

☒ 1. Real-time PCR assay for detecting EBOV genome (L gene)

LightCycler Protocol

Program Name		Activation					
Cycles		1				None	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (hh:mm:ss)	Slope (°C/sec)	2 nd Target Temp (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
1	95	00:15:00	20	0	0	0	None

Program Name		PCR					
Cycles		50				Quantification	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (hh:mm:ss)	Slope (°C/sec)	2 nd Target Temp (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
1	95	00:00:15	20	0	0	0	None
2	52	00:00:25	20	0	0	0	Single
3	72	00:00:20	20	0	0	0	None

Program Name		Cooling					
Cycles		1				None	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (hh:mm:ss)	Slope (°C/sec)	2 nd Target Temp (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
1	30	00:00:30	20	0	0	0	None

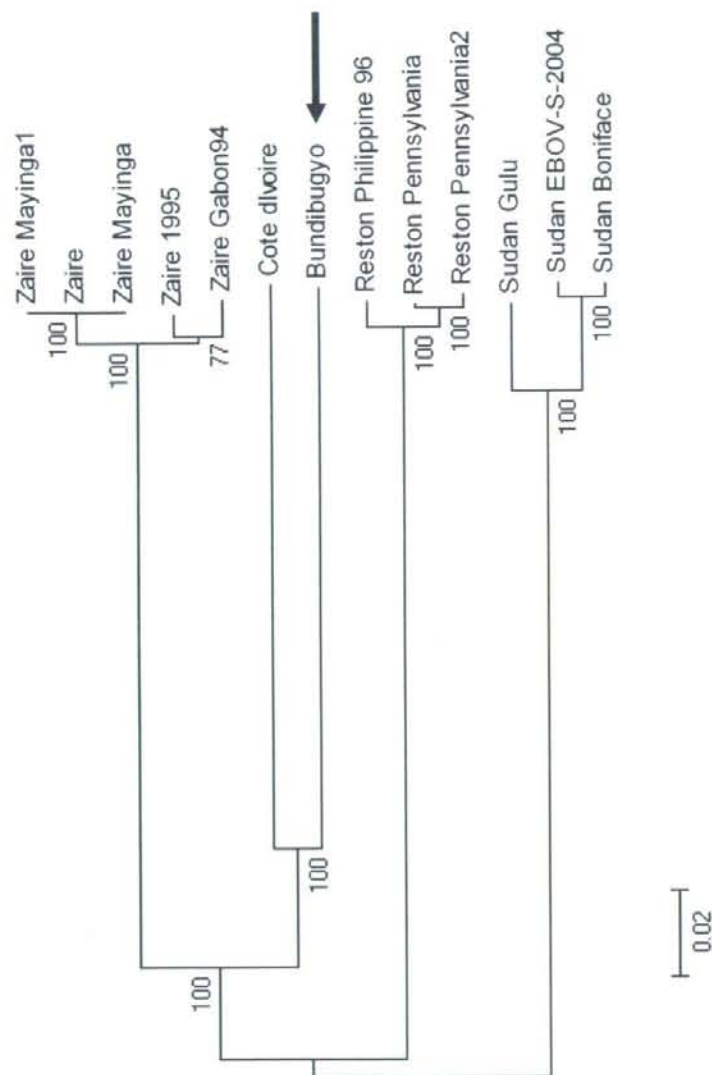


Fig 2. Phylogenetic relationship of Ebola viruses based on NP gene sequences

Neighbor-Joining method with a bootstrap value of 1000 replicates. The percentage of replicate trees in which the associated virus clustered together in the bootstrap test are shown next to the branches. Codon positions included were 1st+2nd+3rd+Noncoding. All positions containing gaps and missing data were eliminated from the dataset (Complete deletion option). There were a total of 2219 positions in the final dataset. Phylogenetic analyses were conducted in MEGA4.

図3. Bundibugyo ebolavirus 遺伝子の検出

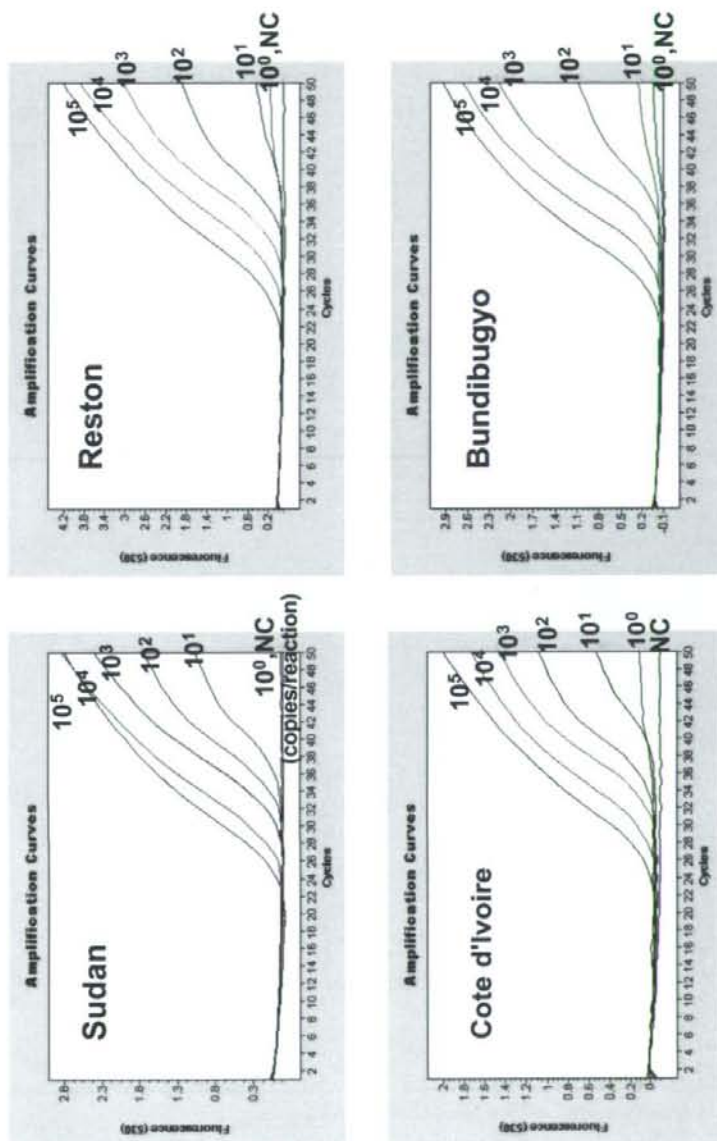
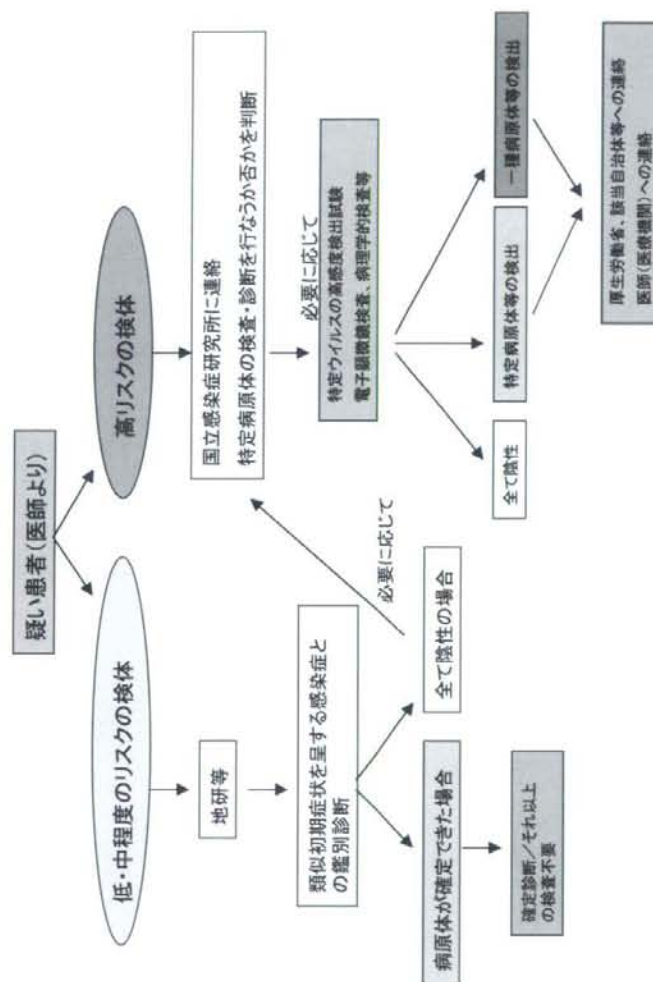


図4. バイオテロの可能性のあるウイルス等の診断スキーム



3. ウイルスによる人獣共通感染症の迅速診断法の開発

研究分担者 加来義浩 国立感染症研究所 獣医科学部

研究協力者 井上 智、野口 章、奥谷晶子 (国立感染症研究所・獣医科学部)

研究要旨 人獣共通感染症の病原体 (zoonotic agent) の中には、比較的容易に伝播され、発病率、致死率が高いなどの特徴をもち、発生時にパニックを誘発するなど、社会的な影響が大きいものも少なくない。本課題では、ヘニパウイルス感染症、リッサウイルス感染症など、国内での診断体制が十分に整備されていない人獣共通感染症を中心に、発生時・平時の両面に応用できる迅速診断法の開発・高度化を目的としている。

今年度は、抗ニパウイルス (NiV) -F, G 蛋白質ウサギポリクローナル抗体を用いた抗原検出 capture ELISA の開発を行った。4 種類のウサギ抗血清 (抗 NiV-F が 2 種類、抗 NiV-G が 2 種類) より IgG を精製し、捕捉抗体および検出抗体としての反応性を検討した。同じ希釈系列の不活化 NiV 抗原に対して、capture ELISA と conventional ELISA を行ったところ、前者は後者よりも約 4 倍高感度であることが確認された。今後、NiV-F/G 蛋白質発現シュードタイプウイルスおよび感染性 NiV を用いて、検出限界の確認を行う予定である。

A. 研究目的

ニパウイルス (パラミクソウイルス科ヘニパウイルス属 *Nipah virus*: NiV) 感染症は、1998 年～99 年にかけてマレーシア、シンガポールで初めて発生し、ヒトに致死的な急性脳炎、ブタに主に呼吸器感染症の流行をもたらした新興の人獣共通感染症である。本ウイルスの自然宿主はオオコウモリであり、オオコウモリからブタに感染したウイルスが、その後ヒト、イヌ、ネコなどに伝播したと考えられている。その後、本症はバングラデシュ、インドで散発しており、同地域では NiV がオオコウモリ→ヒトあるいはヒト→ヒトに直接伝播した可能性が指摘されている。

これまでに日本国内での自然発生および、海外からの輸入症例は報告されておらず、本症を疑う症例が出現した場合、迅速に原因病原体を特定するとともに、発生の疫学的背景によっては他の宿主動物における感染状況を調べる必要がある。

これまで感染研 獣医科学部では、NiV 診断法として、遺伝子検出系 (リアルタイム PCR)、抗体検出系 (ELISA、シュードタイプを用いた

中和試験)、抗原検出系 (ウイルス分離、感染細胞における IFA) の整備を行ってきた。このうち特にリアルタイム PCR は、バイオテロ疑い事例の発生時に、迅速診断系として有効である。しかし、ゲノム (特に PCR プライマーの領域) に人為的に変異が加えられた病原体が、バイオテロに使用された場合、PCR では検出できない可能性がある。このため、迅速診断系のひとつとして、PCR よりも幅広い変異に対応できる抗原検出系の整備が求められてきた。

そこで我々は、抗 NiV-F, G 蛋白質ウサギポリクローナル抗体を用いて、抗原検出 capture ELISA の構築を行った。まず、昨年度作製したウサギポリクローナル血清より、IgG を抽出し、捕捉抗体および検出抗体としての反応性を検討した。続いて、同じ希釈系列の不活化 NiV 抗原に対して、capture ELISA と conventional ELISA を行い、両者の感度を比較した。

B. 研究方法

1) 抗 NiV-F, G 蛋白質ウサギポリクローナル抗体の精製

昨年度、プラスミド DNA 免疫により作製し

た、抗 NiV-F, G 蛋白質ウサギポリクローナル血清 4 種類 (抗 NiV-F が 2 種類、抗 NiV-G が 2 種類) 各 500 μ l から、IgG Purification Kit-G (同仁化学)を用いて、IgG を精製した (F1, F2, G3, G4)。方法は、キット添付のプロトコールに従った。これら 4 種類の IgG を capture ELISA における捕捉抗体として利用した。

続いて、上記 IgG 各 200 μ g 相当から、Peroxidase Labeling Kit-NH₂ (同仁化学)を用いて、peroxidase (POD) 標識を行った (F1-POD, F2-POD, G3-POD, G4-POD)。方法は、キット添付のプロトコールに従った。これら 4 種類の IgG を capture ELISA における検出抗体として利用した。

2) conventional ELISA

4 種類の検出抗体 (F1-POD, F2-POD, G3-POD, G4-POD) の反応性を検討するため、不活化 NiV 抗原に対して conventional ELISA を行った。

具体的な手順は以下のとおり。

① 固相化抗原には、NiV 感染 Vero 細胞の可溶性 (不活化) 抗原液、非感染 Vero 細胞の可溶性抗原液の 2 種を用いた。これらを $\times 2,000$ 希釈し、96 穴プレート (Nunc Maxisorp) に、各ウェル 100 μ l ずつ加え、固相化した。(4 $^{\circ}$ C、一晚) ② PBS-T (PBS, 0.05% Tween 20) で洗浄後、5% skim milk PBS-T で 1 時間ブロッキングした。③ 検出抗体を、1% skim milk PBS-T で $\times 500 \sim \times 8,000$ の範囲で 2 倍ずつ階段希釈した。これらを 100 μ l/well ずつ、ブロッキング後のプレートに反応させた (37 $^{\circ}$ C、1 時間)。④ 洗浄後、 $\times 50,000$ 希釈した HRP 標識 Protein AG (Pierce) を 100 μ l 加え、反応させた (37 $^{\circ}$ C、1 時間)。⑤ 洗浄後、TMB 基質液 Sureblue (KPL) を用いて発色させた。10 分後に 47% 硫酸液で反応を停止し、450nm の波長で吸光度を測定した。

3) NiV 抗原検出 capture ELISA

上記で作製した捕捉抗体、検出抗体を用いて、capture ELISA を行った。

具体的な手順は以下のとおり。

① 捕捉抗体を PBS で 20 μ g/ml に希釈し、96 穴プレートに各ウェル 100 μ l ずつ加え、固相化した (4 $^{\circ}$ C、一晚) ② 洗浄後、5% skim milk PBS-T

で 1 時間ブロッキングした。③ 抗原検体を、1% skim milk PBS-T で希釈し、これらを 100 μ l/well ずつ加え、反応させた (37 $^{\circ}$ C、1 時間)。④ 洗浄後、希釈した検出抗体を 100 μ l 加え、反応させた (37 $^{\circ}$ C、1 時間)。その後の発色反応は、conventional ELISA と同様とした。

C. 研究結果

1) 検出抗体の反応性の検討

不活化 NiV 抗原に対する conventional ELISA により、検出抗体の反応性の比較を行った (図 1)。全ての検出抗体について、固相化抗原の濃度に依存した ELISA 値の減少が認められた。反応性は、G3-POD > G4-POD > F2-POD > F1-POD の順に低下し、抗 NiV-G と抗 NiV-F の間に著しい差が見られた。このことから、以降の実験には、G3-POD、G4-POD の 2 種類を使用した。

2) 捕捉抗体/検出抗体の組み合わせの検討

捕捉抗体として 4 種類 (F1, F2, G3, G4)、検出抗体として 2 種類 (G3-POD, G4-POD) を用いて、capture ELISA を行い、最も高感度な結果を示す捕捉抗体/検出抗体の組み合わせを調べた。抗原として、不活化 NiV 抗原を $\times 2,000$ から 2 倍ずつ階段希釈したものをを用いた。図 2 に示すとおり、捕捉抗体として G3、検出抗体として G3-POD を利用した際に、最も高感度となることが示された。

3) capture/conventional ELISA の感度比較

同じ希釈系列の不活化 NiV 抗原に対して、capture ELISA と conventional ELISA を行い、検出限界を調べることににより、感度の比較を行った。不活化 NiV 抗原は、 $\times 2,000$ から 2 倍ずつ階段希釈したものをを用いた。図 3 に示すとおり、ELISA 値 > 0.2 (無抗原対照ウェルの値をひいたうえで) を陽性とした場合、conventional ELISA では $\times 8,000$ まで検出したのに対し、capture ELISA では $\times 32,000$ まで検出可能であった。反応曲線を比較したところ、抗原濃度が比較的高い $\times 4,000$ までは、conventional ELISA の方が高感度であったのに対し、 $\times 8,000$ より低濃度の抗原では、capture ELISA の方が高感度であった。

D. 考 察

バイオテロ疑い事例の発生時には、特異性の高い迅速診断系の選択肢を、なるべく多く確保することが不可欠である。本課題では、ゲノムに人為的な変異が加えられた病原体も、高感度に検出することを目的に、NiV 抗原検出 capture ELISA の開発を行った。

捕捉抗体および検出抗体には、抗 NiV-F, G 蛋白質ウサギポリクローナル血清より精製した IgG を用いた。ポリクローナル抗体を用いることにより、モノクローナル抗体を用いた場合よりも、(単一のエピトープ認識によらない)幅広い抗原性状のウイルス検出が可能になると考えた。また、本血清はプラスミド DNA を高度免疫して作製したものであることから、培養細胞由来の外來蛋白に対する抗体を含まないことから、高い特異性を示すことが期待された。

POD 標識した検出抗体の反応性を比較したところ、G3-, G4-POD と F1-, F2-POD の間で顕著な差が認められた (図 1)。全ての抗体液にはほぼ同等量の IgG が含まれると考えられることから、F1, F2 では、POD 標識により抗体の affinity が低下した可能性も考えられた。しかし、非標識の F1, F2 も捕捉抗体として機能しない (図 2) ことから、抗 NiV-F 抗体の量的な問題を再検討した。IgG 精製前のポリクローナル血清を用いて、NiV 不活化抗原に対する ELISA を行ったら、G3, G4 血清は、F1, F2 血清よりも、2 倍以上高い ELISA 値を示した (data not shown)。このことから、F1, F2 には、G3, G4 と同等量の IgG が含まれているものの、前者には NiV-F に対する特異抗体の濃度が低いことが、ELISA の低反応性につながったと考えられた。

最も高感度となった捕捉抗体/検出抗体の組み合わせ (G3 と G3-POD) を用いて、階段希釈した不活化 NiV 抗原に対して capture ELISA を行ったら、conventional ELISA よりも約 4 倍高感度であることが確認された (図 3)。反応曲線が $\times 4,000 \sim \times 8,000$ で逆転したことについては、図 4 に示すとおり、capture ELISA の方が低濃度の抗原を効率よく捕捉できるためと考えられた。

本法の出発材料となったウサギポリクロー

ナル血清は、プラスミド免疫により作製したものであり、感染性ウイルスの取り扱いや蛋白の精製を必要としなかった。また、捕捉抗体/検出抗体に用いた IgG は、キット類を用いて簡便に精製、標識したものであることから、短期間に系を構築できるという利点がある。今後、本法の実用化に向けて、まず NiV 粒子に対する検出限界を確認する必要がある。しかし感染性 NiV は、海外の主要な研究機関では BSL4 施設で扱われており、わが国では使用できない。そこで、次年度は BSL2 で取り扱い可能な NiV-F, G 蛋白質発現シュードタイプ (VSV-NiV-GFP) を用いて、暫定的な検出限界を決定したうえで、海外研究機関との共同研究により、感染性 NiV を用いた検出限界の確認を行う予定である。

E. 結 論

抗 NiV-F, G 蛋白質ウサギポリクローナル抗体を用いて、NiV 抗原検出 capture ELISA 系を開発した。捕捉抗体 G3、検出抗体 G3-POD を用いて、階段希釈した不活化 NiV 抗原に対して capture ELISA を行ったら、conventional ELISA よりも約 4 倍高感度であることが確認された。

今後、本法の実用化に向けて、シュードタイプ (VSV-NiV-GFP) および感染性 NiV を用いて、検出限界の確認を行う必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

図1 検出抗体の反応性を確認

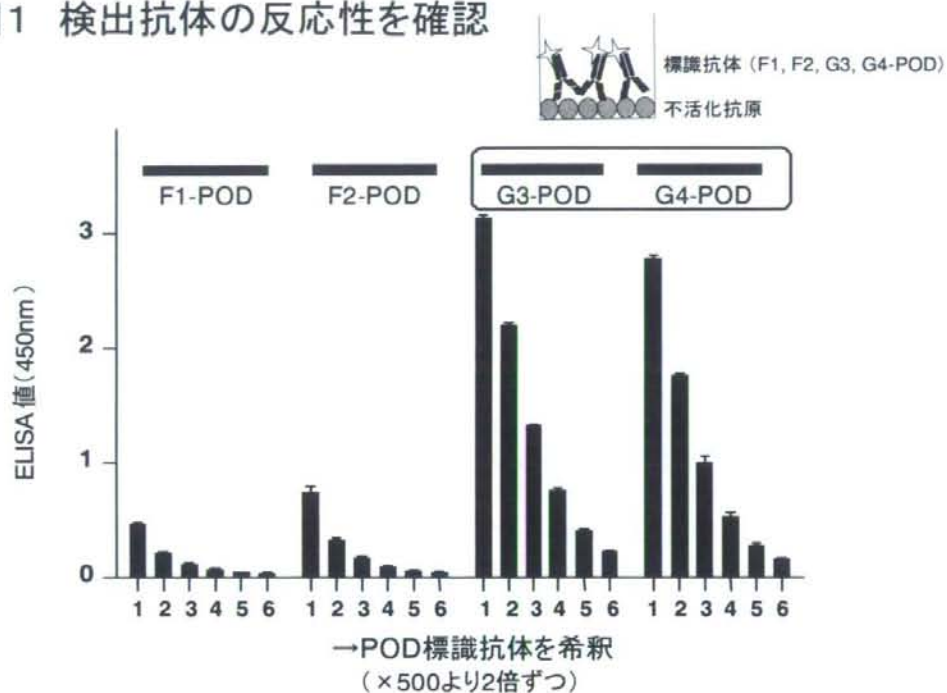


図2 捕捉抗体と検出抗体の組み合わせを検討

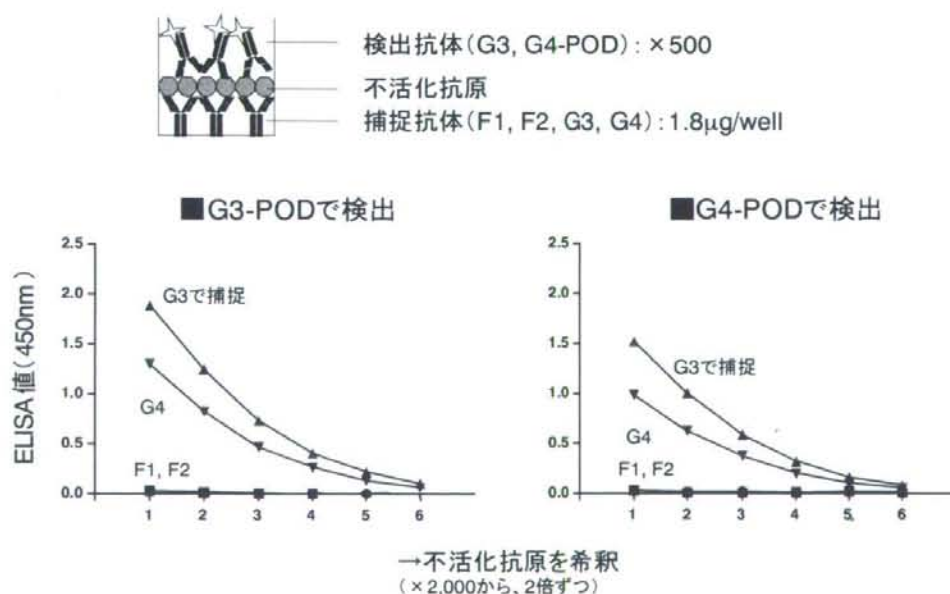


図3 capture/conventional ELISA 感度比較

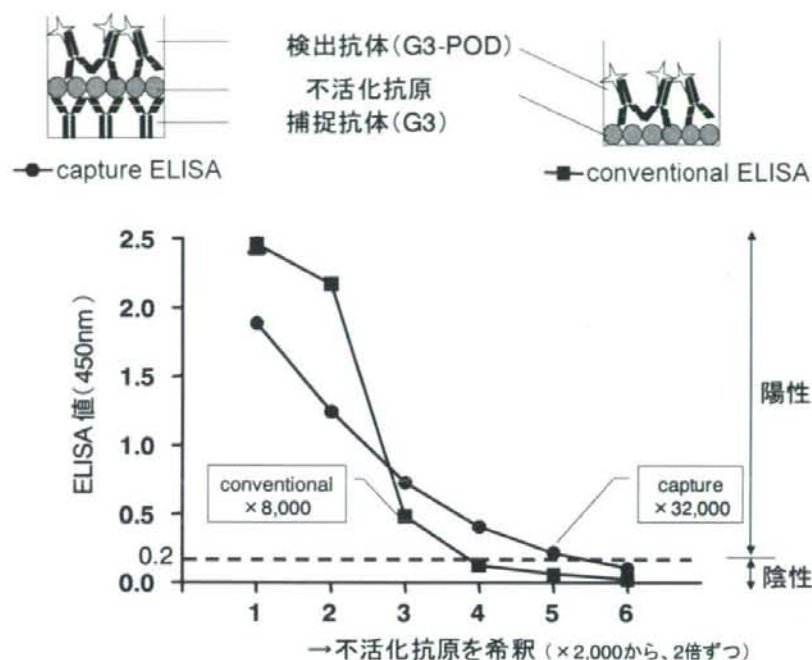
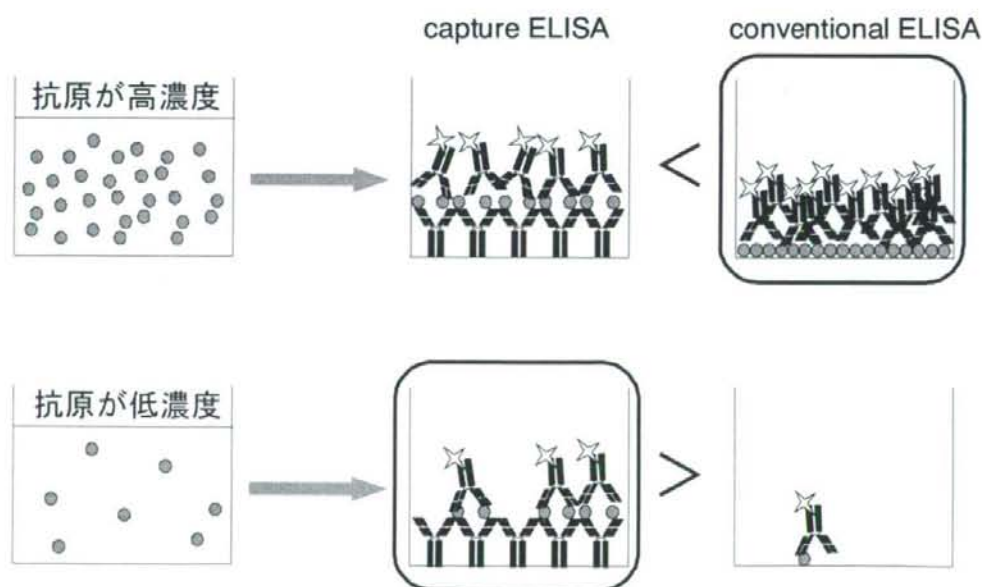


図4 capture/conventional ELISA 感度比較



4. ペスト菌の検出と診断法の確立

ペストモノクローナル抗体を用いたペスト菌の迅速検出系の開発 —ペスト菌に対するモノクローナル抗体の選定と反応条件の検討—

研究分担者 高橋英之 国立感染症研究所 細菌第一部

研究要旨 バイオテロで使用される可能性が考えられるペスト菌の F1 antigen に対するモノクローナル抗体を用いた間接抗体法 (Indirect Fluorescent Antibody、以下 IFA) を用いてペスト菌を検出する方法を検討した。F1 antigen モノマーの発現量が少ないと推測される株に対しては蛍光強度が非常に弱かったものの、F1 抗原を発現しているペスト菌に対しては固定方法非依存的に良好な蛍光像が得られ、ペスト菌の類縁菌である *Y. pseudotuberculosis* 及び *Y. enterocolitica* への交差反応は認められなかった。

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。肺ペスト、腺ペストなどを引き起こすペスト菌は最も危険度の高いカテゴリー A に分類されている。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。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。従来は DNA レベルでのペスト菌の検出方法を開発してきたが、バイオテロの危険に面した場合にはあらゆる手法での検出が要求されてくると想定される。そこで本研究では、バイオテロで使用される可能性が考えられるペスト菌をタンパクレベルでの検出系の確立を試みた。数あるタンパク抗原のうち本研究ではペスト菌の F1 antigen 及び V antigen に着目した。F1 antigen は線毛様の構造をしてペスト菌の細胞表面に突出しているタンパクであり (図 1)、ペストに対する protective antigen、そしてペストの血清診断の際に使用される抗原としてよく知られている。一方、V antigen もその生物学的な機能の詳細は不明なものの (図 2)、ペストに対する protective antigen、そしてペストの血清診断の際に使用される抗原としてよく知られている (図 2)。本研究ではそれらの市販モノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法によるペスト菌の検出方法を検討した。

B. 研究方法

1) ペスト菌のサンプルの調製

-70 °C にてビーズ保存されているペスト菌を Brain-Heart Infusion 寒天培地にて 37°C、もしくは 27°C で 2~3 日間培養した。菌体は 0.3% のホルマリンで 37°C で 5 日間振盪攪拌する事により不活化し、その一部を Brain-Heart Infusion 寒天培地に塗布して 37°C で 3 日間培養し、菌の生存がない事を確認した。一方、メタノール及びアセトン固定の場合にはガラススライド上に 2 滴程の蒸留水を滴下し、1 µl loop のディスポーザブル白金耳で一白金耳分の菌体をプレートから接種して、ガラススライドでスメアした。ガラススライドを風乾後、メタノールもしくはアセトンを滴下し、1 分間再度風乾し、そのガラススライドを一時間 UV 照射してペスト菌の完全不活化を行なった。

2) IFA

1) で調製したガラススライド上に 500 µl の生理食塩水 (以下 PBS) を用いて調製した 2% BSA を滴下し、室温で 30 分間ブロッキングした。その BSA 溶液を除去し、PBS で 100 倍希釈して調製したモノクローナル抗体 (以下 mAb) 溶液を 15 µl 滴下し、CO₂ インキュベーター内 (37°C、5% CO₂) で 1 時間静置する。その後、PBS で 2 回洗浄後、Alexa488 コンジュゲート抗マウス IgG 二次抗体 (Molecular Probes) を PBS で 200 倍希釈して調製した二次抗体液を 15 µl 滴下し、CO₂ インキュベーター内で 1 時間静置する。PBS で 2 回洗浄後、蒸留水で洗浄し、SlowFade Gold antifade reagent (invitrogen) を 1 滴滴下してカバーガラス及びマニキュアで封入した。そのサンプルを OLYMPUS BX51 を用いて観察し、HAMAMATSU ORCA-ER-1394 を介して画像を得た。

3) 画像の処理

2) で得られた位相差顕微鏡像や蛍光顕微鏡像は AQUA-Lite (HAMAMATSU) を用いて解析した。各画像は bmp 形式で出力し、その画像データを Adobe Photoshop CS2 にて整理した。

C. 研究結果

本研究ではペスト菌 F1 antigen 及び V antigen に対するモノクローナル抗体 (mAb) を用いてペスト菌の迅速検出系の確立を試みた。

mAb は多くある市販品の中で免疫染色にも適しているとされたものを3つ選択した(図3~5)。Western blotting 法を用いてこれらの mAb のペスト菌の抽出液に対する反応性を確認した。F1 antigen の mAb である 3YP8 は MII40 株を除いたすべての株と反応し、その反応性はペスト菌の培養温度依存的であった(図3)ことから IFA に十分利用可能であることが確認された。一方、V antigen の mAb は添付プロトコール通りの保存方法で保持したにもかかわらず購入後わずかに数回の使用で失活して Western blotting 用のプローブとしてさえ使用不能となっていた(図4)。そのため、V antigen の mAb を用いてこれ以上の解析は今年度の研究では実施できなかった。さらに本研究では抗原は不明であるが、ペスト菌に対する mAb として市販されていた mAb も検討した(図5)。Western blotting では反応性が 3YP8 よりも悪いものの、その反応性はペスト菌の培養温度依存的であることからおそらくこの mAb はペスト菌の F1 antigen を認識するものであると推測された。しかし、この mAb を用いて IFA を試みたが良好な蛍光像が得られなかった(結果未発表)。以上の結果から、本研究では 3YP8 mAb を用いた IFA の系の検討を行なった。

バイオテロに際して血液、喀痰、患部の切片といった臨床検体が想定される。それらは一般的な細菌検査ではスライドグラスにスメアを取り、メタノール固定、アセトン固定もしくは火炎固定にてサンプルが迅速に処理され、検査過程に移されることになる。その作業工程を踏まえ、メタノール固定、アセトン固定及びホルマリン固定処理したペスト菌 Yreka 株(ワクチン株)の IFA 像の変化を検討した。その結果、いずれの処理法によっても良好な陽性の蛍光像が認められなかった(図6)。それ故、これ以降は処理法と結果が最も安定であったアセトン固定でペスト菌を処理した。IFA による検出系を Yreka 株のみでなく、様々なペスト菌株に対してさらに検討を行なった。その結果、ほとんどのペスト菌株に対しては良好な蛍光像が認められた(図7~10、12、13)が、横浜 Q 及び Bryans 株に対しては弱い蛍光像

しか観察されなかった(図11、14)。しかし、Western blotting で 3YP8 mAb に反応性を示さなかった MII40 株に関しては Western blotting の結果と同様に蛍光像は全く認められなかった(図15)。一方で、ペスト菌の類縁菌である仮性結核菌 (*Y. pseudotuberculosis*)、エルシニア腸炎菌 (*Y. enterocolitica*) では蛍光像が認められなかった(図16)ことから 3YP8 mAb はペスト菌に特異的に反応することが確認された。

以上の結果からこの IFA によるペスト菌をタンパクレベルで検出する系が確立された。

D. 考察

バイオテロリズムでペスト菌が病原体として現実に使用される可能性は十分に考えられる。本研究ではペスト菌を DNA レベルで検出する従来の方法とは別に IFA によるタンパクレベルでの検出系の確立を試みた。その結果、F1 antigen を十分に発現しているペスト菌であれば本研究で確立した系によって検出可能である事が明らかとなった。一方で蛍光像が弱いペスト菌株(横浜 Q、Bryans 株、図11、14)や蛍光像が認められないペスト菌株(MII40 株、図15)も認められたが、いずれの株も蛍光強度と Western blotting で確認される F1 antigen のモノマーの量(図3矢印)に相関が認められることから蛍光像が良好でないのは 3YP3 の抗原量自体が少ない、もしくは無いことに起因すると考えられる。一般的にペスト菌においては F1 antigen は必須の病原性因子であり、野生のペスト菌株や患者由来株においては F1 antigen を十分に発現していると考えられるため、実際の検体の場合には本研究で観察された不明瞭な蛍光像はないと推測される。しかし、万全を期すために V antigen 等の他のペスト菌抗原やペスト菌に対するポリクローナル抗原などを用いた検出系のさらなる開発も必要であろう。

また本研究では抗体の選定が確立されていなかったため、一時間以内に作業が終了する直接抗体法(以下 DFA)ではなく、三時間ほど費やす IFA による検出系の確立にとどまった。本研究班では迅速診断法の開発が一つのテーマとなっているため、IFA の系ではなく DFA の系に移行させるための系の改良を次年度以降に行う予定である。

E. 結論

ペスト菌 F1 antigen の mAb である 3YP8 を用いた間接抗体法によるペスト菌の検出系を開発した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 高橋英之、渡辺治雄、呼吸器症候群(第2版)、
エルシニア肺炎、肺ペストとペスト肺炎、別冊日
本臨床 No.8、258-260、2008.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

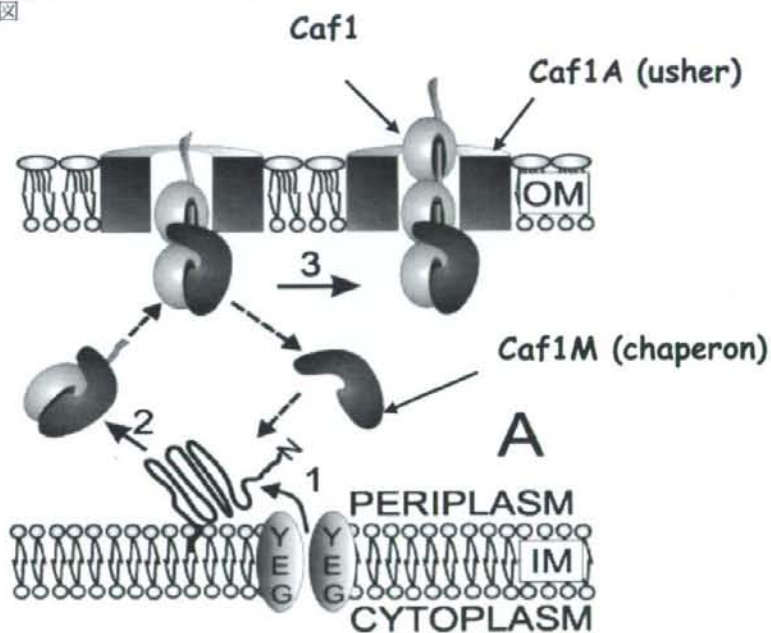
1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

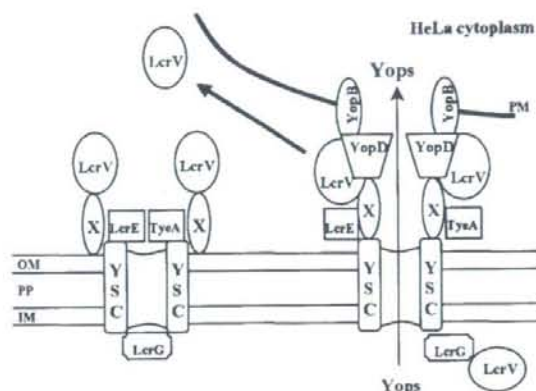
なし

図1 F1 antigen のペスト菌での存在を示した
模式図



Molecular Microbiology (2002) 45(4), 983-995より抜粋

図2 V antigen (LcrV) のペスト菌での所在を示した模式図



Infection and Immunity (1999) 67, 5395より抜粋

図3 Western blotting によるペスト菌 F1 antigen mAb の特異性の検証

CATALOGUE #:	3YP8
PRODUCT NAME:	Monoclonal mouse anti-Yersinia pestis F1 antigen
MAbs:	YPF19 Hybridoma clone has been derived from hybridization of Sp2/0 myeloma cells with spleen cells of Balb/c mice immunised with purified F1 antigen from Y. pestis vaccine strain EB
Specificity:	Y. pestis MAb YPF19 reacts with capsule-bearing strains of Y. pestis only
MAb isotypes:	IgG1 for MAb YPF19
Applications:	Detection of Y. pestis in ELISA and Western blotting. MAb works in immunohistochemistry
Purification:	Chromatography on protein G Sepharose

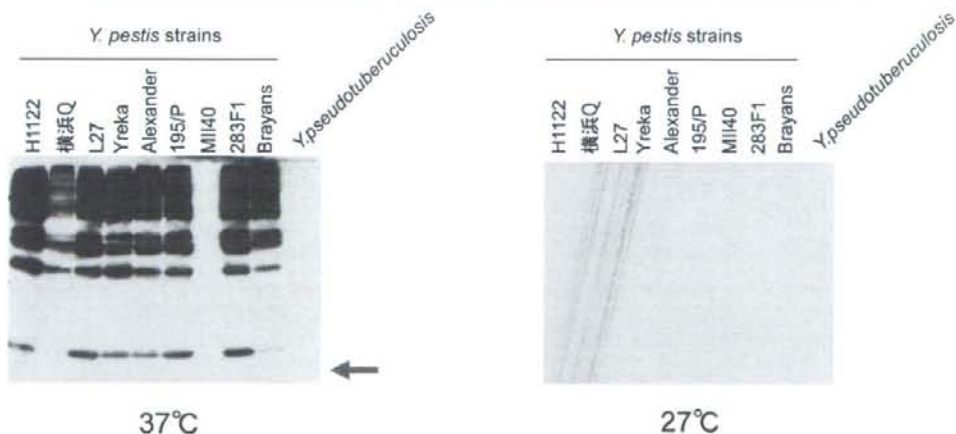


図4 Western blotting によるペスト菌 V antigen mAb の特異性の検証

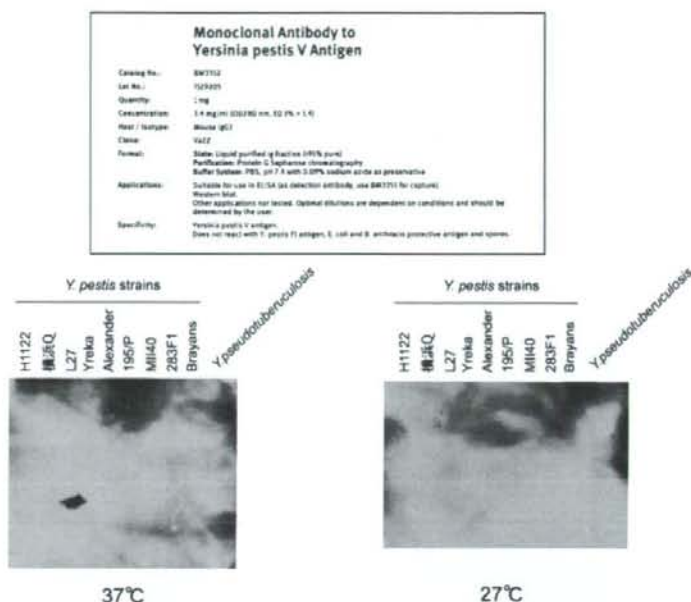


図5 Western blotting によるペスト菌 mAb の特異性の検証

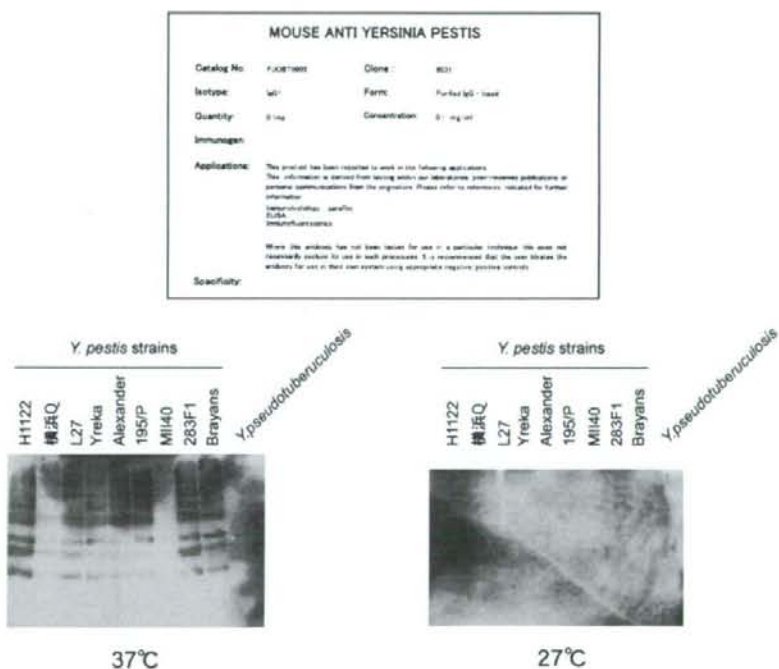


図6 ペスト菌 Yreka 株の固定方法の違いによる IFA 像 (×1000)



図7 ペスト菌 Yreka 株の IFA 像 (×1000)

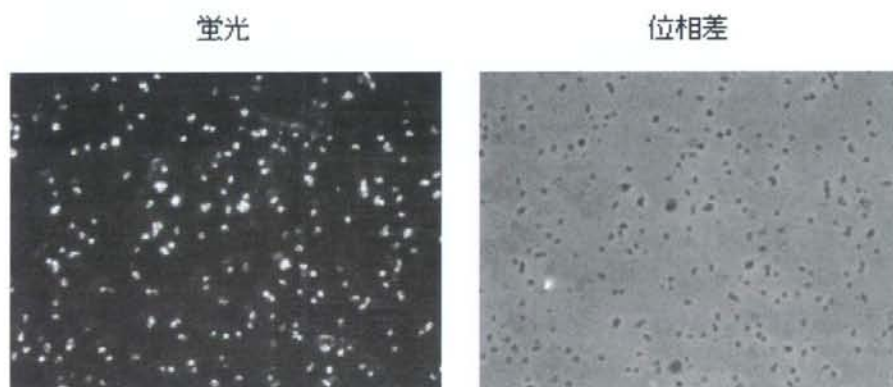


図8 ペスト菌 195P 株の IFA 像 (×1000)

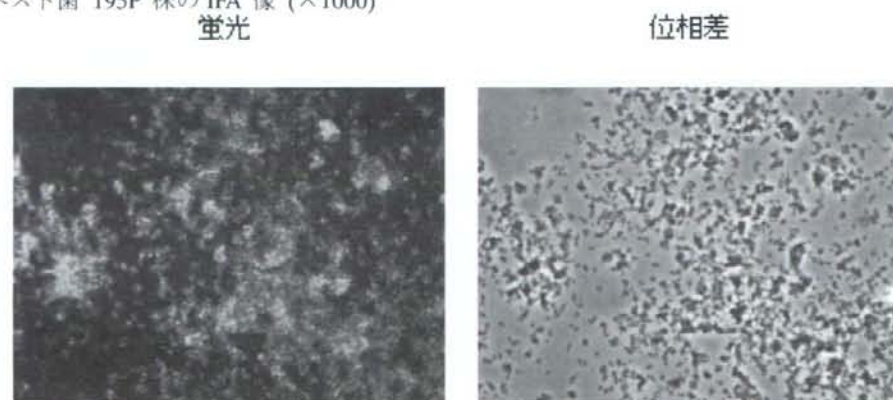


図9 ペスト菌 283F1 株の IFA 像 (×1000)

蛍光



位相差

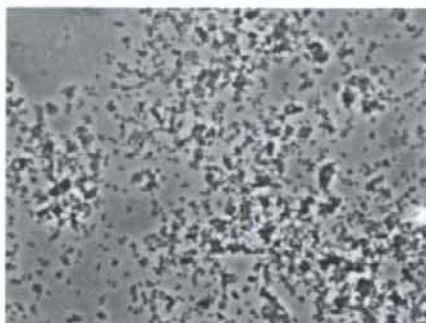


図10 ペスト菌 Alexander 株の IFA 像 (×1000)

蛍光



位相差

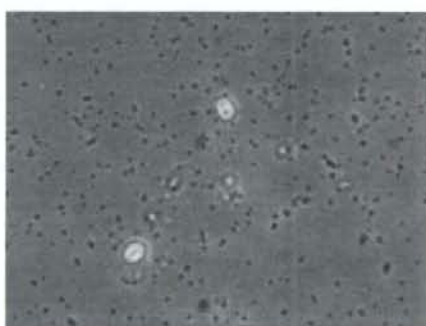
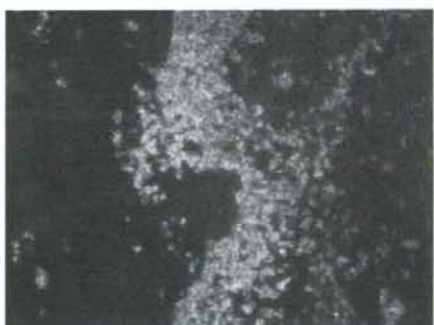


図11 ペスト菌 Bryans 株の IFA 像 (×1000)

蛍光



位相差

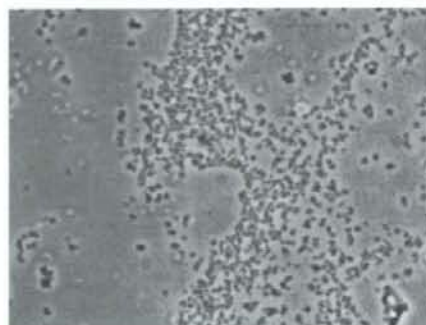


図 1 2 ペスト菌 H1122 株の IFA 像 (×1000)

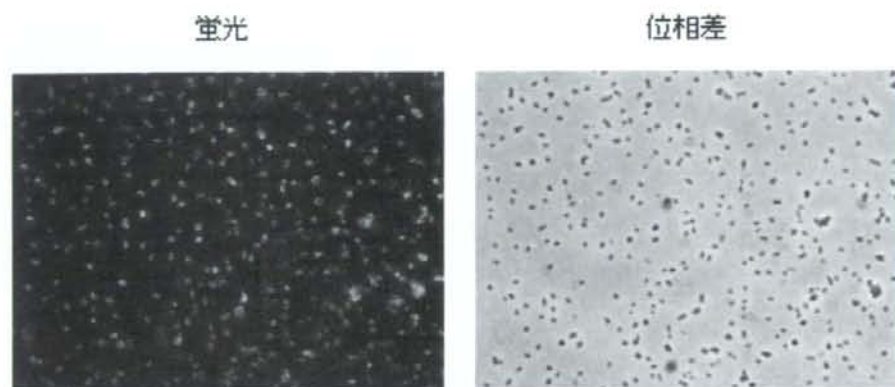


図 1 3 ペスト菌 L27 株の IFA 像 (×1000)

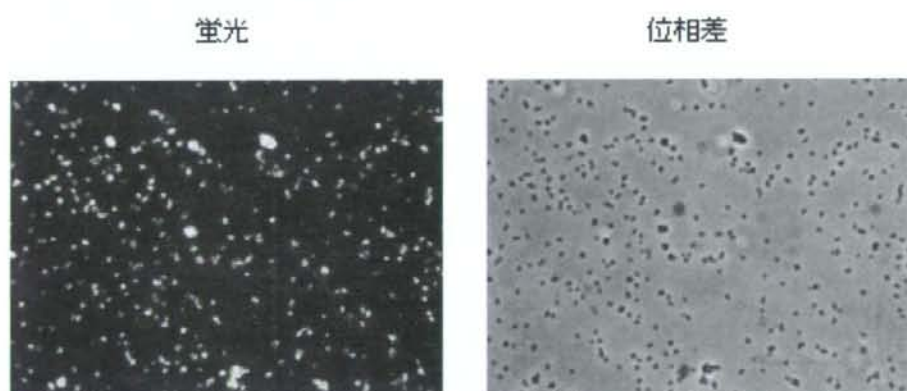


図 1 4 ペスト菌 横浜 Q 株の IFA 像 (×1000)

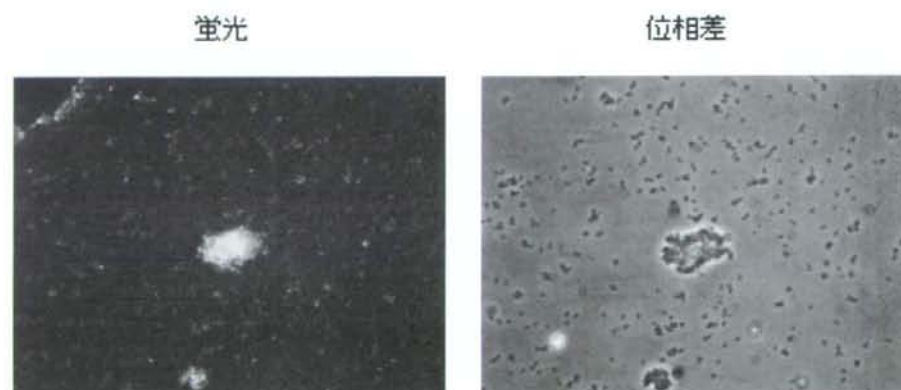


図 1 5 ペスト菌 MII 40 株の IFA 像 (×1000)

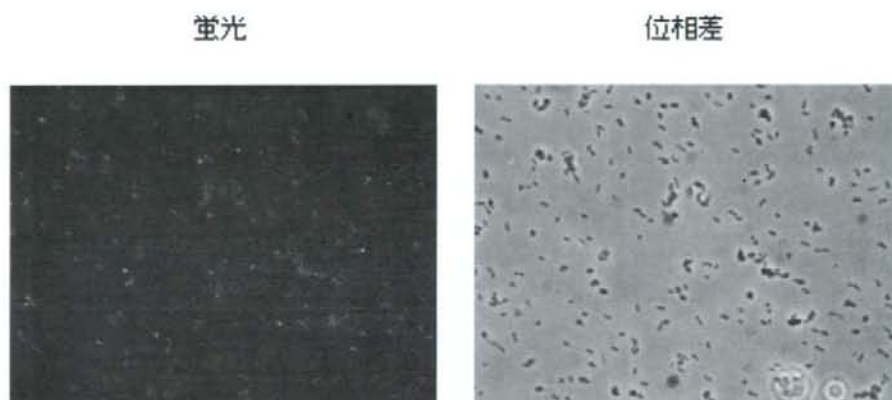
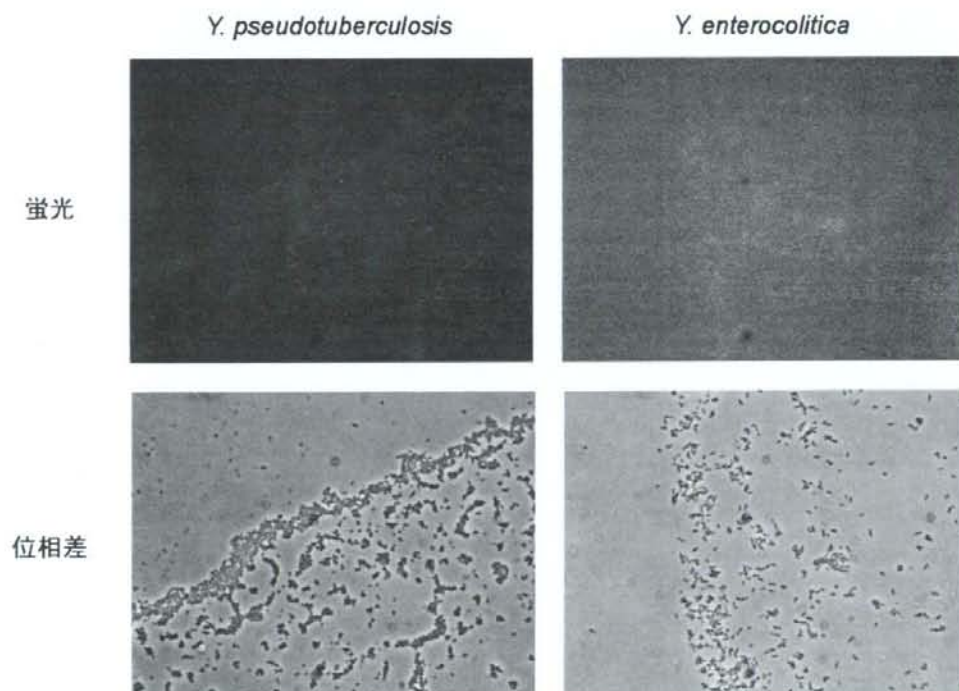


図 1 6 ペスト菌 類縁菌 *Y. pseudotuberculosis* 及び *Y. enterocolitica* の IFA 像 (×1000)



5. 鼻疽菌・類鼻疽迅速診断・同定法の確立の研究

研究分担者 堀野 敦子（国立感染症研究所・細菌第二部）

研究協力者 山根 一和（国立感染症研究所・細菌第二部）

研究要旨

鼻疽菌(*Burkholderia mallei*)、類鼻疽菌 (*Burkholderia pseudomallei*) は日本国内では輸入感染症として位置づけられ、人畜共通感染症に指定されている。類鼻疽菌の感染により発症する類鼻疽（メリオイドーシス）は、邦人が東南アジア等の流行地域を渡航中に感染し、国内で発症した報告例がある稀な感染症である。このため、国内の医療機関等で取り扱い経験がほとんどなく、診断法、分離・同定法が知られていないことが多い。また、鼻疽菌はウマ・ロバに深刻な病気、鼻疽(*glanders*)を引き起こすが、ヒトにも感染することがある。しかしヒトでの発症は世界的にもここ数年報告がない。現在鼻疽はモンゴルなど一部の地域のウマで感染が報告されている。また、類鼻疽菌と鼻疽菌は特定病原体第三種に指定されており、生物テロ時には迅速に診断ならびに分離同定を行うことが求められる。このため、この研究では鼻疽菌、類鼻疽菌の迅速な診断法・同定法における培養法、核酸診断法の確立とマニュアルの作成を目指す。今年度は類鼻疽菌について、類鼻疽流行地域であるタイの共同研究者から流行地の現状に基づいた提言を受け、これを参考にしてマニュアルの作成を行った。また、環境検体からの類鼻疽菌の分離条件の検討を行った。分離マニュアルは日本で使用するのに適したものへと改良を加えていく予定である。

A. 研究目的

生物テロに使用される可能性のある細菌のうち類鼻疽菌、鼻疽菌について培養法、核酸診断法の確立のための検討を行う。

類鼻疽菌は東南アジア、北部オーストラリアが流行地域であり、これらの地域では土壤中や水中などの環境中にも菌が存在している。一方、鼻疽菌は環境中には存在しないと報告されている。鼻疽菌はウマ、ロバなどに感染し発症するが、ヒトにも感染する人畜共通感染症である。しかし、ヒトでの発症例は世界的にみてもここ数年報告が無い。これらの菌は、歴史的に生物テロの兵器として使用が検討された経緯もある。鼻疽菌は日本においては、動物でも近年報告が無く、汚染地域から輸入する動物の検疫が重要とされている。類鼻疽菌はわが国においては輸入感染症であり、東南アジアに渡航し現地で感染した邦人が帰国後に発症した例が報告されている。渡航歴

のない患者が類鼻疽を発生した報告例はない。これらの菌は実験室感染を起こすことがありBSL3の実験施設内で適切に取り扱うことが求められる。類鼻疽は日本国内において発症例数が少ないため臨床機関や検査機関でも診断・同定に苦慮する例が見受けられる。確実な診断・同定が可能であることは、生物テロ発生時においても重要である。このため、医療機関で診療時に参考となる情報を含め、分離同定マニュアルが必要である。平成20年度は類鼻疽菌についてマニュアルを作成することを目標とする。

2009年1月より国立感染症研究所・免疫部および細菌第二部とタイ国コンケン大学医療学部の間で共同研究が開始されたことから、類鼻疽流行地域であるタイ東北部にあるコンケン大学医療学部との間で診断、分離同定同定法などについて情報交換が行えるようになった。類鼻疽菌を日常的に診断、分離同定

している現地の研究者や医師の助言も取り入れ、有用なマニュアルを作成することを目指す。

B. 研究方法

1) 類鼻疽菌の診断法・分離同定法の改良

コンケン大学病院で実際に行われている類鼻疽菌の分離同定方法についてまとめ、我々が現在行っている方法を改良する。

臨床医が類鼻疽菌による感染を疑った場合、参考となる診断基準、検査すべき検体についてまとめる。また、治療法についてもまとめる。

2) 類鼻疽疑い臨床検体の解析

マレーシア・ランカウイ島に渡航した旅行者が帰国後に肺疾患を起こし、類鼻疽感染が疑われた。この患者の臨床検体が細菌第二部に送付された。この肺生検組織検体からの類鼻疽菌の分離同定を試みた。

チョコレート寒天培地に生検サンプルを塗抹し 35℃で培養し 1 週間観察した。また生検組織サンプルから QIAamp mini にてゲノム DNA を抽出し LAMP 法 (Chantratita N et al., J Clin Microbiol. 2008 Feb; 46(2): 568-73. Epub 2007 Nov 26.) を試みた。

3) 環境検体からの類鼻疽菌の分離の検討

類鼻疽菌が環境検体として扱われる場合を想定し、土壌検体からの菌体分離の基礎検討をおこなった。

まず、土壌中の *Burkholderia* 属のバックグラウンドを明らかにすることにした。日本国内の土壌からは *Burkholderia cepacia* が分離されたと考えられたため、*B. cepacia* の選択培地も使用することとした。

湿潤土壌をサンプリングし、Ashdown 変法液体培地を用いて 37℃で 48 時間振盪培養した。また、*B. cepacia* の選択培地である Trypanblue-Tetracycline (TB-T) 液体培地でも 31℃で 48 時間振盪培養を行った。増菌培養後、それぞれを 100 μl ずつ Ashdown 寒天培地と TB-T 寒天培地に植菌し、37℃で培養した。

(倫理面への配慮)

平成 20 年度は倫理面に配慮が必要な検討は行っていない。

C. 研究結果

1) 類鼻疽菌の診断・分離同定法の改良とマニュアル作成

現在、マニュアルを作成中である。

類鼻疽の流行地域にあるタイ・コンケン大学病院における類鼻疽菌の臨床検体からの分離法と、我々がこれまで行ってきた方法には違いがあった。コンケン大学病院での分離同定方法、診断法は以下の通りである。

臨床検体からの類鼻疽菌の分離培養には Ashdown 選択培地などの類鼻疽菌選択培地は使用せず MacConkey 寒天培地を使用し、喀痰検体にのみ MacConkey 寒天培地にゲンタマイシンを添加して使用している。また、分離されたコロニーについては必ず生化学試験が行われている。菌が類鼻疽菌であった場合には、医師の指示により感受性試験が行われている。

臨床検体としては主に血液、喀痰、膿、尿が用いられる。

タイ東北部における類鼻疽の診断では、重症の市中肺炎、敗血症の場合は類鼻疽が鑑別診断の筆頭にあげられる。特に実質臓器である肝臓や脾臓の膿瘍は類鼻疽に特徴的である。また、糖尿病やサラセミア、慢性腎疾患などの基礎疾患があるか、雨期であるか、農業に従事しているかを参考にしている。

治療については、急性期 (2 週間) では第一選択はセフトラジジム、第二選択がスルバクタム/セフォペラゾン、第三選択としてメロペネムもしくはイミペネムが用いられている。維持療法 (5 ヶ月間) ではドキシサイクリンと ST 合剤が用いられている。教科書に記載されているクロラムフェニコールが用いられることはほとんど無い。

2) 類鼻疽疑い臨床検体の解析

類鼻疽菌の感染が疑われたマレーシア・ランカウイ島渡航者の肺生検組織検体につ