

表1 感染症診断検査における電子顕微鏡の役割

－ メリット －

- ・迅速診断が可能  
→ネガティブ染色は30分程度で診断可能
- ・病原体の種類の見当をつけることが可能  
→ウイルスか細菌か、エンベロープの有無、芽胞形成の有無
- ・他の手法では検出困難な病原体の検出が可能  
→病原体毎に至適化された特殊な試薬等が不要。
- ・包括的な鑑別診断が可能  
→診断の手がかりとなるような臨床情報は不要。

－ デメリット －

- ・低感度  
→一般的に $10^6$  particles / ml 以上の高濃度のサンプルが必要
- ・検査者に豊富な経験と高いスキルが要求される。  
→正確な診断のためにはトレーニングが必要不可欠。
- ・電子顕微鏡という高価で操作が煩雑な機械が必要  
→病原体診断には、数十nm程度のウイルス粒子を観察できる分解能が必要であり、高性能な電子顕微鏡が用いられる。
- ・自動化が困難でありスループットが低い。  
→人間が観察し判断する必要がある。

標本の作成、染色、電子顕微鏡による観察、診断を実際に行い、レポートするという方式で行われた。具体的には参加者は3つのグループにわかれて(UK、日本、その他)、内容を隠された8つのサンプルとそれに関する情報、サンプル作成に必要な試薬類が与えられ、2日間(1、2日目とも5時間程度の作業)で様々な方法でサンプルを準備し、電子顕微鏡で観察し診断を試みた。今回使われたサンプルは、臨床検体が4検体、環境サンプルが4検体であった。それぞれのサンプルには簡単なシナリオが想定されており、この情報に基づいて適切なサンプル作成の方法を選択することが求められた。

作業には、サンプル作成から電子顕微鏡観察に至るまで Koch 研究所の専門家がサポートに付き、手技に関するアドバイスを受けたり、鑑別診断に関する意見交換を行ったりすることができ、われわれの技術と設備の確認と問題点、改善点を確認、認識することができる良い機会となった。報告書を提出し、最後に今回の出題の解答と診断のポイントなどが紹介された。今回出題された病原体は、Bacillus spores (図1)、Filovirus、Bunyavirus、

Orthopoxvirus、Herpesvirus、Francisella tularensis、Adenovirus、Orthoreovirus であり、CDC の定めた Bioterrorism Agents/Diseases のカテゴリーA もしくは B に分類されるものがほとんどであった。なお、規定問題(4題)でのわれわれの正答率は100%で、Extra samples として出題されたものの一つが不完全とされた。

日本では扱うことの困難な病原体がサンプルとして提供され、実際に観察することができた点や、Bacillus 属の鑑別方法を具体的に取得できた点、他国の状況や研究者の実際の手技、迅速診断に関する工夫点をお互いに情報交換することができたことは非常に有意義であった。また、各国では近年、電子顕微鏡の専門家の世代交代が進んでおり今回の参加者はほとんどが初めての参加であった。彼らとの交流・親睦を深めることができ、よりよいネットワークづくりができた。

本ワークショップでの経験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こと考えられる。

H. 研究発表

1. 論文発表

1. Hatano B, Maki T, Obara T, Fukumoto H, Hagiwara K, Matsushita Y, Okutani A,



図1. Bacillus spores (1%酢酸ウラン染色)

Bazartseren B, Inoue S, Sata T, Katano H. LAMP using a disposable pocket warmer for anthrax detection, a highly mobile and reliable method for anti-bioterrorism. *Jpn J Infect Dis.* 2010 Jan; 63(1): 36-40.

2. Hatano B, Kojima A, Sata T, Katano H. Virus detection using Viro-Adembeads, a rapid capture system for viruses, and plaque assay in intentionally virus-contaminated beverages. *Jpn J Infect Dis.* 2010 Jan; 63(1): 52-4.
3. Nakajima N, Hata S, Sato Y, Tobiume M, Katano H, Kaneko K, Nagata N, Kataoka M, Ainai A, Hasegawa H, Tashiro M, Kuroda M, Odai T, Urasawa N, Ogino T, Hanaoka H, Watanabe M, Sata T. The first autopsy case of pandemic influenza (A/H1N1pdm) virus infection in Japan: detection of a high copy number of the virus in type II alveolar epithelial cells by pathological and virological examination. *Jpn J Infect Dis.* 2010 Jan; 63(1): 67-71.
4. Kuroda M, Katano H, Nakajima N, Tobiume M, Ainai A, Sekizuka T, Hasegawa H, Tashiro M, Sasaki Y, Arakawa Y, Hata S, Watanabe M, Sata T. Characterization of quasispecies of pandemic 2009 influenza A virus (A/H1N1/2009) by de novo sequencing using a next-generation DNA sequencer. *PLoS One.* 2010 Apr 23; 5(4): e10256.
5. Nakamura T, Sato Y, Watanabe D, Ito H, Shimonohara N, Tsuji T, Nakajima N, Suzuki Y, Matsuo K, Nakagawa H, Sata T, Katano H. Nuclear localization of Merkel cell polyomavirus large T antigen in Merkel cell carcinoma. *Virology.* 2010 Mar 15; 398(2): 273-9.
6. Katano H, Kano M, Nakamura T, Kanno T, Asanuma H, Sata T. A novel real-time PCR system for simultaneous detection of human viruses in clinical samples from patients with uncertain diagnoses. *J Med Virol.* 2011 Feb; 83(2): 322-30.

## 2. 学会発表

1. 中島典子、羽田 悟、飛梅 実、片野晴隆、永田典代、長谷川秀樹、岩田奈緒子、辻隆弘、渡辺正秀、佐多徹太郎. 本邦初の新型インフルエンザウイルス

(A/H1N1pdm)肺炎の剖検例. 第99回日本病理学会総会(東京)2010年4月

2. 片野晴隆、中島典子、辻 隆裕、鈴木良夫、佐多徹太郎. メルケル細胞ポリオーマウイルス large T 抗原の核発現. 第99回日本病理学会総会(東京)2010年4月
3. 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹、佐多徹太郎. 日本の2009年H1N1新型インフルエンザウイルス感染症剖検例の病理. 第58回日本ウイルス学会学術集会(徳島)2010年11月

## I. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 2. ウイルス性特定病原体の鑑別診断法の開発

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 佐山勇輔、谷口 怜、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。本研究では、これまでに新種のエボラウイルスも高感度に検出できるリアルタイム RT-PCR を開発した。また、フィリピンで豚のレストンエボラウイルス感染が確認されたため、サル以外の動物を介してウイルスが侵入する可能性が否定できなくなった。そこで、レストンエボラウイルス抗体検出系やレストンエボラウイルス特異的高感度遺伝子検出法を開発し、ヒトやサル以外の動物の検査も可能にした。

### 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。特に米国でselect agent Aに指定されている天然痘やエボラ出血熱等のバイオテロ病原体の鑑別診断法の開発は重要である。エボラウイルスやマールブルグウイルスはサルを介して国内に侵入する可能性もあることから、サルの輸入検査が実施されている。出血熱ウイルス等では2008年の新種のエボラウイルス (Bundibugyo ebolavirus) が出現した。新種のウイルスが出現すると、これまでに整備されている検査法・検出法では対応できないことがある。そこで、これまでに新種のエボラウイルスも含めて全てのエボラウイルス種に共通な高感度リアルタイムRT-PCRによる遺伝子検出法を開発した。一方、2008年にフィリピンでレストンエボラウイルスの豚への感染が確認され、サル以外の動物を介してウイルスが侵入する可能性が否定できなくなった。そこで、昨年度にレストンエボラウイルス抗体検出系を豚検体に適応できるよう改良し、検査法を新たに開発した。今年度は、さらに精度の高い豚検体の診断を可能にするため、新たに血清診断法を整備し各検査法の評価を行い、確実に診断可能な体制を構築することを目的とした。

### B. 研究方法

#### 1) レストンエボラウイルスの NP 抗体検出

系：2008年のフィリピンでの豚のレストンエボラウイルス感染症流行時に検出されたウイルスのNP遺伝子のcarboxyl (C)末端に8ヒスチジンタグ(his-tag)を付加し、組換えバキュロウイルスで発現した。組換えバキュロウイルス感染昆虫細胞から2価イオン吸着クロマトグラフィーにより、レストンエボラウイルスNPを精製し、ELISA抗原とした。

また、pGEX-2TにNPのC末端側約半分(アミノ酸360-739位)を組み込みGSTとの融合蛋白として大腸菌で発現させELISA抗原とした。一方、恒常的にNPを発現するHeLa細胞塗抹標本を蛍光抗体法用抗原とした。

#### 2) レストンエボラウイルスのGP抗体検出

系：膜糖蛋白(GP)遺伝子の細胞外領域のC末端にhis-tag付加し、組換えバキュロウイルスで発現、精製しELISA抗原とした。また、恒常的にGPを発現するHeLa細胞塗抹標本を蛍光抗体法用抗原とした。

#### 3) レストンエボラウイルスの中和抗体測定

系：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作成した。

(倫理面への配慮)

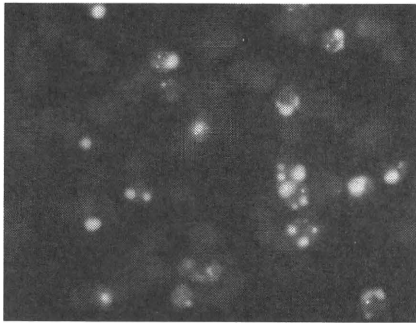
特になし

C. 研究結果

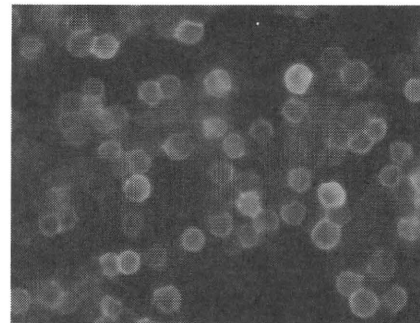
1) レストンエボラウイルスの抗体検出系の豚検体への適用：日本の豚の血清約 50 検体を抗体陰性検体と考え、これらにより各種レストンエボラウイルス抗体測定 ELISA 系の threshold 値を設定した。いずれの血清も極めて低い OD 値を示した。また、間接蛍光抗体法では NP, GP いずれにも抗体陽性検体はなかった。さらに、代替えウイルス中和試験でも全てが陰性であった。

2) 2008 年のレストンエボラウイルス感染症流行時の豚血清中のウイルス特異的抗体の検出：東北大フィリピン拠点、フィリピンの

Research Institute for Tropical Medicine, Bureau of Animal Industry と共同で、開発した血清診断系によるレストンエボラウイルス感染症流行時の豚血清中のウイルス特異的抗体を測定した。その結果、代替え中和法で陽性を示した検体は、ほぼ NP, GP 抗体が ELISA 法、間接蛍光抗体法 (図 1) でも陽性であった。しかし、中和抗体価と GP-ELISA の OD 値や間接蛍光抗体法での抗体価は必ずしも強い相関を示さなかった (図 2)。GST-NP 抗原と全 NP 抗原による NP-ELISA 法の結果は良く相関したが、これらと GP-ELISA 法の結果の相関は低かった。



Serum : pig #C-112 (1:160 dil)  
Antigen : HeLa cells expressing NP  
Characteristic granular staining pattern in cytoplasm



pig #C-109 (1:160 dil)  
HeLa cells expressing GP  
Cell surface staining pattern

図1. 間接蛍光抗体法によるレストンエボラウイルスNP, GP特異抗体の検出

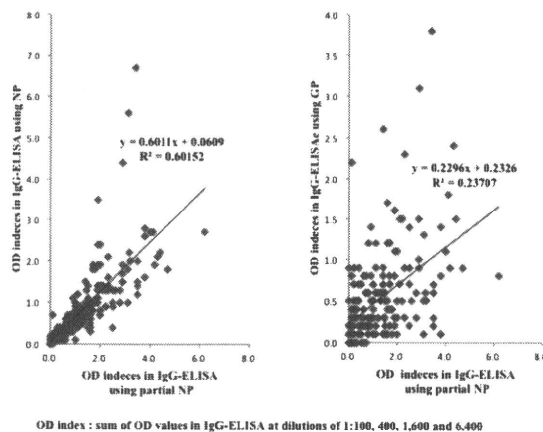


図2. Partial NP, NP, GPを抗原とするIgG-ELISA法による豚からの抗体検出と相関



#### 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いたが、新種のブンディブギョエボラウイルスやレストンエボラウイルスでは、検出が難しいことから、これまでに高感度な *realtime RT-PCR*法を開発した。さらに、フィリピンで豚のレストンエボラウイルス感染症が発生し、霊長類以外にも感染宿主域があることが明らかとなった。このことは、検疫対象となっているサル以外の動物を介して国内にエボラウイルスが侵入する可能性が否定できなくなった。今年度までに、NP及びGP特異的抗体検出 ELISAを改良・開発し、さらにNP抗体検出蛍光抗体法に加えて、GP抗体検出蛍光抗体法も開発した。VSVシュードタイプによる代替え中和試験法も豚検体に適応できることが明らかになった。ウイルス抗原検出系は過去に開発済みであるため、豚のレストンエボラウイルス感染症に関しては、血清診断法、ウイルス検出法等の全ての検出系が確立した。これらを用いて豚血清を検査した結果、1) 日本の豚は抗体陰性であった。2) フィリピンでの流行時の豚血清は、高率に陽性個体が検出された。3) レストンエボラウイルス感染サルでは、NP抗体は高率に検出されるが、発症サルやウイルス血症陽性サルではGP抗体が検出できないのに対し、感染豚ではNP, GP抗体共に高率に上昇することが明らかとなった。このことから、NP抗体、GP抗体検出系共に豚の血清診断には有用であることが分かった。

これまでに、サル、コウモリの抗体検出系が確立され、今回豚の抗体検出系が確立できたため、想定される動物種の全てを検査が可能となった。今後、フィリピンでの健常豚の抗体保有状況を調べることにより、豚のレストンエボラウイルスの自然感染率を明らかにできると考えている。今後、他のより強毒なエボラウイルスの抗体検出系も対象動物を拡大する改良等を行なう予定である。この研究は、東北大フィリピン拠点、フィリピンの Research Institute for Tropical Medicine 及び Bureau of Animal Industry との共同研究で行わ

れた。なお、2008年のフィリピンでの豚のレストンエボラウイルス感染症流行後には、豚、サルでのレストンエボラウイルス感染症の流行はない。

#### E. 結 論

豚のレストンエボラウイルス感染症の血清診断法が整備された。今後、本システムはフィリピンでのレストンエボラウイルスの豚での血清疫学や感染の確認に有用である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Saijo M, Morikawa S, Kurane I. Recent progress in the treatment for Crimean-Congo hemorrhagic fever and future perspectives. *Future Virology* (in press)
- 2) Ogawa H, Miyamoto H, Ebihara H, Ito K, Morikawa S, Feldmann H, Takada A. Detection of all known filovirus species by reverse transcription- polymerase chain reaction using a primer set specific for the viral nucleoprotein gene. *J Virol Methods*. 2011 Jan;171(1):310-3.
- 3) Watanabe S, Masangkay JS, Nagata N, Morikawa S, Mizutani T, Fukushi S, Alviola P, Omatsu T, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Fujii H, Tsuda S, Endoh M, Kato K, Tohya Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y, Akashi H. Bat coronaviruses and experimental infection of bats, the Philippines. *Emerg Infect Dis*. 2010 Aug;16(8):1217-23.
- 4) Watanabe S, Maeda K, Suzuki K, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Shimoda H, Kato K, Yoshikawa Y, Morikawa S, Kurane I, Akashi H, Mizutani T. Novel betaherpesvirus in bats. *Emerg Infect Dis*. 2010 Jun;16(6):986-8.

##### 2. 学会発表

- 1) 新倉 綾、池上徹郎、森川 茂、山田靖子、C. J. Peters、牧野伸治. リフトバレー熱ウイルスL蛋白のポリメラーゼ機能におけるロイシンジッパー様モチーフの重要性. 第58回日本ウイルス学会 (徳島) 2010年11月
- 2) 新井 智、永野昌博、浅川満彦、木村敏之、近 真理奈、多屋馨子、森川 茂、岡部信彦、Richard Yanagihara. Evolutionary insights

- from the genetic diversity of Asama virus in the Japanese shrew mole (*Urotrichus talpoides*). 第58回日本ウイルス学会(徳島) 2010年11月
- 3) 西條政幸、福士秀悦、水谷哲也、緒方もも子、倉根一郎、森川 茂. 3分節RNAの塩基配列に基づく中国新疆ウイグル自治区におけるクリミア・コンゴ出血熱ウイルスの分子疫学と進化. 第58回日本ウイルス学会(徳島) 2010年11月
  - 4) 永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、佐藤由子、森川 茂、佐多徹太郎. SARS発症マウスモデルにおけるIFN- $\gamma$ の投与効果. 第58回日本ウイルス学会(徳島) 2010年11月
  - 5) 渡辺俊平、Masangkay Joseph S、永田典代、森川 茂、水谷哲也、福士秀悦、大松 勉、上田直也、伊波興一朗、谷口 怜、藤井ひかる、津田峻平、加藤健太郎、遠矢幸伸、久和 茂、吉川泰弘、明石博臣. フィリピンにおけるコウモリコロナウイルスの検出および飼育食果コウモリを用いたウイルス感染実験. 第58回日本ウイルス学会(徳島) 2010年11月
  - 6) 岩田奈織子、永田典代、辻 隆裕、長谷川秀樹、佐藤由子、横田恭子、宇田晶彦、水谷哲也、西條政幸、森川 茂、佐多徹太郎. SARS-CoV感染動物モデルを用いたUV不活化SARS-CoVの副反応について. 第58回日本ウイルス学会(徳島) 2010年11月
  - 7) 酒井宏治、田丸精治、前田 健、永田典代、網 康至、岩田奈織子、鈴木忠樹、水谷哲也、福士秀悦、須崎百合子、緒方もも子、長谷川秀樹、西條政幸、山田靖子、倉根一郎、森川 茂. カニクイザルで致死感染症を起こしたイヌジステンパーウイルスのサル及びイヌでの病原性の解析. 第58回日本ウイルス学会(徳島) 2010年11月
  - 8) 伊波興一朗、中内美奈、谷口 怜、福士秀悦、水谷哲也、緒方もも子、西條政幸、久和 茂、倉根一郎、森川 茂. アルゼンチン出血熱の実験室診断法の患者血清を用いた評価. 第58回日本ウイルス学会(徳島) 2010年11月
  - 9) 木下一美、酒井宏治、永田典代、王 麗欣、伊藤(高山)睦代、中道一生、森川 茂、倉根一郎、西條政幸. リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス核蛋白の単クローン抗体を用いた診断法の開発. 第58回日本ウイルス学会(徳島) 2010年11月
  - 10) 水谷哲也、酒井宏治、本道栄一、福士秀悦、緒方もも子、西條政幸、倉根一郎、森川 茂、前田 健. コウモリから分離された新規アデノウイルスのゲノム配列の決定および系統学的解析. 第58回日本ウイルス学会(徳島) 2010年11月
  - 11) 酒井宏治、永田典代、網 康至、岩田奈織子、鈴木忠樹、水谷哲也、福士秀悦、須崎百合子、緒方もも子、西條政幸、長谷川秀樹、山田靖子、倉根一郎、森川 茂. カニクイザルで致死感染症を起こしたイヌジステンパーウイルスの性状と実験感染サルでの病原性の解析. 第150回日本獣医学会(帯広) 2010年9月
  - 12) 谷口 怜、佐山勇輔、渡辺俊平、飯塚愛恵、福士秀悦、水谷哲也、石井寿幸、久和 茂、明石博臣、吉川泰弘、森川 茂、倉根一郎. レストンエボラウイルス膜糖蛋白を標的とした抗体検出系の確立. 第150回日本獣医学会(帯広) 2010年9月
  - 13) 水谷哲也、酒井宏治、本道栄一、福士秀悦、緒方もも子、西條政幸、倉根一郎、森川 茂、前田 健. コウモリから分離された新規アデノウイルスの分子学的性状決定. 第150回日本獣医学会(帯広) 2010年9月
- H. 知的財産の出願・登録状況
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし

### 3. ウイルスによる人獣共通感染症の迅速診断法の開発

研究分担者 加来義浩 (国立感染症研究所 獣医科学部)

研究協力者 井上 智、野口 章、奥谷晶子 (国立感染症研究所・獣医科学部)

研究要旨 ヘニパウイルス感染症、リッサウイルス感染症など、国内での診断体制が十分に整備されていない人獣共通感染症を中心に、発生時・平時の両面に応用できる迅速診断法の開発・高度化を目的としている。今年度は、ヘニパウイルス (ニパウイルス ; NiV、ヘンドラウイルス ; HeV) の抗原検出 capture ELISA の開発を行った。抗 NiV-G 蛋白質ウサギ抗血清より精製した IgG を捕捉用抗体および検出用標識抗体として利用し、感染性ヘニパウイルス (NiV マレーシア株およびバングラデシュ株、HeV) を用いて、検出限界を調べた。また、RABV の reverse genetics 技術および minigenome 技術を活用し、遺伝子検出系の陽性対照 RNA の保護カプセル作製を行った (Bullet RNA 法)。RABV の Leader 配列と Trailer 配列の間に、マルチクロニングサイト (MCS) を組み込んだ一連の遺伝子をクロニングした。今回は、MCS に RABV-N 遺伝子の一部を欠損させた陽性対照 cDNA を挿入した。このプラスミドを、その他の RABV 蛋白質発現プラスミドと co-transfectoin し、上清および lysate を回収した。これらより RNA を抽出し、one-step RT-PCR を行い、保護カプセル ("Bullet RNA") に由来するバンドの存在を確認した。実用化に向けては、標的 RNA の量・純度のさらなる向上が必要であるが、陽性対照 RNA の常温での輸送や長期保存に向けた技術的基盤として期待できる。

#### A. 研究目的

人獣共通感染症の病原体 (zoonotic agent) の中には、比較的容易に伝播され、発病率、致死率が高いなどの特徴をもち、発生時にパニックを誘発するなど、社会的な影響が大きいものも少なくない。ニパウイルス (パラミクソウイルス科ヘニパウイルス属 Nipah virus: NiV) 感染症は、1998 年～99 年にかけてマレーシア、シンガポールで初めて発生し、ヒトに致死的な急性脳炎、ブタに主に呼吸器感染症の流行をもたらした新興の人獣共通感染症である。2001 年以降は、バングラデシュ、インドで、ほぼ毎年のように発生を繰り返している。これまでに日本国内での自然発生および、海外からの輸入症例は報告されておらず、本症を疑う症例が出現した場合、迅速に原因病原体を特定するとともに、発生 of 疫学的背景によっては他の宿主動物における感染状況を調べる必要がある。

一方、狂犬病は狂犬病ウイルス (ラブドウイルス科リッサウイルス属 Rabies virus:

RABV) を病原とする、古くから知られる人獣共通感染症である。痙攣、麻痺といった神経症状を主徴とし、世界各地で毎年 5 万人以上の犠牲者を出している。わが国では、国内感染症例は 50 年以上発生していないが、2006 年 11 月に、京都、横浜において 36 年ぶりに輸入症例が報告され、2 名の方が亡くなった。RABV は感染後であっても、速やかに予防的なワクチン接種を行えば発症を阻止できるが、ひとたび発症すると致死率はほぼ 100% であり、現在確実な治療法はない。このため、疑い症例から迅速に病原体を検出することが、極めて重要である。

これまで感染研の獣医科学部では、NiV および RABV の迅速診断法として、遺伝子検出系 (conventional/realtime PCR) の整備を行ってきた。しかし、ゲノム (特に PCR プライマーの領域) に人為的に変異が加えられた病原体がバイオテロに使用された場合、PCR では検出できない可能性がある。このため、迅速

診断系のひとつとして、PCR よりも幅広い変異に対応できる抗原検出系の整備が求められてきた。

そこで我々は、ヘニパウイルス抗原検出系として、NiV-G 蛋白質ウサギポリクローナル抗体、抗原検出 capture ELISA の構築を行った。昨年度までに、これまでに作製したウサギポリクローナル血清より、IgG を抽出し、捕捉用抗体および検出用標識抗体としての反応性を検討した。本年は、感染性ウイルスを用いて検出限界を測定した。

一方、RABV の遺伝子検出系においては、これまで陽性対照 RNA として、SP6 を用いて合成した RNA を使用してきた。この状態の RNA は、RNase にさらされやすく、長期保存や地方衛研への移送時に分解しやすいリスクがあった。そこで、RNase から保護し、保存性を高めることを目的に、陽性対照 RNA を蛋白質の殻あるいは脂質二重膜で包む方法 (Bullet RNA 法) を検討した。

## B. 研究方法

### 1) 抗 NiV-G 蛋白質ウサギポリクローナル抗体の精製

これまでに、プラスミド DNA 免疫により作製した、抗 NiV-G 蛋白質ウサギポリクローナル血清 ( $\alpha$ -NiV-G3) から、IgG Purification Kit-G (同仁化学) を用いて、IgG を精製した。方法は、キット添付のプロトコールに従った。これらの IgG を capture ELISA における捕捉用抗体として利用した。

続いて、上記 IgG 各 200 $\mu$ g 相当から、Peroxidase Labeling Kit-NH<sub>2</sub> (同仁化学) を用いて、peroxidase (POD) 標識を行った ( $\alpha$ -NiV-G3-POD)。方法は、キット添付のプロトコールに従った。これを capture ELISA における検出用標識抗体として利用した。

### 2) 抗原検出 capture ELISA

上記で作製した捕捉用抗体、検出用標識抗体を用いて、capture ELISA を行った。

具体的な手順は以下のとおり。

① 捕捉用抗体を PBS で 20 $\mu$ g/ml に希釈し、96 穴プレートに各ウェル 100 $\mu$ l ずつ加え、固

相化した (4 $^{\circ}$ C、一晚) ②洗浄後、5% skim milk PBS-T で 1 時間ブロッキングした。③ 抗原検体を、1% skim milk PBS-T で希釈し、これらを 100 $\mu$ l/well ずつ加え、反応させた (37 $^{\circ}$ C、1 時間)。④ 洗浄後、希釈した検出用標識抗体を 100 $\mu$ l 加え、反応させた (37 $^{\circ}$ C、1 時間)。⑤ 洗浄後、 $\times$ 50,000 希釈した HRP 標識 Protein AG (Pierce) を 100 $\mu$ l 加え、反応させた (37 $^{\circ}$ C、1 時間)。⑥ 洗浄後、TMB 基質液 Sureblue (KPL) を用いて発色させた。10 分後に 47%硫酸液で反応を停止し、450nm の波長で吸光度を測定した。

抗原として NiV マレーシア株 (NiV-M)、NiV バングラデシュ株 (NiV-B)、ヘンドラウイルス (HeV) を用いた。これらはいずれも BSL4 病原体であるため、豪州家畜衛生研究所の BSL4 施設にて取り扱われた。

### 3) RABV の reverse genetics 系の構築

RABV 固定株 CVS-26 フルゲノムおよび各蛋白質の cDNA を pcDNA3.1-zeo(+) にクローニングし、以下の 6 つのプラスミドを構築した； pzc26-full2 (フルゲノム cDNA)、pzc26-N (N 蛋白質)、pzc26-P (P 蛋白質)、pzc26-G (G 蛋白質)、pzc26-M (M 蛋白質)、pzc26-L (L 蛋白質)。

マウス神経芽腫 (MNA) 細胞を 6 穴プレートに 70-90% confluent の状態に培養し、各プラスミドを以下の量比で transfect した；ゲノム: 6 $\mu$ g、N: 1 $\mu$ g、P: 0.5 $\mu$ g、G: 0.3 $\mu$ g、M: 0.25 $\mu$ g、L: 0.2 $\mu$ g。72 時間後に、上清を新しい MNA 細胞に継代し、さらに 72 時間培養した。その後、細胞をホルマリン (+0.4% Triton X) で固定し、FITC 標識抗 RABV-N マウスモノクローナル抗体で特異蛍光を確認した。

### 4) Bullet RNA の作製

陰性対照 RNA を発現するプラスミドとして、RABV ゲノム両端の Leader 配列、Trailer 配列の間に (対照 RNA に由来する) 標的 cDNA 配列を挿入し、pcDNA3.1-zeo(+) にクローニングした (図 1 上 Bullet RNA Vector NL(-) insert)。対照として、Leader 配列に N 蛋白質遺伝子 5' 側 100bp、Trailer 配列の 3' 側 100bp を付属したもの (図 1 下 Bullet RNA Vector NL(+) insert)





### 3) Bullet RNA の検出

Bullet RNA Vector を3種の発現プラスミド(N, P, L)と co-transfect した well からは上清と lysate を回収した。一方、5種の発現プラスミド(N, P, G, M, L)と co-transfect した well からは lysate のみを回収した。これらから RNA を抽出し、希釈せずに one-step RT-PCR を行ったところ、Bullet RNA Vector を transfect した well からは、陽性対照 RNA に由来する一部欠損配列が検出された(図5)。

ただしこの検出方法では、Bullet RNA 由来 RNA から増幅された cDNA と、transfect されたプラスミド DNA (pzc26-N) から増幅された cDNA が混合して検出されてしまう。そこで同時に、対照として、(RT 反応を行わず) 直接 PCR を行った。PCR から検出されたバンドは、プラスミド DNA 由来の cDNA ということになる。

Trizol 法によって回収された RNA 液を、階段希釈したうえで、one-step RT-PCR と PCR を同時に行い、両者の検出限界を比較した結果を図6に示す。5種のプラスミド(N, P, G, M, L)と co-transfect した場合、上清では検出限界に差はなかったものの、lysate では one-step RT-PCR の方が100倍高かった。また3種のプラスミド(N, P, L)と co-transfect した場合の lysate では、one-step RT-PCR の方が10倍高かった。

図5 One-step RT-PCR による確認

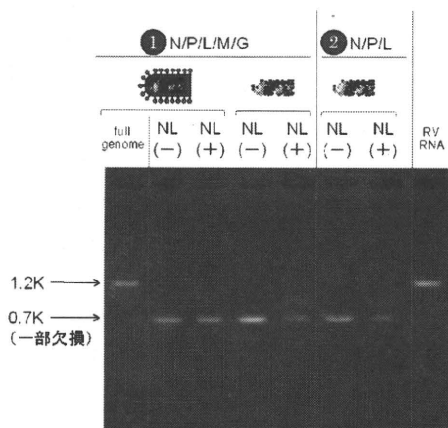
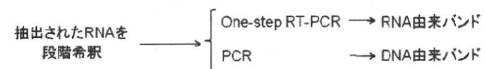


図6 RT-PCR/PCR の検出限界比較



ヘルパープラスミド	回収方法	RTの有無	検出限界
N/P/L/M/G	上清	+	10 <sup>4</sup>
		-	10 <sup>4</sup>
	lysate	+	10 <sup>8</sup>
		-	10 <sup>6</sup>
N/P/L	lysate	+	10 <sup>7</sup>
		-	10 <sup>6</sup>

### D. 考察

バイオテロ疑い事例の発生時には、特異性の高い迅速診断系の選択肢を、なるべく多く確保することが不可欠である。本課題では、ゲノムに人為的な変異が加えられた病原体も、高感度に検出することを目的に、まずヘニパウイルスの抗原検出 capture ELISA の開発を行った。

捕捉抗体および検出用標識抗体には、抗 NiV-G 蛋白質ウサギポリクローナル血清より精製した IgG を用いた。ポリクローナル抗体を用いることにより、モノクローナル抗体を用いた場合よりも、(単一のエピトープ認識によらない) 幅広い抗原性状のウイルス検出が可能になると考えた。また、本血清はプラスミド DNA を高度免疫して作製したものであることから、培養細胞由来の外来蛋白質に対する抗体を含まないことから、高い特異性を示すことが期待された。

種々の感染性ヘニパウイルスを用いて、検出限界の確認を行った結果、6.0×10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/well (NiV-M)、2.5×10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub>/well (NiV-B)、9.4×10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/well (HeV)と推定された(図2)。HeV の検出限界が最も高値であるのは、捕捉/検出抗体の由来が NiV-G 抗体であるためと考えられる。

一般的に capture ELISA では、エンベロープ蛋白質 (NiV-G) を標的とした場合に比べ、核蛋白質 (NiV-N) を標的としたほうが、コピー数が多いために高感度となることが知られている。また、核蛋白質の方が、配列の保存性が高いという利点もある。その一方で、エンベロープ蛋白質を標的とした場合、核蛋白質を露出させるために検体を可溶化する必要がないため、採取した検体をそのまま迅速に検査できる



利点がある。また、ヘニパウイルスを疑うバイオテロ時に最も想定される検体は、患者の脳脊髄液を用いた生前診断である。感染性ウイルスの増殖時には、感染性のある完全粒子の他に、エンベロープ膜とエンベロープ蛋白質だけから構成される中空粒子 (virus-like particle; VLP) が大量に産生されることから、脳脊髄液にはこれら VLP も多く含まれていると考えた。F/G をターゲットにした ELISA 系ではこれらの VLP も検出対象となることから、これらが感度の向上に寄与することを期待した。

ヘニパウイルスの capture ELISA では、以前、米国 CDC のグループが、NiV-N/P 蛋白質に対するモノクローナル抗体 (MoAb) を用いた系で、検出限界が  $4 \times 10^2$  pfu/well と報告している。私たちの検出限界の値よりも、数値の上では 62.5 倍感度がよいことになるが、両者の測定法には、以下に述べるようにいくつかの違いがあるため、慎重に比較する必要がある。すなわち、私たちの用いたウイルスストックの titer はいずれも、TCID<sub>50</sub> を単位として測定されたものであり、pfu で測定された米国 CDC のストックウイルスよりも  $10^2$  倍程度の高 titer であった。これは測定単位の違いも一因であるが、使用している細胞種の違いも影響していると考えられる。米国 CDC が用いている細胞は Vero-E6 細胞であるが、私たちは ATCC より購入した Vero 細胞 (Vero-ATCC) を用いている。本実験の開始前に、NiV-F/G 発現シュードタイプを用いて、両細胞の感受性を比較した結果、より高感度であった Vero-ATCC の使用を決めた経緯がある。現在、豪州家畜衛生研究所で、私たちの用いたウイルスストックについて、米国 CDC と同様の titration 法 (Vero-E6 を用いたプラーク法) で titer を算出し直しており、その結果を待たうえで、両方の感度を比較し直す必要がある。

続いて、陽性対照 RNA の保護カプセルとして、RABV 蛋白質殻および脂質二重膜を利用する Bullet RNA 法の検討を行った。バイオテロ病原体に対する遺伝子検出系では、地衛研と感染研で共通したプライマー/陽性対照を持つことが望ましい。本法により、常温での輸送や長期保存を行っても安定な RNA 対照を作製する技術的基盤として期待されるものである。同

様な考え方に基づくものに、ファージ殻で種々の RNA を包ませた市販品があるが、市販されている RNA は種類が少なく、バイオテロ病原体を対照としたものではない。また、任意の RNA 配列をオーダーした場合、非常に高いコストがかかるのが欠点である。本法は、RABV reverse genetics 技術および minigenome 技術を利用し、感染研で再生産できるシステムの構築を目指した。また、ファージを用いたシステムとは異なり、Bullet RNA には感染性はないことも、本法の利点である。

本実験では、Bullet RNA Vector とともに、3 種 (N, P, L) または 5 種 (N, P, G, M, L) の発現プラスミドを co-transfect し、その上清/lysate 中の Bullet RNA (に由来する RNA) 量を調べた。その結果、図 6 に示すように、transfect されたプラスミドに由来するバンドも相当量含まれていたが、Bullet RNA に由来するバンドも確実に存在していた (図 6 RT(+))。

本系は、RABV の Leader 配列を RABV-N 蛋白質が認識して結合すると、その後は配列非依存的にヌクレオカプシドが形成されるという性質を利用している。配列非依存的であることから、挿入配列には RABV に限らず、様々な陽性対照 RNA 用配列を用いることができる。Bullet RNA Vector は RABV の Leader 配列と Trailer 配列の間に、マルチクローニングサイトを組み込んだため、同一のフォーマット上で様々な RNA 対照を作製することが可能になった。今後の実用化に向けては、上清/lysate 回収後に DNase, RNase 処理を行ったり、RABV-N/RABV-G 抗体固相化ビーズを用いて精製を行うなど、Bullet RNA に由来する RNA の量および純度を高める必要がある。

## E. 結論

抗 NiV-G 蛋白質ウサギポリクローナル抗体を用いて、NiV 抗原検出 capture ELISA 系を開発した。感染性ヘニパウイルスを用いて、検出限界を測定したところ、 $6.0 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/well (NiV-M)、 $2.5 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/well (NiV-B)、 $9.4 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/well (HeV) と推定された。この値は、既報の NiV-N/P MoAb を用いた capture ELISA よりも高い値であるが、両法で用いられたウイルスストックの titer は、測定方法に違いがあり、

これが感度の違いにも影響を与えている可能性がある。現在、既報と同様の方法で、ウイルス titer の測定を行っているところであり、そのうえで両方の感度を慎重に比較する必要がある。

また、遺伝子検出系における種々の陽性対照 RNA の保護カプセル作製法として、RABV の reverse genetics 法および minigenome 法を応用した Bullet RNA 法を検討した。Bullet RNA に由来するバンドの存在が確認できたことから、陽性対照 RNA の常温での輸送や長期保存に向けた技術的基盤ができた。一方で transfect されたプラスミドに由来するバンドも相当量含まれていたことから、実用化に向けては、標的 RNA の量・純度のさらなる向上が必要である。

#### 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

1) 加来義浩、野口 章、奥谷晶子、堀田こずえ、福士秀悦、井上智、山田章雄：分泌型アルカリフォスファターゼ発現 VSV シュードタイプを利用したニパウイルス中和試験法の確立. 第 150 回日本獣医学会 (帯広) 2010 年 9 月

2) 加来義浩、野口 章、奥谷晶子、堀田こずえ、福士秀悦、井上智、山田章雄：分泌型アルカリフォスファターゼ発現 VSV シュードタイプを利用したニパウイルス多検体中和試験法の確立. 第 58 回日本ウイルス学会 (徳島) 2010 年 11 月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 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

研究分担者 高橋英之 (国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官)

研究要旨 バイオテロで使用される可能性が考えられるペスト菌をペスト菌の F1 antigen に対するモノクローナル抗体、F1 antigen に対するポリクローナル抗体及びペスト菌全菌体に対するポリクローナル抗体の精製 IgG を用いた直接抗体法 (Direct Fluorescent Antibody) を用いて迅速に検出する方法を確立した。サンプルの不活化方法に関わらずペスト菌の類縁菌である *Y. pseudotuberculosis* 及び *Y. enterocolitica* へのクロス反応は認められずペスト菌のみを特異的に認識した。以上の結果から蛍光物質をコンジュゲートさせたペスト菌に対するモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体から精製した IgG を用いた DFA によるペスト菌の検出法を確立した。

#### A. 研究目的

バイオテロリズムに使用されると想定されている微生物は、その重要度に応じてカテゴリ A, B, C に分けられている。肺ペスト、腺ペストなどを引き起こすペスト菌は最も危険度の高いカテゴリ A に分類されている。使用される可能性のある病原体には、あらかじめ病原体の検出、診断、治療、予防に関する研究をまとめておく必要がある。現実使用される病原体を予知することは不可能なので、現行の疾患サーベイランスと発生時対策にバイオテロに対する対策の準備を連携させることは不可欠である。従来は DNA レベルでのペスト菌の検出方法を開発してきたが、バイオテロの危険に面した場合にはあらゆる手法での検出が要求されてくると想定される。そこで本研究では、バイオテロで使用される可能性が考えられるペスト菌をタンパクレベルで検出する方法の確立を試みた。数あるタンパク抗原のうち本研究ではペスト菌の F1 antigen に着目した。F1 antigen は線毛様の構造をしてペスト菌の細胞表面に突出しているタンパクであり、ペストに対する protective antigen、そしてペストの血清診断の際に使用される抗原としてよく知られている。本研究ではペスト菌の F1 antigen に対するモノクローナル抗体を用いた直接抗体法

(Direct Fluorescent Antibody) (以下 DFA) によって迅速に検出できる系の構築を検討した。

#### B. 研究方法

##### 1) ペスト菌のサンプルの調製

-70 °C にてビーズ保存されているペスト菌を Brain-Heart Infusion 寒天培地にて 37°C、もしくは 27°C で 2~3 日間培養した。菌体は 10% のホルマリンで 1 時間不活化・固定し、固定ペスト菌を遠心により分離後 PBS に懸濁し、その一部分をスライドガラスに塗布して一時間 UV 照射してペスト菌の完全不活化を行なった。一方、メタノール及びアセトン固定の場合にはガラススライド上に 2 滴程の蒸留水を滴下し、1 µl loop のディスポーザブル白金耳で一白金耳分の菌体をプレートから接種して、スライドガラスでスメアした。ガラススライドを風乾後、メタノールもしくはアセトンを滴下し、1 分間再度風乾し、そのスライドガラスを一時間 UV 照射してペスト菌の完全不活化を行なった。

##### 2) ウサギ血清からの IgG 精製

ウサギ血清は精製処理をする前に PD-10 (GE Healthcare) の脱塩カラムを用いて予め PBS に置換して脱塩処理を行なった。脱塩処理したペスト菌の F1 antigen 及びペスト菌全菌体に対

するウサギ血清 (ポリクローナル抗体) からの IgG の精製には Protenova 社の Ab-Rapid Pure を用いて行なった。精製カラムを 2.5ml の結合バッファー (PBS) を満たしたシリンジに接合して平衡化後、10ml の脱塩ウサギ血清をシリンジを用いて精製カラムにゆっくり注入した。5ml の結合バッファーを満たしたシリンジで精製カラムをゆっくり洗浄後、2ml の溶出バッファー (0.1 M Glycine-HCl, pH2.8) を満たしたシリンジでゆっくり溶出した。溶出された IgG 溶液を 30 $\mu$ l の 1M Tris 溶液で中和した。さらに 400 $\mu$ l の飽和(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えて硫酸沈殿させ、ペレットとして得られた IgG 画分を 50%(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で洗浄後、100 $\mu$ l の PBS に懸濁し、一晚 PBS 中で透析を行なったサンプルを精製 IgG 標品とし、SDS-PAGE によりその精製度を確認した。以降、F1 antigen に対するポリクローナル抗体の精製した IgG 及びペスト菌全菌体に対するポリクローナル抗体の精製 IgG をそれぞれ  $\alpha$ -F1 IgG、 $\alpha$ -*Y.pestis* IgG と称する。

### 3) ペスト菌 F1 antigen モノクローナル抗体 Alexa488 (Alexa594) conjugate の作製

本研究ではペスト菌 F1 antigen モノクローナル抗体は HyTest 社の Monoclonal mouse anti-*Yersinia pestis* F1 antigen (以下  $\alpha$ -F1mAb) を購入して用いた。 $\alpha$ -F1mAb と 蛍光物質 Alexa488、 $\alpha$ -F1 IgG、 $\alpha$ -*Y.pestis* IgG と 蛍光物質 Alexa594 との結合は invitrogen 社の APEX Antibody Labelling Kit を用いて添付のプロトコール通りに実施した。Alexa 蛍光物質でラベルされた mAb、精製 IgG (以下  $\alpha$ -F1mAb-Alexa488、 $\alpha$ -F1 IgG-Alexa594、 $\alpha$ -*Y.pestis* IgG-Alexa594) は 0.1% NaN<sub>3</sub>を含む PBS (pH7.2) をワーキング溶液として 4 $^{\circ}$ C 保存した。

### 4) 直接抗体法 (Direct Fluorescent Antibody)

1) で調製したガラススライド上に 20  $\mu$ l の  $\alpha$ -F1mAb-Alexa488、 $\alpha$ -F1 IgG-Alexa594、 $\alpha$ -*Y.pestis* IgG-Alexa594 を滴下し、室温で 30 分静置する。その後、PBS で 2 回洗浄後、蒸留水で洗浄後、SlowFade Gold antifade reagent (invitrogen) を 2 滴滴下してカバーガラスで封入した。そのサンプルを OLYMPUS BX51 を

用いて観察し、HAMAMATSU ORCA-ER-1394 を介して画像を得た。

### 5) 画像の処理

4) で得られた位相差顕微鏡像や蛍光顕微鏡像は AQUA-Lite (HAMAMATSU) を用いて解析した。各画像は bmp 形式で出力し、その画像データを Adobe Photoshop CS2 にて整理した。

## C. 研究結果

本研究では、昨年度及び一昨年度において作製・検討したペスト菌 F1 antigen に対するモノクローナル抗体 (mAb) 及びポリクローナル抗体を用いた直接抗体法への応用を試みた。

まず DFA を実施するためにこの mAb の Alexa488 (Alexa594) との conjugate を作製した。mAb は 3YP8 を用いた (図 1)。ポリクローナル抗体は精製 F1 抗原をウサギに免疫したウサギ血清、及びペスト菌 H1122 株を免疫したウサギ血清を F1 非発現株 MII40 で吸収した血清から IgG を精製し (図 2)、それぞれ蛍光物質 Alexa488 及び Alexa594 でラベルした (図 3)。

CATALOGUE #:	3YP8
PRODUCT NAME:	Monoclonal mouse anti- <i>Yersinia pestis</i> F1 antigen
MAB:	YPF19 Hybridoma clone has been derived from hybridization of Sp2/O myeloma cells with spleen cells of Balb/c mice immunised with purified F1 antigen from <i>Y. pestis</i> vaccine strain EB.
Specificity:	<i>Y. pestis</i> MAB YPF19 reacts with capsule-bearing strains of <i>Y. pestis</i> only.
MAB isotype:	IgG1 for MAB YPF19
Applications:	Detection of <i>Y. pestis</i> in ELISA and Western blotting. MAb works in immunohistochemistry.
Purification:	Chromatography on protein G Sepharose

図 1 F1 mAb の詳細

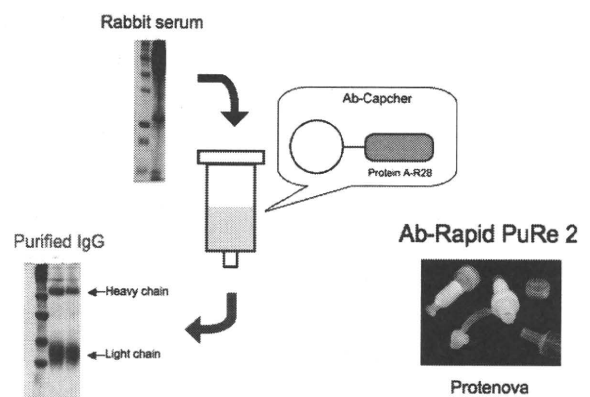


図 2 ウサギ血清からの IgG 精製

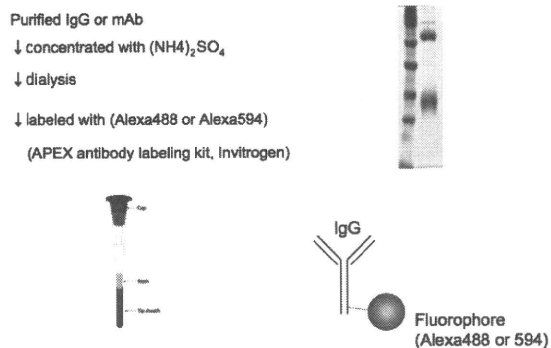


図3 mAb 及び精製 IgG と蛍光物質の結合

バイオテロに際して血液、喀痰、患部の切片といった臨床検体が想定される。臨床検体の一般的な処理はホルマリンで実施されている。一方で一般的な細菌検査ではスライドグラスにスメアを取り、メタノール固定、もしくは火炎固定にてサンプルが迅速に処理され、検査過程に移されることになる。その作業工程を踏まえ、ペスト菌 Yreka 株 (ワクチン株) をホルマリン、メタノールそしてアセトンで固定したサンプルに対して DFA による検出を試みた。様々な条件下で検出を検討した結果、いずれの条件下でも検体に対しては良好な陽性の蛍光像が認められた (図4)。またその条件下ではペスト菌の類縁菌である仮性結核菌 (*Y. pseudotuberculosis*)、エルシニア腸炎菌 (*Y. enterocolitica*) では蛍光像が認められなかった (図5) ことから DFA の陽性反応はペスト菌に特異的であることが確認された。

これらの結果から本研究で作製した  $\alpha$ -F1mAb-Alexa488、 $\alpha$ -F1 IgG-Alexa594、 $\alpha$ -*Y.pestis* IgG-Alexa594 による DFA ではサンプルの処理方法に依存することなくペスト菌の免疫化学的検出が可能となったことが明らかとなった。この結果は平成 19 年度においてペスト菌 F1 antigen モノクローナル抗体は Virostat 社の *Yersinia pestis* monoclonal antibody と FITC の conjugate を作製して DFA によるペスト菌の検出系を確立する際に生じた問題 (ホルマリン処理したペスト菌には反応するがメタノール (熱) 固定処理したサンプルでは DFA による染色像は殆ど認められなかった) (図6) という問題を克服することが出来たこ

とを示していると考えられた。

以上の結果から DFA を適用した免疫化学的検出手法を用いてペスト菌をタンパクレベルで 1 時間以内に検出することが可能となった。

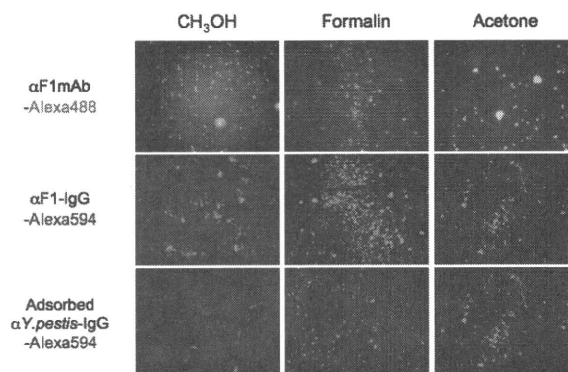


図4 ペスト菌 Yreka 株の DFA 像 (×1000)

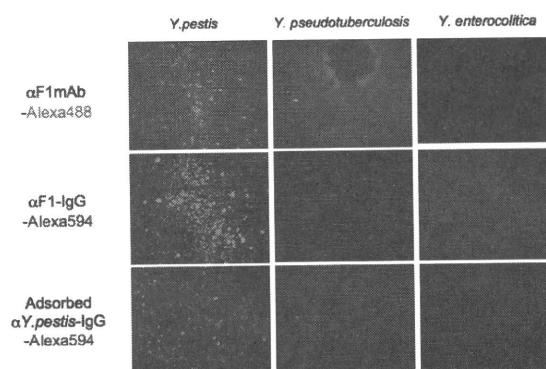


図5 ペスト菌 類縁菌 *Y. pseudotuberculosis* 及び *Y. enterocolitica* の DFA 像 (×1000)  
 ※サンプルはホルマリン処理のものを使用した

#### D. 考察

バイオテロリズムでペスト菌が病原体として現実に使用される可能性は十分に考えられる。本研究ではペスト菌を DNA レベルで検出する従来の方法とは別に免疫化学的手法を用いたタンパクレベルでの迅速検出法の確立を試みた。その結果、検体の処理方法に依存することなくペスト菌を一時間以内に検出することが可能となった。

本研究では mAb を Alexa488、ポリクローナル抗体から精製した IgG を Alexa594 と異なる蛍光を放つ蛍光物質をラベルして個々の抗体の単独の結合能を検証した。だが、実際に検出

する際には本研究で使用した抗体をすべてミックス抗体としてそのミックス抗体を単一の蛍光物質でラベルして抗原に対する抗体の相対的力価を高めることによってさらに検出率を向上させることも可能であろう。また  $\alpha$ -F1mAb-Alexa488、 $\alpha$ -F1 IgG-Alexa594、そして  $\alpha$ -*Y.pestis* IgG-を別の波長で励起する蛍光物質でラベルしてその混合ラベル済み抗体を用いて検出すると複数の波長で検出をすることが可能となり、検出ミスの低減化も可能となると推測される。いずれにせよ抗原の状態に関わらず DFA による免疫化学的手法を用いたタンパクレベルでのペスト菌の迅速検出法が確立されたことにより、更なるペスト菌の迅速診断法の開発の発展につながるが大いに期待される。

#### E. 結論

ペスト菌特異的抗体を用いた直接抗体法によるペスト菌の迅速検出法を開発した。

#### F. 健康危険情報

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



## 5. 鼻疽菌・類鼻疽迅速診断・同定法の確立

研究分担者 堀野敦子（国立感染症研究所 細菌第二部）

研究協力者 山根一和（国立感染症研究所 細菌第二部）

研究要旨 鼻疽菌 (*Burkholderia mallei*)、類鼻疽菌 (*Burkholderia pseudomallei*) の感染により引き起こされる鼻疽、類鼻疽は日本国内では輸入感染症として位置づけられ、人獣共通感染症とされている。本邦における類鼻疽患者は、国内での感染例は報告がないため、類鼻疽は日本では知名度が低い感染症である。したがって、診断法、分離・同定法が知られていないことが多い。一方、*B. mallei* はウマ・ロバに鼻疽 (glanders) を引き起こし、患畜の膿などからヒトにも感染することがある。しかしヒトでの発症は世界的にもここ数年報告がない。*B. pseudomallei* と *B. mallei* は四類感染症で特定病原体第三種に指定されており、生物テロ時には迅速に診断ならびに分離同定を行うことが求められる。そのため、この研究では *B. pseudomallei*、*B. mallei* の迅速な診断・同定を目的とした培養法、核酸診断法の確立とマニュアルの作成を目指す。今年度は前年度までに基礎検討が終了した *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た検討を行う。タイ東北部のコンケン大学で LAMP 法の立ち上げを行った。また、対照株として使用される *B. pseudomallei* ゲノム株 K96243 を用いた検討を行い、我々のこれまでの結果が有効であることが確認できた。また、*B. pseudomallei* については、国立感染症研究所・細菌第二部で保有する国内臨床分離株を用いて、タイピング法の検討を行い、現状では PFGE 法が適しているという結果を得た。バイオテロなどの集団発生時には、株の由来が同一であるかをこの方法で決定することが可能になった。*B. pseudomallei* では、マニュアル作成に必要な情報とデータの収集がほぼ終了した。*B. mallei* については今後の課題となっている。

### A. 研究目的

生物テロに使用される可能性のある細菌のうち *B. pseudomallei* と *B. mallei* について培養法、核酸診断法等の検出法確立のための検討を行う。

*B. pseudomallei* は東南アジア、北部オーストラリアが流行地域であり、これらの地域では土壌中や水中などの環境中にも菌が存在している。一方、*B. mallei* は環境中には存在しないと報告されている。*B. mallei* は主にウマ、ロバなどに感染し発症するが、ヒトにも感染する人畜共通感染症である。しかし、ヒトでの発症例は世界的にみてもここ数年報告が無い。これらの菌は、歴史的に生物テロの兵器として使用が検討された経緯がある。*B. mallei* は日本においては、動物でも近年報告が無く、

汚染地域から輸入する動物の検疫が重要とされている。類鼻疽はわが国においては輸入感染症であり、東南アジアに渡航し現地で感染した邦人が帰国後に発症した例が何例か報告されている。渡航歴のない患者が類鼻疽を発生した報告例はない。これらの菌は過去、国外で実験室感染を起こした報告があり BSL3 の実験施設内での適切な取り扱いが求められる。類鼻疽は日本国内において発生例数が少ないため臨床機関や検査機関でも診断・同定に苦慮する例が見受けられる。生物テロ発生時においても、迅速で確実な診断・同定は、同様に重要である。このため、医療機関で診療時に参考となる情報を含め、分離同定マニュアルが必要であると考え、これを作成することを目的としている。

現在、国立感染症研究所・細菌第二部、免疫部とタイ国・コンケン大学との間で共同研究が行われており、コンケン大学では日本国内では検討ができない類鼻疽患者由来の臨床検体を用いた検討を行うことができる。このため、平成 22 年度は前年に基礎検討を行った核酸検出法について臨床検体を用いた検討をコンケン大学で行うことを目的とした。また、H22 年は国立感染症研究所で *B. pseudomallei* を 1 株同定し、このほかに国内で再発例を含む計三例の *B. pseudomallei* 分離の報告があった。国内分離株がある程度収集されたことから、これらの菌株のタイピングを試みた。

## B. 研究方法

### 1) *B. pseudomallei* の遺伝子学的手法(LAMP 法)の検討

我々は、昨年度までに *B. pseudomallei* の核酸検出法として、*B. pseudomallei* ベン毛関連遺伝子を標的とした LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法のプライマー群を設計した。これらについて、国立感染症研究所・細菌第二部で保有する菌株を用いて基礎検討を行った。基礎検討の結果、この方法は感度、特異度において有用であることが示唆された。しかし、臨床検体を用いた検討は、類鼻疽が輸入感染症である日本国内で行うことはできない。このため、共同研究先であるタイ国コンケン大学で臨床検体を用いた有用性の検討を行うこととした。国立感染症研究所、コンケン大学の各倫理審査委員会の審査通過後にコンケン大学において、同大学の共同研究者とともに LAMP 法の立ち上げを行った。また、検討すべき検体は、血液由来検体、血液培養検体、呼吸器由来検体、膿由来検体とした。

### 2) *B. pseudomallei* 菌株の同定

行政検査検体として類鼻疽疑いの菌株 1 株を受け付けた。LAMP 法、培養法、生化学試験法で *B. pseudomallei* であるかどうか検査を行った。

### 3) *B. pseudomallei* 国内臨床分離株のタイピン

## グ

国立感染症研究所・細菌第二部保有の国内臨床分離株を用いて、PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) 法と、MLST (Multilocus sequence typing) 法を用いてタイピングを行った。

### 4) 薬剤感受性の検討

保有する国内臨床分離株について、薬剤感受性を e-Etest™ を用いて確認した。

### 5) バイオテロ対策への対応

地方衛生研究所等からバイオテロ対策として *B. pseudomallei*, *B. mallei* に関する問い合わせやプライマー、陽性対照分与の依頼がある場合には対応する。

### (倫理面への配慮)

共同研究先のタイ・コンケン大学で臨床検体を用いた LAMP 法の検討を行うに当たり、国立感染症研究所倫理審査委員会とコンケン大学倫理審査委員会の承認を得た (承認番号 253)。

## C. 研究結果

### 1) *B. pseudomallei* の遺伝子学的手法(LAMP 法)の検討

*B. pseudomallei* の研究の際に一般的に対照として用いられる株は、ゲノム解読株である K96243 株であるが、我々はこの株を保有していない。そのため、この株を保有するコンケン大学で、K96243 株のゲノム DNA を用いて LAMP 法の検討を行った。その結果、我々が国内で使用していた臨床分離株を用いた検討と同程度の 4.5 copies/reaction という検出限界を示した。これは既報の *B. pseudomallei* の LAMP 法よりもよい感度であった。引き続き、類鼻疽疑い患者由来の臨床検体を用いて検討を行うことにした。しかしながら、*B. pseudomallei* LAMP 法のコンケン大学でのセットアップが 10 月であり、この時期以降タイ東北部は乾期に入っている。類鼻疽患者発生は次の雨期までまれになることから、現在検体待ちの状態である。

### 2) *B. pseudomallei* 菌株の同定

類鼻疽疑い患者由来の菌株を、LAMP 法、

培養法、生化学試験法で検査した。LAMP 法の結果、*B. pseudomallei* 陽性であった。培養法でも *B. pseudomallei* に特有の皺の寄ったコロニーを形成した。また、生化学試験 API20NE の結果からも *B. pseudomallei* であることが示された。補助的にコンケン大学より分与された *B. pseudomallei* 特異的 LATEX ビーズ結合モノクローナル抗体を反応させたところ凝集反応を示し、この結果からも *B. pseudomallei* であることが示された。上記の結果を総合し、患者から分離された菌株は *B. pseudomallei* であると同定した。

### 3) *B. pseudomallei* 国内臨床分離株のタイピング

国内臨床分離株を MLST 法でタイピングした結果、渡航先や時期の異なる株でも同一の ST となった例があった。

一方、PFGE 法によるタイピングでは同一患者から異なる時期（初発時および再発時）に分離された株が同じパターンを示した。

これらの結果から、現在のところ *B. pseudomallei* についてバイオテロ時など患者多発事例において菌株の同一性を見る場合には PFGE 法によるタイピングが有用と考えられる。

### 4) *B. pseudomallei* 薬剤感受性の検討

*B. pseudomallei* の薬剤感受性試験を当部保有国内臨床分離株を用いて行った。これまで行った範囲では、保有株で類鼻疽の治療に用いられる抗菌薬について耐性を示した薬剤はなかった。

### 5) バイオテロ対策への対応

地方自治体から国際会議開催などの際にバイオテロ対策として、*B. pseudomallei* ならびに *B. mallei* に対する対応を求められることがある。H22 年度は横浜市衛生研究所より APEC 開催にあたり、*B. pseudomallei* と *B. mallei* の核酸検出法のプライマーと陽性コントロールの分与を依頼された。*B. pseudomallei* については対応可能であったが、*B. mallei* の核酸検出法は未だ確立できていないため、対応できず、有事の際には 16S rRNA シークエンス法で対応

するという事になった。*B. mallei* の核酸検出法確立は今後の課題となっている。

### D. 考察

今年度は *B. pseudomallei* についてこれまで検討してきた LAMP 法の検討を継続し、また、国内臨床分離株のタイピングや感受性の確認などを行った。LAMP 法はコントロール菌株として用いられる K96243 株を用いて検出限界の検討および性能を確認することができた。しかし、臨床検体を用いた検討は類鼻疽患者が発生する雨期を逃してしまったことから検体待ちである。

タイピングは患者情報のある *B. pseudomallei* 国内臨床分離株を用いて検討を行った。その結果、精度は PFGE 法が MLST 法よりも良好であることが示された。バイオテロなどの患者集団発生時に、同一の菌株であるか否か検討する際には PFGE 法が MLST 法よりも正確であると考えられる。

PFGE 法を行うには時間がかかるため、PFGE 法と同程度の解析力があると考えられている MLVA 法について比較する予定である。

上記の国内臨床分離株について薬剤感受性試験を行ったが、これまでのところ問題となる耐性を示した株はなかった。今後も臨床分離株が得られた場合には確認を行っていく予定である。

一方、類鼻疽が疑われる患者が発生した場合に、医療機関からは患者血清中の抗体に対する抗体検出法が可能であるかという問い合わせが多い。現在のところ、当部独自の検出法は確立されていない。共同研究先のコンケン大学より分与された IHA キットを用いて、参考情報としての対応は可能になったが、今後に向けて抗体検出法の確立も必要と考える。平成 22 年は類鼻疽患者が年に三件発生した。第二次世界大戦後これまでに数例という発生数だったことを考えると発生数は多い。今年度は当部で初めて *B. pseudomallei* 菌株の同定を行うことができたが、今後も邦人の海外渡航が活発になっていることから患者の発生が考えられる。このため、要請があった場合には対応できる体制を引き続き整えておく必要がある。

これまで述べたように *B. pseudomallei* についての検討は行ってきたが、*B. mallei* についての検討が遅れている。*B. mallei* では国際的にみてもヒトの患者発生はここ数年報告がなく、*B. pseudomallei* のように国内で患者が発生するという可能性は非常に低いと考えられる。しかし、バイオテロ対策を考えた場合にはなんらかの検出法を確立しておく必要がある。今年度の例でも横浜市衛生研究所からの依頼に対し、*B. mallei* に特異的な核酸検出法を提供することができず 16S rRNA シークエンス法を提案せざるをえなかったこともあり、核酸検出法また、同定が可能なシークエンスプライマーの設計を行う必要がある。

#### E. 結 論

これまでの検討で *B. pseudomallei* への対応は核酸検出法、タイピング法などが可能となった。また、国内発症例では患者はいずれも糖尿病の基礎疾患があり、流行地域である東南アジアへの渡航歴があった。診断の際にはこれらの情報も有益であると考え。これらをふまえ、類鼻疽については分離・同定マニュアルに記載する情報がある程度整備されたと考える。*B. pseudomallei* の今後への課題としては抗体検出法の確立が必要と考える。*B. mallei* については全般的に対応が遅れており、今後重点的に検出法を検討する必要がある。

また、現在、類鼻疽の病原体届出基準には、培養法と PCR 法のみ記載がされているので、将来の改正の機会に LAMP 法も含まれる核酸診断法に変更を行うのが望ましいと考えている。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) 山根一和、堀野敦子：国立感染症研究所における類鼻疽の診断および検査体制の

現状. 第 9 回旅行医学会大会 (東京) 2010 年 4 月

- 2) 堀野敦子、山根一和、荒川宜親：類鼻疽 (メリオイドーシス) の診断と同定. 第 93 回日本細菌学会関東支部会 (東京) 2010 年 10 月
- 3) Yamane K, Horino A. VI th World Melioidosis Congress; Epidemiological features and molecular typing of *Burkholderia pseudomallei* isolated from Japanese hospital. Dec. 2010, Townsville, Austraria
- 4) 山根一和、堀野敦子、荒川宜親：国立感染症研究所における類鼻疽の診断および検査態勢. 第 22 回日本臨床微生物学会 (岡山) 2011 年 1 月

#### H. 知的財産の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし