

保存*Bacillus anthracis*菌株の病原因子保有状況

横山 栄二, 岸田 一則

The presence of the pathogenic factors of strains of *Bacillus anthracis* maintained in some laboratories by PCR

Eiji YOKOYAMA and Kazunori KISHIDA

## Summary

The presence of the pathogenic factors of seven strains of *Bacillus anthracis*, which were maintained in some laboratories, were investigated by PCR. The presence of the pathogenic factors of two strains derived from the Pasteur II strain, one out of two strains derived from Stern strain and one out of three strains derived from Davis strain were accord with the presence of the pathogenic factors of the Pasteur II strain, Stern strain and Davis strain, respectively. However, one out of two strains derived from the Stern strain had no pathogenic factors as well as Ba813, which was specific for *B. anthracis*. Moreover, the presence of the pathogenic factors of two out of three strains derived from the Davis strain were accord with the presence of the pathogenic factors of Pasteur II strain. It was suggested that the replacement among the strains of *B. anthracis* would be occurred during the maintenance of the strains.

## I はじめに

*Bacillus anthracis*によって引き起こされる人畜共通伝染病である炭疽は、世界的に発生が認められ<sup>1)</sup>、我が国でも2000年7月に宮崎県で発生が確認された。*B. anthracis*の芽胞は環境からの物理学的感作に対して非常に抵抗性が強く、いったん*B. anthracis*の芽胞で汚染された環境、特に土壌中では長期間生存することが知られている。そのため炭疽発生時には、家畜伝染病予防法に基づき家畜の移動制限が行われ*B. anthracis*による環境汚染の拡大防止がはかれるが、家畜の移動制限は経済的に重大な影響を与えるため、炭疽の発生が疑われる場合には、迅速、かつ、確実な診断が必要となる。

*B. anthracis*は*B. cereus*と非常に類似しており<sup>2)</sup>、その鑑別には、従来の、パールテスト、 $\gamma$ ファージテスト、アスコリー反応が行われていたが、アスコリー反応は交叉反応が起こりやすいことが知られており<sup>3)</sup>、 $\gamma$ ファージテストが最終診断として推奨されている。しかしながら、 $\gamma$ ファージテストは結果が出るまでに数日間を必要とし<sup>4)</sup>、迅速な診断が行えない。また、環境中には病原因子を欠落した*B. anthracis*が存在し<sup>1) 5)</sup>、 $\gamma$ ファージテストでは病原因子の有無に関わらず*B. anthracis*であれば陽性となることから、炭疽発生時に環境中に存在する病原因子を欠落した*B. anthracis*を混同する恐れがあり、炭疽の診断のためには病原因子の確認が必要である。炭疽の病原因子としては、莢膜、防御抗原、浮腫因子、致死因子の4つが報告されており、それぞれの病原因子の遺伝子が特定され<sup>6) 7) 8)</sup>、PCRによって迅速に病原因子保有状況を検出出来ることが報告されている<sup>9)</sup>。そこで、炭疽の迅速診断のためのPCR導入を目的として、当所および関係機関に炭疽鑑別のために実施するテストの対照とするために保存されていた*B. anthracis*

菌株を使用して、病原因子の保有状況を調査した。

## II 材料および方法

## 1 使用菌株

当所および関係機関に保存されていた7株の*B. anthracis*を使用した(表1)。

表1 使用菌株

菌株名	由来	保存機関
CBA99001	Pastuer II 菌株	A
CBA99002	Stern ワクチン株	A
CBA99003	Davis 株	B
CBA99004	Pastuer II 菌株	C
CBA99005	Stern ワクチン株	C
CBA99006	Davis 株	C
CBA99007	Davis 株	D

## 2 PCR

普通寒天平板(日水)に披験菌株を接種し、37℃で一夜培養後、Gene Trapping by Liquid Extraction kit (TaKaRa) を使用してDNAを抽出した。抽出したDNAは、Gene Quant Pro (Pharmacia) を使用してDNA濃度を測定し、20ngをPCR反応液(表2)に加えた。

表2 PCR反応液の組成

試薬	添加量*	最終濃度
10× conc. PCR reaction buffer**	10 $\mu$ l	
10mM PCR Nucleotide Mix**	2 $\mu$ l	200 $\mu$ M
20 $\mu$ M primer #1	2.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ M
20 $\mu$ M primer #2	2.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ M
5U/ $\mu$ l Taq DNA Polymerase**	0.5 $\mu$ l	

\*反応液 100  $\mu$  l 当たり

\*\*Boehringer Mannheim

千葉県衛生研究所

(2000年11月10日受理)

使用したprimerは、Ramisseら<sup>9)</sup>が報告したもののうち、防御抗原の遺伝子 (*pag*) の検出にはprimer67および68, 浮腫因子の遺伝子 (*cya*) の検出にはprimer25および26, 致死因子の遺伝子 (*lef*) の検出にはprimer3および4, 莢膜の遺伝子 (*cap(C)*) の検出にはprimer57および58, *B. anthracis*のchromosomeに特異的な塩基配列であるBa813<sup>10)</sup>の検出にはprimerR1およびR2を使用した(表3)。

PCRはGeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems) を使用して行い, 反応条件は, 94°C 5分間でDNA変性を行い, その後94°C30秒, 58°C30秒, 72°C30秒のサイクルを30回行い, 常法<sup>10)</sup>により増幅バンドを検出した。

### 3 生化学性状試験

CBA99002については,  $\gamma$ ファージテスト<sup>11)</sup>およびAPI 50CHB (BioMerieux) により生化学性状を調査した。

表3 使用primer

遺伝子	Primer	シーケンス(5' → 3')
<i>pag</i>	67	c a g a a t c a a g t t c c c a g g g g
	68	t c g g a t a a g c t g c c a c a a g g
<i>cya</i>	25	g g t t t a g t a c c a g a a c a t g c
	26	c g c c t t c a a g a c c c c
<i>lef</i>	3	c t t t t g c a t a t t a t a t c g a g c
	4	g a a t c a c g a a t a t c a a t t t g t a g c
<i>cap(C)</i>	57	a c t c g t t t t t a a t c a g c c c g
	58	g g t a a c c c t t g t c t t t g a a t
Ba813	R1	t t a a t t c a c t t g c a a c t g a t g g g
	R2	a a c g a t a g c t c c t a c a t t t g g a g

## III 結果

PCRの結果, 被検7株のうちCBA99001およびCBA99004, は, *pag*, *cya*, *lef*, *cap(C)*の4つの病原因子とBa813を保有していた(図1)。また, CBA99005は, *pag*, *cya*, *lef*の3つの病原因子とBa813を保有しており(図2), CBA99007は, *cap(C)*の1つの病原因子とBa813を保有していた(図3)。一方, CBA99002は, *pag*, *cya*, *lef*, *cap(C)*の4つの病原因子を全く保有しておらず, Ba813も保有していなかった(図4)。また, CBA99003およびCBA99006は, CBA99001およびCBA99004と同様に *pag*, *cya*, *lef*, *cap(C)*の4つの病原因子とBa813を保有していた(図5, 6)。

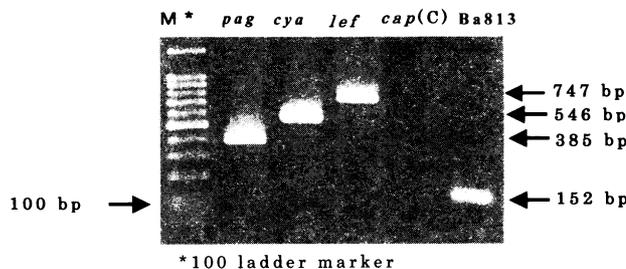


図2 Sternワクチン株由来菌株のPCR像(CBA99005)

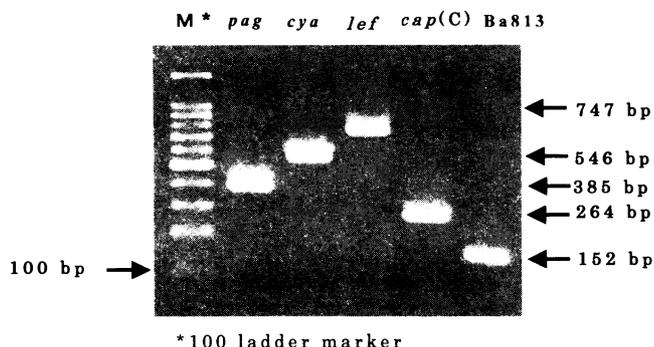


図1 Pasteur II 菌株由来菌株のPCR像(CBA99001)

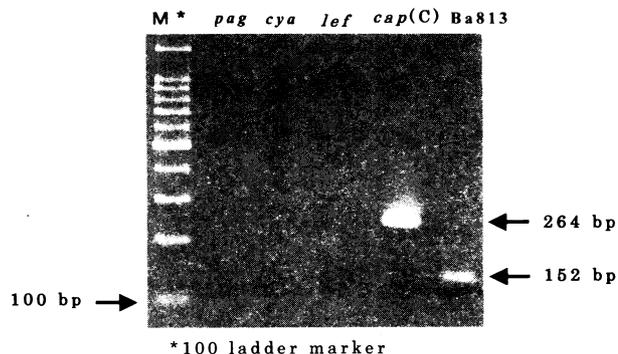
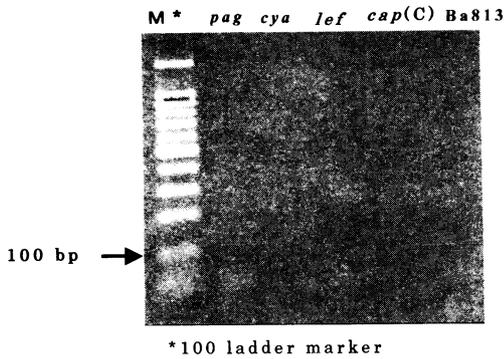
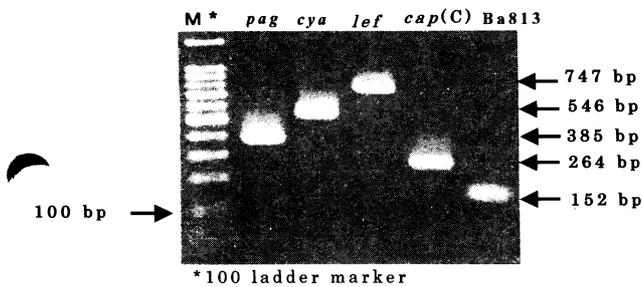


図3 Davis株由来菌株のPCR像(CBA99007)



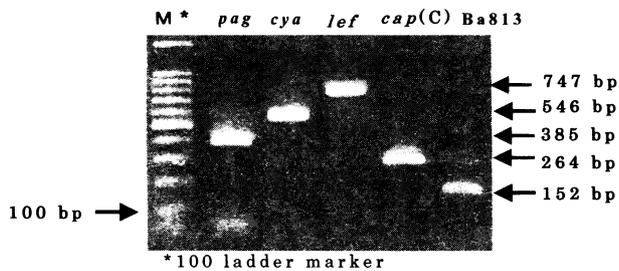
\*100 ladder marker

図4 CBA99002のPCR像



\*100 ladder marker

図5 CBA99003のPCR像

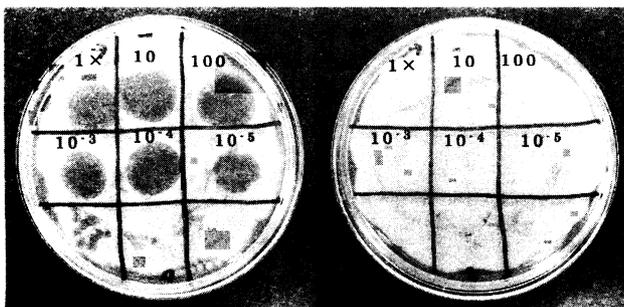


\*100 ladder marker

図6 CBA99006のPCR像

病原因子を全く保有していなかったCBA99002について、 $\gamma$ ファージテストを行ったが、陽性対照としたDavis株由来のCBA99007では $10^{-5}$ まで溶菌が確認されたのに対し、CBA99002では全く溶菌せず、感受性がなかった(図7)。

また、API 50CHBでは*B.cereus*と同定された(%id=98.5, T=0.78)。



Davis株 (陽性対照)

CBA99007

図7 CBA99002に対する $\gamma$ ファージテスト

#### IV 考察

*B.anthraxis*には二つの病原プラスミドが存在し、病原因子のうちpXO1には*pag*, *cya*, *lef*が、pXO2には*cap*が存在することが報告されている<sup>11)</sup>。現在、*B.anthraxis*保存菌株として知られているには、Pastuer II 苗株、Sternワクチン株およびDavis株がある。Pastuer II 苗株はPastuerがワクチン用に開発した弱毒株で日本で保存されている株は4つの病原因子の全てを保有することが知られている<sup>11)</sup>。Sternワクチン株は、pXO2が脱落した無莢膜変異株であり、pXO1に存在する*pag*, *cya*, *lef*の3つの病原因子を保有する。 $\gamma$ ファージテストに使用する $\gamma$ ファージを増殖させる菌株であるDavis株は、pXO1が脱落した非病原性株であり、pXO2に存在する*cap*を保有する。

今回、当所および関係機関に保存されていた*B.anthraxis*菌株についてPCRで病原因子の保有状況について調査したところ、Pastuer II 苗株由来のCBA99001およびCBA99004は、*pag*, *cya*, *lef*, *cap(C)*の4つの病原因子およびBa813を保有しており、この2株がPastuer II 苗株由来であることと一致していた(図1)。また、Sternワクチン株由来のCBA99005は、*cap(C)*以外の*pag*, *cya*, *lef*の3つの病原因子を保有しておりSternワクチン株由来であることと一致していた(図2)。さらに、Davis株由来のCBA99007は*cap(C)*およびBa813を保有しておりDavis株由来であることと一致しており(図3)、PCRが炭疽の迅速診断に使用可能であることが確認された。しかし実際の炭疽発生時には、*B.anthraxis*による汚染拡大防止のために末梢血や臓器の一部から*B.anthraxis*を証明出来ることが望ましいが、PCR反応は血液成分等の夾雑物により反応が阻害されることが知られており<sup>12)</sup>、患者の末梢血や臓器から直接DNAを抽出してPCRによって診断が可能であるかどうかについては今後の検討課題である。

Sternワクチン株由来のCBA99002は病原因子を全く保有していないばかりでなくBa813も保有していなかった(図4)。このことは、CBA99002が*cap(C)*以外の病原因子が存在するpXO1を脱落したことも考えられるが、*B.anthraxis*のchromosomeに特異的な塩基配列であるBa813<sup>9)</sup>を保有していなかったことから、CBA99002は*B.anthraxis*ではないことが考えられる。さらに、CBA99002は、 $\gamma$ ファージテストで感受性陰性であったこと(図7)、羊血液寒天培地上で $\beta$ 溶血を示すこと(データ非掲載)、API 50CHBにより*B.cereus*と同定されたことから、*B.anthraxis*ではなく*B.cereus*であると思われる。また、CBA99003およびCBA99006は*pag*, *cya*, *lef*, *cap(C)*の4つの病原因子およびBa813を保有しており、Pastuer II 苗株由来であると思われる。今回、当所および関係機関に保存されていた*B.anthraxis*の病原因子保有状況をPCRによって調査した結果、菌株の由来どおりの病原因子を保有していた株は7株中4株であり、残り3株はなんらかの理由により菌株が入れ替わっていることが考えられた。これらの菌株は分与や保存の記録が不明瞭であり、どの時点で入れ替わったかを明らかにすることは現在では不可能であるが、今後、さらに混乱を引き起こさないように、保存記録が必要であると思われる。

参考文献

- 1) Patra, G., Vaissaire, J., W-Levy, M., Le Doujet, C. and Mock, M. (1998) Molecular characterization of *Bacillus anthracis* involved in outbreaks of anthrax in France in 1997. *J. Clin. Microbiol.* 36, 3412-3414
- 2) Kaneko, T., Nozaki, R. and Aizawa, K. (1978) Deoxyribonucleic acid relatedness between *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Immun.* 22, 639-641
- 3) Makino, S., Uchida, I., Terakado, N., Sasakawa, C. and Yoshikawa, M. (1989) Molecular characterization and protein analysis of the *cap* region, which is essential for encapsulation in *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* 171, 722-730
- 4) Brown, E. R., Moody, M. D., Treece, E. L. and Smith, C. W. (1958) Differential diagnosis of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus cereus* var. *mycoides*. *J. Bacteriol.* 75, 499-509
- 5) Patra, G., Sylvestre, P., Ramiisse, V., Therasse, J. and Guesdon, J.-L. (1996) Isolation of a specific chromosomal DNA sequence of *Bacillus anthracis* and its possible use in diagnosis. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* 15, 223-231
- 6) Bragg, T. S. and Robertson, D. L. (1989) Nucleotide sequence and analysis of the lethal factor gene (*lef*) from *Bacillus anthracis*. *Gene* 81, 45-54
- 7) Robertson, D. L., Tippetts, M. T. and Leppla, S. H. (1988) Nucleotide sequence of the *Bacillus anthracis* edema factor gene (*cya*): a calmodulin-dependent adenylate cyclase. *Gene* 73, 363-371
- 8) Welkos, S. L., Lowe, J. R., E-McCutchan, F., Vodkin, M., Leppla, S. H. and Schmidt, J. J. (1988) Sequence and analysis of the DNA encoding protective antigen of *Bacillus anthracis*. *Gene* 69, 287-300
- 9) Ramiisse, V., Patra, G., Garrigue, H., Guesdon, J.-L. and Mock, M. (1996) Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiplex PCR analysis of sequences on plasmids pXO1 and pXO2 and chromosomal DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 145, 9-16
- 10) 中山広樹 (1996) バイオ実験イラストレイテッド ③本当に増えるPCR, 秀潤社
- 11) 寺門誠致 (1989) 炭疽菌の病原因子 遺伝子から見た細菌の病原性 p36-51 菜根出版
- 12) Wilson, I. G. (1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3741-3751