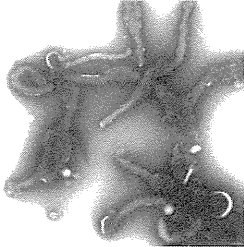
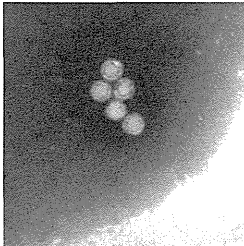
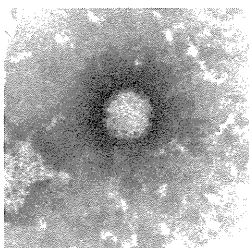

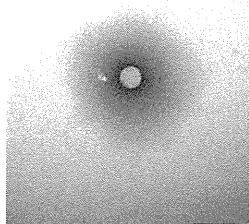


表 高ウイルス血症を引き起こす可能性のある主なウイルスの粒子の特徴と電子顕微鏡像

ウイルス名 (科 Family 属 Genus)	エンベ ロープ (核酸)	形状	粒子の径 (ヌクレオカ プシド径)	電子顕微鏡像。PTA 染色 によるネガティブ像 (ウイルス名と撮影)	同科の感染症 法に基づく特 定病原体 (属)
エボラウイルス (Filoviridae Ebolavirus)	あり (- 鎖 RNA)	フィラ メント 状が優 勢	80 × 1200 nm (50 nm)		エボラウイル ス属、マールブ ルグウイルス 属
(Zaire EV/GHSAG2010)					
デングウイルス (Flaviviridae Flavivirus)	あり (+ 鎖 RNA)	球状	40-60 nm (30 nm)		フラビウイル ス属
(flavivirus / EQA24)					
SFTS ウイルス (Bunyaviridae Phlebovirus)	あり ファジ ー状 (- 鎖 RNA (3 分 節))	球状	90 -120 nm (9 nm)		ナイロウイル ス属、ハンタウ イルス属、フレ ボウイルス属
(SFTS virus/NIID)					
痘瘡ウイルス (Poxviridae Orthopoxvirus)	あり (2 本鎖 直鎖 DNA)	レンガ 状、楕円 形	200-350 ×115-260		オルソポック スウイルス属
(Vaccinia/EQA25)					
B 型肝炎ウイルス (HBV) Hepadnaviridae Orthohepadnavirus	あり (2 本鎖 DNA)	球状	42 nm (28 nm)		該当なし
(HBV/EQA27)					

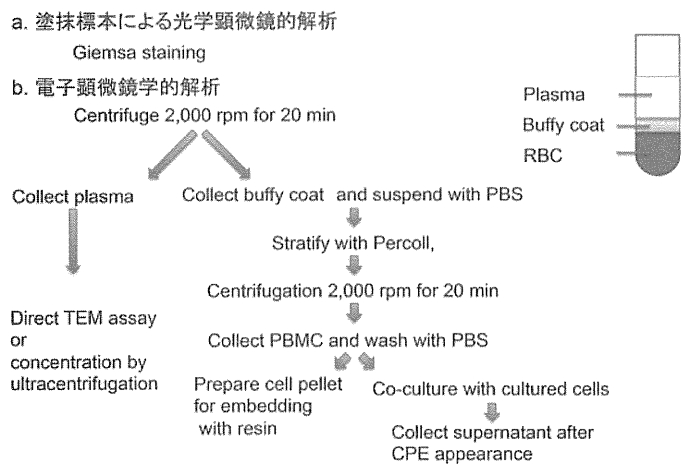


図 血液中のウイルス粒子の迅速検出法の標準手順。不活化は 2%-4% グルタルアルデヒドもしくは 2%パラフォルムアルデヒド液で 30 分～2 時間室温固定 (200  $\mu$ l で十分)し、紫外線照射との組み合わせで行う。

分担研究報告書

痘そうワクチンの安全性評価における病理学的研究

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：オルソポックスウイルス感染症の重症化の宿主側要因を明らかにすることを目的とする。  
今年度はサル痘ウイルスのマウス感染実験系の基礎検討を開始した。

研究協力者：

国立感染症研究所 感染病理部  
岩田奈織子、佐藤由子、原嶋綾子、長谷川秀樹  
国立感染症研究所 ウイルス第一部  
福士秀悦、西條政幸  
国立感染症研究所 獣医科学部  
森川 茂

A. 研究目的

サル痘ウイルスは、ポックスウイルス科オルソポックスウイルスに属し、アフリカ中央部から西部に分布するガンビアンラットなどのげっ歯類を宿主としている。愛玩動物としてアフリカから輸入されたげっ歯類からの感染事例が2003年に米国にて報告されており、免疫抑制状態のヒトでは天然痘類似の全身性疾患（ヒトサル痘）を引き起こす。

われわれは、劇症型サル痘の発症機序を明らかにする目的で、サル痘ウイルス実験的感染カニクイザルの死亡例2頭と回復サル2頭の病態病理を解析した。その結果、劇症型では免疫中枢組織における強い壊死を伴う病変形成が、病態に大きく関与することが推察された(Nagata *et al.*, 2014)。劇症型サル痘発症の要因は、脾、免疫不全状態、特に骨髄低形成による好中球低下症が関連していると推察している。

そこで、好中球の重症化における役割を明らかにするために、サル以外の病態動物モデルの確立を試みることにした。まず、今年度は、サル痘ウイルスのマウス感染実験系の基礎検討を開始した。

（倫理面への配慮）本動物実験は、国立感染症研究所の動物実験委員会に承認された実験計画に従って行った。

B. 研究方法

動物は、日本エスエルシーより購入したBALB/c マウス（接種時、14 週齢メス）を用いた。ウイルスは、Monkeypox virus の Liberia 株および Zr-599 株を用い、ウイルス液（一匹あたり  $10^6$  PFU ウイルス量/50  $\mu$ l）を頸背部に皮下接種し、臨床症状と体重変化を16日間観察した（一群6匹）。接種7日目には、一群あたり4匹を過麻酔殺し、心臓採血と病理解剖を行った。採取した血液は、ヘパリンを添加し、動物用血球計数装置 ベトスキャン HM II（Avaxis 社）で白血球数、リンパ球数、単球数、顆粒球数を測定し、比較した。

C. 結果

体重変化、皮膚所見、臨床症状の点で、いずれの株も皮下接種後の BALB/c マウスに対して明らかな病原性を発揮しなかった（図1）。接

種 7 日目の末梢血中の白血球数は、対照群に比べてウイルス接種群で有意に少なく、それは、リンパ球数と顆粒球数の減少によるものであった (図 2)。病理学的解剖を行ったところ、Zr-599 株接種群の脾の軽度の腫大がみられ、光顕的に T 細胞領域の軽度の拡大が確認された (データは示さない)。その他の腹腔、胸腔内臓器に著変は認められなかった。

#### D. 考察

我々は、オルソポックスウイルス感染後の重症化の宿主側因子を明らかにして、最終的には、痘瘡ワクチン (弱毒株) 接種者における重篤な副反応要因を明らかにすることを目標としている。さらに、サル痘サルモデルに代わる、小動物感染モデルの作出が望ましい。マウス痘の原因となるエクトロメリアウイルスは、BALB/c マウス等、一部の近交系マウスに対して強い病原性を発揮する。よって、我々の研究目的の第一選択とするウイルスとしては不相当と考へ、比較的、弱い毒力を発揮するウイルスを選択することとした。

Hutson らは、2003 年にアメリカ合衆国でおきたサル痘アウトブレイクと同年にコンゴでのアウトブレイクでそれぞれ分離されたサル痘ポックスウイルスを BALB/c マウスと C57BL/6 マウスの足蹠皮下あるいは経鼻接種を行い、いずれも致死的是ではなかったものの、一時的な足蹠の腫脹 (皮下接種)、体重減少 (経鼻接種) と中和抗体価の上昇がみられたことから近交系マウスでもサル痘ウイルス感染が成立し、マウスモデルとして使用できると結論づけた (Hutson et al., 2009)。

今回使用したサル痘ウイルスは、Hutson らの報告と同様、BALB/c に対して強い病原性を発揮しなかった。しかしながら、血球像、脾の変化が認められたことから、感染は成立していることが予想される。今後、接種 28 日目の血清中

和抗体価の測定、ウイルス感染、増殖について解析する。その後、重症化モデルの作出を試みる予定である。

#### E. 結論

サル痘ウイルスのマウス感染実験系の基礎検討を開始した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nagata N, Saijo M, Kataoka M, Ami Y, Suzuki Y, Sato Y, Iwata-Yoshikawa N, Ogata M, Kurane I, Morikawa S, Sata T, Hasegawa H. Pathogenesis of fulminant monkeypox with bacterial sepsis after experimental infection with West African monkeypox virus in a cynomolgus monkey. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014. 7:4359-4370

##### 2. 学会発表

なし

#### G. 知的財産の出願・登録状況

該当なし

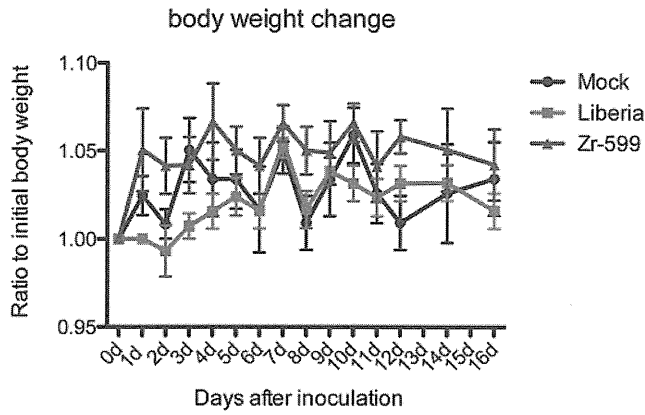


図 1. サル痘ウイルス皮下接種後のマウスの体重変化。各群 n=6。各群間で有意差はみられない。

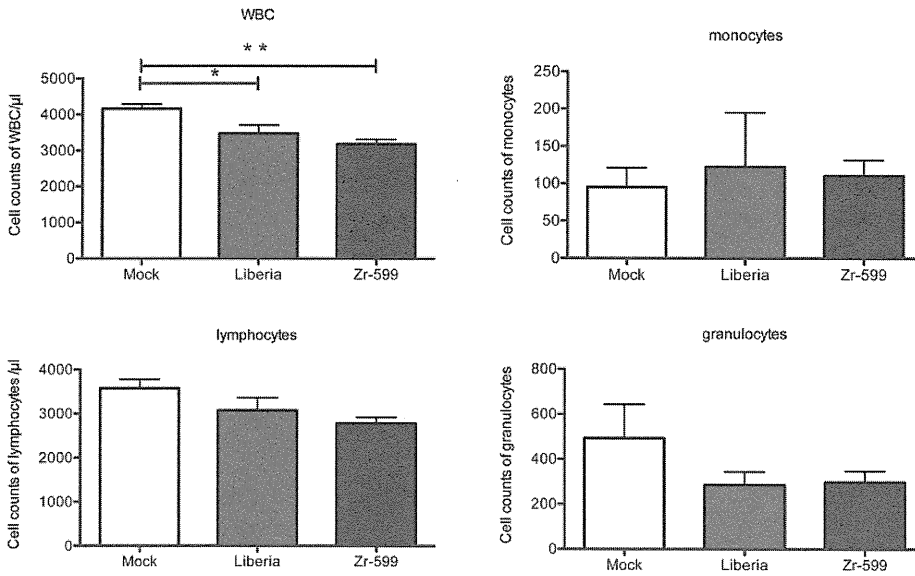


図 2. サル痘ウイルス皮下接種後 7 日目の血球数の比較。各群 n=4。白血球数に有意差がみられ、それは主にリンパ球数と顆粒球数の減少によるものであった。

分担研究報告書

細菌性バイオテロに対する迅速同定法・診断法  
およびワクチンの開発

研究分担者 倉園久生 国立大学法人帯広畜産大学 動物・食品検査診断センター  
江崎孝行 国立大学法人岐阜大学 医学部  
川本恵子 国立大学法人帯広畜産大学 動物・食品検査診断センター

研究要旨 2001年にアメリカで起こった炭疽菌芽胞を使ったバイオテロにより、生物兵器による無差別攻撃に速やかに対応し、安全・安心な社会を構築することが求められている。危険病原体による感染症の蔓延を防ぐ技術開発も危機管理体制の強化の一つとして急務の課題である。本研究では細菌性バイオテロに焦点をあて、危険病原体およびその毒素の迅速同定法・診断法および予防法としてワクチンの開発研究と、広く社会に還元することを目的として研究を遂行する。また、植物毒素であるリシン毒素の迅速検出法開発についても併せて行う。

A. 研究目的

2001年9月11日の米国ニューヨーク世界貿易センタービルへの航空機テロ後に、炭疽菌芽胞混入郵便物によるバイオ（生物）テロが起こり、世界的に関心が高まった。わが国では‘白い粉’による多数の摸倣事件が起こり、その後、2004年の「国民保護法」の制定、2006年の感染症法改正による「特定病原体等」の管理などをはじめとした内閣危機管理室を中心として関係省庁で対応体制が構築されてきた。病原体等の入手と取扱いそして迅速診断・同定法に関する科学的情報は、バイオテロの脅威に対抗する上で、当初より管理ないし制限されてきた。一次対応機関で用いる検査キットの多くはブラックボックス状態で使用せざるを得ない状況にある。病原体等の由来を知るには塩基配列の情報が必要であるが十分公開されていない。対応のアルゴリズムは米国や英国の関連機関からも公表されているが、わが国の実情に即したものを、わが国独自に開発していくことが必要となる。バイ

オテロは病原体等が散布されて患者発生までに潜伏期があり、稀な疾患であるため、早期検知には一次医療機関の医師等への臨床診断支援が必須で、環境中および患者検体から原因病原微生物の迅速な検出と同定、かつ確認のために患者の血清抗体検査や病原体等の分離同定が必要となる。BSL4病原体以外は地方衛生研究所や国立感染症研究所の設備で可能である。さらに病原体の由来を知るためには塩基配列の解析とデータベースが重要である。現在までに多くの病原体等（毒素を含む）の迅速診断法を開発し、臨床診断支援のマニュアルやバイオテロ対応ホームページを作製した。またプロトタイプの網羅的迅速診断法も開発した。しかし病原体の入手が困難なことから特異性の検討は十分とはいえず、鑑別診断とその普及および検査ネットワーク整備に問題を残している。ホームページの活用には、画像が有力な情報となるがいまだ少なく、疾患の追加、治療法や除染法を含めた内容のアップデートそして実際の対応体制の整備も不

十分である。当分担研究班では、バイオテロ関連病原体等の迅速診断検査、抗体検査、病原体分離同定法、特に特定病原体等の中の細菌性感染症を中心として、網羅的な検出・検査法を確立し、広く社会に還元することを目的として研究を遂行する。

対象として各種ウイルス、リケッチア、細菌、毒素等のバイオテロに使用される可能性がある病原体が想定されるが、特に炭疽菌は芽胞としての安定性、乾燥や熱に対する抵抗性、比較的簡単に培養ができることなどから生物兵器の最有力候補として常に注目をあびてきた。炭疽菌は危険度レベル3に属する細菌で、他にペスト、鼻疽/類鼻疽、野兔病、結核、チフス、ブルセラが細菌としてこのレベルに入る。その中で、生物兵器として使用可能なものは炭疽以外にペスト、鼻疽/類鼻疽、野兔病、チフス、ブルセラが想定されるが、検査法や治療法、さらには診断法がまだ確立されていない菌種は鼻疽/類鼻疽、野兔病、ブルセラである。そこで、本研究では、危険度を考慮して炭疽菌の検出法の更なる改良・開発、および鼻疽/類鼻疽、野兔病、ブルセラ症などの危険度3に属する病原体に対する検出・診断法の確立及び治療・予防法の開発や改良を行い、患者検体および環境中からの迅速な検出および診断法の開発を行う。診断法の実用化に当たっては事件発生現場での利用が可能な方法と、検査室における方法の両面からの実用化を目指す。さらに、種々の化学物質および薬剤に対する病原体の感受性に関する検討を行い臨床利用に備える。また、従来のワクチンを基盤とした免疫誘導能が高いワクチンの開発を検討する。

生物テロの発生を予防することが最も基本であることは間違いないが、生物テロが発生した場合、いかに被害を最小限に抑えるかが何よりも重要である。被害を低減するには、バイオテロ発生をできるだけ早く検知すること、散布生物剤を正確に迅速に同定することが求められる。さらに、発生現場や患者対応を行う医療施設などの汚染区域の早急な機能回復のためには適切な除染が必要となる。除染とは、消毒や滅菌などにより微生物を受容可能なレベルまで減少させ、使用可能な状態

にすることである。適切な除染は患者対応、2次被害の拡大防止、汚染現場の早期復旧に極めて重要である。本年度はまずテロ発生後の除染活動を念頭に、これまでに臨床検体からの迅速検出を目的に開発した検査法を環境検体からの検出へと応用できるよう、環境検体のなかでも病原体の検出が特に困難とされる土壌検体を用いて検体処理法の改良を行った。土壌汚染菌の遺伝子学的検出は、1) 土壌からの核酸抽出、2) 目的の病原菌遺伝子の特異的増幅、3) 増幅物の判定、の3段階からなる。検出感度を確保するためには、段階1)において、できるだけ回収率と純度の高い核酸を抽出することが不可欠である。一般に他の環境検体に比べ、土壌からのDNA抽出が困難な理由として、腐食酸(フミン酸)などの土壌成分による干渉作用があげられる。土壌から微生物の核酸を抽出する際に、石などのシリカ粒子に付着している微生物がいることから全量を使用して、菌を物理的に破壊した後、フミン酸などを除去する方法が一般的に利用されている(MoBio法、Ultraclean Soil DNA法)。しかしフミン酸とDNAは類似の特性を持っているため、DNAとフミン酸の混合液からフミン酸だけを効率よく分離するのは困難で、精製過程でDNAも多く失われてしまうという欠点があった。そこで、菌を破壊する前にフミン酸を菌から分離する方法を検討し、更に従来の市販抽出品との比較検討も行った。

現在、風邪、咽頭炎あるいは肺炎症状を訴える患者に対するバイオテロを想定した遺伝子学的迅速診断法がない。このため、本年度は市中の呼吸器感染症とバイオテロ症例の鑑別法を開発した。

細菌毒素に関しては、CDCの生物兵器に使われる可能性の高い蛋白毒素であるボツリヌス毒素(Btx、カテゴリーA)、コレラ毒素(CT)とLT(カテゴリーB: Enteric Pathogens)、黄色ブドウ球菌のエンテロトキシン(SEA&SEB、カテゴリーB: Enteric Pathogens)及びTDH(カテゴリーB: Enteric Pathogens)等に対する免疫学的迅速同定法を確立して検査・診断マニュアルを作成し、その普及を目的としている。研究対象の細菌毒素は食中毒の原因となるため検査キットが市販されているものもあるが、本研究では食品を用いたバイオテロに対する

網羅的迅速同定法を国産で供給できるような体制作りを目的とする。本年度はSEAとSEBを精製してそれぞれに対する家兎抗血清を作製した。更に、TDHおよびTRHの精製を行った。

## B. 研究方法

### B-1. 土壌からの病原体検出法の改良

#### 土壌からの核酸抽出法の開発

国内の標準土壌7種(シラス、砂、シルト、粘土、黒ボク(関東ローム層)、黒ボク(シラス由来)、関東ローム層)の土壌検体を用いて検討を行った。まず、各土壌検体を酸性バッファーに懸濁し、フミン酸を酸化アルミニウムに吸着させ、アルカリにして沈殿させた。その後、フミン酸が除かれた土壌懸濁液から菌を陽性に荷電した粒子に吸着させ、さらに粒子をマグネットに吸着させ、菌が付着した粒子を補足した。上清を捨て、TEバッファーに懸濁後、菌と粒子を分離させ、MORA-Extractキットを用いて懸濁液をジルコニアビーズで物理的に破碎後、手順に従い核酸を抽出した。また、市販抽出キットを用い、それぞれ定められた手順に従い、核酸を抽出し、その効果について比較検討した。

### B-2. 市中の呼吸器感染症と炭疽、類鼻疽オウム病との迅速類症鑑別法の開発

*Bacillus cereus*による院内感染症とされる症例に重篤な肺炎症状をお越し、急速に死亡する症例が散発している。一般細菌検査ではβ溶血する*Bacillus*様菌株は*B. cereus*を疑い検査の対象となるが、β溶血しない*Bacillus*様菌株は*B. subtilis*等の日和見病原菌と見なされる。*B. anthracis*は溶血しないので*B. subtilis*等のコンタミと見なされ通常は検査の対象となっていない。更に、*B. cereus*、*B. thuringiensis*と同定される菌株の中には系統的には炭疽菌に極めて近い株がある。これらの株には*B. anthracis*の病原因子を部分的に保有する株が存在する。β溶血し*B. cereus*と同定される株、あるいは溶血しない*Bacillus*様菌株が分離された時に高度病原性株であるかどうかを調べるために溶血にかかわらず炭疽菌が保有する病原因子(莢膜、防御抗原、浮腫因子、致死因子)を調べる必要がある。

- 1) *B. cereus*、*B. anthracis*共通のDnaJ、莢膜、防御抗原、浮腫因子、致死因子の5つの

病原因子を同時に検出できる核酸クロマトを構築した(図1)。

- 2) 肺炎の病原体スクリーニング用に開発した核酸クロマトにテロ病原体をマウントした系を立ち上げた(図2)。

a) Pneumonia A (*Legionella pneumophila* DnaJ, *Chlamydophila pneumonia-psittaci* DnaJ, *Mycoplasma pneumonia* DnaJ, *Streptococcus pneumonia* LytA, *Bacillus cereus-anthraxis* DnaJ)

b) Pneumonia B (*Haemophilus influenza* DnaJ, *Serratia marcescens* DnaJ, *Staphylococcus aureus* MRSA, *Escherichia coli* DnaJ, *Pseudomonas aeruginosa* DnaJ)

c) Pneumonia C (*Acinetobacter baumannii* DnaJ, *Enterobacter aerogenes* DnaJ, *Burkholderia malle/pseudomallei* DnaJ, *Chlamydia trachomatis* 16S rDNA, *Moraxella catarrhalis* DnaJ)

3)上記2つの核酸クロマトの検査手順を図3に記載する。

### B-3. SEAとSEBの精製と家兎抗血清の作成

*sea*及び*seb*は大腸菌内でHisタグ融合タンパク質(His-SEA及びHis-SEB)として発現させ、SDS-PAGE及びウエスタンブロッティングにより確認した。リコンビナントタンパク質の精製は、カラムクロマトグラフィーと電気的溶出法によって行った。精製した毒素タンパク質は、ウサギに免疫して抗清の作製を試みた(図4)。

### B-4. TDHとTRHの精製

合成した*tdh*及び*trh2*をそれぞれプラスミドベクターpCold TFに組み込んで蛋白発現用大腸菌BL21(DE3)株に導入した。この株についてTFタグ融合蛋白質としてTDHあるいはTRH2を発現させるための至適な条件を検討し、得られた条件下で発現誘導を行った培養液からHisタグ精製および電気的溶出によってTDHあるいはTF-TRH2を精製した(図5)。

## C. 研究結果

### C-1. 土壌からの病原体検出法の改良

我が国の標準土壌7種を検討に用いた(図6)。新規抽出法の有用性を検証するため、精製DNAの純度を指標に市販の土壌核酸抽出キット3種類と抽出結果を比較、検討した。まず、市販キットでの抽出核酸の純度を吸光



度計により調べた。市販キットAは土壤中の腐植酸の除去は優れていたが、DNA回収率は低かった。一方、市販キットBはマグネット法により腐植酸を除去するが、DNA回収率は著しく低かった。市販キットCは、DNA抽出フィルターを使用する方法であるが、フミン酸は除去できなかった(図7)。これら3種類の市販品のうち、キットAとBを用いて、本研究で開発した新規抽出法と精製DNAの純度を比較した。関東ローム層を除いて、いずれの種類の土壤検体においても、新規抽出法が純度および回収量とも優れていた(図8)。

#### C-2. 市中の呼吸器感染症と炭疽、類鼻疽オウム病との迅速類症鑑別法の開発

炭疽菌に対する迅速診断法(核酸クロマト)と、市中呼吸器感染症の病原体スクリーニング用核酸クロマトへのテロ病原体をマウントした2種類の迅速類症鑑別法を開発した。今後はスパイク実験等を行って構築した診断法の制度検定を行う。

#### C-3. SEAとSEBの精製と家兎抗血清の作成

His-SEA及びHis-SEBをSDS-PAGEとウェスタンブロッティングにより検出したところ、予想されるサイズのシグナルが得られ、目的タンパク質の発現が確認できた。本研究で構築したリコンビナント・プラスミドによる大腸菌内での目的タンパク質の発現量は高く、常に効率よく目的タンパク質が得られた。Ni-NTA アガロース ビーズをいた精製の後に電気的溶出法によって目的タンパクを精製し、得られた精製タンパクをウサギに免疫し血清を回収したが、十分な抗体価の上昇は認められなかった。

#### C-4. TDHとTRHの精製

TF-TDH及びTF-TRH2はそれぞれ大腸菌内で盛んに発現し、共に可溶性分画に高い割合で存在していた。最終的に得られた精製蛋白質は実験動物への免疫誘導に使用可能と思われる純度に達しており、大腸菌培養液500mlからモルモット1頭以上に抗体誘導できる量が得られた。

### D. 考察

#### D-1. 土壤からの病原体検出法の改良

土壤からのDNA抽出は他の環境検体に比べ困難であり、これまでに様々な手法が報告されている。土壤からのDNA抽出法は直接法と間接法の大きく2種類に分けられる。直接法では、土壤中溶解してDNAを回収するため、短時間で操作が完了し、DNA収量も比較的多い。しかし、フミン酸などの腐植酸の混入も多く、その後のPCRによる増幅反応の阻害要因となる。間接法では、土壤から微生物画分を回収後、DNAを抽出するため、DNA収量は少ないが、腐植酸の混入が少ない。土壤成分は不均一であるため、すべてにおいて決定的と呼べる方法はまだ存在しない。本研究では間接法を改良し、土壤検体中のフミン酸を酸化アルミニウムに吸着させて除去することで、従来法に比べ比較的純度の高いDNAを抽出することに成功した。

黒ボク土は火山灰土壤で、我が国に特有の土壤成分で関東を中心に、日本全体に広く分布している。黒ボク土はウイルスや細菌などの微生物を強く吸着する性質を持つため、抽出前に微生物分画と土壤分画を分ける間接法では、ほとんどの微生物が土壤分画に存在するため、DNA抽出は困難である。直接法においても他の土壤に比べて著しく回収率は低下することが知られている。新規抽出法は、間接法を改良したものであるが、酸性バッファーでフミン酸を酸化させて、アルミニウム粒子に吸着させて除いた後、間接法で問題となるDNAの回収率の低下を改善するため、菌を陽性に荷電した粒子に吸着させて回収し、さらにマグネット法で濃縮することで、その後のPCRによる増幅反応に使用できる純度のDNAを精製することができた。今回、関東ロームからの抽出は困難で、満足できる結果は得られなかった。今後も条件を検討し、様々な土壤検体で使用可能な抽出条件を検証し、最適化していく予定である。

環境検体からの病原体の高感度な検出は、除染方法および除染完了の評価に必須である。環境検体からの迅速で高感度な危険病原体の検出法を最適化することは、生物剤散布発生時の被害拡大や2次被害をなるべく最小化するために重要であるだけでなく、様々な感染症発生時の除染評価にも有用と考えられる。

#### D-2. 市中の呼吸器感染症と炭疽、類鼻疽オウム病との迅速類症鑑別法の開発

テロが起きた場合に、市中で発生する疾病とテロによる希少感染症との類症鑑別が初期の防圧において非常に重要である。本年度は

炭疽の迅速診断用の核酸クロマトと、市中で発生する細菌性呼吸器感染症と肺炎炭疽との迅速鑑別核酸クロマトを構築した。この系の精度検定を行ってその有用性を確認する事でテロへの対策の一助としたい。

#### D-3. SEAとSEBの精製と家兎抗血清の作成

得られた精製タンパク (SEA及びSEB) をウサギに免疫し血清を回収したが、十分な抗体価の上昇は認められなかった。SEAおよびSEBは銀染色で1本になるまでの高い純度を確保できたので、来年度は、アジュバンドや免疫スケジュールの検討を行い、高感度かつ簡便なSE検出法を構築する。

#### D-4. TDHとTRHの精製

今回構築したTDH及びTRH2の組換え体および蛋白質発現誘導・精製手法によってモルモットへの抗体誘導に十分な純度と量のTF タグ融合TDHあるいは同TRH2 が得られた。来年度はモルモットへの投与により抗TDHあるいは抗TRH2抗体を誘導し、それらの抗体を用いた TDHあるいはTRHに特異的な免疫学的検査法の構築を目指す。

#### E. 結論

1. 環境検体中、特にその検出が困難な土壌検体を用いて、危険病原体由来 DNA の検出に有用な核酸抽出法を開発した。
2. 炭疽菌に対する迅速診断法 (核酸クロマト) と、市中呼吸器感染症の病原体スクリーニング用核酸クロマトへのテロ病原体をマウントした 2 種類の迅速類症鑑別法を開発した。
3. 免疫に耐えられる純度と量の SEA および SEB を精製した。
4. 免疫に耐えられる純度と量の TDH および TRH2 を精製した。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Sukegawa S, Ihara Y, Yuge K, Rao S, Oka K, Arakawa F, Fujimura T, Murakami H, Kurazono H, Takahashi M, Morimatsu F:

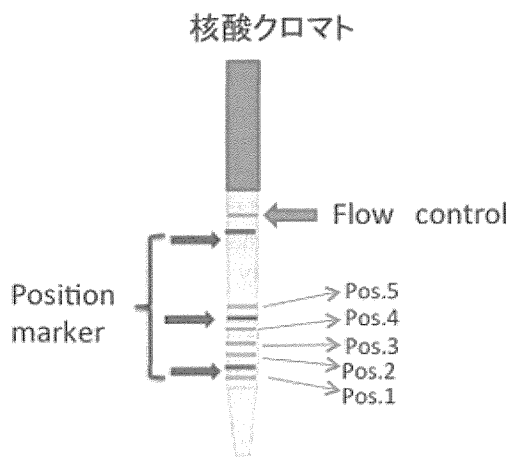
Effects of oral administration of heat-killed *Enterococcus faecium* strain NHRD IHARA in post-weaning piglets. *Animal Science Journal* 85 (4): 454-460, 2014.

2. Nakano M, Yamasaki E, Moss J, Hirayama T, Kurazono H: Study of the stn protein in salmonella; a regulator of membrane composition and integrity. *Method Mol. Biol.* 1225: 127-138, 2015.
3. Yamasaki E, Yamada C, Jin X, Nair GB, Kurazono H, Yamamoto S: Expression of *marA* is remarkably increased from the early stage of development of fluoroquinolone-resistance in uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Chemother.* 21 (2): 105-109, 2015.
4. Ohji S, Yamazoe A, Hosoyama A, Tsuchikane K, Ezaki T, Fujita N. The Complete Genome Sequence of *Pseudomonas putida* NBRC 14164T Confirms High Intraspecies Variation. *Genome Announc.* 2(1), 2014
5. Kikuchi M, Ito S, Yasuda M, Tsuchiya T, Hatazaki K, Takanashi M, Ezaki T, Deguchi T. Remarkable increase in fluoroquinolone-resistant *Mycoplasma genitalium* in Japan. *J Antimicrob Chemother.* 69(9):2376-2382, 2014.
6. Miyazato A, Ohkusu K, Tachi Y, Hashikita G, Ezaki T, Mitsutake K. Two cases of infective endocarditis caused by *Streptococcus tigurinus*. *感染症学雑誌* 88 (3): 304-306, 2014.

#### H. 知的財産の出願・登録状況

特になし

図1. 炭疽菌の迅速診断用核酸クロマト



炭疽菌	因子	位置
<i>B.cereus-anthracis DnaJ</i>	DnaJ	5
<i>B.anthraxis Protective antigen</i>	PA	4
<i>B.anthraxis Capsule</i>	Cya	3
<i>B.anthraxis Edema factor</i>	EF	2
<i>B.anthraxis Lethal factor</i>	LF	1

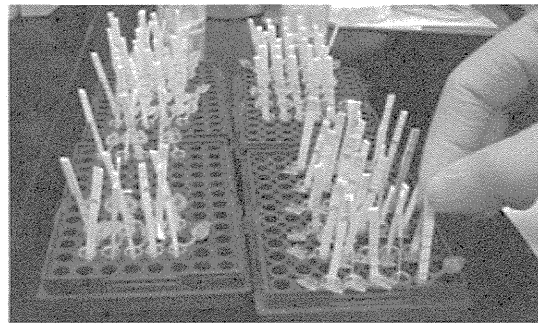
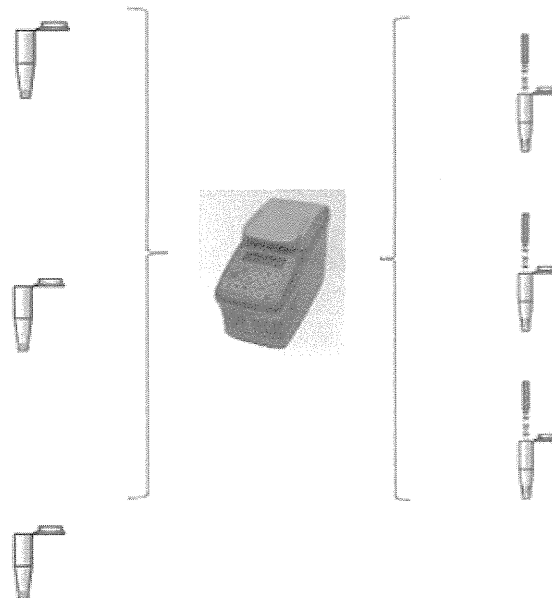
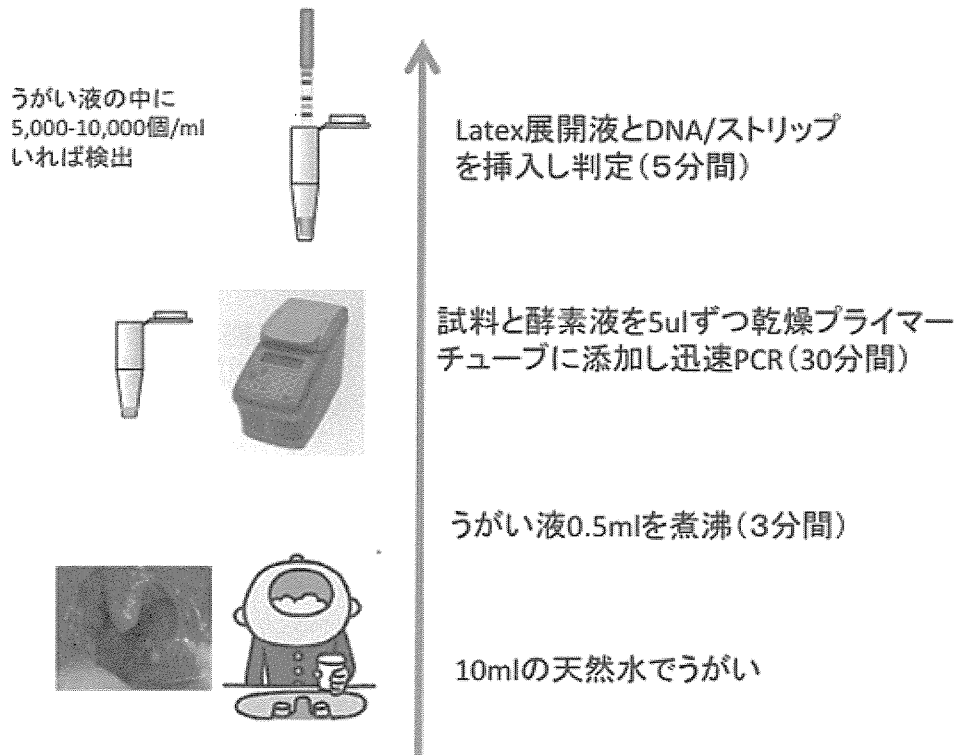


図2. 3本のカクテルPCRで肺炎の病原体Screeningする方法に  
テロ病原体をマウントしスクリーニング

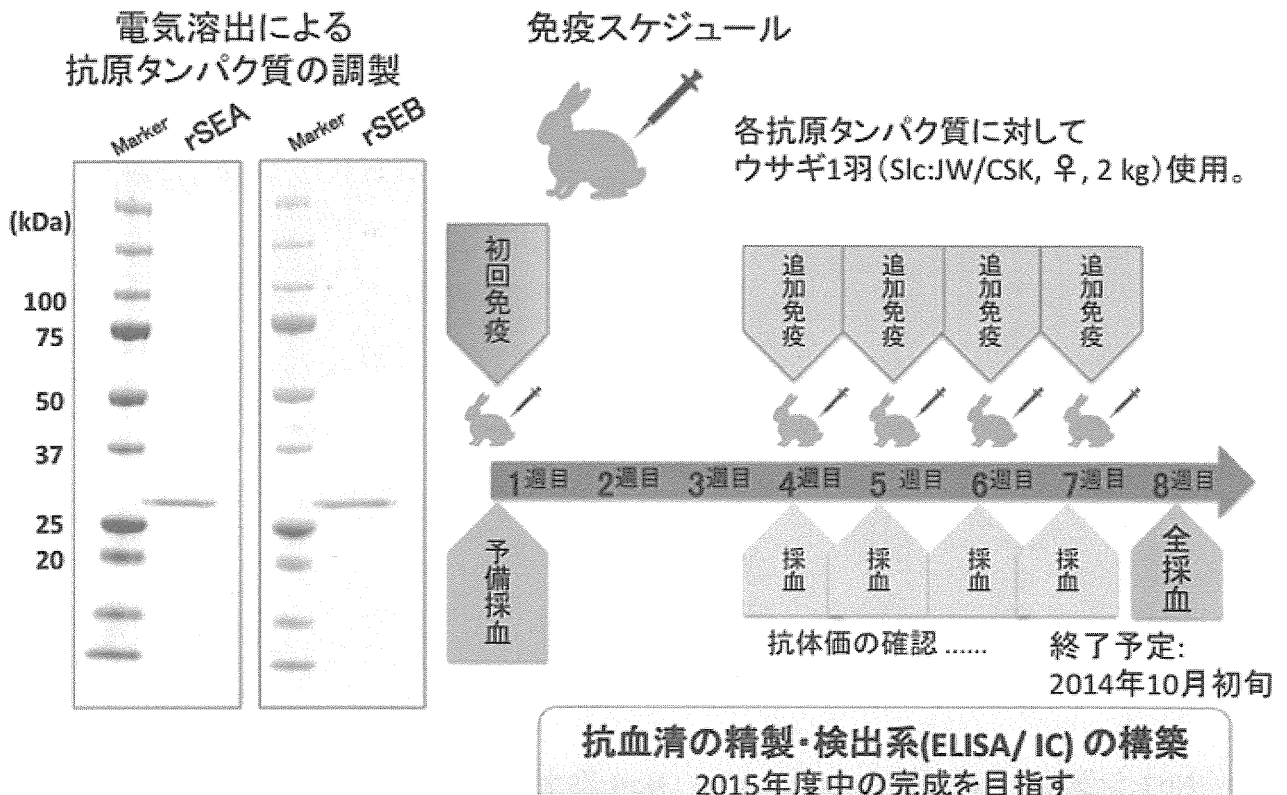
Pneumonia A	
<i>Legionella pneumophila DnaJ</i>	5
<i>Chlamydomphila pneumoniae-psittaci DnaJ</i>	4
<i>Mycoplasma pneumoniae DnaJ</i>	3
<i>Streptococcus pneumoniae LytA</i>	2
<i>Bacillus cereus-anthraxis DnaJ</i>	1
Pneumonia B	
<i>Haemophilus influenzae DnaJ</i>	5
<i>Serratia marcescens DnaJ</i>	4
<i>Staphylococcus aureus MRSA</i>	3
<i>Escherichia coli DnaJ</i>	2
<i>Pseudomonas aeruginosa DnaJ</i>	1
Pneumonia C	
<i>Acinetobacter baumannii DnaJ</i>	5
<i>Enterobacter aerogenes DnaJ</i>	4
<i>Burkholderia malle/pseudomallei DnaJ</i>	3
<i>Chlamydia trachomatis 16S rDNA</i>	2
<i>Moraxella catarrhalis DnaJ</i>	1



### 図3. 簡単な遺伝子検査手順

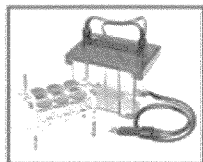


### 図4. 黄色ブドウ球菌SE毒素の精製および特異抗体の作製



## 図5. 腸炎ビブリオTDHおよびTRH毒素の精製

電気溶出による  
抗原タンパク質の  
精製

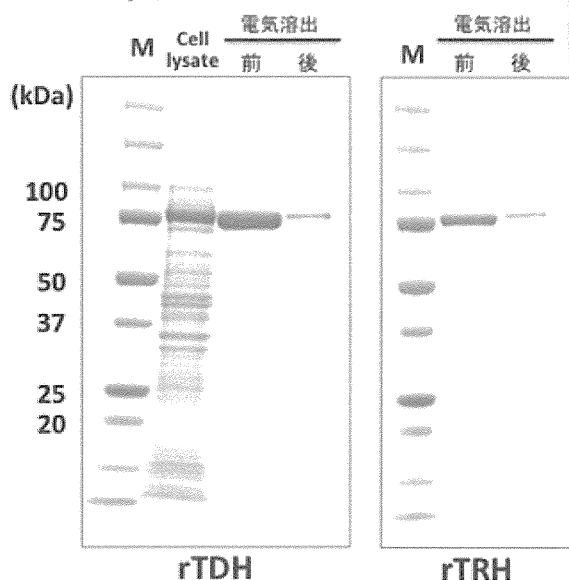


免疫スケジュール



各抗原タンパク質に対して  
モルモット1匹(Slc:Hartley, ♂,  
9-10 wks)を使用。

CBB 染色

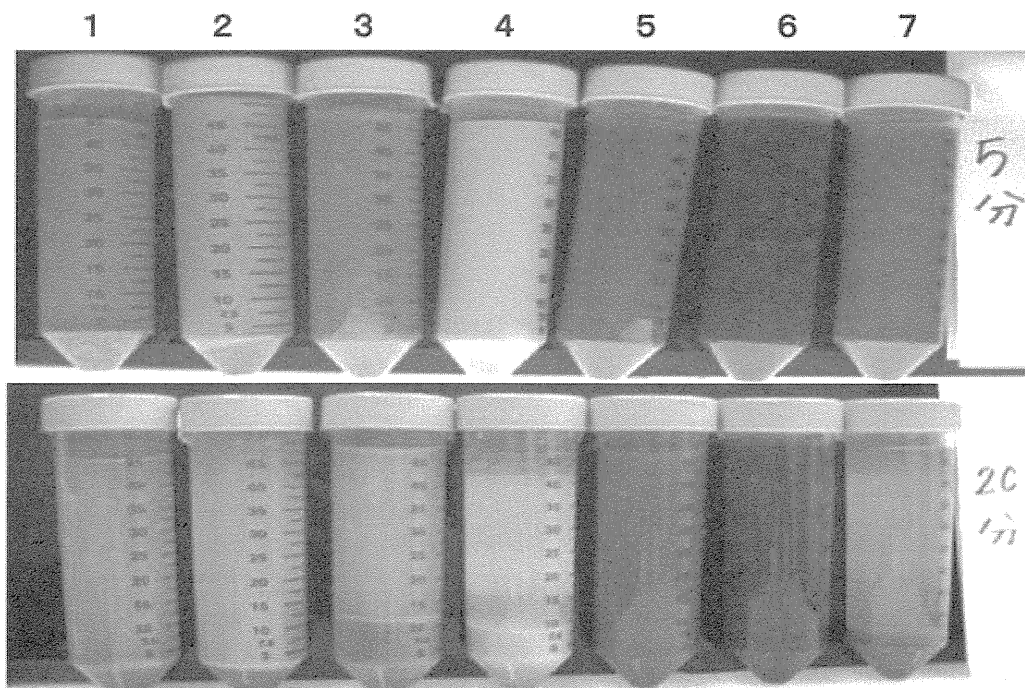


5, 6回に分けて、体調をみながら  
2-3週間の期間を空けて皮下投与。

最終的に、総タンパク質量1 mgを  
等量のFCA/FIAと混合し投与。

抗血清の精製・  
検出系(ELISA/ IC)の構築  
来年夏までの完成を目指す

図6. 我が国の標準土壌として指定されている土壌を購入し、核酸の抽出効率を比較  
(土壌を10倍量のPBSに懸濁し5分, 20分経過)



No1: シラス, No2: 砂, No3: シルト, No4: 粘土,  
No5: 黒ボク(関東ローム層), No6: 黒ボク(シラス由来) No7: 関東ローム層

図7. 土壤精製法として汎用されているPowerSoilキットと国産の抽出キットの比較(No.41関東ローム)

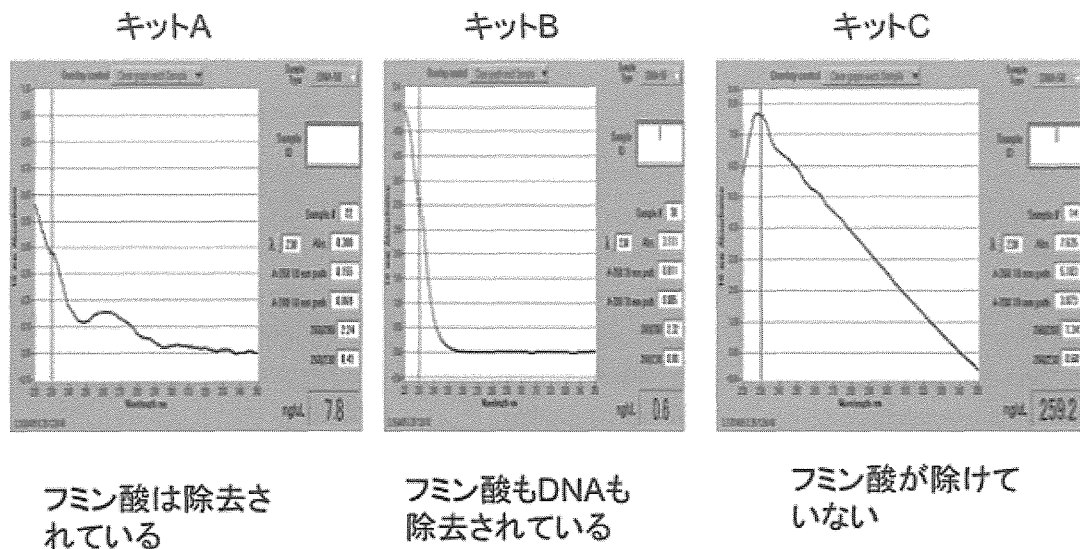
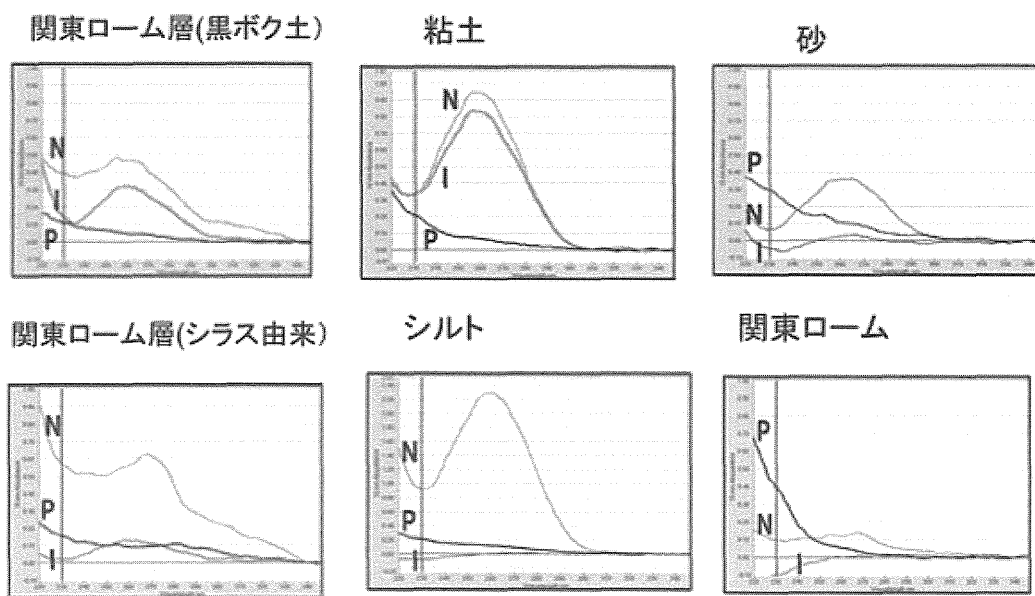


図8. 土壤からDNAを抽出する新規法と市販のキットの比較



P:PowerSoil DNA isolation kit, I: Isoil for Beads beating kit、 N:New(開発した方法)

N:土壤からフミン酸を先に除去してから、菌を破壊してDNAの回収率を上げる新規開発法

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  
（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業））

分担研究報告書

地方衛生研究所におけるバイオテロ対応に関する研究

研究分担者 小林 和夫 堺市衛生研究所長

研究協力者	水田 克巳	山形県衛生研究所長（北海道・東北・新潟地区）
研究協力者	八柳 潤	秋田県健康環境センター 上席研究員（北海道・東北・新潟地区）
研究協力者	岸本 剛	埼玉県衛生研究所 副所長兼感染症室長 （関東・甲・信・静岡地区）
研究協力者	皆川 洋子	愛知県衛生研究所長（東海・北陸地区）
研究協力者	内野 清子	堺市衛生研究所 ウイルス検査担当総括研究員（近畿地区）
研究協力者	杉本 光伸	堺市衛生研究所 細菌検査担当総括研究員（近畿地区）
研究協力者	調 恒明	山口県環境保健センター所長（中国・四国地区）
研究協力者	岸本 壽男	岡山県環境保健センター所長（中国・四国地区）
研究協力者	四宮 博人	愛媛県立衛生環境研究所長（中国・四国地区）
研究協力者	山下 育孝	愛媛県立衛生環境研究所 ウイルス科長（中国・四国地区）
研究協力者	千々和 勝己	福岡県保健環境研究所副所長（九州地区）

**研究要旨**

地方衛生研究所（地衛研）におけるバイオテロ対応の現状と課題について、「1. 現行の国立感染症研究所（感染研）病原体検出マニュアル」、「2. 新規検査マニュアルの整備の必要性」、「3. 地方衛生研究所全国協議会 6 支部の感染症対策部会を中核として支部内連携構築、支部内連携から広域・全国ネットワークの構築」、「4. 地衛研と感染研の連携強化」の視点から、課題の抽出や解決策を探索した。その結果、多くの課題が抽出された。これら課題の解決には、地衛研、各支部内、支部間や地方衛生研究所全国協議会、感染研や厚生労働省の理解や連携が重要である。加えて、地衛研の厳しい予算や人員状況、機能低下、人材育成、技術継承などの課題が抽出された。課題の克服には各地衛研のみならず、地方自治体や国レベルの連携、理解や支援（財政、人的、技術、情報など）が望まれる。バイオテロは突発的で緊急を要する健康危機管理対応であり、平時から対応を準備・構築する必要がある。

**A. 研究目的**

バイオテロ対応において医療機関や地方衛生研究所（地衛研）は診療や原因物質（感染病原体や毒素など）の特定で最前線となることが想定される。本分担研究は地衛研における原因物質（感染病原体や毒素など）の特定に際し、課題を抽出し、課題解決の探索を目的とした。

**B. 研究方法**

地衛研における感染症対策は地方衛生研究所全国協議会感染症対策部会を中核として活動していることから、全国 6 地区支部（北海道・東北・新潟地区、関東・甲・信・静岡地区、東海・北陸地区、近畿地区、中国・四国地区、九州地区）の部会員を研究協力者と構成した。

各研究者に 4 項目（下記）について意見調査（アンケート）を実施し、課題を抽出

や課題の克服を探索した。

1. 現行の国立感染症研究所（感染研）病原体検出マニュアル
2. 新規検査マニュアルの整備の必要性
3. 地方衛生研究所全国協議会 6 支部の感染症対策部会を中核として支部内連携構築、支部内連携から広域・全国ネットワークの構築
4. 地衛研と感染研の連携強化

### 倫理面への配慮

本研究は意見調査研究であり、また、患者など研究対象者は包含せず、倫理面に問題ないと判断した。なお、利益相反はなかった。

## C. 研究結果

### 1. 現行の感染研病原体検出マニュアル(表 1)

感染研病原体検出マニュアルに関し、1) 改訂年月日の記載、2) 地衛研と感染研の担当部分に関する記載、3) 感染研の online 病原体検出マニュアル (<http://www.nih.go.jp/niid/ja/lab-manual.html>) でリンク不全、4) 厚生労働省通知とマニュアルの齟齬、5) 自然毒(リシン、サキシトキシン)や真菌毒(アフラトキシン、マイコトキシン)に関する記載がない、6) 診断不明や未知の原因物質・病原体の対応などが意見された。

### 2. 新規検査マニュアルの整備の必要性(表 2)

新規検査マニュアルの整備の必要性に関し、1) 水痘は特定病原体でないが、天然痘／痘瘡と鑑別診断を要するため、天然痘のマニュアル、2) 新規分析機器の導入が予想される検査に関するマニュアル、3) 感染症の予防及び感染症患者に対する医療に関する法律(感染症法)改正の施行に伴い、病原体サーベイランスが強化(2015年4月以降)に整合・見直し、4) 自然毒や真菌毒に関するマニュアル、5) 地衛研で実施する可能性の高い日本紅斑熱やウエストナイル熱に関する検出マニュアル、6) 検査法の最新化に伴う周知や迅速な更新などが示された。

### 3. 地方衛生研究所全国協議会 6 支部の感染症対策部会を中核として支部内連携構築、支部内連携から広域・全国ネットワークの構築(表 3)

1) 地衛研の現状：的確な技術継承と人材育成、2) 異なる支部間の連携構築、3) バイオテロ病原体は低頻度で試薬備蓄に経費を要し、また、検査精度の維持、検査員の確保が困難など、意見された。

### 4. 地衛研と感染研の連携強化(表 4)

1) 相互理解や配慮、2) 感染症法改正の施行に伴い、感染症発生動向調査事業が見直しされることが想定されるが、経過に関し、情報共有が不十分、3) 地衛研における予算と人員は制約されているが、感染研の支援、4) レファレンスセンターの制度として位置付けが不明瞭、5) 感染研の行政検査成績書が地衛研に返送されるまで長期間を要することがあるなど、示された。

## D. 考察

地衛研は地方衛生行政の科学的・技術的中核機関(健発 0731 第 8 号、厚生労働省健康局長、平成 24 年 7 月 31 日)であり、業務と機能は 1) 試験検査、2) 調査研究、3) 研修・指導、4) 公衆衛生情報の収集・解析・発信、5) 健康危機管理対応、6) 衛生行政施策に資する科学的根拠の提供である。地衛研におけるバイオテロ対応として、上述の 1) - 6) が該当し、加えて、広域性、国と連携が求められる。

地衛研におけるバイオテロ対応の現状と課題について、「1. 現行の感染研病原体検出マニュアル」、「2. 新規検査マニュアルの整備の必要性」、「3. 地方衛生研究所全国協議会 6 支部の感染症対策部会を中核として支部内連携構築、支部内連携から広域・全国ネットワークの構築」、「4. 地衛研と感染研の連携強化」の視点から、課題の抽出や解決策を探索した。

その結果(表 1. - 4.)、多くの課題が抽出された。これら課題の解決には、地衛研、各支部内、支部間や地方衛生研究所全国協議会、感染研や厚生労働省の理解や連携が重要である。加えて、厳しい予算や人



員状況、機能低下、人材育成、技術継承などの課題が抽出された。

解決には各地衛研のみならず、地方自治体や国レベルの連携、理解や支援（財政、人的、技術、情報など）が望まれる。バイオテロは突発的で緊急を要する健康危機管理対応であり、平時から対応を準備・構築する必要がある。

## E. 結論

- バイオテロ対応において地衛研の課題を抽出し、課題解決の探索をした。
- 課題の克服には各地衛研のみならず、地方自治体や国レベルの連携、理解や支援（財政、人的、技術、情報など）が望まれる。

## F. 健康危険情報

特記事項なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kobayashi, K. 2014. Review. Serodiagnosis of *Mycobacterium avium* complex disease in humans. Translational research from basic mycobacteriology to clinical medicine. Jpn. J. Infect. Dis. 67: 329-332.  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/67/5/67\\_329/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/67/5/67_329/_article)  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/67/5/67\\_329/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/67/5/67_329/_pdf)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25241680>.
2. Matsuzaki, Y., K. Sugawara, M. Nakauchi, Y. Takahashi, T. Onodera, Y. Tsunetsugu-Yokota, T. Matsumura, M. Ato, K. Kobayashi, Y. Shimotai, K. Mizuta, S. Hongo, M. Tashiro, and E. Nobusawa. 2014. Epitope mapping of the hemagglutinin molecule of A/(H1N1)pdm09 influenza virus by using monoclonal antibody escape mutants. J. Virol. 88: 12364-12373.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25122788>  
<http://jvi.asm.org/content/88/21/12364.abstract>

3. Sugamata, R., A. Sugawara, T. Nagao, K. Suzuki, T. Hirose, K. Yamamoto, M. Oshima, K. Kobayashi, T. Sunazuka, K.S. Akagawa, S. Omura, T. Nakayama, and K. Suzuki. 2014. Leucomycin A<sub>3</sub>, a 16-membered macrolide antibiotic, inhibits Influenza A virus infection and disease progression. J. Antibiot. 67: 213-222.  
<http://www.nature.com/ja/journal/v67/n3/full/ja2013132a.html>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24496145>
4. 小林和夫. 2014. 細菌および真菌による呼吸器感染症 (§ 9・2・1). 病原微生物学 基礎と臨床 (荒川宣親、神谷茂、柳 雄介 編) 東京: 東京化学同人 . 239-244 . ISBN: 978-4-8079-0827-1

## 2. 学会発表

特記事項なし。

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 特記事項なし。
2. 実用新案登録 特記事項なし。
3. その他 特記事項なし。

表 1. 現行の国立感染症研究所病原体検出マニュアルの問題点および改善法

問 題 点	改 善
<ul style="list-style-type: none"> <li>● バイオテロ対象病原体(特に1種及び2種病原体)について、検出マニュアルの有無・最終改訂年月日のリストがある方が良い</li> <li>● 炭疽・ペスト菌については、地衛研で実施準備する部分と感染研が担当する部分を明示しておいてほしい(本文の前に、検査項目とレベルの表を加えていただくと良い)</li> <li>● すでにマニュアルがありながら、リンクがない(ウエストナイル熱、SFTS、結核など)</li> <li>● リンクされているマニュアルに関し、第何版、作成年月日などが記載されていると最新化されたものかどうか解り易いとする</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 検出マニュアルの有無・最終改訂年月日のリストに関する情報の追加</li> <li>● 地衛研と感染研の担当部分を明記</li> <li>● リンクの確認</li> <li>● 情報の追加</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>● 炭疽菌検出：通知(厚労省、2001年10月18日)と炭疽検査マニュアル(第2版、感染研、2013年3月)が示されているが、PCR法の位置づけが異なる</li> <li>● ホームページ：感染研から検出法のダウンロードができない項目がある(コレラ菌、結核菌、ウエストナイルウイルス、ボツリヌス毒素・菌、SFTS――)</li> <li>● 自然(サキシトシン、リシン)や真菌毒(アフラトキシン、マイコトキシン)に関する検査方法の記載がない</li> <li>● 病原体検出マニュアルは病原体別に記載されているが、診断不明の場合、対応に苦慮</li> <li>● マニュアルに記載されている試薬メーカーが多岐</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 通知(厚労省、2001年10月18日)と炭疽検査マニュアル(第2版、感染研、2013年3月)を整合</li> <li>● 病原体検出マニュアルの整備と更新</li> <li>● 自然毒に関する整備?</li> <li>● 症状に基づいた検査フローチャートの整備が望まれる</li> <li>● 混乱や誤認を回避するため、数社以内</li> </ul>

表 2. 新規検査マニュアルの整備の必要性

問 題 点	改 善
<ul style="list-style-type: none"> <li>● 水痘は特定病原体でないが、天然痘と鑑別診断を要するため、マニュアル整備が必要</li> <li>● 今後、MALDI-TOF-MS等機器分析の当該分野における応用の進展が期待される。将来的にはこれらにも対応するマニュアルが必要</li> <li>● 感染症法改正に伴い、病原体サーベイランスが強化される(2015年4月以降)。</li> <li>● 自然毒や毒素系物質の検査マニュアルが必要</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 水痘に関するマニュアルの整備</li> <li>● MALDI-TOF-MS等機器分析にも対応するマニュアルの整備</li> <li>● 病原体サーベイランスの強化に整合・見直し</li> <li>● 自然毒や毒素系物質の検査マニュアルの整備</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>● 地衛研で実施する可能性の高い日本紅斑熱やウエストナイル熱に関する検出マニュアルの整備</li> <li>● 検査法の最新化に伴う周知や迅速な更新</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 感染研ホームページの更新</li> </ul>

表 3. 地方衛生研究所全国協議会 6 支部の感染症対策部会を中核として支部内連携構築、支部内連携から広域・全国ネットワークの構築

問 題 点	改 善
<ul style="list-style-type: none"> <li>● 的確な技術伝承と人材育成が不十分であり、今後、個々の地衛研の弱体化が進行する可能性</li> <li>● 異なる支部間の連携構築</li> <li>● バイオテロ病原体は低頻度で試薬備蓄に経費を要し、また、検査精度の維持、検査員の確保が困難</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 感染症対策部会を中核とする連携の維持が重要</li> <li>● 副部会員など増員</li> <li>● 部会員の処遇として、衛微協理事會に参加</li> <li>● 地衛研全国協議会で支部間の連携を強化</li> <li>● 支部内で検査を分担し、事務手続きは簡素化</li> <li>● 国からの経費補助</li> </ul>

表 4. 地衛研と国立感染症研究所の連携強化

問 題 点	改 善
<ul style="list-style-type: none"> <li>● 相互の優先事項に対する配慮や理解が不足しがち</li> <li>● 感染症法改正に伴い、感染症発生動向調査事業の見直しが行われ、レファレンスセンターを精度管理センターにすることなどが討議されているが、衛生微生物協議会のレファレンス委員会と別に協議が進行</li> <li>● 地方衛生研究所は施設、予算、検査機器等の状況により検査可能病原体の範囲に制約</li> <li>● 地衛研では予算や人員が漸減し、新たな課題が発生した時の対応が困難</li> <li>● 感染研の行政検査成績書が地衛研に返送されるまで長期間（例：数か月）を要することがある</li> <li>● レファレンスセンターを介した連携も図っているが、レファレンスセンターは制度として位置付けが不明瞭なため、地衛研内で正式な対応が困難</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 衛微協の理事会等を活用して、感染研と地全協感染症対策部会の連携強化</li> <li>● 相互の人事交流の活発化</li> <li>● 衛生微生物協議会の検査情報委員会やレファレンス委員会を整理し、再構築</li> <li>● 検査機器や検査試薬の購入費など財政支援</li> <li>● 検査技術の指導・実技講習</li> <li>● 国からの通知や通達を適宜発出し、地方が課題に向け迅速に対応できるような措置</li> <li>● 検査技術の指導・実技講習</li> <li>● 感染研の迅速な検査対応と回答</li> <li>● レファレンスセンターを通知等で国（厚生労働省、感染研など）が明確に位置付ける</li> </ul>

分担研究報告書

バイオテロ対応ホームページのアップデートと  
治療法の確立

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	鯉渕 智彦 菊地 正 西條 政幸 松本 哲哉 藤井 毅	東京大学医科学研究所附属病院 感染免疫内科 東京大学医科学研究所附属病院 感染免疫内科 国立感染症研究所 ウイルス第一部 東京医科大学 微生物学講座 東京医科大学八王子医療センター 感染症科

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最新の情報を得ることを目的とした『バイオテロ対応ホームページ』を改訂した。総論部分を見直し、かつ2014年に国内で発生したデング熱、および西アフリカ3ヵ国でのエボラ出血熱に関する新知見を追加した。今後とも各病原体（疾患）の最新情報の追加等を行い、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、国内の地方衛生研究所における検査可能疾患の状況調査（アンケート）を行った。

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。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重要な対策の一つとなる。本研究においては、医療従事者が最新のデータに基づいた情報を広く利用できることを目指し、これまでに各疾患の情報を入れたCD-ROMを作成・配布したり、専門家の意見を取り入れたりしながらホームページの修正とアップデートを行ってきた。今後とも新たな情報を追加してより内容を充実させ、一般の医療従事者にとって有用なホームページを公開することを目的とする。

B. 研究方法

国内外の主要雑誌や学会などを通じて、バイオテロ関連疾患についての情報を収集し、ホームページに掲載した内容の妥当性・正確性等について確認する。新たなアウトブレイクが生じた場合には迅速に新知見を追加する。

さらに今年度は、バイオテロ診断支援の一環として国内の地方衛生研究所における検査可能疾患のアンケート調査を行った。

（倫理面への配慮）

特になし

C. 研究結果

ホームページに掲載したバイオテロ関連疾患についての情報を見直し、まず総論部分の改訂を行った。具体的には感染症法、施行令、施行規則の改正を反映させた。また、2014年に約70