

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ない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 ヶ所。

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

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℃, 40 分膜透過処理を行い, Proteinase K (PK) (DAKO 社) 濃度を 0.1 μg/ml で 37℃ 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 red 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】

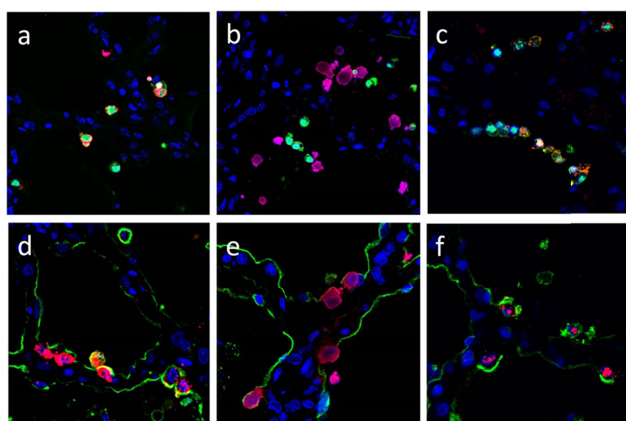
検討材料は剖検組織であり, 剖検時に使用の承諾が得られている。

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 せず共同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) ✓HRP-DAB(茶)	✓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, Minori Kitazawa, Kastuhiro Nakajima, Sangsriratanakul Natthanant, 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, Minori 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  $\mu$ 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。

【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みえるので、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

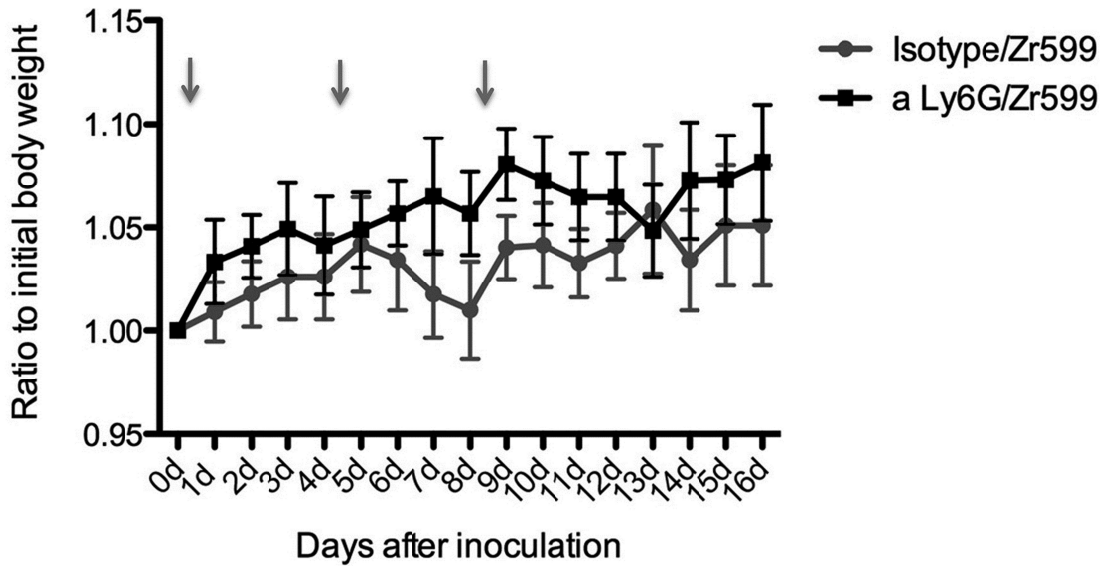


図 1 サル痘ウイルス皮下接種後の好中球枯渇群(a Ly6G/Zr599)および対照群(Isotype/Zr599)マウスの体重変化. 各群 n=6. 各群間で有意差はみられない.

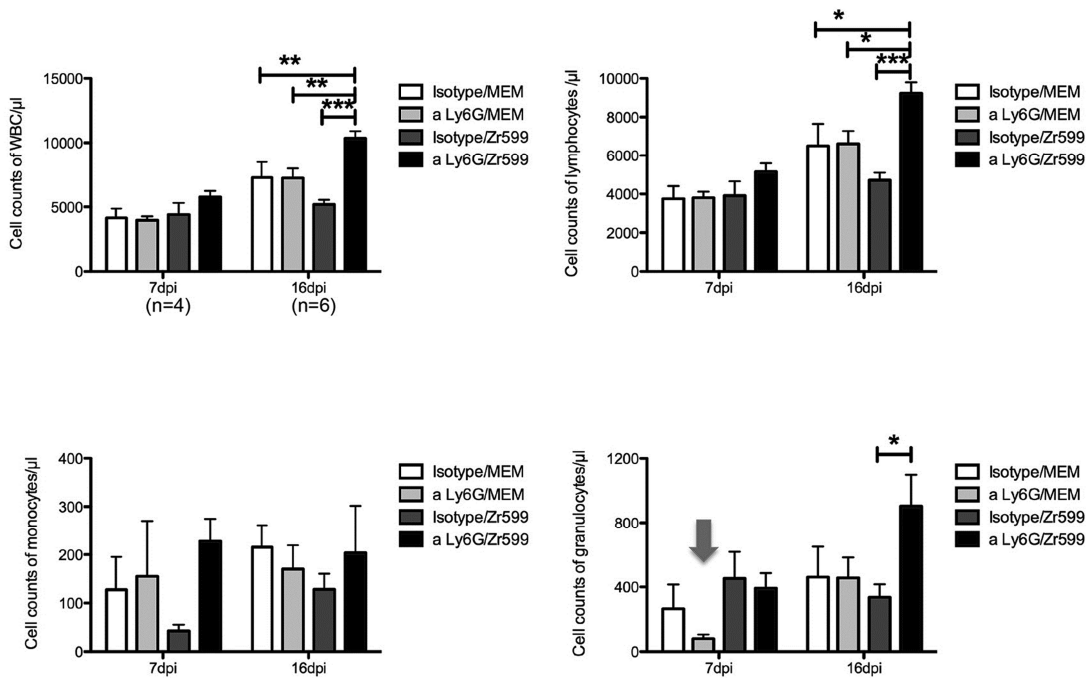


図 2 サル痘ウイルス皮下接種後 7 および 16 日目の血球数の比較. 各群 n=4 または 6. 接種 7 日目の好中球枯渇-非ウイルス接種群(a Ly6G/MEM)において顆粒球は低値であり, 抗体の効果はみられているものの, 同日の好中球枯渇-ウイルス接種群(a Ly6G/Zr599)では, ウイルス感染群(Isotype/Zr599)群と同等であった. さらに, 接種 16 日目には好中球枯渇-ウイルス接種群(a Ly6G/Zr599)で白血球数は有意に高値であり, それは主にリンパ球数と顆粒球数の増加によるものであった.





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

研究分担者 永田典代

B. 研究方法 永田典代

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 µl~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 µl/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 µm (レプトスピラ, エボラウイルス)

0.08 µm (ワクチニアウイルス)

0.03 µm (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

て、 $5 \times 10^3$  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、 $5 \times 10^3$  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(Beniac 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