

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感染性材料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。この *B. pseudomallei* と *B. mallei* の LAMP 法の検討は終了した。*B. pseudomallei* の LAMP 法はタイの類鼻疽流行地域で臨床検体を用いて検討を行い、また日本国内で我々が行っている検査にも併用して性能の比較検討を行っ

た。その結果、LAMP 法は日本国内の検査に十分な性能を持つことが明らかになった。また *B. mallei* についてはこれまでに簡便な核酸検出法の報告がなかった。我々の LAMP 法は簡便に *B. mallei* を検出可能な方法であり、検出感度、特異度にも問題が無い。今後、この LAMP 法は、迅速簡便な検査法として利用できると考えられる。

国立感染症研究所で *B. pseudomallei*, *B. mallei* の検査を行ったところ、依頼機関より検体を送る前に行われた各機関での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た。検出法としては核酸検出法である LAMP 法とした。この方法は迅速検出法として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ため、汎用性が高いと考えられる。

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、現在のところ日本国内では方法がない。このため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、感染研に検体が搬入される前の検査が自動検査機器で行われた場合、誤同定が見受けられたため、過去の検査における誤同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、はじめは異なっていたが、利便性を考えて両者が同じ条件で試験を行えるように条件検討を行った。*B. pseudomallei* の LAMP 法は共同研究先であるタイ国コンケン大学にて臨床検体を用いて評価を行った。また、国内の検査時に、この LAMP 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.)、培養法と併用して使用し結果を比較した。*B. mallei* の LAMP 法は過去に受け付けた検査の保存検体を使用し、性能評価を行った。

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、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* の外膜タンパクの分画を行った。

3. 自動検査機器による *Burkholderia* 属誤同定について

B. pseudomallei の検査を行った結果、感染研へ検体を搬入する根拠となる自動検査機器結果の誤判定が見受けられたため *B. mallei* を含めた過去の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. 研究成果

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

B. pseudomallei, *B. mallei* LAMP 法の反応条件は、検討の結果いずれも反応温度 67、反応時間 60 分となった。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。タイ国コンケン大学で行った、臨床検体を用いた *B. pseudomallei* の LAMP 法の検討の結果では検出感度は 41.2%、特異度は 93.8% であった。この検討は検出に蛍光試薬を用い、反応条件が 63、60 分であった。

B. mallei の LAMP 法では検出感度には問題が無かったが特異度に問題があった。適切なプライマー群の選択に加え反応温度を 67 まであげることで解決された。この条件に合わせて *B. pseudomallei* の条件再検討を行った。日本国内での実用性を検証するため 4 件の

B. pseudomallei 検査を我々の LAMP 法を併用しておこなった。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 法で行った。その結果、*B. pseudomallei* 陽性は 3 件であった。陽性となったものは培養法、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* 陰性となった検体では、培養法でも *B. pseudomallei* であることが否定され、他の核酸検出法でも *B. pseudomallei* が陰性であった。

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はできなかった。このため、各菌体から外膜タンパク質を分画した。

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

タイ国・コンケン大学における *B. pseudomallei* の LAMP 法の臨床検体を用いた検討の結果では検出感度は 41.2%、特異度は 93.8%であった。この結果は既報の検出感度 2.3%に較べると高い検出率ではあるが、まだ十分ではない。コンケン大学で検討を行った後、*B. pseudomallei* の反応条件についてはさらに検討を行っており、検出感度は向上していると考えられるが、類鼻疽患者の臨床検体を用いる検討は日本国内では困難であるため機会を待ちたい。*B. pseudomallei*, *B. mallei* の LAMP 法の日本国内における実用性の検討として、我々の研究機関で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。その保管臨床株を用いて *B. mallei* の LAMP 法を試みた結果、それらの臨床分離株は *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いため、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使用していく予定である。また、有事の際の検出法としても使用可能と考えている。

類鼻疽の血清学的検出法は、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、これ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ため、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 属の自動検査機器を含むコマースシステムによる誤同定の問題は国外でも問題になっており、*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 *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。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に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* には簡便で性能の良い核酸検出法が確立されていなかったため、その開発を目指して検討を行ってきた。迅速核酸検出法には LAMP 法を適用することとした。性能の検討の結果、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* ではこれまで簡便な核酸検出法の報告がなく、この LAMP 法は今後実用的に使用可能と考える。

これらの二種類の LAMP 法は使用マニュアルを準備し要請時には配布可能な状態とした。

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