

201318007B

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23年度～平成25年度 総合研究報告書

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23年度～平成25年度 総合研究報告書

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23～25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. 総合研究報告書（平成 23～25 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・・・・・・ 23
研究分担者：森川 茂（国立感染症研究所 獣医科学部）
2. 人獣共通感染症（炭疽、狂犬病等）に対するヒト検体および感染源検体を用いた迅速
検査、消毒、その標準化等に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 39
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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 43
研究分担者：見理 剛（国立感染症研究所 細菌第二部）
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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 47
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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 55
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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 65
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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 71
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	81
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検出法の確立	87
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	93
研究分担者：倉園 久生（帯広畜産大学）	
11. バイオテロ危機発生時への対応	
ー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ー	123
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	129
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	133
研究分担者：松本 哲哉（東京医科大学 微生物学講座）	
14. ウイルス性出血熱等のバイオテロ関連病原体の診断法およびシステムの整備	
に関する研究	135
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	143

I . 総合研究報告書

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物が多い。一方これらの病原体は、稀なものが多く、通常の病院や検査機関では確定診断が困難であり、確定検査が遅れる可能性がある。バイオテロ対策としては、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。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。

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
中村治：慶應義塾大学 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：

相内章：国立感染症研究所

相野田祐介：東京女子医科大学病院

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

伊藤（高山）睦代：国立感染症研究所

林昌宏：国立感染症研究所

岩城 正昭：国立感染症研究所

岩田奈織子：国立感染症研究所

梅山隆：国立感染症研究所

江崎孝行：岐阜大学

尾家重治：山口大学

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

奥谷晶子：国立感染症研究所

加來浩器：防衛医科大学校

影山努：国立感染症研究所

加藤 はる：国立感染症研究所

加藤 康幸：国立国際医療研究センター

片岡紀代：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

木下（山口）一美：国立感染症研究所

國島広之：東北大学

倉井華子：静岡がんセンター

鯉渕智彦：東京大学医科学研究所

河野茂：長崎大学病院

小林慎一：愛知県衛生研究所

小谷 治：国立感染症研究所研究所

酒井宏治：国立感染症研究所

佐々木 裕子：国立感染症研究所

佐藤由子：国立感染症研究所

佐藤正明：国立感染症研究所

柴山 恵吾：国立感染症研究所

下島昌幸：国立感染症研究所

菅沼明彦：都立駒込病院

杉浦義紹：神戸市環境保健研究所

鈴木忠樹：国立感染症研究所

関塚剛史：国立感染症研究所

関谷紀貴：都立駒込病院

高崎智彦：国立感染症研究所

竹内佳子：国立感染症研究所

竹内史比古：国立感染症研究所

竹下望：国立国際医療研究センター

田辺公一：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

谷口清洲：国立感染症研究所、国立病院機構三重病院

田辺公一：国立感染症研究所

千葉一樹：福島県衛生研究所

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

藤田博己：大原総合病院附属大原研究所、馬原アカリ医学研究所

藤野美穂子：国立感染症研究所

古谷信彦：文京学院大学

松山州徳：国立感染症研究所

三觜雄：札幌市衛生研究所

三好龍也：堺市衛生研究所

山崎博史：山口労災病院

柳澤如樹：都立駒込病院

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

山根一和：川崎医科大学

山本 明彦：国立感染症研究所

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 15 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方法の確立

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発展させ、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：

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 に反応することが明らかになった。NP の本領域を標的とした抗体は、ラッサウイルス、フニンウイルス等、バイオテロに使用される可能性があるアレナウイルスをもれなく検出できると期待できる。LCMV を含むすべてのアレナウイルスに反応する抗体を作製するため、新たに GP-2 ペプチドに対する抗体を調製した。

(2) フラビウイルス共通迅速診断法の確立：

フラビウイルス共通迅速診断法を開発し様々のフラビウイルスを 1×10^{-2} から 1×10^1 (PFU/ml) の感度で検出することができた。さらに、フラビウイルス共通プライマーによる増幅断片の塩基配列を決定し、その系統樹解析を行った。その結果フラビウイルス共通プライマーによる増幅産物は各ウイルスに特異的であり、その増幅産物の塩基配列を決定することによりサンプル中のフラビウイルスを同定できる可能性が示唆された。

(3) アジアで分離される炭疽菌株の遺伝学的タイピングシステムの開発：

モンゴルで分離された炭疽菌株に特異的な 12 箇所 の SNP (Single Nucleotide Poo polymorphism) を特定して 12SNP タイピング法を確立した。さらに、National Center for Infectious Disease with Natural Foci (NCIDNF) の協力を得て動物および環境由来のモンゴル分離株を 14 株追加して確立した 12SNP タイピングについて追加検討を行いモンゴル株は大きく 4 つのクラスターに分かれ、それぞれに地域特性のあることが示された。

(4) 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した。

(5) リケッチア・コクシエラ・クラミジアの迅速検出法の開発：

多様な臨床症状をも示すリケッチア症に対し、どれだけの感度、特異性をもって迅速診断系を準備すべきか考慮する必要がある。その基盤を構築するため、国内の常在リケッチアと輸入症例の多様性を検討するとともに、新規分離リケッチア株の全ゲノム解析をこころみ、既存のリケッチア種との比較を行うことにより、バイオテロを

想定した場合の多様な臨床症状をも示すリケッチア症に対し、SNPs解析による迅速診断系の可能性について検討した。また、従来リケッチアに分類されていた *Coxiella burnetii* は、バイオテロに使用される可能性が議論される病原体である。既存の *C. burnetii* 分離株の分子生物学的特徴を把握することは、通常の感染でないバイオテロが発生した際に、迅速にその事態を明らかにする情報となる。次世代シーケンサーによって数種の株の全ゲノム配列を解析、比較検討したところ、SNPs解析による株の分類、同一株であるか否かの判別に利用可能と考えられる複数の遺伝子領域を確認した。

(6) 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：

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た。BSL 真菌の安全な取扱法について検討した。また、コクシジオイデスゲノム DNA・ヒストプラズマゲノム DNA の検出のための様々な増幅法を検討・開発した。

(7) 鼻疽・類鼻疽の迅速診断法開発：

B. pseudomallei, *B. mallei* は CDC のカテゴリ 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。このため、日本国内で事例が発生したときのために迅速検出法を確立しておく必要がある。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、*B. pseudomallei* と *B. mallei* の LAMP 法の確立を行った。LAMP 法は日本国内の検査に十分な性能を持つことが明らかになった。また *B. mallei* についてはこれまでに簡便な核酸検出法の報告がなかったが、LAMP 法は簡便に *B. mallei* を検出可能な方法であり、検出感度、特異度にも問題が無い。今後、この LAMP 法は、迅速簡便な検査法として利用できる。

(8) ウイルス検出のための高感度診断検査法の開発：

バイオテロ関連病原体を迅速に、かつ、高感度に検出するための 5' -Flap 付加 primer を用いた遺伝子検出法の診断における有用性を評価した。本研究においてリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV)、狂犬病ウイルス (RV)、チクングニアウイルス (CHIKV) に対する既知のプライマーを用いた 5' -Flap 付加 primer 法の検出感度向上について評価した。その結果 LCMV 特異的プライマーに 5' -Flap 付加 primer 法を用いたときその感度は向上した。しかしながら RV, CHIKV に対してはその効果は認められなかった。Flap 配列の付加によるプライマー感度の向上のメカニズムは不明であるが、既存のプライマーに対するその効果の検討は有用であることが示唆された。

(9) 炭疽菌に対する消毒法の開発と標準化に関する研究：

炭疽菌の治療薬は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を行い、Anti Microbial Peptides(抗菌性ペプチド)である豚由来のProtegrin-1が高い抗菌効果を示すことを示した。

(10) 検体の輸送等システムの整備に関する研究：

不明病原体による感染症発生の際に、検体を海外から受け入れることが求められることもある。そこで、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。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)についてもシステムの確立が必要である

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新興感染症の汎発流行、そしてそれらを利用したバイオテロなどの危険性は近年社会的不安の一つとして認識されつつある。バイオテロ病原体を網羅的かつ迅速に配列解読することは最も的確なアプローチの一つと考える。次世代ゲノムシーケンサー(Next-generation DNA sequencer: NGS)のパフォーマンスを用いてWHO指定バイオ

テロ病原体のゲノム配列及び変異情報データベースを充実させ、有事において迅速に対応出来る体制を整えることを目的とした。感染研ゲノムセンターでは病院、地方衛生研究所等でも情報解析できるように、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。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(GeoGSA)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GeoGSAを展開していく。

(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：

マウス肺炭疽モデルにおいて現行ワクチンの主成分であるPAに比べ優れた防御効果を示すEA1を同定し、EA1が次世代炭疽ワクチンの候補分子として有用である可能性を示唆した。植物由来毒素であるリシンの検出系に利用できる特異抗体を得ることに成功した。バイオテロに使用される可能性の高い複数の細菌毒素に対する免疫学的迅速同定法の開発に必要な抗原、抗体、免疫学的迅速同定法の作製を行った。特にコレラ毒素に対しては特異性の高いイムノクロマトの作製を完了した。リアルタイムPCRと比べ約10-100倍感度が高く、目視により検体入手から約1時間で多検体項目をスク

リーニング可能な検出法を開発した

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:

バイオテロに使用される可能性のある病原体をホルマリン固定パラフィン包埋された病理組織中に検出する方法について検討した。1年目は免疫組織化学で腸管出血性大腸菌感染症の剖検例の糸球体および腸管組織にベロ毒素を検出することを試みた。また、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迅速 *in situ* hybridization-AT tailing (ISH-AT) 法を簡便化・迅速化した。この迅速 ISH-AT 法により重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) の剖検組織および実験的 SFTS ウイルス感染細胞に重症熱性血小板減少症候群ウイルスを検出した。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。

(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する。具体的には、電子顕微鏡学的検査法の標準手順法の見直しと改良を行い、実施者の教育訓練法の手順と記録を整備した。また、細菌の迅速検出法の確立のために、バイオテロ関連細菌を中心にレファレンス標本の作製を行った。また、検査従事者の教育訓練法の一つとして 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に参加した。

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:

バイオテロ関連特定病原体の中の真菌感染症に主眼を置き検査法の習熟を計った。一般真菌の網羅的スクリーニング検査検出キットを用いて、健康危機発生時対応を想定のもと、操作性、精度等の評価と共に真菌検査法に慣れた。また、真菌感染症の中で、最も致死率の強いコクジオイデスを対象に病原体の網羅的検出法の構築と操作性、そして問題点の解析を行った。この問題点の解決を目的に最終年度には、国立感染症研究所真菌部とともに、研究協力員の実技研修を行い、検出技術の向上を図った。

実技研修は、真菌感染症による健康危機発災時には、地方衛生研究所の各ブロックにおける研究協力員が指導的立場で危機対応を完遂させることを可能にするためのものである。また作成された「バイオテロ対策病原性真菌検査マニュアル」はバイオテロの可能性のある真菌検査検査対応の一助になる。

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』のホームページを作成後、

ICD を対象に実施したアンケート結果や全国の感染症専門家から寄せられた意見を参考にして修正とアップデートを行ってきた。2011～12年には20疾患を追加、2013年には新たに感染症法に基づく特定病原体等(三種)に指定された重症熱性血小板減少症候群(SFTS)など2疾患を加え、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することができた。今後とも各病原体(疾患)の最新情報の追加を行い、迅速かつ正確に情報提供を行えるようホームページの更新作業を進めていく方針である。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、これまでに本研究において作成していた、(1) ウイルス性出血熱、(2) ウェストナイル熱・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) 野兎病の各項目について、アンケート調査等によって全国から寄せられた意見を参考して細かな修正をおこなうとともに、最新の情報を追加した。平成23年度以降に以下の25疾患を追加した：(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) オムスク出血熱、(10) キャサナル森林病、(11) リフトバレー熱、(12) ハンタウイルス感染症、(13) Bウイルス症、(14) ニパウイルス感染症、(15) レプトスピラ症、(16) 発疹チフス、(17) チクング

ニア熱、(18) ロッキー山紅斑熱、(19) サル痘、(20) 黄熱、(21) 回帰熱、(22) 急性灰白髄炎、(23) デング熱、(24) 日本紅斑熱リケッチア、(25) 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)。執筆は全国から選定した感染症専門家に依頼し、“目で見て理解する”要素を重視し図表等も数多く示した。また各疾患の追加・修正のみならず、総論の内容についても病原体の管理や輸送に関する最新の情報を記載した。

(2) 各医療機関のバイオテロ対策を支援するための方策：

国内の医療機関の多くは感染防止対策加算をきっかけとしてさらなる院内感染対策の充実をはかり、さらに新型インフルエンザに対する対策もBCP作成を含めて進展してきている。しかしバイオテロに関する医療機関の準備状況はまだほとんどなされていない施設が大半を占めており、さらなる対応策が必要と考えられる。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た。平成23年度は全体としての位置付けや方向性を確認し、平成24年度は、バイオテロ対策ガイドラインの基本骨格を作成した。さらに平成25年度は新型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。今後、関連する多くの感染症診療に関するガイドラインの内容と比較しながら、相互の内容に矛盾が生じないように、さらに検討を行う。

D. 考察

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。さらに病原体の由来を知るためにゲノムデータの整備も重要となる。これまで、いくつかのバイオテロ関連病原体等について迅速診断法の開発、マニュアル作製がなされてきた。しかし、個別病原体に関しても、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く、検査ネットワーク整備、さらに病原体の由来の追跡や未知の病原体等への対応に問題を残している。ホームページを活用した診断支援法の最新情報への改訂作業とともに、実際の対応体制の整備も十分とはいえない。

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の作製および検査診断機関のネットワーク化を行った。

バイオテロに利用される恐れのある病原微生物によって引き起こされる疾患は、現在のわが国ではみることのないものがほとんどであり、臨床医の多くがそれらの病態に対する知識はなく、また診療疾患対象としての関心も有していないのが現状であると思われる。一方で、病原診断法やワクチンの開発に関しては、主に基礎系の研究者によって研究開発が国内外で行われている。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。また、重症熱性血小板減少症候群（SFTS）に代表される新興感染症などに対して迅速な情報提供も極めて重要である。このような背景に基づき、国内のインフェクションコントロールドクター（ICD）を対象としたアンケート調査結果に基づく改訂作業に加え、全国の感染症専門家によって組織された研究協力者からの意見を参考した改訂作業を実施した。これにより迅速性や情報の正確性などを備えた有益なホームページの整備がなされた。

バイオテロに対しては、実質的にまだ具体的な準備は何もなされていない医療機関が大半を占めているのが現状である。今後、医療機関が是非取り組まなければいけない課題のひとつになると思われる。ガイドラインが完成したとしても、実際に事案が起これば、社会的な混乱を生じる可能性が高く、行政機関、警察、消防など、各種機関との連携は欠かせない。その意味においても、本ガイドラインを完成させるにあたり、今後、関係機関との調整も必要になるものと思われる。

一方、海外との検体共有等も重要になる可能性がある。Global Health Security Action Group (GHSAG), Unknown Pathogen Workshopに参加することにより、検体の国際輸送に際して課題があることが明らかになった。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。このプロセスを進めることを可能とするその対策を講じておく必

要がある。

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) 英文論文

Yoshikawa T, Saijo M, Morikawa S. Emergence of zoonotic orthopox virus infections. In *Viral Infections and Global Change* (ed. Singh SK), pp377-387, 2014, Wiley Blackwell, New Jersey

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.

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.

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, 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.
- 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
- Uchida M., Harada T., Enkhtuya J., Kusumoto A., Kobayashi Y., Chiba S., Shyaka A., Kawamoto K. Protective effect of *Bacillus anthracis* surface protein EA1 against anthrax in mice. *Biochem Biophys Res Commun,* 421(2):323-8, 2012.
- Yamasaki E, Sakamoto R, Matsumoto T, Morimatsu F, Toyoi H, G. Nair B, Kurazono H, Kurazono T. Development of an immunochromatographic test strip for detection of cholera toxin. *BioMed Research International.* 2013: 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.
- 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,* 2013 August, 75(8):1115-1117
- Gaowa, Ohashi N, Aochi M, Wuritu, Wu D, Yoshikawa Y, Kawamori F, Honda T, Fujita H, Takada N, Oikawa Y, Kawabata H, Ando S, Kishimoto T: *Rickettsia* in ticks,

Japan, Emerg Infect Dis, 2013 Feb, 19(2): 338-340

Sakamoto N, Nakamura-Uchiyama F, Kobayashi K, Takasaki T, Ando S, Iwabuchi S, Ohnishi K; Murine Typhus with Shock and Acute Respiratory Failure in a Japanese Traveler after Returning From Thailand. J Travel Med, 2013 Jan 20(1):50-53

Asano S, Mori K, Yamazaki K, Sata T, Kanno T, Sato Y, Kojima M, Fujita H, Akaike Y, Wakasa H. Temporal differences of onset between primary skin lesions and regional lymph node lesions for tularemia in Japan: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 19 skin cases and 54 lymph node cases. Virchows Arch. 460, 651-658, 2012

Nakajima N, Sato Y, Katano H, Hasegawa H, Kumasaka T, Hata S, Tanaka S, Amano T, Kasai T, Chong JM, Iizuka T, Nakazato I, Hino Y, Hamamatsu A, Horiguchi H, Tanaka T, Hasegawa A, Kanaya Y, Oku R, Oya T, Sata T. Histopathological and immunohistochemical findings of 20 autopsy cases with 2009 H1N1 virus infection. Mod Pathol. 2012 Jan;25(1):1-13.

Detection of a Possible Bioterrorism Agent, *Francisella* sp., in a clinical specimen using Next-generation Direct DNA Sequencing. Makoto Kuroda, Tsuyoshi Sekizuka, Fumiaki Shinya, Fumihiko

Takeuchi, Takayuki Kanno, Tetsutaro Sata, Shigeyuki Asano. J Clin Microbiol. 2012, 50 (5): 1810-1812.

Sayama Y, Demetria C, Saito M, Azul RR, Taniguchi S, Fukushi S, Yoshikawa T, Iizuka I, Mizutani T, Kurane I, Malbas FF Jr, Lupisan S, Catbagan DP, Animas SB, Morales RG, Lopez EL, Dazo KR, Cruz MS, Olveda R, Saijo M, Oshitani H, Morikawa S. A seroepidemiologic study of Reston ebolavirus in swine in the Philippines. BMC Vet Res. 18:8:82, 2012.

Taniguchi S, Sayama Y, Nagata N, Ikegami T, Miranda ME, Watanabe S, Iizuka I, Fukushi S, Mizutani T, Ishii Y, Saijo M, Akashi H, Yoshikawa Y, Kyuwa S, Morikawa S. Analysis of the humoral immune responses among cynomolgus macaque naturally infected with Reston virus during the 1996 outbreak in the Philippines. BMC Vet Res. 11:8(1):189, 2012.

Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Saijo M and Morikawa S. Serological Assays Based on Recombinant Viral Proteins for the Diagnosis of Arenavirus Hemorrhagic Fevers. Viruses 4. 2097-2114. 2012.

Lihoradova O, Kalveram B, Indran SV, Lokugamage N, Juelich TL, Hill TE, Tseng CT, Gong B, Fukushi S, Morikawa S, Freiberg AN, Ikegami T. The Dominant-negative Inhibition of

- dsRNA-dependent Protein Kinase PKR Increases the Efficacy of Rift Valley Fever Virus MP-12 Vaccine. *J Virol.* 86, 7650-7661. 2012.
- Fukushi S, Nakauchi M, Mizutani T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Antigen-capture ELISA for the detection of Rift Valley fever virus nucleoprotein using new monoclonal antibodies. *J Virol Methods.* 180:68-74, 2012
- Shirato K, Maeda K, Tsuda S, Suzuki K, Watanabe S, Shimoda H, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Kyuwa S, Endoh D, Matsuyama S, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Yoshikawa Y, Akashi H, Mizutani T. Detection of bat coronaviruses from *Miniopterus fuliginosus* in Japan. *Virus Genes.* 2012, ;44(1):40-4.
- Gyotoku H, Izumikawa K, Ikeda H, Takazono T, Morinaga Y, Nakamura S, Imamura Y, Nishino T, Miyazaki T, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Yasuoka A, Yaguchi T, Ohno H, Miyazaki Y, Kamei K, Kanda T, Kohno S. A case of bronchial aspergillosis caused by *Aspergillus udagawae* and its mycological features. *Med Mycol.* 50:631-636, 2012.
- Taniguchi S, Watanabe S, Masangkay JS, Omatsu T, Ikegami T, Alviola P, Ueda N, Iha K, Fujii H, Ishii Y, Fukushi, S Saijo M, Kurane, I Kyuwa S, Akashi H, Yoshikawa Y, Shigeru Morikawa, S. Reston Ebola Virus Antibodies in Bats, the Philippines. *Emerg Infect Dis,* 2011 17(8):1559-60
- A Okutani, H Tungalag, B Boldbaatar, A Yamada, D Tserennorov, I Otgonchimeg, A Erdenebat, D Otgonbaatar, and S Inoue. Molecular Epidemiological Study of *Bacillus anthracis* Isolated in Mongolia by Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for 8 Loci (MLVA-8) *Japanese Journal of Infectious Diseases* 2011:4:345-348.
- Fujisawa T, Kadosaka T, Fujita H, Ando S, Takano A, Ogasawara Y, Kawabata H, Seishima M, *Rickettsia africae* Infection in a Japanese Traveler with many tick bites. 2012, *Acta Dermato-Venereologica*
- Na-Ubol M, Srimanote P, Chongsa-nguan M, Indrawattana N, Sookkrung N, Tapchaisri P, Yamazaki S, Bodhidatta L, Eampokalap B, Kurazono H, Hayashi H, Nair GB, Takeda Y & Chaicumpa W. Hybrid & El Tor variant biotypes of *Vibrio cholerae* O1 in Thailand, *Indian J Med Res,* 133: 387-394, 2011
- Zhang J, van Hung P, Hayashi M, Yoshida S, Ohkusu K, Ezaki T. DnaJ sequences of *Bacillus cereus* strains isolated from outbreaks of hospital infection are highly similar to *Bacillus anthracis*.