

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

生物テロに使用される可能性の高い病原体による  
感染症の蔓延防止、予防、診断、  
治療に関する研究班

平成16年度 総括・分担研究報告書 (I)

平成17年 3 月

主任研究者

島田 馨

(東京専売病院)

平成16年度新興・再興感染症研究事業  
 生物テロに使用される可能性の高い病原体による感染症の蔓延防止、  
 予防、診断、治療に関する研究班  
 班員名簿

氏名	所属	職名
島田 馨	東京専売病院	院長
佐多徹太郎	国立感染症研究所感染病理部	部長
神山 恒夫	国立感染症研究所獣医科学部	室長
渡辺 治雄	国立感染症研究所細菌第一部	部長
森川 茂	国立感染症研究所ウイルス第一部	室長
岸本 寿男	国立感染症研究所ウイルス第一部	室長
高橋 元秀	国立感染症研究所細菌第二部	室長
牧野 壮一	帯広畜産大学原虫病研究センター	教授
江崎 孝行	岐阜大学医学部微生物学講座	教授
倉園 久生	岡山大学医学部保健学科検査技術科学	教授
岩本 愛吉	東京大学医科学研究所先端医療研究センター	教授
相楽 裕子	横浜市民病院感染症部	部長
河野 茂	長崎大学医学部第二内科	教授
山口 恵三	東邦大学医学部微生物学講座	教授
賀来 満夫	東北大学大学院医学系研究科病態制御学講座	教授
角田 隆文	東京都立荏原病院感染症科	部長
大西 健児	東京都立墨東病院感染症科	部長
吉開 泰信	九州大学生体防御医学研究所感染防御研究センター	教授
中村 修	慶応義塾大学環境情報学部	助教授

# 目 次

## 平成 16 年度総括・分担研究報告書( I )

### I. 平成 16 年度総括研究報告書 . . . . . 1

主任研究者：島田 馨（東京専売病院）

### II. 感染研小班分担研究報告書

#### 1. 迅速病理診断法の開発 —SARS とサル痘— . . . . . 5

分担研究者：佐多 徹太郎（国立感染症研究所感染病理部）

#### 2. ペスト菌の検出と診断法の確立 . . . . . 9

分担研究者：神山 恒夫（国立感染症研究所獣医科学部）

#### 3. 耐性菌の検出と診断法の確立 . . . . . 15

分担研究者：渡辺 治雄（国立感染症研究所細菌第一部）

#### 4. Real time-LightCycler polymerase chain reaction 法による サル痘ウイルス感染症の診断法の開発 . . . . . 25

分担研究者：森川 茂（国立感染症研究所ウイルス第一部）

#### 5. ボツリヌスの実験室内診断法と予防に関する研究 . . . . . 33

分担研究者：高橋 元秀（国立感染症研究所細菌第二部）

#### 6. Q熱コクシエラの迅速検出法ならびにオウム病クラミジアの 迅速検出法の確立 . . . . . 37

分担研究者：岸本 壽男（国立感染症研究所ウイルス第一部）

### III. 大学小班分担研究報告書「細菌性生物兵器の蔓延防止に関する研究」

#### 1. 炭疽の蔓延防止に関する研究 . . . . . 43

分担研究者：牧野 壮一（帯広畜産大学原虫病研究センター）

#### 2. 鼻疽菌及び類鼻疽菌の検出と診断方法 . . . . . 49

分担研究者：江崎 孝行（岐阜大学医学部大学院独立専攻再生医科学）

#### 3. 野兎病菌の検出法および診断法の確立に関する研究 . . . . . 57

分担研究者：倉園 久生（岡山大学医学部保健学科検査技術科学）

# I. 総括研究報告書

## I. 生物テロに使用される可能性の高い病原体による感染症の蔓延防止、予防、診断、治療に関する研究

主任研究者 島田 馨（東京専売病院院長）

研究要旨 バイオテロ関連疾患はカテゴリーA から C まで分類され多数の疾患がある。いずれも現在ではわが国には存在しないか稀な感染症であり、最初に診断する医師が疑わなければその発生を把握することさえ出来ないので、臨床医の診断・検査・治療にたいする役割は大きい。本年度は一般臨床医、検査技師等に役立つような臨床診断・検査・治療マニュアルを作製した。またホームページを作製中で近々公開予定である。また検査診断法として、迅速病理診断法、ペスト菌、サル痘ウイルス、炭疽菌、ブルセラ症、野兔病、鼻疽、類鼻疽の検査診断法をさらに発展させ、迅速化、特異性を高め、高感度化をはかった。またボツリヌストキソイドを作製した。開発した検査診断法についてはキット化およびマニュアル化を進め、さらに網羅的スクリーニング法を開発していく必要がある。

### 分担研究者：

（感染研小班）

佐多徹太郎 国立感染症研究所部長  
神山恒夫 国立感染症研究所室長  
渡邊治雄 国立感染症研究所部長  
森川 茂 国立感染症研究所室長  
高橋元秀 国立感染症研究所室長  
岸本寿男 国立感染症研究所室長

（大学小班）

牧野壮一 帯広畜産大学教授  
江崎孝行 岐阜大学医学部教授  
倉園久生 岡山大学医学部教授

（臨床小班）

岩本愛吉 東京大学教授  
相楽裕子 横浜市民病院部長  
河野 茂 長崎大学教授  
山口恵三 東邦大学教授  
賀来満夫 東北大学教授  
角田隆文 東京都立荏原病院部長  
大西健児 東京都立墨東病院部長  
吉開泰信 九州大学教授  
中村 修 慶応義塾大学助教授

### A. 研究目的

2001年9-10月にアメリカで発生した炭素菌芽胞混入郵便物を用いたテロ事件に続いて、わが国で同様の模倣事件が多発した。これらの事件に対処する過程で、バイオテロ等の緊急事態に対応して、従来以上の迅速な病原体検出法、蔓延防止策、予防、診断、治療法の開発とその普及の必要性が強く指摘された。さらに本年米国でリシン散布事件が起こった。現在バイオテロに利用されることが危惧される病原体ならびに疾病には、節足動物媒介性ウイルス、痘瘡ウイルス、出血熱ウイルス、炭疽、ペスト、野兔病、ブルセラ、Q熱、ボツリヌス毒素などがあり、米国CDCはその重要性からカテゴリーA から C に分類している。カテゴリーCにはSARS ウイルスやニパウイルス等の新興感染症が含まれる。これらの病原体による疾患は現在では一般に稀であるか、あるいは自然界に存在しないか、あるいは動物由来感染症である。患者の多くは急性で高い致死率を示す。したがって、バイオテロ対策として迅速な診断システムを開発整備し、その技術を各都道府県の衛生

研究所等に移転し、迅速な緊急時対応の体制実現を図ることが必要である。さらに、最初に患者を診る臨床医へのバイオテロ関連疾患の知識を普及し、適切な臨床診断法および治療法をマニュアルとして種々の媒体を用いて提供することも重要である。これらを整備することにより、適切な患者検体の採取と適切な検査診断機関への依頼が可能となり、患者の適切な治療および感染の拡大防止につながる。したがって、本研究では緊急時に環境材料ならびに臨床検体から、これらのバイオテロ病原体を短時間に検出する実験室診断法の開発と、治療薬の効果の検討ならびに臨床診断、治療への対応に関して検討し、マニュアル化することを目的とする。さらに、単なるマニュアル作製にとどまらず、多くの関係者が利用しうる実用的な媒体を検討する。これらの研究によって、事件が発生した場合の緊急対応が可能となり、国民の生物テロに対する不安が軽減されるのみならず、生物テロ事件および模倣事件に対する抑止効果も期待される。

## B. 研究方法

実験室診断法の開発には、国立感染症研究所グループ（感染研班小括）と帯畜大牧野らのグループ（牧野班小括）計9名により、バイオテロ関連疾患のうちCDCが分類したカテゴリーA からCに属するウイルスや細菌感染症等について検査診断法の開発を行い、またバイオテロに関する疾患の臨床診断および治療マニュアルの作製を目的として、岩本班員らによる臨床班計7名（臨床班小括）、そしてWebでの情報公開にあたっての問題点や方法の検討に1名、そして全体の統括に主任研究者があたる体制を組み、班会議等により相互の情報交換を行い、総体的にバイオテロ対策の確立にむけた研究を行う。

実験室検査診断法の開発には、国立感染症研究所グループは、迅速病理診断法、ペスト菌、耐性菌、天然痘およびウイルス性出血熱およびボツリヌス毒素について分担し、帯畜大グループは炭疽菌、ブルセラ症、鼻疽・類鼻疽菌、野兔病菌を分担した。

臨床小班は、診断・検査・治療マニュアルを、分担研究者のみならず、研究協力者のサポートを得てまとめた。

本年度の研究方法については、それぞれの小班的分担研究者報告に詳細を記載した。

## C. 研究結果

### 1. 感染研小班

約半日程度で包埋から抗原検出まで可能な迅速病理包埋・迅速免疫組織化学法を開発し、実験材料でその有用性、有効性について確認した（佐多）。ペスト菌の病原性に係わるプラスミッド3種を検出するReal time PCR法を開発し、陽性対照を作製した（神山）。ニューキノロン耐性ペスト菌を迅速に検出できるPCR clamping法を開発した（渡邊）。天然痘との鑑別が必要なサル痘ウイルスのReal time PCR法を開発し、実験感染サル血液で特異性等を検討した（森川）。ボツリヌス毒素の4型について毒素を精製し、多価トキシイドを作製した。各型の毒素ともに純度の高い標品を得た。GMP gradeのトキシイドの製造中である（高橋）。Q熱コクシエラとオウム病クラミジアの迅速遺伝子検出法としてReal time PCRを開発した。また卵黄からの検出を目的にDNA抽出方法を樹立した（岸本）。

### 2. 大学小班

炭疽菌芽胞に対する抗体を作製し、免疫ビーズ法で土壌中の炭疽菌を含むバシラス属の芽胞の回収を行い、疫学調査で有効性を確認した。芽胞に対する抗体を作製し、感染防御効果を確認した。またブルセラ症のELISA法を発生国であるモンゴルで大規模疫学調査を行い、その有用性を明らかにした（牧野）。鼻疽・類鼻疽を検出する新しいPCR法を開発した。網羅的検出を目的に、Real time PCR法とマイクロアレイを使ったスクリーニング法を開発し、タイの下水から鼻疽・類鼻疽菌のDNA、およびflagellin遺伝子を検出した。慢性疾患であり化学療法後では検出率が低下するので、細菌性病原体のスクリーニングシステムとして16ウェルのPCRチューブで同時に検出する方法を開発した。血清診断法の確立を目標として抗原と

なる遺伝子のクローニング、抗原蛋白の大量発現系を作製した(江崎)。16S rDNA, FopA, およびMMPを標的とした野兎病菌の検出に特異性の高い実用的感度を持つPCR法を、陽性対照を作製することで、キット化した(倉園)。

### 3. 臨床小班

臨床診断や治療に対しては、臨床班員が分担して天然痘、ウイルス性出血熱、SARS、ウエストナイル熱、狂犬病、炭疽、ブルセラ症、ペスト、ボツリヌス毒素、野兎病、鼻疽・類鼻疽、消化管感染起因菌感染症、多剤耐性結核、コクシジオイデス症、Q熱について病原体の特徴、疫学、感染経路、臨床症状、診断、患者の管理および対策、治療、予防ワクチンについて、わが国の現状にあった形で、「バイオテロが疑われる状況と対応のフローチャート」、「バイオテロ疾患の概要」、「写真・図」、そして「疾患の詳細」の順でまとめ、「生物テロ関連感染症の診断・検査・治療マニュアル」として冊子版(分担研究報告書2)を作製した。この内容をもとにインターネットでアクセスできるよう、試験運用で形式や内容を各班員が全体でチェックしたのち、国立感染症研究所のホームページにおくことにした。

### D. 考 察

従来実施困難である培養を基本とした生物学的検査診断法でなく、新しい免疫化学的ないしは核酸増幅法を用いた診断法を使用しなければならないのが、バイオテロ関連疾患の検査診断法である。そのために用いられるPCR法、RT-PCR法、Real time PCR法、LAMP法などを開発できた。とくに、その取り扱い易さや迅速性そして特異性が優れていると考えられる。また、環境中からの検出を目的にDNA抽出法を開発した。しかしながら確認のためには近い将来培養法等の生物学的診断法が必要となろう。一部の対象疾患では疫学調査でその検出系の有用性や有効性を明らかにすることができた。しかしながら実際の疾患はほとんどなく、実際の現場での使用を十分に想定しているかどうかやや不安があるので、今後一層、この方面での検査の可能性について検討していく必要

がある。また細菌病原体の検出で試みられている網羅的診断法の開発に重点を移す必要が考えられる。これまでに開発して系を応用する形で今後研究を進めていくべきであろう。検査診断法の確立はわが国の危機管理対策への貢献になるものと考えられる。

診断・検査・治療マニュアルは初版が完成したが、いまだ掲載疾患に限られており、随時追加していく必要がある。また今後はホームページにマニュアルを掲載するので、新知見が加わった場合には、細かく更新をしていく必要がある。更新されない情報はあまり意味がない。最前線の医師等にとってはバイオテロ疾患をまず疑うことが必要であり、その点で図、写真等、一目でわかる素材が必要である。しかし、ほとんどわが国では資料が存在しない。著作権の関係もあって、ホームページ上ではリンクを多用することが必要となろう。

### E. 結 論

今年度は、迅速包埋・迅速免疫組織化学法、ペスト菌、サル痘、Q熱、クラミジアのreal time PCR法、ボツリヌストキソイドの作製、野兎病、鼻疽、類鼻疽のPCR法、炭疽菌の免疫化学的検査法、ブルセラ症のELISA法の有用性確認について結果をえた。臨床診断・検査・治療マニュアルの冊子版を作製した。またホームページを作製中で近々開設する予定である。

### F. 健康危険情報

とくになし。

### G. 研究発表

1. 論文発表  
各研究分担研究者の項を参照。
2. 学会発表  
各研究分担研究者の項を参照。

### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

# 分担研究報告書



## II. 感染研小班

# 1. 迅速病理診断法の開発

分担研究者 佐多徹太郎（国立感染症研究所感染病理部）

研究協力者 佐藤由子、岩田奈織子、尾崎泰子、長谷川秀樹（同感染病理部）

研究要旨 生物テロの際に採取され、病理組織診断に用いるホルマリン固定パラフィン包埋組織片の迅速包埋および迅速免疫組織化学法を開発した。包埋および免疫染色ともに各2時間で終了できる。形態保存、病原体抗原保存、そして核酸の保持においても十分使用に耐える方法であることがわかった。今後は感染実験材料を用いて病原体診断の経験を積んでいき非常時に備えたい。また、最近バイオテロのネガティブ染色に関する国際的な講習会が開かれ、研究協力者が参加したので、その内容について簡単に紹介した。

## A. 研究目的

生物テロに用いられる病原体の病原微生物学的検査診断法はもとより、診断や確定を目的とした生検・剖検組織を用いた検査・診断が実際行われ、多くの貴重な情報が得られてきていることは周知の事実である。本研究では、通常の病理組織学的診断法に加え、迅速診断法、さらに特異抗体や核酸プローブを用いた高感度検出法を開発し、組織検体を用いた迅速検出および病原体同定法を確立することを目的とする。

本年度は、迅速病理組織パラフィン包埋法および迅速免疫組織化学法を開発したので報告する。またバイオテロ診断に使われるウイルスの電子顕微鏡検索について Robert Koch 研究所で講習会が行われたのでその概要についても報告する。

## B. 研究方法

1) GFP 遺伝子を組み込んだウイルスをカニクイサルに静脈内接種し、3ヶ月後に3頭を安楽死させた。1頭は陰性対照で、2頭にウイルスを静注した。この実験は別目的で計画されたもので、余った組織の一部を本研究に使用した。安楽死後に種々の組織を採材し、凍結標本、4%パラフォルムアルデヒドおよび10%緩衝ホルマリン固定標本を作製した。

2) ホルマリン固定組織は型のごとくパラフィンに包埋した。通常は、全工程16時間で、

パラフィンの温度は62°Cで4時間処理している。また、マイクロウェーブ迅速包埋器でのパラフィン包埋には63-70°Cで100分間かかる。全体ではほぼ2時間で終了した。

3) 通常のパラフィン切片を作製し、通常行っているHE染色と免疫組織化学を行った。一方、迅速包埋した組織はマイクロウェーブ迅速試料処理装置で免疫組織化学を行った。この装置の反応条件は250Wで、照射4秒、停止2秒のサイクルを10分間繰り返し行った。温度は37°Cを保った。免疫組織化学に要する時間は約2時間である。用いた抗体はサイトケラチン、pan-B細胞マーカー(CD20)、ビメンチン、GFAPの4種である。

4) さらに、上記組織から病原体ゲノムを検出することを想定して、DNAおよびRNAを、凍結組織およびパラフィン切片(10μmの厚さで2枚)からフェノール・クロロフォルム法で抽出し、200ngのDNAおよび3μgのRNAを材料としてPCRを行った。対照としてβグロビン(408bp, 250bpの2種)、およびG3PDHのmRNA(117bp)をPCRないし、RT-PCRで増幅し、また外来性遺伝子としてGFP遺伝子(265bp)についてもPCRで増幅した。

(倫理面への配慮)

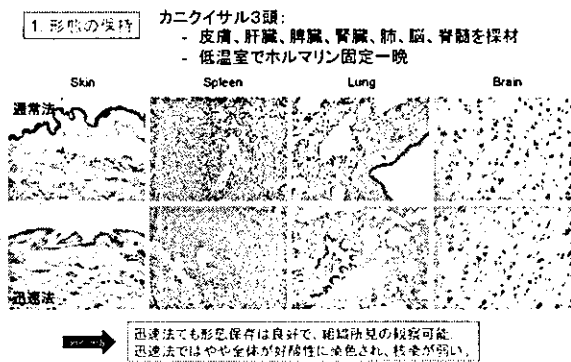
動物実験は国立感染症研究所動物実験委員会の審査許可を受けて行われた。

C. 研究結果

1) HE 染色標本での形態保持

皮膚、肝臓、脾臓、腎臓、肺、脳、脊髄を採材し、低温室で一晩ホルマリン固定した。それらを通常の方法（自動包埋器）と迅速包埋装置に分けてパラフィンに包埋した。前者はほぼ一晩、後者は前述したように2時間である。型のごとくパラフィン切片を作製し、同じ染色液を使って HE 染色標本を作製した。結果を図1に示す。組織の硬い皮膚や、血液量の多い脾臓、含気量の多い肺、そして通常固定時間や脱水時間を長く要する脳組織においても、形態観察は十分に可能であった。HE 染色標本では、迅速包埋装置を使うとやや好酸性に染色される傾向が認められた。

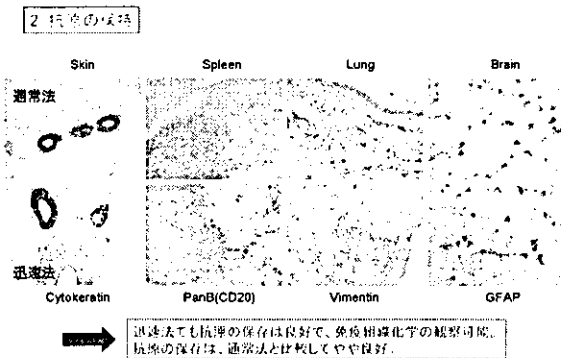
図1. 通常法と迅速法での HE 染色。



2) 免疫組織化学での抗原性

同様に、これらの切片を用いて免疫組織化学に対する影響を検討した。通常法と比較すると、いずれの組織でも、いずれの組織内抗原でも、迅速法のほうがやや良いという所見が得られた。非特異染色像は認められなかった。また、前処理にオートクレーブ処理を行っても組織の破壊は問題にならなかった。

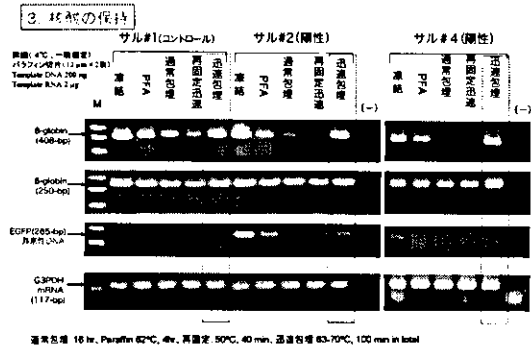
図2. 免疫組織化学。



3) PCR 法によるゲノム検出

3 頭のサル組織から得られた脾臓組織を用いた。凍結標本、パラフォルムアルデヒド固定、通常の包埋、ホルマリンで再固定 (50°C, 40 分) したあと迅速包埋、そして迅速包埋処理した後にパラフィン切片から核酸を抽出した。それぞれについて4種のプライマーを用いて PCR ないし RT-PCR を行った。図3に示すように、通常包埋や再固定迅速包埋検体での核酸増幅率は悪く、迅速包埋では、凍結検体よりは低いですが、パラフォルムアルデヒド固定標本よりも良好な結果が得られた。また外来性遺伝子である GFP 遺伝子についても良好に検出ができた。

図3. PCR.



D. 考 察

通常、病理組織診断にはホルマリン固定とパラフィン包埋が必要で、それぞれにはあるものの最適条件が決まっている。また、プリオン以外の病原体はホルマリンで不活化され、作業者の感染に対する安全性が担保できる。ホルマリン固定時間は、組織の大きさによって異なるが、ごく小さな 1 mm 大のものでは1時間でも構わないが、生検組織程度の大きさでは一晩の固定が最低必要である。ホルマリンの組織内浸透は一晩で 4 mm 程度で、その間におもにタンパク質のリジン残基が架橋され固定されている。包埋は、アルコールやキシレン、そしてパラフィンの組織内浸透が重要で、それにより組織内の液の置換が行われる。マイクロウェーブにより分子間の振動が高まることで、液の置換が促進されると考えられる。今回用いた組織片の大きさは 1-2

cm で厚さ 2 mm とした。さらに条件の異なる臓器組織でも形態は保たれていたことから、この包埋方法で十分に使用に耐えると思われた。免疫組織化学の結果が通常法よりも良かったのは、包埋処理過程の時間が短いことによると思われる。PCR の結果はおそらくホルマリンに接触する時間が短いことによると考えられた。しかも mRNA も検出できた。β グロビン遺伝子の 250 bp くらいまでは十分な検出感度を得られており、この程度のサイズの核酸の保存が良いことを示している。

バイオテロの際には迅速な結果報告が望まれる。今回開発した方法は単なる針生検組織のみならず、通常よりも大きなサイズの組織片でも、また条件の異なる臓器組織でも、ホルマリン固定後であれば、2 時間で包埋が終了し、病原体検出でも免疫組織化学は 2 時間で終了するので、実際に役立つと思われる。

Global Health Security Action Group Laboratory-Network Workshop. - Rapid Diagnostic EM in Suspected Bioterrorist Attacks and Infectious Diseases - at Robert Koch-Institute, Berlin, March 7-8, 2005

バイオテロ疑い検体及び感染症診断における電子顕微鏡迅速診断についてのワークショップが表記のように行われた。参加国はドイツ、イギリス、イタリア、カナダ、アメリカ、メキシコ、日本で、各国よりバイオテロ発生時の電子顕微鏡迅速診断を担当する者が参加した。ワークショップではバイオテロ発生時の診断と検査方法およびその感度などについて紹介された。日本からは天然痘発生時の国立感染症研究所の対応と検査体制について発表を行った。またワークショップではより簡便なバイオテロ関連病原体の検出方法としてある酢酸ウランの代わりにアルシヤンブルーによるネガティブステイニング方法と迅速診断の感度を上げるためにエアーフュージによる検体の濃縮方法について実演、実習が行われた。両方法ともにバイオテロ関連病原体の迅速診には有用で、各国の参加者の興味を引いた。また、電子顕微鏡による迅速診断と PCR、及び RT-PCR (real time を含む)等、他の診断方法との比較が検討され、初期段階での診断の

方向性の決定に電子顕微鏡が有用であるとの意見で一致した。診断の方向性とは検体が炭疽菌等の細菌性の病原体なのか天然痘等のウイルス性の病原体なのか、また PCR で用いるプライマーの決定をいかにするかという初期段階で決定すべき事項である。また各国の電子顕微鏡研究室をテレパソロジーで繋いで情報を共有し、リアルタイムに同じ画像の診断を行うことも検討された。

## E. 結 論

バイオテロ発生時に採取され、生検組織の病理診断のための迅速包埋・迅速免疫組織化学法を開発し、その特徴を明らかにした。

## F. 健康危険情報

とくになし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Chong PY, Chui P, Ling AE, Franks TJ, Tai DYH, Leo YS, Kaw GJL, Wansaicheong G, Chan KP, Oon LLE, Teo ES, Tan KB, Nakajima N, Sata T, Travis W.: Analysis of deaths during the severe acute respiratory syndrome (SARS) epidemic in Singapore: challenges in determining a SARS diagnosis. Arch Pathol Lab Med 2004, 128: 195-204.
- 2) 佐多徹太郎：院内感染が問題となる人獣共通感染症—エボラ出血熱とサーズ (SARS)—. 薬の知識. 2004, 55: 81-84.
- 3) 佐多徹太郎：エボラ出血熱. 感染症の診断・治療ガイドライン 2004. 日本医師会編、pp60-61, 2004.
- 4) 佐多徹太郎：ラッサ熱. 感染症の診断・治療ガイドライン 2004. 日本医師会編、pp80-81, 2004.

2. 学会発表 なし。

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

## 2. ペスト菌の検出と診断法の確立

分担研究者 神山 恒夫 国立感染症研究所 獣医科学部 第一室長  
研究協力者 今岡 浩一 国立感染症研究所 獣医科学部 主任研究官

研究要旨：*Y. pestis* は重要な動物由来感染症であり、バイオテロに使われうると考えられるなど、特異的迅速診断法の開発が必要とされている。すでに *Y. pestis* の検出法として、*inv* と 41.7kb 領域それぞれに特異的な Real-time PCR (LC: Light-Cycler) および LAMP 法を確立し報告した。今回、*Y. pestis* における病原性に関与する 3 種類のプラスミドを検出するための LC を確立し、検出時に用いる陽性対照プラスミドの作製を行った。いずれも特異性は高く、検出感度は反応サンプル中に約 10 コピーあれば検出可能であり、PCR で検出限界以下であったサンプルでも、LC では検出可能であった。

以上、本研究において確立した検出法を組み合わせ、実際に *Y. pestis* が疑われる事例が発生した場合の検出・診断システムとして、次のようなものが考えられた。すでに一般的となっている PCR や特別な機器を必要としない LAMP 法は、多くの施設で実施可能であるので、事例が発生した場合、まず、その地域における試験・研究施設で検出・診断を試みる。判断がつかねる、または病原性プラスミドの詳細な検討が必要な場合、LC を所持する施設（たとえば感染研など）において、さらに検出・診断を実施する。このように、検出方法を組み合わせることで、*Y. pestis* の迅速・高感度な検出システムが可能になると考えられた。

### A. 研究目的

海外で毎年発生し、依然として大きな健康被害を与えているペストは、本来、野生齧歯類の感染症であり、これらに寄生するノミによって咬傷部からヒトへも感染する人獣共通感染症である。また、生物テロに使用される可能性の高い病原体としても考えられ、米国疾病管理センター (CDC) では、カテゴリー A に分類されている。

本研究ではペストの不慮の侵入・発生に備えるため、ペスト菌の高感度・迅速診断法の開発を行うことを目的としている。昨年度までに、主にペスト菌のゲノムを標的とした特異的 PCR、Light-Cycler (LC) を用いた Real-time PCR および LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法の開発を行ってきた。

ペスト菌には、その病原性に関与する遺伝子が数多く存在しているが、ゲノム以外の 70kb、

101kb、9.6kb の外来性プラスミドによるものも多い。70kb プラスミド (pYV) には、宿主細胞の食菌作用に抵抗し機能を傷害する *yop* エフェクター遺伝子が存在する。9.6kb プラスミド (pPla-Pst) の、plasminogen activator は、菌の伝播を促進する。101kb プラスミドには、抗食菌作用を持ち、主要抗原となる fraction 1 の遺伝子が存在する。

そこで、今年度は、ペスト菌の保有する病原性に関与する 3 種類のプラスミドの検出を目的とし、それぞれ *yopM*、*pla*、*cafI* 遺伝子を標的とした LC の開発を行った。また、pGEM-T Easy Vector System を用いて、測定の際に使用する陽性対照プラスミドの作製を行った。

### B. 研究方法

供試菌株：*Yersinia pestis* は、A1122 (ワクチン株、70kb プラスミドを欠く)、Yreka および

その変異株、MII40、その他、野外株など 24 株(一部は米国 CDC より菌抽出 DNA を分与。Table 1a) を用いた。*Y. pseudotuberculosis* (*Y.pseud.*) は Verpoest 1a, Pa3606 1b ほか 20 株を、*Y. enterocolitica* (*Y.entero.*) は Pa2369 O3:B3, Pa177 09:B2 ほか 9 株 (島根県保健環境科学研究所より分与) を実験に用いた (Table 1a)。その他、*Yersinia* 属以外は、*Brucella abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. suis* (動物衛生研究所より分与) など Table 1b に示した 18 菌株を入手し用いた。

**DNA の調整:** 各々の菌株をヒツジ血液寒天培地等で培養し、その培養コロニーから菌を集め、煮沸後、SepaGene (三光純薬) を用いてプロトコールに従い、DNA を分離精製した。

**PCR:** PCR 用プライマーは、*Y.pseud.* および *Y.pestis* 特異的な *invasin* に対しては Tsukano ら (プライマーセット名: *inv* [増幅産物:295bp]) (Tsukano H et.al., Microbiol. Immunol., 40:773, 1996)、また *Y.pestis* 特異的な 41.7kb 領域に対しては Radnedge ら (同: 41.7kb [同:275bp]) (Radnedge L et.al., Appl. Environ. Microbiol., 67:3759, 2001)、*cafI* に対しては Tsukano ら (同: *cafI* [同:171bp]) の報告を参考に作成した。*yopM* および *pla* については新たにプライマーを設定した (同: *yopM* [同:136bp]、*pla* [同:168bp])。PCR のサンプル DNA 量は 1ng を用い、反応条件は *inv*, *cafI*, *yopM*, *pla* については 94°C, 2min— (94°C, 30sec.—54°C, 1min.—72°C, 1min.30sec.) ×30 cycle、41.7kb については (94°C, 15sec.—65°C, 15sec.—72°C, 30sec.) ×27 cycle で行った。

**Real-time PCR (LC):** *cafI*, *yopM*, *pla* 遺伝子領域内 (プライマーは PCR と同じ) にライトサイクラー (ロシュ・ダイアグノスティック社) 用のハイブリダイゼーションプローブを作成し、Real-time PCR を検討した。サンプルの DNA 量は 1ng を用い、反応条件は 95°C, 10min— (95°C, 10sec.—60°C, 15sec.—72°C, 7sec.) ×45 cycle を用いた。

**陽性対照プラスミドの作製:** *inv*, 41.7kb, *cafI*, *pla* は PCR/LC 用のプライマーを、*yopM* (増幅

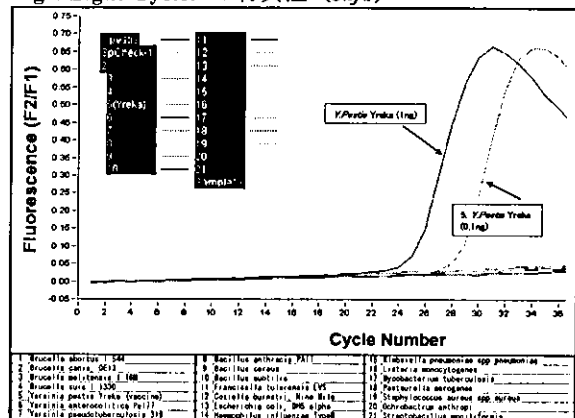
産物:565bp) は tsukano らの報告のプライマーを用いた。各々の PCR 産物を pGEM-T Easy Vector (Promega) に、プロトコールに従い導入し、遺伝子導入プラスミドを作成した。プラスミドを精製し、PCR および LC での反応性と塩基配列の確認を行い、陽性対照プラスミドを得た。

### C. 研究結果

1. PCR: ゲノムにある *inv* および 41.7kb では、*inv* は *Y.pestis*, *Y.pseud.* で、41.7kb は *Y.pestis* のみで検出された。一方、プラスミド上の *cafI*, *yopM*, *pla* では、*cafI* および *pla* は *Y.pestis* のみで検出され、*yopM* は *Y.pestis*, *Y.pseud.* で検出された。プラスミドは、菌株により欠落しているものが認められた。

2. 特異性の検討 (LC): *cafI*, *pla*, *yopM* それぞれについて、*Y.pestis*, *Y.pseud.*, *Y.entero.* および、その他、*Yersinia* 属以外の菌株由来の DNA を用いて反応の特異性を検討した。*cafI* および *pla* に対するプライマー—ハイブリダイゼーションプローブセットは *Y.pestis* ののみを、*yopM* に対するセットは *Y.pestis* と *Y.pseud.* の一部を検出した。どのセットもその他の菌株由来の DNA は増幅しなかった (Fig 1&Table 1a,b)。

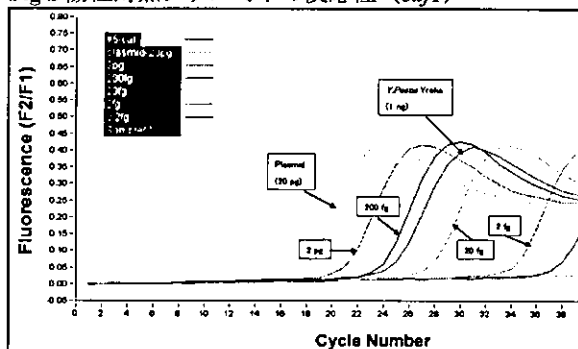
Fig 1 Light-Cycler の特異性 (*cafI*)



3. 陽性対照プラスミドを用いた検出感度の検討: *inv*, 41.7kb, *cafI*, *pla*, *yopM* の増幅領域を含むプラスミドを用いて、LC の検出感度の検討を行った。どの遺伝子においても 0.2fg

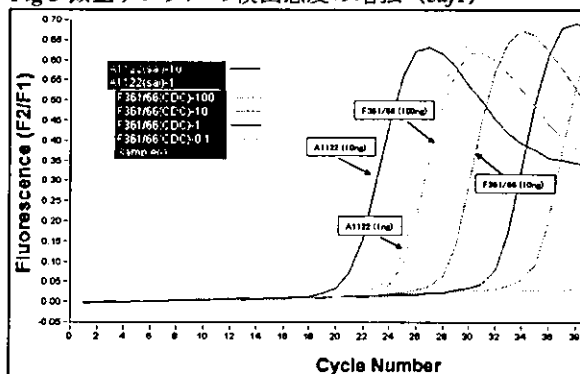
まで十分に測定が可能であった。コピー数では、10~50 コピー程度であった。(Fig 2)

Fig 2 陽性対照プラスミドの反応性 (*cafI*)



4. PCR と LC の感度の比較： PCR と LC の結果を比較すると、ほぼ同様の結果が得られたが、検討した菌株のうち A1122 (CDC 由来) と F361/66 株は、*cafI* が PCR では検出されなかったのに対して、LC では検出された。サンプル DNA 量 1ng の A1122 (細菌部由来) は 22 サイクルから検出されてくるが、これと同様の反応を示す F361/66 は 100ng であった (Fig 3)。このことは、F361/66 が A1122 (細菌部) の 1/100 量しか *cafI* 遺伝子を含んでいないことを示し、また、LC の方が 100 倍、PCR よりも感度が高いことを示している。

Fig 3 微量サンプルの検出感度の増強 (*cafI*)



#### D. 考察

今回、*Y. pestis* の病原性に関与する 3 種類のプラスミドに対する LC の開発を行い、*cafI*、*yopM*、*pla* それぞれに対して、特異性の高い検出法が確立した。また、*inv*、41.7kb を含め、それぞれに対する陽性対照プラスミドを作成

した。陽性対照プラスミドを用いた検出感度の検討では、それぞれ 0.2fg まで検出が十分可能であり、これはコピー数では 10~50 コピーに相当した。PCR と LC の比較では、PCR よりも、LC の方が 100 倍程度感度がよかった。事実、A1122 (CDC) と F361/66 株は、*cafI* が PCR では検出されなかったのに対して、LC では検出された。これは、A1122 (CDC) と F361/66 株では *cafI* プラスミドのコピー数が少なく、サンプル DNA に占める *cafI* DNA 量も少なくなっていたためであると考えられる。病原性プラスミドは、各菌株によりその保持するコピー数が一定でないと考えられるため、PCR よりも感度の高い LC は、その病原性を判断する上で、より効果的であると考えられる。

前回までおよび今回の検討で、*inv*、41.7kb については PCR、LAMP、LC が *cafI*、*yopM*、*pla* については PCR、LC が利用可能となった。以上、本研究において確立した検出法を組み合わせ、実際に *Y. pestis* が疑われる事例が発生した場合の検出・診断システムとして、次のようなものが考えられた。すでに一般的となった PCR や特別な機器を必要としない LAMP 法は、多くの施設で実施可能であるので、事例が発生した場合、まず、その地域における試験・研究施設で PCR (*inv*、41.7kb、*cafI*、*yopM*、*pla*)、LAMP 法 (*inv*、41.7kb) を用いて検出・診断を試みる。判断がつかねる、または病原性プラスミドの詳細な検討が必要な場合、LC (*inv*、41.7kb、*cafI*、*yopM*、*pla*) を所持する施設 (たとえば感染研など) において、さらに検出・診断を実施する。このように、検出方法を組み合わせることで、*Y. pestis* の迅速・高感度な検出システムが可能になると考えられた。

#### E. 結論

*Y. pestis* は重要な動物由来感染症であり、バイオテロに使われうると考えられるなど、特異的迅速診断法の開発が必要とされている。*Y. pestis* の検出法として、*invasin* と 41.7 kb 領域それぞれに特異的な Real-time PCR (LC: Light-Cycler) を確立し報告した。今回、*Y. pestis*

における病原性に関与する3種類のプラスミドを検出するためのLCを確立し、検出時に用いる陽性対照プラスミドの作製を行った。いずれの検出法も特異性は高く、検出感度も反応サンプル中に約10コピーあれば検出可能であり、PCRで検出限界以下であったサンプルでも、LCでは検出できた。すでに、報告したPCR、LAMP、LCを組み合わせることで、迅速・簡便な検出が可能となった。

#### F. 健康危害情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 神山恒夫、高山直秀（共編著）：子どもにうつる動物の病気、真興交易出版、東京、2005.
- 2) 神山恒夫：輸入動物と感染症、クリニカル・プラクティス、23：1062-1066、2004.
- 3) 神山恒夫ほか（共編著）共通感染症ハンドブック、日本獣医師会、東京、2004
- 4) 神山恒夫：野生由来エキゾチックペットと人獣共通感染症、ファーマ・メディカ、22：43-48、2004.
- 5) 神山恒夫（著）：これだけは知っておきたい人獣共通感染症、地人書館、東京、2004.
- 6) 神山恒夫：ヒトからヒトへうつる人獣共通感染症、薬の知識、55：69-73、2004.
- 7) 神山恒夫：プレーリードッグによる野兎病とペスト持ち込みの危機、公衆衛情報、33：27-29、2004.
- 8) 神山恒夫：人獣共通感染症と外来動物、環境動物昆虫学会誌、15-55-64、2004.
- 9) 神山恒夫：ペスト-再侵入が危惧される人獣共通感染症、医学のあゆみ、208：57-63、2004.
- 10) 神山恒夫：ペスト、新興再興感染症（からだの科学増刊）、223-228、2004.
- 11) 神山恒夫：感染症法と動物由来感染症-感染症法による病原体保有動物の侵入対策-、バムサ会誌 16：4-8、2004.

- 12) 神山恒夫：米国のプレーリードッグとサル痘、メディカル・コーナー、115：22-25、2004.

##### 2. 学会発表

- 1) 今岡浩一、福島博、山田章雄、神山恒夫：*Yersinia pestis*の微量迅速検出法の開発. 第78回日本感染症学会総会（東京）2004.4.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



Table 1a) PCR および Light-Cycler による遺伝子の検出

菌 株	P C R					Light-Cycler					
	inv	3a	cafI	pla	yopM	inv	3a	cafI	pla	yopM	
Yersinia	A1122	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
	Yreka (vaccine strain)	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
	Yreka (pgm+のみ)	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
	Yreka (VM-)	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
	Yreka (pgm-, VM+, F+, pst+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Yreka (pgm-, VM-)	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
	M1140 (pgm+のみ)	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
	M1140	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
	Bryans	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	195/P	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Alexiander	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	L-27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	283F1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	横浜Q	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	ZE94-2122	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	A1122 (CDC)	+	+	+	+	-	+	+	**	+	-
	Amal	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	P. EXU2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	VN16-34	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PB6	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+
	Harbin35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Nepal516	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	F361/66	+	+	-	+	+	+	+	**	+	+
	AZ94-0666	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Yersinia	Verpoest, 1a+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
	Pa3606, 1b+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
	蔵谷-2, 1c-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	319, 2a+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	366, 2b+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	人見 (274), 2c+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
	PT112, 3+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
	Wia965-1, 4a+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
	212, 4b+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	479, 5a+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
	197, 5b+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
	DD110, 6+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
	141, 7-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	R7081y, 9-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	OK6088, 10+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
	R1505, 11-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	WN900-3, 12-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	N916, 13-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	CN3, 14-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	SP-940613, 15+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
Yersinia	Pa2369, 03:B3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pa4401, 03:B3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pa241, 03:B4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pa263, 03:B4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pa9571, 05:27:B2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SW13730, 05:27:B2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	WA, 08:B1B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pa12986, 08:B1B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pa177, 09:B2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\* : PCR では検出されなかったが、Light-Cycler では検出されたもの。

Table 1b) PCR および Light-Cycler による遺伝子の検出

菌 株	P C R					Light-Cycler					
	inv	3a	cafI	pla	yopM	inv	3a	cafI	pla	yopM	
<i>Brucella abortus</i> 1 544	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Brucella canis</i> QE13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Brucella melitensis</i> 1 16M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Brucella suis</i> 1 1330	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Francisella tularensis</i> LVS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Coxiella burnetii</i> Nine Mile	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> DH5 alpha	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Haemophilus influenzae</i> TypeB, ATCC10211	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> spp pneumoniae, ATCC13883	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pasteurella aerogenes</i> , ATCC27883	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ochrobactrum anthropi</i> , ATCC49187	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptobacillus moniliformis</i> , ATCC14647	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus anthracis</i> PA11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> , ATCC15315	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , ATCC27294	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> spp aureus, ATCC29247	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

### 3. 耐性菌の検出と診断法の確立

#### —ニューキノロン耐性仮性結核菌を用いたニューキノロン耐性 ペスト菌の迅速検出法の開発—

分担研究者 渡辺治雄 国立感染症研究所細菌第一部 部長

研究協力者 高橋英之 国立感染症研究所細菌第一部 主任研究官

研究要旨 バイオテロで使用される可能性が考えられるペスト菌のニューキノロン耐性ペスト菌を従来の培養方法より迅速に検出する方法として PCR clamping 法を適用した。ペスト菌の類縁菌である仮性結核菌のニューキノロン耐性株を用いて検討した結果、ニューキノロン耐性ペストの DNA *gyrae* の遺伝子 *gyrA* の変異三種と同一の変異に対してはニューキノロン感受性のものと比較して完全に区別して検出することが可能であった。更に小さいコロニーを形成した菌を 100°Cでの処理によって破壊する操作のみで調製した粗 DNA 抽出液を用いた場合においても精製 DNA を用いた時と同様の感度を示すことも確認された。

#### A. 研究目的

バイオテロリズムに使用されると想定されている微生物は、その重要度に応じてカテゴリ A, B, C に分けられている。肺ペスト、腺ペストなどを引き起こすペスト菌は最も危険度の高いカテゴリ A に分類されている。使用される可能性のある病原体には、あらかじめ病原体の検出、診断、治療、予防に関する研究をまとめておく必要がある。また、遺伝子を改変し薬剤に耐性を持つ細菌が使用される可能性もある。現実に使用される病原体を予知することは不可能なので、現行の疾患サーベイランスと発生時対策にバイオテロに対する対策の準備を連携させることは不可欠である。本研究では、バイオテロで使用される可能性が考えられるペスト菌のニューキノロン耐性ペスト菌を従来の培養方法より迅速に検出する方法として PCR clamping 法を開発し、その有用性を検討した。

#### B. 研究方法

##### 2.1 ニューキノロン耐性仮性結核菌の単離

論文上では既に試験管内でニューキノロン耐性ペストを作成し、DNA *gyrae* の遺伝子

*gyrA* のどの塩基に変異が入るかは明らかにされているが、当研究所ではニューキノロン耐性ペスト菌の臨床分離株を保持していない。一方で試験管内でのニューキノロン耐性ペスト菌の作成はバイオセーフティ上好ましくないと考え、ペスト菌(*Yersinia pestis*)と同じエルシニア属に属し、ペスト菌と最も近縁な仮性結核菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*) のニューキノロン耐性を誘導することで作製した。またニューキノロン耐性を作成する前に仮性結核菌の *gyrA* 遺伝子の塩基配列を決定し、ペスト菌の *gyrA* 遺伝子と 99%以上の同一性を示し、キノロン耐性決定領域(QRDR)の塩基配列は仮性結核菌とペスト菌で 100%一致することを確認した(結果未掲載)。ニューキノロン耐性仮性結核菌は、非感受性菌を 1µg/ml のノルフロキサシンを含むブレイン-ハートインフュージョンプレートに塗布し、37°Cで三日間培養後、発育したコロニー(菌)を再度画線培養後、耐性菌を得た。その後、1組のプライマー *gyrA*-1: 5'-ATG AGC GAC CTT GCC AGA GAA ATA-3', *gyrA*-4 :5'-TAC CAG CAG GTT AGG GAT TCT GGT -3'を使用して PCR 法により *gyrA* 遺伝子の QRDR を含む領域を

増幅、シークエンスし、M2、M4 変異が導入されている事を確認した (図 1)。ニューキノロン感受性仮性結核菌株(YPS1)、M2 変異株(YPS2)、M4 変異株(YPS8)の染色体 DNA を 1) DNeasy Tissue Kit (Qiagen)を用いて添付プロトコールに従って精製し、得られた染色体 DNA 溶液の最終濃度を吸光度で測定後、10 ng 量を PCR に供した。2) 大きさ 0.5 mm 程度のコロニーを滅菌爪楊枝で採集後、100 ml の TE バッファーに懸濁し、100°C で 5 分煮沸したものを粗 DNA 抽出液として PCR に供した。一方、最も頻度よく分離された変異の一つである M1 変異をもつノルフロキサシン耐性仮性結核菌は今回の研究で分離されなかった (0/96) ため、1 組のプライマー、*gyrA*-M1-U: 5'-CAA CCC GCA TGA TGA CAG CGC GGT C -3', *gyrA*-M1-L :5' -GAC CGC GCT GTC ATC ATG CGG GTG G -3' と仮性結核菌の野生型 *gyrA* 遺伝子をマルチコピープラスミド上に保持する pHT335 を用いて部位特異的変異導入法によりプラスミドの形で変異導入し、その精製 DNA を希釈したものを pHT 350 とし、M1 変異検出用の鋳型とした。

## 2.2 PCR clamping 法

本研究では、ニューキノロン耐性菌を迅速にスクリーニングするための方法を PCR-clamping 法という方法を用いた。この方法は、ニューキノロン剤の感受性を決定している DNA ジャイレース (*gyrA*) のキノロン耐性決定領域に含まれる点突然変異の場所 (81 番、83 番) を特定する方法である (図 1)。

PNA は DNA 類似構造をもち、塩基配列選択性が強い化学的性質を持つ (図 2)。そのため、野生型 *gyrA* の塩基配列に合わせて設計した *gyrA*-PNA: 5'-CGG CGC TGT CAC CAT -3' を *gyrA*-F : 5'-TGC ACC GTC GCG TAC TGT TTG CG -3', *gyrA*-R :5' -TAC GCA CGA TAG TGT CGT AGA CC -3' (図 4) を用いて PCR 法で *gyrA* 遺伝子のキノロン耐性決定領域を増幅する。その PCR 条件は以下の通りである。

---

10 mM Tris-HCl (pH8.3)  
 50 mM KCl  
 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (以上は添付バッファ)  
 0.2 mM dNTPs  
 0.4 μM *gyrA*-F  
 0.4 μM *gyrA*-R  
 1 μM *gyrA*-PNA  
 1 μM *inv*-F2\* (control primer)  
 1 μM *inv*-R2\* (control primer)  
 0.001% gelatin  
 7.5% glycerol  
 1U ExTaq (Takara Bio)

---

\**gyrA*-PNA が *gyrA* 遺伝子に特異的に作用していることを確かめる目的のためにペスト菌と仮性結核菌のみが保持している *invasin* (*inv*) 遺伝子に対する一組のプライマーも導入してある。

Thermal cycler 9600 (ABI) を用いて図 3 の条件下で 25 サイクル反応後、PCR プロダクト 5 μl を 2% アガロースゲルを用いて電気泳動する。泳動後、エチジウムブロマイドで染色し写真撮影をした。

## C. 研究結果

### 3.1 *gyrA*-PNA 濃度の最適化

PCR-clamping 法を実施する上で *gyrA*-PNA の特異性とその阻害有効濃度の最適化を試みた。その結果、1 μM の濃度でほぼ 100% 野生型 *gyrA* 遺伝子の増幅を阻害し、それは *gyrA* 遺伝子に特異的であることが確認できた (図 5)。

### 3.2 *gyrA*-PNA の遺伝子配列の選択性

次に *gyrA*-PNA が野生型 *gyrA* 遺伝子とニューキノロン耐性 *gyrA* 遺伝子を有効に区別するかを検証した。この実験においては鋳型として野生型及びニューキノロン耐性仮性結核菌の精製染色体 DNA 10 ng を鋳型とした。また、M1 変異に対する反応性も検証するため、約 5 pg の pHT335 (野生型)、pHT350 (M1 変異) の鋳型として用いた。それらの DNA を鋳型と

して PCR clamping 法を実施した結果、野生型 *gyrA* 遺伝子の増幅のみが阻害され、M1、M2、M4 変異 *gyrA* 遺伝子は増幅された (図 6)。以上の結果から *gyrA*-PNA を用いた PCR-clamping 法によって野生型 *gyrA* 遺伝子とニューキノロン耐性 *gyrA* 遺伝子を区別し、ニューキノロン耐性 *gyrA* 遺伝子を選択的に検出することが可能であることが確認された。

### 3.3 粗抽出 DNA を鋳型とした PCR-clamping 法の有効性

最後に実際の検査においては精製度の高い DNA を調製することは煩雑であり、労力、時間、コストの大幅な消費となる。迅速診断として PCR-clamping 法を適用するために簡易的に調製した DNA を鋳型として PCR-clamping を実施した場合の有効性に関して検証した。

鋳型にはブレインハートインフュージョンプレートで 37°C 一晚培養した野生型 *gyrA*、変異型 M2、M4 *gyrA* 遺伝子を保持する仮性結核菌 (直径約 0.5 mm のコロニー) (図 7) を滅菌楊枝で釣菌、100  $\mu$ l の TE バッファーに懸濁後、100°C で 5 分処理したものを 1  $\mu$ l とり、PCR に供した。その結果、100°C で処理後に遠心操作を行なう、行なわないに関わらず、ニューキノロン耐性ペストの DNA *gyrae* の遺伝子 *gyrA* の変異三種と同一の変異に対してはニューキノロン感受性のものと比較して完全に区別して検出することが可能であり、調製した粗 DNA 抽出液を用いた場合においても精製 DNA を用いた時と同様の感度を示すことも確認された (図 8)。

### D. 考察

バイオテロリズムでペスト菌が病原体として現実に使用される可能性は十分に考えられる。また、腸内細菌系と同様に遺伝子組み換えが比較的容易にできるために、遺伝子組み換えなどの手法でペスト菌に薬剤耐性遺伝子や病原性を増強するような遺伝子を組み込んだ細菌を作製しバイオテロに使用される可能性も考えられる。このようなことから、本研

究のような薬剤耐性菌の迅速なスクリーニング法は、耐性遺伝子を調べることで容易に薬剤の感受性が判定でき従来の培養方法よりはるかに短時間で判定できる方法であるため、感受性の判定に緊急性を要するときに非常に有用であると考えられる。また、この成果は、他菌種のニューキノロン耐性株の検出や治療においても大いに貢献できると考えられる。

### E. 結論

従来の耐性菌検査方法では最低でも判定まで三日間を要していたのを本研究結果を用いることにより約 3 時間までに短縮することが可能となった。

### (参考文献)

1. Orum H, Nielsen PE, Egholm M *et al.*, Single base pair mutation analysis by PNA directed PCR clamping. *Nuclei. Acids. Res.* 21:5332-5336, 1993.
2. Thiede C, Bayerdorffer E, Blasczyk R *et al.*, Simple and sensitive detection of mutations in the ras proto-oncogenes using PNA-mediated PCR clamping. *Nuclei. Acids. Res.* 24:983-984, 1996.
3. Lindler LE, Fan W Jahan N. Detection of ciprofloxacin-resistant *Yersinia pestis* by fluoregenic PCR using the lightcycler. *J Clin Microbiol.* 39:3649-3655, 2001.
4. Hurtle W, Lindler L, Fan W, Shoemaker D, Henchaal E and Norwood D. Detection and identification of of ciprofloxacin-resistant *Yersinia pestis* denaturing high-performance liquid chromatography. *J Clin Microbiol.* 41:3273-3283, 2001.

### F. 研究発表 無し

### G. 知的財産権の出願・登録状況 無し