

## 炭疽菌の病原性について

——パスツール没後100年に寄せて——

牧 野 壮 一<sup>1</sup>・内 田 郁 夫<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 帯広畜産大学畜産学部 家畜微生物学教室 〒080 帯広市稲田町

<sup>2</sup> 農林水産省家畜衛生試験場 研究第一部 細菌第2研究室 〒305 つくば市観音台3-1-1

〔受理：1996年3月30日〕

### はじめに

Louis Pasteur は、1822年に生まれ、1895年9月28日に没した。ちょうど1995年が没後100年の年にあたった。彼の功績については、多くの書物があるので、ここではあえて触れるつもりはないが、彼が近代微生物学の創始者であると言われる所以の一つに、1985年に炭疽菌の病弱減弱現象の利用による弱毒生ワクチンの発明が上げられる。また、炭疽菌は、パスツールと同時代を過ごしたもう一人の偉大な微生物学者コッホが、1876年に病原菌を世界で初めて炭疽菌において純培養に成功したことで有名である。まさに近代感染症研究の始まりに炭疽菌が関与したということが言える。この時代は、酪農国における炭疽という伝染病の脅威があったのは事実であり、炭疽を如何に直し、予防するかが大変な問題であったはずである。かつて、我国においては炭疽の発生が見られたが、現在、ほとんど発生がなく、忘れ去られてしまった感がある。タンソ=炭素と訳す

報道機関もあながち責められない現状である。しかし、世界に目をむけると、炭疽の発生は衛生対策の大きな柱となっている国は数多い。外国に暮らすと、炭疽菌に対する考え方が日本とはずいぶん違うことに気付く。酪農国と農耕民族の違いなのであろうか？

さて1995年という年には、色々不幸な事件が多かったが、炭疽菌が中東における生物兵器に使用されていたとか、東京において某宗教団体による炭疽菌体ばらまきの噂があったり、炭疽菌という名前が日本の大衆の報道ベースに載った年でもあった。丁度、パスツール没後100年であったというのも何かの因縁であると考えるのは、考え過ぎであらうか？ 炭疽菌を忘却の彼方に追いやるのも良いが、パスツールの没後100年の年に、炭疽菌についてもう一度考えてみるのも結構なことだと思う。本稿では、1995年9月に英国のウィンチェスターで国際炭疽シンポジウムが開催され内容を中心に、炭疽菌の国内外における現状と基礎研究の進展について紹介したいと思う。今回の会議の特徴は、比較的未開発地域から研究者が来ていたことで、さらに、1989年の前回に比べ旧ソ連からの研究者が非常に増えていることであった。

### 炭 疽 の 疫 学

炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) はグラム陽性桿菌

Sou-ichi MAKINO<sup>1</sup> and Ikuro UCHIDA<sup>2</sup>  
The Pathogenesis of *Bacillus anthracis*

<sup>1</sup> Department of Veterinary Microbiology, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inadacho, Obihiro, Hokkaido 080

<sup>2</sup> Second Laboratory of Bacteriology, National Institute of Animal Health, 3-1-1 Kannondai, Tsukuba-city, Ibaraki 305

であり、*Bacillus* 属の中で唯一の伝染病の原因菌である。家畜においては、家畜法定伝染病に指定されており、草食獣に大変重篤な炭疽を引き起こす。人においては、届出伝染病に指定されており、皮膚、腸および肺炭疽を起こし、重症の場合、死亡率は高い。このため、我が国の食肉衛生検査所においては、炭疽の社会的影響や経済的損失および危険性を考えて、もっとも重要な家畜感染症の検査項目であると言える。幸いなことに、この数年、我が国において炭疽の発生は報告されていないが、外国ではどうであろうか？ 世界の発生状況について、1995年9月に英国ウインチェスターで開催された国際炭疽菌シンポジウムでの報告を中心に紹介しよう。

北アメリカ、特にカナダでは、バッファローの炭疽の発生が問題となっている。発情期の2～3週間前から、秋の霜が降り始めるころまでの間発生し、その伝播にはアブが一役買っていると言われている。この発生は、散発的ながら広範囲で発生するが、潜伏感染なのか、芽胞の拡散による感染なのか定かではなく、菌株間の同一性が問題視されている。遺伝的に近縁と考えられる炭疽菌により100 km以上離れた地域に発生が伝播したという報告もある。一方、アメリカ合衆国のミシシッピやアーカンサスでは地方病的な発生地域があり、家畜に炭疽の発生がある。カナダ同様アブが炭疽の伝播に一役買っている。同様に、東テキサスでは羊、鹿に発生している。地続きのメキシコでも牛に広がっている。これらの地域においては、炭疽に罹患した動物の死骸から、菌体がえさに紛れ込むことが主要な原因の一つであるとも考えられている。しかしながら、幸いなことにヒトへの感染は報告されていない。

中央および南アメリカでは、グアテマラ、ホンジュラス、チリで地方病的に炭疽が存在する。報告はされていないが、パナマでも発生が起きていると言われている。また、ハイチの状況はさらに深刻で、年間2000人の患者がでている。例えば、1993年12月から1994年11月までの期間に、ある一つの病院において、700名の炭疽の患者が入院している。このような状況下では、動物の発生状況までは把握できないのが現状である。炭疽の予防には、最低5年間の予防接種等によるコ

ントロールが必要であると考えられているが、1990年からの5年間に動物へのワクチン接種が、0, 287000, 0, 16738, 114389と一定していないことがハイチにおける炭疽の発生の問題であると指摘されている。一方、ブラジルやウルグアイでは、ワクチンによるコントロールが成功し、炭疽の発生は見られていない。

ヨーロッパでは、ギリシャ、アルバニア、イタリア南部、ルーマニアにおいて炭疽の発生が確認されている。イギリスでは、1995年8月までの7年間で7名の患者と22事例の動物しか報告されていないが、土壌のサンプルを用いて炭疽菌を調べると、3.2%という率で炭疽菌が検出された。また、ポーランドでは、15世紀に作られた羊の皮（コードバン皮）でできた家具を使用して炭疽症状の患者が発生したことが報告されている。

アフリカにおける炭疽の発生状況は、ヒト、家畜を問わず非常に深刻である。特に、西アフリカでは深刻である。例えば、ナミビアのEtosha国立公園においては、象を中心として野生動物に日常的に発生が見られる。また、ザンビアでは全土に炭疽の発生が確認された。そのため、定期的なワクチン接種キャンペーンがなされており、同時に、絵入りの小冊子を作製し村々に炭疽の怖さを啓蒙している。

アジアでは、トルコからパキスタンへの地域が炭疽ベルト（Anthrax belt）と呼ばれ、トルコでは、1970年代に比べ発生は減少傾向にあるものの、1990年以後も年平均355名の患者が報告されている（図1）。ヒトの場合、炭疽による致死率が0.02%と比較的低頻度であるが、根絶するには程遠い感がある。シリアでは、1994年、多くの羊やヤギにおいて発生した。コーカサス地方もベルト内に含まれている。インドでは、ヒトの炭疽は報告されてはいるが、ベルト内の国に比較すれば比較的少ない。もし、インドがこのベルトを絶ち切るようになっていなければ、東南アジアまで炭疽の深刻な汚染ベルトは長くつながっていただろうと考えられている。一方、インドネシアでは、オーストラリア政府の援助のもとに、炭疽の発生が押さえられている。韓国では、1994年2月に炭疽で死亡した牛を食した28名が炭疽に罹患し、3名が死亡した。衛星放送のワールドニ

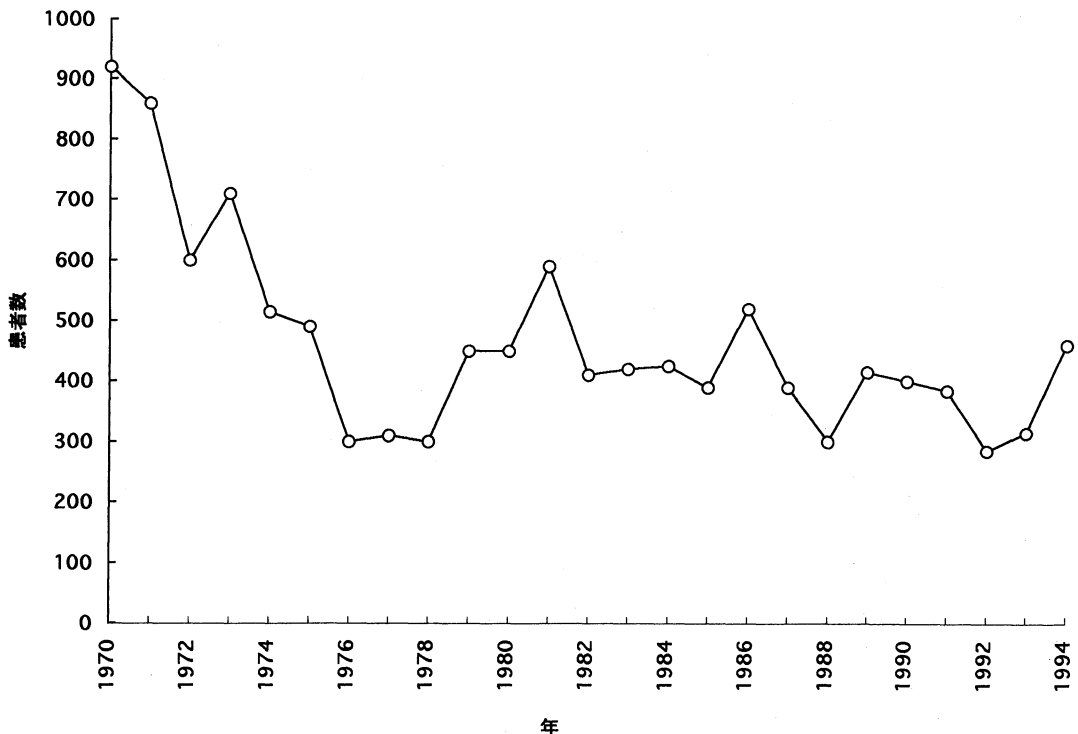


図1. トルコにおける炭疽患者数の推移 (炭疽シンポジウムより)

ユースで取り上げられたのでご記憶のある方もおられると思う。1995年2月にもやはり1名が死亡している。中国では、政府のまとめた統計によると、1994年までの5年間に、9799名の患者が報告され、致死率も平均3.6%と深刻である。これを国民の比率で考えると、百万人あたり0.0172人となる。余りにも国土が広いため正確な統計がとれておらず、実際にはもっと多いと考えられているし、動物における統計はほとんど為されていないようである。

以上、報告から抜粋した。世界各地で統計や報告の基準がまちまちで、全体像はとらえにくいですが、決して炭疽は古い病気ではないのである。島国の日本においては、十数年前には炭疽の発生が見られたが、他の感染症同様、その発生を抑えるのは容易であった。しかし、炭疽菌は40年以上も土壌中に生残することを考えると、動物一般へのリスクは常につきまとうていことをもう一度考え直さねばならないかもしれない。また、日本

周辺の国々では日常的に発生している現状を考えると、いつ、日本で炭疽が発生してもおかしくないのである。

また最近のイングランドにおける研究では、炭疽菌芽胞に対する消毒剤の効果を調べた報告があるが、*Bacillus* 属一般に消毒剤に対する抵抗性が強く、特に炭疽菌は一般的に芽胞に対して強力であると考えられているグルタルアルデヒドの5%溶液に対しても2時間後にしか殺菌されない。従って、炭疽菌の芽胞を環境中から排除することは困難であると言える。WHOは炭疽について、

“the more things change, the more they stay the same” と評している。インドネシアやジンバブエにおいて、炭疽の発生を押さえることは出来たけれど、他の国では失敗したり、何の進展も見られないという現実があり、結局全体で炭疽を見ると、炭疽の関する状況には何の変化もないというわけであろうか？ 炭疽の発生防止には、少なくとも5年間の動物への衛生対策、つまりワクチ

ン接種が必要といわれ、根本的には衛生教育の充実が必要であるという点につきるようである。しかし、財力不足がネックになっており、ヒトへの予防もままならないのに、野生動物にまでワクチン接種可能かという点もある。さらには、家畜においても、牛の炭疽は重要視される反面、豚の炭疽は軽視されるという現実もある。パスツール没後100年経っても、まだまだ炭疽は危険な感染症には変わらないようである。

### 炭疽菌の病原性について

炭疽菌の病原因子としては、毒素産生能と莢膜形成能の2つが知られている。毒素産生能は3種類の異なる蛋白、すなわち防御抗原 (protective antigen, PA と以下略; 83 KDa)、致死因子 (lethal factor, LF; 90 KDa)、浮腫因子 (edema factor, EF; 89 KDa) から成り (図2)、また、莢膜は、多くの病原菌が産生する多糖体とは異なり、D-グルタミン酸のホモポリマーから成るポリペプチドである。両者の遺伝子支配は、どちらも、強毒株の持つ140および96キロボースの大プラスミドによる (図3、図4)。それぞれ、pOX1 と pOX2 と呼ばれるが、炭疽の病原性に両者の存在が必須であることが証明されており、どちらかが脱落すると毒力が減弱することが知られている。前述のパスツールにより作られた炭疽菌の弱毒ワクチン株は、まさにプラスミドの脱落による結果であることがわかっている。(図5)。

まず始めに、現在の炭疽菌に対するワクチンについて簡単に紹介する。現在アメリカで認可されている人間用のワクチンは、The Michigan Department of Public Health において製造された水酸化アルミニウムゲルで吸収された PA が主

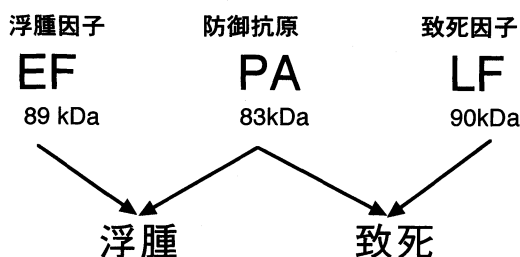


図2. 炭疽毒素成分

成分のワクチンで、MDPH-PA と呼称される。しかし、このワクチンは、何回も接種しなければならず (18カ月内に6回接種し、毎年ブースターが必要)、痛み等の副作用が起こるとともに、菌株によっては効果が低い等の問題点がある。そこで、イギリスおよびアメリカが中心となってクローン化された PA 遺伝子 (pag) を用いた新しいワクチン作りの研究が進められている。一方、動物に対してはほとんどの国で弱毒株 (毒素産生能があり、莢膜非形成変異株) の芽胞懸濁液を用いられている。M. Sterne 博士 (高齢だがまだ元気である) が作出した有名な 34F2 株で、日本でも使用されている。

### 1. 毒素産生能について

炭疽菌の毒素は、PA、LF、EF から成り、LF は実験動物に対して致死作用があり、EF は組織にエデーマを作る。PA は後述するが、両者の毒力発現に重要な役割を担っている。また、これらの構造遺伝子は、それぞれ *pag*, *lef*, そして *cya* として pOX1 プラスミド上に同定されている。毒素研究とその最近の知見は以下の通りである。

(1) 毒素どのようにして細胞内に侵入するのか? : この分野については、アメリカ NIH の S.H. Leppla 博士が精力的に仕事をしている。

まず、PA は、大半の動物細胞上のレセプターに結合する。このレセプターはまだ同定されていないが、結合した PA は、細胞表層のプロテ

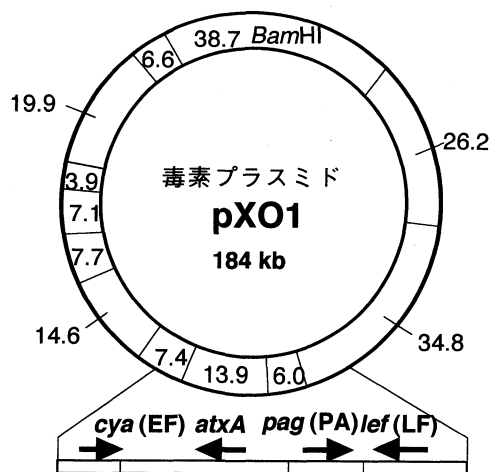


図3. 毒素プラスミド上の毒素産生関連遺伝子群

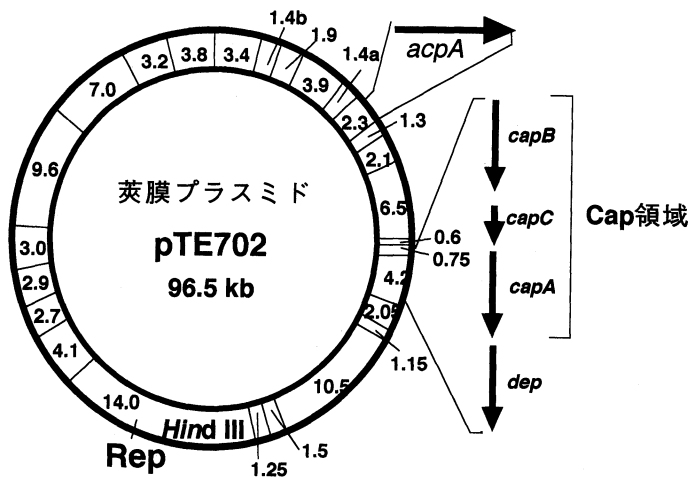


図4. 荚膜プラスミド上の荚膜形成関連遺伝子群

アーゼであるフリン (furin) (4) により一個所で切断され、細胞表層に結合したままの 63 KDa (PA63) と細胞表層から遊離する 20 KDa (PA20) に分かれる。PA63 は、LF または EF を結合してオリゴマーを作り、細胞内に取り込まれる (図6)。PA 蛋白の内、1-167 アミノ酸残基まではフリンにより切断される部分で、中央部分は、LF や EF の転移のための膜チャンネルを形成することが、変異体作成や X-線構造解析から、推定される。この領域は、*Clostridium perfringens* のイオタ毒素 (iota toxin) に一致する。C 末の 140 アミノ酸残基は、レセプターを認識する領域である

(1, 2)。それでは、LF や EF は PA にどのようにして結合するのであろうか？ LF 蛋白構造の詳しい解析の結果、LF の 1-254 アミノ酸残基までの間が、PA との結合部位であることが同定されている。この 254 アミノ酸領域と *Pseudomonas* exotoxin A (PE) 蛋白の ADP-リボシル化部分とを結合させて出来た融合蛋白は、PA が存在する時に、培養細胞内に侵入し、強い毒性を発現することが明らかとなった。この 254 アミノ酸残基部分は、ジフテリア毒素、シガ毒素、破傷風毒素の触媒部分と結合させて融合蛋白を作成しても、同じ結果が得られた。この事実は、PA の膜転移能

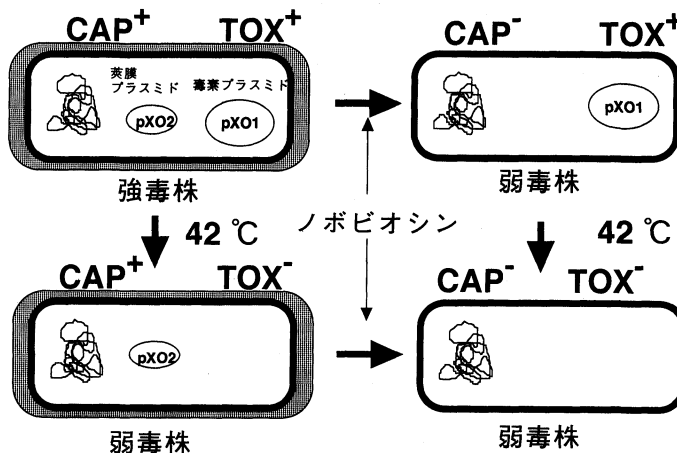


図5. 炭疽菌のプラスミド脱落と病原性

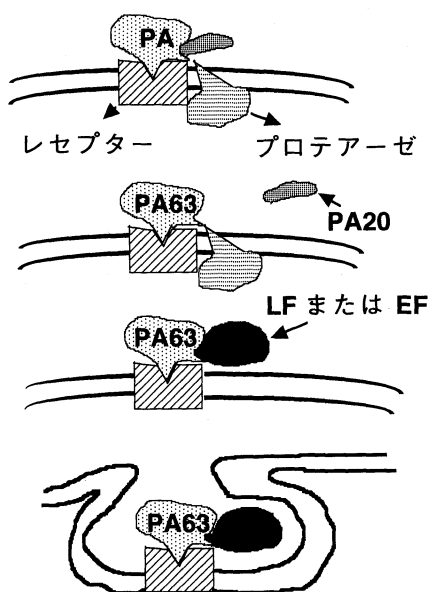


図6. 炭疽毒素の細胞内侵入モデル

が融合蛋白の毒性発現に有効であり、種々の蛋白を細胞内に蓄積可能にすることを意味している。このシステムを利用すれば、エイズや癌等の難病の治療が可能になるかもしれない。

(2) 毒素の生体内における細胞障害作用は？：LF と EF は、それぞれマクロファージと好中球の機能を阻害することが知られている。その内、LF は、亜鉛結合性のメタロプロテアーゼと考え

られている。特に注目されるのは、LF の持つマクロファージへの障害作用である。PA63 と LF のコンプレックスがマクロファージ内に侵入すると、最終的には、マクロファージは破壊される。しかしこの過程が炭疽の宿主に対する毒力の本体ではない。LF がマクロファージと接する際に、LF は大量のサイトカインの放出を誘導する。この誘導が結果的に、宿主に対して強力なトキシックショックを起こす。この過程が、LF の持つ宿主への致死的作用であり、炭疽菌の病原性の原因であると推定されている (3)。炭疽菌の発症機構を知る上で重要な成果である。

## 2. 莢膜形成能について

炭疽菌の莢膜は、D-グルタミン酸の重合体であり、免疫学的には納豆のネバネバに近いものであり、教科書的には、宿主による免疫機構、特に貪食作用から菌体を守る働きをしていると考えられている (6)。炭疽菌の莢膜において興味深い点は、①生体内において莢膜はどのように働いているのか？ ②莢膜はどのようにして合成されているのか？ 等である。

莢膜形成には、pOX2 (pTE702 と我々呼んでいる) 上の約 5 Kb 領域内の 3 種の同一転写方向を持つ遺伝子 (上流から、*capB*, *capC*, *capA*) の存在が必須である (6, 7)。どの遺伝子が不活化されても莢膜は全く合成されない。それらがどのようにして莢膜を合成するのかは明らかではな

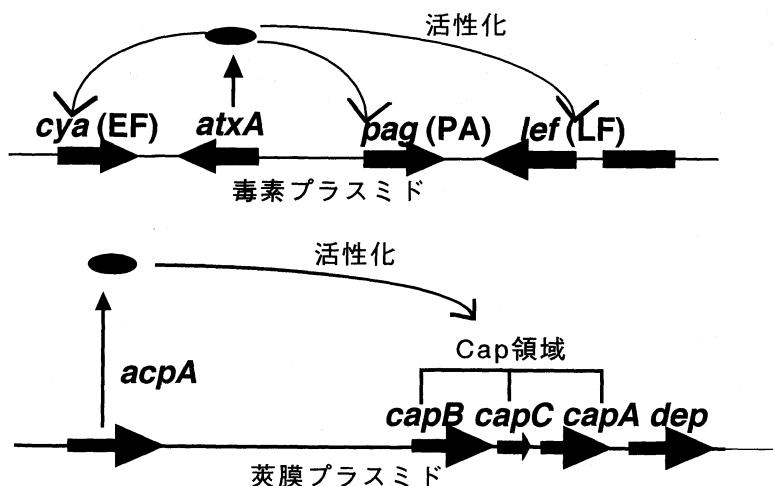


図7. 毒素および莢膜遺伝子群の発現調節

いが、菌体の膜内にて合成系が動いているものと想像されている (図7)。さらには、*capA* のすぐ下流に、やはり同一転写方向を持つ *dep* 遺伝子の存在が明らかになっている。この遺伝子産物は菌体表層の莢膜を菌体外に遊離させる働きを担っている。この働きが、炭疽の病気を起こす経路とどのように関わっているのか全く明らかではないが、炭疽の病原性を明らかにする鍵になるのではないか (8)。

### 3. 病原因子の制御機構

炭疽菌の病原因子である莢膜形成と毒素産生能は、5%以上の炭酸ガスを含む条件下において培養すると増強されることが知られている (7, 9)。この炭酸ガス効果は、3種の毒素遺伝子のみならず、莢膜形成に必須の遺伝子群に対して、転写レベルで観察されている (5, 9)。このことは、炭疽菌が、哺乳類の宿主細胞内に侵入して初めて、上記の病原遺伝子の発現が誘導されるということを意味しており、生体内における発現誘導のシグナルを感じるセンサー遺伝子の存在が強く示唆される。

毒素遺伝子群 *cya*, *pag* および *lef* は毒素プラスミド pX01 上の約 30 kb の領域内に位置し、*cya* と *pag* 間に各毒素遺伝子の発現を正に調節するトランス作用因子 (*atxA*) がある。毒素遺伝子の炭酸ガスによる発現誘導にはこの *atxA* が必須であるが、*atxA* 自身の転写は炭酸ガスの有無による影響は受けない。おそらく、炭酸ガスによる毒素遺伝子の発現誘導にはさらに他の調節因子が関与しているものと考えられる。なお、*atxA* は *pag* 上流に結合する DNA 結合蛋白であることが報告されている。

一方、莢膜プラスミド上の上記莢膜オペロンの上流約 8 Kb には、*acpA* と呼ばれる莢膜オペロンの発現を正に調節する因子がある。*acpA* も *atxA* と同様に、炭酸ガスによる莢膜オペロンの発現誘導に必須な調節因子であるが、*acpA* の場合 *atxA* とは異なり、それ自身の転写が炭酸ガスにより誘導されていることが報告されている。また、大変興味深いことに、*AtxA* と *AcpA* のアミノ酸配列に高い相同性がある (一致度26.7%, 類似度70.6%)。また、毒素遺伝子に対するトランス作用因子である *atxA* が莢膜オペロンの発現を

も正に調節する、いわゆるクロストーク現象も確認されおり (内田ら, 未発表)、これまで毒素と莢膜はそれぞれ独立した因子として考えられてきたが、両者をコードする遺伝子は、種々の調節因子を介したネットワークにより協調的に調節を受けている可能性が考えられる。

### お わ り に

1857年コッホが炭疽菌を病原菌として同定して以来一世紀半が経とうとしている。パスツールが弱毒ワクチン株を作製し、芽胞の抵抗力の強さゆえに、生物兵器の利用まで行われてきた。その間、炭疽菌は、伝染病のあらゆる面を経験して今日に至っている。炭疽菌の病原因子は、莢膜がその一つであると言われたのは、1905年の ZBL BAKT に記載されている。パスツールが弱毒ワクチン株を作製して、十数年経った頃である。それに遅れること、約20年経ち、炭疽菌の毒素の存在が報告されている。それら以外の病原因子の存在が染色体上に推定されているが、主な病原因子は今なお莢膜と毒素である。単純な因子であると思われるのに、その本体の働きについてはずっと不明のままであった。しかし、この1~2年、炭疽菌の発症機構の基礎研究が進展し始めた。その結果、両病原因子とも複雑な機構を持っていることが明らかとなってきた。病気としてはもう古いという見方もあるが、宿主-寄生体の関係から見ると、興味深い点が少ない。パスツールにすれば、100年経っても、まだこの程度しか解っていないのかと嘆くのではないだろうか? 今後とも、細々でも、炭疽菌の正体に迫る研究を続けていきたいものである。

最後に、我々の炭疽菌の一連の研究成果は、日本歯科大学教授 吉川昌之介博士、東京大学医科学研究所教授 笹川千尋博士、農林水産省家畜衛生試験場 寺門誠致博士等との共同研究の成果であることを付け加えます。

### 文 献

- 1) Arora, N., Leppla, S.H. (1993): Residues 1-254 of anthrax toxin lethal factor are sufficient to cause cellular uptake to fused polypeptides. J. Biol. Chem. **268**, 3334-3341.

- 2) Arora, N., Williamson, L.C., Leppla, S.H., Halpem, J.L. (1994): Cytotoxic effects of a chimeric protein consisting of tetanus toxin light chain and anthrax toxin lethal factor in non-neuronal cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 26165–26171.
- 3) Hanna, P.C., Acosta, D., Collier, R.J. (1993): On the role of macrophages in anthrax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10198–10201.
- 4) Klimpel, K.R., Molloy, S.S., Thomas, G., Leppla, S.H. (1992): Anthrax toxin protective antigen is activated by a cell-surface protease with the sequence specificity and catalytic properties of furin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10277–10281.
- 5) Koehler, T.M., Dai, Z., Kaufman-Yarbray, M. (1994): Regulation of the *Bacillus anthracis* protective antigen gene: CO<sub>2</sub> and a trans-acting element activate transcription from one of two promoters. *J. Bacteriol.* **176**, 586–595.
- 6) Makino, S., Sasakawa, C., Uchida, I., Terakado, N., Yoshikawa, M. (1988): Cloning and CO<sub>2</sub>-dependent expression of genetic region for encapsulation in *Bacillus anthracis*. *Mol. Microbiol.* **2**, 371–376.
- 7) Makino, S., Uchida, I., Terakado, N., Sasakawa, C., Yoshikawa, M. (1989): Molecular characterization and protein analysis of the region, which is essential for encapsulation in *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* **171**, 722–730.
- 8) Uchida, I., Makino, S., Sasakawa, C., Yoshikawa, M., Sugimoto, C., Terakado, N. (1993): Identification of a novel gene, *dep*, associated with depolymerization of the capsular polymer in *Bacillus anthracis*. *Mol. Microbiol.* **9**, 487–496.
- 9) Uchida, I., Hornung, J.M., Thorne, C.B., Klimpel, K.R., Leppla, S.H. (1993): Cloning and characterization of a gene whose product is a trans-activator of anthrax toxin synthesis. *J. Bacteriol.* **175**, 5329–5338.