

II. 分担研究報告書

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）
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（旧世界アレナウイルスのラッサウイルス、新世界アレナウイルスのフニンウイルスなど）はバイオテロに用いられる可能性のある病原体でBSL4に分類されている。最近、ザンビア、南アフリカで原因不明の出血熱症状を呈した患者から分離されたLujo(ルジョ)ウイルス、ザンビアでげっ歯類から分離されたLuna(ルナ)ウイルスなど、相次いで新種のアレナウイルスが報告された。この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ことを示唆される。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、アレナウイルスの高度保存領域に対する抗体を作製した。この抗体は、種々のアレナウイルスのリコンビナントタンパク質および、感染性アレナウイルス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と期待できる。

研究協力者：福士秀悦、吉河智城、谷英樹、
谷口怜、福間藍子、下島昌幸、西條政幸（国
立感染症研究所ウイルス第一部）

A 研究目的

ヒトに高い病原性を示すアレナウイルス（旧世界アレナウイルスのラッサウイルス、新世界アレナウイルスのフニンウイルスなど）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。最近、ザンビア、南アフリカで原因不明の出血熱症状を呈した患者から分離さ

れたLujo(ルジョ)ウイルス、ザンビアでげっ歯類から分離されたLuna(ルナ)ウイルスなど、相次いで新種のアレナウイルスが報告された。この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ことを示唆される。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PCR法は開発されていない。ルジョ

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。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のリコンビナントNPを用いて、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、ルジョウイルス、ルナウイルスが検出できるか検討した。平成25年度は海外の感染症研究機関との共同研究によりラッサウイルスに抗原性の近縁なモペイアウイルス(MOPV)、モバラウイルス(MOBV)および、フニンウイルスの弱毒生ワクチン株であるCandid#1を入手し、作製した抗体がウイルスそのもの(Authenticウイルス抗原)に反応するか検討した。また、免疫に用いる抗原の改良を行ない、すべてのアレナウイルスを検出するための抗体作製について検討した。

B 研究方法

アレナウイルス NP の高度保存領域のペプチド合成と抗ペプチド血清の作製：

平成 23、24 年度の研究により、アレナウイルス NP の cap-binding 領域の高度保存領域である、アミノ酸 298-311 位と 311-324 位の 2 種のペプチドに対する、ウサギ抗ペプチド抗体を作製した。(図 1) 本領域はウイルス増殖における NP の機能に必須の領域であることから、未知のアレナウイルスにおいても保存されている可能性が高い。

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：

旧世界アレナウイルスのラッサウイルス(LASV)、ルジョウイルス(LUJV)、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)に加え、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 2)。これらの抗原を用いて ELISA を行ない、抗体との反応性を解析した。

Authentic ウイルス抗原の調製

抗 peptide 311-324 抗体が authentic ウイルス抗原に反応するかどうか検討するため、

以下のアレナウイルスを入手し、ウイルス抗原を調製した。

モペイウイルス (MOPV) : モザンビーク (1977年)、およびジンバブエ (1981年) で、野ネズミの一種 (*Mastomys*) から分離されたアレナウイルス。ヒト抗体陽性例が報告されているが、このウイルスによるヒトの感染症は報告が無く、ヒトへの病原性は無いと考えられている。BSL3。

モバラウイルス (MOBV) : 1983年に中央アフリカ共和国で、野ネズミ (*Praomys* と *Mastomys*) から分離されたアレナウイルス。ラッサウイルスやモペイウイルスと血清学的に交叉する。ウイルス学的性状もこれらのウイルスと類似する。BSL3。

Candid#1: 弱毒化フニンウイルス (生ワクチン株)。フニンウイルスはBSL4に分類されるが、Candid#1はヒトに発病させるおそれほとんどないとして、平成25年3月7日付で病原体管理規制の対象から除外。BSL2。

LCMV WE株: LCMVプロトタイプの一つ。BSL2。
MOPV、MOBV、Candid#1をVeroE6細胞に感染 (MOI=0.01) させ、4日後 (モペイウイルス、モバラウイルス) あるいは、7日後 (Candid#1)、感染細胞を1%NP40/PBSに懸濁し、上清を回収、ウイルス抗原とした。同様にLCMV (WE株) をVero E6に感染 (MOI=0.1) させ、3日後感染細胞を1%NP40/PBSに懸濁し、上清を回収、ウイルス抗原とした。

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

ラッサウイルス NP のアミノ酸 297-311 位および、311-324 位のペプチドをウサギに免疫して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 のリコンビナント NP との反応性を ELISA で調べた (図 3)。抗 peptide 297-311 抗体は ELISA で反応が弱かった。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 ${}_{311}\text{CLSGDGWPYIASRT}$ ${}_{324}$ の 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 1)。

Authentic ウイルス抗原との反応性

平成 23, 24 年度の研究はウイルス抗原としてリコンビナント NP を用いて、抗体の反応性を検討してきた。平成 25 年度はラッサウイルスに抗原性の近縁な MOPV、MOBV および、フニンウイルス弱毒生ワクチン株 Candid#1 のウイルス抗原を調製し、peptide 311-324 抗体との反応性を ELISA で検討した。MOPV、MPBV に対する陽性コントロールはウサギ抗 Luna ウイルス NP 血清を用い、Candid#1、LCMV に対する陽性コントロールとしてそれぞれのウイルスのリコンビナント NP で免疫したウサギ抗血清を用いた。peptide

311-324 抗体は、ウサギ抗血清を用いた場合よりも O. D. 値は低いが、candid#1, MOPV, MOBV に反応した (図 4)。

次に、ウイルス抗原を用いてウエスタンブロットによる peptide 311-324 抗体の反応性を検討した。ELISAと同様、candid#1, MOPV, MOBV に反応した。これらの結果はリコンビナント NP を用いた ELISA の結果と一致した。しかし、MOBV に対する反応は、Candid#1 および MOPV に比較して弱く、LCMV には全く反応しなかった。アミノ酸配列の比較から、MOBV と LCMV では本ペプチド領域のアミノ酸 322 位が Cys であることが抗体の反応性に影響していると考えられた。

アレナウイルスの GP-2 領域のペプチド

アレナウイルスの GP-2 にはすべてのアレナウイルスで保存されている領域がある (図 6)。この部分のペプチド CNYSKFWYLEHAK を合成し、これに対するウサギ抗体を作製した。これを用いてアレナウイルス抗原を検出できるか検討した。ELISA、ウエスタンブロットともにこの抗体は MOPV に強く反応し、他のウイルスにはほとんど反応しなかった (図 7)。

D 考察

現在まで、新興アレナウイルスのリコンビナントタンパク質等を用いて血清診断、病原診断法が開発されているが、旧世界、新世界アレナウイルスともにを広く検出可能な抗体は無い。

本研究では、高度にアレナウイルス間で保存された領域のペプチドの抗血清を作製し、各種アレナウイルスとの反応性を解析した。抗 peptide 311-324 抗体は、リコンビナント NP を抗原とした検討では、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。また、Authentic ウイルス抗原を用いた検討でも、このペプチド抗体は旧世界アレナウイルスである MOPV, MOBV および、新世界アレナウイルスである Candid#1 に反応することが明らかになった。一方、GP-2 ペプチドに対する抗体は MOPV に反応したが、Candid#1, MOBV に反応しなかった。アレナウイルスを広く検出するためには、免疫に用いる GP-2 ペプチド配列の改良が必要である。LCMV に対する反応性に関して課題は残るが、NP の peptide 311-324 位を標的とした抗体は、ラッサウイルス、フニンウイルス等、バイオテロに使用される可能性があるアレナウイルスをもれなく検出できると期待できる。

今後、海外の BSL4 施設を有する感染症研究機関との共同研究により、ラッサウイルス、フニンウイルス等、アレナウイルスそのものを使った、抗体の反応性の検討を行う必要が有る。

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

アレナウイルスのリコンビナント NP に強く反応し、新種のアレナウイルスであるルジョウイルス、ルナウイルスにも強く反応することが明らかになった。

(2) Authentic ウイルス抗原を用いた検討でも、抗 peptide 311-324 抗体旧世界アレナウイルスである MOPV, MOBV および、新世界アレナウイルスである Candid#1 に反応することが明らかになった。NP の本領域を標的とした抗体は、ラッサウイルス、フニンウイルス等、バイオテロに使用される可能性があるアレナウイルスをもれなく検出できると期待できる。

(3) 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 GP-2 ペプチドに対する抗体を調製した。しかし Candid#1, MOBV に反応しなかったため、今後は免疫に用いる GP-2 ペプチド配列の改良が必要である。

F 研究発表

1 論文発表

- 1) Sakai K, Yoshikawa T, Seki F, Fukushi S, Tahara M, Nagata N, Ami Y, Mizutani T, Kurane I, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Komase K, Morikawa S, Takeda M. Canine distemper virus associated with a lethal outbreak in monkeys can readily adapt to use human receptors. *J Virol.* 87(12):7170-7175. 2013.
- 2) Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, Ishido A, Shigeoka T, Tominaga T, Kamei T, Honda M, Ninomiya D, Sakai T, Senba T,

Kaneyuki S, Sakaguchi S, Satoh A, Hosokawa T, Kawabe Y, Kurihara S, Izumikawa K, Kohno S, Azuma T, Suemori K, Yasukawa M, Mizutani T, Omatsu T, Katayama Y, Miyahara M, Ijuin M, Doi K, Okuda M, Umeki K, Saito T, Fukushima K, Nakajima K, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Fukuma A, Ogata M, Shimojima M, Nakajima N, Nagata N, Katano H, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Yamagishi T, Oishi K, Kurane I, Morikawa S, Saijo M. The First Identification and Retrospective Study of Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome in Japan. *J Infect Dis.* Dec 12. 2013.

3) Arai S, Nguyen ST, Boldgiv B, Fukui D, Araki K, Dang CN, Ohdachi SD, Nguyen NX, Pham TD, Boldbaatar B, Satoh H, Yoshikawa Y, Morikawa S, Tanaka-Taya K, Yanagihara R, Oishi K. Novel Bat-borne Hantavirus, Vietnam. *Emerg Infect Dis.* 2013 Jul;19(7):1159-61.

4) 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.* 2013, 87(2): 1105-1114

2 学会発表

- 1) 吉河智城、福士秀悦、谷英樹、宇田晶彦、谷口怜、福間藍子、前田健、高橋徹、森川茂、下島昌幸、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) の確定診断に使用されるコンベンショナル PCR の評価、及びリアルタイム定量 PCR 戸の比較 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日から 12 日、神戸
- 2) 福間藍子、福士秀悦、谷英樹、吉河智城、谷口怜、下島昌幸、森川茂、前田健、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) の血清学的診断法の開発 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日から 12 日、神戸
- 3) 長谷川秀樹、亀井敏昭、高橋徹、鈴木忠樹、片野晴隆、中島典子、福士秀悦、下島昌幸、前田健、水谷哲也、森川茂、西條政幸 日本国内で発生した重症熱性血小板減少症候群の 1 剖検例 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日から 12 日、神戸
- 4) 西條政幸、高橋徹、前田健、水谷哲也、大松勉、吉河智城、谷英樹、福士秀悦、下島昌幸、福間藍子、緒方もも子、鈴木忠樹、中島典子、片野晴隆、永田典代、長谷川秀樹、山岸拓也、倉根一郎、森川茂 後方視的に重症熱性血小板減少症候群と診断された 11 名のウイルス学的・臨床的・疫学的研究 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日から 12 日、神戸
- 5) 森川茂、木村昌伸、福士秀悦、福間藍子、加来義浩、朴ウンシル、谷英樹、吉河智城、井上智、今岡浩一、下島昌幸、西條政幸、前田健 SFTS ウイルス抗体陽性動物の調査 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日から 12 日、神戸
- 6) 谷口怜、福士秀悦、Masangkay Joseoh、渡辺俊平、大松勉、下田宙、前田健、福間藍子、吉河智城、谷英樹、下島昌幸、西條政幸、明石博臣、吉川泰弘、久和茂、森川茂 フィリピンのコウモリからの重症熱性血小板減少症候群ウイルスに反応する抗体の検出 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日から 12 日、神戸
- 7) 宇田晶彦、福士秀悦、加来義浩、吉河智城、下島昌幸、新倉綾、井上智、安藤秀二、前田健、西條政幸、森川茂 マダニからの SFTS ウイルス遺伝子の検出 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日から 12 日、神戸
- 8) 下島昌幸、福士秀悦、谷英樹、吉河智城、福間藍子、谷口怜、前田健、高橋徹、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群ウイルスに対する ribavirin の in vitro 増殖抑制効果 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日から 12 日、神戸
- 9) 新倉綾、福士秀悦、森川茂、山田靖子 リフトバレー熱ウイルス L 蛋白のポリメラーゼ機能における C 末端領域の重要性 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日から 12 日、神戸
- 10) 福士秀悦、谷英樹、吉河智城、谷口怜、福間藍子、緒方もも子、下島昌幸、森川

茂、西條政幸 ナイジェリアにおけるリフトバレー熱の血清疫学 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日から 12 日、神戸

11) 谷英樹、下島昌幸、福間藍子、谷口怜、吉河智城、福士秀悦、森川茂、前田健、高橋徹、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群ウイルス GP を外套したシェードタイプ VSV の作製 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日から 12 日、神戸

12) 高橋徹、前田健、亀井敏昭、水谷哲也、下島昌幸、福士秀悦、谷英樹、吉河智城、森川茂、長谷川秀樹、中島典子、鈴木忠樹、永田典代、片野晴隆、山岸拓也、大石和徳、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) の日本における初症例 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日から 12 日、神戸

G 知的財産権の出願・登録状況

現在出願予定はない。

図1 アレナウイルスの高度保存領域と合成ペプチド

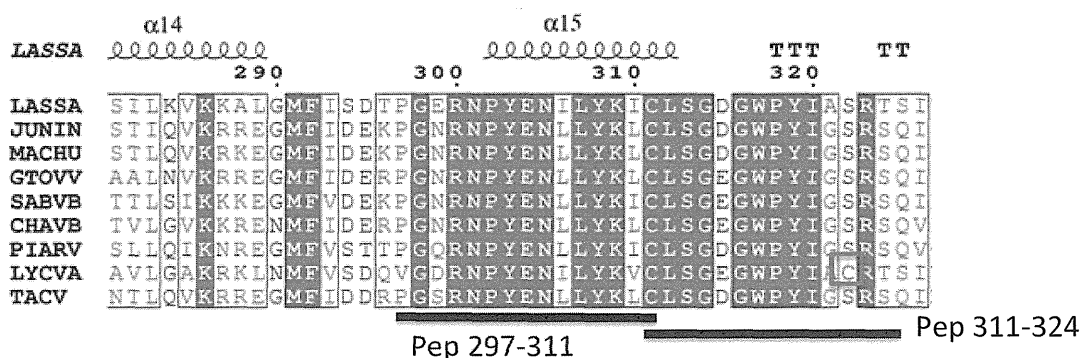


図2 組換えバキュロウイルスを用いた各種アレナウイルス NP 抗原の調製

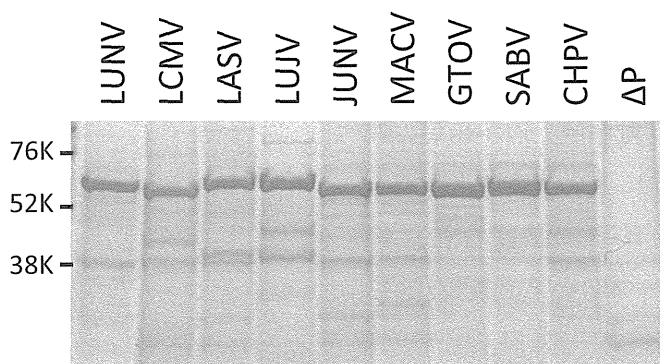


図3) アレナウイルス高度保存領域ペプチド抗体による ELISA

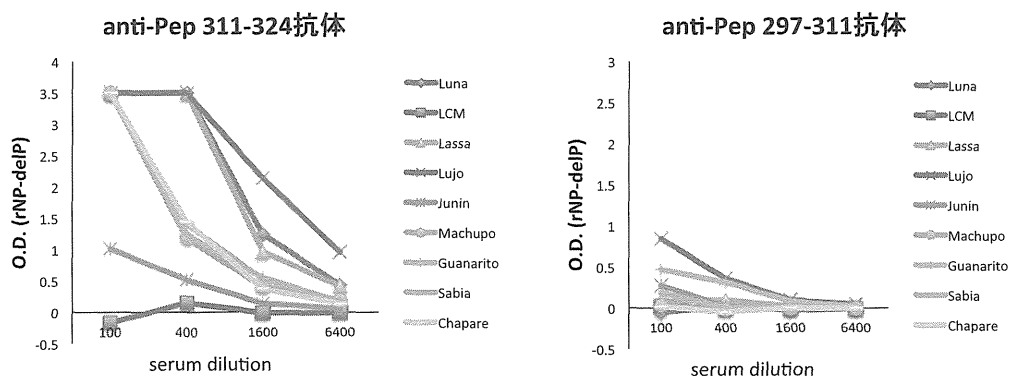


図4 ELISAによるペプチド抗体の authentic ウイルス抗原との反応

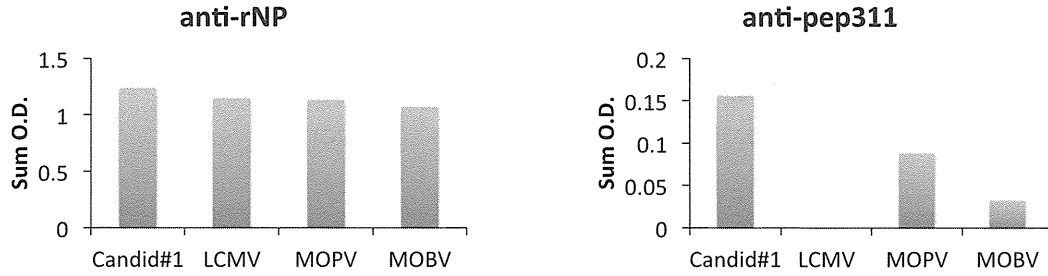


図5 ウェスタンブロッティングによるペプチド抗体の authentic ウイルス抗原との反応

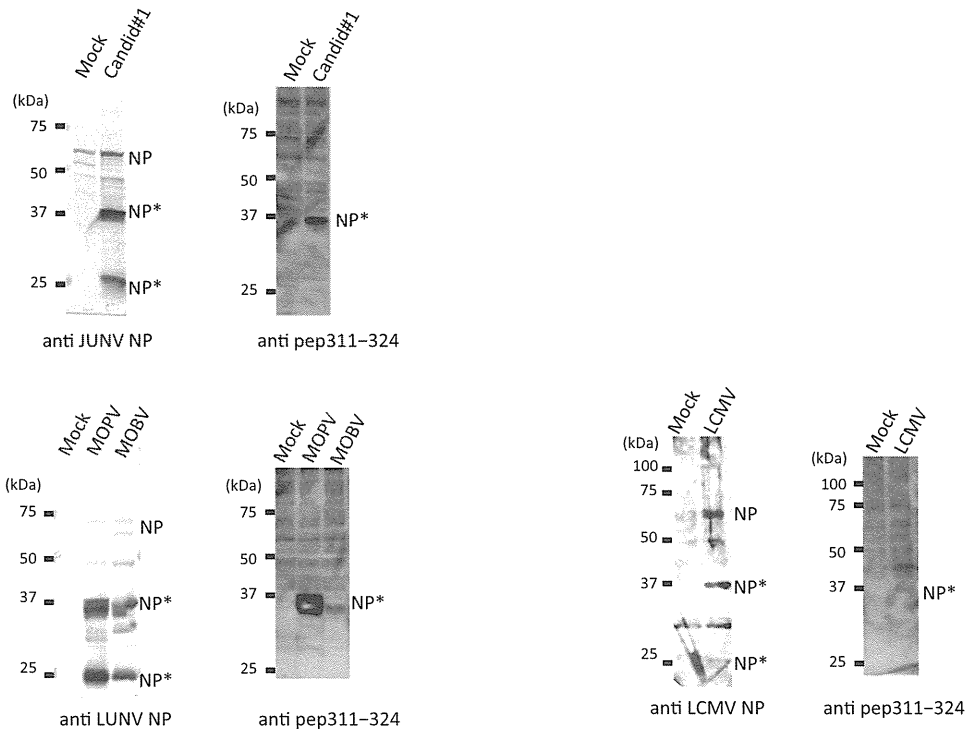


図6 アレナウイルスの GP-2 で保存されている領域

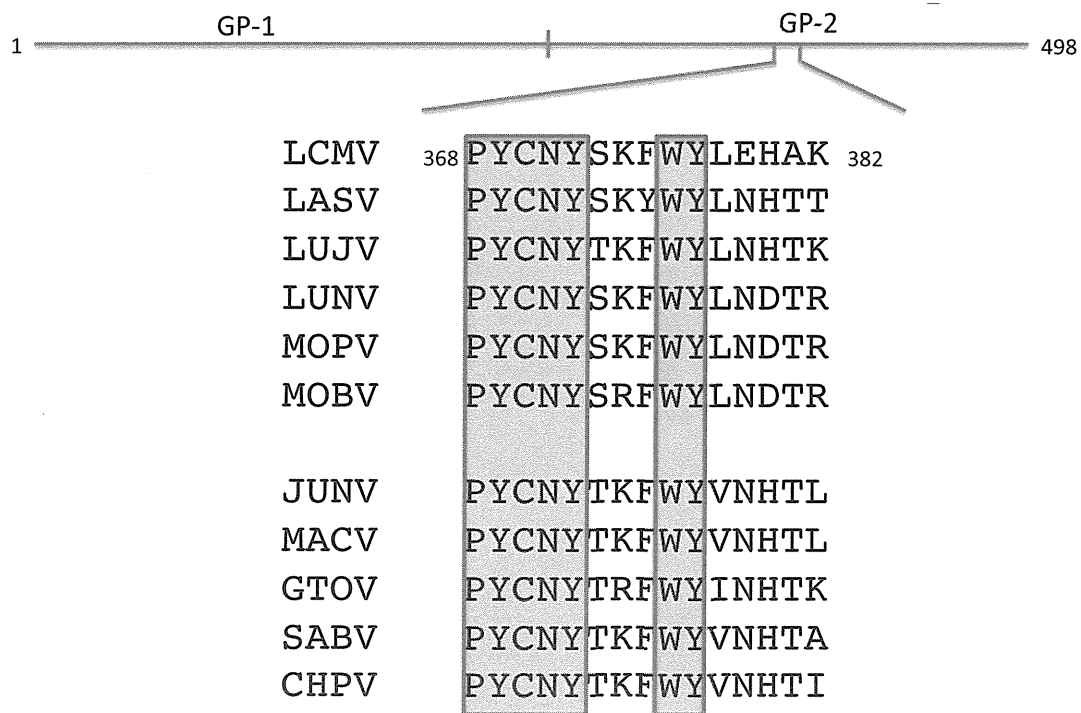
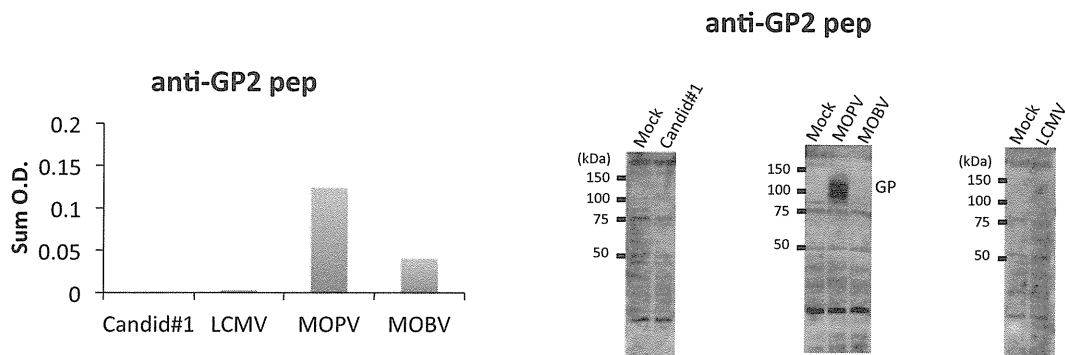


図7 アレナウイルスの GP-2 ペプチド抗体を用いた ELISA (左図) およびウエスタンブロットティング (右図)



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）
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

炭疽に対する迅速検査、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
協力研究者：奥谷晶子 国立感染症研究所獣医科学部、主任研究官

研究要旨：

生物テロで利用される可能性のある炭疽菌の治療薬は、シプロフロキサシンおよびドキシサイクリンなどの抗生剤が使用可能であるが、人為的な薬剤耐性菌の出現に対する備えのため、新たな作用機序をもつ抗菌物質の探索が重要である。また、現在炭疽菌芽胞の除菌に用いられる化学的薬剤は、環境負荷や人体に対する毒性が強いものが多いためこれらに代わる新たな除菌剤の探索も意義があると考えられる。生体由来や食品由来の抗菌物質の中で炭疽菌の「芽胞」「栄養型」「莢膜」のそれぞれの菌形態に効果のある抗菌物質の候補として今回は Anti Microbial Peptides(抗菌性ペプチド)の抗菌効果を検証した。抗菌性ペプチドは炭疽抵抗性動物である豚で複数報告されている。同じく抵抗性を犬由来 AMP も検討した。炭疽感受性動物である牛、山羊、羊由来 AMP とヒト、マウス由来の AMP を人工合成してそれらの抗菌効果を検討したところ、豚由来の Protegrin-1 が最も高い抗菌効果を示した。このような抗菌効果の差は立体構造の差によるものと考えられるが、より詳細な検証が今後の検討課題である。

A. 研究目的

これまで炭疽治療に使用されてきた抗生物質は効果が高く、これまでにペニシリン系以外の薬剤耐性菌の出現は報告されていない。しかしながら、炭疽菌は生物兵器として使用された歴史があり、今後人為的に薬剤耐性が付加されたもの使用される可能性は否定できない。そのため、既存の抗菌剤ではない新たな治療薬の探索は必要であると思われる。また現在炭疽菌の殺菌・消毒に用いられる化学剤(次亜塩素酸ナトリウム、二酸化塩素、過酢酸など)は環境負荷が高く、ヒトや動物への発がん性を持つものもあった課題がある。そこで、今回我々は従来の抗菌剤や化学物質とは異なる抗菌物質として有効かどうかの検討を行うことを目的として食品由来の抗菌物質であるカテキン類、フラノン類および生体由来・短鎖抗菌性ペプチド (AMP) の抗菌効果の検証を行い、既存の薬剤とは異なる作用機序をもつ新たな抗菌活性物質としての可能性について検討を行った。

B. 研究方法

今年度は短鎖抗菌性ペプチド AMP が、炭疽菌

の「芽胞」「栄養型」および「莢膜型」細胞への抗菌効果を示すかについて検証を行った。AMP はその立体構造から α -helix 型、 β -sheet 型、Extended 型に大別される。また、炭疽抵抗性あるいは炭疽感受性動物由来のペプチドが各種同定されているため、全てを網羅するようペプチドを選択して人工合成を行った(表 1)。炭疽菌への抗菌効果は RDA (Radial Diffusion Assay) アッセイで阻止円が形成された最少濃度を MEC(Minimum Effective Concentration)値として測定した(図 1)。

「芽胞」と「栄養型」の比較には 34F2 株 (pXO1+, pXO2-)を用いた。「芽胞」は一晩 37°C 好気培養した LB 培地を 4□で 1 週間保存したものを冷 MilliQ で洗浄後回収し芽胞染色で一視野あたり 70%以上芽胞が認められたものを用いた。

一方、「莢膜」発現の有無の比較には Davis 株 (pXO1-, pXO2+)を用いた。莢膜は、0.7%炭酸水素ナトリウム溶液を添加した Nutrient Agar を嫌気培養して発現させた。コントロールには Nutrient Agar のみで好気培養したものを用いた。

C. 研究結果

RDA アッセイの結果、「芽胞」「栄養型」および「莢膜型」細胞に対して、AMP の構造および由来動物の違いにより抗菌効果に差がみられた(表 2 および 3)。

豚由来の Protegrin-1 は「栄養型」よりも「芽胞」で MEC 値が低かった。それ以外の AMP では「芽胞」と「栄養型」と同等の MEC 値(牛由来、羊由来、ヒト由来 AMP)を示すものと「芽胞」の方が MEC 値が 2 倍から 4 倍以上高いもの(犬由来および Protegrin-1 以外の豚由来 AMP)があった(表 2)。今回は preliminary 段階の実験であったので今後は統計処理が可能な実験系で再現性を確認する予定である。

炭疽菌の「莢膜」は炭酸水素イオンを培地に加えた嫌気培養条件下で発現させて、RDA アッセイによる MEC 値を測定した。その結果、PR-39 では莢膜発現炭疽菌に対する MEC 値が 2 倍高くなったものの、他の豚由来 AMP では差は認められなかった(表 3)。

今回は、2 種類の菌株を個々の実験で用いた結果であるため、菌株の違いによる影響について評価が不十分であるため、今後は菌株数を増やして抗菌効果を測定する予定である。

D. 結論

炭疽抵抗性動物である豚由来の AMP の中でも Protegrin-1 の抗菌効果が高かった。一方で感受性動物である羊由来の SMAP29 でも高い抗菌効果がみられたことから、動物種差よりも立体構造などの AMP の化学的性質そのものが抗菌作用機能に参与している可能性が高いと思われる。今後の検討課題としては、

- 1) AMP の立体構造による作用機序の詳細の検討
- 2) 「芽胞」「莢膜」の構成蛋白質あるいはペプチド発現量を定量化した上での抗菌効果の再現性の検討

などがあげられる。

また、フラノン類やカテキン類などの食品由来の抗菌物質の炭疽菌に対する抗菌効果も検討し、従来とは異なる抗菌効果をもつ生物由来物質の抗菌剤としての可能性や選択肢を探索していく予定である。

E. 研究発表

なし

F. 健康危険情報 特になし

図1 Radial Diffusion Assay の概要。二層化ゲルを用いた各種 AMP の炭疽菌に対する MEC 値測定の流れ。

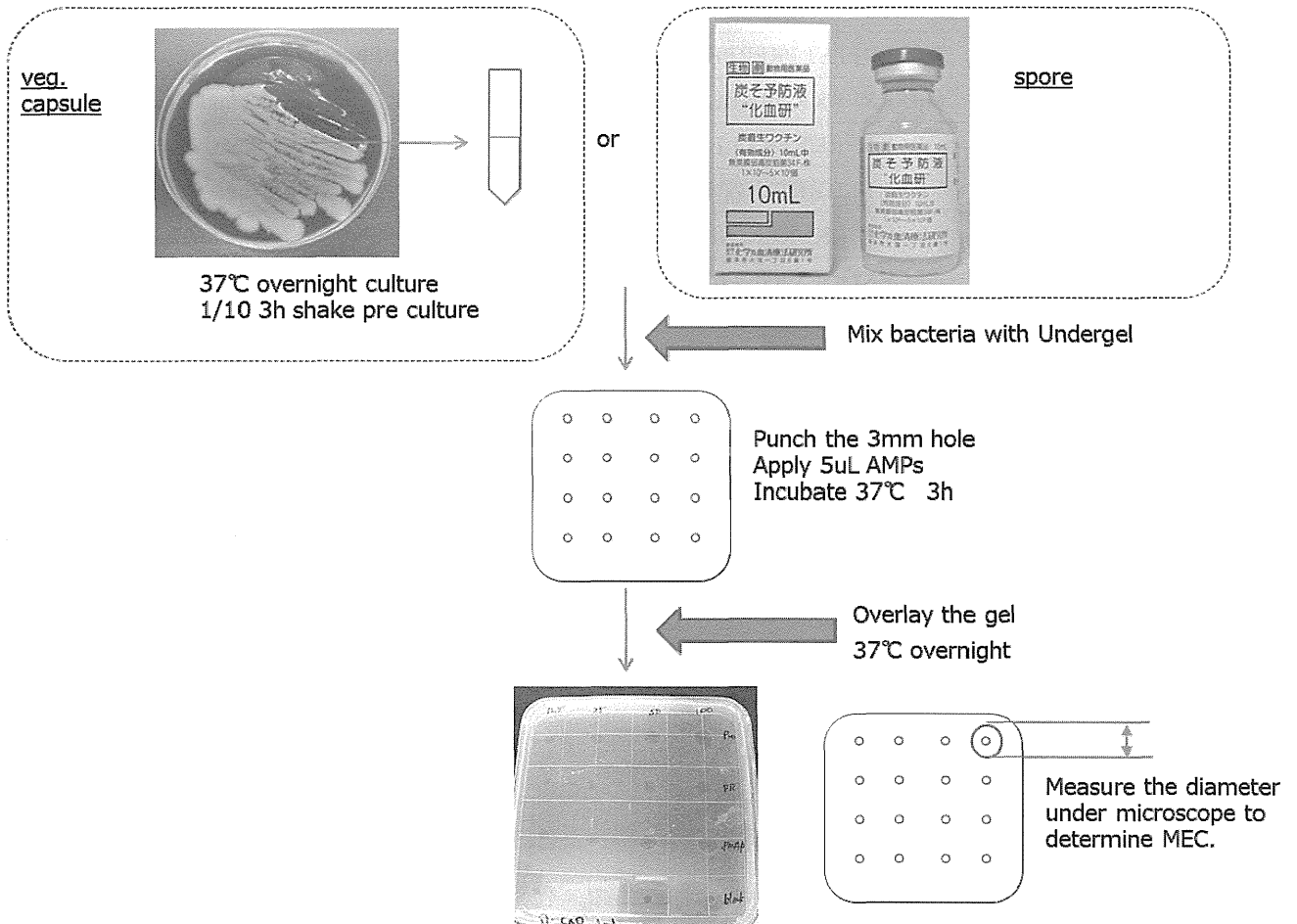


表 1 Antimicrobial peptides used in this study

AMP name	Peptide sequence	Conformational type
swine Protegrin-1 (18a.a.)	RGGRLCYCRRRFCVGVGR	Two-disulfide bridged (beta sheet)
swine PR-39 (39 a.a.)	RRRPRPPYLPRPRPPFFPPRLPPRIPPGFPPRFPPRFP	Linear proline rich
swine PMAP36 (36 a.a.)	GRFRRLRKKTRKRLKKIGKVLKWIPPVGSIPLGC	Alpha helix
cow BMAP27 (27a.a.)	GRFKRFRKKFKKLFKKLSPVIPLLHL	Alpha helix
sheep SMAP29 (29a.a.)	RGLRRLGRKIAHGKVKYGPTVLRIRIA	Alpha helix
human LL-37 (37a.a.)	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES	Alpha helix
mouse CRAMP (33a.a.)	GLLRKGGEKIGEKLLKIGQKIKNFFQKLVQPPE	Alpha helix
dog K9CATH (38a.a.)	RLKELITTGGQKIGEKIRRIGQRIKDFFKNLQPREEKS	Alpha helix

表 2 立体構造および由来動物別の AMP の炭疽菌 34F2 株「芽胞」および「栄養型」細胞
 に対する MEC 値測定結果

**Animal AMPs MEC (minimum effective concentration) test
 for *B. anthracis* vegetative and spore**

	(uM)	
	vegetative	spore
swine Protegrin-1 (β sheet)	1.5	<0.75
swine PR-39 (Extended sheet)	12.5	>25
swine PMAP36 (α -helical)	3.0	6.25
cow BMAP27 (α -helical)	6.25	6.25
sheep SMAP29 (α -helical)	1.5	1.5
human LL-37 (α -helical)	6.25	6.25
mouse CRAMP (α -helical)	6	25
dog K9CATH(α -helical)	6.25	>25

表 3 豚由来 AMP の炭疽菌 Davis 株「莢膜」発現細胞に対する MEC 値の測定結果

Swine different conformational AMPs MEC for *B. anthracis* capsule +/- cells

	capsule- Davis	capsule+ Davis	(μ M)
swine Protegrin-1	<0.75	<0.75	
swine PR-39	1.5	3	
swine PMAP36	0.75	0.75	

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)

「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) を迅速簡便に検出するために、SNAP25 と synaptobrevin を連結した組換えタンパク質を作製した。これを使用した検出法では、全ての血清型の BoNT の検出が可能であり、精製 BoNT の場合 A 型、E 型で数マウス LD₅₀/ml、E 型、F 型で数十マウス LD₅₀/ml 程度の量を 3 時間以内に検出することができた。この方法は精製 BoNT に対してはマウス法に匹敵する検出感度を示すが、検体に夾雑物が存在する場合、検出感度が大きく低下するので、この点の改良が必要である。

A. 研究の目的

ボツリヌス神経毒素 (BoNT : Botulinum neurotoxin) は、自然界に存在する最強のタンパク質毒素であり、バイオテロで使用されうる物質として警戒されている。BoNT は、動物の神経細胞に取り込まれて SNARE と呼ばれる 3 種のタンパク質を切断する。SNARE タンパク質が切断されると神経細胞は神経伝達物質を放出できなくなり、神経遮断による致命的な麻痺症状が起こる。BoNT には A から G の 7 種の血清型が知られており、作用する SNARE タンパク質は異なっている。A、C、E 型の BoNT は、SNAP25 と呼ばれる SNARE 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、迅速検出法の整備は、バイオテロ対策として有効な手段であると考えられる。現在、最も信頼される BoNT 検出法は、マウスを使用する方法であり、検体をマウスに注射し、BoNT による麻痺症状が出現するかを観察する。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、約 5~100 pg) であり、数時間から 1 日で検査できる。しかし、実験動物設備が必要であり、実施できる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、BoNT のエンドペプチダーゼ活性を簡便に検出する方法を検討した。

B. 研究方法

1) BoNT の活性を検出するために、SNARE の組換えタンパク質を生産し、BoNT 検出用の基質とした。2) 組換えタンパク質基質を利用した反応系で、精製 BoNT の検出感度を検討した。3) 実際に検査法として有効か検証した。

C. 研究結果

1) SNAP25 と synaptobrevin を含む基質タンパク質のデザインと生産

SNAP25 と synaptobrevin は BoNT による切断が詳しく解析されているマウスのものを利用した。マウスの SNAP25 は 206 個、synaptobrevin は 116 個のアミノ酸からなるが、SNAP25 は 71- 206 番目の配列部分、synaptobrevin は 31- 92 番目の部分を使用した。これらに対応する cDNA をタカラバイオ社の pCold ProS2 または、pCold GST 発現ベクターに挿入し、さらに蛍光タンパク質 EYFP の遺伝子を連結した。(図 1. A.)。これらが大腸菌に導入して、組換え基質タンパク質 ProS2-HS と GST-HS を得た(図 1. B.)。

2) A、B、E、F 型の BoNT による基質タンパク質の切断実験

ProS2-HS と GST-HS について、A、B、E、F 型の精製 BoNT による切断実験を行った。毒素量は 10^2 および 10^3 マウス

LD₅₀/ml の濃度で検討した。基質と BoNT の反応条件は昨年度の本研究の報告書と同条件にした(反応液組成: 20 mM HEPES-HCl pH 7.0, 2.5 mM DTT, 20 μ M ZnCl₂, 0.2 % ゼラチン)、(基質タンパク質濃度 5 μ g/ml)、(反応時間 37°C、2 時間)。基質切断の確認はアジレント・テクノロジー社の Agilent 2100 バイオアナライザーと High Sensitivity Protein 250 キットで行った。その結果、ProS2-HS と GST-HS は、切断産物のサイズから、いずれの型の BoNT でも、報告されている切断部位で切断がおきていると考えられた(図 2)。しかし、ProS2-HS は GST-HS に比べて、B 型の BoNT による切断パターンに乱れがあり、毒素量が 10^3 マウス LD₅₀/ml では、切断が起こっていなかった。このため、以後の実験には GST-HS を使用した。

また、C、D、G 型の BoNT については感染研で精製毒素を所持していないため、実験を実施しなかった。

3) 精製 BoNT 検出感度の測定

GST-HS を使用した検出系がどの程度の量の精製 BoNT を検出できるか、検出感度を検討した(図 3)。その結果、A 型、E 型の精製 BoNT の場合は 4 マウス LD₅₀/ml でも検出可能だった。E 型、F 型の場合は 16 マウス LD₅₀/ml 程度まで検出された。この検出に必要な時間は 3 時間程度だった。マウス法の場合、3 時間で BoNT 活性が検出されるのは、数十マウス LD₅₀/ml 以上の比較的高濃度の BoNT が接種された場合であり、GST-HS 法は精製 BoNT に対しては、マウス法に匹敵

する検出感度があると考えられた。

4) 検出系としての有効性

ボツリヌス菌の純培養液上清には、通常、数万～数十万マウス LD₅₀/ml の BoNT が含まれる。ボツリヌス菌の検査時には、マウス法によってこれらは容易に検出される。GST-HS による検出法も培養液中の BoNT を検出できるか検討した。しかし、A 型と B 型の BoNT 産生菌の培養上清について BoNT 検出を試みたところ、GST-HS 基質に分解が生じてしまい BoNT の検出が行えなかった(図 4)。これはボツリヌス菌が生産する BoNT 以外のプロテアーゼによって GST-HS 基質が壊されてしまったためと考えられた。反応液にプロテアーゼ阻害剤 (Thermo scientific 社の Halt™ Protease Inhibitor Cocktail EDTA-Free) を加える検討も行ったが、GST-HS 基質の分解を抑えることはできなかった。

D. 考察

ボツリヌス症の診断では、ボツリヌス菌や遺伝子の検出も重要な検査情報になるが、最終的な判定を下す上で最も大きな情報は BoNT 活性そのものの検出である。万が一、ボツリヌス菌、BoNT がバイオテロに使用されるよう事態が発生した場合でも同様のことが言える。BoNT 活性の検出が正確な事態把握の重要な根拠になる。

今回、全ての型の BoNT の基質になる組換えタンパク質 GST-HS を作製し、BoNT 検出系を構築した。今回デザインした方法は、精製 BoNT であればマウス

法に匹敵する感度で、迅速、簡便に BoNT を検出できた。これは、美容や医療用途で使用されている精製 BoNT 製剤の確認、検査の目的には有用なレベルだと考えられる。しかし、GST-HS 法は、マウス法では容易に検出できるボツリヌス菌培養上清中の BoNT が検出不能だった。培養上清に存在するプロテアーゼのためであり、検体中の夾雑物が大きな問題になった。マウス法の優れている点は、BoNT に対する高感受性に加えて、マウスの生理機能に大きな影響を与えない夾雑物であれば、その影響を排除して特異的に BoNT が検出されることである。

ボツリヌス症の診断では患者便や吐物、血清、食品などの検体から BoNT の検出が行われるが、バイオテロのような事例では、おそらく、さらに様々は検体から BoNT 検出が必要になる。実際に有効な BoNT 検査法の構築には、検体中の夾雑物の除去、またはその影響の排除が大きな問題点になる。マウスの体内で神経細胞内に BoNT が取り込まれるような特異性で、夾雑物中から微量な BoNT を抽出する手法と、今回作製した GST-HS 法のような簡便で高感度な方法が組み合わせられれば、マウスを使わない実用的な BoNT 検出法が実現できる。

E. 結論

SNAP25 と synaptobrevin を含む組換えタンパク質を生産し、全ての血清型の BoNT を簡便、迅速に検出できる方法をデザインした。この方法の精製 BoNT に対する検出感度は、マウス法に匹敵したが、夾雑物による影響を受けやすいので、