

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(A)（海外学術調査）

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01679

研究課題名（和文）感染症対策を目指したザンビア共和国の河川水中炭疽菌による拡散・感染モデルの構築

研究課題名（英文）Analyzing a relationship between a diffusion of pathogenic microorganisms in river water and occurrences of infectious disease in Zambia

研究代表者

東 秀明（Higashi, Hideaki）

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・教授

研究者番号：20311227

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 32,600,000円

研究成果の概要（和文）：ザンビア国内で発生している人獣共通感染症病原体の感染経路の解明を目的とし、河川水中の炭疽菌芽胞に着目し病原体の水系伝播の解明を試みた。炭疽アウトブレイクが繰り返し発生しているルアンガ川流域において河川水を採取し、本研究で開発した炭疽芽胞濃縮法により試料を調製した。PCR及び次世代シーケンサーを用いた解析から河川水中に炭疽菌が存在していることを示すと同時に、同河川水での腸管系ウイルスの存在を明らかにした。加えて、採材地点の河川水深、水温、濁度、河川水流等の環境情報を取得し、河川水による病原体拡散モデルの構築を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環境耐性が高い芽胞を形成する細菌を用いた拡散モデルの構築は、長距離区間の拡散・到達率、及び疾病発生起点からの汚染レベルを解明する上で重要な情報となりえる。現在、日本国内において炭疽は沈静化を見せているが、土壌中の残存芽胞により再興感染症として流行すること、及びバイオテロリズムとして芽胞の散布・拡散に河川流水が利用される可能性は否定できない。本研究で得られた結果は、炭疽菌をはじめとした病原体の伝播拡散への対策を進めていく際の基礎データとなるものである。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the transmission system of zoonotic pathogens in Zambia, we focused on anthrax spores in river water and attempted to reveal the waterborne transmission of the pathogen. In the Luangwa River basin, where anthrax outbreaks have been occurring repeatedly, river water samples were collected by the anthrax spore enrichment method developed in this study. By using PCR and next-generation sequencing, the presence of anthrax in the river water was demonstrated. Additionally, we also found the presence of enteroviruses in the river water. Furthermore, environmental information such as river water depth, temperature, turbidity and flow rate were measured at the sampling sites, and a model of pathogen diffusion by river water was constructed.

研究分野：細菌学

キーワード：感染症 伝播経路

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

北海道大学人獣共通感染症リサーチセンターが海外拠点を設置しているザンビアでは、動物、環境及びヒトを介した多様な疾病が頻発している。特に例年流行が確認される炭疽は、野生動物、家畜及びヒトに対して高い致死性を示す炭疽菌の感染が原因となり、健康及び経済面に被害を与える重大な疾病のひとつである。ザンビアで発生する炭疽アウトブレイク事例は、国内二大河川のザンベジ川上流域（図1 地域A：ザンビア国内有数のウシ飼育地域）、及びルワンガ川上流域（図1 地域B）において、畜牛及びカバを中心とした野生動物で隔年から数年の間隔で発生する。また、地域A、Bでアウトブレイク発生後、両河川が流入する下流域（図1 地域C）でカバやゾウが炭疽菌に感染し、甚大な被害が生じている。炭疽菌は芽胞形成菌であり、その芽胞は一定以上の栄養条件下でのみ発芽可能で、数百キロの間、安定して河川水中の移動が可能である。炭疽菌芽胞の高い環境耐性とザンビアの地理的条件から、上流域の地域A、Bにおける炭疽アウトブレイク発生後に生じる地域Cの炭疽事例は、2地域を結ぶ河川水を介した水系伝播が原因となっている可能性を推察した。



図1：ザンビア国二大河川と主な炭疽アウトブレイク発生地域。A；西部州モング地域，B；ノースルアンガ及びサウスルアンガ国立公園，C；ローワーザンベジ国立公園

### 2. 研究の目的

河川水中の炭疽菌芽胞に着目し、病原微生物の定量・遺伝子の網羅的解析及び地理的情報解析を併せ炭疽菌の水系伝播の証明を試みるとともに、炭疽菌芽胞を指標とした河川水における病原微生物の拡散モデルの構築を行う。また、本研究では芽胞収集の手法として水系ウイルスの濃縮方法を応用することから、芽胞形成菌の疫学調査に併せ、ザンビアの河川水に存在する腸管系ウイルスの存在状況を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 荷電膜吸着法を用いた芽胞濃縮法の開発

河川水試料より芽胞を濃縮する方法としてウイルス濃縮に利用される微生物膜上の電荷を利用した荷電膜吸着法を応用し、迅速かつ簡便な芽胞濃縮の方法を確立する。

#### (2) 現地疫学調査：河川水試料採取と微生物濃縮

荷電膜吸着法を利用した濃縮・回収手法を用い、河川水中の炭疽菌芽胞の濃縮を行う。本研究調査は、炭疽アウトブレイクが発生する乾季（9月～11月）を調査対象時として実施する。

#### (3) 微生物解析：河川水中の芽胞形成菌及び腸管系ウイルスの定量および遺伝子解析

河川試料から検出された炭疽菌の汚染発生地点を明らかにするために、次世代シーケンスにより網羅的に解析する。また、NanoPore シークエンサーを用いることで、10 kb 長の遺伝子配列を解析する。また、リアルタイム PCR 解析により河川水中の腸管ウイルスの存在を検証する。

#### (4) 地理・環境データを用いた河川水による病原体輸送モデルの作成

河川における病原体輸送モデルの構築にあたり、流量、水深、流域面積など対象河川流域の情報を収集する。収集した河川流域の環境情報と公開されている衛星画像、地理情報等を利用し、河川水による病原体輸送モデルの構築を試みる。

### 4. 研究成果

#### (1) 荷電膜吸着法を用いた芽胞濃縮法の開発

北海道大学人獣共通感染症リサーチセンターにおいて、炭疽菌ワクチン株を含めた種々の *Bacillus* 属細菌の芽胞を PBS、採取河川水等に懸濁した試料を調製し、荷電膜吸着法による芽胞の濃縮方法を検討した。フィルターの荷電（陰荷電、陽荷電）、材質、フィルター孔サイズが異なる複数のフィルターを検討した結果、HA フィルター（ミリポア）によるろ過処理によって、芽胞を効率良く濃縮できることが明らかとなった。その際、フィルター孔サイズ  $0.45\mu\text{m}$  および  $8\mu\text{m}$  のフィルターを用い処理したところ、明らかに芽胞径（ $\sim 1\mu\text{m}$ ）より大きい  $8\mu\text{m}$  のフィルターを使用した場合も芽胞の濃縮が確認された。このことから、炭疽芽胞は電荷、親水性等の物理的特徴を介して、HA フィルター上に吸着されていることが示唆された。河川水をろ過するにあたり、混在する不溶物の影響は大きく、試料採取に大孔径フィルターを利用できることは有用である。

(2) 現地疫学調査：河川水試料採取と微生物濃縮

(実施者：北海道大学 東； 東京大学 稲葉)

(3) 微生物解析：河川水中の芽胞形成菌及び腸管系ウイルスの定量および遺伝子解析

(実施者：北海道大学 東； 東京大学 稲葉)

本申請課題の研究期間 2017 年～2019 年の各年において、ザンビア国の乾季である 11 月に試料採取を目的とした現地調査を実施した。

2017 年：ルワンガ川流域のノースルワンガ地域・サウスルワンガ地域 (図 1 地域 B) からルサカまでの区間および、ザンベジ川流域のリビングストーンからモング (図 1 地域 A) までの区間において、河川水試料を採取するとともに採材候補地の状況調査を行い、次年度以降の調査地の選定を進めた。河川水 13 検体 (1 検体 最大 40 リッター)、土壌 3 検体及び動物組織 1 検体の計 17 試料を採取した。河川試料に関しては (1) で述べた荷電膜吸着法を以て芽胞を含めた微生物の濃縮を行った。得られた濃縮試料に対し、炭疽菌毒素遺伝子を標的とした PCR 解析ならびに次世代シーケンサー MinION を用いた試料中微生物の網羅的解析を行った。その結果、ノースルワンガ地域チャマ地区で採取された試料より炭疽菌遺伝子を検出することに成功した。このことから、HA フィルターを用いたろ過処理は、河川水試料を対象とした炭疽菌芽胞の濃縮に利用可能であることが示唆され、以降の河川試料処理に用いることとした。

2018 年及び 2019 年：当該 2 年間は、2017 年の結果を踏まえて採材地をチャマ地区に定め、2017 年と同地点の河川試料を採取した (図 2)。これまでにチャマ地区では、炭疽アウトブレイクが繰り返し発生しており、特に 2011 年にはカバ (約 150 頭) と周辺集落のヒト (約 400 名、うち死者 7 名) で多数の炭疽感染事例が発生した地域である。2018 年は 15 地点の河川水試料 (1 検体 20 リッター) および土壌 40 検体、2019 年は同 15 地点 (1 検体 40 リッター) から河川水試料を採取し、HA フィルターによる濃縮処理を行った。その際、各地点の水深、水温、濁度、河川水流速、COD 値、全有機炭素量 (TOC) 及びアンモニア濃度を計測し、後述する拡散モデル構築の参考値として用いた。得られた試料より DNA を抽出し炭疽菌毒素遺伝子の PCR 解析を行い、さらに血液寒天培地及び炭疽菌選択培地 (PLET 培地) による菌体分離を試みたが、当該 2 年間の試料より炭疽菌遺伝子は検出されず菌体も分離されなかった。これまでの炭疽アウトブレイクの動向によると、アウトブレイクは数年の間隔で発生し周期性があることが示唆されている。



図 2：河川試料採取地 (ノースルワンガ地域チャマ地区)

青、ピンク及び水色の点は、2017 年、2018 年及び 2019 年の採材地点を示す (右上)。流域には 100 頭前後を一つのグループとするカバの集団が複数グループ存在している (右下)。同地区で 2011 年および 2016 年に発生した炭疽アウトブレイクは、本エリアで発見された炭疽菌に感染したカバ斃死体から炭疽菌が広がり引き起こされた。

スケールバー：100m



本研究で試料採取を行ったチャマ地区は、上述した 2011 年に続き 2016 年にアウトブレイクが発生している。アウトブレイクの周期性が環境中に存在する菌体数に依存すると仮定した場合、2017 年に得られた陽性検体は 2016 年のアウトブレイクで大量に増殖した菌体の残留体を検出し、一方、アウトブレイクの間際に当たった 2018 年及び 2019 年は環境中の菌数が減少しており、陽性検体が得られなかった可能性が考えられる。この点に関しては、今後の継続的な調査によって、明らかにされていくものと考えられる。

ザンビア河川水中の腸管系ウイルスの存在状況は不明な点が多く残されており、また本課題で着目した河川水による病原体伝播を考察する上で、河川水中に存在するウイルスの挙動に関する情報は有用である。本研究で芽胞収集の手法として用いた HA フィルター法は、水系ウイルスの濃縮方法を応用したものであり、同フィルターを用いることで水系ウイルスの採取が可能である。そこで 2017 年～2019 年に河川水を採取した際、炭疽菌の検出と併せて試料中に存在する腸管系ウイルスの検出を行った。河川水濃縮試料より核酸を抽出し、Aichi virus, Enterovirus, Human Norovirus GI 及び GII, Hepatitis A virus, Rotavirus (RoV), Pepper Mild Mottle Virus (PMMoV) ならびに F-RNA phage GI ~ GIV を対象とした qPCR を実施した。そ

の結果、RoV 及び PMMoV が 2017 年および 2019 年の複数試料から検出された。ノースルアンガ地域チャマ地区はルアンガ川上流域に位置し、人集落からの混入汚水は少ない環境である。これらのウイルスが高頻度に検出された点に関して、さらなる河川水試料の検討に加え、周辺に生息する野生動物がウイルスを保有している可能性を検証して行く必要があると考えられる。

#### (4) 地理・環境データを用いた河川水による病原体輸送モデルの作成

(実施者：東京大学 愛知)

河川の流動および物質輸送をシミュレーションするため、連続の式、St. Venant 運動方程式、移流分散減衰方程式を連立した完全陰解有限差分法シミュレータを開発した。開発したシミュレータを用いて、ルアンガ川を対象とし、炭疽菌移行現象のシミュレーションを行った(図3)。水位及び河川のシミュレーション結果は、サンプリング地点で計測した値と整合的であった(図3)。また、上流部の感染流行地域(図1 地域B)で河川水中に放出された炭疽菌は、40 日前後でルアンガ橋(図3 Luangwa Bridge (図1 地域C))に到達しうることが示唆された。

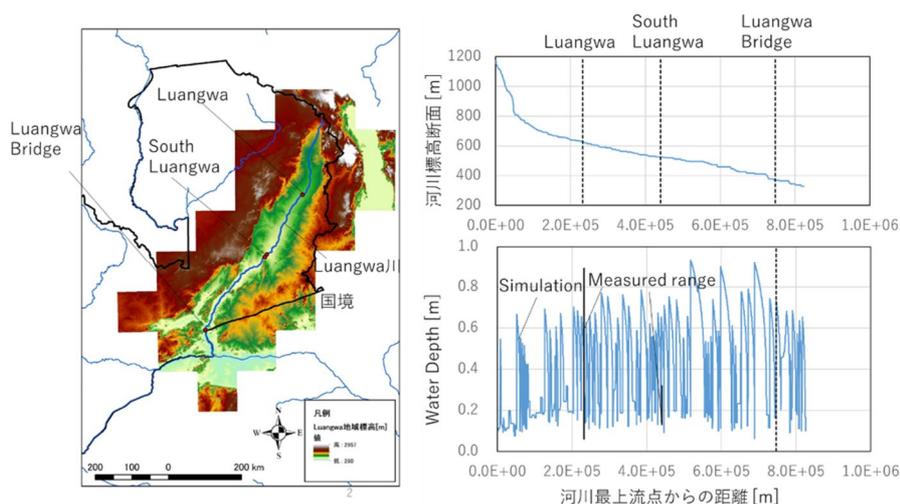


図3：ルアンガ川の河川流動シミュレーション

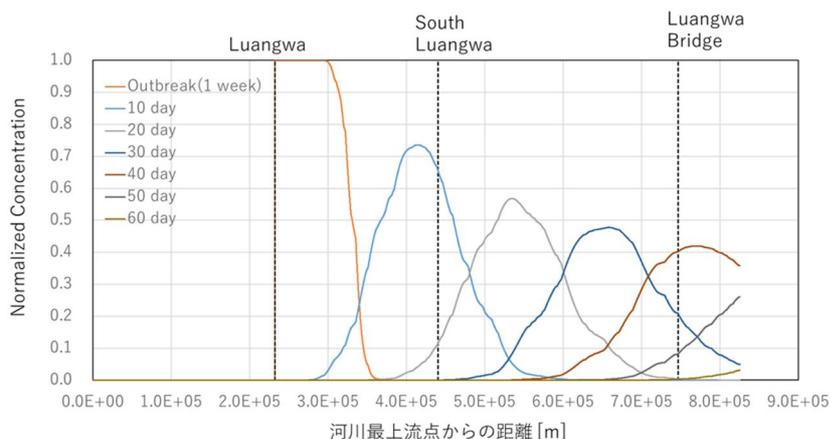


図4：ルアンガ川の炭疽菌移行シミュレーション

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Furuta Y, Harima H, Ito E, Maruyama F, Ohnishi N, Osaki K, Ogawa H, Squarre D, Hang'ombe BM, Higashi H	4. 巻 3
2. 論文標題 Loss of Bacitracin Resistance Due to a Large Genomic Deletion among Bacillus anthracis Strains	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 mSystems	6. 最初と最後の頁 e00182-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mSystems.00182-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Simbotwe M, Fujikura D, Ohnuma M, Omori R, Furuta Y, Muuka GM, Hang'ombe BM, Higashi H.	4. 巻 13
2. 論文標題 Development and application of a Bacillus anthracis protective antigen domain-1 in-house ELISA for the detection of anti-protective antigen antibodies in cattle in Zambia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0205986
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0205986	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Simbotwe M, Mulenga E, Furuta Y, Muuka GM, Hang'ombe BM, Higashi H.	4. 巻 67
2. 論文標題 Geographic distribution of cattle anthrax in Western Zambia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JJVR	6. 最初と最後の頁 195-202
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Toyomane K, Furuta Y, Fujikura D, Higashi H	4. 巻 7
2. 論文標題 Upstream sequence-dependent suppression and AtxA-dependent activation of protective antigens in Bacillus anthracis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PeerJ	6. 最初と最後の頁 e6718
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7717/peerj.6718	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Akamatsu R, Suzuki M, Okinaka K, Sasahara T, Yamane K, Suzuki S, Fujikura D, Furuta Y, Ohnishi N, Esaki M, Shibayama K, Higashi H	4. 巻 25
2. 論文標題 A novel sequence type in <i>Bacillus cereus</i> strains associated with nosocomial infections and bacteremia in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Emerg Infect Dis	6. 最初と最後の頁 883-890
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3201/eid2505.171890	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujikura D., Ikeseue M., Endo T., Chiba S., Higashi H., Uede T	4. 巻 8
2. 論文標題 Death receptor 6 contributes to autoimmunity in lupus-prone mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nat. Commun	6. 最初と最後の頁 13597
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/ncomms13957	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujikura D, Muramatsu D, Toyomane K, Chiba S, Daito T, Iwai A, Kouwaki T, Okamoto M, Higashi H, Kida H, Oshiumi H	4. 巻 163
2. 論文標題 <i>Aureobasidium pullulans</i> -cultured fluid induces IL-18 production, leading to Th1-polarization during influenza A virus infection.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Biochem	6. 最初と最後の頁 31-38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvx062	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogawa H, Kajihara M, Nao N, Shigeno A, Fujikura D, Hang'ombe BM, Mweene AS, Mutemwa A, Squarre D, Yamada M, Higashi H, Sawa H, Takada A	4. 巻 9
2. 論文標題 Characterization of a Novel Bat Adenovirus Isolated from Straw-Colored Fruit Bat ( <i>Eidolon helvum</i> )	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 E371
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v9120371	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ohnishi T, Yamada K, Iwasaki K, Tsujimoto T, Higashi H, Kimura T, Iwasaki N, Sudo H	4. 巻 9
2. 論文標題 Caspase-3 knockout inhibits intervertebral disc degeneration related to injury but accelerates degeneration related to aging.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 19324
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-55709-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件(うち招待講演 7件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 東 秀明
2. 発表標題 人獣共通感染症の克服を目指して -アフリカにおける炭疽の現状-
3. 学会等名 第27回先端科学移動大学2018(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 東 秀明
2. 発表標題 途上国における炭疽の現状と予防対策
3. 学会等名 第63回日本ブドウ球菌研究会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 東 秀明
2. 発表標題 炭疽菌感染の現状と予防対策
3. 学会等名 日本実験動物学会第7回実験動物科学シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 東 秀明
2. 発表標題 炭疽 -現状と新たな予防法への取組み-
3. 学会等名 琉球大学熱帯生物圏研究センターセミナー (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hideaki Higashi, Qiu Yongjin, Ami Soda, Yasuhiko Suzuki, Chihiro Sugimoto, Ayato Takada, Kimihito Ito, Hiroshi Kida, Hirofumi Sawa
2. 発表標題 Research activities at Hokudai Center for Zoonosis Control in Zambia
3. 学会等名 2nd International Joint Symposium: Promotion of Infectious Disease Research Cooperation between Africa and Japan toward Science, Technology and Innovation (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hideaki HIGASHI
2. 発表標題 Research Center for Zoonosis Control and Hokudai Center for Zoonosis Control in Zambia, Hokkaido University
3. 学会等名 新興・再興感染症に関するアジア・アフリカ リサーチフォーラム2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yongjin Qiu, Hideaki Higashi
2. 発表標題 Candidatus Borrelia fainii -a new world relapsing fever borrelia in Zambia-
3. 学会等名 Joint symposium for the control of zoonoses in Zambia (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東 秀明
2. 発表標題 炭疽の現状と予防対策
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 稲葉 愛美, 古田 芳一, 佐野 大輔, 東 秀明
2. 発表標題 ザンビア河川水における炭疽菌を中心とした水関連病原体の実態調査
3. 学会等名 第5回水環境学会東北支部研究発表会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	稲葉 愛美  (Inaba Manami)  (60749448)	東京大学・大学院新領域創成科学研究科・客員共同研究員   (12601)	
研究 分担者	愛知 正温  (Aichi Masaatsu)  (40645917)	東京大学・大学院新領域創成科学研究科・講師   (12601)	