

201318007A

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25年度 総括・分担研究報告書

平成26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25年度 総括・分担研究報告書

平成26年 3 月

研究代表者 倉 根 一 郎

(国立感染症研究所)

平成25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 真菌部	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	帯広畜産大学 畜産衛生学研究部門	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
西條 政幸	国立感染症研究所 ウイルス第一部	部 長
中村 修	慶應義塾大学 環境情報学部	教 授

目 次

I. 総括研究報告書（平成 25 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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・15
研究分担者：森川 茂（国立感染症研究所 獣医科学部）

2. 炭疽に対する迅速検査、消毒、その標準化等に関する研究・・・・・・・・・・25
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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・31
研究分担者：見理 剛（国立感染症研究所 細菌第二部）

3. リケッチア・コクシエラ・クラミジアの迅速検出法の開発
Q熱コクシエラ(*Coxiella burnetii*)のゲノム解析による基盤情報の整備・・・・・・・・37
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
*Coccidioides*のLAMP法による高感度検出系の構築・・・・・・・・・・・・・・43
研究分担者：宮崎 義継（国立感染症研究所 真菌部）

6. 鼻疽・類鼻疽の迅速診断法に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・49
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・・・・・・55
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 迅速 <i>in situ</i> hybridization AT-tailing 法による新興・再興感染症ウイルス の検出	63
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	69
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	73
研究分担者：倉園 久生（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と検査 担当者の育成	87
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. 原因不明感染症の診断法に関する研究	101
研究分担者：西條 政幸（国立感染症研究所 ウイルス第一部）	
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。バイオテロ対策として、病原体の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。また、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。特に、本年度は新たに重症熱性血小板減少症候群（SFTS）をホームページに追加し、また日本紅斑熱も加えた。これにより一種から三種病原体のすべてを網羅した。

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
中村修：慶応義塾大学 教授
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
梅山隆：国立感染症研究所
江崎孝行：岐阜大学
影山努：国立感染症研究所
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
小川基彦：国立感染症研究所
小林慎一：愛知県衛生研究所
奥谷晶子：国立感染症研究所
片野晴隆：国立感染症研究所
川本恵子：帯広畜産大学
鯉渕智彦：東京大学医科学研究所
小林慎一：愛知県衛生研究所
佐藤由子：国立感染症研究所
佐藤正明：国立感染症研究所
下島昌幸：国立感染症研究所
白戸憲也：国立感染症研究所
鈴木忠樹：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
竹内史比古：国立感染症研究所
谷英樹：国立感染症研究所
谷口怜：国立感染症研究所
千葉一樹：福島県衛生研究所
中内美名：国立感染症研究所
中島典子：国立感染症研究所
長谷川秀樹：国立感染症研究所
福士秀悦：国立感染症研究所
福間藍子：国立感染症研究所
藤井毅：東京医科大学
松山州徳：国立感染症研究所
三好龍也：堺市衛生研究所
山下明史：国立感染症研究所
山下育孝：愛媛県立衛生環境研究所
吉河智城：国立感染症研究所

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まだまだ十分ではない。

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、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) 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發展させ、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のリコンビナント NP に強く反応し、新種のアレナウイルスであるルジョウイルス、ルナウイルスにも強く反応することが明らかになった。Authentic ウイルス抗原を用いた検討でも、抗 peptide 311-324 抗体旧世界アレナウイルスである MOPV, MOBV および、新世界アレナウイルスである Candid#1 に反応した。

(2) 炭疽菌の治療薬に関する研究：炭疽菌の治療薬は、シプロフロキサシンおよびドキシサイクリンなどの抗生剤が使用可能であるが、人為的な薬剤耐性菌の出現に対する備えのため、新たな作用機序をもつ抗菌物質の探索が重要である。生体由来や食品由来の抗菌物質の中で炭疽菌の「芽胞」「栄養型」「莢膜」のそれぞれの菌形態に効果のある抗菌物質の候補として Anti Microbial Peptides (抗菌性ペプチド) の抗菌効果を検証した。また、同じく抵抗性を犬由来 AMP も検討した。炭疽感受性動物である牛、山羊、羊由来 AMP とヒト、マウス由来の AMP を人工合成してそれらの抗菌効果を検討したところ、豚由来の Protegrin-1 が最も高い抗菌効果を示した。

(3) ボツリヌス菌・毒素(BoNT)の検査法の改良:

ボツリヌス毒素(BoNT)を迅速簡便に検出するために、SNAP25とsynaptobrevinを連結した組換えタンパク質を作製した。これを使用した検出法では、全ての血清型のBoNTの検出が可能であり、精製BoNTの場合A型、E型で数マウスLD₅₀/ml、E型、F型で数十マウスLD₅₀/ml程度の量を3時間以内に検出することができた。この方法は精製BoNTに対してはマウス法に匹敵する検出感度を示すが、検体に夾雑物が存在する場合、検出感度が大きく低下することから、今後この点の改良が必要である。

(4) リケッチア・コクシエラ・クラミジアの迅速検出法の開発: Q熱コクシエラ(*Coxiella burnetii*)のゲノム解析による基盤情報の整備:

C. burnetii NM-NIIDおよびTK-1ともにコクシエラのゲノムサイズと同等のアセンブルが問題なく可能であった。これらの情報を登録されているNine Mile I相菌(RSA493)の完全長のゲノム配列に沿ってcontigを並び替え、比較解析を行ったところ、SNPs系統樹解析では、比較解析した3つの*C. burnetii*のゲノムは極めて近いクラスターに収束したが、同じ由来とされるNM-NIIDとI相菌(RSA493)では、112の塩基置換があり、II相菌においてはpQpH1が欠落していた。TK-1は、国内で初めて自然発症者から分離された菌株であるが、Nine-Mile株と近縁であるものの、Nine-Mile株II相菌(NM-NIID)とは塩基置換数が225箇所存在した。全長で見ると、3

つのゲノム配列は高度に保存されているものの、NM-NIIDでは複数の核酸代謝系の領域が欠失していたり、さらにTK-1株ではpseudogene領域の変異と欠失、prophage領域の変異も見られた。

(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: *Coccidioides*のLAMP法による高感度検出系の構築:

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*, *C. posadasii*)、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ヒストプラズマなどの高病原性真菌DNAの検出法を検討し、より簡便で成績の良いDNA検出法を開発し、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、LAMP法によるコクシジオイデスおよびヒストプラズマDNAの高感度検出系を確立した。

(6) 鼻疽・類鼻疽の迅速診断法開発:

B. pseudomallei, *B. mallei*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。地方衛生研究所等で検査が可能であるように、普及している核酸検出法での確立をめざし、LAMP(Loop-mediated isothermal amplification)法を選択した。*B. pseudomallei*と*B. mallei*のLAMP法は前年度までに基礎検討が終了した。今年度は、

検査時にこの *B. pseudomallei* の LAMP 法を既報の検出法に加えて実施し、性能の比較検討を行った。既報の検査法と判定結果は同じであった。また、我々の LAMP 法は既報の LAMP 法よりも感度がよく、判定もクリアであった。過去の保存検体を用いた検討では過去の判定と同じ判定結果が得られた。

(7) 原因不明感染症の診断法に関する研究：

不明病原体による感染症発生の際に、EU、米国等の感染症研究機関でどのような診断体制でどのような対応を行うか、また各国の診断技術について情報交換を行うため、GHSAG Unknown Pathogen Workshop (不明病原体感染症診断技術に関するワークショップ)に参加した。本ワークショップでは、事前に不明病原体感染症発生のシナリオと不明病原体を含む検体を各国に送付し、各国の感染症研究機関で行った検査結果について報告しあう形式で行われた。不明病原体に関する診断アルゴリズムが整備されており、対応部局が明確にされていた国もあった。日本は感染研において病原体検出を試みたが、検体輸送の遅延の問題および、不明病原体の輸入が不可能であったことから正確な病原体検出成績が得られなかった。不明病原体の検査には次世代シーケンサーが必ず用いられるようになったが、機種、手法、リード数が多様である。ランニングコスト、所要時間も考慮しなければならない。このため、各国の次世代シーケンサーによる検査結果データを共有し、効率的な検査の構築に役立てていくことになった。

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に対する確か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かなアプローチの一つである。次世代型網羅的病原体検査法の骨格が既に構築済みであり、国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターで検査可能であるが、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。感染研・ゲノムセンターでは現場（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) を開発し Web 情報解析サービスを開始した。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な利便性を考えて作成した。また、バイオテロ病原体の臨床分離株のゲノム情報を活用し、ゲノムワイドな SNPs 検索と分子系統樹作成も可能にするシステム Global core-Genome SNPs Analysis (GcoGSA)を開発し、現在、炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) のみ Web 解析サービスを開始した（関係者のみの運用予定）。順次、他カテゴリーA 病原体であるペスト菌、野兔病菌、コクシエラ、類鼻疽菌、ボツリヌス菌のゲノム情報を用いた GcoGSA を展開する。

(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。天然型リシンの認識が可能と思われる抗リシン B サブユニット特異抗体を作製した。マウス肺炭疽モデルにおいて EA1 は現行ワクチンの主成分である PA 単独に比べ優れた防御効果を示した。粘膜中の EA1 抗体価を維持するためには 2-3 ヶ月毎の追加免疫が必要である。コレラ毒素に対して特異性の高いイムノクロマト法を開発した。腸管出血性大腸菌感染症患者便から免疫学的迅速同定法(Bead-ELISA 法)により直接、シガ様毒素の検出を行った。現場や野外で使用できる迅速・簡便な核酸クロマト法を開発した。

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：

迅速 *in situ* hybridization-AT tailing 法は、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。これを用いて重症熱性血小板減少症候群ウイルスを実際のヒト剖検病理組織切片上で検出した。また中東呼吸器症候群コロナウイルスの *in situ* 検出系も国内ヒト感染例の発生に備えて確立した。新しいウイルス感染症を特異的に検出する病理学的方法を新たに開発した。

(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。

検査従事者の教育訓練法の一つとして平成 23~25 年度に参加した 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を総括し、その利用法について考察した。過去 3 回の EQA-EMV で合計 18 サンプルを検索したが、うち 1 サンプルが誤答であった(フラビウイルス)。しかしながら、このサンプルはサンプル自体が不適当とされ評価から除外された。よって、3 回とも評価対象に関しては 100%の正答率であり診断技術は良好と高い評価がなされた。

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の可能性のある真菌属、なかでも *Coccidioides* によるバイオテロを含めた健康危機対応のため、(1). に病原体検出技術向上を計った。各ブロックの研究協力者が技術的な指導的立場の構築のため、検査技術の習熟・徹底を目指し実技研修を行った。(2). これらの実技研修から得られた技術・知識を、真菌検査に馴染みのない地方衛生研究所がバイオテロ対象真菌検査に取り組める事を目的とした真菌検査マニュアルの作成を行った。

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。昨年度までに、感染症法に基づく特定病原体等のうち、一種、二種および三種に含まれる計 35 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、今年度は新たに特定病原体等に指定された重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) を含む 2 疾患を追加した。これにより一種から三種の病原体すべてと四種病原体の大部分を網羅した。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具体的方法を検討した。具体的には、2010 年までに本研究において作成していた 15 疾患 ((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、さらに 2011~12 年には 20 疾患 ((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) を追加した。今年度は、2013

年に新たに感染症法に基づく特定病原体 (三種病原体等) に指定された重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) をホームページに追加し、また、三種病原体等の中で掲載がなかった日本紅斑熱リケッチアも加えた。これにより一種から三種病原体のすべてを網羅した。

(2) 各医療機関のバイオテロ対策を支援するための方策：

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。国内の医療機関の多くは感染防止対策加算の新設に伴い、院内感染対策にさらに力を注ぐようになっている。しかしバイオテロに関する準備状況はまだ十分とは言えず、さらなる対応策が必要と考えられる。そこで本研究においては、医療機関向けのバイオテロ対策のガイドラインを作成し、具体的な対策の指針を示すことを主な目的としている。昨年度の研究では、バイオテロ対策ガイドラインの基本骨格を作成し研究班における意見を求めた。今年度は高病原性インフルエンザ対策に向けた BCP 作成のガイドライン等を参考にして、さらにたたき台となる案を作成した。

D. 考察

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

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。

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ものが多く、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。今年度は、2013年に新たに感染症法に基づく特定病原体（三種病原体等）に指定された重症熱性血小板減少症候群（SFTS）をホームページに追加し、また、三種病原体等の中で掲載がなかった日本紅斑熱リケッチアも加えた。これにより一種から三種病原体のすべてを網羅した。

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. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 英文発表

Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, Ishido A,

- Shigeoka T, Tominaga T, Kamei T, Honda M, Ninomiya D, Sakai T, Senba T, Kaneyuki S, Sakaguchi S, Satoh A, Hosokawa T, Kawabe Y, Kurihara S, Izumikawa K, Kohno S, Azuma T, Suemori K, Yasukawa M, Mizutani T, Omatsu T, Katayama Y, Miyahara M, Ijuin M, Doi K, Okuda M, Umeki K, Saito T, Fukushima K, Nakajima K, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Fukuma A, Ogata M, Shimojima M, Nakajima N, Nagata N, Katano H, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Yamagishi T, Oishi K, Kurane I, Morikawa S, Saijo M. The First Identification and Retrospective Study of Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome in Japan. *J Infect Dis.* Dec 12. 2013.
- Arai S, Nguyen ST, Boldgiv B, Fukui D, Araki K, Dang CN, Ohdachi SD, Nguyen NX, Pham TD, Boldbaatar B, Satoh H, Yoshikawa Y, Morikawa S, Tanaka-Taya K, Yanagihara R, Oishi K. Novel Bat-borne Hantavirus, Vietnam. *Emerg Infect Dis.* 2013 Jul;19(7):1159-61.
- 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.* 2013, 87(2): 1105-1114
- Sakai K, Yoshikawa T, Seki F, Fukushi S, Tahara M, Nagata N, Ami Y, Mizutani T, Kurane I, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Komase K, Morikawa S, Takeda M. Canine distemper virus associated with a lethal outbreak in monkeys can readily adapt to use human receptors. *J Virol.* 87(12):7170-7175. 2013.
- Andoh M, Andoh R, Teramoto K, Komiya T, Kaneshima T, Takano A, Hayashidani H, Ando S: Survey of *Coxiella burnetii* in ticks collected from dogs in Japan. *J Vet Med Sci,* 75(8):1115-1117, 2013
- Umeyama T, Ohno H, Minamoto F, Takagi T, Tanamachi C, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Kishi K, Fujii T, Takemura H, Watanabe H, Miyazaki Y. Determination of epidemiology of clinically isolated *Cryptococcus neoformans* strains in Japan by multilocus sequence typing. *Jpn J Infect Dis.* 2013, 66(1):51-5.
- Mihara T, Izumikawa K, Kakeya H, Ngamskulrungrroj P, Umeyama T, Takazono T, Tashiro M, Nakamura S, Imamura Y, Miyazaki T, Ohno H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S. Multilocus sequence typing of *Cryptococcus neoformans* in non-HIV associated cryptococcosis in Nagasaki, Japan. *Med Mycol.* 51:252-260, 2013.
- Okubo Y, Wakayama M, Ohno H, Yamamoto S, Tochigi N, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Umeyama T, Shinozaki M, Nemoto T, Nakayama H, Sasai D, Ishiwatari T,

- Shimodaira K, Yamamoto Y, Kamei K, Miyazaki Y, Shibuya K. Histopathological study of murine pulmonary cryptococcosis induced by *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. *Jpn J Infect Dis.* 66:216-221, 2013.
- Okubo Y, Tochigi N, Wakayama M, Shinozaki M, Nakayama H, Ishiwatari T, Shimodaira K, Nemoto T, Ohno H, Kaneko Y, Makimura K, Uchida K, Miyazaki Y, Yamaguchi H, Shibuya K. How Histopathology Can Contribute to an Understanding of Defense Mechanisms against Cryptococci. *Mediators Inflamm.* 2013:465319, 2013.
- Ohno H, Tanabe K, Umeyama T, Kaneko Y, Yamagoe S, Miyazaki Y. Application of nested PCR for diagnosis of histoplasmosis. *J Infect Chemother.* 19:999-1003, 2013.
- MePIC, Metagenomic Pathogen Identification for Clinical Specimens. Fumihiko Takeuchi, Tsuyoshi Sekizuka, Akifumi Yamashita, Yumiko Ogasawara, Katsumi Mizuta, and Makoto Kuroda. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 67: 62-65, 2014
- 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.* 26, 357-369, 2013
- Hayashi M, Natori T, Kubota-Hayashi S, Miyata M, Ohkusu K, Kawamoto K, Kurazono H, Makino S, Ezaki T. A new protocol to detect multiple foodborne pathogens with PCR dipstick DNA chromatography after six-hour enrichment culture in a broad-range food pathogen enrichment broth. *Biomed Research International.* 2103: 295050, 2013.
- Eiki Yamasaki, Ryuta Sakamoto, Takashi Matsumoto, Fumiki Morimatsu, Hiroko Toyoi, G. Balakrish Nair, Hisao Kurazono and Takayuki Kurazono: Development of an immunochromatographic test strip for detection of cholera toxin. *Biomed Research International.* 2103: 679038, 2013.
- Sato N, Sugiura Y, Nukuzuma S, Udagawa S, Tanaka, T. Two rare contaminants, *Helicostylum pulchrum* and *Scopulariopsis flava*, found in a white natural cheese, and the effect of their presence. *Jpn J Fd Microbiol.* 30:15-20, 2013.
- Yoshikawa T, Saijo M, Morikawa S. Emergence of zoonotic orthopox virus infections. In *Viral Infections and Global Change* (ed. Sigh SK), pp377-387, 2014, Wiley Blackwell, New Jersey
- 2) 和文論文
町田安孝, 福島康次, 三好祐顕, 小原一記,

池田康紀, 亀井克彦, 宮崎義継, 福田 健.
経気管支鏡肺生検および気管支肺胞洗浄にて診断された慢性肺コクシジオイデス症の1例. 日本呼吸器学会雑誌. 2:274-278, 2013.

大野秀明, 金子幸弘, 田辺公一, 梅山 隆, 宮崎義継. *Cryptococcus gattii* 感染症 - 新興・再興感染症 up to date-. 化学療法の領域. 29 S-1:1144-1151, 2013.

大野秀明, 宮崎義継. 真菌性脳髄膜炎の遺伝子診断. 臨床神経学. 53:1191-1193, 2013.

2. 学会等発表

1) 国際学会

Kamei K, Watanabe A, Yaguchi T, Muraosa Y, Toyotome T, Ohno H, Miyazaki Y. Epidemiology of imported mycoses in Japan-its past and the present status. 28th International Congress of Chemotherapy and Infection. June 5-8, 2013.

2) 国内学会

吉河智城, 福士秀悦, 谷英樹, 宇田晶彦, 谷口怜, 福間藍子, 前田健, 高橋徹, 森川茂, 下島昌幸, 西條政幸 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の確定診断に使用されるコンベンショナル PCR の評価、及びリアルタイム定量PCR 戸の比較 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10-12日、神戸

福間藍子, 福士秀悦, 谷英樹, 吉河智城,

谷口怜, 下島昌幸, 森川茂, 前田健, 西條政幸 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の血清学的診断法の開発 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10-12日、神戸

長谷川秀樹, 亀井敏昭, 高橋徹, 鈴木忠樹, 片野晴隆, 中島典子, 福士秀悦, 下島昌幸, 前田健, 水谷哲也, 森川茂, 西條政幸 日本国内で発生した重症熱性血小板減少症候群の1剖検例 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10-12日、神戸

西條政幸, 高橋徹, 前田健, 水谷哲也, 大松勉, 吉河智城, 谷英樹, 福士秀悦, 下島昌幸, 福間藍子, 緒方もも子, 鈴木忠樹, 中島典子, 片野晴隆, 永田典代, 長谷川秀樹, 山岸拓也, 倉根一郎, 森川茂 後方視的に重症熱性血小板減少症候群と診断された11名のウイルス学的・臨床的・疫学的研究 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10-12日、神戸

森川茂, 木村昌伸, 福士秀悦, 福間藍子, 加来義浩, 朴ウンシル, 谷英樹, 吉河智城, 井上智, 今岡浩一, 下島昌幸, 西條政幸, 前田健 SFTS ウイルス抗体陽性動物の調査 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10-12日、神戸

谷口怜, 福士秀悦, Masangkay Joseoh, 渡辺俊平, 大松勉, 下田宙, 前田健, 福間藍子, 吉河智城, 谷英樹, 下島昌幸, 西條政幸, 明石博臣, 吉川泰弘, 久和茂, 森川茂 フィリピンのコウモリからの重症熱性血小板減少症候群ウイルスに反応する抗体の検

出 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、
2013 年 11 月 10-12 日、神戸

宇田晶彦、福士秀悦、加来義浩、吉河智城、
下島昌幸、新倉綾、井上智、安藤秀二、前
田健、西條政幸、森川茂 マダニからの SFTS
ウイルス遺伝子の検出 第 61 回日本ウイ
ルス学会学術集会、2013 年 11 月 10-12 日、
神戸

下島昌幸、福士秀悦、谷英樹、吉河智城、
福間藍子、谷口怜、前田健、高橋徹、西條
政幸 重症熱性血小板減少症候群ウイルス
に対する ribavirin の in vitro 増殖抑制効
果 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、
2013 年 11 月 10-12 日、神戸

新倉綾、福士秀悦、森川茂、山田靖子 リ
フトバレー熱ウイルス L 蛋白のポリメラー
ゼ機能における C 末端領域の重要性 第 61
回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11
月 10-12 日、神戸

福士秀悦、谷英樹、吉河智城、谷口怜、福
間藍子、緒方もも子、下島昌幸、森川茂、
西條政幸 ナイジェリアにおけるリフトバ
レー熱の血清疫学 第 61 回日本ウイルス
学会学術集会、2013 年 11 月 10-12 日、神
戸

高橋徹、前田健、亀井敏昭、水谷哲也、下
島昌幸、福士秀悦、谷英樹、吉河智城、森
川茂、長谷川秀樹、中島典子、鈴木忠樹、
永田典代、片野晴隆、山岸拓也、大石和徳、
西條政幸 重症熱性血小板減少症候群
(SFTS) の日本における初症例 第 61 回日

本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10
-12 日、神戸

安藤秀二、佐藤正明、小川基彦：発疹熱輸
入症例の現況、第 20 回リケッチア研究会、
2014 年 1 月 12 日、滋賀県大津市

藤田博己、藤田信子、安藤秀二：国内にお
ける発疹熱リケッチアの潜在について、第
20 回リケッチア研究会、2014 年 1 月 12 日、
滋賀県大津市

大野秀明、宮崎義継. 中枢神経系感染症の
遺伝子診断の進歩-真菌性脳髄膜炎の遺伝子
診断- (シンポジウム). 第 54 回日本神経学
会学術大会. 5 月 29-6 月 1 日, 2013 年, 東
京.

大野秀明, 大久保陽一郎, 金子幸弘, 田辺
公一, 梅山 隆, 山越 智, 亀井克彦, 渋谷
和俊, 宮崎義継. *Cryptococcus gattii* 感
染症の病態解析 (シンポジウム 4). 第 57
回日本医真菌学会総会・学術集会. 9 月
27-28 日, 2013 年, 東京. 知的財産権の出
願・登録状況

堀野敦子、山根一和、柴山恵吾、阿戸学.
LAMP 法による *Burkholderia pseudomallei*
と *Burkholderia mallei* の検出、日本細菌
学会第 86 回総会、2013 年 3 月、千葉県

中島典子、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀
樹 新しい迅速 in situ ゲノム検出法の感
染病理への応用 第 102 回日本病理学会総
会(札幌)2013 年 6 月

片野晴隆、佐藤由子、中島典子、福本瞳、
鈴木忠樹、黒田誠、長谷川秀樹 病理検体
からの不明病原体検出法の最先端 第 102
回日本病理学会総会(札幌)2013年6月

中島典子、片野晴隆 シンポジウム3病原
体の新しい診断法： 定量的PCRによるウイ
ルスの網羅的検出法と病理検体への応用
第18回日本神経感染症学会(宮崎)2013年10
月

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