

・ 総括研究報告

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

所 属 国立感染症研究所ウイルス第一部

研究代表者 西條政幸

研究要旨：研究計画期間の最終年度である H28 年度には，1) 痘瘡ウイルスが用いられるバイオテロに備えた細胞培養痘そうワクチン（LC16m8）に関する研究，2) バイオテロ関連病原体検出法の開発，3) バイオテロにおける臨床的対応に関する研究，4) バイオテロ関連事象発生時に備えた感染研と地方衛生研究所間ネットワーク構築を目的とした研究を実施した。

(1) 細胞培養痘そうワクチン（LC16m8）に関する研究

日本で備蓄されている細胞培養痘そうワクチン LC16m8 (LC16m8 ワクチン) の安全性を確認する 1 方法として、本来の LC16m8 ワクチンのワクチニアウイルスに比較して病原性が高まっていると考えられる Middle Size Plaque (MSP) 形成ウイルスの各ロット（14 ロット）中の含有率を測定した。LC16m8 ワクチンの遺伝学的安定性をより迅速かつ正確に評価する方法として次世代シーケンサー（NGS）技術を導入できるか否か，その有効性を評価した。その有用性が確認された。サル痘ウイルスを用いた感染マウスモデルを作出した。LC16m8 ワクチンの暴露後ワクチンとしての効果を，マウス-エクトロメリアウイルス感染モデルにおいて，LC16m8 株は暴露後投与で効果を示すことが示唆された。

LC16m8 ワクチン接種によって誘導される，ワクチニアウイルスの各抗原に対する抗体誘導を評価するとともに，米国 CDC と共同で痘瘡ウイルスに対する中和抗体誘導能もより詳細に評価した。痘瘡ワクチンに対して中和抗体が誘導されることが初めて証明された。本研究班の研究成績は備蓄されている LC16m8 の安全性と有用性を示すものである。

尚，化血研製造ロット（V03，V04 及び V06）の長期保存安定性試験において，全ての規格試験結果は「適合」であり，現在備蓄されているワクチンの長期安定性も示された。

(2) バイオテロ関連病原体検出法の開発

エボラウイルス遺伝子検出システムの有用性の評価，ベネズエラ馬脳炎ウイルス，東部馬脳炎ウイルス，西部馬脳炎ウイルス遺伝子増幅法，*Paracoccidioides brasiliensis*，*Blastomyces dermatitidis*，*Penicillium marneffeii* 等の DNA を高感度に検出する LAMP 法の開発，黄色ブドウ球菌エンテロトキシン・ボツリヌス A 型毒素・ウェルシュ菌エンテロトキシン・腸炎ピブリオ毒素検出法構築のための抗体の作製，病原体検出するための病理学的検査法（In situ hybridization AT-tailing 法を用いた Zika ウイルスゲノム検出法）の開発，迅速樹脂包埋法，走査電子顕微鏡を利用した新規ウイルス粒子検出法や血中のウイルス粒子の電子顕微鏡による迅速検出法の評価，等の研究により，バイオテロに使用される可能性のある病原体検査法の基盤を強化した。炭疽菌ゲノム情報もちいたゲノム分子系統解析ツール（GcoGSA-BA），デングウイルス遺伝型解析ツールと地理情報を統合した Dengue Genographic Viewer（DGV）を公開し Web 運用するとともに，メタゲノム解析法を用いた環境（公共交通機関の手すり等）中の汚染実態の調査を行い，環境における病原体の存在状況に関するメタゲノムデータを明らかにした。

(3) バイオテロにおける臨床的対応に関する研究

今年度は，実際のバイオテロ遭遇現場で医療従事者が簡便に参照できる資料の必要性を考慮し，「バイオテロを疑う時シート」を作成するとともに，豊富に写真や図表を掲載するなど一覽性・視認性に優れた対応シートを作成し，平成 28 年 3 月に全国の病院（約 990 施設）へ配布した。

(4) バイオテロ関連事象発生時に備えた感染研と地方衛生研究所間等とのネットワークの構築

特定病原体検査対応状況を把握するため，アンケート調査を実施した。地方衛生研究所全国協議会や同感染症対策部会で当該研究の理解や協力を得た。課題の克服改善策を示した。一部の地衛研の参加のもとで，健康危機を想定した検査対応に関する模擬訓練を実施した。

研究分担者

田島茂・国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官

下島昌幸・国立感染症研究所ウイルス第一部第一室・室長

吉河智城・国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官

森川茂・国立感染症研究所獣医科学部・部長

梅山隆・国立感染症研究所真菌部・主任研究官

黒田誠・国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター・センター長

中島典子・国立感染症研究所感染病理部・室長

永田典代・国立感染症研究所感染病理部・室長

小林和夫・堺市衛生研究所・所長

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・教授

鯉淵智彦・東京大学医科学研究所・附属病院感染免疫内科・講師

松本哲哉・東京医科大学微生物学講座・教授

金谷泰宏・国立保健医療科学院健康危機管理研究部・部長

横手公幸・一般財団法人化学及血清療法研究所・国際戦略室・室長

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、「パ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」と「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。

病原体の迅速検出・同定法の基盤整備は、パイオテロの脅威に対抗する上でとても重要である。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迅速で、かつ、正確な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。

また、パイオテロの早期検知には一次対応機関で働く医師等のパイオテロに関する知識の普及と臨床診断支援が必須である。本研究の目標は以下の通りである。

さらに、ひとたびパイオテロ事象（疑い事例を含む）が発生した場合には、厚生労働省や政府機関、国立感染症研究所、地方衛生研究所等が連携して対応する必要がある。それには平時からこれらの関係機関の連携のあり方を検討し、問題点を明ら

かにして、パイオテロ事象が発生した場合に備えておかなければならない。上記の目的のために、以下の研究を実施した。

- 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
- 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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、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
- 6) パ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の確立（一般公開を含む）
- 7) 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、等の性状解析
- 8) 備蓄されている LC16m8 ワクチンの各ロットにおける MSP 含有率の測定
- 9) LC16m8 ワクチンの効率的製造法と備蓄のあり方の検討

B. 研究方法

1. 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) 日本で製造・備蓄されている痘そう LC16m8 ワクチン MSP 測定法の開発と日本で製造・備蓄されている痘そう LC16m8 ワクチン中の MSP 含有量の測定
LC16m8 ワクチン由来 MSP と LC16m8 ワクチンウイルスの性状の違いを明らかにし、その特徴の違いを応用して MSP 含有量を測定した。
 - 2) LC16m8 ワクチンのポックスウイルス感染暴露後効果に関する研究
オルソポックスウイルスに分類されるエクトロメリアウイルス (ECTV) をマウスに攻撃感染させ、その直後に LC16m8 ワクチン、またはその親株の Lister 株ワクチンを接種してその効果を解析した。
 - 3) LC16m8 ワクチン中に含まれる MSP ウイルスの定量的検出のための NGS 法の導入の評価
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、MSP の遺伝子変異特異的配

- 列を 3' 末端とする primer を用いた real-time PCR を導入することで定量的に検出可能な real-time PCR 法を開発した。
- 4) サル痘ウイルス感染マウスモデルの開発
抗 Ly6G 抗体をマウスに投与することにより好中球枯渇させてから、サル痘ウイルス Zr-599 株を 1 匹あたり 10^6 PFU ウイルス量 (100 μ l) を頸背部に皮下接種経路で感染させた。対照群には細胞培養液を接種した。その後、4 日に 1 回の間隔で合計 3 回の抗体投与を行った。ウイルス接種 7 日目と 16 日目に動物を安楽殺し、病理学的解析を行った。
 - 5) LC16m8 ワクチン接種による効果・安全性等に関する調査
ヒトにおける長期免疫、マウスにおける強毒株接種時の防御、第 1 世代ワクチンとの比較、繰り返し接種の効果、長期の効果等の解析を行った。
 - 6) ヒトにおける LC16m8 ワクチン接種によるサル痘ウイルスに対する中和抗体の誘導に関する研究
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サル痘ウイルスに対する中和抗体について再調査した。
2. 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) ベネズエラ馬脳炎ウイルス、東部馬脳炎ウイルス、西部馬脳炎ウイルス遺伝子増幅法の開発
2010 年以降に報告された論文を参考に、これらのウイルスゲノムを検出するリアルタイム RT-PCR 用プライマーおよびプローブを製作した。ウイルス粒子から精製したウイルスゲノムを陽性コントロールとしてゲノムの増幅性および特異性を検討した。
 - 2) エボラウイルス等検出法の外部評価への参加
Robert Koch Institute, Bernard Notch Institute, Philipps University が調製した、陰性コントロール(ウイルスが含まれていないもの)も含む 11 種の不活化サンプルからなる Ebola Proficiency Panel-II を、感染研ウイルス第一部において整備されているエボラウイルス、マールブルグウイルス遺伝子検出法に供し、検査を実施した。
 - 3) 臨床検体からコクシジオイデス属などの高病原性真菌 DNA の検出法の開発
Paracoccidioides brasiliensis, *Blastomyces dermatitidis*, *Penicillium marneffeii* DNA の LAMP 法による高感度検出系 (LAMP 法) の開発を試みた。
 - 4) 環境中のメタゲノム解析
東京近郊を周回する大江戸線の各駅から手すり等の環境サンプルを採取し、次世代シーケンサーを用いたメタゲノム DNA 解析法にて、特徴的な病原体や薬剤耐性菌の検出を試みた。
 - 5) DNA ウイルス核酸の検出が可能な ISH-AT 法の確立
ホルマリン固定パラフィン包埋剖検組織標本、感染細胞標本を使用した。(アデノウイルス感染細胞は国立感染症研究所・花岡博士、B 型肝炎ウイルス (HBV) 感染細胞は国立感染症研究所・渡士博士から分与) ウイルスゲノム情報をもとに検出用のオリゴプローブを作成し ISH-AT 法で検出を試みた。
 - 6) 病原体の電子顕微鏡学的迅速検出法の確立
電子顕微鏡によるウイルス診断法の精度向上のため、教育訓練の一環としてロベルト・コッホ研究所による外部評価に参加した。
 - 7) バイオテロに関連する可能性のある細菌性毒素検出のためのシステム開発
モルモット抗 TRH 血清、モルモット抗 BoNT/A_{Hc} 血清を、モルモットにそれぞれの精製された抗原を免疫して作製した。また、抗ウェルシュ菌毒素 (CPE) 抗体を、組換え発現 CPE 抗原をウサギに免疫して作製した。
3. 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と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
バイオテロ対応ホームページをアップデートするとともに、バイオテロ遭遇現場で医療従事者が簡便に参照できる資料の必要性を考慮し、「バイオテロを疑う時シート」を作成した。
 4. 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
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 地区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」、「5. NBC テロ発生時の緊急連絡体制の構築や健

「康危機発生を想定した模擬訓練」の視点から、アンケート調査により、課題を抽出し、課題の改善などを検討した。

C. 研究結果

1. 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) 日本で製造・備蓄されている痘そう LC16m8 ワクチン MSP 測定法の開発と日本で製造・備蓄されている痘そう LC16m8 ワクチン中の MSP 含有量の測定

備蓄されはじめた初期の乾燥細胞培養痘そうワクチンロット V01～V05 には比較的高い割合で MSP 形成ウイルスが含まれているが、それ以降に製造され備蓄されているワクチンの各ロットにはほとんど含まれていないことが確認された。

- 2) LC16m8 ワクチンのボックスウイルス感染暴露後効果に関する研究

クトロメリアウイルス暴露直後に LC16m8、または *Listeria* を接種すれば死亡率が減少する傾向が確認された。

- 3) LC16m8 ワクチン中に含まれる MSP ウイルスの定量的検出のための NGS 法の導入の評価

主要な MSP と LC16m8 株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。ワクチン中の MSP のうち L1、L4、L5 の 3 種の頻度の高い MSP を検出した結果、本 PCR はバイオアッセイよりも遥かに簡便に含有率を算出できた。

- 4) サル痘ウイルス感染マウスモデルの開発

抗 Ly6G 抗体をマウスに投与することにより好中球枯渇させると、マウスにおいてサル痘ウイルスが増殖し、かつ、病変形成が亢進することが明らかとなった。

- 5) LC16m8 ワクチン接種による効果・安全性等に関する調査

LC16m8 株はマウスおよびヒトにおいて、第 1 世代ワクチンと同様に、既知の中和抗体を含む多様な抗体を誘導した。LC16m8 株は安全性・有効性を兼ね備えたワクチン株である。

- 6) ヒトにおける LC16m8 ワクチン接種によるサル痘ウイルスに対する中和抗体の誘導に関する研究

痘そうワクチン LC16m8 のサル痘ウイルスに対する中和抗体免疫誘導能が確認された。

2. 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) ベネズエラ馬脳炎ウイルス、東部馬脳炎ウイルス、西部馬脳炎ウイルス遺伝子増幅法の開発

デザインされた各々のプライマー・プローブセットを用いたリアルタイム RT-PCR 法により、それぞれのウイルス遺伝子の標的遺伝子が特異的に増幅された。今回新たに作製されたプライマー・プローブセットが適切に機能することが確認された。

- 2) エボラウイルス等検出法の外部評価への参加

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法がかなり高い感度と特異度を有していることが判明した。市販キットは試薬が揃っており準備が容易であるが、価格が高くバイオテロで多検体を処理しなくてはならないような状況には不向きであり、詳細な塩基配列情報も得られる現行の検査法の方がより適していると考えられた。

- 3) 臨床検体からコクシジオイデス属などの高病原性真菌 DNA の検出法の開発

P. brasiliensis および *P. marneffei* については、既報の論文のプライマーセットの導入により、期待通りの検出感度を確保でき、BSL3 真菌検出システムへの組込みに応用できることが示された。しかしながら、新たに設計した *B. dermatitidis* の LAMP プライマーについては、検出感度が低く、実用レベルに達しなかった。

- 4) 環境中のメタゲノム解析

調査対象とした大江戸線においては、ヒト配列が有意な採取箇所やレンサ球菌属配列の多い駅等へ大まかに分類されることが分かった。手すり等の表面は利用者が直接触れる可能性があり、基本的にヒト配列が際立って多い場所であってもおかしくないと推測される一方、ヒト常在菌の *Streptococcus* レンサ球菌属の配列が多数を占める採取箇所もあった。

- 5) DNA ウイルス核酸の検出が可能な ISH-AT 法の確立

アデノウイルス (ADV) 及び B 型肝炎ウイルス (HBV) の検出の確立を試みた。ADV に関しては型特異的な検出を目指している。HBV に関しては、肝癌発生に深く関与していると考えられている cccDNA の検出を目標に様々なプローブの作成、組織の処理法を検討中である。細胞標本及び臨床検体の解析を行って

おり、ADV に関しては双方でウイルスゲノムの検出に成功した。

- 6) 病原体の電子顕微鏡学的迅速検出法の確立
電子顕微鏡によるウイルスの同定は、その粒子の大きさ、形状、エンベロープの有無と形状、検体の由来とその臨床症状がポイントとなることが確認された。
- 7) バイオテロに関連する可能性のある細菌性毒素検出のためのシステム開発
得られた抗 TRH モルモット血清、抗 BoNT/A_{Hc} モルモット血清、ウサギ抗ウェルシュ菌毒素(CPE)抗体は、抗原検出法(例えばイムノクロマト法、ELISA 法、ウエスタンブロット法等)に応用できることが示された。

3. 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と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

- 1) バイオテロ対応ホームページのアップデート
インターネット上で最新の生物テロ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』は、これまでパスワードを知る感染症専門医等のみが閲覧可能であったが、今年度から一般公開を行った。
- 2) 「バイオテロを疑う時シート」の作成
実際のバイオテロ遭遇現場で医療従事者が簡便に参照できる資料の必要性を考慮し、「バイオテロを疑う時シート」を作成した。豊富に写真や図表を掲載するなど一覧性・視認性に優れた対応シートを作成し、平成 28 年 3 月に全国の病院(約 990 施設)へ配布した。

4. 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

多くの課題が抽出されたが、これら課題の改善には地衛研、各地区支部内、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。2016 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。今後に残された主要課題として、1) 特定病原体等を原因とする 1 類感染症(クリミア・コンゴ出血熱、痘瘡、南米出血熱、ラッサ熱)、2 類感染症(結核、中東呼吸器症候群、鳥

インフルエンザ H7N9)や 4 類感染症(17 疾患)に関する病原体検出マニュアルの整備、2) 特定病原体等の規定対象外であるが、アメリカ合衆国 CDC がバイオテロの候補物質(Category B)として指定している毒素(細菌毒素:黄色ブドウ球菌やウエルシュ菌エンテロトキシンや植物毒素:リシン)に関し、所管の明確化や検出マニュアルの整備、3) テロ発生に際し、迅速で円滑な対応をするため、緊急連絡・対応体制の構築や NBC テロを含む健康危機の発生を想定した対応模擬訓練の実施が掲げられる。

【倫理面への配慮】

本研究にて行われた動物実験は国立感染症研究所動物実験委員会の審議を受け適切であると承認されている。

D. 考察

近年、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。2014-15 年には大規模なエボラウイルス病の流行が西アフリカで流行した。また、中東で流は中東呼吸器症候群(MERS)の流行が初めて確認され、その流行は今でも続いている。致命率の高い病原体はバイオテロ病原体として用いられるリスクがあることを理解する必要がある。迅速で正確な診断システム開発が急務となる。

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が生じている。感染症のあり方とバイオテロ対策のあり方が、刻々と変化していることを示している。

本年度の研究を通じて LC16m8 ワクチンの性状、有効性と安全性に関して新知見が加えられた。

日本で備蓄されている天然痘ワクチン LC16m8 の研究においては、痘瘡ウイルスに曝露された後に、早期に LC16m8 ワクチン接種することで天然痘の症状を軽減化することが可能であることが示唆される研究成績が得られた。また、ヒトに LC16m8 ワクチン接種することで、西アフリカ等で流行しているヒトサル痘(サル痘ウイルスによるヒトにおける感染症)の原因ウイルスであるサル痘ウイルスに中和抗体が誘導されることが再確認された。世界的にも安全性が高いと評価されている本ワクチンが、ヒトサル痘に対

して使用されることの正当性を示唆する成績も示された。

バイオテロ関連病原体検査法，迅速検査法の基盤が強化された。アメリカ大陸において流行しているアルファウイルス群による脳炎が，日本を含む非流行地で流行するリスクがあり，それに迅速に対応できるようになった。また，バイオリスク関連真菌感染症への対応のための検査法の開発，病理学的に病原体を正確に，かつ，比較的迅速に検出するための ISH-AT tailing 法を，これまで RNA ウィルスに応用するものであったものと，DNA ウィルスにも応用できるようにした。電子顕微鏡で病原体を迅速に検出するための訓練も Global Security Health Action Group-Laboratory Network 活動の協力を得て，実施された。また，感染研において整備されているエボラウイルス検出システムの外部評価も本活動の協力のもとに実施された。

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，オルソポ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。今年度も世界保健機関が主催する Advisory Committee for Variola Virus Research において，本研究班で実施されている研究成果が発表された。この研究班の重要性を示す事例と言える。

バイオテロ対策における医療機関の協力を得られやすくするためのホームページを充実させ，一般公開させた。さらに全国の医療機関にバイオテロ臨床マニュアルとして応用できる「バイオテロを歌額時シート」を配付した。また，バイオテロ事象が発生したり，その恐れのある時の厚労省，感染研，地方衛生研究所の連携のあり方における問題点を洗い出したりして，今後の対策の強化に必要な提言が可能となった。

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。バイオテロ事象が発生した場合の，医療機関，地方衛生研究所との連携のあり方を明らかにするとともに，一部実践した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Taniguchi S, Maeda K, Horimoto T, Masangkay JS, Puentespina Jr. R, Alvarez J, Eres E, Cosico E, Nagata N, Egawa K, Singh H, Fukuma A, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Tsuchiaka S, Omatsu T, Mizutani T, Une Y, Yoshikawa Y, Shimojima M, Saijo M, Kyuwa S. First isolation and characterization of Pteropine orthoreoviruses in fruit bats in the Philippines. *Archives of Virology* (in press)
- 2) Iizuka I, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Fukushi S, Ogata M, Morikawa S, Hasegawa H, Mizuguchi M, Kurane I, Saijo M. A single vaccination of nonhuman primates with highly attenuated smallpox vaccine, LC16m8, provides long-term protection against monkeypox. *Japanese Journal of Infectious Diseases* (in press)
- 3) Taniguchi S, Fukuma A, Tani H, Fukushi S, Saijo M, Shimojima M. A neutralization assay with a severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strain that makes plaques in inoculated cells. *Journal of Virological Methods*. 244:4-10, 2017
- 4) Yoo JR, Heo ST, Park D, Kim H, Fukuma A, Fukushi S, Shimojima M, Lee KH. Family Cluster Analysis of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Infection in Korea. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 95(6):1351-1357, 2016
- 5) Singh H, Shimojima M, Fukushi S, Fukuma A, Tani H, Yoshikawa T, Taniguchi S, Yang M, Sugamata M, Morikawa S, Saijo M. Serologic assays for the detection and strain identification of Pteropine orthoreovirus. *Emerging Microbes and Infection* 5:e44. doi: 10.1038/emi.2016.35, 2016

- 6) Kurihara S, Satoh A, Yu F, Hayasaka D, Shimojima M, Tashiro M, Saijo T, Takazono T, Imamura Y, Miyazaki T, Tsukamoto M, Yanagihara K, Mukae H, Saijo M, Morita K, Kohno S, Izumikawa K. The world first two cases of severe fever with thrombocytopenia syndrome: An epidemiological study in Nagasaki, Japan. *Journal of Infection and Chemotherapy* 22(7):461-465, 2016
- 7) Kitao A, Ieki R, Takatsu H, Tachibana Y, Nagae M, Hino T, Nakaji H, Shimojima M, Saijo M, Okayama M, Kenzaka T. Severe fever with thrombocytopenia syndrome presenting as hemophagocytic syndrome: two case reports. *Springerplus* 5:361, 2016
- 8) Suda Y, Fukushi S, Tani H, Murakami S, Saijo M, Horimoto T, Shimojima M. Analysis of the entry mechanism of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, using a vesicular stomatitis virus pseudotyping system. *Archives of Virology* 161(6):1447-1454, 2016
- 9) Kawagishi T, Kanai Y, Tani H, Shimojima M, Saijo M, Matsuura Y, Kobayashi T. Reverse genetics for fusogenic bat-borne orthoreovirus associated with acute respiratory tract infections in humans: Role of outer capsid protein C in viral replication and pathogenesis. *PLoS Pathogens* 12(2):e1005455, 2016.
- 10) Tani H, Shimojima M, Fukushi S, Yoshikawa T, Fukuma A, Taniguchi S, Morikawa S, Saijo M. Characterization of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus glycoprotein-mediated entry. *Journal of Virology* 90: 5292-5301, 2016
- 11) Fukuma A, Fukushi S, Yoshikawa T, Tani H, Taniguchi S, Kurosu T, Egawa K, Suda Y, Singh H, Nomachi T, Gokuden M, Ando K, Kida K, Kan M, Kato N, Yoshikawa A, Kitamoto H, Sato Y, Suzuki T, Hasegawa H, Morikawa S, Shimojima M, Saijo M. Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Antigen Detection Using Monoclonal Antibodies to the Nucleocapsid Protein. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10(4):e0004595, 2016
- 12) Kimura M, Une Y, Suzuki M, Park E-S, Imaoka K and Morikawa S. Isolation of *Brucella inopinata*-like bacteria from White's and Denny's tree frogs. *Vector Borne Zoonotic Dis* (in press)
- 13) Park ES, Suzuki M, Kimura M, Mizutani H, Saito R, Kubota N, Hasuike Y, Okajima J, Kasai H, Sato Y, Nakajima N, Maruyama K, Imaoka K, Morikawa S. Epidemiological and pathological study of feline morbillivirus infection in domestic cats in Japan. *BMC Veterinary Research* 12(1):228, 2016
- 14) Zamoto-Niikura A, Morikawa S, Hanaki KI, Holman PJ, Ishihara C. *Ixodes persulcatus* ticks as a vector for *Babesia microti* U. S. lineage in Japan. *Applied Environmental Microbiology* 82(22):6624-6632, 2016
- 15) Arai S, Taniguchi S, Aoki K, Yoshikawa Y, Kyuwa S, Tanaka-Taya K, Masangkay JS, Omatsu T, Puentespina R Jr, Watanabe S, Alviola P, Alvarez J, Eres E, Cosico E, Quibod MN, Morikawa S, Yanagihara R, Oishi K. Molecular phylogeny of a genetically divergent hantavirus harbored by the Geoffroy's rousette (*Rousettus amplexicaudatus*), a frugivorous bat species in the Philippines. *Infection and Genetic Evolution* 45:26-32, 2016
- 16) Uda A, Sharma N, Takimoto K, Deyu T, Koyama Y, Park ES, Fujita O, Hotta A, Morikawa S. Pullulanase Is Necessary for the Efficient Intracellular Growth of *Francisella tularensis*. *PLoS One* 11(7):e0159740, 2016
- 17) Arai S, Kang HJ, Gu SH, Ohdachi SD, Cook JA, Yashina LN, Tanaka-Taya K, Abramov SA, Morikawa S, Okabe N, Oishi K, Yanagihara R. Genetic Diversity of Artybash Virus in the Laxmann's Shrew (*Sorex caecutiens*). *Vector Borne Zoonotic Diseases* 16(7):468-475, 2016
- 18) Hotta A, Fujita O, Uda A, Yamamoto Y, Sharma N, Tanabayashi K, Yamada A, Morikawa S. Virulence of Representative Japanese *Francisella tularensis* and Immunologic Consequence of Infection in Mice. *Microbiology and Immunology* 60(3):168-176, 2016
- 19) Kaneyuki S, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Taniguchi S, Fukuma A, Shimojima M, Kurosu T, Morikawa S, Saijo M. Ulcerative lesions with hemorrhage in a patient with severe

- fever with thrombocytopenia syndrome observed via upper gastrointestinal endoscopy. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 69(6): 525-527, 2016
- 20) 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. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 69 (5):431-434, 2016
- 21) 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. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 69(2):131-134, 2016
- 22) Arafa AS, Yamada S, Imai M, Watanabe T, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Kiso M, Sakai-Tagawa Y, Ito M, Imamura T, Nakajima N, Takahashi K, Zhao D, Oishi K, Yasuhara A, Macken CA, Zhong G, Hanson AP, Fan S, Ping J, Hatta M, Lopes TJ, Suzuki Y, El-Husseiny M, Selim A, Hagag N, Soliman M, Neumann G, Hasegawa H, Kawaoka Y. Risk assessment of recent Egyptian H5N1 influenza viruses. *Scientific Reports* 6:38388, 2016
- 23) Iwatsuki-Horimoto K, Nakajima N, Shibata M, Takahashi K, Sato Y, Kiso M, Yamayoshi S, Ito M, Enya S, Otake M, Kangawa A, da Silva Lopes TJ, Ito H, Hasegawa H, Kawaoka Y. The microminipig as an animal model for influenza A virus infection. *Journal of Virology* 91(2):e01716-16, 2017
- 24) Kotani O, Suzuki T, Yokoyama M, Iwata-Yoshikawa N, Nakajima N, Sato H, Hasegawa H, Taguchi F, Shimizu H, Nagata N. Intracerebral inoculation of mouse-passaged Saffold virus type 3 affects cerebellar development in neonatal mice. *Journal of Virology* 90(21):10007-10021, 2016
- 25) Sakai K, Ami Y, Nakajima N, Nakajima K, Kitazawa M, Anraku M, Takayama I, Sangsriratanakul N, Komura M, Sato Y, Asanuma H, Takashita E, Komase K, Takehara K, Tashiro M, Hasegawa H, Odagiri T, Takeda M. TMPRSS2 Independency for Haemagglutinin Cleavage In Vivo Differentiates Influenza B Virus from Influenza A Virus. *Scientific Reports* 6:29430, 2016
- 26) Hayashi K, Yoshida H, Sato Y, Tobiume M, Suzuki Y, Ariyoshi K, Hasegawa H, Nakajima N. Histopathologic findings of lung with A/H1N1pdm09 infection-associated ARDS in the post-pandemic season. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 70(2):197-200, 2017
- 27) Hai Le T, Thach HN, Tuan TA, Nam DH, Dien TM, Sato Y, Kumasaka T, Suzuki T, Hanaoka N, Fujimoto T, Katano H, Hasegawa H, Kawachi S, Nakajima N. Adenovirus Type 7 Pneumonia in Children Who Died from Measles-Associated Pneumonia, Hanoi, Vietnam, 2014. *Emerging Infectious Disease* 22(4):687-690, 2016
- 28) Kotani O, Naeem A, Suzuki T, Iwata-Yoshikawa N, Sato Y, Nakajima N, Hosomi T, Tsukagoshi H, Kozawa K, Hasegawa H, Taguchi F, Shimizu H, Nagata N. Neuropathogenicity of Two Saffold Virus Type 3 Isolates in Mouse Models. *PLoS One* 11(2):e0148184, 2016
- 29) Furihata S, Matsumura T, Hirata M, Mizutani T, Nagata N, Kataoka M, Katayama Y, Omatsu T, Matsumoto H, Hayakawa Y. Characterization of Venom and Oviduct Components of Parasitoid Wasp *Asobara japonica*. *PLoS One* 11(7) e0160210, 2016
- 30) Onodera, T., A. Hosono, T. Odagiri, M. Tashiro, S. Kaminogawa, Y. Okubo, T. Kurosaki, M. Ato, K. Kobayashi, and Y. Takahashi. 2016. Whole-virion influenza vaccine recalls an early burst of high-affinity memory B cell response through Toll-like receptor signaling. *Journal of Immunology* 196: 4172-4184, 2016
- 31) Aryantini NP, Yamasaki E, Kurazono H, Sujaya IN, Urashima T, Fukuda K. In vitro safety assessments and antimicrobial activities of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from a fermented mare's milk. *Animal Science Journal* (in press)
- 32) Nakano M, Yahiro K, Yamasaki E, Kurazono H, Akada J, Yamaoka Y, Niidome T, Hatakeyama M, Suzuki H, Yamamoto T, Moss J, Isomoto H, Hirayama T. *Helicobacter*

- pylori* VacA, acting through receptor protein tyrosine phosphatase, is crucial for CagA phosphorylation in human duodenum carcinoma cell line AZ-521. *Disease Models & Mechanisms* 19(12): 1473-1481, 2016
- 33) Watanabe S, Matsumura K, Iwai H, Funatogawa K, Haishima Y, Fukui C, Okumura K, Kato-Miyazawa M, Hashimoto M, Teramoto K, Kirikae F, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T. A Mutation in the 16S rRNA Decoding Region Attenuates the Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity* 84:2264-2273, 2016
- 34) Fujikura Y, Yuki A, Hamamoto T, Ichimura S, Kawana A, Ohkusu K, Matsumoto T. Evaluation and validity of a polymerase chain reaction-based open reading frame typing method to dissect the molecular epidemiology for *Acinetobacter baumannii* in an epidemiologic study of a hospital outbreak. *American Journal of Infection and Control* 44(11):e275-e278, 2016
- 35) Yonetani S, Ohnishi H, Ohkusu K, Matsumoto T, Watanabe T. Direct identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF MS using an in-house saponin method. *International Journal of Infectious Diseases* 52:37-42, 2016
- 36) Miyazaki H, Shibuya R, Midorikawa N, Chang B, Ohnishi M, Matsumoto T. Serotype distribution and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in Japan after introduction of the routine immunization program. *Journal of Infection and Chemotherapy* (in press)
2. 学会発表
- 1) 西條政幸. ヒト由来ウイルス感染症と動物由来ウイルス感染症の相違および感染症対策のあり方. 第90回日本感染症学会総会・学術講演会, 仙台, 2016年4月
- 2) 森川茂, 棚林清, 西條政幸. 国立感染症研究所のBSL-4施設が大臣指定を受けるまでの道のりと今後の施設内での業務等について. 第16回日本バイオセーフティ学会学術総会・学術集会. 大宮, 2016年10月
- 3) Yoshikawa T, Fujii Hi, Shibamura M, Omura N, Harada S, Yamada S, Saijo M. Recovery of infectious vaccinia virus from a bacterial artificial chromosome, which retains the full-length viral genome of a strain, LC16m8. 第64回日本ウイルス学会学術集会, 札幌 2016年10月
- 4) Egawa K, Shimojima M, Taniguchi S, Nagata N, Tani H, Yoshikawa T, Kurosu T, Fukushi S, Saijo M. Pathogenicity of human-origin Pteropine orthoreovirus (PRV) and bat-origin PRV in BALB/c mice. 第64回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2016年10月
- 5) 伊藤(高山)睦代, 林昌宏, 森本金次郎, 堀谷まどか, 山口幸恵, 垣内五月, 塩田(飯塚)愛恵, Posadas Herrera Guillermo, 西條政幸. アレナウイルスに対する非増殖型組換え狂犬病ウイルスワクチンの防御能. 第64回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2016年10月
- 6) Kuroasu T, Okuzaki D, Limkittikul K, Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Saijo M. Transcriptome analysis using a fatal mouse model for severe dengue. 第64回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2016年10月
- 7) Kawachi K, Tani H, Shimojima M, Fukushi S, Kurosu T, Kamitani W, Saijo M. Determination of the amino acid residue important for fusion of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus glycoprotein. 第64回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2016年10月
- 8) Shinomiya H, Kimura T, Fukuma A, Shimojima M, Yamashita Y, Mizota F, Yamashita M, Otsuka Y, Kan M, Saijo M. Seroprevalence of severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) virus antibodies in SFTS endemic areas of Ehime prefecture, Japan. 第64回日本ウイルス学会学術集会, 札幌 2016年10月
- 9) Egawa K, Shimojima M, Taniguchi S, Nagata N, Tani H, Yoshikawa T, Kurosu T, Fukushi S, Saijo M. Pathogenicity of human-origin Pteropine orthoreovirus (PRV) and bat-origin PRV in BALB/c mice. 第64回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2016年10月
- 10) Kawagishi T, Kanai Y, Tani H, Shimojima M, Saijo M, Matsuura Y, Kobayashi T. Nelson Bay Orthoreovirus S1 gene segment determines strain-specific differences in viral infectivity and pathogenesis. 第

- 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2016 年 10 月
- 11) Shiota T, Li T, Yoshizaki S, Nishimura Y, Shimizu H, Shimojima M, Saijo M, Wakita T, Ishii K. Molecular characterization of the hepatitis E virus receptor candidate. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌 2016 年 10 月
 - 12) Fukushi S, Fukuma A, Tani H, Kurosu T, Taniguchi S, Egawa K, Shimojima M, Shirato K, Mastuyama S, Sentsui H, Saijo M. Vesicular stomatitis virus pseudotype-based assay for detecting MERS-CoV neutralizing antibody responses. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌 2016 年 10 月
 - 13) Watanabe S, Edenborough K, Tachedjian M, Todd S, Klein R, Shimojima M, Marsh G. Establishment of an efficient reverse genetics system for Nipah virus Bangladesh strain. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2016 年 10 月
 - 14) Shimojima M, Suda Y, Dowall S, Horimoto T, Saijo M, Hewson R. Development of a novel diagnostic assay using VSV for detection of neutralizing activity to CCHFV. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2016 年 10 月
 - 15) Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Fukushi S, Kurosu T, Koyama Y, Uda A, Morikawa S, Komeno T, Nakajima N, Furuta Y, Shimojima M, Saijo M. Therapeutic effects of favipiravir (T-705) against severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection in a mouse lethal model. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2016 年 10 月
 - 16) 渡辺俊平, 下島昌幸, Glenn A. Marsh. ニパウイルス, バングラディッシュ株の組換えウイルス作出系の確立. 第 159 回日本獣医学会学術集会, 藤沢市, 2016 年 9 月
 - 17) 江川和孝, 下島昌幸, 谷口怜, 永田典代, 谷英樹, 黒須剛, 吉河智城, 福土秀悦, 西條政幸. BALB/c マウスにおけるヒト由来およびコウモリ由来プテロパインオールソレオウイルスの病原性解析. 第 159 回日本獣医学会学術集会, 藤沢市, 2016 年 9 月
 - 18) 田子さやか, 井口成一, 相野田祐介, 平井由児, 鷺澤 豊, 後藤亜江子, 柄澤利子, 鶴岡直樹, 渡辺 哲, 亀井克彦, 名木 稔, 梅山 隆, 宮崎義継, 菊池 賢, 米国カリフォルニア州ベーカーズフィールド滞在後に発症した難治性中耳炎の一例, 第 90 回日本感染症学会総会, 仙台, 2016 年 4 月
 - 19) Nakajima N, Hamamatsu A, Hayashi K, Sato Y, Kumasaka T, Tobiume M, Hasegawa H. Severe lung injury associated with A/H1N1 pdm09 infection in the post-pandemic season. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2016 年 10 月
 - 20) 鈴木忠樹, 片野晴隆, 高橋健太, 佐藤由子, 中島典子, 長谷川秀樹. 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) の病理解析. 第 105 回日本病理学会総会, 仙台, 2016 年 5 月
 - 21) 酒井宏治, 中島典子, 駒瀬勝啓, 竹田誠. 呼吸病ウイルスの病原性発現に関わる宿主プロテアーゼ TMPRSS2 の意義. 第 57 回日本臨床ウイルス学会, 福島, 2016 年 5 月
 - 22) 山崎栄樹, 綿引正則, 磯部順子, 佐多徹太郎, 倉園久生. 腸管出血性大腸菌による国内集団食中毒事件患者の糞便中志賀毒素の定量的解析. 第 37 回日本食品微生物学会学術総会, 東京都, 2016 年 9 月
 - 23) 山崎栄樹, 綿引正則, 磯部順子, 佐多徹太郎, 倉園久生. 国内 EHEC 集団食中毒事件患者の糞便中志賀毒素の定量的解析. 第 20 回 EHEC 感染症研究会, 富山県, 2016 年 11 月
 - 24) Yamasaki E, Watahiki M, Isobe J, Sata T, Kurazono H. Quantitative detection of Shiga toxins directly from stool specimens of patients associated with an outbreak of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Japan. 51st US-Japan Joint Panel Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections, ソウル (韓国), 2017 年 2 月
 - 25) 山崎栄樹, 奥村香世, 江崎孝行, 倉園久生. 生物テロに用いられる細菌・毒素の検出法. 第 90 回日本細菌学会総会, 仙台, 2017 年 3 月
 - 26) Nakamura I, Matsumoto I. Improving hand hygiene behavior by scenario based simulation, ASM Microbe 2016, Boston, June 2016
 - 27) 江藤亜紀子, 上村千草, 金原知美, 齋藤智也, 横手公幸, 金谷泰宏. 天然痘ワクチン LC16m8 による感染防御成立時の抗体産生の網羅的解析. 第 20 回ワクチン学会学術集会, 東京,

2016年10月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

3. その他

出願

発明者：山崎栄樹，倉園久夫

出願番号：特願 2016-121670

発明の名称：サルモネラ属菌の血清型判別用
プローブ及びプライマー並びにその使用