

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 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関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。

RDA radial diffusion assays

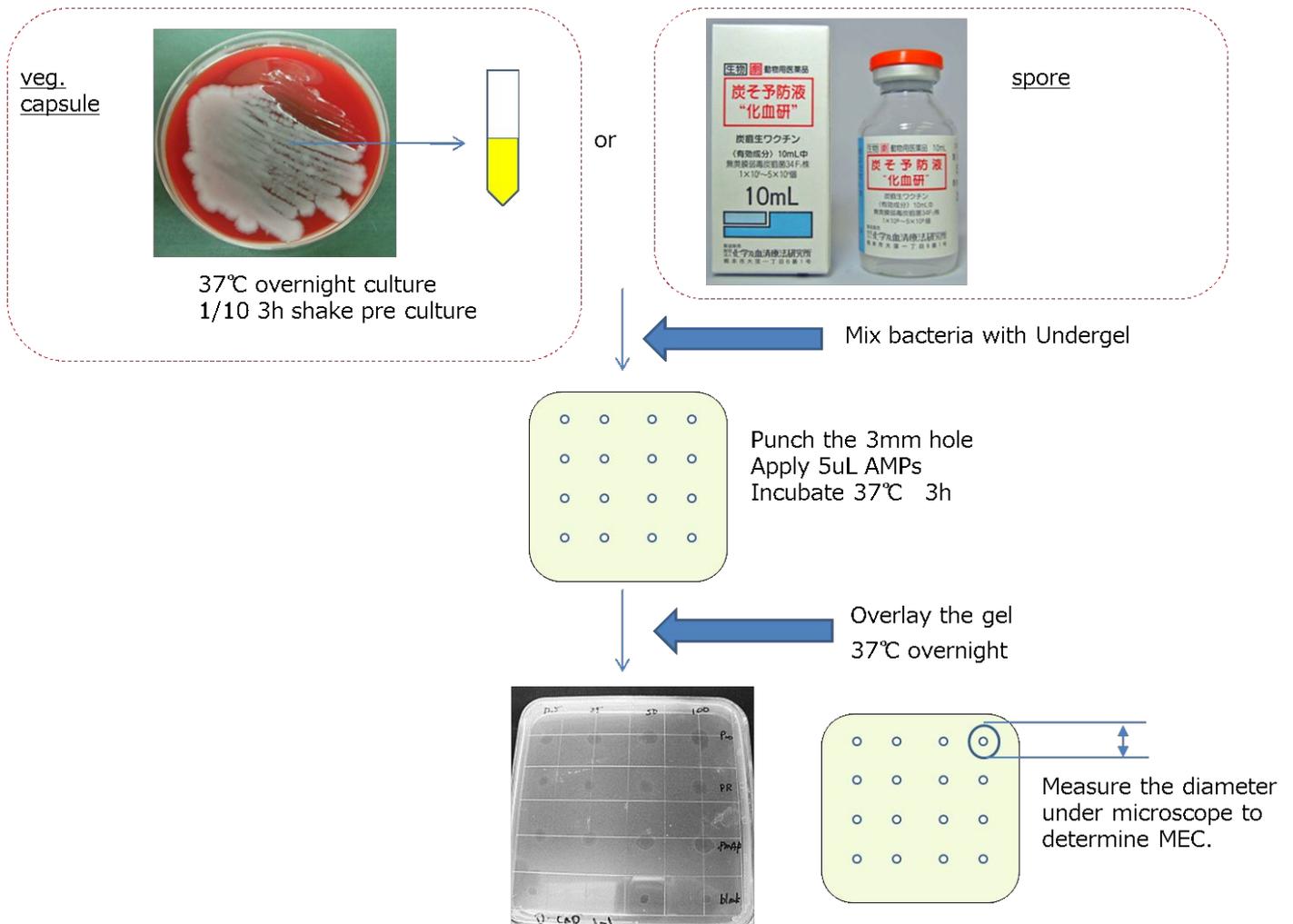


表 1 Antimicrobial peptides used in this study

AMP name	Peptide sequence	Conformational type
swine Protegrin-1 (18a.a.)	RGGRLCYCRRRFCVCGR	Two-disulfide bridged (beta sheet)
swine PR-39 (39 a.a.)	RRRPRPPYLPRPRPPFFPPRLPPRIPPGFPPRFPPRF	Linear proline rich
swine PMAP36 (36 a.a.)	GRFRRLRKKTRKRLKKIGKVLKWIPPVGSIPG	Alpha helix
cow BMAP27 (27a.a.)	GRFKRFRKKFKKLFKKLSPVIPLLHL	Alpha helix
sheep SMAP29 (29a.a.)	RGLRRLGRKIAHGKVKYGPVLRIRIA	Alpha helix
human LL-37 (37a.a.)	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTE	Alpha helix
mouse CRAMP (33a.a.)	GLLRKGGEKIGEKLKKIGQKIKNFFQKLVQPE	Alpha helix
dog K9CATH (38a.a.)	RLKELITTGGQKIGEKIRRIGQRIKDFKLNLPREEKS	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	