

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の確立，
及び細胞培養痘そうワクチンの有効性，安全性に関する研究

分担報告書

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シング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。これまでに私たちは、独自に開発した高感度で特異性の高い *in situ* hybridization-AT tailing (ISH-AT) 法を中心に市販の RNA ISH Kit も利用しながら様々な RNA ウイルス拡散の検出を行ってきた。今回私たちは RNA のみでなく DNA にも視野を広げ DNA ウイルス核酸の検出が可能な ISH-AT 法の確立を試みた。現在は、アデノウイルスの核酸検出系を立ち上げることに成功しグループ判別のみでなく血清型の特特定も可能な系の確立を目指して、臨床的に重要と思われる血清型をターゲットにしプローブの作製等を行っている。

研究協力者・

田中道子・国立感染症研究所感染病理部・協力研究員

A. 研究目的

これまでの研究目的である(1)組織中に病原体ゲノムを検出するための *in situ* 核酸検出法を確立し、バイオテロ発生時に備える。(2) バイオテロに使用される可能性のある病原体について、ゲノム検出用のプローブを作成し、検出プロトコルをあらかじめ確立しておく。に加え、本年度は (3)2 本鎖 DNA や染色体に組み込まれた DNA も検出できるような *in situ* 核酸検出法を確立する。ことを目的とした。

B. 研究方法

材料：ホルマリン固定パラフィン包埋剖検組織標本、感染細胞標本を使用した。(アデノウイルス感染細胞は国立感染症研究所・花岡博士、B 型肝炎ウイルス (HBV) 感染細胞は国立感染症研究所・渡士博士から分与) ウイルスゲノム情報をもとに検出用のオリゴプローブを作成し ISH-AT 法で検出を試みた。

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, 1, 5, 10, 100 µg/ml

にして至適濃度を決定した。ホルマリンピグメントの除去が必要な際は脱パラ後に 3%アンモニウム/70%エタノール 5 分で処理した。内因性アルカリフォスファターゼ除去が必要な際は脱パラ後に 5% HCl/エタノール 5 分 及び PK 処理後に 0.2N HCl/0.3M NaCl 常温 15 分で処理した。内因性ビオチン除去が必要な際はハイブリダイゼーション (ハイブリ) 後に Biotin blocking system (DAKO) を使用した。内因性ペルオキシダーゼ除去が必要な際は 0.3-3.0% 過酸化水素/メタノール を常温 30 分で処理した。また、DNA プローブは 95 度 10 分で熱処理後、組織に添加し、90 度 10 分ハイブリさせてから急冷し、その後 50 度で 0/N ハイブリを行った。

発色法：アルカリフォスファターゼ-Fast rsd の系と、HRP-DAB の系の両方を試行した。後者では検出感度を上げる際はチラミドで増幅する CSA 法を併用した。

【倫理面への配慮】

依頼検体等人の組織のホルマリン固定パラフィンブロックを使用する場合には個人情報の取り扱いに細心の注意を考慮した。

C. 研究結果

新たに DNA ウイルスをターゲットとし DNA-ISH-AT 法の確立を試みた。主にアデノウイルス (ADV) 及び B 型肝炎ウイルス (HBV) の検出の確立を試みた。ADV に関しては型特異的な検出を目指している。HBV に関しては、肝癌発生に深く関与していると考えられている cccDNA の検出を目標に、様々なプローブの作成、組織の処理法を検討中である。細胞標本及び臨床検体の解析を行っており、ADV に関しては双方でウイルスゲノムの検出に成功した(図 1)。

D. 考察

ADV は流行性角結膜炎、出血性膀胱炎、壊死性肺炎など様々な疾患の病因ウイルスとして知られているが、初感染後持続感染することから、近年移植後感染症の原因として注目されている。ADV の型判別が可能な ISH AT 法を確立することで、眼科や泌尿器領域の検体を用いて型判別を可能とし、臨床現場での診断・治療に貢献できる可能性がおおいにある。HBV に関しては、cccDNA の薬剤除去が不可能な現在、慢性肝炎の組織において cccDNA が検出可能になると臨床的にも肝癌発生の可能性の新たな指標とできる可能性が非常に大きく意義深いと考えられる。

E. 結論

ADV に関してはグループの型判別のみでなくグループ内の血清型判別も試みている。現在のところ特に日本において臨床的に重要とされている幾つかの血清型に対しての特異的プローブを作成し、組織検体での検出を試みている。さらに型特異的なリアルタイム PCR のプライマーセットも作製中であり依頼検体での ADV の血清型判別及びウイルスコピー数の測定にも応用していくつもりである。また、DNA-ISH は現在のところ市販のものがなく、この系を確立することができれば基礎研究にも臨床の場にも低コストで貢献することが可能になり様々な場面で活用できると考える。

F. 健康危険情報 特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Arafa AS, Yamada S, Imai M, Watanabe T, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Kiso M, Sakai-Tagawa Y, Ito M, Imamura T, Nakajima

N, Takahashi K, Zhao D, Oishi K, Yasuhara A, Macken CA, Zhong G, Hanson AP, Fan S, Ping J, Hatta M, Lopes TJ, Suzuki Y, El-Husseiny M, Selim A, Hagag N, Soliman M, Neumann G, Hasegawa H, Kawaoka Y. Risk assessment of recent Egyptian H5N1 influenza viruses. *Sci Rep.* 2016 Dec 6;6:38388

- 2) Iwatsuki-Horimoto K, Nakajima N, Shibata M, Takahashi K, Sato Y, Kiso M, Yamayoshi S, Ito M, Enya S, Otake M, Kangawa A, da Silva Lopes TJ, Ito H, Hasegawa H, Kawaoka Y. The Microminipig as an Animal Model for Influenza A Virus Infection. *J Virol.* 2017 Jan 3;91(2)
- 3) Park ES, Suzuki M, Kimura M, Mizutani H, Saito R, Kubota N, Hasuike Y, Okajima J, Kasai H, Sato Y, Nakajima N, Maruyama K, Imaoka K, Morikawa S Epidemiological and pathological study of feline morbillivirus infection in domestic cats in Japan. *BMC Vet Res.* 2016 Oct 11;12(1):228
- 4) Kotani O, Suzuki T, Yokoyama M, Iwata-Yoshikawa N, Nakajima N, Sato H, Hasegawa H, Taguchi F, Shimizu H, Nagata N. Intracerebral inoculation of mouse-passaged Saffold virus type 3 affects cerebellar development in neonatal mice. *J Virol.* 2016 Aug 31. pii: JVI.00864-16. [Epub ahead of print]
- 5) Sakai K, Ami Y, Nakajima N, Nakajima K, Kitazawa M, Anraku M, Takayama I, Sangsriratanakul N, Komura M, Sato Y, Asanuma H, Takashita E, Komase K, Takehara K, Tashiro M, Hasegawa H, Odagiri T, Takeda M. Tmprss2 Independency for Haemagglutinin Cleavage In Vivo Differentiates Influenza B Virus from Influenza A Virus. *Sci Rep.* 2016 Jul 8;6:29430.
- 6) Hayashi K, Yoshida H, Sato Y, Tobiume M, Suzuki Y, Ariyoshi K, Hasegawa H, Nakajima N. Histopathologic findings of lung with A/H1N1pdm09 infection-associated ARDS in the post-pandemic season. *Jpn J Infect Dis.* 2016 Jun 30.
- 7) Hai Ie T, Thach HN, Tuan TA, Nam DH, Dien TM, Sato Y, Kumasaka T, Suzuki T, Hanaoka

N, Fujimoto T, Katano H, Hasegawa H, Kawachi S, Nakajima N. Adenovirus Type 7 Pneumonia in Children Who Died from Measles-Associated Pneumonia, Hanoi, Vietnam, 2014. *Emerg Infect Dis.* 2016 Apr;22(4):687-90.

8) Kotani O, Naeem A, Suzuki T, Iwata-Yoshikawa N, Sato Y, Nakajima N, Hosomi T, Tsukagoshi H, Kozawa K, Hasegawa H, Taguchi F, Shimizu H, Nagata N. Neuropathogenicity of Two Saffold Virus Type 3 Isolates in Mouse Models. *PLoS One.* 2016 Feb 1;11(2):e0148184

2. 学会発表

1) Noriko Nakajima, Akihiko Hamamatsu, Kino Hayashi, Yuko Sato, Toshio Kumasaka, Minoru Tobiume, Hideki Hasegawa Severe lung injury associated with A/H1N1 pdm09

infection in the post-pandemic season 第64回日本ウイルス学会学術集会, 札幌 (2016, 10)

2) 鈴木忠樹, 片野晴隆, 高橋健太, 佐藤由子, 中島典子, 長谷川秀樹 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) の病理解析. 第105回日本病理学会総会, 仙台 (2016.5)

3) 酒井宏治, 中島典子, 駒瀬勝啓, 竹田誠. 呼吸病ウイルスの病原性発現に関わる宿主プロテアーゼ TMPRSS2 の意義 第57回日本臨床ウイルス学会, 福島 (2016,5)

H. 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

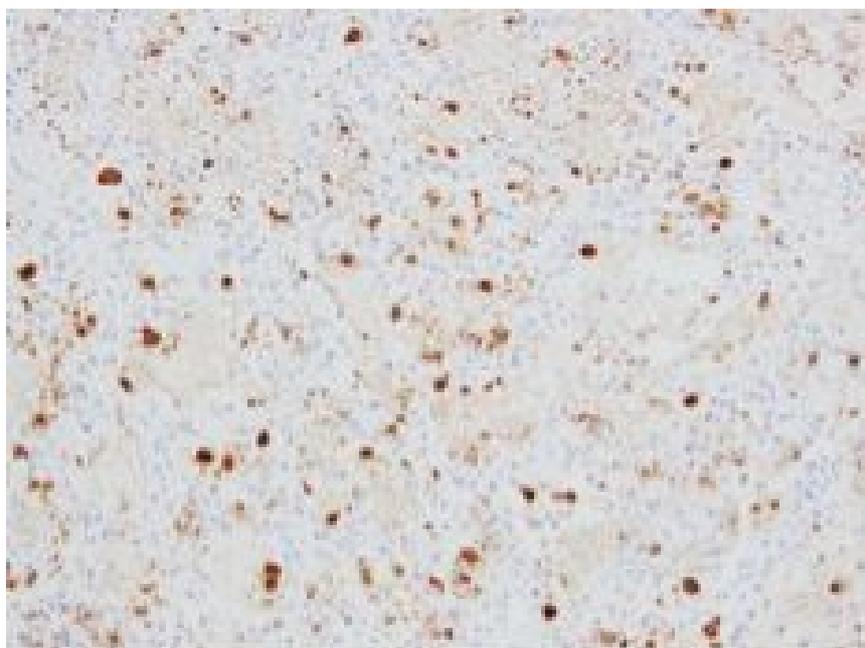


図1. アデノウイルス肺炎の肺剖検組織. DNA ISH-AT法によるアデノウイルスゲノム検出.