

「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・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、我々は現場レベルで迅速・安全・高感度かつ簡便に複数の生物剤の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。これまでに 19 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。19 種類の生物剤をカテゴリーA、RNA ウイルス、食中毒原因菌、カテゴリーBC の各グループに分類し、グループ毎に検出用カセットを作成することにしたが、カテゴリーA グループについてはマルチ増幅とチップ検出が可能であることを確認した。今後は他のグループについてもマルチ増幅とチップ検出を確認する。全自動検知システムについては、昨年度までに試作した全自動 DNA 検査装置と DNA チップ内蔵密閉型カセットを使い、増幅から検出までの検査プロセスの機能検証を実施した。その結果、今回使用した 3 種類のモデル遺伝子を特異的に同時検出できることが確認できた。今後は更なる時間短縮、信頼性向上などについて検討を行うと共に、実検体を使った実用性の評価を実施する計画である。

2. 研究実施内容

(文中にある参照番号は 4. (1) に対応する)

<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

ざる。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、天然痘ウイルス、出血熱ウイルスや Category B に分類したブルセラ菌など約 20 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なように、気密性に配慮した機器内で被疑サンプルの解析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。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。

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 生物剤用、RNA ウイルス用、食中毒原因菌用、カテゴリーBC 生物剤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。グループ毎に、最終候補として選定した各生物剤に対するプライマーセットを複数セット混合した状態で各生物剤遺伝子を増幅できるか(マルチ増幅)についても検討を行った。

また、全自動検知システムについては、昨年度試作した全自動 DNA 検査装置と DNA チップ内蔵密閉型カセットを使って、全自動での DNA 検査を検証した。

<結果>

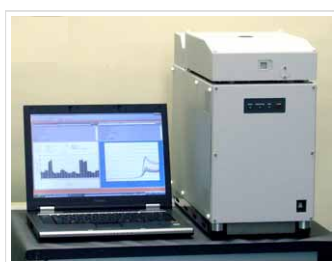
19 種類の生物剤に対して複数のプライマーセットを準備して検討した結果、最終的に1生物剤当たり2-4組の遺伝子増幅プライマーセットを選定することができた(原著論文1、投稿中論文3報など)。全てのプライマーセットは対象となる各生物剤遺伝子を 20-40 分で特異的に増幅することができた。増幅可能な生物剤遺伝子のコピー数の下限は 20-200 コピーであった。マルチ増幅についても検討した結果、カテゴリーA 生物剤グループについては全て 40 分以内の増幅が可能であり、ほぼ目処をつけることができた。今後、他の生物剤グループについてもマルチ増幅を検討する。

また、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

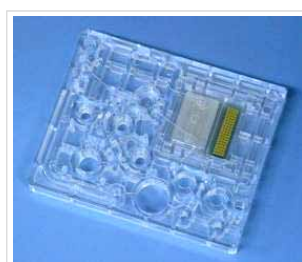
出が可能であるプローブを選定することが出来た。現在、実検体を用いた実用性の評価を開始しており、今後必要に応じてブラッシュアップを行なっていく。

血液試料を想定して、ボイリング法による簡便な核酸抽出法を開発した。更に、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(論文投稿中)。また、生物剤からの簡便核酸抽出法や効率の良い擬似ウイルス作成法の開発も行った(原著論文2, 3など)。

全自動検知システムについては、昨年度までに試作した全自動 DNA 検査装置(W252xH425xD506mm、約 20kg)と DNA チップ内蔵密閉型カセット(W75xH60xD9mm)を使い、全自動での検査プロセスの機能検証を実施した。先ず、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および条件の最適化をすすめ、その後、モデル遺伝子を用いて増幅から検出までのプロセスの検証を行った。その結果、今回使用した 3 種類のモデル遺伝子の特異的に同時検出できることが確認できた。今後は更なる時間短縮、信頼性向上などについて検討を行うと共に、実検体を使った実用性の評価を実施する計画である。



(A)



(B)

図 全自動 DNA 検査装置(A)と DNA チップ内蔵密閉型カセット(B)

<全体研究計画に対する研究進捗状況>

本研究開発では、約 20 種類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、昨年までに開発した項目に加え今回新たに 3 項目を追加することができ、これで全体として 19 種類の生物剤に対してほぼ目処をつけることができた。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増幅の検討を進めると共に、実検体を使った実用性の評価及びブラッシュアップを進めている。

また、全自動 DNA 検知システムについても、DNA チップ内蔵密閉型カセット及び全自動 DNA 検査装置を試作し、全自動検査プロセスの基本的な機能検証をモデル遺伝子を使って検証した。次年度は試作したシステムを科学警察研究所に設置し、実検体を使って装置の実用性を検証する計画である。

全体として、概ね予定通り研究が進んでいると考えている。

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、教授(理事・副学長))

② 研究項目

- ・危険細菌性感染症の検出システムの構築

(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)

- 1、Ohtsuki, R., Kawamoto, K., Kato, Y., Shah, M.M., Ezaki, T., and Makino, S-I.: Rapid detection of *Brucella* spp. by the loop-mediated isothermal amplification method. *J Appl Microbiol.* 2008 Jan 31(in press)
- 2、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.
- 3、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.

(2) 特許出願

平成 19 年度 国内特許出願件数 : 1 件 (CREST 研究期間累積件数 : 2 件)