

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ペ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) 腸管出血性大腸菌ペ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、抗ペロ毒素抗体：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)、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)、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(HRP-ポリマー-Envision 法 LSAB 法 CSAII 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。Mesangiolysis 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 部分をピ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

のも合わせさらに 1 時間要していた。感度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. *病理解剖マニュアル 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

