

200931021A

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・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21年度 総括・分担研究報告書

平成22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
新型インフルエンザ等新興・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21年度 総括・分担研究報告書

平成22年 3 月

研究代表者

佐多 徹太郎

(国立感染症研究所)

平成 21 年度新型インフルエンザ等新興・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	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	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	室長
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 21 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）

輸入イムノクロマトキットの評価

－ BioThreat Alert Tetracore －・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 7

研究分担者：高橋 元秀（国立感染症研究所・細菌第二部）

II. 分担研究報告書

1. 迅速電顕観察法およびヒト病理検体の迅速診断法の開発

－ フィールドで使用できる生物テロ感染病原体の検出法の確立
携帯用使い捨てカイロを用いた LAMP 法の検討－・・・・・・・・・・・・ 17

研究分担者：佐多 徹太郎（国立感染症研究所・感染病理部）

2. ウイルス性特定病原体の鑑別診断法の開発・・・・・・・・・・・・・・・・ 21

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・・・・・・・・ 27

研究分担者：加来 義浩（国立感染症研究所・獣医科学部）

4. 薬剤耐性を含む細菌迅速診断法の開発

－ ペスト菌特異的抗体を用いたペスト菌の迅速検出系の開発－・・・・ 33

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・・・・・・・・・・・・ 41

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・・・・・・・・・・・・・・ 4 5
 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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5 5
 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・・・・・・・・・・・・・・ 6 5
 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・・・・・・ 7 5
 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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 8 7
 研究分担者：田中 智之（堺市衛生研究所）
11. バイオテロ関連疾患の臨床診断支援方法の開発
 - バイオテロ関連感染症の臨床診断と治療 -・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 10 1
 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. バイオテロ対応ホームページのアップデートと治療法の確立
 - バイオテロ関連感染症の臨床支援に向けた対策 -・・・・・・・・・・・・・・・・ 10 3
 研究分担者：松本 哲哉（東京医科大学・微生物学講座）
13. Web 情報の管理方法の確立
 - バイオテロ対応ホームページ -・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 10 7
 研究分担者：中村 修（慶応義塾大学・環境情報学部）
14. 有効な除染方法の開発と確立
 - 次亜塩素酸ナトリウムおよび酢を添加した次亜塩素酸ナトリウムの殺芽胞効果 -
 研究分担者：尾家 重治（山口大学医学部附属病院・薬剤部）・・・・・・・・・・・・ 11 3

Ⅲ. 研究成果に関する刊行一覧表 1 1 7

I. 総括研究報告書

平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金（インフルエンザ等新興・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、網羅的ウイルス遺伝子 PCR 法を地研向けに改変し配布し評価した。環境検体からの核酸抽出法として磁気ビーズ法を開発し、また携帯型炭疽菌核酸検出法を開発した。豚のレストンエボラウイルスの抗体検出系および遺伝子検出系を開発した。ポックスウイルス共通遺伝子検出法をキット化し地研に配布し評価した。ニパと狂犬病ウイルスの抗原検出 ELISA を開発した。蛍光抗体法によるペスト菌の検出法を確立した。鼻疽および類鼻疽菌のレファレンス用の菌株数を増強し、分離同定法を検討し、また LAMP 法の開発を行った。カクテル PCR と蛍光ビーズ法を組み合わせた迅速検出法を開発し、病原体や毒素が検出可能となった。野兔病菌の迅速 ELISA 法を開発した。リケッチア属の核酸迅速検出法を開発した。毒素を簡易かつ迅速に検出するイムノクロマトキットの試作品を作製し地研に配布し評価した。次世代シーケンサを用いた炭疽菌の簡易株系統分類法を開発した。殺芽胞効果には次亜塩素酸ナトリウムと酢の混合液が優れていた。全国地衛研の各ブロックから研究協力体制を構築し、ウイルスを対象とする迅速キット二種類について評価検討し問題点を明かにした。バイオテロ対応ホームページ(HP)の改訂を目的としてシステムおよび担当専門家チームを組織し、改訂専用の HP を立ち上げ、最新版に改訂した。CD-ROM を作製し、全国の主要医療機関に配布した。安定した公開を目的としたシステムの試作を行い評価した。また、市販のイムノクロマトキットについて性能評価をおこなった。

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・室長）
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）
ほか、多くの研究協力者（記載は割愛）。

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」による多数の摸倣事件が起こり、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 of 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。

平成 21 年度は研究事業 2 年目となり、昨年度の成果を踏まえた各研究分担者の研究の進展が期待された。また、研究班の活動として、ウイルスを標的とした二種類の検査キットを作成し、地研の担当者に評価をお願いし、将来の検査ネットワーク構築準備の課題を探った。もう一つは、国内のバイオテロ検査担当機関等で導入されている外国製イムノクロマトキットを 3 種類購入しその性状を検討した。

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を確立する。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。また痘瘡鑑別診断系のキット化と地研での評価を行う（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いることから、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として、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、これらの検証と地衛研への普及をはかる（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）

5) バイオテロ病原体等の検査のための外国製イムノクロマトキットの評価：国内のバイオテロ担当機関である警察や消防等は現場での迅速検査を目的として海外検査キット製品であるイムノクロマトキットを購入し保管しているという。使用した結果において問題と考えられる事例があったために、キットの感度や特異性等について、販売店から購入したキットを用いて検討を行った（高橋元ほか研究協力者）。

(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

フィールドで簡便にしかも確実に生物テロ病原体の同定ができる診断法の確立を目指し、携帯用使い捨てカイロを用いた LAMP (Loop isothermal amplification) 法の開発に取り組んだ。携帯用使い捨てカイロを用いた LAMP 法の感度及び特異性はヒートブロックを使用した LAMP 法と比較して差がなかった。網羅的ウイルス検出法のうち可能性の高いものを選択し試作キットを作成し地研に配布し評価した（佐多）。2008 年、豚にレストンエボラウイルスの感染が確認された。ヒトに抗体陽性者が確認されてはいるが健康被害は確認されていない。今回はこのウイルスの NP と GP 抗原を作成後、抗体検出系を構築し、さらにウイルス特異的高感度遺伝子検出系を開発した。またポックスウイルス共通遺伝子検出法をキット化し地研に配布し評価した（森川）。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。また狂犬病ウイルス抗原を検出する capture ELISA も開発した（加来）。リケッチャ属を迅速高感度に検出する real time PCR 法を開発し、さらに *R. japonica* に特異的で高い感度の TaqMAN MGB realtime PCR 法を開発した（安藤）。吸収抗ペスト菌ウサギ血清と抗 F1 ウサギ血清を用いた間接抗体法によるペスト菌の検出系を開発した（高橋英）。類鼻疽菌の分離同定法の検討を行った。また LMP 法を用いた核酸検出系の開発、そして菌株の収集を行った（堀野）。炭疽菌国内分離株に対し、次世代シーケンサを用いた SNPs 解析による簡易株系統分類法を開発し機能することを確認した。また

薬剤排泄系の SNPs を同定した。炭疽菌感染モデルで検討した結果、次世代シーケンサによる病原体網羅検出法を構築した(黒田)。炭疽菌、野兎病菌、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。野兎病菌のサンドウィッチ ELISA、網羅的免疫学的検査法の開発、リシンの検出系を開発した(牧野)。ボツリヌス毒素の高感度迅速検出系として、サンドウィッチイムノ PCR 法を用いて A 型毒素検出系を作成し、評価検討した。またガス壊疽菌毒素に対する抗毒素抗体を作成した(高橋元)。

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

本年度は森川班員の作製した「定量的 PCR 法を用いたオルソポックスウイルスの検出キット」および片野研究協力者の作製した「定量的 PCR 法を用いたバイオテロ特定病原体(ウイルス)の網羅的スクリーニング検査検出キット」について全国 10 地研で評価した。おおむね期待された病原体遺伝子の検出は可能であったが、今後全国地研に普及するにあたっての課題が明らかとなった(田中)。

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、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、内容の訂正とともに改訂と追記を行った(岩本)。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 を作成し全国の主要な医療機関 1,185 カ所に配布した(松本)。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、昨年度にコンテンツ管理システムへの機能の追加を行い、複

数サーバ環境でのシステム動作の実現とサーバ機能の仮想化対応を実現した(中村)。

4) 有効な除染方法の開発と確立

5 種類の細菌芽胞に対する 0.1% 次亜塩素酸ナトリウムの殺芽胞効果を検討した。炭疽菌(*B. anthracis*) は 20 分以内に、ボツリヌス菌や破傷風菌(*C. tetani*) は 5 分以内に、およびクロストリジウム・ディフィシレ(*C. difficile*) の芽胞は 1 分以内に殺滅した。次亜塩素酸に酢を加えたものではより殺滅効果が高くなった(尾家)。

5) バイオテロ病原体等の検査のための外国製イムノクロマトキットの評価

炭疽菌、野兎病菌、ボツリヌス毒素の 3 種類の検出キットについて検討した。 10^5 以上の検出感度があったが、検査の陽性バンドが薄かった。菌の形態の違いによって特異性に問題があるところも見つかった。また取り扱い説明書においても不適切な表現があった(高橋元ほか)。

D. 考 察

研究分担者の研究の進捗はほぼ予定通りであった。迅速検査法としては核酸検出法が主体で、DNA および RNA の PCR 法をもとに、増幅した塩基配列のチェックも同時に行え、コピー数のデータも得られることから realtime PCR 法が最近では中心となっている。さらに高額な機器が不要な核酸検出法として LAMP 法などが使われている。しかし、増幅迅速診断検査法に持って行くためには核酸の抽出とある程度の精製操作が必要となる。キットの使用が殆どと思われるが、この部分に対する取り組みはまだ不十分と言わざるをえない。対象となる塩基配列の人為的な改変や変異による検出感度の著しい低下を防止するため、最近ではやや感度が落ちるものの、簡便さもあってイムノクロマト法などの免疫学的方法を用いた抗原検出法の開発が行われる。検出感度の高い核酸の検出と感度は良くないが特異抗原の検出の両者をうまくつかっていくことを考えた方がいいのかもしれない。

バイオテロ対策として、それぞれの特性を生かした役割分担として、地研を中心とした検査のネットワーク構築が重要で、そのために適切

な検査法の開発と普及が望まれる。今回、感染研での使用を想定した網羅的ウイルス遺伝子検出法としての **realtime PCR** 法のうちから、バイオテロの可能性の高いものを選択し、スクリーニング用のキットとして作製した。またポックスウイルスについても同様のキットを作製することができた。今回初めて地研で検査キットの評価をしていただいたが、いくつかの課題も明らかとなった。次年度はこれらの課題を踏まえたキットの作製を目指して、細菌やクラミジア・リケッチャ等の検出キットを地研での評価のレベルに進めることが期待されている。これらを通じて、地研と感染研との役割分担ができるネットワークを構築するためにも、バイオテロ対策としての検査対象を絞り込んでいきたいと考えている。

外国製のイムノクロマトキットについてはその使い方の検討が必須と思われる。抗原検出は可能であるが、検出感度がそもそも低いこと、インフルエンザ検査キットのような鼻汁や粘液にかぎらず、実際の現場では病原体そのものが検体でもないことから、より検出感度は低くなるのが容易に推測できる。さらに、病原体そのものを使った今回の試験結果でも、対照のバンドにくらべ薄い反応しか得られないとすると、実際の問題が生じたことがよく理解される。この情報を警察や消防等、保持している機関に提供し、同時に連携を深め、役割分担を明確にする意味でも、次年度には、意見交換の場を設定したいと考えている。

バイオテロ対応ホームページについてはさらに **update** した。そして、本年度版の **CDROM** を作製し、全国の主要な医療機関約 1200 カ所に配布することができた。**Web** も同じ内容となっているが、個人の医療情報管理の点で外部のインターネットに接続が不可能な環境での情報検索に役立ててもらいたい。そして今後の改善点に関するご意見をいただき、それとともに、項目の追加、画像情報の追加を図り、最終年度にとりあえずの完成状態に持って行きたいと考えている。**Web** サーバーの問題もある程度の解決法が見つかったので、サーバーの移行や分散等、また今後の維持管理についてもさらに検討し、古い情報がいつまでも変更されずに掲載されているような状態を避けられるようにしていきたい。

E. 結 論

バイオテロ対策として 1) 迅速診断法や病原体等検出法、2) 地研と感染研の検査ネットワーク構築にむけた協力体制と検査方法の評価、3) バイオテロ診断支援システムとしてのホームページの改善と充実の 3 点に加え、4) 研究班として、病原体等の検出市販キットの性能評価をおこなった。検査法として核酸検出法の充実、抗原検出法の開発が行われ、成果を得た。検査ネットワーク構築を目的として、2 種類のウイルス検出キットを作製し地研で評価した。診断支援ホームページの充実とネットワーク環境のない医療機関に **CDROM** を作製し配布した。次年度には反応を見てさらに改善する。全体としておよそ順調に研究が進んだ。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

刊行一覧には 18 編の英文論文を示した。ほかについては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

輸入イムノクロマトキットの評価 —BioThreat Alert Tetracore—

研究分担者	高橋元秀	国立感染症研究所 細菌第二部
研究協力者	見理 剛	(国立感染症研究所・細菌第二部)
	井上 智	(国立感染症研究所・獣医科学部)
	奥谷晶子	(国立感染症研究所・獣医科学部)
	棚林 清	(国立感染症研究所・獣医科学部)
	堀田明豊	(国立感染症研究所・獣医科学部)
	幸田知子	(大阪府立大学大学院・獣医学専攻感染症制御学講座)
	小崎俊二	(大阪府立大学大学院・獣医学専攻感染症制御学講座)

研究要旨 Tularemia Biothreat Alert™ は 6.75×10^5 CFU 以上の野兎病菌で陽性反応を示したが、テストラインの着色が薄かった。類縁菌の *F. novicida* や *F. philomiragia* および大腸菌との反応はなかった。炭疽菌では、芽胞を含む検体の反応で 1.2×10^4 CFU 以上の菌数で陽性反応を示したが、栄養型では 1.0×10^7 CFU 以上の菌数でも陽性を示さない場合があった。検体を一次培養して検査する場合には芽胞を培養する条件が至適と考えられた。他の *Bacillus* 属菌に対する反応性を調べたところ *Bacillus mycoides* (栄養型) について弱い陽性反応が認められたため *Bacillus* 属内での特異性の検討が必要と考えられた。ボツリヌス毒素では、A 型毒素の菌培養液と部分精製毒素の検出感度は異なる結果であった。毒素型の特異性においては B 型毒素 600LD₅₀ では反応バンドが見られないために A 型毒素に対する特異性は確認された。異なる検体での試験精度については、慎重に使用する必要である。

A. 研究目的

本研究班では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。病原体等の取扱いと迅速診断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。実際に国内で消防関係で購入し管理している検査キットは海外から輸入しているが、その品質は科学的に実証されているのか定かではない。今回、研究班で対応可能な病原体について、海外より入手した診断用キ

ットの感度および精度を試験した。

B. 研究方法

国内の消防署等に納入されている Tetracore 社製の野兎病菌検出キットとして Tularemia Biothreat Alert™、炭疽菌検出用の Anthrax Biothreat Alert™ およびボツリヌス毒素検出用の Bot Tox Biothreat Alert™ を輸入販売元の(株)帝国繊維から購入して用いた。ボツリヌス毒素検出用の Bot Tox Biothreat Alert™ の包装と使用書は資料として添付した。各病原体キットの試験に際しては添付の使用書にそって実施した。

1) 野兔病菌検出キットの試験

野兔病菌 *Francisella tularensis subsp. tularensis* Schu 株 (Type A) を CDM broth で 2 日間培養した菌液 (2×10^8 CFU/ml) を用いた。添付の説明書に従い希釈した菌液 500 μ l を同梱のサンプルバッファ-500 μ l と混合し、10 秒間転倒混和後 150 μ l をサンプルポートへ滴下し、15 分後に目視判定した。陰性対照は生理食塩水を用いた。非特異的反応の有無を調べるために類縁菌の *F. novicida* U112 株や *F. philomiragia* (ATCC25018 株) および大腸菌 LMG194 株を用いた。

2) 炭疽菌検出キットの試験

炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) の試験には栄養型 の菌 (Vegetative cells) と芽胞培養液で調整した菌を使用した。栄養型に対する反応試験では、羊血液寒天培地上で増殖した *B. anthracis* 4 株とその他の *Bacillus* 属 菌 (*B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. thuringiensis*, *B. cereus* および *B. mycoides*) のコロニー (図 3) を TS broth で 一晩培養 (1×10^7 ~ 1×10^8 CFU/ml) して使用した。

芽胞培養液で調製した菌は、病原性プラスミド (pX01 および pX02) 欠損株 3 株 (pX01 のみ欠損、pX02 のみ欠損、pX01 および pX02 全て欠損) を用いた。いずれも、羊血液寒天上のコロニーを DSM 液体培地で 3 日間培養したものと TS 寒天培地で一晩培養後に 4°C に 2 日間静置した 2 種類のコロニーをサンプルバッファ-に懸濁して反応試験に使用した。

3) ボツリヌス毒素検出キットの試験

ボツリヌス菌液については、ボツリヌス A 型菌および B 型菌をクックドミート培地 (Difco) で 30°C 2 日間培養し、遠心後、濾紙 (0.22 μ m) をろ過して粗毒素として用いた。

ボツリヌス毒素については、ボツリヌス A 型菌はペプトン・イースト・グルコース培地で 30°C 4 日間培養し、遠心上清を酸沈殿、硫酸沈殿して粗毒素液を調整した。粗毒素はイオン交換およびカラムクロマトグラフィーで精製した M 毒素 (分子量 15 万) を調整して用いた。

(倫理面への配慮)

動物実験は国立感染症研究所動物実験委員会の審査許可を受けて行われた。

C. 研究結果

1) 野兔病菌検出キットの反応性

検出感度の試験では、サンプル滴下後、約 1 分でコントロールラインの着色が確認された。陽性を示すバンドの着色は滴下後 12 分程で確認された (図 1)。

テストラインのバンドは 4.5×10^6 CFU/ml (6.75×10^5 CFU) 以上の菌液で認められたが、 4.5×10^5 CFU/ml では認められなかった。コントロールラインに比較して陽性でもテストラインは薄く、判定しにくかった。

特異性試験では、*F. philomiragia* および *E. coli* の菌液 10^8 CFU/ml でテストラインに反応は認められなかった (図 2、写真左上)。 *F. novicida* 10^8 CFU/ml の菌液ではサンプル全量の吸収展開が著しく遅延し、全液が展開されなかった (図 2、写真右上)。 10^7 CFU/ml の菌液においては全量容易に吸収され、テストラインに反応はなかった (図 2、写真右下)。

2) 炭疽菌検出キットの試験結果

(1) 栄養型の菌

$1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ CFU/ml の炭疽菌液をキットに $50 \mu\text{l}$ 滴下したところ、4 株中 3 株で陽性バンドが確認された (図 4)。しかしながら、滴下菌液を 100 倍希釈 ($1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ CFU/ml) した場合には陽性バンドを確認することができなかった。

キットの反応性について特異性を調べたところ、炭疽菌 4 株中、1 株で陽性バンドを確認できなかった (図 4)。この株は、2 種類の病原性プラスミドのうち毒素遺伝子をコードするプラスミドを保持していない株であった。

また、*Bacillus* 属菌内での反応性を確認したところ、*B. mycooides* で薄い陽性反応が検出されたが、その他の菌種は全て陰性であった (図 4)。

(2) 芽胞培養液で調整した芽胞を含む菌

病原性プラスミドを欠損する炭疽菌 3 株についてキットの反応性を調べたところ、全ての検体 (1×10^6 CFU/ml 相当の芽胞を含む菌液) で強い陽性反応が認められた (図 5 右)。しかしながら、 1×10^4 CFU/ml 相当の芽胞を含む菌液を使用して反応性を調べたところ、両プラスミドを欠損する株では陰性となった (図 5 左)。

3) ボツリヌス毒素検出キットの試験結果

感度試験：テストラインのバンドは $10,000 \text{LD}_{50}/\text{mL}$ の M 毒素液で認められたが、 $1,000 \text{LD}_{50}/\text{mL}$ では認められなかった。

培養液の感度および特異性試験：いずれもサンプル滴下後、約 3-4 分でコントロールラインの着色が確認された。陽性を示すバンドの着色は滴下後、約 12 分程度で確認された。A 型毒素の検出試験では、テストラインのバンドは $5,000 \text{LD}_{50}/\text{ml}$ の毒素液で認められたが、 $2,500 \text{LD}_{50}/\text{ml}$ では認められなかった。B 型毒素の検出系では、 $600 \text{LD}_{50}/\text{ml}$ の毒素液でバンドは認められな

かった。コントロールラインに比較して陽性でもテストラインは薄く、判定しにくかった。

また、A 型毒素には数種の亜型毒素の存在が確認されているため、A2 亜型毒素の検出感度を試験した結果、A1 の毒素 (5000LD_{50}) に比較して約 1/3 の感度 (15000LD_{50}) であった。

D. 考察

今回試験した野兎病菌検出キット Tularemia Biothreat Alert™ による野兎病菌の検出には、 6.75×10^5 CFU 以上の菌量が必要で、反応バンドの着色が薄く判定しにくく、改良が望まれる。野兎病類似菌との反応は認められなかったことから特異性はあるものと考えられるが、菌種によってはサンプル展開が良好に起こらず試験不能となる場合がありうる事が考えられる。また、土等の対象菌以外の物質の混入時の反応性についてはさらに検証する必要があると考えられた。

「炭疽菌検出キット」では、栄養型の菌よりも芽胞を含む菌液で反応性が強く、検出感度も高かった。本キットを用いた検査では、芽胞が効率よく増殖する培養方法を使用することが至適と考えられた。今回、病原性プラスミドを持たない炭疽菌株でも陽性反応が認められたことから、キットに使用されている検出用抗体は炭疽菌染色体上にコードされている菌体表面蛋白質を認識しているものと考えられた。また、*B. mycooides* (栄養型) に対して弱い陽性反応が認められたことから、*B. mycooides* には炭疽菌と共通の抗原蛋白質を菌体表面に発現している可能性が示唆された。

ボツリヌス毒素検出キットにあつては、キットの感度は、試験する材料の違いで、菌培養液または精製毒素で約 100 倍の差 ($5,000 \text{LD}_{50}$ または $500,000 \text{LD}_{50}$) が生じ

た。試験に用いる緩衝液が反応に及ぼす影響が大きいと記載されているために、環境検体の調整が困難な場合が予想される。検体の違いが感度に及ぼす影響には、pH、毒素純度および反応抑制物質等の要因が考えられるために、キット導入にあつては製造所の基礎成績の照会が必要である。キットの特異性は、A型毒素以外にB型毒素との交差反応は認められなかった。しかし、不明瞭な判定には別途販売されているリーダーを必要とするために、経済性、汎用性に劣ることが予想される。

今回試験した病原体検出用キットは米国の陸軍関係者の会社で開発された機器であり、この前のモデルから国内への輸入している。現品の測定可能な病原体は8種類(炭疽菌、ペスト菌、ボツリヌス毒素、リシン、SEB、ツラレミア、ワクチニア、アブリン)である。

キットの価格はいずれの病原体のキット1枚が約10,000円である。判定に際して測定器を使用して判断し、さらに記録と結果の印刷を可能としたキットとなっており、本測定器は2,500,000円である。

国内の消防、警察関係および防衛省の各組織は、信頼性のある試験法の導入ができていない可能性がある。これは、機器購入に際する製品の評価および試験結果の判定基準が用意されていないためである。

国家としての生物兵器への危機管理における事前対応がシステム化されていないために検出機器の導入への判断がおろそかになっている。テロ現場の初動捜査と検体採取、一次検査機関(消防または警察)および検査機器の結果と判定、さらに最終の判断根拠と具体的な対応方法の調整が急務である。

E. 結論

1) Tularemia Biothreat Alert™ は

6.75x10⁵CFU以上の野兎病菌で陽性反応を示したが、テストラインの着色が薄かった。類縁菌の *F. novicida* や *F. philomiragia* および大腸菌との反応はなかった。

2) 炭疽菌では、芽胞を含む検体では1.2x10⁴CFU以上の菌数で陽性反応を示したが、栄養型では1.0x10⁷CFU以上の菌数でも陽性を示さない場合があった。検体を一次培養して検査する場合には芽胞を培養する条件が至適と考えられた。他の *Bacillus mycoides* (栄養型) について弱い陽性反応が認められたため *Bacillus* 属内での特異性の検討が必要と考えられた。

3) ボツリヌス毒素では、A型毒素の菌培養液と部分精製毒素の検出感度は異なる結果であった。毒素型の特異性においてはB型毒素600LD₅₀では反応バンドが見られないためにA型毒素に対する特異性は確認された。異なる検体での試験精度については、慎重に使用する必要である。

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
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



**For the rapid identification of
*Botulinum Toxin.***

Warning: Not for in vitro diagnostic use.

This Kit Contains:

- 25 Bot Tox BioThreat Alert™ Tests**
- 5 Cotton-tipped Swabs**
- 5 Collection Vials**
- 12 milliliters of BioThreat Alert™
Sample Buffer**

テトラコア (Tetracore) 社製
BTA テストストリップス (生物剤検知チケット) キット
取扱説明書

(0803)

帝国繊維株式会社
東京都中央区日本橋 2-5-13

目次

1. BTA テストストリップス キットについて	
1-1	はじめに 3
1-2	テストストリップスの包装袋の表示 3
1-3	キットの内容物 4
1-4	保管方法 4
2. BTA テストストリップス キットの使用方法	
2-1	はじめに 5
2-2	準備 5
2-3	サンプリング (試料採取) 6
2-4	テスト方法 7
2-5	判定方法 9

購入した海外製品の概要 (ボツリヌス毒素検出用)

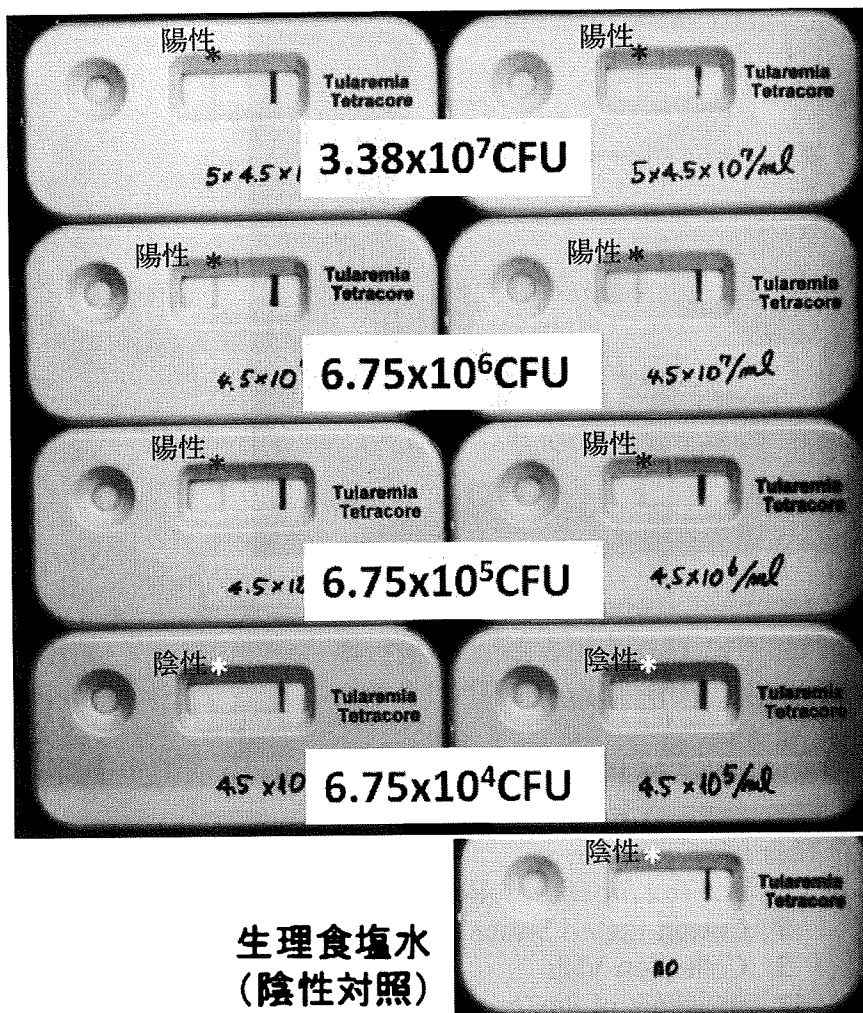


図1. 野兎病菌の検出キットの感度

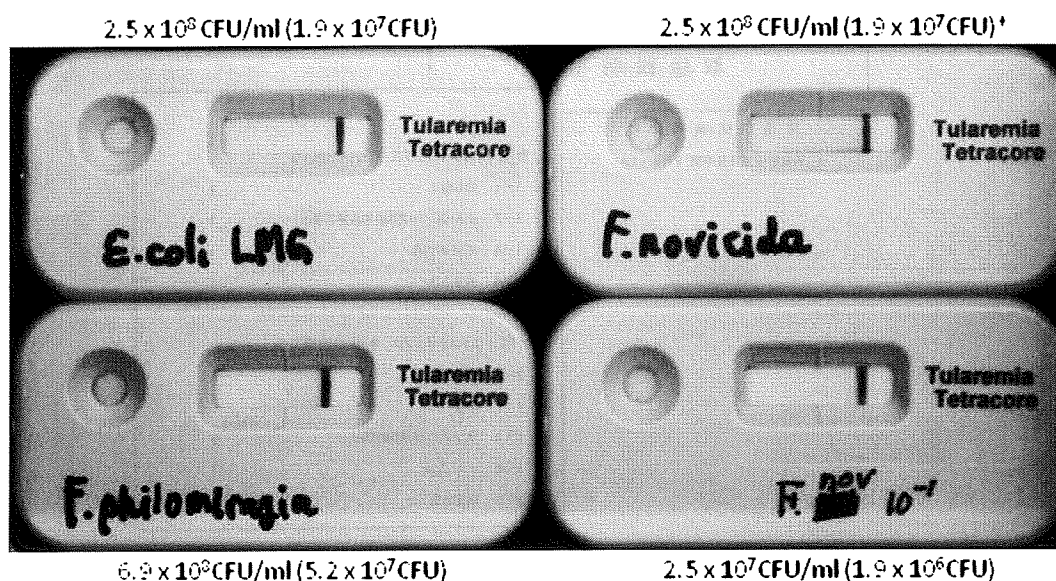


図2. 野兎病菌の検出キットの特異性

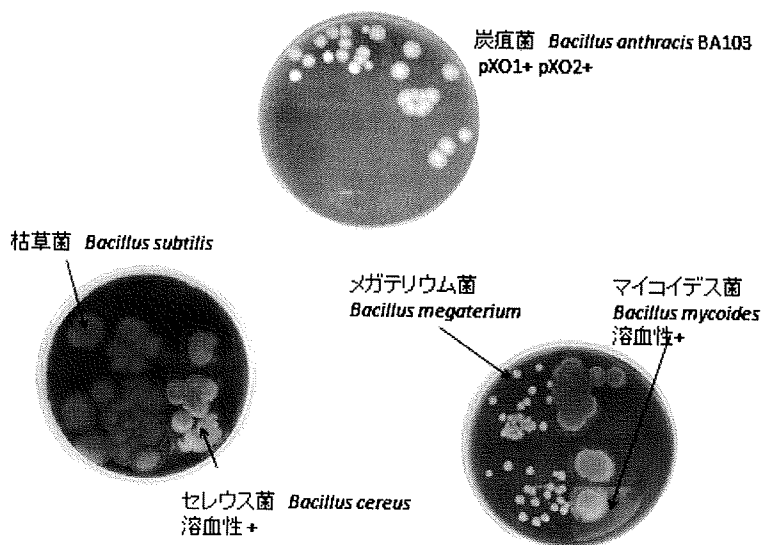


図3. *Bacillus* 属菌の羊血液寒天上コロニー

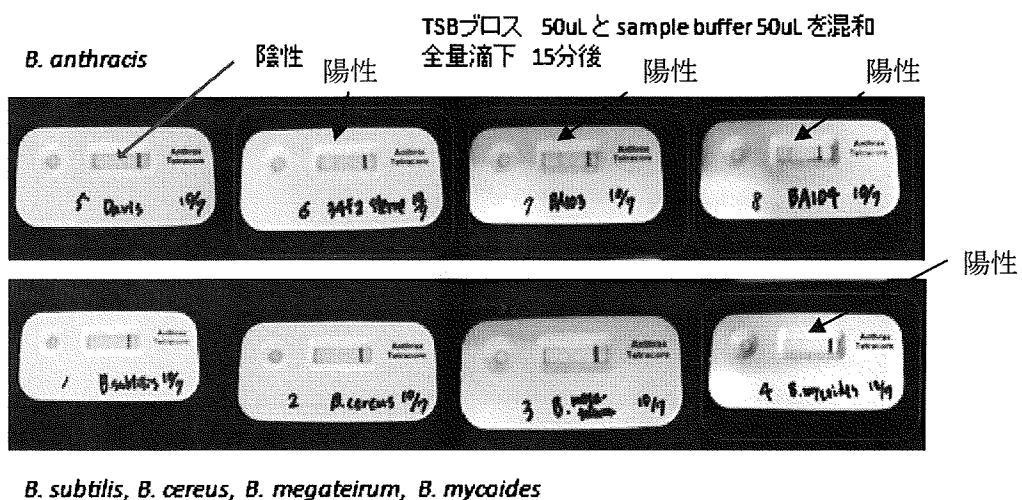
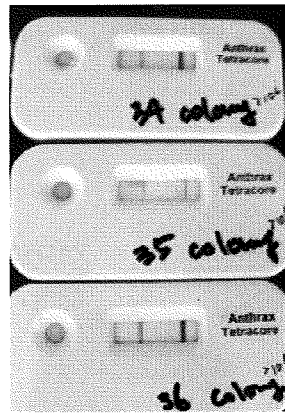
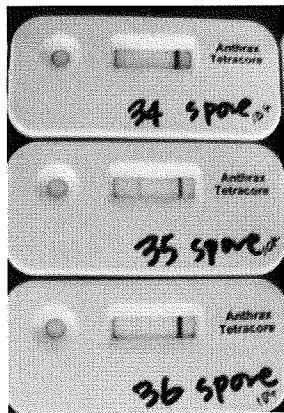


図4. 炭疽菌検出キットの特異性試験



炭疽菌 病原性プラスミド欠損株

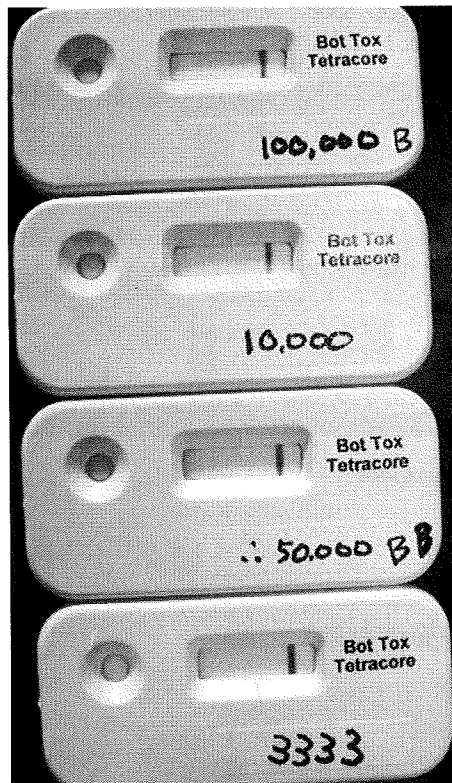
#34:pX01(-) pX02(-) 無莢膜 毒素欠損株

#35:pX01(+) pX02(-) 無莢膜 弱毒株

#36:pX01(-) pX02(+) 有莢膜 毒素欠損株

芽胞菌液 1×10^4 CFU/ml 芽胞菌液 1×10^6 CFU/ml

図5. 炭疽菌検出キットの感度試験



ボツリヌス A 型菌(62A)を TPYG 培地で培養後、上清の毒素を精製した M 型毒素を用いた結果、 $10,000LD_{50}/ml$ の毒素液は陽性で、 $1,000LD_{50}/ml$ では陰性と判定した。

図6. ボツリヌス毒素キットの感度試験