

分担研究報告書

バイオテロに使用される可能性のある真菌感染症の迅速診断法の確立

所 属 国立感染症研究所真菌部
研究分担者 梅山隆

研究要旨

バイオテロに用いられる可能性のある病原真菌として、BSL3 に分類されるコクシジオイデス属 (*Coccidioides immitis*, *C. posadasii*), ヒストプラスマ属 (*Histoplasma capsulatum*), BSL2 に分類されるクリプトコックス・ガツティ (*Cryptococcus gattii*) が想定される。これらの病原真菌は感染性が高く、分離培養で大量の分生子を飛散させる危険性があることから、培養を要しない検査技術の開発が望まれる。本研究は、臨床検体からコクシジオイデス属などの高病原性真菌 DNA の検出法を検討し、より簡便で成績の良い DNA 検出法を開発し、バイオテロを含めた集団感染事例が起きた際の迅速診断に役立てることを目的とする。今年度は、LAMP 法による *Cryptococcus gattii* DNA の高感度検出系の開発を検討した。

研究協力者

名木稔, 星野泰隆, 宮崎義継(国立感染症研究所真菌部)

A. 研究目的

真菌症は HIV 感染患者や臓器移植, 抗癌剤治療などの免疫不全患者のみでみられる感染症と誤解され、公衆衛生の観点から重要性が認識されにくかった。しかし従前からクリプトコックス症やコクシジオイデス症, ヒストプラスマ症などは健常者に起こることが知られており、健常者における集団感染事例や院内感染事例が報告されるようになってきたことから、他の病原体同様にサーベイランスや疫学研究の重要性が増してきた。

バイオテロに用いられる可能性のある病原真菌としては、BSL3 に分類されるコクシジオイデス属 (*Coccidioides immitis*, *C. posadasii*) とヒストプラスマ属 (*Histoplasma capsulatum*), BSL2 に分類されるクリプトコックス・ガツティ (*Cryptococcus gattii*) 等が想定される。いずれの真菌も感染性が高く健常者でも感染が成立し、播種性感染に進行すると致死率は極めて高くなるが、これらの病原真菌は日本国内には定着していないと考えられてきた。しかし、近年では海外の流行地への渡航歴のないヒストプラスマ, クリプトコックス・ガツティ感染患者が報告されるようになり、国内にも感染源が存在する可能性が示唆されている。また、コクシジオイデス属, ヒストプラスマ属については、分離培養で大量の分生子を飛散させる危険性があることから、検査室での分離培養は飛散孢子による集団感染を引き起こす危険性が考えられる。

本研究では、分離培養された BSL3 真菌の安全か

つ簡便な診断系を構築し、バイオテロを含めた集団感染事例が起きた際の迅速診断に役立てることを目的とする。今年度は、*Cryptococcus gattii* の簡便かつ高感度な検査法として、LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法の検討を行った。

B. 研究方法

Cryptococcus gattii 検出のための LAMP 法の標的配列として、*Cryptococcus* 属の莢膜の生合成に関与する *CAP10* 遺伝子の配列を選択した。LAMP プライマーおよび loop プライマーは LAMP 法プライマー設計支援ソフトウェア PrimerExplorer (<http://primerexplorer.jp>) を利用して数組設計した。その他、既に論文で報告されている *CAP59* (Lucas S et al., Clin. Microbiol. Infect., 2010), もしくは *URA5* (Amirabadi AR et al., Af. J. Biotechnol. 2012) を利用した LAMP プライマーについても検討した。

LAMP 反応は栄研化学の Loopamp DNA 増幅試薬キット (乾燥型) および検出試薬として Loopamp 蛍光・目視検出試薬を用いた。専用の 200 μ l PCR チューブを用い、サーマルサイクラーで 63°C で反応を行った。*C. neoformans* H99 株および *C. gattii* R265 株から抽出した DNA を用いて検討を行った。反応後、UV 写真撮影装置で検出を行った。

【倫理面への配慮】

本実験では臨床検体などは使用せず、分離された菌の DNA を用いるのみであったことから、倫理面に関する配慮は不要であった。

C. 研究結果

最初に、既に論文に報告されている *CAP59* の配列

を利用した LAMP 法の導入を試みた。 *C. neoformans* (血清型 A および D) もしくは *C. gattii* (血清型 B および C) の 2 菌種を区別することが出来る LAMP プライマーとして報告されている。論文中の塩基配列を参考にプライマーを合成し、 *C. neoformans* H99 株および *C. gattii* R265 株から抽出したゲノム DNA に対して LAMP 反応を行った。1 時間の反応では、 *C. neoformans* もしくは *C. gattii* を特異的に検出することが出来たが、2 時間の反応では、水のみ陰性コントロールにおいて検出されており(データ未掲載)、本プライマーによる検出系ではバックグラウンドが高い可能性が高く、高感度検出系としては不相当であることが示唆された。

次に、別の論文で報告されている *URA5* の配列を利用した LAMP 法の導入を試みた。また、 *CAP10* 遺伝子の配列を利用して 4 種類の LAMP プライマーセットを設計した。すべてのプライマーセットにおいて、1 時間以内に検出可能であった(図 1)。その中でも *CAP10-25-Cg* および *CAP10-25-Cn* プライマーセットでは 30 分で検出可能であった。また、 *CAP10-13-Cn* プライマーセットを用いると、 *C. neoformans* 特異的な検出が可能であった。いずれも、水のみ陰性コントロールにおいては、2 時間後でも検出されなかった。

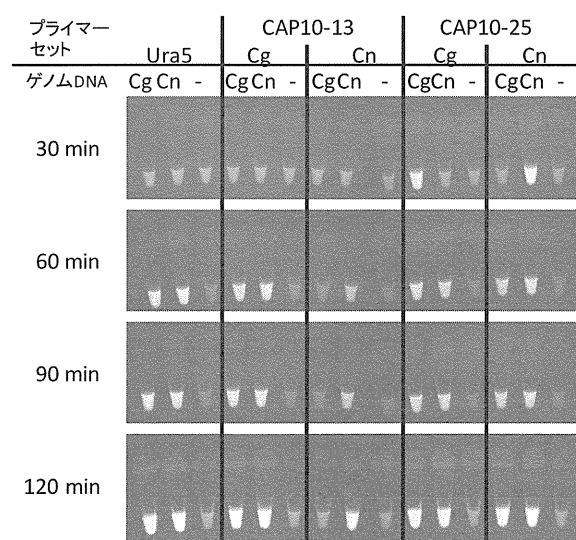


図 1. *C. neoformans* (Cn, H99 株) および *C. gattii* (Cg, R265 株) のゲノム DNA を用いた LAMP 法プライマーセットの検討

D. 考察

ヒストプラズマ属やコクシジオイデス属などの BSL3 真菌、クリプトコックス・ガッティがテロ目的で使用され、国内感染者が発生した場合には、検体から菌が分離されるかどうか予想できないので、医療機関の検査室でこれらの菌を偶発的に培養してしまう可能性が考えられる。

病原体の検出法について、PCR 法はサーマルサイクラー・増幅酵素の性能や操作者の技術への依存が

強く、検査実施機関によって結果が異なることも多い。LAMP 法の反応系は非常に簡素で、反応温度が定温であるため、サーマルサイクラーの性能に依存しないという利点がある。しかも、1 時間で微量 DNA を検出することが可能であり、本実験で確立した LAMP 法を用いればクリプトコックス属を迅速簡便に検出できる。現時点ではクリプトコックス属の菌体から調製した DNA でしか検証できていないが、今後、特異性や検出感度について検討し、臨床検体を用いて本研究で確立した LAMP 法が可能になれば、上記のような危険を伴う菌の培養を回避することも可能であるため、今後実験系の改良を進めていきたい。

E. 結論

LAMP 法によるクリプトコックス・ガッティの迅速診断系のためのプライマーセットを開発した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yurika Ikeda-Dantsuji, Hideaki Ohno, Koichi Tanabe, Takashi Umeyama, Keigo Ueno, Minoru Nagi, Satoshi Yamagoe, Yuki Kinjo, Yoshitsugu Miyazaki. Interferon- γ promotes phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* but not *Cryptococcus gattii* by murine macrophages. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 21: 831-836, 2015
- 2) Shotaro Okachi, Keiko Wakahara, Daizo Kato, Takashi Umeyama, Tetsuya Yagi, Yoshinori Hasegawa. Massive mediastinal cryptococcosis in a young immunocompetent patient. *Respirology Case Reports*. 3 : 95-98, 2015

2. 学会発表

- 1) 梅山隆, 中村茂樹, 山越 智, 名木稔, 壇辻百合香, 中山靖子, 浦井誠, 金城雄樹, 上野圭吾, 星野泰隆, 宮崎義継, 治療薬選択に必要な真菌の菌種同定, 第 59 回日本医真菌学会総会・学術集会, 札幌, 10 月 9-10 日, 2015

G. 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

厚生労働科学研究補助金 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)
分担研究報告所

超高速病原体ゲノム解読システムの構築と包括的な核酸迅速診断法の確立

所属 国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター
研究分担者 黒田誠

研究要旨

未知病原体や変異病原体による新興感染症の汎発流行,そしてそれらを利用したバイオテロなどの危険性は近年社会的不安の一つとして認識されつつある。その危険性に対し的確な対処法を立案・整備する上で、バイオテロ病原体を網羅的かつ迅速に配列解読することは最も確かなアプローチの一つと考える。次世代ゲノムシーケンサー (Next-generation DNA sequencer: NGS) のパフォーマンスを用いて WHO 指定バイオテロ病原体のゲノム配列及び変異情報データベースを充実させ、有事において迅速に対応出来る体制を整えることを本研究課題は目標としている。

炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) は炭疽症の原因となる細菌で、第二次世界大戦以降、生物兵器として各国の軍事機関に研究され、1993 年のオウム真理教によるテロ未遂や 2001 年のアメリカのテロ事件にも利用された事がある。そのため、炭疽症のアウトブレイクが起きた際に、原因菌の出自を詳細に調査することはバイオセキュリティ上の重要な意味を持つ。出自を調査するにはコアゲノムを用いた分子系統解析を行うのが有効であると考えられるが、コアゲノム情報を用いた分子系統解析を容易に行えるツールは存在していなかった。そのため我々は *B. anthracis* の次世代シーケンス (next-generation sequencing: NGS) データをアップロードすると single nucleotide polymorphisms (SNPs) を抽出し、*B. anthracis* を含む *B. cereus* グループ中の系統的な位置関係を推定するウェブアプリケーション GcoGSA-BA (Global core Genome SNP Analysis for *Bacillus anthracis*) を開発した。GcoGSA-BA はコアゲノム系統解析だけでなく、pXO1, pXO2 といった病原性を規定するプラスミドや pXO1 上に存在する三つの炭疽菌毒素遺伝子 (lethal factor, LF; edema factor, EF; protective antigen, PA) を検出する機能も有しており、炭疽菌 (*B. anthracis* Ames Ancestor) ばかりでなく炭疽菌毒素遺伝子を例外的に保持している *B. cereus* G9241 の系統的な位置関係も正しく推定し、更に炭疽菌毒素遺伝子を検出することができた。本年度は GcoGSA-BA による情報解析で、炭疽菌を含むセレウス属グループ全般の病原性因子の特定も可能になる改良を加えた。

2014 年のデング熱感染症・国内発症例を契機に、輸入感染症による国内拡大にも注視すべき事情が生じ、2020 年東京オリンピック対策にも資するデングウイルス遺伝型を図示化するツール Dengue Genograph Viewer (DGV) を構築した。多様な輸入感染症が国内例として散見されると想定され、恣意的なバイオテロのみならず、デングウイルス等の外来ウイルスも検討課題として引き続きデータベース拡充を行っていく。

研究協力者

山下明史 (国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター)

奥谷晶子 (国立感染症研究所・獣医科学部)

A. 研究目的

未知病原体や変異病原体による新興感染症の汎発流行,そしてそれらを利用したバイオテロなどの危険性は近年社会的不安の一つとして認識されている。最先端技術を駆使した次世代ゲノムシーケンサーにより、今までは数年を要した全ゲノム解読が数週間ですべて完了することが可能となった。最先端の革新技术を応用し、効率的かつ安定的に病原体検査システムを運用する体制を整え、WHO 指定バイオテロ病原菌お

よび未知病原体をも検査対象とする網羅的解析法を構築することを目的としている。

B. 研究方法

国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センターで構築した網羅的病原体検査法の情報解析のみをパイプライン化し、インタラクティブに誰でも利用できるソフトを開発した。詳細は研究結果を参照。

【倫理面への配慮】

該当なし

C. 研究結果

1) ネットワーク経由によるバイオテロ病原体検索のための解析システム

現在、感染研・ゲノムセンターにベンチトップ型・次世代シーケンサーと情報解析サーバーが整備されている。感染研に臨床検体が到着後、数日で解析・検査結果を報告できるようにはなっているものの、感染研に検体が送付されるまでには現場で数多くの微生物検査等が行われた後になってしまうケースが少なくない。このような現状の中、各地方自治体にも本研究課題で構築したシステムを導入して頂き、検査体制の一助となるのであれば非常に有効かつ迅速なバイオテロ対策に資するものと考えている。

炭疽菌が候補として浮上した場合、コアゲノム SNPs を利用した炭疽菌・菌株の類縁関係を推定するためのゲノムワイド SNPs 解析システム Global core genome SNP analysis for *Bacillus anthracis* (GcoGSA-BA)

を開発した。炭疽菌ゲノム 5.23 Mb 全体に渡り特徴的な塩基アレル 657,183 箇所を用いたゲノム分子系統樹を作成できる。従来の MLST 法では分解能が非常に悪く、由来特定に難渋した菌株においても高精度に分類することを可能にした。

現在、関係者のみ運用可能としている。GcoGSA-BA は、公開されている炭疽菌ゲノムと比較したゲノムワイド系統樹の生データまで作成し、適当な系統樹ビューワーで閲覧可能なデータのダウンロードを可能にする。炭疽菌は *Bacillus cereus* group に属し、セレウス菌との鑑別間違いを起さぬよう、Lethal factor (LF), Edema factor (EF), Protective antigen (PA) の炭疽菌の病原性に必須な毒素因子の特定も可能にした。本年度は GcoGSA-BA による情報解析で、炭疽菌を含むセレウス属グループ全般の病原性因子の特定も可能になる改良を加えた(表 1)。

2) ウイルスの発生分布を遺伝型として地図上に図示化する

感染症のグローバルな伝播を把握するためには当該病原体の遺伝型を把握することが先決である。インフルエンザウイルス A(H1N1)pdm がほんの数ヶ月で世界中を駆け巡った事実は記憶に新しく、国立感染症研究所・椎野博士の報告によると、国内分離株のゲノム分子系統解析から 2009 年 5 月下旬には様々な防疫体制を超えて複数系統の A(H1N1)pdm が国内に侵入・伝播し、6 月にはパンデミック状況になっていたことが示された。本報告は病原体ゲノム情報に付随する疫学情報(時系列と地域)を十分に精査した点で特筆すべき解析結果であり、パンデミック状況を分子疫学の観点から考察した精度の高いトレーサビリティである。

アウトブレイクは元となる汚染源が必ずどこかに存在し、危機管理対応として被害を最小限に留めるために汚染源の特定は必須である。それ故、出来る限り病原体の遺伝型特定は行なっておきたい。海外か

らの来訪者が増えつつある日本において、2014 年夏のデングウイルスの国内症例を経験した今、病原体の由来特定は重要になってきている。そこで我々は公開データベースに登録されている全てのデングウイルス配列(1945 -2014 年)を収集し、分離国・地域と血清型および遺伝型としてデータベース化し Google Maps 上で表現できるよう作成した(図1)。血清型2と4しか図には示していないが、一目瞭然、ある特定の遺伝型ごとに大陸によって生息分布が制限されている。そもそもデングウイルスは蚊媒介感染症であり、中間宿主の蚊の種類を生息域に制限されることが主要因であろう。このデータベースを有効に活用すれば、患者個々の感染デングウイルス株をゲノム情報として取得し、この Dengue Genograph Viewer (DGV) デング・データベース上で検索すれば最も近縁のデングウイルスを検出することができる。残念ながら、現在の公開配列データベースが完全に世界のデングウイルス情報を網羅しているわけではなく、今後、書庫としてのデータベースの更なる充実が期待される。

D. E. 考察・結論

これまで分担研究として、WHO 指定バイオテロ病原体の配列データベース化を進めてきた。ゲノム情報を活用することにより有効なトレーサビリティに役立てる目的である。構築データベースを有効に活用するためには、迅速な解読リード配列の取得が望ましく、そのためには多くの難題が残っている。本年度の課題として、情報解析の NGS - MePIC - MEGAN - GcoGSA の解読・解析パイプラインの運用と公開を目指した。さらにデングウイルスの分離地域を図示化した Dengue Genograph Viewer を開発し、ゲノム配列を基盤にした分子疫学解析が由来特定にとって非常に有効であることが一目瞭然として理解される。NGS 解読において検査現場からのデータ転送等、迅速にゲノム比較解析を行うために未だ解消されていないボトルネックが残っているが、誰もが簡単に利用できるシステムが先行していけば、シーケンサー等のインフラ整備が後々追いついてくるものと考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 黒田誠 微生物ゲノミクスと公衆衛生学的活用 第 89 回日本感染症学会学術講演会 モーニングセミナー2 京都 (2015.4)
- 2) 黒田誠 NGS 技術による病原体ゲノム情報の大量取得と分子疫学解析への応用 第 158 回日本獣医学会学術集会・シンポジウム 十和田市 (2015.9)
- 3) 黒田誠 NGS を応用した感染症診断の可能性 第

表1 GcoGSA-BA に追加した *Bacillus cereus* の病原性因子のリスト

Capsule genes	gene	product	locus_tag	Reference
cap operon	Bacillus anthracis str. 'Ames Ancestor' plasmid pXO2, complete sequence			
	capB	poly-gamma-glutamate synthase PgsB	GBAA_RS28250	
	capC	poly-gamma-glutamate biosynthesis protein PgsC	GBAA_RS28245	
	capA	capsule biosynthesis protein CapA	GBAA_RS28240	
	capD	capsular polysaccharide biosynthesis protein	GBAA_RS28235	
bpsX operon	Bacillus cereus G9241 plasmid pBC218 cont1893, whole genome shotgun sequence			Mol Microbiol. 2011 April ; 80(2): 455-470. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07582.x.
	pBC218_0073	glycosyl transferase group 2	NC13_RS05360	PNAS June 1, 2004 vol. 101 no. 22 8449-8454
	pBC218_0072	polysaccharide polymerase	NC13_RS05355	
	pBC218_0071	glycosyl transferase WecB/TagA/CpsF family	NC13_RS05350	
	pBC218_0070	hypothetical protein	NC13_RS05345	
	pBC218_0069	hydrolase/polysaccharide capsule synthesis protein	NC13_RS05340	
	pBC218_0068	hypothetical protein	NC13_RS05335	
	bpsX	LytR family transcriptional regulator	NC13_RS05330	
	bpsA	chain length determination	NC13_RS05325	
	bpsB	tyrosin protein kinase	NC13_RS05320	
	bpsC	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	NC13_RS05315	
	bpsD	glycosyl transferase	NC13_RS05310	
	bpsE	sialic acid synthetase	NC13_RS05305	
	bpsF	UDP-N-acetylglucosamine 2 epimerase	NC13_RS05300	
	bpsG	CMP-sialic acid synthetase	NC13_RS05295	
	bpsH	polysaccharide translocase	NC13_RS05290	
	Bacillus cereus G9241 map unlocalized plasmid pBCXO1 cont1908, whole genome shotgun sequence			
has operon	hasA	presumed hyaluronan synthase	pBCXO1_0108	Mol Microbiol. 2011 April ; 80(2): 455-470. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07582.x.
	hasC	UDP-glucose-pyrophosphorylase	pBCXO1_0109	
	hasB	UDP-glucose dehydrogenase	pBCXO1_0110	
	Bacillus anthracis str. 'Ames Ancestor' plasmid pXO1, complete sequence			
	hasA	presumed hyaluronan synthase	GBAA_RS28975	
	hasC	UDP-glucose-pyrophosphorylase	GBAA_RS28980	
	hasB	UDP-glucose dehydrogenase	GBAA_RS28985	
B. cereus virulence genes				
	Bacillus cereus ATCC 14579 chromosome, complete genome			J. Bacteriol. June 2004, p. 3531-3538
enterotoxin	hblB	hemolysin BL binding component precursor	BC3101	
	hblA	hemolysin BL binding component precursor	BC3102	
hemolysin	hblC	hemolysin BL lytic component L2	BC3104	
	hblD	hemolysin BL lytic component L1	BC3103	
	nheA	non-hemolytic enterotoxin lytic component L2	BC1809	
	nheB	non-hemolytic enterotoxin lytic component L1	BC1810	
	nheC	enterotoxin C	BC1811	
	cytK	cytotoxin K	BC1110	
	enterotoxin1	enterotoxin / cell-wall binding protein, entFM	BC0813	
	enterotoxin2	enterotoxin	BC1953	
	enterotoxin3	enterotoxin / cell-wall binding protein	BC2952	
	enterotoxin4	enterotoxin / cell-wall binding protein	BC5239	
	hlyA	hemolysin A	BC4175	
	hlyII	hemolysin II	BC3523	
	hlyIII	hemolysin III	BC2196, BC5449	
	cerA	cereolysinA/phospholipaseC	BC0670	
	cerB	cereolysinB/sphingomyelin phosphodiesterase	BC0671	
	clo	cereolysinO/clo/perfringolysin O precursor	BC5101	
phospholipases	PI-PLC	phosphatidylinositol-specific phospholipaseC	BC3761	
proteases	ColB	collagenase	BC0556	
	Bacillus anthracis str. Ames chromosome, complete genome			J. Bacteriol. June 2004, p. 3531-3538
plcR	truncE plcR	pleiotropic transcriptional regulator	BA_5595	
	Bacillus cereus ATCC 14579 chromosome, complete genome			
	plcR	pleiotropic transcriptional regulator	BC5350	
	Bacillus cereus plasmid pBCE4810			BMC Microbiology 2006, 6:20 doi:10.1186/1471-2180-6-20
cereulide	cesA	cereulide synthetase A	gene 6845..17020	
	cesB	cereulide synthetase B	gene 17034..25079	

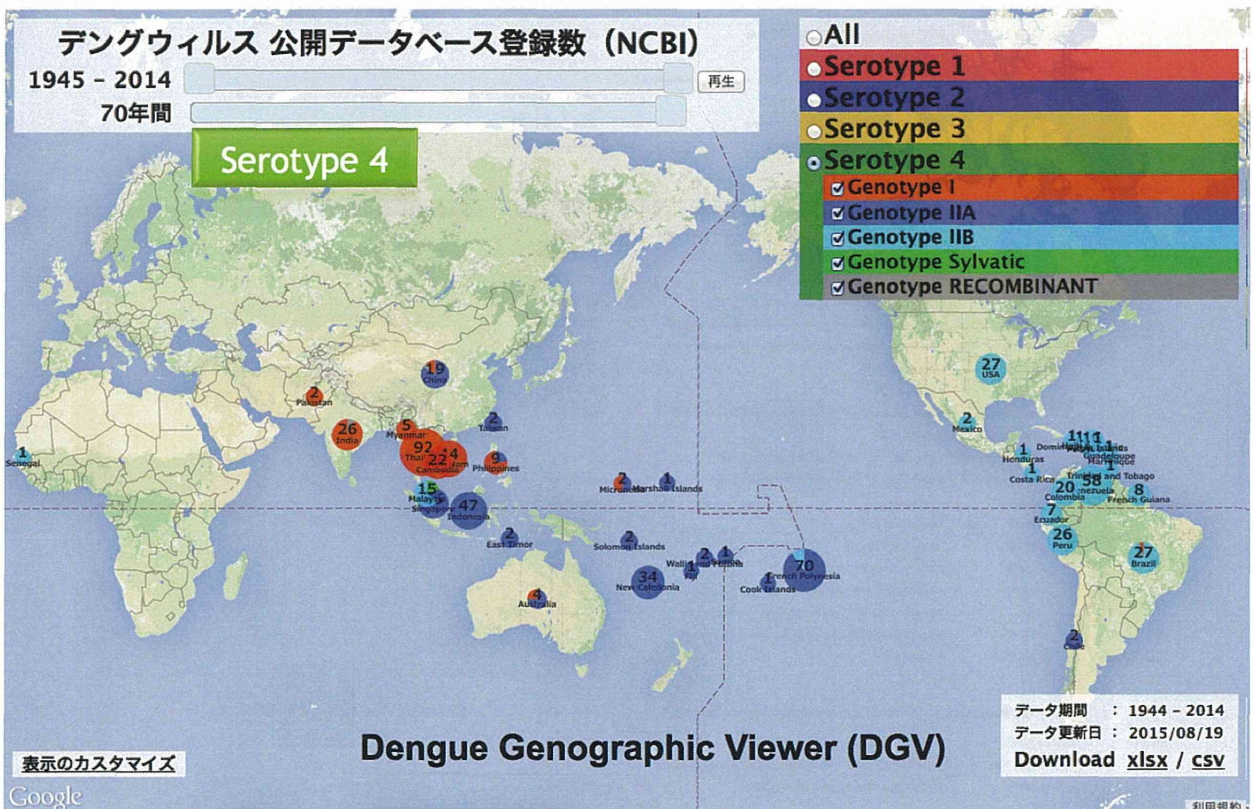
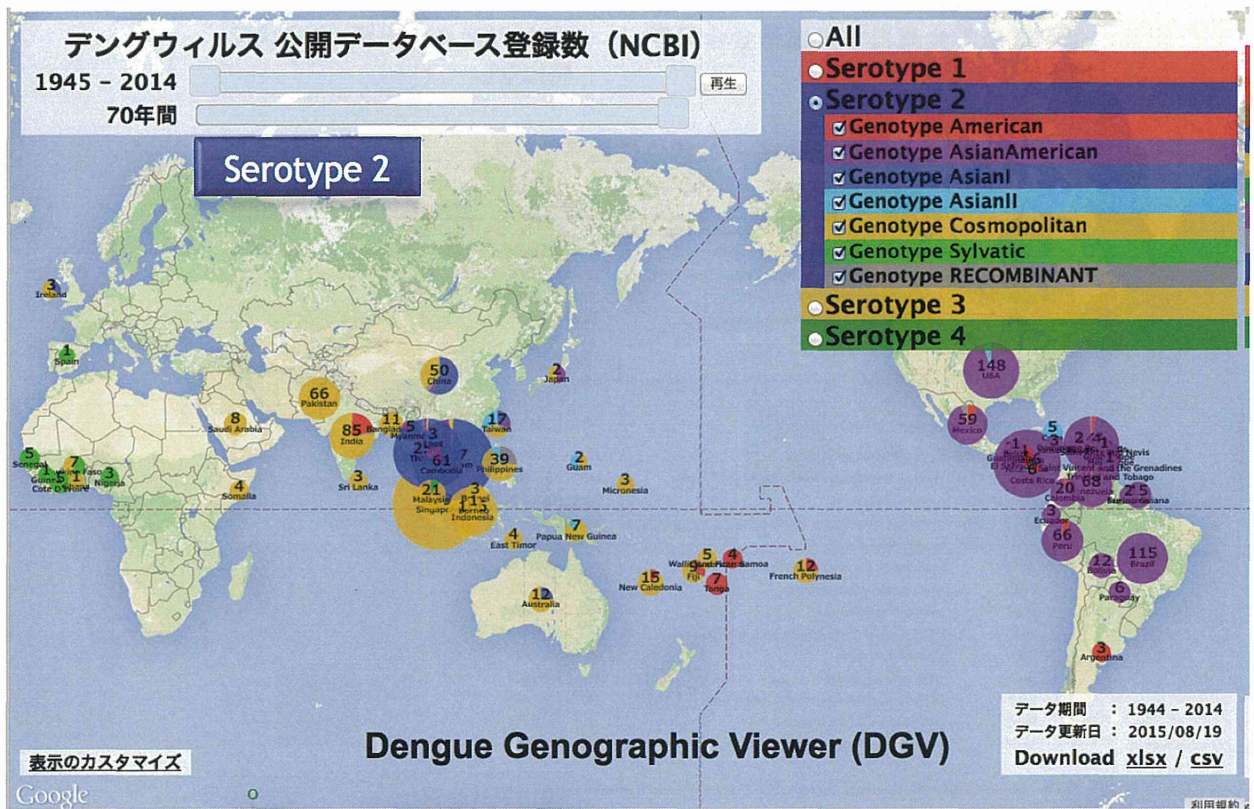


図1 デングウイルス配列(1945 - 2014年)の分離国・地域と血清型および遺伝型データベース (図では血清型2, 4の遺伝型分布のみ表示)

分担研究報告書

病原体の病理学的検出法の確立

所属 国立感染症研究所・感染病理部
研究分担者 中島典子

研究要旨

組織切片上で病原体を検出する方法には病原体の蛋白抗原を検出する免疫組織化学と遺伝子核酸を検出する *in situ* hybridization (ISH)法がある。免疫組織化学は安定した検出系となるが、あらたに特異的な抗体を作製しなければならぬ場合は時間を要し緊急対応は難しい。外来病原体遺伝子を次世代シーケンス法等により同定できるようになった近年、塩基配列情報に基づいて ISH 法用のオリゴヌクレオチドプローブを作成するのは容易である。我々は現在3種類のオリゴヌクレオチドプローブを用いた *in situ* ゲノム検出法を使用している。第一選択として我々が開発した高感度で特異性の高い *in situ* hybridization-AT tailing (ISH-AT)法を用い、検出不可能の場合は、市販されている Z 型オリゴヌクレオチドプローブを用いた分岐プローブ-ISH 法である ViewRNA 法ないしは RNAscope 法を試行している。二重蛍光染色について ISH-AT 法, View RNA 法, RNAscope 法を比較検討した。

A. 研究目的

近年、病原体のゲノムをマルチプレックスリアルタイム PCR 法で検出する方法が開発されているが、複数の病原体ゲノムが同時に検出されることも多く、疾病の病態にかかわる主たる病原体を決定することが難しい。病巣の炎症に関与した主たる病原体を同定しその検出部位を明らかにするためには、生検ないしは剖検で採取した組織を病理学的に解析する必要がある。免疫組織化学や *in situ* 核酸検出法は組織切片上で病原体の検出ができる方法であり、病原体の体内分布や病変との関連を考えるうえで重要な病理学的解析法である。

バイオテロに使用される可能性のある病原体ゲノム等を検出する *in situ* 核酸検出法には、我々の開発した ISH-AT 法や市販の Z 型オリゴヌクレオチドプローブと分岐プローブを用いた ISH 法がある。これらは高感度で特異性の高い方法であり、緊急時の迅速病理学的病原体検出法の有力なツールとなる。なお、分岐プローブ ISH 法は現在 QuantiGene View RNA (Affymetrix 社, ベリタス社)と RNAscope(ACD 社, コスモバイオ)の 2 社から販売されている。後者では、HRP-DAB の発色が可能であり、より解像度の発色ができる。今回、特に二重蛍光染色法について ISH-AT 法と ViewRNA 法, RNAscope 法を比較検討した。

B. 研究方法

1)材料

a) 病理組織標本

ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織を使用。ヒト剖検組織：パンデミックインフルエンザ A/H1N1pdm09 剖検肺組織。

b) プローブ

・ISH-AT 法用のプローブの作成：A/H1N1pdm 09 (AB538390.1)：NP 領域に 2 カ所。

・分岐 DNA-ISH 法のプローブの注文：A(H1N1)pdm 09 (AB538390.1)NP 部分に 20 カ所の混合プローブ。

c) 抗体

一次抗体は上皮細胞のマーカーである Epithelial cell Membrane Antigen (EMA) 抗原に対する抗体あるいはインフルエンザ NP 抗原を検出するポリクローナル抗体を用いた。二次抗体は Alexa488 抗ラビット IgG 抗体を用いた。

2) 方法

・ISH-AT 法

前処理法：抗原賦活液 (DAKO 社) 中で 95°C, 40 分膜透過処理を行い, Proteinase K (PK) (DAKO 社) 濃度を 0.1 μg/ml で 37°C 15 分で処理。

・発色法：取り込ませた Biotin 分子を Alexa568-ストレプトアビジンと反応させた。

・分岐プローブ ISH 法

分岐 DNA-ISH 法は基本的に添付説明書に従ったが、ホルマリン再固定のステップは省略した。発色法として、アルカリフォスファターゼ Fast rsd の系と

Fluorescent(555)の系を使用した.

・蛍光二重染色法

ISH-AT 法ないしは分岐プローブ ISH 法でインフルエンザウイルスゲノムを蛍光 (Alexa568 あるいは Fast red/HNPP あるいは 555) で検出可能とした後, EMA 抗体あるいはインフルエンザウイルス NP 抗原に対する抗体を反応させこれを異なる蛍光色素 (Alexa488) で検出できるようにした.

【倫理面への配慮】

検付材料は剖検組織であり, 剖検時に使用の承諾が得られている.

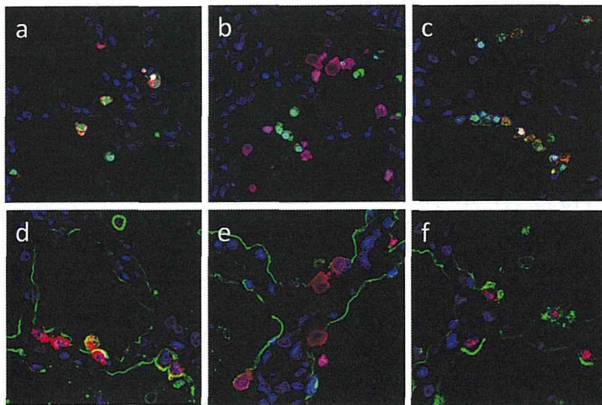
C. 研究結果

組織上での co-localization(共在)を示すには蛍光二重染色を行った後, 共焦点レーザー顕微鏡で解析することが必要である. 感染細胞を同定するために, *in situ* ハイブリダイゼーション法でウイルスゲノムを検出した後, 細胞マーカー蛋白あるいはウイルス抗原に対する抗体を用いた蛍光免疫組織化学で蛍光二重染色を行い, 感染細胞を同定する系を確立した.

インフルエンザウイルス感染肺組織を用いた結果を示す(図1).

図1. 二重蛍光染色

インフルエンザウイルスゲノム (ISH-AT 法, ViewRNA 法, RNA scope 法)とウイルス抗原, 上皮細胞抗原の免疫組織化学



a: ISH-AT (Alexa568) x IHC (Flu) (Alexa488)

b: ViewRNA (Fast Red/HNPP) x IHC(Flu) (Alexa488)

c: RNA scope (555) x IHC (Flu)(Alexa488)

d: ISH-AT (Alexa568) x IHC (EMA)(Alexa488)

e: ViewRNA (Fast Red/HNPP) x IHC (EMA)(Alexa488)

f: RNA scope (555) x IHC (EMA)(Alexa488)

ISH-AT 法と RNA Scope 法は蛍光二重染色が可能であった. View RNA 法においては Fast red/HNPP が免疫組織化学の抗体との結合を阻止している可能性があった.




D. 考察

View RNA 法ではホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE)組織で使用可能な蛍光染色用キットがなく, 細胞標本用のキットを用いたが, 検出に至らなかったため Fast red/HNPP の蛍光色と merge することを期待して二重染色を行った. 一方 RNA scope 法では FFPE 組織でも可能な蛍光染色キットがあるためこれを使用した. 図に示したように Fast Red/HNPP deposit はその後の抗体の結合を阻害するため 2 つの蛍光色が merge せず共局在する分子に対して二重染色には適さないことが分かった.

E. 結論

バイオテロ対策の面からは, 大量の検体を処理しなくてはいけない場合も考えられ, 5 日でプローブ作製可能であることに加え, コストパフォーマンスの面で ISH-AT 法が優れている(図 2). 非常に少ないコピー数のゲノムを検出する際に限って, プローブ数の多い, 分岐 DNA-ISH 法である RNA scope 法の DAB 染色を試行する予定である. ベリタス社 (QuantiGene View RNA) よりもコスモバイオ (RNAscope ACD 社) が販売している. RNAscope 法のほうが感度がよく, FFPE 標本で蛍光二重染色が可能であることがわかった. また RNAscope 法では DAB 発色も可能であり, 染色標本の永久保存ができる点で使いやすい.

図 2. オリゴプローブを用いた ISH 法の比較

	<i>in situ</i> hybridization AT-tailing	View RNA	RNAscope
合成プローブ納期	5-7日(自分で設計)	2~3週間	3~4週間
プローブの塩基長	40塩基	40塩基(公開)	40塩基(非公開)
プローブのデザイン			
混合プローブの数	2個	20個	20個
必要な塩基配列の長さ	40塩基 (GC%~60%)	100-1000塩基	100-1000塩基
プローブの価格	55000円(∞)	62000円(44回分)	200000円(20回分) 113000円(20回分)
検出	✓ALP-FAST RED(赤) ✓HRP-DAB(茶) ✓蛍光	✓ALP-FAST RED(赤)	✓ALP-FAST RED(赤) ✓HRP-DAB(茶) ✓蛍光
その他	試薬1500円/1反応	試薬5000円/1反応	試薬10000円/1反応

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakai K, Sekizuka T, Ami Y, Nakajima N, Kitazawa M, Sato Y, Nakajima K, Anraku M, Kubota T, Komase K, Takehara K, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Kuroda M, Takeda M. A mutant H3N2 influenza virus uses an alternative activation mechanism in TMPRSS2 knockout mice by loss of an oligosaccharide in the hemagglutinin stalk region. *J Virol.* ;89(9):5154-8, 2015.

- 2) 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* 35(2):107-21, 2015
- 3) 中島典子: 季節性および鳥インフルエンザウイルス感染症の病理 病理と臨床 2015,33 : 1146-1153.

2. 学会発表

- 1) Noriko Nakajima, Yuko Sato, Osamu Kotani, Tadaki Suzuki, Toshiaki Kamei, Toru Takahashi, Tetsutaro Sata, Hideki Hasegawa Modified *In situ* Hybridization AT-tailing to Visualize the Gene Expression in Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissues. 2015 USCAP Annual Meeting (アメリカ)2015
- 2) Kentaro Hayashi, Noriko Nakajima, Yuko Sato, Harutaka Katano, Noriyo Nagata, Tadaki Suzuki, Minoru Tobiume, Hiroshi Yoshida, Yoshio Suzuki, Toshio Kumasaka, Tetsutaro Sata, Kota Ariyoshi, Hideki Hasegawa Correlations among Histopathological Characteristics, Viral distribution, and Cytokine/Chemokine Expression level within an Individual with A/H1N1pdm09 induced ARDS. 2015USCAP Annual Meeting (アメリカ)2015
- 3) Noriko Nakajima, Hoang Ngoc Thach, Ta Anh Tuan, Dao Huu Nam, Toshio Kumasaka, Yuko Sato, Shoji Kawachi, Hideki Hasegawa, Tran Minh Dien, Le Thanh Hai Pathological and molecular biological study of measles-associated pneumonia during measles outbreak in Vietnam in 2014. *Pediatric Scientific Conference* 2015 (ベトナム)2015
- 4) Noriko Nakajima, Hoang Ngoc Thach, Ta Anh Tuan, Dao Huu Nam, Toshio Kumasaka, Yuko Sato, Shoji Kawachi, Hideki Hasegawa, Tran Minh Dien, Le Thanh Hai Post-mortem detection of adenovirus type 7 pneumonia in lungs of measles-associated pneumonia fatalities in a pediatric hospital, Hanoi, Vietnam. U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program, (アメリカ)2016
- 5) 中島典子, 佐藤由子, 熊坂利夫, 藤本嗣人, 花岡希, 片野晴隆, 鈴木忠樹, 長谷川秀樹 麻疹に併発した肺炎で死亡した19例の肺組織の分子病理学的解析. 第104回日本病理学会総会, 名古屋(2015.5)
- 6) 岩附研子, 中島典子, 柴田昌利, 高橋健太, 佐藤

由子, 木曾真紀, 山吉誠也, 伊藤睦美, 塩谷聡子, 大竹正剛, 寒川彰久, 伊東祐孝, 長谷川秀樹, 河岡義裕 マイクロミニピッグのインフルエンザ感染モデル動物としての有用性. 第158回日本獣医学学会学術集会 青森 (2015.9)

- 7) Noriko Nakajima, Thach Hoang Ngoc, Yuko Sato, Nozomu Hanaoka, Tsuguto Fujimoto, Tadaki Suzuki, Harutaka Katano, Hai Le Thanh, Hideki Hasegawa. Humann Adenovirus Serotype 7-associated pneumonia in fatal cases of measles 第63回日本ウイルス学会学術集会, 福岡 (2015, 11)
- 8) Makoto Takeda, Kouji Sakai, Yasushi Ami, Minoru Kitazawa, Kastuhiro Nakajima, Sangsriratanakul Natthanan, Masaki Anraku, Noriko Nakajima, Katsuhiko Komase, Kazuaki Takehara, Hideki Hasegawa, Masato Tashiro A natural host model revealed the essential role of the host protease TMPRSS2 for respiratory paramyxovirus pathogenicity. 第63回日本ウイルス学会学術集会, 福岡 (2015, 11)
- 9) Kouji Sakai, Tsuyoshi Sekizawa, Yasushi Ami, Minoru Kitazawa, Kastuhiro Nakajima, Noriko Nakajima, Masaki Anraku, Katsuhiko Komase, Kazuaki Takehara, Hideki Hasegawa, Masato Tashiro, Makoto Kuroda, Makoto Takeda The stalk oligosaccharide of influenza A virus hemagglutinin protein modulates protease specificity for virus activation and pathogenicity. 第63回日本ウイルス学会学術集会, 福岡 (2015, 11)

G. 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

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

所属 国立感染症研究所感染病理部
研究分担者 永田典代

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。昨年度に引き続き、サル痘ウイルスのマウス感染実験系の基礎検討を行った。BALB/c マウスに 2 種類のサル痘ウイルスを皮下接種したところ、感染成立を示唆する所見が得られた。そこでこの感染系を利用し、抗 Ly6G 抗体投与による好中球枯渇マウスに対する感染実験を行った。その結果、好中球枯渇のための抗体投与方法の改良が必要であることがわかった。引き続き検討を進めている。

研究協力者

鈴木忠樹, 岩田奈織子, 佐藤由子, 片岡紀代, 原嶋綾子, 長谷川秀樹(国立感染症研究所感染病理部)
福士秀悦, 高崎智彦, 吉川智城, 西條政幸(国立感染症研究所ウイルス第一部)
小谷治(国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター)

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、特に骨髓低形成による好中球低下症が関連していると推察された。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、サル痘ウイルスのマウス感染実験系の基礎検討を行ったところ、マウスは無症状で耐過したが感染を示唆する所見が得られた。そこで、今年度は、この感染系を利用し、抗 Ly6G 抗体投与による好中球枯渇の感染後の影響について検索を行った。

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)を準備し、国立感染症研究所のバイオリスク管理委員会規定に従い、ABSL3 施設にて感染実験を行った。ウイルスは、Monkeypox virus の Zr-599 株を用いた。好中球枯渇のため、抗マウス Ly6G 抗体(1A8, BioXcell 社)を、また、アイソタイプコントロールとして rat IgG2a (BioXcell 社)を用いた。これらの抗体をマウスの腹腔内に投与し、半日後にウイルス液(一匹あたり 10^6 PFU ウイルス量/100 μ l)を頸背部に皮下接種した。対照群には細胞培養液を接種した(各群 10 匹, 合計 4 群)。その後、4 日に 1 回の間隔で合計 3 回の抗体投与を行った。ウイルス接種 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。残りの個体(一群 6 匹)については、臨床症状と体重変化を 16 日間観察した。観察期間終了後、いずれの個体も過麻酔殺し、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、採血当日に動物用血球計数装置 ベトスキヤン 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。

【倫理面への配慮】

(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。

C. 研究結果

体重変化、皮膚所見、臨床症状の点で、いずれの群も明らかな病変は認められなかった(図 1)。しかしながら、接種 7 日目の末梢血中の白血球数は、好中球枯渇-非ウイルス接種群に比べ、好中球枯渇-ウイルス接種群では顆粒球数は高値であった(図 2)。さらに、接種 16 日目には好中球枯渇-ウイルス接種群

でリンパ球と顆粒球の増加により白血球数は有意に高値を示した。

また、接種7日目の病理学的解析の結果、好中球枯渇-ウイルス接種群で副腎の皮質壊死がみられ、病変部に一致してウイルス抗原が陽性であった(データは示さない)。4匹中4匹の肺にわずかな炎症性細胞浸潤を認めたが、ウイルス抗原は陰性であった。

D. 考察

サルに対して強い病原性を発揮する、2つのサル痘ウイルス臨床分離株は、BALB/c に対して感染性を有するが、明らかな病原性を発揮しなかった(昨年度報告書)。今回は、2つのサル痘ウイルス臨床分離株のうち、マウスに白血球減少を引き起こした Zr-599 株を使用した。接種7日目の好中球枯渇-非ウイルス接種群において顆粒球は低値であったことから、非感染マウスにおいて抗体投与による好中球枯渇の効果はあったと考えられる。しかしながら、同日の好中球枯渇-ウイルス接種群の顆粒球数は、ウイルス感染群と同程度であったため、ウイルス感染により、抗 Ly6G 抗体の枯渇効果は減弱したように見えるので、抗体投与に関して改良が必要と考えられた。一方で、好中球枯渇-ウイルス接種群で副腎の皮質壊死がみられたことから、好中球枯渇群では皮下接種後にウイルス血症が成立したことが示唆された。接種16日目の好中球枯渇-ウイルス接種群で白血球数は有意に高値であり、それは主にリンパ球数と顆粒球数の

増加によるものであった。以上のことから本動物感染モデルにおいて、感染初期の好中球枯渇が病態になんらかの影響を与えた事が示された。好中球枯渇のための抗体投与方法の改良を行い、引き続き検討を進める。

E. 結論

BALB/c マウスのサル痘ウイルス皮下感染モデルを利用し、感染初期の好中球枯渇がウイルス動態と免疫応答に影響を与える事を示した。感染モデルの改良を行い、引き続き検討を進める。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Nagata N, Iwata-Yoshikawa N, Hayasaka D, Sato Y, Kojima A, Kariwa H, Takashima I, Takasaki T, Kurane I, Sata T, Hasegawa H. The pathogenesis of 3 neurotropic flaviviruses in a mouse model depends on the route of neuroinvasion after viremia. *J Neuropathol Exp Neurol.* 74(3):250-260,2015.

2. 学会発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

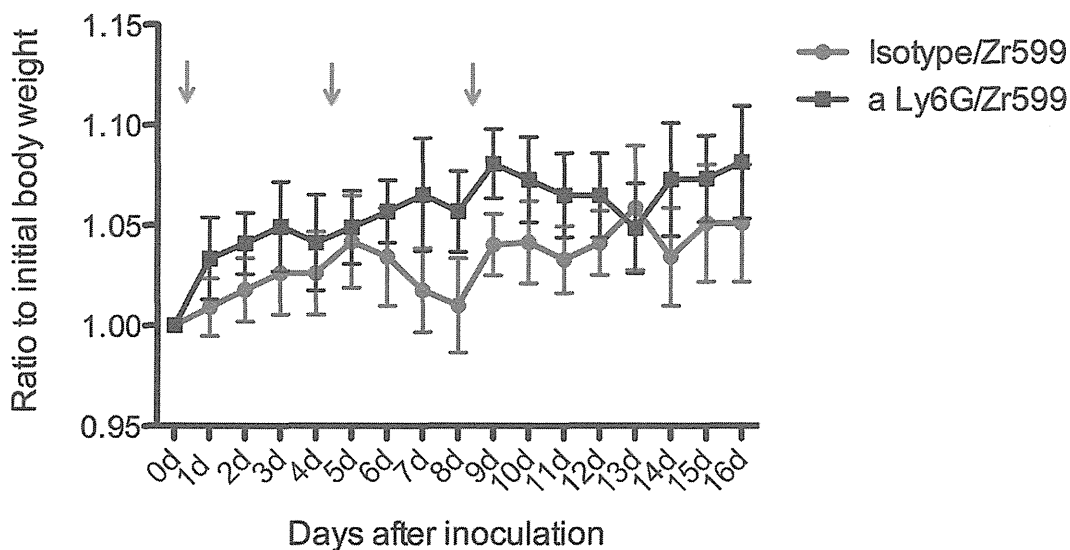


図1 サル痘ウイルス皮下接種後の好中球枯渇群(a Ly6G/Zr599)および対照群(Isotype/Zr599)マウスの体重変化。各群 n=6。各群間で有意差はみられない。

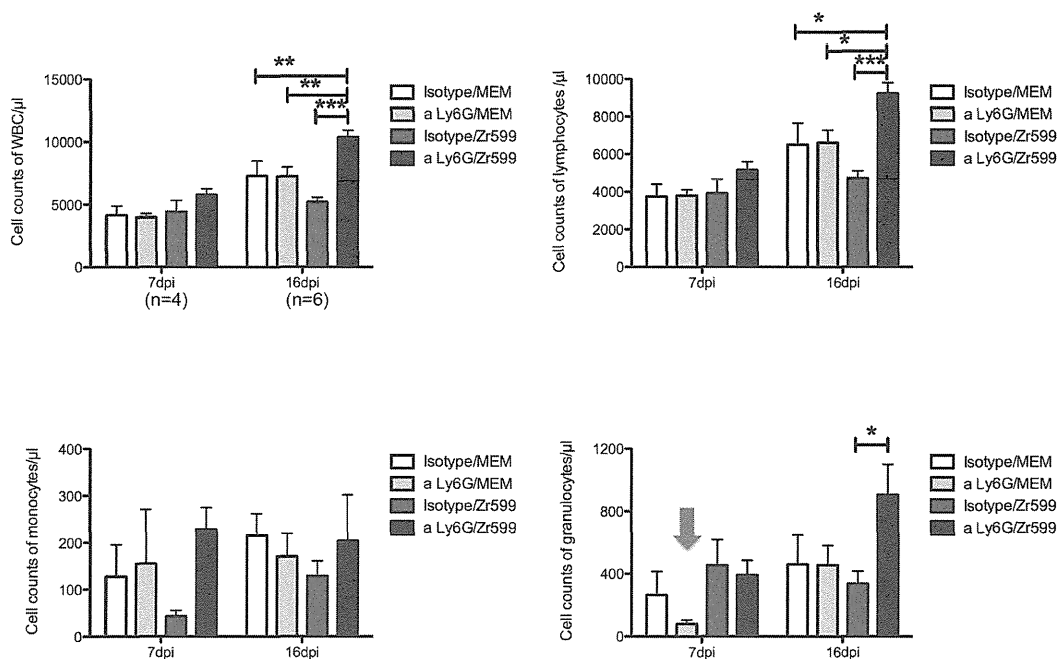


図2 サル痘ウイルス皮下接種後7および16日目の血球数の比較。各群 n=4 または 6。接種7日目の好中球枯渇-非ウイルス接種群(a Ly6G/MEM)において顆粒球は低値であり、抗体の効果はみられているものの、同日の好中球枯渇-ウイルス接種群(a Ly6G/Zr599)では、ウイルス感染群(Isotype/Zr599)群と同等であった。さらに、接種16日目には好中球枯渇-ウイルス接種群(a Ly6G/Zr599)で白血球数は有意に高値であり、それは主にリンパ球数と顆粒球数の増加によるものであった。

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

所属 国立感染症研究所感染病理部
研究分担者 永田典代

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、検出感度と精度を向上するための改良法の一つとして、電子顕微鏡検索のためのサンプルの濃縮方法について Global Health Security Action Group Laboratory-Network の活動の一環である、GHSAG Wet-Lab Workshop on Diagnostic Electron Microscopy of Pathogens, Winnipeg 2015 (平成 27 年 9 月 24, 25 日 National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canada 主催)に参加し実習した内容について報告する。

研究協力者

岩田奈織子, 片岡紀代, 長谷川秀樹(国立感染症研究所 感染病理部)
西條政幸(国立感染症研究所ウイルス第一部)
森川茂(国立感染症研究所 獣医科学部)
小谷治(国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター)

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. BSL2, 3 および 4 の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。今年度は、検出感度と精度を向上するための改良法の一つとして、電子顕微鏡検索のためのサンプルの濃縮方法について Global Health Security Action Group Laboratory-Network の活動の一環である、GHSAG Wet-Lab Workshop on Diagnostic Electron Microscopy of Pathogens, Winnipeg 2015 (平成 27 年 9 月 24, 25 日 National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canada 主催)に参加し実習した内容について報告する。なお、本ワークショップは、バイオテロリストによるバイオ攻撃や感染症の病原体の電子顕微鏡的迅速診断法に携わる専門家の技術訓練、技術の向上、危機的状況における安全かつ迅速で電子顕微鏡学的診断評価の正確性の訓練と向上を目的として

いる。

B. 研究方法

電子顕微鏡による検査において、目的の粒子が少ない場合のサンプルの濃縮法(Beniac DR et al., 2014)を実習した。

まず、ポリカーボネートフィルター(SPI-Pore Standard Polycarbonate Track Etch filter, SPI Supplies, PA, USA)を準備し、フィルターユニット(Millipore 13 mm Swinnex)に装着する。10 μ l~50 ml までの液量のサンプルを 5 mL のシリンジに充填し、準備したフィルターユニットに連結する。ただし、サンプルの液量が少ない場合は 2 mL 以上のリン酸緩衝液あるいは生理食塩水に懸濁し、増量する。シリンジ内に充填したサンプルをシリンジポンプ(1,000 μ l/分)で濾過し、フィルターユニット内のポリカーボネートフィルターに粒子をトラップする。なお、シリンジポンプで濾過する際には、シリンジを垂直、フィルターは水平に設置する。

使用するフィルターの孔径は対象とする病原体の大きさによって、次のように選択する。

0.1 μ m(レプトスピラ, エボラウイルス)

0.08 μ m(ワクチニアウイルス)

0.03 μ m(ヘルペスウイルス, バクテリオファージ)

また、透過電子顕微鏡用サンプル作製の場合、フィルター上に親水化処理済みのカーボン支持膜 200 メッシュ銅グリッドをのせ、フィルターユニットに装着し、濾過する。走査電子顕微鏡用サンプルの場合は、濾過後に粒子がトラップされたポリカーボネートフィルターをおよそ 9 mm 角にカットし、観察に用いる。

【倫理面への配慮】

(倫理面への配慮)該当なし

C. 研究結果

実習のために準備されたサンプルには、グルタールアルデヒド固定済みのワクチニアウイルスあるいはレプトスピラが含まれていた。本法を利用する事によって、 5×10^3 粒子数/1 検体のものから病原体を検出する事ができた。作業に要する時間は 30 分程度であった。ただし、ワクチニアウイルスを含むサンプルには、同程度の大きさ(およそ 500 nm)の夾雑物が含まれていたため、走査電子顕微鏡観察によるウイルス粒子と夾雑物の判別は困難であり、熟練者による指導が必要であった。同じサンプルを用いて、ネガティブ染色法を用いた透過型電子顕微鏡検査では、ウイルス粒子の表面構造が明瞭に観察され、夾雑物との判別は用意であった。一方で、レプトスピラを含むサンプルでは、ネガティブ染色法を用いた透過型電子顕微鏡による検出は全く不可能で、濃縮法と走査電子顕微鏡観察の組み合わせによってはじめて検出する事が可能であった。

D. 考察

Beniac DR *et al.* 2014 によれば、今回のフィルターを利用した濃縮法を用いる事に寄って、 5×10^3 粒子数/1 検体 (10^2 粒子/ml) のものから病原体を検出する事が可能である。標準的な電子顕微鏡観察法では、一般にサンプル中の粒子数が 10^6 粒子/ml であれば検出が可能とされているが、濃縮法を用いることで、その検出感度を 1000 倍以上高める事ができた。その場合、走査型電子顕微鏡の方が広範囲の面積をスクリーニングできるという利点があり、また、レプトスピラのような大型のバクテリアの場合、本法と走査電子顕微鏡観察の組み合わせは非常に有用であると考えられた。一方で、ウイルス粒子の場合は、その表面構造や内部構造を詳細に観察できる透過型電子顕微鏡法を用いることで鑑別精度が増すことが改めて理解された。本濃縮法に必要な材料は、すべて日本でも入手可能で、

フィルターはアイソポア、ポリカーボネート製で代用できる。

本ワークショップは、世界健康安全保障イニシアティブ各国および組織が対象であり、今回は主催者の他、ドイツ、UK、メキシコ、日本の公衆衛生関係の機関とカナダ国内の別の機関(Canadian Food Inspection Agency)から、電子顕微鏡を用いた感染症診断に関わる専門家(各機関 1-2 名、合計 7 名、主催者側 5 名とそのスタッフ 5 名)が参加した。これまではドイツ Robert Koch 研究所が主催していたが、施設の移転のため第 5 回目の今回は、カナダでの初の開催となった。前回までは、透過型電子顕微鏡を用いたネガティブ染色による診断法を主に実習してきたが、今回は、走査電子顕微鏡を使用した粉末状のサンプル解析法も同時に実習しそれぞれの利点、欠点を理解することができた。なお、この研究所で使用している走査電子顕微鏡は高病原性病原体対応のため、グローブボックス内に改良された小型の電子顕微鏡を設置したもので、世界に唯一である(Beniach DR *et al.*, 2015)。

E. 結論

病原体の電子顕微鏡学的迅速検出法に必要な、目的粒子が少ない場合のサンプルの濃縮法を習得した。

F. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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

所 属 堺市衛生研究所
研究分担者 小林和夫

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, 課題を抽出し, 課題に対し方策や改善などを検討した。その結果, 多くの課題が抽出されたが, これら課題の改善には地衛研, 各支部内, 地衛研全国協議会, 感染研および厚生労働省の理解や連携が重要である。2015 年度に改善した事項として, 改正感染症法(特に, 病原体サーベイランスなど感染症に関する情報の収集体制が強化)の施行も関連し, 病原体検出マニュアルの整備, 標準作業手順書の作成, 地衛研全国協議会感染症対策部会員の増員などがあった。特定病原体等に規定されている細菌毒素(ボツリヌス毒素や志賀毒素)に関する独立した検出マニュアルは未整備であり, これらの整備は今後の課題である。現代社会において世界中でテロ行為が頻発している。日本は第 42 回先進国首脳会議(2016 年), 第 9 回ラグビーワールドカップ(2019 年), 夏季オリンピック・パラリンピック(2020 年)などの大きな行事を控え, バイオテロも含めテロ対策を準備・強化する必要がある。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, 平時から対応の準備・構築が強く望まれる。

研究協力者

山形県衛生研究所長(北海道・東北・新潟地区)
水田克巳
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)
八柳潤
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)
岸本剛
愛知県衛生研究所長(東海・北陸地区)
皆川洋子
堺市衛生研究所 検査担当総括研究員(近畿地区)
内野清子, 杉本光伸
山口県環境保健センター所長(中国・四国地区)
調恒明
岡山県環境保健センター所長(中国・四国地区)
岸本壽男
愛媛県立衛生環境研究所長(中国・四国地区)
四宮博人
愛媛県立衛生環境研究所 ウイルス科長(中国・四国地区)
山下育孝
福岡県保健環境研究所副所長(九州地区)
千々和勝己

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特定病原体等(http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-1090-0000-Kenkoukyoku/hyou150521_1.pdf)に規定されている原因物質(感染病原体や毒素など)を中心として, これらの特定に関する課題を抽出し, 課題解決の方策や改善を目的とした。

B. 研究方法

地衛研における感染症対策は地衛研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)から前年度に抽出した課題に関し, 改善状況を調査した。

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

本研究は意見聴取型調査研究であり、また、患者など研究対象者は含ませず、倫理面に問題ないと判断した。また、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, 2)

本研究の主題であるバイテロに関連する特定病原体等 (http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/hyou150521_1.pdf) の検出方法に関し、地方衛生研究所で検査に主として使用する感染研病原体検出マニュアルの前年度に抽出した1-3) 課題と改善状況を調査した。

1) 感染研の online 病原体検出マニュアル (<http://www.nih.go.jp/niid/ja/labo-manual.html>) でリンク不全

特定病原体が関与する3類感染症や5類感染症の全てが記載・リンクが整備され、改善した。1類(クリミア・コンゴ出血熱、痘瘡、南米出血熱、ラッサ熱)、2類(結核、中東呼吸器症候群、鳥インフルエンザH7N9)、多くの4類感染症に関し、記載・リンクが未整備であった(表1)。

2) 改訂年月日や照会先の記載

改訂年月日や照会先の記載も重症呼吸器感染症やコレラなどで改善が見られた。

3) 細菌毒素(ボツリヌス毒素や志賀毒素)

特定病原体等に記載されている毒素単独については依然未記載であった(表2)。

2. 新規検査マニュアルの整備の必要性(表3)

1) 痘瘡はバイオテロで発生が最も危惧され、米国疾病管理予防センター(CDC)のCategory Aに分類されている

(http://fas.org/biosecurity/resource/documents/CD C_Bioterrorism_Agents.pdf)。痘瘡発生の際、皮疹など症状が類似している水痘との鑑別が問題となるため、整備が必要である。水痘ウイルス(ワクチン株を含む)の病原体検出マニュアルは整備され、改善した。しかし、痘瘡は依然として未整備であった。

2) ボツリヌス毒素検出はボツリヌス症に記載されているが、志賀毒素遺伝子検出は腸管出血性大腸菌感染症に記載されているが、毒素蛋白は未収載である。細菌毒素に関する独立した検出マニュアルは未整備であった。

3) 地衛研で実施する可能性の高い4類感染症(日本紅斑熱やウエストナイル熱など)は未整備であった。

3. 地方衛生研究所全国協議会6支部の支部内連携構築、支部内連携から広域・全国ネットワークの構築(表4)

1) 2015年度から地方衛生研究所全国協議会の感

染症対策部会員を1名増員し、6支部全てから部会員を選出した。

2) 地方衛生研究所全国協議会理事会や総会及び地研ネットワーク等で支部間の連携・情報共有を図った。

3) 感染研の病原体検出マニュアルの充実・改訂を要望した。

4) いくつかの支部において厚生労働科学研究や地域ブロック研修会などを通じ、技術共有を図った。

4. 地衛研と感染研の連携強化(表5)

1) 特定病原体に限らず、地衛研と感染研の共同研究や連携は不断に行われた。

2) 精度管理の視点から、国内標準である感染研と地衛研の連携が強化された。

3) 個人として地衛研職員が感染研に転出した事例はあったが、組織の関与(人事の交流制度)はなかった。また、感染研から地衛研の転出はほとんどなく、現場と中枢の相互人事交流が望まれる(考察)。

4) 地衛研から感染研に依頼した行政検査で迅速化が図られた。

5) 感染研と地衛研の連携による標準作業手順書(SOP)(案)作成過程で感染研の支援や幹部等による連携が強化された。

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、広域性であり、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、改善状況についてアンケート調査を実施した(表1 - 5)。

前年度に抽出された多くの課題に関し、地方衛生研究所、地方衛生研究所全国協議会および国立感染症研究所が真摯に取り組み、改善が認められた。

未克服の主要な課題として、

1) 改正感染症法の施行に備え、特定病原体のみならず、病原体検出マニュアルの更なる整備

2) 特定病原体等に規定されていないが、米国CDCは植物毒(リシン)や細菌毒素(*Clostridium perfringens* 由来イプシロン毒素)に関し、バイオテロの候補物質(Category B)として掲げている。所管や検出マニュアルの整備

3) 地方衛生研究所と国立感染症研究所の相互人事交流

などが揚げられる。

課題の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。

現代社会において世界中でテロ行為が頻発している。我が国は第42回先進国首脳会議（2016年），第9回ラグビーワールドカップ（2019年），夏季オリンピック・パラリンピック（2020年）などの大きな行事を控え，バイオテロも含めテロ対策を準備・強化する必要がある。テロは突発的で緊急を要する健康危機であり，平時から対応を準備・構築することが求められる。

E. 結論

- バイオテロ対応において地衛研の課題を抽出し，改善状況を検証した。
- 地衛研と感染研の連携は向上し，バイオテロのみならず，より良い感染症対策に資することが期待できる。
- 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) Adachi, Y., T. Onodera, Y. Yamada, R. Daio, M. Tsuji, T. Inoue, K. Kobayashi, T. Kurosaki, M. Ato, and Y. Takahashi. 2015. Distinct germinal center selection at local sites shapes memory B cell response to viral escape. *J. Exp. Med.* 212: 1709–1723. doi:10.1084/jem.20142284
- 2) Kitada, S., K. Yoshimura, K. Miki, M. Miki, H. Hashimoto, H. Matsui, M. Kuroyama, F. Agheshio, H. Kagawa, M. Mori, R. Maekura, and K. Kobayashi. 2015. Validation of a commercial serodiagnostic kit for diagnosing pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 19: 97–103. doi: 10.5588/ijtld.14.0564
- 3) 小林和夫. 2015. マイコバクテリウム属(抗酸菌). 標準微生物学 第12版(中込 治, 神谷 茂 編) 東京: 医学書院. 276–288. ISBN: 978-4-260-02046-6

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. 感染研の病原体検出マニュアルで記載やリンクがない特定病原体による感染症*

一類感染症	BSL	特定病原体	4 類感染症	BSL	特定病原体
クリミア・コンゴ出血熱	4		ウエストナイル熱		
痘瘡	4		黄熱		
南米出血熱	4		オムスク出血熱		
ラッサ熱	4		オウム病		
			キャサヌル森林熱		
2 類感染症			Q 熱		
結核	3		サル痘		
MERS	3		重症熱性血小板減少症候群		
鳥インフルエンザ (H7N9)	3		腎症候性出血熱		
3 類感染症(全て記載及びリンク済み)			西部ウマ脳炎		
			ダニ媒介性脳炎		
			日本紅斑熱		
			ベネズエラウマ脳炎		
			発疹チフス		
			リフトバレー熱		
			ロッキー山紅斑熱		
			5 類感染症(全て記載及びリンク済み)		

*2016 年 01 月 21 日現在 (<http://www.nih.go.jp/niid/ja/labo-manual.html>)

表2. 現行の国立感染症研究所病原体検出マニュアルの課題および改善した事項

課 題	改善した事項
● バイオテロ対象病原体について、検出マニュアルの整備	● 1 類(クリミア・コンゴ出血熱, 痘瘡, 南米出血熱, ラッサ熱), 2 類(結核, 中東呼吸器症候群, 鳥インフルエンザ H7N9), 多くの 4 類感染症に関し, 記載・リンクが未整備であった。 しかし, 特定病原体が関与する 3 類感染症や 5 類感染症の全てが記載・リンクが整備され, 顕著に改善した。
● 有無・最終改訂年月日のリスト	● 改訂年月日や照会先の記載も重症呼吸器感染症やコレラなどで改善が見られた。
● 細菌毒素(ボツリヌス毒素や志賀毒素)	● ボツリヌス毒素検出はボツリヌス症に記載されているが, 志賀毒素の遺伝子検出は腸管出血性大腸菌感染症に記載されているが, 蛋白毒素は未収載である。

表3. 新規検査マニュアルの整備の必要性

問 題 点	改善した事項
<ul style="list-style-type: none"> ● 水痘ウイルス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 ● 感染症法改正の施行に伴い、病原体サーベイランスなど感染症に関する情報の収集体制が強化される(2016年4月以降)ため、特定病原体のみならず、感染症法に規定された疾患に関し、検査マニュアル ● 細菌毒素の検査マニュアル ● 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査マニュアル 	<ul style="list-style-type: none"> ● 水痘ウイルスの病原体検出マニュアルは整備され、改善したが、痘瘡は未整備である。 ● 3類感染症や5類感染症の全てが記載・リンクが整備され、また、標準作業手順書(SOP)のひな形が提示された。 ● 表2に記載した通り。 ● 未収載・未改善

表4. 地方衛生研究所全国協議会 6支部の支部内連携構築、支部内連携から広域・全国ネットワークの構築

課 題	改善した事項
<ul style="list-style-type: none"> ● 的確な技術伝承と人材育成が不十分 ● 地方衛生研究所全国協議会の感染症対策部会の強化 ● 異なる支部間の連携構築 ● 感染研の病原体検出マニュアルの充実・改訂を要望 	<ul style="list-style-type: none"> ● いくつかの支部で厚生労働科学研究や地域ブロック研修会などを通じ、技術共有を図った。 ● 地衛研全国協議会の感染症対策部会会員を1名増員し、6支部全てから部会員を選出した。 ● 地衛研全国協議会理事会や総会及び地衛研ネットワーク等で支部間の連携・情報共有推進した。 ● 感染研は真摯に対応し、顕著に改善した。

表5. 地衛研と国立感染症研究所の連携強化

課 題	改善した事項
<ul style="list-style-type: none"> ● 地衛研と感染研の精度管理や共同研究の推進 ● 相互の人事交流の活発化 ● 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)を要することがあり、迅速化 	<ul style="list-style-type: none"> ● 検査の精度管理や標準作業手順書(SOP)(案)作成など、持続・有機的連携を構築できた。 ● 個人として地衛研職員が感染研に転出した事例はあったが、組織の関与(人事の交流制度)はなかった ● 検査項目・担当官に依るが、地衛研から感染研に依頼した行政検査で迅速化が図られた

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

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

所属 国立大学法人帯広畜産大学動物・食品検査診断センター

研究分担者 倉園久生

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。

協力研究者

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

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 of 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