

図20 *Brevibacillus*発現系による分泌型RTBの発現

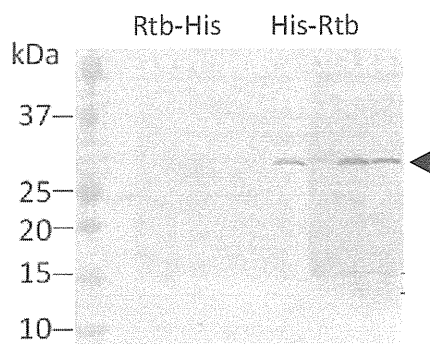
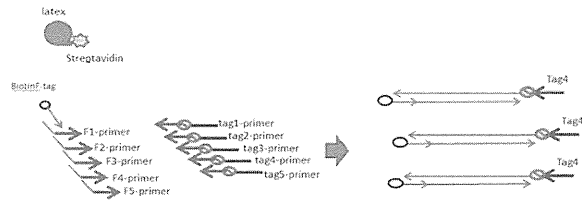


図21 イムノブロットによる発現確認



図22 モバイル型遺伝子増幅装置とキャリーバッグ

タグプライマーによるPCR



核酸クロマト

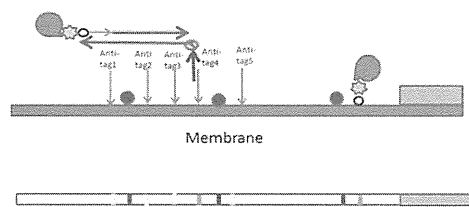


図23 核酸クロマトの原理

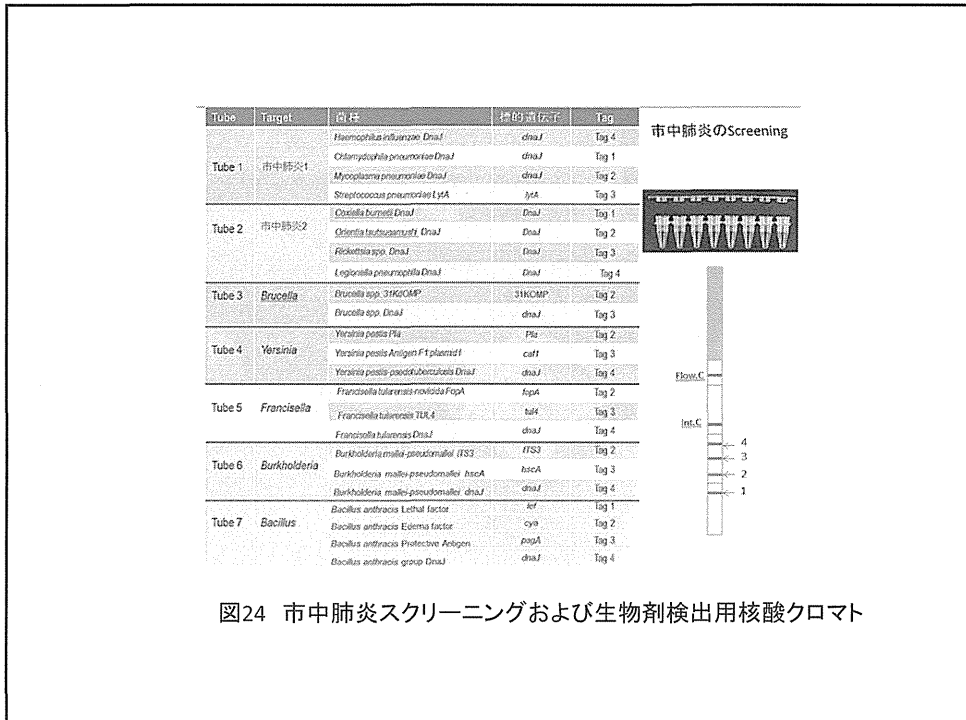


図24 市中肺炎スクリーニングおよび生物剤検出用核酸クロマト

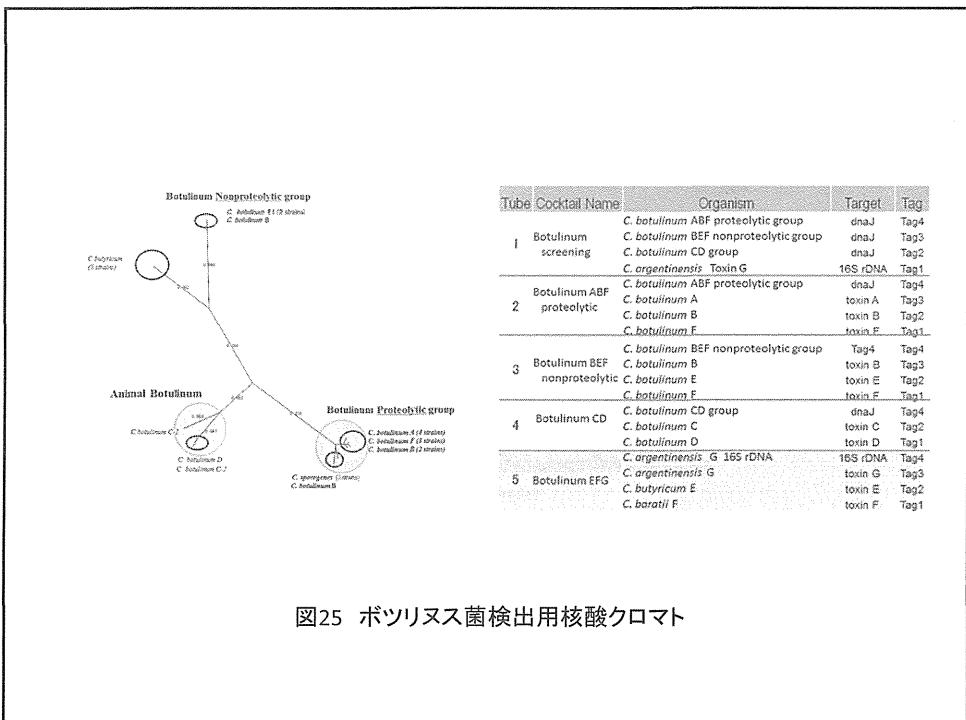


図25 ボツリヌス菌検出用核酸クロマト

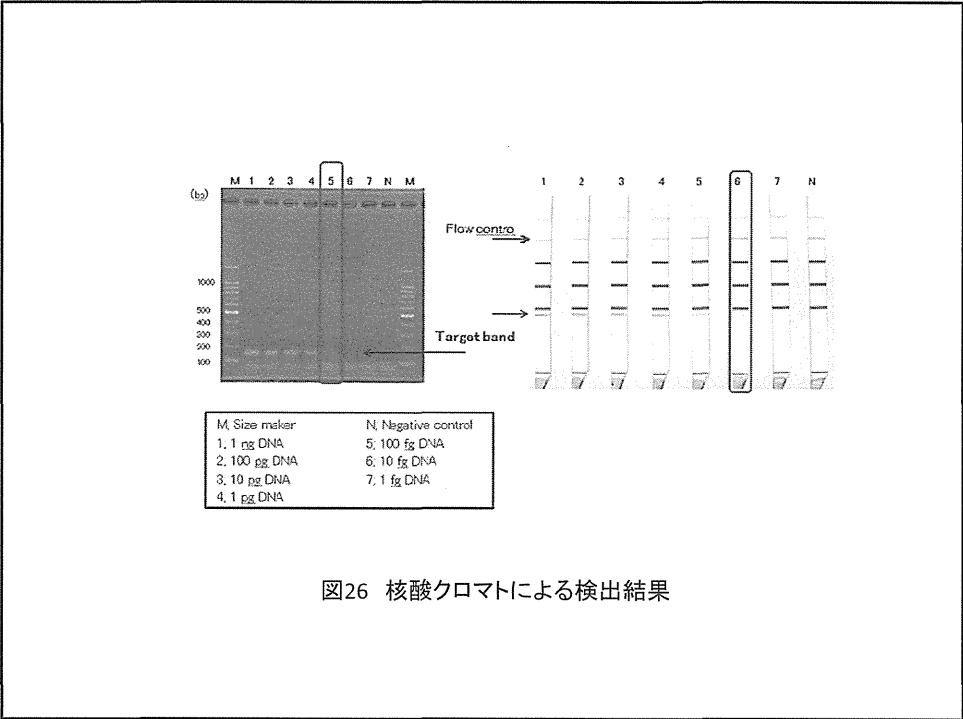


図26 核酸クロマトによる検出結果

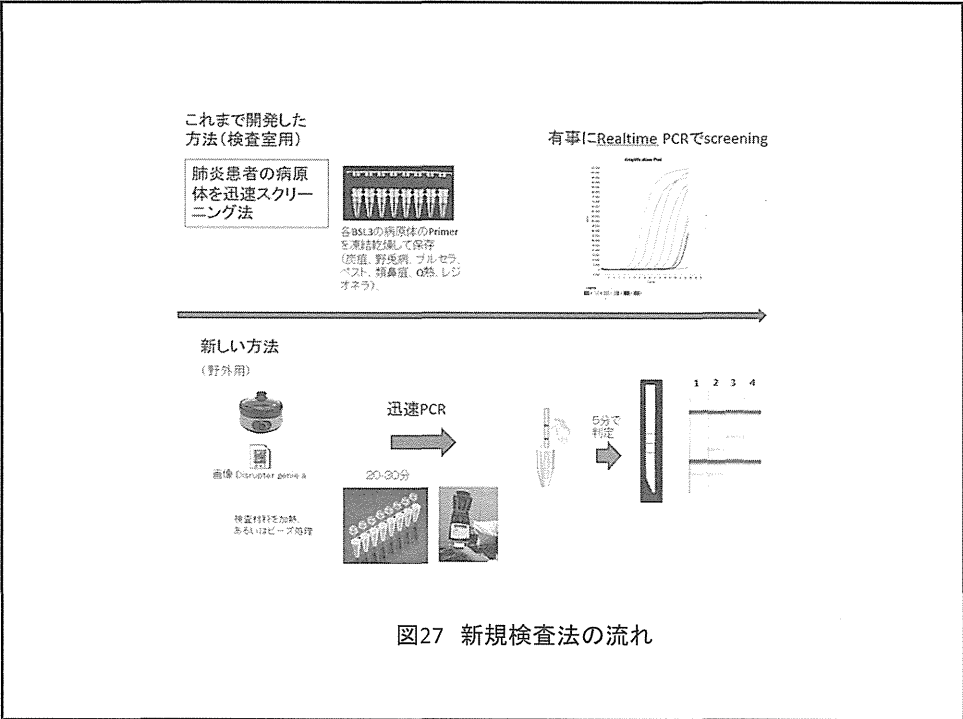


図27 新規検査法の流れ

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

バイオテロ危機発生時への対応  
－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
研究協力者	三觜 雄	札幌市衛生研究所
	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	国立感染症研究所
研究協力者	梅本 隆	国立感染症研究所
研究協力者	田辺 公一	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

平成 23-24 年度には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。平成 23 年度には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。平成 24 年度には真菌感染症の中で、最も致死率の強いコクチ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平成 25 年度には、国立感染症研究所真菌部の指導の下、研究協力員の実技研修を行い、検出技術の向上を図った。

この実技研修は、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出対応の一助になると考える

## A. 研究目的

バイオテロを含む健康危機発生時に、先ず第一に現場で検査対応するのは全国地方衛生研究所である。平成20年度から対象病原体検出法の標準化の作製を目的として、国立感染症研究所でバイオテロ関連特定病原体の網羅的スクリーニング検査・検出キットが作成された、地方衛生研究所が感度、特異性、操作性等について評価してきた。対象病原体として、ウイルスでは天然痘スウィルスワクチン株、アデノウイルス、インフルエンザウイルス H5N1、SARS コロナウイルス等、また、細菌では *Bacillus anthracis*、*Burkholderia pseudomallei-mallei*、*Yersinia pestis*、*Coxiella burnetii*、*Clostridium botulinum toxin A, B* 等を用いた。

平成23年度からはバイオテロ対象病原微生物である真菌を対象に、これまでと同様に国立感染症研究所で作製された網羅的迅速検出法について、検出精度の評価を行った。

過去三年間にバイオテロに使用される可能性のある病原体の中のウイルスと細菌については、評価研修と共に研究協力者がその技術を維持し、技術伝達体制を構築しつつある。一方、バイオテロ対象病原体の一つである真菌についての評価技術研修の初年度は、一般的な真菌検出について国立感染症研究所で作成された網羅的測定キットを用いて地方衛生研究所で測定精度の評価を行った。その結果、研究協力の8地衛研では、ブラインドサンプル; *Candida albicans*、

*Aspergillus fumigates*, *Cryptococcus neoformans*, を特定することが出来た。

しかし、この評価の過程を通して検査精度のさらなる向上のみならず真菌検体そのものの取り扱い等について様々な角度から提言された。二年目は致死率の高い *Coccidioides* 類について評価研修を行った。技術的な未熟さを補うべく、最終年度には研究協力者の実技技術研修会を設定、実際の *Coccidioides* 属遺伝子の検出を実施し問題点を分析、討論を目的とした。

## B. 研究方法

国立感染症研究所で作製されたバイオテロ対象の真菌の迅速網羅的検出法に従った。即ち、遺伝子学的同定法は、一般的に推奨された同定法に準拠しておこなう事とした。

### 1. 方法

共同プロトコールとして評価機関に試薬・サンプルと共に送付された。

### 2. 配布サンプル

#### 1) 平成23年度

- ① Positive control (PC); *Candida albicans* genome DNA
- ② Negative control (NC)
- ③ *Klebsiella pneumoniae* genome DNA
- ④ blind DNA sample 1 (1)
- ⑤ blind DNA sample 2 (2)
- ⑥ blind DNA sample 3 (3)
- ⑦ PCR premix NL (NL)
- ⑧ PCR premix ITS (ITS)

#### 2) 平成24年度

(1) 用意された NL1/NL4 primer を用いて blind DNA 検体の検出成績

Sample 1 : 592bp

*Aspergillus fumigatus* と 99% の相同性

Sample 2 : 568bp

*Ajellomyces capsulatus* と 99% の相同性

Sample 3 : 676b

*Cunninghamella polymorpha* および

*Cunninghamella bertholletiae* と 99% の相同性

Sample 4 : 565bp

*Coccidioides immitis* および

*Coccidioides posadasii* と 99% の相同性

(2) Coi9-1F/Coi9-1R primer を用いた検出成績

Sample 4 : 595bp (reverse primer 側のみ解析可能)

*Coccidioides posadasii* および

*Coccidioides immitis* と 99% の相同性

3) 平成 25 年度

(1) 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

(2) 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。

(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) 検出成績

全て研究協力者の測定結果では、blind samples について同定することが出来、シーケンス結果も一致した。また、各地衛研から検査測定評価について意見が

提出された。すなわち PCR 検出法の条件、真菌にユニバーサルな検出系であるため検出可能な他の真菌類の菌名の開示、検出測定マニュアルの作製等であった。

また、真菌同定検査法の確立は、バイオテロ対策のみならず、食品苦情事例にも非常に有用であるとの意見もあった。

2) 7 研究協力者の中で 4 協力者が正確に *Coccidioides* 遺伝子を検出することが出来た。他の研究協力者にはコンタミのような結果がでる、との技術的な課題、PCR 反応系の不具合、プライマーの設定条件、PCR 反応酵素系の確認の必要性等の課題が提言された。

3) このような検出技術の未完成部分を補足すべく、*Coccidioides* のみに限定した検出実技研修を行い、多くの研究協力者が正確に *Coccidioides* 遺伝子の検出が可能となった。

## D. 考察

アメリカ CDC によるバイオテロ対象重要疾患としたカテゴリー A, B, C 分類には、それぞれ A:6 疾患、B:12 疾患、C:5 疾患 (2003) を設けている。その中で、特に高い死亡率、感染力等をもつカテゴリー A には、天然痘、炭疽、ペスト、ポツリヌス中毒、それに各種のウイルス性出血熱が含まれている。カテゴリー A 対象微生物は、国立感染症研究所で作製されたバイオテロ対象病原体の網羅的測定キットを用いた対象病原体遺伝子検出の測定評価による研修を行ってきた。これらに引き続き、バイオテロに使用される可能性高い真菌類の検出技術の習得を開始した。しかし、バイオテロ対象となる可能性の極めて高

いコクシジオイデス、ヒストプラスミン、トリコセテン・マイコトキシンなどの真菌類を対象にした検出検査では期待されていた成果は望めなかった。

細菌やウイルスに対する検査・同定技術は優れている地方衛生研究所は真菌検査に馴染めていないのが大きな理由と考えられた。しかし、二年間に亘る測定実技研修等により測定技術は向上した。

今後は、ウイルス、細菌のみならずバイオテロ対象病原体真菌の検出には、これらの地方衛生研究所の研究協力者が核となり、バイオテロ健康危機発生時には、技術的指導のみならず情報連携ネットワークの中心としてバイオテロ対象病原体検出の中核となることを望んでいる。

また、最終年度に作成した「バイオテロ対策病原性真菌検査マニュアル」は今後地方衛生研究所の真菌検査活動に大いに役立つものと期待している。

## E. 結論

バイオテロ対象病原体の一つである真菌の網羅的測定キットを用いて地衛研で測定評価を行った。その結果、研究協力者地衛研では、*Coccidioides* 類の遺伝子検出、菌種を特定することが出来た。

作成した「バイオテロ対策病原性真菌検査マニュアル」は有用な検査対応の一助となると考える。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Sugiura Y, Hironaga M. *Arthrographis kalrae*, a rare causal agent of onychomycosis, and its occurrence in natural and commercially available soils. *Med Mycol.* 48:384-389, 2010.
- 2) Noriko Nakajima, Yuko Sato, Harutaka Katano, Hideki Hasegawa, Toshio Kumasaka, Satoru Hata, Shinya Tanaka, Tomonori Amano, Takahiko Kasai, Ja-Mun Chong, Toshihiko Iiduka, Iwao Nakazato, Yohko Hino, Akihiko Hamamatsu, Hisashi Horiguchi, Tomoyuki Tanaka, Akio Hasagawa, Yoshiaki Kanaya, Reiko Oku, Takeshi Oya and Tetsytaro Sata. Histopathological and immunohistological findings of 20 cases with 2009 H1N1 virus infection. *Modern Pathol.*(2011), 1-13
- 3) Kushiro M, Saitoh H, Sugiura Y, Aoki T, Kawamoto S, Saito T. Experimental infection of *Fusarium proliferatum* in *Oryza sativa* plants; fumonisin B<sub>1</sub> production and survival rate in grains. *Int J Fd Microbiol.* 156:204-208, 2012.
- 4) Sugiura Y. *Fusarium* species: mycotoxin production, and plant and murine pathogenicity. *Mycotoxins.* 62: 49-61, 2012.
- 5) 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.

なし

2. 学会発表
- H. 知的財産権の出願・登録状況
  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（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

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

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 感染症研究分野
研究協力者	相野田 祐介	東京女子医科大学病院 感染症科
	加藤 康幸	国立国際医療研究センター病院 国際感染症センター
	竹下 望	国立国際医療研究センター病院 国際感染症センター
	倉井 華子	静岡がんセンター 感染症科
	関谷 紀貴	がん・感染症センター都立駒込病院 臨床検査科
	菅沼 明彦	がん・感染症センター都立駒込病院 感染症科
	柳澤 如樹	がん・感染症センター都立駒込病院 感染症科
	西條 政幸	国立感染症研究所 ウイルス第一部
	安藤 秀二	国立感染症研究所 ウイルス第一部
	井上 智	国立感染症研究所 獣医科学部
	谷口 清洲	国立病院機構三重病院
	宮崎 義継	国立感染症研究所 真菌部
	河野 茂	長崎大学病院 第二内科
	國島 広之	聖マリアンナ大学 総合診療内科
	加來 浩器	防衛医科大学校 防衛医学研究センター
	古谷 信彦	文京学院大学保健医療技術学部・臨床検査学科
	藤井 毅	東京医科大学八王子医療センター
	鯉淵 智彦	東京大学医科学研究所附属病院 感染免疫内科

研究要旨 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。

A. 研究目的

生物テロに用いられる可能性のある病原微生物は多彩で、その多くは極めて稀でかつ重篤な

疾病を引き起こす。すなわち、感染拡大防止と生命予後改善のためには、生物テロ関連疾患の臨床診断、検査材料および検査方法の選択、治

療法の選択について、多くの医療従事者が正確な知識を、インターネットなどを通じて手軽に得られることが大切である。本研究においては、最新のデータに基づいた、インターネット上で広く利用できる臨床診断および治療マニュアルの作成をおこなった。これまでにその内容を入れた CD-ROM を作成・配布や、新たに立ち上げた改訂専用のホームページを通じて、専門家の意見を取り入れながら修正とアップデートを行ってきた。その後、新たな疾患も追加してより内容の充実した使いやすいホームページを整備した。最終的にはこれらのリソースが一般の医療従事者にとっても簡便で迅速な情報源となることを目的とする。

### B. 研究方法

すでに作成していた 15 種類のバイオテロ関連疾患に加えて、新たに追加作成した計 25 疾患に関するマニュアルの編集および、病原体の管理や輸送に関する最新の情報を追加・修正作業を実施した。また、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。

(倫理面への配慮)  
特になし

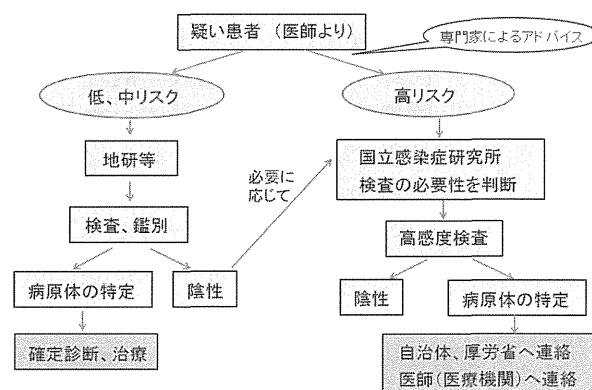
### C. 研究結果

2010 年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。しかし、これらの 15 疾患のみではバイオテロに利用される可能性のある病原微生物を十分に網羅していないことが指摘されたことを受け、新たな疾患として平成 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) キャサヌル森林病、(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 (<http://bt.sfc.wide.ad.jp>)。

また、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も重要な課題である。下図に一つの案を示す。

疑い患者発生時の連携体制の構築 (案)



このようなシステムの構築のためには、国内の施設で可能な臨床診断支援方法を把握しておくことが有用と思われる。これらの情報入手が可能となるよう今後も検討を進めていく必要がある。

	対応可能疾患	臨床検体	検査法など
A 研究室	炭疽菌	血液	LAMP 法
B 県衛生研究所	ボツリヌス菌・毒素	...	毒素遺伝子の塩基配列解析
C 大学	ウイルス性出血熱	...	...

#### D/E. 考察・結論

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。すなわち、本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と考えられる。

F. 健康危険情報  
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表  
なし

2. 学会発表  
発表なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）  
該当なし

厚生労働科学研究費（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

各医療機関のバイオテロ対策を支援するための方策

研究分担者 松本 哲哉 東京医科大学微生物学講座 教授

研究要旨 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。そこで本研究においては、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ている。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することができた。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、さらに検討を行う必要がある。

A. 研究目的

いまだに世界の各地域において、政情が不安定な地域を中心に内部紛争が続き、さらに宗教に絡んだ争いも頻発している。それに伴い、発展途上国のみならず、どの国においてもテロ行為の脅威に曝されており、警戒のレベルを高めている。

バイオテロに対する対策の重要性は認識されるようになってきているが、実際にバイオテロが起こった際に想定される状況は多様であるため、必要な準備に関する明確な指標や基準が定められておらず、各医療機関も具体的に何を準備すべきかについて混乱が生じている。そこで本研究においては、各医療機関が今後、バイオテロに対する準備を行う上で必要なガイドラインを作成することを目的にして検討を行った。

B. 研究方法

バイオテロに関する国内外の各種資料を入手し、さらに感染症に関する各種ガイドラインを参考にして日本の医療現場の現状に合わせたガイドラインを作成した。

C. 研究結果

1) 医療機関におけるバイオテロ対策ガイドラインの作成

バイオテロ対策のガイドラインについては、現在の医療機関が置かれた状況を考慮した上で、より実践的で効率的な内容にすることを目指してい

る。

ガイドラインの骨格とその主な内容としては、下記に挙げるような項目とした。

表1. バイオテロ対策ガイドラインの骨格

- 
- ①バイオテロの定義
  - ②バイオテロに用いられる病原体
  - ③バイオテロの検知と認識
  - ④バイオテロの初期対応
  - ⑤病原体の確認と検査
  - ⑥病原体別にみた感染予防策
  - ⑦外来における対応
  - ⑧病棟における対応
  - ⑨バイオテロ時に想定される状況
  - ⑩他の医療機関との連携
  - ⑪自治体、警察、消防との連携
- 

さらにバイオテロの病原体であっても他の感染症の病原体と同様に予防策は基本的に4種類に分類されるため、病原体の種類に応じて、表2に示すような各種感染予防策を提唱した。

表2. 各種病原体の感染予防策

【標準予防策にて対応可能】

・炭疽、鼻疽、類鼻疽、野兔病、コクシジオイデ

ス症、ボツリヌス毒素中毒など

【飛沫感染予防策】

・SARS、高病原性インフルエンザなど

【接触感染予防策】

・ペスト、ウイルス性出血熱、コレラ、サルモネラ感染症、EHEC 感染症など

【空気感染予防策】

・天然痘、多剤耐性結核菌など

バイオテロ時に想定される状況については、表3のような場面が想定されるため、これらへの対応についても触れる必要があると考えられる。

表3. バイオテロ時に想定される状況

多数の重症患者の増加
外来患者の増加
医療スタッフの減少
医療スタッフの感染
情報不足、デマなどによる混乱
医薬品や関連物資の不足
通常の診療内容への制限
指揮系統の混乱
ライフラインの障害
犯罪の増加

D. 考察

各医療機関においては、診療改定に伴う感染対策に対する加算の実施に伴い、院内感染対策は人的および設備等の面からも充実してきている。さらに、各種耐性菌やインフルエンザ、ノロウイルスなどによるアウトブレイクを多くの施設が経験しており、対策の必要性を実感していることも要因となっていると考えられる。

また、新型インフルエンザに対する対策は国や自治体の指導のもとに、各医療機関における事業継続計画 (business continuity plan: BCP) の作成を求められており、インフルエンザ対策も今後さらに充実が図られる見通しとなっている。

その一方で、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。その理由としては、感染対策面で現在、差し迫っている院

内感染対策、あるいは新型インフルエンザ対策への対応に手一杯で、バイオテロ対策まで行う余裕がない、というのが現実と思われる。

ただし、今後の東京オリンピックの開催や海外における政情不安の状況を考えると、バイオテロ対策を疎かにして良いという判断にはつながらず、むしろ今後、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。

今後、ガイドラインが完成したとしても、実際にことが起こると、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。

なお、本研究班においては、岩本愛吉先生を分担研究者とするグループにおいて、バイオテロ対策ホームページが作成されているため、今後、しかるべき段階でこのホームページを介した一般への情報開示も検討すべきであると考えられる。

E. 結論

各医療機関がバイオテロ対策を実施する上での参考となるガイドラインの作成を計画し、3年間でたたき台となる案を作成した。今後、実用性の高いガイドラインを目標に、詳細を検討していく必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

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

特許取得なし

2. 実用新案登録

登録なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費 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

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

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：

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。

一方、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。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。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：林昌宏，伊藤（高山）睦代，  
福士秀悦，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

ウイルス感染症の診断法としてウイルス特異的遺伝子検出法（定量的 RT-PCR 法等）が用いられるようになっているが、バイオテロ関連病原体の遺伝子検出には高感度にウイルス遺伝子を検出することが求められる。5' -Flap 付加 primer を PCR 法やリアルタイム PCR 法に用いることによりウイル

ス遺伝子をより高感度に検出できることが報告された。そこで既存のウイルス特異的遺伝子検出用 primer の 5' 端に Flap 配列 (AATAAATCATAA) を付加することにより、その検出感度を上げることができるか否かを、5' -Flap 付加 primer を用いた定量的 RT-PCR (qRT-PCR) 法に応用し、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (Lymphocytic choriomeningitis virus, LCMV)、狂犬病ウイルス (RV)、チクングニアウイルス (CHIKV) の遺伝子を用いて評価することを目的とした。

一方、原因不明感染症の診断には、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. 研究方法

1) 5' -Flap 付加プライマーを用いた遺伝子増幅法の検出感度の評価

① ウイルス RNA の抽出 : LCMV および RV のウイルスの RNA を High Pure Viral RNA Kit (Roche) を用いて抽出した。抽出方法はメーカーのマニュアルに従った。

② Flap 付加 LCMV, RV, および, CHIKV 特異的プライマーの設計 : LCMV 特異的プライマー : GP-F (CATTCACCTGGACTTTGTCAGACTC), GP-R (GCAACTGCTGTGTCCCGAAAC) (J Virol Meth 147:167-176, 2008) を用いて Flap 付加 LCMV 特異的プライマー : flap-GP-F (AATAAATCATAACATTCACCTGGACTTTGTCAGACTC), flap-GP-R (AATAAATCATAAGCAACTGCTGTGTTCCCGAAAC) を設計した。RV 特異的プライマーについては, RVH-NF2 (ACTTCCGTTCACTAGGCTTG), RVH-NR2 (GACCCATATAGCATCCAACAA) を用いて Flap 付加 RV 特異的プライマー : flap-RVH-NF2 (AATAAATCATAAACTCCGTTCACTAGGCTTG), flap-RVH-NR2 (AATAAATCATAAGACCCATATAGCATCCAACAA) を設計した。CHIKV 特異的プライマーについては, 10572f (CGCAGGAAGACCAGGACAA), 10798r (CCGCTCTTACCGGGTTTG) を用いて Flap 付加 CHIKV 特異的プライマー : Flap-10572f (AATAAATCATAACGCAGGAAGACCAGGACAA), Flap-10798r (AATAAATCATAACCGCTCTTACCGGGTTTG) を設計した。



③ 各ウイルス特異的プライマーおよび Flap 付加特異的プライマーを用いた RT-PCR 法 : RT-PCR 反応には LightCycler 1.5 (ST300) システム (Roche Applied Science)を用いた。増幅遺伝子は SYBR Green I を用いて検出した。

2) GHSAG Unknown Pathogen Workshop に参加することによる不明病原体診断システムの評価

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。本ワークショップに参加して、原因不明病原体の診断における問題点等を検討した。

C. 研究結果

1) 5' -Flap 付加プライマーを用いた遺伝子増幅法の検出感度の評価

Flap 付加 LCMV 特異的プライマーの検討: LCMV 遺伝子検出のため遺伝子検査において、flap-GP-F および flap-GP-R を用いた場合、Flap 配列を付加しない場合と比較して蛍光強度が約 36%増強した。さらに蛍光の立ち上がりのサイクル数を示す Crossing Point (CP)値の短縮が認められた。Flap 配列を付加したこ

とによって LCMV 特異的プライマーの増幅感度が上昇したことが示唆された。

Flap 付加 RV 特異的プライマーの検討:Flap 配列付加の有無にかかわらず遺伝子検出感度の向上は認められなかった。

Flap 付加 CHIKV 特異的プライマーの検討:Flap 配列付加の有無にかかわらず CP 値に大きな差は観察されなかった(表 3)。またこのとき Flap 配列の有無にかかわらず Tm 値は 82. 27°Cであった。

2) GHSAG Unknown Pathogen Workshop に参加することによる不明病原体診断システムの評価

① 検体の発送から受け取りまでの経緯

日本はイギリスから検体の送付を受け、輸入が完了するまでに 9 日間を要し、その間、検体を凍結状態で保つことができなかった。また、別の検体は BSL3 で扱うべき病原体と明記されて各国に送付するという通知がなされた。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ったこととなった。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。

② 2 つのシナリオのサンプルの病原体診断

シナリオ 1 (レストスピラ症) のサンプル中に存在する病原体を特定するこ

とはできなかった。

シナリオ 2 (出血性大腸菌 0157) の検査用サンプルの入手 (輸入ができなかった)。

#### D. 考察

##### 1) 5' -Flap 付加プライマーを用いた遺伝子増幅法の検出感度の評価

本研究においてこれまでに確立されている LCMV, RV および CHIKV の検出用 qRT-PCR 用プライマーを用いて Flap 配列を既存のプライマーの 5' 端に付加することによるその増幅効率への効果を検討した。その結果 12bp の Flap 配列を既存の qRT-PCR プライマーに付加しても qRT-PCR 反応が阻害されることはなく、 $T_m$  値も全てのプライマーにおいて Flap 配列の有無にかかわらず影響を受けないことが観察された。検討した LCMV, RV, および、CHIKV の遺伝子検出において、LCMV 増幅プライマーに Flap 配列を付加することによって LCMV の遺伝子検出においては検出感度が向上した。しかしながら RV および CHIKV 特異プライマーに Flap 配列を付加しても  $C_P$  値の短縮および感度の向上は観察されなかった。すべての Flap 配列付加プライマーを用いた qRT-PCR 反応においてプラトーにおける蛍光強度の増強が認められた。これは 12bp の Flap 配列を付加することによって増幅産物の分子量が増加したことに起因することが示唆された。

##### 2) GHSAG Unknown Pathogen Workshop に参

加することによる不明病原体診断システムの評価

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。一方、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。

#### E. 結論

- 1) 5' -Flap 付加プライマーを用いた遺伝子増幅法の検出感度の評価  
一般的なウイルス遺伝子増幅法に用いられるプライマーに 5' -Flap (AATAAATCATAA) 付加することにより、遺伝子検出感度を向上させることが可能である場合があることが示唆された。
- 2) GHSAG 不明病原体感染症診断技術に関するワークショップ
  - 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。

⑥ 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。

#### F. 研究発表

##### 1 論文発表

- 1) Sakai K, Yoshikawa T, Seki F, Fukushi 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, 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.

- 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) 伊藤 (高山) 睦代, 中道一生, 山口 (木下) 一美, 王麗欣, 林昌宏, 西條政幸. Establishment of the in vitro test for residual virulent rabies virus in inactivated rabies vaccines. 第 11 回狂犬病研究会, 2012 年 4 月, 東京都
- 2) Lim CK, Moi ML, Kotaki A, Saijo M, Kurane I, Takasaki T. Molecular diagnosis and analysis of imported chikungunya virus strains, Japan, 2006-2011. The 9th Japan-China International Conference of Virology, June 12-13, 2012, Sapporo, Japan
- 3) Lim CK, Kotaki A, Omatu T, Moi ML, Kurane I, Saijo M, Takasaki T. A rapid non-nested reverse transcriptase-PCR assay for vertebrate flavivirus subgroups using a novel universal single primer pair based on a conserved region of NS5 gene sequences. The XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria (ICTMM). September 23-27, 2012, Rio de Janeiro, Brazil
- 4) 中道一生, 井上直樹, 倉根一郎, 林昌宏, 西條政幸. 進行性多巣性白質脳症が疑われた患者の脳脊髄液におけるヘルペスウイルスの出現プロファイルの解析. 第 17 回日本神経感染症学会総会, 2012 年 10 月 19-20 日, 京都市
- 5) 林昌宏, 網康至, 藤井克樹, 北浦一孝, モイメンリン, 白井顕治, 小滝徹, 須崎百合子, 森川茂, 西條政幸, 鈴木隆二, 倉根一郎, 高崎智彦. マーモセットを用いたチクングニアウイルスの霊長類モデルの検討, 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 2012 年 11 月 13-15 日, 大阪
- 6) 垣内五月, 木下 (山口) 一美, 伊藤 (高山) 睦代, 西村秀一, 林昌宏, 西條政幸. 造血幹細胞移植病棟にみられたパラインフルエンザウイルス 3 型感染症流行の分子疫学的解析. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 2012 年 11 月 13-15 日, 大阪
- 7) 伊藤 (高山) 睦代, 中道一生, 林昌宏, 山口 (木下) 一美, 垣内五月, 王麗欣, 倉根一郎, 西條政幸: 乾燥組織培養不活化狂犬病ワクチン国家検定法における 3Rs の導入, 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 (大阪市) 2012 年 11 月 13-15 日.
- 8) 山口 (木下) 一美, 中道一生, 伊藤 (高山) 睦代, 林昌宏, 倉根一郎, 西條政幸. LAMP 法を用いた PML 患者の脳脊髄液中の JC ウイルスの検出および定量試験. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会,