

「先進的統合センシング技術」

平成 17 年度採択研究代表者

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)

「全自動モバイル型生物剤センシングシステム」

1. 研究実施の概要

生物剤を使った犯罪・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。そこで、我々はテロ・犯罪に使用される可能性の高い約 20 種類の生物剤について現場レベルで迅速・安全・高感度かつ簡便に同時検知が可能なマイクロアレイ法をベースとした機器システムを開発することを目標として本研究を開始した。本年度は 16 種類の生物剤について遺伝子増幅法と DNA チップを開発し、高感度に特異的検出が可能であることを確認した。研究計画終了年度までに約 20 種類の生物剤についてマルチ増幅を可能にし、DNA チップによる特異検出を可能にする。更に、全自動化に関わる各要素機能ユニットの開発及び一元化システムとしての統合を行い、全自動モバイル型生物剤検知システムを完成させる。

2. 研究実施内容

<目的>

生物剤を使った犯罪・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と犯罪捜査に最も重要である。しかしながら、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、感染症発生が本邦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・犯罪に利用される可能性の高い生物剤として Category 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 Category B に分類したコレラ菌、ブルセラ菌など約二十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機器システムを開発する。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のように、気密性に配慮した機器内で被疑サンプルからの核酸抽出・検出・解析の過程を全自動で行えるものとし、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小型軽量のモバイル型生物剤自動検知システムを構築する。

<方法>

対象生物剤について遺伝子データベースに登録されている全株のゲノム塩基配列を検索し、各微生物種内で特異的に保存されている領域をターゲット候補として複数選定した。これらのターゲット遺伝子領域を増幅するためのプライマーセットを複数準備し、実際に生物剤遺伝子を用いて反応の特異性、増幅効率を調べた。特に効率良く短時間に特異的増幅が認められたプライマーセットを最終候補として選定し、検出可能な下限値についても生物剤の遺伝子のコピー数で求めた。4-5種の生物剤ごとにプライマーセットを複数組み合わせ合わせたマルチプレックス増幅を行い、反応特異性、増幅効率を調べ、プライマーセットの組み合わせの最適化を行った。更に、ターゲット領域の遺伝子配列情報をベースに DNA チップ検出用プローブ候補を設計し、複数のプローブ候補をのせた電流検出型 DNA チップと専用の検査装置（試作品）を用いて各プローブ候補の特性評価と絞込みを実施した。

また、全自動検知システムについては、逆転写反応、核酸増幅、DNA チップによる検出などを行うための使い捨てのカセットと、カセットを制御するための全自動検査装置から構成されるシステムを実現するため、本年度は先ず使い捨てカセットの設計に必要な基礎データの取得を行うと共に、実際にカセットと全自動検査装置の試作品を開発し機能検証を実施した。

<結果>

16種類の生物剤に対して複数のプライマーセットを準備して検討した結果、最終的に1生物剤当たり2-4組の遺伝子増幅プライマーセットを選定することができた。全てのプライマーセットは対象となる各生物剤遺伝子を20-30分で特異的に増幅することができた。増幅可能な生物剤遺伝子のコピー数の下限は20-200コピーであった。これらのプライマーセットの増幅領域に対し、プローブ候補を設計し、特性の評価を行った。遺伝子増幅産物を用いてDNAチップの特性評価を行った結果、各生物剤について特異的検出が可能であるプローブを選定することが出来た。カテゴリーAの生物剤について3-4セットのプライマーを組み合わせ合わせたマルチプレックス増幅の検討を行い、増幅特性への影響を極力抑えたプライマーセットの組み合わせを決定した。マルチプレックス増幅した産物についてもDNAチップにて検出できることを確認した。また、血液試料を想定して熱処理による簡便な核酸抽出法の有効性を確認すると同時に遺伝子増幅反応への血液成分の影響についても検討した結果、反応への影響はないことを確認した。

DNA チップカセットの仕様について検討を重ねた結果、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することにした。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。

また、自動検知システム開発に向けた要素機能の検証については、先ずシステムで使用する使い捨てカセットの設計に必要な情報として、カセットの材質、核酸増幅における温度特性および送液特性などの基本データを取得した。これらの情報を基に、使い捨てカセット(W75xH60xD9mm)の射出成型品を試作すると共に、増幅反応などの機能検証を行った。また、カセットを制御するための全自動検査装置(W252xH425xD506mm、約20kg)と制御用アプリケーションの試作品も完成し、現在、全自動プロセスを実現するために必要な送液制御、温度制御などの機能確認を進めている。

<全体研究計画に対する研究進捗状況>

当初の研究計画では、本年度末までに15種類(17年度5種類、18年度10種類の合計)の生物剤について遺伝子増幅システムの確立とDNAチップの開発を行うことを目標に掲げていたが、16種類という目標以上の成果が得られた。現在、同一カセットにグループ分けした生物剤遺伝子についてマルチプレックス増幅の検討を進めているが、既にカテゴリーAのグループについてはプライマーセットの検討が完了しており、残りのグループについても次年度前半には完了できる見込みである。また、全自動システムを構成する使い捨てカセットおよび全自動検査装置の試作品も完成し、計画通り機能確認を開始した。

次年度は、更なる要素機能の検証を進めるとともに、DNAチップカセットと装置を含めたプロトタイプ機の各要素ユニットの試作に取り組み、平成19年度末のプロトタイプ完成を目指す。全体として、概ね予定通り研究が進んでいる。

3. 研究実施体制

(1)「安田研究代表」グループ

①研究分担グループ長:安田 二郎(科学警察研究所 室長)

②研究項目

- ・様々な形状の生物剤から効率よく核酸を抽出する方法の検討
- ・各種反応条件の検討
- ・生物剤特異結合プローブの探索
- ・生物剤を使ったシステムの検証

(2)「牧野細菌感染」グループ

①研究分担グループ長:牧野 壮一(帯広畜産大学 センター長・教授)

②研究項目

- ・危険細菌性感染症の検出システムの構築
- ・炭疽菌、ボツリヌス菌、黄色ブドウ球菌、ブルセラ菌の LAMP 法の確立
- ・野兔病菌、類鼻疽菌特異的プライマーの構築
- ・ペスト菌、コレラ菌などの LAMP 法のプライマーの設定

(3)「橋本デバイス開発」グループ

①研究分担グループ長:橋本 幸二((株)東芝 グループ長)

②研究項目

- ・生物剤検知用 DNA チップの開発
- ・モバイル型生物剤自動検知システムの開発

4. 研究成果の発表等

(1)論文発表(原著論文)

- Urata, S., Noda, T., Kawaoka, Y., Morikawa, S., Yokosawa, H., and Yasuda, J.: Tsg101 interacts with Marburg VP40 depending on the PPPY motif, but not the PT/SAP motif as for Ebola virus, and 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.
- 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.
- 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.

(2)特許出願

平成 18年度特許出願:1件(CREST 研究期間累積件数:1件)