

201420004A

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

(H26-新興行政-指定-002)

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)

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

(H26-新興行政-指定-002)

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

I. 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）

II. 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）	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	123

I. 総括研究報告書

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まだまだ十分ではない。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方法の確立、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
 - ①ウイルス性出血熱病原体の鑑別検査法の開発
 - ②蚊媒介性感染ウイルスの迅速検査法の確立
 - ③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
 - ①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

①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

②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

①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法の確立

①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②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

①痘そうウイルス迅速検出法の確立

②動物を用いた有効性の評価系の構築とデータの蓄積

③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

④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

⑤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 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* 属および *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。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。

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関係性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 の系統的関係性も正しく推定し、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 μ 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①として単独患者の重症肺炎、事例②として複数例の重症肺炎、事例③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。

(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ます。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。

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: trul63. 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 D, Nakamura 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、清水公徳、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. マクロファージの食食を指標とした *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, 清水公徳, 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会学術集会. 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,