

20010728

厚生科学研究研究費補助金
新興・再興感染症 研究事業

炭疽菌の発症機構の解明と迅速検出法の確立 (H11—新興6)

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 牧 野 壯 一

平成14(2002)年 4月

目 次

I. 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

II. 分担研究報告

1. 炭疽菌の遺伝子型別および抗生物質耐性に関する研究 28

倉園久夫 岡山大学医学部保健学科

2. 炭疽菌の莢膜物質の病原性への関与に関する研究 41

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

3. 病原体の網羅的スクリーニング法 49

江崎孝行 岐阜大学医学部微生物学教室教授

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 60

IV. 別刷り

61

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。本年度の研究分担では、炭疽菌の感染経路を知るための分子疫学に利用可能な遺伝子解析手法について検討し、同時に薬剤耐性マーカーについて調べた。同時に、炭疽の発症機構に莢膜が深く関与していることを明らかにし、新たな治療法への貢献が期待できた。また、人に病気を起こす病原体はその危険度からレベル3およびレベル2に分類されており、分離培養法は病原体ごとに異なる。発育温度、選択培地、増殖環境、発育に要する時間等、病原体ごとに最適な分離条件が異なっている。土壌、生ゴミ、淡水、および海水など環境に存在する材料に生息する人病原体を網羅的に解析するには、各々の病原体の分離培養に適した方法を選択しなければならない。病原体の代表的な選択分離培地をしめしたが、これをすべて準備してもすべての病原体を網羅的に分離することはできない。そこで分離培養法と遺伝子を用いた検査を併用し、網羅的な検査を実施する必要がある。出てくる。

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
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

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

A. 研究目的

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自然発生は数多く起こっている。しかし、昨年度に実際炭疽菌によるテロが勃発し、世界中を炭疽菌の恐怖に陥れ、いまだにその恐怖は払拭されていない。

以上のように本菌は医学、獣医学上重要な病原体でありながら、血清型のない1菌種であることから、臨床分離株同士を分類する有効な疫学的手法が確立されていない。このため、発生が起きたときにその感染源を正確に特定することは出来ず、炭疽菌における疫学マーカーの研究は防疫上重要な課題となっている。従来細菌の疫学マーカーには生物型、血清型、ファージ型および薬剤感受性パターンなどの表現型が用いられてきたが、近年ではDNA解析による分子生物学的手法が利用されるようになってきている。炭疽菌においても各国の研究者が様々な手法を用いて遺伝子型別を試みている。しかし感染源を正確に特定出来るような、実用的な手法はいまだ確立されていない。また、我が国においては炭疽菌に関する

分子疫学的研究は全くなされておらず、今後の疫学調査の基礎となるデータの作成が急務である。よって本研究では、代表的なDNAフィンガープリンティング法であるRandom amplified polymorphic DNA (RAPD)法、Amplified-fragment length polymorphism (AFLP)法およびPulsed-field gel electrophoresis (PFGE)法を用いて炭疽菌各株のDNA性状を比較し、その遺伝的類似性と、疫学調査における各法の有用性を検証した。また、本菌においては抗菌性薬剤に対する自然耐性はないとされてきたが、近年ではペニシリン耐性菌および第3世代セファロスポリン耐性菌の存在も報告されている。我が国では炭疽菌における薬剤耐性が総合的に調査されたことはないため、現在治療に用いられている薬剤に関して薬剤感受性試験を行った。その結果を上記の研究とあわせてここに報告する。

B. 研究方法

① 菌株および培地

本研究で用いた菌株は表1に示した。34-F2株は莢膜非形成の動物用弱毒ワクチン株で、現在我国で実際に使用されている。Pasteur IおよびPasteur II株はパスツールが作製したワクチン株であり、他は臨床由来株である。P39株はPasteur II株のストレプトマイシン耐性変異株で、P43、P44およびP45株はそれぞれP39株の毒素非産生/莢膜非形成変異株、莢膜非形成変異株、毒素非産生変異株である。M1からM13までの13株はモンゴル由来野外株であり、モンゴルで分離培養され、モンゴルでDNAを精製して、我国で各種遺伝子解析にのみ使用した。培養には普通寒天培地を用い、増菌にはL-ブローを使用した。また、薬剤感受性試験にはミューラーヒ

ントンS寒天培地 (MH培地 ; 栄研化学) を使用した。

② DNA の抽出

一夜培養菌液 3ml を遠心分離して上清を廃棄後、200 μ l の Tris-maleat buffer (pH7.0) に再懸濁、5 μ l の lysozyme (100mg/ml) 、 10 μ l の N-acetylmuramidase SG (10mg/ml) および 1 μ l の RNase (10mg/ml) を加えてマイルドに懸濁し、37 $^{\circ}$ C 30 分保温した。次いで 200 μ l の TE buffer (10mM Tris, 1mM EDTA)、10 μ l の 10%SDS および 10 μ l の proteinaseK (20mg/ml) を加え、55 $^{\circ}$ C で一夜保温した。フェノール抽出後、精製全 DNA を得た。

③ PCR 法

各株の毒素産生能と莢膜形成能を調べるため、これらをコードする毒素プラスミドおよび莢膜プラスミドの有無を、プラスミド上の塩基配列に特異的なプライマーを用いて PCR 法にて確認した。使用したプライマーを表 2 に示す。また、PCR は宝酒造株式会社より販売されている Smart Cyclor を使用し、宝酒造株式会社に依頼し製造されたキットの商品を用いた。表 2 に示したプライマーセットは混合プライマーとしても使用可能であることは実証されているが、莢膜遺伝子および毒素遺伝子検出用に別個に作り、更にそれぞれに疑似反応を抑制するためにインターナルコントロールを設定し、作製した。Smart Cyclor のマニュアルの従い、反応を行った。検出色素は SYBRGreen を用い、リアルタイムで増幅を観察した。反応条件は 95 $^{\circ}$ C 30 秒の後、95 $^{\circ}$ C 5 秒、68 $^{\circ}$ C 30 秒を 30 サイクル繰り返した。その後、マニュアルに従い、増幅産物の融解曲線を調べ、表 2 に示した融解温度を示す場合を陽性と判定した。陰性の場合、インターナルコントロー

ルによる産物が確認でき、その融解温度は、PA プライマーセットの場合は 82.5 \pm 1 $^{\circ}$ C、CAP プライマーセットの場合は 85 \pm 1 $^{\circ}$ C となる。また、確認のため、電気泳動にて産物を確認した。増幅産物の大きさは、表 2 に示したが、インターナルコントロールによる産物の場合は PA プライマーセットの場合は 80 \pm 1 $^{\circ}$ C、CAP プライマーセットの場合は 82 \pm 1 $^{\circ}$ C となる。

PCR の反応は精製 DNA の場合は 10ng 基質として用い、集落の場合は、滅菌蒸留水中に僅か濁る程度の菌体を懸濁し、95 $^{\circ}$ C で 15 分間加熱後、遠心し、その上静置を直接 PCR に用いた。

④ Random amplified polymorphic DNA (RAPD) 法

RAPD 法の基本的な原理、手技は通常の PCR 法と同じである。しかし、特定の配列に対する 2 種類のプライマーではなく、任意に設定した 1 種類のプライマーによって基質 DNA 上の塩基配列をランダムに増幅するという点で PCR 法とは異なる。また、プライマーの基質 DNA への非特異的な結合を可能にするため、プライマーは 10 塩基程度のものを用い、アニーリング温度は低く設定する。RAPD 法に用いたプライマーを表 3 に示す。PCR 反応は DNA thermal cyclor PJ2000 (Perkin- Elmer Corp.) を使用し、(94 $^{\circ}$ C 2 分 \rightarrow 38 $^{\circ}$ C 2 分 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 2 分) \times 45 の条件で行った。得られた PCR 産物は 1.5 % Chromosomal grade agarose(Bio-Rad Laboratories) において電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色したのち蒸留水で洗浄、紫外線照射下で撮影した。

⑤ Fluorescent Amplified-fragment length polymorphism (FAFLP) 法

FAFLP 法は、DNA を制限酵素で断片化し、その中から特定の塩基配列を持つもの

を選択的に PCR 増幅して検出する Amplified-fragment length polymorphism (AFLP) 法を基本としている。PCR 増幅に用いるプライマーを蛍光色素でラベルし、得られた切断-増幅断片を光学的に検出しようとしたのが FAFLP 法である。FAFLP 法は AFLP kit (PE Biosystems.) を用い、添付説明書に従い行った。被験株の DNA およそ 10ng を *EcoRI* と *Mse I* の各制限酵素により切断し、T4 DNA ligase を用いて *EcoRI* および *Mse I* の各アダプターと結合させた。これらの DNA 断片溶液を 20 倍希釈し、*EcoRI* プライマー (5' -GACTGCGTACCAATTC-3') と *Mse I* プライマー (5' -GATGAGTCCTGAGTAA-3') の各プライマーを用いて 1 次 PCR を行った。1 次選抜 PCR は PE-2400 thermocycler (Perkin-Elmer Corp.) を使用し、以下の条件で行った。

72°C 2 分 → (94°C 18 秒 → 56°C 27 秒 → 72°C 108 秒) × 20 → 60°C 30 分

次いで、得られた PCR 産物をさらに 20 倍希釈し、蛍光青色素 5-carboxyfluorescein で標識したプライマーペア、*EcoRI* (*EcoRI*-A) と *Mse I* (*Mse I*-T)、および *EcoRI* (*EcoRI*-T) と *Mse I* (*Mse I*-A) を用いた 2 次 PCR を行った。増幅には Touchdown PCR cycling を用い、以下の条件により行った。

94°C 2 分 → (94°C 18 秒 → アニーリング 27 秒 → 72°C 108 秒) × 30 → 60°C 30 分

アニーリング温度は最初のサイクルは 66°C、続く 9 サイクルは 1 サイクルごとに 1°C ずつ温度を下げ、残る 20 サイクルは 56°C に設定した。得られた PCR 産物は -20°C で保存した。FAFLP 断片の分離は 5% denaturing polyacrylamide gel を用

い、ABI Prism 377 automated DNA sequencer により行った。1.0 μl の各サンプルを、2.0 μl の loading dye (1.25 μl formamide, 0.25 μl loading solution, 蛍光赤色素 6-carboxy- χ -rhodamine で標識した 0.5 μl internal lane standard ; Genescan 500 を含む) と混合し、95°C 2 分加熱後氷上で冷却し、迅速にゲル上にアプライした。Running buffer には 1× TBE を使用し、1.68kV、51°C で 8 時間行った。増幅断片の塩基対と増幅量の計測は、internal lane standard を用いて GeneScan collection software により行い、得られたサイズデータと定量データはエレクトロフェログラムおよび表にあらわされた。、さらに Genotyper software を用いて、GeneScan で計測されたデータのアーティファクトを除去し、増幅断片の有無を分析・集計した。結果を UPGMA に入力し、遺伝子系統樹を作成した。

⑥ Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 法

DNA を種々の制限酵素で切断し、切断 DNA を電気泳動で分離したのち、その切断パターンの異同を肉眼的に判断する方法を Restriction-fragment length polymorphism (RFLP) 法と呼ぶ。その中でも細菌、真菌などのようにサイズの大きな DNA を特殊な泳動装置を用いて分離し、解析する方法が PFGE 法である。本法が通常の電気泳動法と違う点は、異なる 2 方向の電場を交互にかけ、DNA 断片を頻りに方向転換させる事によって巨大 DNA を分離する事である。DNA 断片は左右交互に方向転換しながらゲル中を移動する。サイズの小さい断片は容易に方向転換するが、サイズの大きい断片は方向転換に長時間を要する。この方向転換にかかる時間差が巨大 DNA の分離を可能にする。PFGE 法は

CHEFF DR II apparatus を用い、Clamped homogeneous electric field electrophoresis (CHEF) により行った。DNA の抽出および切断は Rapid PFGE 法により、以下のように行った。普通寒天培地にて 37℃ 一夜培養した供試株菌体を 1 エーゼ掻き取り、TE buffer (100mM Tris, 100mM EDTA) 100 μ l に懸濁した。次いで細胞壁の破壊を目的に 7 μ l の proteinaseK (20mg/ml)、7 μ l の lysozyme (100mg/ml) および 3 μ l の N-acetylmuramidase SG (10 mg/ml) を加え、滅菌蒸留水にて総溶液量を 140 μ l に調整し、37℃ で 30 分保温した。この段階では *B.anthraxis* の細胞壁が強固なことを考慮し、通常の 5 倍量の lysozyme を使用した。次いで 55℃ に保温した 20% SDS 溶液 7 μ l と 1.2% 低融点アガロース (FMC Bioproducts) を加え、混合液を 100 μ l plug mold に注入し、4℃ 10 分冷却して固化させた。ゲルブロックを plug mold から押し出し、10ml 丸底チューブに入った ESPbuffer (0.5M EDTA, pH8.0, 1% sodium-lauryl-sarcosine、proteinaseK 1mg/ml) 1ml 内で 55℃ 一夜、緩やかに震盪しながら保温した。ESP buffer を廃棄後、洗浄のため滅菌蒸留水 10ml をチューブに加え、50℃ 10 分、緩やかに震盪しながら保温した。同様に洗浄のため、TE buffer (10mM Tris, 1mM EDTA, pH8.0) 10ml で 50℃ 15 分、震盪保温を 4 回行った。洗浄後、制限酵素処理のためにゲルブロックを High buffer 1ml 中で 10 分、室温にて平衡化した。High buffer を廃棄後、20U の制限酵素 *SalI* と 50 μ g の牛血清アルブミンを含む High buffer 500 μ l を加え、37℃ 20 時間保温、消化反応を行った。Running buffer に用いる 0.5×TBE で平衡化後、ゲルブロック

を 1%pulsed-field-certified agaros のウェルに挿入し、以下の条件で電気泳動を行った：6V/cm、14℃、4~8 秒 (linear ramp) を 12 時間、8~50 秒を 10 時間。電気泳動したゲルはエチジウムブロマイドで染色し、蒸留水にて洗浄後、紫外線照射下で撮影した。

⑦ 薬剤感受性試験

下記の 9 薬剤に関して、寒天平板拡散法 (ディスク法) によって行った。供試薬剤には、ストレプトマイシン (SM ; 50 μ g/disk ; 昭和薬品化工)、アンピシリン (ABPC ; 30 μ g/disk ; 昭和薬品化工)、ペニシリン (PCG ; 10 μ g/disk ; センシ・ディスク TM、Becton Dickinson Microbiology Systems ; B.D)、エリスロマイシン (EM ; 15 μ g/disk ; B.D)、テトラサイクリン (TC ; 30 μ g/disk ; B.D)、ドキシサイクリン (DOXY ; 30 μ g/disk ; B.D)、シプロフロキサシン (CPFX ; 5 μ g/disk ; B.D)、ノルフロキサシン (NFLX ; 10 μ g/disk ; B.D) およびロメフロキサシン (LFLX ; 10 μ g/disk ; B.D) を用いた。これらの薬剤含有ディスクを、100 倍希釈した *B. anthracis* 一夜培養液を均一に塗布した MH 培地に、各ディスクの間隔が 24mm 以上離れるように置き、35℃ で一夜培養した。判定は完全阻止円を計測し、感受性判定表に従い行った。

⑧ 菌株および培地

炭疽菌パスツール 2 苗にストレプトマイシン体制を付加させた Sm 株を親株として使用した。この株は莢膜形成および毒素産生株である。Sm-1 株は *dep* 遺伝子の変異株で、莢膜形成は観察できるが、親株と異なり高分子の莢膜が菌体表面に重合された後、加水分解により培地中に低分子化されて放出するのに必須の遺伝子の変異を起こしている株である。Sm-2 株は Sm-1 株に

dep 遺伝子を持つプラスミドを導入した株である。Sm-3 株は莢膜非産生株である。

⑨ 低分子莢膜 (L-capsule) の分離

炭疽菌株を NBY プロス (Netrient broth) に 0.3% の割合で Yeast extract を添加し、さらに、100ml 当り 9% の滅菌重曹を 7.2ml 添加して作製する) に接種し、20% 炭酸ガス培養器で一夜培養し、遠心後、上清を濾過滅菌を行い、莢膜物質を精製した。上清に 3 倍量のエタノールを加え、水中で 1 時間以上放置し、遠心し得た沈渣を更に蒸留粋に懸濁し、エタノール沈殿を繰り返した。これを 4 回繰り返す、最終的に少量の滅菌水に懸濁し、121℃、30 分間オートクレーブを行った。総蛋白濃度を測定し、最終的に 1 ml の PBS に懸濁した。得られた L-capsule を加水分解するときは、2N-HCl に調整し、110℃120 分間行った。

⑩ 感染実験

6 週令のマウスを用いて感染実験を行った。菌株は 16 時間 37℃ で震盪培養後、約 106 個の菌液を腹腔内に 1 群当り 15 匹に接種した。感染後 6 および 24 時間後に PBS を 1.0ml 腹腔内に接種し、その 0.2ml を取りだし、顕微鏡による観察と普通寒天上での炭疽菌の存在を調べた。同時に、24 時間後に 5 匹のマウスから肝臓および脾臓を取りだし、普通寒天上に直接塗抹し、炭疽菌の存在を調べた。残りの 10 匹は最大 14 日間生死を観察した。

⑪ マクロファージへの感染実験

BALV/C マウスの腹腔内から骨髄由来マクロファージを調整し、炭疽菌の感染実験を行った。約 105 個の細胞に炭疽菌を m.o.i. 約 2 になるように感染させ、炭酸ガス培養器内で 2 時間培養後、PBS で洗浄し、ゲンタマイシンを含む培養液でさらに 1 時間培養した。細胞はパラホルムアルデヒドで固定し、炭疽菌に対する抗体を用いて免

疫染色を行った。

⑫ Northern hybridization

全 RNA は定法に従い抽出し、通常の方法にて実施した。

⑬ バイオハザード対策

炭疽菌は国立感染症研究所の基準によりレベル-3 病原体に分類されている。このため、実験は P3 実験室内にて行った。また、使用した器具類はヨード剤にて消毒し、寒天培地および液体培地は使用後直ちに高圧滅菌器 (オートクレーブ) にて滅菌した。

C. 研究結果

① PCR による病原因子発現性の比較

被験株すべてにおいて、PCR 法により莢膜形成能と毒素産生性の有無を確認した。その結果、臨床由来株では Morioka 株、Nakagawa 株、P45 株および M9 株において毒素産生性の欠落が認められた。また、ワクチン株 34-F2 株、P44 株では莢膜形成能の欠落がみられ、P43 株は両形質とも欠落していた。その他の株は全て 2 つのプラスミドを保有していた (表 1)。

② RAPD 法による炭疽菌株の比較

21 株から精製した全 DNA について RAPD 法を行った。プライマーは 8 種類のランダムプライマーを用いた (表 3)。その結果、プライマー AP40、AP41、AP42、AP43 および AP45 を用いた RAPD 法では被験株の全てが、完全に一致する増幅パターンを示した。AP47 を用いた RAPD 法では Morioka 株、Nakagawa 株、P43 株および M9 株が、他の株では確認されたバンドを共通して欠いていた。また、AP46 を用いた RAPD 法では 34-F2 株にバンドの欠損が認められ (図 1-A)、AP44 を用いた RAPD 法では M4 株がバンドの欠損を示した (図 1-B)。

③ FAFLP 法による炭

疽菌株の比較

23株についてFAFLP法を行った。EcoRI-AとMseI-TのプライマーペアによるFAFLP法では、46bp、96bp、105bp、150bpおよび155bpの、多型的な増幅断片を検出した。また、EcoRI-T、MseI-AのプライマーペアによるFAFLP法では、87bp、139bp、164bpおよび363bpの多型的な増幅断片を検出した(表4)。これらの情報をUPGMAに入力し、dendrogramを作成した(図2)。便宜上、各株を類似性約97.6%でグループAとグループBに分類し、グループAをさらにグループA1、グループA2およびグループA3に分類した。グループBの各株間では、グループAの各株間に比べて低い類似性が示された。

④ PFGE法による炭疽菌株の比較

RAPD法およびFAFLP法における結果を考慮し、9株について制限酵素SalIを用いてPFGE法を行った(図3)。M9株、Morioka株およびNakagawa株において、他の株では確認された共通のバンドが欠損していた。

⑤ 薬剤感受性試験

9株を対象に、9種類の薬剤についてディスク法により感受性試験を行った。Morioka株がSMに耐性を示したが、他の株では耐性はみられなかった。また、他の薬剤に関しては全ての株が感受性を示した。

⑥ *dep* mutantの病原性

dep mutant, Sm-1株は菌体表層にH-capsuleを形成するが、L-capsuleを菌体外に放出しない。この現象が生物学的に何をしているのかを明らかにする目的で、Sm-1株をマウスに感染させて病原性を調べた。その結果、親株が平均1.7日で全てのマウスを殺したのに比べ、14日後でもSm-1株を感染させたマウスは生残してい

た(Table 5)。また、Sm-2株(Sm-1株に*dep*遺伝子を導入した株)では親株同様マウスが死亡した。さらに6および24時間後のマウス腹腔内炭疽菌はSm-1株以外では確認できたが、Sm-1株では全く検出できなかった(Table 5)。この際、もう一方の病原因子である毒素活性が低下しているのではないかと考え、防御抗原に対する抗体を用いたWestern blottingを行ったが、莢膜の形成にはほとんど差がなかった(Fig.6)。これらの結果から*dep*遺伝子は炭疽菌の病原性発現に必須の遺伝子であることが明らかになった。

⑦ L-capsuleの宿主防御機構への役割

*dep*遺伝子はH-capsuleをL-capsuleに加水分解する働きを持ち、病原性には必須の遺伝子であった。そこで、精製されたL-capsuleが生物活性を持っているのではないかと考え、L-capsuleをSm-1株と混合し、マウスの感染実験を行った。その結果、マウスの病原性を回復させた。同時に、腹腔内に炭疽菌が確認された(Table 5)。しかし、遺伝情報の獲得による(形質転換による)形質の変化の可能性を否定するためにDNaseとRnase処理を行ったL-capsuleを用いて感染実験を行った。しかし無処理のL-capsuleと同じ結果であった。また、L-capsuleを完全に加水分解して同じ実験を行ったところ、マウスの病原性は回復しなかった。同時に、Sm-1の培養上清の沈渣を使用して同じ実験を行ったところ、病原性の回復は観察されなかった(Table 5)。このことはL-capsuleが炭疽菌の病原性に関与していることを示していた。

⑧ マクロファージへの感染実験

上記と同様にマウスマクロファージへの感染実験を行った。その結果、Sm-1株はマクロファージ内に数多く取り込まれて

いたが、Sm 株は取り込まれていた数は少なかった (Fig.7)。

⑨ Northern hybridization

炭酸ガス培養条件および通常の大気中での培養条件で、炭疽菌を培養し、Northern hybridization を行った。プローブは Fig.8 に示した 4 種類の DNA 断片である。その結果、炭疽菌の莢膜形成に必須の *cap* 遺伝子群内の 3 種類の遺伝子と同様、*dep* 遺伝子の発現も炭酸ガス培養により活性化され、しかもすべての転写産物が同じであった (Fig.8)。以上の結果から 4 種類の遺伝子は 1 つのオペロンを形成し、全て同時に発現している可能性を示唆していた。

⑩ 菌体の形態観察

炭疽菌株を炭酸ガス培養条件で集落を形成させ、実体顕微鏡にて観察した (Fig.9)。その結果、親株、*dep* 変異株そして莢膜非形成株間では菌体の形態が異なっていた。*dep* 変異株は菌体表層に莢膜生成物が蓄積しているように観察でき、親株とは全く異質となっていた。

E'. 結果、考察

B. 研究方法、結果、考察

1. 分離培養法による病原体の決定

1) 培養

どの病原体を検索する化不明の場合、材料を非選択培地で培養し発育した優位な病原体を検索する。この方法では一つの平板に発育する集落の識別は数百個がの限界である。100 種類の集落を解析しても、ほぼ 1 % の菌数を占める病原体の検査しかできない。そのため、通常は優位な菌数の計測にしか利用できない。特定の病原体が予測される場合、表 1 に示した選択分離培地を併用すれば、低濃度の病原体の分離精度が向上する。非選択培地に発育した優位

な菌の集落を採取し、図 9 の遺伝学的な同定方法に従い同定作業をすすめる。選択培地からは目的の菌の集落と思われるもののみ選択し図 9 の DNA を使った同定方法に従い同定作業をすすめるか、従来型の生化学的性状を調べ病原体の同定をおこなう。

2) 培養した集落を 16S rDNA を使ったシーケンスで同定する方法

非選択培地から単一集落を採取し、DNA を抽出後、16S rDNA 配列を Polymerase Chain Reaction 法で増幅する。16S rDNA 配列を増幅するには細菌のすべてに共通な遺伝子配列を利用して増幅する。この共通配列はほとんどの細菌に共通の配列で Universal Primer とよばれクラミジア以外の人病原細菌の 16SrDNA 配列を増幅することができる。通常は 5' 末端から 500 塩基までを増幅して同定に利用する。グラム陰性菌では 5' 末端から 900 塩基の場所から 1400 塩基の場所を増幅して配列を決定する。

同定レベルでは 16SrDNA 配列の約 500 塩基を決定すれば十分である。シーケンスは Capillary Sequencer を使用すれば数時間で結果が得られる。決定した配列はデータベース上の配列と比較する。DDBJ, NCBI, EMBL にはレベル 2、およびレベル 3 のほぼすべての病原体の配列が登録されており、分類学的に正式に記載された病原体の 95% 以上の配列が登録されている。そのため決定した配列をインターネット上の Blast Program で検索すれば 1 分以内に病原体名が絞り込める環境が出来上がっている。

しかしこの方法ではしばしば菌種名まで特定できないことが多い。図 9 に示したように 16rDNA 配列が 3 % 以上異なれば、既存の病原菌と異なるのは明らかであるが、2 % 以内の違いしかない場合はこの情報で

は種の同定を完了する事はできない。同じ種に属する菌株でも配列の違いが存在し、異なった種でも同じ 16S rDNA 配列を保有する菌株が存在するからである。その次のステップとして分類学的な種の定義である染色体 DNA の類似度を決定する方法を実施しなければ、最終的な種の同定はできない。

また大腸菌群と赤痢菌群、炭疽菌群 (*Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringensis*, *Bacillus cereus*) ではさらに病原因子を証明しなければ実用的な種の同定にはならない。大腸菌は赤痢菌群とは同じリボゾーム配列を保有するため識別には志賀毒素、耐熱性毒素、易熱性毒素、侵入性遺伝子、一部の生化学的性状、血清学的検査をおこなって始めて識別が可能になる。これは大腸菌と赤痢菌群も定義に従えば遺伝学的には同一菌種であることに起因している。

2. 材料から DNA を抽出し病原体の遺伝子を網羅的に検出同定する方法

一般細菌のスクリーニング用の培地ですべての病原菌を分離することはできない。優位菌の培養を一つの非選択培地で、スクリーニングする事は不可能である。そこで材料から直接細菌の DNA を抽出し、universal primer を使用し、すべての細菌の遺伝子を増幅する、あるいは病原体に特異的な配列を検出する方法が考えられる。

レベル 2 およびレベル 3 の病原体の遺伝子を網羅的に検出するにはその病原体に特異的な遺伝子配列を検索し、遺伝子増幅方法を作成すれば検出系が作成できる。レベル 3 の病原体には 11 属 31 菌種では独立で生育できるのは *Bacillus anthracis*(炭疽菌)、*Francisella tularensis*(野兎病菌)、*Mycobacterium tuberculosis* (結核菌)、*Salmonella typhi* (チフス菌)、

Salmonella paratyphi A(パラチフス A 菌)、*Yersinia pestis* (ペスト菌)、*Burkholderia mallei*(鼻疽菌)、*Burkholderia pseudomallei* (類鼻疽菌)、*Brucella melitensis* (ブルセラ菌) の 9 菌種しかない。その他の *Rickettsia*, *Orientia*, *Coxiella*, および *Chlamydia* は対象菌種が多いが、動物や昆虫に寄生して偏性細胞内寄生菌種なので、土壌や水の検査では検査対象には通常ならない。動物のダニやノミが混入している可能性がある材料の検査では属レベルで検出する primer を準備して検査すれば万全な検査体制が作れる。

レベル 2 の病原体は日本細菌学会の基準では約 350 菌種がリストに掲載されている。これらの菌種一つ一つを検出する primer を準備することは可能であるが、現実的には病原菌を含む属あるいはグループの特異 primer を作成しても増幅し増幅が見られた場合にその産物を識別する方法を作成した方が効率がよい。環境材料を検査対象にすれば、数百万菌種と言われるまだ記載されていない類縁菌の遺伝子を増幅して非特異的な反応が起きることは避けられない。従って増幅産物をシークエンスで確認するか DNA プローブで確認する検査が必要になる。

遺伝子増幅方法は微量化され網羅的な遺伝子検出を実用的な価格で実施できる環境が整いつつあるが、環境中の細菌の 97% は未知の菌種と予測されている。材料から直接病原体の遺伝子を検出する場合、どの菌でも増幅する Universal primer を使用すれば材料中の優位な菌しか検出できなくなる。そこで菌種特異的な primer を使用すれば菌数が少なくても検出できる。

病原性菌種を含む属 genus に特異的な primer を使用すれば使用する特定 primer の数をへらすこともできる。増幅した産物

の確認には通常は電気泳動法で増幅サイズを確認するか、Realtime PCR法で増幅しながら増幅産物をモニターする方法がとられている。また増幅したDNAをマイクロアレイ上に固定した特異プローブに当てて解析する方法も報告されている。

材料の中で優位な一般細菌の解析にはすべての細菌の16S rDNAを増幅するuniversal primerを使用することで網羅的に検出することが出来る。しかしこの方法では増幅したPCR産物は多種類の細菌由来のDNAであるため、直接シークエンスして菌種を決定できない。そこで一般にはPCR産物をクローン化し各クローンを解析する方法がとられている。その際、クローンを100個解析すればもとの材料の1%を占有する細菌まで理論上は解析できる。1000個のクローンをシークエンスすれば0.1%まで解析できることになる。

我々はPCR産物をシークエンスせずに、系統の異なる細菌の16S rDNAを多数固定化したマイクロチップを作成し、PCR産物と反応させることにより、多数の細菌の分布を推測する方法も報告している。この方法では多数の細菌の相対的な濃度も予測できる点で、DDGE等のような増幅した遺伝子の長さの変動をモニターする方法より情報量が多い。

3. 便の中の病原体の網羅的な検査方法の作成

便や喀痰は正常な細菌叢が多数存在するため、正常な細菌と下痢を起こす菌種を識別しなければならない。また大腸菌群のように腸内に常在する菌種があり、リボゾーム配列を使って検出しても意味がない。大腸菌では病原因子を保有している菌株を識別することが要求される。表7に下痢に使用する検出菌種と遺伝子のリストを示した。約58種類の病原体の遺伝子検出方法を作

成すれば網羅的な検査法が作成できる。便の検査では病原体は通常1個から 10^6 個/g、正常細菌は 10^6 から 10^{12} 個/gを占める。Universal primerを一種類使用し、マイクロアレイで解析する方法では優位な 10^8 - 10^{12} /gの正常細菌の一部しか解析できない。そのために表7に示した特異primerを使用しなければ菌数の少ない病原体を検出できない。

D. 考察

炭疽は*B. anthracis*の感染による急性敗血症性疾患であり、現在も世界各地で発生がみられる重要な人獣共通感染症である。炭疽菌は世界中から分離されるにも関わらず、その細菌学的性状が非常に安定している。そのため分離株を区別するための唯一の疫学マーカーとして、様々な遺伝子型別法が試みられている。本研究では、RAPD法、FAFLP法およびPFGE法を用いて、日本およびモンゴル由来臨床株を含む*B. anthracis*菌株間における遺伝的類似性と、各法の有用性を検証した。

炭疽菌における遺伝子型別法では、毒素プラスミドおよび莢膜プラスミドの存在に結果が影響されることが推測できる。炭疽菌の病原性において莢膜プラスミドおよび毒素プラスミドの存在は極めて重要な位置を占め、臨床由来の強毒株は双方のプラスミドを保有する。しかし環境由来の株では毒素産性能あるいは莢膜形成能を持たないものも存在し、本研究で使用した株についてもプラスミド保有状況を調べる必要がある。両プラスミド上の遺伝子(PA、CAP)に特異的なプライマーを用いてPCR法を行った。結果として、臨床由来株の全てが莢膜形成能をもつこと、およびうち3株は毒素非産生性であることが示された。しかし毒素プラスミドは高温培養や長期保

存によって脱落することが知られており、これらの3株も元来は毒素プラスミドを保持していた可能性が高い。今回用いたプライマーセットは、炭疽菌の迅速検出用に宝酒造でキット化されたものであり、炭疽菌検出に有効であることが示された。Smart CyclerによるリアルタイムPCRにより30分以内に増幅の結果を調べることが出来る(図4)、さらに融解曲線を見ることにより簡単にその温度で陽性か陰性かが判断できた(図5)。

RAPD法はPCR法を利用したDNAフィンガープリンティング法で、簡便性・迅速性に優れ、細菌感染症や食中毒の疫学調査に非常に有効である。また、通常のPCR用機器があれば特別な装置は必要無いことから、比較的規模の小さな検査施設でも行う事が出来る。しかし、本法を用いた炭疽菌の遺伝子型別では、プラスミドの存在を考慮すれば、炭疽菌を区別することは困難であった。

PFGE法に関しても同様で、プラスミドの保有を考慮すると、切断パターンは全ての株においてほぼ完全に一致し、各株を分類することは出来なかった。今回は制限酵素にSalIのみを用いたため、異なる酵素を用いることで多型を得ることは出来るかも知れない。しかしながら、実験手技の煩雑さに伴う感染の危険性、および得られる多型の少なさを考慮すると、PFGE法は炭疽菌の遺伝子型別には不向きであると言える。

AFLP法はDNAを制限酵素で断片化し、その中から特定の塩基配列を持つものを選択的にPCR増幅して検出するDNAフィンガープリンティング法である。本法は制限酵素による多型と制限酵素断片の末端内部配列による多型を合わせて検出できるため、多数のマーカーを得ることが出来る。

しかし、前者と同様にプラスミドの存在を考慮すると、Morioka株、M9株およびNakagawa株において、明らかに他の株とは異なる増幅パターンを示していた。特にNakagawa株は特有の増幅断片が2箇所を示され、染色体上に多数の変異が存在すると考えられる。これはRAPD法およびPFGE法では得られなかった結果であり、他の2法よりもFAFLP法は感度の点で優れていると言えるだろう。しかしながら、しかし、炭疽菌を区別するには情報量が少なすぎると結論される。

炭疽の治療には主にペニシリンが使用され、場合に応じてテトラサイクリン、エリスロマイシン、ストレプトマイシンなどが順次用いられる。人における暴露後の予防投薬の推奨薬剤としては、ペニシリンの他にテトラサイクリン系のドキシサイクリンと、ニューキノロンのシプロフロキサシンがあげられる。炭疽菌は一般にこれらの薬剤に感受性であるが、本研究では感受性ディスク法を用い、臨床由来株およびワクチン株9株について、9種類の薬剤に対する感受性試験を行った。結果として、臨床由来株であるMorioka株でSM耐性が認められ、炭疽菌が人為的操作によらず、自然にSM耐性を獲得しうることが示された。Morioka株は臨床分離株であるため、治療の段階で耐性が獲得された可能性が示唆される。

炭疽菌の感染経路は芽胞体が体内に侵入し、まず速やかにマクロファージ内に取り込まれる。しかし、すぐに発芽が起こり、毒素産生によりマクロファージの溶解が起こる。その後炭疽菌は血流中に放出され、毒素の活発な産生と莢膜形成を伴いながら爆発的に増殖する。この結果、毒素によるショック症状により宿主は死に至る。この際、爆発的な増殖に莢膜が関与していると

考えられた。さらに、L-capsule を dep 変異株に外から加えると、その病原性が回復したことから、L-capsule が増殖に大きな役割を果たしているかと推定できた。

莢膜形成に必須の cap 領域と dep 遺伝子は1つのオペロンを形成していた。このことは、炭疽菌が生体内に侵入すると、菌体表層に高分子量の莢膜を形成し、それと同時に莢膜を低分子化して菌体外に放出すると考えられる。一見逆の反応をしており、無駄なようにも考えられるが、合理的な感染防御機構からの逃避機構であろうと推定できた。

L-capsule は外から dep 変異株に加えると、その病原性を回復させた。このことは、炭疽菌の血流中における爆発的に増殖に L-capsule が関与していることを意味しており、新たな炭疽の治療法への開発が期待出来る。

E. 結論

- ① 炭疽菌は1菌種1血清型であり、比較的変異が少ないと言われてきたが、今回の遺伝子型別のための方法では明瞭に区別することは出来なかった。モンゴル由来株のDNAを使用しても全く同じ結果であったことから炭疽菌の染色体は極めて保存されていることが示された。炭疽の発生した場合、更なる遺伝子型別の方法の使用が必要である。
- ② 炭疽菌は多くの薬剤に感受性であることが示され、野外株では多種類の抗生剤が有効であると言える。
- ③ 炭疽菌の検出にリアルタイムPCRが有効であったことが示され、炭疽の疑いがある場合有効であろう。
- ④ 今回炭疽の発症機構において、莢膜物質の低分子化という機構が深く関与していることが明らかになり、炭疽治療へ

の新たな展開が期待出来る。

F. 健康危険情報
特に無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) H.I. Cheun, S-I. Makino, M. Watarai, T. Shirahata, I. Uchida, and K. Takeshi. 2001. A simple and sensitive detection system of *Bacillus anthracis* in meat and tissue. *J Appl Microbiol.* 91: 421-426.
- (2) S-I. Makino, H.I. Cheun, M. Watarai, I. Uchida, and K. Takeshi. 2001. Detection of anthrax spores from the air using real-time PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 33: 237-240.
- (3) Zhao, L. T. Ezaki, Z. Y. Li, Y. Kawamura, K. Hirose. and H. Watanabe. 2001. Vi-suppressed wild strain *Salmonella typhi* cultured in high osmolarity is hyperinvasive to epithelial cells and destructive of Peyer's patches. *Microbiol. Immunol.* 45 : 149-158
- (4) Ezaki, T., Y. Kawamura, N. Li, Z-Y. Li, L. Zhao, and S. Shu 2001. Proposal of genera *Anaerococcus*, gen. nov., *Peptoniphilus*, gen. nov., and *Catonia*, gen. nov. for members of Genus *Peptostreptococcus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2001; 51: 1521-1528
- (5) Makimura K., R. Hanazawa, K. Takatori, Y. Tamura, R. Fujisaki, Y. Nishiyama, S. Abe, K. Uchida, Y. Kawamura, T. Ezaki, and H.

- Yamaguchi. 2001. Fungal Flora on board the Mir-station, identification by morphological features and ribosomal DNA sequences. *Microbiol. Immunol.* 45 : 357-363.
- (6) Licheng Zhao, Yoshiaki Kawamura and Takayuki Ezaki 2001. Construction of virulent defective mutants of *Salmonella typhi* and their phenotypic description as candidates for educational purposes. *Microbiol.Cult. Coll.* 17: 13-21.
- (7) Isshiki,Y., M. Matsuura, S. Dejsirilert, T. Ezaki, K. Kawahara. 2001. Separation of 6-deoxy-heptane from a smooth-type lipopolysaccharide preparation of *Burkholderia pseudomallei* FEMS *Microbiol. Lett.* 199:21-25.
- (8) Ishizaki,A., E.Takese, T. Ikai, S. Kumai, R. Nagano, K. Sonnomoto, K. Doi, S.Ogata, Y. Kawamura, and T. Ezaki. 2001. Taxonomic position of new bacteriocin (nukacin ISK-1) producer isolated from long-aged Nukadoko. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 47:143-147
- (9) Masuzawa,T., N. Takada, M. Kedeken, T. Fukui, Y. Yano, F. Ishiguro. Y. Kawamura, Y. Imai, and T. Ezaki. 2001. *Borrelia sinica* sp. nov., a Lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:1817-1824.
- (10) Makino S-I., Watarai Masahisa, Hyeng-il Cheun, and Uchida I. Role of the lower molecular capsule, which was released from the cell surface of *Bacillus anthracis*, on the pathogenesis. *J. Infect. Dis.* submitted.

TABLE 1. *Bacillus anthracis* strains or DNAs used in the present study

Strains or DNAs	Toxin plasmid	Capsule plasmid	Drug-resistance
Sikan	+	+	-
Moriokaa	-	+	SM
Nakagawa	-	+	-
Ryugasaki	+	+	-
52	+	+	-
P1	+	+	-
34-F2	+	-	-
Pasteur I	+	+	-
Pasteur II	+	+	-
P39	+	+	SM
P43	-	-	SM
P44	+	-	SM
P45	-	+	SM
M1	+	+	ND
M2	+	+	ND
M3	+	+	ND
M4	+	+	ND
M5	+	+	ND
M6	+	+	ND
M7	+	+	ND
M8	+	+	ND
M9	-	+	ND
M10	+	+	ND
M11	+	+	ND
M12	+	+	ND
M13	+	+	ND

ND; not done, SM; streptomycin

表2 使用プライマーとその性質

プライマーセット	名称	塩基配列	標的遺伝子	大きさ	融解温度
PA	PA7	ATCACCAGAGGCAAGACACCC	毒素遺伝子	210 bp	82.5±1_
	PA6	ACCAATATCAAAGAACGACGC			
CAP	MO11	GACGGATTATGGTGCTAAG	莢膜遺伝子	572 bp	85±1_
	MO12	GCACTGGCAACTGGTTTTG			

表 3 Primers for the PCR and RAPD used in the present study

Primer	Sequence(5'-3')
AP40	CCGCAGCCAA
AP41	GCGATCCCCA
AP42	AACGCGCAAC
AP43	GTGGATGCGA
AP44	AGCCAGTTTC
AP45	GTCAACGAAG
AP46	GAGGACAAAG
AP47	GCGGAAATAG

RAPD, rondon amplified polymorphic DNA.

表 4 Polymorphisms of FAFLP profiles exhibited by *B. anthracis* strains

FAFLP profile	Presence of polymorphic fragments of size(bp)									
	<i>Eco</i> R I -A, <i>Mse</i> I -T					<i>Eco</i> R I -T, <i>Mse</i> I -A				
	46	96	105	150	155	87	139	164	363	
Ryugasaki	+	+	-	-	+	+	-	+	-	
Morioka	-	+	-	+	-	-	-	-	-	
M9	-	+	-	+	-	-	+	-	-	
Nakagawa	-	-	+	+	-	-	-	-	+	

Table 5. Virulence of *B. anthracis* for mice

Strain	L-capsule		Mouse				
	Added	Pre-treatment with	Number of survivors after 14 days (n=5)	Mean time to death (days)	Number of mice with bacteria isolated after 24 h (n=5)*	Intraperitoneally detection of the bacterial cells after	
						6 h	24 h
Sm	-	-	0	3.6	5	+	+
Sm-1	-	-	5	-	0	-	-
Sm-2	-	-	2	7	5	+	+
Sm-1	+	-	2	6	5	+	+
Sm-1	+	Proteinase K	5	-	0	-	-
Sm-1	+	DNase or RNase	2	5.7	5	+	+

* All cultures yielded confluent growth of *B. anthracis* except for one mouse (a), from which 4 colonies were detained.

表6. 網羅的に病原体検出するための選択分離培地と培養方法の例

病原体	代表的な選択分離培地	培養方法
大腸菌群	BTB 寒天	DHL 寒天 Chromo 寒天
大腸菌 O157	Sorbitol-寒天	0157
Salmonella, Shigella	SS 寒天	DHL 寒天
Yersinia 属	CIN 培地	25 C、好気培養、4 日
Streptococcus 属、 Staphylococcus 属	PEA 血液寒天	35 C、好気培養、一夜
Corynebacterium diphtheriae	HB ジフテリア寒天培地	Loeffler 寒天
Bordetella pertussis	Bordet^Gengu 寒天	CSM 寒天
Mycobacterium 属	小川培地	7H 11 寒天
Mycoplasma pneumoniae	Bordet^Gengu 寒天	30 C、好気培養、6 週間
Bacillus anthracis	PLET 寒天	Ethanol 前処理
Burkholderia pseudomallei/B. mallei	BCSA 寒天	0FPBL 寒天
Burkholderia cepacia	PC 寒天	0FPBL 寒天
Campylobacter jejuni/C. coli	Skirrow 寒天	35 C、10% CO2 培養 35 C、10% CO2 培養、 4 日
Helicobacter pylori	Dent 寒天	No110 寒天
Staphylococcus 属	Mannitol-食塩寒天	35 C、好気培養、1-2 日
Staphylococcus aureus MRSA 株	MRSA Screening 寒天培地	35 C、好気培養、1-2 日
Bacteroides 属	BBE 寒天	35 C、嫌気培養、3 日
Clostridium perfringens	CW 寒天	35 C、嫌気培養、3 日
Fusobacterium 属	変法 FM寒天	35 C、嫌気培養、3 日
Clostridium difficile	CCFA 寒天	35 C、嫌気培養、3 日 30 C、好気培養、2 週間
Leptospira 属 真菌	Korthof 寒天 サブロー寒天	30 C、好気培養、2-3 日
Candida 属	Candida GE 培地	30 C、好気培養、2-3 日
Enterococcus, Listeria 属	胆汁酸 Esculin 寒天	30 C、好気培養、一夜 35 C、10% CO2 培 養、一夜
Neisseria gonorrhoeae	GC 寒天培地	35 C、10% CO2 培 養、一夜
N. gonorrhoeae, N. meningitidis	Thayer-Martin 寒天	35 C、10% CO2 培 養、一夜
Gardnerella vaginalis	Gardnerella 培地	35 C、10% CO2 培 養、2-3 日 30 C、好気培養、一週 間
Legionella 属	BCYE 寒天	WYO 寒天

表 7. 下痢をおこす細菌及び原虫性病原体の網羅的スクリーニング

病原体	検出に使用する因子	区分
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Enterotoxin(alt)	bacteria
<i>Aeromonas hydrophila</i>	aerolysin	bacteria
<i>Aeromonas sobria</i>	aerolysin	bacteria
<i>Aeromonas</i> spp.	16S rDNA	bacteria
<i>Bacillus anthracis</i>	virulence:protective antigen	bacteria
<i>Bacillus anthracis</i>	virulence:Edema factor	bacteria
<i>Bacillus anthracis</i>	virulence:lethal factor	bacteria
<i>Bacillus cereus</i> group	Haemolysin	bacteria
<i>Bacteroides fragilis</i>	fragilysin metaloprotease	bacteria
<i>Campylobacter jejuni</i>	Specific 16S rDNA	bacteria
<i>Campylobacter jejuni</i> group	virulence : toxin	bacteria
<i>Clostridium botulinum</i> A/B	Botulinum toxin A/B	bacteria
<i>Clostridium botulinum</i> C	Botulinum toxin C	bacteria
<i>Clostridium botulinum</i> E/F	Botulinum Toxin E/F	bacteria
<i>Clostridium difficile</i>	16S rDNA	bacteria
<i>Clostridium difficile</i> toxin A	toxin A	bacteria
<i>Clostridium difficile</i> toxin B	toxin B	bacteria
<i>Clostridium perfringens</i>	16S rDNA	bacteria
<i>Clostridium perfringens</i> toxin	toxin : ent	bacteria
<i>Escherichia coli</i> invasive	virulence:virB	bacteria
<i>Escherichia coli</i> LT (ETEC)	toxin:LT toxin	bacteria
<i>Escherichia coli</i> Shiga 1 (EHEC)	Shiga toxin 1	bacteria
<i>Escherichia coli</i> Shiga 2 (EHEC)	Shiga toxin 2	bacteria
<i>Escherichia coli</i> ST1 (ETEC)	ST 1 toxin	bacteria
<i>Escherichia coli</i> ST11 (ETEC)	ST II toxin	bacteria
<i>Helicobacter pylori</i>	virulence	bacteria
<i>Listeria monocytogenes</i>	listeriolysin O (hlyA)	bacteria
<i>Mycobacterium avium</i>	16S rDNA	bacteria
<i>Mycobacterium</i> spp.	16S rDNA	bacteria
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	16S rDNA	bacteria
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	group 16S rDNA	bacteria
<i>Salmonella</i> spp	toxin: enterotoxin ent	bacteria
<i>Salmonella typhi</i>	virulence :vipR	bacteria
<i>Shigella</i> spp.	virulence :Inv G	bacteria
<i>Shigella</i> spp.	virulence :IpaB	bacteria
<i>Staphylococcus aureus</i> SEA	toxin:seA	bacteria
<i>Staphylococcus aureus</i> SEB	toxin :seB	bacteria
<i>Staphylococcus aureus</i> SEC	toxin :seC	bacteria