

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 福土秀悦、
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 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受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) 主なエンベロー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作出する必要がある。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, Suzuki 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
	病原体の種類の検討をつけることが可能	ウイルスか細菌か、エンベロップ、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

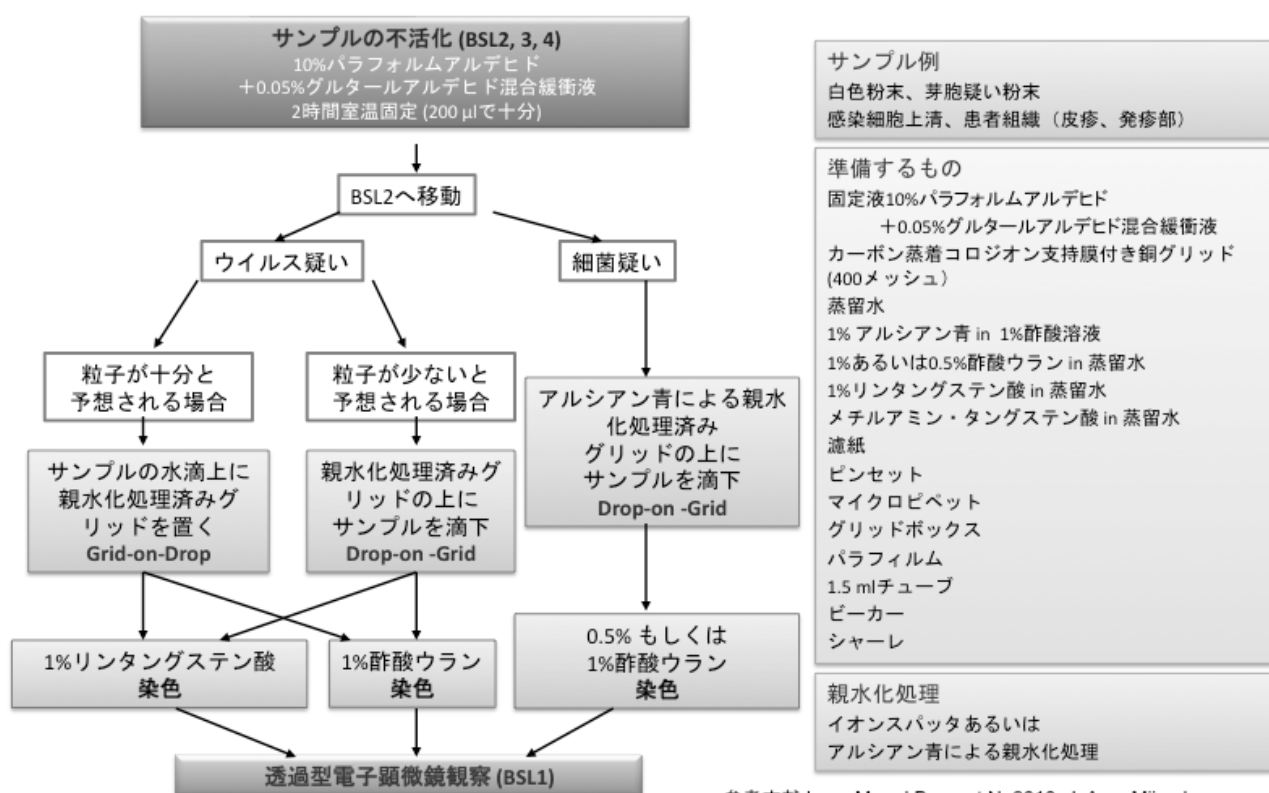


図1 バイオテロ・感染症疑いサンプルを用いた透過型電子顕微鏡学的迅速診断法の標準手順

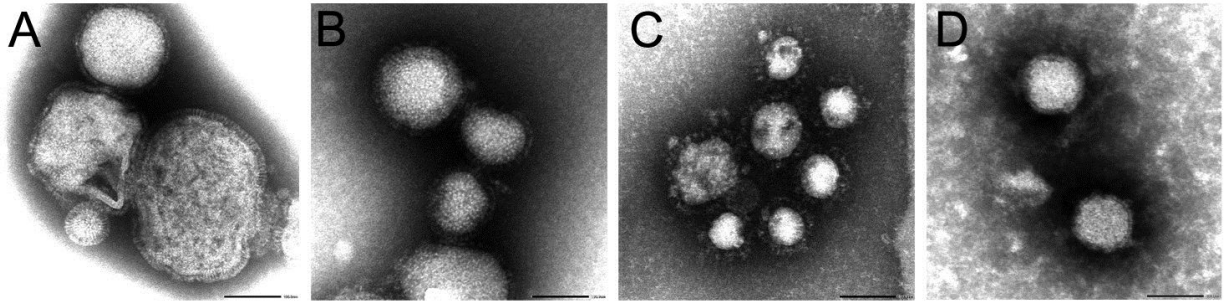


図2 エンベロープウイルスのネガティブ染色像。4%グルタルアルデヒド固定、UV照射による不活化処理の後、2%リンタングステン酸染色、30秒。A. パラミキソウイルス(精製ウイルス粒子)。直径80~300 nm 大小不同、円形、エンベロープは比較的長く、明瞭。80 nmの粒子が必ず存在し、オルソミキソウイルス粒子と類似する(左下)。粒子内にはヌクレオカプシドプロテインが折りたたまれて存在する(右下)。B. オルソミキソウイルス(精製ウイルス粒子)。直径80~200 nm 大小不同、円形、時に不定形。エンベロープは判別しやすいが、パラミキソウイルスに比べると短い。C. コロनावirus(細胞培養上清)。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)。