

図3 ペスト菌 Yreka 株の固定方法の違いによる抗 F1 ペプチド抗体を用いた IFA 像 (×1000)

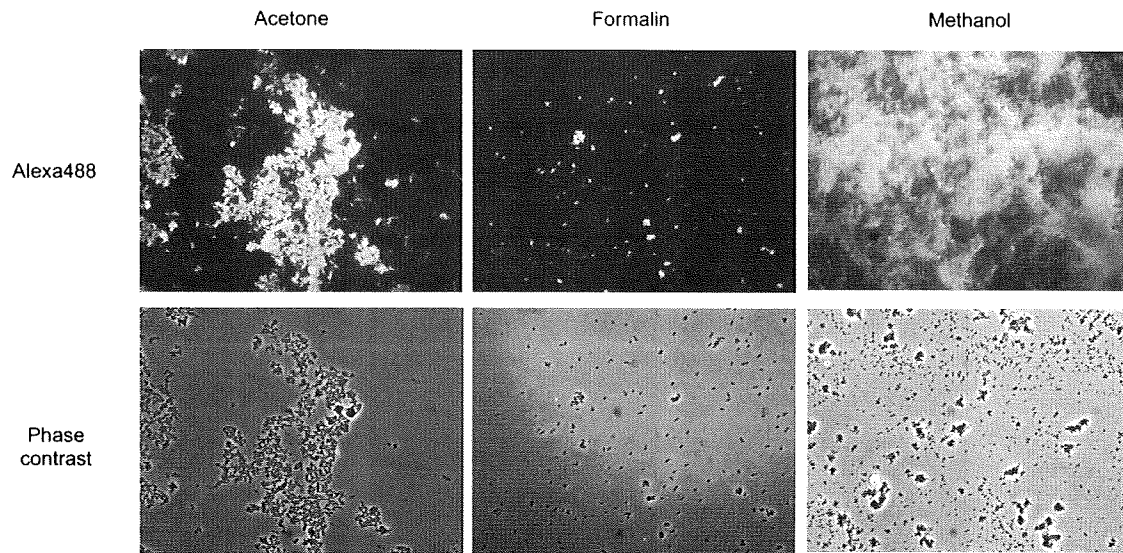


図4 IFA による抗 F1 ペプチド抗体のペスト菌に対する特異性の検証 (×1000)

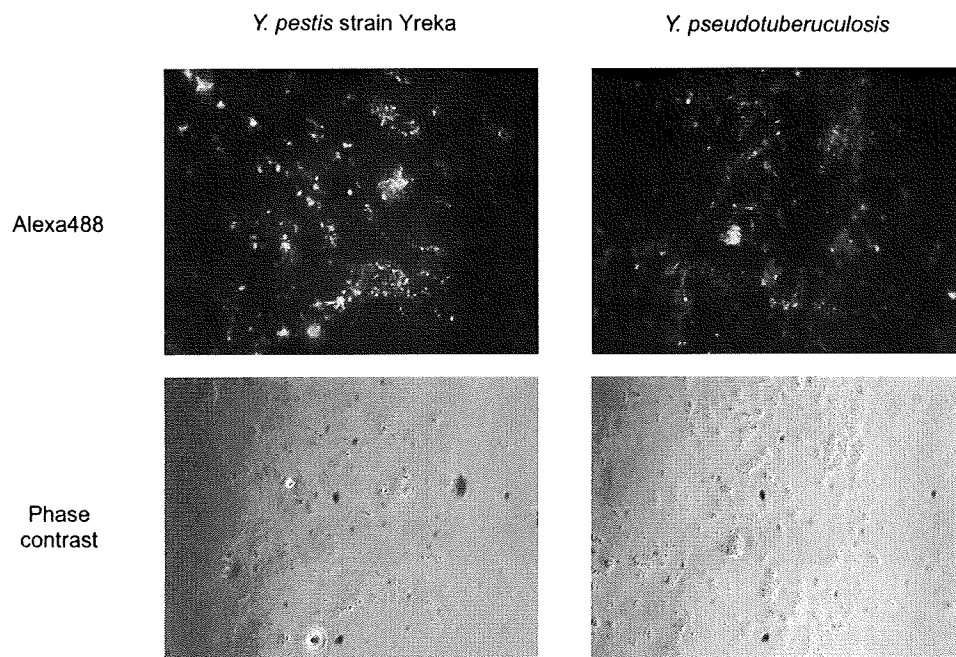


図5 ペスト菌 Yreka 株の固定方法の違いによる抗ペスト菌ウサギ血清、吸収抗ペスト菌ウサギ血清及び抗 F1 ウサギ血清を用いた IFA 像 (×1000)

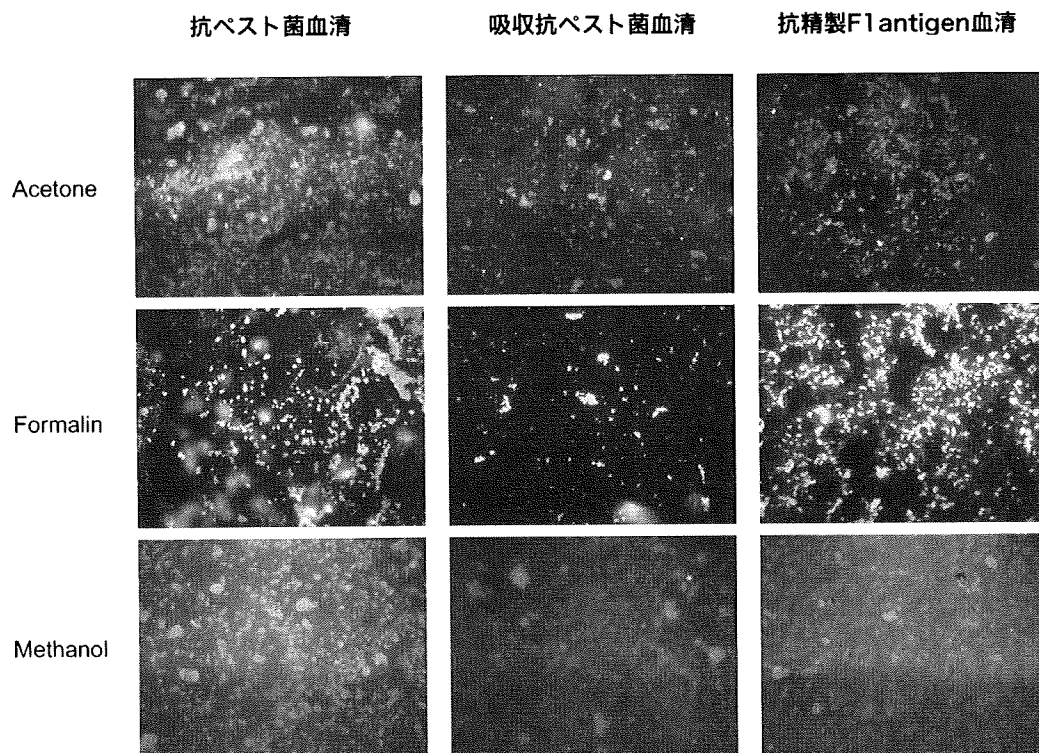


図6 IFA による抗ペスト菌ウサギ血清のペスト菌に対する特異性の検証 (×1000)

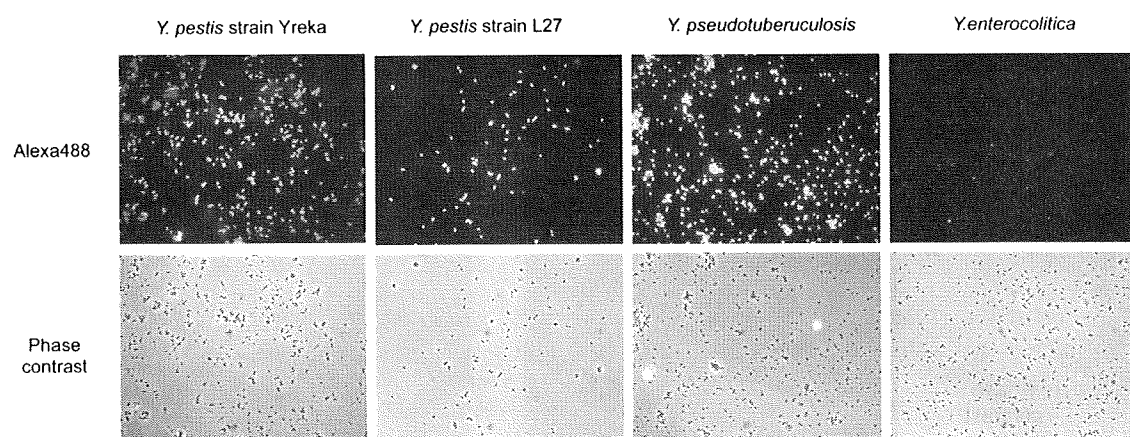


図7 IFAによる吸収抗ペスト菌ウサギ血清のペスト菌に対する特異性の検証 (×1000)

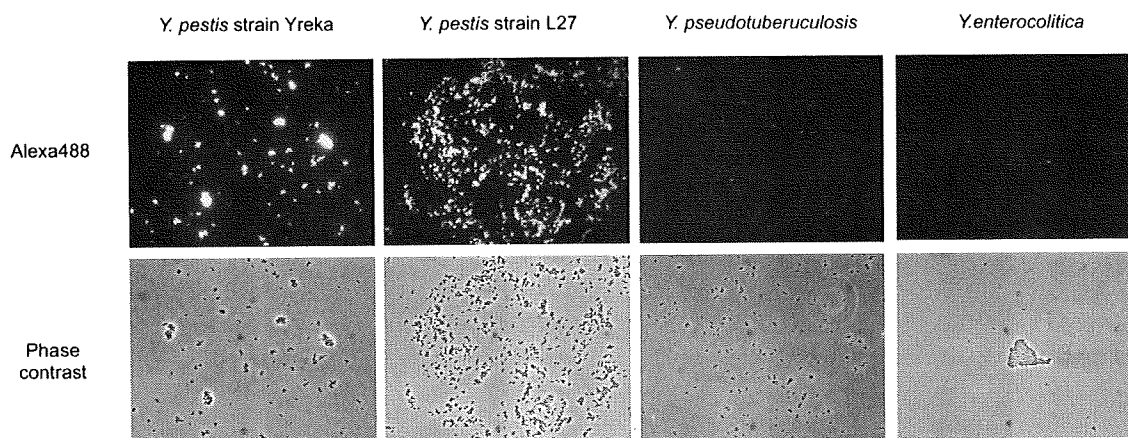


図8 IFAによる抗F1ウサギ血清のペスト菌に対する特異性の検証 (×1000)

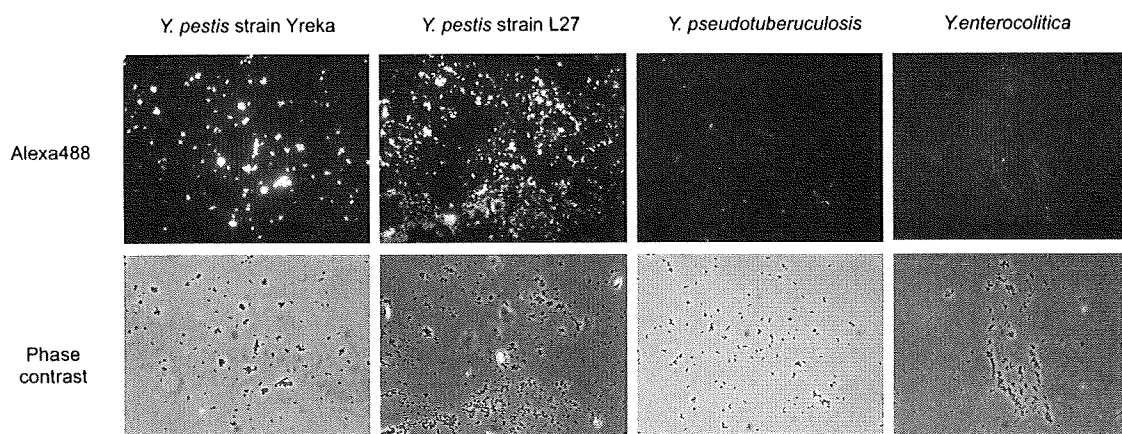


図9 吸収抗ペスト菌ウサギ血清のF1 antigen依存性の検証 (×1000)

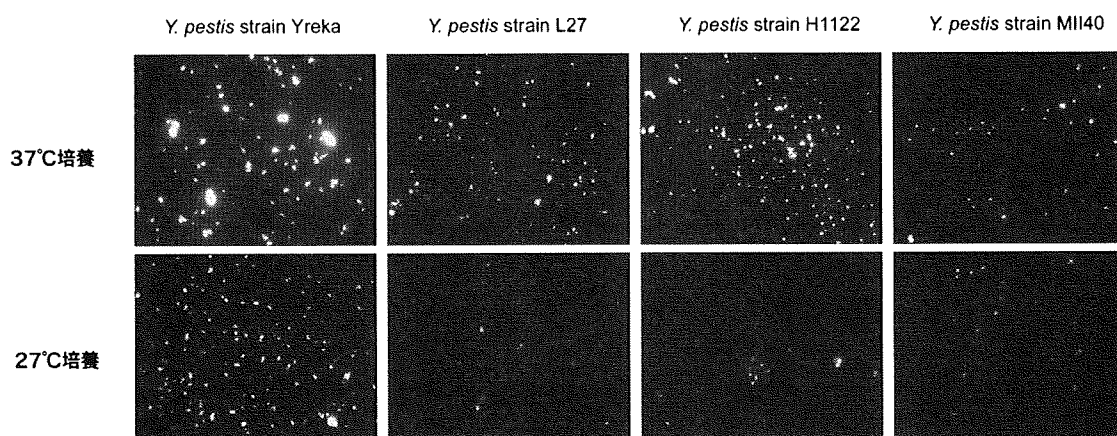
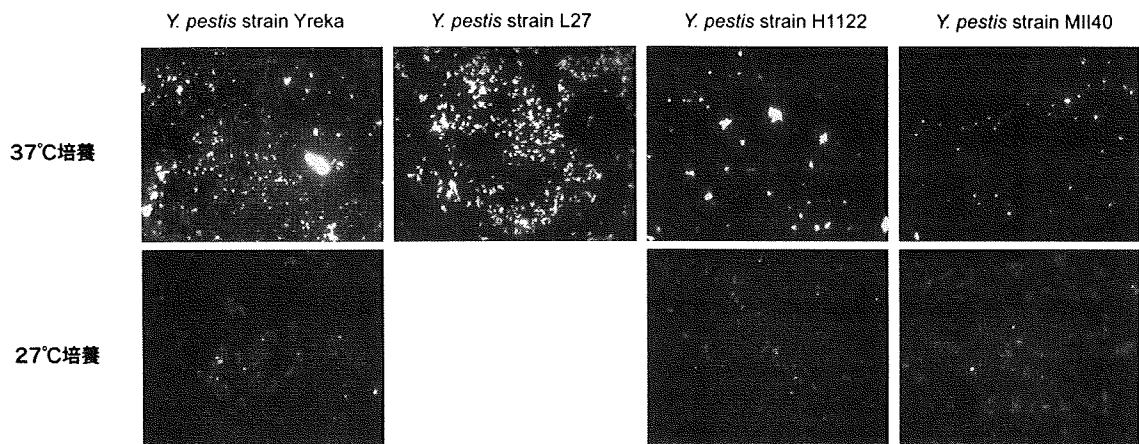


図10 抗F1ウサギ血清のF1 antigen依存性の検証 (×1000)



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、人獣共通感染症に指定されている。本邦においては *B. pseudomallei* 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、国内で発症したという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。一方、*B. mallei* はウマ・ロバに鼻疽(glanders)を引き起こし、患畜の膿などから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、*B. pseudomallei* と *B. mallei* は四類感染症で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 *B. pseudomallei*、*B. mallei* の迅速な診断・同定を目的とした培養法、核酸診断法の確立とマニュアルの作成を目指す。今年度は前年度にタイで収集した知見に基づき、試験法の検討を行った。また、核酸診断法については LAMP 法を用いることとし、独自のプライマー群の設計と行い条件検討を行った。さらに、当研究班の研究者から菌株の分与を受け、*B. pseudomallei* ならびに *B. mallei* の菌株コレクションを充実させた。

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 *B. pseudomallei* と *B. mallei* について培養法、核酸診断法等の検出法確立のための検討を行う。

B. pseudomallei 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壌中や水中などの環境中にも菌が存在している。一方、*B. mallei* は環境中には存在しないと報告されている。*B. mallei* は主にウマ、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がある。*B. mallei* 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何例か報告されている。渡航歴のない患者が類鼻疽を発生した報告例はない。これらの菌は過去、国外で実験室感染を起こした報告があり BSL3 の実験施設内での適切な取り扱いが求められる。類鼻疽は日本国内において発生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。生物テロ発生時においても、迅速で確実な診断・同定は、同様に重要である。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と考え、これを作成することを目的としている。平成 21 年度から *B. pseudomallei* について国立感染症研究所・細菌第二部、免疫部とタイ国・コンケン大学との間で共同研究が開始され、診断、分離同定についても新たな情報を得ることができた。

これに基づき、平成 22 年度は国立感染症研究所・細菌第二部の保有菌株を用いて、生化学試験、薬剤感受性試験などを試みている。この結果をマニュアルに反映しつつ、外部から *B. pseudomallei* について問い合わせがあった場合に対応する。

B. 研究方法

1) *B. pseudomallei* の診断法・分離同定法の改良

昨年度コンケン大学病院において類鼻疽流行地域で実際に行われている *B. pseudomallei* の分離同定方法について知見収集を行ったが、それらのうち同定に必須とされる生化学試験、薬剤感受性試験を当部で保有している *B. pseudomallei* 菌株を用いて検討した。

また、臨床医等が類鼻疽の感染を疑った場合に参考となる診断基準、検査すべき検体についてまとめている。

2) 遺伝子学的手法(LAMP 法)の検討

B. pseudomallei では同定のゴールドスタンダードは培養法とされている。しかし、*B. pseudomallei* に典型的とされる皺のよったコロニー以外にコロニー形態の多様性が報告されていること、また、生化学試験を併用した培養法では同定まで数日かかることから迅速な同定を考える上でも核酸検出法は必要であると考えられる。しかし、*B. pseudomallei* は近縁の *B. mallei*、*Burkholderia thailandensis* と遺伝子の相同性が非常に高く、これまでにいくつかの方法が報告されているが、*B. pseudomallei* に特異的な検出法の決定的な方法はまだ決まっていない。LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法では一報の報告があるが、(Chantratita N *et al.*, J Clin Microbiol. 2008 Feb; 46(2): 568-73. Epub 2007 Nov 26.) 検出感度や検体に対する反応性に問題があるとされている。

今年度、我々は、*B. pseudomallei* に特有のべん毛関連遺伝子を標的遺伝子として、LAMP 法のプライマー群の設計を試みた。設計したプライマー群について、感度ならびに特異度の検証を行った。

3) 菌株コレクションの拡充

当研究班の研究者の協力で *B. pseudomallei* 23 株、*B. mallei* 6 株の分譲を受けることになった。

これらの菌は前述のように特定病原体三種である。このため分譲に伴う移動には、菌株が地上を通過する全ての都道府県公安委員会への届出が必要であり、かつ、感染症法の規定に従った輸送方法に則り輸送する必要があった。今回我々は、日通航空に公安委員会への届出ならびに輸送を委託して菌株の移動を行った。

(倫理面への配慮)

平成 21 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) *B. pseudomallei* 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。

タイにおいて *B. pseudomallei* 培養法の際、必須とされる生化学試験は API20NE (シスメックス・ビオメリュー) を用いて感染研・細菌第二部の保有株で検討を行った。その結果、24 時間の反応時間で *B. pseudomallei* と同定されたが、48 時間反応させるとより確実な結果が得られた。

非常に近縁である *B. thailandensis* との鑑別に必要なアラビノース分解能は (-) であった。

感受性試験も同様に保有株を用いて行った。これまで行った範囲では保有株で問題となる耐性を示した薬剤はなかったが、感受性については検討を継続中である。

2) 遺伝子学的手法 (LAMP 法) の検討

B. pseudomallei のべん毛関連遺伝子を標的とした LAMP 法のプライマー群を栄研化学のプライマー支援ソフト Primer explorer V.4 を使用して設計した。このべん毛関連遺伝子は *B. pseudomallei* に特有な遺伝子である。これらのプライマーを用いて、*B. pseudomallei* から抽出したゲノム DNA を

テンプレートとして LAMP 法の検討を行った。

その結果、感度では検出限界が *B. pseudomallei* のゲノム DNA で約 4.8 コピーであり、報告されている方法より 10 倍程度良好であった。検出までの時間も 20 分程度短かった。

特異度においても、近縁の *B. mallei*, *B. thailandensis* には反応しなかった。

このプライマー群を用いた LAMP 法は有用であると考えられるので今後臨床検体への応用を考えている。

3) 菌株コレクションの拡充

特定病原体三種である *B. pseudomallei*, *B. mallei* は、現在、新たな菌株を入手するのが大変困難な状態であるが、当研究班の研究者の協力を得て、*B. pseudomallei* 23 株、*B. mallei* 6 株の分譲を受けることができ大幅に菌株コレクションを充実させることができた。菌株の移動は日通航空に委託したが、公安委員会への届出ならびに輸送費用に 28 万 5810 円かかった。公安委員会への届出書などは参考資料として添付する。

D. 考 察

作成中の *B. pseudomallei* の診断・同定マニュアルについて、コンケン大学との情報交換により改正すべき点が明らかになった。現在、流行地域で行われている *B. pseudomallei* の分離同定法が日本で実用的かどうか、細菌第二部で保有している *B. pseudomallei* 菌株を用いて検証を行っている。また、診断の際には類鼻疽の流行地域である東南アジアや北部オーストラリアなどへの海外渡航歴があるかどうか、患者情報を考慮すべきである。加えて、本邦での感染の報告例には糖尿病の基礎疾患を持つ患者が多いことから類鼻疽疑い例の患者の糖尿病歴も考慮する必要がある。これらもマニュアルに反映させ、新たに臨床検体についての問い合わせや依頼検査が来た場合には作成したマニュアルに従って対応する。

これまで我々が用いてきた既報の LAMP

法は血液検体では感度がよくないという報告のため改良する必要があった。我々は、独自の LAMP 法プライマー群を設計し、*B. pseudomallei* から抽出したゲノム DNA を用いて検討を行った。その結果、感度は既報よりも良好で、特異度も近縁の *B. mallei*, *B. thailandensis* には反応しなかった。今後、他の菌株での検討に加え、臨床検体を用いた検討も計画中である。

また、当研究班の研究者から *B. pseudomallei* 菌株 23 株、*B. mallei* 6 株の分譲を受けることができた。特定病原体であるこれらの菌株は現在入手が困難であり、菌株コレクションの充実は今後の研究を進める上で大きな利点となると考えられる。また、このように入手困難な株の譲渡を受けられるという点に示されるように、この研究班は有益なネットワークを形成していると考えられる。

菌株の分譲を受け、*B. mallei* については次年度以降基礎検討を開始する。

E. 結 論

本年度は *B. pseudomallei* の核酸検出法を LAMP 法で検討した。現在までのところこの方法は既報の LAMP 法よりも優れていると考えられるが、この先、菌株以外の検体を用いて検討する必要がある。

また、現在、類鼻疽の病原体届出基準には、培養法と PCR 法のみ記載がされているので、将来の改正の機会に LAMP 法も含まれる核酸診断法などに変更を行うのが望ましいと考えている。

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
なし

6. 炭疽、ブルセラ、野兎病菌等の網羅的細菌迅速診断法の確立

研究分担者 牧野壮一 帯広畜産大学 大動物特殊疾病研究センター
研究協力者 江崎孝行 (岐阜大学大学院医学研究科)
倉園久生 (帯広畜産大学・畜産学部)
川本恵子 (帯広畜産大学・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、野兎病菌、ブルセラ菌、鼻疽・類鼻疽菌に主に焦点をあて、網羅的に検出できるシステムの開発研究と、広く社会に還元することを目的として研究を遂行する。PCR法による遺伝子検出法はほぼ確立しているので、病原体を迅速に検出できる網羅的な検出法はPCR法を基本として開発する。また、病原体の免疫学的手法を用いた検出・検査法の開発も同時に遂行する。

A. 研究目的

2001年9月11日の米国ニューヨーク世界貿易センタービルへの航空機テロ後に、炭疽菌芽胞混入郵便物によるバイオ（生物）テロが起こり、世界的に関心が高まった。わが国では‘白い粉’による多数の模倣事件が起こり、その後、内閣危機管理室を中心として関係省庁で対応体制が構築されてきた。2004年の「国民保護法」の制定、2006年の感染症法改正による「特定病原体等」の管理などである。病原体等の入手と取扱いそして迅速診断・同定法に関する科学的情報は、バイオテロの脅威に対抗する上で、当初より管理ないし制限されてきた。一次対応機関で用いる検査キットの多くはブラックボックス状態で使用せざるを得ない状況にある。病原体等の由来を知るには塩基配列の情報が必要であるが十分公開されていない。対応のアルゴリズムは米国や英国の関連機関からも公表されているが、わが国の実情に即したものを、わが国独自に開発していくことが必要となる。バイオテロは病原体等が散布されて患者発生までに潜伏期があり、稀な疾患であるため、早期検知には

一次医療機関の医師等への臨床診断支援が必須で、環境中および患者検体から原因病原微生物の迅速な検出と同定、かつ確認のために患者の血清抗体検査や病原体等の分離同定が必要となる。BSL4病原体以外は地方衛生研究所や国立感染症研究所の設備で可能である。さらに病原体の由来を知るためには塩基配列の解析とデータベースが重要である。現在までに多くの病原体等（毒素を含む）の迅速診断法を開発し、臨床診断支援のマニュアルやバイオテロ対応ホームページを作製した。またプロトタイプの網羅的迅速診断法も開発した。しかし病原体の入手が困難なことから特異性の検討は十分とはいえず、鑑別診断とその普及および検査ネットワーク整備に問題を残している。ホームページの活用には、画像が有力な情報となるがいまだ少なく、疾患の追加、治療法や除染法を含めた内容のアップデートそして実際の対応体制の整備も不十分である。当分担研究班では、バイオテロ関連病原体等の迅速診断検査、抗体検査、病原体分離同定法、特に二種病原体等の中の細菌性感染症を中心として、網羅的な検出・検査法

を確立し、広く社会に還元することを目的として研究を遂行する。

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菌以外にペスト、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ではなく、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壤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や動物に接触してヒトは感染する。発生は通常散発的だが、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。

テロの探知には個々の病原体ごとに検査するのではなく、対象病原体について網羅的に迅速に検出することが必要である。そこで、本研究では、そこで、バイオテロの迅速スクリーニング法と核酸クロマトおよびイムノクロマト法の開発に焦点をあて、遺伝子検出法及び免疫学的検出法を応用し、炭疽菌を中心とした網羅的な検出・診断法の開発、及び病原性因子の解析による新たな治療方法の開発を試みる。

B. 研究方法

1) 野兎病に関する研究

平成18年度から、野兎病が疑われる患者に対する免疫学的診断法と野兎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20年度に確立した野兎病菌の表在特異抗原（FopA-GST融合蛋白：以下

FopA-GSTと略す）の精製法でFopA-GSTを大量精製して家兎抗血清を作製し、この特異抗原に対する免疫学的迅速同定法（Sandwich-ELISA）を構築した。

1. FopA-GSTの精製：Re-foldしたFopA-GSTをGlutathione Sepharose 4Bクロマトで精製してFicoll PM400により濃縮した。濃縮したGlutathione Sepharose 4BクロマトのFopA-GST分画をGE HealthCare社のSuperdex 75カラムでゲル濾過した。
2. 精製FopA-GST融合蛋白に対する家兎抗血清の作製：①100 µgの精製FopA-GSTをFreund Complete Adjuvant (FCA)と混合して家兎に皮内接種した。②3週間後に100 µgの精製FopA-GSTをFCAと混合して家兎に皮内接種した。③抗FopA-GST力価がプラトーに達するまで毎週100 µgの精製FopA-GSTを皮内接種した。
3. 抗FopA-GST力価の測定(ELISA法)：①1 µgの精製FopA-GSTで96穴プレートをコート、②部分採血した家兎抗血清を2倍連続希釈して添加、③Conjugate (Peroxidase Goat-anti rabbit IgG)を添加、④基質(5-aminosalicylic acid)を添加、⑤450 nmの吸光度を測定する。
4. 抗FopA-GST家兎特異IgGの調整：①NHS-activated HPカラム(1.0 ml)に精製FopA-GSTをカップリングした、②4 mlの抗FopA-GST家兎血清から①のカラムを用いて抗FopA-GST家兎特異IgGを調整した。
5. 野兎病菌検出用ELISAの構築：精製FopA-GSTを用いて系の構築を行った。①ELISAプレートにコートする精製FopA-GST濃度の検討を行った、②2次抗体(家兎抗FopA-GST IgG)濃度の検討を行った③野兎病発生地での抗体調査を行うために抗原(精製FopA-GST)をコートした96穴プレートの保管温度(-80 C、4 C、室温)の検討を行った、④構築したELISA系の精製FopA-GSTに対する検出限界を測定した。

2) バイオテロ感染症の網羅的検査

細菌のバイオテロ感染症では暴露後、数日から数週間で発症するため、暴露者は一般病院、あるいは救急病院の外来を呼吸感染、もしくは不明熱で受診すると想定される。従って診断システムは市中肺炎検査にマウントした遺伝子検査法を作出すれば、早期発見につながる。逆にバイオテロ対象のプライマーセットを作っても診療で使用してもらえない可能性が高いので、網羅的遺伝子検査は日常スクリーニング用とハイリスク時の救急検査の2つにわけた対応が必要であると考え。昨年までに遺伝子を用いた検出法はほぼ完成し、後はキット化や検出法の改善が必要となっている。

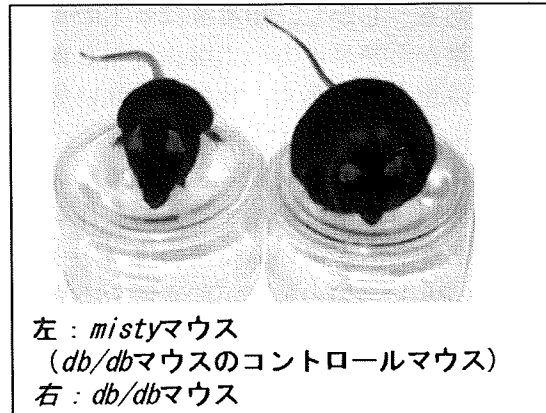
そこで、今年度は、遺伝子検査 (PCR法など) で陽性になった検体や感染状況の把握を網羅的に調べる方法として、免疫学的検出法を提案する。具体的には、ブルセラおよび野兎病の診断用に、IgY抗体を精製し、他検体同時に検出可能なカラムを利用して検出を試みた。

菌体をホルマリン固定後、鶏に免疫し、卵を得て、情報に従い精製した。約100gの卵黄から1gのIgY抗体が得られ、マイクロビーズに抗体を結合させて系を構築した。この際、ウサギに精製標的抗原で免疫し、得られた抗体を蛍光標識し、二次抗体として使用した。

3) 炭疽菌に関する研究

炭疽菌が市中にまかれた場合、どの程度の方が出るか推定されているが、基礎疾患のある患者にはどの程度リスクが増大するかは調べられていない。そこで、今回は我が国で患者数の多い2型糖尿病患者に焦点を当てて解析した。

菌株は炭疽菌Pasteur II苗を使用し、マウスはdb/dbマウスとそのコントロールマウスであるmistyマウスを使用した。このdb/dbマウスは食欲を調節しているホルモンであるレプチンの受容体を欠損していることにより、食欲が調節できず、過食によって、肥満、高血糖となり、糖尿病を発症するマウスで、人の2型糖尿病のモデルマウスとして有効と考えられている。



次に、血糖値と炭疽菌感染の関係を調べる実験を行い、中間型インスリンをdb/dbマウスに20units/headで1日1回投与し血糖値をコントロールし、3群(コントロールマウス、db/dbマウス、インスリン投与db/dbマウス)に炭疽菌芽胞を接種し、生存率、血中細菌数をしらべた。血糖値については、以下の値になった。

db/dbマウス	インスリン投与前	インスリン投与後
血糖値	> 450 mg/dl	102~121 mg/dl
mistyマウス : 121~135 mg/dl		

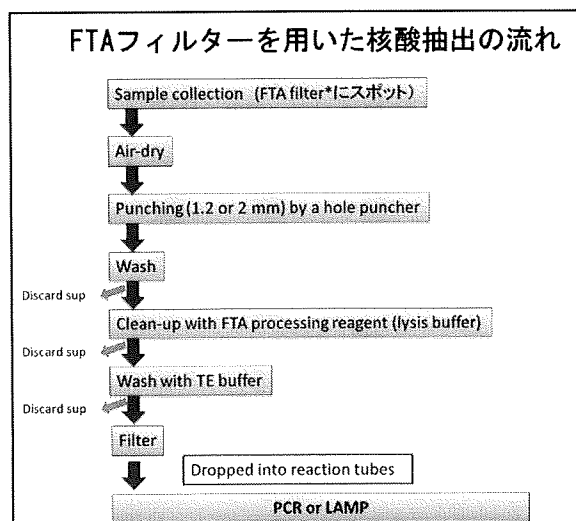
4) その他の研究

生物兵器の中で、植物から分離されるリシン毒度の検出系を確立するために、リシンのBサブユニット遺伝子を大腸菌内で発現させて、融合タンパクを精製後、ウサギに免疫して抗体を作成した。特異性はウエスタンブロッティング法にて融合タンパクに対して確認した。

また、検体の輸送や処理を簡潔化し、危険性を低めるために簡便な処理方法についてFTAカードを使用して検討した。FTAカードの特徴は以下の点である。

1. サンプルをスポットするだけで核酸を捕捉
2. 捕捉した核酸は30分で調製し、ダウンストリームアプリケーションに使用可能
3. FTAカード上のDNAは室温で長期保存可能で、血液サンプルで17年間の保存できた。))
4. 使用前/使用後カードとも室温で保管可
5. 動物/植物/バクテリア…様々な細胞タイプで使用可能

6. 血液などに含まれる病原体は捕捉と同時に不活化されるため、検体の採取や輸送に使用可能な方法は以下のとおりである。



(倫理面への配慮)

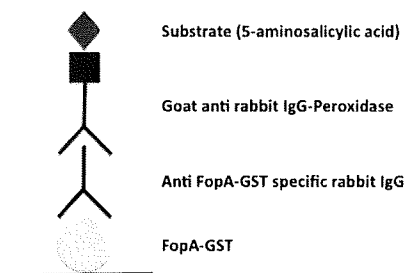
病原体の使用は、病原体等安全管理委員会規則に従って、使用、保管等を行った。動物実験は所属研究機関の動物実験委員会の審査許可を受けて行われ、DNA組換え実験や病原体の取り扱いは法令に従い安全性を考慮して実験を実施した。

C. 研究結果

1) 野兎病菌に関する研究

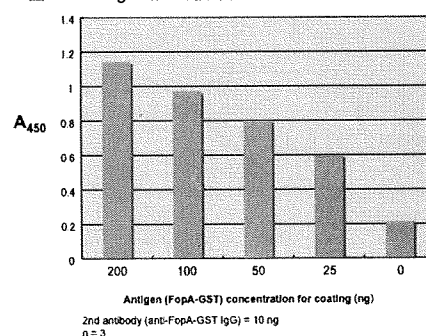
1. FopA-GST の精製：FopA-GST はゲル濾過でシングルピークで溶出され、SDS-PAGEでも1本のバンドとして泳動された (H20年度報告書参照)。
2. 精製 FopA-GST 融合蛋白に対する家兎抗血清の作製：6回のブースターにより抗 FopA-GST 力価はプラトーに達した。
3. 抗 FopA-GST 力価の測定：得られた抗 FopA-GST 家兎血清の力価は 2^{14} であった。
4. 抗 FopA-GST 家兎特異 IgG の調整：4 ml の抗 FopA-GST 家兎血清から、401 μg の抗 FopA-GST 家兎特異 IgG が得られた。
5. 野兎病菌検出用 ELISA の構築：手順は、サンプル (今回は FopA-GST、実際には菌体を含むサンプル) をコート→抗 FopA-GST 家兎特異 IgG 添加→Conjugate (Peroxidase Goat-anti rabbit IgG) 添加→基質 (5-aminosalicylic acid) 添加→450 nm の吸光度測定で行う (図 1)。

図1. Sandwich ELISA for FopA-GST



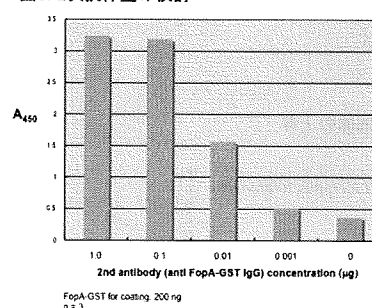
6. ELISA プレートにコートする精製 FopA-GST 濃度の検討：コーティングには 100~200 ng の精製 FopA-GST で充分である事が分かった (図 2)。

図2. Coatingに用いる抗原量の検討

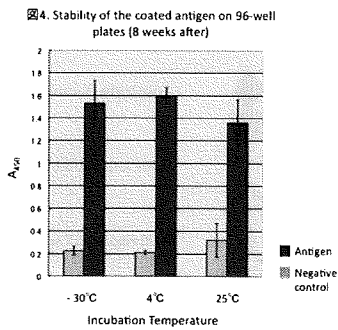


7. 2次抗体 (家兎抗 FopA-GST IgG) 濃度の検討：2次抗体の濃度は 100 ng で充分である事が分かった (図 3)。

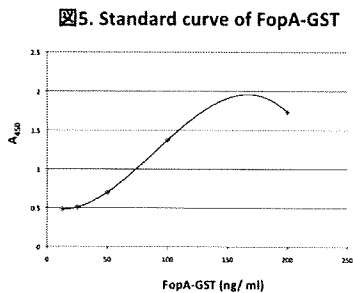
図3. 2次抗体量の検討



8. 96 穴プレートの保管温度の検討：96 穴プレートに抗原をコートして、保存温度による検出感度を比較したところ、8 週間室温 (25°C) で保存しても検出感度は落ちない事が分かった (図 4)。



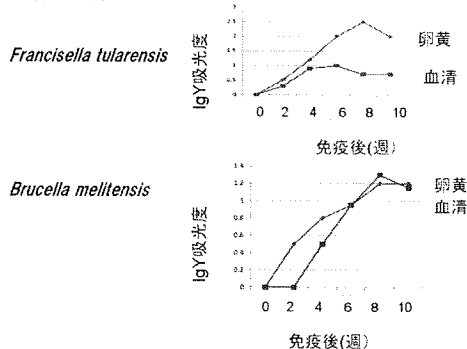
9. 構築したELISA系の精製FopA-GSTに対する検出限界: 50 ng/mlの精製FopA-GSTを検出できる事が分かった(図5)。



2) バイオテロ感染症の網羅的検査

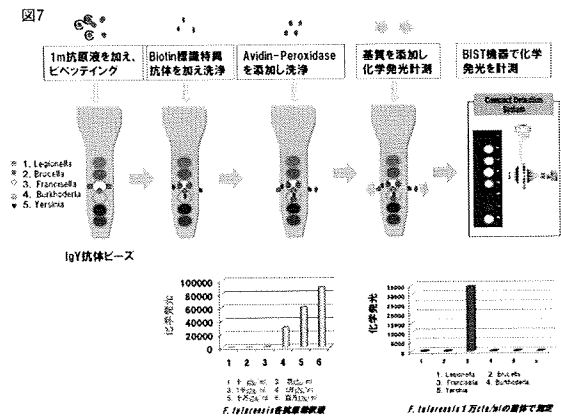
1. 100gの卵黄中には純度が約1%のIgYが含まれるため、精製し、純度約98%で回収率が約61%の状態のIgYを0.6-0.8g改修し、実験に使用した。野兔病菌とブルセラ菌に対するIgYの抗体価の上昇は図6に示す。

図6. 抗体の上昇



2. 次にカラムへの結合と結果を示す(図7)。例えば、5種類の抗体を結合させたカラムを用意し、そこに、サンプル(この場合は野兔病菌液)を加え、二次抗体を反応後、

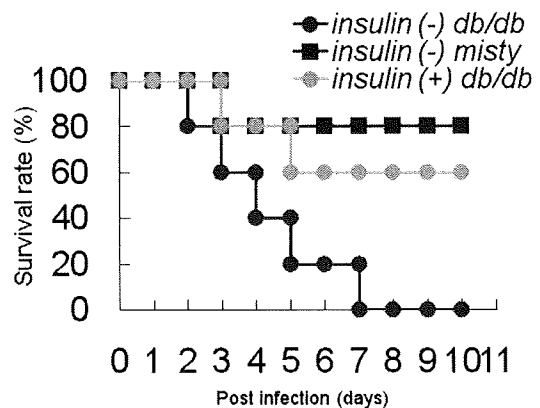
発色後、発光を検知する。その結果、3番のビーズに発光を感知し、野兔病菌であることが示される。今回は、野兔病菌に対して、約10,000個の菌体があれば発光が検知でき、検知器で検知可能であった。



3) 炭疽菌に関する研究

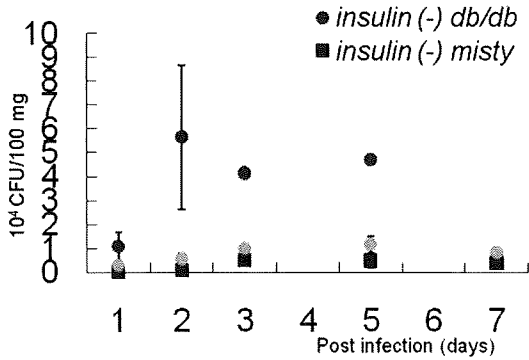
血糖値をコントロールした群と、しなかった群、そして血糖値が正常な群における炭疽菌感染による死亡率(図8)および血中菌数(図9)を調べた。

図8. 血糖コントロール時の生存率



その結果、インスリン投与しないマウスではmistyマウスより死亡率が高く、血中菌数も高かった。このマウスに、インスリン投与を行うと、ほぼmistyマウスと同じレベルまで生存率や菌数が回復した。このことは、糖尿病が炭疽菌感染のリスクを増大させる要因になると結論された。

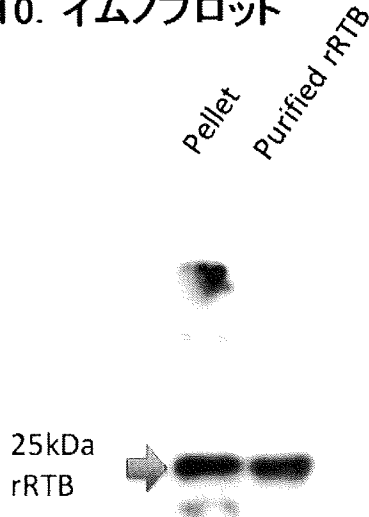
図9. 血糖コントロール時の血中細菌数



4) その他の研究

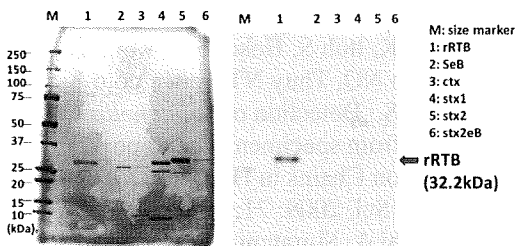
リシンに対する抗体を作成し、その検出系の開発を試みた。抗体の反応性については

図10. イムノブロット



精製リシンの B サブユニットと反応した (図 10)。さらに、特異性を黄色ブドウ球菌の腸管毒素、コレラ毒素、志賀毒素との反応を確認した (図 11)。その結果、他の毒素との反応は検出されずリシン毒素に特異的である

図11. 抗 rRTB抗体の特異性確認



ことが明らかになった。

さらに、FTA カードの有用性について検討した。FTA カードに段階希釈したブルセラ菌液 10 μl をアプライした。菌液は寒天培地に塗布し、翌日、コロニー数を計測し、接種菌数を算出した。FTA カードは乾燥後、付属のパンチャーを用いて、2 mm 径に繰り抜き、これを LAMP 反応液の入ったチューブに入れ、60℃にて増幅反応を行った。ターゲット遺伝子にはブルセラ属菌の BCSP31 を用いた。増幅の有無は濁度でも判定可能であった。スライドには反応後の電気泳動像を示す。少なくとも 33000 個の以上の菌数がフィルター上に捕捉されていれば検出できることが明らかになった (図 12)。

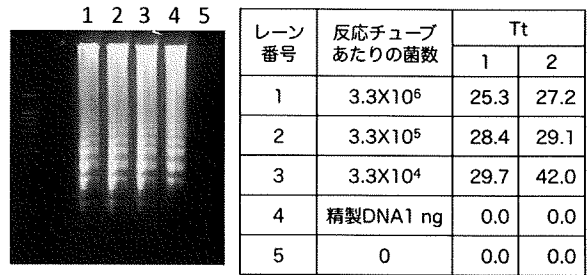


図12. FTAカードを用いたブルセラ菌検出法

FTAカード法によりフィルター(2 mm径)上に捕捉された菌をフィルターごとテンプレートとして反応液に添加し、ブルセラ菌のBCSP31遺伝子を標的としたLAMP法を行った。

D. 考察

1) 野兎病菌に関する研究

今回、精製した FopA-GST 融合蛋白は十分な免疫原性を持ち、最終の力価は ELISA 価で 2¹⁴ まで上昇した。この抗 FopA-GST 家兎血清から精製 FopA-GST をカップリングした Affinity カラムで抗 FopA-GST 家兎 IgG を調整して、野兎病菌及び野兎病菌抗原を検出する Sandwich-ELISA 系を構築した。この系を用いると 50 ng/ml の精製 FopA-GST が検出可能であるので、現在、どのくらいの濃度の野兎病菌体を測定できるかを検討している。更に、系統分類学的に野兎病菌に近い *Aeromonas hydrophila*, *Proteus vulgaris* や臨床症状が酷似している *Yersinia pestis* の菌体に対する交差反応があるか否かの検討を行っている。

今回、精製 FopA-GST でコートした 96 穴プレートの検出能が室温で 8 週間保存しても冷蔵あるいは冷凍保存したプレートと変わらな

かった事から、野兎病が発生した際に野外で検査するのに非常に有用である事が分かった。今回作製した精製 FopA-GST を用いて患者血清中の抗野兎病菌体 IgG を測定する事で野兎病を迅速に診断する事が可能である。現在、この系の構築も行っている。

2) バイオテロ感染症の網羅的検査

今回の網羅的な検出系は、抗原抗体反応を使用したシステムへの開発についてである。遺伝子の検出で陽性になった場合の確認試験や検体を直接調べる系として応用が期待される。バックグラウンドが少ない鶏のIgYを作り検討した。特異性の高い抗原の精製がカギとなるので、網羅的に作成するには時間がかかるが、可能性が見えてきた。PCRを利用した網羅的な方法との併用が強く望まれる。

3) 炭疽菌に関する研究

炭疽菌の発症リスクは健常人をターゲットに推定されてきたが、今回の糖尿病モデルマウスを使用した結果から、基礎疾患を持つ人のリスクは増大することが明らかとなり、今後の防止対策に有用な結果であると考えられた。また、その他、基礎疾患として、腎臓病などの疾病のほか、アレルギーなども要因となる可能性が考えられるが、アレルギーモデルマウスでも類似のデータが出る傾向にあり、多くの宿主要因を考慮した評価が重要であるといえる。

4) その他の研究

リシンはPCR法では全く検出不可能であり、毒素であるために抗原抗体反応による必要がある。毒性が高いことからその検出系の開発は急務である。市販の抗体も購入可能ではあるが、今回調べた他の毒素との交差反応も報告されており、より特異性の高い系の開発が急務である。一方、今回の報告では、リコンビナント毒素タンパクに対して特異性を調べたが、元の毒素との反応を調べる必要がある。この点は、リシン毒素の保有が特別に許可され、精製を行うことが困難なため、現在反応性を確認してもらえらる機関に依頼交渉中である。

E. 結 論

1. 今年度、構築した野兎病菌表在抗原に対する Sandwich-ELISA は 50 ng/ml まで検出可能であった。この系に使用する抗原コートプレートは室温で8週間の保存が可能であった。
2. テロ対策用の網羅的な免疫学的検査法の確立を目指し、研究をスタートさせた。網羅的な PCR 法による検出法とともにキット化する予定である。
3. 炭疽菌のリスクの増大因子としてを糖尿病がその一つであることを見出した。
4. リシンに対する免疫学的検出系を開発した。今後さらなる実検体を使用した検証が不可欠である。また、FTAカードを検体からDNA抽出の簡便な方法として提案した。検体をそのまま輸送することも可能で、また保存することも可能で、有用性が示唆されて。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

(1) 論文発表

- 1) Minami A, Chaicumpa W, Chongsa-Nguan M, Samosornsuk S, Monden S, Takeshi K, Makino S and Kawamoto K.: Prevalence of foodborne pathogens in open markets and supermarkets in Thailand. Food Control. 2010; 21: 221-6.
- 2) Thuy NTB, Takeshi K, Kusumoto A, Makino SI, and Kawamoto K.: *Salmonella* Typhimurium isolated from healthy pigs and their ability of horizontal transfer of multidrug resistance and virulence genes.: Bioscience Microflora. 2009; 28:135-43.
- 3) Kurosaki Y, Sakuma T, Fukuma A, Fujinami Y, Kawamoto K, Kamo N, Makino SI, Yasuda J.: A simple and sensitive method for detection of *Bacillus anthracis* by loop-mediated isothermal amplification. J Appl Microbiol. 2009 (in press).
- 4) Takeshi K, Itoh S, Hosono H, Kono H, Tin VT, Vinh NQ, Thuy NT, Kawamoto K, Makino S.: Detection of *Salmonella* spp. Isolates from specimens due to pork production Chains in Hue City, Vietnam. J Vet Med Sci. 2009; 71: 485-7.
- 5) Takahashi A, Muratani T, Yasuda M,

Takahashi S, Monden K, Ishikawa K, Kiyota H, Arakawa S, Matsumoto T, Shima H, Kurazono H, Yamamoto S.: Genetic profiles of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from cystitis: phylogeny, virulence factors, PAIusp-subtypes, and mutation patterns. J Clin Microbio; 47: 791-5.

- 6) Uchida I, Ishihara R, Tanaka K, Hata E, Makino S, Kanno T, Hatama S, Kishima M, Akiba M, Watanabe A, Kubota T.: *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 ArtA-dependent modification of pertussis toxin-sensitive G proteins in the presence of [³²P]NAD.: Microbiology. 2009; 155:3710-8.

H. 知的財産の出願・登録状況
特になし

7. 細菌毒素の迅速検出法の開発

研究分担者 高橋元秀 国立感染症研究所 細菌第二部

研究協力者 見理 剛、山本明彦 (国立感染症研究所)
向本雅郁、幸田知子、小崎俊司 (大阪府立大学)
高山勝好、小林行治 ((株)アドテック)
大隈邦夫、千北一興 ((財)化血研)

研究要旨 他の細菌毒素と比較して致死活性が著しく高いため、バイオテロに使用される危険性が高いボツリヌス毒素を、現行国際標準試験法であるマウス接種法と比較して、迅速に且つ同程度の感度を備えた検出系を開発する。高感度検出系であるサンドイッチイムノPCRについては、A型毒素は構築し、マウス接種法 (感度; 10 pg/ml) と同程度の感度が得られ、毒素サイズの異なるM毒素、L毒素に対しても同様な感度を有していた。B型毒素の系は、サンドイッチELISA検出系を構築し、次の段階に進んでいる。また、昨年度までに簡易検出系として開発したボツリヌスA型毒素検出用のイムノクロマトキットを18ヶ所の地方衛生研究所に配布し、ボツリヌス食中毒や乳児ボツリヌス患者発生の際の診断にも用い、感度、精度等の検証作業を依頼した。さらに、ボツリヌス毒素検出試験 (マウス中和試験法) において検体に混入するクロストリディアが産生する毒素を中和する抗毒素抗体を作製して、同様に地研に配布して品質の確認をするとともに利便性を高めた。

A. 研究目的

ボツリヌス菌が産生する毒素は抗原性の違いによりAからG型の7型に分類されており、ヒトのボツリヌス症はA,BおよびE型菌が産生する毒素による発症報告が多い。ボツリヌス毒素は微量でヒトに致死性の中毒を起こし、他の毒物と比較して致死活性が著しく高いため、バイオテロ発生にあつては、検体からの検出には迅速で高感度の検出系が求められる。現在のところ最も感度および信頼性が高い国際的なボツリヌス毒素の標準検出・定量法はマウス腹腔内接種法である。検査試料をマウス腹腔内に接種し、経時的に観察し、腹部陥没等のボツリヌス毒素特有の症状を発現して高濃度の場合には死亡することを確認する。毒素型別は診断用抗毒素血清を用いたマウス接種中和試験により判定する。本法による毒素の検出感度は、高度精製した毒素蛋白換算で10~50 pg/mlである。本法は実験動物を用いる試験のために動物管理施設や動物入手までに日数を要すること、また最終的な判定まで

最長4日を要するため、迅速法としては不向きである。さらに、実験動物愛護の観点からWHO等の国際機関でも動物を用いた試験は代替法を検討すること、実験に際して動物数を減らすこと、試験の適性を確認することなどが求められる(3Rs)。

本研究では、ボツリヌス毒素検出系として検出感度、操作性、迅速性からマウス接種法より優れている方法の開発を目指す。現在、各方面で開発が進んでいるサンドイッチイムノPCR法を確立することを一つの目的とする。目標検出感度はマウス接種法と同等かそれ以上(約10 pg/ml=約1マウス腹腔内投与(ip)LD₅₀/mL)を目指す。また、過去に実施した人型ボツリヌス抗体の研究の産物であるA型ボツリヌス毒素を特異的に中和するヒト型抗体を利用してイムノクロマトキットの開発を検討する。本キット開発に当たっては、商品化をめざし他の病原体検出キットを製造販売している企業との共同研究を実施する。試作した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検査を実施する機会があり、評価のポイントを理解している地方衛生研究所の担当者に試験を依頼し、操作法や感度も含めた評価を客観的におこない最終的に商品化に結びつける。

ボツリヌス菌検出試験では、検体(患者便、食品、環境物)を一次培養して培養液中にボツリヌス毒素が産生されているかをマウス法で試験する。その際に、検体中にはボツリヌス菌と同属の他のクロストリジウム菌(*Clostridium* 属: *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. oedematiens* および *C. tetani*) が混入し、培養により個々の毒素を産生する。これら毒素もマウスには致死活性を有するために、これら毒素を特異的に中和する抗毒素抗体の作製が要望されていた。今回、各毒素に対するウマ抗毒素血清を化血研から入手した。治療用ガスエソウマ抗毒素製剤の品質管理に用意されている国内標準ガスエソウマ抗毒素(抗 *C. perfringens*, 抗 *C. septicum*, 抗 *C. oedematiens* および抗 *C. tetani*) に対して標準化し、各菌産生毒素に対する診断用補助血清を作製した。この標品の品質管理についても実使用の多い各地方衛生研究所へ配布し、ボツリヌス毒素検査時の信頼性、利便性および有用性について検証する。

B. 研究方法

1) サンドイッチイムノPCRの作製

昨年度作製したアフィニティ精製ウサギ抗A型ポリクローナル抗体および神経毒素との反応性が高いモノクローナル抗体は14クローンを用いてはサンドイッチELISAにより基本条件設定をおこなった。サンドイッチイムノPCRへの展開は、imTag PCRキット(ケアティス社)を用い、PCR反応後のアガロース電気泳動によりPCR産物を検出し、毒素を加えていない陰性対象で検出されるバンドとの濃淡により毒素の検出濃度を判定した。

イムノクロマトキットの固相化抗体膜の作製条件を検証し、コンジュゲートパッド(金コロイド標識抗体パッド)の作製条件の決定およびイムノクロマトストリップの組み立てと

毒素の添加および判定方法は、昨年度の結果をもとに、標準化した。

固相化抗体は、抗A型神経毒素マウスモノクローナル抗体として1F11または5A6を選択した。検出抗体としては、ビオチン標識抗A型神経毒素アフィニティ精製ウサギIgGを用いた。評価抗原は、精製A型神経毒素としてA1型は62AまたはA2型はCHIBA-Hを用いた。さらにA1毒素の異なる毒素標品として精製M毒素およびL毒素で検討した。

2) 試作製品化ボツリヌスA型毒素検出用イムノクロマトキット

ボツリヌス菌および毒素の取り扱い機関は、感染症法で二種特定病原体となっている。従って、試作したキットは大臣許可を取得しているボツリヌスレファレンスセンター等の地方衛生研究所を含む国内18ヶ所の試験研究所に配布した。各試験研究機関で実施可能なキットの品質確認試験を培養菌液または保存している毒素について実施した。

3) *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. oedematiens* および *C. tetani* の各毒素中和用抗毒素抗体の作製

3種類のガス壊疽菌(*C. perfringens*, *C. septicum*, *C. oedematiens*)が産生する毒素に対する抗毒素は、治療用ガス壊疽製剤を製造する化学及血清療法研究所からウマ免疫血清を分与を受けた。破傷風抗毒素は当室で保存している破傷風トキソイド免疫ウマ血清を用いた。ガスエソ菌(*C. perfringens*, *C. septicum* 及び *C. oedematiens*)については、近縁菌として検体に同時に混入することも多いために3種混合抗体も作製した。各原液血清はあらかじめ生物学的製剤基準の力価試験法(マウス中和法)により抗毒素価を定量した。

(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) サンドイッチイムノPCRの作製

A型毒素に対するサンドイッチイムノPCRでの検出系構築として、マウス腹腔内接種法（純品毒素相当の感度；10 pg/ml）と同程度の感度が得られた。構築したA型毒素に対するサンドイッチイムノPCR検出系はM毒素、L毒素に対しても同程度の感度を有していた。A1神経毒素の検出感度は両抗体とも0.1 ng/mlとマウス接種法と同程度の感度を有していた。また、A2神経毒素に対しては1F11抗体においてA1と比較して10分の1に感度が低下した。

地方衛生研究所での試験法の普及を目的に手技の詳細マニュアルを作成した。また、試験法の感度、再現性等の確認として、国内5ヶ所程度に抗体およびPCRキットを配布する準備を整え、次年度に配布して検証する。

B型毒素に対するサンドイッチイムノPCRでの検出系構築のための条件検討として、サンドイッチELISA検出系を構築した。最終年度に向けて、サンドイッチイムノPCR検出系を構築中である。

2) 試作製品化ボツリヌスA型毒素検出用イムノクロマトキットの品質結果

試作製品化した包装と使用書は図1に示した。ボツリヌス62A菌株をTPYG培地で培養した毒素を精製したM毒素の検出感度は、約1000LD₅₀であった。また、A型毒素には数種の亜型毒素の存在が確認されているため、A2亜型毒素の検出感度を試験した結果、A1の毒素（5000LD₅₀）に比較して約1/3の感度（1500LD₅₀）であった。

3) *C.perfringens*, *C.septicum*, *C.oedematiens* および *C.tetani* の各毒素中和用抗毒素抗体の作製

各々の毒素に対する抗毒素抗体を定量して、単独血清については、バイアルあたり100単位を小分けして凍結乾燥した。ガスエその3種混合抗毒素抗体は、単独抗毒素液を等量で混合し、各毒素抗毒素は33.3単位になるように調整した。各凍結乾燥標品は10本ずつ、レ

ファレンスセンターに属する地方衛生研究所等に配布して、今後、実験室診断の毒素確定時に品質を検証する。

D. 考察

構築したA型毒素検出用のサンドイッチイムノPCR系は、当初目的としたマウス腹腔内注射法の測定感度である2-3致死量換算である10 pgの毒素を検知することが確認された。また、A型毒素検出用の試作標品イムノクロマトキットでは1mL中に1000致死量を含む毒素液の0.1mLを用いた試験で0.5 ng/mlの毒素が検出可能であった。検出感度の比較で、A1神経毒素の検出感度にくらべA2神経毒素に対しては1F11抗体において10分の1に感度が低下したが、この原因は本抗体のA2に対する反応性が低いことが原因であると考える。

本研究では異なる手法により毒素を*in vitro*で検出する方法の開発を目指している。現段階では、サンドイッチイムノPCR法の感度が勝る結果を得ているが、反面実験室で作業が必要、非特異反応による精度に改善点がある。イムノクロマトキットは現場で簡易に使用できる利点はあるが、一次スクリーニングとしてはマウス法の代替法とするには、より多くの検証が必要である。しかし、両方法の長所、短所を取り入れて開発することにより、ボツリヌス毒素検出系の確実性がより向上すると考えられる。

ボツリヌス毒素の国際的確認試験法はバイオアッセーであるマウス腹腔内試験法が未だ標準法となっている。ボツリヌス菌は土壌に分布し、ボツリヌス食中毒においては土壌中に存在する芽胞が食材や食品に混入して、嫌気性で水分や栄養条件がそろった環境で発芽、発育する。菌の増殖に伴い産生された神経毒素により発症する。食品中には土壌に分布する他の*Clostridium*属である*C.perfringens*, *C.septicum*, *C.oedematiens* および *C.tetani* が増殖してその毒素も混入する場合もある。さらに、乳児ボツリヌス症の検査に用いる患者便にも他菌の毒素混入が心配される。ボツリヌ

ス菌・毒素の確認試験は、患者の喫食した食品残物や便（検体）をクックドミート培地で培養し、第一段階で培地上清中の毒素をマウス中和法で確認し、二段階目として毒素が証明された後には菌を単離する。検体中にも土壤に分布する他の *Clostridium* 属が多く混入しており、マウスに注射に際しては他の菌が産生した毒素活性（麻痺、致死）により、ボツリヌス毒素の症状観察が困難なことがある。今回試作して配布した4型の *Clostridium* 属菌が産生する毒素を中和する抗毒素抗体は、本来ならば製造所等による製品開発と市販が求められるが、市場性が無いために民間での開発は不可能であった。さらに、感染症の実験室診断に用いる標準品等は、薬事法の体外用診断薬として認可承認の対象製品と位置づけを求める判断もあるが、試薬等が開発される見込みがないままでは現場での検査に支障をきたす。このため、今回は生物学的製剤基準に掲載される治療用ウマ抗毒素製剤の試験法に準拠した標準品作製の手順で標準化した各抗毒素抗体を作製して、各地方衛生研究所に配布して品質確認を目的に試験を実施する。これら標品の位置づけは、今後あつまった試験結果を検討して、担当部署との協議も必要と考える。

E. 結 論

1) マウス接種法に代わるボツリヌス毒素の高感度検出系としてサンドイッチイムノPCR法の開発を目出した。今年度までに、A型神経毒素の検出系を作製し、試験法マニュアル、試験に必要な抗体および試験キットの調整・準備が整った。次年度に複数の検査機関において試験法の精度、応用性について検証する。また、同様な系でBおよびE型毒素検出系の構築を進めている。

2) 試験機関でマウス法の予備試験として利便性の高いボツリヌスA型毒素検出用のイムノクロマトキットを作製し18ヶ所の地方衛生研究所に配布し、感度および精度等の検証作業を開始した。

3) ボツリヌス毒素をマウス中和試験法で同

定する際に、ボツリヌス菌とともに検体に混入するクロストリディアが産生する毒素を中和する抗毒素抗体を作製して、地研に配布して品質の確認と利便性を確認中する。

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

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