

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 国立感染症研究所・細菌第二部・堀野敦子

研究協力者 川崎医科大学・公衆衛生学 山根一和

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。日本国内では類鼻疽は稀な感染症であり、鼻疽はさらに稀な感染症で戦後ヒトでの発生例は報告が無い。しかし、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類鼻疽の患者発生が多い。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。また、原因菌である *B. mallei* は *B. pseudomallei* とは異なり環境中では生存できない。この菌は主にウマ、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迅速な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、普及している核酸検出法での確立をめざし、LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)法を選択した。*B. pseudomallei* と *B. mallei* の LAMP 法は前年度までに基礎検討が終了した。今年度は、実際の検査時にこの *B. pseudomallei* の LAMP 法を既報の検出法に加えて実施し、性能の比較検討を行った。結果として既報の検査法

と判定結果は同じであった。また、我々の LAMP 法は既報の LAMP 法よりも感度がよく、判定もクリアであった。今年度は *B. mallei* の検査依頼が無かったため検査での性能検討は行っていないが、過去の保存検体を用いた検討では過去の判定と同じ判定結果が得られた。*B. mallei* の LAMP 法はこれまで報告がないため、迅速簡便な検査法として利用できると思われる。

この検査の過程で、国立感染症研究所・細菌第二部に検体を送る前に各機関で行われた自動検査機器による *Burkholderia* 属の誤同定が問題となった。特に *B. pseudomallei* と *B. cepacia* との誤同定が問題となってきたのでこれについてまとめた。また、類鼻疽の血清学的検出法について検討中である。

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。これまでこれらの迅速検出法について核酸検出法を用いた検討を行ってきた。迅速検出法としては簡便な核酸検出法であり地方衛生研究所などで比較的普及している LAMP 法を選択し、昨年度まで基礎検討を終えている。今年度は実際の検査時に、既報の方法に加えて我々の LAMP 法を使用し、実用性の確認ならびに性能の比較検討を行うこととした。

また、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、現在のところ方法がない。このため、今年度は同定法の一つとして類鼻疽の血清学的検出の検討を開始した。

B. pseudomallei, *B. mallei* の検査を行った結果、国立感染症研究所・細菌第二部に検体が搬入される前の初回検査が自動

検査機器で行われた場合、誤判定が見受けられた。検出を行うにあたり問題と考えられたため、これらの誤判定例についてまとめることとした。

B. 研究方法

1 *B. pseudomallei*, *B. mallei* の迅速核酸検出法 (LAMP 法)

現在使用している *B. pseudomallei* の LAMP 法のプライマー群は *B. pseudomallei* のべん毛関連遺伝子 BPSS0122 を標的遺伝子としている。*B. mallei* の迅速遺伝子検出法では LAMP 法の標的遺伝子を BMAA0749 (hemagglutinin domain-containing protein) としている。これらの LAMP 法の反応条件は、いずれも反応温度 67℃、反応時間 60 分である。陽性の場合反応開始 30 分程度で濁度の観察ができ判定が行える。この方法を既報の LAMP 法 (Journal of Clinical Microbiology, Feb. 2008. P568-573. Chantratita N. et al.)、Multiplex PCR 法 (Journal of Clinical Microbiology, 2011. P814-821. Vol.49,

No.3, Ho et al.)、培養法と併用して検査で使用し結果を比較した。

2. 類鼻疽の血清学的検出法の検討

B. pseudomallei, *B. mallei*, *B. thailandensis* と *B. cepacia* の菌体を不活化し SDS-PAGE を行い、類鼻疽患者血清を用いてウェスタンブロッティングを行った。また、*B. thailandensis*, *B. cepacia* ならびに *B. pseudomallei* の外膜タンパク質の分画を行った。

3. 自動検査機器による *Burkholderia* 属誤判定について

B. pseudomallei 検査の結果、検体提出元において感染研へ検体を搬入する根拠となった自動検査機器結果による誤判定が見うけられたため *B. mallei* を含めた過去の検査結果について検討を行った。

(倫理面への配慮)

今年度は倫理面で倫理委員会に申請する必要があるヒトの臨床検体を用いた実験研究はおこなっていない。

C. 研究結果

1. *B. pseudomallei*, *B. mallei* の迅速核酸検出法 (LAMP 法)

今年度は *B. pseudomallei* の同定依頼検査を 4 件行った。検体はいずれも臨床分離株であった。検査は培養法、既報の LAMP 法、Multiplex PCR 法、今回の LAMP 法の 4 法で行った。その結果、*B. pseudomallei* と同定されたものは 3 件であった。同定された検体は培養法、二種類の LAMP 法、Multiplex PCR 法いずれの方法でも *B. pseudomallei* 陽性であった。ま

た、*B. pseudomallei* が否定された検体では、培養法でも *B. pseudomallei* 陰性であり、他の核酸検出法でも *B. pseudomallei* 陰性であった。

B. pseudomallei 陽性検体 3 件について LAMP 法の比較を行ったところ我々の方法は既報の LAMP 法よりも結果がでるまでの時間が 30 分以上早く、濁度の判定もクリアであった。

2. 類鼻疽の血清学的検出法の検討

類鼻疽の原因菌 *B. pseudomallei* に加えて、ヒトから検出される可能性のある類縁菌の *B. mallei*, *B. thailandensis*, *B. cepacia* の whole cell lysate を SDS-PAGE にて泳動し、類鼻疽の患者血清でウェスタンブロッティングを行った。その結果、各菌体の多くのタンパク質に反応してしまい *B. pseudomallei* 特異的な反応を見ることができなかった。このため、各菌体から外膜タンパク質を分画し、これらについて類鼻疽患者血清を用いてウェスタンブロッティングを行う予定であった。現在までのところ、それぞれの菌の外膜タンパク質の分画まで作業が進んだがウェスタンブロッティングには至っていない。

3. 自動検査機器による *Burkholderia* 属誤同定について

これまでに *B. pseudomallei* が疑われた臨床分離株の検体 2 件が検査の結果、*B. cepacia* と同定された。これらの検体は病院や検査機関における初回の検査時に自動検査機器を用いて *B. pseudomallei* の疑いと判定されている。国立感染症研究所

でこれまでに *B. pseudomallei* と *B. mallei* の検査は 14 件行っているが、*B. mallei* と判定されて検査を行った 2 件は *Burkholderia* 属以外の細菌と同定されている。これらの検体も初回の検査では自動検査機器を用いて判定されており、自動検査機器を用いて *Burkholderia* 属と判定された場合には注意が必要であることが明らかになった。

D. 考察

B. pseudomallei, *B. mallei* の LAMP 法の検討として、今年度は実際に検査をおこなう際に既報の手法に加えて、我々の LAMP 法を併用して行い性能を比較した。今年度は、*B. pseudomallei* が疑われる 4 件の検査を行った。送付された検体はいずれも臨床分離株で、3 件は *B. pseudomallei* と同定され 1 件は否定された。用いた方法のあいだで判定に違いはなかった。二種類の LAMP 法の比較では我々の LAMP 法が判定までの時間も早く判定も明確であり、既報よりも検査に適していると考えられた。今後は可能であれば、検査時に臨床分離株に加えて尿検体、血液検体も同時に検査を行い、性能の評価を行いたい。

今年度は *B. mallei* の検査依頼は無かった。過去に *B. mallei* の検査依頼があり、結果として *B. mallei* は否定されている。その保管臨床分離株を用いて *B. mallei* の LAMP 法を試みた結果、それらの株は *B. mallei* 陰性と判定された。日本国内ではバイオテロなどの有事の際以外では、通常

B. mallei が患者から分離されることは考えにくいと、今後は *B. mallei* 検査依頼時の陰性判定の際の参考結果としても使用していく予定である。また、有事の際の検出法として使用可能と考えている。

類鼻疽の血清学的検出法は、医療機関よりサンプルが類鼻疽疑い患者血清しかない場合などに問い合わせがある。現在国内で検出可能な方法がないため検出法の開発を試みているが、現在までのところまだ検出可能な状況に至っていない。日本国内では類鼻疽流行国と異なり、不顕性感染などで血清中の抗体価が陽性である人口が多いという問題を考える必要がほぼ無いと、手法が確立できれば有用なツールになり得るので継続して検討を行いたい。

Burkholderia 属の自動検査機器による誤同定の問題は国外でも問題になっており、自動検査機器だけではなく商業システムによる検出法で *B. pseudomallei* と *B. cepacia* を同定する際の誤同定の多さが指摘されている (Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases 59 (2007),277-281)。我々の経験例とは逆に *B. pseudomallei* の感染者が実は *B. cepacia* に感染していたと誤同定された例も報告されている (Journal of Medical Microbiology(2012),61, 1483-1484)。類鼻疽は迅速な投薬開始が求められる感染症であるだけに重要な問題であろうと考えられる。テロなどの有事の際にもこのような事例が生ずる可能性も

あるため、なんらかの方法で周知ができればと考える。今年度はヒト由来検体のみならず、ネコ由来検体が自動検査機器で *B. pseudomallei* と判定され我々で検査を行った事例もあり、この例でも結果は *B. cepacia* であった。また、自動検査機器では *B. pseudomallei* と *B. cepacia* の誤同定の問題だけではなく、*B. mallei* と他の菌との誤同定例も経験していることから *Burkholderia* 属の検査結果には注意が必要である。同定のゴールドスタンダードである培養法を併用するのが望ましいが、*B. pseudomallei*, *B. mallei* の培養を経験していない場合では判定が難しい可能性も考えられるので、LAMP 法などの核酸検出法を併用するのがより望ましいと考える。

E. 結論

有事の際のバイオテロ対策が必要な *B. pseudomallei*, *B. mallei* の迅速遺伝子検出法に LAMP 法を適用することとし、検討を行ってきた。今年度はこれらの LAMP 法を実際の検査で既報の検査法と併用して性能の比較を行った。その結果、我々の *B. pseudomallei* の LAMP 法は既報の方法と判定結果が一致しており、既報の LAMP 法より 30 分早く検出が可能であった。また、*B. mallei* の検査依頼が無かったため実際の検査での性能比較は行えなかったが、過去の検体を用いた検査では同じ判定を得た。

類鼻疽の血清学的検出法は今後の検討課題として残った。

Burkholderia 属の自動検査機器による誤同定の問題は今後留意すべきと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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) Young Japanese women after traveling to Southeast Asia; Ohno H, Ogata Y, Suguro H, Yokota S, Watanabe A, Kamei K, Yamagoe S, Ishida-Okawara A, Kaneko Y, Horino A, Yamane K, Tsuji T, Nagata N, Hasegawa H, Arakawa Y, Sata T, Miyazaki Y. Intern Med. 2010; 49 (5): 491-5.

2. 学会発表

LAMP 法による *Burkholderia pseudomallei* と *Burkholderia mallei* の検出、堀野敦子、山根一和、柴山恵吾、阿戸 学、日本細菌学会第 86 回総会、2013 年 3 月、千葉県

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

