

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 μ l であったので、これを分注し、4 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% リンタンゲステン酸水溶液(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。エンペローブ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 S99</i>)	Paramyxovirus (<i>Sendai virus</i>)
サンプル 2	Mimivirus (<i>Acanthameba polyphaga mimivirus</i>)	Orthopoxvirus (<i>Vaccinia virus VR1536</i>)	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 VR1536</i>)
サンプル 4	Paramyxovirus (<i>Mumps virus</i>)	Birunavirus (<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 ケ国 (82 ラボ / 報告率 79.6%)	105 ラボ / 29 ケ国 (78 ラボ / 報告率 74.3%)	未実施
100% 正答ラボ数	評価対象 5 検体 : 15 (18.3%) 6 検体 : 9 (10.9%) n = 82	評価対象 4 検体 : 20 (25.6%) 6 検体 : 6 (7.7%) n = 78	未実施
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。