

図3 ペスト菌 Yreka 株の DFA 像 (×1000)

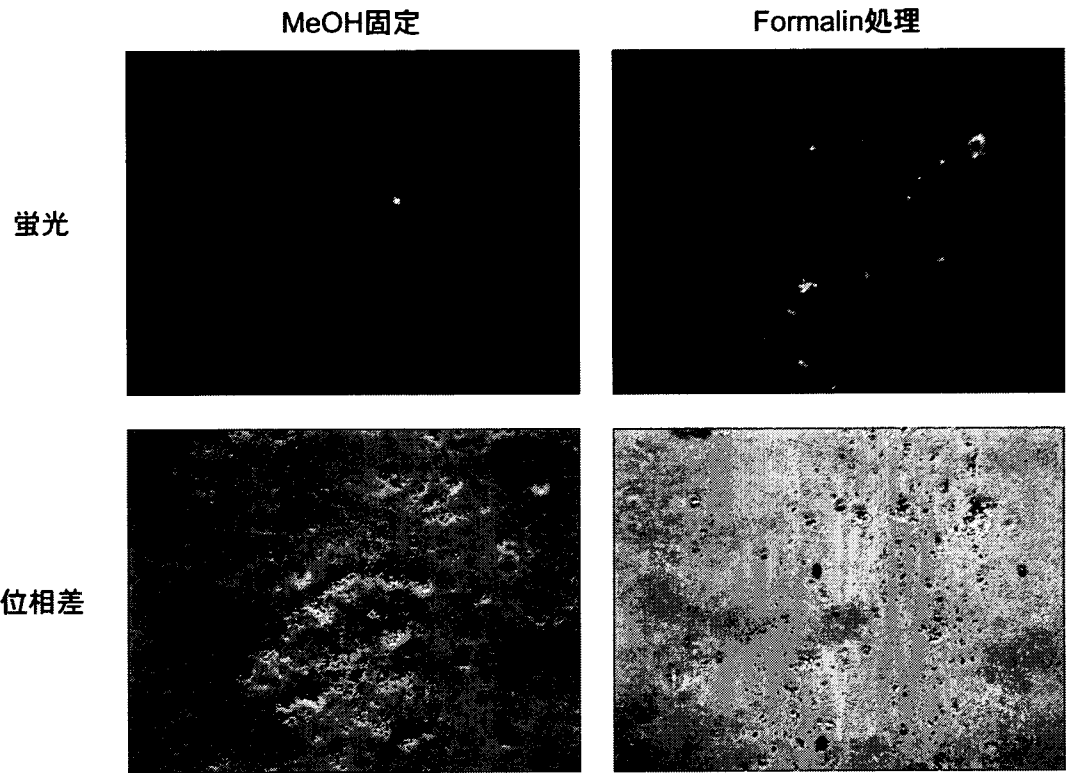


図4 ペスト菌 類縁菌 *Y. pseudotuberculosis* 及び *Y. enterocolitica* の DFA 像 (×1000)

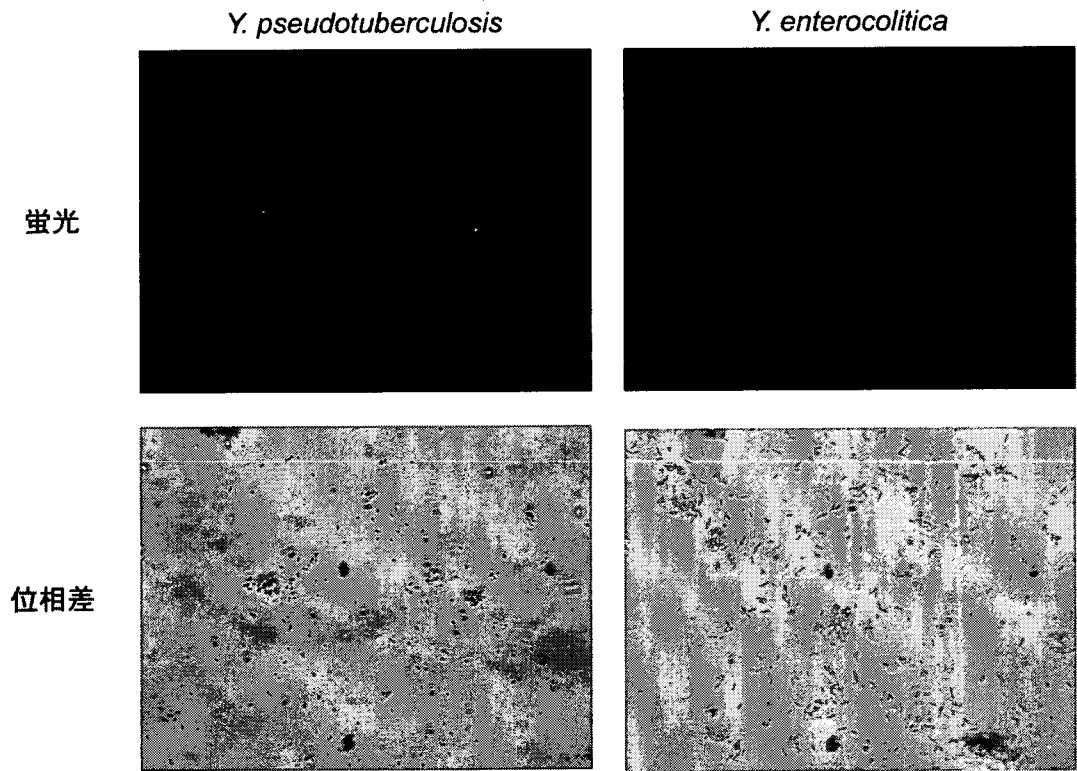


図5 ペスト菌 195P 株の DFA 像 (×1000)

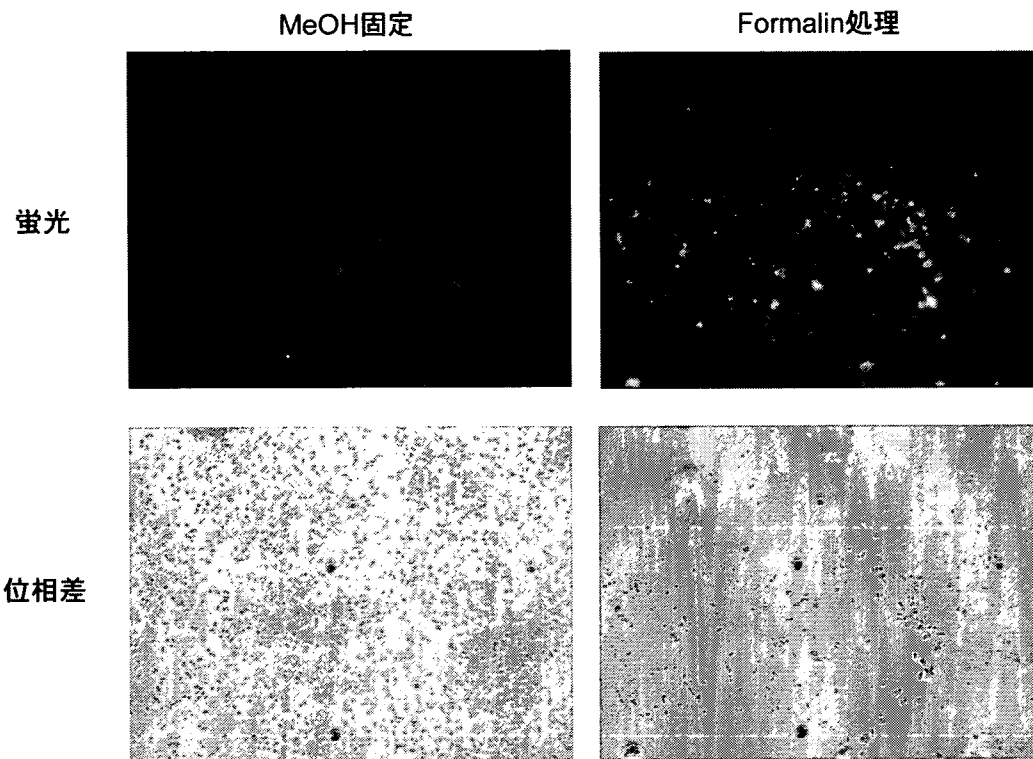


図6 ペスト菌 283F1 株の DFA 像 (×1000)

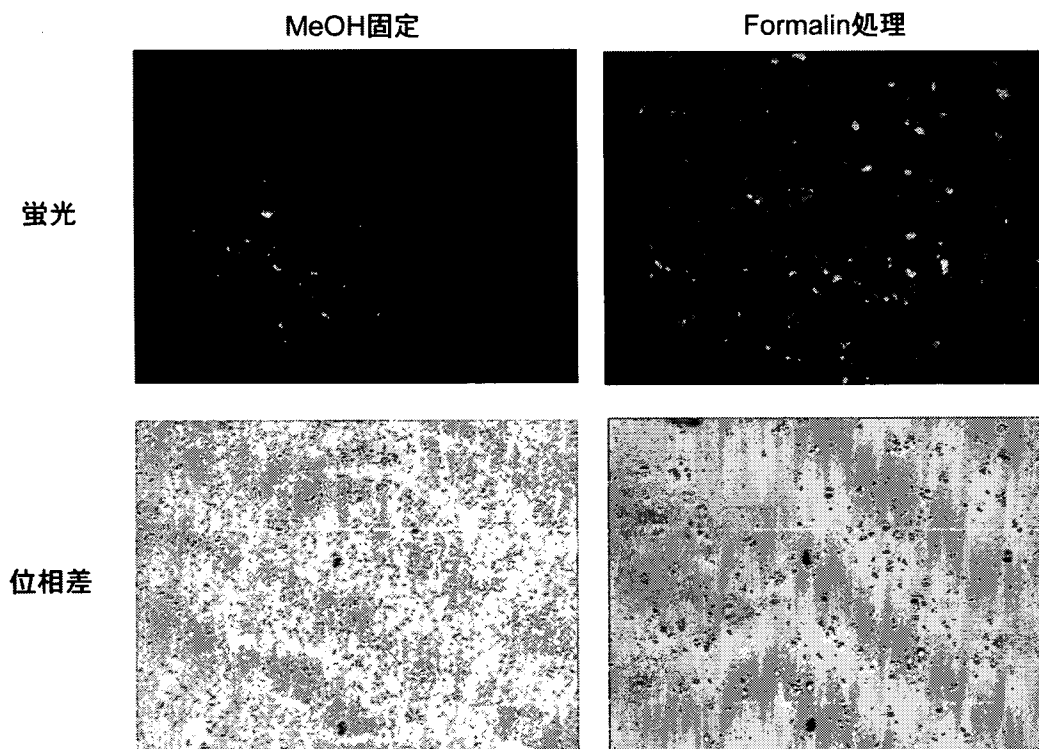


図7 ペスト菌 Alexander 株の DFA 像 (×1000)

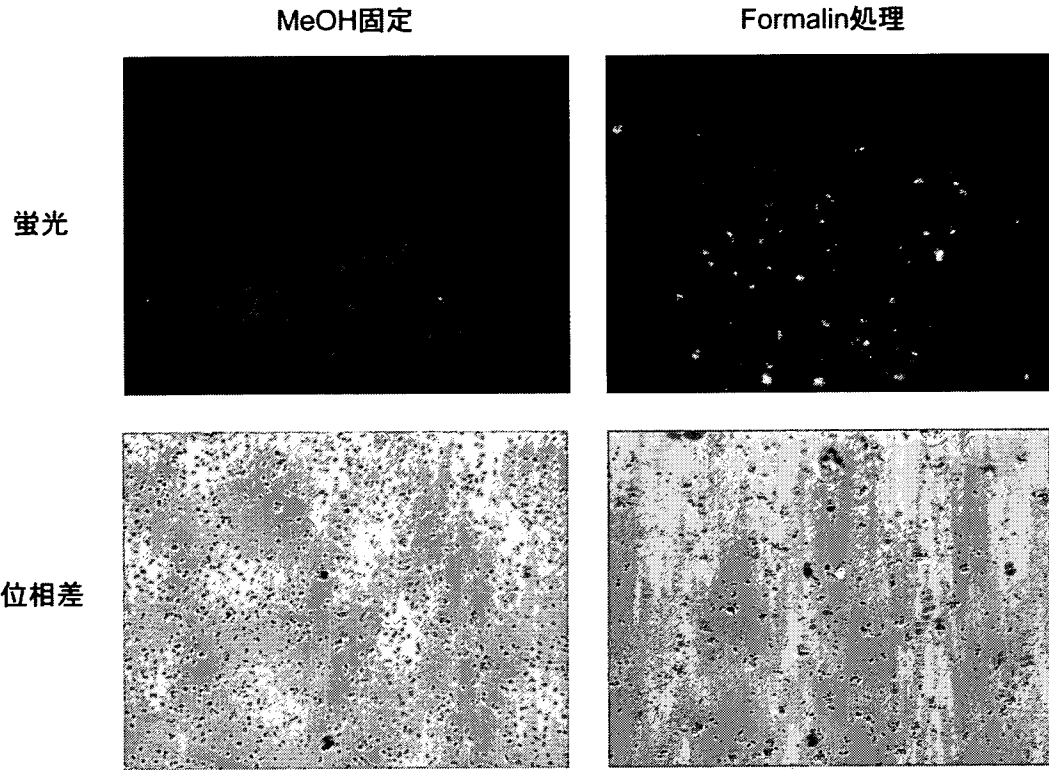


図8 ペスト菌 Bryans 株の DFA 像 (×1000)

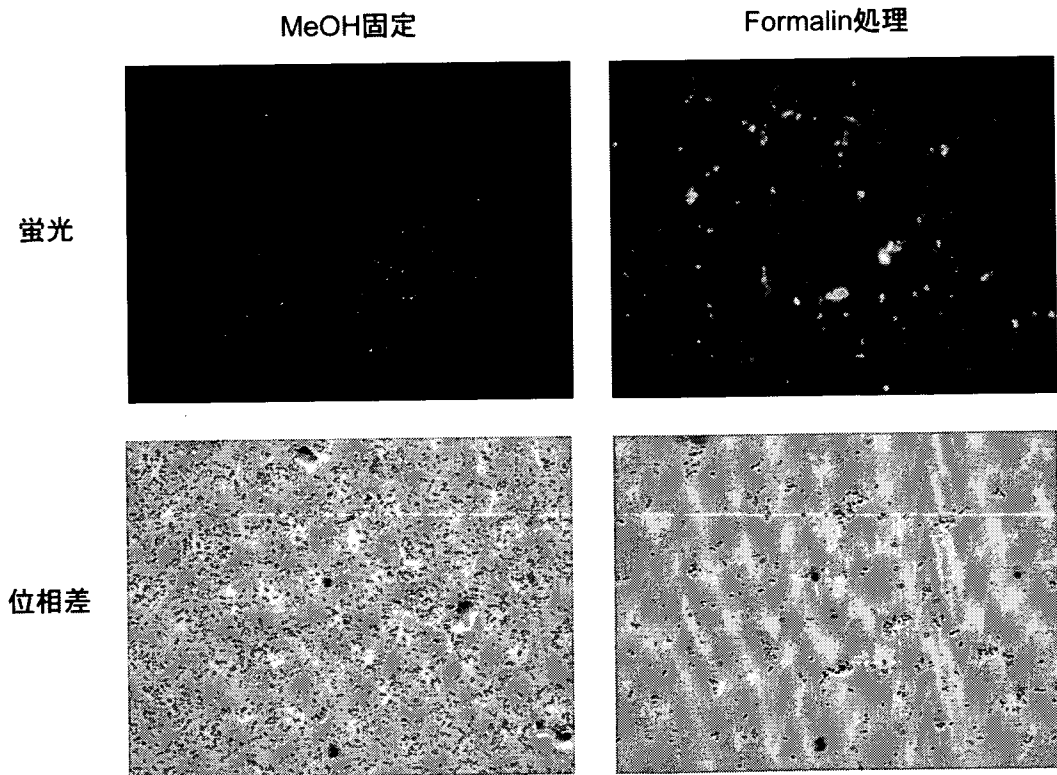


図9 ペスト菌 H1122 株の DFA 像 (×1000)

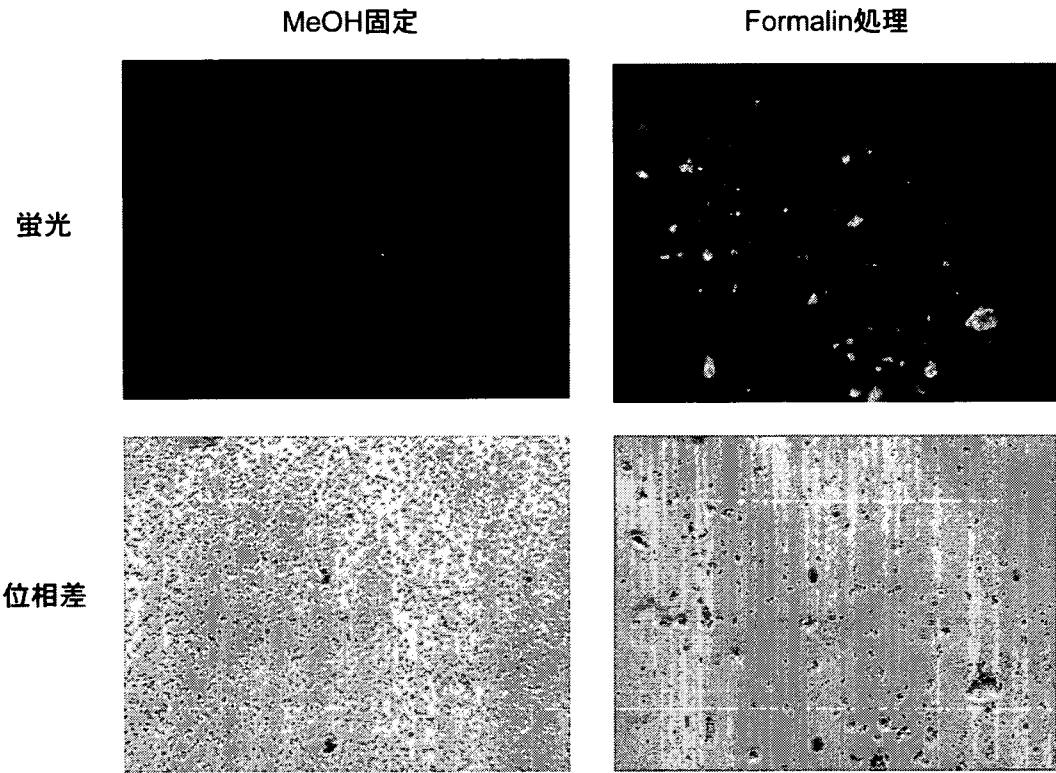
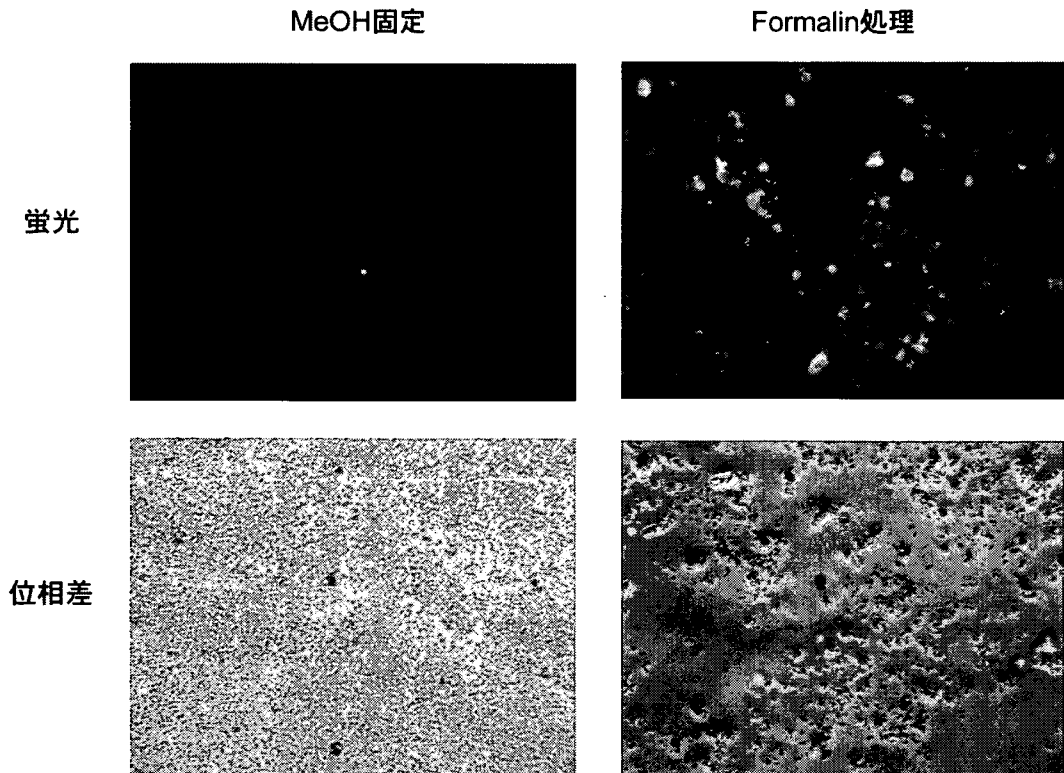


図10 ペスト菌 L27 株の DFA 像 (×1000)



7. 細菌毒素クロストリジウム属菌、ブドウ球菌、VERO 毒素

分担研究者 高橋 元秀 国立感染症研究所 細菌第2部 室長

研究協力者 向本雅郁 (大阪府立大学)、杉山純一 (デンカ生研)

研究要旨 Staphylococcus aureus Enterotoxin B (SEB)と C. septicum α 毒素(AT)の迅速検出系としてイムノクロマトの構築を行った。SEB 検出系ではサンドイッチ ELISA で確立した条件を基に作製した時、非特異バンドが見られ、実用化にはブロッキング剤等の試薬の選定がさらに必要であることがわかった。AT 検出系では 15 分と 30 分のいずれの反応時間でも AT の反応バンドが検出され、陰性対照では擬陽性バンドは検出されなかった。検出感度は 6.3 μ g とサンドイッチ ELISA での検出系に比べて低かったが、発症量以下であり、十分実用化できることが明らかとなった。ボツリヌス毒素によるテロ発生時に治療用抗毒素の枯渇した場合を想定して緊急製造した薬事法外製剤 (平成 15 年) の力価を試験した結果、製造直後の力価と有意な差はなく、安定であることが確認された。また、前研究班で作製したボツリヌス毒素検出用ラッセクス凝集反応キットは複数の地方衛生研究所で有用性が確認されたため、A,B 及び E 型の各型毒素検出キットを追加製造し、ボツリヌスレファレンスセンターに配付した。

A. 研究目的

米国 CDC や CFR では生物テロに用いられる病原体の中で、細菌毒素はボツリヌス毒素、志賀毒素、Staphylococcus aureus Enterotoxin B (SEB)、ガス壊疽毒素に対して警告が発せられている。本研究班では 1. SEB と代表的なガス壊疽疾患の主要病因である Clostridium septicum の α 毒素 (AT) に対する早期診断法としてイムノクロマト法の開発を行う。また、2. 平成 15 年の厚生労働科研費で製造した緊急用ボツリヌス ABEF 多価抗毒素の安定性確認として A 型抗毒素の力価を確認する。ボツリヌス毒素によるテロ発生時に現在国有品である食中毒治療を目的とした国内備蓄ボツリヌス抗毒素では対応が困難なことが予想される。ウマ免疫経験が豊富で、研究者同士の交流のある中国蘭州研究所から免疫血清を輸入して国内 GMP 管理施設で薬事法外の緊急使用を目的とした ABEF 多価ウマ抗毒素を製造したが、緊急時に使用を判断する場合に品質を保証する使用判断材料とする。3. 平成 14-16 年度の研究班で過去に作製したボツリヌス毒素検出用キ

ットは、テロ発生時の有用性を確認するモデルとして、食餌性または乳児ボツリヌス発生時に国内数カ所の地方衛生研究所で評価を依頼していた。その結果、乳児ボツリヌス患者便および不法輸入ボツリヌス毒素医薬品の検査で早期かつ簡易に陽性結果が得られたため、さらに追加製造して国内レファレンスセンターに配付し、マウス試験実施前のスクリーニング用として検査体制を整える。

B. 研究方法

1) Staphylococcus aureus Enterotoxin B (SEB) と C. septicum α 毒素検出用キットの作出

【イムノクロマトの構築】

- a) メンブレン、サンプルパッド、吸収パッド: メンブレンはフローレートが 50~75 sec/4cm の PRIMA 製イムノクロマト用ニトロセルロースメンブレンを用いた。サンプルパッドは Schleicher & Schuell 製のグラスファイバー、吸収パッドは Schleicher & Schuell 製のコットン 900 を用いた。

- b) **検出抗体**：検出抗体には SEB、AT ともにマウスモノクローナル抗体を用いた (clone No. SEB; 18E-6, AT; 9A5)。モノクローナル抗体はハイブリドーマの無血清培養上清を protein G アフィニティーカラムで精製した。モノクローナル抗体にイムノクロマトグラフィー用金コロイド (フナコシ) を標識した。方法は添付マニュアルに準拠した。
- c) **固層化抗体**：SEB、AT ともにアフィニティー精製ウサギポリクローナル IgG を用いた。
- d) **イムノクロマト装置の作製**：図 1 に示す構造のイムノクロマト装置を作製した。各抗体の濃度はサンドイッチ ELISA の条件を参考に数通りの濃度に調整したポリクローナル IgG に最終濃度が 3% になるように BSA を加えた後、幅 1 cm あたり 0.75 μ l をニトロセルローメンブレンに塗布し、50°C、30 分乾燥させ、テストラインとした。サンドイッチ ELISA の条件を参考に数通りの濃度に調整した金コロイド標識モノクローナル抗体に SEB 検出用では最終濃度 1% に skim milk、AT 検出用では最終濃度 3% に BSA を加え、30 分室温静置後、サンプルパッドに 0.5 cm² あたり 100 μ l しみ込ませ、室温で風乾した。ニトロセルロースメンブレンを 0.5 cm 幅に切断し、サンプルパッド、吸収パッドを載せ、イムノクロマト装置を作製し、使用まで 4°C に保存した。
- e) **サンプルの調製**：検査サンプルは精製組換え SEB および AT を Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid) で希釈して用いた。陰性対照には BHI を用いた。

2) 平成 15 年に中国から免疫血清を両国の輸出入規制を適合し、化血研の GMP 管理施設で血清精製、分注等を実施し、薬事法外の緊急使用用 ABEF 多価ウマ抗毒素を製剤化した。安全性試験と力価試験は生物学的製剤基準に掲載される乾燥ボツリヌスウマ抗毒素製剤に準拠

した。今回 A 型抗毒素の力価試験を基準に則り、マウス法で実施した。

A 型標準品を希釈して 0.25mL 中に 0.050 単位を中心に 20% 間隔の濃度単位を含む 5 段階希釈を調整した。また緊急用抗毒素は 20mL の生理食塩液で溶解して、同様の間隔で希釈した。更に、A 型試験毒素を希釈して、0.25mL 中に 1 試験毒素量を含む液を作った。標準希釈及び被検希釈液に調整した毒素を等量に混合し、1 時間静置後、体重 23 ~ 29 日齢のマウス 4 匹を 1 群とし、1 匹当たり混合液 0.5mL を腹腔内に注射して 4 日間観察した。得られた成績は probit 法で統計学的に処理して検体の抗毒素価を求めた。

3) ボツリヌス毒素検出用ラテックス凝集反応用キットの追加製造

高度に免疫したウサギ血清 (抗体) は、毒素を吸着したアフィニティゲルカラムでゲル濾過して精製した後、0.5% ラテックス粒子溶液と精製した抗体を混合して、さらにブロッキングして反応液を調整した。

(倫理面への配慮)

動物実験は国立感染症研究所動物実験委員会の審査許可を受けて行われた。

C. 研究結果

1) イムノクロマトの作成

a) **SEB 検出系の評価**：

イムノクロマト法により SEB を検出するための金コロイド標識抗体および固層化抗体の最適濃度を検討した。金コロイド標識抗体を 1, 2, 4 μ g/100 μ l、固層化抗体を 2, 4, 8 μ g/10 μ g の各組み合わせでイムノクロマト装置を作製し、100 μ g/100 μ l の SEB を含む溶液をサンプルとして、添加後 15 分と 30 分に目視による判定を行った (表 1)。検査サンプルは抗体のいずれの組み合わせにおいても陽性ラインが検出されたが、陰性対照においても、抗体量を十分下げた条件 (金コロイド抗体 1 μ g/100 μ l、固層化抗体 2 μ g/10 μ g) においても擬陽性ラインが検出された。

b) AT 検出系の評価：

イムノクロマト法により AT を検出するための金コロイド標識抗体および固層化抗体の最適濃度の検討を行った。金コロイド標識抗体を 0.25, 0.5, 1, 2 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 、固層化抗体を 1, 2, 4 $\mu\text{g}/10 \mu\text{g}$ の各組み合わせでイムノクロマト装置を作製し、100 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ の AT を含む溶液をサンプルとして、添加後 15 分と 30 分に目視による判定を行った (表 2)。金コロイド標識抗体 1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 、固層化抗体 1 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ およびそれぞれ 0.5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 、2 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ の条件で反応時間 15 分、30 分のいずれにおいても、陽性ラインが検出され、同一条件下での陰性対照においては擬陽性ラインはほとんど検出されなかった。

c) イムノクロマト法による AT の検出感度：

AT に対するイムノクロマトの検出限界を測定するため、金コロイド標識抗体を 1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 、固層化抗体を 1 $\mu\text{g}/10 \mu\text{g}$ の組み合わせでイムノクロマト装置を作製し、50 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ から 2 倍階段希釈した AT を含む溶液をサンプルとして、反応時間 15 分で目視による判定を行った (表 3)。今回作製したイムノクロマト装置での AT の検出限界は 6.3 μg であった。

2) 緊急用抗毒素の安定性試験

2 本の緊急用抗毒素 (ABEF 型混合) を 20mL の生理食塩液で溶解し、A 型抗毒素の力価試験結果を解析した (図 2)。今回溶解した 1 本目の力価 (アンプル当たり) は 11240 国際単位 (IU) で 95% の信頼区間 (CI) は 9530~13200 単位であった。2 本目の力価は 10530 単位で 95% の CI は 8820~12650 単位であった。2 本の試験成績を加重平均した結果、10910 単位で 95% の CI は 9770~12180 単位であった。この値を製造直後の 3 回の試験で得られた 10380 単位 (95% CI 9160-11760) と比較すると有意な差は認められず (表 4)、力価は極めて安定していることが確認できた。

3) ボツリヌス毒素検出用ラッセクス凝集反応

用キットの追加製造

感染研で A,B,E 型個々のボツリヌス毒素イドおよび毒素で高度に免疫した得たウサギ血清をデンカ生研に送り、精製抗体をラッセクス粒子に吸着してキットを作成した。A、B、および E 型のキットの感度は、マウスの致死を指標とした LD₅₀ 値で換算すると約 10~20LD₅₀ であった。各型のキットは衛生微生物技術協議会のボツリヌスの検査機関として登録されているレファレンスセンターに配備して、臨床検体での評価を行う。

D. 考 察

昨年度、SEB および AT のサンドイッチ ELISA を用いた検出系において決定した抗体や試薬の選別および濃度条件を基に、今年度は SEB および AT のイムノクロマト法による検出系を構築した。SEB 検出系では、陰性対照において標識抗体、検出抗体のいずれの濃度の組み合わせにおいても陽性ラインが検出された。サンドイッチ ELISA ではブロッキング剤として skim milk を用いた場合、バックグランドが抑えられていたが、イムノクロマト法ではニトロセルロースメンブレンに対するブロッキング効果が発揮できなかったものと考えられ、ブロッキング試薬の再検討が必要である。

AT 検出系では判定時間が 15 分で十分判定が可能で、陰性対照では擬陽性ラインが出ない条件を確定することができた。この条件での検出感度は 6.3 μg であった。AT のマウスにおける LD₅₀ が 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であることから、今回作製したイムノクロマトはヒトに対する発症量以下の AT を十分検出することが可能である。しかしながら、サンドイッチ ELISA での検出感度は昨年度の結果より 0.1 μg であったことからサンドイッチ ELISA に比べて約 60 倍感度が低かった。試薬の条件等をさらに詳細に検討することでサンドイッチ ELISA と同程度の感度が得られるものとする。SEB や AT がバイオテロに利用される場合は、生活水系への投与や食品への混入が考えられる。食品に混入した毒素をイムノクロマト法で検出する場合、食品に含まれる様々な蛋白や脂質等がアッセイ系を阻害あるいは非特異反応を誘導する可能性がある。今回のサンプル調整にはこの様な場合

を想定して、蛋白や糖が比較的多く含む細菌培養用培地（BHI）をサンプル希釈液として用いた。その結果、AT では非特異反応は見られなかった。反応阻害に関しては、データには示していないが、リン酸バッファーを希釈液に用いた場合検出感度は1.6 μg とBHIを希釈液とした場合より4倍感度が高かった。このことは、BHIに含まれる成分が特異反応を幾分弱めていることを示している。したがって、検出感度をさらに高めるためには、サンプル調整法についてもさらに検討する必要がある。

緊急用に4年前に薬事法外の製剤として製造したABEF型抗毒素中のA型抗毒素価を定量した結果、製造直後の力価と全く等価の結果が得られた。抗体蛋白は非常に安定であり、A型抗毒素価が問題なかったことで他のB.E及びF型抗毒素の力価が減弱している可能性は極めて低い。動物の3Rsを考慮し、A型だけの力価の安定性を確認した。これにより、食中毒患者への治療を目的に現在備蓄されている抗毒素の枯渇がテロ発生時に生じた場合は、緊急使用時の判断材料として力価の安定確認は重要な根拠と考える。

ボツリヌス毒素検出用ラッセクス凝集反応用キットは標準試験法であるマウスを使用しない試験法の替わりができるかを検証することを目標としているが、現時点では実際の臨床検体の試験はあくまでスクリーニング用と位置づけている。今後、食中毒患者および乳児ボツリヌス患者のさまざまな検査材料を試験することにより、測定感度、非特異反応の出現等を検証する。

E. 結論

1. イムノクロマト法によるSEB検出系については非特異反応が高く、ブロッキング剤の検討をさらに行う必要がある。AT検出系においては、発症量以下の毒素量を検出する系を構築することができた。

2. 平成15年に緊急用に製造したABEF型抗毒素のA型抗毒素の力価を生物学的製剤基準の定量法で試験したが、製造直後の値と近似した値が得られ、力価は安定していることが確認された。

3. A,B及びE型各毒素に対する簡易検出キットとしてラッセクス凝集反応用キットを作製して、国内レファレンスセンターに配備した。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表
1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

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

図 1. イムノクロマト装置

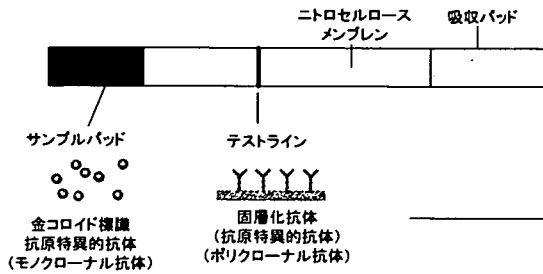


表 1. イムノクロマト法による SEB 検出系の構築

金コロイド標識抗体 ($\mu\text{g}/100\mu\text{l}$)	固着化抗体 ($\mu\text{g}/10\mu\text{l}$)	SEB ($100\mu\text{g}/100\mu\text{l}$)		陰性対照 (BHI medium)	
		判定時間		15分	30分
		15分	30分	15分	30分
	8	+++++	+++++	+++++	+++++
4	4	+++++	+++++	+++++	+++++
	2	+++++	+++++	+++++	+++++
	8	+++++	+++++	+++++	+++++
2	4	+++++	+++++	+++++	+++++
	2	+++++	+++++	+++++	+++++
	8	+++++	+++++	+++++	+++++
表 1	4	+++++	+++++	+++ ±	+++++
	2	+++++	+++++	+++ -	+++++

目視判定: ++ 陽性 + 弱陽性 ± 弱弱陽性 - 陰性

表 2. イムノクロマト法による AT 検出系の構築

金コロイド標識抗体 ($\mu\text{g}/100\mu\text{l}$)	固着化抗体 ($\mu\text{g}/10\mu\text{l}$)	α 毒素 ($50\mu\text{g}/100\mu\text{l}$)		陰性対照 (BHI medium)	
		判定時間		15分	30分
		15分	30分	15分	30分
	4	+++++	+++++	+++++	+++++
2	2	+++++	+++++	+++++	+++++
	1	+++++	+++++	++ ± ±	+++++
	4	+++++	+++++	++ ± ±	+++++
1	2	+++++	+++++	± ± ± -	+++++
	1	+++++	+++++	± - - -	± ± - -
	4	+++++	+++++	± - - -	+ ± ± -
0.5	2	+++++	+++++	± - - -	+ ± - -
	1	+ + ± ±	+++++	- - - -	- - - -
	4	+ + + +	+++++	- - - -	+ ± - -
0.25	2	+ - - -	+ + - -	- - - -	- - - -
	1	± - - -	+ ± - -	- - - -	- - - -

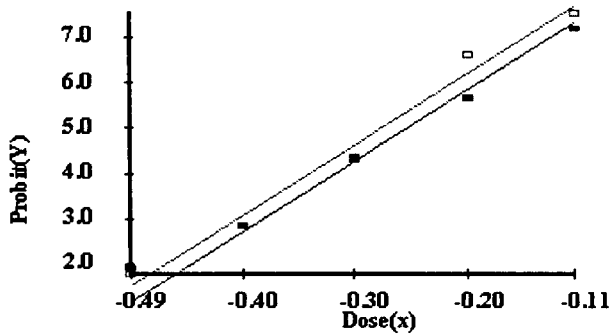
目視判定: ++ 陽性 + 弱陽性 ± 弱弱陽性 - 陰性

表 3. イムノクロマトによる AT の検出感度

α 毒素 ($\mu\text{g}/100\mu\text{l}$)	判定(目視)
50	++
25	++
12.5	+
6.3	+
3.2	±
1.6	-
0	-

図2 緊急用ボツリヌス抗毒素の A 型抗毒素の力価試験解析

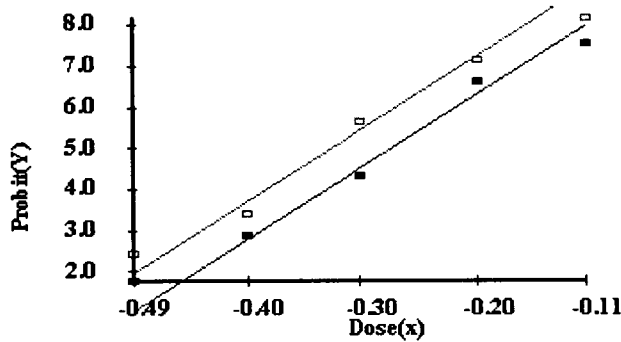
実験1の結果解析 1バイアル当たりの単位:1053 単位



Linearity: $x^2=0.04$: Accept
 LD50 95% Confidence Interval
 Stand 0.55914 : 0.65409, 0.47796
 Linearity: $x^2=0.35$: Accept
 LD50 95% Confidence Interval
 A TAKA 2 07 0.53094 : 0.60263, 0.46779
 Linearity: $x^2=0.39$ Accept
 Parallel $x^2=0.29$: Accept
 Common Slope=15.930

Potency 95% Confidence Interval
 1.053U/ml 1.265, 0.882

実験2の結果解析 1バイアル当たりの単位:1124 単位



Linearity: $x^2=0.35$: Accept
 LD50 95% Confidence Interval
 Stand 0.53094 : 0.60263, 0.46779
 Linearity: $x^2=0.42$: Accept
 LD50 95% Confidence Interval
 A TAKA 07 0.47234 : 0.53631, 0.41600
 Linearity: $x^2=0.77$ Accept
 Parallel $x^2=0.00$: Accept
 Common Slope=17.858

Potency 95% Confidence Interval
 1.124U/ml 1.320, 0.953

表4. 緊急用抗毒素の力価試験結果

	試験回数	1 バイアル当たりの 抗毒素価 (IU)	95%信頼区間
製造直後	3 回	10380	9160-11760
今回 製造後 4 年	2 回	10910	9770-12180

8. 炭疽、ブルセラ、鼻疽・類鼻疽など危険度レベル3に属する細菌の検出及び診断法

分担研究者 牧野 壮一 帯広畜産大学 大動物特殊疾病研究センター 教授

研究協力者 江崎孝行 (岐阜大学・医学部)
倉園久生 (大阪府立大学・獣医学科)、
安田二郎 (警視庁科学捜査研究所)
内田郁夫 (動物衛生研究所・北海道支所)、
川本恵子、大槻隆司 (帯畜大・大動物特殊疾病研究センター)

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。同時に、そのような病原体による感染症の蔓延を防ぐ技術開発も危機管理体制の強化の一つとして急務の課題である。本研究ではバイオテロ候補の危険度レベル3に属し、検出・予防・治療法が不十分である炭疽菌、野兔病菌、ブルセラ菌、鼻疽・類鼻疽菌に主に焦点をあて、研究を進める。炭疽菌では、PCRを用いた特異的検出法は既に確立されているため、治療および予防法に焦点を絞り、炭疽菌芽胞特異的抗体を作成し、その抗体が感染防御能を有することを明らかにしてきた。今年度は、防御抗原に対する抗体を用いた診断法を開発した。野兔病に関しては、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同定法を確立してきた。さらに、平成18年度から、野兔病が疑われる患者に対する免疫学的診断法と野兔病菌に対する免疫学的迅速同定法の確立を試みている。本年度は、平成18年度に確立した野兔病菌に対する特異抗原(FopA-GST融合タンパク質)の精製を行いながら、もう一つの特異抗原(FopA-His融合蛋白)の発現及び精製条件の検討を行った。熱帯および熱帯地方の土壌、水田および河川に生息している類鼻疽菌(*Burkholderia pseudomallei*)に関しては、有効な選択培地がないため、遺伝子を使った迅速高感度なPCR法による検出系が不可欠である。しかしタイの土壌から16S rDNA配列が99%以上類似し、識別が困難な非病原性の*B. thailandensis*が分離される。従って土壌からの検出には*B. thailandensis*と*B. pseudomallei*を識別する必要がある。そこで、16S rDNA、Hypothetical Toxin、FliC、DnaJを使った検出系に加え、カプセル合成因子の一部を用いた類鼻疽特異的検出法を確立してきた。今年度はLuminexを使用した鼻疽/類鼻疽の免疫学的検査法を確立した。さらに、バイオテロに関係する病原体を網羅的な遺伝子増幅法の開発も行った。

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菌種は鼻疽/類鼻疽、野兔病、ブルセラである。そこで、本研究では、危険度を考慮して炭疽菌の検出法の更なる改良・開発、および鼻疽/類鼻疽、野兔病、ブルセラ症などの危険度3に属する病原体に対する検出・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。土壌中に存在する病原体が皮膚の傷口に付着しそ創傷感染、リンパ節へと広がっていく。また粉塵から飛散した菌を吸引し肺炎、あるいは眼球結膜に付着し涙嚢の感染と鼻出血をおこす。涙嚢炎と鼻出血はこの病気の特徴的な所見である。ウマの密度の高い中国の内モンゴルでは現在も感染するケースがあるとされているが、人の感染例も姿を消しつつある。しかし、類鼻疽はヒトの疾患で、亜熱帯から熱帯地方の土壌に分布し東南アジアでは患者数は高く、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なる。タイでは毎年約100例以上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を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。

本研究では炭疽菌を中心とした以上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。

本年度は、免疫学的診断法の開発について、および病原体の網羅的検出法の開発について報告する。

B. 研究方法

B-1. 炭疽菌に関する研究

炭疽菌の防御抗原の融合蛋白を作出した(図1)。定法に従い融合蛋白を精製し(図2)、抗体により確認した(図3)。その後、ELISAにより、野外のワクチン接種牛から得られた血清を用いて検証を行った。

B-2. 野兎病に関する研究

I. MMP-6xHis-tag クローンの構築：

1) 平成18年度で構築したmmp/ pGEX-6P2クローン(Clone No. 5, 7, 10)の塩基配列を決定してクローニングによるmutationがない事を確認する作業を行った。

2) mmp/ pQE-30 クローンの構築：mmp/ pGEX-6P2 クローン (Clone No. 5)の plasmid DNA を BamHI と SmaI で切断して pQE-30 (同じく BamHI と SmaI で切断)にクローニングし

た。

3) mmp/ pQE-30 (Clone No. 3)の塩基配列を sequencing で確認した。

II. mmp/ pQE-30 クローン発現の至適条件の検討：

1) 培養温度：25 C、30 C及び37 Cにおける発現を比較した。

2) 培養時間：3、5、及び24時間培養における発現を比較した。

3) 発現誘導のために添加するIPTGの量によって生じる発現量を比較した。

4) Competent cellの選択：マニュアルで推奨されているM15 (pREP5)とSG13009 (pREP5)の発現量を比較した。

5)MMP-6xHis-tag融合蛋白の可溶性の検討：この蛋白はInclusion body (IB)になる事が判明したので、Ureaによる可溶化を検討した。

6) 発現したMMP-6xHis-tag蛋白の分子量が推定される分子量より小さいことから、Western blotting解析を行った。

III. FopA-GST 融合蛋白の精製：昨年度に確立した FopA-GST 融合蛋白の精製を引き続き行った。

B-3. 類鼻疽に関する研究

類鼻疽菌、鼻疽菌の感染は劇症肺炎よりか慢性感染症の病態をとることが多いため、抗原検査や遺伝子検査では診断できない可能性が高い。そこで血中の抗体を計測する方法を作成した。類鼻疽菌と鼻疽菌は分類学的には近縁で類鼻疽菌の運動性が欠落し、感染宿主への依存性を高めたのが鼻疽菌であり共通抗原を保有している。両者のLPS抗原はこれまでの研究で一種類歯科報告されておらず、単一菌株で両病原体に対する抗体価を計測できると予測し、ホットフェノール法で抽出したLPS抗原を抽出した。一方、タイでは病原性のない類鼻疽菌として報告されてきた菌群が、近年*Burkholderia thailandensis*として独立した菌種として分類されたため、この菌種のLPS抗原も含め、*B.mallei*、*B.pseudomallei*の3菌種、および*Burkholderia*属の基準種である*B.cepacia*、かつて類鼻疽菌が分類されていた*Pseudomonas*属の基準種

P.aeruginosa および大腸菌のLPSをLuminex Beadsに固定し、一度の検査で多種類の微生物の抗体価を計測する方法を作成した。

(倫理面への配慮)

動物実験は所属研究機関の動物実験委員会の審査許可を受けて行われ、DNA組換え実験や病原体の取り扱いには法令に従い安全性を考慮して実験を実施した。

C. 研究結果

C-1. 炭疽菌に関する研究

防御抗原 (PA) の大きさは約85KDであり、GSTとの融合蛋白は予想通りの大きさとなっていた (図2)。さらに、この蛋白はPAに対する抗体を用いて免疫学的に確認された (図3)。さらに、PAは、炭疽菌の毒素である、致死因子と混合するとマクロファージを融解する性質があるため、生物活性を調べた結果、J774細胞を融合することが確認され (図4)、融合蛋白が生物活性を有することが明らかとなった。この融合PAを用いて、免疫学的診断法に利用可能かどうかをELISAを用いて調べた。被検血清は牛から分離し、ワクチン非接種群と接種群を用いた。血清は、ワクチン接種を行っているタイ国において分離した。その結果、ワクチン接種群は全て非接種群に比べ高い値を示した (図5)。

C-2. 野兔病菌に関する研究

I. MMP-6xHis-tagクローンの構築 :

1) 平成18年度に構築した *mmp/ pGEX-6P2* クローン (Clone No. 5, 7, 10) の塩基配列を決定 : 全てのクローンの塩基配列は、既報のTul4遺伝子と完全に一致した。

2) *mmp/ pQE-30* クローンの構築とその塩基配列の決定 : *mmp/ pGEX-6P2* クローンから切り出した *mmp* 遺伝子は *pQE-30* に正しく挿入され (図6)、塩基配列からも証明した。

II. *mmp/ pQE-30* クローン発現の至適条件の検討 :

1) 培養温度 : 25 C、30 C及び37 Cにおける発現を比較したところ、いずれの温度でも強い発現が見られた (図7) が、特に37 Cでの発現が

良かった。

2) 培養時間 : 3、5、及び24時間培養における発現を比較したところ、5時間以上培養すると最も強い発現が得られた (図8)。

3) 発現誘導のために添加するIPTGの量 : 10 μ M、100 μ M、1mMのIPTG量でそれぞれの発現量を比較した結果、10 μ Mで最も強い発現が見られた (図9)。

4) Competent cellの選択 : 発現量の比較により、SG13009 (pREP5)をcompetent cellとして用いる事にした。

5) MMP-6xHis-tag融合蛋白の可溶性の検討 : MMP-6xHis-tag融合蛋白は強発現させるとどの条件下でもInclusion body (IB)になった (図7-9)。しかし、1M以上のUreaを加えると可溶化できた (図11)。

6) Western blotting解析 : His-tagと特異的に反応するMABを用いてWestern blottingを行ったところ、推定されるMMPの分子量より明らかに小さいバンドと反応した

III. FopA-GST融合蛋白の精製 : 昨年度に引き続き、FopA-GST融合蛋白の精製を行った (図12)。

C-3. 類鼻疽に関する研究

1) Luminex Beadsの方法で患者血清、および健康者の血清を使って抗体価を計測した (図13)。患者血清は台湾で発生した患者血清2例、健康者は我が国の成人男性5名の血清をコントロールとして使用し、血清は1千倍希釈しLuminex beadsで計測した。

その結果、健康人の血清の抗体は平均蛍光強度が1000以下であったが、患者血清からは類鼻疽の抗体は1万6千、および2万9千と高値を示した。同時に類鼻疽菌、*B.thailandensis*の抗体も1万以上に野値が得られ、両者が交差することがわかった。

2) LPS抗原が診断的価値があると推測されたことから、この株のLPSを使って鶏に免役し卵抗体を作成した。鶏卵抗体はLuminex beadsに固定し、抗原の検出を行う方法の作成を行った。鶏卵抗体は高力価のものが一羽あたり500mg回収できた。

3) 抗原検査の中で遺伝子を補足する方法も重要な位置を占める。我々はバイオテロに使用

される可能性の高い病原体を10-20種類混合し、検査するカクテルプライマーとその増幅方法を開発した。野兎病菌、ペスト菌、類鼻疽菌、炭疽菌、チフス菌、レジオネラ菌、マイコプラズマ、クラミジア、肺炎桿菌、インフルエンザ杆菌などのプライマーを混合し、同一条件で増幅するカクテル増幅技術は従来のマルチプレックス増幅法と異なり、感度の低下がおこらないため、この基盤技術をウイルス感染症にも適用を広げたい。この技術は細菌では多型が多いDnaJ遺伝子配列を使用することで達成できた。

D. 考察

1) 炭疽菌の検査法は遺伝学的、免疫学的方法はほぼ完成したが、実際に発生国での検証が必要である。

2) 本年度は、遺伝学的迅速同定法のtargetの一つである野兎病菌の表在蛋白のMMPの発現を試みた。昨年度、MMPをGSTとの融合蛋白として強発現させたが、その発現は非常に弱く、精製出来るものではなかった。今年度は、MMP-6xHis-tag融合蛋白として強発現させて、精製に私用できると思われるレベルの発現量が得られた。しかし、この融合蛋白は非常に不安定で、時間の経過とともに分子量が減少した。この原因は粗分画に含まれるプロテアーゼの影響と考えられる。来年度は、菌体懸濁液の段階からプロテアーゼインヒビターを緩衝液に加えて、MMP-6xHis-tag融合蛋白の精製を目指す。

3) *B.thailandensis*は病原性のない類鼻疽菌としてタイの土壌から分離された菌で、現実には人の感染症から分離されることはないの、患者の抗体価の計測には実質上問題はないと考えているのでLPSを抗原とした抗体価の計測は類鼻疽、鼻疽の診断に有用と考える。

4) ウイルスではRT-PCR法を組み合わせ、かつ予測されるSNPのために多種類のprimerを混合する必要がある。プライマーの混合では最大50種類混合しても感度を落とさずに増幅できるためウイルス感染症の診断に適している。今後の課題は増幅産物をLuminex等の多種類のプローブを迅速反応させる方

法を確立することになる。

E. 結論

1) 炭疽菌の検出法はほぼ今年度で完成できたといえる。

2) MMP-6xHis-tag融合蛋白の強発現の条件を確立した。FopA-GST融合蛋白の精製を行った。この精製FopA抗原を用いて野兎病迅速診断法および野兎病菌迅速同定法の構築が可能となった。

3) 鼻疽/類鼻疽の検査法はほぼ完成させた。

4) 今後の課題として網羅的な遺伝子検査法を充実する必要がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

(1) 論文発表

- 1) Wakamoto H, Matsuda H, Kawamoto K, Makino S. Epsilon-polylysine microparticle adjuvant drives cytokine production to Th1 profile.. J Vet Med Sci. 69: 717-723, 2007.
- 2) Iihara H, Niwa T, Shah MM, Nhung PH, Song SX, Hayashi M, Ohkusa K, Itoh Y, Makino S, Ezaki T. Rapid multiplex immunofluorescent assay to detect antibodies against *Burkholderia pseudomallei* and taxonomically closely related nonfermenters. Jpn J Infect Dis. 60: 230-234, 2007.
- 3) R. Ohtsuki^{1,2}, K. Kawamoto^{1,2}, Y. Kato³, M.M. Shah³, T. Ezaki³ and S-I. Makino. Rapid detection of *Brucella* spp. by the loop-mediated isothermal amplification method. J. Appl. Microbiol. 2008 in press.
- 4) Masue N, Deguchi T, Yokoi S, Yamada T, Ohkusu K, Ezaki T: System for simultaneous detection of 16 pathogens related to urethritis to diagnose mixed infection. International Journal of Urology 14:39-42, 2007

H. 知的財産の出願・登録状況

- 1) 特願 2007-183771 生菌の高感度遺伝子検査法

- 2) 国際特許 PCT/JP2007/001042 DnaJ 遺伝子を利用した細菌の検出およびその利用
- 3) 特願 2007-079059 病原微生物のターゲット核酸 増幅法及び増幅用プライマー混合物

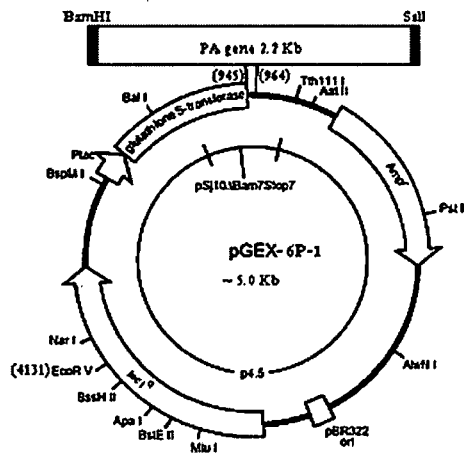


図1. 炭疽菌防御抗原の融合蛋白作成

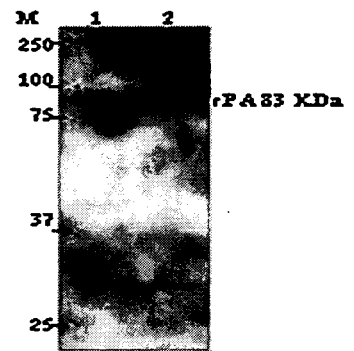


図3. Western blotting showed rPA

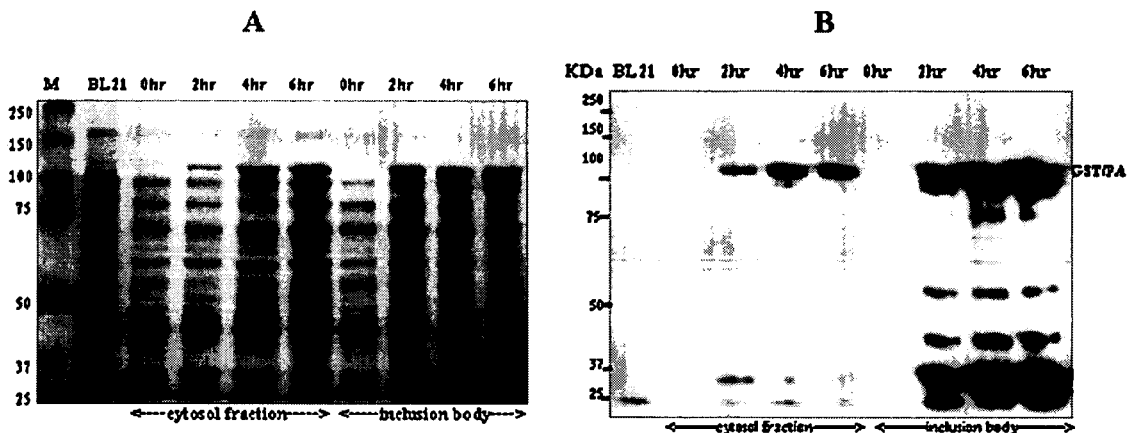


図2. 融合蛋白の精製

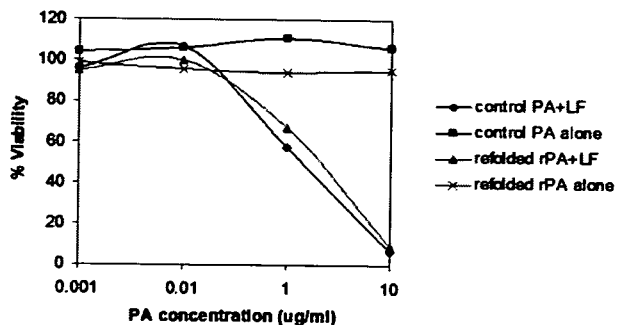


図4. Biological activity of refolded rPA after incubated with LF in the J774.1 cell culture

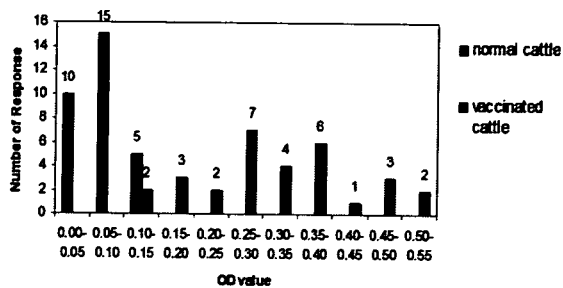


図5. 防御抗原を用いたELISA

図6. pQE-30 vectorを用いたMMP-6 x His tag蛋白の発現

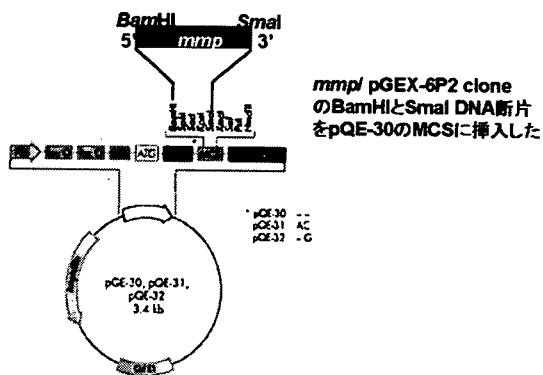


図7. SDS-PAGE profiles of IPTG-induced proteins

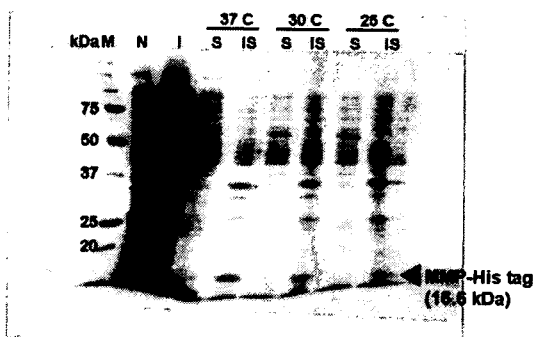


図8. SDS-PAGE profiles of IPTG-induced proteins

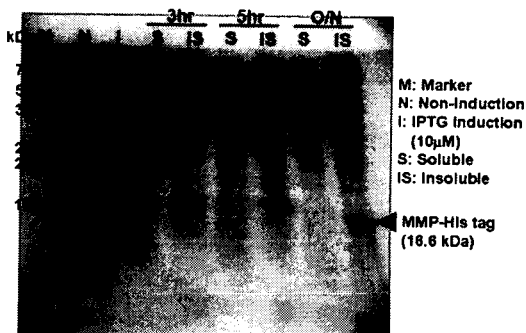


図9. SDS-PAGE profiles of IPTG-induced proteins

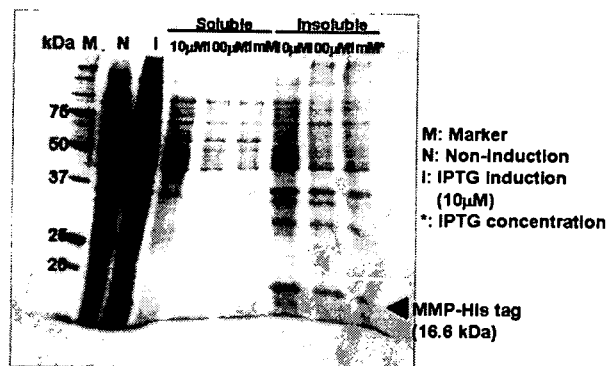


図11. Extraction of MMP-His tag from Inclusion body 図11. Purification of Inclusion Body(MMP-His tag fusion protein) Western Blotting

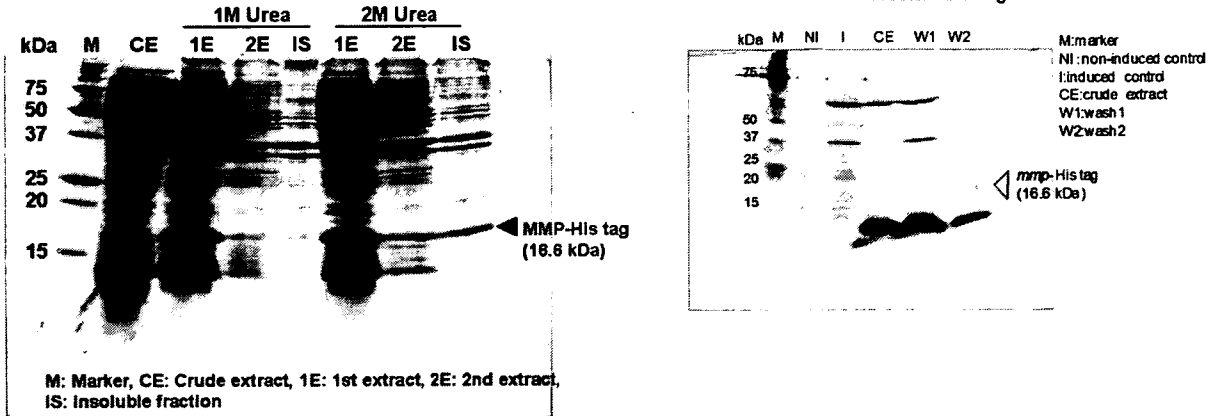


図12. SDS-PAGE and Western blotting analysis of the purified fusion protein

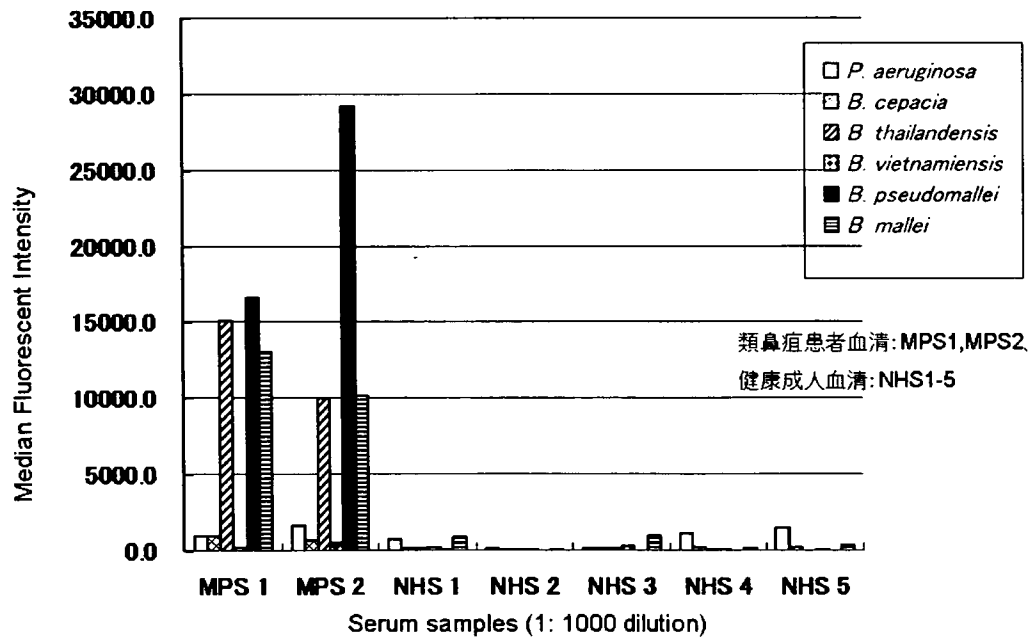
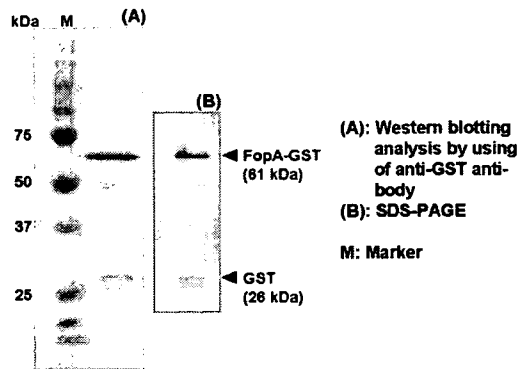


図13. Luminexによる検出

9. バイオテロ関連感染症の臨床診断と治療（1）

分担研究者 岩本 愛吉 東京大学医科学研究所 先端医療研究センター 感染症研究分野 教授
研究協力者 古谷信彦（東邦大学医学部微生物・感染症学）
河野 茂（長崎大学院医歯薬学総合研究科・感染分子病態学）
谷口清洲（感染研・感染症情報センター）
宮崎義継（感染研・生物活性物質部）
國島広之（東北大学医学部附属病院・検査部）
加來浩器（東北大学院医学系研究科・感染制御・検査診断学）
古谷信彦（文京学院大学保健医療技術学部・臨床検査学科）
藤井 毅（東京大学医科学研究所・先端医療研究センター・感染性分野）

研究要旨 生物テロに関連する疾患として特に重要と考えられる疾患について、インターネット上で手軽に情報を得ることを目的とした『生物テロ関連疾患の診断・検査・治療マニュアル』のホームページを作成し、専門家の意見を取り入れながら修正とアップデートをおこなってきた。今年度は、バイオテロ対応ホームページを通じて、より利用者のニーズに応えられるよう診療面の支援にさらに積極的に対応できるような体制を作ることを目指して、国内のインフェクションコントロールドクター（ICD）を対象としたアンケート調査をおこなった。その結果、総数 400 件の回答が寄せられ、全体的に高い評価が得られたが、さらに改善すべき点も明らかとなった。

A. 研究目的

生物テロに用いられる可能性のある病原微生物は多彩で、その多くは極めて稀でかつ重篤な疾病を引き起こす。すなわち、感染拡大防止と生命予後改善のためには、生物テロ関連疾患の臨床診断、検査材料および検査方法の選択、治療法の選択について、多くの医療従事者が正確な知識を、インターネットなどを通じて手軽に得られることが大切である。本研究においては、最新のデータに基づいた、インターネット上で広く利用できる臨床診断および治療マニュアルの作成をおこない、専門家の意見を取り入れながら修正とアップデートをおこなってきた。今年度は、バイオテロ対応ホームページを通じて、より利用者のニーズに応えられるよう診療面の支援にさらに積極的に対応できるような体制を作ることを目指して、より広い意見を求めるために、国内のインフェクションコントロールドクター（ICD）を対象としたアンケート調査をおこなった。

B. 研究方法

メールアドレスが把握されている ICD 3,490 名をアンケート調査対象とした。調査方法は、ICD 協議会の承認を得て、ICD にメールを送信し、ホームページを閲覧の上、アンケート専用ホームページにて回答を得た。実施期間は、平成 19 年 10 月 20 日～12 月 20 日の 2 カ月間とした。

（倫理面への配慮）

特になし

C. 研究結果

アンケート調査の結果、400 件（11.5%）の回答が得られた。回答者の職種別では、医師が 373 名（93.3%）と大半を占めていた。ホームページの全体的な感想については、「非常に参考になる」が 41%、「まあまあ参考になる」が 50%であり、全体的には高い評価が得られた（参考資料 1）。構成に関しては、「すぐに目的の内容にたどり着ける」が 15%、「少し探せば目的の内容にたどり着ける」67%であったが、

「どこに何が書いてあるのかわかりにくい」という意見も 4%にみられた（参考資料2）。ホームページの良いと思われた点については、「具体的でわかりやすい」、「構成がしっかりしている」、「内容が充実している」しているなどの意見が多かった（参考資料3）。一方、今後特に改善すべき点としては、「一般の医師にとってわかりやすい表現にする」、「最新の情報を取り入れる」などの内容に関する意見とならんで、「相談すべき窓口や連絡先を明記する」というホームページの運用に関わる意見も多く寄せられた（参考資料4）。最後に、バイオテロが疑わしい患者が受診した場合に本ホームページを参考にするかどうかという問いに対しては、「必ず利用する」が 40.8%、「おそらくすると思う」が 46%で、「利用しない」という回答は 1 件（0.5%）のみにとどまった（参考資料5）。

D. 考察・結論

今回のアンケート結果では、全体的に高い評価が得られ、本研究の主目的である、より利用者のニーズに応えられるよう診療面の支援にさらに積極的に対応できるような体制を作ることを目指す上で、『生物テロ関連疾患の診断・検査・治療マニュアル』ホームページが極めて有用であることが確認できた。一方で、より最新の情報を取り入れることや、相談窓口を明記することなどの意見も多く寄せられた。今後解決すべき点として、1) 質問等に対応できるネットワークの構築、2) 関連各施設・機関との連携体制の構築、3) 国内の医療施設等への広報、4) CD-ROM、PDF、書籍等による情報提供の検討など、多くの課題が残されている。また、今回の調査対象は ICD という感染症の専門家であり、バイオテロの被害者たちが何か症状に気付いて先ず受診する最寄りの医療機関の医師とは若干意見が異なる可能性も考えられる。これらの点も十分に考慮しながら、ホームページの改訂による内容充実に努める必要があると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表
発表なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

該当なし