

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

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。

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 (CATTACCTGGACTTTGTGCACTC), GP-R (GCAACTGCTGTGTTCCGAAAC)(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 (AATAAATCATAACATTACCTGGACTTTGTGCACTC), flap-GP-R(AATAAATCATAAGCAACTGCTGTGTTCCGAAAC)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(AATAAATCATAAACTTCCGTTCACTAGGCTTG), 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 (CCGCTCTTACCGGTTTG)を用いて Flap 付加 CHIKV 特異的プライマー : Flap-10572f (AATAAATCATAACGCAGGAAGACCAGGACAA), Flap-10798r(AATAAATCATAACCGCTCTTACCGGTTTG)を設計した。

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 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

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 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
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。
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。
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。
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。
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。

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. 健康危険情報 特になし

G. 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, June12-13, 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 , 2012 年 11 月 13-15 日 , 大阪
- 9) 中道一生 , 林昌宏 , 西條政幸 . 進行性多巣性白質脳症患者の脳脊髄液中に検出された JC ポリオーマウイルスの経時的なゲノム変異パターンの解析 . 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 , 2012 年 11 月 13-15 日 , 大阪
- 10) Moi ML, Lim CK, Saijo M, Takasaki T, Kurane I. Re-assessment of dengue neutralizing antibody and viremia titers in dengue patients using Fc R-expressing cells. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH) 61st Annual Meeting, Atlanta, Georgia USA, November 11-15, 2012.
- 11) 吉河智城 , 福士秀悦 , 谷英樹 , 宇田晶彦 , 谷口怜 , 福間藍子 , 前田健 , 高橋徹 , 森川茂 , 下島昌幸 , 西條政幸 . 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) の確定診断に使用されるコンベンショナル PCR の評価 , 及びリアルタイム定量 PCR との比較 . 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 , 2013 年 11 月 10-12 日 , 神戸
- 12) 福間藍子 , 福士秀悦 , 谷英樹 , 吉河智城 , 谷口怜 , 下島昌幸 , 森川茂 , 前田健 , 西條政幸 . 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) の血清学的診断法の開発 . 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 , 2013 年 11 月 10-12 日 , 神戸
- 13) 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 , 2013 年 11 月 10-12 日 , 神戸
- 14) 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 , 2013 年 11 月 10-12 日 , 神戸
- 15) 森川茂 , 木村昌伸 , 福士秀悦 , 福間藍子 , 加来義浩 , 朴ウンシル , 谷英樹 , 吉河智城 , 井上智 , 今岡浩一 , 下島昌幸 , 西條政幸 , 前田健 . SFTS ウイルス抗体陽性動物の調査 . 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 , 2013 年 11 月 10-12 日 , 神戸
- 16) 谷口怜 , 福士秀悦 , Masangkay Joseoh , 渡辺俊平 , 大松勉 , 下田宙 , 前田健 , 福間藍子 , 吉河智城 , 谷英樹 , 下島昌幸 , 西條政幸 , 明石博臣 , 吉川泰弘 , 久和茂 , 森川茂 . フィリピンのコウモリからの重症熱性血小板減少症候群ウイルスに反応する抗体の検出 . 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 , 2013 年 11 月 10-12 日 , 神戸

- 17) 宇田晶彦, 福士秀悦, 加来義浩, 吉河智城, 下島昌幸, 新倉綾, 井上智, 安藤秀二, 前田健, 西條政幸, 森川茂. マダニからの SFTS ウイルス遺伝子の検出. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸
- 18) 下島昌幸, 福士秀悦, 谷英樹, 吉河智城, 福間藍子, 谷口怜, 前田健, 高橋徹, 西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群ウイルスに対する ribavirin の in vitro 増殖抑制効果. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸
- 19) 福士秀悦, 谷英樹, 吉河智城, 谷口怜, 福間藍子, 緒方もも子, 下島昌幸, 森川茂, 西條政幸. ナイジェリアにおけるリフトバレー熱の血清疫学. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸
- 20) 谷英樹, 下島昌幸, 福間藍子, 谷口怜, 吉河智城, 福士秀悦, 森川茂, 前田健, 高橋徹, 西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群ウイルス GP を外套したシュードタイプ VSV の作製. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸
- 21) 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, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸
- H. 知的財産権の出願・登録状況
現在出願予定はない.