

201028006A

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22年度 総括・分担研究報告書

平成23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22年度 総括・分担研究報告書

平成23年 3 月

研究代表者

佐多 徹太郎

(国立感染症研究所)

平成 22 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
倉園 久生	帯広畜産大学 畜産衛生学研究部門	教 授
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 22 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. 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  
－日本国内における野兔病の組織診断と病態の解析－・・・・・・・・ 7

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・・・・・・・・・・・・・・・・ 17

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・・・・・・・・ 21

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－ペスト菌の検出と診断法の確立－  
ペスト菌に特異的なモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を用いた  
直接抗体法によるペスト菌の迅速検出法の開発・・・・・・・・ 27

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・・・・・・・・・・・・・・・・ 31

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・・・・・・・・ 35

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）

倉園 久生（帯広畜産大学・畜産衛生学研究部門）

7. 細菌毒素の迅速検出法の開発に関する研究	47
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	51
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	55
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	61
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	65
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診断と治療	67
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	
ーバイオテロ対応ホームページ	75
研究分担者：中村 修（慶応義塾大学・環境情報学部）	
14. バイオテロ関連微生物の消毒法	85
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	95

# I. 総括研究報告書

平成 22 年度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

## 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、病原体分離同定と検査ネットワーク体制の整備と人材育成、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、そして病原体の除染法について取り組むことを目的とした。本年度の研究成果は、1950-60 年代の野兔病菌感染ヒト病理組織を対象に形態学、免疫組織学、PCR で検討し、有事に備えてその病変の特徴を把握した。バイオテロ用の網羅的ウイルス遺伝子 PCR 法を改善し地衛研に配布した。豚のレストンエボラウイルスの各種抗体検出系の開発と検査への応用で性能を評価した。ニパウイルスの抗原検出 ELISA の検出感度を感染ウイルスで明らかとし、また狂犬病ウイルスの陽性対照 RNA を保護カプセル化した。直接蛍光抗体法によるペスト菌の特異的検出法を確立した。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。病原体の免疫学的検出・検査法の開発を行い、また炭疽菌、鼻疽菌、類鼻疽菌、ペスト菌、コクシエラ菌、オウム病病原体、レジオネラといった細菌によるバイオテロのスクリーニング用に PCR 法を応用したキットを作製し、適切な機器が利用できる 4 か所の地衛研で評価を行った。リケッチア属の LAMP 法を開発した。次世代シーケンサを用いて、ペスト菌、野兔病菌、類鼻疽菌のゲノム情報解析を行い、大陸・国・地域に特徴的な遺伝情報を包括的に取得し、かつ系統分類解析法を整備した。A 型ボツリヌス神経毒素の検出法として、AlphaLISA はマウス接種法と感度はほぼ同程度で、測定時間がかなり短いため、有望であった。ボツリヌス G 型毒素に対する診断用血清の作製し標準化をはかった。バイオテロ関連微生物で汚染を受けた塩化ビニール板・タイル板・セメント板の消毒には酢添加の次亜塩素酸ナトリウムが、またベニヤ板には過酢酸が有効であることが判明した。全国地衛研の各ブロックから研究協力体制を構築し、細菌を対象とする迅速キットについて評価検討し問題点を明かにした。「生物テロ関連疾患の診断・検査・治療マニュアル」というバイオテロ対応ホームページ(HP)について、10 名の研究協力者によって新たに 23 種類のバイオテロ関連疾患に関する内容が追加執筆された。HP の CD-ROM を配布し、バイオテロに関する各医療施設の認識や準備状況を把握するためにアンケート調査を実施した結果、準備の必要性はあるものの、対応していない施設が 74%に達していた。HP の安定した公開を目的として、内容の蓄積機能を公開機能とは別に構築し、内容の管理システムを実運用できるよう調整した。初期の目標をおよそ達成できた。

研究分担者（計 14 名）：	学部）
森川 茂（国立感染症研究所・ウイルス第一部・室長）	高橋 元秀（国立感染症研究所・細菌第二部・室長）
加来 義浩（国立感染症研究所・獣医学部・主任研究官）	安藤 秀二（国立感染症研究所・ウイルス第一部・室長）
高橋 英之（国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官）	黒田 誠（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析・研究センター長）
堀野 敦子（国立感染症研究所・細菌第二部・研究員）	田中 智之（堺市衛生研究所・所長）
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・理事・副学長）	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）
倉園 久生（国立大学法人帯広畜産大学・畜産	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。平成19年6月からは、感染症法に基づく特定病原体等の管理規制が行われている。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。またプロトタイプの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体制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体制の整備と人材育成、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、そして病原体の除染法について取り組み、開発後に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22年度は研究事業3年目の最終年度となり、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、細菌を標的とした検査キットを作成し、地衛研の担当者に評価をお願いし、将来の検査ネットワーク体制構築準備の課題を探った。

#### 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、地衛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衛研での評価を行う（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、野兔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する(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。そして地衛研で検証を行う(安藤)。A 型神経毒素の検出を検討する。またボツリヌス G 型毒素に対する診断用血清の作製し標準化をはかる(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): 地衛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、地衛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体制を樹立し検証する。

### 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

野兔病菌には4つある亜種のうち、主に北米に分布する *subsp. tularensis* は強毒型でヒトを死に至らしめるが、日本に存在する野兔病菌の亜種は *subsp. holarctica* で、ウサギは死に至るが、ヒトへの感染では多くの場合致死的不是ではない。1963 年以前に生検され保存されたヒト病理組織標本について、形態学的、免疫組織化学的および PCR による菌のゲノム検出を試みた。免疫組織化学では壊死病変の周辺、肉芽組織に抗原が認められたが、細胞成分とは一致せず、死滅した細菌の抗原を認識しているものと考えられた。PCR による検討では、抽出した核酸検体の質がよく濃度の高いものでは菌の核酸が増幅可能であることが確認できた。病変部から採取された感染性病原体を電顕で検出する技術をえた(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

らにレストンエボラウイルス GP を外套する VSV シュードタイプを用いて、代替ウイルス中和試験法を開発し、国内およびフィリピンの豚血清を検査した。国内豚は陰性で、フィリピン豚で感染時は NP 抗体の感度がよかった（森川）。ニパウイルスの抗原検出 capture ELISA を開発し、感染ウイルスを用いて検出感度をしらべた。また狂犬病ウイルスの陽性対照 RNA を保護カプセル化した。今後実用化が望まれる（加来）。リケッチャ属の *R. japonica* に LAMP 法を適応させた結果、100 コピーのターゲット DNA を 40 分以内で検出することができ、供試したほとんどの病原性リケッチャを検出できた（安藤）。直接蛍光抗体法によるペスト菌の特異的検出系を開発した（高橋英）。*B. pseudomallei* の LAMP 法について類鼻疽流行地域のタイで臨床検体を用いて検討した。また *B. pseudomallei* について、国内臨床分離株を用いてタイピング法の検討を行い、PFGE 法が適しているという結果を得た（堀野）。次世代シーケンサを用いてペスト菌、野兔病菌、類鼻疽菌のゲノム情報解析を行い、大陸・国・地域に特徴的な遺伝情報を包括的に取得し、かつ系統分類解析法を整備した。（黒田）。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。また細菌によるバイオテロのスクリーニング用に、病原体と類縁菌のプライマー 31 種類をいれ、凍結乾燥した PCR Plate を送付して地衛研 4 か所で同一試薬セットと Real time PCR 機器を利用して評価を行い、今後の対応を検討した（牧野）。現行国際標準試験法であるマウス接種法と比較して、ボツリヌス毒素を、迅速に且つ同程度の感度を備えた検出系を開発する目的で検討したところ、AlphaLISA は検出感度が 0.5 pM とマウス接種法とほぼ同程度で、測定時間が 2 時間と大幅に短縮されるため、ボツリヌス毒素測定系として有望であることがわかった。ただし測定機器が必要である（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

本研究班で作製されたバイオテロ特定病原体網羅的スクリーニング検査検出キットにつ

いて、今年度は特定細菌の検出キットの操作性、精度について評価した。その結果、微調整は必要であるものの、概ね目的のバイオテロ関連細菌の検出が可能であった（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、10 名の研究協力者によって、新たに 23 種類のバイオテロ関連疾患に関する内容が追加執筆された。また、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）。バイオテロ対応ホームページの CD-ROM を配布し、バイオテロに関する各医療施設の認識や準備状況を把握するためにアンケート調査を実施した結果、準備の必要性はあるものの、対応していない施設が 74%に達していた（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効率的なものにするため、コンテンツの多量化に備えるため、バイオテロ対応ホームページの構造を、公開部、編集部、蓄積部の 3 つの機能に分類し、これらが分散環境において動作するシステムとして実装した（中村）。

## 4) 有効な除染方法の開発と確立

バイオテロ関連微生物で環境が汚染された場合での環境表面の消毒法として、ベニヤなどの木質材質を除いて酢添加の 0.5%次亜塩素酸ナトリウムが有効と考えられる。また、ベニヤ板などの木質材質には過酢酸が有効と考えられる。なお、酢添加後の次亜塩素酸ナトリウムの残留塩素濃度は、24 時間で半分程度に低下する。したがって、酢添加の次亜塩素酸ナトリウム液は用時調製とすべきである（尾家）。

## 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、realtime PCR 法が中心である。さらに高額

な機器が不要な核酸検出法として LAMP 法が使われた。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、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も行われる。今回、さらに多くの血清抗体検出法も開発され評価された。迅速診断としての核酸検出法とともに、免疫学的検出法や血清抗体検出法が整備できた。また、保存された野兎病のヒト病理検体を用いたデータがえられ、比較対照が整備できた。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、そして宿主の反応としての血清抗体検出法を利用して、種々の面から原因となる病原体を検出することが望ましい。また病原体の由来を探索する方法として、次世代シーケンサを用いた解析により、アウトブレイクに伴った伝播変遷および株の系統関連がゲノム情報を利用して解明された。この結果は、バイオテロに使用された株の由来・起源をトレースし、発生源を特定することと結果的に同じであり、株固有の SNVs が有用な情報源であることを示している。

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、地衛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。バイオテロ関連特定病原体に対するスクリーニング検査キットの作成と評価をおこなったが、これは予期せぬバイオテロに対しての基礎固めと考える。今後、懸案のマニュアルの作成と全国地衛研がバイオテロに対応できる連携の構築が必要と考える。全国の地衛研には格差が存在することは否めない。そのような中ではブロック内連携を深め危機対応システム、例えばシミュレーション等を通しての連携の構築は重要である。また、感染研とは技術的情報の提供やシミュレーション等の企画・立案や評価などのチームプレーを遂行するためにも、今後もこの班の果たす役割は大きいと考える。

バイオテロ対応ホームページについて、本研究班への要望について尋ねた。その結果、「アップデートした情報の提供」が最も多かった。新しい情報を常に提供するという意味ではホームページの改訂を継続する必要があると思われる。さらに「バイオテロ発生時のアドバイ

ス」という回答も7割を占めていた。現在、この要望に応えられるような体制はできていないが、今後、時間はかかっても相談窓口その他の設置を検討する必要があると思われる。バイオテロ対策ホームページのような、有事の際に重要となる情報は、実際にどの程度の規模のアクセスを想定すべきか平常時には推測しにくい。しかしながら、常に情報が更新された状態で、大規模アクセスに備えられている状況でなければ、効果を発揮できない。今後の課題として、こうしたシステムをどのように実運用していくかがある。実際のシステムをどこにどのように設置し稼働させていくかと、長期の運用のためのインフラストラクチャや、PC や SmartPhone などのインターネット環境の進化に対応したソフトウェア更新を含めた対応が必要になると考える。

## 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) 地衛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、1種類の細菌検出キットを作製し地衛研で評価した。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 CD-ROM を作製しアンケート調査した。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23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

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. 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

— 日本国内における野兎病の組織診断と病態の解析 —

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：片野晴隆、菅野隆行、佐藤由子（国立感染症研究所感染病理部）

浅野重之（いわき市立総合磐城共立病院病理科）

棚林 清、堀田明豊、藤田 修（国立感染症研究所獣医科学部）

研究要旨 野兎病菌 (*Francisella tularensis*) は米国 CDC のバイオテロに利用される病原体等として最も危険とされるカテゴリーA に分類されている。4 つある亜種のうち、主に北米に分布する *subsp. tularensis* は強毒型でヒトを死に至らしめる。日本に存在する野兎病菌の亜種は、中等度の病原性をもつ *subsp. holarctica* でウサギは死に至るが、ヒトへの感染では多くの場合致死的不是ではない。以前は野兎狩りなどで感染者の報告があったが、近年では年間に数例の報告を見るのみである。これまでの日本における野兎病症例を解析しまとめておくことにより、今後テロが疑われる際の診断に役立つと考えられる。そこで福島県の大原研究所に保管されていた 1951 年から 63 年に採取された組織標本について、病理組織学的に検討するとともに、特異抗体を用いた免疫組織化学と PCR による菌の検出を試みた。免疫組織化学では壊死病変の周辺、肉芽組織に抗原が認められた。細胞成分とは一致せず、死滅した細菌の抗原を認識しているものと考えられた。PCR による検討では抽出した核酸検体の質がよく濃度の高いものでは菌の核酸が増幅可能であることが確認できた。現在は亜種ごとの塩基配列解析も進み PCR による亜種判別が可能であり、そのシステムを導入しテロが疑われる際には亜種の判別を速やかに行えるよう準備が必要と考えられた。

## A. 研究目的

2001年米国で発生した炭疽菌事件以降バイオテロ対策に注意が向けられるようになってきたが、個別の病原微生物についての知識の蓄積、診断法の確立はいまだ十分とは言えない。野兎病菌 (*Francisella tularensis*) は米国 CDC(米国疾病予防管理センター)によるバイオテロに利用されうる病原体微生物等のリストでは最も危険なカテゴリーAに分類されているグラム陰性短桿菌である。感染力がとても強く、強毒型の菌では数十の菌体で感染が成立し、粘膜のみならず皮膚からも侵入する。ヒト-ヒト 感染はおこさないとされているが、感染で生じた膿汁などを直接触れば感染する。

野兎病菌が属する *Francisella* 属は2つの種 *Francisella tularensis* と *Francisella philomiragia*

からなる。*F. philomiragia* は日和見感染症の原因菌であり、免疫不全患者や水難事故の被害者などで病気を起こすことがある。*Francisella tularensis* には4つの亜種、すなわち *Francisella tularensis subsp. (subspecies) tularensis, subsp. holarctica, subsp. mediaasiatica, subsp. novicida* があり、ヒトに病気をおこすものは主に強毒型の *subsp. tularensis* と中等度の病原性をもつ *subsp. holarctica* である。これらはそれぞれ type A, type B と呼称されることもある。

野兎病は菌の侵入部位による初期病変によって、潰瘍病変は見られないがリンパ節腫脹のみ認められるリンパ節型、潰瘍・リンパ節型、眼・リンパ節型、鼻・リンパ節型、扁桃・リンパ節型、チフス型、肺型などに分類される。致死的な病態を呈するのは肺炎、敗血症

などを起こした場合であり、皮膚や粘膜から侵入した菌が適切な抗生物質による治療が施されなかったために全身性に広がった場合か、飛散した菌の付着した塵埃の吸入によって生じる病態と考えられる。米国における野兎病は *subsp. tularensis* によるものも多く致死性的になることも過去にはあったようであるが、この亜種によるヒト感染症は米国以外では報告されていない。中等度の毒性をもつ *subsp. holarctica* は日本を含む北緯30°以北の北半球全般に広く分布している。日本での野兎病は全例 *subsp. holarctica* によるものであり多くは皮膚潰瘍・リンパ節型あるいはリンパ節型で肺型の報告はなされていない。またこの亜種による感染はウサギにとっては致死的な場合もあるが、ヒトが死に至ることはほとんどない。

日本においては主に感染野兎との接触、すなわちウサギの剥皮や調理によるものがほとんどであるが、ダニ、蚊、メクラアブなどの昆虫、ノネズミ、ハタネズミなどの野生小動物、ハムスター、プレーリードッグなどのペット、水系汚染などによっても海外では感染が起こっている。1966-67年にスウェーデンの農業地域でおこったアウトブレイクではノネズミによって汚染された干し草から発生した菌を含む塵埃により600人以上の感染者を出した。全世界的には現在も野兎病報告例があるが、日本では非常に稀な疾患となっており数年に1例程度の報告があるのみである。米国でも1950年代には年間900例前後の報告があったが、1980年代には200例、2000年以降は100例前後の報告数となっている。

福島県の大原研究所では1950年代から60年代にかけて診断のために採取された生検材料がパラフィンブロックとして保管されていた。今回はそのサンプルを用いて野兎病ヒト組織における経時的な変化について病理組織学的に検討するとともに、特異抗体による免疫組織化学およびPCR法を用いて野兎病菌の検出がどのような時期にどのような病変で可能なのかを明らかにすることを目的として検出を試みた。

## B. 研究方法

### 1. 検体

1951年から1963年に診断用に採取されパラフィン封埋された野兎病の臨床材料が、大原研究所に保管されていた。本研究に使用した検体は皮膚が19症例(男性15例、女性4例)とリンパ節54症例(57検体;男性43症例、女性11症例)である。

### 2. HE染色、免疫組織化学

パラフィン包埋組織ブロックから4 $\mu$ mの切片を作製し、HE染色標本を準備した。免疫組織化学には抗野兎病菌ウサギポリクローナル抗体を用いた。抗原賦活化はpH6.5炭酸バッファにおける121°C10分のオートクレーブ法にて行った。シグナル増強法としてGenePointキット(Dako社)を使用した。

### 3. 核酸の抽出

5 $\mu$ mのパラフィンブロック薄切切片3枚よりQIAGEN社のQIAamp FFPE DNA mini kitを使用してDNAを抽出した。NanoDrop吸光度計(サーモ・サイエンティフィック社)にて濃度、OD260nm/280nm比の測定を行った。

### 4. PCR法による野兎病菌の検出

野兎病菌の核酸検出には23kDa遺伝子とtul4遺伝子を標的とした特異的Taqman probeとprimerを用いた。陽性コントロールとして*Francisella tularensis subsp. holarctica*であるLVS(Live vaccine strain)ゲノムを使用した。(Versage JL et al.: J Clin Microbiol 2003, 41, 5492-5499)PCR反応はMX3005P(ストラタジェン社)、またはABI Prism 7900HT(アプライド・バイオシステムズ社)を用いて行った。

(倫理面への配慮)

いずれの検体も非連結匿名サンプルとして実験を行った。

## C. 研究結果

### 1. HE染色による形態観察

野兎病臨床検体について発熱日を第一病日として発病後日数を計算し、経時的に組織学的変化を検討した。全例が皮膚およびリンパ

節病変を主体とした皮膚・リンパ節型であった。

皮膚から感染した場合にはまず皮膚病変が出現し、感染後2週間までに皮下組織に炎症がおこり小膿瘍が出現する。さらにその後6週までに皮膚潰瘍が形成される。組織学的には皮下の拡張したリンパ管にリンパ球、樹状細胞などが出現し、真皮内には中心壊死を伴う類上皮細胞肉芽腫が認められる。6週以降には皮下への炎症細胞浸潤、中心が均質で形状が不規則な肉芽腫の形成を認める(図1)。

リンパ節については皮膚より1週間程度遅れて2週間後までに中心壊死が単核球、組織球に囲まれて出現し、6週間後までに中心壊死を伴う小型類上皮細胞肉芽腫が形成される。この肉芽腫には生きた細菌は存在しない。6週間目以降は、中心部が乾酪壊死様の肉芽腫が認められるようになる(図2)。

まとめると、感染したウサギなどの感染源に接触後、手指の皮膚から侵入した野兔病菌

は皮膚(～6週)とリンパ節(2週～)に膿瘍形成性の肉芽腫様病変を形成し、多くは感染皮膚からリンパ管を介して所属リンパ節に移動する。その後野兔病菌による亜急性皮膚病性リンパ節症によるリンパ節腫脹を呈する。

## 2. 野兔病菌特異抗体による免疫組織化学による臨床検体上の野兔病菌検出

野兔病菌を標的とするウサギポリクローナル抗体を用いて免疫組織化学を行った。発症後日数の明らかな検体で皮膚、リンパ節の検体についてそれぞれ野兔病菌が検出可能かどうか検討した。野兔病菌抗原の検出については、6日後、8日後、12日後の真皮膿瘍から、また7日目から40日目までのリンパ節膿瘍から検出可能であった(図1、2、3、4)。真皮やリンパ節の肉芽腫からは野兔病菌は検出されなかった。陽性所見の見られた箇所ではいずれも細胞成分との共染性は認められず、

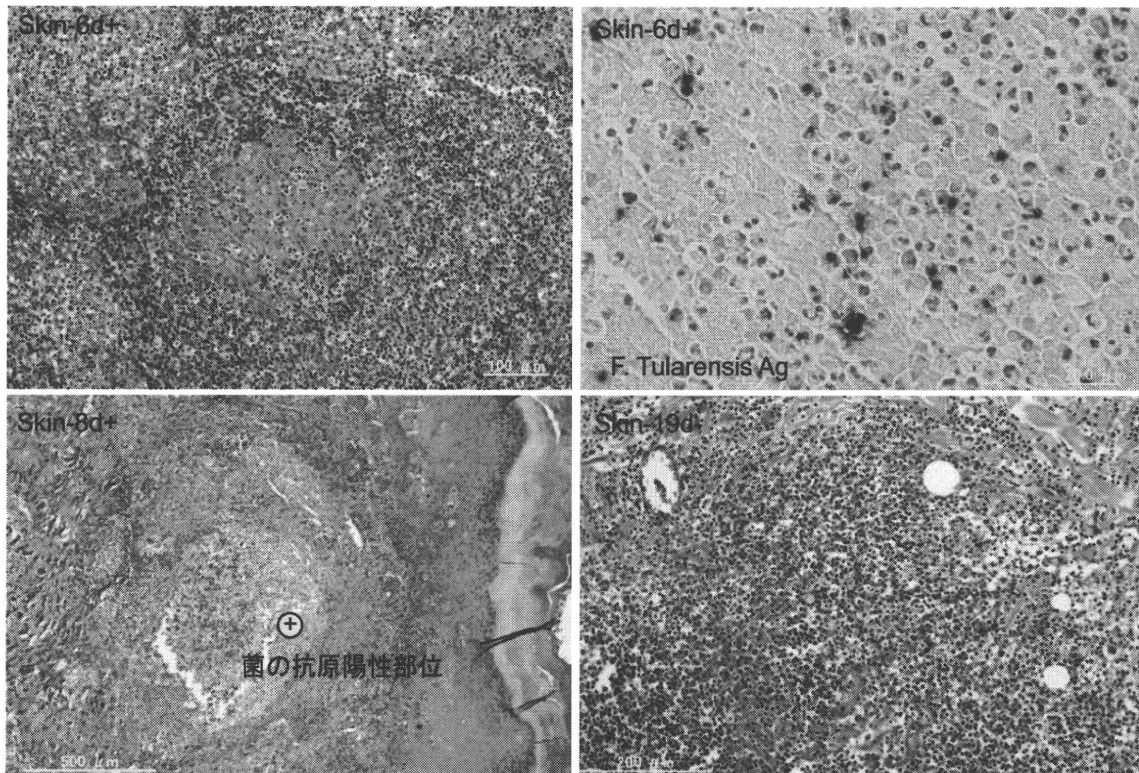


図1. 野兔病臨床検体(皮膚)における免疫組織化学による野兔病菌抗原の検出

(左上) 発病後6日目の皮膚生検組織。壊死を取り囲んで好中球や組織球の浸潤が認められる。類上皮細胞による被包化が進んではいるが反応が弱い印象。(右上) 左上と同じ組織で壊死部で細胞成分の少ない部位に野兔病菌抗原が検出された。(左下) 発病後8日目の皮膚組織。中心に膿瘍を形成した肉芽腫を認める。膿瘍の辺縁部に野兔病菌抗原が陽性であった。(右下) 発病後19日目の皮膚組織。壊死組織が残っておらず、抗原陰性であった。



また菌体も明らかではなかった。膿瘍周囲や肉芽腫の辺縁部に主に陽性シグナルが認められたことから菌体そのものを認識しているのではなく、抗原蛋白が残存しているものを検出している可能性が高いと考えられた。

### 3. 野兔病菌特異 probe, primer を用いた PCR 法による野兔病菌核酸の検出

野兔病菌の核酸検出系としてすでに特異性が確認されている real-time PCR 用の 2 種類の probe, primer セットを用いて行った。パラフィン封埋組織標本から抽出した DNA は OD260/280 の比率で 1.6 以下の品質不良のサンプルが多かった。抽出できた核酸の量が非常に少ないサンプルや OD260/280 の比で 1.6 以下と品質不良のものが少なからずあった原因として、標本自体が 1950 年代から 60 年代と今から 50~60 年前のものとかかなり古いこと、固定条件や保存状況がよくなかった可能

性が考えられた。

今回検出に用いた probe, primer セットのターゲットである 23kDa 遺伝子は野兔病菌がマクロファージに感染したときに強力に誘導される遺伝子であり、Tul4 遺伝子は外膜蛋白をコードしている。いずれも野兔病菌に対する特異性に問題はないことが確認されているが、今回の臨床検体を用いた検討では Tul4 遺伝子に対する probe, primer set では陽性結果が得られなかった。23kDa 遺伝子の probe, primer set に比べて Tul4 遺伝子の set は感度が劣ると考えられた。皮膚検体においては免疫組織化学で陽性となった発症後 6 日目のサンプルから核酸が検出できた。またリンパ節サンプルについてはやはり免疫組織化学で陽性であった 19, 23, 34, 40 日目のサンプルから検出可能であった (図 3, 4)。DNA サンプル不良のため免疫組織化学では陽性になったものの、PCR で検出できないものも多かった。

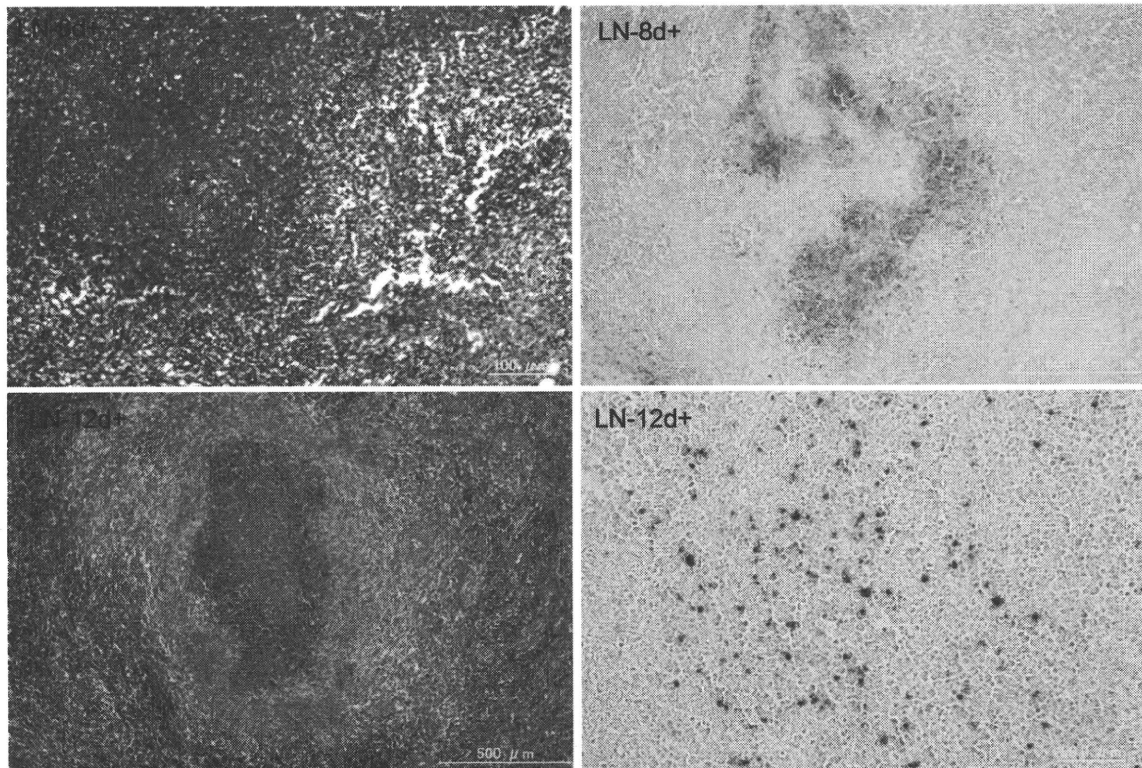


図 2. 野兔病臨床検体 (リンパ節) における免疫組織化学による野兔病菌抗原の検出

(左上、右上) 発病後 8 日目のリンパ節生検組織。肉芽腫の壊死部には細胞成分はほとんど認められないが、免疫組織化学では野兔病菌抗原陽性となった。壊死組織に残存した抗原を検出したものと考えられる。(左下、右下) 発病後 12 日目のリンパ節組織。壊死部を被包化して肉芽腫が形成されている。8 日目の組織同様、細胞成分のほとんど認められない壊死部に野兔病菌抗原が検出された。

#### D. 考察

日本におけるヒト野兎病症例は 1924 年の初発例以降 1994 年までに 1,372 例の報告があったが、近年報告数は減少し 1999 年に千葉で 1 例、2008 年に千葉県と福島県でそれぞれ 1 例の報告があった程度である。抗生物質による治療が確立されている現在、自然発生的な野兎病はコントロール可能であろうが、バイオテロなど人為的な感染経路でもともと日本には存在しない野兎病がもたらされる可能性を想定しておく必要がある。本研究では日本にもともと存在していない野兎病菌による野兎病が発生した場合の鑑別診断に役立てるため、過去の本邦臨床検体についてその病理組織像、検査による野兎病菌の検出について検討を行い実態を把握した。

今回の免疫組織化学、PCR 法により検討した結果から、日本に分布する *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* 感染によるヒト野兎病病理組織像について明らかにすることがで

きた。1951 年から 1963 年という非常に古い検体であるため、固定条件、保存状態が現在と異なり検出程度があまりよくなかったことは残念であるが、日本の在来種野兎病菌によるヒト病理組織典型像として現在得られる可能な限りの情報である。

今後野兎病に関連するバイオテロの可能性として、強毒型の subsp. *tularensis* がそのまま使用される場合、あるいは subsp. *tularensis* または subsp. *holarctica* に何らかの変異を加えた細菌が用いられる場合が考えられる。検索し得た限りでは subsp. *tularensis* と subsp. *holarctica* による野兎病の臨床像、病理組織像の違いについて明確な記載は見当たらなかった。米国の臨床例に関する記載や病理組織像を見ても、経過や組織像に明らかな違いが認められる訳ではないようである。そこで subsp. *tularensis* がエアロゾル化して使用されるような場合に対しては核酸検査によるシーケンスの確認が必要である。近年は核酸抽出法、

### 野兎病患者の皮膚およびリンパ節生検組織 (1951-1963年)

#### 皮膚

番号	発症後日数	免疫染色	PCR
1	1	-	-
2	6	+	+
3	8	+	-*
4	12	+	-*
5	16	-	-
6	18	-	-*
7	19	-	-
8	21	-	-*
9	96	-	-

#### 所属リンパ節

番号	発症後日数	免疫染色	PCR
1	7	+	-*
2	8	+	-*
3	12	+	-*
4	19	+	+
5	24	+	+
6	27	+	-*
7	34	+	+
8	40	+	+
9	74	-	-*

-\*検体DNA不良

図 3. 野兎病患者の皮膚およびリンパ節生検組織における菌検出について

発熱日を第一日として時間経過のわかっている皮膚組織、リンパ節組織を用いて免疫組織化学とPCRによる検出を試みた。皮膚では6日目以降12日目までは免疫組織化学で検出可能であった。リンパ節では7日以降40日目まで可能であった。PCRによる核酸検出は免疫組織化学とほぼ同様の結果であったが、検体不良による検出不能例が多かった。(PCR陽性例はいずれも23kDa遺伝子に対するProbe, Primer setによる)

PCR法、シーケンス法などの分子生物学的な手法は目覚ましく進歩し、簡便で質の高い検査を比較的手軽に行えるようになった。過去には野兎病菌の亜種分類は、病型の違いによって判断していたようだが、現代においては野兎病の診断に際してPCR法やシーケンス法など分子生物学的な手法を用いて強毒型の *subsp. tularensis* と毒性のそれほど強くない *subsp. holarctica* の違いをルーチンで判別しておくべきかもしれない。また核酸配列そのものを確認しなくても通常のPCR法によって *subsp. tularensis* と *subsp. holarctica* を判別する primer が開発されているので準備しておく必要があると思われる。

遺伝子操作により感染性、毒性を高めたような野兎病菌による感染が起こった場合には本研究で明らかとなった本邦野兎病典型像と比較することにより、異なる組織像、臨床経過があれば異常に気づき対応が可能となる。

菌の増殖がそれほど強くないためと考えられるが、抗生物質治療を行った後には野兎病

菌検出が困難な場合が多いようなので、疑わしい症例については必要に応じて早い時期に検体を確保することも念頭に置いておく必要がある。

### E. 結論

日本に分布する野兎病菌、*Francisella tularensis subsp. holarctica* によるヒト野兎病組織を用いて、時間経過と合わせた病理組織像、抗野兎病特異抗体による免疫組織化学による組織中の検出、組織より抽出した核酸を用いてPCR法による野兎病菌ゲノム検出について検討した。野兎病菌亜種が *subsp. holarctica* 以外である、あるいは病理組織像、臨床経過の違いなどにより異常を指摘し、バイオテロの可能性に対して迅速に対応することが可能となった。

### F. 健康危険情報

なし。

## 生検皮膚・リンパ節組織病変と野兎病抗原およびゲノム検出

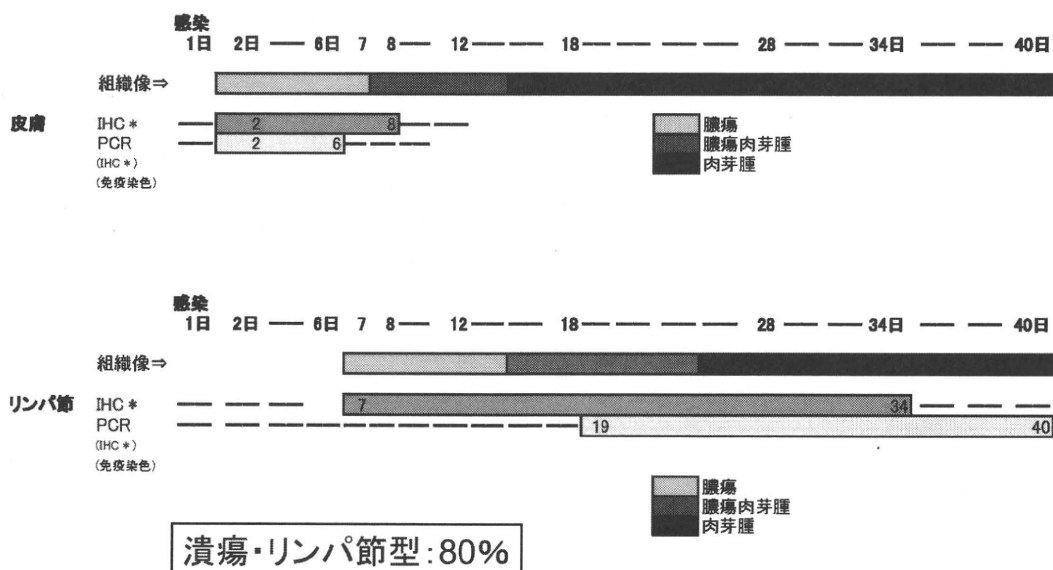


図4. 野兎病皮膚、リンパ節組織病変と野兎病菌抗原およびゲノム核酸の検出  
野兎病菌感染後発熱した日を第1病日として皮膚病変、リンパ節病変の変化ならびに免疫組織化学(IHC: immunohistochemistry)、PCR法による検出可能な時期を図示した。一般的な経過は皮膚から侵入した菌がまず皮膚で病変を形成し、次にリンパ流にのって所属リンパ節に達しそこでさらに病変を形成する。

## G. バイオテロリストの攻撃と感染症における電子顕微鏡学的迅速診断ワークショップに参加して

研究協力者：鈴木忠樹、永田典代（感染研 感染病理部第二室）

要旨 平成22年12月1日から2日にかけてドイツ、ベルリンの Robert Koch 研究所で開催された Global Health Security Action Group Laboratory-Network が主催する Wet Lab: Rapid Diagnostic EM in Suspected Bioterrorist Attacks and Infectious diseases 2010 に参加し、バイオテロに対する情報共有と電子顕微鏡による診断技術の評価を行った。本ワークショップにより今後の診断技術の向上が期待され、「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」の研究の発展に大いに貢献すると考えられた。

ドイツ、ベルリンの Robert Koch 研究所で行われたバイオテロリスト攻撃と感染症における電子顕微鏡学的迅速診断ワークショップに参加し、バイオテロに対する情報共有と電子顕微鏡による診断技術の評価を行った。

本ワークショップは、Global Health Security Action Group Laboratory Network の活動の一環であり、世界健康安全保障イニシアティブ (GHSI) 各国および組織（フランス、UK、イタリア、日本、カナダ、メキシコ、USA、EC と WHO）が対象としたものであり、バイオテロリストによるバイオ攻撃や感染症の病原体の電子顕微鏡的迅速診断法に携わる専門家の技術訓練、技術の向上、危機的状況における迅速な電子顕微鏡学的診断評価の正確性の訓練と向上を目的としている。このワークショップは今回で3回目となるが、第1回、2回と同様に Robert Koch 研究所が主体となり開催された。日程は、平成22年12月1日、2日の2日間であった。

参加者は主催国ドイツの他、UK、日本、カナダ、メキシコ、ルクセンブルクの保健省関連の研究機関から電子顕微鏡を用いた感染症研究を行っている専門家（各国1-3名、合計8

名、主催者側5名）が参加した。日本からは国立感染症研究所感染病理部第二室の鈴木忠樹、永田典代の二名が参加した。

初日である12月1日の午前中にはドイツの Robert Koch 研究所、カナダの Public Health Agency、メキシコの (Instituto Nacional de Diagnostico y Referencia Epidemiologicos INDRE)、イギリスの Health Protection Agency および NIBSC、国立感染症研究所からそれぞれの機関における電子顕微鏡診断業務についての情報交換を行った。この情報交換の中で、最近、欧州で問題となっているヘロインの炭疽菌芽胞混入による死亡例、white powder を封入した脅迫状、牛痘のヒト発症例、ロタウイルス生ワクチン Rotalix の sircovirus などのケースレポートが報告され、それぞれの事例においてどのように電子顕微鏡を用いた病原体検査用いられたかについて紹介があった。

続いて、主催者である Robert Koch 研究所の電子顕微鏡診断部門長である Norbert Bannert 博士より電子顕微鏡を用いたテロの可能性のある病原体検査について、一般的手技や原理などについての講義があった。この講義では、電子顕微鏡病原体検査は迅速に網羅的な検査が特別な試薬を必要とせずに行えるという長所がある一方で、感度が低く、検査者の高いスキルと高価で煩雑な機械（電子顕微鏡）を使わなくてはならず、電子顕微鏡検査だけで確定的診断を下すことは難しいなどの短所もあること（表1）を理解し、検査者がこれらの長所と短所を正しく理解した上で運用することの重要性が説明された。さらに、このような運用により、病原体検査診断におけるゴールドスタンダード的手法である血清学的検査や核酸検査、病原体分離検査などを補完し、より正確な診断をより迅速に導き出すことができるということが強調された。

午前中の講義終了後から、バイオテロ関連病原体サンプルと電子顕微鏡を用いた実習が行われた。用いたサンプルはいずれもバイオテロに関係のある病原体あるいは鑑別の必要な検体であり、いずれの検体も適切な不活化処理をされていた。実習は、これらのサンプルを適切に処理し、電子顕微鏡観察のための