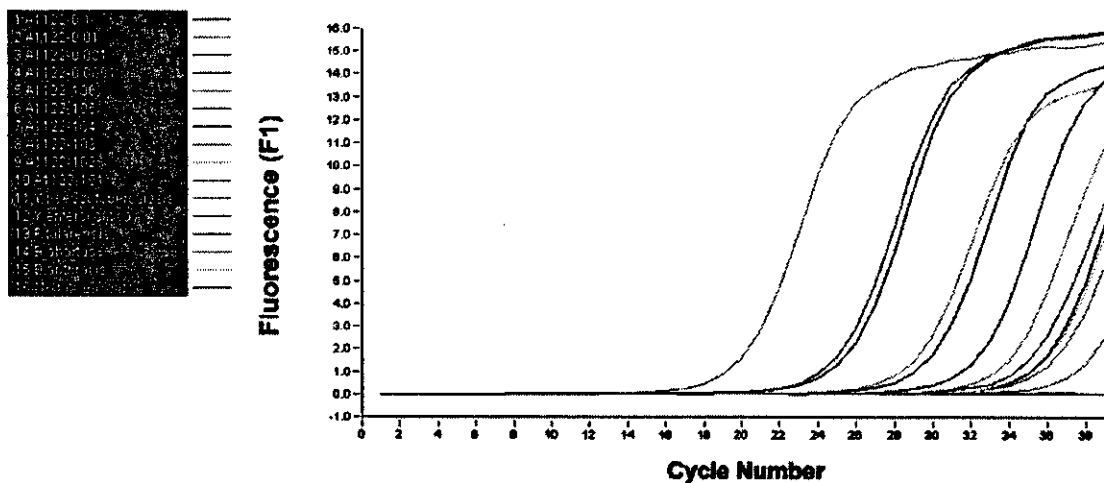
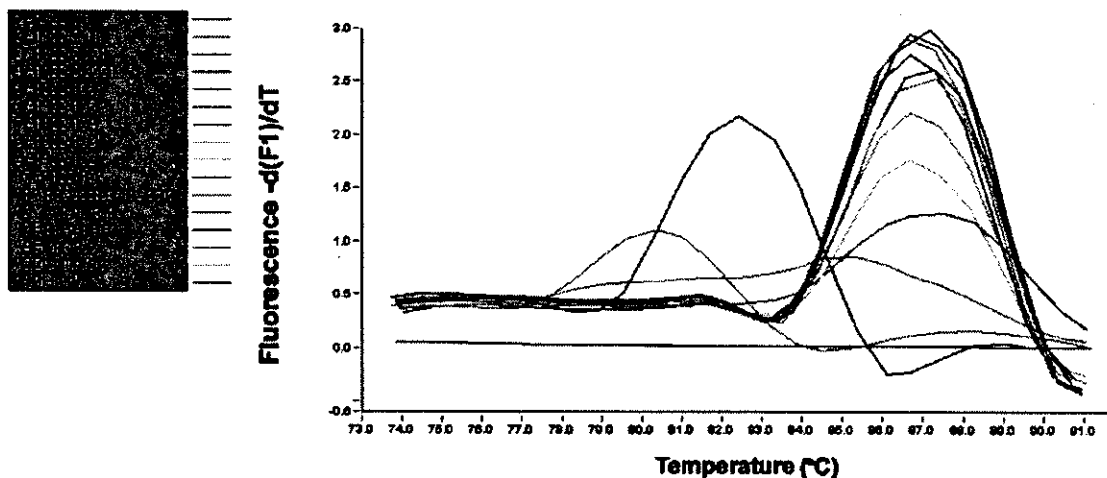


Fig. 3) SYBR Green I を用いた *Y. pestis* 41.7 kb 領域遺伝子の検出

A) 増幅反応



B) 融解分析による特異性の検討



C) 産物のアガロースゲル電気泳動による確認

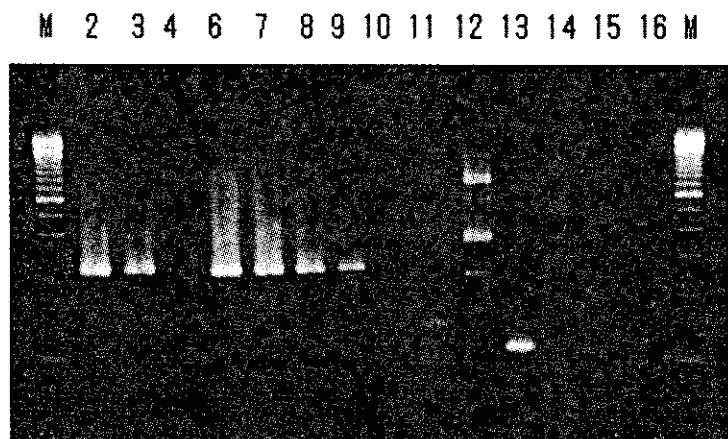
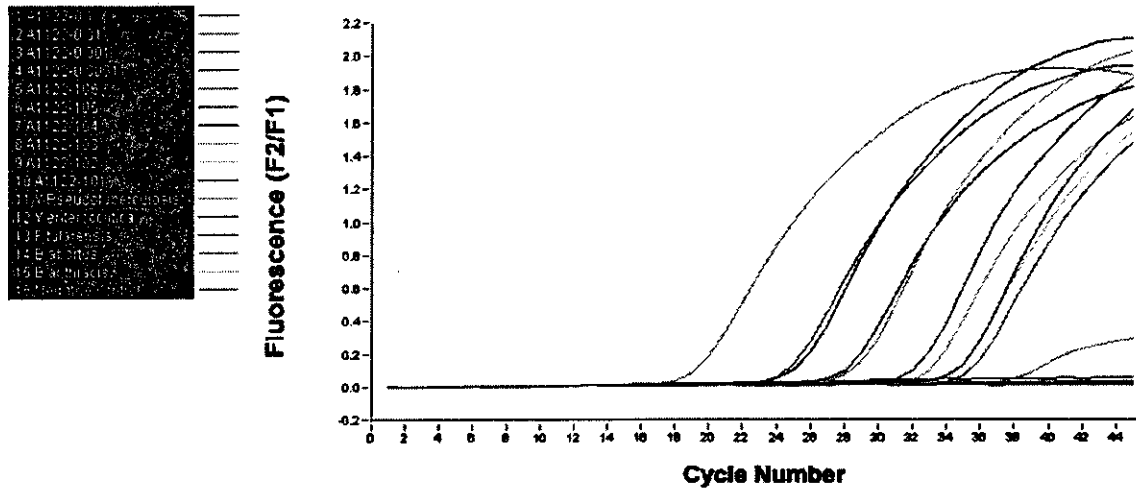


Fig. 4) Hybridization probe を用いた *Y. pestis* 41.7 kb 領域遺伝子の検出

A) 増幅反応



B) 41.7 kb 領域用セット

プライマー	Forward	5'-ggcaacagctcaacacctttgg-3'	
シーケンス	Reverse	5'-tgtagccgctaagcactaccatcc-3'	
サイズ	275 bp	Genebank Access Number	AE013825
ハイブリダイゼーション	5'-tgttgaccggccatagctccatg-3'-Fluorescein 3' Label: Fluorescein		
プローブ	5'-LCRed640-caccgcggttatctcatccgata-3'-phosphorylation		
シーケンス	5' Label: LCRed640 3' Label: Phosphorylated		
全体配列	6481 gttttcggct ggatacaaaa cgcggttcgg caacagctca acacctttgg gcaaggatgc 6541 ctgaaaactt ggcagcagtt ggccagcgat tcgagggcgt tttgtagag aatcgtgatg _____ : 6601 cgtccaatg catgtagac catgacacag tttcaacgct tcattttggtt gaccggccat プライマー 6661 acgtccatga caccgcggtt atctcatccc gataattaccg coatgaaatg gacaatgatg _____ : ハイブ 6721 cccacotaac cctactcgat accgtcaata accttgagg gatggtagtg cttagcggct リプローブ 6781 acaacacgga tatgtacaac gacattctta caggctggca aaagcaggaa aacagtcac		

3. ペストの迅速診断と薬剤感受性

分担研究者 渡辺治雄 国立感染症研究所細菌第一部

研究協力者 塚野尋子 国立感染症研究所細菌第一部

研究要旨 バイオテロとしてペスト菌が使われた場合に、迅速に病原体を検出し適切なる治療を行わなければならない。病原体を診断する方法としてペスト菌の病原因子を対象とした PCR 法の開発を行った。また、治療を行う場合の薬剤の選択のためのデータを得るために、動物モデルを用いて抗菌薬の感受性試験を行い、ニューキノロン剤の有効性を確認した。

A. 研究目的

バイオテロの対象病原体としてペスト菌が挙げられる。ペスト菌が使用された場合に、迅速にペスト菌であることを判定し、適切なる治療を行うことで犠牲者の数を最小限にしなければならない。本研究では、ペスト菌の迅速診断法として、ペスト菌に特異的な病原因子を対象にした multiplex-PCR の開発を行った。また、治療する場合には適切なる抗菌薬療法が功を奏することが多い。耐性菌がバイオテロとして使用されることも考慮して、広範囲な抗菌薬を対象としての感受性試験を、マウスをモデル実験とした *in vivo* で試験を行い、効果の高い抗菌薬の選定を行った。

B. 研究方法

(a) 病原因子を対象とした multiplex-PCR:

ペストの病原機構は、多くの病原因子が複雑に関与している。*Y.pestis* のクロモソーム DNA および 3 種のプラスミド (70-75kb, 110kb, 9.5kb) には様々な病原因子がコードされている。このうち、2 種類 (110kb, 9.5kb plasmid) のプラスミドは、他の *Yersinia* 属細菌においては見られない。*Y.pestis* に特異的な Fraction1 抗原 (*cafI* 遺伝子)、および Murine toxin はその遺伝子が 110kb プラスミド上にコードされており、動物実験から病原性との関連が明らかにされている。またプロテアーゼである *Pla* は、その遺伝子が 9.5kb プラスミド上にコードされ、プラスミノゲンアクチベーターを活性

化することで病原性を示すと考えられている。この他に、*Y. enterocolitica*、*Y. pseudotuberculosis* は *YadA*、*Inv* を用いて細胞に侵入することが分かっているが、*Y.pestis* は *YadA*、*Inv* 遺伝子がフレームシフト変異をおこしているため、*Y. enterocolitica*、*Y. pseudotuberculosis* の様な細胞侵入能はほとんど無い。また最近になって、*Yersinia* 属に共通の病原因子である *Yop*、*Ysc* 等の機能が明らかになりつつある。*Yop*、*Ysc* は、その遺伝子群が 70-75kb プラスミド上にコードされている。各々細胞毒性を示す因子 (*YopE*、*YopO*、*YopH*、*YopM* 等)、これらの物質を細胞に送り込む因子 (*YopB*、*YopN* 等)、これらの因子の発現を調節する因子等から構成され、これらが組織的な挙動を示すことで病原性が発揮される。上記の病原因子をうまく組み合わせ、*Y.pestis* 特異的病原遺伝子を PCR で検出する方法が、迅速検出法として利用可能になる。*cafI*、*pla*、*yopM*、*inv* 遺伝子を対象にしたプライマーの混合を用い、multiplex-PCR の開発を行った。使用したプライマーは以下の通りである。

(1) *cafI* (171 bp):

sense strand(S);

5'-CAGGAACCACTAGCACATC-3'

antisense strand(A);

5'-CCCCACAAGGTTCTCAC-3'

(2) *inv* (295 bp):

sense strand(S);

5'-TAAGGGTACTATCGCGGCGGA-3'

antisense strand(A);

5'-CGTGAAATAACCGTCACACT-3'

この *inv* プライマーは、*Y.pestis*, *Y.pseudotuberculosis* には反応するが、*Y. enterocolitica* には反応しない塩基配列を選定した。

(3) *pla* (480 bp):

sense strand(S);

5'-ATCTTACTTTCCGTGAGAAG-3'

antisense strand(A);

5'-CTTGGATGTTGAGCTTCCTA-3'

(4) *yopM* (565 bp):

sense strand(S);

5'-ATAACTCATCGGGGGCAAAAT-3'

antisense strand(A);

5'-GCGTTATTTATCCGAATTTAGC-3'

この *yopM* プライマーは、*Y.pestis* の *yopM* を検出するが、*Y.pseudotuberculosis*, *Y.enterocolitica* の *yopM* には反応しない配列を選んだ。

PCR の条件は、50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl(pH9.0), 1.5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 100 μM each of dATP, dGTP, dCTP and dTTP, 0.1 μM *pla* primers, 0.1 μM *cafI* primers, 0.1 μM *yopM* primers, 0.05 μM *inv* primers, 0.02 units of AmpliTaq DNA polymerase and 2.0 μl of template DNA. PCR 反応; denaturing 94 °C 30s, annealing 54 °C 1 min, extension 72 °C 1.5 min, 30 cycles 1.5% アガロースゲルで解析。

(b) マウスモデルを用いた *in vivo* 薬剤感受性試験:

ペスト菌としては感染研に保存してある *Y.pestis* no.22 を攻撃用に用いた。まずは、no.22 に対する各薬剤の MIC(minimum inhibitory concentration)を調べた。In vivo 試験としては、雌 DDY マウス (6週令、25g) を使用した。実験は実験動物委員会の承認の元に P3 動物実験室において行われた。各グループ6匹のマウスに、0.2 ml のペスト菌 [約 10²~10³ cfu/mouse] を腹腔内に接種し、その後24時間以内に各抗菌薬を皮下注射あるいは経口的に投与を行った。その後、7日間マウスの生死を観察した。

使用薬剤:

経口投与薬: Ofloxacin, Ciprofloxacin, Sparfloxacin, Grepafloxacin, Prulifloxacin, Pazufloxacin, Levofloxacin, Ampicillin, Cefdinir, Chloramphenicol, Tetracycline, Minocycline, Fosfomycin.

皮下注射薬: Cefotaxime, Imipenem/cilastatin, Panipenem/betamipron, Gentamicin, Isepamicin, Arbekacin.

C. 結果

(a) 病原因子を対象とした multiplex-PCR:

感染研に保存してある28のペスト菌野生株をDNA鋳型として用い場合には、*cafI*, *inv*, *pla*, *yopM* に対し、それぞれ171bp, 295bp, 480bp, 565bpのDNA断片が増幅された。42-Mdのvirulence plasmidを脱落した弱毒株は、*yopM* 遺伝子を増幅していなかった。60-Mdのvirulence plasmidを脱落している弱毒株は、*cafI* 遺伝子を増幅しなかった。また7-Mdのvirulence plasmidを脱落した弱毒株は *pla* 遺伝子を増幅しなかった。*Y.pseudotuberculosis* は *inv* 遺伝子を増幅したが他の3種の遺伝子を増幅しなかった。*Y.enterocolitica* は、どの遺伝子も増幅しなかった。赤痢菌、病原性大腸菌、ブドウ球菌、レンサ球菌等にはどのプライマーも反応しなかった。これらの結果から、*cafI*, *inv*, *pla*, *yopM* の4種のプライマーに反応する菌は、強毒のペスト菌である可能性をします。ペスト菌のもつ病原性に関与する3種のプラスミドのいずれかを脱落している株は、この4種のプライマーのいずれかにも反応しないかもしれない。

(b) MIC 試験

ペスト菌 no.22 を用いての MIC は、Ofloxacin, Ciprofloxacin, Sparfloxacin, Grepafloxacin, Prulofloxacin, Pazufloxacin, Levofloxacin のフロロキノロン剤に対しては、0.008 ~ 0.06 μg/ml で感受性であった。β-ラクタム剤 (Ampicillin, Cefdinir, Cefotaxime, Imipenem/cilastatin, Panipenem/betamipron) に対しては、0.125~0.25 μg/ml で感受性あった。アミノ配糖体 (Gentamicin, Isepamicin, Arbekacin) に対しては、0.5 ~ 1.0 μg/ml, テトラサイクリン類

(Tetracycline, Minocycline) に対しては、0.5～2.0 $\mu\text{g/ml}$ で中程度感受性あった。Chloramphenicol に対しては 8.0 $\mu\text{g/ml}$ Fosmomycin に対しては 128 $\mu\text{g/ml}$ で耐性を示していた。

(c) マウスモデルを用いた in vivo 薬剤感受性試験：

マウスを100%殺すペスト菌の菌量を投与した実験系において、0.4 $\mu\text{g/mouse}$ の各抗菌薬を2回投与した場合の治療効果は以下であった。ニューキノロン剤の Ofloxacin, Sparfloxacin, Levofloxacin の経口投与は100%のマウスを治癒させた。Prulofloxacin, Pazufloxacin の効果は 83%、Grepafloxacin は33%、Ciprofloxacin は17%であった。アミノ配糖体の Gentamicin, Arbekacin, Isepamicin の効果はそれぞれ100%, 83%, 17%であった。しかし、Chloramphenicol, Tetracycline, β -ラクタム剤 (Ampicillin, Cefdinir, Cefotaxime, Imipenem/cilastatin, Panipenem/betamipron) の効果はなく、2 mg/mouse の投与でも全てのマウスが死亡した。

D. 考察

(a) Multiplex-PCR

cafI, *pla*, *yopM*, *inv* の4種の病原性遺伝子群を標的とした multiplex-PCR で全て陽性を示す場合には、強毒のペスト菌であると考えられる。一つでも陰性の場合にどのように判定するかである。*Y. pseudotuberculosis* が *inv* だけに陽性を示す条件であることを考えると、*cafI*, *pla*, *yopM* のどれか一つでも陽性を示す株はペスト菌であるが、強毒株が持つ3種のプラスミドのどれかを脱落した株である可能を示唆するものと考えられる。我が国ではこの100年来ペストの流行はみられていないので、もし *cafI*, *pla*, *yopM* のどれか一つでも陽性を示す株が発見された場合には、何か異常な事態が起こっていると判断した方が適切であろう。その情報により、患者および病原体のサーベイを強化し、不測の事態に備えるべきであろう。

(b) 抗菌薬感受性試験

ペスト菌の各薬剤に対する MIC を調べると、ニューキノロン剤、 β -ラクタム剤は感受性を示す。しかし、マウスを用いた in vivo 試験では β -ラクタム剤は全く効果を示さない。ペスト菌はマクロファージ等の細胞内に侵入し、その中で増殖をするために、細胞内透過性の低い β -ラクタム剤は効果を示さないのであろう。細胞および組織内透過性の高いニューキノロン剤の効果が高いのは頷けるところである。また、ゲンタミシン等のアミノ配糖体の効果が高いのは、今まで WHO 等がペストの治療にアミノ配糖体の使用を推奨しているのと矛盾しない。しかし、今回の結果では Chloramphenicol, Tetracycline の効果がほとんどみられなかったのは意外であった。WHO、CDC は、Chloramphenicol, Tetracycline はそれぞれ髄膜炎型ペスト、および肺ペストに効果があるとしてきているが、再考することが必要かもしれない。

E. 結論

- 1) *cafI*, *pla*, *yopM*, *inv* の4種の病原性遺伝子群を標的とした multiplex-PCR はペスト菌の検出に有効であった
- 2) マウスモデル系を用いた in vivo 実験では、ペストの治療に、ニューキノロン系、及びアミノ配糖体系の薬剤が効果を示した。

(参考文献)

- 1) Tsukano H, Itoh K, Suzuki S, and Watanabe H. Detection and identification of *Yersinia pestis* by polymerase chain reaction (PCR) using multiplex primers. 1996. Microbiol. Immunol. 40: 773-775.
- 2) Goto S, Tsuji A, Murai T, Nishida M, Tsukano H. and Watanabe H. 1998. Therapeutic effect of antimicrobial drugs against experimental infections due to *Yersinia pestis* in mice. J Infect Chemother. 4: 16-19.

F. 論文発表

Kawahara K, Tsukano H, Watanabe H, Lindner B, and Matsuura M. Modification of structure and activity of the lipid A in *Yersinia pestis* lipopolysaccharide by growth temperature. 2002. Infect & Immun. 70: 4092-4098.

4. 天然痘およびウイルス出血熱診断法の確立に関する研究

分担研究者 森川 茂 国立感染症研究所ウイルス第一部第一室長
協力研究者 前田秋彦、西條政幸、倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第一部）
永田典代（国立感染症研究所感染病理部）

研究要旨 バイオテロに用いられた場合の危険度等から米国で category A に分類される感染症に、天然痘、ウイルス性出血熱は含まれる。天然痘の疑われる患者の実験室診断に関しては、国立感染症研究所での対応マニュアルが出来ており迅速診断が可能な状態にある。しかし、バイオテロの疑われる状況で患者以外のサンプルからのウイルス検出に関しては、より高感度のシステムが必要となる。今回、リアルタイム PCR により 10 copies 程度の感度で痘そうウイルス DNA を検出する態勢ができた。しかし、他のオルソボックスウイルスとの鑑別には、今後の改良が必要であることが判明した。一方、エボラウイルスに関しては、RT-PCR 法は既に開発されているが、今回、抗原捕捉 ELISA により、ヒトに病原性があるエボラウイルス種と病原性がないと考えられるレ斯顿種とを鑑別検出することが可能になった。

A. 研究目的

バイオテロに用いられた場合の危険度等から米国で category A に分類される感染症に、天然痘、ウイルス性出血熱は含まれる。天然痘は、WHO の天然痘根絶宣言(1980 年)以後、米国とロシアのみに痘そうウイルスが保管されているため、この 2 国以外ではウイルスおよびその遺伝子も入手できない。天然痘根絶以前の天然痘の実験室診断法は、感受性細胞での細胞変性効果、増殖許容最高温度、動物での感受性などを他のオルソボックスウイルスと比較することにより天然痘ウイルスを同定することにより行われていた。現在、天然痘ウイルスが扱えないため、これらの方法は実施不可能なものも多い。そこで、より迅速な実験室診断法を確立することを目的とした。また、ウイルス性出血熱に関しては、これまで種々の診断法を開発しているが、今年度は、ヒトに病原性のあるエボラウイルス（ザイール、スーダン）と病原性がないと考えられているレ斯顿エボラウイルスとを迅速に識別する迅速診断法の開発を目的とした。

B. 研究方法

天然痘診断法の開発：

- 1) 28 年前にホルマリン固定され、2%ホルマリン液中に保存されている痘そうウイルス感染発育鶏卵漿尿膜標本から、ウイルスの検出同定が可能であるかを検討した。なお、対象としてワクチニアウイルスを発育鶏卵漿尿膜に接種した材料から同様の検出を行い比較した。材料としては、1975 年にホルマリン固定され、ホルマリン液中に保存されている痘そうウイルス感染 CAM(# 48 : variola major Honna PF、# 50 : variola major Ismat Khan、# 64 : variola minor European, Bell E-4)、vaccinia virus (Lister 株、LC16m8 株)を接種した CAM を 2%ホルマリン液に 7 日、30 日、90 日固定したものをを用いた。これらのポックから DNA を抽出し、痘そうウイルス特異的、ワクチニアウイルス特異的 PCR を行った。
- 2) 公開されている痘そうウイルスとワクチニアウイルスの遺伝子配列のデータから、両者を識別可能なリアルタイム PCR 法を開発し、検出感度等を検討した。
- 3) オルソボックスウイルス識別可能な PCR 法に関する過去の文献に従い、複数の PCR 用プライマーを作製し、種々のオルソボックスウイルスの識別、検出限界を検討した。

ウイルス性出血熱の診断法：Reston Ebola ウィルスと Zaire, Sudan Ebola ウィルスを識別する迅速 ELISA 法の開発

1) 6His-tag を N-末端に付加した Reston Ebola ウィルス (EBO-R) の NP を組み換えバキュロウィルスを用いて作製し、組み換え NP に対するモノクローナル抗体(MAb)を作製した。GST 融合蛋白として発現した EBO-R の部分 NP を用いて IgG-ELISA を行い、MAb の認識するエピトープを同定した。抗原捕捉 ELISA は、モノクローナル抗体をコートした ELISA プレートに、抗原を加えて反応後、捕捉された抗原を抗 EBO-R NP ウサギ血清 / 抗ウサギ IgG-HRPD により検出した。また、これらの MAb と Zaire (EBO-Z), Sudan (EBO-S)との反応性を調べた。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒト検体は使用していないため、倫理上の問題はない。

C. 研究結果

天然痘診断法の開発：

(1) ホルマリン固定ふ化鶏卵漿尿膜上のポックからの痘そうウィルスの検出

Variola-specific PCR には、

VAR4 (CAT ACA GTC ACA GAC ACT GTC TC)、VAR2 (GTA GAT GGT TCA TTA TCA TTG TG) の HA 遺伝子を target とした primers を用いて、[94°C, 40 sec / 55°C, 40 sec / 72°C, 40 sec] x 40 cycles 行った。

Vaccinia-specific PCR には、

VAC1 (ATG CAA CTC TAT CAT GTA A)、VAC2 (CAT AAT CTA CTT TAT CAG TG)の ATI 遺伝子を target とした primers を用いて、[94°C 1min / 50°C 1min / 72°C 1min] x 30 cycles 行った。

その結果、ワクチニアウィルス感染 CAM 上のポックからの PCR 検出感度は、ホルマリン固定時間が長くなるほど低下することが判明した (図 1)。

ホルマリン液に 27 年間保存されていた痘そうウィルス感染 CAM のポックからの遺伝子検出を試みたところ、# 50 (variola major, Ismat

Khan) 感染ポックからの検出には 10 ポックが必要であった (図 2)。同様に # 48 (variola major, Honna PF) も 10 ポックから遺伝子が検出できた。しかし、# 64 (variola minor, European, Bell E-4)からは遺伝子が検出できなかった。これらの、ポックの超薄切片を透過電子顕微鏡で観察したところ、いずれのポックからも典型的なオルソポックスウィルス粒子が観察された (図 3)。

(2) リアルタイム PCR による痘そうウィルスとワクチニアウィルスの鑑別

Variola major, Harvey の HA 遺伝子 (GenBank X65516)の 706 から 848 nuc までの 143mer の配列を、人工的にオリゴ合成したものを target に用いた。この領域はワクチニアウィルスとの相同性の低い領域である。

Primer には、

Forward 5' -ATT GTC ACT ACT AAA TCA ACC GCC -3'

Reverse 5' -GCT GCA ATA CCA AAT ACT TTG ACA TAG-3'

を用い、143bp の領域を増幅した。Hybridization probe には、以下の 2 つのプロープを用いた (図 4)。

5'-CCT ATA GAT TTC GTG ATG TTT TTT

ACA GTT GTT GG-3'-Fluorescein

5'-LCRed640-GAC ACA GTA GAT GGT-3'-phosphorylation

その結果、45 cycle の PCR 反応で痘そうウィルス DNA は 100 copies でも確実に検出できたのに対し、ワクチニアウィルスでは 50ng (2.5 x 10⁸ copies)でも全く反応が見られなかった (図 5)。

(3) PCR 法の種々のオルソポックスウィルスとの反応性

Vaccinia, Monkeypox, Ectromeria, Camelpox, Cowpox virus を用いて、これまでに報告されているオルソポックスウィルス識別可能な PCR 法を行い、これらのウィルスの識別、検出限界を検討した。その結果、Monkeypox specific primers (Gabon-1 / Gabon-2 primers. PCR

condition is 30 cycles [94°C 1min, 36°C 1min, 72°C 2.5min], then 72°C 5min. J. Virol. Method. 74: 201-207, 1998) は、Monkeypox 特異的で検出限界は 150 copies であった。Vaccinia specific primers (VAC1 / VAC2 primers. PCR condition is 30 cycles [94°C 1min, 50°C 1min, 72°C 1min], then 72°C 5min. J. Clin. Microbiol. 33: 2069-2976, 1995) は、Vaccinia, Extromeria, Camelpox,, Cowpox virus すべてを検出した。Orthopox 共通 primers (ATI-up-1 / ATI-low-1 primers. PCR condition is 30 cycles [94°C 1min, 40°C 1min, 72°C 2.5min], then 72°C 5min. J Virol Method 64:217-221, 1997) では、Vaccinia, Extromeria, Camelpox, Cowpox virus すべてを検出した。

ウイルス性出血熱の診断法：Reston Ebola ウイルスと Zaire, Sudan Ebola ウイルスを識別する迅速 ELISA 法の開発：

EBO-R に対する MAb 32 個を作製した。このうち、Res2-6C8 および Res2-1D8 が抗原捕捉 ELISA で高感度に EBO-R NP を検出した。Res2-6C8 と Res2-1D8 はそれぞれ EBO-R (フィリピン 1996) の NP の aa 636-639 (4 アミノ酸)、aa 636-643 (8 アミノ酸) を認識した。EBO-R (ペンシルバニ 1989) は、このエピトープ配列が完全に保存されていたが、EBO-Z、EBO-S には同じアミノ酸配列はなかった。これらの MAb は、EBO-Z および EBO-S の NP とは反応せず、抗原捕捉 ELISA でも EBO-Z NP とは反応しなかった。

D. 考察

天然痘が根絶されて 20 年以上経過するため、かつて確立された実験室診断法は、現在では実施不可能なものが多い。オルソポックスウイルス間には抗原性の交叉が非常に強いため、血清学的には痘そうウイルスと他のウイルスを鑑別することは難しい。今回種々の PCR 法を検討した結果、痘そうウイルス特異的 PCR により、ホルマリン固定されたサンプルからも遺伝子を検出することが可能であった。しかし、ホルマリン固定期間に応じて検出感度が低下することも明らかとなった。この点では、電子顕微鏡によるオルソポックスウイル

ス検出の法が優れていた。一方、より迅速な痘そうウイルスとワクチニアウイルスの鑑別法の試みをリアルタイム PCR により行った結果、反応時間 40 分程度で 10 copies 程度の痘そうウイルス DNA を検出し、ワクチニアウイルスと鑑別できることが判明した。しかし、これまでに報告されているオルソポックスウイルス鑑別 PCR では、ウイルス鑑別の不可能なものがあることも判明した。今後、よりウイルス特異的な PCR の開発が必要であると思われる。

一方、エボラウイルスに関しては、これまでに、EBO-Z、EBO-S、EBO-R の NP を検出するための抗原捕捉 ELISA を開発している。今回作製した MAb による抗原捕捉 ELISA は、EBO-R NP を特異的に検出できるため、以前に作製した Ebola ウイルス種交叉性の抗原捕捉 ELISA と併用することにより、迅速にヒトへの病原性がないと考えられる EBO-R と他のヒトへの病原性の強いエボラウイルス種とを鑑別検出できるシステムが確立された。

E. 結論

天然痘の疑われる患者の実験室診断に関しては、国立感染症研究所での対応マニュアルが出来ており迅速診断が可能な状態にある。しかし、バイオテロの疑われる状況で患者以外のサンプルからのウイルス検出に関しては、より高感度のシステムが必要となる。今回、リアルタイム PCR により 10 copies 程度の感度で痘そうウイルス DNA を検出する態勢ができた。しかし、他のオルソポックスウイルスとの鑑別には、今後の改良が必要であることが判明した。一方、エボラウイルスに関しては、RT-PCR 法は既に開発されているが、今回、抗原捕捉 ELISA により、ヒトに病原性があるエボラウイルス種と病原性がないと考えられるレストン種とを鑑別検出することが可能になった。今後、他のウイルス性出血熱に関しても迅速診断法の開発が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saijo, M., Qing, T., Niikura, M., Maeda, A., Ikegami, T., Sakai, K., Prehaud, C., Kurane, I., and Morikawa, S. (2002): Immunofluorescence technique using HeLa cells expressing recombinant nucleoprotein for detection of immunoglobulin G Antibodies to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J. Clin. Microbiol.*, 40: 372-375
- 2) Saijo M, Suzutani T, Niikura M, Morikawa S, Kurane I.(2002): Importance of C-terminus of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase for maintaining thymidine kinase and acyclovir-phosphorylation activities. *J. Med. Virol.*, 6(3): 388-93.
- 3) Saijo, M., Qing, T., Niikura, M., Maeda, A., Ikegami, T., Prehaud, C., Kurane, I., and Morikawa, S. (2002): Recombinant Nucleoprotein based Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for detection of Immunoglobulin G to Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *J. Clin. Microbiol.*, 40: 1587-1591
- 4) Saijo M, Yasuda Y, Yabe H, Kato S, Suzutani T, De Clercq E, Niikura M, Maeda A, Kurane I, Morikawa S.(2002): Bone marrow transplantation in a child with Wiskott-Aldrich syndrome latently infected with acyclovir-resistant (ACV(r)) herpes simplex virus type 1: emergence of foscarnet-resistant virus originating from the ACV(r) virus. *J Med Virol.* 68: 99-104.
- 5) Niikura, M., Takamura, S., Kim, G., Kawai, S., Saijo, M., Morikawa, S., Kurane, I., Li, T-C., Takeda, N., and Yasutomi, Y. (2002): Chimeric recombinant Hepatitis E virus-like particles as an oral vaccine vehicle presenting foreign epitopes. *Virology*, 293, 273-280.
- 6) Morikawa, S., Qing, T., Xinqin, Z., Saijo, M., and Kurane, I. (2002): Genetic Diversity of the M RNA segment among Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus isolates in China. *Virology*, 296: 159-164.
- 7) Ikegami, T., Miranda, M.E.G., Calaor, A.B., Manalo, D.L., Miranda, N.J., Niikura, M., Saijo, M., Une, Y., Nomura, Y., Kurane, I., Ksiazek, T.G., Yoshikawa, Y. and Morikawa, S. (2002): Histopathology of natural Ebola virus subtype Reston infection in cynomolgus macaques during the Philippine outbreak in 1996. *Exp. Anim.*, 51: 447-55.
- 8) Saijo M, Suzutani T, De Clercq E, Niikura M, Maeda A, Morikawa S, Kurane I.(2002): Genotypic and phenotypic characterization of the thymidine kinase of ACV-resistant HSV-1 derived from an acyclovir-sensitive herpes simplex virus type 1 strain. *Antiviral Res.* 56: 253-62.
- 9) 森川 茂 : 天然痘 化学療法 の 領域 (Antibiotics & chemotherapy) 18 (3):343-346, 2002
- 10) Ikegami, T., Saijo, M., Niikura, M., Miranda, M.E.G., Calaor, A.B., Hernandez, M., Manalo, D.L., Kurane, I., Yoshikawa, Y. and Morikawa, S. (2002): Development of an immunofluorescence Method for the Detection of Antibodies to Ebola Virus Subtype Reston by Use of Recombinant Nucleoprotein-expressing HeLa cells. *Microbiol. Immunol.*, 46: 633-638.
- 11) Niikura M, Ikegami T, Saijo M, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. (2003): Analysis of linear B-cell epitopes of the nucleoprotein of ebola virus that distinguish ebola virus subtypes. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003 Jan;10(1):83-7.
- 12) Tang, Q., Saijo, M., Han, L., Niikura, M., Maeda, A., Ikegami, T., Xijung, W., Kurane, I., and Morikawa, S. (2003) Detection of immunoglobulin G to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in sheep sera by recombinant nucleoprotein-based enzyme-linked immunosorbent and immunofluorescence assays. *J. Virol. Metho.*, 108: 111-116.
- 13) Ikegami, T., Saijo, M., Niikura, M., Miranda, M.E.G., Calaor, A.B., Hernandez, M., Manalo, D.L., Kurane, I., Yoshikawa, Y. and Morikawa, S. (2003): Immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay using truncated nucleoproteins of Reston Ebola virus. *Epidemiology and Infection*, in press.
- 14) Maeda, A., Lee , B-H., Yoshimatsu, K., Saijo, M., Kurane, Arikawa, J. and Morikawa, S. (2003): The Intracellular Association of the Nucleocapsid Protein (NP) of HantaanVirus (HTNV) with Small Ubiquitin-Like Modifier-1 (SUMO-1) Conjugating Enzyme 9 (Ubc9). *Virology*, 305: 288-297.

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特許取得：

- 1) 特願 2001-111478 (平成 13 年 4 月 10 日出願)：エボラウイルスを認識するモノクローナル抗体
- 2) 特願 2001-314854 (平成 13 年 10 月 12 日出願)：クリミア・コンゴ出血熱ウイルスを認識するモノクローナル抗体
- 3) 出願委託中：レストンエボラウイルスを認識するモノクローナル抗体

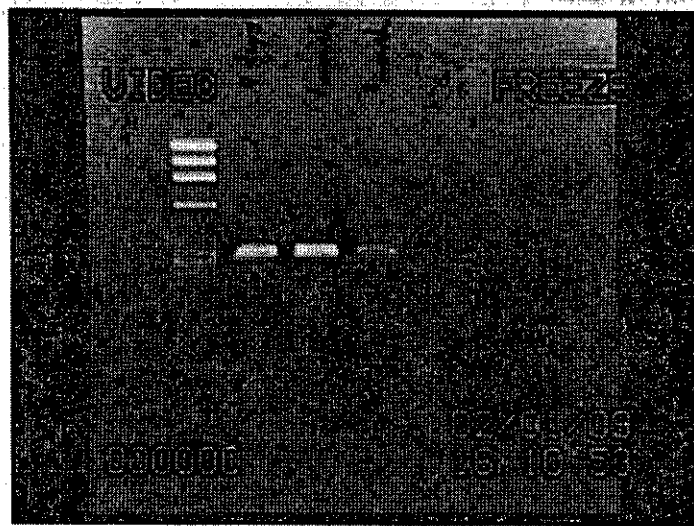


図 1. Vaccinia Lister 感染 CAM 上の pock からの vaccinia-specific PCR による遺伝子検出とホルマリン固定時間の影響

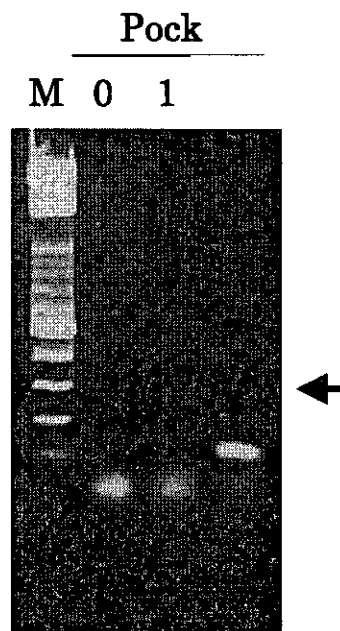
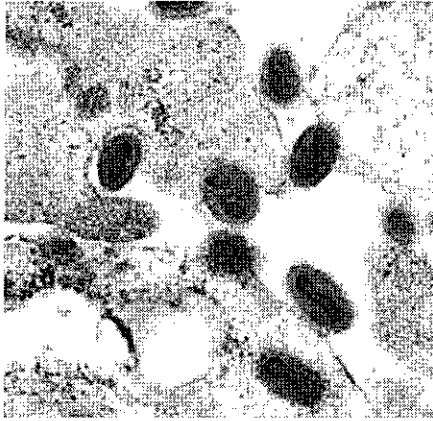


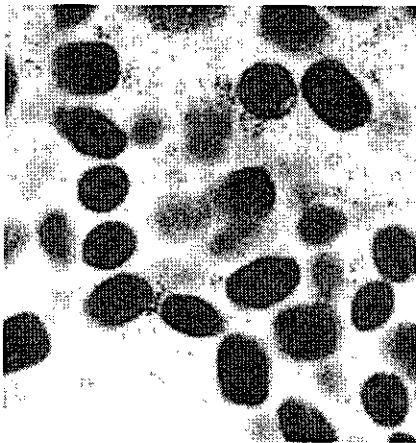
図 2. Variola major #50 からの variola-specific PCR による遺伝子検出
 10 ポックから得られた DNA を 1/25 量用いた場合に、バンドが検出された。バンドの DNA を direct-sequence した結果、variola 遺伝子であることが確認された。



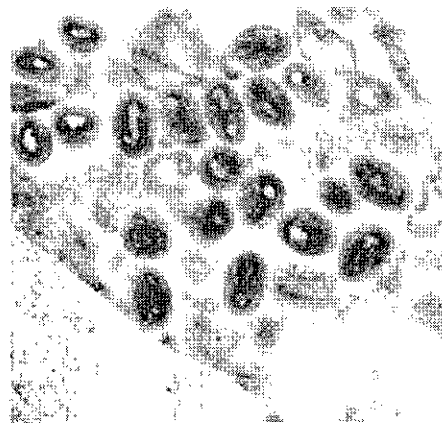
Vaccinia Lister



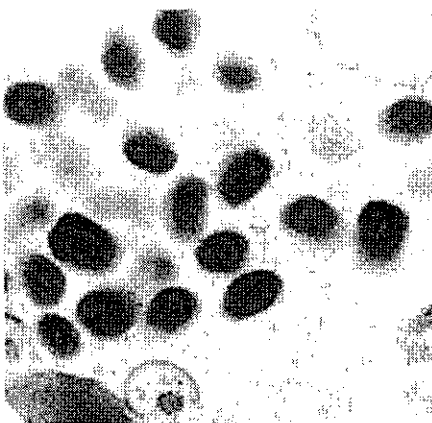
Vaccinia LC16m8



Vaccinia LC16m8



Variola major #50



Variola minor #64

図3. ホルマリンに27年間固定されていたCAMからの電子顕微鏡によるウイルス粒子検出

ATTGTCACTACTAAA TCAACCGCC AATGATG
 CGCACAATGATAATGAACCATCTACTGTGTC A CCAACAACTGTA
 AAAACATCACGAAATCTATAGG TAAGTATAGTACTAAAG A
CTATGTCAA AGTATTTGGT ATTGCAGC

図 4. 痘そうウイルス HA 遺伝子のリアルタイム PCR の target 領域
 (下線が primer の配列、囲まれた配列が probe の配列)

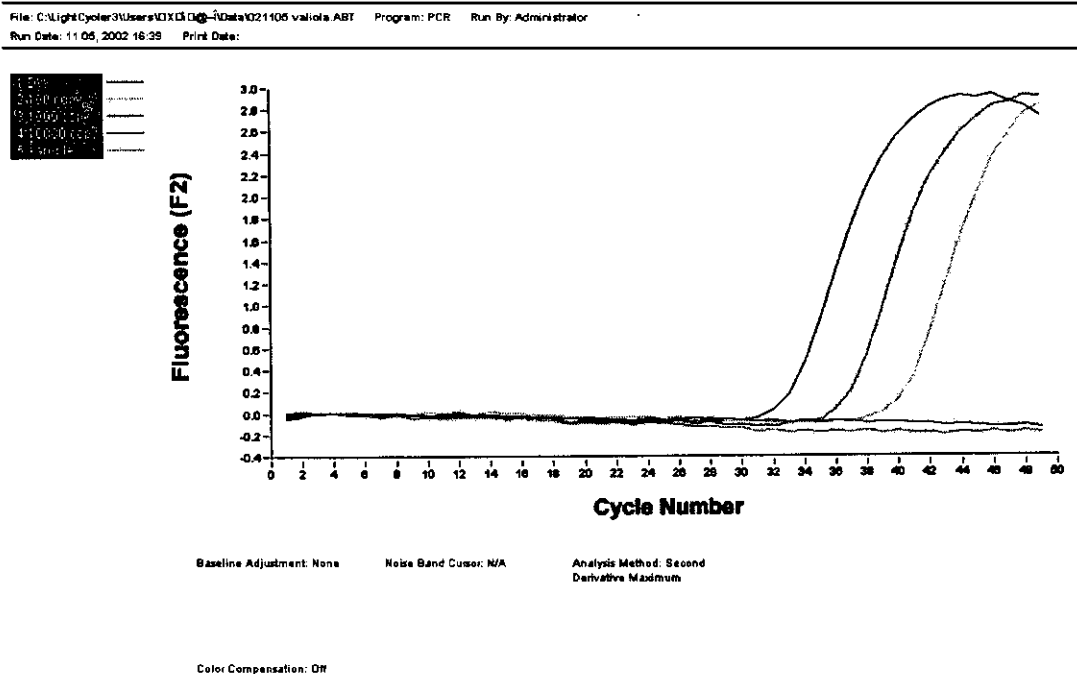


図 5. リアルタイム PCR による痘そうウイルス DNA の検出

5. ボツリヌスの実験室内診断法と予防に関する研究

分担研究者 高橋元秀 国立感染症研究所室長

研究協力者 小崎俊司、幸田知子 大阪府立大学農学部獣医学講座
杉山純一、佐藤祐弘 デンカ生研生産本部生物試薬製造部
大隈邦夫、諸熊一則、大塚幹夫、中西喜彦 化血研第一製造部
岩城正昭、福田 靖、小宮貴子 国立感染症研究所細菌第二部第三室

研究要旨 実験室内診断法として、現行の毒素検出法はマウスでの試験が標準法であるが、A、B、およびE型の毒素を検出するためにゼラチン粒子に精製抗体を感作した簡易測定キットを各30本試作し、感度、精度および再現性が流行な標品を得た。また、ボツリヌスA型およびB型毒素による細菌テロを想定した時に、特定の対象者への予防を目的とした試作トキソイド作出のために、ボツリヌスA、B型菌を培養、産生毒素の精製を行い、最終トキソイド換算として約1,000用量相当の標品を得た。

A. 研究目的

ボツリヌス毒素は、バイオテロに用いられる可能性の高い重要疾患として米国CDCが疾病分類している4つのカテゴリーのなかでは、高い致死性を有するもの等を指標として公衆衛生上最優先で対応が必要とされるカテゴリーAに属している。ボツリヌス毒素によるバイオテロを予想するときに、ボツリヌス毒素のみならず、ボツリヌス菌を食品等の生活基盤の環境物に混入させることにより社会をパニックに陥れる可能性が高い生物兵器とも言える。従って、毒素を検出するためには、迅速且つ精度の優れた方法を用意することが求められる。また、細菌毒素性疾患の代表である破傷風、ジフテリアの予防には、毒素を不活化したトキソイドワクチンが導入され疾病の征圧に貢献している。ボツリヌス毒素によるバイオテロの事前対応手段として、ヒトに感受性の高いA、B、EおよびF型毒素に対応するトキソイドを製造し、テロ発生時の初動調査等に関与する担当者を必要に応じて免疫することを可能とする。

B. 研究方法

ボツリヌス毒素の検出方法は、マウスを用いた

バイオアッセイによるものが一般的な方法として採用されている。通常、毒素を含む検体をマウスの腹腔内に注射すると、腹部筋肉の弛緩性麻痺（腹部の陥凹）、全身性の筋力及び運動性の低下などを観察することで毒素の存在を確認する。診断用ボツリヌス抗毒素血清をマウスにあらかじめ投与するとこの毒素は特異的に中和される。この方法では約100pgの微量なボツリヌス毒素を検出することが可能な方法である。しかし、マウスを常備している国内検査機関は少なく、試験には経験も必要である。ボツリヌス症が疑われる場合、すみやかに検査が実施できるような検査法を開発するために、腸管出血性大腸菌の産生するVERO毒素を検出するキットをモデルとした検査システムを検討することとした。今年度は、ボツリヌスA、B及びE型毒素を不活化したトキソイド及び毒素でウサギを高度免疫して得た高力価の抗毒素血清を、精製ボツリヌス毒素をカップリングしたホルミルセルロファイン（生化学工業）をカラムに充填したアフィニティゲルとSephadexG-25で精製した抗体をラテックスに吸着して感作ラテックスを作製した。

また、ボツリヌス毒素に対する予防を目的と

したトキソイドワクチンの製造として、ヒトに感受性の高い A, B, E 及び F 型毒素に対するトキソイドを製造し、緊急時に初動捜査する担当者への免疫を可能とする事前対応策を検討する。今年度は、菌培養には、使用菌株として A 型は 62A 株, B 型は Okra 株を用いた。凍結保存した芽胞懸濁液を 0.3% Glucose-0.2% Soluble starch 添加 cooked meat (CM) 培地に接種し 30℃ 2 日間培養した。培養液を卵黄加 GAM 寒天培地に塗布し、30℃ 2 日間嫌気培養し、出現したコロニーを CM 培地に接種し 30℃ 2 日間培養し、各コロニーの毒素産生量を調べた。培養液の毒力が最も高い菌液を、再び CM 培地に接種し 30℃ 一晩培養した。この培養液を 0.5% Glucose-0.5% Yeast Extract-2% Proteose Peptone 培地 8 L に対して約 15 ml を接種し、30℃ 3 日間培養した。

毒素の精製は、培養液に 3 N H₂SO₄ を加え、酸沈殿を行った (A 型: pH 3.5, B 型: pH 4.0)。室温で一晩静置した後、上清を除き残った沈殿を遠心によって回収した。沈殿物を 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) に懸濁し、懸濁液の pH を 1 N NaOH で 6.0 とした後、30℃ で 1 時間静置後、4℃ でさらに一晩攪拌した。懸濁液を遠心し、得られた上清を毒素抽出液とした。抽出液中に含まれる核酸を除去するために 2% プロタミンを攪拌しながら徐々に添加し、生じた沈殿物を遠心で除いた。プロタミン処理前後の上清中の吸光度 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 値を比較し、核酸が除去されたことを確認した。核酸除去した遠心上清に固形硫酸アンモニウムを最終濃度が 60% 飽和に達するまで徐々に加えた。一晩 4℃ で静置した後、沈殿を遠心によって回収した後、沈殿物を 0.2 M 食塩添加 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 4.2) に溶解し、同緩衝液に 4℃ で透析した。透析中に生じた沈殿を除いた後、溶解液を同緩衝液で平衡化した SP-Sepharose Fast Flow カラムに添加し、カラムを十分洗浄した後、吸着した毒素を 0.2 から 0.7 M 食塩濃度勾配で溶出した。毒素画分を集め限外ろ過膜 (PM-30) を用いて濃縮した後、0.2 M 食塩添加 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化した Sephadex G-200 カラムを用いてゲルろ過を行い、精製複合体毒素

(L 毒素および M 毒素) を得た (図 1)。

(倫理面への配慮)

現時点ではヒト由来材料の使用やヒトを対象にした実験を予定しておらず、この項目に該当する事項はない。

また、実験動物の取り扱いに際しては、国立感染症研究所の規定に従い、年度ごとに実験計画書を提出・申請し、実験動物委員会の審査を経て実験を行っている。実験に際しても動物愛護の精神を考慮し、使用動物数、安楽死処理等については適正に実施している。

C. 研究結果

ポツリヌス A, B 及び E 型毒素を検出するラッセクス凝集反応法用の簡易キットを各 30 本ずつ試作した。それぞれキットを各型毒素の検出感度を試験した結果、菌培養液 1ml 中の A 型毒素の 160 LD₅₀、B 型毒素の 128 LD₅₀ 及び E 型毒素の 64LD₅₀ を検出可能であった (表 1)。

トキソイド作出のために、A 型毒素は 40 L の培養液から精製毒素を約 300 mg、B 型毒素は 25 L の培養を 2 回繰り返すことにより約 200 mg の精製毒素を得た (表 2)。ヒト用トキソイドの抗原として使用予定の M 毒素は、A 型では 230 mg、B 型では 120 mg を得ることができた。これまで 2 回作製したヒト用トキソイドで、抗体産生が十分に保証されている標品には、1 バイアル当たり各型約 100 g 相当量の毒素タンパク質が含まれているので、今回の精製から得られた A 型、B 型は 1,000 用量程度のトキソイド作製が可能といえる。次年度は、E 型および F 型毒素の調製を行う。

D. 考察

作出したラッセクス凝集反応法用の簡易キットの感度は、型により多少の感度の違いがあるが、菌培養液を測定した結果 64-160 LD₅₀ 量を検出することが可能であった。ポツリヌス毒素がバイオテロに利用される際の毒素濃度を測定するために有用と思われる。来年度に向けて、さらに百本程度用意して、今後必要とする場合の緊急診断用 (スクリーニング) としての

活用が期待できる。また、約 1000 用量分のトキソイド作出用の A、B 型精製毒素が確保できた。過去に製造したトキソイドをヒト接種後の免疫応答から、基礎免疫の接種回数は 1 人に 3 回が必要と考え、翌年 1 回の追加接種を予定している。従って、接種対象が 200 人を超える場合には、さらにトキソイド作出用の毒素の調整が必要となる。本研究班で計画した製造本数は、限定した対象者用への緊急、事前対応用に用意したために、多数を対象としたワクチン接種を考えるのであれば、薬事法上で製造認可承認を得た製剤としての開発、展開を考慮することが必要である。

E. 結 論

ゼラチンに抗毒素を吸着した凝集反応用担体は、ボツリヌス毒素の簡易検出法として、各地方検査所でのスクリーニングに活用が期待される。また、今後トキソイドが作製されることにより、テロ発生時に現場で調査および処理に当たることが想定される担当者に予防措置が可能となる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Torii Y, Tokumaru Y, Kawaguchi S, Izumia N, Maruyama S, Mukamoto M, Kozaki S, and Takahashi M: Production and immunogenic efficacy of botulinum tetraivalent (A, B, E, F) toxoid. Vaccine 20: 2556-2561, 2002.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

特許取得 なし

実用新案登録 なし

その他 なし

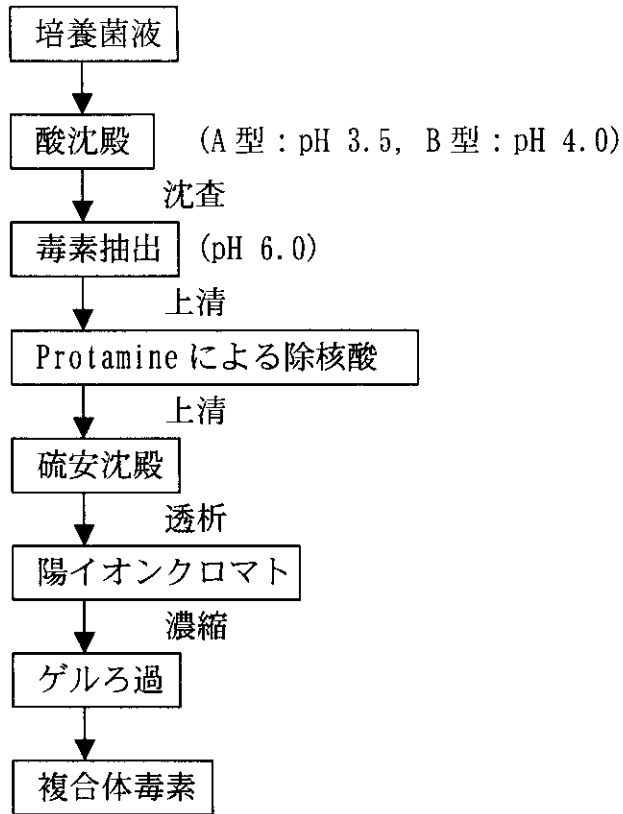


図1. 毒素精製のフローチャート

表1. 抗体感作ラテックスの各型毒素の感度

	A 型	B 型	E 型
M 毒素	640 32	128 2	64 1
L 毒素	160 9	128 2	-
LL 毒素	160 6	-	-
菌培養液	160	128	64
	-	-	-

上段：マウス ipLD₅₀ 下段：タンパク量 (ng)

表 2. A 型および B 型毒素の精製

Type A				
	Volume (ml)	Protein (mg)	Toxicity ($\times 10^9$ LD ₅₀)	Recovery (%)
全培養液	40,000		44.0	100.0
毒素抽出	2,400	6744	18.0	40.9
硫安塩析	114	1368	14.7	33.4
陽イオンクロマト	33	386	7.2	16.4
ゲルろ過				
L toxin	37	95	2.1	4.5
M toxin	175	232	6.6	15.0

Type B				
	Volume (ml)	Protein (mg)	Toxicity ($\times 10^9$ LD ₅₀)	Recovery (%)
全培養液	25,000		45.3	100.0
毒素抽出	1,490	1792	13.6	30.0
硫安塩析	134	158	12.4	27.4
陽イオンクロマト	24	144	10.2	22.5
ゲルろ過				
L toxin	38	49	0.8	1.8
M toxin	13	65	4.8	10.6

B 型毒素については、上記のスケールで再度精製を行い、同様の成績を得ている。

III-I. 帯畜大小括研究報告書

分担研究者 牧野壮一 帯広畜産大学畜産学部助教授

研究要旨 2001年10-11月我が国ではアメリカの炭疽菌芽胞混入郵便物によるテロ事件を模倣した事件が多発した。これらの事件に対応する過程で、バイオテロ等の緊急事態に対応して迅速な病原体検出法、蔓延防止策、予防、診断、治療法の開発および確立の必要性が強く指摘された。本研究ではバイオテロに利用されることが危惧される各種の病原体による希少急性感染症が不明疾患として発生した場合に、複数の原因病原体を想定して環境や臨床材料から網羅的・短時間に検出する検査診断法の開発と治療薬の効果の検討ならびに臨床診断や治療に関する臨床対応を検討し、検査・診断・治療マニュアルを作製し、普及をはかることを目的とする。本課題では危険度の高い細菌感染症の中で炭疽とブルセラ症に着目して、その検出・診断法および治療法を開発し、社会に還元することを目的としている。炭疽菌は米国テロで使用されたこともあり、生物兵器の際も使用される可能性があり、その蔓延防止のための基礎・応用技術の整備は急務である。一方、ブルセラ症は診断・検出法が充分整備されているとは言えず、感染が容易におき、徐々に国力の低下を招くため生物兵器として心配されている。炭疽は土壌細菌で環境中の、特に土壌からの検出方法の確立は疫学調査に必須であるといえ、今回ほぼ完璧にその技術を完成させた。また、ブルセラ症は我国で2年まえに起こったヘラジカの感染事例でオーム病と間違われたことでわかるように、診断法は曖昧である。エルシニア等との交差反応、ワクチン接種群との陽性反応など免疫診断法に問題がある。そこで、本年度はワクチン接種群との判別が可能となる方法を開発し、実際発生国で検証した。

分担研究者

倉園久生 岡山大学医学部教授

江崎孝行 岐阜大学医学部大学院独立専攻再
生医科学教授

的・短時間に検出する検査診断法の開発と治療薬の効果の検討ならびに臨床診断や治療に関する臨床対応を検討し、検査・診断・治療マニュアルを作製し、普及をはかることを目的とする。

A. 研究目的

2001年10-11月我が国ではアメリカの炭疽菌芽胞混入郵便物によるテロ事件を模倣した事件が多発した。これらの事件に対応する過程で、バイオテロ等の緊急事態に対応して迅速な病原体検出法、蔓延防止策、予防、診断、治療法の開発および確立の必要性が強く指摘された。

本研究ではバイオテロに利用されることが危惧される各種の病原体による希少急性感染症が不明疾患として発生した場合に、複数の原因病原体を想定して環境や臨床材料から網羅

対象として各種ウイルス、リケッチア、細菌、毒素等のバイオテロに使用される可能性がある病原体が想定されるが、特に炭疽菌は芽胞としての安定性、乾燥や熱に対する抵抗性、比較的簡単に培養ができることなどから生物兵器の最有力候補として常に注目をあびてきた。炭疽菌は危険度レベル3に属する細菌で、他にペスト、鼻疽/類鼻疽、野兔病、結核、チフス、ブルセラが細菌としてこのレベルに入る。その中で、生物兵器として使用可能なものは炭疽以外にペスト、鼻疽/類鼻疽、野兔病、チフス、ブルセラが

想定されるが、検査法や治療法、さらには診断法がまだ確立されていないのは鼻疽/類鼻疽、野兔病、ブルセラである。そこで、本研究では、危険度を考慮して炭疽菌の検出法の更なる改良・開発、および鼻疽/類鼻疽、野兔病、ブルセラ症に対する検出・診断法の確立及び治療・予防法の開発や改良を行い、患者検体および環境中からの迅速な検出および診断法の開発を行う。診断法の実用化に当たっては事件発生現場での利用が可能な方法と、検査室における方法の両面からの実用化を目指す。さらに、種々の化学物質および薬剤に対する病原体の感受性に関する検討を行い臨床利用に備える。また、従来からのワクチンを基盤とした免疫誘導能が高いワクチンの開発を検討する。

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。ヒトの疾病は、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。実際、感染後24時間以内に大量の抗生物質を投与すれば死亡率は極端に低下するが、発症してしまうと急激に重篤な状態に陥ってしまう。すなわち、血流中に炭疽菌が入り込んでしまうと抗生物質もほとんど効力がなくなる。

一方ブルセラ症は、いろいろな脊椎動物に感染し病気を起こすブルセラ菌によって起こる感染症で、種によって、主に感染する動物が異なる。*Brucella abortus*がウシ、*B. melitensis*がヒツジ・ヤギ、*B. suis*がブタ、*B. canis*がイヌに主として感染し、ヒトはこれらの感染した動物との接触によって、あるいは、ブルセラ菌によって汚染された動物由来の製品との接触によって感染する。即ち、動物のブルセラ症が多く見られる場所ではヒトのブルセラ症もよく発生する。従って、動物へのワクチン接種などによるブルセラ症の撲滅が本感染症の人への自然界での蔓

延を防ぐ最適な方法であるといえる。ヒトのブルセラ症は全身症状を呈し、あらゆる臓器に感染を起こすことで知られており、その症状に特異的なものはなく、発熱、発汗、疲労、体重減少、うつ状態などの症状がみられる、いわゆるやる気をなくすようなけだるさが長期間継続し慢性化する特徴がある。さらに、ブルセラ菌は実験室内感染の危険性が高く、噴霧状態での感染が容易に起こる。そのため、生物兵器として使われることが心配されている。ブルセラ症の診断には一般的に抗体価の上昇で調べるが、ヒトにおけるブルセラ症の診断法は確立されておらず、家畜の国際標準法に従って実際は行われている。しかしこの国際標準法では、*Yersinia enterocolitica* O9 との交差反応が強いこと、ワクチン接種群における抗体価が高いことなどがあり、確実なブルセラ症の診断はできない。例えば、平成13年のヘラジカのブルセラ騒動はオーム病との交差反応であった。ブルセラ特異的な診断法は確立されていない現状にある。

鼻疽は本来動物特にウマの疾病で細菌性病病原体としては危険度が最も高い危険度3に区分される。土壌中に存在する病原体が皮膚の傷口に付着しそ創傷感染、リンパ節へと広がっていく。また粉塵から飛散した菌を吸引し肺炎、あるいは眼球結膜に付着し涙嚢の感染と鼻出血をおこす。涙嚢炎と鼻出血はこの病気の特徴的な所見である。ウマの密度の高い中国の内モンゴルでは現在も感染するケースがあるとされているが、人の感染例は姿を消しつつある。一方、類鼻疽はヒトの疾患で、亜熱帯から熱帯地方の土壌に分布し東南アジアでは患者数は極めて多く感染者の致死率も高い危険な疾患である。特にタイ、マレーシア、ベトナム、北部オーストラリアの患者発生率が高い。両病原体は土壌に分布するため農作業中に感染するケースが多い。皮膚の傷口から感染し潰瘍、リンパ節の腫溜が前景にでる場合と土壌中の菌を吸引して肺炎が全面にでる場合がある。糖尿病や肝臓疾患等で免疫低下がある人が感染するとしばしば経過が長期化し致死的な全身感染症に進展し、治療に抵抗する。本感染症はmelioidosisと呼ばれタイでは毎年約800~1000例の死亡が報告されてい