

## 2. オウム病クラミジアの迅速検出法

動物由来クラミジアの迅速な病原体検出法として有用な方法を検討するため *C. psittaci* の 16s rRNA の領域において probe および primer を設計し、Real-time PCR を実施した。

### C. 研究結果

#### 1. Q熱コクシエラの迅速検出法の検討

##### ①設計した probe および primer の感度

今回設計した遺伝子では、IS 遺伝子に対するプライマーおよびプローブ IS1RT が最も感度が高く、0.01~0.1 個の菌が検出可能であった。IS2RT に関してもほぼ同等の感度が得られた。また、外膜蛋白質に対するプライマーおよびプローブ omp1RT および omp2RT は 1~0.1 個の菌が検出可能であった。結果的に従来の nested-PCR 法と Real Time PCR 法はそれぞれ約 1 個、0.1 個/assay で Real Time PCR 法がやや優れていた。

##### ②設計したプライマーおよびプローブの特異性

omp1 と IS1、omp1 と IS2 の組み合わせで、FAM と VIC の同時検出で検討した。その結果、IS2 は 35 サイクル前から、一般細菌のいくつかに非特異的に反応した。また、omp1 と IS1 は 36 サイクル以降で、いくつかの細菌に非特異的に反応したが、36 サイクル以前では陽性のものはなかった。

#### 2. 鶏卵からの DNA 抽出法の検討

##### ①PBS+NaCl および Tween20 濃度の卵黄への影響

卵黄 500 $\mu$ l に等量の PBS-NaCl を加えたときに、NaCl 濃度が 2.9%以上で顕著なペレット量の減少がみられた。また、Tween20 の濃度はペレットの量に影響しなかった。NaCl 濃度 1M の PBS を加え、ホモジナイズ後、25,000G で遠心した場合に *C. burnetii* の検出感度を落とさずに、卵成分の沈殿量が最も少なくなり *C. burnetii* 遺伝子の抽出効果が最も高いことが判明した。また、同操作による鶏卵（卵黄）中への添加実験を実施した結果、*C. burnetii* 検出感度は  $5 \times 10^2$  個/卵黄 10ml であった。

##### ②スパイク試験の結果

検体あたりスモールスケールでは 1,000 個、ラージスケールでは 10,000 個まで 2 回とも検出可能であった。Omp1 についてもほぼ同様結果であった。

##### ③DNA 抽出法の比較検討

###### ・鶏卵からの検出法についての検討

検討した DNA 抽出法の最適条件下で、Real Time PCR 検出系で得られた感度は 3400 個/卵であった。nested-PCR 法に比べて約 10 倍感度は優れていた。DNA 抽出以降の所用時間は nested-PCR 法と Real Time PCR 法はそれぞれ、7~8 時間、2 時間であった。

##### ④市販鶏卵の Q 熱コクシエラ汚染調査

上記の方法で実際の市販卵からの検出を行ったが 500 個のうち陽性のものはなかった。

#### 2. オウム病クラミジアの迅速検出法の検討

動物由来クラミジア感染症の病原体検出法のため、新たに設計した Real-time PCR 系では、*C. psittaci* とともに動物由来の *C. caviae* および *C. pecorum* が検出可能であったのに対し、*C. trachomatis* および *C. pneumoniae* は検出されなかった。

### D. 考 察

今回設計した Real Time PCR 法のプローブとプライマーは、Q熱コクシエラの迅速検出法としての感度と特異性を有していた。また DNA 抽出法では、従来のカラム遠心法 DNA 抽出キットと複数検体を短時間に処理可能な磁気ビーズを用いた DNA 抽出装置の抽出効果を比較検討したが、良好な結果が得られ、より迅速でコンタミネーションのリスクが軽減できるこれらの検出系の構築は有用と考えられた。現在、さらに抽出条件の改善を進めている。今後は、臨床検体や環境検体を用いた検討を進め、バイオテロに対する対応を目指す。

またオウム病クラミジアの迅速検出法の検討については、これまで検討した動物由来のクラミジアについては特異的な検出法としての有用性が示唆された。今後さらに動物

由来の *C.felis*, *C.abortus* 等での検討をする予定である。

#### E. 結論

バイオテロに対応するため、Q熱コクシエラとオウム病クラミジアの迅速検出法の検討はさらに継続して行う必要がある。

#### F. 健康危機情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 河本知秀、小川基彦、岸本寿男他：海外の屠畜場および農場を視察後同時発症した Q 熱患者 3 症例. 日本感染症学雑誌 76:1030-1034, 2002.
- 2) 小川基彦、河本知秀、川本 歩 ほか：急性 Q 熱の輸入 3 症例における血清抗体価の推移と *Coxiella burnetii* 遺伝子検出の長期検討. 日本感染症学雑誌 77:127-132, 2003.
- 3) 小川基彦、河本知秀、川本 歩ほか：急性 Q 熱患者における血清抗体価の推移と *Coxiella burnetii* 遺伝子検出. 感染と抗菌薬 6:114-115, 2003.
- 4) 小川基彦、アグス・スティヨノ、岸本寿男：Q 熱の抗体価測定の意義と問題点. 化学療法の領域 20:711-715, 2004.
- 5) Toyokawa M, Kishimoto T, Cai Y, Ogawa M, Shiga S, Nishi I, Hosotsubo H, Horikawa M, Asari S: Severe *Chlamydomphila psittaci* pneumonia rapidly diagnosed by detection of antigen in sputum with immunochromatography assay. J Infect Chemother 10:245-249, 2004.
- 6) 蔡 燕、小川基彦、アグス・スティヨノ、福士秀人、田原健司、安藤秀二、岸本寿男：鳥由来検体からのオウム病クラミジアの遺伝子抽出法の検討. 感染症誌2:153-154, 2005.
- 7) 岸本寿男：クラミジア感染症の内科領域における最近の動向. 化学療法の領域 20:413-417, 2004.
- 8) 岸本寿男：クラミジア呼吸器感染症 p1144-1147, 黒川、寺元（編）EBM内科処方指針、中外医学社、東京、2004.
- 9) 岸本寿男、小川基彦、安藤秀二：非定型病原体検査 p71-77, 砂川、尾内（編）小児の肺炎（医薬ジャーナル社、東京）2004.
- 10) 岸本寿男、安藤秀二、小川基彦：非定型病原体の現状. 感染と抗菌薬 7:258-263, 2004.
- 11) 岸本寿男：オウム病. （高久他監修）p1085-1086, 家庭医学大全科、法研.2004.
- 12) 岸本寿男：オウム病. 感染症の診断・治療ガイドライン2004、p114-115、日本医師会、2004.
- 13) 岸本寿男：オウム病. 感染症予防必携 第2版、p109-113、日本公衆衛生協会、2004.
- 14) 岸本寿男、安藤秀二：クラミジア呼吸器感染症の治療ポイントと薬剤処方例. 齋藤（編）感染症診療のコツと落とし穴、中山書店、東京、2004.
- 15) 岸本寿男：オウム病. 感染症の事典 国立感染症研究所学友会（編）、p37-39、朝倉書店、2004.

##### 学会発表

- 1) 佐藤 梢、小川基彦、アグス・セティヨノ、山崎 勉、岸本寿男：Real Time PCR (TaqMan) による *Coxiella burnetii* 検出法の開発. 第 21 回日本クラミジア研究会・第 10 回リケッチア研究会（東京）2003.11.1-2.
- 2) 佐藤 梢、小川基彦、アグス・セティヨノ、山崎 勉、岸本寿男：Real Time PCR (TaqMan) による *Coxiella burnetii* 検出法の開発. 第 52 回東日本感染症学会（横浜）2003.10.30 -31.
- 3) Momoda, T., Ogawa, M., Kojima, T., Ikedo, M., Sato, K., Setiyono, A., Kishimoto, T.: Sensitive and Rapid Detection of *Coxiella burnetii* by Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP), a Novel DNA Amplification Method. American Society for Microbiology 104th General Meeting. New

Orleans, LA, USA. May 24, 2004.

- 4) 百田隆祥、小島禎、池戸正成、小川基彦、佐藤梢、アグス・スティヨノ、安藤秀二、荒川香南子、柳陳堅、岸本寿男:LAMP法を用いた *Coxiella burnetii* の鶏卵からの検出法の検討. 第22回日本クラミジア研究会・第11回リケッチア研究会(倉敷)2004 10.23-24.
- 5) 蔡 燕、小川基彦、佐藤 梢、志賀定詞、アグス・スティヨノ、岸本寿男:オウム病の病原診断における新しいPCR法の検討. 第78回日本感染症学会総会(東京)2004.
- 6) 小川基彦、岸本寿男、佐藤 梢、蔡 燕、志賀定詞、アグス・スティヨノ、多田有希:オウム病集団発生の原因となったヘラジカ由来 *C.psittaci* の遺伝子学的解析とその感染源に関する調査.第78回日本感染症学会総会(東京)2004.
- 7) Chahota, R., H. Ogawa, T. Yamaguchi, H. Fukushi. Genetic Diversity of *Chlamydophila* species prevalent among the captive and feral avian species based on VD2 region of ompA gene. 第22回日本クラミジア研究会/第11回リケッチア研究会合同学術集会(倉敷)2004.

#### H.知的財産権の出願・登録状況

特許取得 なし。

実用新案登録 なし。

その他 なし。

### III. 大学小班

### Ⅲ. 細菌性生物兵器の蔓延防止に関する研究

小班総括者：牧野壯一（帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授）

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）

倉園久生（岡山大学医学部・教授）

#### 1. 炭疽の蔓延防止に関する研究

分担研究者 牧野 壯一 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、今年度は前年度に確立した土壌から直接芽胞を分離する方法について、感度を上げることに成功し、疫学調査に更に有効であることを確認した。同時に、新たなワクチンとして芽胞に対する抗体を用いて感染防御効果を検討し、芽胞が炭疽菌感染に重要な働きをしていること、芽胞に対する抗体が感染防御能を保有することを明らかにした。また、我国で2年まえに起こったヘラジカのオーム病感染事例でブルセラ症と疑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

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。

本研究では炭疽の検出法、特に環境からの検出法の実用化、及びブルセラ特異的診断法の実用化を目的として、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°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°C 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 1 グラムに適量人工的に接種し実験を行った。

2. 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。

3. 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。

4. 土壌の調整方法とビーズとの反応

土壌 1 g 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  $\mu$ l の PBS に再懸濁後、20  $\mu$ 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。

5. マウス感染実験：芽胞に対する抗体と芽胞を Balb/c マウスに感染させ、死亡率および脾臓と肝臓内の菌数を調べた。

6. 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。

7. 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、およびモンゴル国内で広範に 697 血清を分離した。モンゴル国内の 4 県から 23 牧場と 47 人から血清を集めた。そのうち、11 人は簡易凝集試験でブルセラ症と診断されたものである。動物は、羊血清 222、牛血清 219、めん羊

血清 155、ラクダ血清 17、ヤク血清 17 yaks そしてヘラジカ血清 20 であった。

8. 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。ザルコシン抗原 (4  $\mu$ g/ml 濃度の抗原を well あたり 50  $\mu$ 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

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。炭疽菌芽胞の回収率の際も高い条件を確立した。その結果、ビーズには 100  $\mu$ 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  $\mu$ l でビーズは 20  $\mu$ 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。(図 1~4)

### 2) 芽胞に対する抗体による感染防御効果

芽胞に対する抗体 0、0.01、0.1 および 0.5 mg を炭疽菌芽胞  $10^4$  個とそれぞれ混合し、腹腔内投与により感染実験を実施した。死亡率は抗体の投与量に比例した死亡率の減少、および臓器内菌数の現象が確認された (図 5~7)。

### 3) 新たなブルセラ症の免疫学的診断法の開発

全ての血清を急速凝集反応 (Rose Bengal Test; RBT) による国際標準法に従って行ない、次に ELISA を実施した。697 検体中 306 (44.5%) 検体が RBT で陽性と判断された。その内訳は牛で 118 (53.9%)、ヤクで 10 (58.8%)、羊で 95 (42.8%)、めん羊で 51 (32.9%)、ラクダで 4 (23.5%)、ヘラジカで 3 (15.0%) そして人で 25 (53.2%) であった。一方、ELISA 陽性は RBT 陽性血清中の 70.9% にあたる 217 検体であった。

又、ブルセラ症の発生地域で比べると、発生地域では、127検体中98(77.2%)がRBTで陽性であった。その内、94 (95.9%)検体がELISAで陽性であった。ブルセラ症が発生した可能性のある地域では、373検体中 117 (31.4%)検体がRBT

陽性であり、その内85 (72.6%)検体がELISA陽性であった。ブルセラワクチン接種地域では、150検体中66 (44.0%)検体がRBT陽性であった。その内21 (31.8%)検体がELISA陽性であった(以上は結果示さず)。

図1. 抗体量の変化

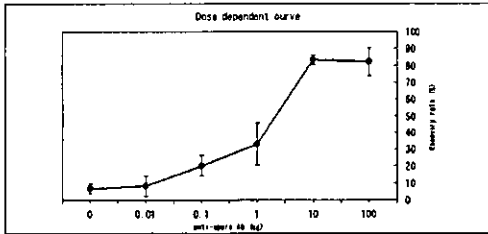


図2. 炭疽菌との特異性

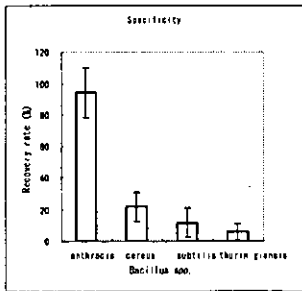


図3. 磁気ビーズとの反応時間

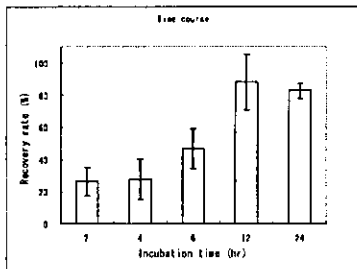


図4. 磁気ビーズの量

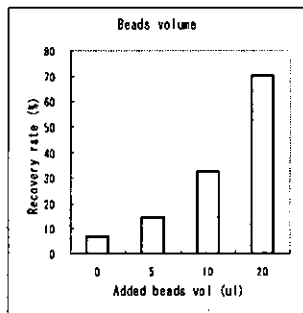


図5. 炭疽菌感染実験

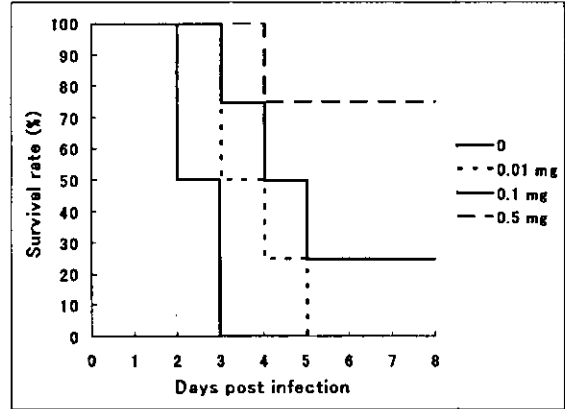


図6. 肝臓および脾臓内炭疽菌数

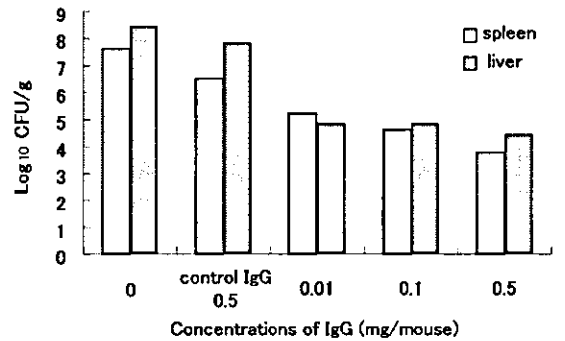


図7. 肝臓および脾臓内菌数の推移

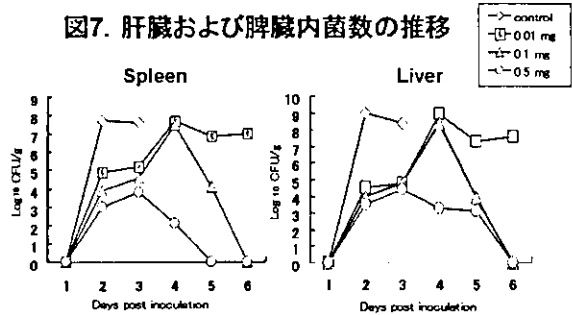
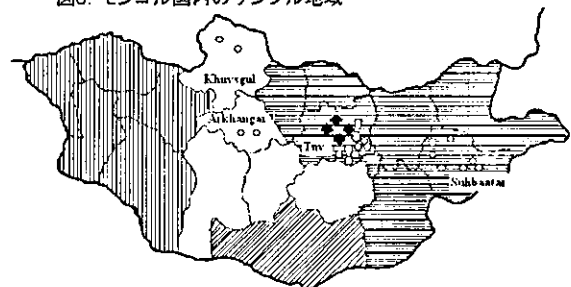


図8. モンゴル国内のサンプル地域





#### 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。今回の改良によりビーズ法は実際に使用可能になると考えられた。抗体の精製及び反応条件の改良が成功したものと考えている。

更に、芽胞に対する抗体は炭疽菌の感染防御能があることが示され、今までの毒素に対するワクチンと同様に芽胞そのものが感染防御能があると推定できた。今後は、そのコンポーネントを同定しワクチン及び感染機構の解明に結び付けていく必要がある。

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。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。昨年度にはザルコシン抗原を用いたELISAの系が以上の問題解決に有効であることを示したが、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り、このシステムを広範なモンゴルでの疫学調査に応用した。現在ブルセラ症と診断された動物のうち、約7割のみが真のブルセラ症であると考えられた。この結果

は、ブルセラ症の発生地域で有意に差があり、本ELISAシステムの有用性が評価できたと考えている。

#### E. 結 論

炭疽菌の分離方法は検出率にまだ問題はあがあるが、従来の培養法に比べ感度の上昇が確認できた。その際使用した、芽胞に対する抗体が炭疽菌感染への防御能を示したことから、新たなワクチンの可能性を示唆するものであった。またブルセラ症の診断の新たな免疫学的方法を発生国で有用性を実証した。

#### F. 健康危険情報

特に無い。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Hiroshi Asakura, Keiko Kawamoto, Toshikazu Shirahata, and Sou-ichi Makino. 2004. Changes in *Salmonella enterica* serovar Oranienburg viability caused by NaCl-induced osmotic stress is related to DNA relaxation by the H-NS protein during host infection. *Microbiol. Pathog.* 36: 147-151.
- 2) H.I. Cheun, K. Kawamoto, M. Hiramatsu, H. Tamaoki, T. Shirahata, S. Igimi and S.-I. Makino. 2004. Protective immunity of SpaA-antigen producing *Lactococcus lactis* against *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection. *J. Appl. Microbiol.* 96:1347-1353.
- 3) Tanaka K, Nishimori K, Makino S, Nishimori T, Kanno T, Ishihara R, Sameshima T, Akiba M, Nakazawa M, Yokomizo Y, Uchida I. 2004. Molecular characterization of a prophage of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104. *J Clin Microbiol.* 42:1807-1812.
- 4) Erdenebaatar J, Bayarsaikhan B, Yondondorj A, Watarai M, Shirahata T, Jargalsaikhan E, Kawamoto K, Makino S-I. 2004. Epidemiological and serological survey of brucellosis in Mongolia by ELISA using

- sarcosine extracts. Microbiol. Immunol. 48:571-577.
- 5) Kim, S., Watarai, M., Suzuki, H., Makino, S-I., Kodama, T., and Shirahata, T. 2004. Lipid raft microdomains mediate class A scavenger receptor-dependent infection of *Brucella abortus*. Microb. Pathog. 37: 11-19.
- 6) Kim, S., Kurokawa, D., Watanabe, K., Makino, S., Shirahata, T. and Watarai, M. 2004. *Brucella abortus* nicotinamidase (PncA) contributes to its intracellular replication and infectivity in mice. FEMS Microbiol. Lett. 234: 289-295.
- 7) Kim, S., Watanabe, K., Shirahata, T. and Watarai, M. 2004. Zinc uptake system (*znuA* locus) of *Brucella abortus* is essential for intracellular survival and virulence in mice. J. Vet. Med. Sci. 66: 1059-1063.
- 8) 牧野 壯一：炭疽. 感染症の診断・治療ガイドライン、(日本医師会編)、pp134-135、医学書院、東京 (2004) .
- H. 特許出願状況  
特にない

表 1. Number of serum samples showing positive results with the RBT and ELISA

Animals	No. of sera examined	No. (%) of RBT positive sera	No. (%) of ELISA-positive among the RBT-positive
Cattle	219	118 (53.9)	85 (72.0)
Sheep	222	95 (42.8)	67 (70.5)
Goat	155	51 (32.9)	33 (64.7)
Camel	17	4 (23.5)	4 (100)
Yak	17	10 (58.8)	8 (80.0)
Reindeer	20	3 (15.0)	3 (100)
Human	47	25 (53.2)	17 (68)
Total	697	306 (43.9)	217 (70.9)

## 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独立専攻再生医科学 教授

研究要旨 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、類鼻疽菌は東南アジアの環境に広く分布し、タイでは水田や土壌からしばしば分離される。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。我々は患者のみならず事例の発祥、及び環境のモニターのために土壌及び水から類鼻疽をはじめとするレベル3の病原体のスクリーニング方法を作成し、実際の土壌及び下水から菌の遺伝子の検出を試みた。

### 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(文献1)。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(Melioidosis)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関わらず、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。

昨年度までの検出系の作成の経過として、*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 rDNA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  
GCGGCCTGGTTCGT-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'-CCTTCGGGCCTCGCGCTATAGGGTTGGCC  
GATGGCTGATT-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異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 fg 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。

## B. 研究方法

### 1. 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 20 fg 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'-CCACTCCGGGTATTAGCCAG-3'

検出プローブ Probe

5'-CCTTCGGGCCTCGCGCTATAGGGTTGGCC  
GATGGCTGATT-3'

Amplicon: 310 bp

### 2. 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 6,000 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。

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表

1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384well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。

実際にタイの研究者から土壌、及び下水から抽出したDNAの分与受け、この方法の有用性を検討した。

### 3. 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1,012種をマイクロアレイに固定した。

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±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。

Realtime増幅反応:96wellおよび384well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SyberGreen1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。

### 4. 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/D. 研究結果及び考察

##### 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*Burkholderia 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(図3)

Realtime PCR方法によるレベル3,及びレベル2の病原体のscreening方法はPCR法を使って環境から遺伝子の増幅を試みた。類鼻疽菌は赤道から亜熱帯の土壌だけでなく、フランス、中国、台湾のからも報告されているので、国内とタイの土壌と下水の分与を受けて実施した。我が国の土壌、及びタイの下水、土壌から抽出したDNAを使ってrealtime PCRおよび病原体のマイクロアレイ法で検出を試みた。その結果、タイの4カ所の下水のうち2箇所、から16S rDNA配列とflagellin遺伝子が検出された。このことからタイの下水には類鼻疽菌が広く分布していることを推測させた。今回は抽出DNAのみの分与をうけたので増幅した遺伝子が類鼻疽菌であったかを培養で確認は出来なかった。しかし下水の培養を行う場合は選択性の良い培地を使用しなければならないので、現実には分離は困難であろう。

分離培地として古くから知られているAshdownの選択培地があるが、我々の経験では選択制が悪く菌の分離は困難である。

参考: Ashdownの選択培地を使用

蒸留水: 475ml

寒天 (No2, Oxoid) :5g

加温したグリセロール: 20ml

0.1%クリスタルバイオレット: 2.5ml

1.0%ニュートラルレッド: 2.5ml

滅菌後、56°Cに保ちGentamycin (1 mg/ml)を2.5 ml加え、平板を作成する。作成後、4°C保存、一週間は使用できる

### 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表3の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3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。

今年度は GroEL, flagellin, Alkaline phosphatase をクローニングし抗原の大量発現系を作成した。さらに LPS 抗原を大量精製し Beads ELISA 法による抗体のスクリーニング方法の作成をおこなった。患者血清の入手が困難であるためこの方法の有効性をひとの血清を使って検証することはできなかった。

### E. 結論

提言として、以下の点をあげたい。

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。東南アジアの累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4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3に示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らる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、骨髄髄、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 Melioidin 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と言われている。*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。

また、参考文献として以下に示す。

- 1) 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.
- 2) Korbsrisate, S., N. Suwanasai, A. Leelaporn, T. Ezaki, Y. Kawamura, and S. Sarasombath. Cloning and Characterization of a nonhemolytic phospholipase C gene from *Burkholderia pseudomallei*. *J. Clin. Microbiol.* 1999. 37:3742-3745.
- 3) Paemanee, A. and Tungpradabkul, S. 1999. Cloning and sequencing of *Burkholderia mallei* flagellin gene. Unpublished, Accession AF111790.
- 4) Brett, P. J., Deshazer, D. and Woods, D. E. 1997. Characterization of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia pseudomallei*-like strains. *J. Epidemiol. Infect.* 118 (2), 137-148.

#### F. 健康危険情報

特に無い。

#### G. 研究発表

- 1) 江崎孝行：ゲノム情報を使った感染症の網羅的診断法。微生物はなぜ病気をおこすのか。日本細菌学会、クバプロ、187-195, 2004.
- 2) 江崎孝行、大楠清文、河村好章：DNA マイクロアレイを用いた環境サンプル中の微生物群集の解析。難培養微生物研究の最

- 新技術. 工藤俊章、大熊盛也 (監修)、シーエムシー出版 (東京) p94-100, 2004.
- 3) Xinxiang Huang, LeV. Pung, Surang Dejsirilert, Prapawadee Tishyadhigama, Ying Li, Hongshen Liu, Kenji Hirose, Yoshiaki Kawamura, Takayuki Ezaki. Cloning and characterization of the gene encoding the z66 antigen of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *FEMS Microbiol. Lett.* 234:239-246, 2004
- 4) Ying Li, Yoshiaki Kawamura, Nagataoshi Fujiwara, Takashi Naka, Hongsheng Liu, Xinxiang Huang, Kazuo Kobayashi, and Takayuki Ezaki. *Sphingomonas yabuuchiae* sp. nov. and *Brevundimonas nasdae* sp. nov., isolated from the Russian space laboratory Mir. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:819-825, 2004.
- 5) Ying Li, Yoshiaki Kawamura, Nagataoshi Fujiwara, Takashi Naka, Hongsheng Liu, Xinxiang Huang, Kazuo Kobayashi, and Takayuki Ezaki. *Rothia aerea* 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.* 54:827-835, 2004
- 6) Guner ES, Watanabe M, Hashimoto N, Kadosaka T, Kawamura Y, Ezaki T, Kawabata H, Imai Y, Kaneda K, Masuzawa T: *Borrelia turcica* sp. nov., isolated from the hard tick *Hyalomma aegyptium* in Turkey. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:1649-1652, 2004.
- 7) 室谷真紀子、大塚喜人、波多宏幸、津端貴子、近江亜矢子、舩尾正俊、中野雅昭、河村好章、江崎孝行 : *Neisseria elongata* 菌血症の 1 例. *日本臨床微生物学雑誌* 14(1): 29-33, 2004.
- 8) 江崎孝行、Yuing Li、大楠清文、河村好章 : 呼吸器感染症の網羅的診断に向けて. *分子呼吸器病* 8:341-344, 2004.
- 9) 大楠清文、江崎孝行 : これからの微生物検査. *遺伝子検査. 臨床と微生物* 31:610-622, 2004.
- H. 特許出願状況  
特になし。



Table 1. 土壤汚染が予測されるレベル3の病原体と検出遺伝子

菌名	遺伝子	増幅産物(塩基)
<i>Bacillus anthracis</i> group	16S rDNA	329
<i>Bacillus anthracis</i> CapA gene	Capsular gene:CapA	408
<i>Bacillus anthracis</i> Protective	Protective antigen ;pag	390
<i>Bacillus anthracis</i> slime	S-layer	555
<i>Brucella melitensis</i>	16S rDNA	319
<i>Burkholderia mallei-pseudomallei</i>	16S rDNA	307
<i>Burkholderia mallei-pseudomallei</i>	Flagelin	268
<i>Chlamydophila /Chlamydia</i> spp.	16S rDNA	272
<i>Chlamydophila psittaci</i>	16S rDNA	413
<i>Coxiella burnetii</i>	surface antigen	552
<i>Coxiella burnetii</i>	16S rDNA	351
<i>Francisella tularensis</i>	17kD major OMP	350
<i>Francisella tularensis</i> group	16S rDNA	307
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	DnaJ	302
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> group	16S rDNA	323
<i>Mycobacterium</i> group	16S rDNA	595
<i>Orientia tsutsugamushi</i>	16S rDNA	285
<i>Orientia tsutsugamushi</i>	OMP	331
<i>Rickettsia</i> spp.	16S rDNA	416
<i>Salmonella</i> spp.	virulence:invA	422
<i>Salmonella typhi</i>	virulence :vipR	409
<i>Yersinia pestis</i>	virulence:pesticin	363
<i>Yersinia pestis</i>	Plasminogen activator	346
<i>Yersinia pestis</i>	Pla:plasminogen activator	346
<i>Yersinia pseudotuberculosis/pestis</i>	16S rDNA	308

図1. 16S rDNA PCRの特異性

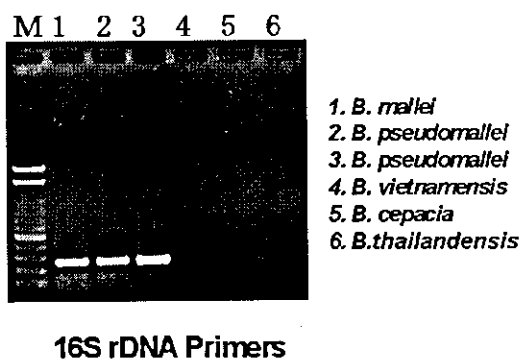


図2. 16S rDNA PCRの検出感度

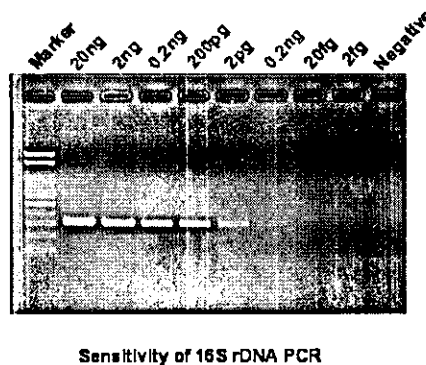
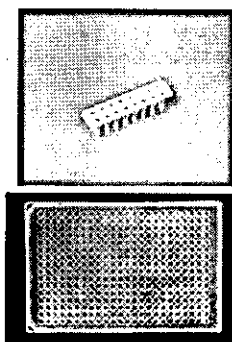
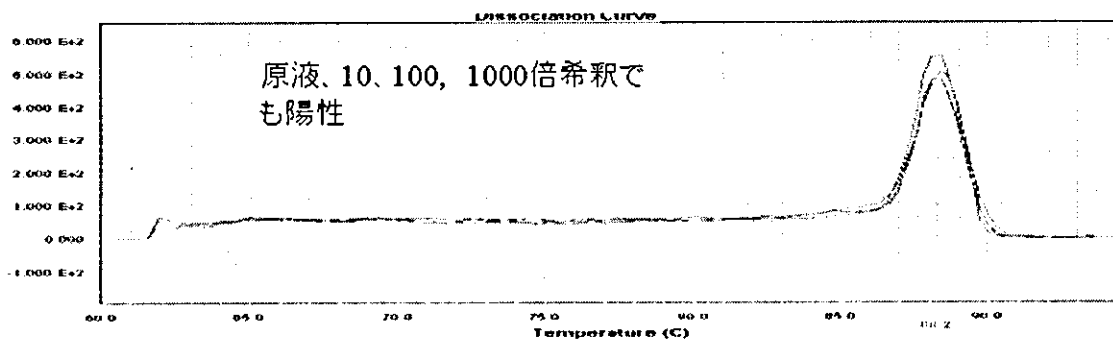


図3. *Burkholderia pseudomallei*の分離例:タイの下水



Level 3: 21 種類のprimerで screening  
 Level 3,2:96 種類のprimerで 4段階  
 希釈して半定量screening



### 3. 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。

平成 14 及び 15 年度で、野兎病菌 (*Francisella tularensis*) の 16S rDNA と表在蛋白である FopA 及び MMP に対する特異的なプライマー対を構築し、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。バイオテロに対する迅速診断法をキット化するには、False positive を絶対に出さない確実な陽性コントロールを添付する必要がある。更に、本研究の対象である野兎病菌は P3 レベル病原体であり、安全な陽性コントロールの構築が必須である。本年度は、対象とする各遺伝子 (16S rDNA、FopA 及び MMP) に対する陽性コントロールを構築して野兎病菌に対する迅速診断法のキットを完成させた。

#### 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。

野兎病菌は危険度 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。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。野兔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。2002年にアメリカ合衆国のペット動物収容施設においてプレーリードッグの野兔病による大量感染死が発生し、プレーリードッグの輸入停止措置が取られた。

現在までに、野兔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。

平成14及び15年度で、野兔病菌(*Francisella tularensis*)の16S rDNAと表在蛋白であるFopA及びMMPに対する特異的なプライマー対を構築し、これらを用いたPCR法による野兔病菌に対する特異的迅速診断法を確立した。バイオテロに対する迅速診断法をキット化するには、False positiveを絶対に出さない確実な陽性コントロールを添付する必要がある。更に、本研究の対象である野兔病菌はP3レベル病原体であり、安全な陽性コントロールの構築が必須である。本年度は、対象とする各遺伝子(16S rDNA、FopA及びMMP)に対する陽性コント

ロールを構築して野兔病菌に対する迅速診断法のキットを完成させた。

## B. 研究方法

1) 各対象遺伝子のPCR法による増幅：下記の各プライマー対を用いて、*Francisella tularensis* subsp. *tularensis* GTC 3P42株のwhole cell DNAに対してPCRを行った。

### ① 16S rDNA:

Forward primer:

AGTAACGCGTAG GAATCTGC

Reverse primer:

CCAAGGCTATTA ACCTTGAG

Amplicon = 356bp

### ② FopA:

Forward primer:

ACTGTATTATTAG GTTCAGCTA

Reverse primer:

CCGTTAGCATCTA CACCTAAGT

Amplicon = 221bp

### ③ MMP:

Forward primer:

TGTTCTACTCTAG GGTTAGG

Reverse primer:

ACTACATTAGCTG TCCACTTA

Amplicon = 350bp

2) PCR反応：反応は、94℃で5分、[94℃で1分間熱変性、50℃で1分間 annealing、72℃で1分間伸長反応]を30 cycle、最後に72℃で7分反応させた。

3) 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。

4) 各PCR産物のcloning：調整した各PCR産物をそれぞれpCR2.1-TOPOにTA cloningし、大腸菌TOP10にtransformationした(図1)。

5) 得られたcloneの検定：

① *EcoRI*による切断：各PCR産物上には*EcoRI* siteはなく、挿入部分の両端に*EcoRI* siteがあるので(図1)、各cloneを*EcoRI*で切断してその挿入断片の大きさを2%アガロースゲルで確認した。

② 得られたclone(FopA cloneは5 clone、MMP