

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

原因不明感染症の診断法に関する研究

研究分担者 西條政幸 国立感染症研究所ウイルス第一部

研究要旨：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（ウイルス感染症対応，細菌感染症対応，不明病原体感染症，バイオテロ対応など）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．サンプルの送付・受取方法（輸送の遅延への対応，感染性病原体の扱い）についても改善が必要である．

研究協力者：福土秀悦，吉河智城，谷英樹，  
下島昌幸（国立感染症研究所ウイルス第一部）；  
影山努，中内美名（国立感染症研究所インフルエンザセンター），  
松山州徳，白戸憲也（国立感染症研究所ウイルス第三部）；  
永田典代（国立感染症研究所感染病理部）

A. 研究目的

原因不明感染症の診断は，患者の発生状況や背景要因，検査データ等から，検査対象とする病原体，検査に用いられる検体の種類，検査手法，除外診断等を考慮し，迅速かつ効率的に行われなければならない．同時に原因不明感染症の発生がバイオテロによるものかどうかを検討し，患者（および周辺）のケア，リスク評価，情報の発信が的確になされるような体制が整備されている必要がある．不明病原体感染症発生の

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のか，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。その概要について報告する。

## B. 研究成果

### GHSAG Unknown Pathogen Workshop について

平成 25 年 12 月 5 日～12 月 6 日，イギリス公衆衛生局（PHE，ロンドン）で 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）が開催された。本ワークショップは G7 各国＋メキシコが参加する，世界健康安全保障行動ラボネットワーク（GHSAG-LN）による新興感染症や生物テロ対応への枠組みである。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，発表するという形で行われた。多くの国では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，バイオテロ対策における新たな病原体検出手段の一つとして次世代シーケンサーが用いられていた。また，原因不明感染症の対応部局（ウイルス感染症対応，細菌感染症対応，不明病原体感染症，生物テロ対応など）が明確にされていた。また今回のワークショップではシナリオに含まれる質問事項（確定診断後の対応等）について議論がなされた。ワーク

ショップは昨年に引き続き 2 回目の開催である（日本は昨年不参加）。

### シナリオ 1

シナリオ 1 は北ベトナムで軍事訓練を行った兵士が重症の肺炎になったという設定である。患者は野生動物の肉を摂取，屋外で睡眠をとり，サルやコウモリとの接触もあった。同僚 2 名にも後日発熱がみられた。臨床知見では肺出血等がみられ，検査データではリンパ球，血小板減少，CRP の上昇等が顕著であった（添付資料 1 参照）。これらのデータを参考にし，送付された臨床検体（血清，尿，気管支洗浄液）について種々の検査を行った（送付された病原体の答えはレプトスピラで，英国で発生したレプトスピラ症患者の検体を健常人血清，尿に混ぜたものであった。気管支洗浄液はレプトスピラを生食液に混ぜたものである。）。次世代シーケンサー，呼吸器感染症のマルチプレックス PCR あるいは cDNA チップ，レプトスピラ特異的 PCR により，日本，フランスを除くすべての国がレプトスピラ症であるという診断結果を示した。一部，電顕でレプトスピラ様の構造物も認められたという報告があった。日本は感染研ウイルス第一部，ウイルス第三部，インフルエンザセンター，感染病理部において，次世代シーケンサー，PCR，電子顕微鏡検査等を行ったが，レプトスピラ症を診断できなかった。これはサンプルが英国から発送されてから感染研に届くまで 9 日間かかり，その間，低温状態を保てず，サンプルの状態が

よくなかったこと、到着後、ウイルス検査を中心に行ったことからレプトスピラを検出できなかったと考えられた（輸送の経緯については後述）。

シナリオの質問事項に対して以下のような回答がなされた。

Q1.What is the differential diagnosis?

A. インフルエンザおよび PVL 陽性 *S. aureus*; プニヤウイルス(ハンタウイルス, CCHF ウイルス等); フィロウイルス(レストンエボラウイルスを除き, アジアでのフィロウイルス感染症はこれまでないので, 新種のフィロウイルスを考慮); SARS コロナウイルス; レプトスピラ; デングウイルス; マラリア

Q2.What is the confirmed diagnosis?

A. レプトスピラ症 (*Leptospira interrogans* による)

Q3.Do the patients pose an infectious hazard?

A. 尿サンプルは感染性あり; 検体の取り扱いにはグローブが必須

Q4.Was this a deliberate attack?

A. いいえ; レプトスピラ症は東南アジアでは一般的な感染症; レプトスピラ Select agent ではない

Q5.How would you treat and manage these patients?

A. Doxycycline, ceftriaxone が有効; 他のペニシリン系抗生物質でもよい

## シナリオ 2

シナリオ 2 はデュアルユース会議出席後、胃腸症状を示した患者が 2 人発生したという設定（添付資料 2 参照）。臨床知見では腹痛、下痢、鮮血便がみられ、検査データでは好中球高値、肝酵素高値等が認められ

た。これらのデータを参考に、送付された検体（血清、尿、便乳剤）について種々の検査を行った（答えは便乳剤に大腸菌 0157 を混ぜたもので、血清、尿は陰性。）。各国共に、病原性大腸菌を対象にした培養、PCR により大腸菌 0157 を検出した。次世代シーケンサーでも検出可能であった。このシナリオでは事前に BSL3 で扱うべき病原体を各国に送付するという通知がなされていた。感染研では「不明の BSL3 病原体」は輸入不可能と判断し、感染性サンプルの輸入および検査を断念した。その後、不活化処理後の便乳剤サンプルのみ送付してもらうこととなった。ワークショップ直前にサンプルが届いたため、検査が間合わず、ワークショップにおいて結果を示すことができなかった。メキシコも同様の理由でサンプルを輸入できなかった。

シナリオの質問事項に対して以下のような回答がなされた。

Q1.How will your laboratory investigate this disease?

A. 血液検体からの分離培養は不可; 便サンプルからの分離培養（ソルビトールマッコンキー寒天培地:SMAC）; RPLA あるいは EIA 法等による毒素 VT 検出; VT 遺伝子検出（特異的 PCR）あるいは腸管感染症をターゲットとしたマルチプレックス PCR; 次世代シーケンサー

Q2.What advice would you give to the embassies involved?

A. 他に患者がいるかどうか調査; 感染源を特定するため、食材と調理業者の調査; 他の会議出席者への通知; 患者との接触者調査; 国際的な情報シェアリング

Q3.What is the risk to the other

conference participants?

A. 同じ食材を摂取した人はハイリスク；感染源の特定が重要

Q4, What is the risk to the city population?

A. 感染源による；外部の調理業者が感染源であれば、アウトブレイクは拡大すると予想される；食材の提供元（農場，食肉処理場，栽培施設等）の調査が必要

Q5. How will you forensically investigate the perpetrators or otherwise of this outbreak?

A. 感染源の特定；原因となった病原体 (O157) のゲノム解析；原因食材にアクセスできる人を調査；accidental か deliberate か捜査が必要

シナリオ 1 の検体の発送から受け取りまでの経緯

上述のように、シナリオ 1 の検体について、日本は輸入の段階で 9 日間要し、その間、検体を凍結状態で保つことができなかった。このことが、感染研で行った次世代シーケンシングでレプトスピラを検出できなかった一つの要因であると考えられる。

検体の発送から受け取りまでの経緯を報告する。11 月 4 日(月)シナリオ 1 の検体(血清，尿，気管支洗浄液)をドライアイス詰めでイギリス PHE から日本へ発送された。11 月 8 日(金) DHL Tokyo から FAX で荷物の到着の連絡を受ける(FAX がウイルス第三部部長室に届いたため、ウイルス第一部による対応が遅れたと思われる)。同日、夕刻、通関手続きのため、商品の詳細、検疫該当の有無の連絡を行う。11 月 9 日(土) DHL から佐川急便(隅田店)へ荷物が渡る。11 月 10 日(日)佐川急便(武蔵村山支店)感

染研の住所を確認できず、配達できないため、そのまま保管(室温)。11 月 13 日(水)感染研から DHL に問い合わせ。その日の夕方に佐川急便から荷物受け取り。荷物を確認。保冷状態は保たれていなかった(図)。以上のように、検体の通関手続きに支障はなかったが、国内の業者間の伝達が不十分であったため、輸送に遅延が生じたと思われる。他国の感染症研究機関は 11 月 8 日(金)に検体を受け取っている。

C. 考察

今回のワークショップでは検体の国際輸送に際して課題があることが明らかにされた。シナリオ 1 は輸送の遅延により、検体の冷凍保存状態を保てなかった。しかし、検体の国際輸送が滞ることは想定されていなければならない。今後は多少の遅延があってもドライアイス詰め状態を保てるような輸送方法を改善しなければならないという議論がなされた。一方、シナリオ 2 において、感染研では「BSL3 で扱うべき不明病原体」を輸入することができず、ワークショップ直前まで「BSL3 で扱うべき不明病原体」への対応が決まらなかった。その後、不活化したサンプルを輸入できたが、検査が間に合わなかった。なお、EU 各国、米国では「トレーニングのための病原体」として「不明の BSL3 病原体」を問題なく輸入できていた。バイオテロが疑われる事象が発生した場合、不明病原体の国際輸送が必要となる可能性もある。このため、感染性の不明病原体をいかに遅延なく輸入(あるいは

は輸出)するかどうか、今後、議論を進め、その対策を講じておく必要がある。

近年、病原体ゲノム情報の蓄積や次世代シーケンサーをはじめとする網羅的遺伝子解析技術の進歩により、新たなゲノムベースの感染症診断法が開発されている。この技術は、新種病原体、不明病原体検出に応用できることから、バイオテロ対策における新たな病原体検出手段の一つとして注目されている。次世代シーケンサーは、解析技術が年々進化しており、機種、リード数、ランニングコスト、所要時間も多様である。このため、今回のワークショップで得られた次世代シーケンサーによるデータを各国で共有し、効率的な検査の構築に役立てていくことになった。

#### D. 結論

- 1) GHSAG 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。
- 2) 事前に送付された不明病原体を含む検体に関し、各国感染症研究機関で行った検査結果について議論がなされた。
- 3) 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十分な結果が得られなかった。
- 4) バイオテロ対策における新たな病原体検出手段の一つとして次世代シーケンサーが使われるようになった。
- 5) 次世代シーケンサーによる検査結果データを各国で共有し、効率的な検査の構築に役立てていくことになった。

5) サンプルの送付方法(輸送の遅延への対応、感染性病原体の扱い)について改善を目指すこととなった。

#### E. 研究発表

##### 1 論文発表

- 1) Sakai K, Yoshikawa T, Seki F, Fukushima 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
- 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, Fukushima 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.
- 3) 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 学会発表

- 1) 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 との比較. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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

- 10) 谷英樹,下島昌幸,福間藍子,谷口怜,  
吉河智城,福土秀悦,森川茂,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 GP を外套したシュード  
タイプ VSV の作製.第61回日本ウイルス  
学会学術集会,2013年11月10-12日,神  
戸

- 11) 高橋徹,前田健,亀井敏昭,水谷哲也,  
下島昌幸,福土秀悦,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

F.健康危険情報

なし

G 知的財産権の出願・登録状況

現在出願予定はない。



## GHSAG UNKNOWN PATHOGEN EXERCISE SCENARIO 1

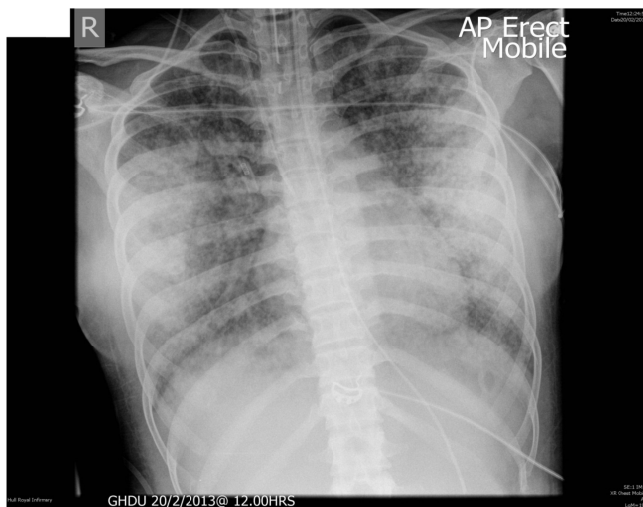
### Details and Travel History

Three special forces recruits on exercise in the North Vietnamese border area have reported to their medical centre with fever and bleeding 1 week after returning from exercise. Their exercise involved jungle and river patrols. As part of the exercise, they have been living wild eating bushmeat and sleeping in the open. They have had contact with a number of indigenous groups and animals in the jungle, including monkeys and bats.

### Clinical Details

The index case was a 29 year old female, previously exceptionally fit and active. She presented on 14/9/13 to her general practitioner (family doctor) unwell with fever, rigors & myalgia, but was reassured and sent home. On 19/9/13 she was much worse and admitted to the local hospital with shortness of breath & pleuritic chest pain. She was initially started on treatment for severe community acquired pneumonia with co-amoxiclav (amoxicillin-clavulanate) and clarithromycin. That night her condition deteriorated with a large pulmonary haemorrhage and she was transferred to intensive care. Her Chest X-ray at that point is shown below. Haematology and clinical chemistry results at her admission to intensive care are in the table below.

Her two companions developed fever 2 and 3 days respectively after her presentation, and are both stable under observation in hospital.





添付資料1 シナリオ1!

Test	Normal range	Results
Haemoglobin	13.5-18.0 g/dL	12.1
White cell count	3.2-11.0 x10 <sup>9</sup> /L	3.6
Neutrophils	1.9-7.7 x10 <sup>9</sup> /L	2.4
Lymphocytes	1.3-3.5 x10 <sup>9</sup> /L	0.4
Platelets	120-400 x10 <sup>9</sup> /L	52
INR	0.8-1.2	1.1
APTT	30-45s	36
Urea	3.6-5.0mmol/L	4.6
Creatinine	70-130umol/L	82
ALT	5-35IU/L	32
ALP	30-300IU/L	37
Bilirubin	3-17umol/L	15
Albumin	35-50g/L	32
CRP	0-10 mg/L	212

!

F% 2'#(!

+1,##!(% 2'#(!1% #: ##) l2, / - &#\* 0

F% 2'#!IR" +A! : '// \* lJ2'(% 9 % 4=9 '!

F% 2'#!DIS, &#!=9 '!

F% 2'#!! IT, /) 31/ 0% - #/'% !% % #!=9 '!

!

A\*\* &&) %!U5#(\$&) (U%4#,!\* &<) / (\$&!, # (5' \$4

=? V 1%&!\$1#!\* &4#,#) \$&!\* &<) / (&VW

D? V 1%&!\$1#!3/) 4&9 #\*! \* &<) / (&VW

I? " / ! \$1 # l2% &&) \$ l2/ (#!%) !& 4# 3&& 5 (!1% && \* VW

G? V % (\$1 &!%\* #' & #, % #!% \$&3>W

Y? . / ; ! ; / 5' \* l0/ 5! \$ # % \$!%) \*!9 % % <#!\$1# (#!2% &&) \$ (VW



## GHSAG UNKNOWN PATHOGEN EXERCISE SCENARIO 2

### Details and History

Two foreign diplomats, a 35 year old woman and a 55 year old man, who attended a conference in a major Western city on dual use technology are admitted to a local hospital with a 1 day history of abdominal pain and loose stools. One has seen fresh blood in his stools.

### Clinical Details for Male Patient

Chest X ray was normal, vital signs are:

Temperature 37.2°C

Blood pressure 100/60

Heart rate 90

Respiratory rate 25

O<sub>2</sub> saturation 98%

Haematology and clinical chemistry results at admission are given in the table below.

Test	Normal range	Results
Haemoglobin	13.5-18.0g/dL	15.8
Haematocrit	42-45%	47%
Platelets	120-400 x 10 <sup>9</sup> /L	120
White cell count	3.2-11.0 x 10 <sup>9</sup> /L	9.0 (70% neutrophils)
Liver function tests:		
AST	5-35 IU/L	45
ALT	5-35 IU/L	50
ALP	30-150 IU/L	50
Bilirubin	3-17umol/L	30
Urine electrolytes:		
Na	135-145 mmol/L	140
K	3.5-5 mmol/L	5
Urea	2.5-6.7mmol/L	8
Creatinine	70-150umol/L	110

## 添付資料2 シナリオ2

### Samples

Three samples have been provided:

Sample 1 EDTA blood (plasma) 1ml

Sample 2 Urine 1ml

Sample 3 Stool 1ml

### Additional Questions (to diagnostic result)


1. How will your laboratory investigate this disease?
2. What advice would you give to the embassies involved?
3. What is the risk to the other conference participants?
4. What is the risk to the city population?
5. How will you forensically investigate the perpetrators or otherwise of this outbreak?

**Results of Unknown Pathogen Exercise**  
Scenario 1

**Summary of Scenario 1**

- ✓ Condition of specimens could be affected by the delayed delivery

4-Nov (Mon): Scenario 1 samples was dispatched  
8-Nov (Fri): Arrived at DHL/Tokyo  
13-Nov (Wed): NIID received package



**Dry ice completely evaporated, and specimens were stored at room temperature!**


 GHSAG Unknown Pathogen Workshop, Dec. 2013, London

図) シナリオ1の検体は室温で保管されていた。