

平成21年6月22日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790452
 研究課題名（和文） 病原微生物及び細菌毒素による死因の法医鑑定を構築するための研究
 研究課題名（英文） A study on establishment of forensic microbiological application of cause of death by pathogenic microbe and bacterial toxins.
 研究代表者
 藤浪 良仁（FUJINAMI YOSHIHITO）
 科学警察研究所・法科学第一部・主任研究官
 研究者番号：30335632

研究成果の概要：

テロへの使用が危惧されている病原微生物のコロニーに対して単一液による簡易抽出によりMALDI-TOF-MSを用いて迅速な識別が可能であった。更に病原細菌により感染死したマウスの脾臓から感染時特有のピークが得られ、MALDI-MS imaging 解析によりその組織内分布が示された。これら手法は、他の病原細菌及び細菌毒素による感染死にも応用可能と思われる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	0	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	0	3,300,000

研究分野：法医学

科研費の分科・細目：法医病理学

キーワード：法医鑑定、感染、病理組織、マスペクトル、機能分子

1. 研究開始当初の背景

病原微生物は「貧者の核兵器」と言われるように威力は絶大であるにも関わらず、その採取は環境中から可能であり特殊な設備や試薬は必要としない。病原微生物は、毒物や爆発物よりも犯罪に使用するの容易であり、毒物混入事件における毒物の様に人為的に使用される可能性は非常に大きい。この場合感染症としての側面も持つため、起こり得る感染症では単なる感染源不明の感染症としてカモフラージュされるおそれもある。また人為的に使用される場合、通常の感染症と感染経路や暴露量は異なり感染様態が異状となる可能性がある。このような場合でも、法

医学の分野では、異状死という情報の殆ど無いところから、病原微生物や細菌毒素による犯罪の可能性も含めて受け入れなければならない。よって法医学の分野で病原微生物及び毒素による死亡を鑑定するために、どのような病原微生物等が関わっているかを簡便かつ迅速に絞り込むための網羅的解析が必要である。現在は微生物の研究は細分化され、細菌、細菌毒素、ウイルスなど個々に対する感染時の動態や検出法の研究は進んでいるが、これらを網羅的に解析する研究は殆ど行われていない。そのため病原微生物を犯罪に使用された場合は、従来の感染症の手法に加えて固定概念を取り払って法医学分野独自

のあらゆる可能性を想定した解析法が必要となる。

2. 研究の目的

申請者は、死因不明遺体の臓器から病原微生物及び毒素による感染死の死因を絞り込む手掛かりとして、マスマススペクトルパターンが有効ではないかと考えている。特にMALDI-TOF-MSは複雑な技術を必要とせず、無数の有機成分が混在する試料から数秒でその特異スペクトルパターンが得られる。遺伝子を対象とした検出系では細菌毒素は検出されないが、主にタンパク質及び糖鎖で構成されている毒素はマスマススペクトルによる解析で同定が可能である。逆にタンパク質及び糖鎖を持っていない病原微生物及び毒素は無い。細菌の表面には絨毛、鞭毛、トランスポーター、接着因子、細胞壁のペプチドグリカンなど生命活動に必須な機能性タンパク質及び糖鎖が発現しており、特に病原微生物の多くは、その表面に病原性を発揮するための特徴的な酵素、Type III secretion system等（細菌毒素をホストの細胞に注入するためのニードル）や免疫回避のための莢膜を発現しており、遺伝子全てではなく機能している重要な遺伝子を反映したものが存在する。これら機能分子を迅速に抽出し解析することで、それら病原微生物及び毒素が特徴的なマスマススペクトルパターンを描くと考えられるため、Fingerprinting法として異同識別が可能となると想定できる。一方、感染等の影響を受けた組織のマスマススペクトルパターンも当然特異的なプロファイルを描くことが予想される。法医病理診断は熟練した法医学の知識が必要であるだけでなく、病理学や組織学、臨床医学等の幅広い知識が必要であり、限られた法医学者へ集中するためその負担は大きい。また感染病理組織像を見て判定するためには熟練とセンスが必要であり、判定者の能力により解釈にバラツキが生じることが避けられない。それらを解消し客観的かつ正確に組織像を解釈するための研究として、組織画像とタンパクプロファイルをデジタル化する手法が有効である。癌の診断法の研究において、病理組織像により分類される癌化のステージとその組織細胞のタンパクプロファイルが対応することが既に報告されている。同様に感染組織像とそのタンパクプロファイルが対応することを明らかにすれば、微生物が存在するだけでなく、確かに組織が感染の影響を受けていることを明らかにすることが出来る。このような手法を用いて、最終的に感染臓器からの網羅的な微生物の同定と臓器の感染時特有のマスマススペクトルパターンを明らかにし、病原微生物及び毒素による感染死の法医鑑定を目指した。今回我々は病原微生物等の固有スペクトル

を得るために、炭疽菌をはじめとする病原細菌の簡易酸抽出物を対象にMALDI-TOF-MSのスペクトルパターンでの迅速異同識別を試みた。また毒素においても同様に検討を行なった。そして最後に病原細菌により感染死した個体を対象に、感染臓器のイメージングマスによる識別を試みた。

3. 研究の方法

細菌株及び細菌毒素の入手

各種細菌株の入手経路を以下に示す。炭疽菌 (*Bacillus anthracis* PasteurII) は帯広畜産大学、炭疽菌 (*Bacillus anthracis* Davis) は動物衛生研究所、ブルセラ菌 (*Brucella melitensis* RIMD0238001) は大阪大学、野兎病菌 (*Francisella tularensis* SCHU) は大原病院大原研究所、ペスト菌 (*Yersinia pestis* P3-417)、類鼻疽菌 (*Burkholderia pseudomallei* P3-66) は岐阜大学、レジオネラは American Type Culture Collection (ATCC)、ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum* okra) 及びその他一般細菌は、岡山大学から分譲を受けたものを用いた。炭疽菌、類鼻疽菌及び一般細菌は好気条件下 BHI 寒天培地 (日水) で、ペスト菌は微好気条件下 10%馬脱繊維血 (日本生物材料センター) 加 BHI 寒天培地で、ブルセラ菌は微好気条件下 10%馬脱繊維血加ブルセラ寒天培地 (Difco)、野兎病菌は微好気条件下 10%馬脱繊維血加ユーゴン寒天培地 (Difco) を用いて培養した。培養時逃すコントロールは、アネロパックのジャー及びガスパックを用いた。炭疽菌芽胞は、効率よく芽胞を得るため芽胞化培地を用い4日間好気条件で培養し、位相差顕微鏡下で栄養型が観察されなくなるまで氷冷滅菌精製水で洗浄し調整した。また、細菌内毒素 (LPS) は Sigma から、細菌外毒素は List Biological Laboratories から購入した。実験動物は、SPF BALB/c マウス 5 週齢 (メス) を用い、日本生物材料センターから購入した。

(1) 病原細菌のマスマススペクトルパターン検出

寒天平板培地上の各種細菌のコロニーを 1%TFA に懸濁し、ピーターによる破碎抽出あるいはボルテックスミキサーで簡易抽出し、無菌濾過したものを細菌抽出サンプルとした。これをマトリックス溶液に混和し、MALDI plate のスポットにアプライした。常温で風乾後、MALDI-TOF-MS で測定し、専用解析ソフトウェアで解析を行った。

(2) 細菌毒素の検出

活性のあるボツリヌス毒素、破傷風毒素、ジフテリア毒素、ディフィシル毒素、黄色ブドウ球菌毒素及びホルムアルデヒドで無毒

化したトキシノイドを MALDI-TOF-MS を用いて検出を試みた。また、内毒素について大腸菌 O26 及びサルモネラ菌 (*S. enteritidis*) の内毒素を識別するため、マトリックスとして DHB を用いリニアネガティブモードで MALDI-TOF-MS を用いた検出を試みた。

(3) 細菌毒素の安定性

細菌毒素が安定して検出出来るかを MALDI-TOF-MS により検出を試みた。ボツリヌス神経毒素 A 型及び黄色ブドウ球菌腸管毒素 B 型を水に溶解し水中における安定性を、また噴霧後の床等に乾燥状態空气中を想定して水溶液を乾燥させたものを室温にて一週間の検出を試みた。

(4) ペプチド断片による細菌毒素の識別

各種細菌毒素をトリプシン (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega) 消化し、生じる無数のペプチド断片のマススペクトルパターンの検出を試みた。

(5) 感染臓器における特徴ピークのイメージング

感染モデルとして BALB/c マウスに致死量の炭疽菌を静脈内接種し、死亡後に摘出した臓器を高圧蒸気滅菌あるいはホルマリン固定による滅菌確認後、凍結切片を作製した。凍結切片は、導電性フィルムに載せ、MALDI 用マトリックスの CHCA 溶液を臓器表面に塗布し、デシケーターで乾燥させた。このように得られた試料を対象に、MALDI-MS Imaging 解析を行った。

4. 研究成果

(1) 病原細菌のマススペクトルパターン検出

バイオセーフティーレベル 3 において、炭疽菌をはじめとする 10 種 60 株、バイオセーフティーレベル 2 以下においてボツリヌス菌など病原細菌及び一般細菌各種について、1% TFA による簡易抽出を行ない、抽出物を MALDI-TOF-MS で解析を行なったところ、酸溶解性低分子タンパク質が描く特異マススペクトルパターンが得られ、これらの識別が可能であった。また、いくつかの病原微生物については、属間あるいは種間共通のバイオマーカー及び株特異ピークも検出することが出来た。また、同一試料においても検出モードをポジティブモードとネガティブモードの両モードで異なるマススペクトルが得られ、両モードのスペクトルを用いると識別精度が向上すると思われる。更にテロへの使用が最も危惧されている炭疽菌においては、詳細な検討を行なった。炭疽菌の株間の比較において Davis 株と PasteurII 株は明確に株同士の識別が可能であった。更に培

養する時の気相の違いによりスペクトルパターンを比較したところ、酸素分圧及び二酸化炭素分圧に変化に伴い、ピークパターンがシフトしていた。また *B. anthracis* PasteurII および Davis において培地への血液添加且つ微好気培養で有効ピーク中で最強強度のピークとなる構成分子の発現が出現した。このバイオマーカーはプラスミド欠損株においても発現していたので、プラスミドに制御を受けていないことが予想される。そしてこのバイオマーカーが *B. anthracis* に固有のピークかどうか判断するために、近縁 *Bacillus* 属菌種の *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* において同様に検討したところ、*B. subtilis* 以外のより近縁な *Bacillus* 属菌種でも発現していた。よってこれらマーカーは炭疽菌特異的なマーカーではないが、より炭疽菌に近縁な *Bacillus* 属菌種であることを示すマーカーであることが示された。また *Bacillus* 属菌種内で異同識別するのであれば、微好気培養下血液寒天培地での培養で有効ピーク数が多いため異同識別が容易になると思われる。炭疽菌とペスト菌の混合試料においても混合試料であることを識別できるかも検討したところ、両者の固有ピークを確認することが出来た。

(2) 細菌毒素の検出

未消化での検出は何れも分解することなく固有の分子量で識別可能であり、また、トリプシン消化後のペプチド断片パターンもトキシノイドと同様に固有であり、これら毒素は各々識別可能であることが明らかとなった。しかし、同じボツリヌス毒素の A 型と B 型の識別は困難であった。内毒素は大腸菌 (*E. coli* O26) 及びサルモネラ菌 (*S. enteritidis*) の内毒素を識別するため、マトリックスとして DHB を用い、リニアネガティブモードで MALDI-TOF-MS による検出を試みた。これら 2 つのフェノール抽出内毒素の検出感度は高くないが、各々固有のマススペクトルパターンを示すため、識別することは可能であった。

(3) 細菌毒素の安定性

ボツリヌス神経毒素 A 型及び黄色ブドウ球菌腸管毒素 B 型の水の中及び乾燥させたものを室温にて一週間の検出を検討した結果、両毒素とも水溶液中及び乾燥条件において一週間経時的に低分子量域に僅かに分解物が認められるが、毒素本体は安定して検出可能であった。

(4) ペプチド断片による細菌毒素の識別

ボツリヌス神経毒素など細菌外毒素及びトキシノイドは、未消化での検出は何れも分解することなく固有の分子量で識別可能であ

り、また、トリプシン消化後のペプチド断片パターンもトキシイドと同様に固有であり、これら毒素は各々識別可能であることが明らかとなった。しかし、同じボツリヌス毒素の A 型と B 型の識別は困難であった。

(5) 感染臓器における特徴ピークのイメージング

組織ホモジナイズを用いて各種臓器のマススペクトルパターンの識別を試みたところ、組織は大別して肺・肝臓・脾臓・腎臓と皮膚・体毛の2パターンに分かれた。組織ホモジナイズとペスト菌抽出物の混合物からのペスト菌検出では、皮膚・体毛からがイオン化も良好であった。一方それ以外の臓器ではイオン化効率が悪く、組織中の金属イオン（大量の Na、K など）が構成高分子のイオン化を阻害していると思われた。

最後に炭疽菌の感染実験を行なった。まず感染臓器中と同様に莢膜発現するように、50% 馬脱絨血寒天培地を用いて培養を行なった。血液培地で誘導した莢膜発現炭疽菌の特徴ピークは分子量 1641 で得られたが、感染死したマウスの脾臓からこの特徴ピークは得られなかった。それに代わって感染臓器と健常臓器のマススペクトルを比較したところ、感染臓器の特有ピークが分子量 1232 と分子量 1249 の2本が得られた。またこれら2つの特有ピークをイメージングしたところ、臓器中の分布が僅かに異なることが観察された。今回人工的に莢膜発現させた炭疽菌の特徴ピークは感染臓器から得られず、培地中の人工的な莢膜発現と生体中での莢膜発現は異なることが考えられた。一方検出された感染臓器の特有ピークが、炭疽菌が被感染個体の生存中に活動していたという感染死の証明に役立たないかと考えている。

結語

今回用いた病原微生物等の MALDI-TOF-MS による迅速異同識別法は、抽出過程から解析まで 30 分以内で行うことが可能であり、データベースを構築することで、炭疽菌、ペストなど病原微生物の検出及び識別が可能であった。また病原微生物等の実験動物における感染実験から感染臓器特有のピークが得られ、その臓器内分布が得られた。また本手法は、他の病原細菌及び細菌毒素による感染死にも応用可能と思われ、このような技術が発展することで、病原微生物及び細菌毒素による死因の法医鑑定に役立つと思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計3件)

Yoshihito Fujinami, Yohei Kurosaki, Masataka Nagakane, Mineo Yoshino and Jiro Yasuda

Rapid identification of biological warfare by MALDI-TOF-MS analysis
2008 ASM Biodefense and Emerging Diseases Research Meeting

平成20年2月26日

米国 (ボルチモア)

藤浪良仁、黒崎陽平、安田二郎
MALDI-TOF-MS を用いた病原細菌の迅速異同識別

第81回日本細菌学会総会

平成20年3月26日

京都

藤浪良仁、黒崎陽平、安田二郎
感染臓器の MALDI-MS Imaging

第82回日本細菌学会総会

平成21年3月13日

名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者
科学警察研究所
法科学第一部
生物第五研究室
藤浪 良仁

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者