

神奈川県

田辺公一、名木 稔、中山浩伸、梅山 隆、山越 智、大野秀明、宮崎義継：病原真菌 *Candida glabrata* における細胞外ステロール取り込み 第 35 回 日本分子生物学会年会 2012 年 12 月

山越 智、梅山 隆、田辺公一、金子幸弘、橋本ゆき、大野秀明、宮崎義継：*Aspergillus fumigatus* の細胞壁、分泌蛋白質 B-11 の機能解析 第 56 回 日本医真菌学会総会・学術集会 2012 年 11 月

大久保陽一郎、大野秀明、篠崎 稔、宮崎義継、根本哲生、若山 恵、栃木直文、笹井大督、石渡誉郎、中山晴雄、下平佳代子、田辺公一、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、職 玉珠、北原加奈子、山本慶郎、渋谷和俊：マウス肺クリプトコックス症モデルを用いた感染防御ならびに構築変換の解析 第 56 回 日本医真菌学会総会・学術集会 2012 年 11 月

田辺公一、梅山 隆、金子幸弘、山越 智、大野秀明、宮崎義継：*Candida glabrata* の生体内における病原因子；鉄欠乏における遺伝子発現調節 第 56 回 日本医真菌学会総会・学術集会 2012 年 11 月

田辺公一、梅山 隆、大野秀明、宮崎義継 COX 阻害剤による *Candida albicans* の抗真菌薬感受性変化と排出ポンプ発現誘導：金子幸弘、第 56 回 日本医真菌学会総会・学術集会 2012 年 11 月

田辺公一、名木 稔、山越 智、梅山 隆、大野秀明、宮崎義継：病原真菌 *Candida glabrata* の細胞外ステロール取り込み活性化機構 第 41 回 薬剤耐性菌研究会 2012 年 10 月

田辺公一、名木 稔、梅山 隆、金子幸弘、山越 智、大野秀明、宮崎義継：*Candida glabrata* の鉄欠乏における遺伝子発現調節 第 95 回 日本細菌学会 関東支部総会 2012 年 10 月

山越 智、梅山 隆、田辺公一、金子幸弘、大野秀明、宮崎義継：*Aspergillus fumigatus* 分泌蛋白質 B₁₁ の病原性の解析とサンドイッチ ELISA 系の構築 第 86 回日本感染症学会総会・学術講演会 2012 年 4 月

梅山 隆、山越 智、田辺公一、大野秀明、宮崎義継：侵襲性肺アスペルギルス症の主要原因菌 *Aspergillus fumigatus* による肺胞上皮細胞への接着と侵入 第 86 回日本感染症学会総会・学術講演会 2012 年 4 月

大野秀明、田辺公一、杉田 隆、畠山修司、大久保陽一郎、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、金城雄樹、渋谷和俊、亀井克彦、宮崎義継：北米流行型 *Cryptococcus gattii* 株の病原性、病原因子の解析—国内臨床分離株を中心に— 第 86 回日本感染症学会総会・学術講演会 2012 年 4 月

渋谷和俊、大久保陽一郎、大野秀明、宮崎義継、田辺公一、金子幸弘、山越 智、梅山

隆, 安藤常浩, 若山 恵 1 : *Cryptococcus gattii* 感染症における病理組織学的解析
第 86 回日本感染症学会総会・学術講演会
2012 年 4 月

名木 稔, 田辺公一, 山越 智, 梅山 隆, 大野秀明, 宮崎義継 : 病原真菌 *Candida glabrata* はユニークなステロールトランスポーターによりアゾール耐性となりうる
第 86 回日本感染症学会総会・学術講演会
2012 年 4 月

田辺公一, 大野秀明, 梅山 隆, 山越 智, 知花博治, 宮崎義継 : 我が国のキャンディン耐性 *Candida glabrata* 株の遺伝子解析
第 60 回日本化学療法学会学術集会 2012 年 4 月

堀野敦子, 山根一和, 柴山恵吾, 阿戸 学 : LAMP 法による *Burkholderia pseudomallei* と *Burkholderia mallei* の検出 日本細菌学会第 86 回総会, 2013 年 3 月, 千葉県

安藤秀二 : マダニと感染症の話, ペストコントロール協会講習会講演, 2012 年 11 月 13 日, 東京

安藤秀二 : リケッチア感染症について〜つが虫病, 日本紅斑熱を中心に, 輸入症例 (海外のトピックス) を含めて, 平成 24 年度動物由来感染症技術研修会, 2012 年 11 月 2 日, 東京

岸田直樹, 安藤秀二, 久保光司 ; 北海道で初めての診断となった国内 5 例目となる African Tick Bite Fever の一例, 第 61 回

日本感染症学会東日本地方会学術集会,
2012 年 10 月 10 日~12 日, 東京

原崎多代, 大屋賢司, 関塚剛史, 奥田秀子, 安藤秀二, 黒田誠, 福士秀人 ; クラミジア肺炎およびオウム病を鑑別するマルチプレックス PCR 法の開発. 第 154 回日本獣医学会, 平成 24 年 9 月 14~16 日, 盛岡

大屋賢司, 黒田誠, 関塚剛史, 奥田秀子, 安藤秀二, 福士秀人 ; 動物クラミジアを検出する LAMP 法の開発. 第 154 回日本獣医学科, 平成 24 年 9 月 14~16 日, 盛岡

佐藤正明, 小川基彦, 安藤秀二 ; *Chlamydia trachomatis* の ML S 解析に関する検討, 第 30 回日本クラミジア研究会, 平成 24 年 9 月 8 日, 東京

大屋賢司, 黒田誠, 関塚剛史, 奥田秀子, 安藤秀二, 福士秀人 ; 動物クラミジアを検出する LAMP 法の開発. 第 30 回日本クラミジア研究会, 平成 24 年 9 月 8 日, 東京

藤澤智美, 藤田博己, 角坂照貴, 安藤秀二, 高野愛, 小笠原由美子, 川端寛樹, 清島真理子 ; *Rickettsia africae* による旅行者感染の一例, 第 20 回ダニと疾患のインターフェース, 平成 24 年 7 月 6~8 日, 徳島県阿南市

安藤秀二, 山内悠子, 竹下望, 藤澤智美, 清島真理子, 堀田剛, 清水恒広, 高城一郎, 岡山昭彦, 阪本直也, 中村ふくみ, 大西健児 ; 実験室診断で経験した多様なリケッチ

ア症，第 86 回日本感染症学会，平成 24 年 4 月 25～26 日，長崎

高城一郎，金子裕美，坂口翔太，川口剛，宮内俊一，梅北邦彦，上野史朗，楠本規生，長友安弘，安藤秀二，岡山昭彦；インドからの輸入感染症と考えられた新規リケッチア症の一例，第 86 回日本感染症学会，平成 24 年 4 月 25～26 日，長崎

中島隆弘，清水恒広，堀田剛，安藤秀二；南アフリカ滞在中に感染し来日後に発症した地中海紅斑熱のブラジル人症例，第 86 回日本感染症学会，平成 24 年 4 月 25～26 日，長崎

伊藤（高山）睦代，中道一生，山口（木下）一美，王 麗欣，林 昌宏，西條政幸．Establishment of the in vitro test for residual virulent rabies virus in inactivated rabies vaccines. 第 11 回狂犬病研究会．東京都，2012 年 4 月．

林 昌宏，網 康至，藤井克樹，北浦一孝，モイ メンリン，白井顕治，小滝 徹，須崎百合子，森川 茂，西條政幸，鈴木隆二，倉根一郎，高崎智彦：マーモセットを用いたチクングニアウイルスの霊長類モデルの検討，第 60 回日本ウイルス学会学術集会（大阪市）2012 年 11 月 13-15 日．

林 昌宏，網 康至，藤井克樹，北浦一孝，モイ メンリン，白井顕治，小滝 徹，須崎百合子，森川 茂，西條政幸，鈴木隆二，倉根一郎，高崎智彦：マーモセットを用いたチクングニアウイルスの霊長類モデルの検

討，第 60 回日本ウイルス学会学術集会（大阪市）2012 年 11 月 13-15 日．

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Ⅱ. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費 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

新興アレナウイルスに対応可能なウイルス抗原検出法の開発に関する研究

研究分担者 森川 茂 国立感染症研究所獣医科学部

研究要旨： ヒトに高い病原性を示すアレナウイルスの多くは BSL4 病原体に分類され、バイオテロ以外にも輸入動物を介して国内にウイルスが侵入する可能性もある。2008 年に致死率が 80%(患者 5 名中 4 名が死亡)のウイルス性出血熱がザンビアと南アフリカで発生した。その患者から新種の旧世界アレナウイルスに分類される Lujo (ルジョ) ウイルスが分離同定された。さらに、2011 年ザンビアでげっ歯類(*Mastomys natalensis*) から新種の旧世界ウイルス Luna (ルナ) ウイルスが分離されたことから、アレナウイルス科の未知のウイルスがいまだ数多く存在する可能性がある。本研究では、このような新種アレナウイルスなども検出可能な手法を開発するために、アレナウイルス N 蛋白の高度保存領域に対する抗体を作製した。これらは、ELISA でルジョウイルス、ルナウイルスを含むアレナウイルスの N 蛋白に広く交差反応性を示した。本領域を抗体作製の標的とすることは、新種、新型のアレナウイルスをもれなく検出できる技術の確立につながることを期待できる。

研究協力者： 福士秀悦、吉河智城、谷英樹、谷口怜、伊波興一朗、下島昌幸、西條政幸（国立感染症研究所ウイルス第一部）、高田礼人（北大人獣共通感染症リサーチセンター）

A 研究目的

ヒトに高い病原性を示すアレナウイルスの多くは BSL4 病原体に分類され、バイオテロ・犯罪に使われるおそれのある生物剤に含まれる。2008 年に致死率が 80%

(患者 5 名中 4 名が死亡)のウイルス性出血熱がザンビアと南アフリカで発生し、その患者から新種の旧世界アレナウイルスに分類される Lujo (ルジョ) ウイルスが分離同定された。さらに、2011 年ザンビアにおいて、げっ歯類(*Mastomys natalensis*) から新種の旧世界アレナウイルスである Luna (ルナ) ウイルスが分離されたことから、アレナウイルス科の未知のウイルスがいまだ数多く存在する可能性がある。このような新興アレナウイ

ルスに対応可能なウイルス検出技術を確立することは、バイオテロ対策上重要な課題である。アレナウイルスはウイルス株間の遺伝子変異が極めて多く、現在まで新種、新型のアレナウイルスを漏れなく検出可能なRT-PCR法は開発されていない。ルジヨウイルスは、同じ旧世界アレナウイルスであるラッサウイルスとも遺伝的、血清学的にもかなり異なるため、ウイルス発生時には同定に時間がかかっている。分離同定された新興アレナウイルスに関しては、その都度新規ウイルス検出法や血清診断法が整備されている。このため、新興アレナウイルス発生時にヒトや宿主動物の疫学的解析ができず、根本的な対応ができていない。バイオテロに新興アレナウイルスが使用されると、原因が特定できない可能性が高い。そこで、本研究では、新興アレナウイルスも検出可能な手法を開発することを目的とする。平成23年度はアレナウイルス間で広く保存されているN蛋白質領域のペプチド抗体を作製し、各種アレナウイルス間での交差反応性を明らかにした。平成24年度は、作製した抗体により、新種のアレナウイルスである、ルジヨウイルス、ルナウイルスが検出できるか検討した。また、抗原の改良を行ない、全てのアレナウイルスを検出可能な抗体作製について検討した。

B 研究方法

組換えバキュロウイルスを用いた各種アレナウイルス NP 抗原の調製：

平成23年度検討に用いた旧世界アレナウイルスのラッサウイルス (LASV)、ルジヨウイルス(LUJV)、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)に加え、今年度は2011年ザンビアにおいて分離されたルナウイルス(LUNV)の組換え NP をバキュロウイルス発現システムで調製した。新世界アレナウイルスの南米出血熱の原因ウイルスであるフニンウイルス(JUNV)、ガナリトウイルス(GTOV)、サビアウイルス (SABV)、マチュポウイルス(MACV)、チャパレウイルス(CHPV)の組換え NP も同様に調製した。陰性コントロール抗原として組換え蛋白質を発現しないバキュロウイルス(Δ P)を用いて組換え NP と同様の手法で調製した(図1)。これらの抗原を用いてIgG-ELISAを行ない、抗体との反応性を解析した。

免疫抗原の調製と抗血清の作製：

平成23年度に作製したLASV NP のアミノ酸297-311位および311-324位のペプチドに対する抗体に加え(それぞれ peptide 297 - 311 および peptide 311 - 324)、今年度は、新たにLCMVのNPのアミノ酸311 - 324位[peptide 311 - 324 (LCMV)]に対する抗ペプチド抗体を作製した。また、LASV NP のアミノ酸310 - 321位および、アミノ酸310 - 323位を、GST融合蛋白質として大腸菌で発現させた。

C 結果

ペプチド抗体と各種アレナウイルス NP との反応性：

LASV NP のアミノ酸 297 - 311 位および、311 - 324 位のペプチド (図 2) を化学合成し、ウサギに 6 回免疫した。得られた血清を用いて、旧世界アレナウイルスの LUNV、LASV、LUJV、LCMV、新世界アレナウイルスの南米出血熱の原因ウイルスである JUNV、GTOV、SABV、MACV、CHPV の NP との反応性を IgG-ELISA で調べた(図 3)。その結果、抗 peptide 297 - 311 抗体は IgG-ELISA での反応が弱かった。一方、抗 peptide 311 - 324 抗体は、LCMV NP 以外のアレナウイルス NP に強く反応し、新種の旧世界アレナウイルスであるルナウイルスにも強く反応した。peptide 311 - 324 のアミノ酸配列を比較すると₃₁₁CLSGDGWPYIASRT₃₂₄ のアミノ酸 322 位の S が LCMV だけ C であることから、322 位のアミノ酸が抗 peptide 311 - 324 抗体との反応に重要であると考えられた(図 2)。LCMV を含むすべてのアレナウイルスに反応する抗体を作製するため、LCMV NP のアミノ酸配列 311 - 324 位のペプチド [peptide 311 - 324 (LCMV)] を作製しウサギ抗血清を作製したが、IgG-ELISA では反応が見られなかった(図 3)。

D 考察

現在まで、新興アレナウイルスの遺伝子組換え蛋白等を用いて血清診断、病原診断法を開発されているが、旧世界、新世界アレナウイルスを広く検出可能な抗体は無い。抗原性の交差が最も認められる NP を高度免疫したウサギ血清でも新世界と旧世界アレナウイルスに交差せず、出血熱の回復患者血清でもウイルス種間の交差はあまり認められない。

本研究では、高度にアレナウイルス間で保存された NP 領域ペプチドの抗血清を作製し、各種アレナウイルス NP との反応性を解析した。抗 peptide 311 - 324 抗体は、LCMV を除く全ての出血熱原因アレナウイルス及び、2011 年に発見された新種の旧世界アレナウイルスであるルナウイルスにも強く反応した。このことから、本領域を抗体作製の標的とすることは、新種、新型のアレナウイルスをもれなく検出できる技術の確立につながると期待できる。

LCMV を含むすべてのアレナウイルスに反応する抗体を作製するため、LCMV NP のアミノ酸配列 311 - 324 位のペプチド [peptide 311 - 324 (LCMV)] を作製しウサギ抗血清を作製したが、IgG-ELISA では反応が見られなかった。このため、ラッサウイルス NP のアミノ酸 310-321 位 (Lassa NP 310 - 321) および、アミノ酸 310-323 位(Lassa NP 310 - 323 LCM-adapt) を GST 融合蛋白質として大腸菌で発現させた (図 4)。今後、これらに対する抗血清を作製し、LCMV を含むすべてのア

レナウイルスに幅広く反応するかどうか検討予定である。

E 結論

(1) アレナウイルスの NP に高度に保存される部位のペプチドに対する抗体

(抗 peptide 311-324 抗体) は LCMV NP 以外のアレナウイルス NP に強く反応し、新種の旧世界アレナウイルスであるルナウイルスにも強く反応することが明らかになった。この抗体を用いた新興アレナウイルス等の検出系の有用性について今後検討したい。

(2) LCMV を含むすべてのアレナウイルスに反応する抗体を作製するため、新たに抗原を調製した。今後、これらに対する抗血清を作製し、LCMV を含むすべてのアレナウイルスに反応するかどうか検討予定である。

F 研究発表

1 論文発表

- 1) Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzaki Y, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Fukushi S, Mizutani T, Yoshikawa T, Otsuki N, Kurane I, Komase K, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Takeda M, Morikawa S. Lethal Canine Distemper Virus Outbreak in Cynomolgus Monkeys in Japan in 2008. *J Virol.* 87:1105-1114, 2012.
- 2) Sayama Y, Demetria C, Saito M, Azul RR, Taniguchi S, Fukushi S, Yoshikawa

T, Iizuka I, Mizutani T, Kurane I, Malbas FF Jr, Lupisan S, Catbagan DP, Animas SB, Morales RG, Lopez EL, Dazo KR, Cruz MS, Olveda R, Saijo M, Oshitani H, Morikawa S. A seroepidemiologic study of Reston ebolavirus in swine in the Philippines. *BMC Vet Res.* 18;8:82, 2012.

- 3) Taniguchi S, Sayama Y, Nagata N, Ikegami T, Miranda ME, Watanabe S, Iizuka I, Fukushi S, Mizutani T, Ishii Y, Saijo M, Akashi H, Yoshikawa Y, Kyuwa S, Morikawa S. Analysis of the humoral immune responses among cynomolgus macaque naturally infected with Reston virus during the 1996 outbreak in the Philippines. *BMC Vet Res.* 11;8(1):189, 2012.

- 4) Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Saijo M and Morikawa S. Serological Assays Based on Recombinant Viral Proteins for the Diagnosis of Arenavirus Hemorrhagic Fevers. *Viruses* 4. 2097-2114. 2012.

- 5) Lihoradova O, Kalveram B, Indran SV, Lokugamage N, Juelich TL, Hill TE, Tseng CT, Gong B, Fukushi S, Morikawa S, Freiberg AN, Ikegami T. The Dominant-negative Inhibition of dsRNA-dependent Protein Kinase PKR Increases the Efficacy of Rift Valley Fever Virus MP-12 Vaccine. *J Virol.* 86, 7650-7661. 2012.

2 学会発表

- 1) Hideki Tani, Koichiro Iha, Shuetsu Fukushi, Satoshi Taniguchi, Tomoki Yoshikawa, Masayuki Saijo, and Shigeru Morikawa. Analysis of cell entry of New and Old World arenaviruses using pseudotyped viruses bearing their envelope proteins. XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria, Rio de Janeiro, Brazil. September 23-27,2012.
- 2) Kie Yamamoto, Koichiro Iha, Christine Bruce, Stuart D. Dowall, Satoshi Taniguchi, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Yoshiyuki Ishii, Shigeru Kyuwa, Roger Hewson, Masayuki Saijo, and Shigeru Morikaw. Serological assays based on recombinant viral proteins for the diagnosis of viral hemorrhagic fevers caused by arenaviruse. XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria, Rio de Janeiro, Brazil. September 23-27,2012.
- 3) 谷英樹、伊波興一朗、谷口怜、吉河智城、福士秀悦、西條政幸、森川茂 シュードタイプ VSV を用いたルジョウウイルスの細胞侵入機構の解析 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月 13 日から 15 日、大阪
- 4) 酒井宏治、關文緒、網康至、田原舞乃、中津祐一郎、大槻紀之、福原秀雄、福士秀悦、吉河智城、西條政幸、森川茂、前仲勝実、山口良二、駒瀬勝啓、竹田

誠 カニクイザルで致死的感染症を起こしたジステンバーウイルスのサルレセプターの効率的な利用；ジステンバーウイルスはヒトへの脅威となり得るか？第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月 13 日から 15 日、大阪

- 5) 谷口怜、佐山祐輔、永田典代、飯塚愛恵、谷英樹、吉河智城、福士秀悦、西條政幸、久和茂、森川茂 レストンエボラウイルス自然感染カニクイザルにおける免疫応答の解析 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月 13 日から 15 日、大阪
- 6) 福士秀悦、新倉 綾、谷 英樹、吉河智城、伊波興一朗、谷口 怜、緒方もも子、西條政幸、森川 茂 日本のマダニ類における新種のブニヤウイルス (SFTSV) 保有調査と SFTSV 血清学的診断法の開発 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月 13 日から 15 日、大阪

G 知的財産権の出願・登録状況

現在出願予定はない。

図1 組換えバキュロウイルスを用いた各種アレナウイルス NP 抗原の調製

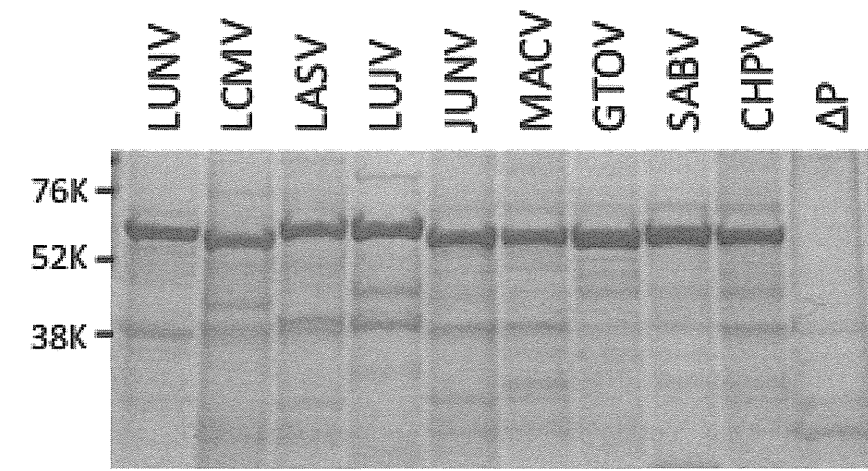
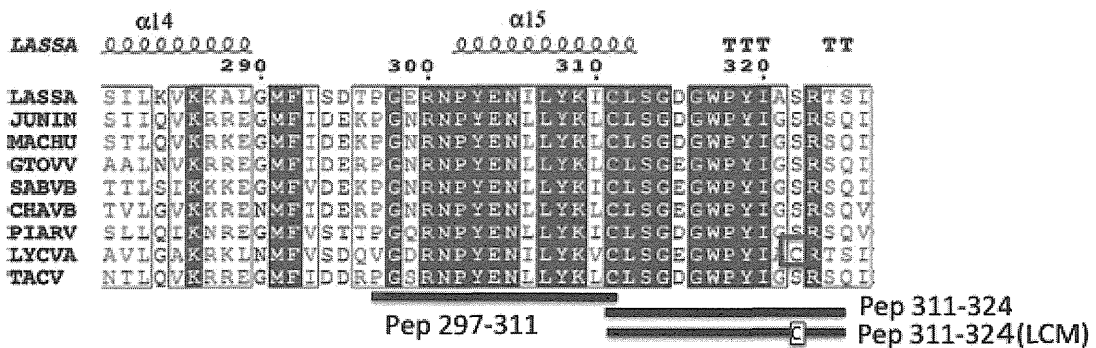


図2 アレナウイルスの高度保存領域と合成ペプチド



厚生労働科学研究費 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

人獣共通感染症（炭疽、狂犬病等）に対するヒト検体および感染源検体を用いた迅速検査、消毒、その標準化等に関する研究

研究分担者：井上 智 国立感染症研究所獣医科学部、室長

研究協力者：奥谷晶子 国立感染症研究所獣医科学部、主任研究官
：黒田誠 国立感染症研究所病原体ゲノム解析センター、センター長
：関塚剛史 国立感染症研究所病原体ゲノム解析センター、主任研究官

研究要旨：近年わが国で発生がないものの、バイオテロに使用される可能性のある炭疽や狂犬病等の動物由来感染症では、希少発生事例（輸入感染症等）に対する迅速な原因病原体の証明と侵入経路等の特定が公衆衛生上の大きな課題である。平成 18 年の輸入狂犬病では狂犬病ウイルスのゲノムを系統解析して侵入経路の特定を容易にした。本研究では遺伝的変異が少ないとされる炭疽菌について簡易な遺伝学的タイピング法を確立することを検討した。昨年度、モンゴルで分離された炭疽菌株に特異的な 12 箇所の SNP (Single Nucleotide Polymorphism) を特定して 12SNP タイピング法を確立した。今年度は、National Center for Infectious Disease with Natural Foci (NCIDNF) の協力を得て動物および環境由来のモンゴル分離株を 14 株追加して確立した 12SNP タイピングについて追加検討を行った。結果、モンゴル株は大きく 4 つのクラスターに分かれ、それぞれに地域特性のあることが示された。今後、ヒト患者・発症動物・環境由来の炭疽菌株を入手して 12SNP タイピングの解像度等を明らかにして、発生事例の解析を並行して感染源・汚染地域の推定等における有効性を検討していく。

A. 研究目的

近年わが国で発生がないものの、バイオテロに使用される可能性のある炭疽や狂犬病等の動物由来感染症では、希少発生事例（輸入感染症等）に対する迅速な原因病原体の証明と侵入経路等の特定が公衆衛生上の大きな課題である。

本研究では、遺伝的変異が少ないとされる炭疽菌について簡易な遺伝学的タイピング法を確立して、ヒト患者・発症動物・環境由来の炭疽菌株について、発生事例の感染源・汚染地域の推定等を簡易かつ容易に行える遺伝子型別法を確立することが目的である。

B. 研究方法

昨年度、モンゴルでの分離地域と土壌・動物を網羅する 8 株の炭疽菌フルゲノムデータを用いて、モンゴル分離株に特異的な 148 箇所の SNP から、代表的な SNP パターンとして 12 箇所の SNP を選択した。

今年度は、動物及び土壌由来のモンゴル分離株 14 株を利用して 12SNP タイピングを行うために必要な PCR プライマーセットを作成して、各 PCR 増幅産物の塩基配列を解読し SNP 特定を行った。

特定した SNP による 12 塩基の疑似配列を作成して、Clustal W 解析を行い MEGA

version 5 を用いて Neighbour-Joining Tree method (Bootstrap、1000 回) による系統解析を行った。

C. 研究結果

アミノ酸の非同義置換が生じている SNP を 12 箇所特定するための PCR プライマーは供与菌株の全てを増幅することができ、系統解析を行ったところモンゴル株は大きく 4 つのクラスターに分かれた (図 1 と図 2)。

昨年度フルゲノム解析を行った 8 株と併せて合計 22 株中、10 株について 12SNP 全てが同一の配列であることが明らかとなった。これらの菌株は分離の年・地域・由来が多岐に渡ってはいるがモンゴルで分離される炭疽菌の分子系統樹において主要なクラスター (②) であることが示唆された。

砂漠地帯のゴビアルタイおよびウブハンガイ地方から分離される菌株が固有のクラスター (③) を形成しているが、菌株数を増やして砂漠地帯固有のクラスターであるかを特定する必要があると考えられた。また、首都ウランバートルや都市化された地域で分離される菌株で構成されたクラスター (①) を見出したが、都市部周辺地域から分離された菌株が構成するクラスター (④) と独立していることが分かった。近年、モンゴルでは家畜が都市部周辺で多く飼育されており、これらの社会情勢を反映した可能性があり、疫学的にも今後注目すべきクラスターと考えられた。

D. 考察

近年わが国で発生がないものの、バイオテロに使用される可能性のある炭疽や狂犬病等の動物由来感染症では、希少発生事例 (輸入感染症等) に対する迅速な原因病原体の証明と侵入経路等の特定が公衆衛生上の大きな課題である。

昨年度、モンゴルで分離された炭疽菌株に

特異的な 12 箇所の SNP (Single Nucleotide Polymorphism) を特定して 12SNP タイピング法を構築し、今年度は National Center for Infectious Disease with Natural Foci (NCIDNF) の協力を得て動物および環境由来のモンゴル分離株を 14 株追加して 12SNP タイピング法の追加検討を行い、モンゴル株が大きく 4 つのクラスターに分かれてそれぞれに地域特性のあることが示された。

今後、ヒト患者・発症動物・環境由来の炭疽菌株を入手して 12SNP タイピングの解像度を明らかにして、発生事例を利用した解析を並行して感染源・汚染地域の推定等についてその有効性を検討していく。

E. 結論

12SNP タイピングによって、遺伝的変異が少ないとされる炭疽菌を簡易に遺伝学的タイピングする方法を可能にした。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kaku Y., Noguchi A., Hotta K., Yamada A., Inoue S. (2011) Inhibition of rabies virus propagation in mouse neuroblastoma cells by an intrabody against the viral phosphoprotein. *Antiviral Res.* 91:64-71.

Kaku Y., Noguchi A., Marsh G. A., Barr J. A., Okutani A., Hotta K., Bazartseren B., Fukushi S., Broder C. C., Yamada A. and Inoue S., Wang L.-F. (2012) Second generation of pseudotype-based serum neutralization assay for Nipah virus

antibodies: Sensitive and high-throughput analysis utilizing secreted alkaline phosphatase. J. Virol. Methods 179:226-232.

Kaku, Y., Noguchi, A., Marsh, A. G., Barr, A. J., Okutani, A., Hotta, K., Bazartseren, B., Broder, C. C., Yamada, A., Inoue, S., and Wang, L.-F. (2012) Antigen capture ELISA system for henipaviruses using polyclonal antibodies obtained by DNA immunization. Arch. Virol. 157:1605-1609.

2. 学会発表

奥谷晶子。アジアにおける炭疽の発生状況と遺伝学的解析について。シンポジウム：忍び寄る人獣共通病原体。第 86 回日本細菌学会総会、2013 年 3 月、千葉県

奥谷晶子、井上 智。アジアにおける炭疽の発生状況と遺伝学的タイピング。特集：人と動物の共通感染症最前線 9。獣医畜産新報 (JVM)。65:374-376、2012

加来義浩、野口章、濱本紀子、Boldbaatar Bazartseren、佐藤 豪、森川 茂、井上 智。分泌型アルカリフォスファターゼ発現 VSV シュードタイプを利用した狂犬病ウイルス中和試験法の開発。第 154 回日本獣医学会学術集会、2012 年 9 月、岩手大学、岩手県

李 松熹、河原 正浩、加来義浩、井上 智、上田 宏、長棟輝行。細胞増殖を指標とした抗狂犬病ウイルス P 蛋白質細胞内抗体の直接選択 (Direct selection of intracellular antibodies against rabies virus phosphoprotein based on cell proliferation)。第 64 回日本生物工学会大会、2012 年 10 月 23 日-26 日、神戸国際会議場、神奈川県

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

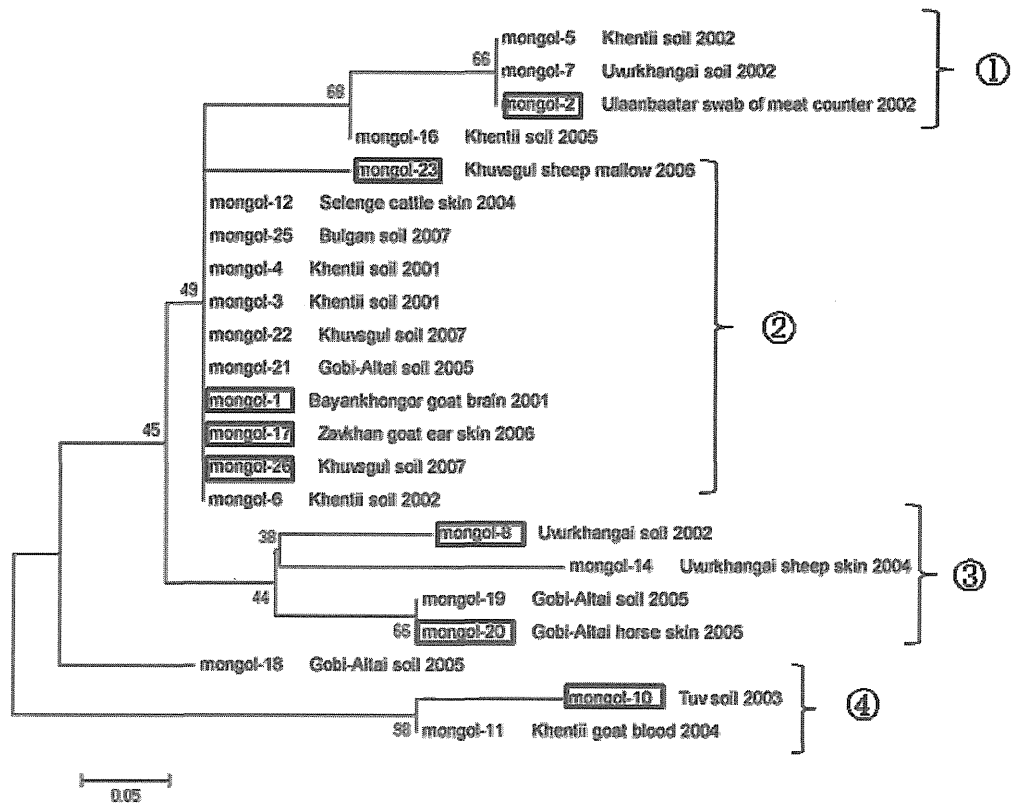
2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

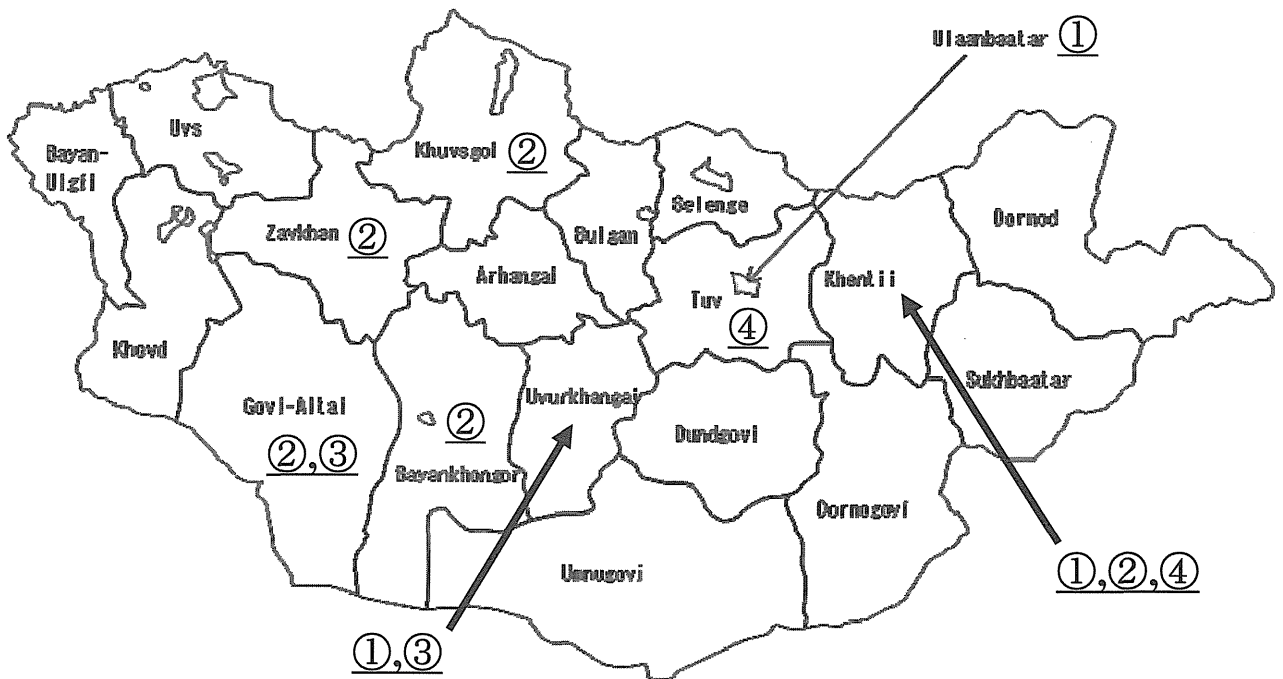
図1. 12SNPタイピングによるモンゴル分離株の系統樹 (NJ tree)



フルゲノム解析した菌株

クラスター: ①②③④

図2. 12SNPタイピングで分類されたクラスター (①②③④) の分布地域



厚生労働科学研究費 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

人獣共通感染症（炭疽、狂犬病等）に対するヒト検体および感染源検体を用いた迅速検査、消毒、その標準化等に関する研究

2. *Bacillus anthracis*に対する次亜塩素酸ナトリウムの殺芽胞効果

分担研究者： 井上 智 （国立感染症研究所獣医科学部 第二室 室長）

研究協力者： 尾家 重治 （山口大学医学部附属病院薬剤部 准教授）
山崎 博史 （山口労災病院薬剤部）
奥谷 晶子 （国立感染症研究所獣医科学部 第二室）

研究要旨 炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) の芽胞を用いて、消毒薬の殺芽胞効果を検討した。まず、0.1% (1,000ppm) 次亜塩素酸ナトリウムの殺滅効果について検討したところ、殺滅に30分の時間を要した。次に、同菌に対し酢添加の0.1% (1,000ppm) 次亜塩素酸ナトリウムの殺滅効果を検討したところ15秒以内に殺滅した。酢添加の次亜塩素酸ナトリウムのほうが次亜塩素酸ナトリウム単剤に比べてはるかに強い殺滅効果を示すことが判明した。

A. 研究目的

消毒薬にもっとも抵抗性を示す微生物として芽胞があげられる。その中でバイオテロ関連微生物としてあげられる *Bacillus anthracis* の芽胞産生菌の消毒薬抵抗性についてのデータは少ない。そこで、汎用消毒薬であり、かつ殺芽胞効果を示す次亜塩素酸ナトリウムを用いて、*Bacillus anthracis* の芽胞に対する殺滅効果について検討した。

B. 研究方法

1. 供試薬剤

次亜塩素酸ナトリウム製剤としてミルトン1.1%（杏林製薬 K.K.）を用いた。酢は穀

物酢（酸度 4.2%, K.K. ミツカン）を用いた。また、次亜塩素酸ナトリウムの不活性化剤として 0.5%チオ硫酸ナトリウム（片山化学工業 K.K.）含有のブイヨン液（栄研化学 K.K.）を用いた。

2. 供試菌

供試菌として *B. anthracis* 34F2 を用いた。*B. anthracis* の芽胞の調製は次のように行った。Nutrient Agar に -80°C ストックから塗沫し 32°C で 5 日間培養した。5ml の冷滅菌水を寒天培地上に重層し 30 分間静置した。水層をかきとり、15ml チューブ 3 本に回収し 3000rpm で 4°C 10 分間遠心した。上清を捨て各 1ml の冷滅菌水に懸濁した。85°C で 20 分間、5 分おきにタッピングでよく混ぜ、栄養型細胞を死滅させた。10000rpm で 4°C、1

分間遠心し、上清を捨てた。冷滅菌水を加えて洗浄(10000rpmで4℃、1分間)を2回繰り返して芽胞液とした。最終的に1mL当り 6×10^9 colony forming units(cfu)レベルの芽胞液を得た。

3. *B. anthracis* の芽胞に対する次亜塩素酸ナトリウムおよび酢添加の次亜塩素酸ナトリウムの殺滅効果

B. anthracis の芽胞に対する0.1%次亜塩素酸ナトリウム、および1%次亜塩素酸ナトリウム：水：酢=1：8：1の混合液（以下、「酢添加の0.1%次亜塩素酸ナトリウム」と略す）の殺滅効果の検討は、室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ の室内で次のように行った。すなわち、芽胞液0.1mLを0.1%次亜塩素酸ナトリウム0.9mLまたは酢添加の0.1%次亜塩素酸ナトリウム0.9mLへ注加し、5秒間攪拌後に経時的に0.1mLずつを採取して、ただちに0.5%チオ硫酸ナトリウム含有のブイヨン液0.9mLに加えた。そして、5秒間攪拌して10分間放置後に生菌数の測定を行った。生菌数測定は、滅菌生理食塩水を用いる10倍段階希釈法により、普通寒天培地で $37^\circ\text{C} \cdot 48$ 時間培養して行った。なお、0.5%チオ硫酸ナトリウム含有のブイヨン液で不活性化した0.1%次亜塩素酸ナトリウムが、芽胞の生菌数測定に影響を及ぼさないことを前もって確認した。また、実験は2回繰り返して行い、その平均値を算出した。

C. 研究結果

表1に、*B. anthracis* の芽胞に対する0.1%次亜塩素酸ナトリウムおよび酢添加の0.1%次亜塩素酸ナトリウムの殺滅効果を示した。0.1%次亜塩素酸ナトリウムは、*B. anthracis* の芽胞を30分間以内に殺滅した。また、酢

添加の0.1%次亜塩素酸ナトリウムは、*B. anthracis* の芽胞を15秒間以内という短時間で殺滅した。

D. 考察

B. anthracis の芽胞に対する次亜塩素酸ナトリウムを用いた消毒法の実験で、酢添加の0.1%次亜塩素酸ナトリウムのほうが0.1%次亜塩素酸ナトリウム単剤に比べてはるかに強い殺滅効果を示すことより、酢添加の0.1%次亜塩素酸ナトリウムは、*B. anthracis* の芽胞に対し有効な消毒法であることが推定できた。今後は*B. anthracis* の芽胞に対する他の消毒薬(0.3%過酢酸、2%グルタール)の殺芽胞効果、および、同属の芽胞細菌(*Bacillus mycoides*, *Bacillus cereus*)に対し消毒薬の殺芽胞効果の検討を加えていく予定である。

E. 結論

B. anthracis の芽胞に対し、酢添加の0.1%次亜塩素酸ナトリウムのほうが0.1%次亜塩素酸ナトリウム単剤に比べてはるかに強い殺滅効果を示した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

表1. *Bacillus anthracis* 34F2の芽胞に対する次亜塩素酸ナトリウムおよび酢添加の次亜塩素酸ナトリウムの殺滅効果(22±2°C)

	芽胞数 (cfu/mL)								
	0 s	15 s	30 s	1 m	5 m	10 m	20 m	30 m	60 m
0.1%次亜塩素酸ナトリウム	8.4X10 ⁸	NT	NT	4.4X10 ⁷	2.7X10 ⁷	3.8X10 ⁶	2.1X10 ³	2.1X10 ²	<10
酢添加の0.1%次亜塩素酸ナトリウム	8.4X10 ⁸	<10	<10	<10	<10	NT	NT	NT	NT
10倍希釈の酢	8.4X10 ⁸	NT	NT	2.9X10 ⁷	NT	NT	NT	NT	3.2X10 ⁷

NT: 試験せず

厚生労働科学研究費 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

「ボツリヌス菌・毒素の検査法の改良」

研究分担者 見理 剛 国立感染症研究所 細菌第二部

要旨：ボツリヌス毒素 (BoNT) の迅速で簡便な検出法を確立するため、A、C、E 型の BoNT によって切断される SNAP25 タンパク質を遺伝子組換えで作製し、これを基質として BoNT の活性を検出するシステムを構築した。A 型と E 型の精製 BoNT でこのシステムを評価したところ、100 マウス LD₅₀/ml の BoNT 活性を約 3 時間で検出できた。A 型と E 型の BoNT 活性を区別することも可能だった。

A. 研究の目的

ボツリヌス菌が生産するボツリヌス神経毒素 (BoNT: Botulinum neurotoxin) は、自然界で最も強力な毒素とされ、バイオテロリズムで使用されうる物質として警戒されている。BoNT の本体はタンパク質を切断するエンドペプチダーゼであり、神経細胞に取り込まれて SNARE と呼ばれるタンパク質群を特異的に切断する。SNARE タンパク質群が切断された神経細胞は神経伝達物質を放出できなくなるので、個体レベルでは神経遮断による強い麻痺症状が出現し、死に至ることもある。BoNT には A から G の 7 種の血清型が知られており、それぞれが作用する SNARE タンパク質は異なっている。A、C、E 型の BoNT は SNARE のうち SNAP25 と呼ばれるタンパク質を切断し、B、D、F、G 型は synaptobrevin を切断する。C 型の BoNT は syntaxin

も切断する。

BoNT の簡便、迅速な検出法を整備することは、バイオテロリズム対策として有効な手段であると考えられる。現在、BoNT の検出法で最も信頼されるのはマウスを使用するバイオアッセイ法であり、BoNT が含まれる検体を注射したマウスに現れる麻痺症状を観察して判定を行う。検出感度は 1 マウス LD₅₀/ml 程度 (ヒトの致死量の約数万分の 1 : 精製した A 型 BoNT の場合で約 5-100 pg 程度) であり、検出所要時間は数時間から 1 日である。マウス法は、特異性、感度ともに非常に優れた方法であるが、マウスを使用する実験動物設備が必要であり、実施できる施設や環境には制限がある。また、実験動物削減の観点からも、マウスを使用しない検査法の確立が求められている。

本研究計画では、マウスを使用しない BoNT 検出法の確立を目指して、A、C、