

厚生科学研究研究費補助金

新興・再興感染症 研究事業

炭疽の発症機構の解明と迅速検出法の確立（H11-新興-6）

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 牧野 壯一

平成13（2001）年 4月

目 次

・ 総括研究報告	
炭疽菌の発症機構の解明と迅速検出法の確立	1
主任研究者 牧野壮一 帯広畜産大学畜産学部助教授	
・ 分担研究報告	
1. 食肉中の炭疽菌の迅速検出法の確立に関する研究	10
藤原真一郎 国立公衆衛生院衛生獣医学部人畜共通感染症室長	
2. 大気中の炭疽菌の迅速検出法の確立に関する研究	14
江崎孝行 岐阜大学医学部微生物学教室教授	
3. 土壌中の炭疽菌の迅速検出法の確立と炭疽の発症機構に関する研究	17
牧野壮一 帯広畜産大学畜産学部家畜微生物学教室助教授	
4. 炭疽菌の新しいワクチン開発に関する研究	21
倉園久夫 岡山大学医学部保健学科	
・ 研究成果の刊行に関する一覧表	24
・ 別刷り	25

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
総括研究報告書

炭疽菌の発症機構の解明と迅速検出法の確立
主任研究者 牧野壯一 帯広畜産大学畜産学部助教授

研究要旨 一世紀以上前に世界で初めて分離・同定された病原体、炭疽菌は世界で恐れられてきた伝染病、炭疽の原因菌である。現在新興・再興感染症がクローズアップされている中で、炭疽菌は容易に大量の芽胞菌体として精製できるので、紛争が起こると常に生物兵器のための病原菌として恐れられてきた。即ち、人為的に起こりうる伝染病と言える。同時に、海外では動物やヒトでの自然発生も毎年数多く報告されている。この原因は炭疽菌芽胞による汚染常在地の存在による。わが国でもかつては発生が多く見られたので、炭疽常在地が多くあると考えられるので、人為的原因による発生も考慮して、炭疽に対する警戒および防疫上の対処は常に必要である。しかし、我が国は炭疽に対しては発生が無いことから無防備であるといえる。また、土壌や動物の炭疽の汚染度を調べる技術も国内外を問わず不十分で、ワクチン技術もまだ不完全であると言える。そこで、本研究では、①炭疽菌の検出法の確立とその応用、②炭疽菌の遺伝子型別の確立、③炭疽の発症機構の解明を通じて、行政的には炭疽の防疫体制や疫学調査研究の強化、学術的には炭疽のワクチン開発の基礎データ作成に貢献する。昨年度、本研究では、炭疽菌の食肉や土壌汚染からの迅速検出法の確立を目的として、そのためにPCR法の応用を考え、炭疽菌に特異的なPCR法を確立し、食肉への応用を行った。さらに、炭疽菌の土壌汚染からの迅速検出法の確立および炭疽菌芽胞形成の生物学的意義を明らかにし炭疽の発症機構の解明のための基礎実験を行った。PCR法の再現性が低いこと、炭疽菌が分離できないことなどの問題点に本年度は取組んだ。更に、炭疽菌の感染経路として空気感染が重要であるが、空気中に1個の芽胞があれば、分離同定が出来る方法を確立した。その際に、炭疽菌の選択に適した培地を提唱した。また、現行の不完全な炭疽ワクチンの改善に、*B. brevis*を用いた新たなワクチン開発にも取組んだが、ワクチンとして有効性に関してはまだ結果が出ていない。

分担研究者氏名・所属・職名

牧野壯一・帯広畜産大学畜産学部・助教授
藤原真一郎・国立公衆衛生院衛生獣医学部・室長
倉園久生・岡山大学医学部・教授
江崎孝行・岐阜大学医学部・教授

A. 研究目的

炭疽菌により起こる炭疽は、草食動物を中心とした家畜伝染病であるが、人を含めた他の動物にも重篤な症状を起こす人畜共通伝染病である。炭疽菌は、乾燥状態で容易に芽胞菌となり、一度土壌が炭疽菌で汚染されると、芽胞菌として感染力を保持しながら数十年生残り、炭疽常在地となる。人の疾病は、創傷感染による皮膚炭疽、汚染動物肉の経口摂取による腸炭疽、および芽胞を吸引する肺炭疽があるが、肺炭疽が最も死亡率が高く、適切な治療を行わない

と99%死亡する。そして、炭疽菌の芽胞は、ごく基本的な設備や知識で簡単に大量培養でき、しかも色も匂いも味もない粉末として調整し噴霧でき、その5ポンドでワシントンDCの人口の半分を侵すことが出来るといわれている。このことは、容易に炭疽菌が生物兵器へ利用される危険性を含んでいる。即ち、炭疽は世界で食肉衛生・防疫上最も恐れられている伝染病の一つである。実際、1998年にアメリカ国防省は、全ての軍人に炭疽ワクチン接種が必要であると勧告している。我国での炭疽の発生はこの数年報告されていないが、先進国を含めた国外での発生は数多く起こっている。我が国でも以前は炭疽が頻繁に発生していたので、土壌の炭疽菌常在化が既に起こっていると考えられ、常に内外から我国は危険にさらされているといえる。しかし、国外でこれほど危険視されている炭疽に対する我国の関心は、極めて低いのが現状である。更に、ワクチン接種期間が18ヶ月に渡っていたり、炭疽の早期診断

技術の確立が不十分で、特に土壌中の炭疽の汚染度を調べる技術が確立されておらず、また炭疽の発症機構自体の詳細がほとんど解明されていないなどの問題点が多く残っている。そこで、本研究では、炭疽に対する国内での発生を未然に防止するために、土壌や不顕性感染動物からの迅速・確実な検出法および国外からの炭疽の伝播に対して未然に防ぐために必要な防疫上の検査法の確立、しいては予防のための基礎データとなる炭疽の発症機構の解明などを行い、発生の可能性のある炭疽から社会を守るために炭疽の基礎および応用研究を行う。同時に、炭疽が発生した場合に備え、その感染経路を的確に把握するための炭疽菌の遺伝子型別を行う基礎データを作成することも研究目標としている。

B. 研究方法

① 菌株とプライマーの設定およびPCRの条件

昨年度報告した炭疽菌の病原因子である荚膜(Cap)、毒素(PA)および染色体上の配列(BA813)を利用したプライマーセットを用い、Nested-PCRを実施した。それらの内、染色体上の配列として、S-layer遺伝子を利用したプライマーセットを今年度追加して使用した。BA813を用いたPCRでは、土壌を用いた検出系(分担研究者牧野の)で、時として非特異的な増幅産物が検出されたので、S-layer遺伝子の配列を使用することにした。即ち、荚膜や毒素遺伝子を持つプラスミドが脱落しても、炭疽菌を検出できる系を確立する必要があったためである。それらの配列は、表1に示す。PCRの条件は95℃15秒、55℃30秒、72℃60秒を1サイクルとして35サイクル行い、アガロースゲル電気泳動により増幅産物を確認した。

炭疽菌の芽胞を作る元株として当研究室保存のパスツール2菌株(毒素、荚膜産生株)を用いた。芽胞液はパスツール2菌株をLブロスで37℃一夜培養し、遠心後、一回生理食塩水で菌体を洗浄後、生理食塩水に再懸濁し、37℃で3日間振盪培養し作成した。更に、80℃15分間加熱後、PBSで3回遠心洗浄後、芽胞数の計測をL寒天平板上にて行い、使用した。

② 培地

昨年度報告した炭疽菌用の選択培地PLET培地(ハートインフュージョン寒天培地に酢酸タリウム; 0.04 g/l、ポリミキシンB; 30,000 units/l、lyzosome; 300,000 units/l、EDTA; 0.3 g/lを添加)と共に、*Bacillus cereus* selective agar (BCA; Oxoid) 平板および非選択培地であるTrypticase soy agar (TSA) を用いた。液体培地としては、

Trypticase soy broth (TSB)を用いた。

③ 食肉から炭疽菌の分離とPCR法による炭疽菌の検出

食肉検査所から豚の腸間膜リンパ節および市販食肉を用い、人工的に炭疽菌芽胞を0、1、10、および100個を添加して実験を行った。炭疽菌は当研究室保存のパスツール2菌株(毒素、荚膜産生株)を用いた。芽胞液の調整方法は昨年度と同じである。栄養型の炭疽菌の場合は連鎖状に繋がり正確な菌数の把握が出来ないため、芽胞を用いて菌数の把握を行った。方法は昨年度の報告から改良された点を中心に記載する。

検体からの直接検出は、炭疽菌芽胞を人工的に混入させた検体1gを10mlのPBS中でホモジナイズ後、その0.1mlを寒天平板培地に塗抹するとともに、1.0mlを直接PCRに用いた。増菌用に、検体1gをTSA10mlと混合し、37℃で16時間振盪培養を行った。翌朝その1次増菌液0.1mlを寒天平板上に塗抹するとともに、その1.0mlを遠心後、全DNAを分離精製した。PCR用のDNAの精製方法は、マニュアル通りにFastPrep™ FP120 instrument (Bio 101, Inc. CA., USA)を用いて行った。DNAは濃度調整後、100ngをPCRに使用した。

④ 大気中からの炭疽菌の分離とPCR法による迅速検出

通常の大気中から空気サンプラーを使用して、5リットルの空気をサンプリングした。それらをフィルターでろ過し、フィルター上の一般菌数を測定するとともに、そのサンプルに人工的に炭疽菌芽胞を0、1、10、および100個を添加して実験を行った。細菌数の計測には、フィルターを生理食塩水中で混濁させて、遠心後直接培地に塗抹した。使用培地は、非選択培地であるTrypticase soy agar (TSA) および*Bacillus cereus* selective agar (BCA; Oxoid) 平板である。

菌数が少量の際にはPCR用のテンプレート量のロスが想定できるので、 10^5 個の大腸菌を人工的に添加してサンプルとした。大腸菌は病原性の無い遺伝子組換えに使用されているMC1061株を使用した。得られたサンプルを遠心後、ペレットに10 μ lの滅菌蒸留水を加え、95℃10分間加熱した。その後、15000回転で3分間遠心後上清の1 μ lをPCRに使用した。また、DNAを精製するためには、QLAamp DNA Mini Kit (Quiagen Japan K.K.)を用いて精製した。PCRのためのプライマーは、昨年度報告した炭疽菌の病原因子である荚膜形成に必須の遺伝子を利用して作製された592bpの増

幅用のMO11とMO12（表1参照）を使用した。混合プライマーとしては、MO11とMO12のセットと、防御遺伝子を増幅するPA6とPA7の210bpを増幅するセットを用いた（表1参照）。増幅システムは、通常の増幅装置とLight Cycler System（ロッシュ・ダイアグノスティック株式会社）を使用した。Light Cycler Systemによる増幅は、FastStart DNA Master SYBR Greenを使用し、コンピュータ上で増幅産物の確認と増幅産物の融解曲線分析を行い、目的とする産物であることを確認した。同時にアガロースゲル電気泳動により増幅産物を確認した。更に、混入芽胞数に応じた増幅産物の定量化が可能か否かについても検討した。

⑤ 炭疽菌芽胞の土壌からの分離方法の確立

各種土壌を採取し、人工的に炭疽菌芽胞を0、1、10、100、および1,000個を添加して実験を行った。

(a) 直接土壌から炭疽菌の分離：WHOの指針に従い、それぞれの土壌を生食で10倍、100倍に希釈し、その希釈液を70℃30分間加熱し、芽胞菌以外を除く。その0.1mlをPLET培地、BCA平板および血液寒天平板に塗抹して炭疽菌を分離した。炭疽菌を疑う集落は、莢膜形成をNBY寒天平板（普通寒天に0.7%重曹を添加した培地）に塗抹後、炭酸ガス培養器で培養し確認した。同様に、炭疽菌特異的PCRで確定した。

(b) PCR法による検出：土壌から直接PCRを行うのは炭疽菌芽胞を多く含む場合も成功しなかったため、増菌法を使用した。まず芽胞を添加した土壌10グラムを100mlの70%エタノールにより2回遠心により洗浄した。その後、100mlの滅菌蒸留水で2回遠心により洗浄し、最終的に100mlのトリプトケース液体培地（TSA）と混合し、37℃で16時間振盪培養を行った。翌朝その1次増菌液0.1mlを10mlのTSAに加え、更に4時間37℃で振盪培養した。その二次増菌液1.0mlを遠心後、滅菌水で2回洗浄し、マニュアル通りにFastPrep™ FP120 instrument（Bio 101, Inc. CA., USA）を用いてPCR用のDNAの精製を行った。DNAは濃度調整後、100ngをNested-PCRに使用した。

(c) 増菌後の炭疽菌の分離：上記の方法で作製した増菌液を適当に希釈して(a)に記載した寒天平板に塗抹して炭疽菌の分離を試みた。炭

疽菌が疑わしい集落はPCRにより確認した。

⑥ 炭疽菌莢膜の持つ生物学的意義

炭疽菌の莢膜形成には3種類の同一転写方向を持つ*capB*、*capC*、および*capA*遺伝子から成る*cap*領域が必須である。この領域により炭疽菌表層に高分子量の莢膜が形成される。しかし、この領域の下流に同じ転写方向を持つ*dep*遺伝子が存在し、この遺伝子が、高分子量の莢膜を低分子化し、菌体表層から離す働きを持つ。昨年度は、この遺伝子の変異株を用いてマウスへの病原性を調べ、莢膜を表層に重合する遺伝子群(*cap*領域)と分解する*dcp*遺伝子が同時に必要とする生物学的意義を明らかにし、その発現調節を明らかにした。その結果を踏まえ、*dep*遺伝子変異株のマクロファージ内取り込みを調べ、病原性の消失の原因を調べ、炭疽の発症機序過程に*dep*遺伝子が果たす役割を明らかにした。具体的には、マウスの腹腔マクロファージを分離後、炭疽菌を感染させて炭疽菌に対する抗体を用いて蛍光染色法により観察した。

⑦ 炭疽菌の新しいワクチン開発

(a) 菌株、プラスミドおよび培地

B. bevis HPD31株を使用した。培地は、T2Mプロス（1% polypeptone, 0.5% Meat extract, 0.2% yeast extract, 1% glucose）およびT2M平板（T2Mプロスに寒天1.5%添加）を用い培養した。培養は、37℃もしくは30℃で行った。プラスミドは*B. bevis*用の発現ベクターpNH326を用いた。pNH326は、*B. bevis*の主要外膜蛋白のシグナル配列がプラスミド上に存在し、そのシグナル配列と融合蛋白を作るように外来DNAを挿入するよう作られている。

(b) PAのpNH326への挿入

PAはpNH326内の*B. brevis*の主要外膜蛋白のシグナル配列と融合蛋白を作るようにプライマーを設定し、PCRによって増幅された。その後、大腸菌内でpCR2.1 TOPO cloning kitによりPAを分離し、pNH326内に再挿入された。pNH326は*B. bevis*内でのみ複製可能なプラスミドのため、外来遺伝子の導入は次に記す*B. bevis*への形質転換の方法により行った。

(c) *B. bevis*への形質転換

*B. bevis*のプラスミドによる形質転換は、BioRad社のGene Pulserシステムによるelectroporation法により行った。簡単に記す

と、*B. bevis* HPD31 株をT2M平板 (1 % polypeptone, 0.5 % meat extract, 0.2 % yeast extract, 4 % glucose, 10 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mM $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ per liter, pH 7.0, 1.5 % agar) で発育させ、1コロニーを5 mlのT2Mプロス内に接種し、30°Cで一晩振盪培養した。次に、その1 mlを100 mlのT2Mプロス内に接種し、 $\text{OD}_{4660}=2.0$ 程度 (後期対数増殖期) まで増殖させて、遠心後沈渣を得た。沈渣をcold-SHC buffer (272 mM sucrose, 16 mM HEPES, 1 mM CaCl_2 , pH 7.0, 15 % glycerol) で洗浄し、最終的に1/50量のSHC bufferに懸濁し、200 μl づつ形質転換に使用した。菌体は、-80°Cにストック可能であり、使用する際には、37°Cで溶解後、200 μl のPSD buffer (2 mM HEPES, KOH, 24% PEG6000, pH 7.0) に懸濁し、プラスミドDNAを混和後、エレクトロポレーションにより*B. brevis*をプラスミドで形質転換した。その混合液は、MT medium (1 % polypeptone, 0.5 % meat extract, 0.2 % yeast extract, 4 % glucose, 20 mM MgCl_2) と混合後、ネオマイシンを含むT2M 平板上で30°C、3日間培養後形質転換体を選択した。

(d) PAの発現

PAの発現は通常の方法に従いウエスタンブロットティング法により調べた。抗体は、PAに対する抗体を用いた。

C. 研究結果

(1) 食肉からの炭疽菌の分離および迅速検出

① 食肉からの芽胞菌の検出

昨年度報告したように、我々の研究室保存菌株を用いた結果では、炭疽菌選択用のPLET培地は明らかに炭疽菌特異的な選択培地として有効であった。しかし、炭疽菌の発育集落数はTSA平板に比べ約10~100分の1に減少しており、炭疽菌を選択するとともに、その発育をも抑制していることが明らかとなった。更に、土壌を用いた結果で (分担研究者牧野の報告参照) は、PLET平板上で炭疽菌以外の菌種の発育も観察され、その集落の形態は炭疽菌と区別できないものであった。そこで、更に有効な培地を選ぶために、BCA平板を候補として検討した。この培地は、セレウス菌を集落の形態で選択しようとするもので、BCA培地上でセレウス菌はトルコ石色を呈し、

集落周囲に混濁リングがレシチナーゼにより観察され、他の菌種と区別可能となる培地である。炭疽菌はセレウス菌と分類学上近い関係にあり、*Bacillus*属の中でセレウスグループに入っている。研究室保存*Bacillus*属を用いた結果、*B. mycooides*, *B. thuringiensis*, *B. cereus*と*B. anthracis*のみがBCA平板上でラフで大型の集落を形成したが、他の*Bacillus*属菌種は発育しないか、ごく小さい集落を呈した。更に、*B. mycooides*, *B. thuringiensis*と*B. cereus*では、集落周囲に明瞭な混濁形成が観察されたが、*B. anthracis*では観察されなかった。同時に、PLET培地で見られた炭疽菌に対する発育阻害も確認されなかった。この結果、BCA培地は炭疽菌の選択用に使用できると考えた。そこで、炭疽菌を人工的に混入させた検体を用いて、BCA培地に塗抹した結果、1グラムのリンパ節に10個以上添加した場合は、培地上で炭疽菌を分離可能であった (図1)。炭疽菌の菌数が少ない場合、同様にBCA培地上に増菌後塗抹して炭疽菌の分離を試みた。その結果、炭疽菌以外の菌の増殖集落の中で大型の集落を選びPCRにより炭疽菌であることを確認した。種々の炭疽菌の混入された検体を用いて炭疽菌の分離が出来たので、前述の直接法との併用で、いかなる場合も食肉から炭疽菌の分離が可能であると結論した (図1)。

② PCR法による炭疽菌DNAの検出

検体1 g 当たり100個以上の炭疽菌があれば、直接PCR法により検出が可能であった (図2)。しかし、増菌培養液を用いると、1個含まれていても検出可能となった (図3)。

(2) 大気中からの炭疽菌の分離と迅速検出

① 菌数の測定

まずTSA平板上で一般細菌数を計測した。大気条件や場所による差はあるものの、 $10^3 \sim 10^4$ 個が検出された。更に、BCA平板を用いて炭疽菌の混入したサンプルを塗抹した。この培地は、セレウス菌を集落の形態で選択しようとするもので、培地上でトルコ石色を呈し、集落周囲に混濁リングがレシチナーゼにより精製され、他の菌種と区別可能となる培地である。この培地上では、*B. mycooides*, *B. thuringiensis*, *B. cereus*と*B. anthracis*のみがBCA平板上でラフで大型の集落を形成したが、他の*Bacillus*属菌種は発育しないかごく小さい集落を呈し、更に、*B. mycooides*, *B.*

*thuringiensis*と*B. cereus*では、集落周囲に明瞭な混濁形成が観察されたが、*B. anthracis*では観察されないため、BCA培地は炭疽菌の選択用に使用できると考えた（分担研究者藤原の報告参照）。結果的に、炭疽菌は培地上で判別可能であり、炭疽菌の分離は可能であった。

② PCR法による炭疽菌DNAの検出

炭疽菌芽胞を添加した空気サンプルから直接加熱処理によりPCRを行った。その結果、1個含む場合わずかの増幅が電気泳動により確認された（図4）。しかし、含有菌数の定量化は全く出来なかった。そこで、Light CyclerシステムにおけるPCRの至適条件を検討した。その結果、アニーリング温度は60℃で行ったときに良好な結果が得られた。同時に、反応液中のMg濃度の指摘条件を検討した結果、終濃度4 mMの時に良好な結果が得られた（図5）。更に、PCRにおける増幅産物が目的の産物と同じであることは、融解曲線の融解ピーク温度を測定すること（図6）、および増幅産物をアガロースゲル電気泳動で確認すること（図7）によって確かめた。更に増幅開始サイクル数を計測することによって、芽胞数の混入数に比例していたので、サンプル内に混入している菌数が定量化できることが明らかになった。

(3) 土壌からの炭疽菌の分離と迅速検出

① 土壌からの芽胞菌の検出

食肉および大気中から効率良くBCA平板により炭疽菌を分離できたため、同様に土壌サンプルでも検討した。しかし、昨年度報告した、炭疽菌選択培地として報告されているPLET培地の結果と同様に、計算上10 g当り1000個以上炭疽菌が土壌中に存在しないと検出できなかった。これは増菌培養を併用しても同じ結果であった。何らかのトリックを使わない限り、炭疽菌芽胞を僅か含んだ土壌サンプルから菌体を分離することは不可能であると結論した。

③ Nested-PCR法による炭疽菌DNAの検出

昨年度、土壌サンプルからの炭疽菌のPCR法による検出は、100個以上含む土壌1グラムからは安定した結果を得たが、少ないときは不安定であったと報告した。土壌の処理過程に問題があるのではないかと考え、方法に記した処理方法を使用した。更に、PCR用のテ

ンプレートDNAの調整方法が煩雑で時間がかかることから新たなシステムを導入した。これらの結果から、1グラム当り1個の芽胞があっても安定に炭疽菌を検出できる系が確立できた（図8）。

(4) 炭疽菌の莢膜の生物学的意義

マウスに対して病原性が喪失していた*dep*遺伝子の変異株が、なぜ非病原株になっていたのかを明らかにするために、マウス腹腔マクロファージを用いて貪食能を比較した。その結果、マクロファージ内に取り込まれた菌体は変異株の方が有意に高いことが明らかとなった。炭疽菌の莢膜物質が抗食作用と関係していることは明らかであったが、通常の細菌の莢膜と異なり、*dep*遺伝子産物により菌体表層に形成された高分子量の莢膜が低分子量の莢膜に分解されて菌体外に放出されることが、抗食作用を誘導すると考えられた。

(5) *B. brevis*を用いた炭疽ワクチンの開発

防御抗原の大腸菌内でのクローニングは、ウエスタンブロットィングにより発現していることが確認され、その後挿入遺伝子断片を*B. brevis*用の発現ベクターpNH326に挿入した。その際、*B. brevis*に直接形質転換する必要がある。プラスミドDNAの形質転換は、*B. brevis*の増殖期にその頻度が大きく左右され、頻度の高い状態の細胞を得るのは簡単には行かなかった。*B. brevis*の増殖曲線の後期対数増殖期を最低3点30分おきにサンプリングを行い、pNH326が最も頻度良く形質転換する条件の細胞を用いた。条件の良い細胞を一度得ることに成功すれば、-80℃にストック可能なので、数ヶ月は良好な条件を保持できた。このようにして、炭疽菌の防御抗原（PA）遺伝子を保有するpNH326を作製し、PAに対する抗体を用いたウエスタンブロットィング解析により、*B. brevis*内でPAの発現を調べた。72時間培養により菌体と培養上清を調べた結果、培養上清に有意に高い産物の産生が確認された（図9）。

D. 考察

① 本研究でデザインしたプライマーは炭疽菌特異的であり、実際の検出には使用できるものと考えられた。しかし、BA813プライマーセットは炭疽菌特異的ではなかった。表1に示したプライマーセットの病原因子としてのPAとCAP用プライマー、および染色体マーカーとしてのS-layer用プライマーをスクリーニングに用いるべきであると結論した。又、菌体そのものを炭疽菌かどうか判定す

には、昨年度同様ミックスプライマーセットの利用が有益であると考えられ、PA5とPA8の毒素検出用プライマー（596 bp増幅）と、BA546とBA547の莢膜遺伝子検出用プライマー（298bpの増幅）を用いるのが良好な結果が得られた。

- ② 炭疽菌の分離にはPLET培地が有効であると昨年度報告したが、土壌サンプルでは炭疽菌以外にも多くの菌種が成育してしまい、集落の形態が他の*Bacillus*属菌と区別がつかないこと、炭疽菌の発育を抑えること、等の問題点があったので、炭疽菌以外にも大きな集落を形成する菌種があるが、色や形で炭疽菌を判定でき、炭疽菌の成育を抑えないことを評価して、BCA培地が炭疽菌の分離に有効であると結論した。しかし、この培地は、食肉や大気など比較的*Bacillus*属菌が少ない環境や一般細菌数が少ない環境で用いるのみ非常に有効であるとする。土壌サンプルなどからは別の方法を確立する必要がある。
- ③ PCR法による炭疽菌の迅速検出は本年度で確立した。大気中は一般細菌数が少ないことを考慮すると、最も効率良く増菌過程を経ずに分離できた。しかも、Light Cycler Systemの導入により更に短時間で検出可能であると結論された。作業時間、2時間以内にはスクリーニングできると考えられる。一方、食肉および土壌の場合は、増菌過程がどうしても必要であったが、食肉の場合は、多量の菌体が存在すれば直接PCRでスクリーニングできることが判っているので、両者の併用が望ましいであろう。土壌に関しては、直接は不可能であるが、菌分離が多量の菌体存在下では併用できる。どちらの場合も更なる迅速化が今後の課題になるものと考えられる。
- ④ 炭疽の発症機構

炭疽の発症機構には、芽胞体から栄養形への変化、莢膜物質を菌体外に積極的に放出する機構が、食菌作用への防御に働くという新しい概念を今回提唱した。炭疽菌の感染過程は、芽胞が生体内に侵入後、発芽過程を経て血流中で爆発的に増殖することによって、最終的には毒素ショックで死亡する。その爆発的な増殖を生体

防御機構では抑えきれない。この防御機構を結果的に押さえる働きを莢膜が持っていることを明らかにした。しかも、莢膜の菌体表層での重合と分解という相反する2種類の反応を同時に起こしていると考えられ、生物学的にも興味深い結果であるといえる。

⑤ 炭疽菌の新たなワクチン開発

現在PAの発現が確認されたが、その発現量の比較や防御能に関しては明らかになっていない。現在の炭疽菌ワクチンは、副作用や接種期間の長さなど多くの問題があるので、防御抗原の精製は重要であると考えられている。今回の方法で、PAの精製が容易に行うことが出来、しかも防御能を保有していたとしたら将来有効なワクチンの一つとして考えることが出来る。今回の*B. brevis*内のPAの発現とワクチンへの応用は韓国国防相でも開発が検討されており、有望なワクチンとなるかもしれない。

E. 結論

- ① 炭疽菌検出用のPCRシステムが確立された。しかし、更なる迅速化が課題である。
- ② 大気および食肉から炭疽菌を分離する方法が確立された。課題は、土壌からの分離方法の確立である。
- ③ 炭疽の毒素の発症への関与はある程度明らかになっているので、それと合わせて、今回の結果から炭疽の発症機構のほぼ全容が明らかになりつつある。
- ④ 炭疽菌ワクチンは、安全性を考えて、無毒菌を宿主に使用する系を導入した。本システムが防御能に寄与できるかが課題である。

F. 研究発表

一部投稿済みで、他は準備中もしくは進行中である。

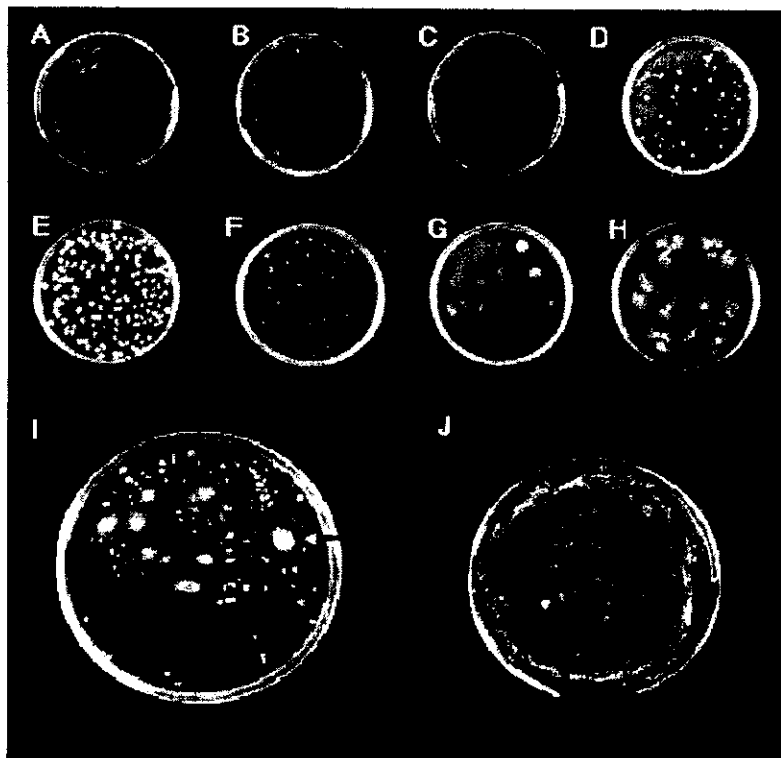


図1. BCA培地上の各種*Bacillus*属菌種の発育集落

A, *B. mycooides*; B, *B. thuringiensis*; C, *B. cereus*; D, *B. brevis*; E, *B. subtilis*; F, *B. licheniformis*; G, *B. anthracis*Sikan; H, *B. anthracis*34-F2; I, 芽胞10個を含む1gのサンプルの直接塗抹; J, 芽胞1個を含む1gのサンプルの増菌培養の塗抹。矢印は、炭疽菌集落を示す。

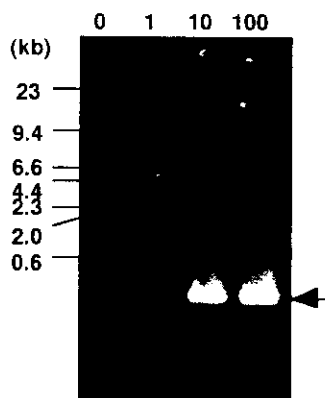


図2. リンパ節からの炭疽菌DNAのNested-PCR法による直接分離

炭疽菌芽胞10個以上の存在でPCRが陽性になっている。

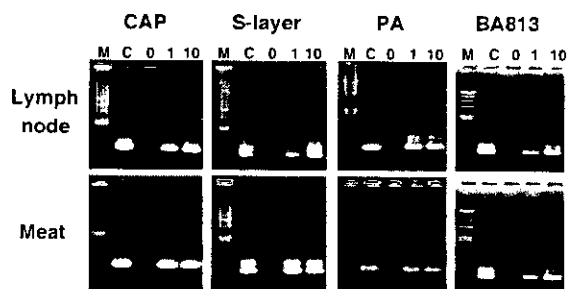


図3. 増菌培養を併用したNested-PCR法による炭疽菌DNAの増幅

左から荚膜遺伝子、S-layer遺伝子、防御抗原遺伝子、染色体上のBA813領域を示す。写真上段はリンパ節を用いた結果、下段は、食肉を用いた結果である。

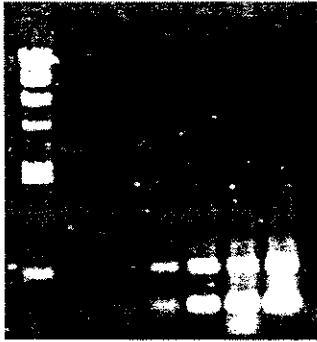


図4. 炭疽菌芽胞の混入した空気サンプルからの炭疽菌DNAの検出

混合プライマーを使用した。左端は λ DNA HindIII 消化サイズマーカーで、順番に芽胞を0、1、10、100、1000個含むサンプルで、右端は精製DNA。

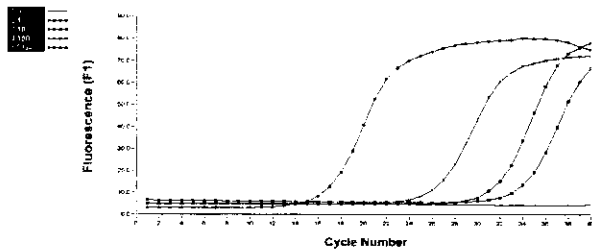


図5. Light Cyclerによる炭疽菌DNAの増幅曲線
プライマーはMO11とMO12を使用した。曲線は左から、精製DNA、100個芽胞、10個芽胞、1個芽胞をそれぞれ含むサンプルで、増幅が見られない線が芽胞を含まないものである。これらを解析して、DNAの含有量が芽胞数と比例していた。

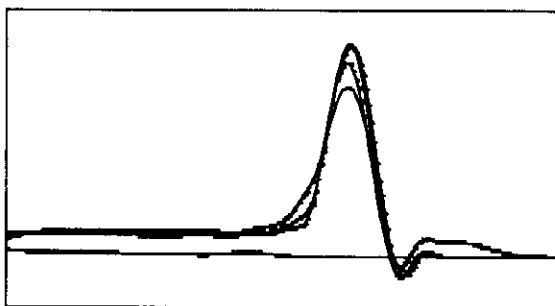


図6. 融解曲線

図2の増幅産物の融解曲線である。全てが、一つのピークを持ち、一致していたので、同じ産物が増幅されたと考えられた。また、芽胞を含まない場合は全くピークが観察できなかった。

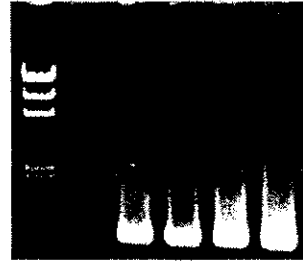


図7. Light Cyclerにより増幅された産物の電気泳動写真

図1で増幅された産物を電気泳動により確認した

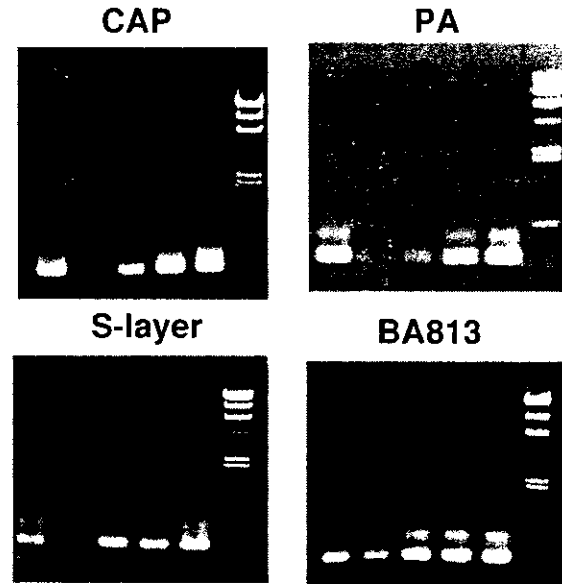


図8. 土壌を用いたNested-PCRによる炭疽菌の検出

それぞれの写真のレーン左から陽性精製DNA、芽胞数0、芽胞数1、芽胞数10、芽胞数100、DNAマーカー。BA813に関しては芽胞数0のレーンでも増幅産物が確認できる。

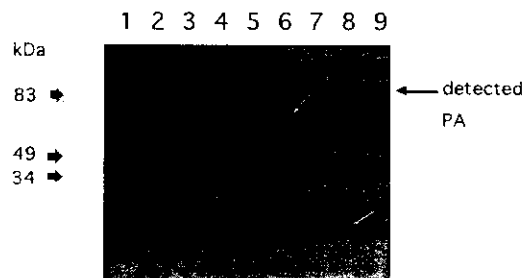


図9. *B. brevis*内でのPAの発現

1, 大腸菌のPAの非発現対照；2, 大腸菌のPA産生陽性対照；3, *B. brevis*の陰性対照；4~6, *B. brevis*内PA導入株の72時間培養菌体；7~9, *B. brevis*内PA導入株の72時間培養上清。

表1. 炭疽菌特異的Nested-PCR用プライマー

PCR	Primer	Sequence (5' - 3')	Target	Amplified size
1st	BA813U	ACTAACGAATCTTTCATTTAGCG	BA813	255 bp
	BA813L	ATTGCACTTGCATAATATCCTTG		
2nd	BA813R1	AACGATAGCTCCTACATTTGGAG		152 bp
	BA813R2	TTAATTCACCTTGCAACTGATGGG		
1st	SL-U1	CGCGTTTCTATGGCATCTCTTCT	S-layer	639 bp
	SL-D1	TTCTGAAGCTGGCGTTACAAAT		
2nd	SL-U2	CGGRACAGAAGCAGCAAAA		357 bp
	SL-D2	GCTGTTGGCTCATCAGCTA		
1st	PA8	GAGGTAGAAGGATATACGGT	PA	596 bp
	PA5	TCCTAACACTAACGAAGTCG		
2nd	PA7	ATCACCAGAGGCAAGACACCC		210 bp
	PA6	ACCAATATCAAAGAACGACGC		
1st	MO11	GACGGATTATGGTGCTAAG	CAP	572 bp
	MO12	GCACTGGCAACTGGTTTTG		
2nd	BA547	GCTGATCTTGACTATGTGGGTG		267 bp
	BA546	GGCTTCCTGTCTAGGACTCGG		

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

食肉中の炭疽菌の迅速検出法の確立に関する研究

分担研究者 藤原真一郎 国立公衆衛生院衛生獣医学部人畜共通感染症室長

研究要旨 一世紀以上前に世界で初めて分離・同定された病原体、炭疽菌は世界で恐れられてきた伝染病、炭疽の原因菌である。現在新興・再興感染症がクローズアップされている中で、炭疽菌は容易に大量の芽胞菌体として精製できるので、紛争が起こると常に生物兵器のための病原菌として恐れられてきた。即ち、人為的に起こりうる伝染病と言える。同時に、海外では動物やヒトでの自然発生も毎年数多く報告されている。この原因は炭疽菌芽胞による汚染常在地の存在による。わが国でもかつては発生が多く見られたので、炭疽常在地が多くあると考えられるので、人為的原因による発生も考慮して、炭疽に対する警戒および防疫上の対処は常に必要である。しかし、我が国は炭疽に対しては発生が無いことから無防備であるといえる。また、土壌や動物の炭疽の汚染度を調べる技術も国内外を問わず不十分で、ワクチン技術もまだ未完全であると言える。そこで、本研究では、①炭疽菌の検出法の確立とその応用、②炭疽菌の遺伝子型別の確立、③炭疽の発症機構の解明を通じて、行政的には炭疽の防疫体制や疫学調査研究の強化、学術的には炭疽のワクチン開発の基礎データ作成に貢献する。本分担研究では、昨年度食肉衛生検査所で炭疽が疑われた場合、迅速に診断可能な系を確立することを目的として研究し、PCR法を利用して食肉からの検出法を確立した。今年度は、その検出方法の精度の向上及び検体から炭疽菌を分離する簡便な方法を確立した。今回の結果で、炭疽の汚染経路として考えられる食肉、空気および土壌の内、食肉からの検査法は確立されたことになった。

A. 研究目的

炭疽菌により起こる炭疽は、草食動物を中心とした家畜伝染病であるが、人を含めた他の動物にも重篤な症状を起こす人畜共通伝染病である。炭疽菌は、乾燥状態で容易に芽胞菌となり、一度土壌が炭疽菌で汚染されると、芽胞菌として感染力を保持しながら数十年生残り、炭疽常在地となる。人の疾病は、創傷感染による皮膚炭疽、汚染動物肉の経口摂取による腸炭疽、および芽胞を吸引する肺炭疽があるが、肺炭疽が最も死亡率が高く、適切な治療を行わないと99%死亡する。そして、炭疽菌の芽胞は、ごく基本的な設備や知識で簡単に大量培養でき、しかも色も匂いも味もない粉末として調整し噴霧でき、その5ポンドでワシントンDCの人口の半分を侵すことが出来るといわれている。このことは、容易に炭疽菌が生物兵器へ利用される危険性を含んでいる。即ち、炭疽は世界で食肉衛生・防疫上最も恐れられている伝染病の一つである。実際、1998年にアメリカ国防省は、全ての軍人に炭疽ワクチン接種が必要であると勧告している。我国での炭疽の発生はこの数年報告されていないが、先進国を含めた国外での発生は数多く起こっている。我が国でも以前は炭

疽が頻繁に発生していたので、土壌の炭疽菌常在化が既に起こっていると考えられ、常に内外から我国は危険にさらされているといえる。しかし、国外でこれほど危険視されている炭疽に対する我国の関心は、極めて低いのが現状である。更に、ワクチン接種期間が18ヶ月に渡っていたり、炭疽の早期診断技術の確立が不十分で、特に土壌中の炭疽の汚染度を調べる技術が確立されておらず、また炭疽の発症機構自体の詳細がほとんど解明されていないなどの問題点が多く残っている。そこで、本研究では、炭疽に対する国内での発生を未然に防止するために、土壌や不顕性感染動物からの迅速・確実な検出法および国外からの炭疽の伝播に対して未然に防ぐために必要な防疫上の検査法の確立、しいては予防のための基礎データとなる炭疽の発症機構の解明などを行い、発生の可能性のある炭疽から社会を守るために炭疽の基礎および応用研究を行う。同時に、炭疽が発生した場合に備え、その感染経路を的確に把握するための炭疽菌の遺伝子型別を行う基礎データを作成することも研究目標としている。特にこの分担研究では、食肉衛生検査所における炭疽菌の迅速検出法の確立を目的として実験を進める。

B. 研究方法

食肉検査所から豚の腸間膜リンパ節および市販食肉を用い、人工的に炭疽菌芽胞を0、1、10、および100個を添加して実験を行った。炭疽菌は当研究室保存のパスツール2苗（毒素、莢膜産生株）を用いた。芽胞液の調整方法は昨年度と同じである。栄養型の炭疽菌の場合は連鎖状に繋がり正確な菌数の把握が出来ないため、芽胞を用いて菌数の把握を行った。方法は昨年度の報告から改良された点を中心に記載する。

① 培地

昨年度報告した炭疽菌用の選択培地PLET培地（ハートインフュージョン寒天培地に酢酸タリウム；0.04 g/l、ポリミキシンB；30,000 units/l、lyzosome；300,000 units/l、EDTA；0.3 g/lを添加）と共に、*Bacillus cereus* selective agar (BCA; Oxoid) 平板および非選択培地である Trypticase soy agar (TSA) を用いた。液体培地としては、Trypticase soy broth (TSB) を用いた。

② PCR法による検出

昨年度報告した炭疽菌の病原因子である莢膜（Cap）、毒素（PA）および染色体上の配列（BA813）を利用したプライマーセットを用い、Nested-PCRを実施した。それらの内、染色体上の配列として、S-layer遺伝子を利用したプライマーセットを今年度追加して使用した。BA813を用いたPCRでは、土壌を用いた検出系（分担研究者牧野の）で、時として非特異的な増幅産物が検出されたので、S-layer遺伝子の配列を使用することにした。それらの配列は、表1に示す。

検体からの直接検出は、炭疽菌芽胞を人工的に混入させた検体1 gを10mlのPBS中でホモジナイズ後、その0.1mlを寒天平板培地に塗抹するとともに、1.0mlを直接PCRに用いた。

増菌用に、検体1 gをTSA10mlと混合し、37℃で16時間振盪培養を行った。翌朝その1次増菌液0.1mlを寒天平板上に塗抹するとともに、その1.0mlを遠心後、全DNAを分離精製した。

PCR用のDNAの精製方法は、マニュアル通りにFastPrep™ FP120 instrument (Bio 101, Inc. CA., USA)を用いて行った。DNAは濃度調整後、100ngをPCRに使用した。PCRの条件は昨年度報告した条件である。

C. 研究結果

① リンパ節および食肉からの芽胞菌の直接検出

昨年度報告したように、我々の研究室保存菌株を

用いた結果では、炭疽菌選択用のPLET培地は明らかに炭疽菌特異的な選択培地として有効であった。

しかし、炭疽菌の発育集落数はTSA平板に比べ約10~100分の1に減少しており、炭疽菌を選択するとともに、その発育をも抑制していることが明らかとなった。更に、土壌を用いた結果で（分担研究者牧野の報告参照）は、PLET平板上で炭疽菌以外の菌種の発育も観察され、その集落の形態は炭疽菌と区別できないものであった。そこで、更に有効な培地を選ぶために、BCA平板を候補として検討した。この培地は、セレウス菌を集落の形態で選択しようとするもので、BCA培地上でセレウス菌はトルコ石色を呈し、集落周囲に混濁リングがレシチナーゼにより観察され、他の菌種と区別可能となる培地である。炭疽菌はセレウス菌と分類学上近い関係にあり、*Bacillus*属の中でセレウスグループに入っている。研究室保存*Bacillus*属を用いた結果、*B. mycooides*, *B. thuringiensis*, *B. cereus* と *B. anthracis*のみがBCA平板上でラフで大型の集落を形成したが、他の*Bacillus*属菌種は発育しないか、ごく小さい集落を呈した。更に、*B. mycooides*, *B. thuringiensis*と*B. cereus*では、集落周囲に明瞭な混濁形成が観察されたが、*B. anthracis*では観察されなかった。同時に、PLET培地で見られた炭疽菌に対する発育阻害も確認されなかった。この結果、BCA培地は炭疽菌の選択用に使用できると考えた。

そこで、炭疽菌を人工的に混入させた検体を用いて、BCA培地に塗抹した結果、1グラムのリンパ節に10個以上添加した場合は、培地上で炭疽菌を分離可能であった（図1）。

② 増菌培地からの炭疽菌の分離

炭疽菌の菌数が少ない場合、増菌後塗抹して炭疽菌を分離同定するが、前述の理由からPLET培地では不相当と考えられたので、BCA培地の応用を検討した。その結果、炭疽菌以外の菌の増殖は確認できたが、それらの集落は小さかった。その中で大型の集落を選びPCRにより炭疽菌であることを確認できた。種々の炭疽菌の混入された検体を用いて炭疽菌の分離が出来たので、前述の直接法との併用で、いかなる場合も炭疽菌の分離が可能であると結論した（図1）。

③ PCR法による炭疽菌DNAの検出

検体1 g当り100個以上の炭疽菌があれば、直接PCR法により検出が可能であった（図2）。しかし、増菌培養液を用いると、1個含まれていても検出可能となった（図3）。

D. 考察

以上の結果は、増菌培養の工程を併用することで、食肉や臓器 1 g 1 個以上の炭疽菌が存在すれば炭疽菌を検出できる事を意味している。直接検出系では、検体の処理からPCRの結果まで約3時間で判定でき、翌朝には炭疽菌が分離できる。また、増菌工程を用いれば、試験開始翌日には炭疽菌陽性化陰性化が判明し、二日後朝には炭疽菌疑似集落の検出が可能である。それらの疑似集落を炭疽菌用のプライマーのいずれかを用いてPCRで炭疽菌であるかを確認すれば（この場合Nested-PCRはする必要はない）、午後には炭疽菌の分離が可能となる。以上の方法を利用すれば、炭疽菌の検出および分離が迅速にできると考えられた。検体処理には、FastPrep™ FP120 instrumentを使用したがる、フェノール等の有機溶媒を一切使用せず、いかなる検体であっても1分以内にDNAが抽出可能で、迅速性に優れ便利であった。多くの検体に応用可能であると考えられる。

今回、BCA培地が炭疽菌の分離に利用可能であったが、この培地にはポリミキシンBや卵黄液を含み、集落形態で容易に炭疽菌を区別できる利点があったが、選択性がPLETに比べ弱く、その結果、炭疽菌のみの選択には適していない。しかし、その欠点が、PLET培地で見られた炭疽菌の発育の抑制を抑え、炭疽菌の分離を容易にした。しかし、この培地は、*Bacillus*属の菌種には選択性が比較的弱く、その結果、炭疽菌以外の*Bacillus*属の芽胞を多く含む土壌では応用できないであろうと考えられた（分担研究者牧野の報告参照）。

E. 結論

今回、増菌培養との併用で、ごくわずかの炭疽菌を含む食肉から迅速かつ的確に炭疽菌を分離・検出する系を確立した。

F. 研究発表 投稿済みである。

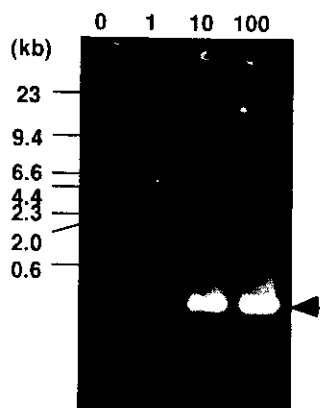


図2. リンパ節からの炭疽菌DNAのNested-PCR法による直接分離
炭疽菌芽胞10個以上の存在でPCRが陽性になっている。

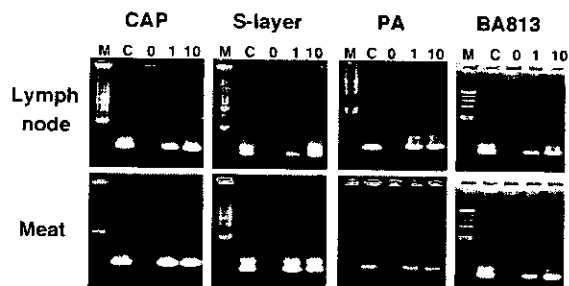


図3. 増菌培養を併用したNested-PCR法による炭疽菌DNAの増幅

左から荚膜遺伝子、S-layer遺伝子、防御抗原遺伝子、染色体上のBA813領域を示す。写真上段はリンパ節を用いた結果、下段は、食肉を用いた結果である。

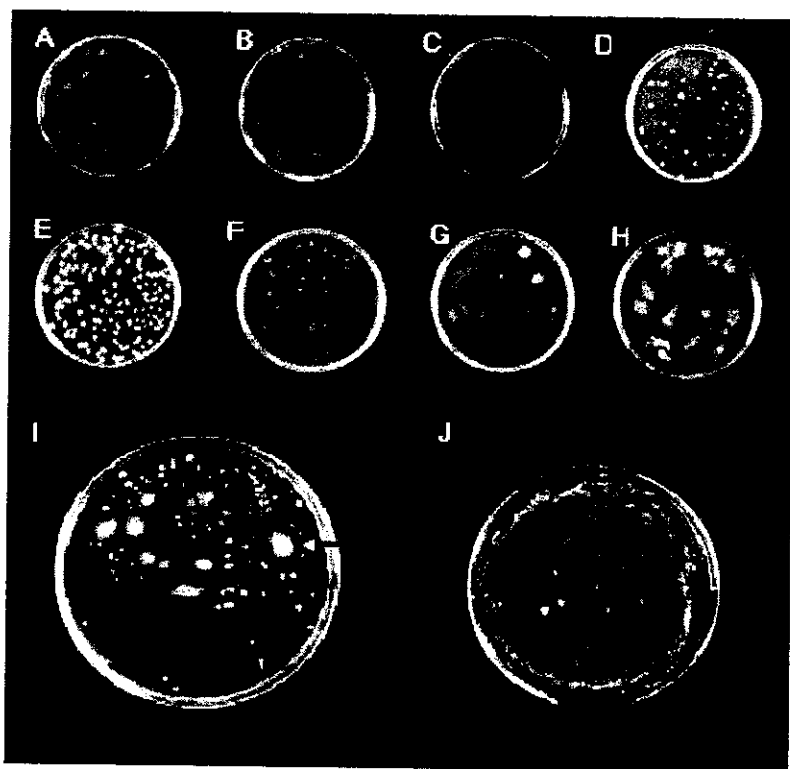


図1. BCA培地上の各種*Bacillus*属菌種の発育集落

A, *B. mycooides*; B, *B. thuringiensis*; C, *B. cereus*; D, *B. brevis*; E, *B. subtilis*; F, *B. licheniformis*; G, *B. anthracis*Sikan; H, *B. anthracis*34-F2; I, 芽胞10個を含む1gのサンプルの直接塗抹; J, 芽胞1個を含む1gのサンプルの増菌培養の塗抹。矢印は、炭疽菌集落を示す。

表1. 炭疽菌特異的Nested-PCR用プライマー

PCR	Primer	Sequence (5' - 3')	Target	Amplified size
1st	BA813U	ACTAACGAATCTTTCATTTAGCG	BA813	255 bp
	BA813L	ATTGCACTTGCATAATATCCTTG		
2nd	BA813R1	AACGATAGCTCCTACATITGGAG		152 bp
	BA813R2	TTAATTCCTGCAACTGATGGG		
1st	SL-U1	CGCGTTTCTATGGCATCTCTTCT	S-layer	639 bp
	SL-D1	TTCTGAAGCTGGCGTTACAAAT		
2nd	SL-U2	CGGRACAGAAGCAGCAAAA		357 bp
	SL-D2	GCTGTTGGCTCATCAGCTA		
1st	PA8	GAGGTAGAAGGATATACGGT	PA	596 bp
	PA5	TCCTAACACTAACGAAGTCG		
2nd	PA7	ATCACCAGAGGCAAGACACCC		210 bp
	PA6	ACCAATATCAAAGAACGACGC		
1st	MO11	GACGGATTATGGTGCTAAG	CAP	572 bp
	MO12	GCACTGGCAACTGGTTTTG		
2nd	BA547	GCTGATCTTGACTATGTGGGTG		267 bp
	BA546	GGCTTCCTGTCTAGGACTCGG		

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

大気中の炭疽菌の迅速検出法の確立に関する研究
分担研究者 江崎孝行 岐阜大学医学部微生物学教室教授

研究要旨 一世紀以上前に世界で初めて分離・同定された病原体、炭疽菌は世界で恐れられてきた伝染病、炭疽の原因菌である。現在新興・再興感染症がクローズアップされている中で、炭疽菌は容易に大量の芽胞菌体として精製できるので、紛争が起こると常に生物兵器のための病原菌として恐れられてきた。即ち、人為的に起こりうる伝染病と言える。同時に、海外では動物やヒトでの自然発生も毎年数多く報告されている。この原因は炭疽菌芽胞による汚染常在地の存在による。わが国でもかつては発生が多く見られたので、炭疽常在地が多くあると考えられるので、人為的原因による発生も考慮して、炭疽に対する警戒および防疫上の対処は常に必要である。しかし、我が国は炭疽に対しては発生が無いことから無防備であるといえる。また、土壌や動物の炭疽の汚染度を調べる技術も国内外を問わず不十分で、ワクチン技術もまだ未完全であると言える。そこで、本研究では、①炭疽菌の検出法の確立とその応用、②炭疽菌の遺伝子型別の確立、③炭疽の発症機構の解明を通じて、行政的には炭疽の防疫体制や疫学調査研究の強化、学術的には炭疽のワクチン開発の基礎データ作成に貢献する。炭疽の汚染経路として食肉、空気および土壌の3種類が考えられるが、本分担研究で、大気中からの炭疽菌の迅速検出法を確立し、同時に、汚染菌数の定量化についても検討した。

A. 研究目的

炭疽菌により起こる炭疽は、草食動物を中心とした家畜伝染病であるが、人を含めた他の動物にも重篤な症状を起こす人畜共通伝染病である。炭疽菌は、乾燥状態で容易に芽胞菌となり、一度土壌が炭疽菌で汚染されると、芽胞菌として感染力を保持しながら数十年生残し、炭疽常在地となる。人の疾病は、創傷感染による皮膚炭疽、汚染動物肉の経口摂取による腸炭疽、および芽胞を吸引する肺炭疽があるが、肺炭疽が最も死亡率が高く、適切な治療を行わないと99%死亡する。そして、炭疽菌の芽胞は、ごく基本的な設備や知識で簡単に大量培養でき、しかも色も匂いも味もない粉末として調整し噴霧でき、その5ポンドでワシントンDCの人口の半分を侵すことが出来るといわれている。このことは、容易に炭疽菌が生物兵器へ利用される危険性を含んでいる。即ち、炭疽は世界で食肉衛生・防疫上最も恐れられている伝染病の一つである。実際、1998年にアメリカ国防省は、全ての軍人に炭疽ワクチン接種が必要であると勧告している。我国での炭疽の発生はこの数年報告されていないが、先進国を含めた国外での発生は数多く起こっている。我が国でも以前は炭疽が頻繁に発生していたので、土壌の炭疽菌常在化が既に起こっていると考えられ、常に内外から我国

は危険にさらされているといえる。しかし、国外でこれほど危険視されている炭疽に対する我国の関心は、極めて低いのが現状である。更に、ワクチン接種期間が18ヶ月に渡っていたり、炭疽の早期診断技術の確立が不十分で、特に土壌中の炭疽の汚染度を調べる技術が確立されておらず、また炭疽の発症機構自体の詳細がほとんど解明されていないなどの問題点が多く残っている。そこで、本研究では、炭疽に対する国内での発生を未然に防止するために、土壌や不顕性感染動物からの迅速・確実な検出法および国外からの炭疽の伝播に対して未然に防ぐために必要な防疫上の検査法の確立、しいては予防のための基礎データとなる炭疽の発症機構の解明などを行い、発生の可能性のある炭疽から社会を守るために炭疽の基礎および応用研究を行う。同時に、炭疽が発生した場合に備え、その感染経路を的確に把握するための炭疽菌の遺伝子型別を行う基礎データを作成することも研究目標としている。炭疽の汚染経路として食肉、空気および土壌の3種類が考えられるが、本分担研究で、大気中からの炭疽菌の迅速検出法を確立し、同時に、汚染菌数の定量化についても検討した。

B. 研究方法

通常の大気中から空気サンプラーを使用して、5リットルの空気をサンプリングした。それらをフィルターでろ過し、フィルター上の一般菌数を測定するとともに、そのサンプルに人工的に炭疽菌芽胞を0、1、10、および100個を添加して実験を行った。細菌数の計測には、フィルターを生理食塩水中で混濁させて、遠心後直接培地に塗抹した。使用培地は、非選択培地であるTrypticase soy agar (TSA) および*Bacillus cereus* selective agar (BCA; Oxoid) 平板である。

菌数が少量の際にはPCR用のテンプレート量のロスが想定できるので、 10^5 個の大腸菌を人工的に添加してサンプルとした。大腸菌は病原性の無い遺伝子組換えに使用されているMC1061株を使用した。得られたサンプルを遠心後、ペレットに10 μ lの滅菌蒸留水を加え、95°C 10分間加熱した。その後、15000回転で3分間遠心後上清の1 μ lをPCRに使用した。また、DNAを精製するためには、QIAamp DNA Mini Kit (Quiagen Japan K.K.) を用いて精製した。炭疽菌は当研究室保存のパスツール2苗（毒素、莢膜産生株）を用いた。芽胞液はパスツール株をLプロスで37°C一夜培養し、遠心後、一回生理食塩水で菌体を洗浄後、生理食塩水に再懸濁し、37°Cで3日間振盪培養し作成した。芽胞数の計測はL寒天平板上にて行った。PCRのためのプライマーは、昨年度報告した炭疽菌の病原因子である莢膜形成に必須の遺伝子を利用して作製された592bpの増幅用のMO11とMO12を使用した。混合プライマーとしては、MO11とMO12のセットと、防御遺伝子を増幅するPA6とPA7の210bpを増幅するセットを用いた。増幅システムは、通常増幅装置とLight Cycler System (ロッシュ・ダイアグノスティック株式会社) を使用した。Light Cycler Systemによる増幅は、FastStart DNA Master SYBR Greenを使用し、コンピュータ上で増幅産物の確認と増幅産物の融解曲線分析を行い、目的とする産物であることを確認した。同時にアガロースゲル電気泳動により増幅産物を確認した。更に、混入芽胞数に応じた増幅産物の定量化が可能か否かについても検討した。

C. 研究結果

①菌数の測定

まずTSA平板上で一般細菌数を計測した。大気条件や場所による差はあるものの、 $10^3 \sim 10^7$ 個が検出された。更に、BCA平板を用いて炭疽菌の混入したサンプルを塗抹した。この培地は、セレウス菌を集落の形態で選択しようとするもの

で、培地上でトルコ石色を呈し、集落周囲に混濁リングがレンチナーゼにより精製され、他の菌種と区別可能となる培地である。この培地上では、*B. mycooides*, *B. thuringiensis*, *B. cereus*と*B. anthracis*のみがBCA平板上でラフで大型の集落を形成したが、他の*Bacillus*属菌種は発育しないかごく小さい集落を呈し、更に、*B. mycooides*, *B. thuringiensis*と*B. cereus*では、集落周囲に明瞭な混濁形成が観察されたが、*B. anthracis*では観察されないため、BCA培地は炭疽菌の選択用に使用できると考えた（分担研究者藤原の報告参照）。結果的に、炭疽菌は培地上で判別可能であり、炭疽菌の分離は可能であった。

②PCR法による炭疽菌DNAの検出

炭疽菌芽胞を添加した空気サンプルから直接加熱処理によりPCRを行った。その結果、1個含む場合わずかの増幅が電気泳動により確認された（図1）。しかし、含有菌数の定量化は全く出来なかった。

まずLight Cycler システムにおけるPCRの最適条件を色々検討した結果、アニーリング温度は60°Cで行ったときに良好な結果が得られた。同時に、反応液中のMg濃度の指摘条件を検討した結果、終濃度4 mMの時に良好な結果が得られた（図2）。更に、PCRにおける増幅産物が目的の産物と同じであることは、融解曲線の融解ピーク温度を測定すること（図3）、および増幅産物をアガロースゲル電気泳動で確認すること（図4）によって確かめた。更に増幅開始サイクル数を計測することによって、芽胞数の混入数に比例していたので、サンプル内に混入している菌数が定量化できることが示唆された。

D. 考察

炭疽菌の動物への感染経路のうち、空気感染が最も恐ろしく、かつ危険である。海外においても炭疽菌の感染経路として空気が最も恐れられており、その簡便・迅速な検出法の確立が重要であると考えられている。本研究では、Light Cycler SystemによるリアルタイムPCR法をその検出系に応用できないか、検討した。リアルタイムPCR法は、現在数社から市販されているが、今回用いたLight Cycler Systemはキャピラリー式の増幅装置であるために、短時間で検出可能であるという利点を持っている。実際に、今回の系では、一時間以内に全ての解析が終了した。同時に、空気をサンプルとした場合には、混入芽胞数を定量化できることも分かり、どの程度

の菌数が混入しているか一時間以内には明らかにできるという利点も会った。通常PCRは、アガロースゲル電気泳動にて増幅産物の確認をするが、本システムに備え付けられている融解曲線の測定を調べるにより目的とするDNA断片が増幅されたのかを確認することが出来た。本システムは、空気のみならず他のサンプルでも応用可能なのか、今後の課題であり、他の菌種でも充分応用可能であろうと考えられ、有効な検出システムであると言える。

E. 結論

今回、空気から迅速かつ的確に炭疽菌を検出する系をリアルタイムPCR法を用いて確立した。更に菌数を測定することなく、一時間以内に菌数を調べることも出来、他方面への応用が強く期待できるシステムであった。

F. 研究発表

投稿および学会発表準備中。平成13年度中に行う予定。

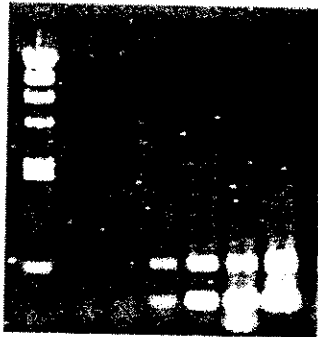


図1. 炭疽菌芽胞の混入した空気サンプルからの炭疽菌DNAの検出
混合プライマーを使用した。左端はλ DNA *Hind*III 消化サイズマーカーで、順番に芽胞を0、1、10、100、1000個含むサンプルで、右端は精製DNA。

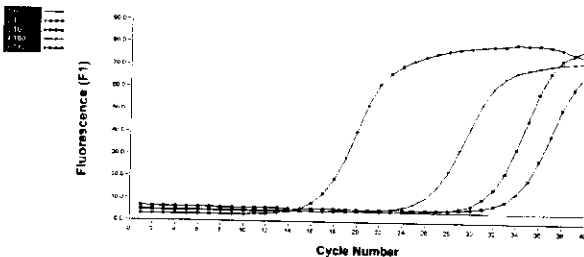


図2. Light Cyclerによる炭疽菌DNAの増幅曲線
プライマーはMO11とMO12を使用した。曲線は左から、精製DNA、100個芽胞、10個芽胞、1個芽胞をそれぞれ含むサンプルで、増幅が見られない線が芽胞を含まないものである。これらを解析して、DNAの含有量が芽胞数と比例していた。

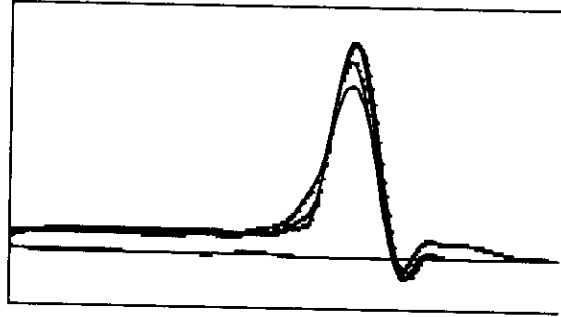


図3. 融解曲線

図2の増幅産物の融解曲線である。全てが、一つのピークを持ち、一致していたので、同じ産物が増幅されたと考えられた。また、芽胞を含まない場合は全くピークが観察できなかった。

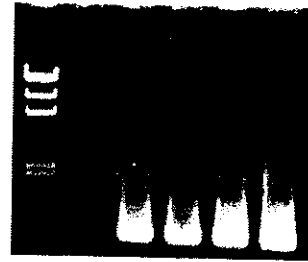


図4. Light Cyclerにより増幅された産物の電気泳動写真

図1で増幅された産物を電気泳動により確認した。

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

土壌中の炭疽菌の迅速検出法の確立と炭疽の発症機構に関する研究
分担研究者 牧野壮一 帯広畜産大学畜産学部家畜微生物学教室助教授

研究要旨 一世紀以上前に世界で初めて分離・同定された病原体、炭疽菌は世界で恐れられてきた伝染病、炭疽の原因菌である。現在新興・再興感染症がクローズアップされている中で、炭疽菌は容易に大量の芽胞菌体として精製できるので、紛争が起こると常に生物兵器のための病原菌として恐れられてきた。即ち、人為的に起こりうる伝染病と言え。同時に、海外では動物やヒトでの自然発生も毎年数多く報告されている。この原因は炭疽菌芽胞による汚染常在地の存在による。わが国でもかつては発生が多く見られたので、炭疽常在地が多くあると考えられるので、人為的原因による発生も考慮して、炭疽に対する警戒および防疫上の対処は常に必要である。しかし、我が国は炭疽に対しては発生が無いことから無防備であるといえる。また、土壌や動物の炭疽の汚染度を調べる技術も国内外を問わず不十分で、ワクチン技術もまだ未完全であると言える。そこで、本研究では、①炭疽菌の検出法の確立とその応用、②炭疽菌の遺伝子型別の確立、③炭疽の発症機構の解明を通じて、行政的には炭疽の防疫体制や疫学調査研究の強化、学術的には炭疽のワクチン開発の基礎データ作成に貢献する。本研究分担では、炭疽菌の土壌汚染からの迅速検出法の確立および炭疽菌莢膜形成の生物学的意義を明らかにし炭疽の発症機構の解明のための基礎実験を行う。炭疽菌は芽胞としてごく少量しか土壌中に汚染されていないと、通常の方法では検出不可能であった。しかし昨年度Nested-PCR法の応用で、必ずしも高感度で炭疽菌DNAを検出することは出来なかったが、ごく僅かの芽胞汚染をも迅速に検出可能である事を報告した。今年度は、土壌1グラム当たり一個の芽胞の混入の際にも検出可能である方法を確立した。要点は、土壌の処理方法の改良であった。また、昨年度炭疽菌は高分子量の莢膜形成と低分子化への莢膜の分解という相反する反応が炭酸ガスの制御下で一つのオペロンを形成し同時に発現していることを明らかにしたが、本年度はその機構が生体内で抗食菌作用に働いていることを明らかにした。

A. 研究目的

炭疽菌により起こる炭疽は、草食動物を中心とした家畜伝染病であるが、人を含めた他の動物にも重篤な症状を起こす人畜共通伝染病である。炭疽菌は、乾燥状態で容易に芽胞菌となり、一度土壌が炭疽菌で汚染されると、芽胞菌として感染力を保持しながら数十年生残し、炭疽常在地となる。人の疾病は、創傷感染による皮膚炭疽、汚染動物肉の経口摂取による腸炭疽、および芽胞を吸引する肺炭疽があるが、肺炭疽が最も死亡率が高く、適切な治療を行わないと99%死亡する。そして、炭疽菌の芽胞は、ごく基本的な設備や知識で簡単に大量培養でき、しかも色も匂いも味もない粉末として調整し噴霧でき、その5ポンドでワシントンDCの人口の半分を侵すことが出来るといわれている。このことは、容易に炭疽菌が生物兵器へ利用される危険性を含んでいる。即ち、炭疽は世界で食肉衛生・防疫上最も恐れられ

ている伝染病の一つである。実際、1998年にアメリカ国防省は、全ての軍人に炭疽ワクチン接種が必要であると勧告している。我国での炭疽の発生はこの数年報告されていないが、先進国を含めた国外での発生は数多く起こっている。我が国でも以前は炭疽が頻繁に発生していたので、土壌の炭疽菌常在化が既に起こっていると考えられ、常に内外から我国は危険にさらされているといえる。しかし、国外でこれほど危険視されている炭疽に対する我国の関心は、極めて低いのが現状である。更に、ワクチン接種期間が18ヶ月に渡っていたり、炭疽の早期診断技術の確立が不十分で、特に土壌中の炭疽の汚染度を調べる技術が確立されておらず、また炭疽の発症機構自体の詳細がほとんど解明されていないなどの問題点が多く残っている。そこで、本研究では、炭疽に対する国内での発生を未然に防止するために、土壌や不顕性感染動物からの迅速・確実な検出法お

よび国外からの炭疽の伝播に対して未然に防ぐために必要な防疫上の検査法の確立、しいては予防のための基礎データとなる炭疽の発症機構の解明などを行い、発生の可能性のある炭疽から社会を守るために炭疽の基礎および応用研究を行う。同時に、炭疽が発生した場合に備え、その感染経路を的確に把握するための炭疽菌の遺伝子型別を行う基礎データを作成することも研究目標としている。

B. 研究方法

本課題では以下の点を中心に行った。

1) 炭疽菌芽胞の土壌からの分離方法の確立

各種土壌を採取し、人工的に炭疽菌芽胞を0、1、10、100、および1,000個を添加して実験を行った。炭疽菌は当研究室保存のパスツール2苗（毒素、莢膜産生株）を用い、芽胞液はパスツール株をしブロスで37℃一夜培養し、遠心後、一回生理食塩水で菌体を洗浄後、生理食塩水に再懸濁し、37℃で3日間振盪培養し作成した。芽胞数の計測はL寒天平板上にて行った。以下の方法で炭疽菌芽胞の検出を検討した。

- ① 直接土壌から炭疽菌の分離：WHOの指針に従い、それぞれの土壌を生食で10倍、100倍に希釈し、その希釈液を70℃30分間加熱し、芽胞菌以外を除く。その0.1mlをPLET培地（WHO推薦のハートインフュージョン寒天培地に酢酸タリウム；0.04 g/l、ポリミキシンB；30,000 units/l、lyzosome；300,000 units/l、EDTA；0.3 g/lを添加した炭疽菌用の選択培地）、*Bacillus cereus* selective agar (BCA; Oxoid) 平板および血液寒天平板に塗抹して炭疽菌を分離した。炭疽菌を疑う集落は、莢膜形成をNBY寒天平板（普通寒天に0.7%重曹を添加した培地）に塗抹後、炭酸ガス培養器で培養し確認した。同様に、炭疽菌特異的PCRで確定した。
- ② PCR法による検出：昨年度報告した炭疽菌の病原因子である莢膜（Cap）、毒素（PA）および染色体上の配列（BA813）を利用したプライマーセットを用い、Nested-PCRを実施した。それらの内、染色体上の配列として、S-layer遺伝子を利用したプライマーセットを今年度追加して使用した。BA813を用いたPCRでは、土壌を用いた検出系（昨年度報告済み）で、時として非特異的な増幅産物が検出されたので、S-layer遺伝子の配列を使用することにした。それらの配列は、分担研究者の藤原の報告書の表1に示した。土壌から直接PCRを行うのは炭疽菌芽胞を多く含む場合

も成功しなかったため、増菌法を使用した。

先ず芽胞を添加した土壌10グラムを100mlの70%エタノールにより2回遠心により洗浄した。その後、100mlの滅菌蒸留水で2回遠心により洗浄し、最終的に100mlのトリプトケース液体培地（TSA）と混合し、37℃で16時間振盪培養を行った。翌朝その1次増菌液0.1mlを10mlのTSAに加え、更に4時間37℃で振盪培養した。その二次増菌液1.0mlを遠心後、滅菌水で2回洗浄し、マニュアル通りにFastPrep™ FP120 instrument (Bio 101, Inc. CA., USA) を用いてPCR用のDNAの精製を行った。DNAは濃度調整後、100ngをNested-PCRに使用した。Nested-PCRの条件は昨年度報告した95℃15秒、55℃15秒、72℃30秒を1サイクルとして35サイクル行い、アガロースゲル電気泳動により増幅産物を確認した。

③ 増菌後の炭疽菌の分離：上記の方法で作製した増菌液を適当に希釈して①に記載した寒天平板に塗抹して炭疽菌の分離を試みた。炭疽菌が疑わしい集落はPCRにより確認した。

2) 炭疽菌莢膜の持つ生物学的意義

炭疽菌の莢膜形成には3種類の同一転写方向を持つ*capB*、*capC*、および*capA*遺伝子から成る*cap*領域が必須である。この領域により炭疽菌表層に高分子量の莢膜が形成される。しかし、この領域の下流に同じ転写方向を持つ*dep*遺伝子が存在し、この遺伝子が、高分子量の莢膜を低分子化し、菌体表層から離す働きを持つ。昨年度は、この遺伝子の変異株を用いてマウスへの病原性を調べ、莢膜を表層に重合する遺伝子群(*cap*領域)と分解する*dep*遺伝子が同時に必要とする生物学的意義を明らかにし、その発現調節を明らかにした。その結果を踏まえ、*dep*遺伝子変異株のマクロファージ内取り込みを調べ、病原性の消失の原因を調べ、炭疽の発症機序過程に*dep*遺伝子が果たす役割を明らかにした。具体的には、マウスの腹腔マクロファージを分離後、炭疽菌を感染させて炭疽菌に対する抗体を用いて蛍光染色法により観察した。

C. 研究結果

①土壌からの芽胞菌の検出

昨年度に、土壌を用いた場合、炭疽菌選択培地として報告されているPLET培地ではごく僅かの炭疽菌芽胞を含む場合には選択培地とはならず、同時に、計算上10g当り1000個以上炭疽菌が土壌中に存在しないと検出できないことを報告した。1