

Staphylococcus aureus SED	toxin :seD	bacteria
Staphylococcus aureus SEE	toxin :SeE	bacteria
Tropheryma whippelii	16S rDNA	bacteria
Vibrio cholerae	toxin :ctA	bacteria
Vibrio cholerae/mimicus	Group 16S rDNA	bacteria
Vibrio fluvialis	16S rDNA	bacteria
Vibrio parahaemolyticus	Specific 16S rDNA	bacteria
Vibrio parahaemolyticus group	haemolysin(Tdh)	bacteria
Vibrio spp.	Group 16S rDNA	bacteria
Vibrio vulnificus	virulence	bacteria
Yersinia enterocolitica	Group 16S rDNA	bacteria
Yersinia enterocolitica group	Group 16S rDNA	bacteria
Yersinia pestis	virulence:pesticin	bacteria
Yersinia pestis	virulence: invasion	bacteria
Yersinia pestis/pseudotuberculosis	Group 16S rDNA	bacteria
Yernisina pseudotuberculosis	virulence: superantigenic toxin	bacteria
Yersinia pestis	virulence:ypE	bacteria
Cryptosporidium parvum	HSP70	protozoa
Entamoeba histolytica	HSP protein:P30 gene	protozoa
Giardia lamblia group	18S rDNA	protozoa

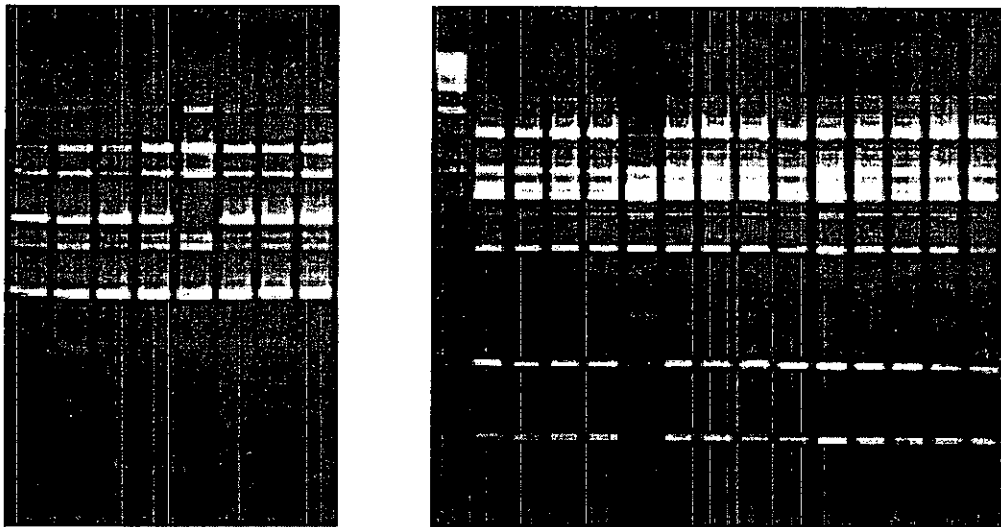


図 1 . RAPD patterns of amplified DNA from *Bacillus anthracis* strains.

A: Strains isolated in Japan, amplified with primer AP46.

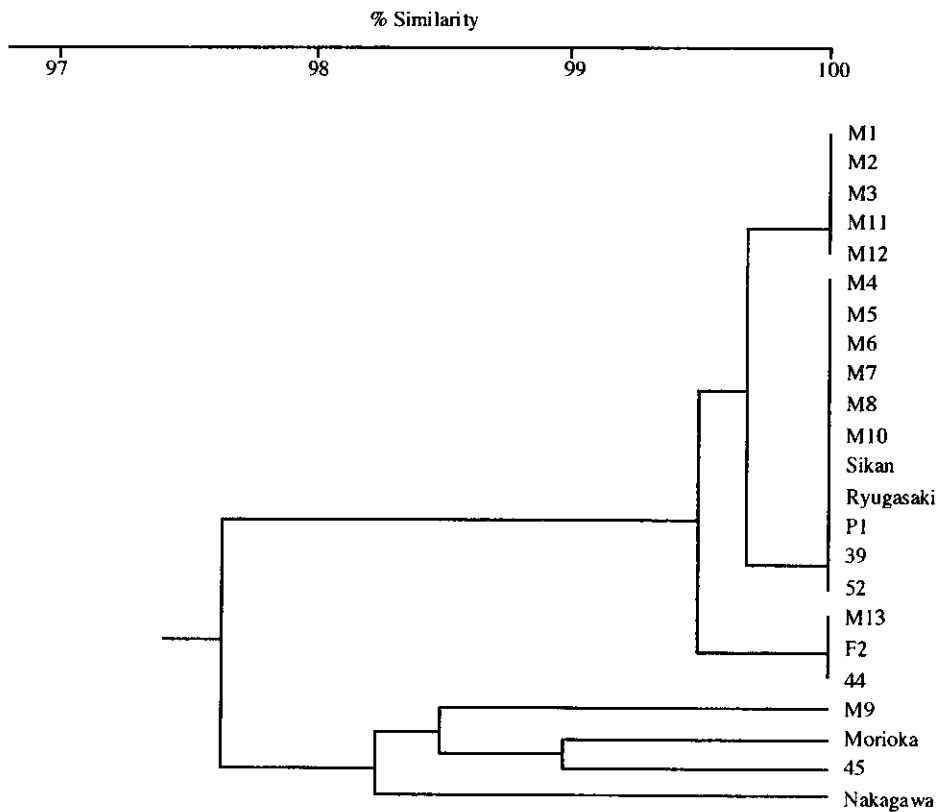
Lanes: 1., Sikan; 2, Morioka; 3, Nakagawa; 4, Ryugasaki; 5, 34 F2; 6, P1; 7, P39; 8, P43.

B: Strains isolated in Mongol, amplified with primer AP44.

Lanes: M,  $\lambda$ -HindIII marker; C, control (Sikan); 1to 13, M1 to M13.

左が A、右が B で、上記の説明は左から順番。

図 2. AFLP による炭疽菌の型別



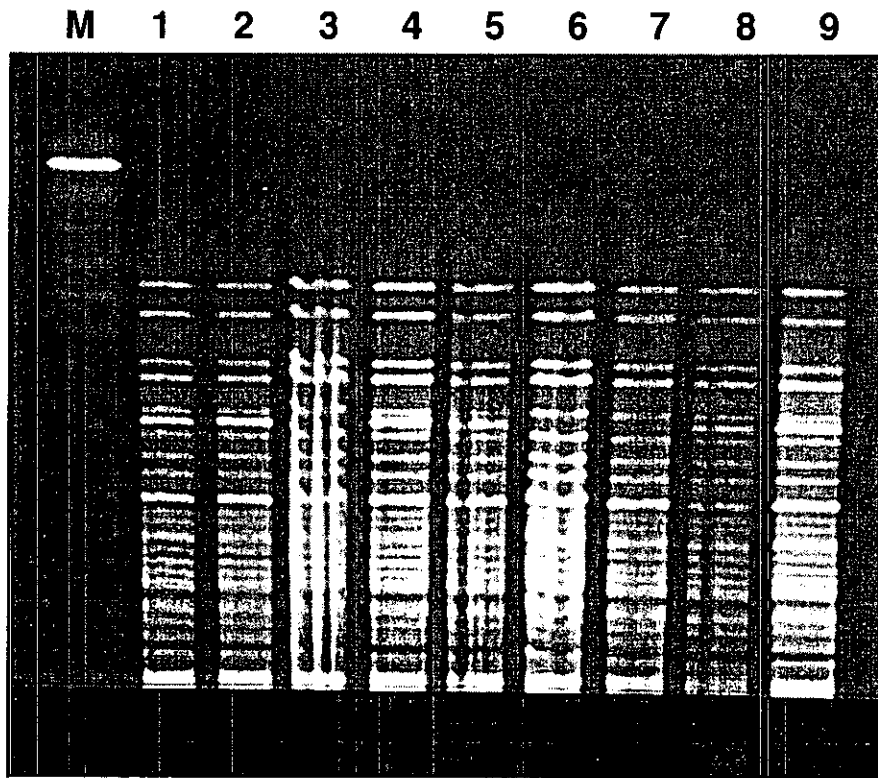


図3. PFGE analysis of *Sal* I digested genomic DNA from *Bacillus anthracis* strains.  
 Lanes: M, marker; 1, M1; 2, M5; 3, M9; 4, M13; 5, Sikan; 6, Morioka; 7, Nakagawa; 8, 34-F2; 9, P39.

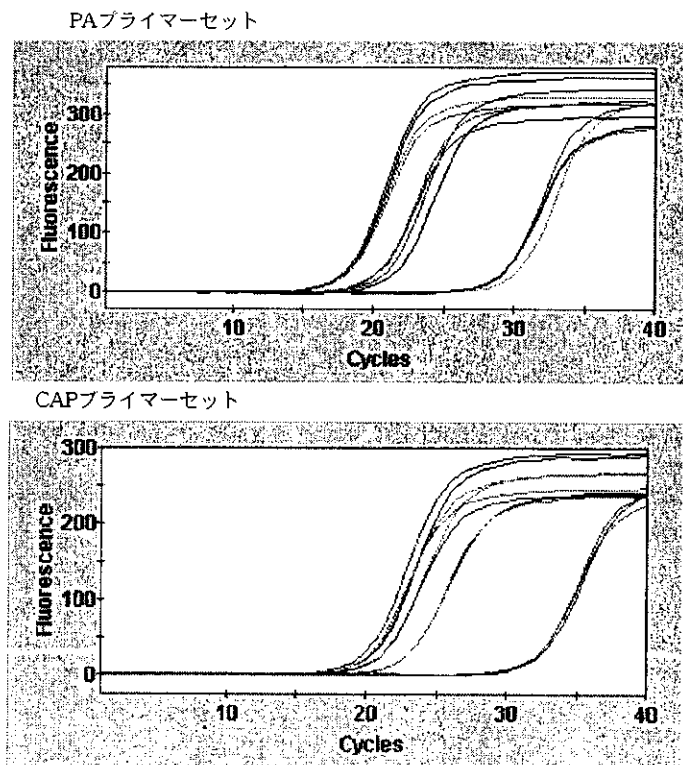
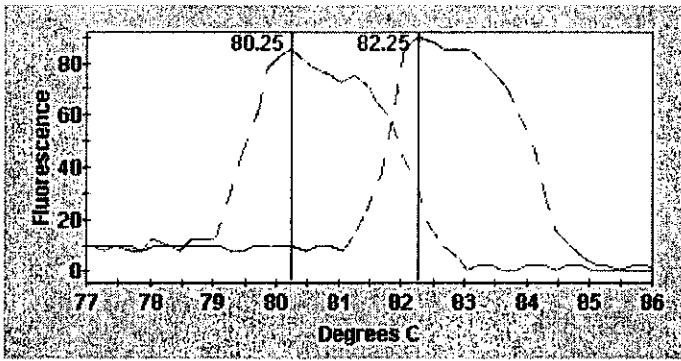


図4. 炭疽菌 DNA のリアルタイム PCR による増殖曲線

PAプライマーセット



CAPプライマーセット

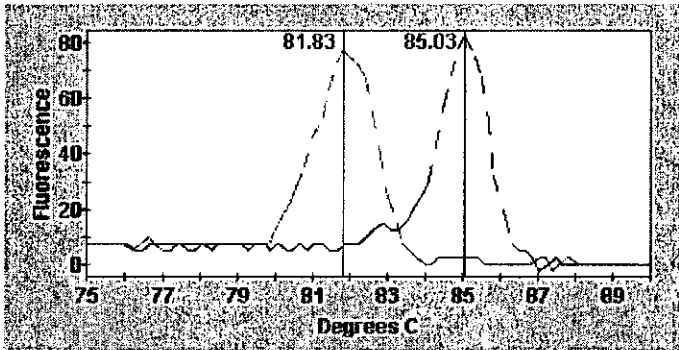


図 5. 炭疽菌 DNA の融解曲線  
陽性と陰性の代表を示す。

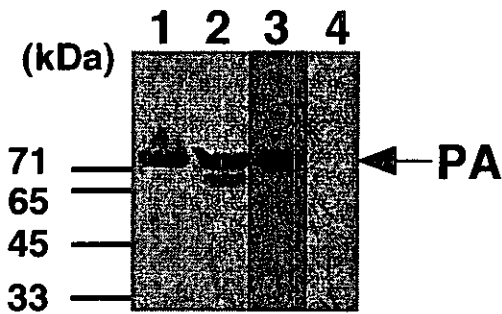
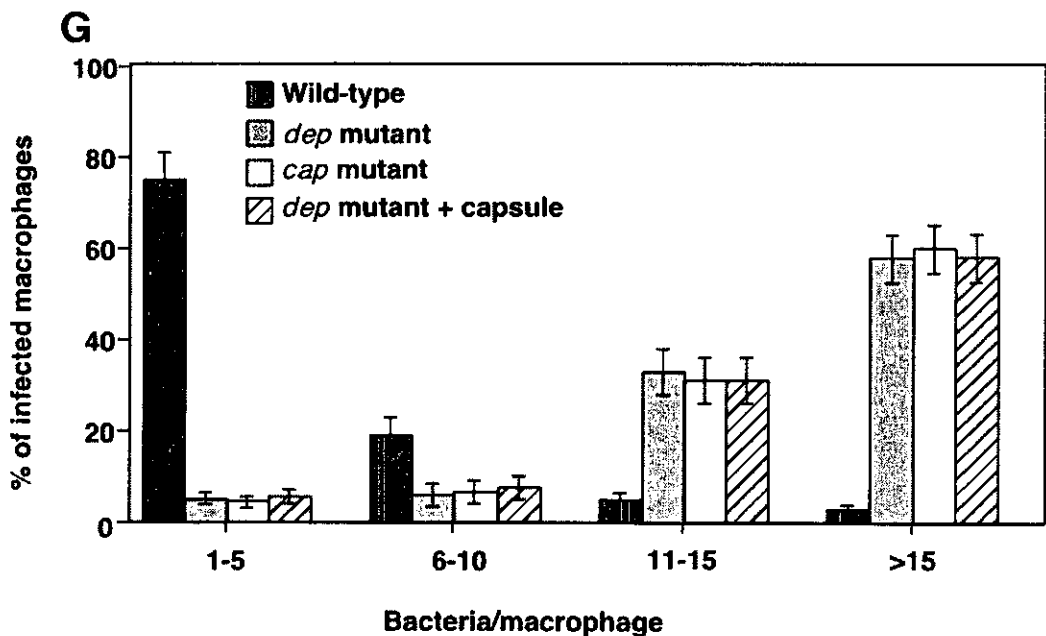
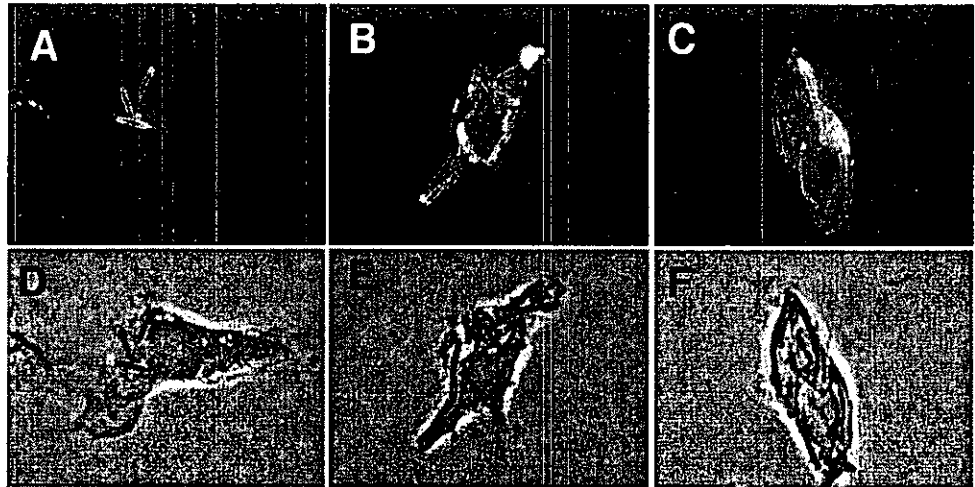


Figure 6. Western blotting analysis using antiserum raised against protective antigen.

Lane 1, *B. anthracis* Sm; lane 2, *B. anthracis* Sm-1; lane 3, purified protective antigen (PA). Bacterial cells were grown on NBY agar plates [5] for 24 h at 37°C in an atmosphere containing 20 % CO<sub>2</sub> and the same bacterial cell numbers were used for the experiments. The position of molecular marker (kDa) is shown on the left. PA protein is



arrowed.

Figure 7. Immunofluorescence staining and phenotype of the internalized *B. anthracis*. Wild-type (A, D), *dep* mutant (B, E) or *dep* mutant with L-capsule (C, F) was allowed to infect bone marrow-derived macrophages for 3 h and then stained for bacteria with anti-*B. anthracis* antibody. Macrophages were observed by a fluorescence (A-C) and a phase contrast microscope (D-F). C; mouse bone marrow-derived macrophages were incubated with wild-type (black columns), *dep* mutant (dark columns), *cap* mutant (white columns) or *dep* mutant bacteria with L-capsule (oblique columns), incubated for 3 h, fixed, and stained with anti-*B. anthracis* antibody. Infected macrophages were located, and the number of intact bacteria per macrophage was determined. Data are the mean of triplicate samples from three identical experiments (9 coverslips total) in which 100 infected macrophages were scored per experiment, and the bar above each column represents the standard deviation. Bacteria/macrophage refers

to yield of bacteria in individual macrophage. % of infected macrophages represent the fraction of 100 infected macrophages that contained the indicated number of bacteria.

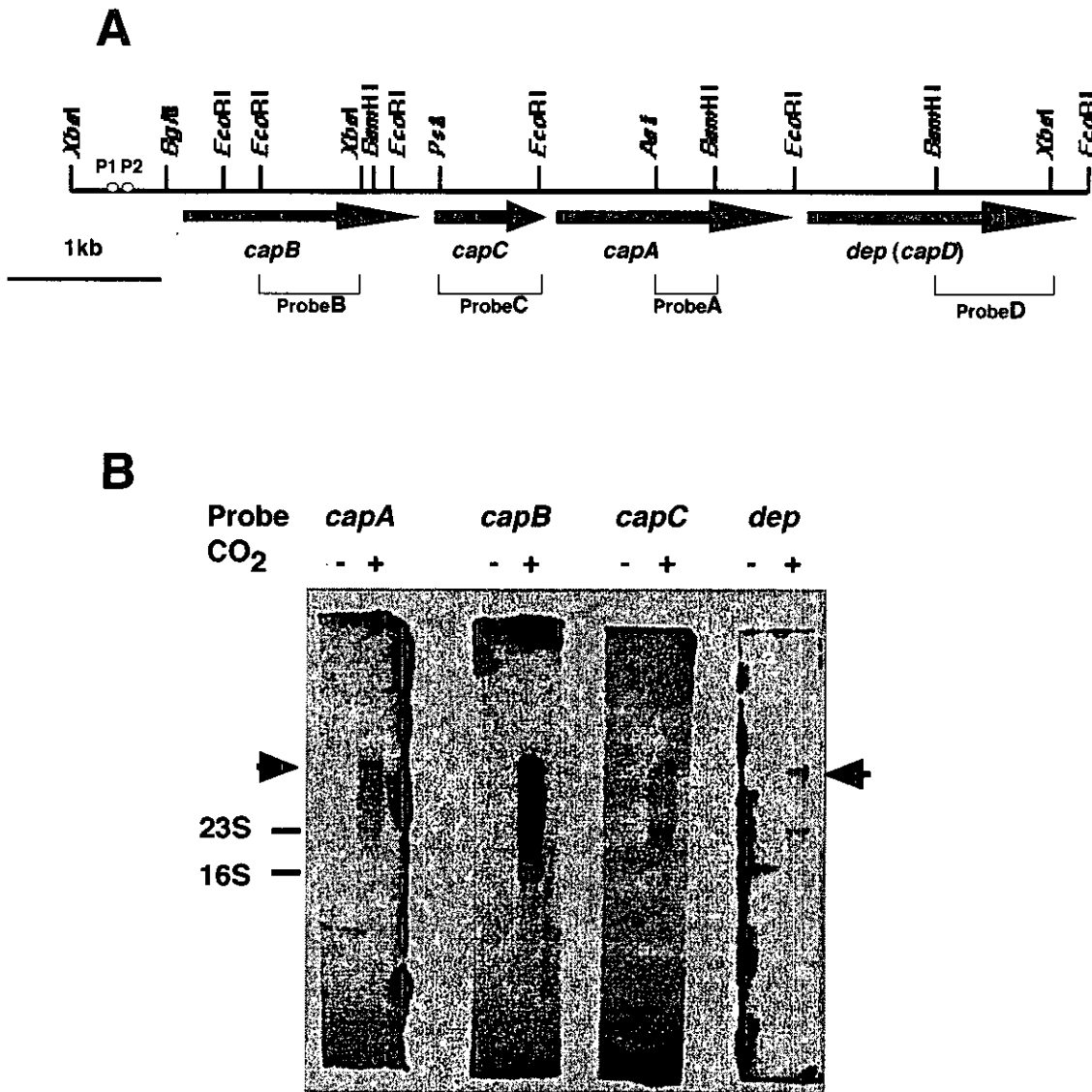


Figure 8. Physical map (A) and Northern hybridization analysis (B) of the *cap-dep* region. Two promoters, P1 and P2, were reported previously [16]. The four DNA probes indicated were constructed with appropriate restriction enzymes (A). The ~ 6 kb transcript which hybridized with all 4 probes is indicated by arrowheads (B). RNA samples were isolated from *B. anthracis* Sm broth culture at normal atmosphere (-) or under 20 % CO<sub>2</sub> (+), each 8 µg of the samples was electrophoresed in 1.0 % agarose gel. The positions of 23S and 16S r-RNA are indicated on the left. Although faint bands hybridized with each probe were detected in the lanes at the position of 23S and 16S r-RNA, they were thought to be degraded mRNA of the ~ 6 kb transcript.

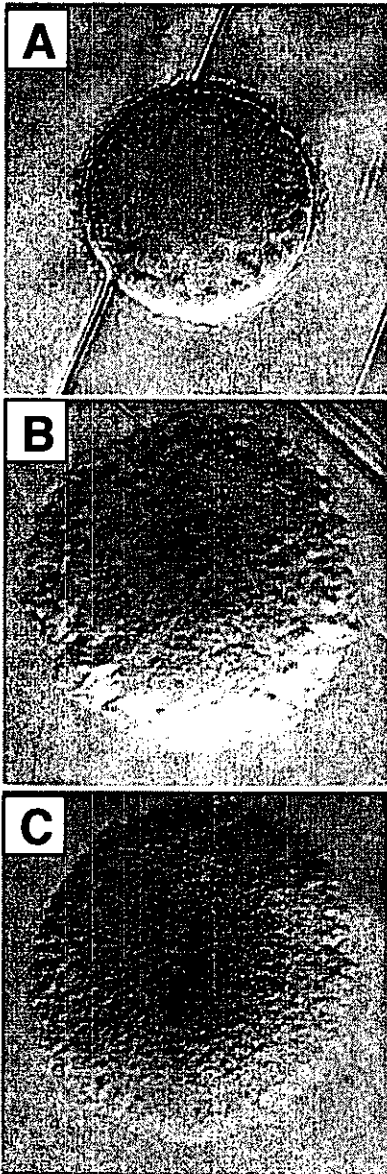


Figure 9. Colony morphology of *dep<sup>-</sup> B. anthracis*. *B. anthracis* Sm (A), Sm-1 (B) and Sm-3 (C) were incubated on NBY agar plates for 24 h at 37°C in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>, then colonies were observed by the stereoscopic microscope.

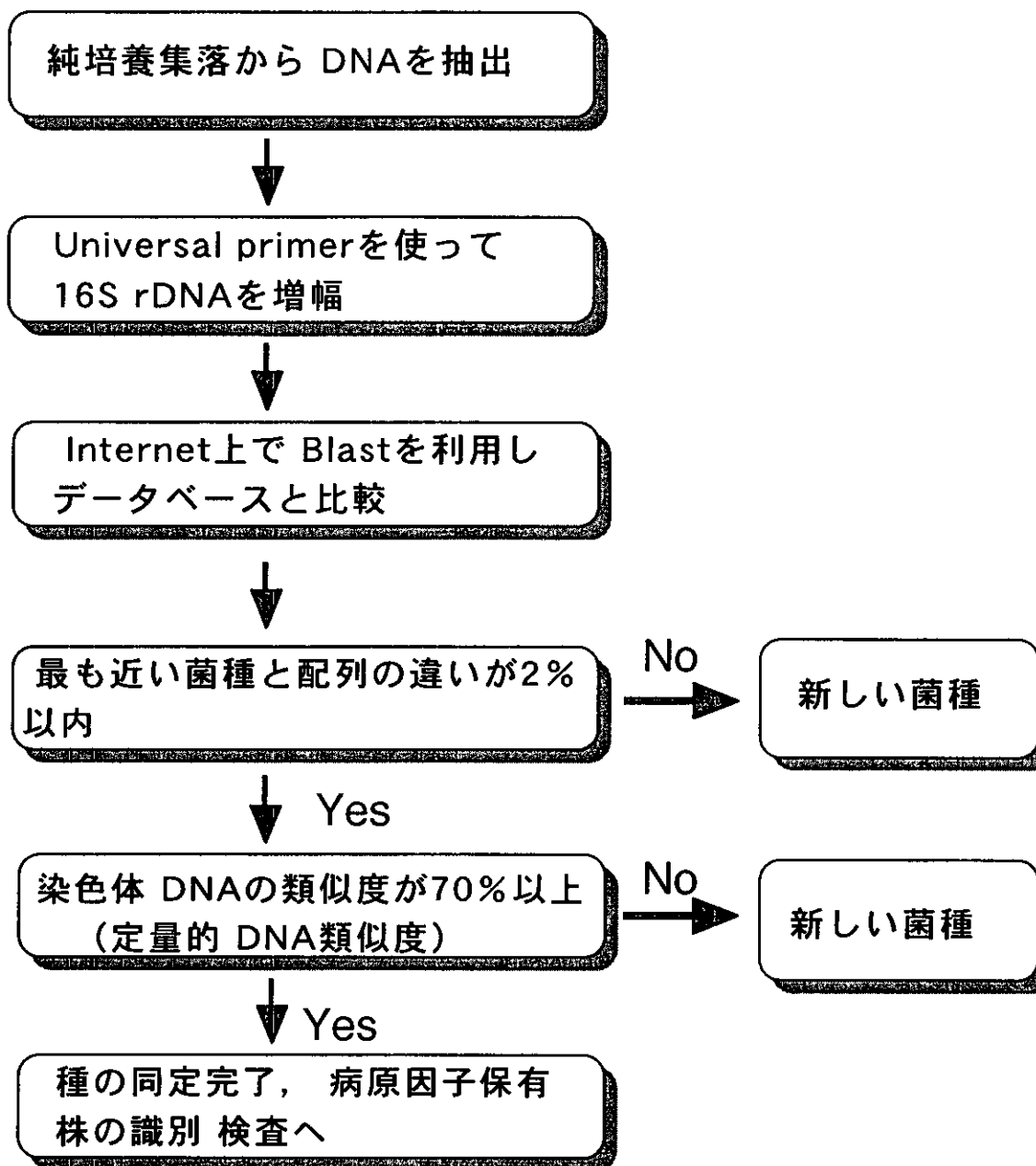


図1. 種の同定の flowchart

図9. 種の同定の flowchart



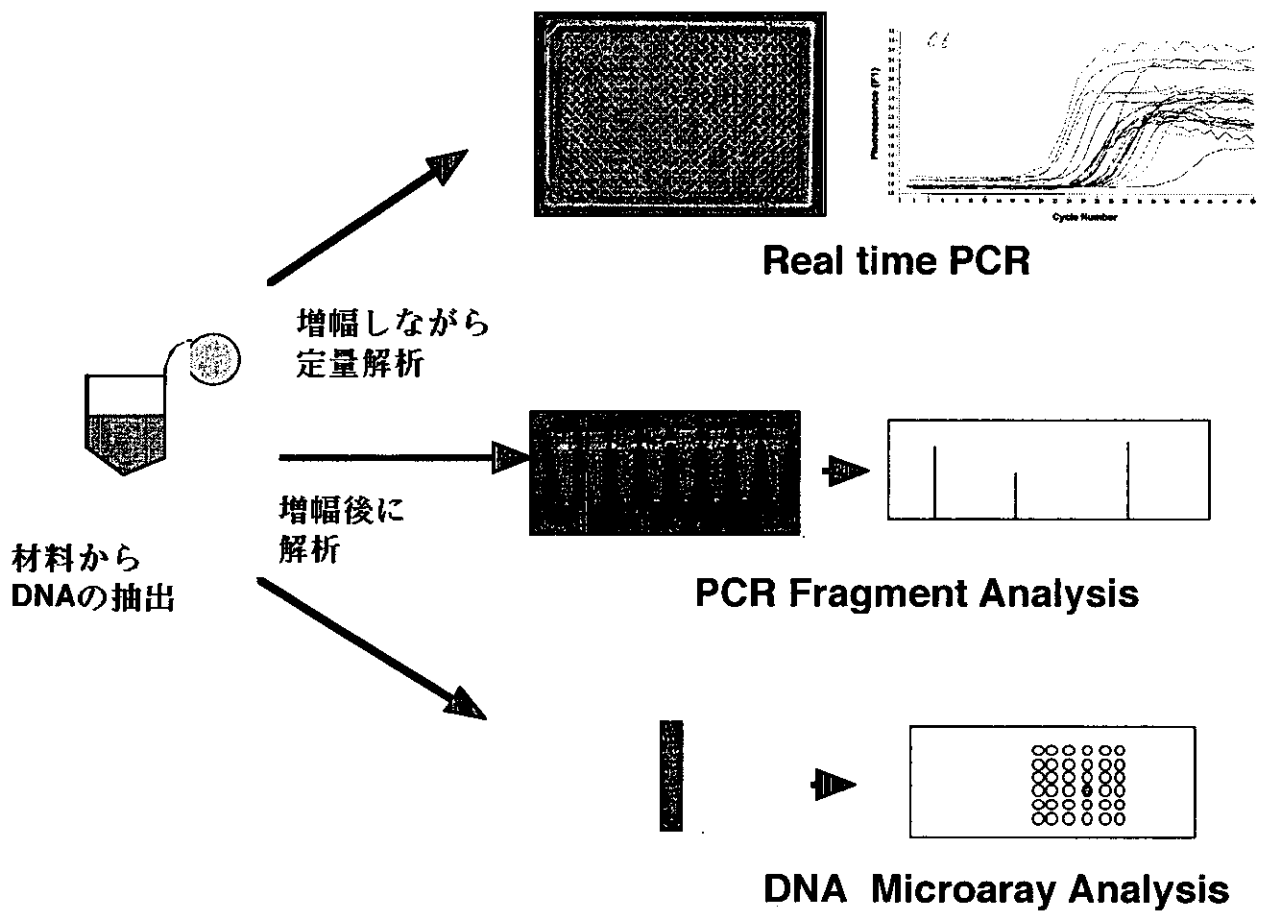


図 10. 検査のフロー

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

炭疽菌の遺伝子型別および抗生物質耐性に関する研究  
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。

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自然発生は数多く起きている。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sporin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-ブローズを使用した。また、薬剤感受性試験にはミュラーヒントン 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  $\mu$ l の Tris-maleate buffer (pH7.0) に再懸濁、5  $\mu$ l の lysozyme (100mg/ml)、10  $\mu$ l の N-acetylmuramidase SG (10mg/ml) および 1  $\mu$ l の RNase (10mg/ml) を加えてマイルドに懸濁し、37°C 30 分保温した。

次いで 200  $\mu$ l の TE buffer (10mM Tris, 1mM EDTA)、10  $\mu$ l の 10%SDS および 10  $\mu$ l の proteinaseK (20mg/ml)を加え、55°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 SYBR Green を用い、リアルタイムで増幅を観察した。反応条件は 95°C 30 秒の後、95°C 5 秒、68°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  $82.5 \pm 1^\circ\text{C}$ 、CAP プライマーセットの場合は  $85 \pm 1^\circ\text{C}$  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  $80 \pm 1^\circ\text{C}$ 、CAP プライマーセットの場合は  $82 \pm 1^\circ\text{C}$  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°C で 15 分間加熱後、遠心し、その上清 1  $\mu$ l 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°C 2 分  $\rightarrow$  38°C 2 分  $\rightarrow$  72°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、添付説明書に従って行った。被験株の DNA およそ 10ng を *EcoR* I と *Mse* I の各制限酵素により切断し、T4 DNA ligase を用いて *EcoR* I 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、*EcoR* I 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、*EcoR* I (*EcoR* I-A) と *Mse* I (*Mse* I-T)、および *EcoR* I (*EcoR* I-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- $\lambda$ -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

断片を頻繁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  $\mu$ l に懸濁した。次いで細胞壁の破壊を目的に 7  $\mu$ l の proteinaseK(20mg/ml)、7  $\mu$ l の lysozyme(100mg/ml)および 3  $\mu$ l の N-acetylmuramidase SG (10 mg/ml) を加え、滅菌蒸留水にて総溶液量を 140  $\mu$ 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  $\mu$ l と 1.2% 低融点アガロース (FMC Bioproducts)を加え、混合液を 100  $\mu$ 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 ESP buffer (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 *Sal* I と 50  $\mu$ g の牛血清アルブミンを含む High buffer 500  $\mu$ 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 $\times$ 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  $\mu$ g/disk ; 昭和薬品化工)、アンピシリン (ABPC ; 30  $\mu$ g/disk ; 昭和薬品化工)、ペニシリン (PCG ; 10  $\mu$ g/disk ; センシ・ディスク<sup>TM</sup>、Becton Dickinson Microbiology Systems ; B.D)、エリスロマイシン (EM ; 15  $\mu$ g/disk ; B.D)、テトラサイクリン (TC ; 30  $\mu$ g/disk ; B.D)、ドキシサイクリン (DOXY ; 30  $\mu$ g/disk ; B.D)、シプロフロキサシン (CPFx ; 5  $\mu$ g/disk ; B.D)、ノルフロキサシン (NFLX ; 10  $\mu$ g/disk ; B.D) およびロメフロキサシン (LFLX ; 10  $\mu$ 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、感受性判定表に従った。

#### ⑧ 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。EcoR I-A と Mse I-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、EcoR I-T、Mse I-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 *Sal*I 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。

#### 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り、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 (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 *Sal I* 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。

#### 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。

#### 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.

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

Strains or	Toxin plasmids	Capsule plasmids	Drug resistance
Sika	+	+	-
Morioka	-	+	SM
Nakagaw	-	+	-
Ryugasa	+	+	-
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;

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°C
	PA6	ACCAATATCAAAGAACGACGC			
CAP	MO11	GACGGATTATGGTGCTAAG	莢膜遺伝子	572 bp	85 ± 1°C
	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, random 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	-	-	+	+	-	-	-	-	+

左がA、右がBで、上記の説明は左から順番。

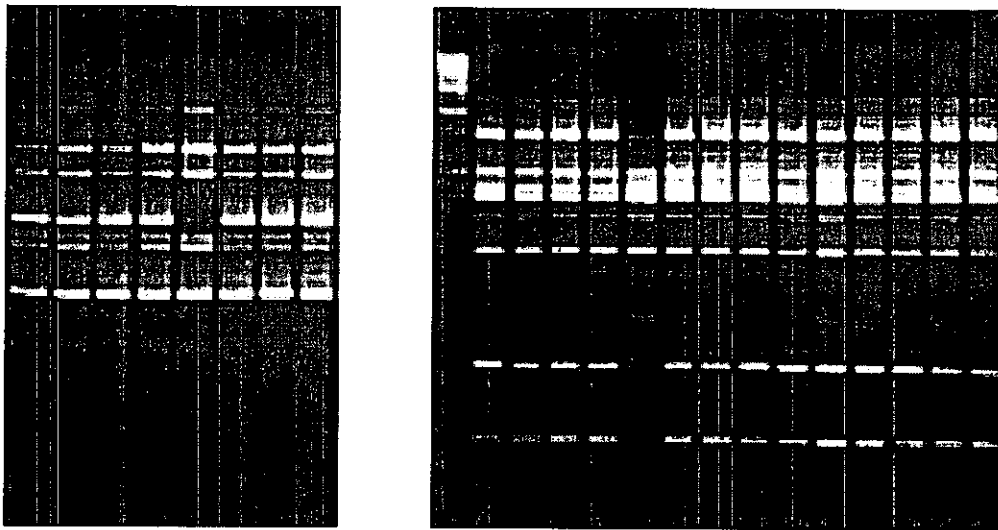


図1. RAPD patterns of amplified DNA from *Bacillus anthracis* strains.

A: Strains isolated in Japan, amplified with primer AP46.

Lanes: 1, Sikan; 2, Morioka; 3, Nakagawa; 4, Ryugasaki; 5, 34-F2; 6, P1; 7, P39; 8, P43.

B: Strains isolated in Mongol, amplified with primer AP44.

Lanes: M,  $\lambda$ -HindIII marker; C, control (Sikan); 1 to 13, M1 to M13.

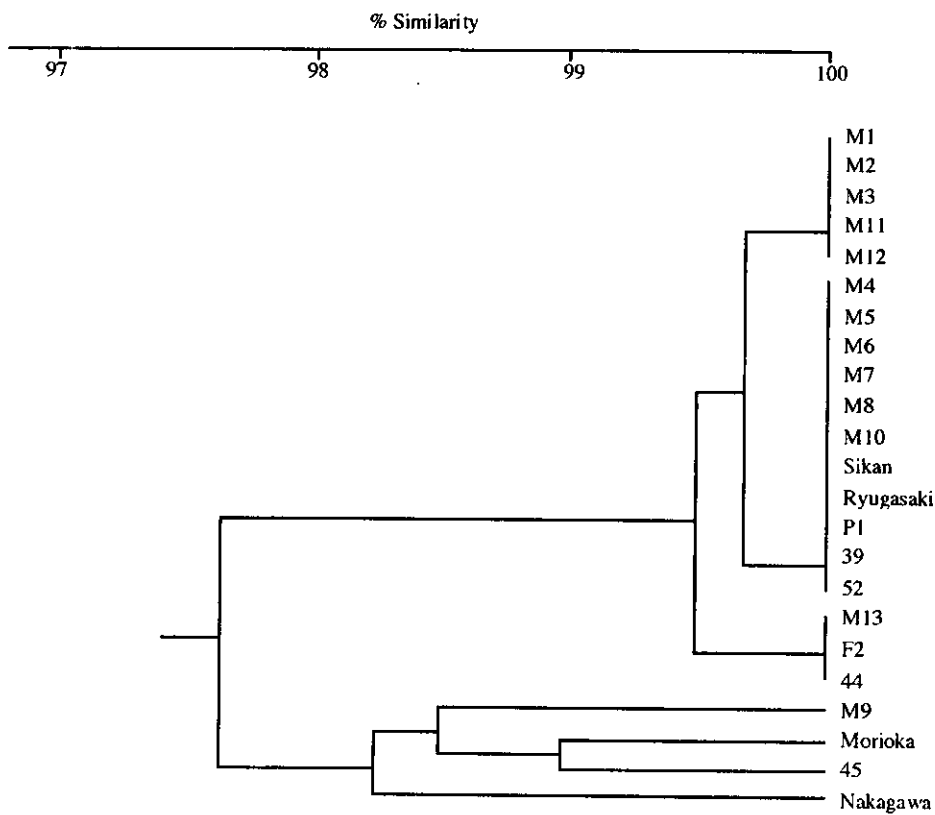


図2. AFLPによる炭疽菌の型別