

る。

野兎病は、野生の動物の病気で、ヒトも感染する。北アメリカ・北ヨーロッパ・北アジアに広く見られ、野兎病菌を持った虫にかまれたり、刺されたりして、あるいは、野兎病菌に汚染したもので動物に接触してヒトは感染する。発生は通常散発的だが、ときに流行を示す。2000年には北欧で蚊の媒介による流行があった。また、野兎病菌は、10-50個の菌だけでも、皮膚に付着したり吸引で感染・発病する可能性があり、症状もペストに似て重症化しやすいので、生物兵器として使われる可能性が危惧されている。

本研究では以上4菌種の検出・診断法の開発、及び病原性因子の解析による新たな治療方法の開発を試みる。

B. 研究方法

方法は各分担研究者の方法に記載されているので、省略する。

C. 研究結果

詳細な図表は各分担研究者の報告書に載せてあるので、省略する。

① 炭疽菌の検出法

炭疽菌特異的プライマーを用い、nested-PCR および real-time PCR 法により土1グラム当たり1個の芽胞があれば、二次増菌の後に検出可能であった。さらに1000個含んでいれば、直接土から検出可能であった。また、一回増菌液を用いると、100個/g以上で産物が確認できた。疫学調査として本方法が実用可能かどうかを検証するために、炭疽菌が常在しているモンゴルの土をランダムに9箇所から採集し実験に使用した。その結果、1サンプルで陽性となった。

② プルセラ診断法の開発

国際標準法に従い、急速凝集反応をプルセラ及びエルシニアに対する抗体およびワクチン接種家畜由来血清に対して実施すると、全て陽性になった。しかし、精製ポリサッカライド抗原を用いるとワクチン接種家畜やエルシニア血清には反応せず、感染家畜とウサギ血清では沈降線が形成された。野外での

応用も可能であり、国際標準法でプルセラ症と診断された家畜について、本方法でその20%が陰性であることが判明した。

③ 鼻疽/類鼻疽特異的検出系の開発

鼻疽/類鼻疽菌ともほぼ同じ16S-rDNA遺伝子配列を保有しているため、PCRのprimerも両方の菌種を増幅するものしかデザインができなかった。結果として両者が陽性であった。両菌種の表現形質の違いは運動性にあるので、類鼻疽菌の鞭毛遺伝子からprimerをデザインしPCR法で増幅を行った。その結果、運動性の無い鼻疽菌からも同じPCR産物が得られた。また、外膜蛋白遺伝子のPCRも使用したが、Burkholderia属の全菌種、及びPseudomonas aeruginosaから異なったバンドが出現したため検出には使用できないと判断した。

④ 野兎病菌の検出系の開発

16S rDNAプライマーを用いたPCRでは、検討したAnnealing温度(45℃、50℃及び55℃)のいずれでも、特異的なバンドは検出されなかった。一方、MMPプライマーを用いたPCRでは、加熱死菌体を用いた場合、*F. tularensis* 及び *F. novicida* では100個菌体があれば検出可能であった。全菌体DNAを用いた場合、*F. tularensis* 及び *F. novicida* では10pgのDNAがあれば検出可能であった。またFopAプライマーを用いたPCRでは、加熱死菌体を用いた場合、*F. tularensis* 及び *F. novicida* では100個菌体があれば検出可能で、全菌体DNAを用いた場合、*F. tularensis* 及び *F. novicida* では10pgのDNAがあれば検出可能であった。大腸菌、*Y. pestis*、*F. philomiragia*、*Y. enterocolitica*、*Y. pseudotuberculosis* では陰性であった。

D. 考察

炭疽菌は土壌を汚染し、長期間存在し動物やヒトに自然感染を繰り返す。土壌から微生物、特に芽胞菌を検出するのは非常に困難である。バシラス属菌が数多く存在し、炭疽菌を選択的に分離するのは極めて困難である。今回の方法は土壌汚染や環境の疫学調査に有効であり、特

に汚染のひどい場合は直接検出可能であった。今回の PCR は nested-PCR と real-time PCR を行ったが、後者の方が感度も高く短時間で結果を出すことができた。

またブルセラ症の診断は、PCR や培養方法が確立されておらず、一般的に慢性化するので抗体検査が主流である。しかし、特異性に問題があり、またワクチン接種との区別がこんなんである欠点を持っている。特に動物のブルセラ症の撲滅はヒトへの蔓延を防ぐ最適の方法であるため、本当のブルセラ症の発生の把握は重要になる。ブルセラ症の動物は淘汰する必要があるので、経済的にも本当のブルセラ症の把握は重要となる。本方法は我国ではさほど必要ではないが、酪農国では充分役に立つものと考えている。

鼻疽と類鼻疽菌を検出するためのプライマーとして 16S rDNA と鞭毛遺伝子が有効であることが証明された。ただし鞭毛遺伝子に関しては PCR 産物をさらに確認するために内部の特異プローブを使用して *B. epacia* など類縁の菌種と識別する必要があった。遺伝子診断は感染症の初期には有効であるが、東南アジアの類鼻疽の感染症は殆どが慢性感染症である。そのため既に化学療法を受けている患者が多く、遺伝子診断を行うには遅すぎる。肺膿瘍、骨髄炎など診断材料を採取することが困難で菌株の分離も化学療法を開始してあるのでむずかしい。そこで、血清診断が有効であろうと考えられ、抗体価の測定を考慮した検出法を確立する必要があろう。

野兔病菌検出用の 3 つの Primers を設計したが、16S rDNA の配列は使用できなかった。一方、外膜蛋白の配列を使用した MMP 及び FopA プライマーは、*F. tularensis* 及び *F. novicida* に特異的であり、検出限界は菌体が 100 個、whole cell DNA は 10pg であった。しかし、外膜蛋白の配列はしばしば株による多型が予想される。今後は野生株を数多く使用して、これらの primers の有効性を検討する必要がある。診断のもう一つの重要な因子として抗体計測がある。特異抗体計測あるいは迅速検出のための抗

原の計測法を確立する事も今後の重要な課題と考える。

E. 結 論

炭疽菌の検出方法はこれで全て完成し、疫学調査への応用が期待できる。またブルセラ症の診断は新たな免疫学的方法を示したが、培養や PCR 法の確立も必要であろう。しかし、いづれにしても両者とも実用的であるといえる。また、鼻疽/類鼻疽および野兔病の検出・診断法は PCR 法の確立から行ったが、検出は可能であった。しかし、ブルセラのような抗体価の測定技術のスタンダードかが今後の重要な研究対象となるといえる。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Watarai, M., Makino, S-I. and Shirahata, T. 2002. An essential virulence protein of *Brucella abortus*, VirB4, requires an intact nucleoside triphosphate-binding domain. *Microbiology*. 148: 1439-1446.
- 2) Watarai, M., Makino, S-I., Fujii, Y., Okamoto, K. and Shirahata, T. 2002. Modulation of *Brucella*-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication. *Cell. Microbiol.* 4: 4849-4855.
- 3) Makino, S-I., Watarai, M., Cheun, H. I., and Uchida, I. 2002. Role of the lower molecular capsule, which was released from the cell surface of *Bacillus anthracis*, on the pathogenesis. *J. Infect. Dis* 186(2):227-33.
- 4) J. Erdenebaatar, S. Sugar, A. Yondondorj, T. Nagabayashi, B. Shuto, M. Watarai, S-I Makino and T. Shirahata. 2002. Serological Differentiation of *Brucella*-Vaccinated and -Infected Domesticated Animals by the Agar Gel Immunodiffusion Test using *Brucella* Polysaccharide in Mongolia. *J. Vet. Med. Sci.* 64: 839-841.
- 5) Watarai, M., Makino, S-I., Michikawa, M., Yanagisawa, K., Murakami, S. and Shirahata, T. (2002) Macrophage plasma membrane cholesterol contributes to *Brucella abortus* infection of mice. *Infect. Immun.* 70:

4818-4825.

- 6) Kim, S., Watarai, M., Makino, S-I., and Shirahata, T. (2002) Membrane sorting during swimming internalization of *Brucella* is required for phagosome trafficking decisions. *Microbiol. Pathog.* 33: 225-237.
- 7) Saengjaruk, P., W. Chaicumpa, G. Watt, P. Tapchaisri, C. Sittinont, K. Tomnakan, MAL. Wambongco, M. Chongsa-nguan, Y. Mahakunkijcharoen, T. Kalambaheti, Y. Sakolvaree, P. Naigowit, H. Kurazono, H. Hayashi: Diagnosis of human leptospirosis by Monoclonal antibody based-antigen detection in urine. *J. Clin. Microbiol.* 40 : 480-489, 2002.
- 8) Shirasaka, D., N. Aoyama, M. Sakashita, K. Kuroda, S. Maekawa, C. M. Wambura, M. Miyamoto, T. Tamura, K. Yahiro, A. Wada, H. Kurazono, T. Hirayama, M. Kasuga: Relationship between gastric ulcer and *Helicobacter pylori* VacA detected in gastric juice using bead-ELISA method. *Helicobacter*, 7: 281-286, 2002.
- 9) Karasawa, T., H. Ito, T. Tsukamoto, S. Yamasaki, H. Kurazono, S. M. Faruque, G. B. Nair, M. Nishibuchi, Y. Takeda: Cloning and characterization of gene encoding homologues of the B-subunit of Cholera toxin and the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin from clinical isolates of *Citrobacter freundii* and *E. coli*. *Infect. Immun.* 70: 7153-7155, 2002.
- 10) Ishitoya, S., S. Yamamoto, S. Kanamaru, H. Kurazono, T. Habuchi, O. Ogawa, A. Terai: Distribution of *afae* adhesins in *Escherichia coli* isolated from Japanese Urinary Tract Infection patients. *J. Urol.*, in press, 2003.

1. 細菌性生物兵器の蔓延防止に関する研究

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。

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。

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、炭疽菌は特に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、炭疽菌及びブルセラ菌に対して検査法の確立及び治療・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り、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* 09 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。

本研究では炭疽の検出法、特に環境からの検出法の開発、及びブルセラ特異的診断法の開発を目的として、また病原性因子の解析による新たな治療方法の開発も試みる。

B. 研究方法

1. 菌株

炭疽菌パスツール2菌株（莢膜産生、毒素産生株）の一夜培養液を芽胞形成培地に常法に従い接種し、37℃にて緩やかに振盪培養を行い作製した。顕微鏡観察によりほぼ100%の芽胞形成を確認後、滅菌生理食塩水で2回洗浄後、80℃30分間加熱処理し、更に2回滅菌生理食塩水で洗浄した。最終芽胞数を 10^7 個/mlになるよう懸濁し、実験に使用した。芽胞は土ーグラムにてきとう量人工的に接種し実験を行った。

2. PCR用基質DNAの調整

土1グラムを70%エタノールで2回洗浄後、滅菌蒸留水で2回洗浄し、トリプトケースブイヨンで2回増菌培養を行った。増菌液1mlを遠心し、FastPrepシステムでDNAを抽出した。

3. PCR法

PCR法による迅速診断法は、S-layer、莢膜、毒素遺伝子特異的プライマーを作製し実施した。表1に示すプライマーでNested-PCR及びReal-time PCRを実施した。

4. ブルセラ抗原の抽出

ブルセラ544株を培養後オートクレーブをかけ、不活化した。その後フェノール抽出を繰り返すことによりポリサッカライド分画を精製した。これを抗原として用いた。また、国際標準診断法に用いる抗原は市販のブルセラ菌急速凝集用菌体を用いた。

5. ブルセラ及びエルシニア陽性血清

ブルセラ544株およびエルシニア09株をウサギに免疫し、陽性血清を得た。

6. 野性サンプルの採取

炭疽菌の検出法を炭疽の発生のあるモンゴルから土壌を採取し実験を行った。土壌はモンゴル農業大学獣医学研究所で培養、DNA抽出を行い、基質DMAを日本に持ち帰りPCRを実施した。同時に、ブルセラ症の常在国であるモンゴルの家畜から血清を分離し今回確立したブルセラ診断法を確かめるために、野外サンプルとして使用した。また、ブルセラ非感染ウシを用いてワクチン接種を行い、今回の方法の有用性を確かめるために定期的に血清を分離し、ワクチン接種の影響を検討した。

C. 研究結果

① 炭疽菌の検出法

炭疽菌特異的プライマーを用い、nested-PCRをまず実施した。土を直接PCRにかけた場合、1000個/g以上で産物が確認できた。また、一回増菌液を用いると、100個/g以上で産物が確認できた。しかし、二次増菌液を用いた場合、一個から検出可能であった(図1)。また、Real-time PCRを行うと、一種類のプライマーで産物が確認できた(図2)。

② モンゴルの土からの炭疽菌の検出

炭疽菌が常在しているモンゴルの土をランダムに9箇所から採集し実験に使用した。全てのプライマーで#3サンプルが陽性であった。#6は毒素遺伝子のみ陽性であった。

③ ブルセラ診断法の開発

国際標準法に従い、急速凝集反応をブルセラ及びエルシニア抗原に対して実施すると、両者とも陽性になった(図3)。しかし、精製ポリサッカライド抗原を用いるとワクチン接種家畜やエルシニア血清には反応しなかったが(図4でそれぞれVとNで示している)、感染家畜とウサギ血清では沈降線が形成された(図4でそれぞれIとCで示してある)。また、ワクチン接種牛に対して摂取後の本方法の反応の出る時期を検討した結果、国際標準法では一年以上も陽性になったが、我々の方法では3ヶ月から陰性になり、ワクチン接種群と感染動物をわけることが可能となった。また、国産標準法でブルセラ症と診断された家畜について、本方法で検査

を行うと家畜によっては20%も陰性であることが判明した。

D. 考察

炭疽菌は土壌を汚染し、長期間存在し動物やヒトに自然感染を繰り返す。土壌から微生物、特に芽胞菌を検出するのは非常に困難である。

バシラス属菌が数多く存在し、炭疽菌を選択的に分離するのは極めて困難である。今回の方法は土壌汚染や環境の疫学調査に有効であり、特に汚染のひどい場合は直接検出可能であった。今回のPCRはnested-PCRとreal-time PCRを行ったが、後者の方が感度も高く短時間で結果を出すことができた。

またブルセラ症の診断は、PCRや培養方法が確立されておらず、一般的に慢性化するので抗体検査が主流である。しかし、特異性に問題があり、またワクチン接種との区別がこんなんである欠点を持っている。特に動物のブルセラ症の撲滅はヒトへの蔓延を防ぐ最適の方法であるため、本当のブルセラ症の発生の把握は重要になる。ブルセラ症の動物は淘汰する必要があるため、経済的にも本当のブルセラ症の把握は重要となる。本方法は我国ではさほど必要ではないが、酪農国では充分役に立つものと考えている。

E. 結論

炭疽菌の検出方法はこれで全て完成し、疫学調査への応用が期待できる。またブルセラ症の診断は新たな免疫学的方法を示したが、培養やPCR法の確立も必要であろう。しかし、いづれにしても両者とも実用的であるといえる。

F. 健康危険情報

特に無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Watarai, M., Makino, S-I. and Shirahata, T. 2002. An essential virulence protein of *Brucella abortus*, VirB4, requires an intact nucleoside triphosphate-binding domain. *Microbiology*. 148: 1439-1446.
- 2) Watarai, M., Makino, S-I., Fujii, Y., Okamoto, K. and Shirahata, T. 2002. Modulation of

- Brucella*-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication. *Cell. Microbiol.* 4: 4849-4855.
- 3) Makino, S-I., Watarai, M., Cheun, H. I., and Uchida, I. 2002. Role of the lower molecular capsule, which was released from the cell surface of *Bacillus anthracis*, on the pathogenesis. *J. Infect. Dis* 186(2):227-33.
 - 4) J. Erdenebaatar, S. Sugar, A. Yondondorj, T. Nagabayashi, B. Shuto, M. Watarai, S-I Makino and T. Shirahata. 2002. Serological Differentiation of *Brucella*-Vaccinated and -Infected Domesticated Animals by the Agar Gel Immunodiffusion Test using *Brucella* Polysaccharide in Mongolia. *J. Vet. Med. Sci.* 64: 839-841.
 - 5) Watarai, M., Makino, S-I., Michikawa, M., Yanagisawa, K., Murakami, S. and Shirahata, T. (2002) Macrophage plasma membrane cholesterol contributes to *Brucella abortus* infection of mice. *Infect. Immun.* 70: 4818-4825.
 - 6) Kim, S., Watarai, M., Makino, S-I., and Shirahata, T. (2002) Membrane sorting during swimming internalization of *Brucella* is required for phagosome trafficking decisions. *Microbiol. Pathog.* 33: 225-237.

H. 特許出願状況

特にない。

表 1. 炭疽菌特異的プライマー

	Primer	Sequence (5' - 3')	Target gene	Amplified size	Accession No.	
1st	SL-U1	CGCGTTTTGTATGGCATGCTTTCT	} <i>sep</i>	639	Z36946	
	SL-D1	TTCTGAAGCTGGCGTTAGAAAT				
	2nd	SL-U2				CGGRACAGAAAGCAGCAAAA
		SL-D2				GCTGTTGGCTCATCAGGTA
1st	PA8	GAGGTAGAAGGATATAAGGGT	} <i>pag</i>	597 bp	AF306782	
	PA5	TCCTAACACTAAGGAAGTCG				
	2nd	PA7				ATCACAGAGGGCAAGACACCG
		PA6				ACCAATATCAAAGAACGACGC
1st	M011	GACGGATTATGTTGCTAAG	} <i>cap</i>	591 bp	M24150	
	M012	GCACTGGCAACTGGTTTTG				
	2nd	BA547				GCTGATCTTGACTATGTGGGTG
		BA546				GGCTTCCTGTCTAGGACTCGG

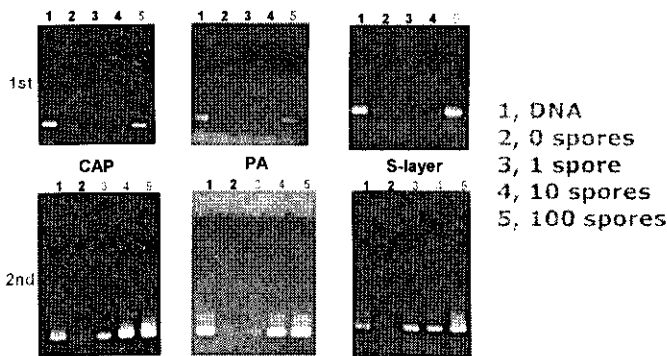


図 2. 増菌培養液の nested-PCR

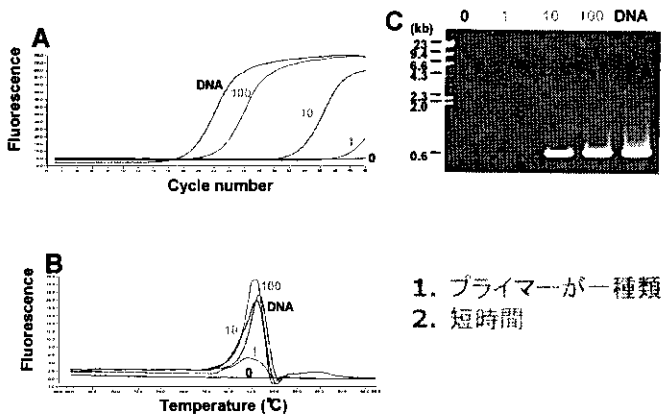


図 2. 増菌培養液の real-time PCR
プライマーは M011, M012 使用

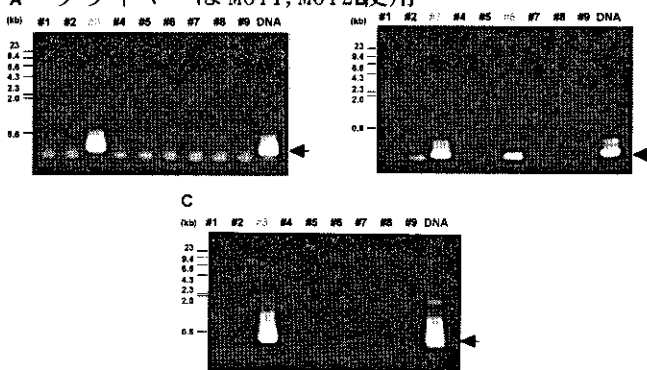


図 3. モンゴルの土壌からの炭疽菌検出

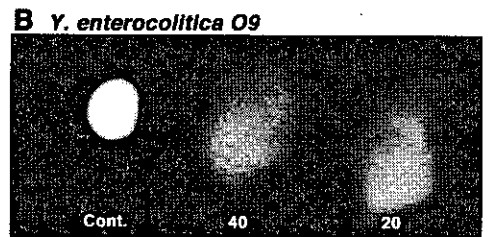
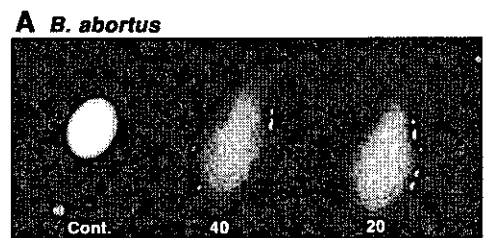


図 4. プルセラ急速凝集反応
菌体をプルセラ (上段) とエルシニア (下段) を使用。

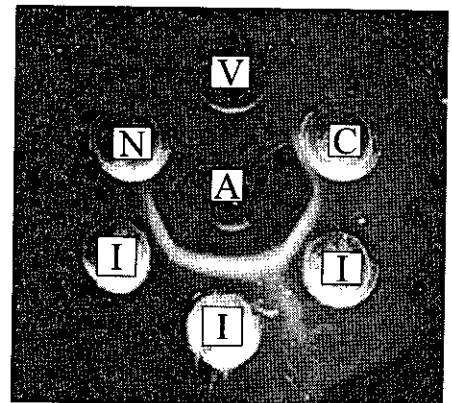


図 5. ゲル内沈降反応

2. 野兎病菌の検出法および診断法の確立に関する研究

分担研究者 倉園久生 岡山大学医学部教授

研究要旨 2001年にアメリカで起こった炭疽菌芽胞を使ったバイオ・テロにより、生物兵器による無差別攻撃が現実のものとなった。バイオ・テロに使用される病原体による感染症は希少かつ急性で、発生した場合には通常の医療機関並びに検査機関での検出・診断が困難である。本研究では、野兎病菌によるバイオ・テロが発生した場合の環境及び患者検体からの迅速検出並びに診断法を確立して検査・診断マニュアルを作成し、その普及を目的とする。野兎病は通常、罹患動物との接触やダニやサシバエなどの虫刺されにより発生するが、大量の菌の噴霧によっても発症するため、本菌によるバイオ・テロでは初発の段階における検査・診断が重要である。現在までに、野兎病に対する迅速診断法の報告はあるが、近縁種との交差が解消されておらず、更に日本では本菌に対する抗体検査は大原研究所のみで行われているのみで検査試薬も市販されておらず、その蔓延防止のためには迅速診断法の整備が急務である。本年度は、野兎病菌 (*Francisella tularensis*) に対する特異的なプライマー対を検討し、これらを用いた PCR 法による野兎病菌に対する特異的迅速診断法を確立した。

A. 研究目的

2001年にアメリカで起こった炭疽菌芽胞を使ったバイオ・テロにより、生物兵器による無差別攻撃が現実のものとなった。バイオ・テロに使用される病原体による感染症は希少かつ危険度 3 に属する菌で、分類学的には、Gamma Proteobacteria に区分され、腸内細菌と近縁関係にある (図 1)。本菌は、第二次世界大戦中に日本の細菌兵器研究部隊が旧満州で扱っていた。その後、アメリカ軍によって、野兎病菌を噴霧する兵器の開発が進められた。1970年にアメリカ合衆国の生物兵器開発は中止されたが、旧ソビエト連邦は開発を続け、更に抗生物質やワクチンの効きにくい野兎病菌株の生産を試みた。残念ながら、現在のところ、野兎病菌に対する検査・診断法はまだ確立されていない。

野兎病は主として野生動物の感染症である。感受性のある動物は、ネズミ、野ネズミ、リス、ウサギ、野ウサギで、感染した動物から吸血昆虫 (ダニ、蚊、サシバエ等) によって動

物やヒトに伝搬される。他の感染源としては、野兎病菌で汚染された干草や水、野兎病で死亡した動物の死体及び感染している動物がある。野兎病菌は、水、土、死体及び皮の中で何週間も生存可能である。更に、10-50個の菌を皮膚に塗布したり吸引することで感染・発病する可能性がある。1966-1967年にスウェーデンで多数の農夫の発症が起こった際は、野積みの干草を移動させる作業中に混在していた本菌を吸引して発病しており、バイオ・テロによる本菌の噴霧の危険性が考えられる。

日本において、2001年と2002年の報告例はないが、北海道・東北・関東地方で多く見られ、冬期と晩春に発生が多い。病日の初期は特徴がなく、しばしば誤った診断が下される。初期症状は、悪寒、発熱、頭痛、気分不快で潜伏期は 2-10 日である。侵入門戸が粘膜だけでなく、皮膚からも侵入するのが本菌の特徴である。通常、侵入部位に潰瘍を形成し、リンパ行性に拡散する。野兎病は初発部位によって、潰瘍・リンパ節型、リンパ節型、目・

リンパ節型、敗血症がた、口・咽頭部型、胸膜・肺型に分類され、治療を行わないと肺炎、敗血症、髄膜炎を引き起こす。

現在までに、野兎病に対する迅速診断法の報告はあるが、近縁種との交差が解消されておらず、更に日本では本菌に対する抗体検査は大原研究所のみで行われているのみで検査試薬も市販されておらず、その蔓延防止のためには迅速診断法の整備が急務である。本年度は、野兎病菌 (*Francisella tularensis*) に対する特異的なプライマー対を検討し、これらを用いた PCR 法による野兎病菌に対する特異的迅速診断法を確立した。

B. 研究方法

1) 遺伝子検出のための Primer 設計：病原性がなくなった野兎病の病原体を使った生菌ワクチンが開発されているが、LPS や莢膜以外の詳細な病原因子は明らかにされていないので、本研究では配列が公開されている下記の 3 つの遺伝子を標的としてデザインした。

① 16S rDNA：公開されている 16S rDNA 配列を基に *Francisella* 属の 3 菌種の配列を比較したところ、16S rDNA 配列は *Francisella* 属の 3 菌種の間では殆ど同じで、3 菌種を識別できる配列はデザイン出来なかった。そこで、3 菌種に共通の配列で、他の属と識別出来ると予測される配列を選択して Primer を設計した。16S rDNA 配列は以下の Accession No の配列を使用した：*F. tularensis* (AF227314, AF227313, AF227312, AF14039, Z21932), *F. novicida* (L26084), *F. philomiragia* (Z21933)。*F. philomiragia* は *Yersinia* から移籍された菌種であり、腸内細菌科の菌種に近いことから *Yersinia* 属及びその他の腸内細菌の配列と比較して *Francisella* 属と共通と考えられる下記の配列を設計した。

Foward: CGCGTAGGAATCTGCCCAT TT
Reverse: TTAACAAACCACCTACAGA CCC
Amplicon = 478bp

② 17kDa Major Membrane Protein (MMP): TUL4 (M32059)：主要な外膜蛋白である TUL4 の遺伝子から配列を選択し、Blast で類似配列を持つ

菌種が存在しない事を確認して、下記の配列を設計した。

Foward: TGTTCTACTCTAGGGTTA G G
Reverse: ACTACATTAGCTGTCCACT TA
Amplicon = 350bp

③ Outer Membrane Protein (FopA): AF097542：外膜蛋白質から *F. tularensis* に特異的な FopA 遺伝子を選択し、Blast で類似配列を持つ菌種が存在しない事を確認して下記の配列を設計した。

Foward: ACTGTATTATTAGGTTTCAG CTA
Reverse: CCGTTAGCATCTACACCTA AGT
Amplicon = 221bp

2) 上記 primers による PCR 法の検定に用いた templates：template には、加熱死菌体及び各菌株から抽出した whole cell DNA を用いた。

① 加熱死菌体：加熱死菌は以下の菌株で作成した。なお、加熱死菌体は、PCR 反応前に更に 95℃ で 15 分間の前処理を行った。

Francisella tularensis subsp. *tularensis* GTC 3P42 株

Yersinia pestis GTC 3P417 株

Escherichia coli MC1061 株

② whole cell DNA は以下の株で調整した。

Francisella tularensis subsp. *tularensis* GTC 3P42 株

Francisella philomiragia GTC 3P424 株

Francisella novicida GTC 3P425 株

Yersinia enterocolitica GTC 127 株

Yersinia pseudotuberculosis GTC 118 株

Escherichia coli MC1061 株

3) PCR 反応液の組成は Applied Biosystem 社 AmpliTaq の組成に従い調整し、primer は各 40 pmol を用いた。

4) 各 primer の annealing 温度：MMP (primer ②) と FopA (primer ③) は 50℃ で行った。16S rDNA (primer ①) は、45℃、50℃ 及び 55℃ で検討した。

5) PCR 反応は、94℃ で 5 分、[94℃ で 1 分、各 annealing 温度で 1 分、72℃ で 1 分] を 30 cycle、最後に 72℃ で 7 分反応させた。

6) PCR 産物の検定：PCR 産物は 2% アガロース・

ゲル電気泳動を行い、その分子量を測定した。

C. 研究結果

①16S rDNA (primer ①)を用いたPCR: 検討した Annealing 温度 (45℃、50℃及び55℃) のいずれでも、特異的なバンドは検出されなかった。

②MMP (primer ②) を用いたPCR: 加熱死菌体を用いた場合、*F. tularensis* 及び *F. novicida* では100個菌体があれば検出可能であった。陰性コントロールの大腸菌及び *Y. pestis* では、 10^6 個菌体があっても陰性であった(図2)。

whole cell DNAを用いた場合、*F. tularensis* 及び *F. novicida* では10pgのDNAがあれば検出可能であった。陰性コントロールの *F. philomiragia*、

Y. enterocolitica、*Y. pseudotuberculosis* 及び *E. coli* では、それぞれ5µg、3µg、2µg、及び3µgのDNAを添加しても陰性であった(図3)。

③FopA (primer ③) を用いたPCR: 加熱死菌体を用いた場合、*F. tularensis* 及び *F. novicida* では100個菌体があれば検出可能であった。陰性コントロールの大腸菌及び *Y. pestis* では、 10^6 個菌体があっても陰性であった(図4)。

whole cell DNAを用いた場合、*F. tularensis* 及び *F. novicida* では10pgのDNAがあれば検出可能であった。陰性コントロールの *F. philomiragia*、

Y. enterocolitica、*Y. pseudotuberculosis* 及び *E. coli* では、それぞれ5µg、3µg、2µg、及び3µgのDNAを添加しても陰性であった(図5)。

D. 考 察

Francisella tularensis 検出用の3つの Primers を設計し、菌体並びに whole cell DNA で検討した。16S rDNAの配列は *Francisella* の3菌種を増幅するには特異性に乏しい事が分かった。一方、外膜蛋白の配列を使用した

Primers (MMP: primer ②及びFopA: primer ③) は、*F. tularensis* 及び *F. novicida* に特異的であり、検出限界は菌体が100個、whole cell DNAは10pgであった。しかし、外膜蛋白の配列はしばしば株による多型が予想される。今後は野生株を数多く使用して、これらの primers の有効性を検討する必要がある。

現在、我国における野兔病の発症例は数年に1度程度で、菌株の入手が困難である。更に、レベル3の菌株を外国から収集するのは困難になっており国内の保有株を幅広く呼びかけて収集する必要がある。また、我国の安全性レベルでは、*F. tularensis* subsp. *tularensis* 以外の2つの亜種も *F. tularensis* 同等の危険度で取り扱われており(表1)、感染症研究所の規定を早急に改めて明確な区別をする必要がある。今後の課題として動物検疫及び生物兵器のリストからはずれると思われる *F. tularensis* の亜種の収集経路を確保すると共に、*F. tularensis* subsp. *tularensis* 野生株の収集を行い遺伝子多型の有無とプライマーの有効性を実証する必要がある。

診断のもう一つの重要な因子として抗体計測がある。患者の抗体の計測は大原研究所のような専門機関出なければ実施してもらえない現状では、我が国全体の正確な患者数の把握が困難である。大原研究所では全菌体を抗原とした抗体計測を行っているが、通常の検査室では抗原が市販されていないので実施できない。このような現状を改善するために、特異抗体計測あるいは迅速検出のための抗原の計測法を確立する事も今後の重要な課題と考える。

E. 結 論

F. tularensis subsp. *tularensis* 検出に用いるPCR用特異 primers として、MMP及びFopA遺伝子に対する primers を設計し、それらの特異性を証明した。次は、1) 野生株を数多く使用して、これらの primers の有効性を検討する、2) 生体材料(筋肉、リンパ節、血液等)や汚染が予想される野外材料(空気、水、植物等)からの構築した検出系の実効性を検討する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saengjaruk, P., W. Chaicumpa, G. Watt, P. Tapchaisri, C. Sittinont, K. Tomnakan, MAL. Wambongco, M. Chongsa-nguan, Y. Mahakunkijcharoen, T. Kalambaheti, Y. Sakolvaree, P. Naigowit, H. Kurazono, H. Hayashi: Diagnosis of human leptospirosis by Monoclonal antibody based-antigen detection in urine. J. Clin. Microbiol. 40 : 480-489, 2002.
- 2) Shirasaka, D., N. Aoyama, M. Sakashita, K. Kuroda, S. Maekawa, C. M. Wambura, M. Miyamoto, T. Tamura, K. Yahiro, A. Wada, H. Kurazono, T. Hirayama, M. Kasuga: Relationship between gastric ulcer and *Helicobacter pylori* VacA detected in gastric juice using bead-ELISA method. Helicobacter, 7: 281-286, 2002.
- 3) Karasawa, T., H. Ito, T. Tsukamoto, S. Yamasaki, H. Kurazono, S. M. Faruque, G. B. Nair, M. Nishibuchi, Y. Takeda: Cloning and characterization of gene encoding homologues of the B-subunit of Cholera toxin and the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin from clinical isolates of *Citrobacter freundii* and *E. coli*. Infect. Immun. 70: 7153-7155, 2002.
- 4) Ishitoya, S., S. Yamamoto, S. Kanamaru, H. Kurazono, T. Habuchi, O. Ogawa, A. Terai: Distribution of *afae* adhesins in *Escherichia coli* isolated from Japanese Urinary Tract Infection patients. J. Urol., in press, 2003.

図1. *Francisella tularensis*の系統分類学的位置

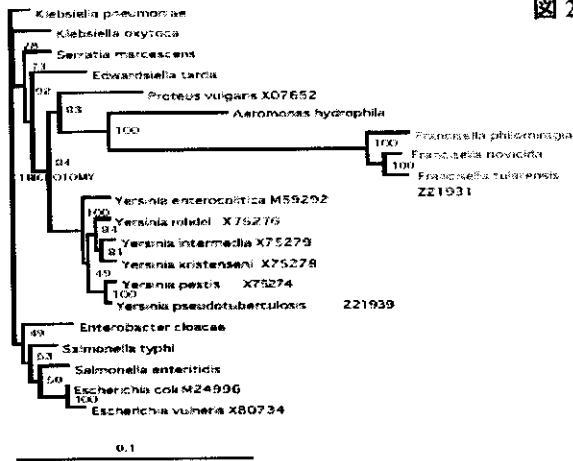


図2: PCR detection of MMP gene (Bacterial cells)

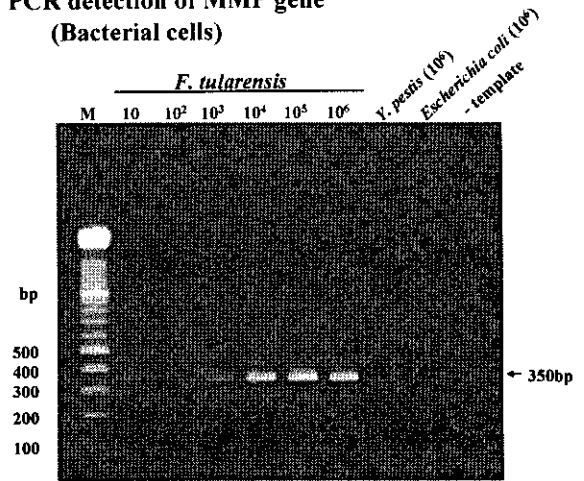


図3: PCR detection of MMP gene (genomic DNA)

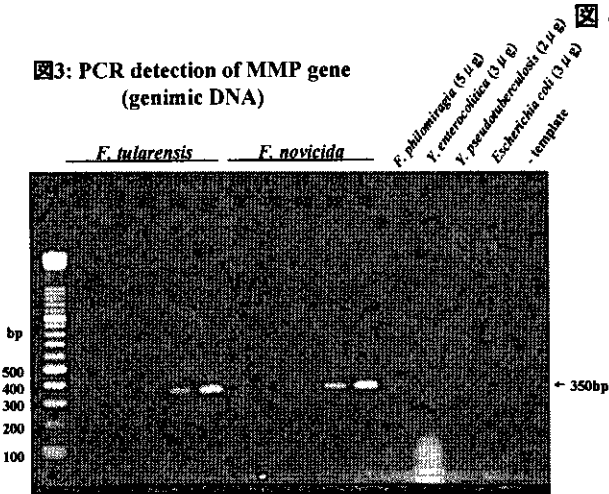


図4: PCR detection of FopA gene (Bacterial cells)

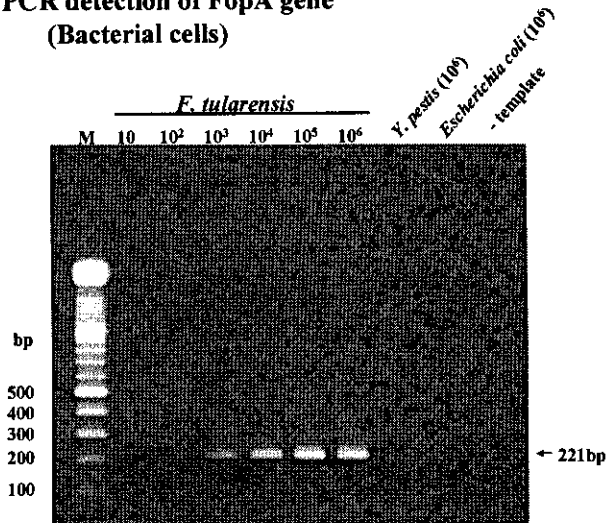


図5: PCR detection of FopA gene (genomic DNA)

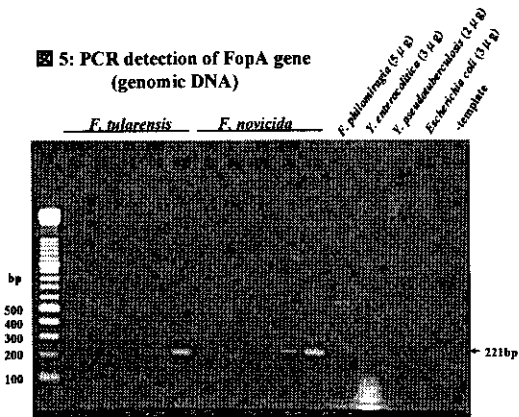


表1. *Francisella*属3つの菌種と*F. tularensis*の3つの亜種

	危険度	
	ドイツ	日本
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i>	3	3
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i>	3	3
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>mediasiatica</i>	2	3
<i>F. novicida</i>	2	2
<i>F. philomiragia</i> (<i>Yersinia</i> から移籍) 2		2

3. 鼻祖菌及び類鼻祖菌の検出と診断方法

分担研究者 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

研究要旨 *Burkholderia* 属の菌種は従来 Gamma Proteobacteria である *Pseudomonas* 属に分類されていたが、我々は 1993 年に 16S rDNA の系統解析から beta Proteobacteria に再分類し *Burkholderia* 属として独立させた (Yabuuchi, E., Y. Kosako, H. Oyaizu, I. Yano, H. Hotta, Y. Hashimoto, T. Ezaki, and M. Arakawa: 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol. Immunol.* 36:1251-1275.)。その際、*B. mallei* と *B. pseudomallei* は 90% 以上の染色体の類似度があり、分類学的に同一種であることを証明した。しかし *B. mallei* は鼻疽 (Glander) を *B. pseudomallei* は類鼻疽 (Meliodosis) と異なった病態を引き起こすことから、2つの菌種を一つにまとめるという提案を差し控え、今後の詳細な遺伝学的解析データの蓄積にゆだねると判断した。*B. mallei* は運動性が無く、*B. pseudomallei* は鞭毛を発現し運動性がある。最近の解析では *B. mallei* は *B. pseudomallei* と同じ配列の鞭毛遺伝子を保有するが、鞭毛を発現していない。*B. pseudomallei* は通常は亜熱帯から熱帯地方の土壌、水を中心に地球上に幅広く分布しているが、*B. mallei* は高度に動物に寄生し、進化の途中で運動性を失ったと推測される。遺伝学的に同一種であるにも係わらず、菌の集落、発育パターン、生化学性状も大きく異なっている。現在、*B. mallei*, *B. pseudomallei* のゲノム解析がほぼ終了しこの春その全ゲノム配列が決定され公開される事になっており両者の違いが遺伝子レベルでより詳細に解明できると期待している。

A. 研究目的

Burkholderia 属の菌種は従来 Gamma Proteobacteria である *Pseudomonas* 属に分類されていたが、我々は 1993 年に 16S rDNA の系統解析から beta Proteobacteria に再分類し *Burkholderia* 属として独立させた (Yabuuchi, E., Y. Kosako, H. Oyaizu, I. Yano, H. Hotta, Y. Hashimoto, T. Ezaki, and M. Arakawa. 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol. Immunol.* 36:1251-1275.)。その際、*B. mallei* と *B. pseudomallei* は 90% 以上の染色体の類似度があり、分類学的に同一種であることを証明した。しかし *B. mallei* は鼻疽 (Glander) を *B. pseudomallei* は類鼻疽

(Meliodosis) と異なった病態を引き起こすことから、2つの菌種を一つにまとめるという提案を差し控え、今後の詳細な遺伝学的解析データの蓄積にゆだねると判断した。

B. mallei は運動性が無く、*B. pseudomallei* は鞭毛を発現し運動性がある。最近の解析では *B. mallei* は *B. pseudomallei* と同じ配列の鞭毛遺伝子を保有するが、鞭毛を発現していない。*B. pseudomallei* は通常は亜熱帯から熱帯地方の土壌、水を中心に地球上に幅広く分布しているが、*B. mallei* は高度に動物に寄生し、進化の途中で運動性を失ったと推測される (図 1)。遺伝学的に同一種であるにも係わらず、菌の集落、発育パターン、生化学性状も大きく異なっている。現在、*B. mallei*, *B. pseudomallei* のゲノム解析がほぼ終了しこの春その全ゲノム配列が決定され公開される事になっており両者の違いが

遺伝子レベルでより詳細に解明できると期待している。

本研究では鼻疽/類鼻疽の検出法の開発を目的として行う。

B. 研究方法

1. 検出系の作成

現在の段階で *B. mallei* と *B. pseudomallei* の病原因子の詳細は解明されていないため病原因子を使った診断方法の作成が出来ない。古くからカプセルと LPS を失った株は病原性が低下するとされているが、その他の菌種で遺伝子レベルで特定されたものはまだ発表されていない。そこで 16Sr DNA 配列、鞭毛遺伝子、及び 30 kDa の膜蛋白抗原の 3 つを候補遺伝子として選択しその特異性を検討した。

① 候補遺伝子 1 : Flagellin 遺伝子

Forward:5CGGCAGGCACGCTGAGCTTC3

Reverse:5GTCGACGACAGCGCCTGGTT3

検出プローブ Probe:

5ATCAAGGTGGCGATCGACTCGAGCGGC
GCGGCCTGGTCGT-3.

Amplicon : 268 bp.

B. mallei は運動性は無いが運動性の遺伝子を保有していることが解明され、その配列は *B. pseudomallei* の鞭毛遺伝子配列とほぼ 100 %一致することが報告されておりこの配列から *B. mallei* と *B. pseudomallei* を同時に検出する primer を選択した。

② 候補遺伝子 2 : 30 kDa, protein antigen

(AF139591)

Forward:5ATAGCCACGCTCGAACACGG3

Reverse:5TTATCGGATGCCGGGCGCGC3

検出プローブ Probe:

5ACGGCAGTGCACGGTCCGCCGCCGCT
TCTCAAGGGCTT3

我々が *B. pseudomallei* に特異的なモノクローン抗体のスクリーニングをおこなった際にとれたクローンの配列から検出用の Primer を作成した。

Amplicon: 477 bp

③ 候補遺伝子 3 : 16S rDNA(AJ131790)

Forward:5'-CGGCGAAAGCCGGATTAATAC-3

Reverse:5'-CCACTCCGGGTATTAGCCAG-3'

検出プローブ Probe

5CCTTCGGGCCTCGCGCTATAGGGTTGGCC
GATGGCTGATT3

Amplicon: 325 bp

2. PCR 法

使用菌株 *B. pseudomallei* GTC 3p4, GTC 3p17, *B. mallei*, GTC3p3,系統的に近縁な *B. vietnamensis* GTC415, *B. cepacia*GTC 645 を使用した。また旧分類で所属していた *Pseudomonas aeruginosa* GTC274 を比較に使用した。

各菌種の DNA を精製後、下記の条件で PCR を行い特異性と感度を測定した。PCR の条件 ; 95 C、1 分、55 C、1 分、74 C、1 分、30 サイクル。

C. 結果

① 16S rDNA による遺伝子検出

B. pseudomallei, *B. mallei* はほぼ同じ 16S rDNA 遺伝子配列を保有している。PCR の primers も両方の菌種を増幅するものしかデザインができなかった。PCR の結果も予測どおり *B. mallei* と *B. pseudomallei* の両方のリボソームが増幅された。定量希釈では 200 f g まで検出する事が出来たので実用レベルの検出感度が得られた。

1990 年代からタイを中心に Arabinose の発酵が陰性の *B. pseudomallei* がタイの土壌から分離され、性状、コロニーの形態が類似することから Arabinose(-)の *B. pseudomallei* が報告されるようになった。この菌株は動物実験で病原性が弱く *B. pseudomallei* と明らかにことなっていた。この株の 16S rDNA 解析では *B. pseudomallei* と配列が 99%以上類似していたが、染色体 DNA の類似度が 70%以下であり、*B.thailandensis* と命名された。今後はこの菌種を入手し、特異性を評価する必要がある。また 野生株がこの primer で増幅できるか検証が必要であるが、菌株の輸入が困難であることから、次年度はタイから *B. pseudomallei* の野生株の DNA の供与をうけ、特異性の検証を実施する予定でいる。

② 鞭毛遺伝子

両菌種の表現形質の主な違いは運動性にある。*B. mallei* は運動性が無く、*B. pseudomallei* は運動性がある。この違いに着目して *B. pseudomallei* の鞭毛遺伝子から primer をデザインし PCR 法で増幅を行った。その結果、運動性の無い *B. mallei* から *B. pseudomallei* と全く同じ PCR 産物が得られた。

最近になって *B. mallei* には *B. pseudomallei* と同じ配列の鞭毛遺伝子が染色体上に存在することが報告された。鞭毛遺伝子の PCR の結果は両方の菌種以外のからも非特異バンドが検出された。しかし増幅産物のバンドが薄いこととサイズがことなることから識別は容易であると推測された。今後は産物を DNA プローブで識別する系を作成すれば確認出来る系が作成できると予測している。

③ 外膜蛋白遺伝子

蛋白遺伝子の PCR は使用した *Burkholderia* 属の全菌種、及び *Pseudomonas aeruginosa* から異なったバンドが出現したため検出には使用できないと判断した。この遺伝子は *B. mallei*, *B. pseudomallei* とだけ反応するモノクローン抗体を検索中に発見し、遺伝子配列を決定した経緯がある。そのことから *B. mallei*, *B. pseudomallei* に特異的遺伝子であると予測して Primer を作成した。遺伝子情報の少ない *B. pseudomallei* に対する特異抗原を作る際にこの遺伝子産物を使用して抗体の検出系を作成する計画でいたので失望を隠せない。ただし、この4月に全ゲノム解析の結果が公表されるのでそのデータを基に特異的な抗原遺伝子をデザイン出来ると考えている。

D. 考 察

B. mallei と *B. pseudomallei* を検出するための primer として 16S rDNA と鞭毛遺伝子が有効であることが証明された。ただし鞭毛遺伝子に関しては PCR 産物をさらに確認するために内部の特異プローブを使用して *B. cepacia* など類縁の菌種と識別する必要があった。

環境には記載されていない細菌が数百万種類存在するといわれている。ところが分類学で記載された細菌種は 5000 種類にすぎない。16S rDNA だけで検出系を組むと未知の非病原体を検出する可能性も否定できない。そこで複数の遺伝子を使った検出方法が必要になる。

また疾病の診断にあたって病原体を予測することは極めて困難である。生物テロに対応できる迅速検査を行うには、可能性のある検査を一度に網羅的に実施し、判断しなければならない。レベル3の病原体を網羅的に検出する multiplex PCR 法や増幅産物を確認する DNA マイクロアレイを組み合わせる方法がこの目的には適している。

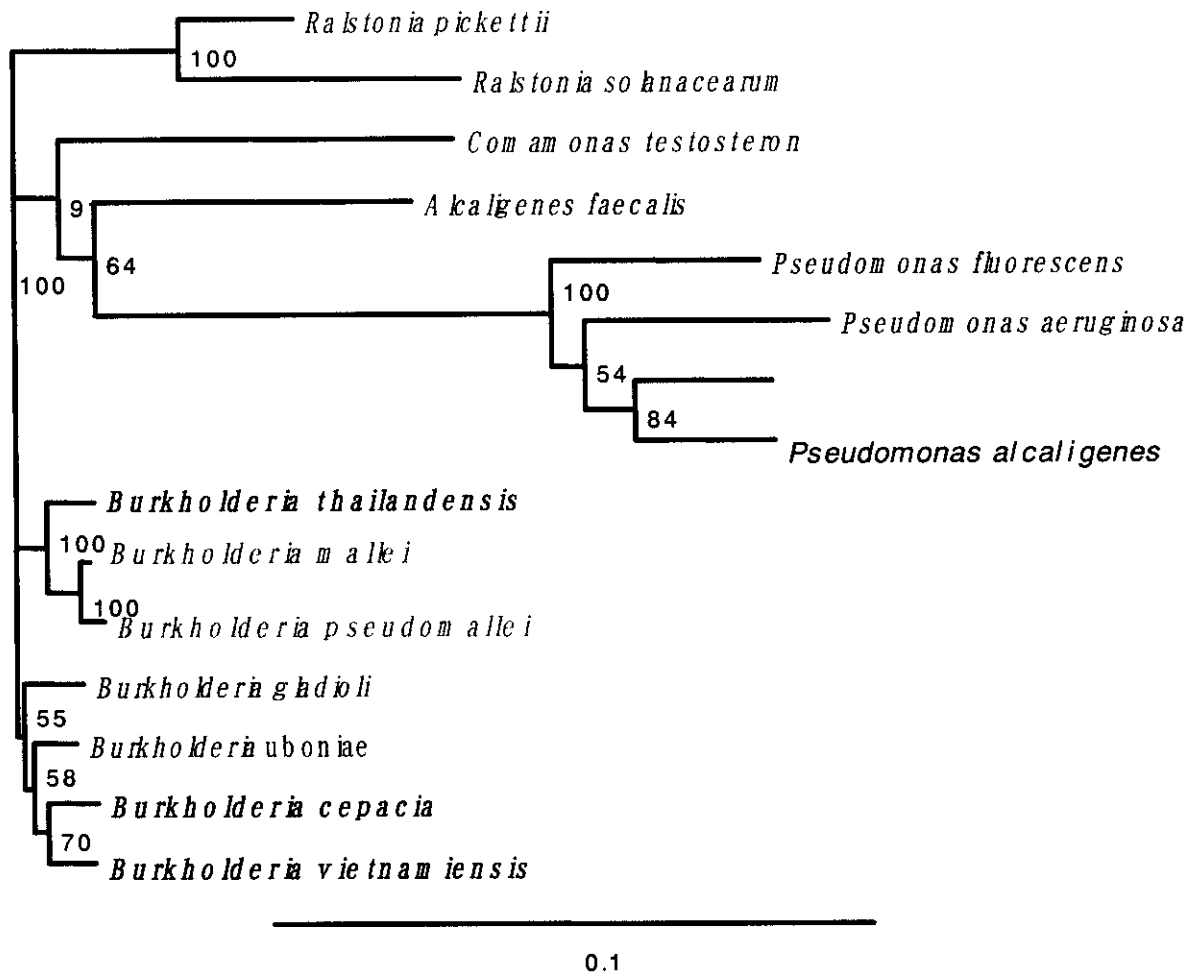
遺伝子診断は感染症の初期には有効であるが、東南アジアの類鼻疽の感染症は殆どが慢性感染症である。そのため既に化学療法を受けている患者が多く、遺伝子診断を行うには遅すぎる。肺膿瘍、骨髄炎など診断材料を採取することが困難で菌株の分離も化学療法を開始するのでむずかしい。このような患者には抗体を測定する血清診断が最も有効である。現在、東南アジアで行われている方法は培養液から部分精製した Melioidin といわれる抗原（混合抗原）及び全菌体を使った抗体測定が中心で *B. cepacia* との交差反応も多く特異的な血清診断ではない。Western blotting で特異抗体を測定する方法もあるが実用的ではないため、より簡便な方法で抗体の計測方法を確立する必要がある。

次年度の目標としてレベル3の病原体に対する抗体を網羅的に計測する抗体アレイ、或いはビーズアレイの作成も重要な目標であると考えている

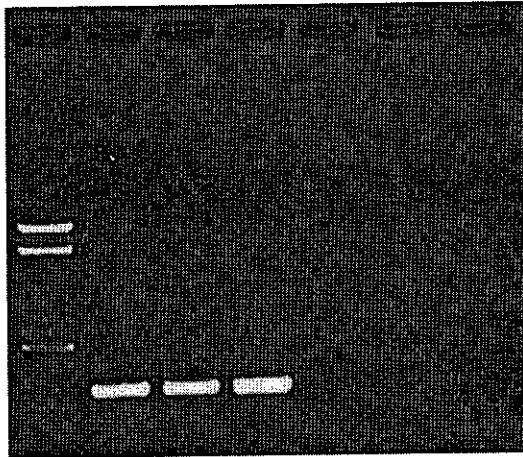
E. 結 論

鼻疽/類鼻疽の検出法として PCR 法が有効であることが証明された。今後は、抗体調査も含め、さらに有効な方法を PCR 法の改良も含め検討すべきである。

図1. 類鼻疽、鼻疽菌の系統分類学的位置 (16S rDNA の系統樹)



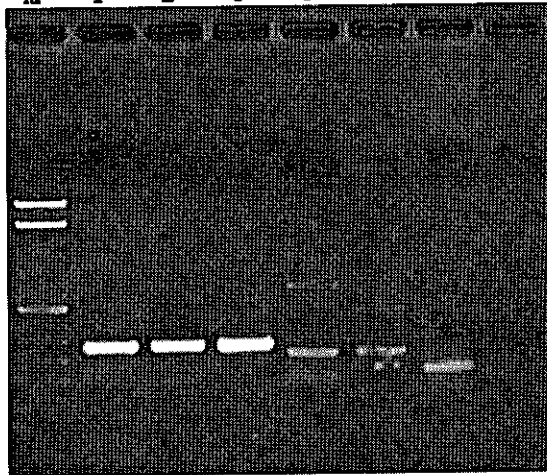
M 1 2 3 4 5 6



1. *B. mallei*
2. *B. pseudomallei*
3. *B. pseudomallei*
4. *B. vietnamensis*
5. *B. cepacia*
6. *P. aeruginosa*

16S rDNA Primers

M 1 2 3 4 5 6 7



1. *B. mallei*
2. *B. pseudomallei*
3. *B. pseudomallei*
4. *B. vietnamensis*
5. *B. cepacia*
6. *P. aeruginosa*
7. Negative

Flagellin 遺伝子のPCR

1. 臨床班小括研究報告書

研究要旨 バイオテロに用いられる危険病原体によって惹起される感染症は、第一線で診療に当たる一般臨床医が経験していないものである。危険病原体による感染症について、その臨床像や治療法を取りまとめ、マニュアルを作るためのたたき台を作成した。

岩本 愛吉	東京大学医科学研究所	教授
山口 恵三	東邦大学医学部	教授
河野 茂	長崎大学大学院	教授
大西 健児	東京都立墨東病院	部長
角田 隆文	東京都立荏原病院	部長
賀来 満夫	東北大学大学院	教授
相楽 裕子	横浜市民病院	部長
吉開 泰信	九大生体防御医学研究所	教授
中村 修	慶応大学	助教授

A. 研究目的

バイオテロに用いられる微生物は危険病原体であり、稀な疾患が多い。従って、多くの臨床医は経験がない。最初に患者を診療する医師がバイオテロ関連疾患ときづかなければ発生を把握することさえできない。また感染拡大防止においても臨床医の診断と治療に関する役割は大きい。そのためにもバイオテロ感染疾患と考えられている疾患の臨床診断、検査材料の選択そして治療法の選択について多くの医師が最新の知識を得ておくことが必要である。そのため関連する情報を把握し、臨床診断マニュアルとしてまとめ、普及しておくことが重要である。また実際に検査や治療について検査研究部門と密接な連携を持つ必要がある。これらの最新情報を含めて治療マニュアルの作成を目指し、本年度はそのたたき台となる資料収集を行った。

B. 研究方法

文献や出席した学会の情報をもとに情報収集を行い、臨床像、治療法等につき分担し、まとめた。

(倫理面への配慮)

文献などの情報検索と経験に基づく知見をまとめることを目的としており、倫理的な拝領を必要とする内容を含んでいない。

C. 研究結果

ウイルス疾患（天然痘、エボラ出血熱などのウイルス性出血熱、ハンタウイルス感染症、狂犬病、ニパウイルス脳炎、ウエストナイルウイルス）、細菌疾患（炭疽、野兔病、鼻疽、類鼻疽）、真菌疾患（コクシディオイデス症）、リケッチア・クラミジア疾患（Q熱、オーム病、恙虫病）、毒素（ボツリヌス毒素、リシン、カビ毒、フグ毒、麻痺性貝毒、ブドウ球菌腸毒素B、コノトキシン）などに関し、疫学、臨床像、治療法、予防法などについて文献や学会情報を用いて検索し、まとめた。

ワクチンで予防可能な疾患、邦人の治療量に関する検討を行った。

D. 考 察

以上、大規模なバイオテロに用いる生物兵器として最も重要なものは、炭疽菌と痘瘡ウイルスだと考えられているが、より幅広く危険病原体とその感染症について一般臨床医に情報提供することが必要である。

E. 結 論

バイオテロに使用される危険性のある危険病原体について、臨床症状、治療などにつき取りまとめた。今後、これをたたき台としてマニュアルを作成する。

F. 健康危険情報

該当しない。

G. 研究発表

1 論文発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

- 1) Yamamoto, Y., Takasaki, T., Yamada, K., Kimura, M., Washizaki, K., Yoshikawa, H., Hitani, A., Nakamura, T. and Iwamoto, A. A case of acute disseminated encephalomyelitis secondary to dengue fever. J. Infect. Chem. 8:175-177, 2002.
- 2) Nakamura, H., Nakamura, T., Suzuki, M., Minamoto, F., Oyaizu, N., Shiba, T., Miyaji, M, and Iwamoto, A. A case of disseminated coccidioidomycosis with intra- and para-vertebral abscesses. J. Infect. Chem. 8: 178-181, 2002.
- 3) Koibuchi, T., Takahashi, T., Nakamura, T., Suzuki, M., Minamoto, F., Oyaizu, N., Yazawa, K., Mikami, Y., and Iwamoto, A. The first isolation of *Nocardia nova* from an HIV-1 infected individual in Japan. J. Infect. Chemother. 8:358-360, 2002
- 4) Endo, T., Miura, T., Koibuchi, T., Nakamura, H., Takahashi, T., Odawara, T., Goto, M., Ajisawa, A., Iwamoto, A., and Nakamura, T. Molecular analysis of human herpesvirus 8 using single nucleotide polymorphisms in open reading frame 26. J. Clin. Microbiol. In press.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし