

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ウイルスワクチン株、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

Positive control (PC); *Candida*

albicans genome DNA

Negative control (NC)

Klebsiella pneumoniae genome DNA

blind DNA sample 1 (1)

blind DNA sample 2 (2)

blind DNA sample 3 (3)

PCR premix NL (NL)

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 B₁ 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