

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

生物テロに使用される可能性の高い病原体による  
感染症の蔓延防止、予防、診断、  
治療に関する研究班

平成14年度 総括・分担研究報告書

平成15年 3 月

主任研究者

島 田 馨

(東京専売病院)

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

生物テロに使用される可能性の高い病原体による  
感染症の蔓延防止、予防、診断、  
治療に関する研究班

平成14年度 総括・分担研究報告書

平成15年 3 月

主任研究者

島 田 馨

(東京専売病院)

新興・再興感染症 研究事業  
 生物テロに使用される可能性の高い病原体による感染症の蔓延防止、  
 予防、診断、治療に関する研究班

班員名簿

氏 名	所 属	職 名
島田 馨	東京専売病院	院 長
佐多徹太郎	国立感染症研究所感染病理部	部 長
神山 恒夫	国立感染症研究所獣医科学部	室 長
渡邊 治雄	国立感染症研究所細菌第一部	部 長
森川 茂	国立感染症研究所ウイルス第一部	室 長
高橋 元秀	国立感染症研究所細菌第二部	室 長
牧野 壮一	帯広畜産大学畜産学部病原細菌学教室	助教授
江崎 孝行	岐阜大学医学部微生物学講座	教 授
倉園 久生	岡山大学医学部保健学科検査技術科学	教 授
岩本 愛吉	東京大学医科学研究所先端医療研究センター	教 授
相楽 裕子	横浜市民病院感染症部	部 長
河野 茂	長崎大学医学部第二内科	教 授
山口 恵三	東邦大学医学部微生物学講座	教 授
賀来 満夫	東北大学大学院医学系研究科病態制御学講座	教 授
角田 隆文	東京都立荏原病院感染症科	部 長
大西 健児	東京都立墨東病院感染症科	部 長
吉開 泰信	九州大学生体防御医学研究所感染防御研究センター	教 授
中村 修	慶応義塾大学環境情報学部	助教授

# 目 次

I. 平成14年度総括研究報告書	1
主任研究者：島田 馨（東京専売病院）	
II. 感染研小班	
II-I. 小括研究報告書	5
分担研究者：佐多 徹太郎（国立感染症研究所感染病理部）	
II-II. 分担研究報告書	
1. 迅速病理診断法の開発 —エボラ出血熱—	7
分担研究者：佐多 徹太郎（国立感染症研究所感染病理部）	
2. ペスト菌の検出と診断法の確立	10
分担研究者：神山 恒夫（国立感染症研究所獣医科学部）	
3. ペストの迅速診断と薬剤感受性	17
分担研究者：渡辺 治雄（国立感染症研究所細菌第一部）	
4. 天然痘およびウイルス出血熱診断法の確立に関する研究	20
分担研究者：森川 茂（国立感染症研究所ウイルス第一部）	
5. ポツリヌスの実験室内診断法と予防に関する研究	28
分担研究者：高橋 元秀（国立感染症研究所細菌第二部）	
III. 帯畜大小班	
III-I. 小括研究報告書	33
分担研究者：牧野 壮一（帯広畜産大学畜産学部）	
III-II. 分担研究報告書	
1. 細菌性生物兵器の蔓延防止に関する研究	38
分担研究者：牧野 壮一（帯広畜産大学畜産学部）	
2. 野兎病菌の検出法および診断法の確立に関する研究	43
分担研究者：倉園 久生（岡山大学医学部）	
3. 鼻祖菌及び類鼻祖菌の検出と診断方法	48
分担研究者：江崎 孝行（岐阜大学医学部大学院独立専攻再生医科学）	

#### IV. 臨床小班

1. 小括研究報告書 . . . . . 53

#### 2. 分担研究報告書

バイオテロに関する疾患の臨床診断および治療マニュアルの作成 . . . . . 55

分担研究者：岩本 愛吉 東京大学医科学研究所  
山口 惠三 東邦大学医学部  
河野 茂 長崎大学大学院  
大西 健児 東京都立墨東病院  
角田 隆文 東京都立荏原病院  
賀来 満夫 東北大学大学院  
相楽 裕子 横浜市民病院  
吉開 泰信 九大生体防御医学研究所  
中村 修 慶応大学

V. 研究成果に関する一覧表 . . . . . 105

# 総括研究報告書

## I. 生物テロに使用される可能性の高い病原体による感染症の蔓延防止、予防、診断、治療に関する研究

主任研究者 島田 馨 東京専売病院院長

**研究要旨** バイオテロ関連疾患はカテゴリーA から C まで分類され多数の疾患がある。いずれも現在ではわが国には存在しないか稀な感染症であり、最初に診断する医師が疑わなければその発生を把握することさえ出来ない。臨床医の診断・検査・治療にたいする役割は大きい。本年度は一般臨床医に役立つような臨床診断・検査・治療マニュアル作製のたたき台となる資料の収集を行いまとめた。また検査診断法として、エボラウイルスの病理および病原性鑑別診断法、ペスト菌、痘瘡ウイルス、炭疽菌、鼻疽、類鼻疽の real-time PCR 法、ボツリヌス毒素やブルセラ症に対する免疫化学的検査法について開発と実施検討を行った。

### 分担研究者：

（感染研小班）

佐多徹太郎 国立感染症研究所部長  
神山恒夫 国立感染症研究所室長  
渡邊治雄 国立感染症研究所部長  
森川 茂 国立感染症研究所室長  
高橋元秀 国立感染症研究所室長

（帯畜大小班）

牧野壮一 帯広畜産大学助教授  
江崎孝行 岐阜大学医学部教授  
倉園久生 岡山大学医学部教授

（臨床小班）

岩本愛吉 東京大学教授  
相楽裕子 横浜市民病院部長  
河野 茂 長崎大学教授  
山口恵三 東邦大学教授  
賀来満夫 東北大学教授  
角田隆文 東京都立荏原病院部長  
大西健児 東京都立墨東病院部長  
吉開泰信 九州大学教授  
中村 修 慶応義塾大学助教授

### A. 研究目的

2001 年 9-10 月にアメリカで発生した炭素菌芽胞混入郵便物を用いたテロ事件に続いて、わが国で同様の模倣事件が多発した。これらの事件に対処する過程で、バイオテロ等の緊急事態に対応して、従来以上の迅速な病原体検出法、蔓延防止策、予防、診断、治療法の開発とその普及の必要性が強く指摘された。現在バイオテロに利用されることが危惧される病原体ならびに疾病には、節足動物媒介性ウイルス、痘瘡ウイルス、出血熱ウイルス、炭疽、ペスト、野兎病、ブルセラ、Q熱、ボツリヌス毒素などがあり、米国 CDC はその重要性からカテゴリーA から C に分類している。これらの病原体による疾患は現在では一般に稀であるか、あるいは自然界に存在しないが、患者の多くは急性で高い致死率を示す。したがって、バイオテロ対策として迅速な診断システムを開発整備し、その技術を各都道府県の衛生研究所等に移転し、迅速な緊急時対応の体制実現を図ることが必要である。さらに、最初に患者を診る臨床医へのバイオテロ関連疾患の知識を普及し、適切な臨床診断法および治療法をマニュアルとして種々

の媒体を用いて提供することも重要である。これらを整備することにより、適切な患者検体の採取と適切な検査診断機関への依頼が可能となり、患者の適切な治療および感染の拡大防止につながる。したがって、本研究では緊急時に環境材料ならびに臨床検体から、これらのバイオテロ病原体を短時間に検出する実験室診断法の開発と、治療薬の効果の検討ならびに臨床診断、治療への対応に関して検討し、マニュアル化することを目的とする。これらの研究によって、事件が発生した場合の緊急対応が可能となり、国民の生物テロに対する不安が軽減されるのみならず、生物テロ事件および模倣事件に対する抑止効果も期待される。

## B. 研究方法

実験室診断法の開発には、国立感染症研究所グループ（感染研班小括）と帯畜大牧野らのグループ（牧野班小括）計9名により、バイオテロ関連疾患のうちおもにカテゴリーAに属するウイルスや細菌感染症等について検査診断法の開発を行い、またバイオテロに関する疾患の臨床診断および治療マニュアルの作製を目的として、岩本班員らによる臨床班計7名（臨床班小括）、そしてWebでの情報公開にあたっての問題点や方法の検討に1名、そして全体の統括に主任研究者があたる体制を組み、班会議等により相互の情報交換を行い、総体的にバイオテロ対策の確立にむけた研究を行う。

実験室検査診断法の開発には、国立感染症研究所グループは迅速病理診断法、ペスト菌、耐性菌、天然痘およびウイルス性出血熱およびボツリヌス毒素について分担し、帯畜大グループは炭疽菌、ブルセラ症、鼻疽・類鼻疽菌、野兎病菌を分担した。臨床診断や治療に対しては、臨床班員が分担して天然痘、ウイルス性出血熱、炭疽、野兎病、鼻疽、類鼻疽、真菌性疾患、リケッチャ疾患、毒素、ワクチン等について病原体の特徴、疫学、感染経路、臨床症状、診断、患者の管理および対策、治療、予防について、わが国の現状にあった形で疾患の概要をまとめることにした。それぞれの小班の小括および分担研究者報告に詳細を記載した。

## C. 研究結果

### 1. 感染研小班

カテゴリーAに分類されるバイオテロ関連疾患および病原体に対し、生・剖検組織材料を用いたエボラウイルス抗原の迅速病理診断法、real time PCR法を用いたペスト菌検出診断法、real time PCR法による天然痘ウイルス検出法および抗原捕捉 ELISA法によるエボラウイルスのヒトへの病原性の鑑別検出診断法、ボツリヌス毒素の免疫化学的検出診断法といった実験室診断法の作製を行った。またペスト菌がニューキノロン系抗菌薬に感受性があることを確認した。

### 2. 帯畜大小班

炭疽菌特異的 nested PCR法や real-time PCR法を開発し、その特異性や検出感度について検討した。さらに実際の土壌検体から炭疽菌 DNAを検出した。ブルセラ症に対する急速凝集法の改良を精製ポリサッカライド抗原を用いて行い、交差反応性を除去する方法を開発した。鼻疽、類鼻疽特異的検出法として PCR法を検討したが、特異性については検討の余地があることが分かった。野兎病の PCR法について検出法や感度、特異性を検討した。

### 3. 臨床小班

ウイルス、細菌、真菌、毒素によるバイオテロ関連疾患について分担して、疫学、臨床症状、治療法、予防法についてまとめた。またワクチンで予防可能な疾患や日本人の治療薬投与量に関する検討を行った。来年度に診断・治療マニュアル作製をめざし資料収集を行った。

## D. 考察

### 1. 感染研小班

従来実施困難であった生物学的診断法でなく、新しい免疫化学的ないしは核酸増幅法を用いたものであり、その取り扱い易さや迅速性そして特異性に優れていると考えられる。細かな問題も残されているが、これらの方法はわが国の危機管理対策への貢献になるものと考えられる。今後ほかの疾患への対応を含めて検査診



断法を開発し、かつより特異的、高感度、迅速性を高めていく。

## 2. 帯畜大小班

炭疽菌検出法はほぼ完成したので実際の疫学的調査への応用が期待できる。ブルセラ症診断については免疫学的方法としては実用的であるが、培養や PCR 法の確立が必要である。鼻疽、類鼻疽菌の検出は PCR 法をほぼ確立したが検討の余地が残されている。

## 3. 臨床小班

バイオテロ関連疾患として重要なものは炭疽菌と痘瘡ウイルスであるが、より幅広い関連疾患について一般臨床医に情報提供ができるようにしていく。

## E. 結 論

エボラウイルスの病理および病原性鑑別診断法、ペスト菌、痘瘡ウイルス、炭疽菌、鼻疽、類鼻疽の PCR 法、ボツリヌス毒素やブルセラ症に対する免疫化学的検査法について検査法の開発と実施検討を行った。臨床診断・治療マニュアル作製のために資料収集を行いまとめた。

## F. 健康危険情報

とくになし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

各研究小班小括および分担研究者の項を参照。

### 2. 学会発表

各研究小班小括および分担研究者の項を参照。

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

### 1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし

# 分担研究報告書

## II-I. 感染研小括研究報告書

分担小括研究者 佐多徹太郎 国立感染症研究所

**研究要旨** バイオテロ関連疾患の病原体検査診断法として、免疫組織化学法によるエボラ出血熱病原体の組織内検出同定法、ペスト菌 DNA 検出法、天然痘ウイルス DNA の real time PCR 法、毒素の免疫化学的検出法を開発した。そして実際の検出を試みた。またペスト菌の抗菌薬感受性について調べた。今後は、検出法の特異性、簡便性、迅速性についてさらに検討し、マニュアル化を進め、緊急時の対応として体制化を図っていくことが可能となると考えられた。

分担研究者：

(感染研小班)

佐多徹太郎 国立感染症研究所部長  
神山恒夫 国立感染症研究所室長  
渡邊治雄 国立感染症研究所部長  
森川 茂 国立感染症研究所室長  
高橋元秀 国立感染症研究所室長

### A. 研究目的

2001年9-10月にアメリカで発生した炭素菌芽胞混入郵便物を用いたテロ事件に続いて、わが国で同様の模倣事件が多発した。バイオテロ等の緊急事態に対応して、迅速な病原体検出法、蔓延防止策、予防、診断、治療法の開発とその普及の必要性が強く指摘された。現在バイオテロに利用されることが危惧される病原体ならびに疾病は、米国 CDC によると、その重要性からカテゴリーを A から C に分類されている。これらの病原体による疾患は現在では一般に稀であるか、また自然界に存在しないが患者の多くは急性で高い致死率を示す。したがって、バイオテロ対策として迅速な診断システムを開発整備し、その技術を各都道府県の衛生研究所等に移転し、迅速な緊急時対応の体制実現を図ることが必要である。本研究では緊急時に環境材料ならびに臨床検体から、これらのバイオテロ病原体を短時間に検出する実験室診断法の開発と確立をめざし、臨床的対応に資するこ

とを目的とする。

国立感染症研究所グループではカテゴリー A に分類されるバイオテロ関連疾患および病原体に対し、生・剖検組織材料を用いた迅速病理診断法、ペスト菌検出診断法、耐性菌の検出診断法、天然痘およびウイルス性出血熱の検出診断法、ボツリヌス毒素の検出診断法と題して実験室診断法の開発、そしてその実験室診断法は各都道府県の地方衛生研究所に移転し、緊急時対応体制の確立を図ることを目的とする。

### B. 研究方法

国立感染症研究所グループ(感染研小班)は、実験室診断法の開発として迅速病理診断法、ペスト菌、耐性菌、天然痘およびウイルス性出血熱およびボツリヌス毒素について分担した。分担項目の方法については各報告書に記載されているので、ここでは省略する。

### C. 研究結果

1) 生・剖検組織材料を用いた迅速病理診断法：エボラ出血熱の原因ウイルスにはおもにザイル株とスーダン株がある。これらのウイルス実験感染サルホルマリン固定パラフィン包埋組織切片と森川らの開発した抗 NP モノクローナル抗体を用いた免疫染色法により、両者の株ともにウイルス抗原の組織内検出が可能となった。

2) ペスト菌検出診断法：生物材料に混入したペスト菌 DNA を抽出し、PCR 法で検出可能であった。また real time PCR 法により、より高感度で特異的な迅速診断が可能となった。1-10 コピーのペスト菌核酸を 1 時間程度で検出できる。また病原因子を対象とした multiplex PCR 法を開発した。

3) ペスト菌の抗菌薬感受性：ペスト菌をマウスに腹腔内に感染させ 24 時間以内に種々の抗菌薬を投与して薬剤感受性について検討した。その結果、ニューキノロン系の有効性を確認した。

4) 天然痘およびウイルス性出血熱の検出診断法：患者検体以外の材料から痘瘡ウイルス DNA を 10 コピー程度の感度で迅速に検出できる real time PCR 法を作製した。しかしほかのオルソポックスウイルスとの鑑別にはなお改良の余地が残されていることが判明した。エボラウイルスのうち、ヒトへの病原性のあるものとなないレストン株を抗原捕捉 ELISA 法で鑑別検出することが可能となった。

5) ポツリヌス毒素の検出診断法：ポツリヌス毒素の検出はマウスを用いる方法が標準であるが、今回ゼラチン粒子を抗体で感作した免疫学的方法で検出する簡易キットを作製した。またポツリヌス毒素に対する予防目的とするトキシソイドの作出を目的として毒素の精製を行った。

#### D. 考 察

バイオテロ関連疾患のうちカテゴリー A に分類されるウイルス性出血熱、ペスト、天然痘、ポツリヌス毒素、そして耐性菌の検出診断法の作製を行った。これらは従来実施困難であった生物学的診断法でなく、新しい免疫化学的ないしは核酸増幅法を用いたものであり、その取り扱い易さや迅速性そして特異性に優れていると考えられる。細かな問題も残されているが、これらの方法はわが国の危機管理対策への貢献になるものと考えられる。今後ほかの疾患へ

の対応を含めて検査診断法を開発し、かつより特異的、高感度、迅速性を高めていきたい。

#### E. 結 論

ウイルス性出血熱、天然痘、ペスト、毒素、および耐性菌に対する検査診断法を作製した。またペスト菌の抗菌薬感受性としてニューキノロン系の有効性を確認した。

#### F. 健康危険情報

とくになし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

各分担研究者の項を参照。

##### 2. 学会発表

各分担研究者の項を参照。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

# 1. 迅速病理診断法の開発—エボラ出血熱—

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 島崎加恵、佐藤由子、倉田 毅（同感染病理部）  
森川 茂（同ウイルス第1部）

**研究要旨** エボラ出血熱のホルマリン固定パラフィン包埋した生・剖検組織検体で病理・免疫組織化学診断が可能となった。主要なウイルス株であるザイール株とスーダン株の実験感染サル組織および抗 NP モノクローナル抗体を用いた検討により、両者ともに感染細胞の細胞質内に存するウイルス抗原を検出することができた。現時点でわが国で使用できる最も良い組織内エボラウイルス抗原の検出法と考えられた。

## A. 研究目的

生物テロに用いられる病原体はわが国ではすでにみられなくなったか、あるいはごく稀な疾患である。多くの情報が米国 CDC から発信されているが、実際の検査診断には陽性対照となる病原体やその感染材料が必須となる。しかしながらなかなか手に入れることが困難な状況でもある。2001年の「世界同時多発テロ」後の炭疽菌事件後、わが国でも模倣した事件が多発した。当時はすでにある実験方法を応用した対応しか取れなかったが、現在の世界情勢を鑑みるとより体系的な準備が必要である。

生物テロに用いられる病原体の病原微生物学的検査診断法はもとより、生検・剖検組織を用いた診断が実際行われ、多くの貴重な情報が得られていることは周知の事実である。本研究では、通常の病理組織学的診断法に加え、迅速診断法、さらに特異抗体や核酸プローブを用いた高感度検出法を開発し、組織検体を用いた迅速検出および病原体同定法を確立することを目的とする。

本年度はエボラ出血熱について検討を行った。

## B. 研究方法

(1) 抗体：CDC から分与されたザイール株の GP に対するモノクローナル抗体および森川から供与された NP に対するモノクローナル抗体を使用した。

(2) エボラウイルス感染 Vero 細胞：CDC で作製し irradiation およびアセトン固定されたもので、ザイール株、スーダン株そしてレストン株の細胞塗沫標本を使用した。

(3) エボラウイルス実験感染サル剖検組織：CDC の Dr. McCormick および Dr. Fisher-Hoho の感染実験サルですでに発表してある剖検ホルマリン組織切片を用いた。

上記の感染細胞や実験感染サル組織は CDC での共同実験等で倉田が借用したものであり、放射線照射やアセトンないしホルマリンで固定され、感染ウイルスは完全に不活化されたものである。

(4) 免疫細胞組織化学法：アセトン固定された感染細胞は間接蛍光抗体法で、ホルマリン固定組織は LASB 法で免疫細胞組織化学を行い、ウイルス抗原を検出した。また組織ではマクロファージやリンパ球マーカーおよび血管内皮細胞マーカーとなるモノクローナル抗体を用い、感染細胞の同定に使用した。

## C. 研究結果

(1) エボラウイルス感染細胞でのウイルス抗原検出

ウイルスの GP に対する抗体および12種類のウイルス NP 蛋白に対する抗体を用いて、ザイール株、スーダン株およびレストン株に対する

反応性を蛍光抗体法で検討した。GP 抗体はエボラザイル株にしか反応はみられなかった。NP 抗体はザイル株にはすべて、レストン株は9クローン、スーダン株には10クローンが反応した。3種のウイルス株とともに反応する抗体は8種類であった。NP 抗体は感染細胞の細胞質を中心に、GP 抗体は細胞質および細胞膜の抗原を検出していた。

## (2) 実験感染サルでのウイルス抗原の検出

これらの抗体を用いてエボラウイルス感染実験サルのホルマリン固定パラフィン包埋組織切片での反応性を酵素免疫組織化学法で検討した。ホルマリン固定では抗原決定基がリジンやアルギニンなどのアミノ酸でクロスリンクによりマスクされることがあるので、トリプシンやオートクレーブ等で抗原賦活化についてまず検討した。その結果、GP 抗体ではトリプシンを含め何らの前処理も行わず、希釈倍率1,000x で十分な反応性を示した。NP 抗体は1 mM EDTA で121°C 10分のオートクレーブ処理により希釈倍率 2,000x で良好な反応が得られた。この検出条件で3種のウイルス感染組織標本を用いて免疫組織化学を行った。GP 抗体はザイル株感染組織にのみ反応したが、NP 抗体はレストン株、ザイル株、スーダン株のいずれにも反応した。

## (3) ウイルス抗原の局在と免疫組織化学所見

GP 抗体ではザイル株感染組織で、ウイルス抗原は血管内皮細胞を中心として全身組織に分布していた。肝臓では肝細胞、デイスセ腔にも認められ、細胞質内封入体も陽性となった。細胞膜に沿った強い染色所見が得られた(図1)。それに対し、NP 抗体では細胞内のウイルス抗原が強く検出でき、細胞質内封入体も陽性となった。同じ切片で両者の反応を比較すると、細胞膜の強調された染色所見はNP 抗体では得られず、細胞質内の抗原が強く認められた。全体としてウイルス抗原の分布は少ない印象を与えるが、陽性細胞には変わりがなかった(図3)。

血管内皮細胞にはウイルス抗原陽性であったが、マクロファージには今回、陽性所見が認められなかった。

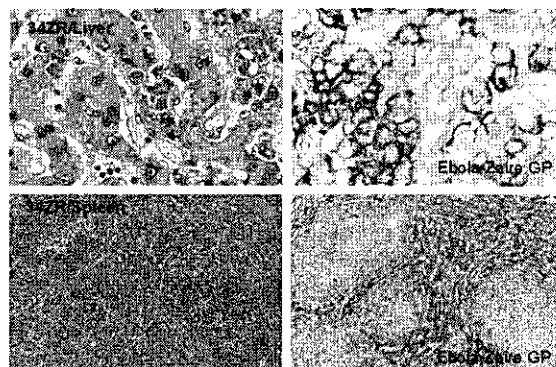


図1. 上段は肝臓、下段は脾臓で、ザイル株感染組織。右上下は、GP 抗体で免疫染色。

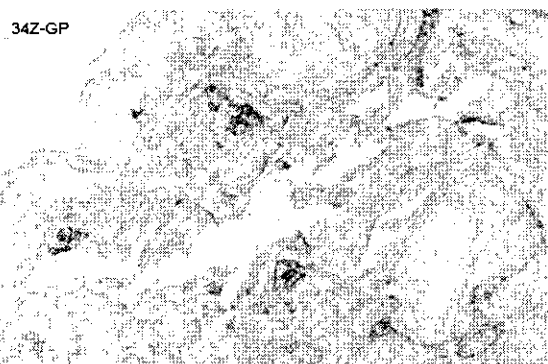


図2. ザイル株感染サルの皮膚、GP 抗体による免疫染色。

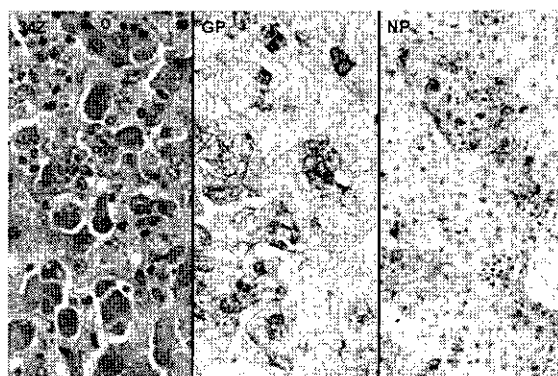


図3. ザイル株感染肝臓。GP 抗体 (中)、NP 抗体 (右)。

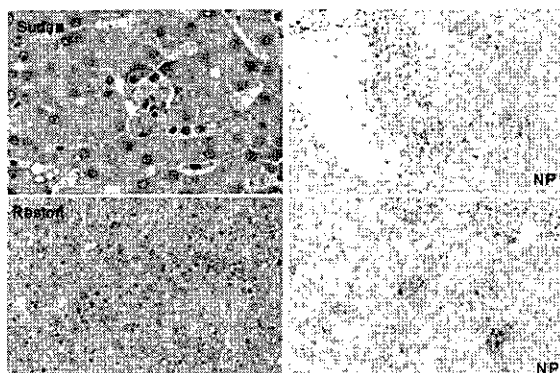


図4. スーダン株 (上) およびレストン株 (下) 感染肝臓。右上下はNP 抗体による免疫染色。

#### D. 考 察

ヒトに感染するエボラウイルスには大きく分けてザイール株、スーダン株、ガボン株、コートジボアール株があり、ウイルスを大きく分類するとザイール株（ガボン株は類似している）とスーダン株である。ザイール株は出血を主症状とする 80%以上という致命率の高いウイルスで、スーダン株は感染性が強いと考えられるが致命率は 50%前後である。ほかマカク属サルに致死病的病変をおこすが、ヒトへの感染性や病原性のないレストン株がある。

エボラウイルスのアウトブレイク時には血液から ELISA 法でウイルス抗原あるいは PCR 法でウイルスゲノムを検出し早期診断とする。またその後、ELISA 法でウイルス抗体の有無を測定し、臨床症状の改善とともに、回復期と判定する。抗体が出現すればウイルス血症はなくなり、その患者が感染源になることはない。アウトブレイクの時には、エボラの臨床症状のみでの診断は一般的に困難で、疫学的な症例定義による診断のみならず、検査診断による確認が必要である。しかし、自宅や病院での急死の際には採血ができずに亡くなる例もあり、その場合、診断不明例となる。しかしながら、家族の許可を得た後、皮膚生検組織を採取しホルマリン固定し免疫組織化学法でエボラウイルス抗原を検出することで診断が可能となる。またアウトブレイクの前ないし初期の診断不明死亡例の検査診断にも、もし検体が採取されていれば、有用であることが報告されている。

今回、エボラウイルスのモノクローナル抗体を手に入れ、またエボラウイルス感染サル組織が手に入ったことから、いままでおもなアウトブレイクを起こしたウイルス株の病理組織学的診断が可能となった。生検組織であれば、通常、翌日には診断が可能であるが、一日で病理組織診断は可能である。実際の臨床検体での確認は行えないが、本年度はエボラ出血熱に関する病理組織診断法を確立することができたと考えられる。

#### E. 結 論

アウトブレイクの主な株のエボラウイルス抗原をホルマリン固定パラフィン包埋した病理組織切片で検出することができるようになった。

#### F. 健康危機情報

とくになし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 佐多徹太郎：エボラ出血熱。感染症発生動向調査週報。32: 9-13,2002.
- 2) 佐多徹太郎、島崎加恵、佐藤由子、倉田毅：ウイルス性出血熱。日本臨床。61(増刊号): 281-287, 2003.

##### 2. 学会発表

- 1) 島崎加恵、佐藤由子、長谷川秀樹、倉田毅、佐多徹太郎：エボラ出血熱ウイルス実験感染サルの感染病理—組換え NP 蛋白単クローン抗体を用いた免疫組織化学。第 91 回日本病理学会総会、3 月、横浜。

## 2. ペスト菌の検出と診断法の確立

分担研究者 神山恒夫 国立感染症研究所獣医科学部 第一室長  
研究協力者 今岡浩一 国立感染症研究所獣医科学部 主任研究官

**研究要旨** 本研究では、生物テロに使用される可能性の高い病原体として、ペスト菌 (*Yersinia pestis*) を取り上げ、生物材料からの菌の検出とその迅速診断法 (PCR 法) の確立を試みた。まず、生物材料に混入しているペスト菌の DNA は SepaGene 等、通常の細胞の分離や DNA 抽出の方法により抽出でき、その後の PCR で検出可能であることが示された。さらに高感度・迅速診断法として、ライトサイクラー (Real-time PCR 法) の応用を試みた。まず、SYBR Green I を用いた方法では、迅速に検出可能で、融解分析により非特異的反応を分離できるが、対照群としておいた他の菌種も増幅反応では検出されてしまう。そこで、ハイブリダイゼーションプローブを用いた方法を応用したところ、この方法では、非特異的反応もほとんどなく、感度も試料中に 1~10 コピーあれば検出可能であることが示された。反応時間も一時間足らずであり、非常に有効なペスト菌検出法であると考えられた。

### A. 研究目的

ペストはアフリカ、南北アメリカ、およびアジアに発生が多く、わが国では 1926 年以來国内発生はないものの、1999 年に WHO に報告された患者数は 14 カ国から 2603 名で、このうち 212 名が死亡したとされている。1988 年から 10 カ年の平均患者数は 2547 名 (うち 181 名が死亡) で、依然として大きな健康被害を与えている。ペストは本来野生齧歯類の感染症であり、これらに寄生するノミによって偶発的にヒトへも感染する人獣共通感染症である。原因菌である *Yersinia pestis* はノミ咬傷部から近傍のリンパ節へ侵入して増殖する。これが血流等を介して全身に回り敗血症を起こす場合もある。ペストによるヒトの死亡率は高く、治療を行わない場合には 50-60% の死亡率に達するといわれる。また、生物テロに使用される可能性の高い病原体としても考えられ、米国疾病管理センター (CDC) では、カテゴリー A にあげている。

そこで、本研究ではペストの不慮の侵入・発生に備えるため、ペスト菌の生物材料からの検出ならびに、高感度・迅速診断法の開発を試みた。

### B. 研究方法

1. 供試菌株: *Y. pestis* は、A1122 (ワクチン株、42Md プラスミドを欠く) と Yreka 株を用いた。対照として、*Y. pseudotuberculosis* 2a、*Y. enterocolitica* 09、*F. tularensis*、*B. abortus*、*B. anthracis*、各々から DNA を抽出して用いた。
2. *Y. pestis* を検出するために、まず、A1122 培養コロニーから菌を集め、DNA を SepaGene (三光純薬) を用いてプロトコールに従い分離精製し、陽性コントロールとした。また、菌をあらかじめ希釈して同様に抽出した。次に、実際の検体は、血液サンプルであることも考えられるので、ヒツジ脱繊維血に、煮沸滅菌した種々の濃度の菌液を混入し、それぞれ血漿部分と血球部分から SepaGene を用いて DNA を分離した。
3. 動物組織からの菌検出のシミュレーションとして、マウス血液、脾臓および肺の小片に  $1 \times 10^5$  個の菌液を混入した。その後、脾臓及び肺の小片はホモジナイズにより細胞を単離し、SepaGene を用いてそれぞれ DNA を抽出した。
4. PCR: *Y. pestis* を検出するために、Radnedge ら (Appl. Environ. Microbiol., 67: 3759-3762,



2001) が報告した *Y. pestis* クロモソーム特異的な 41.7 kb 領域におけるプライマーセット 3a (Fig. 1. forward: ggC AAC AgC TCA ACA CCT TTg g, reverse: TgT AgC CgC TAA gCA CTA CCA TCC) を検討した。

5. Real-time PCR (SYBR Green I) : *Y. pestis* の遺伝子を高感度で迅速に検出するために、PCR と同じプライマーセット 3a を用い、Real-time PCR を検討した。まず、2 本差 DNA (dsDNA) と結合しているときのみに蛍光を発する SYBR Green I とライトサイクラー (ロシュ・ダイアグノスティック社) を用いた系の検討を行った。SYBR Green I は PCR により生じる dsDNA の副溝 (minor groove) に結合したときに蛍光を発し、PCR 産物の増加を迅速にモニターする。今回は、検出限界を知るために、濃度既知の *Y. pestis* (A1122) DNA と種々の濃度の A1122 菌液から抽出した DNA をサンプルとして用いた。反応条件は 95°C, 10 min (95°C, 10 sec 62°C, 10 sec 72°C, 10 sec) × 40 cycle、反応チューブあたりの DNA 量は *Y. pestis* が 100pg~0.1pg DNA、菌液は  $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^1$  より分離した DNA、他の菌は 100pg DNA を用いた。また、DNA の組成 (塩基長や G-C contents の違い) により融解温度が異なることを利用した融解分析を行い、反応特異性 (産物の特異性) を検討した。

6. Real-time PCR (Hybridization probe) : *Y. pestis* のプライマーセット 3a 増幅領域内 (41.7 kb 領域) にライトサイクラー (ロシュ・ダイアグノスティック社) 用のハイブリダイゼーションプローブを作成し (Fig. 4B)、Real-time PCR 法を検討した。これは、増幅領域内に、互いに近接して (1 塩基の間隔をあけて) ハイブリダイズする 2 種の異なる蛍光プローブを用意し、この 2 種のプローブが近接してハイブリダイズしたときに初めて発する蛍光をモニターすることで、特異的 PCR 産物の検出を行う方法である。反応条件は 95°C, 10min (95°C, 10sec 62°C, 15sec 72°C, 10sec) × 45 cycle、サンプルは、SYBR Green I と同じ物を用いた。

## C. 研究結果

1. 生物材料からの DNA の分離および PCR : 精製 DNA を用いた PCR 法では、およそ 20pg まで特異的バンドが検出され、菌液では  $2.5 \times 10^3$  まで検出された (Fig. 1A)。また、ヒツジ脱繊維血に混入させた菌からは、血球部分からは  $1 \times 10^3$  まで、血漿からは  $1 \times 10^2$  まで検出可能であった (Fig. 1B)。今回、血球よりも血漿からの方が検出感度が良くなったのは、煮沸菌液では、上清中に菌の DNA がすでにでているためであり、本試験の目的である菌体が血球に混じっているときの菌の検出も可能であることは示された。

次に、マウス血清に菌を混入しても PCR により検出可能であった (Fig. 2A)。また、脾臓 (Fig. 2B) 及び肺 (Fig. 2C) の小片に、菌を混入した場合も、その後の細胞の分離過程を経ても最終的に PCR により検出可能であった。

2. Real-time PCR (SYBR Green I) : SYBR Green I を用いた方法では、精製 DNA では 1pg まで、菌の場合は  $1 \times 10^2$  個までが検出可能であった (Fig. 3A)。しかしながら、対照として用いた、*Y. pseudotuberculosis* 2a、*Y. enterocolitica* 09、*F. tularensis*、*B. abortus*、*B. anthracis* でも反応は遅いが、蛍光が検出されてきた (Fig. 3A)。そこで、その特異性を見るために融解分析を行った結果 *Y. pseudotuberculosis* 2a、*Y. enterocolitica* 09、*F. tularensis*、*B. abortus*、*B. anthracis* はその融解曲線が明らかに *Y. pestis* を異なり、認められた蛍光は非特異的な物であることがわかった (Fig. 3B)。さらに、反応後の産物を、アガロースゲル電気泳動でも確認したところ、*Y. pseudotuberculosis* 2a、*Y. enterocolitica* 09、*F. tularensis* は非特異的なサイズの異なるバンドが見られ、また他の物でもプライマーダイマーと考えられるバンドが認められるだけであり (Fig. 3C) 本反応系の特異性が示された。

3. Real-time PCR (Hybridization probe) : SYBR Green I 法よりもさらに特異性が高い Hybridization probe (Fig. 4B) を用いた方法を行った。その結果、*Y. pestis* だけで、0.1pg および  $1 \times 10^1$  まで容量依存性に検出可能であ

った。他の *Yersinia* spp. および他の菌種には反応せず、非常に特異性及び検出感度に優れている結果となった (Fig. 4A)。

#### D. 考 察

生物材料からは、血清では直接 SepaGene など DNA 抽出試薬を用いることで、また、組織からは細胞をホモジナイズにより分離した後、DNA の抽出を行うことで混入しているペスト菌の DNA も抽出可能であることが示された。

また、高感度・迅速診断法として、ライトサイクラー (Real-time PCR 法) の応用を試みた。まず、SYBR Green I を用いた方法では、迅速に検出可能で、融解分析により非特異的反応を同定・排除できるが、対照群としておいた他の菌種も増幅反応のみでは検出されてしまう。そこで、ハイブリダイゼーションプローブを用いた方法を応用したところ、この方法では、非特異的反応もほとんどなく、感度も通常の PCR の約 1000 倍程度で、試料中に 1~10 コピーあれば検出可能であることが示された。反応時間も一時間足らずであり、非常に有効なペスト菌検出法であると考えられた。

#### E. 結 論

ペスト菌 (*Yersinia pestis*) の高感度・迅速診断法として、ライトサイクラー (Real-time PCR 法) の応用を検討し、ハイブリダイゼーションプローブを用いた方法により、非特異的反応もほとんどなく、一時間足らずで、感度も試料中に 1~10 コピーあれば検出可能であることを示した。非常に有効なペスト菌検出法であると考えられるので、生物試料のみならず他の試料への微量混入を含め、確実に検出可能であるかどうか、さらに検証する必要があると考えられる。

#### F. 健康危害情報

特になし。

#### G. 研究発表等

##### 1. 論文発表

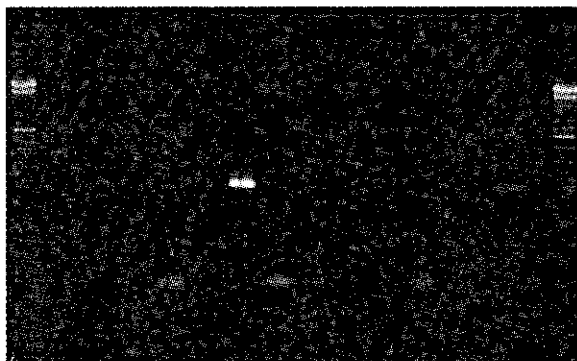
- 1) 神山恒夫、山田章雄 (編) : 動物由来感染

症、真興交易出版、東京、2003 年 (印刷中)

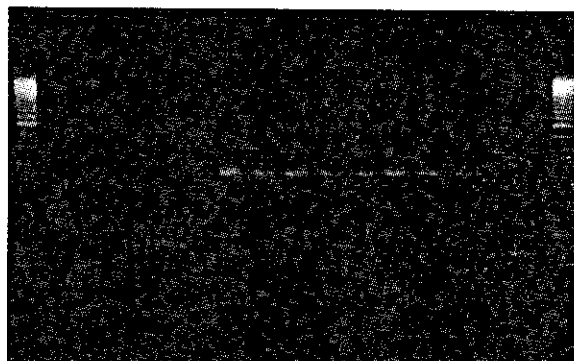
- 2) 神山恒夫 : ペスト。新世紀の感染症学 p453-458、日本臨床、東京、2003
- 3) Katae M, Miyahira Y, Takeda K, Matsuda H, Yagita H, Okumura K, Takeuchi T, Kamiyama T, Ohwada A, Fukuchi Y, Aoki T.: Coadministration of an interleukin-12 gene and a *Trypanosoma cruzi* gene improves vaccine efficacy. *Infect Immun.* 2002, 70:4833-40.
- 4) 神山恒夫 : 輸入ペット由来の感染症、小児科診療、65 : 2156-2160, 2002
- 5) 神山恒夫 : 身近なペットからうつる病気、チャイルドヘルス、5 : 33-35, 2002
- 6) 神山恒夫 : 珍しいペットと人獣共通感染症、チャイルドヘルス、5 : 28-30, 2002

Fig. 1) *Y. pestis* 関連遺伝子の PCR

A) 精製 DNA 及び希釈菌液から抽出した DNA



B) 煮沸菌液を混入させた血液からの抽出 DNA



増幅領域 : 41.7 kb region (276 bp)

Primer 3a: forward ggC AAC AgC TCA ACA CCT TTg g

reverse TgT AgC CgC TAA gCA CTA CCA TCC

M: Size marker (100 bp ladder)

1~5: *Y. pestis* (A1122) purified DNA

2ng/tube~0.0002ng/tube

6~11:  $2.5 \times 10^5$  個/tube

~ $2.5 \times 10^0$  個/tube

12: *B. anthracis* purified DNA (2ng/tube)

13: *B. canis* purified DNA (2ng/tube)

14: template DNA (-)

M: Size marker (100 bp ladder)

M: Size marker (100 bp ladder)

1~5: pellet  $1 \times 10^5$  個/tube

~pellet  $1 \times 10^1$  個/tube

6~10: supernatant  $1 \times 10^6$  個/tube

~supernatant  $1 \times 10^2$  個

11: *Y. pestis* (A1122) purified DNA (2ng/tube)

12: *Y. pestis* (Yreka) purified DNA (2ng/tube)

13: *Y. pseudotuberculosis* 2a purified DNA

14: *Y. enterocolitica* 09 purified DNA

15: template DNA (-)

M: Size marker (100 bp ladder)

Fig. 2) マウス血清および組織からの *Y. pestis* 関連遺伝子の PCR

