

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

**バイオテロに使用される可能性のある病原体等
の新規検出法と標準化に関する研究**

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

平成 26 年 3 月

研究代表者

倉根 一郎

(国立感染症研究所)

目 次

・ 総括研究報告書（平成 25 年度）

- 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と
標準化に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1
研究代表者：倉根 一郎（国立感染症研究所）

・ 分担研究報告書

- 1 . 新興アレナウイルスに対応可能なウイルス抗原検出法の開発
に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・15
研究分担者：森川 茂（国立感染症研究所 獣医科学部）

- 2 . 炭疽に対する迅速検査、消毒、その標準化等に関する研究・・・・・・・・25
研究分担者：井上 智（国立感染症研究所 獣医科学部）

- 3 . ボツリヌス菌・毒素の検査法の改良・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・31
研究分担者：見理 剛（国立感染症研究所 細菌第二部）

- 3 . リケッチア・コクシエラ・クラミジアの迅速検出法の開発
Q熱コクシエラ(*Coxiella burnetii*)のゲノム解析による基盤情報の整備・・・・・・・・37
研究分担者：安藤 秀二（国立感染症研究所 ウイルス第一部）

- 5 . バイオテロの可能性のある真菌感染症の迅速診断法の確立
*Coccidioides*のLAMP法による高感度検出系の構築・・・・・・・・・・・・43
研究分担者：宮崎 義継（国立感染症研究所 真菌部）

- 6 . 鼻疽・類鼻疽の迅速診断法に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・49
研究分担者：堀野 敦子（国立感染症研究所 細菌第二部）

- 7 . 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・・・・55
研究分担者：黒田 誠（国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター）

8 . 病原体の病理学的検出法の確立 迅速 <i>in situ</i> hybridization AT-tailing 法による新興・再興感染症ウイルス の検出	63
研究分担者：佐多 徹太郎（富山県衛生研究所）	
9 . 病原体の電子顕微鏡学的迅速検出法の確立	69
研究分担者：永田 典代（国立感染症研究所 感染病理部）	
10 . 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	73
研究分担者：倉園 久生（帯広畜産大学）	
11 . 検体調整法およびスクリーニング法の普及、バイオテロ検査マニュアルの作製と検査 担当者の育成	87
研究分担者：田中 智之（堺市衛生研究所）	
12 . バイオテロ関連疾患の臨床診断支援方法の開発 バイオテロ関連感染症の臨床診断と治療	93
研究分担者：岩本 愛吉（東京大学医科学研究所・先端医療研究センター）	
13 . 各医療機関のバイオテロ対策を支援するための方策	95
研究分担者：松本 哲哉（東京医科大学 微生物学講座）	
14 . 原因不明感染症の診断法に関する研究	101
研究分担者：西條 政幸（国立感染症研究所 ウイルス第一部）	
. 研究成果の刊行に関する一覧表	113

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）

総括研究報告書

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と標準化に関する研究

研究代表者：倉根一郎（国立感染症研究所 副所長）

研究要旨：バイオテロに利用される可能性のある病原体等は感染し発症すれば非常に高い致死率を示す。バイオテロ対策として、病原体の早期検知法の確立と迅速診断システムの整備が必須である。また、早期検出により、感染拡大を防止し、社会的なパニックを防止する必要がある。本研究では、バイオテロの迅速な検出を可能とし、さらに感染防止策等の迅速な対応策の策定を可能とすることを目的として、1) 特定病原体等に対する遺伝子検出法、抗原抗体検出法、毒素迅速検出法等の迅速診断法の確立と標準化を行った、2) 網羅的検出法として、網羅的ウイルス検出法、網羅的細菌検出法、超高速ゲノム解読法の確立を行い、さらに未知の病原体等検出法、病原体のデータベース等の開発と確立を行った、3) 病理学的病原体検出法、特に免疫組織化学的検出法、および電子顕微鏡を用いた病原体検出法の確立を行った、4) 地方衛生研究所への真菌検査技術の移転や、技術移転時における問題点も明らかにした、5) 診断検査支援のため、ホームページを整備し、バイオテロ対応関係機関との情報交換を密にするシステムの確立を行った。特に、本年度は新たに重症熱性血小板減少症候群（SFTS）をホームページに追加し、また日本紅斑熱も加えた。これにより一種から三種病原体のすべてを網羅した。

研究分担者：

安藤秀二：国立感染症研究所 室長
井上智：国立感染症研究所 室長
岩本愛吉：東京大学医科学研究所 教授
倉園久生：帯広畜産大学 教授
黒田誠：国立感染症研究所 センター長
見理剛：国立感染症研究所 主任研究官
西條政幸：国立感染症研究所 部長

佐多徹太郎：富山県衛生研究所 所長
田中智之：堺市衛生研究所 所長
永田典代：国立感染症研究所 室長
中村修：慶応義塾大学 教授
堀野敦子：国立感染症研究所 主任研究官
松本哲哉：東京医科大学 教授
宮崎義継：国立感染症研究所 部長
森川茂：国立感染症研究所 部長

研究協力者:

安藤匡子：国立感染症研究所
飯塚節子：島根県保健環境科学研究所
梅山隆：国立感染症研究所
江崎孝行：岐阜大学
影山努：国立感染症研究所
小笠原由美子：国立感染症研究所
小河正雄：大分県衛生環境研究センター
小川基彦：国立感染症研究所
小林慎一：愛知県衛生研究所
奥谷晶子：国立感染症研究所
片野晴隆：国立感染症研究所
川本恵子：帯広畜産大学
鯉淵智彦：東京大学医科学研究所
小林慎一：愛知県衛生研究所
佐藤由子：国立感染症研究所
佐藤正明：国立感染症研究所
下島昌幸：国立感染症研究所
白戸憲也：国立感染症研究所
鈴木忠樹：国立感染症研究所
杉浦義紹：神戸市環境保健研究所
関塚剛史：国立感染症研究所
竹内史比古：国立感染症研究所
谷英樹：国立感染症研究所
谷口怜：国立感染症研究所
千葉一樹：福島県衛生研究所
中内美名：国立感染症研究所
中島典子：国立感染症研究所
長谷川秀樹：国立感染症研究所
福士秀悦：国立感染症研究所
福間藍子：国立感染症研究所
藤井毅：東京医科大学
松山州徳：国立感染症研究所
三好龍也：堺市衛生研究所
山下明史：国立感染症研究所
山下育孝：愛媛県立衛生環境研究所
吉河智城：国立感染症研究所

A．研究目的

米国における炭疽菌芽胞混入郵便物によるバイオテロの後、わが国における摸倣事件が発生した。その後対応体制が構築され、「特定病原体等」の管理が整備された。迅速診断法に関する基盤整備は、バイオテロの脅威に対抗する上で必須といえる。一次対応機関で用いることが予想される検査キットの多くは今後の検証が必要であり、病原体等の由来を知るための塩基配列の情報も十分公開されていない。従って、我が国の現状に即した検査法の確立と標準化、対応アルゴリズム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、さらに稀な病原体が使用されるため、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ある。患者検体、時には環境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。さらに病原体の由来を知るための塩基配列の解析とデータベースの確立も重要となる。これまで、いくつかの病原体に対する迅速診断法が開発されてきたが、バイオテロに用いられる可能性のある病原体がすべて網羅されているわけではない。一方、スクリーニングを目的とした網羅的検出法は特異性等の検討がいまだ十分ではない。

本研究の目的は以下の通りである。1) 特定病原体等に対する、遺伝子検出法、抗原抗体検出法、毒素迅速検出法等の迅速診断法の確立と標準化を行う。2) 網羅的検出法として、網羅的ウイルス検出法、網羅的細菌検出法、超高速ゲノム解読法の確立

を行い、さらに未知の病原体等検出法、病原体のデータベース等の開発と確立を行う。

3) 電子顕微鏡を用いた検出法、免疫組織化学的検出法を確立する。4) 検体調整法とスクリーニング法の普及、検査マニュアルの整備を行い、地方衛生研究所や検査機関での対応と検査ネットワークの整備を行う。5) 診断検査支援のため、バイオテロ対応ホームページを整備し、関係機関との情報交換を密にするシステムを確立する。本研究により、我が国におけるバイオテロの迅速な検出が可能となり、バイオテロ対策のための検査診断基盤を確立する。

B. 研究方法

研究は研究代表者、研究分担者 14 名の計 15 名によって行なわれた。研究においては各人の担当分野を研究代表者が有機的に結合づける形で遂行された。

研究は、1) ヒト検体および環境検体を用いた特定病原体、細菌毒素等の迅速診断法の確立、2) 病原体の網羅的検出法および未知の病原体検出法の確立、3) 病理学的手法や電子顕微鏡を用いた病原体検出法の確立、4) バイオテロ検査マニュアルの整備および地方衛生研究所等とのネットワーク確立、技術移転、5) 臨床診断支援方法の開発および有効な治療方法の確立を中心に行った。具体的には、以下の具体的方法で研究を遂行した。

1) ヒト検体および環境検体を用いた特定病原体、細菌毒素等の迅速診断法の確立

ウイルス特定病原体の鑑別診断法の開発：ウイルス性出血熱、痘瘡ウイルス等の鑑別診断の目的としたリアルタイム検出法の改良と、各種検出機器にあわせたプロト

コールの汎用化を図る。

蚊媒介性感染ウイルスの迅速検査法の確立：等蚊媒介性感染ウイルスの迅速診断法確立と標準化を行う。

人獣共通感染症の迅速診断法の開発：人獣共通感染症（炭疽、狂犬病）等に対するヒト検体、野外動物検体を用いた迅速検査診断法を確立し方法の標準化を行う。

鼻疽・類鼻疽迅速診断・同定法の確立：類鼻疽菌の分離培養同定および核酸診断法、鼻疽菌の診断法および鑑別法を確立する。

リケッチア、クラミジアの迅速診断法の開発：リケッチア、Q 熱コクシエラ、オウム病クラミジアの real time PCR 法、Multiplex 検出系を確立する。

真菌の迅速検査法の確立：コクシジオイデス等真菌の迅速検出系を確立し、さらに標準化と技術移転を行う。地方衛生研究所への技術移転と検証を行う。

細菌毒素の迅速検出法の開発：PCR 法によるボツリヌス毒素のサブタイプ検出、血中抗毒素価定量、毒素迅速検出イムノクロマト法を確立し地方衛生研究所への普及をはかる。

2) 病原体の網羅的検出法および未知の病原体検出法の確立

網羅的細菌迅速診断法の確立：網羅的 PCR 法、特異抗体の作製、それらを用いた検出系について、実証試験を行い検出系の検証と精度管理法を確立する。

超高速病原体ゲノム解読システムの構築と包括的核酸迅速診断法の確立：次世代シーケンサによる超高速病原体ゲノム解読システムと炭疽菌等の日本固有株の全ゲノム配列データベースのシステム評価を行う。同時に未知の病原体も検出できるシステム

を構築する。

3) 病理学的手法や電子顕微鏡を用いた病原体検出法の確立

ヒト病理検体の迅速診断法の開発：バイオテロに使用される可能性のある病原体に対する免疫組織学的方法を確立する。

迅速電顕検査法の確立：ネガティブ染色電顕で病原微生物を確認する迅速診断法の確立と入手可能な特定病原体等のレファレンス用写真リストを作製する。

4) バイオテロ検査マニュアルの整備および地方衛生研究所等とのネットワーク確立、技術移転

地方衛生研究研は検査の一次対応機関であるが、バイオテロ病原体の検体調整法のマニュアル作成と普及、地研で対応可能な病原体等の検出実技研修を通して技術移転を行う。また、地方衛生研究所間、および国立感染症研究所、関連機関との検査ネットワークを樹立する。

5) 臨床診断支援方法の開発および有効な治療法の確立

バイオテロ関連疾患の臨床診断支援法の開発：バイオテロ対応ホームページを発展させ、Q&A を作製するとともに診断アルゴリズムを高度化し、状況に応じた機能評価を行う。また、臨床診断支援ネットワークを樹立する。

バイオテロ対応ホームページのアップデートと治療法の確立：対象疾患の追加、医療機関や検査センターでの検査対応能力の評価、ワクチン関連情報のアップデート、そして抗菌薬情報の検証とアップデートを行う。また、情報公開の方法に関する研究開発を行う。

C. 研究結果

1) ヒト検体および環境検体を用いた特定病原体、細菌毒素等の迅速診断法の確立：

(1) 新興アレナウイルスに対応可能なウイルス抗原検出法の開発：新種アレナウイルスなども検出可能な手法を開発するために、アレナウイルス N 蛋白の高度保存領域に対する抗体を作製した。アレナウイルスの NP に高度に保存される部位のペプチドに対する抗体（抗 peptide 311-324 抗体）は LCMV-NP 以外のアレナウイルスのリコンビナント NP に強く反応し、新種のアレナウイルスであるルジョウイルス、ルナウイルスにも強く反応することが明らかになった。Authentic ウイルス抗原を用いた検討でも、抗 peptide 311-324 抗体旧世界アレナウイルスである MOPV, MOBV および、新世界アレナウイルスである Candid#1 に反応した。

(2) 炭疽菌の治療薬に関する研究：

炭疽菌の治療薬は、シプロフロキサシンおよびドキシサイクリンなどの抗生剤が使用可能であるが、人為的な薬剤耐性菌の出現に対する備えのため、新たな作用機序をもつ抗菌物質の探索が重要である。生体由来や食品由来の抗菌物質の中で炭疽菌の「芽胞」「栄養型」「莢膜」のそれぞれの菌形態に効果のある抗菌物質の候補として Anti Microbial Peptides(抗菌性ペプチド)の抗菌効果を検証した。また、同じく抵抗性を犬由来 AMP も検討した。炭疽感受性動物である牛、山羊、羊由来 AMP とヒト、マウス由来の AMP を人工合成してそれらの抗菌効果を検討したところ、豚由来の Protegrin-1 が最も高い抗菌効果を示した。

(3) ボツリヌス菌・毒素(BoNT) の検査法の改良:

ボツリヌス毒素 (BoNT) を迅速簡便に検出するために、SNAP25 と synaptobrevin を連結した組換えタンパク質を作製した。これを使用した検出法では、全ての血清型の BoNT の検出が可能であり、精製 BoNT の場合 A 型、E 型で数マウス LD₅₀/ml、E 型、F 型で数十マウス LD₅₀/ml 程度の量を 3 時間以内に検出することができた。この方法は精製 BoNT に対してはマウス法に匹敵する検出感度を示すが、検体に夾雑物が存在する場合、検出感度が大きく低下することから、今後この点の改良が必要である。

(4) リケッチア・コクシエラ・クラミジアの迅速検出法の開発: Q 熱コクシエラ (*Coxiella burnetii*) のゲノム解析による基盤情報の整備:

C. burnetii NM-NIID および TK-1 とともにコクシエラのゲノムサイズと同等のアセンブルが問題なく可能であった。これらの情報を登録されている Nine Mile 1 相菌 (RSA493) の完全長のゲノム配列に沿って contig を並び替え、比較解析を行ったところ、SNPs 系統樹解析では、比較解析した 3 つの *C. burnetii* のゲノムは極めて近いクラスターに収束したが、同じ由来とされる NM-NIID と 1 相菌 (RSA493) では、112 の塩基置換があり、相菌においては pQpH1 が欠落していた。TK-1 は、国内で初めて自然発症者から分離された菌株であるが、Nine-Mile 株と近縁であるものの、Nine-Mile 株 相菌 (NM-NIID) とは塩基置換数が 225 箇所存在した。全長でみると、3

つのゲノム配列は高度に保存されているものの、NM-NIID では複数の核酸代謝系の領域が欠失していたり、さらに TK-1 株では pseudogene 領域の変異と欠失、prophage 領域の変異も見られた。

(5) バイオテロの可能性のある真菌感染症の迅速診断法の確立: *Coccidioides* の LAMP 法による高感度検出系の構築:

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 (*Coccidioides immitis*, *C. posadasii*)、ヒストプラズマ (*Histoplasma capsulatum*) 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、培養をしない検査技術が必要とされる。喀痰などの臨床検体からヒストプラズマ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し、LAMP 法によるコクシジオイデスおよびヒストプラズマ DNA の高感度検出系を確立した。

(6) 鼻疽・類鼻疽の迅速診断法開発:

B. pseudomallei, *B. mallei* は CDC のカテゴリー B に指定されておりバイオテロに使用される懸念のある細菌である。地方衛生研究所等で検査が可能であるように、普及している核酸検出法での確立をめざし、LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法を選択した。*B. pseudomallei* と *B. mallei* の LAMP 法は前年度までに基礎検討が終了した。今年度は、

検査時にこの *B. pseudomallei* の LAMP 法を既報の検出法に加えて実施し、性能の比較検討を行った。既報の検査法と判定結果は同じであった。また、我々の LAMP 法は既報の LAMP 法よりも感度がよく、判定もクリアであった。過去の保存検体を用いた検討では過去の判定と同じ判定結果が得られた。

(7) 原因不明感染症の診断法に関する研究：

不明病原体による感染症発生の際に、EU、米国等の感染症研究機関でどのような診断体制でどのような対応を行うか、また各国の診断技術について情報交換を行うため、GHSAG Unknown Pathogen Workshop (不明病原体感染症診断技術に関するワークショップ)に参加した。本ワークショップでは、事前に不明病原体感染症発生のシナリオと不明病原体を含む検体を各国に送付し、各国の感染症研究機関で行った検査結果について報告しあう形式で行われた。不明病原体に関する診断アルゴリズムが整備されており、対応部局が明確にされていた国もあった。日本は感染研において病原体検出を試みたが、検体輸送の遅延の問題および、不明病原体の輸入が不可能であったことから正確な病原体検出成績が得られなかった。不明病原体の検査には次世代シーケンサーが必ず用いられるようになったが、機種、手法、リード数が多様である。ランニングコスト、所要時間も考慮しなければならない。このため、各国の次世代シーケンサーによる検査結果データを共有し、効率的な検査の構築に役立てていくことになった。

2) 網羅的ウイルス検出法、網羅的細菌検

出法、超高速ゲノム解読法の確立：

(1) 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：未知病原体や変異病原体によるバイオテロに対する確な対処法を整備する上で、使用された病原体を網羅的かつ迅速に配列解読することは最も確なアプローチの一つである。次世代型網羅的病原体検査法の骨格が既に構築済みであり、国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターで検査可能であるが、バイオテロ発生(および疑い事例を含む)において現場対応が迅速であればあるほど有効な対応策だと考えている。感染研・ゲノムセンターでは現場(病院・地方衛生研究所等)でも情報解析できるよう、ネットワーク経由で病原体鑑別するための情報解析パイプライン (Metagenomic Pathogen Identification pipeline for Clinical specimen: MePIC) を開発し Web 情報解析サービスを開始した。情報解析を習熟していない検査技師であっても簡単な講習会により利用できるような利便性を考えて作成した。また、バイオテロ病原体の臨床分離株のゲノム情報を活用し、ゲノムワイドな SNPs 検索と分子系統樹作成も可能にするシステム Global core-Genome SNPs Analysis (GcoGSA)を開発し、現在、炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) のみ Web 解析サービスを開始した(関係者のみの運用予定)。順次、他カテゴリーA 病原体であるペスト菌、野兔病菌、コクシエラ、類鼻疽菌、ボツリヌス菌のゲノム情報を用いた GcoGSA を展開する。

(2) 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：

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・診断法の確立およびワクチンの開発研究を目的として研究を遂行した。また、植物毒素であるリシン毒素の迅速検出法開発についても併せて行った。本年度は以下の結果が得られた。天然型リシンの認識が可能と思われる抗リシン B サブユニット特異抗体を作製した。マウス肺炭疽モデルにおいて EA1 は現行ワクチンの主成分である PA 単独に比べ優れた防御効果を示した。粘膜中の EA1 抗体価を維持するためには 2-3 ヶ月毎の追加免疫が必要である。コレラ毒素に対して特異性の高いイムノクロマト法を開発した。腸管出血性大腸菌感染症患者便から免疫学的迅速同定法(Bead-ELISA 法)により直接、シガ様毒素の検出を行った。現場や野外で使用できる迅速・簡便な核酸クロマト法を開発した。

3) 病理学的手法や電子顕微鏡を用いた病原体検出法の確立 :

(1) 病原体の病理学的検出法の確立 : 病理学的解析のためのオリゴプローブを用いた *in situ* 遺伝子検出系 :

迅速 *in situ* hybridization-AT tailing 法は、オリゴヌクレオチドプローブを用いた高感度で特異性の高い *in situ* 遺伝子検出系である。これを用いて重症熱性血小板減少症候群ウイルスを実際のヒト剖検病理組織切片上で検出した。また中東呼吸器症候群コロナウイルスの *in situ* 検出系も国内ヒト感染例の発生に備えて確立した。新しいウイルス感染症を特異的に検出する病理学的方法を新たに開発した。

(2) 病原体の電子顕微鏡学的迅速検出法の確立 :

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た。

検査従事者の教育訓練法の一つとして平成 23~25 年度に参加した Robert Koch 研究所によるウイルスの透過型電子顕微鏡診断法技術の外部評価を総括し、その利用法について考察した。過去 3 回の EQA-EMV で合計 18 サンプルを検索したが、うち 1 サンプルが誤答であった(フラビウイルス)。しかしながら、このサンプルはサンプル自体が不適当とされ評価から除外された。よって、3 回とも評価対象に関しては 100% の正答率であり診断技術は良好と高い評価がなされた。

4) バイオテロ検査マニュアルの整備および地方衛生研究所等とのネットワーク確立と技術移転 :

バイオテロに使用される病原体の可能性のある真菌属、なかでも *Coccidioides* によるバイオテロを含めた健康危機対応のため、(1). に病原体検出技術向上を計った。各ブロックの研究協力者が技術的な指導の立場の構築のため、検査技術の習熟・徹底を目指し実技研修を行った。(2). これらの実技研修から得られた技術・知識を、真菌検査に馴染みのない地方衛生研究所がバイオテロ対象真菌検査に取り組める事を目的とした真菌検査マニュアルの作成を行った。

5) 臨床診断支援方法の開発および有効な治療方法の確立

(1) バイオテロ関連疾患の臨床診断支援

方法の開発：バイオテロ関連感染症の臨床診断と治療：

生物テロに関連する疾患について、インターネット上で手軽に情報を得ることを目的とした『生物テロ関連疾患の診断・検査・治療マニュアル』のホームページを改訂した。昨年度までに、感染症法に基づく特定病原体等のうち、一種、二種および三種に含まれる計 35 種類のバイオテロ関連疾患に関する情報を掲載していたが、今年度は新たに特定病原体等に指定された重症熱性血小板減少症候群（SFTS）を含む 2 疾患を追加した。これにより一種から三種の病原体すべてと四種病原体の大部分を網羅した。さらにバイオテロ診断支援の一環として、関連各施設・機関との連携体制の構築について具体的方法を検討した。具体的には、2010 年までに本研究において作成していた 15 疾患（(1) ウイルス性出血熱、(2) ウエストナイル熱・脳炎、(3) Q 熱、(4) 狂犬病、(5) コクシジオイデス症、(6) SARS、(7) 消化管感染症、(8) 多剤耐性結核、(9) 炭疽、(10) 天然痘、(11) 鼻疽・類鼻疽、(12) ブルセラ症、(13) ペスト、(14) ボツリヌス症、(15) 野兔病）に加え、さらに 2011～12 年には 20 疾患（(1) 西部ウマ脳炎、(2) 東部ウマ脳炎、(3) ベネズエラウマ脳炎、(4) ダニ媒介性脳炎、(5) ヘンドラウイルス感染症、(6) リッサウイルス感染症、(7) 日本脳炎、(8) 南米出血熱、(9) ハンタウイルス感染症、(10) (11) B ウイルス症、(12) ニパウイルス感染症、(13) レプトスピラ症、(14) 発疹チフス、(15) チクングニア熱、(16) ロッキー山紅斑熱、(17) サル痘、(18) 黄熱、(19) 回帰熱、(20) デング熱）を追加した。今年度は、2013

年に新たに感染症法に基づく特定病原体（三種病原体等）に指定された重症熱性血小板減少症候群（SFTS）をホームページに追加し、また、三種病原体等の中で掲載がなかった日本紅斑熱リケッチアも加えた。これにより一種から三種病原体のすべてを網羅した。

（2）各医療機関のバイオテロ対策を支援するための方策：

バイオテロに関する医療機関の関心や準備状況はまだ十分ではなく、さらに啓発活動を行うと共に、バイオテロ対策のガイドラインを作成して具体的な対策の指針を示すことが必要と考えられる。国内の医療機関の多くは感染防止対策加算の新設に伴い、院内感染対策にさらに力を注ぐようになっている。しかしバイオテロに関する準備状況はまだ十分とは言えず、さらなる対応策が必要と考えられる。そこで本研究においては、医療機関向けのバイオテロ対策のガイドラインを作成し、具体的な対策の指針を示すことを主な目的としている。昨年度の研究では、バイオテロ対策ガイドラインの基本骨格を作成し研究班における意見を求めた。今年度は高病原性インフルエンザ対策に向けた BCP 作成のガイドライン等を参考にして、さらにたたき台となる案を作成した。

D．考察

本研究では、一次対応者や対応機関を支援する目的で最新情報を提供し、緊急時に事件や環境ないし臨床検体からバイオテロ関連病原体等を短時間に検出同定する実験室診断法の開発や病原体ゲノムデータベ-

スの作製および検査診断機関のネットワーク化を行った。具体的には、1) 特定病原体等に対する、遺伝子検出法、抗原抗体検出法、毒素迅速検出法等の迅速診断法の確立と標準化を行う、2) 網羅的検出法として、網羅的ウイルス検出法、網羅的細菌検出法、超高速ゲノム解読法の確立を行い、さらに未知の病原体等検出法、病原体のデータベース等の開発と確立を行う、3) 電子顕微鏡を用いた検出法、免疫組織化学的検出法を確立する、4) 検体調整法とスクリーニング法の普及、検査マニュアルの整備を行い、地方衛生研究所や検査機関での対応と検査ネットワークの整備を行う、5) 診断検査支援のため、バイオテロ対応ホームページを整備し、関係機関との情報交換を密にするシステムを確立する、の5項目を大きな目標とした。

バイオテロにおいては患者発生まで潜伏期間があることから、一次医療機関で感染症として疑われ臨床診断が行われる可能性が高い。従って、患者検体を用いての迅速検査、病原体等の分離同定、および血清抗体検査、あるいは時に環境検体を用いた病原体検出が必要である。

バイオテロに利用される恐れのある病原体による感染症は、現在わが国では存在しないものが多く、臨床医の多くがこれらの感染症に対する十分な知識や関心も有していないのが現状であると思われる。従ってホームページの作成にあたっては、一般の臨床医が容易に理解できるような工夫をおこなうとともに、広い見識を有する感染症専門家から最新の知見を加えながら常に最新の情報を提供することが重要である。過去作製した内容についても、継続的な改訂

作業が必要となる。今年度は、2013年に新たに感染症法に基づく特定病原体(三種病原体等)に指定された重症熱性血小板減少症候群(SFTS)をホームページに追加し、また、三種病原体等の中で掲載がなかった日本紅斑熱リケッチアも加えた。これにより一種から三種病原体のすべてを網羅した。

E. 結論

バイオテロの迅速な検出を可能とし、さらに、感染防止策等の迅速な対応策の策定を可能とすることを目的として、以下の5項目に関して研究を行った。1) 特定病原体等に対する、遺伝子検出法、抗原抗体検出法、毒素迅速検出法等の迅速診断法の確立と標準化を行った。2) 網羅的検出法として、網羅的ウイルス検出法、網羅的細菌検出法、超高速ゲノム解読法の確立を行い、さらに未知の病原体等検出法、病原体のデータベース等の開発と確立を行った。3) 病理学的、また電子顕微鏡を用いた病原体検出法、免疫組織化学的検出法の確立を行った。4) 地方衛生研究所への真菌検査の技術移転を行い、併せて技術移転時における問題点も明らかにした。5) 診断検査支援のため、ホームページを整備し、バイオテロ対応関係機関との情報交換を密にするシステムの確立を行った。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 英文発表

Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, Ishido A,

- Shigeoka T, Tominaga T, Kamei T, Honda M, Ninomiya D, Sakai T, Senba T, Kaneyuki S, Sakaguchi S, Satoh A, Hosokawa T, Kawabe Y, Kurihara S, Izumikawa K, Kohno S, Azuma T, Suemori K, Yasukawa M, Mizutani T, Omatsu T, Katayama Y, Miyahara M, Ijuin M, Doi K, Okuda M, Umeki K, Saito T, Fukushima K, Nakajima K, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Fukuma A, Ogata M, Shimojima M, Nakajima N, Nagata N, Katano H, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Yamagishi T, Oishi K, Kurane I, Morikawa S, Saijo M. The First Identification and Retrospective Study of Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome in Japan. *J Infect Dis.* Dec 12. 2013.
- Arai S, Nguyen ST, Boldgiv B, Fukui D, Araki K, Dang CN, Ohdachi SD, Nguyen NX, Pham TD, Boldbaatar B, Satoh H, Yoshikawa Y, Morikawa S, Tanaka-Taya K, Yanagihara R, Oishi K. Novel Bat-borne Hantavirus, Vietnam. *Emerg Infect Dis.* 2013 Jul;19(7):1159-61.
- Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzuki Y, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Fukushi S, Mizutani T, Yoshikawa T, Otsuki N, Kurane I, Komase K, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Takeda M, Morikawa S. Lethal Canine Distemper Virus Outbreak in Cynomolgus Monkeys in Japan in 2008. *J Virol.* 2013, 87(2): 1105-1114
- Sakai K, Yoshikawa T, Seki F, Fukushi S, Tahara M, Nagata N, Ami Y, Mizutani T, Kurane I, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Komase K, Morikawa S, Takeda M. Canine distemper virus associated with a lethal outbreak in monkeys can readily adapt to use human receptors. *J Virol.* 87(12):7170-7175. 2013.
- Andoh M, Andoh R, Teramoto K, Komiya T, Kaneshima T, Takano A, Hayashidani H, Ando S: Survey of *Coxiella burnetii* in ticks collected from dogs in Japan. *J Vet Med Sci*, 75(8):1115-1117, 2013
- Umeyama T, Ohno H, Minamoto F, Takagi T, Tanamachi C, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Kishi K, Fujii T, Takemura H, Watanabe H, Miyazaki Y. Determination of epidemiology of clinically isolated *Cryptococcus neoformans* strains in Japan by multilocus sequence typing. *Jpn J Infect Dis.* 2013, 66(1):51-5.
- Mihara T, Izumikawa K, Kakeya H, Ngamskulrungroj P, Umeyama T, Takazono T, Tashiro M, Nakamura S, Imamura Y, Miyazaki T, Ohno H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S. Multilocus sequence typing of *Cryptococcus neoformans* in non-HIV associated cryptococcosis in Nagasaki, Japan. *Med Mycol.* 51:252-260, 2013.
- Okubo Y, Wakayama M, Ohno H, Yamamoto S, Tochigi N, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Umeyama T, Shinozaki M, Nemoto T, Nakayama H, Sasai D, Ishiwatari T,

Shimodaira K, Yamamoto Y, Kamei K, Miyazaki Y, Shibuya K. Histopathological study of murine pulmonary cryptococcosis induced by *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. *Jpn J Infect Dis.* 66:216-221, 2013.

Okubo Y, Tochigi N, Wakayama M, Shinozaki M, Nakayama H, Ishiwatari T, Shimodaira K, Nemoto T, Ohno H, Kaneko Y, Makimura K, Uchida K, Miyazaki Y, Yamaguchi H, Shibuya K. How Histopathology Can Contribute to an Understanding of Defense Mechanisms against Cryptococci. *Mediators Inflamm.* 2013:465319, 2013.

Ohno H, Tanabe K, Umeyama T, Kaneko Y, Yamagoe S, Miyazaki Y. Application of nested PCR for diagnosis of histoplasmosis. *J Infect Chemother.* 19:999-1003, 2013.

MePIC, Metagenomic Pathogen Identification for Clinical Specimens. Fumihiko Takeuchi, Tsuyoshi Sekizuka, Akifumi Yamashita, Yumiko Ogasawara, Katsumi Mizuta, and Makoto Kuroda. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 67: 62-65, 2014

Nakajima N, Van Tin N, Sato Y, Thach HN, Katano H, Diep PH, Kumasaka T, Thuy NT, Hasegawa H, San LT, Kawachi S, Liem NT, Suzuki K, Sata T. Pathological study of archival lung tissues from five fatal cases of avian H5N1 influenza in Vietnam. *Mod Pathol.* 26, 357-369, 2013

Hayashi M, Natori T, Kubota-Hayashi S, Miyata M, Ohkusu K, Kawamoto K, Kurazono H, Makino S, Ezaki T. A new protocol to detect multiple foodborne pathogens with PCR dipstick DNA chromatography after six-hour enrichment culture in a broad-range food pathogen enrichment broth. *BioMed Research International.* 2103: 295050, 2013.

Eiki Yamasaki, Ryuta Sakamoto, Takashi Matsumoto, Fumiki Morimatsu, Hiroko Toyoi, G. Balakrish Nair, Hisao Kurazono and Takayuki Kurazono: Development of an immunochromatographic test strip for detection of cholera toxin. *BioMed Research International.* 2103: 679038, 2013.

Sato N, Sugiura Y, Nukuzuma S, Udagawa S, Tanaka, T. Two rare contaminants, *Helicostylum pulchrum* and *Scopulariopsis flava*, found in a white natural cheese, and the effect of their presence. *Jpn J Fd Microbiol.* 30:15-20, 2013.

Yoshikawa T, Saijo M, Morikawa S. Emergence of zoonotic orthopox virus infections. In *Viral Infections and Global Change* (ed. Sigh SK), pp377-387, 2014, Wiley Blackwell, New Jersey

2) 和文論文

町田安孝, 福島康次, 三好祐顕, 小原一記,

池田康紀, 亀井克彦, 宮崎義継, 福田 健.
経気管支鏡肺生検および気管支肺胞洗浄に
て診断された慢性肺コクシジオイデス症の
1 例. 日本呼吸器学会雑誌. 2:274-278,
2013.

大野秀明, 金子幸弘, 田辺公一, 梅山 隆,
宮崎義継. *Cryptococcus gattii* 感染症 -
新興・再興感染症 up to date-. 化学療法
の領域. 29 S-1:1144-1151, 2013.

大野秀明, 宮崎義継. 真菌性脳髄膜炎の遺
伝子診断. 臨床神経学. 53:1191-1193,
2013.

2. 学会等発表

1) 国際学会

Kamei K, Watanabe A, Yaguchi T, Muraosa
Y, Toyotome T, Ohno H, Miyazaki Y.
Epidemiology of imported mycoses in
Japan-its past and the present status.
28th International Congress of
Chemotherapy and Infection. June 5-8,
2013.

2) 国内学会

吉河智城, 福士秀悦, 谷英樹, 宇田晶彦,
谷口怜, 福間藍子, 前田健, 高橋徹, 森川
茂, 下島昌幸, 西條政幸 重症熱性血小板
減少症候群(SFTS)の確定診断に使用される
コンベンショナル PCR の評価、及びリアル
タイム定量 PCR 戸の比較 第61回日本ウイ
ルス学会学術集会、2013年11月10 - 12日、
神戸

福間藍子, 福士秀悦, 谷英樹, 吉河智城,

谷口怜, 下島昌幸, 森川茂, 前田健, 西條
政幸 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の
血清学的診断法の開発 第 61 回日本ウイ
ルス学会学術集会、2013年11月10 - 12日、
神戸

長谷川秀樹, 亀井敏昭, 高橋徹, 鈴木忠樹,
片野晴隆, 中島典子, 福士秀悦, 下島昌幸,
前田健, 水谷哲也, 森川茂, 西條政幸 日
本国内で発生した重症熱性血小板減少症候
群の1剖検例 第 61 回日本ウイルス学会
学術集会、2013年11月10 - 12日、神戸

西條政幸, 高橋徹, 前田健, 水谷哲也, 大
松勉, 吉河智城, 谷英樹, 福士秀悦, 下島
昌幸, 福間藍子, 緒方もも子, 鈴木忠樹,
中島典子, 片野晴隆, 永田典代, 長谷川秀
樹, 山岸拓也, 倉根一郎, 森川茂 後方視
的に重症熱性血小板減少症候群と診断され
た11名のウイルス学的・臨床的・疫学的研
究 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、
2013年11月10 - 12日、神戸

森川茂, 木村昌伸, 福士秀悦, 福間藍子,
加来義浩, 朴ウンシル, 谷英樹, 吉河智城,
井上智, 今岡浩一, 下島昌幸, 西條政幸,
前田健 SFTS ウイルス抗体陽性動物の調査
第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013
年11月10 - 12日、神戸

谷口怜, 福士秀悦, Masangkay Joseoh, 渡
辺俊平, 大松勉, 下田宙, 前田健, 福間藍
子, 吉河智城, 谷英樹, 下島昌幸, 西條政
幸, 明石博臣, 吉川泰弘, 久和茂, 森川茂
フィリピンのコウモリからの重症熱性血小
板減少症候群ウイルスに反応する抗体の検

出 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、
2013 年 11 月 10 - 12 日、神戸

宇田晶彦、福士秀悦、加来義浩、吉河智城、
下島昌幸、新倉綾、井上智、安藤秀二、前
田健、西條政幸、森川茂 マダニからの SFTS
ウイルス遺伝子の検出 第 61 回日本ウイ
ルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 - 12 日、
神戸

下島昌幸、福士秀悦、谷英樹、吉河智城、
福間藍子、谷口怜、前田健、高橋徹、西條
政幸 重症熱性血小板減少症候群ウイルス
に対する ribavirin の in vitro 増殖抑制効
果 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、
2013 年 11 月 10 - 12 日、神戸

新倉綾、福士秀悦、森川茂、山田靖子 リ
フトバレー熱ウイルス L 蛋白のポリメラー
ゼ機能における C 末端領域の重要性 第 61
回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11
月 10 - 12 日、神戸

福士秀悦、谷英樹、吉河智城、谷口怜、福
間藍子、緒方もも子、下島昌幸、森川茂、
西條政幸 ナイジェリアにおけるリフトバ
レー熱の血清疫学 第 61 回日本ウイルス
学会学術集会、2013 年 11 月 10 - 12 日、神
戸

高橋徹、前田健、亀井敏昭、水谷哲也、下
島昌幸、福士秀悦、谷英樹、吉河智城、森
川茂、長谷川秀樹、中島典子、鈴木忠樹、
永田典代、片野晴隆、山岸拓也、大石和徳、
西條政幸 重症熱性血小板減少症候群
(SFTS)の日本における初症例 第 61 回日

本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10
- 12 日、神戸

安藤秀二、佐藤正明、小川基彦：発疹熱輸
入症例の現況、第 20 回リケッチア研究会、
2014 年 1 月 12 日、滋賀県大津市

藤田博己、藤田信子、安藤秀二：国内にお
ける発疹熱リケッチアの潜在について、第
20 回リケッチア研究会 2014 年 1 月 12 日、
滋賀県大津市

大野秀明、宮崎義継．中枢神経系感染症の
遺伝子診断の進歩-真菌性脳髄膜炎の遺伝子
診断-(シンポジウム)．第 54 回日本神経学
会学術大会．5 月 29-6 月 1 日、2013 年、東
京．

大野秀明、大久保陽一郎、金子幸弘、田辺
公一、梅山 隆、山越 智、亀井克彦、渋谷
和俊、宮崎義継．*Cryptococcus gattii* 感
染症の病態解析 (シンポジウム 4)．第 57
回日本医真菌学会総会・学術集会．9 月
27-28 日、2013 年、東京．知的財産権の出
願・登録状況

堀野敦子、山根一和、柴山恵吾、阿戸学．
LAMP 法による *Burkholderia pseudomallei*
と *Burkholderia mallei* の検出、日本細菌
学会第 86 回総会、2013 年 3 月、千葉県

中島典子、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀
樹 新しい迅速 in situ ゲノム検出法の感
染病理への応用 第 102 回日本病理学会総
会(札幌)2013 年 6 月

片野晴隆、佐藤由子、中島典子、福本瞳、
鈴木忠樹、黒田誠、長谷川秀樹 病理検体
からの不明病原体検出法の最先端 第 102
回日本病理学会総会(札幌)2013年6月

中島典子、片野晴隆 シンポジウム3病原
体の新しい診断法： 定量的PCRによるウイ
ルスの網羅的検出法と病理検体への応用
第18回日本神経感染症学会(宮崎)2013年10
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

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）
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と標準化に関する研究
分担研究報告書

新興アレナウイルスに対応可能なウイルス抗原検出法の開発に関する研究

研究分担者 森川 茂 国立感染症研究所獣医科学部

研究要旨：ヒトに高い病原性を示すアレナウイルス（旧世界アレナウイルスのラッサウイルス、新世界アレナウイルスのフニンウイルスなど）はバイオテロに用いられる可能性のある病原体でBSL4に分類されている。最近、ザンビア、南アフリカで原因不明の出血熱症状を呈した患者から分離されたLujjo(ルジヨ)ウイルス、ザンビアでげっ歯類から分離されたLuna(ルナ)ウイルスなど、相次いで新種のアレナウイルスが報告された。このことからアレナウイルス科の未知のウイルスがまだまだ数多く存在することを示唆される。本研究では、このような新種アレナウイルスなども検出可能な手法を開発するために、アレナウイルスの高度保存領域に対する抗体を作製した。この抗体は、種々のアレナウイルスのリコンビナントタンパク質および、感染性アレナウイルスに広く交差反応性を示した。本領域を抗体作製の標的とすることは、新種、新型のアレナウイルスを漏れなく検出できる技術の確立につながると期待できる。

研究協力者：福士秀悦、吉河智城、谷英樹、
谷口怜、福間藍子、下島昌幸、西條政幸（国
立感染症研究所ウイルス第一部）

A 研究目的

ヒトに高い病原性を示すアレナウイルス（旧世界アレナウイルスのラッサウイルス、新世界アレナウイルスのフニンウイルスなど）はBSL4病原体に分類され、バイオテロ・犯罪に使われるおそれのある生物剤に含まれる。最近、ザンビア、南アフリカで原因不明の出血熱症状を呈した患者から分離さ

れたLujjo(ルジヨ)ウイルス、ザンビアでげっ歯類から分離されたLuna(ルナ)ウイルスなど、相次いで新種のアレナウイルスが報告された。このことからアレナウイルス科の未知のウイルスがまだまだ数多く存在することを示唆される。このような新興アレナウイルスに対応可能なウイルス検出技術を確立することは、バイオテロ対策上、重要な課題である。アレナウイルスはウイルス株間の遺伝子変異が極めて多く、現在まで新種、新型のアレナウイルスを漏れなく検出可能なPCR法は開発されていない。ルジヨ

ウイルスは、同じ旧世界アレナウイルスであるラッサウイルスとも遺伝的、血清学的にもかなり異なるため、ウイルス発生時には同定に時間がかかっている。分離同定された新興アレナウイルスに関しては、その都度新規ウイルス検出法や血清診断法が整備されている。このため、新興アレナウイルス発生時にヒトや宿主動物の疫学的解析ができず、根本的な対応ができていない。バイオテロに新興アレナウイルスが使用されると、原因が特定できない可能性が高い。本研究では、新興アレナウイルスも検出可能な手法を開発することを目的とする。平成23年度はアレナウイルス間で広く保存されているN蛋白質領域のペプチド抗体を作製し、各種アレナウイルスのリコンビナントNPを用いて、交差反応性を明らかにした。平成24年度は、作製した抗体により、新種のアレナウイルスである、ルジョウイルス、ルナウイルスが検出できるか検討した。平成25年度は海外の感染症研究機関との共同研究によりラッサウイルスに抗原性の近縁なモペイアウイルス(MOPV)、モバラウイルス(MOBV)および、フニンウイルスの弱毒生ワクチン株であるCandid#1を入手し、作製した抗体がウイルスそのもの(Authenticウイルス抗原)に反応するか検討した。また、免疫に用いる抗原の改良を行ない、すべてのアレナウイルスを検出するための抗体作製について検討した。

B 研究方法

アレナウイルス NP の高度保存領域のペプチド合成と抗ペプチド血清の作製：

平成 23、24 年度の研究により、アレナウイルス NP の cap-binding 領域の高度保存領域である、アミノ酸 298-311 位と 311-324 位の 2 種のペプチドに対する、ウサギ抗ペプチド抗体を作製した。(図 1) 本領域はウイルス増殖における NP の機能に必須の領域であることから、未知のアレナウイルスにおいても保存されている可能性が高い。

組換えバキュロウイルスを用いた各種アレナウイルス NP 抗原の調製：

旧世界アレナウイルスのラッサウイルス(LASV)、ルジョウイルス(LUJV)、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)に加え、2011年ザンビアにおいて分離されたルナウイルス(LUNV)の組換え NP をバキュロウイルス発現システムで調製した。新世界アレナウイルスの南米出血熱の原因ウイルスであるフニンウイルス(JUNV)、ガナリトウイルス(GTOV)、サビアウイルス(SABV)、マチュポウイルス(MACV)、チャパレウイルス(CHPV)の組換え NP も同様に調製した。陰性コントロール抗原として組換え蛋白質を発現しないバキュロウイルス(P)を用いて組換え NP と同様の手法で調製した(図 2)。これらの抗原を用いて ELISA を行ない、抗体との反応性を解析した。

Authentic ウイルス抗原の調製

抗 peptide 311-324 抗体が authentic ウイルス抗原に反応するかどうか検討するため、

以下のアレナウイルスを入手し、ウイルス抗原を調製した。

モペイウイルス(MOPV):モザンビーク(1977年)、およびジンバブエ(1981年)で、野ネズミの一種(*Mastomys*)から分離されたアレナウイルス。ヒト抗体陽性例が報告されているが、このウイルスによるヒトの感染症は報告が無く、ヒトへの病原性は無いと考えられている。BSL3。

モバラウイルス(MOBV): 1983年に中央アフリカ共和国で、野ネズミ(*Praomys*と*Mastomys*)から分離されたアレナウイルス。ラッサウイルスやモペイウイルスと血清学的に交叉する。ウイルス学的性状もこれらのウイルスと類似する。BSL3。

Candid#1:弱毒化フニンウイルス(生ワクチン株)。フニンウイルスはBSL4に分類されるが、Candid#1はヒトに発病させるおそれほとんどないとして、平成25年3月7日付で病原体管理規制の対象から除外。BSL2。

LCMV WE株: LCMVプロトタイプの一つ。BSL2。

MOPV、MOBV、Candid#1をVeroE6細胞に感染(MOI=0.01)させ、4日後(モペイウイルス、モバラウイルス)あるいは、7日後(Candid#1)、感染細胞を1%NP40/PBSに懸濁し、上清を回収、ウイルス抗原とした。同様にLCMV(WE株)をVero E6に感染(MOI=0.1)させ、3日後感染細胞を1%NP40/PBSに懸濁し、上清を回収、ウイルス抗原とした。

C 結果

ペプチド抗体と各種アレナウイルス NP との反応性

ラッサウイルス NP のアミノ酸 297-311 位および、311-324 位のペプチドをウサギに免疫して得られた血清を用いて、旧世界アレナウイルスの LUNV、LASV、LUJV、LCMV、新世界アレナウイルスの南米出血熱の原因ウイルスである JUNV、GTOV、SABV、MACV、CHPV のリコンビナント NP との反応性を ELISA で調べた(図 3)。抗 peptide 297-311 抗体は ELISA で反応が弱かった。一方、抗 peptide 311-324 抗体は、LCMV-NP 以外のアレナウイルス NP に強く反応し、新種の旧世界アレナウイルスであるルナウイルスにも強く反応した。peptide 311-324 のアミノ酸配列を比較すると ${}_{311}\text{CLSGDGWPYIASRT}{}_{324}$ の 322 位の S が LCMV だけ C であることから、322 位のアミノ酸が抗 peptide 311-324 抗体との反応に重要であると考えられた(図 1)。

Authentic ウイルス抗原との反応性

平成 23,24 年度の研究はウイルス抗原としてリコンビナント NP を用いて、抗体の反応性を検討してきた。平成 25 年度はラッサウイルスに抗原性の近縁な MOPV、MOBV および、フニンウイルス弱毒生ワクチン株 Candid#1 のウイルス抗原を調製し、peptide 311-324 抗体との反応性を ELISA で検討した。MOPV、MPBV に対する陽性コントロールはウサギ抗 Luna ウイルス NP 血清を用い、Candid#1、LCMV に対する陽性コントロールとしてそれぞれのウイルスのリコンビナント NP で免疫したウサギ抗血清を用いた。peptide

311-324 抗体は、ウサギ抗血清を用いた場合よりも O.D. 値は低いが、candid#1, MOPV, MOBV に反応した (図 4)。

次に、ウイルス抗原を用いてウエスタンブロットによる peptide 311-324 抗体の反応性を検討した。ELISA と同様、candid#1, MOPV, MOBV に反応した。これらの結果はリコンビナント NP を用いた ELISA の結果と一致した。しかし、MOBV に対する反応は、Candid#1 および MOPV に比較して弱く、LCMV には全く反応しなかった。アミノ酸配列の比較から、MOBV と LCMV では本ペプチド領域のアミノ酸 322 位が Cys であることが抗体の反応性に影響していると考えられた。

アレナウイルスの GP-2 領域のペプチド

アレナウイルスの GP-2 にはすべてのアレナウイルスで保存されている領域がある (図 6)。この部分のペプチド CNYSKFWYLEHAK を合成し、これに対するウサギ抗体を作製した。これを用いてアレナウイルス抗原を検出できるか検討した。ELISA、ウエスタンブロットともにこの抗体は MOPV に強く反応し、他のウイルスにはほとんど反応しなかった (図 7)。

D 考察

現在まで、新興アレナウイルスのリコンビナントタンパク質等を用いて血清診断、病原診断法が開発されているが、旧世界、新世界アレナウイルスともを広く検出可能な抗体は無い。

本研究では、高度にアレナウイルス間で保存された領域のペプチドの抗血清を作製し、各種アレナウイルスとの反応性を解析した。抗 peptide 311-324 抗体は、リコンビナント NP を抗原とした検討では、LCMV を除く全ての出血熱原因アレナウイルス及び、2011 年に発見された新種の旧世界アレナウイルスであるルナウイルスにも強く反応した。また、Authentic ウイルス抗原を用いた検討でも、このペプチド抗体は旧世界アレナウイルスである MOPV, MOBV および、新世界アレナウイルスである Candid#1 に反応することが明らかになった。一方、GP-2 ペプチドに対する抗体は MOPV に反応したが、Candid#1, MOBV に反応しなかった。アレナウイルスを広く検出するためには、免疫に用いる GP-2 ペプチド配列の改良が必要である。LCMV に対する反応性に関して課題は残るが、NP の peptide 311-324 位を標的とした抗体は、ラッサウイルス、フニンウイルス等、バイオテロに使用される可能性があるアレナウイルスをもれなく検出できると期待できる。

今後、海外の BSL4 施設を有する感染症研究機関との共同研究により、ラッサウイルス、フニンウイルス等、アレナウイルスそのものを使った、抗体の反応性の検討を行う必要が有る。

E 結論

(1) アレナウイルスの NP に高度に保存される部位のペプチドに対する抗体 (抗 peptide 311-324 抗体) は LCMV-NP 以外の

アレナウイルスのリコンビナント NP に強く反応し、新種のアレナウイルスであるルジヨウイルス、ルナウイルスにも強く反応することが明らかになった。

(2) Authentic ウイルス抗原を用いた検討でも、抗 peptide 311-324 抗体旧世界アレナウイルスである MOPV, MOBV および、新世界アレナウイルスである Candid#1 に反応することが明らかになった。NP の本領域を標的とした抗体は、ラッサウイルス、フニンウイルス等、バイオテロに使用される可能性があるアレナウイルスをもれなく検出できると期待できる。

(3) LCMV を含むすべてのアレナウイルスに反応する抗体を作製するため、新たに GP-2 ペプチドに対する抗体を調製した。しかし Candid#1、MOBV に反応しなかったため、今後は免疫に用いる GP-2 ペプチド配列の改良が必要である。

F 研究発表

1 論文発表

- 1) Sakai K, Yoshikawa T, Seki F, Fukushi S, Tahara M, Nagata N, Ami Y, Mizutani T, Kurane I, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Komase K, Morikawa S, Takeda M. Canine distemper virus associated with a lethal outbreak in monkeys can readily adapt to use human receptors. *J Virol.* 87(12):7170-7175. 2013.
- 2) Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, Ishido A, Shigeoka T, Tominaga T, Kamei T, Honda M, Ninomiya D, Sakai T, Senba T,

Kaneyuki S, Sakaguchi S, Satoh A, Hosokawa T, Kawabe Y, Kurihara S, Izumikawa K, Kohno S, Azuma T, Suemori K, Yasukawa M, Mizutani T, Omatsu T, Katayama Y, Miyahara M, Ijuin M, Doi K, Okuda M, Umeki K, Saito T, Fukushima K, Nakajima K, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Fukuma A, Ogata M, Shimojima M, Nakajima N, Nagata N, Katano H, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Yamagishi T, Oishi K, Kurane I, Morikawa S, Saijo M. The First Identification and Retrospective Study of Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome in Japan. *J Infect Dis.* Dec 12. 2013.

3) Arai S, Nguyen ST, Boldgiv B, Fukui D, Araki K, Dang CN, Ohdachi SD, Nguyen NX, Pham TD, Boldbaatar B, Satoh H, Yoshikawa Y, Morikawa S, Tanaka-Taya K, Yanagihara R, Oishi K. Novel Bat-borne Hantavirus, Vietnam. *Emerg Infect Dis.* 2013 Jul;19(7):1159-61.

4) Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzuki Y, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Fukushi S, Mizutani T, Yoshikawa T, Otsuki N, Kurane I, Komase K, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Takeda M, Morikawa S. Lethal Canine Distemper Virus Outbreak in Cynomolgus Monkeys in Japan in 2008. *J Virol.* 2013, 87(2): 1105-1114

2 学会発表

- 1) 吉河智城、福士秀悦、谷英樹、宇田晶彦、谷口怜、福間藍子、前田健、高橋徹、森川茂、下島昌幸、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の確定診断に使用されるコンベンショナル PCR の評価、及びリアルタイム定量 PCR 戸の比較 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日から 12 日、神戸
- 2) 福間藍子、福士秀悦、谷英樹、吉河智城、谷口怜、下島昌幸、森川茂、前田健、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の血清学的診断法の開発 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日から 12 日、神戸
- 3) 長谷川秀樹、亀井敏昭、高橋徹、鈴木忠樹、片野晴隆、中島典子、福士秀悦、下島昌幸、前田健、水谷哲也、森川茂、西條政幸 日本国内で発生した重症熱性血小板減少症候群の 1 剖検例 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日から 12 日、神戸
- 4) 西條政幸、高橋徹、前田健、水谷哲也、大松勉、吉河智城、谷英樹、福士秀悦、下島昌幸、福間藍子、緒方もも子、鈴木忠樹、中島典子、片野晴隆、永田典代、長谷川秀樹、山岸拓也、倉根一郎、森川茂 後方視的に重症熱性血小板減少症候群と診断された 11 名のウイルス学的・臨床的・疫学的研究 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日から 12 日、神戸
- 5) 森川茂、木村昌伸、福士秀悦、福間藍子、加来義浩、朴ウンシル、谷英樹、吉河智城、井上智、今岡浩一、下島昌幸、西條政幸、前田健 SFTS ウイルス抗体陽性動物の調査 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日から 12 日、神戸
- 6) 谷口怜、福士秀悦、Masangkay Joseoh、渡辺俊平、大松勉、下田宙、前田健、福間藍子、吉河智城、谷英樹、下島昌幸、西條政幸、明石博臣、吉川泰弘、久和茂、森川茂 フィリピンのコウモリからの重症熱性血小板減少症候群ウイルスに反応する抗体の検出 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日から 12 日、神戸
- 7) 宇田晶彦、福士秀悦、加来義浩、吉河智城、下島昌幸、新倉綾、井上智、安藤秀二、前田健、西條政幸、森川茂 マダニからの SFTS ウイルス遺伝子の検出 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日から 12 日、神戸
- 8) 下島昌幸、福士秀悦、谷英樹、吉河智城、福間藍子、谷口怜、前田健、高橋徹、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群ウイルスに対する ribavirin の in vitro 増殖抑制効果 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日から 12 日、神戸
- 9) 新倉綾、福士秀悦、森川茂、山田靖子 リフトバレー熱ウイルス L 蛋白のポリメラーゼ機能における C 末端領域の重要性 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日から 12 日、神戸
- 10) 福士秀悦、谷英樹、吉河智城、谷口怜、福間藍子、緒方もも子、下島昌幸、森川

茂、西條政幸 ナイジェリアにおけるリ
フトバレー熱の血清疫学 第 61 回日本
ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10
日から 12 日、神戸

11) 谷英樹、下島昌幸、福間藍子、谷口怜、
吉河智城、福土秀悦、森川茂、前田健、
高橋徹、西條政幸 重症熱性血小板減少
症候群ウイルス GP を外套したシュード
タイプ VSV の作製 第 61 回日本ウイルス
学会学術集会、2013 年 11 月 10 日から 12
日、神戸

12) 高橋徹、前田健、亀井敏昭、水谷哲也、
下島昌幸、福土秀悦、谷英樹、吉河智城、
森川茂、長谷川秀樹、中島典子、鈴木忠
樹、永田典代、片野晴隆、山岸拓也、大
石和徳、西條政幸 重症熱性血小板減少
症候群 (SFTS) の日本における初症例
第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013
年 11 月 10 日から 12 日、神戸

G 知的財産権の出願・登録状況

現在出願予定はない。

図1 アレナウイルスの高度保存領域と合成ペプチド

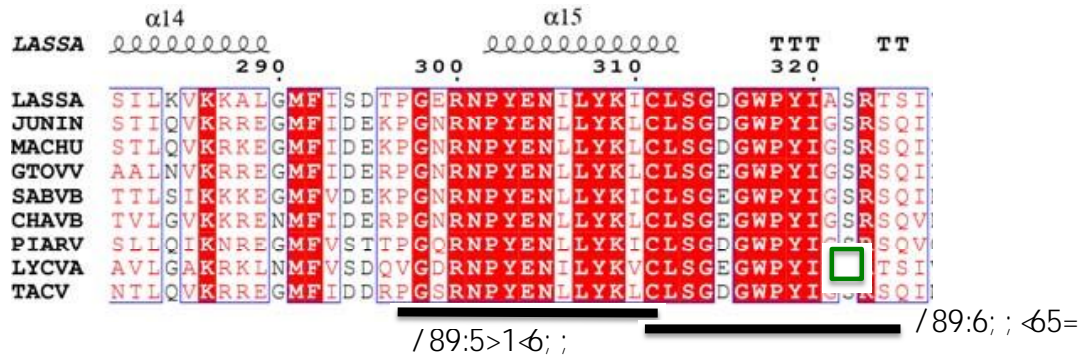


図2 組換えバキュロウイルスを用いた各種アレナウイルス NP 抗原の調製

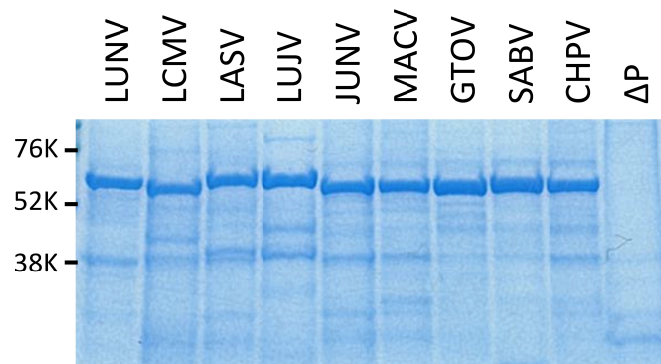


図3) アレナウイルス高度保存領域ペプチド抗体による ELISA

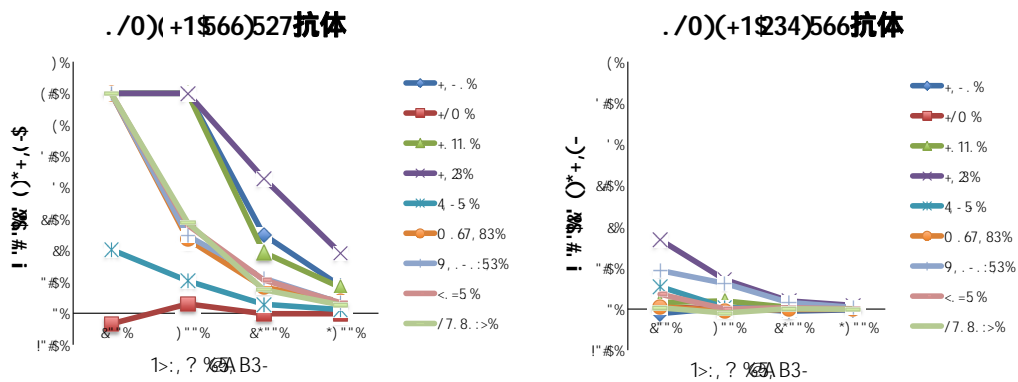


図4 ELISAによるペプチド抗体の authentic ウイルス抗原との反応

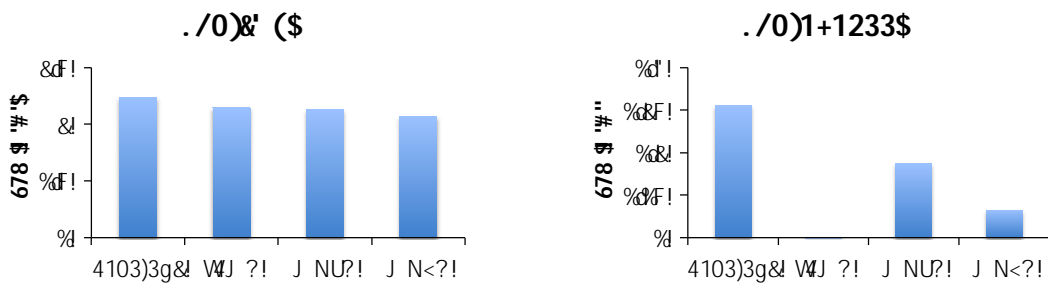


図5 ウェスタンブロッティングによるペプチド抗体の authentic ウイルス抗原との反応

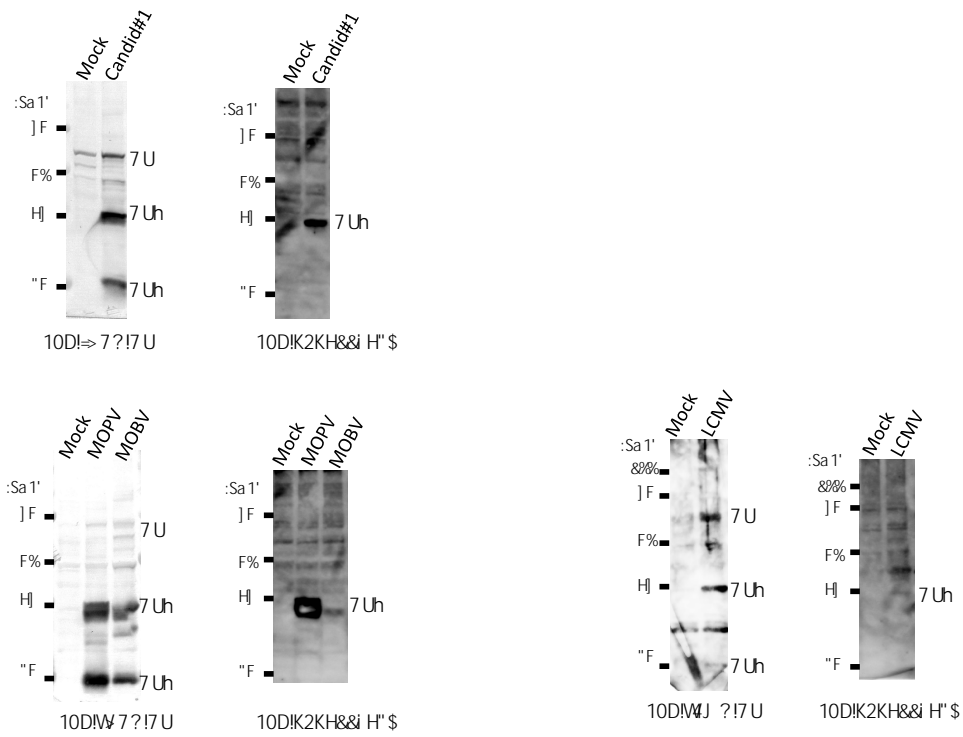


図6 アレナウイルスの GP-2 で保存されている領域

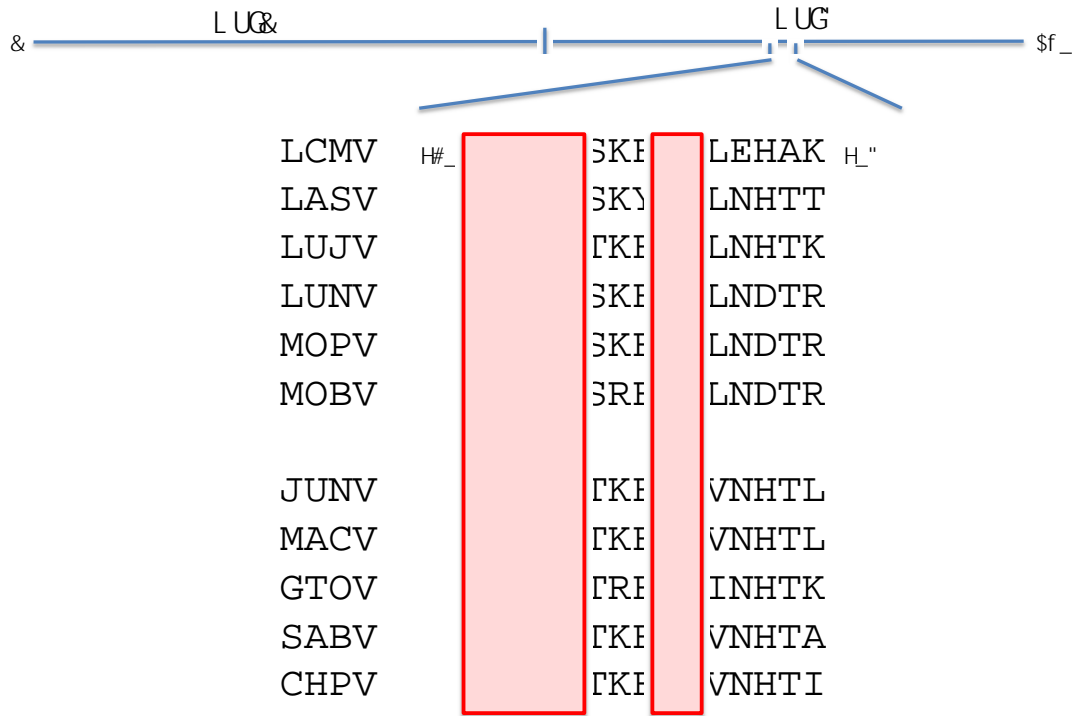
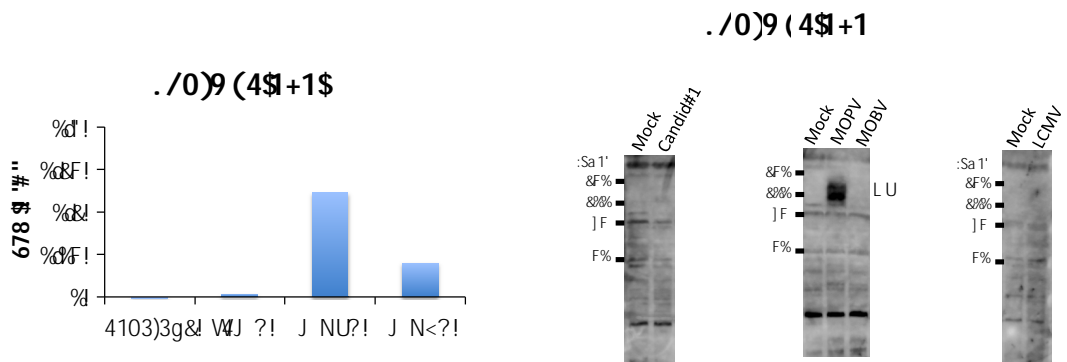


図7 アレナウイルスの GP-2 ペプチド抗体を用いた ELISA (左図) およびウエスタンブロッティング (右図)



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）
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と標準化に関する研究
分担研究報告書

炭疽に対する迅速検査、消毒、その標準化等に関する研究

研究分担者：井上 智 国立感染症研究所獣医科学部、室長
協力研究者：奥谷晶子 国立感染症研究所獣医科学部、主任研究官

研究要旨：

生物テロで利用される可能性のある炭疽菌の治療薬は、シプロフロキサシンおよびドキシサイクリンなどの抗生剤が使用可能であるが、人為的な薬剤耐性菌の出現に対する備えのため、新たな作用機序をもつ抗菌物質の探索が重要である。また、現在炭疽菌芽胞の除菌に用いられる化学的薬剤は、環境負荷や人体に対する毒性が強いものが多いためこれらに代わる新たな除菌剤の探索も意義があると考えられる。生体由来や食品由来の抗菌物質の中で炭疽菌の「芽胞」「栄養型」「莢膜」のそれぞれの菌形態に効果のある抗菌物質の候補として今回は Anti Microbial Peptides(抗菌性ペプチド)の抗菌効果を検証した。抗菌性ペプチドは炭疽抵抗性動物である豚で複数報告されている。同じく抵抗性を犬由来 AMP も検討した。炭疽感受性動物である牛、山羊、羊由来 AMP とヒト、マウス由来の AMP を人工合成してそれらの抗菌効果を検討したところ、豚由来の Protegrin-1 が最も高い抗菌効果を示した。このような抗菌効果の差は立体構造の差によるものと考えられるが、より詳細な検証が今後の検討課題である。

A. 研究目的

これまで炭疽治療に使用されてきた抗生物質は効果が高く、これまでにペニシリン系以外の薬剤耐性菌の出現は報告されていない。しかしながら、炭疽菌は生物兵器として使用された歴史があり、今後人為的に薬剤耐性が付加されたもの使用される可能性は否定できない。そのため、既存の抗菌剤ではない新たな治療薬の探索は必要であると思われる。また現在炭疽菌の殺菌・消毒に用いられる化学剤(次亜塩素酸ナトリウム、二酸化塩素、過酢酸など)は環境負荷が高く、ヒトや動物への発がん性を持つものもあった課題がある。そこで、今回我々は従来の抗菌剤や化学物質とは異なる抗菌物質として有効かどうかの検討を行うことを目的として食品由来の抗菌物質であるカテキン類、フラノン類および生体由来・短鎖抗菌性ペプチド(AMP)の抗菌効果の検証を行い、既存の薬剤とは異なる作用機序をもつ新たな抗菌活性物質としての可能性について検討を行った。

B. 研究方法

今年度は短鎖抗菌性ペプチド AMP が、炭疽菌

の「芽胞」「栄養型」および「莢膜型」細胞への抗菌効果を示すかについて検証を行った。AMPはその立体構造から α -helix 型、 β -sheet 型、Extended 型に大別される。また、炭疽抵抗性あるいは炭疽感受性動物由来のペプチドが各種同定されているため、全てを網羅するようペプチドを選択して人工合成を行った(表 1)。炭疽菌への抗菌効果は RDA (Radial Diffusion Assay) アッセイで阻止円が形成された最少濃度を MEC(Minimum Effective Concentration)値として測定した(図 1)。

「芽胞」と「栄養型」の比較には 34F2 株(pXO1+, pXO2-)を用いた。「芽胞」は一晩 37 好気培養した LB 培地を 4℃で 1 週間保存したものを冷 MilliQ で洗浄後回収し芽胞染色で一視野あたり 70%以上芽胞が認められたものを用いた。

一方、「莢膜」発現の有無の比較には Davis 株(pXO1-, pXO2+)を用いた。莢膜は、0.7%炭酸水素ナトリウム溶液を添加した Nutrient Agar を嫌気培養して発現させた。コントロールには Nutrient Agar のみで好気培養したものを用いた。

C. 研究結果

RDA アッセイの結果、「芽胞」「栄養型」および「莢膜型」細胞に対して、AMP の構造および由来動物の違いにより抗菌効果に差がみられた(表2 および 3)。

豚由来の Protegrin-1 は「栄養型」よりも「芽胞」で MEC 値が低かった。それ以外の AMP では「芽胞」と「栄養型」と同等の MEC 値(牛由来、羊由来、ヒト由来 AMP)を示すものと「芽胞」の方が MEC 値が2倍から4倍以上高いもの(犬由来および Protegrin-1 以外の豚由来 AMP)があった(表2)。今回は preliminary 段階の実験であったので今後は統計処理が可能な実験系で再現性を確認する予定である。

炭疽菌の「莢膜」は炭酸水素イオンを培地に加えた嫌気培養条件下で発現させて、RDA アッセイによる MEC 値を測定した。その結果、PR-39 では莢膜発現炭疽菌に対する MEC 値が2倍高くなったものの、他の豚由来 AMP では差は認められなかった(表3)。

今回は、2種類の菌株を個々の実験で用いた結果であるため、菌株の違いによる影響について評価が不十分であるため、今後は菌株数を増やして抗菌効果を測定する予定である。

D. 結論

炭疽抵抗性動物である豚由来の AMP の中でも Protegrin-1 の抗菌効果が高かった。一方で感受性動物である羊由来の SMAP29 でも高い抗菌効果がみられたことから、動物種差よりも立体構造などの AMP の化学的性質そのものが抗菌作用機能に関与している可能性が高いと思われる。今後の検討課題としては、

- 1) AMP の立体構造による作用機序の詳細の検討
- 2) 「芽胞」「莢膜」の構成蛋白質あるいはペプチド発現量を定量化した上での抗菌効果の再現性の検討
などがあげられる。

また、フラノン類やカテキン類などの食品由来の抗菌物質の炭疽菌に対する抗菌効果も検討し、従来とは異なる抗菌効果をもつ生物由来物質の抗菌剤としての可能性や選択肢を探索していく予定である。

E. 研究発表

なし

F. 健康危険情報

特になし

図1 Radial Diffusion Assay の概要。二層化ゲルを用いた各種 AMP の炭疽菌に対する MEC 値測定の流れ。

RDA radial diffusion assays

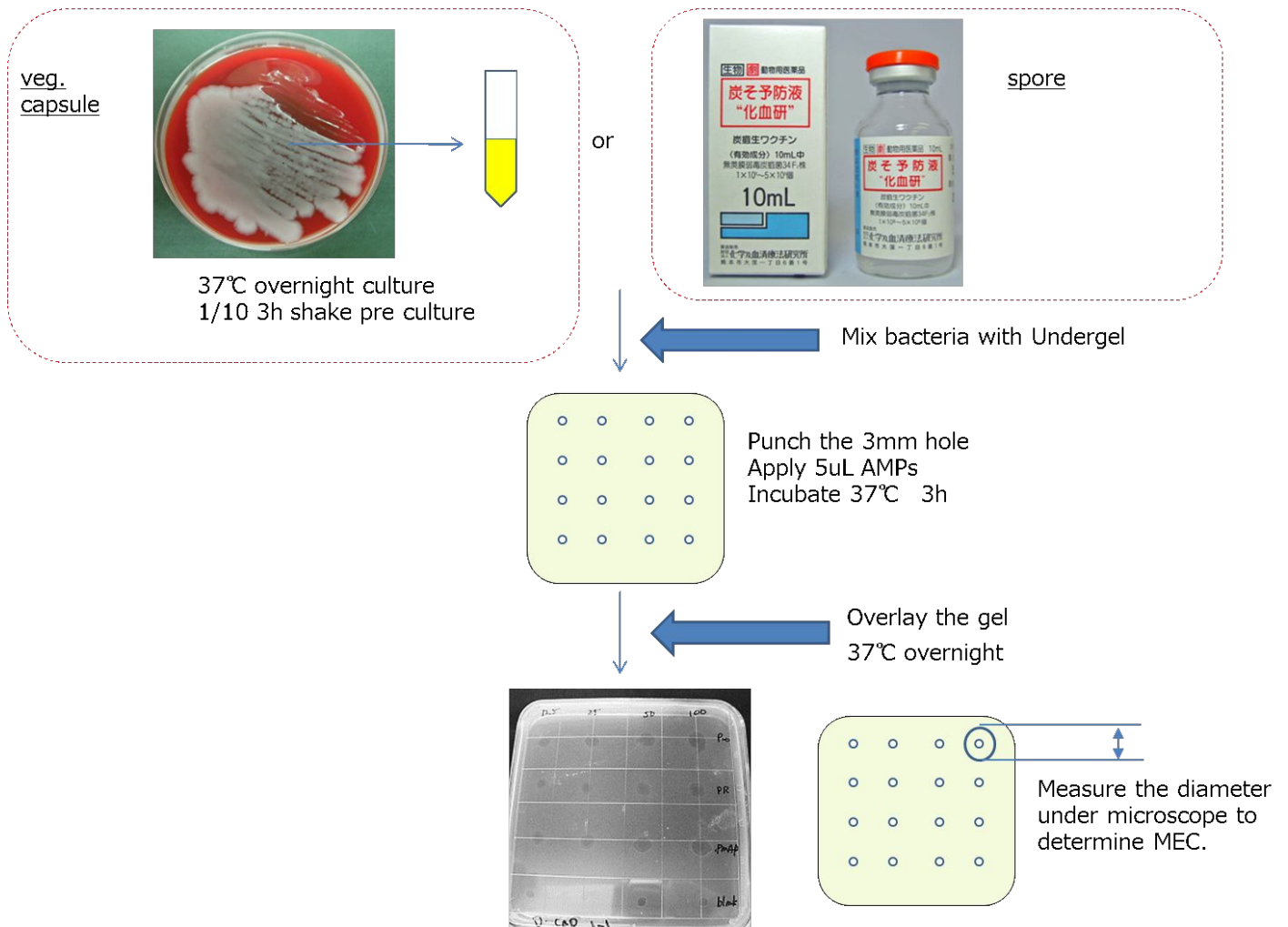


表 1 Antimicrobial peptides used in this study

AMP name	Peptide sequence	Conformational type
swine Protegrin-1 (18a.a.)	RGGRLCYCRRRFCVVCVGR	Two-disulfide bridged (beta sheet)
swine PR-39 (39 a.a.)	RRRPRPPYLPRPRPPFFPPRLPPRIIPPGFPPRFPPRFPP	Linear proline rich
swine PMAP36 (36 a.a.)	GRFRRLRKKTRKRLKKIGKVLKWIPPVGSIPLGC	Alpha helix
cow BMAP27 (27a.a.)	GRFKRFRKKFKKLFKKLSPVIPLLHL	Alpha helix
sheep SMAP29 (29a.a.)	RGLRRLGRKIAHGPKKYGPTVLRIRIA	Alpha helix
human LL-37 (37a.a.)	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES	Alpha helix
mouse CRAMP (33a.a.)	GLLRKGGEKIGEKLKKIGQKIKNFFQKLVQPE	Alpha helix
dog K9CATH (38a.a.)	RLKELITTGGQKIGEKIRRIGQRIKDFKLNLPREEKS	Alpha helix

表 2 立体構造および由来動物別の AMP の炭疽菌 34F2 株「芽胞」および「栄養型」細胞
 に対する MEC 値測定結果

Animal AMPs MEC (minimum effective concentration) test for *B. anthracis* vegetative and spore

	(uM)	
	vegetative	spore
swine Protegrin-1 (β sheet)	1.5	<0.75
swine PR-39 (Extended sheet)	12.5	>25
swine PMAP36 (α -helical)	3.0	6.25
cow BMAP27 (α -helical)	6.25	6.25
sheep SMAP29 (α -helical)	1.5	1.5
human LL-37 (α -helical)	6.25	6.25
mouse CRAMP (α -helical)	6	25
dog K9CATH(α -helical)	6.25	>25

表3 豚由来 AMP の炭疽菌 Davis 株「莢膜」発現細胞に対する MEC 値の測定結果

Swine different conformational AMPs MEC for *B. anthracis* capsule +/- cells

	capsule- Davis	capsule+ Davis	(μ M)
swine Protegrin-1	<0.75	<0.75	
swine PR-39	1.5	3	
swine PMAP36	0.75	0.75	

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)

「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と標準化に関する研究」
分担研究報告書

「ボツリヌス菌・毒素の検査法の改良」

研究分担者 見理 剛 国立感染症研究所 細菌第二部

要旨:ボツリヌス毒素 (BoNT) を迅速簡便に検出するために、SNAP25 と synaptobrevin を連結した組換えタンパク質を作製した。これを使用した検出法では、全ての血清型の BoNT の検出が可能であり、精製 BoNT の場合 A 型、E 型で数マウス LD₅₀/ml、E 型、F 型で数十マウス LD₅₀/ml 程度の量を 3 時間以内に検出することができた。この方法は精製 BoNT に対してはマウス法に匹敵する検出感度を示すが、検体に夾雑物が存在する場合、検出感度が大きく低下するので、この点の改良が必要である。

A. 研究の目的

ボツリヌス神経毒素 (BoNT : *Botulinum neurotoxin*) は、自然界に存在する最強のタンパク質毒素であり、バイオテロで使用されうる物質として警戒されている。BoNT は、動物の神経細胞に取り込まれて SNARE と呼ばれる 3 種のタンパク質を切断する。SNARE タンパク質が切断されると神経細胞は神経伝達物質を放出できなくなり、神経遮断による致死的な麻痺症状が起こる。BoNT には A から G の 7 種の血清型が知られており、作用する SNARE タンパク質は異なっている。A、C、E 型の BoNT は、SNAP25 と呼ばれる SNARE を切断し、B、D、F、G 型は synaptobrevin を切断

する。C 型の BoNT は syntaxin も切断する。

BoNT の簡便、迅速検出法の整備は、バイオテロ対策として有効な手段であると考えられる。現在、最も信頼される BoNT 検出法は、マウスを使用する方法であり、検体をマウスに注射し、BoNT による麻痺症状が出現するかを観察する。検出感度は 1 マウス LD₅₀/ml 程度 (ヒトの致死量の約数万分の 1 : 精製した A 型 BoNT の場合、約 5~100 pg) であり、数時間から 1 日で検査できる。しかし、実験動物設備が必要であり、実施できる環境には制限がある。また、実験動物削減の観点からも、マウスを使用しない検査法が求められている。

本研究計画では、マウスを使用しない BoNT 検出法の確立を目指して、BoNT のエンドペプチダーゼ活性を簡便に検出する方法を検討した。

B. 研究方法

1) BoNT の活性を検出するために、SNARE の組換えタンパク質を生産し、BoNT 検出用の基質とした。2) 組換えタンパク質基質を利用した反応系で、精製 BoNT の検出感度を検討した。3) 実際に検査法として有効か検証した。

C. 研究結果

1) SNAP25 と synaptobrevin を含む基質タンパク質のデザインと生産

SNAP25 と synaptobrevin は BoNT による切断が詳しく解析されているマウスのものを利用した。マウスの SNAP25 は 206 個、synaptobrevin は 116 個のアミノ酸からなるが、SNAP25 は 71- 206 番目の配列部分、synaptobrevin は 31- 92 番目の部分を使用した。これらに対応する cDNA をタカラバイオ社の pCold ProS2 または、pCold GST 発現ベクターに挿入し、さらに蛍光タンパク質 EYFP の遺伝子を連結した。(図 1. A.) これらが大腸菌に導入して、組換え基質タンパク質 ProS2-HS と GST-HS を得た(図 1. B.)

2) A、B、E、F 型の BoNT による基質タンパク質の切断実験

ProS2-HS と GST-HS について、A、B、E、F 型の精製 BoNT による切断実験を行った。毒素量は 10^2 および 10^3 マウ

ス LD₅₀/ml の濃度で検討した。基質と BoNT の反応条件は昨年度の本研究の報告書と同条件にした(反応液組成: 20 mM HEPES-HCl pH 7.0, 2.5 mM DTT, 20 μM ZnCl₂, 0.2 % ゼラチン)(基質タンパク質濃度 5 μg/ml)(反応時間 37、2 時間)。基質切断の確認はアジレント・テクノロジー社の Agilent 2100 バイオアナライザーと High Sensitivity Protein 250 キットで行った。その結果、ProS2-HS と GST-HS は、切断産物のサイズから、いずれの型の BoNT でも、報告されている切断部位で切断がおきていると考えられた(図 2)。しかし、ProS2-HS は GST-HS に比べて、B 型の BoNT による切断パターンに乱れがあり、毒素量が 10^3 マウス LD₅₀/ml では、切断が起こっていなかった。このため、以後の実験には GST-HS を使用した。

また、C、D、G 型の BoNT については感染研で精製毒素を所持していないため、実験を実施しなかった。

3) 精製 BoNT 検出感度の測定

GST-HS を使用した検出系がどの程度の量の精製 BoNT を検出できるか、検出感度を検討した(図 3)。その結果、A 型、E 型の精製 BoNT の場合は 4 マウス LD₅₀/ml でも検出可能だった。E 型、F 型の場合は 16 マウス LD₅₀/ml 程度まで検出された。この検出に必要な時間は 3 時間程度だった。マウス法の場合、3 時間で BoNT 活性が検出されるのは、数十マウス LD₅₀/ml 以上の比較的高濃度の BoNT が接種された場合であり、GST-HS 法は精製 BoNT に対しては、マウス法に匹敵

する検出感度があると考えられた。

4) 検出系としての有効性

ボツリヌス菌の純培養液上清には、通常、数万～数十万マウス LD₅₀/ml の BoNT が含まれる。ボツリヌス菌の検査時には、マウス法によってこれらは容易に検出される。GST-HS による検出法も培養液中の BoNT を検出できるか検討した。しかし、A 型と B 型の BoNT 産生菌の培養上清について BoNT 検出を試みたところ、GST-HS 基質に分解が生じてしまい BoNT の検出が行えなかった(図 4)。これはボツリヌス菌が生産する BoNT 以外のプロテアーゼによって GST-HS 基質が壊されてしまったためと考えられた。反応液にプロテアーゼ阻害剤 (Thermo scientific 社の Halt™ Protease Inhibitor Cocktail EDTA-Free) を加える検討も行ったが、GST-HS 基質の分解を抑えることはできなかった。

D. 考察

ボツリヌス症の診断では、ボツリヌス菌や遺伝子の検出も重要な検査情報になるが、最終的な判定を下す上で最も大きな情報は BoNT 活性そのものの検出である。万が一、ボツリヌス菌、BoNT がバイオテロに使用されるよう事態が発生した場合でも同様のことが言える。BoNT 活性の検出が正確な事態把握の重要な根拠になる。

今回、全ての型の BoNT の基質になる組換えタンパク質 GST-HS を作製し、BoNT 検出系を構築した。今回デザインした方法は、精製 BoNT であればマウス

法に匹敵する感度で、迅速、簡便に BoNT を検出できた。これは、美容や医療用途で使用されている精製 BoNT 製剤の確認、検査の目的には有用なレベルだと考えられる。しかし、GST-HS 法は、マウス法では容易に検出できるボツリヌス菌培養上清中の BoNT が検出不能だった。培養上清に存在するプロテアーゼのためであり、検体中の夾雑物が大きな問題になった。マウス法の優れている点は、BoNT に対する高感受性に加えて、マウスの生理機能に大きな影響を与えない夾雑物であれば、その影響を排除して特異的に BoNT が検出されることである。

ボツリヌス症の診断では患者便や吐物、血清、食品などの検体から BoNT の検出が行われるが、バイオテロのような事例では、おそらく、さらに様々は検体から BoNT 検出が必要になる。実際に有効な BoNT 検査法の構築には、検体中の夾雑物の除去、またはその影響の排除が大きな問題点になる。マウスの体内で神経細胞内に BoNT が取り込まれるような特異性で、夾雑物中から微量な BoNT を抽出する手法と、今回作製した GST-HS 法のような簡便で高感度な方法が組み合わせられれば、マウスを使わない実用的な BoNT 検出法が実現できる。

E. 結論

SNAP25 と synaptobrevin を含む組換えタンパク質を生産し、全ての血清型の BoNT を簡便、迅速に検出できる方法をデザインした。この方法の精製 BoNT に対する検出感度は、マウス法に匹敵したが、夾雑物による影響を受けやすいので、

検体中の夾雑物の影響を除去する手段の
開発が必要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

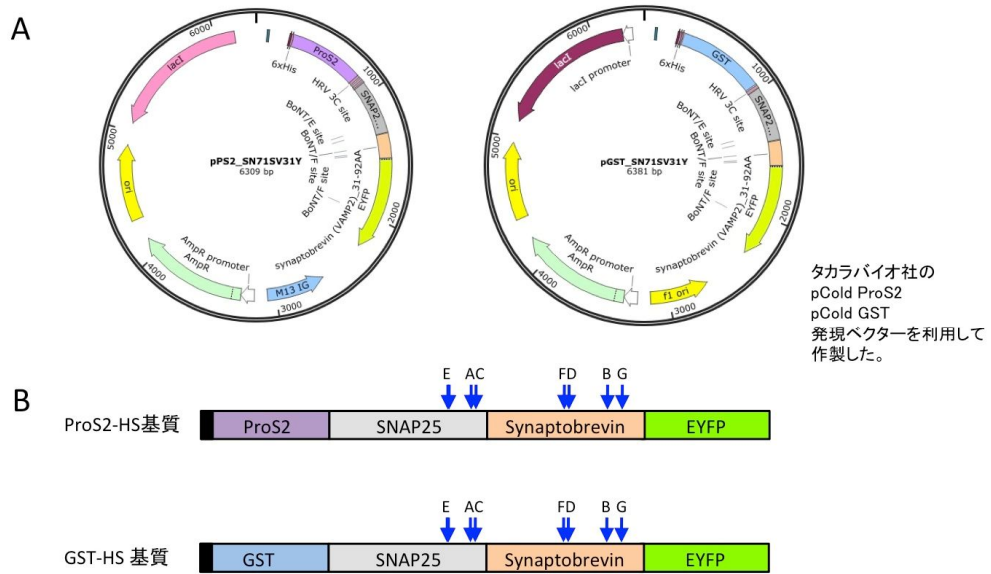
なし

2. 学会発表

なし

**H. 知的財産権の出願・登録状況（予定
を含む）**

なし



タカラバイオ社の
pCold ProS2
pCold GST
発現ベクターを利用して
作製した。

図1. A. 基質タンパク質の生産に使用した発現プラスミド
B. 発現される基質タンパク質の構造および BoNT による切断部位の模式図

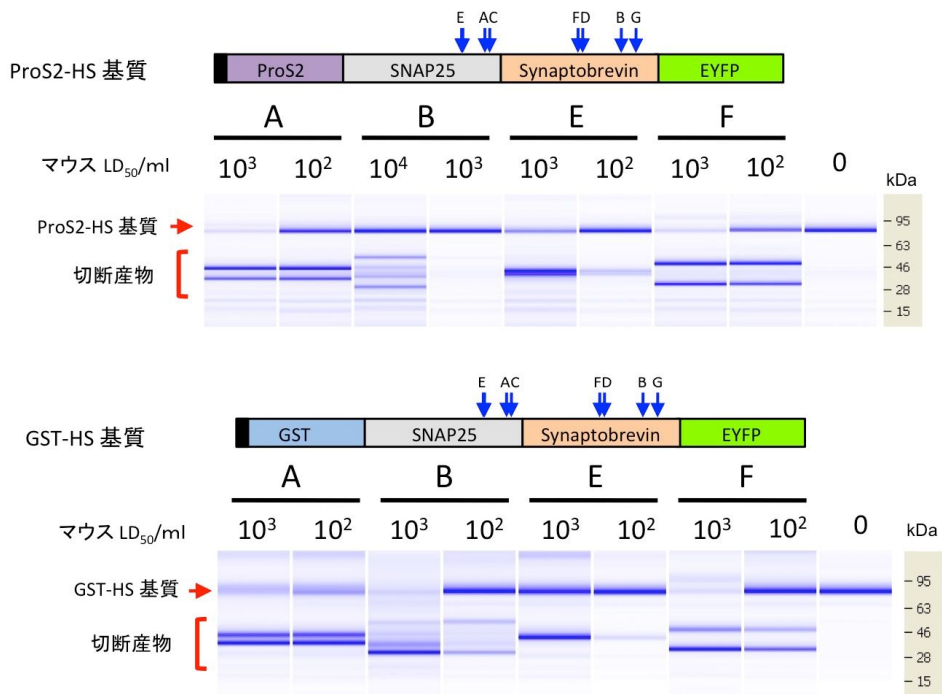
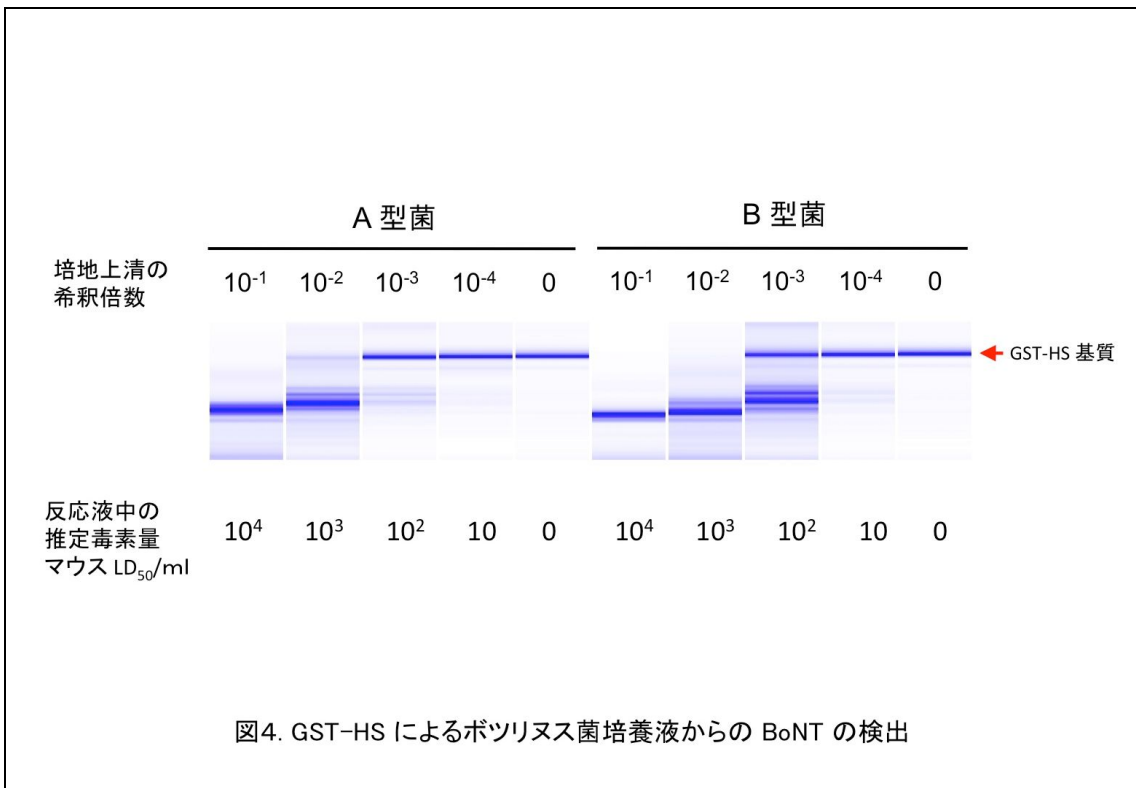
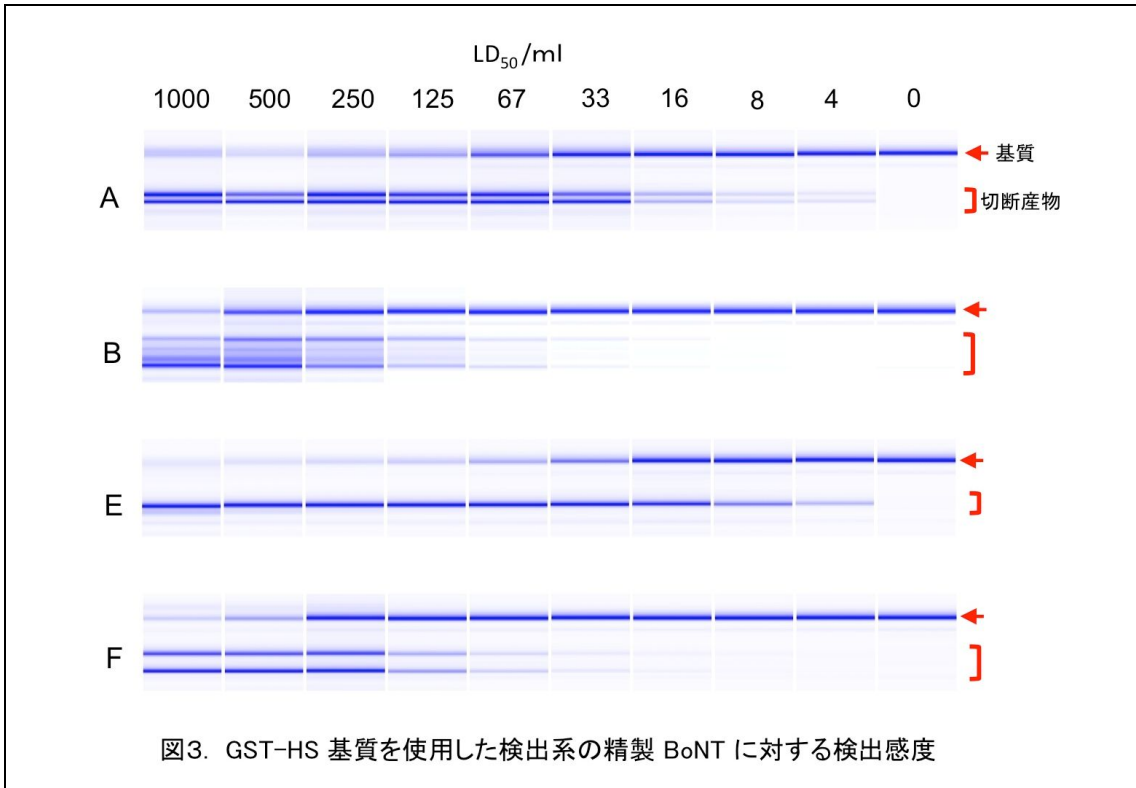


図2 BoNT (A、B、E、F 型) による組換えタンパク質基質の切断実験



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)
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と標準化に関する研究
分担研究報告書

リケッチア・コクシエラ・クラミジアの迅速検出法の開発
Q熱コクシエラ(*Coxiella burnetii*)のゲノム解析による基盤情報の整備

研究分担者	安藤 秀二	国立感染症研究所ウイルス第一部 室長
研究協力者	関塚 剛史	国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター
研究協力者	黒田 誠	国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター
研究協力者	小笠原由美子	国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター
研究協力者	安藤 匡子	国立感染症研究所ウイルス第一部
研究協力者	小川 基彦	国立感染症研究所ウイルス第一部
研究協力者	佐藤 正明	国立感染症研究所ウイルス第一部

研究要旨：従来リケッチアに分類されていた*Coxiella burnetii*は、バイオテロに使用される可能性のあるとして、常にその取扱いに注意が必要と議論される病原体である。国内で分離された株、国内の実験室に保存されていた*C. burnetii*の分子生物学的特徴を把握することは、通常の感染でないバイオテロが発生した際に、迅速にその事態を明らかにする情報となる。Prototypeの*C. burnetii* Nine Mile株の実験室における継代でLPS抗原の変化で病原性が低下した 相菌と日本で初めて確認された患者から分離されたTK-1株について、次世代シーケンサーによって全ゲノム配列を解析するとともに、公開登録されている*C. burnetii* Nine Mile株の病原性の強い相菌のゲノム情報と比較検討したところ、SNPs解析による株の分類、同一株であるか否かの判別に利用可能と考えられる複数の遺伝子領域を確認できた。

A . 研究目的

Q熱病原体*Coxiella burnetii*は、微生物学的には現在レジオネラ目に属する偏性寄生細菌であるが、歴史的に長い間、リケッチアに分類されていた。バイオテロ・エージェントとして世界的に注目され、しばしばバイオテロに使用することが企まれた経緯がある。国内での自然発生患者は少ないものの、ひとたび発生すれば、多くの偶蹄類家畜の淘汰やヒトへの感染拡大など社会的影響も大きい。国内で分離された株、国内の実験室に保存さ

れる*C. burnetii*の分子生物学的特徴を把握することは、通常の感染でないバイオテロが発生した際に迅速にその事態を明らかにする基礎情報となる。前年度、輸入症例から分離された新規リケッチアの全ゲノム解析が、株の特性を把握するために極めて有効なツールであること示されたことに続き、Q熱病原体*C. burnetii*での全ゲノム解析の有用性を検討した。

B . 研究方法

1 . *C. burnetii*株と解析DNAの調整

国内で保管されていた*C. burnetii* Nine Mile株(prototype) 相菌(in vitro継代によりLPSの相変異を起こし,病原性が減弱したもの)(以下NM-NIID)と実験室感染を除く自然発症の本邦第一例目の患者から分離されたTK-1株をBGM細胞で培養し,T25培養ボトル1本の感染細胞を解析のための出発材料とした。ほぼ100%感染した細胞を培養上清とともに回収,高速冷却遠心機により得たペレットを1mLのPBS(-)に再懸濁した。この菌液をダウンスホモジナイザーで30ストローク処理,低速遠心し,上清を回収後,その上清を再度高速冷却遠心してペレットとした。このペレットから定法によりDNAを抽出した。

2 . ゲノム解析

得られたゲノムDNAを次世代シーケンサー(イルミナ社マイシクMiSeq)を用いて解読し,レファレンス・シーケンス(*Macaca mulatta*)の配列に解読リードをマッピング,unmap readをCLC genome workbenchで*de novo*アセンブルしたところ,1 kb以上(x1000以上のcoverage)のcontigを回収した。表1に示す全ゲノム情報が公表されている*C. burnetii*株とSNPs系統樹解析を行うとともに,今回解析した2株とprototype Nine Mile I相菌(RSA493)の比較解析を行った。

3 .海外のアウトブレイクに関する情報解析

2007年から2010年にかけて,オランダにおいて,多数の偶蹄類動物の淘汰を必要とする患者数千人規模の大アウトブレイクが発生した。その後,その発生に関する詳しい解析と多くの情報が発表されており,その情報を解析することにより,日本でのQ熱の発生形態の想定とバイオテロを感知するためのファ

クターの検討を試みた。

(倫理面への配慮)

必要なし

C . 研究結果

1. *C. burnetii*のゲノム解析

次世代シーケンサーによる解析の結果,*C. burnetii* NM-NIIDおよびTK-1ともにコクシエラのゲノムサイズと同等のアセンブルが問題なく可能であった(表2)。これらの情報を登録されているNine Mile I相菌(RSA493)の完全長のゲノム配列に沿ってcontigを並び替え,比較解析を行ったところ,SNPs系統樹解析では,比較解析した3つの*C. burnetii*のゲノムは極めて近いクラスターに収束したが,同じ由来とされるNM-NIIDとI相菌(RSA493)では,112の塩基置換があり,相菌においてはpQpH1が欠落していた。TK-1は,国内で初めて自然発症者から分離された菌株であるが,Nine-Mile株と近縁であるものの,Nine-Mile株 相菌(NM-NIID)とは塩基置換数が225箇所存在した(図1,表3)。全長でみると,3つのゲノム配列は高度に保存されているものの(図2),NM-NIIDでは複数の核酸代謝系の領域が欠失していたり(図3),さらにTK-1株ではpseudogene領域の変異と欠失,prophage領域の変異も見られた。

2. アウトブレイク情報からの国内の社会的影響等の検討と解析

オランダのアウトブレイクで見えてきたQ熱の集団発生の特徴は以下のとおりである。

患者発生の前兆として山羊の流産が多発。動物や動物製品にかかわった患者が多い。(ただし,Q熱の感染源として一般的な偶蹄類等に限らない。)

職業的特徴はなし。

流産が多発した農場からの距離。

周辺環境の影響。

マダニは関与していない。

一度汚染された農場の清浄化は困難。(芽胞様構造)

D. 考察

今年度は、前年度のリケッチアにおける全ゲノム解析の有効性を踏まえ、国内で保管されている*C. burnetii*株のゲノム解読を行った。粗精製で培養細胞の共雑物が混ざっていても、*C. burnetii*の解析は十分可能であり、国内保存株の特徴を見だし、バイオテロに於ける迅速な株特定の基盤の作成が可能であることが示された。

国内保存株Nine-Mile 相菌(NM-NIID)は、国外の同一由来株とは異なる変異箇所が存在し、実際にバイオテロが発生した場合に於ける、国内保存株との差違を明確に出来ると示唆された。また、国内初の分離株TK-1は、NM-NIIDと非常に近縁であった。Nine Mile株が米国のマダニから分離されている経緯からも、TK-1株を分離した患者は国内に土着した*C. burnetii*による事例である可能性は低い。実際に、患者の渡航歴から、カナダでの偶蹄類家畜との接触がり、そこでの感染であった事が疫学データからも示唆されていたが、帰国から約2カ月経過しての発症であったため、エピソードとしては強く疑われるものの、国内での感染も明確に否定できないものであった。今回の解析結果から、やはりカナダでの感染を強く疑うものであったことが言える。

三者間の比較では、核酸代謝系の遺伝子の欠失および変異が認められ、*C. burnetii*は、偏性細胞内寄生細菌のため、核酸代謝系を欠

失しても生存は可能である事も本データから示唆される。複数の領域において、株間に変異や欠失も認められた。また一方、病原性関連領域と報告されているT4SSIは、三者間で高度に保存されていた。病原性における表現系の僅かな差異は、今回認められた変異箇所によると示唆される。

以上のことから、*C. burnetii*に関し、国内保存株のゲノムワイドな情報を蓄積することにより、バイオテロの可能性を見極めることができる可能性が示された。

また、様々な疫学情報を蓄積することにより、自然な発生か否かを判断するためには、日本国内の畜産形態を含めた総合的な情報収集が必要であることが明らかであった。

E. 結論

*C. burnetii*によるQ熱は臨床的には他の熱性疾患等との鑑別が難しく、バイオテロが想定される患者発生があった際は、国内に常在または実験室保管株であるか、海外の株であるかの鑑別できるかがテロの認知やリスク評価に重要となる。国内外の情報を蓄積することにより、より簡便で迅速な対応を可能とすることが必要と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Andoh M, Andoh R, Teramoto K, Komiyama T, Kaneshima T, Takano A, Haya-shidani H, Ando S: Survey of *Coxiella burnetii* in ticks collected from dogs in

Japan. J Vet Med Sci, 2013 August, 75 (8):1115-1117

2) Ogawa M, Uchiyama T, Satoh M, Ando S: Decontamination of mycoplasma-contaminated *Orientia tsutsugamushi* strains by repeating passages through cell cultures with antibiotics, BMC Microbiol., 13:32-, 2013

3) Sashida H, Sasaoka F, Suzuki J, Fujihara M, Nagai K, Fujita H, Kadosaka T, Ando S, Harasawa R; Two Clusters among *Mycoplasma haemomuris* Strains, Defined by the 16S-23S rRNA Intergenic Transcribed Spacer Sequences. J Vet Med Sci. 2013 May, 75(5):643-648

4) 安藤秀二, リケッチア, 平松啓一監修, 中込治, 神谷茂編集, 標準微生物学, 第12版,

2014(in press)

2. 学会発表

1) 安藤秀二, 佐藤正明, 小川基彦: 発疹熱輸入症例の現況, 第20回リケッチア研究会, 2014年1月12日, 滋賀県大津市

2) 藤田博己, 藤田信子, 安藤秀二: 国内における発疹熱リケッチアの潜在について, 第20回リケッチア研究会, 2014年1月12日, 滋賀県大津市

H. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|------|
| 1. 特許取得 | 該当なし |
| 2. 実用新案登録 | 該当なし |
| 3. その他 | 該当なし |

表1 *Coxiella burnetii*のゲノム解析状況(PATRIC)

GI ID	Strain	Origin	Disease	Status	Size	
82552	Nine Mile Phase I, RSA493	Montana, Tick, 1935	unknown	complete	1,995,281 bp	TIGR
33747	Henzerling, RSA331	Italy, human blood, 1945	Acute	complete	2,016,427 bp	TIGR
32972	Dugway, 5J108-111	Utah, Rodents blood, 1958	unknown	complete	2,158,758 bp	JGraig Venter Inst
77120	K Q154	Oregon, Human heart valve, 1976	Endocarditis	complete	2,063,100 bp	RM Lab /Integrated Genomics, Inc
10955	G Q212	Nova Scotia, Human heart valve, 1981	Endocarditis	complete	2,008,870 bp	RM Lab /Integrated Genomics, Inc
107188	MSU Goat Q177	Montana, Goat cotyledon, 1980	(Abortion)	WGS		TIGR
129292	Q321, RSA334	Central Africa, Human blood, 1949	Acute	WGS		TIGR
243852	cb109	Germany, human cardiac valve		WGS		URMITE

表2 *de novo*アッセムブルの結果

	Number of contigs	N50 (bp)	N90 (bp)	Max (bp)	total (bp)
Nine-Mile II NIID	42	99,504	25,343	230,631	1,945,990
TK-1 NIID	67	58,046	18,039	198,250	1,956,580

表3 三者間のSNP数

	Nine-Mile NIID	TK-1 NIID
RSA 493	112	209
Nine-Mile NIID		225

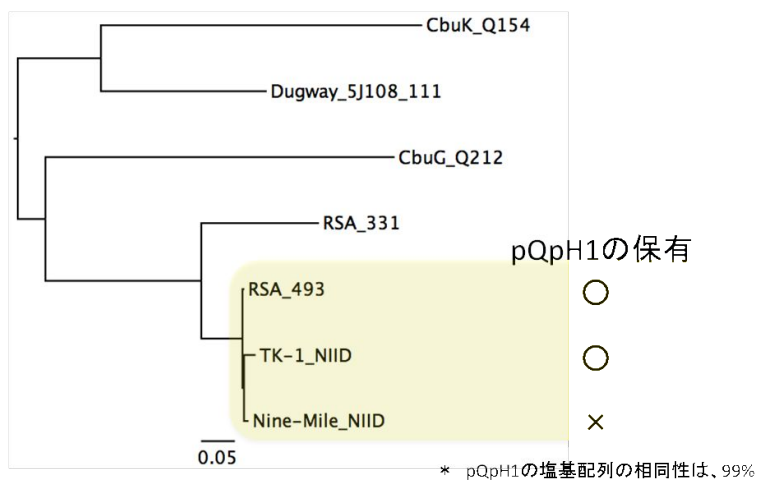


図1 SNPs 系統解析
Coxiella burnetii CbuG Q212 をreferenceにしてSNPを抽出
 Total SNPs: 10,947 SNPs

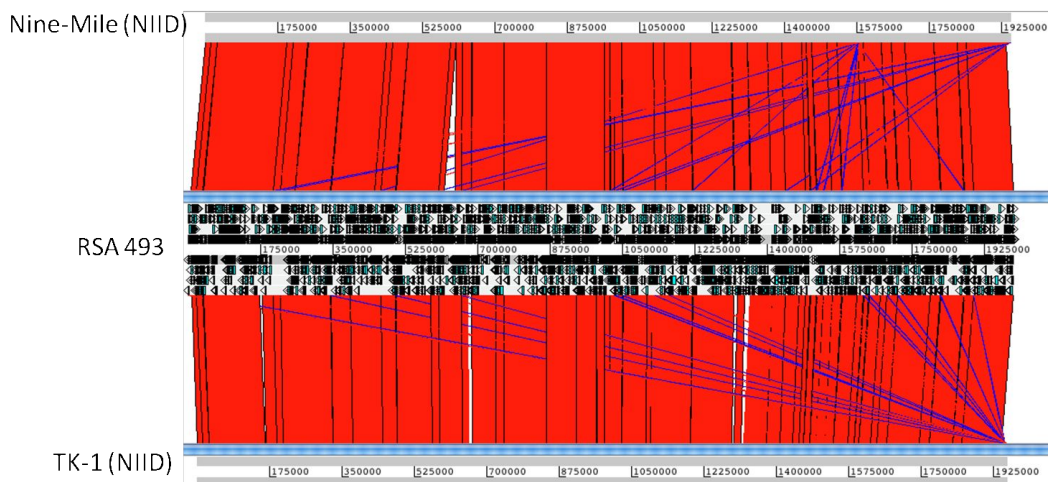


図2 ゲノム比較解析

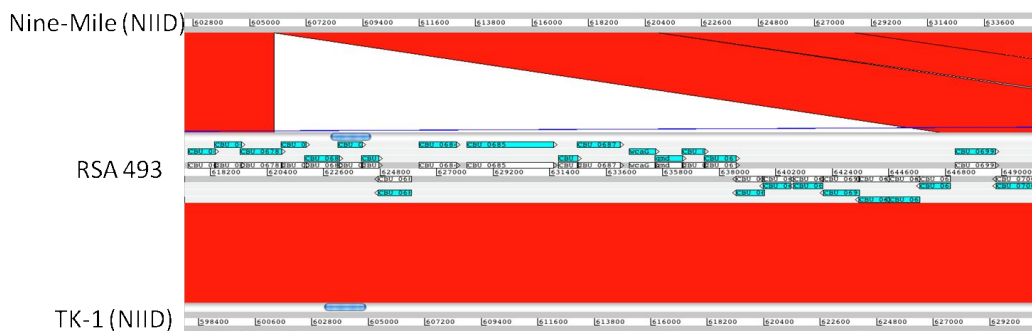


図3 ゲノム比較解析 ~Nine-Mile_NIIDで欠失していた箇所~

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）
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と標準化に関する研究
分担研究報告書

バイオテロの可能性のある真菌感染症の迅速診断法の確立
Coccidioides の LAMP 法による高感度検出系の構築

研究分担者 宮崎義継 国立感染症研究所 真菌部
研究協力者 梅山 隆 国立感染症研究所 真菌部第一室

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 (*Coccidioides immitis*, *C. posadasii*)、ヒストプラズマ (*Histoplasma capsulatum*) 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、培養をしない検査技術が必要とされる。本研究では、喀痰などの臨床検体からヒストプラズマ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した。今年度は、LAMP 法によるコクシジオイデスおよびヒストプラズマ DNA の高感度検出系を確立した。

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、ヒストプラズ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 (*Coccidioides immitis*)、ヒストプラ

ズマ (*Histoplasma capsulatum*)、BSL2 に分類されるクリプトコックス・ガッティ (*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、播種性感染まで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ズマ、クリプトコックス・ガッ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、ヒストプラズマ属については、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、コクシジオイデス属およびヒストプラスマ属の簡便かつ高感度な検査法の開発として、LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法の検討を行った。

B. 研究方法

コクシジオイデス検出のための LAMP 法の標的配列として、以前開発したコクシジオイデス特異的 PCR の標的である *Coi9-1* 領域を用いた。ヒストプラスマの標的配列として、M 抗原遺伝子を用いた。4 種類の 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。

LAMP 反応は栄研化学の Loopamp DNA 増幅試薬キット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 で反応を行った。検討に用いた *C. immitis*、*Coccidioides posadasii* および *H. capsulatum* の DNA は臨床分離株から抽出した。陰性コントロールとして *Aspergillus fumigatus* AfS35 のゲノム DNA を用いた。反応後、UV 写真撮影装置で検出を行った。

(倫理面からの配慮について)

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

1) コクシジオイデス属 LAMP 法の開発

まず、3 組の LAMP プライマーセット A, B, C を設計し、10 ng の *C. immitis* および *C. posadasii* のゲノム DNA に対して LAMP 反応を行った (図 1)。

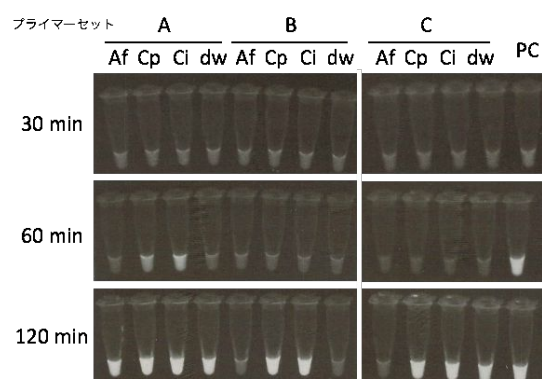


図 1. コクシジオイデス属 LAMP プライマーの検討 Af: *Aspergillus fumigatus*, Cp: *Coccidioides posadasii*, Ci: *Coccidioides immitis*, dw: distilled water, PC: キット添付の陽性コントロール

プライマーセット A では、1 時間で検出できたが、2 時間では陰性コントロールでも偽陽性として検出された。プライマーセット B では 1 時間では検出できなかったが、2 時間後に陽性サンプルのみ検出できた。プライマーセット C では、1 時間では検出できず、2 時間後で検出された。水のみ陰性コントロールにおいて検出されているが、アスペルギルス DNA の陰性コントロールでは検出されていないことから、注意して操作したにもかかわらず、微量の DNA のコンタミが原因と考えられる。

次に、プライマーセット B および C について検出感度を上げるために、loop プライマーの検討を行った。それぞれのプライマーセットについて 2 組ずつ loop プライマーを設計し (B-L1, B-L2, C-L1, C-L2) LAMP 反応を行った (図 2)。

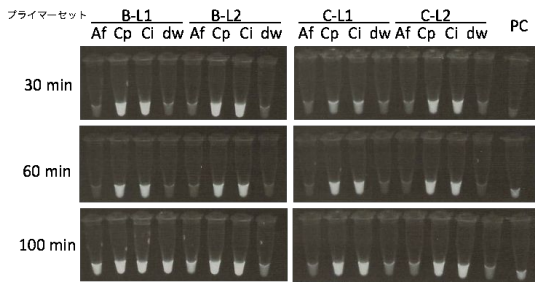


図 2. コクシジオイデス属 loop プライマーの検討 Af: *Aspergillus fumigatus*, Cp: *Coccidioides posadasii*, Ci: *Coccidioides immitis*, dw: distilled water, PC: キット添付の陽性コントロール

全ての LAMP-loop プライマーの組み合わせについて 30 分で検出可能であった。B-L1 および B-L2 では 100 分後に陰性コントロールでも検出されてしまったことから、C-L1 および C-L2 プライマーセットが今回検討した中で最適なものであるとして、今後の検討に用いることにした。

次に、検出限界の検討を行った。C. posadasii のゲノム DNA を定量し、10 倍ずつの希釈系列を作製して、C-L1 および C-L2 プライマーセットを用いて LAMP 反応を行った。ゲノムサイズを 30 Mb で換算すると、どちらのプライマーセットでも 100 fg、30 コピーまで検出が可能であった。

2) ヒストプラズマ属 LAMP 法の開発

上記の戦略に従って、M 抗原遺伝子を標的としたヒストプラズマ DNA に対する LAMP 法の開発を行った。4 組の LAMP-loop プライマーセットを設計し、そのうち 1 組だけが、5 種類の臨床分離 *H. capsulatum* DNA を検出することが出来た (図 3)。

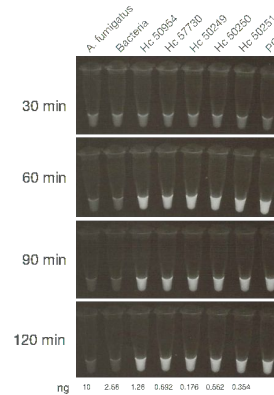


図 3 ヒストプラズマ属 LAMP 法の検討
PC: キット添付の陽性コントロール

D. 考察

ヒストプラズマ属やコクシジオイデス属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 法は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 法を用いればコクシジオイデスおよびヒストプラズマを迅速簡便に検出できる。現時点では菌体から調製した DNA でしか検証できていないが、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 法によるコクシジオイデス属およびヒストプラズマ属の迅速診断系を確立した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Umeyama T, Ohno H, Minamoto F, Takagi T, Tanamachi C, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Kishi K, Fujii T, Takemura H, Watanabe H, Miyazaki Y. Determination of epidemiology of clinically isolated *Cryptococcus neoformans* strains in Japan by multilocus sequence typing. *Jpn J Infect Dis*. 2013, 66(1):51-5.
2. Mihara T, Izumikawa K, Kakeya H, Ngamskulrungraj P, Umeyama T, Takazono T, Tashiro M, Nakamura S, Imamura Y, Miyazaki T, Ohno H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S. Multilocus sequence typing of *Cryptococcus neoformans* in non-HIV associated cryptococcosis in Nagasaki, Japan. *Med Mycol*. 51:252-260, 2013.
3. Okubo Y, Wakayama M, Ohno H, Yamamoto S, Tochigi N, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Umeyama T, Shinozaki M, Nemoto T, Nakayama H, Sasai D, Ishiwatari T, Shimodaira K, Yamamoto Y, Kamei K, Miyazaki Y, Shibuya K. Histopathological study of murine pulmonary cryptococcosis induced by *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. *Jpn J Infect Dis*. 66:216-221, 2013.
4. Okubo Y, Tochigi N, Wakayama M, Shinozaki M, Nakayama H, Ishiwatari T, Shimodaira K, Nemoto T, Ohno H, Kaneko

Y, Makimura K, Uchida K, Miyazaki Y, Yamaguchi H, Shibuya K. How Histopathology Can Contribute to an Understanding of Defense Mechanisms against Cryptococci. *Mediators Inflamm*. 2013:465319, 2013.

5. Ohno H, Tanabe K, Umeyama T, Kaneko Y, Yamagoe S, Miyazaki Y. Application of nested PCR for diagnosis of histoplasmosis. *J Infect Chemother*. 19:999-1003, 2013.

和文論文

1. 町田安孝, 福島康次, 三好祐顕, 小原一記, 池田康紀, 亀井克彦, 宮崎義継, 福田 健. 経気管支鏡肺生検および気管支肺胞洗浄にて診断された慢性肺コクシジオイデス症の1例. *日本呼吸器学会雑誌*. 2:274-278, 2013.
2. 大野秀明, 金子幸弘, 田辺公一, 梅山隆, 宮崎義継. *Cryptococcus gattii* 感染症 -新興・再興感染症 up to date-. *化学療法領域*. 29 S-1:1144-1151, 2013.
3. 大野秀明, 宮崎義継. 真菌性脳髄膜炎の遺伝子診断. *臨床神経学*. 53:1191-1193, 2013.

学会発表

国際学会

1. Kamei K, Watanabe A, Yaguchi T, Muraosa Y, Toyotome T, Ohno H, Miyazaki Y. Epidemiology of imported mycoses in Japan-its past and the present status. 28th International Congress of Chemotherapy and Infection. June 5-8, 2013.

国内学会

1. 大野秀明, 宮崎義継. 中枢神経系感染症の遺伝子診断の進歩-真菌性脳髄膜炎の遺伝子診断-(シンポジウム). 第54回日本神経学会学術大会. 5月29-6月1日, 2013年, 東京.
2. 宮崎義継, 砂川富正, 大石和徳. パネルディスカッション 病原体サーベイランスの現状と課題「国立感染症研究所の立場から」. 衛生微生物技術協議会第34回研究会. 7月11-12日, 2013年, 名古屋.
3. 田辺公一, 大野秀明, 金子幸弘, 梅山隆, 山越 智, 名木 稔, 知花博治, 亀井克彦, 宮崎義継. 日本のカンディン耐性カンジダの現状. 第57回日本医真菌学会総会・学術集会. 9月27-28日, 2013

年, 東京.

4. 大野秀明, 大久保陽一郎, 金子幸弘, 田辺公一, 梅山 隆, 山越 智, 亀井克彦, 渋谷和俊, 宮崎義継. *Cryptococcus gattii* 感染症の病態解析(シンポジウム4). 第57回日本医真菌学会総会・学術集会. 9月27-28日, 2013年, 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特許取得

特記事項なし

実用新案登録

特記事項なし

その他

特記事項なし

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）
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と標準化に関する研究
分担研究報告書

鼻疽・類鼻疽の迅速診断法に関する研究

研究分担者 国立感染症研究所・細菌第二部・堀野敦子

研究協力者 川崎医科大学・公衆衛生学 山根一和

研究要旨

鼻疽/glanders、類鼻疽/melioidosis は *Burkholderia* 属の細菌、*Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei* がそれぞれ感染して起きる感染症である。日本国内では類鼻疽は稀な感染症であり、鼻疽はさらに稀な感染症で戦後ヒトでの発生例は報告が無い。しかし、国外では両者にはかなり違いが認められる。類鼻疽菌、*B. pseudomallei* は東南アジア、北部オーストラリアなどでは土壤中に常在菌として生存しており、農耕期やモンスーンの時期に類鼻疽の患者発生が多い。感染経路は創傷からの経皮感染、吸入感染、また経口摂取である。発病する患者は基礎疾患を持っていることが多い。多くは糖尿病、腎臓障害、過度のアルコール摂取である。類鼻疽流行地域では類鼻疽は稀な疾患ではない。タイの流行地域では類鼻疽流行期に市中肺炎患者が医療機関を受診した場合には、まず類鼻疽が疑われる。

一方、鼻疽は国外でも非常に稀な疾患である。ウマでまれに散発例が見られるがヒトへの感染例はほとんど報告されていない。近年ではアメリカで実験室感染と考えられる例が報告されているのみである。また、原因菌である *B. mallei* は *B. pseudomallei* とは異なり環境中では生存できない。この菌は主にウマ、ロバに感染する。ヒトには患畜の膿などから感染するとされる。

これらの *B. pseudomallei*, *B. mallei* は CDC のカテゴリー-B に指定されておりバイオテロに使用される懸念のある細菌である。このため、日本国内で事例が発生したときのために迅速な検出法を確立しておく必要がある。本研究では地方衛生研究所等で検査が可能であるように、普及している核酸検出法での確立をめざし、LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)法を選択した。*B. pseudomallei* と *B. mallei* の LAMP 法は前年度までに基礎検討が終了した。今年度は、実際の検査時にこの *B. pseudomallei* の LAMP 法を既報の検出法に加えて実施し、性能の比較検討を行った。結果として既報の検査法

と判定結果は同じであった。また、我々の LAMP 法は既報の LAMP 法よりも感度がよく、判定もクリアであった。今年度は *B. mallei* の検査依頼が無かったため検査での性能検討は行っていないが、過去の保存検体を用いた検討では過去の判定と同じ判定結果が得られた。*B. mallei* の LAMP 法はこれまで報告がないため、迅速簡便な検査法として利用できると思われる。

この検査の過程で、国立感染症研究所・細菌第二部に検体を送る前に各機関で行われた自動検査機器による *Burkholderia* 属の誤同定が問題となった。特に *B. pseudomallei* と *B. cepacia* との誤同定が問題となってきたのでこれについてまとめた。また、類鼻疽の血清学的検出法について検討中である。

A. 研究目的

本分担研究では、バイオテロに使用される懸念のある *Burkholderia* 属の細菌、*B. pseudomallei* と *B. mallei* の迅速検出法を確立することを目的としている。これまでこれらの迅速検出法について核酸検出法を用いた検討を行ってきた。迅速検出法としては簡便な核酸検出法であり地方衛生研究所などで比較的普及している LAMP 法を選択し、昨年度まで基礎検討を終えている。今年度は実際の検査時に、既報の方法に加えて我々の LAMP 法を使用し、実用性の確認ならびに性能の比較検討を行うこととした。

また、類鼻疽については、患者血清中の抗体から類鼻疽を診断・同定する方法も求められているが、現在のところ方法がない。このため、今年度は同定法の一つとして類鼻疽の血清学的検出の検討を開始した。

B. pseudomallei, *B. mallei* の検査を行った結果、国立感染症研究所・細菌第二部に検体が搬入される前の初回検査が自動

検査機器で行われた場合、誤判定が見受けられた。検出を行うにあたり問題と考えられたため、これらの誤判定例についてまとめることとした。

B. 研究方法

1 *B. pseudomallei*, *B. mallei* の迅速核酸検出法 (LAMP 法)

現在使用している *B. pseudomallei* の LAMP 法のプライマー群は *B. pseudomallei* のべん毛関連遺伝子 BPSS0122 を標的遺伝子としている。*B. mallei* の迅速遺伝子検出法では LAMP 法の標的遺伝子を BMAA0749 (hemagglutinin domain-containing protein) としている。これらの LAMP 法の反応条件は、いずれも反応温度 67℃、反応時間 60 分である。陽性の場合反応開始 30 分程度で濁度の観察ができ判定が行える。この方法を既報の LAMP 法 (Journal of Clinical Microbiology, Feb. 2008. P568-573. Chantratita N. et al.)、Multiplex PCR 法 (Journal of Clinical Microbiology, 2011. P814-821. Vol.49,

No.3, Ho et al.)、培養法と併用して検査で使用し結果を比較した。

2. 類鼻疽の血清学的検出法の検討

B. pseudomallei, *B. mallei*, *B. thailandensis* と *B. cepacia* の菌体を不活化し SDS-PAGE を行い、類鼻疽患者血清を用いてウェスタンブロッティングを行った。また、*B. thailandensis*, *B. cepacia* ならびに *B. pseudomallei* の外膜タンパク質の分画を行った。

3. 自動検査機器による *Burkholderia* 属誤判定について

B. pseudomallei 検査の結果、検体提出元において感染研へ検体を搬入する根拠となった自動検査機器結果による誤判定が見うけられたため *B. mallei* を含めた過去の検査結果について検討を行った。

(倫理面への配慮)

今年度は倫理面で倫理委員会に申請する必要があるヒトの臨床検体を用いた実験研究はおこなっていない。

C. 研究結果

1. *B. pseudomallei*, *B. mallei* の迅速核酸検出法 (LAMP 法)

今年度は *B. pseudomallei* の同定依頼検査を 4 件行った。検体はいずれも臨床分離株であった。検査は培養法、既報の LAMP 法、Multiplex PCR 法、今回の LAMP 法の 4 法で行った。その結果、*B. pseudomallei* と同定されたものは 3 件であった。同定された検体は培養法、二種類の LAMP 法、Multiplex PCR 法いずれの方法でも *B. pseudomallei* 陽性であった。ま

た、*B. pseudomallei* が否定された検体では、培養法でも *B. pseudomallei* 陰性であり、他の核酸検出法でも *B. pseudomallei* 陰性であった。

B. pseudomallei 陽性検体 3 件について LAMP 法の比較を行ったところ我々の方法は既報の LAMP 法よりも結果がでるまでの時間が 30 分以上早く、濁度の判定もクリアであった。

2. 類鼻疽の血清学的検出法の検討

類鼻疽の原因菌 *B. pseudomallei* に加えて、ヒトから検出される可能性のある類縁菌の *B. mallei*, *B. thailandensis*, *B. cepacia* の whole cell lysate を SDS-PAGE にて泳動し、類鼻疽の患者血清でウェスタンブロッティングを行った。その結果、各菌体の多くのタンパク質に反応してしまい *B. pseudomallei* 特異的な反応を見ることができなかった。このため、各菌体から外膜タンパク質を分画し、これらについて類鼻疽患者血清を用いてウェスタンブロッティングを行う予定であった。現在までのところ、それぞれの菌の外膜タンパク質の分画まで作業が進んだがウェスタンブロッティングには至っていない。

3. 自動検査機器による *Burkholderia* 属誤同定について

これまでに *B. pseudomallei* が疑われた臨床分離株の検体 2 件が検査の結果、*B. cepacia* と同定された。これらの検体は病院や検査機関における初回の検査時に自動検査機器を用いて *B. pseudomallei* の疑いと判定されている。国立感染症研究所

でこれまでに *B. pseudomallei* と *B. mallei* の検査は 14 件行っているが、*B. mallei* と判定されて検査を行った 2 件は *Burkholderia* 属以外の細菌と同定されている。これらの検体も初回の検査では自動検査機器を用いて判定されており、自動検査機器を用いて *Burkholderia* 属と判定された場合には注意が必要であることが明らかになった。

D. 考察

B. pseudomallei, *B. mallei* の LAMP 法の検討として、今年度は実際に検査をおこなう際に既報の手法に加えて、我々の LAMP 法を併用して行い性能を比較した。今年度は、*B. pseudomallei* が疑われる 4 件の検査を行った。送付された検体はいずれも臨床分離株で、3 件は *B. pseudomallei* と同定され 1 件は否定された。用いた方法のあいだで判定に違いはなかった。二種類の LAMP 法の比較では我々の LAMP 法が判定までの時間も早く判定も明確であり、既報よりも検査に適していると考えられた。今後は可能であれば、検査時に臨床分離株に加えて尿検体、血液検体も同時に検査を行い、性能の評価を行いたい。

今年度は *B. mallei* の検査依頼は無かった。過去に *B. mallei* の検査依頼があり、結果として *B. mallei* は否定されている。その保管臨床分離株を用いて *B. mallei* の LAMP 法を試みた結果、それらの株は *B. mallei* 陰性と判定された。日本国内ではバイオテロなどの有事の際以外では、通常

B. mallei が患者から分離されることは考えにくい。今後は *B. mallei* 検査依頼時の陰性判定の際の参考結果としても使用していく予定である。また、有事の際の検出法として使用可能と考えている。

類鼻疽の血清学的検出法は、医療機関よりサンプルが類鼻疽疑い患者血清しかない場合などに問い合わせがある。現在国内で検出可能な方法がないため検出法の開発を試みているが、現在までのところまだ検出可能な状況に至っていない。日本国内では類鼻疽流行国と異なり、不顕性感染などで血清中の抗体価が陽性である人口が多いという問題を考える必要がほぼ無い。手法が確立できれば有用なツールになり得るので継続して検討を行いたい。

Burkholderia 属の自動検査機器による誤同定の問題は国外でも問題になっており、自動検査機器だけではなく商業システムによる検出法で *B. pseudomallei* と *B. cepacia* を同定する際の誤同定の多さが指摘されている (Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases 59 (2007),277-281)。我々の経験例とは逆に *B. pseudomallei* の感染者が実は *B. cepacia* に感染していたと誤同定された例も報告されている (Journal of Medical Microbiology(2012),61, 1483-1484)。類鼻疽は迅速な投薬開始が求められる感染症であるだけに重要な問題であろうと考えられる。テロなどの有事の際にもこのような事例が生ずる可能性も

あるため、なんらかの方法で周知ができればと考える。今年度はヒト由来検体のみならず、ネコ由来検体が自動検査機器で *B. pseudomallei* と判定され我々で検査を行った事例もあり、この例でも結果は *B. cepacia* であった。また、自動検査機器では *B. pseudomallei* と *B. cepacia* の誤同定の問題だけではなく、*B. mallei* と他の菌との誤同定例も経験していることから *Burkholderia* 属の検査結果には注意が必要である。同定のゴールドスタンダードである培養法を併用するのが望ましいが、*B. pseudomallei*, *B. mallei* の培養を経験していない場合では判定が難しい可能性も考えられるので、LAMP 法などの核酸検出法を併用するのがより望ましいと考える。

E. 結論

有事の際のバイオテロ対策が必要な *B. pseudomallei*, *B. mallei* の迅速遺伝子検出法に LAMP 法を適用することとし、検討を行ってきた。今年度はこれらの LAMP 法を実際の検査で既報の検査法と併用して性能の比較を行った。その結果、我々の *B. pseudomallei* の LAMP 法は既報の方法と判定結果が一致しており、既報の LAMP 法より 30 分早く検出が可能であった。また、*B. mallei* の検査依頼が無かったため実際の検査での性能比較は行えなかったが、過去の検体を用いた検査では同じ判定を得た。

類鼻疽の血清学的検出法は今後の検討課題として残った。

Burkholderia 属の自動検査機器による誤同定の問題は今後留意すべきと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) ベトナムから帰国後空洞病変で発症し、再燃時多発肺結節を認めたメリオイドシスの 1 例、倉田季代子、貫井義久、島田裕之、井上幸久、吉村信行、堀野敦子、日本呼吸器学会雑誌、Vol.49, No.6, 443-448、2011

2) Young Japanese women after traveling to Southeast Asia; Ohno H, Ogata Y, Suguro H, Yokota S, Watanabe A, Kamei K, Yamagoe S, Ishida-Okawara A, Kaneko Y, Horino A, Yamane K, Tsuji T, Nagata N, Hasegawa H, Arakawa Y, Sata T, Miyazaki Y. Intern Med. 2010; 49 (5): 491-5.

2. 学会発表

LAMP 法による *Burkholderia pseudomallei* と *Burkholderia mallei* の検出、堀野敦子、山根一和、柴山恵吾、阿戸 学、日本細菌学会第 86 回総会、2013 年 3 月、千葉県

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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）
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と標準化に関する研究
分担研究報告書

分担研究課題： 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

研究分担者	黒田 誠	国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター センター長
研究協力者	関塚剛史	国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室
	竹内史比古	国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室
	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第三室

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。その危険性に対する確な対処法を立案・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。

次世代型網羅的病原体検査法の骨格が既に構築済みであり、国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センターで検査可能であるが、バイオテロ発生（および疑い事例を含む）において現場対応が迅速であればあるほど有効な対応策だと考えている。感染研・ゲノムセンターでは現場（病院・地方衛生研究所等）でも情報解析できるよう、ネットワーク経由で病原体鑑別するための情報解析パイプライン（Metagenomic Pathogen Identification pipeline for Clinical specimen: MePIC）を開発し Web 情報解析サービスを開始した。情報解析を習熟していない検査技師であっても簡単な講習会により利用できるよう利便性を考えて作成している。また、バイオテロ病原体の臨床分離株のゲノム情報を活用し、ゲノムワイドな SNPs 検索と分子系統樹作成も可能にするシステム Global core-Genome SNPs Analysis (GcoGSA)を開発し、現在、炭疽菌(*Bacillus anthracis*)のみ Web 解析サービスを開始した（関係者のみの運用予定）。順次、他カテゴリーA 病原体であるペスト菌、野兔病菌、コクシエラ、類鼻疽菌、ボツリヌス菌のゲノム情報を用いた GcoGSA を展開していく予定である。

将来的に日常の微生物検査で NGS が汎用される日が来るであろう。その際、予見しえなかった症例から NGS – MePIC – MEGAN パイプラインでカテゴリーA 病原体を検出した場合、引き続き GcoGSA にてゲノム分子疫学解析を行い、バイオテロ病原体（もしくは孤発例）の由来を推定するトレーサビリティ・追跡への情報提供になり、有事における迅速なバイオテロ対策へと貢献できると考える。

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終了することが可能となった。最先端の革新技術を応用し、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体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-3, 4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(図1)。

本システムで特に重要なのが配列解読後の情報解析にあたる。基本、情報解析に特化した専門家が必要となるが、各自治体に人材を用意もしくは養成している余裕はない。そこで、その煩雑な解析部分をできるだけ簡便化するために、検査技師等がインタラクティブに病原体鑑別を利用できるよう、Web interface による情報解析パイプラインを用意した。

2) 配列解読から情報解析まで

ベンチトップ型・次世代シーケンサー MiSeq (Illumina)の解読リードを病院・地方衛生研究所等

でも情報解析できるよう、ネットワーク経由で病原体鑑別するための情報解析パイプライン (Metagenomic Pathogen Identification pipeline for Clinical specimen: MePIC) を構築した(図2)。情報解析を習熟していない検査技師であっても簡単な講習会により利用できるよう利便性を考えて作成した。本システム MePIC は、感染研、地方衛生研究所においても利用可能な次世代型網羅的病原体検索システムをサポートする Web 情報解析サービスであり、現在、アカデミアのみアカウント取得可能として提供している。

<https://mepic.niid.go.jp/cgi-bin/mepic2/index.cgi>

3) Metagenomic Pathogen Identification pipeline for Clinical specimen: MePIC

MiSeq 等の次世代シーケンサーの解読リードを下記の手順で必要な情報パラメーターを設定し、解析ボタンのワンクリックで解析をシームレスに行うことができる。

Target read files:

次世代シーケンサーの解読リードをアップロード

Reads trimming:

解読リードの不必要なアダプター配列の削除とクオリティーの低い塩基の削除

Screening:

bwa mapping 法によるヒト配列の削除(マウス等、他のほ乳動物のゲノム配列など、別途、レファレンス配列の指定が可能)

Reads classification:

megaBLAST によるデータベース検索。各種データベースの選択が可能。非特異的なヒットを選択しないよう、E-value 等の閾値の変更も可能

MePICで解析したMegablast解析結果は、配列アライメントを含むテキスト配列で排出される。そのテキスト配列をフリーソフト MEGAN (MEtaGenome Analyzer

<http://ab.inf.uni-tuebingen.de/software/megan/>)で生物種毎の系統分類をおこない、病原体候補を探索し

ていく。臨床検体に内在する数多くの候補生物が抽出されるため、ここでの探索には病原体と感染症の知識が多分に要求される。

4) コアゲノム SNPs を利用した菌種・菌株の類縁関係の特定 (図4)

MePIC - MEGAN による病原体検索の結果、仮に炭疽菌が候補として浮上した場合、先に使用した解読リードを用いて病原体の由来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 (図5)。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因子の特定も可能にした。

今後、ペスト、野兔病、コクシエラ、類鼻疽、ボツリヌスと順々に構築予定である (図6)。

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、情報解析の工程に特化して迅速性を追求したシステム改善を行った。今後、様々な工程の中でボトルネックになっている箇所を効率よく改善し、総合的なシステム化に貢献したいと考えている。NGS - MePIC - MEGAN - GcoGSA の解読・解析パイプラインを開発し、実際に運用できるところまで完了した。未だ解消されていないボトルネックが残っていることは事実だが、誰もが簡便に

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. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1) 論文発表

- MePIC, Metagenomic Pathogen Identification for Clinical Specimens. Fumihiko Takeuchi, Tsuyoshi Sekizuka, Akifumi Yamashita, Yumiko Ogasawara, Katsumi Mizuta, and Makoto Kuroda. Jpn. J. Infect. Dis., 2014, 67 (1): 62-65.

2) 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

該当なし

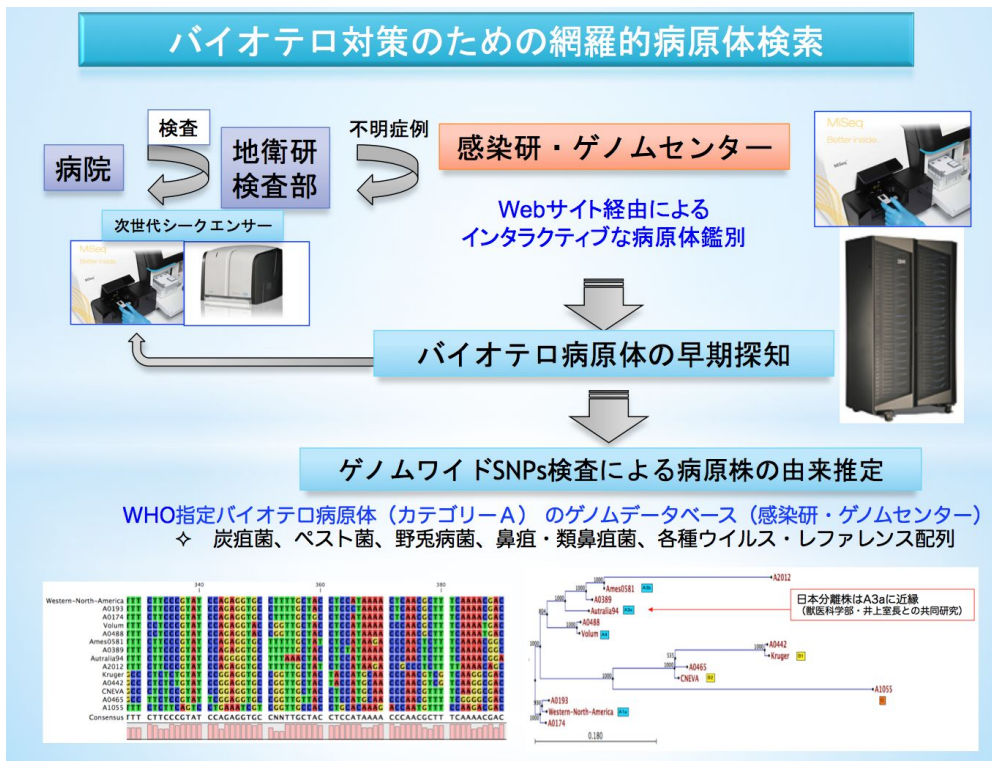


図1 ネットワーク経由によるバイオテロ病原体検索のための解析システム。現在、感染研・ゲノムセンターにベンチトップ型・次世代シーケンサーと情報解析サーバーが整備されている。地方衛生研究所等においても少しずつ整備されるようになってきた。検査技師等がインタラクティブに病原体鑑別を利用するために、Web interface による情報解析プログラムの開発と提供を試みた。

次世代型網羅的病原体検索システムをサポートする

Web情報解析サービスの提供

MePIC, Metagenomic pathogen identification for clinical specimens

<https://mepic.niid.go.jp/cgi-bin/mepic2/index.cgi>

Welcome to MePIC v2.0

Please login to start

User ID: Password:

First visit? Please [register account](#).

[to MePIC manual](#)

- ヒト臨床検体からの網羅配列解読(メタゲノム解読)の情報解析
- 臨床検体に内在する微生物群の分類
- 初心者でも使いやすい
(生物学、感染症学の知識は欲しい)

現在、アカデミアのみアカウント取得可能

図2 臨床検体からダイレクトに網羅配列解読したリード配列の情報解析パイプライン (Metagenomic Pathogen Identification pipeline for Clinical specimen: MePIC)。次世代シーケンサー NGS による解読リードから必要な情報のみ抽出するための Web 情報解析サービス。

図3 MePIC の操作画面の仕様。NGS リードから i) 質の悪いリード、塩基の除去、ii) 臨床検体に内在するヒト配列の削除、iii) megablast 検索による病原体検索。この i - iii までの一連の流れを一度に完結させるパイプライン。

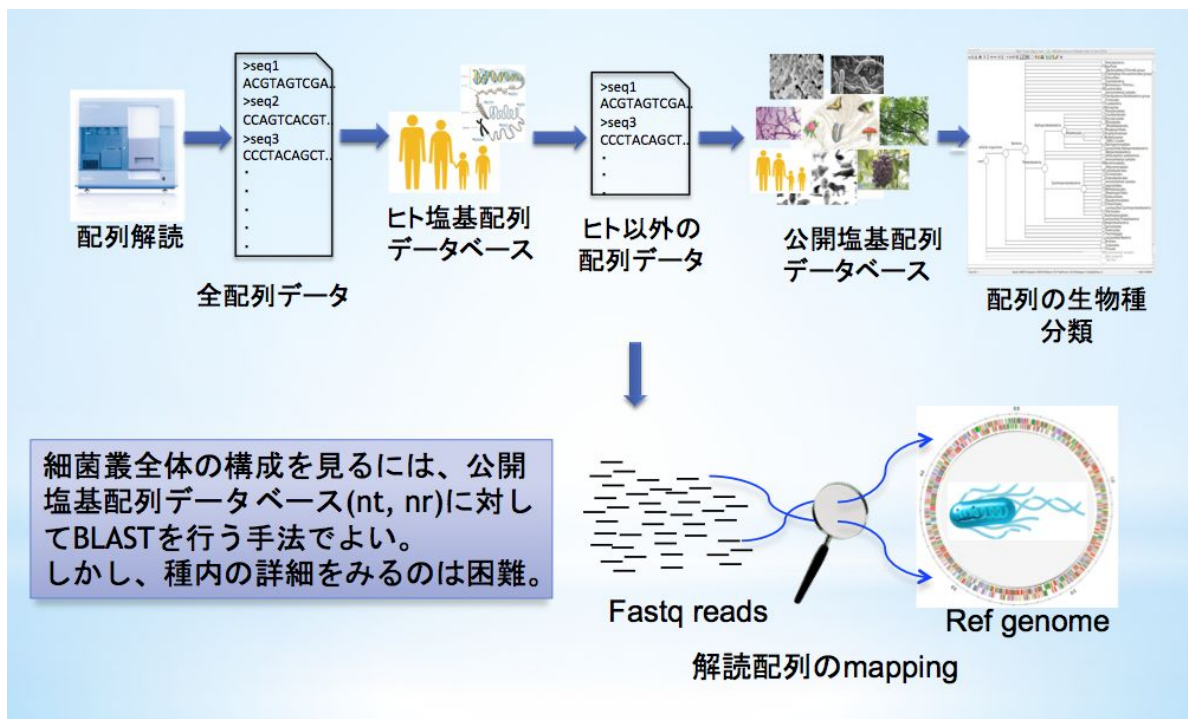


図4 ゲノム全体の SNPs (ゲノムワイド SNPs 解析) の概念図。

炭疽菌 *Bacillus anthracis* のゲノム分子疫学 (関係者のみ運用予定)

GcoGSA BA

Global core Genome SNP Analysis for *Bacillus anthracis*

Project name:

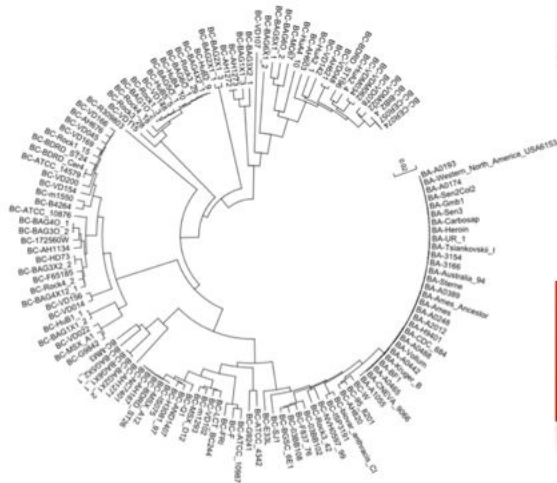
Input your sequence reads (Only .fastq.gz up to 2GBytes in total are acceptable.)

Strain Name	Read file 1	Read file 2
1	選択... ファイルが選択されていません。	選択... ファイルが選択されていません。
2	選択... ファイルが選択されていません。	選択... ファイルが選択されていません。
3	選択... ファイルが選択されていません。	選択... ファイルが選択されていません。
4	選択... ファイルが選択されていません。	選択... ファイルが選択されていません。
5	選択... ファイルが選択されていません。	選択... ファイルが選択されていません。

Send an e-mail after finished analyzing.
 Mail address:
 Change number of samples

Reference genome: *Bacillus anthracis* str. 'Ames Ancestor' chromosome, complete genome. (gil50196905reflNC_007530.2)

Phylogenetic tree of the original data set.



[Traditional tree shape](#)
[Newick formatted data](#)
[MEGA formatted data](#)
[SNP allere table \(compressed 13MBytes\)](#)

LF
EF
PA

Mapping status

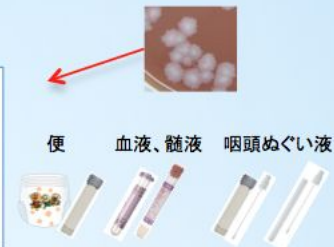
Strain	Raw reads	After Trimming	Mapping
S6 sequence	7631281	4926893 (64.6%)	4896388 (64.2%)
S5 sequence	6850274	4814255 (70.3%)	4775247 (69.7%)

Mapped region

Sequence or region	Whole length	Mapped bp (%) (depth >=5)	
		S5 sequence	S6 sequence
gil50196905reflNC_007530.2l	5227419	4914301 (94.0%)	4827010 (92.3%)
gil20520075igblAE011190.1l	181677	163651 (90.1%)	161559 (88.9%)
gil50118566igblAE017335.3l	94830	84018 (88.6%)	81139 (85.6%)
lethal factor (AE011190 149357-151786)	2429	1865 (76.8%)	1767 (72.7%)
edema factor (AE011190 122608-125010)	2402	1946 (81.0%)	2187 (91.0%)
protective antigen (AE011190 143779-146073)	2294	2225 (97.0%)	2161 (94.2%)

Number of SNPs used: 636038 / 657183 (96.8%)

[Download SNP data in tabular format. \(8.6 MBytes\)](#)
[Download SNP data in fasta format. \(83.3 MBytes\)](#)
[Download phylogenetic tree in Newick format. \(5.5 KBytes\)](#)
[Download phylogenetic tree in PDF format. \(9.3 KBytes\)](#)



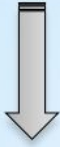
~~Gco junior~~



SNP判定のエラーが多い

図5 MePIC - MEGAN による病原体検索の結果、炭疽菌が候補として浮上した場合、先に使用した解読リードを用いたゲノムワイド SNPs 解析システム Global core genome SNP analysis for *Bacillus anthracis* (GcoGSA-BA) を開発した。現在、関係者のみ運用可能としている。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をダウンロード可能である。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) の炭疽菌の病原因子の特定も可能にした。

illumina .fastq 生解読リード



- De novo assembly
- RNA finding
- 16S-rRNA phylogeny
- Species identification

GcoGSA : Global core Genome SNPs Analysis

GcoGSA-BA (炭疽菌、セレウス菌)

- YP(ペスト菌)
- FT(野兎病菌 Type A, B)
- CR (コクシエラ、リケッチア)
- BPM(類鼻疽菌)
- CB(ボツリヌス菌)

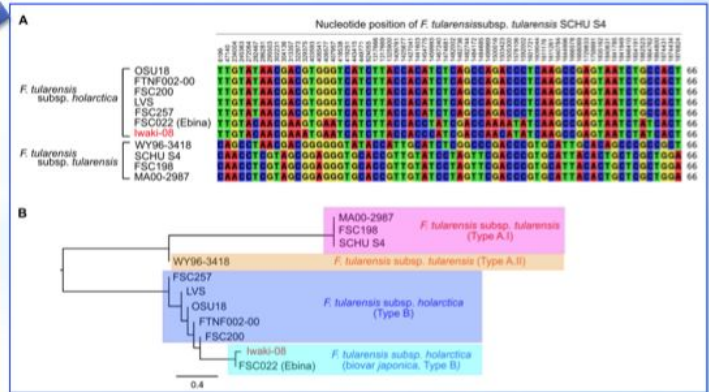
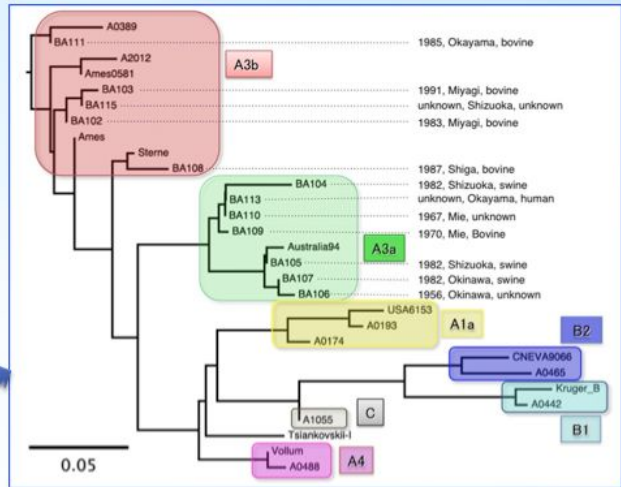


図6 今後、ペスト、野兎病、コクシエラ、類鼻疽、ボツリヌスと順々に構築予定である。

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）
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と標準化に関する研究
分担研究報告書

病原体の病理学的検出法の確立
迅速 *in situ* hybridization AT-tailing 法による新興・再興感染症ウイルスの検出

研究分担者 佐多徹太郎（富山県衛生研究所）

研究協力者 中島典子、佐藤由子、鈴木忠樹、片野晴隆、長谷川秀樹

（国立感染症研究所・感染病理部）

研究要旨 我々が開発した迅速 *in situ* hybridization-AT tailing 法は、オリゴヌクレオチドプローブを用いた高感度で特異性の高い *in situ* 遺伝子検出系である。これを用いて重症熱性血小板減少症候群ウイルスを実際のヒト剖検病理組織切片上で検出した。また中東呼吸器症候群コロナウイルスの *in situ* 検出系も国内ヒト感染例の発生に備えて確立した。新しいウイルス感染症を特異的に検出する病理学的方法を新たに開発しえた。

A．研究目的

生物テロ対策として病原体の病理組織内検出法を確立しておく必要がある。免疫組織化学や *in situ* 核酸検出法は組織切片上で病原体が検出できる方法であり、さらに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。昨年度は我々が開発した高感度で特異性の高い新しい *in situ* 核酸検出法である *in situ* hybridization-AT tailing (ISH-AT) 法を簡便化かつ迅速化に成功した。今年度はこの迅速 ISH-AT 法を用いて、新興再興感染症ウイルスである重症熱性血小板減少症候群ウイルス (SFTSV)、中東呼吸器症候群コロナウイルス (MERS-CoV) の検出法を確立することを目的とした。

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。SFTS 感染細胞 (国立感染症研究所ウイルス第1部下島昌幸先生より分与)、SFTS 剖検組織、MERS-CoV 感染細胞標本(国立感染症研究所ウイルス第3部松山州徳先生より分与)を用いた。

b) プローブ

ISH-AT 法用のプローブの作成: SFTS ウイルスのコンセンサスシーケンス部分に、L 鎖と M 鎖に 1 ヲ所ずつ、S 鎖に 2 ヲ所、アンチセンス (AS) プローブとセンス (S) プローブを計 5 セット設計した。MERS-CoV の NP 領域と Env 領域に 1 ヲ所ずつ設計した。なお、SFTSV のゲノムはマイナスの 1 本鎖 RNA であるため、S プローブはゲノム RNA を AS プローブは mRNA を検出

する。MERS-CoV のゲノムはプラスの 1 本鎖 RNA であるため、AS プローブはゲノム RNA と mRNA を検出し、S プローブが陰性コントロールとなる。

2) 方法

a) SFTSV 感染細胞における SFTSV 遺伝子の検出

Vero 細胞に SFTSV を感染後 6、24、48 時間後に細胞を iP Gell で固め、ホルマリン固定パラフィン包埋細胞標本を作成した。

非感染細胞を mock として迅速 ISH-AT 法で SFTSV 遺伝子を検出した。さらに SFTSV 感染ヒト剖検組織 FFPE 切片上で SFTSV を検出した。

b) MERS-CoV 遺伝子の検出

MERS-CoV 感染細胞のホルマリン固定パラフィン包埋細胞標本を作成した。非感染細胞を mock として迅速 ISH-AT 法で MERS-CoV 遺伝子を検出した。

c) FFPE 組織より RNA を回収し、リアルタイム RT-PCR 法で切片中の SFTSV-RNA のコピー数を定量した。

(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

(1)SFTSV 検出用 ISH-AT プローブの検討

S 鎖、M 鎖、L 鎖領域に設計したプローブそれぞれ単独で ISH-AT を試行した結果、S 鎖 3'末の NP 領域に対するプローブの感度・特異性がすぐれていた。このプローブ Sense (S) プローブは 5'-CTTGGCC CAGATGGGGTYCCCAGCAGAGCTGC

TGAGGTTG-(AT)₁₀、AS プローブは 5'-CAACCTCAGCAGCTCTGCTGGG RACCCCATCTGGGCCAAG-(AT)₁₀ である。T_m 値は 89.15 、GC%は 62.5%であった。

(2)SFTSV 感染 Vero 細胞における SFTSV のゲノム RNA および mRNA の検出

感染 6 時間後及び 24 時間後では SFTSV-mRNA 陽性細胞がより多く検出され、48 時間後では SFTSV-RNA 陽性細胞がより多く検出された。感染後 24 時間にウイルス複製が最大になると考えられた。

(3)SFTSV 剖検組織における SFTSV ゲノムの検出

SFTSV 剖検組織(論文発表 2 の症例)において、腫脹したリンパ節の病理組織は、広範囲の壊死に組織球と芽球様細胞の浸潤を伴っていた。なお好中球の浸潤はみとめられなかった。SFTSV-RNA 陽性細胞は主に、腫脹したリンパ節あるいはその近傍のリンパ節で検出された。SFTSV-RNA は SFTSV NP 抗原陽性細胞と同様、芽球様細胞の細胞質に検出された。切片中の SFTSV コピー数は 10⁵/細胞以上であった。陽性シグナルは Sense プローブをもちいたときの方が多く、解析した切片ではゲノム RNA の方が mRNA のコピー数より多いことが考えられた。

(4) MERS-CoV 感染 Vero 細胞

ISH-AT 法で型特異的な AT プローブを NP 及び Env 領域に 1 種類ずつ作製した。AS プローブ : 5'-GAGCTCGGGGCGATTAT GTGAAGAGGAACTGAATCGCGC-(AT)₁₀-3' と 5'-GCGCAGGGGTAGAATTGGCATT AAGAGGTACACCCTGCC-(AT)₁₀-3'

ISH-AT 施行時には、2 種類のプローブの mixture とした。感染 Vero 細胞中のウイルス RNA を特異的に ISH-AT 法で検出した。AS プローブとのハイブリダイゼーションで細胞質に陽性シグナルが見られた。陰性コントロールの S プローブでは陽性シグナルが全くみられず、特異的なプローブが作成できたと考えられた。

D. 考察

感染病原体を用いたバイオテロの場合、患者あるいは死亡者から採取した検体中から病原体遺伝子を検出・同定する最も強力なツールは次世代シーケンス法であろう。実際、日本においてこれまで診断されていなかった SFTS は次世代シーケンス法により SFTSV の遺伝子が確認された。その後塩基配列が、決定しこれまで中国から報告されていた配列とあわせて、ISH-AT 用プローブを作成した。SFTSV に対しては準備してあった抗体がホルマリン固定パラフィン包埋組織切片の免疫組織化学に使用できたため ISH-AT の結果と合わせて検討できた。ISH-AT の利点としては mRNA を特異的に検出できることである。一方 MERS コロナウイルス感染症では MERS-CoV に対する抗体が FFPE 切片の免疫組織化学に使用可能か現在検討中であるが、日本で患者が発生した場合はすでに ISH-AT 法のプローブは完成している。今後レファレンス標本が海外から入手された場合は ISH-AT 法でウイルスの感染部位を同定したいと考えている。

E. 結論

病原体不明の疾患の病原ウイルスが次世代シーケンス法により決定し、日本では重

症熱性血小板減少症候群ウイルスと命名された。中国から報告のあったウイルスであり、すでに抗原検出用の抗体は準備されていたが、速やかに ISH-AT 用のプローブを作成し、ウイルスゲノムを病理組織に検出することができた。主にリンパ芽球様細胞に検出された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Asano S, Mori K, Yamazaki K, Sata T, Kurata A, Sato Y, Odajima H, Akaike Y, Wakasa H, Kojima M. Necrotizing lymphadenitis (NEL) is a systemic disease characterized by blastic transformation of CD8+ cells and apoptosis of CD4+ cells. *Virchows Arch* 464, 95-103, 2014
2. Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, Ishido A, Shigeoka T, Tominaga T, Kamei T, Honda M, Ninomiya D, Sakai T, Senba T, Kaneyuki S, Sakaguchi S, Satoh A, Hosokawa T, Kawabe Y, Kurihara S, Izumikawa K, Kohno S, Azuma T, Suemori K, Yasukawa M, Mizutani T, Omatsu T, Katayama Y, Miyahara M, Ijuin M, Doi K, Okuda M, Umeki K, Saito T, Fukushima K, Nakajima K, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Fukuma A, Ogata M, Shimojima M, Nakajima N, Nagata N, Katano H, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Yamagishi T, Oishi K, Kurane I, Morikawa S, Saijo M: The first identification and retrospective study of severe fever with thrombocytopenia syndrome in Japan. **J Infect Dis.** 2013.

3. Kuribayashi S, Sakoda Y, Kawasaki T, Tanaka T, Yamamoto N, Okamatsu M, Isoda N, Tsuda Y, Sunden Y, Umemura T, Nakajima N, Hasegawa H, Kida Excessive cytokine response to rapid proliferation of highly pathogenic avian influenza viruses leads to fatal systemic capillary leakage in chickens. PLoS One. 9,8(7), 2013.
 4. Nakajima N, Van Tin N, Sato Y, Thach HN, Katano H, Diep PH, Kumasaka T, Thuy NT, Hasegawa H, San LT, Kawachi S, Liem NT, Suzuki K, Sata T. Pathological study of archival lung tissues from five fatal cases of avian H5N1 influenza in Vietnam Mod Pathol.26, 357-369, 2013
2. 学会発表
- 1) 国際発表
 - 1) Nakajima N, Sato Y, Katano H, Kawachi K, Suzuki K, Liem NT, Sata T, Hasegawa H Pathological study of ARDS complicated by influenza virus infection Option for the Control of Influenza VIII September 4-10, 2013. CapeTown
 - 2) 国内発表
 1. 中島典子 病理標本からわかること-新しい *in situ* RNA 検出法:第 124 回小児血液腫瘍懇話会(東京)2013 年 5 月
 2. 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹 新しい迅速 *in situ* ゲノム検出法の感染病理への応用 第 102 回日本病理学会総会(札幌)2013 年 6 月
 3. 片野晴隆、佐藤由子、中島典子、福本瞳、鈴木忠樹、黒田誠、長谷川秀樹 病理検体からの不明病原体検出法の最先端 第 102 回日本病理学会総会(札幌)2013 年 6 月
 4. 長谷川秀樹、中島典子 重症インフルエンザ病態解明へのアプローチ剖検例からの検討 第 102 回日本病理学会総会(札幌)2013 年 6 月
 5. 小谷治、Naeem Asif、鈴木忠樹、岩田奈織子、中島典子、片野晴隆、細見卓司、塚越博之、長谷川秀樹、田口文広、清水博之、永田典代 新生仔マウスを用いた Saffold virus(SAFV)患者由来株の病原性の比較解析 第 156 回日本獣医学会学術集会(岐阜)2013 年 9 月
 6. 中島典子、片野晴隆 シンポジウム 3 病原体の新しい診断法: 定量的 PCR によるウイルスの網羅的検出法と病理検体への応用 第 18 回日本神経感染症学会(宮崎)2013 年 10 月
 7. 長谷川秀樹、亀井敏昭、高橋徹、鈴木忠樹、片野晴隆、中島典子、福士秀悦、下島昌幸、前田健、水谷哲也、森川茂、西條政幸 日本国内で発生した重症熱性血小板減少症候群の 1 剖検例 第 61 回日本ウイルス学会学術集会(神戸)2013 年 11 月
 8. 西條政幸、高橋徹、前田健、水谷哲也、大松勉、吉河智城、谷英樹、福士秀悦、下島昌幸、福間藍子、緒方もも子、鈴木忠樹、中島典子、片野晴隆、永田典代、長谷川秀樹、山岸拓也、倉根一郎、森川茂 後方視的に重症熱性血小板減少症候群と診断された 11 名のウイルス学的・臨床的・疫学的研究 第 61 回日本ウイルス学会学術集会(神戸)2013 年 11 月

- | | |
|---|-----------------|
| 9. 小谷治、Naeem Asif、鈴木忠樹、岩田奈織子、中島典子、片野晴隆、長谷川秀樹、田口文広、清水博之、永田典代
新生仔マウスを用いた Saffold virus 小脳継代株の作出とその病原性の解析
第 61 回日本ウイルス学会学術集会(神戸) 2013 年 11 月 | 2. 実用新案登録
なし |
| 10. 高橋徹、前田健、亀井敏昭、水谷哲也、下島昌幸、福土秀悦、谷英樹、吉河智城、森川茂、長谷川秀樹、中島典子、鈴木忠樹、永田典代、片野晴隆、山岸拓也、大石和徳、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) の日本における初症例
第 61 回日本ウイルス学会学術集会 (神戸) 2013 年 11 月 | 3. その他
なし |
| 11. 潮田和佳、小谷治、岩田奈織子、鈴木忠樹、中島典子、長谷川秀樹、清水博之、永田典代 コクサッキーウイルス B2 実験室株脳内接種後のマウスにおける水頭症の発症機序
第 61 回日本ウイルス学会学術集会 (神戸) 2013 年 11 月 | |

H . 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
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）
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と標準化に関する研究
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

永田 典代 国立感染症研究所 感染病理部 第二室長

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た電子顕微鏡を用いた迅速検出法の確立を目的とする。今年度は、検査従事者の教育訓練法の一つとして平成 23～25 年度にわれわれが参加した Robert Koch 研究所によるウイルスの透過型電子顕微鏡診断法技術の外部評価を総括し、その利用法について考察した。

協力研究者：

国立感染症研究所 感染病理部
鈴木忠樹、岩田奈織子、片岡紀代、藤野美穂子、
竹内佳子、小谷 治、佐多徹太郎、長谷川秀樹
国立感染症研究所 細菌第二部
佐々木 裕子、堀野 敦子、見理 剛、岩城 正昭、
山本 明彦、加藤 はる、柴山 恵吾
国立感染症研究所 ウイルス第一部 福士秀悦、
ウイルス第三部 松山州徳、酒井宏治
国立感染症研究所 インフルエンザ研究センター
相内 章

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感染症診断の一助となる。最近では、新興・再興感染症のみならず、コウモリ・蚊等から分離される未知のウイルスのスクリーニングの手段として、用いられつつあり、当ラボでも同様の研究目的のための電子顕微鏡学的検索の依頼をうけるようになってきた。しかしながら、電子顕微鏡による感染症診断検査の実施者には高いスキルと経験が要求される。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．細菌の迅速検出法に必要なレファレンス標本の作製、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。

われわれは、1と3の一環として、平成23年度から、Robert Koch 研究所によるウイルスの透過型電子顕微鏡診断法技術の外部評価 External Quality Assurance Scheme in EM Virus Diagnostics (EQA-EMV)に参加している。今回は、これまでのEQA-EMV 評価結果について報告し、教育訓練の一環としての利用法について考察した。EQA-EMV は電子顕微鏡の教育訓練を目的として Robert Koch 研究所の Hans Gelderblom 博士により 1994 年から導入されたものである。Robert Koch 研究所によって毎年開催され、世界中の 100 カ所余りのラボが参加しており、平成 25 年は第 26 回目であった。

B. 研究方法

サンプルは、培養細胞で病原体を増殖しその培養上清を、2 - 2.5%パラフォルムアルデヒドで不活化処理し、防腐剤として 0.02%アジ化ナトリウム混合したものであった。出題対象の病原体は、臨床検体（医学・獣医学領域）で、すべてのサンプルは Robert Koch 研究所で調整され、参加機関に対して郵送により配布された。

毎回 6 サンプルが郵送され、当ラボのプロトコールに従い、サンプルの調整と電子顕微鏡観察を行い、回答した。詳細は結果に示した。

C. 結果

EQA-EMV の経過とサンプル内容、正答率等を含む概要は表に示したとおりである。

実際の手順

われわれは、平成 23 年度よりこのシステムを教育訓練に組み込んでいる。配布されたサンプル量は 200 ~250 μ l であったので、これを分注し、4 に保管した。ラボ内の教育訓練参加者は、カーボン支持膜を張ったグリッド(300 ウェル)を用いて、2% リンタンゲステン酸水溶液(pH 7)あるいは 2% 酢酸ウラニウム水溶液によるネガティブ染色を各自、実施した。観察は、透過型電子顕微鏡 JEM-1400 (日本電子株式会社)で行い、撮影は付属の CCD カメラを用いた。指定の報告書様式にサンプルの状態(粒子の固定、形状保持の良否)、診断名、診断に要した時間を記載した。また、得られた画像をあわせて報告書を作成した。その後、実際にサンプルを観察しながら参加者で討議を進め、ラボ内の回答を統一した。

報告者は、回答期限内に Robert Koch 研究所の担当者に電子メールにて報告書を提出した。出題サンプルの内容(使用した病原体名と株名)は即日、電子メールにて伝えられた。参加ラボの回答を回収し、締め切り後に、主催者から総括が送付され正答率などの結果が公表された。

サンプルの妥当性について

EQA-EMV 実施の際には、指定のレファレンスラボ 6 カ所が同様に参加しており、この指定ラボのうち少なくとも 5 カ所が正答であれば、そのサンプルは適正であると判断された。EQA-EMV24 と 25 は実際の臨床検体の条件に近かったため(粒子数が少ない、夾雑物が多い)結局、EQA-EMV24 のフラビウイルス等、3 サ

ンプルが評価から除外された。

ラボ内の教育訓練の結果

教育訓練参加者には 1 年目と 2 年目には初心者が含まれており、当初は指導を要し正答率は 50% 以下であったが、この教育訓練を経て今年度は、染色および観察技術は安定し正答率も 50% 以上となり、診断技術の向上がみられた。

外部評価結果

過去 3 回の EQA-EMV で合計 18 サンプルを検索したが、うち 1 サンプルが誤答であった(フラビウイルス)。しかしながら、このサンプルは前述の理由から不相当とされ評価から除外された。よって、3 回とも評価対象に関しては 100% の正答率であり診断技術は良好と高い評価がなされている。

D. 考察

出題された病原体には、その年に世界で問題となったものや新たに発見された病原体が含まれていた(Schmallenberg virus, Mimivirus など)。一方で、新興感染症やバイオテロで重要な Orthopoxvirus や Paramyxovirus は毎年出題されている。ラボ内の教育訓練参加者の診断技術の向上がみられたことから、EQA-EMV をウイルスの透過型電子顕微鏡診断法技術の教育訓練に組み込み、毎年実施ことは電子顕微鏡検査システムを維持する上で有用であると考えられる。

このような外部評価を実施する場合、配布するサンプルにはその均一性・安定性が要求され、また、サンプルの取り違えを防止する必要がある。もし、当施設で国内の電子顕微鏡使用施設に同様の評価を実施する場合にはウイルス関連部署の多大な協力が必要になる。国内の電子顕微鏡検査システムを充実する必要がある場合、現在、感染研内で定期的に行われている地方衛生研究所対象の病原体講習会(ウイルス実習コース)等に電子顕微鏡検査技術講習を組み込み、

土台を構築することが現実的であろう。各施設の外部評価は Robert Koch 研究所の EQA-EMV への参加を推奨したい。現在、日本国内施設からは 3-4 カ所が参加しているとのことである。

なお、今年度の不明病原体の電子顕微鏡観察依頼のうち、2 検体は電子顕微鏡学的に明らかかなウイルス粒子を検出し、それぞれポリオーマウイルス、レオウイルスと診断された。いずれもその後の遺伝子学的解析の手がかりとなった例である。その他、2 検体でウイルス様粒子は存在したものの、確定には至らず、2 検体は粒子が確認できなかった。

E. 結論

Robert Koch 研究所主催の透過型電子顕微鏡診断法技術の外部評価に参加し、教育訓練を充実し、検査精度の向上をはかることができた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, Ishido A, Shigeoka T, Tominaga T, Kamei T, Honda M, Ninomiya D, Sakai T, Senba T, Kaneyuki S, Sakaguchi S, Satoh A, Hosokawa T, Kawabe Y, Kurihara S, Izumikawa K, Kohno S, Azuma T, Suemori K, Yasukawa M, Mizutani T, Omatsu T, Katayama Y, Miyahara M, Ijuin M, Doi K, Okuda M, Umeki K, Saito T, Fukushima K, Nakajima K, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Fukuma A, Ogata M, Shimojima M, Nakajima N, Nagata N, Katano H, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Yamagishi T, Oishi K, Kurane I, Morikawa S, Saijo M. The First Identification and Retrospective Study of Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome in Japan. J Infect Dis. 2013. Advance access on line

2. 学会発表

なし

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

表 ロベルト・コッホ研究所 (RKI) 主催の

「電子顕微鏡を用いた病原体検出法」の外部評価 (EQA-EMV) 第 24-26 回のまとめ

	EQA-EMV24	EQA-EMV 25	EQA-EMV 26
RKI による サンプル 送付年月日	平成 23 年 9 月 21 日	平成 24 年 10 月 29 日	平成 25 年 11 月 28 日
当ラボの 回答年月日	平成 23 年 10 月 17 日	平成 24 年 12 月 7 日	平成 26 年 1 月 22 日
RKI による 総括年月日	平成 24 年 1 月 26 日	平成 25 年 3 月 14 日	未実施
サンプル数	6 検体 各 250 µl うち 1 検体は評価から除外*	6 検体 各 200 µl うち 2 検体は評価から除外	6 検体 各 200 µl
不活化処理	2.5 % パラホルムアルデヒド	2 % パラホルムアルデヒド	2 % パラホルムアルデヒド
防腐剤	0.02 % アジ化ナトリウム	0.02 % アジ化ナトリウム	0.02 % アジ化ナトリウム
受領サン プルの状態	良好	良好	海外出張のため、受領後室温に 1 週間程度放置した。エンペローブウイルスの染色性は低下したが、診断に差し支えはなかった。
サンプル 1	Herpesvirus (<i>Murid herpesvirus 2</i>)	Calicivirus *評価から除外 (<i>Murine norovirus S99</i>)	Paramyxovirus (<i>Sendai virus</i>)
サンプル 2	Mimivirus (<i>Acanthameba polyphaga mimivirus</i>)	Orthopoxvirus (<i>Vaccinia virus VR1536</i>)	Mimivirus (<i>Acanthameba polyphaga mimivirus</i>)
サンプル 3	Flavivirus *評価から除外 (<i>Tick-borne encephalitis virus</i>)	Coronavirus *評価から除外 (<i>Cavally virus</i>)	Orthopoxvirus (<i>Vaccinia virus VR1536</i>)
サンプル 4	Paramyxovirus (<i>Mumps virus</i>)	Birunavirus (<i>Infectious pancreatic necrosis virus</i>)	Orthomyxovirus (<i>Influenzavirus A/ H2N2</i>)
サンプル 5	Bunyavirus (<i>Gluleako virus</i>)	Bunyavirus (<i>Schmallenberg virus</i>)	Rotavirus (<i>Rotavirus A</i>)
サンプル 6	Orthopoxvirus (<i>Vaccinia virus</i>)	Paramyxovirus (<i>Bovine parainfluenza virus</i>)	Herpesvirus (<i>Human cytomegalovirus</i>)
当ラボの正 答数・率	5/6 検体・83%, 5/5 検体*・100% サンプル 3 Flavivirus を誤答 ラボ内参加者数 4 名	6/6 検体・100%, 4/4 検体*・100% ラボ内参加者数 5 名	6/6 検体・100% ラボ内参加者数 3 名 (2014 年 2 月 1 日現在)
参加ラボ数 (報告数)	103 ラボ / 29 ケ国 (82 ラボ / 報告率 79.6%)	105 ラボ / 29 ケ国 (78 ラボ / 報告率 74.3%)	未実施
100% 正答ラボ数	評価対象 5 検体 : 15 (18.3%) 6 検体 : 9 (10.9%) n = 82	評価対象 4 検体 : 20 (25.6%) 6 検体 : 6 (7.7%) n = 78	未実施
参加ラボの 平均正答率	67.1%	68.6%	未実施

* 指定のレファレンスラボ 6 カ所のうち 2 カ所以上が誤回答であったため、評価から除外された。

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）
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と標準化に関する研究
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

研究分担者 倉園久生 国立大学法人帯広畜産大学・畜産学部
江崎孝行 国立大学法人岐阜大学・医学部
川本恵子 帯畜大・動物・食品衛生研究センター

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。また、植物毒素であるリシン毒素の迅速検出法開発についても併せて行う。

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。またプロトタイプの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・検査法を確立し、広く社会に還元することを目的として研究を遂行する。

対象として各種ウイルス、リケッチア、細菌、毒素等のバイオテロに使用される可能性がある病原体が想定されるが、特に炭疽菌は芽胞としての安定性、乾燥や熱に対する抵抗性、比較的簡単に培養ができることなどから生物兵器の最有力候補として常に注目をあびてきた。炭疽菌は危険度レベル3に属する細菌で、他にペスト、鼻疽/類鼻疽、野兔病、結核、チフス、ブルセラが細菌としてこのレベルに入る。その中で、生物兵器として使用可能なものは炭疽以外にペスト、鼻疽/類鼻疽、野兔病、チフス、ブルセラが想定されるが、検査法や治療法、さらには診断法がまだ確立されていない菌種は鼻疽/類鼻疽、野兔病、ブルセラである。そこで、本研究では、危険度を考慮して炭疽菌の検出法の更なる改良・開発、および鼻疽/類鼻疽、野兔病、ブルセラ症などの危険度3に属する病原体に対する検出・診断法の確立及び治療・予防法の開発や改良を行い、患者検体および環境中からの迅速な検出および診断法の開発を行う。診断法の実用化に当たっては事件発生現場での利用が可能な方法と、検査室における方法の両面からの実用化を目指す。さらに、種々の化学物質および薬剤に対する病原体の感受性に関する検討を行い臨床利用に備える。また、従来のワクチンを基盤とした免疫誘導能が高いワクチンの開発を検討する。

今年度、本研究班では、炭疽発症予防効果をもつ粘膜ワクチンの持続期間および気道チャレンジにおける発症予防効果の検討と抗分泌型組換えリシン抗体の作製、複数の病原体を検出できる核酸クロマトの開発、細菌性毒素の検出系のキット化への取り組みを行なった。

炭疽菌 *Bacillus anthracis* は、グラム陽性の芽胞形成桿菌で、人獣共通感染症の炭疽を引き起こす微生物である。炭疽は、感染経路の違いにより、皮膚炭疽、肺炭疽、腸炭疽の3つの病型をとる。そのうち、肺炭疽は本菌芽胞の吸入によって引き起こされる致死率の高い感染症である。現在、米国や英国で用いら

れているヒト用ワクチンは、毒素産生株の培養上精を用いた成分ワクチンであり、その接種対象は限られている。また、十分な免疫効果を維持するために、複数回の筋注投与と年1回の追加投与が必要であり、接種による副作用も報告されるなど、簡便性および安全性が問題視されている。そのため、有事の場合の大量免疫に使用できず、より安全で、より有用なワクチンの開発が必要とされている。

昨年度の研究で、炭疽ワクチンの新たな候補成分として芽胞と栄養体の両方に発現するEA1を同定し、これを免疫抗原とした経鼻免疫により炭疽の発症が予防できることを見出した。本年度は実際の感染ルートを模して経鼻的に炭疽菌をチャレンジした場合の予防効果について検討するとともに、粘膜免疫の持続期間について検討した。

リシンは、トウゴマ (*Ricinus communis*) の種子から抽出される糖タンパク毒素で、分子量約 30 kDa のAサブユニットと分子量約 32 kDa のBサブユニットからなり、天然有機化合物のなかでも毒性の強い化合物の一つである。リシン毒素はA、B二つのサブユニットから構成される。毒素活性を持つのはAサブユニットで、Bサブユニットは標的細胞の受容体に結合し、Aサブユニットを細胞内へと輸送する。リシンの致死量は、成人の場合、20- 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で、吸入で約4-8時間、経口投与では、約10時間で中毒症状が現れる。現在のところ、本毒素に対する有効な解毒剤は存在しない。また、これまでにテロや犯罪における使用歴がある。そのため、本毒素の迅速検出法は、安心・安全な社会構築のため急務である。毒素の致死量が低く、リシンと同様の症状を示すその他の細菌毒素も存在することから、高感度で、類症鑑別も可能となる検出法の開発が望ましい。本研究では、細菌毒素検出に加え、テロ使用での危険性が高い植物毒素であるリシンの検出法開発も併せて行う。

細菌毒素に関しては、CDCの生物兵器に使われる可能性の高い蛋白毒素であるボツリヌス毒素 (Btx、カテゴリーA)、コレラ毒素 (CT) と LT (カテゴリーB: Enteric Pathogens)、黄色ブドウ球菌のエンテロトキシン (SEA&SEB、カテゴリーB: Enteric Pathogens) 及び TDH (カテゴリーB: Enteric Pathogens) 等に対する免疫学的迅速同定法を確立して検査・診断マニュアルを作成し、その普及を目的としている。研究対象の細菌毒素は食中毒の原因となるた

め検査キットが市販されているものもあるが、本研究では食品を用いたバイオテロに対する網羅的迅速同定法を国産で供給できるような体制作りを目的とする。CT および LT に対する家兎抗血清を作製して各毒素に対する ELISA 系及び Immunochromatography (IC) を構築し、それぞれの抗血清の特異性の検証を行った。一方で富山県衛生研究所の佐多徹太郎先生より供与された 2011 年に発生した腸管出血性大腸菌による広域食中毒事件（ユッケを原因食品とする）の患者便を試料とし、高感度免疫学的検出法を用いた患者便からのシガ様毒素(Stx1 および Stx2)の直接検出系について検討した。

B . 研究方法

B - 1 . リシン毒素検出系の構築

1. リシン毒素検出系の構築 :

リシンのトウゴマからの抽出は、化学兵器の禁止及び特定物質の規制等に関する法律に抵触するため、実験室レベルの検討に使用することは困難である。そこで、毒素活性は持たないが毒素の構成成分として必須である B サブユニットの組換え体を作製し、これを抗原として高親和性抗体の作製を行っている。

昨年度は *Brevibacillus* 発現系を利用した分泌型 RTB 発現系の構築を行い、シグナルペプチドを組み込んだ N 末 His タグを付加した分泌型 RTB 発現株の作製に成功した。本年度はこの株を 2SLN 培地で 30、2 日間培養し、得られた上清から His タグカラムを用いて分泌型 RTB の精製を行った。これを抗原として家兎（雌、日本白色種、3 kg）にアジュバント（TiterMax）と共に皮下免疫した。免疫は 2 週間毎に 3 回繰り返し、抗体価は ELISA により得られた抗血清から IgG 抗体画分を精製した。

B - 2 . 炭疽に対する粘膜ワクチンの開発

H24 年度の研究において炭疽菌芽胞と栄養体の両者の表層に存在する EA1 を免疫抗原に利用した粘膜免疫ワクチンが炭疽発症予防効果をもつことを実証した。本年度は、EA1 粘膜免疫の持続期間について検討し、さらに実際の感染経路のひとつである気道感染を行い、EA1 の粘膜免疫によるワクチン効果を検討した。

実験動物は 8-10 週齢の BALB/c マウス（ ）を用い、イソフルラン麻酔後、鼻孔より 10 µg となるように 5 ~ 10 µl の組換えタンパクを投与することで経鼻免疫した。粘膜アジュバントとして合成二本鎖 RNA の poly (I:C)（InvivoGen, San Diego, CA, USA）を用いた。EA1 を既知の炭疽菌ワクチン分子である PA（List Biological Laboratories）とそれぞれ単独、あるいは組み合わせて、Poly(I:C)アジュバント併用下で週 3 回、計 3 週間、経鼻投与した。アジュバントのみの投与群を対照群とした（表 1）。免疫開始時および最終免疫から最大 15 週間までの期間、定期的に各群のマウスから血液、糞便、唾液を採材し、血中および粘膜抗体価を ELISA により測定した。抗体価が十分上昇したのを確認後、ブースト免疫をかけ、3 日後に全採血した。得られた免疫血清から Protein A カラムを用いて IgG を精製した。感染実験には、*B. anthracis* Pasteur II 苗（pXO1⁺, pXO2⁺）を使用し、培養には BHI あるいは TSA を用い、37°C で培養した。炭疽菌芽胞は栄養体の混入のない高純度の芽胞を精製した。炭疽菌芽胞液（約 7.6 × 10⁴ CFU/mouse）は PBS に懸濁して調整した。投与に使用した芽胞液は、10 倍段階希釈した後、L-agar に塗布し、37 で一晚培養後、出現したコロニー数を計測し、正確な投与菌数を算出した。20 µl の芽胞液を BALB/c マウスの鼻腔から 2 回に分けて投与した。投与後、マウスの臨床状態を定期的に観察し、生存率を測定した。各群の生存率曲線はログランク検定により有意差の有無を解析した。

B - 3 . コレラ毒素に対するイムノクロマトの精度検定

H24 年度までに作製した抗 CT 抗体を用いてコレラ毒素に対するイムノクロマトを作製した。イムノクロマトの作製は（株）日本ハム中央研究所にて行った。作製したイムノクロマトについて精製組換え CT タンパク質および CT 発現コレラ菌株を用いた検出感度の検証を行った。本研究ではコレラ毒素の発現を惹起するために AKI 培地を用いた 2 層培養法（4 時間の静置培養の後に 6 時間の振とう培養を行う）を採用した。また精度の検定を目的として、CT と高い相同性を持つ大腸菌の易熱性下痢毒素 LT タンパク質および LT 産生大腸菌株、さらにコレラ菌と同じビブリオ属菌である腸炎ビブリオを用いた検定を行った。

B - 4 . 患者糞便からのシガ様毒素直接検出

2011年に発生した腸管出血性大腸菌による広域食中毒事件(ユッケを原因食品とする)の患者便からStx1およびStx2の直接検出を試みた。試料は富山県衛生研究所の佐多徹太郎先生と綿引正則先生より供与された。試料はリン酸緩衝液に懸濁したのちに直接試験に供した。検出系としては抗Stx1抗体結合ビーズおよび抗Stx2抗体結合ビーズを用いたBead-ELISA法(検出限界はStx1: 500 pg/ml、Stx2: 250 pg/ml)を利用した。

B - 5 . 複数の病原体を検出できる核酸クロマトの開発

複数の病原体を同時検出できる核酸クロマトの開発を行った。病原体を含む検査材料100 μlをジルコニアビーズが充填されたチューブに加え、100℃で3分間加熱後、1分間ボルテックスし、遠心後上清を回収し核酸を抽出した。5 μlを鋳型として、処理特異的プライマー領域に非特異的な共通配列のタグ配列を付加したプライマー、タグ配列プライマー、ビオチン標識配列を混合し、PCR反応を行った。続いて増幅産物とストレプトアビジン標識ラテックスビーズを混合し、核酸クロマトにて増幅を確認した。原理を図7に示す。

(倫理面への配慮)

病原体の使用は、病原体等安全管理委員会規則に従って、使用、保管等を行った。動物実験は所属研究機関の動物実験委員会の審査許可を受けて行われ、DNA組換え実験や病原体の取り扱いには法令に従い安全性を考慮して実験を実施した。

C . 研究結果

C - 1 . リシン毒素検出系の構築

分泌型組換えRTBの免疫により、目的の特異抗体を得ることができた。この抗体は相同性の高いその他の毒素に対して交差反応を示さなかった。

C - 2 . 炭疽に対する粘膜ワクチンの開発

表1に実験群を示す。PAとEA1をそれぞれ単独、あるいは組み合わせて、Poly(I:C)アジュバント併用下で週3回、計3週間、経鼻投与した(B群:PA, C群:EA1, D群:PA+EA1)。

アジュバントのみの投与群を対照群とした(A群)。経鼻免疫によりB-Cの免疫群における血中IgGおよびIgA、粘膜中IgAの抗体価が上昇していた。すなわち、B群ではPA、C群ではEA1、またD群ではPAおよびEA1に対する血中および粘膜中の特異抗体価がそれぞれ誘導されていた(図1,2)。抗体価の上昇を確認後、最終免疫以降の抗体価の推移を調べたところ、血中IgGについては最終免疫時と同程度の抗体価が維持されていた。しかし、血中IgAは最終免疫後経時的に減少し、15週目では最終免疫時の抗体価を示す吸光度が半分以下にまで減少した。一方、粘膜中IgAは唾液では13週目までは経時的に漸減し、15週目ではピーク時(4週目)の1/4にまで吸光度は減少した。糞便IgAは唾液IgAに比べ抗体価は大きく減少し、15週目では対照群との間に有意差が認められないほどであった。15週目に抗原を1回だけ経鼻投与したところ、全ての群において4週目より高い吸光度が観察されるなど、強いブースト効果が認められた。

続いて、肺炭疽の感染経路である気道感染による感染実験をこれらの実験群で行った。図3に生存曲線を示す。対象群のA群では、気道チャレンジ後3日目からマウスは死亡し、最終的な生存率は20.0%であった。PA免疫群(B群)、EA1免疫群(C群)およびEA1とPA免疫群(D群)の生存率はそれぞれ、37.5%、83%、75%であった。ログランク検定による生存率曲線の統計解析の結果、A群に比べ有意差が認められたのはC群とD群で、B群では有意差はなかった。また、EA1単独のC群がEA1とPAの2重投与したD群より高い生存率を示したが、ログランク検定では両群間に有意差は認められなかった。

C - 3 . コレラ毒素に対するイムノクロマトの精度検定

H24年度までに作製した抗CT抗体を用いて作製したコレラ毒素に対するイムノクロマト(CT-IC)の感度について明らかにする目的で段階希釈した精製組み換えCTタンパク質について検査を行い、CT-ICが10ng/ml濃度(サンプル量: 100μl)のCTを検出可能である事を明らかにした(図4)。また、特異性の検証を目的としてCTと非常に高い相同性を有する大腸菌のheat-labile toxin(LT)について同様の検証を行った結果、CT-ICは100ng/mlのLTに対して

も擬陽性を示さず、CT-ICが高い特異性を持つことが示された。さらに*ct*遺伝子(+)コレラ菌株15株及び、*ct*遺伝子(-)コレラ菌株5株について検査を行った結果、*ct*遺伝子(+)株すべてにおいてCT-ICによるCTの検出が可能であった。一方で*ct*遺伝子(-)株において偽陽性は検出されなかった(図5)。

特異性の検証を目的としてLT産生大腸菌および腸炎ピブリオについて検査を行った(図6)。LT産生大腸菌株は検査に供した12株のうち3株で非常に弱いシグナルが検出されたものの9株では擬陽性は検出されなかった。また腸炎ピブリオでは検査に供した7株全てで偽陽性の検出は観察されなかった。

C - 4 . 患者糞便からのシガ様毒素直接検出

腸管出血性大腸菌を原因とする食中毒事件は本邦において大きな社会問題となる事が多い。本年度の研究では2011年に5名の死者を出し大きな社会問題となったユッケを原因とした広域食中毒事件の患者便からのStx1およびStx2毒素タンパク質の直接検出を試みた。検出系としては抗Stx1抗体結合ビーズおよび抗Stx2抗体結合ビーズを用いた高感度免疫学的検出系(Bead-ELISA法)を利用した。9名の患者より採取された便について検査を行ったところ、それぞれ4名の患者便よりStx1およびStx2の検出が可能であった(表2)。このうちStx1を検出した検体番号OB4においては、大腸菌の検出がなされておらず、また検体番号OB5においては遺伝子検査において*stx*遺伝子が検出されていたにもかかわらずStxタンパク質の検出には至らなかった。これらの結果から病原性大腸菌の毒素産生性検査を含む細菌感染症の原因物質の同定において原因菌の分離培養に加え遺伝子検査やタンパク質をターゲットとした免疫学的検査を併用することの重要性が示された。

C - 5 . 複数の病原体を検出できる核酸クロマトの開発

今年度はボツリヌス菌検出用の核酸クロマトを作成した(図8)。核酸クロマトの検出感度は従来のPCR法に比べ約10倍高く、かつ1時間以内で検出可能であった。

D . 考 察

D - 1 . リシン毒素検出系の構築

H23に作製した大腸菌による組換えRTBを抗原として得られた特異抗体は検出感度が低く、組換え蛋白は大腸菌内で不溶性の封入体を形成しており、様々な手法でリフォールディングを試みたが、凝集を完全に抑制することは困難であり、このような状態では立体構造に変化が生じている可能性がある。天然型リシンと反応する抗体を得るために、昨年度はシグナルペプチドを付加した分泌型RTBの発現株を作製し、今年度の研究において立体構造を保持したRTBを認識する特異抗体を得ることができた。現在、本抗体を利用したイムノクロマトの作製に着手している。

D - 2 . 炭疽に対する粘膜ワクチンの開発

炭疽菌の病原性は、芽胞の発芽、栄養体の増殖、毒素の産生、の3つの段階から成り立っている。炭疽菌は増殖速度が早く、血中で劇的に菌数が増加する。現行のヒト用炭疽ワクチンは炭疽菌が産生する毒素の一つである防御抗原(PA)を主成分とし、炭疽菌の産生する毒素の作用を阻害することはできるが、芽胞の発芽や栄養体の増殖を防ぐことは難しい。EA1は炭疽菌の栄養体と芽胞の両者の表層に発現していることから、EA1を標的とした免疫により、芽胞及び栄養体に対する2重の防御効果が期待できる。我々は、これまでの侵襲性のワクチンで問題となっていた接種部での副作用を回避し、接種を簡便化するため、EA1の経鼻投与による粘膜免疫誘導による炭疽防御効果について検討してきた。粘膜免疫は全身免疫と粘膜免疫を誘導できる。炭疽菌は気道や消化管、創傷部位の粘膜を介して感染するため、粘膜免疫の誘導は効果的な感染防御に重要である。

EA1粘膜免疫の持続期間について検討したところ、血中特異抗体価については最終免疫から3ヶ月後も高い抗体価を維持しており、特に血中IgGについては最終免疫時とほぼ同程度の抗体価を示していた。一方で、粘膜中の特異抗体価については経時的な減少が見られた。免疫部位の鼻粘膜から遠位にある腸管粘膜中の特異的IgAは最終免疫から3ヶ月後は非免疫群の対象群と同程度にまで減少した。一方、免疫部位から近位粘膜である唾液中の特異的IgAの抗体価はピーク時より半減していたが、比較的高い抗体価が維持されていた。

また、抗体価が減少しても追加免疫することで以前より高い抗体価を短時間に誘導できることから、初回免疫後は約3ヶ月おきの追加免疫で十分高い抗体価を維持できると思われる。米国で使用されているヒト用炭疽ワクチンは、4週間隔で2回筋注して初回免疫を誘導し、6, 12, 18ヶ月後に追加の皮下接種を行う。その後は1年毎の追加免疫という煩雑で外科的侵襲性のある接種プロトコルである。今回の我々の粘膜ワクチンにおいても抗体価の維持には約3ヶ月毎の追加免疫が必要であることが示唆されたが、経鼻免疫は簡便で被接種者にストレスがなく、状況によっては自分で接種することも可能である。今後は、持続的に接種部位の免疫応答を刺激できるような除放性キャリアを利用することで投与間隔の延長や効果的な免疫誘導を検討する必要がある。

またPA単独免疫では肺炭疽の発症が予防できないことが以前から指摘されていたが、今回の検討においても同様の結果が得られた。おそらく、PAを標的とした免疫応答では、体内に侵入した炭疽菌芽胞の発芽と栄養体の増殖を抑制することができないため、増殖した菌により産生される毒素量を十分に中和できる抗体価が誘導されていない場合、毒素の作用を完全に阻害することが難しいと思われる。一方で、EA1は単独免疫で炭疽菌感染に対する有意に優れた防御効果を示した。EA1の経鼻免疫は粘膜および全身免疫を刺激し、気道内に侵入した炭疽菌を効果的に排除することで、感染個体における炭疽の発症を予防したと考えられる。

D - 3 . コレラ毒素に対するイムノクロマトの精度検定

コレラ菌の中でコレラ毒素を産生する株のみが病原性を発揮するため、コレラが疑われる患者に対する検査においては菌の検出に加え、検出された菌の毒素産生性を明らかにする事が重要となる。本年度の研究においてはコレラ毒素に対する免疫学的迅速検査法を開発しその特異性および感度の検証を行った。開発された方法は大腸菌の易熱性下痢毒素(コレラ毒素と80%以上の相同性を持つ)とコレラ毒素を10倍以上の感度で判定可能な非常に特異性の高い方法であった。感度においては10 ng/ml程度を検出限

界としており食品や糞便からのコレラ毒素の直接検出に十分な感度とは言い難かった。今後、培養法との併用を含め開発されたイムノクロマト法の使用法および用途についての検討が必要である。

D - 4 . 患者糞便からのシガ様毒素直接検出

腸管出血性大腸菌を原因とする食中毒事件は大きな社会問題となる事が多く、また過去の事例では風評被害などの問題もみられるなど、より慎重な原因物質の特定が求められる場合が多い。本年度の研究では実際に本邦において大きな社会問題となった食中毒事件の患者より分離された株を用いた検査を行い、複数の検査法を用いて原因物質の特定することの重要性を示した。本研究で用いたBead-ELISA法は免疫学的検出系の中でも特に高い検出感度(数十~数百pg/ml程度)を実現する事が可能となっており、前述のCDCが指定する生物兵器に使われる可能性の高い蛋白毒素に対する検出系の構築も可能である。我々は現在様々なタンパク毒素に対する特異的抗体の構築を進めており、今後、作出される抗体を用いた高感度免疫学的検出系の構築を進めていく予定である。

D - 5 . 複数の病原体を検出できる核酸クロマトの開発

単独プライマーは高感度であるが、複数の病原体を一つ一つ増幅して検査しなければならず、手間と時間がかかる。複数の病原体を同時に調べる方法としてmultiplex PCR法があるが、プライマーの組み合わせに制限があり、単独プライマーに比べ感度は劣る。本技術では多種類のプライマーを混合しても単独プライマーと同等の感度を達成でき、かつ特異的増幅をDNAクロマトで目視により5分で確認できるため、増幅の有無に高価なリアルタイムPCR装置や面倒な電気泳動などを必要としない(図9)。そのため本システムは生物剤の現場での検出に適用できるだけでなく、検査や感染症の集団発生時にも利用できる。

E . 結 論

1. 天然型リシンの認識が可能と思われる抗リシン B サブユニット特異抗体を作製し

- た。
2. マウス肺炭疽モデルにおいて EA1 は現行ワクチンの主成分である PA 単独に比べ優れた防御効果を示した。
 3. 粘膜中の EA1 抗体価を維持するためには 2-3 ヶ月毎の追加免疫が必要である。
 4. コレラ毒素に対して特異性の高いイムノクロマト法を開発した。
 5. 腸管出血性大腸菌感染症患者便から免疫学的迅速同定法 (Bead-ELISA法) により直接、シガ様毒素の検出を行った。
 6. 現場や野外で使用できる迅速・簡便な核酸クロマト法を開発した。

F . 健康危険情報
特になし。

G . 研究発表

論文発表

1. Firew Kassa Esho, Budbazar Enkhtuya, Akiko Kusumoto and Keiko Kawamoto. Microbial assessment and prevalence of foodborne pathogens in natural cheeses in Japan, *BioMed Research International*. 2103: 205801, 2013.
2. Hayashi M, Natori T, Kubota-Hayashi S, Miyata M, Ohkusu K, Kawamoto K, Kurazono H, Makino S, Ezaki T. A new protocol to detect multiple foodborne pathogens with PCR dipstick DNA chromatography after six-hour enrichment culture in a broad-range food pathogen enrichment broth. *BioMed Research International*. 2103: 295050, 2013.
3. Kusumoto A, Miyashita M, Kawamoto K. Deletion in the C-terminal domain of ClpX delayed entry of Salmonella enterica into a viable but non-culturable state. *Res Microbiol*. 164(4):335-41, 2013.
4. Ohji S, Yamazoe A, Hosoyama A, Tsuchikane K, Ezaki T, Fujita N., The Complete Genome Sequence of Pseudomonas putida NBRC 14164T Confirms High Intraspecies Variation. *Genome Announc.* ; 2(1). pii: e00029-14, 2014.
5. Mori S, Imamura F, Koga Y, Uramoto H, Ezaki T, Sugimoto M., Pulmonary Mycobacterium abscessus disease in a patient receiving low-dose methotrexate for treatment of early rheumatoid arthritis. *J Infect Chemother*. 19(6):1146-51, 2013.
6. Ogura M, Yano H, Sato M, Nakamura A, Wakimoto Y, Ohkusu K, Ezaki T., Comparative analysis of MRSA strains isolated from cases of mupirocin ointment treatment in which eradication was successful and in which eradication failed. *J Infect Chemother*. 19(2):196-201, 2013.
7. Zaw MT, Yamasaki E, Yamamoto S, Nair GB, Kawamoto K, Kurazono H: Uropathogenic specific protein gene, highly distributed in extraintestinal uropathogenic *Escherichia coli*, encodes a new member of H-N-H nuclease superfamily. *Gut Pathog*. 5: 13, 2013
8. Nitaya Indrawattana, Orawan Sungkhachat, Nitat Sookrung, Manas Chongsa-nguan, Anchalee Tungtongchitr, Supayang Piyawan Voravuthikunchai, Thida Kong-ngoen, Hisao Kurazono and Wanpen Chaicumpa: *Staphylococcus aureus* clinical isolates: Antibiotic susceptibility, molecular characteristics and ability to form biofilm. *BioMed Research International*, 2013: 314654, 2013.
9. Eiki Yamasaki, Ryuta Sakamoto, Takashi Matsumoto, Fumiki Morimatsu, Hiroko Toyoi, G. Balakrish Nair, Hisao Kurazono and Takayuki Kurazono: Development of an immunochromatographic test strip for detection of cholera toxin. *BioMed Research International*. 2103: 679038, 2013.
10. Shin Sukegawa, Yasuhiro Ihara, Kaoruko Yuge, Shengbin Rao, Kentaro Oka, Fumihiko Arakawa, Tatsuya Fujimura, Hiroshi Murakami, Hisao Kurazono, Motomichi Takahashi, Fumiki Morimatsu: Effects of oral administration of heat-killed *Enterococcus faecium* strain NHRD IHARA in post-weaning piglets. *Animal Science Journal*, in press, 2014.

H . 知的財産の出願・登録状況
特になし

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）
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と標準化に関する研究
分担研究報告書

「検体調整法およびスクリーニング法の普及、バイオテロ検査マニュアルの作製
と検査担当者の育成」

研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所長
研究協力者	千葉 一樹	福島県衛生研究所
	小林 慎一	愛知県衛生研究所
	杉浦義紹	神戸市環境保健研究所
	山下育孝	愛媛県立衛生環境研究所
	飯塚 節子	島根県保健環境科学研究所
	小河正雄	大分県衛生環境研究センター
	三好 龍也	堺市衛生研究所

研究分担者	宮崎 義継, 梅田 隆	国立感染症研究所
研究代表者	倉根一郎	国立感染症研究所

研究要旨:

バイオテロに使用される病原体の可能性のある真菌属、なかでも*Coccidioides* によるバイオテロを含めた健康危機対応のため、(1).に病原体検出技術向上を計った。各ブロックの研究協力者が技術的な指導的立場の構築のため、検査技術の習熟・徹底を目指し実技研修を行った。(2).これらの実技研修から得られた技術・知識を、真菌検査に馴染みのない地方衛生研究所がバイオテロ対象真菌検査に取り組める事を目的とした真菌検査マニュアルの作成を行った。このマニュアルは全国地方衛生研究所に配布予定である。

A . 研究目的

バイオテロによる健康危機は時、場所を選ばず発災する。これまで、国におけるバイオテロ対策の一環として、この研究班を通して健康危機対応のモチベーションを高めてきた。2008 年度米国における炭疽菌芽胞によるバイオテロ事件から発生した本邦での「白い粉事件」健康危機事例における地方衛生研究所が検査技領域で示した役割の再認識を始めとし、そ

の後、バイオテロ関連特定病原体の中のウイルス、さらに細菌の網羅的スクリーニング検査検出キットの評価を行った。平成23年度からはバイオテロ特定病原体の対象である真菌類の同定スクリーニング検査検出キット活用の習熟を目的に、一般的な真菌類を検査対象にし、検査技術の習得を試みた。

次年度はバイオテロ対象の真菌類の中

で致死率の極めて高い*Coccidioides*属の検出を試みた。国立感染症研究所作製の*Coccidioides*属検出キット(プロトコール)に則り、プロトコールに基づいた技術的対応と共に検出技術の客観的な評価を試みた。

しかし、測定結果には、良、可、非がみられ、今年度、改めて*Coccidioides*属検出のための実技研修を行った。

B . 研究方法

[1] 検査技術習熟実技研修

1) *Coccidioides*属検出実技研修概要

開催日時: 平成 25 年 11 月 18 日(火)

10:00 AM ~

開催場所: 神戸市環境保健研究所

研修内容:

(1) *Coccidioides* 属の基礎的な教育講演。

コクシジオイデス症の遺伝子診断法

講師: 宮崎義継

輸入真菌感染症の概要を説明され、そのなかで最も危険性の高い

Coccidioides 菌を中心に菌の特徴、分布、国内感染者数、検査方法と診断法、および菌の取り扱い上の注意点について解説。

実技内容: 「PCR によるコクシジオイデス菌の検出」

講師: 梅山 隆

コクシジオイデスの DNA を真菌検出の共通領域であるリボゾーム RNA 遺伝子領域 (18S - 5.8S - 26S) のうち ITS - NL 領域を増幅するプライマー対、コクシジオイデス菌の選択的検出プライマー対を用いた PCR 法による遺伝子検出。

(2) 前年度班会議で評価したコクシジオイデス遺伝子検出実技再検討

(3) PCR 試薬反応過程で、真菌鏡検実習。不活化された真菌標本について顕微鏡下で観察、それぞれの菌種の形態的な特徴について受講し確認を計る。対象真菌: コクシジオイデス、ヒストプラズモシス、クリプトコッカス。

(4) 電気泳動による PCR 増幅産物の確認、評価、確認できない場合は原因究明。

18:30 実技研修、評価・反省会終了

2) 検体、試薬の調整・調達

検体は国立感染症研究所真菌部にて調達された。試薬、ピペット類、遺伝子増幅機器等の検査機器類等は神戸市環境保健研究所で可能な限り準備した。

[2] 「バイオテロ対策病原性真菌検査マニュアル」の作製

以下の目次で作製に臨んだ。

1. 真菌について(総説)
2. バイオテロの対象となるヒト病原真菌
3. 臨床検体の検査に関する注意事項
4. 検査方法
 - 1) 臨床検体 (サンプル)
 - 2) 分離培養
 - 3) 分子生物学的手法による病原真菌の同定
5. 感染症法届出基準
6. 参考文献
7. 研究分担者および協力者

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C . 研究結果

[1] コクシジオイデス遺伝子検出実技研修結果

ITS/NL系PCRでは、全ての実施者でポジティブコントロール(PC)のバンド(約500bp)がみられ、ネガティブコントロール(NC)ではバンドはみられなかった。しかし、サンプル(Sample 1: *C. posadasii* DNA、Sample 2: *C. immitis* DNA)では、目的のバンド(約1.2kbp)薄い場合やバンドがみられない場合があり、非特異反応のバンドもみられた。

Coi 9系PCRでは、全ての実施者でSample 1、2、PCで目的の大きさのバンド(Sample 1:約560bp、Sample 2:約500bp、PC:約240bp)がみられ、NCではみられなかった。

全ての実施者でITS/NL系、Coi 9系ともPCの反応がみられ、コンタミネーションもなく結果が得られ、実施者の検査手技の習得は確認できた。しかし、ITS/NL系ではサンプルを用いた場合、反応性が悪く、アニーリング温度の設定、検査試薬の変更など反応条件の検討が必要と考えられ再検討を行った。

[2] マニュアルの作製

「バイオテロ対策病原性真菌の検査マニュアル」が編集されている。平成26年3月31日発行予定である。

D. 考察

前年度は国立感染症研究所作製の*Coccidioides*属検出キット(プロトコール)に則り、地衛研の客観的な検出技術の評価と共に、検出キットの相対的な評価を試みた。その結果は必ずしも完璧な同定技術をえられたものではなかった。

そのため、今年度は研究協力員一堂に会しコクシジオイデス遺伝子検出のための実技研修を行った。

昨年度と異なり、全ての実施者でITS/NL系、Coi 9系ともPCRの反応がみられ、コンタミネーションもなく結果が得られ、実施者の検査手技の習得は確認できた。しかし、ITS/NL系ではサンプルを用いた場合、反応性が悪く、アニーリング温度の設定、検査試薬の変更など反応条件のさらなる検討が必要な局面にも遭遇した。改良点が確認できているため、次回からは正確な反応系の遂行が行えるものと考えられる。一つの連係プレーの一例としたスキームを図4に掲げた。

一方、「バイオテロ対策病原性真菌の検査マニュアル」の作製は最終校正の段階に入り、予定通りの発行である。この真菌検査マニュアルが病原性真菌による健康危機発生時に迅速な対応が行える一助として活用が望まれる。

E. 結論

1. コクシジオイデス遺伝子検出実技研修結果、すべての実技研修実施者に陽性コントロールの反応が確認できた。しかし、サンプル検体では目的バンドの薄い場合、見られない場合等があり、PCR条件設定の再検討、修正を行った。
2. 「バイオテロ対策病原性真菌の検査マニュアル」が編集されている。病原性真菌による健康危機対応時の検査マニュアルとして一助となることが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kushiro M, Saitoh H, Sugiura Y, Aoki T, Kawamoto S, Saito T. Experimental infection of *Fusarium proliferatum* in *Oryza sativa* plants; fumonisin B₁ production and survival rate in grains. Int J Fd Microbiol. 156:204-208, 2012.
- 2) Sugiura Y. *Fusarium* species: mycotoxin production, and plant and murine pathogenicity. Mycotoxins. 62: 49-61, 2012.
- 3) Sato N, Sugiura Y, Nukuzuma S, Udagawa S, Tanaka, T. Two rare contaminants, *Helicostylum pulchrum* and *Scopulariopsis flava*,

found in a white natural cheese, and the effect of their presence. Jpn J Fd Microbiol. 30:15-20, 2013.

2. 学会発表

なし

H . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

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）
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と標準化に関する研究
分担研究報告書

バイオテロ関連疾患の臨床診断支援方法の開発
バイオテロ関連感染症の臨床診断と治療

研究分担者	岩本 愛吉	東京大学医科学研究所 先端医療研究センター 感染症研究分野
研究協力者	西條 政幸 安藤 秀二 藤井 毅 鯉淵智彦	国立感染症研究所 ウイルス第一部 国立感染症研究所 ウイルス第一部 東京医科大学八王子医療センター 感染症科 東京大学医科学研究所附属病院 感染免疫内科

研究要旨 生物テロに関連する疾患について、インターネット上で手軽に情報を得ることを目的とした『生物テロ関連疾患の診断・検査・治療マニュアル』のホームページを改訂した。昨年度までに、感染症法に基づく特定病原体等のうち、一種、二種および三種に含まれる計 35 種類のバイオテロ関連疾患に関する情報を掲載していたが、今年度は新たに特定病原体等に指定された重症熱性血小板減少症候群（SFTS）を含む 2 疾患を追加した。これにより一種から三種の病原体すべてと四種病原体の大部分を網羅することができた。今後とも各病原体（疾患）の最新情報の追加などを行い、ホームページの更新作業を進めていく方針である。さらにバイオテロ診断支援の一環として、関連各施設・機関との連携体制の構築について具体的方法を検討した。

A．研究目的

生物テロに用いられる可能性のある病原微生物は多彩で、その多くは極めて稀でかつ重篤な疾病を引き起こす。すなわち、感染拡大防止と生命予後改善のためには、生物テロ関連疾患の臨床診断、検査材料および検査方法の選択、治療法の選択について、多くの医療従事者が正確な知識を、インターネットなどを通じて手軽に得られることが大切である。本研究においては、最新のデータに基づいた、インターネット上で広く利用できる臨床診断および治療マニュアルの作成をおこなった。その内容を入れた CD-ROM を作成・配布や、新たに立ち上げた改訂専用のホームページを通じて、専門家の意見を取り入れながら修正とアップデートをおこなってきた。新たな疾患も追加して、より内容の充実した、使いやすいマニュアルを作成し、最終的に一般の医療従事者にとっても有用なホームページを

公開することを目的とする。

B．研究方法

すでに作成していた 35 種類のバイオテロ関連疾患情報の妥当性・正確性等について確認するとともに、新たに特定病原体に指定された重症熱性血小板減少症候群（SFTS）など、2 疾患を追加した。

（倫理面への配慮）

特になし

C．研究結果

2010 年までに本研究において作成していた 15 疾患（(1) ウイルス性出血熱、(2) ウエストナイル熱・脳炎、(3) Q 熱、(4) 狂犬病、(5) コクシジオイデス症、(6) SARS、(7) 消化管感染症、(8) 多剤耐性結核、(9) 炭疽、(10) 天然痘、

(11) 鼻疽・類鼻疽、(12) ブルセラ症、(13) ペスト、(14) ボツリヌス症、(15) 野兔病)に加え、さらに2011～12年には20疾患(1)西部ウマ脳炎、(2)東部ウマ脳炎、(3)ベネズエラウマ脳炎、(4)ダニ媒介性脳炎、(5)ヘンドラウイルス感染症、(6)リッサウイルス感染症、(7)日本脳炎、(8)南米出血熱、(9)ハンタウイルス感染症、(10) (11) Bウイルス症、(12)ニパウイルス感染症、(13)レプトスピラ症、(14)発疹チフス、(15)チクングニア熱、(16)ロッキー山紅斑熱、(17)サル痘、(18)黄熱、(19)回帰熱、(20)デング熱)を追加した。今年度は、2013年に新たに感染症法に基づく特定病原体(三種病原体等)に指定された重症熱性血小板減少症候群(SFTS)をホームページに追加し、また、三種病原体等の中で掲載がなかった日本紅斑熱リケッチアも加えた。これにより一種から三種病原体のすべてを網羅した。

D / E . 考察・結論

バイオテロに利用される恐れのある病原微生物によって引き起こされる疾患は、現在のわが国ではみることのないものがほとんどであり、臨床医の多くがそれらの病態に対する知識はなく、また診療疾患対象としての関心も有していないのが現状であると思われる。一方で、病原診断法やワクチンの開発に関しては、主に基礎系の研究者によって研究開発が国内外で行われている。したがって、本ホームページの作成にあたっては、一般の臨床医が容易に理解できるような工夫をおこなうとともに、広い見識を有する感染症専門家から最新の知見を加えながら常に最新の情報を提供することが重要である。これまで国内のインフェクションコントロールドクター(ICD)を対象としたアンケート調査結果に基づく改訂作業に加え、全国の感染症専門家によって組織された研究協力者からの意見を参考した改訂作業を実施してきたが、今年度は新たに重症熱性血小板減少症候群(SFTS)など2疾患を追加した。SFTSのような新興感染症についても迅速にホームページ上に掲載することができ、より利便性のある情報源へと整備することができた。診断支援ツールの一環として、ホームページの整備が必要な状況はこれか

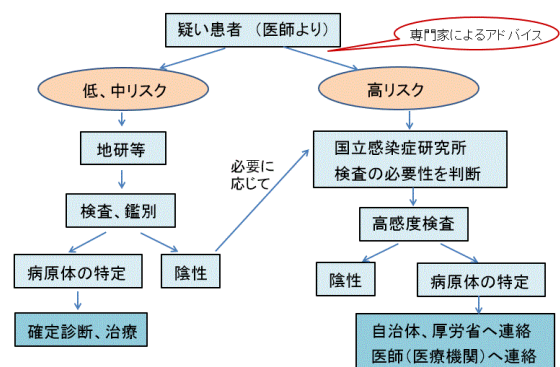
らも続くと考えられる。今後とも最新の情報を追加し、利用者の利便性を考えたホームページの改善を目指す必要がある：

(<http://bt.sfc.wide.ad.jp>)

また、バイオテロ診断支援の一環として、関連各施設・機関との連携体制の構築も重要な課題である。

このようなシステムの構築のためには、国内の施設で可能な臨床診断支援方法を把握しておくことが有用と思われる。これらの情報入手が可能となるよう今後も検討を進めていく必要がある。

疑い患者発生時の連携体制の構築(案)



	対応可能疾患	臨床検体	検査法など
A 研究室	炭疽菌	血液	LAMP 法
B 県衛生研究所	ボツリヌス菌・毒素	...	毒素遺伝子の塩基配列解析
C 大学	ウイルス性出血熱

F . 健康危険情報
特になし

G . 研究発表
1 . 論文発表
なし

2 . 学会発表
発表なし

H . 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)
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）
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と標準化に関する研究
分担研究報告書

各医療機関のバイオテロ対策を支援するための方策

研究分担者 松本 哲哉 東京医科大学微生物学講座 教授

研究要旨 国内の医療機関の多くは感染防止対策加算の新設に伴い、院内感染対策にさらに力を注ぐようになってきている。しかしバイオテロに関する準備状況はまだ十分とは言えず、さらなる対応策が必要と考えられる。そこで本研究においては、医療機関向けのバイオテロ対策のガイドラインを作成し、具体的な対策の指針を示すことを主な目的としている。昨年度の研究では、バイオテロ対策ガイドラインの基本骨格を作成し研究班における意見を求めた。今年度は高病原性インフルエンザ対策に向けたBCP作成のガイドライン等を参考にして、さらにたたき台となる案を作成することができたが、感染症診療に関するガイドラインが数多く存在しているため、関連する部分においては相互の内容に矛盾が生じないように、確認する必要があり、さらに詳細を詰めていく必要がある。

A．研究目的

世界の政情が不安定な状況において、テロ行為のリスクは高まっている。国内においてもバイオテロが起こる可能性は否定できず、各医療機関において対策を行う必要がある。ただしバイオテロが起こった際に想定される状況は多様であり、国内においてもその準備に関する具体的な指針がないのが現状である。そこで、本研究においては、各医療機関が今後、バイオテロに対する準備を行う上で必要なガイドラインを作成することを目的としている。

B．研究方法

平成 24 年度はバイオテロに関する国内外の各種資料を入手し、それらを参考にし日本の医療現場の現状に合わせたガイドラインの基本骨格を作成した。平成 25 年度はそれを受けてさらに具体的な内容の検討を行った。

C．研究結果

医療機関におけるバイオテロ対策ガイドラインの作成

バイオテロ対策のガイドラインについては、現在の医療機関が置かれた状況を考慮した上で、より実践的で効率的な内容にすることを目指している。

昨年作成したガイドラインの骨格に肉付けする形で、各項目の内容についてさらに検討を行

った。その主な内容としては、以下の通りである。

1) 医療機関のバイオテロの準備に向けた薬剤等の準備

バイオテロの病原体は多様であり、それらに用いられる薬剤も各病原体に適したものが必要となる。ただし特殊な薬剤をバイオテロ対策のためだけに各医療機関が在庫として準備しておくことは難しいと考えられるため、基本的に一般的な診療で用いられる薬剤を中心として、病原体別にリストを作成した（表 1）。なお、薬剤の表記方法については、わかりやすいように商品名で記載するようにした。

2) 医療機関のバイオテロの準備に向けた个人防护具等の準備

バイオテロ対策において、対応する医療従事者を感染のリスクから守るためには、个人防护具（PPE）の準備は欠かせない。しかし个人防护具も薬剤と同様にバイオテロ対策に限定した物品を備えておくことは現実的に困難と考えられるため、日常診療で使用される物品を中心にリストを作成した。これについては、各医療機関で在庫の状況を把握しておくことが必要と思われるため、インフルエンザ対策のガイドライン等にならって、商品名、定数在庫、使用期限、取扱業者を予め記入しておけるようにリストを作成した（表 2）。なお、このスタイルは文献 1 を

参考に作成した。

3) 準備状況を把握するためのチェックリストの作成

各医療機関において、基本的に対応していただきたい項目を推奨アクションとして列記し、実施検討、実施中、実施済の3項目に分けて確認できるようにした。なお、このスタイルはWHOによる「パンデミック・インフルエンザに対する病院管理体制チェックリスト パンデミック(H1N1)2009を中心に(翻訳版)」を参考に作成した(文献2)。

4) バイオテロ患者の診療フローチャート

バイオテロの患者は最初からそれが疑われる状況で医療機関を受診するとは限らず、逆に原因不明の疾患として扱われる場合が多いと考えられる。そのため、急性感染症の可能性が考えられる患者を対象として、バイオテロを念頭として考えた場合の一般的なフローチャートを作成した(図1)。

D. 考察

現在、国内の各医療機関では、診療改定に伴う感染対策に対する加算の実施に伴い、院内感染対策面で人的および設備等の充実がはかられるようになってきている。またインフルエンザについても、新型あるいは高病原性のインフルエンザの流行を見据えて、国や自治体の後押しも加わって、

各医療機関におけるBCP(business continuity plan:事業継続計画)の作成が行われている。

まだ上記の対策が軌道に乗ったとは言えない現在の状況において、さらにバイオテロ対策の必要性について各医療機関に啓発したとしても、実際の準備を行って頂ける施設はかなり限定されるものと思われる。

そこで本研究においては、院内感染対策やインフルエンザ対策と個別に行うのではなく、それらの対策の延長線上として対応してもらうことを念頭に置いている。

本ガイドラインについては、まだ細部の点において修正を行う必要があるため、今後、まずは本研究班の中で引き続き検討を行い、さらに公開可能な状況になった場合は、本研究班の岩本愛吉先生を分担研究者とするグループで作成されているバイオテロ対策ホームページ上にア

ップしていただき、一般からのパブリックコメントを募る予定としている。

E. 結論

各医療機関がバイオテロ対策を実施する上での参考となるガイドラインの作成を計画し、今年度はさらに具体案の作成を行った。検討した内容は主に新型インフルエンザ等の各種ガイドラインを参考にし、バイオテロに当てはめて作成したものが中止であり、今後、さらにそれらのガイドラインとともに活用できるような内容に修正を行っていく必要がある。

参考文献

1. 新型インフルエンザ等発生時の診療継続計画作りの手引き 成 24 年度 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「新型インフルエンザ発生時の公衆衛生対策の再構築に関する研究」分担研究「新型インフルエンザ等発生時の診療継続計画作りに関する研究」分担研究者 吉川 徹

http://www.virology.med.tohoku.ac.jp/pandemicflu/i/tool/sinryou_tebiki.pdf

2. WHO「パンデミック・インフルエンザに対する病院管理体制チェックリスト パンデミック(H1N1)2009を中心に(翻訳版)」平成24年度厚生労働研究費新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業「新型インフルエンザ発生時の公衆衛生対策の再構築に関する研究」(研究代表者:押谷 仁)

<http://www.virology.med.tohoku.ac.jp/pandemicflu/i/tool/focusonpandemic09.pdf>

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特許取得なし

2. 実用新案登録
登録なし

3. その他
なし

表 1. バイオテロに使用される代表的な治療薬の一覧

	推奨商品名 (用法用量)	代替商品名 (用法用量)	備考
炭疽	シプロキサシ (1回 300mg 1日2回 点滴静注)	レボフロキサシ (1回 500mg 1日1回, 点滴静注)	ダラシ S, バンコマイシ ン、チエナム、ペニシリ ン G も有効。
ブルセラ症	ビブラマイシ (100mg、2錠 分2) + ゲンタマイシ注 (1 回 5mg/kg 1日1回 筋注, 7 日間)	ビブラマイシ (100mg、2錠 分 2) + リファジ (150mg、4 - 6 カプセル 分1)	内服薬はいずれも 42 日間 の投与を推奨
コレラ	クラビット (500mg、1錠 分 1 3日間)	ビブラマイシ 100mg、2錠 分 2 3日間)	輸液が基本。抗菌薬は排菌 期間の短縮を目的として使 用
鼻疽	セフトジジム (1日 4g 分2~ 4 点滴静注)	ゲンタマイシ (1日 80~120mg 分2~3 筋注・点滴静注)	イミペネム、シプロフロキ サシ、ST 合剤なども有効
類鼻疽	セフトジジム (1日 4g 分2~ 4 点滴静注)	チエナム (1日 2g, 分4 点滴静 注)	アモキシシリン/クラブラ ン酸、メロペネムなども有 効
ペスト	硫酸ストレプトマイシ (1 回 1g 1日2回 筋注)	シプロキサシ (1回 400mg 1日2 回 静注)	ゲンタシやビブラマイシ ンも有効
野兎病	ゲンタマイシ (1日 80~ 120mg 分2~3 筋注・点滴静 注) + ミノサイクリン (1日 200mg 分2 内服)	硫酸ストレプトマイシ (1回 1g 1日2回 筋注) + ミノサイ クリン (1日 200mg 分2 内服)	GM+MINO は 7~14 日間継続
Q熱	ミノマイシ (1回 100mg 1 日2回 点滴静注)	クラビット (500mg 1錠 分1 2 週間)	重・中等症例はミノマイシ ン静注を推奨
コクシジ オ イデス症	アンビゾーム (1日 1回 2.5mg/kg, 点滴静注)	ジフルカン (1回 400mg 1日1 回 静注)	治療期間はジフルカンでは 6 か月以上
ボツリヌ ス 毒素	乾燥ボツリヌス抗毒素注射用 (1V 注射用水 20 mL に溶解 し静注または点滴静注)		症状が軽減しないときは 3 ~ 4 時間ごとに追加

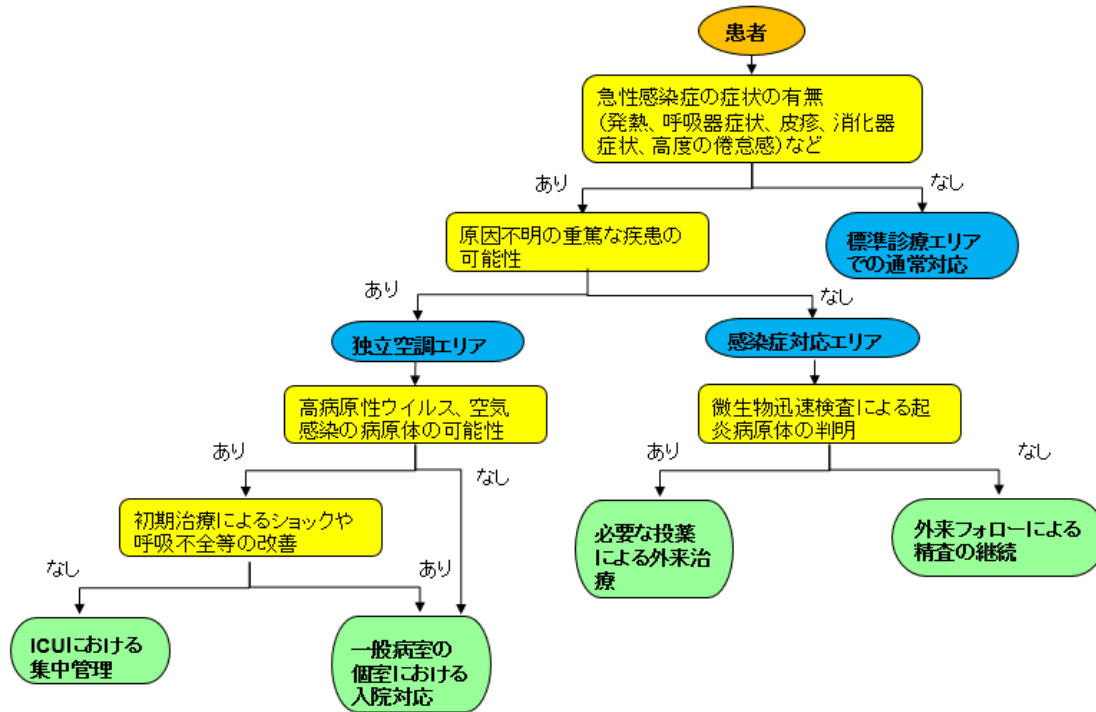
表2. バイオテロへの対応に必要な

	商品名	定数在庫	使用期限	取扱業者
	サージカルマスク			
	N95 マスク			
	手袋(プラスチック)			
	手袋(ニトリル)			
	ガウン			
	エプロン			
	フェイスシールド			
	キャップ			
	シューズカバー			
	擦式手指消毒剤			
	エタノール			
	次亜塩素酸ナトリウム			
	4級アンモニウム			

表3. 医療機関のバイオテロの準備に向けたチェックリスト

推奨アクション	実施検討	実施中	実施済
バイオテロを想定したマニュアルを作成している。	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
バイオテロに関連した院内の委員会を組織している。	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
必要な個人用防護具(PPE)を確認し、確保している。	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
必要な治療薬を確認し、確保している。	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
バイオテロの想定訓練を実施している。	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
バイオテロに関する院内の勉強会等を実施している。	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

図 1. バイオテロを考慮すべき状況における診療のフローチャート



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）
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と標準化に関する研究
分担研究報告書

原因不明感染症の診断法に関する研究

研究分担者 西條政幸 国立感染症研究所ウイルス第一部

研究要旨：不明病原体による感染症発生の際に，EU，米国等の感染症研究機関でどのような診断体制でどのような対応を行うか，また各国の診断技術について情報交換を行うため，GHSAG Unknown Pathogen Workshop（不明病原体感染症診断技術に関するワークショップ）に参加した．本ワークショップでは，事前に不明病原体感染症発生のシナリオと不明病原体を含む検体を各国に送付し，各国の感染症研究機関で行った検査結果について報告しあう形式で行われた．不明病原体に関する診断アルゴリズムが整備されており，対応部局（ウイルス感染症対応，細菌感染症対応，不明病原体感染症，バイオテロ対応など）が明確にされていた国もあった．日本は感染研において病原体検出を試みたが，検体輸送の遅延の問題および，不明病原体の輸入が不可能であったことから正確な病原体検出成績が得られなかった．不明病原体の検査には次世代シーケンサーが必ず用いられるようになったが，機種，手法，リード数が多様である．ランニングコスト，所要時間も考慮しなければならない．このため，各国の次世代シーケンサーによる検査結果データを共有し，効率的な検査の構築に役立てていくことになった．サンプルの送付・受取方法（輸送の遅延への対応，感染性病原体の扱い）についても改善が必要である．

研究協力者：福土秀悦，吉河智城，谷英樹，
下島昌幸（国立感染症研究所ウイルス第一部）；
影山努，中内美名（国立感染症研究所インフルエンザセンター），
松山州徳，白戸憲也（国立感染症研究所ウイルス第三部）；
永田典代（国立感染症研究所感染病理部）

A. 研究目的

原因不明感染症の診断は，患者の発生状況や背景要因，検査データ等から，検査対象とする病原体，検査に用いられる検体の種類，検査手法，除外診断等を考慮し，迅速かつ効率的に行われなければならない．同時に原因不明感染症の発生がバイオテロによるものかどうかを検討し，患者（および周辺）のケア，リスク評価，情報の発信が的確になされるような体制が整備されている必要がある．不明病原体感染症発生の

際に，EU，米国等の感染症研究機関でどのような診断体制でどのような対応を行うのか，また各国の診断技術について情報交換を行うため，GHSAG Unknown Pathogen Workshop（不明病原体感染症診断技術に関するワークショップ）に参加した。その概要について報告する。

B. 研究成果

GHSAG Unknown Pathogen Workshop について

平成 25 年 12 月 5 日～12 月 6 日，イギリス公衆衛生局（PHE，ロンドン）で GHSAG Unknown Pathogen Workshop（不明病原体感染症診断技術に関するワークショップ）が開催された。本ワークショップは G7 各国＋メキシコが参加する，世界健康安全保障行動ラボネットワーク（GHSAG-LN）による新興感染症や生物テロ対応への枠組みである。事前に不明病原体感染症発生のシナリオと不明病原体を含む検体を各国に送付し，各国の感染症研究機関で行った検査結果について，発表するという形で行われた。多くの国では不明病原体に関する診断アルゴリズムが整備されており，バイオテロ対策における新たな病原体検出手段の一つとして次世代シーケンサーが用いられていた。また，原因不明感染症の対応部局（ウイルス感染症対応，細菌感染症対応，不明病原体感染症，生物テロ対応など）が明確にされていた。また今回のワークショップではシナリオに含まれる質問事項（確定診断後の対応等）について議論がなされた。ワーク

ショップは昨年に引き続き 2 回目の開催である（日本は昨年不参加）。

シナリオ 1

シナリオ 1 は北ベトナムで軍事訓練を行った兵士が重症の肺炎になったという設定である。患者は野生動物の肉を摂取，屋外で睡眠をとり，サルやコウモリとの接触もあった。同僚 2 名にも後日発熱がみられた。臨床知見では肺出血等がみられ，検査データではリンパ球，血小板減少，CRP の上昇等が顕著であった（添付資料 1 参照）。これらのデータを参考にし，送付された臨床検体（血清，尿，気管支洗浄液）について種々の検査を行った（送付された病原体の答えはレプトスピラで，英国で発生したレプトスピラ症患者の検体を健常人血清，尿に混ぜたものであった。気管支洗浄液はレプトスピラを生食液に混ぜたものである。）。次世代シーケンサー，呼吸器感染症のマルチプレックス PCR あるいは cDNA チップ，レプトスピラ特異的 PCR により，日本，フランスを除くすべての国がレプトスピラ症であるという診断結果を示した。一部，電顕でレプトスピラ様の構造物も認められたという報告があった。日本は感染研ウイルス第一部，ウイルス第三部，インフルエンザセンター，感染病理部において，次世代シーケンサー，PCR，電子顕微鏡検査等を行ったが，レプトスピラ症を診断できなかった。これはサンプルが英国から発送されてから感染研に届くまで 9 日間かかり，その間，低温状態を保てず，サンプルの状態が

よくなかったこと、到着後、ウイルス検査を中心に行ったことからレプトスピラを検出できなかったと考えられた（輸送の経緯については後述）。

シナリオの質問事項に対して以下のような回答がなされた。

Q1.What is the differential diagnosis?

A. インフルエンザおよび PVL 陽性 *S. aureus*; プニヤウイルス(ハンタウイルス, CCHF ウイルス等); フィロウイルス(レストンエボラウイルスを除き, アジアでのフィロウイルス感染症はこれまでないので, 新種のフィロウイルスを考慮); SARS コロナウイルス; レプトスピラ; デングウイルス; マラリア

Q2.What is the confirmed diagnosis?

A. レプトスピラ症 (*Leptospira interrogans* による)

Q3.Do the patients pose an infectious hazard?

A. 尿サンプルは感染性あり; 検体の取り扱いにはグローブが必須

Q4.Was this a deliberate attack?

A. いいえ; レプトスピラ症は東南アジアでは一般的な感染症; レプトスピラ Select agent ではない

Q5.How would you treat and manage these patients?

A. Doxycycline, ceftriaxone が有効; 他のペニシリン系抗生物質でもよい

シナリオ 2

シナリオ 2 はデュアルユース会議出席後、胃腸症状を示した患者が 2 人発生したという設定（添付資料 2 参照）。臨床知見では腹痛、下痢、鮮血便がみられ、検査データでは好中球高値、肝酵素高値等が認められ

た。これらのデータを参考に、送付された検体（血清、尿、便乳剤）について種々の検査を行った（答えは便乳剤に大腸菌 0157 を混ぜたもので、血清、尿は陰性。）。各国共に、病原性大腸菌を対象にした培養、PCR により大腸菌 0157 を検出した。次世代シーケンサーでも検出可能であった。このシナリオでは事前に BSL3 で扱うべき病原体を各国に送付するという通知がなされていた。感染研では「不明の BSL3 病原体」は輸入不可能と判断し、感染性サンプルの輸入および検査を断念した。その後、不活化処理後の便乳剤サンプルのみ送付してもらうこととなった。ワークショップ直前にサンプルが届いたため、検査が間合わず、ワークショップにおいて結果を示すことができなかった。メキシコも同様の理由でサンプルを輸入できなかった。

シナリオの質問事項に対して以下のような回答がなされた。

Q1.How will your laboratory investigate this disease?

A. 血液検体からの分離培養は不可; 便サンプルからの分離培養（ソルビトールマッコンキー寒天培地:SMAC）; RPLA あるいは EIA 法等による毒素 VT 検出; VT 遺伝子検出（特異的 PCR）あるいは腸管感染症をターゲットとしたマルチプレックス PCR; 次世代シーケンサー

Q2.What advice would you give to the embassies involved?

A. 他に患者がいるかどうか調査; 感染源を特定するため、食材と調理業者の調査; 他の会議出席者への通知; 患者との接触者調査; 国際的な情報シェアリング

Q3.What is the risk to the other

conference participants?

A. 同じ食材を摂取した人はハイリスク；感染源の特定が重要

Q4, What is the risk to the city population?

A. 感染源による；外部の調理業者が感染源であれば、アウトブレイクは拡大すると予想される；食材の提供元（農場，食肉処理場，栽培施設等）の調査が必要

Q5. How will you forensically investigate the perpetrators or otherwise of this outbreak?

A. 感染源の特定；原因となった病原体 (O157) のゲノム解析；原因食材にアクセスできる人を調査；accidental か deliberate か捜査が必要

シナリオ 1 の検体の発送から受け取りまでの経緯

上述のように、シナリオ 1 の検体について、日本は輸入の段階で 9 日間要し、その間、検体を凍結状態で保つことができなかった。このことが、感染研で行った次世代シーケンシングでレプトスピラを検出できなかった一つの要因であると考えられる。

検体の発送から受け取りまでの経緯を報告する。11 月 4 日(月)シナリオ 1 の検体(血清，尿，気管支洗浄液)をドライアイス詰めでイギリス PHE から日本へ発送された。11 月 8 日(金) DHL Tokyo から FAX で荷物の到着の連絡を受ける(FAX がウイルス第三部部長室に届いたため、ウイルス第一部による対応が遅れたと思われる)。同日、夕刻、通関手続きのため、商品の詳細、検疫該当の有無の連絡を行う。11 月 9 日(土) DHL から佐川急便(隅田店)へ荷物が渡る。11 月 10 日(日)佐川急便(武蔵村山支店)感

染研の住所を確認できず、配達できないため、そのまま保管(室温)。11 月 13 日(水)感染研から DHL に問い合わせ。その日の夕方に佐川急便から荷物受け取り。荷物を確認。保冷状態は保たれていなかった(図)。以上のように、検体の通関手続きに支障はなかったが、国内の業者間の伝達が不十分であったため、輸送に遅延が生じたと思われる。他国の感染症研究機関は 11 月 8 日(金)に検体を受け取っている。

C. 考察

今回のワークショップでは検体の国際輸送に際して課題があることが明らかにされた。シナリオ 1 は輸送の遅延により、検体の冷凍保存状態を保てなかった。しかし、検体の国際輸送が滞ることは想定されていなければならない。今後は多少の遅延があってもドライアイス詰め状態を保てるような輸送方法を改善しなければならないという議論がなされた。一方、シナリオ 2 において、感染研では「BSL3 で扱うべき不明病原体」を輸入することができず、ワークショップ直前まで「BSL3 で扱うべき不明病原体」への対応が決まらなかった。その後、不活化したサンプルを輸入できたが、検査が間に合わなかった。なお、EU 各国、米国では「トレーニングのための病原体」として「不明の BSL3 病原体」を問題なく輸入できていた。バイオテロが疑われる事象が発生した場合、不明病原体の国際輸送が必要となる可能性もある。このため、感染性の不明病原体をいかに遅延なく輸入(あるいは

は輸出)するかどうか,今後,議論を進め,その対策を講じておく必要がある.

近年,病原体ゲノム情報の蓄積や次世代シーケンサーをはじめとする網羅的遺伝子解析技術の進歩により,新たなゲノムベースの感染症診断法が開発されている.この技術は,新種病原体,不明病原体検出に応用できることから,バイオテロ対策における新たな病原体検出手段の一つとして注目されている.次世代シーケンサーは,解析技術が年々進化しており,機種,リード数,ランニングコスト,所要時間も多様である.このため,今回のワークショップで得られた次世代シーケンサーによるデータを各国で共有し,効率的な検査の構築に役立てていくことになった.

D. 結論

- 1) GHSAG 不明病原体感染症診断技術に関するワークショップに参加した.
- 2) 事前に送付された不明病原体を含む検体に関し,各国感染症研究機関で行った検査結果について議論がなされた.
- 3) 日本は感染研において病原体検出を試みたが,検体輸送の遅延の問題および,不明病原体の輸入が不可能であったことから十分な結果が得られなかった.
- 4) バイオテロ対策における新たな病原体検出手段の一つとして次世代シーケンサーが使われるようになった.
- 5) 次世代シーケンサーによる検査結果データを各国で共有し,効率的な検査の構築に役立てていくことになった.

5) サンプルの送付方法(輸送の遅延への対応,感染性病原体の扱い)について改善を目指すこととなった.

E. 研究発表

1 論文発表

- 1) Sakai K, Yoshikawa T, Seki F, Fukushi S, Tahara M, Nagata N, Ami Y, Mizutani T, Kurane I, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Komase K, Morikawa S, Takeda M. Canine distemper virus associated with a lethal outbreak in monkeys can readily adapt to use human receptors. *J Virol.* 87(12):7170-7175, 2013
- 2) Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, Ishido A, Shigeoka T, Tominaga T, Kamei T, Honda M, Ninomiya D, Sakai T, Senba T, Kaneyuki S, Sakaguchi S, Satoh A, Hosokawa T, Kawabe Y, Kurihara S, Izumikawa K, Kohno S, Azuma T, Suemori K, Yasukawa M, Mizutani T, Omatsu T, Katayama Y, Miyahara M, Ijuin M, Doi K, Okuda M, Umeki K, Saito T, Fukushima K, Nakajima K, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Fukuma A, Ogata M, Shimojima M, Nakajima N, Nagata N, Katano H, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Yamagishi T, Oishi K, Kurane I, Morikawa S, Saijo M. The First Identification and Retrospective Study of Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome in Japan. *J Infect Dis.* Dec 12. 2013.
- 3) Yoshikawa T, Saijo M, Morikawa S.

Emergence of zoonotic orthopox virus infections. In *Viral Infections and Global Change* (ed. Sigh SK), pp377-387, 2014, Wiley Blackwell, New Jersey

2 学会発表

- 1) 吉河智城, 福士秀悦, 谷英樹, 宇田晶彦, 谷口怜, 福間藍子, 前田健, 高橋徹, 森川茂, 下島昌幸, 西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の確定診断に使用されるコンベンショナル PCR の評価, 及びリアルタイム定量 PCR との比較. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸
- 2) 福間藍子, 福士秀悦, 谷英樹, 吉河智城, 谷口怜, 下島昌幸, 森川茂, 前田健, 西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の血清学的診断法の開発. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸
- 3) 長谷川秀樹, 亀井敏昭, 高橋徹, 鈴木忠樹, 片野晴隆, 中島典子, 福士秀悦, 下島昌幸, 前田健, 水谷哲也, 森川茂, 西條政幸. 日本国内で発生した重症熱性血小板減少症候群の 1 剖検例. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸
- 4) 西條政幸, 高橋徹, 前田健, 水谷哲也, 大松勉, 吉河智城, 谷英樹, 福士秀悦, 下島昌幸, 福間藍子, 緒方もも子, 鈴木忠樹, 中島典子, 片野晴隆, 永田典代, 長谷川秀樹, 山岸拓也, 倉根一郎, 森川茂. 後方視的に重症熱性血小板減少症候群と診断された 11 名のウイルス学的・臨床的・疫学的研究. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸
- 5) 森川茂, 木村昌伸, 福士秀悦, 福間藍子, 加来義浩, 朴ウンシル, 谷英樹, 吉河智城, 井上智, 今岡浩一, 下島昌幸, 西條政幸, 前田健. SFTS ウイルス抗体陽性動物の調査. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸
- 6) 谷口怜, 福士秀悦, Masangkay Joseoh, 渡辺俊平, 大松勉, 下田宙, 前田健, 福間藍子, 吉河智城, 谷英樹, 下島昌幸, 西條政幸, 明石博臣, 吉川泰弘, 久和茂, 森川茂. フィリピンのコウモリからの重症熱性血小板減少症候群ウイルスに反応する抗体の検出. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸
- 7) 宇田晶彦, 福士秀悦, 加来義浩, 吉河智城, 下島昌幸, 新倉綾, 井上智, 安藤秀二, 前田健, 西條政幸, 森川茂. マダニからの SFTS ウイルス遺伝子の検出. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸
- 8) 下島昌幸, 福士秀悦, 谷英樹, 吉河智城, 福間藍子, 谷口怜, 前田健, 高橋徹, 西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群ウイルスに対する ribavirin の in vitro 増殖抑制効果. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸
- 9) 福士秀悦, 谷英樹, 吉河智城, 谷口怜, 福間藍子, 緒方もも子, 下島昌幸, 森川

茂,西條政幸.ナイジェリアにおけるリ
フトバレー熱の血清疫学.第61回日本
ウイルス学会学術集会,2013年11月
10-12日,神戸

- 10) 谷英樹,下島昌幸,福間藍子,谷口怜,
吉河智城,福士秀悦,森川茂,前田健,
高橋徹,西條政幸.重症熱性血小板減少
症候群ウイルス GP を外套したシュード
タイプ VSV の作製.第61回日本ウイルス
学会学術集会,2013年11月10-12日,神
戸

- 11) 高橋徹,前田健,亀井敏昭,水谷哲也,
下島昌幸,福士秀悦,谷英樹,吉河智城,
森川茂,長谷川秀樹,中島典子,鈴木忠

樹,永田典代,片野晴隆,山岸拓也,大
石和徳,西條政幸.重症熱性血小板減少
症候群(SFTS)の日本における初症例
第61回日本ウイルス学会学術集会,2013
年11月10-12日,神戸

F.健康危険情報

なし

G 知的財産権の出願・登録状況

現在出願予定はない。



GHSAG UNKNOWN PATHOGEN EXERCISE SCENARIO 1

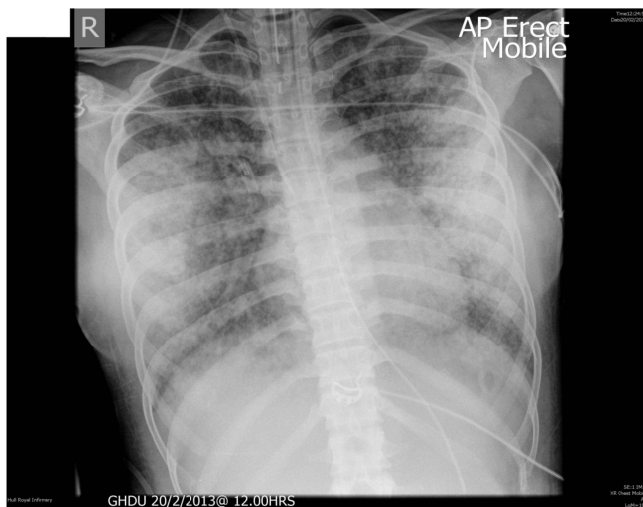
Details and Travel History

Three special forces recruits on exercise in the North Vietnamese border area have reported to their medical centre with fever and bleeding 1 week after returning from exercise. Their exercise involved jungle and river patrols. As part of the exercise, they have been living wild eating bushmeat and sleeping in the open. They have had contact with a number of indigenous groups and animals in the jungle, including monkeys and bats.

Clinical Details

The index case was a 29 year old female, previously exceptionally fit and active. She presented on 14/9/13 to her general practitioner (family doctor) unwell with fever, rigors & myalgia, but was reassured and sent home. On 19/9/13 she was much worse and admitted to the local hospital with shortness of breath & pleuritic chest pain. She was initially started on treatment for severe community acquired pneumonia with co-amoxiclav (amoxicillin-clavulanate) and clarithromycin. That night her condition deteriorated with a large pulmonary haemorrhage and she was transferred to intensive care. Her Chest X-ray at that point is shown below. Haematology and clinical chemistry results at her admission to intensive care are in the table below.

Her two companions developed fever 2 and 3 days respectively after her presentation, and are both stable under observation in hospital.



添付資料1 シナリオ1!

Test	Normal range	Results
Haemoglobin	13.5-18.0 g/dL	12.1
White cell count	3.2-11.0 x10 ⁹ /L	3.6
Neutrophils	1.9-7.7 x10 ⁹ /L	2.4
Lymphocytes	1.3-3.5 x10 ⁹ /L	0.4
Platelets	120-400 x10 ⁹ /L	52
INR	0.8-1.2	1.1
APTT	30-45s	36
Urea	3.6-5.0mmol/L	4.6
Creatinine	70-130umol/L	82
ALT	5-35IU/L	32
ALP	30-300IU/L	37
Bilirubin	3-17umol/L	15
Albumin	35-50g/L	32
CRP	0-10 mg/L	212

!

F% 2'#(!

+1,##!(% 2'#(!1% #: ##) l2, / - &#* 0

F% 2'#!IR" +A! : // * lJ2'(% 9 % 4=9 '!

F% 2'#!DIS, &#!=9 '!

F% 2'#!! IT, /) 31/ 0% - #/'% !% % #!=9 '!

!

A** &&) %!U5#(\$&) (U%4#,!* &<) / (\$&!, # (5' \$!4

=? V 1%&!\$!#!* &4#,#) \$&!* &<) / (&VW

D? V 1%&!\$!#!3/) 4&9 #*! * &<) / (&VW

I? " / ! \$! # l2% &&) \$ l2/ (#!%) !& 4#3&&5(!1%&& *VW

G? V % (\$! &!%* #' & #, % #!% \$&&3>W

Y? . / ; ! ; / 5' * l0/ 5! \$ # % \$!%) *!9 % % #! \$! # (#!2% &&) \$ (VW



GHSAG UNKNOWN PATHOGEN EXERCISE SCENARIO 2

Details and History

Two foreign diplomats, a 35 year old woman and a 55 year old man, who attended a conference in a major Western city on dual use technology are admitted to a local hospital with a 1 day history of abdominal pain and loose stools. One has seen fresh blood in his stools.

Clinical Details for Male Patient

Chest X ray was normal, vital signs are:

Temperature 37.2°C

Blood pressure 100/60

Heart rate 90

Respiratory rate 25

O₂ saturation 98%

Haematology and clinical chemistry results at admission are given in the table below.

Test	Normal range	Results
Haemoglobin	13.5-18.0g/dL	15.8
Haematocrit	42-45%	47%
Platelets	120-400 x 10 ⁹ /L	120
White cell count	3.2-11.0 x 10 ⁹ /L	9.0 (70% neutrophils)
Liver function tests:		
AST	5-35 IU/L	45
ALT	5-35 IU/L	50
ALP	30-150 IU/L	50
Bilirubin	3-17umol/L	30
Urine electrolytes:		
Na	135-145 mmol/L	140
K	3.5-5 mmol/L	5
Urea	2.5-6.7mmol/L	8
Creatinine	70-150umol/L	110

添付資料2 シナリオ2

Samples

Three samples have been provided:

Sample 1 EDTA blood (plasma) 1ml

Sample 2 Urine 1ml

Sample 3 Stool 1ml

Additional Questions (to diagnostic result)


1. How will your laboratory investigate this disease?
2. What advice would you give to the embassies involved?
3. What is the risk to the other conference participants?
4. What is the risk to the city population?
5. How will you forensically investigate the perpetrators or otherwise of this outbreak?

Results of Unknown Pathogen Exercise
Scenario 1

Summary of Scenario 1

- ✓ Condition of specimens could be affected by the delayed delivery

4-Nov (Mon): Scenario 1 samples was dispatched
8-Nov (Fri): Arrived at DHL/Tokyo
13-Nov (Wed): NIID received package



Dry ice completely evaporated, and specimens were stored at room temperature!


 GHSAG Unknown Pathogen Workshop, Dec. 2013, London

図) シナリオ1の検体は室温で保管されていた。

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, Ishido A, Shigeoka T, Tominaga T, Kamei T, Honda M, Ninomiya D, Sakai T, Senba T, Kaneyuki S, Sakaguchi S, Satoh A, Hosokawa T, Kawabe Y, Kurihara S, Izumikawa K, Kohno S, Azuma T, Suemori K, Yasukawa M, Mizutani T, Omatsu T, Katayama Y, Miyahara M, Ijuin M, Doi K, Okuda M, Umeki K, Saito T, Fukushima K, Nakajima K, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Fukuma A, Ogata M, Shimojima M, Nakajima N, Nagata N, Katano H, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Yamagishi T, Oishi K, Kurane I, Morikawa S, Saijo M.	The First Identification and Retrospective Study of Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome in Japan.	J Infect Dis	209	816-827	2014
Arai S, Nguyen ST, Boldgiv B, Fukui D, Araki K, Dang CN, Ohdachi SD, Nguyen NX, Pham TD, Boldbaatar B, Satoh H, Yoshikawa Y, Morikawa S, Tanaka-Taya K, Yanagihara R, Oishi K.	Novel Bat-borne Hantavirus, Vietnam.	Emerg Infect Dis	19(7)	1159-61	2013
Andoh M, Andoh R, Teramoto K, Komiya T, Kaneshima T, Takano A, Hayashidani H, <u>Ando S</u>	Survey of <i>Coxiella burnetii</i> in ticks collected from dogs in Japan	J Vet Med Sci	75	1115-1117	2013
Ogawa M, Uchiyama T, Satoh M, <u>Ando S</u>	Decontamination of mycoplasma-contaminated <i>Orientia tsutsugamushi</i> strains by repeating passages through cell cultures with antibiotics	BMC Microbiol	13	13	2013
Umeyama T, Ohno H, Minamoto F, Takagi T, Tanamachi C, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Kishi K, Fujii T, Takemura H, Watanabe H, <u>Miyazaki Y.</u>	Determination of epidemiology of clinically isolated <i>Cryptococcus neoformans</i> strains in Japan by multilocus sequence typing.	Jpn J Infect Dis.	66(1)	51-5	2013
Mihara T, Izumikawa K, Kakeya H, Ngamskulrunroj P, Umeyama T, Takazono T, Tashiro M, Nakamura S, Imamura Y, Miyazaki T, Ohno H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S.	Multilocus sequence typing of <i>Cryptococcus neoformans</i> in non-HIV associated cryptococcosis in Nagasaki, Japan.	Med Mycol.	51	252-260	2013

Okubo Y, Wakayama M, Ohno H, Yamamoto S, Tochigi N, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Umeyama T, Shinozaki M, Nemoto T, Nakayama H, Sasai D, Ishiwatari T, Shimodaira K, Yamamoto Y, Kamei K, Miyazaki Y, Shibuya K.	Histopathological study of murine pulmonary cryptococcosis induced by <i>Cryptococcus gattii</i> and <i>Cryptococcus neoformans</i> .	Jpn J Infect Dis.	66	216-221	2013
Okubo Y, Tochigi N, Wakayama M, Shinozaki M, Nakayama H, Ishiwatari T, Shimodaira K, Nemoto T, Ohno H, Kaneko Y, Makimura K, Uchida K, Miyazaki Y, Yamaguchi H, Shibuya K.	How Histopathology Can Contribute to an Understanding of Defense Mechanisms against Cryptococci.	Mediators Inflamm.	46	5319	2013
Ohno H, Tanabe K, Umeyama T, Kaneko Y, Yamagoe S, Miyazaki Y.	Application of nested PCR for diagnosis of histoplasmosis.	J Infect Chemother.	19	999-1003	2013
町田安孝, 福島康次, 三好祐顕, 小原一記, 池田康紀, 亀井克彦, 宮崎義継, 福田 健.	経気管支鏡肺生検および気管支肺胞洗浄にて診断された慢性肺コクシジオイデス症の1例.	日本呼吸器学会雑誌.	2	274-278	2013
大野秀明, 金子幸弘, 田辺公一, 梅山隆, 宮崎義継.	<i>Cryptococcus gattii</i> 感染症-新興・再興感染症 up to date-.	化学療法の領域.	29 S-1	1144-1151	2013
大野秀明, 宮崎義継.	真菌性脳髄膜炎の遺伝子診断.	臨床神経学.	53	1191-1193	2013
Fumihiko Takeuchi, Tsuyoshi Sekizuka, Akifumi Yamashita, Yumiko Ogasawara, Katsumi Mizuta, and Makoto Kuroda.	MePIC, Metagenomic Pathogen Identification for Clinical Specimens.	Jpn. J. Infect. Dis.,	67 (1)	62-65	2014
Nakajima N, Sato Y, Katano H, Hasegawa H, Kumasaka T, Hata S, Tanaka S, Amano T, Kasai T, Chong JM, Iizuka T, Nakazato I, Hino Y, Hamamatsu A, Horiguchi H, Tanaka T, Hasegawa A, Kanaya Y, Oku R, Oya T, <u>Sata T</u> .	Histopathological and immunohistochemical findings of 20 autopsy cases with 2009 H1N1 virus infection.	Mod Pathol.	25(1)	1-13	2012
Esho FK, Enkhtuya B, Kusumoto A, Kawamoto K.	Microbial assessment and prevalence of foodborne pathogens in natural cheeses in Japan.	<i>BioMed Research International</i> .	2103	205801	2013
Hayashi M, Natori T, Kubota-Hayashi S, Miyata M, Ohkusu K, Kawamoto K, Kurazono H, Makino S, Ezaki T.	A new protocol to detect multiple foodborne pathogens with PCR dipstick DNA chromatography after six-hour enrichment culture in a broad-range food pathogen enrichment broth.	<i>BioMed Research International</i>	2103	295050	2013

Kusumoto A, Miyashita M, Kawamoto K.	Deletion in the C-terminal domain of ClpX delayed entry of <i>Salmonella enterica</i> into a viable but non-culturable state.	<i>Res Microbiol.</i>	164(4)	335-41	2013
Yamasaki E, Sakamoto R, Matsumoto T, Morimatsu F, Toyoi H, G. Nair B, Kurazono H, Kurazono T.	Development of an immunochromatographic test strip for detection of cholera toxin.	<i>BioMed Research International</i>	2013	679038	2013

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
安藤秀二	リケッチア	神谷茂	標準微生物学 第12版	医学書院	東京	2014	in press
安藤秀二	発疹熱・発疹チフス	永井良三, 大田健	今日の治療と看護 第3版	南江堂	東京	2013	935-937
Yoshikawa T, Saijo M, Morikawa S.	Emergence of zoonotic orthopox virus infections.	Sigh SK	Viral Infections and Global Change	Wiley Blackwell	New Jersey	2014	pp377-387
永田典代、長谷川秀樹、佐多徹太郎	第11章電子顕微鏡/病理組織学的検査。ウイルス感染症の検査・診断スタンダード	田代真人、牛島廣治		羊土社		2011	p410-439