

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。昨年度は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。

本年度はバイオテロに利用される可能性の高い5種類の細菌性病原体(炭疽菌、野兔病菌、ブルセラ菌、ペスト菌、類鼻疽菌)の迅速遺伝子検出系を作成し、25分で遺伝子を増幅し、DNA-Chromatography法で増幅産物を約5分で識別する野外仕様の検出系を完成させた。

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的迅速同定法を国産で供給できるような体制作りを目的とする。本年度はA型ボツリヌス毒素、TDH及びTRHを精製してそれぞれに対する家兎抗血清を作製した。

B. 研究方法

B-1. バイオテロに利用される可能性の高い5種類の細菌性病原体(炭疽菌、野兔病菌、ブルセラ菌、ペスト菌、類鼻疽菌)の迅速遺伝子検出系の作成

検出遺伝子の選択:

細菌性病原体の検出系を作成する場合、菌種を検出する遺伝子と病原因子の遺伝子を検出する系の2つの標的が必要になる。菌種を検出遺伝子は株の間で安定して保存されている必要がある。16S rRNA 遺伝子のような多型の少ない配列は菌種内の株では多型が少なく、配列はよく保存されているが、類縁菌の間でも保存されており、菌種の識別に特異 PCR primer を設計するのは困難である。そこ

でこの目的には 16S rRNA 遺伝子より約 10 倍の多型がある house keeping gene である *dnaJ* 遺伝子を使用した。DnaJ 遺伝子は菌種間の識別に有効な配列を多く保有しているが、同一菌種内の株の間での多型はほとんどないので菌種の検出に適しているが、分類学上の不備で識別できない類縁種がある。例えば *Bacillus anthracis* には 16SrRNA 遺伝子配列が全く同じ、3 つの菌種 (*B. thuringiensis*, *B. mycooides*, *B. cereus*) があり、*dnaJ* でも明確に識別できない。そこで *B. anthracis* を明確に識別するにはこの菌種が保有する病原因子、浮腫因子、防御因子、致死因子を顕出する方法が必要になる(表 1)。野外仕様型の検出系には菌種を漏れなく検出する *dnaJ* 遺伝子と病原因子を併用した。病原因子は菌種内の株で保有の有無が異なることから、病原因子検出 primer と菌種検出 primer を両方同時に検出する系が必要になる。環境中、特に土壌には *B. anthracis* と同じ 16SrRNA 遺伝子および *dnaJ* 配列を保有する *B. thuringiensis*, *B. mycooides*, *B. cereus* が高頻度に常在しているので *B. anthracis* の検出には *dnaJ* は使用しなかった。

カクテル primer の作成:

菌種と病原因子を検出し、識別可能なカクテル primer を作成した。表 1 の各 primer の下流の 5 末端には 5 種類の補足用 Tag を準備した。上流側 primer には共通に biotin を標識した。

屋外仕様の Quick Mobile(QM)の作製:

4 つの検体を同時に増幅できる 1.7kg の軽量の PCR 機器を Thermogen 社(長野)に依頼し、作製した(図 1)。この機器は屋外仕様のため電源としては AC adaptor (100-240V 仕様)、車のタバコで電源、さらにリチウム電源の 3 つを選択できる。PCR tube は low profile tube を採用し、増幅時間は標準 25 分で終了できる。専用の Program card を挿入し、屋外では one touch 操作で program が始動するように迅速化が図られている。使用するカクテル primer は PCR tube に乾燥して準備しており、使用時には煮沸した試料 5ul と室温保存で数週間は安定して増幅

に使用できる 2xTaq premix 試薬を 5ul 加え、合計 10ul の反応液で増幅するようにした。

DNA クロマトと判定方法:

カクテル核酸増幅産物を識別するため、ニトロセルロース濾紙に anti-tag を print した DNA クロマト濾紙(図 2)を TBA 社(仙台)に依頼し、作成した。カクテル増幅産物に Avidin を固定した青ラテックスを 10ul 加え、約 5 分で DNA クロマト上にプリントしてある anti-tag と反応した PCR 産物が青色のラインとして見えてくる。

B-2. バイオテロに利用される細菌毒素に対する免疫学的迅速同定法の確立

TDH と TRH の精製とモルモット抗血清の作製:

前年度までに構築した TF-TDH 及び TF-TRH 発現大腸菌 BL21(DE3) 株は、至適条件下で発現誘導を行った。リコンビナントタンパク質の発現に使用したベクターは、可溶化タグ TF の他に His タグも内蔵している。したがって、得られた培養液から His タグ精製及び電気的溶出によって TF-TDH あるいは TF-TRH を精製した。精製タンパク質は、モルモット(オス, 9 週齢)1 匹ずつに免疫して抗血清の作製を試みた。

BoNT/A_{Hc} 精製とモルモット抗血清の作製:

BoNT/A_{Hc} は大腸菌内で His-TF タグ融合タンパク質 (His-TF-BoNT/A_{Hc}) 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、His タグ精製と電気的溶出法によって行った。得られた精製タンパク質は、モルモット(オス, 9 週齢)1 匹に免疫して抗血清の作製を試みた。

C. 研究結果

C-1. バイオテロに利用される可能性の高い 5 種類の細菌性病原体(炭疽菌, 野兔病菌, ブルセラ菌, ペスト菌, 類鼻疽菌)の迅速遺伝子検出系の作成

標準株を用いた迅速遺伝子検出系の評価:

作成した primer を GTC で保有する菌株とモンゴル国立研究所 National Center for Infectious Disease with National foci の保有株で検証を行った。 *Brucella* 菌の基準株 *B.melitensis*NCTC 10094, *B.abortus*NCTC 10093, *B.canis*ATCC 23365 および、GTC 保有で使用している *B.abortus* の血清型 20 株は OMP および *dnaJ* の遺伝子で全て陽性であった。 *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* の基準株 strain B-38, および、わが国で分離され、GTC で保存されている *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* 85 菌株は全て、*dnaJ*, *fopA*, および *tu4* が陽性であった。 GTC 保有の基準株 *Yersinia pestis*NCTC 5923, モンゴルで保有の野生株およびロシアのワクチン株で行った。 基準株およびロシアのワクチン株の *pla* 遺伝子は陰性、野生株 2 株は *pla* 遺伝子及び *dnaJ* 遺伝子はいずれも陽性であった(図 3)。 類縁菌の *Yersinia pseudotuberculosis* 基準株 JCM 1676 株は *pla* 遺伝子陰性であるが、*dnaJ* は陽性であった。 *Bacillus anthracis* は GTC 保有株で評価した(表 2)。 病原性プラスミッドを脱落させた GTC3P0882, GTC 3P0883, 及び GTC3P0884 はそれぞれの病原因子が欠損していた。 ワクチン株 GTC3P1524 は 3 つの病原因子を保有していた。 モンゴル国立研究所保有株でも同様の検証を実施した(図 4)。

B. anthracis, *F. tularensis*, *B. melitensis*, 及び *Y.pestis* の基準株を使用したスパイク実験では、いずれも 1,000 から 5,000cfu/ml の菌液を 3 分間の煮沸後、濃縮せず、そのまま 5ul を PCR に使用すれば DNA-クロマト法で増幅産物を検出-確認できる感度があることを確認した。

モンゴルの汚染地域の土壌を用いたスパイク実験: 炭疽菌に汚染されたモンゴルの土壌をサンプリングし *B. anthracis* の protective antigen の検出を試みた。 2013 年に炭疽で死亡した牛で汚染された土壌が隔離されており、動物が立ち入らないように汚染地区を鉄線で囲ってあった(図 5)。 この土壌から分離を試みた。 土壌 25g を 10 倍量の蒸留水に懸濁、

一夜室温に置いたのち、上澄みから核酸を抽出したが、病原因子は検出されなかった。 さらに土壌をモンゴルで使用されている peptone-meat broth に入れ、一夜増菌培養した培地の上澄みから分離を試みたが、炭疽菌の病原因子は検出されなかった。

この方法の検出感度を調べるため、汚染領域以外のモンゴルの代表的な通常土壌をあらかじめ検疫所の許可を得て国内に持ち帰った。 これらの土壌に炭疽菌のワクチン株を加えてスパイク実験を行い検出感度を測定した。

土壌 250g を 10 倍量の 2250ml の peptone-meat broth に加え、10 分割し、病原因子を保有する炭疽菌ワクチン株を 1.2×10^6 cfu/ml から 1.2×10^8 cfu/ml を 1ml ずつ、スパイクした。 24 時間培養後、上澄み 1ml を採取し、微量卓上遠心機で 12,000g で 3 分間遠心、上澄みを廃棄後、200ul の蒸留水に沈渣を懸濁、100 度で 3 分間煮沸し、その 5ul を遺伝子増幅に使用した。 1.2×10^6 cfu をスパイクした培養液から炭疽菌の病原因子を全て検出できたため、この方法で 25g 中に 1 個の炭疽菌が存在すれば検出できると予測した。

C-2. バイオテロに利用される細菌毒素に対する免疫学的迅速同定法の確立

TDH と TRH の精製とモルモット抗血清の作製:

TF-TDH 及び TF-TRH を精製し、得られた精製タンパク質をモルモットに免疫し血清を回収した。 抗体価の評価は、オクタロニー法によって実施した。 その結果、TF-TDH は十分な抗体価の上昇が認められたのに対し、TF-TRH は十分な抗体価の上昇が認められなかった(図 6, 図 7)。

BoNT/A_{Hc} 精製とモルモット抗血清の作製:

His-TF-BoNT/A_{Hc} を精製し、得られた精製タンパク質をモルモットに免疫し血清を回収した。 抗体価の評価は、オクタロニー法によって実施した。 その結果、His-TF-BoNT/A_{Hc} は十分な抗体価の上昇が認められた(図 8)。 また、通常モルモットの免疫スケジュールは、初回免疫の後、2 週間間隔で 4 回の追加免疫とされているが、今回の免疫においては

追加免疫2回目実施後の時点で十分な抗体価の上昇が認められた。

D. 考察

D-1. バイオテロに利用される可能性の高い5種類の細菌性病原体(炭疽菌, 野兔病菌, ブルセラ菌, ペスト菌, 類鼻疽菌)の迅速遺伝子検出系の作成

標準株を用いた迅速遺伝子検出系の評価:
構築した迅速遺伝子検出系を岐阜大学とモンゴル獣医学研究所の多種の保存株を用いて検証した結果, いずれも1,000から5,000cfu/mlの菌液を3分間の煮沸後, 濃縮せず, そのまま5ulをPCRに使用すればDNA-クロマト法で増幅産物を検出-確認できたことにより実際のバイオテロ事例でも十分に応用可能であると考えられる。

モンゴルの汚染地域の土壌を用いたスパイク実験:
モンゴルの汚染土壌を用いて行ったスパイク実験では, 1.2 cfu をスパイクした培養液から炭疽菌の病原因子を全て検出できたため, この方法で25g中に1個の炭疽菌が存在すれば検出できることが分かった。この感度は実際のバイオテロ事例でも十分に応用可能であると考ええる。

D-2. バイオテロに利用される細菌毒素に対する免疫学的迅速同定法の確立

TDHとTRHの精製とモルモット抗血清の作製:

今回実施したモルモットへの免疫スケジュールにおいて, ICの作製に使用可能なレベルの抗体価を示す抗TDH血清が得られた。一方, 抗TRH抗体は得られなかったため, 免疫スケジュールや使用するモルモットの週齢等, 各種免疫条件を検討し, 再度免疫を実施する。抗TDH同様, 抗TRH抗体が得られた際には, 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。

BoNT/A_{Hc}精製とモルモット抗血清の作製:

今回用いた精製His-TF-BoNT/A_{Hc}を抗原に使用し, モルモットに免疫を実施した結果, ICの作製に使用可能なレベルの抗体価を示す抗BoNT/A_{Hc}血清が得られた。今回実施した免疫方法によって, 通常よりも早い段階で抗血清が得られた一方, モルモットの生育が伴っておらず, 期待される血清の半分程度の血清量しか得られなかった。したがって, 再度同様の免疫方法によってモルモットを免疫し, 今後の抗体精製に十分な量の血清が得られるように試みる。

E. 結論

1. 構築した迅速遺伝子検出法は実際のバイオテロ事例にも応用可能と考えられる。
2. 検出系に使用出来る程度の抗体価を示す抗TDH血清が得られた。
3. 検出系に使用出来る程度の抗体価を示す抗BoNT/A_{Hc}血清が得られた。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Nakano M, Yamasaki E, Moss J, Hirayama T, Kurazono H: Study of the stn protein in salmonella; a regulator of membrane composition and integrity. *Methods Mol Biol.* 2015;1225:127-138.
 - 2) 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.* 2015 Feb; 21(2):105-109.
 - 3) Nakashima S, Yura H, Tomonaga M, Harada T, Hara A, Hara S, Nakano M, Yamasaki E, Sakamoto N, Ishimatsu Y, Isomoto H, Gochuico R B, Suffredini A F, Mukae H, Kurazono H, Hirayama T, Moss J, Kohno S: Identification of *Helicobacter pylori* VacA in Human Lung and its

- Effects on Lung Cells. *BBRC* 460 (3): 721–726, 2015.
- 4) Masuda K, Yamamoto S, Kubota K, Kurazono H, Makino S-I, Kasuga F, Ijimi S, Asakura H.: Evaluation of the dynamics of microbiological quality in lightly pickled napa cabbages during manufacture. *J. Food Safety*, doi: 10.1111/jfs.12195, 2015.
- 5) Asakura H, Kawamoto K, Murakami S, Tachibana M, Kurazono H, Makino S, Yamamoto S, Igimi S.: Ex vivo proteomics of *Campylobacter jejuni* 81–176 reveal that FabG affects fatty acid composition to alter bacterial growth fitness in the chicken gut. *Research in Microbiology* 2015 *In press*.
- 6) Eiki Yamasaki , Masanori Watahiki , Junko Isobe , Tetsutaro Sata , G. Balakrish Nair and Hisao Kurazono.: Quantitative Detection of Shiga Toxins Directly from Stool Specimens of Patients Associated with an Outbreak of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Japan—Quantitative Shiga toxin detection from stool during EHEC outbreak. *Toxins*, 2015, 7, 4381–4389; doi:10.3390/toxins7104381112
- 7) Asakura H, M Tachibana, M Taguchi, T Hiroi, H Kurazono, S-I Makino, F Kasuga, S. Igimi: Seasonal and growth-dependent dynamics of bacterial community in radish sprouts. *Journal of Food Safety*. 2015. *In press*
- 8) Li HM, Hiroi T, Zhang Y, Shi A, Chen G, De S, Metter EJ, Wood WH 3rd, Sharov A, Milner JD, Becker KG, Zhan M, Weng NP. TCR β repertoire of CD4+ and CD8+ T cells is distinct in richness, distribution, and CDR3 amino acid composition. , *J Leukoc Biol*. 2015 Sep 22. pii: jlb.6A0215–071RR. [Epub ahead of print]
- H. 知的財産の出願・登録状況
特になし

厚生労働科学研究補助金 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

バイオテロ対応ホームページのアップデートとバイオテロ対策支援方法の開発

所 属 東京大学医科学研究所附属病院
研究分担者 鯉淵智彦

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』に関して情報の妥当性・正確性を確認した。今後は医療従事者のみならず、一般公開も検討すべきと考えられたため、課題の洗い出しと具体的な対応策を検討した。さらに、バイオテロ診断支援の一環として行った国内の地方衛生研究所に対する検査可能疾患の状況調査(アンケート)を詳細に解析したところ、一部の病原体に関しては検査可能施設が限られるなどの問題点が挙げられた。今後の国内の検査体制をいかに整備していくかが重要な課題である。

研究協力者

菊地正 東京大学医科学研究所附属病院

松本哲哉 東京医科大学 微生物学講座

な施策を洗い出し、新たな支援方法を開発することも目的とする。

A. 研究目的

バイオテロに用いられる可能性のある病原微生物は多彩で、その多くは重篤な疾病を引き起こす。中には一般の医療従事者にはほとんど診療経験のない病原体も含まれ、例として炭疽菌や2014年に西アフリカで流行したエボラウイルス病などが挙げられる。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、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、有用なホームページを公開することを目的とする。また、これらの研究を通じて今後のバイオテロ対策に必要な

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。

また、昨年度に行ったバイオテロ診断支援に関する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結果をより詳細に解析し、新たなバイオテロ対策支援方法の開発を行う。

【倫理面への配慮】

特になし

C. 研究結果

ホームページに対しては昨年度に総論部分の見直しとデング熱およびエボラウイルス病のアウトブレイクに関する情報を加えた。今年度は新たなアウトブレイクの発生はほとんど見られず、関連情報の変更や修正が必要な箇所は限られていた。

そこで今後のホームページのあり方を十分に検討した結果、限られた医療従事者だけが閲覧出来る状況よりも、将来的には一般公開が望ましいと考えられたため、課題の洗い出しとその対策を検討した。最大の課題はサイバー攻撃であるが、セキュリティの専門家との意見交換を行い、必要十分な対応策を取ることは可能と判断した。その他、アクセス集中時の対策などいくつかの課題に対する具体策を検討し、一般公開に向けての目処を立てた。また、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等に対して施行した状況調査(アンケート)を詳細に解析し、一部の病原体に関しては検査可能施設に限られることが判明した。さらに陽性検体の不足している施設が存在することも明らかとなった。

D. 考察

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。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してきた。この目的はある程度達成されつつあり、今後はより広く医療従事者以外にも情報を提供すべき段階にあると考えられる。しかしながらサイバー攻撃への対応、アクセス集中時にサーバーが耐えられるかなどの懸念は残り、これらの課題に対してはセキュリティ対策の専門家と十分に検討していく必要がある。さらに医療従事者以外が閲覧することになった場合、専門的内容のままでは十分な理解ができず、場合によっては誤解を生じうる可能性もあるため記載内容を十分に検討する必要がある。

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が、一部の病原体に関しては検査可能施設に限られていた(表1)。このアンケート調査により、陽性検体の不足による精度管理の問題や、検査のための研修を希望している施設もあるなど国内の現状を把握することができた。これらの結果をもとに今後の検査体制をいかに整備していくかが課題と思われる。

E. 結論

国際的なテロリズムの拡大が懸念されるなか、バイオテロ対策の重要性は今後も増大していくことが予想される。バイオテロに使用されうる病原体や各疾患の特徴などを包括的に閲覧できるホームページの充実は今後も継続していく必要がある。

またバイオテロ疑い事例に対する国内の検査体制の現状を把握し、支援体制を継続して整備していくことが不可欠である。

F. 研究発表

1. 論文発表
発表なし
2. 学会発表
発表なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表 1. 10-50%の施設で検査可能な病原体

種別	病原体または毒素	CDC (2000)
二種	野兔病菌	A
二種	ペスト菌	A
二種	ボツリヌス毒素	A
三種	鼻疽菌	B
三種	類鼻疽菌	B
三種	発疹チフスリケッチア	B
三種	ブルセラ属菌	B
三種	Q熱コクシエラ	B
三種	ロッキー山紅斑熱リケッチア	
三種	多剤耐性結核菌	
三種	狂犬病ウイルス	
四種	オウム病クラミジア	B
四種	黄熱ウイルス	
四種	インフルエンザウイルス (H2N2)	
その他	サキシトキシン	
その他	T-2マイコトキシン	
その他	アフラトキシン	

厚生労働科学研究補助金 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

近年、国際情勢の変化に伴い、テロの脅威が深刻化してきている。今後、国内でも各種の世界的な行事が予定されており、テロ対策の充実は不可欠である。医療機関は特にバイオテロに対する対応を迫られる可能性が高いが、現時点では準備が十分になされたとは言えず、ほとんど手つかずの医療機関も多く認められる。その背景には医療機関向けのバイオテロ対策の指針等が示されておらず、具体的に何をすれば良いのかが明確になっていない状況があると考えられる。そこで本研究では国内の医療機関向けにバイオテロ対策のガイドラインを作成することを主な目的としている。昨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、各論の一部を作成した。今年度は個々の病原体にかかわらず広く対応できるようにすることを目指して、総論部分の案を作成した。

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。海外では各地でテロが起こっており、日本でも伊勢志摩サミットやオリンピックなどテロのターゲットとなりやすい行事が予定されていることから、テロに対する対策を十分に行っておく必要がある。ただし一般的にテロの中でもバイオテロに対する関心はやや低い傾向にあるため、その対策は遅れがちであると考えられる。そこで、本研究においては、各医療機関が今後、バイオテロに対する準備を行う上で必要なガイドラインを作成することを目的にしている。

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、バイオテロ対策のガイドラインを作成した。

C. 研究結果

医療機関におけるバイオテロ対策ガイドラインの作成

バイオテロ対策のガイドラインについては、現在の医療機関が置かれた状況を考慮した上で、より実践的で効率的な内容にすることを目指して、事業継続計画(Business Continuity Plan:BCP)を含めてガ

イドラインの総論部分の案を作成した。

ガイドラインの項目とポイントは下記のとおりである。

1) 必要な薬剤の準備

バイオテロに用いられる代表的な病原体に対して推奨される治療薬とその用法用量を提示した(追加資料表 1)。

2) 必要な感染防護具の準備

バイオテロに対応する際に必要な感染防護具(PPE)について各医療機関の状況に合わせた準備用の表を作成した。

3) バイオテロ対応のフローチャート

バイオテロ発生当初は原因となる病原体が不明の状態では対応せざるを得ないため、代表的なパターンとして急性感染症を発症した時点から段階的に対応するフローチャートを作成した(追加資料図 1)。

4) BCP の作成

BCPは、自然災害、高病原性の感染症のパンデミック、テロ攻撃などの緊急事態に遭遇した場合に、必要とされる医療機関の機能を維持し、診療行為を継続できるように、予め対応すべき内容や手段、必要な物品などを取り決めた計画のことである。

今回、中小規模病院を対象として、バイオテロを想定したBCP作成と対応の例を作成した(追加資料表2)。

D. 考察

現在、IS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が増し、国際紛争も激しくなって、緊張が高まっている。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。

現在、国内でもテロを警戒する意識は少しずつ高まっているが、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。

そこで今回は、新型インフルエンザの流行を見据えて、国や自治体が推し進めている各医療機関のBCP作成を参考にして、バイオテロ発生時のBCP作成について焦点を当てて検討を行った。

ただし問題点としては、バイオテロ発生時は病原体が確定できず、さまざまな状況を広く想定しながら対応せざるを得ないことであり、必要最小限かつ有効な対処法を提示できるよう検討していく必要がある。

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、今年度は総論部分の案を作成した。今後、さらに実際の医療現場で活用できる内容にできるようブラッシュアップ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 平成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」研究分担者 吉川 徹
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

資料

表 1. バイオテロに使用される代表的な治療薬の一覧

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

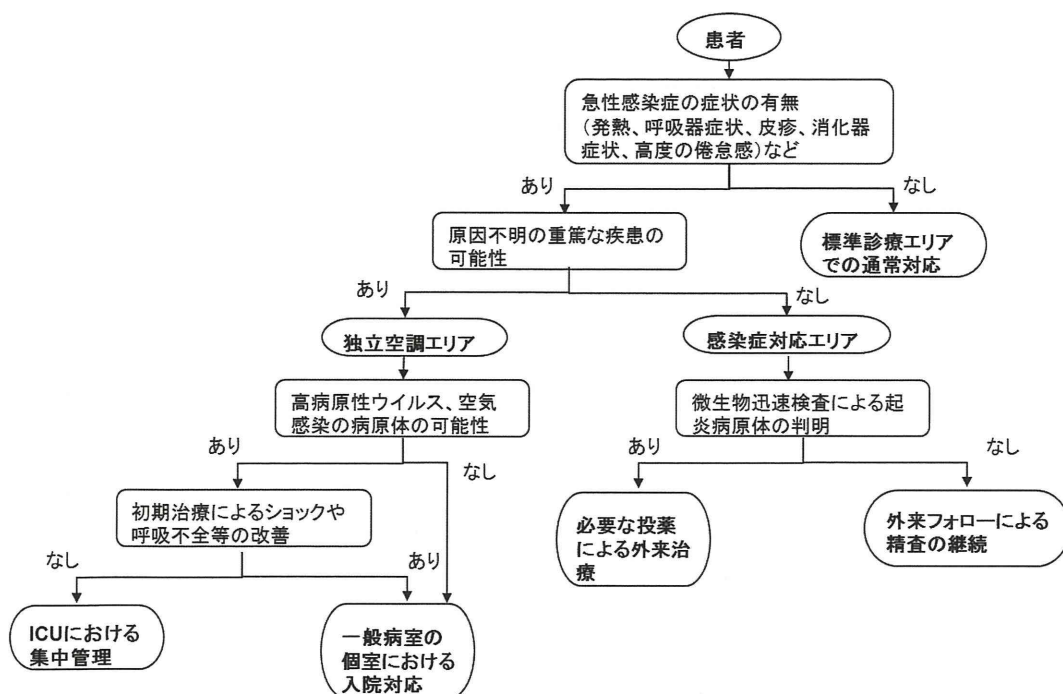


図 1. バイオテロが疑われる状況における対応フローチャート

表 2. バイオテロを想定した BCP 作成と対応の例(中小規模病院対象)

(1) 自施設の役割の明確化

要点: 地域における自施設の役割を明らかにすることによって緊急時に対応すべきことを明確にする.

例:

- ・地域医療を担う立場として, 地域住民が必要な診療を受けられる体制を確保する.

(2) バイオテロ被害の各段階における基本的な対応方針

要点: 発生の初期から深刻な状況まで各段階に合わせた対応を決定する.

例:

・国内発生の段階

さらに警戒の段階を高めて, 必要な物品等や院内体制の再確認を行う

・地域発生の段階(都道府県内での患者の発生)

バイオテロの患者が受診した際の具体的対応の確認.

・地域発生の段階(近隣地域での患者の発生)

バイオテロ専用の外来, 病室の確保. 優先度が低い診療の中止や延期.

(3) 優先すべき診療業務の明確化

要点: 診療業務の内容を以下の3段階の優先度に分けて分類する.

例:

・優先度高: 地域感染期でも継続

外来診療, 透析業務, 緊急手術など

・優先度中: 地域感染期には縮小

慢性疾患の外来, 入院など

・優先度低: 地域感染期には延期

待期的手術, 検診など

(4) 被害の想定

要点: 最も被害が大きい状況を踏まえて想定される被害を考察する.

例:

- ・感染者: 1 日最大 30 名の感染疑い患者が外来を受診(真の感染者はその 1 割程度).

- ・職員の欠勤: 個々の理由等により欠勤率 30%

(5) 対応本部の組織作りと構成メンバー, 役割分担の確認

要点: 対策本部の本部長は院長とし, 他の構成員とその役割を明確にする.

例:

- ・構成員: 院長, 副院長, 診療部長, 看護部長, 検査部長, 薬剤部長, ICT メンバー, その他

- ・指揮系統: 対策本部長(院長)を頂点として, 以下意志決定の順位を定める.

- ・役割分担: ICT メンバー(具体的対応の提案と現場指導), 検査部長(流行時の検査対応の指示), 薬剤部長(必要な治療薬の確保と管理)など

(6) 必要な機器や物品等の確認と準備

要点: バイオテロを想定して必要とされる物品や機器およびその数を明らかにし, 緊急時の供給体制について予め業者と相談しておく.

例:

- ・医薬品: 各種抗菌薬など

- ・検査キット: 除外対象となるインフルエンザ等の各種感染症の迅速診断キットなど

- ・PPE: マスク(サージカル, N95), 手袋, ガウン, ゴーグルなど
- ・消毒薬: 擦式消毒薬, 次亜塩素酸ナトリウムなど
- ・機器: 人口呼吸器, パルスオキシメーター, 簡易血液・生化学検査機器など

(7) 職員向け連絡体制の確立

要点: 緊急時の情報や診療体制の変更, 個別の指示がスムーズに行える連絡体制を築く

例:

- ・緊急連絡網の設置: 職員の連絡先の把握や一斉メール配信システムなどの構築

(8) 情報提供

要点: 患者および地域住民向けに自施設の診療対応について情報を提供する。

例:

- ・患者(入院, 外来)への情報提供
診療体制の変更の通知や協力の依頼を直接および書面を通じて連絡
- ・地域住民への情報提供
ホームページや掲示物による新しい診療体制の提示

(9) 地域連携

要点: 他の医療機関, 国立感染症研究所, 自治体, 保健所, 警察, 消防などとの相互連絡や連携体制を相談しておく

例:

- ・国立感染症研究所への検査依頼の確認
バイオテロの病原体の確認のための検査依頼の手段や検体輸送等の確認
 - ・医療施設間相互の情報共有
各施設の患者受け入れ状況や入院可能人数, 薬剤保有状況などの情報共有
 - ・自治体や保健所への報告内容の確認や連絡体制の確認
-

分担研究報告書

情報管理及び提供法の確立と維持

所 属 国立保健医療科学院健康危機管理研究部
研究分担者 金谷泰宏

研究要旨

我々は、LC16m8 が既存の種痘免疫に対してブーストをかけるが、初種痘における B5 タンパク質に対する抗体誘導は既接種群と比して弱いことを明らかにしてきた。さらに、プロテインアレイを用いた網羅的な抗原性の解析は、LC16m8 の有効性を支持すると同時に、LC16m8 の B5 タンパク質について、より詳細な研究の必要性を示唆している。今年度の研究においては、LC16m8 接種血清と Dryvax 接種血清との抗原性の比較、種々の痘そうワクチンを接種したマウス血清のアレイ測定結果の解析、LC16m8 および抗 B5 抗体に関する文献レビュー、抗 B5 抗体の測定系の確立などを引き続き行った。LC16m8 接種血清と Dryvax 接種血清の抗原性は B5 タンパク質を除き概ね同様の傾向を示した。国内外の研究、及び、我々の研究から抗 B5 抗体の産生は痘そうワクチンによる防御に必ずしも必須ではないという結果が示されているが、有効性・安全性の点から重要な抗原であり、抗原性、および影響を及ぼす要因について引き続き検討が必要である。また、LC16m8 の有効性について、ASEAN 地域フォーラムにおいて報告を行った。

研究協力者

江藤亜紀子(国立保健医療科学院健康危機管理研究部)

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 LC16m8 株の抗原性について検討を行った。

A.研究目的

LC16m8 株は EEV の主要抗原 B5 タンパク質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暴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性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、

B.研究方法

(1) LC16m8 接種血清と Dryvax 接種血清との抗原性の比較

LC16m8 を接種した日本人血清(Saito 2009)、および Dryvax を接種した米国人血清(Tan et al., 2012, GSE34931)のプロテインアレイ測定データを同時に正規化することにより直説比較を行った。正規化は R の vsn パッケージを用いた。

(2) マウス血清のアレイ測定結果の解析

LC16m8 の長期における有効性、他のワクチン株との有効性・安全性の比較、強毒性ウイルスに対する防御効果などを明らかにするため、マウス血清のプロテインアレイ測定が行われた。測定は数度に渡って行われたため、これらの結果を統合的に評価するため、正規化によりバックグラウンドを揃え、統計解析を行った。

(3) LC16m8 および抗 B5 抗体に関する文献レビュー

B5 タンパク質の変異は LC16m8 の安全性に関わる大きな特徴である。抗 B5 抗体は、痘そうワクチンの防御に必須と言われていたが、最近の国内外の研究は、必ずしも抗 B5 抗体が必要ではないことを示している。抗 B5 抗体の機能と LC16m8 の安全性・有効性について

での知見をまとめた。

(4) 抗 B5 抗体の測定系の確立

B5 タンパク質の部分配列に対する抗ペプチド抗体の作成を行った。抗原の配列は野生型の B5 タンパク質の C 末端側に近い配列とした(aa257-273)。常法に従いウサギポリクローナル抗体作成を行っている。

【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) LC16m8 接種血清と Dryvax 接種血清との抗原性の比較

初種痘で LC16m8 を接種した日本人血清(Saito 2009)と Dryvax を接種した米国人血清(GSE34931)の抗原性の比較では、主要抗原に対する抗体産生の傾向は B5 を除き類似していた。陽性率は米国人血清の方が高い傾向を示したが、接種量の違いが要因の 1 つと考えられた(日本人血清では LC16m8 を 5 回接種に対し、米国人血清では Dryvax 株を 15 回接種)。非主要抗原で、陽性率が大きく異なるものがいくつか認められた。

(2) マウス血清のアレイ測定結果の解析

ワクチンの接種とアレイ測定は、LC16m8 の長期の効果、強毒株に対する防御効果に関与する抗原の同定、および、Lister 株などの他のワクチンとの抗原性の比較やブースターの効果などを目的に行われた(図 1)。抗原性の詳細について解析中である。

(3) LC16m8 および抗 B5 抗体に関する文献レビュー結果はレビュー論文として発表した。

(4) 抗 B5 抗体の測定系の確立

昨年度に引き続き抗体等の調整を行った。また、測定のためのプログラムを作成し動作確認を行った。

(5) ASEAN 地域フォーラム (ARF) との連携

LC16m8 の生物テロ発生後の運用について、本研究成果を ASEAN 各国に示すとともに、生物テロを想定した机上演習に参加した(防衛医大 木下学准教授)。

D.考察

マウスにおけるプロテインアレイ測定結果の統合的な解析は、LC16m8 の有効性に寄与する抗原について重要な情報を与えると考えられる。特に長期の効果については、ヒト検体と合わせて解析を行う予定である。LC16m8 の抗原性については、第一世代ワクチンの抗原性との比較により、その有効性を支持

する結果を得られており、今年度行った Dryvax 接種血清との直接比較によりさらにその類似性が確認された。マウスにおいては LC16m8 株接種により B5 タンパク質に対する抗体が産生されることは報告されており、本研究のプロテインアレイの系でも確認されている。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ており、引き続き解析を進めているところである。

E.結論

本研究では、LC16m8 株接種による抗体産生について、抗原を網羅的に搭載したプロテインアレイを用いて解析し、その結果を基に、主要抗原 B5 タンパク質の抗原性について解析を進めている。B5 タンパク質に対する応答は、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

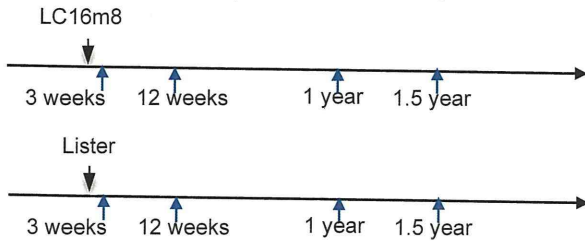
1. 論文発表

- 1) Nishiyama Y, Matsukuma S, Matsumura T, Kanatani Y, Saito T. Preparedness for a smallpox pandemic in Japan: public health perspectives. *Disaster Med Public Health Prep.* 2015 Apr;9(2):220-3.
- 2) Eto A, Saito T, Yokote H, Kurane I, Kanatani Y. Recent advances in the study of live attenuated cell-cultured smallpox vaccine LC16m8. *Vaccine.* 2015 Nov 9;33(45):6106-11 Review
- 3) Eto A, Saito T, Yokote H, Kurane I, Kanatani Y. Key Clinical Research Article. Recent advances in the study of live attenuated cell-cultured smallpox vaccine LC16m8. *Global Medical Discovery.* November 12, 2015
<https://globalmedicaldiscovery.com/key-clinical-research-articles-global-medical-discovery/recent-advances-in-the-study-of-live-attenuated-cell-cultured-smallpox-vaccine-lc16m8/>
- 4) Nishiyama Y, Fujii T, Kanatani Y, Shinmura Y, Yokote H, Hashizume S. Freeze-dried live attenuated smallpox vaccine prepared in cell culture "LC16-KAKETSUKEN": Post-marketing surveillance study on safety and efficacy compliant with Good Clinical Practice. *Vaccine.* 2015 Nov 9;33(45):6120-7.

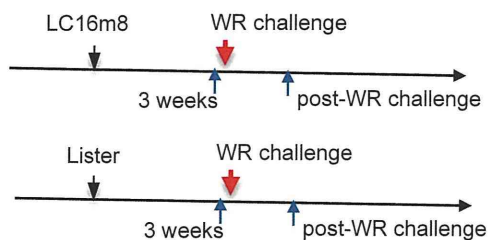
2. 学会発表

- 1) 江藤亜紀子, 齋藤智也, 横手公幸, 金谷泰宏. 天然痘ワクチン初回接種時の抗体産生応答に関する日米研究の比較. 第19回ワクチン学会学術集

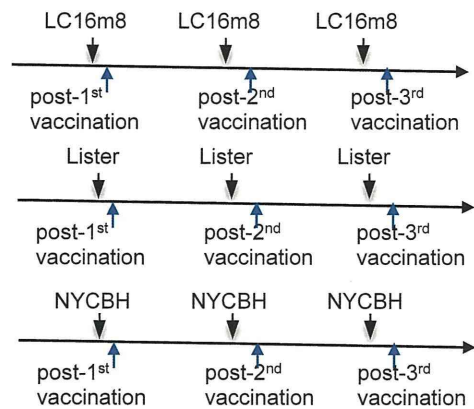
(1) LC16m8の長期の効果(Lister株との比較研究)



(2) LC16m8 の防御効果(Lister株との比較研究)



(3) LC16m8 の複数回接種の効果 (Lister株, NYCBH株との比較研究)



(4) LC16m8 接種後の他のワクチン株のブースター効果 (MVA株との比較研究)

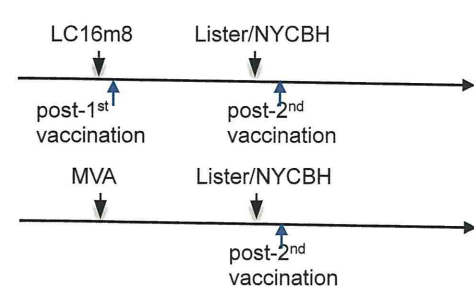


図 1. ワクチン接種とアレイ測定

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

研究分担者 横手公幸

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 事業開発部

研究要旨

LC16m8 を 1 回接種された健康成人の抗体陽性率は経時的な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、LC16m8 接種後の中和抗体価とプロテオミク解析における反応強度に相関が見られた抗原は 11 種類あった。そのうち、LC16m8 接種 30 日後と比較して接種 1 年後にプロテオミク解析における反応強度が有意に低下した抗原は A11R, A13L, A17L であった。

研究協力者

- (1) 橋爪壯(千葉大学 名誉教授)
- (2) 新村靖彦, 上村千草, 内田梓, 金原知美, 丸野真一, 宮本誠二(一般財団法人化学及血清療法研究所)

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 I 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nder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nder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。

昨年度までの研究において我々は LC16m8 単回接種 4 年後の中和抗体(Anti-Lister PRNT)陽性率について、初回接種群では低下傾向が認められ、これに起因している抗原群をプロテオミク解析によって調査してきた。更なる検証の為、同様の被験者群における解析データの蓄積が必要であると考え、本年度は、別の被験者群における LC16m8 単回接種 1 年後までの Dryvax に対する中和抗体価の持続及び抗原認識パターンについて調査を行った。

B.研究方法

本調査研究では、154 名の種痘歴の無い健康成人において米国承認備蓄ワクチン Dryvax を比較対照として 2004~2005 年に米国で実施された細胞培養弱毒痘そうワクチン LC16m8 の第 I/II 相無作為二重盲検臨床試験で取得されたサンプルを用いて解析を行った。

中和抗体の持続を評価するために、痘そうワクチン接種前、接種 30 日後、60 日後、180 日後及び 360 日後の Anti-Dryvax PRNT₅₀ のデータを解析し、Anti-Dryvax PRNT₅₀ が接種前の値の 4 倍以上となった場合を抗体陽性として抗体陽性率を算出した。

加えて、LC16m8 接種者 11 名について、接種前、接種 30 日後、接種 360 日後に採取された血清サンプルを用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】

本調査研究で再解析した臨床試験成績は、米国 FDA に了承されたプロトコルに従い、米国 GCP に準拠して実施された臨床試験で取得された成績であることを確認した。

C. 研究結果

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-Dryvax PRNT) の持続を調査するために、化血研が種痘歴の無い健康成人 154 名において米国承認備蓄ワクチン Dryvax を比較対照として 2004～2005 年に米国で実施した細胞培養弱毒生痘そうワクチン LC16m8 の第 I/II 相無作為二重盲検臨床試験で取得された成績を再解析した。中和抗体陽性率は接種 30 日後に LC16m8 群では 98%(118/120)、Dryvax 群では 100%(24/24)であったが、接種 360 日後ではそれぞれ 84%(81/97)、88%(15/17)となり、ワクチン株に関係無く抗体陽性率に低下傾向が認められた。(表 1)

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。

LC16m8 接種者 11 名について、接種前、接種 30 日後、接種 360 日後の個人毎の PRNT₅₀ の推移を図 1 に示した。

11 名の被験者は Dryvax に対する中和抗体の持続により、以下の 2 つのグループに分けて解析を行った。

Group A: LC16m8 接種 30 日後及び接種 360 日後で抗体価を維持していた被験者 (4 名)

Group B: LC16m8 接種 30 日後から接種 360 日後で抗体価が明らかに低下した被験者 (7 名)

Group A, Group B, 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。これら 52 個の認識抗原群は昨年度に評価した LC16m8 接種 4 年後までの認識抗原群とほぼ類似していた。

また、52 個の認識抗原のうち、Dryvax に対する中和抗体価とプロテオミック解析における反応強度に相関がみられた 11 種類の抗原群を表 2 に、相関図を図 3 に示した。

さらに、この 11 種類の抗原群について、各グループ毎の比較を行った。接種前と比較して蛍光強度に有意差が見られた抗原を表 3 及び表 4 に示した。Group A では、接種前と比較して接種 30 日後の蛍光強度が有意に高かった抗原は A17L, D8L, A10L, D13L, A11R, H3L, A26L, A27L であり、そのうち A17L,

D8L, A10L, D13L, A11R, H3L, A27L は接種 1 年後まで有意に高かった。また、A11R は接種 30 日後と比較して 360 日後では蛍光強度が有意に低下した。Group B では、接種前と比較して 30 日後の蛍光強度が有意に高かった抗原は D8L, A27L, D13L, A17L, H3L, I1L, A10L, A13L, A33R であり、そのすべての抗原が接種 360 日後まで有意に高かった。また、A13L と A17L は接種 30 日後と比較して 360 日後では蛍光強度が有意に低下した。

D. 考察

昨年度までの研究において我々は LC16m8 単回接種 4 年後の中和抗体 (Anti-Lister PRNT) 陽性率について、再接種群では経時的な変化は認められなかったが、初回接種群では低下傾向が認められ、これに起因している抗原群をプロテオーム解析によって調査してきた。

更なる検証の為、本年度は、2004～2005 年に米国で実施された細胞培養弱毒生痘そうワクチン LC16m8 の第 I/II 相無作為二重盲検臨床試験で取得されたサンプルを用いて中和抗体 (Anti-Dryvax PRNT) の持続を調査した。中和抗体陽性率は LC16m8 群とその比較対照とした Dryvax 群ともに接種 30 日後に最高値となり、その後接種 360 日後まで徐々に低下した。なお、中和抗体価及び抗体陽性率の低下傾向はワクチン株に関係無く確認されたことから、LC16m8 株という弱毒株に特有の事象ではないと考えられる。

更に、この接種 4 年後の抗体価の低下に起因する抗原群が、1 年後でも既に低下しているのかについて調査するため、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、LC16m8 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、これらの認識抗原群は昨年度に評価した LC16m8 接種 4 年後までの認識抗原群とほぼ類似しており、他の研究において防御や中和に重要であると言われている抗原を含んでいた。これらの抗原群のうち、中和抗体価 (Anti-Dryvax PRNT) とプロテオミック解析における反応強度の間に相関が見られた抗原群は 11 種類であった。

また、接種 1 年後まで Dryvax に対する中和抗体を維持していた被験者群において、接種前と比較して接種 30 日後の蛍光強度が有意に高かった抗原は 8 種類あり、そのうち A11R は接種 30 日後から 1 年後まで有意に低下した。また、接種 30 日後から 1 年後で Dryvax に対する中和抗体価が明らかに低下した被験者群において、接種前と比較して接種 30 日後の蛍光強度が有意に高かった抗原は 9 種類あり、そのうち A13L と A17L は接種 30 日後から接種 1 年後では有

意に低下した。今回の調査では中和抗体価の持続によって2つの被験者群に分けて解析を行ったが、2つの被験者間に明確な違いは見られなかった。しかし、A11RとA13Lは、前回4年後の中和抗体価及び陽性率の低下に起因していると考察した抗原群である。今回は接種1年後の結果であり接種4年後の途中の過程にあると考え、A11RとA13Lは1年後で既に低下が始まっている抗原群であり、これらが中和抗体価の低下に起因する抗原群の一部であることが考察された。

この中和抗体価及び抗体陽性率の低下傾向に起因する認識抗原については被験者数を増やし更に慎重に検証していく必要があると考えられた。加えて、LC16m8追加接種の要否に関する議論も必要であると考えられた。

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、抗体陽性率に経時的な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、LC16m8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、LC16m8接種後の中和抗体価とプロテオミク解析における反応強度に相関が見られた抗原は11種類あった。そのうち、LC16m8接種30日後から1年後の反応強度が有意に低下した抗原はA11R、A13L、A17Lであった。

この中和抗体価及び抗体陽性率の低下傾向に起因する認識抗原については被験者数を増やし更に慎重に検証していく必要があると考えられた。加えて、LC16m8追加接種の要否に関する議論も必要であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yokote H, Shinmura Y, Kanehara T, Maruno S, Kuranaga M, Matsui H, Hashizume S. Vaccinia virus strain LC16m8 defective in the B5R gene

keeps strong protection comparable to its parental strain Lister in immunodeficient mice. *Vaccine*. 33:6112-6119, 2015

- 2) Nishiyama Y, Fujii T, Kanatani Y, Shinmura Y, Yokote H, Hashizume S. Freeze-dried live attenuated smallpox vaccine prepared in cell culture "LC16-KAKETSUKEN" Post-marketing surveillance study on safety and efficacy compliant with Good Clinical Practice. *Vaccine*. 33:6120-6127, 2015
- 3) Eto A, Saito T, Yokote H, Kurane I, Kanatani Y. Recent Advances in the Study of the Live Attenuated Cell-Cultured Smallpox Vaccine LC16m8. *Vaccine*. 33:6106-61, 2015
- 4) Hayakawa T, Aoi T, Bravery C, Hoogendoorn K, Knezevic I, Koga J, Maeda D, Matsuyama A, McBlane J, Morio T, Petricciani J, Rao M, Ridgway A, Sato D, Sato Y, Stacey G, Sakamoto N, Trouvin JH, Umezawa A, Yamato M, Yano K, Yokote H, Yoshimatsu K, Zorzi- Morre P. Report of the international conference on regulatory endeavors towards the sound development of human cell therapy products. *Biologicals*. 43(5):283-97, 2015
- 5) Mottate K, Yokote H, Mori S, Horita A, Miyatsu Y, Torii Y, Kozai Y, Iwaki M, Takahashi M, Ginnaga A. Retrospective survey to evaluate the safety and efficacy of Japanese botulinum antitoxin therapy in Japan. *Toxicon*. 110:12-18, 2016

2. 学会発表

- 1) 江藤亜紀子, 齋藤智也, 横手公幸, 金谷泰宏. 天然痘ワクチン初回接種時の抗体産生に関する日米研究の比較. 第19回日本ワクチン学会学術集会 愛知(2015.11)

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.
3. その他
該当なし.

表 1. 痘そうワクチン接種後の中和抗体価及び抗体陽性率(Anti-Dryvax PRNT)

ワクチン	接種前	接種 30 日後		接種 60 日後		接種 180 日後		接種 360 日後	
	GMT	GMT	陽性率	GMT	陽性率	GMT	陽性率	GMT	陽性率
LC16m8 (N=125)	12	367	98% (118/120)	207	97% (115/120)	109	89% (101/114)	91	84% (81/97)
Dryvax (N=24)	14	1,208	100% (24/24)	433	96% (22/23)	330	91% (21/23)	174	88% (15/17)

GMT: Geometric mean titer

陽性判定基準: 接種前の抗体価の 4 倍以上の抗体価を獲得した者を陽性と判定

表 2. LC16m8 接種後の中和抗体価(Anti-Dryvax PRNT)と
プロテオミク解析における反応強度に相関が見られた抗原群(11 種)

Membrane		Core (2)	Other (3)
EEV (1)	IMV (5)		
A33R	H3L	A10L	A11R
	D8L	I1L	D13L
	A17L		A26L
	A13L		
	A27L		

A33R: EEV membrane phosphoglycoprotein, H3L: IMV heparin binding surface protein, D8L: IMV membrane protein, A17L: IMV membrane protein, A13L: IMV membrane protein, A27L: IMV surface protein, A10L: precursor p4a of core protein 4a, I1L: putative DNA-binding virion core protein, A11R: hypothetical protein, D13L: rifampicin target, A26L: cowpox A-type inclusion protein.

表 3. 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

	接種 30 日後*	接種 360 日後*
Group A	A17L, D8L, A10L, D13L, A11R, H3L, A26L, A27L	A11R, A27L, A10L, D13L, D8L, H3L, A17L, A33R
Group B	D8L, A27L, D13L, A17L, H3L, I1L, A10L, A13L, A33R	H3L, D13L, A10L, D8L, I1L, A27L, A13L, A17L, A33R

* 有意差が大きい順に記載