

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.

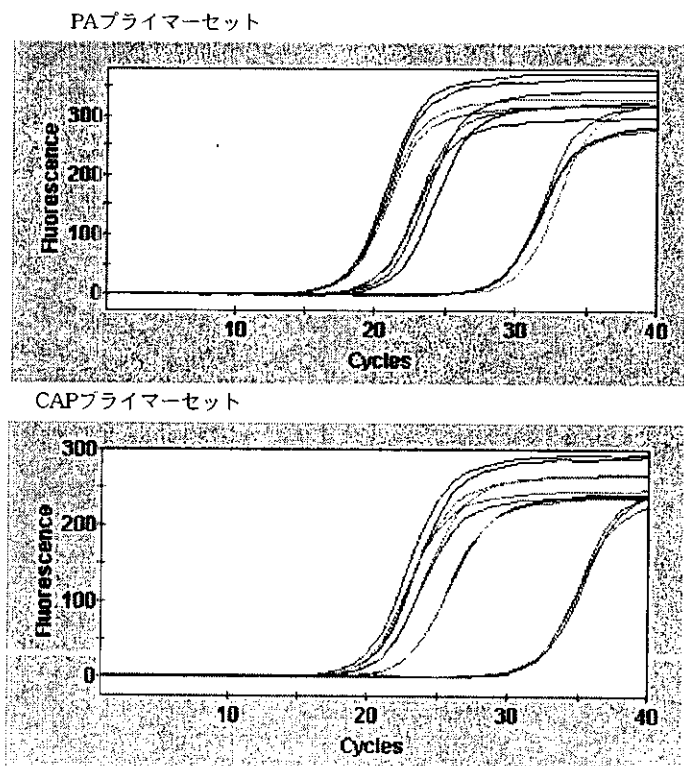
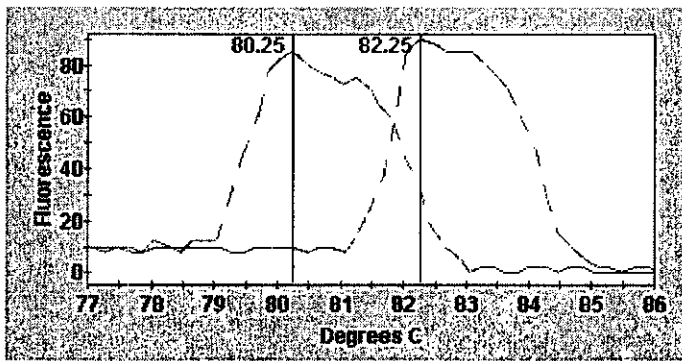


図4. 炭疽菌 DNA のリアルタイム PCR による増殖曲線

PAプライマーセット



CAPプライマーセット

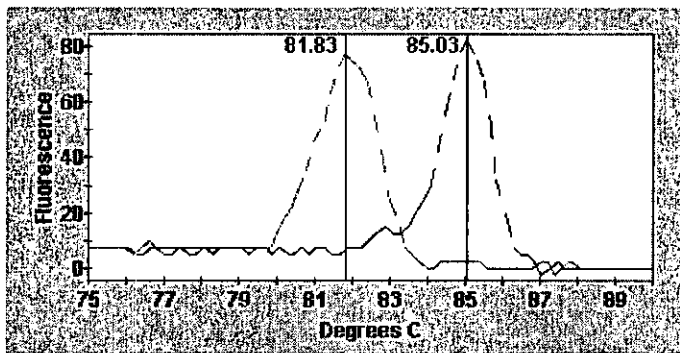


図 5. 炭疽菌 DNA の融解曲線  
陽性と陰性の代表を示す。

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

炭疽菌の莢膜物質の病原性への関与に関する研究

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。

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に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。

### 2. 低分子莢膜 (L-capsule) の分離

炭疽菌株を NBY プロス (Nutrient 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、氷中で 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 回繰り返し、最終的に少量の滅菌水に懸濁し、121°C、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°C 120 分間行った。

### 3. 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°C で震盪培養後、約  $10^6$  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。

### 4. 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  $10^5$  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。

## 5. Northern hybridization

全 RNA は定法に従い抽出し、通常の方法にて実施した。

## 6. 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、感染の危険性がある手技に関しては 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后直ちに高圧滅菌器（オートクレーブ）にて滅菌した。

## C. 研究結果

### 1. *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 1)。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 1)。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.1)。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。

### 2. 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 1)。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 1)。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。

### 3. 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.2)。

### 4. 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.3 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.3)。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。

### 5. 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.4)。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* 変異株は菌体表面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。

### D. 考察

1. 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と考えられた。
2. 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、菌体表面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。

3. 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

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.

Northern hybridization を行った。プローブは Fig.3 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.3)。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。

### 5. 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.4)。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。

### D. 考察

1. 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と考えられた。
2. 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。

3. 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

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.

Table 1. 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.

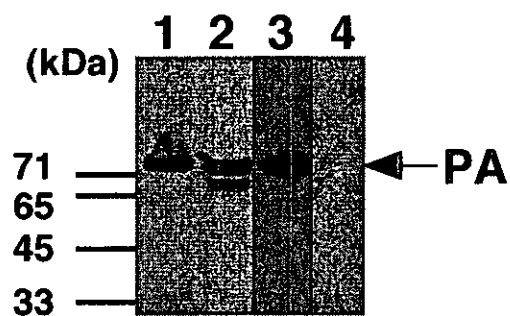


Figure 1. Western blotting analysis using antiserum raised against protective antigen.

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

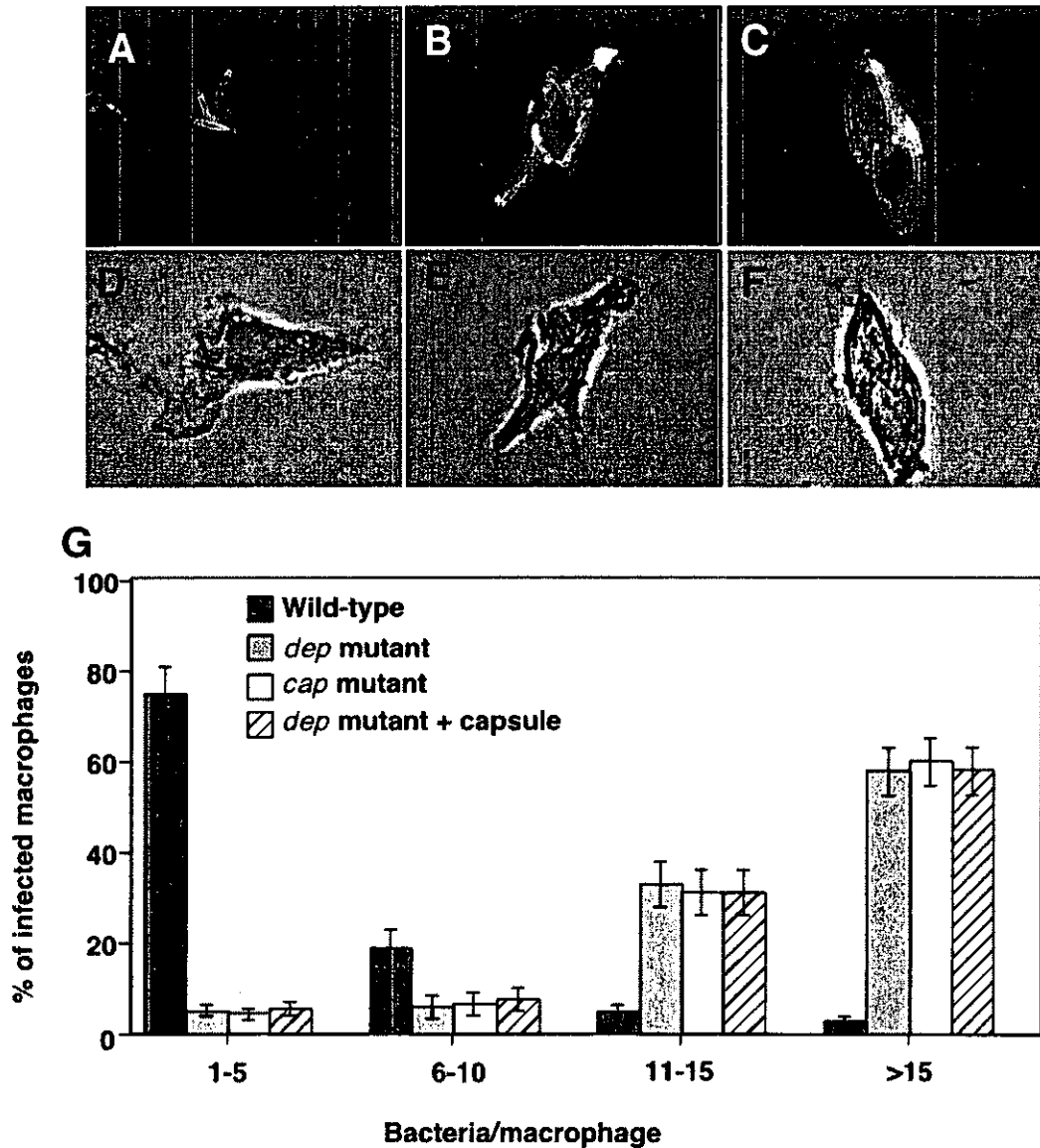


Figure 2. Immunofluorescence staining and phenotype of the internalized *B. anthracis*. Wild-type (A, D), *dep* mutant (B, E) or *dep* mutant with L-capsule (C, F) was allowed to infect bone marrow-derived macrophages for 3 h and then stained for bacteria with anti-*B. anthracis* antibody. Macrophages 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.

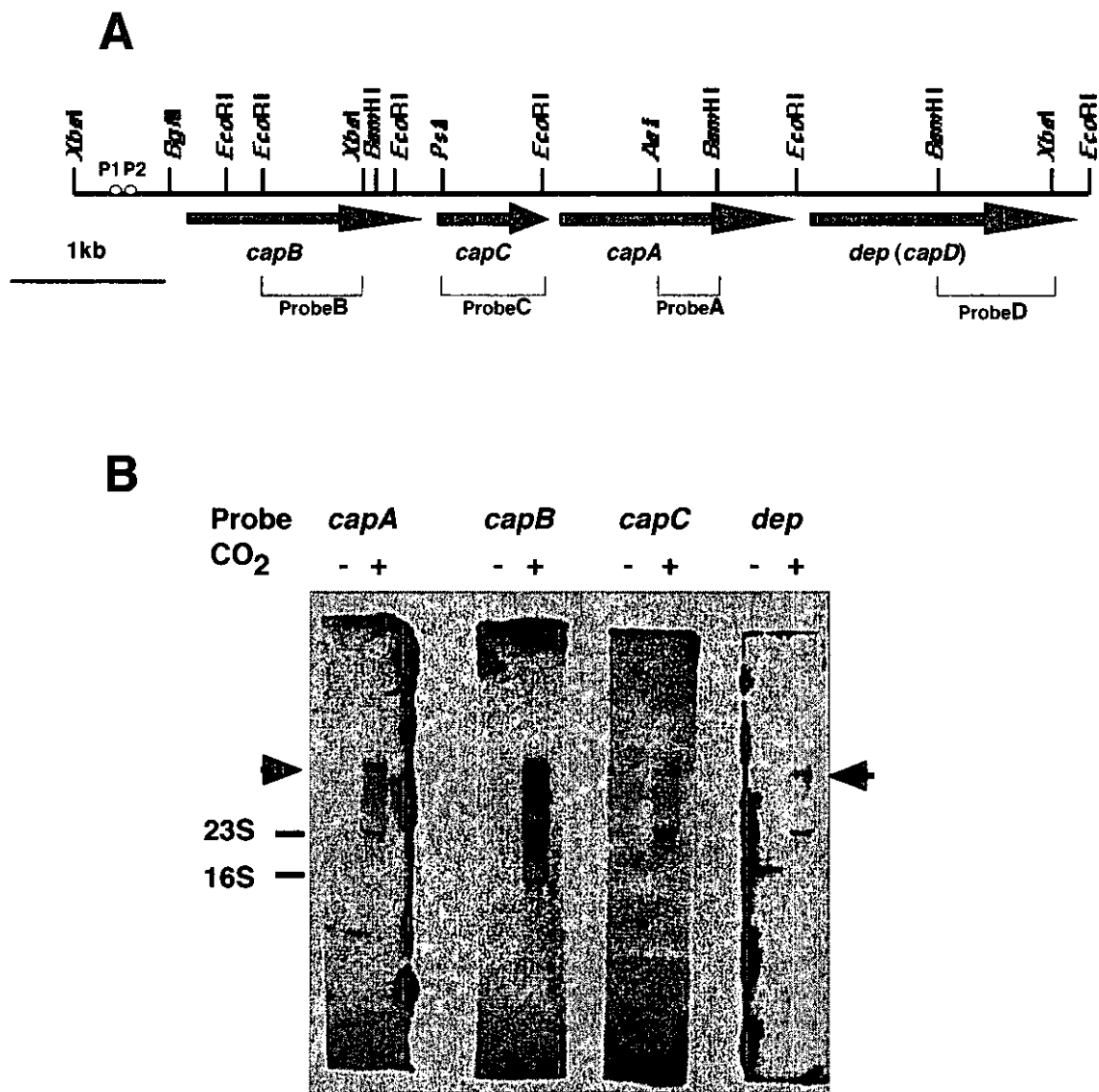


Figure 3. Physical map (A) and Northern hybridization analysis (B) of the *cap-dep* region. Two promoters, P1 and P2, were reported previously [16]. The four DNA probes indicated were constructed with appropriate restriction enzymes (A). The ~ 6 kb transcript which hybridized with all 4 probes is indicated 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.

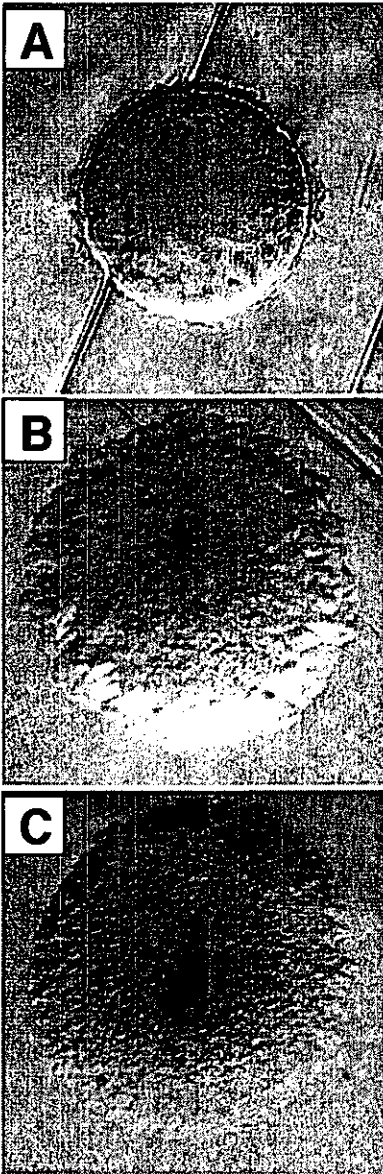


Figure 4. Colony morphology of *dep*<sup>-</sup> *B. anthracis*. *B. anthracis* Sm (A), Sm-1 (B) and Sm-3 (C) were incubated on NBY agar plates for 24 h at 37\_C in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>, then colonies were observed by the stereoscopic microscope.

分担研究報告書

病原体の網羅的スクリーニング法

分担研究者 江崎孝行 岐阜大学医学部

研究要旨 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表1にしめしたが、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。

A. 研究目的

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表1にしめしたが、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。

## 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1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1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

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事が多い。図 1 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

痢菌群も図 3 の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ケンスで確認するか 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、直接シーケ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ケンスすれば 0.1% まで解析できることになる。

我々は PCR 産物をシーケンスせずに、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 2 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 2 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。

- 1) Zhao, L.1 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
- 2) 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
- 3) 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.
- 4) 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.
  - 5) 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.
  - 6) 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
  - 7) 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.

表 1. 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	35 C、好気培養、一夜
大腸菌 O157	Sorbitol-寒天	Chromo 寒天 0157	35 C、好気培養、一夜
Salmonella, Shigella	SS 寒天	DHL 寒天	35 C、好気培養、一夜
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	35 C、好気培養、一夜
Bordetella pertussis	Bordet-Gengou 寒天	CSM 寒天	35 C、好気培養、一夜
Mycobacterium 属	小川培地	7H 11 寒天	30 C、好気培養、2 日
Mycoplasma pneumoniae	Bordet-Gengou 寒天		30 C、好気培養、6 週間
Bacillus anthracis	PLET 寒天	Ethanol 前処理	35 C、好気培養、一夜
Burkholderia pseudomallei/B. mallei	BCSA 寒天	OFFBL 寒天	30 C、好気培養、2 日
Burkholderia cepacia	PC 寒天	OFFBL 寒天	30 C、好気培養、2 日
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		35 C、好気培養、1-2 日
Staphylococcus 属	Mannitol-食塩寒天	No110 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
Leptospira 属	Korthof 寒天		30 C、好気培養、2 週間
真菌	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、2-3 日
Gardnerella vaginalis	Gardnerella 培地		30 C、好気培養、一週間
Legionella 属	BCYE 寒天	WYO 寒天	30 C、好気培養、一週間

表 2. 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 (EPEC)	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 (EPEC)	ST 1 toxin	bacteria
<i>Escherichia coli</i> ST11 (EPEC)	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
<i>Staphylococcus aureus</i> SED	toxin :seD	bacteria
<i>Staphylococcus aureus</i> SEE	toxin :SeE	bacteria
<i>Tropheryma whippelii</i>	16S rDNA	bacteria
<i>Vibrio cholerae</i>	toxin :ctA	bacteria
<i>Vibrio cholerae/mimicus</i>	Group 16S rDNA	bacteria
<i>Vibrio fluvialis</i>	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