

201123041A

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

バイオテロに使用される可能性のある病原体等の  
新規検出法と標準化に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

平成24年 3月

研究代表者 倉根 一郎  
(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

バイオテロに使用される可能性のある病原体等の  
新規検出法と標準化に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

平成24年 3月

研究代表者 倉 根 一 郎

(国立感染症研究所)

平成23年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

「バイオテロに使用される可能性のある病原体等の新規検出法と標準化に関する研究」

班 員 名 簿

氏 名	所 属	職 名
倉根 一郎	国立感染症研究所	副所長
森川 茂	国立感染症研究所 ウイルス第一部	室 長
井上 智	国立感染症研究所 獣医科学部	室 長
見理 剛	国立感染症研究所 細菌第二部	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
宮崎 義継	国立感染症研究所 生物活性物質部	部 長
堀野 敦子	国立感染症研究所 細菌第二部	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	センター長
佐多 徹太郎	富山県衛生研究所	所 長
永田 典代	国立感染症研究所 感染病理部	室 長
倉園 久生	国立大学法人帯広畜産大学 畜産学部	教 授
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

# 目 次

## I. 総括研究報告書（平成23年度）

- バイオテロに使用される可能性のある病原体等の新規検出法と  
標準化に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1  
研究代表者：倉根 一郎（国立感染症研究所）

## II. 分担研究報告書

1. 患者血清を用いたフラビウイルス共通迅速診断法の評価・・・・・・・・ 15  
研究代表者：倉根 一郎（国立感染症研究所副所長）
  
2. 新興アレナウイルスに対応可能なウイルス抗原検出法の  
開発に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 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. 人獣共通感染症（炭疽、狂犬病等）に対するヒト検体および  
感染源検体を用いた迅速検査、消毒、その標準化等に関する研究・・・・ 31  
研究分担者：井上 智（国立感染症研究所 獣医科学部）
  
4. ボツリヌス菌株の同定と管理のための遺伝子型別法の検討・・・・・・・・ 37  
研究分担者：見理 剛（国立感染症研究所 細菌第二部）
  
5. リケッチア・クラミジアの迅速検出法の開発  
リケッチアの多様性への対応の必要性に関する考察・・・・・・・・ 45  
研究分担者：安藤 秀二（国立感染症研究所 ウイルス第一部）
  
6. バイオテロの可能性のある真菌感染症の迅速診断法の確立・・・・・・・・ 51  
研究分担者：宮崎 義継（国立感染症研究所 生物活性物質部）

7. 鼻疽・類鼻疽の迅速診断法に関する研究	57
研究分担者：堀野 敦子（国立感染症研究所 細菌第二部）	
8. 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	61
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）	
9. 病原体の病理学的検出法の確立 腸管出血性大腸菌産生ベロ毒素検出の試み	67
研究分担者：佐多 徹太郎（富山県衛生研究所）	
10. 病原体の電子顕微鏡学的迅速検出法の確立	73
研究分担者：永田 典代（国立感染症研究所 感染病理部）	
11. 細菌性バイオテロに対する迅速同定法・診断法およびワクチンの開発	79
研究分担者：倉園 久生（国立大学法人帯広畜産大学 畜産学部）	
12. バイオテロ危機発生時への対応	89
地衛研のこれまでの研究成果と今後の課題	
研究分担者：田中 智之（堺市衛生研究所）	
13. 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	101
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）	
14. 各医療機関のバイオテロ対策を支援するための方策	103
研究分担者：松本 哲哉（東京医科大学 微生物学講座）	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	107

# I. 総括研究報告書

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）

総括研究報告書

バイオテロに使用される可能性のある病原体等の新規検出法と標準化に関する研究

研究代表者：倉根一郎（国立感染症研究所 副所長）

研究要旨：

バイオテロに利用される可能性のある病原体等は感染し発症すれば非常に高い致死率を示す物が多い。一方これらの病原体は、稀なものが多く、通常の病院や検査機関では確定診断が困難であり、確定検査が遅れる可能性がある。従って、バイオテロ対策としては、早期検知法の確立と迅速診断システムの整備が必須である。さらに、早期検出により、感染拡大を防止し、社会的なパニックを防止する必要がある。本研究では、バイオテロの迅速な検出を可能とし、さらに感染防止策等の迅速な対応策の策定を可能とすることを目的として、1) 特定病原体等に対する、遺伝子検出法、抗原抗体検出法、毒素迅速検出法等の迅速診断法の確立と標準化を行った、2) 網羅的検出法として、網羅的ウイルス検出法、網羅的細菌検出法、超高速ゲノム解読法の確立を行い、さらに未知の病原体等検出法、病原体のデータベース等の開発と確立を行った、3) 病理学的、また電子顕微鏡を用いた病原体検出法、免疫組織化学的検出法の確立すを行った、4) 検体調整法とスクリーニング法の普及、検査マニュアルの整備を行い、地方衛生研究所や検査機関での対応と検査ネットワークの整備を行った。かた、5) 診断検査支援のため、バイオテロ対応関係機関との情報交換を密にするシステムの確立を開始した

研究分担者：

	宮崎 義継：国立感染症研究所 部長
森川 茂：国立感染症研究所 室長	堀野 敦子：国立感染症研究所 主任研究
井上 智：国立感染症研究所 室長	官
見理 剛：国立感染症研究所 主任研究官	黒田 誠：国立感染症研究所 センター長
安藤 秀二：国立感染症研究所 室長	佐多徹太郎：富山県衛生研究所 所長

永田 典代：国立感染症研究所 室長  
倉園 久生：帯広畜産大学 教授  
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 教授  
松本 哲哉：東京医科大学 教授

#### A. 研究目的

米国における炭疽菌芽胞混入郵便物によるバイオテロの後、わが国における摸倣事件が発生した。その後対応体制が構築され、2006年の感染症法改正による「特定病原体等」の管理が整備された。迅速診断法に関する基盤整備は、バイオテロの脅威に対抗する上で必須といえる。一次対応機関で用いることが予想される検査キットの多くは十分検証された物とはいえ、病原体等の由来を知るための塩基配列の情報も十分公開されていない。従って、我が国の現状に即した検査法の確立と標準化、対応アルゴリズム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が発生までに潜伏期があり、さらに稀な病原体が使用されるため、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。患者検体、時には環境検体から原因病原微生物の迅速な検出と同定、かつ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が必要となる。さらに病原体の由来を知るための塩基配列の解析とデータベースの確立も重要となる。これまで、いくつかの病原体に対する迅速診断法が開発されてきたが、バイオテロに用いられる可能性のある病原体がすべて網羅されているわけではない。一方、スクリーニングを目的とした網羅的検出法は特異

性等の検討がまだまだ十分ではない。

本研究の目標は以下の通りである。1) 特定病原体等に対する、遺伝子検出法、抗原抗体検出法、毒素迅速検出法等の迅速診断法の確立と標準化を行う。2) 網羅的検出法として、網羅的ウイルス検出法、網羅的細菌検出法、超高速ゲノム解読法の確立を行い、さらに未知の病原体等検出法、病原体のデータベース等の開発と確立を行う。3) 電子顕微鏡を用いた検出法、免疫組織化学的検出法を確立する。4) 検体調整法とスクリーニング法の普及、検査マニュアルの整備を行い、地方衛生研究所や検査機関での対応と検査ネットワークの整備を行う。5) 診断検査支援のため、バイオテロ対応ホームページを整備し、関係機関との情報交換を密にするシステムを確立する。本研究により、我が国におけるバイオテロの迅速な検出が可能となり、バイオテロ対策のための検査診断基盤を確立する。

#### B. 研究方法

研究は研究代表者（倉根）、研究分担者13名の計14名によって行なわれた。研究においては各人の担当分野を研究代表者が有機的に結合づける形で遂行された。

研究は、1) ヒト検体および環境検体を用いた特定病原体、細菌毒素等の迅速診断法の確立、2) 病原体の網羅的検出法および未知の病原体検出法の確立、3) 病理学的手法や電子顕微鏡を用いた病原体検出法の確立、4) バイオテロ検査マニュアルの整備および地方衛生研究所等とのネットワーク確立、技術移転（田中）、5) 臨床診断支援方法の開発および有効な治療方法の確立を中心に行った。具体的には、以下の



具体的方法で研究を遂行した。

1) ヒト検体および環境検体を用いた特定病原体、細菌毒素等の迅速診断法の確立

①ウイルス性特定病原体の鑑別診断法の開発：ウイルス性出血熱、痘瘡ウイルス等の鑑別診断の目的としたリアルタイム検出法の改良と、各種検出機器にあわせたプロトコールの汎用化を図る。

②蚊媒介性感染ウイルスの迅速検査法の確立：等蚊媒介性感染ウイルスの迅速診断法確立と標準化を行う。

③人獣共通感染症の迅速診断法の開発：人獣共通感染症（炭疽、狂犬病）等に対するヒト検体、野外動物検体を用いた迅速検査診断法を確立し方法の標準化を行う。

④鼻疽・類鼻疽迅速診断・同定法の確立：類鼻疽菌の分離培養同定および核酸診断法、鼻疽菌の診断法および鑑別法を確立する。

⑤リケッチア、クラミジアの迅速診断法の開発：リケッチア、Q熱コクシエラ、オウム病クラミジアの real time PCR 法、Multiplex 検出系を確立し、地方衛生研究所における検証を行う。

⑥真菌の迅速検査法の確立：コクシジオイデス等真菌の迅速検出系を確立し、さらに標準化と技術移転を行う。

⑦細菌毒素の迅速検出法の開発：PCR 法によるボツリヌス毒素のサブタイプ検出、血中抗毒素価定量、毒素迅速検出イムノクロマト法を確立し地方衛生研究所への普及をはかる。

2) 病原体の網羅的検出法および未知の病原体検出法の確立

①ブルセラ、野兎病菌等の網羅的細菌迅速診断法の確立：網羅的 PCR 法、特異抗体の作製、それらを用いた検出系について、実

証試験を行い検出系の検証と精度管理法を確立する。

②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：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と炭疽菌等の日本固有株の全ゲノム配列データベースの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。

③未知の病原体検出法の改良：これまで確立した RDV 法を改良し、標準化と普及を図る。

3) 病理学的手法や電子顕微鏡を用いた病原体検出法の確立。

①ヒト病理検体の迅速診断法の開発：バイオテロに使用される可能性のある病原体に対する免疫組織学的方法を確立する。

②迅速電顕検査法の確立：ネガティブ染色電顕で病原微生物を確認する迅速診断法の確立と入手可能な特定病原体等のレファレンス用写真リストを作製する。

4) バイオテロ検査マニュアルの整備および地方衛生研究所等とのネットワーク確立、技術移転：地方衛生研究研は検査の一次対応機関であるが、バイオテロ病原体の検体調整法のマニュアル作成と普及、地研で対応可能な病原体等の検出実技研修を通して技術移転を行う。また、地方衛生研究所間、および国立感染症研究所、関連機関との検査ネットワークを樹立する。

5) 臨床診断支援方法の開発および有効な治療法の確立

①バイオテロ関連疾患の臨床診断支援法の開発：バイオテロ対応ホームページを発展させ、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

行う。また、臨床診断支援ネットワークを樹立する。

②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：対象疾患の追加、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。また、情報公開の方法に関する研究開発を行う。

### C. 研究結果

1) ヒト検体および環境検体を用いた特定病原体、細菌毒素等の迅速診断法の確立：

(1) 新興アレナウイルスに対応可能なウイルス抗原検出法の開発：

2008年にアフリカ大陸で発生したラッサ熱様の出血熱の原因ウイルスは、新種のアレナウイルス(Lujo ウイルス)であった。これまで同定されているアレナウイルスと遺伝的にも抗原性もかなり異なるウイルスであった。このような新興アレナウイルスなども検出可能な血清学的検出法を開発するために、アレナウイルス N 蛋白の cap-binding 領域の高度保存領域の 2 種類のペプチド抗体を作製した。これらは、ELISA やウエスタンブロットでは新世界、旧世界アレナウイルスの N 蛋白に広く交差反応性を示した。これらの抗体を用いたアレナウイルス検出法への応用が可能である。

(2) アジアで分離される炭疽菌株の遺伝学的タイピングシステムの開発：

炭疽の発生と流行が問題となっているモンゴル National Center for Infectious Disease with Natural Foci との共同研究により、アジアで分離される炭疽菌株の遺

伝学的タイピングシステムの開発を行った。モンゴルで土壌および感染動物から分離された 29 株の炭疽菌株から DNA を抽出し、MLVA (Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeats Analysis) による系統解析を行った。モンゴルで分離される炭疽菌株は日本や中国等で分離される炭疽菌株と同じクラスター(A3 クラスター)に分類された。分離菌株のフルゲノム解析によってモンゴル株に特異的な SNP (Single Nucleotide Polymorphism)を抽出して系統解析を行うことにより、A3b クラスター内に分類されたモンゴル分離株は 3 つの大きなブランチに系統分類可能であった。

(3) ボツリヌス菌株の同定と管理のための遺伝子型別法：

国立感染症研究所に保管されているボツリヌス菌株をモデルに、比較可能な菌株カタログ化の検討を行った。A 型および A(B) 型のボツリヌス菌株については MLVA 法 (Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis) でカタログ化を行うことが可能であった。一方、B 型菌では、簡易的レベルでの菌株の区別には MLVA 法が利用できるが、より精度の高いカタログを作成するには、VNTR プライマーの再設定などの改良が必要であった。

(4) リケッチア・クラミジアの迅速検出法の開発：

海外輸入例からのリケッチア症の確認を行った。ペア血清抗体価を確認したところ、6 病日いずれも陰性であったものが、12 病日で R. japonica 並びに R. conorii に対する抗体価が 640 倍以上と上昇した。リ

ケッチア特異的遺伝子検出の PCR では、全血材料において *ompA* のみ陽性となり、ダイレクトシーケンスの結果、紅斑熱群リケッチアのクラスターにはいるものの、これまで知られているリケッチア種とは異なるシーケンス配列であった。分離に成功したリケッチアについて、臨床検体で検討した PCR 標的に加え、*16S rRNA*、*geneD(Sca4)* 遺伝子についても検討した。すべての標的において PCR 陽性となり、シーケンス解析の結果、*ompA* の PCR 産物は、臨床検体(急性期全血)から直接検出した遺伝子配列と完全に一致した。

(5) バイオテロの可能性のある真菌感染症の迅速診断法の確立：

バイオテロに用いられる可能性のある病原真菌として、BSL3 に分類されるコクジディオイデス (*Coccidioides immitis*)、ヒストプラズマ (*Histoplasma capsulatum*)、BSL2 に分類されるクリプトコックス・ガッティ (*Cryptococcus gattii*) が想定される。これらの病原真菌は感染性が高く、分離培養で大量の分生子を飛散させる危険性があることから、培養をしない検査技術が必要とされる。喀痰などの臨床検体からヒストプラズマなどの病原真菌 DNA の検出法を複数比較検討し、より簡便で成績の良い DNA 検出法を見出し、バイオテロを含めた集団感染事例が起きた際の迅速診断に役立つため、nested PCR、リアルタイム PCR (インターカレーター法、Taqman probe 法) によるヒストプラズマ DNA の検出を行い、感度の比較検討を行った。10pg のゲノム DNA を検出することができた。

(6) 鼻疽・類鼻疽の迅速診断法開発：

鼻疽、類鼻疽の病原体である *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei* は CDC のカテゴリーB に指定されておりバイオテロに使用される懸念のある細菌である。日本国内で事例が発生したときのために検出法を確立しておく必要がある。LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法による検査法お確立を行った。*B. pseudomallei* の LAMP 法はすでに基礎検討が終わっており、今年度はタイの臨床検体の検討を試み既報より良好な結果を得た。*B. mallei* の LAMP 法については、実用可能と考えられるプライマー群を設計した。

2) 網羅的検出法として、網羅的ウイルス検出法、網羅的細菌検出法、超高速ゲノム解読法の確立：

(1) 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：

バイオテロに使用された病原体を網羅的かつ迅速に配列解読することは最も確かなアプローチの一つと考える。次世代ゲノムシーケンサーのパフォーマンスを用いてバイオテロ病原体のゲノム配列及び変異情報データベースを充実させ、有事において迅速に対応出来る体制を整えた。

バイオテロ対策として臨床検体から迅速に野兎病菌の遺伝情報を得ることは重要である。野兎病菌は亜種レベルで病原性が異なることから、1塩基バリエーション(SNVs)、VNTR 等の genotyping 法を利用した亜種の分類が病原性の評価に有効である。野兎病菌の感染症疑いの患者の腋窩部膿瘍を用いて、次世代シーケンサー Illumina GAIIX

による病原体の網羅的検出を行った。抗菌薬治療により膿瘍から起因菌の増殖を検出できなかったが、PCR 検査では野兎病菌陽性であった。GAIIx にて 3,828 万本のリード (125 mer) を解読し、ヒト由来配列 (〜99%) を完全に削除し、野兎病菌と類似性を示す 833 本 (0.002%) の解読リードを得た。野兎病菌 Type A (高病原性) と Type B (低病原性) の双方を検出したことから、SNVs を利用した亜種を分類する株系統樹解析を行った。系統関係から、日本固有に分布する *F. tularensis* subsp. *holartctica* (biovar *japonica*) と近縁であることが判明した。本症例は地域的な散发症例であり、バイオテロ使用が懸念される Type A (高病原性) と異なると鑑別することができた。

(2) 細菌性バイオテロに対する迅速同定法・診断法およびワクチンの開発 :

細菌性バイオテロに焦点をあて、危険病原体およびその毒素の迅速同定法・診断法および予防法としてワクチンの開発研究と、広く社会に還元することを目的として研究を遂行した。また、植物毒素であるリシン毒素の迅速検出法開発についても併せて行った。研究により、リシン検出系に利用できる特異抗体を得ることに成功した。CT 及び LT に対する ELISA 系を構築した。SEA 及び SEB の精製に成功して十分な免疫源が準備できた。炭疽菌の芽胞および栄養体の表層に存在する抗原性の高い分子を特定した。簡便で大量免疫にも応用しうる炭疽ワクチンの新規候補分子を同定した。

3) 病理学的手法や電子顕微鏡を用いた病

原体検出法の確立 :

(1) 病原体の病理学的検出法の確立。腸管出血性大腸菌産生ベロ毒素検出 :

腸管出血性大腸菌は腸管上皮細胞に付着後増殖し、ベロ毒素を産生する。腸管出血性大腸菌感染症の重症例では、腹痛、下痢、嘔吐、血便に加え、溶血性尿毒症症候群 (HUS) や急性脳症を併発することがあり、救命されても腎不全、脳神経障害など重症の後遺症が残る場合がある。腸管出血性大腸菌あるいはベロ毒素そのものが、集団食中毒を装ったバイオテロ目的で使用される可能性は否めないことから 4 種特定病原体である。剖検組織においてベロ毒素を検出したという報告は非常に少ない。腸管出血性大腸菌 O-157 感染で死亡したホルマリン固定パラフィン包埋剖検組織中にベロ毒素を検出できるか検討した。ウサギ抗ベロ毒素ポリクローナル抗体を用いた免疫組織化学で糸球体に陽性シグナルが検出できたが、特異性の検討に時間を要した。特異性の高いモノクローナル抗体の作成が今後の課題である。

(2) 病原体の電子顕微鏡学的迅速検出法の確立 :

バイオテロに使用される可能性のある病原体等を中心とした電子顕微鏡を用いた迅速検出法の確立を目的とする。電子顕微鏡学的検査法の標準手順法の見直しを行い、実施者の教育訓練法の手順と記録を整備した。また、細菌の迅速検出法の確立のために、バイオテロ関連細菌を中心にレファレンス標本の作製を行った。

4) バイオテロ検査マニュアルの整備およ

び地方衛生研究所等とのネットワーク確立、技術移転：

バイオテロに使用される可能性のある病原体の網羅的検出法の構築と評価を行った。可能性のある病原体の中のウイルスと細菌については、研究協力地衛研がその技術を維持している。今年度はバイオテロ対象病原体の一つである真菌について、網羅的測定キットの作製とそれを用いて地衛研で測定精度の評価を行った。その結果、研究協力の 8 地衛研では、ブラインドサンプル；*Candida albicans*、*Aspergillus fumigates*、*Cryptococcus neoformans*、を特定した。

#### 5) 臨床診断支援方法の開発および有効な治療方法の確立

(1) バイオテロ関連疾患の臨床診断支援方法の開発：

生物テロに関連する疾患について、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た。その後、ICD を対象に実施したアンケート結果や全国の感染症専門家から改訂専用のホームページに寄せられた意見を参考に修正とアップデートをおこなってきた。さらに新たに 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が、今年度は、その原稿をもとに最近の情報や画像を取り入れるように編集作業を行った。総論の内容についても、病原体の管理や輸送に関する最新の情報を追加・修正して、ホームページの更新作業中を進めた。

(2) 各医療機関のバイオテロ対策を支援するための方策：

実際にバイオテロが起こった場合、どの医療機関においても患者に遭遇するリスクがあるため、各医療機関の感染症対策の担当者や責任者はバイオテロへの関心を高める必要がある。しかし、全国 1,185 カ所の主要医療施設を対象としたアンケート調査では、自施設でバイオテロに対処できる準備を整えておく必要があると答えたのは 76%と大半であったが、その一方で特に何も対応をしていない施設が 74%に達していた。そこで、各医療機関に対して、バイオテロ対策の重要性をさらに認識してもらうための方策として情報提供を行った。さらに各医療機関において、感染対策の担当者がバイオテロをテーマとして講演を実施できるような題材として PowerPoint によるスライドを作成し、ホームページなどを通じて各医療機関に提供する準備を行った。

#### D. 考察

バイオテロにおいては患者発生まで潜伏期間があることから、一次医療機関で感染症として疑われ臨床診断が行われる可能性が高い。従って、患者検体を用いての迅速検査、病原体等の分離同定、および血清抗体検査、あるいは時に環境検体を用いた病原体検出が必要である。さらに病原体の由来を知るためにゲノムデータの整備も重要となる。これまで、種々の研究において、いくつかのバイオテロ関連病原体等について迅速診断法の開発、マニュアル作製がなされてきた。しかし、これらの個別病原体に関しても、バイオテロに用いられる可能性のある病原体がすべて網羅されているわけではない。一方、スクリーニングを目的とした網羅的検出法は特異性等の検討が

いまだ十分ではなく、検査ネットワーク整備、さらに病原体の由来の追跡や未知の病原体等への対応に問題を残している。ホームページを活用した診断支援法の最新情報への改訂作業とともに、実際の対応体制の整備も十分とはいえない。本研究では、一次対応者や対応機関を支援する目的で最新情報を提供し、緊急時に事件や環境ないし臨床検体からバイオテロ関連病原体等を短時間に検出同定する実験室診断法の開発や病原体ゲノムデータベースの作製および検査診断機関のネットワーク化を行った。具体的には、1) 特定病原体等に対する、遺伝子検出法、抗原抗体検出法、毒素迅速検出法等の迅速診断法の確立と標準化を行う。2) 網羅的検出法として、網羅的ウイルス検出法、網羅的細菌検出法、超高速ゲノム解読法の確立を行い、さらに未知の病原体等検出法、病原体のデータベース等の開発と確立を行う。3) 電子顕微鏡を用いた検出法、免疫組織化学的検出法を確立する。4) 検体調整法とスクリーニング法の普及、検査マニュアルの整備を行い、地方衛生研究所や検査機関での対応と検査ネットワークの整備を行う。5) 診断検査支援のため、バイオテロ対応ホームページを整備し、関係機関との情報交換を密にするシステムを確立するプロセスを開始する。本研究により、バイオテロの迅速な検出が可能となり、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。

#### E. 結論

バイオテロの迅速な検出を可能とし、さらに、感染防止策等の迅速な対応策の策定

を可能とすることを目的として、1) 特定病原体等に対する、遺伝子検出法、抗原抗体検出法、毒素迅速検出法等の迅速診断法の確立と標準化を行った、2) 網羅的検出法として、網羅的ウイルス検出法、網羅的細菌検出法、超高速ゲノム解読法の確立を行い、さらに未知の病原体等検出法、病原体のデータベース等の開発と確立を行った、3) 病理学的、また電子顕微鏡を用いた病原体検出法、免疫組織化学的検出法の確立すを行った、4) 検体調整法とスクリーニング法の普及、検査マニュアルの整備を行い、地方衛生研究所や検査機関での対応と検査ネットワークの整備を行った、5) 診断検査支援のため、バイオテロ対応関係機関との情報交換を密にするシステムの確立を開始した。

#### F. 健康危機管理情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

##### 1) 英文論文

Moi ML, Lim CK, Chua KB, Takasaki T, Kurane I. Dengue virus infection-enhancing activity in serum samples with neutralizing activity as determined by using FcγR-expressing cells. PLoS Neglected Tropical Diseases, in press.

Fukushi S, Nakauchi M, Mizutani T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Antigen-capture ELISA for the detection of Rift Valley fever virus nucleoprotein using new monoclonal antibodies. J Virol Methods. 180:68-74, 2012

- Kennedy JS, Gurwith M, Dekker CL, Frey SE, Edwards KM, Kenner J, Lock M, Empig C, Morikawa S, Saijo M, Yokote H, Karem K, Damon I, Perlroth M, and Greenberg RN. Safety and Immunogenicity of LC16m8, an Attenuated Smallpox Vaccine in Vaccinia-Naive Adults. *J Infect Dis* 2011, 204(9):1395-402
- Shirato K, Maeda K, Tsuda S, Suzuki K, Watanabe S, Shimoda H, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Kyuwa S, Endoh D, Matsuyama S, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Yoshikawa Y, Akashi H, Mizutani T. Detection of bat coronaviruses from *Miniopterus fuliginosus* in Japan. *Virus Genes*. 2012, ;44(1):40-4.
- Taniguchi S, Watanabe S, Masangkay JS, Omatsu T, Ikegami T, Alviola P, Ueda N, Iha K, Fujii H, Ishii Y, Fukushi, S Saijo M, Kurane, I Kyuwa S, Akashi H, Yoshikawa Y, Shigeru Morikawa, S. Reston Ebola Virus Antibodies in Bats, the Philippines. *Emerg Infect Dis*, 2011 17(8):1559-60
- Okutani A, Tungalag H, Boldbaatar B, Yamada A, Tserennorov D, Otgonchimeg I, Erdenebat A, Otgonbaatar D, and Inoue S. Molecular Epidemiological Study of *Bacillus anthracis* Isolated in Mongolia by Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for 8 Loci (MLVA-8) *Japanese Journal of Infectious Diseases* 2011;4:345-348.
- Nguyen A.K.T., Nguyen vinh D., Ngo G.C., Nguyen T.T., Inoue S., Yamada A., K.X.D., Nguyen van D., Phan T.X., Pham B.Q., Nguyen H.T. and Nguyen H.T.H. (2011) Molecular epidemiology of rabies virus in Vietnam (2006-2009). *Jpn.J.Infect.Dis.* 64:391-396.
- Tanabe K, Lamping E, Nagi M, Okawada A, Holmes AR, Miyazaki Y, Cannon RD, Monk BC, Niimi M. Chimeras of *Candida albicans* Cdr1p and Cdr2p reveal features of pleiotropic drug resistance transporter structure and function. *Mol Microbiol.* 82(2):416-33, 2011.
- Kuroda M, Sekizuka T, Shinya F, Takeuchi F, Kanno T, Sata T, Asano S. Detection of a Possible Bioterrorism Agent, *Francisella* sp., in a clinical specimen using Next-generation Direct DNA Sequencing. *J Clin Microbiol.* In press (Jan. 30. 2012).
- 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, 83:322-330
- Oie S, Obayashi A, Yamasaki H, Furukawa H, Kenri T, Takahashi M, Kawamoto K, Makino S. Disinfection methods for spores of *Bacillus atrophaeus*, *B. anthracis*, *Clostridium tetani*, *C. botulinum* and *C. difficile*. *Biol Pharm Bull.* 2011;34(8):1325-9.
- Na-Ubol M, Srimanote P, Chongsanguan M, Indrawattana N, Sookkrung N, Tapchaisri P,

Yamazaki S, Bodhidatta L, Eampokalap B, Kurazono H, Hayashi H, Nair GB, Takeda Y & Chaicumpa W: Hybrid & El Tor variant biotypes of *Vibrio cholerae* O1 in Thailand, Indian J Med Res, 133: 387-394, 2011

Nakano M, Yamasaki E, Ichinose A, Shimohata T, Takahashi A, Akada-K. J, Nakamura K, Moss J, Hirayama T and Kurazono H: *Salmonella* enterotoxin, Stn, regulates membrane composition and integrity. Dis Model Mech, In press, 2012.

Zhang J, van Hung P, Hayashi M, Yoshida S, Ohkusu K, Ezaki T. DnaJ sequences of *Bacillus cereus* strains isolated from outbreaks of hospital infection are highly similar to *Bacillus anthracis*. Diagn Microbiol Infect Dis, 70: 307-315, 2011.

Yamada Y, Ohkusu K, Yanagihara M, Tsuneoka H, Ezaki T, Tsuboi J, Okabayashi H, Suwabe A. Prosthetic valve endocarditis caused by *Bartonella quintana* in a patient during immunosuppressive therapies for collagen vascular diseases. Diagn Microbiol Infect Dis, 70: 395-398, 2011.

Saito H, Iwamoto T, Ohkusu K, Otsuka Y, Akiyama Y, Sato S, Taguchi O, Sueyasu Y, Kawabe Y, Fujimoto H, Ezaki T, Butler R.: *Mycobacterium shinjukuense* sp. nov.; a slowly growing, nonchromogenic species isolated from human clinical specimens. Int J Syst Evol Microbiol, 61: 1927-1932, 2011.

Fujisawa T, Kadosaka T, Fujita H, Ando S, Takano A, Ogasawara Y, Kawabata H, Seishima M, *Rickettsia africae* Infection in a Japanese Traveler with many tick bites. 2012, Acta Dermato-Venereologica, doi: 10.2340/1555-1313

## 2) 和文論文

ベトナムから帰国後空洞病変で発症し、再燃時多発肺結節を認めたメリオイドーシスの1例、倉田季代子, 貫井義久, 島田裕之, 井上幸久, 吉村信行, 堀野敦子、日本呼吸器学会雑誌、Vol. 49, No. 6, 443-448、2011

永田典代、長谷川秀樹、佐多徹太郎。第11章電子顕微鏡/病理組織学的検査。田代真人、牛島廣治編集。ウイルス感染症の検査・診断スタンダード 羊土社 2011. p410-439

永田典代、長谷川秀樹。第2章ウイルス分離培養 第3項 実験動物、等。田代真人、牛島廣治編集。ウイルス感染症の検査・診断スタンダード 羊土社 2011. p257-268

江崎孝行, 水野卓也, 林将大, 吉田滋, 張継偉, 大楠清文: 新たなゲノムベースの感染症診断-開発の現状、応用と展望- 臨床所見から原因病原体を絞り込めない不明感染症の検査、化学療法領域 29巻: 2006-2020、2011年。

大楠清文, 江崎孝行. 遺伝子解析技術の新たな潮流と感染制御への適応、日本化学療法学雑誌 59巻: 441-453、2011年。

安藤秀二, 発疹熱・発疹チフス・日本紅斑



熱, 今日の治療と看護 改定第3版, in press

安藤秀二 病原体等の保存・保管と輸送, バイオメディカルインス研究会編, バイオセーフティの原理と実際, 医学評論社. P112-121, 2011年6月

成田雅、鵜沼菜穂子、伊藤文人、佐藤憲行、星野智祥、井上実、山本正悟、安藤秀二、藤田博己：11月熱 福島県中南部におけるタテツガムシ媒介性つつが虫病, 日本内科学会誌, 101:164-167, 2012

## 2. 学会等発表

### 1) 国際学会

Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Detection of higher levels of dengue viremia using FcγR-expressing BHK-21 cells than FcγR negative cells in serum samples from patients with secondary infection but not in those with primary infection. 第15回国際ウイルス学会 2011年9月

Lim CK, Takasaki T, Moi ML, Kotaki A, Kurane I, Saijo M. Molecular diagnosis and analysis of imported chikungunya virus strains, Japan, 2006-2010. 第60回アメリカ熱帯医学衛生学学会年次総会 2011年12月

Morikawa S, Sayama Y, Taniguchi S, Fukushi S, Kurane I, and Saijo M. Serological survey of Reston ebolavirus infection in the Philippines. 45th Joint Working Conference on Immunology and Viral Disease, Stanford USA, 2011 June 20-22

Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Yoshikawa (Iwata) N, Hasegawa H, Fukushi S, Mizutani T, Sata T, Kurane I, Morikawa S. Immune responses against EEV and IMV in non-human primates infected with monkeypox virus or vaccinated with a highly attenuated smallpox vaccine LC16m8 and protection from lethal monkeypox. International union of microbiological societies 2011 congress, Sapporo 11-16 Sept 2011

Lim CK, Ami Y, Fuji Yi, Moi ML, Kitaura K, Kotaki A, Morikawa S, Saijo M, Suzuki R, Kurane I, Takasaki T. Pathogenesis of epidemic chikungunya virus in nonhuman primates. International union of microbiological societies 2011 congress, Sapporo 11-16 Sept 2011

Iha K, Nakauchi-Hori K, Taniguchi S, Fukushi S, Mizutani T, Ogata M, Kyuwa S, Saijo M, Romanowski V, A Enria DA, Morikawa S. Establishment of serological diagnosis of Argentine hemorrhagic fever using recombinant antigens. International union of microbiological societies 2011 congress, Sapporo 11-16 Sept 2011

Sayama Y, Fukushi S, Saito M, Taniguchi S, Iizuka I, Mizutani T, Kurane I, Saijo M, Oshitani H, Morikawa S. A serological survey of Reston ebolavirus infection in swine during epizootic in 2008 in the Philippines. International union of microbiological societies 2011 congress, Sapporo 11-16 Sept 2011

Taniguchi S, Watanabe S, Iha K, Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Kurane I, Kyuwa S, Akashi H, Yoshikawa Y, Morikawa S. The detection of Reston ebolavirus antibodies in wild bats in the Philippines. International union of microbiological societies 2011 congress, Sapporo 11-16 Sept 2011

Kenri T. et al. Genetic characterization of *Clostridium botulinum* strains isolated from infant botulism cases in Japan in 2011, 48 th Interagency Botulism Research Coordinating Committee, October, 5-7, Santa Fe, NM, USA.

Ando S, Trend of rickettsioses in Japan, 6<sup>th</sup> International meeting of Rickettsiae and rickettsial Diseases, Crete, Greece, 5-7 Jun 2011

## 2) 国内学会

田辺公一、大野秀明、梅山 隆、山越 智、知花博治、宮崎義継. *Candida glabrata* 臨床分離株におけるキャンディン感受性と *FKS* 遺伝子の解析. 真菌分子細胞研究会、香川、2011

名木 稔、田辺公一、中山浩伸、知花博治、梶原 将、大野秀明、宮崎義継. 病原真菌 *Candida glabrata* の細胞外ステロール獲得機構の解明. 真菌分子細胞研究会、香川、2011 (11月)

大野秀明、大川原明子、田辺公一、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、泉川公一、藤井毅、竹村 弘、岸 一馬、河野 茂、宮崎

義継. 日本国内で分離された *Cryptococcus* 属臨床分離株の血清型解析と抗真菌薬に対する感受性動向. 第 60 回日本感染症学会東日本地方会学術集会、第 58 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会、山形、2011 (10月)

田辺公一、大野秀明、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、金城雄樹、杉田 隆、畠山修司、亀井克彦、渋谷和俊、宮崎義継. *Cryptococcus gattii* 国内分離株の病原因子解析. 第 60 回日本感染症学会東日本地方会学術集会、第 58 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会、山形、2011 (10月)

梅山 隆、山越 智、田辺公一、大野秀明、宮崎義継. *Aspergillus fumigatus* Msp1 キナーゼの生化学的・遺伝学的アプローチによる解析. 第 60 回日本感染症学会東日本地方会学術集会、第 58 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会、山形、2011 (10月)

梅山 隆、大野秀明、田辺公一、山越 智、宮崎義継. 標準化 MLST 解析法を用いたわが国のクリプトコックス属臨床分離株の分子疫学解析. 第 55 回日本医真菌学会学術集会、東京、2011 (10月)

大野秀明、田辺公一、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、杉田 隆、畠山修司、亀井克彦、渋谷和俊、宮崎義継. 本邦初の北米流行型 *Cryptococcus gattii* 臨床分離株の実験的病原性解析. 第 55 回日本医真菌学会学術集会、東京、2011 (10月)

山越 智、梅山 隆、田辺公一、金子幸弘、橋本ゆき、大野秀明、宮崎義継。*Aspergillus fumigatus* の分泌蛋白 B11 およびそのホモログの検出系と病原性について。第 55 回日本医真菌学会学術集会、東京、2011 (10 月)

田辺公一、大野秀明、梅山 隆、山越 智、宮崎義継。日本とタイにおける遺伝子検出法を用いた環境生息ヒストプラスマ属の検出。第 55 回日本医真菌学会学術集会、東京、2011 (10 月)

大野秀明、田辺公一、梅山 隆、金子幸弘、山越 智、宮崎義継。クリプトコックス・ガッティ (*Cryptococcus gattii*)。衛生微生物技術協議会 第 32 回研究会、東京、2011 (6 月)

大野秀明、田辺公一、杉田 隆、畠山修司、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、亀井克彦、宮崎義継。国内で初めて分離された VGIIa 型 *Cryptococcus gattii* 株の薬剤感受性と病原性についての検討。第 59 回日本化学療法学会総会、札幌、2011 (6 月)

山越 智、梅山 隆、田辺公一、金子幸弘、橋本ゆき、大野秀明、宮崎義継。*Aspergillus* 属分泌蛋白質を標的にしたサンドイッチ ELISA 法によるアスペルギルス症診断系構築の試み。第 32 回関東医真菌懇話会、東京、2011 (5 月)

田辺公一、大野秀明、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、杉田 隆、畠山修司、亀井克彦、

宮崎義継。国立感染症研究所における地域流行型真菌症への対応と現状。第 32 回関東医真菌懇話会、東京、2011 (5 月)

梅山 隆、大野秀明、田辺公一、山越 智、渡邊 浩、宮崎義継。福岡県筑後地区周辺におけるクリプトコックス症多発発生例からの分離株の MLST 法による疫学的検討。第 85 回日本感染症学会総会、東京、2011 (4 月)

大野秀明、田辺公一、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、宮崎義継。遺伝子診断法を用いた土壌中に生息するヒストプラスマ属検出の試み。第 85 回日本感染症学会総会、東京、2011 (4 月)

黒田誠、関塚剛史、竹内史比古。Deep sequencing 法による野兎病菌 *Francisella* 感染症の腋窩部膿瘍の網羅的病原体検索第 85 回日本細菌学会・総会 長崎市 2012 年 3 月

松本哲哉。バイオテロ対策の現状ー“想定外”にしないためにー。第 27 回日本環境感染学会総会 (教育講演) 2012 年 2 月 (福岡)

安藤秀二、小笠原由美子：2011 年に経験した多様な輸入リケッチア症、第 18 回リケッチア研究会、大阪、平成 24 年 2 月 12 日

安藤秀二：宮古島のつつが虫病の国内外における位置づけと今後の検査対応について、つつが虫病に関する調査報告会、沖縄県宮古島市、平成 24 年 1 月 23 日

安藤秀二：ズーノーシスとしての偏性細胞

内寄生細菌の自然界おけるリスク、第11  
回日本バイオフィサイ学会、筑波、平成23年12  
月2日

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

3. その他

なし