

6. アルボウイルスに対する血清診断法の確立と標準化に関する研究

分担研究者 倉根 一郎 国立感染症研究所ウイルス第一部長

研究要旨 節足動物媒介性ウイルス（アルボウイルス）による感染症の多くは熱帯および亜熱帯地域において流行している。このうちフラビウイルスは特に問題となり、デング熱・デング出血熱は輸入感染症としてすでに脅威になりつつある。さらに西ナイル熱、黄熱等も将来脅威となりうると考えられる。これらフラビウイルス感染症に対して早急に実験室診断法の確立と標準化を行い、各研究機関へ技術移転を行うことが対策として重要である。IgM 捕捉 ELISA による特異的 IgM の検出はフラビウイルスに対する主要な血清診断法であるが、本研究においては、フラビウイルス交叉性単クローン抗体を用いた IgM 捕捉 ELISA を確立し、血清診断における有用性を確認した。フラビウイルス交叉性単クローン抗体を用いることにより、アッセイ法の標準化が容易になる。さらに、いずれのフラビウイルスに対する IgM 捕捉 ELISA の確立もウイルス抗原を代えることにより可能であり、今後新たなフラビウイルスに対する血清診断法の確立にも応用しうる。

A. 研究目的

日本人海外渡航者の増加にともない、熱帯・亜熱帯地域において節足動物媒介性ウイルス（アルボウイルス）に感染し帰国後発症する例が数多くみられる。このうち、患者数の最も多いものとしてデングウイルス感染によるデング熱・デング出血熱があるが、その他にも西ナイル熱・西ナイル脳炎、日本脳炎、黄熱等フラビウイルスによる疾患に対する診断法の確立と標準化は重要な課題である。これらの感染症の実験室診断としては病原体そのものあるいは遺伝子の検出と IgM 捕捉 ELISA による特異的 IgM の検出が重要である。

上記フラビウイルスには共通抗原が存在する。従って、理論的には、IgM 捕捉 ELISA 法において、この共通抗原を認識する単クローン抗体を用いる系を確立することにより、ウイルス抗原を変えることによりいずれのフラビウイルスに対しても IgM 捕捉 ELISA を確立することが可能となる。

本研究においては、(1) いずれのフラビウイルスに対しても応用可能であるフラビウイルス交叉性単クローン抗体を用いた IgM 捕捉 ELISA を確立し、(2) このアッセイ系が実際のヒト検体に対して有用であることを検証すること、さらに (3) IgM 捕捉-ELISA 法を含むデ

ング熱・デング出血熱診断検査法システムを確立することにある。

B. 研究方法

1) ウイルス抗原

デングウイルス 1 型-4 型、西ナイルウイルス、黄熱ウイルス（ワクチン株）および日本脳炎ウイルス感染細胞培養上清中のウイルスをベータプロピオラクトンにて不活化させてウイルス抗原として用いた。

2) 検体

血清は熱帯・亜熱帯流行地域へ旅行後、日本国内でデング熱・デング出血熱を疑がわれ診断のために国立感染症研究所ウイルス 1 部に送付された患者血清、日本脳炎患者、西ナイル脳炎患者血清、黄熱ワクチン接種後の血清ある。

3) 単クローン抗体

単クローン抗体としてはフラビウイルス交叉性エピトープに対する単クローン抗体とデングウイルス交叉性ではあるが他のフラビウイルスには交叉しない単クローン抗体（IgG）を精製して用いた。

4) IgM 捕捉 ELISA 法

IgM 捕捉 ELISA 法は以下のように行った。(i) マイクロプレートに抗ヒト IgM ヤギ抗体をコートする。(ii) 患者血清を反応させ、患者血清中の IgM 抗体を捕捉させる。

(iii) 各ウイルス抗原 (V) と同様に処理した非感染抗原 (C) 抗原を加え、固捕捉されたウイルス特異的 IgM 抗体と反応させる。

(iv) 捕捉された各ウイルス特異的ヒト IgM と反応したウイルス抗原と、酵素標識した単クローン抗体を反応させる。(v) 酵素に対する発色基質を加えて発色させ、吸光度を測定する。(vi) 各ウイルス抗原に対する吸光度と非感染抗原に対する吸光度との比を計算し陽性および陰性を決定する。(vii) 熱帯・亜熱帯地域への渡航歴のない日本人血清により得られた測定結果を陰性対照として、その平均値 + 3SD 以上を IgM 陽性とした。

(倫理面への配慮) 血清は感染症の診断のため国立感染症研究所ウイルス 1 部に送付されたものである。また、それ以外の血清についてはドナーの承諾のもとに行われた。

C. 研究結果

1) IgM 捕捉 ELISA 法の確立

フラビウイルス交叉性単クローン抗体を用いた IgM 捕捉 ELISA 法のモデルとして、デング IgM 捕捉 ELISA を確立した。使用する交叉性単クローン抗体を用いてデングウイルス 1 型 - 4 型の抗原量をそれぞれ一定量に設定した。交叉性単クローン抗体を用いたデング IgM 捕捉 ELISA は従来のデング患者血清由来 IgG を用いた系と比較して非特異的反応が有意に低かった。従来使用していた、デング患者血清由来 IgG を用いたデング IgM 捕捉-ELISA によって陽性と判定された 14 検体は新しい方法によってもすべて陽性と判定された。また、この交叉性単クローン抗体を用いた IgM 捕捉 ELISA の結果は市販のデング IgM 捕捉 ELISA キットによる結果とも非常に良く相関した。すでに IgM 抗体陰性と診断された 32 検体は、すべて陰性であった。

2) フラビウイルス交叉性単クローン抗体を用いた黄熱 IgM 捕捉 ELISA の作製

上記の単クローン抗体を用いて同様の方法により黄熱 IgM 捕捉 ELISA を作製した。本 IgM 捕捉 ELISA の評価を黄熱 IgM 抗体陽性と判定されているヒト血清 15 検体と、20 人の

黄熱ワクチン接種者からの検体を用いて行った。黄熱 IgM 抗体陽性患者血清は新黄熱 IgM 捕捉 ELISA により陽性と判定された。すべてのワクチン接種者の血清検体は接種後のある時点で陽性と判定された。

3) フラビウイルス交叉性単クローン抗体を用いた日本脳炎ウイルス IgM 捕捉 ELISA、西ナイルウイルス IgM 捕捉 ELISA の作製

上記の単クローン抗体を用いて同様の方法により日本脳炎および西ナイルウイルス IgM 捕捉 ELISA を作製した。西ナイルウイルス IgM 陽性が確認されている血清検体および日本脳炎ウイルス IgM 陽性が確認されている血清検体はいずれも各々の IgM 捕捉 ELISA によって陽性と判定された。さらに、これらの日本脳炎ウイルス IgM 陽性血清は値は低いながら西ナイルウイルス IgM 捕捉 ELISA によっても陽性と判定され、日本脳炎ウイルスと西ナイルウイルス間の IgM の交叉性が示された。

D. 考察

節足動物媒介性ウイルス (アルボウイルス) 感染の血清・病原体診断においては、血液中のウイルス遺伝子の PCR 法による検出と、IgM 捕捉-ELISA によるウイルス特異的 IgM の検出が近年頻繁に用いられている。対象としているウイルスによって幾分異なっているが、一般的にウイルス血症の時期と特異的 IgM が出現してくる時期は幾分異なっているため、この 2 つの方法を併用することにより、感染を見逃すことはほとんどなくなると考えられる。さらに、ほとんどの日本人のフラビウイルス感染症患者は各ウイルスの初感染であるため特異的 IgM は診断において重要な意味を持つ。さらに、IgM はウイルス特異性が比較的高いことも診断にとっては有用である。

これまで、赤血球凝集阻止反応 (HI test) が主に用いられてきた。HI test も実用的な方法であるが HI test 用抗原の作製、血球の維持の問題、さらに HI test はウイルス交叉性であるという問題がある。その点で IgM 捕捉 ELISA の実用性は高い。ただし、例えばデングウイルス再感染においてはデングウイルス IgM が出現しない例もみられるので、その場合には IgG-ELISA 等により特異的 IgG の早期の上昇を確認する必要がある。

これまで、IgM 捕捉 ELISA においてはヒトや動物血清から精製した IgG を標識して用いる

ことが多かったが、フラビウイルス交叉性単クローン抗体を用いることにより、使用する抗体量の標準化や、ウイルス抗原に定量化が比較的容易に行い得る。さらに、フラビウイルスにおいては、ウイルス抗原を代えるのみで各ウイルス種に対する IgM 捕捉 ELISA 法を確立することが可能である。これらのことは、アッセイ法の標準化と他研究機関への技術移転においては非常な利点と考えられる。

もう一つの利点は非特異的陽性の排除が可能である。我々は陽性、陰性の判定に際し、ウイルス抗原 (V) と同様に処理した非感染抗原 (C) 抗原に対する反応の比を求めている。仮に非感染抗原に対する非特異的反応が出現しても V/C 比は高くないので、ウイルス比特異的な IgM 抗体が存在しても陰性との判定が可能となる。

また、検出抗体を患者血清由来 IgG に替えてマウス単クローン抗体を用いることにより、ヒト由来組織を診断に使用することやヒト由来の感染性因子で汚染された材料を使用する危険性の回避、さらに、各研究施設が有償で入手可能という利点もある。

E. 結論

フラビウイルス交叉性単クローン抗体を用いて、デングウイルス、日本脳炎ウイルス、西ナイルウイルス、及び黄熱ウイルス抗原を用いて各々に特異的な IgM 捕捉-ELISA を作製し、いずれも十分な特異性と感度を有することを確認した

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamamoto A., Nakayama M., Tashiro M., Ogawa T., and Kurane I. : Hydroxyapatite-coated nylon beads as a new reagent to develop a particle agglutination assay system for detecting Japanese encephalitis virus-specific human antibodies. *Journal of Clinical Virology*. 19:195-204, 2000
- 2) Kurane, I., Takasaki, T., and Yamada K.: Recent topics of flavivirus infections in

Japan: Increase of imported dengue cases and isolation of tick-borne encephalitis virus. *Emerging Infectious Diseases*. 6:569-571, 2000

- 3) Nawa, M., Yamada, K., Takasaki, T., Akatsuka, T., and Kurane, I. : Serotype-cross-reactive IgM responses in dengue virus infections determined by enzyme-linked immunosorbent assays. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 7:774-777, 2000
- 4) Nawa, M., Takasaki, T., Yamada, K., Akatsuka, T., and Kurane, I.: Development of dengue IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay with higher sensitivity using monoclonal detection antibody. *Journal of Virological Methods*. 92:65-70, 2001

2. 学会発表

- 1) 山田堅一郎、高崎智彦、名和 優、倉根一郎「デングウイルス感染診断キットの評価：その有用性と問題点」熱帯医学会大会、平成 12 年 11 月、東京都
- 2) Yamada, K., Takasaki, T., Hamada, A., Okuzawa, E., Nawa, M. and Kurane, I. "Rate of seroconversion for dengue viruses among Japanese who stayed in tropical areas for extended periods." 第 15 回日本国際保健医療学会、平成 12 年 8 月、長崎県
- 3) 山田堅一郎、高崎智彦、名和 優、武田 昭、倉根一郎「自己免疫疾患患者における抗デング IgM 抗体偽陽性例について」第 35 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、平成 12 年 6 月、沖縄県
- 4) 田部井由紀子、吉田靖子、長谷川道弥、長島真美。平田一郎、小久保弥太郎、名和 優、山田堅一郎、高崎智彦、倉根一郎「デングウイルス感染症の実験室内診断－種々の測定法による抗体価の検討－」第 35 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、平成 12 年 6 月、沖縄県
- 5) 名和 優、赤塚俊隆、山田堅一郎、高崎智彦、倉根一郎「モノクローナル抗体を用いたデング IgM-ELISA の構築と、血清型別診断への応用」第 35 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、平成 12 年 6 月、沖縄県

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

7. 病理組織材料を用いた病原体の検出と感染症診断への応用に関する研究 —単純ヘルペスウイルスおよびエプシュタインバールウイルスの診断—

分担研究者 佐多 徹太郎 国立感染症研究所感染病理部長
研究協力者 佐藤 由子、柏瀬 光寿、余田 敬子、長谷川 秀樹、
岩崎 琢也 国立感染症研究所感染病理部

研究要旨 生検剖検組織を用いたウイルス感染症の病理学的診断および研究の方法について、実際の症例を検討する中で明らかにした。剖検眼組織を用いた免疫組織化学により HSV-1 抗原を特異的に検出することにより、Progressive outer retinal necrosis の病因ウイルスとして水痘帯状疱疹ウイルスではなく、HSV-1 でも起こることを明らかにした。また非細菌性咽頭扁桃炎 32 例および口腔咽頭炎 5 例の扁桃生検組織を用いた免疫組織化学、in situ hybridization 法、PCR さらに血清学的検討により、伝染性単核球症と臨床症状が共通するものの、EBV 非初感染でも EBV による咽頭扁桃炎・口腔咽頭炎が起こることを明らかにし、さらに臨床的鑑別を可能とする臨床所見の解析を行い、その特徴を明らかにした。

A. 研究目的

感染症の診断には、いくつかの方法があることが知られている。いずれもある臨床症状の把握が出発点となる。血清診断法としては、有病期と回復期の 2 点で病原体に対する抗体価の 4 倍以上の上昇を認めることで診断するが、有病期においては診断に役立たないこともある。病原体診断法としては、局所ないし全身から検体を採取し、分離培養をこころみ、その特徴を明らかにすることにより同定する。この病原体診断がもっとも確実であるが、従来の方法では原因となる病原体の増殖が必要なことから、時間がかかるのが欠点である。最近では、病原体の特異抗原や特異核酸断片を特異抗体や PCR 法を用いて検出することが行われ、比較的時間を要しないことから、有病期における迅速診断法として使われている。形態学および病理学的診断法は、病変部の塗抹標本や細胞ないし組織標本作製し、病原体そのものないし病原体による細胞や組織変化を観察して診断を行うものであるが、特異性が乏しいために、他の方法を併用することにより確定診断を得ることが可能となる。それには特異抗体を用いた抗原抗体反応にもとづく免疫細胞組織化学や、特異核酸プローブを用いた in situ hybridization がある。も

ちろん、細胞組織検体からできる方法の全てを試みることも可能であるという特徴をもつ。

病理検体として生検および剖検組織がその大部分を占めており、大体はホルマリンで固定され、パラフィン包埋された切片を病理診断の対象とする。おもに HE 染色による形態観察と、免疫組織化学、in situ hybridization そして PCR 法が行われる。免疫組織化学には、病原ウイルスを同定するための中和抗体が使える場合もあるが、抗体価が低い場合には非特異反応がみられることや単クローン抗体ではホルマリン固定により反応性が失われていることがあり、有用な抗体の開発が必要である。In situ hybridization 法には基本的に核酸プローブの作製が重要であり、そのためにはクローニング等の作業が前もって必要となる。病原体の性状ないし特徴を知ることができれば、オリゴヌクレオチドプローブを作製することで可能となる。もちろん、固定組織切片から核酸を抽出し、PCR 法を適用することもできる。

今回は、臨床的に水痘帯状疱疹ウイルス感染が疑われ、結果的に単純ヘルペスウイルス I 型 (HSV-1) 感染と判明した症例、およびウイルス性咽頭喉頭所見を示した症例においてエプスタインバールウイルス (EBV) を検索したので報告する。

B. 研究方法

1. 生検および剖検病理組織は 10%緩衝ホルマリンで固定し、型のごとくパラフィンに包埋した。4 m の切片を作製し、シランコートガラススライドに貼り付けた。HE 染色で全体の形態変化を観察し、ヘルペス群ウイルスに対するウサギポリクローナルないしマウスモノクローナル抗体および LSAB 法を用いた免疫組織化学でウイルス抗原を検索した。これらの抗体は当部で作製したもので、相互の交差反応は見られないことが確認できており、さらにホルマリン固定組織でも十分抗原を検出できることが判明している。また EBV の検討には、EBER-RNA を検出するオリゴヌクレオチドプローブないし EBER DNA を PCR で増幅し、クローニングしたのち、in vitro translation kit でビオチン標識 RNA プローブを作製し、in situ hybridization 法による検出を試みた。
2. 10 m のホルマリン固定パラフィン包埋切片を 2 枚作製し、エッペンドルフチューブにいれ、キシレンで脱パラフィンした後、エタノールで置換し、proteinase K で一晚消化後、フェノールクロロフォルムで DNA を抽出した。小さな切片には Dexpat (Takara)キットも用いた。また未固定病理組織が得られた場合は通常の方法で DNA を抽出した。
3. 患者血清については種々の方法によるウイルス血清抗体価の検討を行った。

(倫理面への配慮)

剖検組織の検討は事前の剖検承諾書を得、種々の検討は診断の過程で行われた。生検組織については詳細な診断目的と治療への関与について十分に説明し、患者の同意を得て、生検組織診断を行った。結果については外来受診時に説明を行った。

C. 研究結果

1. Progressive outer retinal necrosis 眼病変における病原ウイルスの検討
血友病患者で血液製剤により HIV に感染した 32 才の男性が右目の視力低下を主訴に眼科を受診した。食道カンジダ症、帯状疱疹の既往があるが、眼科的診察の結果、右網膜

に出血と壊死が認められ、CMV 抗原血症もあったため、CMV 網膜炎と診断された。抗ウイルス剤の投与で一時改善したが、HIV 感染による全身状態の悪化のため治療を中止せざるを得なくなった。左の脛に HSV 様の皮膚病変が認められた。両眼網膜後極の浮腫性変化が突然起こり、出血および壊死病変が再発し、網膜全体に病変が急速に広がった。炎症性所見や血管炎、そして網膜剥離は認められなかった。抗ウイルス剤およびγグロブリン製剤の投与によっても改善せず、多臓器不全で死亡した。期間中 HSV に対する CF および NT 抗体価の有意な上昇は認められなかった。剖検が行われ、脳トキソプラズマ症が判明したが、ヘルペスウイルス感染病変は網膜以外にはみられなかった。

両眼網膜の大部分は破壊され、右眼の後極に一部の網膜が残存し、HCMV 感染細胞が認められた。左眼には HCMV は認められなかった。免疫組織化学法により HSV-1、HSV-2、VZV、HCMV、HHV-6 の抗原の検出を試みた結果、右眼には巨細胞封入体細胞と一致して HCMV 抗原がみられ、また両眼には HSV-1 抗原が陽性となった。他のヘルペスウイルス抗原は陰性であった。HSV-1 陽性細胞の存在する場所は変性し、網膜細胞は残存しておらず、細胞種を決めることができなかった。核内封入体は不明瞭であった。すなわち、右眼には HCMV 感染が持続していたが、両眼網膜には HSV-1 感染があることが判明した。PCR 法により上記ヘルペスウイルス DNA の検出を試みたが、組織の変性が強く、110 bp の α -globin 遺伝子さえ検出することができなかった。電顕組織標本の検討は困難であった。またすべての眼球がホルマリンで固定されていたため、ウイルス分離を行うことはできなかった。

2. EB ウイルスおよび単純ヘルペスウイルス感染による口腔咽頭扁桃炎

非細菌性の感染による口腔咽頭炎・扁桃炎症例のうち生検組織が得られた 37 例、急性扁桃炎 32 例・口腔咽頭炎 5 例を対象とした。扁桃炎 32 症例の主症状は、咽頭痛、高熱 (38.0℃以上)・摂食障害であった。臨床所見として扁桃以外の口腔咽頭粘膜にも白苔やびらんなどの粘膜病変を伴う扁桃炎と頸部リンパ節腫脹を認め、そのほとんどが入院を要するほどの重症であった。一方、口腔咽頭炎 5 例には扁桃炎例ほどの重症例はなく、抗生剤治療にて 2 週間以上改善しない難治例が多かった。5 例中の 2 例は 10 ヶ月または 4 年

以上再発を繰り返す症例であった。全 37 例中 28 例が約 7 日間以上の抗生剤治療にて改善しなかった。全 37 例の患者から、重症または難治性の病状の精査目的でインフォームドコンセントのもと生検された。

生検組織検体を用いた EBER ISH および HSV 抗原に対する免疫組織化学にて、扁桃炎 8 例・口腔咽頭炎 4 例から EBV 感染を、扁桃炎 5 症例患者から HSV 感染を検出した。病理学的に核内封入体は HSV 感染の 5 例にのみ認められた。また、今回の症例中、HSV と EBV を同時に検出した症例はなかった。EBV 性口腔咽頭炎 1 例の生検組織から悪性リンパ腫が見つかった。扁桃組織の病理所見は、上皮や扁桃実質および上皮の壊死、空胞形成または炎症性リンパ球浸潤が認められた。

EBER 陽性細胞は 12 検体（咽頭扁桃炎 8 例と口腔咽頭炎 4 例）の粘膜上皮および扁桃実質から検出された。EBER 陽性細胞の検出パターンは大きく 2 つに分けられ、上皮内および実質に EBER 陽性細胞が散在するものを“scattered pattern”と、扁桃上皮基底層を中心に上皮内基底層側 3 分の 2 と上皮基底層から扁桃実質に広がるように EBER 陽性細胞が検出されたものを“linear pattern”と命名した。また、陰性コントロールとして用いた 24 例の扁桃組織は、EBER ISH・PCR とも全検体陰性であった。

免疫組織化学的に HSV 抗原は扁桃炎 5 症例患者から検出した。病理学的に核内封入体は扁桃上皮の核に認められ、扁桃上皮層は変性し炎症性細胞浸潤が見られた。核内封入体は免疫組織化学的に HSV 抗原陽性であった。HSV-1 または-2 の型特異的モノクローナル抗体を用いた染色では、4 例が HSV-1 抗原陽性であった。残り 1 例は検体が不足したため、HSV の血清型は判別不能であった。

EBER 陽性の 12 例中 8 例から EBV DNA が全例増幅された。PCR 陰性の 4 例は β -globin PCR も陰性で、非緩衝ホルマリン固定標本であったためか適切な DNA が抽出できなかったとかがえられた。また、PCR の陰性コントロールとして用いた 24 例の扁桃組織は陰性であった。EBV 陽性細胞である B95-8 細胞株の 10 倍希釈系を用い、エチディオム・プロマイド染色下で 50fg 以上の検出が可能であることが判明した。

生検組織の病理学的検査と血清学的診断の後、写真に記録した患者の扁桃および口腔咽頭所見の写真記録からその粘膜病変の臨床的特徴を再検討した。HSV 感染による急性咽頭扁桃炎患者は、臨床的に扁桃表面粘膜のア

フタ形成と口腔粘膜のアフタ形成のどちらかまたは双方を伴う扁桃の発赤腫脹を呈していた。特徴的なことは、ヘルペス性歯肉炎、口唇ヘルペスなど、口腔咽頭粘膜のヘルペス病変も同時に認められたことであった。HSV 性咽頭扁桃炎例では口腔咽頭粘膜の出血斑は認めなかった。このうち 2 例は扁桃炎と同時に性器ヘルペスの合併がみられた。

EBV が検出された急性咽頭扁桃炎患者の臨床所見は、伝染性単核球症や血清学的な再感染ないし再活性化でも共通性があり、HSV 感染による咽頭扁桃炎とは明らかに異なるものであった。症例のほとんどが細菌性扁桃炎によるものに比べ厚い印象の白苔を伴う口蓋扁桃の発赤腫脹を呈していた。さらに咽頭扁桃、舌根扁桃に白苔を伴う例や、咽頭および喉頭蓋粘膜のびらんや潰瘍形成、口蓋粘膜点状出血斑が認められた。

EBV 口腔咽頭炎例の臨床所見は、HSV および EBV 性咽頭扁桃炎例に比べてより多彩であった。有痛性のびらんや潰瘍の形成、口蓋垂の浮腫状腫大、歯肉炎、口唇や舌のびらんなどの粘膜病変も認められた。各々の症例がこれらの多彩な病変を様々な組み合わせで併発していた。頸部リンパ節腫脹は、EBER ISH 陽性または HSV 抗原陽性の症例すべてに認められた。全身の発疹は EBV 初感染の咽頭扁桃炎例 3 例中 2 例にみられた。

D. 考察

HIV 感染者の末期、免疫不全が高度になると、さまざまな日和見感染症を併発する。眼病変の原因としては、ヘルペスウイルス群ウイルス、トキソプラズマ、クリプトコッカス、カリニ、カンジタそして細菌性感染症が知られている。ヘルペスウイルス群ウイルス感染症の中ではサイトメガロウイルス網膜炎がよく知られているが、免疫不全の程度により、単純ヘルペスウイルスや水痘帯状疱疹ウイルスも急性網膜壊死の原因として起こることが知られている。Progressive outer retinal necrosis (PORN)は、サイトメガロウイルス網膜炎と同様、免疫不全が高度な患者に起こることが報告され、そのほとんどの症例では水痘帯状疱疹ウイルスの感染によることが、免疫組織化学、電顕により証明されてきた。その臨床所見は抗ウイルス剤に不応性で、急速に進行し失明に至る予後不良な経過をたどり、網膜壊死を来す。多巣性病変が深部および辺縁部網膜におこり、黄斑部は保存され、血管炎所見を欠くという特徴がある。本症

例の臨床経過から PORN と診断したが、網膜病変の免疫組織化学的検討により、HCMV と HSV-1 の抗原が検出されたことから、もともと HCMV 感染によるサイトメガロウイルス網膜炎が右眼に存在するが、両側性に急速に進行した眼症状は HSV-1 の感染によると考えられた。すなわち、水痘帯状疱疹ウイルス感染によると考えられてきた PORN であるが、HSV-1 感染によっても起こることが、免疫組織化学的検討により、世界ではじめて明らかにされた。

EBV は多くの健常者の唾液中に存在するにも関わらず、oral hairy leukoplakia (OHL) や鼻咽頭癌のような口腔咽頭疾患の病原体として重要なウイルスである。これまで EBV 初感染による口腔咽頭の炎症性疾患として、伝染性単核症時の浸出性扁桃炎のみが知られている。伝染性単核症を伴わない EBV 性咽頭扁桃炎・口腔咽頭炎の存在を生検組織検査の結果から示した報告はない。今回、われわれは細菌感染によらない咽頭扁桃炎症例・口腔咽頭炎 37 症例から、病理組織学・免疫組織化学・*in situ* hybridization・PCR を用いて EBV 性咽頭扁桃炎 12 例および HSV 性咽頭扁桃炎 5 例を確認した。EBV 口腔咽頭扁桃炎 12 例のうち、伝染性単核症に伴う急性咽頭扁桃炎 3 例、伝染性単核症を伴わない急性咽頭扁桃炎 5 例・口腔咽頭炎 4 例が見つかった。血清学的には、伝染性単核症に伴う急性咽頭扁桃炎 3 例は EBV の初感染で、伝染性単核症を伴わない 9 例は非初感染であることがわかった。EBV 初感染と非初感染では、生検検体を用いた EBER ISH の染色パターンが異なっていた。

扁桃の白苔はほとんどの急性咽頭扁桃炎例に観察されたが、EBV 咽頭扁桃炎例では全く見られなかった。EBV 性咽頭扁桃炎の白苔は上咽頭に、HSV 性急性咽頭扁桃炎例の白苔は下咽頭にそれぞれ認められた。点状出血斑は EBV 性咽頭扁桃炎の特徴的な病変とされている。EBV 初感染および非初感染に伴う 3 例の咽頭扁桃炎にこの臨床所見が観察されたが、HSV 性咽頭扁桃炎例では認められなかった。EBV 非初感染に伴う口腔咽頭炎例の、有痛性で非特異的なびらん・アフタ・潰瘍からなる粘膜病変は、HSV および EBV 性咽頭扁桃炎例に比べて多彩で、様々な組み合わせで口腔咽頭に広範に分布していた。

口腔咽頭病変の部位は、口腔咽頭内で EBV および HSV 感染が拡がる形態が異なることを示唆している。HSV 性咽頭扁桃炎例は全例初感染で、その病変は口唇・口腔・咽頭・下咽頭に観察され、それはウイルス感染が唾液の嚥下される流れに沿って拡がったことを示している。一方、EBV 初感染・非初感染例の病変は、上咽頭

の白苔が唾液の通過だけでは説明できないため、口腔への直接感染、または EBV 感染リンパ球を介した非直接感染によるものではないかと推察された。

EBER ISH と PCR を組み合わせた病理組織学解析によって、伝染性単核症の臨床的特徴を伴わない EBV 性咽頭扁桃炎 5 例・EBV 性口腔咽頭炎 4 例を確認することができた。これらの症例は血清学的分析に基づいて、非初感染と考えられた。しかし、EBV 性咽頭扁桃炎は初感染・非初感染に関わらず、その扁桃・口腔咽頭所見は特徴的であった。EBER ISH は陽性シグナルを持つ細胞の分布様式が異なる 2 つの染色パターンを示した。EBV 初感染による咽頭扁桃炎の組織では扁桃実質および扁平上皮を越えて EBER 陽性細胞が散在 (scattered pattern) し、一方 EBV 非初感染による咽頭扁桃炎・口腔咽頭炎の組織では EBER 陽性細胞が扁桃上皮基底層に (linear pattern) 集簇していた。全身症状および血清抗体価の変化の有無・EBER ISH 陽性パターンの相違から、EBV 初感染と非初感染では異なる病態が存在するものと思われた。

E. 結論

1. 免疫不全に伴って発症する網膜炎はヘルペス群ウイルス感染症が多いが、急速に進行する網膜壊死病変に HSV-1 感染が関与することが明らかにされた。剖検後の詳細な検討により、PORN という眼病変が HSV-1 感染によっても起こることが世界で始めて明らかにされた。
2. 伝染性単核球症と臨床症状が共通するものの、EBV 非初感染で EBV 咽頭扁桃炎・口腔咽頭炎が起こることを明らかとした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
 1. Kino N, Sata T, Sato Y, Sugase M, Matsukura T: Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of a novel human papillomavirus (type 82) associated with a vaginal intraepithelial

- neoplasia. Clin Diag Lab Immunol 2000, 7: 91-95.
2. Katano H, Suda T, Morishita Y, Yamamoto K, Hoshino Y, Nakamura K, Tachikawa N, Sata T, Hamaguchi H, Iwamoto A, Mori S.: HHV-8-associated solid lymphomas occurring in AIDS patients take anaplastic large cell morphology. Modern Pathol 2000, 13: 77-85.
 3. Yoda K, Sata T, Kurata T, Aramaki H.: Oropharyngotonsillitis associated with non-primary Epstein-Barr virus infection. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2000, 126: 185-193.
 4. Katano H, Iwasaki T, Baba N, Terai M, Mori S, Iwamoto A, Kurata T, Sata T.: Identification of antigenic proteins encoded by human herpesvirus 8 and seroprevalence in the general population and among patients with and without Kaposi's sarcoma. J Virol 2000, 74: 3478-3485.
 5. Katano H, Sato Y, Kurata T, Mori S, Sata T.: Expression and localization of human herpesvirus 8-encoded proteins in primary effusion lymphoma, Kaposi's sarcoma and multicentric Castleman's disease. Virology 2000, 269: 335-344.
 6. Kashiwase M, Sata T, Yamauchi Y, Minoda H, Usui N, Iwasaki T, Kurata T, Usui M.: Progressive outer retinal necrosis caused by herpes simplex virus type 1 in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. Ophthalmology 2000, 107: 790-794.
 7. Nakamura Y, Takahashi H, Shoya Y, Nakaya T, Watanabe M, Tomonaga K, Iwahashi K, Ameno K, Momiyama N, Taniyama H, Sata T, Kurata T, de La Torre JC, Ikuta K.: Isolation of borna disease virus from human brain tissue. J Virol 2000, 74: 4601-11.
 8. Maeda M, Maeda A, Wakiguchi H, Murakami N, Sata T, Okada T, Kurashige T: Polymyositis associated with primary cytomegalovirus infection. Scand J Infect Dis 2000, 32: 212-4.
 9. Kondo Y, Izumi T, Yanagawa T, Kanda H, Katano H, Sata T.: Spontaneously regressed Kaposi's sarcoma and human herpesvirus 8 infection in an human immunodeficiency virus -negative patient. Pathol Int 2000, 50: 340-346.
 10. Kano M, Matano T, Nakamura H, Takeda A, Kato A, Ariyoshi K, Mori K, Sata T, Nagai Y.: Elicitation of protective immunity against simian immunodeficiency virus infection by a recombinant sendai virus expressing the gag protein. AIDS 2000, 14 : 1281-1282.
 11. Matano T, Kano M, Odawara T, Nakamura H, Takeda A, Mori K, Sata T, Nagai Y.: A novel DNA vaccine strategy inducing safer restricted replication of attenuated vaccine virus only in the receptor-transduced cells. Vaccine 2000, 18, 3310-3318.
 12. Tanaka M, Endo K, Suzuki T, Kakita A, Takahashi H, Sata T.: Parkinsonism in HIV encephalopathy. Mov Disord 2000, 15: 1032-1033.
 13. Katano H and Sata T.: Human herpesvirus 8-virology, epidemiology, and related diseases-. Jpn J Infect Dis 2000, 53: 137-155.
 14. Ishiji T, Kawase M, Honda M, Niimura M, Yoshimura E, Sata T, Matsukura T.: Distinctive distribution of human papillomavirus type 16 and type 20 in the tonsillar and the skin carcinomas of in a patient with epidermodysplasia verruciformis. Br J Dermatol 2000, 143, 1005-1010

H. 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
なし

8. 臨床分離菌、薬剤耐性菌のライブラリーの作成に関する研究

分担研究者 荒川 宜親 国立感染症研究所細菌・血液製剤部長
研究協力者 柴田 尚宏、土井 洋平、柴山 恵吾、黒川 博史
国立感染症研究所細菌・血液製剤部

研究要旨 平成11年から施行された「感染症新法」では、MRSA、VRE、PRSP、薬剤耐性緑膿菌による感染症が、第四類感染症に指定され、感染症患者の報告が定点あるいは全数報告されている。本研究では、カルバペネムに耐性を獲得した緑膿菌やセラチアなどの薬剤耐性菌、特に臨床で最も多用されている広域β-ラクタム薬に耐性を獲得した肺炎桿菌や大腸菌などの臨床分離菌が、どのような耐性遺伝子を保有しているかを判定するため、PCR解析の際の陽性コントロールとして用いる TEM-型 ESBL、SHV-型 ESBL、CTX-M-型β-ラクタマーゼ、IMP-1 型メタロβ-ラクタマーゼの遺伝子を保有する参照株の選定と各々の耐性遺伝子を検出する特異的 PCR プライマーを設定した。

各々を組み合わせ PCR 解析を行った場合、特異性や再現性が高い結果が得られることが確認され、その結果、国内の臨床分離株において、SHV-型 ESBL 産生菌や CTX-M-型β-ラクタマーゼ産生菌、IMP-1 型メタロβ-ラクタマーゼ産生菌を識別することが可能となった。

A. 研究目的

我が国では、1970年代から、各種のグラム陰性桿菌に幅広い抗菌活性を示す、様々な広域セフェム薬が次々と開発され、臨床に導入され、緑膿菌や肺炎桿菌、大腸菌などによる感染症の治療薬として広く用いられてきた。その結果、それらの細菌による感染症の治療は大きく進歩した。しかし、最近、緑膿菌のみならず *Acinetobacter* spp.、*Stenotrophomonas* spp.、*Burkholderia cepacia* などの菌種では、耐性菌の出現が報告され問題となっている。特に我が国では広域抗菌スペクトルを示す第三代セフェム薬やセファマイシン、カルバペネムといった半合成β-ラクタム薬が多用されており、これらの薬剤に耐性を獲得した様々な耐性菌が臨床現場で出現し問題となりつつある。例えば、セフトジジムやセフトキシムに耐性を獲得した肺炎桿菌や大腸菌が頻度は低いものの1%程度の分離率で各地から分離されるようになりつつある。また、類似の耐性パターンを示すが、セフミノクスやラタモキシフなどのセファマイシンにまで耐性を獲得した肺炎桿菌や *Citrobacter* spp.、*Enterobacter* spp.、なども分離されてい

る。特に、国内の各地の医療施設からしばしば分離され問題視されているカルバペネム耐性の緑膿菌や *Serratia marcescens* などにおけるイミペネム耐性菌の分離頻度は各々、1~2%、4~5%に達しており、IMP-1 型のメタロβ-ラクタマーゼの産生株では、耐性度が高くなるため、内外で警戒されている。

そこで、国内の臨床現場で分離される様々な広域β-ラクタム薬耐性菌の産生するβ-ラクタマーゼを識別し、細菌検査手法の精度管理並びに標準化およびその普及に資するため、PCR解析時の参照株の選定と検出用の特異的 PCR プライマーセットを設定した。

B. 研究方法

1. 臨床分離菌のストックの中からの参照株の選定
感染研の保有する様々な臨床分離菌の中から、大腸菌、肺炎桿菌、セラチア、緑膿菌について、セフトジジム(CAZ)やセフトキシム(CTX)などの第三代セフェム薬、ラタモキシフ(LMOX)やセフミノクス(CMNX)などの

セファマイシン系薬、イミペネム (IPM) などのカルバペネム系薬などに耐性を示す株を選び、特定の耐性遺伝子を保有するか否かを PCR 解析などにより検討した。

2. メルカプト酢酸ナトリウムによる検査
メタロ-β-ラクタマーゼを強く阻害するメルカプト酢酸ナトリウムを用い、セフトジジム耐性菌がメタロ-β-ラクタマーゼ産生株か否かを識別した。
3. PCR 解析用プライマーの設定
データベースなどに登録されている既知の耐性遺伝子や感染研で独自にシーケンス解析した塩基配列を参考にして、特定の遺伝子を検出する PCR プライマーのセットを設定した。
4. PCR 解析の実施
被検用の耐性株を LB 培地を用いて、1,000,000 CFU/ml 程度の菌数まで培養した後、煮沸法により DNA を抽出し定法の PCR 解析により遺伝子の検出を試みた。
5. 遺伝子の塩基配列の決定による確認
増幅された PCR 産物を鋳型として、ダイターミネーター法により塩基配列の決定を行い、期待された DNA が増幅検出されているか否かを確認した。

C. 研究結果

1. PCR 解析用の参照株の選定
表 1 に示す菌種において、それぞれの β-ラクタマーゼ遺伝子を保有する PCR 解析用の参照株を選定した。
2. メルカプト酢酸ナトリウムによる検査
セフトジジム耐性株については、それらがメタロ-β-ラクタマーゼ産生株か否かをメタロ-β-ラクタマーゼを強く阻害するメルカプト酢酸ナトリウムを用いて識別した (図 1)。
3. PCR 解析用プライマーの設定
EMBL のデータベースなどに登録されている既知の耐性遺伝子や感染研で独自にシーケンス解析した塩基配列を参考にして、表 2 に示す特定の遺伝子を検出する PCR プライマーのセットを設定した。
4. PCR 解析の実施
被検用の参照株の候補を選び、表 3、表 4 に

示す条件により PCR 解析を試みた結果、概ね満足できる結果が得られた (図 2)。

しかし、*K. pneumoniae* はその染色体上に SHV-型 β-ラクタマーゼの遺伝子に相同性の高い β-ラクタマーゼ遺伝子を保有するため、しばしば SHV-型 PCR 反応にて偽陽性反応が出て、識別が困難であった (図 3)。

5. 遺伝子の塩基配列の決定による確認
増幅された PCR 産物を鋳型とし、ダイターミネーター法により塩基配列の決定を行った結果、期待する DNA 断片が増幅されていることを確認した。

D. 考察

我が国では、欧米で蔓延が問題となっている基質拡張型 β-ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌の分離頻度は未だ 1% 以下と少ないが、逆に、IMP-1 型メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌が緑膿菌で 1% 程度、セラチアで 4~5% 程度分離される事がこれまでの我々の調査で示されている。しかし、それらを細菌検査室において日常の薬剤感受性試験結果からのみ識別することは困難であり、最終的に PCR 法による確認試験が必要となっている。しかし、これまで国内ではそのための参照株は存在しておらず、十分な精度管理が行われてこなかった。その結果、それらの耐性株が実際にどの程度国内に蔓延しているか不明な点も多く残されていた。今回、国内で分離された様々な広域セフェム薬耐性菌の産生する β-ラクタマーゼを識別する事を可能とする PCR 解析用の参照株の選定と特異的 PCR プライマーセットの設定を行った事により、これらの参照株やプライマーセットを普及させることで、β-ラクタマーゼの識別が可能となり精度管理の向上が大いに期待される。

尚、医療施設の細菌検査室で PCR 解析が実施できるところは限られており、当面の間、感染研などでのバックアップ体制を整備する必要がある。平成 13 年度からの感染研の新規事業として「新たに出現する薬剤耐性菌の分子のおよび疫学的解析」が開始されるため、本事業の中においてそのようなバックアップ体制を継続することが可能と考えられる。

一方、*K. pneumoniae* は、SHV 型 β-ラクタマーゼの遺伝子に極めて類似した LEN-1 型ペニシリナーゼの遺伝子を染色体上に保有するため、SHV-特異的 PCR プライマーセットによりしばしば偽陽性に出る事が問題であるが、その際は、大腸菌にプラスミドを接合伝達し PCR 解

析を行うことで、問題点が解決されうる。

尚、プラスミド上に SHV-型ペニシリナーゼや TEM-型ペニシリナーゼの遺伝子を保有し、さらに未知の β -ラクタマーゼを保有することで CAZ などに耐性を獲得している耐性株では、本検査法が利用できない場合もあり、その際は、薬剤感受性試験結果などと十分に対比して検討することが必要な場合もある。例えば、CMY-型のセファロスポリナーゼ遺伝子をプラスミド上に保有する株では、今回選定した PCR 条件や参照株では、それらを識別できないため、新たなプライマーの設定や参照株の選定が必要であり、今後の検討課題としたい。

E. 結論

国内で臨床分離される、様々な広域 β -ラクタム薬耐性菌において、それら産生する β -ラクタマーゼの遺伝子を識別するための参照株の選定と PCR プライマーセットを設定した。そしてこれ

らが普及されることにより、耐性菌検査の精度管理の向上が期待される。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
投稿準備中
2. 学会発表
準備中

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

表1 PCR検査用参照株

大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>)	
TEM-型 ESBL 産生株 (HKY560)	
SHV-型 ESBL 産生株 (HKY402)	
CTX-M-2 型 β-ラクタマーゼ産生株	(YO445)
CTX-M-3 型 β-ラクタマーゼ産生株	(NCB191)
CTX-M-9 型 β-ラクタマーゼ産生株	(NCB317)
.....	
肺炎桿菌 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)	
CTX-M-2 型 β-ラクタマーゼ産生株	(NCB125)
CTX-M-3 型 β-ラクタマーゼ産生株	(NCB121)
IMP-1 型メタロ-β-ラクタマーゼ産生株	(M115)
.....	
セラチア (<i>Serratia marcescens</i>)	
IMP-1 型メタロ-β-ラクタマーゼ産生株	(AK9373)
.....	
緑膿菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	
IMP-1 型メタロ-β-ラクタマーゼ産生株	(M207)

表3 PCR反応系

滅菌精製水	30 μl
10×PCR バッファー	5 μl
dNTP mixture	4 μl
PCR プライマー1	0.5 μl
PCR プライマー2	0.5 μl
Taq DNA polymerase	0.25 μl
DNA テンプレート	10 μl
.....	
計	50 μl

表2 β-ラクタマーゼ遺伝子検出用

PCRプライマーセット

TEM-型 β-lactamase 遺伝子	(TEM-1, TEM-2 ペニシリナーゼ遺伝子も 反応する)
5'-CCGTGTCGCCCTTATTCC-3'	
5'-AGGCACCTATCTCAGCGA-3'	
.....	
SHV-型 β-lactamase 遺伝子	(SHV-1, LEN-1 ペニシリナーゼ遺伝子も 反応する)
5'-ATTTGTCGCTTCTTTACTCGC-3'	
5'-TTTATGGCGTTACCTTTGACC-3'	
.....	
CTX-M-2(≒Toho-1)型 β-lactamase 遺伝子	
5'-ACGCTACCCCTGCTATTT-3'	
5'-CCTTTCCGCCTTCTGCTC-3'	
.....	
CTX-M-1, 3(=MEN-1)型 β-lactamase 遺伝子	
5'-GCTGTTGTTAGGAAGTGTGC-3'	
5'-CCATTGCCCGAGGTGAAG-3'	
.....	
CTX-M-9(≒Toho-2)型 β-lactamase 遺伝子	
5'-GCAGATAATACGCAGGTG-3'	
5'-CGCCGTGGTGGTGTCTCT-3'	
.....	
IMP-1 型 metallo-β-lactamase 遺伝子	
5'-ACCGCAGCAGAGTCTTTGCC-3'	
5'-ACAACCAGTTTTGCCTTACC-3'	

表4 PCRサイクル

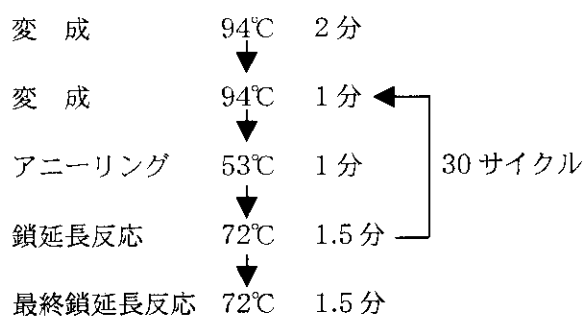
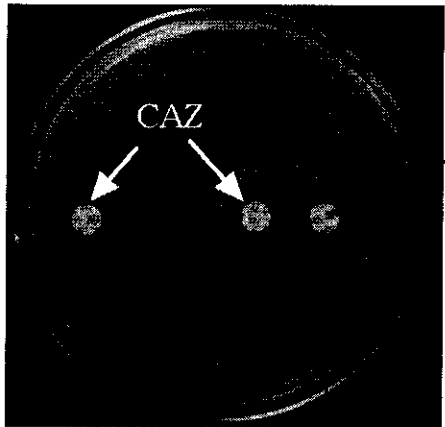


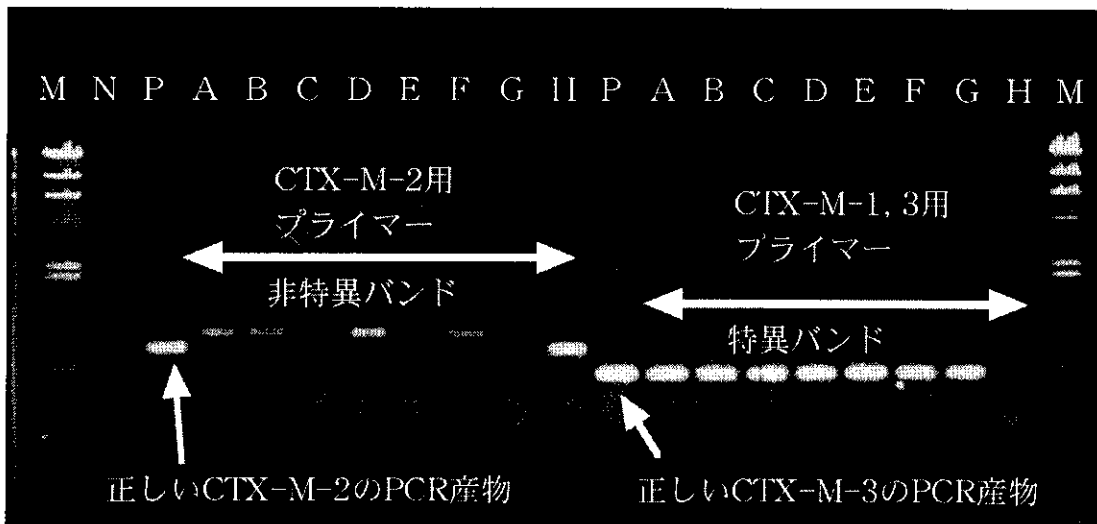
図1 メルカプト法によるメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌の識別



メタロ-β-ラクタマーゼの阻害剤であるSMAの影響で、感受性化が起こり、発育阻止帯の拡張が観察される。

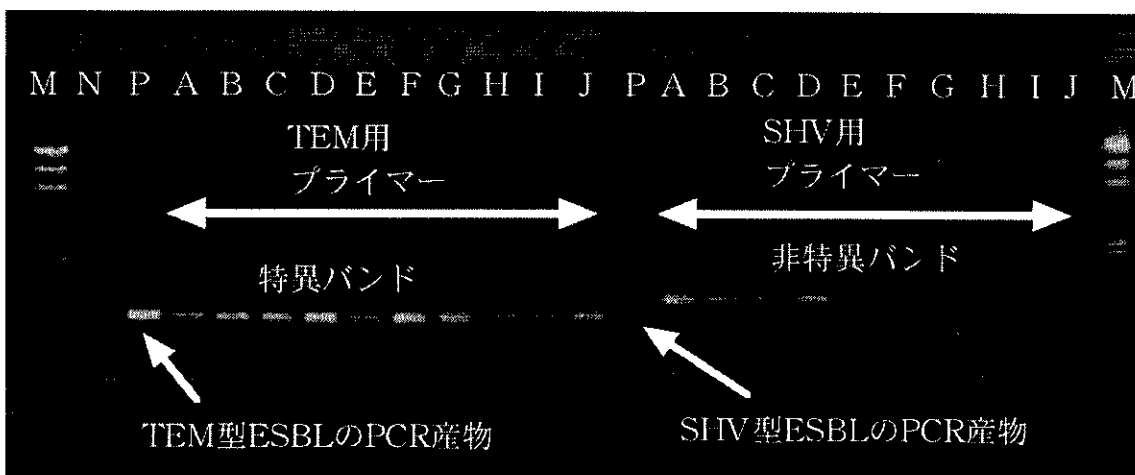
メルカプト酢酸
ナトリウム(SMA)

図2 *E. coli*におけるCTM-M-2とCTX-M-3(≒CTX-M-1)産生株の識別例



M: マーカー
N: 陰性対照
P: 陽性対照

図3 *K. pneumoniae*におけるTEM-型ESBL産生株の識別例



9. 炭疽の診断および検査法の標準化に関する研究

分担研究者 牧野壮一 帯広畜産大学畜産学部助教授

研究要旨 一世紀以上前に世界で初めて分離・同定された病原体、炭疽菌は世界で恐れられてきた伝染病、炭疽の原因菌である。現在新興・再興感染症がクローズアップされている中で、炭疽菌は容易に大量の芽胞菌体として精製できるので、紛争が起こると常に生物兵器のための病原菌として恐れられてきた。即ち、人為的に起こりうる伝染病と言える。同時に、海外では動物やヒトでの自然発生も毎年数多く報告されている。この原因は炭疽菌芽胞による汚染常在地の存在による。わが国でもかつては発生が多く見られたので、炭疽常在地が多くあると考えられるので、人為的原因による発生も考慮して、炭疽に対する警戒および防疫上の対処は常に必要である。しかし、我が国は炭疽に対しては発生が無いことから無防備であるといえる。炭疽の診断・検出技術は、農林水産省が炭疽が家畜法定伝染病に指定されていることから、獣医学領域では不完全ではあるが標準化している。しかし、ヒトの炭疽に関しては、標準的な診断・検出方法は全く無いのが現状である。そこで、①炭疽菌の検出法の確立、②炭疽菌の検出法の標準化、③炭疽の診断法の標準化を目的として本研究を実施する。具体的には、炭疽菌の細菌学的検査法、血清学的診断法および遺伝子増幅法（PCR）による迅速検出法の確立を目的とする。今年度は、炭疽に罹患した場合を想定して、マウスをモデル系として炭疽を迅速に検出する方法について検討した。

A. 研究目的

炭疽菌により起こる炭疽は、草食動物を中心とした家畜伝染病であるが、人を含めた他の動物にも重篤な症状を起こす人畜共通伝染病である。炭疽菌は、乾燥状態で容易に芽胞菌となり、一度土壌が炭疽菌で汚染されると、芽胞菌として感染力を保持しながら数十年生残し、炭疽常在地となる。ヒトの場合、創傷感染による皮膚炭疽、汚染動物肉の経口摂取による腸炭疽、および芽胞を吸引する肺炭疽があるが、肺炭疽が最も死亡率が高く、適切な治療を行わないと 99% 死亡する。実際は、感染後 24 時間以内に大量の抗生物質を投与する必要性が指摘されている。すなわち、血流中に炭疽菌が入り込んでしまうと抗生物質もほとんど効力がなく、免疫防御能も働かないほど急性経過をとる。さらには、特徴的な炭疽の症状はなく、風邪や食中毒と初期症状は全く変わらない。そして、炭疽菌の芽胞は、ごく基本的な設備や知識で簡単に大量培養

でき、しかも色も匂いも味もない粉末として調整し噴霧できるのである。すなわち、炭疽は発症してから探知される伝染病である。しかし、炭疽の患者を迅速に探知できれば、新たな炭疽の発生は防ぐことは充分可能である。つまり最初の炭疽の診断が最も重要であると言える。そこで、本研究では、炭疽の患者が発生した場合の診断方法を標準化する目的で、実験動物を利用して診断方法を検討する。

B. 研究方法

- ① 実験動物による炭疽の発症
炭疽菌パスツール 2 菌株の一夜培養液を 10 倍希釈後マウスの腹腔内に接種した。24～48 時間以内には炭疽を発症して死亡する。その臓器及び体液を採取して以下の実験に用いる。

② 家畜伝染病予防法により行われる炭疽の診断法の応用

家畜の炭疽の診断には、国内では(a)直接分離、(b)直接鏡検、(c)アスコリーテスト、(d)ガンマーファーージ溶菌試験、(e)パールテスト、および(f)動物接種試験があり、さらに外国では(g)蛍光抗体法や(h)ELISA法が使用されている。このうち、パールテストはその信頼性などから一般的ではない。これらを実際にヒトに応用した場合の診断過程について時間や国内での実用性等について検証する。

③ PCR法による迅速診断法

上記の方法に代わり、迅速性を考慮してPCR法が提案され、実用化が期待されている。それらと上記方法との違いを検証する。実際にPCRを行うためには、炭疽菌特異的なPCRの確立が不可欠であるが、既に牧野等により炭疽菌の病原因子である莢膜形成、毒素産生能に必須の遺伝子および染色体上のS-layer形成遺伝子の3種類のセットを用いたNested-PCR法が確立されている(厚生科学研究費補助金、新興・再興感染症研究事業、H11-新興-6)。これらを直接患者に用いる際の迅速性について検討する。

C. 研究結果

① 家畜伝染病予防法により行われる炭疽の診断法の応用

方法の項に記した技法について検討した。

(a) 直接分離：患者由来の血液、髄液および臓器からTrypticase soy agarの非選択培地と、血液寒天を併用し、炭疽菌の分離を行った。血液寒天の併用は、非溶血性のラフな集落を観察するのに適している。非選択培地上でもラフな大型の集落を観察できる。通常、生体サンプルは無菌的であるので、無菌的に各サンプルは採取すれば、上記の非選択培地で充分である。しかし、検体採取過程で雑菌の混入が防げ得ない状況においては、選択培地を用いた。選択培地としては、炭疽用選択培地として知られているPLET培地ではなく、*Bacillus cereus* selective agar (BCA; Oxoid)平板が有効である。BCA培地は、セレウス菌を集落の形態で選択しようとするもので、BCA培地上でセレウス

菌はトルコ石色を呈し、集落周囲に混濁リングがレシチナーゼにより観察され、他の菌種と区別可能となる培地である。炭疽菌はセレウス菌と分類学上近い関係にあり、*Bacillus*属の中でセレウスグループに入っている。通常、*B. mycooides*, *B. thuringiensis*, *B. cereus*と*B. anthracis*のみがBCA平板上でラフで大型の集落を形成すが、他の*Bacillus*属菌種は発育しないか、ごく小さい集落を呈する。さらに、*B. mycooides*, *B. thuringiensis*と*B. cereus*では、集落周囲に明瞭な混濁形成が観察されるが、*B. anthracis*では観察されない。同時に、PLET培地と異なり炭疽菌に対する発育阻害がない。炭疽により死亡したマウスを用いた実験で、上記の3種類の培地で24時間後37℃の培養で炭疽菌を分離することが出来た。しかし、炭疽に感染した場合、死亡前に炭疽菌がどの位の経過で分離可能かについては今後の課題であり、詳細な検討を要する。

(b) 直接鏡検：各サンプルをスライドグラスに塗抹してグラム染色を行うと、グラム陽性大桿菌が連鎖状に連なり観察できた。この場合、墨汁やコンゴレッドによる対比染色を追加すると、莢膜の確認が可能となるので診断に併用した。しかし、(a)と同じく死亡マウスを使ったものであり、炭疽菌がどの程度で鏡検可能となるかは今後の課題である。

(c) アスコリーテスト：炭疽菌に対する高度診断用血清がウマで作られ、市販されている。死亡患畜の肝臓等の臓器を乳剤にして煮沸後の上清を試験管内凝集試験を行って調べる診断法である。マウスを用いて充分診断法として応用可能であったが、あくまでも死亡時にもみ使用可能であり、感染初期の動物での使用には適さない。また、*Bacillus*属で陽性になる菌種もあり確定診断とは言いにくい。

(d) ガンマーファーージ溶菌試験：(a)の直接分離で炭疽菌用集落を検出できれば、容易に応用可能である。ファーージ液は常に保存しておく必要があるが、-20℃で通常一年程度は力価を失わずに保存できる。

(e) パールテスト：この方法は上記の方法を行えば必要のない方法のため削除し

た。

- (f) 動物接種試験：最終的に確定診断をする場合必要である。しかし、時間がかかることと、マウスやモルモットを用いるので、迅速性には欠ける。しかし、最も確定診断としては有効である。死亡した動物から炭疽菌を分離し、同定して、更に純化した細菌を動物接種して炭疽の確定診断とする。
- (g) 蛍光抗体法、ELISA 法：欧米でアスコリ-反応の代わりとして使用されている方法である。我国にはスタンダードとなる抗体が現存していないので、抗体を作製する必要があり、今後の課題である。診断法の国際化を考えれば必要な手法である。

以上の従来から行われている家畜用の炭疽菌の診断方法は、ヒトにも応用可能であった。すなわち、発症し炭疽菌が血流中で増加している場合、一時間以内には血液サンプルから直接鏡検により炭疽菌様細菌の存在を察知可能であり、翌日には、分離でき炭疽菌を検出可能である。しかし、ヒトの場合、動物よりも迅速性が要求され、しかも発症前に診断可能な方法にする必要があるため、従来の方法は完全ではない。

② PCR法による迅速診断法

そこで、迅速性を考慮して PCR 法が提案され、実用化が期待されている。現在最も有力視されているプライマーセットを用いて、マウスの臓器や血液における PCR を実施した。死亡したため、体内での炭疽菌の菌数が多いため、Nested-PCR は不要であり、1回の PCR で炭疽菌 DNA を検出できた。発症して死亡した場合は短時間で炭疽を診断できた。しかし、発症以前の患者の探知であり、感染経過と PCR 法による検出感度を調べるのが今後の課題である。

D. 考察

従来家畜用に用いられてきた炭疽の診断方法は、ヒトにも応用可能である。しかし、確定診断には、迅速性を考慮して PCR 法を併用すべきである。炭疽が発症し死亡した患者の場合、血液を用いて市販の簡易キットにより全 DNA を抽出し、PCR を行えば炭疽による死亡か否かは 4 時間程度で診断できると考える。更に確定診断のためには炭疽菌の分離同定を更にもう一日要す。しかし問題は、発症以前の場合の検出法

であり、実験動物をモデル系として発症過程と炭疽菌の体内移行との関係を調べる必要がある。すなわち、血液中にその位の経過で検出可能な状態になるかという点である。僅かの菌数さえあれば PCR 法により検出可能となるはずである。今後の課題である。次年度はこの点を明らかにして、炭疽の診断法の標準化を図る必要がある。

E. 結論

- ① 炭疽菌の診断法は家畜用の方法がそのまま使えると考えられたが、一部不要であると考えられるものもあった。
- ② PCR 法が迅速法として利用可能であると結論された。
- ③ 以上の方法の併用で更なる迅速化が図られることが期待されるが、あくまでも発症した場合の診断法であると言える。発症前の方法は今後の検討課題である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

一部の結果は、投稿及び学会発表準備中。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Yoda K, Sata T, Kurata T, Aramaki H	Oropharyngotonsillitis associated with non-primary Epstein-Barr virus infection.	Arch Otolaryngol Head Neck Surg			in press
Izumiya H, Terajima, J, Matsushita S, Tamura K, Watanabe H	Molecular characterization of multidrug resistant Salmonella enterica serovar Typhimurium isolated in Japan by detection of class 1 integron and pulsed-field gel electrophoresis.	J Clin Microbiol			in press
Fukuda K, Takahashi K, Iwata Y, Mori N, Gonda, K, Horimoto T, Sawada T, Tashiro M, Yamaguchi K, Niwa S, Shigeta S	Immunological and PCR analyses for Borna disease virus in psychiatric patients and blood donors in Japan.	J Infect Dis	39		in press
Lin K-H, Chern C-L, Chu P-Y, Cheng C-H, Wang H-L, Sheu M-M, Huang W-L, Pongsuwanna Y, Yamamoto S, Yoshino S, Ishiko H, Takeda N.	Genetic analysis of recent Taiwanese isolates of a variant of coxsackievirus A24	J Med Virol			in press
Kato A, Ohnishi Y, Kohase M, Saito S, Tashiro M, Nagai Y	The smallest Y2 of Sendai virus C proteins is fully capable of both counteracting the anti-viral action of interferons and inhibiting viral RNA synthesis.	J Virol	76		in press
Taniguchi K, Wu H, Maeno Y, Kusuhara Y, Matsuura Y, Takeda N, Urasawa S.	Completion of nucleotide sequence of a human rotavirus genome and expression of its structural proteins by baculovirus system	J Virol			in press
Reickert T, Sugaya N, Fedson D, William G, Simonen L, Tashiro M	The experience in Japan of influenza vaccination of school children	New Engl J Med			in press
Umino Y, Tashiro M	Inhibition of rubella virus growth by Fungizone.	Vaccine			in press
Li T-C, Takeda N, Miyamura T	Oral administration of hepatitis E virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice	Vaccine			in press
Katano H, Sato Y, Kurata T, Mori S, Sata T	Expression and localization of human herpesvirus 8-encoded proteins in primary effusion lymphoma, Kaposi's sarcoma and multicentric Castlemans disease.	Virology			in press
Someya Y, Takeda N, Miyamura T.	Complete nucleotide sequence of the Chiba virus Genome and functional expression of the 3C-like protease in escherichia coli	Virology			in press
Nawa M, Takasaki T, Yamada K, Akatsuka T, Kurane I	Development of dengue IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay with higher sensitivity using monoclonal detection antibody.	J Virol Metho	92	65-70	2001

Kano M, Matano T, Nakamura H, Takeda A, Kato A, Ariyoshi K, Mori K, Sata T, Nagai Y	Elicitation of protective immunity against simian immunodeficiency virus infection by a recombinant sendai virus expressing the gag protein	AIDS	14	1281-1282	2000
Yoda K, Sata T, Kurata T, Aramaki H	Oropharyngotonsillitis associated with non-primary Epstein-Barr virus infection	Arch Otolaryngol Head Neck Surg	126	185-193	2000
Okada H, Kobune F, Sato TA, Kohama ., Takeuchi Y, Abe T, Akayama N, Tshuchiya T, Tashiro M	Extensive lymphopenia due to apoptosis of uninfected lymphocytes in acute measles patients.	Arch Virol	145	905-920	2000
Ishiji T, Kawase M, Honda M, Niimura M, Yoshimura E, Sata T, Matsukura T	Distinctive distribution of human papillomavirus type 16 and type 20 in the tonsillar and the skin carcinomas of in a patient with epidermodysplasia verruciformis	Br J Dermatol	143	1005-1010	2000
Kino N, Sata T, Sato Y, Sugase M, Matsukura T	Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of a novel human papillomavirus (type 82) associated with a vaginal intraepithelial neoplasia	Clin Diag Lab Immunol	7	91-95	2000
Nawa M, Yamada K, Takasaki T, Akatsuka, T, Kurane I	Serotype-cross-reactive IgM responses in dengue virus infections determined by enzyme-linked immunosorbent assays.	Clin Diagn Lab Immunol	7	774-777	2000
Kurane I, Takasaki T, Yamada K	Recent topics of flavivirus infections in Japan : Increase of imported dengue cases and isolation of tick-borne encephalitis virus.	Emerg Infect Dis	6	569-571	2000
Kobayashi S, Sakae K, Suzuki Y, Shinozaki K, Okada M, Ishiko H, Kamada K, Suzuki K, Natori K, Miyamura T, Takeda N	Molecular cloning, expression, and antigenicity of Seto virus belonging to genogroup I Norwalk-like viruses	J Clin Microbiol	38	3492-3494	2000
Hale AD, Tanaka TN, Kitamoto N, Ciarlet M, Jiang X, Takeda N, Brown DGW, Estes MK	Identification of an epitope common to genogroup 1 Norwalk-like viruses	J Clin Microbiol	38	1656-1660	2000
Yamamoto A, Nakayama M, Tashiro M, Ogawa T, Kurane I	Hydroapatite-coated nylon beads as a new reagent to develop a particle agglutination assay for detecting Japanese encephalitis virus-specific antibodies.	J Clin Virol	19	195-204	2000
Nishimura Hitamura S, Iwasaki, T, Kurata T, Tashiro M	Characterization of human influenza A (H5N1) virus infection in mice: neuro-, pneumo- and adipotropic infection.	J Gen Virol	81	2503-2510	2000
Li T-C, Shinzawa H, Ishibashi M, Sata M, Kisoon K, Mast EE, Miyamura T, Takeda N	Empty virus-like particle-based enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to hepatitis E virus	J Med Virol	62	327-333	2000

Kobayashi S, Sakae K, Natori K, Takeda N, Miyamura T, Suzuki Y	Serotype-specific antigen ELISA for detection of Chiba virus in stools	J Med Virol	62	233-238	2000
Li F, Riddell MA, Seow HF, Takeda N, Miyamura T, Anderson DA	Recombinant subunit ORF2.1 antigen and induction of antibody against immunodominant epitopes in the hepatitis E virus capsid protein	J Med Virol	60	379-386	2000
Katano H, Iwasaki T, Baba N, Terai M, Mori S, Iwamoto A, Kurata T, Sata T	Identification of antigenic proteins encoded by human herpesvirus 8 and seroprevalence in the general population and among patients with and without Kaposi's sarcoma	J Virol	74	3478-3485	2000
Nakamura Y, Takahashi H, Shoya Y, Nakaya T, Watanabe M, Tomonaga K, Iwahashi K, Ameno K, Momiyama N, Taniyama H, Sata T, Kurata T, de La Torre JC, Ikuta K	Isolation of borna disease virus from human brain tissue	J Virol	74	4601-4611	2000
Tamura M, Natori K, Kobayashi M, Miyamura T, Takeda N.	Interaction of recombinant Norwalk virus particles with 105-kilodalton cellular binding protein, a Candidate Receptor Molecule for Virus Attachment	J Virol	74	11589-11597	2000
Takeda M, Takeuchi K, Miyajima N, Koabune F, Ami Y, Nagata N, Suzuki Y, Nagai Y, Tashiro M	Recovery of pathogenic measles virus from cloned cDNA.	J Virol	74	6643-6647	2000
Hasan MK, Kato A, Muranaka M, Yamaguchi R, Sakai Y, Hatano I, Tashiro M, Nagai Y	Versability of the accessory C protein of Sendai virus: contribution to virus assembly as an additional role.	J Virol	74	5619-5628	2000
Katano H and Sata T	Human herpesvirus 8-virology, epidemiology, and related diseases	Jpn J Infect Dis	53	137-155	2000
Kobayashi S, Sakae K, Suzuki Y, Ishiko H, Kamada K, Suzuki K, Natori K, Miyamura T, Takeda N	Expression of recombinant capsid proteins of Chiba virus, a Genogroup II Norwalk-like virus (NLV), and development of an ELISA to detect the viral antigen	Microbiol Immunol	44	687-693	2000
Katano H, Suda T, Morishita Y, Yamamoto K, Hoshino Y, Nakamura K, Tachikawa N, Sata T, Hamaguchi H, Iwamoto A, Mori S	HHV-8-associated solid lymphomas occurring in AIDS patients take anaplastic large cell morphology	Modern Pathol	13	77-85	2000
Tanaka M, Endo K, Suzuki T, Kakita A, Takahashi H, Sata T.	Parkinsonism in HIV encephalopathy	Mov Disord	15	1032-1033	2000
Kashiwase M, Sata T, Yamauchi Y, Minoda H, Usui N, Iwasaki T, Kurata T, Usui M	Progressive outer retinal necrosis caused by herpes simplex virus type 1 in a patient with acquired immunodeficiency syndrome	Ophthalmol	107	790-794	2000