

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「先進的統合センシング技術」
研究課題
「全自動モバイル型生物剤センシングシステム」

研究終了報告書

研究期間 平成17年10月～平成20年 9月

研究代表者：安田 二郎
(科学警察研究所法科学第一部
生物第五研究室、室長)

§ 1 研究実施の概要

1990 年代以降、生物剤（病原微生物および毒素）を用いた犯罪・テロに対する脅威が世界的に高まっており、特に、2001 年 9 月 11 日アメリカ合衆国で発生した同時多発テロ以降、米、英をはじめ世界各地で炭疽菌、リシン毒素をはじめとする種々の生物剤を用いた犯罪が頻発している。我が国においても 1993 年にオウム真理教団による炭疽菌、ボツリヌス菌毒素の都内散布事件が実際に発生しており、また、米国の炭疽菌郵送事件を模倣した事件も 2001 年以降多数発生し、模倣事件の発生件数はこれまでに数千件を超えている。更に緊張を増す昨今の国際情勢の中では、我が国も国際的テロ組織の標的とされ、バイオテロ発生の危険度が極めて高い状況となっている。

生物テロが発生した際には、使用された生物剤の迅速な同定が被害の最小化や蔓延防止および犯罪捜査に最も重要である。化学剤、核物質、放射性物質（いわゆる CNR）に関しては現場で使用可能な資器材の開発が軍用およびそれらの民生利用として進められ、現時点でも有用性の高いものがいくつか市販されているが、生物剤に関しては、病原微生物という視点から研究室で行う臨床診断、疫学的検査のための精度の高い検出技術は確立されているが、現場での迅速・簡便検知という視点からのシステム開発はあまり積極的に進められていない。9.11 同時多発テロ以降、米国をはじめとする先進国で生物剤を対象とした犯罪防止のための機器・システムが自国の技術を基盤にして構築されているが、多くの場合それらの詳細は機密情報として公開されていない。米国では 9.11 同時多発テロ時の対応の不手際を教訓に、国土の防衛と市民の安全を守ることを目的として、それまで複数の省庁に分散していた機能を統合した巨大な省庁である国土安全保障省（Department of Homeland Security）が 2002 年末に設立され、年間 7 千億円以上といわれる予算がバイオテロ対策に注ぎ込まれている。日本政府が同様の省庁を新設したり、同等の予算をバイオテロ対策に投じる可能性は現時点では極めて低いと思われるが、我が国においても生物剤を用いたテロ・犯罪対策用の機器・システムを独自に日本オリジナルの技術を利用して構築することが安心・安全な社会の実現に不可欠であることは疑問の余地がない。そこで、我々はまず現場で迅速かつ簡便に生物剤の検知・同定が可能なシステムを構築することが現実的かつ対応可能な最優先課題であると考え、本プロジェクトを起案した。

バイオテロ・犯罪に利用可能な生物剤は多種多様であり、個々の生物剤について一対一の検出法を行っていたのでは時間がかかりすぎる。また、検出法の確立されていない対象生物剤もあり、更には、感染症発生が我が国において報告されていない生物剤については対応が遅れるケースも想定される。そこで、これらの事案に対応するために本研究では米国疾病予防管理センター（CDC）がテロ・犯罪に使用される可能性の高い生物剤としてカテゴリー A に分類した炭疽菌、ペスト菌、天然痘ウイルス、出血熱ウイルスやカテゴリー B に分類したコレラ菌、ブルセラ菌を含む 19 種類について同時検知が可能なマイクロアレイ法をベースとしたシステムデバイスの開発を行った。開発目標は、「現場レベルで迅速・安全・高感度かつ簡便に生物剤の同定が可能なように、使い捨てタイプの密閉型反応カセットに被疑試料を注入し、気密性に配慮した機器に挿入するだけで生物剤の同定を全自動で行え、対象とする生物剤すべてについて短時間に高感度の検出が可能、また、生物剤、感染症・病原微生物データベースを活用した情報検索および情報通信が可能なシステムも搭載し、最高レベルの機動性を備えたモバイル型生物剤検知システムの開発」である。

システムの基本要素は、生物剤の混入が想定される試料からの核酸抽出、生物剤遺伝子の増幅、DNA チップによる検出、検出結果の解析、情報発信から成る。何れの生物剤にも適用可能な核酸抽出法を考案し、対象とする全ての生物剤について遺伝子増幅法として LAMP

法あるいは RT-LAMP 法を開発し、更に複数の生物剤遺伝子を同時に増幅できるように反応のマルチプレックス化をアレンジする。各生物剤に特異的なプローブ DNA を固相化した電流検出型 DNA チップを並べたマイクロアレイに遺伝子増幅産物をハイブリダイゼーション反応させ、挿入剤添加後に電流を検知することで複数の生物剤を同時に検出することが可能になる。1 時間半程度での検出を目指した。

まず、生物剤からの核酸抽出法に関しては、煮沸による簡便法、市販のキットを用いた方法等検討を重ねた結果、ビーズ破碎法を応用した簡便法を考案した。

遺伝子増幅法には複雑な温度制御が不要な等温増幅の LAMP 法 (RNA をゲノムとしてもつ出血熱ウイルスなどに対しては RT-LAMP 法) を採用し、19 種類の生物剤それぞれについて種内で高度に保存されている 1-3 の遺伝子領域 (合計 36 領域) を増幅標的領域として設定した。それぞれの遺伝子領域について、 10^3 コピー以上の生物剤遺伝子を 40 分以内に検出することを目標にプライマー (遺伝子増幅用の短鎖 DNA) セットのデザインと反応条件の検討を行った。その結果、全 19 種類の生物剤について目標検出時間 (17~36 分)、感度 ($10^2 \sim 10^3$ コピー) を満たした LAMP 法あるいは RT-LAMP 法を開発することができた。

次に各生物剤遺伝子に対する LAMP 増幅産物と特異的に結合するプローブを決定するために、プローブ候補として選定したさまざまな配列をもつ短鎖 DNA をチップ上に固相化して、LAMP 増幅産物との結合能や結合特異性を検討し、高感度かつ特異的に認識するプローブを選定した。DNA チップには、日本発のバイオオリジナル技術であり研究グループの東芝が特許を保有する電流検出型の DNA チップを採用した。良好なシグナル (電流値) が得られるプローブを最終候補として選定した。

単一の生物剤遺伝子領域に対して開発した LAMP 法あるいは RT-LAMP 法について、続いてマルチ増幅 (複数の生物剤に対するプライマーセットを混合し、複数の生物剤の遺伝子を同時に増幅) 可能な組み合わせを検討した。

遺伝子増幅以降の過程は密閉型の使い捨てカセット内において全自動で進行する。カセットの大きさは縦 75mm 横 60mm 厚さ 9mm でこの中に試料や試薬の保持、反応を行うチャンバ、チャンバ間を接続する流路が形成されており、プラスチック板を両面からゴムシートで挟み込む構造になっており、電流検出型 DNA チップもカセット内に内蔵されている。チャンバは、サンプル・チャンバ、3つの増幅チャンバ、別々に増幅された試料を混合する混合チャンバ、DNA チップ上の不要な試料を洗浄するための試薬を保持しておく洗浄液チャンバ、挿入剤を保持しておく挿入剤チャンバ及び試料や試薬の廃液を貯蔵するための廃液チャンバから構成されている。チャンバ及び流路はカセット内で環状流路構造を形成しており、外部とは完全に遮断された完全密閉構造となっている。当初、一枚のカセットで 19 種類全ての検出を想定していたが、カセット 1 枚当たりのコストを抑える目的と実際の使用に際して被疑試料の形状から明らかに不要な検査を省くためにカセットはカテゴリー A 生物剤用、RNA ウイルス用、カテゴリー BC 生物剤用の 3 種類に分けることにした。それぞれのカセットは 4-10 種類の生物剤 (各 12 遺伝子領域) に対応している。これにより、1 検査あたりのコストを大幅に下げることが可能になり、汎用性を高めることができた。

全自動検査装置の試作機を作製し、カセットの性能評価を行った。装置サイズは幅 252mm、高さ 425mm、奥行き 506mm、重さ約 20kg であり、当初目標としていた小型・軽量化 (目標: 50cm 角以内、20kg 以内) をほぼ達成している。装置本体は、コンピュータと Ethernet ケーブルで接続されており、コンピュータによって制御されている。コンピュータは無線 LAN 内蔵であるため情報通信も可能である。

カセットのサンプルチャンバに試料を注入後、注入口をシールして全自動検査装置にセットし、検査をスタートさせるとカセット内で試料が 3つの増幅チャンバに等量ずつ分配される。次に、

各増幅チャンバをヒーター内蔵プッシャで密閉した上で加熱することにより生物剤遺伝子を増幅する。各増幅チャンバでは 2-5 の遺伝子に対するマルチ LAMP 増幅反応が行われる。増幅時間は 40 分に設定した。増幅後の試料は混合チャンバで混合後、DNA チップ上へ送液し、ハイブリダイゼーション反応へと進む。次に、洗浄液チャンバから供給された洗浄液で非特異吸着を除去した後、挿入剤が供給されて電気化学測定を行う。検査時間は増幅 40 分を含めて 85 分に設定した。

実際に本物の生物剤を用いた実証実験を行い、高い検出特異性を確認できた。例えば炭疽菌については同属の菌との精度の高い識別が可能であった。検出感度は菌数換算で 40 から 4×10^3 個であった。検出感度に関しては若干の改良の余地を残している。

これまでに多数発生している偽剤を用いた「白い粉事案」への対応として、擬似試料(砂糖、小麦粉、タルク)を用いた検討も行った。擬似試料に対して擬陽性シグナルが検出されないこと及び擬似試料に生物剤を混入した際に、正確に生物剤の検出が可能であることを確認した。さらに、ヨーグルトや生体試料(血液、糞便、臓器)中の生物剤の検出も行い、良好な結果を得た。

試作機はカセットスロットを 1 ユニットしか持たないが、市販化に向けて全自動装置のカセットユニット数を増やすことにより、一度に処理できる試料数を増やす予定である。

研究期間内に概ねシステムの開発を完了することができたので、今後は市販化に向けて装置の最終仕様の確定等を行っていく予定である。

開発システムは、現在市販されている何れの現場検知システムよりも操作性、感度、検出時間、対応可能生物剤数などに関して格段の優位性を持っている。具体的な研究成果としては、(1) これまで対応不可能であった生物剤をも対象とした複数の生物剤の同時検知が可能になった(2) 非常に短時間に高精度かつ安全な検知が可能になった(3) 生物剤に関する知識や熟練した取り扱い技術をもたない者でも簡便に検査が行えるようになった(4) 迅速に検査結果が得られるため、迅速な事後対応が可能になったなどがあげられる。これらの成果は、生物剤による犯罪・テロの脅威から国家社会を守り、国民の不安軽減の一助となり、安心・安全な社会の構築に大きく寄与する。また、本研究の成果は、生物剤の検知に関する高度な先端科学技術システムの構築を国内外にアピールするものであり、生物剤による犯罪・テロに対する抑止力としての効果も絶大である。また、本研究では、19 種類の生物剤について LAMP 法あるいは RT-LAMP 法を開発したが、これらはそのままそれぞれの病原微生物によって引き起こされる感染症の臨床診断、疫学調査等にも使用可能なシステムであり、有用性の高いものである。

今後は、本研究参加機関および警察関連機関(警察庁、都道府県警の科学捜査研究所、公安機動捜査隊、鑑識課、警備課など)での実用化を図ると共に、関連府省庁への働きかけを行い、衛生研究所、消防庁、海上保安庁、防衛省、空港、港湾検疫所等へ活用を広げて行く予定である。また、本課題で開発した生物剤自動検知システムは、微生物の遺伝子多型解析にも応用可能であり、法微生物学鑑定への活用も視野に入れている。また、新興・再興感染症などの病原体検知、さらには食品の衛生検査などへの応用も可能であることから、感染症対策、衛生管理対策としても幅広く活用を図る予定である。

§ 2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

本課題では、現場レベルで使用可能なモバイル型全自動多項目生物剤同時検知システムの開発を目指した。具体的な設定目標は、(1) 米国疾病予防管理センター (CDC) がテロ・犯罪に使用される可能性の高い生物剤としてカテゴリーA、BおよびCに分類した約 20 種類の生物剤の同時検知、(2) 特異性の高い高精度の検出、(3) 高感度検出 (すべての生物剤に対して 10^3 個以上)、(4) 短時間 (1 時間程度) での迅速検知・同定、(5) 生物剤に関する知識や取扱いに精通していない者でも安全かつ高精度に操作できる全自動システム、(6) 小型・軽量化 (50cm 角以内、20kg 以内)、(7) 情報通信システムの搭載であった。

上記目標を達成すべく研究開始時に立てた3年間(4カ年度)の研究計画は下記のとおりである。

項目	平成17年度 (6ヶ月)	平成18年度	平成19年度	平成20年度 (6ヶ月)
生物剤からの核酸抽出法の検討	←	→		
生物剤遺伝子の増幅法の検討	5種類	11種類	3種類 マルチ増幅	
DNAチップの開発	5種類	11種類	3種類	
要素機能の検証 (サンプリング、逆転写反応、バイオハザード)	←		→	
各要素ユニットの試作 (サンプリング、核酸抽出、逆転写反応、バイオハザードの各ユニット)		←	プロトタイプシステムの完成 プレス発表 (2月)	
実証実験				↓

生物剤からの核酸抽出法に関しては、安田研究代表グループが主に担当し、生物剤の中で最も核酸抽出に手間がかかる炭疽菌芽胞を用いて、煮沸による簡便法、市販のキットを用いた方法及びその改良法や様々な方法の組み合わせ、条件検討を行い、最終的にビーズ破碎法を応用した簡便法を考案した。この方法は何れの生物剤にも適用できる。牧野細菌感染グループは、芽胞菌以外には市販のキット (MORA-Extract キット) で十分な結果が得られることを示している。また、RNA ウイルスに対してはもっと簡便な煮沸法でも十分である。

遺伝子増幅には複雑な温度制御が不要な等温増幅の LAMP 法 (RNA をゲノムとしてもつ出血熱ウイルスなどに対しては RT-LAMP 法) を採用した。19 種類の生物剤について遺伝子デ

データベースを活用して種内で高度に保存されている 1-3 の遺伝子領域（合計 36 領域）を増幅標的領域として設定した。それぞれの遺伝子領域について、1,000 コピー以上の生物剤遺伝子を 40 分以内に検出することができるプライマーセットのデザインと反応条件の検討を行った。その結果、全 19 種類の生物剤について目標検出時間、感度を満たした LAMP 法あるいは RT-LAMP 法を開発することができた。カテゴリーA 生物剤および RNA ウイルスに対する反応系（2 2 反応系）を安田研究代表グループが開発し、カテゴリーA 生物剤の一部およびカテゴリーBC 生物剤に対する反応系（1 4 反応系）を牧野細菌感染グループが開発した。

それぞれの遺伝子増幅反応で標的とした遺伝子領域に対して、橋本デバイス開発グループがプローブ候補を複数設計し、それらプローブを固相化した DNA チップを作製した。DNA チップには、操作性に優れ、システムの小型化や自動化にも有利で東芝が特許を保有する電流検出型 DNA チップを採用した。DNA チップの感度・特異性の評価は、ハイブリダイゼーション反応以降を自動化した東芝製 DNA 自動検査装置 Genelyzer™ を用いて行った。橋本デバイス開発グループが合成遺伝子断片（PCR 増幅産物）を用いて候補を絞り込み、安田研究代表グループと牧野細菌感染グループが実剤を用いて最終候補の選定を行い、最も感度・特異性の高いプローブを決定した。

当初の計画通り、19 種類の生物剤（36 の遺伝子領域）について遺伝子増幅反応系の開発とプローブの決定を 19 年度末までに終了した。

バイオハザードへの対応と全自動化を実現するために密閉型の使い捨てカセット内で全反応を行い、解析結果の表示をするシステムを完成させなければならない。カセットは、試料や試薬の保持および反応を行うチャンバ、チャンバ間を接続する流路からなり、プラスチック板を両面からゴムシートで挟み込む構造になっており、電流検出型 DNA チップもカセット内に内蔵する仕様とした。サンプル・チャンバ、3 つの増幅チャンバ、別々に増幅された試料を混合する混合チャンバ、DNA チップ上の不要な試料を洗浄するための試薬を保持しておく洗浄液チャンバ、挿入剤を保持しておく挿入剤チャンバ及び試料や試薬の廃液を貯蔵するための廃液チャンバを設定し、チャンバ及び流路はカセット内で環状流路構造をとるよう設計し、外部と完全に遮断した完全密閉構造を実現した。システムデザイン、密閉性、送液系のチェック等橋本デバイス開発グループが担当した。

研究開始当初は、一枚のカセットで 19 種類全ての検出を想定していたが、カセット 1 枚当たりのコストを抑える目的と実際の使用に際して被疑試料の形状から明らかに不要な検査を省くためにカセットはカテゴリーA 生物剤用、RNA ウイルス用、カテゴリーBC 生物剤用の 3 種類に分けることにした。これにより、1 検査あたりのコストを大幅に下げることが可能になり、汎用性を高めることができると考えた。それぞれのカセットは 4-10 種類の生物剤（各 12 遺伝子領域）に対応している。

カセット内の 3 つの増幅チャンバで 12 遺伝子領域の増幅を可能にするためには、マルチ増幅（複数の生物剤に対するプライマーセットを混合し、複数の生物剤の遺伝子を同時に増幅）を実現しなければならない。そこで、マルチ増幅可能な反応の組み合わせをカセット毎に検討した。安田研究代表グループがカテゴリーA 生物剤用カセットおよび RNA ウイルス用カセットで対応する生物剤、牧野細菌感染グループがカテゴリーBC 生物剤用カセットで対応する生物剤について LAMP 反応のマルチ化を検討した。平成 20 年度第一四半期末までに生物剤遺伝子 10^3 コピーを 40 分以内に増幅可能なマルチ化反応の組み合わせの検討をほぼ終了した。

橋本デバイス開発グループが、全自動検査装置の試作機を計画通り 19 年度末までに作製し、全自動化カセットでの実証試験を安田研究代表グループが平成 20 年度に行った。全自動検査装置試作機のサイズは幅 252mm、高さ 425mm、奥行き 506mm、重さ約 20kg であり、当初目標としていた小型・軽量化（目標：50cm 角以内、20kg 以内）をほぼ達成している。装置本体は、コンピュータと Ethernet ケーブルで接続されており、コンピュータによって制御されている。コンピュ

ータは無線LAN内蔵であるため情報通信も可能なシステムとなった。試作システムでの検査時間は増幅 40 分を含めて 85 分に設定した。実際に本物の生物剤を用いた実証実験を行い、高い検出特異性を確認できた。検出感度は菌数換算で 40 から 4×10^3 個であり、若干の改良の余地を残している。検査時間は若干短縮できる見込みである。

また、ほぼ当初の計画通り平成 20 年 3 月 17 日にプレスリリースも行った。

以上、概ね計画通り研究計画を進めることができ、今後は市販化に向けた仕様の確定等を行っていく。

(2)実施体制

グループ名	研究代表者又は 主たる共同研究者氏名	所属機関・部署・役職名	研究題目
安田研究代表グループ	安田 二郎	科学警察研究所・法科学第一部・生物第五研究室・室長	多項目生物剤検知法の開発と実証実験
牧野細菌感染グループ	牧野 壮一	国立大学法人帯広畜産大学・大動物特殊疾病研究センター・教授	危険細菌性感染症の検出システムの構築
橋本デバイス開発グループ	橋本 幸二	株式会社東芝 研究開発センター・グループ長	生物剤検知用 DNA チップおよび自動検知システムの開発に関する研究

§ 3 研究実施内容及び成果

3.1 多項目生物剤検知法の開発と実証実験 (科学警察研究所 安田研究代表グループ)

(1)研究実施内容及び成果

(1)-1 生物剤の混入が想定される試料からの核酸抽出法の検討

生物剤の中で最も核酸抽出に手間がかかる炭疽菌芽胞を用いて、煮沸による簡便法、市販のキットを用いた方法及びその改良法や様々な方法の組み合わせ、条件検討を行った。簡便さ、コスト、DNA 抽出効率、LAMP 反応への影響などを指標に検討した結果、最終的にビーズ破碎法を応用した簡便法(図1)を考案した。この方法では、ミニビートビーターと卓上小型遠心機を用いるがこれらは開発デバイスに組み込む予定である。

実際にこの方法を用いて炭疽菌芽胞から核酸を抽出し、LAMP 反応を検討した成績の一例を表1に示す。1テストあたり200個の芽胞から炭疽菌遺伝子検出が可能であった。煮沸処理の有無にかかわらず、同等の感度が得られた。

この方法は何れの生物剤にも適用できる。また、RNA ウィルスに対してはもっと簡便な煮沸法でも十分である。

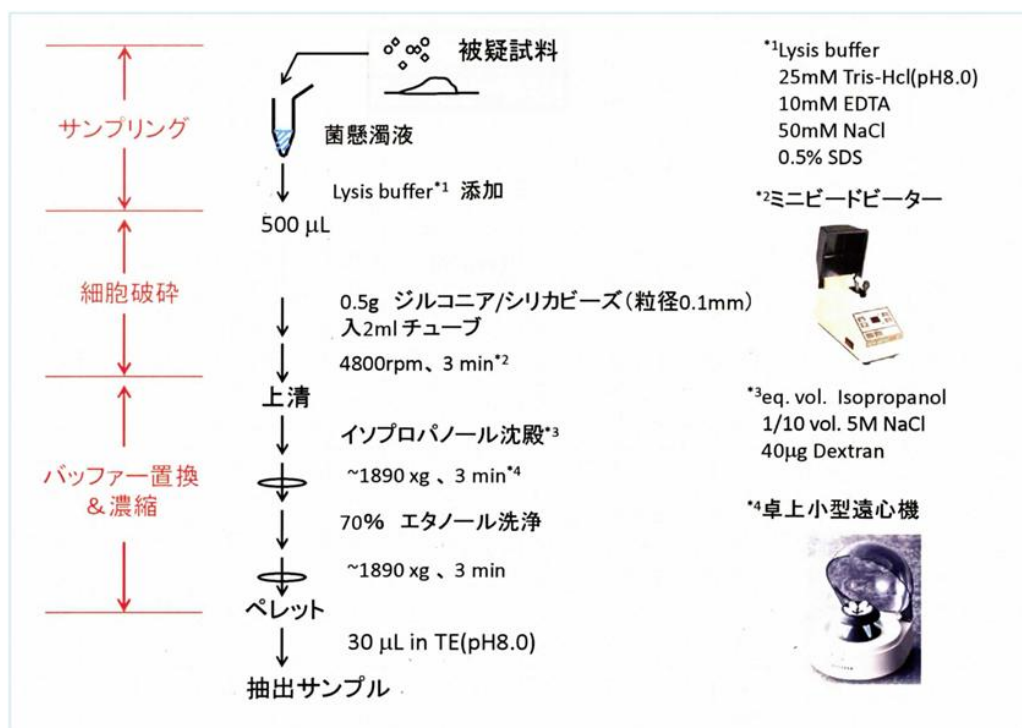


図1 生物剤からの核酸抽出法

表1 簡便法を用いた炭疽菌芽胞からの核酸抽出

spore		beads		boil + beads	
per test	per LAMP	pos	ave.±SD	pos	ave.±SD
2x10 ⁴	2.6x10 ³	4/4	31.8 ± 1.9	4/4	29.5 ± 0.2
2x10 ³	2.6x10 ²	4/4	37.5 ± 3.0	4/4	34.9 ± 3.2
2x10 ²	2.6x10 ¹	3/4	43.0 ± 6.7	3/4	41.2 ± 3.9
2x10 ¹	2.6x10 ⁰	1/4	47.2	2/4	50.1

(1)-2 生物剤遺伝子増幅法の開発

米国疾病予防管理センター (CDC) がバイオテロに使用される可能性の高い病原体として指定したカテゴリー分類 (表2) を参考に、本研究で検出対象とする生物剤 19 種類を決定した。後述するが、19 種類の生物剤は便宜上、カテゴリーA 生物剤 (5 種類)、RNA ウィルス (4 種類)、カテゴリーBC 生物剤 (10 種類) の 3 つに分類している。

表2 バイオテロに使用される可能性の高い病原体の種類(米国 CDC による分類)

カテゴリー	病原体(学名もしくは英名)
A	細菌及びその毒素
	炭疽菌 (<i>Bacillus anthracis</i>)
	ボツリヌス菌毒素 (<i>Clostridium botulinum</i> toxin)
	ペスト菌 (<i>Yersinia pestis</i>)
	野兔病 (<i>Francisella tularensis</i>)
	ウイルス
	天然痘ウイルス (Variola major, Smallpoxvirus)
	出血熱ウイルス (Viral hemorrhagic fevers)
	エボラ (Ebola virus)、マールブルグ (Marburg virus)、ラッサ (Lassa virus)、マチュポ (Machupo virus)
	細菌及びその毒素
B	ブルセラ菌 (<i>Brucella</i> species)
	鼻疽菌 (<i>Burkholderia mallei</i>)
	クロストリジウム毒素 (Epsilon toxin of <i>Clostridium perfringens</i>)
	黄色ブドウ球菌腸管毒素B (<i>Staphylococcus enterotoxin B</i>)
	Q熱菌 (<i>Coxiella burnetii</i>)
	ウイルス
	脳炎ウイルス (Viral encephalitis)
	ベネゼエラ、ウエスタン、イースタン馬脳炎ウイルスなど (Venezuelan, Western, Eastern equine encephalitis viruses)
	その他
	リシン毒素 (Ricin toxin from <i>Ricinus communis</i> , castor beans)
C	細菌
	多剤耐性結核菌 (Multidrug-resistant tuberculosis)
	ウイルス
	新興ウイルス (Emerging viruses) ニパ (Nipa virus)、ハンタ (Hanta virus)、黄熱病 (Yellow fever virus) など

遺伝子増幅法としては、これまで PCR 法が一般的な手法として用いられており、現在でも PCR 法を利用した病原微生物(生物剤)検知システムの開発研究が多く報告されているが、今回、我々は(株)栄研化学が遺伝子増幅法として新規に開発した LAMP 法を我々の開発システムにおける遺伝子増幅に採用した。LAMP 法は遺伝子増幅のためのプライマー(遺伝子増幅用の短鎖 DNA)のデザインが若干複雑であるが、PCR 法のような精緻な温度変化の制御を必要とせず、等温で遺伝子を増幅できるため複雑な温度制御系が不要であるという大きな利点を持っている。また、同じ温度制御系で RNA を鋳型とした RT-LAMP 反応(逆転写酵素を追加した系)も行うことができ、DNA と RNA を同じシステムで増幅することができるという利点も有する。我々の開発システムは RNA ウイルスも対象としているため、この利点はシステムの小型・軽量化を考える上で非常に重要であった。

19 種類の生物剤のうち、我々のグループは主にカテゴリーA生物剤(5 種類)、RNAウイルス(4 種類)を担当した。各生物剤について、種内で高度に保存されている 1-3 の遺伝子領域(合計 24 領域)を増幅標的領域として設定し、それぞれの遺伝子領域について、 10^3 コピー以上の生物剤遺伝子を 40 分以内に検出することを目標にプライマーセットのデザインと反応条件の検討を行った。

LAMP 法では遺伝子増幅反応の進行に比例し、反応副産物であるピロリン酸マグネシウムが析出するため反応液の濁度を測定することにより反応をリアルタイムにモニタリングすることができる(図2)。濁度 0.1 以上を陽性、0.1 となった時間を検出時間とした。

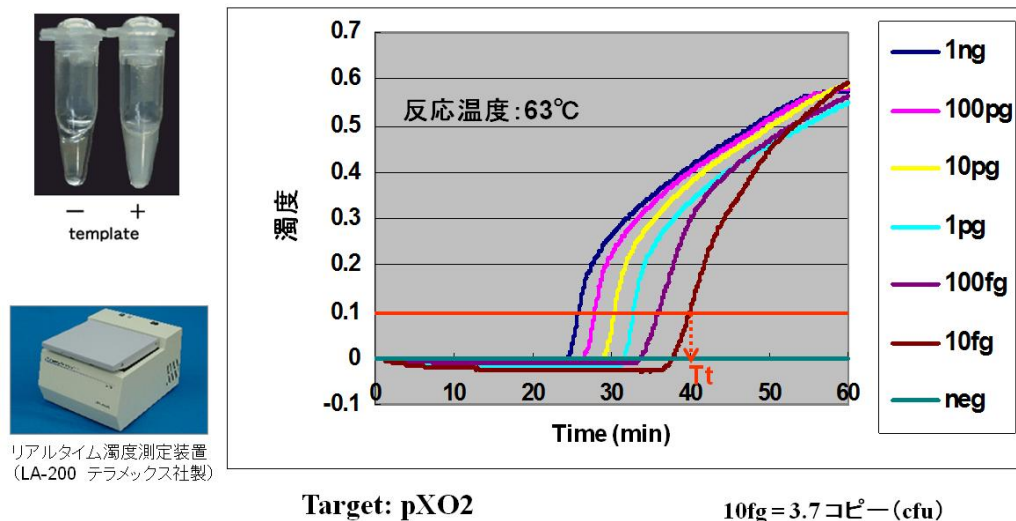


図2 LAMP 法による生物剤遺伝子検出の例

その結果、カテゴリーA生物剤、RNAウイルス全9種類の生物剤(24 遺伝子領域)について目標検出時間40分(15~36分)、感度 10^3 コピー($3.7 \sim 10^3$ コピー)を満たしたLAMP法あるいはRT-LAMP法を開発することができた(表3および4)。すべての反応系で近縁の細菌・ウイルス種には交差反応をしないこと、および入手可能な同種細菌株、同種ウイルス株に特異的に反応することを確認した。

尚、出血熱ウイルス等、国内では入手不可能な病原体については、カナダ、イギリスの研究機関との共同研究で遺伝子を手あるいは現地研究施設で増幅反応の実証実験を行った。

表3 LAMP 反応の成績(カテゴリーA 生物剤)

生物剤の種類(菌種)	標的遺伝子領域	プライマーセット	シングル増幅時の検出限界 DNA量(コピー数)	検出時間 (分)	マルチ増幅 組合せ番号	マルチ増幅時の検出限界 DNA量(コピー数)	検出時間 (分)
炭疽菌	pX01	炭疽1	1ng/10fg (3.7)	16/30	1	1ng/1pg (3.7×10^2)	22/33
	pX02	炭疽2	1ng/10fg (3.7)	15/28	2	1ng/10pg (3.7×10^3)	24/33
	chromosome	炭疽3	1ng/100fg (3.7×10)	19/33	3	1ng/10pg (3.7×10^3)	31/36
A	a	Aa	1ng/100fg	20/36	3	1ng/10pg	22/30.1
	b	Ab	1ng/1pg	23/32.9	2	1ng/10pg	30/35
	c	Ac	1ng/100pg	22/28	1	1ng/10pg	28.4/36.6
B	d	Bd	100fg (4.2×10)	15	2	1ng/1pg	23.8/38.4
	e	Be	1ng/100fg (4.2×10)	16/30	3	1ng/10pg	25.5/32.6
C	f	Cf	未検討	未検討	1	($10^8/10^2$)	22/35
	g	Cg	未検討	未検討	3	($10^8/10^2$)	21/35
D	h	Dh	100fg (1.0×10^2)	25	1	1ng/1pg	24.0/31.8
	i	Di	1ng/100fg (1.0×10^2)	17/29	2	1ng/10pg	29.0/36.7

* 生物剤 C はマルチ増幅で十分な検出感度及び時間が確認できたので、シングル増幅の検討は行っていない。

表4 RT-LAMP 反応の成績 (RNA ウイルス)

生物剤の種類 (ウイルス種)	標的遺伝子領域	プライマーセット	シングル増幅時の検出限界 (DNA量ある1コピー数)	検出時間 (分)	マルチ増幅 組合せ番号	マルチ増幅時の検出限界 (コピー数)	検出時間 (分)
ウイルスE	j	Ej	$10^5/-$	18/-	6	$10^5/10^3$	15.4/24.6
	k	Ek	$10^5/10^2$	18/26	5	$10^5/10^3$	21.2/32.6
ウイルスF	l	Fl	0.6ng/-	14/-	4	$10^5/10^3$	13.9/22.2
	m	Fm	0.6ng/6pg	24.6/31.0	6	$10^5/10^3$	17.6/26.7
ウイルスG	n	Gn	$10^5/10^2$	19/30	4	$10^5/10^3$	19.0/25.7
	o	Go	$10^5/10^2$	18/32	4	$10^5/10^3$	18.2/31.2
	p	Gp	0.2ng/-	17/-	5	$10^5/10^3$	25.1/35.8
	q	Gq	0.2ng/-	22/-	5	$10^5/10^3$	18.5/27.0
ウイルスH	r	Hr	$10^5/10^3$	10.2/17.4	6	$10^5/10^3$	12.1/18.7
	s	Hs	$10^5/10^2$	9.9/20.5	6	$10^5/10^3$	12.6/19.9
	t	Ht	$10^5/10^2$	12.7/27.2	4	$10^5/10^2$	14.2/28.8
	u	Hu	未検討	未検討	5	$10^5/10^3$	14.2/19.0

*ウイルス H の u 領域はマルチ増幅で十分な検出感度及び時間が確認できたので、シングル増幅の検討は行っていない。

本研究開発システムでは、使い捨て密閉型カセット内の 3 つの増幅反応チャンバで 12 の遺伝子領域の増幅に対応しなければならないため、1 つの増幅チャンバあたり同時に 4 つの遺伝子領域の増幅が可能なように反応のマルチ化を実現しなければならない。

そこで、単一の生物剤遺伝子領域に対して開発した LAMP 法あるいは RT-LAMP 法について、カテゴリーA 生物剤グループおよび RNA ウイルスグループ内でマルチ増幅（複数の生物剤に対するプライマーセットを混合し、複数の生物剤の遺伝子を同時に増幅）可能な反応系の組み合わせを検討した。

その結果、各グループ 12 の遺伝子増幅反応系を 4 つずつ 3 つの組み合わせグループにまとめることができた（表 3 および 4）。表 3 および 4 において、マルチ増幅組合せ番号が同じ反応系は同じ反応チャンバ内でマルチ増幅可能なものである。RNA ウイルスグループについては、3 つのマルチ増幅系において 12 すべての反応系で目標検出時間 40 分（18.7～35.8 分）、感度 10^3 コピー（ $10^2 \sim 10^3$ コピー）を達成することができた。カテゴリーA 生物剤グループについては、すべての反応系で目標検出時間 40 分（30.1～38.4 分）を達成できたが、感度については約半数の反応系で目標の 10^3 コピーをわずかに下回った（ 3.7×10^3 コピー）。概ね、生物剤の遺伝子増幅法の開発に関しては目標を達成できたと判断し、増幅産物を特異的に認識するプローブの選定に移った。

(1)-3 プローブ探索

各生物剤遺伝子に対する LAMP 反応で標的とした遺伝子領域に対して、橋本デバイス開発グループがプローブ候補を複数設計し、それらプローブを固相化した DNA チップを作製した。電流検出型 DNA チップの検出原理を図 3 に示す。

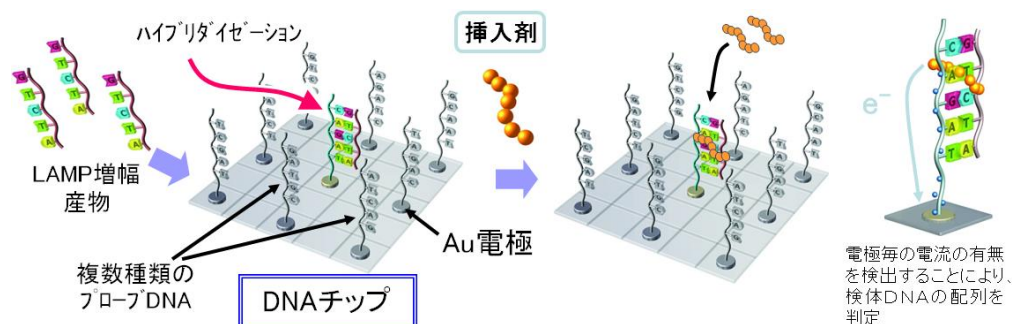


図3 電流検出型 DNA チップによる生物剤遺伝子検出原理

橋本デバイス開発グループが合成遺伝子断片（PCR増幅産物）を用いて候補を絞り込んだDNAチップ・プローブに対して、生物剤から抽出した遺伝子を用いて我々のグループが感度・特異性の評価を行い、プローブの最終決定を行った。DNAチップ・プローブの評価はハイブリダイゼーション反応以降を自動化した東芝製DNA自動検査装置 Genelyzer™を用いて行った。図4に例示したように、最も感度・特異性の高いプローブを最終候補として選定した。

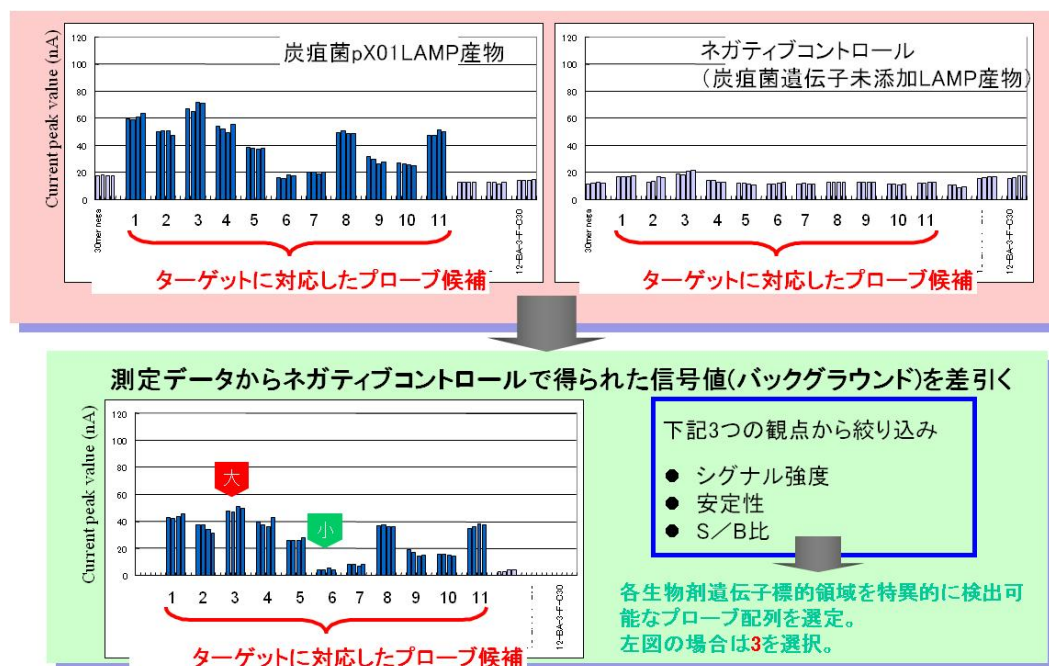
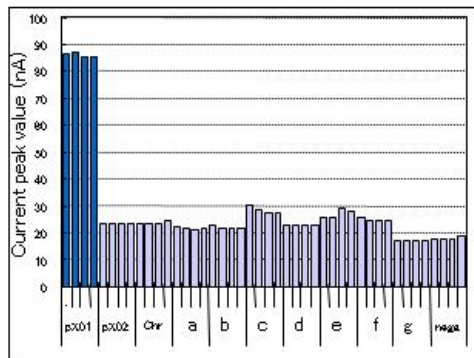


図4 プローブ選定の例

実際に各グループの生物剤のマルチ LAMP 反応産物を最終候補のプローブを搭載した DNA チップで解析した成績の一部を図5および 6 に示す。

炭疽菌 (pX01)



生物剤A (a遺伝子領域)

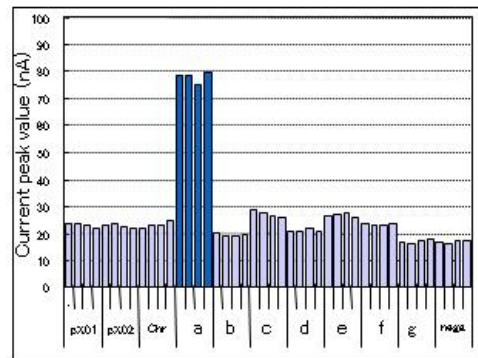
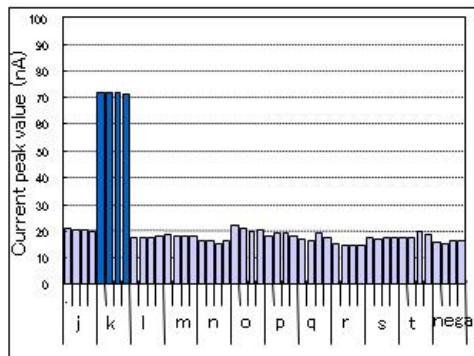


図5 DNA チップ検出の例 (カテゴリーA 生物剤)

ウイルスE (k遺伝子領域)



ウイルスG (p遺伝子領域)

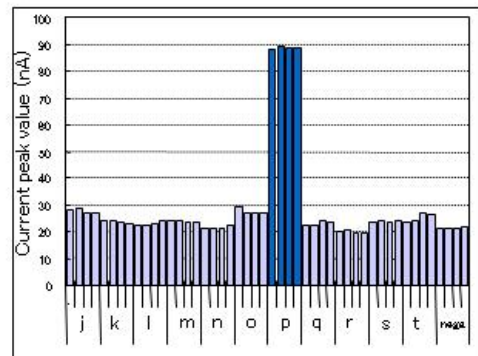


図6 DNA チップ検出の例 (RNA ウイルス)

最終的にカテゴリーA 生物剤グループおよび RNA ウイルスグループの各 12 遺伝子領域に対して、それぞれのマルチ LAMP 反応産物と特異的に結合し、シグナル強度の高いプローブを決定することができた(図7)。

カテゴリーA生物剤			RNAウイルス		
生物剤種	プライマー	プローブ	生物剤種	プライマー	プローブ
炭疽菌	炭疽1	○	ウイルスE	Ej	○
	炭疽2	○		Ek	○
	炭疽3	○	ウイルスF	Fl	○
生物剤A	Aa	○		Fm	○
	Ab	○	ウイルスG	Gn	○
	Ac	○		Go	○
生物剤B	Bd	○		Gp	○
	Be	○		Gq	○
生物剤C	Cf	○	ウイルスH	Hr	○
	Cg	○		Hs	○
生物剤D	Dh	○		Ht	○
	Di	○		Hu	○

図7 プローブの決定

(1)-5 実証試験

全自動検知システムを用いた生物剤検知の実証実験については、橋本デバイス開発グループと共同で科学警察研究所において行った。研究実施内容及び成果については、橋本デバイス開発グループの項で記述。

(1)-6 混在試料からの検討、

これまでに多数発生している偽剤を用いた「白い粉事案」への対応として、擬似試料である砂糖、小麦粉、タルクに炭疽菌芽胞を混入あるいは非混入した試料に対して、全自動検知システムを用いた生物剤検知の検証を行った。

その結果、炭疽菌芽胞を混入していない擬似試料からは何れも非特異シグナルは検出されず、炭疽菌芽胞を混入した擬似試料からは擬似試料を含まない場合と同等の感度で炭疽菌遺伝子が検出されることを確認した。

炭疽菌芽胞を感染させたマウスからの血液試料を用いた検討も行った結果、血液成分の持ち込みは本検出システムの検出感度にほとんど影響しないことを確認した。

(2)研究成果の今後期待される効果

開発システムは、今後早期の市販化に向けて仕様の確定等を行っていき、警察関連機関（警察庁、都道府県警の科学捜査研究所、公安機動捜査隊、鑑識課、警備課など）での実用化を図ると共に、関連府省庁への働きかけを行い、衛生研究所、消防庁、海上保安庁、防衛省、空港、港湾検疫所等へ活用を広げて行く予定である。

わが国独自のシステムとして本課題で開発した全自動モバイル型生物剤センシン

グシステムは、既存する何れの生物剤検知システムよりも優れた特性を備えており、生物剤による犯罪・テロの脅威から国家社会を守り、国民の不安軽減の一助となり、安心・安全な社会の構築に大きく寄与するものと自負している。また、本研究の成果は、生物剤の検知に関する高度な先端科学技術システムの構築を国内外にアピールするものであり、生物剤による犯罪・テロに対する抑止力としての効果も絶大であると考えている。

また、本課題で開発した生物剤自動検知システムは、微生物の遺伝子多型解析にも応用可能であり、法微生物学鑑定への活用も視野に入れている。加えて、新興・再興感染症などの病原体検知、さらには食品の衛生検査などへの応用も可能であることから、感染症対策、衛生管理対策としても幅広く活用を図る予定である。本システム実現により、新たな診断・検査産業が創出され、経済の活性化への寄与も期待できる。更に、本研究で開発した全自動モバイル型生物剤検知装置を大気捕集装置と連動させることで環境中の生物剤をリアルタイムに検知するセンサーシステムの開発にも着手しており、開発システムは世界の最先端を行く米国の大気中生物剤モニタリングシステム BioWatch よりも格段に優れたシステムとして、バイオテロ対策に大きく貢献することが期待される。

3.2 危険細菌性感染症の検出システムの構築

(国立大学法人帯広畜産大学 牧野細菌感染グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

(1)-1 目的:

生物剤を用いた犯罪・テロが国民の安心安全を脅かす大きな脅威となっているが、そのような事案が発生した際には、迅速な検知・同定・情報伝達が被害の最小化に最も重要である。特に、炭疽をはじめとする危険病原体の検出系の確立は我国独自で装備する必要がある。しかし、危険な生物剤を扱った実績のある研究者は国内で限られているので、施設・実績とも整った当研究グループが参画した。研究内容は、細菌性危険病原体(炭疽菌、野兔病菌、ボツリヌス菌、類鼻疽菌など)の迅速診断法の確立及び検証・応用を行った。

危険度の高い細菌等について、上記項目を遂行した。具体的には、CDC のカテゴリー A 生物剤の検出系を優先的に作成し(安田グループと共同)、次にカテゴリー B に属する生物剤の検出系を作成した。最終的には多項目同時検知が可能なアレイシステムを構築し、完成したデバイスを用いて、マルチ LAMP 法による特異的検出系を検証した。

(1)-2 方法:

(1)-2-1 各生物剤の LAMP プライマーの設計および特異性検討(シングル LAMP)

まず各生物剤について、単独増幅で高い特異性を持ち、かつ高感度な LAMP プライマーの選定を行った。牧野グループでは、以下の生物剤: CDC による分類でカテゴリー A に属する 2 種類の生物剤、カテゴリー B・C に属するブルセラ属菌をはじめとする 10 種類の生物剤についてプライマー設計を行った。

続いて、これらのプライマーについて、63℃ 40 分間の一定条件で LAMP 法を行い、検出感度および特異性について検討した(カテゴリー A に属する 2 種類の生物剤に関しての検討は安田グループの報告書を参照のこと)。代表例としてブルセラ菌を標的とした場合の結果について示す(図1)。

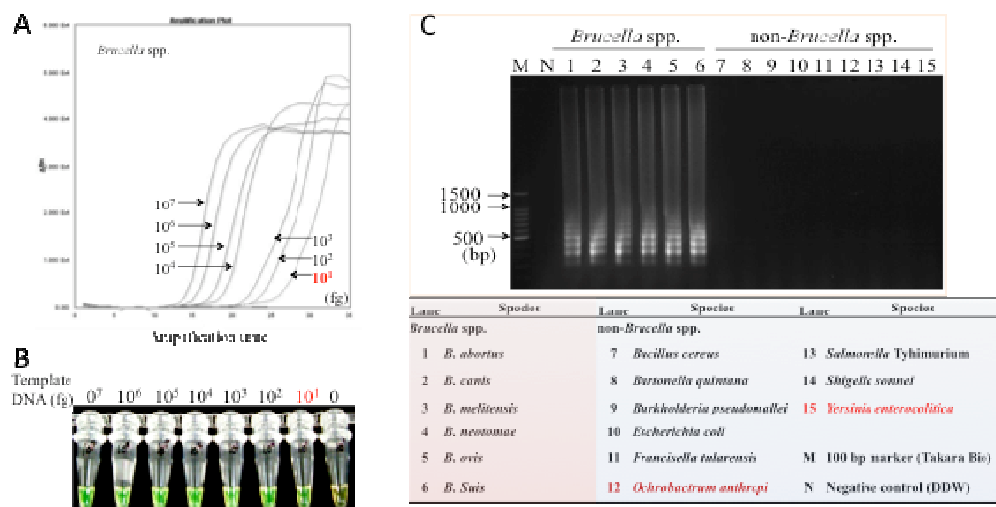


図1 ブルセラ属菌検出 LAMP 法

図1 (A)はリアルタイム LAMP の結果を、(B)は蛍光目視検出試薬(栄研化学、東京)を用いた場合の目視検出例を、(C)にはLAMP 産物の特異性確認について2%アガロースゲル電気泳動結果を示す。

図1 (A)および(B)に示すように、このプライマーは DNA 10 fg (ゲノムサイズから換算すると、2.8 ゲノムコピー)からの検出が可能であった。さらに(C)に示すとおり、特異性についてはレーン1-6のブルセラ属菌のみ増幅し、ブルセラ類縁菌については、血清学的方法ではブルセラ菌との識別が困難な *Yersinia enterocolitica* O9 (レーン15)の他、分類学的にブルセラ菌種として分類され、*BCSP31* をターゲットとした PCR では増幅することが報告されている *Ochrobactrum anthropi* (レーン 12)についても増幅は確認されなかった。

その他のプライマーについても、シングルLAMPでは全て一反応あたりの検出感度 10 pg (各菌のゲノムサイズからの菌数換算で約 10³個)以下であり、特異性も極めて優れていることを確認し、最適なプライマーを選定した。

(1)-2-2 マルチプレックス LAMP の組み合わせの選定

次に、マルチプレックス LAMP の組み合わせの選定を行った。(1)-2-1 で設計したプライマーのうち、カテゴリーA の2種類の生物剤検出用プライマーのマルチプレックスの検討は安田グループによって行われた。

カテゴリーB・C に属する生物剤については、表1に示す A~C の3組のマルチプレックスLAMPのプライマー組み合わせを選定した。この際特に非特異的増幅が起きず、且つプライマー間相互作用によって著しい反応時間の遅延や検出感度の低下が起これらに注意しながら選定した。

表 1 カテゴリーB・C のマルチプレックス LAMP プライマーの組み合わせ

組み合わせ	菌種名	検出感度(40 分)
A	I-1	100 pg
	J	10 pg
	K	10 pg
	L	100 pg
B	I-2	1 ng
	ブルセラ属菌	10 fg
	M	1 pg
	N	100 fg
C	I-3	1 pg
	O	10 pg
	P	100 pg
	Q	1 pg

マルチプレックス化によって一部のターゲットについては、反応時間の増加、および検出感度の低下が見られたが、その他のターゲットについては 10 pg 以下での検出が可能であった。

(1)-2-3 マルチプレックス LAMP 産物の DNA チップ解析結果

次に、LAMP増幅産物をDNA自動検査装置Genelyzer™ を使用してDNAチップによる解析を行った。プライマーセット別の解析結果を以下に示す(図2-1～3)。

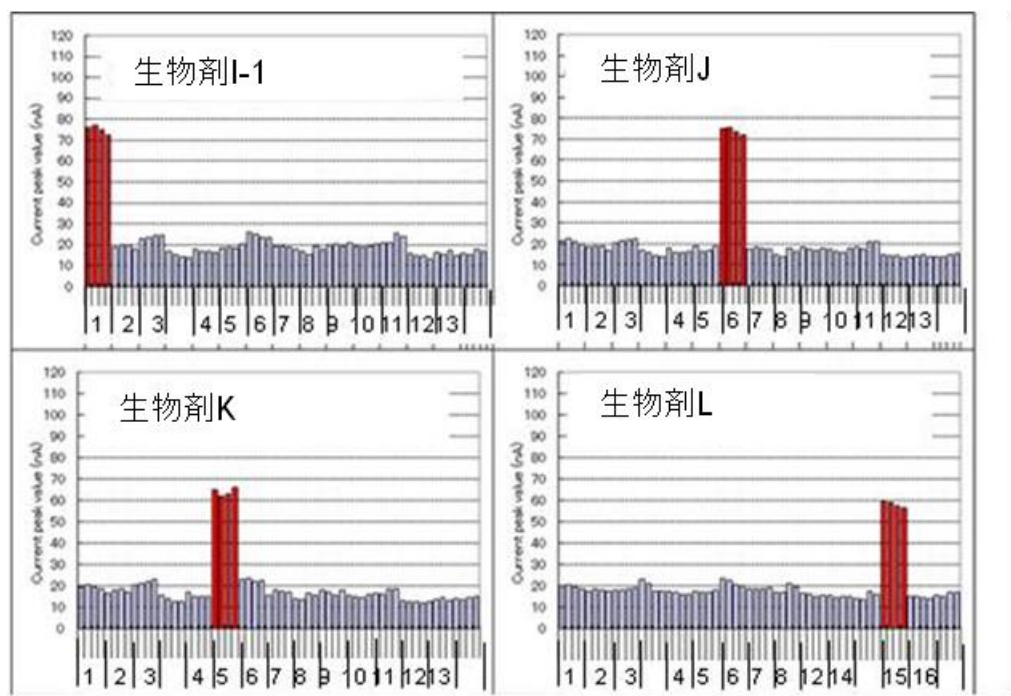


図2-1 プライマーセット A の DNA チップ解析結果
(図中の数字はプローブの番号を示す)

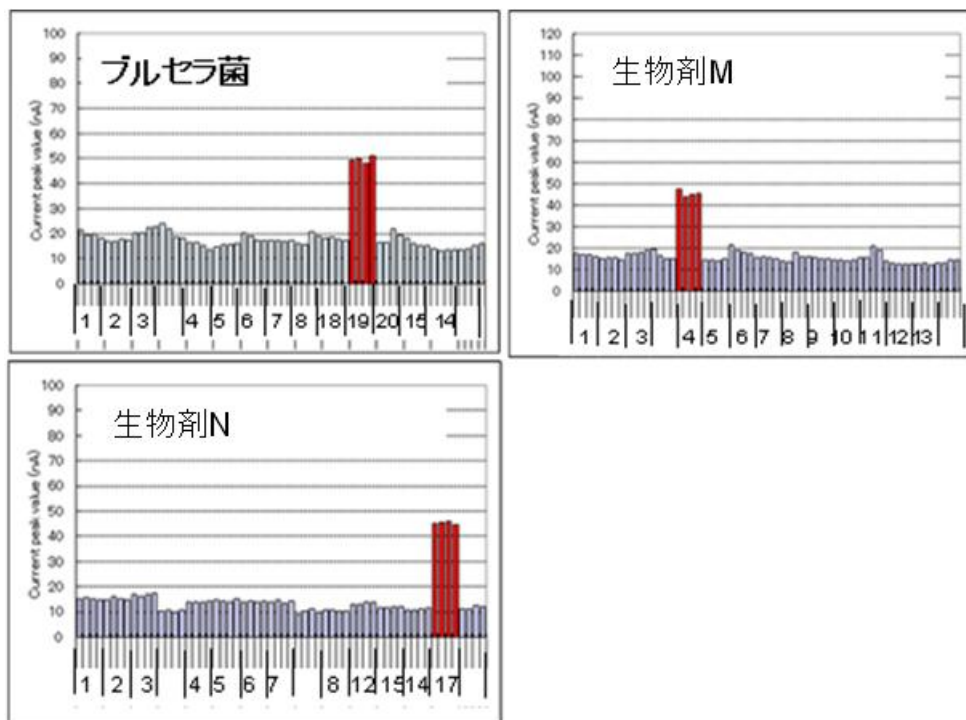


図2-2 プライマーセットBのDNAチップ解析結果
(図中の数字はプローブの番号を示す)

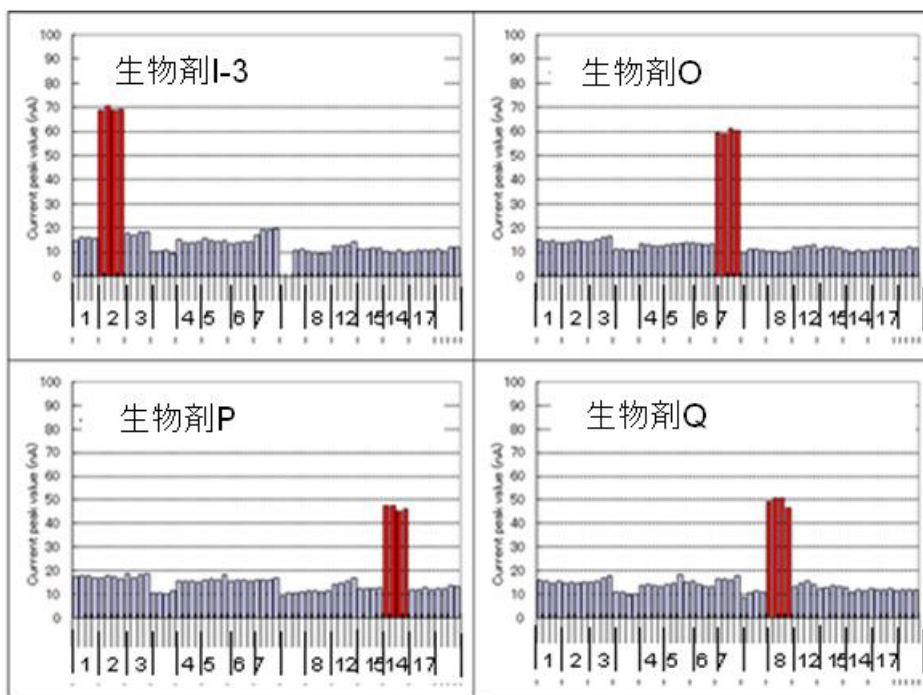


図2-3 プライマーセットCのDNAチップ解析結果
(図中の数字はプローブの番号を示す)

次に検出例の応用例として、ブルセラ菌汚染ヨーグルトからの検出と、人工的に毒素産生性コレラ菌を接種した糞便からの検出を試みた。

(1)-2-4 ブルセラ菌汚染ヨーグルトからの検出

ブルセラ属菌 (*Brucella* spp.) は人獣共通感染症の1つであるブルセラ症の起原因菌である。本菌に感染すると家畜や野生動物では不妊や流産などの繁殖生涯を引き起こし、ヒトでは波状熱やマルタ熱とよばれる症状を呈する。ヒトへの感染は主に、家畜への接触や、汚染乳製品の摂取を通じて感染する。そこで細菌に汚染された食材からの検出例としてブルセラ菌を接種したヨーグルトからの検出を試みた。なおヨーグルトからのDNAの抽出には、市販の MORA-Extract キット(極東製薬工業、東京)を使用した。

市販のプレーンヨーグルト 2.0 gと、滅菌PBS 17.8 ml、滅菌PBSで段階希釈したブルセラ菌 (*Brucella abortus* Tulya株; $1.73 \times 10^5 \sim 10^9$ CFU / ml) 200 μ l をVortexミキサーで2分間混合し、ブルセラ菌汚染ヨーグルト懸濁液を作出した。

上記懸濁液 2.0 ml を滅菌 2 ml チューブに移し、15,000 rpm で10分間遠心してペレットを得た(図3)。

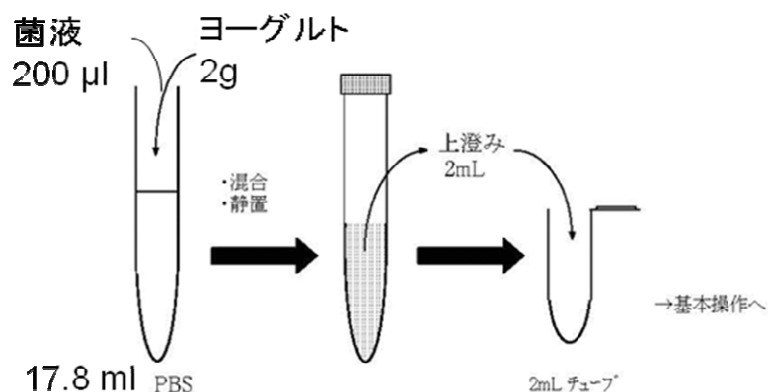


図3 汚染ヨーグルトからの DNA 抽出の基本操作

上清を捨て、ペレットを 150 μ l のライシスバッファーで懸濁した。

ブロックインキュベーターで 70℃ 10 分間 インキュベートし、溶菌を促進させた。

全量をジルコニアビーズが入った容器に移し、破砕機 FastPrep (フナコシ、東京) で 2 分間 振とうさせた。

破砕処理後、200 μ l の SDS 溶液を加え、再び 70℃ 10 分間加温して溶菌を促進させた。

400 μ l のフェノール混合液を加え、1 分間 Vortex ミキサーで攪拌した後、15,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を粗 DNA 液として新しい滅菌 2 ml チューブに回収した。チューブに 99%エタノール 1 ml を加え、vortex したのち、15,000 rpm, 3 分間遠心し、上澄みを捨てた。

70%エタノール 1 ml を加え、vortex したのち、15,000 rpm, 3 分間遠心し上澄みをマイクロピペットで吸引して捨てた。

エバポレーターで完全にエタノールを飛ばした後、200 μ l の TE バッファーに溶解し、

実験に使用した。

上記の方法でブルセラ菌汚染ヨーグルトから抽出した DNA $2\mu\text{l}$ をサンプルとして用い、リアルタイム LAMP を行い、汚染食材からの LAMP 検出を検討した。リアルタイム LAMP 反応はリアルタイム濁度計 LA-200 (テラメックス、京都) を用い、 63°C 40 分間の恒温反応により行った(図4)。

さらにLAMP増幅産物をDNA自動検査装置Genelyzer™ を使用してDNAチップによる解析を行った (LAMP陽性サンプル: 図5、LAMP陰性(ネガティブコントロール:ブルセラ菌未接種ヨーグルト抽出DNA: 図6)。

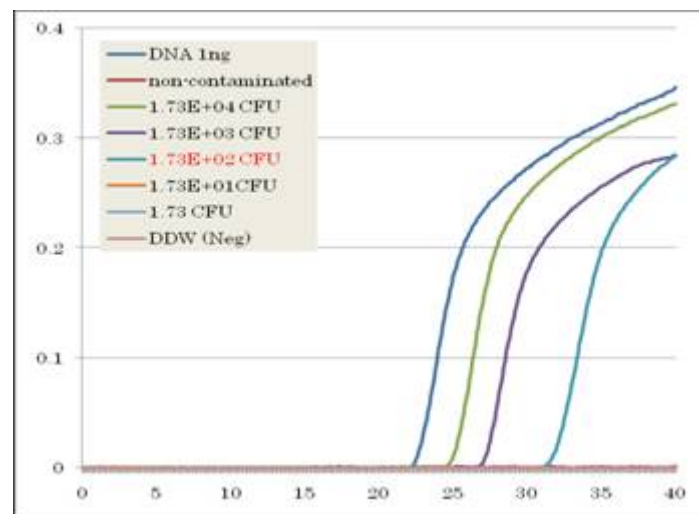


図4 ブルセラ菌汚染ヨーグルト抽出 DNA を用いたリアルタイム LAMP

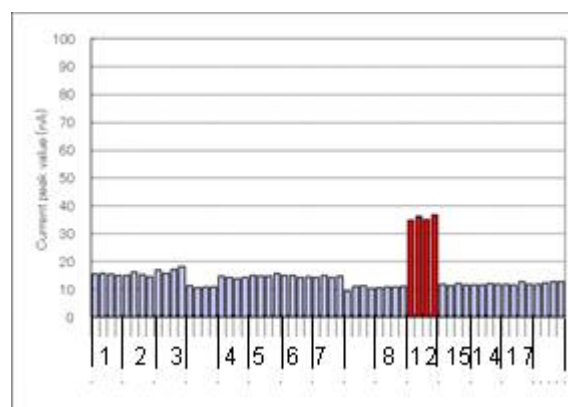


図5 ブルセラ菌汚染ヨーグルト抽出DNA (1.73×10^2 CFU) の DNA チップ解析結果 (図中の数字はプローブの番号を示す)

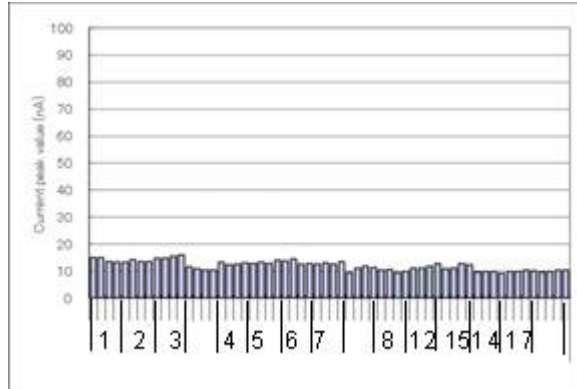


図6 ブルセラ菌非汚染ヨーグルト抽出 DNA の DNA チップ解析結果
(図中の数字はプローブの番号を示す)

(1)-2-5 毒素産生性コレラ菌接種糞便からの検出

コレラは汚染された水や食品を介して経口感染する、最も重要な急性の下痢性疾患の 1 つである。汚染食材の摂取後、1～3 日の潜伏期の後に胃の酸性環境で死滅しなかった菌が、小腸下部に達し、定着・増殖し、感染局所で菌が産生したコレラ毒素が細胞内に侵入して病態を引き起こす。激しい水溶性下痢を発症することが特徴である。下痢便の量は 1 日に 10 リットルを超えることがあり、主要な死因は下痢、嘔吐に伴う脱水症である。本研究では実際の発生を想定した臨床応用として、毒素産生性コレラ菌を人工的に接種した糞便からのコレラ菌検出を試みた。なお糞便からの DNA の抽出には、MORA-Extract キットを使用した。

健常者の糞便 1.0 g と、滅菌 PBS 8.9 ml、滅菌 PBS で段階希釈した毒素産生性コレラ菌 (*Vibrio cholera* O1 株; $1.03 \times 10^5 \sim 10^9$ CFU / ml) 100 μ l を Vortex ミキサーで 2 分間 混合し、コレラ菌人工的接種糞便を作出した。
3 分間静置後、上澄み 2.0 ml を滅菌 2 ml チューブに移し、15,000 rpm で 3 分間遠心してペレットを得た(図7)。

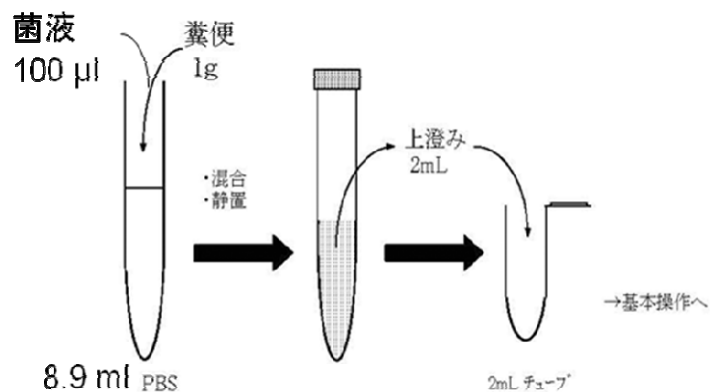


図7 コレラ菌接種糞便からの DNA 抽出の基本操作

上清を捨て、ペレットを 150 μ l のライシスバッファーで懸濁した。

ブロックインキュベーターで 70℃ 10 分間 インキュベートし、溶菌を促進させる。全量をジルコニアビーズが入った容器に移し、破砕機 FastPrep(フナコシ)で 2 分間 振とうさせた。

破砕処理後、200 μ l の SDS 溶液を加え、再び 70℃ 10 分間加温して溶菌を促進させた。

400 μ l のフェノール混合液を加え、1 分間 Vortex ミキサーで攪拌した後、15,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を粗 DNA 液として新しい滅菌 2 ml チューブに回収した。

チューブに 99%エタノール 1 mlを加え、vortex したのち、15,000 rpm, 3 分間遠心し、上澄みを捨てた。

70%エタノール 1 mlを加え、vortex したのち、15,000 rpm, 3 分間遠心し上澄みをマイクロピペットで吸引して捨てた。

エバポレーターで完全にエタノールを飛ばした後、200 μ l の TE バッファーに溶解し、実験に使用した。

上記の方法で毒素産生性コレラ菌人工的接種糞便から抽出した DNA 2 μ l をサンプルとして用い、リアルタイム LAMP を行った。

リアルタイム LAMP 反応はリアルタイム濁度計 LA-200(テラメックス)を用い、63℃ 40 分間の恒温反応により行った(図8)。

さらにLAMP増幅産物をDNA自動検査装置Genelyzer™ を使用してDNAチップによる解析を行った(LAMP陽性サンプル:図9、LAMP陰性(ネガティブコントロール:毒素産生性コレラ菌未接種糞便抽出DNA:図10)。

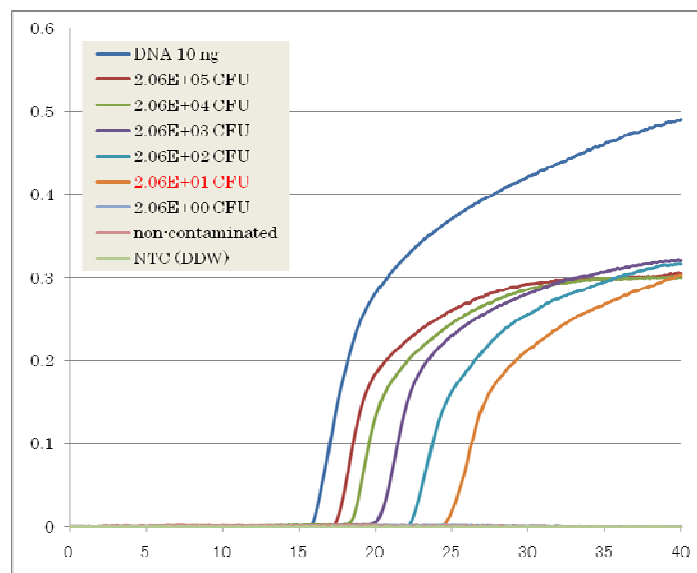


図8 毒素産生性コレラ菌接種糞便から抽出した DNA を用いたリアルタイム LAMP

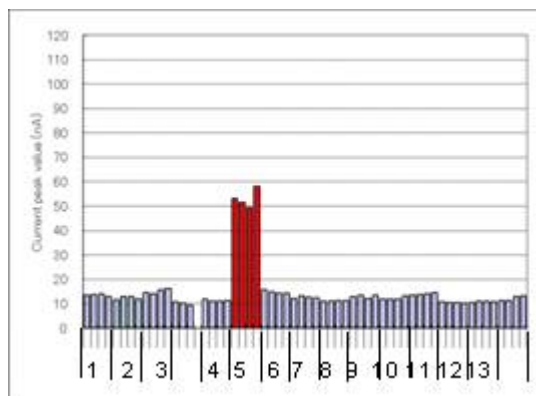


図9 毒素産生性コレラ菌接種糞便抽出DNA(2.06×10^4 CFU)のDNAチップ解析結果(図中の数字はプローブの番号を示す)

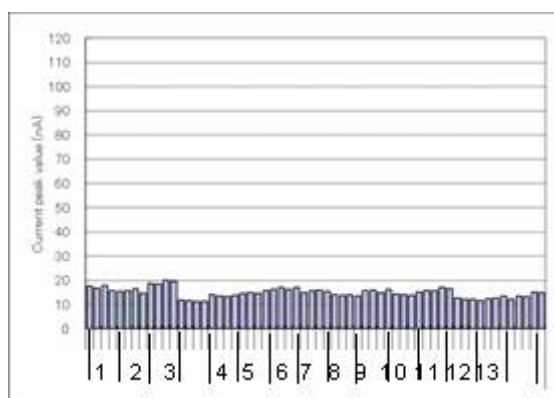


図10 毒素産生性コレラ菌未接種糞便抽出DNAのDNAチップ解析結果(図中の数字はプローブの番号を示す)

(1)-3 結果:

(1)-3-1 各生物剤のLAMPプライマーの設計および特異性検討(シングルLAMP)

牧野グループでは12生物剤(14ターゲット)の特異的検出用プライマーを設計し、いずれもシングルLAMPでは63℃ 40分間の恒温反応で検出感度は一反応あたりDNA 10 pg以下(菌数に換算して 10^3 以下)でかつ特異性の高いプライマーの設計に成功した。

(1)-3-2 マルチプレックスLAMPの組み合わせの選定

カテゴリーB・Cに属する10生物剤(12ターゲット)のマルチプレックスLAMPで、交差反応が無く、特異的検出可能なプライマーの組み合わせを検討したところ、表1に示す3組の組み合わせで63℃ 40分間の恒温反応で表1に示す検出感度で増幅可能であった。一部のターゲットについてはマルチプレックス化により反応時間の増加、および検出感度の低下が見られたが、これについては引き続き検出感を向上させるべく検討を続けている。

(1)-3-3 マルチプレックスLAMP産物のDNAチップ解析結果

LAMP増幅産物をDNA自動検査装置GenelyzerTM を使用してDNAチップによる解析を行ったところ、図2-1～3に示すとおり、それぞれのターゲットの検出用プローブの乗った電極で高いシグナルが得られた。このことからマルチプレックスLAMPで増幅したサンプルでも、個別に正しく検出可能であることが確認できた。

(1)-3-4 ブルセラ菌汚染ヨーグルトからの検出

人工的にブルセラ菌を接種したブルセラ菌汚染ヨーグルトから抽出したDNAでは、63℃ 40 分間の恒温反応で、1 反応あたり 1.73×10^2 CFUからの増幅が可能であった(図4)。このLAMP産物をDNAチップに当てて評価したところ、ブルセラ菌検出用プローブが乗った電極で高いシグナルが得られた(図5)。一方ブルセラ菌未接種ヨーグルトから抽出したDNAではLAMP反応での増幅は見られず(図4、non-contaminated)、さらにこのLAMP産物をチップに当ててもシグナルの増加は見られなかった(図6)。ヨーグルト中には多数の乳酸菌などが含まれているが、本方法ではブルセラ菌未接種のヨーグルトから抽出したDNAではLAMP反応でも、DNAチップを用いた検証でも交差は見られず、極めて高い特異性を持つことが確認された。PCRの場合、乳製品は製品中に含まれる多量のタンパク質、脂肪分、ミネラル類によって反応が阻害されることが報告されている。しかしながら本研究のLAMP法を用いた場合反応阻害はなく、増菌培養無しで 1 反応あたり 1.73×10^2 CFUからの増幅が可能であった。このことから本方法は、少量の菌の環境汚染の検出にも有用であることが示唆された。

(1)-3-5 毒素産生性コレラ菌接種糞便からの検出

人工的に毒素産生性コレラ菌を接種した糞便から抽出したDNAでは、63℃ 40 分間の恒温反応で、1 反応あたり 2.06×10^1 CFUからの増幅が可能であった(図8)。このLAMP産物をDNAチップに当てて評価したところ、毒素産生性コレラ菌検出用プローブが乗った電極で高いシグナルが得られた(図9)。一方毒素産生性コレラ菌未接種糞便から抽出したDNAではLAMP反応での増幅は見られず(図8、non-contaminated)、さらにこのLAMP産物をチップに当ててもシグナルの増加は見られなかった(図10)。糞便中には様々な腸内細菌が含まれているが、本方法では毒素産生性コレラ菌未接種の糞便から抽出したDNAではLAMP反応でも、DNAチップを用いた検証でも交差は見られず、極めて高い特異性を持つことが確認された。本研究のLAMP法では、増菌培養を行わなくても、1 反応あたり 2.06×10^1 CFUからの検出が可能であったことから、非常に迅速かつ高感度に毒素産生性コレラ菌の検出ができた。このことから本方法はコレラの迅速診断だけでなく、少量の菌の環境汚染の検出にも有用であることが示唆された。

今回応用例としてブルセラ菌汚染ヨーグルトからの検出例と、毒素産生性コレラ菌接種糞便からの検出例を示したが、この2つの検出例が示すように、今回開発した DNA チップは少量の菌の環境汚染の検出や、医療現場での応用も期待でき、今後さらに実証試験を重ね、製品化に繋げて行きたい。

(2)研究成果の今後期待される効果

全体的には、危険感染症に対する迅速な対処法が整い、警察などの現場での応用が期待できるが、個々の感染症の診断や検出系が整い、医療現場での応用も期待できる。

3. 3 生物剤検知用 DNA チップおよびモバイル型生物剤自動検知システムの研究 (株式会社東芝 研究開発センター 橋本デバイス開発グループ)

(1)研究実施内容及び成果

(1)-1 目的:

バイオテロが発生した場合、使われた生物剤の種類によってその後の対応が大きく異なることから、複数の病原体を迅速に同時検出するシステムが求められている。そこで、炭疽菌、天然痘ウイルス、ブルセラ、ボツリヌス菌など、米国疾病管理センター(CDC)が生物剤として用いられる可能性のある病原体として指定する微生物・ウイルスを対象にして、それらを同時検出できるような DNA チップの開発を行う。

また、バイオテロ発生の検知、適切な防護・治療・除染対策、感染源・感染経路の特定、犯罪の立証などを迅速に行うためには、対象物発見現場での迅速検査が求められる。現場での検査を実現するためには、機器の小型軽量化、安全の確保の為に自動化が欠かせない。そこで、上記 DNA チップを使用したモバイル型の生物剤自動検知システムを開発する。

(1)-2 方法:

(1)-2-1 生物剤検知用 DNA チップの開発

当グループでは、安田研究代表グループと牧野細菌感染グループが選択した生物剤を検知するためのDNAチップを開発した。DNAチップには、操作性に優れ、システムの小型化や自動化に有利な電流検出型DNAチップ*を採用し、前述の研究グループから入手したLAMP増幅産物にあわせプローブ配列をデザインした。プローブ配列デザインには塩基配列組成や、プローブ捕捉領域の立体構造、Tm値/Dimer形成/ヘアピン構造を取るリスクなどを考慮した形で実施し、複数のプローブ配列候補を設計・合成した。それらの候補をDNAチップ上に固定化後カセットに組み込み、DNA自動検査装置Genelyzer™を用いて感度・特異性・安定性の観点から特性の優れたプローブの選定すると共に、測定条件の最適化を行った。最後に、実検体からの増幅産物を利用して実用性の評価を行った。

* 当研究グループが開発した電気化学的な DNA 検出技術を利用している。電気化学的な DNA 検出技術は、1本鎖 DNA プローブを固定化した電極基板と、2 本鎖 DNA(プローブ DNA とターゲット DNA とのハイブリッド)に特異的に結合する電気化学的に活性な核酸挿入剤を用いて特定の DNA 配列の有無を検出するもので、蛍光検出型 DNA チップで必要なターゲットの蛍光標識や光学検出器が不要などのメリットがある。

(1)-2-2 全自動検知システムの開発

全自動検知システムについては、電流検出型 DNA チップと各種試薬を内蔵した密閉型カセットと、カセットを制御するための全自動 DNA 検査装置を開発した。

(1)-2-3 全自動検知システムを用いた生物剤検知の実証試験

試作した DNA チップ内蔵密閉型カセットと全自動 DNA 検査装置を、安田研究代表グループの施設に設置し、実検体を使った実用性評価試験を実施した。

なお、プロジェクト終了後には本システムの製品化を計画しているが、システムの特異性を鑑みると、本研究開発で得られた成果の詳細を開示することは必ずしも得策ではないと判断し、ここでは生物剤名を伏せるなどで対応することにした。

(1)-3 結果:

(1)-3-1 生物剤検知用 DNA チップの開発

CDCがバイオテロに使われる可能性の高い生物剤に指定する 19 種類を検知するDNAチップを開発した。DNAチップは実際の使用に際して状況に応じて利用できるようにカテゴリーAの生物剤用、RNAウイルス用、食中毒原因菌用など生物剤をグループ分けし、グループごとにカセットを作成した。グループ分けすることにより消耗品であるカセットのコストも大幅に抑えることができる。開発したDNAチップの感度は対象とする生物剤によって若干異なるが、ゲノム量で概ね 1pg~100pg (菌数換算で $10^3 \sim 10^5$ 個)であった。また、近縁種に対する反応性を評価したところ、交差反応もなく特異性は良好であった。

ここでは、炭疽菌検出用 DNA チップを例に検討結果を示す。炭疽菌の場合は、病原性に関連する遺伝子として2種類のプラスミド(pXO1とpXO2)が知られている。そこで、この2種類のプラスミドと炭疽菌のゲノムDNA上の特異的な配列を検出するプローブを設計した。まず、3種類のターゲット配列を含むPCR断片を擬似検体としてLAMP増幅とDNAチップによる電流検出を行った(図1)。増幅の指標である濁度の立ち上がり時間は21~24分であり、どのターゲットにおいても効率よく増幅できることが分かった。また、同一ターゲット内では再現性も非常に良好であった。この増幅産物をDNAチップに反応させてところ、ターゲットに特異的なプローブのみで電流値が増加しており、特異的な検出が可能であることが示された。

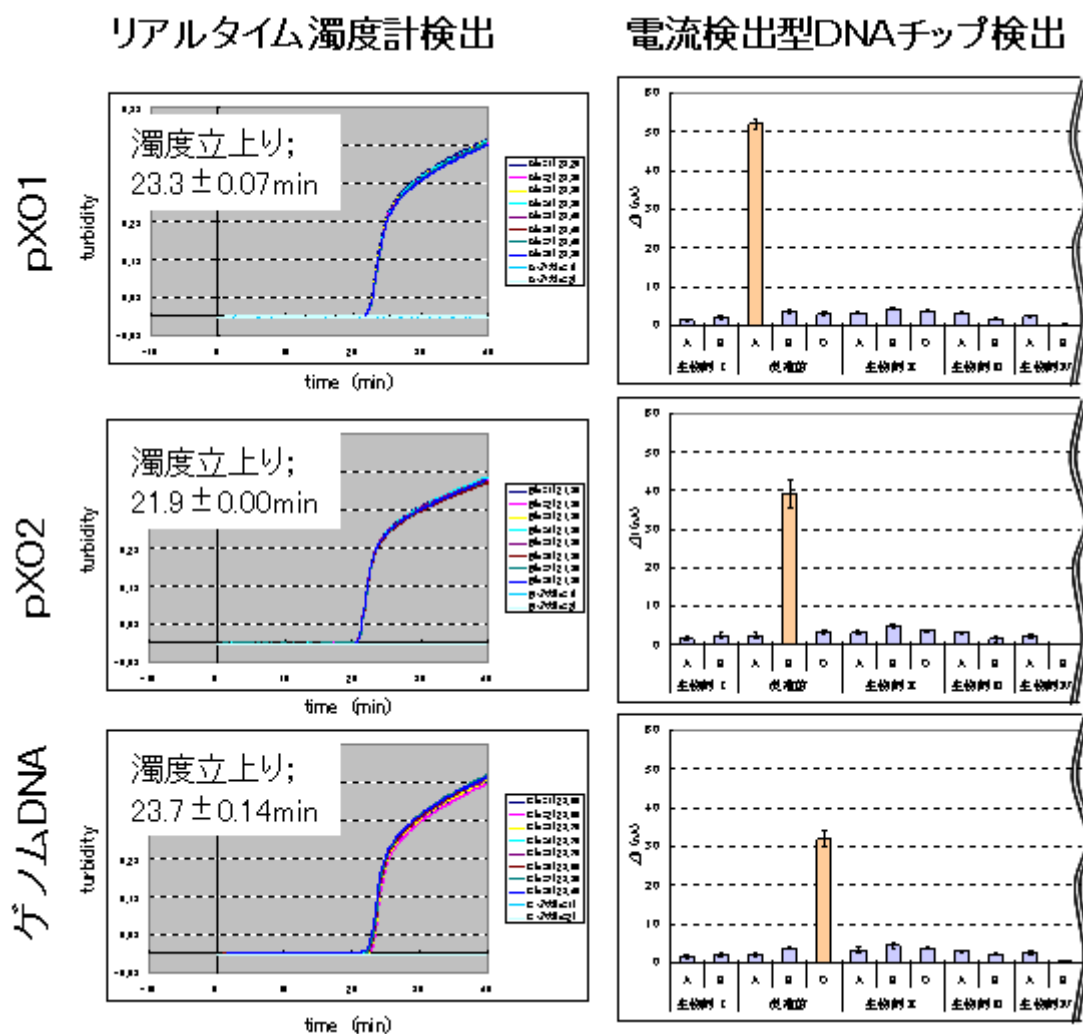


図1 生物剤検知結果の一例(炭疽菌を例に)

続いて実際に実検体を用いた特異性評価の検討を行った。表1に示した炭疽菌の6種類の株を用いてLAMP増幅からDNAチップ検出の一連の操作を行った結果、それぞれの株が保有する遺伝子に一致した信号が得られた。また、他のBacillus属に対する反応性の評価を行った結果、交差反応は一切見られなかった。以上の結果より、開発したLAMP増幅とDNAチップの検出系は、実検体に対しても特異的な検出が可能であることが示された(表2)。

表1 炭疽菌用 DNA チップ検出結果の一例(株特異性試験)

種	株	プラスミド		Genelyzer™		
		pXO1	pXO2	ターゲットA (pXO1)	ターゲットB (pXO2)	ターゲットC (ゲノムDNA)
<i>B. anthracis</i>	PasteurII No.30	+	+	+	+	+
	PasteurII No.36	-	-	-	-	+
	PasteurII No.34	-	+	-	+	+
	Davis	-	+	-	+	+
	Morioka	-	+	-	+	+
	P-I	+	+	+	+	+

表2 炭疽菌用 DNA チップの交差反応性試験に用いた菌種

種	代表株	株数	12種23株
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC4342	8	
<i>Bacillus thuringiensis</i>	NBRC3951	4	
<i>Bacillus mycoides</i>	HSCC395	2	
<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	HSCC1480	1	
<i>Bacillus badium</i>	11059T	1	
<i>Bacillus circulans</i>	NBRC13626	1	
<i>Bacillus firmus</i>	12464T	1	
<i>Bacillus licheniformis</i>	13417T	1	
<i>Bacillus megaterium</i>	NBRC15308	1	
<i>Bacillus pumilus</i>	NBRC12092	1	
<i>Bacillus sphaericus</i>	13420T	1	
<i>Bacillus subtilis</i>	NBRC3134	1	

続いて検出感度の評価を行った(図2)。感度はターゲットにより若干異なるが、炭疽菌検出チップの場合は、概ね1~10pgであった。また、同一検体を用いて既存法と検出感度の比較を行った

結果、免疫ストリップ法に比べると2～3桁、リアルタイムPCR法に比べても同等以上であることが示された(表3)。

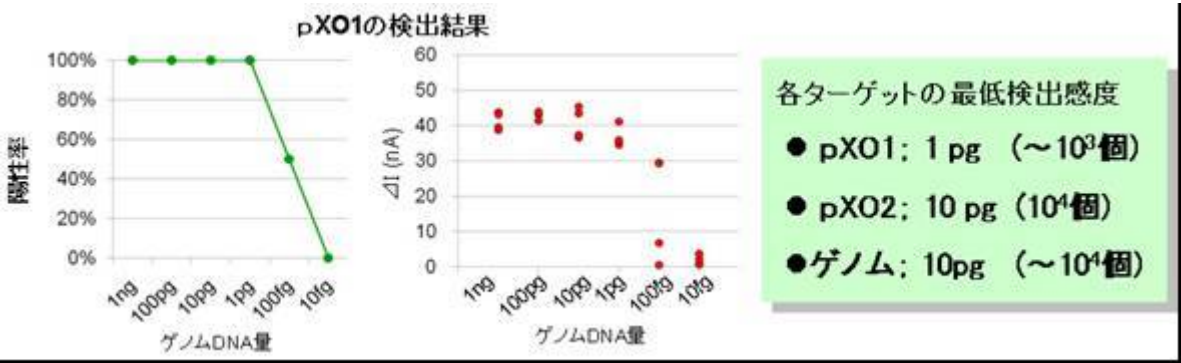


図2 炭疽菌用 DNA チップ検出結果の一例(感度試験)

表3 従来法との炭疽菌検出感度の比較

システム名	原理	ターゲット	最小検出量 (1テストあたり)
BTA [®] Test strip	免疫ストリップ法	－	10 ⁶ cfu
R.A.P.I.D. [®]	リアルタイムPCR法	pXO1	10pg (10 ⁴ cfu eq.)
Genelyzer [™]	電流検出型DNAチップ	pXO1	1pg
		pXO2	10pg
		染色体	10pg

(1)-3-2 全自動検知システムの開発

全自動検出カセットの構成

図1に全自動検出に用いるカセットを示した(W75xH60xD9mm)。試料や試薬の保持、反応を行うチャンバ、チャンバ間を接続する流路が形成されたプラスチック板を両面からゴムシートで挟み込む構造になっており、電流検出型 DNA チップもカセット内に内蔵されている。

(1)-3-2 全自動検知システムの開発

全自動検出カセットの構成

図3に全自動検出に用いるカセットを示した(W75xH60xD9mm)。試料や試薬の保持、反応を行うチャンバ、チャンバ間を接続する流路が形成されたプラスチック板を両面からゴムシートで挟み込む構造になっており、電流検出型 DNA チップもカセット内に内蔵されている。

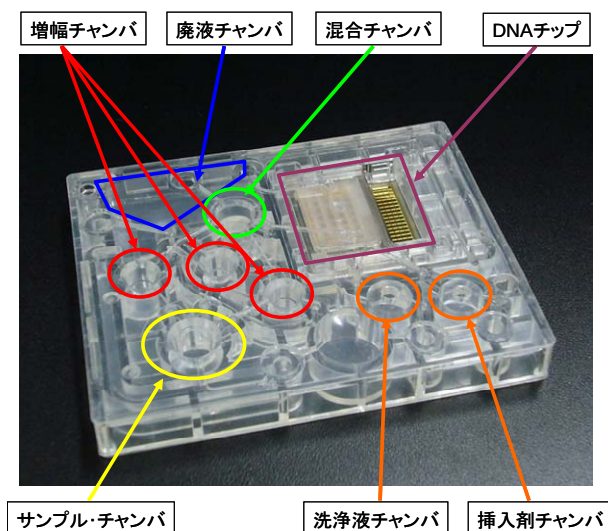


図3 試作した全自動検出カセット

チャンバは、サンプル・チャンバ、3つの増幅チャンバ、別々に増幅された試料を混合する混合チャンバ、DNAチップ上の不要な試料を洗浄するための試薬を保持しておく洗浄液チャンバ、挿入剤を保持しておく挿入剤*チャンバ及び試料や試薬の廃液を貯蔵するための廃液チャンバから構成されている。チャンバ及び流路はカセット内で環状流路構造を形成しており、外部とは完全に遮断された完全密閉構造となっている。

* 電流検出型 DNA チップで使用し、電気信号の源となる物質。

全自動検査装置の構成

図4試作した全自動検査装置を示した (W252xH425xD506mm、約 20kg)。装置本体は、コンピュータと Ethernet ケーブルで接続されており、コンピュータによって制御されている。前述したカセット内の液体の送液は、装置内のカムに接続されたプッシャを駆動することで実現している。サンプル・チャンバ及び増幅チャンバ位置に相当するプッシャにはヒーターが内蔵されており、同時に加熱制御できるようになっている。また、DNA チップ部分の温度制御は、ペルティエ素子ユニットにより精密な温度制御を行っている。DNA チップの電気化学信号は、チップ基板上に形成された電極パッドに電気コネクタを接触させ、装置に内蔵しているポテンシオスタット回路を用いて、挿入剤からの電気化学信号を取得している。

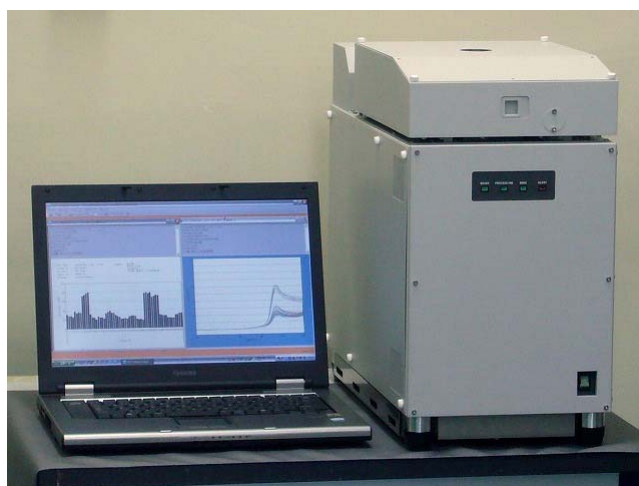


図4 試作した全自動検査装置

図5には全自動検査を行うためのコンピュータ操作画面のイメージを示した。Cassette Type 欄において、予め登録してあるカセット種類の中から、検査を実行しようとしているカセット種類を選択する。Cassette Type には、使用する DNA チップの電極配置情報、各電極に固定化されているプローブ情報、全自動処理の動作条件、シーケンスシートとの対応情報、電流検出条件、信号処理パラメータ、型判定条件設定パラメータ等の情報が、すべて.mdb (Microsoft Access Database)形式ファイルとして対応付けられている。適切な Cassette Type (前述の 3 グループ)を選択すれば、Sequence 欄には、対応する動作シーケンスが表示され、主な全自動動作条件は、Test Condition 欄に表示される。Sample ID 欄には、検査を行う試料の識別記号を入力する。あとは、全自動検出カセットを装置本体にセットし Start ボタンを押せば、検査結果表示まで全自動で処理は行われる。

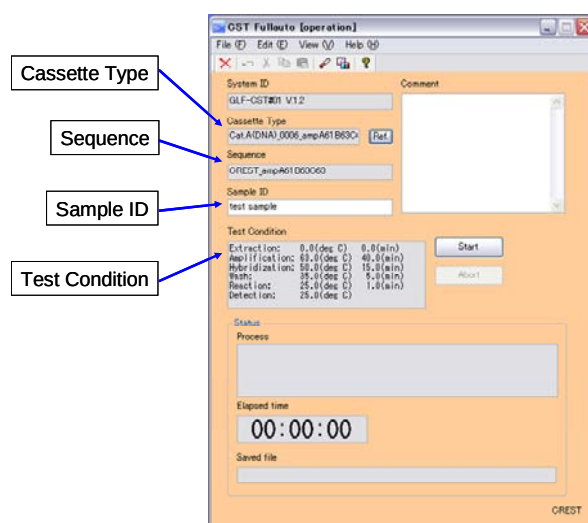


図5 コンピュータ操作画面

全自動での操作手順(検査プロセス)

全自動動作の手順に従って操作の概略を示す(図6)。まず、粗抽出済み液体試料をサンプル・チャンバに投入後、投入口をシールし装置にセットする。全自動検査をスタートさせると、カセット内で試料が3つの増幅チャンバに等量ずつ分配される。次に、各増幅チャンバをヒーター内蔵プッシャで密閉した上で加熱することによりDNA(RNA)を増幅する。増幅には等温増幅法である LAMP 増幅法を採用し、増幅時間は 40 分に設定した。増幅後の試料は混合チャンバで混合後、DNA チップ上に移動させハイブリダイゼーション反応を行う。次に、洗浄液チャンバから供給された洗浄液で非特異吸着を除去した後挿入剤が供給され、電気化学測定を行う。今回検査時間は 85 分に設定した(増幅 40 分を含む)。

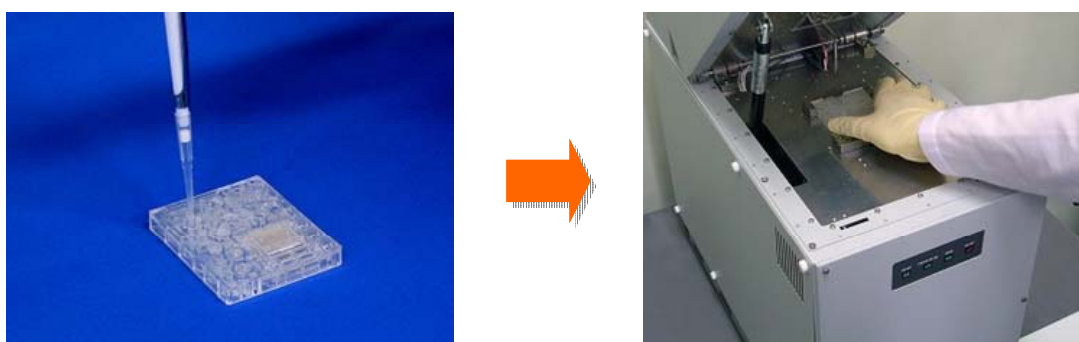
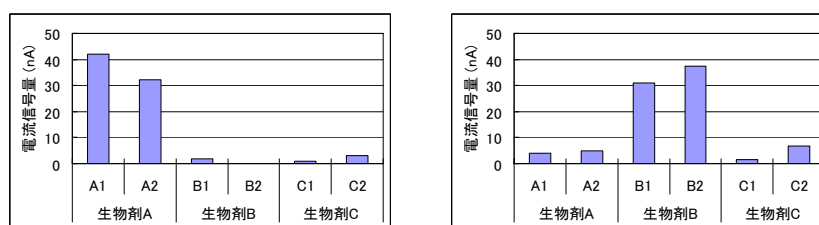


図6 全自動での操作手順

(1)-3-2 全自動検知システムを用いた生物剤検知の実証試験

カテゴリーA に分類されている生物剤の全自動検出結果のうち、2 種(生物剤 A、生物剤 B とする)の検出結果の一例を示す(図7)。対象により最適な増幅温度が異なることから、3 つの増幅チャンバの内 1 つは 61℃、他の 2 つは 63℃に設定し実験を行った結果、それぞれの生物剤に対応した電極からのみ電流値が増加しており、全自動システムを使った特異的な検出が確認できた。



a) 生物剤A検出信号

b) 生物剤B検出信号

図7 生物剤A及び生物剤Bの検出能評価結果

図8には、生物剤 A に関して、異なる 2 種類の株 (Aa 株と Ab 株とする) の株特異性の評価を行った結果の一例を示す。生物剤 A の Aa 株と Ab 株は、危険性の観点で識別できることが好ましい。生物剤 A 検出用として遺伝子 A1 検出用プローブと遺伝子 A2 検出用プローブをデザインし、それぞれの生物剤株を検出した結果、A1 と A2 を有する Aa 株と A2 のみを有する Ab 株とで異なる検出パターンで識別できた。

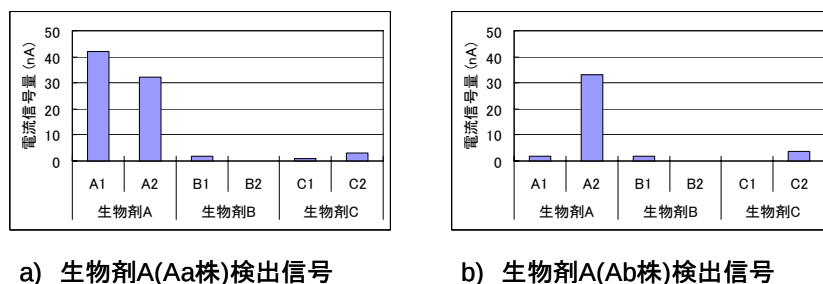


図8 生物剤 A の株特異性評価結果

図9には、生物剤 A に関する交差反応性評価結果の一例を示す。生物剤 A が属している「属」において、危険性がない他の「種」の生物種は検出されないことが好ましい。そこで、生物剤 A の 2 種の近縁種 (近縁種 1、近縁種 2 とする) について検出を行ったところ、いずれも信号が検出されず、明確に識別できることを確認した。以上から、生物剤 A について、1) 生物剤 A が存在する場合には、検出できるという検出能を確認、2) 生物剤 A の株の識別も可能であり、株特異性が得られることを確認、3) 近縁種は明確に識別でき、交差反応がないことを確認した。

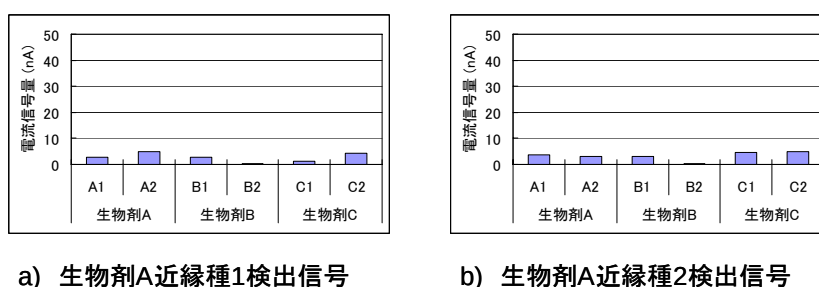
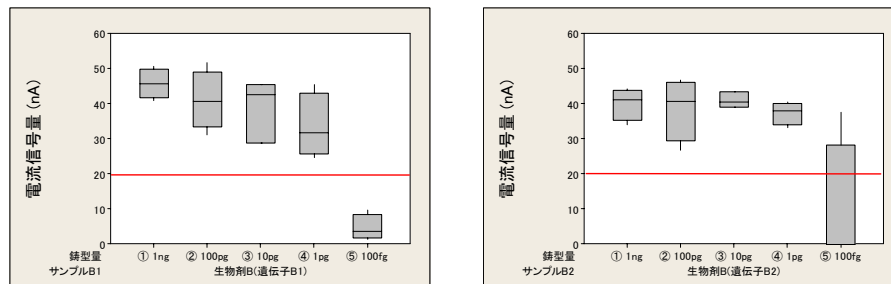


図9 生物剤 A の交差反応性評価結果

図10には、別の生物剤 B に関して感度評価を行った結果を示す (箱ひげ図)。カセットに投入する鋳型量を希釈していき、どこまで検出できるかを実験した。生物剤 B については、遺伝子 B1 検出用プローブと遺伝子 B2 検出用プローブの 2 種類の電極を設定しているので、それぞれに対して、感度評価を行っている。存在の有無を判別する閾値 (電流信号量) を仮に 20 nA に設定すると、遺伝子 B1、遺伝子 B2 の何れについても、いずれも、1 pg

(/200 μ l)の鋳型量まで検出が可能であった。



a) 遺伝子B1の検出感度

b) 遺伝子B2の検出感度

図10 生物剤 B の感度評価結果

図11には、RNAウイルス(生物剤D(RNA)とする)を全自動検出した結果の一例を示す(鋳型量は 10^6 copies(/200 μ l))。カセット内の増幅試薬にRNAからDNAへの逆転写酵素を添加し実験を行った結果、RNAウイルスであっても全自動検出できることを確認した。

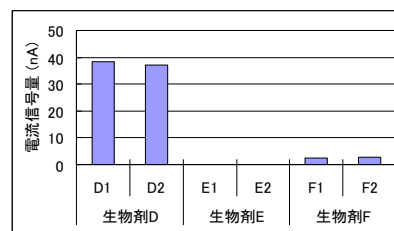


図11 生物剤 D の検出結果

(1)-4 まとめ

19種類の生物剤を検知するためのDNAチップとモバイル型全自動検査システムを開発し、実検体を用いた実証試験で実用性を検証した。3年間のプロジェクトでは、当初予定していた計画を概ね達成することができたと考えている。今後の実装に向けては、操作性や信頼性などの向上を図り、早期製品化に繋げて行きたい。

(2)研究成果の今後期待される効果

今後期待される効果としては以下を考えている。

- ・本システムの実装により、バイオテロの迅速検知が実現し、テロによる被害を大幅に低減することができる。
- ・生物剤検知に関する技術力をアピールすることで、テロ抑止力としての効果が期待できる。
- ・開発したシステムは医療診断(例えば、新興・再興感染症検査など)や食品検査などへの応用も可能であり、新たな産業の創出や経済の活性化への寄与も期待できる。

§ 4 研究参加者

①「安田研究代表グループ（多項目生物剤検知法の開発と実証実験）」

	氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
○	安田 二郎	科学警察研究所	室長	研究全般の総括	H17.10～H20.9
	黒崎 陽平	科学警察研究所	研究員	増幅反応系の開発と核酸抽出法の検討	H17.10～H20.9
	藤浪 良仁	科学警察研究所	研究員	生物剤の調製	H17.10～H20.9
*	佐久間 稔恵	科学警察研究所	非常勤職員	増幅反応条件の検討と実証実験	H17.10～H20.9
*	福間 藍子	科学警察研究所	非常勤職員	増幅反応条件の検討とプローブ探索	H17.10～H20.9
*	櫻井 陽	科学警察研究所	非常勤職員	DNA チップの反応特異性の検討	H19. 5～H20.3
*	砂川 美佐緒	科学警察研究所	非常勤職員	全自動カセットの実証実験	H20. 4～H20.9
	浦田 秀造	北海道大学	大学院生	DNA チップの反応特異性の検討	H17.10～H20.3

②牧野細菌感染グループ（危険細菌性感染症の検出システムの構築）

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	牧野 壮一	帯広畜産大学 大動物特殊疾病研究センター・食品有害微生物分野	教授	危険細菌感染症の検出プローブの作成	H17.10～H20.9
	川本 恵子	帯広畜産大学 大動物特殊疾病研究センター・食品有害微生物分野	准教授	反応条件の適正化	H17.10～H20.9
*	大槻 隆司	帯広畜産大学 大動物特殊疾病研究センター・食品有害微生物分野	研究員	検出系の検証と応用、および 検出系に応用可能な新たな病原因子の検索	H17.10～H20.9

		物分野			
--	--	-----	--	--	--

③「橋本デバイス開発」グループ（生物剤検知用DNAチップおよびモバイル型生物剤自動検知システムの研究）

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	橋本 幸二	（株）東芝 研究開発センター	グループ長	DNA チップおよび全自動装置の開発全般	H17.10～H20.9
	源間 信弘	同上	技監	DNA チップおよび全自動装置の開発全般	H17.10～H18.3
	橋本 みちえ	同上	参事	DNA チップの開発	H18.4～H18.9
	本郷 禎人	同上	参事	全自動装置の開発	H17.10～H20.9 ⁽¹⁾
	伊藤 桂子	同上	主務	DNA チップの開発	H17.10～H18.3
	堀内 秀紀	同上	主務	DNA チップの開発	H17.10～H20.9
	小久保 高弘	同上	主務	全自動装置の開発	H17.10～H20.9
	岡田 純	同上	主務	全自動装置の開発・評価	H17.10～H20.9
*	大村 美由紀	同上	派遣社員	DNA チップの開発・評価	H17.10～H20.9 (H17.10～H19.3) ⁽²⁾
*	原田 真帆	同上	派遣社員	全自動装置の評価	H19.4～H20.9

(1) 中断時期有

(2) CREST 雇用期間

§ 5 招聘した研究者等

氏 名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間

§ 6 成果発表等

(1)原著論文発表（国内(和文)誌 0件、国際（欧文）誌 9件）

1. Urata, S., Noda, T., Kawaoka, Y., Yokosawa, H., and Yasuda, J.: Cellular factors required for Lassa virus budding. Journal of Virology, **80**, 4191-4195, 2006.
2. Kurosaki, Y., Takada, A., Ebihara, H., Grolla, A., Kamo, N., Feldmann, H., Kawaoka, Y., and Yasuda, J.: Rapid and Simple Detection of Ebola Virus by Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification. Journal of Virological Methods, **141**, 78-83, 2007.

3. Kikkawa, H., Fujinami, Y., Suzuki, S., and Yasuda, J.: Identification of the amino acid residues critical for specific binding of the bacteriolytic enzyme of γ -phage, PlyG, to *Bacillus anthracis*. *B.B.R.C.*, **363**, 531-535, 2007.
4. Urata, S., Yokosawa, H., and Yasuda, J.: Regulation of HTLV-1 Gag budding by Vps4A, Vps4B, and AIP1/Alix. *Virology Journal*, **4**, 66 (1-5), 2007.
5. Urata, S., Noda, T., Kawaoka, Y., Morikawa, S., Yokosawa, H., and Yasuda, J.: Interaction of Tsg101 with Marburg virus VP40 depends on the PPPY motif, but not the PT/SAP motif as in the case of Ebola virus, and Tsg101 plays a critical role in the budding of Marburg virus-like particles induced by VP40, NP, and GP. *Journal of Virology*, **81**, 4895-4899, 2007.
6. Fujinami, Y., Hirai, Y., Sakai, I., Yoshino, M., and Yasuda, J.: Sensitive detection of *Bacillus anthracis* using a binding protein originating from γ -phage. *Microbiology and Immunology*, **51**, 163-169, 2007.
7. Ohtsuki R, Kawamoto K, Kato Y, Shah MM, Ezaki T, Makino S-I. Rapid detection of *Brucella* spp. by the loop-mediated isothermal amplification method. *J Appl Microbiol. Journal of Applied Microbiology*, **104**, 1815-1823, 2008.
8. Kikkawa, S. H., Ueda, T., Suzuki, S., and Yasuda, J.: Characterization of the catalytic activity of the γ -phage lysin, PlyG, specific for *Bacillus anthracis*. *FEMS Microbiology Letters*, **286**, 236-240, 2008.
9. Sakuma, T., Kurosaki, Y., Fujinami, Y., Takizawa, T., and Yasuda, J.: Rapid and simple detection of *Clostridium botulinum* types A and B by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Applied Microbiology*, in press.

その他 投稿中論文 4 件

(2)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 招待講演 (国内会議12件、国際会議 2件)

- 1、安田二郎 (科学警察研究所): 生物剤の検知技術、外務省&JICA「生物テロの事前対処及び危機管理セミナー」 柏、2006 年 7 月 13 日。
- 2、安田二郎 (科学警察研究所): 生物剤の分析・同定と現場検知について、内閣官房安全保障・危機管理勉強会、内閣官房、2006 年 11 月 8 日。
- 3、安田二郎 (科学警察研究所): 「バイオテロ対策: 生物剤現場検知システムの開発」産業技術研究所第 3 回計測フロンティアシンポジウム「安全な社会・安心な生活を確保するための計測・分析・評価技術の開発」つくば国際会議場、2007 年 1 月 23 日。
- 4、安田二郎 (科学警察研究所): バイオテロと生物剤検知、警察政策学会テロ・安保問題研究部会セミナー、グランドアーク半蔵門、2007 年 3 月 19 日。
- 5、安田二郎 (科学警察研究所): 「新興・再興感染症とバイオテロ」第 54 回日本実験動物学会総会シンポジウム「実験動物学と新興・再興感染症研究」、東京、2007 年 5 月 24 日。
- 6、安田二郎 (科学警察研究所): バイオテロ研究の現状、防衛省第 10 回生物兵器対処セミナー、東京、2007 年 8 月 2 日。
- 7、安田二郎 (科学警察研究所): 2007 年日米バイオディフェンス研究シンポジウム報告会「バイオテロ対策強化のための課題領域」、東京、2007 年 9 月 19 日。
- 8、安田二郎 (科学警察研究所): 生物剤の検知と異同識別、第 13 回日本法科学技術学会シンポジウム「CBRN テロに対する法科学技術」、東京、2007 年 11 月 9 日。
- 9、安田二郎 (科学警察研究所): バイオテロ対策の現状、日本薬学会北陸支部第 117 回例会特別講演会、金沢、2007 年 11 月 11 日。
- 10、安田二郎 (科学警察研究所): バイオテロ・犯罪捜査における問題点、第 2

回バイオセキュリティワークショップ「バイオテロリズム対策とバイオディフェンス研究開発上の課題」、東京、2007年12月19-20日。

- 1 1、安田二郎（科学警察研究所）：生物剤検知、第3回バイオセキュリティワークショップ「研究開発振興がバイオテロ抑止に果たす役割」、東京、2008年1月18日。
- 1 2、安田二郎（科学警察研究所）：Research activity of NRIPS on countermeasures against bioterrorism、JST「FBI との WMD テロ・犯罪対策専門家会合」、東京、2008年3月5日。
- 1 3、Yasuda, J.（科学警察研究所）：Filovirus Infections Other Viral Fevers, 1st U.S.-Japan Medical Biodefense Research & Bioterrorism Symposium, Arlington, VA, June 11-13, 2007.
- 1 4、Yasuda, J.（科学警察研究所）：Molecular aspects of filovirus and arenavirus budding, 41st Annual Meeting of the US-Japan cooperative medical science program, Baltimore, MD, July 24-25, 2007

② 口頭発表（国内会議14件、国際会議 0件）

- 1、黒崎陽平、河岡義裕、安田二郎（科学警察研究所）：RT-LAMP 法によるエボラウイルスの迅速簡便検知、第 53 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2005 年 11 月。
- 2、安田二郎、河岡義裕、喜田宏、浦田秀造（科学警察研究所）：レトロウイルスとインフルエンザウイルスの出芽機構、第 53 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2005 年 11 月。
- 3、藤浪良仁、平井義一、黒崎陽平、吉川ひとみ、安田二郎（科学警察研究所）：γ phage 由来炭疽菌特異的結合タンパク質を高感度炭疽菌検出法、第 79 回日本細菌学会総会、金沢、2006 年 3 月。
- 4、黒崎陽平、藤浪良仁、安田二郎（科学警察研究所）：LAMP 法を用いた炭疽菌の迅速簡便検知、第 79 回日本細菌学会総会、金沢、2006 年 3 月。
- 5、藤浪良仁、安田二郎（科学警察研究所）：レジオネラ菌の同定と定量に関する研究、第 12 回日本法科学技術学会学術集会、東京、2006 年 11 月。
- 6、吉川ひとみ、杉田律子、藤浪良仁、安田二郎、鈴木真一（科学警察研究所）：微生物による土砂試料の法科学的分析、第 12 回日本法科学技術学会学術集会、東京、2006 年 11 月。
- 7、黒崎陽平、安田二郎（科学警察研究所）：マールブルグウイルスの迅速遺伝子検出法の開発、第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007 年 10 月。
- 8、浦田秀造、横沢英良、安田二郎（科学警察研究所）：マールブルグウイルス粒子形成の解析、第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007 年 10 月。
- 9、安田二郎、浦田秀造（科学警察研究所）：ウイルス出芽と細胞内膜輸送系、第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会（BMB2007）ワークショップ「膜輸送をめぐるユビキチン機能の新展開」、横浜、2007 年 12 月。
- 1 0、佐久間稔恵、黒崎陽平、藤浪良仁、安田二郎（科学警察研究所）：食品中からのボツリヌス菌簡易検出法の開発、第 81 回日本細菌学会総会、京都、2008 年 3 月 24-26 日。
- 1 1、藤浪良仁、黒崎陽平、安田二郎（科学警察研究所）：MALDI-TOF-MS を用いた病原細菌の迅速異同識別、第 81 回日本細菌学会総会、京都、2008 年 3 月 24-26 日。
- 1 2、大槻隆司・牧野壮一（帯広畜産大学）：LAMP 法を用いたコレラ菌の迅速検出法、第 81 回日本細菌学会総会、京都、2008 年 3 月 24-26 日。
- 1 3、堀内秀紀¹、黒崎陽平²、大槻隆司³、佐久間稔恵²、藤浪良仁²、橋本幸二¹、川本恵子³、牧野壮一³、安田二郎²（東芝¹、科学警察研究所²、帯広畜産大学³）、

DNAチップを用いた生物剤検知システムの開発、第81回日本細菌学会総会、京都、2008年3月24-26日。

- 14、岡田純¹、本郷禎人¹、橋本幸二¹、源間信弘¹、牧野壮一²、安田二郎³、(東芝¹、帯広畜産大学²、科学警察研究所³)、電流検出型DNAチップを用いた全自動検査システムの開発、第55回応用物理学関係連合講演会、東京、2008年3月27日。

③ ポスター発表 (国内会議13件、国際会議10件)

- 1、浦田秀造、河岡義裕、横沢英良、安田二郎 (科学警察研究所)：ラッサウイルスの出芽解析、第53回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2005年11月。
- 2、吉川ひとみ、藤浪良仁、鈴木真一、安田二郎 (科学警察研究所)： γ phage 由来 *Bacillus anthracis* 特異的結合蛋白質 PlyGB の解析、第28回日本分子生物学会年会、福岡、2005年12月。
- 3、浦田秀造、野田岳志、河岡義裕、森川茂、横沢英良、安田二郎 (科学警察研究所)：マールブルグウイルス VP40 によるウイルス様粒子形成の出芽解析、第54回日本ウイルス学会学術集会、名古屋、2006年11月。
- 4、黒崎陽平、藤浪良仁、牧野壮一、安田二郎 (科学警察研究所)：生体試料からの炭疽菌簡易検出法、第80回日本細菌学会総会、大阪、2007年3月27日。
- 5、大槻隆司・牧野壮一 (帯広畜産大学)：LAMP 法を用いたブルセラ属菌の迅速検出法、第80回日本細菌学会総会、大阪、平成19年3月27日。
- 6、安田二郎、浦田秀造 (科学警察研究所)：ウイルス出芽に関わるウイルス側エレメントと宿主因子、第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007年10月。
- 7、福岡藍子、黒崎陽平、安田二郎 (科学警察研究所)：RT-LAMP 法によるラッサウイルスの迅速簡易検出、第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007年10月。
- 8、浦田秀造、横沢英良、安田二郎 (科学警察研究所)：ユビキチンリガーゼによるマールブルグウイルス粒子形成の制御、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会 (BMB2007)、横浜、2007年12月。
- 9、吉川ひとみ、藤浪良仁、上田卓也、鈴木真一、安田二郎 (科学警察研究所)： γ phage 由来 *Bacillus anthracis* 細胞壁特異的溶解酵素 PlyG の解析、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会 (BMB2007)、横浜、2007年12月。
- 10、佐久間稔恵、黒崎陽平、藤浪良仁、安田二郎 (科学警察研究所)：食品中からのボツリヌス菌簡易検出法の開発、第81回日本細菌学会総会、京都、2008年3月24-26日。
- 11、藤浪良仁、黒崎陽平、安田二郎 (科学警察研究所)：MALDI-TOF-MS を用いた病原細菌の迅速異同識別、第81回日本細菌学会総会、京都、2008年3月24-26日。
- 12、大槻隆司・牧野壮一 (帯広畜産大学)：LAMP 法を用いたコレラ菌の迅速検出法、第81回日本細菌学会総会、京都、平成20年3月24-26日。
- 13、堀内秀紀¹、黒崎陽平²、大槻隆司³、佐久間稔恵²、藤浪良仁²、橋本幸二¹、川本恵子³、牧野壮一³、安田二郎² (東芝¹、科学警察研究所²、帯広畜産大学³)、DNAチップを用いた生物剤検知システムの開発、第81回日本細菌学会総会、京都、2008年3月24-26日
- 14、Urata, S., Noda, T., Kawaoka, Y., Yokosawa, H., and Yasuda, J. (科学警察研究所)：Lassa virus budding utilizes cellular MVB sorting pathway. In "The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress", Kyoto, June 18-23, 2006.
- 15、Urata, S., Noda, T., Morikawa, Y., Kawaoka, Y., and Yasuda, J. (科学警察研究所)：Analyses of Marburg virus budding. In "The XIIIth International

- Conference on Negative Strand Viruses”, Salamanca, Spain, June 17-22, 2006.
- 1 6、Kurosaki, Y., Takada, A., Ebihara, H., Feldmann, H., Kawaoka, Y., and Yasuda, J. (科学警察研究所) : Rapid detection of Ebola virus by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) method. In “The 25th Annual Meeting of American Society for Virology”, Madison, USA, July 15-19, 2006.
 - 1 7、Urata, S., Noda, T., Morikawa, Y., Kawaoka, Y., and Yasuda, J. (科学警察研究所) : Cellular and Viral Requirements for Marburg Virus Budding. In “2007 ASM Biodefense and Emerging Diseases Research Meeting”, Washington DC, USA, Feb 27-March 2, 2007.
 - 1 8、Urata, S., Yokosawa, H., and Yasuda, J. (科学警察研究所) : Cellular factors required for HTLV-1 budding. In “ Cold Spring Harbor Laboratory Retrovirus meeting”, New York, USA, May 22-27, 2007
 - 1 9、Urata, S., Noda, T., Kawaoka, Y., Morikawa, S., Yokosawa, H., and Yasuda, J. (科学警察研究所) : The interaction between Tsg101 and VP40 depending on PPPY is important for Marburg virus-like particle production. In “ The 26th Annual Meeting of American Society for Virology”, Oregon, USA, July 14-18, 2007
 - 2 0、Yasuda, J., and Urata, S. (科学警察研究所) : Analyses of Marburg virus budding. The 4th International Symposium on Filovirus; Filovirus Global Symposium, Libreville, Gabon, March 26-28, 2008.
 - 2 1、Kurosaki, Y., Grolla, A., Feldmann, H., and Yasuda, J. (科学警察研究所) : Rapid and simple detection for Marburg virus with the RT-LAMP method, The 4th International Symposium on Filovirus; Filovirus Global Symposium, Libreville, Gabon, March 26-28, 2008.
 - 2 2、Yasuda, J. (科学警察研究所) : Cellular and viral requirements for budding of Mason-Pfizer monkey virus, The 14th International Congress of Virology, Istanbul, Turkey, August 10-15, 2008.
 - 2 3、Kurosaki, Y., Sakuma, T., Fukuma, A., Fujinami, Y., Yasuda, J. (科学警察研究所) : Rapid identification for Bacillus anthracis by loop-mediated isothermal amplification. The 12th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, Istanbul, Turkey, August 5-9, 2008.

(3) プレス発表

発表効果、反響などを含め記述してください。

「DNA チップを用いた生物剤検知システムの開発」について、科学警察研究所、帯広畜産大学、東芝の 3 者でプレスリリースを実施(2008/3/17)。読売新聞、朝日新聞、毎日新聞、日経新聞など、主要な紙面に取り上げられた(掲載は 2008/3/18)。また、防衛省、農水省をはじめ関連機関からの問い合わせも多数受けた。

(4) 特許出願

①国内出願 (4件)

1. ≪発明の名称、発明者、出願人、出願日、出願番号≫
1. 発明の名称:核酸検出カセット及び核酸検出装置
 発明者:本郷禎人、小久保高弘、堀内秀紀、橋本幸二
 出願人:株式会社東芝
 出願日:2007/3/23
 出願番号:2007-77915
2. 発明の名称:核酸検出カセット及び核酸検出装置

発明者:本郷禎人、小久保高弘、堀内秀紀、橋本幸二、岡田純、
出願人:株式会社東芝
出願日:2008/3/19
出願番号:2008-70976

3. 発明の名称:核酸検出カセット及び核酸検出装置

発明者:本郷禎人
出願人:株式会社東芝
出願日:2008/9/22
出願番号:2008-242968

4. 発明の名称:核酸検出カセット

発明者:本郷禎人、岡田純、小久保高弘
出願人:株式会社東芝
出願日:2008/9/24
出願番号:2008-244744

②海外出願 (1件)

1. 発明の名称:核酸検出カセット

発明者:本郷禎人、小久保高弘、堀内秀紀、橋本幸二、岡田純、
出願人:株式会社東芝
出願日:2008/3/19
出願番号:PCT/JP2008/55134

(5)受賞等

①受賞・・・なし

②新聞報道

- 1、「エボラウイルス 1時間で簡単に検出」、日経産業新聞 2006年1月23日
- 2、「バイオテロ 20種 1時間で特定:小型検知システム開発」について、東京新聞(2007年6月21日夕刊1面及び10面)
- 3、「DNA チップを用いた生物剤検知システムの開発」について、読売新聞、朝日新聞、毎日新聞、日経新聞、北海道新聞、日経産業新聞、日刊工業新聞、ビジネスアイなど主要な紙面に取り上げられた(掲載は2008年3月18日)。

③その他・・・なし

(6)その他特記事項

- 1、安田二郎:全自動モバイル型生物剤センシングシステム、未来材料、11月号、pp58-62、エヌティーエス社、東京、2008年。
- 2、安田二郎:新興・再興感染症とバイオテロ、日本実験動物学会ニュース、pp8、研成社、東京、2007年5月10日発行。
- 3、国際ナノテクノロジー総合展・技術会議 nano tech 2008(東京ビッグサイト、2008/2/13-15)に出展。ショートプレゼンテーションを実施。
- 4、JSTシンポジウム CREST12-科学技術イノベーションを目指すCRESTの挑戦-、「バイオテロの迅速検知技術」(東京国際フォーラム、2008/5/27)に出展。
- 5、第7回国際バイオExpo2008(東京ビッグサイト、2008/7/2-3)に出展。ショートプレゼンテーションを実施。
- 6、第7回国際バイオフォーラム バイオ研究支援製品技術セミナー、電流検出型DNAチップ・遺伝子検査のプラットフォームを目指して、東京、2008年7月2日。

7、日経マイクロデバイス Tech-On セミナー、電流検出型 DNA チップ・遺伝子検査のプラットフォームを目指して、東京、2008 年 9 月 25 日。

§ 7 研究期間中の主な活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2007.5.7	チーム内ミーティング	東芝本社	10 名	開発進捗状況についての報告と今後の方針についての討論
2007.9.21	チーム内ミーティング	東芝ホクト電子本社(旭川)	12 名	チップ及びデバイス試作機工場視察。開発進捗状況についての報告と今後の方針についての討論
2007.11.6	チーム内ミーティング	東芝本社(東京)	10 名	開発進捗状況についての報告と今後の方針についての討論
2007.12.21	チーム内ミーティング	東芝ホクト電子本社(旭川)	12 名	チップ及びデバイス試作機工場視察。開発進捗状況についての報告と今後の方針についての討論
2008.2.6	チーム内ミーティング	東芝本社(東京)	10 名	開発進捗状況についての報告と今後の方針についての討論
2008.3.10	チーム内ミーティング	東芝本社	10 名	開発進捗状況についての報告と今後の方針についての討論
2008.4.15	チーム内ミーティング	東芝本社	10 名	開発進捗状況についての報告と今後の方針についての討論
2008.5.12	チーム内ミーティング	科学警察研究所	5 名	開発進捗状況についての報告と今後の方針についての討論
2008.5.29	チーム内ミーティング	東芝本社	10 名	開発進捗状況についての報告と今後の方針についての討論
2008.7.22	チーム内ミーティング	科学警察研究所	5 名	開発進捗状況についての報告と今後の方針についての討論
2008.8.21	チーム内ミーティング	東芝本社	10 名	開発進捗状況についての報告と今後の方針についての討論
2008.8.25	チーム内ミーティング	帯広畜産大学	9 名	開発進捗状況についての報告と今後の方針についての討論

* 平成 19 年度以降のみ記載

§8 結び

本研究課題は、3年間という比較的短い研究期間内に概ね計画通り目標を達成できたと認識している。検出時間と一部の生物剤に対する検出感度については目標を若干下回っているが、市販化までには改善できると考えている。今後は平成 21 年度末までに市販化することを目標に仕様の確定等を行っていく予定である。開発システムは、警察関連機関（都道府県警の科学捜査研究所、公安機動捜査隊、鑑識課、警備課など）における現場検知に活用するほか、関連府省庁への働きかけを行い、衛生研究所、消防庁、海上保安庁、防衛省、空港、港湾検疫所等へ活用の場を広げて行く計画である。また、東南アジア諸国をはじめ、海外への輸出も検討中である。

わが国独自のシステムとして本課題で開発した全自動モバイル型生物剤センシングシステムは、既存する何れの生物剤検知システムよりも優れた特性を備えており、生物剤による犯罪・テロの脅威から国家社会を守り、国民の不安軽減の一助となり、安心・安全な社会の構築に大きく寄与するものと自負している。また、本研究の成果は、生物剤の検知に関する高度な先端科学技術システムの構築を国内外にアピールするものであり、生物剤による犯罪・テロに対する抑止力としての効果も絶大であると考えている。

また、本課題で開発した生物剤自動検知システムは、微生物の遺伝子多型解析にも応用可能であり、法微生物学鑑定への活用も視野に入れている。加えて、新興・再興感染症などの病原体検知、さらには食品の衛生検査などへの応用も可能であることから、感染症対策、衛生管理対策としても幅広く活用を図る予定である。本システム実現により、新たな診断・検査産業が創出され、経済の活性化への寄与も期待できる。更に、本研究で開発した全自動モバイル型生物剤検知装置を大気捕集装置と連動させることで環境中の生物剤をリアルタイムに検知するセンサーシステムの開発にも着手しており、開発システムは世界の最先端を行く米国の大気中生物剤モニタリングシステム BioWatch よりも格段に優れたシステムとして、バイオテロ対策に大きく貢献することが期待される。

本研究は研究代表者である安田にとって初めての大型プロジェクトであり、研究グループ間の連携など多くを学び、さらに目標通りの研究成果を上げられたことは今後の研究に対する大きな自信となりました。研究開始当初は、安田が科学警察研究所においてバイオテロ対策研究室(生物第五研究室)を立ち上げてわずか2年足らずの時期であり設備・機器等非常に乏しい状況でしたが、本課題の研究費で十分な機器整備ができ、大変感謝しております。また、本研究課題に関連したテーマで4名が博士号を取得し、若手研究者育成という点からも多少は貢献できたと思っています。

末筆になりましたが、本研究課題を御採択いただき、研究の推進に多大なる御支援・御助言をいただきました板生清研究総括、栗山幸造領域参事、領域アドバイザーの先生方、吉田耕一郎様、庄司真理子様はじめ JST の関係各位にこの場をお借りして御礼申し上げます。