

. 分担研究報告

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

分担報告書

研究統括，バイオテロ対策における国際連携のあり方の検討：
国家備蓄されている弱毒痘そうワクチンの各ロットの安全性に関する検討としての
Middle Size Plaque 形成ウイルス含有量の解析

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：痘瘡ウイルスが用いられるバイオテロに備えて日本では弱毒生細胞培養痘そうワクチン (LC16m8) が備蓄されている。このワクチンは日本で開発された高度に弱毒化された痘瘡ワクチンであり、その安全性と有効性から国際的に注目されているワクチンの 1 つである。LC16m8 の B5R 遺伝子に変異が認められることが安全性の因子の 1 つである。しかし、LC16m8 を増殖させる過程で B5R 遺伝子変異が消失して、性質に変化が生じ、病原性が高まるウイルス（ことが知られている）。そこで日本で製造・備蓄されている痘そうワクチン LC16m8 の各ロット中の Middle Size Plaque (MSP) 形成ウイルス含有量を測定した。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。

また、第 18 回世界保健機関痘瘡ウイルス研究専門家会議 (Advisory Committee on Variola Virus Research) および Emerging Disease Clinical Assessment and Response Network (EDCARN)（ともに世界保健機関）に参加するとともに、バイオテロ対策に資する情報を収集した。

研究協力者

福士秀悦・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
黒須剛・国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官
緒方もも子・国立感染症研究所ウイルス第一部・研究員

A. 研究目的

痘そうウイルスを用いたバイオテロ対策の一つとして日本で製造備蓄されている細胞培養痘そうワクチン LC16m8 株は Lister 株から継代培養により 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 株を継代するとブラークサイズのやや大きい Middle Size Plaque (MSP) 形成ウイルスが出現

することが知られている。これまでの研究で、MSP は LC16m8 株の弱毒化に関わる B5R 遺伝子に変異が生じた、LC16m0 型のリバータントウイルスであることが明らかになっている。LC16m0 株は LC16m8 株に比べ皮膚増殖性が強いため、アレルギー、アトピーを持つ人では種痘性湿疹など皮膚合併症の発生率が高くなることが懸念される。MSP の存在が明らかになって以降、その含有率を低く抑えたワーキングシードからワクチンを製造する手法が取り入れられているが、完全に取り除くことはできない。MSP は一定の割合でワクチンに含まれ、その含量は各ロットにより異なると考えられる。そこで、本研究ではこれまでに備蓄されてきたワクチンにどの程度 MSP が含まれるか明らかにし、各ロットのワクチンの安全性の再評価に関する科学的知見を得ることを目的とした。

また、バイオテロ対策における国際連携のあり方を検討するための情報を収集したり、連携したりすることを目的に Advisory Committee on Variola Virus Research (世界保健機関、WHO、

ジュネーブ)に参加した。さらにWHO主催の Emerging Disease Clinical Assessment and Response Network (EDCARN) 第1回会合(ベルリン)に出席した。

B. 研究方法

細胞培養痘そうワクチンのロットV01～V014を用いて、10倍段階希釈したウイルス液を6 wellプレートを用いてVero E6およびRK13細胞に接種し、3日後ホルマリン固定、染色後、pla-que数を測定した。森川ら(H15年度厚生労働科学研究費補助金 細胞培養痘そうワクチンの品質管理に関する研究 H15-特別-43 研究成果報告書)の方法に従い、MSP形成ウイルス含有率=(VeroE6細胞で明瞭な1mm程度のpla-queを形成するウイルス力価÷RK13細胞でのウイルス力価)×100とした。同様の操作を2度行い、各ロットのMSP含有率を算出した。また、バイオテロ対策における国際連携のあり方を検討目的に、Advisory Committee on Variola Virus Research [ACVVR, 世界保健機関(WHO), 開催地ジュネーブ]に参加した。また、WHO主催の Emerging Disease Clinical Assessment and Response Network (EDCARN) 第1回会合(ベルリン)に出席した。

【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た。

C. 研究結果

1. 備蓄されている細胞培養痘そうワクチンの各ロットにおけるMSP形成ウイルス含有率
細胞培養痘そうワクチンのロットV01～V05のMSP形成ウイルス含有率は3～4%であった。これらは2003年に製造されたものであった。一方、それ以降に製造され備蓄されているロットV06～V14のMSP形成ウイルス含有率は0.3%程度あるいはそれ以下であった(図1)。

2. バイオテロ関連国際会議への出席と報告

1) 第18回世界保健機関(WHO)痘瘡ウイルス研究アドバイザリーコミティー

第18回世界保健機関(WHO)痘瘡ウイルス研究アドバイザリーコミティーでは、米国CDCおよびロシアVECTORがこれまで本会議で許可され実施している感染性痘瘡ウイルスを用いた研究の経過、および、申請研究課題について

審議された。特に痘瘡ウイルス感染症の診断(米国CDCが開発している蛋白質検出法に基づく診断システム開発やVectorが開発している遺伝子検査法)、抗ウイルス薬に関する研究(Bincidofovir, Ticovirimat等)動物実験モデル作製に関する研究成果が報告された。また、ワクチンに関する活動ではIMVANEX(IMV)およびLC16m8に関する研究や承認、備蓄に関するアップデートについて報告された。日本に関連する事項として、感染研、化血研と米国CDCが共同して行っている研究(高度弱毒細胞培養痘そうワクチンLC16m8接種が誘導する痘瘡ウイルスに対する中和抗体に関する研究)の成績について報告がなされた。本会議での大きな課題のひとつに人工的に感染性のある痘瘡ウイルスを合成できる時代にあることが指摘されたことが挙げられる。ACVVRでは、この問題点を無視することはできないと考えることが確認された。本会議では、感染性のある痘瘡ウイルスが用いられる研究(米国CDCおよびロシアVECTORからの提案)課題について審議された。本会議の議事録・提言はWHOにより公表される予定である。

2) 第1回EDCARN

世界保健機構(WHO)がウイルス性出血熱および新興ウイルス感染症の臨床的な対応を強化するためのフレームワーク [EMERGING DISEASES CLINICAL ASSESSMENT AND RESPONSE NETWORK (EDCARN)]を立ち上げた。そのネットワーク構築および情報交換を主とした国際ワークショップに出席した。主にエボラウイルス病対応の総括および今後対応が求められるクリミア・コンゴ出血熱に対する対応のための専門家(特に臨床的な対応にあたる医師および研究者)が一同に会した。2014年-2015年にかけて西アフリカで流行したエボラウイルス病対応、クリミア・コンゴ出血熱の流行状況やその対策、WHOを中心とした対応フレームワークがどうあるべきかを話し合った。今後、特にWHOとしてはクリミア・コンゴ出血熱対策を強化する意向であることが理解された。感染研もアジアの主要な研究機関のひとつとして積極的にWHOのEDCARNのフレームに貢献することが求められると考えられた。また、WHOもそれを期待していることが理解された。これら感染症の病原体は米国やヨーロッパにおいてはバイオテロ病原体として用いられる危険性に備えて管理が厳重になされている。本出張はバイオテロ対策を強化するための研究に有用でもあった。

D. 考察

LC16m0 株は LC16m8 株同様、温度感受性株であり、神経病原性は低く高神経性も低いため、親株である Lister 株に比較しワクチンとしての安全性の高い。しかし、LC16m0 株は LC16m8 株に比べ皮膚増殖性が強いため、アレルギー、アトピーを持つ人では種痘性湿疹など皮膚合併症の発生率が高くなることが懸念される。備蓄されている細胞培養痘そうワクチンのなかに LC16m0 型のリバータントウイルスがロット V01～V05 では MSP 含有率が 3～4% と高率であることを明らかにした。これらのロットは V06 以降のロットに比較し皮膚疾患を効率に起こす可能性がある。

第 18 回 ACVVR で議論された新規テーマとして痘瘡ウイルスの人工合成の問題について議論された。特に痘瘡ウイルスの人工合成が可能な技術が開発されている現状にある。実際にこれまでワクチニアウイルスなどのオルソポックスウイルスが人工合成されている。この技術が痘瘡ウイルスに応用される事態となれば、新たな対策が求められる。バイオテロ対策にも重要な課題となる可能性がある。第 1 回 EDCARN では主にクリミア・コンゴ出血熱の臨床的対応における国際連携のあり方が議論された。日本の製薬メーカーが開発した抗ウイルス薬、favipiravir の臨床応用の可能性などについても議論された。

E. 結論

日本で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 MSP が含まれているがその割合は 0.3% 以下であった。

バイオテロ対策における国際連携はこれからも維持・強化されるべき課題と考えられる。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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) Izuka I, Ami Y, Suzuki 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)

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 Tomoki, Hikaru Fujii, Miho Shibamura, Natsumi Omura, Shizuko Harada, Souichi Yamada, Masayuki Saijo . 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 . 10)
- 4) Kazutaka Egawa, Masayuki Shimojima, Satoshi Taniguchi, Noriyo Nagata, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Takeshi Kurosu, Shuetsu Fukushi, Masayuki Saijo . 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 . 10)
- 5) 伊藤(高山)睦代 , 林昌宏 , 森本金次郎 , 堀谷まどか , 山口幸恵 , 堀内五月 , 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 . 10)

3. 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