

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

分担研究「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
研究協力者	黒田 誠	国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター
研究協力者	関塚 剛史	国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター

要旨： 本研究計画のボツリヌス関連事項として、(1) ボツリヌス菌保管株の管理・識別法、(2) ボツリヌス毒素の迅速検査法について検討した。

A. 研究の目的

ボツリヌス菌（Cb：*Clostridium botulinum*）とボツリヌス毒素（BoNT：*Botulinum neurotoxin*）はバイオテロに使用される可能性が高く、警戒されている。その対策として、本研究では(1) Cb株の管理・識別法と(2) BoNTの迅速検査法について研究を行った。

B. 研究方法

(1) Cb株の管理・識別法については、遺伝子型に基づく菌株の分類法の検討を行った。感染研には約80株のCb株が保管されているが、このうち最近分離された10株について、遺伝子型別と、ゲノム解析を行い、詳しく比較した。ゲノム解析は病原体ゲノム解析研究センターとの共同研究で行った。

(2) BoNTの迅速検査法は、BoNTに

よって切断される遺伝子組換えタンパク質を生産し、これを使用してマウスを使わないBoNTの検出系を検討した。

C. 研究結果

(1) Cb株の管理・識別法

国内で2006年から2011年の間に分離されたCb株10株について詳細な遺伝子レベルでの比較を行った(1株がA型菌、2株がB型菌、7株がA(B)型菌)。A(B)型菌7株は、PFGE、MLVA分析などで3つのグループに分けられることがわかった。ゲノム解析によって、このうち2つは5.9kbのプラスミドをもち、もう1つは21kbのプラスミドをもつグループであることが今回明らかになった。また、10株のゲノム解析結果を、既報のCbゲノム12株とSNP分析によって比較した結果、約145,000個のSNPマーカーが抽出され、詳

細な系統樹が作成された（図 1）。国内分離の 2 株の B 型菌のうち 1 株は比較的珍しいサブタイプ B6 の毒素遺伝子を持っており、ゲノム解析による系統樹でも他の株と大きな違いが見られた。国内分離の A 型菌は海外の株と似ていたが 1,300～2,000 SNP マーカーに違いが見られた。

(2) BoNT の迅速検査法

BoNT のによって切断される 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。この方法は精製 BoNT に対して、約 3 時間の検査時間でマウス法に匹敵する検出感度を示したが、夾雑物による影響を受けやすいので、検体中の夾雑物の影響を除去する手法の開発が必要である。

D. 考察

Cb や BoNT によるバイオテロ対策としては、(1) Cb 菌株の管理と識別態勢の整備、(2) Cb と BoNT の迅速検査法・消毒除去法 (3) 予防薬 (トキシイドワクチン) と治療薬 (抗毒素) の整備、などが考えられる、本研究では、このうち (1) Cb 株の管理・識別法と (2) BoNT の迅速検査法に焦点を当てて検討を行った。

(1) Cb 株の管理・識別法については、感染研保管の Cb 株 10 株について遺伝子型別、ゲノム解析を行った結果、詳細な菌株系統の識別ができるようになった。これらの方法論を他の保管菌株に拡張していけば、Cb 菌株の危機管理のための、保管菌株の詳細なカタログ化が可能だと考えられる。本研究班によって病原体ゲ

ノム解析研究センターとの共同研究が行えたことは、研究を進める上で非常に大きな力となった。

(2) BoNT の迅速検査法

マウス法を使用しなくても、それに匹敵する検出感度の BoNT 検出法が構築できたが、この検出感度が実現されるのは精製 BoNT に対してであり、夾雑物が多い検体では検出感度が大きく低下する。夾雑物の影響を除いて検出感を維持する手法の開発が必要になる。

E. 結論

Cb 菌保管株の危機管理に役立つと考えられる、Cb 菌の系統分類、カタログ化に利用すべき方法論が定まってきた。BoNT の迅速検査法として、改良すべき点はあるが、マウスを使用しない高感度な方法を構築した。

F. 健康危険情報

特になし

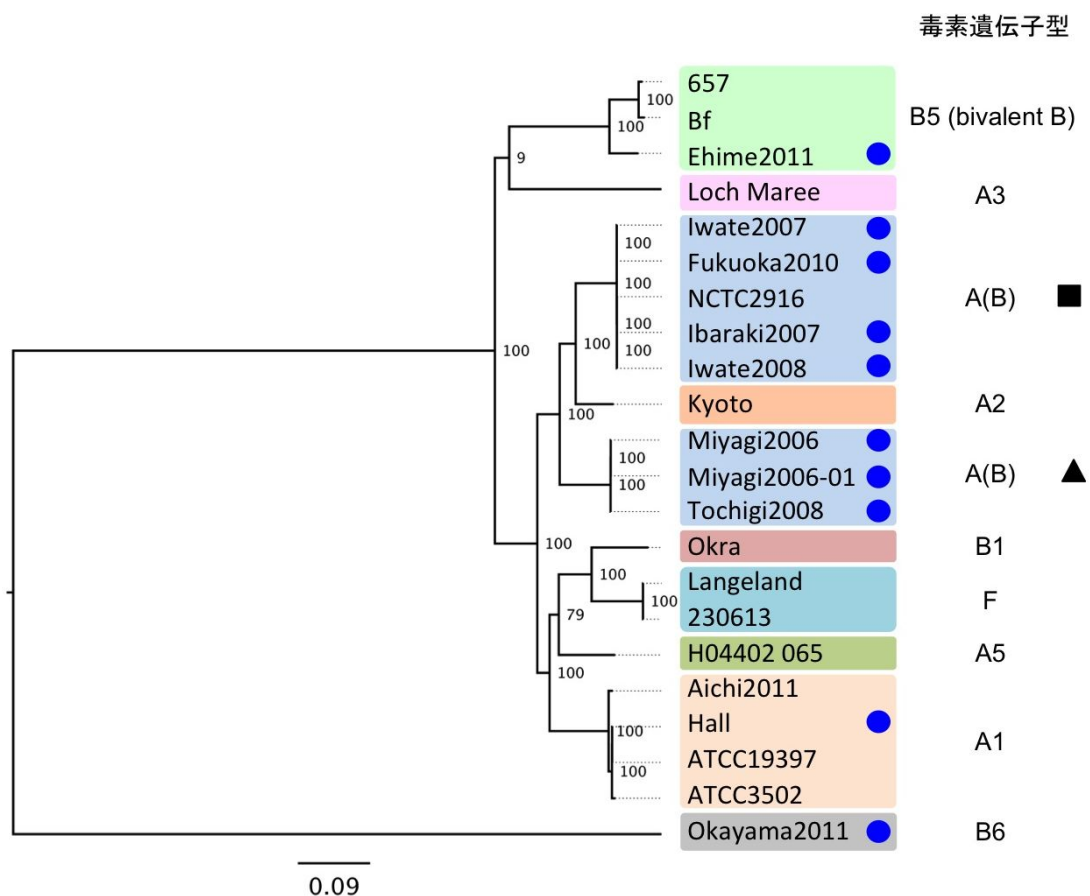
G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

図 1. ゲノム解析結果に基づくボツリヌス菌株の系統樹



- 今回、解析を行った感染研保管の国内分離株
- 5.9 kb のプラスミドをもつ A(B) 型菌のグループ
- ▲ 21 kb のプラスミドをもつ A(B) 型菌のグループ