

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

「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, 梅田 隆	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。このマニュアルは全国地方衛生研究所に配布予定である。

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。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本邦での「白い粉事件」健康危機事例における地方衛生研究所が検査技領域で示した役割の再認識を始めとし、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。平成23年度からはバイオテロ特定病原体の対象である真菌類の同定スクリーニング検査検出キット活用の習熟を目的に、一般的な真菌類を検査対象にし、検査技術の習得を試みた。

次年度はバイオテロ対象の真菌類の中

で致死率の極めて高い*Coccidioides*属の検出を試みた。国立感染症研究所作製の*Coccidioides*属検出キット(プロトコール)に則り、プロトコールに基づいた技術的対応と共に検出技術の客観的な評価を試みた。

しかし、測定結果には、良、可、非がみられ、今年度、改めて*Coccidioides*属検出のための実技研修を行った。

B . 研究方法

[1] 検査技術習熟実技研修

1) *Coccidioides*属検出実技研修概要

開催日時: 平成 25 年 11 月 18 日(火)

10:00 AM ~

開催場所: 神戸市環境保健研究所

研修内容:

(1) *Coccidioides* 属の基礎的な教育講演。

コクシジオイデス症の遺伝子診断法

講師: 宮崎義継

輸入真菌感染症の概要を説明され、そのなかで最も危険性の高い

Coccidioides 菌を中心に菌の特徴、分布、国内感染者数、検査方法と診断法、および菌の取り扱い上の注意点について解説。

実技内容: 「PCR によるコクシジオイデス菌の検出」

講師: 梅山 隆

コクシジオイデスの DNA を真菌検出の共通領域であるリボゾーム RNA 遺伝子領域 (18S - 5.8S - 26S) のうち ITS - NL 領域を増幅するプライマー対、コクシジオイデス菌の選択的検出プライマー対を用いた PCR 法による遺伝子検出。

(2) 前年度班会議で評価したコクシジオイデス遺伝子検出実技再検討

(3) PCR 試薬反応過程で、真菌鏡検実習。不活化された真菌標本について顕微鏡下で観察、それぞれの菌種の形態的な特徴について受講し確認を計る。対象真菌: コクシジオイデス、ヒストプラズモシス、クリプトコッカス。

(4) 電気泳動による PCR 増幅産物の確認、評価、確認できない場合は原因究明。

18:30 実技研修、評価・反省会終了

2) 検体、試薬の調整・調達

検体は国立感染症研究所真菌部にて調達された。試薬、ピペット類、遺伝子増幅機器等の検査機器類等は神戸市環境保健研究所で可能な限り準備した。

[2] 「バイオテロ対策病原性真菌検査マニュアル」の作製

以下の目次で作製に臨んだ。

1. 真菌について(総説)
2. バイオテロの対象となるヒト病原真菌
3. 臨床検体の検査に関する注意事項
4. 検査方法
 - 1) 臨床検体 (サンプル)
 - 2) 分離培養
 - 3) 分子生物学的手法による病原真菌の同定
5. 感染症法届出基準
6. 参考文献
7. 研究分担者および協力者

(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] コクシジオイデス遺伝子検出実技研修結果

ITS/NL系PCRでは、全ての実施者でポジティブコントロール(PC)のバンド(約500bp)がみられ、ネガティブコントロール(NC)ではバンドはみられなかった。しかし、サンプル(Sample 1: *C. posadasii* DNA、Sample 2: *C. immitis* DNA)では、目的のバンド(約1.2kbp)薄い場合やバンドがみられない場合があり、非特異反応のバンドもみられた。

Coi 9系PCRでは、全ての実施者でSample 1、2、PCで目的の大きさのバンド(Sample 1:約560bp、Sample 2:約500bp、PC:約240bp)がみられ、NCではみられなかった。

全ての実施者でITS/NL系、Coi 9系ともPCの反応がみられ、コンタミネーションもなく結果が得られ、実施者の検査手技の習得は確認できた。しかし、ITS/NL系ではサンプルを用いた場合、反応性が悪く、アニーリング温度の設定、検査試薬の変更など反応条件の検討が必要と考えられ再検討を行った。

[2] マニュアルの作製

「バイオテロ対策病原性真菌の検査マニュアル」が編集されている。平成26年3月31日発行予定である。

D. 考察

前年度は国立感染症研究所作製の*Coccidioides*属検出キット(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。その結果は必ずしも完璧な同定技術をえられたものではなかった。

そのため、今年度は研究協力員一堂に会しコクシジオイデス遺伝子検出のための実技研修を行った。

昨年度と異なり、全ての実施者でITS/NL系、Coi 9系ともPCRの反応がみられ、コンタミネーションもなく結果が得られ、実施者の検査手技の習得は確認できた。しかし、ITS/NL系ではサンプルを用いた場合、反応性が悪く、アニーリング温度の設定、検査試薬の変更など反応条件のさらなる検討が必要な局面にも遭遇した。改良点が確認できているため、次回からは正確な反応系の遂行が行えるものと考えられる。一つの連係プレーの一例としたスキームを図4に掲げた。

一方、「バイオテロ対策病原性真菌の検査マニュアル」の作製は最終校正の段階に入り、予定通りの発行である。この真菌検査マニュアルが病原性真菌による健康危機発生時に迅速な対応が行える一助として活用が望まれる。

E. 結論

1. コクシジオイデス遺伝子検出実技研修結果、すべての実技研修実施者に陽性コントロールの反応が確認できた。しかし、サンプル検体では目的バンドの薄い場合、見られない場合等があり、PCR条件設定の再検討、修正を行った。
2. 「バイオテロ対策病原性真菌の検査マニュアル」が編集されている。病原性真菌による健康危機対応時の検査マニュアルとして一助となることが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kushiro M, Saitoh H, Sugiura Y, Aoki T, Kawamoto S, Saito T. Experimental infection of *Fusarium proliferatum* in *Oryza sativa* plants; fumonisin B₁ production and survival rate in grains. Int J Fd Microbiol. 156:204-208, 2012.
- 2) Sugiura Y. *Fusarium* species: mycotoxin production, and plant and murine pathogenicity. Mycotoxins. 62: 49-61, 2012.
- 3) 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.

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