

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
バイオテロに使用される可能性のある病原体等の新規検出法と標準化に関する研究  
分担研究報告書

鼻疽・類鼻疽の迅速診断法に関する研究

研究分担者 堀野敦子 国立感染症研究所・細菌第二部

協力研究者 山根一和 川崎医科大学・公衆衛生学

研究要旨

鼻疽(glanders)、類鼻疽(melioidosis)は *Burkholderia* 属の細菌、*Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei* がそれぞれ感染して起きる感染症である。日本国内では鼻疽も類鼻疽も稀な感染症であるが、国外では両者にはかなり違いが認められる。類鼻疽菌、*B. pseudomallei* は東南アジア、北部オーストラリアなどでは土壤中に常在菌として生存しており、農耕期やモンスーンの時期に患者発生が多い。感染経路は創傷からの経皮感染、吸入感染、また経口摂取による感染である。発病する患者は基礎疾患を持っていることが多い。多くは糖尿病、腎臓障害、過度のアルコール摂取等である。類鼻疽流行地域では類鼻疽は稀な疾患ではない。タイの流行地域では類鼻疽流行期に市中肺炎患者が医療機関を受診した場合には、まず類鼻疽が疑われる。

一方、鼻疽は国外でも非常に稀な疾患である。ウマでまれに散発例が見られるがヒトへの感染例はほとんど報告されていない。近年ではアメリカで実験室感染と考えられる例が報告されているのみである。この鼻疽菌、*B. mallei* は環境中では生存できない。主にウマ、ロバに感染する。ヒトには患畜の膿などから感染するとされる。

これらの *B. pseudomallei*, *B. mallei* は CDC のカテゴリーB に指定されておりバイオテロに使用される懸念のある細菌である。このため、日本国内で事例が発生したときのために検出法を確立しておく必要がある。本研究では地方衛生研究所等で検査が可能であるように、普及している検査法での確立をめざし、LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)法を選択した。*B. pseudomallei* の LAMP 法は前回までの研究班で基礎検討が終わり、今年度はタイで臨床検体の検討を試み既報より良好な結果を得た。*B. mallei* の LAMP 法は、これまで適当なプライマー群を設計することができなかったが、今年度、実用可能と考えられるプライマー群を設計した。これまで *B. mallei* の LAMP 法の報告はないため、このプライマー群により LAMP 法で検出ができるようになる。

## A. 研究目的

本分担研究では、バイオテロに使用される懸念のある *Burkholderia* 属の細菌、*B. pseudomallei* と *B. mallei* の迅速検出法を確立することを目的としている。これまで、*B. pseudomallei* の迅速検出法について検討を行ってきた。迅速検出法として簡便な遺伝子検出法であり地方衛生研究所などでは普及している LAMP 法を選択し、昨年度までに基礎検討を終えている。日本国内では類鼻疽患者はほとんど発生しないため、今年度は共同研究先のタイ・コンケン大学にて類鼻疽患者血液検体を用いて LAMP 法の性能検討を行うことを目的とした。また、*B. mallei* については *B. pseudomallei* と同様に LAMP 法による迅速遺伝子検出法の確立を目指し、適切なプライマー群を設計することを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. *B. pseudomallei* の迅速遺伝子検出法 (LAMP 法)

タイ国コンケン県で敗血症の類鼻疽患者血液よりバツフィーコートを分離し、ゲノム DNA を抽出して LAMP 法の鋳型として用いた。また、類鼻疽以外の敗血症患者から採取したバツフィーコートも対照検体として用いた。LAMP 法の検出には蛍光色素試薬を用い、ウォーターバス水浴中にて 63°C で 60 分反応させ、蛍光による判定を行った。

### 2. *B. mallei* の迅速遺伝子検出法 (LAMP 法)

LAMP 法の標的遺伝子を BMAA0749

(hemagglutinin domain-containing protein) とし、プライマー群の設計を行った。まず、*B. mallei* ATCC 株 23344 から抽出したゲノム DNA を鋳型として検出感度の検討を 63°C、60 分の反応条件で行った。*Burkholderia* 属は種間の遺伝子配列が非常に良く似ているため、ヒトから検出される可能性のある *B. pseudomallei*, *B. thailandensis*, *B. cepacia* から抽出したゲノム DNA を用いて特異度の検討を行った。

(倫理面への配慮)

コンケン大学での臨床検体を用いた研究は感染研倫理審査 受付番号 253 により承認されている

## C. 研究成果

### 1. *B. pseudomallei* の LAMP 法

類鼻疽流行地域にあるタイ・コンケン大学で、コンケン県で発生した敗血症類鼻疽患者由来バツフィーコートから抽出したゲノム DNA を用いて検討した結果、感度が 41.2%、特異度 93.8% という結果であった。既報 (Chantratita N. et al. J. Clin. Microb. Vol.46. 2008) では血液由来検体の検出感度は 2.3% と非常に低く、この方法より検出率は高かった。LAMP 法での検出率が高いとされる血液以外の臨床検体を用いた検討は、共同研究先の理由で行うことはできなかった。

### 2. *B. mallei* の迅速遺伝子検出法

標的遺伝子を BMAA0749 とした *B. mallei* LAMP 法のプライマー群を ID\_19, ID\_93, ID\_102 の 3 群設計した。ATCC 株 23344 から抽出したゲノム DNA を用いて 63°C、60 分の条件で検討した結果、検出限界は、ID\_19 と

ID\_102 がゲノム DNA で 1 反応あたり 5.46 コピーと良好であった。続いて、特異度の基礎検討を行った。これらのプライマー群は *B. pseudomallei*, *B. thailandensis*, *B. cepacia* から抽出したゲノム DNA を鋳型として用いた LAMP 法では陰性であった。しかし、*B. pseudomallei* について株数を増やし 24 株を用いて検討した結果、このうちの 3 株に反応した。反応温度条件を 67°C に変更することにより ID\_102 は *B. pseudomallei* に反応しなくなった。一方 ID\_93 は検出感度では検出限界はゲノム DNA で 1 反応あたり 54.6 コピーであった。特異度について上記と同様に検討した結果、65°C、60 分の反応条件で特異度に問題は無く、24 株の *B. pseudomallei* にも反応しなかった。

#### D. 考察

*B. pseudomallei* の LAMP 法では、類鼻疽患者血液由来検体のゲノム DNA を用いて検討した結果、感度は良好なものではなかった。しかしながら、既報の血液検体を用いた LAMP 法の検出感度 2.3% から 41.2% へと感度が上がっており、反応条件を調整することにより、さらに改良できると考えられる。また、国内で LAMP 法を適用する場合には、類鼻疽疑い患者由来の臨床分離株について検査を行うことが多く、この場合の LAMP 法検出には問題が無い。呼吸器検体など、LAMP 法による検出率が高いとされている他の臨床検体については、検討を行う機会が得られれば試みたい。類鼻疽については、患者血清中の抗体から類鼻疽を診断・同定する

方法も求められているが、この方法については来年度以降の課題になる。

一方、*B. mallei* の LAMP 法プライマー群はこれまで適当なものを設計することができなかったが、今年度、遺伝子 BMAA0749 を標的遺伝子として実用可能と考えられるものを設計することができた。ID\_102 と ID\_93 のプライマー群は特異度に問題が無く使用できると考えられる。ID-93 は検出限界が 54.6 コピーであり、ID\_102 より低い、既報の *B. mallei* の Real-time PCR では検出限界が 424 コピーであることから、このプライマー群でも使用に問題は無いと考えられる。ID\_93 と ID\_102 のどちらがより安定して使用できるのか、さらに反応温度と使用酵素を変更して検討を行う。これまで *B. mallei* の LAMP 法の報告はないため、このプライマー群と *B. pseudomallei* のプライマー群で *Burkholderia* 属のバイオテロ対策 LAMP キットとして、必要な場合に地方衛生研究所などに配布できると考えられる。

#### E. 結論

*B. pseudomallei*, *B. mallei* の迅速遺伝子検出法に LAMP 法を適用し、プライマー群の設計、ならびにそれらの検出感度と特異度の確認を行った。*B. pseudomallei* は類鼻疽の流行地域にあるタイ・コンケン大学で類鼻疽患者血液由来検体を用いて検討を行い、既報よりは検出感度が良いことを確認した。*B. mallei* では新規にプライマー群を 3 群設計し検討した結果、これらのうち 2 群のプライマー群は実用可能であると考えられた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

ベトナムから帰国後空洞病変で発症し、再燃時多発肺結節を認めたメリオイドーシスの1例、倉田季代子，貫井義久，島田裕之，井上幸久，吉村信行，堀野敦子、日本呼吸器学会雑誌、Vol. 49, No. 6, 443-448、2011

2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

## 厚生労働科学研究費補助金

### (新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

#### バイオテロに使用される可能性のある病原体等の新規検出法と標準化に関する研究

分担研究課題： 超高速病原体ゲノム解読システムの構築と包括的な核酸迅速診断法の確立

研究分担者	黒田 誠	国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター センター長
研究協力者	関塚剛史	国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室
	竹内史比古	国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室
	浅野重之	いわき市立総合磐城共立病院・病理科
	菅野隆行	国立感染症研究所・感染病理部
	佐多徹太郎	富山県衛生研究所

#### 研究要旨

未知病原体や変異病原体による新興感染症の汎発流行、そしてそれらを利用したバイオテロなどの危険性は近年社会的不安の一つとして認識されつつある。その危険性に対する確な対処法を立案・整備する上で、使用された病原体を網羅的かつ迅速に配列解読することは最も確なアプローチの一つと考える。次世代ゲノムシーケンサーのパフォーマンスを用いて WHO 指定バイオテロ病原体のゲノム配列及び変異情報データベースを充実させ、有事において迅速に対応出来る体制を整えることを本研究課題は目標としている。

野兎病菌 (*Francisella tularensis*) は WHO 指定バイオテロ病原体 (カテゴリーA) に分類され、バイオテロ対策として臨床検体から迅速に野兎病菌の遺伝情報を得ることは重要である。野兎病菌は亜種レベルで病原性が異なることから、1 塩基バリエーション (SNVs), VNTR 等の genotyping 法を利用した亜種の分類が病原性の評価に有効である。本研究において、野兎病菌の感染症疑いの患者の腋窩部膿瘍を用いて、次世代シーケンサー Illumina GAIIX による病原体の網羅的検出を行った。抗菌薬治療により膿瘍から起原菌の増殖を検出できなかったが、PCR 検査では野兎病菌陽性であった。GAIIX にて 3,828 万本のリード (125 mer) を解読し、ヒト由来配列 (~99%) を完全に削除し、野兎病菌と類似性を示す 833 本 (0.002%) の解読リードを得た。野兎病菌 Type A (高病原性) と Type B (低病原性) の双方を検出したことから、SNVs を利用した亜種を分類する株系統樹解析を行った。系統関係から、日本固有に分布する *F. tularensis* subsp. *holarctica* (biovar *japonica*) と近縁であることが判明した。本症例は地域的な散発症例であり、バイオテロ使用が懸念される Type A (高病原性) とは明確に異なると鑑別することができた。

#### A. 研究目的

未知病原体や変異病原体による新興感染症の汎発流行、そしてそれらを利用したバイオテロなどの危険性は近年社会的不安の一つとして認識されている。最先端技術を駆使した次世代ゲノムシーケンサーにより、今までは数年を要した全ゲノム解読が数週間で終了することが可能となった。最先端の

革新技術を応用し、効率的かつ安定的に病原体検査システムを運用する体制を整え、WHO 指定バイオテロ病原菌および未知病原体をも検査対象とする網羅的解析法を構築することを目的としている。

#### B. 研究方法

- 1) 網羅配列解読による野兎病菌鑑別と病原性評価  
いわき市立総合磐城共立病院・浅野先生から供試

頂いた感染症の疑いのある不明病検体(右腋窩リンパ節膿瘍)を用いて病原体検索を試みた。

### 1) 網羅配列解読のライブラリー作製:

膿瘍検体から解読用 DNA ライブラリーを作成するために、NEXTERA DNA sample prep kit (EpiCentre) を用いた。

### 2) 次世代シーケンサーによる網羅塩基配列解読:

次世代シーケンサー illumina GAIIX で DNA ライブラリーの網羅解読を行った。解読キットは、TruSeq SBS kit v5 (illumina)を使用した。1サンプルにつき 3,828 万本の解読リード (125 mer) を取得した。解読リードに内在するヒトゲノム配列を bwasw マッピングソフトで削除した。残った解読リードを用いて相同性検索 (megablast) を行い、病原体を検索した。現在公開されているほぼ全ての生物種の配列を内包している米国 NCBI nt 配列データベース (2011 年 7 月 11 日版) に対して相同性検索を行い、病原体候補を検索した。得られた結果を MEGAN (v. 4. 40. 6) にて類似性の見られた生物種の一覧図を得た (MEGAN の閾値: 1 ヒット以上、score 200. 0 以上)。

### 3) 1 塩基バリエーション SNV による野兔病菌の株系統解析:

高病原性・野兔病菌タイプ A に属する *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* SCHU\_S4 LT2 株のゲノム情報 (GenBank ID: NC\_006570. fna) をレファレンス配列にして、maq v0. 7. 1 によるリード・マッピングを行った。phred score,  $\geq 20$ ; coverage,  $\geq 1$ ; variant frequencies,  $\geq 0. 90$  の条件で SNVs を抽出した (MapView 使用)。公開され利用可能な野兔病菌・10 株のゲノム情報を加え、該当 SNV サイトのアレルを用いて最尤法による系統樹解析を行った (RAxML v7. 25 を使用)。

(倫理面への配慮)

微生物検査として網羅配列解読による病原体検出を行った。患者配列を特定する作業は行わず、個人情報に結びつく配列解析は一切行っていない。国立感染症研究所・医学研究倫理委員会にて承認済み。

## C. 研究結果

### 1) 網羅配列解読による病原体鑑別と病原性評価

野兔病菌 (*Francisella tularensis*) は WHO 指定バイオテロ病原体 (カテゴリーA) に分類され、バイオテロ対策として臨床検体から迅速に野兔病菌の遺伝情報を得ることは重要である。本研究において、野兔病菌の感染症疑いの患者の腋窩部膿瘍 (図 1) を用いて、次世代シーケンサー Illumina GAIIX による病原体の網羅的検出を行った。抗菌薬治療により膿瘍から起因菌の増殖を検出できなかったが、PCR 検査では野兔病菌陽性であった。

GAIIX にて 3,828 万本のリード (125 mer) を解読し、ヒト由来配列 ( $\sim 99\%$ ) を完全に削除し、細菌と類似性を示す 833 本 (0. 002%) の解読リードを得た (図 2)。相同性検索で得られた結果を taxonomy で分類したところ、全て野兔病菌 *Francisella tularensis* に相当する配列であった (図 3)。高病原性 Type A. *F. tularensis* subsp. *tularensis* と低病原性 Type B. subsp. *holarctica* との両方が約半数ずつヒットし、単純な相同性検索のみでは感染病原体の病原性を評価できなかった (図 3)。

野兔病菌 Type A (高病原性) と Type B (低病原性) の双方を検出したことから、SNVs を利用した亜種を分類する株系統樹解析を行った。解読で得られた野兔病菌 833 リード (図 3 参照) を用いて、野兔病菌ゲノムに特徴的な SNV サイト 66 箇所を検出し、株固有の SNV アレルのアライメント解析を行った (図 4)。Iwaki-08 は、日本分離株 FSC022 (Ebina) の SNV アレルと酷似しており、1 箇所のみ異なっていた (nt posi.: 329, 375)。

アライメント結果を元に最尤法で系統樹を作成した。Iwaki-08 は日本固有に分布する *F. tularensis* subsp. *holarctica* (biovar *japonica*) と近縁であることが判明した。本症例は地域的な散发症例であり、バイオテロ使用が懸念される Type A (高病原性) とは明確に異なると鑑別することができた。

#### D. 考 察

患者リンパ節膿瘍検体から網羅解読法で病原体・野兔病菌を検出し、その特徴的な株固有 SNVs を利用することで、病原性の強弱に関する遺伝情報を得ることができた。野兔病菌は病原性が異なる subsp. に分類され、北米由来の高病原性 Type A であるのか、低病原性 Type B による散発的な地域発生であるのか明確に分類する必要がある。検体から菌分離が可能であれば、従来検査法で鑑別するほうが確実であり正確であると思われる。しかしながら、本症例のように分離培養できなかった事例やバイオテロ発生時において、出来る限りの対策を講じることが先決である。昨年度の研究班において、野兔病菌の網羅的なゲノム情報の収集とデータベース化を完了しており、本事例の解析を短期間で完了することができた。分担研究として、これまで以上に WHO 指定バイオテロ病原体のデータベース化を進めることがより一層重要であると認識している。

#### E. 結 論

野兔病菌・全ゲノム配列の解析結果を基礎として、包括的な遺伝子検査法の開発および SNVs データベース整備を行い、バイオテロ発生等の具体的な事例においても対応できる網羅核酸診断システムを構築した。本事例により、次世代シーケンサーを用いた網羅解読が、有効な迅速診断法になり得ることが分かった。新興ウイルスや知能犯が作製した人為的バイオテロ病原体など、予見しえないバイオテロがいつ何時発生してもおかしくはない。想定される非常事態に対し様々なシミュレーションを行い、網羅的核酸診断システムによる包括的なセーフティネットの更なる改善に努めていきたい。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1) 論文発表

Detection of a Possible Bioterrorism Agent, *Francisella* sp., in a clinical specimen using Next-generation Direct DNA Sequencing. Makoto Kuroda, Tsuyoshi Sekizuka, Fumiaki Shinya, Fumihiko Takeuchi, Takayuki Kanno, Tetsutaro Sata, Shigeyuki Asano. J Clin Microbiol. In press (Jan. 30. 2012).

##### 2) 学会発表

黒田誠、関塚剛史、竹内史比古。Deep sequencing 法による野兔病菌 *Francisella* 感染症の腋窩部膿瘍の網羅的病原体検索第 85 回日本細菌学会・総会 長崎市 2012 年 3 月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む） 該当なし

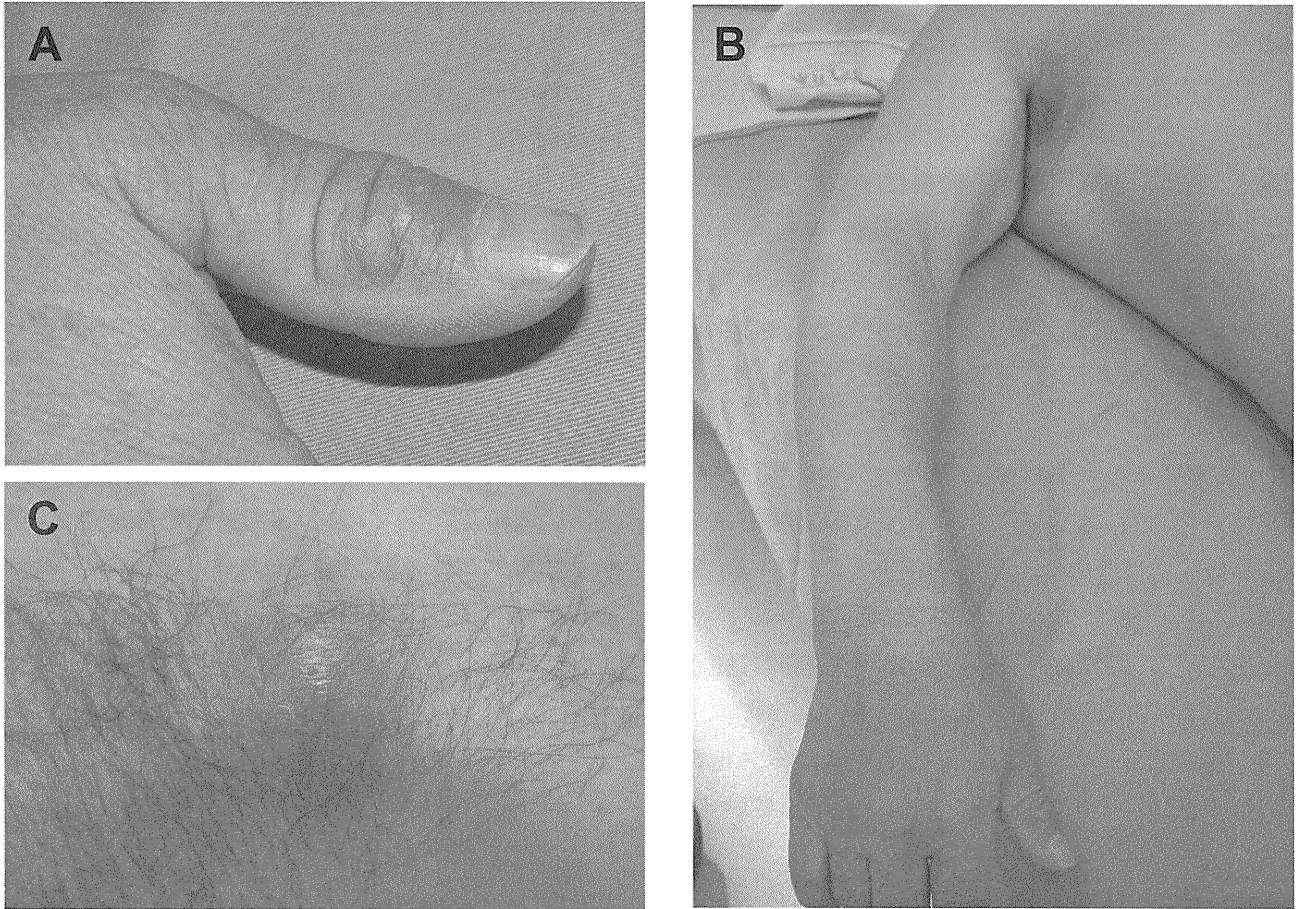


図1 患者 (Iwaki-08) の臨床所見。A) 右親指、B) 右腋窩リンパ節、C) Bの拡大図

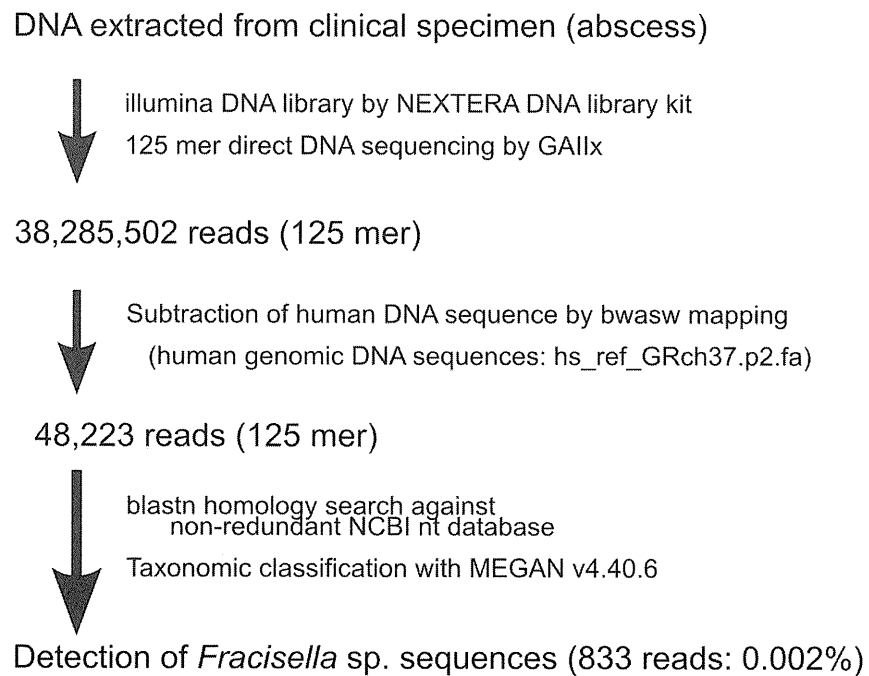


図2 Iwaki-08 患者の右腋窩リンパ節膿瘍からの病原体検索パイプライン



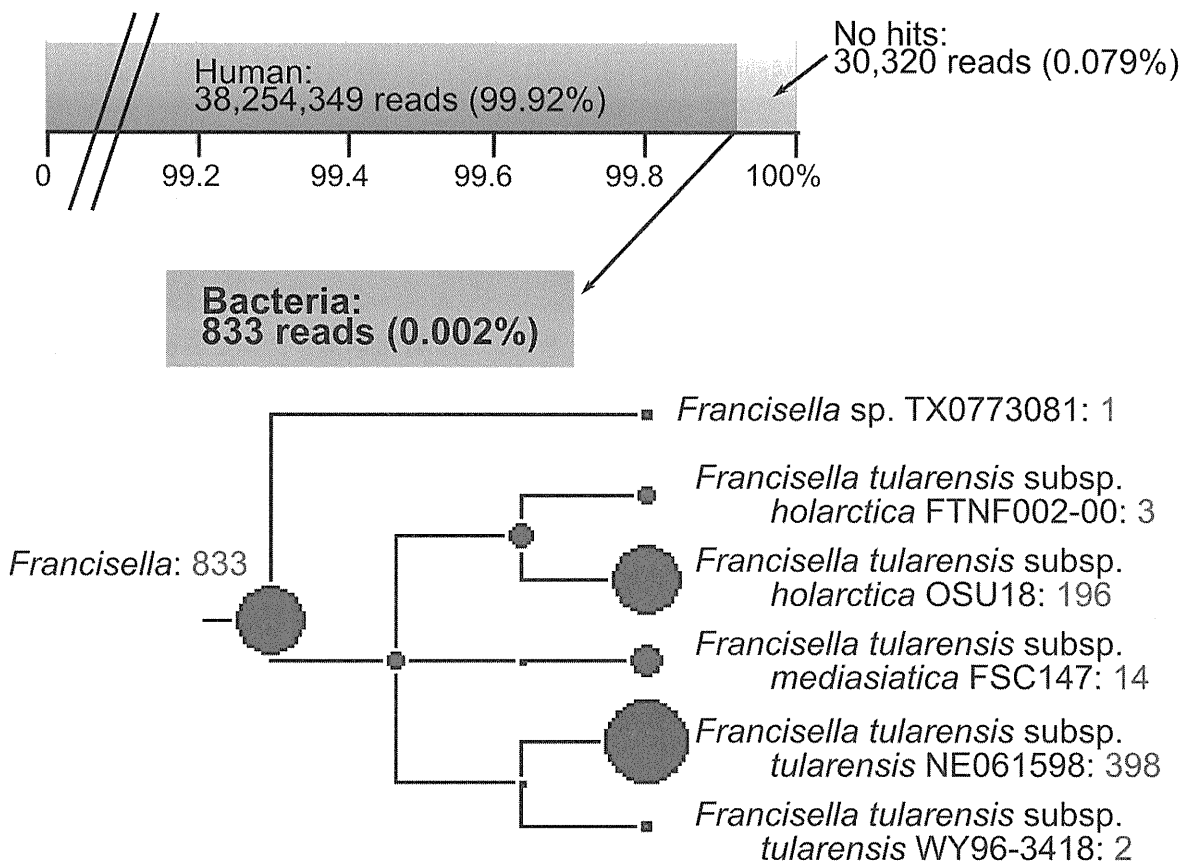


図3 イルミナ網羅解読にて取得した解読リードの解析。99.92%が膿瘍由来のヒト配列であり、細菌 bacteria と思われる配列は833リード(0.002%)たらずであった。ウイルス様配列は検出されなかった。細菌配列の相同性検索で得られた結果を taxonomy で分類したところ、全て野兔病菌 *Francisella tularensis* に相当する配列であった。*Francisella* の系統関係と subsp. そして、該当する系統のヒット・リード数(赤字)で示している。高病原性 Type A. *F. tularensis* subsp. *tularensis* と低病原性 Type B. subsp. *holarctica* との両方が約半数ずつヒットし、単純な相同性検索のみでは感染病原体の病原性を評価できなかった。

Nucleotide position of *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4

	6189	6719	7249	7779	8309	8839	9369	9899	10429	10959	11489	12019	12549	13079	13609	14139	14669	15199	15729	16259	16789	17319	17849	18379	18909	19439	19969	20499	21029	21559	22089	22619	23149	23679	24209	24739	25269	25799	26329	26859	27389	27919	28449	28979	29509	30039	30569	31099	31629	32159	32689	33219	33749	34279	34809	35339	35869	36399	36929	37459	37989	38519	39049	39579	40109	40639	41169	41699	42229	42759	43289	43819	44349	44879	45409	45939	46469	46999	47529	48059	48589	49119	49649	50179	50709	51239	51769	52299	52829	53359	53889	54419	54949	55479	56009	56539	57069	57599	58129	58659	59189	59719	60249	60779	61309	61839	62369	62899	63429	63959	64489	65019	65549	66079	66609	67139	67669	68199	68729	69259	69789	70319	70849	71379	71909	72439	72969	73499	74029	74559	75089	75619	76149	76679	77209	77739	78269	78799	79329	79859	80389	80919	81449	81979	82509	83039	83569	84099	84629	85159	85689	86219	86749	87279	87809	88339	88869	89399	89929	90459	90989	91519	92049	92579	93109	93639	94169	94699	95229	95759	96289	96819	97349	97879	98409	98939	99469	99999
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i>	OSU18	TTGTAT	AACGAG	GTGGGT	CATTT	ATACACAT	CTAGCA	GACCC	TAAAG	CGGAGT	AATTT	GGCACT	66																																																																																																																																																																					
	FTNF002-00	TTGTAT	AACGAG	GTGGGT	CATTT	ATACACAT	CTAGCA	GACCC	TAAAG	CGGAGT	AATTT	GGCACT	66																																																																																																																																																																					
	FSC200	TTGTAT	AACGAG	GTGGGT	CATTT	ATACACAT	CTAGCA	GACCC	TAAAG	CGGAGT	AATTT	GGCACT	66																																																																																																																																																																					
	LVS	TTGTAT	AACGAG	GTGGGT	CATTT	ATACACAT	CTAGCA	GACCC	TAAAG	CGGAGT	AATTT	GGCACT	66																																																																																																																																																																					
	FSC257	TTGTAT	AACGAG	GTGGGT	CATTT	ATACACAT	CTAGCA	GACCC	TAAAG	CGGAGT	AATTT	GGCACT	66																																																																																																																																																																					
	FSC022 (Ebina)	TTGTAT	AACGAG	GTGGGT	CATTT	ATACACAT	CTAGCA	GACCC	TAAAG	CGGAGT	AATTT	GGCACT	66																																																																																																																																																																					
	Iwaki-08	TTGTAT	AACGAG	GTGGGT	CATTT	ATACACAT	CTAGCA	GACCC	TAAAG	CGGAGT	AATTT	GGCACT	66																																																																																																																																																																					
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i>	WY96-3418	TTGTAT	AACGAG	GTGGGT	CATTT	ATACACAT	CTAGCA	GACCC	TAAAG	CGGAGT	AATTT	GGCACT	66																																																																																																																																																																					
	SCHU S4	TTGTAT	AACGAG	GTGGGT	CATTT	ATACACAT	CTAGCA	GACCC	TAAAG	CGGAGT	AATTT	GGCACT	66																																																																																																																																																																					
	FSC198	TTGTAT	AACGAG	GTGGGT	CATTT	ATACACAT	CTAGCA	GACCC	TAAAG	CGGAGT	AATTT	GGCACT	66																																																																																																																																																																					
	MA00-2987	TTGTAT	AACGAG	GTGGGT	CATTT	ATACACAT	CTAGCA	GACCC	TAAAG	CGGAGT	AATTT	GGCACT	66																																																																																																																																																																					

図4 解読で得られた野兔病菌 833 リード (図3参照) を用いて、野兔病菌ゲノムに特徴的な SNV サイト 66 箇所を検出した。ゲノム・レファレンス配列 SCHU S4 株のゲノム・ポジションと、株固有の SNV アレルを表記し、それらをアライメント解析した。Iwaki-08 は、日本分離株 FSC022 (Ebina) の SNV アレルと酷似しており、1 箇所のみ異なっていた (nt posi.: 329, 375)。

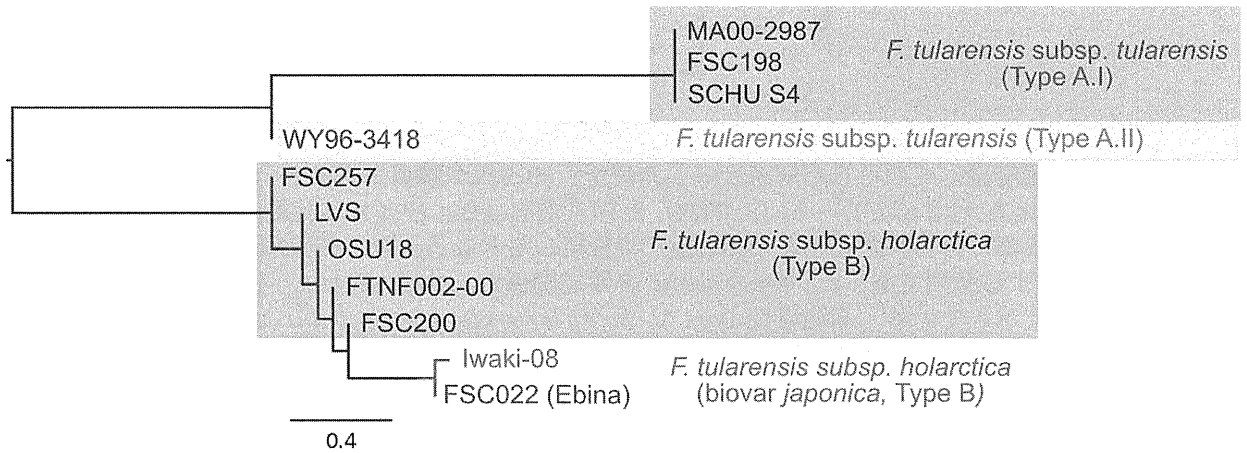


図5 図4で解析したアライメントを元に、最尤法で系統樹を作成した。Iwaki-08 は明らかに *F. tularensis* subsp. *holarctica* (biovar *japonica*) に属し、高病原性 Type A とは明確に異なることが明らかになった。

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
バイオテロに使用される可能性のある病原体等の新規検出法と標準化に関する研究  
分担研究報告書

## 病原体の病理学的検出法の確立 腸管出血性大腸菌産生ベロ毒素検出の試み

研究分担者 佐多徹太郎（富山県衛生研究所・感染研感染病理部）

研究協力者 片野晴隆、中島典子、佐藤由子、長谷川秀樹（国立感染症研究所  
感染病理部）、倉園久生（帯広畜産大学 畜産衛生学部）、吉田恭太郎、  
山下憲一（公立学校共済組合近畿中央病院 病理部）、  
田中智之（堺市衛生研究所）

研究要旨： 腸管出血性大腸菌は腸管上皮細胞に付着後増殖し、ベロ毒素を産生する。ベロ毒素はそのレセプターG<sub>b3</sub> を表出する腸管、腎臓および脳の血管内皮細胞に結合し細胞内に取り込まれ、60S リボゾームを失活させ細胞のタンパク合成を障害する。腸管出血性大腸菌感染症の重症例では、腹痛、下痢、嘔吐、血便に加え、溶血性尿毒症症候群（HUS）や急性脳症を併発することがあり、救命されても腎不全、脳神経障害など重症の後遺症が残る場合がある。腸管出血性大腸菌あるいはベロ毒素そのものが、集団食中毒を装ったバイオテロ目的で使用される可能性は否めないことから 4 種特定病原体である。剖検組織においてベロ毒素を検出したという報告は非常に少ない。今年度は腸管出血性大腸菌 O-157 感染で死亡したホルマリン固定パラフィン包埋剖検組織中にベロ毒素を検出できるか検討した。ウサギ抗ベロ毒素ポリクローナル抗体を用いた免疫組織化学で糸球体に陽性シグナルが検出できたが、特異性の検討に時間を要した。特異性の高いモノクローナル抗体の作成が今後の課題である。

### A. 研究目的

これまで生物テロ対策として、病原体の病理組織内検出（電子顕微鏡を用いた形態解析、免疫組織化学、新しい *in situ* 核酸検出法など）や、ウイルス網羅的検出リアルタイム PCR キット（Multivirus real-time PCR）の開発、携帯用使い捨てカイロを用いた LAMP 法の開発などを手掛けてきた。

2011 年 4 月に富山県で発生した腸管出血

性大腸菌による集団食中毒では、県内の患者 175 名のうち、4 名が腸管出血性大腸菌 O111 が産生するベロ毒素によって、溶血性尿毒症症候群（HUS）や急性脳症を併発し死亡した。ベロ毒素（VT）には VT1 と VT2 がある。VT1 は赤痢菌の産生する志賀毒素（Stx1）と免疫学的、物理化学的、および生物学的性状が同じであり、VT2 のアミノ酸配列は、およそ 55%が VT1 と同じであるが、

免疫学的、物理化学的性状は異なる。ペロ毒素の毒性は非常に強力で同じ細菌毒であるボツリヌス毒素や破傷風毒素の毒性に匹敵する。もしこのような毒素あるいは毒素を効率よく産生する細菌が生物テロとして使用された場合、速やかに検出・同定することは可能であろうか。死亡例が出た場合、ペロ毒素が死亡原因であると確定するには、病理組織中にペロ毒素を証明しなくてはならない。ペロ毒素を病理組織中に検出できるか試みるために、1996年に大阪の堺市で発生した腸管出血性大腸菌 O-157 による食中毒で死亡したホルマリン固定パラフィン包埋剖検組織を用いて検討した。

## B. 研究方法

### 1) 材料

#### a) 病理標本

腸管出血性大腸菌 O157 剖検例のホルマリン固定パラフィン包埋組織標本 42 ブロック (肺 5、肝臓 3、腎臓 3、脾臓 2、心臓 2、膵臓 2、副腎 2、胃 2、空腸 2、回腸 2、結腸 13、直腸 2、リンパ節 2)。陰性コントロールとして他疾患の大腸および腎臓標本を用いた。

#### b) 抗体

・抗ペロ毒素抗体：①マウス抗 Shigatoxin1(13C4)モノクローナル抗体、マウス抗 Shigatoxin2 (11E10)モノクローナル抗体 (Santa-Cruz)、②ウサギポリクローナル抗 VT1 抗体、ウサギポリクローナル抗 VT2 抗体 (精製 IgG) (倉園先生より分与)、③ウサギポリクローナル抗 VT1 抗体、ウサギポリクローナル抗 VT2 抗体 (ウサギ血清) (デナカ生研杉山先生から分与)。

・陰性コントロール用抗体：ウサギ抗ヒト

IgG 抗体、ウサギ抗ヒト  $\kappa$  鎖抗体。

・マウス抗 CD34 抗体 (CD34:血管内皮細胞のマーカー蛋白)

### 2) 方法

HE 染色で病理組織所見をとる。特殊染色として、PAS 染色、PTAH 染色。

・VT1,VT2 免疫組織化学：(抗体) 腸管、腎臓組織において上記の抗体①②③のいずれか。(前処理) ①0.25% trypsin ②0.01M クエン酸 buffer 121°C、10 分③1mM EDTA/Tris (pH 9.0) 121°C、10 分④1 mM EDTA (pH 8.0) 121°C、10 分および免疫複合体で抗原部位がマスクされている可能性を排除するため、グリシン-HCl buffer (pH2.2) RT、90 分のいずれか。(検出法) ①HRP-ポリマー-Envision 法 ②LSAB 法 ③CSAII 法(すべて DAKO 社) のいずれかを用いてペロ毒素の免疫組織化学を試行した。

(倫理面への配慮) 検討材料は剖検組織であり、剖検時に了解が得られている。

## C. 研究結果

### 1) 症例

O157 による全結腸炎により発症後 5 日で死亡した 13 歳女児。生来健康。発熱で発症し、水溶性下痢、腹痛・嘔吐、頻回の鮮血便がみられた。HUS や脳症は併発しなかったが、第 5 病日にショックで死亡。血清腹水は 1700ml あった。剖検所見ならびに 4 姉妹の便培養、血清抗 O157LPS-IgM 抗体推移により診断された。

### 2) 病理組織所見

a) 腸管 結腸全域に高度な粘膜面の出血壊死、広範囲のびらんや浅い潰瘍がみられた。粘膜部位は好中球を含む炎症性滲出物に富む。粘膜下は出血と水腫による肥厚が著し

い。部分的に静脈壁の壊死、血栓がみとめられ、固有筋層から漿膜面にも出血が広範囲に認められる(図 1 a)。これに対して直腸小腸は変化に乏しかった。

b) 腎臓 近位尿細管上皮に硝子滴が巢状に散在(図 1b)し、一部の糸球体にフィブリン血栓がみられた(図 1e)。1ヵ所のみである

が、Mesangiolytic の所見もみられた (図 1c, d)。

c) 脾臓 濾胞は萎縮し白脾髄の細胞脱落が著明で、T 細胞領域に少量のリンパ球が残存した。

d) その他 肝臓、腎臓、肺、副腎等にはうっ血充血のほかには著変なし。

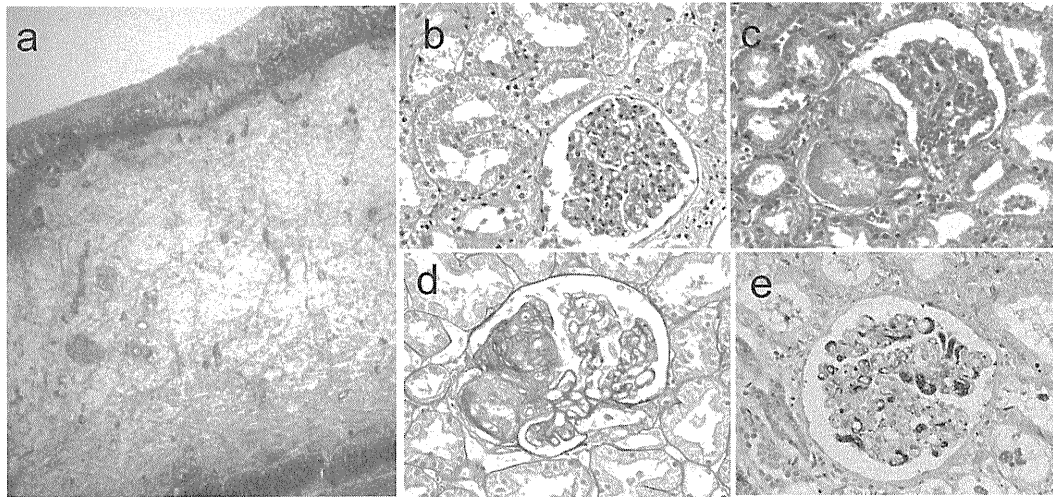


図 1. a. 結腸、 b. 腎臓、近位尿細管上皮細胞の硝子滴変化、 c. 糸球体のメザンギウム細胞が膨張破壊により変性 (Mesangiolytic) している。 d. PAS 染色 (基底膜とメザンギウム領域が染まる。) d. PTAH 染色 (フィブリン血栓が青紫色に染まる。) a-c: ヘマトキシリン・エオジン染色。

### 3) 免疫組織化学

(腎臓) LSAB 法で、ウサギ抗 VT1 ポリクローナル抗体、ウサギ抗 VT2 ポリクローナル抗体 (未精製、ウサギ血清) を使用した際、Mesangiolytic の部位に一致して陽性シグナルがみられた (図 2c)。尿細管上皮細胞や間質の部位にもシグナルが検出された(図 2a)が、陰性コントロールのウサギ抗ヒト IgG 抗体を用いても、また VT 陰性の他疾患の腎臓組織にもみられた(図 2b)ことから非特異的シグナルと考えられた。糸球体内の細胞については陰性コントロールにおいてシグナルは認められなかった。Mesangiolytic

は毒素による内皮細胞の障害、血栓による糸球体虚血などにより糸球体係蹄間のメザンギウム領域が膨張破壊ないし変性した病変でフィブリンの沈着をともなっている。この部位に検出されたシグナルは、内皮細胞にあった VT 毒素がこの部位に取り込まれて検出されたと考えられる。シグナル陽性部位と基底膜との位置関係をみるために VT が検出された切片を PAS と二重染色した。シグナルの一部は基底膜の内側にあり、血管内皮細胞の部位と一致した(図 2d)。血管内皮細胞マーカー蛋白である CD34 の発現は他疾患と比較して減弱していたことが

ら血管内皮細胞の障害が示唆された。

(腸管)

CSAII 法でウサギ抗 VT1 ポリクローナル抗体、ウサギ抗 VT2 ポリクローナル抗体 (精製 IgG) を使用した際、腸管の血管内細胞周

囲にシグナルがみられた。しかしながらシグナルは血管内皮細胞部位とは一致せず、その周囲の膠原繊維部分に検出され特異的なものではないと考えられた。

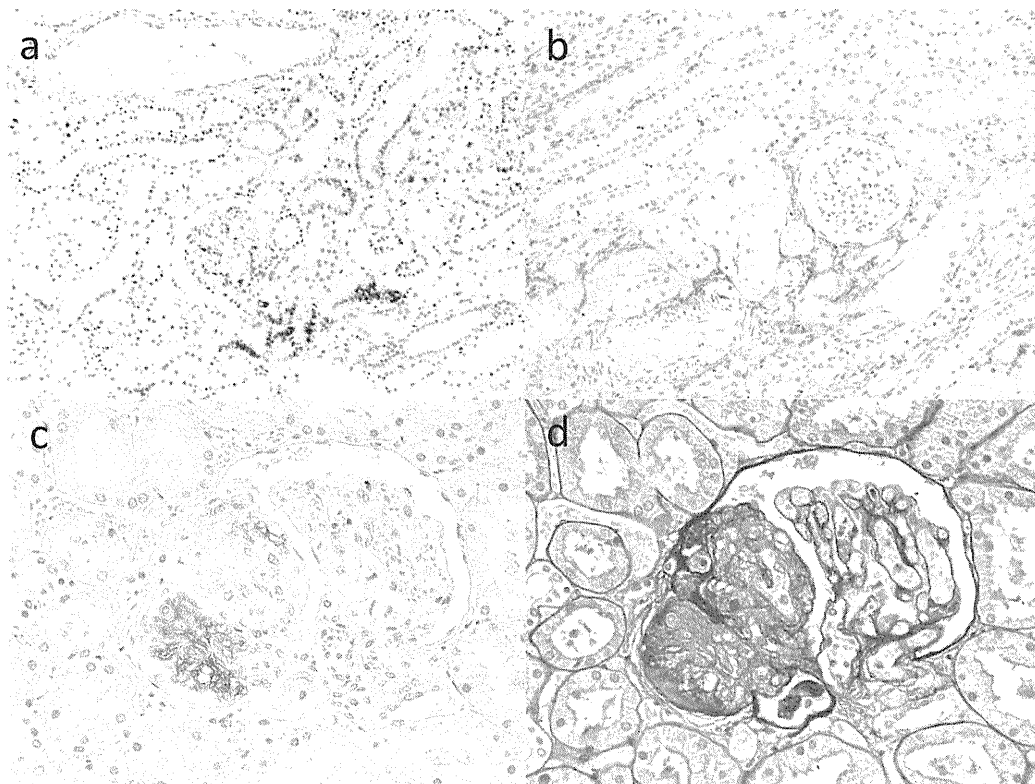


図2 抗ペロ毒素抗体免疫組織化学(a 患者腎臓、b 他疾患症例腎臓、c-d 患者糸球体) 尿細管上皮細胞や間質に非特異シグナルがみられる (a,b)。糸球体の Mesangiolysis の中にペロ毒素が検出された。d. PAS 染色との二重染色。

腸管の血管内皮障害の指標に CD34 の発現を免疫組織化学で解析したところ、結腸組織では血管内皮細胞部位での CD34 の発現は消失していた。

#### D. 考案

腸管出血性大腸菌が産生するペロ毒素は HUS や急性脳症(脳浮腫)を引き起こすが、ペロ毒素のヒト体内における動態は解明さ

れていない。水腫を起こすことから、産生された毒素が血管に影響を及ぼす可能が考えられるが、血漿交換や人工透析などの治療により死亡時の体内にどれほどの毒素が残存しているかについてもわからない。ペロ毒素のレセプターである Gb3 の発現細胞に一致して障害を受けていることからペロ毒素が関与していることは確かであるが、急性脳症などの脳神経障害においてペロ毒

素による血管内細胞障害や神経グリア障害とサイトカインストームなどがどの程度病態に関与しているのかは明らかにされていない。今回解析した症例では臨床的に HUS を併発していなかったが、腎臓の病理所見では focal segmental ではあるが HUS で特徴的な Mesangiolytic やフィブリン血栓が認められた。今後 HUS、脳症併発例の剖検例、生検例も含めて毒素の発現の解析を試みるべきであると考えている。また検出系の特異性を向上させるためにベロ毒素に対するモノクローナル抗体と陽性コントロールとなる細胞あるいは組織標本を用意することが重要である。

#### E. 結論

バイオテロに使用される可能性が考えられる毒素の 1 つである腸管出血性大腸菌産生ベロ毒素を組織中に検出することを試みた。現在入手できた抗体を用いて糸球体に陽性シグナルが得られたが、体内動態の検討とともに、特異性に関して改良の余地があると思われた。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Hatano B, Goto M, Fukumoto H, Obara T, Maki T, Suzuki G, Yamamoto T, Hagiwara K, Matsushita Y, Fujii T, Imakiire T, Kikuchi Y, Takahashi R, Kanai M, Tamura K, Izumi T, Takahashi Y, Iwamoto Y, Mimura S, Mukai Y, Takita K, Takeo H,

Kitamura R, Shimizu E, Fukushima K, Hakozaki Y, Uehata A, Sakai M, Ohshima S, Shirotani T, Oba K, Hasegawa H, Sata T, Katano H: Mobile and accurate detection system for infection by the 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus with a pocket-warmer reverse-transcriptase loop-mediated isothermal amplification, J Med Virol 2011, 83:568-573

- 2) Katano H, Kano M, Nakamura T, Kanno T, Asanuma H, Sata T: A novel real-time PCR system for simultaneous detection of human viruses in clinical samples from patients with uncertain diagnoses, J Med Virol 2011, 83:322-330

2. 学会発表  
なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
「バイオテロに使用される可能性のある病原体等の新規検出法と標準化に関する研究」  
分担研究報告書

病原体の電子顕微鏡学的迅速検出法の確立

永田 典代 国立感染症研究所 感染病理部 第二室長

研究要旨：バイオテロに使用される可能性のある病原体等を中心とした電子顕微鏡を用いた迅速検出法の確立を目的とする。本年度は、電子顕微鏡学的検査法の標準手順法の見直しを行い、実施者の教育訓練法の手順と記録を整備した。また、細菌の迅速検出法の確立のために、バイオテロ関連細菌を中心にレファレンス標本の作製を行った。

協力研究者：

国立感染症研究所 感染病理部  
鈴木忠樹、岩田奈織子、片岡紀代、藤野美穂子、小谷 治、佐多徹太郎、長谷川秀樹  
国立感染症研究所 細菌第二部  
佐々木 裕子、堀野 敦子、見理 剛、岩城 正昭、山本 明彦、加藤 はる、柴山 恵吾

A. 研究目的

透過型電子顕微鏡による病原体の検出方法は迅速性、簡便性に優れ、スクリーニングによる包括的な鑑別診断が可能という点で感染症診断の一助となる。透過型電子顕微鏡学的検査の利点と欠点を表 1 にまとめた。病原体が含まれた液が適切に調整され、観察条件が整っていれば、ネガティブ染色から観察、判定まで 15 分かからない。これに病原体特異的な抗血清を用いた免疫染色（免疫電顕）を加えることで精度は高くなる。そのため、バイオテロ対策としての迅速診断にも応用可能である。しかしながら、電子顕微鏡による感染症診断検査の実施者には高いスキルが要求される。また、これまで我々は、ウイルスを中心とした電子顕微鏡的迅速診断を行ってきたが、欧米では炭疽菌の芽胞を用いたバイオテロ等が現実問題となっており、Robert Koch 研究所を中心に透過型電子顕微鏡による細菌

の迅速検出法が取り入れられている。

本研究では、バイオテロに使用される可能性のある病原体等を中心とした電子顕微鏡を用いた迅速検出法の確立を目的とする。BSL3、BSL2 病原体に十分対応するための電子顕微鏡学的検査法の標準手順の見直し、細菌の迅速検出法に必要なレファレンス標本の作製、検出の感度・精度を向上するための改良法の 3 点を課題とする。今年度は前者 2 点を中心に取り組んだ。

B. 研究方法

1. 電子顕微鏡学的迅速診断法の標準手順の見直し

インフルエンザウイルス、大腸菌等を用いて電子顕微鏡学的迅速診断法の標準手順に従い、作業を分担研究者他 3 名（永田、鈴木、岩田、片岡）でそれぞれ実施し評価した。

2. 細菌の走査電子顕微鏡標本作製の標準手順方法の決定

国立感染症研究所 細菌第二部にて培養した緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) を用いて走査電子顕微鏡標本の作製を行った。走査型電子顕微鏡装置 JSM-6700F (日本電子) を用いて観察し、適切な培養、固定、および作製条件を検討し、標準手順方法を決定した。



### 3. 菌液注入サル肝組織材料を用いたレファレンス標本の作製

バイオテロ関連病原体と鑑別診断に必要な病原体を選択し、*Burkholderia* 属、*Clostridium* 属、*Corynebacterium* 属、*Helicobacter* 属、*Bartonella* 属、*Bordetella* 属、*Mycoplasma* 属を国立感染症研究所細菌第二部にて培養、調整後、これらの菌液をカニクイザルの肝組織に直接注入した。その後、10%ホルマリン緩衝液で浸漬固定を行い、常法どおりパラフィン包埋切片を作製した。一部の標本で樹脂包埋標本を作製した。なお、ボツリヌス菌標本については10%ホルマリン緩衝液で1週間以上浸漬固定し、固定組織の中央部から組織を採取、菌体が完全に死滅したことを培養で確認後、指定実験室から搬出した。また、サル肝組織は国立感染症研究所動物管理室より供与いただいた。

### 4. *Burkholderia* 属の鑑別診断のための抗体の検討

*Burkholderia mallei* (Anti-*Pseudomonas mallei* LPS antibody [3D11]) の市販抗体を入手し、パラフィン切片を用いた免疫組織化学染色による菌体抗原検出方法を検討した。抗原の賦活化方法は pH 6 クエン酸緩衝液あるいは pH 9 抗原賦活化剤(ニチレイ)による 121°C 10 分オートクレーブ処理とした。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> メタノール処理による内因ペルオキシダーゼ阻害反応を室温で 30 分実施し、DAKO Envision system (DAKO) を用いてプロトコール通り免疫組織化学法を行った。

## C. 結果

### 1. 電子顕微鏡学的迅速診断法の標準手順と教育訓練の整備

BSL2 病原体を想定した電子顕微鏡学的迅速診断法の標準手順作業内容の見直しを行い、手順書の改訂を行った(図 1)。また、教育訓練

の整備が必要であるとの認識から、本年度より Robert Koch 研究所主催の電子顕微鏡学的ウイルス診断の外部評価 (External Quality Assurance Scheme in EM Virus Diagnosis EQA-EMV) に参加し、これを検査実施者の教育訓練の一環とすることとした。同時に教育訓練の標準手順・記録書の整備を行った。

### 2. 細菌の走査電子顕微鏡標本作製法の標準手順

培養条件は滅菌済みスライドガラス上で数時間〜一晩以内とした。固定、洗浄は以下の条件とした。

カコジル酸緩衝液による洗浄後、前固定 4°C 一晩、2.5% グルタルアルデヒド液 1% パラフォルムアルデヒド混合 0.1M カコジル酸緩衝液。カコジル酸緩衝液による洗浄後(10分6回)、1次固定1時間、1% OsO<sub>4</sub> 液。カコジル酸緩衝液による洗浄後(10分6回)、2次固定1時間、1% タンニン酸添加 0.1M CA 緩衝液。カコジル酸緩衝液による洗浄後(10分6回)、後固定1時間 1% OsO<sub>4</sub> 液。カコジル酸緩衝液による洗浄後、50%〜100% エタノール系列による脱水、酢酸イソアミルへの置換。臨界点乾燥装置(日本電子)を用いて乾燥後、プラチナコーティング(20秒2回)。その後、走査電子顕微鏡で観察した。鞭毛は維持され、脱水による菌体表面の収縮は殆ど観察されず、標本の状態は良好であった。

### 3. 菌液注入サル肝組織材料を用いたレファレンス標本

常法どおりパラフィン切片を作製し、組織ギムザ染色、グラム染色、芽胞染色を実施し菌体が肝組織内に注入されていることを確認した。各細菌につき、3ブロックずつ参照標本作製した。

### 4. 抗 *Burkholderia mallei* LPS モノクローナ

## ル抗体を用いた免疫組織化学法

項目2で作製した*B. mallei*菌体注入サル肝組織標本を用いて、*Burkholderia mallei*(Anti-*Pseudomonas mallei* LPS antibody [3D11])の市販抗体を一次抗体として免疫組織化学染色を実施した。その結果、菌体表面が抗原陽性であり、カニクイザル組織標本における非特異反応はみられなかった(図2)。この市販抗体によるパラフィン切片組織上の*B. mallei*菌体の証明が可能であることが判明した。今後は、*B. pseudomallei*、*B. thailandensis*に対する非特異反応性について検討する予定である。

## D. 考察

本年度はこれまでの透過型電子顕微鏡を用いた迅速診断法の標準手順書の全体的な見直しを行い、これまで不十分であった、検査方法の教育訓練の標準手順・記録書の整備を行った。また、細菌の走査電子顕微鏡標本作製法の標準手順方法を決定した。標本作製に際しては、細菌の種類によって適切な培養条件が異なるため、それぞれの病原体の専門家と協議を行いながら適切な培養標本を作出する必要がある。検討の結果、固定以降の操作は今回決定した方法を基準とすることとした。なお、バイオテロ関連病原体は芽胞菌も含むため、ネガティブ染色法に用いる固定法は10%パラフォルムアルデヒド0.05%グルタルアルデヒド固定液2時間とする。来年度以降、ネガティブ染色標本作製し走査電子顕微鏡像と比較する。

なお、決定した作製条件で*Mycoplasma*属3種類の走査電子顕微鏡標本作製した。ちょうど、2011年秋季にマイコプラズマ肺炎が流行したため、この際に撮影してあった*Mycoplasma pneumoniae*の写真をマスコミに提供することができた。また、毎年冬季にはインフルエンザ流行株の電子顕微鏡写真提供の

依頼がある。このように、電子顕微鏡撮影写真は一般へ情報提供や感染症の理解にも役立っている。正確な情報を得る、もしくは伝えるためにも、技術者の正確で安定した標本作製技術と検査する者の高いスキルの維持が重要である。

## E. 結論

今年度は、バイオテロ関連病原体等の透過型電子顕微鏡学的検査法の標準手順書の改訂と実施者の教育訓練法の整備を行った。また、細菌の迅速検出法に必要なレファレンス標本等の作製を行った。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 永田典代、長谷川秀樹、佐多徹太郎。第11章電子顕微鏡/病理組織学的検査。田代真人、牛島廣治編集。ウイルス感染症の検査・診断スタンダード 羊土社 2011. p410-439
- 2) 永田典代、長谷川秀樹。第2章ウイルス分離培養 第3項 実験動物、等。田代真人、牛島廣治編集。ウイルス感染症の検査・診断スタンダード 羊土社 2011. p257-268

### 2. 学会発表

なし

## G. 知的財産の出願・登録状況

なし

表1 感染症診断検査における電子顕微鏡の利点と欠点

利 点	迅速診断が可能	ネガティブ染色は 30 分程度で診断可能
	病原体の種類を検討をつけることが可能	ウイルスか細菌か、エンベロープ、芽胞形成の有無
	他の手法では検出困難な病原体の検出が可能	病原体毎に至適化された特殊な試薬等が不要
	包括的な鑑別診断が可能	臨床情報はある程度不要
欠 点	低感度	10 <sup>6</sup> 粒子数/ml 以上の高濃度のサンプルが必要
	実施者には豊富な経験と高いスキルが必要	正確な診断のためにはトレーニングが必要
	電子顕微鏡は高価で操作が煩雑	病原体診断には数十 nm 程度のウイルス粒子を観察できる高い分解能が必要
	自動化は困難、処理量に限度がある	人間が観察し判断する必要

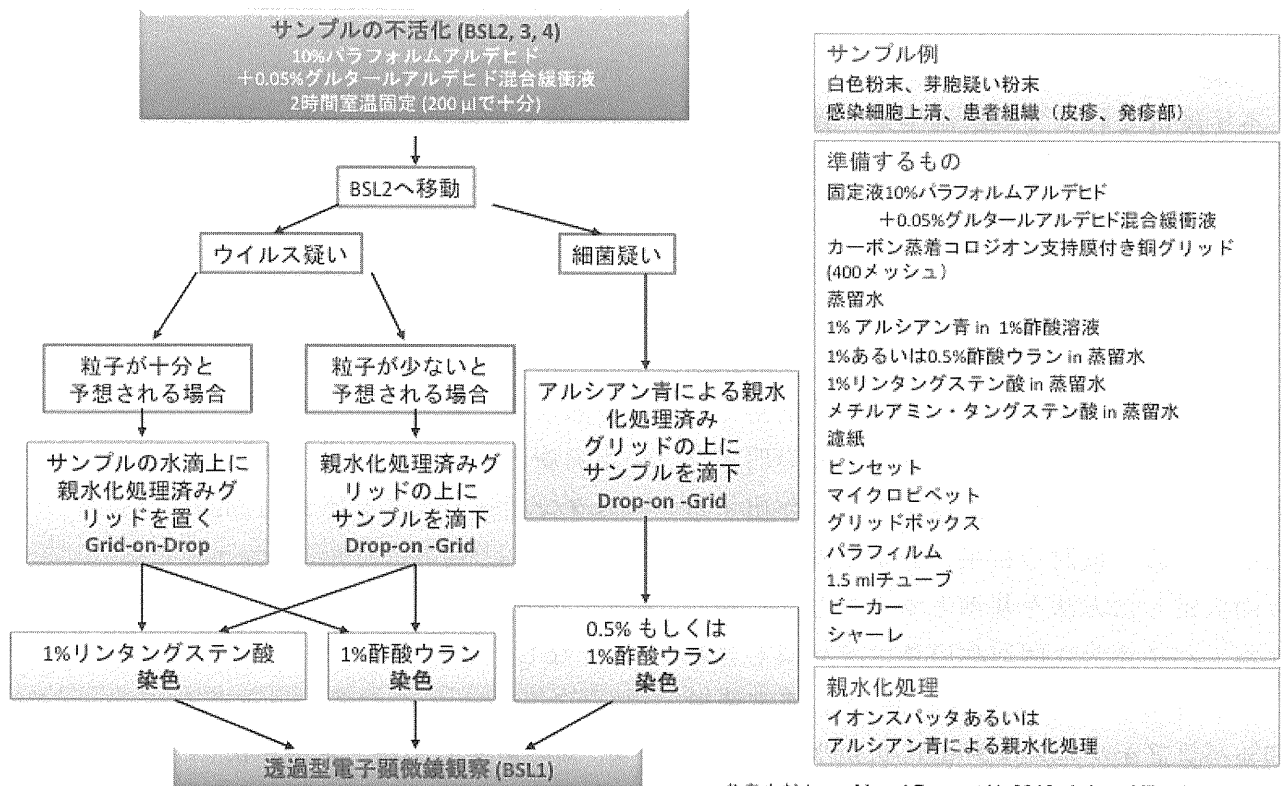


図1 バイオテロ・感染症疑いサンプルを用いた透過型電子顕微鏡学的迅速診断法の標準手順

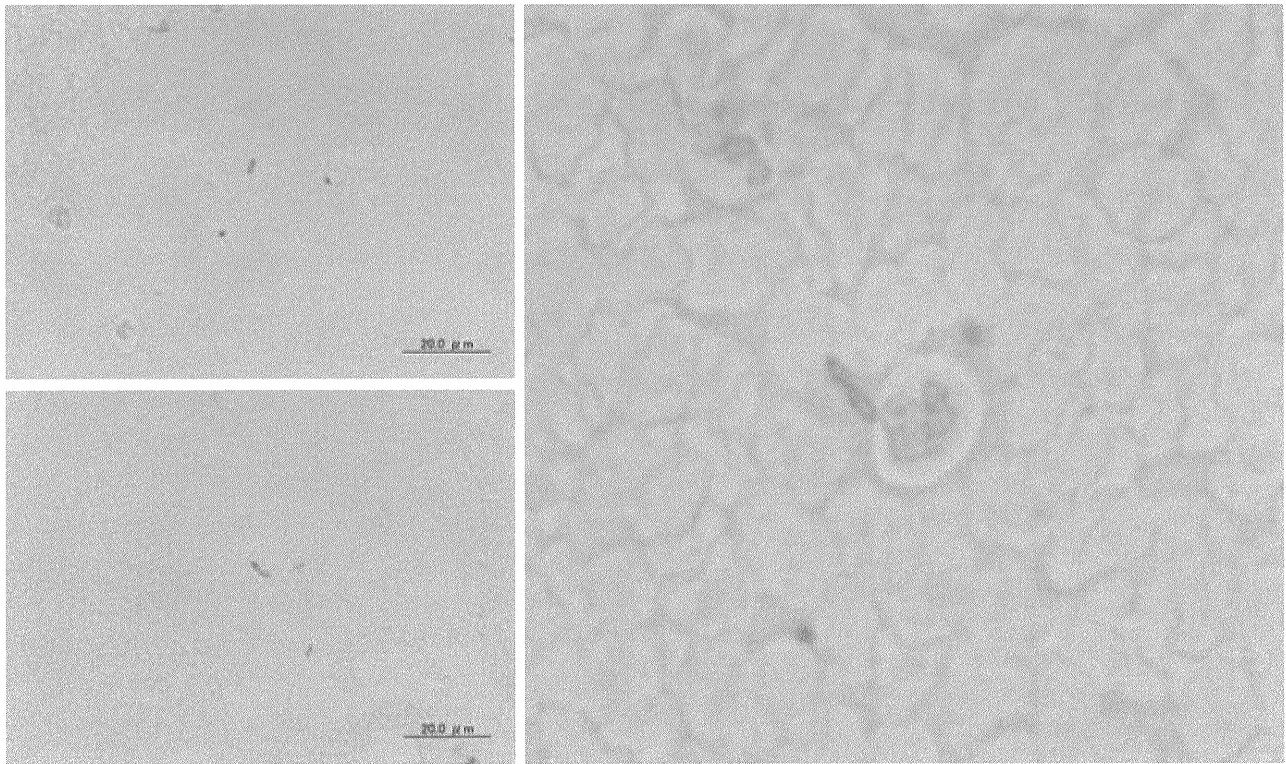


図2 *B. mallei* 菌液注入サル肝組織標本を用いた Anti-*Pseudomonas mallei* LPS monoclonal antibody [3D11]の免疫組織化学法。血管内に注入された菌体の表面が抗原陽性である。