

#### D. 考 察

今年度はSEBおよびATのイムノクロマト法による検出系構築のため、抗体や試薬の選別および濃度の決定をサンドイッチ ELISA の系を用いて行った。SEB、AT いずれの検出系においても、固層化抗体にはモノクローナル抗体、検出抗体にはポリクローナル抗体を用いる系で感度的に良好な結果が得られ、検出抗体に関してはビオチン化した方が直接酵素標識した抗体に比べて若干感度が高い傾向が見られた。これらの結果から、イムノクロマト法では、両毒素検出系とも、固層化抗体はモノクローナル抗体、検出抗体にはビオチン標識ポリクローナル抗体を用いることとした。また、用いる抗体濃度は SEB では固層化抗体は 18E6 クローン 10 ng/ml、検出抗体 40 ng/ml、AT ではそれぞれ 5 ng/ml、20 ng/ml と作製労力やコストの面から考えても使用不可能な量ではなく、十分、本イムノクロマト系に供給可能であると考えられる。

検出感度に関しては、イムノクロマト法での感度はサンドイッチ ELISA での感度とほぼ同等か、酵素系ではなく金コロイドを用いることから幾分高くなると一般的に考えられている。今回のサンドイッチ ELISA での検出感度は SEB で 200 ng/ml、AT で 100 ng/ml であった。SEB の LD<sub>50</sub> は 20 ng/kg、ED<sub>50</sub> は 0.4 ng/kg であると推定されていることから、現段階での検出感度においても致死量程度の毒素量を検出することは可能であると思われる。しかし、発症量を検出するためにはさらに感度を高めるための改善が必要である。AT に関しては LD<sub>50</sub> が 10 µg/kg であることから現段階での検出系で十分対応できると考えられる。

来年度は、このサンドイッチ ELISA において確立された条件を基にイムノクロマトを作製し、検出感度および試料の調整法等を検討していく予定である。

また、ボツリヌス毒素検出用のキットの手技、特異性の検証が地方衛研の現場で確認されたことは、現在毒素の標準検出法であるマウス試験を実施する前のスクリーニングとして有用である。

#### 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基礎データとなるサンドイッチ ELISA での検出系を確立した。

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

#### 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 教授

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 (動物衛生研究所・北海道支所)、

川本恵子、大槻隆司 (帯畜大・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、迅速・簡便という観点から LAMP (loop-mediated isothermal amplification) 法の確立を行った。同時に、ブルセラ属菌特異的 LAMP 法も確立した。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および各陽性コントロールを構築し、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た。本年度は、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のために、野兔病菌に対する特異抗原 (FopA-GST 融合タンパク質) の精製を行った。類鼻疽菌 (*Burkholderia pseudomallei*) に関しては、バイオテロ対策として不明熱患者の類鼻疽菌と類縁菌の血液中の抗体を網羅的にスクリーニングする方法を作成した。

### 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、野兔病、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、野兔病、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し、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。

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嚢の感染と鼻出血をおこす。涙嚢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、人の感染例は姿を消しつつある。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命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。

野兔病は、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、野兔病菌を持った虫にかまれたり、刺されたりして、あるいは、野兔病菌に汚染したものを動物に接触してヒトは感染する。発生は通常散發的だが、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LAMP法による迅速検出法の確立、野兔病と鼻疽/類鼻疽の免疫学的検出・診断法の確立について検討した。LAMP法は、迅速、簡便で、PCR法に比べ多くの利点がある(図1)。また、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のために、野兔病菌に対する特異抗原(FopA-GST融合タンパク質)の精製を行った。さらに鼻疽/類鼻疽に関しては、バイオテロ対策として不明熱患者の血液中の抗体を網羅的にスクリーニングする方法の作成をめざした。発病の初期では抗原検出や、遺伝子検査が有効であるが、化学療法に抵抗し、疾病が長引くと、抗体測定が重要な手段となる。抗体の上昇に2週間かかるが、初期段階で被害を最小限にとどめることができる。そこで類鼻疽菌、鼻疽菌と類縁種であるセパシア菌、緑膿菌、およびレジオネラ菌の6種類の血清型のLPSを抗原としてluminex蛍光ビーズと共有結合させ、患者の抗体をluminexで同時に測定する方法の作成を目指した。

## B. 研究方法

### B-1. 炭疽菌に関する研究

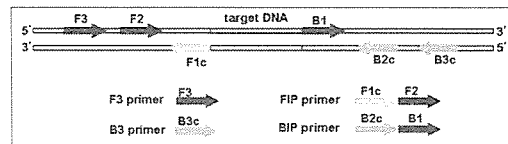
1) 炭疽菌の莢膜形成遺伝子(*capA*)、防御抗原遺伝子(*pag*)そして染色体上のS-layer形成遺伝子(*sap*)を用いて、LAMP法用のプライマーセットを構築した(図2)。使用菌株は当研究室保存の炭疽菌株パスツール2苗の強毒株、毒素非産生株、莢膜非形成株、そして他の炭疽菌株(士官、盛岡、中川、竜ヶ崎、52、34F-2、P-1)を用いた(表1)。さらにバシラス株として、セレウス菌、*B. thuringiensis*、枯草菌、*B. megaterium*、*B. circulance*、*B. pumilus*を用いた(表2)。それぞれ、DNA抽出は定法に従った。

2) LAMP法は63度で行った。

3) 検出は、目視、電気泳動、およびリアルタイムで蛍光検出を行った。

### 図1. 炭疽およびブルセラ症におけるLAMP法の応用

- 迅速 ・ 15min ~ 1hで目的の遺伝子を増幅。
- 簡便 ・ 一定温度(60~65°C)で増幅反応が進行。  
・ 増幅過程で生じる副産物(ピロリン酸マグネシウム)による反応液の濁度からリアルタイムに増幅のモニタリングが可能。
- 高感 ・ 標的遺伝子に対して6つの領域を認識する4つのプライマーを設定。



### 図2. 炭疽菌検出の標的遺伝子

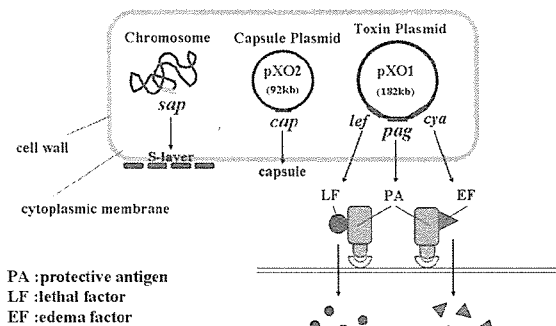


表2. 近縁*Bacillus*属に対する交差反応

species	strain	PCR			nested PCR			LAMP		
		pXO1	pXO2 chrom.	cap	pXO1	pXO2 chrom.	cap	pXO1	pXO2 chrom.	cap
<i>B. cereus</i>	NBRC3002	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NBRC3003	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NBRC3132	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	NBRC3457	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	NBRC3514	+	-	-	-	-	-	+	-	-
	NBRC3836	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	NBRC13494	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>B. thuringiensis</i>	NBRC13597	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	NBRC13690	+	-	-	-	-	-	-	-	+
	NBRC13305	+	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>B. subtilis</i>	NBRC3951	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	NBRC13865	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	NBRC13866	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. megaterium</i>	NBRC3134	-	-	-	-	-	-	+	-	+
	NBRC13306	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NBRC13626	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. pumilus</i>	NBRC12092	+	-	-	-	-	-	-	-	-

-: negative amplification. +: positive amplification  
2x10<sup>6</sup> cells was tested

### B-2. ブルセラ症に関する研究

1) ブルセラ属菌共通の抗原蛋白としてBCSP31(*Brucella* cell surface protein 31 KDa)にターゲットを絞り、その遺伝子からLAMP法に適したプライマーセットを構築した。温度は一定で63度で行った。

2) 使用菌株は、表3に示すブルセラ属菌株と類縁菌を用いて特異性を行った。特に、*Ochrobactrum*と*Bartonella*属菌はバシラス属菌と類縁性が高く、PCRによる鑑別が困難であると報告されている。

3) 検出は、目視、電気泳動、およびリアルタイムで蛍光検出を行った。

表 1. 炭疽菌株における LAMP 特異性

species	strain	PCR			nested PCR			LAMP		
		pXO1	pXO2	chrom.	pXO1	pXO2	chrom.	pXO1	pXO2	chrom.
		pag	cap	sap	pag	cap	sap	pag	cap	sap
<i>B. anthracis</i>	PasteurII tox/cap <sup>-</sup>	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	PasteurII tox/cap <sup>+</sup>	-	+	+	-	+	+	-	+	+
	PasteurII tox <sup>+</sup> /cap <sup>+</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	shikan	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	morioka	-	+	+	-	+	+	-	+	+
	nakagawa	-	+	+	-	+	+	-	+	+
	ryugasaki	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	52	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	P-I	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	34-F2	+	-	+	+	-	+	+	-	+

-; negative amplification, +; positive amplification  
10ng of nucleic acids was tested

表 3. 研究に用いた菌株

No.	Species (Group)	Strain	No.	Species (Group)	Strain
<i>Bacillus species</i>			<i>non-Bacillus species</i>		
1	<i>B. anthracis</i>	544 (ATCC 23445)	24	<i>Bacillus cereus</i>	
2	<i>B. anthracis</i>		25	<i>Bacillus subtilis</i>	
3	<i>B. anthracis</i>		26	<i>Bacillus thuringiensis</i>	
4	<i>B. anthracis</i>		27	<i>Bartonella henselae</i>	CDC 03436
5	<i>B. anthracis</i>		28	<i>Bartonella quintana</i>	CIP 103739
6	<i>B. anthracis</i>		29	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	
7	<i>B. anthracis</i>		30	<i>Klebsiella coli</i>	O1 J7 H7
8	<i>B. anthracis</i>		31	<i>Phaenocarpa tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i>	
9	<i>B. anthracis</i>		32	<i>Mycoplasma ramosa</i>	JCM 7222
10	<i>B. anthracis</i>	1119-3	33	<i>Ochrobactrum anatum</i>	JCM 10066
11	<i>B. anthracis</i>	123	34	<i>Ochrobactrum anatum</i>	JCM 10070
12	<i>B. anthracis</i>	45/20	35	<i>Ochrobactrum anatum</i>	JCM 10072
13	<i>B. anthracis</i>	99			
14	<i>B. anthracis</i>	5-19	36	<i>Salmonella enterica</i> ser. <i>Choleraesuis</i>	
15	<i>B. anthracis</i>	3	37	<i>Salmonella enterica</i> ser. <i>Enteritidis</i>	
16	<i>B. anthracis</i>	Q513	38	<i>Salmonella enterica</i> ser. <i>Dublin</i>	
17	<i>B. anthracis</i>	16M	39	<i>Salmonella enterica</i> ser. <i>Enteritidis</i>	
18	<i>B. anthracis</i>		40	<i>Salmonella enterica</i> ser. <i>Oranienburg</i>	
19	<i>B. anthracis</i>		41	<i>Salmonella enterica</i> ser. <i>Typhimurium</i>	LT2
20	<i>B. anthracis</i>		42	<i>Salmonella enterica</i> ser. <i>Typhimurium</i>	N491
21	<i>B. anthracis</i>	63/290	43	<i>Salmonella enterica</i> ser. <i>Typhi</i>	
22	<i>B. anthracis</i>		44	<i>Shigella flexneri</i>	
23	<i>B. anthracis</i>		45	<i>Shigella sonnei</i>	
24	<i>B. anthracis</i>		46	<i>Shigella sonnei</i>	
25	<i>B. anthracis</i>		47	<i>Shigella sonnei</i>	
26	<i>B. anthracis</i>		48	<i>Shigella sonnei</i>	
27	<i>B. anthracis</i>		49	<i>Yersinia enterocolitica</i>	O 9 (79b)
28	<i>B. anthracis</i>		50	<i>Yersinia pestis</i>	

ATCC American Type Culture Collection, Rockville, MD  
CDC Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA  
CIP Pasteur Institute Collection, Institut Pasteur, Paris, France  
JCM Japan Collection of Microorganisms, Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), Tsukuba, Japan  
Genetically related bacteria Antigenically related bacteria

4) ブルセラ菌の感染を考えて、マウスに感染実験を行い、臓器を回収して LAMP 法で菌検出が可能かどうか調べた。菌株は野外株をマウス腹腔内に約  $7.9 \times 10^8$  CFU を 100  $\mu$ L 注射し感染させた。感染マウスから、血液・脾臓・肝臓を摘出し、CFU 測定後、感染マウス臓器由来 DNA を Tissue DNA Extraction kit (QIAGEN) を用いて精製し、LAMP 反応に用いた。

### B-3. 野兔病に関する研究

1) *fopA/pGEX-6P2* クローンの塩基配列の確認：

i) 平成 17 年度で構築した *fopA/pGEX-6P2* クローン (Clone No. 2, 5, 7, 8, 10) の各塩基配列を決定してクローニングによる変異がない事を確認した。

ii) *fopA/pGEX-6P2* クローンの塩基配列を決定して primer 設計に用いた既報の FopA の

塩基配列 (Gene Bank No. AF097542) と比較したところ、全てのクローンに一致して塩基配列に違いが見られたので、クローン作製に用いた *F. tularensis* subsp. *tularensis* GTC 3P42 株の whole cell DNA を用いて *fopA* 遺伝子の direct sequencing を行った。

2) *fopA/pGEX-6P2* クローン発現の至適条件の検討：

i) 培養温度：20°C 及び 25°C における発現を比較した。

ii) 培養時間：3、5、及び 24 時間培養における発現を比較した。

iii) FopA-GST 融合蛋白の可溶性の検討：PBS に対する可溶性を検討したところ、この蛋白は Inclusion body (IB) になる事が判明したので、Urea による可溶化を検討した。

iv) FopA-GST 融合蛋白の Re-folding による可溶化の検討：FopA-GST 融合蛋白は 8M Urea で可溶化できたので、M Urea で可溶化後、Urea 濃度、4M、2M、0M に順次透析して Re-folding を行った。

3) FopA-GST 融合蛋白の精製：Re-fold した FopA-GST 融合蛋白は Glutathione Sepharose 4B および Hydroxyapatite により連続的に精製し、最終的に HPLC によるゲル濾過を行った。

4) 精製 FopA-GST 融合蛋白標品のチェック：最終精製標品に対しては、SDS-PAGE および抗 GST 抗体を用いた Western blotting 解析を行った。

## B-4. 類鼻疽に関する研究

類鼻疽菌 *B. pseudomallei* (GTC 3P056)、*B. mallei* (GTC 3P003<sup>T</sup>)、*B. cepacia* (GTC 013<sup>T</sup>)、*P. aeruginosa* (GTC 002<sup>T</sup>)、*Legionella pneumophila* serogroup 1 to 6 (GTC 745<sup>T</sup>) GTC746、GTC747、GIFU9246、GTC297、GTC748) and *Escherichia coli* (GTC 503<sup>T</sup>) および鼻疽菌のLPS抗原はmonophasicであるとされているので基準株を使用した。上記菌株のLPSをhot phenol法で抽出し、Luminex 蛍光ビーズに共有結合させた。一方、ウサギに上記菌株の死菌を接種し、評価陽の抗体を作成した。

(倫理面への配慮)

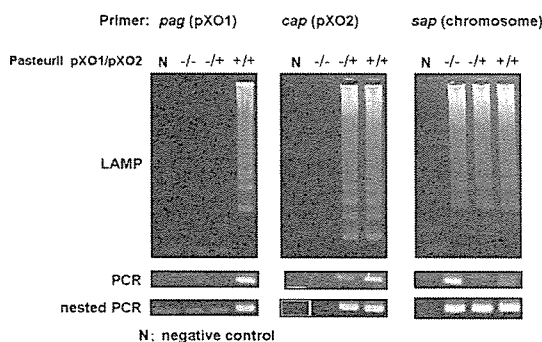
動物実験は所属研究機関の動物実験委員会の審査許可を受けて行われ、DNA 組換え実験や病原体の取り扱いには法令に従い安全性を考慮して実験を実施した。

## C. 研究結果

### C-1. 炭疽菌に関する研究

1) 炭疽菌株で形質が明らかなパスツール株を用い LAMP 法を行った (表 1、図 3)。その結果、莢膜形成と毒素産生の形質に一致した検出が可能であった。そこで、他の炭疽菌についても実施した (表 1)。

図3. LAMP法による炭疽菌遺伝子の検出



2) 次に、類縁菌について、特異性を確認した (表 2)。その結果、一部の菌株で陽性になった。しかし、3種類の形質が全て陽性になった株はなかった。

3) また従来の PCR 法との感度の比較、および検出限界を調べた結果、PCR 法と感度はほぼ同じであった。また、検出感度は 100-10 fg であり、検出時間は 30 分前後であった (表 4)。

表4. 炭疽菌遺伝子の検出時間

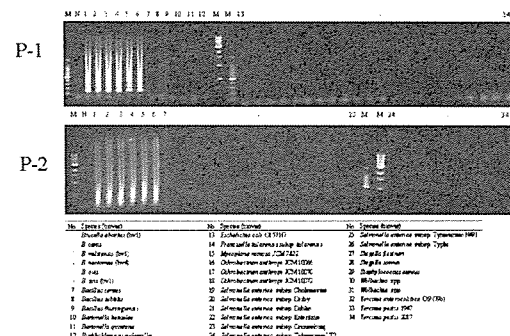
nucleic acid	Tt (min)		
	pXO1 pag	pXO2 cap	chrom. sap
1 ng	21.9	26.0	29.5
100 pg	23.6	28.0	31.6
10 pg	25.5	30.5	33.9
1 pg	28.1	32.9	39.1
100 fg	30.5	36.4	42.7
10 fg	NA	40.1	NA

NA: turbidity did not appear within 60 min.

### C-2. ブルセラ症に関する研究

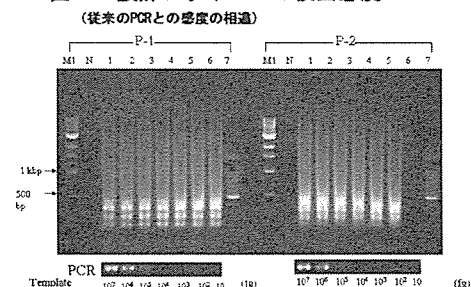
1) 2種類のプライマーセットを作成して、表 3 に示した菌株について LAMP 法を行った (表 3、図 4)。その結果、ブルセラ菌株は全てが陽性になったが、多菌種は全て陰性となった。特に、他の報告で PCR 法では区別できなかった *Ochrobactrum* と *Bartonella* 属菌に対しても陰性となり、本方法の特異性が確認できた。

図4. 設計プライマーの特異性判定



2) 次に検出感度の比較を行った (図 5)。その結果、PCR 法に比べて 1,000~10,000 倍高かった。検出感度は、DNA 10~100 fg であり、この濃度を菌数に換算すると、本方法ではブルセラ菌が 2.78 個あれば検出可能であることが示された。

図5. 設計プライマーの検出感度



LAMP法による検出感度は、PCR法に比べて10<sup>3</sup>~10<sup>4</sup>倍高かった。

LAMP法による検出感度は、DNA 10~100 fg であり、この濃度を菌数に換算すると、本方法ではブルセラ菌が2.78個あれば検出可能であることが示された

3) マウスに感染実験を行い、臓器からの LAMP 法を実施すると、全ての臓器から検出可能であった。

### C-3. 野兔病に関する研究

1) *fopA/pGEX-6P2* クローンの塩基配列の確認：

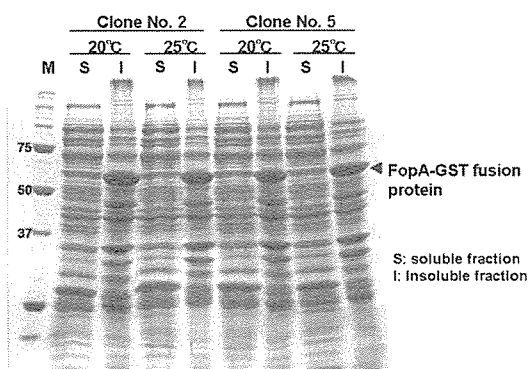
i) *fopA/pGEX-6P2* クローンの塩基配列の決定：全てのクローン (Clone No. 2, 5, 7, 8, 10) において、6 カ所の silent replacement (T483G, C669T, T835C, C855T, C936T, C978T) と 1 カ所アミノ酸置換を伴う塩基置換 (G931A: Gly→Ser) が存在した。

ii) 親株 (*F. tularensis* subsp. *tularensis* GTC 3P42 株) の *fopA* 遺伝子の塩基配列の確認：親株の whole cell DNA に対して *fopA* 遺伝子の direct sequencing を行ったところ、クローン株の *fopA* 遺伝子の塩基配列と親株の *fopA* 遺伝子の塩基配列は一致した。1) で見られた primer 設計に用いた既報の *fopA* 遺伝子の塩基配列 (Gene Bank No. AF097542) との相違は株間の相違であった。

2) *fopA/pGEX-6P2* クローン発現の至適条件の検討 (IPTG 濃度は昨年度の結果より 100 μM とした)：

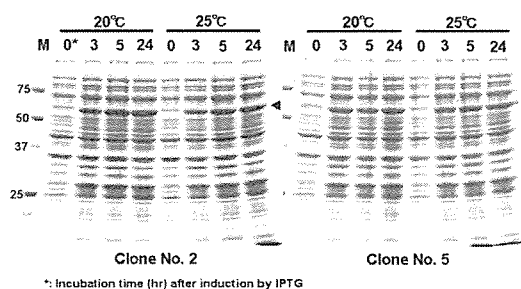
i) 培養温度：2 株のクローン (Clone No. 2 と 5) の 20°C 及び 25°C における発現を比較したところ、いずれの温度でも強い発現が見られた (図 6)。

図6. SDS-PAGE profiles of the FopA-GST clones at different temperature



ii) 培養時間：2 株のクローン (Clone No. 2 と 5) の 3、5、及び 24 時間培養における発現を比較したところ、5 時間以上培養すると最も強い発現が得られた (図 7)。

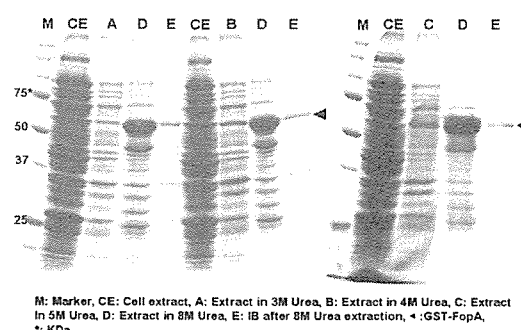
図7. SDS-PAGE profiles of the FopA-GST fusion-protein



\*: Incubation time (hr) after induction by IPTG

iii) FopA-GST 融合蛋白の可溶性の検討：FopA-GST 融合蛋白は強発現させるとどの温度でも IB になった (図 6)。3~5M Urea では IB からの可溶化は難しかったが、8M まで Urea 濃度を上げると可溶化できた (図 8)。

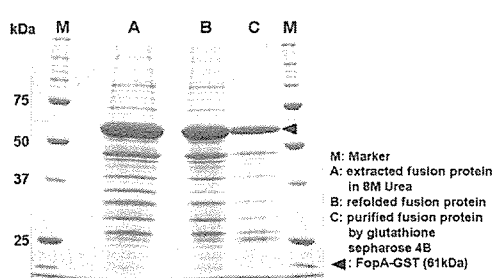
図8. SDS-PAGE profiles of the extract in different Urea concentration



M: Marker, CE: Cell extract, A: Extract in 3M Urea, B: Extract in 4M Urea, C: Extract in 5M Urea, D: Extract in 8M Urea, E: IB after 8M Urea extraction, \* : GST-FopA, \*\* : KDa

iv) FopA-GST 融合蛋白の Re-folding による可溶性の検討：IB になった FopA-GST 融合蛋白を 8M Urea で可溶化して透析により Urea 濃度を段階的に下げると (4→2→0M)、FopA-GST 融合蛋白の一部が Urea の非存在下で可溶化できた (図 9)。

図9. Purification of the fusion protein by glutathione sepharose 4B



3) FopA-GST 融合蛋白の精製：

i) Glutathione Sepharose 4B による精製：Re-fold した FopA-GST 融合蛋白を Glutathione Sepharose 4B で精製したところ、かなり他のタンパクの混在があるものの、FopA-GST 融合蛋白が取れた。

ii) Hydroxyapatite CHII カートリッジ (Bio-Rad 社) による精製 : Glutathione Sepharose 4B による精製物にはかなりの混在タンパクが存在していたので、この生成物を Hydroxyapatite CHII カートリッジに吸着させて 8M Urea で溶出した (図 10)。溶出画分を SDS-PAGE で解析したところ、まだ他のタンパクが混在していた (図 11)。

図 10. Elution profile of the fusion protein on Econo-Pac CHT-II cartridge

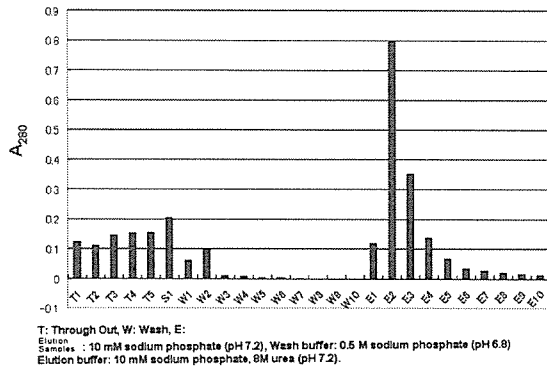
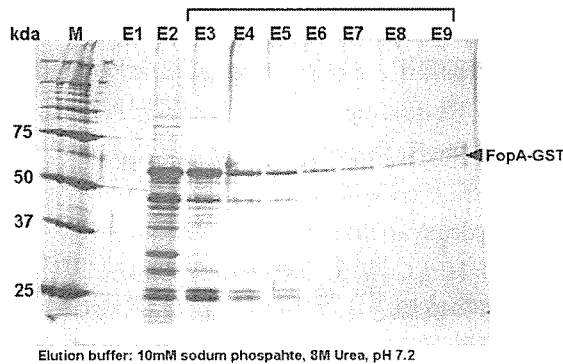
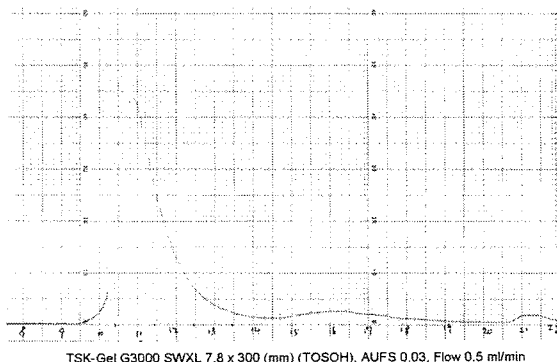


図 11 SDS-PAGE analysis of the eluted fusion-protein through Econo-Pac CHT-II cartridge



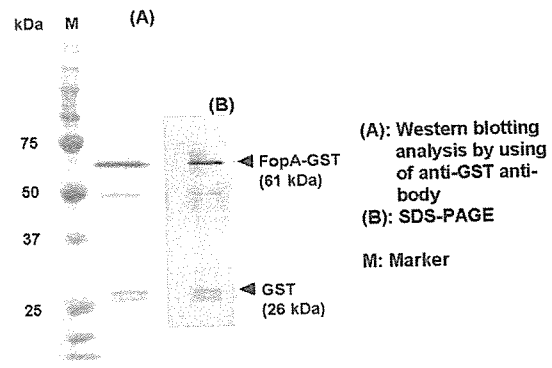
iii) TSK SWSL G3000 カラムによるゲル濾過 : Hydroxyapatite CHII カートリッジ精製における比較的混在タンパクの少ない画分 E3 ~E9 を濃縮してゲル濾過を行ったところ、FopA-GST 融合蛋白はショルダーのある 1 ピークとして溶出された (図 12)。

図 12. Elution profile of the fusion protein on HPLC



4) 精製 FopA-GST 融合蛋白標品のチェック : 最終精製標品に対して純度検定を行ったところ、SDS-PAGE の結果では複数のバンドが検出されたが、Western blotting の結果、FopA-GST 融合蛋白、GST 蛋白、及びこれらの分解産物である事が分かり (図 13)、今回、構築した発現・精製法により FopA-GST 融合蛋白が精製できる事が分かった。

図 13. SDS-PAGE and Western blotting analysis of the purified fusion protein



#### C-4. 類鼻疽に関する研究

類鼻疽菌の LPS ビーズは鼻疽菌と *B. thailandensis* を免疫したウサギ血清と交差した (図 14)。 *B. thailandensis* は病原性のない類鼻疽菌として知られ、近年独立した菌種として分類されたが、この菌による人感染症はないので実質的な問題はないと判断した。また 鼻疽菌は類鼻疽菌の鞭毛が欠損したクローンで LPS の抗原も一致しているので識別できないが、類鼻疽菌と鼻疽菌を同時に測定できるので、逆に実用性が高いと判断した。

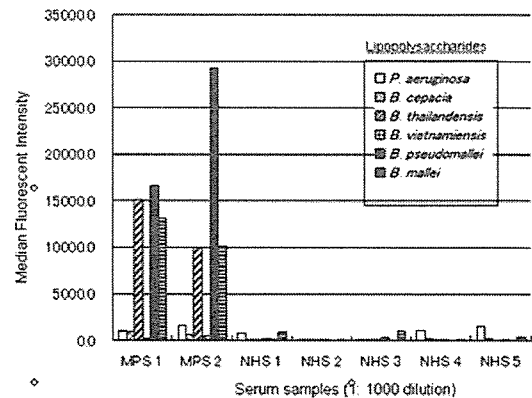


図 14. ヒト血清の LPS に対する反応 :

類鼻疽菌、鼻疽菌、および *B.thailandensis* が交差した。MPS1 と MPS2 は類鼻疽患者血清 NHS1-5 は正常健康人の血清



類鼻疽菌、鼻疽菌のLPSは一種類と報告されている。作成した類鼻疽菌のウサギ抗体で保有している50菌株は作成したウサギ抗血清に凝集した。一方、肺炎を起こす*Legionella*には15種類が知られ、そのうち6種類が臨床的に重要で血清型別が行われている。*Legionella*の6血清型を図15の如く、識別できた。

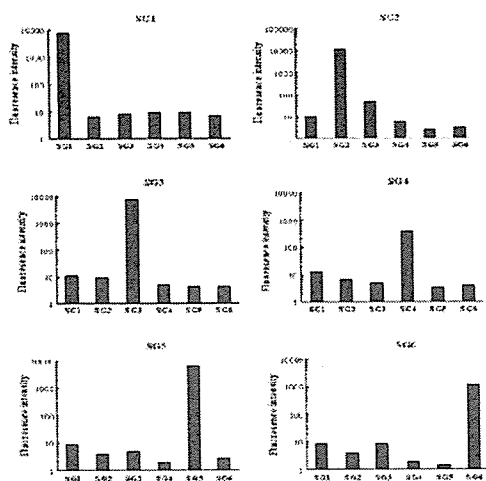


図 15. *Legionella* 6 血清型の識別  
*Legionella* の 6 種類の血清型は LPS 抗原で識別できた。

#### D. 考 察

##### 1) 炭疽およびブルセラ症について

LAMP 法の特徴は、栄研化学 (株) によって 2000 年に考案された日本生まれの新しい遺伝子増幅法で、全ての反応が等温で進行し (60~65°C (通常 63°C)), 増幅効率が極めて高く、大量の増幅産物を得ることができ (通常の PCR が  $10^7$  倍であるのに対し LAMP では  $10^{10}$  倍に増幅し、PCR に比べても 1000 倍高い増幅効率)、また簡便な方法で検出できるので、最近 LAMP 法を用いた細菌やウイルスの検出法が幾つか報告されている。この方法により炭疽菌および振りセラ菌の検出が可能になった。機器類の簡便さが特に注目されており、現場での方法に適しているといえるかもしれない。

##### 2) 野兔病について

平成 14 から 17 年度において、野兔病菌 (*Francisella tularensis*) の 16S rDNA と表在蛋白 Fop 及び MMP に対する特異的な PCR 系、Multiplex-PCR 系およびこれらの検出系で用いる各陽性コントロールを構築した。

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 の一つである野兔病菌の表在蛋白の FopA の精製を試みた。FopA は GST との融合蛋白として強発現できたが、Inclusion body となり、Native な条件下では精製できなかった。しかし、8M Urea で溶解後、透析で Urea 濃度を段階的に減らして Re-folding する事で一部を可溶化して Glutathione Sepharose 4B で粗精製した。しかし、この精製方法では混在タンパクが多かったので、HydroxyapatiteCHII によるクロマトグラフィーと HPLC によるゲル濾過を連続して行う事で精製抗原として使用可能なレベルまで精製できた。しかし、この方法で大量の精製抗原の調整は難しいので、現在、FopA のアミノ酸配列からエピトープと考えられる配列を選んでそのペプチドを合成して、これに対する家兔血清を作製中である。Re-fold した FopA-GST 融合タンパクに対して、Glutathione Sepharose 4B クロマトグラフィーと抗ペプチド IgG を用いたアフィニティ・クロマトグラフィーを連続して行う事で純度の高い大量の抗原が作成できる (当教室では他の融合タンパクの精製をこの方法で行っている)。

今後、少量であるが FopA の精製抗原が作成できたので、平成 15 年度に作成した *F. tularensis* 全菌体に対する家兔抗血清を用いて、この精製抗原の野兔病診断における有用性を ELISA 系で検討する。

精製 FopA 抗原の大量調整が終わり次第、

FopA に対する家兎血清を作成して ELISA 系を作成する。そして、その野兎病菌体に対する特異性を検討し、野兎病菌迅速同定法を構築する。更に、FopA の deletion mutants を作成して構築した ELISA 系を用いてエピトープ検索を行い、更に精度の高い野兎病菌迅速同定法を構築する。

### 3) 鼻疽/類鼻疽について

肺炎など不明熱の患者の多くは初期治療で抗生物質を投与され、病原体を検出することは困難である。そこで肺炎を起こす主要な細菌性病原体の抗体をスクリーニングすることは重要な意味をもつ。

Luminexbeads は一度に 100 種類の抗体を計測できるため、このようなスクリーニングに適している。この実験では Legionella、類鼻疽菌、鼻疽菌、緑膿菌、セパシア菌、大腸菌を標的にした抗体の測定系を作成したが、マイコプラズマ、インフルエンザ桿菌、MRSA、肺炎双球菌、コクシエラ、クラミジア、およびクレブシエラを追加すれば、主要な市中肺炎を起こす病原体の抗体はスクリーニングできる。課題はすべての血清型の LPS 抗原を準備できないので、肺炎を起こす主要な血清型と、バイオテロに使用される病原体を組み合わせれば、日常のスクリーニングの過程で、テロの発生を感知できる。事例が起きた時の検査ではなく、スクリーニングで常に検知できる体制を構築しておくことは重要な意味をもつ。

これまでマルチプレックススクリーニングとして PCR による抗原の検出、および抗体の検出を行うシステムを構築してきた。

## E. 結論

1. 炭疽菌の LAMP 法による迅速検出系を確立した。検出は 30 分程度で、菌数は 10 個以上で可能であった。
2. ブルセラ菌の LAMP 法による迅速検出系を確立した。検出は 40 分以内で、菌数は約 3 個以上で可能であった。
3. 精製 FopA 抗原の作製に成功した。この精製 FopA 抗原を用いて野兎病迅速診断法および野兎病菌迅速同定法の構築が可能となった。
4. LPS を結合させた Luminexbeads で多種類の病原体の抗体をスクリーニングする方

法を構築した。

## F. 健康危険情報

とくになし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Enkhtuya J, Kawamoto K, Kobayashi Y, Uchida I, Rana N, Makino S. Significant passive protective effect against anthrax by antibody to *Bacillus anthracis* inactivated spores that lack two virulence plasmids. *Microbiology* 152: 3103-10, 2006.
- 2) Ozawa Y, Makino S, Park JY, Chang JH, Kim JH, An SH. A review of recent unexpected animal disease events in Japan and Korea and the follow-up action taken. *Rev Sci Tech* 25: 125-35, 2006.
- 3) 江崎孝行、大楠清文：新しい臨床検査・未来の臨床検査 感染症検査 DNA チップを用いた細菌の同定．検査と技術 34:1303-1307, 2006.

### 2. 学会発表

- 1) 飯原大稔、丹羽 隆、シャー モハammad モニル、林 将大、大楠清文、河村好章、江崎孝行：Suspension Array を利用した類鼻疽菌を含むグラム陰性菌の網羅的検出方法の開発。第 79 回日本細菌学会総会（金沢）2006 年 3 月
- 2) 大楠清文、林 将大、窪田佐代子、江崎孝行：遺伝子検査で診断が可能となった 3 症例。第 4 回救急領域感染対策セミナー（岐阜）2006 年 8 月
- 3) 丹羽 隆、飯原大稔、林 将大、大楠清文、河村好章、江崎孝行：Bead array を用いた各種血清型の抗体検出法の開発。第 43 回日本細菌学会中部支部総会（岐阜）2006 年 10 月

## H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 江崎孝行：特願 2006-272329、DnaJ 遺伝子を使った細菌の検出・同定方法

## 9. バイオテロ関連感染症の臨床診断と治療

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、  
中村 修 慶応義塾大学 環境情報学部 助教授

研究協力者 古谷信彦、山口恵三（東邦大学医学部微生物・感染症学）  
大野秀明、宮崎義継、河野 茂（長崎大学院医歯薬学総合研究科・感染分子病態学）  
國島広之（東北大学医学部附属病院・検査部）  
加來浩器（東北大学院医学系研究科・感染制御・検査診断学）  
藤井 毅、中村哲也（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、附属病院感染免疫内科）

研究要旨 インターネット上で手軽に検索し、情報を得ることを主目的とした『生物テロ関連疾患の診断・検査・治療マニュアル』を作製した。総論では、生物テロを想定すべき状況やサーベイランス・モニタリングシステム、バイオハザード対策について記載した。また、生物テロに関連する疾患として特に重要と考えられる疾患について、鑑別のための一覧表および症候別フローチャートを提示した。各疾患については、要点をコンパクトにまとめたサマリーおよび詳細な記述を並列させ、疾患の概略を手短に理解できるとともに、詳しい情報も得られるように配慮した。また、カラー図版を多用することによって“目で見て理解する”要素を重視した。

### A. 研究目的

生物テロに用いられる可能性のある病原微生物は多彩で、その多くは極めて稀でかつ重篤な疾病を引き起こす。すなわち、感染拡大防止と生命予後改善のためには、生物テロ関連疾患の臨床診断、検査材料および検査方法の選択、治療法の選択について、多くの医療従事者が正確な知識を、インターネットなどを通じて手軽に得られることが大切である。本研究においては、最新のデータに基づいた、インターネット上で広く利用できる臨床診断および治療マニュアルの作成をおこなうことを目的にした。

### B. 研究方法

生物テロに用いられる可能性のあるウイルス疾患につき、文献その他により情報収集をおこない、臨床的特徴や病原診断法、治療法などについてまとめた。

（倫理面への配慮）

特になし

### C. 研究結果

マニュアルの総論として、生物テロに用いられる可能性がある生物剤の種類や特徴、投射・散布手段、想定すべき状況（生物剤の種類による被害発生の違いなど）、サーベイランス・モニタリングシステム、バイオハザード対策について記載した。また、生物テロ関連疾患として特に重要と考えられる、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熱の15疾患については、鑑別診断のための一覧表（参考資料1）および症候別のフローチャート（参考資料2）を提示した。

これらの各疾患については、発生が疑われる状況から診断、治療にいたる対応の流れをフローチャートで示すとともに、潜伏期や感染経路、臨床症状、検体採取と輸送、検査法や治療などの要点をサマリーとしてコンパクトにまとめた。また、各疾患の詳細としては、病原体の特徴、主な臨床像、臨床検査所見、確定診断、治

療、予防（ワクチン）、バイオハザード対策、感染症法における取り扱いについて、最新の正確な情報をできるだけ詳しく記載した。さらに、“目で見て理解する”要素を重視して、各疾患の皮膚所見やレントゲン像、菌の染色像や培養形態、病理組織所見などのカラー図版を多用して、より実践的でわかりやすいマニュアルとした。

#### D. 考察・結論

生物テロの被害者たちが何か症状に気付いて先ず受診するのは最寄りの医療機関である。しかし、生物テロは一般には稀な疾患を引き起こすため、多くの臨床医は経験がない。最初に患者を診療する医師が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、生物テロに用いられる病原体は強毒である可能性が高く、極めて迅速な情報入手が必要である。本研究で作製した『生物テロ関

連疾患の診断・検査・治療マニュアル』は、万一の状況において、生物テロに関連した疾患情報をまとめて検索できるシステムとして、実践的な役割を果たすことが十分に期待できる。

#### 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  
発表なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

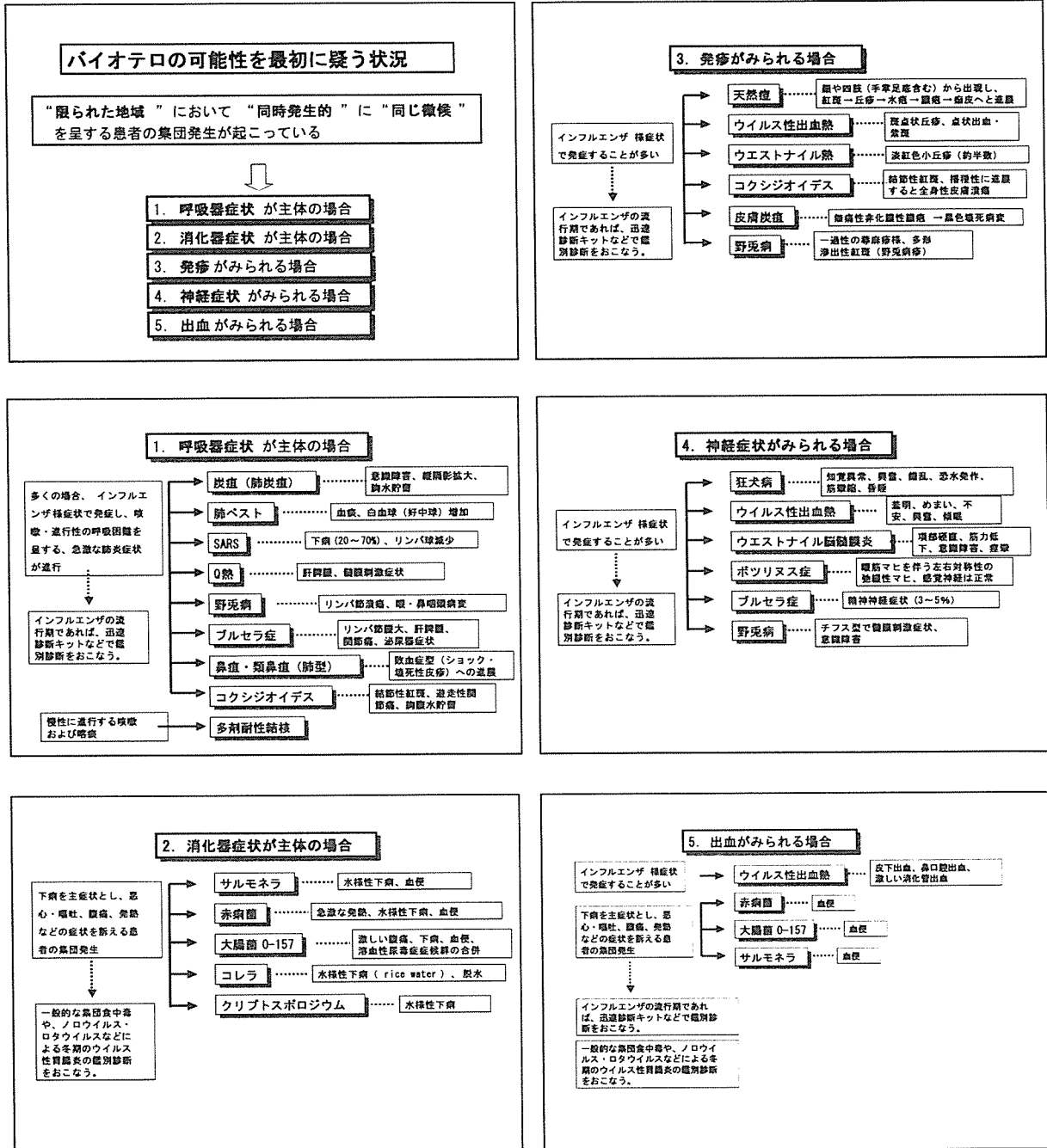
該当なし

### 参考資料1

#### バイオテロ関連疾患:主要症状一覧

疾患名		臨床徴候					
		インフルエンザ様症状	呼吸器症状	消化器症状	皮膚症状	精神神経症状	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・体幹有意の斑状皮疹
	クリミア・コンゴ出血熱	○		○	○	○	粘膜(消化管)出血・失明・めまい
	ラッサ熱	○	△	○			比較的緩徐な発症・粘膜(消化管)出血・髄膜炎
ウエストナイル熱・脳炎		○			○	○	リンパ節腫脹・小丘疹・髄膜炎刺激症状
Q熱		○	○				肝脾腫・髄膜炎刺激症状
狂犬病		△				○	咽喉頭の痙攣(恐水症)・不安感・麻痺・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・消血性尿毒症候群
	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→落屑
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
ポツリヌス症				○		△	消化管・泌尿器系障害・視覚異常・眼瞼下垂・運動障害・呼吸筋麻痺
野兔病		○	○	△		○	急激な肺炎症状・リンパ節潰瘍・眼・鼻・扁桃病変・意識障害

バイオテロ関連疾患：鑑別診断フローチャート



## 10. バイオテロ関連感染症の臨床診断と治療

分担研究者 松本 哲哉 東京医科大学 微生物学講座 教授

研究協力者 中村明子 (共立薬科大学)

岩崎恵美子 (厚労省仙台検疫所)

亀井克彦 (千葉大・真菌医学研究センター)

満田年宏 (横浜市大医学部附属病院・臨床検査部)

尾家重治 (山口大医学部附属病院・薬剤部)、

川名明彦 (国立国際医療センター・呼吸器科)

岩田健太郎 (亀田総合病院・総合診療感染症科)

小林寅喆 (三菱化学ピーシーエル(株))

谷口清洲 (感染研・感染症情報センター)

真野 薫 ((株)協和企画)

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、16のバイオテロに利用される可能性の高い疾患群を対象に平成17年3月にとりまとめた。平成17年度に本マニュアルを基にしたホームページを作成することが決定し、新たなワーキンググループを発足させ準備を進めてきた。平成18年度はホームページ原案が完成し、従来のワーキンググループに加えてさらに8名の外部の識者による拡大検討委員会を作成し、ホームページの改訂に向けて意見を求めた。集まった意見を参考に改訂作業を進め、本年度内の一般公開が可能な段階に至っている。今後は一般の臨床家を中心に本当に利用しやすいマニュアルを目指して、より多くの方から意見を求めて改訂の参考にするとともに、ホームページのあり方や運用方法についてもさらに検討を進める予定である。

### A. 研究目的

近年、世界的に生物兵器の使用の可能性などが議論されるに伴い、バイオテロに対する関心も高まってきている。幸い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。ただし国内におけるバイオテロ対策に向けた情報は明かに不足しており、バイオテロに遭遇した際の対応も基準となるものが定められていない。このような現状において、もし国内でバイオテロが発生した際に、まず最初に患者を診察することになるであろう一般の臨床医にとって、インターネットなどを通じて迅速に必要な情報にアクセスできる体制の構築が望まれる。

このような背景をもとに、バイオテロ対策や

バイオテロに使用される可能性のある感染症に必要な知識の普及を目的として、本マニュアルのホームページ化が決定した。本ホームページにおいては、バイオテロに遭遇した際の診断や対応の補助的役割を担うとともに、本ホームページを通じて、バイオテロ対策への社会の関心を高めることも、重要な課題と考えられる。

### 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
  - ・ウィルス性出血熱
  - ・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
- 

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ながらマニュアル改訂を実施するとともに、さらに広く意見を求めるために 8 名の識者からなる拡大検討委員会を作成し、ホームページの原案をもとにして意見を集めた。集められた意見は各疾患の担当者に返し、修正等の対応を決められた後で、ホームページの管理者に連絡し、実際のホームページにその修正を反映させた。

(倫理面への配慮)

特になし

### C. 研究結果

平成 18 年度は以下の項目を主体として研究を実施した。

1) ワーキンググループによる改訂作業の継続：

ワーキンググループにおいては引き続き、マニュアルの内容の再チェックを行い、更新された情報については新規の内容に改めた。

より目指す内容にたどり着きやすくするた

めに、検索機能の充実を図ると共に、ホームページ内リンクについてもその構成を見直した。画像については、臨床を重視した画像を追加するべく CDC、WHO、タイ、フィリピンなどの、海外施設、国内の大学、研究所、病院等の施設から広く収集を行った。それによって、改訂前に 54 あった画像の数は改訂後には 109 にまで増やすことができた。さらに画像の著作権のチェックも重要なポイントとなるため、出版関連の業者に依頼して全画像をチェックするとともに、著作権が未解決の画像は直接交渉を行った。

### 2) 拡大検討委員会の作成とホームページの改訂：

ワーキンググループのメンバー以外に、広く意見を求めるために、各専門領域(微生物全般、真菌、公衆衛生、臨床感染症、臨床検査、消毒薬、小児科、呼吸器)の識者からなる拡大検討委員会を作成した。彼らにはホームページの原案をクローズドにて閲覧してもらい、それぞれの立場から意見を提出してもらった。拡大検討委員会の意見の一例としては、本ホームページの目的等をトップページで明確化した方が良い、連絡窓口、相談先などについて情報を提示した方が良い、実際の検査内容に関する注意事項について追加すべき、消毒法などの情報についても記載すべき、感染症法の改定内容をホームページにも反映して欲しい、といった意見が寄せられた。これらの意見を受けて、それぞれの内容に対応すべく改訂が進められている。なおホームページの一般公開は年度内に予定されている。

### 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。

本来、この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たが、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上困難であると結論づけられた。そこでインターネットを介してホームページにアクセスすることで利用できる状況を目指すため、マニュアルを専用のホームページに移し替えて公開することが決定した。これにより、印刷されたマニュアルを探す必要がなくなり情報へのアクセスの簡便さは格段にアップした。また新しい情報を入手した際の内容の更新がホームページのアップデートにより随時可能となった。また、ホームページを公開することで、現在、ワーキンググループ、拡大検討委員会、を中心に行っている改訂作業に関して、より広く意見を求めることが可能となると期待される。

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している。

本研究班による成果は以下の点において、行政施策に貢献できるものと考えている。すなわち、1)感染症法の改定と関連して危険な病原体の取り扱いについて周知徹底を図れる、2)行政のバイオテロ対策の一環として、本ホームページの利用が可能である、3)バイオテロ関連の問い合わせについて、適切な窓口へ導く参考になる。今後、感染症法の改定に伴って病原体の取り扱いや管理の方法について関心が高まることが予想されるが、本ホームページがそれに関連した情報を与えることができれば、より一般への周知徹底の一助になるものと考えられる。また、行政が取り組んでいるバイオテロの対策について、本ホームページから与える情報も重要な意味を持つと考えられる。また今後何らかの事態が起こった際に、その相談窓口や検査の問い合わせを巡っては混乱が生じることが予想される。その場合に疾患の鑑別とともに必要な検査に関する情報を与える本ホームページの役割は重要であると思われる。

## E. 結 論

バイオテロ対策に向けたホームページの一般公開に向けて、ワーキンググループおよび拡大検討委員会による検討を行い、ホームページ内容の改訂を行った。これにより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すと共に、国民一般にもバイオテロに関して注意を喚起し、関心を高める一助になると期待される。さらに今後は CD-ROM 化など新たなメディアを通じた情報の発信に向けて検討を重ねていく予定である。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Matsumoto T, Matsumura K, Anwar KS, Mollah AH, Murakami H, Kobayashi I, Kawagoe K, Shiga S, Kishimoto T, Nahar N, Tateda K, Yamaguchi K: Prevalence of *Chlamydomphila pneumoniae* among Bangladeshi children under age 5 years with acute respiratory infections. J Infect Chemother 12: 139-44, 2006

### 2. 学会発表

- 1) 松本哲哉: 厚生労働省研究班によるバイオテロ対策マニュアルについて (シンポジウム)。第 80 回日本感染症学会総会 (東京) 2006 年 4 月

## 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



# 1 1. 評価による技術的基盤整備に関する研究

分担研究者 山本 保博 日本医科大学 教授

研究協力者 岡部信彦、大日康史（感染研・感染症情報センター）  
柏樹悦郎、井村俊郎（関西空港検疫所）  
金谷泰宏（防衛医大・防衛医学研究センター）  
中瀬克己（岡山市保健所）  
藤井 毅（東大医科学研究所・感染免疫内科）  
森川 茂（感染研・ウイルス第1部）  
島田 靖、川井 真、小井土雄一、牧野俊郎、近藤久禎  
（日本医科大学・救急医学）

研究要旨 バイオテロ等による天然痘発生時における、保健所、検疫所、研究所、医療機関、医療従事者、行政機関等の役割について、各分野の専門家により検討した。今年度は、天然痘への対応における基本方針を策定し、天然痘対応マニュアルに必要な項目を提示した。このことにより新型インフルエンザ対応は天然痘対応と多くの共通点があることがわかり、標準的な感染症対策、バイオテロ対策を提示できる可能性があることが示唆された。次年度は、天然痘対応マニュアルの細目の策定、精緻化を課題とする。

## A. 研究目的

テロを含んだ災害対応については、訓練や類似の事例からの経験により適宜見直されていく必要がある。天然痘への対応については、平成16年に天然痘対応指針（第5版）が出されている。しかし、近年、SARS、新型インフルエンザ対応において、感染症対策の新たな知見が示されている。

そこで、今回、天然痘対策の今までの積み上げの上に、近年の感染症対策の知見を踏まえて、新たな天然痘への対応方針、及びマニュアルのあり方を提示することを目的とした。

## B. 研究方法

天然痘が発生した際、第一に対応することが想定される保健所、検疫所、研究所、医療機関、医療従事者、行政機関等の役割について、各分野の専門家による検討をおこなった、検討に当たっては、従来の天然痘対応指針と新型インフルエンザ対応計画を参考にした。

## C. 研究結果

現行の天然痘対応指針（第5版）は以下の項目により構成されている。

1. 基本方針
2. 組織体制
3. 報告基準
4. 症候群別サーベイランス
5. 保健所における初期対応
6. 保健所に必要な装備及び備品
7. 検査材料の採取
8. 検体材料の輸送
9. 医療体制
10. 治療指針
11. 患者移送
12. 消毒・汚染除去等
13. 疫学調査及び接触者の管理
14. 予防接種
15. 広報及び情報提供

この項目及び新型インフルエンザ対応計画を参考として、天然痘対応マニュアルに必要な項目について検討した。その結果、天然痘の基礎知識、基本方針、行動計画、ガイドライン・ケースシナリオ等が挙げられた。

天然痘の基礎知識に関しては、従来の天然痘対応指針に示されている事項を基礎として検討することとした。

基本方針については、症例定義、報告基準、フェーズ分け、医療提供体制、ワクチン接種戦略について検討することとした。とりわけフェーズ分けについては、従来の、平時、蓋然性上昇時、国内発生時に加え、国内大規模発生時についても加える必要性が指摘された。ここは、現行指針の、1 基本方針、2 組織体制、3 報告基準、9 医療体制をカバーするものとした。

行動計画については、新型インフルエンザ対応に倣い、フェーズ毎の対応の記載について検討した。記載する項目としては、計画と連携、サーベイランス、予防と封じ込め、医療、情報提供・共有とした。新型インフルエンザ対応に準じた対応を基本に天然痘の特徴も踏まえ検討した。とりわけワクチン接種に関わる対応については天然痘の特色であり、ここは、現行指針の、1 基本方針、2 組織体制、9 医療体制をカバーするものとした。

ガイドライン・ケースシナリオについては、以下の項目について、専門家による分担作業によって検討し、今年度はその原案が提示された。カッコ内は現行指針の対応項目である。

- ◆ テロ対応の基本
- ◆ サーベイランス (4 症候群サーベイランス)
- ◆ 予防接種 (14 予防接種)
- ◆ 診断・治療 (10 治療指針)
- ◆ 医療機関、公的環境等の感染対策 (11 患者移送、12 消毒・汚染除去)
- ◆ 積極的疫学調査 (5 保健所における初期対応、6 保健所に必要な装備、備品、13 疫学調査及び接触者の管理)
- ◆ 検疫
- ◆ リスクコミュニケーション (15 広報及び情報提供)
- ◆ 参考資料：検体の取り扱い等 (7 検体材料の取り扱い、8 検体材料の輸送)

また、主に国際空港におけるバイオテロ対応を検証するための訓練についてそのあり方を検討し、成田空港において実施した。

## D. 考 察

今年度は、天然痘対応研究組織を形成し、天然痘対応の基本方針を策定し、マニュアルの原案を提示した。この作業を通じて、新型インフルエンザの対応を基本として天然痘対応について検討することは概ね可能であることがわかった。このことにより、今後多種多様な感染症、バイオテロ対応について標準的なモデルを提示できる可能性が示唆された。

次年度は、天然痘対応マニュアルの細目を策定すること、演習・訓練によりマニュアルの更なる精緻化を図ること、危機管理に関する研修等で使用できるよう天然痘対応の講義資料を作成することを課題とする。

## E. 結 論

天然痘発生時の対応について、各分野の専門家による検討により、対応の基本方針を策定し、マニュアルに必要な項目を提示した。このことにより新型インフルエンザ対応は天然痘対応と多くの共通点があることがわかり、標準的な感染症対策、バイオテロ対策を提示できる可能性があることが示唆された。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 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

分担研究者 出口 弘 東京工業大学複雑システム数理分野 教授

研究協力者 兼田敏之 (名古屋工業大学)、内山巖雄 (京都大学)  
安川文朗 (同志社大学)

**研究要旨** 天然痘をはじめとする新興再興感染症に対して感染後の病態変化に関する病態モデル、感染が生じる都市の構造とそこでの人間活動モジュール、感染プロセスモデルの三つに大きく分けてモデル化し、様々なシナリオの組み合わせをその上で評価できるようにした。また SOARS という言語を用い感染症専門家を交えてのグループプログラミングという手法を発展させグリッドシミュレーションを行い、多くのシナリオの評価を行った。結果として、天然痘に関し、ワクチネーション政策、学校の閉鎖政策、ワクチンの備蓄政策等を総合評価した。

### A. 研究目的

天然痘をはじめとする新興再興感染症に対し個々の人間が活動する形でのモデルをアドホックでない形で策定するためには、感染プロセスと対策に関して、幾つかの一般的なモジュールに分けてこれをモデル化することが必要となる。本研究では、感染後の病態変化に関する病態モデル、感染が生じる都市の構造とそこでの人間活動モジュール、人間の社会的活動の中での感染プロセスを表現する感染プロセスモデルの三つに大きく分けてモデル化することを目的とした。更にこれらのモデルの上に、様々なレベルでの感染防止対策を導入し、これを評価できることを目的とした。ここで考慮した感染防止対策は、主に社会的な感染防止対策とワクチネーションに関する対策に大別できる。これらをモデルの上で様々なシナリオの組み合わせとして評価できるようにした。

新興再興感染症では、実際にパンデミックが生じるまでその病態や感染の特色が必ずしも明確に分かっているとは限らない。本研究では、感染症の専門家とモデル作成者が集まって短期間にモデルを改変し、可能なシナリオを評価することのできるシステムの策定も目的とした。そのためには SOARS という領域専門家にも比較的容易にモデルの構造の理解や改変が容易なシミュレーション言語を用いて、グループプログラミングという手法を発展させた。さらに多

くのシナリオを同時実行し評価するためのグリッドシミュレーションを行った。

### B. 研究方法

#### 1) 病態遷移モデル

本研究では、天然痘を含む新興再興感染症の病態遷移を表現するために、感染のレベルを 0: 未感染, 1: 初期感染, 2, 2m, 3, 3m, 3s, 4m, 4c, 5, D: 死亡, 0i: 回復と免疫獲得、といった幾つかの状態とその状態を取る日数、及び状態間の遷移確率で与えるモデルを用いた。図 1 はその一般的なフレームである。これにより天然痘やインフルエンザなど幾つかの感染症の病態遷移を表現することができる。病態遷移の確率は、治療パターンによってもその遷移プロセスは変化するが、今回は治療モデルによる遷移プロセスの変化は割愛した。また本モデルではこれ以外のより複雑な病態遷移モデルもモジュールを入れ替えるだけで比較的容易に拡張可能となる。

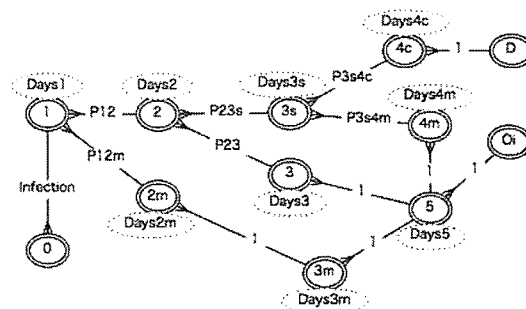


図 1. 病態遷移の一般モデル

## 2) 都市と人口構造のモデル

2-1) 人口構成: 世代は5つ (baby, schoolchild, student, young, middle, old) に区分される。人口の3割が終生免疫を持つ middle と old の世代、7割が赤ん坊から若者まで (young, baby, schoolchild, student) の免疫を持たない世代と仮定する。

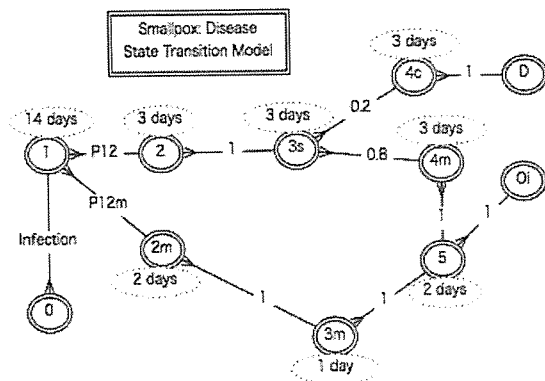


図2. 天然痘用の病態遷移モデル

2-2) 都市の構造と人間活動モデル: 都市の中での感染のプロセスをモデル化するためには、都市構造のモデル化が必要となる。このモデル策定は、現実の都市を想定してようなその都市のレプリカを作るアプローチと、感染に特に関係した要因を抜き出して一般的な都市モデルを策定し、個々の都市の構造を家族構成、世代別人口比率、就学率、就労率、オフィスの数とサイズ、学校の数など幾つの特徴パラメータで表現するモデルに分けられる。本研究では後者のアプローチを採用し、2次医療圏を想定した1万人規模の都市を想定した (図3)。

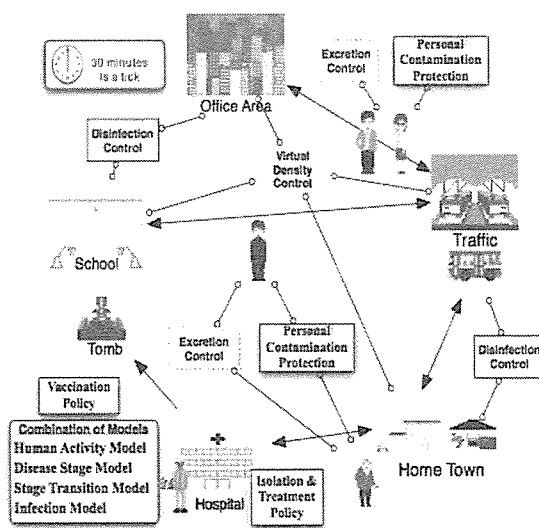


図3. 感染症に関する都市の一般モデル

なお1万人をベースにしたモデルでスクエラビリティを考慮することで数十万の都市についても基本的な感染状況を外挿できるようになっている。都市では、交通チャンネル(車両の収容人員をもった電車の車両やバスのような場)を経由して、オフィスに通う労働者と、地域の学校に通う小学生、交通を利用する中学高校生などがモデル化されており、病態によって病院へと収容される構造となっている。本モデルの範囲では院内感染は扱っていない。

モデルでは上述の都市構造に関するパラメータを表形式で整理し、シミュレーションモデルに読み込む形式となっている (図4)。これにより国内の都市のみならず、例えばバンドンやジャカルタといった途上国の都市構造もそれなりに組込めるようになっている。

## 3) 感染プロセスモデル

都市での感染プロセスを表現するために、ここではそのプロセスを幾つかの段階においてモデル化するアプローチを用いた (図5)。ウイルスを排出する感染者は、そのリスクを排出スケールで表現し、更にそこに排出抑制のフィルターを対策として設定できると仮定する。排出抑制フィルターは例えば咳でウイルス排出する場合のマスクに対応する。排出されたウイルスにより局所的な場 (スポットと呼ぶ) が汚染される。この局所的な場については、その汚染の時間的な減衰に関して消毒などの対策を想定する。これを汚染の除去フィルターと呼ぶ。更に場の汚染が個人の汚染を引き起こすというモデルを仮定し、場の汚染から個人汚染が決定されるプロセスで、場の空間的な密度と個人の防御を感染防止のフィルターとして仮定する。前者は場の人口密度が低いところでは感染リスクが小さくなることを意味する。この具体的な対策としては列車の時差通勤やオフィスや教室でのレイアウトなどが考えられる。後者の個人防御はN95マスクや防護服のような個人の汚染防御の対策を意味する。更に個人の汚染は場の汚染同様に、その汚染の時間的な減衰に関して消毒などの対策を表現するフィルターを想定する。この個人の汚染が最終的に個人の感染リスクを決定する。その間でこのリスクを決定するのがワクチネーションによって決定される個人の抗体価など身体的条件となる。