


図6 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>



- 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)

Welcome to MePIC v2.0

Please login to start

User ID: _____ Password: _____

First visit? Please register account.

現在、アカデミアのみアカウント取得可能

[to MePIC manual](#)

図7 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。

MePIC v2.0

Log out
MePIC Manual

便 血液、髄液 咽頭ぬぐい液

MeiSeq GS junior

ID:

Project name

Select file(s) to upload
(Only .fastq.gz or .sff files, up to 2GBytes in total are acceptable.)

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。

Quality trimming and adaptor removal
Trimming params

5' trim length
Trim lower than this q-value
Quality threshold for fastq-mcf.pl
Minimum remaining sequence length

Host genome subtract
Subtract host genome
Database for subtraction

Homology search / read mapping
Search method
Database
E-value
Gap
Filter
Number of hits

質の悪いリード、塩基を除去

ヒト配列を削除
(サル、マウスの選択も可能)

megablast検索 による核酸配列の照合

検索データ (.txt) をダウンロード
→ MEGAN v5 (チュービンゲン大学) のソフトで閲覧する

図8 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。

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

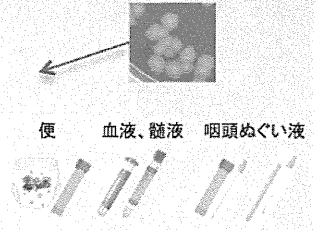
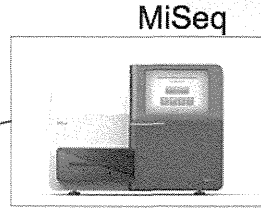
GcoGSA BA

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。



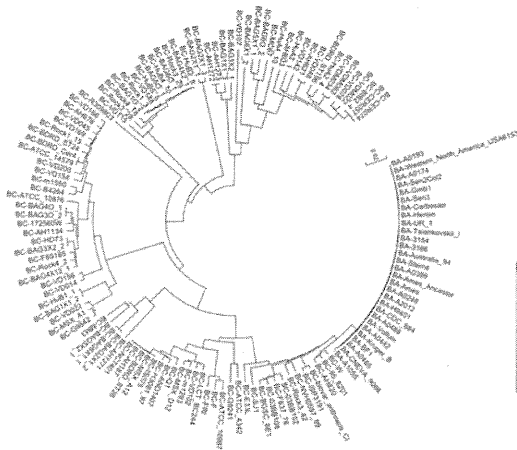
Send an e-mail after finished analyzing.

Mail address: _____

Send 5

Reference genome: *Bacillus anthracis* str. 'Ames Ancestor' chromosome, complete genome. (gii50196905iref|NC_007530.2)

Phylogenetic tree of the original data set.



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



SNP判定のエラーが多い

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

Sequence or region	Whole length	Mapped bp (%) (depth >=5)	
		S5 sequence	S6 sequence
gii50196905iref NC_007530.2	5227419	4914301 (94.0%)	4827010 (92.3%)
gii20520075 giiAE011190.1	181677	163651 (90.1%)	161559 (88.9%)
gii50118566 giiAE017335.3	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: 638038 / 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. (5.5 KBytes)
- Download phylogenetic tree in PDF format. (9.3 KBytes)

LF
EF
PA

図9 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。

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

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 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。2年目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迅速 *in situ* hybridization-AT tailing (ISH-AT) 法を簡便化・迅速化した。最終年度は、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。

A. 研究目的

バイオテロが起こった場合、迅速な診断と病原体の同定が急務である。現在では、病原体の分離同定が困難であっても次世代シーケンス法により、未知の病原体の検出が可能となった。病原体同定後は病原体遺伝子の特異的に検出するリアルタイム PCR 用の primer、probe を作成することにより各組織での病原体の定量解析も可能である。ただしこの方法では病原体がどの細胞に感染しているかはわからない。病原体に対する免疫組織化学用の特異抗体を作成できれば体内での病原体の局在がわかる。既存の特異抗体がない場合は抗体を作製しなければならぬため迅速に対応できない。我々が開発した合成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* 核酸検出法である *in situ* hybridization-AT tailing (ISH-AT) 法は検出したい病原体の塩基配列の一部でもわかればプローブを作成し病原体の遺伝子を検出することが可能である。

本分担研究の3年間の目的は、生物テロ対策のための迅速で特異性の高い病原体の病理組織内検出法を確立することである。

B. 研究方法

(1) 腸管出血性大腸菌ベロ毒素の組織内での検出の試み

腸管出血性大腸菌 0157 剖検例のホルマリン固定パラフィン包埋した腎臓および腸管標本において、抗ベロ毒素抗体：①マウス

抗 Shigatoxin1 (13C4)モノクローナル抗体、マウス抗 Shigatoxin2 (11E10)モノクローナル抗体 (Santa-Cruz), ②ウサギポリクローナル抗 VT1 抗体、ウサギポリクローナル抗 VT2 抗体 (精製 IgG) (帯広畜産大学 倉園先生より分与)、③ウサギポリクローナル抗 VT1 抗体、ウサギポリクローナル抗 VT2 抗体 (ウサギ血清) (デンカ生研杉山先生から分与) をもちいてベロ毒素の検出を試みた。3 種類の前処理条件と 3 種類の検出法 (①HRP-ポリマーEnvision 法 ②LSAB 法 ③CSAII 法 (すべて DAKO 社)) のいずれかを用いてベロ毒素の免疫組織化学を試行した。

(2) *in situ* hybridization-AT tailing (ISH-AT) 法の迅速化の試み

A(H1N1)pdm09 感染ホルマリン固定パラフィン包埋肺組織を用いて、ISH-AT 法の迅速化を試みた。プローブは A(H1N1)pdm 09 (AB538390.1) NP 領域に 2 ヶ所作成した。1 日で検出が終了するように従来のプロトコルを改編した。プローブとのハイブリダイゼーションをオーバーナイトから 2 時間に短縮し、ハイブリ後の洗浄も 15 分 4 回を 5 分 4 回にした。またアルカリホスファターゼの発色系を使用することで感度を上げ、シグナル増幅系のステップ (CSA 法) を省略した。結果を市販されている分岐 DNA-ISH 法と比較検討した

(3) 迅速 ISH-AT 法を用いた重症熱性血小板減少症候群ウイルスのヒト剖検組織における検出

SFTSV 遺伝子の S 鎖に設計したアンチセンス (AS) プローブとセンス (S) プローブを用いた。SFTSV 感染後 6、24、48 時間後の Vero 細胞 (国立感染症研究所ウイルス第 1

部下島先生より分与) のホルマリン固パラフィン包埋細胞切片中に迅速 ISH-AT 法で SFTSV 遺伝子を検出した。さらに SFTS ヒト剖検組織切片上で SFTSV 遺伝子を検出した。また 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) 腸管出血性大腸菌ベロ毒素の組織内での検出の試み

腎臓においては LSAB 法で、ウサギ抗 VT1 あるいは抗 VT2 ポリクローナル抗体 を使用した。Mesangiolytic は、毒素による内皮細胞の障害、血栓による糸球体虚血などにより糸球体係蹄間のメザンギウム領域が膨張破壊ないし変性した病変で、フィブリンの沈着をともなっているが、この部位に一致して陽性シグナルがみられた。このシグナルは、内皮細胞にあったベロ毒素がこの部位に取り込まれて検出されたと考えられた。陽性シグナルは基底膜の内側にあり、血管内皮細胞の部位と一致した。腸管では特異的な陽性シグナルは得られなかった。

(2) *in situ* hybridization-AT tailing (ISH-AT) 法の迅速化の試み

脱パラから発色まで 7 時間で完了できるようにプロトコルを改編し迅速 ISH-AT 法を確立した。(AT)₁₀ 部分をビオチンで修飾しストレプトアビジン-アルカリホスファターゼ (SA-ALP) を結合させ、Fast Red (赤色) で発色させた。従来の Tyramide でシグナル増幅させ DAB (茶色) で発色させる系で

は内因性ペルオキシダーゼ活性を処理するは同程度であった。市販の分岐 DNA プローブを用いる ISH 法と比較してプローブ数が同じ場合は迅速 ISH-AT 法の方が感度が良かった。

(3) 迅速 ISH-AT 法を用いた重症熱性血小板減少症候群ウイルスのヒト剖検組織における検出

迅速 ISH-AT 法により SFTSV 感染細胞で SFTSV ゲノムを検出した。感染 24 時間後までは SFTSV-mRNA 陽性細胞がより多く検出され、48 時間後では SFTSV-RNA (ウイルスのマイナス鎖 RNA 遺伝子) 陽性細胞数の方が多かった。SFTSV 剖検組織において、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、リンパ芽球様細胞の細胞質に検出された。リンパ節切片中の SFTSV コピー数は 10^5 /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) 迅速 ISH-AT 法を用いたその他のウイルスゲノムの検出

国内の発症がない、あるいは少ないため、ヒト病理組織での検出は試行されていないが、中東呼吸器症候群 (MERS) コロナウイルス、H7N9 亜型鳥インフルエンザウイルス、EV71 ウイルス、デングウイルス (1、2、3、4 型) を検出する ISH-AT 用プローブを作成した。特異性は感染細胞などですでに確認されている。

D. 考察

本邦初の SFTS 症例は次世代シーケンス法により診断された。患者の SFTSV の遺伝

子とそ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 遺伝子のコピー数の高い切片においては迅速 ISH-AT 法により 7 時間でゲノムが検出された。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したところ、感度は劣るが、ウイルスの局在は一致し、抗体がない場合の検出系として迅速 ISH-AT 法は優れていると考えられた。

E. 結論

バイオテロに使用される可能性が考えられる毒素の 1 つである腸管出血性大腸菌産生ベロ毒素を組織中に検出することを試み、現在入手できた抗体を用いて糸球体に陽性シグナルが得られたが、判定が困難であった。ホルマリン固定パラフィン包埋組織の免疫組織化学に使用できる抗体の作成は難しく、陽性シグナルの特異性に関しては実際に試行してみないとわからない。バイオテロなど迅速検出を要する場合は、適当な抗体がない場合は迅速 ISH-AT 法が強力なツールになると思われる。今後さらに ISH-AT 法の感度を上げるような改良を試みたい。

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
 - 5) Ablordey A, Amissah DA, Aboagye IF, Hatano B, Yamazaki T, Sata T, Ishikawa K, Katano H Detection of *Mycobacterium ulcerans* by the loop mediated isothermal amplification method, *PLoS Negl Trop Dis* 2012, 6:e1590
 - 6) 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
 - 7) 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.
 - 8) 片野晴隆、佐藤由子、佐多徹太郎、長谷川秀樹: 病原体の同定. *病理解剖マニユアル 病理と臨床* 2012, 30: 269-277.
 - 9) Hatano B, Goto M, Fukumoto H, Obara T, Maki T, Suzuki G, Yamamoto T, Hagsawa K, Matsushita Y, Fujii T, Imakiire T, Kikuchi Y, Takahashi R, Kanai M, Tamura K, Izumi T, Takahashi Y, Iwamoto Y,

- Mimura S, Mukai Y, Takita K, Takeo H, Kitamura R, Shimizu E, Fukushima K, Hakozaki Y, Uehata A, Sakai M, Ohshima S, Shirotani T, Oba K, Hasegawa H, Sata T, Katano H: Mobile and accurate detection system for infection by the 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus with a pocket-warmer reverse-transcriptase loop-mediated isothermal amplification, *J Med Virol* 2011, 83:568-573
- 10) Katano H, Kano M, Nakamura T, Kanno T, Asanuma H, Sata T: A novel real-time PCR system for simultaneous detection of human viruses in clinical samples from patients with uncertain diagnoses, *J Med Virol* 2011, 83:322-330
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) Pathological study of formalin-fixed paraffin-embedded lung tissues with H5N1 influenza infection in Vietnam: Noriko Nakajima, Ngo Van Tin, Yuko Sato, Hoang Ngoc Thach, Harutaka Katano, Pho Hong Diep, Toshio Kumasaka, Nguyen Trung Thuy, Hideki Hasegawa, Luong Thi San, Shoji Kawachi, Nguyen Thanh Liem, Kazuo Suzuki and Tetsutaro Sata Severe Influenza: Burden, Pathogenesis and Management (Second isirv Antiviral Group Conference) October, 2012, Hanoi Vietnam
- 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
 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
 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
 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
 12. 鈴木 忠樹、片野晴隆、大場 靖子、小林 進太郎、佐藤 由子、佐多 徹太郎、澤 洋文、長谷川 秀樹。JC ウイルス後期蛋白質に対する特異抗体を用いた進行性多巣性白質脳症の免疫組織化学的診断法の比較検討。第60回日本ウイルス学会学術集会。2012.11.
 13. 小谷 治、鈴木 忠樹、Naeem Asif、岩田 奈織子、中島 典子、片野晴隆、田口 文広、長谷川 秀樹、清水 博之、永田 典代。新生仔マウスにおける新規ヒトカルジオウイルス（Saffold virus）の神経病原性の解析。第60回日本ウイルス学会学術集会。2012.11.
 14. 片野晴隆. エイズ剖検例における日和見感染症と腫瘍の実態. 第26回 日本エイズ学会学術集会総会 横浜 2012.11.
 15. 高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルス感染症で死亡したベトナム小児例の病理学的解析: 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、熊坂利夫、佐多徹太郎、長谷川秀樹 第101回日本病理学会総会（東京）2012年4月
- 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

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。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。

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
一 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。透過型電子顕微鏡学的検査の利点と欠点を表 1 にまとめた。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 点を課題とした。

B. 研究方法

1. 電子顕微鏡学的迅速診断法の標準手順の見直し

1) インフルエンザウイルス、大腸菌等を用いて電子顕微鏡学的迅速診断法の標準手順に従い、作業を見直した。

2) 主なエンベロップウイルスを対象として電子顕微鏡学的迅速診断法の標準手順に従い検索を行った。

3) Robert Koch 研究所主催の電子顕微鏡学的ウイルス診断の外部評価(External Quality Assurance Scheme in EM Virus Diagnosis EQA-EMV)に参加し、これを検査実施者の教育訓練の一環とした。同時に教育訓練の標準手順・記録書の整備を行った。

2. 細菌の走査電子顕微鏡標本作製の標準手順方法の決定

緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) を対象として、走査型電子顕微鏡装置 JSM-6700F(日本電子)を用いて観察し、適切な培養、固定、および作製条件を検討し、標準手順方法を決定した。

3. 菌液注入サル肝組織材料を用いたレファレンス標本の作製

バイオテロ関連病原体と鑑別診断に必要な病原体を選択し、*Burkholderia* 属、*Clostridium* 属、*Corynebacterium* 属、*Helicobacter* 属、*Bartonella* 属、*Bordetella* 属、*Mycoplasma* 属をカニクイザルの肝組織に直接注入し、10%ホルマリン緩衝液固定パラフィン包埋切片を作製した。なお、ボツリヌス菌標本については10%ホルマリン緩衝液で1週間以上浸漬固定し、固定組織の中央部から組織を採取、菌体が完全に死滅したことを培養で確認後、指定実験室から搬出した。また、サル肝組織は国立感染症研究所動物管理室より供与いただいた。

C. 結果

1. 電子顕微鏡学的迅速診断法の標準手順と教育訓練の整備

1) BSL2 病原体を想定した電子顕微鏡学的迅速診断法の標準手順作業内容の見直しを行い、手順書の改訂を行った(図 1)。

2) 今回検索対象としたオルソミキソウイルス、パラミキソウイルス、コロナウイルス、ブニヤウイルス、フラビウイルス、ピコルナウイルスは、いずれも、細胞培養上清でも検査には十分な粒子濃度であった(図 2)。エンベロープを有し、直径 80~120 nm の球状のウイルス粒子の場合、実際の検査ではネガティブ染色の状態によって鑑別が困難な場合があることがわかった(特に同時感染を判断する場合)。また、細胞

にはこの程度の大きさの球状物は多く含まれており、細胞内構造物がサンプルに多く混入しているとウイルス粒子との判別が困難となった。特に、ブニヤウイルスは、粒子の球状が不定形で、エンベロープが比較的不明瞭であったため、初見の場合は、粒子そのものの存在の判定が非常に困難であった。

3) 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。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。

2. 細菌の走査電子顕微鏡標本作製法の標準手順

培養条件は滅菌済みスライドガラス上で数時間~一晚以内とした。固定、洗浄は以下の条件とした。カコジル酸緩衝液による洗浄後、前固定 4°C 一晚、2.5% グルタルアルデヒド液 1% パラフォルムアルデヒド混合 0.1M カコジル酸緩衝液。カコジル酸緩衝液による洗浄後(10分6回)、1次固定1時間、1% OsO₄ 液。カコジル酸緩衝液による洗浄後(10分6回)、2次固定1時間、1% タンニン酸添加 0.1M CA 緩衝液。カコジル酸緩衝液による洗浄後(10分6回)、後固定1時間 1% OsO₄ 液。カコジル酸緩衝液による洗浄後、50%~100% エタノール系列による脱水、酢酸イソアミルへの置換。臨界点乾燥装置(日本電子)を用いて乾燥後、プラチナコーティング(20秒2回)。その後、走査電子顕微鏡で観察した。鞭毛は維持され、脱水による菌体表面の収縮は殆ど観察されず、

標本の状態は良好であった。結局、緑膿菌の他、マイコプラズマ、類鼻疽菌とボツリヌス菌の粒子像を得た。

3. 菌液注入サル肝組織材料を用いたレファレンス標本

常法どおりパラフィン切片を作製し、組織ギムザ染色、グラム染色、芽胞染色を実施し菌体が肝組織内に注入されていることを確認した。各細菌につき、3ブロックずつ参照標本を作製した。

D. 考察

ウイルスの電子顕微鏡観察について

直径 80~120 nm の球状の粒子は、細胞には多く含まれており、ウイルス粒子検索に準備する感染細胞の細胞変性効果が進みすぎている（すなわち、壊死細胞が多く含まれている）と、細胞内構造物が混入しやすく、また、ウイルス粒子も壊れているものが多くなる。具体的には、エンベロープの剥離や、粒子破壊、ヌクレオカプシドプロテインの切断などがみられ、診断に影響する。

ブニヤウイルスは 2013 年 1 月に本邦初の SFTS ウイルス感染患者死亡例が報告されたこともあり、今後は観察する機会が増えるかもしれない。ブニヤウイルスは比較的、観察が困難なウイルス粒子であり、参照標本を準備しておくこと、教育訓練を維持することの重要性が強調された事例であった。

EQA-EMV で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。

細菌の電子顕微鏡観察について

細菌の走査電子顕微鏡標本作製法の標準手順方法を決定した。標本作製に際しては、細菌の種類によって適切な培養条件が異なるため、それぞれの病原体の専門家と協議を行いながら適切な培養標本を作成する必要がある。検討の結果、固定以降の操作は今回決定した方法を基準とすることとした。なお、バイオテロ関連病原体の芽胞菌は、ネガティブ染色法に用いる固定法は 10%パラフォルムアルデヒド 0.05%グルタルアルデヒド固定液 2 時間とした。

2012-13 年にかけて新興感染症がいくつか出現した。MERS-CoV, H7N9 インフルエンザ、SFTSV の電子顕微鏡撮影写真は一般へ情報提供や感染症の理解にも役立った。正確な情報を得る、もしくは伝えるためにも、技術者の正確で安定した標本作製技術と検査する者の高いスキルの維持が重要である。

E. 結論

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行い、標準手順とレファレンス標本を確立した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 永田典代、長谷川秀樹、佐多徹太郎。第 11 章電子顕微鏡/病理組織学的検査。田代真人、牛島廣治編集。ウイルス感染症の検査・診断スタンダード 羊土社 2011. p410-439

2. 永田典代、長谷川秀樹。第2章ウイルス分離培養 第3項 実験動物、等。田代真人、牛島廣治編集。ウイルス感染症の検査・診断スタンダード 羊土社 2011. p257-268

3. Lethal canine distemper virus outbreak in cynomolgus monkeys in Japan in 2008. Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzaki Y, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Fukushi S, Mizutani T, Yoshikawa T, Otsuki N, Kurane I, Komase K, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Takeda M, Morikawa S. *J Virol.* 2013. 87:1105-1114.

4. Analysis of the humoral immune responses among cynomolgus macaque naturally infected with Reston virus during the 1996 outbreak in the Philippines. 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. *BMC Vet Res.* 2012. 8:189.

5. 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

Nagata N, Kataoka M, Sato Y, Sakai K, Iwata N, Suzuki T, Saijo M, Morikawa S, Kurane I, Sata T, Hasegawa H. Case reports with diagnostic electron microscopy and pathology for infectious diseases: The past five years experience, from 2007 to 2011. Glienicke Workshop on Electron Microscopy in Infectious Diseases - Diagnostics and Research 2012.10. Berlin

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

表 感染症診断検査における電子顕微鏡の利点と欠点

利点	迅速診断が可能	ネガティブ染色は 30 分程度で診断可能
	病原体の種類を検討をつけることが可能	ウイルスか細菌か、エンベロープ、芽胞形成の有無
	他の手法では検出困難な病原体の検出が可能	病原体毎に至適化された特殊な試薬等が不要
	包括的な鑑別診断が可能	臨床情報はある程度不要
欠点	低感度	10 ⁶ 粒子数/ml 以上の高濃度のサンプルが必要
	実施者には豊富な経験と高いスキルが必要	正確な診断のためにはトレーニングが必要
	電子顕微鏡は高価で操作が煩雑	病原体診断には数十 nm 程度のウイルス粒子を観察できる高い分解能が必要
	自動化は困難、処理量に限度がある	人間が観察し判断する必要

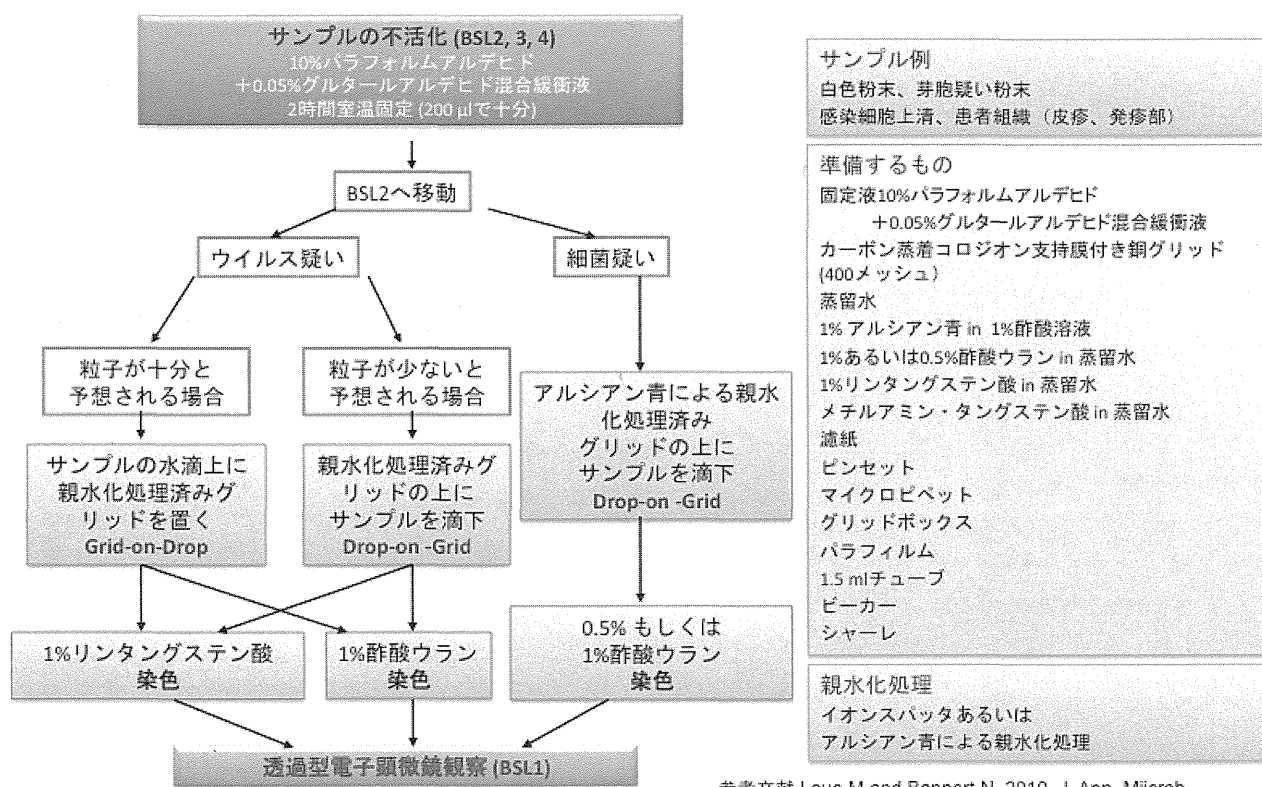


図1 バイオテロ・感染症疑いサンプルを用いた透過型電子顕微鏡学的迅速診断法の標準手順

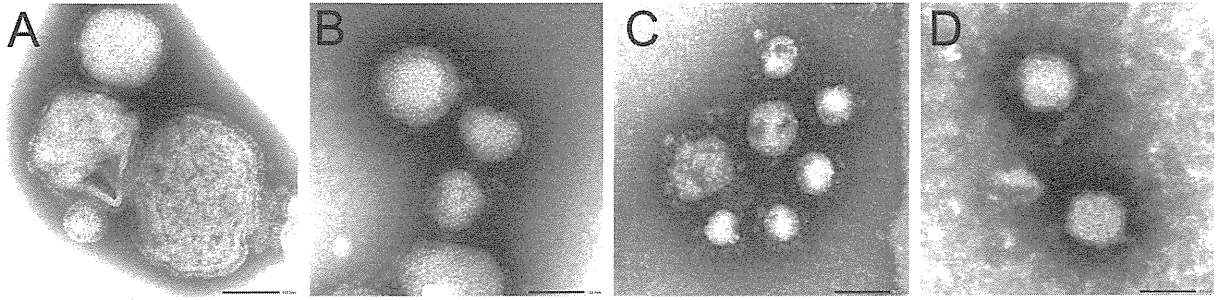


図2 エンベロープウイルスのネガティブ染色像。4%グルタルアルデヒド固定、UV照射による不活化処理の後、2%リンタングステン酸染色、30秒。A. パラミキソウイルス（精製ウイルス粒子）。直径80~300 nm 大小不同、円形、エンベロープは比較的長く、明瞭。80 nmの粒子が必ず存在し、オルソミキソウイルス粒子と類似する（左下）。粒子内にはヌクレオカプシドプロテインが折りたたまれて存在する（右下）。B. オルソミキソウイルス（精製ウイルス粒子）。直径80~200 nm 大小不同、円形、時に不定形。エンベロープは判別しやすいが、パラミキソウイルスに比べると短い。C. コロनावirus（細胞培養上清）。80 nm~100 nmの円形粒子だが、特徴的なコロナ状のスパイクを有する。D. ブニヤウイルス（細胞培養上清）。100~110 nmの円形粒子だが、比較的輪郭が不明瞭でいびつ。エンベロープは不明瞭で繊細（fuzzyと表現される）。

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

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、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。一方で、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。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。

H23年度からH25年度の間には本研究班では、炭疽発症予防効果をもつ粘膜ワクチンの開発、生物兵器に使用される可能性の高い細菌性毒素および植物由来毒素に対する検出系のキット化への取り組み、および複数の病原体を同時に検出できる核酸クロマトの開発を行なった。

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。本研究では、炭疽ワクチンの新たな候補成分として芽胞表層タンパクに着目し、炭疽に対する防御効果について検討した。

細菌毒素に関しては、CDCが指定する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) と大腸菌の易熱性下痢毒素 (LT)

(カテゴリーB: Enteric Pathogens)、黄色ブドウ球菌のエンテロトキシン (SEA&SEB、カテゴリーB: Enteric Pathogens) 及び腸炎ビブリオの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、その普及を目指す。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、本研究ではこれらの毒素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。本研究期間においては各細菌毒素に対する特異的抗体を作製し、イムノクロマト法、ELISA法等の免疫学的迅速同定法の構築を行った。

植物由来の毒素であるリシンは、トウゴマ (*Ricinus communis*) の種子から抽出される糖タンパク質で、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 µg/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を目的としてリシン特異的抗体の作製を行った。

また、バイオテロが発生した場合、できる限り被害を軽減するために、使用された生物剤の迅速な同定が求められる。生物剤の種類によって対応が異なるため、複数の病原体を迅速に検出するシステムの構築が望ましい。本年度は現場での生物剤迅速検出系構築のための検査ツールを開発した。

B. 研究方法

B-1. 炭疽に対する粘膜ワクチンの開発

H23年度は、炭疽菌芽胞の表層タンパク質

の同定とその粘膜免疫における免疫原性について検討した。*B. anthracis* Pasteur II 苗の病原性株(pXO1+, pXO2+) 及び 非病原性株(pXO1-, pXO2-)を使用し、非病原性株から芽胞を高純度に精製し、4%パラホルムアルデヒド固定により不活化した後、家兎に免疫し、抗炭疽菌芽胞抗体を作製した。続いて、病原性および非病原性株芽胞から芽胞タンパクを抽出し、SDS-PAGE に展開後、タンパクを PVDF 膜に電気的にトランスファーし、前述の抗炭疽菌芽胞抗体を用いてイムノブロットを行った。反応性を示すバンドをゲルから切り出し、回収した。ゲル片を MilliQ 水で振とう洗浄、脱色し、アセトニトリルと炭酸水素ナトリウム水溶液処理を行った。乾燥させたゲル片に 10 mM ジチオトレイトール(DTT)/25 mM 炭酸水素アンモニウム溶液を加え、56°C で 45 分間インキュベートした。チューブを室温に戻した後、25 mM 炭酸水素アンモニウムに溶解した 55 mM ヨードアセトアミドを加え、遮光しながら 30 分間処理し、タンパク質をアルキル化した。洗浄後、25 mM 炭酸水素アンモニウムで 20 倍希釈したトリプシン溶液(5 µg/ml)で 37°C で一晩インキュベートし、トリプシン消化した。10 分間ソニケーションすることによりペプチドを抽出し、1% TFA/50%アセトニトリルを加え、タンパク抽出液を得た。抽出液は遠心濃縮した。サンプルを Pre-spotted Anchor Chip に 1 µl アプライし、TFA 処理後、乾燥させ、質量分析によりスポット上のペプチド断片を Autoflex MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics)により質量分析を行った。測定条件は、リニアモードで、レーザーは 110 ns でパルス照射した。キャリアレーションは、Anchor Chip に付属したものを用いた。得られたスペクトルは、蛋白質同定ソフト MASCOT を用いて解析し、該当するタンパク質 (EA1) を同定した。

次に同定されたタンパクの組換えタンパクを作製した。炭疽菌ゲノムから、該当タンパクをコードする遺伝子を PCR により増幅し、これを pGEX-6P-1 ベクターにクローニングし、GST タグ付組換えタンパク発現ベクターを構築した。これを BL21 (DE3) に導入し、定法に従い、目的のタンパクを精製した。GST タグは生成過程でカラムオンダイジェストにより、組換えタンパクから外した。

同定タンパクの炭疽菌での発現解析に使用するため、上述の精製組換えタンパクを家兎に免疫し、特異抗体を得た。

免疫染色は、4% PFA で不活化した炭疽菌芽胞を用いた。非特異反応を防ぐために 3% skim milk in T-PBS により 30 分間ブロッキング後、特異抗体を 1 次抗体、Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG を 2 次抗体として、免疫染色を行った。染色した芽胞は、蛍光顕微鏡およびフローサイトメーターにより観察した。すなわち、スライド上に染色芽胞を載せ、ProLong Gold で封入し、蛍光顕微鏡下で観察した。取得した画像は DP70-BSW ソフト(Olympus)により解析した。また、フローサイトメーター解析では、FACSCantII (Becton Dickinson)を用いてデータを取得し、FACSDiva ソフト(Becton Dickinson)で解析した。

続いて、同定した芽胞表層タンパクの粘膜免疫での抗原性や有用性を検討するため、以下の方法により粘膜免疫した。実験動物には 6 週齢の雄の BALB/c マウスを用い、ジエチルエーテルを用いて軽く麻酔した後、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。投与スケジュールは、週 1 回あるいは 3 回×3 週間で行った。アジュバントを用いた免疫では、組換えタンパク単独又は 5 µl のアジュバントと組み合わせて週 1 回又は週 3 回×3 週間投与した。アジュバントには合成二本鎖 RNA の poly (I:C) を用いた。各群のマウスは定期的に採血を行い、血中および粘膜抗体価を ELISA により測定した。

H24 年度は、EA1 を粘膜投与した場合の炭疽発症予防効果について検討した。

実験動物は 6 週齢の雄の 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。表 1 に免疫条件を示す。投与スケジュールは週 3 回×3 週間で行った。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。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は ELISA により測定した。

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 5×10³ CFU/mouse)は PBS に懸濁して調整した。100 µl の芽胞液を BALB/c マウスに腹腔内投与した。投与後、マウスの状態を定期的に観察した。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。

感染臓器（肺、肝臓、脾臓）中の菌数を測定するため、投与後 2 日目および 3 日目にマウスを頸椎脱臼により安楽死させ、臓器を回収した。臓器の重量に対し、100 mg/ml となるように滅菌水を加え、ペッスルを用いて注意深く破碎した。臓器懸濁液を 10 倍段階希釈し、100 μ l ずつ L-agar に塗布し、37°C で一晚培養後、コロニー数を計測した。また、マウスから肺、肝臓および脾臓の一部を回収し、10 N マイルドホルム（Wako）により固定した。定法に従い、パラフィン包埋後、2 μ m の切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色（HE 染色）を行った。また、マウス胸部のマルチスライス X 線 CT (Computed Tomography) 画像を撮影し、肺野の病変所見を観察した。

H25 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 μ g となるように 5 ~ 10 μ l 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 2）。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 7.6×10^4 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 μ l 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-2. 細菌毒素検出キットの開発

特異的プライマーを用いて PCR 法により増幅した各毒素をコードする遺伝子を発現ベクターである pET28a もしくは pCold-TF のマルチクローニングサイトに挿入し、毒素タンパク質をコードする組換えプラスミドを構築した。各毒素タンパク質は N 末端あるいは C 末端のいずれかに His-Tag を融合する様に設計された。組換えプラスミドをタンパク質発現用大腸菌株 *E. coli* BL21(DE3) に導入し、各毒素の組換えタンパク質を大量発現する組換え大腸菌株を得た。組換え大腸菌株内で IPTG 誘導により発現させた組換え毒素タンパク質は Ni²⁺-NTA レジン（キアゲン）充填カラムを用いて常法により精製を行った後に、ゲルろ過カラムもしくは electrogel elution 法を用いて再精製を行った。各精製標品は SDS-PAGE で展開後、銀染色により精製度の確認を行った後に抗原として使用した。各精製標品はアジュバント（FCA）と混合し家兎に免疫した。最初の免疫から 3 週間後に最初の追加免疫を行い、それ以降は血中抗体価の上昇がサチュレイトするまで 1 週間ごとに追加免疫を行った。血中抗体価はオクタロニー試験により行った。得られた抗血清から抗原を結合させたアフィニティカラムにより毒素特異的抗体を精製した。得られた特異的抗体はサンドイッチ ELISA、Bead-ELISA、イムノクロマトストリップなどの作製に使用された。イムノクロマトストリップの作製は（株）日本ハム中央研究所により行われた。

B-3. 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。そこで本研究では、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た。

H23 年度には NCBI 遺伝子データベースのリシン B サブユニット（以下、RTB）の塩基配列を元に、RTB のヌクレオチドを合成した。これにリンカー配列を付加し、pET-32 ベクタ

一にクローニングし、発現ベクターを構築した。定法に従い、大腸菌組換えタンパク発現システムにより、可溶性 RTB 組換えタンパク（以下 rRTB）を精製した。rRTB100 µg を抗原として等量の TiterMax と混合して抗原液を調整し、定法に従い、BALB/c マウスおよび家兎に免疫した。免疫前および免疫後の血液を定期的に採取し、血清中の抗 rRTB 抗体価を ELISA により測定した。抗体価の上昇を確認後、Porotein A あるいは Protein G カラムにより抗血清から IgG 抗体を精製した。得られた抗体の反応性と特異性については、ELISA とイムノブロットにより検討した。

H24 年度には H23 年度までに得られた rRTB が大腸菌内で不溶性の封入体を形成しており、立体構造に変化が生じている可能性があったため、様々な手法でリフォールディングを試みた。しかしながら凝集を完全に抑制することは困難であった。天然型リシンと十分に反応する抗体を得るためには、立体構造を保持した抗原が望ましい。そこで、H24 年度には *Brevibacillus* 発現系を利用した分泌型 RTB 発現系の構築を行った。H23 年度に構築した発現ベクターを鋳型として、*rtb* 遺伝子を PCR で増幅し、*Brevibacillus* 用発現ベクターに組み込んだ。この時、6×His タグを N 末あるいは C 末に付加できるようプライマーを設計した。また、4 種類のシグナルペプチドを用意し、計 8 種類の発現ベクターを構築した。作製した発現ベクターはエレクトロポレーション法に宿主細胞に遺伝子導入した。得られた形質転換体のコロニーを釣菌して、液体培地にて培養した。SDS-PAGE および抗 His 抗体を用いたイムノブロット法による発現確認を行った。

H25 年度には H24 年度に作製した組換え *Brevibacillus* 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-4. バイオテロ病原体を多項目で迅速にスクリーニングする方法の開発

バイオテロの発生現場や臨床現場で実施可能な簡便で迅速、かつ多検体項目についてスクリーニング可能な検出法の開発を行った。

検出法は病原体の特異的な遺伝子領域を標的とした遺伝子増幅法を原理とし、現行の検査法で課題となっている現場での検出、迅速性、簡便性、多検体項目の検出について検討、開発をした。BSL3 の病原細菌であるブルセラ、炭疽、野兎病、ペスト、ボツリヌス、チフス、リケッチア、クラミドフィラ、コクシエラ、および類鼻疽に対して、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°C 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、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、ビオチン標識配列を混合し、PCR 反応を行った。スクリーニングで得る結果を迅速に確認するため、一つの病原体に対してハウスキーピング遺伝子、病原因子、16S rDNA を組み合わせて 2-3 のターゲットで個々の病原体を確認するプライマーセットを作成した（プライマー配列については特許申請を考慮して記載しない）。PCR 反応後、増幅産物を目視で判定できるように、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。ビーズには青色ラテックスを使用した。

（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に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. 炭疽に対する粘膜ワクチンの開発

H23 年度には新規ワクチン候補分子を探索するため、炭疽菌の感染型である芽胞の表層タンパクの同定を行った。炭疽菌の病原因子は pXO1 および PXO2 の二つの病原プラスミドに多く存在しているが、プラスミド上の因子は環境などにより容易に脱落することがあるため、染色体上にコードされており、かつ炭疽菌表層に存在する分子を標的とした。そのため、両病原プラスミドを持たない非病原性株の芽胞を抗原として、抗炭疽菌芽胞抗体を作製し、この抗体と反応する分子を同定す