

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15年度 総括・分担研究報告書

平成16年3月

主任研究者

島田 馨

(東京専売病院)

平成15年度新興・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	帯広畜産大学原虫病研究センター	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 15 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 —SARS とサル痘—	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. ペスト菌の微量迅速検出法の開発に関する研究	11
分担研究者：神山 恒夫（国立感染症研究所獣医科学部）	
3. 耐性菌の検出と診断法の確立	19
分担研究者：渡辺 治雄（国立感染症研究所細菌第一部）	
4. Polymerase chain reaction (PCR) 法およびリアルタイム PCR 法による オルソポックスウイルス感染症の診断	21
分担研究者：森川 茂（国立感染症研究所ウイルス第一部）	
5. ボツリヌスの実験室内診断法と予防に関する研究	27
分担研究者：高橋 元秀（国立感染症研究所細菌第二部）	
III. 大学小班	
III-I. 小括研究報告書	31
分担研究者：牧野 壮一（帯広畜産大学原虫病研究センター）	
III-II. 分担研究報告書	
1. 炭疽・ブルセラ症の蔓延防止に関する研究	37
分担研究者：牧野 壮一（帯広畜産大学原虫病研究センター）	
2. 鼻疽菌及び類鼻疽菌の検出と診断方法	49
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）	
3. 野兎病菌の検出法および診断法の確立に関する研究	59
分担研究者：倉園 久生（岡山大学医学部保健学科検査技術科学）	

IV. 臨床小班

IV-I. 小括研究報告書	6 5
---------------	-----

IV-II. 分担研究報告書

1. ウイルス疾患	6 7
分担研究者：岩本 愛吉（東京大学医科学研究所）	
2. 輸入感染症の発生状況	7 1
分担研究者：相楽 裕子（横浜市民病院）	
3. 真菌疾患	7 5
分担研究者：河野 茂（長崎大学医学部第二内科）	
4. 細菌疾患	8 1
分担研究者：山口 惠三（東邦大学医学部微生物学講座）	
5. ワクチン	8 3
分担研究者：吉開 泰信（九大生体防御医学研究所）	

I. 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ため、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情報をさらに収集し、提言をまとめた。また検査診断法として、迅速病理診断法、ペスト菌、痘瘡ウイルス、炭疽菌、ブルセラ症、野兔病、鼻疽、類鼻疽の核酸診断法をさらに発展させ、迅速化、特異性を高め、高感度化をはかった。またボツリヌストキソイドを作製した。開発した検査診断法についてはキット化およびマニュアル化を進め、また他の病原体の検出法開発を進めていく。これらの結果をもとに臨床、検査・診断、治療をまとめた、役に立つマニュアル作製にむけた作業を進め、来年度には使えるようにしていく。

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

（大学小班）

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。さらに本年米国でリシン散布事件が起こった。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、野兔病、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。カテゴリーCにはSARSウイルスやニパウイルス等の新興感染症が含まれる。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か、あるいは動物由来感染症である。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。さらに、単なるマニュアル作製にとどまらず、多くの関係者が利用しうる実用的な媒体を検討する。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CDCが分類したカテゴリーAからC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、野兔

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、野兔病、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。本年度の研究結果については、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からC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SARSウイルス核酸やサル痘の迅速病理診断法、real time PCR法およびLAMP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ポックスウイルス鑑別診断法、ボツリヌス毒素に対するトキシノイドの開発を行った。また耐性菌を検出するPCR-RFLP法を作製した。

2. 大学小班

炭疽菌芽胞に対する抗体を作製し、免疫ビーズ法で土壤中の炭疽菌を含むバシラス属の芽胞の回収を行った。PBS中では80%以上であったが、土壤中では20%にとどまった。サルコシン抽出抗原でブルセラ症のELISAを行ったところ、交差反応がなく、ワクチン接種群との区別が可能となった。16S rDNAを標的とした野兔病菌の検出に特異性の高い実用的感度を持つPCR法を作製した。また野兔病菌に対する特異抗体を作製し、ELISA法を開発中である。鼻疽、類鼻疽菌についても16S rDNAを標的としたPCR法を開発した。またMicroarray法で喀痰検体から網羅的に病原体を検出する方法を開発している。

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、予防法についてさらに情報を収集し提言をまとめた。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。さらに感染予防策の実際について検討した。来年度に検査・診断・治療マニュアル作製をめざし、作業班を結成した。

D. 考 察

1. 感染研小班

従来実施困難である培養を基本とした生物学的検査診断法でなく、新しい免疫化学的ないしは核酸増幅法を用いた診断法を使用しないとならないのが、バイオテロ関連疾患の検査診断法である。とくに、その取り扱い易さや迅速性そして特異性が優れていると考えられる。しかしながら確認のためには近い将来培養法等の生物学的診断法が必要となろう。研究対象とした病原体や毒素については準備が整いつつあるが、今後はスパイクテスト等の実際の検体を想定した検出も必要となり、またクラミジア・リケッチャの検査診断法開発も追加する必要がある。細かな問題も残されているが、より特異的、高感度、迅速性を高めていく。検査診断法の確立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。

2. 大学小班

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について一般臨床医に情報提供ができるよう、マニュアルの整備を行う準備が整った。

E. 結 論

今年度は、SARS、サル痘の迅速病理診断法、ペスト菌、痘瘡ウイルス、炭疽菌、野兔病、鼻疽、類鼻疽の real time PCR 法、ボツリヌストキソイドの作製、ブルセラ症に対する免疫化学的検査法土壌中からの炭疽菌芽胞の回収等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追加した。来年度のマニュアル作製準備が整った。

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. 感染研小班

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 SARS コロナウイルス、サル痘の病原体の組織内検出同定法、ペスト菌 DNA 検出法、耐性菌の核酸検出法、痘瘡ウイルス DNA の real time PCR 法、毒素の免疫化学的検出法を開発した。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、キット化や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になる。

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

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について実験室診断法の開発を行い、そしてその実験室診断法を各都道府県の地方衛生研究所に移転できるようにし、緊急時検査診断対応体制の確立を図ることを目的とする。

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検査・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バイオテロ

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。分担項目の詳細な方法とその結果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：バイオテロ関連病原体のカテゴリー C に分類される SARS ウイルスの組織内検出が in situ hybrAT-CSA 法で可能となった。抗体がなくても病原体の一部の塩基配列が判明すれば感染組織での感染病理学的診断が可能となるので有益な方法と思われる。また天然痘との鑑別で重要なサル痘のサル実験感染組織を作製し、ウイルス抗原の検出を行った。天然痘感染組織は入手不可能なので陽性対照としても重要と考えられる。

2) ペスト菌検出診断法: *Y. pestis* の検出法として、invasin と 41.7 kb 領域それぞれに特異的な Real-time PCR (LC: Light-Cycler)、LAMP 法を確立し比較を行った。*Y. pestis* と *Y. pseudotuberculosis* (*Y. pseud.*) を鑑別することが可能であった。感度は PCR は 250 pg/assay、LC、LAMP は 2 pg/assay と PCR の約 100 倍の感度を示した。所用時間は LC が最も短く 50 分、次に LAMP であった。LC は専用の機器を必要とするが所用時間が短く、LAMP は特別な装置を必要とせず簡便に実施できる。

3) 耐性菌の検出: ペスト菌が薬剤耐性菌であるかどうかを迅速に検出することは、治療面において大変重要である。ニューキノロン系に対する耐性遺伝子としては DNA gyrase (*gyrA*, *gyrB*) および topoisomerase (*parC*, *parE*) が知られているので、今回、チフス菌のニューキノロン系薬剤に対する耐性菌を迅速に検出するスクリーニング法として PCR-RFLP 法の開発を行った。わずか 3 時間程度の短時間で調べることができた。

4) 天然痘ウイルス: Variola ウイルス, monkeypox ウイルス, オルソポックス属ウイルス, および, ワクシニア (*vaccinia*) ウイルスにそれぞれ特異的プライマー (それぞれ Var1/2, Gabon-1/-2, ATI-up-1/low-1, Vac1/2) を用いた polymerase chain reaction (PCR) 法および variola ウイルスゲノムを特異的に検出するためのリアルタイム PCR 法を整えた。リアルタイム PCR 法や PCR 法による天然痘とサル痘の診断は、迅速、高感度であり、かつ特異的であった。

5) ボツリヌス毒素の検出診断法: ボツリヌスによるバイオテロの際に、特定の対象者への予防を目的とした試作トキソイド作出を目的として、ボツリヌス A,B,E 及び F 型菌を培養し、毒素の精製を行い、最終的に 4 型混合トキソイドとして約 500 用量相当の標品を得た。各毒素は個々にホルマリンで無毒化し、4 型混合トキソイドとして製剤化する。

D. 考 察

バイオテロ関連疾患のペスト、天然痘、ボツリヌス毒素、そして耐性菌の検出診断法を開発した。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。また SARS 感染組織から一部の塩基配列をもとに検出する迅速病理学的診断法を確立した。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

天然痘、ペスト、毒素、SARS コロナウイルス、サル痘および耐性菌に対する病原体等の検査診断法を作製した。

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

II-II. 感染研小括研究班分担研究報告書

1. 迅速病理診断法の開発 —SARS とサル痘—

分担研究者 佐多 徹太郎（国立感染症研究所感染病理部）
研究協力者 中島 典子、佐藤 由子、永田 典代、岩田奈織子、
長谷川秀樹（同感染病理部）
森川 茂、西條 政幸（ウイルス第1部）

研究要旨 バイオテロ関連病原体のカテゴリーCに分類される SARS ウイルスの組織内検索が *in situ* hybrAT-CSA 法で可能となった。抗体がなくても病原体の一部の塩基配列が判明すれば感染組織での感染病理学的診断が可能となるので有益な方法と思われる。また天然痘との鑑別で重要なサル痘のサル実験感染組織を作製し、抗ワクチニアウイルス抗体で病原部のウイルス抗原の検出を行った。天然痘感染組織は入手不可能なので陽性対照としても重要と考えられる。

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、人獣共通感染症であることが多い。多くの関連情報が米国 CDC 等から Website を通して発信されているが、実際の検査診断法開発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、いったん炭疽菌やリシンの事件が起こると配布が制限されるため、なかなか手に入れることが困難な状況である。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ことはいうまでもない。

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、診断や確定を目的とした生検・剖検組織を用いた検査・診断が実際行われ、多くの貴重な情報が得られてき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、病原体の塩基配列がわかればオリゴヌクレオチドプローブを作製することにより病原体や特異抗体がなくても組織診断が可能となると思われる *in situ* hybrAT-CSA 法の（図 1）応用について SARS コロナウイルスを対象として検討し、さらに天然痘と鑑別が必要となるサル痘について検討した。

In situ HybrAT-CSA法-検出感度の増加

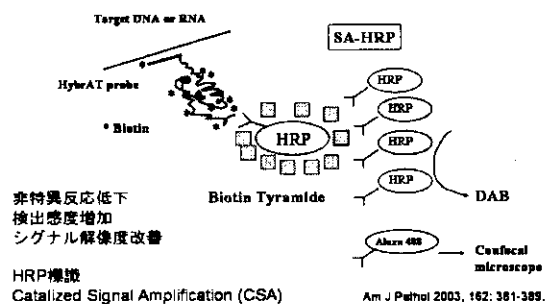


図 1

B. 研究方法

核酸プローブの作製：データベースに登録された SARS コロナウイルス(SARS-CoV)の全塩基配列をもとに、ウイルス複製過程を考慮して、40 mer のオリゴヌクレオチドプローブを2種4本作製した。プローブとした領域はウイルス複製の際につねに転写され、その分子コピー数の多いと考えられる NP 領域に、in situ hybrAT-CSA 法に適した配列を設定した(図2)。

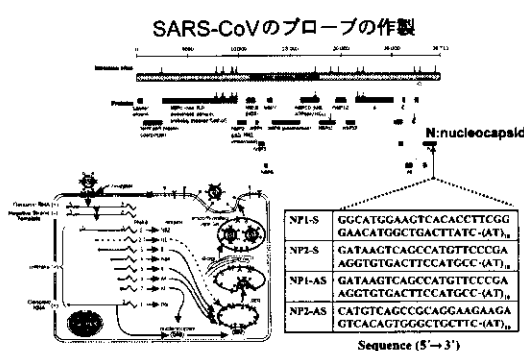


図2

SARS-CoV 感染細胞：反応性を検討するために、SARS-CoV 感染 Vero E6 細胞を作製し、トリプシンで分散したのち、スメアを作製し、アセトンで室温 20 分固定した。この固定条件ではウイルスの感染性は失活することが判明している。

SARS-CoV 感染疑い病理組織：SARS の診断のために送られてきた一部のホルマリン固定剖検肺組織の1例、および共同研究としてパラフィン切片を提供された8例の肺および主要臓器組織切片を用いた。

サル痘のサル実験感染組織：ウイルス1部の森川・西條先生との共同研究で行われているサル痘の実験感染サル組織を用いた。病変の観察とウイルス抗原の検出を試みた。免疫組織化学には抗ワクチニアウイルスウサギ抗体を用いた。

(倫理面への配慮)

ヒト組織は送付元で匿名化され、受付番号ないし病理番号のみとなっており、個人を特定する情報は含まれていない。また病気の病理診断目的で行われた。動物実験は国立感染症研究所動物実験委員会の審査許可を受けて行われた。

C. 研究結果

1. SARS-CoV：SARS-CoV 感染 Vero E6 細胞および非感染 Vero E6 細胞のスメアを対象とし、antisense および sense probe を用いて in situ hybrAT-CSA 法でウイルスの検出を試みた。その結果、antisense probe で非常にクリアなシグナルを細胞質内に検出し、sense probe ではシグナルは得られなかった(図3)。したがってウイルスの塩基配列の一部が判明すれば、in situ hybrAT-CSA 法が応用できる可能性が示された。そこで、SARS 感染疑いのホルマリン固定パラフィン切片を用いてウイルス核酸の検出を試みた。この時点では RT-PCR 法はおこなっておらずウイルス感染の有無は不明であった。組織学的には、軽度の硝子膜形成と軽度の炎症性細胞浸潤が認められた。感染細胞とほぼ同じ条件で検出をおこなったところ、末梢肺領域の肺胞上皮細胞の細胞質内にシグナルが認められ、sense probe ではシグナルはみられなかった(図4)。そこで in situ hybrAT-CSA 法で SARS-CoV の核酸と、上皮細胞のマーカーである EMA (Epithelial membrane antigen)ないしマクロファージのマーカーである CD68 を免疫組織化学で二重染色したところ、SARS-CoV の核酸はおもに肺胞上皮細胞に認められたが、一部のシグナル陽性細胞はマクロファージであることが判明した(図5)。計9例のヒト肺組織で検討した結果、肺病変が軽度な症例ほどシグナル陽性細胞が検出され、完全な硝子膜形成があり、そして肺胞内に肉芽組織が認められる症例ではほとんどシグナルを検出することはできなかった。後日これらの症例について病期を教えてもらったところ、発症後10日以上 of 症例では SARS-CoV が陰性であることがわかった。

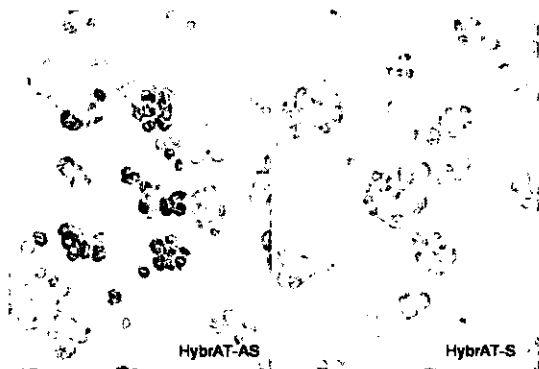


図 3

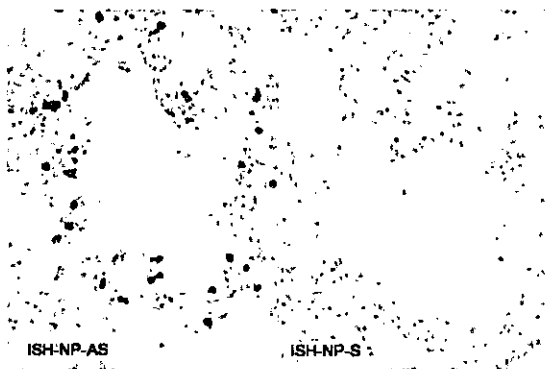


図 4

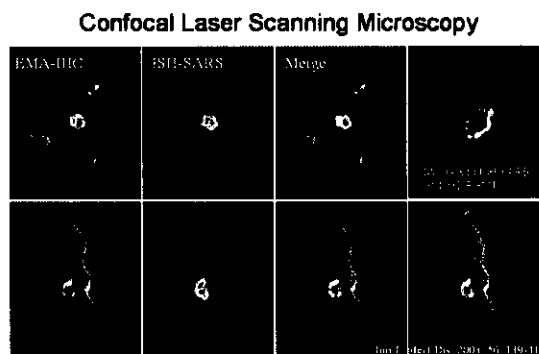


図 5

2. サル痘：サル痘を実験感染させ、発痘が皮膚に確認できた時点でサルを安楽死させ、剖検を行った。皮膚や肺には類円形の壊死を伴う病変が多発していた。肺では壊死病変は少なかった。抗ワクチニアウイルスウサギ抗体を用いた免疫組織化学では病変内および病変辺縁部にウイルス抗原が検出できた（図 6）。

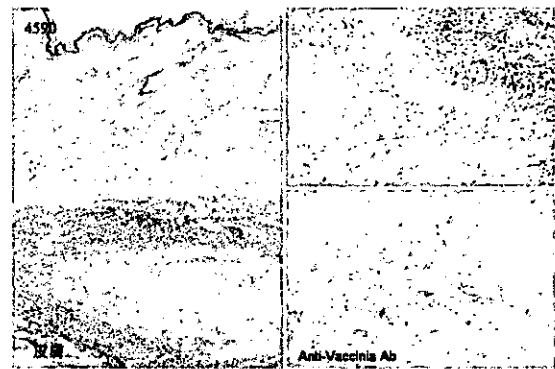


図 6

D. 考 察

in situ hybrAT-CSA 法はオリゴヌクレオチドプローブを用いてウイルス核酸等を検出する方法で、プローブ長はわずか40 merであるが、従来の RNA プローブを用いた検出方法よりも検出感度が高いことが判明している。新興感染症でまだウイルスの情報が十分に得られていない時期であっても一部の塩基配列がわかれば、その情報をもとにプローブを作製し検査診断に使うことができる。また今回、抗 SARS-CoV 抗体ができていない時期で、しかもウイルス増殖のある感染症では、有力なツールになることが明らかとなった。その後、抗ウイルス抗体が作製され、in situ hybrAT-CSA 法の結果と比較することが可能となった結果、ウイルスのシグナルはほぼ同じ細胞種に検出され、in situ hybrAT-CSA 法による結果と同一であることが明らかとなり、より有益な方法であることが判明した。近い将来も類似の新興感染症が起こる可能性があり、そのとき、またバイオテロ関連感染症でも有力な病理学的方法であるのは確実である。さらに病理学的診断が診断基準のひとつにもなっていることから、重要な方法と考えられる。

サル痘については、天然痘と同じポックスウイルスであるが天然痘の病理組織は入手できていないので、同じ抗体でポックスウイルス感染症の診断にとって重要な陽性対照となりうる。天然痘、サル痘、ワクチニアウイルスが検出できるため、病変の質を知っておくことが実際の診断上重要である。

E. 結 論

我々の開発した in situ hybrAT-CSA 法が新興感染症およびカテゴリーC のバイオテロ関連疾患の病理診断に使用できることが判明した。また、SARS-CoV の病理組織変化について明らかにした。またサル痘感染組織の病理学的検討が可能となり、免疫組織化学法による病原体診断に有益な試料を得ることができた。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakajima N, Ionescu P, Sato Y, Hashimoto M, Kuroita T, Takahashi H, Yoshikura H, Sata T.: In situ hybridization AT-tailing with catalyzed signal amplification for sensitive and specific in situ detection of HIV-1 mRNA in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Am J Pathol* 2003, 162: 381-389.
- 2) Nakajima N, Asahi-Ozaki Y, Nagata N, Sato Y, Dizon F, Paladin FJ, Olveda RM, Odagiri T, Tashio M, Sata T.: SARS coronavirus-infected cells in lung detected by new in situ hybridization technique. *Jpn J Infect Dis.* 2003, 56: 139-41.
- 3) Chong PY, Chui P, Ling AE, Franks TJ, Tai DYH, Leo YS, Kaw GJL, Wansaicheong G, Chan KP, Oon LLE, Teo ES, Tan KB, Nakajima N, Sata T, Travis W.: Analysis of deaths during the severe acute respiratory syndrome (SARS) epidemic in Singapore: challenges in determining a SARS diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 2004, 128: 195-204.
- 4) 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 suppl., 281-287, 2003
- 5) 島崎加恵、佐藤由子、倉田毅、佐多徹太郎: ウイルス性出血熱の病理。病理と臨床。21: 94-101, 2003.
- 6) 佐多徹太郎、倉田毅: 新興・再興感染症。病理と臨床。21: 2-8, 2003.
- 7) 佐多徹太郎: エボラ出血熱。総合臨床。52: 1236-1240, 2003.
- 8) 永田典代、佐多徹太郎: ウマ脳炎。動物由来感染症—その診断と対策—。真興交易医書出版。2003, pp83-87.
- 9) 佐多徹太郎: 鼻疽、類鼻疽。動物由来感染症—その診断と対策—。真興交易医書出版。2003, pp196-198.
- 10) 佐多徹太郎: エボラ出血熱。Molecular Medicine。40:912-917, 2003.
- 11) 佐多徹太郎、永田典代: 重症急性呼吸器症候群(SARS)。診断病理。20: 197-204, 2003.
- 12) 佐多徹太郎、永田典代、中島典子、佐藤由子、長谷川秀樹、熊坂利夫: SARS ウイルスと SARS の病理。日本胸部臨床。62:796-803, 2003.
- 13) 佐多徹太郎: 院内感染が問題となる人獣共通感染症—エボラ出血熱と SARS—。薬の知識。2004、印刷中。

2. 学会発表

- 1) 佐多徹太郎: SARS と原因ウイルス—感染病理学の立場から。第 92 回日本病理学会総会特別企画・教育セミナー「新型肺炎〜重症急性呼吸器症候群(SARS)について」(福岡) 2003.4.
- 2) 佐多徹太郎: SARS coronavirus と感染病理。特別講演。第 44 回日本臨床細胞学会総会(東京) 2003.5.
- 3) 中島典子、尾崎泰子、永田典代、佐藤由子、樋口好美、小田切孝人、田代真人、佐多徹太郎: ホルマリン固定パラフィン包埋剖検肺組織標本における SARS コロナウイルス感染細胞の同定。第 51 回日本ウイルス学会総会(横浜) 2003. 10.

2. ペスト菌の微量迅速検出法の開発に関する研究

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

協力研究者 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：*Y. pestis* は重要な動物由来感染症であり、バイオテロに使われうると考えられるなど、特異的迅速診断法の開発が必要とされている。今回、*Y. pestis* の検出法として、invasin と 41.7 kb 領域それぞれに特異的な Real-time PCR (LC: Light-Cycler)、LAMP 法を確立し、比較を行った。PCR、LC、LAMP とも invasin のプライマーは *Y. pestis* と *Y. pseudotuberculosis* (*Y. pseud.*) を、41.7 kb のプライマーは *Y. pestis* の DNA のみを増幅し高い特異性を示した。また、invasin のみ検出は *Y. pseud.*、invasin 及び 41.7 kb 検出は *Y. pestis* と、両者の鑑別が可能であった。感度は PCR は 250 pg/assay、LC、LAMP は 2 pg/assay と PCR の約 100 倍の感度を示した。所用時間は LC が最も短く 50 分、次に LAMP であった。LC は専用の機器を必要とするが所用時間が短く、LAMP は特別な装置を必要とせず簡便に実施できる。それぞれ状況に応じて利用でき有用な検出法である。

A. 研究目的

ペストはわが国では 1926 年以来国内発生はないものの、海外、特にアフリカ、南北アメリカ、およびアジアでは毎年発生し、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咬傷部からヒトへも感染する人獣共通感染症である。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 に分類されている。

本研究ではペストの不慮の侵入・発生に備えるため、ペスト菌の高感度・迅速診断法の開発を行うことを目的としている。昨年度、特異的 PCR および Light-Cycler (LC) を用いた Real-time PCR 法の開発を報告した。本年度は、さらに簡便な方法として LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法の開発を行い、PCR および LC との比較検討を実施した。

B. 研究方法

供試菌株：*Y. pestis* は、A1122 (ワクチン株、

42Md プラスミドを欠く)、Yreka およびその変異株と M1140 など 7 株 (Table 1) を用いた。*Y. pseudotuberculosis* (*Y. pseud.*) は Verpest 1a、Pa3606 1b ほか Table 1 に示した 20 株を、*Y. enterocolitica* (*Y. entero.*) は Pa2369 O3:B3、Pa177 09:B2 ほか Table 1 に示した 9 株 (島根県保健環境科学研究所より分与) を実験に用いた。その他、*Yersinia* 属以外は、*Brucella abortus*、*B. canis*、*B. melitensis*、*B. suis* (動物衛生研究所より分与) など Table 1 に示した 18 菌株を入手し用いた。

DNA の調整： 各々の菌株をヒツジ血液寒天培地等で培養し、その培養コロニーから菌を集め煮沸後、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た。

PCR： PCR 用プライマーは、*Y. pseud.* および *Y. pestis* 特異的な invasin に対しては Tsukano ら (プライマーセット：inv) (Tsukano H et.al., Microbiol. Immunol., 40:773, 1996)、*Y. pestis* 特異的な 41.7 kb 領域に対しては Radnedge ら (プライマーセット：3a) (Radnedge L et.al., Appl. Environ. Microbiol., 67:3759, 2001) の報告を参考にし作成した。反応条件は inv については

94°C, 2min—(94°C, 30sec.—54°C, 1min.—72°C, 1min.30sec.) ×30 cycle, 3a については (94°C, 15sec.—65°C, 15sec.—72°C, 30sec.) ×27 cycle で行った。

Real-time PCR (LC) : *Y. pseud.* および *Y. pestis* 特異的な *inv* および *Y. pestis* 特異的な 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、Real-time PCR 法を検討した。反応条件は 95°C, 10min—(95°C, 10sec.—62°C, 15sec.—72°C, 10sec.) ×40 cycle を用いた。

LAMP 法 : LAMP 用プライマーセットを、*invasin* 遺伝子内および、41.7 kb 領域に設計した。Notomi らの最初の報告 (Notomi T et.al., Nucleic Acids Res., 28:e63, 2000) に従い、1M Betaine, 0.4mM each dNTP, 0.2μM F3 & B3 primer, 0.8μM FIP & BIP primer, 2mM Mg⁺⁺, 0.32 U/μl *Bst* DNA polymerase の組成で、反応条件は 95°C, 5min. (熱変成) —氷水冷- DNA 合成酵素の添加- 64°C, 1hr. (DNA 合成) - 80°C, 10min. (反応の停止) を用いた。また、上記方法をもとにして、反応時間の短縮や簡便性をはかるために、種々の Mg⁺⁺ および dNTP 濃度条件についても比較検討した。

C. 研究結果

1. LAMP 法における反応条件の検討: まず、現在、LAMP 法で用いられている一般的な方法 (熱変成過程を必要としない) において、Mg⁺⁺ 濃度は 8mM となっているが、種々の Mg⁺⁺ 濃度および、それぞれに対して至適な dNTP 濃度で実施し、その反応に及ぼす影響を検討した。その結果、Mg⁺⁺ 濃度の上昇につれ、反応性が増すことが明らかとなったが、同時に反応しないはずの *Y. enterocolitica* (Pa177 O9:B2) でも増幅反応が起こり、特異性が低下していくことが明らかとなった (Fig.1)。

そのため、熱変成過程を必要とするが LAMP 法の原法の反応条件で特異性を検討した。その結果、*invasin* に対しては、*Y. pestis* および *Y. pseudotuberculosis* で、また 41.7 kb では *Y. pestis* のみで増

幅反応が起こり、高い特異性を示した (Fig.2)。反応時間は、30 分では増幅が不十分で、60 分を必要とした。

2. 検出感度の比較: *invasin*、および 41.7 kb 領域遺伝子の検出感度を PCR、LC、LAMP で、比較検討した。PCR で *inv*、41.7 kb とともに約 250 pg/assay まで検出可能であった (Fig.3a)。また、LC は *inv*、41.7 kb とともに約 2 pg/assay と PCR の約 125 倍の感度を示し、所用時間は 50 分程度であった (Figs.3b and c)。次に LAMP は *inv*、41.7 kb とともに約 2.5 pg/assay と PCR の約 100 倍、LC とほぼ同等の感度を示し、所用時間は 80 分程度であった (Fig.3d)。

3. 特異性の比較: それぞれの方法で、*Y. pestis*、*Y. pseudotuberculosis*、*Y. enterocolitica* および、その他、*Yersinia* 属以外の菌株由来の DNA を用いて反応の特異性を検討した。その結果、PCR、LC、LAMP とともに、*invasin* のプライマーセットは *Y. pestis* と *Y. pseudotuberculosis* を、41.7 kb 領域のプライマーセットは *Y. pestis* の DNA のみを増幅し、他の菌株由来の DNA は増幅しなかった (Table 1)。

D. 考察

invasin と 41.7 kb 領域それぞれに特異的な Real-time PCR (LC)、LAMP 法を確立した。LAMP 法は標的遺伝子内の 6 箇所の領域に対して 4 種類のプライマーを設定して、鎖置換反応を利用し一定温度で DNA 増幅反応を行う方法である。LAMP 法では、Mg⁺⁺ 濃度を高くすると、熱変成過程を必要とせず、反応時間も短縮が可能であるが、今回の LAMP 用プライマーセットを用いた検討では、非特異反応が強くて良好な検出系とはいえなかった。しかしながら、反応に要する時間は約 2.5 倍程度を必要とするが、Mg⁺⁺ 濃度を 2mM にして、あらかじめ熱変成過程を用いる原法では特異性が高く良好な結果が得られた。*Y. pestis* の検出・診断という目的を考えると、原法が良いと考えられた。

また、PCR、LC、LAMP (原法) とともに *invasin* のプライマーセットは *Y. pestis* と *Y. pseudotuberculosis* を、41.7 kb 領域のプライマーセットは *Y. pestis* の

DNAのみ増幅し高い特異性を示し、invのみ検出は *Y.pseud.*、inv 及び 41.7 kb 検出は *Y.pestis* と、両者の鑑別が可能であると考えられた。感度は LC、LAMP は PCR の約 100 倍と PCR よりも微量検出に効果的であると考えられた。

以上のことより、LC は専用の機器を必要とするが所用時間が短く、LAMP は特別な装置を必要とせず簡便に実施できる。それぞれ状況および実施施設に応じて利用でき有用な検出法であると考えられた。

E. 結 論

Y. pestis の検出法として、invasin (プライマー: inv) と 41.7 kb 領域 (3a) それぞれに特異的な Real-time PCR (LC)、LAMP 法を確立した。どちらも、高い特異性を示し、inv のみ検出は *Y. pseud.*、inv および 41.7 kb 検出は *Y. pestis* と、両者の鑑別が可能であった。LC は専用の機器を必要とするが所用時間が 50 分程度と短く、LAMP 法は特別な装置を必要とせず簡便に実施できる。それぞれ状況に応じて利用できる有用な検出法である。

F. 健康危害情報

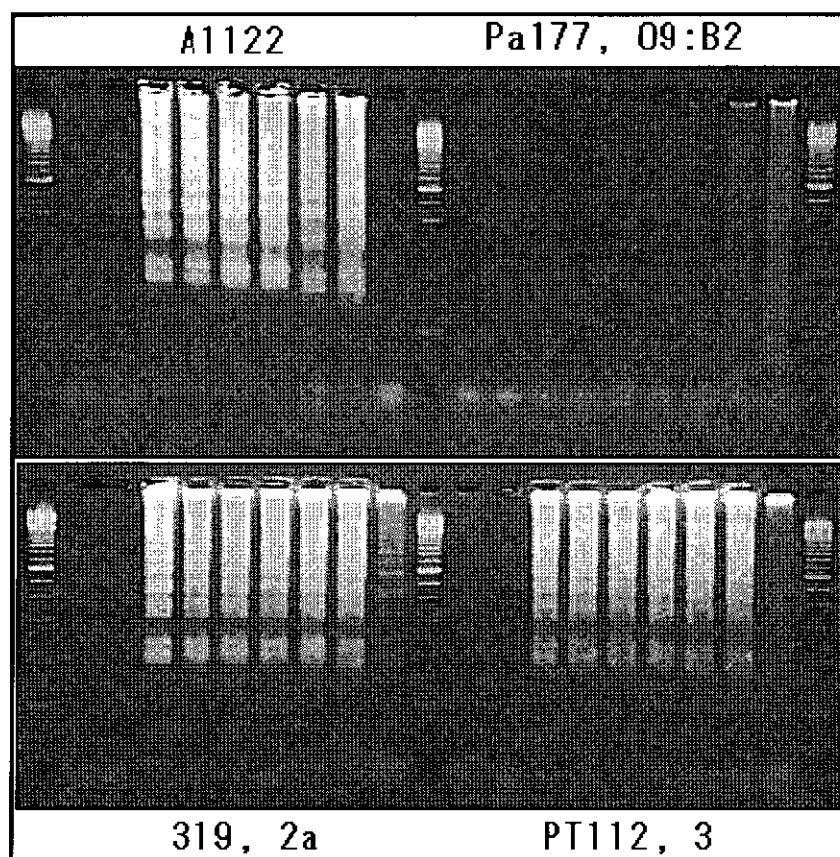
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 今岡浩一、福島博、山田章雄、神山恒夫。
Yersinia pestis の微量迅速検出法の開発。第 78 回日本感染症学会総会、東京、2004 (予定)
- 2) 神山恒夫 ペスト-再侵入が危惧される人獣共通感染症。医学のあゆみ、208:57-62、2004.
- 3) 神山恒夫、人から人へうつる人獣共通感染症、ペスト。薬の知識、3:70-75. 2004.
- 4) 神山恒夫 輸入野生齧歯類と感染症。臨床医、29:1812-1815、2003.
- 5) 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 6) 神山恒夫: ペスト。新世紀の感染症学 p453-458、日本臨床、東京、2003

Fig. 1) LAMP 法における Mg⁺⁺ 濃度の影響



1. Mg ⁺⁺ , 2mM	4. 5mM	7. 8mM
2. 3mM	5. 6mM	8. 9mM
3. 4mM	6. 7mM	9. 10mM