

グラム土壌には約 10^4 個の一般細菌が含まれており、僅かの炭疽菌を含む場合は直接分離は不可能であると結論した。その原因は、PLET培地などの培地上では、炭疽菌集落が他の芽胞形成*Bacillus*属菌と区別出来にくいことがあげられた。そこで、分担研究者藤原の報告書に記載されたBCA培地の土壌への応用を試みた。本培地は炭疽菌集落が他の*Bacillus*属菌と容易に区別出来る事、そして炭疽菌の発育を阻害しないことの利点がある（藤原報告書参照）。しかし、*B. mycoides*, *B. thuringiensis*および*B. cereus*は炭疽菌と近い集落形態をとり、*Bacillus*属菌種の発育を必ずしも全て抑えるわけではないので、炭疽菌の検出は成功しなかった。即ち、上記の方法では、そこで、土壌にごく僅かの炭疽菌汚染の場合は、直接培養では非常に分離は困難であると結論できた。

②増菌培養による炭疽菌の分離

直接培養では、土壌中に僅かに含まれる炭疽菌の分離は不可能であったので、増菌法による分離を試みた。しかし直接培養と同様に、培地の種類を変えても、炭疽菌の分離は出来なかった。炭疽菌の増菌が選択的ではなかったと考えられた。

③Nested-PCR法による炭疽菌DNAの検出

昨年度、研究室保存菌株を用いて炭疽菌に特異的であると報告した染色体用のPCRでは、全ての土壌培養検体で炭疽菌を添加しなくても陽性になった。そこで、今回は炭疽菌のS-layer形成の遺伝子を利用したプライマーを新たに設定した。更に、昨年度は増幅産物の検出が含有芽胞菌数が多い時には確認できたが、少ない場合は確実に検出できなかった。そこで、土壌サンプルの処理方法に問題がある可能性が考えられたので、本年度は、方法に記したようにエタノールを用いること、および増菌の時間を6時間から4時間に減らし検出を試みた。その結果、図2に示すように、全てのプライマーセットで、芽胞数が1個からPCR産物が検出された。

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食食能を比較した。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。

D. 考察

①炭疽菌を土壌から直接分離することは、グラム当たり1000個以上の芽胞数の汚染がない限り不可能であると結論された。しかし、逆に、何らかの事態が起こり多量の芽胞の汚染が起こった時は、炭疽菌を直接分離できると考えられた。次に、増菌法により分離を試みたが、同様に少量の芽胞数の場合、炭疽菌を分離することは出来なかった。これは、多分芽胞菌が土壌中に大量に存在するため、炭疽菌の発育のみを促進させることが出来なかったためと考えられる。しかし、現在炭疽菌に特異的な抗体を作製中で、免疫ビーズ法などにより炭疽菌を分離できるかもしれない。更には、炭疽菌のみの発育を促進できるようなサプリメントを加えて増菌させれば炭疽菌を分離できるかもしれない。同時に、マウスを用いた動物接種によって炭疽菌を死亡マウスから分離できるかもしれない。この3点が次年度の課題になると考えられる。

②PCR法を応用した炭疽菌の迅速検出法を、土壌の処理方法を変えることで、確立した。昨年度に比べ検出感度の上昇が明らかであった。1個の芽胞の混入をも確実に検出可能であった。3種類のプライマーセットを用いることで炭疽菌の検出を確実なものにした。しかし、Nested-PCRによる検出は、翌日には判定可能であったが、更に迅速性が要求されるかもしれない。今回は菌体処理にFastPrep™ FP120 instrumentを導入したが、この結果、処理工程は約1~2時間短縮できた。更なる短縮には、PCRの反応自体の短縮が必要かもしれない。また、増菌過程の短縮も可能かもしれない。更なる迅速化を次年度に図る予定である。

③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。

E. 結論

炭疽菌の土壌汚染を迅速に検出する方法として、Nested-PCR法を用いて確立した。しかし、炭疽菌の土壌からの直接分離は芽胞菌数の多い時以外は成功しなかった。また、炭疽の発症機構にかかわる莢膜の働きを明らかにした。

F. 研究発表

全て発表準備中である。

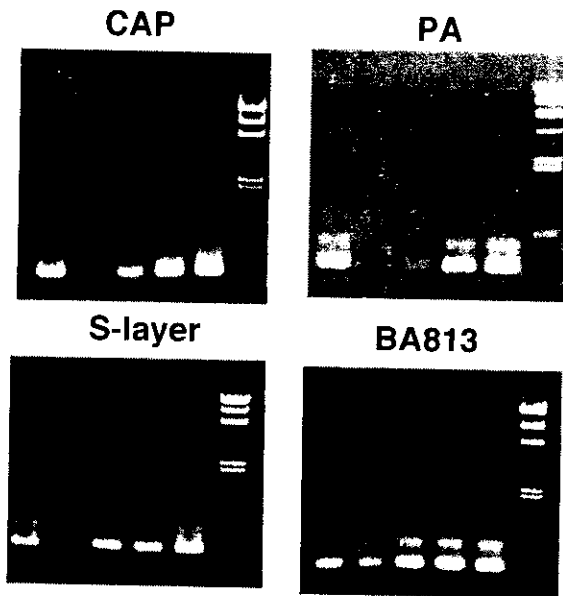


図1. 土壌を用いたNested-PCRによる炭疽菌の検出

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。

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

炭疽菌の新しいワクチン開発に関する研究
分担研究者 倉園久夫 岡山大学医学部保健学科

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。本研究分担では、炭疽菌のワクチン開発を目的として、*Bacillus brevis*による炭疽菌の防御抗原の発現を調べ、ワクチンとして使用可能かについて検討した。本年度は防御抗原の発現について検討した。

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、炭疽菌のワクチン効果の中心である防御抗原（PA）を用いた成分ワクチン開発の手掛かりを得るために、高度発現ベクター系として近年知られてきた*Bacillus brevis*を宿主としたPAの発現系を作出し、安全なワクチン開発の基礎を確立する。*Bacillus brevis*はグラム陰性菌における内毒素を考慮する必要がないこと、培養方法が比較的容易なこと、動物に病原性が全く無いことの利点に加え、本方法で用いるベクター系により培養上清に1リットル当たり1グラム程度の蛋白質が産生されることが期待でき、しかもワンステップのカラム操作で容易に精製可能なことなど、次世代のワクチンベクター系として期待されている。

B. 研究方法

①菌株と培地

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。

②プラスミド

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。

③PA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。

④ *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 FeSO₄·7H₂O, 10 mM MnSO₄·4H₂O, 1 mM ZnSO₄·7H₂O 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℃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、OD₄₆₀=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 CaCl₂, pH7.0, 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℃にストック可能であり、使用する際には、37℃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. bevis*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 MgCl₂)と混合後、ネオマイシンを含むT2M平板上で30℃、3日間培養後形質転換体を選択した。

⑤PA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

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テ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。図1に示す *B. bevis*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ティング解析により、*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2)。

*B. bevis*へのプラスミド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。図1に示す *B. bevis*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ティング解析により、*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2)。

D. 考察

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*内での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

PAの*B. brevis*内での発現が確認され、ワクチン効果および発現量を明らかにして、次世代のワクチンとして使用可能になるかも知れない。

F. 研究発表

考察で記した内容を明らかにして、投稿および学会発表は平成13年度中に行う予定。

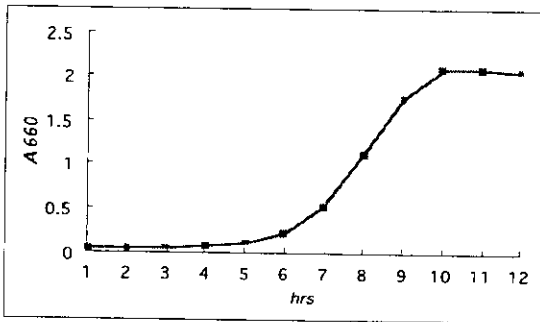


図1. *B. brevis*の増殖曲線
約8時間半から10時間の間30分おきにサンプリングを行い、pNH326が最も高頻度に形質転換されたサンプルをストックした。

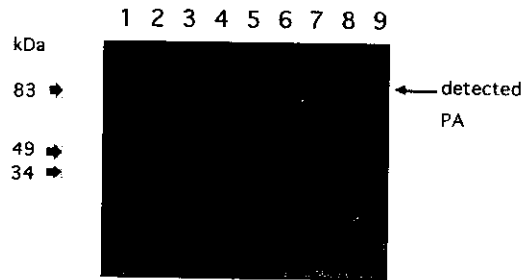


図2. *B. brevis*内でのPAの発現
1, 大腸菌のPAの非発現対照；2, 大腸菌のPA産生陽性対照；3, *B. brevis*の陰性対照；4～6, *B. brevis*内PA導入株の72時間培養菌体；7～9, *B. brevis*内PA導入株の72時間培養上清。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出 版 年	ページ
牧野壮一	炭疽	日本医師 会編	炭疽. 感染症 の診断・治療 ガイドライン	医学書 院	東京	1999 年	p134-135

20000532

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。