

**厚生労働科学研究費補助金**

**新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業  
(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)**

**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の確立、  
及び細胞培養痘そうワクチンの有効性、安全性に関する研究**

**平成 26 年度 総括・分担研究報告書**

**平成 27 年 3 月**

**研究代表者**

**倉根 一郎**

**(国立感染症研究所)**

# 目 次

## ・ 総括研究報告書（平成26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の確立、  
及び細胞培養痘そうワクチンの有効性、安全性に関する研究・・・・・・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 . ウイルス性特定病原体の鑑別診断法の開発・・・・・・19  
細胞培養弱毒生痘そうワクチンの特性解析（遺伝子機能解析）  
品質試験法に関する研究・・・・・・25  
研究分担者：森川 茂（国立感染症研究所 獣医科学部）
  
- 2 . バイオテロに使用される可能性のある真菌感染症の迅速診断法の確立・・・・・・35  
*Coccidioides*属および*Histoplasma*属のLAMP法による検出系の改良  
研究分担者：宮崎 義継（国立感染症研究所 真菌部）
  
- 3 . 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・・・・・・43  
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）
  
- 4 . 病原体の病理学的検出法の確立・・・・・・51  
研究分担者：中島 典子（国立感染症研究所 感染病理部）
  
- 5 . 病原体の電子顕微鏡学的迅速検出法の確立・・・・・・57  
痘そうワクチンの安全性評価における病理学的研究・・・・・・61  
研究分担者：永田 典代（国立感染症研究所 感染病理部）
  
- 6 . 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・・・・・・65  
研究分担者：倉園 久生（帯広畜産大学 動物・食品検査診断センター）

7 . 地方衛生研究所におけるバイオテロ対応に関する研究 . . . . .	75
研究分担者：小林 和夫（堺市衛生研究所）	
8 . 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 . . . . .	81
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）	
9 . 各医療機関のバイオテロ対策を支援するための方策 . . . . .	83
研究分担者：松本 哲哉（東京医科大学・微生物学分野）	
10 . ウイルス性出血熱の検査に関する研究 . . . . .	97
細胞培養弱毒生痘そうワクチンを土台とした組換えワクシニア ウイルス作製システムの改良 . . . . .	105
研究分担者：西條 政幸（国立感染症研究所 ウイルス第一部）	
11 . 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの疫学的有効性及び安全性評価に関する研究 . . . . .	111
研究分担者：金谷 泰宏（国立保健医療科学院 健康危機管理研究部）	
12 . 痘そうワクチン LC16m8 接種者における中和抗体持続に関する調査研究 . . . . .	117
研究分担者：横手 公幸（一般財団法人化学及血清療法研究所）	
<b>. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . .</b>	<b>123</b>

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業  
（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業））

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の確立、  
及び細胞培養痘そうワクチンの有効性、安全性に関する研究

研究代表者：倉根一郎（国立感染症研究所 副所長）

研究要旨：バイオテロに利用される可能性のある病原体等は感染し発症すれば非常に高い致死率を示す。バイオテロ対策として、病原体の早期検知法の確立と迅速診断システムの整備が必須である。また、早期検出により、感染拡大を防止し、社会的なパニックを防止する必要がある。本研究では、バイオテロの迅速な検出を可能とし、さらに感染防止策等の迅速な対応策の策定を可能とすることを目的として、1) 特定病原体等に対する遺伝子検出法、抗原抗体検出法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、網羅的病原体検出法、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) 地方衛生研究所におけるバイオテロ対応の現状について課題について、課題の抽出や解決策を探索した。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。さらに、危機管理対策として国家備蓄されている細胞培養弱毒生痘そうワクチン（LC16m8）を非特定の国民への緊急及び予防的使用を行う場合を想定して、安全性と有効性の検証するために動物を用いた評価系及び臨床疫学研究における有効性の評価系等を構築しデータを蓄積した。本研究により、バイオテロの迅速な検出が可能となり、感染防止策等の迅速な対応策の策定も可能となる。

研究分担者：

岩本愛吉：東京大学医科学研究所 教授

金谷泰宏：国立保健医療科学院 部長

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

小林和夫：堺市衛生研究所 所長

西條政幸：国立感染症研究所 部長

中島典子：国立感染症研究所 室長

永田典代：国立感染症研究所 室長

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  
横手公幸：化学及血清療法研究所 部長

#### A．研究目的

バイオテロは病原体等が散布されて患者が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。特に初期には全く病原体の予想がつかない可能性がないが、網羅的検出法は特異性等の検討がいまだ十分ではない。本研究の目標は以下の通りである。1)すでに確立されている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整備と標準化を行う。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、さらに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、関係機関への情報提供システムを確立する。5)近年バイオテロに最も使用される可能性のある病原体として天然痘ウイルスがあげられている。

その危機管理対策のひとつとして 1975 年に細胞培養痘そうワクチンとして製造承認を受けている細胞培養弱毒生痘そうワクチン(LC16m8 株)が備蓄されている。我が国における種痘廃止とともに、本ワクチンに関する研究はなされていなかった。本研究では LC16m8 ワクチンの有効性、安全性、その科学的基盤、製造における効率性、安定性、等を明らかにする。

#### B．研究方法

研究代表者、研究分担者 12 名の計 13 名によって行なわれた。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法の確立、6)痘そうワクチン LC16m8 の有効性、安全性に関する研究を中心に行った。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

ウイルス性出血熱病原体の鑑別検査法の開発

蚊媒介性感染ウイルスの迅速検査法の確立

真菌の迅速検査法の確立

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

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

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の確立

迅速電顕観察法の確立：電顕によ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の作成

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

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じた技術移転と検査ネットワークの確立。

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

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と維持、診断アルゴリズムの高度化 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(松本哲哉): 対象疾患の追加、医療機関の検査対応能力の評価

6) 痘そうワクチン LC16m8 の有効性、安全性に関する研究

痘そうウイルス迅速検出法の確立

動物を用いた有効性の評価系の構築とデータの蓄積

弱毒及び病原性などの確認のためのウイルスの特性解析

痘瘡ウイルスに対する中和抗体誘導能及び認識抗原エピトープ解析

長期間保存による安全性、有効性を含む安定性の確認

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) ウイルス性特定病原体の鑑別診断法の開発

エボラ出血熱のように急性期の血中ウイルス量の高い感染症では、ウイルス抗原検出をイムノクロマトで行うことでより簡便に患者の確定診断が可能になる。また、ウイルス中和抗体を効率よく誘導できれば治療用抗体としての利用も可能となる。このような観点から、ザイールエボラウイルスの膜糖タンパク質 (GP) の組換えバキュロウイルスを2種類作製した。一つは his タグ付 GP を昆虫細胞に発現する組換えバキュロウイルスで、もう一つは CAG プロモーターにより哺乳類細胞で GP を発現する組換えバキュロウイルスである。それぞれを昆虫細胞 Tn5 と哺乳類細胞 Vero に感染させて GP の発現を比較した結果、前者では Tn5 細胞でのみ GP が発現し、後者では Vero 細胞で GP が発現した。後者の Vero 細胞では preGP と GP1 思われるサイズの蛋白質が確認された。昆虫細胞では High mannose 型糖鎖まで複合型糖鎖修飾されないため、昆虫細胞と哺乳類細胞で発現された GP は分子量が異なった。これらを用いてマウス等の動物で GP 特異抗体の作製が可能となり、抗原検出用抗体としての応用が期待される

(2) ウイルス性出血熱の検査に関する研究

西アフリカで流行しているエボラウイルス「西アフリカ型」は分子系統上ザイールエボラウイルスに近縁であるものの、ザイールエボラウイルスそのものとは塩基配列の違いがある。本研究では、これまで国立

感染症研究所で整備されてきたエボラウイルス検出用 PCR プライマー、プローブが「西アフリカ型」に対応できるかどうか検討した。塩基配列の比較から NP 遺伝子をターゲットにしたコンベンショナル PCR 用プライマーは「西アフリカ型」を検出できると考えられた。一方、L 遺伝子をターゲットにしたリアルタイム PCR 用プライマー、プローブにいくつかの塩基配列の違いが認められた。「西アフリカ型」に完全に一致した配列のプローブを用いたリアルタイム PCR と従来のプローブを用いたリアルタイム PCR は同等の感度で「西アフリカ型」を検出可能であった。これらの結果から、従来のコンベンショナル PCR、リアルタイム PCR の両方で行うエボラウイルス検査で「西アフリカ型」の検出に対応できると考えられた。

(3) バイオテロの可能性のある真菌感染症の迅速診断法の確立：*Coccidioides* 属お *Histoplasma* 属の LAMP 法による検出系の改良

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属 (*Coccidioides immitis*, *C. posadasii*)、ヒストプラズマ属 (*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、培養を要しない検査技術の開発が望まれる。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。LAMP 法によるコクシジオイ

デスおよびヒストプラズマ DNA の高感度検出系の実用化を目指し、乾燥ポリメラーゼの有用性を検討し、菌体取り扱いマニュアル、プライマーセットおよび乾燥ポリメラーゼを使用した検査キットを作製して集団感染時に検査機関、医療機関に送付する準備を整えた。

2) 網羅的ウイルス検出法、網羅的細菌検出法、超高速ゲノム解読法の確立：

(1) 超高速病原体ゲノム解読システムの構築と包括的な核酸迅速診断法の確立：

炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) をターゲットとして研究を行った。*B. anthracis* の次世代シーケンス (next-generation sequencing: NGS) データをアップロードすると single nucleotide polymorphisms (SNPs) を抽出し、*B. anthracis* を含む *B. cereus* グループ中の系統的位相関係を推定するウェブアプリケーション GcoGSA-BA (Global core Genome SNP Analysis for *Bacillus anthracis*) を開発した。GcoGSA-BA はコアゲノム系統解析だけでなく、pX01、pX02 といった病原性を規定するプラスミドや pX01 上に存在する三つの炭疽菌毒素遺伝子 (lethal factor, LF; edema factor, EF; protective antigen, PA) を検出する機能も有しており、炭疽菌 (*B. anthracis* Ames Ancestor) ばかりでなく炭疽菌毒素遺伝子を例外的に保持している *B. cereus* G9241 の系統的位相関係も正しく推定し、更に炭疽菌毒素遺伝子を検出することが可能となった。

(2) 細菌性バイオテロに対する迅速同定法・診断法およびワクチンの開発：

細菌性バイオテロに焦点をあて、危険病原体およびその毒素の迅速同定法・診断法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した。また、植環境検体中、特にその検出が困難な土壌検体を用いて、危険病原体由来 DNA の検出に有用な核酸抽出法を開発した。炭疽菌に対する迅速診断法（核酸クロマト）と、市中呼吸器感染症の病原体スクリーニング用核酸クロマトへのテロ病原体をマウントした 2 種類の迅速類症鑑別法を開発した。

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ヌクレオチドプローブを用いた *in situ* 遺伝子検出系

バイオテロに使用された既知あるいは未知の病原体を病理組織中に検出する方法として、オリゴヌクレオチドプローブを用いた *in situ* hybridization 法がある。これまで開発した高感度で特異性の高い *in situ* hybridization-AT tailing (ISH-AT) 法と市販されている Z 型オリゴヌクレオチドプローブを用いた分岐 DNA-ISH 法である ViewRNA 法と RNAscope 法を比較検討した。標的核酸のコピー数が 100/細胞の場合は両者とも検出可能であり、プローブ作製までの日数、とコストパフォーマンスの面からも、ISH-AT 法を第 1 選択としてよいことが明らかとなった。

(2) 病原体の電子顕微鏡学的迅速検出法の確立：

バイオテロに使用される可能性のある病

原体等を中心とした電子顕微鏡を用いた迅速検出法の確立を目的とした。バイオテロに使用される可能性のある病原体等を中心として電子顕微鏡を用いた病原体の迅速検出法の確立を目的とする。ウイルス血症を引き起こすウイルス感染症を対象として、血中のウイルス粒子の電子顕微鏡学的検出法について検討し、手順を整理した。高ウイルス血症を引き起こす可能性のある主なウイルスの粒子の特徴と電子顕微鏡像まとめた。また、血液中のウイルス粒子の迅速検出法の標準手順を図にまとめた。不活化処理は、文献的に調査し、Koch 研究所および CDC の標準手順を考慮した結果、2%-4% グルタルアルデヒドもしくは 2% パラフォルムアルデヒド液で 30 分～2 時間室温固定 (200  $\mu$ l で十分) し、紫外線照射との組み合わせで行うこととした。

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：

地方衛生研究所（地衛研）におけるバイオテロ対応の現状と課題について、「1. 現行の国立感染症研究所（感染研）病原体検出マニュアル」、「2. 新規検査マニュアルの整備の必要性」、「3. 地方衛生研究所全国協議会 6 支部の感染症対策部会を中核として支部内連携構築、支部内連携から広域・全国ネットワークの構築」、「4. 地衛研と感染研の連携強化」の視点から、課題の抽出や解決策を探索した。その結果、多くの課題が抽出された。これら課題の解決には、地衛研、各支部内、支部間や地方衛生研究所全国協議会、感染研や厚生労働省の理解や連携が重要である。加えて、地衛

研の厳しい予算や人員状況、機能低下、人材育成、技術継承などの課題が抽出された。課題の克服には各地衛研のみならず、地方自治体や国レベルの連携、理解や支援（財政、人的、技術、情報など）が望まれる。

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) バイオテロ対応ホームページのアップデートと治療法の確立

ホームページに掲載したバイオテロ関連疾患についての情報を見直し、まず総論部分の改訂を行った。具体的には感染症法、施行令、施行規則の改正を反映させた。また、2014年に約70年ぶりに国内発生したデング熱に関する新知見を追加した。国内発生約160人の状況、迅速キットの現状などについて記載した。さらに西アフリカでのエボラ出血熱のアウトブレイクに関する情報を加えた。2015年始めまでの発生状況、臨床症状、致死率などを掲載した。

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も重要な課題である。そこで今年度は、国内の施設で検査可能な疾患の現状把握を目的として、地方衛生研究所に対して状況調査(アンケート)を行った。全国79施設のうち、2015年1月末までに78施設から回答を得た。一部の病原体に対する検査体制が未整備であることが示唆された。

(2) 各医療機関のバイオテロ対策を支援するための方策：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、まず炭疽菌を取り上げ、ガイドラインを作成した。ガイドラインの項目とポイントは下記のとおりである：病原体の基礎知識、疾患の基礎知識、バイオテロのリスク、感染対策、危機対応フローチャート。事例として単独患者の重症肺炎、事例として複数例の重症肺炎、事例として複数の重症肺炎に加えて、皮膚炭疽が疑わしい症例も加わった事例、を取り上げて、バイオテロを想定した場合の考察や医師など各職種別にみた取るべき対応について解説を行った。

6. 痘そうワクチン LC16m8 の有効性、安全性に関する研究

(1) 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの特性解析、品質試験法に関する研究

細胞培養痘そうワクチンの製造承認株である LC16m8 株は、Lister 株から低温馴化により LC16 株、LC16m0 株を經由して樹立された安全性の高いワクチン株である。しかし、LC16m8 株を継代するとプラークサイズのやや大きい LC16m0 型 (medium size plaque; MSP) のウイルスが出現する。MSP は B5R の一塩基欠失を相補する変異ウイルスであり、その変異のパターンが複数あることが分かっている。これまでにバイオアッセイで得られる MSP 情報と同等の成績が次世代シーケンス (NGS) 解析により得られることを示した。NGS 解析は取得データの処理に比較的時間を要することから、これまでの MSP の変異パターン解析で得られた主要な MSP を定量的に検出可能な PCR 法を開発することを試みた。その結果、MSP 変異配列を識別する MGB-probe を用いるリアルタイム PCR では LC16m8 株と特定の MSP

を鑑別できるが、LC16m8 株遺伝子が大量に存在すると、MSP 変異配列特異的 MGB-probe の結合に阻害的効果が生じ、少量の MSP を検出できなくなった。一方、MSP の遺伝子変異特異的配列を 3' 末端とする primer を用いた PCR でも LC16m8 株と特定の MSP を識別できた。

#### (2) 痘そうワクチンの安全性評価における病理学的研究

オルソポックスウイルス感染症の重症化の宿主側要因を明らかにすることを目的とし、サル痘ウイルスのマウス感染実験系の基礎検討を開始した。動物は、日本エスエルシーより購入した BALB/c マウス(接種時、14 週齢メス)を用いた。ウイルスは、Monkeypox virus の Liberia 株および Zr-599 株を用いた。体重変化、皮膚所見、臨床症状の点で、いずれの株も皮下接種後の BALB/c マウスに対して明らかな病原性を示さなかった。接種 7 日目の末梢血中の白血球数は、対照群に比べてウイルス接種群で有意に少なく、リンパ球数と顆粒球数の減少によるものであった。病理学的解剖を行ったところ、Zr-599 株接種群の脾の軽度の腫大がみられ、光顕的に T 細胞領域の軽度の拡大が確認された(データは示さない)。その他の腹腔、胸腔内臓器に著変は認められなかった。

#### (3) 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの疫学的有効性及び安全性評価に関する研究

これまでの研究の中で、LC16m8 が既存の種痘免疫に対してブーストをかけるとともに既接種者の B5R 抗体の産生を促すことについて検証を行った。一方で、初種痘にお

ける B5R に対する抗体誘導は既接種群と比べて弱いことが指摘されている。本年度はプロテインアレイを用いて LC16m8 により誘導される抗体プロファイルを解析し、これまでに LC16m8 の有効性を支持する結果が得られた。B5R の抗原性について解析を行い、LC16m8 の B5R タンパク質の抗体誘導能を確認した。

#### (4) 痘そうワクチン LC16m8 接種者における中和抗体持続に関する調査研究

LC16m8 を 1 回接種された健康成人の約 4 年後の抗体陽性率は初種痘群において低下傾向が認められた。Proteome Microarray Chip を用いたプロテオミク解析を行った結果、種痘 4 年後まで抗体陽性であった被験者群において、種痘前と比較して種痘 1 ~ 7 か月後の蛍光強度が有意に高かった抗原は 6 種類あり、そのうち A27L, A10L は種痘 4 年後まで有意に高かった。また、種痘 4 年後で陰性であった被験者群において、種痘前と比較して種痘 1 ~ 7 か月後の蛍光強度が有意に高かった抗原は 7 種類あり、そのうち A11R, A34R, D8L は種痘 4 年後では有意に低下した。

#### (5) 細胞培養弱毒生痘そうワクチンを土台とした組換えワクシニアウイルス作製システムの改良

細胞培養痘そうワクチンの製造承認株である LC16m8 株は、Lister 株から低温馴化により LC16 株、LC16m0 株を経由して樹立された安全性の非常に高いワクチン株である。近年ではこの長所を生かして、他の感染症へのワクチンとしての応用もされはじめている。に我々は相同組換えを利用する、

LC16 系統のワクシニアウイルスを土台とした組換えワクシニアウイルス作製システムを構築している。当システムは、簡便かつ高効率に recVac を作製可能であり、且つ最終的に完成したウイルスゲノム内からはその後の研究に不必要な recVac 選択カセット（薬剤耐性遺伝子と蛍光タンパク質を含む遺伝子カセット）を取り除くことが可能である。現時点までの方法ではこの recVac 選択カセットはこれを保持するウイルスを選択薬剤存在下で選択する際の、正の選択のみに使用している。このカセットをウイルスゲノムから取り除く際には選択薬剤非存在下で、相同組換えにより偶然脱落するのを期待するしか無く、そこが律速にもなり得た。本年度は選択薬剤として 2-チオキサントンを用いて、recVac 選択カセットが脱落することを人為的に促進する「負の選択システム」を組み込んだ改良版 recVac 作製システムを確立した。

#### 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、患者検体を用いての迅速検査、病原体等の分離同定、および血清抗体検査、あるいは時に環境検体を用いた病原体検出が必要である。

迅速診断・同定法の基盤整備は、バイオテロの脅威に対抗する上で必須である。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十分検証されているとはいえない。バイオテロの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。特に初期には全く病原体の予想がつかない可能性がないが、網羅的検出法は特異性等の検討がいまだ十分ではない。

本研究では、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。具体的には、1) すでに確立されている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整備と標準化を行う。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) さらに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、関係機関への情報提供システムを確立する、の5項目を大きな目標とした。

また、近年バイオテロに最も使用される可能性のある病原体として天然痘ウイルスがあげられている。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

盤を確立するとともに天然痘に対する防御対策も確立する。このような総合的取り組みはほとんどなされておらず独創的である。その危機管理対策のひとつとして 1975 年に細胞培養痘そうワクチンとして製造承認を受けている細胞培養弱毒生痘そうワクチン (LC16m8 株) が備蓄されている。我が国における種痘廃止とともに、本ワクチンに関する研究はなされていなかった。本研究では LC16m8 ワクチンの有効性、安全性、その科学的基盤、製造における効率性、安定性、等を明らかにした。

天然痘ウイルス等バイオテロに利用される可能性のある病原体等や感染症は感染し発症すれば非常に高い致死率を示すものが多い。さらに、これらの病原体は、通常きわめて稀であり、通常の病院や検査機関では確定診断が困難であることから、確定検査が遅れる可能性がある。従って、バイオテロ対策としては、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。さらに、早期に感染症対策をとり社会的なパニックを防止するためには、病原体の早期検出を行う必要がある。特に、国内外において最も危惧されている天然痘に対して我が国で開発された LC18m8 ワクチンに関してのデータが整備され防御対策の基盤が確立される。LC16m8 ワクチンは国際的にも注目されており、この研究により WHO 等国際的貢献に資する重要な知見が得られるものと考えられる。本研究により、バイオテロの迅速な検出が可能となり、感染防止策等の迅速な対応策の策定が可能となる。また、国民のバイオテロに対する不安が軽減され、さらにバイオテロ事件および模倣事件に対する抑止効果も期待できる。

## 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、1) 特定病原体等に対する遺伝子検出法、抗原抗体検出法の迅速診断法の確立と標準化、2) 網羅的検出法として、網羅的病原体検出法、超高速ゲノム解読法の確立と、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、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、4) 地方衛生研究所におけるバイオテロ対応の現状について課題の抽出や解決策の、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、6) 危機管理対策として国家備蓄されている細胞培養弱毒生痘そうワクチン (LC16m8) の安全性と有効性の検証するために動物を用いた評価系及び臨床疫学研究における有効性の評価、を行った。

## F . 健康危険情報

特になし

## G . 研究発表

### 1. 論文発表

#### 1) 英文発表

Paola Katrina G. Ching, Vikki Carr de los Reyes, Maria Nemia Sucaldito, Enrique Tayag, Alah Baby Columna-Vingno, Fedelino F. Malbas, Gilbert C. Bolo, James J. Sejvar, Debbie Eagles, Geoffrey Playford, Erica Dueger, Yoshihiro Kaku,



- Shigeru Morikawa, Makoto Kuroda, Glenn A. Marsh, Sam McCullough, and A. Ruth Foxwell. Outbreak of Henipavirus Infection, Philippines. *Emerg Infect Dis.* 2015, 21(5), 21(2):328-31. DOI: 10.3201/eid2102.141433
- Shimajima M, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Fukuma A, Taniguchi S, Suda Y, Maeda K, Takahashi T, Morikawa S, Saijo M. Effects of ribavirin on severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in vitro. *Jpn J Infect Dis.* 2014;67(6):423-7.
- David Nadeba Bukbuk, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Satoshi Taniguchi, Koichiro Iha, Aiko Fukuma, Masayuki Shimajima, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo, Francis Kasolo, Saka Saheed Baba. Development and Validation of Serological Assays for Viral Hemorrhagic Fevers and Determination of Prevalence of Rift Valley Fever in Borno State, Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2014 Oct 24. pii: tru163. PMID: 25344695
- 10) Naoko Iwata-Yoshikawa, Akihiko Uda, Tadaki Suzuki, Yasuko Tsunetsugu-Yokota, Yuko Sato, Shigeru Morikawa, Masato Tashiro, Tetsutaro Sata, Hideki Hasegawa and Noriyo Nagata. Effects of Toll-Like Receptor Stimulation on Eosinophilic Infiltration in Lungs of BALB/c Mice Immunized with UV-Inactivated Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus Vaccine. *J. Virol.* 2014, 88(15):8597-8614. DOI: 10.1128/JVI.00983-14.
- Tani H, Iha K, Shimajima M, Fukushi S, Taniguchi S, Yoshikawa T, Kawaoka Y, Nakasone N, Ninomiya H, Saijo M, Morikawa S. Analysis of Lujo virus cell entry using pseudotype vesicular stomatitis virus. *J Virol.* 2014, 88(13):7317-7330. DOI:10.1128/JVI.00512-14.
- Uda A, Sekizuka T, Tanabayashi K, Fujita O, Kuroda M, Hotta A, Sugiura N, Sharma N, Morikawa S, Yamada A. Role of Pathogenicity Determinant Protein C (PdpC) in Determining the Virulence of the *Francisella tularensis* Subspecies *tularensis* SCHU. *PLoS One.* 2014 Feb 18;9(2):e89075.
- Neekun Sharma, Akitoyo Hotta, Yoshie Yamamoto, Akihiko Uda, Osamu Fujita, Toshio Mizoguchi, Junji Shindo, Chun-Ho Park, Noboru Kudo, Hitoshi Hatai, Toshifumi Oyamada, Akio Yamada, Shigeru Morikawa, and Kiyoshi Tanabayashi. Serosurveillance for *Francisella tularensis* among wild animals in Japan using a newly developed competitive ELISA. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases,* 2014 Apr;14(4):234-9
- Saraya T, Tanabe K, Araki K, Yonetani S, Makino H, Watanabe T, Tsujimoto N, Takata

- S, Kurai D, Ishii H, Miyazaki Y, Takizawa H, Goto H. Breakthrough invasive *Candida glabrata* in patients on micafungin: a novel FKS gene conversion correlated with sequential elevation of MIC. *Journal of Clinical Microbiology*. 52(7):2709-2712, 2014.
- Seki M, Ohno H, Gotoh K, Motooka DNAkamura S, Iida T, Miyazaki Y, Tomono K. Allergic bronchopulmonary mycosis due to co-infection with *Aspergillus fumigatus* and *Schizophyllum commune*. *IDCases*. 1:5-8, 2014.
- Kenri T, Sekizuka T, Yamamoto A, Iwaki M, Komiya T, Hatakeyama T, Nakajima H, Takahashi M, Kuroda M, Shibayama K. Genetic characterization and comparison of *Clostridium botulinum* isolates from botulism cases in Japan between 2006 and 2011. *Appl Environ Microbiol*. 2014 Nov;80(22):6954-64. doi: 10.1128/AEM.02134-14. Epub 2014 Sep 5. PubMed PMID: 25192986; PubMed Central PMCID: PMC4249013.
- Yamashita A, Sekizuka T, Kuroda M. GcoGSA-BA: A Global Core Genome SNP Analysis for *Bacillus anthracis*. *Biosecur Bioterror*. Volume 13, Number 1, 2015. DOI: 10.1089/hs.2014.0076 in press.
- 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(6):816-27, 2014
- Koma T, Yoshimatsu K, Nagata N, Sato Y, Shimizu K, Yasuda SP, Amada T, Nishio S, Hasegawa H, Arikawa J. Neutrophil depletion suppresses pulmonary vascular hyperpermeability and occurrence of pulmonary edema caused by hantavirus infection in C.B-17 SCID mice. *J Virol*. 2014. 88:7178-7188
- Nagata N, Saijo M, Kataoka M, Ami Y, Suzaki Y, Sato Y, Iwata-Yoshikawa N, Ogata M, Kurane I, Morikawa S, Sata T, Hasegawa H. Pathogenesis of fulminant monkeypox with bacterial sepsis after experimental infection with West African monkeypox virus in a cynomolgus monkey. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014. 7:4359-4370
- Yoshikawa T, Fukushi S, Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Toda S, Shimazu Y, Yano K,

Morimitsu T, Ando K, Yoshikawa A, Kan M, Kato N, Motoya T, Kuzuguchi T, Nishino Y, Osako H, Yumisashi T, Kida K, Suzuki F, Takimoto H, Kitamoto H, Maeda K, Takahashi T, Yamagishi T, Oishi K, Morikawa S, Saijo M, Shimojima M. Sensitive and specific PCR systems for the detection of both Chinese and Japanese severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strains, and the prediction of the patient survival based on the viral load. *J Clin Microbiol.* 52(9):3325-3333, 2014.

Hiroyuki Yokote, Yasuhiko Shinmura, Tomomi Kanehara, Shinichi Maruno, Masahiko Kuranaga, Hajime Matsui and So Hashizume. Safety of attenuated smallpox vaccine LC16m8 in immunodeficient mice. *Clin. Vaccine Immunol.* 2014, 21(9):1261-66

## 2) 和文論文

梅山 隆, 宮崎義継. 侵襲性カンジダ症の診断～血清診断～遺伝子診断. . 侵襲性カンジダ症. 115-117, 2014 年, 医薬ジャーナル社.

宮崎義継, 金子幸弘, 樽本憲人. V. 感染症検査・真菌. パーフェクトガイド検査値事典[第2版]. 477-481, 2014 年, 総合医学社.

梅山 隆, 大野秀明, 宮崎義継. 真菌症～よく目にする真菌症から今後注意すべき真菌症まで-Aspergillus: 病態と抗原価の関連. *感染症内科.* 2(6):575-580, 2014 年.

金子幸弘, 浦井 誠, 宮崎義継. III 診断・治療法から見た大切な真菌症、4 治療薬の選択と投与. 目で見る真菌と真菌症. p192-202, 2014 年, 医薬ジャーナル社, 大阪.

河野 茂, 亀井克彦, 二木芳人, 宮崎義継. 座談会: 深在性真菌症の診断・治療ガイドラインを読み解く. *呼吸.* 33(5):435-43, 2014 年.

大野秀明, 宮崎義継. 日本にも現れたクリプトコックス・ガッティ. *日経サイエンス.* 44(5):76p76, 2014 年, 日本経済新聞出版社, 東京.

宮崎義継, 砂川富正, 大石和徳. ミニ特集: 病原体サーベイランス体制とその利用、国立感染症研究所の立場から. *小児科.* 55(4):403-6, 2014 年.

浦井 誠, 金子幸弘, 宮崎義継. 深在性真菌症における治療薬の選択の変化 ガイドライン改訂から見えてくる今後の治療展望. どう変わり、どう攻める? 深在性真菌症の新しい治療. *感染と抗菌薬.* 1:5-13, 2014 年.

浦井 誠, 金子幸弘, 宮崎義継. どう変わり、どう攻める? 深在性真菌症の新しい治療: 深在性真菌症における治療薬の選択の変化 ガイドライン改訂から見えてくる今後の治療展望. *感染と抗菌薬.* 17(1):5-13, 2014 年.

中島典子、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹：ウイルス性肺炎．病理と臨床 32：1146-1153, 2014

中島典子：オリゴヌクレオチドプローブを用いた新しい in situ ハイブリダイゼーション法．呼吸 33：152-159, 2014

高橋健太、鈴木忠樹、中島典子、飛梅 実、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹：脳炎・脳症の病理 Neuroinfection．神経感染症 19:32-39, 2014

小林和夫．2014．細菌および真菌による呼吸器感染症( § 9・2・1 ).病原微生物学 基礎と臨床( 荒川宣親、神谷 茂、柳 雄介編) 東京：東京化学同人 .239-244 .ISBN: 978-4-8079-0827-1

## 2 . 学会等発表

### 1 ) 国際学会

Shigeru Morikawa, Masanobu Kimura, Shuetsu Fukushi, Aiko Fukuma, Yoshihiro Kaku, Unsil Paku, Hideki Tani, Tomoyuki Yoshikawa, Koichi Imaoka, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Ken Maeda. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in domestic and wild animals in Japan. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014

Aiko Fukuma, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Satoshi Taniguchi, Momoko Ogata, Masayuki Shimojima, Shigeru Morikawa, Masayuki

Saijo. Development of IFA and ELISA to detect antibodies against SFTSV. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014

Hideki Tani, Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushi, Tomoki Yoshikawa, Aiko Fukuma, Satoshi Taniguchi, Momoko Ogata, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. Analyses of cell entry of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus using pseudotype vesicular stomatitis virus system. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014.

Akihiko Uda, Hiroki Kawabata, Shuetsu Fukushi, Yoshiharu Kaku, Masayuki Shimojima, Shuji Ando, Ken Maeda, Hiromi Fujita, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa, Tomoyuki Yoshikawa, Aya Niikura, Sawabe Kyoko. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in ticks in Japan. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014.

Yu Ikeyama, Satoru Arai, Bazartseren Boldgiv, Bazartseren Boldbaatar, Kazuko Araki, Hiroshi Satoh, Keiko Tanaka-Taya, Shigeru Morikawa, Richard Yanagihara, Kazunori Oishi. Co-circulation of two distinct divergent hantaviruses in Sorex species in Mongolia. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014

Shigeru Morikawa, Akihiko Uda, Masanobu Kimura, Kawabata, Hiroki, Shuetsu Fukushi, Aiko Fukuma, Yoshihiro Kaku, Unsil Paku, Hideki Tani, Tomoyuki Yoshikawa, Aya Niikura, Shuji Ando, Sawabe Kyoko, Hiromi Fujita, Koichi Imaoka, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Ken Maeda. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in animals and ticks in Japan. The 10th China-Japan International Conference of Virology, Changchun, China, Aug25-28 2014.

Kenri T, Sekizuka T, Yamamoto A, Iwaki M, Takahashi M, Kuroda M, Shibayama K. Whole genome single-nucleotide polymorphism (SNP) Analysis of Clostridium botulinum isolates from botulism cases in Japan. 51th Interagency Botulism Research Coordinating Committee (IBRCC 2014), Philaderphia PA, USA. October 26-29, 2014.

Noriko Nakajima, Yuko Sato, Hideki Hasegawa, Hoang Ngoc Thach, Nguyen Trung Thuy, Tran Minh Dien, Nguyen Thanh Liem, Shoji Kawachi, Kazuo Suzuki Pathological study of Severe ARDS cases in NHP-Hanoi International symposium and Teikyo-Harvard program (東京) 2014

Fukuma A, Fukushi S, Taniguchi S, Tani H, Yoshikawa T, Suzuki T, Hasegawa H, Saijo M, Shimojima M. Development of

antigen-capture ELISA for the detection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus nucleoprotein. The 10th China-Japan International Conference of Virology. Changchun, China. (2014. 08).

Paul N. Hudson, V. Olson, S. Smith, Z. Reed, A. Kondas, W. Davidson, H. Yokote, M. Saijo, S. Morikawa, I. Kurane, I. Damon. Assessment of the neutralizing efficacy of serum from Lc16m8-vaccinated individuals against two variola virus strains. Efficacy of serum from Lc16m8-vaccinated individuals against two variola virus strains. 2014 International Poxvirus, Asfarvirus & Iridovirus Conference. Victoria, Canada (2014, 09)

## 2) 国内学会

堀田明豊, 木村昌伸, 中村幸子, 片山敦司, 中下留美子, 坪田敏男, 猪島康雄, 鈴木道雄, 今岡浩一, 棚林清, 藤田修, 山本美江, 宇田晶彦, 森川茂. 2007年以前の国内野生動物における重症熱性血小板減少症候群ウイルス (SF TSV) に対する抗体調査. 第157回日本獣医学学会学術集会, 北海道, 2014年9月.

森川茂, 木村昌伸, 堀田明豊, 加来義浩, 朴ウンシル, 鈴木道雄, 野口章, 井上智, 今岡浩一, 前田健. 「野生のシカにおけるSFTSウイルス抗体調査」第157回日本獣医学学会学術集会, 北海道, 2014年9月9日-12日

加来義浩, 奥谷晶子, 河合康洋, 野口章, 濱本紀子, 梁瀬徹, 加藤友子, 新井智, 井

上智、森川茂. 「国内で分離された未分類のラブドウイルスの遺伝学的解析」第157回日本獣医学会学術集会、2014年9月9日-12日

森川茂、朴 ウンシル、今岡 浩一、前田健、宇田 晶彦. 「SFTS ウイルスの生活環における野生のシカの役割」 第62回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014年11月10-12日

西條政幸、吉河智城、福士秀悦、谷英樹、福間藍子、谷口怜、須田遊人、Harpal Singh、前田健、高橋徹、森川茂、下島昌幸. 「重症熱性血小板減少症候群ウイルスの分子系統学的特徴とその地理的分布」 第62回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014年11月10-12日

谷英樹、谷口怜、福間藍子、福士秀悦、森川茂、下島昌幸、西條政幸. 「重症熱性血小板減少症候群ウイルスGP の細胞融合能と25-hydroxycholesterol による感染阻害効果」 第62回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014年11月10-12日

金城雄樹、上野圭吾、浦井 誠、金子幸弘、大久保陽一郎、清水公德、大野秀明、亀井克彦、川本 進、澁谷和俊、宮崎義継. シンポジウム 3 病原性真菌の感染成立機構クリプトコックスの莢膜多糖による免疫回避機構の解析及びその制御法の開発. 第58回日本医真菌学会総会. 11月1-2日, 2014年, 横浜.

梅山 隆, 山越 智, 田辺公一, 名木 稔,

大野秀明, 宮崎義継. アスペルギルスの抗真菌薬耐性. 第58回日本医真菌学会総会・学術集会. 11月1-2日, 2014年, 横浜.

壇辻百合香, 大野秀明, 梅山 隆, 上野圭吾, 大久保陽一郎, 田辺公一, 名木 稔, 山越 智, 金城雄樹, 杉田 隆, 澁谷和利, 宮崎義継. マクロファージの貪食を指標とした *Cryptococcus gattii* 感染病態の評価. 第58回日本医真菌学会総会・学術集会. 11月1-2日, 2014年, 横浜.

上野圭吾, 金城雄樹, 大久保陽一郎, 清水公德, 金子幸弘, 浦井 誠, 川本 進, 亀井克彦, 大野秀明, 澁谷和俊, 宮崎義継. 高病原性 *Cryptococcus gattii* の感染防衛に寄与する樹状細胞ワクチンの作用. 第58回日本医真菌学会総会. 11月1-2日, 2014年, 横浜.

浦井 誠, 金子幸弘, 上野圭吾, 田辺公一, 梅山 隆, 山越 智, 金城雄樹, 大野秀明, 杉田 隆, 宮崎義継. 高病原性 *Cryptococcus gattii* の莢膜多糖成分が免疫細胞に及ぼす影響. 第58回日本医真菌学会総会. 11月1-2日, 2014年, 横浜.

上野圭吾, 金城雄樹, 大久保陽一郎, 浦井 誠, 金子幸弘, 大野秀明, 亀井克彦, 澁谷和俊, 宮崎義継. 高病原性 *Cryptococcus gattii* の感染防衛に寄与する樹状細胞ワクチン. 第63回日本感染症学会東日本地方学術集会. 10月29-31日, 2014年, 東京.

本川奈々, 福田雄一, 今村圭文, 宮崎泰可, 泉川公一, 大野秀明, 柳原克紀, 宮崎義継,

早田 宏, 田代隆良, 河野 茂. 肺アスペルギローマとの鑑別が困難であった *Pseudallescheria boydii* による肺菌球症の 1 例. 第 62 回日本化学療法学会西日本支部総会・第 57 回日本感染症学会中日本地方会学術集会・第 84 回日本感染症学会西日本地方会学術集会 合同開催. 10 月 23 日-25 日, 2014 年, 岡山.

上野 圭吾, 大久保陽一郎, 清水公德, 金子幸弘, 浦井 誠, 水口裕紀, 奈良拓也, 川本 進, 大野秀明, 澁谷和俊, 宮崎義継, 金城雄樹. 高病原性クリプトコックス症に対する樹状細胞ワクチンの効果. 第 25 回日本生体防御学会学術総会. 7 月 9-11 日, 2014 年, 仙台.

田辺公一, 大野秀明, 名木 稔, 浦井 誠, 金子幸弘, 梅山 隆, 山越 智, 荒木光二, 皿谷 健, 宮崎義継. ミカファンギン耐性 *Candida glabrata* 株の *in vitro* 性状解析. 第 35 回関東医真菌懇話会. 6 月 7 日, 2014 年, 東京.

田辺公一, 大野秀明, 名木 稔, 浦井 誠, 金子幸弘, 梅山 隆, 山越 智, 知花博治, 亀井克彦, 宮崎義継. カンジダ属の抗真菌薬感受性の変貌. 第 88 回日本感染症学会学術講演会第 62 回日本化学療法学会総会合同学会. 6 月 18-20 日, 2014 年, 博多.

浦井 誠, 金子幸弘, 田辺公一, 梅山 隆, 山越 智, 金城雄樹, 大野秀明, 杉田 隆, 宮崎義継. 高病原性 *Cryptococcus gattii* 由来莢膜多糖の免疫細胞に及ぼす影響. 第 88 回日本感染症学会学術講演会第 62 回日

本化学療法学会総会合同学会. 6 月 18-20 日, 2014 年, 博多.

山下明史, 関塚剛, 黒田誠. GcoGSA-BA NGS データから炭疽菌のコアゲノム系統解析を行うウェブアプリケーション. 第 88 回日本細菌学会総会 岐阜市 平成 27 年 3 月 26-28 日 (ポスター発表)

長谷川秀樹, 亀井敏昭, 高橋 徹, 鈴木忠樹, 片野晴隆, 中島典子, 森川 茂, 西條政幸, 倉田 毅: 日本国内で発生した重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) の病理解析. 第 103 回日本病理学会総会 (広島) 2014

岩田 奈織子, 福士 秀悦, 福間 藍子, 鈴木忠樹, 竹田 誠, 田代 真人, 長谷川 秀樹, 永田 典代. 中東呼吸器症候群コロナウイルスに対するマウスおよびラットの感受性について. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 2014 年 11 月

福間藍子, 福士秀悦, 吉河智城, 鈴木忠樹, 谷英樹, 谷口怜, 下島昌幸, 西條政幸. SFTS ウイルスの核蛋白質に対するモノクローナル抗体の作製と抗原検出 ELISA への応用. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11).

西條政幸, 吉河智城, 福士秀悦, 谷英樹, 福間藍子, 谷口怜, 須田遊人, Harpal Singh, 前田健, 高橋徹, 森川茂, 下島昌幸. 重症熱性血小板減少症候群ウイルスの分子系統学的特徴とその地理的分布. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜 (2014. 11)..

吉河智城，福士秀悦，谷英樹，福間藍子，  
谷口怜，須田遊人，Harpal Singh，江川和  
孝，下島昌幸，森川茂，西條政幸．ワクシ  
ニアウイルス LC16m8 株を土台とした組換  
えワクシニアウイルス作出システムの確立．  
第 62 回日本ウイルス学会学術集会， 横浜  
(2014.11)

江藤亜紀子、齋藤智也、西山靖将、横手公  
幸、金谷泰宏．種痘による長期免疫に寄与  
する抗原の同定および LC16m8 株接種に対  
する影響についての解析．第 18 回ワクチ  
ン学会学術集会；2014 年 12 月；福岡市

丸野真一，金原知美，新村靖彦，横手公幸，  
齋藤智也，橋爪壮．国産第三世代痘そうワ  
クチン LC16m8 の WHO 推奨．第 18 回日本ワ  
クチン学会学術集会 福岡(2014.12)

1．特許取得

なし

2．実用新案登録

なし

3．その他

なし



分担研究報告書

ウイルス性特定病原体の鑑別診断法の開発

研究分担者：森川茂（国立感染症研究所 獣医科学部部長）

研究協力者：朴ウンシル（同、獣医科学部）、福土秀悦、吉河智城、谷英樹、谷口怜、下島昌幸、西條政幸（国立感染症研究所ウイルス第一部）

研究要旨：昨年、これまでにない規模のエボラ出血熱の流行が西アフリカで発生し、平成27年2月時点でも未だ終息していない。アフリカでのエボラ出血熱患者の確定診断には RT-PCR による遺伝子診断が行われている。これらは、欧米等の支援によって設置されたラボでのみ実施可能である。エボラ出血熱のように急性期の血中ウイルス量の高い感染症では、ウイルス抗原検出をイムノクロマトで行うことでより簡便に患者の確定診断が可能になる。また、ウイルス中和抗体を効率よく誘導できれば治療用抗体としての利用も可能となる。本研究では、このような観点から、ザイールエボラウイルスの膜糖タンパク質 (GP)の組換えバキュロウイルスを2種類作製した。一つは his タグ付 GP を昆虫細胞に発現する組換えバキュロウイルスで、もう一つは CAG プロモーターにより哺乳類細胞で GP を発現する組換えバキュロウイルスである。それぞれを昆虫細胞 Tn5 と哺乳類細胞 Vero に感染させて GP の発現を比較した結果、前者では Tn5 細胞でのみ GP が発現し、後者では Vero 細胞で GP が発現した。後者の Vero 細胞では preGP と GP1 と思われるサイズの蛋白質が確認された。昆虫細胞では High mannose 型糖鎖まで複合型糖鎖修飾されないため、昆虫細胞と哺乳類細胞で発現された GP は分子量が異なった。これらを用いてマウス等の動物で GP 特異抗体の作製が可能となり、抗原検出用抗体としての応用が期待される。

A 研究目的

昨年、西アフリカにおけるエボラ出血熱の大流行が問題となったが、平成27年2月時点で未だ終息していない。これまで、BSL病原体が取り扱えない日本では、RT-PCRによる遺伝子検出、ウイルス核蛋白質(NP)単クローン抗体を用いた抗原検出法、IgM, IgG抗体検出法、シュードタイプ VSVによる中和抗体検査法などが開発されている。これらの検査法は、アフリカからの帰国者の疑い症例の実験室検査等に実際に用いられている。

一方、アフリカでのエボラ出血熱患者の確定診断にはリアルタイムRT-PCRによる遺伝子診断が行われている。これらは、欧米等の支援によって設置されたラボでのみ実施可能であり、疑い患者検体を検査ラボまで輸送して対応している。エボ

ラ出血熱のように急性期の血中ウイルス量が非常に高い感染症では、ウイルス抗原検出をイムノクロマトで行うことでより簡便に患者の確定診断が可能になる。また、ウイルス中和抗体を効率よく誘導できれば治療用抗体としての利用も可能となる。本研究では、このような観点から、ザイールエボラウイルスの膜糖タンパク質 (GP)を効率よく発現する組換えバキュロウイルスを2種類作製する。用いるプロモーターによりエボラウイルスGPを昆虫細胞で発現する組換えバキュロウイルスとCAG プロモーターにより哺乳類細胞で GPを発現する組換えバキュロウイルスを作製した。これらを用いて、エボラウイルスGP特異的抗体を簡便に作製し、検査法、中和抗体作製を行うことを目的とする。

## B 研究方法

### 1) 組換えバキュロウイルス：

ポリヘドリンプロモーターによりエボラウイルス GP 遺伝子を発現する組換えバキュロウイルス(Ac-his-EBOZ-GP)と CAG プロモーターによりエボラウイルス GP 遺伝子を発現する組換えバキュロウイルス(AcCAG-EBOZ-GP)を作製した(図1)。それぞれの組換えウイルスは、Tn5 細胞で培養しストックウイルス(力価  $2 \times 10^7$  /mL)を作製した。

### 2) 昆虫細胞と哺乳類細胞でのエボラウイルス GP の発現：

抗エボラウイルス GP 抗体は、Prof. C. J. Peters (UTMB, Texas, USA) から分与されたウサギ高度免疫エボラウイルス GP 血清を用いた。組換えバキュロウイルスを昆虫細胞 Tn5 とは哺乳類細胞 Vero および Vero E6 に moi=10 で感染させた。感染後 48 時間後に細胞を回収し、SDS-PAGE / Western blotting によりエボラウイルス GP の発現、分子量等を確認した。

## C 結果

### 1) 組換えバキュロウイルス：

2 種類の組換えバキュロウイルスを作製した(図1)。AcCAG-EBO-GP は GP を発現するプロモーターが哺乳類細胞でのみ機能するため、昆虫細胞ではウイルスは増殖するが GP 遺伝子の発現はない。一方、バキュロウイルスは哺乳類細胞に流産感染するため、ウイルスは増殖しないが CAG プロモーターで制御される遺伝子の発現が期待できる。Ac-his-EBO-GP は、ポリヘドリンプロモーターで GP 遺伝子を制御するため昆虫細胞で遺伝子が発現する。

### 2) 昆虫細胞と哺乳類細胞でのエボラウイルス GP の発現：

2 種類の組換えバキュロウイルスを昆虫細胞と哺乳類細胞に感染後 48 時間で細胞を回収し、エボラウイルス GP の発現を調べた(図2)。その結果、予想通り AcCAG-EBO-GP 感染 Vero 細胞、Vero E6 細胞では EBO-GP の発現が確認された。分子量 160kDa, 130kDa の蛋白質が検出できたが、これは preGP, GP1 に相当すると考えられた。Tn5 細胞(昆虫細胞)では EBO-GP の発現は認められなかった。一方、Ac-his-EBO-GP 感染 Vero 細胞、Vero E6 細胞では EBO-GP の発現は認められなかったが、Tn5 細胞では分子量 130kDa,

60kDa の蛋白質が検出された。130kDa の蛋白質は preGP なのか GP1 なのかは不明である。昆虫細胞では high mannose 型糖鎖修飾はされるが complex 型糖鎖修飾はされないため、両者で分子量が異なると思われた。

## D 考察

本研究で作製された組換えバキュロウイルス AcCAG-EBO-GP をマウス等に経鼻接種することにより、エボラウイルス GP 特異的抗体が誘導可能か検討したい。また、Ac-his-EBO-GP 感染 Tn5 細胞から EBO-GP を精製して、マウス等を免疫してエボラウイルス GP 特異的抗体が誘導可能か確認する予定である。両者による免疫で誘導される抗体の中和力価等を比較し、抗原検出に有用な抗体を提供したい。

## E 結論

2 種類の組換えバキュロウイルスにより、種々の細胞でエボラウイルス GP を効率よく発現する系ができた。抗体作製にこれらを有効に利用することが可能である。

## F 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Paola Katrina G. Ching, Vikki Carr de los Reyes, Maria Nemia Sualdito, Enrique Tayag, Alah Baby Columna-Vingno, Fedelino F. Malbas, Gilbert C. Bolo, James J. Sejvar, Debbie Eagles, Geoffrey Playford, Erica Dueger, Yoshihiro Kaku, Shigeru Morikawa, Makoto Kuroda, Glenn A. Marsh, Sam McCullough, and A. Ruth Foxwell. Outbreak of Henipavirus Infection, Philippines. *Emerg Infect Dis.* 2015, 21(5), 21(2):328-31. DOI: 10.3201/eid2102.141433
- 2) Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Fukuma A, Taniguchi S, Suda Y, Maeda K, Takahashi T, Morikawa S, Saijo M. Effects of ribavirin on severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in vitro. *Jpn J Infect Dis.* 2014;67(6):423-7.
- 3) Orba Y, Sasaki M, Yamaguchi H, Ishii A, Thomas Y, Hang'ombe BM, Mweene AS, Morikawa S, Saijo M, Sawa H. Orthopoxvirus infection among wildlife in Zambia. *J Gen Virol.* 2014 Oct 15. pii: vir.0.070219-0. doi: 10.1099/vir.0.070219-0.
- 4) David Nadeba Bukbuk, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Satoshi Taniguchi,

- Koichiro Iha, Aiko Fukuma, Masayuki Shimojima, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo, Francis Kasolo, Saka Saheed Baba. Development and Validation of Serological Assays for Viral Hemorrhagic Fevers and Determination of Prevalence of Rift Valley Fever in Borno State, Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2014 Oct 24. pii: tru163. PMID: 25344695
- 5) Eun-Sil Park, Michio Suzuki, Masanobu Kimura, Keiji Maruyama, Hiroshi Mizutani, Ryuichi Saito, Nami Kubota, Tetsuya Furuya, Tetsuya Mizutani, Koichi Imaoka, Shigeru Morikawa. Identification of a natural recombination in the F and H genes of feline morbillivirus. *Virology*, 2014, 468-470: 524-531
  - 6) Noriyo Nagata, Masayuki Saijo, Michiyo Kataoka, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Yuko Sato, Naoko Iwata-Yoshikawa, Momoko Ogata, Ichiro Kurane, Shigeru Morikawa, Tetsutaro Sata, and Hideki Hasegawa. Pathogenesis of fulminant monkeypox with bacterial sepsis after experimental infection with West African monkeypox virus in a cynomolgus monkey. *Int J Clin Exp Pathol* 2014, 7(7):4359-4370.
  - 7) Tomoki Yoshikawa, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Aiko Fukuma, Satoshi Taniguchi, Shoichi Toda, Yukie Shimazu, Koji Yano, Toshiharu Morimitsu, Katsuyuki Ando, Akira Yoshikawa, Miki Kan, Nobuyuki Kato, Takumi Motoya, Tsuyoshi Kuzuguchi, Yasuhiro Nishino, Hideo Osako, Takahiro Yumisashi, Kouji Kida, Fumie Suzuki, Hirokazu Takimoto, Hiroaki Kitamoto, Ken Maeda, Toru Takahashi, Takuya Yamagishi, Kazunori Oishi, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo, and Masayuki Shimojima. Sensitive and specific PCR systems for the detection of both Chinese and Japanese severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strains, and the prediction of the patient survival based on the viral load. *J. Clin. Microbiol.* 2014 Sep;52(9):3325-33.
  - 8) Aya Zamoto-Niikura, Masayoshi Tsuji, Koichi Imaoka, Masanobu Kimura, Shigeru Morikawa, Patricia J. Holman, Haruyuki Hirata, and Chiaki Ishihara. Sika Deer Carrying *Babesia* Parasites Closely Related to *B. divergens*, Japan. *EID*, 2014, 20(8):1398-1400.
  - 9) Sunohara M, Morikawa S, Fuse A, Sato I. GATA-dependent regulation of TPO-induced c-mpl gene expression during megakaryopoiesis. *Okajimas Folia Anat Jpn.* 2014;90(4):101-6. PMID: 24815109
  - 10) Naoko Iwata-Yoshikawa, Akihiko Uda, Tadaki Suzuki, Yasuko Tsunetsugu-Yokota, Yuko Sato, Shigeru Morikawa, Masato Tashiro, Tetsutaro Sata, Hideki Hasegawa and Noriyo Nagata. Effects of Toll-Like Receptor Stimulation on Eosinophilic Infiltration in Lungs of BALB/c Mice Immunized with UV-Inactivated Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus Vaccine. *J. Virol.* 2014, 88(15):8597-8614. DOI: 10.1128/JVI.00983-14.
  - 11) Tani H, Iha K, Shimojima M, Fukushi S, Taniguchi S, Yoshikawa T, Kawaoka Y, Nakasone N, Ninomiya H, Saijo M, Morikawa S. Analysis of Lujo virus cell entry using pseudotype vesicular stomatitis virus. *J Virol.* 2014, 88(13):7317-7330. DOI:10.1128/JVI.00512-14.
  - 12) Yamanaka A, Iwakiri A, Yoshikawa T, Sakai K, Singh H, Himeji D, Kikuchi I, Ueda A, Yamamoto S, Miura M, Shioyama Y, Kawano K, Nagaishi T, Saito M, Minomo M, Iwamoto N, Hidaka Y, Sohma H, Kobayashi T, Kanai Y, Kawagishi T, Nagata N, Fukushi S, Mizutani T, Tani H, Taniguchi S, Fukuma A, Shimojima M, Kurane I, Kageyama T, Odagiri T, Saijo M, Morikawa S. Imported case of acute respiratory tract infection associated with a member of species nelson bay orthoreovirus. *PLoS One.* 2014 Mar 25;9(3):e92777. doi: 10.1371/journal.pone.0092777.
  - 13) Uda A, Sekizuka T, Tanabayashi K, Fujita O, Kuroda M, Hotta A, Sugiura N, Sharma N, Morikawa S, Yamada A. Role of Pathogenicity Determinant Protein C (PdpC) in Determining the Virulence of the *Francisella tularensis* Subspecies *tularensis* SCHU. *PLoS One.* 2014 Feb 18;9(2):e89075.
  - 14) Neekun Sharma, Akitoyo Hotta, Yoshie Yamamoto, Akihiko Uda, Osamu Fujita, Toshio Mizoguchi, Junji Shindo, Chun-Ho Park, Noboru Kudo, Hitoshi Hatai, Toshifumi Oyamada, Akio Yamada, Shigeru Morikawa, and Kiyoshi Tanabayashi. Serosurveillance for *Francisella tularensis* among wild animals in Japan using a newly developed competitive ELISA. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 2014 Apr;14(4):234-9

- 15) Toru Takahashi, Ken Maeda, Tadaki Suzuki, Aki Ishido, et al., Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. The First Identification and Retrospective Study of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Japan. *J Inf Dis.*, 2014 Mar;209(6):816-27.
2. 学会発表
1. 堀田明豊、棚林清、山田章雄、森川茂. 国内の医師および獣医師への One Health についての意識調査. 第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月
  2. 堀田明豊、木村昌伸、中村幸子、片山敦司、中下留美子、坪田敏男、猪島康雄、鈴木道雄、今岡浩一、棚林清、藤田修、山本美江、宇田晶彦、森川茂. 2007 年以前の国内野生動物における重症熱性血小板減少症候群ウイルス(SFTSV)に対する抗体調査. 第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月.
  3. 堀田明豊、木村昌伸、坪田敏男、中村幸子、片山敦司、中下留美子、猪島康雄、鈴木道雄、今岡浩一、棚林清、藤田修、山本美江、宇田晶彦、森川茂. 「2007 年以前の国内野生動物における重症熱性血小板減少症候群ウイルス (SFTSV) に対する抗体調査」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月 9 日-12 日
  4. 藤田修、宇田晶彦、木村昌伸、藤田博己、今岡浩一、森川茂. 「ニホンジカから採取したマダニ類のウイルス遺伝子保有状況からみた自然界における SFTS ウイルス維持様式の検討」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月 9 日-12 日
  5. 森川茂、木村昌伸、堀田明豊、加来義浩、朴ウンシル、鈴木道雄、野口章、井上智、今岡浩一、前田健. 「野生のシカにおける SFTS ウイルス抗体調査」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月 9 日-12 日
  6. 浜崎千菜美、鎌田龍星、野口慧多、寺田豊、下田宙、高野愛、鈴木和男、森川茂、前田健. 「野生動物における SFTS ウイルス感染の疫学調査」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月 9 日-12 日
  7. 松本苑子、橋野正紀、鈴木尋、高野愛、藤田修、堀田明豊、森川茂、高田伸弘、渡邊健太、清水隆、度会雅久. 「ダニにおける Francisella tularensis の全国的疫学調査」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月 9 日-12 日
  8. 堀田明豊、棚林清、山田章雄、森川茂. 「国内の医師および獣医師への One Health についての意識調査」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月 9 日-12 日
  9. 加来義浩、奥谷晶子、河合康洋、野口章、濱本紀子、梁瀬徹、加藤友子、新井智、井上智、森川茂. 「国内で分離された未分類のラプトウイルスの遺伝学的解析」第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 9 日-12 日
  10. 新倉綾、森川茂、平田晴之、石原智明. 「北海道のシニツマダニ *Ixodes persulcatus* から分離された *Babesia microti* の性状解析」第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 9 日-12 日
  11. 新井智、池山優、Boldgiv Bazartseren、Boldbaatar Bazartseren、荒木和子、佐藤弘、多屋馨子、森川茂、Yanagihara Richard、大石和徳. 「モンゴルのトガリネズミに確認された遺伝的に異なるハンタウイルスの共循環」第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 9 日-12 日
  12. 池山優、新井智、Kang Haeji、大館智志、Taylor Kyle、中田圭亮、雲野明、荒木和子、佐藤弘、多屋馨子、森川茂、Yanagihara Richard、大石和徳. 「Sarufutsu virus ; オオアシトガリネズミに感染を確認した新規ハンタウイルス」第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 9 日-12 日
  13. 朴ウンシル、鈴木道雄、木村昌伸、丸山啓二、水谷浩志、斉藤隆一、久保田菜美、古谷哲也、水谷哲也、今岡浩一、森川茂. 「日本のネコにおける新規モルビリウイルス(feline morbillivirus, FMV)の疫学調査」第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 9 日-12 日
  14. 森川茂、朴ウンシル、今岡浩一、前田健、宇田晶彦. 「SFTS ウイルスの生活環における野生のシカの役割」第 62 回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014 年 11 月 10-12 日
  15. 西條政幸、吉河智城、福士秀悦、谷英樹、福岡藍子、谷口怜、須田遊人、Harpal Singh、前田健、高橋徹、森川茂、下島昌幸. 「重症熱性血小板減少症候群ウイルスの分子系統学的特徴とその地理的分布」第 62 回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014 年 11 月 10-12 日
  16. 前田健、濱崎千菜美、下田宙、鎌田龍星、野口慧多、米満研三、高野愛、鈴木和男、森川茂. 「SFTS ウイルスの生活環における動物の重要性」第 62 回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014 年 11 月 10-12 日
  17. 朴ウンシル、佐藤由子、中島典子、古谷哲也、水谷哲也、今岡浩一、森川茂. 「日本国内ネコにおける新規モルビリウイルス (feline morbillivirus, FMV) の疫学調査」第 62 回日

- 本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014年11月10-12日
18. 河内健吾、氏家誠、谷英樹、森川茂、田口文広。「Baculovirus を用いた牛 Torovirus の可溶性 HemagglutininEsterase protein の発現」第62回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014年11月10-12日
  19. 新井智、池山優、Se Hun Gu, Son Truong Nguyen, 福井大、大館智志、吉川泰弘、森川茂、荒木和子、佐藤弘、多屋馨子、Richard Yanagihara、大石和徳。「ベトナムの翼手目由来に確認されたハンタウイルスの多様性」第62回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014年11月10-12日
  20. 谷英樹、谷口怜、福間藍子、福士秀悦、森川茂、下島昌幸、西條政幸。「重症熱性血小板減少症候群ウイルス GP の細胞融合能と 25-hydroxycholesterol による感染阻害効果」第62回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014年11月10-12日
  21. 吉河智城、福士秀悦、谷英樹、福間藍子、谷口怜、須田遊人、Harpal Singh、江川和孝、下島昌幸、森川茂、西條政幸。「ワクシニアウイルス LC16m8 株を土台とした組換えワクシニアウイルス作出システムの確立」第62回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014年11月10-12日
  22. Shigeru Morikawa, Masanobu Kimura, Shuetsu Fukushima, Aiko Fukuma<sup>1</sup> Yoshihiro Kaku, Unsil Paku, Hideki Tani<sup>1</sup> Tomoyuki Yoshikawa, Koichi Imaoka, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Ken Maeda. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in domestic and wild animals in Japan. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014
  23. Aiko Fukuma, Shuetsu Fukushima, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Satoshi Taniguchi, Momoko Ogata, Masayuki Shimojim<sup>1</sup>, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. Development of IFA and ELISA to detect antibodies against SFTSV. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014
  24. Hideki Tani, Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushima, Tomoki Yoshikawa, Aiko Fukuma, Satoshi Taniguchi, Momoko Ogata, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. Analyses of cell entry of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus using pseudotype vesicular stomatitis virus system. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014.
  25. Akihiko Uda, Hiroki Kawabata, Shuetsu Fukushima, Yoshiharu Kaku, Masayuki Shimojima, Shuji Ando, Ken Maeda, Hiromi Fujita, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa, Tomoyuki Yoshikawa, Aya Niikura, Sawabe Kyoko. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in ticks in Japan. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014.
  26. Yu Ikeyama, Satoru Arai, Bazartseren Boldgiv, Bazartseren Boldbaatar, Kazuko Araki, Hiroshi Satoh, Keiko Tanaka-Taya, Shigeru Morikawa, Richard Yanagihara, Kazunori Oishi. Co-circulation of two distinct divergent hantaviruses in Sorex species in Mongolia. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014
  27. Shigeru Morikawa, Akihiko Uda, Masanobu Kimura, Kawabata, Hiroki, Shuetsu Fukushima, Aiko Fukuma, Yoshihiro Kaku, Unsil Paku, Hideki Tani, Tomoyuki Yoshikawa, Aya Niikura, Shuji Ando, Sawabe Kyoko, Hiromi Fujita, Koichi Imaoka, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Ken Maeda. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in animals and ticks in Japan. The 10<sup>th</sup> China-Japan International Conference of Virology, Changchun, China, Aug25-28 2014.
- G 知的財産権の出願・登録状況  
現在出願予定はない。

図 1. エボラウイルス GP 発現組換えバキュロウイルスの模式図

Construction of rec-Baculoviruses

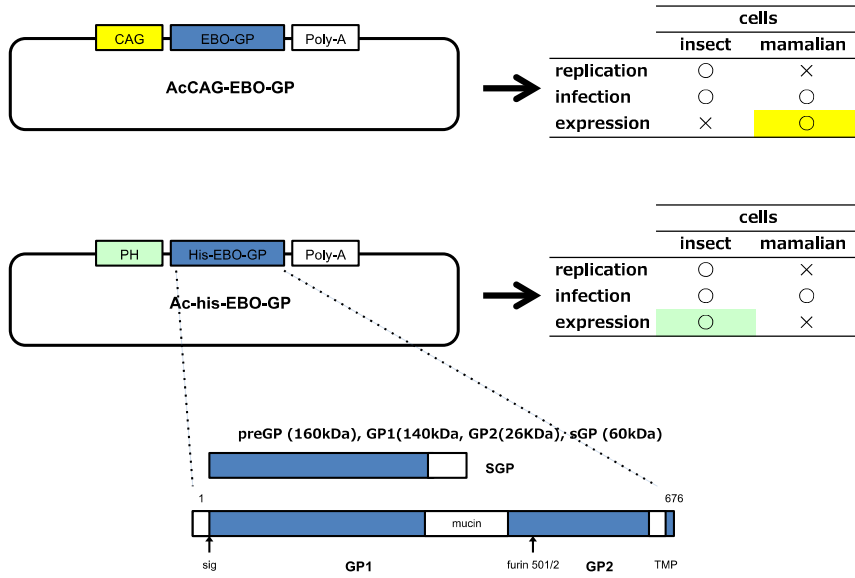
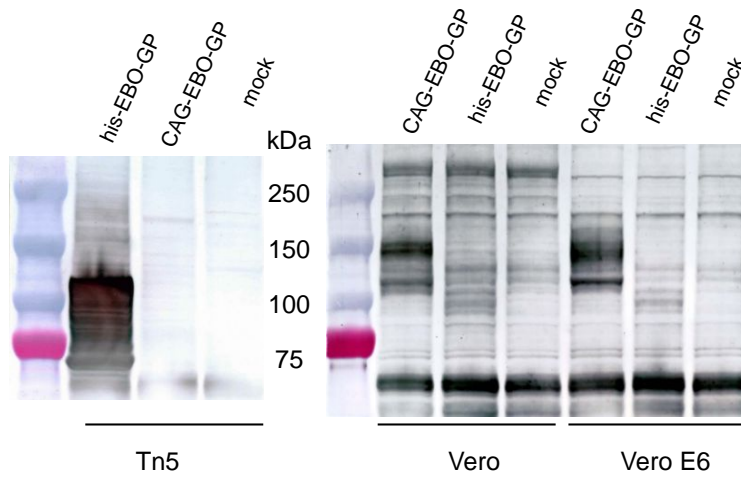


図 2. 組換えバキュロウイルス感染細胞でのエボラウイルス GP の発現  
preGP (160kD), GP1(140kDa, GP2(26kDa), sGP (60kDa)



厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業  
（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業））

分担研究報告書

細胞培養弱毒生痘そうワクチンの特性解析（遺伝子機能解析）品質試験法に関する研究

研究分担者：森川茂（国立感染症研究所 獣医科学部部长）

研究協力者：朴ウンシル、宇田晶彦（同、獣医科学部）、吉河智城、西條政幸（同、ウイルス第一部）、倉根一郎（同、副所長）、横手公幸、金原知美、丸野真一、新村靖彦（化血研）

研究要旨:細胞培養痘そうワクチンの製造承認株である LC16m8 株は、Lister 株から低温馴化により LC16 株、LC16mO 株を経由して樹立された安全性の高いワクチン株である。しかし、LC16m8 株を継代するとブラックサイズのやや大きい LC16mO 型（medium size plaque; MSP）のウイルスが出現する。これまでの解析から、MSP は B5R の一塩基欠失を相補する変異ウイルスであり、その変異のパターンが複数あることが分かっている。これまでにバイオアッセイで得られる MSP 情報と同等の成績が次世代シーケンズ（NGS）解析により得られることを示した。NGS 解析は取得データの処理に比較的時間を要することから、これまでの MSP の変異パターン解析で得られた主要な MSP を定量的に検出可能な PCR 法を開発することを試みた。その結果、MSP 変異配列を識別する MGB-probe を用いるリアルタイム PCR では LC16m8 株と特定の MSP を鑑別できるが、LC16m8 株遺伝子が大量に存在すると、MSP 変異配列特異的 MGB-probe の結合に阻害的効果が生じ、少量の MSP を検出できなくなった。一方、MSP の遺伝子変異特異的配列を 3'末端とする primer を用いた PCR でも LC16m8 株と特定の MSP を識別できた。この方法を SybrG によるリアルタイム PCR へ発展させることにより、主要な MSP 含有率を定量できる可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

細胞培養痘そうワクチンの製造承認株である LC16m8 株は、Lister 株から低温馴化により LC16 株、LC16mO 株を経由して樹立された株である。サルを用いて行われた神経病原性試験により非常に神経毒性が低いことがわかっている。また、1970年代には10万人の子供に接種され、その際に重篤な副反応は確認されなかったことより安全性の非常に高いワクチン株といえる。さらに、自衛隊での成人への種痘にも用いられ安全性がさらに確認されている。Lister 株は 41 以上でも初代ウサギ腎細胞でのブラック形成能があるのに対し、LC16mO 株と LC16m8 株は 41 ではブラックを形成しない（増殖温度感受性）。LC16m8 株は、B5R 遺伝子に 1 塩基欠損があるため、正常な B5R が作られないために初代ウサギ腎細胞におけるブラックサイズが小さい。LC16m8 株を継代するとブラックサイズのやや大きい LC16mO 型のウイルス（medium size plaque; MSP）が出現する。これまでの解析から、これらは LC16mO 型への復帰株ではなく、B5R の一塩基欠失を相補する変異ウイルスであり、その変異のパターンは複数あることが分か

っている。これまでに、次世代シーケンズ（NGS）解析によりバイオアッセイで得られた MSP の情報と同等の成績が得られることを明らかにした。NGS 解析は取得データの処理に比較的時間を要することから、これまでの MSP の変異パターン解析で得られた主要な MSP を、定量的に検出可能な PCR 法を開発し、品質管理に資する情報を提供することを目的とした。

#### B. 研究方法

1) MSP の性状を保つクローンの配列と出現頻度：  
シードウイルスから3代継代して作製したもの（K1）と乾燥細胞培養痘そうワクチン VO7, VO9 を用いた。K1 から Vero E6 細胞で MSP を選択して遺伝子配列を決定した。また、K1 を Vero E6 細胞で継代することにより得られた MSP も同様に解析した。

2) MSP の種類と出現頻度：  
これまでの研究から、MSP には LC16m8 株で認められる B5R 遺伝子の 274 位の G 欠損が LC16mO 株型の B5R 遺伝子に復帰したものはなかった。これまでに

得られた MSP の遺伝子変異は、1塩基の duplication による1塩基挿入か、4塩基配列の duplication によるものがある(表1、図 1)。これらの出現頻度は、得られた MSP のクローンの遺伝子配列から算定されたものと、illumina を用いた NGS 解析により得られたものがほぼ一致することから、MSP には L1 から L7 の 7 タイプが大部分を占める考えられる。

### 3) MSP を検出する PCR 法の検討:

LC16m8 株のウイルスストック中に含まれる MSP の含有率を測定するには、主要なタイプの MSP の含有率を測定すれば良いと考えられる。そこで、以下の PCR 法を検討した。

#### 1) Allele-specific primer PCR による MSP の検出法:

この方法は、SNIP 検出用に開発された PCR で、プライマーの 3' 末端から二番目には変異特異塩基、三番目には不一致塩基を設定した(図2)。

2) Mutation specific primer PCR による MSP の検出法: この PCR では片側のプライマーに MSP の型特異的プライマーを設定した(図3)。

3) MSP 変異部位を含む共通プライマーによる SybrG リアルタイム PCR: これは共通プライマーで増幅した PCR 産物を SybrG 遊離の denature 曲線の違いから検出する方法である(図4)。

4) MGB probe によるリアルタイム PCR: これは、プローブのハイブリに要する部分を 17mer と短く出来るプローブによるリアルタイム PCR で、共通プライマーで増幅し、共通プローブと各 MSP 特異的プローブの 2 つのプローブにより MSP 比率を求める方法である(図5)。

### 【倫理面への配慮】

ヒト検体、動物は使用していないため該当しない。

## C. 研究結果、及び D. 考察

### 1) MSP の性状を保つクローンの配列と出現頻度:

K1 には、RK13 細胞を用いたプラークサイズの測定法により MSP が 2.5% 程度含まれていることが分かっている。K1 から MSP をプラーククローニングして、これらの B5R の遺伝子配列と出現頻度を算出することにより、MSP の遺伝型と出現頻度が分かっている。MSP には主に 7 遺伝子型があり、それぞれの出現頻度は 2.4% から 36.6% と異なった。NGS による解析では、K1 に含まれる MSP の遺伝子型と出現頻度は 3.8% から 38.9% で、それぞれの遺伝子型と出現頻度はよく一致した(表1)。このことから MSP には主要な 7 タイプがあり、その出現頻度は MSP のタイプにより異なることがわかった。

### 2) MSP 頻度の定量的 PCR による解析

1) から、幾つかの主要な MSP タイプの含有率を定量的に検出できる PCR を開発すれば、ワクチンの品質管理に応用可能と考えられる。そこで、幾つかの PCR 法を比較検討した。

1) Allele-specific primer PCR による MSP の検出法では、L3, L4 は検出できず L2 は検出できるが PCR サイクルを 20 回以上行くと非特異反応による産物が増幅された。このため、本研究の目的には適さなかった。

2) Mutation specific primer PCR による MSP の検出法では、まず L2 特異的プライマーを作成して検討した。用いるプライマーの長さを 17mer から 22mer まで検討した結果、プライマー長 18mer のプライマーを用いると最も特異度が高かった。そこで、18mer プライマーを用いて LC16m8 株遺伝子に L2 遺伝子を混合した場合、0.01% の L2 型遺伝子が特異的に検出できた。K1, V7, V9 は、NGS 解析では L2 型 MSP が、それぞれ 0.12%, 0.008%, 0.0003% 含まれることが分かっている。これらを対象に L2 特異的 PCR を行うと、K1 では検出できたが V7, V9 では検出できなかった(図3B)。

3) MSP 変異部位を含む共通プライマーによる SybrG リアルタイム PCR は、LC16m8 株と L1, L2, L3 などが鑑別できるが、LC16m8 型 B5R が大部分を占める検体では、MSP 遺伝子型を検出する感度が充分ではなかった(図4B)。

4) MGB probe によるリアルタイム PCR は、それぞれ LC16m8 型、L1, L2, L3, L4 を効率よく特異的に検出できた。しかし、K1 等大部分が LC16m8 型である検体中からの検出効率、Mutation specific primer PCR による MSP の検出法と比較すると劣っていた。

これらの結果から、現時点では Mutation specific primer PCR による SybrG を用いるリアルタイム PCR が最も有望であると考えられる。しかし、MGB probe によるリアルタイム PCR も改良の余地があるため、この両者で、MSP の定量化を可能とするため、条件等の検討を行う予定である。

## E. 結論

乾燥細胞培養痘そうワクチンは、quasispecies からなる Lister 株による第 1 世代の Calf lymph ワクチンのワクチニアウイルスから、低温培養により温度感受性株で小ポックサイズを形成する株として選択された LC16m8 株をウサギ初代腎細胞で増殖して製造される。少ポックサイズは B5R 遺伝子の 274 位の G の欠損によることが分かっているが、この欠損を相補する変異が導入されたものが MSP と呼ばれる。MSP の含有率を定量することはワクチンの品質管理のうえでも有用であると考えられる。このためにはリアルタイム PCR による定量法の確立が重要である。



## F.研究発表

### 1 . 論文発表

- 1) Paola Katrina G. Ching, Vikki Carr de los Reyes, Maria Nemia Sualdito, Enrique Tayag, Alah Baby Columna-Vingno, Fedelino F. Malbas, Gilbert C. Bolo, James J. Sejvar, Debbie Eagles, Geoffrey Playford, Erica Dueger, Yoshihiro Kaku, Shigeru Morikawa, Makoto Kuroda, Glenn A. Marsh, Sam McCullough, and A. Ruth Foxwell. Outbreak of Henipavirus Infection, Philippines. *Emerg Infect Dis.* 2015, 21(5), 21(2):328-31. DOI: 10.3201/eid2102.141433
- 2) Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Fukuma A, Taniguchi S, Suda Y, Maeda K, Takahashi T, Morikawa S, Saijo M. Effects of ribavirin on severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in vitro. *Jpn J Infect Dis.* 2014;67(6):423-7.
- 3) Orba Y, Sasaki M, Yamaguchi H, Ishii A, Thomas Y, Hang'ombe BM, Mweene AS, Morikawa S, Saijo M, Sawa H. Orthopoxvirus infection among wildlife in Zambia. *J Gen Virol.* 2014 Oct 15. pii: vir.0.070219-0. doi: 10.1099/vir.0.070219-0.
- 4) David Nadeba Bukbuk, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Satoshi Taniguchi, Koichiro Iha, Aiko Fukuma, Masayuki Shimojima, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo, Francis Kasolo, Saka Saheed Baba. Development and Validation of Serological Assays for Viral Hemorrhagic Fevers and Determination of Prevalence of Rift Valley Fever in Borno State, Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2014 Oct 24. pii: tru163. PMID: 25344695
- 5) Eun-Sil Park, Michio Suzuki, Masanobu Kimura, Keiji Maruyama, Hiroshi Mizutani, Ryuichi Saito, Nami Kubota, Tetsuya Furuya, Tetsuya Mizutani, Koichi Imaoka, Shigeru Morikawa. Identification of a natural recombination in the F and H genes of feline morbillivirus. *Virology*, 2014, 468-470: 524-531
- 6) Noriyo Nagata, Masayuki Saijo, Michiyo Kataoka, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Yuko Sato, Naoko Iwata-Yoshikawa, Momoko Ogata, Ichiro Kurane, Shigeru Morikawa, Tetsutaro Sata, and Hideki Hasegawa. Pathogenesis of fulminant monkeypox with bacterial sepsis after experimental infection with West African monkeypox virus in a cynomolgus monkey. *Int J Clin Exp Pathol* 2014, 7(7):4359-4370.
- 7) Tomoki Yoshikawa, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Aiko Fukuma, Satoshi Taniguchi, Shoichi Toda, Yukie Shimazu, Koji Yano, Toshiharu Morimitsu, Katsuyuki Ando, Akira Yoshikawa, Miki Kan, Nobuyuki Kato, Takumi Motoya, Tsuyoshi Kuzuguchi, Yasuhiro Nishino, Hideo Osako, Takahiro Yumisashi, Kouji Kida, Fumie Suzuki, Hirokazu Takimoto, Hiroaki Kitamoto, Ken Maeda, Toru Takahashi, Takuya Yamagishi, Kazunori Oishi, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo, and Masayuki Shimojima. Sensitive and specific PCR systems for the detection of both Chinese and Japanese severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strains, and the prediction of the patient survival based on the viral load. *J. Clin. Microbiol*, 2014 Sep;52(9):3325-33.
- 8) Aya Zamoto-Niikura, Masayoshi Tsuji, Koichi Imaoka, Masanobu Kimura, Shigeru Morikawa, Patricia J. Holman, Haruyuki Hirata, and Chiaki Ishihara. Sika Deer Carrying *Babesia* Parasites Closely Related to *B. divergens*, Japan. *EID*, 2014, 20(8):1398-1400.
- 9) Sunohara M, Morikawa S, Fuse A, Sato I. GATA-dependent regulation of TPO-induced c-mpl gene expression during megakaryopoiesis. *Okajimas Folia Anat Jpn.* 2014;90(4):101-6. PMID: 24815109
- 10) Naoko Iwata-Yoshikawa, Akihiko Uda, Tadaki Suzuki, Yasuko Tsunetsugu-Yokota, Yuko Sato, Shigeru Morikawa, Masato Tashiro, Tetsutaro Sata, Hideki Hasegawa and Noriyo Nagata. Effects of Toll-Like Receptor Stimulation on Eosinophilic Infiltration in Lungs of BALB/c Mice Immunized with UV-Inactivated Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus Vaccine. *J. Virol.* 2014, 88(15):8597-8614. DOI: 10.1128/JVI.00983-14.
- 11) Tani H, Iha K, Shimojima M, Fukushi S, Taniguchi S, Yoshikawa T, Kawaoka Y, Nakasone N, Ninomiya H, Saijo M, Morikawa S. Analysis of Lujo virus cell entry using pseudotype vesicular stomatitis virus. *J Virol.* 2014, 88(13):7317-7330. DOI:10.1128/JVI.00512-14.
- 12) Yamanaka A, Iwakiri A, Yoshikawa T, Sakai K, Singh H, Himeji D, Kikuchi I, Ueda A, Yamamoto S, Miura M, Shioyama Y, Kawano K, Nagaishi T, Saito M, Minomo M, Iwamoto N, Hidaka Y, Sohma H, Kobayashi T, Kanai Y, Kawagishi T, Nagata N, Fukushi S, Mizutani T, Tani H, Taniguchi S, Fukuma A, Shimojima M, Kurane I, Kageyama T, Odagiri T, Saijo M, Morikawa S. Imported case of acute

respiratory tract infection associated with a member of species nelson bay orthoreovirus. PLoS One. 2014 Mar 25;9(3):e92777. doi: 10.1371/journal.pone.0092777.

- 13) Uda A, Sekizuka T, Tanabayashi K, Fujita O, Kuroda M, Hotta A, Sugiura N, Sharma N, Morikawa S, Yamada A. Role of Pathogenicity Determinant Protein C (PdpC) in Determining the Virulence of the Francisella tularensis Subspecies tularensis SCHU. PLoS One. 2014 Feb 18;9(2):e89075.
  - 14) Neekun Sharma, Akitoyo Hotta, Yoshie Yamamoto, Akihiko Uda, Osamu Fujita, Toshio Mizoguchi, Junji Shindo, Chun-Ho Park, Noboru Kudo, Hitoshi Hatai, Toshifumi Oyamada, Akio Yamada, Shigeru Morikawa, and Kiyoshi Tanabayashi. Serosurveillance for Francisella tularensis among wild animals in Japan using a newly developed competitive ELISA. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 2014 Apr;14(4):234-9
  - 15) Toru Takahashi, Ken Maeda, Tadaki Suzuki, Aki Ishido, et al. , Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. The First Identification and Retrospective Study of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Japan. J Inf Dis., 2014 Mar;209(6):816-27.
2. 学会発表
  1. 堀田明豊、棚林清、山田章雄、森川茂. 国内の医師および獣医師への One Health についての意識調査. 第 157 回日本獣医学会学術集会, 北海道, 2014 年 9 月
  2. 堀田明豊, 木村昌伸, 中村幸子, 片山敦司, 中下留美子, 坪田敏男, 猪島康雄, 鈴木道雄, 今岡浩一, 棚林清, 藤田修, 山本美江, 宇田晶彦, 森川茂. 2007 年以前の国内野生動物における重症熱性血小板減少症候群ウイルス (SFTSV) に対する抗体調査. 第 157 回日本獣医学会学術集会, 北海道, 2014 年 9 月.
  3. 堀田明豊、木村昌伸、坪田敏男、中村幸子、片山敦司、中下留美子、猪島康雄、鈴木道雄、今岡浩一、棚林清、藤田修、山本美江、宇田晶彦、森川茂. 「2007 年以前の国内野生動物における重症熱性血小板減少症候群ウイルス (SFTSV) に対する抗体調査」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月 9 日-12 日
  4. 藤田修、宇田晶彦、木村昌伸、藤田博己、今岡浩一、森川茂. 「ニホンジカから採取したマダニ類のウイルス遺伝子保有状況からみた自然界における SFTS ウイルス維持様式の検討」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月 9 日-12 日
  5. 森川茂、木村昌伸、堀田明豊、加来義浩、朴ウンシル、鈴木道雄、野口章、井上智、今岡浩一、前田健. 「野生のシカにおける SFTS ウイルス抗体調査」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月 9 日-12 日
  6. 浜崎千菜美、鍬田龍星、野口慧多、寺田豊、下田宙、高野愛、鈴木和男、森川茂、前田健. 「野生動物における SFTS ウイルス感染の疫学調査」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月 9 日-12 日
  7. 松本苑子、橋野正紀、鈴木尋、高野愛、藤田修、堀田明豊、森川茂、高田伸弘、渡邊健太、清水隆、度会雅久. 「ダニにおける Francisella tularensis の全国的疫学調査」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月 9 日-12 日
  8. 堀田明豊、棚林清、山田章雄、森川茂. 「国内の医師および獣医師への One Health についての意識調査」第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道、2014 年 9 月 9 日-12 日
  9. 加来義浩、奥谷晶子、河合康洋、野口章、濱本紀子、梁瀬徹、加藤友子、新井智、井上智、森川茂. 「国内で分離された未分類のラプトウイルスの遺伝学的解析」第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 9 日-12 日
  10. 新倉綾、森川茂、平田晴之、石原智明. 「北海道のシュルツマダニ Ixodes persulcatus から分離された Babesia microti の性状解析」第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 9 日-12 日
  11. 新井智、池山優、Boldgiv Bazartseren、Boldbaatar Bazartseren、荒木和子、佐藤弘、多屋馨子、森川茂、Yanagihara Richard、大石和徳. 「モンゴルのトガリネズミに確認された遺伝的に異なるハンタウイルスの共循環」第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 9 日-12 日
  12. 池山優、新井智、Kang Haeji、大館智志、Taylor Kyle、中田圭亮、雲野明、荒木和子、佐藤弘、多屋馨子、森川茂、Yanagihara Richard、大石和徳. 「Sarufutsu virus ; オオアシトガリネズミに感染を確認した新規ハンタウイルス」第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 9 日-12 日
  13. 朴ウンシル、鈴木道雄、木村昌伸、丸山啓二、水谷浩志、斉藤隆一、久保田菜美、古谷哲也、水谷哲也、今岡浩一、森川茂. 「日本のネコにおける新規モルビリウイルス(feline morbillivirus, FMV)の疫学調査」第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 9 日-12 日
  14. 森川茂、朴ウンシル、今岡浩一、前田健、宇田晶彦. 「SFTS ウイルスの生活環における野生のシカの役割」第 62 回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014 年 11 月 10-12 日

15. 西條政幸、吉河智城、福士秀悦、谷英樹、福間藍子、谷口怜、須田遊人、Harpal Singh、前田健、高橋徹、森川茂、下島昌幸。「重症熱性血小板減少症候群ウイルスの分子系統学的特徴とその地理的分布」第62回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014年11月10-12日
16. 前田健、濱崎千菜美、下田宙、鎌田龍星、野口慧多、米満研三、高野愛、鈴木和男、森川茂。「SFTSウイルスの生活環における動物の重要性」第62回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014年11月10-12日
17. 朴ウンシル、佐藤由子、中島典子、古谷哲也、水谷哲也、今岡浩一、森川茂。「日本国内ネコにおける新規モルビリウイルス (feline morbillivirus, FMV) の疫学調査」第62回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014年11月10-12日
18. 河内健吾、氏家誠、谷英樹、森川茂、田口文広。「Baculovirus を用いた牛 Torovirus の可溶性 HemagglutininEsterase protein の発現」第62回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014年11月10-12日
19. 新井智、池山優、Se Hun Gu、Son Truong Nguyen、福井大、大館智志、吉川泰弘、森川茂、荒木和子、佐藤弘、多屋馨子、Richard Yanagihara、大石和徳。「ベトナムの翼手目由来に確認されたハンタウイルスの多様性」第62回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014年11月10-12日
20. 谷英樹、谷口怜、福間藍子、福士秀悦、森川茂、下島昌幸、西條政幸。「重症熱性血小板減少症候群ウイルス GP の細胞融合能と 25-hydroxycholesterol による感染阻害効果」第62回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014年11月10-12日
21. 吉河智城、福士秀悦、谷英樹、福間藍子、谷口怜、須田遊人、Harpal Singh、江川和孝、下島昌幸、森川茂、西條政幸。「ワクシニアウイルス LC16m8 株を土台とした組換えワクシニアウイルス作出システムの確立」第62回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014年11月10-12日
22. Shigeru Morikawa, Masanobu Kimura, Shuetsu Fukushima, Aiko Fukuma<sup>1</sup> Yoshihiro Kaku, Unsil Paku, Hideki Tani<sup>1</sup> Tomoyuki Yoshikawa, Koichi Imaoka, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Ken Maeda. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in domestic and wild animals in Japan. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014
23. Aiko Fukuma, Shuetsu Fukushima, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Satoshi Taniguchi, Momoko Ogata, Masayuki Shimojima<sup>1</sup>, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. Development of IFA and ELISA to detect antibodies against SFTSV. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014
24. Hideki Tani, Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushima, Tomoki Yoshikawa, Aiko Fukuma, Satoshi Taniguchi, Momoko Ogata, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. Analyses of cell entry of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus using pseudotype vesicular stomatitis virus system. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014.
25. Akihiko Uda, Hiroki Kawabata, Shuetsu Fukushima, Yoshiharu Kaku, Masayuki Shimojima, Shuji Ando, Ken Maeda, Hiromi Fujita, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa, Tomoyuki Yoshikawa, Aya Niikura, Sawabe Kyoko. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in ticks in Japan. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014.
26. Yu Ikeyama, Satoru Arai, Bazartseren Boldgiv, Bazartseren Boldbaatar, Kazuko Araki, Hiroshi Satoh, Keiko Tanaka-Taya, Shigeru Morikawa, Richard Yanagihara, Kazunori Oishi. Co-circulation of two distinct divergent hantaviruses in Sorex species in Mongolia. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014
27. Shigeru Morikawa, Akihiko Uda, Masanobu Kimura, Kawabata, Hiroki, Shuetsu Fukushima, Aiko Fukuma, Yoshihiro Kaku, Unsil Paku, Hideki Tani, Tomoyuki Yoshikawa, Aya Niikura, Shuji Ando, Sawabe Kyoko, Hiromi Fujita, Koichi Imaoka, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Ken Maeda. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in animals and ticks in Japan. The 10<sup>th</sup> China-Japan International Conference of Virology, Changchun, China, Aug25-28 2014.

G.知的財産権の出願・登録状況

なし



図 2. Allele-specific primer PCR による MSP の検出

## Allele-specific primer PCRによるMSPの検出法



Primerの3' 末端から二番目には変異特異塩基、三番目には不一致塩基

	Ratio(%)	参考配列	Forward primer 配列
m0		GTCTCTGAATTATATGATAAGCC-ATT-AT-AC-G	
m8		GTCTCTGAATTATATGATAAGCC-ATT-AT-AC--	
L1:267A	36.6 / 38.9*	GTCTCTGAATTATATGATAAGCC <b>A</b> TT-AT-AC--	GTCTCTGAATTATATGATAAGC <b>GAA</b>
L2: 267C	14.6 / 6.6	GTCTCTGAATTATATGATAAGCC <b>C</b> ATT-AT-AC--	GTCTCTGAATTATATGATAAGC <b>GCA</b>
L4: 271T	24.4 / 20.6	GTCTCTGAATTATATGATAAGCC-ATT-AT <b>T</b> AC--	CTGAATTATATGATAAGCCATT <b>AGTA</b>
L5: 274(4ins)	12.2 / 12.8	GTCTCTGAATTATATGATAAGCC-ATT-AT-AC <b>ATAC</b>	ATTATATGATAAGCCATTATAC <b>ATAC</b>
L6: 275-6(2del)	4.9 / 12.3	GTCTCTGAATTATATGATAAGCC-ATT <b>TA</b> T-AC--	CTCTGAATTATATGATAAGCCAT <b>GTA</b>

\*MSP中の頻度/deep seq

Common Reverse primer : GGACACGTAACAGTATCATTCCA

図 3. Mutation specific primer PCR による MSP の検出

## Mutation specific primer PCRによるMSPの検出法



特異的変異塩基がプライマーの3' 末端に来るように、17bp~22bpまで設計。

例) 267C MSPのforward primer

267C 参考配列 : GTCTCTGAATTATATGATAAGCC**C**ATT-AT-AC--

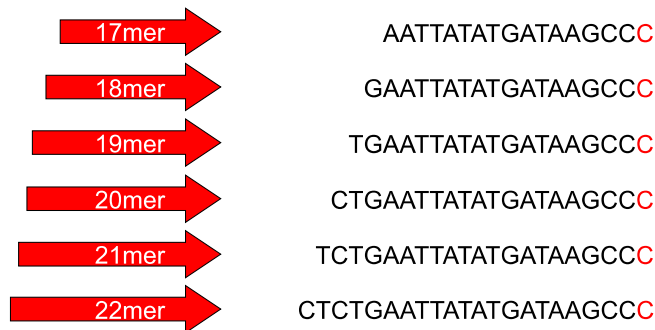
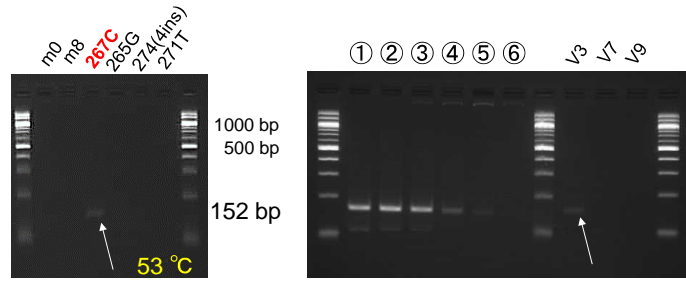


図 3 B. Mutation specific primer PCR による L2 型 MSP の検出

18mer, annealing temperature 53°C, 20~30 cycle PCR反応で特異的陽性確認。



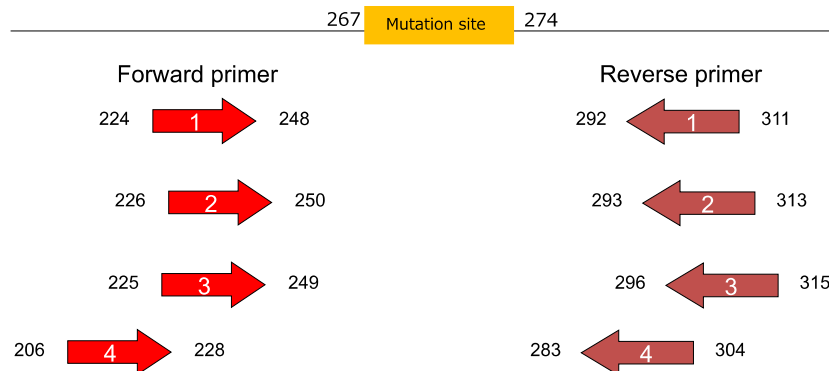
Copynumbers in reactions

Diluted	①	②	③	④	⑤	⑥	V3	V7	V9
267C	1.3E+08	1.3E+07	1.3E+06	1.3E+05	1.25E+04	0	6.40E+04	4.70E+03	0
m8	0	4.5000E+07	4.9500E+07	4.9950E+07	4.9995E+07	5.00E+07	5.2035E+07	4.6944E+07	6.4994E+07
Ratio(%)	100	10	1	0.1	0.01	0	0.12	0.01	0

- " 16~22mer中、18merプライマーでMSP特異的PCRが可能。
- " 54~64°Cまでannealing temperatureを設定して行ったが、特異的な反応まで低下。
- " V3のMSPまでは検出可能であるが、V7、V9のMSP検出にはさらなる検討が必要。
- " 17~18merのプライマーを設計し、major MSPの検出を試みる。

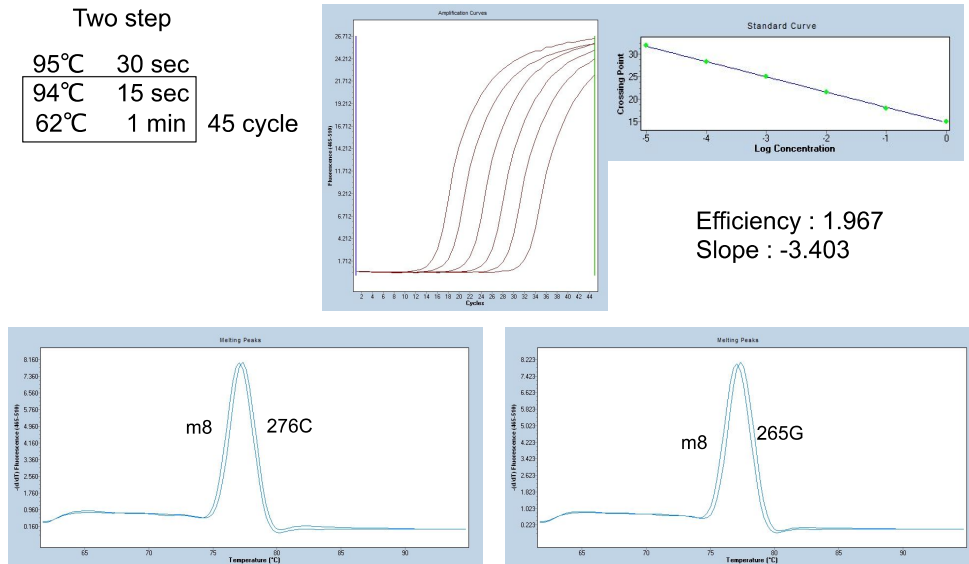
図 4 . MSP 変異部位を含む共通プライマーによる SybrG リアルタイム PCR

### Common primer PCR/SybrGによるMSPの検出法



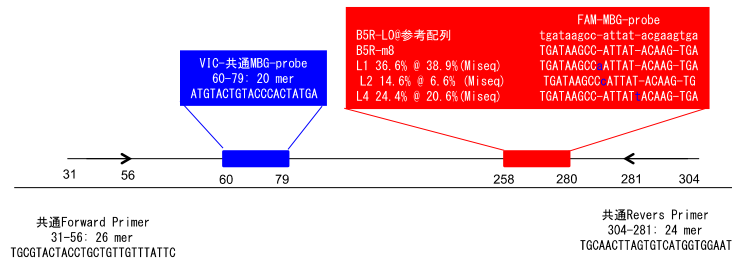
変異領域を挟むように、また、PCR産物のTm値に差があるようにcommon primersをデザイン。リアルタイムの融解曲線解析によりサンプル中の変異株の比率を調べる。

図 4 B. L2, L3 型 MSP の共通プライマーによる SybrG リアルタイム PCR での検出



- ✓ 4組のprimer中Common primer 2を用いたリアルタイムの融解曲線解析で、差が出る。
- ✓ 271Tおよび274(4ins)はm8と融解曲線で差が出ない。
- ✓ V3, V7およびV9でも融解曲線における差は見出せなかった。

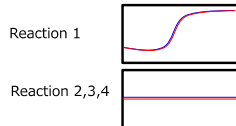
図 5 .MGB-probe によるリアルタイム PCR による MSP の検出



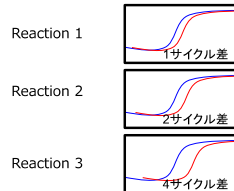
1サンプルに付き以下の4つの反応を行う

組み合わせ	共通 Forward & Revers	VIC 共通MGB-probe	FAM-MGB-probe
Reaction 1	使用	使用	B5R-m8用 FAM-MGB-Probe
Reaction 2	使用	使用	L1 FAM-MGB-Probe
Reaction 3	使用	使用	L2 FAM-MGB-Probe
Reaction 4	使用	使用	L3 FAM-MGB-Probe

サンプル中にB5R-m8が100%の場合の増幅イメージ



サンプル中にB5R-m8が50%、L1が25%、L2が6%の場合の増幅イメージ



厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業  
（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業））

分担研究報告書

バイオテロに使用される可能性のある真菌感染症の迅速診断法の確立  
*Coccidioides* 属および *Histoplasma* 属の LAMP 法による検出系の改良

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 名木 稔、梅山 隆、田辺公一 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属 (*Coccidioides immitis*, *C. posadasii*)、ヒストプラスマ属 (*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、培養を要しない検査技術の開発が望まれる。本研究は、喀痰などの臨床検体からヒストプラス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する。今年度は、LAMP 法によるコクシジオイデスおよびヒストプラスマ DNA の高感度検出系の実用化を目指し、乾燥ポリメラーゼの有用性を検討し、菌体取り扱いマニュアル、プライマーセットおよび乾燥ポリメラーゼを使用した検査キットを作製して集団感染時に検査機関、医療機関に送付する準備を整えた。

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、ヒストプラス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属 (*Coccidioides immitis*, *C. posadasii*) とヒストプラスマ属 *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、播種性感染に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胞子による集団感染を引き起こす危険性が考えられる。

本研究では、分離培養された BSL3 真菌の安全かつ簡便な診断系を構築し、バイオテロを含めた集団感染事例が起きた際の迅速診断に役立てることを目的とする。今年度は、コクシジオイデス属およびヒストプラズマ属の簡便かつ高感度な検査法である LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法を実用化レベルまで改良する目的で、乾燥ポリメラーゼの有用性の検討、乾燥ポリメラーゼを用いた LAMP 法キットの作製、感度および特異度の検討、菌体取り扱いマニュアルの作製を行った。

## B. 研究方法

コクシジオイデス属検出のための LAMP 法の標的配列として、以前開発したコクシジオイデス特異的 PCR の標的である Coi9-1 領域を用いた。ヒストプラ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>) で設計したものをを用いた。

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  $\mu$ 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 (各 4 株ずつ) から抽出した。陰性コントロールとして *Aspergillus fumigatus* AfS35 と *Candida albicans* SC5314 の 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) 乾燥ポリメラーゼを使用した LAMP 法の検討

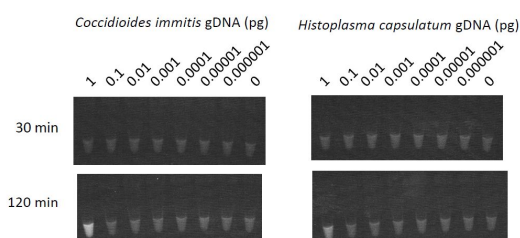


図 1. 乾燥ポリメラーゼを使用した LAMP 法の感度測定

*C. immitis* および *H. capsulatum* から抽出したゲノム DNA を定量し、10 倍ずつの希釈系列を作製して、乾燥ポリメラーゼを使用して LAMP 反応を行った。(図 1)。

*C. immitis*、*H. capsulatum* 共に 2 時間反応後の検出限界は 1 pg であった。以前行った、通常のポリメラーゼ (液体品) を用いた検討では、*Coccidioides* の検出限界は 100 fg であった (*Histoplasma* は未実施)。乾燥ポリメラーゼを用いた場合、感度は 10 分の 1 に低下したが、十分に高感度であると考え、長期間保存可能である乾燥ポリメラーゼを用いて今後の検討を行うこととした。

### 2) 複数の *Coccidioides* および *Histoplasma*

## 臨床分離株を用いた検討

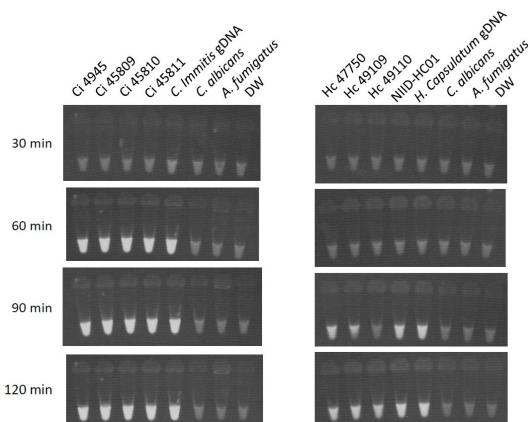


図 2. 複数の臨床分離株を用いた LAMP 法特異度の検討

これまで、*Coccidioides* 属、*Histoplasma* 属各 1 株ずつの臨床分離株から抽出し、精製した DNA を用いて LAMP 法の検討を行ってきた。千葉大学真菌医学医療センターから両菌種複数株の臨床分離株を分与して頂き、それらの菌株を用いて LAMP 法の特異度を検討した(図 2)。また、検査をより簡便に行うことを目的に、DNA 抽出には精製キット等を使用せず、エタノール滅菌後の菌体を煮沸した上清を用いた。今回検討した各 4 株の臨床分離株は全て LAMP 法によって検出された。また、120 分の反応では陰性コントロールは検出されなかった。さらに、DNA を精製することなく菌体煮沸液を用いて検査を行うことができることがわかった。

## D. 考察

ヒストプラズマ属やコクシジオイデス属がテロ目的で使用され、国内感染者が発生した場合には、検体から菌が分離されるかどうか予想できないので、医療機関の検査室でこれらの菌を偶発的に培養してしまう可能性が考えられる。

病原体の検出法について、PCR 法はサーマルサイクラー・増幅酵素の性能や操作者の技術への依存が強く、検査実施機関によって結

果が異なることも多い。LAMP 法は非常に簡素で、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、短時間で微量 DNA を検出することが可能であり、本実験で確立した LAMP 法を用いればコクシジオイデスおよびヒストプラズマを迅速簡便に検出できる。現時点では菌体から調製した DNA でしか検証できていないが、臨床検体を用いて本研究で確立した LAMP 法が可能になれば、上記のような危険を伴う菌の培養を回避することも可能であるため、今後検討を進めていきたい。

## E. 結論

LAMP 法によるコクシジオイデス属およびヒストプラズマ属の迅速診断キットを作製し、集団感染時に検査機関、医療機関に送付する準備を整えた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

英文原著

1. Saraya T, Tanabe K, Araki K, Yonetani S, Makino H, Watanabe T, Tsujimoto N, Takata S, Kurai D, Ishii H, Miyazaki Y, Takizawa H, Goto H. Breakthrough invasive *Candida glabrata* in patients on micafungin: a novel *FKS* gene conversion correlated with sequential elevation of MIC. *Journal of Clinical Microbiology*. 52(7):2709-2712, 2014.
2. Urai M, Kaneko Y, Niki M, Inoue M, Tanabe K, Umeyama T, Fukazawa H, Ohno H, Miyazaki Y. Potent drugs that attenuate anti-*Candida albicans* activity

- of fluconazole and their possible mechanisms of action. J Infect Chemother. 20(10):612-615, 2014.
3. Ikeda I, Ohno T, Ohno H, Miyazaki Y, Nishimoto K, Fukushima S, Makino T, Ihn H. A case of Fusarium paronychia successfully treated with occlusive dressing of antifungal cream. J Dermatol. 41(4):340-2, 2014.
  4. Tarumoto N, Kinjo Y, Kitano N, Sasai D, Ueno K, Okawara A, Izawa Y, Shinozaki M, Watarai H, Taniguchi M, Takeyama H, Maesaki S, Shibuya K, Miyazaki Y. Exacerbation of Invasive *Candida albicans* Infection by Commensal Bacteria or a Glycolipid Through IFN- $\gamma$  Produced in Part by iNKT Cells. J Infect Dis. , 2014.
  5. Seki M, Ohno H, Gotoh K, Motooka DNAkamura S, Iida T, Miyazaki Y, Tomono K. Allergic bronchopulmonary mycosis due to co-infection with *Aspergillus fumigatus* and *Schizophyllum commune*. IDCases. 1:5-8, 2014.
- 和文総説
1. 梅山 隆, 宮崎義継. 侵襲性カンジダ症の診断～血清診断～遺伝子診断. . 侵襲性カンジダ症. 115-117, 2014年, 医薬ジャーナル社.
  2. 宮崎義継, 金子幸弘, 樽本憲人. V. 感染症検査・真菌. パーフェクトガイド検査値事典[第2版]. 477-481, 2014年, 総合医学社.
  3. 梅山 隆, 大野秀明, 宮崎義継. 真菌症-よく目にする真菌症から今後注意すべき真菌症まで-*Aspergillus*: 病態と抗原価の関連. 感染症内科. 2(6):575-580, 2014年.
  4. 金子幸弘, 浦井 誠, 宮崎義継. III 診断・治療法から見た大切な真菌症、4 治療薬の選択と投与. 目で見る真菌と真菌症. p192-202, 2014年, 医薬ジャーナル社, 大阪.
  5. 河野 茂, 亀井克彦, 二木芳人, 宮崎義継. 座談会: 深在性真菌症の診断・治療ガイドラインを読み解く. 呼吸. 33(5):435-43, 2014年.
  6. 大野秀明, 宮崎義継. 日本にも現れたクリプトコックス・ガッティ. 日経サイエンス. 44(5):76p76, 2014年, 日本経済新聞出版社, 東京.
  7. 田辺公一, 宮崎義継. 耐性病原体 up-to-date ~ 耐性メカニズムから治療戦略まで ~、1 抗微生物薬に対する耐性メカニズム、2 抗真菌薬耐性. 化学療法の領域. 30(S-1):20-5, 2014年.
  8. 宮崎義継, 砂川富正, 大石和徳. ミニ特集: 病原体サーベイランス体制とその利用、国立感染症研究所の立場から. 小児科. 55(4):403-6, 2014年.
  9. 浦井 誠, 金子幸弘, 宮崎義継. 深在性真菌症における治療薬の選択の変化 ガイドライン改訂から見えてくる今後の治療展望. どう変わり、どう攻める? 深在性真菌症の新しい治療. 感染と抗菌薬. 1:5-13, 2014年.
  10. 浦井 誠, 金子幸弘, 宮崎義継. どう変わり、どう攻める? 深在性真菌症の新しい治療: 深在性真菌症における治療薬の選択の変化 ガイドライン改訂から見えてくる今後の治療

展望. 感染と抗菌薬. 17(1):5-13, 2014年.

11. 梅山 隆, 大野秀明, 宮崎義継. ムーコル症: 診断の実際とピットフォール. 呼吸器内科. 25(1):32-7, 2014年.
12. 樽本憲人, 金城雄樹, 北野尚樹, 渋谷和俊, 前崎繁文, 宮崎義継. 全身性カンジダ感染増悪における iNKT 細胞の関与. Med Mycol J. 55J:J115-J122, 2014年.
13. 大野秀明, 荒岡秀樹, 梅山 隆, 金子幸弘, 宮崎義継. 接合菌症. 臨床検査. 58(1):97-103, 2014年.

## 2. 学会発表

1. 金城雄樹, 上野圭吾, 浦井 誠, 金子幸弘, 大久保陽一郎, 清水公德, 大野秀明, 亀井克彦, 川本 進, 渋谷和俊, 宮崎義継. シンポジウム 3 病原性真菌の感染成立機構 クリプトコックスの莢膜多糖による免疫回避機構の解析及びその制御法の開発. 第58回日本医真菌学会総会. 11月1-2日, 2014年, 横浜.
2. 梅山 隆, 山越 智, 田辺公一, 名木 稔, 大野秀明, 宮崎義継. アスペルギルス抗真菌薬耐性. 第58回日本医真菌学会総会・学術集会. 11月1-2日, 2014年, 横浜.
3. 壇辻百合香, 大野秀明, 梅山 隆, 上野圭吾, 大久保陽一郎, 田辺公一, 名木 稔, 山越 智, 金城雄樹, 杉田 隆, 渋谷和利, 宮崎義継. マクロファージの貪食を指標とした *Cryptococcus gattii* 感染病態の評価. 第58回日本医真菌学会総会・学術集会. 11月1-2日, 2014年, 横浜.
4. 上野圭吾, 金城雄樹, 大久保陽一郎, 清水公德, 金子幸弘, 浦井 誠, 川本 進, 亀井克彦, 大野秀明, 渋谷和俊, 宮崎義継. 高病原性 *Cryptococcus gattii* の感染防衛に寄与する樹状細胞ワクチンの作用. 第58回日本医真菌学会総会. 11月1-2日, 2014年, 横浜.
5. 浦井 誠, 金子幸弘, 上野圭吾, 田辺公一, 梅山 隆, 山越 智, 金城雄樹, 大野秀明, 杉田 隆, 宮崎義継. 高病原性 *Cryptococcus gattii* の莢膜多糖成分が免疫細胞に及ぼす影響. 第58回日本医真菌学会総会. 11月1-2日, 2014年, 横浜.
6. 田辺公一, 宮崎義継. カンジダ症における薬剤耐性. 第97回日本細菌学会関東支部総会. 10月30-31日, 2014年, 東京.
7. 上野圭吾, 金城雄樹, 大久保陽一郎, 浦井 誠, 金子幸弘, 大野秀明, 亀井克彦, 渋谷和俊, 宮崎義継. 高病原性 *Cryptococcus gattii* の感染防衛に寄与する樹状細胞ワクチン. 第63回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 10月29-31日, 2014年, 東京.
8. 名木 稔, 田辺公一, 石野敬子, 梅山 隆, 山越 智, 大野秀明, 宮崎義継. 真菌の薬剤耐性の現状と課題. 第63回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 10月29-31日, 2014年, 東京.
9. 本川奈々, 福田雄一, 今村圭文, 宮崎泰可, 泉川公一, 大野秀明, 柳原克紀, 宮崎義継, 早田 宏, 田代隆良, 河野茂. 肺アスペルギローマとの鑑別が困難であった *Pseudallescheria boydii* による肺菌球症の1例. 第62回日本化学療法学会西日本支部総会・第57回日本感染症学会中日本地方会学術集会・

- 第 84 回日本感染症学会西日本地方会  
学術集会 合同開催. 10月23日-25日,  
2014年, 岡山.
10. 多田明子, 山本剛伸, 藤本亘, 河口 豊,  
浦井 誠, 梅山 隆, 宮崎義継. 黒色菌  
糸症の1例. 第263回日本皮膚科学会  
岡山地方会. 9月21日, 2014年, 岡山.
  11. 上野 圭吾, 大久保陽一郎, 清水公德,  
金子幸弘, 浦井 誠, 水口裕紀, 奈良拓  
也, 川本 進, 大野秀明, 澁谷和俊, 宮  
崎義継, 金城雄樹. 高病原性クリプト  
コックス症に対する樹状細胞ワクチン  
の効果. 第25回日本生体防御学会学術  
総会. 7月9-11日, 2014年, 仙台.
  12. 田辺公一, 大野秀明, 名木 稔, 浦井  
誠, 金子幸弘, 梅山 隆, 山越 智, 宮崎  
義継. カンジダ属の抗真菌薬耐性. 第  
35回関東医真菌懇話会. 6月7日, 2014  
年, 東京.
  13. 田辺公一, 大野秀明, 名木 稔, 浦井  
誠, 金子幸弘, 梅山 隆, 山越 智, 荒木  
光二, 皿谷 健, 宮崎義継. ミカファン  
ギン耐性 *Candida glabrata* 株の in  
vitro 性状解析. 第35回関東医真菌懇  
話会. 6月7日, 2014年, 東京.
  14. 浦井 誠, 金子幸弘, 稲垣浩司, 狩谷  
哲芳, 政本大二郎, 水谷 真, 名木 稔,  
上野圭吾, 山越 智, 田辺公一, 梅山  
隆, 大川原明子, 金城雄樹, 大野秀明,  
宮崎義継. 腹膜透析中に発症した  
*Cryptococcus laurentii* による腹膜炎  
の一例. 第35回関東医真菌懇話会. 6  
月7日, 2014年, 東京.
  15. 金城雄樹, 金子幸弘, 梅山 隆, 川上和  
義, 大石和徳, 宮崎義継. マウスモデ  
ルでの肺炎球菌蛋白・糖脂質併用ワク  
チンの感染防御効果の解析. 第88回日  
本感染症学会学術講演会・第62回日本  
化学療法学会総会合同学会. 6月18日  
-20日, 2014年, 福岡.
  16. 梅山 隆, 大野秀明, 田辺公一, 山越  
智, 名木稔, 宮崎義継. 症例から学ぶ  
感染症セミナームーコル症の真菌同定  
検査. 第88回日本感染症学会学術講演  
会・第62回日本化学療法学会総会合同  
学会. 6月18日-20日, 2014年, 福岡.
  17. 梅山 隆, 山越 智, 田辺公一, 名木  
稔, 金子幸弘, 金城雄樹, 大野秀明, 宮  
崎義継. 病原糸状菌 *Aspergillus  
fumigatus* の Polo-like キナーゼ遺伝子  
破壊株の菌糸成長・分生子形成・抗真  
菌薬感受性への影響. 第88回日本感染  
症学会学術講演会・第62回日本化学療  
法学会総会合同学会. 6月18日-20日,  
2014年, 福岡.
  18. 田辺公一, 大野秀明, 名木 稔, 浦井  
誠, 金子幸弘, 梅山 隆, 山越 智, 知花  
博治, 亀井克彦, 宮崎義継. カンジダ  
属の抗真菌薬感受性の変貌. 第88回日  
本感染症学会学術講演会第62回日本  
化学療法学会総会合同学会. 6月18-20  
日, 2014年, 博多.
  19. 浦井 誠, 金子幸弘, 田辺公一, 梅山  
隆, 山越 智, 金城雄樹, 大野秀明, 杉  
田 隆, 宮崎義継. 高病原性  
*Cryptococcus gattii* 由来荚膜多糖の免  
疫細胞に及ぼす影響. 第88回日本感染  
症学会学術講演会第62回日本化学療  
法学会総会合同学会. 6月18-20日,  
2014年, 博多.
  20. 宮崎義継. 真菌感染症について: 薬剤  
耐性真菌. 第3回日本微生物学連盟市  
民公開フォーラム<薬が効かない感染  
症の話-薬剤耐性感染症の現状とその  
対策>. 4月26日, 2014年.

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  
（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業））

分担研究報告書

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
	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
	見理 剛	国立感染症研究所 細菌第二部

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。その危険性に対し的確な対処法を立案・整備する上で、バイオテロ病原体を網羅的かつ迅速に配列解読することは最も確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。

炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) は炭疽症の原因となる細菌で、第二次世界大戦以降、生物兵器として各国の軍事機関に研究され、1993 年のオウム真理教によるテロ未遂や 2001 年のアメリカのテロ事件にも利用された事がある。そのため、炭疽症のアウトブレイクが起きた際に、原因菌の出自を詳細に調査することはバイオセキュリティ上の重要な意味を持つ。出自を調査するにはコアゲノムを用いた分子系統解析を行うのが有効であると考えられるが、コアゲノム情報を用いた分子系統解析を容易に行えるツールは存在していなかった。そのため我々は *B. anthracis* の次世代シーケンス (next-generation sequencing: NGS) データをアップロードすると single nucleotide polymorphisms (SNPs) を抽出し、*B. anthracis* を含む *B. cereus* グループ中の系統的位置関係を推定するウェブアプリケーション GcoGSA-BA (Global core Genome SNP Analysis for *Bacillus anthracis*) を開発した。GcoGSA-BA はコアゲノム系統解析だけでなく、pX01、pX02 といった病原性を規定するプラスミドや pX01 上に存在する三つの炭疽菌毒素遺伝子 (lethal factor, LF; edema factor, EF; protective antigen, PA) を検出する機能も有しており、炭疽菌 (*B. anthracis* Ames Ancestor) ばかりでなく炭疽菌毒素遺伝子を例外的に保持している *B. cereus* G9241 の系統的位置関係も正しく推定し、更に炭疽菌毒素遺伝子を検出することができた。テロを疑われる炭疽症のアウトブレイクが起きた際に GcoGSA-BA を用いることで、バイオテロリズムのために用意された株なのか、環境由来の病原菌なのかを迅速かつ容易に判断することができ、国内外のバイオセキュリティに大きく貢献することができると考えられる。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。

## 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、効率の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

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。詳細は研究結果を参照。

(倫理面への配慮)

該当なし

## C . 研究結果

### 1) ネットワーク経路によるバイオテロ病原体検査のための解析システム

現在、感染研・ゲノムセンターにベンチトップ型・次世代シーケンサーと情報解析サーバーが整備されている。感染研に臨床検体が到着後、数日で解析・検査結果を報告できるようにはなっているものの、感染研に検体が送付されるまでには現場で数多くの微生物検査等が行われた後になってしまうケースが少なくない。このような現状の中、各地方自治体にも本研究課題で構築したシステムを導入して頂き、検査体制の一助となるのであれば非常に有効かつ迅速なバイオテロ対策に資するものと考えている。

炭疽菌が候補として浮上した場合、コアゲノム SNPs を利用した炭疽菌・菌株の類縁関係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1と2)。炭疽菌ゲノム 5.23 Mb 全体に渡り特徴的な塩基アレル 657,183 箇所を用いたゲ

ノム分子系統樹を作成できる(図3)。従来の MLST 法では分解能が非常に悪く、由来特定に難渋した菌株においても高精度に分類することを可能にした。

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(図2)。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毒素因子の特定も可能にした(図2)。

### 2) 国内分離ボツリヌス菌のゲノム分子疫学解析

国内分離ボツリヌス菌のゲノム分子疫学解析を行った(感染研・細菌第二部・見理先生との共同研究)。公開ゲノム配列とのコアゲノム比較解析から、144,896 箇所の SNPs サイトを抽出し、ゲノム分子系統樹を作成した(図5)。従来の分子疫学解析を精度よく評価することに成功し、茨城県と岩手県に分離県と年代が異なる分離株においても由来特定と同一性を議論する基盤情報を収集解析することができた。

## D/E . 考 察・結 論

これまで分担研究として、WHO 指定バイオテロ病原体の配列データベース化を進めてきた。ゲノム情報を活用することにより有効なトレーサビリティに役立つ目的である。構築データベースを有効に活用するためには、迅速な解読リード配列の取得が望ましく、そのためには多くの難題が残っている。本年度の課題として、情報解析の NGS - MePIC - MEGAN - GcoGSA の解読・解析パイプラインの運用と公開を目指した。検査現場からのデータ転送等、迅速にゲノム比較解析を行うために未だ解消されていないボトルネックが残っているが、誰もが簡便に利用できるシステムが先行していけば、シーケンサー等のインフラ整備が後々追いついてくるものと考えている。

## F . 健康危険情報

特になし



## G . 研究発表

### 1 ) 論文発表

- Kenri T, Sekizuka T, Yamamoto A, Iwaki M, Komiya T, Hatakeyama T, Nakajima H, Takahashi M, Kuroda M, Shibayama K. Genetic characterization and comparison of *Clostridium botulinum* isolates from botulism cases in Japan between 2006 and 2011. Appl Environ Microbiol. 2014 Nov;80(22):6954-64. doi: 10.1128/AEM.02134-14. Epub 2014 Sep 5. PubMed PMID: 25192986; PubMed Central PMCID: PMC4249013.
- Yamashita A, Sekizuka T, Kuroda M. GcoGSA-BA: A Global Core Genome SNP Analysis for *Bacillus anthracis*. Biosecur Bioterror. Volume 13, Number 1, 2015. DOI: 10.1089/hs.2014.0076 in press.

### 2 ) 学会発表

- 山下明史、関塚剛、黒田誠. GcoGSA-BA NGS データから炭疽菌のコアゲノム系統解析を行うウェブアプリケーション。第88回日本細菌学会総会 岐阜市 平成 27 年 3 月 26-28 日 (ポスター発表)
- Kenri T, Sekizuka T, Yamamoto A, Iwaki M, Takahashi M, Kuroda M, Shibayama K. Whole genome single-nucleotide polymorphism (SNP) Analysis of *Clostridium botulinum* isolates from botulism cases in Japan. 51th Interagency Botulism Research Coordinating Committee (IBRCC 2014), Philadelphia PA, USA. October 26-29, 2014. (Poster presentation).

## H . 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

該当なし

# 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.

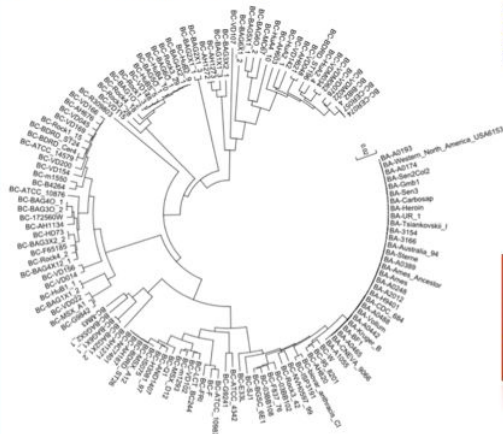
Mail address:

Send

Change number of samples

Reference genome: *Bacillus anthracis* str. 'Ames Ancestor' chromosome, complete genome. (gil50196905|refl|NC\_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

MiSeq



便 血液、髄液 咽頭ぬぐい液



~~GSA 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
gil50196905 refl NC_007530.2	5227419	4914301 (94.0%)	4827010 (92.3%)
gil20520075 gbl AE011190.1	181677	163651 (90.1%)	161559 (88.9%)
gil50118566 gbl AE017335.3	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1 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。

# GcoGSA *Bacillus anthracis* based on phylocoregenomics

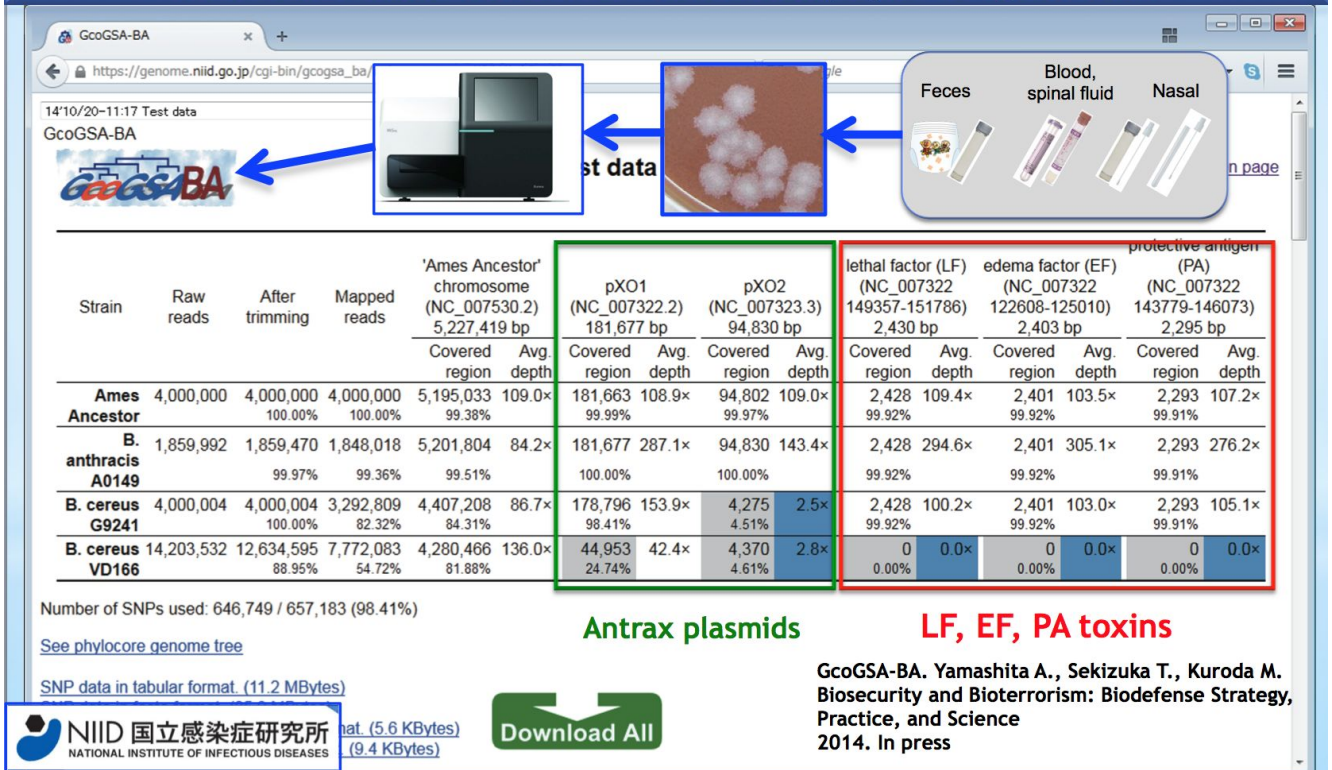


図2 GcoGSA を用いたコアゲノム SNPs 分子系統解析と炭疽菌プラスミド・毒素因子(LF, EF, PA 毒素)の特定

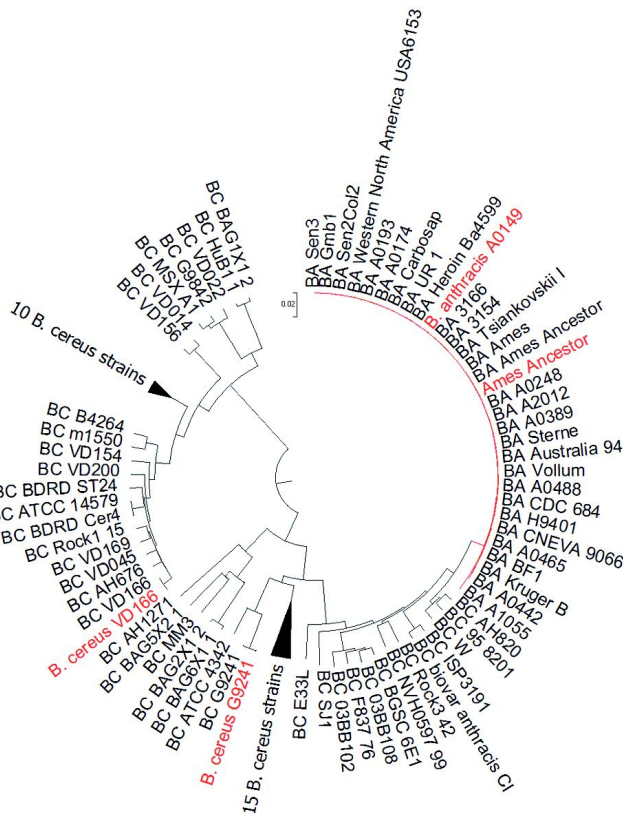
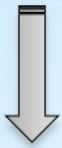


図3 コアゲノム SNPs 分子系統解析の1例。炭疽菌と類縁のセレウス菌との鑑別を容易にするだけでなく、炭疽菌株グループの中の詳細な分子疫学を可能とした。

illumina .fastq 生解読リード



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

GcoGSA :  
Global core Genome SNPs Analysis

GcoGSA-BA (炭疽菌、セレウス菌)

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

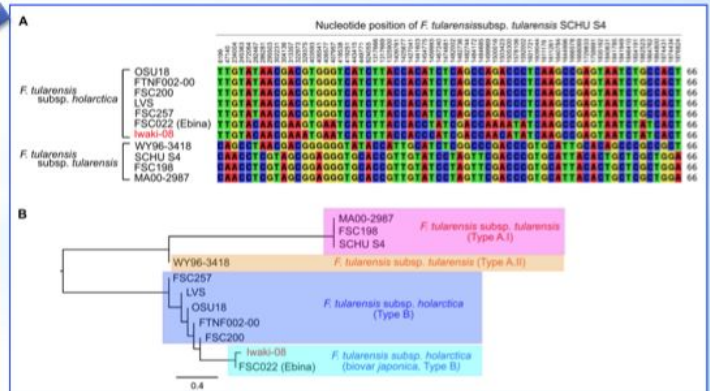
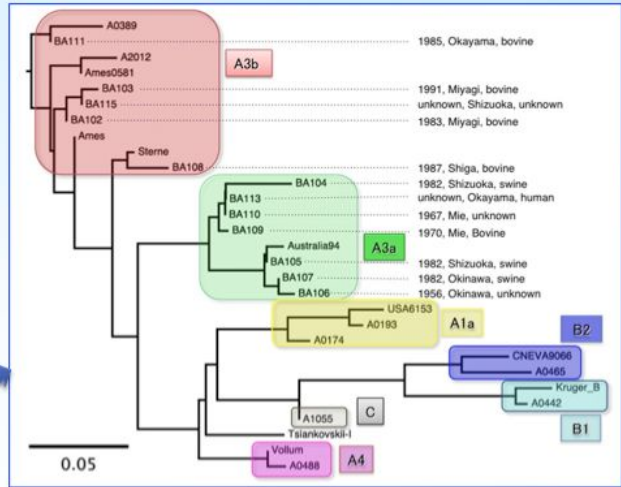


図4 今後、ペスト、野兎病、コクシエラ、類鼻疽、ボツリヌスと順々に構築予定である。



## Genetic characterization and comparison of *Clostridium botulinum* strains isolated from botulism cases in Japan between 2006 and 2011.

Kenri T<sup>1</sup>, Sekizuka T<sup>2</sup>, Yamamoto A<sup>3</sup>, Iwaki M<sup>3</sup>, Komiya T<sup>3</sup>, Hatakeyama T<sup>4</sup>, Nakajima H<sup>5</sup>, Takahashi M<sup>3</sup>, Kuroda M<sup>2</sup>, Shibayama K<sup>3</sup>.

Figure 5

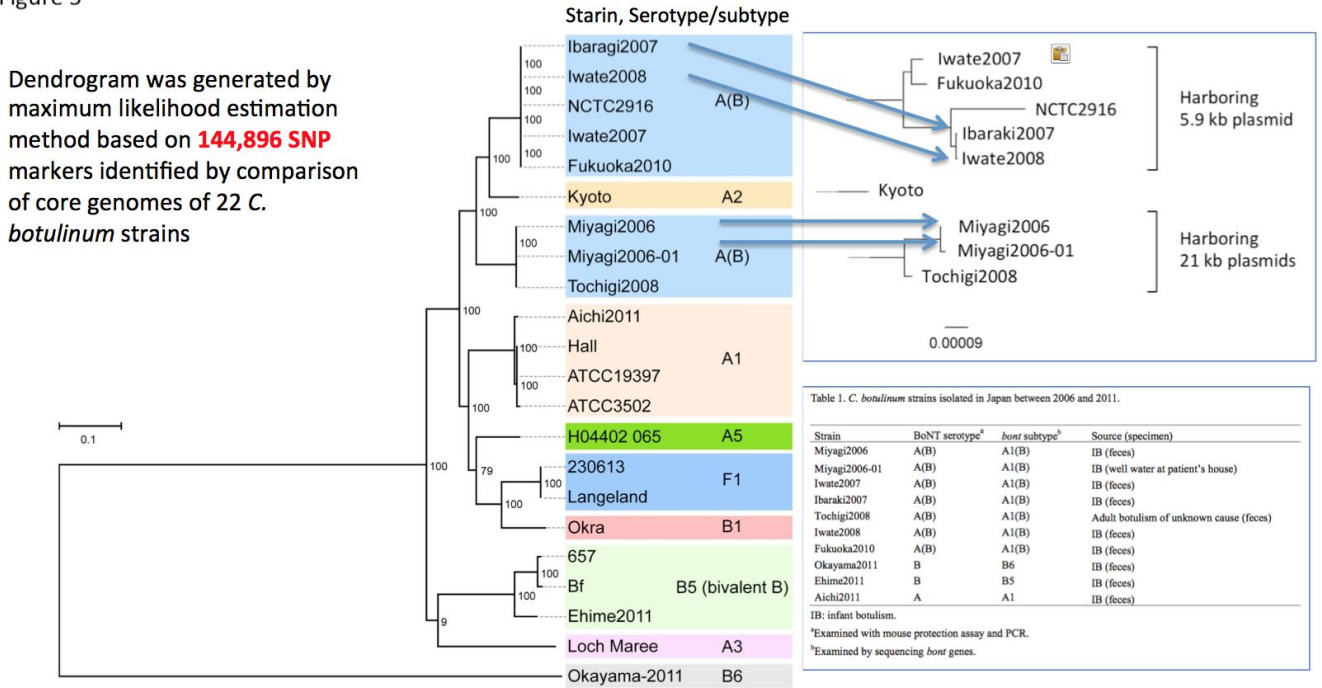


図5 国内分離ボツリヌス菌のゲノム分子疫学解析（感染研・細菌第二部 見理先生との共同研究）。国内分離株と公開ゲノム配列のコアゲノム比較解析から、144,896箇所のSNPsサイトを抽出し、ゲノム分子系統樹を作成した。従来の分子疫学解析を精度よく評価することに成功し、分離県と年代が異なる分離株においても由来特定と同一性を議論する基盤情報を収集解析することができた。

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 中島 典子（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た既知あるいは未知の病原体を病理組織中に検出する方法として、病原体のゲノムをオリゴヌクレオチドプローブを用いた *in situ* hybridization 法がある。今年度は我々が開発した高感度で特異性の高い *in situ* hybridization-AT tailing (ISH-AT) 法と市販されている Z 型オリゴヌクレオチドプローブを用いた分岐 DNA-ISH 法である ViewRNA 法と RNAscope 法を比較検討した。標的核酸のコピー数が 100/細胞の場合は両者とも検出可能であり、プローブ作製までの日数、とコストパフォーマンスの面からも、ISH-AT 法を第 1 選択としてよいことがわかった。非常に少ないコピー数のゲノムを検出する際は、プローブ数の多い、分岐 DNA-ISH 法も試行する予定である。分岐 DNA-ISH 法である View RNA 法と RNAscope 法については今後さらに比較検討する予定である。

A . 研究目的

バイオテロ対策として病原体の病理学的検出法を確立しておく必要がある。免疫組織化学や *in situ* 核酸検出法は組織切片上で病原体の検出ができる方法であり、病原体の体内分布や病変との関連を考えるうえで重要な病理学的解析法である。組織切片上で病原体を検出する方法には病原体の蛋白抗原を検出する免疫組織化学と遺伝子核酸を検出する *in situ* hybridization (ISH) 法がある。良質な抗体がすでにある場合、免疫組織化学は安定した検出系となるが、未知の病原体等の場合、あらたに特異的な抗体を作製しなければならず、時間を要し緊急対応は難しい。外来病原体遺伝子を次世代シーケンス法等により同定できるよう

になった近年、塩基配列情報に基づいて ISH 法用のオリゴヌクレオチドプローブを作成するのは容易である。従来、オリゴヌクレオチドプローブによる ISH 法は感度が低く実用的でなかったが、我々の開発した ISH-AT 法や市販の Z 型オリゴヌクレオチドプローブ（ターゲットハイブリ）と分岐 DNA プローブを用いた ISH 法は高感度で特異性の高い方法であり、緊急時の迅速病理学的病原体検出法の有力なツールとなる。分岐 DNA-ISH 法は現在 2 社から販売されている。QuantiGene View RNA (Affymetrix 社、ベリタス社) と RNAscope (ACD 社、コスモバイオ) であり、後者のほうが反応ステップが多いが、それだけ感度がいいと宣伝されている。また後者では、HRP-DAB の発色が

可能であり、より解像度の高い染色像が得られる。この方法で用いるプローブは標的遺伝子の塩基配列情報(最低 300 塩基長以上)を提供するだけで検出用の混合プローブを注文できる。実際の生物テロや新興・再興感染症発生に備え、最良の検出方法を確立するために、今回、ISH-AT 法と ViewRNA 法、RNAscope 法を比較検討した。

## B . 研究方法

### 1)材料

#### a) 病理組織標本

ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織を使用。ヒト剖検組織:パンデミックインフルエンザ A/H1N1pdm09 剖検肺組織、重症熱性血小板減少症候群(SFTS)剖検リンパ節。動物実験剖検組織:中東呼吸器症候群コロナウイルス(MERS CoV)感染マウス組織(国立感染症研究所・感染病理部岩田先生より分与)。

#### b) プローブ

・ISH-AT 法用のプローブの作成:A/H1N1pdm 09 (AB538390.1):NP 領域に 2 ヶ所。

SFTSV :S 鎖領域 1 ヶ所、L 鎖領域 1 ヶ所に設計したプローブ。

MERS-CoV: :NP 及び Env 領域に 1 種類ずつ作製した。ISH-AT 施行時には、2 種類のプローブの mixture とした。

・分岐 DNA-ISH 法のプローブの注文(ベリタス社):A(H1N1)pdm 09 (AB538390.1) NP 部分 20 ヶ所の混合プローブと 2 ヶ所の混合プローブ、SFTSV S 鎖 領域に 20 ヶ所(ベリタス社)あるいは 19 ヶ所の混合プローブ(コスモバイオ社)を作成した。

### 2) 方法

・ISH-AT 法

前処理法:抗原賦活液(DAKO 社)中で 95℃、40 分、膜透過処理を行い、Proteinase K(PK)(DAKO 社)濃度を 0.1, 1, 5, 10, 100 µg/ml にして至適濃度を決定した。また RNAscope 法のキットの Pretreatment 2 液で煮沸 15 分、Pretreatment 3 液 40℃ 処理を 15 あるいは 30 分行った。

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

・分岐プローブ ISH 法

分岐 DNA-ISH 法は基本的に添付説明書に従ったが、ホルマリン再固定のステップは省略した。(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。感染動物標本に関しては動物実験委員会の承認を得て実験が行われた。

## C . 研究結果

### (1) ISH-AT 法の前処理

前処理の条件はサンプルによって至適化しないといけませんが、これまで PK はまず 0.1 µg/ml で試行し、検出できない場合は 1 µg/ml にしてきた。A/H1N1pdm09 肺炎の剖検肺組織(100 コピー/細胞)を用いて前処理で結果がどのように変わるか確認したところ、PK=1 がもっとも検出率がよく、10, 50, 100 µg/ml にすると抗原シグナルが増えても組織の形態が損傷されて(過消化)いた。RNAscope の試薬を用いた前処理ではヒト肺組織で推奨されている strong という条件で PK1 µg/ml と同等の結果が得られた。

### (2) ISH-AT 法による MERS CoV 感染

マウス組織におけるウイルス RNA の検出

免疫組織化学で示されたウイルス抗原の局在に一致してウイルスゲノムが検出された。

ウイルスコピー数が  $10^5$  コピーと  $10^3$  コピーの検体で試行したが、コピー数が多い切片でより多くの陽性シグナルが検出された。 $10^3$  コピーの検体でも陽性シグナルが得られた。

#### (3) ISH-AT 法と分岐 DNA-ISH に用いるプローブの比較

双方とも標的核酸の 40 塩基に対し、1 つあるいは 1 組のオリゴプローブがハイブリする。A/H1N1pdm09 の NP 領域 2 ヲ所に ISH-AT 用オリゴヌクレオチドプローブを作成し混合プローブとした。分岐 DNA-ISH 法用には NP 領域 20 ヲ所の混合プローブと 2 ヲ所の混合プローブを用意した。切片中の mRNA のコピー数が  $10^4$  コピー/細胞である切片において、2 ヲ所の混合プローブを用いた ISH-AT 法では十分量検出できたが、2 ヲ所の混合 Z 型プローブを用いた分岐プローブ-ISH 法ではほとんど検出できなかった。よって 2 ヲ所の probe (結合部分は計 80 塩基長)での検出感度は ISH-AT 法のほうが高感度といえる。RNAscope の系では 2 ヲ所の混合 Z 型プローブで検出可能かどうか今後解析する予定である。RNAscope 法では標的核酸について最低 300 塩基長を要するので ISH-AT 法と同等の感度には 5-7 組のプローブ mixture を要することが予想される。逆に ISH-AT 法ではプローブ数を増やすことで検出感度を上げられる可能性が十分考えられた。

#### (4) SFTS 剖検リンパ節におけるウイルスゲノムの検出

ISH-AT 法と ViewRNA 法で比較すると、迅速・簡便性、感度はほぼ同等であった。

ISH-AT-CSA 法と RNAscope 法を比較するとコピー数の多い切片では両者の検出感度はほぼ同

等であったが、コピー数が少なくなると RNAscope 法のほうがよりシグナル/ノイズ比が高く、陽性シグナルが多かった。

#### D. 考察

次世代シーケンス法などにより患者あるいは死亡者から採取した検体中の病原体遺伝子を同定され、塩基配列の一部でも確定できれば、速やかに ISH 用のオリゴヌクレオチドプローブを作成し、病理切片中で病原体遺伝子検出し、その体内分布(局在)を明らかにできる。検出方法としてはコピー数がある程度あれば ISH-AT 法が最もはやく対処できる。死亡時にはすでに組織中に残存するウイルスコピー数が少ない場合はリアルタイム RT-PCR で切片中に残存する標的遺伝子の量を測定し、1000 コピー以上であれば ISH-AT 法で検出できる可能性があると判断している。コピー数が少ない場合、市販の分岐 DNA-ISH 法も試行してみるべきである。現在国内ではベリタス社(Quant iGene View RNA)とコスモバイオ(RNAscope ACD 社)が販売している。難点は非常にコストがかかることである。1 スライドの反応にプローブと試薬代が 1-2 万円かかる。RNAscope 法のほうが感度がよいと思われるが、リアルタイム RT-PCR により解析したコピー数とつぎ合わせてより詳細な検出感度を検討する必要がある。また非特異シグナルなども併せて検討する予定である。

#### E. 結論

病原体遺伝子の in situ 検出法を比較検 AT 法、ISH-AViewRNA 法、RNAscope 法では、標的核酸のコピー数が 100/細胞の場合はほぼ同様の検出感度であった。プローブ作製までの日数、



とコストパフォーマンスの面からも、ISH-AT法を第1選択としてよいことがわかった。非常に少ないコピー数のゲノムを検出する際は、ISH-AT法の前処理やプローブ数を増やすなどの工夫をしながら、プローブ数の多い、分岐DNA-ISH法も試行する予定である。

#### F . 健康危険情報

なし

#### G . 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Sato Y, Nakajima N, Koike S, Iwasaki T, Sata T, Yamashita T, Minagawa H, Taguchi F, Hasegawa H, Shimizu H, Nagata N. Establishment of a panel of in-house polyclonal antibodies for the diagnosis of enterovirus infections. *Neuropathology*. Sep 28. 2014 [Epub ahead of print]
2. Moritake H, Kamimura S, Nunoi H, Nakayama H, Suminoe A, Inada H, Inagaki J, Yanai F, Okamoto Y, Shinkoda Y, Shimomura M, Itonaga N, Hotta N, Hidaka Y, Ohara O, Yanagimachi M, Nakajima N, Okamura J, Kawano Y. Clinical characteristics and genetic analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia with hemophagocytic lymphohistiocytosis: a Japanese retrospective study by the Kyushu-Yamaguchi Children's Cancer Study Group. *Int J Hematol*. 100(1):70-8, 2014

3. Watanabe T, Zhong G, Russell CA, Nakajima N, Hatta M, Hanson A, McBride R, Burke DF, Takahashi K, Fukuyama S, Tomita Y, Maher EA, Watanabe S, Imai M, Neumann G, Hasegawa H, Paulson JC, Smith DJ, Kawaoka Y. Circulating avian influenza viruses closely related to the 1918 virus have pandemic potential. *Cell Host Microbe*. 15(6):692-705, 2014
4. Sakai K, Ami Y, Tahara M, Kubota T, Anraku M, Abe M, Nakajima N, Sekizuka T, Shirato K, Suzaki Y, Ainai A, Nakatsu Y, Kanou K, Nakamura K, Suzuki T, Komase K, Nobusawa E, Maenaka K, Kuroda M, Hasegawa H, Kawaoka Y, Tashiro M, Takeda M. The host protease TMPRSS2 plays a major role in in vivo replication of emerging H7N9 and seasonal influenza viruses. *J Virol*. 88(10):5608-16, 2014
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. 209(6):816-27, 2014

6. 中島典子 : H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスに感染したヒトの臨床、病理およびウイルス学的知見 . 化学療法の領域 30:40-48, 2014
7. 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹 : ウイルス性肺炎 . 病理と臨床 32 : 1146-1153, 2014
8. 中島典子 : オリゴヌクレオチドプローブを用いた新しいin situ ハイブリダイゼーション法 . 呼吸 33: 152-159, 2014
9. 高橋健太、鈴木忠樹、中島典子、飛梅 実、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹 : 脳炎・脳症の病理 Neuroinfection . 神経感染症 19:32-39, 2014
10. 中島典子 : インフルエンザ感染症の病理 . 小児内科 2014, 45:1935-1941

## 2. 学会発表

### 1) 国際発表

1. Kouji Sakai, Yasushi Ami, Maino Tahara, Noriko Nakajima, Makoto Kuroda, Hideki Hasegawa, Yoshihiro Kawaoka, Masato Tashiro, Makoto Takeda. The host protease Tmprss2 play a major role for influenza virus replication in vivo. International Union of Microbiological Societies (IUMS 2014)- XIVth

International congress of Bacteriology and Applied Microbiology, XIVth International Congress of Mycology, XVIth International Congress of Virology (カナダ) 2014

2. Osamu Kotani, Naeem Asif, Tadaki Suzuki, Naoko Iwata, Noriko Nakajima, Harutaka Katano, Takushi Hosomi, Hiroyuki Tsukagoshi, Hideki Hasegawa, Fumihiro Taguchi, Hiroyuki Shimizu, Noriyo Nagata Comparative analyses of the pathogenicity of two isolates of Saffold virus in neonatal mouse. International Picornavirus meeting (Europic2014) (ベルギー) 2014
3. Noriko Nakajima, Yuko Sato, Hideki Hasegawa, Hoang Ngoc Thach, Nguyen Trung Thuy, Tran Minh Dien, Nguyen Thanh Liem, Shoji Kawachi, Kazuo Suzuki Pathological study of Severe ARDS cases in NHP-Hanoi International symposium and Teikyo-Harvard program (東京) 2014

## 2) 国内発表

1. 酒井宏治、網康 至、田原舞乃、久保田耐安楽正輝、中島典子、高下恵美、関塚剛史、駒瀬勝啓、信澤枝里、小田切孝人、前仲勝実、黒田 誠、長谷川秀樹、河岡義裕、田代真人、竹田 誠 : II 型膜貫通型セリンプロテアーゼ Tmprss2 は、HA 開裂部位に mono-basic なアミノ酸配列をもつ A 型インフルエンザウイルスに対する肺内必須活性化酵素である . 第 62 回日本ウイルス学

会学術集会（横浜）2014年11月

2. 渡辺登喜子、Gongxun Zhong Col in Russell、中島典子、八田正人、Anthony Handson、高橋健太、渡辺真治、今井正樹、長谷川秀樹、河岡義裕：スペイン風邪ウイルスに類  
似の鳥インフルエンザウイルスのパンデ  
ミックポテンシャル．第 62 回日本ウイル  
ス学会学術集会（横浜）2014年11月
  3. 朴ウンシル、佐藤由子、中島典子、古屋哲  
也、水谷哲也、今岡浩一、森川 茂：日本  
国内ネコにおける新規モルビリウイルス  
（feline morbillivirus, FMV）の疫学調  
査．第 62 回日本ウイルス学会学術集会（横  
浜）2014年11月
  4. 福本 瞳、高橋健太、佐藤由子、峰 宗太郎、  
保科しほ、中島典子、佐伯秀久、長谷川秀  
樹、黒田 誠、片野晴隆：網羅的ウイルス  
検出法 multivirus real-time PCR の改良  
と臨床検体への応用．第 62 回日本ウイル  
ス学会学術集会（横浜）2014年11月
  5. 竹田 誠、中島典子、河岡義裕：TMPRSS2 は、  
インフルエンザの病原性発現に必須の宿  
主プロテアーゼである．第 88 回日本感染  
症学会学術講演会（福岡）2014
  6. 竹田 誠、中島典子、水田克巳：宿主プロ  
テアーゼ TMPRSS2 は、急性呼吸器感染症ウ  
イルスの生体内活性化酵素である．第 55  
回日本臨床ウイルス学会（札幌）2014
  7. 仲里 巖、喜舎場由香、新垣和也、加藤誠  
也、中島典子、片野晴隆、長谷川秀樹：新  
生児心筋炎の 3 剖検例．第 103 回日本病理  
学会総会（広島）2014
  8. 秋田英貴、鄭子文、中島典子、星本和種、  
笹島ゆう子、瀧本雅文：風疹感染胎盤の一  
例．第 103 回日本病理学会総会（広島）2014
  9. 中島典子、渡辺登喜子、佐藤由子、高橋健  
太、鈴木忠樹、田代真人、河岡義裕、長谷  
川秀樹：ヒトから分離された H7N9 亜型鳥  
インフルエンザウイルス感染動物モデル  
の病理学的解析．第 103 回日本病理学会総  
会（広島）2014
  10. 長谷川秀樹、亀井敏昭、高橋 徹、鈴木忠  
樹、片野晴隆、中島典子、森川 茂、西條  
政幸、倉田 毅：日本国内で発生した重症  
熱性血小板減少症候群（SFTS）の病理解析．  
第 103 回日本病理学会総会（広島）2014
- 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  
（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業））

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て電子顕微鏡を用いた病原体の迅速検出法の確立を目的とする。今年度は、ウイルス血症を引き起こすウイルス感染症を対象として、血中のウイルス粒子の電子顕微鏡学的検出法について検討し、手順を整理した。

**研究協力者：**

国立感染症研究所 感染病理部

鈴木忠樹、岩田奈織子、佐藤由子、片岡紀代、  
小谷 治、原嶋綾子、長谷川秀樹

国立感染症研究所 ウイルス第一部

福士秀悦、高崎智彦、吉川智城、西條政幸

**A. 研究目的**

透過型電子顕微鏡による病原体の検出方法は迅速性、簡便性に優れ、スクリーニングによる包括的な鑑別診断が可能という点でバイオテロ対策や新興・再興感染症のウイルス学的診断の一助となる。本研究では、バイオテロに使用される可能性のある病原体等を中心とした電子顕微鏡を用いた迅速検出法の確立を目的として、1. BSL3, BSL2 病原体に十分対応するための電子顕微鏡学的検査法の標準手順の見直し、2. ウイルス・細菌の迅速検出法に必要なレファレンス標本の作製、見直しと改善、3. 検出の感度・精度を向上するための改良法の3点を課題としている。

2014年は、デング出血熱の日本国内発生や西アフリカにおけるエボラウイルスのアウトブレイクによる輸入感染疑い例の発生が問題となった。いずれも高いウイルス血症が特徴的であ

り、患者血清を用いたウイルス粒子の検出が可能な感染症である。そこで、今年度は、血液検体からのウイルス粒子の検出法の標準手順書の見直しを行った。

**B. 研究方法**

高いウイルス血症を引き起こすウイルス感染症を文献的にリストし、各ウイルス粒子電子顕微鏡像のリファレンス標本を整理した。また、不活化法を文献的に調査し、標準手順を見直した。対象とするウイルス粒子の標本は、これまでにわれわれが当該研究で準備し、撮影したもの（表中に NIID と表記） Koch 研究所による外部評価の際にわれわれが撮影したもの（同、EQA）、および、2010年12月1-2日に Koch 研究所主催された GHSAG wet-lab workshop on diagnostic electron microscopy of pathogens でわれわれが撮影した画像（同、GHSAG）を含む。

**C. 結果**

高ウイルス血症を引き起こす可能性のある主なウイルスの粒子の特徴と電子顕微鏡像を表にまとめた。他に A 型肝炎ウイルス（*Picornaviridae, Hepatovirus*）パルボウイルス B19（*Parvoviridae, Erythrovirus*）が主なウイルスとして挙げられる。また、血液中のウイ

ルス粒子の迅速検出法の標準手順を図にまとめた。不活化処理は、文献的に調査し、Koch 研究所および CDC の標準手順を考慮した結果、2%-4% グルタルアルデヒドもしくは 2% パラフォルムアルデヒド液で 30 分～2 時間室温固定 (200  $\mu$ l で十分) し、紫外線照射との組み合わせで行うこととした。

#### D. 考察

実際に高ウイルス血症発症時のデング熱患者の血清を用いて電子顕微鏡学的にウイルス粒子の検出を試みると、直接法の場合は、染色液は酢酸ウラン液を用いるよりもリンタングステン酸を用いた方が、染色液の浸透が効率よく、血清原液でも粒子を検出することが可能であった (データは示さない)。しかしながら、血清由来タンパクなどの夾雑物が多いため、10 倍以上のリン酸緩衝液による希釈を行った方が、検出効率が良かった。よって、実際に患者血清を検索する場合は、血清原液をある程度、段階希釈し、リンタングステン酸染色を選択した方がよいであろう。しかしながら、電子顕微鏡学的観察には、少なくとも  $10^6$ /ml 以上のウイルス粒子が存在しないと検出が困難となり、病期によっては、ウイルス量が低く、超遠心等を利用したウイルス粒子の濃縮が必要となる。また、病原体によっては、白血球への感染が優勢との報告があるため (エボラウイルス、オルソポックスウイルス、細胞内寄生性細菌など)、白血球を回収し、これを迅速包埋し検索に用いた方が効率がよい可能性もある。また、2014 年の西アフリカにおけるエボラウイルスの大流行をうけ、今後は、BSL4 病原体にも十分対応ができるように標準手順書を見直す必要がある。

#### E. 結論

血液中のウイルス粒子の電子顕微鏡学的検出法について検討し、手順を整理した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Sato Y, Nakajima N, Koike S, Iwasaki T, Sata T, Yamashita T, Minagawa H, Taguchi F, Hasegawa H, Shimizu H, Nagata N. Establishment of a panel of in-house polyclonal antibodies for the diagnosis of enterovirus infections. *Neuropathology*. 2014. doi: 10.1111/neup.12171.

2) Iwata-Yoshikawa N, Uda A, Suzuki T, Tsunetsugu-Yokota Y, Sato Y, Morikawa S, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H, Nagata N. Effects of Toll-like receptor stimulation on eosinophilic infiltration in lungs of BALB/c mice immunized with UV-inactivated severe acute respiratory syndrome-related coronavirus vaccine. *J Virol*. 2014. 88:8597-8614

3) Koma T, Yoshimatsu K, Nagata N, Sato Y, Shimizu K, Yasuda SP, Amada T, Nishio S, Hasegawa H, Arikawa J. Neutrophil depletion suppresses pulmonary vascular hyperpermeability and occurrence of pulmonary edema caused by hantavirus infection in C.B-17 SCID mice. *J Virol*. 2014. 88:7178-7188

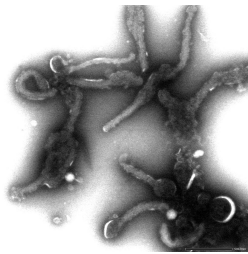
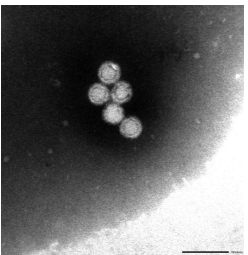
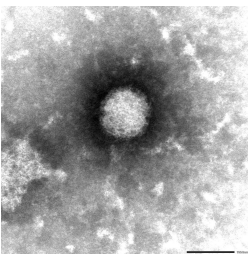
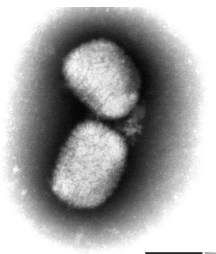
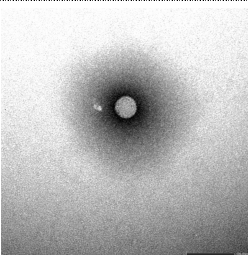
##### 2. 学会発表

1) 岩田 奈織子、福士 秀悦、福間 藍子、鈴木 忠樹、竹田 誠、田代 真人、長谷川 秀樹、永田 典代. 中東呼吸器症候群コロナウイルスに対するマウスおよびビラットの感受性について。第 62 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 2014 年 11 月

#### G. 知的財産の出願・登録状況

該当なし

表 高ウイルス血症を引き起こす可能性のある主なウイルスの粒子の特徴と電子顕微鏡像

ウイルス名 (科 Family 属 Genus)	エンベ ロープ (核酸)	形状	粒子の径 (ヌクレオカ プシド径)	電子顕微鏡像。PTA 染色 によるネガティブ像 (ウイルス名と撮影)	同科の感染症 法に基づく特 定病原体(属)
エボラウイルス (Filoviridae Ebola virus)	あり (-鎖 RNA)	フィラ メント 状が優 勢	80 × 1200 nm (50 nm)	 (Zaire EV/GHSAG2010)	エボラウイル ス属、マールブ ルグウイルス 属
デングウイルス (Flaviviridae Flavivirus)	あり (+鎖 RNA)	球状	40-60 nm (30 nm)	 (flavivirus / EQA24)	フラビウイル ス属
SFTS ウイルス (Bunyaviridae Phlebovirus)	あり ファジ ー状 (-鎖 RNA (3分 節))	球状	90 -120 nm (9 nm)	 (SFTS virus/NIID)	ナイロウイル ス属、ハンタウ イルス属、フレ ボウイルス属
痘瘡ウイルス (Poxviridae Orthopoxvirus)	あり (2本鎖 直鎖 DNA)	レンガ 状、楕円 形	200-350 × 115-260	 (Vaccinia/EQA25)	オルソポック スウイルス属
B 型肝炎ウイルス (HBV) Hepadnaviridae Orthohepadnavirus	あり (2本鎖 DNA)	球状	42 nm (28 nm)	 (HBV/EQA27)	該当なし

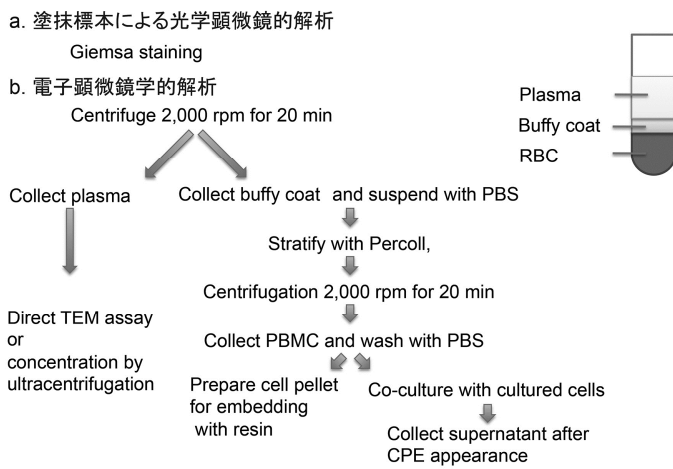


図 血液中のウイルス粒子の迅速検出法の標準手順。不活化は2%-4% グルタルアルデヒドもしくは2%パラフォルムアルデヒド液で30分~2時間室温固定(200 μlで十分)し、紫外線照射との組み合わせで行う。



厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業  
（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業））

分担研究報告書

痘そうワクチンの安全性評価における病理学的研究

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：オルソポックスウイルス感染症の重症化の宿主側要因を明らかにすることを目的とする。  
今年度はサル痘ウイルスのマウス感染実験系の基礎検討を開始した。

**研究協力者：**

国立感染症研究所 感染病理部  
岩田奈織子、佐藤由子、原嶋綾子、長谷川秀樹  
国立感染症研究所 ウイルス第一部  
福士秀悦、西條政幸  
国立感染症研究所 獣医科学部  
森川 茂

**A. 研究目的**

サル痘ウイルスは、ポックスウイルス科オルソポックスウイルスに属し、アフリカ中央部から西部に分布するガンビアンラットなどのげっ歯類を宿主としている。愛玩動物としてアフリカから輸入されたげっ歯類からの感染事例が2003年に米国にて報告されており、免疫抑制状態のヒトでは天然痘類似の全身性疾患（ヒトサル痘）を引き起こす。

われわれは、劇症型サル痘の発症機序を明らかにする目的で、サル痘ウイルス実験的感染カニクイザルの死亡例2頭と回復サル2頭の病態病理を解析した。その結果、劇症型では免疫中枢組織における強い壊死を伴う病変形成が、病態に大きく関与することが推察された(Nagata *et al.*, 2014)。劇症型サル痘発症の要因は、脾、免疫不全状態、特に骨髓低形成による好中球低下症が関連していると推察している。

そこで、好中球の重症化における役割を明らかにするために、サル以外の病態動物モデルの確立を試みることにした。まず、今年度は、サル痘ウイルスのマウス感染実験系の基礎検討を開始した。

（倫理面への配慮）本動物実験は、国立感染症研究所の動物実験委員会に承認された実験計画に従って行った。

**B. 研究方法**

動物は、日本エスエルシーより購入したBALB/c マウス（接種時、14週齢メス）を用いた。ウイルスは、Monkeypox virus の Liberia 株および Zr-599 株を用い、ウイルス液（一匹あたり  $10^6$  PFU ウイルス量/50  $\mu$ l）を頸背部に皮下接種し、臨床症状と体重変化を16日間観察した（一群6匹）。接種7日目には、一群あたり4匹を過麻酔殺し、心臓採血と病理解剖を行った。採取した血液は、ヘパリンを添加し、動物用血球計数装置 ベトスキャン HM II（Avaxis 社）で白血球数、リンパ球数、単球数、顆粒球数を測定し、比較した。

**C. 結果**

体重変化、皮膚所見、臨床症状の点で、いずれの株も皮下接種後のBALB/c マウスに対して明らかな病原性を発揮しなかった（図1）。接

種 7 日目の末梢血中の白血球数は、対照群に比べてウイルス接種群で有意に少なく、それは、リンパ球数と顆粒球数の減少によるものであった(図 2)。病理学的解剖を行ったところ、Zr-599 株接種群の脾の軽度の腫大がみられ、光顕的に T 細胞領域の軽度の拡大が確認された(データは示さない)。その他の腹腔、胸腔内臓器に著変は認められなかった。

#### D. 考察

我々は、オルソポックスウイルス感染後の重症化の宿主側因子を明らかにして、最終的には、痘瘡ワクチン(弱毒株)接種者における重篤な副反応要因を明らかにすることを目標としている。さらに、サル痘サルモデルに代わる、小動物感染モデルの作出が望ましい。マウス痘の原因となるエクトロメリアウイルスは、BALB/c マウス等、一部の近交系マウスに対して強い病原性を発揮する。よって、我々の研究目的の第一選択とするウイルスとしては不相当と考え、比較的、弱い毒力を発揮するウイルスを選択することとした。

Hutson らは、2003 年にアメリカ合衆国でおきたサル痘アウトブレイクと同年にコンゴでのアウトブレイクでそれぞれ分離されたサル痘ポックスウイルスを BALB/c マウスと C57BL/6 マウスの足蹠皮下あるいは経鼻接種を行い、いずれも致死적ではなかったものの、一時的な足蹠の腫脹(皮下接種)、体重減少(経鼻接種)と中和抗体価の上昇がみられたことから近交系マウスでもサル痘ウイルス感染が成立し、マウスモデルとして使用できると結論づけた(Hutson et al., 2009)。

今回使用したサル痘ウイルスは、Hutson らの報告と同様、BALB/c に対して強い病原性を発揮しなかった。しかしながら、血球像、脾の変化が認められたことから、感染は成立していることが予想される。今後、接種 28 日目の血清中

和抗体価の測定、ウイルス感染、増殖について解析する。その後、重症化モデルの作出を試みる予定である。

#### E. 結論

サル痘ウイルスのマウス感染実験系の基礎検討を開始した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nagata N, Saijo M, Kataoka M, Ami Y, Suzaki Y, Sato Y, Iwata-Yoshikawa N, Ogata M, Kurane I, Morikawa S, Sata T, Hasegawa H. Pathogenesis of fulminant monkeypox with bacterial sepsis after experimental infection with West African monkeypox virus in a cynomolgus monkey. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014. 7:4359-4370

##### 2. 学会発表

なし

#### G. 知的財産の出願・登録状況

該当なし

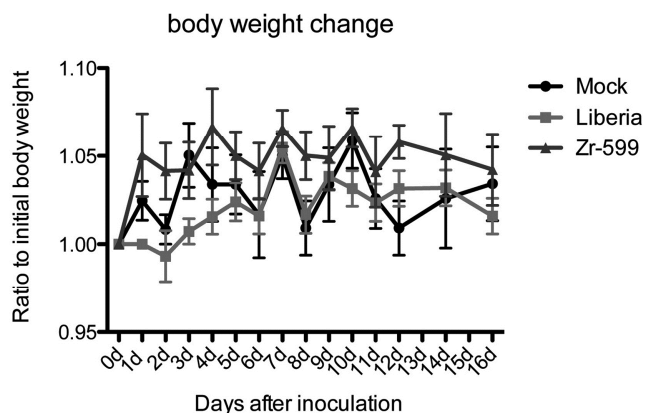


図 1. サル痘ウイルス皮下接種後のマウスの体重変化。各群 n=6。各群間で有意差はみられない。

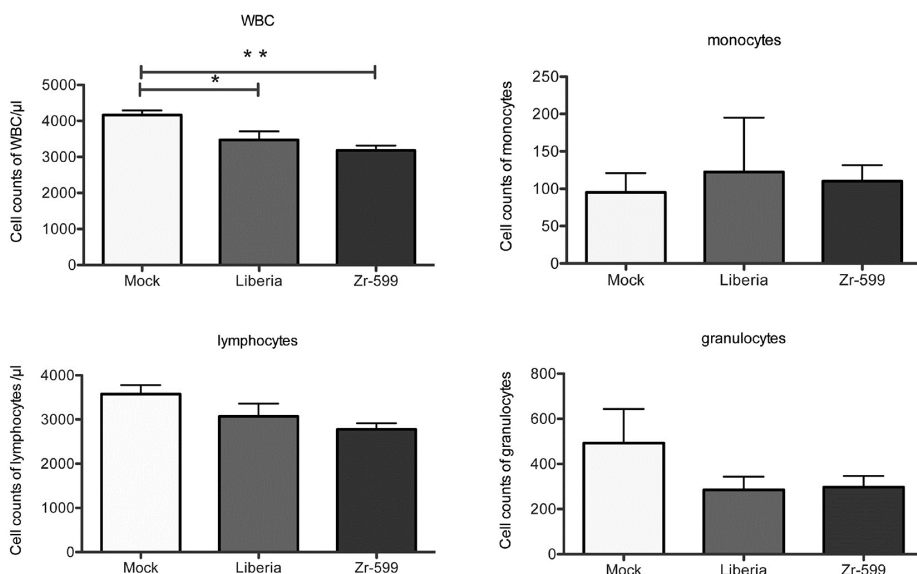


図 2. サル痘ウイルス皮下接種後 7 日目の血球数の比較。各群 n=4。白血球数に有意差がみられ、それは主にリンパ球数と顆粒球数の減少によるものであった。

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  
（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業））

## 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 動物・食品検査診断センター  
江崎孝行 国立大学法人岐阜大学 医学部  
川本恵子 国立大学法人帯広畜産大学 動物・食品検査診断センター

研究要旨 2001年にアメリカで起こった炭疽菌芽胞を使ったバイオテロにより、生物兵器による無差別攻撃に速やかに対応し、安全・安心な社会を構築することが求められている。危険病原体による感染症の蔓延を防ぐ技術開発も危機管理体制の強化の一つとして急務の課題である。本研究では細菌性バイオテロに焦点をあて、危険病原体およびその毒素の迅速同定法・診断法および予防法としてワクチンの開発研究と、広く社会に還元することを目的として研究を遂行する。また、植物毒素であるリシン毒素の迅速検出法開発についても併せて行う。

#### A．研究目的

2001年9月11日の米国ニューヨーク世界貿易センタービルへの航空機テロ後に、炭疽菌芽胞混入郵便物によるバイオ（生物）テロが起こり、世界的に関心が高まった。わが国では‘白い粉’による多数の摸倣事件が起こり、その後、2004年の「国民保護法」の制定、2006年の感染症法改正による「特定病原体等」の管理などをはじめとした内閣危機管理室を中心として関係省庁で対応体制が構築されてきた。病原体等の入手と取扱いそして迅速診断・同定法に関する科学的情報は、バイオテロの脅威に対抗する上で、当初より管理ないし制限されてきた。一次対応機関で用いる検査キットの多くはブラックボックス状態で使用せざるを得ない状況にある。病原体等の由来を知るには塩基配列の情報が必要であるが十分公開されていない。対応のアルゴリズムは米国や英国の関連機関からも公表されているが、わが国の実情に即したものを、わが国独自に開発していくことが必要となる。バイ

オテロは病原体等が散布されて患者発生までに潜伏期があり、稀な疾患であるため、早期検知には一次医療機関の医師等への臨床診断支援が必須で、環境中および患者検体から原因病原微生物の迅速な検出と同定、かつ確認のために患者の血清抗体検査や病原体等の分離同定が必要となる。BSL4病原体以外は地方衛生研究所や国立感染症研究所の設備で可能である。さらに病原体の由来を知るためには塩基配列の解析とデータベースが重要である。現在までに多くの病原体等（毒素を含む）の迅速診断法を開発し、臨床診断支援のマニュアルやバイオテロ対応ホームページを作製した。またプロトタイプの網羅的迅速診断法も開発した。しかし病原体の入手が困難なことから特異性の検討は十分とはいえず、鑑別診断とその普及および検査ネットワーク整備に問題を残している。ホームページの活用には、画像が有力な情報となるがいまだ少なく、疾患の追加、治療法や除染法を含めた内容のアップデートそして実際の対応体制の整備も不

十分である。当分担研究班では、バイオテロ関連病原体等の迅速診断検査、抗体検査、病原体分離同定法、特に特定病原体等の中の細菌性感染症を中心として、網羅的な検出・検査法を確立し、広く社会に還元することを目的として研究を遂行する。

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

生物テロの発生を予防することが最も基本であることは間違いないが、生物テロが発生した場合、いかに被害を最小限に抑えるかが何よりも重要である。被害を低減するには、バイオテロ発生をできるだけ早く検知すること、散布生物剤を正確に迅速に同定することが求められる。さらに、発生現場や患者対応を行う医療施設などの汚染区域の早急な機能回復のためには適切な除染が必要となる。除染とは、消毒や滅菌などにより微生物を受容可能なレベルまで減少させ、使用可能な状態

にすることである。適切な除染は患者対応、2次被害の拡大防止、汚染現場の早期復旧に極めて重要である。本年度はまずテロ発生後の除染活動を念頭に、これまでに臨床検体からの迅速検出を目的に開発した検査法を環境検体からの検出へと応用できるよう、環境検体のなかでも病原体の検出が特に困難とされる土壌検体を用いて検体処理法の改良を行った。土壌汚染菌の遺伝子学的検出は、1) 土壌からの核酸抽出、2) 目的の病原菌遺伝子の特異的増幅、3) 増幅物の判定、の3段階からなる。検出感度を確保するためには、段階1)において、できるだけ回収率と純度の高い核酸を抽出することが不可欠である。一般に他の環境検体に比べ、土壌からのDNA抽出が困難な理由として、腐食酸(フミン酸)などの土壌成分による干渉作用があげられる。土壌から微生物の核酸を抽出する際に、石などのシリカ粒子に付着している微生物がいることから全量を使用して、菌を物理的に破壊した後、フミン酸などを除去する方法が一般的に利用されている(MoBio法、Ultraclean Soil DNA法)。しかしフミン酸とDNAは類似の特性を持っているため、DNAとフミン酸の混合液からフミン酸だけを効率よく分離するのは困難で、精製過程でDNAも多く失われてしまうという欠点があった。そこで、菌を破壊する前にフミン酸を菌から分離する方法を検討し、更に従来の市販抽出品との比較検討も行った。

現在、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がない。このため、本年度は市中の呼吸器感染症とバイオテロ症例の鑑別法を開発した。

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

網羅の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。本年度はSEAとSEBを精製してそれぞれに対する家兎抗血清を作製した。更に、TDHおよびTRHの精製を行った。

## B. 研究方法

### B - 1. 土壌からの病原体検出法の改良

#### 土壌からの核酸抽出法の開発

国内の標準土壌7種(シラス、砂、シルト、粘土、黒ボク(関東ローム層)、黒ボク(シラス由来)、関東ローム層)の土壌検体を用いて検討を行った。まず、各土壌検体を酸性バッファーに懸濁し、フミン酸を酸化アルミニウムに吸着させ、アルカリにして沈殿させた。その後、フミン酸が除かれた土壌懸濁液から菌を陽性に荷電した粒子に吸着させ、さらに粒子をマグネットに吸着させ、菌が付着した粒子を補足した。上清を捨て、TEバッファーに懸濁後、菌と粒子を分離させ、MORA-Extractキットを用いて懸濁液をジルコニアベースで物理的に破碎後、手順に従い核酸を抽出した。また、市販抽出キットを用い、それぞれ定められた手順に従い、核酸を抽出し、その効果について比較検討した。

### B - 2. 市中の呼吸器感染症と炭疽、類鼻疽オウム病との迅速鑑別法の開発

*Bacillus cereus*による院内感染症とされる症例に重篤な肺炎症状をお越し、急速に死亡する症例が散発している。一般細菌検査では溶血する*Bacillus*様菌株は*B. cereus*を疑い検査の対象となるが、溶血しない*Bacillus*様菌株は*B. subtilis*等の日和見病原菌と見なされる。*B. anthracis*は溶血しないので*B. subtilis*等のコンタミと見なされ通常は検査の対象となっていない。更に、*B. cereus*、*B. thuringiensis*と同定される菌株の中には系統的には炭疽菌に極めて近い株がある。これらの株には*B. anthracis*の病原因子を部分的に保有する株が存在する。溶血し*B. cereus*と同定される株、あるいは溶血しない*Bacillus*様菌株が分離された時に高度病原性株であるかどうかを調べるために溶血にかかわらず炭疽菌が保有する病原因子(莢膜、防御抗原、浮腫因子、致死因子)を調べる必要がある。

- 1) *B. cereus*, *B. anthracis* 共通のDnaJ、莢膜、防御抗原、浮腫因子、致死因子の5つの

病原因子を同時に検出できる核酸クロマトを構築した(図1)。

- 2) 肺炎の病原体スクリーニング用に開発した核酸クロマトにテロ病原体をマウントした系を立ち上げた(図2)。

a) Pneumonia A (*Legionella pneumophila* DnaJ, *Chlamydophila pneumonia-psittaci* DnaJ, *Mycoplasma pneumonia* DnaJ, *Streptococcus pneumonia* LytA, *Bacillus cereus-anthraxis* DnaJ)

b) Pneumonia B (*Haemophilus influenza* DnaJ, *Serratia marcescens* DnaJ, *Staphylococcus aureus* MRSA, *Escherichia coli* DnaJ, *Pseudomonas aeruginosa* DnaJ)

c) Pneumonia C (*Acinetobacter baumannii* DnaJ, *Enterobacter aerogenes* DnaJ, *Burkholderia malle/pseudomallei* DnaJ, *Chlamydia trachomatis* 16S rDNA, *Moraxella catarrhalis* DnaJ)

- 3) 上記2つの核酸クロマトの検査手順を図3に記載する。

### B - 3. SEAとSEBの精製と家兎抗血清の作成

*sea*及び*seb*は大腸菌内でHisタグ融合タンパク質(His-SEA及びHis-SEB)として発現させ、SDS-PAGE及びウエスタンブロッティングにより確認した。リコンビナントタンパク質の精製は、カラムクロマトグラフィーと電気的溶出法によって行った。精製した毒素タンパク質は、ウサギに免疫して抗血清の作製を試みた(図4)。

### B - 4. TDHとTRHの精製

合成した*tdh*及び*trh2*をそれぞれプラスミドベクター pCold TF に組み込んで蛋白発現用大腸菌 BL21(DE3) 株に導入した。この株についてTFタグ融合蛋白質としてTDHあるいはTRH2を発現させるための至適な条件を検討し、得られた条件下で発現誘導を行った培養液からHisタグ精製および電気的溶出によってTDHあるいはTF-TRH2を精製した(図5)。

## C. 研究結果

### C - 1. 土壌からの病原体検出法の改良

我が国の標準土壌7種を検討に用いた(図6)。新規抽出法の有用性を検証するため、精製DNAの純度を指標に市販の土壌核酸抽出キット3種類と抽出結果を比較、検討した。まず、市販キットでの抽出核酸の純度を吸光

度計により調べた。市販キットAは土壤中の腐植酸の除去は優れていたが、DNA回収率は低かった。一方、市販キットBはマグネット法により腐植酸を除去するが、DNA回収率は著しく低かった。市販キットCは、DNA抽出フィルターを使用する方法であるが、フミン酸は除去できなかった(図7)。これら3種類の市販品のうち、キットAとBを用いて、本研究で開発した新規抽出法と精製DNAの純度を比較した。関東ローム層を除いて、いずれの種類の土壤検体においても、新規抽出法が純度および回収量とも優れていた(図8)。

#### C - 2 . 市中の呼吸器感染症と炭疽、類鼻疽オウム病との迅速類症鑑別法の開発

炭疽菌に対する迅速診断法(核酸クロマト)と、市中呼吸器感染症の病原体スクリーニング用核酸クロマトへのテロ病原体をマウントした2種類の迅速類症鑑別法を開発した。今後はスパイク実験等を行って構築した診断法の制度検定を行う。

#### C - 3 . SEA と SEB の精製と家兎抗血清の作成

His-SEA及びHis-SEBをSDS-PAGEとウエスタンブロッティングにより検出したところ、予想されるサイズのシグナルが得られ、目的タンパク質の発現が確認できた。本研究で構築したりコンビナント・プラスミドによる大腸菌内での目的タンパク質の発現量は高く、常に効率よく目的タンパク質が得られた。Ni-NTA アガロース ビーズをいた精製の後に電氣的溶出法によって目的タンパクを精製し、得られた精製タンパクをウサギに免疫し血清を回収したが、十分な抗体価の上昇は認められなかった。

#### C - 4 . TDH と TRH の精製

TF-TDH及びTF-TRH2はそれぞれ大腸菌内で盛んに発現し、共に可溶性分画に高い割合で存在していた。最終的に得られた精製蛋白質は実験動物への免疫誘導に使用可能と思われる純度に達しており、大腸菌培養液 500 ml からモルモット 1 頭以上に抗体誘導できる量が得られた。

#### D . 考 察

##### D - 1 . 土壤からの病原体検出法の改良

土壤からのDNA抽出は他の環境検体に比べ困難であり、これまでに様々な手法が報告されている。土壤からのDNA抽出法は直接法と間接法の大きく2種類に分けられる。直接法では、土壤中で溶菌してDNAを回収するため、短時間で操作が完了し、DNA収量も比較的多い。しかし、フミン酸などの腐植酸の混入も多く、その後のPCRによる増幅反応の阻害要因となる。間接法では、土壤から微生物画分を回収後、DNAを抽出するため、DNA収量は少ないが、腐植酸の混入が少ない。土壤成分は不均一であるため、すべてにおいて決定的と呼べる方法はまだ存在しない。本研究では間接法を改良し、土壤検体中のフミン酸を酸化アルミニウムに吸着させて除去することで、従来法に比べ比較的純度の高いDNAを抽出することに成功した。

黒ボク土は火山灰土壤で、我が国に特有の土壤成分で関東を中心に、日本全体に広く分布している。黒ボク土はウイルスや細菌などの微生物を強く吸着する性質を持つため、抽出前に微生物分画と土壤分画を分ける間接法では、ほとんどの微生物が土壤分画に存在するため、DNA抽出は困難である。直接法においても他の土壤に比べて著しく回収率は低下することが知られている。新規抽出法は、間接法を改良したものであるが、酸性バッファーでフミン酸を酸化させて、アルミニウム粒子に吸着させて除いた後、間接法で問題となるDNAの回収率の低下を改善するため、菌を陽性に荷電した粒子に吸着させて回収し、さらにマグネット法で濃縮することで、その後のPCRによる増幅反応に使用できる純度のDNAを精製することができた。今回、関東ロームからの抽出は困難で、満足できる結果は得られなかった。今後も条件を検討し、様々な土壤検体で使用可能な抽出条件を検証し、最適化していく予定である。

環境検体からの病原体の高感度な検出は、除染方法および除染完了の評価に必須である。環境検体からの迅速で高感度な危険病原体の検出法を最適化することは、生物剤散布発生時の被害拡大や2次被害をなるべく最小化するために重要であるだけでなく、様々な感染症発生時の除染評価にも有用と考えられる。

##### D - 2 . 市中の呼吸器感染症と炭疽、類鼻疽オウム病との迅速類症鑑別法の開発

テロが起きた場合に、市中で発生する疾病とテロによる希少感染症との類症鑑別が初期の防圧において非常に重要である。本年度は

炭疽の迅速診断用の核酸クロマトと、市中で発生する細菌性呼吸器感染症と肺炭疽との迅速鑑別核酸クロマトを構築した。この系の精度検定を行ってその有用性を確認する事でテロへの対策の一助としたい。

#### D - 3 . SEAとSEBの精製と家兎抗血清の作成

得られた精製タンパク (SEA及びSEB) をウサギに免疫し血清を回収したが、十分な抗体価の上昇は認められなかった。SEAおよびSEBは銀染色で1本になるまでの高い純度を確保できたので、来年度は、アジュバンドや免疫スケジュールの検討を行い、高感度かつ簡便なSE検出法を構築する。

#### D - 4 . TDHとTRHの精製

今回構築したTDH及びTRH2の組換え体および蛋白質発現誘導・精製手法によってモルモットへの抗体誘導に十分な純度と量のTF タグ融合TDHあるいは同TRH2 が得られた。来年度はモルモットへの投与により抗TDHあるいは抗TRH2抗体を誘導し、それらの抗体を用いた TDHあるいはTRHに特異的な免疫学的検査法の構築を目指す。

#### E . 結 論

1. 環境検体中、特にその検出が困難な土壌検体を用いて、危険病原体由来 DNA の検出に有用な核酸抽出法を開発した。
2. 炭疽菌に対する迅速診断法(核酸クロマト)と、市中呼吸器感染症の病原体スクリーニング用核酸クロマトへのテロ病原体をマウントした 2 種類の迅速類症鑑別法を開発した。
3. 免疫に耐えられる純度と量の SEA および SEB を精製した。
4. 免疫に耐えられる純度と量のTDHおよび TRH2を精製した。

#### F . 健康危険情報

特になし。

#### G . 研究発表

##### 論文発表

1. 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* 85 (4): 454-460, 2014.

2. Nakano M, Yamasaki E, Moss J, Hirayama T, Kurazono H: Study of the stn protein in salmonella; a regulator of membrane composition and integrity. *Method Mol. Biol.* 1225: 127-138, 2015.
3. Yamasaki E, Yamada C, Jin X, Nair GB, Kurazono H, Yamamoto S: Expression of marA is remarkably increased from the early stage of development of fluoroquinolone-resistance in uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Chemother.* 21 (2): 105-109, 2015.
4. Ohji S, Yamazoe A, Hosoyama A, Tsuchikane K, Ezaki T, Fujita N. The Complete Genome Sequence of *Pseudomonas putida* NBRC 14164T Confirms High Intraspecies Variation. *Genome Announc.* 2(1), 2014
5. Kikuchi M, Ito S, Yasuda M, Tsuchiya T, Hatazaki K, Takanashi M, Ezaki T, Deguchi T. Remarkable increase in fluoroquinolone-resistant *Mycoplasma genitalium* in Japan. *J Antimicrob Chemother.* 69(9):2376-2382, 2014.
6. Miyazato A, Ohkusu K, Tachi Y, Hashikita G, Ezaki T, Mitsutake K. Two cases of infective endocarditis caused by *Streptococcus tigurinus*. *感染症学雑誌* 88 (3): 304-306, 2014.

#### H . 知的財産の出願・登録状況

特になし





厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業  
（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業））

分担研究報告書

地方衛生研究所におけるバイオテロ対応に関する研究

研究分担者 小林 和夫 堺市衛生研究所長

研究協力者	水田 克巳	山形県衛生研究所長（北海道・東北・新潟地区）
研究協力者	八柳 潤	秋田県健康環境センター 上席研究員（北海道・東北・新潟地区）
研究協力者	岸本 剛	埼玉県衛生研究所 副所長兼感染症室長（関東・甲・信・静岡地区）
研究協力者	皆川 洋子	愛知県衛生研究所長（東海・北陸地区）
研究協力者	内野 清子	堺市衛生研究所 ウイルス検査担当総括研究員（近畿地区）
研究協力者	杉本 光伸	堺市衛生研究所 細菌検査担当総括研究員（近畿地区）
研究協力者	調 恒明	山口県環境保健センター所長（中国・四国地区）
研究協力者	岸本 壽男	岡山県環境保健センター所長（中国・四国地区）
研究協力者	四宮 博人	愛媛県立衛生環境研究所長（中国・四国地区）
研究協力者	山下 育孝	愛媛県立衛生環境研究所 ウイルス科長（中国・四国地区）
研究協力者	千々和 勝己	福岡県保健環境研究所副所長（九州地区）

### 研究要旨

地方衛生研究所（地衛研）におけるバイオテロ対応の現状と課題について、「1．現行の国立感染症研究所（感染研）病原体検出マニュアル」、「2．新規検査マニュアルの整備の必要性」、「3．地方衛生研究所全国協議会6支部の感染症対策部会を中核として支部内連携構築、支部内連携から広域・全国ネットワークの構築」、「4．地衛研と感染研の連携強化」の視点から、課題の抽出や解決策を探索した。その結果、多くの課題が抽出された。これら課題の解決には、地衛研、各支部内、支部間や地方衛生研究所全国協議会、感染研や厚生労働省の理解や連携が重要である。加えて、地衛研の厳しい予算や人員状況、機能低下、人材育成、技術継承などの課題が抽出された。課題の克服には各地衛研のみならず、地方自治体や国レベルの連携、理解や支援（財政、人的、技術、情報など）が望まれる。バイオテロは突発的で緊急を要する健康危機管理対応であり、平時から対応を準備・構築する必要がある。

### A. 研究目的

バイオテロ対応において医療機関や地方衛生研究所（地衛研）は診療や原因物質（感染病原体や毒素など）の特定で最前線となることが想定される。本分担研究は地衛研における原因物質（感染病原体や毒素など）の特定に際し、課題を抽出し、課題解決の探索を目的とした。

### B. 研究方法

地衛研における感染症対策は地方衛生研究所全国協議会感染症対策部会を中核として活動していることから、全国6地区支部（北海道・東北・新潟地区、関東・甲・信・静岡地区、東海・北陸地区、近畿地区、中国・四国地区、九州地区）の部会員を研究協力者と構成した。

各研究者に4項目（下記）について意見調査（アンケート）を実施し、課題を抽出

や課題の克服を探索した。

1 . 現行の国立感染症研究所（感染研）病原体検出マニュアル

2 . 新規検査マニュアルの整備の必要性

3 . 地方衛生研究所全国協議会 6 支部の感染症対策部会を中核として支部内連携構築、支部内連携から広域・全国ネットワークの構築

4 . 地衛研と感染研の連携強化

### **倫理面への配慮**

本研究は意見調査研究であり、また、患者など研究対象者は包含せず、倫理面に問題ないと判断した。なお、利益相反はなかった。

### **C. 研究結果**

1 . 現行の感染研病原体検出マニュアル(表 1)

感染研病原体検出マニュアルに関し、1) 改訂年月日の記載、2) 地衛研と感染研の担当部分に関する記載、3) 感染研の online 病原体検出マニュアル (<http://www.nih.go.jp/niid/ja/labo-manual.html>) でリンク不全、4) 厚生労働省通知とマニュアルの齟齬、5) 自然毒(リシン、サキシトキシン)や真菌毒(アフラトキシン、マイコトキシン)に関する記載がない、6) 診断不明や未知の原因物質・病原体の対応などが意見された。

2 . 新規検査マニュアルの整備の必要性(表 2)

新規検査マニュアルの整備の必要性に関し、1) 水痘は特定病原体でないが、天然痘/痘瘡と鑑別診断を要するため、天然痘のマニュアル、2) 新規分析機器の導入が予想される検査に関するマニュアル、3) 感染症の予防及び感染症患者に対する医療に関する法律(感染症法)改正の施行に伴い、病原体サーベイランスが強化(2015年4月以降)に整合・見直し、4) 自然毒や真菌毒に関するマニュアル、5) 地衛研で実施する可能性の高い日本紅斑熱やウエストナイル熱に関する検出マニュアル、6) 検査法の最新化に伴う周知や迅速な更新などが示された。

3 . 地方衛生研究所全国協議会 6 支部の感染症対策部会を中核として支部内連携構築、支部内連携から広域・全国ネットワークの構築(表 3)

1) 地衛研の現状：的確な技術継承と人材育成、2) 異なる支部間の連携構築、3) バイオテロ病原体は低頻度で試薬備蓄に経費を要し、また、検査精度の維持、検査員の確保が困難など、意見された。

4 . 地衛研と感染研の連携強化(表 4)

1) 相互理解や配慮、2) 感染症法改正の施行に伴い、感染症発生動向調査事業が見直しされることが想定されるが、経過に関し、情報共有が不十分、3) 地衛研における予算と人員は制約されているが、感染研の支援、4) レファレンスセンターの制度として位置付けが不明瞭、5) 感染研の行政検査成績書が地衛研に返送されるまで長期間を要することがあるなど、示された。

### **D. 考察**

地衛研は地方衛生行政の科学的・技術的中核機関(健発 0731 第 8 号、厚生労働省健康局長、平成 24 年 7 月 31 日)であり、業務と機能は 1) 試験検査、2) 調査研究、3) 研修・指導、4) 公衆衛生情報の収集・解析・発信、5) 健康危機管理対応、6) 衛生行政施策に資する科学的根拠の提供である。地衛研におけるバイオテロ対応として、上述の 1) - 6) が該当し、加えて、広域性、国と連携が求められる。

地衛研におけるバイオテロ対応の現状と課題について、「1 . 現行の感染研病原体検出マニュアル」、「2 . 新規検査マニュアルの整備の必要性」、「3 . 地方衛生研究所全国協議会 6 支部の感染症対策部会を中核として支部内連携構築、支部内連携から広域・全国ネットワークの構築」、「4 . 地衛研と感染研の連携強化」の視点から、課題の抽出や解決策を探索した。

その結果(表 1 . - 4 .) 多くの課題が抽出された。これら課題の解決には、地衛研、各支部内、支部間や地方衛生研究所全国協議会、感染研や厚生労働省の理解や連携が重要である。加えて、厳しい予算や人

員状況、機能低下、人材育成、技術継承などの課題が抽出された。

解決には各地衛研のみならず、地方自治体や国レベルの連携、理解や支援（財政、人的、技術、情報など）が望まれる。バイオテロは突発的で緊急を要する健康危機管理対応であり、平時から対応を準備・構築する必要がある。

## E. 結論

- バイオテロ対応において地衛研の課題を抽出し、課題解決の探索をした。
- 課題の克服には各地衛研のみならず、地方自治体や国レベルの連携、理解や支援（財政、人的、技術、情報など）が望まれる。

## F. 健康危険情報

特記事項なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. **Kobayashi, K.** 2014. Review. Serodiagnosis of *Mycobacterium avium* complex disease in humans. Translational research from basic mycobacteriology to clinical medicine. Jpn. J. Infect. Dis. 67: 329-332.  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/67/5/67\\_329/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/67/5/67_329/_article)  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/67/5/67\\_329/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/67/5/67_329/_pdf)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25241680>.
2. Matsuzaki, Y., K. Sugawara, M. Nakauchi, Y. Takahashi, T. Onodera, Y. Tsunetsugu-Yokota, T. Matsumura, M. Ato, **K. Kobayashi**, Y. Shimotai, K. Mizuta, S. Hongo, M. Tashiro, and E. Nobusawa. 2014. Epitope mapping of the hemagglutinin molecule of A/(H1N1)pdm09 influenza virus by using monoclonal antibody escape mutants. J. Virol. 88: 12364-12373.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25122788>  
<http://jvi.asm.org/content/88/21/12364.abstract>

3. Sugamata, R., A. Sugawara, T. Nagao, K. Suzuki, T. Hirose, K. Yamamoto, M. Oshima, **K. Kobayashi**, T. Sunazuka, K.S. Akagawa, S. Omura, T. Nakayama, and K. Suzuki. 2014. Leucomycin A<sub>3</sub>, a 16-membered macrolide antibiotic, inhibits Influenza A virus infection and disease progression. J. Antibiot. 67: 213-222.  
<http://www.nature.com/ja/journal/v67/n3/full/ja2013132a.html>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24496145>
4. **小林和夫** . 2014 . 細菌および真菌による呼吸器感染症 ( § 9・2・1 ) . 病原微生物学 基礎と臨床 ( 荒川宣親、神谷茂、柳 雄介 編 ) 東京 : 東京化学同人 . 239-244 . ISBN: 978-4-8079-0827-1

## 2. 学会発表

特記事項なし。

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 特記事項なし。
2. 実用新案登録 特記事項なし。
3. その他 特記事項なし。

**表 1 . 現行の国立感染症研究所病原体検出マニュアルの問題点および改善法**

問 題 点	改 善
<ul style="list-style-type: none"> <li>● バイオテロ対象病原体(特に1種及び2種病原体)について、検出マニュアルの有無・最終改訂年月日のリストがある方が良い</li> <li>● 炭疽・ペスト菌については、地衛研で実施準備する部分と感染研が担当する部分を明示しておいてほしい(本文の前に、検査項目とレベルの表を加えていただくと良い)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 検出マニュアルの有無・最終改訂年月日のリストに関する情報の追加</li> <li>● 地衛研と感染研の担当部分を明記</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>● すでにマニュアルがありながら、リンクがない(ウエストナイル熱、SFTS、結核など)</li> <li>● リンクされているマニュアルに関し、第何版、作成年月日などが記載されていると最新化されたものかどうか解り易いと考え</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● リンクの確認</li> <li>● 情報の追加</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>● 炭疽菌検出：通知(厚労省、2001年10月18日)と炭疽検査マニュアル(第2版、感染研、2013年3月)が示されているが、PCR法の位置づけが異なる</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 通知(厚労省、2001年10月18日)と炭疽検査マニュアル(第2版、感染研、2013年3月)を整合</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>● ホームページ：感染研から検出法のダウンロードができない項目がある(コレラ菌、結核菌、ウエストナイルウイルス、ボツリヌス毒素・菌、SFTS - - -)</li> <li>● 自然(サキシトシン、リシン)や真菌毒(アフラトキシン、マイコトキシン)に関する検査方法の記載がない</li> <li>● 病原体検出マニュアルは病原体別に記載されているが、診断不明の場合、対応に苦慮</li> <li>● マニュアルに記載されている試薬メーカーが多岐</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 病原体検出マニュアルの整備と更新</li> <li>● 自然毒に関する整備?</li> <li>● 症状に基づいた検査フローチャートの整備が望まれる</li> <li>● 混乱や誤認を回避するため、数社以内</li> </ul>

**表 2 . 新規検査マニュアルの整備の必要性**

問 題 点	改 善
<ul style="list-style-type: none"> <li>● 水痘は特定病原体でないが、天然痘と鑑別診断を要するため、マニュアル整備が必要</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 水痘に関するマニュアルの整備</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>● 今後、MALDI-TOF-MS 等機器分析の当該分野における応用の進展が期待される。将来的にはこれらにも対応するマニュアルが必要</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● MALDI-TOF-MS 等機器分析にも対応するマニュアルの整備</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>● 感染症法改正に伴い、病原体サーベイランスが強化される(2015年4月以降)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 病原体サーベイランスの強化に整合・見直し</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>● 自然毒や毒素系物質の検査マニュアルが必要</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 自然毒や毒素系物質の検査マニュアルの整備</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>● 地衛研で実施する可能性の高い日本紅斑熱やウエストナイル熱に関する検出マニュアルの整備</li> <li>● 検査法の最新化に伴う周知や迅速な更新</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 感染研ホームページの更新</li> </ul>

**表3 . 地方衛生研究所全国協議会 6 支部の感染症対策部会を中核として支部内連携構築、支部内連携から広域・全国ネットワークの構築**

問 題 点	改 善
<ul style="list-style-type: none"> <li>● 的確な技術伝承と人材育成が不十分であり、今後、個々の地衛研の弱体化が進行する可能性</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 感染症対策部会を中核とする連携の維持が重要</li> <li>● 副部会員など増員</li> <li>● 部会員の処遇として、衛微協理事会に参加</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>● 異なる支部間の連携構築</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 地衛研全国協議会で支部間の連携を強化</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>● バイオテロ病原体は低頻度で試薬備蓄に経費を要し、また、検査精度の維持、検査員の確保が困難</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 支部内で検査を分担し、事務手続きは簡素化</li> <li>● 国からの経費補助</li> </ul>

**表4 . 地衛研と国立感染症研究所の連携強化**

問 題 点	改 善
<ul style="list-style-type: none"> <li>● 相互の優先事項に対する配慮や理解が不足しがち</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 衛微協の理事会等を活用して、感染研と地全協感染症対策部会の連携強化</li> <li>● 相互の人事交流の活発化</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>● 感染症法改正に伴い、感染症発生動向調査事業の見直しが行われ、レファレンスセンターを精度管理センターにすることなどが討議されているが、衛生微生物協議会のレファレンス委員会と別に協議が進行</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 衛生微生物協議会の検査情報委員会やレファレンス委員会を整理し、再構築</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>● 地方衛生研究所は施設、予算、検査機器等の状況により検査可能病原体の範囲に制約</li> <li>● 地衛研では予算や人員が漸減し、新たな課題が発生した時の対応が困難</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 検査機器や検査試薬の購入費など財政支援</li> <li>● 検査技術の指導・実技講習</li> <li>● 国からの通知や通達を適宜発出し、地方が課題に向け迅速に対応できるような措置</li> <li>● 検査技術の指導・実技講習</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>● 感染研の行政検査成績書が地衛研に返送されるまで長期間（例：数か月）を要することがある</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 感染研の迅速な検査対応と回答</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>● レファレンスセンターを介した連携も図っているが、レファレンスセンターは制度として位置付けが不明瞭なため、地衛研内で正式な対応が困難</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● レファレンスセンターを通知等で国（厚生労働省、感染研など）が明確に位置付ける</li> </ul>



分担研究報告書

## 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

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	鯉淵 智彦 菊地 正 西條 政幸 松本 哲哉 藤井 毅	東京大学医科学研究所附属病院 感染免疫内科 東京大学医科学研究所附属病院 感染免疫内科 国立感染症研究所 ウイルス第一部 東京医科大学 微生物学講座 東京医科大学八王子医療センター 感染症科

**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最新の情報を得ることを目的とした『バイオテロ対応ホームページ』を改訂した。総論部分を見直し、かつ2014年に国内で発生したデング熱、および西アフリカ3ヵ国でのエボラ出血熱に関する新知見を追加した。今後とも各病原体（疾患）の最新情報の追加等を行い、ホームページの更新作業を進めていく方針である。さらにバイオテロ診断支援の一環として、国内の地方衛生研究所における検査可能疾患の状況調査（アンケート）を行った。

### 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。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重要な対策の一つとなる。本研究においては、医療従事者が最新のデータに基づいた情報を広く利用できることを目指し、これまでに各疾患の情報を入れたCD-ROMを作成・配布したり、専門家の意見を取り入れたりしながらホームページの修正とアップデートを行ってきた。今後とも新たな情報を追加してより内容を充実させ、一般の医療従事者にとって有用なホームページを公開することを目的とする。

### B．研究方法

国内外の主要雑誌や学会などを通じて、バイオテロ関連疾患についての情報を収集し、ホームページに掲載した内容の妥当性・正確性等について確認する。新たなアウトブレイクが生じた場合には迅速に新知見を追加する。

さらに今年度は、バイオテロ診断支援の一環として国内の地方衛生研究所における検査可能疾患のアンケート調査を行った。

（倫理面への配慮）

特になし

### C．研究結果

ホームページに掲載したバイオテロ関連疾患についての情報を見直し、まず総論部分の改訂を行った。具体的には感染症法、施行令、施行規則の改正を反映させた。また、2014年に約70



年ぶりに国内発生したデング熱に関する新知見を追加した。国内発生の約 160 人の状況、迅速キットの現状などについて記載した。さらに西アフリカでのエボラ出血熱のアウトブレイクに関する情報を加えた。2015 年始めまでの発生状況、臨床症状、致死率などを掲載した。

(<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。そこで今年度は、国内の施設で検査可能な疾患の現状把握を目的として、地方衛生研究所に対して状況調査（アンケート）を行った。全国 79 施設のうち、2015 年 1 月末までに 78 施設から回答を得た。多くの施設では一定の検査水準にあったが、一部の病原体に対する検査体制が未整備であることが示唆された。

表 1 80%以上の施設で検査可能な病原体

種別	病原体または毒素	CDC(2000)
三種	MERSコロナウイルス	
三種	SFTSウイルス	
四種	コレラ菌	B
四種	赤痢菌属	B
四種	チフス菌	B
四種	腸管出血性大腸菌	B
四種	ポリオウイルス	
四種	志賀毒素	
四種	インフルエンザウイルス(H5N1,H7N7,H7N9)	
四種	デングウイルス	
四種	パラチフスA菌	
その他	黄色ブドウ球菌エンテロトキシンB	B
その他	ウエルシュ菌エンテロトキシン	B

#### 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、現在のわが国では診る機会が少ないものが多い。臨床医の大多数は病態に対する十分な知識はなく、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。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。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行うとともに、広い見識を有する感染症専門家から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。2014 年夏には約 70 年ぶりに国内発生のデ

ング熱が確認され、本疾患に対する認識を新たにする重要な契機となった。また西アフリカ3カ国（ギニア、リベリア、シエラレオネ）を中心にエボラ出血熱が拡大した。2014 年にこれら2つの感染症が国内外で発生したことはバイオテロの観点からも重要な意味を持つ。発生状況、致死率、病原性に関する情報などを追加し、正確かつ最新の情報を提供する場として更新を図った。今後とも最新の情報を加え、利用者の利便性を考えたホームページの作成を行う予定である。

国内の検査施設との連携も重要な課題である。バイオテロに関連する事態は国内のあらゆる場所で発生しうる。各検査施設の現状把握を目的として全国の地方衛生研究所にアンケート調査を行い、99%という高い回答率を得た。MERS コロナウイルス、SFTS ウイルス、インフルエンザウイルスなどは 80%以上の施設で検査可能であった(表 1)。来年度へ向けてアンケートのさらなる詳細な解析を行い、検査体制を充実させるための対策を検討したい。

(本アンケートの施行に当たり、ご尽力頂いた倉根一郎班長、地方衛生研究所全国協議会会長小澤邦壽先生(群馬県衛生環境研究所長)、小林和夫先生(堺市衛生研究所所長)に厚く御礼申し上げます。また、アンケートにご協力下さった各衛生研究所の方々にこの場を借りて感謝申し上げます。)

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。)  
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業  
（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業））

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分野 教授

研究要旨 国内の多くの医療機関においてバイオテロに対する関心は低く、その対策に向けた準備もまだ十分とは言えない。その理由として、国内の医療機関の状況に合わせたバイオテロ対策の指針が明確にされておらず、十分な情報提供がなされていないことが挙げられる。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。今年度はバイオテロにおける最も重要な疾患のひとつである炭疽に焦点をあて、ガイドラインを作成した。今後はこれをたたき台として、医療の現場で有効な活用ができるようにさらに改訂を進めるとともに、他の病原体による感染症に対しても、ガイドライン作成を進めていく予定である。

A．研究目的

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

B．研究方法

バイオテロに関する国内外の各種資料を入手し、それらを参考にして日本の医療現場の現状に合わせて、炭疽菌によるバイオテロ対策のガイドラインを作成した。平成 25 年度はそれを受けてさらに具体的な内容の検討を行った。

C．研究結果

医療機関におけるバイオテロ対策ガイドラインの作成  
バイオテロ対策のガイドラインについては、現在の医療機関が置かれた状況を考慮した上で、より実践的で効率的な内容にすることを旨として、まず炭疽菌を取り上げ、ガイドラインを作成した（追加資料参照）

ガイドラインの項目とポイントは下記のとおりである。

りである。

1) 病原体の基礎知識

バイオテロの病原体としての炭疽菌の特徴について概要を説明した。

2) 疾患の基礎知識

病型、臨床症状、臨床的診断、微生物学的検査、治療、予防、に項目を分けて、炭疽に関する特徴を解説した。

病型については、皮膚炭疽、肺炭疽（吸入炭疽）および腸炭疽の 3 種類に分けて特徴を解説した。臨床症状は 3 病型の典型的な症状について解説した。臨床的診断は a) 問診および診察、b) 血液検査、c) 画像診断について、微生物学的検査は、a) 検体の採取法、b) 一般の検査室で可能な検査、c) 外部に依頼すべき検査、について解説した。治療は初期治療や併用について、予防は a) ワクチン、b) 曝露後予防について解説した。

3) バイオテロのリスク

炭疽菌を用いた過去の事例を取り上げて、バイオテロのリスクについて解説した。

4) 感染対策

事前に必要な準備として、a) マニュアル等、b) 検査・診断用、c) 伝播予防用について解説した。さらに患者への対応や消毒、環境面への対応、

専門医療機関との連携、感染症法上の対応についても解説を行った。

#### 5) 危機対応フローチャート

炭疽のバイオテロが疑われる状況と対応について、炭疽が疑われる状況から始まって、経過を追って治療や取るべき対応について簡略的に図示した。

#### 6) アクションカード

【事例】として単独患者の重症肺炎、【事例】として複数例の重症肺炎、【事例】として複数の重症肺炎に加えて、皮膚炭疽が疑わしい症例も加わった事例、を取り上げて、バイオテロを想定した場合の考察や医師など各職種別にみた取るべき対応について解説を行った。

#### D. 考察

現在、イスラム国を始めとして宗教あるいは特定の思想に基づくテロ行為や国際紛争が活発な状況となっている。このような状況において、バイオテロに対する備えも重要性が増してきている。しかし国内では、バイオテロに対する関心は高いとは言えず、医療機関においてもその対策はほとんどなされていないのが現状である。

感染症の分野でもインフルエンザについては、新型あるいは高病原性のインフルエンザの流行を見据えて、国や自治体の後押しも加わって、各医療機関におけるBCP (business continuity plan:事業継続計画)の作成が進められている。今後、バイオテロについても、国内外で実際の事例が発生すると、その対策の必要性について急に関心が高まることも予想される。その段階において、何も具体的に指針となるようなものがないと、対応の不備によってさらに被害が拡大することが予想されるため、本ガイドラインの作成は重要な意義があると思われる。

現時点においては、ガイドラインは他の多くの病原体をカバーすることや、公開前の段階で識者の意見等を受けて改訂していくことが必要であり、引き続き作業を継続していく必要がある。

る。

#### E. 結論

各医療機関がバイオテロ対策を実施する上での参考となるガイドラインの作成を計画し、今年度は炭疽を対象として具体案の作成を行った。今後、さらに病原体の種類を増やすとともに、実際の医療現場で活用できる内容に向けて修正を行っていく必要がある。

#### 参考文献

1. 新型インフルエンザ等発生時の診療継続計画作りの手引き 成 24 年度 厚生労働科学研究費補助金新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業「新型インフルエンザ発生時の公衆衛生対策の再構築に関する研究」 分担研究「新型インフルエンザ等発生時の診療継続計画作りに関する研究」 分担研究者 吉川 徹  
[http://www.virology.med.tohoku.ac.jp/pandemicflu/i/tool/sinryou\\_tebiki.pdf](http://www.virology.med.tohoku.ac.jp/pandemicflu/i/tool/sinryou_tebiki.pdf)

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
特許取得なし
2. 実用新案登録  
登録なし
3. その他  
なし

## 炭 疽 (anthrax)

### 1. 病原体の基礎知識

炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) はグラム陽性桿菌で、土壌などの環境中に生息している。通常はヒツジやヤギなどの家畜や野生動物に感染し、人獣共通感染症を起こす。炭疽菌は分類上はバチルス属に属しているが、他のバチルス属の菌と異なり、鞭毛がないために運動性を示さない。さらに血液寒天培地で培養しても溶血性を示さないという特徴を有している。本菌は芽胞を形成し、乾燥した状態でも長時間生息し、熱や消毒薬などに対しても強い抵抗性を示す。

炭疽菌は非常に強毒の菌であり、浮腫因子(edema factor)や致死因子(lethal factor)と呼ばれる毒素や、防御抗原 (protective antigen) と呼ばれるタンパクを産生して出血、浮腫、および壊死などを引き起こす。また、本菌は生体内に侵入しても、その莢膜によりマクロファージなどの貪食に抵抗性を示す。これらの病原因子が重なって本菌は致死性の感染を起こすと考えられている。

### 2. 疾患の基礎知識

#### 1) 病型

炭疽菌感染症の病型は基本的に皮膚炭疽、肺炭疽 (吸入炭疽) および腸炭疽の 3 種類に分けられる (表 1)。ただし、最近では 3 種類の病型に加えて麻薬の静注に伴う “Injection Anthrax” が 4 つめの病型として加えられている。

自然感染の場合は、そのほとんどを皮膚炭疽が占めているが、肺炭疽や腸炭疽が自然感染として起こることはまれであるため、これらの疾患に遭遇した場合はバイオテロによる感染の可能性も考慮しなければならない。

表 1. 炭疽の分類と主な特徴

疾患	感染経路	潜伏期間	症状	致死率
皮膚炭疽	接触感染 (皮膚の直接接触)	1~12日	・感染局所の丘疹、発赤、浮腫 ・外観の黒色に変化	10~20%
肺炭疽 (吸入炭疽)	経気道感染 (菌の吸入)	1~7日(あるいはさらに長期)	・インフルエンザ様症状(発熱、頭痛、筋肉痛、倦怠感) ・呼吸不全(胸痛、呼吸困難、チアノーゼ) ・ショック、意識障害	45~90%
腸炭疽	経口感染 (汚染した食物の摂取)	1~7日	・嘔気、嘔吐、腹痛、発熱 ・吐血、血便、激しい下痢	25~50%

## 2) 臨床症状

### a) 皮膚炭疽

炭疽菌は正常の皮膚からはほとんど侵入しないため、皮膚の傷口から炭疽菌が侵入して発症することが多い。炭疽菌に接触後、1～10日間の後に小さな虫さされ様の丘疹が出現し、患者はかゆみを感じる人が多いといわれている。その後、病巣部は無痛性の膿胞を形成し、中心部は壊死し、周囲に発赤と浮腫を認める。病変部は外見上、炭のように黒褐色の痂皮を形成し、皮膚炭疽に特徴的な病変ができる。炭疽の名前は、この黒色の外観を示す病変に由来している。さらに感染部位の所属リンパ節炎を合併しやすい。炭疽の予後は不良であり、皮膚炭疽は未治療の場合、10～20%の致死率を示す。

### b) 肺炭疽（吸入炭疽）

肺炭疽は最初に微熱、倦怠感などの症状から始まり、さらに頭痛、筋肉痛、悪寒などインフルエンザ様の症状を認める。その後、胸痛や血痰も認められる。無治療の場合、多くの症例で呼吸困難、チアノーゼ、胸水などを伴い、さらにショック状態へと急激に進展する。そのため、肺炭疽の場合は治療が遅れて重症化する可能性が高く、無治療の場合の致死率は99%、治療が行われても45～90%とかなり高い。

### c) 腸炭疽

腸炭疽では、嘔気、嘔吐、腹痛、発熱などの胃腸炎症状で発症する。さらに状態が悪化すると吐血や血便がみられる。なお経口的に入ってきた炭疽菌が咽頭部で感染を起こす場合があり、咽頭痛や嚥下障害、発熱を訴えるとともに、頸部のリンパ節腫脹を伴う。発症後、2、3日経過して菌血症を合併することがあり、その場合は致死率が高くなる。

## 3) 臨床的診断

### a) 問診および診察

炭疽の症例に遭遇した場合に、本疾患を鑑別診断の1つに加えられるかどうか、診断の最初の鍵となる。問診ではまず、自然感染によるものを除外するために、家畜や皮革を扱う職業に従事していないかどうかを確認する必要がある。

急激に進行する市中肺炎の症例に遭遇した場合は、通常は肺炎球菌性肺炎やレジオネラ肺炎などが鑑別疾患として挙げられるが、これらの病原体による肺炎が否定的で、急激に進行する肺炎を認めた場合は注意が必要である。特に同様の症例を複数認めた場合は、バイオテロの可能性もあり、肺炭疽の鑑別が重要である。

腸炭疽は本疾患に特有な所見が認められず、臨床的な判断で本疾患を疑うことは困難である。炎症性腸疾患や通常の細菌性腸炎が否定されたにもかかわらず、血便の持続や敗血症を合併するような症例では本疾患の可能性も念のため考慮する。

### b) 血液検査

血液検査では一般的に白血球やCRPなど炎症所見が認められる。なお、末梢血白血球は好中球優位の増加を示す。臓器の障害によりASTやALT、LDHなどの上昇が認められるが、本疾患に特異的な所見はない。

### c) 画像診断

肺炭疽では胸部 X 線で高度なリンパ節腫脹を伴う縦隔の拡大が特徴的であり、この所見を認めた際に本疾患が疑われる。さらに胸水貯留や肺水腫、および肺出血を伴うことがある。皮膚炭疽や腸炭疽では疾患に特異的な画像所見は認めない。

### 4) 微生物学的検査

#### a) 検体の採取法

検査に用いる検体としては、皮膚炭疽であれば病巣部位を滅菌綿棒で擦過した検体を用い、肺炭疽は喀痰、腸炭疽は便を用いる。ただし肺炭疽では縦隔の炎症が主体であり、典型的な肺炎として発症することはまれであるとも言われており、検査に適した喀痰が得られない場合もある。いずれの病型においても菌血症の頻度が高いため、血液培養を実施しておく必要がある。

#### b) 一般の検査室で可能な検査

炭疽が疑われる場合、まず臨床検体のグラム染色を実施し、可能性を検討する(表 2)。炭疽菌はグラム染色を行うと竹の竿状に連鎖した桿菌が観察される。菌の形態だけで診断を確定することは困難である。しかし、重症の炭疽では多数の菌による菌血症を伴いやすいので、末梢血の直接塗抹標本のグラム染色で炭疽菌を観察することが可能であるといわれている。なお、炭疽菌が疑われる所見を認めた場合は、本疾患を考慮して、バイオセーフティの観点から以後、検体の扱いを慎重に行う必要がある。

#### c) 外部に依頼すべき検査

炭疽の確定診断は菌の検出により行われるため、培養検査は重要である(表 2)。培養で疑わしい菌が分離された場合の最終同定は国立感染症研究所など専門機関に依頼する必要がある。

なお、炭疽の診断には PCR を用いた迅速診断法や血中抗体価の測定あるいは血中毒素の検出も可能とされているが、一般の検査室で対応することは困難であり、外部の専門機関への依頼が必要である。

表 2. 炭疽の微生物学検査法

---

#### 塗抹染色

- ・グラム染色：竹を接いだ形態を認める。
- ・莢膜染色：インディアインク、メチレンブルー染色、直接蛍光染色など

#### 培養

- ・血液寒天培地で、37℃、18 時間培養。非溶血性で周辺が鋸歯状のコロニー。形状はセレウス菌と似ているが運動性を認めない。

#### 同定

- ・形態及び生化学的性状に加えて、溶血性、γファージの溶菌性や莢膜の有無等を総合的に判定。

#### その他の検査

- ・PCR: 染色体およびプラスミドの遺伝子を検出
  - ・ファージによる溶菌テスト、イムノクロマトによる抗原検出、抗体検査なども候補に挙げられているが、一部の施設においてのみ可能
-

## 5) 治療

炭疽菌は本来、ペニシリン系、カルバペネム系、ニューキノロン系、テトラサイクリン系など多くの抗菌薬に良好な感受性を示す。通常はこれらの抗菌薬の中を単独で用いることで、治療効果が期待されるが、重症化の可能性を考慮して、炭疽の初期治療の基本は抗菌薬の併用である(表3)。

併用による治療の基本は、ニューキノロン系抗菌薬(シプロフロキサシンまたはレボフロキサシン)の点滴静注に加えて、克林ダマイシンやリファンピシンを追加する治療法が推奨されている(表3)。また、ニューキノロン系抗菌薬とβ-ラクタム系抗菌薬の併用も効果が期待できると思われる。海外ではニューキノロン系抗菌薬の代わりにドキシサイクリンの点滴静注も推奨されているが、日本では静注用の製剤は販売されていない。

治療開始後、臨床症状が寛解したら、シプロフロキサシン 1回 400mg 1日2回、またはレボフロキサシン 1回 500mg 1日1回の経口投与に切り替える。治療期間は60日間の投与が目安になっている。小児の患者で初期治療で軽快した場合、投与可能なニューキノロン系抗菌薬として、トスフロキサシン 1日 12mg/kg 1日2回 経口にて投与する治療が考えられる。

なお、自然感染の場合の炭疽菌は前述のように多くの抗菌薬に良好な感受性を示すが、バイオテロではペニシリンなどへの耐性が付加された菌を使用される可能性があるため、可能な範囲で薬剤感受性を検討することが望ましい。

表3. 炭疽の初期治療

対象	選択すべき薬剤	併用の組合せ	注意事項
成人	シプロフロキサシン 1回 300mg 12時間毎 点滴静注 または、レボフロキサシン 1回 500mg 1日1回 点滴静注 克林ダマイシン 900mg 静注 8時間毎 リファンピシン 300mg 経口 12時間毎 ペニシリン G 400万単位静注 4時間毎 メロペネム 1回 1g 8時間毎	1) + 2) + + 3) + 4) +	基本的には 1) または 2) の選択が推奨されている。 薬剤感受性が良好であれば、単独の選択もある。
小児	シプロフロキサシン 1回 10mg/kg 12時間毎 点滴静注 または、レボフロキサシン 1回 10 mg/kg 12時間毎 点滴静注 克林ダマイシン 7.5mg/kg 静注 6時間毎 ペニシリン G 5万単位/kg 静注 6時間毎(12歳未満) 400万単位静注 4時間毎(12歳以上)	1) + 2) + 3) + 4) +	小児を対象としたリファンピシンの投与は 20mg/kg で静注となっているため今回は対象外とした。

治療上、留意すべき点としては、本菌感染症が疑われた時点で早期から適切な薬剤を選択し、治療を開始する必要がある点である。抗菌薬は十分量投与することが必要であり、最初は点滴静注で始めて、臨床症状の改善を確認した上で経口抗菌薬への変更が行われる。しかし国内では小児を対象としたニューキノロン系抗菌薬の点滴静注は承認されておらず、その投与は副作用のリスクより、治療上の効果が上

回ると判断した場合に限って慎重に投与する必要がある。肺炭疽では病状の進行に伴って、脱水、呼吸不全、ショックなどに陥りやすいため、補液、酸素吸入、昇圧剤など全身管理を含めた治療も必要である。

なお、海外では肺炭疽の症例を対象として、Raxibacumab（GSK）と呼ばれるヒト型のモノクローナル抗体が承認されている。

## 6) 予防

### a) ワクチン

炭疽菌のワクチンは米国では主に軍の関係者やバイオテロ対策を担当する者を対象として接種が義務づけられており、実際にリスクの高い任務を担当する場合はその 120 日前にワクチンを接種するように定められている。それ以外のワクチンの対象者として、炭疽菌に曝露される可能性のある職業である微生物の研究所の職員や動物あるいは皮革などを扱う職業の人が候補に挙げられている。

米国 FDA の認可を受けた炭疽ワクチンとしては BioThrax®（Emergent BioSolutions 社）があり、そのホームページにはすでに 300 万人が接種したと記載されている。0.5 ml の筋注で初回接種後、1 および 6 か月後に再接種を行い、その後ブースターとして 1 年間隔で接種を続ける方法が推奨されている。なお本ワクチンの副反応として疼痛、発赤など接種部位の局所反応（ $\geq 10\%$ ）や、頭痛、筋肉痛、倦怠感などの全身性の反応（ $\geq 5\%$ ）が認められている。

### b) 曝露後予防

炭疽菌に曝露された可能性が高い場合は抗菌薬の予防内服が必要である。一般的にシプロフロキサシンとドキシサイクリンが推奨されており、両薬剤の予防効果は同等とされている。肺に炭疽菌を吸入した可能性がある場合、曝露されて発症するまで 1 週間以内と考えられるが、芽胞のまま肺内に長期間生存することも想定される。これまでに曝露後 60 日後に発症した症例が経験されていることもあり、予防的な抗菌薬の投与期間としては最長 60 日間の投与が推奨されている。しかし曝露された可能性があるというだけで多数の人々に 60 日間の曝露後予防を実施するのは現実的ではないため、基本的に 10 日間の予防投与を実施し、その間に本当に曝露された可能性の高い人を選別し、選ばれた人だけを対象に残り 50 日間の予防投与を実施すべき、という考え方も提案されている。

なお、曝露後の予防として前述の炭疽ワクチンも有効とされており、曝露後すぐに接種した後、計 3 ~ 5 回程度の接種が推奨されている。

## 3. バイオテロのリスク

炭疽菌はバイオテロに使用される可能性の最も高い病原体のひとつであり、米国 CDC はバイオテロに使用される可能性のある微生物の中で、炭疽菌を最も危険度の高いカテゴリー A に分類している。これまで実際に、炭疽菌がバイオテロに用いられた事例がいくつか存在する。

過去に炭疽菌が実際にバイオテロに使用された例としては、2001 年に米国で起こった炭疽菌事件が有名である。郵便物に混入された炭疽菌が原因で皮膚炭疽 12 例、肺炭疽 11 例が発生し、肺炭疽患者のうち 5 例が死亡した。最初にこの事件はイラクやアル・カイダの関与も疑われたが、米国の軍事施設の研究所に勤務していた微生物学の研究者が犯人と結論づけられた。

これまでバイオテロに寄らない炭疽菌の集団感染の事例は少なからず報告されているが、その背景に



はいくつかの要因が考えられる。2010年にバングラデシュで500名を超える炭疽患者が発生しているが、ほとんどすべての患者は皮膚炭疽で、感染する前に炭疽菌に感染した動物と接触したか感染した動物の肉を食べたということであり、バングラデシュのように動物が感染する可能性が高く、動物との接触の頻度も高い地域では自然感染として炭疽が流行する可能性も否定できない。

また2009年以降、イギリスなどヨーロッパで発生した麻薬の静注に伴う炭疽菌の感染例も100例以上に達しており、炭疽菌による麻薬の汚染という特殊な状況ではあるが、集団で感染を起こす危険性のひとつと考えられる。

#### 4. 感染対策

##### 1) 事前に必要な準備

###### a) マニュアル等

各医療施設の状況に見合ったマニュアルの作成が必要である。BCPについては、新型インフルエンザの流行ほどの広く影響が出ることは考えにくいだが、特定の地域で多くの感染者が発生する可能性は否定できず、その状況を想定した計画を立てることが望ましい。

###### b) 検査・診断用

本菌の推定を行うための検査については、通常の微生物検査の対応で可能である。ただし確定を行うための検査は専門機関に依頼する必要がある。疑わしい菌が確認されたら、菌株を搬送して確認を依頼する必要があるため、予め定められた方法に従って搬送の手続きを行う必要があり、菌株搬送用のジェラルミンケース等を準備しておく必要がある。

###### c) 伝播予防用

本菌の伝播予防策に用いるPPEは手袋、サージカルマスク、ガウン、ゴーグルなどであり、炭疽への対策用に特別にPPEを確保しておく必要はない。消毒薬は後述のようにアルコールは無効であり、次亜塩素酸を用いる必要がある。また汚染器材等はオートクレーブによる滅菌が必要である。

##### 2) 伝播予防策

炭疽菌によるヒトヒト感染は起こらないため、標準予防策による対応が行われる。ただし皮膚炭疽の患者から他の患者に感染が見られた報告もあるため、皮膚炭疽の創部の扱いは慎重に行う必要がある。

##### 3) 患者への対応

皮膚病創部の管理がきちんとしていけば個室での隔離は必要ではない。ただし患者は重症化しやすく、特に肺炭疽の場合は呼吸管理や全身管理を行う必要性があるため、その点を考慮して病室を決定する必要がある。

##### 4) 消毒

汚染した可能性がある物品や器具などは、高圧蒸気滅菌用耐熱性袋に入れ、なるべく速やかにオートクレーブで滅菌する。消毒薬を用いる場合、炭疽菌は芽胞を形成するため、通常用いられる消毒薬であるエタノール等に対して抵抗性を示す点に注意が必要である。実際に芽胞を形成している炭疽菌を用い

て消毒薬の効果を検討した報告では、1000ppm の次亜塩素酸 1 分処理では約 10 分の 1 にしか菌は減少せず、10 分処理で約 1 万分の 1 に減少し、20 分処理でようやく検出限界以下となっている。そこでより効果を高めるために次亜塩素酸に酢を加えて酸性の条件下で検討したところ、炭疽菌と同じバチルス属の *Bacillus atrophaeus* を 30 秒処理で検出限界以下にまで殺菌することができた。以上より、酸性にした次亜塩素酸溶液を消毒に用いることでより効果を高めることができると考えられる。

#### 5) 環境面への対応

基本的に病室の清掃は一般的な病室への対応と同様で良い。ただし、皮膚炭疽の場合は、創部の処置によって病室の環境を汚染させないように配慮しなければならない。

#### 6) 専門医療機関との連携

炭疽であることが確認された場合、感染症の専門医のアドバイスを受けながら治療を行う必要がある。専門医が院内にいない場合は、他院の専門医に連絡を取って、対応を決めることが望ましい。感染症を専門とする診療科がある病院に転院を行うかどうかについては、相談の上、決定する必要がある。

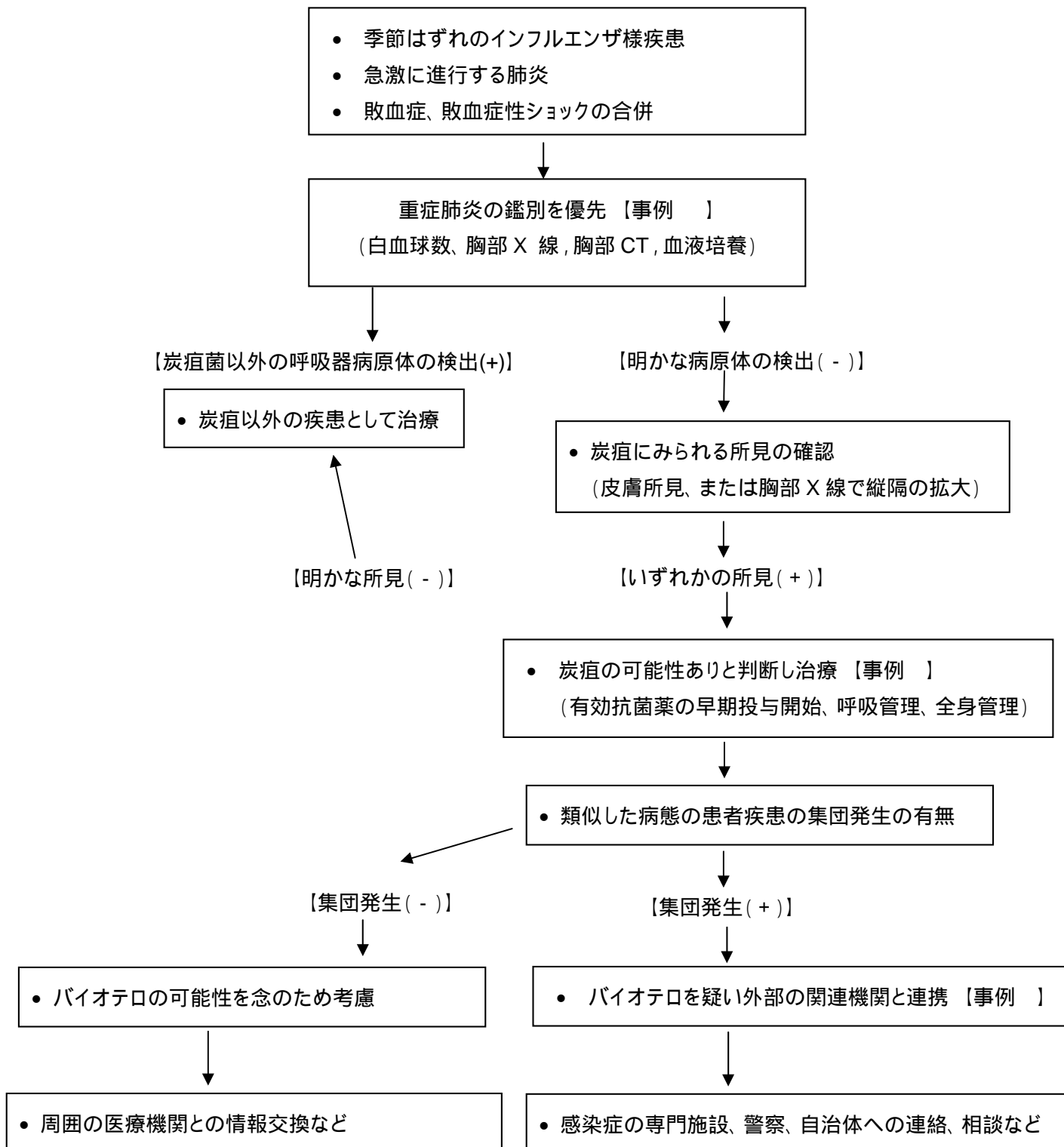
#### 7) 感染症法上の対応

炭疽は感染症法によって四類感染症に指定されており、発症症例だけでなく、無症状の病原体保有者の場合も、分離・同定による病原体の検出あるいは P C R 法による病原体の遺伝子の検出例は医師が届出を直ちに行わなければならない、と定められている。

## 危機対応フローチャート

### 炭疽のバイオテロが疑われる状況と対応

(事例 ~ の詳細はアクションカードの項目を参照)



## アクションカード

**【事例】** 45歳、男性。営業職のサラリーマン。発熱、倦怠感、胸痛を訴えて外来を受診。念のため胸部X線をチェックするが、肺野には明らかな浸潤影は確認できなかった。時期はずれだが念のためインフルエンザの抗原をチェックしたが陰性であった。患者の倦怠感が強そうだったので入院も勧めたが、本人は仕事を休めないというので、とりあえず一般の感冒薬とペニシリンの内服薬を処方して帰宅させた。

翌日、受診したサラリーマンが、家族に抱き抱えられるようにして再び受診。顔色は悪く、質問にもほとんど答えられない状態であった。早速採血を行って確認したところ白血球数 25,000, CRP 12.6mg/dl と強い炎症所見を認めた。血圧も 92/46mmHg と低めでショック状態が疑われたため、輸液を開始し即入院とした。再び胸部X線をチェックしたところ肺野の陰影を認め、急性肺炎としてレジオネラおよび肺炎球菌による感染も考慮して尿中抗原をチェックしたが陰性であった。主治医はカルバペネムの投与と酸素吸入を開始し、病棟をICUに変更した。

### 【考察】

通常の肺炎にしては病状の進展が急激である。ただし症例は単独であり、この段階において、バイオテロや炭疽の可能性を考慮することは困難であり、原因不明の重症肺炎としての対応が行われる。

### 【取るべき対応】

#### ・医師

重症肺炎として可能性の高いレジオネラや肺炎球菌などの可能性は否定的となっているが、この状態で肺炭疽を疑うことはかなり困難と思われる。ただし、他の病原体を含めてさらに起因病原体の診断に努める。さらに重症肺炎として積極的な抗菌薬投与と呼吸管理、全身管理を行う。

#### ・看護師

ICUにおける集中管理が必要な重症患者として対応する。現時点では起因病原体が不明であることから、周囲への伝播の可能性を否定できず、飛沫感染予防策を想定した対応を行う。

#### ・薬剤師

抗菌薬の選択や投与方法について、PK-PD および副作用の観点からアドバイスを行う。TDMが必要な抗菌薬が選択された場合は、TDMの実施を医師に推奨し、その結果を受けて投与設計の変更を行う。

#### ・検査技師

積極的に起因病原体の検索に努める。塗抹標本のグラム染色だけでなく、ヒメネス染色等についても実施を考慮する。血液培養の実施をアドバイスする。

#### ・事務員

今後、患者の家族等への説明や問診に向けて、家族等の連絡先を確認しておく。

## アクションカード

**【事例】** 外来に中学生とその母親が呼吸困難と強い倦怠感を訴えて受診。親子で肺炎が疑われたため二人とも入院させ、酸素投与とカルバペネム系抗菌薬の投与を開始した。この親子二人はいずれも上肢の皮膚に強い発赤を伴う病変が認められた。皮膚病変は無痛性の膿疱で、中心部は壊死して炭のように黒色に変化し、周囲に発赤と浮腫を認めた。

入院翌日、2人とも呼吸状態はさらに悪化していた。肺炎球菌、およびレジオネラの尿中抗原は陰性であったが、*Legionella pneumophila* serogroup 1 以外のレジオネラ肺炎、早期の肺炎球菌性肺炎、マイコプラズマ肺炎なども否定できないと考えて、さらにフルオロキノロン系抗菌薬を併用した。検査部に昨日の喀痰の検査結果を問い合わせても、通常の肺炎の病原体は検出されていない、という返事であった。

### 【考察】

親子が同時期に重症の肺炎として入院しており、伝播性の高い病原体であることが推測される。また、本症例では一般の肺炎と異なり、皮膚病変を有することが注目される。無痛性であり、中心部が壊死し黒色を示していることなどの特徴から炭疽を含めた鑑別診断が必要となる。

### 【取るべき対応】

#### ・医師

重症肺炎として可能性の高いレジオネラや肺炎球菌などの可能性は否定的となっているが、検査部と協力してさらに起因病原体の検索を行う必要がある。特に皮膚病変はその黒色の特徴から炭疽の可能性も考慮して病変部の検体を採取し、塗抹染色や培養を実施する。

#### ・看護師

重症の肺炎患者として対応が必要であり、さらに起因病原体が不明であるため、飛沫感染予防策を行う。また、皮膚病変についても、感染の危険性を考慮して接触感染予防策に準じた対応を行う。

#### ・薬剤師

抗菌薬の選択や投与方法について、PK-PD および副作用の観点からアドバイスをを行う。TDM が必要な抗菌薬が選択された場合は、TDM の実施を医師に推奨し、その結果を受けて投与设计の変更を行う。消毒薬について、炭疽を考慮すると言われた場合は、芽胞形成菌に有効な消毒法のアドバイスをを行う。

#### ・検査技師

積極的に起因病原体の検索に努める。塗抹標本のグラム染色では、炭疽菌が推定されるかどうかを確認する。血液培養の実施をアドバイスする。炭疽菌が疑われる菌が分離された場合は、専門機関に相談し、同定を依頼する。

#### ・事務員

入院の事務手続きを説明する際には、皮膚病変に触れないように注意する。また、炭疽と診断された場合の保健所等への報告手続きについて確認しておく。

## アクションカード

**【事例】** 夜間帯に高熱、呼吸困難を訴える 78 歳の男性患者がショック状態で救急車で搬送された。入院直後より酸素投与、昇圧剤の投与、輸液管理、およびカルバペネム系抗菌薬の投与が行われた。しかし状態は改善せず、翌日の午後に死亡してしまう。死因については明確ではないが、胸部 X 線では肺炎像と縦隔の拡大を認めた。

同日の外来に強い呼吸困難と胸痛を訴える患者が 3 名受診した。いずれも病院の近くに住んでいる以外、特に共通点はみられない。胸部 X 線で浸潤影を認め、白血球数の増加、CRP の上昇を認めた。倦怠感が強く重症化が予想されたため、入院を勧めたが 2 名は入院を受け入れ、1 名は拒否したためニューキノロン系抗菌薬を処方して帰宅させた。

入院させた 2 名の患者はニューキノロン系抗菌薬の点滴静注を開始したが、翌日、いずれも呼吸不全が高度となり、内 1 名はすでにショック状態に陥り、けいれんを伴った。明確ではなかったが頂部硬直が疑われたため、髄膜炎の合併も疑われたため、頭部 CT をオーダーしたが、けいれんが続き髄腔穿刺は見送り、セフトキシムの点滴静注を併せて行った。残り 1 例は腕の一部に黒褐色に変色した膨隆疹を認めた。

その翌日、検査室から患者の血液培養の結果について、2 名の患者いずれの血液培養も、グラム陽性桿菌陽性、という連絡があった。

### 【考察】

同時期に重症の肺炎患者が受診し、死亡する例も出ている。またこれらの患者に特に共通点はないため、会社内や大学内での感染の流行とも考えにくい。このように突然、複数の重症感染症の患者が受診した場合には、パイオテロも想定して対応を進めていく必要がある。

### 【取るべき対応】

#### ・医師

個々の患者に対して、全身管理を含めて集中的に治療を行う。起因病原体の検索のための、各種検体の提出を行い、念のため血清を保存しておく。近隣で同様の患者が発生していないかどうかを、他の医療機関に連絡して確認を取る。

#### ・看護師

入院患者の隔離あるいはコホーティングを検討する。さらに同様の患者が増えることを想定して病棟の管理体制を相談する。

#### ・薬剤師

さらに同様の患者が増えた場合を想定して、必要と思われる薬剤の在庫の確認と、不足しそうな薬剤の発注を行う。病棟への消毒薬の供給を十分量行う。

#### ・検査技師

積極的に起因病原体の検索に努める。炭疽菌を始めとして、想定される病原体に必要な検査を医師にアドバイスする。検査に必要な試薬等の確保を行う。炭疽菌が疑われる菌が分離された場合は、専門機関に相談し、同定を依頼する。

#### ・事務員

病院として対応すべき非常事態であることを院内の職員に向けて通知するため、感染対策のメンバーとともに準備を行う。保健所等への報告が必要な病原体であることが診断された場合の手続きについて確認しておく。

## 文献

- 1) 山本達男. 炭疽菌 bioterrorism - 炭疽菌とは何か - 考古堂書店. 2002
- 2) CDC: Update: Investigation of Bioterrorism-Related Anthrax and Interim Guidelines for Clinical Evaluation of Persons with Possible Anthrax, 50: 941-947, 2001  
<http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/wk/mm5043.PDF>
- 3) Palmateer NE et al. Anthrax infection amongst heroin users in Scotland during 2009-2010: a case-control study by linkage to a national drug treatment database. Clin Infect Dis. 55:706-710. 2012
- 4) Sweeney et al. Anthrax infection. Am J Respir Crit Care Med. 184:1333-1341. 2011
- 5) WHO : Guidelines for the surveillance and control of anthrax in humans and animals.3rd ed. 1998. [http://www.who.int/csr/resources/publications/anthrax/WHO\\_EMZDI\\_98\\_6/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/anthrax/WHO_EMZDI_98_6/en/)
- 6) Theodore J. et al: Clinical and Epidemiologic Principles of Anthrax, Emerging Infectious Diseases, 5: 552-555, 1999.
- 7) 厚生労働省. 感染症法に基づく医師及び獣医師の届出について - 炭疽 - .  
<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou11/01-04-17.html>
- 8) Public Health England. Guidelines for Action in the Event of a Deliberate Release of Anthrax. 2010 [http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb\\_C/1194947401128](http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1194947401128)
- 9) 日本臨床微生物学会, 日本臨床衛生検査技師会, 日本臨床検査医学会編: 炭疽菌検査マニュアル (Ver.1) 2001
- 10) 国立感染症研究所. 炭疽検査マニュアル (第2版) .  
[http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/anthrax\\_%2020120608-2.pdf](http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/anthrax_%2020120608-2.pdf)
- 11) Oggioni MR et al.: Protocol for Real-Time PCR Identification of Anthrax Spores from Nasal Swabs after Broth Enrichment, J Clin Microbiol, 40: 3956-3963, 2002
- 12) Bradley JS et al., Pediatric Anthrax Clinical Management: Executive Summary  
<http://pediatrics.aappublications.org/content/early/2014/04/22/peds.2014-0564>
- 13) Inglesby et al. Anthrax as a Biological Weapon, Medical and Public Health Management, JAMA, 281:1735-1745, 1999.
- 14) Emergent BioSolutions. BioThrax ホームページ. <http://www.biophrax.com/>
- 15) Oie S. et al. Disinfection Methods for Spores of *Bacillus atrophaeus*, *B. anthracis*, *Clostridium tetani*, *C. botulinum* and *C. difficile*. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 34:1325-1329, 2011
- 16) 厚生労働省検疫所. バングラデシュで炭疽が流行. 2010  
<https://www.forth.go.jp/keneki/fukuoka/201009276.pdf>

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業  
（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業））

分担研究報告書

「ウイルス性出血熱の検査に関する研究」

研究分担者 西條政幸 国立感染症研究所ウイルス第一部長

研究協力者 福士秀悦，谷口怜，谷英樹，吉河智城，下島昌幸 国立感染症研究所第一部

研究要旨：2014年，西アフリカ地域でエボラ出血熱が制御できずに流行拡大した。2015年2月現在，流行は終息のめどが付いていない。西アフリカで流行しているエボラウイルス「西アフリカ型」は分子系統上ザイールエボラウイルスに近縁であるものの，ザイールエボラウイルスそのものとは塩基配列の違いがある。本研究では，これまで国立感染症研究所で整備されてきたエボラウイルス検出用 PCR プライマー，プローブが「西アフリカ型」に対応できるかどうか検討した。塩基配列の比較から NP 遺伝子をターゲットにしたコンベンショナル PCR 用プライマーは「西アフリカ型」を検出できると考えられた。一方，L 遺伝子をターゲットにしたリアルタイム PCR 用プライマー，プローブにいくつかの塩基配列の違いが認められた。「西アフリカ型」に完全に一致した配列のプローブを用いたリアルタイム PCR と従来のプローブを用いたリアルタイム PCR は同等の感度で「西アフリカ型」を検出可能であった。これらの結果から，従来のコンベンショナル PCR，リアルタイム PCR の両方で行うエボラウイルス検査で「西アフリカ型」の検出に対応できると考えられた。

A. 研究目的

2014年，西アフリカ地域でエボラ出血熱が制御できずに流行拡大した。WHOの発表（2015年1月14日付け）によると西アフリカ3カ国（ギニア，リベリア，シエラレオネ）ではエボラウイルス感染疑い例を含めて累積患者数が21,296人（うち死亡者8,429人）に達している。西アフリカで流行しているエボラウイルス「西アフリカ型」は分子系統上ザイールエボラウイルスに近縁であるものの，ザイールエボラウイルスそのものとは塩基配列の違いがある（*N Engl J Med.* 2014;371(15):1418-1425）。これまで国立感染症研究所で整備されてきたエボラウイルス

検出用 PCR プライマー，プローブはすべてのエボラウイルス株を検出できるようにデザインされている（図1および図2）。しかし，これらは「西アフリカ型」が流行する以前に設計されたものである。本研究では，エボラウイルス検出用 PCR プライマー，プローブが「西アフリカ型」に対応できるかどうか検討した。

B. 研究方法

1) 西アフリカで流行しているエボラウイルス塩基配列を入手し，現在，国立感染症研究所で使用されているエボラウイルス検出用プライマー，プローブとリアルタイム



ントを行った。

- 2) 「西アフリカ型」の L 遺伝子のリアルタイム PCR 領域を合成し,リアルタイム PCR 検討用鋳型 DNA スタンダードとした。
- 3) 「西アフリカ型」に完全に一致する配列の蛍光プローブ (5' CCGAAATCATCACTTGTGTG GTGCCA-3') を作製し,リアルタイム PCR に用いた。

#### C. 研究結果

- 1) 塩基配列の比較から NP 遺伝子をターゲットにしたコンベンショナル PCR 用 1st プライマーは混合塩基 D (G or A or T), Y (T or C) を含み, 2<sup>nd</sup> プライマーも同様に混合塩基 Y (T or C), R (G or A) を含んでいるため,「西アフリカ型」にみられる塩基配列の変異に対応できると考えられた (図 3 および 図 4)。
- 2) 塩基配列の比較から L 遺伝子をターゲットにしたリアルタイム PCR 用プライマーのうち, Forward プライマー F1lo-A2-4 は「西アフリカ型」に完全に一致し, Reverse プライマー F1li-B は 5' 側に 2 塩基のミスマッチがあることが判った (図 5)。一方, FAM-EBOSud は完全には一致していないもののイノシンを導入しているため,「西アフリカ型」を検出可能であると考えられた (図 6)。
- 3) 蛍光プローブを用いたリアルタイム PCR 法はプローブのミスマッチが検出感度を低下させる大きな要因となりうる。そこで,「西アフリカ型」に完全に一致する配列の蛍光プローブ (5' CCGAAATCATCACTTGTGTG GTGCCA-3') を作製し,リアルタイム PCR に用いた。西アフリカ型プローブを用いたリアルタイム PCR により「西アフリカ型」が検出可能であり,その感度は従来のプローブを用いたリアルタイム PCR と同等であったことから,この結果から,従来のプローブを用いても感度の低下することなく

「西アフリカ型」を検出できると考えられた (図 7)。

#### D. 考察

これまで国立感染症研究所で整備されてきたエボラウイルス検出用 PCR プライマー, プローブが「西アフリカ型」に対応できるかどうか検討した。塩基配列の比較から NP 遺伝子をターゲットにしたコンベンショナル PCR 用プライマーは「西アフリカ型」を検出できると考えられた (図 3 および 4)。一方, L 遺伝子をターゲットにしたリアルタイム PCR 用プライマー, プローブにいくつかの塩基配列の違いが認められた (図 5 および 6)。「西アフリカ型」に完全に一致した配列のプローブを用いたリアルタイム PCR と従来のプローブを用いたリアルタイム PCR は同等の感度で「西アフリカ型」を検出可能であった (図 7)。これらの結果から,従来のコンベンショナル PCR,リアルタイム PCR の両方で行うエボラウイルス検査で「西アフリカ型」の検出に対応できると考えられた。リアルタイム PCR 用のプローブのうち, Reverse プライマーの 5' 側に 2 塩基のミスマッチが見られた。一般的にプライマーの 5' 側のミスマッチは PCR に影響を及ぼすことは少ないと考えられるが,これが「西アフリカ型」の検出感度に影響を及ぼすかどうか,今後詳細な検討が必要である。

#### E. 結論

国立感染症研究所で整備されてきたエボラウイルス検出用 PCR プライマー, プローブによって「西アフリカ型」エボラウイルスを検出できることが確認された。

#### F. 健康危険情報

2014 年から 2015 年にかけて西アフリカにおいてかつてない規模のエボラ出血熱が流行した。米国および英国ではエボラ出血熱の輸入感染事例が発生し,米国では輸入感染患

者が入院治療を受けた病院内で医療従事者の院内感染が発生した。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yoshikawa T, Fukushi S, Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Toda S, Shimazu Y, Yano K, Morimitsu T, Ando K, Yoshikawa A, Kan M, Kato N, Motoya T, Kuzuguchi T, Nishino Y, Osako H, Yumisashi T, Kida K, Suzuki F, Takimoto H, Kitamoto H, Maeda K, Takahashi T, Yamagishi T, Oishi K, Morikawa S, Saijo M, Shimojima M. Sensitive and specific PCR systems for the detection of both Chinese and Japanese severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strains, and the prediction of the patient survival based on the viral load. *J Clin Microbiol.* 52(9):3325-3333, 2014.

### 2. 学会発表

- 1) 福間藍子, 福士秀悦, 吉河智城, 鈴木忠樹, 谷英樹, 谷口怜, 下島昌幸, 西條政幸. SFTS

ウイルスの核蛋白質に対するモノクローナル抗体の作製と抗原検出ELISAへの応用. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11)

- 2) 西條政幸, 吉河智城, 福士秀悦, 谷英樹, 福間藍子, 谷口怜, 須田遊人, Harpal Singh, 前田健, 高橋徹, 森川茂, 下島昌幸. 重症熱性血小板減少症候群ウイルスの分子系統学的特徴とその地理的分布. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11) ..
- 3) Fukuma A, Fukushi S, Taniguchi S, Tani H, Yoshikawa T, Suzuki T, Hasegawa H, Saijo M, Shimojima M. Development of antigen-capture ELISA for the detection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus nucleoprotein. The 10th China-Japan International Conference of Virology. Changchun, China. (2014. 08).

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

```

Zaire 1 AAGCATTTCCTAGCAATATGATGGTAGTTACGGAACTGAGCAAAAAGAAAGCTTATTGCATCAAGCATCATGGCACACACAAGTGATGATTTTGGTGA 100
Tai F 1 .....C.A.....T.G.A.G.C.....C.T.....G.T.....T..... 100
Sudan 1 .....C.A.....T.C.A.GA.G.A.....G.G...C.CC.T..C.....C.....T.....C.A..... 100
Reston 1 .G.C.C.C.T.C.....A.T.....A.....G...C.TC.T...G.....C.....C.....A..... 100
Bundibugyo 1 .C.....T.C.....T.A.A.G.....G.G...C.G...C.G.G.G.....C.....C.....A..... 100
Marburg Ravn 1 .G...C...T.....T...T.GA.A...G...GCTG.....C.T.....T.ATTCA.CAAG.A.A.G... 100
* * * * *
Filo-A2-2 AAGCCTTTCCTAGCAACATGATGGT TGGCACCAACACIAGTGATGATTTTGG FAM-EBOg
Filo-A2-3 AAGCATTCCCTAGCAACATGATGGT TGGCACCAIACIAGTGATGATTTGG FAM-EBOsud
Filo-A2-4 AAGCATTTCCTAGCAATATGATGGT TGGCACCAATTCAGCAAGCATAGG FAM-MBg
* * * * *

Zaire 101 ACATGCCACAGTTAGAGGGAGTAGCTTTGTAACCTGATTAGAGAAATACAATCTTGCATTAGATATGAGTTACAGCACCTTTTATAGAATATTGCAAC 200
Tai F 101 GA...T.T.....C...T.....A.C.G.A.....T.A...CC.....T.....T.....C..T..T 200
Sudan 101 G.....C.T.A...T.....C.A.CC.G.A.....G.C.C.G...A.C...T..C.C.CA..... 200
Reston 101 GA...T.C.C.....T.....T.....G.....G.....C.C.....C.T.....A.....T.G.C..... 200
Bundibugyo 101 GA...T.....C.C.C.....T.C.CC.A.....CT.G.....T.A.....T.....C.T..T 200
Marburg Ravn 101 GA...T.A...TGCA..T...T.....C.T.....C.....CG.A...C...C.C.T..T 200
* * * * *

Zaire 201 CGTTGCTATGGTGTAAAGAATGTTTTAATTGGATGCATTATACAATCCACAGTGTATATGCATGTCAGTGATTATTATAATCCACCACAT 293
Tai F 201 .....T.C.....A.GA...T.G.....C.C.T.A.....A...G.....C.C..... 293
Sudan 201 .AA.....G..CGC...C.G.....C.TCCT..T.G.A...C.....T.....C..... 293
Reston 201 .A.....GGT...C.....TT.....G.....C.....G.T..C 293
Bundibugyo 201 .A.T.....A.A.T.A.C.....G.A.G.A.....A...A.....C.T..... 293
Marburg Ravn 201 .A.T.C.....A.T.A..CG.C.....TCCT..A...TA.C.....C.T.....GC..T.T.C 293
* * * * *
GATGTCAGTGATTATTATAACCCACCACAT Filo-B
CATGTCAGTGACTTTTATAGCCCTCCTCAC Filo-B Ravn
GATGTRAGTGATTATTATAAYCCCCACAT Filo-B BI

```

modified from the method described by C. Drosten, JID 2007:196

図 1 .L-遺伝子を標的としたエボラウイルス・マールブルグウイルス遺伝子を増幅させるための定量的リアルタイム RT-PCR におけるプライマーおよびプローブの塩基配列 (デザイン) .

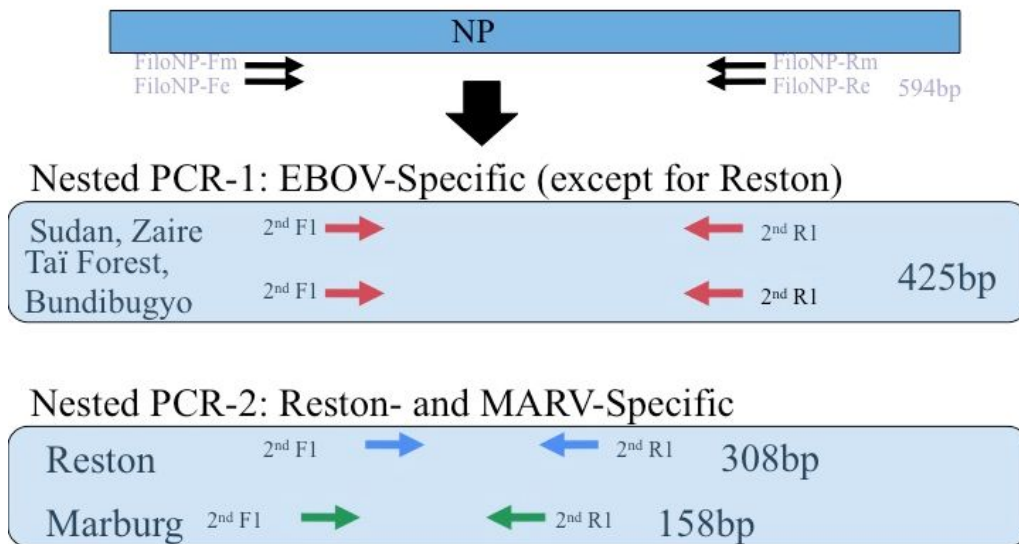
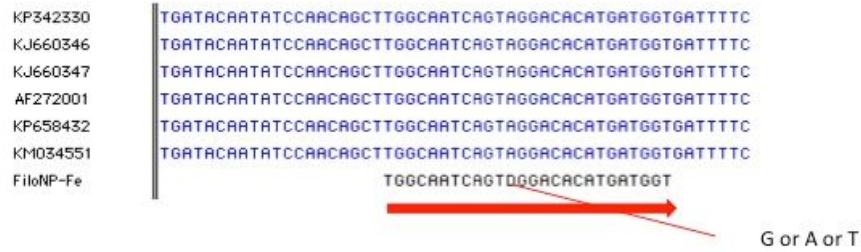


図 2 .国立感染症研究所ウイルス第一部において整備されている種特異的エボラウイルスおよびマールブルグウイルス遺伝子増幅のための nested RT-PCR 法におけるプライマーの核蛋白質 (NP) 遺伝子に結合する部位の概要 .

FiloNP-Fe



FiloNP-Re

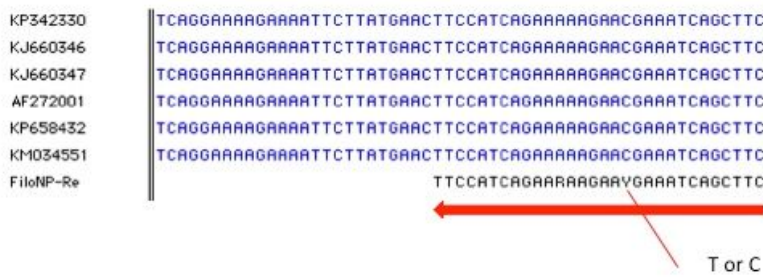


図 3 . NP 遺伝子を標的にしたコンベンショナル PCR 用 1st プライマーのエボラウイルス西  
アフリカ株への相同性 .

Sudan Zaire 2<sup>nd</sup> F1



Sudan Zaire 2<sup>nd</sup> R1

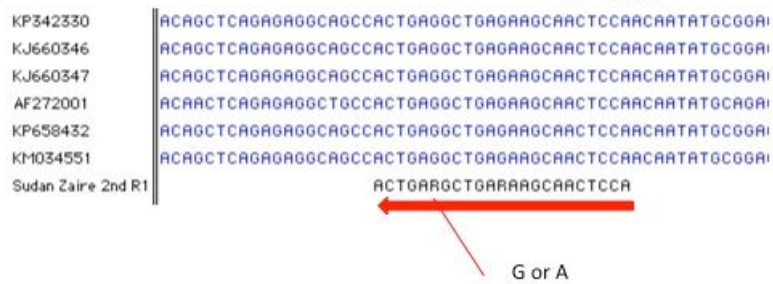


図 4 . NP 遺伝子を標的にしたコンベンショナル PCR 用 2ndPCR におけるプライマーのエボラ  
ウイルス西アフリカ株への相同性 .

Filo-A2\_4, Filo-A2\_3, Filo-A2-2

```

KP342330 | CTGATGGTCTTGCTAAGCATTTCCTAGCAATATGATGGTAGTTACGGARCGTGA
KJ660346 | CTGATGGTCTTGCTAAGCATTTCCTAGCAATATGATGGTAGTTACGGARCGTGA
KJ660347 | CTGATGGTCTTGCTAAGCATTTCCTAGCAATATGATGGTAGTTACGGARCGTGA
AF272001 | CTGATGGTCTTGCTAAGCATTTCCTAGCAATATGATGGTAGTTACGGARCGTGA
KP658432 | CTGATGGTCTTGCTAAGCATTTCCTAGCAATATGATGGTAGTTACGGARCGTGA
KM034551 | CTGATGGTCTTGCTAAGCATTTCCTAGCAATATGATGGTAGTTACGGARCGTGA
Filo-A2_4 | ARGCAATTCCTAGCAATATGATGGT
Filo-A2_3 | ARGCAATTCCTAGCAATATGATGGT
Filo-A2_2 | ARGCAATTCCTAGCAATATGATGGT

```

Filo-B, FiloB-BI

```

KP342330 | TCCCACAGTGTTATATGCATGTCAGTGATTATTATATCCACCSCATACCTCACACT
KJ660346 | TCCCACAGTGTTATATGCATGTCAGTGATTATTATATCCACCSCATACCTCACACT
KJ660347 | TCCCACAGTGTTATATGCATGTCAGTGATTATTATATCCACCSCATACCTCACACT
AF272001 | TCCCACAGTGTTATATGCATGTCAGTGATTATTATATCCACCSCATACCTCACACT
KP658432 | TCCCACAGTGTTATATGCATGTCAGTGATTATTATATCCACCSCATACCTCACACT
KM034551 | TCCCACAGTGTTATATGCATGTCAGTGATTATTATATCCACCSCATACCTCACACT
Filo-B | CATGTCAGTGATTATTATATCCACCSCAT
Filo-B-BI primer | CATGTAGTGATTATTATATCCACCSCAT

```

G or A                      T or C

図5. L 遺伝子を標的にしたリアルタイム PCR 用プライマーにおける Forward プライマー Filo-A2-4 と Reverse プライマー Filo-B の西アフリカ型エボラウイルスの遺伝子標的部位との相同性. Forward プライマー Filo-A2-4 は「西アフリカ型」に完全に一致し, Reverse プライマー Filo-B は 5' 側に 2 塩基のミスマッチが認められる.

Filo-A2\_4, Filo-A2\_3, Filo-A2-2

```

KP342330 | CTGATGGTCTTGCTAAGCATTTCCTAGCAATATGATGGTAGTTACGGARCGTGA
KJ660346 | CTGATGGTCTTGCTAAGCATTTCCTAGCAATATGATGGTAGTTACGGARCGTGA
KJ660347 | CTGATGGTCTTGCTAAGCATTTCCTAGCAATATGATGGTAGTTACGGARCGTGA
AF272001 | CTGATGGTCTTGCTAAGCATTTCCTAGCAATATGATGGTAGTTACGGARCGTGA
KP658432 | CTGATGGTCTTGCTAAGCATTTCCTAGCAATATGATGGTAGTTACGGARCGTGA
KM034551 | CTGATGGTCTTGCTAAGCATTTCCTAGCAATATGATGGTAGTTACGGARCGTGA
Filo-A2_4 | ARGCAATTCCTAGCAATATGATGGT
Filo-A2_3 | ARGCAATTCCTAGCAATATGATGGT
Filo-A2_2 | ARGCAATTCCTAGCAATATGATGGT

```

Filo-B, FiloB-BI

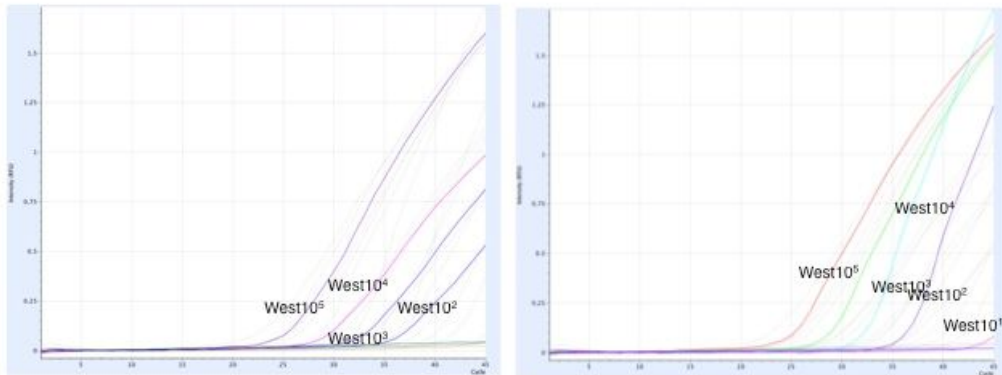
```

KP342330 | TCCCACAGTGTTATATGCATGTCAGTGATTATTATATCCACCSCATACCTCACACT
KJ660346 | TCCCACAGTGTTATATGCATGTCAGTGATTATTATATCCACCSCATACCTCACACT
KJ660347 | TCCCACAGTGTTATATGCATGTCAGTGATTATTATATCCACCSCATACCTCACACT
AF272001 | TCCCACAGTGTTATATGCATGTCAGTGATTATTATATCCACCSCATACCTCACACT
KP658432 | TCCCACAGTGTTATATGCATGTCAGTGATTATTATATCCACCSCATACCTCACACT
KM034551 | TCCCACAGTGTTATATGCATGTCAGTGATTATTATATCCACCSCATACCTCACACT
Filo-B | CATGTCAGTGATTATTATATCCACCSCAT
Filo-B-BI primer | CATGTAGTGATTATTATATCCACCSCAT

```

G or A                      T or C

図6. L 遺伝子を標的にしたリアルタイム PCR 用プライマーにおけるプローブ FAM-EBOSud の標的遺伝配列との相同性. 「西アフリカ型」を検出可能であると考えられる.



鋳型DNA: 西アフリカ型エボラウイルス L遺伝子		
	従来のプローブ	西アフリカ型プローブ
10 <sup>5</sup>	25.61722027	24.94538461
10 <sup>4</sup>	30.39735545	28.35831422
10 <sup>3</sup>	33.88288273	31.47739283
10 <sup>2</sup>	37.8660777	35.65336026
10 <sup>1</sup>	ND	ND
10 <sup>0</sup>	ND	ND

図7. 定量的リアルタイム RT-PCR において、西アフリカ型プローブを用いた場合と従来のプローブを用いたリアルタイム PCR における検出限界の比較。従来のプローブを用いても感度の低下することなく「西アフリカ型」を検出できると考えられた。





厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業  
（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業））

分担研究報告書

「ウイルス性出血熱の検査に関する研究」

細胞培養弱毒生痘そうワクチンを土台とした組換えワクシニアウイルス作製システムの改良

研究分担者 西條政幸 国立感染症研究所ウイルス第一部長  
研究協力者 福士秀悦，谷口怜，谷英樹，吉河智城，下島昌幸 国立感染症研究所第一部  
研究協力者 森川茂 国立感染症研究所獣医学部

研究要旨：細胞培養痘そうワクチンの製造承認株である LC16m8 株は，Lister 株から低温馴化により LC16 株，LC16m0 株を經由して樹立された安全性の非常に高いワクチン株である．近年ではこの長所を生かして，他の感染症へのワクチンとしての応用もされはじめている．既に我々は相同組換えを利用する，LC16 系統のワクシニアウイルスを土台とした組換えワクシニアウイルス作製システムを構築している．当システムは，簡便かつ高効率に recVac を作製可能であり，且つ最終的に完成したウイルスゲノム内からはその後の研究に不必要な recVac 選択カセット（薬剤耐性遺伝子と蛍光タンパク質を含む遺伝子カセット）を取り除くことが可能である．一方で，現時点までの方法ではこの recVac 選択カセットはこれを保持するウイルスを選択薬剤存在下で選択する際の，正の選択のみに使用している．このカセットをウイルスゲノムから取り除く際には選択薬剤非存在下で，相同組換えにより偶然脱落するのを期待するしか無く，そこが律速にもなり得た．そこで本研究は選択薬剤として 2-チオキサンチンを用いて，recVac 選択カセットが脱落することを人為的に促進する「負の選択システム」を組み込んだ改良版 recVac 作製システムを確立した．

A. 研究目的

細胞培養痘そうワクチンの製造承認株である LC16m8 株は，Lister 株から低温馴化により LC16 株，LC16m0 株を經由して樹立された株である．サルを用いて行われた神経病原性試験により非常に神経毒性が低いことがわかっている．また，1970 年代には約 10 万人の子供に接種され，その際に重篤な副反応は確認されなかったことより安全性の非常に高いワクチン株といえる．さらに，自衛隊での成人への種痘にも用いられ安全性がさらに確認されている．この安全性と種痘における強く長期に亘る免疫誘導から，組換えワクシニアウイルスとして他の感染症ワクチンとしての応用も期待されている．既に我々は相同組換えを利用した組換えワクシニアウイルス（recVac）作製システムを構築している（図 1）．当システムは，簡便かつ高効率に recVac を作製可能であり，且つ最終的に完成したウイルスのゲノム内からはその後の研究に不必要な recVac 選択カセット（薬剤耐性遺伝子と蛍光タンパク質 mCherry 遺伝子を含む遺伝子カセット）を取り除くことが可能である．しかし現時点までの方法では，この recVac 選択カセットは

それを保持するウイルスを選択薬剤存在下で選択する際の，いわゆる正の選択のみに使用している．一方で，このカセットを取り除く際には選択薬剤非存在下で相同組換えによって偶然 recVac 選択カセットが脱落するのを期待するしか無かった．カセットが脱落する確立はあまり高いものではなく，これがスクリーニングの手間を増やすため，recVac 作製の律速となってしまっていた．そこで本研究では，薬剤を用いて選択圧をかけることで，recVac 選択カセットが脱落することを人為的に促進する負の選択システムを組み込んだ改良版 recVac 作製システムの開発を行った．

B. 研究方法

recVac 選択カセット内の薬剤選択遺伝子には，これまで同様キサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（*gpt*，または XGPRT と省略される）を用いている．本薬剤選択用遺伝子は，ミコフェノール酸（MPA）を用いた recVac の正の選択時に用いている MPA 存在下で阻害される細胞のプリン合成系（図 2）を中間型 recVac 感染細胞内で発現した XGPRT と，同時に添加するキサンチンによりレスキューする方法である．



今回は、キサントンのアナログである 2-チオキサントン (2-TX) を用いた負の選択法の適応を検討した。2-TX は XGPRT によってプリン合成系に取り込まれると、生体にとって機能的なプリンになりえないため毒性を発揮する。従って、XGPRT を持つ recVac の増殖が抑制され、更なる相同組換えによって生じた recVac 選択カセット部分が除かれた完成型の recVac が増殖する負の選択が可能になると考えたためである。そこで、2-TX の至適濃度などを検討し、負の選択法の実用性を検討した。

#### 【倫理面への配慮】

ヒト検体、動物は使用していないため該当しない。遺伝子組換えに当っては、文部科学省の承認を得た上で行った。

#### C. 研究結果、及び D. 考察

まず 2-TX の至適濃度を検討した。8mg/ml から 2 倍の段階希釈系列を作製し、そこで本組換え法で EGFP を導入した recVac (recVac-EGFP) を感染させた。recVac-EGFP は以前に作製した薬剤選択カセットが除去された完成型と、カセットを含む中間型を用いた。結果より、4mg/ml の 2-TX を培地中に添加することで、中間型ウイルスの増殖は阻害するが、完成型ウイルスの増殖は阻害しないことが明らかとなった (図 3)。この時、4mg/ml の 2-TX を培地中に添加したウェル内に出現したプラークを詳細に観察すると、中間型ウイルス感染細胞が発現する mCherry 遺伝子の赤色の蛍光を示すプラークの端から、完成型ウイルスが完成した細胞であることを示す赤色蛍光の発現していない EGFP の発現のみが確認されるプラークが出現していた (図 4)。これは、2-TX の選択圧によって、完成型ウイルスが選択されてきていることを示唆していると考えた。

そこで、薬剤選択カセットを含む中間型ウイルスを 2-TX 存在下で細胞に感染させた時に、完成型ウイルスが選択されてくるかを実際に検討した。前の検討実験より得られた結果をもとに、4mg/ml の 2-TX を培地中に添加し、そこに中間型ウイルスを感染させて 5 日間培養を行った。対照として MPA を添加したウェル、または薬剤を添加していないウェルも用意した (図 5)。感染細胞で発現している蛍光遺伝子を LED トランスイルミネーター上で確認すると、MPA 添加、または薬剤未添加のウェルでは、中間型ウイルスが発現している mCherry の赤色蛍光と EGFP の緑色蛍光が混ざったオレンジ色のプラークが多数を占めていたのに対して、2-TX を添加したウェルでは EGFP の蛍光が多数を占めていた (図 5A)。より定量的に観察するために、ウェルに含まれる、それぞれのウイルス量をプラーク

アッセイにより測定し、その割合を確認した。すると、やはり 2-TX 添加ウェル内では EGFP のみを発現している完成型ウイルスの割合が約 80% を占めていた (図 5B)。以上により、これまでに確立した、recVac 作製システムに負の選択システムを導入した改良型のシステムの確立が出来た。recVac 作製時間の律速の 1 つであった recVac 選択カセットが脱落を、2-TX によって人為的に促進することが可能となった。これにより recVac 作製のスピードアップにつながると考えている。

#### E. 結論

本研究により、薬剤を用いて選択圧をかけることで、recVac 選択カセットが脱落することを人為的に促進する「負の選択システム」を組み込んだ改良版 recVac 作製システムを確立した。

本法を用いて実際に組換えウイルスを作製している。現時点で、タンパク質発現の確認できた組換えウイルスワクチニアウイルスは □B5R (B5R 領域完全欠損ウイルス) EGFP そしてワクチン開発のために行っている、LCMV (リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス) の NP, Z, GPC, 更に SFTSV (重症熱性血小板減少症候群) の NP, GPC 発現ウイルスである。引き続き組換えワクチニアウイルスの作製を行い、研究を進展させたい。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表
  - 1) 吉河智城, 福士秀悦, 谷英樹, 福間藍子, 谷口 怜, 須田遊人, Harpal Singh, 江川和孝, 下島 昌幸, 森川茂, 西條政幸. ワクチニアウイルス LC16m8 株を土台とした組換えワクチニアウイルス作出システムの確立. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜 (2014.11)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

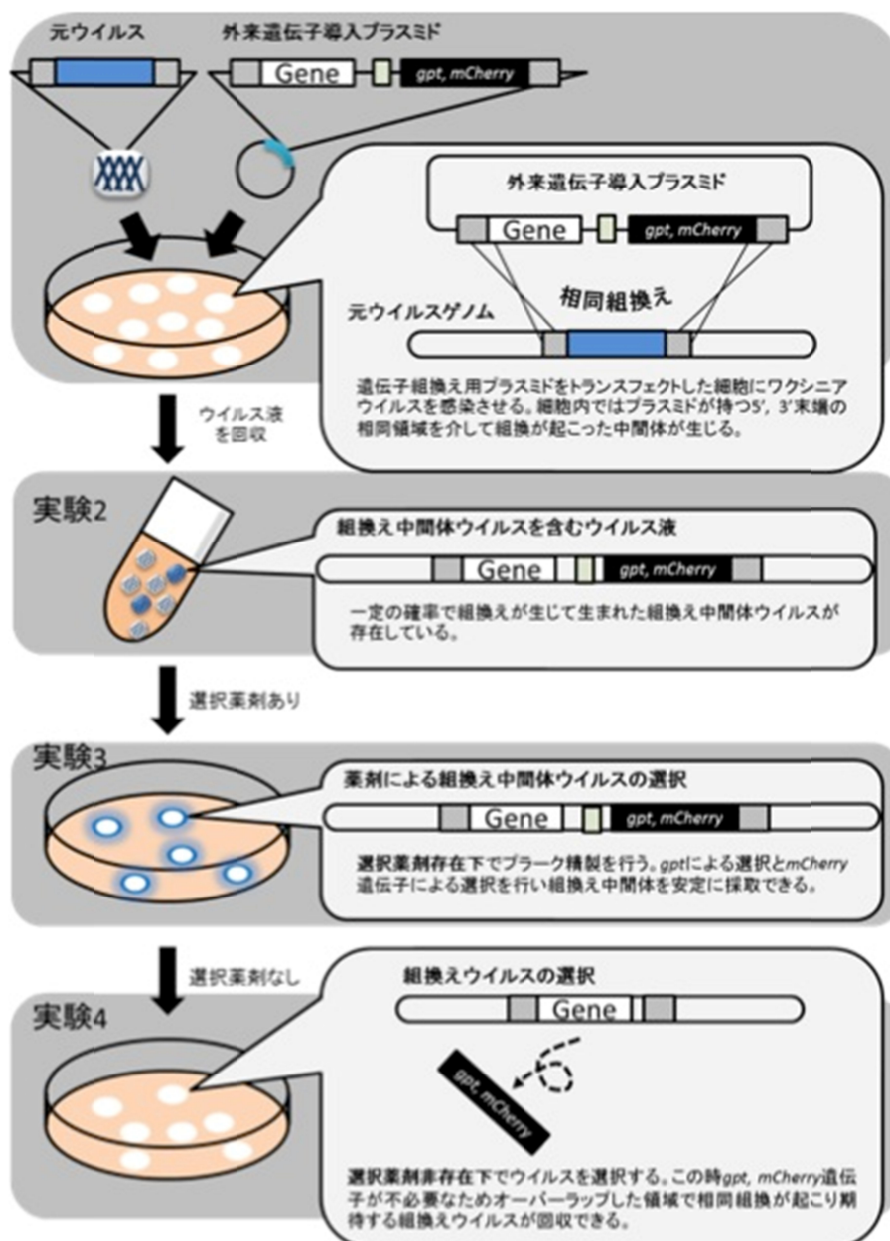


図1. 組換えワクチニアウイルス作製の概略.

## Positive or Negative Selection by XGPRT

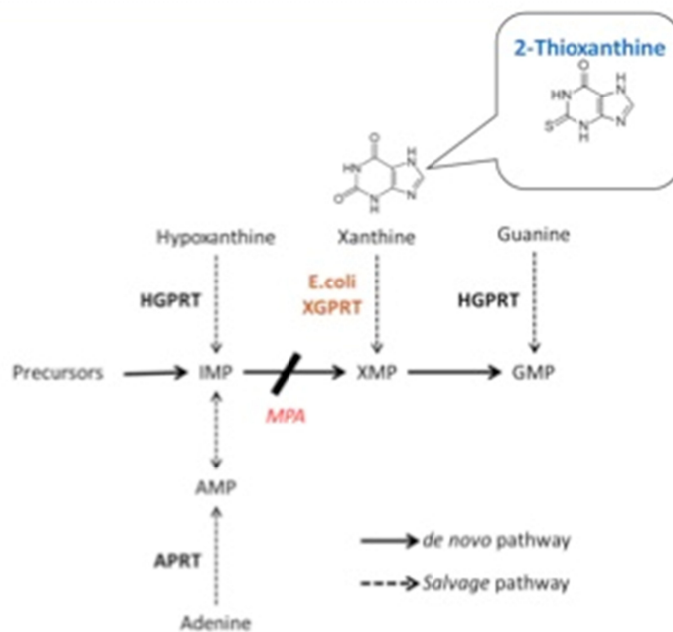


図 2 .ミコフェノール酸(MPA),キサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(XGPRT)及び2-チオキサンチンの生体内プリン合成系への関与 .

## Determination The Dosage of 2-Thioxanthine

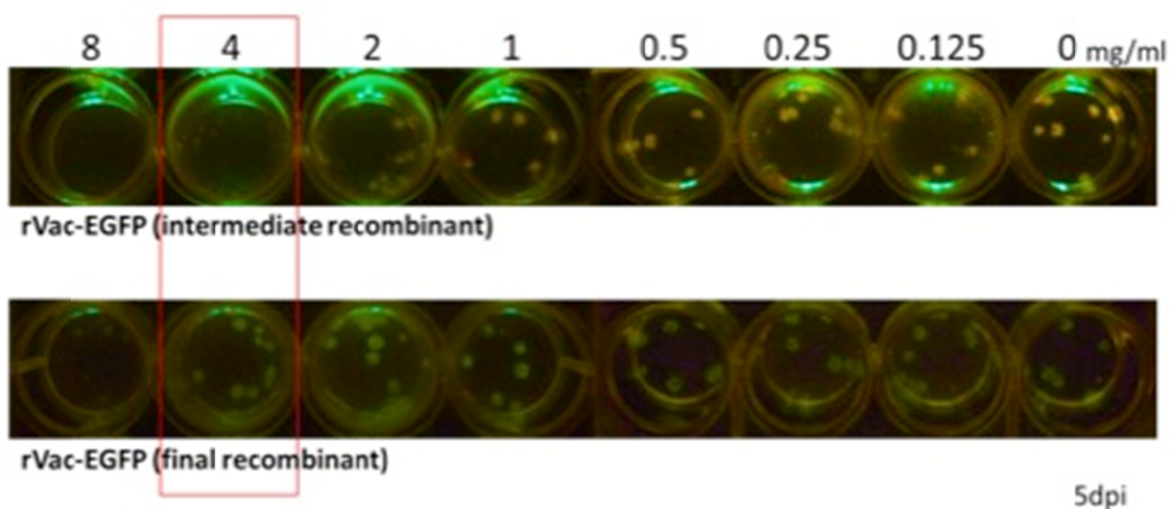


図 3 . 2-チオキサンチンの至適濃度の検討 .

## Effect of 2-Thioxanthine

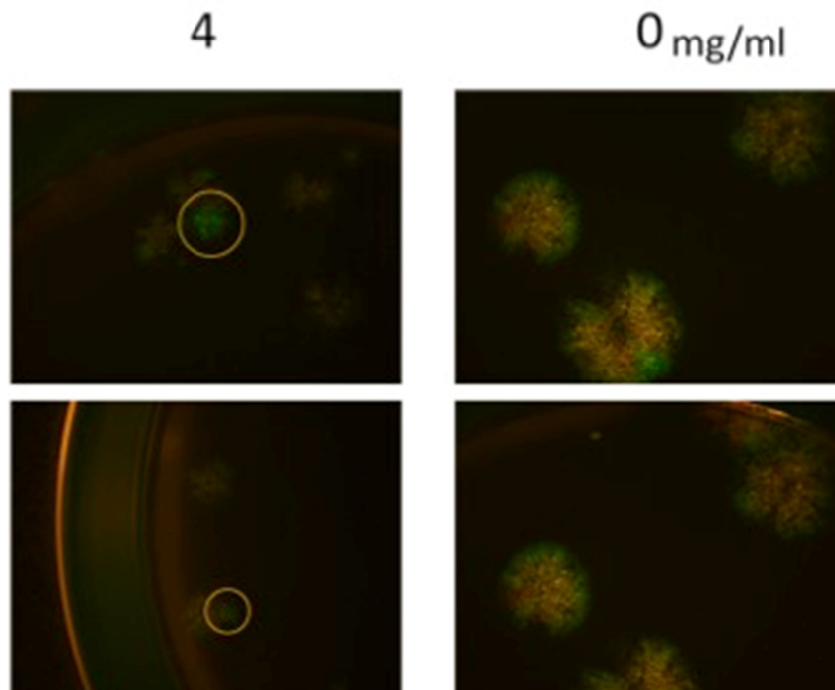


図 4 . 完成型ウイルスが完成した細胞であることを示す , EGFP の発現のみが確認されるプラークの出現 .

## Performance of The Negative Selection

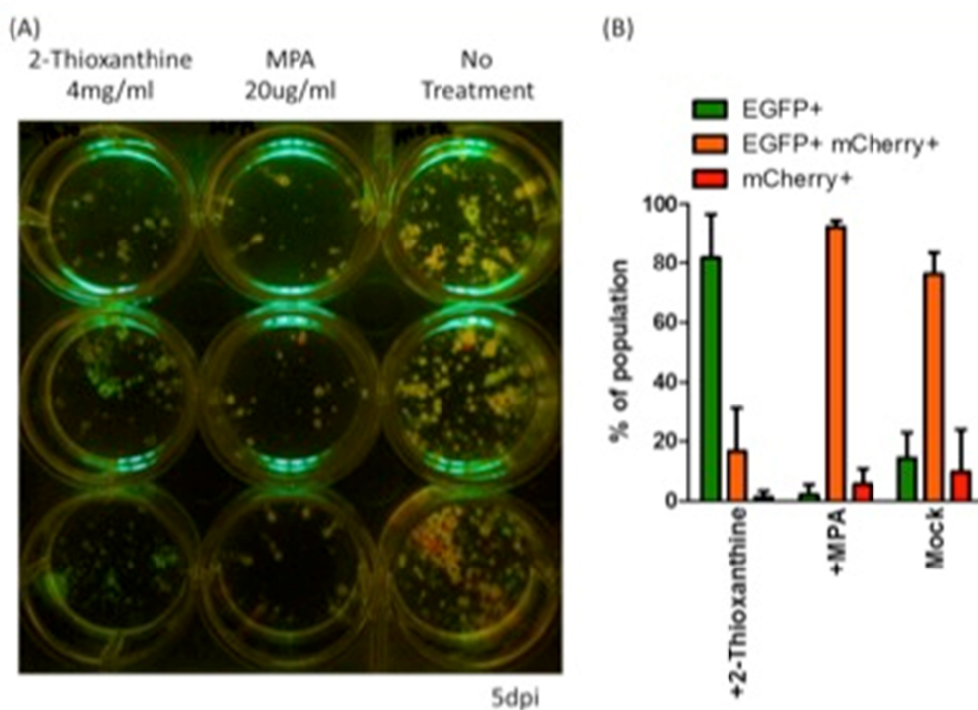


図 5 . 薬剤選択カセットを含む中間型ウイルスを 2-TX 存在下で細胞に感染させた , 「負の選択」時の , 完成型ウイルスが選択されてくるか否かの検討 .

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業  
（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業））

分担研究報告書

細胞培養弱毒生痘そうワクチンの疫学的有効性及び安全性評価に関する研究

研究分担者 金谷泰宏  
国立保健医療科学院 健康危機管理研究部

研究要旨

我々は、これまでの研究の中で、LC16m8 が既存の種痘免疫に対してブーストをかけるとともに既接種者の B5R 抗体の産生を促すことについて検証を行った。一方で、初種痘における B5R に対する抗体誘導は既接種群と比して弱いことが指摘されている。本研究においては、プロテインアレイを用いて LC16m8 により誘導される抗体プロファイルを解析し、昨年度までに LC16m8 の有効性を支持する結果が得られた。今年度、引き続き解析したところ、さらに詳細な解析の必要性が認められた。国内外の研究により B5R 抗体の産生は痘そうワクチンによる防御に必須ではないという結果も示されているが、有効性・安全性の点から重要な抗原であることから、プロテインアレイ解析結果も踏まえ、その抗原性について解析を行い、LC16m8 の B5R タンパク質の抗体誘導能を確認した。抗体の機能については引き続き検討が必要である。

A. 目的

LC16m8 株は EEV の主要抗原 B5 に変異があり切断型として発現しているため、ワクチンとしての有効性の評価には、この変異が抗原性にどのような影響を与えているかを明らかにすることが必要である。一方、抗体産生にはウイルス株の種類、個人の遺伝的要素、生理状態、ワクチン接種歴などの過去における曝露が影響を与えることから、有効なワクチン接種プログラムの開発には、LC16m8 株接種に関わるこれらの要因の関係を明らかにすることが必要である。

1970 年代以前、わが国では、天然痘のワクチン接種は 3 回の種痘を受けるプログラムであり、1976 年まで実施された。そのため、現在では、76 年以降が生年の世代は免疫がなく、それ以前の世代は出生年によって種痘歴（ワクチン株の種類と接種回数）が異なる世代が混在しており、いずれもワ

クチンの有効性評価と接種プログラムを構築するにあたり考慮する必要がある。わが国では 1970～1975 年の間に出生した者は 1 回、1964～1969 年の間に出生した者は 2 回、1963 年以前に出生した者は 3 回の接種を受けている。1970 年以前においては池田株、大連 1 株が、1970 年代は Lister 株が使用された。日本人集団においては、これらの免疫的背景を考慮したワクチン接種プログラムを開発することにより、安全性、有効性の高い接種が可能となる。

本研究では、プロテインアレイを用いた LC16m8 抗原性の解析を続けるとともに、有効性・安全性の評価に重要な LC16m8 株の B5 タンパク質の抗原性について検討を行った。

B. 研究方法

1. プロテインアレイを用いた LC16m8 の抗原性の解析

### (1)血清

齊藤らが報告した LC16m8 株接種の臨床試験のうち、第2ラウンドの被験者(200名)の血清を対象とした。善感反応を示さなかった4検体を除く196検体をプロテインアレイに供し測定を行った。血清は接種前、接種後1ヶ月目に採取し、ペア血清として解析を行った。

### (2)抗原プロファイル解析

ウイルス抗原としてワクシニアウイルス ウェスタンリザーブ株のゲノム上の ORF の遺伝子産物を搭載したアレイを用いた (Antigen Discovery Inc. Irvine, CA, USA)。ネガティブコントロールとして、ウイルス由来の遺伝子産物を発現させないスポットを設定した (no DNA control)。血清は、E.coli 溶解液 (最終濃度 4~5mg/mL) を含んだブロッキングバッファーで 50 倍に希釈し、18 度で 1 時間処理し、アレイにプローブして 4 度で 18 時間処理した。洗浄後、ブロッキングバッファーで 200 倍に希釈したビオチン化ヤギ抗ヒト IgA/G/M、Ig 鎖、Ig 鎖、IgM $\mu$  鎖 2 次抗体に 18 度で 2 時間処理した。数回洗浄後、スライドをストレプトアビジン結合 PBXL-3 存在下で 1 時間処理。遠心により風乾した後、Parkin Elmer confocal glass slide scanner を用いて蛍光強度を取得した。蛍光強度は、ScanArrayExpress software (Parkin Elmer) により定量化を行った。測定は 4 回に分けて行った。接種回によりアレイの構成が一部異なることから、全測定に共通して含まれる 195 個の遺伝子産物に対する測定値を統計解析に用いた。それぞれの血清についてトリPLICATEで測定を行った。ポジティブコントロールとして、ワクシニアウイ

ルスのタンパク質に対して高い抗体価を有するヒトの抗ワクシニアウイルスイムノグロブリンを同様にプロテインアレイにプローブして抗原抗体反応を蛍光強度として測定した。

### (3) LC16m8 接種血清のデータの処理

プロテインアレイ間のばらつき、複数回にわたる測定の影響を調整するため、アレイの測定結果の正規化を行った。正規化には R の vsn パッケージを用いた。正規化後、トリPLICATEのアレイデータのメディアアン値をとり各抗原に対する抗体の測定値とした。正規化データは再変換を行い蛍光強度のスケールに戻した。

日本人の集団は、生年により種痘の接種履歴が異なるため、A 群 (1976 年以降出生、種痘歴なし)、B 群 (1970~1975 年の間に出生、種痘 1 回)、C 群 (1964~1969 年の間に出生、種痘 2 回)、D 群 (1963 年以前の出生、種痘 3 回) の 4 群にわけて解析を行った。第 2 ラウンドの全被験者は 200 名であり、A-D 群の人数は、45 名、47 名、45 名、63 名であった。このうち、善感反応が認められなかった A 群の 4 検体以外はアレイ測定を行った。さらに、ペア血清が揃わない 2 検体 (C 群、および D 群)、善感反応が認められなかった 1 検体 (A 群) は統計解析から除外した。ここに示した統計解では、A-D の各群の人数は、41 名、47 名、44 名、62 名である。

L1, A17 については技術的な問題によりシグナルが全検体からは取得できなかったため、A17 に対する A 群および B 群の結果以外は統計解析に含めなかった。

### (4) アメリカ人の血清のデータの概要

LC16m8 接種血清の抗体プロファイルとの比

較のため、NCBI の GEO データベースに収録されている Dryvax 接種血清のアレイ測定の結果(GSE34931, Tan et al., 2012)の再解析を行った。検体は、本来は、3回の独立した dose-sparing studies (NIH study ID/clinicaltrial.gov. ID:01-632/NCT00026611,02-009/NCT00038987,02-054/NCT00050518) (Frey 2002)のものである。既存免疫について検討する目的では、過去に接種歴のある検体の接種前の抗体プロファイル(臨床試験での接種したワクチン株の種類と容量は問わず、接種前の血清のみを抽出)を再解析した。

#### (5)データ解析

抗体産生についての解析は、抗原ごとに接種前後の血清について各群の平均, SD, SE を算出した。t 検定により有意差を検定した。統計解析は R (2.14.0, 3.1.0)または JMP9.0 (SAS Japan)を用いて行った。

## 2. マウス LC16m8 接種血清のエピトープの解析

### (1)B5 タンパク質の調整

B5 タンパク質および部分配列に相当するフラグメントタンパク質は、DNA を化学合成後、インビトロトランスレーションを行い調整した。合成タンパク質には、N 端に His タグ、His-TEV タグ、C 端に HA タグを必要に応じて付加した。合成後、タンパク質は、抗 His タグカラムを用いて精製した。

合成配列は、Lister 株などの野生型の B5 タンパク質 (1-317aa) LC16m8 株の B5 タンパク質 (truncated B5 protein, 1-92aa) LC16m8 株の B5 タンパク質が含まない C 端側のフラグメント (92-275aa) 膜外ドメイ

ン (20-275aa) とした。

### (2)抗体の調整

B5 タンパク質の検出のため、部分配列に対する抗ペプチド抗体を調整した。抗原の配列は 22-39 残基の配列とした。常法に従いウサギポリクローナル抗体を調整した。抗体価は ELISA 法により確認した。

### (3) マウス LC16m8 接種血清

化血研よりご提供いただいた。

## 3. B5(aa1-92)単体に対する抗体産生についての検討

### (1)B5 タンパク質の調整

LC16m8 株の B5 タンパク質 (1-92aa) を上記の方法で大量合成を行った。

### (2)マウスにおける抗原性の検証

精製した合成タンパク質をマウスに免疫した。抗体価は ELISA 法により確認した。

### (3)統計解析

統計解析は R (3.1.0)または JMP9.0 (SAS Japan)を用いて行った。

## 【倫理面への配慮】

本調査研究の実施に当たっては、臨床研究の指針を踏まえるとともに、自衛隊中央病院倫理委員会の承認を得た (No.16-004. 平成 16 年 8 月 30 日)。

動物実験については、厚生労働省の動物実験等の実施に関する基本指針を踏まえて行った。

## C. 研究結果

### 1. プロテインアレイを用いた LC16m8 の抗原性の解析

昨年度までに引き続き、プロテインアレイを用いた天然痘ワクチン接種による抗体産



生について解析を進めた。今年度は特に長期免疫に焦点を当てた。天然痘ワクチンによる防御に寄与する抗原として、複数の IMV 表層の抗原が中和抗原として報告されているが、日本人、アメリカ人の集団のデータとも、長期免疫の抗体プロフィールにおいては、コアなどに局在する抗原に対する抗体が多く検出される(A9, A4, I1, A10 など)。これらの長期免疫による既存抗体量とワクチン接種による抗体産生量の関連等についてさらに解析を行った。一方、EEV の抗体は、抗 B5 抗体も含め、長期免疫においては多くは検出されなかった。

## 2. マウス LC16m8 接種血清のエピトープの解析

LC16m8 株の接種による抗体産生において、B5 タンパク質 (truncated B5 protein, 1-92aa) の抗原性を評価するに当たり、B5 protein(aa1-92)そのものが抗体を誘導しているのか、あるいは LC16m8 株のリバーストが生じ野生型の B5 タンパク質 (aa1-317)が発現されたために抗体が誘導されたのかを識別することが重要である。ワクチン接種血清が認識する B5 のエピトープを明らかにするため、B5 の部分配列に相当するフラグメントに対する認識の有無を検討することとした。はじめに、B5 タンパク質および抗体の調整を行った。合成したタンパク質は以下の通りである。全長のタンパク質 (B5aa1-317, 317 アミノ酸)、LC16m8 株の配列に相当するフラグメント (B5aa1-92, 92 アミノ酸)、LC16m8 株では失われた 92 残基以降 C 末端側の配列のフラグメント (B5aa92-317, 226 アミノ酸)を合成タンパク質として調整した。

B5(aa1-92)は予想される分子量に合成産物が得られた。B5aa1-317 は予想される分子量の他、熱処理等による重合が起こると思われる挙動を示し、一定の収量を得るのが困難であった。そこでさらに、合成、精製を困難にする膜貫通領域及びシグナルペプチドを除いた配列 (B5aa20-275, 276 アミノ酸)も合わせて合成した。B5(aa20-275)は膜外領域全体に相当するため、B 細胞エピトープを含むと考えられている。

これらの抗原を認識する抗体として、22-39 残基のアミノ酸配列を合成し、抗ペプチド抗体を作成した。2 検体の抗体価を ELISA 法により測定した結果、OD450 の吸光度が 12,500 倍希釈溶液において、0.486, 0.534、2,500 倍希釈溶液において 1.151, 1.167 と高抗体価が得られた。

これらの合成タンパク質 (抗原) および抗体 (ポジティブコントロール)を用い、マウス LC16m8 接種血清のエピトープの解析を進めているところである。

## 3. B5(aa1-92)単体に対する抗体産生についての検討

LC16m8 株の接種により B5 に対する抗体が産生されることはマウスにおいて報告されている (Meseda 2009, 本研究班の未発表データ)。しかし、LC16m8 株の B5 (aa1-92)の配列に対し、どのような構造をエピトープとする抗体が産生されるのか、その詳細は不明である。エピトープの解析は B5 (aa1-92)の抗原性を明らかにするために重要である。そこで、合成した B5 (B5aa1-92)に対する抗体産生を検証した。Tag 配列を付加した B5 (aa1-92)を大量合成し、マウス 4 匹に免疫し、血清の抗体



価を ELISA 法により測定したところ、B5 (aa1-92)の配列に対する抗体価の上昇が認められた(2回免疫後、12500倍希釈において吸光度 0.9965)。一方、タグ配列に対する抗体は検出されなかった。そのため、B5 (aa1-92)のタンパク質が抗体を誘導したと考えられた。

#### D. 考察

##### 1. プロテインアレイを用いた LC16m8 の抗原性の解析について

プロテインアレイを用いた抗体プロファイルの解析は、網羅的に抗体産生を把握することが可能であり、従来、主要抗原として研究が進んでいた IMV, EEV の表層抗原以外の抗体も血清中に多く存在することが明らかとなった。これらの抗体の機能についてはあまり報告がない。他の測定系での検証、機能解析などが今後必要と考えられる。

本研究の結果は、抗 B5 抗体の長期免疫における役割など、いくつかの疑問を新たに生じさせた。先行研究等との比較を詳細に行い、相違点については、技術的要因、ウイルス側の要因、宿主側の要因のいずれに起因するのかを検証し、抗体産生におけるウイルス株の種類、個人の遺伝的要素、過去における暴露の影響などについて明らかにしていくことが重要である。

##### 2. LC16m8 株の B5 の抗原性について

LC16m8 株は EEV の主要抗原 B5R に変異があり、短縮型のタンパク質として発現していることから、その有効性に議論があった。最近の国内外の報告をみると、抗 B5 抗体が防御のために決定的に重要であるという報告 (Putz 2005)がある一方、B5R 以外の EEV

抗原も補体を加えたより生理条件に近い測定系において中和活性を担う抗体を惹起すること、さらに単独の抗原に対する抗体が防御能(中和能)の全てを担うわけではなく、複数の抗体が関与していることが報告されている (Benhnia 2013)。LC16m8 株が動物モデルにおいて防御を示す (Kidokoro 2005, Morikawa 2005, Saijo 2006)ことから抗 B5 抗体の有無のみで防御の有無が決定されるのではないと考えられる。同時に、B5 タンパク質は、主要抗原としてワクチンの有効性のみならず安全性にも影響を与えていることから重要であり、LC16m8 株の B5 の抗原性についても明らかにしていく必要がある。

LC16m8 株接種により、マウスにおいては B5 タンパク質に対する抗体の産生が報告されているが、ヒトにおいては、現在までのプロテインアレイ解析の結果から新規の疑問点も生じ、引き続き解析が必要な状況である。マウスにおいても、B5(aa1-92)の抗原性について、B 細胞エピトープ、T 細胞エピトープの詳細はわかっていない。

野生型の B5R タンパク質の B 細胞エピトープは主に aa56-84, aa256-275 の 2 カ所に集中して存在することがマウスにおけるモノクローナル抗体作成の研究から示されている (Aldaz-Carroll 2005)。B5(aa1-92)は、そのうち N 端側の領域 (aa56-84) を含むものの、分子内のシステインの架橋による高次構造を失っていることから、野生型と同様のエピトープを供するか否かは検証が必要である。さらに、LC16m8 株感染細胞における B5 タンパク質の発現をみると、ごく少量ではあるが野生型の分子量に相当する分子も検出されることから、LC16m8 株接種マ

ウス血清における抗体誘導が B5(aa1-92)のみでも起こりうるものかどうか疑問が残っていた(Meseda 2009)。

本研究において、B5(aa1-92)の抗原性について、ワクチン接種血清のエピトープ解析、および、ウイルスではなく合成タンパク質単体による抗体誘導能の検証という観点から研究を進めている。今年度、B5(aa1-92)単体による抗体誘導が認められたことは上記の先行研究の疑問点を説明するものである。LC16m8 株の B5 に対する抗体について、Paran and Lustig は、抗 B5 抗体の *in vitro* での中和反応と *in vivo* での防御の多くが補体(C3, C1q)への結合能に依存しているとした Benhnia らの報告(Benhnia 2009)を取り上げた総説の中で、「LC16m8 株の truncated B5 protein に対する抗体が同様のメカニズムで EV を中和できるか、マウスを防御できるかどうかは興味深い」と言及している。B5(aa1-92)抗体の機能解析は、ワクシニアに対する免疫において B5 タンパク質が果たす役割を明らかにする上で重要と考えられる。

LC16m8 株の B5 タンパク質の抗原性について引き続き解析を続ける予定である。

#### E. 結論

本研究では、LC16m8 株接種による抗体産生をについて、プロテインアレイを用いて

網羅的に解析を続けるとともに、その結果も踏まえて、主要抗原 B5 の抗原性について解析を進めている。今年度、B5(aa1-92)単体の抗体誘導能を確認した。B5 に対する免疫応答は、ワクチンの有効性のみでなく安全性にもかかわることから、LC16m8 株の接種プログラムの確立のためには詳細な解析が必要である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

江藤亜紀子、齋藤智也、西山靖将、横手公幸、金谷泰宏. 種痘による長期免疫に寄与する抗原の同定および LC16m8 株接種に対する影響についての解析。第 18 回ワクチン学会学術集会；2014 年 12 月；福岡市

#### G. 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



分担研究報告書

痘そうワクチン LC16m8 接種者における中和抗体持続に関する調査研究

所 属 一般財団法人 化学及血清療法研究所  
ワクチン事業部門 開発部  
研究分担者 横手 公幸

研究要旨：

LC16m8 を 1 回接種された健康成人の約 4 年後の抗体陽性率は初種痘群において低下傾向が認められた。Proteome Microarray Chip を用いたプロテオミック解析を行った結果、種痘 4 年後まで抗体陽性であった被験者群において、種痘前と比較して種痘 1～7 か月後の蛍光強度が有意に高かった抗原は 6 種類あり、そのうち A27L, A10L は種痘 4 年後まで有意に高かった。また、種痘 4 年後で陰性であった被験者群において、種痘前と比較して種痘 1～7 か月後の蛍光強度が有意に高かった抗原は 7 種類あり、そのうち A11R, A34R, D8L は種痘 4 年後では有意に低下した。

研究協力者

- (1) 千葉大学 名誉教授  
橋爪 壮
- (2) 一般財団法人化学及血清療法研究所  
新村 靖彦、上村 千草、内田 梓、金原 知美、  
丸野 真一、宮本 誠二

A. 研究目的

乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 は、有効性を保持しながら弱毒化に成功した生ウイルスワクチンで 1975 年に製造承認が許可された。当時の痘そうワクチンの定期接種は、小児に対して予防目的で池田株、大連 株や LC16m8 の親株である Lister 株が 3 期、3 回の接種が実施されていたが、WHO（世界保健機関）の天然痘根絶計画が進み、日本では 1976 年に痘そうワクチンの定期接種が中止となった。

近年天然痘ウイルスによる生物テロの危険性が指摘されたことを受けて、わが国ではこの痘そうワクチン LC16m8 がテロ対抗医薬品として 2001 年以降再製造、国家備蓄されている。また、天然痘テロに対する危機管理対策としてファーストレスポンスの成人対象者（初種痘者及び再種痘者）に対して LC16m8 が 1 回接種されている。

一方、天然痘流行期に WHO は、天然痘曝露に対する最大限の防御レベルが要求される人（ファーストレスポンスの対象者）に対しては、毎年の追加接種を推奨していた。また流行期の疫学調査や種痘経験者に対する最近の血清学的調査（抗体測定）等の文献によると、従来の痘そうワクチ

ンについては、2～3 回の種痘後 10～30 年程度経過した時点においても天然痘の発症または重症化を阻止可能なレベルの抗体が保持されていることが報告されている。

以上の背景より、近年 LC16m8 を 1 回接種された成人対象者に対する免疫持続の調査が必要と考え、本研究を開始した。

B. 研究方法

1) 血清検体

バイオテロ対処の観点から細胞培養弱毒痘そうワクチン LC16m8 が接種され、種痘前、種痘後 1 か月後、4 か月後及び 7 か月後に採取された血清サンプルが保管されている自衛隊員のうち、本研究に同意の得られた 39 名（初種痘：24 名、再種痘 15 名）より採取した血清サンプルを用いた。これらの大部分が採血された時点で種痘後 4 年経過していた。

2) 評価

【中和抗体価測定】

LC16m8 ワクチン種痘前、種痘 1 か月後、4 か月後、7 か月後、及び約 4 年後の各時期に採取された血清検体について、中和抗体価を測定した。中和抗体価の測定は Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT)により行い、50%のプラーク減少時の抗体価（PRNT<sub>50</sub>）を判定した。チャレンジウイルスは、WHO の天然痘根絶計画で主軸を担った Lister 株を用いた。なお、PRNT<sub>50</sub> が 128 倍以上の場合を抗体陽性と判定した。

### 【プロテオミック解析】

24名の初種痘群から、種痘前、種痘1か月又は4か月又は7か月後、種痘約4年後に採血された血清が3ポイント全て揃っている11名の被験者の血清検体について、ワクチン接種により誘導された抗体による認識抗原たん白質群をVaccinia Western Reserve (WR) specific-Proteome Microarray Chipを用いて解析した。なお、この解析はAntigen Discovery, Inc. (Irvine, CA, USA)へ委託し実施した。

### 【倫理面への配慮】

本調査研究の実施に当たっては、臨床研究の指針を踏まえるとともに、自衛隊中央病院倫理委員会の承認を得た。(No.16-004.平成16年8月30日、No.18-022.平成18年12月21日、No.21-001.平成21年6月10日)

### C. 研究結果

天然痘テロに対する危機管理対策として、細胞培養弱毒生痘そうワクチン LC16m8 を1回接種された成人被接種者が獲得した中和抗体の持続を調査した。まず初種痘者24名、再種痘者15名の計39名について調査を実施した。LC16m8 ワクチン種痘前、種痘1ヵ月後、4ヵ月後、7ヵ月後、及び約4年後のPRNT<sub>50</sub>のGMT(幾何学平均値)及び抗体陽性率を表1に示した。

初種痘群及び再種痘群の中和抗体陽性率はそれぞれ、LC16m8 ワクチン種痘前では17%(2/12)及び100%(13/13)、種痘1ヵ月後では56%(5/9)及び87%(13/15)、4ヵ月後では86%(6/7)及び92%(11/12)、7ヵ月後では80%(4/5、初種痘群のみ測定)、約4年後では58%(14/24)及び93%(14/15)であった。

次に、LC16m8 接種により誘導された抗体による認識抗原たん白質群をVaccinia WR specific-Proteome Microarray Chipを用いて解析した。24名の初種痘群から、種痘前、種痘1か月又は4か月又は7か月後、種痘約4年後の血清がそろっている11名の被験者について、個人毎のPRNT<sub>50</sub>の推移を図1に示した。

11名の被験者は抗体陽性率により、以下の3つのグループに分けて解析を行った。

Group A: LC16m8 種痘1-7ヶ月後及び種痘約4年後で陽性であった被験者(5名)

Group B: LC16m8 種痘1-7ヶ月後は陽性であったが、約4年後では陰性の被験者(4名)

Group C: LC16m8 種痘後全ての時期で陰性の被験者(2名)

Group A, Group B, Group Cにおいて、LC16m8 ワクチン接種による抗原認識パターンをヒートマッ

プとして図2に示した。

各グループ毎に、種痘前と比較して蛍光強度に有意差が見られた抗原を表2、表3及び表4に示した。Group Aでは、種痘前と比較して種痘1-7か月後の蛍光強度が有意に高かった抗原はA13L, A26L, A27L, A33R, D13L, A10Lであり、そのうちA27L, A10Lは種痘4年後まで有意に高かった。また、A13Lは種痘1-7か月後と比較して種痘4年後では蛍光強度が有意に低下した。Group Bでは、種痘前と比較して種痘1~7か月後の蛍光強度が有意に高かった抗原はA11R, D13L, D8L, A34R, H3L, A27L, A10Lであった。また、A11R, D6R, A34R, D8Lは種痘1-7か月後と比較して種痘4年後では蛍光強度が有意に低下した。

### D. 考察

本研究では、天然痘テロに対する危機管理対策として、細胞培養弱毒生痘そうワクチン LC16m8 を1回接種された成人被接種者が獲得した中和抗体(Anti-Lister PRNT)の持続を調査した。

中和抗体陽性率については再種痘群では経時的な変化は認められなかったが、初種痘群では低下傾向が認められ、約4年後には抗体陽性率が約60%となった。この低下傾向について原因調査するため、ワクチニアウイルスWR株の95%以上の構成たん白質を網羅するProteome Microarray Chipを用いて、ワクチン接種により誘導された抗体の認識ウイルス抗原を調査した。種痘4年後まで抗体陽性であった被験者群において、種痘前と比較して種痘1~7か月後の蛍光強度が有意に高かった抗原は6種類あり、そのうちA27L, A10Lは種痘4年後まで有意に高かった。また、種痘4年後で陰性であった被験者群において、種痘前と比較して種痘1~7か月後の蛍光強度が有意に高かった抗原は7種類あり、そのうちA11R, A34R, D8Lは種痘4年後では有意に低下した。これらの抗原群が4年後の中和抗体価及び抗体陽性率の低下に起因していると考察された。今後、さらに各接種時期におけるグループ間の蛍光強度の解析や個人毎の解析を実施する。

### E. 結論

天然痘テロに対する危機管理対策として、細胞培養弱毒生痘そうワクチン LC16m8 を1回接種された成人被接種者が獲得した中和抗体の持続を調査した結果、再種痘群では抗体陽性率に経時的な変化は認められなかったが、初種痘群では低下傾向が認められた。この低下傾向について原因調査するため、ワクチニアウイルスWR株の95%以上の構成たん白質を網羅するProteome Microarray

Chip を用いて、ワクチン接種により誘導された抗体の認識ウイルス抗原を調査した。その結果、種痘4年後まで抗体陽性であった被験者群において、種痘4年後まで反応強度が有意に高かった抗原はA27L, A10Lであり、また、種痘1-7か月後では抗体陽性であったものの、種痘4年後で陰性であった被験者群において、種痘4年後の反応強度が有意に低下した抗原はA11R, A34R, D8Lであった。これらの抗原群が4年後の中和抗体価及び抗体陽性率の低下に起因していると考察された。

3. その他  
該当なし。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Hiroyuki Yokote, Yasuhiko Shinmura, Tomomi Kanehara, Shinichi Maruno, Masahiko Kuranaga, Hajime Matsui and So Hashizume. Safety of attenuated smallpox vaccine LC16m8 in immunodeficient mice. Clin. Vaccine Immunol. 2014, 21(9):1261-66

##### 2. 学会発表

1) Paul N. Hudson, V. Olson, S. Smith, Z. Reed, A. Kondas, W. Davidson, H. Yokote, M. Saijo, S. Morikawa, I. Kurane, I. Damon. ASSESSING THE NEUTRALIZATION EFFICIENCY OF SERUM FROM LC16m8-VACCINATED INDIVIDUALS AGAINST TWO VARIOLA VIRUS STRAINS. 2014 International Poxvirus, Asfarvirus & Iridovirus Conference. Victoria, Canada (2014, 09)

2) 丸野真一, 金原知美, 新村靖彦, 横手公幸, 齋藤智也, 橋爪壮. 国産第三世代痘そうワクチン LC16m8 の WHO 推奨. 第18回日本ワクチン学会学術集会 福岡 (2014.12)

3) 江藤亜紀子, 齋藤智也, 西山靖将, 横手公幸, 金谷泰宏. 種痘による長期免疫に寄与する抗原の同定およびLC16m8株に対する影響についての解析. 第18回日本ワクチン学会学術集会 福岡 (2014.12)

#### G. 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。

表 1 . 痘そうワクチン LC16m8 接種後の中和抗体価(Anti-Lister PRNT)及び中和抗体陽性率

種痘歴	評価タイミング									
	種痘前		種痘 1 ヶ月後		種痘 4 ヶ月後		種痘 7 ヶ月後		種痘約 4 年後	
	GMT	陽性率	GMT	陽性率	GMT	陽性率	GMT	陽性率	GMT	陽性率
初種痘	40	17% (2/12)	323	56% (5/9)	815	86% (6/7)	404	80% (4/5)	214	58% (14/24)
再種痘	457	100% (13/13)	772	87% (13/15)	1274	92% (11/12)	-	-	716	93% (14/15)

GMT: Geometric mean titer

陽性判定基準: PRNT<sub>50</sub> ≥ 128

表 2 . 痘そうワクチン LC16m8 接種前と比較してプロテオミク解析における蛍光強度が有意に上昇した抗原

	種痘 1-7 か月後*	種痘 4 年後*
Group A	A13L, A26L, A27L, A33R, D13L, A10L	A27L, A10L
Group B	A11R, D13L, D8L, A34R, H3L, A27L, A10L	無
Group C	無	無

\* 有意差が大きい順に記載

表 3 . 痘そうワクチン LC16m8 接種 1-7 か月後と比較してプロテオミク解析における蛍光強度が有意に低下した抗原

	種痘 4 年後*
Group A	A13L
Group B	A11R, D6R, A34R, D8L
Group C	無

\* 有意差が大きい順に記載

表 4 . 蛍光強度に有意差が見られた抗原

Membrane		Core (1)	Other (4)
EEV (2)	IMV (4)		
A33R	A13L	A10L	A26L
A34R	A27L		A11R
	D8L		D13L
	H3L		D6R

A33R: EEV membrane phosphoglycoprotein, A34R: IEV and EEV membrane glycoprotein, A13L: IMV membrane protein, A27L: IMV surface protein, D8L: IMV membrane protein, H3L: IMV heparin binding surface protein, A10L: precursor p4a of core protein 4a, A26L: cowpox A-type inclusion protein, A11R: hypothetical protein, D13L: rifampicin target, D6R: 70kDa small subunit of early gene transcription factor VETF

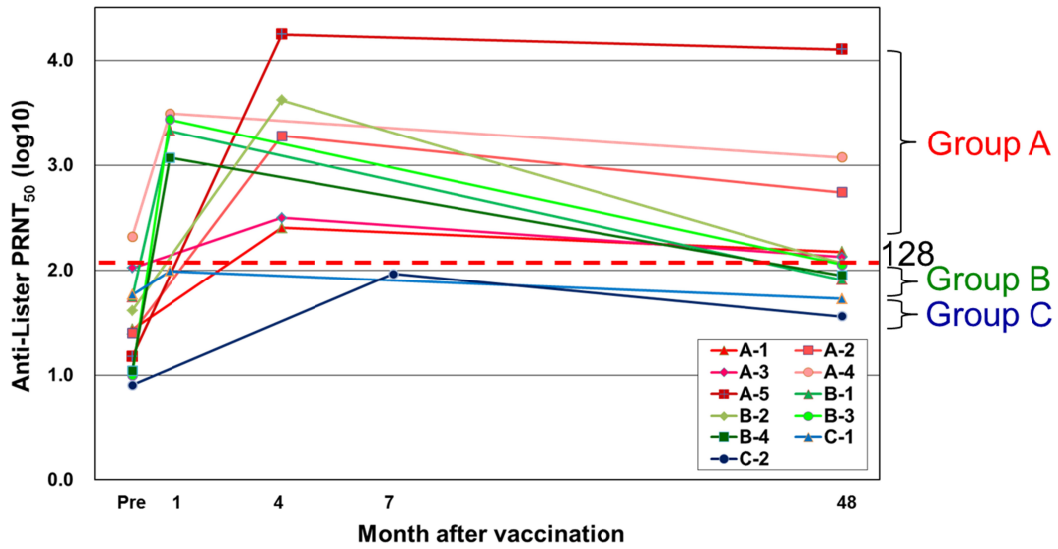


図 1. 痘そうワクチン LC16m8 接種後の中和抗体価推移 (個人別)

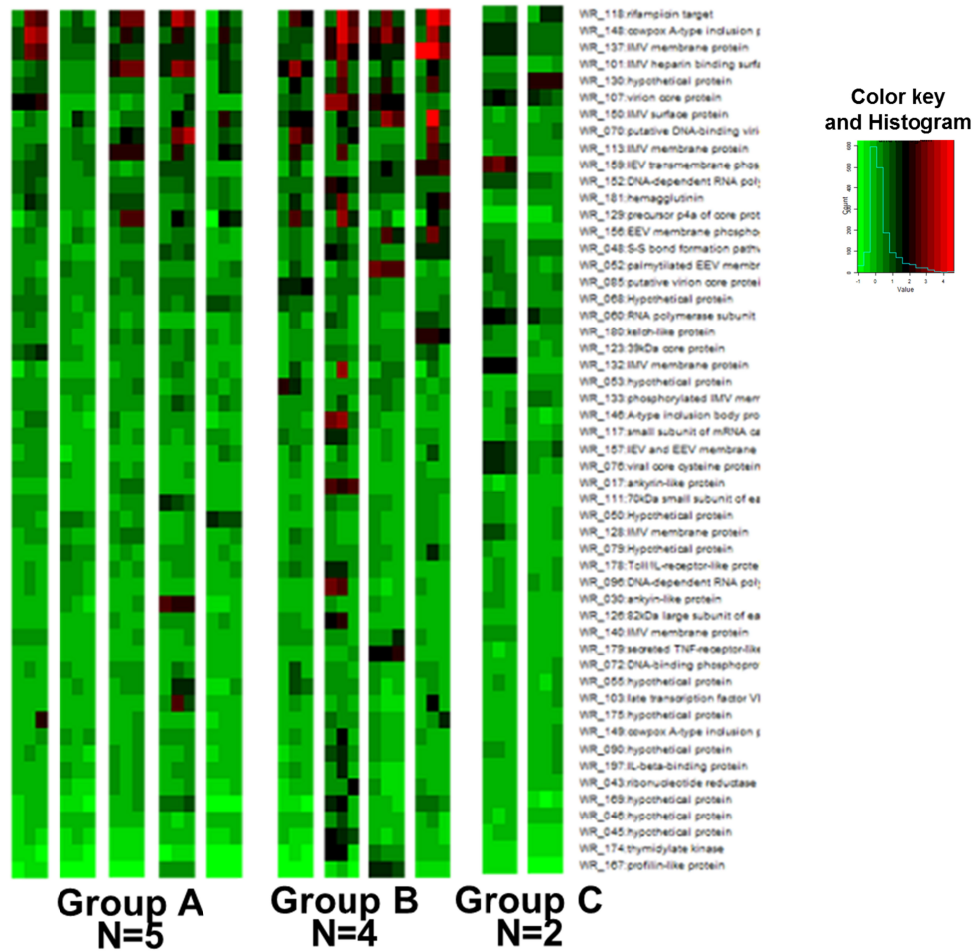


図 2 . 痘そうワクチン接種後の認識抗原たん白質プロファイル(Heatmap)



研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

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
Nagata N, Saijo M, Kataoka M, Ami Y, Suzaki Y, Sato Y, Iwata-Yoshikawa N, Ogata M, Kurane I, Morikawa S, Sata T, Hasegawa H.	Pathogenesis of fulminant monkeypox with bacterial sepsis after experimental infection with West African monkeypox virus in a cynomolgus monkey.	Int J Clin Exp Pathol.	7(7)	4359-4370	2014
Hiroyuki Yokote, Yasuhiko Shinmura, Tomomi Kanehara, Shinichi Maruno, Masahiko Kuranaga, Hajime Matsui, So Hashizume.	Safety of attenuated smallpox vaccine LC16m8 in immunodeficient mice	Clin. Vaccine Immunol.	21(9)	1261-66	2014
Kenri T, Sekizuka T, Yamamoto A, Iwaki M, Komiya T, Hatakeyama T, Nakajima H, Takahashi M, Kuroda M, Shibayama K.	Genetic characterization and comparison of Clostridium botulinum isolates from botulism cases in Japan between 2006 and 2011.	Appl Environ Microbiol.	80(22)	6954-64	2014
Yamashita A, Sekizuka T, Kuroda M.	GcoGSA-BA: A Global Core Genome SNP Analysis for Bacillus anthracis.	Biosecur Bioterror.	Volume 13, Number 1	in press	2015

Paola Katrina G. Ching, Vikki Carr de los Reyes, Maria Nemia Sucaldito, Enrique Tayag, Alah Baby Columna-Vingno, Fedelino F. Malbas, Gilbert C. Bolo, James J. Sejvar, Debbie Eagles, Geoffrey Playford, Erica Dueger, Yoshihiro Kaku, Shigeru Morikawa, Makoto Kuroda, Glenn A. Marsh, Sam McCullough, and A. Ruth Foxwell.	Outbreak of Henipavirus Infection, Philippines.	Emerg Infect Dis.	21(5) , 21(2)	328-31	2015
Shimajima M, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Fukuma A, Taniguchi S, Suda Y, Maeda K, Takahashi T, Morikawa S, Saijo M.	Effects of ribavirin on severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in vitro.	Jpn J Infect Dis	67(6)	423-7	2014
David Nadeba Bukbuk, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Satoshi Taniguchi, Koichiro Iha, Aiko Fukuma, Masayuki Shimajima, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo, Francis Kasolo, Saka Saheed Baba.	Development and Validation of Serological Assays for Viral Hemorrhagic Fevers and Determination of Prevalence of Rift Valley Fever in Borno State, Nigeria.	Trans R Soc Trop Med Hyg		pii: tru163.	2014
Naoko Iwata-Yoshikawa, Akihiko Uda, Tadaki Suzuki, Yasuko Tsunetsugu-Yokota, Yuko Sato, Shigeru Morikawa, Masato Tashiro, Tetsutaro Sata, Hideki Hasegawa and Noriyo Nagata.	Effects of Toll-Like Receptor Stimulation on Eosinophilic Infiltration in Lungs of BALB/c Mice Immunized with UV-Inactivated Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus Vaccine.	J. Virol.	88(15) ):	8597-8614.	2014
Tani H, Iha K, Shimajima M, Fukushi S, Taniguchi S, Yoshikawa T, Kawaoka Y, Nakasone N, Ninomiya H, Saijo M, Morikawa S.	Analysis of Lujo virus cell entry using pseudotype vesicular stomatitis virus.	J Virol.	88(13) )	7317-7330	2014
Uda A, Sekizuka T, Tanabayashi K, Fujita O, Kuroda M, Hotta A, Sugiura N, Sharma N, Morikawa S, Yamada A.	Role of Pathogenicity Determinant Protein C (PdpC) in Determining the Virulence of the Francisella tularensis Subspecies tularensis SCHU.	PLoS One.	Feb 18;9( 2)	e89075	2014
Neekun Sharma, Akitoyo Hotta, Yoshie Yamamoto, Akihiko Uda, Osamu Fujita, Toshio Mizoguchi, Junji Shindo, Chun-Ho Park, Noboru Kudo, Hitoshi Hatai, Toshifumi Oyamada, Akio Yamada, Shigeru Morikawa, and Kiyoshi Tanabayashi.	Serosurveillance for Francisella tularensis among wild animals in Japan using a newly developed competitive ELISA.	Vector-Borne and Zoonotic Diseases,	Apr;1 4 (4)	234-9	2014

Saraya T, Tanabe K, Araki K, Yonetani S, Makino H, Watanabe T, Tsujimoto N, Takata S, Kurai D, Ishii H, Miyazaki Y, Takizawa H, Goto H.	Breakthrough invasive <i>Candida glabrata</i> in patients on micafungin: a novel FKS gene conversion correlated with sequential elevation of MIC.	Journal of Clinical Microbiology.	52(7)	2709-2712,	2014
Seki M, Ohno H, Gotoh K, Motooka D, Nakamura S, Iida T, Miyazaki Y, Tomono K.	Allergic bronchopulmonary mycosis due to co-infection with <i>Aspergillus fumigatus</i> and <i>Schizophyllum commune</i> .	IDCases.	1	5-8	2014
Kenri T, Sekizuka T, Yamamoto A, Iwaki M, Komiya T, Hatakeyama T, Nakajima H, Takahashi M, Kuroda M, Shibayama K.	Genetic characterization and comparison of <i>Clostridium botulinum</i> isolates from botulism cases in Japan between 2006 and 2011.	Appl Environ Microbiol.	Nov;80(22)	:6954-64	2014
Yamashita A, Sekizuka T, Kuroda M. GcoGSA-BA:	A Global Core Genome SNP Analysis for <i>Bacillus anthracis</i> .	Biosecur Bioterror.	Volume 13, Number 1,	in press.	2015
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(6)	816-27	2014
Koma T, Yoshimatsu K, Nagata N, Sato Y, Shimizu K, Yasuda SP, Amada T, Nishio S, Hasegawa H, Arikawa J.	Neutrophil depletion suppresses pulmonary vascular hyperpermeability and occurrence of pulmonary edema caused by hantavirus infection in C.B-17 SCID mice.	J Virol.	88	7178-7188	2014
Nagata N, Saijo M, Kataoka M, Ami Y, Suzaki Y, Sato Y, Iwata-Yoshikawa N, Ogata M, Kurane I, Morikawa S, Sata T, Hasegawa H.	Pathogenesis of fulminant monkeypox with bacterial sepsis after experimental infection with West African monkeypox virus in a cynomolgus monkey.	Int J Clin Exp Pathol.	7	4359-4370	2014

Yoshikawa T, Fukushi S, Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Toda S, Shimazu Y, Yano K, Morimitsu T, Ando K, Yoshikawa A, Kan M, Kato N, Motoya T, Kuzuguchi T, Nishino Y, Osako H, Yumisashi T, Kida K, Suzuki F, Takimoto H, Kitamoto H, Maeda K, Takahashi T, Yamagishi T, Oishi K, Morikawa S, Saijo M, Shimojima M.	Sensitive and specific PCR systems for the detection of both Chinese and Japanese severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strains, and the prediction of the patient survival based on the viral load.	J Clin Microbiol.	52(9)	3325-3333	2014
Hiroyuki Yokote, Yasuhiko Shinmura, Tomomi Kanehara, Shinichi Maruno, Masahiko Kuranaga, Hajime Matsui and So Hashizume.	Safety of attenuated smallpox vaccine LC16m8 in immunodeficient mice. Clin.	Vaccine Immunol	21(9)	1261-66	2014
梅山 隆, 大野秀明, 宮崎義継.	真菌症-よく目にする真菌症から今後注意すべき真菌症まで- Aspergillus: 病態と抗原価の関連.	感染症内科	2(6)	575-580	2014
河野 茂, 亀井克彦, 二木芳人, 宮崎義継.	座談会: 深在性真菌症の診断・治療ガイドラインを読み解く.	呼吸	33(5)	435-43	2014
宮崎義継, 砂川富正, 大石和徳	ミニ特集: 病原体サーベイランス体制とその利用、国立感染症研究所の立場から.	小児科	55(4)	403-6,	2014
浦井 誠, 金子幸弘, 宮崎義継.	菌症における治療薬の選択の変化 ガイドライン改訂から見える今後の治療展望. どう変わり、どう攻める? 深在性真菌症の新しい治療.	感染と抗菌薬	1	5月13日	2014
浦井 誠, 金子幸弘, 宮崎義継.	どう変わり、どう攻める? 深在性真菌症の新しい治療: 深在性真菌症における治療薬の選択の変化 ガイドライン改訂から見える今後の治療展望.	感染と抗菌薬	17(1)	5月13日	2014
中島典子, 佐藤由子, 片野晴隆, 長谷川秀樹	ウイルス性肺炎	病理と臨床	32	1146-1153	2014
中島典子	オリゴヌクレオチドプローブを用いた新しい insitu ハイブリダイゼーション法.	呼吸	33	152-159	2014
中島典子	ウイルス性肺炎	病理と臨床	32	1146-1153	2014