

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
（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業））

分担研究報告書

細菌性バイオテロに対する迅速同定法・診断法 およびワクチンの開発

研究分担者 倉園久生 国立大学法人帯広畜産大学 動物・食品検査診断センター
江崎孝行 国立大学法人岐阜大学 医学部
川本恵子 国立大学法人帯広畜産大学 動物・食品検査診断センター

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に速やかに対応し、安全・安心な社会を構築することが求められている。危険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。本研究では細菌性バイオテロに焦点をあて、危険病原体およびその毒素の迅速同定法・診断法および予防法としてワクチンの開発研究と、広く社会に還元することを目的として研究を遂行する。また、植物毒素であるリシン毒素の迅速検出法開発についても併せて行う。

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’による多数の摸倣事件が起こり、その後、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」の管理などをはじめとした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。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、特に特定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。

生物テロの発生を予防することが最も基本であることは間違いないが、生物テロが発生した場合、いかに被害を最小限に抑えるかが何よりも重要である。被害を低減するには、バイオテロ発生をできるだけ早く検知すること、散布生物剤を正確に迅速に同定することが求められる。さらに、発生現場や患者対応を行う医療施設などの汚染区域の早急な機能回復のためには適切な除染が必要となる。除染とは、消毒や滅菌などにより微生物を受容可能なレベルまで減少させ、使用可能な状態

にすることである。適切な除染は患者対応、2次被害の拡大防止、汚染現場の早期復旧に極めて重要である。本年度はまずテロ発生後の除染活動を念頭に、これまでに臨床検体からの迅速検出を目的に開発した検査法を環境検体からの検出へと応用できるよう、環境検体のなかでも病原体の検出が特に困難とされる土壌検体を用いて検体処理法の改良を行った。土壌汚染菌の遺伝子学的検出は、1) 土壌からの核酸抽出、2) 目的の病原菌遺伝子の特異的増幅、3) 増幅物の判定、の3段階からなる。検出感度を確保するためには、段階1)において、できるだけ回収率と純度の高い核酸を抽出することが不可欠である。一般に他の環境検体に比べ、土壌からのDNA抽出が困難な理由として、腐食酸(フミン酸)などの土壌成分による干渉作用があげられる。土壌から微生物の核酸を抽出する際に、石などのシリカ粒子に付着している微生物がいることから全量を使用して、菌を物理的に破壊した後、フミン酸などを除去する方法が一般的に利用されている(MoBio法、Ultraclean Soil DNA法)。しかしフミン酸とDNAは類似の特性を持っているため、DNAとフミン酸の混合液からフミン酸だけを効率よく分離するのは困難で、精製過程でDNAも多く失われてしまうという欠点があった。そこで、菌を破壊する前にフミン酸を菌から分離する方法を検討し、更に従来の市販抽出品との比較検討も行った。

現在、風邪、咽頭炎あるいは肺炎症状を訴える患者に対するバイオテロを想定した遺伝学的迅速診断法がない。このため、本年度は市中の呼吸器感染症とバイオテロ症例の鑑別法を開発した。

細菌毒素に関しては、CDCの生物兵器に使われる可能性の高い蛋白毒素であるボツリヌス毒素(Btx、カテゴリーA)、コレラ毒素(CT)とLT(カテゴリーB: Enteric Pathogens)、黄色ブドウ球菌のエンテロトキシン(SEA&SEB、カテゴリーB: Enteric Pathogens)及びTDH(カテゴリーB: Enteric Pathogens)等に対する免疫学的迅速同定法を確立して検査・診断マニュアルを作成し、その普及を目的としている。研究対象の細菌毒素は食中毒の原因となるため検査キットが市販されているものもあるが、本研究では食品を用いたバイオテロに対する

網羅の迅速同定法を国産で供給できるような体制作りを目的とする。本年度はSEAとSEBを精製してそれぞれに対する家兎抗血清を作製した。更に、TDHおよびTRHの精製を行った。

B．研究方法

B - 1．土壌からの病原体検出法の改良

土壌からの核酸抽出法の開発

国内の標準土壌7種(シラス、砂、シルト、粘土、黒ボク(関東ローム層)、黒ボク(シラス由来)、関東ローム層)の土壌検体を用いて検討を行った。まず、各土壌検体を酸性バッファーに懸濁し、フミン酸を酸化アルミニウムに吸着させ、アルカリにして沈殿させた。その後、フミン酸が除かれた土壌懸濁液から菌を陽性に荷電した粒子に吸着させ、さらに粒子をマグネットに吸着させ、菌が付着した粒子を補足した。上清を捨て、TEバッファーに懸濁後、菌と粒子を分離させ、MORA-Extractキットを用いて懸濁液をジルコニアベースで物理的に破碎後、手順に従い核酸を抽出した。また、市販抽出キットを用い、それぞれ定められた手順に従い、核酸を抽出し、その効果について比較検討した。

B - 2．市中の呼吸器感染症と炭疽、類鼻疽オウム病との迅速類症鑑別法の開発

*Bacillus cereus*による院内感染症とされる症例に重篤な肺炎症状をお越し、急速に死亡する症例が散発している。一般細菌検査では溶血する*Bacillus*様菌株は*B. cereus*を疑い検査の対象となるが、溶血しない*Bacillus*様菌株は*B. subtilis*等の日和見病原菌と見なされる。*B. anthracis*は溶血しないので*B. subtilis*等のコンタミと見なされ通常は検査の対象となっていない。更に、*B. cereus*、*B. thuringiensis*と同定される菌株の中には系統的には炭疽菌に極めて近い株がある。これらの株には*B. anthracis*の病原因子を部分的に保有する株が存在する。溶血し*B. cereus*と同定される株、あるいは溶血しない*Bacillus*様菌株が分離された時に高度病原性株であるかどうかを調べるために溶血にかかわらず炭疽菌が保有する病原因子(莢膜、防御抗原、浮腫因子、致死因子)を調べる必要がある。

- 1) *B. cereus*、*B. anthracis*共通のDnaJ、莢膜、防御抗原、浮腫因子、致死因子の5つの

病原因子を同時に検出できる核酸クロマトを構築した(図1)。

- 2) 肺炎の病原体スクリーニング用に開発した核酸クロマトにテロ病原体をマウントした系を立ち上げた(図2)。

a) Pneumonia A (*Legionella pneumophila* DnaJ, *Chlamydophila pneumonia-psittaci* DnaJ, *Mycoplasma pneumonia* DnaJ, *Streptococcus pneumonia* LytA, *Bacillus cereus-anthraxis* DnaJ)

b) Pneumonia B (*Haemophilus influenza* DnaJ, *Serratia marcescens* DnaJ, *Staphylococcus aureus* MRSA, *Escherichia coli* DnaJ, *Pseudomonas aeruginosa* DnaJ)

c) Pneumonia C (*Acinetobacter baumannii* DnaJ, *Enterobacter aerogenes* DnaJ, *Burkholderia malle/pseudomallei* DnaJ, *Chlamydia trachomatis* 16S rDNA, *Moraxella catarrhalis* DnaJ)

- 3)上記2つの核酸クロマトの検査手順を図3に記載する。

B - 3．SEAとSEBの精製と家兎抗血清の作成

*sea*及び*seb*は大腸菌内でHisタグ融合タンパク質(His-SEA及びHis-SEB)として発現させ、SDS-PAGE及びウエスタンブロッティングにより確認した。リコンビナントタンパク質の精製は、カラムクロマトグラフィーと電気的溶出法によって行った。精製した毒素タンパク質は、ウサギに免疫して抗清の作製を試みた(図4)。

B - 4．TDHとTRHの精製

合成した*tdh*及び*trh2*をそれぞれプラスミドベクター pCold TF に組み込んで蛋白発現用大腸菌 BL21(DE3) 株に導入した。この株についてTFタグ融合蛋白質としてTDHあるいはTRH2を発現させるための至適な条件を検討し、得られた条件下で発現誘導を行った培養液からHisタグ精製および電気的溶出によってTDHあるいはTF-TRH2を精製した(図5)。

C．研究結果

C - 1．土壌からの病原体検出法の改良

我が国の標準土壌7種を検討に用いた(図6)。新規抽出法の有用性を検証するため、精製DNAの純度を指標に市販の土壌核酸抽出キット3種類と抽出結果を比較、検討した。まず、市販キットでの抽出核酸の純度を吸光

度計により調べた。市販キットAは土壤中の腐植酸の除去は優れていたが、DNA回収率は低かった。一方、市販キットBはマグネット法により腐植酸を除去するが、DNA回収率は著しく低かった。市販キットCは、DNA抽出フィルターを使用する方法であるが、フミン酸は除去できなかった(図7)。これら3種類の市販品のうち、キットAとBを用いて、本研究で開発した新規抽出法と精製DNAの純度を比較した。関東ローム層を除いて、いずれの種類の土壤検体においても、新規抽出法が純度および回収量とも優れていた(図8)。

C - 2 . 市中の呼吸器感染症と炭疽、類鼻疽オウム病との迅速類症鑑別法の開発

炭疽菌に対する迅速診断法(核酸クロマト)と、市中呼吸器感染症の病原体スクリーニング用核酸クロマトへのテロ病原体をマウントした2種類の迅速類症鑑別法を開発した。今後はスパイク実験等を行って構築した診断法の制度検定を行う。

C - 3 . SEA と SEB の精製と家兎抗血清の作成

His-SEA及びHis-SEBをSDS-PAGEとウエスタンブロッティングにより検出したところ、予想されるサイズのシグナルが得られ、目的タンパク質の発現が確認できた。本研究で構築したりコンビナント・プラスミドによる大腸菌内での目的タンパク質の発現量は高く、常に効率よく目的タンパク質が得られた。Ni-NTA アガロース ビーズをいた精製の後に電氣的溶出法によって目的タンパクを精製し、得られた精製タンパクをウサギに免疫し血清を回収したが、十分な抗体価の上昇は認められなかった。

C - 4 . TDH と TRH の精製

TF-TDH及びTF-TRH2はそれぞれ大腸菌内で盛んに発現し、共に可溶性分画に高い割合で存在していた。最終的に得られた精製蛋白質は実験動物への免疫誘導に使用可能と思われる純度に達しており、大腸菌培養液 500 ml からモルモット 1 頭以上に抗体誘導できる量が得られた。

D . 考 察

D - 1 . 土壤からの病原体検出法の改良

土壤からのDNA抽出は他の環境検体に比べ困難であり、これまでに様々な手法が報告されている。土壤からのDNA抽出法は直接法と間接法の大きく2種類に分けられる。直接法では、土壤中で溶菌してDNAを回収するため、短時間で操作が完了し、DNA収量も比較的多い。しかし、フミン酸などの腐植酸の混入も多く、その後のPCRによる増幅反応の阻害要因となる。間接法では、土壤から微生物画分を回収後、DNAを抽出するため、DNA収量は少ないが、腐植酸の混入が少ない。土壤成分は不均一であるため、すべてにおいて決定的と呼べる方法はまだ存在しない。本研究では間接法を改良し、土壤検体中のフミン酸を酸化アルミニウムに吸着させて除去することで、従来法に比べ比較的純度の高いDNAを抽出することに成功した。

黒ボク土は火山灰土壤で、我が国に特有の土壤成分で関東を中心に、日本全体に広く分布している。黒ボク土はウイルスや細菌などの微生物を強く吸着する性質を持つため、抽出前に微生物分画と土壤分画を分ける間接法では、ほとんどの微生物が土壤分画に存在するため、DNA抽出は困難である。直接法においても他の土壤に比べて著しく回収率は低下することが知られている。新規抽出法は、間接法を改良したものであるが、酸性バッファーでフミン酸を酸化させて、アルミニウム粒子に吸着させて除いた後、間接法で問題となるDNAの回収率の低下を改善するため、菌を陽性に荷電した粒子に吸着させて回収し、さらにマグネット法で濃縮することで、その後のPCRによる増幅反応に使用できる純度のDNAを精製することができた。今回、関東ロームからの抽出は困難で、満足できる結果は得られなかった。今後も条件を検討し、様々な土壤検体で使用可能な抽出条件を検証し、最適化していく予定である。

環境検体からの病原体の高感度な検出は、除染方法および除染完了の評価に必須である。環境検体からの迅速で高感度な危険病原体の検出法を最適化することは、生物剤散布発生時の被害拡大や2次被害をなるべく最小化するために重要であるだけでなく、様々な感染症発生時の除染評価にも有用と考えられる。

D - 2 . 市中の呼吸器感染症と炭疽、類鼻疽オウム病との迅速類症鑑別法の開発

テロが起きた場合に、市中で発生する疾病とテロによる希少感染症との類症鑑別が初期の防圧において非常に重要である。本年度は

炭疽の迅速診断用の核酸クロマトと、市中で発生する細菌性呼吸器感染症と肺炭疽との迅速鑑別核酸クロマトを構築した。この系の精度検定を行ってその有用性を確認する事でテロへの対策の一助としたい。

D - 3 . SEAとSEBの精製と家兎抗血清の作成

得られた精製タンパク (SEA及びSEB) をウサギに免疫し血清を回収したが、十分な抗体価の上昇は認められなかった。SEAおよびSEBは銀染色で1本になるまでの高い純度を確保できたので、来年度は、アジュバンドや免疫スケジュールの検討を行い、高感度かつ簡便なSE検出法を構築する。

D - 4 . TDHとTRHの精製

今回構築したTDH及びTRH2の組換え体および蛋白質発現誘導・精製手法によってモルモットへの抗体誘導に十分な純度と量のTF タグ融合TDHあるいは同TRH2 が得られた。来年度はモルモットへの投与により抗TDHあるいは抗TRH2抗体を誘導し、それらの抗体を用いた TDHあるいはTRHに特異的な免疫学的検査法の構築を目指す。

E . 結 論

1. 環境検体中、特にその検出が困難な土壌検体を用いて、危険病原体由来 DNA の検出に有用な核酸抽出法を開発した。
2. 炭疽菌に対する迅速診断法(核酸クロマト)と、市中呼吸器感染症の病原体スクリーニング用核酸クロマトへのテロ病原体をマウントした 2 種類の迅速類症鑑別法を開発した。
3. 免疫に耐えられる純度と量の SEA および SEB を精製した。
4. 免疫に耐えられる純度と量のTDHおよび TRH2を精製した。

F . 健康危険情報

特になし。

G . 研究発表

論文発表

1. Sukegawa S, Ihara Y, Yuge K, Rao S, Oka K, Arakawa F, Fujimura T, Murakami H, Kurazono H, Takahashi M, Morimatsu F:

Effects of oral administration of heat-killed *Enterococcus faecium* strain NHRD IHARA in post-weaning piglets. *Animal Science Journal* 85 (4): 454-460, 2014.

2. Nakano M, Yamasaki E, Moss J, Hirayama T, Kurazono H: Study of the stn protein in salmonella; a regulator of membrane composition and integrity. *Method Mol. Biol.* 1225: 127-138, 2015.
3. Yamasaki E, Yamada C, Jin X, Nair GB, Kurazono H, Yamamoto S: Expression of marA is remarkably increased from the early stage of development of fluoroquinolone-resistance in uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Chemother.* 21 (2): 105-109, 2015.
4. Ohji S, Yamazoe A, Hosoyama A, Tsuchikane K, Ezaki T, Fujita N. The Complete Genome Sequence of *Pseudomonas putida* NBRC 14164T Confirms High Intraspecies Variation. *Genome Announc.* 2(1), 2014
5. Kikuchi M, Ito S, Yasuda M, Tsuchiya T, Hatazaki K, Takanashi M, Ezaki T, Deguchi T. Remarkable increase in fluoroquinolone-resistant *Mycoplasma genitalium* in Japan. *J Antimicrob Chemother.* 69(9):2376-2382, 2014.
6. Miyazato A, Ohkusu K, Tachi Y, Hashikita G, Ezaki T, Mitsutake K. Two cases of infective endocarditis caused by *Streptococcus tigurinus*. *感染症学雑誌* 88 (3): 304-306, 2014.

H . 知的財産の出願・登録状況

特になし

