

201028006B

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20年度～平成22年度 総合研究報告書

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20年度～平成22年度 総合研究報告書

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 20-22 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. 総合研究報告書（平成 20-22 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. 研究成果に関する刊行一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 9

I. 総合研究報告書

平成 20-22 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

総合研究報告書

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 当研究班の目的は、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とした。3 年分の結果を以下に記載する。飲料物からウイルスを回収することができた。ま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た。携帯型炭疽菌核酸検出法を開発した。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をえた。1950-60 年代の野兎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。新種のエボラウイルス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。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。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。ニパと狂犬病ウイルスの抗原検出 ELISA を開発した。狂犬病ウイルスの陽性対照 RNA を保護カプセル化した。直接および間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 法を開発を行った。GST 融合蛋白の大量精製法を確立することで、野兎病迅速診断法および迅速同定法の構築が可能となった。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。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。リケッチア属の核酸迅速検出法および LAMP 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 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った。さらにペスト菌、野兎病菌、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。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。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がほぼ同程度で、測定時間がかかなり短かった。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。市販の外国製イムノクロマトキット数種について性能評価をおこなった。炭疽菌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。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。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。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。全国各地衛研の各ブロックから研究協力体制を構築し、ウイルスおよび細菌を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。当初の目標はおおよそ達成できた。

研究分担者（計 14 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）
倉園 久生（国立大学法人帯広畜産大学・畜産学部）
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、多くの研究協力者の参加をえた（記載は各研究分担者の項を参照いただきたい）。

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。

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する（牧野）。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標準化をはかる（高橋元）。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。そして病原体の由来を明かにできるようにする（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

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。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) 法の開発を行い、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。野兎病菌には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、日本に存在する野兎病菌の亜種は 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性ではない。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)。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、新たに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。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いるが健康被害は確認されていない。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、代替え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。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、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抗原を検出する capture ELISA も開発した。狂犬病ウイルスの陽性対照 RNA を保護カプセル化した(加来)。新規に解読を行った *R. japonica* のゲノム情報を用いた結果、リケッチャ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。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。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)。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。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)。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。菌株の収集を行った。類鼻疽菌の LAMP 法について流行地域のタイで臨床検体を用いて検討した。また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)。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った。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。またペスト菌、野兎病菌、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。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った(牧野)。マウス接種法に代わるボツリス

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。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。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

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。森川班員の作製した「定量的 PCR 法を用いたオルソボ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。また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。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、改善の要望の多かった「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。さらに 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(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、また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。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

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。

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。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当初の計画にそって行われ結果的にはほぼ予定通りであった。バイオテロが疑われた場合の迅速検査法を整備することはその後の対応の出発点であり、重要である。この目的には核酸検出法が主体となり、増幅塩基配列が確認できるrealtime PCR法が中心となろう。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、開発できた。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た。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、保存された野兔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の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、期待されるところである。

いわゆる臨床支援として考案されたバイオテロ対応ホームページは、臨床医のみならず種々の対応者にも役立てられる。実際、洞爺湖サミットや横浜APECでも担当者に配布された。これについて、本研究班への要望を調べた。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。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、こうしたシステムをどのように実際に運用していくかという課題がある。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。そのためにも研究班で研

究開発されたあとの維持管理についてどのようにするべきかを関係者で話合っていきたい。

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。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ほぼ順調に進んだ。そして地衛研とグループないし個々に評価された。地衛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。また、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。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。全体としておよそ順調に研究が進んだ。各研究の詳細は各年度毎の研究報告書に記載した。

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50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

II. 研究成果に関する刊行一覧表

研究成果に関する刊行一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ure AE, Ghiringhelli PD, Possee RD, <u>Morikawa S</u> , Romanowski V.	Argentine hemorrhagic fever diagnostic test based on recombinant Junin virus N protein.	J Med Virol	80	2127-33	2008
Watanabe S, Mizutani T, Sakai K, Kato K, Tohya Y, Fukushi S, Saijo M, Yoshikawa Y, Kurane I, <u>Morikawa S</u> , Akashi H.	Ligation-mediated amplification for effective rapid determination of viral RNA sequences (RDV).	J Clin Virol	43	56-9	2008
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, <u>Morikawa S</u>	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	140-2	2008
Maeda K, Hondo E, Terakawa J, Kiso Y, Nakaichi N, Endoh D, Sakai K, <u>Morikawa S</u> , Mizutani T	Isolation of novel adenovirus from fruit bat (<i>Pteropus dasymallus yayeyamae</i>).	Emerg Infect Dis	14	347-9	2008
Sakai K, Ueno Y, Ueda S, Yada K, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Mutoh K, Yoshioka K, Nakamura M, Takehara K, <u>Morikawa S</u> , Mizutani T	Novel reovirus isolation from an Ostrich (<i>Struthio camelus</i>) in Japan.	Vet Microbiol	134	227-32	2009
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, <u>Morikawa S</u> , 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	153-8	2009

高橋英之、渡辺治雄	エルシニア肺炎、肺ペストとペスト肺炎	呼吸器症候群 (第2版)別冊 日本臨床	8	258-60	2008
Hisatsune J, Nakayama M, Isomoto H, <u>Kurazono H</u> , Mukaida N, Mukhopadhyay AK, Azuma T, Yamaoka Y, Sap J, Yamasaki E, Yahiro K, Moss J, Hirayama T	Molecular characterization of <i>Helicobacter pylori</i> VacA induction of IL-8 in U937 cells reveals a prominent role for p38MAPK in activating transcription factor-2, cAMP response element binding protein, and NF-kappaB activation.	J Immunol	180	5017-27	2008
Tapchaisri P, Na-Ubol M, Tiyasuttipan W, Chaiyaroj SC, Yamasaki S, Wongsaroj T, Hayashi H, Nair GB, Chongsa-Nguan M, <u>Kurazono H</u> , Chaicumpa W	Molecular typing of <i>Vibrio</i> cholerae O1 isolates from Thailand by pulsed-field gel electrophoresis.	J Health Popul Nutr	26	79-87	2008
Nakayama M, Hisatsune J, Yamasaki E, Isomoto H, <u>Kurazono H</u> , Hatakeyama M, Azuma T, Yamaoka Y, Yahiro K, Moss J, Hirayama T	<i>Helicobacter pylori</i> VacA-induced inhibition of GSK3 through the PI3K/Akt signaling pathway.	J Biol Chem	284	1612-9	2009
大楠清文、 <u>江崎孝行</u>	遺伝子検査による好酸菌感染症の迅速診断	結核	83	684-8	2008
大楠清文、 <u>江崎孝行</u>	遺伝子検査による呼吸器感染症の迅速診断	呼吸器科	14	63-74	2008
<u>江崎孝行</u>	微生物の危険度分類	臨床と微生物	35	279-92	2008

大楠清文、 <u>江崎孝行</u>	感染症診断における遺伝子解析技術の適応	日本臨床微生物学雑誌	18	163-75	2008
Asakura H, Kawamoto K, Haishima Y, Igimi S, Yamamoto S, <u>Makino S</u>	Differential expression of the outer membrane protein W (OmpW) stress response in enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 corresponds to the viable but non-culturable state.	Res Microbiol	159	709-17	2008
Okada Y, <u>Makino S</u> , Okada N, Asakura H, Yamamoto S, Igimi S	Identification and analysis of the osmotolerance associated genes in <i>Listeria monocytogenes</i> .	Food Addit Contam	25	1089-94	2008
Ohtsuki R, Kawamoto K, Kato Y, Shah MM, Ezaki T, <u>Makino SI</u>	Rapid detection of <i>Brucella</i> spp. by the loop-mediated isothermal amplification method.	J Appl Microbiol	104	1815-23	2008
<u>松本哲哉</u>	新・隔離予防策とバイオテロ対策—日本における対策の現況	感染対策 ICT ジャーナル	3	201-6	2008
Hanaoka N, Sakata A, Takano A, Kawabata H, Watanabe H, Kurane I, Kishimoto T, <u>Ando S</u>	Development of a pUC19-based recombinant plasmid to serve as a positive control in PCR for <i>Orientia tsutsugamushi</i> .	Microbiol Immunol	53	305-8	2009
Fujita H, Kadosaka T, Nitta Y, <u>Ando S</u> , Takano A, Watanabe H, Kawabata H	<i>Rickettsia</i> sp. in <i>Ixodes granulatus</i> ticks, Japan.	Emerg Infect Dis	14	1963-65	2008
Yamazaki T, Takemura H, Inoue M, Ogawa M, <u>Ando S</u> , Sato K, Kishimoto T	The intracellular accumulation of phagocytic and epithelial cells and the inhibitory effect on <i>Chlamydia</i> pneumoniae of telithromycin and comparator antimicrobials.	J Chemother	20	428-30	2008

Hisada H, Yamazaki T, Inoue M, Sato K, <u>Ando S</u> , Kishimoto T	In vitro activity of garenoxacin against Chlamydia spp.	J Chemother	20	282-84	2008
Matsui T, Nakashima K, Ohyama T, Kobayashi J, Arima Y, Kishimoto T, Ogawa M, Cai Y, Shiga S, <u>Ando S</u> , Kurane I, Tabara K, Itagaki A, Nitta N, Fukushi H, Matsumoto A, Okabe N	An outbreak of psittacosis in a bird park in Japan.	Epidemiol Infect	136	492-95	2008
Tobiume M, Sato Y, Katano H, Nakajima N, Tanaka K, Noguchi A, Inoue S, Hasegawa H, Iwasa Y, Tanaka J, Hayashi H, Yoshida S, Kurane I, <u>Sata T</u>	Rabies virus dissemination in neural tissues of autopsy cases due to rabies imported into Japan from the Philippines: immunohistochemistry.	Pathol Int	59	555-66	2009
Nakauchi M, Fukushi S, Saijo M, Mizutani T, Ure AE, Romanowski V, Kurane I, <u>Morikawa S</u>	Characterization of monoclonal antibodies to Junin virus nucleocapsid protein and application to the diagnosis of hemorrhagic fever caused by South American arenaviruses.	Clin Vaccine Immunol	16	1132-38	2009
Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Iizuka I, Shiota T, Sakai K, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Sata T, Kurata T, Kurane I, <u>Morikawa S</u>	Virulence and pathophysiology of the Congo Basin and West African strains of monkeypox virus in non-human primates.	J Gen Virol	90	2266-71	2009
Iizuka I, Saijo M, Shiota T, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Hasegawa H, Sakai K, Fukushi S, Mizutani T, Ogata M, Nakauchi M, Kurane I, Mizuguchi M, <u>Morikawa S</u>	Loop-mediated isothermal amplification-based diagnostic assay for monkeypox virus infections.	J Med Virol	81	1102-8	2009
Saito T, Fujii T, Kanatani Y, Saijo M, <u>Morikawa S</u> , Yokote H, Takeuchi T, Kuwabara N	Clinical and immunological response to attenuated tissue-cultured smallpox vaccine LC16m8.	JAMA	301	1025-33	2009

<u>Kaku Y</u> , Noguchi A, Marsh GA, McEachern JA, Okutani A, Hotta K, Bazartsuren B, Fukushi S, Broder CC, Yamada A, Inoue S, Wang LF.	A neutralization test for specific detection of Nipah virus antibodies using pseudotyped vesicular stomatitis virus expressing green fluorescent protein.	J Virol Methods	160	7-13	2009
Thuy NTB, Takeshi K, Kusumoto A, <u>Makino SI</u> , Kawamoto K	Salmonella Typhimurium isolated from healthy pigs and their ability of horizontal transfer of multidrug resistance and virulence genes.	Bioscience Microflora	28	135-43	2009
Kurosaki Y, Sakuma T, Fukuma A, Fujinami Y, Kawamoto K, Kamo N, <u>Makino SI</u> , Yasuda J	A simple and sensitive method for detection of Bacillus anthracis by loop-mediated isothermal amplification.	J Appl Microbiol	107	1947-56	2009
Takeshi K, Itoh S, Hosono H, Kono H, Tin VT, Vinh NQ, Thuy NT, Kawamoto K, <u>Makino S</u>	Detection of Salmonella spp. Isolates from specimens due to pork production Chains in Hue City, Vietnam.	J Vet Med Sci	71	485-7	2009
Takahashi A, Muratani T, Yasuda M, Takahashi S, Monden K, Ishikawa K, Kiyota H, Arakawa S, Matsumoto T, Shima H, <u>Kurazono H</u> , Yamamoto S	Genetic profiles of fluoroquinolone-resistant Escherichia coli isolated from cystitis: phylogeny, virulence factors, PAIusp-subtypes, and mutation patterns.	J Clin Microbiol	47	791-5	2009
Uchida I, Ishihara R, Tanaka K, Hata E, <u>Makino S</u> , Kanno T, Hatama S, Kishima M, Akiba M, Watanabe A, Kubota T	Salmonella enterica serotype Typhimurium DT104 ArtA-dependent modification of pertussis toxin-sensitive G proteins in the presence of [32P]NAD.	Microbiology	155	3710-8	2009
Hanaoka N, Matsutani M, Kawabata H, Yamamoto S, Fujita H, Sakata S, Azuma Y, Ogawa M, Takano A, Watanabe H, Kishimoto T, Shirai M, Kurane I, <u>Ando S</u>	Diagnostic assay for Rickettsia japonica.	Emerg Infect Dis	15	1994-7	2009
藤井史敏、前野敏也、藤本卓司、内野清子、三好龍也、松尾光子、吉田永祥、 <u>田中智之</u>	新型インフルエンザ感染が証明された激症型溶血性レンサ球菌感染症の一例	IDWR	11	22-3	2009

内野清子、高橋幸三、三好龍也、松尾光子、狩山雅代、吉田永祥、田中智之、石井まどか、岡村隆行、藤井史敏、前野敏也	2009/10 シーズン、新型インフルエンザウイルス遺伝子と同時に検出された B 型インフルエンザウイルス	IDWR	12	16-8	2009
Matsuura M, <u>Takahashi H</u> , Watanabe H, Saito S, Kawahara K	Immunomodulatory effects of <i>Yersinia pestis</i> lipopolysaccharides on human macrophages.	Clin Vaccine Immunol	17	49-55	2010
Okutani A, Sekizuka T, Boldbaatar B, Yamada A, <u>Kuroda M</u> , Inoue S	Phylogenetic typing of <i>Bacillus anthracis</i> isolated in Japan by the multiple locus variable-number tandem repeats and the comprehensive single nucleotide polymorphism.	J Vet Med Sci	72	93-7	2010
Hatano B, Maki T, Obara T, Fukumoto H, Hagsawa K, Matsushita Y, Okutani A, Bazartseren B, Inoue S, <u>Sata T</u> , Katano H	LAMP Using a Disposable Pocket Warmer for Anthrax Detection, a Highly Mobile and Reliable Method for Anti-Bioterrorism.	Jpn J Infect Dis	63	36-40	2010
Hatano B, Kojima A, <u>Sata T</u> , 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	63	52-4	2010
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, <u>Sata T</u>	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	63	67-71	2010
Kuroda M, Katano H, Nakajima N, Tobiume M, Ainai A, Sekizuka T, Hasegawa H, Tashiro M, Sasaki Y, Arakawa Y, Hata S, Watanabe M, <u>Sata T</u>	Characterization of quasispecies of pandemic 2009 influenza A virus (A/H1N1/2009) by <i>de novo</i> sequencing using a next-generation DNA sequencer.	PLoS One	5	e10256	2010

Nakamura T, Sato Y, Watanabe D, Ito H, Shimonohara N, Tsuji T, Nakajima N, Suzuki Y, Matsuo K, Nakagawa H, <u>Sata T</u> , Katano H	Nuclear localization of Merkel cell polyomavirus large T antigen in Merkel cell carcinoma.	Virology	398	273-9	2010
Katano H, Kano M, Nakamura T, Kanno T, Asanuma H, <u>Sata T</u>	A novel real-time PCR system for simultaneous detection of human viruses in clinical samples from patients with uncertain diagnoses.	J Med Virol.	83	322-30	2011
Watanabe S, Maeda K, Suzuki K, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Shimoda H, Kato K, Yoshikawa Y, <u>Morikawa S</u> , Kurane I, Akashi H, Mizutani T	Novel betaherpesvirus in bats.	Emerg Infect Dis	16	986-8	2010
Watanabe S, Masangkay JS, Nagata N, <u>Morikawa S</u> , 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	16	1217-23	2010
Ogawa H, Miyamoto H, Ebihara H, Ito K, <u>Morikawa S</u> , 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	171	310-3	2011
Saijo M, <u>Morikawa S</u> , Kurane I	Recent progress in the treatment for Crimean-Congo hemorrhagic fever and future perspectives.	Future Virology		in press	