

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

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 23 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。平成 24 年度：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い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。平成 25 年度：生物テロで利用される可能性のある炭疽菌の治療薬は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を行い、Anti Microbial Peptides(抗菌性ペプチド)である豚由来の Protegrin-1 が高い抗菌効果を示すことを明らかにした。

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。国内外の専門家と連携してバイオテロに使用される可能性のある人獣共通感染症の患者・感染源動物等について、迅速な検査、消毒および標準化を進めることにより、わが国での公衆衛生行政における危機管理対応を容易にすることが本研究の目的である。

そこで、本研究では炭疽の発生と流行が問題となっているモンゴル National Center for Infectious Disease with Natural Foci (NCIDNF) との共同研究により、アジアで分離される炭疽菌株の遺伝学的タイピングシステムの開発を行い、我々の確立した SNP 解析方法を応用して分離株を菌株レベルで識別できる SNP タイピングシステムの確立を試みた。また、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が、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として従来の抗菌剤や化学物質とは異なる抗菌物質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) の抗菌効果について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

1. MLVA8 解析

モンゴル国内で分離された土壌由来と動物由来の炭疽菌 29 株を使用した。

炭疽菌染色体上の 6 箇所および病原性プラスミド pX01 および pX02 上の各 1 箇所の併せて 8 箇所の繰り返し配列領域について特異的プライマーによる PCR を行い、ダイレクトシーケンシング (ABI 3730 xl DNA Analyzer) により塩基配列を解読した。

塩基配列より各繰り返し配列の繰り返し数を算出し、アジア地域を始めとして欧米やアフリカ由来のデータと併せて、PHYLIP version 3.6 と Tree View version 1.6.6. を用いて、unweighted pair group method with arithmetic means (UPGMA) method による系統解析を行った。

2. SNP 解析

2-1.

モンゴル株 29 株を用いて、我々が先に構築した、日本国内分離株を菌株レベルに識別可能な 80 箇所の SNP (80

tag-SNP) による系統解析を行った。

80 箇所の SNP は ABI 3730 xl DNA Analyzer により解読・特定して、モンゴル株に特異的な 80 SNP ライブラリーを作成した後に、MEGA version 5 を用いて Neighbour-Joining Tree method で系統解析を行った。

2-2.

モンゴル株 29 株から、モンゴルでの分離地域と土壌・動物由来株を網羅する 10 株についてフルゲノム解析を行った。

遺伝子バンクに登録されている 21 株の公開フルゲノムデータと今回モンゴル株から得たゲノムデータを比較して、染色体上、病原性プラスミド pX01 および pX02 上の全 SNP を検索した。

また、検索した全 SNP から、モンゴル分離株に特異的な SNP パターンを抽出して、代表的な SNP (tag-SNP) を選択した後に、MEGA version 5 を使用して Neighbour-Joining Tree method で系統解析を行った。

3. 短鎖抗菌性ペプチド AMP の検討

炭疽菌の「芽胞」「栄養型」および「莢膜型」細胞への抗菌効果を検証を行った。AMP はその立体構造から -helix 型、 -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。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。「芽胞」と「栄養型」の比較には 34F2 株 (pX01+, pX02-)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 (pX01-, pX02+)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

1. MLVA8 解析

モンゴル分離株 29 株は全て A3 クラスタに分類された。A3 クラスタは日本を始めとしたアジア諸国で分離される炭疽菌が多く分類されるクラスタである。しかしながら、MLVA8 による系統解析ではモンゴル分離株が形成するクラスタは同じブランチからの枝分かれから形成されており、菌株レベルでの識別は不可能であった。

2. SNP 解析

2-1.

MLVA8 よりも解析力の高い 80 tag-SNP を用いてモンゴル分離株の系統解析を行った(図 2)。モンゴル分離株は、日本分離株や Ames 株と同じ A3b クラスタに分類された。また、A3b クラスタ内で大きく 3 つのブランチを形成した。

80 tag-SNP は、MLVA8 解析より詳細な分類が可能であるが、日本分離株に特異的な 80 tag-SNP ではモンゴル分離株を菌株レベルで識別することは困難であった。

2-2.

モンゴル株 29 株から、モンゴルでの分離地域と土壌・動物由来株を網羅する 10 株のうち、7 株についてフルゲノムデータを得ることができた。モンゴル分離株に特異的な 148 箇所の SNP を抽出して、各 SNP パターンから代表的な SNP を 12 箇所に絞り込んだ。この 12 箇所の SNP を利用して系統樹を作成したところ、菌株レベルでの識別が可能となった。

3.

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、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。

D. 結論

SNP を用いた遺伝学的タイピングによって、モンゴル分離株を菌株レベルで識別できることを明らかにした。分

離菌株のフルゲノム解析によってモンゴル株に特異的な SNP (Single Nucleotide Polymorphism) を抽出して系統解析を行うと、A3b クラスタ内に分類されたモンゴル分離株を 3 つの大きなブランチに系統分類可能となった。

フルゲノム解析で分離菌株に特異的な SNP を特定すると、遺伝的変異が少ない炭疽菌についても、希少発生事例（輸入感染症等）において、その感染源や汚染地域を推定できる迅速な遺伝学的タイピングシステム確立の可能性が示唆された。

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。

本研究は、わが国で希少とされるバイオテロに使用される可能性のある人獣共通感染症の具体的な症例分析と病原体解析が可能になることから、公衆衛生行政への貢献度は極めて高いと考えられた。

E . 研究発表

A Okutani, H Tungalag, B Boldbaatar, A Yamada, D Tserennorov, I Otgonchimeg, A Erdenebat, D Otgonbaatar, and S Inoue.

Molecular Epidemiological Study of *Bacillus anthracis* Isolated in

Mongolia by Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for 8 Loci (MLVA-8) Japanese Journal of Infectious Diseases 2011;4:345-348.

F . 健康危険情報

特になし