

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18年度 総括・分担研究報告書

平成19年3月

主任研究者

佐多 徹太郎

(国立感染症研究所)

平成 18 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 員 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 1 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 1 部	室 長
遠藤 卓郎	国立感染症研究所 寄生動物部	部 長
高橋 英之	国立感染症研究所 細菌第 1 部	主任研究官
高橋 元秀	国立感染症研究所 細菌第 2 部	室 長
牧野 壮一	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 感染症分野	教 授
松本 哲哉	東京医科大学 微生物学講座	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	教 授
出口 弘	東京工業大学大学院 総合理工学研究科 知能システム科学	教 授
金谷 泰宏	防衛医科大学校・防衛医学研究センター	助教授
大日 康史	国立感染症研究所 感染症情報センター	主任研究官

## 目 次

I. 総括研究報告書（平成 18 年度）	
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	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. 天然痘およびウイルス出血熱診断法の確立	11
分担研究者：森川 茂（国立感染症研究所・ウイルス第 1 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 熱のスクリーニングに用いる血清診断法の検討	21
分担研究者：岸本 壽男（国立感染症研究所・ウイルス第 1 部）	
5. 社会不安を誘導することを目的とした故意の汚染に使用される 可能性のある原虫類対策に関する研究	25
分担研究者：遠藤 卓郎（国立感染症研究所・寄生動物部）	
6. サイクリングプローブ法を用いたニューキノロン耐性 チフス菌・パラチフス A 菌の迅速診断法の開発	31
分担研究者：高橋 英之（国立感染症研究所・細菌第 1 部）	
7. 細菌毒素クロストリジウム属菌、ブドウ球菌、VERO 毒素	35
分担研究者：高橋 元秀（国立感染症研究所・細菌第 2 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 細菌の検出および診断法	39
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）	
9. バイオテロ関連感染症の臨床診断と治療	49
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・感染症分野）	
分担研究者：中村 修（慶応義塾大学・環境情報学部）	
10. バイオテロ関連感染症の臨床診断と治療	53
分担研究者：松本 哲哉（東京医科大学・微生物学講座）	
11. 評価による技術的基盤整備に関する研究	57
分担研究者：山本 保博（日本医科大学）	
12. エージェントベースモデルを用いた感染シミュレーションの作製と 被害予測システムの開発	59
分担研究者：出口 弘（東京工業大学大学院・総合理工学研究科・知能システム科学）	
13. 天然痘ウイルスを用いたテロに関するシナリオの作成について	69
分担研究者：金谷 泰宏（防衛医科大学校・防衛医学研究センター）	
14. 数理モデルを用いた感染拡大予測と感染制御の効果判定	73
分担研究者：大日 康史（国立感染症研究所感染症情報センター）	
III. 研究成果に関する刊行一覧表	85

# I. 総括研究報告書

平成18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で特異的な診断法を開発整備し、一次対応者への情報提供を目的とした臨床診断・検査等の対応支援ホームページの作製、天然痘対応指針の改定、そしてさまざまなシナリオを用いたコンピューターシミュレーションによる被害予測および対応評価を可能にし、バイオテロ対策に役立てることを目的とした。バイオテロ病原体等の迅速検査法の開発が進められ、遺伝子診断法のみならず、あらたな抗原や抗体検査法が開発されつつある。バイオテロ疾患の情報提供手段としてマニュアルのホームページがほぼ完成し、より拡大した形で改善が検討できるようになった。また、シナリオの検討とともに、コンピューターシミュレーション法の開発が行われ、被害予測が可能となり、さらに対応策の評価が可能となりつつある。これらの結果により、バイオテロ対策として整備が進んだ。

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科学部 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）  
高橋英之（国立感染症研究所細菌1部 主任研究官）  
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）  
松本哲哉（東京医科大学微生物学講座 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）  
出口 弘（東京工業大学大学院総合理工学研究科知能システム科学 教授）  
金谷泰宏（防衛医科大学校防衛医学研究センター 助教授）  
大日康史（国立感染症研究所感染症情報センター 主任研究官）

### 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、アメーバなどがあり、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、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、1) 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、2) 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、自治体、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。本年度から、3) 天然痘対応指針の改訂を開始し、また、4) シナリオにもとづいた感染の拡大をコンピュータでシミュレーションし被害予測を行う。適切な対応がとられた場合の被害の軽減についてもシミュレーションし、対応策が検討できるようにする。これらによって、事件が発生した場合の緊急時対応が可能となり、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、1) 緊急時対応可能な迅速実験室診断法を確立する。a) 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、Realtime 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。b) 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。c) 原虫検査: *Naegleria fowleri* の感染組織での迅速検出法の実現を行い、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。さらにクリプトスポリジウムによる水系感染に対し、大量の水から効果的に検査ができるようにする。d) 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、LAMP法を作製する。そして免疫学的診断法としてELISA法を開発する。細菌感染症診断の網羅的スクリーニングシステムの開発を行う。e) 毒素検査: *Staphylococcus aureus* の産生するエンテロトキシンBおよび *C. septicum* α毒素の迅速検出法の検討をおこなう。2) 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。3) 天然痘対応マニュアル改訂: 平成16年度の天然痘対応指針(第5版)の改訂をおこなう。4) シミュレーション: シミュレーションモデルを構築してコンピュータを用いて感染被害を予測し、予防措置に役立てる。(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

1) 緊急時対応可能な迅速実験室診断法の確立: 生物テロに使用されるウイルスを検出するには、スクリーニングとして網羅的な検索が可能でかつ定量的な方法がのぞましい。この目的にあう Realtime PCR 法の開発を行った。感染症法が改正され 26 種の 1 種から 4 種病原体が記載されたので、これらとともに、鑑別すべきウイルスについても同時に検出できるようにした。いずれも陽性コントロールプラスミッドをもちいて 10 コピーが検出でき、しかも他のウイルスとの交差は認められなかった (佐多)。天然痘ウイルスと他のオルソポックスウイルスの鑑別、および大痘瘡と小痘瘡ウイルスの鑑別するための LC-PCR 法を開発し、それぞれ特異的かつ 1-10 コピー程度に検出できた。また GHSAG のワークショップとして天然痘について米国 CDC で行われ、高感度でかつ特異的に検出できることが判明した (森川)。ニパウイルス N および P タンパク抗体を DNA 免疫により作成した。また N タンパク発現細胞を樹立し蛍光抗体法が可能となった (山田)。Q 熱のスクリーニングとして血清診断が行われているが、非特異反応が問題となっていた。今回非特異反応除去剤(OYC 希釈液)を用いることでより正確な診断が可能となった (岸本)。原虫・寄生虫を用いた生物テロ対策として、*Naegleria fowleri*, *B. mandrillaris* および *Acanthamoeba* spp. といった 3 種類のアメーバを対象とした in situ hybridization 法を確立し、プローブの供給体制を整えた。また *Cryptosporidium parvum* は水道あるいは親水施設を対象とした故意の汚染に用いられる可能性のある原虫である。本原虫の検出は比較的多量の水の濃縮と迅速検出法が必要なため、可溶性の粒子を用いたケーキろ過濃縮と LAMP 法 (遺伝子検出法) によるモニタリングシステムを提案した (遠藤)。バイオテロで使用される可能性が考えられるチフス菌・パラチフス A 菌のニューキノロン耐性を

点変異が検出できるサイクリングプローブ法で迅速に検出する方法を確立した。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株の DNA gyrae の遺伝子 *gyrA* の変異 5 種をサイクリングプローブ法により、ニューキノロン感受性 (野生型 *gyrA*) のものと比較して、優位に区別して検出することができた (高橋英)。*Staphylococcus aureus* enterotoxin B (SEB) と *C. septicum* α 毒素 (AT) の早期検出系開発を目的として、昨年度精製毒素と抗体を作製したので、本年度はサンドイッチ ELISA 法で条件検討した。検出感度は SEB で 200ng/ml、AT で 100ng/ml であり、イムノクロマト法による検出系を作製することが可能であることがわかった。また昨年度に開発作製したボツリヌス毒素検出用ラテックス凝集反応キットが迅速かつ簡易に陽性結果がえられたため、追加製造を開始した (高橋元)。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ている。炭疽菌およびブルセラ属菌を検出する LAMP 法を開発し、高感度でしかも 30 分で検出できた。炭疽菌の強毒、莢膜形成や毒素産生形質株および類縁菌について特異性および感度は良好であった。ブルセラ属菌では PCR 法よりも特異的で感度も高いことが判明した。野兔病については、変異の少ない遺伝子産物を融合蛋白として発現することに成功した。類鼻疽菌および鼻疽菌の血清抗体を luminex 法で多種類の抗体をスクリーニングする方法を開発した (牧野)。

2) 臨床対応の検討: 「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、インターネット上で検索し、情報を得ることが可能なホームページを作製している。本年度は、統一的に記載を改善し、内容をアップデートした。画像は有力な情報であるので、著作権問題をクリアし、さらに倍増させた。ホームページの構成や記載内容については拡大検討会を開催し、多くの方から改善点等をいただき、改訂を行った。さらに今後の維持管理についても検討を行った (岩本、松本、中村)。

3) 天然痘対応マニュアル改訂: 天然痘対応指



針の改定にむけて基本方針を策定した(山本)。  
4) シミュレーション: 生物テロの被害予測を種々のパラメーターを設定しコンピュータシミュレーションを行うシナリオを作製した(金谷)。エージェント(出口)およびインディビジュアルベースモデル(大日)を用いてプログラムを作成し、経時的な被害をシミュレーション予測し、かつ対策を評価することが可能となった。

#### 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 Realtime PCR 法が開発できた。今後は病原体や臨床検体で感度や特異性を検証する。簡易なキットを作成し、地研等へ配付を考えている。未知の病原体やプライマー配列に変異が導入された場合については検出できないため、プライマーを複数準備する必要がある。今回開発した痘瘡ウイルスの LC-PCR 系は高感度で特異性が高かったため、種々の応用が可能である。また特異性が高いため、多くの近縁ウイルスから痘瘡ウイルスを同定できると考えられた。ニパウイルスに関する診断系は抗体や抗原はすべて海外から分与されたもので、BSL-4 実験室のない国内で調整を可能としないといけない。今回作成できた抗体は反応性や特異性がすぐれ陽性対照血清として十分使用可能である。N 蛋白発現細胞については検証が必要である。Q 熱の血清診断として樹立した今回の蛍光抗体法は利便性があるが、これまで本邦独特の非典型 Q 熱例について再検討が必要と考えられ、今後データの蓄積が必要である。原虫の *in situ hybridization* 法は蛍光抗体法と比較して特異性にすぐれているので、技術の普及が必要である。また、クリプトスポリジウムについてはモニタリングが重要と考えられ、今回の濃縮法と LAMP 法を組み合わせた方法が役立つと考えられる。耐性菌の迅速なスクリーニング法は従来と比較して非常に短時間(約 1 時間)で検出可能なので緊急時や治療の際の適切な抗生物質の選択にも貢献できる。SEB や AT の検出系としてイムノクロマト法開発の基礎的条件を得た。感度はほぼ致死量の毒素の検出が可能で

あるものの、今後感度を高めるための改善も必要である。また、ボツリヌス毒素の検出系はマウス試験の前のスクリーニングとして有用と考えられた。バイオテロ関連細菌病原体の検出方法には種々の方法を準備しておくことに意義がある。その点、迅速遺伝子検出法ほか抗体検出法も有用であるため、開発を進めている。

生物テロ対応マニュアルは第一線の医師のみならず、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る。一般公開をめざして問題点の克服にほぼめどがつき、およその準備が終了した。まず限定的に公開し、さらに改訂と充実を行う。

天然痘対応指針の改訂をめざして研究協力組織を作り、基本方針の策定をおこなった。標準的モデルが提示できる可能性があることがわかった。今後は演習や訓練で精緻化し、研修に使う資料の作成も行う。

生物テロの発生から終息するまでを 5 段階に分類し、日数や対策要素を加えることでコンピュータシミュレーションに適合し、かつ政策評価に重点を置いた複数のシナリオを作製できた。1 万人規模の都市を想定したが、実態とさらに合わせる必要がある。膨大なパラメータを検討し、参加型のプログラミングが可能システムとして、さらに発展されれば、新たなシミュレーション疫学的手法が開発できる可能性が考えられた。また、構築できた感染症モデルは、今後、保健所レベルでの患者発生予測や対応能力を評価できると考えられ、新たなガイドラインの策定のツールとなると期待される。

#### E. 結論

緊急時対応可能な迅速実験室診断法の確立をめざし、網羅的ウイルス検出 Realtime PCR 法が樹立され、ほか天然痘の新たな LC-PCR 法、ニパウイルスの抗原や抗体作製、Q 熱の蛍光抗体法、アメーバやクリプトスポリジウムの検出法、耐性菌の迅速診断法、SEB や AT の検出系、炭疽、ブルセラ、野兔病、鼻疽、類鼻疽の遺伝子および抗体検出法が行われ、実用的レベルに充実してきた。また、バイオテロ発生時の一次対応支援となるバイオテロ対策マニュアルの

ホームページの公開に向けて準備が整いつつある。天然痘対応指針の改訂のための基本方針が確定した。また、シナリオとそれをもとにシミュレーションによる被害予測および対策評価が可能となりつつある。

#### 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

江崎孝行：特願 2006-272329 DnaJ 遺伝子を使った細菌の検出・同定法

##### 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、加納基史（感染研・感染病理部）  
本藤 良（日本獣医生命科学大学）

研究要旨 生物テロに使用されるウイルスをスクリーニングするためのシステムとして、多くのウイルスを同時に検出可能な網羅的定量的 PCR 法の開発を行った。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あるウイルス、および、鑑別診断として必要なウイルスを網羅的に検出することができるよう、各ウイルスに対するプローブ、プライマーを組み合わせ、定量的 PCR キットを作成した。特異性は各ウイルスの陽性コントロールサンプルを反応させ、非特異反応が検出されないことを確認した。これにより、生物兵器になりうる既知のウイルスを高感度に検出するスクリーニング系が確立したものと考えている。今後、臨床検体などを用い、このキットの反応性の確認を行うとともに改変ウイルスや未知の病原体の検出法について検討していく。

## A. 研究目的

ウイルスの検出法として、polymerase chain reaction (PCR) は最も感度が高く、特異性の高い方法である。生物テロの現場で要求されるウイルス検査法の要件として 1) 迅速に結果が得られ、生物テロの緊急性に対応しうるものであること、2) 感度が高く、少量のサンプルで正確な結果が得られること、3) 費用や設備がかからず、ある程度の設備を備えた施設であれば実施可能であること、などが挙げられる。ウイルス疾患の症状はウイルスごとに特徴があり、臨床症状などからある程度、原因ウイルスを推察することが可能であるが、その一方で、近似した症状を持つウイルス疾患も多く、鑑別が困難なことも多い。また、ウイルスが生物テロに用いられた場合には、遺伝子操作によりウイルスが改変され、改変される前のウイルスとは異なる症状を起すことも予想される。こうしたことから、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。さらに、ウイルス感染症は病期により、体内でウイルスコピー数が増減し、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、定量できるような網羅的定量的 PCR 法の開発を目指し、昨年度より、定量的 PCR の陽性コントロールプラスミドを作成する技術や、バイオテロに使用される可能性のあるウイルスを検出するための定量的 PCR の基盤的な技術を確認してきた。今年度はその技術を用い、バイオテロに使用される可能性のあるウイルスの他に、鑑別診断に必要なウイルスを加え、さらに多くの種類のウイルスを標的に PCR の系を立ち上げ、網羅するウイルスの数を増やすことを試みた。

## 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、新感染症法に記載されている第 1 種病原体のうち、エボラ出血熱、クリミア・コンゴ出血熱、痘そう、マールブルグ病、ラッサ熱、および第 2 種病原体の重症急性呼吸

器症候群 (SARS)、および第 3-4 種病原体に挙げられたウイルス 26 種類を選択した。(表参照) 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：今年度までに定量的 PCR が確立された標的ウイルス一覧 (感染症法の分類による。)

- (1種病原体等)
  - 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
- (2種病原体等)
  - SARS コロナウイルス
- (3種病原体等)
  - 狂犬病ウイルス
  - サル痘ウイルス
  - 腎症候性出血熱ウイルス
  - 西部馬脳炎ウイルス
  - ダニ媒介性脳炎ウイルス群
  - 東部馬脳炎ウイルス
  - 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
  - ヘンドラウイルス
  - リフトバレーウイルス
- (4種病原体等)
  - インフルエンザウイルス
  - 黄熱ウイルス
  - 鳥インフルエンザウイルス
  - ポリオウイルス
  - ウエストナイルウイルス
  - デングウイルス
  - 日本脳炎ウイルス
- (鑑別診断として検索するウイルス)
  - 肝炎ウイルス群
  - エンテロウイルス
  - ヘルペスウイルス群
  - パルボウイルス
  - その他

## 2) 定量的 PCR

陽性コントロールプラスミドの作成法や定量的 PCR の詳細は前年度の報告書に記載済みである。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 (アプライド・バイオシステムズ社)を用いて、プライマー・プローブを選定した。Taqman Probe (FAM-TAMRA 標識)を用い、定量的 PCR を施行した (ABI Prism 7900HT, アプライド・バイオシステムズ社)。PCR の内部標準としてヒト GAPDH 遺伝子の増幅を同時に行った。

## C. 研究結果

昨年度に確立した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、痘瘡ウイルスなどの第 1-2 種病原体に加え、今年度は第 3 種、4 種病原体である、腎症候性出血熱ウイルス、馬脳炎ウイルス群、ダニ媒介性脳炎ウイルス、ヘンドラウイルス、サル痘ウイルスなどにつき、定量的 PCR を確立した。いずれも陽性コントロールプラスミドを  $10^8$  コピーから 10 コピーまで段階希釈した溶液から標準曲線を作成し、10 コピーを安定的に検出することを確認した。さらに、鑑別診断に必要なウイルスとして、コロナウイルス、肝炎ウイルス、パルボウイルスなどについても同様に定量的 PCR を立ち上げた。

特異性の検定法として、各ウイルスの感染細胞または、ウイルス液そのものから核酸を抽出し、これを各プローブ・プライマーセットに反応させたところ、それぞれ該当するウイルスのプローブ・プライマーセットでのみ反応し、他のセットでは検出されないことを確認した。また、天然痘ウイルスをはじめとする日本で入手困難なウイルスについては部分遺伝子をクローニングしたプラスミドを用いてこれをコントロールとした。いずれの検定においても各プローブ、プライマーセットがそれぞれのウイルスを特異的に検出すること、および、他のウイルスとは反応しないことを確認した。

#### D. 考 察

定量的 PCR は高感度な核酸検出系として定着しつつあり、地方衛生研究所をはじめ、多くの研究施設にすでに導入されている。本研究で開発したスクリーニング系はこうした現場に近い研究機関で、迅速、かつ、正確にウイルス検出ができることを目的に開発を進めてきた。これまでに、感染症法の第 1 種から第 4 種病原体として記載されているすべてのウイルス 26 種類について、定量的 PCR が確立され、バイオテロに使用されるおそれのある既知のウイルスをスクリーニングする網羅的定量的 PCR の試作キットは完成したものと考えている。

各ウイルスのウイルス液、または感染細胞の核酸をコントロールにした実験では非特異的な反応は見られず、いずれのプロープ・プライマーセットも標的ウイルスを特異的に検出している。しかし、天然痘などの一部のウイルスは国際法上、所持が禁じられており、これらのウイルスは実際のウイルスを使った検定ができない。こうしたウイルスについては、本研究ではウイルスの遺伝子断片を含んだプラスミドで代用したが、いずれは何らかの方法でウイルスそのものを陽性コントロールとして検出、確認する必要がある。

本研究で確立した網羅的ウイルス検出系は迅速でかつ高感度、しかも、類似するウイルス疾患を短時間で鑑別できる点で、実際のバイオテロの現場で大変有効なツールとなりうるものと期待している。もちろん、各ウイルスの確定診断には、PCR 増幅後、PCR 産物の核酸配列やウイルス分離が必要であるが、スクリーニングの系としては十分な確度と迅速性を備えているものと考え。問題は未知のウイルスや標的部位に改変が加えられたウイルスについてはこのスクリーニングでは検出することができない点である。実際のバイオテロではウイルスに改変が施されている可能性もあり、未知の病原体を含めた、改変ウイルスを検出するための改良が今後望まれるところである。また、本スクリーニングシステムは最終的には各地方衛生研究所で使用できるよう、簡易型のキットを作成する予定であるが、質的コントロールをどこまでやるか、

最適な輸送法や保存法は何か、長期保存によるプロープ、プライマーの劣化がないか、などを今後、検討する必要がある。

(謝辞)

下記の先生方から各ウイルスの陽性コントロールを提供いただきました。深謝いたします。

国立感染症研究所：神田忠仁、森清一郎（ゲノムセンター）、小田切孝人、加藤篤、駒瀬勝啓、田口文広、沼崎 啓（ウイルス 3 部）、森川 茂、高崎智彦、井上直樹（ウイルス 1 部）、鈴木哲朗、武田直和、米山徹夫、清水博之、白土東子（ウイルス 2 部）、井上 智（獣医科学部）、小島朝人、高橋秀宗、徳永研三、田中道子、後藤希代子、尾崎泰子、松倉俊彦（感染病理部）

#### E. 結 論

生物テロに使用される可能性のあるウイルスをスクリーニングするシステムとしてウイルスの網羅的定量的 PCR 法を開発した。各ウイルスの感染細胞およびウイルス液をコントロールに置いた実験ではそれぞれのウイルスを特異的に、かつ、高感度に検出することがわかった。今後、さらに実際の臨床サンプルをテストし、臨床応用がどこまで可能かを検討する。

#### 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

- 1) 加納基史、佐多徹太郎、片野晴隆：Real-time PCR を用いたウイルスの網羅的検出法の確立。第 54 回日本ウイルス学会学術集会（名古屋）2006.11.

## 2. 天然痘およびウイルス出血熱診断法の確立

### —Light Cycler PCR 法の開発と評価—

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 福士秀悦、水谷哲也、西條政幸（感染研・ウイルス第1部）

研究要旨 近年、天然痘（痘瘡）ウイルスによるバイオテロリズムの危険性が指摘されている。また、アフリカ大陸に限局していたサル痘が、2003年に米国で流行した。そのため天然痘やサル痘の迅速診断の必要性が高まっている。天然痘やサル痘ウイルスは、他のオルソポックスウイルスと抗原的には識別できず、既種痘者の場合、抗ワクチニア抗体があるため血清診断は難しい。このため、診断はウイルス種の同定が必要になる。昨年度は、サル痘ウイルス特異的 Light Cycler (LC)-PCR をサル痘ウイルス感染サル検体を用いて評価したが、今年度は、天然痘の原因ウイルス（痘瘡ウイルス）と他のオルソポックスウイルスとの鑑別 LC-PCR 及び、強毒な大痘瘡ウイルスとやや弱毒な小痘瘡ウイルスの鑑別 LC-PCR を開発した。これらの痘瘡ウイルス以外との反応性については予め評価した上で、米国 CDC において痘瘡ウイルス DNA の検出感度を検討した。その結果、1) オルソポックスウイルス共通 LC-PCR は、痘瘡ウイルスを含めて高感度に検出できた。2) 痘瘡ウイルス特異的 LC-PCR は、他のポックスウイルスと交差せず特異的かつ高感度に痘瘡ウイルスを検出できた。3) 大痘瘡・小痘瘡鑑別 LC-PCR は、高感度かつ特異的に両者を鑑別できた。

#### 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。天然痘の病原ウイルスである痘瘡ウイルス遺伝子を特異的に増幅・検出する real-time LightCycler polymerase chain reaction（以下、LC-PCR）法をこれまでに開発、評価したが、一部の牛痘ウイルス株との効果が認められた。反応後のかい離曲線の解析で両者は識別できるが、より特異性の高い LC-PCR の開発と、大痘瘡・小痘瘡ウイルスを鑑別する LC-PCR を開発評価することを目的とした。

#### 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、ワクチニアウイルス、牛痘ウイルス、キャメルポックスウイルス、エクトロメリアウイルスを用いた。これらを Vero E6 細胞で培養し、Hirt 法により感染細胞からウイルス DNA を抽出した。

2) LC-PCR：i) オルソポックスウイルス共通 LC-PCR には、A 及び H 遺伝子を標的とした primers を用いた Syber Green 法を開発した。ii) 痘瘡ウイルス特異的 LC-PCR には、B1 遺伝子

を標的とした hybri-probe 法を用いた。また、以前開発した J 遺伝子を標的とした hybri-probe 法とも比較した。iii) 大痘瘡・小痘瘡ウイルスを鑑別する LC-PCR 法には、B2 遺伝子を標的とした hybri-probe 法を開発した。LC-PCR は、それぞれの方法に対応した反応キットを用いて、LightCycler-PCR (Roche Diagnostics 社、Mannheim、ドイツ)により行なった。陽性対照には、それぞれの領域に対応するワクチニアウイルス遺伝子断片を組み込んだ pGEM-Teasy plasmids または、痘瘡ウイルスの対応する部分の合成 DNA を用いた。痘瘡ウイルス以外のオルソポックスウイルスに対する検出感度及び特異性は国立感染症研究所で行なった。痘瘡ウイルス及びその DNA は、米国の Centers for Disease Control and Prevention (Atlanta, GA, USA) (CDC) のポックス部門及びロシアの Vector にのみ保管されている。このため、Global Health Security Action Group (GHSAG)-Laboratory network の合意により CDC で行われた第2回 smallpox virus workshop に参加し、用意された blind samples を用いて評価した。

### C. 研究結果

1) オルソボックスウイルス共通 LC-PCR : オルソボックスウイルスは、ウイルス間での遺伝子配列がよく保存されている。これまで、GenBank に登録されている全ボックスウイルス配列のアライメントから A 遺伝子と H 遺伝子の保存されている領域を対象に forward, reverse primers を各 3 種類デザインした。これら 18 通りの組み合わせで、細胞遺伝子に対して非特異反応を生じない組み合わせを用いて、種々のオルソボックスウイルス遺伝子の増幅率を検討した。その結果、A と H では primer が、それぞれ 10 コピー、1 コピーが検出でき、高感度であった (図 1)。また、この系では Sybr Green による検出系を用いているが、反応後の乖離曲線解析である程度のウイルス識別が可能であった。

2) 痘瘡ウイルス特異的 LC-PCR : 痘瘡ウイルスと他のオルソボックス間で配列の異なる領域は、遺伝子両端に存在するが、痘瘡ウイルス特異的 LC-PCR には、B1 遺伝子領域を標的に Hybri-probe 法をデザインした。いくつかデザインしたうち最も感度の高く、非特異反応でない primer set を Sybr Green 法で選別した。その結果、合成部分遺伝子を標的にした場合、10 コピーの感度で検出できた (図 2)。

3) 大痘瘡・小痘瘡ウイルスを鑑別する LC-PCR : 大痘瘡ウイルスと小痘瘡ウイルスを鑑別する LC-PCR には、B1 と隣接する B2 遺伝子を標的に hybri-probe 法をデザインした。これらは、共通の reverse primer と大痘瘡ウイルス特異的及び小痘瘡ウイルス特異的 forward primers, hybri-probe を用いるものである。これらは、合成部分遺伝子を標的にした反応では、それぞれ 10、1 コピーの検出感度であった (図 3)。しかし、100 万コピー程度の牛痘ウイルス DNA を反応に加えると非特異反応が見られた。

4) 上記 LC-PCR の評価: これらを、GHSAG-Laboratory network の合意により CDC で行われた第 2 回 smallpox virus workshop に於て評価した (表 1)。その結果、オルソボックスウイルス共通 LC-PCR は、オルソボックスウイルス属の中で唯一遺伝子配列が他のウイルスと比較的異なるラクーンボックスウイルスの検出感

度は低かったが、それ以外では痘瘡ウイルス遺伝子を含めて、高感度にかつほぼ正確に検体中に含まれる DNA コピー数を算出できた。痘瘡ウイルス特異的 LC-PCR も同様に高感度にかつほぼ正確に検体中に含まれる DNA コピー数を算出できた。また、以前作製した J 遺伝子を標的とした LC-PCR とも同感度であった。大痘瘡・小痘瘡ウイルスを鑑別する LC-PCR は、CDC に於て用意された検体に小痘瘡ウイルスが無かったため、小痘瘡ウイルス特異的 LC-PCR がどの程度反応するかは検討できなかった。しかし、全ての大痘瘡ウイルス遺伝子は、大痘瘡ウイルス特異的 LC-PCR で検出され、小痘瘡ウイルス特異的 LC-PCR では反応しなかったことから、両者の特異性は高いと想定される。

### D. 考察

これまでに、痘瘡ウイルスの J 遺伝子を標的とし Hybri-probe による LC-PCR を開発し、CDC で評価した。この方法は、痘瘡ウイルスに対する特異性、検出感度は極めて高かったが、一部の牛痘ウイルス遺伝子と若干交差した。これは、反応後の probe の乖離反応から識別は可能であったが、より特異的な LC-PCR の開発と、極めて病原性の強い大痘瘡ウイルスと、比較的病原性の弱い小痘瘡ウイルスを鑑別する LC-PCR も同時に開発した。また、オルソボックスウイルスを網羅的に検出する LC-PCR も開発した。昨年度にサル痘ウイルス感染サル検体を用いてサル痘ウイルス特異的 LC-PCR を評価した結果、LC-PCR では血液からの遺伝子検出がウイルス分離よりも高感度であったことから、今回開発した LC-PCR の実験室診断への有用性は高いと考えられる。また、バイオテロの可能性のある検体や環境からのウイルス遺伝子の検出にも応用可能と考えられる。

今回開発した LC-PCR と昨年度評価したサル痘ウイルス特異的 LC-PCR を組み合わせることで、1) オルソボックスウイルスか否かの判定、2) サル痘、痘瘡ウイルス、他のボックスウイルスの識別、3) 大痘瘡ウイルスと小痘瘡ウイルスの識別が可能となった。これらのバイオテロ対策上の貢献度は高いと考えられる。



## E. 結 論

オルソポックスウイルス共通 LC-PCR、痘瘡ウイルスと他のオルソポックスウイルスとの鑑別 LC-PCR 及び、強毒な大痘瘡ウイルスとやや弱毒な小痘瘡ウイルスの鑑別 LC-PCR を開発した。米国 CDC において痘瘡ウイルス DNA の検出感度を検討した結果、1) オルソポックスウイルス共通 LC-PCR は、痘瘡ウイルスを含めて高感度に検出できた。2) 痘瘡ウイルス特異的 LC-PCR は、他のポックスウイルスと交差せず特異的かつ高感度に痘瘡ウイルスを検出できた。3) 大痘瘡・小痘瘡鑑別 LC-PCR は、高感度かつ特異的に両者を鑑別できた。

(謝辞)

GHSAG laboratory network 及び、その合意により smallpox workshop を開催した CDC のポックスウイルス部門に深謝します。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S: LC16m8, a highly attenuated vaccinia virus vaccine lacking expression of the membrane protein B5R, protects monkeys from monkeypox. *J Virol* 80: 5179-5188, 2006.
- 2) Saijo M, Niikura M, Ikegami T, Kurane I, Kurata T, Morikawa S: Laboratory diagnostic systems for Ebola and Marburg hemorrhagic fevers developed with recombinant proteins. *Clin Vaccine Immunol* 13:444-451, 2006.
- 3) Mizutani T, Endoh D, Okamoto M, Shirato K, Shimizu H, Arita M, Fukushi S, Saijo M, Sakai K, Limn CK, Ito M, Nerome R, Takasaki T, Ishii K, Suzuki T, Kurane I, Morikawa S, Nishimura H: Rapid Genome Sequencing of RNA Viruses. *Emerg Infect Dis.* (in press)
- 4) Ike F, Bourgade F, Ohsawa K, Sato H, Morikawa S, Saijo M, Kurane I, Takimoto K, Yamada YK, Jaubert J, Berard M, Nakata H, Hiraiwa N, Mekada K, Takakura A, Itoh T,

Obata Y, Yoshiki A, Montagutelli X: LCMV infection in a wild-derived mouse inbred strain undetected by dirty bedding sentinel health monitoring and revealed after embryo transfer. *Comp Med.* (in press)

### 2. 学会発表 (国際学会)

- 1) Saijo M, Georges-Courbot MC, Fukushi S, Mizutani T, Marianneau P, Georges AJ, Kurane I, Romanowski V, Morikawa S: Recombinant nucleoprotein-base diagnosis of Lassa fever-antibody and antigen detection systems. *Filoviruses: Recent advances and future challenges, An ICID global conference, September 2006, Winnipeg, Canada.*
- 2) Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S: Highly attenuated vaccinia vaccine, LC18m8, lacking B5R membrane protein expression protects monkeys from monkeypox. *12th International Conference of Infectious Diseases, June 2006, Lisbon, Portugal.*
- 3) Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S: Difference in pathogenesis of monkeypox virus (MPXV) in nonhuman primates between MPXV Zr-599 (Congo Basin) and Liberia (Western Africa) strains. *US-Japan Cooperative Medical Science Program 40th Virology Panel Meeting, June 2006, Sendai, Japan.*
- 4) Yokote H, Shinmura Y, Kanehara T, Ohkuma K, Oka T, Funatsu A, Morikawa S, Saijo M, Kurane I, Kutata T, Hashizume S. Safety and efficacy study of attenuated smallpox vaccine LC16m8 in animals. *ASM Biodefence Research Meeting, February 2006, Washington DC, USA.*

## H. 知的財産権の出願・登録 (予定を含む) 特許取得: 該当なし

図1. オルソボックスウイルス共通LC-PCR法の感度 (上段がA、下段がH遺伝子標的)

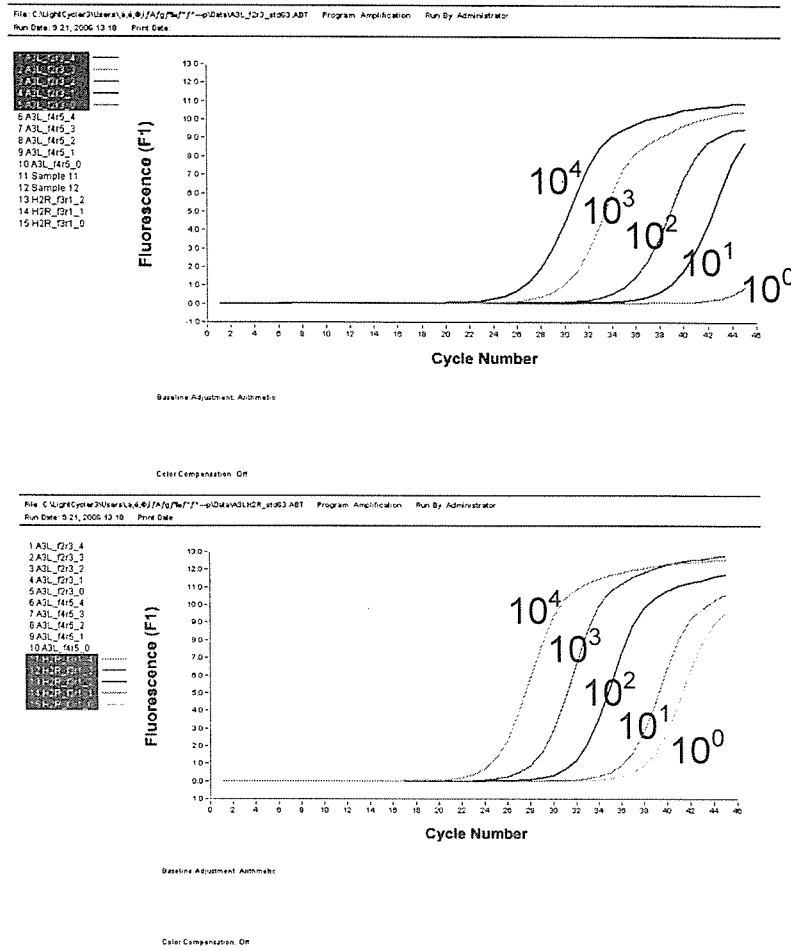


図2. 痘瘡ウイルス特異的LC-PCRの感度

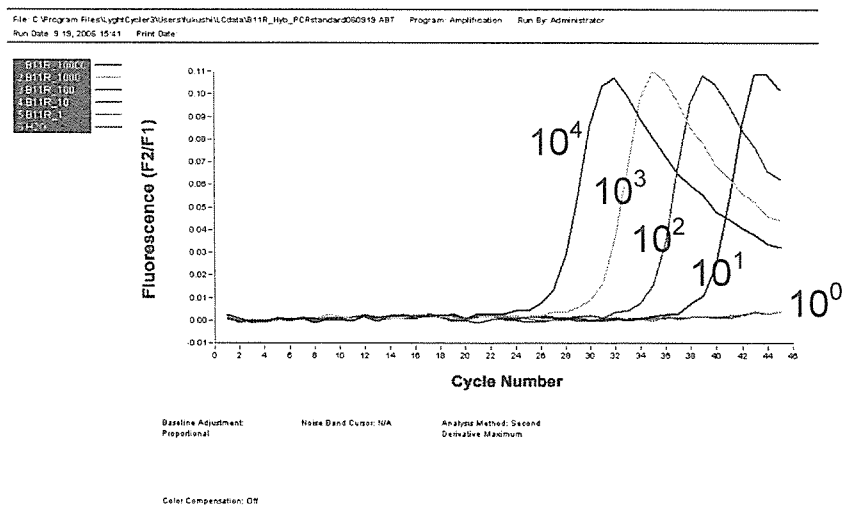


図3. 大痘瘡ウイルス特異的LC-PCRと小痘瘡ウイルス特異的LC-PCRの感度

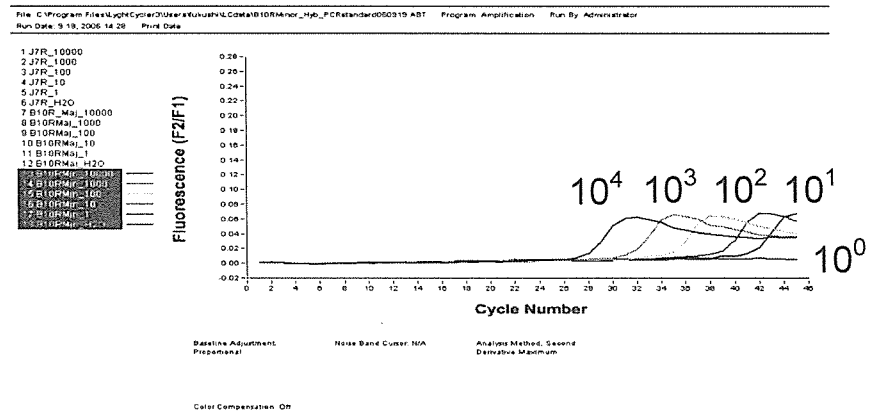
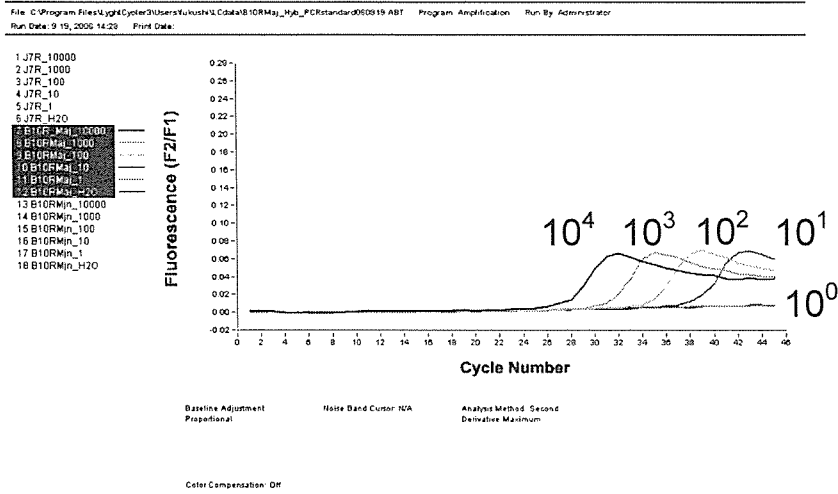


表1. 痘瘡ウイルスに対するLC-PCRの反応

Virus DNA	Strain	conc./5 microL	A	H	B1-HybrP	J-HybrP	B2 Maj- HybrP	B2 Min- HybrP	variola	Variola Major	Variola Minor
			orthopox specific	variola specific		var-major specific	var-minor specific				
variola major	7125 India 1964	3.E+07	Pos	5.1E+07	8.1E+06	6.7E+07	4.8E+07	Neg	O	O	
		3.E+06	Pos	5.9+E06	6.9E+05	5.7E+06	3.7E+06	Neg	O	O	
		3.E+05	Pos	6.2E+05	5.5E+04	2.5E+05	2.5E+05	Neg	O	O	
		3.E+04	Pos	3.5E+04	2.1E+03	8.6E+03	1.4E+04	Neg	O	O	
		3.E+03	Pos	4.9E+03	5.8E+02	1.0E+03	1.6E+03	Neg	O	O	
		3.E+02	Pos	5.8E+02	8.2E+01	8.9E+01	9.0E+01	Neg	O	O	
		3.E+01	Pos	6.8E+01	1.5E+01	1.1E+01	5.3E+00	Neg	O	O	
variola major	BSH Bangladesh 1975	3.E+03	Pos	1.9E+03	3.8E+02	4.5E+02	4.8E+02	Neg	O	O	
		3.E+07	Pos	1.8+E07	1.9E+06	1.9E+07	1.2E+07	Neg	O	O	
		3.E+06	Pos	2.0+E06	2.4E+05	1.5E+06	1.0E+06	Neg	O	O	
		3.E+05	Pos	1.7E+05	2.2E+04	5.2E+04	7.1E+04	Neg	O	O	
		3.E+04	Pos	2.6E+04	1.6E+03	3.4E+03	3.6E+03	Neg	O	O	
		3.E+02	Pos	2.7E+02	1.5E+01	3.6E+01	5.0E+01	Neg	O	O	
variola major	v70-222-7 Sumatra 1970	3.E+01	Pos	3.0E+01	1.5E+00	8.0E+00	5.8E+00	Neg	O	O	
		3.E+07	Pos	3.0+E07	4.1E+06	3.0E+07	2.2E+07	Neg	O	O	
		3.E+06	Pos	3.8+E06	3.9E+05	3.5E+06	2.1E+06	Neg	O	O	
		3.E+05	Pos	2.8E+05	3.5E+04	9.7E+04	8.7E+04	Neg	O	O	
		3.E+04	Pos	2.2E+04	1.4E+04	7.4E+03	8.6E+03	Neg	O	O	
		3.E+03	Pos	2.8E+03	2.4E+02	4.2E+02	1.8E+02	Neg	O	O	
		3.E+02	Pos	3.3E+02	6.8E+01	9.0E+01	7.4E+01	Neg	O	O	
variola major	v73-175-5 Nepal 1973	3.E+01	Pos	5.9E+01	1.6E+00	1.8E+00	9.7E+00	Neg	O	O	
		3.E+07	Pos	4.5+E07	5.2E+06	4.9E+07	3.6E+07	Neg	O	O	
		3.E+06	Pos	5.4+E06	7.3E+05	4.8E+06	2.8E+06	Neg	O	O	
		3.E+05	Pos	6.6E+05	4.4E+04	1.3E+05	1.7E+05	Neg	O	O	
		3.E+04	Pos	4.0E+04	3.2E+03	8.6E+03	7.4E+03	Neg	O	O	
		3.E+03	Pos	5.5E+03	5.3E+02	1.5E+03	1.3E+03	Neg	O	O	
		3.E+02	Pos	4.7E+02	1.1E+02	1.6E+02	1.3E+02	Neg	O	O	
		3.E+01	Pos	4.3E+01	1.0E+01	2.3E+01	8.8E+00	Neg	O	O	

conc./5microLカラムの数字は、検体中のウイルスDNAコピー数  
各LC-PCRのカラムの数字は、反応から計算されたウイルスDNAコピー数