

201225029A

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24年度 総括・分担研究報告書

平成25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24年度 総括・分担研究報告書

平成25年 3月

研究代表者 倉根 一郎

(国立感染症研究所)

平成24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 獣医科学部	部 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	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	教 授
西條 政幸	国立感染症研究所 ウイルス第一部	部 長

目 次

I. 総括研究報告書（平成24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. 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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・19
研究分担者：森川 茂（国立感染症研究所 獣医科学部）
2. 人獣共通感染症（炭疽、狂犬病等）に対するヒト検体および
 - 1) 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・・・・・・27
 - 2) *Bacillus anthracis*に対する次亜塩素酸ナトリウムの殺芽胞効果・・・・・・31研究分担者：井上 智（国立感染症研究所 獣医科学部）
3. ボツリヌス菌・毒素の検査法の改良・・・・・・・・・・・・・・・・・・35
研究分担者：見理 剛（国立感染症研究所 細菌第二部）
4. リケッチア・クラミジアの迅速検出法の開発
新規リッチケアのゲノム解析によるリッチケア同定法の検討・・・・・・・・・・41
研究分担者：安藤 秀二（国立感染症研究所 ウイルス第一部）
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・・・・・・・・・・47
研究分担者：宮崎 義継（国立感染症研究所 生物活性物質部）
6. 鼻疽・類鼻疽の迅速診断法に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・55
研究分担者：堀野 敦子（国立感染症研究所 細菌第二部）
7. 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）

8. 病原体の病理学的検出法の確立 新興・再興感染症の病理学的解析のためのオリゴプローブを用いた <i>in situ</i> 遺伝子検出系	69
研究分担者：佐多 徹太郎（富山県衛生研究所）	
9. 病原体の電子顕微鏡学的迅速検出法の確立	75
研究分担者：永田 典代（国立感染症研究所 感染病理部）	
10. 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）	
11. 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 作製を検査担当者の育成	89
研究分担者：田中 智之（堺市衛生研究所）	
12. 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	93
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）	
13. 各医療機関のバイオテロ対策を支援するための方策	95
研究分担者：松本 哲哉（東京医科大学 微生物学講座）	
14. 5' -Flap 付加 primer を用いた高感度診断評価システムの開発	99
研究分担者：西條 政幸（国立感染症研究所 ウイルス第一部）	
15. フラビウイルス共通迅速診断法による増幅産物の解析	107
研究代表者：倉根 一郎（国立感染症研究所副所長）	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	113

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。バイオテロ対策としては、病原体の早期検出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) 病理学的病原体検出法、特に免疫組織化学的検出法、および電子顕微鏡を用いた病原体検出法の確立を行った、4) 地方衛生研究所への真菌検査技術の移転や、技術移転時における問題点も明らかにした、5) 診断検査支援のため、ホームページを整備し、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行った。

研究分担者：

安藤秀二：国立感染症研究所 室長

井上智：国立感染症研究所 室長

岩本愛吉：東京大学医科学研究所 教授

倉園久生：帯広畜産大学 教授

黒田誠：国立感染症研究所 センター長

見理剛：国立感染症研究所 主任研究官

西條政幸：国立感染症研究所 部長

佐多徹太郎：富山県衛生研究所 所長

田中智之：堺市衛生研究所 所長

永田典代：国立感染症研究所 室長

堀野敦子：国立感染症研究所 主任研究官

松本哲哉：東京医科大学 教授

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 部長

研究協力者:

安藤匡子：国立感染症研究所
飯塚節子：島根県保健環境科学研究所
伊藤（高山）睦代：国立感染症研究所
林昌宏：国立感染症研究所
江崎孝行：岐阜大学
尾家重治：山口大学
小笠原由美子：国立感染症研究所
小河正雄：大分県衛生環境研究センター
奥谷晶子：国立感染症研究
加來浩器：防衛医科大学校
片野晴隆：国立感染症研究所
川本恵子：帯広畜産大学
木下（山口）一美：国立感染症研究所
國島広之：東北大学
鯉淵智彦：東京大学医科学研究所
河野茂：長崎大学病院
小林慎一：愛知県衛生研究所
佐藤由子：国立感染症研究所
杉浦義紹：神戸市環境保健研究所
関塚剛史：国立感染症研究所
高崎智彦：国立感染症研究所
竹内史比古：国立感染症研究所
田辺公一：国立感染症研究所
谷口清洲：国立感染症研究所
千葉一樹：福島県衛生研究所
中島典子：国立感染症研究所
中村治：慶應義塾大学
長谷川秀樹：国立感染症研究所
藤井毅：東京医科大学
藤田博己：馬原アカリ医学研究所
古谷信彦：文京学院大学
三好龍也：堺市衛生研究所
山崎博史：山口労災病院
山下育孝：愛媛県立衛生環境研究所
山根一和：川崎医科大学

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、「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今後の検証が必要であり、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いまだ十分ではない。

本研究の目的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、研究分担者 14 名の計 15 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びつ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、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 検出系を確立する。

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。地方衛生研究所への技術移転と検証を行う。

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網羅的細菌迅速診断法の開発：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) 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：

新種アレナウイルスなども検出可能な手法を開発するために、アレナウイルス N 蛋白の高度保存領域に対する抗体を作製した。アレナウイルスの NP に高度に保存される部位のペプチドに対する抗体（抗 peptide 311-324 抗体）は LCMV NP 以外のアレナウイルス NP に強く反応し、新種の旧世界アレナウイルスであるルナウイルスにも強く反応することが明らかになった。これらの抗体を用いて作製した ELISA 法はルジョウイルス、ルナウイルスを含むアレナウイルスの N 蛋白に広く交差反応性を示した。また、LCMV を含むすべてのアレナウイルスに反応する抗体を作製するため、新たに抗原を調製した。本領域を抗体作製の標的とすることは、新種、新型のアレナウイルスをもれなく検出できる技術の確立につながる。

(2) フラビウイルス共通迅速診断法の確立：

フラビウイルスはこれまでに約 70 種類以上報告されている。流行地域も重なるため各ウイルスの迅速な鑑別が重要である。フラビウイルス共通迅速診断法を開発し様々のフラビウイルスを 1×10^{-2} から 1×10^1 (PFU/ml) の感度で検出できることができた。さらに、フラビウイルス共通プライマーによる増幅断片の塩基配列を決定し、その系統樹解析を行った。その結果フラビウイルス共通プライマーによる増幅産物は各ウイルスに特異的であり、その増幅産物

の塩基配列を決定することによりサンプル中のフラビウイルスを同定できる可能性が示唆された。

(3) 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：

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。昨年度、モンゴルで分離された炭疽菌株に特異的な 12 箇所の SNP (Single Nucleotide Polymorphism) を特定して 12SNP タイピング法を確立したが、本年度はさらに動物および環境由来のモンゴル分離株を 14 株追加して確立した 12SNP タイピングについて追加検討を行った。モンゴル株は大きく 4 つのクラスターに分かれ、それぞれに地域特性のあることが示された。

(4) ボツリヌス菌・毒素 (BoNT) の検査法の改良：

ボツリヌス毒素 (BoNT) の迅速で簡便な検出法を確立するため、A、C、E 型の BoNT によって切断される SNAP25 タンパク質を遺伝子組換えで作製し、これを基質として BoNT の活性を検出するシステムを構築した。A 型と E 型の精製 BoNT でこのシステムを評価したところ、100 マウス LD₅₀/ml の BoNT 活性を約 3 時間で検出できた。A 型と E 型の BoNT 活性を区別することも可能となった。

(5) リケッチア・クラミジアの迅速検出法の開発：新規リケッチアのゲノム解析による同定法の検討：

新規分離リケッチア株の全ゲノム解析をこころみ、既存のリケッチア種との比較を行うことにより、バイオテロを想定した多様な臨床症状をも示すリケッチア症に対し、SNPs 解析による迅速診断系の可能性について検討した。次世代シーケンサーによる解析の結果、総リード数で 2,355,293 x 2 リードが得られた。240,559 リード (5.4%) がリケッチア由来のもの候補として残った。1 kb 以上のものが 21 contigs 得られ、トータルで約 1.34 Mb のゲノムサイズであることが推定された。さらに、ゲノムワイドの SNPs 系統解析を行い、紅斑熱群ならびに発疹チフス群を含む既報の 23 種のリケッチア種のゲノム情報と比較した。解析にもちいた新規リケッチア R. sp Tenjiku は明らかに他のリケッチア種と異なるものであった。

(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：

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 に分類されるコクシジオイデス (*Coccidioides immitis*)、ヒストプラズマ (*Histoplasma capsulatum*) 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の高病原性真菌 DNA の検出法を検討した。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てることを目的とした。平板寒天培地にコクシジオイデスやヒストプラズマが発育した場合の検体処理方法を検討し、マルチプレックスリアル

タイム PCR によるコクシジオイデスおよびヒストプラスマ DNA の検出系を確立した。

(7) 鼻疽・類鼻疽の迅速診断法開発：

Burkholderia mallei (*B. mallei*)、*Burkholderia pseudomallei* (*B. pseudomallei*) に対する LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法の確立を目的とした。

B. pseudomallei と *B. mallei* の LAMP 法は前年度、基礎検討を行ったが、二つの系の反応条件を揃えるため、両者が問題なく反応できる温度、反応液量を検討した。*B. pseudomallei* の LAMP 法の反応温度を上げ、反応系の液量を調整したことで対応が可能であった。LAMP 法の感度ならびに特異性には問題はなかった。現在この *B. pseudomallei* の LAMP 法は検査時に参考データとして使用するために実施しているが、既報よりも感度がよく、判定もクリアである。また、*B. mallei* の LAMP 法はこれまで報告がないため、迅速簡便な検査法として利用できる。

(8) ウイルス検出のための高感度診断評価システムの開発：

バイオテロに対応するためには迅速でより高感度の検査系確立が求められる。近年 5' -Flap 付加 primer 法を用いることにより診断法の感度の向上が文献的に報告された。この報告に基づき、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV)、狂犬病ウイルス (RV)、チクングニアウイルス (CHIKV) に対する既知のプライマーを用いた 5' -Flap 付加 primer 法の検討を行った。その結果 LCMV 特異的プライマーに 5' -Flap 付加 primer 法を用いたときその感度の向上が観察され

た。しかしながら RV、CHIKV に対してはその効果は認められなかった。Flap 配列の付加によるプライマー感度の向上のメカニズムは不明であるが、既存のプライマーに対するその効果のさらなる検討は有用であることが示唆された

2) 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：

未知病原体や変異病原体によるバイオテロ対しの確な対処法を整備する上で、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なアプローチの一つである。次世代ゲノムシーケンサー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ることを目的とした。網羅的病原体検査法の骨格は既に構築済みであり、実施可能となっている。バイオテロ発生時に迅速に対応するためには、これまでに構築したシステムを現場でも利用できるような体制と支援が必要である。本年度は次世代シーケンサーによる解読リードを病院・地方衛生研究所等で情報解析できるよう、ネットワーク経由で病原体鑑別するための情報解析パイプライン (Metagenomic Pathogen Identification pipeline for Clinical specimen: MePIC) を構築し、情報解析の工程に特化して迅速性を追求したシステム構築を行った。情報解析に習熟していない担当者であっても講習会により利用できるよう利便性を有するよう作製した。今後、様々な工程の中でボトルネックになっている箇所を効率よく改善し、総合

的なシステムを完成させる。

(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・診断法の確立およびワクチンの開発研究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。本年度は以下の結果が得られた。立体構造を保持した可溶性リシン発現系を構築した。EA1 が次世代炭疽ワクチンの候補分子として有用である可能性が示唆された。免疫抗原として十分な量かつ純度の A 型ボツリヌス毒素重鎖融合蛋白を作製した。免疫抗原として十分な量かつ純度の TDH 融合蛋白を作製した。免疫抗原として十分な量かつ純度の SEA 及び SEB 融合蛋白を作製した。

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：病理学的解析のためのオリゴプローブを用いた *in situ* 遺伝子検出系：

開発したオリゴヌクレオチドプローブを用いた、高感度で特異性の高い *in situ* 遺伝子検出系である *in situ* hybridization-AT tailing (ISH-AT) 法の迅速化を試み、1 日で結果が得られる方法を確立した。市販されている Z 型オリゴヌクレオチドプローブを用いた分岐 DNA-ISH 法 (Affymetrix 社) と迅速化 ISH-AT 法の感度・特異性・費用などを比較検討し、ISH-AT 法のさらなる改良の可能性を検討した。分岐 DNA-ISH 法と比較して 40 塩基長の

標的部分により多くの標識ができることがわかり、プローブ数を増やすことでさらに感度を上げることができると可能性が明らかとなった。

(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した。電子顕微鏡学的検査法 (ネガティブ染色法) の標準手順法に従って、80-120 nm の球状のエンベロープウイルス 4 種の形状を比較し、その手順の改良と鑑別法について検討した。オルソミキソウイルス、パラミキソウイルス、コロナウイルス、ブニヤウイルスはいずれもエンベロープを有し、直径 80-120 nm の球状の粒子である。検査ではネガティブ染色の状態によって鑑別が困難な場合があることが明らかとなった。オルソミキソウイルス、パラミキソウイルス、コロナウイルスは鑑別に注意を要した。また、細胞にはこの程度の大きさの球状物が多く含まれており、細胞内構造物がサンプルに多く混入しているとウイルス粒子との判別が困難となった。特に、ブニヤウイルスは、粒子の球状が不定形で、エンベロープが比較的不明瞭であったため、粒子そのものの存在の判定が非常に困難であった。

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と技術移転：

バイオテロに使用される病原体はウイルス、細菌のみではない。真菌、なかでも *Coccidioides* によるバイオテロ対応は重

要である。今年度はバイオテロ対象病原体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の地衛研で測定精度の評価を行った。*Coccidioides* 同定スクリーニング検査検出キットを用いて、複数のブラインドサンプルについて研究協力者が同検出・同定を行った。全国7つの地方衛生研究所においてサンプルの検出と同定を行った。概ね *Coccidioides* の同定を行うことが出来た。地方衛生研究所では真菌検査にあまり馴染みがないが、健康危機発生時には現場で対応しなければならない機関であることの再確認とともに、新たな課題も明らかとなった。幾つかの参加機関で同定できなかった検体があったが、技術的な課題なのか、あるいは送付サンプルの degradation が原因であったかについて今後明らかにする必要がある。また、各機関の有する使用機器による検出感度等の差がある可能性も否定できない。各機関の有する機器ごとに高い検出が出来るような試薬等の調整も必要であることが確認された。

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：バイオテロ関連感染症の臨床診断と治療：

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』のホームページを改訂した。昨年度までは感染症法に基づく特定病原体等のうち、一種および二種に含まれる15種類のバイオテロ関連疾患に関する情報を掲載していたが、今年度は新たに20疾患

を追加した。

具体的には、これまでに本研究において作成していた、(1) ウイルス性出血熱、(2) ウエストナイル熱・脳炎、(3) Q熱、(4) 狂犬病、(5) コクシジオイデス症、(6) SARS、(7) 消化管感染症、(8) 多剤耐性結核、(9) 炭疽、(10) 天然痘、(11) 鼻疽・類鼻疽、(12) ブルセラ症、(13) ペスト、(14) ボツリヌス症、(15) 野兔病、に加えて、新たな疾患として、(1) 西部ウマ脳炎、(2) 東部ウマ脳炎、(3) ベネズエラウマ脳炎、(4) ダニ媒介性脳炎、(5) ヘンドラウイルス感染症、(6) リッサウイルス感染症、(7) 日本脳炎、(8) 南米出血熱、(9) ハンタウイルス感染症、(10) (11) Bウイルス症、(12) ニパウイルス感染症、(13) レプトスピラ症、(14) 発疹チフス、(15) チクングニア熱、(16) ロッキー山紅斑熱、(17) サル痘、(18) 黄熱、(19) 回帰熱、(20) デング熱、の計20疾患について作製し、平成24年7月に、最近の情報や画像を取り入れるべく編集作業を行い、ホームページ上にアップした。これにより一種、二種、三種病原体のすべてと四種病原体の大部分を網羅することができた。今後とも各病原体(疾患)の最新情報の追加を行い、ホームページの更新作業を進めていく方針である。さらにバイオテロ診断支援の一環として、関連各施設・機関との連携体制の構築についても検討を行う。

(2) 各医療機関のバイオテロ対策を支援するための方策：

バイオテロに関する医療機関の関心や準備状況はまだ十分ではなく、さらに啓発活動を行うと共に、バイオテロ対策のガイド

ラインを作成して具体的な対策の指針を示すことが必要と考えられる。本研究においては、バイオテロ対策ガイドラインの基本骨格を作成するとともに、すでに進められている院内感染対策に加え、今後の課題となっている高病原性インフルエンザ対策や災害における感染症対策を考慮して、これらの対策とともに効率的なバイオテロ対策を実施することを検討した。バイオテロ対策のガイドラインについては、現在の医療機関が置かれた状況を考慮した上で、より実践的で効率的な内容にすることを目指して作製することとした。具体的には、①バイオテロの定義、②バイオテロに用いられる病原体、③バイオテロの検知と認識、④バイオテロの初期対応、⑤病原体の確認と検査、⑥病原体別にみた感染予防策、⑦外来における対応、⑧病棟における対応、⑨バイオテロ時に想定される状況、⑩他の医療機関との連携、⑪自治体、警察、消防との連携、を含むものとなる。さらに医療従事者に広くバイオテロの認識を深めてもらうように、啓発活動の一環としてバイオテロをテーマとした講演を行った。

(3) 炭疽菌に対する消毒法の開発と標準化に関する研究：

炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) の芽胞を用いて、消毒薬の殺芽胞効果を検討した。0.1% (1,000ppm) 次亜塩素酸ナトリウムの殺滅効果について検討したところ、殺滅に30分の時間を要した。次に、同菌に対し酢添加の0.1% (1,000ppm) 次亜塩素酸ナトリウムの殺滅効果を検討したところ15秒以内に殺滅した。酢添加の次亜塩素酸ナトリウムが次亜塩素酸ナトリウム単剤に比べて

強い殺滅効果を示すことが示された。

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、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、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まだまだ十分ではなく、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、の5項目を大きな目標とした。

バイオテロに利用される恐れのある病原体による感染症は、現在わが国では存在しない物が多く、臨床医の多くがこれらの感染症に対する十分な知識や関心も有していないのが現状であると思われる。従ってホームページの作成にあたっては、一般の臨床医が容易に理解できるような工夫をおこなうとともに、広い見識を有する感染症専門家から最新の知見を加えながら常に最新の情報を提供することが重要である。過去作製した内容についても、継続的な改訂作業が必要となる。本年度は参照可能な疾患が大幅に増加し、より多彩な状況に対応可能なホームページとなった。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るとともに、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、以下の5項目に関して研究を行った。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を行った。4) 地方衛生研究所への真菌検査の技術移転を行い、併せて技術移転時における問題点も明らかにした。5) 診断検査支援のため、ホームページを整備し、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行った。

F. 健康危機管理情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzaki Y, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Fukushi S, Mizutani T, Yoshikawa T, Otsuki N, Kurane I, Komase K, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Takeda M, Morikawa S. Lethal Canine Distemper Virus Outbreak in Cynomolgus Monkeys in Japan in 2008. *J Virol.* 87:1105-1114, 2012.

Sayama Y, Demetria C, Saito M, Azul RR, Taniguchi S, Fukushi S, Yoshikawa T, Iizuka I, Mizutani T, Kurane I, Malbas FF Jr, Lupisan S, Catbagan DP, Animas SB, Morales RG, Lopez EL, Dazo KR, Cruz MS, Olveda R, Saijo M, Oshitani H, Morikawa S. A seroepidemiologic study of Reston

ebolavirus in swine in the Philippines. BMC Vet Res. 18;8:82, 2012.

Taniguchi S, Sayama Y, Nagata N, Ikegami T, Miranda ME, Watanabe S, Iizuka I, Fukushi S, Mizutani T, Ishii Y, Saijo M, Akashi H, Yoshikawa Y, Kyuwa S, Morikawa S.: Analysis of the humoral immune responses among cynomolgus macaque naturally infected with Reston virus during the 1996 outbreak in the Philippines. BMC Vet Res. 11;8(1):189, 2012.

Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Saijo M and Morikawa S. Serological assays based on recombinant viral proteins for the diagnosis of arenavirus hemorrhagic fevers. Viruses 4. 2097–2114, 2012.

Lihoradova O, Kalveram B, Indran SV, Lokugamage N, Juelich TL, Hill TE, Tseng CT, Gong B, Fukushi S, Morikawa S, Freiberg AN, Ikegami T. The dominant-negative inhibition of dsRNA-dependent protein kinase PKR increases the efficacy of Rift Valley fever virus MP-12 vaccine. J Virol. 86, 7650–7661, 2012.

Kaku Y., Noguchi A., Marsh G.A., Barr J.A., Okutani A., Hotta K., Bazartseren B., Fukushi S., Broder C.C., Yamada A. and Inoue S., Wang L.-F. Second generation of pseudotype-based serum neutralization assay for Nipah virus

antibodies: Sensitive and high-throughput analysis utilizing secreted alkaline phosphatase. J. Virol. Methods 179:226–232, 2012

Kaku, Y., Noguchi, A., Marsh, A. G., Barr, A. J., Okutani, A., Hotta, K., Bazartseren, B., Broder, C. C., Yamada, A., Inoue, S., and Wang, L.-F: Antigen capture ELISA system for henipaviruses using polyclonal antibodies obtained by DNA immunization. Arch. Virol. 157:1605–1609, 2012

Nagi M, Tanabe K, Nakayama H, Yamagoe S, Umeyama T, Oura T, Ohno H, Kajiwara S, Miyazaki Y.: Serum cholesterol promotes the growth of *Candida glabrata* in the presence of fluconazole. J Infect Chemother. 2012 Dec 12. [Epub ahead of print]

Ablordey A, Amissah DA, Aboagye IF, Hatano B, Yamazaki T, Sata T, Ishikawa K, Katano H: Detection of *Mycobacterium ulcerans* by the loop mediated isothermal amplification method. PLoS Negl Trop Dis, 6:e1590, 2012.

Nakano M, Yamasaki E, Ichinose A, Shimohata T, Takahashi A, Akada KJ, Nakamura K, Moss J, Hirayama T, and Kurazono H. Salmonella enterotoxin, Stn, regulates membrane composition and integrity. Dis Model Mech. 5: 515–521, 2012.

Sashida H, Sasaoka F, Suzuki J, Fujihara M, Nagai K, Fujita H, Kadosaka T, Ando S, Harasawa R; Two Clusters among *Mycoplasma haemomuris* Strains, Defined by the 16S-23S rRNA Intergenic Transcribed Spacer Sequences. J Vet Med Sci. In press 2013.

Gaowa, Ohashi N, Aochi M, Wuritu, Wu D, Yoshikawa Y, Kawamori F, Honda T, Fujita H, Takada N, Oikawa Y, Kawabata H, Ando S, Kishimoto T: Rickettsia in ticks, Japan, Emerging Infectious Diseases, Feb, 19(2): 338-340, 2013.

Sakamoto N, Nakamura-Uchiyama F, Kobayashi K, Takasaki T, Ando S, Iwabuchi S, Ohnishi K: Murine Typhus with Shock and Acute Respiratory Failure in a Japanese Traveler after Returning From Thailand. J Travel Med, Jan 20(1):50-53, 2013.

2) 和文論文

片野晴隆、佐藤由子、佐多徹太郎、長谷川秀樹：病原体の同定. 病理解剖マニュアル 病理と臨床 30: 269-277, 2012.

安藤秀二, ペストコントロール技術セミナー「怖いダニ類媒介性感染症～地域毎の情報を発信することが大事」, ペストコントロール, 2012年10月

奥谷晶子、井上 智。アジアにおける炭疽の発生状況と遺伝学的タイピング。特集：

人と動物の共通感染症最前線 9。獣医畜産新報 (JVM)。65:374-376、2012

2. 学会等発表

1) 国際学会

Tani H, Iha K, Fukushi S, Taniguchi S, Yoshikawa T, Saijo M, and Morikawa S. Analysis of cell entry of New and Old World arenaviruses using pseudotyped viruses bearing their envelope proteins. XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria, Rio de Janeiro, Brazil. September 23-27, 2012.

Yamamoto K, Iha K, Bruce C, S D Dowall, Taniguchi S, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Ishii Y, Kyuwa S, Roger Hewson, Saijo M, and Morikawa S. Serological assays based on recombinant viral proteins for the diagnosis of viral hemorrhagic fevers caused by arenaviruses. XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria, Rio de Janeiro, Brazil. September 23-27, 2012.

Tanabe K, Ohno H, Umeyama T, Yamagoe S, Chibana H and Miyazaki Y: Genetic analysis of echinocandin-resistant *Candida glabrata* isolated in Japan 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology June 2012

Ohno H, Tanabe K, Kaneko Y, Umeyama T, Yamagoe S and Miyazaki Y: Nested PCR for diagnosis of histoplasmosis 18th Congress of the International Society

for Human and Animal Mycology June 2012

Umeyama T, Ohno H, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S and Miyazaki Y: Multi-locus sequence typing epidemiology of *Cryptococcus neoformans* strains clinically isolated in Japan 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology June 2012

Nakajima N, Tin N.V, Sato Y, Thach H.N, Katano H, Diep P.H, Kumasaka T, Thuy N.T, Hasegawa H, San L.T, Kawachi S, Liem N.T, Suzuki K and Sata T: Pathological study of formalin-fixed paraffin-embedded lung tissues with H5N1 influenza infection in Vietnam. Severe Influenza: Burden, Pathogenesis and Management (Second isirv Antiviral Group Conference) Hanoi Viet Nam 2012年10月

Nagata N, Kataoka M, Sato Y, Sakai K, Iwata N, Suzuki T, Saijo M, Morikawa S, Kurane I, Sata T, Hasegawa H. Case reports with diagnostic electron microscopy and pathology for infectious diseases: The past five years experience, from 2007 to 2011. Glienicke Workshop on Electron Microscopy in Infectious Diseases - Diagnostics and Research. Berlin 2012. 10.

Ando S, Ogasawara Y; Traveler's Rickettsioses and Domestic Rickettsioses in Japan In 2011, 15th International Congress on Infectious

Diseases, Bangkok, Thailand, June 13-16, 2012

Takajoh I, Matsuda M, Kariya Y, Sakaguchi S, Kawaguchi T, Miyauchi S, Umekita K, Ueno S, Kusumoto N, Nagatomo Y, Ogasawara Y, Ando S, Okayama A; Novel spotted fever group rickettsiosis? In a Japanese traveler returned from India, 15th International Congress on Infectious Diseases, Bangkok, Thailand, June 13-16, 2012

Moi M.L, Lim C.K, Saijo M, Takasaki T, Kurane I. Re-assessment of dengue neutralizing antibody and viremia titers in dengue patients using Fc γ R-expressing cells. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH) 61st Annual Meeting. Atlanta, Georgia USA. November 11-15, 2012.

Lim C.K, Moi M.L, Kotaki A, Saijo M, Kurane I, Takasaki T. Molecular diagnosis and analysis of imported chikungunya virus strains, Japan, 2006-2011. The 9th Japan-China International Conference of Virology. Sapporo, Japan. June 12-13, 2012.

Lim C.K, Kotaki A, Omatu T, Moi M.L, Kurane I, Saijo M, Takasaki T. A Rapid Non-nested Reverse Transcriptase-PCR Assay for Vertebrate Flavivirus Subgroups Using a Novel Universal Single Primer Pair Based on a Conserved Region

of NS5 Gene Sequences. The XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria (ICTMM). Rio de Janeiro, Brazil. September 23-27, 2012.

Moi M.L, Lim C.K, Saijo M, Takasaki K, Kurane I. Re-assessment of dengue neutralizing antibody and viremia titers in dengue patients using Fc γ R-expressing cells. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH) 61st Annual Meeting. Atlanta, Georgia USA. November 11-15, 2012.

2) 国内学会

松本哲哉. バイオテロ. 第 101 回日本病理学会総会 病理診断講習会. 平成 24 年 4 月 東京

松本哲哉. バイオテロ. 第 11 回関東深在性真菌症研究会(特別講演). 平成 24 年 11 月 東京

谷英樹、伊波興一朗、谷口怜、吉河智城、福士秀悦、西條政幸、森川茂: シュードタイプ VSV を用いたルジョウウイルスの細胞侵入機構の解析 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月 13 日から 15 日、大阪

酒井宏治、關文緒、網康至、田原舞乃、中津祐一郎、大槻紀之、福原秀雄、福士秀悦、吉河智城、西條政幸、森川茂、前仲勝実、山口良二、駒瀬勝啓、竹田誠: カニクイザルで致死感染症を起こしたジステンバーウイルスのサルレセプターの効率的な利用;

ジステンバーウイルスはヒトへの脅威となり得るか? 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月 13 日から 15 日、大阪

谷口怜、佐山祐輔、永田典代、飯塚愛恵、谷英樹、吉河智城、福士秀悦、西條政幸、久和茂、森川茂 レストンエボラウイルス自然感染カニクイザルにおける免疫応答の解析 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月 13 日から 15 日、大阪

福士秀悦、新倉 綾、谷 英樹、吉河智城、伊波興一朗、谷口 怜、緒方もも子、西條政幸、森川 茂 日本のマダニ類における新種のブニヤウイルス (SFTSV) 保有調査と SFTSV 血清学的診断法の開発 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月 13 日-15 日、大阪

奥谷晶子、井上 智。アジアにおける炭疽の発生状況と遺伝学的解析について。シンポジウム: 忍び寄る人獣共通病原体。第 86 回日本細菌学会総会、2013 年 3 月、千葉県

加来義浩、野口章、濱本紀子、Boldbaatar Bazartseren、佐藤 豪、森川 茂、井上 智。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狂犬病ウイルス中和試験法の開発。第 154 回日本獣医学会学術集会、2012 年 9 月、岩手大学、岩手県

李 松熹、河原 正浩、加来義浩、井上 智、上田 宏、長棟輝行。細胞増殖を指標とした抗狂犬病ウイルス P 蛋白質細胞内抗体の直接選択。第 64 回日本生物工学会大会、2012 年 10 月 23 日-26 日、神戸国際会議場、