

200829035A

厚生労働科学研究費補助金
新興・再興感染症研究事業

テロの可能性のある病原体等の早期検知・
迅速診断法の開発とその評価法の
確立に関わる研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

平成21年 3 月

研究代表者

佐多 徹太郎

(国立感染症研究所)

厚生労働科学研究費補助金
新興・再興感染症研究事業

テロの可能性のある病原体等の早期検知・
迅速診断法の開発とその評価法の
確立に関わる研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

平成21年 3 月

研究代表者

佐多 徹太郎

(国立感染症研究所)

平成 20 年度新興・再興感染症研究事業
「テロの可能性のある病原体等の早期検知・迅速診断法の開発と
その評価法の確立に関わる研究」

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 ウイルス第一部	室 長
加来 義浩	国立感染症研究所 獣医科学部	研究員
高橋 英之	国立感染症研究所 細菌第一部	主任研究官
堀野 敦子	国立感染症研究所 細菌第二部	研究員
牧野 壮一	帯広畜産大学 大動物特殊疾病研究センター	理事・ 副学長
高橋 元秀	国立感染症研究所 細菌第二部	室 長
安藤 秀二	国立感染症研究所 ウイルス第一部	主任研究官
黒田 誠	国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター	室 長
田中 智之	堺市衛生研究所	所 長
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	慶応義塾大学 環境情報学部	教 授
尾家 重治	山口大学医学部附属病院 薬剤部	准教授

目 次

I. 総括研究報告書（平成 20 年度）

テロの可能性のある病原体等の早期検知・迅速診断法の開発と
その評価法の確立に関わる研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1

研究代表者：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. 飲料物に混入されたウイルスの感染性と検出法に関する検討
ー 生物テロ対策としてのウイルス検出法の検討ー

研究代表者：佐多 徹太郎（国立感染症研究所・感染病理部）・・・・・・ 7

2. テロの可能性のあるウイルスの鑑別診断法の一次検査体制の構築・・・・・・・・・・ 11

研究分担者：森川 茂（国立感染症研究所・ウイルス第一部）

3. ウイルスによる人獣共通感染症の迅速診断法の開発・・・・・・・・・・ 19

研究分担者：加来 義浩（国立感染症研究所・獣医科学部）

4. ペスト菌の検出と診断法の確立

ペストモノクローナル抗体を用いたペスト菌の迅速検出系の開発

ー ペスト菌に対するモノクローナル抗体の選定と反応条件の検討ー・・・・・・ 25

研究分担者：高橋 英之（国立感染症研究所・細菌第一部）

5. 鼻疽菌・類鼻疽迅速診断・同定法の確立の研究・・・・・・・・・・ 35

研究分担者：堀野 敦子（国立感染症研究所・細菌第二部）

6. 炭疽、ブルセラ、野兔病菌等の網羅的細菌迅速診断法の確立・・・・・・・・・・ 39

研究分担者：牧野 壮一（帯広畜産大学・大動物特殊疾病研究センター）

7. 細菌毒素の迅速検出法の開発	49
研究分担者：高橋 元秀（国立感染症研究所・細菌第二部）	
8. リケッチア・コクシエラ・クラミジアの迅速診断法の開発	57
研究分担者：安藤 秀二（国立感染症研究所・ウイルス第一部）	
9. 超高速病原体ゲノム解読システムの構築と包括的な核酸迅速診断法の確立	63
研究分担者：黒田 誠（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター）	
10. 検体調整法およびスクリーニング法の普及、バイオテロ検査マニュアルの作製と 検査担当者の育成	69
研究分担者：田中 智之（堺市衛生研究所）	
11. バイオテロ関連感染症の臨床診断と治療	91
研究分担者：岩本 愛吉（東京大学医科学研究所・先端医療研究センター）	
12. バイオテロ関連感染症の臨床支援に向けた対策	95
研究分担者：松本 哲哉（東京医科大学・微生物学講座）	
13. バイオテロ対応ホームページ	101
研究分担者：中村 修（慶応義塾大学・環境情報学部）	
14. 次亜塩素酸ナトリウムおよび過酢酸の殺芽胞効果	109
研究分担者：尾家 重治（山口大学医学部附属病院・薬剤部）	
Ⅲ. 研究成果に関する刊行一覧表	113

I. 総括研究報告書

平成 20 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）
テロの可能性のある病原体等の早期検知・迅速診断法の開発と
その評価法の確立に関わる研究

総括研究報告書

研究代表者 佐多 徹太郎 国立感染症研究所感染病理部

研究要旨：当研究班では、バイオテロ関連病原体等の迅速診断検査、抗体検査、病原体分離同定法と検査ネットワークの整備と人材育成、関係機関との情報交換、および病原体ゲノムデータベースの作製、臨床診断支援法の構築とアップデート、そして除染法について取り組み、結果を評価しつつ、確立することを目的とした。本年度の研究成果としては、Viro-Adembeads を用いて飲料物からウイルスを回収することに成功した。新種のエボラウイルスにも対応できる高感度リアルタイム RT-PCR 法を整備した。ニパウイルス抗原検出 ELISA を作成した。類鼻疽菌の分離培養法に改善すべき点が明らかになった。次世代シーケンサを用いた SNPs 解析法は、菌株の由来を特定する初動捜査法として極めて有効であると考えられた。GST 融合蛋白の大量精製法を確立し、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。炭疽菌の検出法は今年度で完成できた。細菌の網羅的検出系の確立が可能となった。マウス接種法に代わるボツリヌス毒素の高感度迅速検出系としてサンドイッチイムノ PCR 法およびイムノクロマトキットを開発した。本邦における「白い粉事件」の集約をアンケート調査にて試みた。医師を主な対象としてバイオテロに関する適切な情報を提供するため作成した“バイオテロ対応ホームページ”を改訂した。改訂に当たって入力部の高機能化を目指し正確な情報の入力を支援するシステムを構築することができた。*B. anthracis* の芽胞の消毒薬抵抗性は、*B. subtilis* の芽胞と同等かまたはそれ以下であった。

研究分担者（計 13 名）：

森川 茂（国立感染症研究所・ウイルス第一部・室長）
加来 義浩（国立感染症研究所・獣医科学部・主任研究官）
高橋 英之（国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官）
堀野 敦子（国立感染症研究所・細菌第二部・研究員）
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・理事・副学長）
高橋 元秀（国立感染症研究所・細菌第二部・室長）
安藤 秀二（国立感染症研究所・ウイルス 1 部・主任研究官）
黒田 誠（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析・研究センター・室長）
田中 智之（堺市衛生研究所・所長）

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（慶応義塾大学・環境情報学部・教授）
尾家 重治（山口大学医学部附属病院薬剤部・准教授）

A. 研究目的

2001 年 9 月 11 日の米国ニューヨーク世界貿易センタービルへの航空機テロ後に、炭疽菌芽胞混入郵便物によるバイオ（生物）テロが起こり、世界的に関心が高まった。わが国では「白い粉」による多数の模倣事件が起こり、その後、内閣危機管理室を中心として関係省庁で対応体制が構築されてきた。2004 年の「国民保護法」の制定、2006 年の感染症法改正による「特定病原体等」の管理などである。

病原体等の入手と取扱いそして迅速診断・同定法に関する科学的情報は、バイオテロの脅威

に対抗する上で、当初より管理ないし制限されてきた。一次対応機関で用いる検査キットの多くはブラックボックス状態で使用せざるを得ない状況にある。病原体等の由来を知るには塩基配列の情報が必要であるが十分公開されていない。対応のアルゴリズムは米国や英国の関連機関からも公表されているが、わが国の実情に即したものを、わが国独自に開発していくことが必要となる。

バイオテロは病原体等が散布されて患者発生までに潜伏期があり、稀な疾患であるため、早期検知には一次医療機関の医師等への臨床診断支援が必須である。環境中および患者検体から原因病原微生物の迅速な検出と同定、そして、確認のために患者の血清抗体検査や病原体等の分離同定も必要となる。BSL4 病原体以外は地方衛生研究所や国立感染症研究所の設備で可能である。さらに病原体の由来を知るためには塩基配列の解析とデータベースが重要である。

現在までに多くの病原体等（毒素を含む）の迅速診断法を開発し、臨床診断支援のマニュアルやバイオテロ対応ホームページを作製した。またプロトタイプ網羅的迅速診断法も開発した。しかし病原体の入手が困難なことから特異性の検討は十分とはいえず、鑑別診断とその普及および国内の検査ネットワーク整備に問題を残している。ホームページの活用には、画像が有力な情報となるがいまだ少なく、疾患の追加、治療法や除染法を含めた内容のアップデートそして実際の対応体制の整備も不十分である。

当研究班では、バイオテロ関連病原体等の迅速診断検査、抗体検査、病原体分離同定法と検査ネットワークの整備と人材育成、関係機関との情報交換、および病原体ゲノムデータベースの作製、臨床診断支援法の構築とアップデート、そして除染法について取り組み、評価しつつ確立することを目的とする。本研究によって、患者の早期の適切な診断・治療から感染拡大の防止につながり、国民のバイオテロに対する不安が軽減され、さらにバイオテロ事件および模倣事件に対する抑止効果も期待できる。

B. 研究方法

1) 事件ないし環境および人体検体を用いた特定病原体等の迅速診断法と確認評価方法の開発

迅速電顕観察法の確立とヒト病理検体の迅速診断法の開発として、ネガティブ染色電顕で

病原微生物を確認する迅速診断法の確立と入手可能な特定病原体等のレファレンス用写真を作製する。環境検体からの検出法や網羅的ウイルス検出法の特異性評価を行い、地研に普及し評価する（佐多）。ウイルス性特定病原体の鑑別診断法の開発として、ウイルス性出血熱、痘瘡ウイルス、ニパウイルスの鑑別診断を目的とした multiplex 検出法および血清診断系の開発を行う（森川）。ウイルスによる人獣共通感染症の迅速診断法の開発として、ニパウイルス特異モノクローナル抗体を作製し抗原捕捉 ELISA 法を開発する、そして野外動物検体で感度と特異性の検証を行う（加来）。薬剤耐性を含む細菌迅速診断法の開発として、国内で唯一ペスト菌を保有しており、病原体培養同定法と対比しつつ、特異抗原を検出する迅速診断法、薬剤耐性の迅速診断法を開発する（高橋英）。鼻疽・類鼻疽迅速診断・同定法の確立として、類鼻疽菌の分離培養同定および核酸診断法を開発し、鼻疽菌の診断法を開発する。そして両者の特異的診断法および鑑別法を確立する（堀野）。炭疽、ブルセラ、野兎病菌等の網羅的細菌迅速診断法の確立をめざして、網羅的 PCR 法、特異抗原の特定と組換え蛋白および特異抗体の作製、検出目的別に網羅的 PCR 法の構築と DNA およびイムノクロマトの作製、実証試験による検出系の検証と精度管理法の確立（牧野）。クラミジア・コクシエラ・リケッチャの迅速診断法の開発：リケッチャ、Q 熱コクシエラ、オウム病クラミジアの real time PCR 法と Multiplex 検出系を開発する。そして地研で検証を行う（安藤）。細菌毒素の迅速検出法の開発として、PCR 法によるボツリヌス毒素のサブタイプ検出法および血中抗毒素価定量法、毒素迅速検出イムノクロマト法の開発、これらの検証と地方衛生研究所への普及をはかる（高橋元）。超高速病原体ゲノム解読システムの構築と包括的核酸迅速診断法の確立として、次世代シーケンサによる超高速病原体ゲノム解読システムを構築し、炭疽菌等の日本固有株の全ゲノム配列を解読しデータベースを構築し、システム評価を行う。同時に未知の病原体も検出できるシステムを構築する（黒田）。

2) 検体調整法およびスクリーニング法の普及、バイオテロ検査マニュアルの整備、そして人材

育成（田中）：地研は検査の一次対応機関で、検体調整法のマニュアル化と普及、地研で対応可能な病原体等の検出実技研修を通して対応能力強化と人材育成を行う。当研究班のスクリーニング法を普及するとともにシミュレーションを通して対応能力を評価する。感染研を含めた検査ネットワークを樹立し検証する。

3) 臨床診断支援方法の開発および有効な治療方法の確立

バイオテロ関連疾患の臨床診断支援法の開発のうちバイオテロ対応ホームページへの質問要望等の対応方法を構築し、Q&A を作製するとともに診断アルゴリズムを高度化し、状況に応じた機能評価を行い、臨床診断支援ネットワークを樹立する（岩本）。バイオテロ対応ホームページのアップデートと治療法の確立をめざし、対象疾患の追加とともに一〜二次医療機関や検査センターでの検査対応能力の評価、ワクチン関連情報のアップデート、そして抗菌薬情報の検証とアップデートを行う（松本）。Web 情報の管理方法の確立としてバイオテロ関連疾患情報は、公開する上で特殊性があるので、内容のアップデートに従い、情報公開の仕組みに関する研究開発を行う（中村）。

4) 有効な除染方法の開発と確立：細菌芽胞はもっとも消毒抵抗性高いので、枯草菌芽胞を用いた環境や機材の有効な消毒法を検討し、ほかの病原体等について評価検証する（尾家）

（倫理面への配慮）

ヒト検体を用いた研究には、対象者に対し人権擁護、インフォームド・コンセントに配慮し疫学研究に関する倫理指針に則り、各施設の研究倫理委員会の承認をえる。実験動物を扱う場合は、実験動物委員会の審査と承認を得て、動物愛護の精神に則る。組換え DNA 実験では遺伝子組換え実験等安全管理委員会の承認をえる。また特定病原体等の取扱は感染症法に従う。

C. 研究結果

1) 事件ないし環境および人体検体を用いた特定病原体等の迅速診断法と確認評価方法の開発

生物テロとしてウイルスが飲料水などに混

入された事態を想定し、ウイルスの効率的な検出法、さらに、飲料物がワクシニアウイルス感染に与える影響についても検討し、Viro-Adembeads を用いて飲料物からウイルスを回収することに成功した。近年ウガンダで流行したエボラ出血熱の原因ウイルスは新種あるいは新型のエボラウイルスであり、これまでのプライマーでは検出できなかったが、エボラウイルス共通リアルタイム RT-PCR を新たに構築し、合成鋳型を用いてその有用性を明らかにした。抗ニパウイルス F、G 蛋白質ウサギポリクローナル抗体を用いた抗原検出 capture ELISA を開発した。新規に解読を行った *R. japonica* のゲノム情報を用いた結果、リケッチア族のみに高度に保存されている特異的な遺伝子配列群としてオルソロググループを同定し、特異的標的配列を同定した。ペスト菌の F1 antigen に対するモノクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法を用いたペスト菌検出法を作成・評価した。核酸検出系のほかに、類鼻疽菌の分離培養法の検討を行った。3 株の炭疽菌国内分離株に対し、次世代シーケンサを用いた SNPs 解析法は、バイオテロに使われた場合に使用炭疽菌株の由来を特定する初動捜査法として極めて有効であると考えられた。迅速法と並行して、全ゲノム配列から全 SNP 情報を抽出し、より精度の高い株の特定が可能になった。炭疽菌、野兔病菌、ブルセラ菌、鼻疽・類鼻疽菌に焦点をあて、網羅的に検出できる遺伝子検出法および免疫学的検出法の開発研究を行った。マウス接種法に代わるボツリヌス毒素の高感度迅速検出系として、サンドイッチイムノ PCR 法の検出感度は 100 pg/mL、およびイムノクロマトキットの検出感度は 10ng/mL (1000 マウス ipLD50/mL) の毒素を検出する系を開発した。

2) 検体調整法およびスクリーニング法の普及、バイオテロ検査マニュアルの整備、そして人材育成

特定病原体取り扱いの対応能力に関する地衛研の現状をアンケート調査した結果、対応能力は備わっているものと判断された。過去のバイオテロの教訓として、本邦における「白い粉事件」の集約をアンケート調査にて試みた。「白い粉事件」では 1,050 以上の検体を地衛研が取

り扱った。事件の前後で、地衛研では、ハード面、ソフト面の整備のみならず感染研、各自治体との連携の強化、健康危機管理要領の作成、検査マニュアルの充実等、健康危機対応の機運が一段と高まった。過去の経験に基づいた危機意識の維持と新しい検査・診断技術の習得を図りつつ、バイオテロに向けた対応が今後も重要である。

3) 臨床診断支援方法の開発および有効な治療方法の確立

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、インターネット上で手軽に情報を得ることを目的とした『生物テロ関連疾患の診断・検査・治療マニュアル』のホームページを作成し、専門家の意見を取り入れながら修正とアップデートをおこなってきた。今年度は、昨年実施したインфекションコントロールドクター (ICD) を対象としたアンケート調査の結果で、改善の要望が多かった「疾患の鑑別」について改訂作業をおこなった。また、常に Up to date の内容を維持して欲しいという要望が多く寄せられたので、本来のホームページとは別に「改訂専用ホームページ」を新たに開設し、研究協力者のコメントや訂正を蓄積していった。その結果、総計 188 のコメントが寄せられ、改訂を行った。さらにインターネットに接続できない状況においても利用可能な状況を整えるため、ホームページの内容をもとに 2009 年版の CD-ROM を作成し地方衛生研究所全国協議会加入機関など全 81 カ所に配布を行った。バイオテロに対応する情報をインターネットを通じて広く公開する基盤環境をさらに、効率的なものにするため、コンテンツ管理システムへの機能の追加を行った。

4) 有効な除染方法の開発と確立

炭疽菌 (*B. anthracis*)、枯草菌 (*B. subtilis*)、破傷風菌 (*C. tetani*) およびクロストリジウム・ディフィシレ (*C. difficile*) の芽胞を用いて、2 種の消毒薬の殺芽胞効果を検討した。過酢酸および次亜塩素酸ナトリウムに対する抵抗性の強さは、*B. subtilis* $\geq$ *B. anthracis* $\geq$ *C. tetani* $\geq$ *C. difficile* であった。

D. 考 察

抗ベスト菌 F1 抗原の抗体の選別が確立されていなかったため、一時間以内に作業が終了する直接抗体法 (以下 DFA) ではなく、三時間ほど費やす IFA による検出系の確立にとどまった。来年度には直接法を検討したい。

地衛研では、突然の健康危機に必要な迅速性、正確性を一層高く備えるには、ハード面の整備のみならず、技術面での向上のための研修、実技の習得が重要と考えられた。ハード面、ソフト面の整備のみならず感染研、各自治体との連携の強化、健康危機管理要領の作成、検査マニュアルの充実等、健康危機対応の機運が一段と高まった。過去の経験に基づいた危機意識の維持と新しい検査・診断技術の習得を図りつつ、バイオテロに向けた対応が今後も重要である。

バイオテロ対応ホームページについては、一般の臨床医が日常的に経験することは極めて少なく医学的知識が乏しいと考えられるバイオテロ関連疾患を鑑別診断にあげることができる本フローチャートの有用性は認められたものの、内容および使い勝手が不十分であったと考えられた。本ホームページによる情報提供がどれだけ寄与できるかについては、本ホームページの内容をどれだけ充実させることができるかによると思われる。

E. 結 論

バイオテロ関連病原体等の迅速検出法の開発については順調に進んだ。とくに次世代シーケンサを用いた解析により病原体の由来調査ができる可能性がでてきた。地研が対応したいいわゆる「白い粉事件」の経験を今後にも生かせるように集約した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

各研究分担者の報告書参照。

2. 学会発表

各研究分担者の報告書参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
登録なし
3. その他
なし

II. 分担研究報告書

1. 飲料物に混入されたウイルスの感染性と 検出法に関する検討

— 生物テロ対策としてのウイルス検出法の検討—

研究分担者 佐多徹太郎 国立感染症研究所 感染病理部

研究協力者 波多野 弁 (陸上自衛隊開発実験団・部隊医学実験隊)
片野晴隆、小島朝人 (国立感染症研究所・感染病理部)

研究要旨 生物テロとしてウイルスが飲料水などに混入された事態を想定し、ウイルスの効率的な検出法を検討した。ウイルスを捕捉する多価電解質の磁気ビーズ Viro-Adembeads を用いることで、水道水、オレンジジュース、牛乳、緑茶に混入されたヒトヘルペスウイルス 8 (HHV-8) 及び痘瘡ワクチン株であるワクシニアウイルス (LC16m8 株) を迅速に回収することが可能であった。さらに、飲料物がワクシニアウイルス感染に与える影響についても検討し、オレンジジュース、緑茶に混入した場合、ワクシニアウイルスの感染力価が著しく低下することが判明した。これらの知見は、ウイルスを用いた生物テロに対する効率的な対処を考える上で重要と考える。

A. 研究目的

2001 年のアメリカ炭疽菌テロ事件を契機とし、生物テロ対策はますます重要となってきた。生物テロの多くは秘密裏に計画、実行され、通常、開始からテロと認識されるまでには相当の時間を要することから、テロを早期に察知することは非常に困難である。しかしながら、生物テロに使用される病原微生物をなるべく早く、検出、同定する方法をあらかじめ検討しておくことで、より迅速な対処が可能となる。WHO のガイドライン (WHO 報告: Public health response to biological and chemical weapons, 2nd edition 2003) によれば、生物テロに用いられるウイルスとして、天然痘ウイルス、ベネズエラ馬脳炎ウイルスなどが指摘されているが、生物テロとしてウイルスが使用された際の迅速検出法に関しては、未だ確立されているとは言い難い。

今回、我々は、生物テロとしてウイルスが水道水、オレンジジュース、緑茶、牛乳に混入された事態を想定し、これらのサンプルからウイルス多価電解質磁気ビーズ Viro-Adembeads を用いて迅速にウイルスを回収し、定量的 PCR 法により検出する方法の確立を試みた。また、同時に飲料物がウイルス感染に与える影響についても検討した。

B. 研究方法

1) 検査材料

国立感染症研究所において保存されている、ヒトヘルペスウイルス 8 (HHV-8) 及びワクシニアウイルス (LC16m8 株) を検討材料として用いた。これらのウイルスを混入する物質として、水道水、オレンジジュース、緑茶、牛乳 (コンビニエンスストアで購入) を用いた。

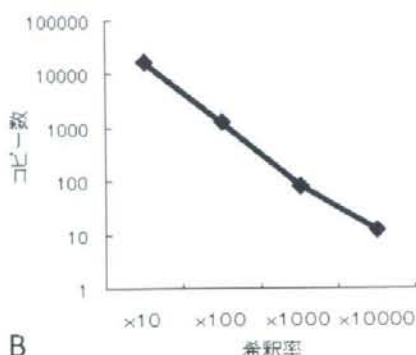
2) 実験方法

a) Viro-Adembeads を用いたウイルス回収法
ウイルス原液を、水道水、オレンジジュース、緑茶、牛乳を用いて、10 倍、100 倍、1,000 倍、10,000 倍の希釈ウイルス溶液をそれぞれ 900 μ l 作成し、Viro-Adembeads (Ademtec 社) を用いてウイルスを回収し、最終量 50 μ l にした。回収したウイルス溶液から、DNA extraction kit (Qiagen) を用いてウイルス DNA を抽出し、Taqman PCR にてウイルス DNA の定量を行った。Real time PCR 装置は MX3005P (ストラタジーン社) を用いた。また、ウイルス原液 100 μ l から直接 DNA extraction kit を用いて DNA を抽出し、ウイルス量を定量することにより、Viro-Adembeads によるウイルス DNA 回収率の変化を検討した。

b) 飲料物がウイルス感染に与える影響についての検討

ワクシニアウイルスを、水道水、緑茶、麦茶、オレンジジュース、牛乳でそれぞれ希釈し、室温で20分放置した。その後、CV-1 cell に希釈したウイルス溶液を添加し、90 分間 感染させた。ウイルス溶液を除き、PBS で洗浄後、培地を加え、培養を行った。2 日後に、ホルマリン固定後にクリスタルバイオレット染色を行い、ブラック数により感染力価の評価を行った。

A



B

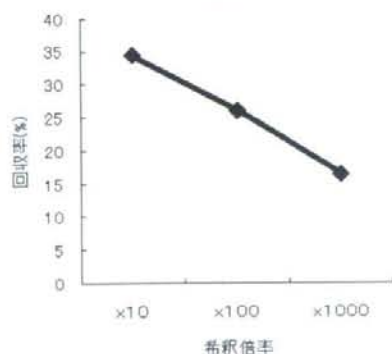


図1 Viro-Adembeads による HHV-8 の回収。(A) DNA コピー数。培地中に HHV-8 を希釈し、Viro-Adembeads を用いてウイルスの回収を行い、抽出した DNA からウイルス DNA コピー数を定量した。(B) 回収率。希釈率を上げると回収率が低下する。

C. 研究結果

1) Viro-Adembeads を用いた HHV-8 ウイルスの回収・検出

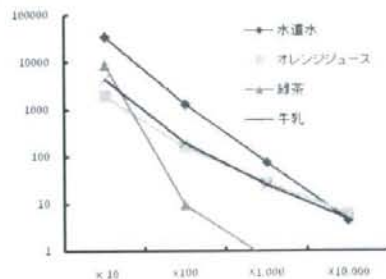
a) HHV-8 のウイルス濃度による DNA 回収率の変化

HHV-8 に対する Viro-Adembeads の有効性を評価した。HHV-8 を RPMI1640 培地で段階的に希釈し、Viro-Adembeads を用いてウイルス DNA を回収した。回収されたウイルス DNA はウイルス濃度に比例して減少し、ウイルス回収率は希釈率を上げると減少する傾向が認められた。(図1)

b) HHV-8 ウイルス混入溶液の種類によるウイルス回収率の違い

次に HHV-8 ウイルス溶液を、水道水、オレンジジュース、緑茶、牛乳で希釈し、Viro-Adembeads を用いてウイルスを回収後、DNA を抽出し、その回収率を検討した。いずれの溶液においても、DNA 回収量はウイルス濃度にほぼ比例し、水道水に比較して、オレンジジュース、お茶、牛乳いずれも DNA 回収量は低下した(図2)。DNA 回収率を検討したところ、水道水と比較して、オレンジジュース、緑茶、牛乳からのウイルス回収率は低かった。

A



B

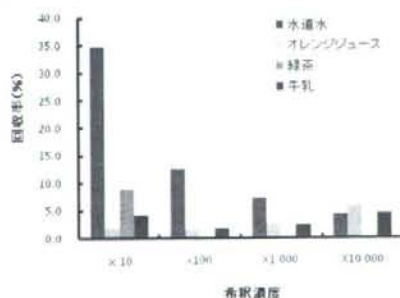


図2 飲料物に混入した HHV-8 の Viro-Adembeads による回収 (A) DNA コピー数。(B) 回収率。

2) Viro-Adembeads によるワクシニアウイルス(LC16m8)回収実験

ワクシニアウイルス(LC16m8)を用いて同様の検討を行った。濃度依存性にウイルス DNA 回収量は減少し、x1,000, x10,000 溶液では Real time PCR の検出感度以下であった。HHV-8 と比較すると、ワクシニアウイルスの回収率はいずれの飲料物においても低かった (図3)。

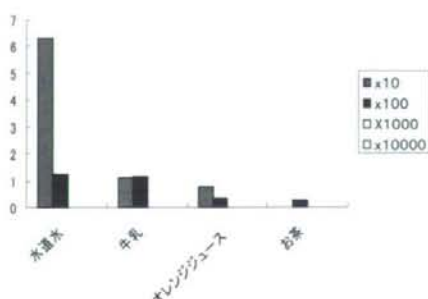


図3. 飲料物に混入したワクシニアウイルスの Viro-Adembeads による回収率。縦軸は回収率(%)。

3) 混入飲料物によるワクシニアウイルス感染への影響に関する検討結果

培地 (DMEM)、水道水、牛乳、麦茶で希釈したワクシニアウイルスは感染性にほとんど影響がなかったのに対し、緑茶、オレンジジュースで希釈したワクシニアウイルスでは、プラーク数が激減し、感染性の著明な低下が認められた。(図4)

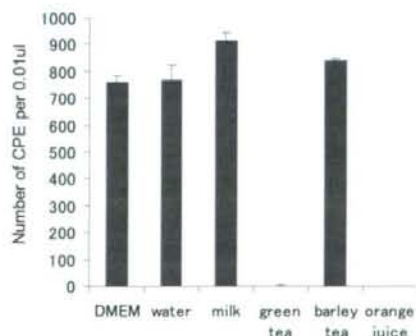


図4. 飲料物に混入したワクシニアウイルスの感染性の検討。縦軸はワクシニアウイルス 0.01ul(約1,000 PFU)あたりの CPE 数。

D. 考 察

我々の検討では、HHV-8 の場合は、水道水及び培養液におけるウイルス DNA 回収率は比較的高く、Viro-Adembeads を用いることにより検出感度を上げられるものと考えられた。一方で牛乳、オレンジジュース、緑茶では、ウイルス回収率は低く、これらの飲料物に混入された場合、Viro-Adembeads によるウイルス回収は希釈率や条件などによっては、やや困難であると思われた。ワクシニアウイルスは、HHV-8 と比較して全体的に Viro-Adembeads による回収率が低かった。これにはいくつかの理由が考えられる。最大の原因は定量的 PCR に用いたプローブ、プライマー配列が天然痘ウイルスを検出するために設計されたものであり、ワクシニアウイルスと相同性のある配列を標的にしているが、標的配列が完全に一致した配列ではないためである。もう一つの理由は、Viro-adembeads との結合能がワクシニアウイルスとヘルペスウイルスの間で異なる可能性があるためである。これらの問題は今後、検討しなければならない課題である。Viro-Adembeads はウイルス特有のタンパク質やエピトープを補足する多価電解質の磁気ビーズで、これまでに HIV、CMV、インフルエンザウイルスを濃縮するのに用いられてきた。そのウイルス濃縮操作は超遠心法と比較して簡易であり、約 30 分で終了する。また、その回収率も溶液によっては超遠心法と比較して高いといわれている。

(http://www.ademtech.com/products.aspx?id=104&id_p=58)。今回のオレンジジュース、お茶、牛乳などに混入された場合は、Viro-Adembeads による濃縮率は低下し、その効果は限定的であったものの、水道水の場合は効率的にウイルス濃縮が可能であったと考えられ、水道水などの異物があまり混入していない溶液にウイルスが混入された場合には、Viro-Adembeads は有効なウイルス検出手段であると思われた。

天然痘ウイルスとワクシニアウイルスは同じボックスウイルスであり、感染機構は近似している。今回の研究でワクシニアウイルスは、緑茶、オレンジジュースに混入された場合、その感染性が著しく低下することが明らかになった。この結果は緑茶、オレンジジュースが天然痘ウイルスにおいても同様の感染性の低下を引き起こす可能性を示唆するものであり、今後、飲料物へのウイルス混入事例が起きた場合の対処要領を考える上で、参考となる重要な知見と考える。

E. 結 論

Viro-Adembeads を用いて飲料物からウイルスを回収することに成功した。水道水など、比較的混入物の少ない液体からのウイルス回収に役立つものと考えられた。また、ワクシニアウイルスは、オレンジジュース、緑茶に混入されると、感染性が著しく低下することが分かった。今後の効率的な生物テロ対策を考える上で、重要な知見と考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

- 1) 片野晴隆、菅野隆行、佐多徹太郎，定量的 PCR による網羅的ウイルス検出法の開発とエイズ剖検例の各臓器におけるウイルス感染プロファイル 第 97 回日本病理学会総会 2008.4 金沢
- 2) 片野晴隆、加納基史、中村智之、菅野隆行、浅沼秀樹、佐多徹太郎，定量的 PCR による網羅的ウイルス検出法の開発とエイズ剖検例の各臓器におけるウイルス感染プロファイルの解析，第 56 回日本ウイルス学会学術集会 2008 年 11 月、岡山。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

2. テロの可能性のあるウイルスの鑑別診断法の 一次検査体制の構築

研究分担者 森川 茂 国立感染症研究所 ウイルス第一部

研究協力者 福士秀悦、水谷哲也、西條政幸、倉根一郎

(国立感染症研究所・ウイルス第一部)

研究要旨 エボラウイルスは、バイオテロリズムに用いられる危険性が最も高いウイルスの1つであると指摘されている。これまでに、エボラウイルスに関しては、抗原検出系、遺伝子検出系、抗体検出系を開発し、評価してきた。これらにより、疑い患者発生時の鑑別診断体制は整備されたと考えられた。しかし、近年ウガンダで流行したエボラ出血熱の原因ウイルスが新種あるいは新型のエボラウイルスであることが明らかになり、*Bundibugyo ebolavirus* と命名された。このウイルスは、従来のエボラ共通 RT-PCR では検出できないか、低感度でしか検出できないことが分かった。そこで、新たなエボラウイルス共通リアルタイム RT-PCR を構築し、合成鋳型を用いてその有用性を明らかにした。

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。これらの疑い患者が発生した場合等には、対象とするバイオテロ病原体別の実験室診断法による的確な診断を行うことは重要である。しかし、これらの検査を一元的に国立感染症研究所等で行なうことは物理的に不可能となる場合がある。このため、類似の初期症状を呈するウイルス感染症との鑑別診断を整備し地研等を含めた全国レベルで一次検査体制を構築することが重要である。本研究では最終的にバイオテロ病原体の的確な実験室診断法を整備・改良するとともに、類似の初期症状を呈するウイルス感染症との鑑別診断法を整備することを最終的な目的とする。

本年度は、ウガンダのエボラ出血熱の流行の原因病原体として新たに分離同定された *Bundibugyo ebolavirus* (表1) は、当初フィロウイルス共通 RT-PCR として世界中で用いられている L 遺伝子検出 primers である *filoA/filoB* で検出できなかった。今般、その遺伝子配列が明らかになったため、その理由がこの領域の遺伝子配列の *heterogeneity* によることがわかった。そこで *Bundibugyo ebolavirus* も含めた高感度なエボラウイルス共通リアル

タイム RT-PCR による遺伝子検出法の開発を行った。

B. 研究方法

- 1) 各種エボラウイルスの NP 遺伝子配列による分子系統学的解析: *Bundibugyo ebolavirus* が新型のウイルスとして報告された際に、全遺伝子配列から分子系統解析を行われ、*Cote d'Ivoire ebolavirus* にかなり近縁であると報告されている。最も配列の保存されている NP 遺伝子配列から *Mega4 program* を用いて *Bundibugyo ebolavirus* の分子系統樹を作成し他のエボラウイルス種との関係を確認した。
- 2) primer および probe: エボラウイルスの L 遺伝子の最も保存されている 293 塩基からなる領域を標的として 3 種の forward primers と 2 種の reverse primers の混合 primers をデザインした。Forward primers から 26 塩基の一部 degenerated な 2 種類の FAM ラベル Taqman probes をデザインした。
- 3) 鋳型 DNA: Reston ebolavirus, Sudan ebolavirus, Cote d'Ivoire ebolavirus および、*Bundibugyo ebolavirus* (それぞれ GenBank accession No. NC_004161, NC_006432,

FJ217162 および、FJ217161) の L 遺伝子 293 塩基の部分に 3 分割し、オーバーラップするようにして合成した 100-120 塩基のオリゴヌクレオチドを用いて自己鋳型による PCR を行い、各オリゴを連結した。得られた PCR 産物をリアルタイム RT-PCR のスタンダード DNA として用いた。

- 4) リアルタイム RT-PCR: 3 種の forward primers と 2 種の reverse primers、2 種の Taqman probes、2 × QuantiTect Probe PCR Master Mix (QIAGEN 社) を混合し、10 倍段階希釈したスタンダード DNA を加え、ライトサイクラーを用い、図 1 に示す条件で RT-PCR を行った。

C. 研究結果

- 1) Mega4 program を用いて、エボラウイルスの報告されている NP 遺伝子配列をもとに NJ 法 (nucleotide p-distance model) を用いて bootstrap=1000 で分子系統解析を行なった。その結果、図 2 に示すように Bundibugyo ebolavirus は、Cote d'Ivoire ebolavirus に最も近縁ではあるが別種のウイルスであることが確認できた。また、L 遺伝子配列から filoA/B による従来の RT-PCR では検出が困難であるのは、filoA の配列の特に 3' 側の不一致が原因と考えられる。最近、本ブライマーによるリアルタイム RT-PCR が開発されたが、Reston ebolavirus が検出できないことが指摘されているが、これも 3' 側の不一致およびその他の不一致で 23% 配列が異なるためと考えられた。
- 2) これまでに塩基配列が報告されている Zaire ebolavirus, Reston ebolavirus, Sudan ebolavirus に加え、2008 年に明らかになった Cote d'Ivoire ebolavirus および、Bundibugyo ebolavirus の L 遺伝子の塩基配列を比較したところ、L 遺伝子の 5' 側にウイルス種間で保存されている領域を見いだした。各ウイルス種間における 4-5 塩基の variation に対応するため、forward primer を 3 種、reverse primer を 2 種、Taqman probe を 2 種設定した。
- 3) それぞれのエボラウイルス種のターゲ

ット領域に相当する DNA を合成し、スタンダード DNA とした。定量されたスタンダード DNA の 10 倍段階希釈したものを鋳型に、上記の混合 primers および混合 probes を用いたリアルタイム RT-PCR を行ったところ、Reston ebolavirus, Sudan ebolavirus, Cote d'Ivoire ebolavirus および、Bundibugyo ebolavirus とともに、10 コピーまで検出可能であった (図 3)。なお、本リアルタイム RT-PCR は、Zaire ebolavirus も検出可能である。

D. 考 察

これまで、エボラウイルス、マールブルグウイルス共通の filoA/filoB primers による RT-PCR 法が、国立感染症研究所や動物検疫所での遺伝子検査の方法として用いられてきた。しかし、この RT-PCR 法では検出できないエボラウイルス種があることがわかった。なお、Cote d'Ivoire ebolavirus の遺伝子配列は部分的にしか決定されていなかったが、昨年全配列が決定され、このウイルス種も従来の primers では低感度にしかならぬことが予想された。このため、エボラウイルス特異的ウイルス遺伝子検出法の改良が急務となり、本年度は、TaqMan probe を用いるリアルタイム RT-PCR 法を作製し、合成鋳型 DNA を作製して評価した結果、10 コピー程度の遺伝子を検出できる高感度な検査法であった。本リアルタイム RT-PCR 法は Reston ebolavirus を検出できることは、感染材料を用いて確認している。今後、本試験法で陽性の場合に、再確認検査用及びウイルス種特定検査法として用いるウイルス種別 RT-PCR 法を Cote d'Ivoire ebolavirus と Bundibugyo ebolavirus に関しては整備する必要がある。

なお、最終的にはウイルス性出血熱や天然痘の実験室診断は国立感染症研究所が行うが、図 4 に示すような検査スキームを国内に整備する必要がある。来年度以降、オルソボックスウイルス共通リアルタイム PCR 法の国内での整備を始めとして整備して行きたい。

E. 結 論

新種のエボラウイルス (Bundibugyo ebolavirus) にも対応できる高感度なリアルタ

イム RT-PCR 法を整備した。これにより、従来の検査法では見落とす可能性があったウイルス種に関しても、検出可能な検査法に改良できた。

F. 健康危険情報

2007-2008 年にウガンダで流行したエボラ出血熱の病原が、Bundibugyo ebolavirus という新しいウイルスであった。2008 年からフィリピンでブタの Reston ebolavirus 感染が確認されているが、ヒトの健康被害は報告されていない。一方、2008 年にはマールブルグ熱の輸入症例（ウガンダより帰国）がオランダで 1 例発生し、死亡している。また、2008 年 1 月にウガンダから帰国した米国人がマールブルグ熱を発症し回復している。北米大陸では初めての輸入症例である。両者ともウガンダ西部の Maramagambo Forest の洞窟を訪れている。

G. 研究発表

- 1) Yamao T, Eshita Y, Kihara Y, Satho T, Kuroda M, Sekizuka T, Nishimura M, Sakai K, Watanabe S, Akashi H, Rongsriyam Y, Komalamisra N, Srisawat R, Miyata T, Sakata A, Hosokawa M, Nakashima M, Kashige N, Miake F, Fukushi S, Nakauchi M, Saijo M, Kurane I, Morikawa S, Mizutani T. : Novel virus discovery in field-collected mosquito larvae using an improved system for rapid determination of viral RNA sequences (RDV ver4.0). Arch Virol., 154(1):153-8, 2008.
 - 2) Ure AE, Ghiringhelli PD, Possee RD, Morikawa S, Romanowski V. : Argentine hemorrhagic fever diagnostic test based on recombinant Junin virus N protein. J Med Virol., 80(12):2127-33, 2008.
 - 3) Sakai K, Ueno Y, Ueda S, Yada K, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Mutoh K, Yoshioka K, Nakamura M, Takehara K, Morikawa S, Mizutani T. : Novel reovirus isolation from an Ostrich (Struthio camelus) in Japan. Vet Microbiol., 134: 227-32 2009
 - 4) Watanabe S, Mizutani T, Sakai K, Kato K, Tohya Y, Fukushi S, Saijo M, Yoshikawa Y, Kurane I, Morikawa S, Akashi H. : Ligation-mediated amplification for effective rapid determination of viral RNA sequences (RDV). J Clin Virol. 43(1):56-9, 2008.
 - 5) Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Iizuka I, Sakai K, Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. : Diagnosis and assessment of monkeypox virus (MPXV) infection by quantitative PCR assay: differentiation of Congo Basin and West African MPXV strains. Jpn J Infect Dis. 61(2):140-2, 2008.
 - 6) Maeda K, Hondo E, Terakawa J, Kiso Y, Nakaichi N, Endoh D, Sakai K, Morikawa S, Mizutani T. : Isolation of novel adenovirus from fruit bat (Pteropus dasymallus yayeyamae). Emerg Infect Dis. 14(2):347-9, 2008.
- #### H. 知的財産権の出願・登録（予定を含む）
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし

表1. Ebola HF outbreak chronology

Year	Country	Virus subtype*	Cases	Deaths	Case fatality (%)
1976	Sudan	Sudan	284	151	53
1976	Zaire (DRC)	Zaire	318	280	88
1977	Zaire (DRC)	Zaire	1	1	100
1979	Sudan	Sudan	34	22	65
1994	Gabon	Zaire	52	31	60
1994	Cote d'Ivoire	Cote d'Ivoire	1	0	0
1995	Liberia	Cote d'Ivoire	1	0	0
1995	DRC	Zaire	315	250	79
1996	Gabon	Zaire	37	21	57
1996 - 1997	Gabon	Zaire	60	45	75
1996	South Africa	Zaire	1**	1	100
2000 - 2001	Uganda	Sudan	425	224	53
2001 - 2002	Gabon	Zaire	65	53	82
2001 - 2002	DRC	Zaire	59	44	75
2002 - 2003	DRC	Zaire	143	128	90
2003	DRC	Zaire	35	29	83
2004	Sudan	Sudan	17	7	41
2004	Sudan	Sudan	20	5	25
2005	DRC	Zaire	12	9	75
2007	DRC	Zaire	249	183	73
2007 - 2008	Uganda	Bundibugyo	149	37	25
2008-2009	DRC	Zaire	36 ?	12 ?	33
Total			2314	1533	

Restonは、カニクイザルでの流行のみでヒトの発症者はいない。