

E. 結 論

炭疽菌の検出方法は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、いず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。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表

各分担研究を参照

H. 特許出願状況

なし

Ⅲ-Ⅱ. 大学小括研究班分担研究報告書

1. 炭疽・ブルセラ症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、昨年度の報告でPCRによる検出法は確立したが、今年度は土壌から直接芽胞を分離する方法について検討した。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。昨年度、ワクチン接種群との判別が可能となる方法を開発したが、本年度は、発生国であるモンゴル国で実際に大規模な疫学調査を実施し、その有用性を明らかにした。

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。

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な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

菌株：炭疽菌パスツール2苗株（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°C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°C30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1グラムに適量人工的に接種し実験を行った。

芽胞に対する抗体の作製：上記精製芽胞を用いてウサギを免疫し抗体を作製した。ウサギIgGの上昇をELISAで確認後、炭疽菌、枯草菌、セレウス菌、および*B. thuringiensis*の芽胞

を用いた蛍光免疫染色により特異性を検証した。

抗体のビーズへのコーティング： ビーズ (IMB ; Dynabeads M-280, $6-7 \times 10^8$ per ml) にはプロトコールに従い抗体を吸着させた。

土壌の調整方法とビーズとの反応： 土壌 1g に適量の芽胞を人工的に混入させて 10 ml の PBS に懸濁後、65°C で 30 分間加熱処理した。次に、500 回転 5 分間遠心し、土壌を除いた後、さらに 15,000 回転で 10 分間遠心し、菌体を得た。沈渣を 100 μ l の PBS に再懸濁後、20 μ l の抗体吸着ビーズを加え、24 時間 4°C でゆっくりと混合した。ビーズの洗浄後 PLET 培地および TSA 培地上に沈渣を塗抹し、37°C で培養後コロニーを得た。

PCR 法： 炭疽菌特異的 PCR 法による迅速診断法は、昨年度報告した 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。

ブルセラ抗原の抽出： ブルセラ強毒株、544 株を培養後 0.5% ザルコシン液に懸濁後、ろ過滅菌したろ液を抗原として使用した。その他ブルセラの全菌体抗原とエルシニア O9 株の全菌体抗原を使用した。

血清サンプル： ブルセラ 544 株およびエルシニア O9 株をウサギに免疫し作成した陽性血清、およびモンゴル国でワクチン接種群や感染家畜から分離した血清を用いた。

血清試験： 国際的に認められている簡易試験として Rose Bengal 試験 (RBT) を用いた。同時に試験管内凝集試験を実施、両者が陽性の場合国際基準により陽性と判断した。ザルコシン抗原 (4 μ g/ml 濃度の抗原を well あたり 50 μ l アプライした) を用いた方法は、ELISA により常法に従い実施した。

C. 研究結果

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、図 1 で示すように炭疽菌には特異的な蛍光が強く観察できたが、枯草菌、セレウス菌、および *B.*

thuringiensis の芽胞にはほとんど蛍光染色されなかった。このことから炭疽菌芽胞に特異性が高いと判断した。

そこで、抗体を精製後、免疫ビーズと混合し、抗体をビーズ上に吸着させた。その条件検定のために図 2 と 3 を行なった。その結果、ビーズには 100 μ g と反応させて炭疽菌特異的免疫磁気ビーズを作製した。さらに使用する反応液は 100 μ l でビーズは 20 μ l 懸濁液を用い、4°C で 24 時間反応させる条件を決定した。

このビーズを用いて 4 菌種の芽胞に対する特異性について検討した。PBS に各芽胞を加えてビーズによる回収を行なった。その結果、表 1 に示すように炭疽菌に非常に高い特異性を示した。これは、炭疽菌芽胞数を変えても 80% 程度の回収率であった (表 2)。そこで、4 菌種を混合して炭疽菌の回収率を調べた (表 3)。その結果、バックグラウンドとしての菌種は分離できるが、炭疽菌の分離率は他菌種に比べ優位に高かった。しかし、炭疽菌単独に比べて効率は低下した。そこで、実際に滅菌土壌を用いて実験を行った。その結果、約 20% の分離率であり、極端に効率が低下した。結果は示さないが、未滅菌土壌を用いた場合、15% 程度の分離率であった。分離コロニーは炭疽菌である事は PCR により確認している (結果示さず)。

2) 新たなブルセラ症の免疫学的診断法の開発： 図 4 に国際標準法に従って行なった、急速凝集反応 (RBT) の結果を示す。抗原を不活化ブルセラ及びエルシニア全菌体に対して実施した。その結果、両者とも強陽性になり、区別する事は不可能であった。

そこで、ザルコシン抗原とブルセラ全菌体を用いたブルセラおよびエルシニアに対するウサギ抗体を用いた ELISA を行なった (図 5)。その結果、全菌体を用いると抗体を希釈しても、量血清に対して強い反応を起こすが、ザルコシン抗原を用いると 50 倍希釈からブルセラ抗体に対して強い反応を示した。このことは、ザルコシン抗原はブルセラ抗体に対して強い反応を特異的に起こす事を意味していた。即ち、エルシニアとの交差反応を起こさないといえた。

そこで、ザルコシン抗原を用いた ELISA で陽性と判定するカット値の決定を行なった。抗血清は、明らかに感染していると判断された牛と羊、および明らかに感染していないと判断できる牛と羊から分離して調べた。その結果、0.5 をカット値として決定し、以後の実験に使用した (図 6)。

エルシニアとの交差反応を考慮しないで診断できる系を確立したが、ワクチン接種家畜では長期間経過して初めて RBT テストなどの簡易法で陰性になることが知られていた。そこで、ワクチン接種後 1-2 ヶ月の家畜から血清を分離し、ザルコシン抗原を用いた ELISA の有用性について図 5 の実験と同様な系で検討した。その結果、血清を 200 倍希釈して使用すると、ワクチン接種群と感染群を区別可能であろうと考えられた (図 7)。そこで、ワクチン履歴の明白な牛と羊、および感染が確実な牛と羊を用い、それぞれから血清を分離して図 6 と同様に ELISA を行った (図 8)。その結果、ワクチン接種歴が確実な牛と羊一頭において陽性反応が出た。これらはブルセラ感染を否定できるものではないので、感染が起きているのかもしれない。

実際にランダムに集められた 59 検体の血清を用いて ELISA を行なった (図 9)。同時に、RBT テストも実施し、陽性検体は 10 検体あった。これらのうち、一検体を除いて全て ELISA で陽性と判定されたが、逆に ELISA 陽性で RBT テスト陰性が数検体あった。

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。他の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分離可能になる手掛かりが得られたものと考えている。しかし、頻度は低く、更なる改良が必要である。しかし、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 との共通抗原があり、そのため交差反応がでるために特異性に問題があり、またワクチン接種家畜との区別が困難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、経済的にも真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。今回、エルシニアにのみの交差反応に注目したが、それ以外にも野兎病、大腸菌 O157 などとも共通抗原を持っているので、今回の方法は更に有用性が増すものと期待される。最終的には、今回示したザルコシン抗原を用いた ELISA の系は、図 9 の結果から、まず従来の RBT テストを実施して、陽性サンプルについてのみ ELISA を実施するのが適当であるといえる。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。

E. 結 論

炭疽菌の分離方法は検出率にまだ問題はあるが、従来の培養法に比べ感度の上昇が確認できた。またブルセラ症の診断は新たな免疫学的方法を示した。ワクチン接種群や交差反応を無視できる方法として、実用可能ではないかと期待できた。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sou-ichi Makino and Hyeng-il Cheun. 2003. Application of the real-time PCR for the

- detection of airborne microbial pathogens in reference to the anthrax spores. *J. Microbiol. Meth.* 53: 141-147.
- 2) Makino, S-I., Tobe, T., Asakura, H., Watarai, M., Ikeda, T., Takeshi, K., Sasakawa, C. 2003. Distribution of the secondary type III secretion system locus found in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 among Shiga toxin-producing *E. coli*. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2341-2347
 - 3) Kim, S., Watarai, M., Kondo, Y., Erdenebaatar, J., Makino, S-I., Shirahata, T. 2003. Isolation and characterization of mini-Tn5Km2 insertion mutants of *Brucella abortus* deficient in internalization and intracellular growth in HeLa cells. *Infect. Immun.* 71: 3020-3027.
 - 4) Masahisa Watarai, Suk Kim, Janchivdorj Erdenebaatar, Sou-ichi Makino, Motohiro Horiuchi, Toshikazu Shirahata, Suehiro Sakaguchi and Shigeru Katamine. 2003 Cellular prion protein promotes *Brucella* infection into macrophages. *J. Exp. Med.* 198: 5-17.
 - 5) Cheun, H-I., Makino, S-I., Watarai, M., Erdenebaatar, J., Kawamoto, K., and Uchida, I. 2003. Rapid and effective detection of anthrax spores in soil by PCR. *J. Appl. Microbiol.* 95:728-733.
 - 6) Erdenebaatar, J., Bayarsaikhan, B., Watarai, M., Makino, S-I., and Shirahata, T. 2003. Enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate the antibody responses of animals infected with *Brucella* species from those of animals infected with *Yersinia enterocolitica* O9. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10:710-714.
 - 7) Hisao Kurazono, Masayuki Nakano, Shingo Yamamoto, Osamu Ogawa, Kazuyo Yuri, Katsuhisa Nakata, Miyuki Kimura, Sou-ichi Makino, and G. Balakrish Nair. Distribution of the *usp* gene in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from companion animals and correlation with serotypes and size-variations of the pathogenicity island. *Microbiol. Immunol.* 47 (10): 797-802, 2003.
 - 8) 牧野壮一. 2003. 炭疽菌の特性と病原性. *クリーンテクノロジー* 13: 43-45.
 - 9) 牧野壮一. 2003. 人と動物の共通感染症としての炭疽. *動物協会会報* 36 (1): 59-62.
 - 10) 牧野壮一. 炭疽菌. 理解して実践する感染症診療・投薬ガイド、「総合臨牀」増刊号 52: 447-452、2003年
 - 11) 牧野壮一. 細菌の遺伝学 グラム陽性桿菌 *バシラス属* (炭疽菌) 2003年、新世紀の感染症学 (下) -ゲノム・グローバル時代の感染症アップデート- *日本臨牀* 増刊号 61: 677-682.
 - 12) 牧野壮一. 炭疽. 実践抗生物質・抗菌薬療法ガイド、*Medical Practice* Vol 20 臨時増刊、285-287、2003.
 - 13) 牧野壮一. 炭疽菌への対応. *臨床医* Vol 29 (6), 1312-1313, 2003.
 - 14) 度会雅久、牧野壮一、白幡敏一. 細菌の感染におけるラフトの役割. *生体の科学* 54(4), 310-315, 2003.
 - 15) 牧野壮一. ブルセラ. *細菌学* (竹田美文、林英生 編). P 242-244、朝倉書店 東京 2002年5月.
 - 16) 牧野壮一 炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) 病原菌の今日的意味 (松本慶蔵 編)、P272-280、*医薬ジャーナル* 大阪 2003年4月27日
 - 17) 牧野壮一. *バシラス属* (好気性有芽胞菌) と感染症 *獣医微生物学* 第二版 (見上毅 編). P 93-96、文永堂出版 東京 2003年9月.
 - 18) 牧野壮一. *リステリア属* と感染症 *獣医微生物学* 第二版 (見上毅 編). P 99-100、文永堂出版 東京 2003年9月.

Table 1. Recovery of different Bacillus spores using anti-anthrax spore IgG coated immunomagnetic beads (IMB) (Sensitivity/specificity)

添加芽胞	芽胞数	分離芽胞数	炭疽菌分離率 (%)	全分離率
炭疽菌	79	67	84.8	84.8
炭疽菌	79	63	79.7	79.7
セレウス	110	2	0	
セレウス	110	4	0	
枯草菌	67	2	0	
枯草菌	67	1	0	
BT	123	2	0	
BT	123	2	0	

Table2. Recovery of anthrax spores from sterile PBS condition

添加芽胞数	回収芽胞数	回収率 (%)
0	0	0
1	0	0
28	27	96.4
41	38	92.7
49	36	73.5
52	41	78.8
63	58	92
169	142	84
494	406	82.2
588	404	68.7

平均回収率: 83.5%

SD: 9.8%

Table 3. Recovery of anthrax spores from combination of other bacilli spores in sterile PBS condition

菌種	芽胞数	總分離数	炭疽菌数	炭疽菌以外	炭疽菌分離率 (%)	炭疽菌以外分離率 (%)
Ba,Bc	79,110	67	53	14	67.1	12.7
Ba,Bc	79,110	63	59	4	74.7	3.6
Ba,Bs	79,67	61	56	5	70.8	7.4
Ba,Bs	79,67	70	58	12	73.4	17.9
Ba,Bt	79,123	73	51	22	64.5	9.8
Ba,Bt	79,123	64	47	17	59.5	13.8
Ba,Bc,Bt	79,110,123	73	39	34	49.4	14.6
Ba,Bc,Bt	79,110,123	82	35	47	44.3	14.1
Ba,Bc,Bs	79,110,67	68	43	25	54.4	14.1
Ba,Bc,Bs	79,110,67	57	49	8	62.0	4.5
Ba,Bs,Bt	79,67,123	63	44	19	55.7	10.0
Ba,Bs,Bt	79,67,123	61	47	14	59.5	7.3
Ba,Bc,Bs,Bt	79,110,67,123	79	41	38	51.9	12.7
Ba,Bc,Bs,Bt	79,110,67,123	82	37	45	46.8	15.0

Table 4. Recovery of anthrax spores seeded in sterile soil

添加芽胞数	分離数	検出率 (%)
0	0	0
1	0	0
19	4	21
72	15	20.8
104	19	18.2
534	103	19.3

平均回収率: 19.8%

SD: 1.3%

図1. 炭疽菌の芽胞に対する特異抗体の作成

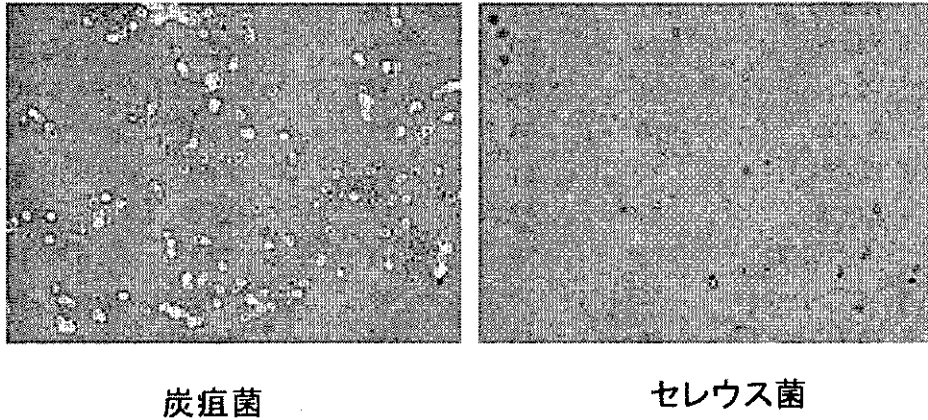


図2. ビーズ量と混合する抗体量

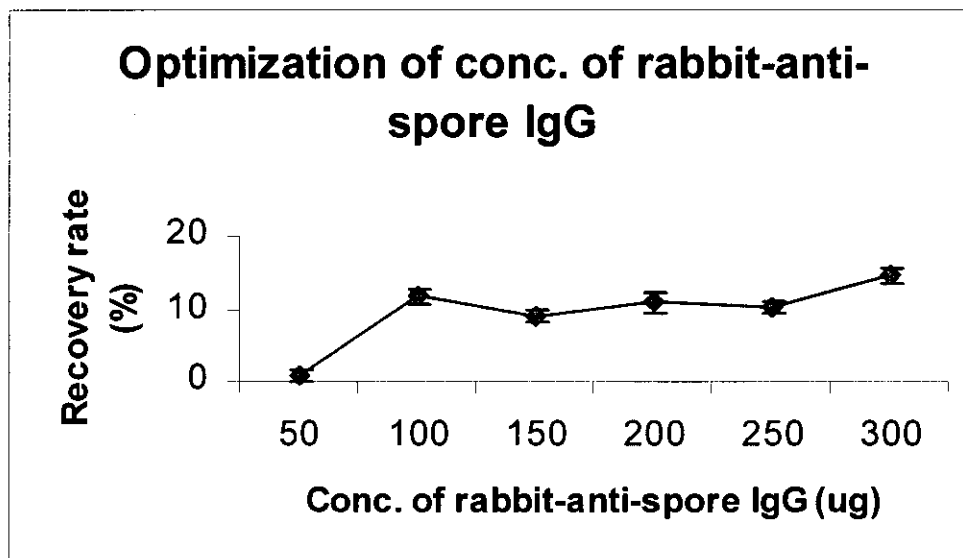


図3. ビーズ量の最適量の決定

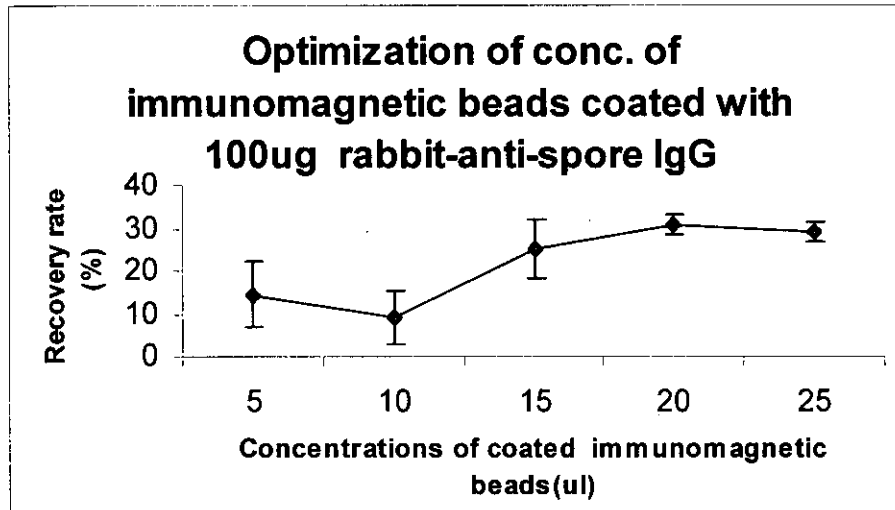
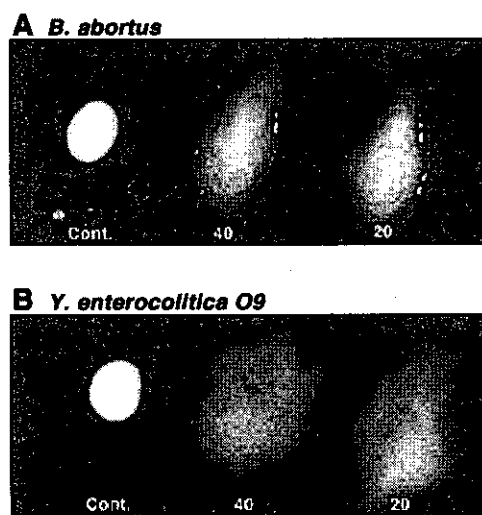
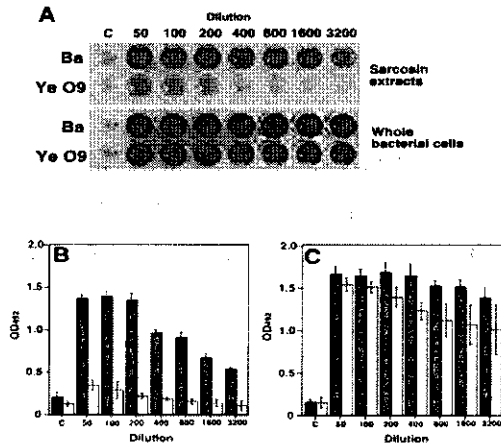


図4. Rose Bengal Test

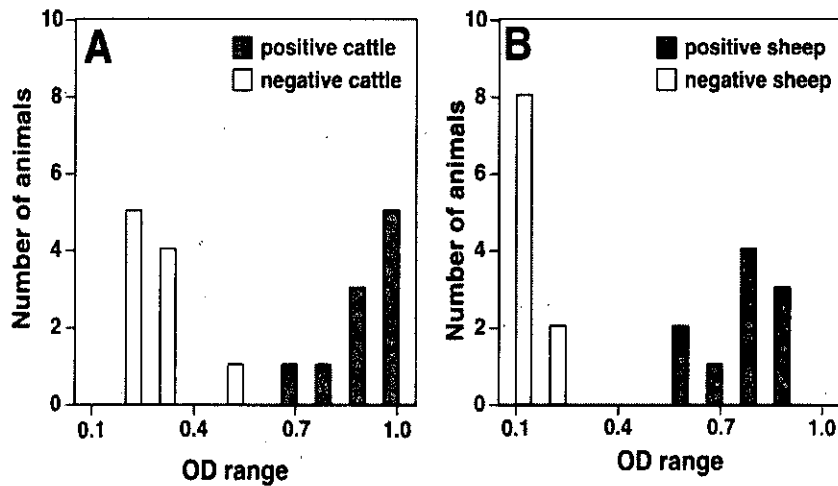


☒5. ELISA test with sarcosin extracted antigen for differentiation *Brucella* and *Y. enterocolitica* O9 infected animals



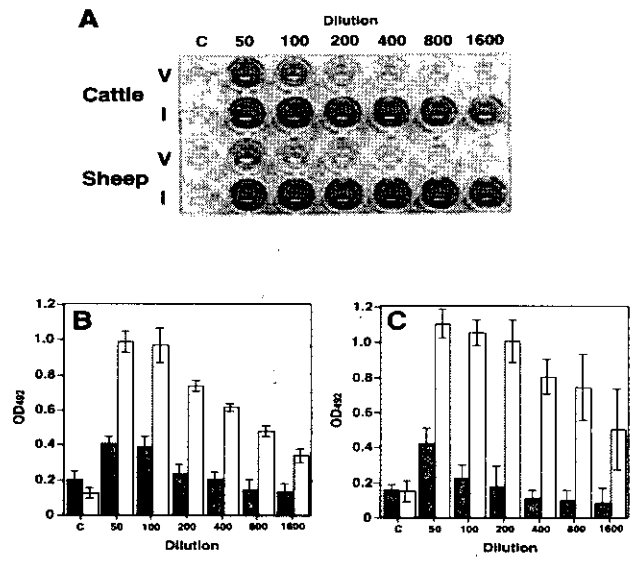
- A. ELISA with sarcosin extracted and *Brucella* whole cell antigens
- B. Sarcosin extract
- C. Whole cell antigen

☒6. Specificity of sarcosin extracted antigen in the ELISA



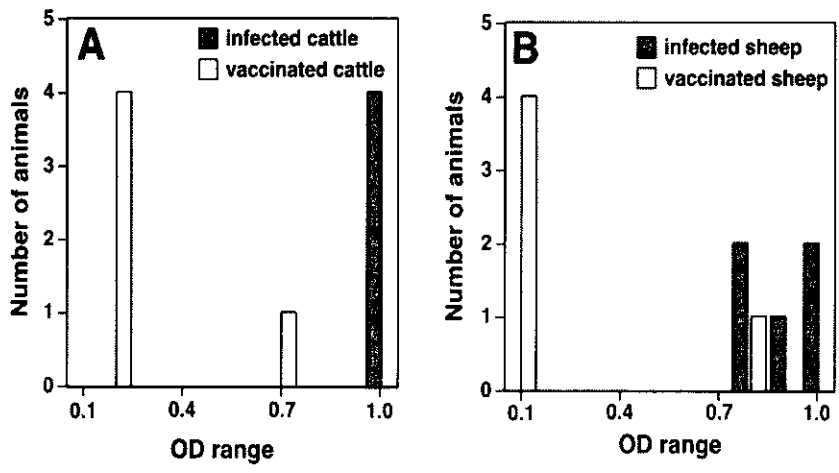
- A. Serum samples from infected and healthy cattle,
- B. Serum samples from infected and healthy sheep

☒7. Titer of vaccinated and infected animals by ELISA



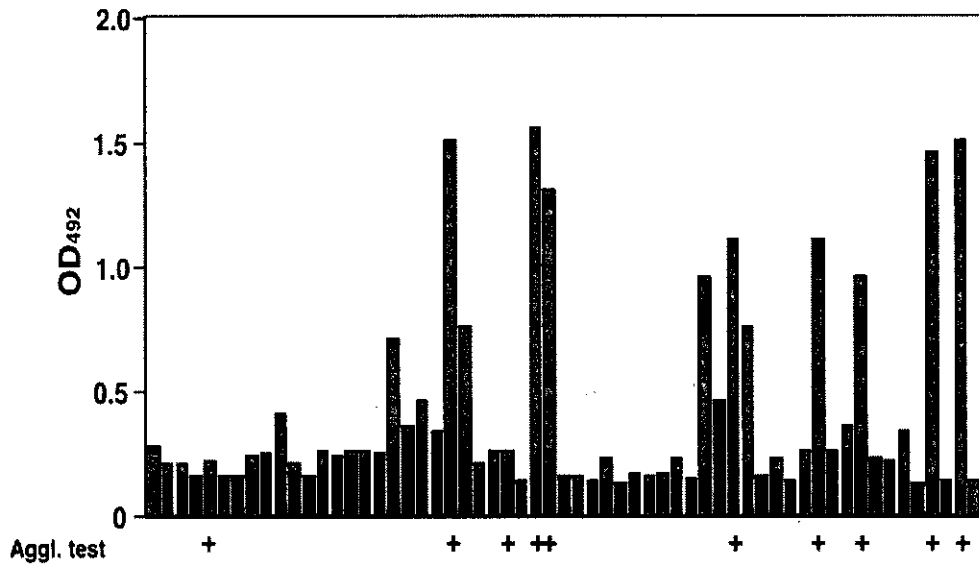
A, ELISA test with sarcosine extracted antigen. V; sera from vaccinated animals, I; sera from infected animals,
 B. titer of a cattle sera,
 C. titer of a sheep sera

☒8. Differentiation vaccinated and infected animals by ELISA using sarcosine extracted antigen



Sera from infected and vaccinated cattle/A/ and sheep /B/
 In the dilution of 1/200

图9. Specificity and sensitivity of the sarcosin extracted antigen in the ELISA



2. 鼻疽菌及び類鼻疽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

類鼻疽に感染するケースは現在も東南アジアを中心として亜熱帯から赤道にかけて多数報告されている。温帯地方でもフランス、中国、台湾、韓国、及び米国でも散発例が報告されており、フランスでは国土の大部分が既に *B. pseudomallei* に汚染されたとの報告がある。我が国では症例は少ないが戦後3例の患者例が報告されている。疾患がまれであることから、典型的な皮膚症状が出ない限り、患者を診察で疑うことは不可能で患者数の多いタイでも初期診断の時点で、多くは一般の化膿性皮膚疾患、あるいは慢性の骨髄炎や肺炎として処理されている。

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

昨年度までの検出系の作成の経過: *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 16S r-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てきた。その結果、30 KDa の膜蛋白抗原の特異性は低いので検出には使用できないことが判明した。そこで最終的に下記の 2 種類の遺伝子を検出用に使用することを提案した。

第 1 の候補遺伝子として Flagellin 遺伝子を選択し

Forward

primer :5'-CGGCAGGCACGCTGAGCTTC-3'、

Reverse

primer :5'-GTCGACGACAGCGCCTGGTT-3'、

検出プローブ Probe :

5'-ATCAAGGTGGCGATCGACTCGAGCGGC
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た。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。

候補遺伝子 2 : 16S rDNA (AJ131790)

Forward:5'-CGGCGAAAGCCGGATTAATAC-3'

Reverse:5'-CCACTCCGGGTATTAGCCAG-3'

検出プローブ Probe:

5'-CCTTCGGGCCTCGCGCTATAGGGTTGGC
CGATGGCTGATT-3'

Amplicon: 325 bp

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 プローブで確認する系を作成必要があると考えている。

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 の結果も予測通り *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* と明らかに異なっていた。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。

16S rDNA による遺伝子検出系の改良： 新菌種 *B.thailandensis* を入手し配列を比較した所、*B. pseudomallei* と異なる配列を有することがわかり、新たに *B. pseudomallei* により特異的な配列の primer をデザインすることができた (図 1)。PCR の結果は *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 20fg まで検出する事が出来たので実用レベルの感度が得られた(図 2)。候補遺伝子 2 : 16S rDNA(AJ131790)

Forward:5'-TAATACCGCATACGATCTGAG-3'
Reverse:5'-CCACTCCGGTATTAGCCAG-3'
検出プローブ Probe
5'-CCTTCGGGCCTCGCGCTATAGGGTTGGC
CGATGGCTGATT-3'
Amplicon: 310 bp

環境の病原体のスクリーニング法の作成： 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 6000 種類にすぎない。16S rDNA だけで類鼻疽のような病原体の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、患者の疾病の診断にあたって類鼻疽のようなまれな病原体による感染症を初診で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するようなシステムを導入しなければならない。この考え方に沿うと、レベル 3 の病原体も含む網羅的検出 multiplex PCR 法や増幅産物を確認する DNA マイクロアレイ法を組み合わせる方法がこの目的には適している。

我々はこの目的のために Realtime PCR と Microarray を使ったスクリーニング方法を試作した。

1) PCR primer plate の作成

環境の土壌中の病原微生物のスクリーニングのために 16S rDNA および病原因子を標的にしたプライマーを 1012 種類の微生物について作成した。レベル 3 の病原体には 16S rDNA と病原因子を組み合わせたスクリーニング方法を作成した。プライマーは 96 well もしくは 384 well に分注し、同一プロトコールで実験がおこなえるように工夫した。

2) マイクロアレイの作成

病原体マイクロアレイには細菌の 16S rDNA 配列から配列を選択し、5 末端をアミダイドで標識し 40-50 塩基長の合成オリゴ DNA を作成した。病原微生物 1012 種をマイクロアレイに固定した。

3) すべての病原体の DNA 抽出に対応した共通な破砕法の作成

土壌の病原体は土 2g から、糞便は 0.5g、喀痰は 0.5ml から DNA を抽出する方法を作成した。病原体の破砕方法はグラム陽性、陰性のいずれにも有効なように比重が重たい Giriconium ビーズを Multibeads shocker で物理的な破砕を行い、古典的な phenol-chloroform 法で DNA を抽出した。

4) Realtime 増幅反応

96 well および 384 well の Plate にあらかじめ Primer をいれ乾燥した状態で保存した。DNA のモニター用に SyberGree1 を混合し、自動分注器で well に分注しモニターした。Primer のない一般細菌のモニターには Universal primer を使用し、増幅産物を Cy3 で標識しマイクロアレイと反応させた。

5) マイクロアレイの解析

糞便、喀痰の増幅産物は 2 時間、土壌の増幅産物は 16 時間のハイブリッド形成を行い検出 DNA のシグナルを定量化した。

C. 結果

1) 16S rDNA による遺伝子検出系の改良： 従来、タイの土壌に広く分布すると報告されてきた *B. pseudomallei* 株の中には arabinose 陽性株が多数存在していた。この株は患者から分離される株とは異なりマウスに対する病原性は弱かった。DNA/DNA 類似度の実験からこの

株は *Burkholderia pseudomallei* とは異なる *B. thailandensis* と命名された。この菌種は系統的に *B. pseudomallei* に最も近く、16S rDNA 配列も類似していた。我々が昨年度作成した primer ではこの株の遺伝子の増幅は見られなかったが、より配列の異なった特異 primer を新たにデザインした。この primer の検出感度は 40 fg/ml でほぼ実用的な感度であった。

2) 土壌病原体のスクリーニング方法の作成: Realtime PCR 法によるレベル3、及びレベル2の病原体の screening 方法は PCR 法だけで実験が完結するのが望ましいが、土壌によって *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Burkholderia pseudomallei* の 16S rDNA primer と反応する非特異的な長さの異なるバンドが出現した。全 primer を同じ条件で増幅するため特異性をあげるには限界があるが、実用化段階までにはまだデータの蓄積が必要であった。

しかし、現状では病原体のすべての screening をする方法が無いので 増幅産物を電気泳動してサイズを確認するか、病原体 DNA チップと反応させて確認する手段をとらなければならない。

病原体 DNA チップには 16S rDNA 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が、Universal primer を使用して増幅した産物を病原体 DNA チップと反応させる方法では優位な菌しか検出できない。乾燥した土壌でも通常的一般細菌は 10^6 CFU/g のレベルで生息している。Universal primer で病原菌の signal を検出するには菌相の 0.1-1%にまで増殖した菌群だけであるので 10^3 - 10^5 まで *B. pseudomallei* が増殖しておれば検出できる可能性がある。特に *B. pseudomallei* を検出する目的には特異 primer の方が遥かに感度が高くなる。赤道から亜熱帯の土壌だけでなく、フランスの土壌汚染が報告されているので、国内でサンプリングを試みたが陽性土壌は見つかっていない。我が国の土壌をこの方法で幅広く調査した事例は無いので今後土壌汚染の有無を調査したい。

3) 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。そこでわれわれは一回の検査で網羅的に診断する方法を作成している。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で見つけられような方法が有効であると考えている。我々は表1の病原体を 16 well の PCR tube で同時に検出するシステムを作成したが、まだ臨床材料でテストする段階までは到達していない。*B. pseudomallei* に特異的 primer を利用すれば喀痰中の検出感度は数百個/mlになるが、初診段階で類鼻疽菌による急性肺炎を疑うことは熟練した医師でも不可能にちかい。我々の方法では *Burkholderia* 属の菌種に共通な primer を使用することでこの欠点を補うことができる。*Burkholderia* 属の菌種に共通な primer を使用し、増幅産物が得られたときに病原体マイクロアレイには反応させることで頻度の高い *B. cepacia* なのか、まれな他の菌種であるかが判定できる。通常肺炎のスクリーニングで頻度の高い *B. cepacia* やその類縁菌の検出同定に有効で、隠された *B. pseudomallei* の症例を迅速に発掘することができる。

4) 抗体検査法へのアプローチ: 東南アジアの類鼻疽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。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を計測する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原アレイ、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。

D. 考 察

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。

鼻疽、類鼻疽は慢性経過する症例が圧倒的に多いため、初期の検査で見逃し、通常の細菌性肺炎と考えて治療を開始すると、治療に失敗し慢性化する。感染症が蔓延した場合、原因不明のまま治療が実行され、病原体の数が少なくなるため、遺伝子検査法で検出できなくなることが予測される。従って、このような場合、抗体検査法が必要な検査になる。この解決には鼻疽、類鼻疽に対する抗体の計測が有効になる。皮膚感染、骨髄炎、慢性の肺炎の場合、患者の血液の抗体値は数千倍から数万倍まできわめて高い抗体価の上昇が見られると報告されている。抗体の多くはLPS抗体と分泌たんぱく質であるMeloidinであるが、抗体はしばしば類似の菌である*B. thailandensis*, *B. cepacia*, *P. aeruginosa*に交差反応するため、単独で抗体を計測すると間違った判断を行う可能性がある指摘されている。*B. pseudomallei*に特異的な抗原を検索するには情報の少ない現段階では多くの時間がかかるため、*B. pseudomallei*のLPSだけでなく、*B. thailandensis*, *B. cepacia*, *P. aeruginosa*など類縁菌の抗体も同時に比較できるような網羅的抗体検査法を作成するほうが開発は早く、多目的に使用できる。

レベル2およびレベル3の病原体に対する抗体を一度の検査で計測できるような網羅的抗原アレイの作成が極めて重要な方法になる。近年のナノテクノロジーを使えば微量の抗原で多数の抗体の計測ができるため、開発に値する重要な診断方法となるだろう。

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。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表

- 1) 江崎孝行：感染の成立と免疫応答の理解の進歩. 臨床と病理 21 : 17-25, 2003.
- 2) 江崎孝行：感染症に対する検査法の進歩：遺伝学的検査法. 新世紀の感染症学 (下巻) 日本臨床(臨時増刊号) 373-380, 2003.
- 3) 江崎孝行: Real time PCR と系統アレイを用いた微生物相の網羅的解析方法, バイオインフォマテイクスがわかる. pp.105-111, 羊土社, 2003.
- 4) Kuo, A., J.M. Guibis, J.F. Antcliff, T. Rahman, E.D. Lowe, J. Zimmerman, J. Cuthbertson, F. M. Ashcroft, T. Ezaki, D.A. Doyle: Crystal structure of the Potassium Channel KirBac1.1 (*Burkholderia pseudomallei*) in the closed state. Science 300: 1922-1926, 2003.
- 5) Jiao, Z, Y. Kawamura, N. Mishima, R. Yang, N. Li, X. Liu, and T. Ezaki: Need to differentiate lethal toxin producing strains of *Burkholderia gladioli*, which cause severe food poisoning: description of *B. gladioli* pathovar *cocovenenans* and an emended description of *B. gladioli*. Microbiol. Immunol. 47: 915-925, 2003.
- 6) Kawamura, Y., H. Fujiwara, N. Mishima, Y. Tanaka, A. Tanimoto, S. Ikawa, Y. Itoh, and T. Ezaki: First *Streptococcus agalactiae* isolates highly resistant to Quinolones, with point mutations in *gyrA* and *parC*. Antimicrob. Agents Chemother. 47: 3605-3609, 2003.
- 7) Liu, H., Y. Li, X. Huang, Y. Kawamura, and T. Ezaki: Use of the *dnaJ* gene for the detection and identification of all *Legionella pneumophila* serogroups and description of the primers used to detect 16S rDNA gene sequences of major members of the genus *Legionella*. Microbiol. Immunol. 47: 859-869, 2003.
- 8) Li, Y., Y. Kawamura, N. Fujiwara, T. Naka, H. Liu, X. Huang, K. Kobayashi, and T. Ezaki: *Chryseobacterium miricola* sp. nov. a novel species isolated from condensation water of space station Mir. Syst. Applied. Microbiol. 26: 523-528, 2003
- 9) 河村好章、江崎孝行：シュードモナス属. 感染と抗菌薬 Vol. 6; No.1: 2-4, 2003.
- 10) 山田博子、江崎孝行：DNA チップ・マイクロアレイ法の応用と今後の展望. 臨床検査, 医学書院 47;2: 145-150, 2003.
- 11) 江崎孝行：遺伝子診断と DNA チップ. 新医療 5: 143-144, 2003.
- 12) 江崎孝行：感染症の成立と免疫応答の理解の進歩. 病理と臨床 21:17-25, 2003.
- 13) Li, Y., Y. Kawamura, N. Fujiwara, T. Naka, H. Liu, X. Huang, K. Kobayashi, and T. Ezaki: *Rothia aeria* sp. nov., *Rhodococcus baikonurensis* sp. nov. and *Arthrobacter russica* sp. nov., isolated from the air in the Russian space laboratory Mir. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. in press, 2004.
- 14) Li, Y., Y. Kawamura, N. Fujiwara, T. Naka, H. Liu, X. Huang, K. Kobayashi, and T. Ezaki: *Sphingomonas yabuuchiae* sp. nov. and *Brevundimonas nasdae* sp. nov., isolated from the Russian space laboratory Mir. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. in press, 2004.

H. 特許出願状況

特になし

表1. 急性細菌性肺炎のスクリーニング

Organism	Gene
<i>Neisseria meningitidis</i>	16S rDNA
<i>Streptococcus pyogenes</i>	SLO
<i>Rickettsia/Ehrlichia spp.</i>	Group(16SrRNA)
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	16S rDNA
<i>Chlamyphila /Chlamydia spp.</i>	Group(16SrRNA)
<i>Branhamella catarrhalis</i>	16SrRNA
<i>Pneumocystis carini</i>	Specific antigen MS
<i>Legionella group</i>	16S r DNA
<i>Pseudomonas aeruginosa group</i>	Group(16SrRNA)
<i>Coxiella burnetii</i>	Specific(antigen)
<i>Mycobacterium spp.</i>	Group(16SrRNA)
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Toxin
<i>Legionella pneumophila</i>	DnaJ
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	pneumolysin
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	DnaJ
<i>Orientia tsutsugamushi 16SRNA</i>	16S rDNA
<i>Staphylococcus aureus mecA</i>	MecA
<i>Bordetella pertussis toxin</i>	Specific (Toxin)
<i>Staphylococcus aureus TSST-1</i>	Toxin
<i>Burkholderia spp.</i>	16S rDNA
<i>Enterobacteriaceae(Major)</i>	16S rDNA
<i>Haemophilus influenzae</i>	Specific (16S rRNA)
<i>Bartonella group</i>	16S rDNA
<i>Aspergillus group.</i>	Group(18S rRNA)
<i>Yersinia pestis</i>	Specific(virulence)
<i>Bacillus antracis pag</i>	Protective aqntigen
<i>Prevotella group</i>	16S rDNA
<i>Klebsiella oxytoca group</i>	16S rDNA
Fungus universal	Group(18S rRNA)
Bacterial universal	Universal(16SrRNA)