

## . 分担研究報告

平成 26 年度～平成 28 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金  
(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

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

所 属 国立感染症研究所ウイルス第一部  
研究分担者 西條政幸

研究要旨：H26 年度には 2014-2015 年にかけて西アフリカでの流行のエボラウイルス病の原因となったエボラウイルス株に国立感染症研究所で整備されている .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．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ことを確認した．

H26-28 年度には，LC16m8 ワクチンの安全性という特徴を踏まえて，このワクチンを土台とした新規ワクチン開発の基盤を立ち上げる研究を実施した．具体的にはより簡便に外来遺伝子を LC16m8 ワクチンに挿入させる技術を開発した．また，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．

H26-H28 年度の 3 年間を通じて，世界保健機関が主催する痘瘡ウイルス研究専門家会議 (Advisory Committee on Variola Virus Research) や Global Health Security Action Group-Laboratory Network 等のバイオテロ対策に関連する国際会議等に出席して，バイオテロ対策に資する情報を収集した．

H26 年度は研究分担者として，H27-28 年度は研究代表者として研究の実施，本研究班の活動の調整，取りまとめ等の業務を担当した．

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

ウイルス性出血熱の診断方法の開発 (エボラウイルス病の遺伝子増幅法の評価) ,LC16m8 ワクチンの安全性に関する研究 (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

の測定) ,LC16m8 ワクチンの組換えウイルス作製法の開発，国際的なバイオテロ対策の連携のあり方について担当した．これらの知見をもとにバイオテロ対策に貢献するための基盤を強化することを目的とした．

B. 研究方法

1. エボラウイルス遺伝子検出法の再評価

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．

2. LC16m8 ワクチンの安全性に関する研究

1) LC16m8 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

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の改良を試みた．具体的には，組換えワクチニアウイルス選択力

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)を人為的に、ある薬剤を用いることで効率的かつ選択的に取り除く技術の開発を試みた。

## 2) 国家備蓄されている弱毒痘そうワクチンの各ロット中の MSP ウイルス含有量の決定

本来のワクチン製剤としての LC16m8 ウイルスは RK-13 細胞で増殖できるが、Vero 細胞でほとんど増殖できないという細胞選択性を有しているが、MSP ウイルスは両細胞でほぼ同等の増殖性を示すという特徴を有する。この性質の違いを利用して、日本で備蓄されている細胞培養痘そうワクチンのロット V01 ~ V014 中の MSP 含有量(率)を測定した。

## 3) バイオテロ関連国際会議への出席と情報収集

H26-H28 年度の3年間を通じて、世界保健機関が主催する痘瘡ウイルス研究専門家会議(Advisory Committee on Variola Virus Research, ACVVR)や Global Health Security Action Group-Laboratory Network(GHSAG-LN)等のバイオテロ対策に関連する国際会議等に出席して、バイオテロ対策に資する情報を収集した。

### 【倫理面への配慮】

遺伝子組換えに当っては、文部科学省の承認を得た上で行った。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. エボラウイルス遺伝子検出法の再評価

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。

### 2. LC16m8 ワクチンの安全性に関する研究

#### 1) LC16m8 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

薬剤(キサンチンのアナログである 2-チオキサンチン)を用いて選択圧をかけることで、組換えワクシニアウイルス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組換えワクシニアウイルス作製システムを確立することに成功した。

#### 2) 国家備蓄されている弱毒痘そうワクチンの各ロット中の MSP ウイルス含有量の決定

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。

#### 3. バイオテロ関連国際会議への出席と情報収集

本研究班が継続された H26 年 4 月 1 日から 3 年間、年に 1 度世界保健機関が主催する痘瘡ウイルス研究専門家会議に出席した。また、毎年 2 回程開催される GHSAG-LN 会議に出席した。ACVVR では痘瘡ウイルス関連バイオテロ対策に関連する研究等も議論の対象となる。本会議では LC16m8 ワクチンの有効性(特に本研究班で実施されている LC16m8 ワクチンのヒトへの接種により、痘瘡ウイルスに対する中和抗体誘導に関する研究等も発表された。GHSAG-LN 会議では出血熱ウイルス感染症流行対応、バイオセーフティやバイオセキュリティに関する情報交換もなされた。GHSAG-LN の活動の一環として、電子顕微鏡による病原体検出法の訓練が実施され、本研究班から研究分担者である永田典代博士(国立感染症研究所感染病理部)が参加した。また、フィロウイルス感染症検査の外部評価活動も実施され、本研究班から研究分担者である下島昌幸博士(国立感染症研究所ウイルス第一部)がこの活動に参加した。

## D. 考察

エボラウイルス遺伝子検査法の充実や LC16m8 ワクチンの有効性・安全性等に関する研究、さらには組換え LC16m8 ウイルスの作製法の改良等を通じて、バイオテロ対策に資する活動に貢献した。

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(SFTS)が、最近の新興感染症の

代表例として挙げられる。これらの病原体による感染症の致命率はともに約 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。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。

バイオテロ対策と感染症対策は表裏一体とも言えるが、それぞれに対応した特殊な対策や関係機関との連携が求められる。刻々と変化する国際情勢に合わせて、バイオテロ対策は備えと改良が求められる。

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。日本におけるLC16m8ワクチン関連研究は国際的にも重要なものとなっていることを認識する必要があると考えられる。

#### E. 結論

エボラウイルス遺伝子検査法の充実やLC16m8ワクチンの有効性・安全性等に関する研究、さらには組換えLC16m8ウイルスの作製法の改良等の研究活動やバイオテロに関連すると考えられる国際会議に出席し、専門家と意見交換することを通じて、バイオテロ対策に資する活動に貢献した。

#### F. 健康危険情報 特記事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 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. *Journal of Clinical Microbiology* 52(9):3325-3333, 2014

- 2) 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)
- 3) 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)

##### 2. 学会発表

- 1) 吉河智城, 福士秀悦, 谷英樹, 福間藍子, 谷口怜, 須田遊人, Harpal Singh, 江川和孝, 下島昌幸, 森川茂, 西條政幸. ワクシニアウイルス LC16m8 株を土台とした組換えワクシニアウイルス作出システムの確立. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜 (2014.11)
- 2) 福間藍子, 福士秀悦, 吉河智城, 鈴木忠樹, 谷英樹, 谷口怜, 下島昌幸, 西條政幸. SFTS ウイルスの核蛋白質に対するモノクローナル抗体の作製と抗原検出 ELISA への応用. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜 (2014.11)
- 3) 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, 横浜, (2014.11)
- 4) 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)
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 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. 10)
- 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