

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細菌・
ウイルス等による感染症の蔓延防止、
予防、診断、治療に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

平成18年 3 月

主任研究者

佐多 徹太郎

(国立感染症研究所)

平成17年度新興・再興感染症研究事業
バイオテロ研究班名簿

氏 名	所 属	職 名
佐多徹太郎	国立感染症研究所感染病理部	部 長
森川 茂	国立感染症研究所ウイルス第一部	室 長
山田 章雄	国立感染症研究所獣医科学部	部 長
岸本 壽男	国立感染症研究所ウイルス第一部	室 長
遠藤 卓郎	国立感染症研究所寄生動物部	部 長
廣瀬 健二	国立感染症研究所細菌第一部	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	教 授
岩本 愛吉	東京大学医科学研究所	教 授
中村 修	慶応義塾大学環境情報学部	助教授
山本 保博	日本医科大学救急医学教室	教 授

目 次

I. 生物テロに使用される可能性の高い細菌・ウイルス等による感染症の蔓延防止、予防、診断、治療に関する研究班 総括研究報告書（平成17年度）	1
主任研究者：佐多 徹太郎（国立感染症研究所・感染病理部）	
II. 分担研究報告書	
1. 生物テロに使用される可能性のあるウイルスを検出する網羅的定量的PCR法の開発	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. ヒトサル痘の高感度診断法ーサル痘ウイルス感染霊長類を用いた解析ー	11
分担研究者：森川 茂（国立感染症研究所・ウイルス第一部）	
3. ニパウイルス等人獣共通感染症に関する診断法の確立	17
分担研究者：山田 章雄（国立感染症研究所・獣医科学部）	
4. Q熱コクシエラの迅速診断法の確立	21
分担研究者：岸本 壽男（国立感染症研究所・ウイルス第一部）	
5. 感染組織からの <i>Naegleria fowleri</i> の迅速検出法の開発と動物感染モデルを用いた陽性対照標本の作製と供給	25
分担研究者：遠藤 卓郎（国立感染症研究所・寄生動物部）	
6. Real time PCR法を用いたニューキノロン耐性ペスト菌の迅速検出法の開発	29
分担研究者：廣瀬 健二（国立感染症研究所・細菌第1部）	
7. クロストリジウム属菌およびSEB診断法の開発	35
分担研究者：高橋 元秀（国立感染症研究所・細菌第二部）	

8. 炭疽、ブルセラ、鼻疽・類鼻疽など危険度レベル3に属する
細菌の検出及び診断法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 39
分担研究者：牧野 壮一（国立大学法人帯広畜産大学・大動物特殊疾病研究センター）
9. 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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 47
分担研究者：岩本 愛吉（東京大学医科学研究所・先端医療研究センター）
分担研究者：中村 修（慶応義塾大学・環境情報学部）
10. 評価による技術的基盤整備に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 53
分担研究者：山本 保博（日本医科大学・救急医学）

I. 総括研究報告書

平成17年度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細菌・ウイルス等による感染症の蔓延防止、
予防、診断、治療に関する研究

総括研究報告書

主任研究者 佐多徹太郎（国立感染症研究所感染病理部 部長）

研究要旨 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、感染拡大を防止する必要がある。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治療薬の効果の検討、ならびに臨床診断、治療への対応、さらに対策の最前線となる自治体等の対応支援に関して検討することを目的とした。対象病原体等として、ウイルス、細菌、リケッチャ、原虫から生物テロ関連病原体を選び、網羅的および迅速診断法等の開発を行った。毒素として、*Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB)と *C. septicum* α 毒素の抗体を作成した。臨床対応としては、前年度までに作成したマニュアルをさらに使いやすく改訂しホームページの一般公開ができるよう、問題点を洗い出し一つずつクリアしている。また、生物テロ対策の最前線となる自治体や病院等の支援を目的として評価による技術基盤として評価シートの作成を行った。

分担研究者：

森川 茂（国立感染症研究所ウイルス1部 室長）
山田章雄（国立感染症研究所獣医学部 部長）
岸本寿男（国立感染症研究所ウイルス1部 室長）
遠藤卓郎（国立感染症研究所寄生動物部 部長）
広瀬健二（国立感染症研究所細菌1部 室長）
高橋元秀（国立感染症研究所細菌2部 室長）
牧野壮一（国立大学法人帯広畜産大学大動物特殊疾病研究センター 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）
中村 修（慶応大学環境情報学部 助教授）
山本保博（日本医科大学救急医学 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。わが国では公衆衛生上の被害は発生していないが、これらの事件に対し、バイオテロや新興感染症等の緊急事態における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ある。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感染

症には、人獣共通感染症を中心に、節足動物媒介性ウイルス、痘瘡ウイルス、出血熱ウイルス、ニパウイルス、炭疽、ペスト、野兔病、鼻疽、類鼻疽、ブルセラ、Q熱、ボツリヌス毒素、アムバなどがあり、またSARS等の新興感染症も含まれる。これらの病原体による感染症は現在では一般に稀であったり、また存在しないものであり、いったん感染すると多くの患者は潜伏期の後、急性発症し高い致死率を示す。従って、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、感染拡大を防止する必要がある。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することを目的とする。本研究によって病原体に対する網羅的な緊急対応迅速診断法が確立されるとともに消毒、滅菌、治療が早期に行われ、自治体の対応支援とともに被害の拡大が未然に防がれる。また、開発された技術を各都道府県の衛生研究所等に移転してさらに迅速な緊急時対応の実現を図るとともに、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。さらに、現場における人為的感染災害対応の現状と問題点がより明確化され、今後のマニュアルおよび訓練に反映されることにより、バイオテロ災害対応のため国、感染研や地方衛研、自衛隊等の連携強化などの基盤整備の充実が期待される。これらによって、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

現時点で生物テロに利用されることが危惧される病原体として、節足動物媒介性ウイルス、痘瘡ウイルス、サル痘ウイルス、出血熱ウイルス、ニパウイルス、炭疽、ペスト、野兔病、鼻疽、類鼻疽、ブルセラ、Q熱、ボツリヌス毒素、アメーバ等対象として、緊急時対応可能な迅速実験室診断法を確立する。1) ウイルス検査: 環境中からの検出や最新の情報をもとにプライマーの至適化を行い、Real Time PCR 法やLAMP 法の高感度化、患者の臨床症状から病原体が想定できない場合に対応するために未知のウイルスを検出同定できる PCR 法を開発する。テロを想定したシミュレーション実験を行う。ワクチンが実用化されている疾病についてはサイトカイン産生組み換えウイルスなどを作製し基礎的データを作製する。2) リケッチャ検査: *Coxiella burnetii* の特異的迅速検出法と Q 熱の迅速診断法は未だ確立されていないので、抗原および遺伝子検出法をさまざまな方法を駆使して確立する。3) 原虫検査: *Naegleria fowleri* の感染組織での迅速検出法の開発を行い、あわせて *Acanthamoeba sp.* あるいは *Balamuthia mandrillaris* に起因する疾患との鑑別を可能とする検出方法として、免疫染色法ならびに in situ hybrAT-CSA 法の利用を検討する。動物感染モデルから陽性対照を作製し、必要に応じて供給体制を整備する。4) 細菌検査: サルモネラ菌、ペスト菌、チフス菌、赤痢菌などの下痢性腸内細菌の検出同定法と治療薬剤に

対する薬剤耐性を迅速に調べられる方法を開発する。近縁種との交差が解消されていない野兔病、類鼻疽、ブルセラの特異的迅速検出法として、NASBA 法を改良する。そして免疫学的診断法を ELISA 系で開発する。病原菌特異的な表在抗原を特定することによる検出系を開発する目的で、精製蛋白と抗体を用いたエピトープ検索を行い、各菌種特異的なエピトープを決定する。Realtime Multiplex NASBA を開発する。Silicon Array RNA 増幅法で感染症診断の網羅的スクリーニングシステムをめざす。5) 毒素検査: いままでに緊急避難的に作製したボツリヌス A,B,E 及び F 型の抗毒素と腸管出血性大腸菌の産生する VERO 抗毒素の有効性再評価、および *Staphylococcus aureus* の産生するエンテロトキシン B の迅速検出法の検討をおこなう。数種のクロストリジウム毒素について迅速検出法の開発をおこなう。6) 病理検査: バイオテロに関連する病原体による疾患は現在では一般に稀であるが、病理検査には陽性対照として用いるための組織標本作製ないし入手して病理学的特徴を明らかにし、組織病変中の病原体の迅速検出法を確立する。これには特異抗原やゲノムを高感度に特異性に優れたプローブを開発し、それによる迅速検出同定方法を確立する。7) 臨床対応の検討: バイオテロは一般には稀な疾患を引き起こすため、バイオテロ関連疾患と気づかなければ発生を把握することさえできない。また感染拡大防止においても臨床医の診断と治療に関する役割は大きい。そのためにも多くの医師が最新の知識を得ておくことが必要となる。したがって、バイオテロや新興感染症関連疾患情報については、可能な限り常時更新され、適時公開されていくことが必要で、わが国の準備態勢を確立し向上させる。バイオテロや新興感染症が発生した際には、初期対応に協力し、当該疾患の臨床的特徴、臨床診断、治療法の研究を行い、マニュアルとして各種媒体での公開を目指す。その情報公開に対し有効かつ効果的なアクセスを可能とする研究開発を行う。8) 自治体支援: バイオテロ発生現場の各自治体における実践的行動マニュアルの作製、模擬演習(シミュレーション)法の作成、アセスメントシートの作製により、自治体の対応能力向上を目的とした支援を行う。

(倫理面への配慮)

ヒトの検体や感染情報を使用する際には、所属機関の研究倫理委員会への申請および許可を受けて行う。動物実験は動物に与える苦痛を最小限にとどめ、各班員所属の動物実験委員会への申請および許可を受けてから、また組換え DNA 実験は当該委員会への申請および許可を受けてから行った。

C. 研究結果

生物テロに使用されるウイルスを検出するにはまず網羅的な検索が望ましいため、網羅的で定量的な PCR 法の開発に着手した。標的ウイルスとしては感染症法に記載されているウイルスを中心に、出血熱ウイルスや痘瘡ウイルスなど生物テロに使用される可能性の高いウイルスを優先した。国内の実験室に多く設置されている ABI Prism 3130 の real time PCR 法で各プライマーとプローブを作製した。陽性コントロールは合成オリゴマーから作成したプラスミドをそれぞれのウイルスごとに作成した。16 種類のウイルスについて同時に検出を試みたところ、陽性対照は定量性や感度に問題なく、検出できた (佐多)。天然痘ウイルスは生物テロに使われる危険性が高いとされている。現在は根絶されているため、鑑別としてサル痘ウイルス感染サルモデルでウイルス検出系の評価をおこなった。サル痘ウイルスをカニクイサル 4 頭に感染させ経時的に血液を採取し DNA を抽出した。LC-PCR 法によりウイルス DNA を検出し、ウイルス分離成績と比較した。感染後 3 日でウイルスゲノム血症が確認され、3 週間には分離はできなかったがゲノムは検出できた。(森川)。ニパウイルスの遺伝子および血清診断系の開発を行った。Real time PCR 法では最低 10^3 まで、通常の PCR 法では 10^7 まで検出が可能であった。分与された遺伝子断片を用いて抗原の作製を試みた (山田)。生物テロとして *C. burnetii* が使われる可能性は浄水や環境水などの水系汚染であることを想定し、種々の容量の蒸留水へのスパイクテストを行った。Real time PCR 法では、50 μ l の水では菌体 0.1 個、50 ml では菌体 10 個が必要で抽出および検出効率が 100 倍低下した (岸本)。原虫・寄生虫を用いた生物テロの可能性は低いものの、温

水環境に生息する自由生活性アメーバ類の中には極めて強い致死性の疾患の原因病原体、*Naegleria fowleri* が知られている。*N. fowleri* は病原性が強く、作為的に環境を汚染することで社会的混乱を引き起こす恐れがある。わが国におけるアメーバ性髄膜脳炎の起因病原体は *N. fowleri* に限らず、*B. mandrillaris* および *Acanthamoeba* spp. の報告があり、鑑別診断の必要性から本研究ではこれら 3 種類のアメーバを対象とした in situ hybridization 法の応用について検討した。各アメーバの遺伝子から特異的な領域を 40 mer のプローブとして選択しビオチン標識した。反応条件を厳しくするとそれぞれに特異的なシグナルを得ることができた (遠藤)。バイオテロで使用される可能性が考えられるペスト菌のニューキノロン耐性ペスト菌を Real time PCR 法を用いて迅速に検出する方法を確立した。ペスト菌の類縁菌である仮性結核菌のニューキノロン耐性株を用いて検討した結果、ニューキノロン耐性ペストの DNA gyrase の遺伝子 *gyrA* の変異四種と同一の変異に対しては Allelic discrimination assay によってニューキノロン感受性 (野生型 *gyrA*) のものと比較して有意に区別して検出することが可能であった。更にペスト特異的 DNA 領域のプローブ、3a-VIC と野生型 *gyrA*-MGB-FAM プローブを用いた duplex real time PCR を実施することにより、ペスト菌の同定とニューキノロン感受性の同時判定が可能な系も確立した (広瀬)。*Staphylococcus aureus* enterotoxin B (SEB) と *C. septicum* α 毒素の早期検出系としてイムノクロマト法を開発するための検出用抗体を作成した。両毒素ともリコンビナント蛋白を作製し、免疫用の抗原とした。SEB に関しては 13 クローンの抗 SEB モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが 12 クローン得られ、その中で SEB との反応性が高い 2 クローンについて精製抗体を作製した。 α 毒素は 16 クローンのハイブリドーマが得られ、現在中和活性や反応性を検討中である。また、ウサギ抗 α 毒素ポリクローナル抗体を作製し、アフィニティー精製 IgG を調製した (高橋)。バイオテロ候補の危険度レベル 3 に属し、検出・予防・治療法が不十分である炭疽菌、野兎病菌、鼻疽・類鼻疽菌に主に焦点をあて研究を進めた。炭疽

菌では、PCR を用いた特異的検出法は既に確立されているため、治療および予防法に焦点を絞り、炭疽菌芽胞特異的抗体を作成し、その抗体に感染防御能があることを明らかにし、防御効果のあると考えられる 250 もしくは 25 kDa の抗原を検出した。野兔病に関しては、いままでに野兔病菌 (*Francisella tularensis*) の 16S rDNA と表在蛋白である *FopA* 及び *MMP* に対する特異的なプライマー対を構築し、これらを用いた PCR 法による野兔病菌に対する特異的迅速同定法を確立し、今回、この迅速同定法用に構築した陽性コントロールの塩基配列の確認を行って、このキットを完成させた。更に、野兔病が疑われる患者に対する免疫学的診断法と野兔病菌に対する免疫学的迅速同定法の確立を目指した。類鼻疽菌 (*Burkholderia pseudomallei*) に関しては、熱帯および熱帯地方の土壌、水田および河川に生息しているが、有効な選択培地がないため、遺伝子を使った迅速高感度な検出法が不可欠である。しかしタイの土壌から 16S rDNA 配列が 99%以上類似し、識別が困難な非病原性の *B. thailandensis* が分離される。従って土壌からの検出には *B. thailandensis* と *B. pseudomallei* を識別する必要がある。これまで 16S rDNA、Hypothetical Toxin、FliC、DnaJ を使った *B. pseudomallei* 検出系を作成してきた。しかし *B. thailandensis* において非特異増幅が検出される欠点があった。そこで今回は、カプセル合成因子の一部を用いた類鼻疽特異的検出法を確立した (牧野)。

「生物テロ関連疾患の診断・検査・治療マニュアル 2005」を作成したが、問題点も指摘された。本年度は、1) 疑われる疾患を絞り込める工夫を盛り込む、2) バイオテロに遭遇した際の対応について具体性を持たせる、3) 画像を充実させリアリティのある読みやすい内容にする、および 4) 画像の著作権をクリアする、の 4 点をマニュアル改訂の要点と定め、疾患毎に分担を決めて検討を行った (岩本、中村)。

地域における基盤整備を充実させるためには、災害対応の基盤における継続したサイクルでの準備が必要となり、このため生物テロに対する地域および病院の基盤整備評価ツールの開発することにより、指針となる方向性を示すことが可能となる。そのため、評価による技術

的基盤整備は重要である。地域の基盤整備の評価として、①地域で、ワクチン、解毒剤と医薬品を提供するために準備ができていないか。②地域で、生物テロが発生したときに十分な検査施設と対応が可能であるか。③地域で、生物兵器 (炭疽菌など) などの専門的知識を持つ研究員を確保できているか。④地域で、生物テロに対して十分に対応できる研究所を持っているか。⑤地域で、生物テロを早期発見できるサーベイランスシステムを保有しているか。⑥地域の病院は、生物テロにおける対応計画を持ち、非医療施設 (例えばコミュニティセンター、スポーツアリーナまたはホテル) が、地域の連携に組み込まれているか。⑦地域では、アウトブレイクした場合に対応する医療従事者の供給、継続医療の計画、サポートシステムができていないか。⑧地域の病院は、感染の疑いがあった場合、24 時間のいつでも専門家との即時 (15 分以内) で電話相談ができるシステムになっているか。⑨地域病院の医療従事者は、感染性の生物テロ発生時に優先的にワクチンまたは抗ウイルス剤を投与できるシステムが構築されているか。⑩地域の病院では、呼吸不全患者が大量発生した場合に、十分な人工呼吸器装置の備蓄 (10 台以上) とその他の必要物品の準備ができていないかを検討する。また、病院における生物テロ災害準備の評価として①地域との連携、②生物テロ対応の行動マニュアルの作成、③教育と反復練習、④患者のトリアージと診断治療、⑤感染予防、除染、蔓延防止と隔離、⑥感染拡大のサーベイランス、⑦災害時における、治療能力の拡大、⑧感染に対する検査機関の充実、⑨医薬品とワクチンの備蓄および供給、⑩患者および医療従事者の安全と精神的支援、⑪情報公開・共有を大項目とした。これらの詳細な評価項目とシートを作成したので、今後、具体的な準備すべき方向性が統一され、各都道府県の地域および病院のより効率的に基盤整備が進捗すると考える (山本)。

D. 考 察

生物テロかどうかも含めて臨床診断が困難な場合もあるため、スクリーニング法として網羅的ウイルス検出と定量ができる real time PCR 法の開発を行った。合成オリゴヌクレオ

チドを用いた陽性対照での実験で 16 種類まで同時に検出できた。今後対象ウイルスを 50 種程度まで増やし、またプライマーも複数以上準備し、利用可能な検体で評価していく。天然痘ウイルスは実験に使えないため、サル痘ウイルス感染サルで検出法の評価を行ったところ、ウイルス分離ができない血液から感染後 2-3 週でもゲノムを検出することができ、有用であることがわかった。通常の PCR 法よりも LC-PCR 法は感度がよかった。しかし正確な診断のためには他のウイルス学的診断法を組み合わせる必要がある。ニパウイルスの遺伝子診断系は補助的なものと位置づけられているので、BSL-3 以下で使用可能な診断系を構築する必要がある。大量の汚染水からの *C. burnetii* の検出には効率的な遠心濃縮法の開発が必須である。自由生活性アメーバの組織内検出には抗体を用いた免疫組織化学が行われるが、特異性の高い抗体を作製することが困難であった。今回作製した特異オリゴプローブにより 3 種のアメーバの検出が特異的に行えるようになった。プローブは合成 DNA なので検出法の普及に役立つ。ニューキノロン系抗菌剤耐性ペスト菌の DNA および抗菌剤感受性を迅速 (2 時間) かつ高感度に調べる方法を開発し、有事に役立つと期待された。細菌毒素を検出する種々の抗体を作製し抗原検出系の開発の準備が進んだ。BSL-3 病原体の検査診断法は複数以上あることが望ましい。遺伝子診断法はほぼ確立できたので、今後は炭疽菌抗原や野兔病菌抗原を作製し抗原診断法を開発することが可能となった。生物テロマニュアルは当初、医師のみならず、看護師、臨床検査技師等もその対象範囲に入れ、さまざまな分野の職種においても利用が可能になることを目指していた。しかし逆にそれによって記載する内容は複雑になり、実際にバイオテロが発生した際に利用しにくくなる可能性が考えられた。そのため、今回はまずバイオテロが発生した際に直接患者と接する可能性が高い、一般の臨床医をその対象としてこのマニュアルを提供することとした。またホームページの活用は効果的と考えられるが、一般公開をめざして問題点の克服にめどがついた。さらに外部へのサクセス制限がある場合も考えられるため、CD-ROM による提供も考慮してい

る。今回作成した評価シートは、大項目において検討し、細部においては実際の生物テロ発生時における病院の詳細な行動計画を記載し評価することにした。これにより、日常から地域の災害拠点病院がこのような基盤整備ができていることを確認することが可能となり、実際に災害発生時に十分な対応が可能であると考ええる。当然、現時点では、どの基幹病院においても十分でないことは容易に推測できるが、このような評価シートを作成し、指針となる方向性を示すことにより、少しずつではあるが改善されることが十分に期待される。

E. 結 論

生物テロに用いられる可能性のあるウイルスを網羅的かつ定量的に検出できる real time PCR 法を開発を行った。高感度サル痘ウイルス検出用の LC-PCR 系がサル感染実験でも有用であることがわかった。ニパウイルスの Real time PCR 法を開発した。*C. burnetii* を浄水や環境水から検出するための効率的濃縮法の開発が必要である。自由生活性アメーバ類を特異的に鑑別する in situ hybridization 法を開発した。ペスト菌 DNA とニューキノロン感受性の Real time PCR 法を用いた同時迅速検出系を開発した。*Staphylococcus aureus* enterotoxin B (SEB) と *C. septicum* α 毒素の検出用抗体を作成した。炭疽菌ワクチン開発に有用なデータが得られた。野兔病菌の PCR 陽性対照として有用であることを確認し、表在蛋白を発現させた。類鼻疽菌特異的な PCR 法を開発した。バイオテロ対策マニュアルの改訂およびホームページの公開に向けて、修正すべき点を明確にし、作業を行った。生物テロに対する地域および病院の基盤整備評価ツールの開発することにより、指針となる方向性を示すことが可能となり、各都道府県の地域および病院のより効率的に基盤整備が進捗すると考える。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

各分担研究者の報告書参照。

2. 学会発表

各分担研究者の報告書参照。

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. 分担研究報告書

1. 生物テロに使用される可能性のあるウイルスを検出する網羅的定量的 PCR 法の開発

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 片野晴隆、尾崎泰子、加納基史（国立感染症研究所感染病理部）
本藤 良（日本獣医畜産大学）
高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス 1 部）
清水博之（国立感染症研究所ウイルス 2 部）
加藤 篤（国立感染症研究所ウイルス 3 部）

研究要旨 生物テロに使用されるウイルスを検出する迅速な検査法として、網羅的定量的 PCR 法の開発に着手した。標的ウイルスとしては感染症法に記載されているウイルスを中心に出血熱ウイルスや痘瘡ウイルスなど生物テロに使用される可能性の高いウイルスを優先した。陽性コントロールは合成オリゴマーから作成したプラスミドをそれぞれのウイルスごとに作成した。予備実験では同一の条件で一つのプレートに 16 種類までのウイルスを定量する系が作成でき、目的あるいは核酸の種類（DNA/RNA）により数プレートに分け、数回の反応で多くのウイルスを網羅的にスクリーニングすることが可能となる予定である。本年度は一類感染症を中心に開発、検討したが、今後、検出するウイルスの種類を順次、増加させ、鑑別診断が必要なウイルスを含め、30-40 種類のウイルスを網羅的に検出・定量できる系の完成を目指す。

A. 研究目的

生物テロに使用される微生物は細菌、真菌、ウイルスなどさまざまな種に及ぶが、ウイルスは他の微生物と異なり、光学顕微鏡で見ることができず、確定診断としてはウイルス核酸の検出や分離、培養検査が必要とされる。ウイルスの分離培養試験は通常数日を要し、生物テロの緊急性を考えると遅きに失する。また、ウイルスの分離培養試験はウイルスの種類により方法が異なり、通常、生きたウイルスのみが検出可能である。さらに、ウイルスの分離培養は使用する細胞の状態などによっても検出感度が大きく異なり、生物テロにウイルスが使われた際の病原体検出法として、ウイルス分離を第一義的に選択することはできない。最も迅速で正確なウイルス診断法としては PCR 法が多用されるが、PCR 法は対象ウイルスがあらかじめ分かっている必要があること、変異ウイルスは検出できない場合があるなどの欠点がある。改変されたウイルスが生物テロに用いられた場合には、改変前のウイルスとは異なる症状を起こすことも予想され、原因ウイルスを同定する

最初のスクリーニングには、可能性のあるウイルスを広く検索するような網羅的な検索が望ましい。また、ウイルス感染症は病期により、ウイルスコピー数が変動し、潜伏感染するウイルスが生物テロに使用された場合に、急性期の患者と慢性期の患者の区別にウイルスコピー数が容易に測定できるような系をスクリーニングに用いることは、迅速で正しい診断に大きく貢献すると考えられる。そこで、本研究ではなるべく多くの種類のウイルスを一度に同時に検出、定量できるような定量的 PCR 法の開発を目的とした。

B. 研究方法

1. ウイルスの選択

生物テロに使用される可能性のあるウイルスとして、感染症法に記載されている第 1 類感染症のうち、エボラ出血熱、クリミア・コンゴ出血熱、重症急性呼吸器症候群（SARS）、痘そう、マールブルグ病、ラッサ熱、および第 2 類感染症のうちの急性灰白髄炎、さらに第 4・5 類感染症のうちの重要なものから順次、作成

していくことにした。同時に鑑別疾患としてあげられる疾患の原因ウイルスを同定する目的でヘルペスウイルス属、肝炎ウイルスなどウイルスも標的とする。(表 1)

2. プライマー・プローブ・陽性コントロール

標的遺伝子の選定は、これまでの報告を参考に、ウイルス株間により変異の少ない部位を選定した。また、報告がないものに関しては Genbank 等のデータから独自に標的遺伝子を定め、Primer Express (Applied Biosystems)を用いて、プライマー・プローブを選定した。プローブは 5'側に 6-carboxy-fluorescein (FAM), 3'側に 6-carboxytetramethyl-rhodamine (TAMRA)を修飾したものをを用いた。陽性コントロールは、標的遺伝子を合成オリゴマーで作成し、PCRで増幅した後に pCR2.1 に TA クローニングしたプラスミドを用いた。プラスミドは DNA シークエンサー (ABI Prism 3130, Applied Biosystems)により、その核酸配列を確認した。

3. PCR 反応

各陽性コントロールのプラスミドを 10 コピーから 100,000,000 コピーまでを段階希釈したものを鋳型としてウイルス特異的プライマーと Taqman Probe (FAM-TAMRA labeled)により定量的 Taqman PCR (ABI Prism 7900HT, Applied Biosystems)を行った。8 種類のウイルスを同時検索するには 96 well plate の横一列を 1 種類のウイルスの、16 種類のウイルスを検出するには、横一列を二つのウイルスの希釈系列および検体を測定するよう、配置した。反応液は TaqMan Universal Master Mix X2 (Applied Biosystems: 4304437)をベースにプローブ、forward primer および reverse primer はいずれも最終濃度で 300 nM になるように混和した。反応条件は Hold 95°C 10 min, (95°C 15 sec+60°C 1 min) x 50 cycles とした。PCR の内部標準として GAPDH 遺伝子の増幅を同時に行った。

C. 研究結果

一度に多くのウイルスを検出することを可能にするため、画一化した反応条件の下に定量的 PCR を立ち上げた。陽性コントロールの作成では 40-80 mer の合成オリゴマーを 10 bp ほどの相補的な配列を持つように作成し、これ

表 1. 予定している標的ウイルス
(感染症法の分類による。)

(一類感染症)
エボラウイルス
クリミア・コンゴ出血熱ウイルス
痘瘡ウイルス
マールブルグウイルス
ラッサウイルス
南米出血熱ウイルス
SARS コロナウイルス
(二類感染症または四類感染症)
サル痘ウイルス
腎症候性出血熱ウイルス
ニパウイルス
ハンタウイルス肺症候群ウイルス
B ウイルス
ベネズエラ馬脳炎ウイルス
東部馬脳炎ウイルス
西部馬脳炎ウイルス
ダニ媒介性脳炎ウイルス群
ヘンドラウイルス
リフトバレーウイルス
ポリオウイルス
E 型肝炎ウイルス
ウエストナイルウイルス
A 型肝炎ウイルス
黄熱ウイルス
狂犬病ウイルス
鳥インフルエンザウイルス
デングウイルス
日本脳炎ウイルス
リッサウイルス
(鑑別診断として検索するウイルス)
C 型肝炎ウイルス(HCV)
エンテロウイルス
B 型肝炎ウイルス(HBV)
単純ヘルペスウイルス(HSV) I 型
単純ヘルペスウイルス(HSV) II 型
水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)
エプスタイン・バーウイルス(EBV)
サイトメガロウイルス(CMV)
ヒトヘルペスウイルス(HHV) 6
ヒトヘルペスウイルス(HHV) 7
ヒトヘルペスウイルス(HHV) 8
パルボウイルス B19
ムンプスウイルス
その他

とプライマーを使った通常の PCR 法により標的遺伝子の断片を増幅することができた。60-150 bp の PCR 産物を TA クローニングし、得られたプラスミドの濃度からコピー数の算出が可能であった。これにより、危険な病原体を扱うことなく、安全に陽性コントロールの作成が可能であることが確認された。

定量的 PCR は、まず、エボラ出血熱ウイルス、マールブルグウイルス、ラッサウイルス、SARS ウイルス、B ウイルス、ムンプスウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス、痘瘡ウイルスの 8 種類について、同時検索を試みた。若干の感度の差が見られたものの、定量には問題のない標準曲線が得られた (図 1)。定量感度の差は約 100 倍以内であり、いずれのウイルスも 10 コピー以上であれば安定して検出可能である結果を得た。さらに、ウイルスの種類を増やし、鑑別診断として検索するウイルスである A 型肝炎ウイルス (HAV)、C 型肝炎ウイルス (HCV)、エンテロウイルスを、B 型肝炎ウイルス (HBV)、単純ヘルペスウイルス (HSV) I 型、II 型、水痘帯状疱疹ウイルス (VZV)、エプスタイン・バーウイルス (EBV)、サイトメガロウイルス (CMV)、ヒトヘルペスウイルス (HHV) 6, 7, 8, パルボウイルス B19 等について、16 種類まで増やして、同時に定量的 PCR を行ったところ、各ウイルスの陽性コントロールが定量性に問題なく、検出された。

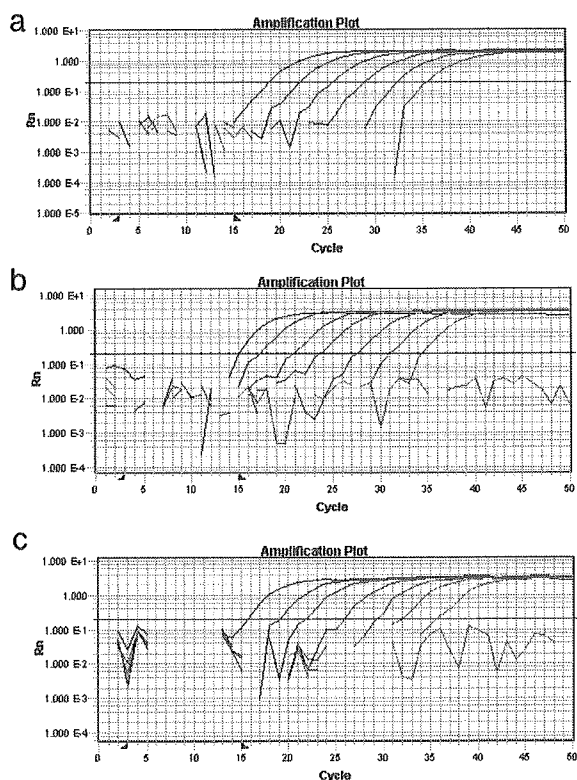


図1 出血熱ウイルスの定量的 PCR
a. エボラ出血熱ウイルス、b. マールブルグウイルス、c. ラッサウイルス。各ウイルスの標的遺伝子をクローニングしたプラスミドを段階希釈したものを鋳型とし、Taqman PCR で得られた増殖曲線 (amplification plot) を示す。

今年度は 1 類感染症を中心に定量的 PCR 法の確立を行ったが、来年度中に、予定されるすべてのウイルス (表 1) につき、優先度の高いものから順番に定量的 PCR 法を確立し、実際の感染細胞や臨床検体により、その感度と特異性を確認する予定である。

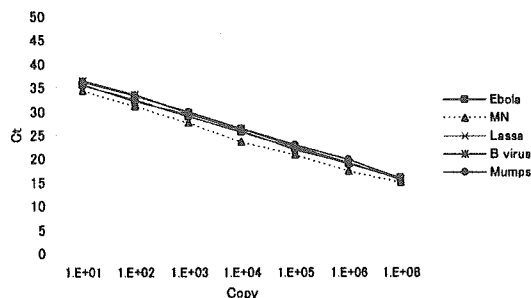


図2 数種類のウイルスの同時検索
一つのプレート上に 8 種類のウイルスを検出した。図ではそのうちのエボラ出血熱ウイルス、マールブルグウイルス、ラッサウイルス、B ウイルス、ムンプスウイルスの標準曲線 (standard curve) を同一グラフにプロットした。5 種類のウイルスでほとんど感度が近似していることが分かる。

D. 考 察

生物テロにおいては、その蔓延を最小限にとどめるため、原因微生物を可及的すみやかに同定し、同定された微生物に対する最良の対策を迅速に講じる必要がある。PCR 法は現在一般的に用いられている検査法の中でもっとも高感度なものであり、多くの施設で実施可能である。定量的 PCR 法は通常の PCR 法を原理に蛍光プローブを用いて、増幅核酸量を定量的に計測できる方法である。定量的 PCR 法は標的核酸長が短いため、通常の PCR 法よりも感度が高い。定量的 PCR 法には蛍光の種類や試薬類、機械の機種等により数種類の方法が市場に出ている。本研究では Applied Biosystems の TaqMan PCR 法を採用しているが、その理由として、他の機種に比べ、世界的に広く普及しており、多くの地方衛生研究所などの研究室が導入していること、特異的蛍光 probe を使用していることからその特異性が高いこと、などが挙げられる。

当班では、これまで、生物テロに使用される可能性のある細菌や真菌を検出する定量的 PCR の系を開発している。しかし、生物テロに使用される可能性のあるウイルスに関しては、陽性コントロールを収集することが難しい

ことから、多くのウイルスを同時に網羅的に検出する検査系は世界的にも類を見ない。これは、ウイルスが細菌や真菌と異なり、培養法や分離法がウイルスごとに異なり、複雑であること、ウイルス種ごとに専門性が高く、学者の間でコントロールを使い回す機会が少ないことなどに起因している。特に、生物テロに使用されるおそれの多いウイルスはその一部の核酸配列が公開されていないものも少なくない。本研究では陽性コントロールとしてウイルス本体を扱うことを避け、合成オリゴマーを組み合わせ、プラスミドを構築し、これを陽性コントロールとした。この方法は安全性が高く、プラスミドに含まれるウイルスの核酸配列は定量的 PCR の増幅に必要なほんの 150bp 以下の DNA 断片であり、これらの遺伝子単独では増殖性や病原性を持たない。また、今回、我々が作成した陽性コントロールのプラスミドにはプローブとプライマーの間の配列に特殊な変異を導入した。万が一、陽性コントロールが無断で使用されても、由来が分かるようにするためである。なお、プライマー、プローブの配列は、標的核酸配列に変異を加えたウイルスは本検査系では検出できない可能性があり、安全上の理由で非公表とした。

今年度の成果は、定量的 PCR を立ち上げる基礎的な技術が確立し、一部のウイルスに対する定量的 PCR に着手したことであり、今後、生物テロ対策として実用段階になるまでには、まだ時間がかかるものと思われる。いまのところ、プラスミドで構築した陽性コントロールのみを検出しているため、今後、実際のウイルス感染細胞や臨床検体でその特異性と感度を確認する必要がある。また、現在の科学技術をすれば、どのようなウイルスでも危険な病原体に変化させることが可能であることを考えると、表に挙げたウイルスだけでなく、種を越えた、なるべく多くのウイルスを網羅する努力を続けていかなければならず、常に新しい情報を収集し、今後、新たに発見されるウイルスなども加えていく必要がある。

E. 結 論

生物テロに使用される可能性のあるウイルスを検出する網羅的、定量的 PCR 法の開発に

着手した。予備実験では同一の条件で一つのプレートに 16 種類までのウイルスを定量する系が作成できた。今後、検出するウイルスの種類を順次、増加させ、鑑別診断が必要なウイルスを含め、30-40 種類のウイルスを網羅的に検出・定量できる系の完成を目指す。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表
1. 論文発表
なし。
2. 学会発表
なし

2. ヒトサル痘の高感度診断法—サル痘ウイルス感染 霊長類を用いた解析—

分担研究者 森川 茂 国立感染症研究所ウイルス第1部第1室 室長

協力研究者 西條政幸 (国立感染症研究所ウイルス第1部主任研究官)
福士秀悦 (国立感染症研究所ウイルス第1部第1室研究員)
水谷哲也 (国立感染症研究所ウイルス第1部主任研究官)
緒方もも子 (国立感染症研究所ウイルス第1部第1室研究員)
長谷川秀樹 (国立感染症研究所感染病理部第3室室長)
永田典代 (国立感染症研究所感染病理部主任研究官)
網 康至 (国立感染症研究所動物実験管理室)

研究要旨 近年、生物兵器のひとつとして痘そう (いわゆる、天然痘) ウイルスが用いられるという危険性が高まっていると考えられている。我が国においても、その危険性に対する備えの一環として、痘そうワクチンが再生産・備蓄されている。天然痘は病原性の極めて高いウイルスのひとつであるが、痘そうウイルスに近縁のサル痘ウイルスもヒトにおいて痘そうと類似の感染症を引き起こす。そのため、痘そうの鑑別診断に重要な感染症としてサル痘ウイルスによるヒトサル痘が挙げられる。また、痘そうが根絶されている今日では、新規に開発された痘そうの診断法を評価する上でも、霊長類におけるサル痘ウイルス感染をモデルとしてサル痘ウイルスの動態を解析することが必要である。本研究では、サル痘ウイルスの A-type inclusion 遺伝子における特異的塩基配列を利用した、real-time LightCycler polymerase chain reaction (LC-PCR)による高感度サル痘ウイルス遺伝子検出法を用いて、サル痘ウイルス感染カニクイザルにおけるウイルス血症レベルを解析し、その成績をウイルス分離検査の成績と比較した。本 real-time LC-PCR により、高感度にサル痘ウイルスゲノムを検出することができ、また、ウイルス分離が困難となる抗体が上昇した後でもウイルスゲノムが検出できることが明らかにされた。

A. 研究目的

バイオテロリズムの危険性はかねてから指摘されている。バイオテロリズムに用いられる病原体には、炭疽菌や痘そうウイルスなどの他に、エボラウイルスなどの出血熱ウイルスが含まれる。中でも痘そうウイルスが用いられるバイオテロリズムが特に懸念され、その対策の重要性が指摘されている。これまで私たちは痘そうウイルス遺伝子の特異的に増幅・検出する real-time LightCycler polymerase chain reaction (以下、LC-PCR) 法を開発した。

サル痘ウイルスは、痘そうウイルスと同様にオルソポックスウイルス科オルソポックスウイルス属に分類される。サル痘ウイルスの宿主は西～中央アフリカに生息するリスなどのげ

っ歯類である。痘そうウイルスに極めて近縁のサル痘ウイルスは、霊長類において痘そう (天然痘) 様疾患 (サル痘) を引き起こす。ヒトにおいても痘そう様疾患を引き起こしヒトサル痘と呼ばれ、それは同地域の風土病ある。

現在では痘そうは地球上から根絶されているため、痘そうに関する研究を行うのは困難である。そのため痘そうの診断法の開発とその評価を行うには、霊長類におけるサル痘ウイルス感染症をモデルに用いる必要がある。また、バイオテロリズムにより痘そうが流行した場合に、鑑別疾患としてヒトサル痘が重症水痘とともに挙げられる。実際、2003年に西アフリカのガーナから米国にペット用として輸出されたげっ歯類 (Gambian giant rat など) が感染源

となるヒトサル痘が米国で発生した。さらにガーナから米国に輸出されたげっ歯類の一部が我が国にも輸出されていたことが明らかにされている。

本研究では、当研究室で開発されたサル痘ウイルス A-type inclusion (ATI) 遺伝子における特異的塩基配列を利用した LC-PCR 法の診断における有用性を、サル痘ウイルス感染カニクイザルモデルを用いて、ウイルス分離法と比較して評価した。

B. 研究方法

- 1) ウイルス：国立感染症研究所に保管されているサル痘ウイルス Zr-599 株 [中央アフリカ (コンゴ民主共和国) で分離された] を用いた。
- 2) カニクイザル：カニクイザル (2 頭、#4651 と #4653) に Zr-599 株サル痘ウイルス 10^6 PFU をそれぞれ皮下接種法により感染させ、他のカニクイザル (2 頭、#4654 と #4655) には同ウイルス 10^6 PFU をそれぞれ鼻腔内噴霧接種法により感染させた。
- 3) LC-PCR：LC-PCR は、LightCycler-PCR (Roche Diagnostics 社、Mannheim、ドイツ) を用いて行われた。遺伝子検出感度を決定するための standard 遺伝子には、濃度が決定されているサル痘ウイルス Zr-599 株の部分

ATI 遺伝子が挿入された pGEM-T-easy ベクターを用いた。

- 4) LC-PCR 用サンプル：経時的に採取された血液 (全血) 200ml から Viral Nucleic Acid KitTM (Roche Diagnostics) を用いて、ウイルス DNA を抽出・精製した。
- 5) ウイルス分離：感染カニクイザルから経時的に採取された血液 4ml から buffy coat 分画を採取し、PBS で 2 回洗浄した後 Vero 細胞と共培養することによりウイルスを分離した。尚、分離ウイルス量を定量するために、共培養 4 日目に細胞単相培養に形成されているプラーク数を測定した。

C. 結果

- 1) ウイルス分離と LC-PCR 法の比較 (図 1)：皮下接種群 2 頭中 2 頭で、鼻腔内接種群 2 頭中 1 頭で、感染 3 日以内に LC-PCR によりウイルスゲノム血症が確認された。皮下接種群におけるウイルス血症レベルは、鼻腔内接種群におけるそれに比較して高く、感染約 3 週間後においても比較的高いレベルで持続していた。一方、経時的に採取された血液 (Buffy coat 分画) からのウイルス分離検査においては、感染初期にウイルスが多く分離される個体 (#4653、#4655) や感染後期に分

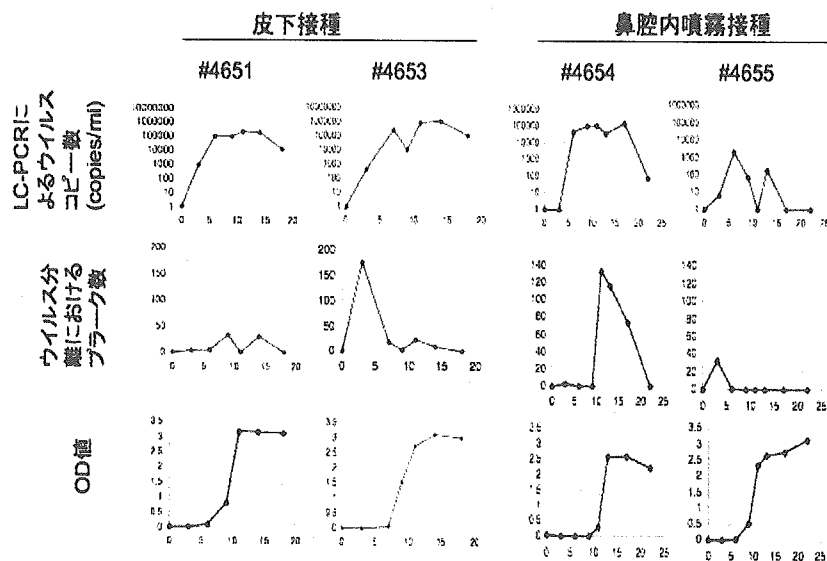


図 1. サル痘ウイルス感染カニクイザルにおけるウイルスゲノム血症、ウイルス血症 (ウイルス分離) および抗体反応。

離される個体(#4651、#4654)が認められた。感染約3週間後には全頭においてウイルス分離成績は陰性化していたが、ウイルスゲノム血症が持続していたものが4頭中3頭であった。

- 2) 臨床症状の程度とウイルスゲノム血症レベルの関連(図1): 皮下接種群2頭と鼻腔内噴霧接種群の1頭(#4653)では、全身皮膚に発生した水疱性皮膚病変数は約300から1,000個に登り、食欲低下、体重減少、活動性の低下の程度が非常に強く、特に皮下接種

D. 考 察

当研究室では、痘そうウイルスのATI遺伝子の特異的塩基配列を利用し、痘そうウイルスゲノムを特異的に増幅し検出するLC-PCRが開発されている。本研究では、痘そうの診断法を評価する目的で、サル痘ウイルス感染カニクイザルをモデルとしてサル痘ウイルスゲノム検出用 LC-PCR 法のサル痘の診断における有用性を、ウイルスゲノム血症の推移を解析することにより評価した。データは示さなかったが、通常のPCR法では血液サンプルからサル痘ウイルスゲノムを増幅することができず、少なくとも患者血液を検体とした場合には、PCR法ではウイルスゲノムを検出できないと考えられる。本LC-PCRによる解析の結果、特に抗体反応が出現し、ウイルス分離成績は陰性化する感染後2週間目以降でも、ウイルスゲノム血症が高レベルで持続していることが明らかになった。LC-PCRでは、比較的感染後期でもウイルスゲノムを血液から増幅し検出できることから、(ヒト)サル痘の診断において大変有用であると考えられる。当研究室で開発され備えられている痘そうウイルスゲノム検出用LC-PCR法も、サル痘ウイルス検出用LC-PCRとほぼ同等の感度であることが明らかにされている。つまり、痘そうウイルスゲノム検出用LC-PCR法も血液を検体とした診断法として有用であろうと予想される。

痘そうウイルスゲノム検出用LC-PCRは、痘そうウイルス遺伝子を増幅する一般的PCR法の感度に比べて、約1,000倍の感度でゲノムを増幅することが明らかにされている。本研究において評価したサル痘ウイルスゲノム増幅用

群ではほぼ致死的な感染症を発症していた。一方、鼻腔内噴霧群の1頭(#4655)は、皮膚病変数は1個のみで、症状も比較的軽微であった。前者の3頭ではウイルスゲノム血症レベルが、最高で100,000コピー/ml以上に達し、さらにウイルスゲノム血症は感染後約3週間持続したのに対し、後者ではウイルス血症レベルは、10,000コピー/ml以下であった。また、軽症の#4655では、ウイルス分離も、感染初期にのみ陽性であった。

LC-PCRも、サル痘ウイルスゲノムを増幅するPCR法に比較して1,000倍程度の感度で、ウイルスゲノムを増幅することが明らかにされている。実際、サル痘ウイルスゲノムを特異的に検出するためのPCR法(サル痘ウイルスのATI遺伝子における特異的塩基配列をもとに設計されたプライマーGabon-1とGabon-2が用いられたPCR法、J Virol Methods 74:201-7, 1998)では、感染カニクイザルから採取された血液中のサル痘ウイルス遺伝子を増幅し検出することはできなかったが、LC-PCRでは可能であった。つまり、少なくとも血液を検体とした場合、比較的高感度に特異的遺伝子を増幅するとされるPCR法の診断における有用性は、サル痘ウイルス感染症では低いものと考えられる。

本研究で開発されたLC-PCR法により、高感度にサル痘ウイルス部分遺伝子を増幅し、検出することが可能であることが明らかにされた。しかも、迅速に結果を得ることができた。血液を用いてLC-PCRのサル痘ウイルス感染症の診断における有用性を検討したが、サル痘ウイルス感染症では、咽頭スワブや水疱性皮膚病変にウイルスゲノムが存在し、ウイルスが分離されるので、これらを検体としてもLC-PCRによりウイルス遺伝子を検出することが可能であろう。しかし、感度が高いことは、疑陽性の成績を呈しやすいという問題点もあり、結果の判定にはLC-PCRの成績だけによることのないようにする必要がある。

4頭中3頭は重症のサル痘を、1頭は軽症のサル痘を発症した。その軽症のサル痘では血中ウイルスゲノム数が有意に低い値であった。このことは、血中ウイルスゲノム数が臨床症状の

程度を反映している可能性を示唆する。
LC-PCR は病勢の判定にも有用と考えられる。

LC-PCR 法は、ウイルス分離、電子顕微鏡によるウイルス粒子の検出、分離されたウイルスの遺伝子情報解析によるウイルスの同定、血清学的診断法など、いくつかの診断法と組み合わせて施行され、痘そうやヒトサル痘を正確に診断し、また、病勢・予後の判定に用いられる必要がある。

E. 結 論

高感度サル痘ウイルスゲノム増幅用 LC-PCR の診断における有用性を、サル痘ウイルス感染カニクイザルから経時的に採取された血液をサンプルとして評価した。本 LC-PCR はヒトサル痘の診断に大変有用であることが明らかにされた。この成績から本 LC-PCR とほぼ同等の感度で痘そうウイルスゲノムを増幅する LC-PCR も痘そうの診断法として有用であると推測される。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saijo M, Morikawa S, Fukushi S, Mizutani T, Hasegawa H, Nagata N, Iwata N, Kurane I: Inhibitory effect of mizoribine and ribavirin on the replication of severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus. *Antiviral Res* 66:159-63, 2005.
- 2) Saijo M, Niikura M, Maeda A, Sata T, Kurane I, Morikawa S: Characterization of monoclonal antibodies to Marburg virus nucleoprotein (NP) that can be used for NP-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J Med Virol* 76:111-118, 2005.
- 3) Saijo M, Ogino T, Taguchi F, Fukushi S, Mizutani T, Notomi T, Kanda H, Minekawa H, Matsuyama S, Long HT, Hanh NTH, Kurane I, Tashiro M, Morikawa S: Recombinant nucleocapsid protein-based IgG enzyme-linked immunosorbent assay for the serological diagnosis of SARS. *J Virol Methods* 125:181-186, 2005.
- 4) Hatakeyama S, Moriya K, Saijo M, Morisawa Y, Kurane I, Koike K, Kimura S, Morikawa S: Persisting humoral anti-smallpox immunity among the current Japanese population after the discontinuation in 1976 of routine smallpox vaccinations. *Clin Diagn Lab Immunol* 12:520-524, 2005.
- 5) Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Matsuyama S, Miyajima N, Taguchi F, Itamura S, Kurane I, Morikawa S: Vesicular stomatitis virus pseudotyped with severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. *J Gen Virol* 86:2269-2274, 2005.
- 6) Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S: JNK and PI3K/Akt signaling pathways are required for establishing persistent SARS-CoV-infection in Vero E6 cells. *Biochim Biophys Acta(BBA)-Molecular Basis of Disease* 1741:4-10, 2005.
- 7) Saijo M, Tang Q, Shimayi B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Maeda A, Kurane I, Morikawa S: Antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever using a novel monoclonal antibody. *J Med Virol* 77:83-88, 2005.
- 8) Morikawa S, Sakiyama T, Hasegawa H, Saijo M, Maeda A, Kurane I, Maeno G, Kimura C, Yoshida T, Asahi-Ozaki Y, Sata T, Kurata T, Kojima A: An attenuated LC16m8 smallpox vaccine: analysis of full-genome sequence and induction of immune protection. *J Virol* 79:11873-11891, 2005.

2. 学会発表

- 1) Mizutani T, Fusushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S: Importance of JNK and PI3K/Akt signaling pathways for establishing persistent SARS-CoV infection in Vero E6 cells. Xth International Nidovirus Symposium. Colorado Springs, CO, USA, June 2005.
- 2) Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Asahi-Ozaki Y, Sato Y, Harashima A, Morikawa S, Saijo M, Itamura S, Saito T, Odagiri T, Tashiro M, Ami