

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した。1. 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。2. 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した。3. 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た。5 回の参加を通し，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

鈴木忠樹・国立感染症研究所感染病理部・室長

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

佐藤由子・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・非常勤職員

長谷川秀樹・国立感染症研究所感染病理部・部長

高崎智彦・国立感染症研究所ウイルス第一部・室長

西條政幸・国立感染症研究所ウイルス第一部・部長

森川茂・国立感染症研究所獣医科学部・部長

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。

(1) 血液検体からの病原体の電子顕微鏡学的検出法について

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，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。

(2) 電子顕微鏡検索のためのサ

## サンプルの濃縮方法について

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。

- (3) 電子顕微鏡を用いた病原体の検出に関する外部評価について  
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

### 1. 血液検体からの病原体の電子顕微鏡学的検出法について

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。

### 2. 電子顕微鏡検索のためのサンプルの濃縮方法について

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  $\mu$ 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 (1000  $\mu$ 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  $\mu$ m (レプトスピラ, エボラウイルス)
- 0.08  $\mu$ m (ワクチニアウイルス)
- 0.03  $\mu$ 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。

### 3. 電子顕微鏡を用いた病原体の検出に関する外部評価について

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．私たちは，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】

該当なし

### C. 研究結果

#### 1. 血液検体からの病原体の電子顕微鏡学的検出法について

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1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1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  $\mu$ 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．

#### 2. 電子顕微鏡検索のためのサンプルの濃縮方法について

実習のために準備されたサンプルには，グルタ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， $5 \times 10^3$  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．

#### 3. 電子顕微鏡を用いた病原体の検出に関する外部評価について

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 $\mu$ 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 $\mu$ 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2)．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

#### 1. 血液検体からの病原体の電子顕微鏡学的検出法について

実際に高ウイルス血症発症時の Dengue 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、検出効率が高かった。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。

## 2. 電子顕微鏡検索のためのサンプルの濃縮方法について

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 (Beniac DR *et al.*, 2015)。

## 3. 電子顕微鏡を用いた病原体の検出に関する外部評価について

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。私たちが誤答したうちの 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超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

1. 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。
2. 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。
3. 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) 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

- 4) 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.
- 5) 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/s00705-017-3251-2

##### 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

#### 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1. 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

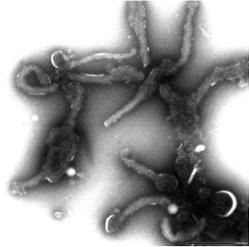
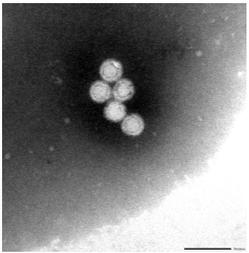
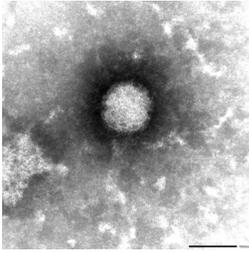
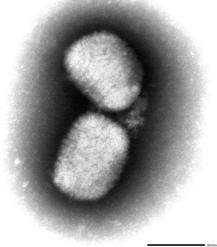
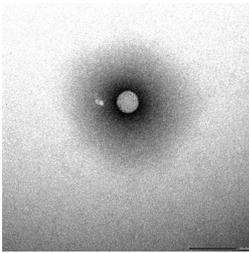
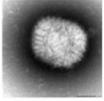
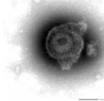
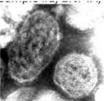
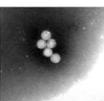
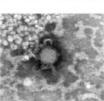
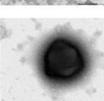
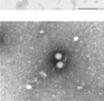
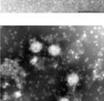
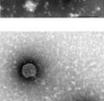
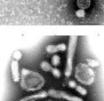
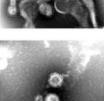
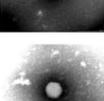
ウイルス名 (科 Family 属 Genus)	エンベ ロープ (核 酸)	形状	粒子の径 (ヌクレオ カプシド 径)	電子顕微鏡像 .PTA 染色 によるネガティブ像 (ウイルス名と撮影)	同科の感染 症法に基づ く特定病原 体(属)
エボラウイルス (Filoviridae Ebola virus)	あり (- 鎖 RNA)	フィラ メント 状が優 勢	80 × 1200 nm (50 nm)		エボラウイ ルス属, マー ルブルグウ イルス属
				(Zaire EV/GHSAG2010)	
デングウイルス (Flaviviridae Flavivirus)	あり (+ 鎖 RNA)	球状	40-60 nm (30 nm)		フラビウイ ルス属
				(flavivirus / EQA24)	
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)		ナイロウイ ルス属, ハン タウイルス 属, フレボウ イルス属
				(SFTS virus/NIID)	
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		オルソポッ クスウイル ス属
				(Vaccinia/EQA25)	
B 型肝炎ウイルス (HBV) Hepadnaviridae Orthohepadnavirus	あり (2本 鎖 DNA)	球状	42 nm (28 nm)		該当なし
				(HBV/EQA27)	

表 2. 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



図 1. 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  $\mu$ l で十分) し、紫外線照射との組み合わせで行う。