

平成**年**月**日

株式会社 ○○○○ 御中

岐阜市大学北 2 丁目 210-1
エーエムアール株式会社
TEL 058-293-0610

御 報 告 書

1. 件 名：環境試料の PCR によるヒト病原体の定量解析試験
2. 分析・試験項目：PCR によるヒト病原体の定量解析試験
3. 分析試験方法：別紙のとおり。
4. 分析・試験結果：別紙のとおり。

以上

1. 試験名称

環境試料中のヒト病原体確認試験

2. 試験受付番号

No. ×××-××

3. 試験の目的

PCRによるヒト病原体の定量解析を用いて、提供試料における病原性細菌の存在程度を判定する。

4. 被験物質

試料名：△△△△△

試料形態：土壌試料

輸送形態：常温輸送

試料受領日：平成**年**月**日

5. 試験指針

(1) 解析方法

ヒト病原体(バイオセーフティレベル 2, 3 に分類*¹)をそれぞれ特異的に増幅するプライマー96種類(ユニバーサルプライマーを含む)を作製し、1プライマーにつき4箇所に充填した384ウェルプレートを用いて、被験試料から抽出したDNAを4つの異なる濃度に希釈して遺伝子増幅を行い、どの希釈段階のDNAで遺伝子増幅が見られるかを測定した。

その結果から、もとの試料中のヒト病原体由来の披検遺伝子数(copy数)を推測し判定した。

*1; 病原体等安全取扱・管理指針「表Ⅱ-1 病原微生物のBSLレベル」(日本細菌学会)

(2) 判定方法

披検試料から抽出したDNAを用いて、PCRを35サイクル行い、増幅シグナルが何も得られなかった場合は陰性(-)と判定した。増幅シグナルが得られた場合は、再度の電気泳動にて標的遺伝子のバンドの増幅の確認や融解曲線分析法で得られた融解温度(T_m値)^{*2}の検討を加えた上で陽性(+)の判定を確定した。

*2; <http://www.takara-bio.co.jp/prt/pdfs/prt1-3.pdf#search='%E8%9E%8D%>

6. 試験手順

(1) DNA 抽出

披験試料 4g を分取し、36ml の生理食塩水を加え混和後、8000rpm で 20 分遠心した。上澄みを捨てた後、沈渣を 1g 分取し、UltraClean Soil DNA Isolation Kit (MO BIO laboratories) を用いてプロトコールに従い DNA を抽出した。100 μ l の TE buffer に溶出し、抽出 DNA とした。

(2) PCR 反応

抽出 DNA (原液) をさらに 10 倍、100 倍、1,000 倍と 4 段階に希釈し、各希釈 DNA 液を 10 μ l 添加した PCR Mixture (100 ウェル分) を調製した。それらを 96 ウェルに分注 (4 濃度で 384 ウェル) し、下記条件でリアルタイム PCR を実施した。

- ・ PCR 酵素 : SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time)、タカラバイオ社製
- ・ PCR 機器 : 7900HT Fast リアルタイム PCR システム、Applied Biosystems 社製
- ・ PCR 条件 : 94°C 2:00 \rightarrow (92°C 0:30 \rightarrow 55°C 0:30 \rightarrow 74°C 1:00) \times 35 cycles
(95°C 0:15 \rightarrow 60°C 1:00 \rightarrow 95°C 0:15、 T_m 測定)

(3) 電気泳動条件

- ・ 使用機器 : MCE-202 MultiNA (DNA/RNA 分析用マイクロチップ電気泳動装置)
島津製作所製
- ・ 泳動条件 : 推奨プロトコールに準拠
- ・ 使用ゲル : MultiNA 専用試薬

7. 試験結果

(1) PCR 増幅確認試験

陽性コントロールである細菌のユニバーサルプライマー（表 2、No. PC : Bacteria universal）を用いた PCR 増幅確認試験の結果、供試の全希釈濃度まで所定の増幅産物の陽性判定が得られた。

(2) ヒト病原体存在確認試験

被験試料中のヒト病原体由来遺伝子をそれぞれ特異的に増幅させるプライマーを用いてその存在確認試験を行った。陽性と判定された病原体を表 1 に示し、全結果を巻末の表 2 に示した。

表 1 陽性と判定したヒト病原体由来の披検遺伝子

No	菌名	BSL	陽性段階	判定結果
35	Enterobacteriaceae (major)	1*, 2	100 倍希釈	1×10^6 copy/g 未満
58	<i>Nocardia</i> group	1*, 2	原液	1×10^4 copy/g 未満
72	<i>Vibrio</i> group	1*, 2	原液	1×10^4 copy/g 未満

8. 考察

(1) 検出濃度の算定

本試験では、1 反応ウェルあたり 100 μ l の抽出 DNA の 1/1,000 量を使用した。この 100 μ l の抽出 DNA は試験手順から算出して 1g の試料から抽出されていることになる。PCR 反応液に 1 コピー遺伝子が存在すれば検出できるとした場合、濃度 1 の DNA 原液では 1g 当たり 1000copy 以上の遺伝子が存在していたことになる。

よって、各濃度では概して次の数量の遺伝子コピーが存在することになる。

濃度 1	(原液)陽性	単位試料当たり	1.0×10^3 copy/g 以上
濃度 2	(10 倍希釈)陽性		1.0×10^4 copy/g 以上
濃度 3	(100 倍希釈)陽性		1.0×10^5 copy/g 以上
濃度 4	(1,000 倍希釈)陽性		1.0×10^6 copy/g 以上

例えば、供試 DNA の第 1 濃度（原液）の PCR 反応液でも PCR 増幅シグナルが得られなければ、ヒト病原体由来の披検遺伝子の存在は 1.0×10^3 copy/g 未満と判定が可能である。

(2) PCR 増幅確認試験結果

バクテリアユニバーサルを用いた評価で、全希釈濃度まで所定の増幅産物の陽性判定が得られた事より、一連の試験において PCR 増幅阻害はなかったものと判断した。

(3) 現場/事業対応における指針の選定

供試した試料はバイオレメディエーション処理を実施したフィールドから経時的に採取された試料である。

供試試料より、表 1 に示す様に日本細菌学会が定める BSL（病原体等安全取扱・管理指針「表 II-1 病原微生物の BSL レベル」）に設定される各種病原体を含む菌群が検出された。本件の現場適用においては、係る BSL に応じた現場/事業対応（病原体等安全取扱・管理指針等に準拠）が望まれる状況にあると推察される。

(4) 被検試料から検出された特記すべき病原体

Enterobacteriaceae が陽性となったが、このプライマーは主要な腸内細菌科の菌種を幅広く検出するので、当該プライマーの陽性判定のみをもって病原体の存在を示唆するものではない。

さらに、同時に供された腸内細菌科に属する病原性の強い大腸菌群や *Salmonella* 属、*Shigella* 属、*Yersinia* 属、*Klebsiella* 属の特異プライマーは陽性となっていないこと

から、その他の腸内細菌科の菌種が反応したものと考えられる。

また、*Vibrio* group が陽性判定となったが、*Vibrio* 属の菌種は水系の環境に多く常在する菌種であるが、本試験においては病原性の強い *Vibrio cholerae* や *Vibrio parahaemolyticus* の特異プライマーは陰性であったことから、その他の *Vibrio* 属の菌種が反応したものと考えられる。

(5) 現場/事業対応における作業指針

上記(4)をふまえ、陽性と判断された *Nocardia* group、*Vibrio* group は 1×10^4 copy/g 未満と通常の土壌・地下水中の病原体濃度と概ね同等レベルまで収束したことから、相応の対応が望まれる状況にあると推察される。

(6) 注意事項

尚、上記の一連の評価は、受託試料中に存在が確認された病原体を含む菌群の種類とその存在濃度に関して係る病原体等安全取扱・管理指針（日本細菌学会）に則った作業指針を示すものであり、微生物の関与が想定される諸事業（農業／食品事業／水処理事業等）における既得のファミリーリティ（経験的に確立され公衆受容を取得しているバイオセーフティ）を否定するものではないことを注記する。

また、土壌にはあらかじめ各種病原体が存在すること、そしてバイオレメディエーション事業の終了時点で、一般土壌レベルまでの各種病原体の存在濃度に収束することが、一連の判断にて重視されるべきであることを併せて注記する。

以上

表 2 試料名△△△△△における人病原体の全判定結果(1/4)

No.	病原体名	BSL	遺伝子	濃	濃	濃	濃
				度	度	度	度
				1	2	3	4
1	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> group	2	16S rDNA	—	—	—	—
2	<i>Cowdria ruminantium</i>	1*	16S rDNA	—	—	—	—
3	<i>Actinomadura madurae</i> group	2	16S rDNA	—	—	—	—
4	<i>Actinomyces viscosus</i> group	2	16S rDNA	—	—	—	—
5	<i>Aeromonas hydrophila</i> group	1*, 2	16S rDNA	—	—	—	—
6	<i>Anaplasma marginale</i> group	2	16S rDNA	—	—	—	—
7	<i>Arcanobacterium haemolyticum</i> group	1*	16S rDNA	—	—	—	—
8	<i>Bacillus anthracis</i>	3	Capsular gene: CapA	—	—	—	—
9	<i>Bacillus anthracis</i>	3	protective antigen: pagA	—	—	—	—
10	<i>Bacillus cereus</i>	2	Haemolysin: HbIA	—	—	—	—
11	<i>Bacillus cereus-anthraxis</i> group	1, 2, 3	16S rDNA	—	—	—	—
12	<i>Bacillus thuringiensis</i>	1	Toxin	—	—	—	—
13	<i>Bartonella</i> spp.	1*, 2	16S rDNA	—	—	—	—
14	<i>Lawsonia</i> group	1	16S rDNA	—	—	—	—
15	<i>Borrelia burgdorferi</i> group	2	16S rDNA	—	—	—	—
16	<i>Brucella melitensis</i> group	3	16S rDNA	—	—	—	—
17	<i>Burkholderia cepacia</i> group	1*, 2	16S rDNA	—	—	—	—
18	<i>Burkholderia pseudomallei /mallei</i>	3	Flagellin	—	—	—	—
19	<i>Burkholderia pseudomallei /mallei</i>	3	16S rDNA	—	—	—	—
20	<i>Burkholderia pseudomallei /mallei</i>	3	putative insecticidal toxin OMP	—	—	—	—
21	<i>Cardiobacterium hominis</i> group	1*	16S rDNA	—	—	—	—
22	<i>Chlamydomphila psittaci</i> group	2	16S rDNA	—	—	—	—
23	<i>Chromobacterium violaceum</i>	2	16S rDNA	—	—	—	—

注：BSL；病原体等安全取扱・管理指針「表Ⅱ-1 病原微生物のBSLレベル」（日本細菌学会）

濃度 1；抽出 DNA 原液⇒①、濃度 2；①を 10 倍希釈⇒②、濃度 3；②を 10 倍希釈⇒③、濃度 4；③を 10 倍希釈、+；陽性、-；陰性

表 2 試料名△△△△△における人病原体の全判定結果(2/4)

No.	病原体名	BSL	遺伝子	濃	濃	濃	濃
				度	度	度	度
				1	2	3	4
24	<i>Clostridium bifermentans</i> group	1*	16S rDNA	-	-	-	-
25	<i>Clostridium difficile</i>	2	16S rDNA	-	-	-	-
26	<i>Clostridium perfringens</i>	2	16S rDNA	-	-	-	-
27	<i>Clostridium perfringens</i>	2	Enterotoxin (cpe)	-	-	-	-
28	<i>Clostridium tetani</i> group	2	Tetanus toxin	-	-	-	-
29	<i>Clostridium tetani</i> group	2	16S rDNA	-	-	-	-
30	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> group	1*, 2	16S rDNA	-	-	-	-
31	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	2	Toxin	-	-	-	-
32	<i>Coxiella burnetii</i>	3	16S rDNA	-	-	-	-
33	<i>Coxiella burnetii</i>	3	Specific antigen	-	-	-	-
34	<i>Ehrlichia-Anaplasma</i> spp.	1, 2	16S rDNA	-	-	-	-
35	<i>Enterobacteriaceae</i> (major)	1*, 2	16S rDNA	+	+	+	-
36	<i>Enterococcus</i> spp	1*	16S rDNA	-	-	-	-
37	<i>Escherichia coli</i>	2	virB	-	-	-	-
38	<i>Escherichia coli</i>	2	Shiga 1	-	-	-	-
39	<i>Escherichia coli</i>	2	Shiga 2	-	-	-	-
40	<i>Escherichia coli</i>	2	ST1	-	-	-	-
41	<i>Escherichia coli</i>	2	LT	-	-	-	-
42	<i>Escherichia</i> group	1*, 2	16S rDNA	-	-	-	-
43	<i>Francisella</i> group	2, 3	16S rDNA	-	-	-	-
44	<i>Francisella tularensis</i>	3	OMP	-	-	-	-
45	<i>Haemobartonella canis</i> group	1*	16S rDNA	-	-	-	-
46	<i>Haemophilus influenzae</i>	2	16S rDNA	-	-	-	-
47	<i>Haemophilus-Pasteurella-Mannheimia-Actinobacillus</i> group	1*, 2	16S rDNA	-	-	-	-
48	<i>Klebsiella pneumoniae</i> group	1*, 2	16S rDNA	-	-	-	-
49	<i>Legionella</i> group	2	16S rDNA	-	-	-	-
50	<i>Leptospira interrogans</i> group	1*, 2	16S rDNA	-	-	-	-

注：BSL；病原体等安全取扱・管理指針「表Ⅱ-1 病原微生物のBSLレベル」（日本細菌学会）

濃度 1；抽出 DNA 原液⇒①、濃度 2；①を 10 倍希釈⇒②、濃度 3；②を 10 倍希釈⇒③、濃度 4；③を 10 倍希釈、+；陽性、-；陰性

表 2 試料名△△△△△における人病原体の全判定結果 (3/4)

No.	病原体名	BSL	遺伝子	濃	濃	濃	濃
				度	度	度	度
				1	2	3	4
51	<i>Listeria monocytogenes</i>	2	16S rDNA	-	-	-	-
52	<i>Mycobacterium avium</i>	1*, 2	16S rDNA	-	-	-	-
53	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	2	16S rDNA	-	-	-	-
54	<i>Mycobacterium</i> spp.	1*, 2, 3	16S rDNA	-	-	-	-
55	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3	dnaJ	-	-	-	-
56	<i>Mycoplasma mycoides-pneumoniae</i> group	2, 3	16S rDNA	-	-	-	-
57	<i>Neorickettsia-E. sennetsu</i> group	2	16S rDNA	-	-	-	-
58	<i>Nocardia</i> group	1*, 2	16S rDNA	+	-	-	-
59	<i>Orientia tsutsugamushi</i>	3	16S rDNA	-	-	-	-
60	<i>Orientia tsutsugamushi</i>	3	Specific (virulence)	-	-	-	-
61	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> group	1*, 2	16S rDNA	-	-	-	-
62	<i>Rickettsia/Ehrlichia</i> spp.	1*, 2, 3	16S rDNA	-	-	-	-
63	<i>Rochalimea quintana</i>	2	16S rDNA	-	-	-	-
64	<i>Salmonella</i> spp.	2, 3	Enterotoxin	-	-	-	-
65	<i>Salmonella typhi</i>	3	virulence :vipR	-	-	-	-
66	<i>Shigella</i> spp.	2	virG(IcsA)	-	-	-	-
67	<i>Staphylococcus aureus</i>	2	mecA	-	-	-	-
68	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	2	16S rDNA	-	-	-	-
69	<i>Streptococcus</i> spp.	1*, 2	16S rDNA	-	-	-	-
70	<i>Streptomyces</i> group	1*	16S rDNA	-	-	-	-
71	<i>Vibrio cholerae</i>	2	CT	-	-	-	-
72	<i>Vibrio</i> group	1*, 2	16S rDNA	+	-	-	-
73	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2	Tdh	-	-	-	-
74	<i>Yersinia</i> group	1*, 2, 3	16S rDNA	-	-	-	-
75	<i>Yersinia pestis</i>	3	virulence: pesticin	-	-	-	-

注：BSL；病原体等安全取扱・管理指針「表Ⅱ-1 病原微生物のBSLレベル」（日本細菌学会）

濃度 1；抽出 DNA 原液⇒①、濃度 2；①を 10 倍希釈⇒②、濃度 3；②を 10 倍希釈⇒③、濃度 4；③を 10 倍希釈、+；陽性、-；陰性

表 2 試料名△△△△△における人病原体の全判定結果 (4/4)

No.	病原体名	BSL	遺伝子	濃	濃	濃	濃
				度	度	度	度
				1	2	3	4
76	<i>Yersinia pestis</i>	3	Plasminogen activator	—	—	—	—
77	<i>Yersinia pseudotuberculosis/pestis</i>	2, 3	16S rDNA	—	—	—	—
78	<i>Cryptococcus neoformans</i> group	1, 2	28S rDNA	—	—	—	—
79	<i>Aspergillus fumigatus</i> group	1*, 2	28S rDNA	—	—	—	—
80	<i>Coccidioides immitis</i> group	3	28S rDNA	—	—	—	—
81	<i>Candida albicans</i> group	1, 2	28S rDNA	—	—	—	—
82	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> group	2, 3	28S rDNA	—	—	—	—
83	<i>Cryptosporidium parvum</i>	2	HSP70	—	—	—	—
84	<i>Ajellomyces capsulatus/dermatitidis</i> group	2, 3	28S rDNA	—	—	—	—
85	<i>Penicillium marneffeii</i> group	3	28S rDNA	—	—	—	—
86	<i>Bacillus cereus</i> 1 ITS1	2	ITS1	—	—	—	—
87	<i>Bacillus cereus</i> 2 ITS1	2	ITS1	—	—	—	—
88	<i>Bacillus anthracis</i> ITS1 (<i>cereus</i> - <i>thuringensis</i>)	1, 2, 3	ITS1	—	—	—	—
89	<i>Clostridium botulinum</i> 1 ABF-sporogenes group	2	16S rDNA	—	—	—	—
90	<i>Clostridium botulinum</i> 2 EFG group	2	16S rDNA	—	—	—	—
91	<i>Clostridium botulinum</i> 3 CD group	2	16S rDNA	—	—	—	—
92	<i>Clostridium botulinum</i> 4 G group	2	16S rDNA	—	—	—	—
93	<i>Clostridium butyricum</i>	2	16S rDNA	—	—	—	—
94	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1*	16S rDNA	—	—	—	—
PC	Fungal universal	1, 2, 3	18S rDNA	—	—	—	—
PC	Bacteria universal	1, 1*, 2, 3	16S rDNA	+	+	+	+

注：BSL；病原体等安全取扱・管理指針「表 II-1 病原微生物の BSL レベル」（日本細菌学会）

濃度 1；抽出 DNA 原液⇒①、濃度 2；①を 10 倍希釈⇒②、濃度 3；②を 10 倍希釈⇒③、濃度 4；③を 10 倍希釈、+；陽性、-；陰性