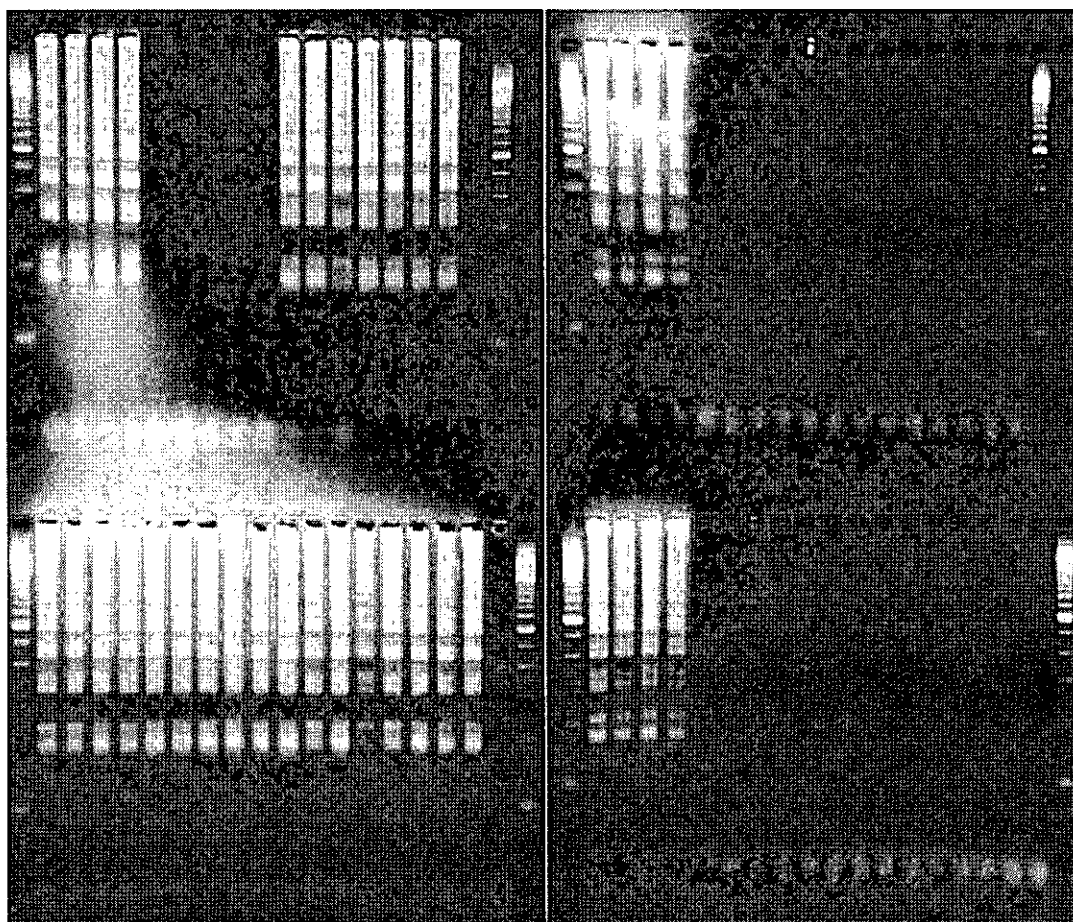


Fig. 2) LAMP 法の特異性

inv

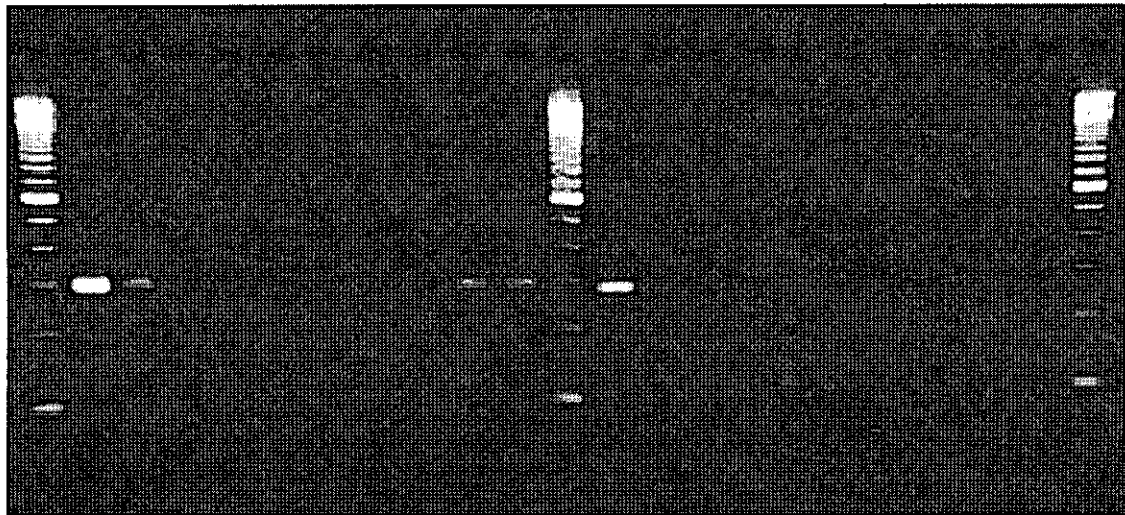
3a



| 上 段                  |                   | 下 段                 |                    |
|----------------------|-------------------|---------------------|--------------------|
| 1. A1122 (1ug/ml)    | 10. Verpoest, 1a+ | 1. A1122 (1ug/ml)   | 10. 141,7+         |
| 2. A1122 (0.1ug/ml)  | 11. Pa3603, 1b+   | 2. A1122 (0.1ug/ml) | 11. R7081y, 9-     |
| 3. Yreka (1ug/ml)    | 12. 麓谷-2, 1c-     | 3. Yreka (1ug/ml)   | 12. OK6088, 10+    |
| 4. Yreka (0.1ug/ml)  | 13. 319, 2a+      | 4. Yreka (0.1ug/ml) | 13. R1505, 11-     |
| 5. Pa4401, 03:B3     | 14. 366, 2b+      | 5. W1a965-1, 4a+    | 14. MW900-3, 12-   |
| 6. Pa263, 03:B4      | 15. 人見(274), 2c+  | 6. 212, 4b+         | 15. N916, 13-      |
| 7. SW13730, 05,27:B2 | 16. PT112, 3+     | 7. 479, 5a+         | 16. CN3, 14-       |
| 8. Pa12986, 08:B1B   | 17. Sample(-)     | 8. 197, 5b+         | 17. SP-940613, 15+ |
| 9. Pa177, 09:B2      |                   | 9. DD110, 6+        | 18. Sample(-)      |

注： 図中の 1 ug/ml 等はサンプル濃度を示す。1ug/ml = 2.5ng/assay となる。

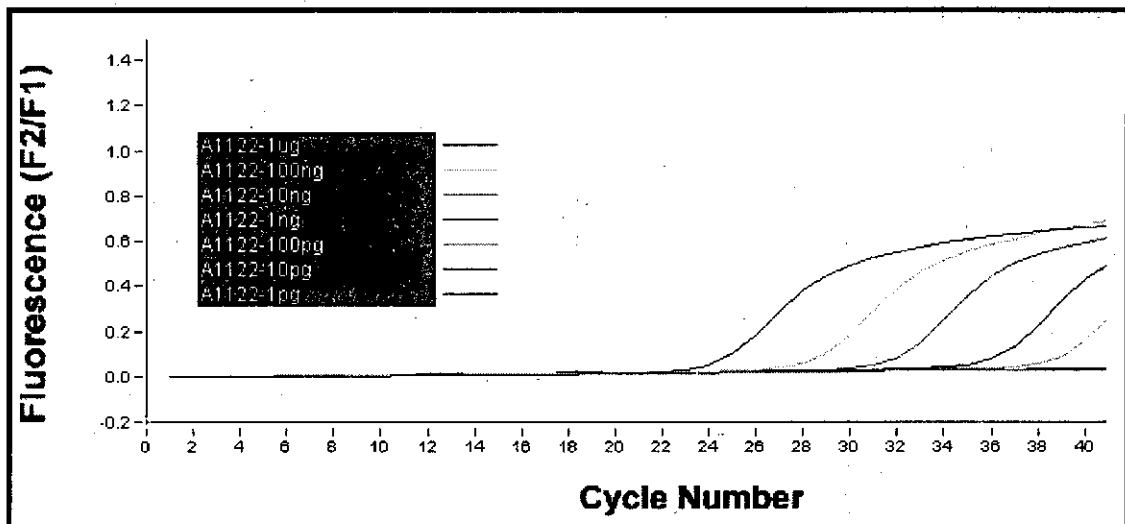
Fig. 3a) *Y. pestis* の検出感度の比較 (PCR 法)



| 左:inv          | 右:41.7                  |
|----------------|-------------------------|
| M. Size Marker |                         |
| 1. A1122 (1ug) | 6. 10pg                 |
| 2. 100ng       | 7. 1pg                  |
| 3. 10ng        | 8. Pa177, O9:B2 (100ng) |
| 4. 1ng         | 9. 319, 2a+ (100ng)     |
| 5. 100pg       | 10. 212, 4b+ (100ng)    |

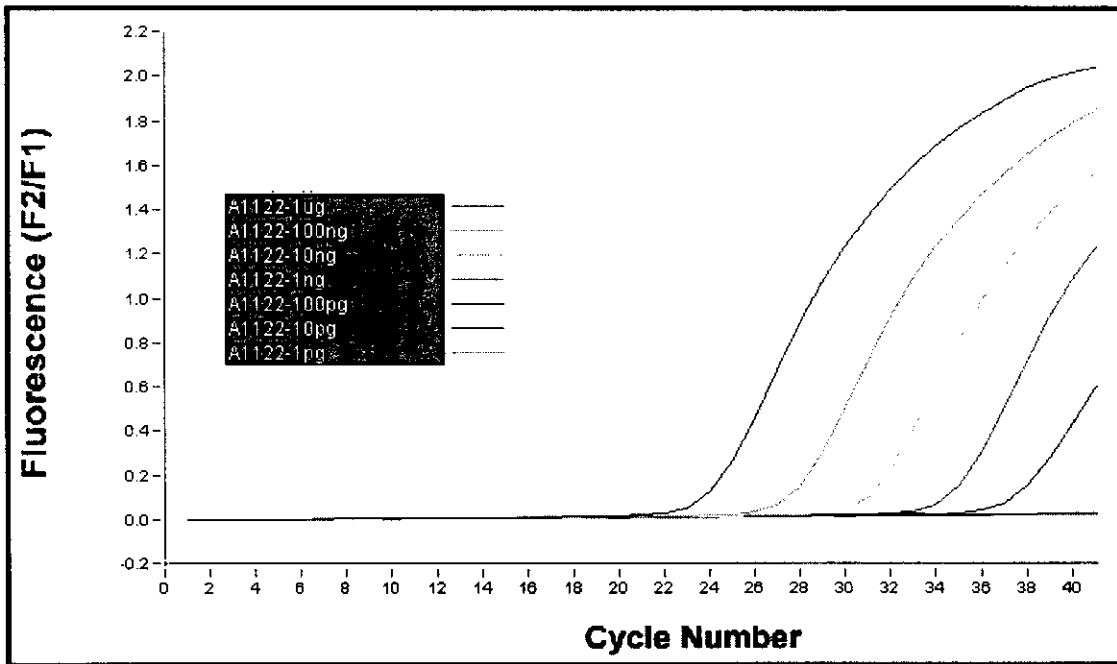
注： 図中の 1 ug/ml 等はサンプル濃度を示す。1ug/ml = 2.5ng/assay となる。

Fig. 3b) *Y. pestis* の検出感度の比較 (LC) (inv)



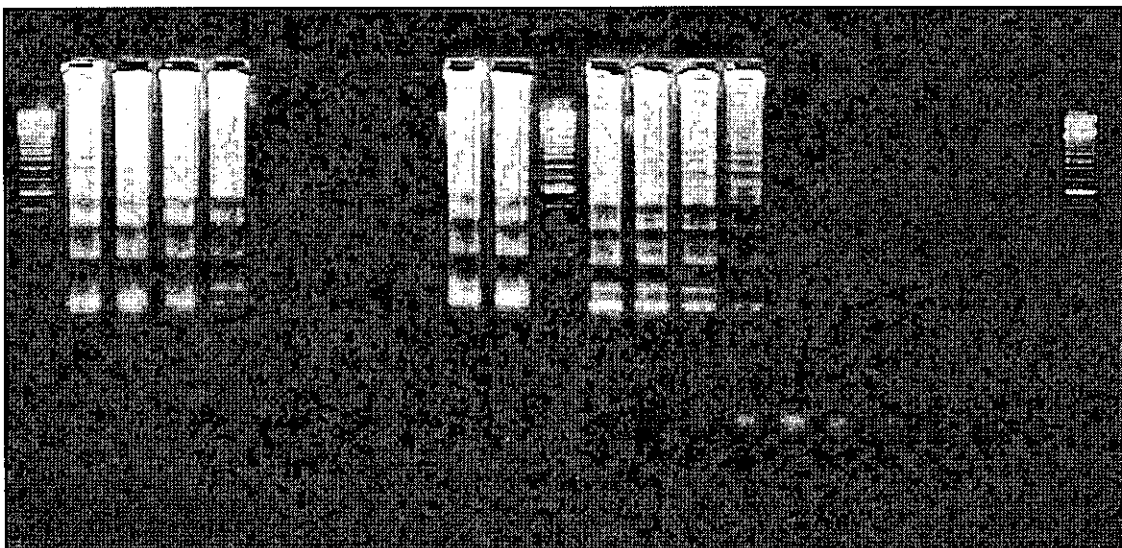
注： 図中の 1 ug/ml 等はサンプル濃度を示す。1ug/ml = 2ng/assay となる。

Fig. 3c) *Y. pestis* の検出感度の比較 (LC) (41.7kb)



注： 図中の 1 ug/ml 等はサンプル濃度を示す。1ug/ml = 2ng/assay となる。

Fig. 3d) *Y. pestis* の検出感度の比較 (LAMP 法)



| 左: inv         | 右: 41.7                 |
|----------------|-------------------------|
| M. Size Marker |                         |
| 1. A1122 (1ug) | 6. 10pg                 |
| 2. 100ng       | 7. 1pg                  |
| 3. 10ng        | 8. Pa177, O9:B2 (100ng) |
| 4. 1ng         | 9. 319, 2a+ (100ng)     |
| 5. 100pg       | 10. 212, 4b+ (100ng)    |

注： 図中の 1 ug/ml 等はサンプル濃度を示す。1ug/ml = 2.5ng/assay となる。

Table 1) 3 種類の方法による *Yersinia* 属菌の検出

|    | 菌株   | PCR |      | Light-Cycler |      | LAMP |      |
|----|--|-----|------|--------------|------|------|------|
|    |  | inv | 41.7 | inv          | 41.7 | inv  | 41.7 |
| Y. | A1122  | +   | +    | +            | +    | +    | +    |
| p  | Yreka (vaccine strain)   | +   | +    | +            | +    | +    | +    |
| e  | Yreka (pgm+のみ)   | +   | +    | +            | +    | +    | +    |
| s  | Yreka (VW-)  | +   | +    | +            | +    | +    | +    |
| t  | Yreka (pgm-, VW+, F1, pst+)                                    | +   | +    | +            | +    | +    | +    |
| i  | Yreka (pgm-, VW-)  | +   | +    | +            | +    | +    | +    |
| s  | M140 (pgm+のみ)  | +   | +    | +            | +    | +    | +    |
| Y. | Verpoest, 1a+  | +   | -    | +            | -    | +    | -    |
| p  | Pa3606, 1b+  | +   | -    | +            | -    | +    | -    |
| s  | 融谷-2, 1c-  | +   | -    | +            | -    | +    | -    |
| e  | 319, 2a+   | +   | -    | +            | -    | +    | -    |
| u  | 366, 2b+   | +   | -    | +            | -    | +    | -    |
| d  | 人見 (274), 2c+  | +   | -    | +            | -    | +    | -    |
| o  | PT112, 3+  | +   | -    | +            | -    | +    | -    |
| t  | W1a965-1, 4a+  | +   | -    | +            | -    | +    | -    |
| u  | 212, 4b+   | +   | -    | +            | -    | +    | -    |
| b  | 479, 5a+   | +   | -    | +            | -    | +    | -    |
| e  | 197, 5b+   | +   | -    | +            | -    | +    | -    |
| r  | 00110, 6+  | +   | -    | +            | -    | +    | -    |
| c  | 141, 7-  | +   | -    | +            | -    | +    | -    |
| u  | R7081y, 9-   | +   | -    | +            | -    | +    | -    |
| i  | OK6088, 10+  | +   | -    | +            | -    | +    | -    |
| o  | R1505, 11-   | +   | -    | +            | -    | +    | -    |
| s  | W9900-3, 12-   | +   | -    | +            | -    | +    | -    |
| i  | MS16, 13-  | +   | -    | +            | -    | +    | -    |
| s  | OK3, 14-   | +   | -    | +            | -    | +    | -    |
|    | SP-940613, 15+   | +   | -    | +            | -    | +    | -    |
| Y. | Pa2369, O3:B3  | -   | -    | -            | -    | -    | -    |
| en | Pa4401, O3:B3  | -   | -    | -            | -    | -    | -    |
| te | Pa241, O3:B4   | -   | -    | -            | -    | -    | -    |
| ro | Pa263, O3:B4   | -   | -    | -            | -    | -    | -    |
| co | Pa9571, O5,27:B2   | -   | -    | -            | -    | -    | -    |
| li | SW13730, O5,27:B2  | -   | -    | -            | -    | -    | -    |
| ti | WA, O8:B1B   | -   | -    | -            | -    | -    | -    |
| ca | Pa12966, O8:B1B  | -   | -    | -            | -    | -    | -    |
|    | Pa177, O9:B2   | -   | -    | -            | -    | -    | -    |
|    | <i>Brucella abortus</i> 1, 125                                 | -   | -    | -            | -    | -    | -    |
|    | <i>Brucella canis</i> , OE13                                   | -   | -    | -            | -    | -    | -    |
|    | <i>Brucella melitensis</i> 1, 16M                              | -   | -    | -            | -    | -    | -    |
|    | <i>Brucella suis</i> 1, 1330                                   | -   | -    | -            | -    | -    | -    |
|    | <i>Francisella tularensis</i> , LVS                            | -   | -    | -            | -    | -    | -    |
|    | <i>Haemophilus influenzae</i> typeB, ATCC10211                 | -   | -    | -            | -    | -    | -    |
|    | <i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> , ATCC10603 | -   | -    | -            | -    | -    | -    |
|    | <i>Pasteurella aerogenes</i> , ATCC27883                       | -   | -    | -            | -    | -    | -    |
|    | <i>Coxiella burnetii</i> , Nine Mile                           | -   | -    | -            | -    | -    | -    |
|    | <i>Escherichia coli</i> , DH5 alpha                            | -   | -    | -            | -    | -    | -    |
|    | <i>Ochrobactrum anthropi</i> , ATCC49187                       | -   | -    | -            | -    | -    | -    |
|    | <i>Ochrobactrum anthropi</i> , ATCC49687                       | -   | -    | -            | -    | -    | -    |
|    | <i>Bacillus anthracis</i>                                      | -   | -    | -            | -    | -    | -    |
|    | <i>Bacillus cereus</i>   | -   | -    | -            | -    | -    | -    |
|    | <i>Bacillus subtilis</i>                                       | -   | -    | -            | -    | -    | -    |
|    | <i>Listeria monocytogenes</i> , ATCC15315                      | -   | -    | -            | -    | -    | -    |
|    | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , ATCC27294                  | -   | -    | -            | -    | -    | -    |
|    | <i>Staphylococcus aureus</i> ssp <i>aureus</i> , ATCC29247     | -   | -    | -            | -    | -    | -    |

### 3. 耐性菌の検出と診断法の確立

#### ニューキノロン耐性チフス菌・パラチフス A 菌のスクリーニング法の開発

分担研究者 渡辺 治雄 国立感染症研究所細菌第一部 部長

協力研究者 廣瀬 健二 国立感染症研究所細菌第一部 主任研究官

研究要旨 バイオテロに関連する病原体、特にペスト菌が薬剤耐性菌であるかどうかを迅速に検出することは、治療面において大変重要である。効果が期待できる薬剤の代表的なものには、ニューキノロン系薬剤がある。しかし今までに、ニューキノロン系薬剤に耐性を示すペスト菌の報告はない。ニューキノロン系に対する耐性遺伝子としては DNA gyrase (*gyrA*, *gyrB*) および topoisomerase (*parC*, *parE*) が知られているので、今回の実験ではチフス菌のニューキノロン系薬剤に対する耐性菌を迅速に検出するスクリーニング法の開発を行った。ニューキノロン系への耐性機序は菌種を超えて共通性があるので、ペスト菌に対しても応用可能と考えられる。

#### A. 研究目的

バイオテロリズムに使用されると想定されている微生物は、その重要度に応じてカテゴリーA,B,Cに分けられている。腸チフス、パラチフスの原因菌であるチフス菌・パラチフス A 菌などの食品や水で媒介される病原体もカテゴリーBの中に含まれている。使用される可能性のある病原体には、あらかじめ病原体の検出、診断、治療、予防に関する研究をまとめておく必要がある。また、遺伝子を改変し薬剤に耐性を持つ細菌が使用される可能性もある。現実使用される病原体を予知することは不可能なので、現行の疾患サーベイランスと発生時対策にバイオテロに対する対策の準備を連携させることは不可欠である。本研究では、バイオテロで使用される可能性が考えられる腸チフス・パラチフスの耐性菌であるニューキノロン耐性チフス菌・パラチフス A 菌を従来の培養方法より迅速にスクリーニングする方法を開発し、その有用性を検討した。

#### B. 研究方法

ニューキノロン耐性チフス菌・パラチフス A 菌は臨床分離株にないため耐性を誘導することで作製した。ニューキノロン耐性菌は、感受

性菌を低濃度 (0.002 $\mu$ g/ml) のシプロフロキサシンを含むLブロスに接種し、この濃度に発育した菌をさらに2倍濃度のシプロフロキサシンを含むLブロスで培養することを繰り返し、耐性菌を得た。耐性菌のシプロフロキサシンのMICは4 $\mu$ g/ml以上であった。

1組のプライマー *gyrA*-F: 5'-TGT CCG AGA TGG CCT GAA GC-3', *gyrA*-*Hin*fl-R :5'-ATG TAA CGC AGC GAG AAT GGC TGC GCC ATA CGA ACG CTG GAG-3' を使用して PCR 法で *gyrA* 遺伝子のキノロン耐性決定領域を増幅する。PCR プロダクト 10 $\mu$ l と制限酵素 *Hin*fl 1 $\mu$ l を混合し 1 時間 37 $^{\circ}$ C でインキュベートする。その後、その 10 $\mu$ l を 15%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動する。泳動後、エチジウムブロマイドで染色し写真を撮る。感受性株では、137, 43, 15 bp の 3 本、耐性株は 195 bp の 1 本、83 番変異の低感受性株は 152, 43 bp の 2 本、87 番変異の低感受性株は 137, 58 bp の 2 本のバンドが見られる。

#### C. 研究結果

本研究では、ニューキノロン耐性菌を迅速にスクリーニングするための方法を PCR-RFLP という方法を用いて開発した。この方法は、ニ

ニューキノロン剤の感受性を決定している DNA ジャイレース (*gyrA*) のキノロン耐性決定領域に含まれる点突然変異の場所 (83 番、87 番) を特定する方法である。この方法を用いて、あらかじめキノロン耐性決定領域の塩基配列を決定し突然変異の場所が既知のニューキノロン耐性菌とニューキノロン低感受性菌約 30 株で変異のパターンが決定できるかを調べたところ、試験したすべての株で変異の入っている場所を正確に特定することができた。さらに、ニューキノロン剤の感受性が不明の臨床分離株を用いて同様な実験を行ったところ、切断パターンによってニューキノロン耐性株、ニューキノロン低感受性株、ニューキノロン感受性株の区別もすることができた。この方法により選択分離培地上にコロニーが発育してから、ニューキノロン感受性株、低感受性株、耐性株のスクリーニングをわずか 3 時間程度の短時間ですることができた。

#### D. 考 察

バイオテロリズムでサルモネラ、赤痢菌、腸管出血性大腸菌 O157 などの食品や水で媒介される病原体が現実使用される可能性は少ないと考えられる。しかしながら、これらの腸管病原性細菌は比較的入手が簡単であるためバイオテロに使用される可能性は捨てきれない。また、腸内細菌は遺伝子組み換えが比較的容易にできるために、遺伝子組み換えなどの手法で腸内細菌に薬剤耐性遺伝子や病原性を増強するような遺伝子を組み込んだ細菌を作製しバイオテロに使用される可能性も考えられる。このようなことから、本研究のような薬剤耐性菌の迅速なスクリーニング法は、耐性遺伝子を調べることで容易に薬剤の感受性が判定でき従来の培養方法よりはるかに短時間で判定できる方法であるため、感受性の判定に緊急性を要するときに非常に有用であると考えられる。また、この成果は、腸チフス・パラチフス治療においても、適切な抗生物質の選択に大いに貢献できると考えられる。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

Hirose, K., Tamura, K., and Watanabe, H. Screening method for *Salmonella enterica* serovar Typhi and Paratyphi A with reduced susceptibility to fluoroquinolone by PCR-restriction fragment length polymorphism. *Microbiol. Immunol.* 47:161-165, 2003.

## 4. Polymerase chain reaction (PCR) 法およびリアルタイム PCR 法によるオルソポックスウイルス感染症の診断

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 西條 政幸、倉根 一郎 (国立感染症研究所ウイルス第一部)  
長谷川秀樹 (国立感染症研究所感染病理部)

研究要旨 近年、天然痘 (痘そう、variola) ウイルスが用いられたバイオテロリズムの危険性が指摘され、また、アフリカ大陸にのみ発生が認められていたサル痘が、2003 年に米国で流行した。そのため天然痘やサル痘 (monkeypox) の迅速診断の必要性が高まっている。Variola ウイルス、monkeypox ウイルス、オルソポックス属ウイルス、および、ワクシニア (vaccinia) ウイルスにそれぞれ特異的プライマー (それぞれ Var1/2, Gabon-1/-2, ATI-up-1/low-1, Vac1/2) を用いた polymerase chain reaction (PCR) 法および variola ウイルスゲノムを特異的に検出するためのリアルタイム PCR 法を整えた。これらのウイルスゲノム検出法の精度や感度を、variola ウイルスを含むオルソポックス属ウイルスゲノムを用いて評価した。リアルタイム PCR 法は PCR 法に比べて 10~10,000 倍の感度を示した。Variola ウイルスおよび monkeypox ウイルス特異的プライマーを用いた PCR 法により、それぞれ特異的に variola ウイルスと monkeypox ウイルスのゲノムが増幅された。オルソポックス属ウイルス共通プライマーおよび vaccinia ウイルス特異的プライマーを用いた PCR では、variola, monkeypox, 牛痘 (cowpox), キャメルポックス (camelpox), vaccinia, ectromeria ウイルスすべてのゲノムが増幅された。リアルタイム PCR 法や PCR 法による天然痘とサル痘の診断は、迅速であり、かつ、特異的である。さらにリアルタイム PCR 法は、PCR 法に比較してより高感度である。

### A. 研究目的

天然痘 (痘そう、variola) ウイルスは、天然痘の病原体で、バイオテロリズムに用いられる危険性のある病原体のひとつである。世界保健機構 (WHO) による天然痘根絶宣言 (1980 年) 以後に、世界中に保管されていた variola ウイルスが米国とロシアにある研究所に集められ、保管されている。それらの研究所から非合法的に流失した、または、両国に集積されないまま保管されていた variola ウイルスがバイオテロリズムに用いられるという危険性に備えるため、オルソポックス属ウイルスのゲノム増幅による天然痘の診断法を備え、平成 14 年度の本研究の報告書にその研究成果を報告した。今年度は、オルソポックス属ウイルスのゲノム増幅による診断法 (PCR 法とリアルタイム PCR)

の精度と感度、問題点等を、variola, monkeypox, cowpox, camelpox, vaccinia, ectromeria ウイルスの遺伝子を用いて検討した。

### B. 研究方法

オルソポックス属ウイルス遺伝子：米国疾病予防センター (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA) のポックス部門で調整された variola (12 株)、サル痘 (monkeypox, 2 株)、牛痘 (cowpox, 2 株)、キャメルポックス (camelpox, 1 株)、ワクシニア (vaccinia, 3 株)、エクトロメリア (ectromeria, 1 株) ウイルスの遺伝子、および、非ポックスウイルス遺伝子 (水痘带状疱疹ウイルスや単純ヘルペスウイルス、黄色ブドウ球菌など) を用いた。

**PCR 法：** Variola ウイルス特異的 PCR は、VAR1 (CAT ACA GTC ACA GAC ACT GTC TC)、VAR2 (GTA GAT GGT TCA TTA TCA TTG TG) の HA 遺伝子を標的としたプライマーセットを用いて、[94°C, 40 秒/55°C, 40 秒/72°C, 40 秒] x 40 サイクルの条件で行った。Vaccinia ウイルス特異的 PCR は、VAC1 (ATG CAA CTC TAT CAT GTA A)、VAC2 (CAT AAT CTA CTT TAT CAG TG) の ATI 遺伝子を標的としたプライマーセットを用いて、[94°C, 1 分/50°C, 1 分/72°C] x 30 回の条件で行った。Monkeypox ウイルス特異的 PCR は、A-type inclusion body (ATI) 遺伝子を標的とした Gabon-1 (GAG AGA ATC TCT TGA TAT) と Gabon-2 (ATT CTA GAT TGT AAT C) によるプライマーセットを用いて、[94°C, 1 分/36°C, 1 分/72°C, 1 分] x 30 回の条件で、オルソポックス属ウイルス共通 PCR は、ATI 遺伝子を標的とした ATI-up-1 (AAT ACA AGG AGG ATC T) と ATI-low-1 (CTT AAC TTT TTC TTT CTC) によるプライマーセットを用いて、[94°C, 1 分/50°C, 1 分/72°C, 1 分] x 30 回の条件で行った。得られた PCR 反応液を、2%アガロースゲル電気泳動法で分け、そのゲルを etidium bromide 染色液で処理し、PCR 産物を検出した。

**リアルタイム PCR：** Variola ウイルスの HA 遺伝子を標的としたプライマーセットおよびハイブリダイゼーションプローブを用いて、Light Cycler-PCR (Roche Diagnostics 社、Mannheim、ドイツ) を用いて行った。

### C. 研究結果

1. PCR 法によるウイルスゲノム検出： Variola ウイルス特異的 PCR 陽性を呈したサンプルはすべて variola ウイルスゲノムであった。調べられた variola ウイルス 12 株すべてが陽性を呈した。また、monkeypox ウイルス特異的 PCR 陽性を呈したサンプル (4 サンプル) は、すべて monkeypox ウイルスゲノムであった。つまり、variola ウイルス特異的 PCR と monkeypox ウイルス特異的 PCR の特異性は高い。一方、オルソポックス属ウイルス共通プライマーおよび vaccinia ウイルス特異的プライ

マーを用いた PCR では、variola, monkeypox, cowpox, camelpox, vaccinia, ectromeria ウイルスすべてのゲノムが増幅された。

2. リアルタイム PCR 法によるウイルスゲノム検出： リアルタイム PCR 法によっても、12 株のすべての variola ウイルスゲノムが検出された (図 2)。このリアルタイム PCR 法では最少 2~20fg の variola ウイルスゲノムの検出が可能であった。これは、ウイルスゲノム 10-100 copies に相当する。しかし、vaccinia, ectromeria, cowpox, camelpox ウイルスのゲノム量が 200,000~2,000,000 fg と比較的大量の場合、本リアルタイム PCR 法は陽性を呈した。ただし、リアルタイム PCR 法において、反応温度と蛍光シグナルの変化の関係を解析すると、つまり melting curve にその関係を示すことにより、variola ウイルスによる陽性シグナルをオルソポックス属ウイルスの他のウイルスによる陽性シグナルから区別することが可能であった。

3. PCR 法とリアルタイム PCR 法の感度の比較： 表 1 に variola ウイルスのゲノム量と variola ウイルス特異的 PCR 法、リアルタイム PCR 法の成績の関係を提示する。この例では、サンプルが 400,000fg 以上ゲノム量の場合に variola ウイルス特異的 PCR 法で陽性を呈した。一方、リアルタイム PCR 法では 40fg 以上のゲノムを含む検体が、陽性を呈した。この場合では、PCR 法に比較してリアルタイム PCR 法は 10,000 倍以上の高い感度を示している。このように variola ウイルス 12 株すべてを検討したところ、リアルタイム PCR 法では、PCR 法に比較して 10~10,000 倍の高い感度で variola ウイルスゲノムを検出できることが明らかにされた。

### D. 考察

本研究で得られた成績の重要な事項は、(1) リアルタイム PCR および variola ウイルス特異的 PCR 法の特異性が高いこと、(2) リアルタイム PCR 法の variola ウイルスゲノム検出の感度が極めて高いこと、(3) 調べられた variola



ウイルス 12 株すべてがリアルタイム PCR および variola ウイルス特異的 PCR 法で陽性を呈した、以上の 3 点である。

一般的に、天然痘の診断には、天然痘に特異的な臨床症状と皮膚病変におけるウイルス抗原検出で可能を考えられる。将来、バイオテロリズムや何らかの事件により典型的な天然痘が流行したとすると、流行時には天然痘の診断は比較的容易である。しかし、そのような流行時に要求されるウイルス学的検査として、発症前に variola ウイルスに感染しているか否かを調べる、天然痘をサル痘や他の水疱性感染性疾患と鑑別する、等の必要が生じる。それは流行拡大を最小限にするためと患者の抗ウイルス剤による治療を適切に行うためである。そのような場合には、ウイルス血症の有無、また、その定量的解析が有効と考えられる。このような目的のためには、感度が比較的低い variola ウイルス特異的 PCR 法では不十分であり、今回の成績は、リアルタイム PCR がその目的にかなう検査法であることを示している。

本報告書にはリアルタイム PCR 法に用いられたプライマーおよびプローブの塩基配列は提示しなかった。これはこれらの塩基配列情報を、将来バイオテロリズムをたくらむ人々へ流出させない方がよいと、現時点で考えられたためである。同様の措置が米国を始めいくつかの国でとられている。

オルソボックス属ウイルス特異的 PCR 法、vaccinia ウイルス特異的 PCR 法の両方で、今回調べたすべてのオルソボックスウイルスゲノムが検出された。このことは、PCR 法で得られた PCR 産物の塩基配列を決定し、その情報を元にして PCR 産物の由来を決定する必要があることを示している。

現在でも、西アフリカ諸国で天然痘様疾患であるサル痘が流行し、さらに、2003 年 4 月から 6 月にかけて、米国にて輸入感染症としてのサル痘の流行が確認された。このように天然痘だけでなく、サル痘を特異的に診断するためのシステムの構築が重要と考えられる。

万一、天然痘が発生した場合、index case では、天然痘が疑われず診断が遅れることが想定

される。このため、二次感染者の発生は避けられない。天然痘は 1 類感染症であり、痘そうウイルスは level 4 病原体に分類されるため、天然痘患者が発生したことが明らかになった後の臨床検体の取り扱いには、BSL4 実験室の稼働が不可欠である。同様の事態は、ウイルス性出血熱患者が、バイオテロあるいは輸入感染症として国内で発生して二次感染が疑われる症例が発生した場合にも当てはまる。今後、日本の BSL4 実験室の稼働がバイオテロ対策上必須であると考えられる。

## E. 結 論

高感度に、しかも、特異的に天然痘を診断するための遺伝子増幅法 (リアルタイム PCR 法) による診断法を開発した。

## F. 謝 辞

本研究は、米国疾病予防センターのボックスウイルス部門の Inger Damon 博士らとの共同研究である。

## G. 健康危険情報

該当事項はない。

## H. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Tang, Q., Saijo, M., Zhang, Y., Asiguma, M., Dong, T., Han, L., Shimayi, B., Maeda, A., Kurane, I., Morikawa, S. (2003) A patient with Crimean-Congo hemorrhagic fever diagnosed with recombinant nucleoprotein-based antibody detection systems. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 10:489-491
- 2) Ikegami, T., Niikura, M., Saijo, M., Miranda, M.E., Calaor, A.B., Henandez, M., Acosta, L.P., Manalo, D.L., Kurane, I., Yoshikawa, Y., Morikawa, S. (2003) Antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay that specifically detects Reston ebola virus nucleoprotein. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 10:552-557

- 3) Ikegami, T., Saijo, M., Niikura, M., Miranda, M.E., Calaor, A.B., Fernandez, M., Manalo, D.L., Kurane, I., Yoshikawa, Y., Morikawa, S. (2003) Immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay using truncated nucleoproteins of Reston Ebola virus. *Epidemiology and Infection* 130:533-539
- 4) Saijo, M., Tang, Q., Shimayi, B., Han, L., Zhang, Y., Asiguma, M., Tianshu, D., Maeda, A., Kurane, I., Morikawa, S. Possible horizontal transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus from a mother to her child. *Japanese Journal of Infectious Diseases* (in press)
- 5) Niikura, M., Maeda, A., Ikegami, T., Saijo, M., Kurane, I., Morikawa, S. Modification of endothelial cell functions by hantaan virus infection: prolonged hyper-permeability induced by TNF-alpha of hantaan virus infected endothelial cell monolayers. *Archives of Virology* (in press)

表 1. ゲノム量と variola ウイルス特異的 PCR 法, リアルタイム PCR 法の成績の一例.

| ゲノム量 (fg) | オルソポックス属ウイルス共通 PCR 法 | Variola ウイルス特異的 PCR 法 | Vaccinia ウイルス特異的 PCR 法 | リアルタイム PCR 法(copies) |
|-----------|----------------------|-----------------------|------------------------|----------------------|
| 40        | _* <sup>1</sup>      | -                     | -                      | $4.3 \times 10^2$    |
| 400       | -                    | -                     | -                      | $2.2 \times 10^3$    |
| 4,000     | -                    | -                     | -                      | $3.0 \times 10^4$    |
| 40,000    | -                    | -                     | -                      | $4.0 \times 10^5$    |
| 400,000   | -                    | +++                   | +                      | NT* <sup>2</sup>     |
| 4,000,000 | ++                   | +++                   | +                      | $5.1 \times 10^7$    |

\* 1: +, -はそれぞれ PCR 陽性, 陰性を示す. +の数が多いほど PCR 産物のバンドのシグナルが強いことを示す.

\* 2: "NT"は, "Not tested (調べられていない)"ことを示す.

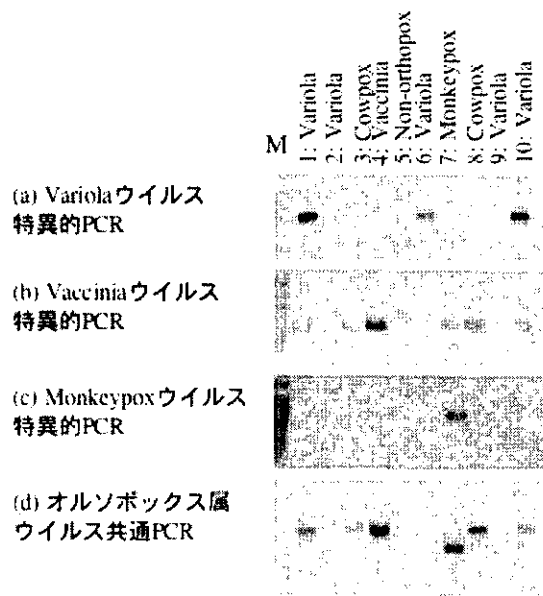


図1. オルソボックス属ウイルスの各 PCR 法における成績。ここには 10 サンプルの 4 種類の PCR 法による成績が提示されている。

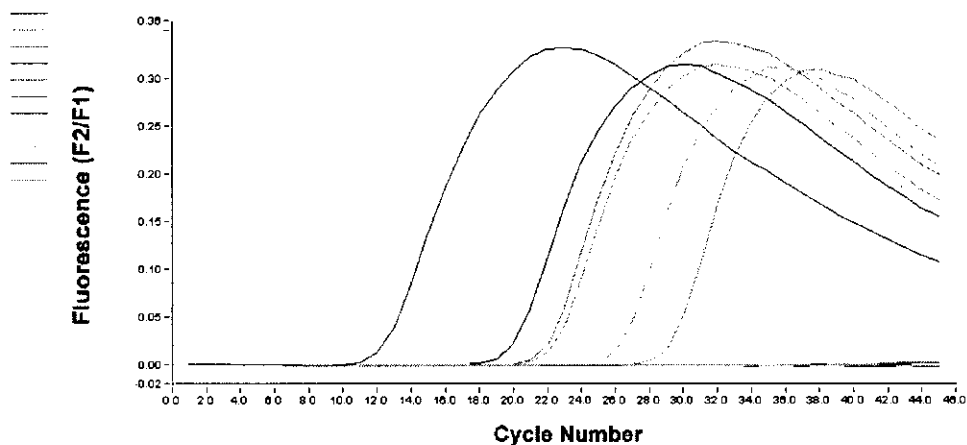


図2. リアルタイム PCR 法による variola ウイルスゲノムの検出結果。サイクル数と検出される variola ウイルスゲノムによるシグナルの強さの関係。最も少ないサイクル数でシグナル陽性を呈したサンプルが陽性コントロールで、それに続いてシグナル陽性を呈したサンプルすべてが variola ウイルスゲノムであった。

## 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 国立感染症研究所細菌第二部室長

研究協力者 小崎 俊司、幸田 知子（大阪府立大学農学部獣医疫学講座）  
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 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, E 及び F 型菌を培養、産生した毒素の精製を行い、最終 4 型混合トキソイド換算として約 500 用量相当の標品を得た。各型毒素ともに高度に精製し、過去に製造されたトキソイドに用いた毒素純度に比べて、安定且つ基本分子構造である M 型毒素標品を得た。各毒素は個々にホルマリンで無毒化し、4 型混合トキソイドとして製剤化する。今後、安全性と有効性の評価は、実験動物を用いて確認する。

### 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、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。ボツリヌス毒素は極めて高い致死性を有し、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バイオテロも予想される。これ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。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試作製造し、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手段を講じる。

### B. 研究方法

ボツリヌス毒素に対するヒトの予防を目的とし、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ワクチンの試作製造し、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。トキソイドの製造および品質管理試験法の概要を図 1 に示し

た。昨年度は、A 型、B 型ボツリヌス菌の培養、毒素精製を行ったので、本年度は E 型、F 型菌の培養、毒素精製を行った。

- ・精製 A、B、E 及び F 型毒素
- ・個々の毒素をタンパク量約 200  $\mu$ g/ml に調整
- ・ホルマリンを 0.4v/w% 添加
- ・37°C で約 3 週間処理
- ・無毒化を完了後
- ・品質試験  
安全性試験：無菌試験、pH 試験、タンパク量含有試験、アルミニウム含有試験、無毒化終了試験、異常毒性否定試験  
力価試験：モルモット法、マウス法

図 1. トキソイドの製造と品質管理方法

菌培養：使用菌株として E 型は 35,396 株、F 型は Langeland 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°C 2 日間培養した。培養液を卵黄加 GAM 寒天培地に塗布し、30°C 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°C 2 日間培養し、各コロニーの毒素産生能を調べた。培養液の毒力が最も高い菌液を、再び CM 培地に接種し 30°C 一晚培養した。この培養液を 0.5% Glucose-0.5% Yeast Extract-2% Proteose Peptone

培地 (E 型 : pH 6.3, F 型 : pH 7.0) 8 L に対して約 15 ml を接種し、30°C 3 日間培養した。

**毒素の精製 :**

1) E 型菌 : 培養液を遠心し、回収した沈殿物を 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 4.8) で懸濁した。懸濁液をさらに遠心し、0.2 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) に懸濁し、pH を 10% NaOH で 6.0 に修正した後、37°C で 2 時間静置後、4°C でさらに一晩攪拌した。懸濁液を遠心し、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°C で静置した後、沈殿を遠心によって回収した。沈殿物を 0.02 M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) に溶解し、同緩衝液に 4°C 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 CM-Sepharose Fast Flow カラム (CM-1) に添加し、未吸着分画を回収し、吸着した非毒素成分を 0 から 0.5 M 食塩濃度勾配で溶出した。CM-1 未吸着分画に含まれる核酸を除去するために 100µg/ml RNase を添加し、同緩衝液に 30°C で 6 時間静置後、一晩 4°C で透析した。透析中に生じた沈殿を除いた上清を 0.02 M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化した CM-Sepharose Fast Flow カラム (CM-2) に添加しカラムを十分洗浄した後、吸着した毒素を 0 から 0.5 M 食塩濃度勾配で溶出した。毒素画分を集め限外ろ過膜 (YM-30) を用いて濃縮した後、濃縮中に生じた沈殿を除去し、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 (M 毒素) を得た (図 2)。

- ・培養菌液
  - ・高速遠心 (菌を回収)
  - ・毒素抽出 (pH6.0)
  - ・硫酸沈殿・透析
  - ・陽イオン クロマト (CM-Sepharose)
  - ・RNase (除核酸)
  - ・陽イオン クロマト (CM-Sepharose)
  - ・ゲル濾過 (Sephadex G-200)
- 図 2. E 型毒素の精製方法

2) F 型菌 : 培養液に 3 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を加え、酸沈殿を行った (pH 3.9)。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、pH を 10% NaOH で 6.0 に修正した後、室温で一晩攪拌した。懸濁液の 1/4 容量に相当する飽和硫酸アンモニウム溶液を徐々に添加し、4°C で 30 分間攪拌した後、遠心し、得られた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°C で静置した後、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) に溶解し、不溶物を遠心により除去した上清を、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 3% プロタミンを 4°C で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 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 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を 0.2 M 食塩添加 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 4.4) に 4°C 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 S-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 0.4 M 食塩濃度勾配で溶出した。毒素画分を集め限外ろ過膜 (YM-30) を用いて濃縮した後、不溶物を遠心により除去し、上清を 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 (M 毒素) を得た (図 3)。

- ・培養菌液
  - ・酸沈殿 (毒素と菌を沈殿)
  - ・毒素抽出
  - ・プロタミン処理 (RNA の除去)
  - ・硫酸沈殿・透析
  - ・陽イオン クロマト (SP-Sepharose, S-Sepharose)
  - ・濃縮
  - ・ゲル濾過 (Sephadex G-200)
- 図 3. A, B 又 F 型毒素の精製方法

(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

ヒト用トキソイドの抗原として使用する計画で精製毒素(M型)をE型毒素は95Lの培養液から約127mg、F型毒素は125Lの培養液から約195mgの精製毒素を得た(図4)。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50 $\mu$ 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E型、F型は前年度のA型、B型同様、最低1,000dose程度のトキソイド作製が可能といえる。

| 毒素型                           | A型                    | B型                     | E型                    | F型                    |
|-------------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 菌培養総量(L)                      | 40                    | 100                    | 190                   | 125                   |
| 最終液量(ml)                      | 175                   | 52                     | 134                   | 100                   |
| 総タンパク(mg)                     | 232                   | 260                    | 254                   | 180                   |
| 毒素活性<br>(LD <sub>50</sub> )   | 6.6 x 10 <sup>9</sup> | 1.9 x 10 <sup>10</sup> | 1.1 x 10 <sup>9</sup> | 2.1 x 10 <sup>8</sup> |
| 比活性<br>(LD <sub>50</sub> /mg) | 2.8 x 10 <sup>7</sup> | 7.4 x 10 <sup>7</sup>  | 4.3 x 10 <sup>8</sup> | 1.3 x 10 <sup>8</sup> |

図4. 精製毒素標品

### D. 考察

昨年度、ヒト用トキソイドの抗原として使用予定のM毒素は、A型毒素は40Lの培養液から精製毒素を約230mg、B型毒素は25Lの培養を2回繰り返すことにより約250mgの精製毒素を得た。また、今年度はE型毒素は190Lの培養液から精製毒素を約250mg、F型毒素は125Lの培養液から約180mgの精製毒素を得ることができた。過去に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 $\mu$ 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各型毒素からは最低500~1000用量程度の4型混合のトキソイド作製が可能と思われる。そのうち、品質管理試験用に数百本が必要となるために、最終のできあがり本数は、少なくとも500本を確保できるよう計画する。

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慮するのであれば、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。

今後、各型毒素をホルマリンで無毒化した後、ABE及びF型の4型混合トキソイドを試作する。その後、実験動物により安全性と有効性を評価する。評価系のモデルは、破傷風トキソイドの生物学的製剤基準に準拠する。さらに、人体に接種することを想定し、医療に関する法的、倫理的な問題点を検討する。

### E. 結論

ヒトに感受性の高いA,B,EおよびF型毒素に対応する4型(多価)トキソイドを試作製造する。ジフテリア、破傷風などの細菌毒素に対する市販トキソイドの製造技術と知識を利用する。試作トキソイドワクチンの品質管理方法を検討し、緊急対策時に使用可能かを検証する。テロ発生時の初動調査等に関与する担当者が必要に応じて免疫することを可能とする手段を講じる。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

Kiyohito Nakai, Motohide Takahashi and Motowo Tomita : The equine antitoxins supply system for biological poisons in Japan. *Toxicon* Vol. 42, (5), 561-562, 2003

## 提言

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 が疾病分類では、4つのカテゴリーのなかでは、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。米国内では CDC 等国家機関が協力して、ボツリヌストキソイドを製造し、テロ対策用の事前対応・予防策として、軍人又は研究者、検査担当者へ接種している。海外から製造・認可承認されたトキソイドワクチンを入手することは困難であり、国策として防衛庁、厚生労働省、総務省等の省庁間での総括議論、調整が必要である。ボツリヌス毒素に対する予防ワクチンを製造し、国内で超法規的に製造、接種を可能とするために、大量のトキソイドを備蓄することが必要であろう。

### III. 大学小班



## Ⅲ-Ⅰ. 大学小括研究報告書

牧野 壮一 帯広畜産大学原虫病研究センター教授

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の中で、特にレベル3に属する細菌性感染症の焦点を当て、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を行い、検査・診断マニュアルを作製し、普及をはかることを目的とする。対象として炭疽菌、ブルセラ菌、野兎病菌、鼻疽/類鼻疽菌をターゲットにし、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。

### 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の中で、特にレベル3に属する細菌性感染症の焦点を当て、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を行い、検査・診断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、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、野兎病、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、野兎病、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、野兎病、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、野兎病、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

原体としては危険度が最も高い危険度3に区分される。土壤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、人の感染例も姿を消しつつある。一方、類鼻疽はヒトの疾患で、亜熱帯から熱帯地方の土壤に分布し東南アジアでは患者数は極めて高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。両病原体は土壤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壤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や動物に接触してヒトは感染する。発生は通常散發的だが、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) 炭疽菌のビーズによる分離：炭疽菌芽胞に対する抗体を用いて4種類のバシラス属菌株の芽胞に蛍光染色を行なった結果、炭疽菌に特異的な抗体であると判断した。そこで、抗体を免疫ビーズと混合し、芽胞の回収を行なった。その結果、PBS 中では80%程度の回収率であった。しかし滅菌土壌を用いて実験を行ったところ、約20%の分離率であり、回収率が低下した。

2) 新たなブルセラ症の免疫学的診断法の開発：国際標準法である急速凝集反応 (Rose Bengal Test; RBT) のエルシニア全菌体に対する交差反応を阻止するために、ザルコシン抗原を用いた結果、交差反応を起こさなかった。同時にワクチン接種群とも区別可能であった。

3) 16S rDNA による遺伝子検出系の改良：昨年度作成した primer より特異性の高い primer を新たにデザインした。検出感度は40 fg/ml でほぼ実用的な感度であった。

4) 土壌病原体のスクリーニング方法の作成：16S r-DNA 遺伝子を使ったレベル3, 2, および日和見病原体の特異DNA配列が固定してある病原体DNAチップを用い、土壌調査の調査の可能性を確立した。

5) 喀痰の病原体のスクリーニング方法の作成：遺伝子診断は感染症の初期には有効であるが、初診で皮膚膿瘍や肺炎患者が類鼻疽菌による感染を受けていると予測することは不可能に近い。そこで類鼻疽菌による急性感染症はエロゾル吸入による急性肺炎が最も可能性が高いので気道感染を起こす細菌性病原体のスクリーニング法の確立を試みた。

6) 16S rDNA に対する特異 primer 対を用いた 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。Whole cell DNA を用いた場合、*F. tularensis* では10pg、*F. novicida* では1pgのDNAがそれぞれあれば検出可能であった。

7) FopA 及び MMP に対する特異 primers を用いた Multiplex-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。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。

8) *F. tularesnsis* 全菌体に対する家兎抗血清の作成：得られた家兎血清は $2^{16}$ 倍希釈まで *F. tularesnsis* と有為に反応した。

### 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。我々の実験では土壌1g当たり1000個の芽胞があれば、何とか炭疽菌を直接培地に塗末して分離可能であったので、今回の系は少なくとも1gに10個程度の芽胞でも分離できたので、感度は高くなったといえるであろう。しかしさらに感度を高める必要がある。

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、エルシニアO9やワクチン接種家畜との区別が困難であり、今回のザルコシン抗原を用いたELISAの系は、有用性が高く、今後、更に発生国での疫学調査に応用可能かについて検討する予定である。

鼻疽は現在きわめてまれであるが類鼻疽は東南アジアを中心に亜熱帯から熱帯領域に患者数は多い。しかし我が国での患者発症例は戦後3例しか報告が無く、そのため我が国では患者が発生するという認識が低く、迅速に診断する環境は整備されていない。バイオテロが発生した場合、初期段階で臨床医が鼻疽、類鼻疽菌による感染症を診断することはきわめて困難である。東南アジアの類鼻疽の患者の多くは皮膚の膿瘍、骨髄炎、および肺炎であり、古典的な皮膚症状と所見を呈する臨床像はほとんどない。

特異的な遺伝子診断法は鼻疽、類鼻疽のテロを強く疑う場合、土壌、水、食品からの分離には有効であるが、患者からの検出を考えると実

用価値が低い。類鼻疽の患者のほとんどは慢性経過した患者で急性感染症を引き起こす例は少ないからである。従って早期に患者の診断を行う際は類鼻疽を念頭に置かなくても疾病を診断できる環境が重要である。表2に示した様にバイオテロに使用されるレベル3の感染症の可能性をすべて調査する方法はテロが予想される場合は極めて有効であるが、通常時には誰も使用しない。一般細菌診断スクリーニングの中に類鼻疽の検出も含めた感染症検査方法を導入する必要がある。

類鼻疽の急性感染症は肺炎が最も考えられるが、表1にしめしたような病原体のスクリーニングを通常の肺炎の診断に利用しておれば、初発例の早期発見につながる。

同様に敗血症、膿瘍の原因検査にも炭疽菌、野兎病菌、ペスト菌などレベル3の病原体の感染症も視野に入れたスクリーニング方法を一般化させる必要がある。現代の医療では発生頻度、経済性が優先され、頻度の少ない疾患はルーチンの検査から切り捨てられており、患者の立場からの診断システムが構築されていない。医療を受ける側の患者はすべての可能性を検査してもらえぬ網羅的スクリーニング方法は患者へのサービス向上にもつながる。

*Francisella tularensis* 16S rDNA 検出用に Primers を設計し、菌体並びに whole cell DNA で検討した。今回構築した 16S rDNA に対する Primers 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 (*F. tularensis*)並びに 1pg (*F. novicida*)であった。平成14年度に確立した PCR 法は、Primer に外膜蛋白を code する遺伝子の一部を使用しているため、株による多型が予想される。今回構築した PCR 法で使用する Primers は 16S rDNA から設計しているため株間による差異は非常に少ないと考えるが、今後、菌株を増やして検討する必要がある。以上、平成14及び15年度の実験結果より、野兎病菌に対する遺伝学的迅速検出法 (PCR 法) は確立できた。しかし、この検出法を完成するためには確実な陽性コントロールが必要である。今回の一部の実験には *F. tularensis* の whole cell

DNA を用いたが、whole cell DNA は、1)凍結融解を繰り返すとニックが入る恐れがある、2) 4°C では長期保存ができない、3) *F. tularensis* からの whole cell DNA の調整には P3 実験室が必要がある、4) Whole cell DNA 調整用に菌株を分与せねばならず、本菌の管理の問題 (本菌の拡散) が生ずる。このリスクを回避するため、平成16年度は確立した PCR 法で用いる、安全で管理が容易な陽性コントロールの作成を行う。即ち、今回確立した PCR 法で調整した DNA 断片を cloning vector に挿入して、それらの塩基配列を確認する。これらの DNA 断片は、16S rDNA あるいは外膜蛋白 (FopA 及び MMP) をそれぞれ code する遺伝子的一部分のため、リスクはない。最終的に、全ての primers と陽性コントロール (各 recombinant plasmid DNA) に説明書を添付した検出キットを作成して 100 キットほど保存しておく。

診断のもう一つの重要な方法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で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。今年度はこの目的のために *F. tularensis* 全菌体に対する家兎抗血清を作成した。作成した抗血清は、*F. tularensis* 全菌体を用いた ELISA 系で  $2^{16}$  倍希釈まで反応した。平成16年度は、野兎病に罹患したと考えられる野生動物の血清サンプルと共に全菌体を用いた ELISA を行い、この抗血清が陽性コントロールとして使用可能か否かを検証する。更に、塩基配列が公表されている野兎病菌の外膜蛋白 (FopA 及び MMP) の推定アミノ酸配列よりエピトープと考えられる領域を発見 vector に組み込み精製し、この抗血清を用いて野兎病菌特異抗原の決定を行い、抗原検出法の確立を目指す。