

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。私たちは、電子顕微鏡によるウイルス診断法の精度向上のため、教育訓練の一環としてロベルト・コッホ研究所による外部評価に参加している。今年度は5回目の参加となり、合計14種類のウイルス科の粒子を電子顕微鏡観察することができた。電子顕微鏡によるウイルスの同定は、その粒子の大きさ、形状、エンベロープの有無と形状、検体の由来とその臨床症状がポイントとなる。初見での病原体検出は比較的難しく、参照標本での教育と継続的な訓練は必要不可欠である。

研究協力者

岩田（吉河）奈織子・国立感染症研究所感染病理部・主任研究官

片岡紀代・国立感染症研究所感染病理部

長谷川秀樹・国立感染症研究所感染病理部・部長

A. 研究目的

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、診断法の精度を向上するため、教育訓練の一環として取り入れているロベルト・コッホ研究所による外部評価について過去5年間の評価結果をとりまとめた。

B. 研究方法

平成 23 年度から毎年参加している、ロベルト・コッホ研究所による外部評価（External Quality Assurance Scheme in EM Virus Diagnostics, EQA-EMV）の結果をとりまとめ、その成果を考察した。この外部評価は、電子顕微鏡の教育訓練を目的として Dr. Hans Gelderblom により 1994 年から導入された。ロベルト・コッホ研究所が毎年主催し、世界中の 100 カ所余りのラボが参加している。医学およ

び獣医学領域の臨床検体を対象としている。また、サンプルは、培養細胞でウイルスを増殖した培養上清であり、これが2%ホルマリン0.02%アジ化ナトリウム混合液に調整され、250 マイクロリットルずつ分注されたものが参加者に配布（郵送）される。外部評価の際には指定のレファレンスラボ6カ所が同様に参加し、リファレンスラボのうち少なくとも5カ所が正答であればサンプルは適正であるとする。我々は、平成 23 年（EQA-EMV24）から参加しており、今回で5回目の参加となった。

【倫理面への配慮】

（倫理面への配慮）該当なし

C. 研究結果

いずれのサンプルについても標準的な対応として次の通り観察試料を作製した。

1. 支持膜つきグリッドを親水化処理する。
2. 試料を微量高速遠心機で粗遠心する。
3. パラフィルムを準備し、フィルターを通した蒸留水、染色液、蒸留水の順番で30 μ l程度の大きめの水滴を作る。
4. パラフィルムの上に5~30 μ lの検体を滴下する。
5. 支持膜付きグリッドを（支持膜側を下にして）検体ドロップの上に置く（30秒~10分吸着、試料による）。
6. ピンセットでグリッドを持ち上げ、余分な液をろ紙で吸い取る。

7. これを（支持膜側を下にして）蒸留水に移動し（洗浄），再度ろ紙で吸い取る．
8. 次に（支持膜側を下にして）染色液に移動し，およそ 30 秒染色する．
9. ピンセットでグリッドを持ち上げ，余分な液をろ紙で吸い取る．
10. これを同様に蒸留水で洗浄し，再度ろ紙で吸い取る．
11. ろ紙を敷いたシャーレに（支持膜側を上にして）置き，乾燥する．
12. 透過型電子顕微鏡で観察する．

これまでに 5 回の EQA-EMV に参加し，のべ 30 件のウイルスを観察した（表）．結局，14 種類のウイルス科あるいは属の観察を経験した．観察結果の回答内容は概ね良好であるが，誤答が 3 件あった．

D. 考察

電子顕微鏡によるウイルスの同定は，その粒子の大きさ，形状，エンベロープの有無と形状，検体の由来とその臨床症状がポイントとなる．我々が誤答したうちの 2 件は，比較的小さな球形のウイルス粒子を示すフラビウイルスとヘパドナウイルスであり，同様の形状のウイルスはいずれも初見での鑑別は困難であった．また，1 件は試料に含まれるウイルス粒子数が少ないものであり，われわれの標準的な方法では観察が出来なかった．オルソポックスウイルス，ヘルペスウイルス，パラミクソウイルス，オルソミキソウイルス，ロタウイルス，アデノウイルス，パラポックスウイルスに関しては，特徴的な形状，大きさを示すため，鑑別は比較的容易であった．また，アメーバから発見されたミミウイルスは粗遠心により粒子が沈殿してしまうので，懸濁した試料を直接，観察する必要があった．また，このウイルス粒子周囲の線毛を維持して観察するのは困難であった．ミミウイルスに関しては，由来がアメーバであったため，観察方法を工夫することができた．

E. 結論

初見での病原体検出は比較的難しく，参照標本での教育と継続的な訓練は必要不可欠である．

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Furihata S, Matsumura T, Hirata M, Mizutani T, Nagata N, Kataoka M, Katayama Y, Omatsu T, Matsumoto H, Hayakawa Y. Characterization of Venom and Oviduct Components of Parasitoid Wasp *Asobara japonica*. PLoS One. 2016.11(7) e0160210.
- 2) Taniguchi S, Maeda K, Horimoto T, Masangkay JS, Puentespina R Jr, Alvarez J, Eres E, Cosico E, Nagata N, Egawa K, Singh H, Fukuma A, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Tsuchiaka S, Omatsu T, Mizutani T, Une Y, Yoshikawa Y, Shimojima M, Saijo M, Kyuwa S. First isolation and characterization of pteropine orthoreoviruses in fruit bats in the Philippines. Archives of Virology. 2017. doi. 10.1007/s 00705-017-3251-2

2. 学会発表

特になし

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

表 ロベルト・コッホ研究所による外部評価（第24～28回）で用いられた病原体とその内容

ウイルス科あるいは属	ネガティブ染色像	EQA24	EQA25	EQA26	EQA27	EQA28
<i>Orthopoxvirus</i>		○	○	○		○
<i>Herpesviridae</i>		○		○	○* E	○
<i>Paramyxoviridae</i>		○	○	○		○
<i>Flaviviridae</i>		○ E			○	
<i>Bunyaviridae</i>		○	○			
<i>Mimiviridae</i>		○		○		
<i>Calicivirus</i>			○			○
<i>Coronavirus</i>			○			
<i>Birnavirus</i>			○			
<i>Orthomyxoviridae</i>				○	○	
<i>Rotavirus</i>				○		
<i>Adenoviridae</i>					○	
<i>Hepadnaviridae</i>					○ E	○
<i>Parapoxvirus</i>						○

、出題病原体、E、回答が不適当であったもの、*サンプルに含まれる粒子数が少なかったもの