

図 エンベロープウイルスのネガティブ染色像。4%グルタルアルデヒド固定、UV 照射による不活化処理の後、2%リンタングステン酸染色、30 秒。A. パラミキソウイルス（精製ウイルス粒子）。直径 80～300 nm 大小不同、円形、エンベロープは比較的長く、明瞭。80 nm の粒子が必ず存在し、オルソミキソウイルス粒子と類似する（左下）。粒子内にはヌクレオカプシドプロテインが折りたたまれて存在する（右下）。B. オルソミキソウイルス（精製ウイルス粒子）。直径 80～200 nm 大小不同、円形、時に不定形。エンベロープは判別しやすいが、パラミキソウイルスに比べると短い。C. コロナウイルス（細胞培養上清）。80 nm～100 nm の円形粒子だが、特徴的なコロナ状のスパイクを有する。D. ブニヤウイルス（細胞培養上清）。100～110 nm の円形粒子だが、比較的輪郭が不明瞭でいびつ。エンベロープは不明瞭で繊細（fuzzy と表現される）。

表 エンベロープを持つ 80～120 nm の主な球状ウイルスの形状、主な感染臓器と検出可能な材料

科 <i>Family</i>	エンベ ロープ 特徴	核酸	形状	粒 子 の 大 きさ	ヌクレ オカプ シドの 大きさ	主な 関連ウイルス	主な感染臓 器 ()内 生 検材料
<i>Coronaviridae</i>	あり コロナ 状	+ RNA	鎖 球状	75 -160 nm	10 -20 nm	<i>Human coronavirus 229E</i> <i>Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus</i>	(鼻咽頭拭 い液、肺洗 浄液) 肺
<i>Orthomyxoviridae</i>	あり 判別し やすい	- RNA (8分節)	鎖 球状	80 -120 nm	9-15 nm	<i>Influenza A virus</i> <i>Influenza B virus</i>	(鼻咽頭拭 い液) 肺
<i>Paramyxoviridae</i>	あり 比較的 明瞭	- RNA	鎖 球状、 多形性	100- 500 nm	12 -18 nm	<i>Human respiratory syncytial virus, Measles virus, Mumps virus, Nipah virus</i>	(咽頭拭い 液、皮膚、 肺、髄液) 肺、リンパ 節他全臓器
<i>Bunyaviridae</i>	あり ファジ ー状	- RNA (3分節)	鎖 球状	90 -120 nm	9 nm	<i>Rift Valley fever virus,</i> <i>Crimean-Congo hemorrhagic fever virus,</i> <i>Hantaan virus, SFTS virus</i>	(血液) 腎、 肺、脾、そ の他全臓器

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

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

江崎孝行 国立大学法人岐阜大学・医学部

川本恵子 帯畜大・動物・食品衛生研究センター

研究要旨 2001年にアメリカで起こった炭疽菌芽胞を使ったバイオテロにより、生物兵器による無差別攻撃に速やかに対応し、安全・安心な社会を構築することが求められている。危険病原体による感染症の蔓延を防ぐ技術開発も危機管理体制の強化の一つとして急務の課題である。本研究では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する。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う。

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’による多数の摸倣事件が起こり、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。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、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、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。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検査ネットワーク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。当分担研究班では、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、特に特定病原体等の中の細菌性感染症を中心として、網羅的な検出・検査法を確立し、広く社会に還元することを目的として研究を遂行する。

対象として各種ウイルス、リケッチア、細菌、毒素等のバイオテロに使用される可能性がある病原体が想定されるが、特に炭疽菌は芽胞としての安定性、乾燥や熱に対する抵抗性、比較的簡単に培養ができることなどから生物兵器の最有力候補として常に注目をあびてきた。炭疽菌は危険度レベル3に属する細菌で、他にペスト、鼻疽/類鼻疽、野兔病、結核、チフス、ブルセラが細菌としてこのレベルに入る。その中で、生物兵器として使用可能なものは炭疽以外にペスト、鼻疽/類鼻疽、野兔病、チフス、ブルセラが想定されるが、検査法や治療法、さらには診断法がまだ確立されていない菌種は鼻疽/類鼻疽、野兔病、ブルセラである。そこで、本研究では、危険度を考慮して炭疽菌の検出法の更なる改良・開発、および鼻疽/類鼻疽、野兔病、ブルセラ症などの危険度3に属する病原体に対する検出・診断法の確立及び治療・予防法の開発や改良を行い、患者検体および環境中からの迅速な検出および診断法の開発を行う。診断法の実用化に当たっては事件発生現場での利用が可能な方法と、検査室における方法の両面からの実用化を目指す。さらに、種々の化学物質および薬剤に対する病原体の感受性に関する検討を行い臨床利用に備える。また、従来からのワクチンを基盤とした免疫誘導能が高いワクチンの開発を検討する。

今年度、本研究班では、昨年度同定した炭疽ワクチン候補抗原の炭疽発症予防効果の検討、抗原性を保持した組換えリシン発現系の作製、細菌性毒素の検出系のキット化への取り組みを行なった。

炭疽菌 *Bacillus anthracis* は、グラム陽性の芽胞形成桿菌で、人獣共通感染症の炭疽を引き起こす微生物である。炭疽は、感染経路の違いにより、皮膚炭疽、肺炭疽、腸炭疽の3つの病型をとる。そのうち、肺炭疽は本菌芽胞の吸入によって引き起こされる致死率の高い感染症である。現在、米国や英国で用いられているヒト用ワクチンは、毒素産生株の培養上精を用いた成分ワクチンであり、その接

種対象は限られている。また、十分な免疫効果を維持するために、複数回の筋注投与と年1回の追加投与が必要であり、接種による副作用も報告されるなど、簡便性および安全性が問題視されている。そのため、有事の場合の大量免疫に使用できず、より安全で、より有用なワクチンの開発が必要とされている。

本研究では、炭疽ワクチンの新たな候補成分として芽胞表層タンパクに着目し、炭疽に対する防御効果について検討した。投与方法については非侵襲性である粘膜免疫を用いた。

リシンは、トウゴマ (*Ricinus communis*) の種子から抽出される糖タンパク毒素で、分子量約30 kDaのAサブユニットと分子量約32 kDaのBサブユニットからなり、天然有機化合物のなかでも毒性の強い化合物の一つである。リシン毒素はA、B二つのサブユニットから構成される。毒素活性を持つのはAサブユニットで、Bサブユニットは標的細胞の受容体に結合し、Aサブユニットを細胞内へと輸送する。リシンの致死量は、成人の場合、20-30 µg/kgで、吸入で約4-8時間、経口投与では、約10時間で中毒症状が現れる。現在のところ、本毒素に対する有効な解毒剤は存在しない。また、これまでにテロや犯罪における使用歴がある。そのため、本毒素の迅速検出法は、安心・安全な社会構築のため急務である。毒素の致死量が低く、リシンと同様の症状を示すその他の細菌毒素も存在することから、高感度で、類症鑑別も可能となる検出法の開発が望ましい。本研究では、細菌毒素検出に加え、テロ使用での危険性が高い植物毒素であるリシンの検出法開発も併せて行う。

細菌毒素に関しては、CDCの生物兵器に使われる可能性の高い蛋白毒素であるボツリヌス毒素 (Btx、カテゴリーA)、コレラ毒素 (CT) とLT (カテゴリーB: Enteric Pathogens)、黄色ブドウ球菌のエンテロトキシン (SEA&SEB、カテゴリーB: Enteric Pathogens) 及びTDH (カテゴリーB: Enteric Pathogens) 等に対する免疫学的迅速同定法を確立して検査・診断マニュアルを作成し、その普及を目的として行った。研究対象の細菌毒素は食中毒の原因となるので種々の検査キットが市販されているものもあるが、本研究では、食品を用いたバイオテロに対する網羅的迅速同定

法を国産で供給できるようにする。CTおよびLTに対する家兎抗血清を作製して各毒素に対するELISA系及びImmunochromatography (IC)を構築し、それぞれの抗血清の特異性の検証を行なった。更に、TDH、SEAとSEBの精製法を確立して家兎抗血清を作製するのに充分なこれらの毒素を精製した。

B. 研究方法

B-1. 網羅的抗原・抗体検出系

1. リシン毒素検出系の構築：

リシンのトウゴマからの抽出は、化学兵器の禁止及び特定物質の規制等に関する法律に抵触するため、実験室レベルの検討に使用することは困難である。そこで、毒素活性は持たないが毒素の構成成分として必須であるBサブユニットの組換え体を作製し、これを抗原として高親和性抗体の作製を行っている。

昨年度得られた抗 rRTB 特異抗体を用いてイムノクロマトを作製し、特異性および検出感度を検証した。一方で、抗原として用いた組換え蛋白は大腸菌内で不溶性の封入体を形成していたため、立体構造に変化が生じている可能性がある。様々な手法でリフォールディングを試みたが、凝集を完全に抑制することは困難であった。天然型リシンと十分に反応する抗体を得るためには、立体構造を保持した抗原が望ましい。そこで、今年度は *Brevibacillus* 発現系を利用した分泌型 RTB 発現系の構築を行った。昨年度、構築した発現ベクターを鋳型として、*rtb* 遺伝子を PCR で増幅し、*Brevibacillus* 用発現ベクターに組み込んだ。この時、6×His タグを N 末あるいは C 末に付加できるようプライマーを設計した。また、4 種類のシグナルペプチドを用意し、計 8 種類の発現ベクターを構築した。作製した発現ベクターはエレクトロポレーション法に宿主細胞に遺伝子導入した。得られた形質転換体のコロニーを釣菌して、液体培地にて培養した。SDS-PAGE および抗 His 抗体を用いたイムノブロット法による発現確認を行った。

B-2. 炭疽に対する粘膜ワクチンの開発

H23 年度の研究により炭疽菌芽胞と栄養体の両者の表層に存在する共通抗原として EA1 を特定した。本年度は、同抗原を粘膜投与した場合の炭疽発症予防効果について検討した。

実験動物は 6 週齢の雄の BALB/c マウスを用い、イソフルラン麻酔後、鼻孔より 10 μg となるように 5 ~ 10 μl の 組換えタンパクを投与することで経鼻免疫した。表 1 に免疫条件を示す。投与スケジュールは週 3 回×3 週間で行った。粘膜アジュバントとして合成二

Group	Antigen	Adjuvant
A	None	+
B	PA	+
C	EA1	+
D	PA + EA1	+

表1 粘膜免疫の投与群(n=8)

本鎖 RNA の poly (I:C) (InvivoGen, San Diego, CA, USA) を用いた。定期的に各群のマウスから血液、糞便、唾液を採材し、血中および粘膜抗体価は ELISA により測定した。

感染実験には、*B. anthracis* Pasteur II 苗 (pXO1⁺, pXO2⁺) を使用し、培養には BHI あるいは TSA を用い、37°C で培養した。炭疽菌芽胞は栄養体の混入のない高純度の芽胞を精製した。炭疽菌芽胞液 (約 5×10³ CFU/mouse) は PBS に懸濁して調整した。100 μl の芽胞液を BALB/c マウスに腹腔内投与した。投与後、マウスの状態を定期的に観察した。投与に使用した芽胞液は、10 倍段階希釈した後、L-agar に塗布し、37°C で一晚培養後、出現したコロニー数を計測し、正確な投与菌数を算出した。

感染臓器 (肺、肝臓、脾臓) 中の菌数を測定するため、投与後 2 日目および 3 日目にマウスを頸椎脱臼により安楽死させ、臓器を回収した。臓器の重量に対し、100 mg/ml となるように滅菌水を加え、ペッスルを用いて注意深く破碎した。臓器懸濁液を 10 倍段階希釈し、100 μl ずつ L-agar に塗布し、37°C で一晚培養後、コロニー数を計測した。また、マウスから肺、肝臓および脾臓の一部を回収し、10 N マイルドホルム (Wako) により固定した。定法に従い、パラフィン包埋後、2 μm の切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) を行った。また、マウス胸部のマルチスライス X 線 CT (Computed Tomography) 画像を撮影し、肺野の病変所見を観察した。

B-3. A型ボツリヌス毒素重鎖 (A-Btx-C) の発現・精製

H23年度に構築した A-Btx-C クローンは発現が弱く十分量の抗原が作製できない事が分かったため、当該遺伝子のクローニングを再度行った。即ち、A-Btx-C を code する遺伝子を A 型ボツリヌス菌 62A 株の whole cell DNA から PCR cloning して、発現系ベクターである pCold TF に挿入した。Recombinant plasmid DNA を発現用大腸菌である BL21 (DE3) に導入して発現させて、発現した融合蛋白を Ni-NTA カラムで精製した。精製純度を上げるために Ni-NTA カラムで精製した標品を更に電気抽出法で精製した。

B-4. SEA 及び SEB の発現・精製

黄色ブドウ球菌が産生するエンテロトキシン (A 型 : SEA、B 型 : SEB) を code する遺伝子をそれぞれ PCR cloning して発現系ベクターの pET28a に挿入した。この recombinant plasmid DNA を大腸菌 BL21 (DE3) に導入して発現させ、Ni-NTA カラムおよび電気抽出法で精製した。

B-5. TDH の発現・精製

腸炎ビブリオの Whole cell DNA から TDH を code する遺伝子を PCR cloning して、pColdTF に挿入した。この recombinant plasmid DNA を発現系大腸菌である BL21 (DE3) に導入して発現させた。発現した融合蛋白は Ni-NTA カラムで精製した。

(倫理面への配慮)

病原体の使用は、病原体等安全管理委員会規則に従って、使用、保管等を行った。動物実験は所属研究機関の動物実験委員会の審査許可を受けて行われ、DNA 組換え実験や病原体の取り扱いには法令に従い安全性を考慮して実験を実施した。

C. 研究結果

C-1. 網羅的抗原・抗体検出系

1. リシン毒素検出系の構築 :

得られた形質転換体のコロニーを釣菌して、液体培地にて培養した。数日間培養後、培養上清を回収し、SDS-PAGE にて発現確認を行

った結果、His タグを C 末、N 末に付加したいずれの場合においても、27 kDa の RTB の分子量を示す位置にバンドが認められたが、N 末に His タグを付加した場合により強い発現が見られた (図 1)。また 4 種のシグナルペプチドのうち C タイプが最も強い発現を示した。

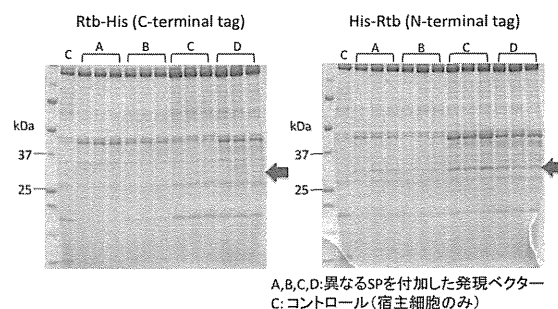


図1 Brevibacillus発現系による分泌型RTBの発現

続いて、同じ培養上清について、抗 His タグ抗体を用いたイムノブロット法を行ったところ、C 末 His-RTB については、CBB 染色では微弱なバンドが確認されたものの、イムノブロットでは確認出来なかった (図 2)。一方、

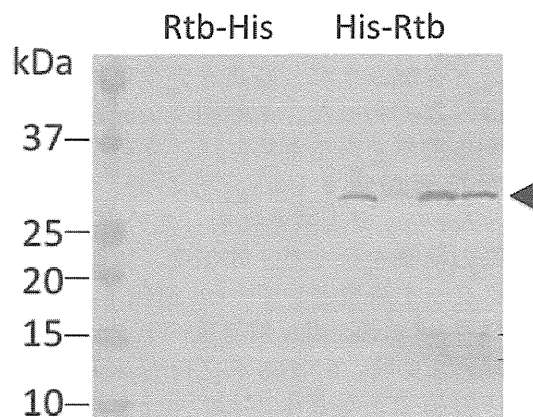


図2 イムノブロットによる発現確認

N 末 His タグ付加した株では B タイプのシグナルペプチドを除き、全ての株由来の培養上清で 27 kDa のバンドが検出された。

C-2. 炭疽に対する粘膜ワクチンの開発

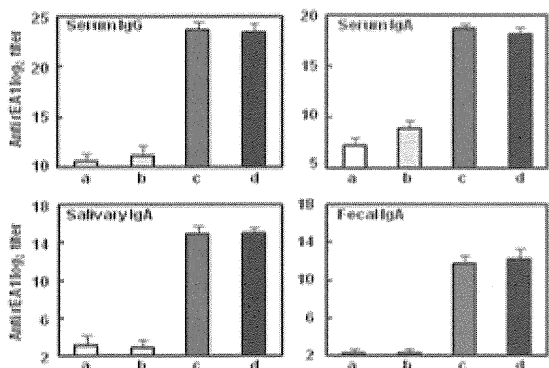
新規ワクチン候補分子を探索するため、炭疽菌の感染型である芽胞の表層タンパクの同定を行ったところ、EA1 を同定した。EA1 は芽胞のみならず栄養体の表面にも発現していることから、炭疽菌の生活環のな

かで異なる型に共通の抗原をワクチン候補分子として用いれば、効果的な免疫誘導と感染防御が期待できると思われる。昨年度の研究成果で EA1 が粘膜免疫においても抗原性を有し、十分な抗体産生を誘導しうることから、本年度は既知のワクチン候補分子である PA と組み合わせて粘膜投与した場合の感染防御効果についてマウスを用いた感染実験で検討した。

PA (List Biological Laboratories) と EA1 をそれぞれ単独、あるいは組み合わせて、Poly(I:C)アジュバント併用下で週 3 回、計 3 週間、経鼻投与した。アジュバントのみの投与群を対照群とした。

免疫群における血中および粘膜中特異抗体価を調べた結果、経鼻免疫により EA1 および PA に対するそれぞれの血中 IgG および IgA、粘膜中 IgA の抗体価が上昇していた (図 3)。

EA1特異抗体



PA特異抗体

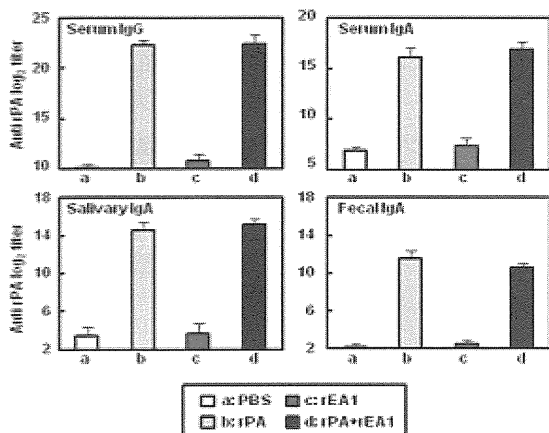


図3 血中および粘膜特異抗体価

対照群では EA1 あるいは PA に対する特異抗体は検出されなかった。

続いて、炭疽に対する防御効果についてマウス感染実験により検討した。各群とも n=8 匹とした。対照群では、免疫群に比べ、臨床症状の発現が早く、感染後 4 日目に全頭死亡した (図 4)。これに対し、PA 単独免疫群、EA1 単独免疫群、および EA1+PA 免疫群の感

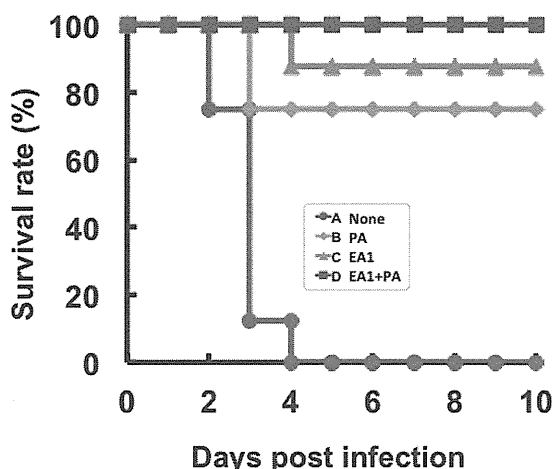


図4 炭疽感染実験の生存率

染後 10 日目の生存率は、それぞれ 62.5%、82.5%、および 100%であった。いずれの群においても、非免疫群に比べ、免疫群では生存率は改善されていたが、対照群である非免疫群と比較した場合、統計的に有意な生存率を示したのは、EA1 単独免疫群と EA1+PA 群で、棄却率はそれぞれ p=0.0128、p=0.0020 であった。EA1 免疫群と PA 単独免疫群間には有意差は認められなかった。

感染 2 日目の各臓器について HE 染色による病理組織所見を調べた (図 5、6)。対照群

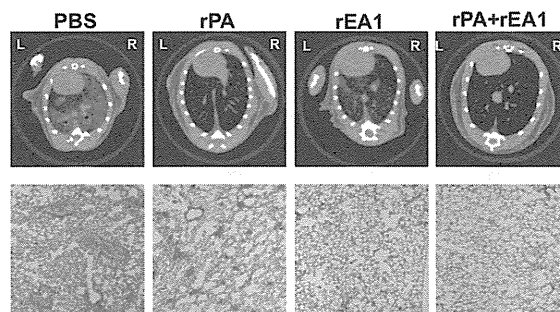


図5 マウス胸部CTおよび肺の病理所見

の肺では、出血や著しい毛細管うっ血が認められた。また、血液中および間質に夥しい数の莢膜に覆われた栄養体 (発芽した炭疽菌)

が見られた。しかし、間質における炎症性細胞反応はほとんど観察されなかった。これは炎症性細胞の浸潤などの炎症反応が起こる前に、極めて短時間で病気が進行したためと考えられる。脾臓や肝臓においても出血やうっ血病変が観察され、炭疽菌の全身性感染によ

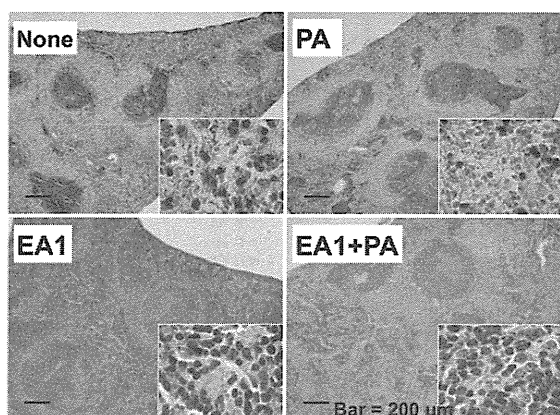


図6 脾臓の病理所見

る急激な循環不全が起こったと思われた。このような病変は程度が改善されているものの、PA 単独投与群でも認められ、臓器には多数の炭疽菌が観察された。これに対し、EA1 単独免疫群や EA1+PA 免疫群などの EA1 免疫群では病理学的に異常な所見はほとんど認められず、炭疽菌もほとんど検出されなかった。

感染 2 日目および 3 日目の各群のマウスから肺、肝臓、脾臓を回収し、臓器中菌数を調べた。この実験による臓器中菌数の検出限界は、 1.00×10^2 CFU/g である。感染 2 日目および 3 日目の対照群における各臓器中の菌数は約 $10^7 \sim 10^9$ CFU/g と高い値を示した (図 7)。これに対し、免疫群では、臓器中の菌数

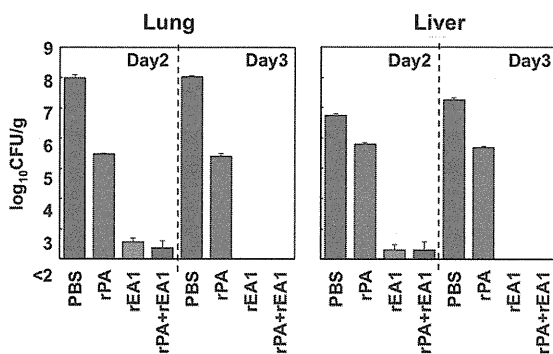


図7 臓器中の炭疽菌数

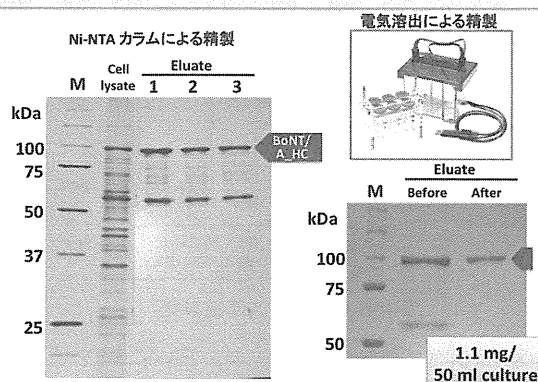
は対照群と比較して有意に減少していた。特

に、EA1 投与群では、臓器中菌数の著しい減少がみられた。感染 2 日目の各臓器の菌数は、EA1 単独投与群で、それぞれ、肺: 3.67×10^2 、肝臓: 2.00×10^2 、 1.33×10^2 CFU/g であり、EA1+PA 投与群では、肺: 2.33×10^2 、肝臓: 2.00×10^2 、脾臓: 1.00×10^2 CFU/g であった。すなわち、EA1 免疫群における臓器中菌数は、対照群に比べ約 105 ~ 107 分の一にまで減少していた ($p < 0.0001$)。さらに感染 3 日目においては、検出限界以下となった。一方、PA 単独投与群でも対照群に比べ、臓器中菌数は減少していた。感染 2 日目の各臓器中の菌数は、肺: 2.97×10^5 CFU/g、肝臓: 6.23×10^5 CFU/g、脾臓: 3.83×10^6 CFU/g で、3 日目では 2.50×10^5 、 4.87×10^5 、 4.07×10^5 CFU/g であった。2 日目と 3 日目の菌数には有意差はなく、EA1 免疫群に比べ、有意に高い菌数を示した。各臓器中の菌数において、EA1 単独免疫群と EA1+PA 免疫群で有意な差が認められなかった。

C-3. A型ボツリヌス毒素重鎖 (A-Btx-C) の発現・精製

A-Btx-C を code する Recombinant plasmid DNA を発現用大腸菌、BL21(DE3) に導入して発現させて、発現した融合蛋白を Ni-NTA カラムで精製した。精製過程のサンプルの銀染色 (図 8 左、cell lysate、溶出分画 1、2、3) から問題なく精製することができた。更に、この精製サンプルの純度を上げるために、目的蛋白部分のゲルのみを切り出し、そのゲルから電気抽出法により目的蛋白の抽出を行った (図 8 右)。電気抽出前のサンプル (Before)

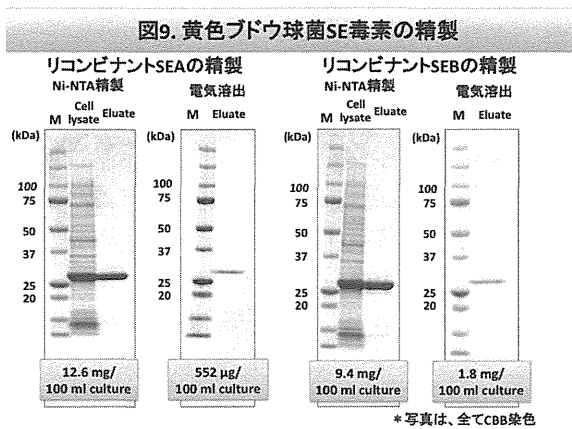
図8. A型ボツリヌス菌毒素重鎖C末端領域タンパクの精製



と比べ、55 kDa付近の不要な蛋白がなくなり、目的蛋白のみを抽出することに成功した。50 mlの培養液を出発材料とした場合、1.1 mgの目的蛋白が得られた。

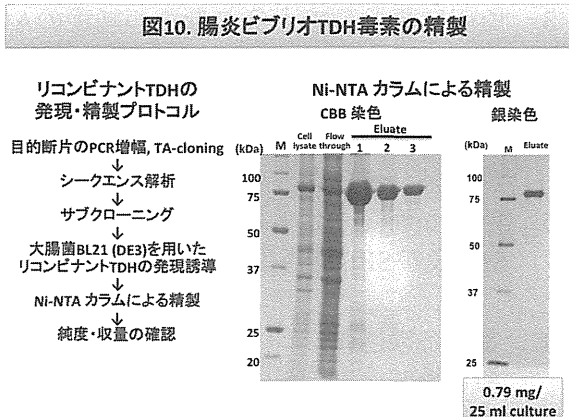
C-4. SEA及びSEBの発現・精製

SEAあるいはSEBをcodeするRecombinant plasmid DNAをそれぞれ大腸菌BL21 (DE3)に導入して発現させ、Ni-NTAカラムおよび電気抽出法で精製した。SEA、SEBともにCBB染色で1本のバンドとして泳動され、100 ml培養液からのそれぞれの回収量は0.552 mgおよび1.8 mgであった (図9)。



C-5. TDHの発現・精製

TDHをcodeするrecombinant plasmid DNAを発現系大腸菌、BL21 (DE3)に導入して発現させた。発現した融合蛋白をNi-NTAカラムで精製したところ精製分画の3番目 (図10)はCBB染色でも銀染色でも1本のバンドとして



泳動された。この精製法による目的蛋白の回収量は、25 mlの培養液から0.79 mgであった。

D. 考 察

D-1. 網羅的抗原・抗体検出系

本年度は、リシン検出系に応用するよりよい抗体を得るため、立体構造に変化のない可溶性 RTB 抗原の作製を試みた。種々の発現ベクターを検討した結果、C末に His タグを付加した場合、SDS-PAGE では該当する分子量に微弱なバンドが検出されたが、イムノブロットでは検出されなかったことから、His タグが分解されているか、CBB で検出されたバンドが目的タンパク質ではない可能性も考えられた。しかし、N末付加では4種類のシグナルペプチドのうち3種類で SDS-PAGE、イムノブロットとも発現が確認された。以上の結果から、今後は最も発現の強かった C タイプシグナルペプチドと N末に His タグを付加した発現ベクター導入株を用いて、培養をスケールアップし、rRTB の大量精製を行い、抗体作製を行う予定である。

D-2. 炭疽に対する粘膜ワクチンの開発

今年度の研究により、次の3つの知見を得た。1) EA1の経鼻投与は血中および粘膜中の特異抗体の産生を誘導した。2) 致死量の炭疽菌感染実験により、EA1免疫群では発症の遅延、生存率の改善が認められた。3) PAと組み合わせて免疫した結果、PA単独に比べ生存率は大きく改善され、全頭が生存した。4) EA1投与群では、感染初期の臓器中菌数が極めて少なかった。

これらの結果から、EA1の経鼻免疫は粘膜および全身免疫を刺激し、体内に侵入した炭疽菌を効果的に排除することで、感染個体における炭疽の発症を予防するものと考えられる。

炭疽菌の病原性は、芽胞の発芽、栄養体の増殖、毒素の産生、の3つの段階から成り立っている。炭疽菌は増殖速度が早く (倍加時間約10分)、血中に播種されると劇的に菌数が増加する。Weissらは、動物感染モデルにおいて菌血症の進行と同時に血中に高濃度のPAが検出されることを示しており、多数の菌によって産生された毒素が全身の

血流にのると毒血症による多臓器不全を引き起こして宿主は死に至ると考えられている。炭疽菌はシプロフロキサシンやドキシサイクリンなどの抗生物質に対し高い感受性を示すため、通常ヒトの炭疽の治療にはこれら抗生物質の混合投与が行われる。しかし、肺炭疽では発症後に抗生物質を投与しても高い致死率を示すため、炭疽菌に暴露後極めて早い段階に投与できない場合は生存率に大きく影響する。そのため、炭疽菌による健康危害を軽減するためには、暴露後の抗生物質治療より、ワクチンによる発症予防がより効果的と考えられている。

現行のヒト用炭疽ワクチンは炭疽菌が産生する毒素の一つである防御抗原(PA)を主成分としたものである。PAを主成分とするワクチンでは、産生された毒素の作用を阻害することができるが、芽胞の発芽や栄養体の増殖を防ぐことが難しい。そのため、炭疽菌の病原性発現に至る3段階を同時に標的とするようなワクチンの開発が望ましい。EA1による免疫が、芽胞及び栄養体に対する2重の防御効果が期待できるため、毒素作用を阻害するPA免疫と組み合わせることで多重的な防御効果が期待できる(図11)。

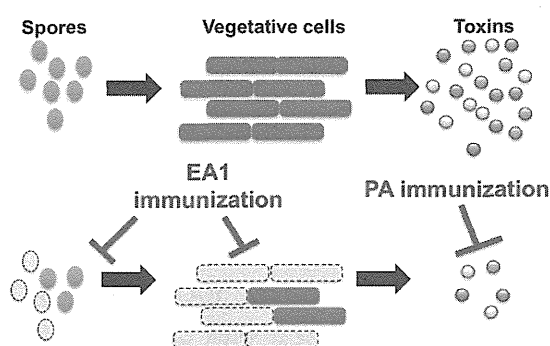


図11 EA1とPAによる混合粘膜免疫の作用点

EA1に対する免疫の誘導は炭疽の初期感染防御に重要であり、その後の病態に影響することを明らかにした。また、PAと組み合わせることでより高い防御効果が得られた。以上の結果は、炭疽菌に対して複数の要素をターゲットとすることが炭疽菌の効果的な感染防御には重要であることを示している。

また、これまでの侵襲性のワクチンで問題となっていた接種部での副作用及び接種

を簡便に行うために、非侵襲性の経鼻投与によりrEA1を用いてマウスを免疫した。経鼻免疫により、粘膜及び全身の免疫が誘導されていたことから、炭疽菌芽胞の侵入部位における感染防御が期待できる。

D-3~5. 蛋白毒素 (A型ボツリヌス毒素重鎖、SEA、SEB、TDH) の発現・精製

病原細菌が産生する蛋白毒素に対する免疫学的迅速同定法並びに診断法を構築するために各毒素の発現・精製を行った。前年度に構築したA-Btx-Cクローンは発現量が少なく十分な抗原量が確保できないため、新たなクローン (pColdクローン) を構築した。tdh遺伝子もpColdベクターにクローニングして発現させた。SEA及びSEBはpET28aにクローニングした。いずれのクローンも目的の融合蛋白を可溶性分画に大量に発現した。全ての発現した融合蛋白 (A-Btx-C、TDH、SEA、SEB) はNi-NTAカラム単独あるいはNi-NTAカラムー電気抽出法によりCBB染色あるいは銀染色で1本バンドになるまで精製できた。来年度はこれらの精製毒素に対する家兎あるいはモルモット抗血清を作製して、免疫学的迅速同定法並びに診断法を構築する。

E. 結論

1. 立体構造を保持した可溶性リシン発現系を構築した。
2. 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。
3. 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。
4. 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。
5. 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。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

1. Uchida M., Harada T., Enkhtuya J., Kusumoto

- A., Kobayashi Y., Chiba S., Shyaka A., Kawamoto K. Protective effect of Bacillus anthracis surface protein EA1 against anthrax in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012 421(2):323-8.
2. Kusumoto A, Miyashita M, Kawamoto K. Deletion in the C-terminal domain of ClpX delayed entry of *Salmonella enterica* into a viable but non-culturable state. *Res Microbiol* (in press).
 3. Masako Okamoto, Yasushi Kyutoku, Manabu Sawada, Lester Clowney, Eiju Watanabe, Ippeita Dan, Keiko Kawamoto. Health numeracy in Japan: measures of basic numeracy account for framing bias in a highly numerate population. *BMC Medical Informatics and Decision Making* (in press, 2012). 12(1):104
 4. Asakura H, Ekawa T, Sugimoto N, Momose Y, Kawamoto K, Makino SI, Igimi S, Yamamoto S. Membrane topology of *Salmonella* invasion protein SipB confers osmotolerance. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 (In press).
 5. 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*. 2012 5: 515-521.

H. 知的財産の出願・登録状況
特になし

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

「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と
検査担当者の育成」

研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所長
研究協力者	千葉 一樹	福島県衛生研究所
	小林 慎一	愛知県衛生研究所
	杉浦義紹	神戸市環境保健研究所
	山下育孝	愛媛県立衛生環境研究所
	飯塚 節子	島根県保健環境科学研究所
	小河正雄	大分県衛生環境研究センター
	三好 龍也	堺市衛生研究所

研究分担者	宮崎 義継, 田辺 公一	国立感染症研究所
研究代表者	倉根一郎	国立感染症研究所

研究要旨:

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。真菌属、なかでも *Coccidioides* によるバイオテロを含めた健康被害対応は極めて重要である。*Coccidioides* 同定スクリーニング検査検出キットを用いて、研究協力者が同定・検出評価を行った。幾つかの課題が浮かび上がったが、*Coccidioides* の同定を行うことが出来た。浮上した課題への対応、解決は今後の健康危機発災時に迅速に対応できる礎となる。

A. 研究目的

バイオテロによる健康危機は時、場所を選ばず発災する可能性がある。これまで、国におけるバイオテロ対策の一環として、この研究班を通して健康危機対応のモチベーションを高めてきた。2008年度米国における炭疽菌芽胞によるバイオテロ事件から発生した「白い粉事件」健康危機事例について地方衛生研究所の検査対応を調査し、果たした役割について改めて認識した。その後、バイオテロ関連特定病原体の中のウイルス、さらに細菌の網羅的スクリーニング検査検出キットの評価

を行った。昨年よりバイオテロ特定病原体、真菌類の同定スクリーニング検査検出キットの習熟を目的に *Candida albicans*、*Klebsiella pneumoniae*、*Cryptococcus neoformans* の予備的検査を試みた。地方衛生研究所ではルーチン検査として真菌を検査対象にしている機関は限られているためである。

また、バイオテロ対象の真菌類の中で *Coccidioides* はより強毒であり、無治療であれば、急性あるいは慢性の経過をとる播種型の致死率の50%以上より髄膜炎を伴えば致死率は100%に達する、と言わ

れている。

今回、国立感染症研究所作製の *Coccidioides* 検出キット(プロトコール)に則り、地衛研の客観的な検出技術の評価と共に、検出キットの相対的な評価を試みた。

B. 研究方法

国立感染症研究所生物活性物質部宮崎、田辺両先生から送付された真菌検出系プライマー、陽性・陰性コントロールと共に同定未決定の4検体を用いて、菌種名(菌属名)の決定を試みた。また、検査手順についても評価を試みた。遺伝子増幅機器や塩基配列決定機器、また試薬等は研究協力者が帰属し、常設されている機器・器具を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1) 用意された NL1/NL4 primer を用いて blind DNA 検体の検出成績

Sample 1 : 592bp

Aspergillus fumigatus と99%の相同性

Sample 2 : 568bp

Ajellomyces capsulatus と99%の相同性

Sample 3 : 676b

Cunninghamella polymorpha および *Cunninghamella bertholletiae* と99%の相同性

Sample 4 : 565bp

Coccidioides immitis および *Coccidioides posadasii* と99%の相同性
7研究協力者中5協力者が全てを検出することが出来た。1研究協力者はSample 2が、もう1つはSample 2 及び4が検出不能であった。

2) Coi9-1F/Coi9-1R primer を用いた検出成績

Sample 5 : 595bp (reverse primer側のみ解析可能)

Coccidioides posadasii および *Coccidioides immitis* と99%の相同性

4研究協力機関が検出することが出来た。

3) 真菌検査システムの評価にあたり各機関からのコメント

①

- ・ ITS 領域についても PCR 増幅をサンプル②、④、ポジコンで行ったところ良好な結果を得たので DNA 試料には問題がないと考えられた。
- ・ PCR 法を用いる場合、コンタミネーションが大きな問題となる。Positive control からのコンタミネーションを識別するために、外来遺伝子を挿入した Positive control の作製を検討してみてもどうか。
- ・ シークエンスの試薬、条件等について各機関で統一した方法を取り、検証する必要があると感じた。
- ・ 配布された検査試薬等の内容量が不明で、検査の遂行に戸惑いました。可能でしたら内容量を明記していただくと幸いです。
- ・ 送付された各プライマーは液量が各 3μl ずつしか入っていなかったため、シークエンス分が足りなかった。そのためこちらで必要なプライマーを用意した。後日プライマーが再送付されたが、今後は検査に十分な量の配布を要望します。

②

- ・ Sample 4 で Coi9-F primer のシークエンスは、何度繰り返してもコンタミのような結果となり、塩基配列をうまく読み取ることができなかった。しかし、Coi9-R primer のみでも *C. posadasii* と決定できた。
- ・ Coi9-1F を用いたシークエンスは、うまくいかなかった。
- ・ Coi9-1F/Coi9-1R の系では、Positive

control がなかったが、PCR の反応の確認のためにも Positive control は必要だと思う。

- PCR の結果としてサンプル④の Coi9 のバンドが薄く、PCR 条件の再検討が必要でないかと思われた。
- Coi9 については検出されたバンドが薄く、送付された試薬で行った結果と変わらなかった。
- PCR 産物は電気泳動で非特異増幅バンド等認められず、キットを用いた精製のみでシーケンス解析を行ったが、NL1/NL4 プライマー系では reverse 側が解析しづらく、Coi9-1F/Coi9-1R プライマー系では forward 側が解析できなかったことから、今後検討が必要と思われる。
- コクシジオイデス属 DNA 特異プライマー (Coi 9-1F/ Coi 9-1R) を用いた PCR 法では、陽性コントロール、ブラインドサンプル 4 検体とも増幅バンドが認められなかった。
- コクシジオイデス属特異プライマー Coi9-1F/Coi9-1R では *Coccidioides* であった sample4 のみで増幅が認められ、他の属である *Aspergillus*、*Ajellomyces*、*Cunninghamella*、*Candida* は増幅しなかった。

③

- Sample ②の PCR 産物が得られなかった理由として Ex Taq の酵素活性に問題があったのではないかと推測された
- サンプル②についてシーケンスを行い、得られた遺伝子配列で BLAST 検索を行ったところ、*Histoplasma capsulatum* の配列と 100% 一致した。ITS 領域によるサンプル④の照合では *C. posadasii* のみと 100% 一致した。
- Sample 3 の相同性検索の結果は、他の sample に比べて 99% 以上の相同性を示した Hit 数が少なく、信頼性に乏し

い結果であると思われる。(7 Hit 中 3 Hit が、*C. bertholletiae* であった。)

- Sample No.3 の D1/D2 LSU 領域の PCR 増幅産物は、他の Sample と比べて高分子量であった。
- サンプル④については D1/D2 領域での照合では *C. immitis* と *C. posadasii* の塩基の違いの差が少なく、Coi9 の遺伝子配列の照合による同定が必要であった。

④

- D1/D2 領域の PCR 増幅はすべてのサンプルでバンドが良好に認められた。
- 真菌の D1/D2 large subunit を増幅するプライマー NL1/NL4 では PC (*Candida albicans* genome DNA) および 4sample とも増幅が認められ、シーケンス後の BLAST 検索によって真菌の同定が可能であった。
- D1/D2 プライマーを用いた PCR 法では、ブラインドサンプル 4 検体中 3 検体で増幅バンドが確認された。
- 増幅バンドは、No. 1 と No. 4 及び PC は約 600bp、No. 4 は約 700bp の位置にみられた。バンドの位置は、想定されていた約 500bp とは異なっていた。

⑤

- 真菌の検査については不案内であるので、有事に備えての検査マニュアルの整備は是非とも必要である。
- 今後、実際の検体を扱う場合、どのような検体をどのように処理するのかなどもマニュアル化していただきたい

D. 考察

昨年度は、バイオテロ対象微生物の一つである真菌属の検査が迅速同定が行われることを目的として、真菌類の同定スクリーニング検査検出キットの評価を行う前に *Candida albicans*、*Klebsiella pneumoniae*、*Cryptococcus neoformans* の予備的検査の習熟を試みた。今年度は *Coccidioides* をターゲットにした同定ス

クリーニング検出キットを評価した。

新たな試みとして、今年度は2013. 2. 21 研究班会議に先駆けて、倉根研究代表者、宮崎研究分担者、田辺先生同席のもとに研究協力者会議を行った。

この目的は地方衛生研究所では真菌検査に馴染みがないこと、しかし、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をもとに、今回の検査結果について専門家からの助言を戴きながら、今後のバイオテロ対象真菌の同定ための意見交換である。

その意見総括する。

- (1). 全ての検体が同定できなかった機関があったが、技術的な課題なのかあるいは送付サンプルのdegradation等の有無について確認すべきである。
- (2). 細菌、ウイルス遺伝子が Kbase単位であるに比べ真菌のDNAは Megbaseであり、degradationしやすい点、さらに 標的 primer 等の reaction site(focus) がspecificになりにくい可能性。
- (3). whole genomeでspecificになる部位を検索する検討作業も必要。
- (4). 使用機器による検出感度等の差がある可能性は否定できない。場合によっては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。
- (5). 各機関に帰属する機器、試薬に高感度に対応するために 希釈段階別の資料の提供も検討。
- (6). 将来的には真菌検査の普及や健康危機対応のためには真菌レファレンスセンターを構築して地方衛生研究所のモチベーションを高めては。

この意見交換の中にも述べられているように、真菌類の同定検査にはまだいくつかのクリアしなければならない課題が含まれている。しかし、これらの課題は即改良可能な点が多く含まれている。しかし、最も大きな課題は、これらの検査を施行する地方衛生研究所側に多くの問

題を抱えている点である。その最たるものが人材である。今回の研究協力員は各地方衛生研究所でのウイルス検査、細菌検査を担当している研究員である。PCR等の遺伝子検査の習熟度は素晴らしいものがある。今回得られた成績も、技術的には大きな課題はなく、あるとすれば真菌検査の取扱いに馴れていない、という言葉に尽きると思われる。今回の研究協力者が各ブロックで核となり健康危機発災時のために研修伝達を行うことは必要不可欠である。加えて、後継者の育成、真菌検査に馴れる、と言う背景のもとに「真菌レファレンスセンター構築」の必要性は決して思い付きの発想ではなく、実現に向けた現実的な課題と考える。

来年度は、バイオテロのみならず *Coccidioides*による健康危機対策に向けて、完璧な同定技術を習得すべく上記の意見を基に総括したいと考える。

F. 健康危険情報

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。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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

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

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 感染症研究分野
研究協力者	西條 政幸	国立感染症研究所 ウイルス第一部
	井上 智	国立感染症研究所 獣医科学部
	谷口清洲	国立感染症研究所 感染症情報センター
	宮崎義継	国立感染症研究所 生物活性物質部
	河野 茂	長崎大学病院 第二内科
	國島広之	東北大学医学部附属病院 検査部
	加來浩器	防衛医科大学校 国際感染症学
	古谷信彦	文京学院大学保健医療技術学部・臨床検査学科
	藤井 毅	東京医科大学八 王子医療センター
	鯉淵智彦	東京大学医科学研究所附属病院 感染免疫内科

研究要旨 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。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）の最新情報の追加などを行い、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。

A. 研究目的

生物テロに用いられる可能性のある病原微生物は多彩で、その多くは極めて稀でかつ重篤な疾病を引き起こす。すなわち、感染拡大防止と生命予後改善のためには、生物テロ関連疾患の臨床診断、検査材料および検査方法の選択、治療法の選択について、多くの医療従事者が正確な知識を、インターネットなどを通じて手軽に得られることが大切である。本研究においては、最新のデータに基づいた、インターネット上で広く利用できる臨床診断および治療マニュアルの作成をおこなった。その内容を入れた CD-ROM を作成・配布や、新

たに立ち上げた改訂専用のホームページを通じて、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。新たな疾患も追加して、より内容の充実した、使いやすいマニュアルを作成し、最終的に一般の医療従事者にとっても有用なホームページを公開することを目的とする。

B. 研究方法

すでに作成していた 15 種類のバイオテロ関連疾患に加えて、新たに追加作成した 20 疾患に関するマニュアルの編集および、病原体の管理や輸送に関する最新の情報を追加・

修正作業を実施した。

(倫理面への配慮)

特になし

C. 研究結果

2010年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) 野兎病の各項目について、アンケート調査等によって全国から寄せられた意見を参考して細かな修正をおこなうとともに、最新の情報を追加してきた。しかし、これらの15疾患のみではバイオテロに利用される可能性のある病原微生物を十分に網羅していないことが指摘されたことを受け、昨年度より新たな疾患として、(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、全国から選定した感染症専門家に執筆作業を依頼した。今年度初めにすべての原稿が完成したため、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。

D/E. 考察・結論

バイオテロに利用される恐れのある病原微生物によって引き起こされる疾患は、現在のわが国ではみることのないものがほとんどであり、臨床医の多くがそれらの病態に対する

知識はなく、また診療疾患対象としての関心も有していないのが現状であると思われる。一方で、病原診断法やワクチンの開発に関しては、主に基礎系の研究者によって研究開発が国内外で行われている。したがって、本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。国内のインフェク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結果に基づく改訂作業に加え、今年度は全国の感染症専門家によって組織された研究協力者からの意見を参考した改訂作業を実施した。これにより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。診断支援ツールの一環として、ホームページの整備が必要な状況はこれからも続くと考えられる。今後とも最新の情報を追加し、利用者の利便性を考えたホームページの改善を目指す必要がある。

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

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

各医療機関のバイオテロ対策を支援するための方策

研究分担者 松本 哲哉 東京医科大学微生物学講座 教授

研究要旨 現在、国内の医療機関は感染防止対策加算の新設によって院内感染対策の充実にさらに努力するようになり、医療機関の連携も積極的に行われるようになってきた。しかし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、今年度、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感染対策を実施することを検討している。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今年度は、第101回日本病理学会総会、および第11回関東深在性真菌症研究会において、それぞれバイオテロをテーマとした講演を行った。

A. 研究目的

いまだに世界の各地域において、政情が不安定な地域を中心に内部紛争が続き、さらに宗教に絡んだ争いも頻発している。それに伴い、発展途上国のみならず、どの国においてもテロ行為の脅威に曝されており、警戒のレベルを高めている。

平成13年に策定された『NBCテロ等大量殺傷型テロ事件発生時の政府の基本的対処とNBCテロの特殊性を踏まえた被害管理の措置を定めた対処計画（内閣危機管理監決裁）』においては、「NBCテロ事件に対し、政府は、人命の尊重に配慮しつつ、法秩序の維持のため断固たる態度をもって臨むものとし、迅速に人命救助と事件の解決に向けた措置を執るとともに、被害の拡大防止、再発防止と社会不安解消のため、最大限の努力を払うものとする」と明記されている。さらに「関係省庁等は、本対処計画に定める事項の実施に関し、別に定める役割分担に従い、予め所要の体制整備を推進するとともに、大量殺傷型テロ事件が発生し又は発生するおそれがある場合には、相互に連携・協力し必要な対処を行うものとする」と記載されている。

NBCテロ(Nuclear/Biological/Chemical terrorism)に含まれる放射性物質、感染性生物、化学物質を用いたバイオテロに対する対策は、いずれも事前の準備が重要であり、それぞれ想定される状況を考慮した対応が必要となる。ただしバイオテロの場合、用いられる可能性のある病原体は多種類に及び、その使用形態や、発生後の広がりや被害についても具体的に想定するのは困難である。

バイオテロが起こった際に想定される状況が多様であるため、必要な準備に関する明確な指標や基準が定められておらず、各医療機関も具体的に何を準備すべきかについて混乱が生じている。そこで本研究においては、各医療機関が今後、バイオテロに対する準備を行う上で必要なガイドラインを作成することを目的にしている。

さらに実際に各医療機関に準備を行ってもらうために、バイオテロに関する啓発活動も併せて行っていくことも目的にしている。

B. 研究方法

バイオテロに関する国内外の各種資料を手し、それらを参考にして日本の医療現場の

現状に合わせたガイドラインの基本骨格を作成した。

さらに第 101 回日本病理学会総会 病理診断講習会、および第 11 回関東深在性真菌症研究会において、それぞれバイオテロをテーマとした講演を行った。

C. 研究結果

1) 医療機関におけるバイオテロ対策ガイドラインの作成

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いる。

ガイドラインの骨格とその主な内容としては、下記に挙げるような項目を検討している。

表 1. バイオテロ対策ガイドラインの骨格

①バイオテロの定義、	④バイオテロの初期対応
②バイオテロに用いられる病原体	⑤病原体の確認と検査
③バイオテロの検知と認識	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
⑧病棟における対応	⑨バイオテロ時に想定される状況
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、
⑩他の医療機関との連携、	⑪自治体、警察、消防との連携
⑪自治体、警察、消防との連携	

① バイオテロの定義 バイオテロ (bioterrorism) は、ウイルスや細菌、真菌等、ヒトに害を及ぼす病原体、及びそこから毒素等 (以下病原体等) を用い、無差別に大量のヒトを殺傷しようとする行為である。	⑦ 外来における対応 感染が疑われる患者は他の患者と離れた場所に待機させ、換気の良い場所を外来用の診察場所にあて、X線の撮影もなるべくポータブルを用いて共用部分の汚染を防ぐ
② バイオテロに用いられる病原体 バイオテロに应用される可能性が高い疾患として下記の病原体が挙げられるが、バイオテロに应用可能な病原体は、CDC や WHO の資料に基づく 40 種類以上の病原体がリストアップされる。	⑧ 病棟における対応 病原体の種類が不明の場合は、できれば陰圧個室に患者を収容する。入室するスタッフは最低限に制限し、患者の排泄物等は厳重に管理して廃棄する。必要に応じて環境面の消毒を行う。
③ バイオテロの検知と認識 バイオテロであることを認識するために	⑨ バイオテロ時に想定される状況

は、健常人にもかかわらず急激に進行して死亡する例の発生や、原因不明の発熱や重篤な状態の患者が一部の地域に多発した場合にバイオテロを想定する必要がある。

- ④ バイオテロの初期対応
炭疽が考えられる場合は、シャワーなどによって洗い流すとともに、衣服等を厳重に処理する。咳などを訴える場合は、マスクを装着させ、物理的に他の患者と引き離して管理する。
- ⑤ 病原体の確認と検査
多くのバイオテロの病原体は、医療機関における検査室で最終確認を行うことは困難であり、国立感染症研究所などに相談の上、確定を行う。
- ⑥ 病原体別にみた感染予防策
病原体の種類に応じて、表 2 に示すような各種感染予防策が行われる。

表 2. 各種病原体の感染予防策

【標準予防策にて対応可能】
・炭疽、鼻疽、類鼻疽、野兔病、コクシジオイデス症、ボツリヌス毒素中毒など
【飛沫感染予防策】
・天然痘、SARS、高病原性インフルエンザなど
【接触感染予防策】
・ペスト、ウイルス性出血熱、コレラ、サルモネラ感染症、EHEC 感染症など

バイオテロが発生した際は、その規模にもよるが範囲が広い場合は下記のような問題が生じる可能性がある。

表 3. バイオテロ時に想定される状況

多数の重症患者の増加
外来患者の増加
医療スタッフの減少
医療スタッフの感染
情報不足、デマなどによる混乱
医薬品や関連物資の不足
通常の診療内容への制限
指揮系統の混乱
ライフラインの障害
犯罪の増加

- ⑩ 他の医療機関との連携
外来や入院患者が増加した場合は、他の医療機関と連携して患者の振り分けや、診療に関する情報交換などを行う。
- ⑪ 自治体、警察、消防との連携
バイオテロの際には社会的な混乱を生じる可能性が高く、行政機関、警察、消防など、各種機関との連携が必要である。

D. 考察

各医療機関においては、診療改定に伴う感染対策に対する加算の実施に伴い、院内感染対策に関する関心が高くなるとともに、その対策も人的および設備等の面からも充実してきている。その背景には各種耐性菌やインフルエンザ、ノロウイルスなどによるアウトブレイクを多くの施設が経験し、それに伴って生じる多大な損害や苦労を実感していることも要因となっていると考えられる。

その一方で、バイオテロに対しては、起こり得るかもしれないが、身近なこととしては考えにくく、その対策を積極的に行う程の認識には至っていないというのが現状である。確かに国内の医療機関の現状を考えると、差し迫った院内感染対策の充実が責務であり、バイオテロ対策に十分な資源や労力をつぎ込む余裕は認められない。

国や自治体では現在、高病原性インフルエ

ンザのパンデミックなどを想定した対策も積極的に進めている。特に各医療機関においては、BCP (business continuity plan: 事業継続計画) の作成が義務づけられ、職員の多くが勤務できない状況における対応策の検討が行われている。

さらに東日本大震災の後で、衛生環境が悪化し、避難所などにおいて感染症の流行が認められたことから、災害対策における感染対策の重要性も認識されるようになってきている。

上記の高病原性インフルエンザ対策や災害対策は、バイオテロや院内感染対策と若干、趣旨は異なるが、感染の流行に対する対応、という点では共通であることから、一緒に行える対策はまとめて行うことで、効率的に準備を進めることができ、かかる費用についても軽減化が可能であると考えられる。

具体的には、院内のアウトブレイク対策の基本となっている、標準予防策、接触感染予防策、飛沫感染予防策、空気感染予防策の考え方はバイオテロの病原体に当てはめて考えることが可能であり、院内に患者が入院した際の対応も各病原体の伝播形式に合わせて対応を取ることができる。

さらに高病原性インフルエンザを想定して検討されている事業継続計画 (business continuity plan: BCP) の作成は、想定される状況を変更すればバイオテロの際にも利用可能である。

また、新型インフルエンザの流行の際に各医療機関で問題となった PPE (個人防護具) については、マスク (サージカルマスク、N95 マスク)、手袋 (化学防護手袋、ラテックス手袋)、防護服、シューズカバーなどが含まれるが、その多くは他の病原体に対しても利用可能であり、個別に準備すると費用も膨らみや保管場所も必要になることから、共用することで簡素化が可能である。

薬品については、備蓄用のタミフルは自然発生的に起こった新型インフルエンザだけでなく、バイオテロとして拡散された高病原性インフルエンザに対しても利用可能と思われる。

今後、ガイドラインが完成したとしても各医療機関にそれが広く周知され、さらに実際

にバイオテロ対策に用いられるようになるには、併せて啓発活動も重要になると思われる。

すでに本研究班においては、岩本愛吉先生を研究分担者とするグループにおいて、バイオテロ対策ホームページが作成され、運用されていることから、このホームページを紹介した一般への情報開示も検討すべきであると考えられる。

さらに医療従事者への啓発活動も重要な課題になると思われるため、昨年度は日本環境感染学会でバイオテロをテーマとした教育講演を実施し、さらに今年度は日本病理学会総会、および関東深在性真菌症研究会において講演を行った。さらに各種の学会等において、バイオテロに関連した企画を取り上げてもらったり、講習会を開催することについても検討する予定である。

医療機関同士の連携については、平成 24 年度の診療報酬改定によって加算 1 および加算 2 を算定される医療機関同士が年 4 回以上、合同のカンファレンスを開催することが義務づけられた。これにより各地域の医療機関同士の連携はかなり進むことが期待される。バイオテロについてもこの連携を活用し、対策面の向上を図ることが期待される。

E. 結論

各医療機関がバイオテロ対策を実施する上での参考となるガイドラインの作成を計画し、今年度はその骨格について検討を行った。さらに医療従事者の認識をさらに深めても

らうための方策として、日本病理学会総会、および関東深在性真菌症研究会においてバイオテロに関する講演を行った。今後ガイドラインが完成した際は、本研究班の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進めるとともに、そのフィードバックを受けて検討を重ねていく予定である。

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) 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)

2) 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)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

特許取得なし

2. 実用新案登録

登録なし

3. その他

なし