

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 23 年度～平成 25 年度 総合研究報告書

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

・総合研究報告書（平成 23～25 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・・・・・・23
研究分担者：森川 茂（国立感染症研究所 獣医科学部）

- 2 . 人獣共通感染症（炭疽、狂犬病等）に対するヒト検体および感染源検体を用いた迅速
検査、消毒、その標準化等に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・39
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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・43
研究分担者：見理 剛（国立感染症研究所 細菌第二部）

- 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・・・・・・・・・・・・・・47
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・・・・・・・・・・・・・・55
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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・65
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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・71
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	81
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検出法の確立	87
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	93
研究分担者：倉園 久生（帯広畜産大学）	
11 . バイオテロ危機発生時への対応	
- 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 -	123
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	129
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	133
研究分担者：松本 哲哉（東京医科大学 微生物学講座）	
14 . ウイルス性出血熱等のバイオテロ関連病原体の診断法およびシステムの整備 に関する研究	135
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	143

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物が多い。一方これらの病原体は、稀なものが多く、通常の病院や検査機関では確定診断が困難であり、確定検査が遅れる可能性がある。バイオテロ対策としては、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。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。

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
中村治：慶應義塾大学 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:

相内章：国立感染症研究所

相野田祐介：東京女子医科大学病院

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

伊藤（高山）睦代：国立感染症研究所

林昌宏：国立感染症研究所

岩城 正昭：国立感染症研究所

岩田奈織子：国立感染症研究所

梅山隆：国立感染症研究所

江崎孝行：岐阜大学

尾家重治：山口大学

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

奥谷晶子：国立感染症研究所

加來浩器：防衛医科大学校

影山努：国立感染症研究所

加藤 はる：国立感染症研究所

加藤 康幸：国立国際医療研究センター

片岡紀代：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

木下（山口）一美：国立感染症研究所

國島広之：東北大学

倉井華子：静岡がんセンター

鯉淵智彦：東京大学医科学研究所

河野茂：長崎大学病院

小林慎一：愛知県衛生研究所

小谷 治：国立感染症研究所研究所

酒井宏治：国立感染症研究所

佐々木 裕子：国立感染症研究所

佐藤由子：国立感染症研究所

佐藤正明：国立感染症研究所

柴山 恵吾：国立感染症研究所

下島昌幸：国立感染症研究所

菅沼明彦：都立駒込病院

杉浦義紹：神戸市環境保健研究所

鈴木忠樹：国立感染症研究所

関塚剛史：国立感染症研究所

関谷紀貴：都立駒込病院

高崎智彦：国立感染症研究所

竹内佳子：国立感染症研究所

竹内史比古：国立感染症研究所

竹下望：国立国際医療研究センター

田辺公一：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

谷口清洲：国立感染症研究所、国立病院機構三重病院

田辺公一：国立感染症研究所

千葉一樹：福島県衛生研究所

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

藤田博己：大原総合病院附属大原研究所、馬原アカリ医学研究所

藤野美穂子：国立感染症研究所

古谷信彦：文京学院大学

松山州徳：国立感染症研究所

三觜雄：札幌市衛生研究所

三好龍也：堺市衛生研究所

山崎博史：山口労災病院

柳澤如樹：都立駒込病院

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

山根一和：川崎医科大学

山本 明彦：国立感染症研究所

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まだまだ十分ではない。

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 15 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ルの汎用化を図る。

蚊媒介性感感染ウイルスの迅速検査法の確立：等蚊媒介性感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

地方衛生研究所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:

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。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。

(2) フラビウイルス共通迅速診断法の確立:

フラビウイルス共通迅速診断法を開発し様々のフラビウイルスを 1×10^{-2} から 1×10^1 (PFU/ml) の感度で検出できた。さらに、フラビウイルス共通プライマーによる増幅断片の塩基配列を決定し、その系統樹解析を行った。その結果フラビウイルス共通プライマーによる増幅産物は各ウイルスに特異的であり、その増幅産物の塩基配列を決定することによりサンプル中のフラビウイルスを同定できる可能性が示唆された。

(3) アジアで分離される炭疽菌株の遺伝学的タイピングシステムの開発:

モンゴルで分離された炭疽菌株に特異的な 12 箇所の SNP (Single Nucleotide Poo polymorphism) を特定して 12SNP タイピング法を確立した。さらに、National Center for Infectious Disease with Natural Foci (NCIDNF) の協力を得て動物および環境由来のモンゴル分離株を 14 株追加して確立した 12SNP タイピングについて追加検討を行いモンゴル株は大きく 4 つのクラスターに分かれ、それぞれに地域特性のあることが示された。

(4) 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 LD_{50}/ml 、E 型、F 型で数十マウス LD_{50}/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した。

(5) リケッチア・コクシエラ・クラミジアの迅速検出法の開発:

多様な臨床症状をも示すリケッチア症に対し、どれだけの感度、特異性をもって迅速診断系を準備するべきか考慮する必要がある。その基盤を構築するため、国内の常在リケッチアと輸入症例の多様性を検討するとともに、新規分離リケッチア株の全ゲノム解析をこころみ、既存のリケッチア種との比較を行うことにより、バイオテロを

想定した場合の多様な臨床症状をも示すリケッチア症に対し、SNPs解析による迅速診断系の可能性について検討した。また、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が議論される病原体である。既存の *C. burnetii* 分離株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。次世代シーケンサーによって数種の株の全ゲノム配列を解析、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した。

(6) 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：

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た。BSL 真菌の安全な取扱法について検討した。また、コクシジオイデスゲノム DNA・ヒストプラズマゲノム DNA の検出のための様々な増幅法を検討・開発した。

(7) 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。このため、日本国内で事例が発生したときのために迅速検出法を確立しておく必要がある。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、*B. pseudomallei* と *B. mallei* の LAMP 法の確立を行った。LAMP 法は日本国内の検査に十分な性能を持つことが明らかになった。また *B. mallei* についてはこれまでに簡便な核酸検出法の報告がなかったが、LAMP 法は簡便に *B. mallei* を検出可能な方法であり、検出感度、特異度にも問題が無い。今後、この LAMP 法は、迅速簡便な検査法として利用できる。

(8) ウイルス検出のための高感度診検査法の開発：

バイオテロ関連病原体を迅速に、かつ、高感度に検出するための 5'-Flap 付加 primer を用いた遺伝子検出法の診断における有用性を評価した。本研究においてリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV)、狂犬病ウイルス (RV)、チクングニアウイルス (CHIKV) に対する既知のプライマーを用いた 5'-Flap 付加 primer 法の検出感度向上について評価した。その結果 LCMV 特異的プライマーに 5'-Flap 付加 primer 法を用いたときその感度は向上した。しかしながら RV, CHIKV に対してはその効果は認められなかった。Flap 配列の付加によるプライマー感度の向上のメカニズムは不明であるが、既存のプライマーに対するその効果の検討は有用であることが示唆された。

(9) 炭疽菌に対する消毒法の開発と標準化に関する研究：

炭疽菌の治療薬は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を行い、Anti Microbial Peptides(抗菌性ペプチド)である豚由来のProtegrin-1が高い抗菌効果を示すことを示した。

(10) 検体の輸送等システムの整備に関する研究：

不明病原体による感染症発生の際に、検体を海外から受け入れることが求められることもある。そこで、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。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)についてもシステムの確立が必要である

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。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的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目的とした。感染研ゲノムセンターでは病院、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。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。

(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：

マウス肺炭疽モデルにおいて現行ワクチンの主成分であるPAに比べ優れた防御効果を示すEA1を同定し、EA1が次世代炭疽ワクチンの候補分子として有用である可能性を示唆した。植物由来毒素であるリシンの検出系に利用できる特異抗体を得ることに成功した。バイオテロに使用される可能性の高い複数の細菌毒素に対する免疫学的迅速同定法の開発に必要な抗原、抗体、免疫学的迅速同定法の作製を行った。特にコレラ毒素に対しては特異性の高いイムノクロマトの作製を完了した。リアルタイムPCRと比べ約10-100倍感度が高く、目視により検体入手から約1時間で多検体項目をスク

リーニング可能な検出法を開発した

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:

バイオテロに使用される可能性のある病原体をホルマリン固定パラフィン包埋された病理組織中に検出する方法について検討した。1年目は免疫組織化学で腸管出血性大腸菌感染症の剖検例の糸球体および腸管組織にベロ毒素を検出することを試みた。また、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迅速 *in situ* hybridization-AT tailing(ISH-AT)法を簡便化・迅速化した。この迅速 ISH-AT 法により重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の剖検組織および実験的 SFTS ウイルス感染細胞に重症熱性血小板減少症候群ウイルスを検出した。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。

(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する。具体的には、電子顕微鏡学的検査法の標準手順法の見直しと改良を行い、実施者の教育訓練法の手順と記録を整備した。また、細菌の迅速検出法の確立のために、バイオテロ関連細菌を中心にレファレンス標本の作製を行った。また、検査従事者の教育訓練法の一つとして 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に参加した。

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:

バイオテロ関連特定病原体の中の真菌感染症に主眼を置き検査法の習熟を計った。一般真菌の網羅的スクリーニング検査検出キットを用いて、健康危機発生時対応を想定のもと、操作性、精度等の評価と共に真菌検査法に慣れた。また、真菌感染症の中で、最も致死率の強いコクチジオイデスを対象に病原体の網羅的検出法の構築と操作性、そして問題点の解析を行った。この問題点の解決を目的に最終年度には、国立感染症研究所真菌部とともに、研究協力員の実技研修を行い、検出技術の向上を図った。

実技研修は、真菌感染症による健康危機発災時には、地方衛生研究所の各ブロックにおける研究協力員が指導的立場で危機対応を完遂させることを可能にするためのものである。また作成された「バイオテロ対策病原性真菌検査マニュアル」はバイオテロの可能性のある真菌検査検査対応の一助になる。

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』のホームページを作成後、

ICD を対象に実施したアンケート結果や全国の感染症専門家から寄せられた意見を参考にして修正とアップデートを行ってきた。2011～12年には20疾患を追加、2013年には新たに感染症法に基づく特定病原体等(三種)に指定された重症熱性血小板減少症候群(SFTS)など2疾患を加え、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)の最新情報の追加を行い、迅速かつ正確に情報提供を行えるよう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。

具体的には、これまでに本研究において作成していた、(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) 野兔病の各項目について、アンケート調査等によって全国から寄せられた意見を参考して細かな修正をおこなうとともに、最新の情報を追加した。平成23年度以降に以下の25疾患を追加した：(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) オムスク出血熱、(10) キャサヌル森林病、(11) リフトバレー熱、(12) ハンタウイルス感染症、(13) Bウイルス症、(14) ニパウイルス感染症、(15) レプトスピラ症、(16) 発疹チフス、(17) チクング

ニア熱、(18) ロッキー山紅斑熱、(19) サル痘、(20) 黄熱、(21) 回帰熱、(22) 急性灰白髄炎、(23) デング熱、(24) 日本紅斑熱リケッチア、(25) 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)。執筆は全国から選定した感染症専門家に依頼し、“目で見て理解する”要素を重視し図表等も数多く示した。また各疾患の追加・修正のみならず、総論の内容についても病原体の管理や輸送に関する最新の情報を記載した。

(2) 各医療機関のバイオテロ対策を支援するための方策：

国内の医療機関の多くは感染防止対策加算をきっかけとしてさらなる院内感染対策の充実をはかり、さらに新型インフルエンザに対する対策もBCP作成を含めて進展してきている。しかしバイオテロに関する医療機関の準備状況はまだほとんどなされていない施設が大半を占めており、さらなる対応策が必要と考えられる。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た。平成23年度は全体としての位置付けや方向性を確認し、平成24年度は、バイオテロ対策ガイドラインの基本骨格を作成した。さらに平成25年度は新型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。今後、関連する多くの感染症診療に関するガイドラインの内容と比較しながら、相互の内容に矛盾が生じないように、さらに検討を行う。

D. 考察

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、患者検体を用いた迅速検査、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。さらに病原体の由来を知るためにゲノムデータの整備も重要となる。これまで、いくつかのバイオテロ関連病原体等について迅速診断法の開発、マニュアル作製がなされてきた。しかし、個別病原体に関しても、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まだ十分ではなく、検査ネットワーク整備、さらに病原体の由来の追跡や未知の病原体等への対応に問題を残している。ホームページを活用した診断支援法の最新情報への改訂作業とともに、実際の対応体制の整備も十分とはいえない。

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ー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。

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。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。また、重症熱性血小板減少症候群（SFTS）に代表される新興感染症などに対して迅速な情報提供も極めて重要である。このような背景に基づき、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た。これにより迅速性や情報の正確性などを備えた有益なホームページの整備がなされた。

バイオテロに対しては、実質的にまだ具体的な準備は何もなされていない医療機関が大半を占めているのが現状である。今後、医療機関が是非取り組まなければいけない課題のひとつになると思われる。ガイドラインが完成したとしても、実際に事案が起これば、社会的な混乱を生じる可能性が高く、行政機関、警察、消防など、各種機関との連携は欠かせない。その意味においても、本ガイドラインを完成させるにあたり、今後、関係機関との調整も必要になるものと思われる。

一方、海外との検体共有等も重要になる可能性がある。Global Health Security Action Group (GHSAG), Unknown Pathogen Workshopに参加することにより、検体の国際輸送に際して課題があることが明らかになった。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。このプロセスを進めることを可能とするその対策を講じておく必

要がある。

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) 英文論文

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

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.

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.

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, 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.
- 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.
- 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
- Uchida M., Harada T., Enkhtuya J., Kusumoto A., Kobayashi Y., Chiba S., Shyaka A., Kawamoto K. Protective effect of *Bacillus anthracis* surface protein EA1 against anthrax in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 421(2):323-8, 2012.
- 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. *BioMed Research International.* 2013: 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.
- 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*, 2013 August, 75(8):1115-1117
- Gaowa, Ohashi N, Aochi M, Wuritu, Wu D, Yoshikawa Y, Kawamori F, Honda T, Fujita H, Takada N, Oikawa Y, Kawabata H, Ando S, Kishimoto T: *Rickettsia* in ticks,

- Japan, Emerg Infect Dis, 2013 Feb, 19(2): 338-340
- Sakamoto N, Nakamura-Uchiyama F, Kobayashi K, Takasaki T, Ando S, Iwabuchi S, Ohnishi K; Murine Typhus with Shock and Acute Respiratory Failure in a Japanese Traveler after Returning From Thailand. J Travel Med, 2013 Jan 20(1):50-53
- Asano S, Mori K, Yamazaki K, Sata T, Kanno T, Sato Y, Kojima M, Fujita H, Akaike Y, Wakasa H. Temporal differences of onset between primary skin lesions and regional lymph node lesions for tularemia in Japan: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 19 skin cases and 54 lymph node cases. Virchows Arch. 460,651-658, 2012
- 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, Sata T. Histopathological and immunohistochemical findings of 20 autopsy cases with 2009 H1N1 virus infection. Mod Pathol. 2012 Jan;25(1):1-13.
- Detection of a Possible Bioterrorism Agent, *Francisella* sp., in a clinical specimen using Next-generation Direct DNA Sequencing. Makoto Kuroda, Tsuyoshi Sekizuka, Fumiaki Shinya, Fumihiko Takeuchi, Takayuki Kanno, Tetsutaro Sata, Shigeyuki Asano. J Clin Microbiol. 2012, 50 (5): 1810-1812.
- Sayama Y, Demetria C, Saito M, Azul RR, Taniguchi S, Fukushi S, Yoshikawa T, Iizuka I, Mizutani T, Kurane I, Malbas FF Jr, Lupisan S, Catbagan DP, Animas SB, Morales RG, Lopez EL, Dazo KR, Cruz MS, Olveda R, Saijo M, Oshitani H, Morikawa S. A seroepidemiologic study of Reston ebolavirus in swine in the Philippines. BMC Vet Res. 18;8:82, 2012.
- Taniguchi S, Sayama Y, Nagata N, Ikegami T, Miranda ME, Watanabe S, Iizuka I, Fukushi S, Mizutani T, Ishii Y, Saijo M, Akashi H, Yoshikawa Y, Kyuwa S, Morikawa S. Analysis of the humoral immune responses among cynomolgus macaque naturally infected with Reston virus during the 1996 outbreak in the Philippines. BMC Vet Res. 11;8(1):189, 2012.
- Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Saijo M and Morikawa S. Serological Assays Based on Recombinant Viral Proteins for the Diagnosis of Arenavirus Hemorrhagic Fevers. Viruses 4. 2097-2114. 2012.
- Lihoradova O, Kalveram B, Indran SV, Lokugamage N, Juelich TL, Hill TE, Tseng CT, Gong B, Fukushi S, Morikawa S, Freiberg AN, Ikegami T. The Dominant-negative Inhibition of

- dsRNA-dependent Protein Kinase PKR Increases the Efficacy of Rift Valley Fever Virus MP-12 Vaccine. *J Virol*.86, 7650-7661.2012.
- Fukushi S, Nakauchi M, Mizutani T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Antigen-capture ELISA for the detection of Rift Valley fever virus nucleoprotein using new monoclonal antibodies. *J Virol Methods*. 180:68-74, 2012
- Shirato K, Maeda K, Tsuda S, Suzuki K, Watanabe S, Shimoda H, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Kyuwa S, Endoh D, Matsuyama S, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Yoshikawa Y, Akashi H, Mizutani T. Detection of bat coronaviruses from *Miniopterus fuliginosus* in Japan. *Virus Genes*. 2012, ;44(1):40-4.
- Gyotoku H, Izumikawa K, Ikeda H, Takazono T, Morinaga Y, Nakamura S, Imamura Y, Nishino T, Miyazaki T, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Yasuoka A, Yaguchi T, Ohno H, Miyazaki Y, Kamei K, Kanda T, Kohno S. A case of bronchial aspergillosis caused by *Aspergillus udagawae* and its mycological features. *Med Mycol*. 50:631-636, 2012.
- Taniguchi S, Watanabe S, Masangkay JS, Omatsu T, Ikegami T, Alviola P, Ueda N, Iha K, Fujii H, Ishii Y, Fukushi, S Saijo M, Kurane, I Kyuwa S, Akashi H, Yoshikawa Y, Shigeru Morikawa, S. Reston Ebola Virus Antibodies in Bats, the Philippines. *Emerg Infect Dis*, 2011 17(8):1559-60
- A Okutani, H Tungalag, B Boldbaatar, A Yamada, D Tserennorov, I Otgonchimeg, A Erdenebat, D Otgonbaatar, and S Inoue. Molecular Epidemiological Study of *Bacillus anthracis* Isolated in Mongolia by Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for 8 Loci (MLVA-8) Japanese Journal of Infectious Diseases 2011:4:345-348.
- Fujisawa T, Kadosaka T, Fujita H, Ando S, Takano A, Ogasawara Y, Kawabata H, Seishima M, *Rickettsia africae* Infection in a Japanese Traveler with many tick bites. 2012, *Acta Dermato-Venereologica*
- Na-Ubol M, Srimanote P, Chongsa-nguan M, Indrawattana N, Sookrung N, Tapchaisri P, Yamazaki S, Bodhidatta L, Eampokalap B, Kurazono H, Hayashi H, Nair GB, Takeda Y & Chaicumpa W. Hybrid & El Tor variant biotypes of *Vibrio cholerae* O1 in Thailand, *Indian J Med Res*, 133: 387-394, 2011
- Zhang J, van Hung P, Hayashi M, Yoshida S, Ohkusu K, Ezaki T. DnaJ sequences of *Bacillus cereus* strains isolated from outbreaks of hospital infection are highly similar to *Bacillus anthracis*.

Diagn Microbiol Infect Dis, 70: 307-315, 2011.

Yamada Y, Ohkusu K, Yanagihara M, Tsuneoka H, Ezaki T, Tsuboi J, Okabayashi H, Suwabe A. Prosthetic valve endocarditis caused by *Bartonella quintana* in a patient during immunosuppressive therapies for collagen vascular diseases. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 70: 395-398, 2011.

Katano H, Kano M, Nakamura T, Kanno T, Asanuma H, Sata T: A novel real-time PCR system for simultaneous detection of human viruses in clinical samples from patients with uncertain diagnoses, *J Med Virol* 2011, 83:322-330

2) 和文論文

安藤秀二, 発疹熱・発疹チフス・日本紅斑熱, 今日の治療と看護 改定第3版, 総編集: 永井良三, 大田健, 南江堂(東京) pp935-937, 2013年3月

安藤秀二, 日本紅斑熱, 獣医公衆衛生研究, 14: 13-17, 2012年3月

宮崎義継, 金子幸弘, 梅山 隆, 田辺公一, 大野秀明. *Cryptococcus gattii* 感染症. 感染症. 42:172-175, 2012.

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.

片野晴隆, 佐藤由子, 佐多徹太郎, 長谷川秀樹: 病原体の同定. 病理解剖マニュアル 病理と臨床 2012, 30: 269-277.

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ーシスの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, 443-448, 2011

大楠清文, 江崎孝行: 肺炎 臨床と研究の最新動向 遺伝子解析技術を用いた肺炎の起炎菌診断の実践、医学のあゆみ 237:193-199, 2011.

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.

Nagata N, Kataoka M, Sato Y, Sakai K, Iwata N, Suzuki T, Saijo M, Morikawa S, Kurane I, Sata T, Hasegawa H. Case

reports with diagnostic electron microscopy and pathology for infectious diseases: The past five years experience, from 2007 to 2011. Glienicke Workshop on Electron Microscopy in Infectious Diseases - Diagnostics and Research 2012.10. Berlin

Hideki Tani, Koichiro Iha, Shuetsu Fukushi, Satoshi Taniguchi, Tomoki Yoshikawa, Masayuki Saijo, and Shigeru Morikawa. Analysis of cell entry of New and Old World arenaviruses using pseudotyped viruses bearing their envelope proteins. XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria, Rio de Janeiro, Brazil. September 23-27,2012.

Kie Yamamoto, Koichiro Iha, Christine Bruce, Stuart D. Dowall, Satoshi Taniguchi, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Yoshiyuki Ishii, Shigeru Kyuwa, Roger Hewson, Masayuki Saijo, and Shigeru Morikaw. Serological assays based on recombinant viral proteins for the diagnosis of viral hemorrhagic fevers caused by arenaviruse. XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria, Rio de Janeiro, Brazil. September 23-27,2012.

Ando S, Ogasawara Y; Traveler 's Rickettsioses and Domestic Rickettsioases in Japan In 2011, 15th International Congress on Infectious

Diseases, Bangkok, Thailand, June 13-16, 2012

Takajoh I, Matsuda M, Kariya Y, Sakaguchi S, Kawaguchi T, Miyauchi S, Umekita K, Ueno S, Kusumoto N, Nagatomo Y, Ogasawara Y, Ando S, Okayama A; Novel spotted fever group rickettsiosis? In a Japanese traveler returned from India, 15th International Congress on Infectious Diseases, Bangkok, Thailand, June 13-16, 2012

Lim CK, Moi ML, Kotaki A, Saijo M, Kurane I, Takasaki T. Molecular diagnosis and analysis of imported chikungunya virus strains, Japan, 2006-2011. The 9th Japan-China International Conference of Virology, June12-13, 2012, Sapporo, Japan

Lim CK, Kotaki A, Omatu T, Moi ML, Kurane I, Saijo M, Takasaki T. A rapid non-nested reverse transcriptase-PCR assay for vertebrate flavivirus subgroups using a novel universal single primer pair based on a conserved region of NS5 gene sequences. The XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria (ICTMM). September 23-27, 2012,Rio de Janeiro, Brazil

Ohno H, Tanabe K, Kaneko Y, Umeyama T, Yamagoe S, Miyazaki Y. Nested PCR for diagnosis of histoplasmosis. 18th Congress of the International Society for

Human and Animal Mycology. June 11-15, 2012, Berlin, Germany.

Umeyama T, Ohno H, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Miyazaki Y. Multi-locus sequence typing epidemiology of *Cryptococcus neoformans* strains clinically isolated in Japan. 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. June 11-15, 2012, Berlin, Germany.

Tanabe K, Ohno H, Umeyama T, Yamagoe S, Chibana H, Miyazaki Y. Genetic analysis of echinocandin-resistant *Candida glabrata* isolated in Japan. 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. June 11-15, 2012, Berlin, Germany.

Shigeru Morikawa, Yusuke Sayama, Satoshi Taniguchi, Shuetsu Fukushi, Ichiro Kurane, and Masayuki Saijo. Serological survey of Reston ebolavirus infection in the Philippines. 45th Joint Working Conference on Immunology and Viral Disease, Stanford USA, 2011 June 20-22

Koichiro Iha, Mina Nakauchi-Hori, Satoshi Taniguchi, Shuetsu Fukushi, Tetsuya Mizutani, Momoko Ogata, Shigeru Kyuwa, Masayuki Saijo, Victor Romanowski, Delia A Enria, Shigeru Morikawa. Establishment of serological diagnosis of Argentine hemorrhagic fever using recombinant antigens. International

union of microbiological societies 2011 congress, Sapporo 11-16 Sept 2011

Yusuke Sayama¹, Shuetsu Fukushi, Mariko Saito, Satoshi Taniguchi, Itoe Iizuka, Tetsuya Mizutani, Ichiro Kurane, Masayuki Saijo, Hitoshi Oshitani, Shigeru Morikawa. A serological survey of Reston ebolavirus infection in swine during epizootic in 2008 in the Philippines. International union of microbiological societies 2011 congress, Sapporo 11-16 Sept 2011

Satoshi Taniguchi, Shumpei Watanabe, Koichiro Iha, Shuetsu Fukushi, Tetsuya Mizutani, Masayuki Saijo, Ichiro Kurane, Shigeru Kyuwa, Hiroomi Akashi, Yasuhiro Yoshikawa, Shigeru Morikawa. The detection of Reston ebolavirus antibodies in wild bats in the Philippines. International union of microbiological societies 2011 congress, Sapporo 11-16 Sept 2011

2) 国内学会

倉園久生, 廣井豊子, 倉園貴至, 山崎栄樹. Development of an immune-chromatographic test strip for detection of cholera toxin. 第87回日本細菌学会総会、東京、3月26-28日, 2014.

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

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 invitro 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

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.

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

黒田誠、関塚剛史、竹内史比古。Deep sequencing 法による野兎病菌 *Francisella* 感染症の腋窩部膿瘍の網羅的病原体検索第 85 回日本細菌学会・総会 長崎市 2012 年 3 月

谷英樹、伊波興一郎、谷口怜、吉河智城、福士秀悦、西條政幸、森川茂 シュードタイプ VSV を用いたルジヨウウイルスの細胞侵入機構の解析 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月 13-15 日、大阪

谷口怜、佐山祐輔、永田典代、飯塚愛恵、谷英樹、吉河智城、福士秀悦、西條政幸、久和茂、森川茂 レストンエボラウイルス自然感染カニクイザルにおける免疫応答の解析 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月 13-15 日、大阪

福士秀悦、新倉 綾、谷 英樹、吉河智城、伊波興一郎、谷口 怜、緒方もも子、西條政幸、森川 茂 日本のマダニ類における新種のブニヤウイルス (SFTSV) 保有調査と SFTSV 血清学的診断法の開発 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月 13-15 日、大阪

安藤秀二: リケッチア感染症について ~ つが虫病, 日本紅斑熱を中心に, 輸入症例 (海外のトピックス) を含めて, 平成 24 年

度動物由来感染症技術研修会，2012 年 11 月 2 日，東京

岸田直樹，安藤秀二，久保光司；北海道で初めての診断となった国内 5 例目となる African Tick Bite Fever の一例，第 61 回日本感染症学会東日本地方会学術集会，2012 年 10 月 10 日～12 日，東京

大屋賢司，黒田誠，関塚剛史，奥田秀子，安藤秀二，福士秀人；動物クラミジアを検出する LAMP 法の開発．第 30 回日本クラミジア研究会，平成 24 年 9 月 8 日，東京

藤澤智美，藤田博己，角坂照貴，安藤秀二，高野愛，小笠原由美子，川端寛樹，清島真理子；Rickettsia africae による旅行者感染の一例，第 20 回ダニと疾患のインターフェース，平成 24 年 7 月 6～8 日，徳島県阿南市

安藤秀二，山内悠子，竹下望，藤澤智美，清島真理子，堀田剛，清水恒広，高城一郎，岡山昭彦，阪本直也，中村ふくみ，大西健児；実験室診断で経験した多様なリケッチア症，第 86 回日本感染症学会，平成 24 年 4 月 25～26 日，長崎

高城一郎，金子裕美，坂口翔太，川口剛，宮内俊一，梅北邦彦，上野史朗，楠本規生，長友安弘，安藤秀二，岡山昭彦；インドからの輸入感染症と考えられた新規リケッチア症の一例，第 86 回日本感染症学会，平成 24 年 4 月 25～26 日，長崎

中島隆弘，清水恒広，堀田剛，安藤秀二；

南アフリカ滞在中に感染し来日後に発症した地中海紅斑熱のブラジル人症例，第 86 回日本感染症学会，平成 24 年 4 月 25～26 日，長崎

安藤秀二，小笠原由美子；2011 年に経験した多様な輸入リケッチア症，第 18 回リケッチア研究会，大阪，平成 24 年 2 月 12 日

大野秀明，田辺公一，杉田 隆，畠山修司，大久保陽一郎，金子幸弘，梅山 隆，山越智，金城雄樹，渋谷和俊，亀井克彦，宮崎義継．北米流行型 *Cryptococcus gattii* 株の病原性、病原因子の解析-国内臨床分離株を中心に-. 第 86 回日本感染症学会総会・学術講演会．4 月 25-26 日，2012 年，長崎．

渋谷和俊，大久保陽一郎，大野秀明，宮崎義継，田辺公一，金子幸弘，山越 智，梅山隆，安藤常浩，若山 恵．*Cryptococcus gattii* 感染症における病理組織学的解析．第 86 回日本感染症学会総会・学術講演会．4 月 25-26 日，2012 年，長崎．

木村雅友，大野秀明，梅山 隆，宮崎義継．アスペルギルスとクリプトコックスによる肺混合感染の 2 手術例．第 56 回日本医真菌学会総会・学術集会．11 月 10-11 日，2012 年，東京．

大久保陽一郎，大野秀明，篠崎 稔，宮崎義継，根本哲生，若山 恵，栃木直文，笹井大督，石渡誉郎，中山晴雄，下平佳代子，田辺公一，金子幸弘，梅山 隆，山越 智，職玉珠，北原加奈子，山本慶郎，渋谷和俊．マウス肺クリプトコッカス症モデルを用い

た感染防御ならびに構築変換の解析. 第 56 回日本医真菌学会総会・学術集会. 11 月 10-11 日, 2012 年, 東京.

安藤秀二, リケッチア症, 第 6 回輸入感染症講習会, 東京, 平成 23 年 9 月 24 日

大野秀明、大川原明子、田辺公一、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、泉川公一、藤井毅、竹村 弘、岸 一馬、河野 茂、宮崎義継. 日本国内で分離された *Cryptococcus* 属臨床分離株の血清型解析と抗真菌薬に対する感受性動向. 第 60 回日本感染症学会東日本地方会学術集会、第 58 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会、山形、2011 (10 月)

田辺公一、大野秀明、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、金城雄樹、杉田 隆、畠山修司、亀井克彦、渋谷和俊、宮崎義継. *Cryptococcus gattii* 国内分離株の病原因子解析. 第 60 回日本感染症学会東日本地方会学術集会、第 58 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会、山形、2011 (10 月)

梅山 隆、大野秀明、田辺公一、山越 智、宮崎義継. 標準化 MLST 解析法を用いたわが国のクリプトコックス属臨床分離株の分子疫学解析. 第 55 回日本医真菌学会学術集会、東京、2011 (10 月)

大野秀明、田辺公一、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、杉田 隆、畠山修司、亀井克彦、渋谷和俊、宮崎義継. 本邦初の北米流行型 *Cryptococcus gattii* 臨床分離株の実験的病原性解析. 第 55 回日本医真菌学会学術

集会、東京、2011 (10 月)

田辺公一、大野秀明、梅山 隆、山越 智、宮崎義継. 日本とタイにおける遺伝子検出法を用いた環境生息ヒストプラスマ属の検出. 第 55 回日本医真菌学会学術集会、東京、2011 (10 月)

大野秀明、田辺公一、梅山 隆、金子幸弘、山越 智、宮崎義継. クリプトコックス・ガッティ (*Cryptococcus gattii*). 衛生微生物技術協議会 第 32 回研究会、東京、2011 (6 月)

大野秀明、田辺公一、杉田 隆、畠山修司、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、亀井克彦、宮崎義継. 国内で初めて分離された VGIIa 型 *Cryptococcus gattii* 株の薬剤感受性と病原性についての検討. 第 59 回日本化学療法学会総会、札幌、2011 (6 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。2008 年にアフリカ大陸で発生したラッサ熱様の出血熱の原因ウイルスは、新種のアレナウイルス(Lujo ウイルス)で、これまで同定されているアレナウイルスと遺伝的にも抗原性もかなり異なるウイルスであった。本ウイルスの宿主は未同定で、バイオテロ以外にも輸入動物を介して国内にウイルスが侵入する可能性もある。ザンビアでは、新種のアレナウイルス（Luna ウイルス）が分離され、相次いで新種のアレナウイルスが報告されている。このように未知のアレナウイルスが数多く存在すると思われる。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組換えタンパク質と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も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、福岡藍子、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

ウイルス性出血熱の原因ウイルスのうちウイルス株間の遺伝子変異が極めて多いアレナウイルスでは、しばしばRT-PCRによる検出から漏れるウイルス株がある。RT-PCR法に用いられるprimersは、頻繁に修正されているが、それでも、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RT-PCR法は開発されていない。しかし、アレナウイルスの遺伝子変異は、同種のウイルス株間ではsynonymousな変異が多いため免疫学的には広く交差する。一方、旧世界アレナウイルスと新世界アレナウイルスでは免疫学的にも交差は認められない。また、2008年にアフリカ大陸で新興したラッサ熱様の出血熱の原因ウイルスLujo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。このため、新興アレナウイルス発生時には、ウイルスの同定に時間がかかっている。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。また、近年相次いで旧世界アレナウイルスが分離されており、アレナウイルスの遺伝的多型性が再確認されている。未知のアレナウイルスが数多く存在すると考えられ、それらによる新興感染症発生時に迅速対応可能なウイルス検出技術を確立することは、公衆衛生上、バイオテロ対策上、重要である。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 の構造と mRNA cap-binding 領域の高度保存領域:

ラッサウイルスのNPの結晶構造が2010年12月に明らかにされた(Nature 468: 779-785, 2010)。構造相同性解析から、ラッサウイルスNPには、宿主細胞のmRNAのcap構造を認識する領域と3'-5'エキソヌクレアーゼ活性領域が同定され、アレナウイルス間で機能領域が高度に保存されていることも明らかとなった。これらの領域の中でエピトープになり得るペプチド領域を推定し、ラッサウイルスのNP構造ファイル3MWP.pdbの表層に存在するかをPyMolソフトにより解析した。

ペプチド合成と抗ペプチド血清の作製:

ラッサウイルスNPのアミノ酸298-311位と311-324位の2種のペプチドをSIGMA Aldrich社で合成した。同社に、MBS法(m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester)によりCys残基とキャリア蛋白KLHの架橋とフロイントコンプリートアジュバントを用いたウサギに免疫(6回)を依頼し、抗ペプチド抗体を作製した。

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(Δ P)を用いて組換え NP と同様の手法で調製した(図1)。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。

モペイアウイルス(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ア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が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(モペイアウイルス、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

アレナウイルス NP の mRNA cap-binding 領域の高度保存領域のエピトープの予測と構造上の位置の予測:

新旧アレナウイルスの NP 間で、cap-binding 領域の特に高度に保存されている領域のエピトープとなり得るペプチドを親水性、各種予測による二次構造等を勘案して選択した結果、cap-binding 領域のアミノ酸 298-311 位及びアミノ酸 311-324 位の 2 箇所がエピトープになり得ると考えられた(図2)。また、これらの 2 種のペプチドのラッサウイルス NP の立体構造上の位置を PyMol で解析すると、表層に存在すると考えられた(図3)。

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 4)。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 2)。

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 5)。

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(図 6)。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 7)。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 8)。

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をともに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フニンウイルス 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。

(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 健康危機情報

特になし

G 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, Suzaki 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
 - 5) Sayama Y, Demetria C, Saito M, Azul RR, Taniguchi S, Fukushi S, Yoshikawa T, Iizuka I, Mizutani T, Kurane I, Malbas FF Jr, Lupisan S, Catbagan DP, Animas SB, Morales RG, Lopez EL, Dazo KR, Cruz MS, Olveda R, Saijo M, Oshitani H, Morikawa S. A seroepidemiologic study of Reston ebolavirus in swine in the Philippines. *BMC Vet Res.* 18;8:82, 2012.
 - 6) Taniguchi S, Sayama Y, Nagata N, Ikegami T, Miranda ME, Watanabe S, Iizuka I, Fukushi S, Mizutani T, Ishii Y, Saijo M, Akashi H, Yoshikawa Y, Kyuwa S, Morikawa S. Analysis of the humoral immune responses among cynomolgus macaque naturally infected with Reston virus during the 1996 outbreak in the Philippines. *BMC Vet Res.* 11;8(1):189, 2012.
 - 7) Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Saijo M and Morikawa S. Serological Assays Based on Recombinant Viral Proteins for the Diagnosis of Arenavirus Hemorrhagic Fevers. *Viruses* 4. 2097-2114. 2012.
 - 8) Lihoradova O, Kalveram B, Indran SV, Lokugamage N, Juelich TL, Hill TE, Tseng CT, Gong B, Fukushi S, Morikawa S, Freiberg AN, Ikegami T. The Dominant-negative Inhibition of dsRNA-dependent Protein Kinase PKR Increases the Efficacy of Rift Valley Fever Virus MP-12 Vaccine. *J Virol.* 86,

- 7650-7661.2012.
- 9) Fukushi S, Nakauchi M, Mizutani T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Antigen-capture ELISA for the detection of Rift Valley fever virus nucleoprotein using new monoclonal antibodies. *J Virol Methods*. 180:68-74, 2012
- 10) Arai S, Gu SH, Baek LJ, Tabara K, Bennett SN, Oh HS, Takada N, Kang HJ, Tanaka-Taya K, Morikawa S, Okabe N, Yanagihara R, Song JW. Divergent ancestral lineages of newfound hantaviruses harbored by phylogenetically related crocidurine shrew species in Korea. *Virology*, 2012, in press
- 11) Tani H., Morikawa S, and Matsuura Y. Development and applications of VSV vectors based on cell tropism. *Frontiers in Microbiol.*, 2012, 2(272): 1-7.
- 12) Kennedy JS, Gurwith M, Dekker CL, Frey SE, Edwards KM, Kenner J, Lock M, Empig C, Morikawa S, Saijo M, Yokote H, Karem K, Damon I, Perlroth M, and Greenberg RN. Safety and Immunogenicity of LC16m8, an Attenuated Smallpox Vaccine in Vaccinia-Naive Adults. *J Infect Dis* 2011, 204(9):1395-402
- 13) Shirato K, Maeda K, Tsuda S, Suzuki K, Watanabe S, Shimoda H, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Kyuwa S, Endoh D, Matsuyama S, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Yoshikawa Y, Akashi H, Mizutani T. Detection of bat coronaviruses from *Miniopterus fuliginosus* in Japan. *Virus Genes*. 2012, ;44(1):40-4.
- 14) Taniguchi S, Watanabe S, Masangkay JS, Omatsu T, Ikegami T, Alviola P, Ueda N, Iha K, Fujii H, Ishii Y, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Kyuwa S, Akashi H, Yoshikawa Y, Shigeru Morikawa, S. Reston Ebola Virus Antibodies in Bats, the Philippines. *Emerg Infect Dis*, 2011 17(8):1559-60
- 15) Abe M, Ito N, Sakai K, Kaku Y, Oba M, Nishimura M, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Sugiyama M, Mizutani T. A novel sapelovirus-like virus isolation from wild boar. *Virus Genes*. 2011, 43(2):243-8.
- ## 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

- 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 日から 12 日、神戸
- 13) Hideki Tani, Koichiro Iha, Shuetsu Fukushi, Satoshi Taniguchi, Tomoki Yoshikawa, Masayuki Saijo, and Shigeru Morikawa. Analysis of cell entry of New and Old World arenaviruses using pseudotyped viruses bearing their envelope proteins. XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria, Rio de Janeiro, Brazil. September 23-27,2012.
 - 14) Kie Yamamoto, Koichiro Iha, Christine Bruce, Stuart D. Dowall, Satoshi Taniguchi, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Yoshiyuki Ishii, Shigeru Kyuwa, Roger Hewson, Masayuki Saijo, and Shigeru Morikawa. Serological assays based on recombinant viral proteins for the diagnosis of viral hemorrhagic fevers caused by arenaviruses. XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria, Rio de Janeiro, Brazil. September 23-27,2012.
 - 15) 谷英樹、伊波興一朗、谷口怜、吉河智城、福士秀悦、西條政幸、森川茂 シュードタイプ VSV を用いたルジヨウウイルスの細胞侵入機構の解析 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月 13 日から 15 日、大阪
 - 16) 酒井宏治、關文緒、網康至、田原舞乃、中津祐一郎、大槻紀之、福原秀雄、福士秀悦、吉河智城、西條政幸、森川茂、前仲勝実、山口良二、駒瀬勝啓、竹田誠 カニクイザルで致死感染症を起こしたジステンバーウイルスのサルレセプターの効率的な利用 ; ジステンバーウイルスはヒトへの脅威となり得るか ? 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月 13 日から 15 日、大阪
 - 17) 谷口怜、佐山祐輔、永田典代、飯塚愛恵、谷英樹、吉河智城、福士秀悦、西條政幸、久和茂、森川茂 レストンエボラウイルス自然感染カニクイザルにおける免疫応答の解析 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月 13 日から 15 日、大阪
 - 18) 福士秀悦、新倉 綾、谷 英樹、吉河智城、伊波興一朗、谷口 怜、緒方もも子、西條政幸、森川 茂 日本のマダニ類における新種のブニヤウイルス (SFTSV) 保有調査と SFTSV 血清学的診断法の開発 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月 13 日から 15 日、大阪
 - 19) Shigeru Morikawa, Yusuke Sayama, Satoshi Taniguchi, Shuetsu Fukushi, Ichiro Kurane, and Masayuki Saijo. Serological survey of Reston ebolavirus infection in the Philippines. 45th Joint Working Conference on Immunology and Viral Disease, Stanford USA, 2011 June 20-22
 - 20) 岡本宗裕、小野文子、藤本浩二、高野淳一朗、濱野正敬、森川茂、永田典代、水谷哲也、酒井宏治、堀井俊宏、中屋隆明、中村昇太、宮沢孝幸、松井淳 ニホンザル血小板減少症の原因ウイルスの同定 第 152 回日本獣医学会学術集会、2011 年

- 9月19日から21日、大阪
- 21) 酒井宏治、永田典代、水谷哲也、網康至、吉河(岩田)奈織子、長谷川秀樹、福士秀悦、西條政幸、竹田誠、森川茂 カニクイザルから分離した新しいサルアデノウイルスの性状解析 第152回日本獣医学会学術集会、2011年9月19日から21日、大阪
- 22) Noriyo Nagata, Naoko Iwata, Hideki Hasegawa, Yuko Sato, Shigeru Morikawa, Tetsutaro Sata Interferon gamma protects adult balb/c mice from lethal respiratory illness after mouse-adapted SARS-CoV infection. International union of microbiological societies 2011 congress, Sapporo 11-16 Sept 2011
- 23) Masayuki Saijo, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Noriyo Nagata, Naoko Yoshikawa (Iwata), Hideki Hasegawa, Shuetsu Fukushi, Tetsuya Mizutani, Tetsutaro Sata, Ichiro Kurane, Shigeru Morikawa. Immune responses against EEV and IMV in non-human primates infected with monkeypox virus or vaccinated with a highly attenuated smallpox vaccine LC16m8 and protection from lethal monkeypox. International union of microbiological societies 2011 congress, Sapporo 11-16 Sept 2011
- 24) Chang-Kweng Lim, Yasuo Ami, Yoshiki Fujii, Meng Ling Moi, Kazutaka Kitaura, Akira Kotaki, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo, Ryuji Suzuki, Ichiro Kurane, Tomohiko Takasaki. Pathogenesis of epidemic chikungunya virus in nonhuman primates. International union of microbiological societies 2011 congress, Sapporo 11-16 Sept 2011
- 25) Koichiro Iha, Mina Nakauchi-Hori, Satoshi Taniguchi, Shuetsu Fukushi, Tetsuya Mizutani, Momoko Ogata, Shigeru Kyuwa, Masayuki Saijo, Victor Romanowski, Delia A Enria, Shigeru Morikawa. Establishment of serological diagnosis of Argentine hemorrhagic fever using recombinant antigens. International union of microbiological societies 2011 congress, Sapporo 11-16 Sept 2011
- 26) Kouji Sakai, Yohei Nishio, Noriyo Nagata, Yasushi Ami, Katsuhiko Komase, Masayuki Shimojima, Ken Maeda, Makoto Takeda, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa. Characterization of canine distemper virus isolated from cynomolgus monkeys during 2008 epizootic in Japan. International union of microbiological societies 2011 congress, Sapporo 11-16 Sept 2011
- 27) Yusuke Sayama¹, Shuetsu Fukushi, Mariko Saito, Satoshi Taniguchi, Itoe Iizuka, Tetsuya Mizutani, Ichiro Kurane, Masayuki Saijo, Hitoshi Oshitani, Shigeru Morikawa. A serological survey of Reston ebolavirus infection in swine during epizootic in 2008 in the Philippines. International union of microbiological societies 2011 congress, Sapporo 11-16

Sept 2011

- 28) Satoru Arai, Se Hun Gu, Luck Ju Baek, Kenji Tabara, Hong-Shik Oh, Nobuhiro Takada, Hae Ji Kang, Keiko Tanaka-Taya, Shigeru Morikawa, Nobuhiko Okabe, Richard Yanagihara, Jin-Won Song. Expanded evolutionary insights from Jeju virus, a newfound hantavirus harbored by the Asian lesser white-toothed shrew (*Crocidura shantungensis*). International union of microbiological societies 2011 congress, Sapporo 11-16 Sept 2011
- 29) Tetsuya Mizutani, Masako Abe, Naoto Ito, Kouji Sakai, Yoshihiro Kaku, Mami Oba, Momoko Ogata, Ichiro Kurane, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa, Makoto Sugiyama. An isolated virus homologous to porcine sapelovirus from wild boar. International union of microbiological societies 2011 congress, Sapporo 11-16 Sept 2011
- 30) Satoshi Taniguchi, Shumpei Watanabe, Koichiro Iha, Shuetsu Fukushi, Tetsuya Mizutani, Masayuki Saijo, Ichiro Kurane, Shigeru Kyuwa, Hiroomi Akashi, Yasuhiro Yoshikawa, Shigeru Morikawa. The detection of Reston ebolavirus antibodies in wild bats in the Philippines. International union of microbiological societies 2011 congress, Sapporo 11-16 Sept 2011

H 知的財産権の出願・登録状況

現在出願予定はない。

図1 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

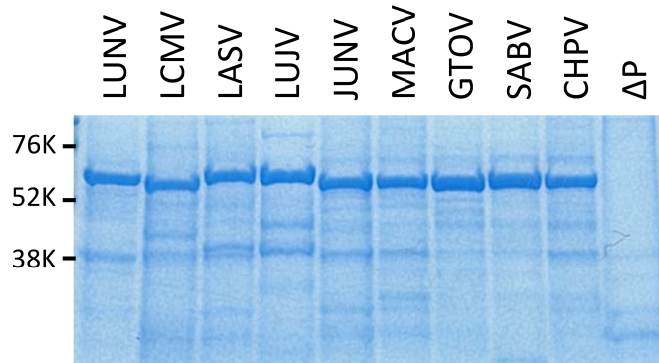


図2 アレナウイルスの高度保存領域と合成ペプチド

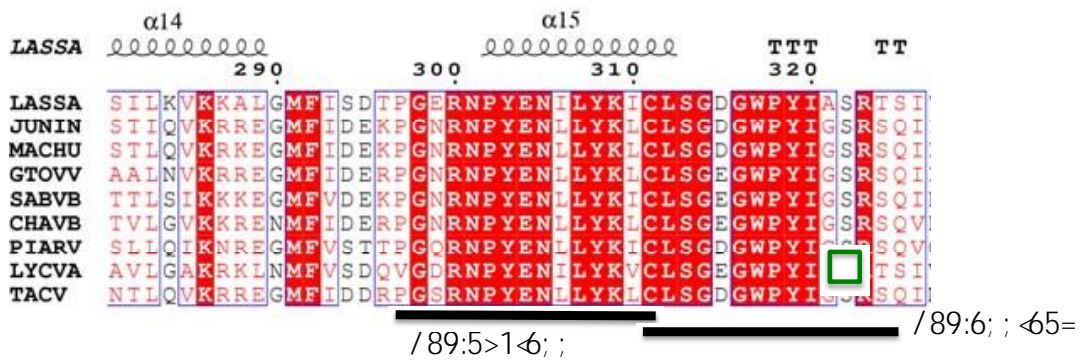
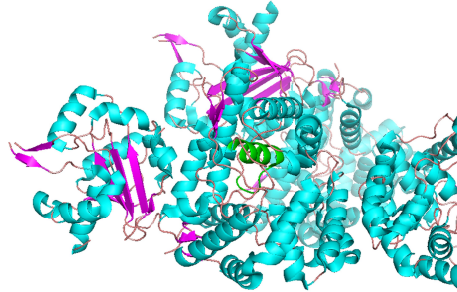
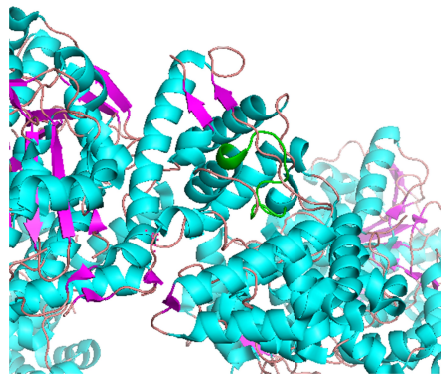


図 3-1 ラッサウイルス NP の 297PGERNPYENILYKIC₃₁₁ ペプチドの位置 (緑色)



(PyMol View of Lassa NP structure; 3MWP.pdb)

図 3-2 ラッサウイルス NP の 311CLSGDGWPYIASRT₃₂₄ ペプチドの位置 (緑色)



(PyMol View of Lassa NP structure; 3MWP.pdb)

図 4 アレナウイルス高度保存領域ペプチド抗体による ELISA

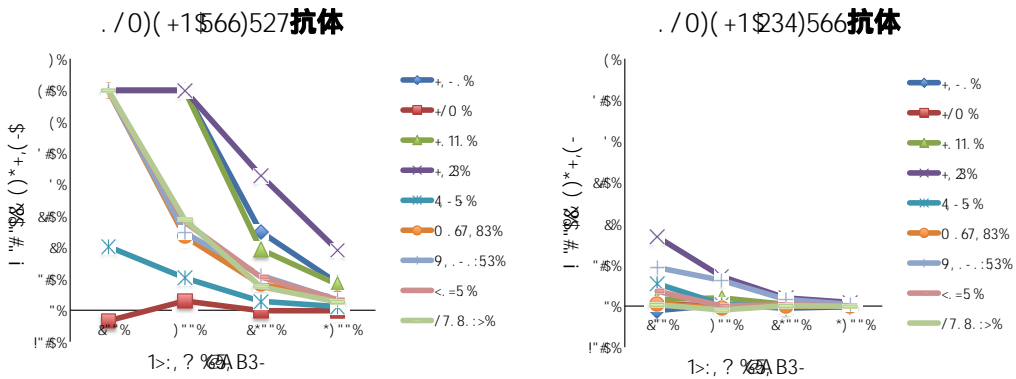


図5 ELISAによるペプチド抗体の authentic ウイルス抗原との反応

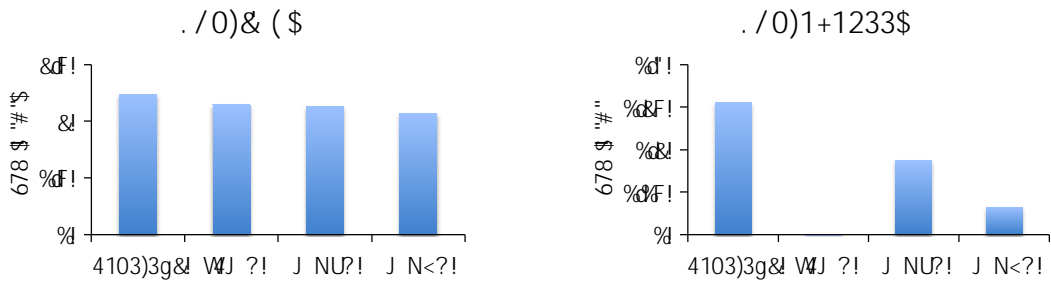


図6 ウェスタンブロッティングによるペプチド抗体の authentic ウイルス抗原との反応

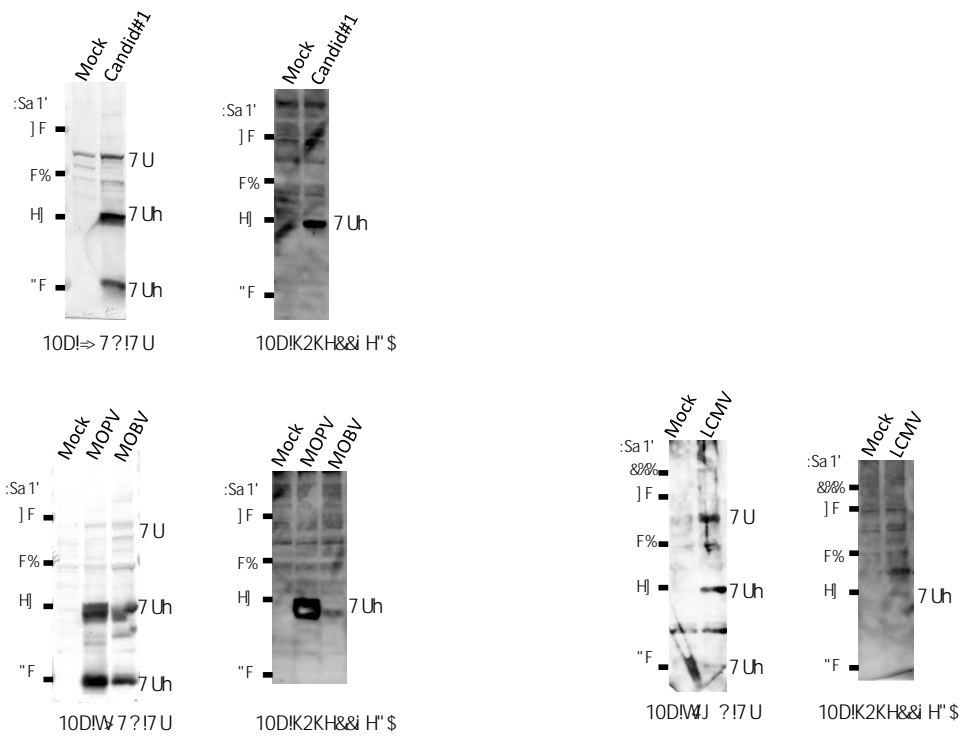


図7 アレナウイルスの GP-2 で保存されている領域

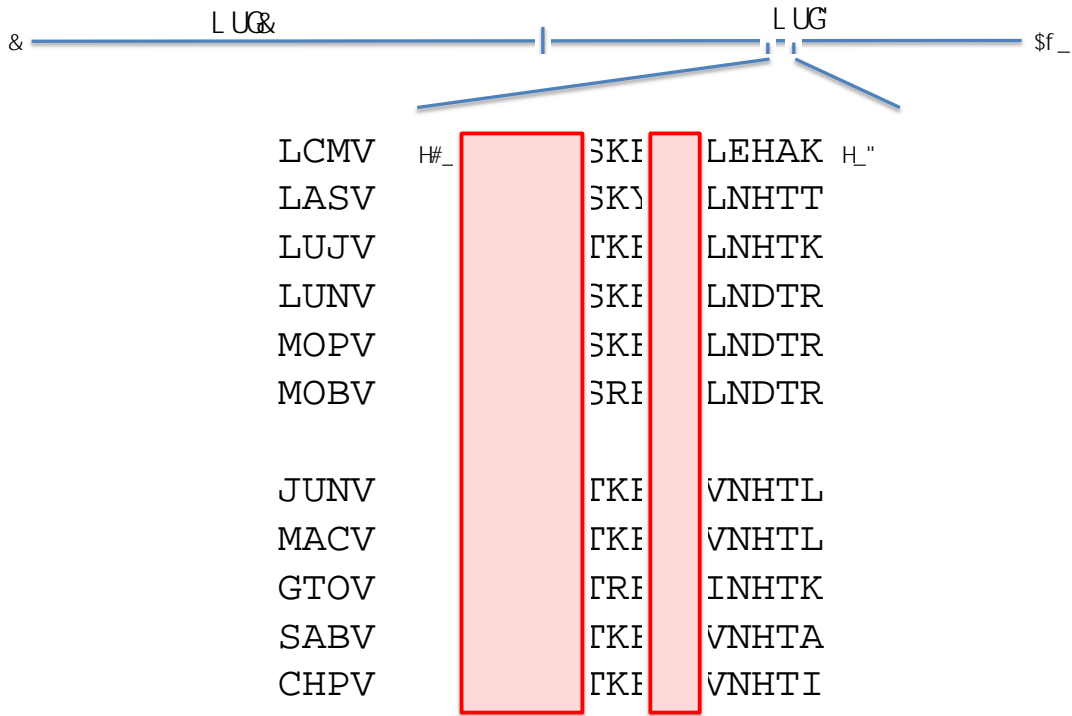
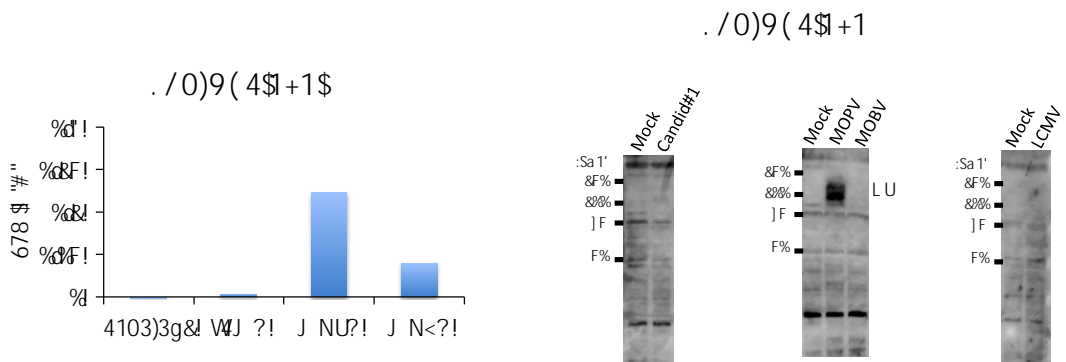


図8 アレナウイルスの GP-2 ペプチド抗体を用いた ELISA (左図) および ウェスタンブロッティング (右図)



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

人獣共通感染症（炭疽、狂犬病等）に対するヒト検体および感染源検体を用いた
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
研究協力者：奥谷晶子 国立感染症研究所獣医科学部、主任研究官
：黒田誠 国立感染症研究所病原体ゲノム解析センター、センター長
：関塚剛史 国立感染症研究所病原体ゲノム解析センター、主任研究官

研究要旨：

近年わが国で発生がないものの、バイオテロに使用される可能性のある炭疽や狂犬病等の動物由来感染症では、希少発生事例（輸入感染症等）に対する迅速な原因病原体の証明と侵入経路等の特定が公衆衛生上の大きな課題である。平成 23 年度：モンゴルで分離された炭疽菌株に特異的な 12 箇所の SNP (Single Nucleotide Polymorphism) を特定して 12SNP タイピング法を確立した。平成 24 年度：National Center for Infectious Disease with Natural Foci (NCIDNF) の協力を得て動物および環境由来のモンゴル分離株を 14 株追加して確立した 12SNP タイピングについて追加検討を行いモンゴル株は大きく 4 つのクラスターに分かれ、それぞれに地域特性のあることが示された。平成 25 年度：生物テロで利用される可能性のある炭疽菌の治療薬は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を行い、Anti Microbial Peptides(抗菌性ペプチド)である豚由来の Protegrin-1 が高い抗菌効果を示すことを明らかにした。

A. 研究目的

近年わが国で発生がないものの、バイオテロに使用される可能性のある炭疽や狂犬病等の動物由来感染症では、希少発生事例（輸入感染症等）に対する迅速な原因病原体の証明と侵入経路等の特定が公衆衛生上の大きな課題である。国内外の専門家と連携してバイオテロに使用される可能性のある人獣共通感染症の患者・感染源動物等について、迅速な検査、消毒および標準化を進めることにより、わが国での公衆衛生行政における危機管理対応を容易にすることが本研究の目的である。

そこで、本研究では炭疽の発生と流行が問題となっているモンゴル National Center for Infectious Disease with Natural Foci (NCIDNF) との共同研究により、アジアで分離される炭疽菌株の遺伝学的タイピングシステムの開発を行い、我々の確立した SNP 解析方法を応用して分離株を菌株レベルで識別できる SNP タイピングシステムの確立を試みた。また、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が、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として従来の抗菌剤や化学物質とは異なる抗菌物質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) の抗菌効果について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

1. MLVA8 解析

モンゴル国内で分離された土壌由来と動物由来の炭疽菌 29 株を使用した。

炭疽菌染色体上の 6 箇所および病原性プラスミド pX01 および pX02 上の各 1 箇所の併せて 8 箇所の繰り返し配列領域について特異的プライマーによる PCR を行い、ダイレクトシーケンシング (ABI 3730 xl DNA Analyzer) により塩基配列を解読した。

塩基配列より各繰り返し配列の繰り返し数を算出し、アジア地域を始めとして欧米やアフリカ由来のデータと併せて、PHYLIP version 3.6 と Tree View version 1.6.6. を用いて、unweighted pair group method with arithmetic means (UPGMA) method による系統解析を行った。

2. SNP 解析

2-1.

モンゴル株 29 株を用いて、我々が先に構築した、日本国内分離株を菌株レベルに識別可能な 80 箇所の SNP (80

tag-SNP) による系統解析を行った。

80 箇所の SNP は ABI 3730 xl DNA Analyzer により解読・特定して、モンゴル株に特異的な 80 SNP ライブラリーを作成した後に、MEGA version 5 を用いて Neighbour-Joining Tree method で系統解析を行った。

2-2.

モンゴル株 29 株から、モンゴルでの分離地域と土壌・動物由来株を網羅する 10 株についてフルゲノム解析を行った。

遺伝子バンクに登録されている 21 株の公開フルゲノムデータと今回モンゴル株から得たゲノムデータを比較して、染色体上、病原性プラスミド pX01 および pX02 上の全 SNP を検索した。

また、検索した全 SNP から、モンゴル分離株に特異的な SNP パターンを抽出して、代表的な SNP (tag-SNP) を選択した後に、MEGA version 5 を使用して Neighbour-Joining Tree method で系統解析を行った。

3. 短鎖抗菌性ペプチド AMP の検討

炭疽菌の「芽胞」「栄養型」および「莢膜型」細胞への抗菌効果を検証を行った。AMP はその立体構造から -helix 型、 -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。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。「芽胞」と「栄養型」の比較には 34F2 株 (pX01+, pX02-)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 (pX01-, pX02+)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

1. MLVA8 解析

モンゴル分離株 29 株は全て A3 クラスタに分類された。A3 クラスタは日本を始めとしたアジア諸国で分離される炭疽菌が多く分類されるクラスタである。しかしながら、MLVA8 による系統解析ではモンゴル分離株が形成するクラスタは同じブランチからの枝分かれから形成されており、菌株レベルでの識別は不可能であった。

2. SNP 解析

2-1.

MLVA8 よりも解析力の高い 80 tag-SNP を用いてモンゴル分離株の系統解析を行った(図 2)。モンゴル分離株は、日本分離株や Ames 株と同じ A3b クラスタに分類された。また、A3b クラスタ内で大きく 3 つのブランチを形成した。

80 tag-SNP は、MLVA8 解析より詳細な分類が可能であるが、日本分離株に特異的な 80 tag-SNP ではモンゴル分離株を菌株レベルで識別することは困難であった。

2-2.

モンゴル株 29 株から、モンゴルでの分離地域と土壌・動物由来株を網羅する 10 株のうち、7 株についてフルゲノムデータを得ることができた。モンゴル分離株に特異的な 148 箇所の SNP を抽出して、各 SNP パターンから代表的な SNP を 12 箇所に絞り込んだ。この 12 箇所の SNP を利用して系統樹を作成したところ、菌株レベルでの識別が可能となった。

3.

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、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。

D. 結論

SNP を用いた遺伝学的タイピングによって、モンゴル分離株を菌株レベルで識別できることを明らかにした。分

離菌株のフルゲノム解析によってモンゴル株に特異的な SNP (Single Nucleotide Polymorphism) を抽出して系統解析を行うと、A3b クラスタ内に分類されたモンゴル分離株を 3 つの大きなブランチに系統分類可能となった。

フルゲノム解析で分離菌株に特異的な SNP を特定すると、遺伝的変異が少ない炭疽菌についても、希少発生事例（輸入感染症等）において、その感染源や汚染地域を推定できる迅速な遺伝学的タイピングシステム確立の可能性が示唆された。

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。

本研究は、わが国で希少とされるバイオテロに使用される可能性のある人獣共通感染症の具体的な症例分析と病原体解析が可能になることから、公衆衛生行政への貢献度は極めて高いと考えられた。

E . 研究発表

A Okutani, H Tungalag, B Boldbaatar, A Yamada, D Tserennorov, I Otgonchimeg, A Erdenebat, D Otgonbaatar, and S Inoue.

Molecular Epidemiological Study of *Bacillus anthracis* Isolated in

Mongolia by Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for 8 Loci (MLVA-8) Japanese Journal of Infectious Diseases 2011;4:345-348.

F . 健康危険情報

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

分担研究「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
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	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

要旨： 本研究計画のボツリヌス関連事項として、(1) ボツリヌス菌保管株の管理・識別法、(2) ボツリヌス毒素の迅速検査法について検討した。

A. 研究の目的

ボツリヌス菌（Cb：*Clostridium botulinum*）とボツリヌス毒素（BoNT：*Botulinum neurotoxin*）はバイオテロに使用される可能性が高く、警戒されている。その対策として、本研究では(1) Cb株の管理・識別法と(2) BoNTの迅速検査法について研究を行った。

B. 研究方法

(1) Cb株の管理・識別法については、遺伝子型に基づく菌株の分類法の検討を行った。感染研には約80株のCb株が保管されているが、このうち最近分離された10株について、遺伝子型別と、ゲノム解析を行い、詳しく比較した。ゲノム解析は病原体ゲノム解析研究センターとの共同研究で行った。

(2) BoNTの迅速検査法は、BoNTに

よって切断される遺伝子組換えタンパク質を生産し、これを使用してマウスを使わないBoNTの検出系を検討した。

C. 研究結果

(1) Cb株の管理・識別法

国内で2006年から2011年の間に分離されたCb株10株について詳細な遺伝子レベルでの比較を行った(1株がA型菌、2株がB型菌、7株がA(B)型菌)。A(B)型菌7株は、PFGE、MLVA分析などで3つのグループに分けられることがわかった。ゲノム解析によって、このうち2つは5.9kbのプラスミドをもち、もう1つは21kbのプラスミドをもつグループであることが今回明らかになった。また、10株のゲノム解析結果を、既報のCbゲノム12株とSNP分析によって比較した結果、約145,000個のSNPマーカーが抽出され、詳

細な系統樹が作成された（図 1）。国内分離の 2 株の B 型菌のうち 1 株は比較的珍しいサブタイプ B6 の毒素遺伝子を持っており、ゲノム解析による系統樹でも他の株と大きな違いが見られた。国内分離の A 型菌は海外の株と似ていたが 1,300～2,000 SNP マーカーに違いが見られた。

(2) BoNT の迅速検査法

BoNT のによって切断される 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。この方法は精製 BoNT に対して、約 3 時間の検査時間でマウス法に匹敵する検出感度を示したが、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法の開発が必要である。

D. 考察

Cb や BoNT によるバイオテロ対策としては、(1) Cb 菌株の管理と識別態勢の整備、(2) Cb と BoNT の迅速検査法・消毒除去法 (3) 予防薬 (トキシソイドワクチン) と治療薬 (抗毒素) の整備、などが考えられる、本研究では、このうち (1) Cb 株の管理・識別法と (2) BoNT の迅速検査法に焦点を当てて検討を行った。

(1) Cb 株の管理・識別法については、感染研保管の Cb 株 10 株について遺伝子型別、ゲノム解析を行った結果、詳細な菌株系統の識別ができるようになった。これらの方法論を他の保管菌株に拡張していけば、Cb 菌株の危機管理のための、保管菌株の詳細なカタログ化が可能だと考えられる。本研究班によって病原体ゲ

ノム解析研究センターとの共同研究が行えたことは、研究を進める上で非常に大きな力となった。

(2) BoNT の迅速検査法

マウス法を使用しなくても、それに匹敵する検出感度の BoNT 検出法が構築できたが、この検出感度が実現されるのは精製 BoNT に対してであり、夾雑物が多い検体では検出感度が大きく低下する。夾雑物の影響を除いて検出感を維持する手法の開発が必要になる。

E. 結論

Cb 菌保管株の危機管理に役立つと考えられる、Cb 菌の系統分類、カタログ化に利用すべき方法論が定まってきた。BoNT の迅速検査法として、改良すべき点はあるが、マウスを使用しない高感度な方法を構築した。

F. 健康危険情報

特になし

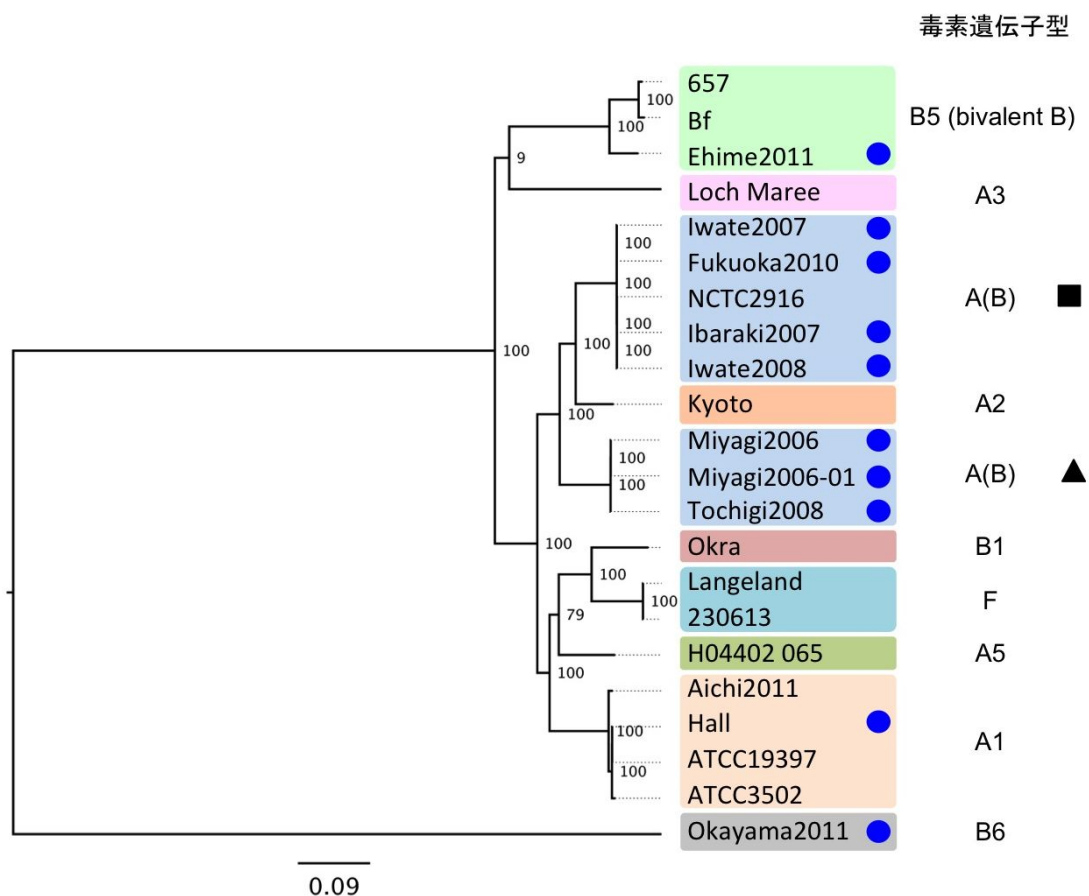
G. 研究発表

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

図 1. ゲノム解析結果に基づくボツリヌス菌株の系統樹



- 今回、解析を行った感染研保管の国内分離株
- 5.9 kb のプラスミドをもつ A(B) 型菌のグループ
- ▲ 21 kb のプラスミドをもつ A(B) 型菌のグループ

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

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	藤田 博己	大原総合病院附属大原研究所
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：バイオテロに使用される可能性があるとして一部が特定病原体に指定されている紅斑熱群リケッチアには、多様なリケッチア種があることが知られている。輸入症例から分離されたリケッチアは、これまで報告のない遺伝子配列を示していたことから、紅斑熱群リケッチアに関しては、今後もその多様性が広がる可能性があり、バイオテロを想定した場合、多様な臨床症状をも示すリケッチア症に対し、どれだけの感度、特異性をもって迅速診断系を準備すべきか考慮する必要がある。本研究では、その基盤を構築するため、国内の常在リケッチアと輸入症例の多様性を検討するとともに、新規分離リケッチア株の全ゲノム解析をこころみ、既存のリケッチア種との比較を行うことにより、バイオテロを想定した場合の多様な臨床症状をも示すリケッチア症に対し、SNPs解析による迅速診断系の可能性について検討した。また、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が議論される病原体である。既存の *C. burnetii* 分離株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。次世代シーケンサーによって数種の株の全ゲノム配列を解析、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

バイオテロ・エージェントとして複数のリケッチアが指定されている。その中で、紅斑熱群リケッチアには多様なリケッチア種があることが知られている。われわれの研究室では、国内に常在するつつが虫病や日本紅斑

熱などのリケッチア症、さまざまなベクターからのリケッチアの検出の他、多様な輸入リケッチア症を診断、経験している。リケッチア症の多様性に関し、どこまで広く対応・検出すべきか、アプローチ可能かを考察するため、輸入例から分離されたリケッチアの遺伝

子解析を全ゲノム解析まで行い、リケッチア症の多様性に関し検討した。

また、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、歴史的に長くリケッチアに分類されていた。他のリケッチアと同様にバイオテロ・エージェントとして世界的に注目されている。国内の患者発生は少ないものの、ひとたび発生すれば、多くの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り、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*においても全ゲノム解析の有用性を検討した。

B．研究方法

1．輸入リケッチア症例の確認、分離・同定

熱性疾患を呈した海外渡航者の鑑別診断依頼に基づき、抗リケッチア抗体価の測定、急性期全血や発疹部皮膚生検材料からリケッチア特異遺伝子の検出のため、複数の遺伝子領域を標的としたPCR、ダイレクトシーケンスを行った。また、急性期全血をL929細胞に接種し、分離を試みた。

2．分離リケッチアの解析

分離されたりケッチアからDNAを抽出し、複数の遺伝子領域について解析(Multi locus sequencing)を行った。

3．海外輸入例から得られた新規リケッチアの培養とゲノム解析DNAの調整

新規リケッチア株*Rickettsia* sp. TenjikuをL929細胞で培養、T75培養ボトル全量を解

析のための出発材料とした。100%感染したL929細胞を培養上清とともに回収、高速冷却遠心により得た沈渣を5mL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、上清を回収後、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。

4．*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(以下NM-NIID)と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本の感染細胞をゲノム解析に供した。上記リケッチアと同様に回収し、ペレットを1mLのPBS(-)に再懸濁、同様の細胞破碎、抽出法によりDNAを抽出した。

5．分離リケッチアのゲノム解析

3および4で得たゲノムDNAについて次世代シーケンサー(イルミナ社マイシックMiSeq)を用いて解読した。マウスおよびサルのレファレンス・シーケンス配列に解読リードをマッピング、unmap readをCLC genome workbenchで*de novo*アッセンブルし、1 kb以上のcontigを回収した。全ゲノム情報が公表されているリケッチア種、株と比較し、SNPs系統樹解析を行った。

(倫理面への配慮)

必要なし

C．研究結果

1．リケッチア症患者の確認

2011年に経験した一例はユニークな検査結果となった。6病日では用いたいずれの抗原に対しても陰性であったが、12病日で*R. japonica*並びに*R. conorii*に対する抗体価が有意に上昇、PCRでは、急性期全血材料に

において *ompA* のみ陽性となり、ダイレクトシーケンスの結果、紅斑熱群リケッチアのクラスターにはいるものの、既知のリケッチア種とは異なるシーケンス配列であった(図1)。

2. リケッチアの分離・同定

このリケッチアの分離に成功し、5つの領域の遺伝子領域についても検討したところ、すべてPCR陽性となり、シーケンス解析の結果、*ompA* のPCR産物は、臨床検体(急性期全血)から直接検出した遺伝子配列と完全に一致した。他のPCR産物の配列は、*ompA* ほど他のリケッチア種との相性は低くないものの、既報のリケッチア種とは異なる配列であった。

2. 新規リケッチアのゲノム解析

次世代シーケンサーによる解読、レファレンス・シーケンスにマッピングし、残ったリケッチア由来候補をCLC genome workbenchでアセンブルしたところ、1 kb以上のcontigが21個得られ、トータルで約1.34 Mbのゲノムサイズであることが推定された。

リケッチア独自のものと考えられた21個のcontigsをCGE (Center for Genomic Epidemiology) serverのsnpTree1.1によるゲノムワイドのSNPs系統解析を行い、紅斑熱群ならびに発疹チフス群を含む既報の23種のリケッチア種のゲノム情報と比較したところ、解析に用いたリケッチアは明らかに他のリケッチア種と異なる新規のものであった。

(図2)

3. *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。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、3つの*C. burnetii*株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、相菌では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、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。

D. 考察

初年度(2011年)の輸入症例の一つは、*R. japonica*ならびに*R. conorii*に対する抗体価の上昇が明らかであったこと、渡航先の情報から、当初、*R. conorii* subsp. *indica*と推測した。しかし、分離されたリケッチアは、これまで国内、海外でも報告のないものであった。臨床検体から直接PCR法によって検出できたものは、*ompA*領域のみであった。データベースに登録されていた情報は、唯一インドの研究者グループが登録した配列の長さが異なる同領域の情報のみであり、分離株により他の複数の遺伝子領域も解析できたが、これまでデータベースには登録がないものであった。

リケッチア症の検査目的において、*ompA*領域を標的としたPCRは、必ずしも第一の標的でないため、通常の検査プロトコールでは確定できないリケッチアであった。また、リケッチア症を疑う臨床検体からの直接PCR法を実施する場合、刺し口や発疹部皮膚生検材料からの検出が推奨されているものの、今回

の症例では、検体の保存状態からDNA抽出自体が難しく、全血からの抽出DNAのみPCR法へ供試可能であった。また、当室でルーチンに使用しているPCR増幅酵素ではシーケンス解析に供するに十分な増幅ができず、より増幅効率の高い酵素に変更することで検出、シーケンス解析が可能となった。リケッチア症は、原因となるリケッチア種が紅斑熱群に分類された場合でも、その症状は多様であり、臨床症状からリケッチア症を疑うことが難しいことも少なくない。リケッチア症とその原因となるリケッチア種の多様性が示されるなかで、今後、より広範なリケッチアに特異性、感度の高い遺伝子検出系の準備のため、さらに多くのリケッチア遺伝子の情報を集め、データベース化することも必要であろう。

2年次は、初年度に得た新規リケッチアの全ゲノム解析によるゲノムワイドのSNPs系統解析から、このリケッチアは、部分的に行っていた *ompA*, *gl tA*, *17 k-Da*, *16S*, *geneD* の各遺伝子と同様に、既知のリケッチア種と異なることが示された。供試21個のcontigsによるSNPs解析から既知のリケッチアと鑑別が可能であるが、より少ないcontigsでの解析により同様の鑑別が可能であるかの検討が必要である。さらにリケッチア症疑いの検体から直接シーケンス解析を行うことにより、SNPs解析からリケッチアの検出並びに鑑別が可能であるかの検討が必要である。

臨床症状からリケッチア症を疑うことが難しいことも多く、バイオテロを想定するためには、国内常在のリケッチアであるか、既知のリケッチアであるかの鑑別がテロの認知やリスク評価に重要となる。海外のみならず国内においても多様なリケッチアの存在があきらかになってきており、より簡便で迅速なリケッチアの鑑別のための標的SNPの検討が必要であり、その検出が臨床材料への適

用が可能かさらに進める必要がある。

3年次は、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一部の *C. burnetii* 株のゲノム解読を試みた。

国内保存株 *C. burnetii* 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、TK-1株は、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あり、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。しかし、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と言える。株間の比較では、核酸代謝系の遺伝子の欠失および変異が認められ、また複数の領域において、変異や欠失も認められた。一方、病原性関連領域と報告されているT4SSは、高度に保存されていた。

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基盤を作成、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。

E . 結論

リケッチア症の原因となるリケッチア種は多様である。バイオテロを想定した場合、多様な臨床症状をも示すリケッチア症に対し、どれだけの感度、特異性をもって迅速診断系

を準備すべきか考慮する必要がある。ゲノムワイドのSNPs解析の導入がよりおこないやすくするための環境整備が今後必要と考えられる。また、*C. burnetii*によるQ熱も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, Hayashidani 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)
- 5) Gaowa, Ohashi N, Aochi M, Wuritu, Wu D, Yoshikawa Y, Kawamori F, Honda T, Fujita H, Takada N, Oikawa Y, Kawabata H, Ando S, Kishimoto T: Rickettsia in ticks, Japan, Emerg Infect Dis, 2013 Feb, 19(2): 338-340
- 6) Sakamoto N, Nakamura-Uchiyama F, Kobayashi K, Takasaki T, Ando S, Iwabuchi S, Ohnishi K; Murine Typhus with Shock and Acute Respiratory Failure in a Japanese Traveler after Returning From Thailand. J Travel Med, 2013 Jan 20(1):50-53
- 7) 安藤秀二, ペストコントロール技術セミナー「怖いダニ類媒介性感染症～地域毎の情報を発信することが大事」, ペストコントロール, No. 160, p 27-31, 2012年10月
- 8) 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11版, 2012年4月
- 9) 安藤秀二, 発疹熱・発疹チフス・日本紅斑熱, 今日の治療と看護 改定第3版, 総編集: 永井良三, 大田健, 南江堂(東京) pp935-937, 2013年3月
- 10) 安藤秀二, 日本紅斑熱, 獣医公衆衛生研究, 14: 13-17, 2012年3月
- 11) 安藤秀二, 最近の輸入発疹熱事例について. 人と動物の共通感染症研究会のニューズレター, 10: 4-6, 2011年10月
- 12) 安藤秀二, 病原体等の保存・保管と輸送, バイオメディカルサイエンス研究会編, バイオセーフティの原理と実際, 医学評論社. P 112-121, 2011年6月
- 13) Fujisawa T, Kadosaka T, Fujita H, Ando S, Takano A, Ogasawara Y, Kaw

abata H, Seishima M, *Rickettsia africae* Infection in a Japanese Traveler with many tick bites. 2012, Acta Dermato-Venerologica, doi: 10.2340/15555-1313
14) 成田雅, 鶴沼菜穂子, 伊藤文人, 佐藤憲行, 星野智祥, 井上実, 山本正悟, 安藤秀二, 藤田博己: 11月熱 福島県中南部におけるタテツツガムシ媒介性つつが虫病, 日本内科学会誌, 101: 164-167, 2012

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
3) Ando S, Ogasawara Y: Traveler's Rickettsioses and Domestic Rickettsioses in Japan In 2011, 15th International Congress on Infectious Diseases, Bangkok, Thailand, June 13-16, 2012
4) Takajoh I, Matsuda M, Kariya Y, Sakaguchi S, Kawaguchi T, Miyauchi S, Umekita K, Ueno S, Kusumoto N, Nagatomo Y, Ogasawara Y, Ando S, Okayama A: Novel spotted fever group rickettsiosis? In a Japanese traveler returned from India, 15th International Congress on Infectious Diseases, Bangkok, Thailand, June 13-16, 2012
5) 安藤秀二: マダニと感染症の話, ペストコントロール協会講習会講演, 2012年11月13日, 東京
6) 安藤秀二: リケッチア感染症について ~ つつが虫病, 日本紅斑熱を中心に, 輸入症例(海外のトピックス)を含めて, 平成24年度動物由来感

染症技術研修会, 2012年11月2日, 東京
7) 岸田直樹, 安藤秀二, 久保光司: 北海道で初めての診断となった国内5例目となる African Tick Bite Fever の一例, 第61回日本感染症学会東日本地方会学術集会, 2012年10月10日 ~ 12日, 東京
8) 原崎多代, 大屋賢司, 関塚剛史, 奥田秀子, 安藤秀二, 黒田誠, 福士秀人: クラミジア肺炎およびオウム病を鑑別するマルチプレックスPCR法の開発. 第154回日本獣医学会, 平成24年9月14 ~ 16日, 盛岡
9) 大屋賢司, 黒田誠, 関塚剛史, 奥田秀子, 安藤秀二, 福士秀人: 動物クラミジアを検出するLAMP法の開発. 第154回日本獣医学科, 平成24年9月14 ~ 16日, 盛岡
10) 佐藤正明, 小川基彦, 安藤秀二: Chlamydia trachomatis のML S解析に関する検討, 第30回日本クラミジア研究会, 平成24年9月8日, 東京
11) 大屋賢司, 黒田誠, 関塚剛史, 奥田秀子, 安藤秀二, 福士秀人: 動物クラミジアを検出するLAMP法の開発. 第30回日本クラミジア研究会, 平成24年9月8日, 東京
12) 藤澤智美, 藤田博己, 角坂照貴, 安藤秀二, 高野愛, 小笠原由美子, 川端寛樹, 清島真理子: *Rickettsia africae* による旅行者感染の一例, 第20回ダニと疾患のインターフェース, 平成24年7月6 ~ 8日, 徳島県阿南市
13) 安藤秀二, 山内悠子, 竹下望, 藤澤智美, 清島真理子, 堀田剛, 清水恒広, 高城一郎, 岡山昭彦, 阪本直也, 中村ふくみ, 大西健児: 実験室診断で経験した多様なリケッチア症, 第86回日本感染症学会, 平成24年4月25 ~ 26日, 長崎
14) 高城一郎, 金子裕美, 坂口翔太, 川口剛, 宮内俊一, 梅北邦彦, 上野史朗, 楠本規生, 長友安弘, 安藤秀二, 岡山昭彦: インドからの輸入感染症と考えられた新規リケッチア症の一

例,第86回日本感染症学会,平成24年4月25
~26日,長崎

15)中島隆弘,清水恒広,堀田剛,安藤秀二;
南アフリカ滞在中に感染し来日後に発症した地
中海紅斑熱のブラジル人症例,第86回日本感
染症学会,平成24年4月25~26日,長崎

16)安藤秀二,小笠原由美子:2011年に経験
した多様な輸入リケッチア症,第18回リケッ
チア研究会,大阪,平成24年2月12日

17)安藤秀二:宮古島のつつが虫病の国内外
における位置づけと今後の検査対応につい
て,つつが虫病に関する調査報告会,沖縄県
宮古島市,平成24年1月23日

18)安藤秀二:ズーノーシスとしての偏性細

胞内寄生細菌の自然界おけるリスク,第11
回日本バイオセーフティ学会,筑波,平成2
3年12月2日

19)安藤秀二,リケッチア症,第6回輸入感
染症講習会,東京,平成23年9月24日

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 |

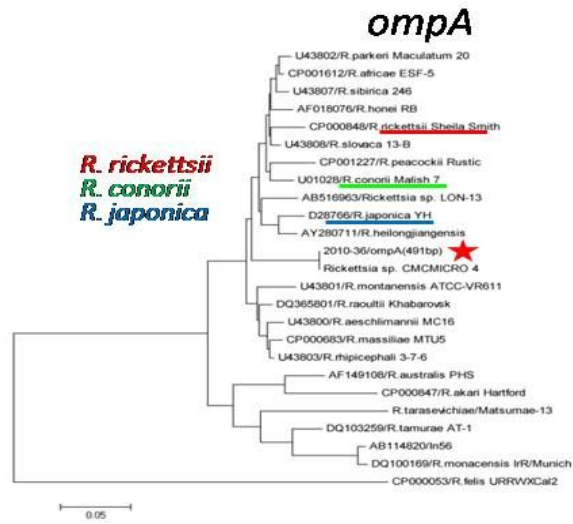


図1 検出・分離されたリケッチアのompA領域の系統樹

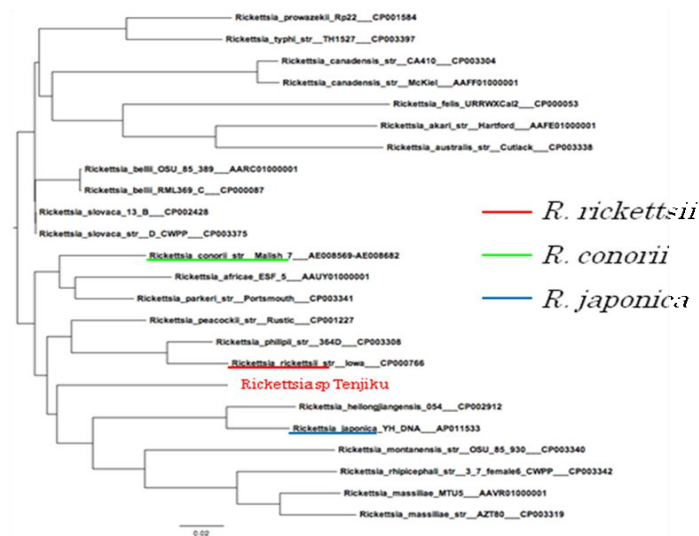


図2 新規リケッチアのSNPs系統樹

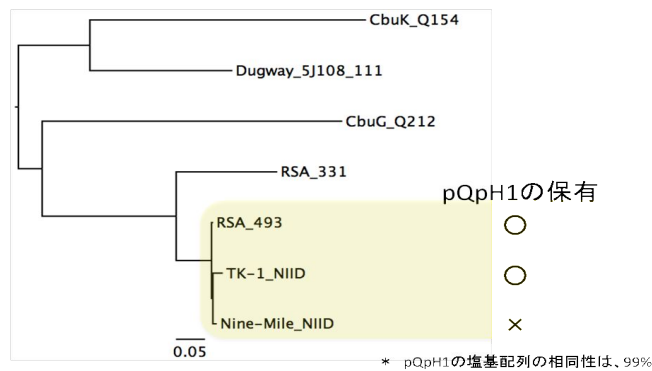


図3 SNPs系統解析(*C. burnetii* CbuG Q212 をreferenceにしてSNPを抽出, Total SNPs: 10,947 SNPs)

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

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 田辺公一、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。本研究では、BSL 真菌の安全な取扱法について検討した。また、コクシジオイデスゲノム DNA・ヒストプラズマゲノム DNA の検出のための様々な増幅法を検討・開発した。

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。

B. 研究方法

平板培地で培養されたヒストプラズマ属およびコクシジオイデス属は大量の分生子（胞子を）産生し、わずかな振動や気流によって胞子を飛散させる。したがって気流が発生している安全キャビネット内で実験操作は多大な危険を伴う。そこで、安全キャビネット内に小型のグローブボックスを操作し平板培地で発育した菌を取り扱った。菌の不活化は 100%エタノールを用い、グローブボックスはホルマリン燻蒸によって消毒を行った。

検出法の検討に用いたコクシジオイデスゲノム DNA は、千葉大学真菌医学研究センターから分与された菌株から抽出した DNA を用いた。ヒストプラズマゲノム DNA は感染研 BSL3 施設で過去に臨床検体から分離した *Histoplasma capsulatum* より抽出した DNA サンプルを用いた。

Realtime PCR の標的は、ヒストプラズマ DNA については、M 抗原遺伝子および、100kDa タンパク質遺伝子の内部に Taqman probe を設計し、コクシジオイデス DNA については、Coi9-1 領域に LUX プライマーを設計し、それぞれ検出を試みた。Realtime PCR については SYBERgreen を用いたインターカレーター法と Taqman probe 法の双方を検討した。Realtime PCR は 2step (95 5 秒、60 30 秒) を 40 サイクル行った。PCR 反応の特異性については形態の類似する複数の菌種の DNA を用いて検証を行った。

コクシジオイデス検出のための LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 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。ヒストプラズ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) 平板培地で培養された BSL3 の不活化と DNA 抽出方法

小型のグローブボックスを安全キャビネット内に設置し、その中で実験操作を行った。プラスチックの使い捨て白金耳の先端を PBS(0.01% Tween 80)に浸し、寒天培地上で発育したコロニーから最小限の実験操作で胞子を釣菌し、斜面培地に接種し、30 での分離培養を行った。

6-7 日後、斜面培地で発育した菌の不活化を行った。シリコン栓より注射針を用いて 70%エタノールを栓付近まで注入し、2 日間室温で放置した。その後、安全キャビネット内で斜面培地より菌体を剃刀で切除し DNA 抽

出に供した。いずれの操作手順においてもグローブボックス内にはある程度孢子が飛散することが予想されたため、ボックス内でホルマリンの入った容器を開放し、燻蒸によって消毒を行った。

以上の実験手法は何度かシミュレート操作を行い検討を重ねたうえで現時点での最善の実験手法であると判断した。

2) nested PCR による *Histoplasma capsulatum* genome DNA 検出感度の検討

10ng から順次希釈した *H. capsulatum* DNA を鋳型とし、M 抗原遺伝子を標的とした nested PCR を行った。目的領域の増幅はアガロースゲル電気泳動にて確認し、増幅断片の塩基配列を決定し、非特異的増幅ではないことを確認した。

アガロースゲル電気泳動において、1fg まで遺伝子の増幅を確認できた。また、陰性コントロールとして、*Aspergillus*、*Candida*、*Cryptococcus*、*Trichosporon*、*Penicillium* などの真菌から調製したゲノム DNA を用いて第一段階 PCR を行ったが、増幅は認められなかった。

3) インターカレーター法による *Histoplasma capsulatum* genome DNA 検出

M 抗原遺伝子および 100 kDa タンパク質遺伝子について nested PCR で感度・特異性ともに良好な成績の認められた領域と、ソフトウェア (PrimerExpress) が選抜した領域についてプライマーをデザインした。リアルタイム PCR については、SYBR Premix Extaq (TAKARA) を用い、Mx3000P QPCR System (Agilent technologies) を用いて蛍光定量を行った。その結果、M 抗原遺伝子および 100kDa タンパク質 遺伝子について、いずれも 10 pg のゲノム DNA を検出することができた。

4) Taqman probe 法による *Histoplasma capsulatum* genome DNA 検出

インターカレーター法で標的とした増幅領域の中央付近に Taqman probe を設定し、TaqMan® Universal Master Mix II (Applied Biosystems) を用いて実験を行った。Taqman probe を用いることで感度の向上が期待されたが、予想とは反対に、M 抗原遺伝子および 100 kDa タンパク質遺伝子ともに 1 ng のゲノム DNA が検出限界であった。

5) Taqman probe および LUX プライマーによるヒストプラズマおよびコクシジオイデス DNA の検出

ヒストプラズマ属について M 抗原遺伝子および 100 kDa タンパク質遺伝子の適切な領域に Taqman probe (VIC-TAMRA) を設計し、Mx3000P QPCR System (Agilent technologies) を用いて蛍光定量を行った。その結果、M 抗原遺伝子に関してはこの実験系は機能しなかったが、100kDa タンパク質遺伝子については、1 ng のゲノム DNA を検出することができた。

LUX プライマーによる realtime PCR も上記と同様の実験系で蛍光定量 (蛍光色素 : FAM) を行った。こちらの PCR についてはコクシジオイデスゲノム DNA の調製が完了しなかったため、当部で保存してあった濃度不明のコクシジオイデス DNA を用いて検証を行ったが、過去の報告通り LUX プライマーによる DNA の検出が可能であった。

上記、2 種類の realtime PCR は蛍光色素の検出波長が異なるために、混合して使用することが理論上可能である。二種類のプローブを混合して PCR を行ったが、双方の蛍光検出結果に互いに全く影響がないことを確認できた。また、白色の糸状菌であり、形態的にコクシジオイデス属やヒストプラズマ属と判別

が困難である、*Pseudallescheria boydii*、*Schizophyllum commune*、*Penicillium griseofulvum* のゲノム DNA を用いて実験を行い、目的の菌以外のゲノム DNA では蛍光が検出されないことを確認することができた。

6) コクシジオイデス 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)。

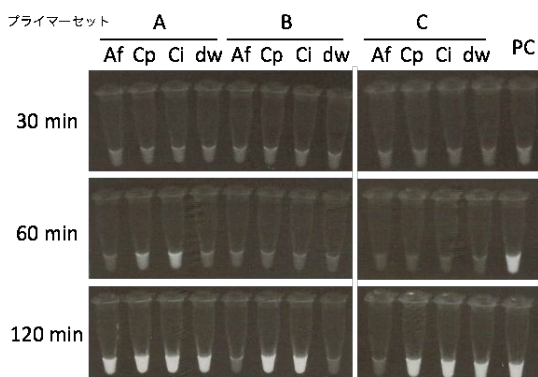


図 1. コクシジオイデス属 LAMP プライマーの検討 Af: *Aspergillus fumigatus*, Cp: *Coccidioides posadasii*, Ci: *Coccidioides immitis*, dw: distilled water, PC: キット添付の陽性コントロール

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 時間後に検出された。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)。

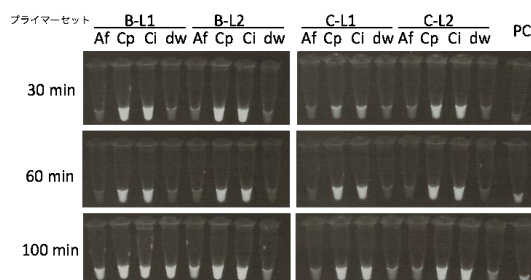


図 2. コクシジオイデス属 loop プライマーの検討 Af: *Aspergillus fumigatus*, Cp: *Coccidioides posadasii*, Ci: *Coccidioides immitis*, dw: distilled water, PC: キット添付の陽性コントロール

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。

7) ヒストプラスマ属 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スマ 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)

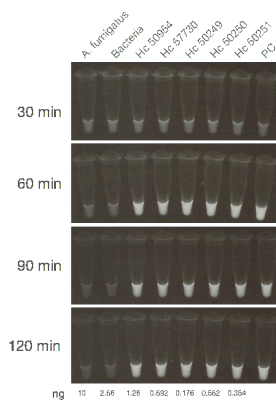


図 3 ヒストプラスマ属 LAMP 法の検討

PC: キット添付の陽性コントロール

D. 考察

ヒストプラス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。

今回検討した培養された菌の取り扱い方法によって、いずれの検査施設でも安全に菌を分離培養することが可能となり、仮に感染者が増加した場合、各検査施設においても菌の取り扱い・同定が可能になるものと期待される。

Nested PCR による *Histoplasma* DNA の検出感度は非常に高く、計算上 1fg のゲノム DNA が含まれるサンプルにおいてもバンドが観察された。しかしながら、ゲノムサイズから換算すると 1 細胞に含まれるゲノム DNA は約 40 fg であり、M 抗原遺伝子は遺伝子上に 1 コピーしかない。したがって、今回の検討での検出感度の算出は正確ではなく、ストック DNA の濃度の測定が正確でないかあるいは希釈系列の作製が正確にできていなかった可能性が考えられる。いずれにせよ、nested PCR の感度は非常に高く、現時点では環境サンプルな

どのごく微量の *Histoplasma* 属真菌が含まれるサンプルにおける最も有力な遺伝子検出法であると考えられた。

Nested PCR は感度が高い一方で、操作が煩雑であり、第一段階 PCR 産物のコンタミによる擬陽性の問題点がある。この問題点を克服するために、二種類のリアルタイム PCR 実験系の構築を試みた。

インターカレーター法では 10ng の *Histoplasma* DNA まで検出することができたが、nested PCR と比較すると感度において劣っていた。Taqman probe を用いたリアルタイム PCR においては特異性が上昇することから、非特異的な反応が抑制されることで若干の感度の向上が期待されたが、むしろインターカレーター法よりも感度が低いという結果になった。いずれのリアルタイム PCR 法においても PCR のサイクルは 40 サイクルのみであり、80 サイクル反応を行う nested PCR に匹敵する感度を実現することは困難なのかもしれない。

ただし、近年の遺伝子解析手法の進歩は著しく、PCR に関しては好感度の DNA ポリメラーゼやキットが次々と開発されている。最新の遺伝子解析技術情報を参考にしながら、実験系の改良を続けていけば、高い感度と特異性をもち、なおかつ粗精製サンプルからでも遺伝子の検出が可能な実験系の構築が可能になると期待される。

本研究で確立した realtime PCR 実験系ではヒストプラスマかコクシジオイデスカを特異的かつ迅速簡便に同定することが可能である。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、臨床検体をもちいてこの realtime PCR 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。

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ス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

胞子を飛散させやすい BSL3 真菌の取り扱い方法の検討を行った。

マルチプレックス Realtime PCR によるヒストプラスマ属とコクシジオイデス属の迅速診断系を確立した。

LAMP 法によるコクシジオイデス属およびヒストプラス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. Kimura M, Araoka H, Uchida N, Ohno H, Miyazaki Y, Fujii T, Nishida A, Izutsu K, Wake A, Taniguchi S, Yoneyama A. *Cunninghamella bertholletiae* pneumonia showing a reversed halo sign on chest computed tomography scan following cord blood transplantation. *Med Mycol.* 50:412-416, 2012.

2. Sugiura K, Sugiura N, Yagi T, Iguchi M, Ohno H, Miyazaki Y, Akiyama M. Cryptococcal Cellulitis in a Patient with Bullous Pemphigoid. *Acta Derm Venereol.* , 2012.
3. Gyotoku H, Izumikawa K, Ikeda H, Takazono T, Morinaga Y, Nakamura S, Imamura Y, Nishino T, Miyazaki T, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Yasuoka A, Yaguchi T, Ohno H, Miyazaki Y, Kamei K, Kanda T, Kohno S. A case of bronchial aspergillosis caused by *Aspergillus udagawae* and its mycological features. *Med Mycol.* 50:631-636, 2012.
4. 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.
5. Mihara T, Izumikawa K, Kakeya H, Ngamskulrungrroj 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.
6. 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.

7. 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.
8. 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. 宮崎義継, 金子幸弘, 梅山 隆, 田辺公一, 大野秀明. *Cryptococcus gattii* 感染症. 感染症. 42:172-175, 2012.
2. 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.
3. 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.
4. 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. Ohno H, Tanabe K, Kaneko Y, Umeyama T, Yamagoe S, Miyazaki Y. Nested PCR for diagnosis of histoplasmosis. 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. June 11-15, 2012, Berlin, Germany.
2. Umeyama T, Ohno H, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Miyazaki Y. Multi-locus sequence typing epidemiology of *Cryptococcus neoformans* strains clinically isolated in Japan. 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. June 11-15, 2012, Berlin, Germany.
3. Tanabe K, Ohno H, Umeyama T, Yamagoe S, Chibana H, Miyazaki Y. Genetic analysis of echinocandin-resistant *Candida glabrata* isolated in Japan. 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. June 11-15, 2012, Berlin, Germany.
4. 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, 大川原明子, 田辺公一, 金子幸弘, 梅山 隆, 山越 智, 泉川公一, 藤井 毅, 竹村 弘, 岸 一馬, 河野 茂, 宮崎義継. 日本国内で分離された

- Cryptococcus* 属臨床分離株の血清型解析と抗真菌薬に対する感受性動向. 第 60 回日本感染症学会東日本地方会学術集会、第 58 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会、山形、2011 (10 月)
2. 田辺公一、大野秀明、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、金城雄樹、杉田 隆、畠山修司、亀井克彦、渋谷和俊、宮崎義継. *Cryptococcus gattii* 国内分離株の病原因子解析. 第 60 回日本感染症学会東日本地方会学術集会、第 58 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会、山形、2011 (10 月)
 3. 梅山 隆、大野秀明、田辺公一、山越 智、宮崎義継. 標準化 MLST 解析法を用いたわが国のクリプトコックス属臨床分離株の分子疫学解析. 第 55 回日本医真菌学会学術集会、東京、2011 (10 月)
 4. 大野秀明、田辺公一、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、杉田 隆、畠山修司、亀井克彦、渋谷和俊、宮崎義継. 本邦初の北米流行型 *Cryptococcus gattii* 臨床分離株の実験的病原性解析. 第 55 回日本医真菌学会学術集会、東京、2011 (10 月)
 5. 田辺公一、大野秀明、梅山 隆、山越 智、宮崎義継. 日本とタイにおける遺伝子検出法を用いた環境生息ヒストプラスマ属の検出. 第 55 回日本医真菌学会学術集会、東京、2011 (10 月)
 6. 大野秀明、田辺公一、梅山 隆、金子幸弘、山越 智、宮崎義継. クリプトコックス・ガッティ (*Cryptococcus gattii*). 衛生微生物技術協議会 第 32 回研究会、東京、2011 (6 月)
 7. 大野秀明、田辺公一、杉田 隆、畠山修司、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、亀井克彦、宮崎義継. 国内で初めて分離された VGIIa 型 *Cryptococcus gattii* 株の薬剤感受性と病原性についての検討. 第 59 回日本化学療法学会総会、札幌、2011 (6 月)
 8. 徳山承明、眞木二葉、竹村 弘、高木妙子、田辺公一、大野秀明、宮崎義継、亀井克彦、長谷川泰弘. 日本人 AIDS 患者に発症したマルネツフェイ型ペニシリウム症の一例. 第 32 回関東医真菌懇話会、東京、2011 (5 月)
 9. 田辺公一、大野秀明、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、杉田 隆、畠山修司、亀井克彦、宮崎義継. 国立感染症研究所における地域流行型真菌症への対応と現状. 第 32 回関東医真菌懇話会、東京、2011 (5 月)
 10. 梅山 隆、大野秀明、田辺公一、山越 智、渡邊 浩、宮崎義継. 福岡県筑後地区周辺におけるクリプトコックス症多発発生例からの分離株の MLST 法による疫学的検討. 第 85 回日本感染症学会総会、東京、2011 (4 月)
 11. 大野秀明、田辺公一、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、宮崎義継. 遺伝子診断法を用いた土壤中に生息するヒストプラスマ属検出の試み. 第 85 回日本感染症学会総会、東京、2011 (4 月)
 12. 大野秀明、田辺公一、杉田 隆、畠山修司、大久保陽一郎、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、金城雄樹、渋谷和俊、亀井克彦、宮崎義継. 北米流行型 *Cryptococcus gattii* 株の病原性、病原因子の解析-国内臨床分離株を中心に-. 第 86 回日本感染症学会総会・学術講演会. 4 月 25-26 日、2012 年、長崎.
 13. 渋谷和俊、大久保陽一郎、大野秀明、宮崎義継、田辺公一、金子幸弘、山越 智、梅山 隆、安藤常浩、若山 恵. *Cryptococcus gattii* 感染症における病

- 理組織学的解析. 第86回日本感染症学会
総会・学術講演会. 4月25-26日, 2012
年, 長崎.
14. 泉川公一, 三原 智, 森永芳智, 中村茂
樹, 今村圭文, 宮崎泰可, 掛屋 弘, 山
本善裕, 柳原克紀, 梅山 隆, 大野秀明,
宮崎義継, 田代隆良, 河野 茂. 長崎大
学病院における *Cryptococcus* の
Multilocus Sequence Typing を用いた分
子疫学調査. 第52回日本呼吸器学会学術
講演会. 4月20-22日, 2012年, 神戸.
15. 宮崎義継. 気管支鏡検査 (TBLB および
BAL) にて診断された肺コクシジオイデス
症の一例. 第61回日本感染症学会東日本
地方回学術集会/第58回日本化学療法学
会東日本支部総会/第95回日本細菌学会
関東支部総会. 10月10-12日, 2012年,
東京.
16. 木村雅友, 大野秀明, 梅山 隆, 宮崎義
継. アスペルギルスとクリプトコックス
による肺混合感染の2手術例. 第56回日
本医真菌学会総会・学術集会. 11月10-11
日, 2012年, 東京.
17. 大久保陽一郎, 大野秀明, 篠崎 稔, 宮
崎義継, 根本哲生, 若山 恵, 栃木直文,
笹井大督, 石渡誉郎, 中山晴雄, 下平佳
代子, 田辺公一, 金子幸弘, 梅山 隆,
山越 智, 職 玉珠, 北原加奈子, 山本慶
郎, 渋谷和俊. マウス肺クリプトコッカ
ス症モデルを用いた感染防御ならびに構
築変換の解析. 第56回日本医真菌学会総
会・学術集会. 11月10-11日, 2012年, 東
京.
18. 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.
19. 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感染性材料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。この *B. pseudomallei* と *B. mallei* の LAMP 法の検討は終了した。*B. pseudomallei* の LAMP 法はタイの類鼻疽流行地域で臨床検体を用いて検討を行い、また日本国内で我々が行っている検査にも併用して性能の比較検討を行っ

た。その結果、LAMP 法は日本国内の検査に十分な性能を持つことが明らかになった。また *B. mallei* についてはこれまでに簡便な核酸検出法の報告がなかった。我々の LAMP 法は簡便に *B. mallei* を検出可能な方法であり、検出感度、特異度にも問題が無い。今後、この LAMP 法は、迅速簡便な検査法として利用できると考えられる。

国立感染症研究所で *B. pseudomallei*, *B. mallei* の検査を行ったところ、依頼機関より検体を送る前に行われた各機関での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た。検出法としては核酸検出法である LAMP 法とした。この方法は迅速検出法として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ため、汎用性が高いと考えられる。

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、現在のところ日本国内では方法がない。このため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、感染研に検体が搬入される前の検査が自動検査機器で行われた場合、誤同定が見受けられたため、過去の検査における誤同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、はじめは異なっていたが、利便性を考えて両者が同じ条件で試験を行えるように条件検討を行った。*B. pseudomallei* の LAMP 法は共同研究先であるタイ国コンケン大学にて臨床検体を用いて評価を行った。また、国内の検査時に、この LAMP 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.)、培養法と併用して使用し結果を比較した。*B. mallei* の LAMP 法は過去に受け付けた検査の保存検体を使用し、性能評価を行った。

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、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* の外膜タンパクの分画を行った。

3. 自動検査機器による *Burkholderia* 属誤同定について

B. pseudomallei の検査を行った結果、感染研へ検体を搬入する根拠となる自動検査機器結果の誤判定が見受けられたため *B. mallei* を含めた過去の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. 研究成果

1. *B. pseudomallei*, *B. mallei* の迅速遺伝子検出法 (LAMP 法)

B. pseudomallei, *B. mallei* LAMP 法の反応条件は、検討の結果いずれも反応温度 67、反応時間 60 分となった。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。タイ国コンケン大学で行った、臨床検体を用いた *B. pseudomallei* の LAMP 法の検討の結果では検出感度は 41.2%、特異度は 93.8% であった。この検討は検出に蛍光試薬を用い、反応条件が 63、60 分であった。

B. mallei の LAMP 法では検出感度には問題が無かったが特異度に問題があった。適切なプライマー群の選択に加え反応温度を 67 まであげることで解決された。この条件に合わせて *B. pseudomallei* の条件再検討を行った。日本国内での実用性を検証するため 4 件の

B. pseudomallei 検査を我々の LAMP 法を併用しておこなった。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 法で行った。その結果、*B. pseudomallei* 陽性は 3 件であった。陽性となったものは培養法、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* 陰性となった検体では、培養法でも *B. pseudomallei* であることが否定され、他の核酸検出法でも *B. pseudomallei* が陰性であった。

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はできなかった。このため、各菌体から外膜タンパク質を分画した。

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

タイ国・コンケン大学における *B. pseudomallei* の LAMP 法の臨床検体を用いた検討の結果では検出感度は 41.2%、特異度は 93.8%であった。この結果は既報の検出感度 2.3%に較べると高い検出率ではあるが、まだ十分ではない。コンケン大学で検討を行った後、*B. pseudomallei* の反応条件についてはさらに検討を行っており、検出感度は向上していると考えられるが、類鼻疽患者の臨床検体を用いる検討は日本国内では困難であるため機会を待ちたい。*B. pseudomallei*, *B. mallei* の LAMP 法の日本国内における実用性の検討として、我々の研究機関で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。その保管臨床株を用いて *B. mallei* の LAMP 法を試みた結果、それらの臨床分離株は *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いため、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使用していく予定である。また、有事の際の検出法としても使用可能と考えている。

類鼻疽の血清学的検出法は、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、これ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ため、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 属の自動検査機器を含むコマースシステムによる誤同定の問題は国外でも問題になっており、*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 *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。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に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* には簡便で性能の良い核酸検出法が確立されていなかったため、その開発を目指して検討を行ってきた。迅速核酸検出法には LAMP 法を適用することとした。性能の検討の結果、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* ではこれまで簡便な核酸検出法の報告がなく、この LAMP 法は今後実用的に使用可能と考える。

これらの二種類の LAMP 法は使用マニュアルを準備し要請時には配布可能な状態とした。

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かな対処法を立案・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か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菌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

1) 網羅配列解読による野兔病菌鑑別と病原性評価

いわき市立総合磐城共立病院・浅野先生から供頂いた感染症の疑いのある不明病検体(右腋窩リンパ節膿瘍)を用いて病原体検索を試みた。

➤ 網羅配列解読のライブラリー作製:

膿瘍検体から解読用 DNA ライブラリーを作成するために、NEXTERA DNA sample prep kit (EpiCentre) を用いた。

➤ 次世代シーケンサーによる網羅塩基配列解読:

次世代シーケンサー illumina GAIIX で DNA ライブラリーの網羅解読を行った。解読キットは、TruSeq SBS kit v5 (illumine)を使用した。1 サンプルにつき 3,828 万本の解読リード (125 mer) を取得した。解読リードに内在するヒトゲノム配列を bwasw マッピングソフトで削除した。残った解読リードを用いて相同性検索 (megablast) を行い、病原体を検索した。現在公開されているほぼ全ての生物種の配列を内包している米国 NCBI nt 配列データベース(2011年7月11日版)に対して相同性検索を行い、病原体候補を検索した。得られた結果を MEGAN (v.4.40.6)にて類似性の見られた生物種の一覧図を得た(MEGANの閾値: 1 ヒット以上、score 200.0 以上)。

2) 1塩基バリエーション SNV による野兔病菌の株系統解析:

高病原性・野兔病菌タイプ A に属する *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* SCHU_S4 株のゲノム情報 (GenBank ID: NC_006570.fna) をレファレンス配列にして、maq v0.7.1 によるリード・マッピングを行った。phred score, ≥ 20 ; coverage, ≥ 1 ; variant frequencies, ≥ 0.90 の条件で SNVs を抽出した (MapView 使用)。公開され利用可能な野兔病菌・10 株のゲノム情報を加え、該当 SNV サイトの

アレルを用いて最尤法による系統樹解析を行った (RAxML v7.25 を使用)。

3) バイオテロ対策のための次世代型網羅的病原体検索パイプラインの開発

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, 5, 6 を参照。

(倫理面への配慮)

微生物検査として網羅配列解読による病原体検出を行った。患者配列を特定する作業は行わず、個人情報に結びつく配列解析は一切行っていない。国立感染症研究所・医学研究倫理委員会にて承認済み。

C. 研究結果

1) 網羅配列解読による病原体鑑別と病原性評価

野兔病菌 (*Francisella tularensis*) は WHO 指定バイオテロ病原体 (カテゴリー A) に分類され、バイオテロ対策として臨床検体から迅速に野兔病菌の遺伝情報を得ることは重要である。本研究において、野兔病菌の感染症疑いの患者の腋窩部膿瘍 (図 1) を用いて、次世代シーケンサー illumina GAIIX による病原体の網羅的検出を行った。抗菌薬治療により膿瘍から起因菌の増殖を検出できなかったが、PCR 検査では野兔病菌陽性であった。

GAIIX にて 3,828 万本のリード (125 mer) を解読し、ヒト由来配列 (~99%) を完全に削除し、細菌と類似性を示す 833 本 (0.002%) の解読リードを得た (図 2)。相同性検索で得られた結果を taxonomy で分類したところ、全て野兔病菌 *Francisella tularensis* に相当する配列であった (図 3)。高病原性 Type A. *F. tularensis* subsp. *tularensis* と低病原性 Type B. subsp. *holarctica* との両方が約半数ずつヒットし、単純な相同性検索のみでは感染病原体の病原性を評価できなかった (図 3)。

野兔病菌 Type A (高病原性) と Type B (低病原

性)の双方を検出したことから、SNVs を利用した亜種を分類する株系統樹解析を行った。解読で得られた野兔病菌 833 リード(図3参照)を用いて、野兔病菌ゲノムに特徴的な SNV サイト 66 箇所を検出し、株固有の SNV アレルのアライメント解析を行った(図4)。Iwaki-08 は、日本分離株 FSC022 (Ebina) の SNV アレルと酷似しており、1 箇所のみ異なっていた (nt posi.: 329,375)。

アライメント結果を元に最尤法で系統樹を作成した。Iwaki-08 は日本固有に分布する *F. tularensis* subsp. *holarctica* (biovar *japonica*) と近縁であることが判明した。本症例は地域的な散发症例であり、バイオテロ使用が懸念される Type A (高病原性)とは明確に異なると鑑別することができた(図5)。

2) ベンチトップ型次世代シーケンサーの特徴

従来の次世代シーケンサーは大型シーケンサーという特徴から、大量配列の排出には有効である。しかしながら、バイオテロ発生等、有事に迅速に対応するためには解読時間の短縮が求められていた。大型シーケンサーよりも安価でかつ解読時間を短縮したベンチトップ型・次世代シーケンサーの登場により、従来よりも迅速に臨床検体の病原体検索が可能となった。昨年度に報告した野兔病菌感染症例を挙げると、大型シーケンサーでは最短7日間の解読・解析時間を要していたが、ベンチトップ型により2.5日にまで短縮することが可能になった。大型と比較して解読量は減るものの、臨床検体から病原体推定する場合には十分な量を得られることが分かった。

3) 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、感染研に検体を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6)。

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が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。

4) 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7)。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>

5) 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(図8)。

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。

6) コアゲノム SNPs を利用した菌種・菌株の類縁関係の特定

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9)。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こさぬよう、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。

D/E. 考 察・結 論

患者リンパ節膿瘍検体から網羅解読法で病原体・野兔病菌を検出し、その特徴的な株固有 SNVs を利用することで、病原性の強弱に関する遺伝情報を得ることができた。野兔病菌は病原性が異なる subsp. に分類され、北米由来の高病原性 Type A であるのか、低病原性 Type B による散発的な地域発生であるのか明確に分類する必要がある。これまでの分担研究におけるデータベース構築のもと、野兔病菌の網羅的なゲノム情報の収集とデータベース化を完了しており、本事例の解析を短期間で完了することができた。

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。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、誰もが簡単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

- Detection of a Possible Bioterrorism Agent, *Francisella* sp., in a clinical specimen using Next-generation Direct DNA Sequencing. Makoto Kuroda, Tsuyoshi Sekizuka, Fumiaki Shinya, Fumihiko Takeuchi, Takayuki Kanno, Tetsutaro Sata, Shigeyuki Asano. J Clin Microbiol. 2012, 50 (5): 1810-1812.
- 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

黒田誠、関塚剛史、竹内史比古。Deep sequencing 法による野兔病菌 *Francisella* 感染症の腋窩部膿瘍の網羅的病原体検索第 85 回日本細菌学会・総会 長崎市 2012 年 3 月

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

該当なし



図1 患者 (Iwaki-08) の臨床所見。A) 右親指、B) 右腋窩リンパ節、C) Bの拡大図

DNA extracted from clinical specimen (abscess)



illumina DNA library by NEXTERA DNA library kit
125 mer direct DNA sequencing by GAIIX

38,285,502 reads (125 mer)



Subtraction of human DNA sequence by bwasw mapping
(human genomic DNA sequences: hs_ref_GRCh37.p2.fa)

48,223 reads (125 mer)



blastn homology search against
non-redundant NCBI nt database
Taxonomic classification with MEGAN v4.40.6

Detection of *Fraxisella* sp. sequences (833 reads: 0.002%)

図2 Iwaki-08 患者の右腋窩リンパ節膿瘍からの病原体検索パイプライン

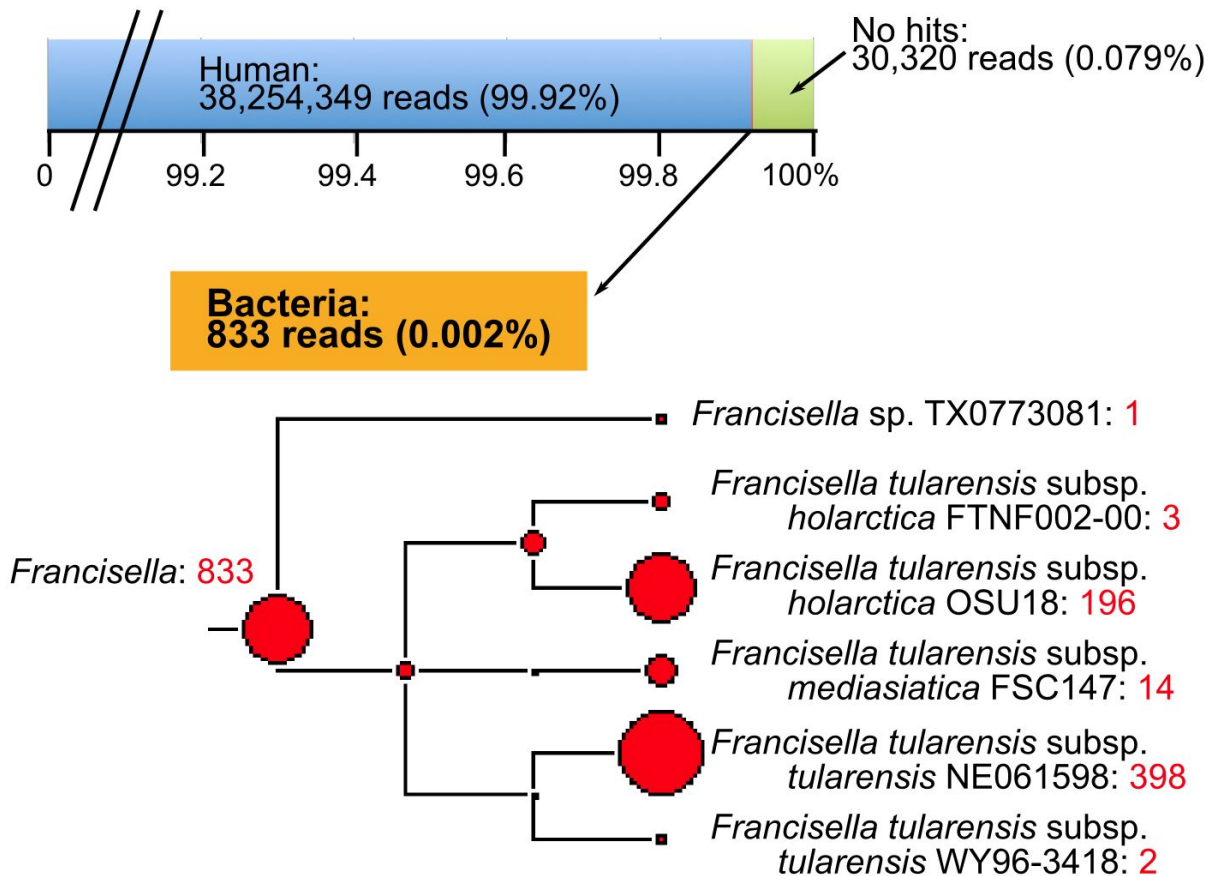


図3 イルミナ網羅解読にて取得した解読リードの解析。99.92%が膿瘍由来のヒト配列であり、細菌 bacteria と思われる配列は 833 リード (0.002%) ならずであった。ウイルス様配列は検出されなかった。細菌配列の相同性検索で得られた結果を taxonomy で分類したところ、全て野兔病菌 *Francisella tularensis* に相当する配列であった。*Francisella* の系統関係と subsp. そして、該当する系統のヒット・リード数 (赤字) で示している。高病原性 Type A. *F. tularensis* subsp. *tularensis* と低病原性 Type B. subsp. *holarctica* との両方が約半数ずつヒットし、単純な相同性検索のみでは感染病原体の病原性を評価できなかった。

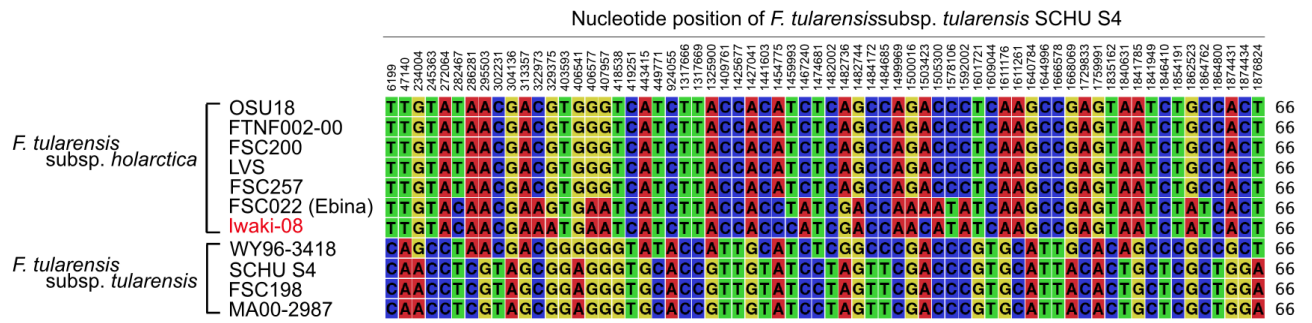


図4 解読で得られた野兎病菌 833 リード (図3参照) を用いて、野兎病菌ゲノムに特徴的な SNV サイト 66 箇所を検出した。ゲノム・レファレンス配列 SCHU S4 株のゲノム・ポジションと、株固有の SNV アレルを表記し、それらをアライメント解析した。Iwaki-08 は、日本分離株 FSC022 (Ebina) の SNV アレルと酷似しており、1 箇所のみ異なっていた (nt posi.: 329, 375)。

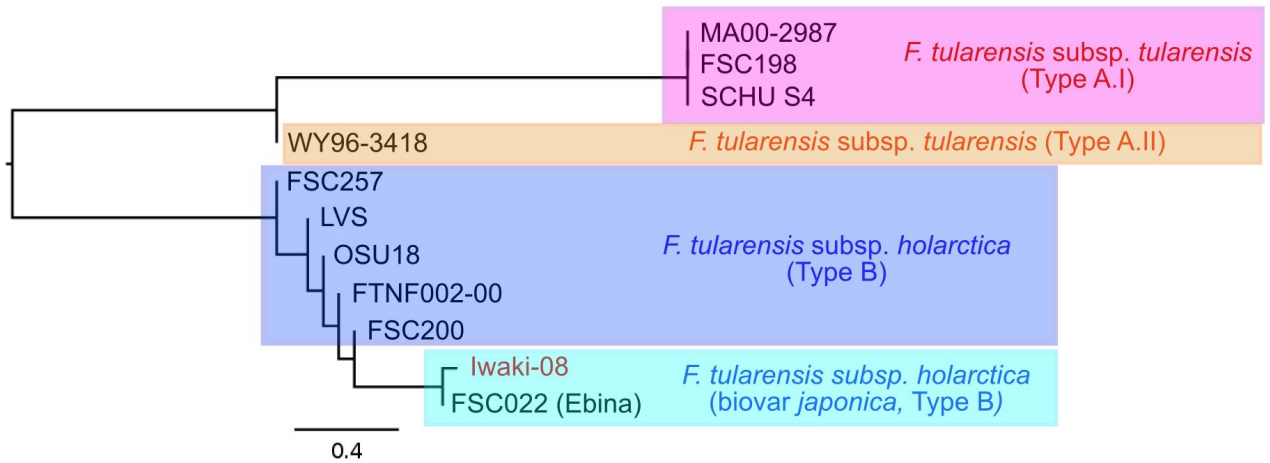


図5 図4で解析したアライメントを元に、最尤法で系統樹を作成した。Iwaki-08 は明らかに *F. tularensis* subsp. *holarctica* (biovar *japonica*) に属し、高病原性 Type A とは明確に異なることが明らかになった。

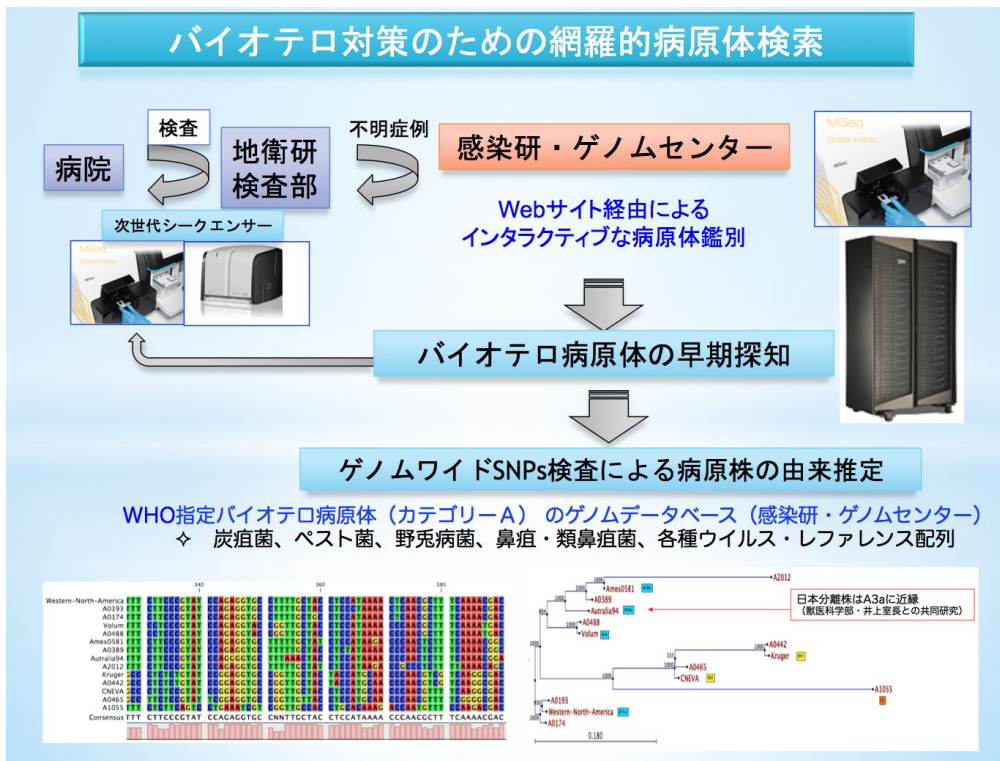


図6 ネットワーク経由によるバイオテロ病原体検索のための解析システム。現在、感染研・ゲノムセンターにベンチトップ型・次世代シーケンサーと情報解析サーバーが整備されている。地方衛生研究所等においても少しずつ整備されるようになってきた。検査技師等がインタラクティブに病原体鑑別を利用するために、Web interface による情報解析プログラムの開発と提供を試みた。

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7 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。

MePIC v2.0 [Log out](#) [MePIC Manual](#)

ID:

Project name

Select file(s) to upload
(Only .fastq.gz or .sff files, up to 2GBytes in total are acceptable.)

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。

Quality trimming and adaptor removal
Trimming params

5' trim length
Trim lower than this q-value
Quality threshold for fastq-mcf.pl
Minimum remaining sequence length

Host genome subtract
Subtract host genome
Database for subtraction

Homology search / read mapping
Search method
Database
E-value
Gap
Filter
Number of hits

便 血液、髄液 咽頭ぬぐい液

MiSeq GS junior

質の悪いリード、塩基を除去

ヒト配列を削除 (サル、マウスの選択も可能)

megablast検索 による核酸配列の照合

検索データ (.txt) をダウンロード
→ MEGAN v5 (チュービンゲン大学) のソフトで閲覧する

図8 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。

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:

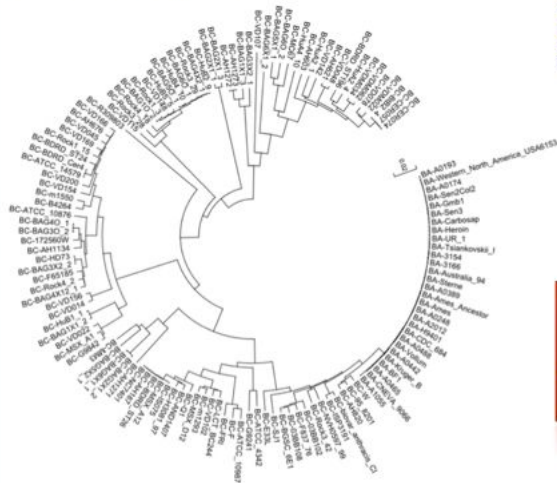
Input your sequence reads (Only .fastq.gz up to 2GBytes in total are acceptable.)

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

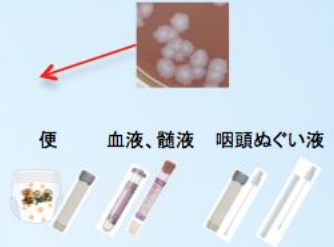
Reference genome: *Bacillus anthracis* str. 'Ames Ancestor' chromosome, complete genome. (gil50196905reflNC_007530.2)

Phylogenetic tree of the original data set.



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

LF
EF
PA



~~Gc junior~~



SNP判定のエラーが多い

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. \(9.3 KBytes\)](#)

図9 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。

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

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 バイオテロに使用される可能性のある病原体をホルマリン固定パラフィン包埋された病理組織中に検出する方法について検討した。1年目は免疫組織化学で腸管出血性大腸菌感染症の剖検例の糸球体および腸管組織にペロ毒素を検出することを試みた。2年目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迅速 *in situ* hybridization-AT tailing (ISH-AT) 法を簡便化・迅速化した。最終年度は、この迅速 ISH-AT 法により重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) の剖検組織および実験的 SFTS ウイルス感染細胞に重症熱性血小板減少症候群ウイルスを検出した。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。

A. 研究目的

バイオテロが起こった場合、迅速な診断と病原体の同定が急務である。現在では、病原体の分離同定が困難であっても次世代シーケンス法により、未知の病原体の検出が可能となった。病原体同定後は病原体遺伝子の特異的に検出するリアルタイム PCR 用の primer、probe を作成することにより各組織での病原体の定量解析も可能である。ただしこの方法では病原体がどの細胞に感染しているかはわからない。病原体に対する免疫組織化学用の特異抗体を作成できれば体内での病原体の局在がわかる。既存の特異抗体がない場合は抗体を作製しなければならぬため迅速に対応できない。我々が開発した合成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* 核酸検出法である *in situ* hybridization-AT tailing (ISH-AT) 法は検出したい病原体の塩基配列の一部でもわかればプローブを作成し病原体の遺伝子を検出することが可能である。

本分担研究の3年間の目的は、生物テロ対策のための迅速で特異性の高い病原体の病理組織内検出法を確立することである。

B. 研究方法

(1) 腸管出血性大腸菌ペロ毒素の組織内での検出の試み

腸管出血性大腸菌 0157 剖検例のホルマリン固定パラフィン包埋した腎臓および腸管標本において、抗ペロ毒素抗体：マウス

抗 Shigatoxin1(13C4)モノクローナル抗体、マウス抗 Shigatoxin2 (11E10)モノクローナル抗体(Santa-Cruz)、ウサギポリクローナル抗 VT1 抗体、ウサギポリクローナル抗 VT2 抗体(精製 IgG)(帯広畜産大学 倉園先生より分与)、ウサギポリクローナル抗 VT1 抗体、ウサギポリクローナル抗 VT2 抗体(ウサギ血清)(デンカ生研杉山先生から分与)をもちいてベロ毒素の検出を試みた。3 種類の前処理条件と 3 種類の検出法(HRP-ポリマーEnvision 法 LSAB 法 CSAII 法(すべて DAKO 社))のいずれかを用いてベロ毒素の免疫組織化学を試行した。

(2) *in situ* hybridization-AT tailing (ISH-AT) 法の迅速化の試み

A(H1N1)pdm09 感染ホルマリン固定パラフィン包埋肺組織を用いて、ISH-AT 法の迅速化を試みた。プローブは A(H1N1)pdm 09 (AB538390.1) NP 領域に 2 ヲ所作成した。1 日で検出が終了するように従来のプロトコルを改編した。プローブとのハイブリダイゼーションをオーバーナイトから 2 時間に短縮し、ハイブリ後の洗浄も 15 分 4 回を 5 分 4 回にした。またアルカリホスファターゼの発色系を使用することで感度を上げ、シグナル増幅系のステップ(CSA 法)を省略した。結果を市販されている分岐 DNA-ISH 法と比較検討した

(3) 迅速 ISH-AT 法を用いた重症熱性血小板減少症候群ウイルスのヒト剖検組織における検出

SFTSV 遺伝子の S 鎖に設計したアンチセンス(AS)プローブとセンス(S)プローブを用いた。SFTSV 感染後 6、24、48 時間後の Vero 細胞(国立感染症研究所ウイルス第 1

部下島先生より分与)のホルマリン固パラフィン包埋細胞切片中に迅速 ISH-AT 法で SFTSV 遺伝子を検出した。さらに SFTS ヒト剖検組織切片上で SFTSV 遺伝子を検出した。また 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) 腸管出血性大腸菌ベロ毒素の組織内での検出の試み

腎臓においては LSAB 法で、ウサギ抗 VT1 あるいは抗 VT2 ポリクローナル抗体を使用した。Mesangiolysis は、毒素による内皮細胞の障害、血栓による糸球体虚血などにより糸球体係蹄間のメザンギウム領域が膨張破壊ないし変性した病変で、フィブリンの沈着をともなっているが、この部位に一致して陽性シグナルがみられた。このシグナルは、内皮細胞にあったベロ毒素がこの部位に取り込まれて検出されたと考えられた。陽性シグナルは基底膜の内側にあり、血管内皮細胞の部位と一致した。腸管では特異的な陽性シグナルは得られなかった。

(2) *in situ* hybridization-AT tailing (ISH-AT) 法の迅速化の試み

脱パラから発色まで 7 時間で完了できるようにプロトコルを改編し迅速 ISH-AT 法を確立した。(AT)₁₀ 部分をピオチンで修飾しストレプトアビジン-アルカリホスファターゼ(SA-ALP)を結合させ、Fast Red(赤色)で発色させた。従来の Tyramide でシグナル増幅させ DAB(茶色)で発色させる系で

は内因性ペルオキシダーゼ活性を処理するは同程度であった。市販の分岐 DNA プローブを用いる ISH 法と比較してプローブ数が同じ場合は迅速 ISH-AT 法の方が感度が良かった。

(3) 迅速 ISH-AT 法を用いた重症熱性血小板減少症候群ウイルスのヒト剖検組織における検出

迅速 ISH-AT 法により SFTSV 感染細胞で SFTSV ゲノムを検出した。感染 24 時間後までは SFTSV-mRNA 陽性細胞がより多く検出され、48 時間後では SFTSV-RNA(ウイルスのマイナス鎖 RNA 遺伝子)陽性細胞数の方が多かった。SFTSV 剖検組織において、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、リンパ芽球様細胞の細胞質に検出された。リンパ節切片中の SFTSV コピー数は 10^5 /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) 迅速 ISH-AT 法を用いたその他のウイルスゲノムの検出

国内の発症がない、あるいは少ないため、ヒト病理組織での検出は試行されていないが、中東呼吸器症候群(MERS)コロナウイルス、H7N9 亜型鳥インフルエンザウイルス、EV71 ウイルス、デングウイルス(1、2、3、4 型)を検出する ISH-AT 用プローブを作成した。特異性は感染細胞などですでに確認されている。

D. 考察

本邦初の SFTS 症例は次世代シーケンス法により診断された。患者の SFTSV の遺伝

のも合わせさらに 1 時間要していた。感度子とそ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 遺伝子のコピー数の高い切片においては迅速 ISH-AT 法により 7 時間でゲノムが検出された。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したところ、感度は劣るが、ウイルスの局在は一致し、抗体がない場合の検出系として迅速 ISH-AT 法は優れていると考えられた。

E. 結論

バイオテロに使用される可能性が考えられる毒素の 1 つである腸管出血性大腸菌産生ベロ毒素を組織中に検出することを試み、現在入手できた抗体を用いて糸球体に陽性シグナルが得られたが、判定が困難であった。ホルマリン固定パラフィン包埋組織の免疫組織化学に使用できる抗体の作成は難しく、陽性シグナルの特異性に関しては実際に試行してみないとわからない。バイオテロなど迅速検出を要する場合は、適当な抗体がない場合は迅速 ISH-AT 法が強力なツールになると思われる。今後さらに ISH-AT 法の感度を上げるような改良を試みたい。

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
 - 5) Ablordey A, Amissah DA, Aboagye IF, Hatano B, Yamazaki T, Sata T, Ishikawa K, Katano H Detection of *Mycobacterium ulcerans* by the loop mediated isothermal amplification method, *PLoS Negl Trop Dis* 2012, 6:e1590
 - 6) Asano S, Mori K, Yamazaki K, Sata T, Kanno T, Sato Y, Kojima M, Fujita H, Akaike Y, Wakasa H. Temporal differences of onset between primary skin lesions and regional lymph node lesions for tularemia in Japan: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 19 skin cases and 54 lymph node cases. *Virchows Arch.* 460,651-658, 2012
 - 7) 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, Sata T. Histopathological and immunohistochemical findings of 20 autopsy cases with 2009 H1N1 virus infection. *Mod Pathol.* 2012 Jan;25(1):1-13.
 - 8) 片野晴隆、佐藤由子、佐多徹太郎、長谷川秀樹: 病原体の同定. *病理解剖マニュアル 病理と臨床* 2012, 30: 269-277.
 - 9) Hatano B, Goto M, Fukumoto H, Obara T, Maki T, Suzuki G, Yamamoto T, Hagsawa K, Matsushita Y, Fujii T, Imakiire T, Kikuchi Y, Takahashi R, Kanai M, Tamura K, Izumi T, Takahashi Y, Iwamoto Y,

Mimura S, Mukai Y, Takita K, Takeo H, Kitamura R, Shimizu E, Fukushima K, Hakozaki Y, Uehata A, Sakai M, Ohshima S, Shirotani T, Oba K, Hasegawa H, Sata T, Katano H: Mobile and accurate detection system for infection by the 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus with a pocket-warmer reverse-transcriptase loop-mediated isothermal amplification, J Med Virol 2011, 83:568-573

10) Katano H, Kano M, Nakamura T, Kanno T, Asanuma H, Sata T: A novel real-time PCR system for simultaneous detection of human viruses in clinical samples from patients with uncertain diagnoses, J Med Virol 2011, 83:322-330

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) Pathological study of formalin-fixed paraffin-embedded lung tissues with H5N1 influenza infection in Vietnam: Noriko Nakajima, Ngo Van Tin, Yuko Sato, Hoang Ngoc Thach, Harutaka Katano, Pho Hong Diep, Toshio Kumasaka, Nguyen Trung Thuy, Hideki Hasegawa, Luong Thi San, Shoji Kawachi, Nguyen Thanh Liem, Kazuo Suzuki and Tetsutaro Sata Severe Influenza: Burden, Pathogenesis and Management

(Second isirv Antiviral Group Conference) October, 2012, Hanoi Vietnam

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
 10. 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（神戸）2013年11月
 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
 12. 鈴木 忠樹、片野晴隆、大場 靖子、小林 進太郎、佐藤 由子、佐多 徹太郎、澤 洋文、長谷川 秀樹。JC ウイルス後期蛋白質に対する特異抗体を用いた進行性多巣性白質脳症の免疫組織化学的診断法の比較検討。第60回日本ウイルス学会学術集会。2012.11.
 13. 小谷 治、鈴木 忠樹、Naeem Asif、岩田 奈織子、中島 典子、片野晴隆、田口 文広、長谷川 秀樹、清水 博之、永田 典代。新生仔マウスにおける新規ヒトカルジオウイルス（Saffold virus）の神経病原性の解析。第60回日本ウイルス学会学術集会。2012.11.
 14. 片野晴隆。エイズ剖検例における日和見感染症と腫瘍の実態。第26回日本エイズ学会学術集会総会 横浜 2012.11.
 15. 高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルス感染症で死亡したベトナム小児例の病理学的解析：中島典子、佐藤由子、片野晴隆、熊坂利夫、佐多徹太郎、長谷川秀樹 第101回日本病理学会総会（東京）2012年4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
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

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。具体的には、電子顕微鏡学的検査法の標準手順法の見直しと改良を行い、実施者の教育訓練法の手順と記録を整備した。また、細菌の迅速検出法の確立のために、バイオテロ関連細菌を中心にレファレンス標本の作製を行った。また、検査従事者の教育訓練法の一つとして 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に参加した。

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。透過型電子顕微鏡学的検査の利点と欠点を表 1 にまとめた。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 点を課題とした。

B. 研究方法

1. 電子顕微鏡学的迅速診断法の標準手順の見直し

1) インフルエンザウイルス、大腸菌等を用いて電子顕微鏡学的迅速診断法の標準手順に従い、作業を見直した。

2) 主なエンベロープウイルスを対象として電子顕微鏡学的迅速診断法の標準手順に従い検索を行った。

3) Robert Koch 研究所主催の電子顕微鏡学的ウイルス診断の外部評価(External Quality Assurance Scheme in EM Virus Diagnosis EQA-EMV)に参加し、これを検査実施者の教育訓練の一環とした。同時に教育訓練の標準手順・記録書の整備を行った。

2. 細菌の走査電子顕微鏡標本作製の標準手順方法の決定

緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) を対象として、走査型電子顕微鏡装置 JSM-6700F (日本電子) を用いて観察し、適切な培養、固定、および作製条件を検討し、標準手順方法を決定した。

3. 菌液注入サル肝組織材料を用いたレファレンス標本の作製

バイオテロ関連病原体と鑑別診断に必要な病原体を選択し、*Burkholderia* 属、*Clostridium* 属、*Corynebacterium* 属、*Helicobacter* 属、*Bartonella* 属、*Bordetella* 属、*Mycoplasma* 属をカニクイザルの肝組織に直接注入し、10%ホルマリン緩衝液固定パラフィン包埋切片を作製した。なお、ボツリヌス菌標本については10%ホルマリン緩衝液で1週間以上浸漬固定し、固定組織の中央部から組織を採取、菌体が完全に死滅したことを培養で確認後、指定実験室から搬出した。また、サル肝組織は国立感染症研究所動物管理室より供与いただいた。

C. 結果

1. 電子顕微鏡学的迅速診断法の標準手順と教育訓練の整備

1) BSL2 病原体を想定した電子顕微鏡学的迅速診断法の標準手順作業内容の見直しを行い、手順書の改訂を行った(図 1)。

2) 今回検索対象としたオルソミキソウイルス、パラミキソウイルス、コロナウイルス、ブニヤウイルス、フラビウイルス、ピコルナウイルスは、いずれも、細胞培養上清でも検査には十分な粒子濃度であった(図 2)。エンベロープを有し、直径 80~120 nm の球状のウイルス粒子の場合、実際の検査ではネガティブ染色の状態によって鑑別が困難な場合があることがわかった(特に同時感染を判断する場合)。また、細胞

にはこの程度の大きさの球状物は多く含まれており、細胞内構造物がサンプルに多く混入しているとウイルス粒子との判別が困難となった。特に、ブニヤウイルスは、粒子の球状が不定形で、エンベロープが比較的不明瞭であったため、初見の場合は、粒子そのものの存在の判定が非常に困難であった。

3) 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。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。

2. 細菌の走査電子顕微鏡標本作製法の標準手順

培養条件は滅菌済みスライドガラス上で数時間~一晚以内とした。固定、洗浄は以下の条件とした。カコジル酸緩衝液による洗浄後、前固定 4°C 一晚、2.5% グルタルアルデヒド液 1% パラフォルムアルデヒド混合 0.1M カコジル酸緩衝液。カコジル酸緩衝液による洗浄後(10分6回)、1次固定1時間、1% OsO₄ 液。カコジル酸緩衝液による洗浄後(10分6回)、2次固定1時間、1% タンニン酸添加 0.1M CA 緩衝液。カコジル酸緩衝液による洗浄後(10分6回)、後固定1時間 1% OsO₄ 液。カコジル酸緩衝液による洗浄後、50%~100% エタノール系列による脱水、酢酸イソアミルへの置換。臨界点乾燥装置(日本電子)を用いて乾燥後、プラチナコーティング(20秒2回)。その後、走査電子顕微鏡で観察した。鞭毛は維持され、脱水による菌体表面の収縮は殆ど観察されず、

標本の状態は良好であった。結局、緑膿菌の他、マイコプラズマ、類鼻疽菌とボツリヌス菌の粒子像を得た。

3. 菌液注入サル肝組織材料を用いたレファレンス標本

常法どおりパラフィン切片を作製し、組織ギムザ染色、グラム染色、芽胞染色を実施し菌体が肝組織内に注入されていることを確認した。各細菌につき、3ブロックずつ参照標本作製した。

D. 考察

ウイルスの電子顕微鏡観察について

直径 80~120 nm の球状の粒子は、細胞には多く含まれており、ウイルス粒子検索に準備する感染細胞の細胞変性効果が進みすぎている（すなわち、壊死細胞が多く含まれている）と、細胞内構造物が混入しやすく、また、ウイルス粒子も壊れているものが多くなる。具体的には、エンベロープの剥離や、粒子破壊、ヌクレオカプシドプロテインの切断などがみられ、診断に影響する。

ブニヤウイルスは 2013 年 1 月に本邦初の SFTS ウイルス感染患者死亡例が報告されたこともあり、今後は観察する機会が増えるかもしれない。ブニヤウイルスは比較的、観察が困難なウイルス粒子であり、参照標本を準備しておくこと、教育訓練を維持することの重要性が強調された事例であった。

EQA-EMV で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。

細菌の電子顕微鏡観察について

細菌の走査電子顕微鏡標本作製法の標準手順方法を決定した。標本作製に際しては、細菌の種類によって適切な培養条件が異なるため、それぞれの病原体の専門家と協議を行いながら適切な培養標本作出する必要がある。検討の結果、固定以降の操作は今回決定した方法を基準とすることとした。なお、バイオテロ関連病原体の芽胞菌は、ネガティブ染色法に用いる固定法は 10%パラフォルムアルデヒド 0.05%グルタルアルデヒド固定液 2 時間とした。

2012-13 年にかけて新興感染症がいくつか出現した。MERS-CoV, H7N9 インフルエンザ、SFTSV の電子顕微鏡撮影写真は一般へ情報提供や感染症の理解にも役立った。正確な情報を得る、もしくは伝えるためにも、技術者の正確で安定した標本作製技術と検査する者の高いスキルの維持が重要である。

E. 結論

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行い、標準手順とレファレンス標本を確立した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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。田代真人、牛島廣治編集。ウイルス感染症の検査・診断スタンダード 羊土社 2011.p410-439

2. 永田典代、長谷川秀樹。第2章ウイルス分離培養 第3項 実験動物、等。田代真人、牛島廣治編集。ウイルス感染症の検査・診断スタンダード 羊土社 2011.p257-268

3. Lethal canine distemper virus outbreak in cynomolgus monkeys in Japan in 2008. 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. J Virol. 2013. 87:1105-1114.

4. Analysis of the humoral immune responses among cynomolgus macaque naturally infected with Reston virus during the 1996 outbreak in the Philippines. Taniguchi S, Sayama Y, Nagata N, Ikegami T, Miranda ME, Watanabe S, Iizuka I, Fukushi S, Mizutani T, Ishii Y, Saijo M, Akashi H, Yoshikawa Y, Kyuwa S, Morikawa S. BMC Vet Res. 2012. 8:189.

5. 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

Nagata N, Kataoka M, Sato Y, Sakai K, Iwata N, Suzuki T, Saijo M, Morikawa S, Kurane I, Sata T, Hasegawa H. Case reports with diagnostic electron microscopy and pathology for infectious diseases: The past five years experience, from 2007 to 2011. Glienicke Workshop on Electron Microscopy in Infectious Diseases - Diagnostics and Research 2012.10. Berlin

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

表 感染症診断検査における電子顕微鏡の利点と欠点

利点	迅速診断が可能	ネガティブ染色は 30 分程度で診断可能
	病原体の種類を検討をつけることが可能	ウイルスか細菌か、エンベロップ、芽胞形成の有無
	他の手法では検出困難な病原体の検出が可能	病原体毎に至適化された特殊な試薬等が不要
	包括的な鑑別診断が可能	臨床情報はある程度不要
欠点	低感度	10 ⁶ 粒子数/ml 以上の高濃度のサンプルが必要
	実施者には豊富な経験と高いスキルが必要	正確な診断のためにはトレーニングが必要
	電子顕微鏡は高価で操作が煩雑	病原体診断には数十 nm 程度のウイルス粒子を観察できる高い分解能が必要
	自動化は困難、処理量に限度がある	人間が観察し判断する必要

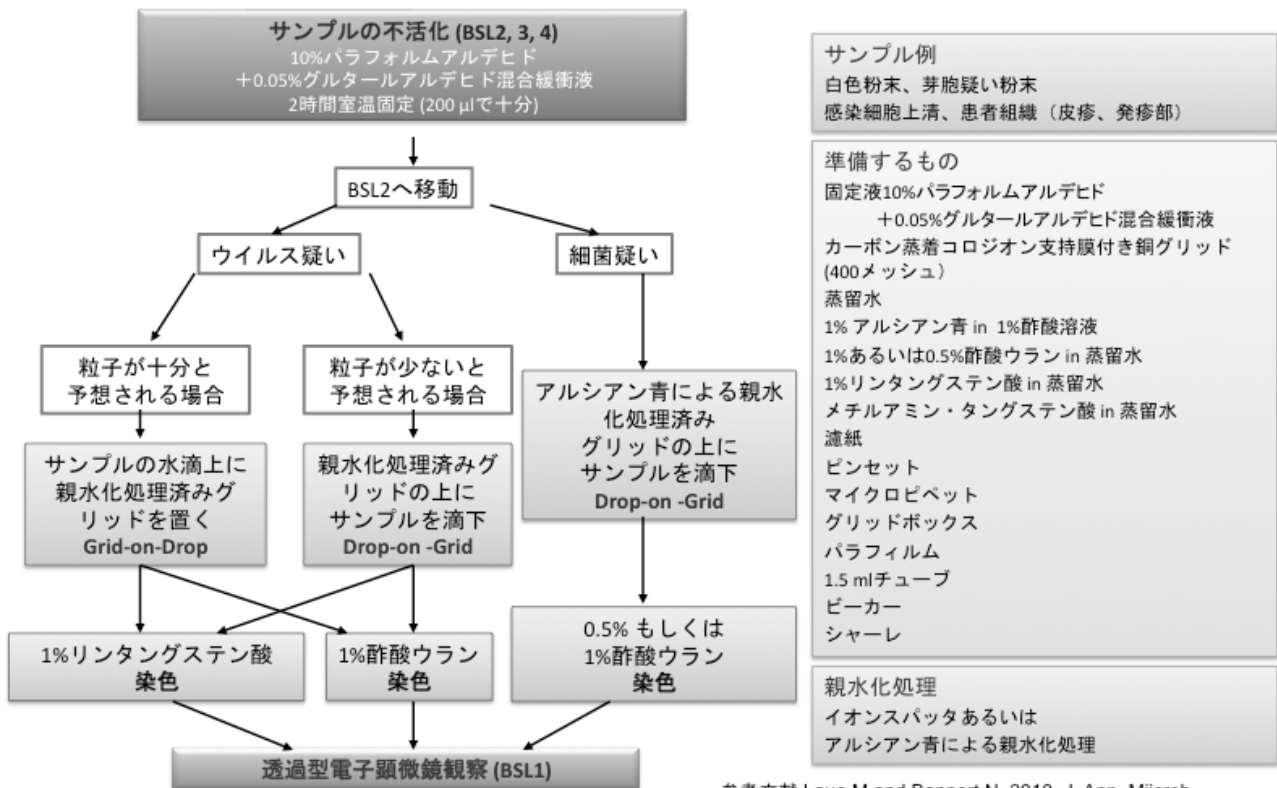


図1 バイオテロ・感染症疑いサンプルを用いた透過型電子顕微鏡学的迅速診断法の標準手順

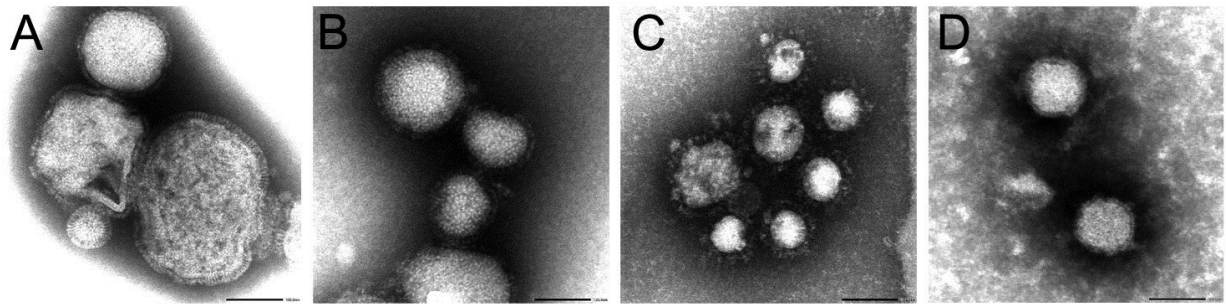


図2 エンベロープウイルスのネガティブ染色像。4%グルタルアルデヒド固定、UV照射による不活化処理の後、2%リンタングステン酸染色、30秒。A. パラミキソウイルス(精製ウイルス粒子)。直径80~300 nm 大小不同、円形、エンベロープは比較的長く、明瞭。80 nmの粒子が必ず存在し、オルソミキソウイルス粒子と類似する(左下)。粒子内にはヌクレオカプシドプロテインが折りたたまれて存在する(右下)。B. オルソミキソウイルス(精製ウイルス粒子)。直径80~200 nm 大小不同、円形、時に不定形。エンベロープは判別しやすいが、パラミキソウイルスに比べると短い。C. コロनावirus(細胞培養上清)。80 nm~100 nmの円形粒子だが、特徴的なコロナ状のスパイクを有する。D. ブニヤウイルス(細胞培養上清)。100~110 nmの円形粒子だが、比較的輪郭が不明瞭でいびつ。エンベロープは不明瞭で繊細(fuzzyと表現される)。

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

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、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。一方で、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。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 of 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。

H23年度からH25年度の間には本研究班では、炭疽発症予防効果をもつ粘膜ワクチンの開発、生物兵器に使用される可能性の高い細菌性毒素および植物由来毒素に対する検出系のキット化への取り組み、および複数の病原体を同時に検出できる核酸クロマトの開発を行なった。

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。本研究では、炭疽ワクチンの新たな候補成分として芽胞表層タンパクに着目し、炭疽に対する防御効果について検討した。

細菌毒素に関しては、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であるボツリヌス毒素 (Btx、カテゴリーA)、コレラ毒素 (CT) と大腸菌の易熱性下痢毒素 (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) 及び腸炎ビブリオの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、その普及を目指す。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、本研究ではこれらの毒素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。本研究期間においては各細菌毒素に対する特異的抗体を作製し、イムノクロマト法、ELISA法等の免疫学的迅速同定法の構築を行った。

植物由来の毒素であるリシンは、トウゴマ (*Ricinus communis*) の種子から抽出される糖タンパク質で、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 µg/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を目的としてリシン特異的抗体の作製を行った。

また、バイオテロが発生した場合、できる限り被害を軽減するために、使用された生物剤の迅速な同定が求められる。生物剤の種類によって対応が異なるため、複数の病原体を迅速に検出するシステムの構築が望ましい。本年度は現場での生物剤迅速検出系構築のための検査ツールを開発した。

B. 研究方法

B-1. 炭疽に対する粘膜ワクチンの開発

H23年度は、炭疽菌芽胞の表層タンパク質

の同定とその粘膜免疫における免疫原性について検討した。*B. anthracis* Pasteur II 苗の病原性株(pXO1+, pXO2+) 及び 非病原性株(pXO1-, pXO2-)を使用し、非病原性株から芽胞を高純度に精製し、4%パラホルムアルデヒド固定により不活化した後、家兔に免疫し、抗炭疽菌芽胞抗体を作製した。続いて、病原性および非病原性株芽胞から芽胞タンパクを抽出し、SDS-PAGE に展開後、タンパクを PVDF 膜に電氣的にトランスファーし、前述の抗炭疽菌芽胞抗体を用いてイムノブロットを行った。反応性を示すバンドをゲルから切り出し、回収した。ゲル片を MilliQ 水で振とう洗浄、脱色し、アセトニトリルと炭酸水素ナトリウム水溶液処理を行った。乾燥させたゲル片に 10 mM ジチオトレイトール(DTT)/25 mM 炭酸水素アンモニウム溶液を加え、56 °C で 45 分間インキュベートした。チューブを室温に戻した後、25 mM 炭酸水素アンモニウムに溶解した 55 mM ヨードアセトアミドを加え、遮光しながら 30 分間処理し、タンパク質をアルキル化した。洗浄後、25 mM 炭酸水素アンモニウムで 20 倍希釈したトリプシン溶液(5 µg/ml)で 37°C で一晩インキュベートし、トリプシン消化した。10 分間ソニケーションすることによりペプチドを抽出し、1% TFA/50%アセトニトリルを加え、タンパク抽出液を得た。抽出液は遠心濃縮した。サンプルを Pre-spotted Anchor Chip に 1 µl アプライし、TFA 処理後、乾燥させ、質量分析によりスポット上のペプチド断片を Autoflex MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics)により質量分析を行った。測定条件は、リニアモードで、レーザーは 110 ns でパルス照射した。キャリアレーションは、Anchor Chip に付属したものを用いた。得られたスペクトルは、蛋白質同定ソフト MASCOT を用いて解析し、該当するタンパク質 (EA1) を同定した。

次に同定されたタンパクの組換えタンパクを作製した。炭疽菌ゲノムから、該当タンパクをコードする遺伝子を PCR により増幅し、これを pGEX-6P-1 ベクターにクローニングし、GST タグ付加組換えタンパク発現ベクターを構築した。これを BL21 (DE3) に導入し、定法に従い、目的のタンパクを精製した。GST タグは生成過程でカラムオンダイジェストにより、組換えタンパクから外した。

同定タンパクの炭疽菌での発現解析に使用するため、上述の精製組換えタンパクを家兔に免疫し、特異抗体を得た。

免疫染色は、4% PFA で不活化した炭疽菌芽胞を用いた。非特異反応を防ぐために 3% skim milk in T-PBS により 30 分間ブロッキング後、特異抗体を 1 次抗体、Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG を 2 次抗体として、免疫染色を行った。染色した芽胞は、蛍光顕微鏡およびフローサイトメーターにより観察した。すなわち、スライド上に染色芽胞を載せ、ProLong Gold で封入し、蛍光顕微鏡下で観察した。取得した画像は DP70-BSW ソフト(Olympus)により解析した。また、フローサイトメーター解析では、FACSCantII (Becton Dickinson)を用いてデータを取得し、FACSDiva ソフト(Becton Dickinson)で解析した。

続いて、同定した芽胞表層タンパクの粘膜免疫での抗原性や有用性を検討するため、以下の方法により粘膜免疫した。実験動物には 6 週齢の雄の BALB/c マウスを用い、ジエチルエーテルを用いて軽く麻酔した後、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。投与スケジュールは、週 1 回あるいは 3 回 × 3 週間で行った。アジュバントを用いた免疫では、組換えタンパク単独又は 5 µl のアジュバントと組み合わせて週 1 回又は週 3 回 × 3 週間投与した。アジュバントには合成二本鎖 RNA の poly (I:C) を用いた。各群のマウスは定期的に採血を行い、血中および粘膜抗体価を ELISA により測定した。

H24 年度は、EA1 を粘膜投与した場合の炭疽発症予防効果について検討した。

実験動物は 6 週齢の雄の 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。表 1 に免疫条件を示す。投与スケジュールは週 3 回 × 3 週間で行った。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。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は ELISA により測定した。

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 5 × 10³ CFU/mouse) は PBS に懸濁して調整した。100 µl の芽胞液を BALB/c マウスに腹腔内投与した。投与後、マウスの状態を定期的に観察した。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 °C 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。

感染臓器（肺、肝臓、脾臓）中の菌数を測定するため、投与後 2 日目および 3 日目にマウスを頸椎脱臼により安楽死させ、臓器を回収した。臓器の重量に対し、100 mg/ml となるように滅菌水を加え、ペッスルを用いて注意深く破碎した。臓器懸濁液を 10 倍段階希釈し、100 μ l ずつ L-agar に塗布し、37 °C で一晚培養後、コロニー数を計測した。また、マウスから肺、肝臓および脾臓の一部を回収し、10 N マイルドホルム（Wako）により固定した。定法に従い、パラフィン包埋後、2 μ m の切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色（HE 染色）を行った。また、マウス胸部のマルチスライス X 線 CT(Computed Tomography)画像を撮影し、肺野の病変所見を観察した。

H25 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 μ g となるように 5 ~ 10 μ l 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 2）。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 7.6×10^4 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 °C 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 μ l 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 - 2 . 細菌毒素検出キットの開発

特異的プライマーを用いて PCR 法により増幅した各毒素をコードする遺伝子を発現ベクターである pET28a もしくは pCold-TF のマルチクローニングサイトに挿入し、毒素タンパク質をコードする組換えプラスミドを構築した。各毒素タンパク質は N 末端あるいは C 末端のいずれかに His-Tag を融合する様に設計された。組換えプラスミドをタンパク質発現用大腸菌株 *E. coli* BL21(DE3) に導入し、各毒素の組換えタンパク質を大量発現する組換え大腸菌株を得た。組換え大腸菌株内で IPTG 誘導により発現させた組換え毒素タンパク質は Ni²⁺-NTA レジン（キアゲン）充填カラムを用いて常法により精製を行った後に、ゲルろ過カラムもしくは electrogel elution 法を用いて再精製を行った。各精製標品は SDS-PAGE で展開後、銀染色により精製度の確認を行った後に抗原として使用した。各精製標品はアジュバント（FCA）と混合し家兎に免疫した。最初の免疫から 3 週間後に最初の追加免疫を行い、それ以降は血中抗体価の上昇がサチュレイトするまで 1 週間ごとに追加免疫を行った。血中抗体価はオクタロニ-試験により行った。得られた抗血清から抗原を結合させたアフニティカラムにより毒素特異的抗体を精製した。得られた特異的抗体はサンドイッチ ELISA、Bead-ELISA、イムノクロマトストリップなどの作製に使用された。イムノクロマトストリップの作製は（株）日本ハム中央研究所により行われた。

B - 3 . 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。そこで本研究では、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た。

H23 年度には NCBI 遺伝子データベースのリシン B サブユニット（以下、RTB）の塩基配列を元に、RTB のヌクレオチドを合成した。これにリンカー配列を付加し、pET-32 ベクタ

ーにクローニングし、発現ベクターを構築した。定法に従い、大腸菌組換えタンパク発現システムにより、可溶性 RTB 組換えタンパク（以下 rRTB）を精製した。rRTB100 µg を抗原として等量の TiterMax と混合して抗原液を調整し、定法に従い、BALB/c マウスおよび家兔に免疫した。免疫前および免疫後の血液を定期的に採取し、血清中の抗 rRTB 抗体価を ELISA により測定した。抗体価の上昇を確認後、Porotein A あるいは Protein G カラムにより抗血清から IgG 抗体を精製した。得られた抗体の反応性と特異性については、ELISA とイムノプロットにより検討した。

H24 年度には H23 年度までに得られた rRTB が大腸菌内で不溶性の封入体を形成しており、立体構造に変化が生じている可能性があったため、様々な手法でリフォールディングを試みた。しかしながら凝集を完全に抑制することは困難であった。天然型リシンと十分に反応する抗体を得るためには、立体構造を保持した抗原が望ましい。そこで、H24 年度には *Brevibacillus* 発現系を利用した分泌型 RTB 発現系の構築を行った。H23 年度に構築した発現ベクターを鋳型として、*rtb* 遺伝子を PCR で増幅し、*Brevibacillus* 用発現ベクターに組み込んだ。この時、6×His タグを N 末あるいは C 末に付加できるようにプライマーを設計した。また、4 種類のシグナルペプチドを用意し、計 8 種類の発現ベクターを構築した。作製した発現ベクターはエレクトロポレーション法に宿主細胞に遺伝子導入した。得られた形質転換体のコロニーを釣菌して、液体培地にて培養した。SDS-PAGE および抗 His 抗体を用いたイムノプロット法による発現確認を行った。

H25 年度には H24 年度に作製した組換え *Brevibacillus* 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兔（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 - 4. バイオテロ病原体を多項目で迅速にスクリーニングする方法の開発

バイオテロの発生現場や臨床現場で実施可能な簡便で迅速、かつ多検体項目についてスクリーニング可能な検出法の開発を行った。

検出法は病原体の特異的な遺伝子領域を標的とした遺伝子増幅法を原理とし、現行の検査法で課題となっている現場での検出、迅速性、簡便性、多検体項目の検出について検討、開発をした。BSL3 の病原細菌であるブルセラ、炭疽、野兔病、ペスト、ポツリヌス、チフス、リケッチア、クラミドフィラ、コクシエラ、および類鼻疽に対して、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、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。スクリーニングで得る結果を迅速に確認するため、一つの病原体に対してハウスキーピング遺伝子、病原因子、16S rDNA を組み合わせる 2-3 のターゲットで個々の病原体を確認するプライマーセットを作成した（プライマー配列については特許申請を考慮して記載しない）。PCR 反応後、増幅産物を目視で判定できるように、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。ビーズには青色ラテックスを使用した。

（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 . 炭疽に対する粘膜ワクチンの開発

H23 年度には新規ワクチン候補分子を探索するため、炭疽菌の感染型である芽胞の表層タンパクの同定を行った。炭疽菌の病原因子は pXO1 および PXO2 の二つの病原プラスミドに多く存在しているが、プラスミド上の因子は環境などにより容易に脱落することがあるため、染色体上にコードされており、かつ炭疽菌表層に存在する分子を標的とした。そのため、両病原プラスミドを持たない非病原性株の芽胞を抗原として、抗炭疽菌芽胞抗体を作製し、この抗体と反応する分子を同定す

ることで、新規候補分子を得た。図 1 に示すように、イムノプロット解析により、抗炭疽芽胞抗体と反応する 3 つのバンドが、それぞれ分子量約 100-250, 100 および 75kD に相当する位置に観察された。これらのタンパクは炭疽菌芽胞表層に局在し、かつ免疫原性を有すると考えられた。そこで、これらの分子を特定するため、質量分析計により該当するバンドの MS スペクトルを解析し、タンパクを同定した。その結果、分子量 100-250 kDa のタンパクは BclA、100 および 75 kDa のタンパクは EA1 であった。図 2 に EA1 の MS スペクトラムを示す。

BclA は既報でワクチン候補分子として有用性が低い事が報告されているので、本研究では EA1 を標的として研究を行った。

EA1 が実際炭疽菌表層に存在しているかを検討するため、組換え EA1 タンパク (以下 rEA1) を作製し、さらに rEA1 に対する特異抗体を作製した。抗 EA1 抗体で炭疽菌を免疫染色した結果を図 3 に示す。

この結果から、EA1 は炭疽菌芽胞だけでなく栄養体の表層にも局在することが明らかとなった。また、フローサイトメーターにより同様の解析を行った (図 4)。その結果、EA1 は炭疽菌芽胞表層に高発現していた。

また、炭疽の近縁種である *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. thuringensis* には EA1 の発現はほとんど観察されなかった。

本研究では、簡便なワクチン投与方法として粘膜免疫によるワクチン開発を目指している。rEA1 が粘膜免疫においても抗原性を有し、十分な抗体産生を誘導しうるかどうかを検討した。その結果、週 3 回 × 3 週間の経鼻投与で、血中だけでなく、糞便および唾液などの粘膜においても抗体産生を誘導できることが分かった (図 5)。

H25 年度には既知のワクチン候補分子である PA と組み合わせて粘膜投与した場合の感染防御効果についてマウスを用いた感染実験で検討した。

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。アジュバントのみの投与群を対照群とした。免疫群における血中および粘膜中特異抗体価を調べた結果、経鼻免疫により EA1 および PA に対するそれぞれの血中 IgG および IgA、粘膜中 IgA の抗体価が上昇していた (図 6)。対照群では EA1 あるいは PA に対する特異抗体は検出されな

かった。

続いて、炭疽に対する防御効果についてマウス感染実験により検討した。各群とも $n=8$ 匹とした。対照群では、免疫群に比べ、臨床症状の発現が早く、感染後 4 日目に全頭死亡した (図 7)。これに対し、PA 単独免疫群、EA1 単独免疫群、および EA1 + PA 免疫群の感染後 10 日目の生存率は、それぞれ 62.5%、82.5%、および 100%であった。いずれの群においても、非免疫群に比べ、免疫群では生存率は改善されていたが、対照群である非免疫群と比較した場合、統計的に有意な生存率を示したのは、EA1 単独免疫群と EA1 + PA 群で、棄却率はそれぞれ $p=0.0128$ 、 $p=0.0020$ であった。EA1 免疫群と PA 単独免疫群間には有意差は認められなかった。

感染 2 日目の各臓器について HE 染色による病理組織所見を調べた (図 8, 9)。対照群の肺では、出血や著しい毛細管うっ血が認められた。また、血液中および間質に夥しい数の莢膜に覆われた栄養体 (発芽した炭疽菌) が見られた。しかし、間質における炎症性細胞反応はほとんど観察されなかった。これは炎症性細胞の浸潤などの炎症反応が起こる前に、極めて短時間で病気が進行したためと考えられる。脾臓や肝臓においても出血やうっ血病変が観察され、炭疽菌の全身性感染による急激な循環不全が起こったと思われる。このような病変は程度が改善されているものの、PA 単独投与群でも認められ、臓器には多数の炭疽菌が観察された。これに対し、EA1 単独免疫群や EA1 + PA 免疫群などの EA1 免疫群では病理学的に異常な所見はほとんど認められず、炭疽菌もほとんど検出されなかった。

感染 2 日目および 3 日目の各群のマウスから肺、肝臓、脾臓を回収し、臓器中菌数を調べた。この実験による臓器中菌数の検出限界は、 1.00×10^2 CFU/g である。感染 2 日目および 3 日目の対照群における各臓器中の菌数は約 $10^7 \sim 10^9$ CFU/g と高い値を示した (図 10)。これに対し、免疫群では、臓器中の菌数は対照群と比較して有意に減少していた。特に、EA1 投与群では、臓器中菌数の著しい減少がみられた。感染 2 日目の各臓器の菌数は、EA1 単独投与群で、それぞれ、肺: 3.67×10^2 、肝臓: 2.00×10^2 、 1.33×10^2 CFU/g であり、EA1 + PA 投与群では、肺: 2.33×10^2 、肝臓: 2.00×10^2 、脾臓: 1.00×10^2 CFU/g であった。すなわち、EA1 免疫群における臓器中菌数は、対照群に比べ約 $10^5 \sim 10^7$ 分の一にまで減少

していた ($p < 0.0001$)。さらに感染 3 日目においては、検出限界以下となった。一方、PA 単独投与群でも対照群に比べ、臓器中菌数は減少していた。感染 2 日目の各臓器中の菌数は、肺： 2.97×10^5 CFU/g、肝臓： 6.23×10^5 CFU/g、脾臓： 3.83×10^6 CFU/g で、3 日目では 2.50×10^5 、 4.87×10^5 、 4.07×10^5 CFU/g であった。2 日目と 3 日目の菌数には有意差はなく、EA1 免疫群に比べ、有意に高い菌数を示した。各臓器中の菌数において、EA1 単独免疫群と EA1 + PA 免疫群で有意な差が認められなかった。

H25 年度には、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。

表 2 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 11, 12)。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 13 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 - 2 . 細菌毒素検出キットの開発

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の中で本研究にてターゲットとした毒素の一覧およびそれぞれの毒素に対する検出キット開発の進捗状況について表 3 にまとめた。各毒素に対して進捗状況は様々であるが、最も開発が進んでいるコレラ毒素検出キットに関しては精製組換え CT タンパク質を用いた検出感度検証において、CT 特異的イムノクロマト (CT-IC) が 10ng/ml 濃度 (サンプル量: $100\mu\text{l}$) の CT を検出可能であった (図 15)。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 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。*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 16)。さらに特異性の検証を目的として LT 産生大腸菌および腸炎ビブリオについて検査を行った (図 17)。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。また腸炎ビ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。以上の結果から開発された CT 特異的イムノクロマトの高い特異性が示された。

C - 3 . リシン毒素検出系の構築

H23 年には組換え大腸菌内で発現させた rRTB の精製を行い、これを抗原として抗 rRTB 抗体を獲得した。抗 rRTB 免疫抗体を用いたイムノプロットの結果を図 18 に示す。レーン 1 は、発現大腸菌のペレット、レーン 2 はそこから精製した rRTB を示す。図中の矢印で示すように、rRTB の分子量である約 25 kDa の位置に陽性バンドが検出された。天然リシンの B サブユニットの分子量は約 33 kDa で、rRTB

との分子量に違いがあるが、これは大腸菌発現系により糖鎖の付加がないためと考えられる。

続いて、リシンと相同性の高い細菌毒素を用いて、本抗体の反応特異性について検討した。アミノ酸配列から、リシンBサブユニットと最も近縁である志賀毒素 Stx1, Stx2 および志賀毒素の亜型である Stx2e の他、黄色ブドウ球菌エンテロトキシン B、コレラ毒素の各毒素を還元条件で SDS-PAGE で分離し、抗 rRTB 抗体を用いてイムノプロットを行った。図 19 に示すように、抗 rRTB 抗体は、rRTB にのみ特異的な反応を示した。

H23 年度までに得られた rRTB が大腸菌内で不溶性の封入体を形成しており、立体構造に変化が生じている可能性があった。H24 年度には天然型リシンと十分に反応する抗体を得るために、立体構造を保持した抗原を得ることを目的として *Brevibacillus* 発現系を利用した分泌型 RTB 発現系の構築を行った。

得られた形質転換体のコロニーを釣菌して、液体培地にて培養した。数日間培養後、培養上清を回収し、SDS-PAGE にて発現確認を行った結果、His タグを C 末、N 末に付加したいずれの場合においても、27 kDa の RTB の分子量を示す位置にバンドが認められたが、N 末に His タグを付加した場合により強い発現が見られた (図 20)。また 4 種のシグナルペプチドのうち C タイプが最も強い発現を示した。続いて、同じ培養上清について、抗 His タグ抗体を用いたイムノプロット法を行ったところ、C 末 His-RTB については、CBB 染色では微弱なバンドが確認されたものの、イムノプロットでは確認出来なかった (図 21)。一方、N 末 His タグ付加した株では B タイプのシグナルペプチドを除き、全ての株由来の培養上清で 27 kDa のバンドが検出された。

H25 年度には H24 年度に得られた上記の形質組替え株より分泌型 rRTB を精製し、これを免疫することで、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 - 4. バイオテロ病原体を多項目で迅速にスクリーニングする方法の開発

遺伝子増幅機器を現場で使用できるようにポータブルで小型の高性能機器遺伝子増幅機器を開発した (図 22)。この機器は反応量 10 μ l と少量で、30 サイクルで 25 分、40 サイクルで 30 分と短時間で遺伝子増幅ができる。重量

は 4.5 kg でキャリーバックに入れて現場に持ち運びができる簡便化された遺伝子増幅機器である。実際、野外やモンゴルなどの海外途上国においても使用可能で、移動中の衝撃を軽減するため内部にクッションを置いたキャリーバッグで持ち運びができ、女性 1 人でも負担なく運搬できることを確認した。

また現場での簡便な遺伝子抽出法を検討した結果、炭疽菌やボツリヌス菌などの芽胞菌に対しては、検査材料 100 μ l 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。非芽胞菌に対しては、100 、3 分間の加熱抽出で十分であった。

また核酸クロマト用の遺伝子増幅ができるプライマーを開発した。検出原理を図 23 に示す。本プロジェクト期間中に、主に CDC による生物剤分類カテゴリー A (*Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis*, *Clostridium botulinum*) とカテゴリー B (*Brucella* spp, *Burkholderia pseudomallei*) の細菌を中心に開発を行った。また、肺炭疽や肺ペスト、野兔病菌感染でみられる呼吸器症状と細菌性の市中肺炎を類症鑑別可能なキットも開発した (図 24) 一例としてボツリヌス菌検出用の核酸クロマトを示す (図 25)。上述の加熱抽出液 5 μ l を鋳型として PCR 反応を 40 サイクル行った。反応後、PCR 反応液をストレプトアビジン標識青色ビーズの入ったクロマト展開液と混合し、増幅産物の有無を核酸クロマトストリップにより目視で検出した。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、10 fg の DNA を検出でき、かつ 1 時間以内に目視で結果を判定することができた (図 26)。

D . 考 察

D - 1 . 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（図 14）。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 - 2 . 細菌毒素検出キットの開発

本研究班ではバイオテロに使用される可能性の高い細菌毒素の網羅的検出系の開発とそれら検査法の安定供給を目指し、様々な細菌毒素に対する免疫学的迅速検査法の開発を行っている。免疫学的検出法は本研究班でも開発を行っている核酸クロマト等の遺伝子をターゲットとした遺伝子検出法と並び、迅速な細菌検査法として様々な現場で使用されている。免疫学的検出法は一般的に遺伝子検査法と比較して検出感度の面で劣るものの、本研究班でターゲットとしている毒素タンパク質の様な菌の存在無しでも存在しうる外毒素を検出するには非常に有効な手段である。また、遺伝子検査法と免疫学的検査法の併用によって診断の精度上昇が見込まれるとの指摘については H25 年度の本研究班の報告書内で本研究事業の研究分担者の 1 人である富山県衛生研究所の佐多徹太郎先生との共同研究（腸管出血性大腸菌感染症患者糞便からのシガ様毒素の高感度免疫学的迅速検出法 Bead-ELISA を用いた直接検出）でデータを示したところである。

本研究期間に開発を行ったイムノクロマト法については電源等を必要としないためオンサイトでの検査を可能にする点でも非常に有益である。表 3 に示す様に現在、様々な細菌毒素に対して平行して免疫学的迅速同定法の開発を行っている。H23 年度から H25 年度までの研究期間内でコレラ毒素に対してはイムノクロマトの作製までを完了しており、非常に特異性の高い方法が構築された事を確認している。現在、他の細菌毒素についても同様に高感度・高特異性のイムノクロマトの開発を進めている。

D - 3 . リシン毒素検出系の構築

H23 年度までに作製した大腸菌で発現させた rRTB 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、H24 年度にはシグナルペプチドを付加した分泌型 rRTB の発現株を作製し、H25 年度には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。今後、本抗体を利用したイムノクロマトの作製を行う。

D - 4. バイオテロ病原体を多項目で迅速にスクリーニングする方法の開発

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 27)。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、検疫や感染症の集団発生時にも利用できる。また、肺炭疽や肺ペスト、野兔病菌感染で見られる呼吸器症状と細菌性の市中肺炎を類症鑑別可能なキットも開発した。現在、上気道の細菌感染症の病原体検査は培養法に依存しており、*Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Legionella*, *Streptococcus* など特殊な培養と選択培地を要求される病原体が多く、一般細菌培養検査では対応できない。今回我々が開発した核酸クロマト法は生物テロ対応だけでなく、通常は臨床現場で微生物検査が行われない市中肺炎の原因菌を診察外来の待ち時間を利用して検出でき、感染症外来においてよりの確な診断に貢献できる。風邪、咽頭炎あるいは肺炎症状を訴える患者に対するバイオテロを想定した遺伝学的迅速診断法は市中で起こる呼吸器感染症に対する類症鑑別法としても期待できる。

課題としては10 µlの反応液を low profile tube で増幅するポータブルな遺伝子増幅装置を開発したが、作業現場でバッテリー駆動型、あるいは自動車の電源を使い作動させる必要性があり、より小型化へと改良する必要がある。

また、本研究開発では、PCR増幅産物の蓋をあけて核酸クロマトろ紙を挿入して増幅産物を識別しているが、操作者によってはコンタミの可能性もあるため、蓋を開けずにクロ

マトを展開できるようなチューブや技術の開発が必要かもしれない。

さらに、我が国ではBSL3や特定病原体の感染症の頻度は低いため、疾病が蔓延している発展途上国で、環境水、土壌、動物及び人からの検出ができるかどうかの現地検証が必要になる。現在、様々な感染症が問題となっている海外の途上国における実証試験を計画している。

本研究で開発したクロマトの性能は、リアルタイム PCR と比べて約 10~100 倍感度が高く特異性も高かった。核酸クロマト法は DNA 抽出から 1 時間以内に判定ができ、1 反応で 4 菌種を同時に検査できるため、コストの削減や検査時間の短縮が可能である。また、イムノクロマトと同様バンドの有無を目視判定して増幅産物の判定ができるため、臨床外来はもとより、生物剤散布現場やインフラの整わない場所などでも利用可能である。

医療現場で原因不明の感染症を本研究で開発した多項目遺伝子検査法でスクリーニングする方法として利用される道を作らなければならない。バイオテロを最小限の被害で食い止めるには、頻度の高い一般感染のスクリーニング試薬の中にマウントして見逃しのない医療ができる体制を構築する必要がある。核酸増幅用のプライマーは長期乾燥に耐えるので普段から備蓄しておく必要がある。

E . 結 論

1. マウス肺炭疽モデルにおいて現行ワクチンの主成分である PA に比べ優れた防御効果を示す EA1 を同定し、EA1 が次世代炭疽ワクチンの候補分子として有用である可能性を示唆した。
2. 植物由来毒素であるリシンの検出系に利用できる特異抗体を得ることに成功した。
3. バイオテロに使用される可能性の高い複数の細菌毒素に対する免疫学的迅速同定法の開発に必要な抗原、抗体、免疫学的迅速同定法の作製を行った。特にコレラ毒素に対しては特異性の高いイムノクロマトの作製を完了した。
4. リアルタイムPCRと比べ約10-100倍感度が高く、目視により検体入手から約1時間で多検体項目をスクリーニング可能な検出法を開発した。

F . 健康危険情報
特になし

G . 研究発表

1 . 論文発表

1. Matsui T, Takita E, Sato T, Aizawa M, Ki M, Kadoyama Y, Hirano K, Kinjo S, Asao H, Kawamoto K, Kariya H, Makino S, Hamabata T, Sawada K, Kato K. Production of double repeated B subunit of Shiga toxin 2e at high levels in transgenic lettuce plants as vaccine material for porcine edema disease. *Transgenic Res.* 20(4):735-48, 2011.
2. Matsumoto A, Isomoto H, Nakayama M, Hisatsune J, Nishi Y, Nakashima Y, Matsushima K, Kurazono H, Nakao K, Hirayama T, and Kohno S. *Helicobacter pylori* VacA reduces cellular expression of STAT3 and pro-survival Bcl-2 family proteins, Bcl-2 and Bcl-X_L, leading to apoptosis in gastric epithelial cells. *Dig Dis Sci*, 56: 999-1006, 2011.
3. Na-Ubol M, Srimanote P, Chongsa-nguan M, Indrawattana N, Sookrung N, Tapchaisri P, Yamazaki S, Bodhidatta L, Eampokalap B, Kurazono H, Hayashi H, Nair GB, Takeda Y & Chaicumpa W. Hybrid & El Tor variant biotypes of *Vibrio cholerae* O1 in Thailand, *Indian J Med Res*, 133: 387-394, 2011
4. Murakami T, Inoshima Y, Watanabe K-I , Kobayashi Y, Matsui T, Kurazono H, Ishiguro I: Pathogenesis of experimental amyloid protein A amyloidosis in sore hocks-affected rabbits. *Amyloid*, 18: 112-118, 2011.
5. Chulanetra M, Sookrung N, Srimanote P, Indrawattana N, Sakolvaree Y, Chongsa-nguan M, Kurazono H, Chaicumpa W. Toxic marine puffer fish in Thailand seas and tetrodotoxin they contained. *Toxins*. 3:1249-1262, 2011.
6. Nakano M, Yamasaki E, Ichinose A, Shimohata T, Takahashi A, Akada-K. J, Nakamura K, Moss J, Hirayama T and Kurazono H: *Salmonella* enterotoxin, Stn, regulates membrane composition and integrity. *Dis Model Mech*, 5(4):515-21, 2012.
7. Van Hung P, Zhang J, Hayahi M, Yoshida S, Ohkusu K, Ezaki T. Genetic relatedness and identification of clinical strains of genus *Campylobacter* based on dnaJ, 16SrDNA, groEL, and rpoB gene sequences. *Microbiol Cult Coll*, 27: 1-12, 2011.
8. Zhang J, van Hung P, Hayashi M, Yoshida S, Ohkusu K, Ezaki T. DnaJ sequences of *Bacillus cereus* strains isolated from outbreaks of hospital infection are highly similar to *Bacillus anthracis*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 70: 307-315, 2011.
9. Yamada Y, Ohkusu K, Yanagihara M, Tsuneoka H, Ezaki T, Tsuboi J, Okabayashi H, Suwabe A. Prosthetic valve endocarditis caused by *Bartonella quintana* in a patient during immunosuppressive therapies for collagen vascular diseases. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 70: 395-398, 2011.
10. Saito H, Iwamoto T, Ohkusu K, Otsuka Y, Akiyama Y, Sato S, Taguchi O, Sueyasu Y, Kawabe Y, Fujimoto H, Ezaki T. Butler R.: *Mycobacterium shinjukuense* sp. nov.; a slowly growing, nonchromogenic species isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol*, 61: 1927-1932, 2011.
11. 大楠清文, 江崎孝行: 肺炎 臨床と研究の最新動向 遺伝子解析技術を用いた肺炎の起炎菌診断の実践、 医学のあゆみ 237:193-199, 2011.
12. 江崎孝行, 水野卓也, 林将大, 吉田滋, 張繼偉, 大楠清文: 【新たなゲノムベースの感染症診断-開発の現状、応用と展望-】 臨床所見から原因病原体を絞り込めない不明感染症の検査、 化学療法の領域 29:2006-2020, 2011.
13. Oie S, Obayashi A, Yamasaki H, Furukawa H, Kenri T, Takahashi M, Kawamoto K, Makino S. Disinfection methods for spores of *Bacillus atrophaeus*, *B. anthracis*, *Clostridium tetani*, *C. botulinum* and *C. difficile*. *Biol Pharm Bull*. 34(8):1325-9, 2011.
14. Kusumoto A, Asakura H, Kawamoto K. General stress sigma factor RpoS influences time required to enter the viable but non-culturable state in *Salmonella enterica*. *Microbiol Immunol*. 56(4):228-37, 2012.
15. Chaisowwong W, Kusumoto A, Hashimoto M, Harada T, Maklon K, Kawamoto K. Physiological Characterization of *Campylobacter jejuni* under cold stresses conditions: Its potential for public threat. *J Vet Med Sci*. 74(1):43-50, 2012.
16. Asakura H, Kawamoto K, Okada Y, Kasuga F, Makino S, Yamamoto S, Igimi S. Intrahost passage alters SigB-dependent acid resistance and host cell-associated kinetics of *Listeria monocytogenes*. *Infect Genet Evol*. 12(1):94-101, 2012.
17. 大楠清文, 江崎孝行. 遺伝子解析技術の新たな潮流と感染制御への適応、 日本化学療法学雑誌 59:441-453, 2011.
18. Uchida M., Harada T., Enkhtuya J., Kusumoto A., Kobayashi Y., Chiba S.,

- Shyaka A., Kawamoto K. Protective effect of Bacillus anthracis surface protein EA1 against anthrax in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 421(2):323-8, 2012.
19. Okamoto M, Kyutoku Y, Sawada M, Clowney L, Watanabe E, Dan I, Kawamoto K. Health numeracy in Japan: measures of basic numeracy account for framing bias in a highly numerate population. *BMC Medical Informatics and Decision Making*. 12(1):104, 2012.
 20. Asakura H, Ekawa T, Sugimoto N, Momose Y, Kawamoto K, Makino SI, Igimi S, Yamamoto S. Membrane topology of *Salmonella* invasion protein SipB confers osmotolerance. *Biochem Biophys Res Commun*. 426(4):654-658, 2012.
 21. Nakano M, Yamasaki E, Ichinose A, Shimohata T, Takahashi A, Akada KJ, Nakamura K, Moss J, Hirayama T, and Kurazono H. *Salmonella* enterotoxin, Stn, regulates membrane composition and integrity. *Dis Model Mech*. 5:515-521, 2012.
 22. Ezaki T, Hayashi M, Zhang J, Mizuno T, Natori T, Ohkusu K. Role of Culture Collections in Disasters, *Disaster Research*, 7:768-774, 2012.
 23. Hayashi M, Kubota-Hayashi S, Natori T, Mizuno T, Miyata M, Yoshida S, Zhang J, Kawamoto K, Ohkusu K, Makino S, Ezaki T. Use of blood-free enrichment broth in the development of a rapid protocol to detect *Campylobacter* in twenty-five grams of chicken meat. *Int. J. Food Microbiol*. 163(1):41-46, 2013.
 24. Esho FK, Enkhtuya B, Kusumoto A, Kawamoto K. Microbial assessment and prevalence of foodborne pathogens in natural cheeses in Japan. *BioMed Research International*. 2103: 205801, 2013.
 25. 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.
 26. 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.
 27. 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.
 28. 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.
 29. 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.
 30. 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.
 31. Indrawattana N, Sungkhachat O, Sookrung N, Chongsanguan M, Tungtongchitr A, Voravuthikunchai SP, Konggoen T, Kurazono H, Chaicumpa W. *Staphylococcus aureus* clinical isolates: Antibiotic susceptibility, molecular characteristics and ability to form biofilm. *BioMed Research International*, 2013: 314654, 2013.
 32. 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. *BioMed Research International*. 2013: 679038, 2013.
 33. 大楠清文, 江崎孝行. 感染症診断における遺伝子解析技術の有用性. *小児科*. 54(7):1001-1010, 2013.
 34. Sukegawa S, Ihara Y, Yuge K, Rao S, Oka K, Arakawa F, Fujimura T, Murakami H, Kurazono H, Takahashi M, Morimatsu F. Effects of oral administration of heat-killed *Enterococcus faecium* strain NHRD IHARA in post-weaning piglets. *Animal Science Journal*, in press, 2014.
- ## 2 . 学会発表
1. Takayuki Ezaki. Screening of Environmental Human, Animal and Plant Pathogens in Soil and Water. International Conference on Environmental OMICS, Guangzhou, China, 2011

2. Takayuki Ezaki. Shall We Spin out Classical Taxonomy of High Risk Pathogens Even after Complete Genome Era? International Union of Microbiological Societies 2011 Congress(Sapporo)2011.9.7
3. Akiko Kusumoto, Toshihiko Harada, Keiko Kawamoto. The role of general stress factor RpoS in *Salmonella* VBNC state. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress(Sapporo)2011.9.7
4. Takayuki Ezaki, Shuffling Classification of genus *Escherichia* and *Shigella* for better Identification of *E. coli* and *Shigella* spp. after complete Genome Era. Cholera & Other Bacterial Enteric Infections; Speaker US-Japan Cooperative Medical Science Program. Kolkata, India, 2011
5. Takayuki Ezaki, Takuya Mizuno, Masahiro Hayashi, Asami Mori, Shigeru Yoshida Izumi Kanazawa, and Kiyofumi Ohkusu. Shuffling Classification of genus *Escherichia* and *Shigella* for better Identification of *E. coli* and *Shigella* spp. after complete genome era US-Japan Cooperative medical science program cholera and other bacterial enteric infections. 46th Conference, Kolkata, India. 2011.
6. 宮下 雅行, 楠本 晃子, 川本 恵子. サルモネラ VBNC 変異株の単離と解析. 第 152 回 日本獣医学会, 大阪, 9 月 19 日, 2011.
7. Takayuki Ezaki Reconstruction of Taxonomy of family *Enterobacteriaceae* after Genome wide Analysis of House Keeping Genes. The 35th Annual Meeting Molecular Biology Society of Japan, Hakata, Japan, 2012.
8. 江崎孝行. dnaJ 遺伝子を用いた食中毒起炎菌の検査法. *Campylobacter* の検査・診断の最前線. 第 3 回日本カンピロバクター研究会総会プログラム, 宮崎, 12 月 3-5 日, 2012.
9. 内田 信, Anselme Shyaka, 川本恵子. 新規炭疽ワクチン候補分子 EA1 の経鼻投与による炭疽発症予防効果. 第 86 回日本細菌学会総会, 千葉, 3 月 18 日, 2013.
10. Akiko Kusumoto, Masayuki Miyashita, Keiko Kawamoto. Isolation and analysis of *Salmonella* VBNC mutant. 第 85 回日本細菌学会, 長崎, 3 月 28 日, 2012.
11. 楠本 晃子, 朝倉 宏, Esho Firew Kassa, 川本 恵子. 帯広近郊の野鳥由来カンピロバクター分離株の MLST 解析. 第 86 回日本細菌学会総会, 千葉, 3 月 18 日, 2013.
12. 百瀬 愛佳, 川本 恵子, 五十君 静信, 山本 茂貴, 朝倉 宏. サルモネラの 3 型分泌装置エフェクター SipB 膜上移送は浸透圧抵抗性に寄与する. 第 86 回日本細菌学会総会, 千葉, 3 月 18 日, 2013.
13. Kassa Esho Firew, Enkhtuya Budbazar, 楠本晃子, 川本恵子. Microbiological quality and prevalence of foodborne pathogens in natural cheeses in Japan. 第 87 回日本細菌学会総会, 東京, 3 月 26-28 日, 2014.
14. 楠本 晃子, 川本 恵子. 魚病細菌 *Tenacibaculum maritimum* の滑走運動はプロテアーゼ分泌に関与する. 第 87 回日本細菌学会総会, 東京, 3 月 26-28 日, 2014.
15. 朝倉宏, 川本恵子, 倉園久生, 岡田由美子, 五十君 静信. *Listeria monocytogenes* 1/2b 株間に認められる遺伝学・形質学的多様性. 第 87 回日本細菌学会総会, 東京, 3 月 26-28 日, 2014.
16. 倉園久生, 廣井豊子, 倉園貴至, 山崎栄樹. Development of an immunochromatographic test strip for detection of cholera toxin. 第 87 回日本細菌学会総会, 東京, 3 月 26-28 日, 2014.
17. 山崎 栄樹, 山本新吾, 倉園久生. Uropathogenic specific protein gene encodes a new member of H-N-H nuclease superfamily. 第 87 回日本細菌学会総会, 東京, 3 月 26-28 日, 2014.
18. 水野卓也, 名取達矢, 福永肇, 大楠清文, 江崎孝行. 全ゲノムシーケンス解析から見た *Mycobacterium* 属内の系統分類に有効な遺伝子群. 第 87 回日本細菌学会総会, 東京, 3 月 26-28 日, 2014.
19. 江崎孝行. House keeping gene をつけた新しい分類指標と肺炎診断への利用. 第 87 回日本細菌学会総会, 東京, 3 月 26-28 日, 2014.
20. 大楠清文, 江崎孝行. ハウスキーピング遺伝子シーケンス解析による感染症診断. 第 87 回日本細菌学会総会, 東京, 3 月 26-28 日, 2014.
21. 福永肇, 江崎孝行, 水野卓也. M 細胞タイトジャンクションの開閉による *Campylobacter jejuni* 感染症の成立. 第 87 回日本細菌学会総会, 東京, 3 月 26-28 日, 2014.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

特許出願

核酸クロマトグラフ法を利用した肺炎原因菌の検出方法（特許出願番号
2011C6262 PCT/JP2011/001934）

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

バイオテロ危機発生時への対応
- 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
研究協力者	三觜 雄	札幌市衛生研究所
	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	国立感染症研究所
研究協力者	梅本 隆	国立感染症研究所
研究協力者	田辺 公一	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

平成 23-24 年度にはバイオテロ関連特定病原体の中の真菌感染症に主眼を置き検査法の習熟を計った。平成 23 年度には一般真菌の網羅的スクリーニング検査検出キットを用いて、健康危機発生時対応を想定のもと、操作性、精度等の評価と共に真菌検査法に慣れた。平成 24 年度には真菌感染症の中で、最も致死率の強いコクチジオイデスを対象に病原体の網羅的検出法の構築と操作性、そして問題点の解析を行った。この問題点の解決を目的に平成 25 年度には、国立感染症研究所真菌部の指導の下、研究協力員の実技研修を行い、検出技術の向上を図った。

この実技研修は、真菌感染症による健康危機発災時には、地方衛生研究所の各ブロックにおける研究協力員が指導的立場で危機対応を完遂させることを可能にするためのものである。また作成された「バイオテロ対策病原性真菌検査マニュアル」はバイオテロの可能性のある真菌検査検出対応の一助になると考える

A. 研究目的

バイオテロを含む健康危機発生時に、先ず第一に現場で検査対応するのは全国地方衛生研究所である。平成 20 年度から対象病原体検出法の標準化の作製を目的として、国立感染症研究所でバイオテロ関連特定病原体の網羅的スクリーニング検査・検出キットが作成された、地方衛生研究所が感度、特異性、操作性等について評価してきた。対象病原体として、ウイルスでは天然痘ウイルスワクチン株、アデノウイルス、インフルエンザウイルス H5N1、SARS コロナウイルス等、また、細菌では *Bacillus anthracis*、*Burkholderia pseudomallei-mallei*、*Yersinia pestis*、*Coxiella burnetii*、*Clostridium botulinum toxin A, B* 等を用いた。

平成 23 年度からはバイオテロ対象病原微生物である真菌を対象に、これまでと同様に国立感染症研究所で作製された網羅的迅速検出法について、検出精度の評価を行った。

過去三年間にバイオテロに使用される可能性のある可能性のある病原体の中のウイルスと細菌については、評価研修と共に研究協力者がその技術を維持し、技術伝達体制を構築しつつある。一方、バイオテロ対象病原体の一つである真菌についての評価技術研修の初年度は、一般的な真菌検出について国立感染症研究所で作成された網羅的測定キットを用いて地方衛生研究所で測定精度の評価を行った。その結果、研究協力の 8 地衛研では、ブラインドサンプル; *Candida albicans*,

Aspergillus fumigates, *Cryptococcus neoformans*, を特定することが出来た。

しかし、この評価の過程を通して検査精度のさらなる向上のみならず真菌検体そのものの取り扱い等について様々な角度から提言された。二年目は致死率の高い *Coccidioides*

類について評価研修を行った。技術的な未熟さを補うべく、最終年度には研究協力者の実技技術研修会を設定、実際の *Coccidioides* 属遺伝子の検出を実施し問題点を分析、討論を目的とした。

B. 研究方法

国立感染症研究所で作製されたバイオテロ対象の真菌の迅速網羅的検出法に従った。即ち、遺伝子学的同定法は、一般的に推奨された同定法に準拠しておこなう事とした。

1. 方法

共同プロトコールとして評価機関に試薬・サンプルと共に送付された。

2. 配布サンプル

1) 平成 23 年度

Positive control (PC); *Candida*

albicans genome DNA

Negative control (NC)

Klebsiella pneumoniae genome DNA

blind DNA sample 1 (1)

blind DNA sample 2 (2)

blind DNA sample 3 (3)

PCR premix NL (NL)

PCR premix ITS (ITS)

2) 平成24年度

(1) 用意されたNL1/NL4 primerを用いてblind DNA 検体の検出成績

Sample 1 : 592bp

*Aspergillus fumigatus*と99%の相同性

Sample 2 : 568bp

Ajellomyces capsulatus と99%の相同性

Sample 3 : 676b

Cunninghamella polymorpha および

*Cunninghamella bertholletiae*と99%の相同性

Sample 4 : 565bp

Coccidioides immitis および

Coccidioides posadasii と99%の相同性

(2) Coi9-1F/Coi9-1R primer を用いた検出成績

Sample 4 : 595bp (reverse primer側のみ解析可能)

Coccidioides posadasii および

Coccidioides immitis と99%の相同性

3)平成 25 年度

(1) 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

(2) 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。

(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) 検出成績

全て研究協力者の測定結果では、blind samples について同定することが出来、シークエンス結果も一致した。また、各地衛研から検査測定評価について意見が

提出された。すなわち PCR 検出法の条件、真菌にユニバーサルな検出系であるため検出可能な他の真菌類の菌名の開示、検出測定マニュアルの作製等であった。

また、真菌同定検査法の確立は、バイオテロ対策のみならず、食品苦情事例にも非常に有用であるとの意見もあった。

2) 7 研究協力者の中で 4 協力者が正確に *Coccidioides* 遺伝子を検出することが出来た。他の研究協力者にはコンタミのような結果がでる、との技術的な課題、PCR 反応系の不具合、プライマーの設定条件、PCR 反応酵素系の確認の必要性等の課題が提言された。

3) このような検出技術の未完成部分を補足すべく、*Coccidioides* のみに限定した検出実技研修を行い、多くの研究協力者が正確に *Coccidioides* 遺伝子の検出が可能となった。

D. 考察

アメリカ CDC によるバイオテロ対象重要疾患としたカテゴリーA,B,C 分類には、それぞれ A:6 疾患、B:12 疾患、C:5 疾患(2003)を設けている。その中で、特に高い死亡率、感染力等をもつカテゴリーAには、天然痘、炭疽、ペスト、ポツリヌス中毒、それに各種のウイルス性出血熱が含まれている。カテゴリーA 対象微生物は、国立感染症研究所で作製されたバイオテロ対象病原体の網羅的測定キットを用いた対象病原体遺伝子検出の測定評価による研修を行ってきた。これらに引き続き、バイオテロに使用される可能性高い真菌類の検出技術の習得を開始した。しかし、バイオテロ対象となる可能性の極めて高

いコクシジオイデス、ヒストプラスミン、トリコセテン・マイコトキシンなどの真菌類を対象にした検出検査では期待されていた成果は望めなかった。

細菌やウイルスに対する検査・同定技術は優れている地方衛生研究所は真菌検査に馴染めていないのが大きな理由と考えられた。しかし、二年間に亘る測定実技研修等により測定技術は向上した。

今後は、ウイルス、細菌のみならずバイオテロ対象病原体真菌の検出には、これらの地方衛生研究所の研究協力者が核となり、バイオテロ健康危機発生時には、技術的指導のみならず情報連携ネットワークの中心としてバイオテロ対象病原体検出の中核となることを望んでいる。

また、最終年度に作成した「バイオテロ対策病原性真菌検査マニュアル」は今後地方衛生研究所の真菌検査活動に大いに役立つものと期待している。

E. 結論

バイオテロ対象病原体の一つである真菌の網羅的測定キットを用いて地衛研で測定評価を行った。その結果、研究協力者地衛研では、*Coccidioides* 類の遺伝子検出、菌種を特定することが出来た。

作成した「バイオテロ対策病原性真菌検査マニュアル」は有用な検査対応の一助となると考える。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sugiura Y, Hironaga M. *Arthrographis kalrae*, a rare causal agent of onychomycosis, and its occurrence in natural and commercially available soils. *Med Mycol.* 48:384-389, 2010.
- 2) Noriko Nakajima, Yuko Sato, Harutaka Katano, Hideki Hasegawa, Toshio Kumasaka, Satoru Hata, Shinya Tanaka, Tomonori Amano, Takahiko Kasai, Ja-Mun Chong, Toshihiko Iiduka, Iwao Nakazato, Yohko Hino, Akihiko Hamamatsu, Hisashi Horiguchi, Tomoyuki Tanaka, Akio Hasagawa, Yoshiaki Kanaya, Reiko Oku, Takeshi Oya and Tetsytaro Sata. Histopathological and immunohistological findings of 20 cases with 2009 H1N1 virus infection. *Modern Path.*(2011), 1-13
- 3) 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.
- 4) Sugiura Y. *Fusarium* species: mycotoxin production, and plant and murine pathogenicity. *Mycotoxins.* 62: 49-61, 2012.
- 5) 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.

なし

2. 学会発表

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（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	相野田 祐介	東京女子医科大学病院 感染症科
	加藤 康幸	国立国際医療研究センター病院 国際感染症センター
	竹下 望	国立国際医療研究センター病院 国際感染症センター
	倉井 華子	静岡がんセンター 感染症科
	関谷 紀貴	がん・感染症センター都立駒込病院 臨床検査科
	菅沼 明彦	がん・感染症センター都立駒込病院 感染症科
	柳澤 如樹	がん・感染症センター都立駒込病院 感染症科
	西條 政幸	国立感染症研究所 ウイルス第一部
	安藤 秀二	国立感染症研究所 ウイルス第一部
	井上 智	国立感染症研究所 獣医科学部
	谷口 清洲	国立病院機構三重病院
	宮崎 義継	国立感染症研究所 真菌部
	河野 茂	長崎大学病院 第二内科
	國島 広之	聖マリアンナ大学 総合診療内科
	加來 浩器	防衛医科大学校 防衛医学研究センター
	古谷 信彦	文京学院大学保健医療技術学部・臨床検査学科
	藤井 毅	東京医科大学八王子医療センター
	鯉淵 智彦	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』のホームページを作成後、ICD を対象に実施したアンケート結果や全国の感染症専門家から寄せられた意見を参考にして修正とアップデートを行ってきた。2011～12年には20疾患を追加、2013年には新たに感染症法に基づく特定病原体等(三種)に指定された重症熱性血小板減少症候群(SFTS)など2疾患を加え、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)の最新情報の追加を行い、迅速かつ正確に情報提供を行えるよう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。これまでにその内容を入れた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行ってきた。その後、新たな疾患も追加してより内容の充実した使いやすいホームページを整備した。最終的にはこれらのリソースが一般の医療従事者にとっても簡便で迅速な情報源となることを目的とする。

B. 研究方法

すでに作成していた 15 種類のバイオテロ関連疾患に加えて、新たに追加作成した計 25 疾患に関するマニュアルの編集および、病原体の管理や輸送に関する最新の情報を追加・修正作業を実施した。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について具体的方法を検討した。

(倫理面への配慮)

特になし

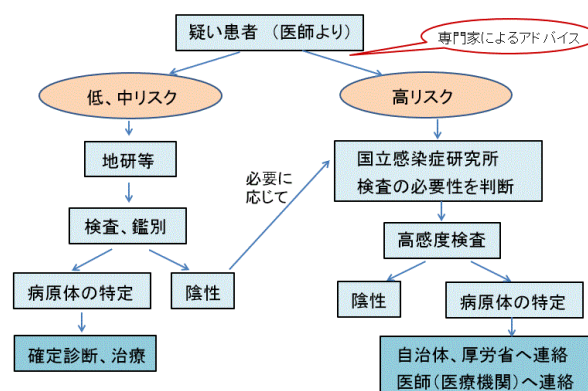
C. 研究結果

2010 年までに本研究において作成していた、(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) 野兔病の各項目について、アンケート調査等によって全国から寄せられた意見を参考して細かな修正をおこなうとともに、最新の情報を追加した。しかし、これらの 15 疾患のみではバイオテロに利用される可能性のある病原微生物を十分に網羅していないことが指摘されたことを受け、新たな疾患として平成 23 年度以降に以下の 25 疾患を追加した：(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) オムスク出血熱、(10) キャサヌル森林病、(11) リフトバレー熱、(12) ハンタウイルス感染症、(13) Bウイルス症、(14) ニパウイルス感染症、(15) レプトスピラ症、(16) 発疹チフス、(17) チクングニア熱、(18) ロッキー山紅斑熱、(19) サル痘、(20) 黄熱、(21) 回帰熱、(22) 急性灰白髄炎、(23) デング熱、(24) 日本紅斑熱リケッチア、(25) 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS)。執筆は全国から選定した感染症専門家に依頼し、“目で見て理解する”要素を重視し図表等も数多く示した。また各疾患の追加・修正のみならず、総論の内容についても病原体の管理や輸送に関する最新の情報を記載した (<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。下図に一つの案を示す。

疑い患者発生時の連携体制の構築 (案)



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。

	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

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。すなわち、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。また、重症熱性血小板減少症候群（SFTS）に代表される新興感染症などに対して迅速な情報提供も極めて重要である。このような背景に基づき、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た。これにより迅速性や情報の正確性などを備えた有益なホームページの整備がなされたと考えられる。

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
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（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をきっかけとしてさらなる院内感染対策の充実をはかり、さらに新型インフルエンザに対する対策もBCP作成を含めて進展してきている。しかしバイオテロに関する医療機関の準備状況はまだほとんどなされていない施設が大半を占めており、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。平成23年度は全体としての位置付けや方向性を確認し、平成24年度は、バイオテロ対策ガイドラインの基本骨格を作成した。さらに平成25年度は新型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。今後、関連する多くの感染症診療に関するガイドラインの内容と比較しながら、相互の内容に矛盾が生じないように、さらに検討を行う必要がある。

A．研究目的

いまだに世界の各地域において、政情が不安定な地域を中心に内部紛争が続き、さらに宗教に絡んだ争いも頻発している。それに伴い、発展途上国のみならず、どの国においてもテロ行為の脅威に曝されており、警戒のレベルを高めている。

バイオテロに対する対策の重要性は認識されるようになってきているが、実際にバイオテロが起こった際に想定される状況は多様であるため、必要な準備に関する明確な指標や基準が定められておらず、各医療機関も具体的に何を準備すべきかについて混乱が生じている。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にして検討を行った。

B．研究方法

バイオテロに関する国内外の各種資料を入手し、さらに感染症に関する各種ガイドラインを参考にして日本の医療現場の現状に合わせたガイドラインを作成した。

C．研究結果

1) 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。

ガイドラインの骨格とその主な内容としては、下記に挙げるような項目とした。

表1．バイオテロ対策ガイドラインの骨格

バイオテロの定義
バイオテロに用いられる病原体
バイオテロの検知と認識
バイオテロの初期対応
病原体の確認と検査
病原体別にみた感染予防策
外来における対応
病棟における対応
バイオテロ時に想定される状況
他の医療機関との連携
自治体、警察、消防との連携

さらにバイオテロの病原体であっても他の感染症の病原体と同様に予防策は基本的に4種類に分類されるため、病原体の種類に応じて、表2に示すような各種感染予防策を提唱した。

表2．各種病原体の感染予防策

【標準予防策にて対応可能】

・炭疽、鼻疽、類鼻疽、野兔病、コクシジオイ
デス症、ボツリヌス毒素中毒など

【飛沫感染予防策】

・SARS、高病原性インフルエンザなど

【接触感染予防策】

・ペスト、ウイルス性出血熱、コレラ、サルモ
ネラ感染症、EHEC 感染症など

【空気感染予防策】

・天然痘、多剤耐性結核菌など

バイオテロ時に想定される状況については、表
3 のような場面が想定されるため、これらへの
対応についても触れる必要があると考えられる。

表3. バイオテロ時に想定される状況

多数の重症患者の増加
外来患者の増加
医療スタッフの減少
医療スタッフの感染
情報不足、デマなどによる混乱
医薬品や関連物資の不足
通常の診療内容への制限
指揮系統の混乱
ライフラインの障害
犯罪の増加

D. 考察

各医療機関においては、診療改定に伴う感染対
策に対する加算の実施に伴い、院内感染対策は
人的および設備等の面からも充実してきている。
さらに、各種耐性菌やインフルエンザ、ノロウ
イルスなどによるアウトブレイクを多くの施設
が経験しており、対策の必要性を実感している
ことも要因となっていると考えられる。

また、新型インフルエンザに対する対策は国
や自治体の指導のもとに、各医療機関における
事業継続計画(business continuity plan: BCP)
の作成を求められており、インフルエンザ対策
も今後さらに充実が図られる見通しとなってい
る。

その一方で、バイオテロに対しては、実質的
にまだ具体的な準備は何もなされていない医療
機関が大半を占めているのが現状である。その
理由としては、感染対策面で現在、差し迫って

いる院内感染対策、あるいは新型インフルエン
ザ対策への対応に手一杯で、バイオテロ対策ま
で行う余裕がない、というのが現実と思われる。

ただし、今後の東京オリンピックの開催や海
外における政情不安の状況を考えると、バイオ
テロ対策を疎かにして良いという判断にはつな
がらず、むしろ今後、医療機関が是非取り組ま
なければいけない課題のひとつになると思われ
る。

今後、ガイドラインが完成したとしても、実
際にことが起こると、社会的な混乱を生じる可
能性が高く、行政機関、警察、消防など、各種
機関との連携は欠かせない。その意味におい
ても、本ガイドラインを完成させるにあたり、今
後、関係機関との調整も必要になるものと思わ
れる。

なお、本研究班においては、岩本愛吉先生を
分担研究者とするグループにおいて、バイオテ
ロ対策ホームページが作成されているため、今
後、しかるべき段階でこのホームページを介し
た一般への情報開示も検討すべきであると思
える。

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、3年
間でたたき台となる案を作成した。今後、実用
性の高いガイドラインを目標に、詳細を検討し
ていく必要がある。

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。)

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

厚生労働科学研究費（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

ウイルス性出血熱等のバイオテロ関連病原体の診断法およびシステムの整備に関する研究

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：

バイオテロ関連病原体を迅速に、かつ、高感度に検出するための5'-Flap付加 primer を用いた遺伝子検出法の診断における有用性を評価した。本研究においてリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)、狂犬病ウイルス(RV)、チクングニアウイルス(CHIKV)に対する既知のプライマーを用いた5'-Flap付加 primer 法の検出感度向上について評価した。その結果 LCMV 特異的プライマーに5'-Flap付加 primer 法を用いたときその感度は向上した。しかしながら RV, CHIKV に対してはその効果は認められなかった。Flap 配列の付加によるプライマー感度の向上のメカニズムは不明であるが、既存のプライマーに対するその効果の検討は有用であることが示唆された。

一方、不明病原体による感染症発生の際に、検体を海外から受け入れることが求められることもある。そこで、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。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。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：林昌宏，伊藤（高山）睦代，
福士秀悦，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

ウイルス感染症の診断法としてウイルス特異的遺伝子検出法（定量的 RT-PCR 法等）が用いられるようになっているが、バイオテロ関連病原体の遺伝子検出には高感度にウイルス遺伝子を検出することが求められる。5'-Flap付加 primer を PCR 法やリアルタイム PCR 法に用いることによりウイル

ス遺伝子をより高感度に検出できることが報告された。そこで既存のウイルス特異的遺伝子検出用 primer の 5' 端に Flap 配列 (AATAAATCATAA) を付加することにより、その検出感度を上げることができるか否かを、5' -Flap 付加 primer を用いた定量的 RT-PCR (qRT-PCR)法に応用し、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (Lymphocytic choriomeningitis virus, LCMV)、狂犬病ウイルス (RV)、チクングニアウイルス (CHIKV) の遺伝子を用いて評価することを目的とした。

一方、原因不明感染症の診断には、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. 研究方法

- 1) 5' -Flap 付加プライマーを用いた遺伝子増幅法の検出感度の評価

ウイルス RNA の抽出：LCMV および RV のウイルスの RNA を High Pure Viral RNA Kit (Roche)を用いて抽出した。抽出方法はメーカーのマニュアルに従った。

Flap 付加 LCMV, RV, および, CHIKV 特異的プライマーの設計: LCMV 特異的プライマー :GP-F (CATTACCTGGACTTTGTGCACTC), GP-R (GCAACTGCTGTGTTCCGAAAC)(J Virol Meth 147:167-176,2008)を用いて Flap 付加 LCMV 特異的プライマー : flap-GP-F

(AATAAATCATAACATTACCTGGACTTTGTGCACTC),

flap-GP-R(AATAAATCATAAGCAACTGCTGTGTTCCGAAAC)を設計した。RV 特異的プライマーについては、RVH-NF2 (ACTTCCGTTCACTAGGCTTG), RVH-NR2 (GACCCATATAGCATCCAACAA) を用いて Flap 付加 RV 特異的プライマー :flap-RVH-NF2(AATAAATCATAAACTTCC

GTTCACTAGGCTTG), flap-RVH-NR2(AATAAATCATAAGACCCATATAGCATCCAACAA) を設計した。CHIKV 特異的プライマーについては、10572f (CGCAGGAAGACCAGGACAA), 10798r (CCGCTCTTACCGGTTTG)を用いて Flap 付加 CHIKV 特異的プライマー :

Flap-10572f

(AATAAATCATAACGCAGGAAGACCAGGACAA),

Flap-10798r(AATAAATCATAACCGCTCTTACCGGTTTG)を設計した。

各ウイルス特異的プライマーおよび Flap 付加特異的プライマーを用いた RT-PCR 法 : RT-PCR 反応には LightCycler 1.5 (ST300) システム (Roche Applied Science)を用いた。増幅遺伝子は SYBR Green I を用いて検出した。

2) GHSAG Unknown Pathogen Workshop に参加することによる不明病原体診断システムの評価

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。本ワークショップに参加して , 原因不明病原体の診断における問題点等を検討した。

C. 研究結果

1) 5' -Flap 付加プライマーを用いた遺伝子増幅法の検出感度の評価

Flap 付加 LCMV 特異的プライマーの検討 : LCMV 遺伝子検出のため遺伝子検査において , flap-GP-F および flap-GP-R を用いた場合 , Flap 配列を付加しない場合と比較して蛍光強度が約 36% 増強した。さらに蛍光の立ち上がりのサイクル数を示す Crossing Point (CP) 値の短縮が認められた。Flap 配列を付加したこ

とによって LCMV 特異的プライマーの増幅感度が上昇したことが示唆された。

Flap 付加 RV 特異的プライマーの検討 : Flap 配列付加の有無にかかわらず遺伝子検出感度の向上は認められなかった。

Flap 付加 CHIKV 特異的プライマーの検討 : Flap 配列付加の有無にかかわらず CP 値に大きな差は観察されなかった(表 3)。またこのとき Flap 配列の有無にかかわらず Tm 値は 82.27 であった。

2) GHSAG Unknown Pathogen Workshop に参加することによる不明病原体診断システムの評価

検体の発送から受け取りまでの経緯

日本はイギリスから検体の送付を受け , 輸入が完了するまでに 9 日間を要し , その間 , 検体を凍結状態で保つことができなかった。また , 別の検体は BSL3 で扱うべき病原体と明記されて各国に送付するという通知がなされた。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ったこととなった。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。

2 つのシナリオのサンプルの病原体診断

シナリオ 1 (レストスピラ症) のサンプル中に存在する病原体を特定するこ

とはできなかった。

シナリオ 2 (出血性大腸菌 0157) の検査用サンプルの入手 (輸入ができなかった)。

D. 考察

1) 5' -Flap 付加プライマーを用いた遺伝子増幅法の検出感度の評価

本研究においてこれまでに確立されている LCMV, RV および CHIKV の検出用 qRT-PCR 用プライマーを用いて Flap 配列を既存のプライマーの 5' 端に付加することによるその増幅効率への効果を検討した。その結果 12bp の Flap 配列を既存の qRT-PCR プライマーに付加しても qRT-PCR 反応が阻害されることはなく、 T_m 値も全てのプライマーにおいて Flap 配列の有無にかかわらず影響を受けないことが観察された。検討した LCMV, RV, および、CHIKV の遺伝子検出において、LCMV 増幅プライマーに Flap 配列を付加することによって LCMV の遺伝子検出においては検出感度が向上した。しかしながら RV および CHIKV 特異プライマーに Flap 配列を付加しても C_P 値の短縮および感度の向上は観察されなかった。すべての Flap 配列付加プライマーを用いた qRT-PCR 反応においてプラトーにおける蛍光強度の増強が認められた。これは 12bp の Flap 配列を付加することによって増幅産物の分子量が増加したことに起因することが示唆された。

2) GHSAG Unknown Pathogen Workshop に参

加することによる不明病原体診断システムの評価

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。一方、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。

E. 結論

- 1) 5' -Flap 付加プライマーを用いた遺伝子増幅法の検出感度の評価
一般的なウイルス遺伝子増幅法に用いられるプライマーに5' -Flap (AATAAATCATAA) 付加することにより、遺伝子検出感度を向上させることが可能である場合があることが示唆された。
- 2) GHSAG 不明病原体感染症診断技術に関するワークショップ
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。
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。
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。
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。
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。

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。

F. 健康危険情報 特になし

G. 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) 伊藤(高山)睦代, 中道一生, 山口(木下)一美, 王麗欣, 林昌宏, 西條政幸. Establishment of the in vitro test for residual virulent rabies virus in inactivated rabies vaccines. 第 11 回狂犬病研究会, 2012 年 4 月, 東京都
- 2) Lim CK, Moi ML, Kotaki A, Saijo M, Kurane I, Takasaki T. Molecular diagnosis and analysis of imported chikungunya virus strains, Japan, 2006-2011. The 9th Japan-China International Conference of Virology, June12-13, 2012, Sapporo, Japan
- 3) Lim CK, Kotaki A, Omatu T, Moi ML, Kurane I, Saijo M, Takasaki T. A rapid non-nested reverse transcriptase-PCR assay for vertebrate flavivirus subgroups using a novel universal single primer pair based on a conserved region of NS5 gene sequences. The XVIII International Congress for Tropical

Medicine and Malaria (ICTMM). September 23-27, 2012, Rio de Janeiro, Brazil

- 4) 中道一生, 井上直樹, 倉根一郎, 林昌宏, 西條政幸. 進行性多巣性白質脳症が疑われた患者の脳脊髄液におけるヘルペスウイルスの出現プロファイルの解析. 第 17 回日本神経感染症学会総会, 2012 年 10 月 19-20 日, 京都市
- 5) 林昌宏, 網康至, 藤井克樹, 北浦一孝, モイメンリン, 白井顕治, 小滝徹, 須崎百合子, 森川茂, 西條政幸, 鈴木隆二, 倉根一郎, 高崎智彦. マーモセットを用いたチクングニアウイルスの霊長類モデルの検討, 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 2012 年 11 月 13-15 日, 大阪
- 6) 垣内五月, 木下(山口)一美, 伊藤(高山)睦代, 西村秀一, 林昌宏, 西條政幸. 造血幹細胞移植病棟にみられたパラインフルエンザウイルス 3 型感染症流行の分子疫学的解析. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 2012 年 11 月 13-15 日, 大阪
- 7) 伊藤(高山)睦代, 中道一生, 林昌宏, 山口(木下)一美, 垣内五月, 王麗欣, 倉根一郎, 西條政幸: 乾燥組織培養不活化狂犬病ワクチン国家検定法における 3Rs の導入, 第 60 回日本ウイルス学会学術集会(大阪市)2012 年 11 月 13-15 日.
- 8) 山口(木下)一美, 中道一生, 伊藤(高山)睦代, 林昌宏, 倉根一郎, 西條政幸.

- LAMP 法を用いた PML 患者の脳脊髄液中の JC ウイルスの検出および定量試験 . 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 , 2012 年 11 月 13-15 日 , 大阪
- 9) 中道一生 , 林昌宏 , 西條政幸 . 進行性多巣性白質脳症患者の脳脊髄液中に検出された JC ポリオーマウイルスの経時的なゲノム変異パターンの解析 . 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 , 2012 年 11 月 13-15 日 , 大阪
- 10) Moi ML, Lim CK, Saijo M, Takasaki T, Kurane I. Re-assessment of dengue neutralizing antibody and viremia titers in dengue patients using Fc R-expressing cells. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH) 61st Annual Meeting, Atlanta, Georgia USA, November 11-15, 2012.
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 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

- 17) 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
- 18) 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
- 19) 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
- 20) 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
- 21) 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
- H. 知的財産権の出願・登録状況
現在出願予定はない.

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
Sayama Y, Demetria C, Saito M, Azul RR, Taniguchi S, Fukushi S, Yoshikawa T, Iizuka I, Mizutani T, Kurane I, Malbas FF Jr, Lupisan S, Catbagan DP, Animas SB, Morales RG, Lopez EL, Dazo KR, Cruz MS, Olveda R, Saijo M, Oshitani H, Morikawa S.	A seroepidemiologic study of Reston ebolavirus in swine in the Philippines.	BMC Vet Res.	18;8	82	2012
Taniguchi S, Sayama Y, Nagata N, Ikegami T, Miranda ME, Watanabe S, Iizuka I, Fukushi S, Mizutani T, Ishii Y, Saijo M, Akashi H, Yoshikawa Y, Kyuwa S, Morikawa S.	Analysis of the humoral immune responses among cynomolgus macaque naturally infected with Reston virus during the 1996 outbreak in the Philippines.	BMC Vet Res.	11;8(1)	189	2012
Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Saijo M, Morikawa S.	Serological Assays Based on Recombinant Viral Proteins for the Diagnosis of Arenavirus Hemorrhagic Fevers.	Viruses	4	2097-2114	2012

Lihoradova O, Kalveram B, Indran SV, Lokugamage N, Juelich TL, Hill TE, Tseng CT, Gong B, Fukushi S, Morikawa S, Freiberg AN, Ikegami T.	The Dominant-negative Inhibition of dsRNA-dependent Protein Kinase PKR Increases the Efficacy of Rift Valley Fever Virus MP-12 Vaccine.	J Virol	86	7650-7661	2012
Fukushi S, Nakauchi M, Mizutani T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S.	Antigen-capture ELISA for the detection of Rift Valley fever virus nucleoprotein using new monoclonal antibodies.	J Virol Methods	180	68-74	2012
Arai S, Gu SH, Baek LJ, Tabara K, Bennett SN, Oh HS, Takada N, Kang HJ, Tanaka-Taya K, Morikawa S, Okabe N, Yanagihara R, Song JW.	Divergent ancestral lineages of newfound hantaviruses harbored by phylogenetically related crocidurine shrew species in Korea.	Virology, 2012, in press			
Kennedy JS, Gurwith M, Dekker CL, Frey SE, Edwards KM, Kenner J, Lock M, Empig C, Morikawa S, Saijo M, Yokote H, Karem K, Damon I, Perlroth M, and Greenberg RN.	Safety and Immunogenicity of LC16m8, an Attenuated Smallpox Vaccine in Vaccinia-Naive Adults.	J Infect Dis	204(9)	1395-402	2011
Taniguchi S, Watanabe S, Masangkay JS, Omatsu T, Ikegami T, Alviola P, Ueda N, Iha K, Fujii H, Ishii Y, Fukushi S, Saijo M, Kurane, I Kyuwa S, Akashi H, Yoshikawa Y, Shigeru Morikawa, S.	Reston Ebola Virus Antibodies in Bats, the Philippines.	Emerg Infect Dis,	17(8)	1559-60	2011
A Okutani, H Tungalag, B Boldbaatar, A Yamada, D Tserennorov, I Otgonchimeg, A Erdenebat, D Otgonbaatar, and S Inoue.	Molecular Epidemiological Study of <i>Bacillus anthracis</i> Isolated in Mongolia by Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for 8 Loci (MLVA-8)	Japanese Journal of Infectious Diseases	64	345-348.	2011
奥谷晶子、井上 智	アジアにおける炭疽の発生状況と遺伝学的タイプング	獣医畜産新報 (JVM)	65	374-376	2012
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
Gaowa, Ohashi N, Aochi M, Wuritu, Wu D, Yoshikawa Y, Kawamori F, Honda T, Fujita H, Takada N, Oikawa Y, Kawabata H, <u>Ando S</u> , Kishimoto T	Rickettsia in ticks, Japan	Emerg Infect Dis	19	338-340	2013
Sakamoto N, Nakamura-Uchiyama F, Kobayashi K, Takasaki T, <u>Ando S</u> , Iwabuchi S, Ohnishi K	Murine Typhus with Shock and Acute Respiratory Failure in a Japanese Traveler after Returning From Thailand	J Travel Med	20	50-53	2013

安藤秀二	日本紅斑熱	獣医公衆衛生研究	14	13-17	2012
安藤秀二	怖いダニ類媒介性感染症 ～地域毎の情報を発信することが大事	ベストコントロール	160	27-31	2012
安藤秀二	最近の輸入発疹熱事例について	人と動物の共通感染症研究会ニュースレター	10	4-6	2011
Fujisawa T, Kadosaka T, Fujita H, <u>Ando S</u> , Takano A, Ogasawara Y, Kawabata H, Seishima M	<i>Rickettsia africae</i> Infection in a Japanese Traveler with many tick bites	Acta Dermato-Venerologica		doi: 10.2340/15555-1313	2011
成田雅, 鷓沼菜穂子, 伊藤文人, 佐藤憲行, 星野智祥, 井上実, 山本正悟, <u>安藤秀二</u> , 藤田博己	11月熱 福島県中南部におけるタテツツガムシ媒介性つつが虫病	日本内科学会誌	101	164-167	2012
Sugiura K, Sugiura N, Yagi T, Iguchi M, Ohno H, Miyazaki Y, Akiyama M.	Cryptococcal Cellulitis in a Patient with Bullous Pemphigoid.	Acta Derm Venereol			2012
Gyotoku H, Izumikawa K, Ikeda H, Takazono T, Morinaga Y, Nakamura S, Imamura Y, Nishino T, Miyazaki T, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Yasuoka A, Yaguchi T, Ohno H, Miyazaki Y, Kamei K, Kanda T, Kohno S.	A case of bronchial aspergillosis caused by <i>Aspergillus udagawae</i> and its mycological features.	Med Mycol.	50	631-636	2012
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
宮崎義継, 金子幸弘, 梅山 隆, 田辺公一, 大野秀明.	<i>Cryptococcus gattii</i> 感染症.	感染症	42:	172-175	2012
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
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,	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ーシスの1例	日本呼吸器学会雑誌、	49	443-448	2011
Ohno H, Ogata Y, Suguro H, Yokota S, Watanabe A, Kamei K, Yamagoe S, Ishida-Okawara A, Kaneko Y, <u>Horino A</u> , Yamane K, Tsuji T, Nagata N, Hasegawa H, Arakawa Y, Sata T, Miyazaki Y.	Young Japanese women after traveling to Southeast Asia	Intern Med	49 (5)	491-5	2010
<u>Makoto Kuroda</u> , Tsuyoshi Sekizuka, Fumiaki Shinya, Fumihiko Takeuchi, Takayuki Kanno, Tetsutaro Sata, Shigeyuki Asano.	Detection of a Possible Bioterrorism Agent, <i>Francisella</i> sp., in a clinical specimen using Next-generation Direct DNA Sequencing.	J Clin Microbiol.	50 (5)	1810-1812	2012
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
片野晴隆, 佐藤由子, 佐多徹太郎, 長谷川秀樹	病原体の同定. 病理解剖マニュアル	病理と臨床	30	269-277	2012
Katano H, Kano M, Nakamura T, Kanno T, Asanuma H, Sata T	A novel real-time PCR system for simultaneous detection of human viruses in clinical samples from patients with uncertain diagnoses	J Med Virol	83	322-330	2011

Matsui T, Takita E, Sato T, Aizawa M, Ki M, Kadoyama Y, Hirano K, Kinjo S, Asao H, Kawamoto K, Kariya H, Makino S, Hamabata T, Sawada K, Kato K.	Production of double repeated B subunit of Shiga toxin 2e at high levels in transgenic lettuce plants as vaccine material for porcine edema disease.	Transgenic Res.	20(4)	735-48	2011
Nakano M, Yamasaki E, Ichinose A, Shimohata T, Takahashi A, Akada-K. J, Nakamura K, Moss J, Hirayama T and Kurazono H	<i>Salmonella</i> enterotoxin, Stn, regulates membrane composition and integrity.	Dis Model Mech,	5(4)	515-21	2012
Zhang J, van Hung P, Hayashi M, Yoshida S, Ohkusu K, Ezaki T.	DnaJ sequences of <i>Bacillus cereus</i> strains isolated from outbreaks of hospital infection are highly similar to <i>Bacillus anthracis</i> .	Diagn Microbiol Infect Dis	70	307-315	2011
Yamada Y, Ohkusu K, Yanagihara M, Tsuneoka H, Ezaki T, Tsuboi J, Okabayashi H, Suwabe A.	Prosthetic valve endocarditis caused by <i>Bartonella quintana</i> in a patient during immunosuppressive therapies for collagen vascular diseases.	Diagn Microbiol Infect Dis	70	395-398	2011
Saito H, Iwamoto T, Ohkusu K, Otsuka Y, Akiyama Y, Sato S, Taguchi O, Sueyasu Y, Kawabe Y, Fujimoto H, Ezaki T. Butler R.	<i>Mycobacterium shinjukuense</i> sp. nov.; a slowly growing, nonchromogenic species isolated from human clinical specimens.	Int J Syst Evol Microbiol	61	1927-1932	2011
江崎孝行, 水野卓也, 林将大, 吉田滋, 張繼偉, 大楠清文	【新たなゲノムベースの感染症診断-開発の現状、応用と展望-】臨床所見から原因病原体を絞り込めない不明感染症の検査	化学療法の領域	29	2006-2020	2011
Oie S, Obayashi A, Yamasaki H, Furukawa H, Kenri T, Takahashi M, Kawamoto K, Makino S.	Disinfection methods for spores of <i>Bacillus atrophaeus</i> , <i>B. anthracis</i> , <i>Clostridium tetani</i> , <i>C. botulinum</i> and <i>C. difficile</i> .	Biol Pharm Bull.	34(8)	1325-9	2011
大楠清文, 江崎孝行.	遺伝子解析技術の新たな潮流と感染制御への適応	日本化学療法学雑誌	59	441-453	2011
Uchida M., Harada T., Enkhtuya J., Kusumoto A., Kobayashi Y., Chiba S., Shyaka A., Kawamoto K.	Protective effect of <i>Bacillus anthracis</i> surface protein EA1 against anthrax in mice.	Biochem Biophys Res Commun,	421(2)	323-8	2012
Okamoto M, Kyutoku Y, Sawada M, Clowney L, Watanabe E, Dan I, Kawamoto K.	Health numeracy in Japan: measures of basic numeracy account for framing bias in a highly numerate population.	BMC Medical Informatics and Decision Making.	12(1)	104	2012

Ezaki T, Hayashi M, Zhang J, Mizuno T, Natori T, Ohkusu K.	Role of Culture Collections in Disasters,	Journal of Disaster Research	7	768-774	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
大楠清文, 江崎孝行.	感染症診断における遺伝子解析技術の有用性.	小児科.	54(7)	1001-1010	2013
Sugiura Y, Hironaga M.	<i>Arthrographis kalrae</i> , a rare causal agent of onychomycosis, and its occurrence in natural and commercially available soils.	Med Mycol.	48	384-389	2010
Sato N, Sugiura Y, Nukuzuma S, Udagawa S, Tanaka, T.	Two rare contaminants, <i>Helicostylum pulchrum</i> and <i>Scopulariopsis flava</i> , found in a white natural cheese, and the effect of their presence.	Jpn J Fd Microbiol	30	15-20	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
安藤秀二	リケッチア	神谷茂	標準微生物学 第11版	医学書院	東京	2012	317-325
安藤秀二	病原体等の保存・保管と輸送	バイオセーフティ研究会	バイオセーフティの原理と実際	医学評論社	東京	2011	112-121
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