

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)

分担研究報告書

近隣地域からの侵入が危惧されるわが国にない感染症の 発生予防に関する研究
狂犬病ウイルス L 蛋白質の分子機能解析に有用となる組換え L 蛋白質の作出と機能性の確認

分担研究者: 伊藤直人 岐阜大学応用生物科学部・准教授

研究要旨: RNA 依存性 RNA ポリメラーゼである狂犬病ウイルス L 蛋白質は、狂犬病の治療法や新規暴露後予防法の有力な分子標的となることが予想されるものの、その分子機能についてはほとんど解明されていない。昨年度、L 蛋白質の機能解析を実施するためのツールとして、レポーター遺伝子を発現する L 遺伝子欠損狂犬病ウイルスを作出した。本年度は、同ウイルスを用いた L 蛋白質機能解析に使用するため、3xFLAG タグ融合 L 蛋白質を発現するプラスミドを構築し、同蛋白質の検出および機能性の確認を行なった。抗 FLAG 抗体を用いた間接蛍光抗体法およびウェスタン・ブロット法により、組換え L 蛋白質の検出に成功した。また、3x FLAG タグ融合 L 蛋白質は、タグの付加がない L 蛋白質と同様の効率で、L 遺伝子欠損ウイルスの増殖を支持することが判明した。今後、この組換え L 蛋白質に変異を導入することで、その分子機能の解析を実施する予定である。

A. 研究目的

狂犬病は、ほぼ 100%の高い致死率と重篤な神経症状を特徴とするウイルス性人獣共通感染症である。有効かつ確実な治療法は、現在も確立されていない。その病原体である狂犬病ウイルスは、主に神経細胞で活発に複製する。すべてのウイルス蛋白質が複製に必須であるものの、特に、L 蛋白質は、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼとして中心的な役割を担っている。L 蛋白質は、ゲノム複製のみならず、mRNA の合成にも関与し、その合成に必要なキャッピング活性およびポリ A 付加活性も保有している。このような重要性および多機能性より、L 蛋白質は治療法の有力な分子標的となると考えられる。しかし、L 蛋白質

の分子機能は、ほとんど未解明のままである。

昨年度は、L 蛋白質の機能解析を推進するためのツールとして、レポーター遺伝子を発現する L 遺伝子欠損狂犬病ウイルスを作出した。プラスミドを用いた一過性発現により L 蛋白質を供給することで、L 遺伝子欠損ウイルスが複製し、かつレポーター遺伝子が発現されることが確認された。したがって、様々な領域に変異を導入した組換え L 蛋白質と L 遺伝子欠損ウイルスを組み合わせて使用することで、L 蛋白質の分子機能解析が可能となった。

上記のような機能解析を実施するためには、変異導入が L 蛋白質の発現量に及ぼす影響を

同時に評価する必要がある。しかし、これまで、L 蛋白質に対する特異抗体を用いて組換え L 蛋白質の検出を試みたものの、成功には至っていない(データ未掲載)。そこで本年度は、組換え L 蛋白質の検出を容易にするため、3x FLAG タグを融合した組換え L 蛋白質を作出した後、実際に抗 FLAG 抗体を用いてその発現の検出を行った。また、タグを付加した組換え L 蛋白質が L 遺伝子欠損ウイルスの増殖を支持するか否かについて、同ウイルスが発現するルシフェラーゼの活性を指標として評価した。

B. 研究方法

常法の DNA クローニング技術を用いて、狂犬病ウイルス固定毒の西ヶ原株の L 遺伝子 cDNA を哺乳類細胞発現プラスミドベクター pCAGGS/MCS に挿入した。この時、組換え L 蛋白質の C 末端に 3xFLAG タグが融合するように遺伝子操作を行なった。完成したプラスミドを pCNIIL-3xFLAG と命名した。

pCNIIL-3xFLAG からの組換え L 蛋白質の発現を確認する目的で、マウス神経芽細胞腫由来 NA 細胞に同プラスミドを導入した。3 日後に細胞を固定した後、抗 FLAG タグ抗体を用いた間接蛍光抗体法を実施した。また、プラスミド導入 3 日後の NA 細胞のライセートを作製し、ウェスタン・ブロット法により組換え L 蛋白質の検出を行なった。

pCNIIL-3xFLAG から発現される FLAG タグ融合 L 蛋白質の機能性を検討するため、同プラスミドを NA 細胞に導入した後、ホタルルシフェラーゼ発現 L 遺伝子欠損ウイルス Nishi- Δ L/Luc 株(昨年度に作出)を感染多重度 0.01 で接種した。

接種 3 日後、ウイルス増殖に伴い発現されるルシフェラーゼの活性を測定することで、L 蛋白質機能を評価した。同様の実験を、FLAG タグを持たない L 蛋白質を発現するプラスミドを用いて実施した。

(倫理面からの配慮について)

本実験は、岐阜大学組換え DNA 安全委員会の承認を得ている(25 岐大術産 第 2 号の 21)。

C. 研究結果

pCNIIL-3xFLAG を導入した NA 細胞を用いて、抗 FLAG 抗体による間接蛍光抗体法を実施した。その結果、強い蛍光シグナルが細胞質を中心に観察された(図 1)。一方、空ベクターを導入した細胞に上記のようなシグナルは認められなかった。

ウェスタン・ブロット法により組換え L 蛋白質の発現を確認したところ、pCNIIL-3xFLAG 導入 NA 細胞のライセートにおいて、L 蛋白質の分子量と一致する、約 220 kDa のバンドが観察された(図 2)。一方、空ベクターを導入した細胞のライセートでは、このようなバンドは確認されなかった。以上より、プラスミドからの組換え L 蛋白質の発現が確認された。

次に、pCNIIL-3xFLAG から発現される組換え L 蛋白質の機能性を検証した。同蛋白質を発現する NA 細胞に Nishi- Δ L/Luc 株を接種した結果、ウイルス増殖を示すルシフェラーゼの発現が確認された(図 3)。このルシフェラーゼ活性の値は、空ベクター(pCAGGS/MCS)を導入した場合と比べ有意に高かった($p < 0.01$)。また、その値は、FLAG タグを持たない組換え蛋白質を用いた場

合の値と同等であった。以上より、L 蛋白質 C 末端への FLAG タグの付加は、その機能に顕著な影響を与えないことが明らかとなった。

D. 考察

L 遺伝子欠損狂犬病ウイルスを用いて L 蛋白質の機能解析を行うには、種々の領域に変異を導入した組換え L 蛋白質を作製・発現し、同ウイルスの複製に伴い誘導されるレポーター遺伝子の発現をモニターする必要がある。すなわち、レポーター遺伝子の発現低下を指標として、L 蛋白質の機能に重要な役割を果たす領域を特定することができると考えられる。一方、変異導入による L 蛋白質の機能低下の機序を検討する場合、当該変異が L 蛋白質の発現量に影響を及ぼす可能性を検証する必要がある。しかしながら、約 220 kDa の L 蛋白質の高い分子量が一因となり、プラスミドから発現した場合でも、組換え蛋白質を検出することは非常に困難である。実際、当研究室で所有している抗 L 蛋白質ウサギ血清を用いて、ウェスタン・ブロット法による組換え L 蛋白質の検出を試みたが、成功には至らなかった(データ未掲載)。そこで、タグの付加とその特異抗体の活用により組換え L 蛋白質の検出が可能となるかについて検討した。

既知の狂犬病ウイルス株の L 蛋白質のアミノ酸配列を比較した結果、その C 末端に、他の株では認められない 15 アミノ酸の余剰配列を有する株(固定毒 PV 株)が確認された。このことは、通常のウイルス株の L 蛋白質にタグ配列を付加しても、その機能に大きな影響が生じないことを示唆している。そこで、固定毒の西ヶ原株の L 蛋白質 C 末端に、22 アミノ酸からなる 3xFLAG タグ

を融合することにした。

3xFLAG 融合 L 蛋白質を発現するプラスミド pCNI-L-3xFLAG を NA 細胞に導入し、間接蛍光抗体法およびウェスタン・ブロット法により組換え蛋白質の検出を試みた。その結果、いずれの方法においても、抗 FLAG 抗体により組換え L 蛋白質を検出することに成功した(図 1 および 2)。3xFLAG タグは、基本的に従来の FLAG タグを 3 連結した構造を持つ。一般に、3xFLAG タグの使用により、組換え蛋白質の検出感度が 20~200 倍上昇するとされている。実際、従来の FLAG タグを融合した組換え L 蛋白質も作出したが、その検出感度は 3xFLAG タグを融合したものよりも明らかに低かった(データ未掲載)。以上より、3xFLAG タグの活用は、組換え蛋白質の検出感度を著しく上昇させることが確認された。

3xFLAG 融合 L 蛋白質の発現は、タグの付加がない L 蛋白質と同等の効率で、L 遺伝子欠損ウイルスの増殖を支持することが確認された(図 3)。すなわち、C 末端への 3xFLAG タグの付加が L 蛋白質の機能に影響を及ぼさないことが裏付けられた。このことは、組換え L 蛋白質の発現量と機能を同時に評価できる実験系の確立を意味している。現在、本系の有用性をさらに評価する目的で、L 蛋白質の 728-730 位に存在する RNA ポリメラーゼ活性モチーフ(GDN)を SDD に置換した不活性型変異体の作出を行なっている。

L 蛋白質は、様々な酵素活性を有する多機能蛋白質である。このような多機能性が同一分子内でどのような様式で保持されているのかについては興味深い課題であるものの、その実態は明らかになっていない。今回、樹立した 3xFLAG 融合 L 蛋白質と L 遺伝子欠損ウイルス

を組み合わせることで、従来よりも詳細な L 蛋白質の機能解析が可能になる。このような解析から得られる知見は、狂犬病の治療法確立のための有益な基盤情報となると考えられる。

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

E. 結論

L 遺伝子欠損狂犬病ウイルスを用いた L 蛋白質の機能解析に使用する目的で、3xFLAG タグを C 末端に融合した組換え L 蛋白質を作出した。抗 FLAG 抗体により同蛋白質の検出が可能になったこと、ならびに 3xFLAG タグの付加が L 蛋白質の機能に顕著な影響を与えないことが確認されたことから、組換え L 蛋白質の発現量と機能性の両者を評価できる実験系を樹立することができた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

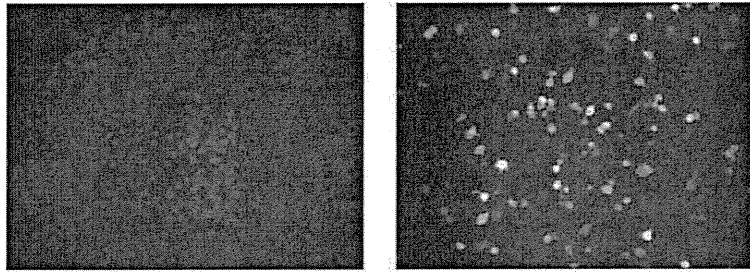
該当なし

2. 学会発表

中川賢人、伊藤直人、岡田和真、岡寺康太、三竹博道、杉山誠. L 蛋白質機能解析に有用となる L 遺伝子欠損型狂犬病ウイルスの樹立. 第 158 回日本獣医学会学術集会. 北里大学(青森県十和田市). 2015 年 9 月 7 日~9 日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得



導入プラスミド pCAGGS/MCS (空ベクター) pCNiL-3xFLAG

図1. 間接蛍光抗体法による組換えL蛋白質の検出

細胞：マウス神経芽腫由来NA細胞
 一次抗体：抗FLAG抗体

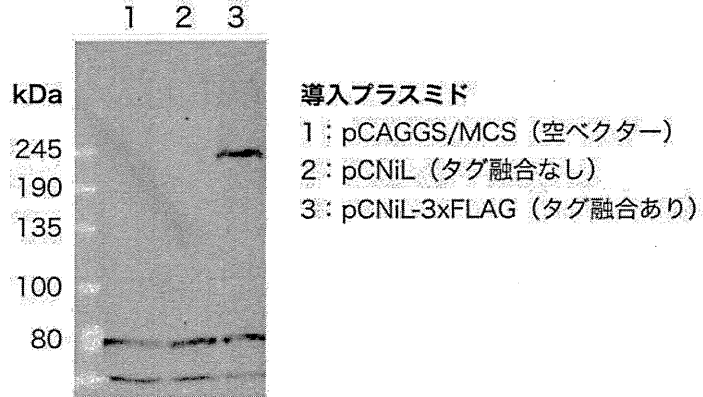


図2. ウェスタン・プロット法による組換えL蛋白質の検出

細胞：マウス神経芽腫由来NA細胞
 一次抗体：抗FLAG抗体

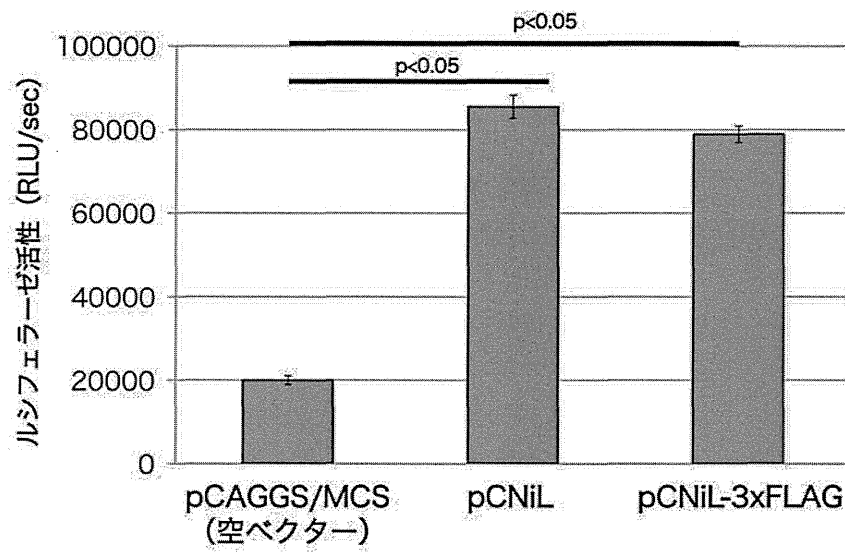


図3. L遺伝子欠損ウイルスを用いた組換えL蛋白質の機能性の確認

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)
分担研究報告書

近隣地域からの侵入が危惧されるわが国にない感染症の 発生予防に関する研究

ブルセラ症の診断法の開発
(含、無尾類からの新規ブルセラ属菌の分離と解析)

研究分担者 今岡 浩一 国立感染症研究所 獣医科学部 第一室長
研究協力者 朴 ウンシル 国立感染症研究所 獣医科学部 第一室研究員
研究協力者 木村 昌伸 国立感染症研究所 獣医科学部 主任研究官
研究協力者 鈴木 道雄 国立感染症研究所 獣医科学部 主任研究官
研究協力者 宇根 有美 麻布大学 獣医学部 獣医学科 教授

研究要旨: 1)これまでに、本研究にて、3種の無尾類より、新規ブルセラ属菌 5株を分離した。今回、ウサギ免疫血清を用いて、本分離菌の抗原性を検討した。A9h (A7h,A10h)に対する抗血清は各種ブルセラ属菌との反応性が *B. abortus* に対する抗血清と同様であった。A141 に対する抗血清は、A141 との反応性が強く、*B. canis* と一部交差反応を示した。A105 は A105 とのみ強く反応していた。3種のカエルから分離された新規ブルセラ属菌はそれぞれ異なる抗原性を持つことが明らかとなった。2) 特異的血清診断法に用いる検出用抗原を作成した。*B. canis* を UV 不活化、超音波処理等を行った後、超遠心処理により得られた上清を抗原として、Western Blotting、2次元電気泳動により、特異的タンパク群を同定した。その中で、ブルセラ属に近縁な *Ochrobactrum* 属菌とのホモロジーが少ないタンパクを選択し、それらの組換えタンパクを作成した。得られた組換えタンパクと *B. canis* 抗血清との反応性を確認したところ、10KDa chaperonin が良好な反応性を示した。

A. 研究目的

波状熱やマルタ熱として知られるブルセラ症 (Brucellosis) は、ブルセラ属菌 (*Brucella* spp.) による、世界中の多くの国と地域で重要な人獣共通感染症である。近年では、旧来の家畜ブルセラ菌 (*B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*) やイヌブルセラ菌 (*B. canis*) だけでなく、海棲哺乳類由来や、その他新種のブルセラ属菌が、齧歯類、食肉類、霊長類、さらにヒト患者からも分離されている。(表 1)。

1. 2012 年にアフリカ産無尾類由来の新たなブルセラ属菌が報告され、これらは *B. inopinata* に近縁であった。*B. inopinata* はヒトに感染しうる菌と考えられているが、その自然宿主や生態は不明である。我々は、これまでに、本研究にて、3種の無尾類より、新規ブルセラ属菌 5株を分離した(表 2)。これら 5株について、生化学的性状を検討したところ、これまで知られている他のブルセラ属菌よりも、遺伝的に最もブルセラ属菌と近縁であると考えられている *Ochrobactrum* 属菌に近い性状を示したが、A105, A141 株と A9h (A7h,

A10h)株では、その性状に差が認められた。さらに、A9h は、*omp2-ca* タイプの配列を検出する特異的 PCR で、A105 や A141 に比して、反応性が非常に弱く、これら 2 株とは異なる遺伝子背景を持つことが示唆された。今回、それぞれの死菌をウサギに免疫して作成した抗血清を用いて、抗原性の違いを検討した。

2. 国内では、ブルセラ症の血清診断法には試験管凝集反応 (TAT) が用いられる。しかし、その煩雑さとサンプル血清使用量の多さ、最終的に判定者により差があり得る、目視による判定という欠点が問題となることから、ELISA 法やイムノクロマト法など、より簡便で特異性・普遍性が高い方法の開発が期待されている。LPS が抗原として用いられることもあるが、smooth-type のブルセラ属菌の LPS は *Yersinia enterocolitica* O9 と非常に高いホモロジーを持つ。そこで、Western Blotting 法により、ブルセラ属菌特異的抗原タンパクを選定し、そのアミノ酸配列・遺伝子配列の決定を行い、その組換えタンパクを作成し、診断用抗原としての可能性を検討した。

B. 研究方法

1. 無尾類由来ブルセラ属菌の抗原性の検討

1) 無尾類由来ブルセラ属菌および抗血清：A105 株 (イエアメガエル由来)、A141 株 (デニスフロッグ由来) および A9h 株 (ベルツノガエル由来) を用いた。なお、A7h, A9h, A10h 株は同一個体から分離されており、これまでの解析ではその性状等も一致しており単一株と考えられることから、以下、A9h で代表する。

各菌株に対する抗血清は、ホルマリン不活化全菌体をアジュバント (TiterMax Gold、TiterMax 社) とともにウサギ (日本白色種) に免疫することにより作成した。

2) ELISA: 抗原として、A9h, A105, A141, *B. canis* (BC), *B. abortus* (BA), *B. suis* (BS), *B. neotomae* (BN), *O. intermedium* (OI) のホルマリン不活化全菌体を使用した。96 ウェルマイクロプレ

ートに抗原 (0.01 OD/ml) を 50ul 入れ、4°C で一晩、固相化した。ブロッキングした後、800 倍から 4 倍段階希釈した A9h, A105, A141, BA, BC に対するウサギ免疫血清を反応させた。次いで、二次抗体として抗ウサギ IgG-HRP0 抗体を反応後、ABTS を用いて発色を検討した。

2. ブルセラ属菌特異的診断用抗原の作出

1) 標的タンパクの選定: *B. canis* 菌液を紫外線照射により不活化後、凍結融解・超音波処理を行い、超遠心により、その上清である分画 BcUV2-1 を得た。BcUV2-1 を抗原とし、1 次元および 2 次元電気泳動による WB 法で、ブルセラ属菌等に対する各種ウサギ免疫血清及び *B. canis* 感染血清との反応性をみた。それぞれ、抗ブルセラ抗体が特異的に反応するスポットを回収し、NANO-LC-MS/MS 法で当該タンパク群を同定した。その中で、ブルセラ属菌と近縁な *Ochrobactrum* 属菌とのホモロジーが少ないタンパクを選定した。

2) 組換えタンパクの作成と確認: ブルセラ菌 (*Brucella* spp.) の DNA を鋳型とし、制限酵素サイトを含有するプライマーを用いて PCR で各タンパクのコード領域の遺伝子増幅を行った。増幅した DNA 断片を pCR4-TOPO に挿入し、大腸菌 (XL1-blue) にトランスフォームし、組換えプラスミドを調整し、挿入塩基配列の確認を行った。各遺伝子 DNA が挿入された pCR4-TOPO ベクターを BamHI と KpnI で制限酵素処理を行い、その DNA 断片を、pET43.1b(+) 発現ベクターに挿入し、大腸菌 (BL21(DE3)pLysS) をトランスフォームした。得られた組換え大腸菌を IPTG で発現誘導し、Nus タグ融合タンパクを発現した大腸菌からニッケルカラムで Nus タグ融合タンパク質として精製し、SDS-PAGE および WB を用いて各タンパク質を確認した。さらに、Ni-NTA agarose (QIAGEN) と His⁶Bind buffer kit (NOVAGEN) で fusion protein を精製し、SDS-PAGE および WB を用いて各タンパク質を確認した。

C. 研究結果

1. 無尾類由来ブルセラ属菌の抗原性の検討 (図 1): A9h に対する抗血清は、ホモである A9h だけでなく、BA, BS, BN とも強く反応し、やはり Smooth-type のブルセラ属菌と交差性が言われている OI とも強く反応した。この反応性は、BA に対する抗血清を用いたときの反応と類似していた。A141 に対する抗血清は、A141 との反応性が強く、BC とも一部交差反応を示した。逆に、BC に対する抗血清は、A141 との反応性が強く、BC とも一部交差反応を示した。A105 は A105 とのみ強く反応していた。以上のことから、3 種のカエルから分離された新規ブルセラ属菌は、BA タイプ (A9h)、BC タイプ (A141)、既知のブルセラ属菌とは反応しないタイプ (A105) と、それぞれ異なる抗原性を持つことが明らかとなった。

2. ブルセラ属菌特異的診断用抗原の作出

1) 標的タンパクの選定: WB のスポット (図 2) から確認されたタンパク群のうち、以下の 6 タンパクを *Ochrobactrum* 属とのホモロジーが低いことから、診断用抗原候補として選定した。10 kDa chaperonin (以下、10C)、OsmC family protein (OsmC)、Uncharacterized protein (gi|489053777) (UP82)、Uncharacterized protein (gi|489057608) (UP83)、DNA gyrase subunit B (gyrB)、NADH-ubiquinone oxidoreductase (NAD) (表 3)。

2) 各遺伝子の construct は sequence でエラーのないことを確認した。各 construct (10C/pET43.1b(+), NAD/pET43.1b(+), OsmC/pET43.1b(+), GyrB/pET43.1b(+), UP-82/pET43.1b(+), UP-83/pET43.1b(+)) で BL21(DE3)pLysS をトランスフォームし、0.4mM と 1mM IPTG で各組換えタンパクの発現を誘導した。結果、0.4mM と 1mM IPTG の両濃度で 5 つの組換えタンパク、10C、OsmC、NAD、gyrB、UP83 の発現が SDS-PAGE と S tag (Novagen, monoclonal anti-mouse) に対する抗体を用いた

immunoblot で確認された (図 3)。すべて 70~75 kDa 付近でバンドが確認された。しかし、*B. canis* に対するウサギ免疫血清は 10C のみに反応を示した (図 3)。当該組換えタンパクを精製した (図 4) が、これについての WB 等、詳細な解析は現在検討中である。

D. 考察

これまでに、国内繁殖の無尾類 3 種から、ブルセラ特異的 PCR によりブルセラ属菌と判定される菌を 5 株分離した。これらは、遺伝子タイピングに用いられる 9 座の遺伝子について、ホモロジー解析と系統樹解析を実施した結果、*B. inopinata* に近縁であることがわかっている。しかしながら、今回、これら分離株の抗原性を検討したところ、一様ではなく、BA タイプ (A9h)、BC タイプ (A141)、既知のブルセラ属菌とは反応しないタイプ (A105) と、それぞれ異なる抗原性を持つことが明らかとなった。これまでに、ヒト培養細胞に感染し、細胞内で増殖することを明らかにしているが、今後さらにその病原性について、より詳細に *in vitro*、*in vivo* で検討を加え、3 種それぞれの特徴を確認し、ヒトへの感染リスクを検討する必要があると考えられる。

今回、ブルセラ属菌特異的診断法の開発のため、ブルセラ特異的抗原 (抗血清と特異的反応性を示すタンパク) を同定し、これの組換えタンパク作成を行った。その結果、10 kDa chaperonin が良好な反応性を示した。これについては、精製と WB および ELISA での反応性の検証を現在行っているところである。さらに、その他既知のタンパクを含め、特異性、感度等の検討が必要である。

E. 結論

1. 本研究において、これまでに以下の点が明らかとなった。1) 国内に流通するカエルからブルセラ属菌を分離した。2) 遺伝子解析により *B.*

*inopinata*に近縁だった。3)特異的遺伝子検出法を開発した。4)3種の菌はそれぞれ抗原性が異なっていた。5)ヒト細胞に感染、細胞内で増殖することからヒトへの感染・発症リスクを持つことが推測された。

2. 抗ブルセラ抗体と特異的に反応するタンパク群を同定し、その中で、ブルセラ属菌に最も近縁とされる *Ochrobactrum* 属菌とホモロジーの低いタンパクについて、ブルセラ特異的組換えタンパクを作成した。10 kDa chaperonin が良好な反応性を示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表等

1. 論文発表等

(1) Taguchi,Y., Imaoka,K., Kataoka,M., Uda,A., Nakatsu,D., Horii-Okazaki,S., Kunishige,R., Kano,F. and Murata,M. Yip1A, a novel host factor for the activation of the IRE1 pathway of the unfolded protein response during *Brucella* infection. PLoS Pathogens, 11(3): DOI:10.1371/journal.ppat.1004747 March 5, 2015

(2)武藤義和, 山元佳, 橋本武博, 片浪雄一, 忽那賢志, 竹下望, 早川佳代子, 金川修造, 大曲貴夫, 加藤康幸, 今岡浩一. *Brucella melitensis* 感染症と診断されたソマリア人男性の1例. in: 病原微生物検出情報, 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局, 36(10): 195-196, 2015

2. 学会発表等

(1)佐藤昭裕, 藤田裕晃, 月森彩加, 小林勇仁, 中村造, 福島慎二, 水野泰孝, 大楠清文, 藤井毅, 今岡浩一, 松本哲哉. アニマルケアスタッフの *B. canis* 無症候性保菌. 第89回日本感染症学会総会, 京都, 2015年4月

(2)今岡浩一. 人獣共通感染症の動向とリスク評価について. 平成27年度中央畜産技術研修会(畜産物安全行政), 白河, 2015年6月

(3)田口由起, 今岡浩一, 片岡紀代, 宇田晶彦, 中津大貴, 堀井咲耶, 國重莉奈, 加納ふみ, 村田昌之. Yip1A は *Brucella abortus* 感染下での小胞体ストレス応答のIRE1 経路の活性化に必要な新規宿主因子である. 第67回日本細胞生物学会大会, 東京, 2015年6-7月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

表 1：ブルセラ属菌と主なホスト

種	宿主動物	ヒトへの感染・発症
Old species		
<i>B. melitensis</i>	山羊、めん羊、ラクダ	あり（最も一般的で重要）
<i>B. abortus</i>	牛、水牛、エルク	あり（次に重要）
<i>B. suis</i>	ブタ、いのしし、トナカイ、カリブー	あり
<i>B. canis</i>	犬（イヌ科）	あり（近年、報告数が増加傾向）
<i>B. ovis</i>	めん羊	報告無し
<i>B. neotomae</i>	げっ歯目	報告無し
Novel species		
<i>B. ceti</i>	クジラ、イルカ	2例の患者報告あり。実験室感染例も報告あり
<i>B. pinnipedialis</i>	アザラシ、アシカ	
<i>B. microti</i>	ハタネズミ、（土壌）	報告無し
<i>B. inopinata</i>	不明、（カエル？）	株名BO1、BO2の2例の報告あり
Future species		
<i>B. sp. 83/13および</i> <i>B. sp. NF2653</i>	げっし目	報告無し
<i>B. papionis sp. nov.</i>	ハブーン	報告無し

表 2：無尾類よりの分離株

株名	由来	臓器
A105	イエアメガエル <i>Litoria caerulea</i>	骨髄
A141	デニスフロッグ <i>Polypedates dennysii</i>	肝臓
A7h	ベルツノガエル <i>Ceratophrys ornate</i>	肝臓
A9h		
A10h		

表 3：診断用抗原候補タンパク

Protein	gene	MW	Note*	BLAST_P
10 kDa chaperonin	groS groES	10,393	<i>gij489056247</i>	<i>Ochrobactrum</i> 94%
Uncharacterized protein (DNA gyrase subunit B)		12,741	<i>gij489054589</i>	<i>Ochrobactrum</i> 85%
OsmC family protein		14,232	<i>gij489055612</i>	<i>Ochrobactrum</i> 94%
Uncharacterized protein		11,217	<i>gij489057608</i>	<i>Ochrobactrum</i> 83%
Uncharacterized protein		14,831	<i>gij489053777</i>	<i>Ochrobactrum</i> 82%
NADH-ubiquinone oxidoreductase		11,955	<i>gij489053677</i>	<i>Ochrobactrum</i> 87%

図 1 : ELISA による各抗血清と各抗原の反応性

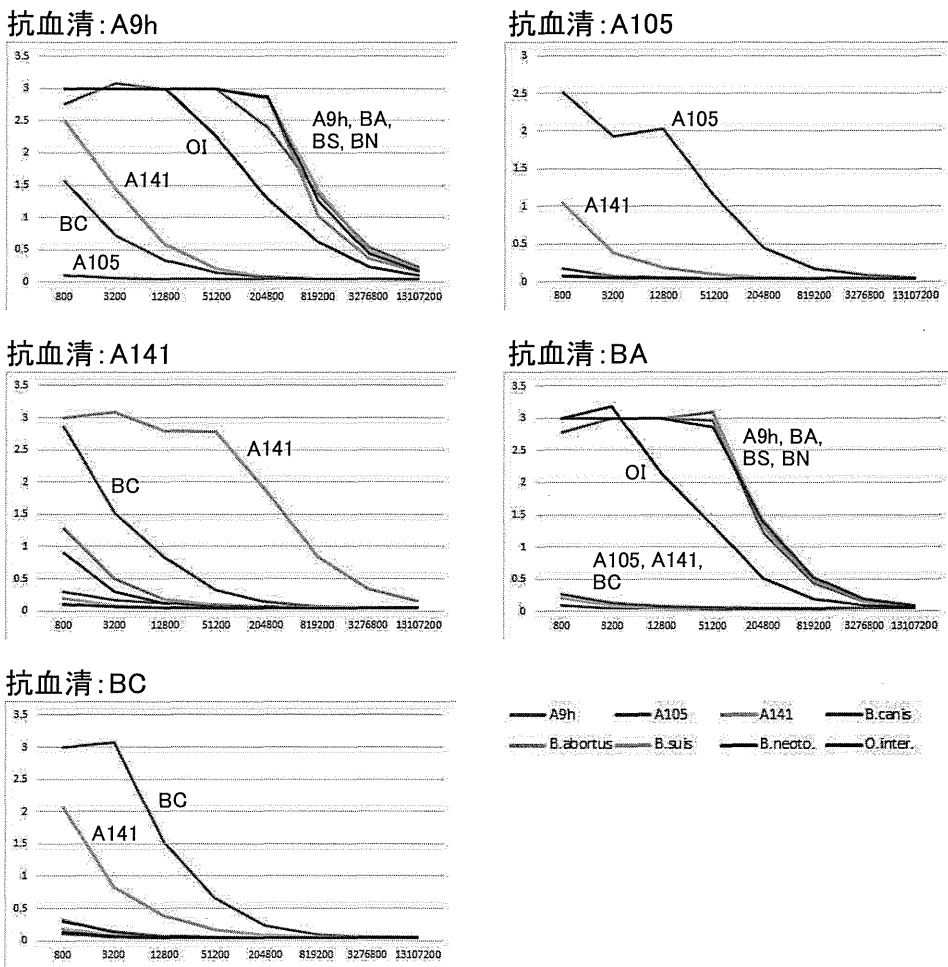
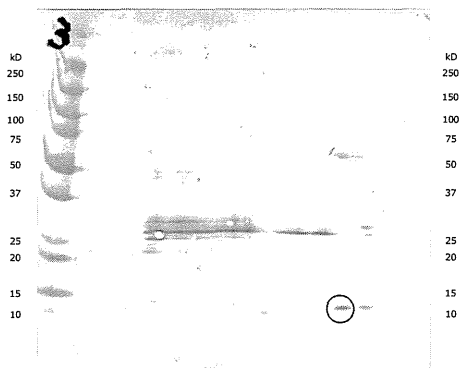


図 2 : 標的タンパクの選定用スポット (2次元電気泳動による WB)

B. canis UV2-1
 ATTO SDS ELIMINANT B選?心 G25
 1D:PH3-10, 2D:5-20%
 Ag:5μg
 1st Ab: x1,000
 2nd Ab: proteinA/G-HRPも x10,000



B. canis イヌ感染?血清 (MAT x160, TAT160)

図3：組換えタンパクの確認と *B. canis* 免疫ウサギ血清との反応性

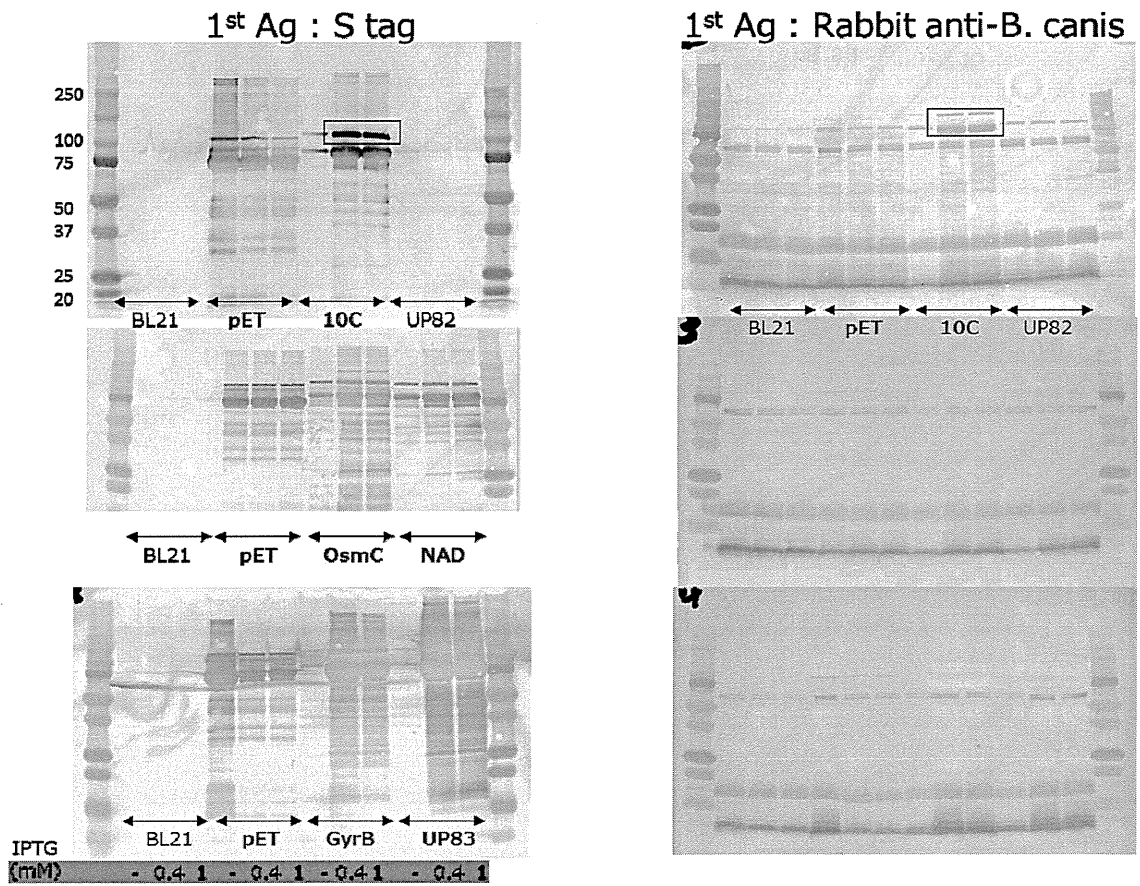
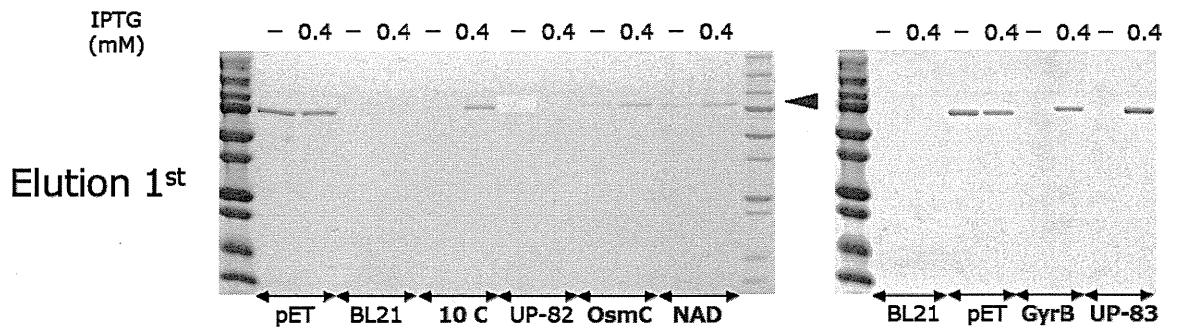


図4：組換えタンパクの精製



近隣地域からの侵入が危惧されるわが国にない感染症の発生予防に関する研究

—バルトネラ感染症の疫学—

研究分担者 丸山 総一 日本大学生物資源科学部・教授

研究要旨:和歌山県で捕獲したユビナガコウモリ 50 頭の血液から *Bartonella* の分離を試みた結果, 12 頭(24.0%)から *Bartonella* が分離された。*gltA* と *rpoB* による遺伝子型別の組み合わせによって, 分離株は 12 の遺伝子グループ(I~XII)に分類された。さらに, 5 遺伝子領域(*gltA*, *rpoB*, *ftsZ*, *ribC*, 16S rRNA)の連結配列に基づく系統解析を行ったところ, 日本のユビナガコウモリは 2 種の *Bartonella* を保有していることが明らかとなった。このうち, 1 種は台湾のユビナガコウモリが保有する *Bartonella* と非常に近縁であり, 他の 1 種は既存種とは異なる新種の *Bartonella* であることが示唆された。

A. 研究目的

近年の研究により, コウモリは様々なウイルス性人獣共通感染症の病原巣であることが明らかとなってきた。ニパウイルスやヘンドラウイルスは, マレーシアやバングラデシュ, オーストラリアのオオコウモリ属を, 狂犬病ウイルスを含むリッサウイルスは, ナミチスイコウモリやストローオオコウモリ属からそれぞれ検出されている。また, オーストラリアやブラジルのオオコウモリ属から *Leptospira* DNA が, オランダのヒナコウモリの仲間から *Campylobacter jejuni* がそれぞれ検出されていることから, コウモリはウイルスのみならず細菌性人獣共通感染症の病原巣にもなる可能性が示唆されている。

Bartonella は, 哺乳類の赤血球に寄生するグラム陰性菌で, その 13 種 2 亜種は人に病原性を有することが知られている。近年では, イギリス, ケニア, ペルー, グアテマラおよび台湾に生息する複数種のコウモリに *Bartonella* が広く分布する

ことが明らかとなってきた。また, コウモリから分離された *Bartonella mayotimonensis* に類似の DNA が, 人の心内膜炎から検出されたことから, コウモリは人のバルトネラ症の潜在的な病原巣になりうることを示されている。しかしながら, わが国のコウモリにおける *Bartonella* の保有状況は全く不明の状態である。そこで, 本研究では和歌山県で捕獲したユビナガコウモリにおける *Bartonella* の分布状況とその遺伝子性状を詳細に解析した。

B. 研究方法

2013 年に, 和歌山県某所の用水路トンネル内に生息していたユビナガコウモリを複数のコロニーから数頭ずつ捕獲し, 計 50 頭を研究に使用した。コウモリの血液およそ 100 μ l を 5% 兎血液加 Heart Infusion 寒天培地に塗抹し, 35°C, 5%CO₂ 下で 1 カ月間培養した。分離株は, コロニー形態, 発育日数ならびにグラム染色性(陰性)から

Bartonella と推定した。*Bartonella* を保有していた各個体から無作為に 3 株を選択し、2 つのハウスキーピング遺伝子領域 (*gltA* および *rpoB*) を標的とした PCR により *Bartonella* と同定した。分離株は、*gltA* および *rpoB* 領域の塩基配列から各領域の遺伝子型を決定し、その組み合わせに基づいて遺伝子グループに分類した。各遺伝子グループから無作為に選抜し代表株について、BLAST 検索により両領域の塩基配列の相同性を検討した。さらに代表株の 5 遺伝子領域 (*gltA*, *rpoB*, *ftsZ*, *ribC*, 16S rRNA) の連結配列に基づき、台湾のユビナガコウモリ属由来 *Bartonella* 6 株と *Bartonella* 標準株とともに系統解析を行った。遺伝子解析で、新種と疑われた系統の株については、マイクロスキャン RAID パネルを用いて生化学性状を検討した。

(倫理面からの配慮について)

研究対象のユビナガコウモリは、学術研究用に捕獲された個体である。捕獲した個体は適切な麻酔下のもと、心臓から全採血した。

C. 研究結果

検討したユビナガコウモリの 24.0% (12/50) から *Bartonella* が分離された。分離株は、*gltA* 領域と *rpoB* 領域の遺伝子型の組み合わせから 12 の遺伝子グループ (I~XII) に分類された。

BLAST 検索の結果、遺伝子グループ I~XI の代表株は台湾のユビナガコウモリ属由来 *Bartonella* と *gltA* 領域で 99.7~100%、*rpoB* 領域で 99.2~100% の相同性であった。一方、遺伝子グループ XII の代表株は、マレーシアのクモバエ由来 *Bartonella* DNA と *gltA* 領域で 88.1%、*B. quintana* Fuller[†] と *rpoB* 領域で 89.1% の相同性であった。(表 1)。

5 領域の連結配列に基づく系統解析では、遺

伝子グループ I~XI の代表株は台湾のユビナガコウモリ属由来 *Bartonella* と同一のクラスター (系統 I) を形成したのに対し、遺伝子グループ XII の代表株は独立したクラスター (系統 II) を形成した (図 1)。また、検討したコウモリ分離株は全て同一の生化学性状を示し、*B. henselae*, *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*, *B. acomydis*, *B. pachyuromydis* の 4 菌種と最も類似した性状であった (表 2)。

D. 考察

本研究では、わが国 (和歌山県) のユビナガコウモリが *Bartonella* を保有していることを初めて明らかにした。*gltA*, *rpoB* 領域の塩基配列の相同性解析および 5 領域の連結配列に基づく系統解析から、和歌山県のユビナガコウモリは 2 種の新たな *Bartonella* を保有しており、1 種は台湾のユビナガコウモリ属由来 *Bartonella* と同種、他の 1 種は台湾株や既存種とは異なる *Bartonella* 種であることが明らかとなった。さらに、和歌山県のユビナガコウモリから分離された株は *B. henselae*, *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*, *B. acomydis*, *B. pachyuromydis* の 4 菌種と非常に類似した生化学性状を有することも明らかとなった。

本研究では、和歌山県のユビナガコウモリのみを用いたことから、全国的なコウモリにおける *Bartonella* の保有状況を示していない。今後、国内に生息する他種のコウモリや全国的なユビナガコウモリにおける *Bartonella* の保有状況を明らかにするとともに、コウモリ分離株の遺伝子性状から、コウモリにおける本菌の宿主特異性についても検討する必要があると考えられた。さらに、コウモリが保有する *Bartonella* の人における病原性についても明らかにする必要があると思わ

れる。

E. 結論

和歌山県のユビナガコウモリは *Bartonella* を保有しており、新種と思われる *Bartonella* が分布していることも明らかとなった。

L. 健康危険情報

わが国のユビナガコウモリが保有する *Bartonella* の病原性は不明なものの、諸外国では心内膜炎患者の心臓弁から、コウモリを宿主とする *B. mayotimonensis* の DNA が検出されている。コウモリを感染源としたボルトネラ感染症の発生について留意する必要がある。

M. 研究発表

1. 論文発表

1)

ato, S., Kabeya, H., Yoshino, A., Sekine, W., Suzuki, K., Tamate, H. B., Yamazaki, S., Chomel, B. B., and Maruyama, S. 2015. Japanese Macaques (*Macaca fuscata*) as Natural Reservoir of *Bartonella quintana*. *Emerg. Infect. Dis.* 21(12): 2168-2170.

2)

im, K. S., Inoue, K., Kabeya, H., Sato, S., Takada, T., Pangjai, D., Chiu, S. H., Fujita, H., Kawabata, H., Takada, N., Kariwa, H., and

なし

Maruyama, S. 2016. Prevalence and diversity of *Bartonella* species in wild small mammals in Asia. *J. Wildl. Dis.* 52(1): 10-21.

2. 学会発表

11) Sato, S., Kabeya, H., Yoshino, A., Sekine, W., Suzuki, K., Tamate, H. B., Yamazaki, S., Chomel, B. B., and Maruyama, S.. Japanese macaques (*Macaca fuscata*) as a new natural reservoir of *Bartonella quintana*, the causative agent of trench fever. Third International Congress on Pathogens at the Human-Animal Interface (タイ王国チェンマイ, 2015年8月6日~8日)

12) 佐藤真伍, 壁谷英則, 植田大二郎, 三浦達弥, 鈴木和男, 丸山総一. 和歌山県のタヌキにおける病原性 *Bartonella* の保有状況. 第158回日本獣医学会学術集会(北里大学, 2015年9月7日~9日)

N. 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

表 1. 遺伝子グループ代表株の *gltA* および *rpoB* 各領域の塩基配列の BLAST 検索結果

遺伝子グループ (株名)	近縁な <i>Bartonella</i> との相同性					
	<i>gltA</i>			<i>rpoB</i>		
	株名	由来 (国名)	相同性	株名	由来 (国名)	相同性
I (bat2-1)	No.5,6,8,15	ユビナガコウモリ (台湾)	100%	No.15	ユビナガコウモリ (台湾)	99.4%
II (bat8-1)	No.5,6,8,15	ユビナガコウモリ (台湾)	100%	No.15	ユビナガコウモリ (台湾)	99.3%
III (bat40-1)	No.5,6,8,15	ユビナガコウモリ (台湾)	100%	No.5	ユビナガコウモリ (台湾)	99.5%
IV (bat40-3)	No.5,6,8,15	ユビナガコウモリ (台湾)	100%	No.5	ユビナガコウモリ (台湾)	99.6%
V (bat44-2)	No.5,6,8,15	ユビナガコウモリ (台湾)	100%	No.5	ユビナガコウモリ (台湾)	100%
VI (bat23-1)	No.7,16	ユビナガコウモリ (台湾)	99.7%	No.5	ユビナガコウモリ (台湾)	100%
VII (bat8-3)	No.7,16	ユビナガコウモリ (台湾)	99.7%	No.5	ユビナガコウモリ (台湾)	99.3%
VIII (bat43-1)	No.7,16	ユビナガコウモリ (台湾)	100%	No.5	ユビナガコウモリ (台湾)	100%
IX (bat45-1)	No.7,16	ユビナガコウモリ (台湾)	100%	No.7	ユビナガコウモリ (台湾)	100%
X (bat48-1)	No.7,16	ユビナガコウモリ (台湾)	100%	No.15	ユビナガコウモリ (台湾)	99.3%
XI (bat48-3)	No.7,16	ユビナガコウモリ (台湾)	100%	No.15	ユビナガコウモリ (台湾)	99.2%
※ PCR 産物から得られた <i>Bartonella</i> の <i>gltA</i> 領域における塩基配列 XII (bat24-1)	E5 ※	クモバエ (マレーシア)	88.1%	<i>B. quintana</i> Fuller ^T	ヒト (ユーゴスラビア)	89.1%

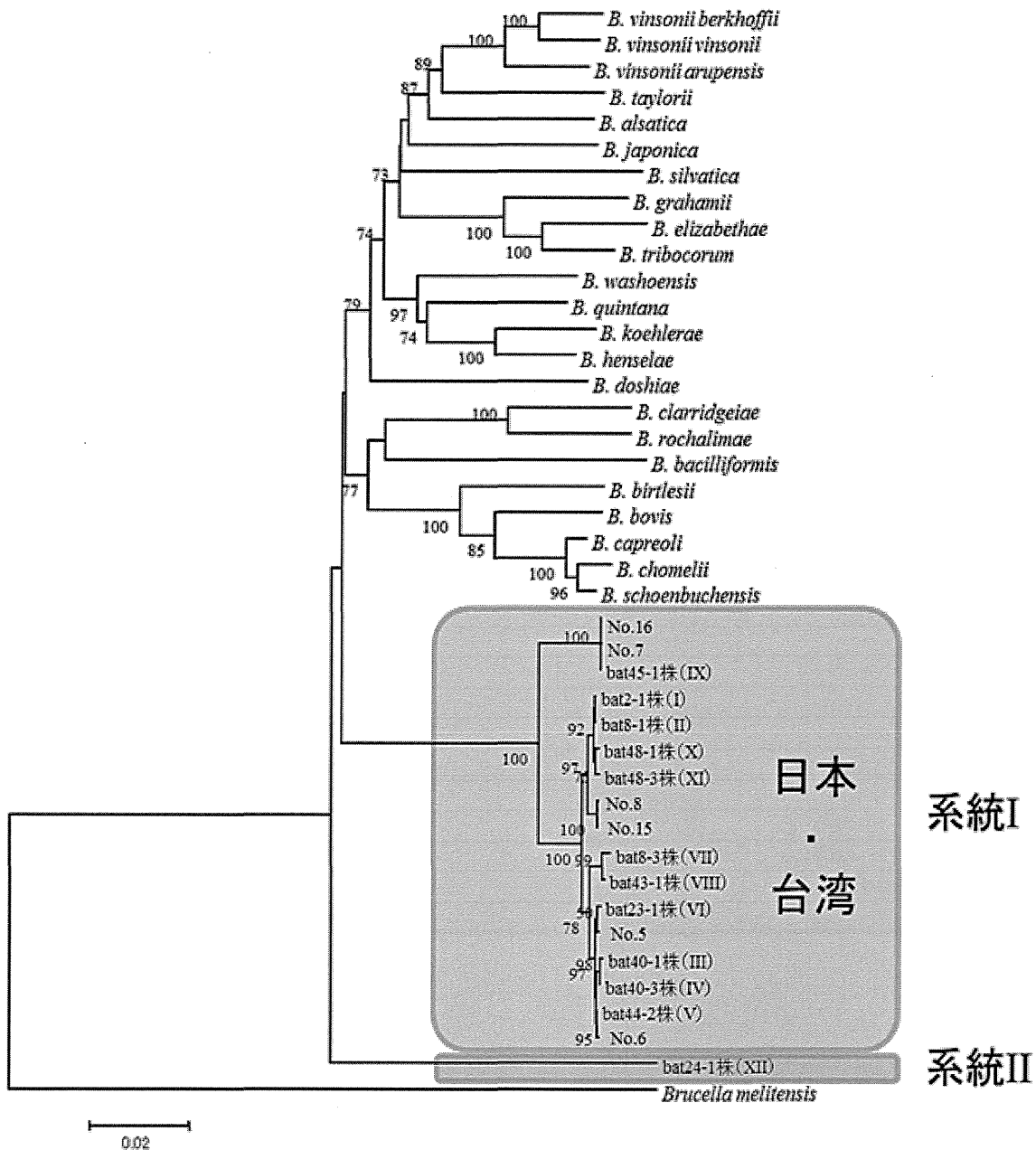


図1. 5 遺伝子 (*gltA*, *rpoB*, *ftsZ*, *ribC*, 16Sr RNA) 領域の連結配列に基づく系統解析
 各遺伝子グループの代表株 12 株 (bat2-1, bat8-1, bat40-1, bat40-3, bat44-2, bat23-1, bat8-3, bat43-1, bat45-1, bat48-1, bat48-3, bat24-1), 台湾のユビナガコウモリ由来 *Bartonella* No. 5, 6, 7, 8, 15 および 16 株ならびに *Bartonella* 標準株と共に系統解析を行った。括弧内のローマ数字は遺伝子グループ名を, 系統樹の分岐部に振られた数字は Bootstrap 値をそれぞれ示す。

表 2. 分離株の生化学性状

生化学性状	系統 I		系統 II		既存種 <i>B. henselae</i> , <i>B. v. berkhoffii</i> <i>B. acomydis</i> , <i>B. pachyuromydis</i>
	bat23-1	bat48-1	bat24-1	bat24-2	
p-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド	—	—	—	—	—
p-ニトロフェニル-α-D-ガラクトピラノシド	—	—	—	—	—
ビス-p-ニトロフェニルリン酸	+	+	+	+	+
p-ニトロフェニル-N-アセチル-β-D-グルコサミド	+	+	+	+	—
p-ニトロフェニル-α-D-グルコピラノシド	—	—	—	—	—
o-ニトロフェニル-β-D-グルコピラノシド	—	—	—	—	—
p-ニトロフェニル-α-L-フコピラノシド	—	—	—	—	—
p-ニトロフェニル-α-D-マンノピラノシド	—	—	—	—	—
ロイシン	+	+	+	+	+
メチオニン	+	+	+	+	+
リジン (アルカリ性)	+	+	+	+	+
リジン (酸性)	+	+	+	+	+
グリシルグリシン	+	+	+	+	+
グリシン	+	+	+	+	+
プロリン	+	+	+	+	+
アルギニン	+	+	+	+	+
ピロリドニル	—	—	—	—	—
トリプトファン	+	+	+	+	+
3-インドキシルリン酸	—	—	—	—	—
トレハロース	—	—	—	—	—
ウレアーゼ活性	—	—	—	—	—
インドール反応	—	—	—	—	—
亜硝酸還元反応	—	—	—	—	—
カタラーゼ活性	—	—	—	—	—

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)

分担研究報告書

近隣地域からの侵入が危惧されるわが国にない感染症の発生予防に関する研究
東南アジアのヤモリ由来 *Salmonella* Weltevreden における病原遺伝子の分布ならびに
ベトナムの土壌からの類鼻疽菌の分離

分担研究者 林谷秀樹 東京農工大学大学院・准教授

研究要旨: 東南アジアのヤモリ由来 *Salmonella* Weltevreden 21 株について、10 種類の病原遺伝子の保有状況を PCR 法により調べたところ、その保有率は最も高い遺伝子(4 種)では 100%、低い遺伝子(1 種)では 0%であった。供試した 21 菌株は、病原遺伝子保有の有無により 5 パターンに型別された。また、これまで *S.weltevreden* から検出されたことのない *sopE1* 遺伝子は、沖縄由来株からのみ検出された。また、東南アジアの環境に広く分布し、人獣共通感染症の原因菌の一つとして知られ、近年、海外感染症として我が国に持ち込まれる事例が頻発している類鼻疽(*Melioidosis*)について、ベトナム・メコンデルタの土壌から原因菌である類鼻疽菌(*Burkholderia pseudomallei*)の分離を増菌培養法ならびに PCR 法を用いて試みた。その結果、両法を併用することで 200 検体中 26 検体(13.0%)から類鼻疽菌は分離され、本地域に類鼻疽菌が広くかつ高率に分布することが明らかになった。

A. 研究目的

Salmonella Weltevreden は、東南アジアに広く分布し、これらの地域の人のサルモネラ感染症の大きな割合を占めている血清型である。近年、本血清型菌は、我が国の沖縄県に侵入し、その定着・拡大が問題となっている。東南アジアでは、ヤモリが本菌を高率に保有していることが我々の調査で明らかになっているが、本研究では東南アジアのヤモリ由来 *S. Weltevreden* における各種病原遺伝子の保有状況について、PCR 法により検討を行なった。

また、日本に侵入・定着が危惧される類鼻疽菌(*Burkholderia mallei*)について、本年度は

増菌法と PCR 法を併用し、ベトナム・メコンデルタの土壌から本菌の分離を試みた。

B. 材料と方法

1. 東南アジアのヤモリ由来 *S.weltevreden* の病原性遺伝子の検出

1) 供試菌株

供試菌株として、昨年度の研究で異なる PFGE パターンを示したヤモリ由来 *S.weltevreden* 21 株(ベトナム由来 14 株、カンボジア由来 1 株、タイ由来株 5 株および沖縄県由来 1 株)を用いた。

2) 標的とする病原遺伝子