

なかったが、*B. pseudomallei* の株数を増やし 24 株で試みたところ 3 株反応する株があった。このため系の特異度を改良するべく反応温度を上昇させ、改善が見られるか試みることにした。

3. 抗 *B. pseudomallei*, *B. mallei* モノクローナル抗体の検討

国立感染症研究所・病理部より分与されたこれらの抗体の性能評価を行うこととした。*B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*, *B. cepacia* の菌体を不活化し SDS-PAGE を行いそれぞれの抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。

(倫理面への配慮)

今年度は倫理面で倫理委員会に申請する必要があるヒトの臨床検体を用いた実験研究はおこなっていない。

C. 研究結果

1. *B. pseudomallei* の LAMP 法

B. pseudomallei の LAMP 法の反応温度を *B. mallei* に合わせて 67°C に変更した結果、感度にも特異度にも問題は無く *B. pseudomallei* 特異的な増幅が認められた。このため反応条件は 67°C、60min とした。LAMP 試薬の組成と反応量を現行の LAMP 法に適合させた結果でも感度、特異度に問題は無かった。この方法は既報の *B. pseudomallei* の LAMP 法よりも結果がでるまでの時間が 30 分以上早く判定もクリアである。

2. *B. mallei* の迅速遺伝子検出法

前年度、標的遺伝子を BMAA0749 とし

た *B. mallei* LAMP 法のプライマー群を ID_19, ID_93, ID_102 の 3 群設計した。*B. mallei* ATCC 株 23344 から抽出したゲノム DNA を鋳型として検出感度の検討を 63°C、60 分の反応条件で検討した結果、検出限界は、ID_19 と ID_102 がゲノム DNA で 1 反応あたり 5.46 コピーと良好であった。一方 ID_93 は検出感度では検出限界はゲノム DNA で 1 反応あたり 54.6 コピーであった。続いて、特異度の基礎検討を行った。これらのプライマー群は *B. pseudomallei*, *B. thailandensis*, *B. cepacia* から抽出したゲノム DNA を鋳型として用いた LAMP 法では陰性であった。しかし、*B. pseudomallei* について株数を増やし 24 株を用いて検討した結果、このうちの 3 株に反応した。

今年度はこの結果をうけて、*B. mallei*、LAMP 法の特異度を上げるため反応温度を上げて検討を行った。ID_93 は 65°C、60 分の反応条件で反応が不安定になったため、使用に適さなかった。ID_19 は反応温度を上げても *B. pseudomallei* に反応してしまい、プライマー群として不適當であった。一方 ID_102 は反応温度条件を 67°C に変更することにより *B. pseudomallei* に反応しなくなった。*B. mallei* に対する特異度と感度に変化はなかった。このため、ID_102 を *B. mallei* のプライマー群として使用することとした。

3. 抗 *B. pseudomallei*, *B. mallei* モノクローナル抗体の検討

これらの抗体をウェスタンブロッティ

ングで *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*, *B. cepacia* の菌体成分に反応させたところ、抗 *B. pseudomallei* モノクローナル抗体は *B. pseudomallei* の他に *B. thailandensis* にも反応した。また、抗 *B. mallei* モノクローナル抗体は *B. mallei* の他に *B. pseudomallei* にも弱く反応した。*B. cepacia* はどちらの抗体にも反応しなかった。

D. 考察

B. pseudomallei, *B. mallei* の LAMP 法の検討を行うにあたって、*Burkholderia* 属は種間の遺伝子配列の相同性が高いため、ヒトから検出される可能性のある *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*, *B. cepacia* から抽出したゲノム DNA を用いて特異度の検討を行っている。

前年までに、類鼻疽流行地域で血液検体を用いて *B. pseudomallei* の LAMP 法の感度を検討したところ、検出感度は 41.2% と既報の 4.3% よりは高いものの十分な値ではなかった。しかし、日本国内で本 LAMP 法を適用する場合には、類鼻疽疑い患者由来の臨床分離株について検査を行うことがほとんどであり、この場合の LAMP 法による *B. pseudomallei* の検出・同定は問題無く行うことが可能である。呼吸器検体など、LAMP 法による検出率が高いとされている他の臨床検体については、検討を行う機会が得られれば試みたい。類鼻疽については、患者血清中の抗体から類鼻疽を診断・同定する方法も求められているが、現在のところ課題と

なっている。

一方、*B. mallei* の LAMP 法プライマー群は前年度、遺伝子 BMAA0749 を標的遺伝子として実用可能と考えられるものを設計した。しかし、前年度の時点では特異度に問題があったため、プライマー群 ID_93 と ID_102 のどちらがより安定して使用できるのか、さらに反応温度を変更して検討を行った。その結果、ID_102 が適当であると結論づけられた。これに伴い、*B. pseudomallei* LAMP 法の反応系の修正を行い、2 種類の LAMP 法の反応条件を揃えた。これにマニュアルを添付することにより *Burkholderia* 属テロ対策用 LAMP キットとして完成し、要請時には配布できると考えられる。また、これまで *B. mallei* の LAMP 法の報告はないため、簡便に試験が行えると期待される。

B. pseudomallei と *B. mallei* に対するモノクローナル抗体を検討した結果では、抗 *B. pseudomallei* モノクローナル抗体には *B. pseudomallei* と *B. thailandensis* が反応した。抗 *B. mallei* モノクローナル抗体には *B. mallei* に加えて *B. pseudomallei* が弱く反応した。*B. cepacia* はいずれの抗体にも反応しなかった。以上より、両者の抗体でウェスタンブロッティングを行えば組み合わせにより *B. cepacia* 以外の菌を区別することは可能ではあるが、実用的では無いと考えられた。

E. 結論

有事の際のバイオテロ対策が必要な *B. pseudomallei*, *B. mallei* の迅速遺伝子検出

法に LAMP 法を適用することとし、検討を行ってきた。今年度は *B. mallei* の特異度を改善させる検討と二種類の LAMP 法の条件を一致させるための検討を行った。その結果、二種類の LAMP 法は同条件の反応系で使用が可能になった。*B. pseudomallei* の LAMP 法は既報より 30 分早く検出が可能である。また、*B. mallei* の LAMP 法はこれまでに報告が無く、本法により簡便に検査が行えると期待される。

日本細菌学会第 86 回総会、2013 年 3 月、千葉県

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
なし
3. その他

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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

2) Young Japanese women after traveling to Southeast Asia; Ohno H, Ogata Y, Suguro H, Yokota S, Watanabe A, Kamei K, Yamagoe S, Ishida-Okawara A, Kaneko Y, Horino A, Yamane K, Tsuji T, Nagata N, Hasegawa H, Arakawa Y, Sata T, Miyazaki Y. Intern Med. 2010; 49 (5): 491-5.

2. 学会発表

LAMP 法による *Burkholderia pseudomallei* と *Burkholderia mallei* の検出、堀野敦子、山根一和、柴山恵吾、阿戸 学、

厚生労働科学研究費 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
分担研究報告書

分担研究課題： 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

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 センター長
研究協力者 関塚剛史 国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室
竹内史比古 国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室

研究要旨

未知病原体や変異病原体による新興感染症の汎発流行、そしてそれらを利用したバイオテロなどの危険性は近年社会的不安の一つとして認識されつつある。その危険性に対する確かな対処法を立案・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 WHO 指定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本研究課題は目標としている。

網羅的病原体検査法の骨格が既に構築済みであり、臨床検体の入手ができれば直ぐにでも国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センターで実施可能となっている。しかしながら、バイオテロ発生（および疑い事例を含む）において現場対応が迅速であればあるほど有効な対応策だと考えている。そのためには、感染研で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も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) を構築した。情報解析を習熟していない検査技師であっても簡単な講習会により利用できるよう利便性を考えて作成した。

A. 研究目的

未知病原体や変異病原体による新興感染症の汎発流行、そしてそれらを利用したバイオテロなどの危険性は近年社会的不安の一つとして認識されている。最先端技術を駆使した次世代ゲノムシーケンサーにより、今までは数年を要した全ゲノム解読が数週間で終了することが可能となった。最先端の革新技術を応用し、効率的かつ安定的に病原体検査システムを運用する体制を整え、WHO 指定バイオテロ病原菌および未知病原体をも検査対象とする網羅的解析法を構築することを目的としている。

B. 研究方法

国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センターで構築した網羅的病原体検査法の情報解析のみをパイプライン化し、インタラクティブに誰でも利用できるソフトを開発した。詳細は研究結果-3, 4 を参照。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

1) ベンチトップ型次世代シーケンサーの特徴

従来の次世代シーケンサーは大型シーケンサーという特徴から、大量配列の排出には有効である。しかしながら、バイオテロ発生等、有事に迅速に対応するためには解読時間の短縮が求められていた。大型シーケンサーよりも安価でかつ解読時間を短縮したベンチトップ型・次世代シーケンサーの登場により、従来よりも迅速に臨床検体の病原体検索が可能となった。昨年度に報告した野党病菌感染症例を挙げると、大型シーケンサーでは最短7日間の解読・解析時間を要していたが、ベンチトップ型により2.5日にまで短縮することが可能になった(図1)。大型と比較して解読量は減るものの、臨床検体から病原体推定する場合には十分な量を得られることが分かった。

2) ネットワーク経由によるバイオテロ病原体検索のための解析システム(案)

現在、感染研・ゲノムセンターにベンチトップ型・次世代シーケンサーと情報解析サーバーが整備されている。感染研に臨床検体が到着後、数日で解析・検査結果を報告できるようにはなっているものの、感染研に検体が送付されるまでには現場で数多くの微生物検査等が行われた後になってしまうケースが少なくない。このような現状の中、各地方自治体にも本研究課題で構築したシステムを導入して頂き、検査体制の一助となるのであれば非常に有効かつ迅速なバイオテロ対策に資するものと考えている(図2)。

本システムで特に重要なのが配列解読後の情報解析にあたる。基本、情報解析に特化した専門家が必要となるが、各自治体に人材を用意もしくは養成している余裕はない。そこで、その煩雑な解析部分をできるだけ簡便化するために、検査技師等がインタラクティブに病原体鑑別を利用できるよう、Web interfaceによる情報解析パイプラインを用意した。

3) 配列解読から情報解析まで

ベンチトップ型・次世代シーケンサー

MiSeq (Illumina)の解読リードをリアルタイムにネットワーク転送することが可能になっており、随時、スマートフォン等を利用して解読状況の確認と情報解析を行うためのクラウドサービス Illumina BaseSpace が提供されている(図3)。残念ながら、このBaseSpaceには病原体を推定する解析プログラムは用意されていない。本研究課題のテーマの一つである“誰でも利用しやすい環境”が重要だと考えている。そこで、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も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)を構築した(図4)。情報解析を習熟していない検査技師であっても簡単な講習会により利用できるよう利便性を考えて作成した。

4) Metagenomic Pathogen Identification pipeline for Clinical specimen: MePIC

MiSeq等の次世代シーケンサーの解読リードを下記の手順で必要な情報パラメーターを設定し、解析ボタンのワンクリックで解析をシームレスに行うことができる。

① Target read files:

次世代シーケンサーの解読リードをアップロード

② Reads trimming:

解読リードの不必要なアダプター配列の削除とクオリティの低い塩基の削除

③ Screening:

bwa mapping法によるヒト配列の削除(マウス等、他のほ乳動物のゲノム配列など、別途、レファレンス配列の指定が可能)

④ Reads classification:

megaBLASTによるデータベース検索。各種データベースの選択が可能。非特異的なヒットを選択しないよう、E-value等の閾値の変更も可能

MePIC で解析した Megablast 解析結果は、配列アライメントを含むテキスト配列で排出される。そのテキスト配列を フリーソフト MEGAN (MEtaGenome ANalyzer) で生物種毎の系統分類をおこなった。

<http://ab.inf.uni-tuebingen.de/software/megan/>

MEGAN の使用方法についての詳細は割愛する。

サンプル検体として、咽頭拭い液から細胞培養により増殖させた分離ウイルス (細胞 CPE 上清) と、オリジナルの咽頭拭い液の DNaseq, RNAseq の結果を用いた。RNAseq の結果から、Saffold virus を検出した。検出感度は総解読リード数の 0.4~4% であり、8kb の Saffold virus 全長を確定することが可能であった。

D/E. 考 察・結 論

これまで分担研究として、WHO 指定バイオテロ病原体の配列データベース化を進めてきた。ゲノム情報を活用することにより有効なトレーサビリティに役立てる目的である。構築データベースを有効に活用するためには、迅速な解読リード配列の取得が望ましく、そのためには多くの難題が残っている。本年度の課題として、情報解析の工程に特化して迅速性を追求したシステム改善を行った。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、総合的なシステム化に貢献したいと考えている。未だ解消されていないボトルネックが残っていることは事実だが、誰もが簡便に利用できるシステムが先行していけば、シーケンサー等のインフラ整備が

後々追いついてくるものと考えている。

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
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
該当なし

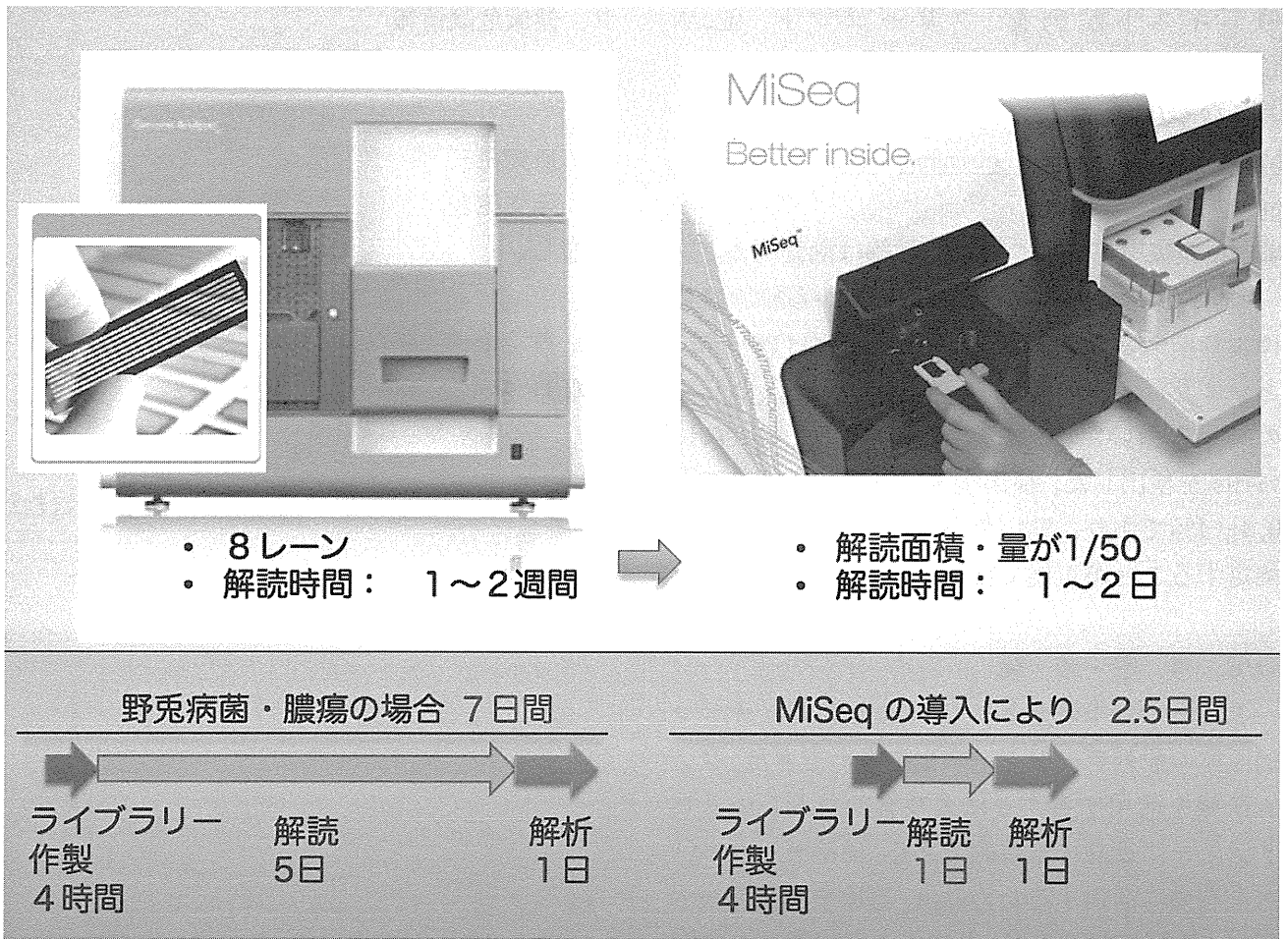
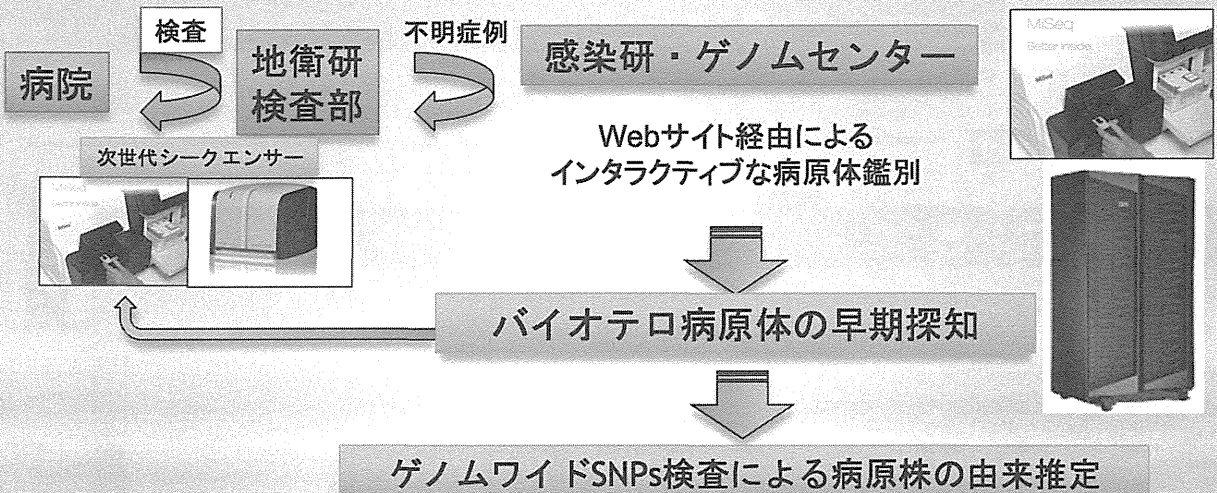


図1 ベンチトップ型・次世代シーケンサーによる迅速な網羅的病原体検査の概要。
 大型シーケンサーでは最短7日間の解読・解析時間を要していたが、
 ベンチトップ型により2.5日にまで短縮することが可能になった。

バイオテロ対策のための網羅的病原体検索



WHO指定バイオテロ病原体（カテゴリーA）のゲノムデータベース（感染研・ゲノムセンター）
 ☆ 炭疽菌、ペスト菌、野兔病菌、鼻疽・類鼻疽菌、各種ウイルス・レファレンス配列

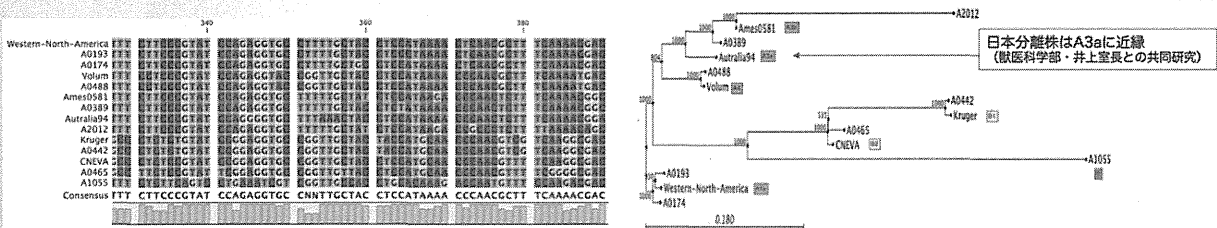


図2 ネットワーク経由によるバイオテロ病原体検索のための解析システム（案）。現在、感染研・ゲノムセンターにベンチトップ型・次世代シーケンサーと情報解析サーバーが整備されている。検査技師等がインタラクティブに病原体鑑別を利用するためには、検査現場にシーケンサーの整備と、ゲノムセンターにWeb interfaceによる情報解析プログラムを用意する必要がある。

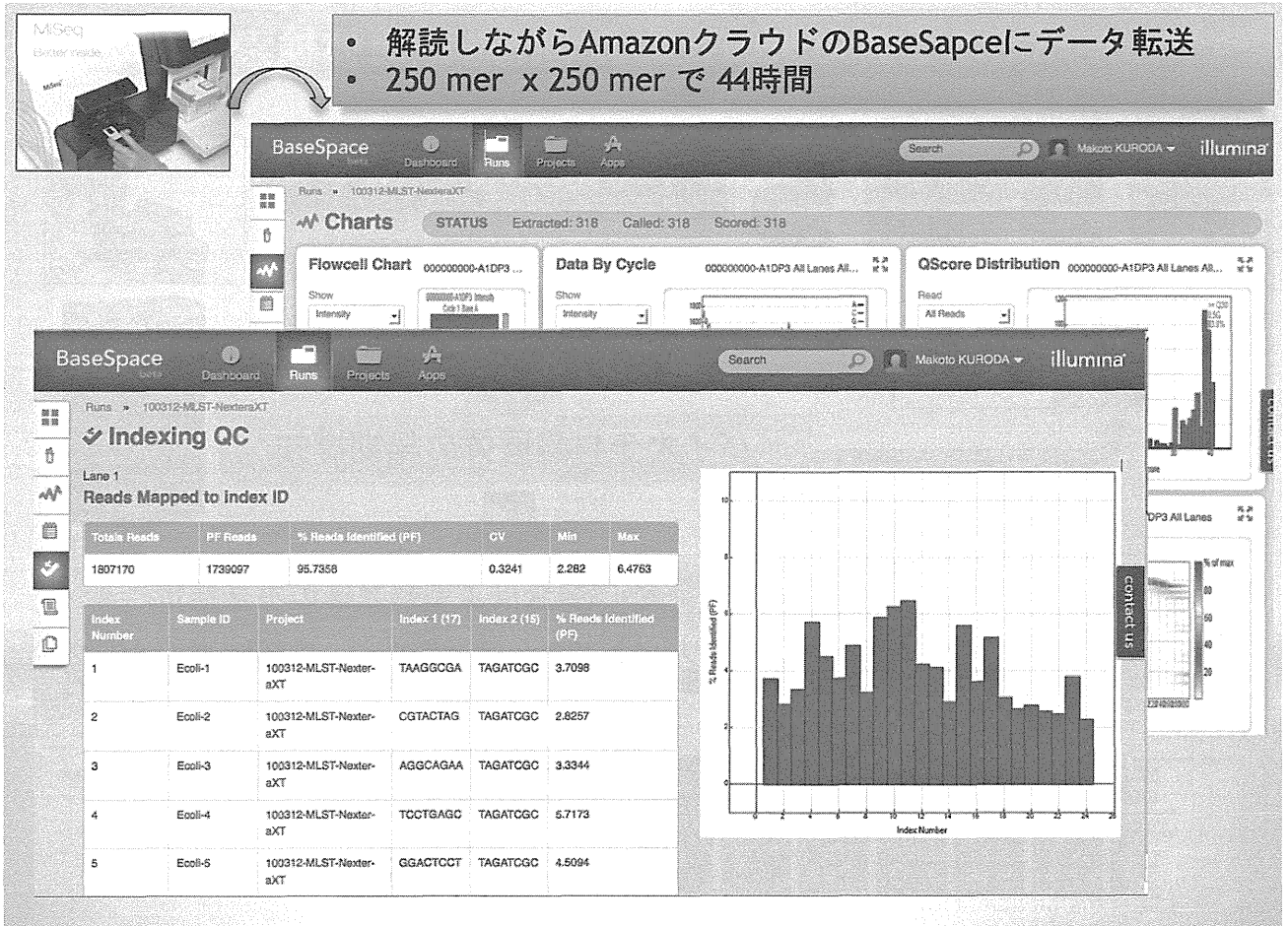
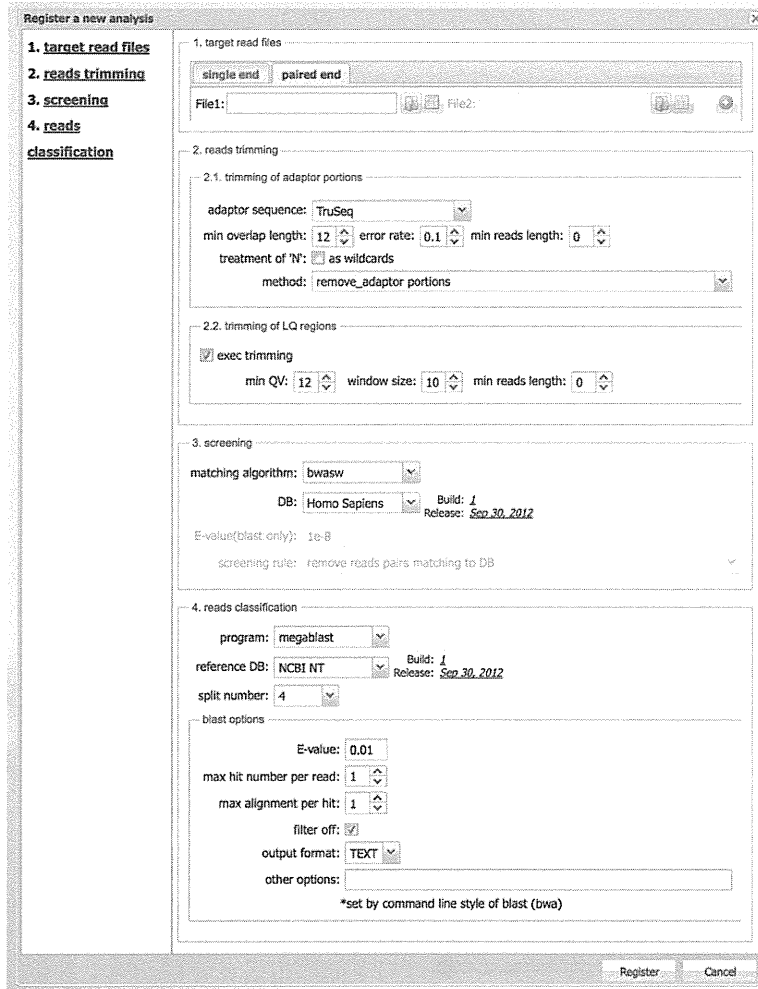


図3 次世代シーケンサーの解読リードをリアルタイムにネットワーク転送し、解読状況の確認と情報解析を行うためのクラウドサービス Illumina BaseSpace の概要。スマートフォン等で外出先からも進捗状況、結果が閲覧できる。図は 24 種類の検体を一度に解読して分類できている結果を示している。



- ① Target read files:
次世代シーケンサーの解読リードをアップロード
- ② Reads trimming:
解読リードの不必要なアダプター配列の削除とクオリティーの低い塩基の削除
- ③ Screening:
bwa mapping法によるヒト配列の削除(マウス等、他のほ乳動物のゲノム配列など、別途、レファレンス配列の指定が可能)
- ④ Reads classification:
megaBLASTによるデータベース検索。各種データベースの選択が可能。非特異的なヒットを選択しないよう、E-value等の閾値の変更も可能

図4 臨床検体からダイレクトに網羅配列解読したリード配列の情報解析パイプライン (Metagenomic Pathogen Identification pipeline for Clinical specimen: MePIC)

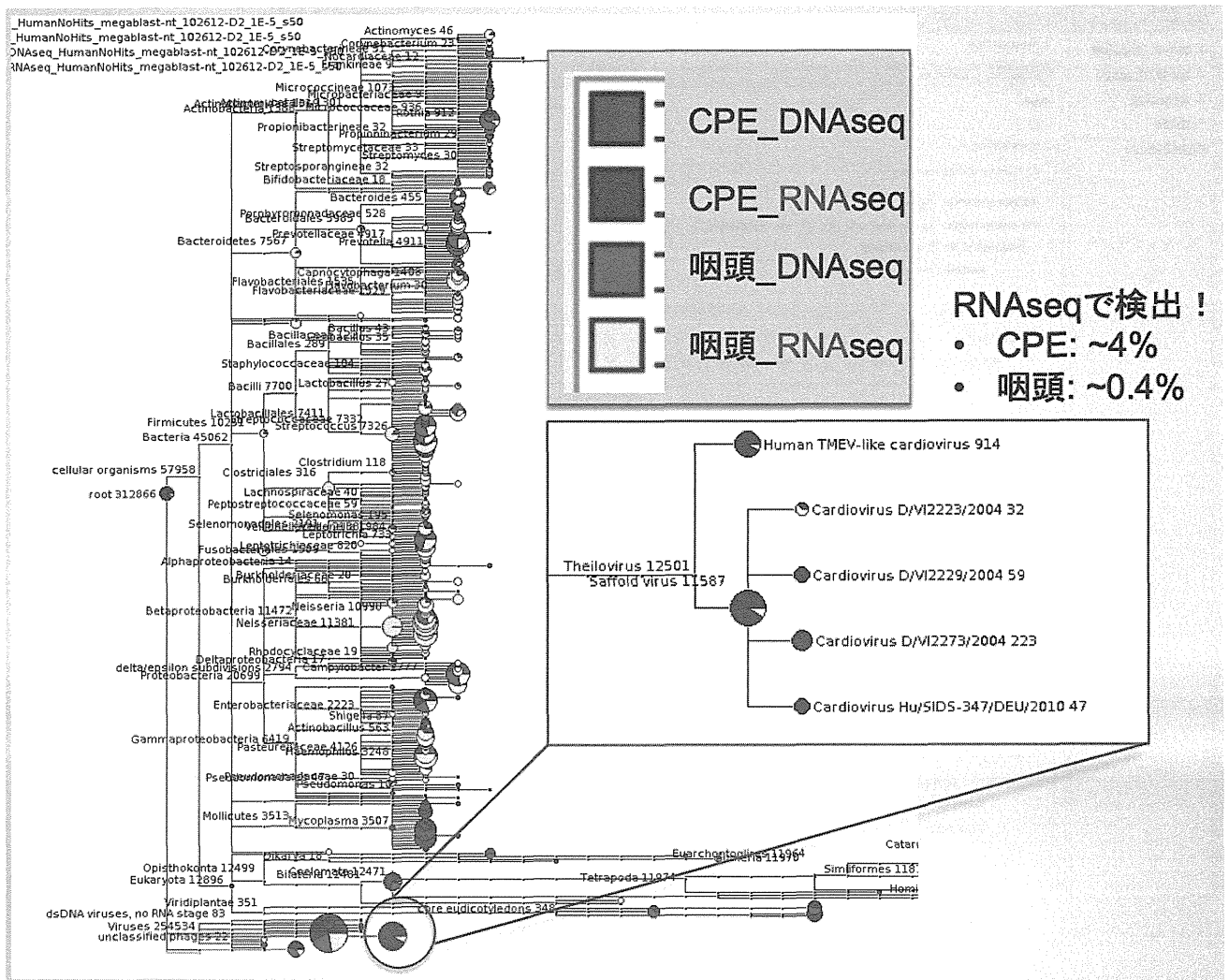


図5 MePICで得られたmegablast 相同性検索結果をMEGANソフトで閲覧。サンプル検体として、咽頭拭い液から細胞培養により増殖させた分離ウイルス（細胞CPE上清）と、オリジナルの咽頭拭い液のDNAseq, RNAseqの結果。RNAseqの結果から、Saffold virusを検出した。検出感度は総解読リード数の0.4~4%であり、8kbのSaffold virus全長を確定することが可能であった。

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 *in situ* 遺伝子検出系

研究分担者 佐多徹太郎（富山県衛生研究所）

研究協力者 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹

（国立感染症研究所・感染病理部）

研究要旨 今年度は我々が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ようになった。実際の生物テロや新興・再興感染症発生に備え、最良の検出方法を確立しておくために、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が判明するとともに、双方の長所・短所について考察した。

A. 研究目的

生物テロ対策として病原体の病理組織内検出法を確立しておく必要がある。免疫組織化学や *in situ* 核酸検出法は組織切片上で病原体の検出ができる方法であり、病原体の体内分布や病変との関連を考えるうえで重要な病理学的解析法である。組織切片上で病原体を検出する方法には病原体の蛋白抗原を検出する免疫組織化学と遺伝子核酸を検出する *in situ* hybridization (ISH) 法がある。良質な抗体がすでにある場合、免疫組織化学は安定した検出系となるが、あらたに特異的な抗体を作製しなければならない場合は時間を要し緊急対応は難しい。一方、外来病原体遺伝子を次世代シーケンス法

等により同定できるようになった近年、塩基配列情報に基づいて ISH 法用のオリゴヌクレオチドプローブを作成するのは容易である。従来、オリゴヌクレオチドプローブによる ISH 法は感度が低く実用的でなかったが、我々の開発した ISH-AT 法は高感度で特異性の高い方法であり、緊急時の迅速病理学的病原体検出法の有力なツールとなることは SARS の流行時に明らかとなった。市販の Z 型オリゴヌクレオチドプローブと分岐 DNA を用いた新しい ISH 法 (以下分岐 DNA-ISH 法と表記。商品名: QuantiGene View RNA: Affymetrix 社) では、標的遺伝子の塩基配列情報 (1000 塩基長以上) を提供するだけで検出用の混合プローブを注文でき

る。実際の生物テロや新興・再興感染症発生に備え、最良の検出方法を確立するために、今回、ISH-AT 法と分岐 DNA-ISH 法を比較検討した。

B. 研究方法

1) 材料

a) 病理組織標本

ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織を使用。ヒト剖検組織：パ
ンデミックインフルエンザ A(H1N1)pdm09 剖
検肺組織、エンテロウイルス 71 (EV71)
脳炎剖検脳組織 (マレーシア例)。動物実
験剖検組織：EV71 感染サル脳組織 (国
立感染症研究所・感染病理部永田先生よ
り分与)。感染細胞標本：デングウイルス
感染 Vero 細胞 (国立感染症研究所・感
染病理部小島先生より分与)。

b) プローブ

・ISH-AT 法用のプローブの作成：
A(H1N1)pdm 09 (AB538390.1) NP 領域 (2
カ所)、EV71 VP1 領域 (2 カ所) および
5'NC 領域 (1 カ所)、デングウイルス
type1-4 の特異的部分のプローブそれぞ
れ (1 カ所) を作製

・分岐 DNA-ISH 法のプローブの注文 (ベ
リタス社)：A(H1N1)pdm 09 (AB538390.1)
NP 部分 20 カ所の混合プローブと 2 カ所
の混合プローブ。EV71 マレーシア株の
VP1 領域および 5'NC 部分 10 カ所ずつの
混合プローブ、デングウイルス type3 の
20 カ所の混合プローブ。(ベリタス社に
注文するとその塩基配列内に自動的に 20
カ所の混合プローブが作成される。)

2) 方法

・ISH-AT 法の迅速化

1 日で検出が終了するように従来のプロ

トコールを改編した。プローブとのハイ
ブリダイゼーションをオーバーナイトか
ら 2 時間に短縮し、ハイブリ後の洗浄も
15 分 4 回を 5 分 4 回にした。またアルカ
リホスファターゼの発色系を使用するこ
とで感度を上げ、シグナル増幅系のステ
ップ (CSA 法) を省略した。分岐 DNA-ISH
法は基本的に添付説明書に従ったが、ホ
ルマリン再固定、前処理、発色に関して
は適宜改編した。

・パンデミックインフルエンザ A(H1N1)pdm09
肺切片中のウイルス mRNA の検出を 2 つ
の方法で行い比較した。

・動物実験標本を用いて 2 つの検出法の
評価を検討した。

・FFPE 組織より RNA を回収し、リアル
タイム RT-PCR 法で切片中のウイルス核
酸のコピー数を定量した。

(倫理面への配慮) 検討材料は剖検組織
であり、剖検時に使用の承諾が得られて
いる。感染動物標本に関しては動物実験
委員会の承認を得て実験が行われた。

C. 研究結果

(1) ISH-AT 法の迅速化

脱パラから発色まで 7 時間で完了でき
るようにプロトコールを改編した。プロ
ーブに結合している (AT)₁₀ をビオチンで
修飾しストレプトアビジン-アルカリホ
スファターゼ (SA-ALP) を結合させ、Fast
Red (赤色) で発色させた。Tyramide で
シグナル増幅させ DAB (茶色) で発色さ
せる系では内因性ペルオキシダーゼ活性
を処理するのも合わせさらに 1 時間要す
る。感度は同程度である。

(2) A(H1N1)pdm09 感染剖検肺切片上
での A(H1N1)pdm mRNA の検出

A(H1N1)pdm の NP 領域 2 ヲ所に ISH-AT 用オリゴヌクレオチドプローブ [3'末に (AT)₁₀ 結合] を作成し混合プローブとした。分岐 DNA-ISH 法用には NP 領域 20 ヲ所の混合プローブと 2 ヲ所の混合プローブを用意した。いずれの方法でも 1 つのプローブにつき、標的遺伝子と結合する部分は 40 塩基である (図)。インフルエンザウイルスが増殖しているときの検体では mRNA のコピー数も多く、ISH-AT 法と 20 ヲ所の混合プローブを用いた分岐 DNA-ISH 法ではどちらの方法でも検出でき差がなかった (図)。しかし 2 ヲ所の混合プローブを用いた分岐 DNA-ISH 法ではほとんど検出できなかった。よって 2 ヲ所の probe (結合部分は計 80 塩基長) での検出感度は ISH-AT 法のほうが高感度といえる。ISH-AT 法において混合プローブ数を増やすことでさらに感度を上げられる可能性がある。

(3) EV71 (カルフォルニア株) 感染サル脳組織におけるウイルス mRNA 検出

ISH-AT 法で EV71 の 5'NC 領域 1 ヲ所とカルフォルニア株 VP1 領域 2 ヲ所に AT プローブを作製して 3 種類の混合プローブで ISH-AT 法を試みた。また分岐 DNA-ISH 法では 5'NC とマレーシア株 VP1 領域に 10 ヲ所ずつ合計 20 ヲ所の混合プローブを用いた。この場合株間で共通する 5'NC のプローブ (10 ヲ所) によって検出できることを期待した。迅速化した ISH-AT 法と分岐 DNA-ISH 法で検出可能であった。感度はほぼ同等であった。

(4) エンテロウイルス 71 (EV71) 脳炎ヒト剖検脳組織 (マレーシア例) におけるウイルス mRNA 検出

ISH-AT 法では EV71 の 5'NC 領域 1 ヲ

所とマレーシア株 VP1 領域 2 ヲ所の 3 種類の混合プローブで、分岐 DNA-ISH 法では 5'NC とマレーシア株 VP1 に 10 ヲ所ずつ合計 20 種類の混合プローブで検出した。ISH-AT 法でも検出できたが、分岐 DNA-ISH 法のほうがより多くの陽性細胞を検出できた。

(5) デングウイルス 1~4 型感染 Vero 細胞

ISH-AT 法で型特異的な AT プローブを 1 種類ずつ作製し、感染 Vero 細胞中のウイルス RNA を特異的に ISH-AT 法で検出した。一方、デング熱例の剖検肝臓切片からは ISH-AT 法でも分岐 DNA-ISH 法でも検出できなかった。感染後日数が経過した症例であったのでウイルス RNA の残存量が少なかったのかもしれない。

(6) FFPE 中のウイルス核酸コピー数と ISH 検出結果

FFPE 標本においてどれだけ RNA が分解されずに残存しているかを確認するために β アクチン mRNA のコピー数をリアルタイム RT-PCR で解析している。死亡後剖検までに長時間経過している場合は 100 コピー以下あるいは検出限界以下 [10 コピー以下] となる場合もある。一般に 10^5 コピー以上が望ましい。ウイルス核酸コピー数に関しては 10^3 コピー以上の場合 ISH-AT 法で検出可能であることが多かった。

D. 考察

感染病原体を用いたバイオテロの場合、患者あるいは死亡者から採取した検体中から病原体遺伝子を検出・同定する最も強力なツールは次世代シーケンシング法であろう。病原体遺伝子が確認され、塩基

配列の一部でも確定できれば、病理切片中で検出することが可能である。検出方法としてはコピー数がある程度あれば ISH-AT 法が最もはやく対処できる。実際、SARS コロナウイルス感染症では免疫組織化学より速やかに ISH-AT 法により肺胞上皮細胞にウイルスが感染することを証明できた。ウイルス感染に伴うサイトカインストームなどで死亡する場合には、死亡時にはすでに組織中に残存するウイルスコピー数が少ない場合がある。このような場合はリアルタイム RT-PCR で切片中に残存する標的遺伝子の量を測定し、1000 コピー以上であれば検出できる可能性があると判断している。コピー数が少ない場合、感染細胞標本などの陽性コントロールがあると助けになる。また標的遺伝子の塩基配列が 1000 塩基長以上確定できていれば市販の分岐 DNA-ISH 法も試行してみるべきである。現在国内ではベリタス社 (QuantiGene View RNA) が販売している。

今回、分岐 DNA-ISH 法と比較検討の結果、ISH-AT 法の改良の余地が明らかとなった。現在の ISH-AT 法のプローブは GC%と Tm 値を参考に設計しているが、プローブによって感度のばらつきがある。今後は感度の高いプローブの条件をさらに見出し、低コピー数の標的核酸も検出できるプローブを自動的に設計できるように検討したいと考えている。またリアルタイム RT-PCR により解析したコピー数とつき合わせてより詳細な検出感度を検討する予定である。

E. 結論

ISH-AT 法のプロトコールを改編して

迅速化できた。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可能性があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakajima N, Van Tin N, Sato Y, Thach HN, Katano H, Diep PH, Kumasaka T, Thuy NT, Hasegawa H, San LT, Kawachi S, Liem NT, Suzuki K, Sata T: Pathological study of archival lung tissues from five fatal cases of avian H5N1 influenza in Vietnam. *Mod Pathol*. 2012 Nov 23. [Epub ahead of print]
- 2) 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*. 2012, 6:e1590.
- 3) Nakajima N, Sato Y, Katano H, Hasegawa H, Kumasaka T, Hata S, Tanaka S, Amano T, Kasai T, Chong JM, Iizuka T, Nakazato I, Hino Y, Hamamatsu A, Horiguchi H, Tanaka T, Hasegawa A, Kanaya Y, Oku R, Oya T, Sata T: Histopathological and immunohistochemical findings of 20 autopsy cases with 2009 H1N1 virus

- infection. Mod Pathol. 2012 Jan; 25(1):1-13.
- 4) 片野晴隆、佐藤由子、佐多徹太郎、長谷川秀樹：病原体の同定. 病理解剖マニユアル 病理と臨床 2012, 30: 269-277.

2. 学会発表

1) 国際発表

1. Noriko Nakajima, Ngo Van Tin, Yuko Sato, Hoang Ngoc Thach, Harutaka Katano, Pho Hong Diep, Toshio Kumasaka, Nguyen Trung Thuy, Hideki Hasegawa, Luong Thi San, Shoji Kawachi, Nguyen Thanh Liem, Kazuo Suzuki and Tetsutaro Sata: 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) (ハノイ・ベトナム) 2012年10月

2) 国内発表

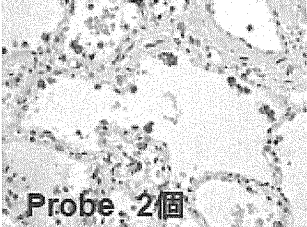
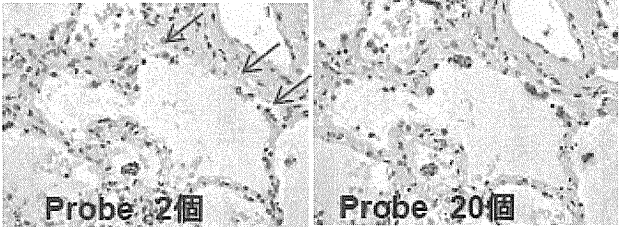
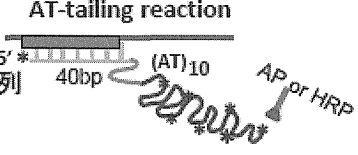
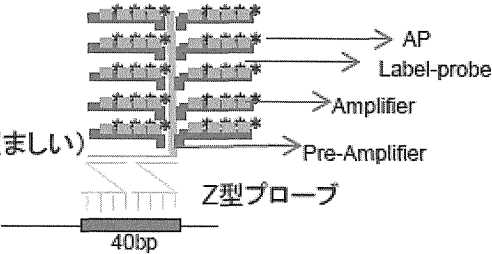
1. 鈴木忠樹、片野晴隆、大場靖子、小林進太郎、佐藤由子、佐多徹太郎、澤洋文、長谷川秀樹：JC ウイルス後期蛋白質に対する特異抗体を用いた進行性多巣性白質脳症の免疫組織化学的診断法の比較検討。第 60 回日本ウイルス学会学術集会（大阪）2012年11月
2. 小谷 治、鈴木忠樹、Naeem Asif、岩田奈織子、中島典子、片野晴隆、田口文広、長谷川秀樹、清水博之、永田典代：新生仔マウスにおける新規ヒトカルジオウイルス（Saffold virus）の神経病原性の解析。第 60 回日本ウイルス学

会学術集会（大阪）2012年11月

3. 片野晴隆：エイズ剖検例における日和見感染症と腫瘍の実態。第 26 回日本エイズ学会学術集会総会（横浜）2012年11月
4. 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、熊坂利夫、佐多徹太郎、長谷川秀樹：高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルス感染症で死亡したベトナム小児例の病理学的解析。第 101 回日本病理学会総会（東京）2012年4月

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
なし
3. その他
なし

	In situ hybridization AT (ISH-AT)法	分岐DNA-ISH 法(市販品)
必要な塩基配列情報の長さ	40塩基から可能	40塩基部分
プローブの特徴	GC>50%、Tm>80°C 3'末にATの繰り返し配列	最大20個の混合プローブ (1000塩基長以上が望ましい)
プローブの納期	およそ1週間	およそ3週間
検出に要する時間	およそ6-7時間(迅速化に成功)	およそ7-8時間
使用する温度	37°C、50°C、55°C、60°C	40°C
A(H1N1)pdm09-mRNAの検出 (肺胞上皮細胞で陽性)	 <p>Probe 2個</p>	 <p>Probe 2個 Probe 20個</p>
•ISH-AT法のほうが少ないプローブ数で検出感度がいい。	<p>AT-tailing reaction</p> 	
	<p>probeは2カ所でも検出可能</p>	<p>probeは2カ所では不十分</p>

厚生労働科学研究費 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
分担研究報告書

病原体の電子顕微鏡学的迅速検出法の確立

研究分担者 永田 典代 国立感染症研究所 感染病理部 第二室長

研究要旨：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。今年度は、先に準備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。

協力研究者：

国立感染症研究所 感染病理部

鈴木忠樹、岩田奈織子、片岡紀代、藤野美穂子、竹内佳子、小谷 治、佐多徹太郎、長谷川秀樹

国立感染症研究所 細菌第二部

佐々木 裕子、堀野 敦子、見理 剛、岩城 正昭、山本 明彦、加藤 はる、柴山 恵吾

国立感染症研究所 ウイルス第一部 福士秀悦、ウイルス第三部 松山州徳、酒井宏治

国立感染症研究所 インフルエンザ研究センター 相内 章

A. 研究目的

透過型電子顕微鏡による病原体の検出方法は迅速性、簡便性に優れ、スクリーニングによる包括的な鑑別診断が可能という点で感染症診断の一助となる。最近では、新興・再興感染症のみならず、コウモリ・蚊等から分離される未知のウイルスのスクリーニングの手段として、用いられつつある。しかしながら、電子顕微鏡による感染症診断検査の実施者には高いスキルが要求される。本研究では、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ている。1.

BSL3, BSL2 病原体に十分対応するための電子顕微鏡学的検査法の標準手順の見直し、2. 細菌の迅速検出法に必要なレファレンス標本の作製、3. 検出の感度・精度を向上するための改良法の3点を課題としている。

今年度は、1の標準手順に従って、実際のウイルス検査に取り組み、3の検査精度の向上（観察方法）をはかった。

一方で、2. 細菌の検出に必要なレファレンス標本の作製を開始し、走査電子顕微鏡写真の撮影を行った。今年度は、ウイルス検査について報告する。

B. 研究方法

電子顕微鏡学的迅速診断法の標準手順によるウイルス粒子の検索

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、フラビウイルス、ピコルナウイルスを対象とした。これらのウイルス感染細胞の上清を用いて電子顕微鏡学的迅速診断法の標準手順に従い検索を行った。ただし、この報告書の図にはオルソミキソウイルス、パラミキソウイルス精製ウイルス粒子を用いた。固定は4%グルタルアルデヒド、2%リンタングステン酸によるネガティブ染色を実施した。観察は、透過型電子顕微鏡 JEM-1400(日本電子)

で行い、撮影は付属の CCD カメラを用いた。

C. 結果

1. 試料の準備

それぞれの協力研究者には、ウイルス感染細胞を準備いただき、上清に 10^6 TCID₅₀/ml 以上のウイルス粒子を含むと予想されるタイミングで 100 μ l の上清を分与いただいた。いずれも 6 穴〜24 穴プレートの上清を用いたが、問題はなかった。1.5 ml プロピレンチューブ内で、ウイルスを含んだ上清を 100 μ l の 8%グルタルアルデヒド(GA)と等量混合し、その後、UV トランスイルミネータ上で 5 分以上 UV 不活化を行った。不活化処理後に 10,000g 1 分遠心を行い、Grid-on-Drop 法によりネガティブ染色を実施した。ネガティブ染色後に再度、安全キャビネットの UV を利用して、UV 照射を 10 分以上行った。最終濃度 4%GA 固定と UV 不活化処理による検査への影響はなかった。染色前の 10,000g 1 分間の遠心処理は適切であった。

2. ウイルス粒子の検索

今回検索対象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、ブニヤウイルス、フラビウイルス、ピコルナウイルスは、いずれも、細胞培養上清でも検査には十分な粒子濃度であった。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、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 (図)。教科書的にはそれぞれの形状に特徴があることが記載されているが、実際の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わかった(特に同時感染を判断する場合)。これら 4 つのウイルスの形状、主な感染臓器と検出可能な材料について表にまとめた。オルソミキソウ

イルス、パラミキソウイルス、コロナウイルスは特に、上気道炎に関係する病原体であり、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は多く含まれており、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、初見の場合は、粒子そのものの存在の判定が非常に困難であった。

D. 考察

直径 80〜120 nm の球状の粒子は、細胞には多く含まれており、ウイルス粒子検索に準備する感染細胞の細胞変性効果が進みすぎている(すなわち、壊死細胞が多く含まれている)と、細胞内構造物が混入しやすく、また、ウイルス粒子も壊れているものが多くなる。具体的には、エンベロープの剥離や、粒子破壊、ヌクレオカプシドプロテインの切断などがみられる。

ブニヤウイルスはこれまで当所で検索する機会は無であったが、2013 年 1 月に本邦初の SFTS ウイルス感染患者死亡例が報告されたこともあり、今後は観察する機会が増えるかもしれない。今回は、ウイルス第一部で事前に中国 CDC から SFTS ウイルス参照株を入手しており、我々も共同で電子顕微鏡検索を実施してあったため(図)、1 月に行った検査では順調に作業をすすめることができた。参照標本を準備しておくこと、教育訓練を維持することの重要性が強調された事例であった。

なお、昨年度に引き続き、Robert Koch 研究所によるウイルスの透過型電子顕微鏡診断法技術の外部評価 External Quality Assurance Scheme in EM Virus Diagnostics (EQA-EMV)に参加した。この EQA-EMV は、電子顕微鏡の教育訓練を目

的として Robert Koch 研究所の Hans Gelderblom により 1994 年から導入されたものである。Robert Koch 研究所によって毎年開催され、世界中の 100 カ所余りのラボが参加しており、2012 年には 25 回目をむかえた。対象サンプルは臨床検体（医学・獣医学領域）を対象としており、培養細胞でウイルスを増殖した培養上清を、2%ホルマリン 0.02%アジ化ナトリウム混合液で不活化処理し、参加者に配布（郵送）している。EQA-EMV 実施の際には、指定のレファレンスラボ 6 カ所が同様に参加しており、この指定ラボのうち少なくとも 5 カ所が正答であれば、そのサンプルは適正であると判断されている。われわれは、昨年度よりこのシステムを教育訓練に組み込んでおり、2012 年にも 5 名が訓練を実施した（岩田、鈴木、片岡、竹内、永田）。

E. 結論

透過型電子顕微鏡検索の標準手順に従って、実際のウイルス検査に取り組み、検査精度の向上（観察方法）をはかることができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Lethal canine distemper virus outbreak in cynomolgus monkeys in Japan in 2008. Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzuki 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. J Virol. 2013. 87:1105-1114.

2. Analysis of the humoral immune responses among cynomolgus macaque naturally infected with Reston virus

during the 1996 outbreak in the Philippines. 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. BMC Vet Res. 2012. 8:189.

2. 学会発表

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 2012.10. Berlin

G. 知的財産の出願・登録状況

なし