

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
(H26-新興行政-指定-002)

研究代表者	西條政幸	国立感染症研究所ウイルス第一部
研究分担者	田島茂	国立感染症研究所ウイルス第一部
	下島昌幸	国立感染症研究所ウイルス第一部
	吉河智城	国立感染症研究所ウイルス第一部
	森川茂	国立感染症研究所獣医科学部
	梅山隆	国立感染症研究所真菌部
	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
	中島典子	国立感染症研究所感染病理部
	永田典代	国立感染症研究所感染病理部
	小林和夫	堺市衛生研究所
	倉園久生	帯広畜産大学・畜産衛生学研究部門・食品衛生学分野
	鯉淵智彦	東京大学医科学研究所・附属病院感染免疫内科
	松本哲哉	東京医科大学微生物学講座
	金谷泰宏	国立保健医療科学院健康危機管理研究部
	横手公幸	一般財団法人化学及血清療法研究所

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の新規検出法の確立】

ウエストナイルウイルス, 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*), BSL2 に分類されるクリプトコックス・ガッティ, 炭疽菌の新規検出法を確立した. 6 種類全ての lineage に分類されるウエストナイルウイルスに対応可能な新規 TaqMan プライマー・プローブセットを開発した. LAMP 法によるクリプトコックス・ガッティ遺伝子の高感度検出系を開発した. 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への対処法を立案・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 1 つである. 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る目的で, 炭疽菌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, 炭疽菌およびその類縁菌の系統的な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, pXO1, pXO2 といった病原性を規定するプラスミドや pXO1 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 の系統的な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可能となった. GcoGSA-BA による情報解析で, 炭疽菌を含むセレウス属グループ全般の病原性因子の特定も可能にするための改良を加えた. さらに, 2014 年のデング熱感染症・国内発症例を契機に, 輸入感染症による国内拡大にも注視すべき事情が生じ, 2020 年東京オリンピック開催時に発生する可能性の高いデング熱国内対策にも資する, デングウイルス遺伝型を図示化するツール Dengue Genograph Viewer (DGV) を構築した.

【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有用性の評価】

エボラ出血熱の致死率は 90% に達する. 国立感染症研究所ウイルス第一部で準備されているエボラウイルス検出方法により 2014-15 年に西アフリカでの流行の原因となったエボラウイルスも検出することが可能か否かを評価した. 組織切片上で病原体遺伝子核酸を検出する *in situ* hybridization (ISH) 法のひとつである, オリゴヌクレオチドプローブを用いた *in situ* ゲノム検出法には 3 種類 (ISH-AT 法, View RNA 法, RNAscope 法) がある. それらの有用性を比較評価した. Global Health Security Action Group Laboratory-Network の活動の一環である, GHSAG Wet-Lab Workshop on Diagnostic Electron Microscopy of Pathogens, Winnipeg 2015 (平成 27 年 9 月 24, 25 日 National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canada 主催) に参加し, バイオテロに使用される可能性のある病原体等の電子顕微鏡を用いた迅速検出法の確立を目的に, 検出感度と精度を向上するための改良法の一つとして, 電子顕微鏡検索のためのサンプルの濃縮方法について評価した.

【バイオテロ対策のためのネットワーク構築】

現在、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にある。国内の医療機関向けにバイオテロ対策のガイドラインの作成において、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、ガイドラインにおける総論部分を充実させた。

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対するに対し方策や改善などを検討した。その結果、これら課題の改善には地衛研、各支部内、地衛研全国協議会、感染研および厚生労働省の理解や連携が重要であることが確認された。改正感染症法(特に、病原体サーベイランスなど感染症に関する情報の収集体制が強化)の施行も関連し、病原体検出マニュアルの整備、標準作業手順書の作成、地衛研全国協議会感染症対策部会員の増員などがあった。

【細胞培養痘そうワクチンの有効性、安全性に関する研究】

国産の弱毒痘そうワクチン株である LC16m8 を用いて暴露後重症化阻止が可能か検討した。オルソポックスウイルスに属するエクトロメリアウイルス(ECTV)を用いたマウスモデル系を確立した。次に ECTV でマウスを攻撃する前後 3 日の間に LC16m8 株、またはその親株の Lister 株を接種して効果を検討した。ECTV 暴露 3 日前に Lister 株を投与した群でのみ発症・重症化阻止効果は確認できたが、ECTV 暴露後の LC16m8、Lister 株の投与による効果は確認されなかった。サル痘ウイルスの BALB/c マウス感染モデル開発に関する研究を推進した。病原性の異なる 2 種類のサル痘ウイルスをそれぞれ BALB/c マウスに皮下接種したところ、ともに感染成立を示唆する所見が得られた。抗 Ly6G 抗体投与による好中球枯渇マウスに対する感染実験のモデルとしての有用性を評価する。

LC16m8 株は、継代培養するとプラークサイズのやや大きい LC16mO 型 (medium size plaque; MSP) ウイルスが出現する。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。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、LC16m8 株と特定の MSP を識別できた。そこで、主要タイプの MSP を特異的に検出する PCR を用いて、LC16m8 株と MSP を混合したスパイク試験を実施した結果、MSP 含有率 0.01~1%まで検出できた。さらに RNase H2-dependent PCR により、より特異度の高い MSP 検出 PCR が開発された。

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 の有効性について、ASEAN 地域フォーラムにおいて報告した。

LC16m8 を 1 回接種された健康成人の抗体陽性率の経時的な推移を調べた。抗体陽性率は時間が経過すると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法を用いて、LC16m8 接種 30 日後と接種 1 年後を比較すると、有意に低下した抗原は A11R, A13L, A17L であることが明らかにされた。

【ホームページ】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。

A. 研究目的

本研究班においては、大きく2つの課題に対処する。一つは、「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」、もう一つは「細胞培養痘そうワクチンの有効性、安全性に関する研究」の推進である。

バイオテロ対策には迅速検査、分離同定、および血清抗体検査、環境検体を用いた病原体検出が必要となる。さらに病原体の由来を知るためにゲノムデータの整備も重要となる。これまで本研究班では種々のバイオテロ関連病原体等について迅速診断法の開発がなされてきた。しかし、検査ネットワーク整備、さらに病原体の由来の追跡や未知の病原体等への対応にも課題を残している。今年度は、一次対応者や対応機関を支援する目的でバイオテロに関する情報を提供するシステムを準備するとともに、緊急時に患者や環境等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することを目的とした。また、病原体ゲノムデータベースの整備および検査診断機関のネットワーク化を行うことも目的とした。

具体的には、1)各種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、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、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)電子顕微鏡を用いた検出法、免疫組織化学的検出法の確立、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通じた地方衛生研究所と感染研等とのネットワークの整備、5)診断検査支援のため、関係機関への情報提供システムの確立を目的とした。

本年度は特に地方衛生研究所との検査ネットワークの整備とホームページ等の情報発信の整備に重点的に取り組んだ。

日本では、痘瘡ウイルスによるバイオテロに備えて、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。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、等を明らかにすることを目的とした。具体的には、LC16m8の有効性等を調べるための動物モデル開発、LC16m8の曝露後投与による天然痘類似疾患の発症予防効果の有無、LC16m8接種を受けた人々

における中和抗体や個々の蛋白質に対する抗体の推移を詳細に調査すること、さらにはLC16m8ワクチンの品質管理のための新規解析法の開発等を目的とした。

B. 研究方法

1. 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に関する研究

1) ウエストナイルウイルス検出法の開発

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、現行および最近発表された方法(TaqMan qRT-PCR法)が全lineageに対応可能かを調べた。さらに新たなTaqMan qRT-PCRセットを開発し、その特異性および検出感度について評価した。

2) エボラウイルス検出のための遺伝子検査の評価

国立感染症研究所ウイルス第一部に整備されている、現行のエボラウイルスの検出方法で最近のエボラウイルスも検出できるか否かを調べ、バイオテロ発生時に対応可能か検討した。

3) LAMP法によるクリプトコックス・ガッティ遺伝子の高感度検出系の開発

クリプトコックス・ガッティ遺伝子検出のためのLAMP法の標的配列として、クリプトコックス属の莢膜の生合成に関与するCAP10遺伝子の配列を標的としたLAMP法を開発することを試みた。LAMP反応は栄研化学のLoopamp DNA増幅試薬キット(乾燥型)および検出試薬としてLoopamp蛍光・目視検出試薬を用いた。

4) 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、炭疽菌を含むバシラス・セレウス属菌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*)の開発を試みた。

また、2020年東京オリンピック対策にも資するデングウイルス遺伝型を図示化するツールDengue Genograph Viewer(DGV)を構築した。

5) 組織切片上で病原体遺伝子核酸を検出する *in situ*

hybridization (ISH) 法の評価に関する研究

高感度で特異性の高い *in situ* hybridization-AT tailing (ISH-AT) 法における二重蛍光染色について ISH-AT 法, View RNA 法, RNAscope 法の病理検体 (標本) における遺伝子検出法の利点について比較検討した。

- 6) 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

検出感度と精度を向上するための改良法の一つとして、電子顕微鏡検出のためのサンプルの濃縮方法について Global Health Security Action Group Laboratory-Network の活動の一環である、GHSAG Wet-Lab Workshop on Diagnostic Electron Microscopy of Pathogens, Winnipeg 2015 (平成 27 年 9 月 24, 25 日 National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canada 主催) に参加した。

- 7) 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関する研究

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、課題を抽出し、課題に対し方策や改善などを検討した。

- 8) 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

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 法で増幅産物を短時間に識別する野外仕様の検出系の開発を試みた。また, 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た。さらに, 重篤な食中毒の原因の 1 つである 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することを試みた。

- 9) 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に関する研究

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。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。

- 10) 各医療機関のバイオテロ対策を支援するための方策に関する研究

国内の医療機関向けにバイオテロ対策のガイドライン (項目は, 必要な薬剤の準備, 必要な感染防護具の準備, バイオテロ対応のフローチャート, BCP の作成, 等) を作成し, 改良を加えた。

2. 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) エクトロメリアウイルス (ECTV) を用いたマウスモデルの確立および LC16m8 曝露後投与効果の解析

ECTV を用いたマウスモデル系の確立を試みた。また, 確立された感染モデルを用いた, LC16m8 の 1 回接種による免疫能誘導までの最短期間および曝露後接種効果の有無をウイルス学的に評価した。

- 2) LC16mO 型 (medium size plaque; MSP) の迅速検出システム開発

MSP は B5R の一塩基欠失を相補する変異ウイルスである。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。

- 3) サル痘ウイルスのマウス感染実験系の基礎検討

サル痘ウイルスのマウス感染実験系の基礎検討を行った。BALB/c マウスに 2 種類のサル痘ウイルスを皮下接種した, 症状の出現や病態の推移を調べた。

- 4) 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における情報管理及び提供法の確立と維持に関する研究

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.

5) 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抗体陽性率の経時的推移を評価した. Proteome Microarray Chip を用いたプロテオミク解析を行い, 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を検索した.

C. 研究結果

1. 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に関する研究

1) ウエストナイルウイルス検出法の開発

現行のウエストナイルウイルス用プライマー・プローブセットでは, lineage によっては検出不能であることが明らかとなった. 2) 最近報告されたウエストナイルウイルスゲノム検出法(TaqMan 法)の有用性について検討したが, 現行セットと同様検出不能な lineage があることがわかった. 3) すべての lineage に対応可能な新規 TaqMan プライマー・プローブセットを開発した.

2) エボラウイルス検出のための遺伝子検査の評価

現行の病原体検出マニュアルが最新の Makona 株も検出できることが判明した. また conventional RT-PCR (nested), real time RT-PCR, 抗原検出 ELISA の3つの診断法では感度はこの順に優れ, コピー数と抗原量は相関しリーズナブルな結果が得られることが判明した.

3) LAMP 法によるクリプトコックス・ガッティ遺伝子の高感度検出系の開発

URA5 の配列を利用した LAMP 法の導入を試みた. また, CAP10 遺伝子の配列を利用して 4 種類の LAMP プライマーセットを設計した. 設計されたすべてのプライマーセットを用いた LAMP により, クリプトコックス・ガッティ遺伝子を 1 時間以内に検

出することが可能であった.

4) 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

GcoGSA-BA はコアゲノム系統解析だけでなく, pXO1, pXO2 といった病原性を規定するプラスミドや pXO1 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 GcoGSA-BA による情報解析で, 炭疽菌を含むセウス属グループ全般の病原性因子の特定も可能になる改良を加えた.

公開データベースに登録されている全ての Dengue ウイルス配列(1945 -2014 年)を収集し, 分離国・地域と血清型および遺伝型としてデータベース化し Google Maps 上で表現できるようにした.

5) 組織切片上で病原体遺伝子核酸を検出する *in situ* hybridization (ISH) 法の評価に関する研究

組織上での co-localization(共局在)を示すには蛍光二重染色を行った後, 共焦点レーザー顕微鏡で解析することが必要である. 感染細胞を同定するために, *in situ* ハイブリダイゼーション法でウイルスゲノムを検出した後, 細胞マーカー蛋白あるいはウイルス抗原に対する抗体を用いた蛍光免疫組織化学で蛍光二重染色を行い, 感染細胞を同定する系を確立した. ISH-AT 法と RNA Scope 法は蛍光二重染色が可能であった.

6) 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

病原体の電子顕微鏡学的迅速検出法に必要な, 目的粒子が少ない場合のサンプルの濃縮法を習得した.

7) 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関する研究

抽出されたいくつかの課題の改善には地衛研, 各支部内, 地衛研全国協議会, 感染研および厚生労働省の理解や連携が重要であることが確認された. 2015 年度に改善した事項として, 改正感染症

法(特に,病原体サーベイランスなど感染症に関する情報の収集体制が強化)の施行も関連し,病原体検出マニュアルの整備,標準作業手順書の作成,地衛研全国協議会感染症対策部会員の増員などがあった.特定病原体等に規定されている細菌毒素(ボツリヌス毒素や志賀毒素)に関する独立した検出マニュアルは未整備であり,その整備の必要性が確認された.

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)調査により,一部の病原体に関しては検査可能施設が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.

8) 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

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法で増幅産物を短時間に識別する野外仕様の検出系が開発された.また,生物兵器に使われる可能性のある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するとともに,検査・診断マニュアルを作成した.さらに,重篤な食中毒の原因の1つである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兔抗血清を整備した.

9) 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に関する研究

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.今後のホームページのあり方を十分に検討し,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判断した.ホームページの一般公開のための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.また,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.

10) 各医療機関のバイオテロ対策を支援するための方策に関する研究

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.

2. 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) エクトロメリアウイルス(ECTV)を用いたマウスモデルの確立およびLC16m8曝露後投与効果の解析

ECTVを用いたマウスモデル系を確立した. ECTV曝露3日前にLister株を投与した群でのみ発症・重症化阻止効果は確認できた.一方,ECTV曝露後のLC16m8,Lister株の投与による効果は確認されなかった.

2) LC16mO型(medium size plaque; MSP)の迅速検出システム開発

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,LC16m8株と特定のMSPを識別できた.主要タイプのMSPを特異的に検出するPCRを用いて,LC16m8株とMSPを混合したスパイク試験を実施した結果,MSP含有率0.01~1%まで検出できた.さらにRNase H2-dependent PCRを導入することにより,より特異度の高いMSP検出PCRを開発した.

3) サル痘ウイルスのマウス感染実験系の基礎検討

サル痘ウイルス感染がBALB/cマウスにおいて成立する所見が得られた.そこでこの感染系を利用し,抗Ly6G抗体投与による好中球枯渇マウスに対する感染実験を行ったが,適切なマウスモデルを開発するには,好中球枯渇のための抗体投与方法の改良が必要であることが明らかとなった.

4) 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における情報管理及び提供法の確立と維持に関する研究

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,私たちの研究から抗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ことが明らかにされた。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。

5) 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。

D. 考察

近年、特に新興感染症の流行が発見され、再興感染症の大規模流行の発生等が起こっている。中東で流行が確認された中東呼吸器症候群(MERS や 2011 年に中国で流行が確認され、2013 年には日本でも流行が確認された重症熱性血小板減少症候群が、最近の新興感染症の代表例として挙げられる。2015 年には韓国で MERS の比較的大きな流行が発生した。これらの病原体による感染症の致死率はともに約 30%を超え、嚴重な病原体管理、バイオセキュリティ上の対象病原体となる。一方、このような病原体による感染症の発生はテロリズムの結果として発生する可能性のある感染症との鑑別疾患となり、迅速で正確な診断システム開発が急務となる。さらに、2014 年から 2105 年にかけて、西アフリカで未曾有の大規模エボラ出血熱流行が発生した。この経験により大規模エボラ出血熱が発展途上国だけでなく、いわゆる先進国で発生した場合には、それらの流行が当該国のみならず、国際社会に与える影響が計り知れないことが明らかにされた。

新興感染症に加えて、世界規模の食品関連感染症(食中毒)が発生する事例(病原性大腸菌による感染症や狂牛病由来変異型クロイツフェルト・ヤコブ病の流行)は発生している。このような感染症は、バイオテ

ロ対策対象疾患ともなりうる。

天然痘が撲滅されてからほぼ 35 年が経過した。また、ポリオウイルス 2 型によるポリオ(いわゆる小児麻痺)は根絶されたと考えられている。これらの病原体の管理が一層徹底される必要があるが、これらの病原体が再び地球上の自然界に出現することのないよう、新たな病原体管理のための規則が徹底される必要性が生じている。世界保健機関を中心に、いくつかの機関の専門家は、痘瘡ウイルスやポリオウイルスを人工的に製造できる時代になっていることから、病原体研究のあり方や管理のあり方において、これまで想定されていない対応が求められるという認識で一致している。今後、バイオテロ対策において従来の対策に加えて、国際連携のもとにバイオテロ対策を構築していく必要性が生じている。

G7+メキシコの国々の連携に、Global Health Security Action Group-Laboratory Network(GHSAG-LN)という組織が結成されてから久しい。これまで、このフレームの中で、痘瘡ウイルス検査法の診断における有用性、ウイルス性出血検査法の評価、電子顕微鏡による病原体検索の研修、新興感染症の発生を想定した訓練が実施されてきた。今年度においても、エボラウイルス(2014 年流行株)検出法の評価や電子顕微鏡による病原体検索の研修を本研究班の支援のもとに行われた。今後もこのフレームを利用して、バイオテロ対策に資する研究が継続されることが期待される。本研究班の活動の一環として、2015 年に 2 度開催された GHSAG-LN face-to-facing 会議に、研究代表者が出席した。

天然痘が根絶されて久しいことから、天然痘ワクチン(痘瘡ワクチン)を製造できる施設は世界に数える程しかなく、その 1 つ(化血研、熊本)が日本に存在する。しかも、日本で整備されている LC16m8 細胞培養高度弱毒痘瘡ワクチンは、その有効性と高い安全性の特徴を有することから、国際的にも注目されている。痘瘡ウイルスによるバイオテロ対策の重要性は変わらず世界的に存在し、認識されているところである。本研究班で行われている LC16m8 に製造法、安定性の評価、品質管理のあり方に関する研究、オルソボックスウイルス感染症の予防効果に関する研究は、日本国内だけでなく、国際的にも評価が高い。実際、毎年世界保健機関で開催される Advisory Committee for Variola Virus

Research には、本研究班の代表者や分担者が招へいされ、本研究班で実施されている研究成果が発表されている。この研究班の重要性を示す事例と言える。が、特に LC16m8 接種を受けた人々において、感染性の痘瘡ウイルスに対する中和抗体が誘導されること(現在も継続中の研究であり、今年度の報告書には研究成績が記載されていない)が、米国 CDC と本研究班との共同研究によって明らかにされている。

現在の中東や北アフリカにおける社会基盤の崩壊、テロリズムの台頭、大規模新興感染症の発生等、国際社会はいろんな側面で不安定化している。このような状況では、バイオテロ対策の重要性は増すことはあっても、減弱する状況にはない。今後も実効性のあるバイオテロ対策研究を幅広く継続していくことが求められる。

E. 結論

バイオテロに用いられる可能性のある病原体・毒素の迅速診断システム開発(検出法の開発を含む)を継続して行った。また、細胞培養高度弱毒痘瘡ワクチン LC16m8 の有効性、安全性、品質管理検査法、等に関する研究を推進した。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tani H, Fukuma A, Fukushi S, Taniguchi S, Yoshikawa T, Iwata-Yoshikawa N, Sato Y, Suzuki T, Nagata N, Hasegawa H, Kawai Y, Uda A, Morikawa S, Shimojima M, Watanabe H, Saijo M. Efficacy of T-705 (Favipiravir) in the treatment of infections with lethal severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *mSphere*, 1 (1): e00061-15.
- 2) Hotta A, Tanabayashi K, Fujita O, Shindo J, Park CH, Kudo N, Hatai H, Oyamada T, Yamamoto Y, Takano A, Kawabata H, Sharma N, Uda A, Yamada A, Morikawa S. Survey of *Francisella tularensis* in Wild Animals in the Endemic Areas in Japan. *Jpn J Infect Dis.* in press
- 3) Ogawa K, Komagata O, Hayashi T, Itokawa K,

Morikawa S, Sawabe K, Tomita T. Field and laboratory evaluations of the efficacy of DEET repellent against *Ixodes* ticks. *Jpn J Infect Dis.* in press

- 4) Okutani A, Osaki M, Takamatsu D, Kaku Y, Inoue S, Morikawa S. Draft genome sequences of *Bacillus anthracis* strains stored for several decades in Japan. *Genome Announc.* 2015, 3(3). pii: e00633-15.
- 5) Sakai K, Hagiwara K, Omatsu T, Hamasaki C, Kuwata R, Shimoda H, Suzuki K, Endoh D, Nagata N, Nagai M, Katayama Y, Oba M, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Mizutani T, Maeda K. Isolation and Characterization of a Novel Rhabdovirus from a Wild Boar (*Sus scrofa*) in Japan. *Vet Microbiol*, 2015, 179(3-4):197-203.
- 6) Hamamoto N, Uda A, Tobiume M, Park CH, Noguchi A, Kaku Y, Okutani A, Morikawa S, Inoue S. Association between RABV G Proteins Transported from the Perinuclear Space to Cell Surface Membrane and N-glycosylation of the Sequon at Asn204. *Jpn J Infect Dis.* 2015, 68(5): 387-93.
- 7) Yoshikawa T, Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Singh H, Suda Y, Shirabe K, Toda S, Shimazu Y, Nomachi T, Gokuden M, Morimitsu T, Ando K, Yoshikawa A, Kan M, Uramoto M, Osako H, Kida K, Takimoto H, Kitamoto H, Terasoma F, Honda A, Maeda K, Takahashi T, Yamagishi T, Oishi K, Morikawa S, Saijo M. Phylogenetic and Geographic Relationships of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in China, South Korea, and Japan. *J Infect Dis.* 2015, 212(6): 889-98.
- 8) Okamoto M, Miyazawa T, Morikawa S, Ono F, Nakamura S, Sato E, Yoshida T, Yoshikawa R, Sakai K, Mizutani T, Nagata N, Takano J, Okabayashi S, Hamano M, Fujimoto K, Nakaya T, Iida T, Horii T, Miyabe-Nishiwaki T, Watanabe A, Kaneko A, Saito A, Matsui A, Hayakawa T, Suzuki J, Akari H, Matsuzawa T, Hirai H. Emergence of infectious malignant thrombocytopenia in Japanese macaques (*Macaca fuscata*) by SRV-4 after transmission to a novel host. *Sci Rep.* 2015, 5:8850.
- 9) Ching PK, de los Reyes VC, Sualdito MN, Tayag E,

- Columna-Vingno AB, Malbas FF Jr, Bolo GC Jr, Sejvar JJ, Eagles D, Playford G, Dueger E, Kaku Y, Morikawa S, Kuroda M, Marsh GA, McCullough S, Foxwell AR. Outbreak of Henipavirus Infection, Philippines. *Emerg Infect Dis*. 2015, 21(2): 328-31.
- 10) 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.
- 11) 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*. 2015, 96 (Pt 2): 390-4.
- 12) Ikeda-Dantsuji Y, Ohno H, Tanabe K, Umeyama T, Ueno K, Nagi M, Yamagoe S, Kinjo Y, Miyazaki Y. Interferon- promotes phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* but not *Cryptococcus gattii* by murine macrophages. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 21: 831-836, 2015
- 13) Okachi S, Wakahara K, Kato D, Umeyama T, Yagi T, Hasegawa Y. Massive mediastinal cryptococcosis in a young immunocompetent patient. *Respirology Case Reports*. 3: 95-98, 2015
- 14) Sakai K, Sekizuka T, Ami Y, Nakajima N, Kitazawa M, Sato Y, Nakajima K, Anraku M, Kubota T, Komase K, Takehara K, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Kuroda M, Takeda M. A mutant H3N2 influenza virus uses an alternative activation mechanism in Tmprss2 knockout mice by loss of an oligosaccharide in the hemagglutinin stalk region. *J Virol*. ;89(9):5154-8, 2015.
- 15) 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* 35(2):107-21, 2015
- 16) 中島典子: 季節性および鳥インフルエンザウイルス感染症の病理 病理と臨床 2015,33:1146-1153.
- 17) Nagata N, Iwata-Yoshikawa N, Hayasaka D, Sato Y, Kojima A, Kariwa H, Takashima I, Takasaki T, Kurane I, Sata T, Hasegawa H. The pathogenesis of 3 neurotropic flaviviruses in a mouse model depends on the route of neuroinvasion after viremia. *J Neuropathol Exp Neurol*. 74(3):250-260, 2015.
- 18) Adachi Y, Onodera T, Yamada Y, Daio R, Tsuji M, Inoue T, Kobayashi K, Kurosaki T, Ato M, Takahashi Y. Distinct germinal center selection at local sites shapes memory B cell response to viral escape. *J. Exp. Med.* 212: 1709-1723, 2015 doi:10.1084/jem.20142284
- 19) Kitada S, Yoshimura K, Miki K, Miki M, Hashimoto H, Matsui H, Kuroyama M, Ageshio F, Kagawa H, Mori M, Maekura R, Kobayashi K. Validation of a commercial serodiagnostic kit for diagnosing pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease. *Int J Tuberc Lung Dis* 19: 97-103, 2015 doi: 10.5588/ijtld.14.0564
- 20) 小林和夫. 2015. マイコバクテリウム属(抗酸菌). 標準微生物学 第12版(中込治, 神谷茂編) 東京: 医学書院. 276-288. ISBN: 978-4-260-02046-6
- 21) 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.
- 22) 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
- 23) 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
- 24) 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.
- 25) 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
- 26) 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
- 27) 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) 黒田誠 微生物ゲノミクスと公衆衛生学的活用 第89回日本感染症学会学術講演会 モーニングセミナー2 京都 (2015.4)
- 2) 黒田誠 NGS技術による病原体ゲノム情報の大量取得と分子疫学解析への応用 第158回日本獣医学会学術集会・シンポジウム 十和田市 (2015.9)
- 3) 黒田誠 NGSを応用した感染症診断の可能性 第64回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第62回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会 札幌 (2015.10)
- 4) Nakajima N, Sato Y, Kotani O, Suzuki T, Kamei T, Takahashi T, Sata T, Hasegawa H. Modified *In situ* Hybridization AT-tailing to Visualize the Gene Expression in Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissues. 2015 USCAP Annual Meeting (アメリカ) 2015
- 5) Hayashi K, Nakajima N, Sato Y, Katano H, Nagata N, Suzuki T, Tobiume M, Yoshida H, Suzuki Y, Kumasaka T, Sata T, Ariyoshi K, Hasegawa H. Correlations among Histopathological Characteristics, Viral distribution, and Cytokine/Chemokine Expression level within an Individual with A/H1N1pdm09 induced ARDS. 2015 USCAP Annual Meeting (アメリカ)
- 6) Nakajima N, Thach HN, Tuan TA, Nam DH, Kumasaka T, Sato Y, Kawachi S, Hasegawa H, Dien TM, Hai LT. Pathological and molecular biological study of measles-associated pneumonia during measles outbreak in Vietnam in 2014. Pediatric Scientific Conference 2015 (ベトナム)
- 7) Nakajima N, Thach HN, Tuan TA, Nam DH, Kumasaka T, Sato Y, Kawachi S, Hasegawa H, Dien TM, Hai LT. Post-mortem detection of adenovirus type 7 pneumonia in lungs of measles-associated pneumonia fatalities in a pediatric hospital, Hanoi, Vietnam. U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program, (アメリカ) 2016
- 8) 中島典子, 佐藤由子, 熊坂利夫, 藤本嗣人, 花岡希, 片野晴隆, 鈴木忠樹, 長谷川秀樹 麻疹に併発した肺炎で死亡した19例の肺組織の分子病理学的解析. 第104回日本病理学会総会, 名古屋 (2015.5)
- 9) 岩附研子, 中島典子, 柴田昌利, 高橋健太, 佐藤由子, 木曾真紀, 山吉誠也, 伊藤睦美, 塩谷聡子, 大竹正剛, 寒川章久, 伊東祐孝, 長谷川秀樹, 河岡義裕 マイクロミニピッグのインフルエンザ感染モデル動物としての有用性. 第158回日本獣医学会学術集会 青森 (2015.9)
- 10) Nakajima N, Ngoc TH, Sato Y, Hanaoka N, Fujimoto T, Suzuki T, Katano H, Thanh HL, Hasegawa H. Humann Adenovirus Serotype 7-associated pneumonia in fatal cases of measles 第63回日本ウイルス学会学術集会, 福岡 (2015, 11)
- 11) Takeda M, Sakai K, Ami Y, Kitazawa M, Nakajima K, Natthanan S, Anraku M, Nakajima N, Komase K, Takehara K, Hasegawa H, Tashiro M. A natural host model revealed the essential role of the host protease TMPRSS2 for respiratory paramyxovirus pathogenicity. 第63回日本ウイルス学会学術集会, 福岡 (2015, 11)
- 12) Sakai K, Sekizawa T, Ami Y, Kitazawa M, Nakajima K, Nakajima N, Anraku M, Komase K, Takehara K, Hasegawa H, Tashiro M, Kuroda M, Takeda M. The stalk oligosaccharide of influenza A virus hemagglutinin protein modulates protease

- specificity for virus activation and pathogenicity. 第
63 回日本ウイルス学会学術集会, 福岡 (2015,
11)
- 13) 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關す
る日米研究の比較. 第 19 回ワクチン学会学術集
会. 犬山 (2015.11)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

