

マは 16 クローン得られた。現在、得られたクローンより産生されるモノクローナル抗体の α 毒素との反応性 (ELISA およびイムノブロットィング) および毒素中和活性について調べ、使用する抗体の選別を行っている。ポリクローナル抗体については、3 回の免疫により血清中の ELISA 抗体価で 512,000 倍の高い抗体が得られた。アフィニティー精製後、本抗体はイムノブロットィングでは 1 $\mu\text{g/ml}$ 、ELISA では 100 ng/ml の濃度で α 毒素を検出することができた。

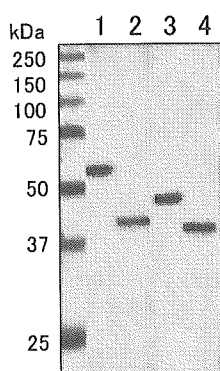


図2. recATの精製

- 1: Recombinant protoxin (56 kDa)
- 2: Trypsinized recombinant toxin (45 kDa)
- 3: Native protoxin (49 kDa)
- 4: Trypsinized native toxin (44 kDa)

3) 地方衛生研究所の主な使用目的は、ボツリヌス食中毒、乳児ボツリヌス症の診断に用いる。毒素はマウス試験に用いる A,B,E,F 型各毒素、菌は患者検体から分離した菌および実験室内診断である PCR 用の標準菌株が対象となる。留意点として、年間の行政依頼検査数が不明であり、通常の許可申請は困難なこと、検査は緊急で公安への移動届けを事前に行うのは難しいことが確認された。

大学、研究所での使用目的は、実験室診断及び品質管理、毒素の機能解析、作用研究の基礎研究等に用いている。毒素はマウス試験に用い、菌は環境から分離した菌、または PCR 用の標準菌株が保管されている。留意点は、学生講義、実習が日常化している校内での取り扱い施設の区分制限およびセキュリティー保持のための施設整備がどの程度求められるのかである。

抗毒素等製造所での使用目的は、ボツリヌスウマ抗毒素製剤の製造に用いている。毒素はウマ免疫用ボツリヌス毒素 (A,B,E,F 型)

として使用し、菌は毒素原料をえるための各型菌が対象となる。留意点としては取り扱い施設の区分制限として GMP 対応区域の整備、セキュリティー保持のための施設整備がどの程度求められるのかである。

ジストニア患者等の治療用毒素としてボツリヌス毒素の臨床応用が行われている。A 型毒素は眼瞼痙攣、片側顔面痙攣、痙性斜頸の 3 疾患は輸入製造認可承認薬として全国 5000 ヶ所の診療所で用いられている。また、現在、新規開発毒素 (B 型) として臨床治験中である。製造、販売業者等での保管、運搬に関しては、薬事法での許可を取得している標品の扱い、新制度への対応が留意点とされた。

D. 考 察

今年度は検出系構築のための抗体作製を行った。SEB についてはモノクローナル抗体が作成でき、ポリクローナル抗体については現在免疫中でありまもなくアフィニティー精製抗体を得るところまで来ている。 α 毒素についてはモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を作成でき、モノクローナル抗体は現在検出系に使用するクローンを選別中である。従って、今年度の目標はほぼ達成できたと考えている。

感染症分科会における事務局説明によれば、平成 18 年に予定される感染症法一部改正により、病原微生物の取り扱い規制が行われることとなる。規制病原体に予定のボツリヌス菌・毒素について、規制の対象となる製造所、研究所、大学および地方衛生研究所の現状調査を行った結果、おおむね施行時に大きな混乱は生じないことが予想される。

E. 結 論

Staphylococcus aureus Enterotoxin B (SEB) と *C.septicum* 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。感染症法の一部改正に伴う病原微生物等のバイオセキュリティー基準については、ボツリヌス毒素・菌を例にとり法施行後の現場対応を考察した結果、患者の医療及び公衆衛生対策に必要な実験室診断に支障がおこらないような措置の検討が必要と思われる。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hang'ombe BM, Kohda T, Mukamoto M, Kozaki S: Relationship between Clostridium septicum alpha-toxin activity and binding to erythrocyte membranes. J Vet Med Sci 67:69-74, 2005.
- 2) Hang'ombe BM, Mukamoto M, Kohda T, Sugimoto N, Kozaki S: Cytotoxicity and oligomerization of Clostridium septicum alpha-toxin in detergent resistant membranes of mammalian cells. Microb Pathog 37:279-286, 2004.

2. 学会発表

なし。

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

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

分担研究者 牧野 壮一（帯広畜産大学・大動物特殊疾病研究センター）

研究協力者 江崎孝行（岐阜大学・医学部）、倉園久生（大阪府立大学・獣医学科）
安田二郎（警視庁科学捜査研究所）、内田郁夫（独立行政法人農業生物系
特定産業技術研究機構・動物衛生研究所・北海道支所）
川本 恵子、大槻 隆司（帯広畜産大学・大動物特殊疾病研究センター）

研究要旨 2001年にアメリカで起こった炭疽菌芽胞を使ったバイオテロにより、生物兵器による無差別攻撃が現実のものとなった。バイオテロに使用される病原体による感染症は希少かつ急性で、発生した場合には通常の医療機関並びに検査機関での検出・診断が困難である。同時に、そのような病原体による感染症の蔓延を防ぐ技術開発も危機管理体制の強化の一つとして急務の課題である。本研究では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、野兔病菌、鼻疽・類鼻疽菌に主に焦点をあて、研究を進める。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、その抗体が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キログルトンの抗原を検出した。野兔病に関しては、平成14から17年度で、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、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。

A. 研究目的

2001年10-11月我が国ではアメリカの炭疽菌芽胞混入郵便物によるテロ事件を模倣した事件が多発した。これらの事件に対応する過程で、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、治療法の開発および確立の必要性が強く指摘された。本研究ではバイオテロに利用されることが危惧される各種の病原体の中で、特にレベル3に属する細菌性感染症の焦点を当て、環境や臨床材料から網羅的・短時間に検出する検査診断法の開発を行い、検査・診断マニュアルを作製し、普及

をはかることを目的とする。

対象として各種ウイルス、リケッチア、細菌、毒素等のバイオテロに使用される可能性がある病原体が想定されるが、特に炭疽菌は芽胞としての安定性、乾燥や熱に対する抵抗性、比較的簡単に培養ができることなどから生物兵器の最有力候補として常に注目をあびてきた。炭疽菌は危険度レベル3に属する細菌で、他にペスト、鼻疽/類鼻疽、野兔病、結核、チフス、ブルセラが細菌としてこのレベルに入る。その中で、生物兵器として使用可能なものは炭疽以外にペスト、鼻疽/類鼻疽、野兔病、チフス、ブルセラが

想定されるが、検査法や治療法、さらには診断法がまだ確立されていない菌種は鼻疽/類鼻疽、野兎病、ブルセラである。そこで、本研究では、危険度を考慮して炭疽菌の検出法の更なる改良・開発、および鼻疽/類鼻疽、野兎病、ブルセラ症などの危険度3に属する病原体に対する検出・診断法の確立及び治療・予防法の開発や改良を行い、患者検体および環境中からの迅速な検出および診断法の開発を行う。診断法の実用化に当たっては事件発生現場での利用が可能な方法と、検査室における方法の両面からの実用化を目指す。さらに、種々の化学物質および薬剤に対する病原体の感受性に関する検討を行い臨床利用に備える。また、従来からのワクチンを基盤とした免疫誘導能が高いワクチンの開発を検討する。

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り、炭疽常在地となる。ヒトの疾病は、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、感染後24時間以内に大量の抗生物質を投与すれば死亡率は極端に低下するが、発症してしまうと急激に重篤な状態に陥ってしまう。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なる。

一方ブルセラ症は、いろいろな脊椎動物に感染し病気を起こすブルセラ菌によって起こる感染症で、種によって、主に感染する動物が異なる。*Brucella abortus*がウシ、*B. melitensis*がヒツジ・ヤギ、*B. suis*がブタ、*B. canis*がイヌに主として感染し、ヒトはこれらの感染した動物との接触によって、あるいは、ブルセラ菌によって汚染された動物由来の製品との接触によって感染する。即ち、動物のブルセラ症が多く見られる場所ではヒトのブルセラ症もよく発生する。従って、動物へのワクチン接種などによるブルセラ症の撲滅が本感染症の人への自然界での蔓延を防ぐ最適な方法であるといえる。ヒトのブ

ルセラ症は全身症状を呈し、あらゆる臓器に感染を起こすことで知られており、その症状に特異的なものではなく、発熱、発汗、疲労、体重減少、うつ状態などの症状がみられる、いわゆるやる気をなくすようなけだるさが長期間継続し慢性化する特徴がある。さらに、ブルセラ菌は実験室内感染の危険性が高く、噴霧状態での感染が容易に起こる。そのため、生物兵器として使われることが心配されている。ブルセラ症の診断には一般的に抗体価の上昇で調べるが、ヒトにおけるブルセラ症の診断法は確立されておらず、家畜の国際標準法に従って実際は行われている。しかしこの国際標準法では、*Yersinia enterocolitica* O9 との交差反応が強いこと、ワクチン接種群における抗体価が高いことなどがあり、確実なブルセラ症の診断はできない。例えば、平成13年のヘラジカのブルセラ騒動はオーム病との交差反応であった。ブルセラ特異的な診断法は確立されていない現状にある。

鼻疽は本来動物特にウマの疾病で細菌性病原体としては危険度が最も高い危険度3に区分される。土壌中に存在する病原体が皮膚の傷口に付着しそ創傷感染、リンパ節へと広がっていく。また粉塵から飛散した菌を吸引し肺炎、あるいは眼球結膜に付着し涙囊の感染と鼻出血をおこす。涙囊炎と鼻出血はこの病気の特徴的な所見である。ウマの密度の高い中国の内モンゴルでは現在も感染するケースがあるとされているが、人の感染例も姿を消しつつある。しかし、類鼻疽はヒトの疾患で、亜熱帯から熱帯地方の土壌に分布し東南アジアでは患者数は高く、致死率も高い危険な疾患である。特にタイ、マレーシア、ベトナム、北部オーストラリアの患者発生率が高い。両病原体は土壌に分布するため農作業中に感染するケースが多い。皮膚の傷口から感染し潰瘍、リンパ節の腫溜が前景にでる場合と土壌中の菌を吸引して肺炎が全面にでる場合がある。糖尿病や肝臓疾患等で免疫低下がある人が感染するとしばしば経過が長期化し致死的な全身感染症になる。タイでは毎年約100例以上の死亡が報告されている。

野兎病は、野生の動物の病気で、ヒトも感染する。北アメリカ・北ヨーロッパ・北アジアに広く見られ、野兎病菌を持った虫にかまれたり、刺されたりして、あるいは、野兎病菌に汚染し

たものや動物に接触してヒトは感染する。発生は通常散発的だが、ときに流行を示す。2000年には北欧で蚊の媒介による流行があった。また、野兔病菌は、10-50個の菌だけでも、皮膚に付着したり吸引で感染・発病する可能性があり、症状もペストに似て重症化しやすいので、生物兵器として使われる可能性が危惧されている。

本研究では炭疽菌を中心とした以上4菌種の検出・診断法の開発、及び病原性因子の解析による新たな治療方法の開発を試みる。

本年度は、炭疽菌の発症機構の解明と新たな予防法の開発を念頭に、芽胞に対する抗体が免疫防御能に関与すること、野党病菌の迅速検出法のキット化の検証と免疫検出法の開発、類鼻疽菌特異的検出法の開発を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. 炭疽菌に関する研究

1-1) 栄養型炭疽菌はパスツール2苗株（莢膜産生、毒素産生株）および、その莢膜非形成・毒素非産生変異株を通常の液体培地で培養し、その一夜培養液を芽胞形成培地に接種し、37度にて緩やかに振盪培養を行い調整した。顕微鏡観察により芽胞形成を確認後、滅菌生理食塩水で2回洗浄後、80度30分間加熱処理し、更に2回滅菌生理食塩水で洗浄した。最終芽胞数を 10^7 個/mlになるよう懸濁し、実験に使用した。芽胞は土ーグラムに適量人工的に接種し実験を行った。

1-2) 莢膜非形成・毒素非産生変異株由来芽胞をホルマリンで不活化後、ウサギに免疫し抗体を作成した。

1-3) ウエスタンブロッティング、マウス感染実験、免疫染色などは常法に従った。

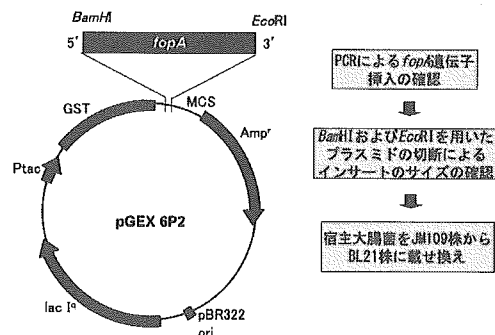
2. 野兔病に関する研究

2-1) *F. tularensis* subsp. *tularensis* GTC 3P42株の16S rDNA 遺伝子とMMP 遺伝子の塩基配列の確認：構築した16S rDNA 遺伝子及びMMP 遺伝子の陽性コントロールの塩基配列は、既報のそれぞれの塩基配列と2塩基対ずつ違いが見られた。この陽性コントロールをPCR法で構築する際に用いた、*F. tularensis* subsp. *tularensis* GTC 3P42株のwhole cell DNAをDirect sequencingした。

2-2) 野兔病菌の特異的な表在蛋白と考えられるFopAの発現するために、*fopA* insertの作成を行った。*F. tularensis* subsp. *tularensis* GTC 3P42株のwhole cell DNAをTemplateにして、
upstream:AGAGGGATCCTTGATGAGATTA AAAAGTATT,
downstream:AGAGGAATTCCTCAGAAAGTTTTTGGGTTATA

のプライマー対を用いて、94℃で5分、[94℃で1分間熱変性、52℃で1分間 annealing、72℃で1分間伸長反応]を25 cycle、最後に72℃で7分反応させた。得られたPCR産物はBamHIとEcoRIで切断して、精製した。次に発現vector、pGEX-6P2をBamHIとEcoRIで切断して精製し、*fopA* insertをligationして、大腸菌JM109株にtransformationした。得られたtransformantsは、*fopA*に対する特異的PCRで選別し、陽性クローンのみを発現のために大腸菌BL21株にtransformationした(図1)。BL21株にtransformationしたFopA-GST融合蛋白クローンは、種々のIPTG濃度でInductionをかけて、融合蛋白の発現を検討した。更に、発現した融合蛋白は抗GSTヤギ血清を用いたWestern blotting解析でGST融合蛋白である事を確認した。

図1 pGEX6P2ベクターを用いたFopA-GST融合タンパク発現の試み



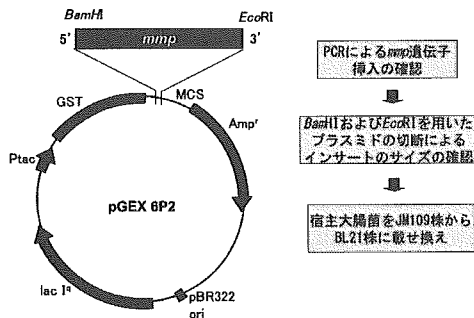
2-3) 同様に野兔病菌の特異的な表在蛋白と考えられるMMPの発現系を作成した。

upstream:AGAGGGATCCATGAAAAAATAATT AAGCTT,
downstream:AGAGGAATTCCTTAAATATTTATT GAATCAGA

のプライマー対を用いて、94℃で5分、[94℃で1分間熱変性、52℃で1分間 annealing、72℃で1分間伸長反応]を25 cycle、最後に72℃で7分反応させた。得られたPCR産物はBamHIとEcoRIで切断して、精製した。発現vector、

pGEX-6P2 を *Bam*HI と *Eco*RI で切断して精製し、1)で作成した *mmp* insert を ligation して、大腸菌 JM109 株に transformation した。得られた transformants は、*mmp* 遺伝子に対する特異的 PCR で選別し、陽性クローンのみを発現のために大腸菌 BL21 株に transformation した (図 2)。BL21 株に transformation した

図2 pGEX6P2ベクターを用いたMMP-GST融合タンパク発現の試み

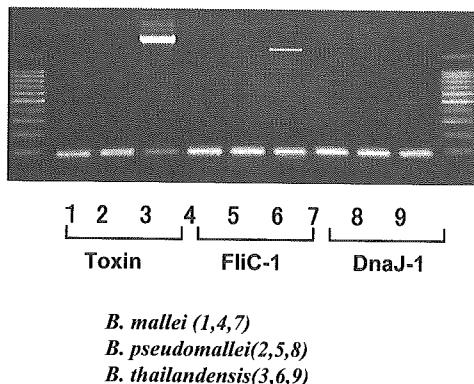


2-4) FopA-GST 融合蛋白クローンは、種々の IPTG 濃度で Induction をかけて、融合蛋白の発現を検討した。更に、発現した融合蛋白は抗 GST ヤギ血清を用いた Western blotting 解析で GST 融合蛋白である事を確認した。

3. 類鼻疽に関する研究

3-1) われわれは これまで 16S rDNA, Hypothetical Toxin, FliC, DnaJ をつかって、*B. pseudomallei* を特異的に検出する方法を作成してきたが、これらのプライマーは図 3 に示すごとく、*B. pseudomallei* から特異的な増幅が得られるが、*B. thailandensis* がら非特異バンドが増幅される欠点があった。そこで、2004 年にゲノムプロジェクトのデータが公開され、*B. pseudomallei* と *B.thailandensis* に特異的な配列の検索が可能になり、カプセル合成遺伝子の一部

図3



の領域が *B. pseudomallei* にのみ存在することがわかった。そこで、この領域の Primer *kpsD*-1, *kpsD*-2 を作成して *B. mallei*, *B. pseudomallei* および *B. thailandensis* の遺伝子の検出を試み、類鼻疽特異的検出系の確立を試みた。

(倫理面への配慮)

動物実験は所属研究機関の動物実験委員会の審査許可を受けて行われ、DNA 組換え実験や病原体の取り扱いには法令に従い安全性を考慮して実験を実施した。

C. 研究結果

1. 炭疽菌に関する研究

1-1) 抗芽胞抗体の特異性: 抗体の特異性を蛍光染色にて炭疽菌と *B. cereus*, *B. subtilis* および *B. thuringiensis* を比べた。抗体は炭疽菌表層に検出され、病原下部および変異株でも差が無く反応した (図 4)。他の菌種には反応しなかった。この結果作成した抗体は炭疽菌芽胞特異的であると確認した。次に、芽胞上のような抗原を認識するのかをウエスタンブロッティング法にて調べた。その結果 250 kDa および 25 kDa の強いバンドが病原株および非病原株に共通に検出された (図 5)。

図4. 炭疽菌の免疫染色

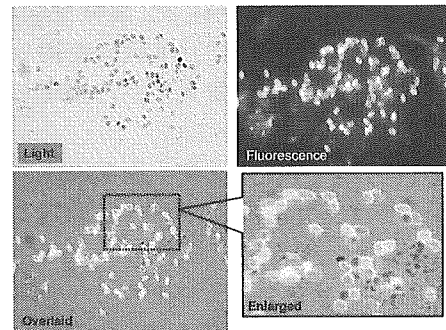
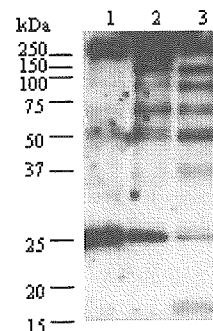


図5. Western blotting analysis



1-2) 抗芽胞抗体 (anti-BA spore IgG) の感染防御: マウス腹腔内に *B. anthracis* spores (5×10^3) と各種濃度の anti-BA spore IgG (0.01、0.1、0.5 mg) を接種し、死亡率と内臓(肝臓、脾臓)内菌数を計測した (図 6)。その結果、抗体を加えていないマウス群では芽胞接種後 3 日以内に死亡したが、抗体処理群では、抗体量に比例して死亡率が低くなった。さらに、マウスの脾臓および肝臓内菌数を比べると、抗体量に比例して菌数の減少が確認された (図 7)。このことは芽胞に対する抗体が炭疽菌の感染を防御することが明らかになった。さらにこのことを確認するために、組織的観察を行った。その結果、死亡率と同様に組織の病変が抗大量が多いほど変化が少なくなることが明らかになった (図 8)。

図6. Survival rate of mice in *B. anthracis* infection

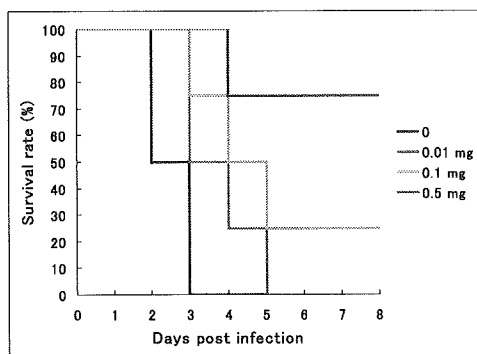


図7. Dose-dependent inhibitory effect by anti-spore IgG on bacterial proliferation 3 days post infection

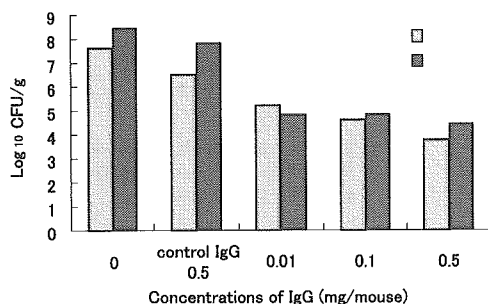
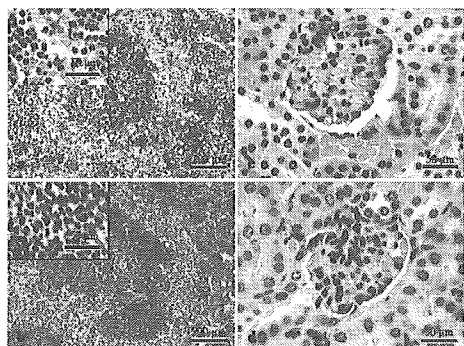


図8. 感染切片の比較



2. 野兔病に関する研究

2-1) *F. tularensis* subsp. *tularensis* GTC 3P42 株の 16SrDNA 遺伝子と MMP 遺伝子の塩基配列の確認: 16SrDNA に対する陽性コントロールで見られた既報の 16SrDNA との 2 塩基対の違いは、Direct sequencing の結果、株間の違いである事が分かった。MMP 遺伝子に対する陽性コントロールで見られた既報の MMP 遺伝子との 2 塩基対の違いは、Direct sequencing の結果、PCR cloning により生じた mutation である事が判明した。しかし、変異した箇所は PCR primer の部位とは異なり PCR 法による同定実験には影響は及ぼさず、この陽性コントロールを切り出して MMP 遺伝子に対する DNA probe として用いても、350bp 中の 2bp の変異であるので問題ないといえる。

2-2) 野兔病菌の特異的な表在蛋白と考えられる FopA の発現: 得られた FopA-GST 融合蛋白クローン (Clone No. 1) を 0.1、1.0、10、及び 100 mM の IPTG で Induction して、1、3、5 時間後の発現を SDS-PAGE で解析したところ、全ての IPTG 濃度において FopA-GST 融合蛋白と推定される蛋白が強く発現していた (図 9)。強発現した蛋白が FopA-GST 融合蛋白であるか否かを、抗 GST ヤギ血清を用いた Western blotting 解析で確認したところ、強発現した蛋白は抗 GST ヤギ血清と反応した (図 10)。

2-3) 野兔病菌の特異的な表在蛋白と考えられる MMP の発現: 得られた MMP-GST 融合蛋白クローン (Clone No. 3, 5, 7, 10) を 10mM の IPTG で Induction して、1、3、5 時間後の発現を SDS-PAGE で解析したところ、全ての IPTG 濃度において MMP-GST 融合蛋白と推定される蛋白が弱くではあるが発現していた (図 11)。

図9

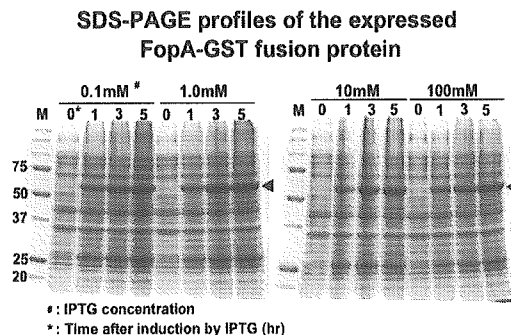
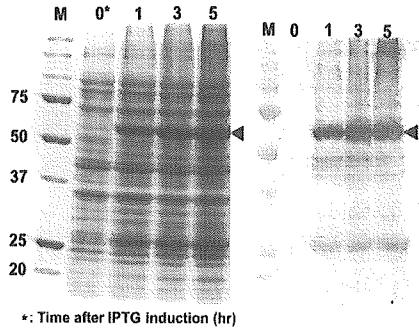
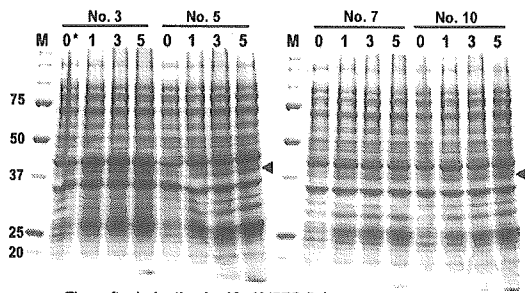


図10. SDS-PAGE and Western blotting analysis of FopA-GST fusion protein



*: Time after IPTG induction (hr)

図11. SDS-PAGE profiles of the expressed MMP-GST fusion protein



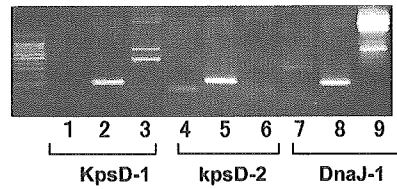
** Time after induction by 10mM IPTG (hr)

3. 類鼻疽に関する研究

カプセル領域の Primer kpsD-1, kpsD-2 を作成して *B. mallei*, *B. pseudomallei*, *B. thailandensis* の遺伝子の検出を試みたところ図 12 に示すごとく kpsD-2 primer で *B. pseudomallei* のみが増幅する primer を得ることができた。この Primer の検出感度は 8.6 fg で十分な感度が得られた。

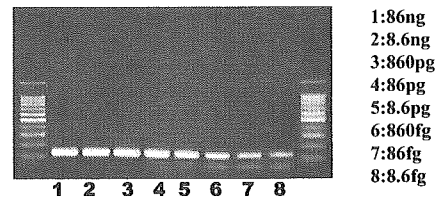
(図 13-1)。一方、FliC 遺伝子配列を改良し *B. thailandensis* のみを増幅する primer FliC-2 を作成し(図 13-2)、マルチプレックスで両者を識別できる方法を作成した(図 14)。この FliC-2 の検出感度も 6.7 fg であり、実用的な感度に達していた(図 13-2)。*B. mallei* の土壌からの分布は報告されていないので kpsD-2 と fliC-2 のマルチプレックス PCR を行なえば土壌のスクリーニングに有効である。しかし患者の材料でもこの primer の組み合わせで実用可能だが、*B. mallei* の検出ができなくなるので(図 15)、Hypothetical Toxin, あるいは DnaJ 遺伝子を併用する必要が出てくる。

図12

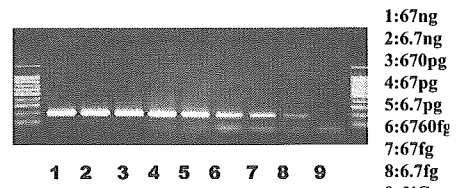


B. mallei (1,4,7)
B. pseudomallei(2,5,8)
B. thailandensis(3,6,9)

図13

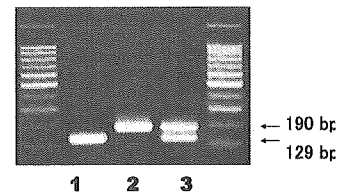


1. Sensitivity of kpsD-2 primer for *B. pseudomallei*



2. Sensitivity of FliC-2 primer for *B. thailandensis*

図14

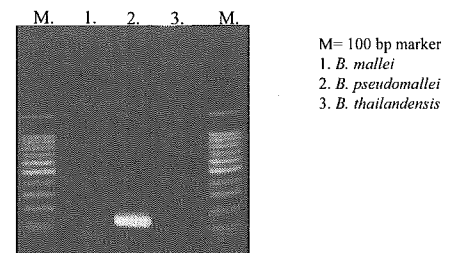


1, KpsD-2 Primer for *B. pseudomallei*
 2, FliC-2 Primer for *B. thailandensis*
 3, Kps+FliC-2 primer mixture

図15

Burkholderia pseudomallei detection

Specificity test of *B. pseudomallei* (kpsD-2 primer):



D. 考 察

1. 現在の炭疽菌ワクチンは毒素に対する高対価の上昇を期待するものである。しかし、その作用には限界があることが知られており、新たなワクチン開発が望まれている。今回の報告により、芽胞に対する抗体が感染防御脳を示したことにより、新たなワクチン開発につながると考えられる。その反応抗原は現在二種類が免疫的に検出されており、今後はその蛋白の同定と機能解析が必要である。

2. 平成 14 から 16 年度において、野兎病菌 (*Francisella tularensis*) の 16S rDNA と表在蛋白 Fop 及び MMP に対する特異的な PCR 系と Multiplex-PCR 系を構築した。この検出法を完成するために、それぞれの遺伝子に対する陽性コントロールを構築した。FopA 遺伝子に対する陽性コントロールの塩基配列は既報の FopA 遺伝子の塩基配列と一致した。しかし、16SrDNA と MMP 遺伝子に対する陽性コントロールの塩基配列は既報の塩基配列と 2 塩基対ずつ異なっていた。PCR cloning に用いた *F. tularensis* subsp. *tularensis* GTC 3P42 株の whole cell DNA を Direct sequencing したところ、16SrDNA については株間により違いであり、MMP 遺伝子については PCR cloning による mutation である事が分かった。MMP 遺伝子に対する陽性コントロールでは、変異した箇所は PCR primer の部位とは異なり PCR 法による同定実験には影響は及ぼさない。更に、この陽性コントロールを切り出して MMP 遺伝子に対する DNA probe として用いても、350bp 中の 2bp の変異であるので問題ない。

現在、我が国における野兎病の発症例は数年に 1 度程度で、菌株の入手が困難である。更に、レベル 3 の菌株を外国から収集するのは困難になっており国内の保有株を幅広く呼びかけて収集する必要がある。また、我が国の安全性レベルでは、*F. tularensis* subsp. *tularensis* 以外の 2 つの亜種も *F. tularensis* 同等の危険度で取り扱われており、感染症研究所の規定を早急に改めて明確な区別をする必要がある。今後の課題として動物検疫及び生物兵器のリストからはずれると思われる *F. tularensis* の亜種の収集経路を確保すると共に、*F. tularensis* subsp. *tularensis* の野

生株の収集を行い遺伝子多型の有無と Primers の有効性を株数を増やして実証する必要がある。今年度の実験結果より、野兎病菌に対する遺伝学的迅速同定法はキットとして完成した。今後、野兎病菌のコレクションを充実させて、このキットの精度検定を行う予定である。

希少感染症の場合、特にそれが P3 レベルの病原体である場合は、最初の同定及び診断を間違えると被害が想像以上に甚大になる。このため、診断法及び同定法は複数ある事が望ましい。特に、これらの病原体がバイオテロを目的に人工的に改変される可能性（特に表在抗原の改変）を考えると免疫学的診断法及び同定法の確立が必須である。患者の抗体の計測は大原研究所のような専門機関でなければ実施してもらえない現状では、我が国全体の正確な患者数の把握が困難である。大原研究所では全菌体を抗原とした抗体計測を行っているが、通常の検査室では抗原が市販されていないので実施できない。このような現状を改善するために、特異抗体計測あるいは迅速検出のための抗原の計測法を確立する事が今後の重要な課題と考える。

本年度は、遺伝学的迅速同定法の target にした野兎病菌の表在蛋白である FopA と MMP の発現を試みた。FopA は GST との融合蛋白として強発現できた。現在、発現した FopA-GST 融合蛋白の精製を行っている。MMP も GST との融合蛋白として発現させたが、その発現は弱かった。大量培養により必要量が確保できれば、このクローンで精製を行うが、無理であれば MMP に関しては、発現 vector の選定から再度、行う。これら野兎病菌体の表在蛋白が精製できれば、1) 平成 15 年度に作成した *F. tularensis* 全菌体に対する家兎抗血清を用いて、この精製抗原の有用性を ELISA 系で検討する。2) それぞれの精製蛋白 (FopA 及び MMP) に対する家兎血清を作成して ELISA 系を作成し、野兎病菌体に対する特異性を検討する。3) FopA 及び MMP の deletion mutants を作成し、2) で構築した ELISA 系を用いて epitope 検索を行う。

3. 類鼻疽菌の検出は今回のプライマーセットが有効であると確認できた。今後は菌株を増やして更なる検証が必要である。

E. 結 論

- 1) 炭疽菌のワクチン開発に有用なデータが得られた。
- 2) 野兔病菌検出に用いる PCR 系用陽性コントロールの塩基配列を検討し、その有用性を確認し、表在蛋白の FopA および MMP を GST 融合蛋白として強発現させた。
- 3) 類鼻疽特異的な検出系を開発した。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kanamaru S., H. Kurazono, Y. Mizunoe, A. Terai, K. Monden, H. Kumon, O. Ogawa, S. Yamamoto: Increased biofilm formation in *Escherichia coli* isolated from acute prostatitis. *Int J Antimicrob Agent* (accepted for publication), 2005.
- 2) Asakura H, Igimi S, Kawamoto K, Yamamoto S, Makino S-I: Role of in vivo passage on the environmental adaptation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7: Cross-induction of the viable but nonculturable state by osmotic and oxidative stresses. *FEMS. Microbiol Lett*, 2005. (in press)
- 3) Panutdaporn N, Kawamoto K, Asakura H, Makino S-I. Resuscitation of the viable but non-culturable state of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg by recombinant resuscitation-promoting factor derived from *Salmonella* Typhimurium strain LT2. *Int J Food Microbiol*, 2005. (in press)
- 4) Saitoh M, Tanaka K, Nishimori K, Makino S-I, Kanno T, Ishihara R, Hatama S, Kitano R, Kishima M, Sameshima T, Akiba M, Nakazawa M, Yokomizo Y, Uchida I: The *artAB* genes encode a putative ADP-ribosyltransferase toxin homologue associated with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Microbiology* 2005, 151:3089-3096.
- 5) Takeshi K, Komaki M, Makino S-I: Control of food-borne botulism in thermally processed low-acid foods packaged in hermetically sealed

containers. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 2005, 46:210-212.

- 6) Makino S-I, Kawamoto K, Takeshi K, Okada Y, Yamasaki M, Yamamoto S, Igimi S: An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. *Int J Food Microbiol* 2005, 104:189-196.
- 7) Ikeda T, Tamate N, Yamaguchi K, Makino S-I. Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H. *Appl Environ Microbiol* 2005, 71:2793-2795.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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 臨床小班分担研究報告書

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
感染症研究分野 教授

研究協力者 中村 修 (慶応大学環境情報学部)
古谷信彦、山口恵三 (東邦大学医学部微生物・感染症学講座)
大野秀明、宮崎義継、河野 茂 (長崎大学医学部歯学部附属病院第2内科)
松本哲哉 (東京医科大学微生物学講座)
谷口清洲 (国立感染症研究所感染症情報センター)

研究要旨 本研究班では平成14年度より3年間の研究期間で得られた成果を、『生物テロ関連疾患の診断・検査・治療マニュアル2005』として、炭疽、天然痘、野兔病、ウイルス性出血熱、ボツリヌス症、ペスト、鼻疽・類鼻疽、ブルセラ症、消化管感染症、重症急性呼吸器症候群(SARS)、ウエストナイル熱/脳炎、狂犬病、コクシジオイデス症、多剤耐性結核菌、Q熱の16疾患(疾患群を含む)を対象に平成17年3月にとりまとめた。平成17年度はマニュアルの改訂とともにホームページの作成に向けて、新たなワーキンググループを発足させ、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。その結果、臨床症状からバイオテロ関連疾患を絞り込む一覧表を作成したり、バイオテロ疾患鑑別の補助となるフローチャートを作成するなどして、より疾患名にたどり着きやすい工夫を取り入れた。また画像の著作権について一定の方針を決定し、さらに多方面から画像を入手して内容を充実させることにした。来年度の一般公開に向けてホームページの改訂も併行して実施し、一般の臨床家にとって本当に利用しやすいマニュアルを目指してさらに検討を進める予定である。

A. 研究目的

米国で2001年9月から郵便物に粉と一緒に炭疽菌を同封した一連の事件が発生し、バイオテロに関する注目は急速に高まった。幸いにも日本国内ではまだ実際に被害者が出るようなバイオテロを経験していないが、今後国内で起こらないという保証はどこにもなく、予め来るべき日に対して備えておくことは重要と考えられる。ただしバイオテロに使用される可能性のある病原体は、炭疽やペストのように国内ではまず遭遇することのない感染症の起炎菌や、天然痘ウイルスのようにすでに撲滅宣言が出されている病原体も対象となっている。そのため一般の国内の臨床医は、実際にこのような感染症に遭遇したとしても、疾患名さえも念頭に浮かばない

状況が想定される。確かにこれまでに国内外においてバイオテロに関する書籍や資料は多く出版され、さらに関連したホームページも存在はしている。しかしバイオテロに利用されやすい病原体全体を包括し、それぞれの病原体の診断法について基礎的研究の成果を踏まえ、適切な対応策を具体的に解説したものは残念ながら見あたらない。そこで本研究班では、バイオテロ患者に最初に遭遇しやすいと考えられる一般の医療スタッフ(主に臨床医)向けに、診療に有効に活用できるような実践的な情報を提供するために、より良いマニュアルの作成を目指すと共に、ホームページを立ち上げて広く普及を図ることを目的としている。

B. 研究方法

平成 14 年度より島田馨先生を主任研究者として立ち上げられた厚生労働省の研究班（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）は、バイオテロを対象としたマニュアル作成に取り組み、3 年間の研究期間の間に得られた成果を、『生物テロ関連疾患の診断・検査・治療マニュアル 2005』として平成 17 年 3 月にとりまとめた。このマニュアルの対象とした疾患は以下の表のとおりである。

表 1. バイオテロ対策マニュアル対象疾患

- ・炭疽
- ・天然痘
- ・野兔病
- ・ウイルス性出血熱
- ・ポツリヌス症
- ・ペスト
- ・鼻疽・類鼻疽
- ・ブルセラ症
- ・消化管感染症
- ・重症急性呼吸器症候群(SARS)
- ・ウエストナイル熱／脳炎
- ・狂犬病
- ・コクシジオイデス症
- ・多剤耐性結核菌
- ・Q 熱

その後、本研究班は佐多徹太郎先生を主任研究班として継続されることになり、基礎小班では各病原体の診断方法の確立を目指して基礎的な研究が引き続き行われた。一方、臨床小班ではマニュアルの改訂とともにホームページの作成に向けて、新たなワーキンググループを発足させた。

ワーキンググループによる検討を重ねた結果、マニュアル改訂の要点としては、1) 疑われる疾患を絞り込む工夫を盛り込む、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 点と定め、疾患毎に分担を決めて検討を行った。

C. 研究結果

マニュアル改訂の具体的な内容に関しては、以下の項目別に従って作業を進めることになった。

【課題 1】疑われる疾患を絞り込む工夫を盛り込む。

前述のマニュアルにおいては、感染症の疾患別に詳細を記載した内容のマニュアルを作成していたが、実際の症例を目の前にして臨床医が特定の疾患に絞り込むことができなければ、このマニュアルをうまく利用することは困難である。図 1 は昨年度までの検討によって作成されたバイオテロ対策用のホームページのトップページを示したものであるが、ワーキンググループ内で検討した結果、このように疾患別に示されたリストを示されても、まだ具体的な疾患名が浮かんでいない段階ではこれ以上先に進めていくことが困難である、という意見が出された。そこでこのような反省をもとに以下の工夫を盛り込むこととなった。

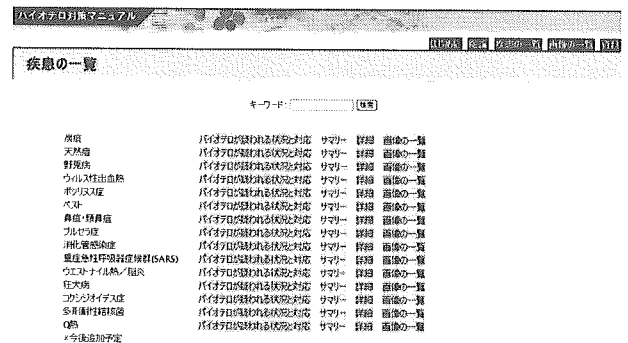


図 1. バイオテロ対策マニュアルのトップページ

・臨床症状からバイオテロ関連疾患を絞り込む一覧表を作成（表 2 参照）。

・バイオテロ疾患鑑別の補助となるフローチャートを作成（図 2、3 参照）。

実際に臨床症状からバイオテロ関連疾患を絞り込むための一覧表として、表 2（バイオテロ関連疾患：主要症状一覧）を作成した。この表を活用することにより、単一の疾患に限定することは困難であっても、症状をチェックしていくことによっていくつかの疾患に絞り込むことが可能となる。

疾患名	インフルエンザ様 症状	呼吸器 症状	消化器 症状	皮膚 症状	神経 症状	臨床徴候
						ポイントとなる徴候
ウイルス性出血熱	エボラ出血熱	○		○	○	粘膜（消化管）出血・結膜炎（red eyes）
	マールブルグ出血熱	○		○	○	粘膜（消化管）出血・体幹有数の斑状皮疹
	クリミア・コンゴ出血熱	○		○	○	粘膜（消化管）出血・羞明・めまい
	ラッサ熱	○	△	○		比較的緩徐な発症・粘膜（消化管）出血・難聴
ウエストナイル熱・脳炎	○			○	○	リンパ節腫脹・小丘疹・髄膜刺激症状
Q熱	○	○				肝脾腫・髄膜刺激症状
狂犬病	△				○	咽喉頭の痙攣（脱水症）・不安感・痲痺・昏睡
コクシジオイデス感染症	○	○			○	結節性紅斑・遊走性関節痛・胸腹水貯留
SARS	○	○	○			咳嗽・進行性の呼吸困難・下痢
消化管 感染症	サルモネラ			○		水様性下痢・血便
	赤痢			○		急激な発熱・水様性下痢・血便
	大腸菌O-157感染症			○		激しい腹痛・水様性下痢・血便・溶血性尿毒症候群
	コレラ			○		水様性下痢（rice water）・脱水・ショック
	クリプトスポロジウム			○		水様性下痢
多剤耐性結核		○				慢性に進行する咳嗽・喀痰
炭疽（主に肺炭疽）	○	○	△	△	○	進行性の呼吸困難・胸痛・昏睡
天然痘	○			○		皮疹（顔面・四肢から）：紅斑→丘疹→水疱→膿疱→痂屑
鼻疽・類鼻疽	○					高熱・急激な肺炎症状・ショック
ブルセラ症	○	△	△		△	リンパ節腫大・肝脾腫・関節痛・泌尿器症状
ペスト（主に肺ペスト）	○	○	△			高熱・急激な肺炎症状・血痰・ショック
ボツリヌス症			○		△	消化管・泌尿器系障害・視覚異常・咽頭下垂・運動障害・呼吸筋麻痺
野兔病	○	○	△		○	急激な肺炎症状・リンパ節腫脹・眼・鼻・耳炎・意識障害

表2. バイオテロ関連疾患: 主要症状一覧

さらにバイオテロ疾患鑑別の補助となるフローチャートを作成するために、主にみられる症状をもとに以下の5つのグループに分類した(図2)。

1. 呼吸器症状が主体の場合
2. 消化器症状が主体の場合
3. 発疹がみられる場合
4. 神経症状がみられる場合
5. 出血がみられる場合

バイオテロの可能性を最初に疑う状況

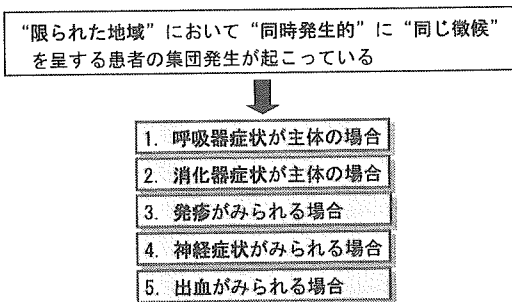


図2. バイオテロ疾患鑑別の補助となるフローチャート(全体)

そしてさらに、各グループ別に鑑別のポイントを追加して、各疾患にたどり着けるように工夫

を行った。たとえば呼吸器症状が主体の場合では、図3に示すように、まずはインフルエンザの可能性を否定して、その後で各種疾患の特徴を踏まえて、炭疽（肺炭疽）から多剤耐性結核まで、9つの疾患のどれかを選べるように工夫している。

なおこのホームページはすでに検索機能も持たせているが、残念ながら検索できるキーワードが少ないために、現時点で症状をもとに疾患名を絞り込むことは難しい。そこでキーワード検索機能をより充実させることとした。

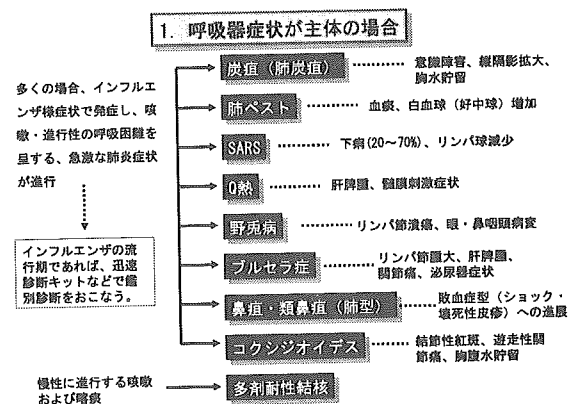


図3. バイオテロ疾患鑑別の補助となるフローチャート(呼吸器)

【課題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。

一部の臨床家を対象にこのマニュアルおよびホームページに関する意見を求めたところ、実際にどこに相談していいのか、その窓口となる連絡先を明示して欲しい、という要望が寄せられた。それを受けて、マニュアルでは実際に相談できる問い合わせ先を提示することを目標として、検討段階に入っている。具体的には臨床面の相談と検査の依頼の二つの窓口が想定されるため、候補として、厚労省結核感染症課、地研、地研の情報センター、国立感染症情報センターなどが候補に挙げられる。

【課題3】 画像を充実させ読みやすい内容にする。

本当に利用しやすい臨床のマニュアルにするためには単に文字だけを使用して解説するのではなく、画像を充実される必要がある。そのため各方面からの協力を仰いで、バイオテロに関連した画像をさらに多く集めて、説得力のある読みやすい内容にすることを決めた。

なおバイオテロ関連疾患は近年国内でほとんど発生したことがない感染症がほとんどであり、自然発生的にも稀な疾患であるために、臨床例の画像を入手するのはかなり困難である。そこで前回のマニュアルではインターネットを中心に検索し、入手できるものを取り入れてきたが、その後、このマニュアルをホームページを含めて広く公開するにあたっては、画像の著作権をクリアしなければいけないという課題に直面した。そこで株式会社協和企画の真野 薫氏に協力を依頼し、画像の著作権に関するアドバイスを求め、ワーキンググループ内で対策を検討した。その結果、従来の経過をもとに判断すると、米国CDCおよびWHOが提供している画像については、営利目的以外の使用であれば事前に著作権に関する承諾を得る必要はないであろう、という結論に達した。しかしそれ以外の画像については、どうしても必要な場合は直接権利者と交渉を行うか、他に画像を持っている方を捜して著作権をクリアしたものだけを掲載することとした。

D. 考 察

本マニュアルは当初、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が、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。

基本的には本マニュアルは印刷物として病院施設に配布することを想定しているが、それでも全施設に配布できるだけの数を揃えることは実際には困難であるため、ホームページによる公開が必要と考えられる。実際にこれまでの研究班でもホームページの立ち上げに向けて準備を進めていたことは事実であるが、少なくとも使いやすいホームページと言うには、改良すべき点が多いものであった。そこで今回はワーキンググループにてホームページに関しても問題点を洗い出し、より利用者にとって使いやすい内容になるように、各改善項目に対する担当者を決めて、改訂作業を継続している。

今後の予定としては、平成18年度にホームページの一般公開を行い、そこに寄せられた意見をもとに内容の修正を図り、さらにワーキンググループで引き続き内容のアップデートを行う。

さらに病院内のイントラネットからインターネットに直接接続できない環境があることも考慮して、WebのCD-ROMを作成することも計画の一部に入れている。

E. 結 論

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、ワーキンググループによる検討を行い、修正すべき点を明確にし、作業を行った。一般の臨床家にとって実際に利用しやすいマニュアルを目指して現在、作業を進めている段階である。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wachi K, Tateda K, Yamashiro Y, Takahashi M, Matsumoto T, Furuya N, Ishii Y, Akasaka Y, Yamaguchi K, Uchida K. Intern Med. 2005 44(12):1316-9.
- 2) Alba J, Ishii Y, Thomson K, Moland ES, Yamaguchi K. Kinetics study of KPC-3, a plasmid-encoded class A carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. Antimicrob Agents Chemother. 2005 49(11):4760-2.
- 3) Kimura S, Ishii Y, Yamaguchi K. Evaluation of dipicolinic acid for detection of IMP- or VIM-type metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Diagn Microbiol Infect Dis. 2005 53(3):241-4.
- 4) Shioto K, Ishii Y, Kimura S, Alba J, Watanabe K, Matsushima Y, Yamaguchi K. Metallo-beta-lactamase IMP-1 in *Providencia rettgeri* from two different hospitals in Japan. J Med Microbiol. 2005 54(Pt 11):1065-70.
- 5) Yamaguchi K, Ohno A; Levofloxacin Surveillance Group. Investigation of the susceptibility trends in Japan to fluoroquinolones and other antimicrobial agents in a nationwide collection of clinical isolates: a longitudinal analysis from 1994 to 2002. Diagn Microbiol Infect Dis. 2005 52(2):135-43.
- 6) Yoshizawa S, Tateda K, Matsumoto T, Gondaira F, Miyazaki S, Standiford TJ, Yamaguchi K. *Legionella pneumophila* evades gamma interferon-mediated growth suppression through interleukin-10 induction in bone marrow-derived macrophages. Infect Immun. 2005 73(5):2709-17.
- 7) Ishii Y, Alba J, Kimura S, Shioto K, Yamaguchi K. Evaluation of antimicrobial activity of beta-lactam antibiotics using Etest against clinical isolates from 60 medical centres in Japan. Int J Antimicrob Agents. 2005 25(4):296-301.
- 8) Miura T, Kimura M, Koibuchi T, Endo T, Nakamura H, Odawara T, Wataya Y, Nakamura T, Iwamoto A. Clinical characteristics of imported malaria in Japan: analysis at a referral hospital. Am J Trop Med Hyg. 2005 73(3):599-603.
- 9) Matsumura T, Fujii T, Miura T, Koibuchi T, Endo T, Nakamura H, Odawara T, Iwamoto A, Nakamura T. Questionnaire-based analysis of mefloquine chemoprophylaxis for malaria in a Japanese population. J Infect Chemother. 2005 11(4):196-8.
- 10) Miyazaki T, Miyazaki Y, Izumikawa K, Kakeya H, Miyakoshi S, Bennett JE, Kohno S. Fluconazole treatment is effective against a *Candida albicans* erg3/erg3 mutant in vivo despite in vitro resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2006 50(2):580-6.
- 11) Fukuda Y, Yanagihara K, Ohno H, Higashiyama Y, Miyazaki Y, Tsukamoto K, Hirakata Y, Tomono K, Mizuta Y, Tashiro T, Kohno S. In vivo efficacies and pharmacokinetics of DX-619, a novel des-fluoro(6) quinolone, against *Streptococcus pneumoniae* in a mouse lung infection model. Antimicrob Agents Chemother. 2006 50(1):121-5.
- 12) Kobayashi T, Miyazaki Y, Yanagihara K, Kakeya H, Ohno H, Higashiyama Y, Hirakata Y, Mizuta Y, Tomono K, Tashiro T, Kohno S. A probable case of aspiration pneumonia caused by *Candida glabrata* in a non-neutropenic patient with candidemia. Intern Med. 2005 44(11):1191-4.
- 13) Yanagihara K, Tashiro M, Fukuda Y, Ohno H, Higashiyama Y, Miyazaki Y, Hirakata Y, Tomono K, Mizuta Y, Tsukamoto K, Kohno S. Effects of short interfering RNA against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* coagulase in vitro and in vivo. J Antimicrob Chemother. 2006 57(1):122-6. Epub 2005 Dec 12.
- 14) Hirakata Y, Matsuda J, Nakano M, Hayashi T, Tozaka S, Takezawa T, Takahashi H, Higashiyama Y, Miyazaki Y, Kamihira S, Kohno S. Evaluation of the BD Phoenix Automated Microbiology System SMIC/ID panel for identification and antimicrobial susceptibility testing of *Streptococcus* spp. Diagn Microbiol Infect Dis. 2005 53(3):169-73.

- 15) Matsuse H, Kondo Y, Saeki S, Nakata H, Fukushima C, Mizuta Y, Kohno S. Naturally occurring parainfluenza virus 3 infection in adults induces mild exacerbation of asthma associated with increased sputum concentrations of cysteinyl leukotrienes. *Int Arch Allergy Immunol.* 2005 138(3):267-72. Epub 2005 Oct 7.
- 16) Hirakata Y, Matsuda J, Miyazaki Y, Kamihira S, Kawakami S, Miyazawa Y, Ono Y, Nakazaki N, Hirata Y, Inoue M, Turnidge JD, Bell JM, Jones RN, Kohno S; SENTRY Asia-Pacific Participants. Regional variation in the prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region (SENTRY 1998-2002). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005 52(4):323-9.
- 17) Ishii H, Mukae H, Kakugawa T, Yoshioka S, Sakamoto N, Inoue Y, Kohno S. A rare case of dilatation of pulmonary veins and pulmonary emphysema in both lower lobes. *Respirology.* 2005 10(4):548-52.

2. 学会発表
発表なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
特許取得なし

2. 実用新案登録
登録なし

3. その他
なし

10. 評価による技術的基盤整備に関する研究 (地域および病院の基盤整備評価ツールの開発)

分担研究者 山本 保博 (日本医科大学高度救命救急センター)
研究協力者 野口 宏 (愛知医科大学救急医学教室)
後藤 謙和 (近畿厚生局)
近藤 久禎 (厚生労働省医政局指導課)
牧野 俊郎、浅野 悦洋 (成田国際空港クリニック)
登坂 直規 (国立感染症研究所感染症情報センターFETP)
川井 真、小井土雄一、久志本成樹、小川太志、島田 靖
(日本医科大学救命救急センター)、

研究要旨 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、治療に関する研究として評価による技術的基盤整備は、重要である。特に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。

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地域での病院は、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、伝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、十分な人口呼吸器装置の備蓄 (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。

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を作成することにより、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。

A. 研究目的

はじめに

生物テロは、従来の災害とは異なり、犠牲者の除染を行う、医療従事者の二次感染を予防する、伝染を封じ込めるためにその対応が特殊で

あることが特徴的である。

このような特殊な災害に対して準備を行い、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重要となる。

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。

武力攻撃事態等における国民の保護のための措置に関する法律

(感染症等の指定等の特例)

第二百一十一条 厚生労働大臣は、武力攻撃事態等において、武力攻撃に伴って既に知られている感染性の疾病(一類感染症(感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律(平成十年法律第百十四号)第六条第二項の一類感染症をいう。)を除く。)が発生し、又は発生するおそれがある場合において、当該疾病について、同法第三章から第六章までの規定の全部又は一部を準用しなければ国民の生命及び健康に重大な影響を与えるおそれがあると認めるときは、同条第七項の規定にかかわらず、当該疾病を同項の指定感染症として指定することができる。この場合における同法第七条の規定の適用については、同条第一項及び第二項中「政令で定める期間」とあるのは「厚生労働大臣の定める期間」と、同条第一項中「政令で定めるところにより」とあるのは「厚生労働大臣の定めるところにより」と、同条第二項中「前項の政令で定められた期間」とあるのは「前項の厚生労働大臣の定める期間」と、「当該政令で定められた疾病」とあるのは「武力攻撃事態等における国民の保護のための措置に関する法律第二百一十一条第一項の規定により厚生労働大臣が定めた疾病」と、「同項の政令により」とあるのは「前項の厚生労働大臣の定めるところにより」とする。

2 厚生労働大臣は、武力攻撃事態等において、武力攻撃に伴って検疫法(昭和二十六年法律第二百一十一号)第二条の検疫感染症以外の感染性の疾病(同法第三十四条の二第一項の新感染症を除く。)が発生し、又は発生するおそれがある場合において、当該疾病について、検疫を行わなければその病原体が国内に侵入し国民の生命及び健康に重大な影響を与えるおそれがあると認めるときは、同法第三十四条の規定にかかわらず、当該疾病を感染症の種類として指定し、同法第二条の二、第二章及び第四章(第三十四条の二から第四十条までを除く。)の規定のうち厚生労働大臣が定めるものを適用することができる。この場合においては、同法第十六条第二項の規定にかかわらず、厚生労働大臣は、当該感染症の潜伏期間を考慮して、同条第一項の停留の期間を定めることができる。

3 厚生労働大臣は、武力攻撃事態等において、武力攻撃に伴って感染性の疾病(予防接種法(昭和二十三年法律第六十八号)第二条第二項の一類疾病(以下この項において「一類疾病」という。))及び同条第三項の二類疾病を除く。)が発生し、又は発生するおそれがある場合において、その発生及びま

ん延を予防するため特に予防接種を行う必要があると認めるときは、同条第二項第八号の規定にかかわらず、当該疾病を一類疾病として指定することができる。

(埋葬及び火葬の特例)

第二百二十二条 厚生労働大臣は、大規模な武力攻撃災害の発生により埋葬又は火葬を円滑に行うことが困難となった場合において、公衆衛生上の危害の発生を防止するため緊急の必要があると認めるときは、政令で定めるところにより、厚生労働大臣の定める期間に限り、墓地、埋葬等に関する法律(昭和二十三年法律第四十八号)第五条及び第十四条に規定する手続の特例を定めることができる。

(保健衛生の確保への協力)

第二百二十三条 地方公共団体の長又はその職員は、武力攻撃災害の発生により当該地方公共団体の区域内における住民の健康の保持又は環境衛生の確保に関する措置を講ずるため緊急の必要があると認めるときは、当該地方公共団体の区域内の住民に対し、その実施に必要な援助について協力を要請することができる。

2 前項の場合において、地方公共団体の長及びその職員は、その要請を受けて住民の健康の保持又は環境衛生の確保に関する措置の実施に必要な援助について協力をする者の安全の確保に十分に配慮しなければならない。

厚生労働省国民保護計画

第3節NBC攻撃による災害への対処

1 共通事項

1) 平素からの備え

○ 厚生労働省関係部局は、保健所、地方衛生研究所の職員に対してNBC攻撃による災害に係る研修の推進を図る。

2) 武力攻撃災害発生時の措置

○ 厚生労働省健康局は、NBC攻撃により生活の用に供する水が汚染された場合には、必要に応じ、国民保護法第108条の規定に基づき、その水の管理者に対し、給水の制限等の措置を講ずるよう命じるものとする。

○ 厚生労働省医薬食品局食品安全部は、関係省庁と連携しつつ、必要に応じ、放射性物質等による食品の汚染状況の調査、放射性物質等により汚染された食品の出荷規制又は廃棄等について、関係機関に要請するものとする。

3) 生物剤による攻撃の場合

○ 生物剤は、人に知られることなく散布することが可能であり、また発症するまでの潜伏期

間中に感染者が移動することにより、生物剤が散布されたと判明したときには既に被害が拡大している可能性がある。

○ 生物剤による被害は、使用される生物剤の特性、特にヒトからヒトへの感染力、ワクチンの有無、既に知られている生物剤か否か等により被害の範囲が異なるが、ヒトを媒体とする生物剤による攻撃が行われた場合には、二次感染により被害が拡大することが考えられる。

したがって、一元的情報収集、データ解析等サーベイランス（疾病監視）により、感染源及び汚染地域を特定し、感染源となった病原体の特性に応じた、予防、治療及びまん延防止を行うことが重要である。

○ 厚生労働省健康局は、明らかに異状な感染症の発生動向を認めた場合には、速やかに関係省庁等に連絡するとともに、感染の原因が特定された場合は関係機関と連携して治療関連情報等を提供するものとする。

○ 厚生労働省健康局は、情報収集、データ解析、疫学調査、関係者へのデータ提供及び公開を行うサーベイランス（疾病監視）の結果等により、汚染地域の範囲及び感染源を特定し、又は都道府県知事にこれらの実施を指示するものとする。

○ 厚生労働省健康局は、関係機関から提供のあった情報の集約及び分析を行い、その結果を被災都道府県に還元し、早期解決を促すとともに、必要に応じて広域的な保健医療関係者の派遣調整等を行い、事態の沈静化を図るように努める。

○ 厚生労働省健康局は、生物剤による災害が発生した場合、当該生物剤に関する迅速な情報収集、被災者の救助、医療体制の確保、迅速な原因物質の特定、汚染地域の範囲の特定及び除染の実施等汚染の拡大の防止のために必要な措置を講ずるとともに、国民の生命、身体又は財産を保護するため緊急の必要があると認めるときは、関係都道府県知事に協力の要請を行うものとする。

○ 厚生労働省健康局は、生物剤による攻撃が発生し、又は発生するおそれがあるときは、感染症の予防上留意すべき事項を報道機関等を通じて国民に周知させるよう都道府県等の関係機関を指導するものとする。

○ 生物剤による攻撃の場合には、厚生労働省健康局は、ワクチンの接種に関する情報についても広報し、痘そうが使用され、又は使用されるおそれがある場合には、必要に応じて、予防接種法に基づき、都道府県知事に臨時の予防接種を指示するものとする。

災害準備発展ための継続サイクル

- 災害計画のために専門的なチームを招集する
 - 現時点における災害に対する資源が、十分であるか不足の程度を評価する
 - 災害計画マニュアルを詳細に作成する
 - 災害に対する教育と反復練習を行う
 - 知識、技術と資源の適切性を評価する
 - 客観的なデータに基づく計画の修正
 - 必要に応じて弱点部門を強化するために、教育とトレーニングを修正する
- これらのステップを繰り返して、災害準備を発展させる

地域全体における生物テロ災害準備の評価

地域の基盤整備の評価

評価項目：

- 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) 地域での病院は、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、伝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、十分な人口呼吸器装置の備蓄（10台以上）とその他の必要物品の準備ができていますか

（資料 Ready or Not? Protecting the Public's Health from Disease, Disasters, and Bioterrorism, 2005:<http://healthyamericans.org/reports/bioterror05/>）

災害対応の基礎基盤における重要な要素

- 指揮命令系統は、は全ての災害対応従事者の役割と責任を定める。
- 包括的統合を、地域において病院および関係機関と構築しなければならない
- 災害時に必要な施設、患者搬送および資源の供給システムの構築
- 災害対応従事者の安全確保
- 十分な治療体制
- 十分な人的確保
- 情報提供と共有

病院における生物テロ災害準備の評価

- 地域との連携
- 生物テロ対応の行動マニュアルの作成
- 教育と反復練習
- 患者のトリアージと診断治療
- 感染予防、除染、蔓延防止と隔離
- 感染拡大のサーベイランス
- 災害時における、治療能力の拡大
- 感染に対する検査機関の充実
- 医薬品とワクチンの備蓄および供給
- 患者および医療従事者の安全と精神的支援
- 情報公開、共有

地域における生物テロに対する準備と対応を評価することは、今後のより良い基盤整備に役立つと考える

地域の基盤整備の評価、病院の基盤整備評価を行う

B. 研究方法

1. 地域の基盤整備の評価

評価項目：

- 1) 地域で、ワクチン、解毒剤と医薬品を提供するために、準備ができていますか
- 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ができていますか
- 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) 地域での病院は、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ますか
- 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、伝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、十分な人口呼吸器装置の備蓄（10台以上）とその他の必要物品の準備ができていますか

（資料 Ready or Not? Protecting the Public's Health from Disease, Disasters, and Bioterrorism, 2005:<http://healthyamericans.org/reports/bioterror05/>）

2. 病院

[指定医療機関の確保]

- 1) 都道府県に対して、フェーズ4、5で新型インフルエンザ患者（疑い患者を含む）の診療・治療にあたる指定医療機関等の整備を進めるよう要請する。（厚生労働省）