

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) 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

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1)。

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。

2) 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2)。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。本システム MePIC は、感染研、地方衛生研究所においても利用可能な次世代型網羅的病原体検索システムをサポートする Web 情報解析サービスであり、現在、アカデミアのみアカウント取得可能として提供している。

<https://mepic.niid.go.jp/cgi-bin/mepic2/index.cgi>

3) 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

<http://ab.inf.uni-tuebingen.de/software/megan/>) で生物種毎の系統分類をおこない、病原体候補を探索し

ていく。臨床検体に内在する数多くの候補生物が抽出されるため、ここでの探索には病原体と感染症の知識が多分に要求される。

4) コアゲノム SNPs を利用した菌種・菌株の類縁関係の特定 (図4)

MePIC - MEGAN による病原体検索の結果、仮に炭疽菌が候補として浮上した場合、先に使用した解読リードを用いて病原体の由来を推定するためのゲノムワイド SNPs 解析システム Global core genome SNP analysis for *Bacillus anthracis* (GcoGSA-BA) を開発した (図5)。現在、関係者のみ運用可能としている。GcoGSA-BA は、公開されている炭疽菌ゲノムと比較したゲノムワイド系統樹の生データまで作成し、適当な系統樹ビューワーで閲覧可能なデータのダウンロードを可能にする。炭疽菌は *Bacillus cereus* group に属し、セレウス菌との鑑別間違いを起さぬよう、Lethal factor (LF), Edema factor (EF), Protective antigen (PA) の炭疽菌の病原性に必須な因子の特定も可能にした。

今後、ペスト、野兔病、コクシエラ、類鼻疽、ボツリヌスと順々に構築予定である (図6)。

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。NGS - MePIC - MEGAN - GcoGSA の解読・解析パイプラインを開発し、実際に運用できるところまで完了した。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

- MePIC, Metagenomic Pathogen Identification for Clinical Specimens. Fumihiko Takeuchi, Tsuyoshi Sekizuka, Akifumi Yamashita, Yumiko Ogasawara, Katsumi Mizuta, and Makoto Kuroda. Jpn. J. Infect. Dis., 2014, 67 (1): 62-65.

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

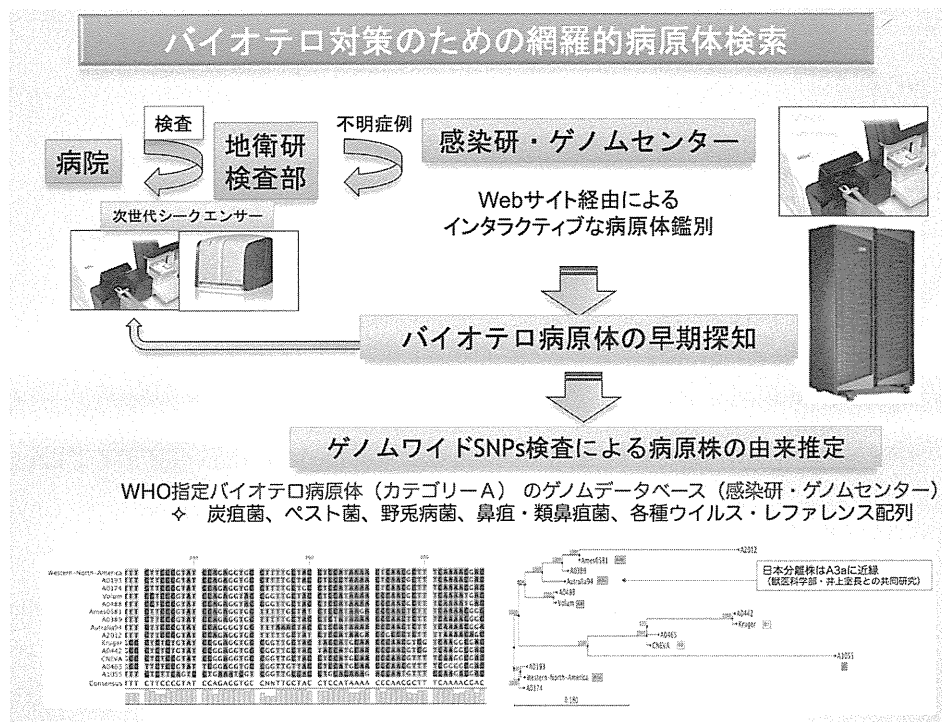


図1 ネットワーク経由によるバイオテロ病原体検索のための解析システム。現在、感染研・ゲノムセンターにベンチトップ型・次世代シーケンサーと情報解析サーバーが整備されている。地方衛生研究所等においても少しずつ整備されるようになってきた。検査技師等がインタラクティブに病原体鑑別を利用するために、Web interface による情報解析プログラムの開発と提供を試みた。

次世代型網羅的病原体検索システムをサポートする

Web情報解析サービスの提供

MePIC, Metagenomic pathogen identification for clinical specimens

<https://mepic.niid.go.jp/cgi-bin/mepic2/index.cgi>



Welcome to MePIC v2.0

Please login to start

User ID: _____ Password:

First visit? Please register account.

[to MePIC manual](#)

- ヒト臨床検体からの網羅配列解読(メタゲノム解読)の情報解析
- 臨床検体に内在する微生物群の分類
- 初心者でも使いやすい
(生物学、感染症学の知識は欲しい)

現在、アカデミアのみアカウント取得可能

図2 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)。次世代シーケンサー NGS による解読リードから必要な情報のみ抽出するための Web 情報解析サービス。

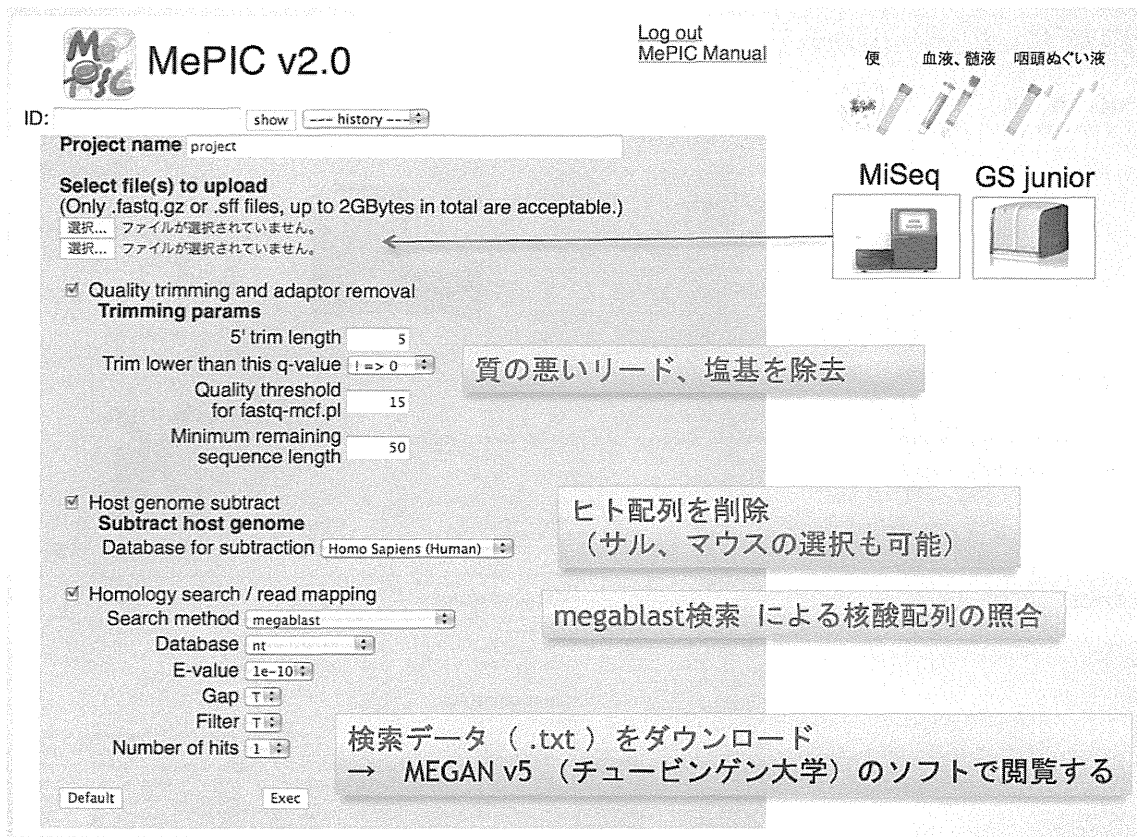


図3 MePICの操作画面の仕様。NGSリードから i) 質の悪いリード、塩基の除去、ii) 臨床検体に内在するヒト配列の削除、iii) megablast 検索による病原体検索。この i - iii までの一連の流れを一度に完結させるパイプライン。

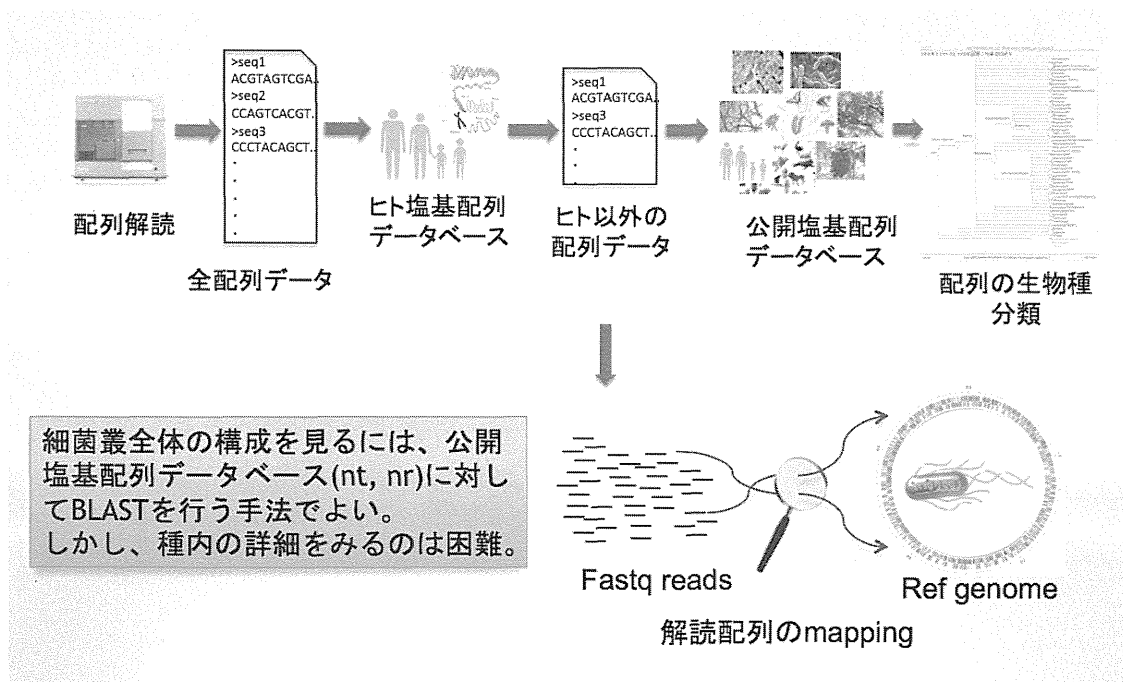


図4 ゲノム全体のSNPs (ゲノムワイドSNPs解析)の概念図。

炭疽菌 *Bacillus anthracis* のゲノム分子疫学 (関係者のみ運用予定)

GcoGSA BA

Global core Genome SNP Analysis for *Bacillus anthracis*

Project name: _____

Input your sequence reads (Only .fastq.gz up to 2GBytes in total are acceptable.)

Strain Name	Read file 1	Read file 2
1	選択... ファイルが選択されていません。	選択... ファイルが選択されていません。
2	選択... ファイルが選択されていません。	選択... ファイルが選択されていません。
3	選択... ファイルが選択されていません。	選択... ファイルが選択されていません。
4	選択... ファイルが選択されていません。	選択... ファイルが選択されていません。
5	選択... ファイルが選択されていません。	選択... ファイルが選択されていません。

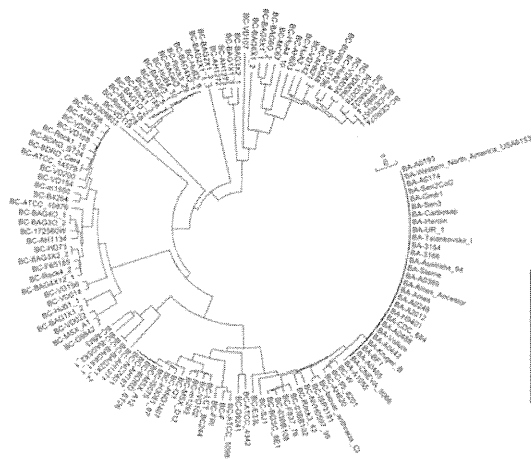
Send an e-mail after finished analyzing.

Mail address: _____

Change number of samples (5)

Reference genome: *Bacillus anthracis* str. 'Ames Ancestor' chromosome, complete genome. (gil50196905refINC_007530.2)

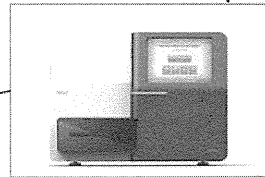
Phylogenetic tree of the original data set.



Traditional tree shape
Newick formatted data
MEGA formatted data
SNP allere table (compressed 13MBytes)

LF
EF
PA

MiSeq



便 血液、髄液 咽頭ぬぐい液



~~GSA junior~~



SNP判定のエラーが多い

Mapping status

Strain	Raw reads	After Trimming	Mapping
S6 sequence	7631281	4926893 (64.6%)	4896388 (64.2%)
S5 sequence	6850274	4814255 (70.3%)	4775247 (69.7%)

Mapped region

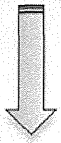
Sequence or region	Whole length	Mapped bp (%) (depth >=5)	
		S5 sequence	S6 sequence
gil50196905refINC_007530.2	5227419	4914301 (94.0%)	4827010 (92.3%)
gil20520075igblAE011190.11	181677	163651 (90.1%)	161559 (88.9%)
gil50118566igblAE017335.31	94830	84018 (88.6%)	81139 (85.6%)
lethal factor (AE011190_149357-151786)	2429	1865 (76.8%)	1767 (72.7%)
edema factor (AE011190_122608-125010)	2402	1946 (81.0%)	2187 (91.0%)
protective antigen (AE011190_143779-146073)	2294	2225 (97.0%)	2161 (94.2%)

Number of SNPs used: 636036 / 657183 (96.8%)

Download SNP data in tabular format. (8.6 MBytes)
Download SNP data in fasta format. (83.3 MBytes)
Download phylogenetic tree in Newick format. (5.9 KBytes)
Download phylogenetic tree in PDF format. (9.3 KBytes)

図5 MePIC - MEGAN による病原体検索の結果、炭疽菌が候補として浮上した場合、先に使用した解読リードを用いたゲノムワイドSNPs解析システム Global core genome SNP analysis for *Bacillus anthracis* (GcoGSA-BA) を開発した。現在、関係者のみ運用可能としている。公開されている炭疽菌ゲノムと比較したゲノムワイド系統樹の生データまで作成し、適当な系統樹ビューワーで閲覧可能なデータをダウンロード可能である。炭疽菌は *Bacillus cereus* group に属し、セレウス菌との鑑別間違いを起さぬよう、Lethal factor (LF), Edema factor (EF), Protective antigen (PA) の炭疽菌の病原因子の特定も可能にした。

ILLUMINA .FASTQ 生解読リード



- De novo assembly
- RNA finding
- 16S-rRNA phylogeny
- Species identification

GcoGSA :
Global core Genome SNPs Analysis

GcoGSA-BA (炭疽菌、セレウス菌)

-YP (ペスト菌)

-FT (野兎病菌 Type A, B)

-CR (コクシエラ、リケッチア)

-BPM (類鼻疽菌)

-CB (ボツリヌス菌)

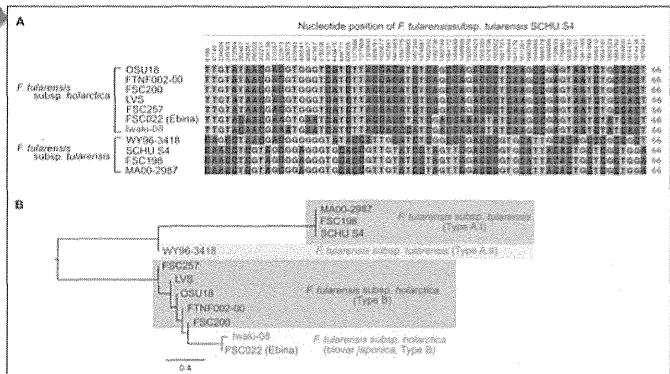
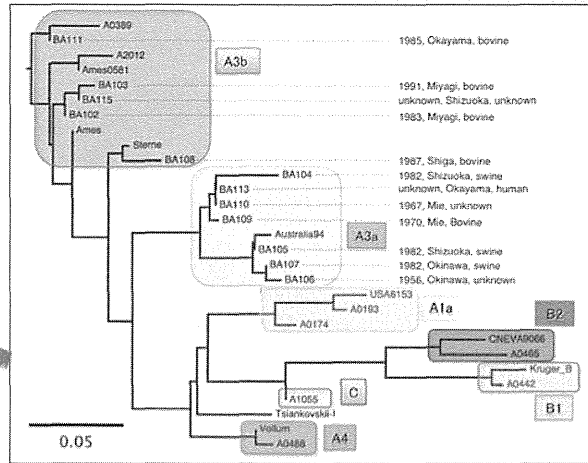
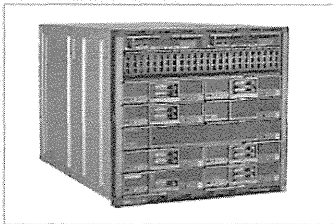


図6 今後、ペスト、野兎病、コクシエラ、類鼻疽、ボツリヌスと順々に構築予定である。

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
分担研究報告書

病原体の病理学的検出法の確立
迅速 *in situ* hybridization AT-tailing 法による新興・再興感染症ウイルスの検出

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、鈴木忠樹、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 我々が開発した迅速 *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えた。

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が検出できる方法であり、さらに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。昨年度は我々が開発した高感度で特異性の高い新しい *in situ* 核酸検出法である *in situ* hybridization-AT tailing (ISH-AT) 法を簡便化かつ迅速化に成功した。今年度はこの迅速 ISH-AT 法を用いて、新興再興感染症ウイルスである重症熱性血小板減少症候群ウイルス (SFTSV)、中東呼吸器症候群コロナウイルス (MERS-CoV) の検出法を確立することを目的とした。

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。SFTS 感染細胞 (国立感染症研究所ウイルス第1部下島昌幸先生より分与)、SFTS 剖検組織、MERS-CoV 感染細胞標本(国立感染症研究所ウイルス第3部松山州徳先生より分与)を用いた。

b) プローブ

ISH-AT 法用のプローブの作成:SFTS ウイルスのコンセンサスシーケンス部分に、L鎖とM鎖に1カ所ずつ、S鎖に2カ所、アンチセンス (AS) プローブとセンス (S) プローブを計5セット設計した。MERS-CoVのNP領域とEnv領域に1カ所ずつ設計した。なお、SFTSVのゲノムはマイナスの1本鎖RNAであるため、SプローブはゲノムRNAをASプローブはmRNAを検出

する。MERS-CoV のゲノムはプラスの 1 本鎖 RNA であるため、AS プローブはゲノム RNA と mRNA を検出し、S プローブが陰性コントロールとなる。

2) 方法

a) SFTSV 感染細胞における SFTSV 遺伝子の検出

Vero 細胞に SFTSV を感染後 6、24、48 時間後に細胞を iP Gell で固め、ホルマリン固定パラフィン包埋細胞標本を作成した。

非感染細胞を mock として迅速 ISH-AT 法で SFTSV 遺伝子を検出した。さらに SFTSV 感染ヒト剖検組織 FFPE 切片上で SFTSV を検出した。

b) MERS-CoV 遺伝子の検出

MERS-CoV 感染細胞のホルマリン固定パラフィン包埋細胞標本を作成した。非感染細胞を mock として迅速 ISH-AT 法で MERS-CoV 遺伝子を検出した。

c) FFPE 組織より RNA を回収し、リアルタイム RT-PCR 法で切片中の SFTSV-RNA 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。

C. 研究結果

(1) SFTSV 検出用 ISH-AT プローブの検討

S 鎖、M 鎖、L 鎖領域に設計したプローブそれぞれ単独で ISH-AT を試行した結果、S 鎖 3'末の NP 領域に対するプローブの感度・特異性がすぐれていた。このプローブ Sense (S) プローブは 5'-CTTGGCC CAGATGGGGTYCCAGCAGAGCTGC

TGAGGTTG-(AT)₁₀、AS プローブは 5'-CAACCTCAGCAGCTCTGCTGGG RACCCCATCTGGGCCAAG-(AT)₁₀ である。Tm 値は 89.15°C、GC%は 62.5%であった。

(2) SFTSV 感染 Vero 細胞における SFTSV のゲノム RNA および mRNA の検出

感染 6 時間後及び 24 時間後では SFTSV-mRNA 陽性細胞がより多く検出され、48 時間後では SFTSV-RNA 陽性細胞がより多く検出された。感染後 24 時間にウイルス複製が最大になると考えられた。

(3) SFTSV 剖検組織における SFTSV ゲノムの検出

SFTSV 剖検組織(論文発表 2 の症例)において、腫脹したリンパ節の病理組織は、広範囲の壊死に組織球と芽球様細胞の浸潤を伴っていた。なお好中球の浸潤はみとめられなかった。SFTSV-RNA 陽性細胞は主に、腫脹したリンパ節あるいはその近傍のリンパ節で検出された。SFTSV-RNA は SFTSV NP 抗原陽性細胞と同様、芽球様細胞の細胞質に検出された。切片中の SFTSV コピー数は 10⁵/細胞以上であった。陽性シグナルは Sense プローブをもちいたときの方が多く、解析した切片ではゲノム RNA の方が mRNA のコピー数より多いことが考えられた。

(4) MERS-CoV 感染 Vero 細胞

ISH-AT 法で型特異的な AT プローブを NP 及び Env 領域に 1 種類ずつ作製した。AS プローブ : 5'-GAGCTCGGGGCGATTAT GTGAAGAGGAACTGAATCGCGCG-(AT)₁₀-3' と 5'-GCGCAGGGGTAGAATTGGCATT AAGAGGTACACCCTGCC-(AT)₁₀-3'

ISH-AT 施行時には、2 種類のプローブの mixture とした。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。AS プローブとのハイブリダイゼーションで細胞質に陽性シグナルが見られた。陰性コントロールの S プローブでは陽性シグナルが全くみられず、特異的なプローブが作成できたと考えられた。

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ス法であろう。実際、日本においてこれまで診断されていなかった SFTS は次世代シーケンス法により SFTSV の遺伝子が確認された。その後塩基配列が、決定しこれまで中国から報告されていた配列とあわせて、ISH-AT 用プローブを作成した。SFTSV に対しては準備してあった抗体がホルマリン固定パラフィン包埋組織切片の免疫組織化学に使用できたため ISH-AT の結果と合わせて検討できた。ISH-AT の利点としては mRNA を特異的に検出できることである。一方 MERS コロナウイルス感染症では MERS-CoV に対する抗体が FFPE 切片の免疫組織化学に使用可能か現在検討中であるが、日本で患者が発生した場合はすでに ISH-AT 法のプローブは完成している。今後レファレンス標本が海外から入手された場合は ISH-AT 法でウイルスの感染部位を同定したいと考えている。

E. 結論

病原体不明の疾患の病原ウイルスが次世代シーケンス法により決定し、日本では重

症熱性血小板減少症候群ウイルスと命名された。中国から報告のあったウイルスであり、すでに抗原検出用の抗体は準備されていたが、速やかに ISH-AT 用のプローブを作成し、ウイルスゲノムを病理組織に検出することができた。主にリンパ芽球様細胞に検出された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Asano S, Mori K, Yamazaki K, Sata T, Kurata A, Sato Y, Odajima H, Akaike Y, Wakasa H, Kojima M. Necrotizing lymphadenitis (NEL) is a systemic disease characterized by blastic transformation of CD8+ cells and apoptosis of CD4+ cells. *Virchows Arch* 464, 95-103, 2014

2. 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.* 2013.

3. Kuribayashi S, Sakoda Y, Kawasaki T, Tanaka T, Yamamoto N, Okamatsu M, Isoda N, Tsuda Y, Sunden Y, Umemura T, Nakajima N, Hasegawa H, Kida Excessive cytokine response to rapid proliferation of highly pathogenic avian influenza viruses leads to fatal systemic capillary leakage in chickens. PLoS One. 9,8(7), 2013.
 4. 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
2. 学会発表
- 1) 国際発表
 - 1) Nakajima N, Sato Y, Katano H, Kawachi K, Suzuki K, Liem NT, Sata T, Hasegawa H Pathological study of ARDS complicated by influenza virus infection Option for the Control of Influenza VIII September 4-10, 2013. CapeTown
 - 2) 国内発表
 1. 中島典子 病理標本からわかること-新しい *in situ* RNA 検出法:第 124 回小児血液腫瘍懇話会(東京) 2013 年 5 月
 2. 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
 3. 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
4. 長谷川秀樹、中島典子 重症インフルエンザ病態解明へのアプローチ剖検例からの検討 第 102 回日本病理学会総会(札幌)2013 年 6 月
 5. 小谷治、Naeem Asif、鈴木忠樹、岩田奈織子、中島典子、片野晴隆、細見卓司、塚越博之、長谷川秀樹、田口文広、清水博之、永田典代 新生仔マウスを用いた Saffold virus(SAFV)患者由来株の病原性の比較解析 第 156 回日本獣医学会学術集会(岐阜) 2013 年 9 月
 6. 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
 7. 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(神戸) 2013 年 11 月
 8. 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(神戸) 2013 年 11 月

- | | |
|---|--|
| <p>9. 小谷治、Naeem Asif、鈴木忠樹、岩田奈織子、中島典子、片野晴隆、長谷川秀樹、田口文広、清水博之、永田典代
新生仔マウスを用いた Saffold virus 小脳継代株の作出とその病原性の解析
第 61 回日本ウイルス学会学術集会（神戸）2013 年 11 月</p> <p>10. 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（神戸）2013 年 11 月</p> <p>11. 潮田和佳、小谷治、岩田奈織子、鈴木忠樹、中島典子、長谷川秀樹、清水博之、永田典代 コクサッキーウイルス B2 実験室株脳内接種後のマウスにおける水頭症の発症機序
第 61 回日本ウイルス学会学術集会（神戸）2013 年 11 月</p> | <p>2. 実用新案登録
なし</p> <p>3. その他
なし</p> |
|---|--|

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

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
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

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、検査従事者の教育訓練法の一つとして平成 23～25 年度にわれわれが参加した 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。

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、用いられつつあり、当ラボでも同様の研究目的のための電子顕微鏡学的検索の依頼をうけるようになってきた。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と経験が要求される。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、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。

われわれは、1と3の一環として、平成23年度から、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)に参加している。今回は、これまでのEQA-EMV評価結果について報告し、教育訓練の一環としての利用法について考察した。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博士により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、平成25年は第26回目であった。

B. 研究方法

サンプルは、培養細胞で病原体を増殖しその培養上清を、2 - 2.5%パラフォルムアルデヒドで不活化処理し、防腐剤として0.02%アジ化ナトリウム混合したものであった。出題対象の病原体は、臨床検体（医学・獣医学領域）で、すべてのサンプルはRobert Koch 研究所で調整され、参加機関に対して郵送により配布された。

毎回 6 サンプルが郵送され、当ラボのプロトコールに従い、サンプルの調整と電子顕微鏡観察を行い、回答した。詳細は結果に示した。

C. 結果

EQA-EMV の経過とサンプル内容、正答率等を含む概要は表に示したとおりである。

実際の手順

われわれは、平成 23 年度よりこのシステムを教育訓練に組み込んでいる。配布されたサンプル量は 200 ~250 µl であったので、これを分注し、4 °C に保管した。ラボ内の教育訓練参加者は、カーボン支持膜を張ったグリッド(300 ウェル)を用いて、2% リンタングステン酸水溶液(pH 7)あるいは 2% 酢酸ウラニウム水溶液によるネガティブ染色を各自、実施した。観察は、透過型電子顕微鏡 JEM-1400 (日本電子株式会社)で行い、撮影は付属の CCD カメラを用いた。指定の報告書様式にサンプルの状態(粒子の固定、形状保持の良否)、診断名、診断に要した時間を記載した。また、得られた画像をあわせて報告書を作成した。その後、実際にサンプルを観察しながら参加者で討議を進め、ラボ内の回答を統一した。

報告者は、回答期限内に Robert Koch 研究所の担当者に電子メールにて報告書を提出した。出題サンプルの内容(使用した病原体名と株名)は即日、電子メールにて伝えられた。参加ラボの回答を回収し、締め切り後に、主催者から総括が送付され正答率などの結果が公表された。

サンプルの妥当性について

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た。EQA-EMV24 と 25 は実際の臨床検体の条件に近かったため(粒子数が少ない、夾雑物が多い)結局、EQA-EMV24 のフラビウイルス等、3 サ

ンプルが評価から除外された。

ラボ内の教育訓練の結果

教育訓練参加者には 1 年目と 2 年目には初心者が含まれており、当初は指導を要し正答率は 50% 以下であったが、この教育訓練を経て今年度は、染色および観察技術は安定し正答率も 50% 以上となり、診断技術の向上がみられた。

外部評価結果

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、このサンプルは前述の理由から不相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ている。

D. 考察

出題された病原体には、その年に世界で問題となったものや新たに発見された病原体が含まれていた(Schmallenberg virus, Mimivirus など)。一方で、新興感染症やバイオテロで重要な Orthopoxvirus や Paramyxovirus は毎年出題されている。ラボ内の教育訓練参加者の診断技術の向上がみられたことから、EQA-EMV をウイルスの透過型電子顕微鏡診断法技術の教育訓練に組み込み、毎年実施ことは電子顕微鏡検査システムを維持する上で有用であると考えられる。

このような外部評価を実施する場合、配布するサンプルにはその均一性・安定性が要求され、また、サンプルの取り違えを防止する必要がある。もし、当施設で国内の電子顕微鏡使用施設に同様の評価を実施する場合にはウイルス関連部署の多大な協力が必要になる。国内の電子顕微鏡検査システムを充実する必要がある場合、現在、感染研内で定期的に行われている地方衛生研究所対象の病原体講習会(ウイルス実習コース)等に電子顕微鏡検査技術講習を組み込み、

土台を構築することが現実的であろう。各施設の外部評価は Robert Koch 研究所の EQA-EMV への参加を推奨したい。現在、日本国内施設からは 3-4 カ所が参加しているとのことである。

なお、今年度の不明病原体の電子顕微鏡観察依頼のうち、2 検体は電子顕微鏡学的に明らかなウイルス粒子を検出し、それぞれポリオーマウイルス、レオウイルスと診断された。いずれもその後の遺伝子学的解析の手がかりとなった例である。その他、2 検体でウイルス様粒子は存在したものの、確定には至らず、2 検体は粒子が確認できなかった。

E. 結論

Robert Koch 研究所主催の透過型電子顕微鏡診断法技術の外部評価に参加し、教育訓練を充実し、検査精度の向上をはかることができた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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.* 2013. Advance access on line

2. 学会発表

なし

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

表 ロベルト・コッホ研究所 (RKI) 主催の

「電子顕微鏡を用いた病原体検出法」の外部評価 (EQA-EMV) 第 24-26 回のまとめ

	EQA-EMV24	EQA-EMV 25	EQA-EMV 26
RKI による サンプル 送付年月日	平成 23 年 9 月 21 日	平成 24 年 10 月 29 日	平成 25 年 11 月 28 日
当ラボの 回答年月日	平成 23 年 10 月 17 日	平成 24 年 12 月 7 日	平成 26 年 1 月 22 日
RKI による 総括年月日	平成 24 年 1 月 26 日	平成 25 年 3 月 14 日	未実施
サンプル数	6 検体 各 250 µl うち 1 検体は評価から除外*	6 検体 各 200 µl うち 2 検体は評価から除外	6 検体 各 200 µl
不活化処理	2.5 % パラホルムアルデヒド	2 % パラホルムアルデヒド	2 % パラホルムアルデヒド
防腐剤	0.02 % アジ化ナトリウム	0.02 % アジ化ナトリウム	0.02 % アジ化ナトリウム
受領サンプ ルの状態	良好	良好	海外出張のため、受領後室温に 1 週 間程度放置した。エンペロープウイ ルスの染色性は低下したが、診断に 差し支えはなかった。
サンプル 1	Herpesvirus (<i>Murid herpesvirus 2</i>)	Calicivirus *評価から除外 (<i>Murine norovirus</i> S99)	Paramyxovirus (<i>Sendai virus</i>)
サンプル 2	Mimivirus (<i>Acanthameba polyphaga mimivirus</i>)	Orthopoxvirus (<i>Vaccinia virus</i> VR1536)	Mimivirus (<i>Acanthameba polyphaga mimivirus</i>)
サンプル 3	Flavivirus *評価から除外 (<i>Tick-borne encephalitis virus</i>)	Coronavirus *評価から除外 (<i>Cavally virus</i>)	Orthopoxvirus (<i>Vaccinia virus</i> VR1536)
サンプル 4	Paramyxovirus (<i>Mumps virus</i>)	Birnavirus (<i>Infectious pancreatic necrosis virus</i>)	Orthomyxovirus (<i>Influenzavirus A/ H2N2</i>)
サンプル 5	Bunyavirus (<i>Gluleako virus</i>)	Bunyavirus (<i>Schmallenberg virus</i>)	Rotavirus (<i>Rotavirus A</i>)
サンプル 6	Orthopoxvirus (<i>Vaccinia virus</i>)	Paramyxovirus (<i>Bovine parainfluenza virus</i>)	Herpesvirus (<i>Human cytomegalovirus</i>)
当ラボの正 答数・率	5/6 検体・83%, 5/5 検体*・100% サンプル 3 Flavivirus を誤答 ラボ内参加者数 4 名	6/6 検体・100%, 4/4 検体*・100% ラボ内参加者数 5 名	6/6 検体・100% ラボ内参加者数 3 名 (2014 年 2 月 1 日現在)
参加ラボ数 (報告数)	103 ラボ / 29 ヶ国 (82 ラボ / 報告率 79.6%)	105 ラボ / 29 ヶ国 (78 ラボ / 報告率 74.3%)	未実施
100%	評価対象 5 検体 : 15 (18.3%)	評価対象 4 検体 : 20 (25.6%)	未実施
正答ラボ数	6 検体 : 9 (10.9%) n = 82	6 検体 : 6 (7.7%) n = 78	
参加ラボの 平均正答率	67.1%	68.6%	未実施

* 指定のレファレンスラボ 6 カ所のうち 2 カ所以上が誤回答であったため、評価から除外された。

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
分担研究報告書

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、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」の管理などをはじめとした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。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 of 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、炭疽発症予防効果をもつ粘膜ワクチンの持続期間および気道チャレンジにおける発症予防効果の検討と抗分泌型組換えリシン抗体の作製、複数の病原体を検出できる核酸クロマトの開発、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。

昨年度の研究で、炭疽ワクチンの新たな候補成分として芽胞と栄養体の両方に発現するEA1を同定し、これを免疫抗原とした経鼻免疫により炭疽の発症が予防できることを見出した。本年度は実際の感染ルートを模して経鼻的に炭疽菌をチャレンジした場合の予防効果について検討するとともに、粘膜免疫の持続期間について検討した。

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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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いる。研究対象の細菌毒素は食中毒の原因となるた

め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な体制作りを目的とする。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。一方で富山県衛生研究所の佐多徹太郎先生より供与された 2011 年に発生した腸管出血性大腸菌による広域食中毒事件（ユッケを原因食品とする）の患者便を試料とし、高感度免疫学的検出法を用いた患者便からのシグ様毒素(Stx1 および Stx2)の直接検出系について検討した。

B. 研究方法

B-1. リシン毒素検出系の構築

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。

昨年度は *Brevibacillus* 発現系を利用した分泌型 RTB 発現系の構築を行い、シグナルペプチドを組み込んだ N 末 His タグを付加した分泌型 RTB 発現株の作製に成功した。本年度はこの株を 2SLN 培地で 30°C、2 日間培養し、得られた上清から His タグカラムを用いて分泌型 RTB の精製を行った。これを抗原として家兎（雌、日本白色種、3 kg）にアジュバント（TiterMax）と共に皮下免疫した。免疫は 2 週間毎に 3 回繰り返し、抗体価は ELISA により得られた抗血清から IgG 抗体画分を精製した。

B-2. 炭疽に対する粘膜ワクチンの開発

H24 年度の研究において炭疽菌芽胞と栄養体の両者の表層に存在する EA1 を免疫抗原に利用した粘膜免疫ワクチンが炭疽発症予防効果をもつことを実証した。本年度は、EA1 粘膜免疫の持続期間について検討し、さらに実際の感染経路のひとつである気道感染を行い、EA1 の粘膜免疫によるワクチン効果を検討した。

実験動物は 8-10 週齢の 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。粘膜アジュバントとして合成二本鎖 RNA の poly (I:C)（InvivoGen, San Diego, CA, USA）を用いた。EA1 を既知の炭疽菌ワクチン分子である PA（List Biological Laboratories）とそれぞれ単独、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（表 1）。免疫開始時および最終免疫から最大 15 週間までの期間、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を ELISA により測定した。抗体価が十分上昇したのを確認後、ブースト免疫をかけ、3 日後に全採血した。得られた免疫血清から Protein A カラムを用いて IgG を精製した。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 7.6×10⁴ CFU/mouse）は PBS に懸濁して調整した。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。20 µl の芽胞液を BALB/c マウスの鼻腔から 2 回に分けて投与した。投与後、マウスの臨床状態を定期的に観察し、生存率を測定した。各群の生存率曲線はログランク検定により有意差の有無を解析した。

B-3. コレラ毒素に対するイムノクロマトの精度検定

H24 年度までに作製した抗 CT 抗体を用いてコレラ毒素に対するイムノクロマトを作製した。イムノクロマトの作製は（株）日本ハム中央研究所にて行った。作製したイムノクロマトについて精製組換え CT タンパク質および CT 発現コレラ菌株を用いた検出感度の検証を行った。本研究ではコレラ毒素の発現を惹起するために AKI 培地を用いた 2 層培養法（4 時間の静置培養の後に 6 時間の振とう培養を行う）を採用した。また精度の検定を目的として、CT と高い相同性を持つ大腸菌の易熱性下痢毒素 LT タンパク質および LT 産生大腸菌株、さらにコレラ菌と同じビブリオ属菌である腸炎ビブリオを用いた検定を行った。

B-4. 患者糞便からのシガ様毒素直接検出

2011年に発生した腸管出血性大腸菌による広域食中毒事件（ユッケを原因食品とする）の患者便からStx1およびStx2の直接検出を試みた。試料は富山県衛生研究所の佐多徹太郎先生と綿引正則先生より供与された。試料はリン酸緩衝液に懸濁したのちに直接試験に供した。検出系としては抗Stx1抗体結合ビーズおよび抗Stx2抗体結合ビーズを用いたBead-ELISA法（検出限界はStx1: 500 pg/ml、Stx2: 250 pg/ml）を利用した。

B-5. 複数の病原体を検出できる核酸クロマトの開発

複数の病原体を同時検出できる核酸クロマトの開発を行った。病原体を含む検査材料100 μlをジルコニアビーズが充填されたチューブに加え、100℃で3分間加熱後、1分間ボルテックスし、遠心後上清を回収し核酸を抽出した。5 μlを鋳型として、処理特異的プライマー領域に非特異的な共通配列のタグ配列を付加したプライマー、タグ配列プライマー、ピオチン標識配列を混合し、PCR反応を行った。続いて増幅産物とストレプトアビジン標識ラテックスビーズを混合し、核酸クロマトにて増幅を確認した。原理を図7に示す。

（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. リシン毒素検出系の構築

分泌型組換えRTBの免疫により、目的の特異抗体を得ることができた。この抗体は相同性の高いその他の毒素に対して交差反応を示さなかった。

C-2. 炭疽に対する粘膜ワクチンの開発

表1に実験群を示す。PAとEA1をそれぞれ単独、あるいは組み合わせ、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（B群:PA, C群:EA1, D群:PA+EA1）。

アジュバントのみの投与群を対照群とした（A群）。経鼻免疫によりB-Cの免疫群における血中IgGおよびIgA、粘膜中IgAの抗体価が上昇していた。すなわち、B群ではPA、C群ではEA1、またD群ではPAおよびEA1に対する血中および粘膜中の特異抗体価がそれぞれ誘導されていた（図1,2）。抗体価の上昇を確認後、最終免疫以降の抗体価の推移を調べたところ、血中IgGについては最終免疫時と同程度の抗体価が維持されていた。しかし、血中IgAは最終免疫後経時的に減少し、15週目では最終免疫時の抗体価を示す吸光度が半分以下にまで減少した。一方、粘膜中IgAは唾液では13週目までは経時的に漸減し、15週目ではピーク時（4週目）の1/4にまで吸光度は減少した。糞便IgAは唾液IgAに比べ抗体価は大きく減少し、15週目では対照群との間に有意差が認められないほどであった。15週目に抗原を1回だけ経鼻投与したところ、全ての群において4週目より高い吸光度が観察されるなど、強いブースト効果が認められた。

続いて、肺炭疽の感染経路である気道感染による感染実験をこれらの実験群で行った。図3に生存曲線を示す。対象群のA群では、気道チャレンジ後3日目からマウスは死亡し、最終的な生存率は20.0%であった。PA免疫群（B群）、EA1免疫群（C群）およびEA1とPA免疫群（D群）の生存率はそれぞれ、37.5%、83%、75%であった。ログランク検定による生存率曲線の統計解析の結果、A群に比べ有意差が認められたのはC群とD群で、B群では有意差はなかった。また、EA1単独のC群がEA1とPAの2重投与したD群より高い生存率を示したが、ログランク検定では両群間に有意差は認められなかった。

C-3. コレラ毒素に対するイムノクロマトの精度検定

H24年度までに作製した抗CT抗体を用いて作製したコレラ毒素に対するイムノクロマト（CT-IC）の感度について明らかにする目的で段階希釈した精製組み換えCTタンパク質について検査を行い、CT-ICが10ng/ml濃度（サンプル量: 100μl）のCTを検出可能である事を明らかにした（図4）。また、特異性の検証を目的としてCTと非常に高い相同性を有する大腸菌のheat-labile toxin（LT）について同様の検証を行った結果、CT-ICは100ng/mlのLTに対して

も擬陽性を示さず、CT-ICが高い特異性を持つことが示された。さらに*ct*遺伝子(+)コレラ菌株15株及び、*ct*遺伝子(-)コレラ菌株5株について検査を行った結果、*ct*遺伝子(+)株すべてにおいてCT-ICによるCTの検出が可能であった。一方で*ct*遺伝子(-)株において偽陽性は検出されなかった(図5)。

特異性の検証を目的としてLT産生大腸菌および腸炎ビブリオについて検査を行った(図6)。LT産生大腸菌株は検査に供した12株のうち3株で非常に弱いシグナルが検出されたものの9株では擬陽性は検出されなかった。また腸炎ビブリオでは検査に供した7株全てで偽陽性の検出は観察されなかった。

C-4. 患者糞便からのシガ様毒素直接検出

腸管出血性大腸菌を原因とする食中毒事件は本邦において大きな社会問題となる事が多い。本年度の研究では2011年に5名の死者を出し大きな社会問題となったユッケを原因とした広域食中毒事件の患者便からのStx1およびStx2毒素タンパク質の直接検出を試みた。検出系としては抗Stx1抗体結合ビーズおよび抗Stx2抗体結合ビーズを用いた高感度免疫学的検出系(Bead-ELISA法)を利用した。9名の患者より採取された便について検査を行ったところ、それぞれ4名の患者便よりStx1およびStx2の検出が可能であった(表2)。このうちStx1を検出した検体番号OB4においては、大腸菌の検出がなされておらず、また検体番号OB5においては遺伝子検査において*stx*遺伝子が検出されていたにもかかわらずStxタンパク質の検出には至らなかった。これらの結果から病原性大腸菌の毒素産生性検査を含む細菌感染症の原因物質の同定において原因菌の分離培養に加え遺伝子検査やタンパク質をターゲットとした免疫学的検査を併用することの重要性が示された。

C-5. 複数の病原体を検出できる核酸クロマトの開発

今年度はボツリヌス菌検出用の核酸クロマトを作成した(図8)。核酸クロマトの検出感度は従来のPCR法に比べ約10倍高く、かつ1時間以内で検出可能であった。

D. 考 察

D-1. リシン毒素検出系の構築

H23に作製した大腸菌による組換えRTBを抗原として得られた特異抗体は検出感度が低く、組換え蛋白は大腸菌内で不溶性の封入体を形成しており、様々な手法でリフォー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り、このような状態では立体構造に変化が生じている可能性がある。天然型リシンと反応する抗体を得るために、昨年度はシグナルペプチドを付加した分泌型RTBの発現株を作製し、今年度の研究において立体構造を保持したRTBを認識する特異抗体を得ることができた。現在、本抗体を利用したイムノクロマトの作製に着手している。

D-2. 炭疽に対する粘膜ワクチンの開発

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、血中で劇的に菌数が増加する。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、炭疽菌の産生する毒素の作用を阻害することはできるが、芽胞の発芽や栄養体の増殖を防ぐことは難しい。EA1は炭疽菌の栄養体と芽胞の両者の表層に発現していることから、EA1を標的とした免疫により、芽胞及び栄養体に対する2重の防御効果が期待できる。我々は、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を回避し、接種を簡便化するため、EA1の経鼻投与による粘膜免疫誘導による炭疽防御効果について検討してきた。粘膜免疫は全身免疫と粘膜免疫を誘導できる。炭疽菌は気道や消化管、創傷部位の粘膜を介して感染するため、粘膜免疫の誘導は効果的な感染防御に重要である。

EA1粘膜免疫の持続期間について検討したところ、血中特異抗体価については最終免疫から3ヶ月後も高い抗体価を維持しており、特に血中IgGについては最終免疫時とほぼ同程度の抗体価を示していた。一方で、粘膜中の特異抗体価については経時的な減少が見られた。免疫部位の鼻粘膜から遠位にある腸管粘膜中の特異的IgAは最終免疫から3ヶ月後は非免疫群の対象群と同程度にまで減少した。一方、免疫部位から近位粘膜である唾液中の特異的IgAの抗体価はピーク時より半減していたが、比較的高い抗体価が維持されていた。