

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

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て電子顕微鏡を用いた病原体の迅速検出法の確立を目的とする。今年度は、ウイルス血症を引き起こすウイルス感染症を対象として、血中のウイルス粒子の電子顕微鏡学的検出法について検討し、手順を整理した。

研究協力者：

国立感染症研究所 感染病理部

鈴木忠樹、岩田奈織子、佐藤由子、片岡紀代、
小谷 治、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、高崎智彦、吉川智城、西條政幸

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バイオテロ対策や新興・再興感染症のウイルス学的診断の一助となる。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. ウイルス・細菌の迅速検出法に必要なレファレンス標本の作製、見直しと改善、3. 検出の感度・精度を向上するための改良法の3点を課題としている。

2014年は、デング出血熱の日本国内発生や西アフリカにおけるエボラウイルスのアウトブレイクによる輸入感染疑い例の発生が問題となった。いずれも高いウイルス血症が特徴的であ

り、患者血清を用いたウイルス粒子の検出が可能な感染症である。そこで、今年度は、血液検体からのウイルス粒子の検出法の標準手順書の見直しを行った。

B. 研究方法

高いウイルス血症を引き起こすウイルス感染症を文献的にリストし、各ウイルス粒子電子顕微鏡像のリファレンス標本を整理した。また、不活化法を文献的に調査し、標準手順を見直した。対象とするウイルス粒子の標本は、これまでにわれわれが当該研究で準備し、撮影したもの（表中に NIID と表記） Koch 研究所による外部評価の際にわれわれが撮影したもの（同、EQA）、および、2010年12月1-2日に Koch 研究所主催された GHSAG wet-lab workshop on diagnostic electron microscopy of pathogens でわれわれが撮影した画像（同、GHSAG）を含む。

C. 結果

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を表にまとめた。他に A 型肝炎ウイルス（*Picornaviridae, Hepatovirus*）パルボウイルス B19（*Parvoviridae, Erythrovirus*）が主なウイルスとして挙げられる。また、血液中のウイ

ルス粒子の迅速検出法の標準手順を図にまとめた。不活化処理は、文献的に調査し、Koch 研究所および CDC の標準手順を考慮した結果、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 μ l で十分)し、紫外線照射との組み合わせで行うこととした。

D. 考察

実際に高ウイルス血症発症時のデング熱患者の血清を用いて電子顕微鏡学的にウイルス粒子の検出を試みると、直接法の場合は、染色液は酢酸ウラン液を用いるよりもリンタングステン酸を用いた方が、染色液の浸透が効率よく、血清原液でも粒子を検出することが可能であった(データは示さない)。しかしながら、血清由来タンパクなどの夾雑物が多いため、10倍以上のリン酸緩衝液による希釈を行った方が、検出効率が良かった。よって、実際に患者血清を検索する場合は、血清原液をある程度、段階希釈し、リンタングステン酸染色を選択した方がよいであろう。しかしながら、電子顕微鏡学的観察には、少なくとも 10^6 /ml 以上のウイルス粒子が存在しないと検出が困難となり、病期によっては、ウイルス量が低く、超遠心等を利用したウイルス粒子の濃縮が必要となる。また、病原体によっては、白血球への感染が優勢との報告があるため(エボラウイルス、オルソポックスウイルス、細胞内寄生性細菌など)、白血球を回収し、これを迅速包埋し検索に用いた方が効率がよい可能性もある。また、2014年の西アフリカにおけるエボラウイルスの大流行をうけ、今後は、BSL4病原体にも十分対応ができるように標準手順書を見直す必要がある。

E. 結論

血液中のウイルス粒子の電子顕微鏡学的検出法について検討し、手順を整理した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Sato Y, Nakajima N, Koike S, Iwasaki T, Sata T, Yamashita T, Minagawa H, Taguchi F, Hasegawa H, Shimizu H, Nagata N. Establishment of a panel of in-house polyclonal antibodies for the diagnosis of enterovirus infections. *Neuropathology*. 2014. doi: 10.1111/neup.12171.

2) Iwata-Yoshikawa N, Uda A, Suzuki T, Tsunetsugu-Yokota Y, Sato Y, Morikawa S, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H, Nagata N. Effects of Toll-like receptor stimulation on eosinophilic infiltration in lungs of BALB/c mice immunized with UV-inactivated severe acute respiratory syndrome-related coronavirus vaccine. *J Virol*. 2014. 88:8597-8614

3) Koma T, Yoshimatsu K, Nagata N, Sato Y, Shimizu K, Yasuda SP, Amada T, Nishio S, Hasegawa H, Arikawa J. Neutrophil depletion suppresses pulmonary vascular hyperpermeability and occurrence of pulmonary edema caused by hantavirus infection in C.B-17 SCID mice. *J Virol*. 2014. 88:7178-7188

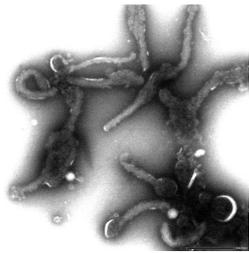
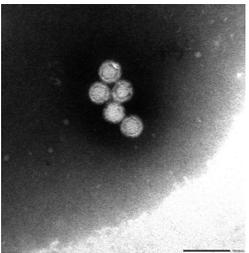
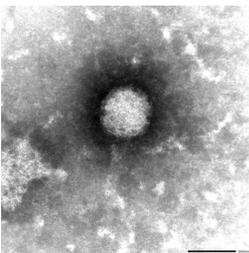
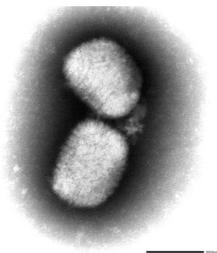
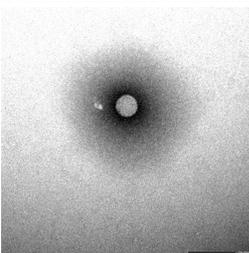
2. 学会発表

1) 岩田 奈織子、福士 秀悦、福間 藍子、鈴木 忠樹、竹田 誠、田代 真人、長谷川 秀樹、永田 典代. 中東呼吸器症候群コロナウイルスに対するマウスおよびビラットの感受性について。第62回日本ウイルス学会学術集会(横浜)2014年11月

G. 知的財産の出願・登録状況

該当なし

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 Ebola virus)	あり (- 鎖 RNA)	フィラ メント 状が優 勢	80 × 1200 nm (50 nm)	 (Zaire EV/GHSAG2010)	エボラウイル ス属、マールブ ルグウイルス 属
デングウイルス (Flaviviridae Flavivirus)	あり (+ 鎖 RNA)	球状	40-60 nm (30 nm)	 (flavivirus / EQA24)	フラビウイル ス属
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)	 (SFTS virus/NIID)	ナイロウイル ス属、ハンタウ イルス属、フレ ボウイルス属
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	 (Vaccinia/EQA25)	オルソポック スウイルス属
B 型肝炎ウイルス (HBV) Hepadnaviridae Orthohepadnavirus	あり (2 本鎖 DNA)	球状	42 nm (28 nm)	 (HBV/EQA27)	該当なし

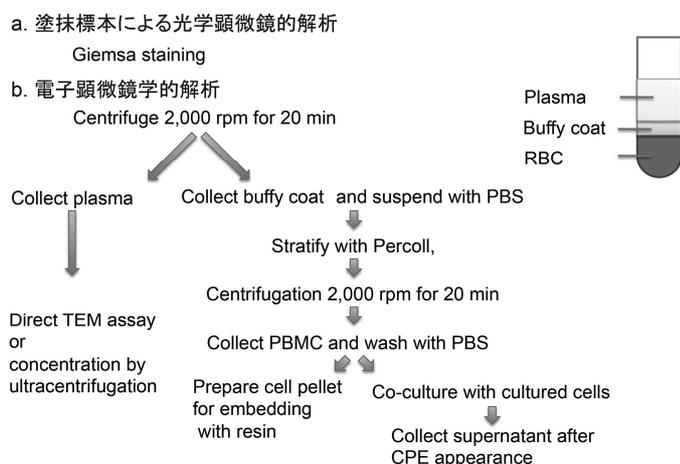


図 血液中のウイルス粒子の迅速検出法の標準手順。不活化は2%-4% グルタルアルデヒドもしくは2%パラフォルムアルデヒド液で30分~2時間室温固定(200 μl で十分)し、紫外線照射との組み合わせで行う。