

分担報告書

天然痘バイオテロ対応に関する公衆衛生対応の検討

所 属 国立保健医療科学院
健康危機管理研究部・上席主任研究官
研究分担者 齋藤 智也

研究要旨: バイオテロ対策の国際的な動向を調査し、主に日本国内での公衆衛生対策のあり方を検討した。また、バイオテロ(主に天然痘テロ)対応に関する公衆衛生対応の検討として、ワクチン及び医薬品の開発状況について文献的情報収集を行った。バイオテロ対策の国際的な動向については、英国と韓国の会議に出席し、専門家らと議論を行った。英国での会議における議論と指摘事項、提言は、生物テロへの対応を考えた際の、セキュリティ・法執行機関との連携について具体的な手順を含めて検討する必要性を示唆するものであった。韓国での会議では、現行の通常時の対応計画(いつテロが発生するかがわからない前提での計画)に加えて、マスギャザリングイベントのような、ある一定期間、限られた場所でインテンシブに対応を行う計画についても別途オペレーションプランの検討が必要であることを認識した。ワクチン・医薬品については、MVA ワクチン、主に米国で開発中の2医薬品について開発状況の情報収集を行った。今後の開発状況を注視しつつ、発生時の対応オペレーションの中での必要性等検討を進めていく必要がある。また、天然痘ワクチンの国際共有オペレーションのフレームワークが WHO から示されたことから、本邦においてもこれに従ったワクチン拠出が可能であるか、天然痘テロ対応の中で具体的な検討が必要である。

A. 研究目的

バイオテロ対策の国際的な動向を調査し、日本国内での対策のあり方を検討する。また、バイオテロ(主に天然痘テロ)対応に関する公衆衛生対応の検討を行う。ワクチン含む医薬品のみならず、搬送・診断・治療・除染等公衆衛生対応の技術的検討を行う。

天然痘バイオテロ対応に関する公衆衛生対応の文献的検討を行った。本年度は、特にワクチンを含む医薬品に関する現状について、文献的にレビューを実施した。また、天然痘ワクチンの国際的共有についての WHO フレームワークを検討した。

【倫理面への配慮】

該当しない。

B. 研究方法

1. バイオテロ対策の国際的な動向の調査

生物テロ対策の動向について英国(Responding to deliberate biological release: the requirements for effective, coordinated international action 意図的**生物剤**散布への対処: 効果的で調和された国際的な行動のための要件)および韓国(The International Symposium and Workshop on Mass Gathering Medicine and Olympic Winter Games Pyeong Chang 2018 マスギャザリング医療・平昌オリンピック冬季大会シンポジウム・ワークショップ)の会議に出席し、生物テロ対策の世界的状況に関する情報収集を実施した。

2. バイオテロ(主に天然痘テロ)対応に関する公衆衛生対応の検討

C. 研究結果

1. バイオテロ対策の国際的な動向の調査

会議参加報告 1 "Responding to deliberate biological release: the requirements for effective, coordinated international action" (意図的**生物剤**散布への対処: 効果的で調和された国際的な行動のための要件):

近年、生物兵器禁止条約(BWC)の中でも第7条が定める「発生時の支援」に関連する議論が活発になっている。第7条の実施強化は、2012-2015 の会期間活動の中でも、2014・2015 年の2カ年議題として取り扱われてきた。さらに、シリアでの度重なる化学兵器の使用は、効果的な国

際的支援の困難さを浮き彫りにするとともに、事前準備の必要性が認識された。期せずして発生した 2014-2015 年の西アフリカの Ebola ウイルス病アウトブレイクでも国際社会の準備不足を露呈した。第7条を実施するにあたっては、さらに様々な関係機関の協調的活動には困難が予想され、現実的な法的、ロジ、運用等課題があることが認識されている。

すでに 2016 年に Wilton Park では Ebola 対応の教訓について会議が開催され検討がなされており¹、これが意図的な散布であった場合には非常に状況が複雑になることはすでに指摘されている。第8回 BWC 検討会合でも議論されたが具体的な合意には至らなかったものの、「対応能力が事前に必要」と述べ、会期間活動で指摘された必要要件を強調している。グローバルパートナーシップのバイオセキュリティ WG や GHSA のパッケージの対応でも優先事項となっている。本会議は、これらの取り組みを支援し、国際的な対応協調がどうすれば効果的になるか、実務志向の明確な提言を作成するために行われた。本会議は英国外務省の執行組織であり、安全保障領域を含めた数多くの国際会議をホストする Wilton Park と Global Affairs Canada とジョージタウン大学グローバルヘルス科学・安全保障センターの共催により行われた。総勢 35 名の公衆衛生、セキュリティの専門家が参加した。会議で指摘されたチャレンジ(問題点・未解決点)としては、

- 感染症やアウトブレイクの多様性
- 国際機関レベルで生物テロに対する主対応機関が明確でないこと
- 生物兵器禁止条約に支援や調査に関する役割は記載されているが、関係機関の調整を行う機能はない
- 生物兵器禁止条約において「支援が提供されうる状況」が明確ではない
- 生物兵器禁止条約第7条に基づき支援を要請する明確な手順が存在しない
- 意図的な生物剤散布が発生した際の軍の役割に関する誤解が生じる可能性
- 国際的人道支援と法執行機関の協働的な対応に関する標準作業手順(SOP)の欠如が挙げられた。

提言としては、

- 公衆衛生、セキュリティ、法執行機関、人道

支援のセクターからの専門家リストを作成し定期的に会合を行う。

- 国際機関における既存の役割や対応能力、リソース等をマッピングし、状況評価を行う。また、用語の統一を行う。
- 人道支援と捜査・調査の分離。公衆衛生と法執行機関の情報共有メカニズムをデザインする。
- 既存の文書やメカニズムを活用した国際的 SOP を開発する。
- 世界中の「ゴールドスタンダード」となる捜査のための法科学ラボがガイダンスやベストプラクティスを国際機関に提供し、生物テロが疑われた際の検体移送管理(Chain of Custody)に関するガイダンス文書を開発する。が挙げられた。

会議参加報告2 The International Symposium and Workshop on Mass Gathering Medicine and Olympic Winter Games Pyeong Chang 2018(マシギザリング医療・平昌オリンピック冬季大会シンポジウム・ワークショップ) :別添 1 を参照

2. 天然痘テロ対応に関する公衆衛生対応の検討
○天然痘テロに対する公衆衛生対応の中でも、ワクチン・医薬品等医薬品の状況については、MVA ワクチン、及び主に米国で開発中の2医薬品について開発状況の情報収集を行った。

MVA ワクチンの現状について

高度に弱毒化され増殖能が無いワクシニアウイルスによる痘そうワクチン株である Modified Vaccinia Ankara(MVA)株を用いた痘そうワクチン MVA-BN® (EU 以外での販売名称: IMVAMUNE® EU での販売名称: IMVANEX®) は、EU およびカナダでは 2013 年に承認を受けている。デンマークのバーバリアン・ノルディック社が開発している。EU では、すべての大人に対する積極的免疫について承認されている。カナダでは、18歳以上の大人で、緊急時に第1、第2世代ワクチンに対する禁忌者を対象として承認されている。米国では HIV 感染者及びアトピー性皮膚炎罹患者を対象とした pre-emergency use authorization が 2010 年に与えられており、2,800 万ドーズが国家備蓄に納入済みである。ヒトでの接種については、8,800 人以上(うち 650

¹ The 2014-2015 Ebola outbreak: lessons for

response to a deliberate event (2016 年 9 月)

人以上の HIV 患者、380 人以上のアトピー性皮膚炎患者を含む)に対して、重大な安全性の問題なく実施されている。免疫原性については、動物モデルで、旧来のワクチンとの同等性が示されており、また防御能も示されているところである。ヒトでの免疫原性については、第一世代ワクチンである Dryvax との同等性が報告されている。現在、第二世代ワクチンである ACAM2000 との比較も第3相試験として行われており、良好な免疫反応を得たと報告されている。また、併せて実施された2回接種後の ACAM2000 ワクチン接種後の局所皮膚反応“Take”の減弱も認め、免疫原性が確認されたとしている。

現在も開発が継続中で、特に、現在は天然痘に近縁のサル痘のヒト感染についての防御効果に関する治験も行われている。また、現在は液体製品であるが、フリーズドライ製品の開発も行われている。

TPOXX® (tecovirimat/ST-246)について

TPOXX® (tecovirimat/ST-246)は、米国 SIGA Technologies 社が開発する抗ウイルス薬である。経口薬については、開発を終え、2018 年中の承認が見込まれている。米国国家備蓄に採用されており、200 万ドーズを納入済みである[現在は実験的新薬(IND)での使用]。FDA のアニマルルールに則って開発が行われ、非ヒト霊長類を含む5種類の動物モデルで効果が示されている。ヒトでの天然痘ワクチン接種後の重篤な副反応例5例について治療使用例があり、毒性は見られていない。また、Phasell のヒトでのスタディでも重篤な副作用はなく、頭痛がもっとも多く見られる副作用であったが、プラセボ投与例でも見られた。成人での投与は、600mg、1日2回、14日間設定されている。なお、静注薬も現在開発中である。

Brincidofovir について

Brincidofovir (BCV, CMX001) は、米国 Chimerix 社が開発する抗ウイルス薬である。細胞内で代謝されて cidofovir-diphosphate (CDV-PP) を生成し、ウイルス複製を阻害し、痘そうウイルス(Variola major)の in vitro での増殖阻害を認めている。これまで 1400 人以上のサイトメガロウイルス、アデノウイルス感染症患者に IND (実験的新薬)プログラムで投与されてきた経験があり、その中には免疫不全者や腎・肝障害を有する者、生後1ヶ月未満の者も含まれている。腎毒性で知られる cidofovir のプロドラッグである

が、これまでの投与で特に報告はない。錠剤と液体製品があり、静注製品も開発中である。痘そうに対する効果については、FDA のアニマルルールに従って開発が行われている。これまで第三相相当のウサギモデルでの実験で効果が示されており、マウスモデルでも現在実験中である。ウサギモデルでは、発熱後の治療開始で100%の生存を認めた(プラセボ群で 53%)。また、ウイルス量の減少効果も認めている。投与量についてはまだ正式に決定されていないが、200mg/week を3週間で考えられている。

○天然痘ワクチンの国際的共有についての WHO フレームワークについては、世界健康安全保障アクションイニシアチブ(GHSI)のタスクフォースの中でそのベースとなる議論が行われてきた。その成果物として“Operational framework for the development of the World Health Organization Smallpox Vaccine Emergency Stockpile in response to a smallpox event (World Health Organization, WHO/WHE/IHM/2017.14)”が作成され、2017 年 12 月に公開された。

天然痘の根絶以後、WHO は Smallpox Vaccine Emergency Stockpile (SVES)を構築してきた。現在は、スイスの WHO 本部で保管している第1世代ワクチン(Calf-lymph ワクチン)が約240万ドーズ、ほか、フランス・ドイツ・ニュージーランド・英国・米国が国家備蓄として保有し、緊急時の提供を表明している 3100 万ドーズで構成されている。緊急時の初期には、WHO が保管する備蓄がまず動員され、その後各国の拠出ワクチンが使用される予定である。このようなワクチン動員の際のワクチンの要請方法や、拠出ワクチンを要請国に提供するプロセスを記載したものである。なお、このプロセスはワクチンと溶解液、接種のための二又針について示すものであり、WHO の備蓄に含まれない免疫グロブリンや抗ウイルス薬には当てはまらないとしている。本フレームワークには、放出要請から WHO 備蓄の放出のプロセスとそれに伴う文書フォーム、SOP、法規制的検討事項、ロジ面での検討事項、金銭、コミュニケーション等について記載された。

D. 考察

英国での会議における議論と指摘事項、提言は、生物テロへの対応を考えた際の、セキュリティ・法執行機関との連携について具体的な手順を含めて検討する必要性を示唆するものであった。天然

痘対応指針については、自然発生例を想定した公衆衛生対応としてはまとまった内容であると言えるが、テロのような人為的コンテキストで発生した際の対応手順としての検討が未熟であり、今後の検討課題と言える。現行の天然痘対応指針第5版は平成16年を最後にアップデートされていないが、その後、感染症法改正のほか、国民保護法など、テロ対策関連の法整備が進められてきたことから、これらに基づく対応との整合性と併せて検討を進めていく必要がある。

韓国のバイオテロ対策は、オリンピック・パラリンピックという期間・場所がある程度限定された状況について、綿密な対応計画が練られていることが理解できた。現行の通常時の対応計画(いつテロが発生するかがわからない前提での計画)に加えて、マスギャザリングイベントのような、ある一定期間、限られた場所でインテンシブに対応を行う計画についても別途オペレーションプランの検討が必要であることを認識させられた。

ワクチン・医薬品については、MVA ワクチン、主に米国で開発中の2医薬品について開発状況の情報収集を行った。

MVA ワクチンについては、免疫原性、安全性について知見が蓄積されていた。一方で、非増殖性株が使われていることから、旧来のワクチン接種方法である二叉針による接種ではなく皮下あるいは筋注による接種が必要であり、免疫が得られたことを示す皮膚反応である“Take”が認められないこと、2回接種が必要である点は、ワクチン接種オペレーション上使い難い側面があることに注意が必要である。また、液体製品であり、長期保存に難点がある点には注意が必要である。少なくとも、発生時の対応上、国内で LC16m8 が第一選択となる状況は変わらないだろう。発生前に何らかの理由で打つ必要が生じる一方で、接種および接種による免疫反応の確認のための時間的余裕があり、かつ社会接種者や免疫不全者等接種による副反応のリスクを最大限に抑える必要があるような状況で無ければ、MVA ワクチンの必要性は今のところ考えにくい。

医薬品については、米国で開発され、すでに国家備蓄にも採用されている TPOXX®と開発途中の Brincidofovir について情報収集を行った。特に TPOXX®については、投与量も設定され、承認の最終段階に入っている。また、国家備蓄にも採用されており、発生時の治療薬として有力な選択肢となりつつあるといえる。患者発生時には、(入手

が可能である限り)使わない、という選択肢は考えにくい。Brincidofovir についてはまだ開発中であるが、TPOXX®と作用機序が異なることから、併用も治療オプションとして考えうるだろう。

今後の開発状況を注視しつつ、発生時の対応オペレーションの中で、患者が国内発生した場合に使用を検討する可能性がありうるのか、といった必要性に加えて、使用する可能性があるとした場合にはその際の調達手順の必要性等も検討を進めていく必要があるだろう。

WHO 備蓄の天然痘ワクチンの共有フレームワークは、天然痘ワクチンの備蓄・生産国である日本にとっても重要な文書である。拠出表明は行っていないが、発生時には提供を要請される可能性は十分に考えられる。また、本文書にも備蓄されている第3世代ワクチンとして LC16m8 の詳細が記載された。天然痘テロ発生時の対応については、本フレームワークに従った国際的なワクチン拠出が可能であるかの具体的な検討も必要であると考えられる。

E. 結論

生物テロ対応について、テロ対応としてのコンテキストを考慮した、セキュリティ・法執行機関との連携を含めた対応手順の具体的な検討が必要である。また、現行の通常時の対応計画(いつテロが発生するかがわからない前提での計画)に加えて、マスギャザリングイベントのような、ある一定期間、限られた場所でインテンシブに対応を行う計画についても別途オペレーションプランの検討が必要である。

天然痘治療薬については、米国で開発中の医薬品について、今後の開発状況を注視しつつ、発生時の対応オペレーションの中で、患者が国内発生した場合に使用を検討する可能性がありうるのか、といった必要性に加えて、使用する可能性があるとした場合にはその際の調達手順の必要性等も検討を進めていく必要がある。

また、天然痘テロ対応の中には、天然痘ワクチンの国際共有オペレーションのフレームワークが示されたことから、本邦においてもこれに従ったワクチン拠出が可能であるかの具体的な検討が必要である。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- なし
2. 学会発表
- 1) Saito T. Overview of Bioterrorism Preparedness and Response in Japan. NCT Asia Pacific, Seoul, Korea (2017.5)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

分担報告書

出血熱ウイルスを含むバイオテロ関連病原ウイルス検出法の改良

所 属 国立感染症研究所
ウイルス第一部・室長
研究分担者 下島 昌幸

研究要旨: バイオテロで痘そうウイルスが用いられる可能性がある。痘そうの特徴的な臨床症状の1つに体表の水疱があるが、類似の症状はヒトのサル痘や水痘でも認められる。これらの病原体を迅速に且つ区別して検出するリアルタイム PCR を文献(Maksyutov et al., J Virol Methods, 2016)に基づき構築した。痘そうウイルス、サル痘ウイルス、水痘帯状疱疹ウイルスを同時に且つ迅速に区別して検出するマルチプレックスなリアルタイム PCR 法を構築した。構築したリアルタイム PCR 法の検出感度は 10^1 - 10^0 コピー/反応と良好であった。リアルタイム PCR 法の構築には合成 DNA を用いている。手持ちの関連ウイルス(サル痘ウイルスや近縁の複数のウイルス種)を用い、目的のウイルスを特異的に検出できるかの検証が必要である。

研究協力者

福士秀悦・国立感染症研究所・主任研究官

A. 研究目的

エボラウイルス病やラッサ熱等は症状が重篤で致命率が高い感染症で、有効な予防法や治療法は知られていない。そのためその病原体であるエボラウイルスやラッサウイルス等の出血熱ウイルスはバイオテロに用いられうるとして様々な対策が取り組まれている。

痘そう(天然痘)も症状が重篤で致命率が高い感染症であるが、優れた予防法としてワクチンが開発され世界的に用いられ、1980 年には世界保健機関より根絶宣言がなされた。ワクチンも用いられなくなったため、例えば日本では 43, 44 歳あたりより若い人は通常ワクチン接種を受けていない。そのため痘そうウイルスもバイオテロに用いられる病原体の1つに位置付けられている。

バイオテロと考えられる事案が発生した場合に、その病原体を特定することは重要な課題の1つである。病原体の特定はその後規模の把握や被害の拡大阻止においても重要視される。迅速性や正確性は当然求められる。国立感染症研究所ウイルス第一部では既にウイルス性出血熱や痘そうの実験室診断法を準備しているが、近年の試薬や機器・技術の進歩をとり入れた改良を加えることは常に考慮しておく必要がある。

本年度は痘そうウイルスの検出法の改良を行なっ

た。痘そうウイルスは痘そうの根絶時に所持できなくなったため検出法の構築・改良は独自にはできないが、ロシアの Vector 研究所から近年の技術を取り入れた検出法が公表された。この検出法の導入を行なった。

B. 研究方法

Maksyutov et al. (J Virol Methods, 2016 Oct;236:215-220) (図1)の方法に基づき、リアルタイム PCR による痘そうウイルスの検出法を構築した。

痘そうの特徴的な臨床症状の1つに体表の水疱形成があるが、同様の症状はサル痘および水痘でも認められる。臨床症状での区別は困難なため、痘そう疑い事例の発生の際はこれらとの鑑別は重要である。Maksyutov et al.の方法は合わせてこれらの病原体(サル痘ウイルスおよび水痘・帯状疱疹ウイルス)も検出するリアルタイム PCR となっているため、サル痘ウイルスおよび水痘・帯状疱疹ウイルスも検出するよう構築した。

核酸抽出のコントロール、感度や特異性を評価するスタンダードも Maksyutov et al.の方法に基づき調製した。

【倫理面への配慮】

該当なし

C. 研究結果

痘そうウイルスは B12 遺伝子を, サル痘ウイルスは F3 遺伝子を, 水痘・帯状疱疹ウイルスは ORF38 遺伝子を標的とするプライマーとプローブを人工合成し調製した. プローブの色素はそれぞれ FAM, HEX, Texas Red のラベルとした. 核酸抽出のコントロールの検出プローブは Cy5 ラベルとした(図 2).

スタンダード DNA も人工合成し PCR で増幅して用いた(図 3). 核酸抽出用のコントロール DNA は痘そうウイルスのプライマーで増幅されコントロール用のプローブで検出されるよう人工合成した(図 3).

以上のプライマーやプローブ等を図 4 に示す割合で混合し, 同図に示す条件で反応させた. 痘そうウイルスのスタンダード DNA を反応液に加えた場合に FAM(つまり痘そうウイルス検出用のプローブの色素)のシグナルのみが検出された(図 5). サル痘ウイルスのスタンダード DNA, 水痘・帯状疱疹ウイルスのスタンダード DNA の場合もそれぞれの色素のシグナルのみが検出された(図 6). 核酸抽出用のコントロール DNA を反応液に加えた場合も特異的な色素(Cy5)のシグナルのみが検出された(図 7). いずれの感度も 10^1 コピーから 10^0 コピーであった(図 6).

D. 考察

Maksyutov et al.が報告した痘そうウイルス, サル痘ウイルス, 水痘・帯状疱疹ウイルスを区別して検出するリアルタイム PCR を国立感染症研究所ウイルス第一部の実験室に導入し, 同程度(以上)の感度が観察された. 痘そうウイルスが用いられたと考えられるバイオテロの発生時において, 迅速に病原体を特定する方法として活用できると考えられる.

導入したリアルタイム PCR は現時点では合成した DNA を用いて評価しているため, 感度や特異性については実際のウイルスを用いた確認が必要である. サル痘ウイルスを含めいくつか関連ウイルスが手元にあるので, それらを用いた確認が今後必要である.

E. 結論

サル痘ウイルス, 水痘・帯状疱疹ウイルスを区別して検出するリアルタイム PCR を国立感染症研究所ウイルス第一部の実験室で再現した. 痘そうウイルスが用いられたと考えられるバイオテロの発生時において, 迅速に病原体を特定する方法として活用できると考えられる. 実際のウイルスを用いた確認が必要である.

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, 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. *J Virol Methods*. 2017 Jun;244:4-10.
- 2) Suda Y, Chamberlain J, Dowall S, Saijo M, Horimoto T, Hewson R, Shimojima M. The development of a novel diagnostic assay that uses a pseudotyped vesicular stomatitis virus for the detection of neutralising activity to Crimean-Congo haemorrhagic fever virus. *Jpn J Infect Dis*. In press.

2. 学会発表

- 1) 下島昌幸 国際緊急援助隊・感染症対策チームによるコンゴ民主共和国における黄熱対策支援第 17 回日本バイオセーフティ学会総会・学術集会(教育講演)2017 年 12 月 11 日
- 2) Kawagishi T, Kanai Y, Nouda R, Tani H, Shimojima M, Saijo M, Matsuura Y, Kobayashi T. Nelson bay orthoreovirus cell attachment protein σ C determines strain-specific differences in viral infectivity and pathogenesis. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2017, Osaka (W2-3-09)
- 3) Kurosu T, Okuzaki D, Limkittikul K, Shimojima M, Fukushi S, Watanabe S, Saijo M. The dynamics of disease progression in severe dengue. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2017, Osaka (W2-4-04)
- 4) Fukushi S, Kurosu T, Watanabe S, Shimojima M, Shirato K, Matsuyama S, Yoshikawa-Iwata N, Nagata N, Ohnishi K, Ato M, Sentsui H, Saijo M. Development of competitive ELISA for detecting serologic responses to MERS-CoV using novel monoclonal antibodies against spike protein. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2017, Osaka (W2-4-11)

- 5) Shimojima M, Taniguchi S, Ami Y, Nagata N, Fukushi S, Kurosu T, Watanabe S, Tani H, Fukuma A, Iwata-Yoshikawa N, Saijo M. A non-human primate model for severe fever with thrombocytopenia syndrome SFTS. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2017, Osaka (W2-5-05)
- 6) Watanabe M, Arii J, Shimojima M, Kato A, Kawaguchi Y. A host cell membrane protein interacts with HSV-1 gE and promotes viral cell-to-cell spread. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2017, Osaka (W2-6-02)
- 7) Onishi M, Kanai Y, Kawagishi T, Nouda R, Pannacha P, Shimojima M, Saijo M, Matsuura Y, Kobayashi T. Analysis of genome packaging mechanism of Nelson bay orthoreovirus. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 24, 2017, Osaka (P1-DRO-03)
- 8) Nouda R, Kawagishi T, Kanai Y, Shimojima M, Saijo M, Matsuura Y, Kobayashi T. Functional analysis of Nelson bay orthoreovirus p17 protein. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 24, 2017, Osaka (P1-DRO-04)
- 9) Watanabe S, Marsh G, Shimojima M, Fukushi S, Kurosu T, Saijo M. The expression of hendra virus F gene is downregulated by its untranslated region. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2017, Osaka (P2-N1-07)
- 10) Taniguchi S, Shimojima M, Fukushi S, Kurosu T, Tani H, Yoshikawa T, Morikawa S, Kato F, Maeki T, Tajima S, Lim CK, Saijo M. Comparative analysis of viral replication and transcription function of severe fever with thrombocytopenia virus and Heartland virus. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2017, Osaka (P2-N1-08)
- 11) Tani H, Fujii H, Taniguchi S, Fukushi S, Kurosu T, Shimojima M, Morikawa S, Saijo M. The protein kinase inhibitors inhibit entry of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in vitro. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2017, Osaka (P2-N4-13)
- 12) 渡辺瑞季, 有井潤, 下島昌幸, 川口寧 単純ヘルペスウイルス gE と相互作用して細胞間感染を促進する宿主因子の同定 第 160 回日本獣医学会学術集会 2017 年 9 月 13 日
- 13) 下島昌幸, 谷口怜, 網康至, 永田典代, 福士秀悦, 黒須剛, 渡辺俊平, 谷英樹, 福間藍子, 岩田奈織子, 西條政幸 重症熱性血小板減少症候群 SFTS の霊長類モデル 第 160 回日本獣医学会学術集会 2017 年 9 月 13 日
- 14) 渡辺俊平, 須田遊人, 福士秀悦, 黒須剛, 西條政幸, 下島昌幸 ヘビのアレナウイルスの糖蛋白質 (GP) は機能的にフィロウイルスの GP に類似する 第 160 回日本獣医学会学術集会 2017 年 9 月 15 日
- 15) 佐藤(大久保)梢, 熊谷由美, 福士秀悦, 下島昌幸, 西條政幸, 山野公明, 大西真 新興回帰熱の新規抗体検査用抗原の性能評価に関する研究 第 160 回日本獣医学会学術集会 2017 年 9 月 15 日
- 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
特になし



Species-specific differentiation of variola, monkeypox, and varicella-zoster viruses by multiplex real-time PCR assay



Rinat A. Maksyutov*, Elena V. Gavrilova, Sergei N. Shchelkunov

State Research Center of Virology and Biotechnology "VECTOR", Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russia

ABSTRACT

Article history:

Received 9 February 2016
Received in revised form 23 July 2016
Accepted 25 July 2016
Available online 28 July 2016

Keywords:

Variola virus
Monkeypox virus
Varicella-zoster virus
Real-time PCR

A method of one-stage rapid detection and differentiation of epidemiologically important variola virus (VARV), monkeypox virus (MPXV), and varicella-zoster virus (VZV) utilizing multiplex real-time TaqMan PCR assay was developed. Four hybridization probes with various fluorescent dyes and the corresponding fluorescence quenchers were simultaneously used for the assay. The hybridization probes specific for the VARV sequence contained FAM/BHQ1 as a dye/quencher pair; MPXV-specific, JOE/BHQ1; VZV-specific, TAMRA/BHQ2; and internal control-specific, Cy5/BHQ3. The specificity and sensitivity of the developed method were assessed by analyzing DNA of 32 strains belonging to orthopoxvirus and herpesvirus species. © 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

図 1. 痘そうウイルス等を検出するリアルタイム PCR の構築で参考とした文献

Primer and Probe

Primer	Sequence (5'-3')
VARV B12R upper	ATGTTCAAGCTGTTAATATCAATCTCG
VARV B12R lower	TTTGCCACTGAACCATTCTATCAT
MPXV F3L upper	CATCTATTATAGCATCAGCATCAGA
MPXV F3L lower	GATACTCCTCCTCGTTGGTCTAC
VZV ORF38 upper	AAACCGCACATGATAACGC
VZV ORF38 lower	GATTAGGACCATCCCCCG
Probe	Sequence (5'-3')
VARV B12R probe	FAM-CTGTCCGAGCCACAGTTTCGAGACG-BHQ1
MPXV F3L probe	HEX-TGTAGGCCGTGTATCAGCATCCATT-BHQ1
VZV ORF38 probe	TexasRed-ACAATGAGTAGTGGCTTTATGGCGAG-BHQ3
VARV-I.C. probe	Cy5-TTGCTTGTCTGCTCGTATCGTCC-BHQ3

図 2. 痘そうウイルス (VARV), サル痘ウイルス (MPXV), 水痘・带状疱疹ウイルス (VZV) の表示遺伝子を検出するプライマーおよびプローブの配列とラベル, 核酸抽出コントロールのプローブの配列とラベル

DNA standards (PCR product)

Standard DNA	Sequence (5'-3')
VARV B12R (120 bp)	GATCATGTTCAAGCTGTTAATATCAATCTCGATAAACG TGAACAGGCTGTCGGAGCCACAGTTTCGAGACGAGGA GATTTAGAAATGTTGGGATTATTGCATGATAGAATGGT TCAGTGGCAAATCGA
MPXV F3L (79 bp)	GATCCATCTATTATAGCATCAGCATCAGAATCTGTAGG CCGTGTATCAGCATCCATTGTCGTAGACCAACGAGGA GGAGTATCTCGA
VZV ORF38 (89 bp)	GATCTAAATATAACCTCGTCCGCAAAAAAAAAACCGCACA TGATAACGCGCGGATACAATGAGTAGTGGCTTTATGGC GAGGATCCCAAATGTCCATTACCCGGGGGATGGTCCT AATCTTCGA
VARV B12R-I.C. (119 bp)	GATCATGTTCAAGCTGTTAATATCAATCTCGATAAACG TGAACAGGTTGCTTGTCTGCTCGTATCGTCCAGGAG ATTTAGAAATGTTGGGATTATTGCATGATAGAATGGTT CAGTGGCAAATCGA

図 3. 人工合成した各ウイルスのスタンダード DNA および核酸抽出コントロールの配列

Reaction setup

		primer probe Mix 1		primer probe Mix 2	
		per reaction	final conc.	per reaction	final conc.
50uM	VARV upper primer	0.15uL	300nM	0.1uL	200nM
	VARV lower primer	0.15uL	300nM	0.1uL	200nM
	MPXV upper primer	0.15uL	300nM	0.1uL	200nM
	MPXV lower primer	0.15uL	300nM	0.1uL	200nM
	VZV upper primer	0.15uL	300nM	0.1uL	200nM
	VZV lower primer	0.15uL	300nM	0.1uL	200nM
	VARV probe (FAM)	0.125uL	250nM	0.1uL	200nM
	MPXV probe (HEX)	0.125uL	250nM	0.1uL	200nM
	VZV probe (TexasRed)	0.125uL	250nM	0.1uL	200nM
	VARV-I.C. probe (Cy5)	0.125uL	250nM	0.1uL	200nM
primer probe mix total		1.4uL		1.0uL	
2 x QuantiTect probe PCR Mix		12.5uL		12.5uL	
H ₂ O		8.1uL		8.5uL	
Standard DNA or sample DNA		3.0uL		3.0uL	
Total		25.0uL		25.0uL	

PCR condition

95°C	10 min
95°C	15 sec
63°C	60 sec
45 cycles	
37°C	30 sec



QuantiTect Probe PCR Kits

図 4. リアルタイム PCR の反応液の組成と反応条件

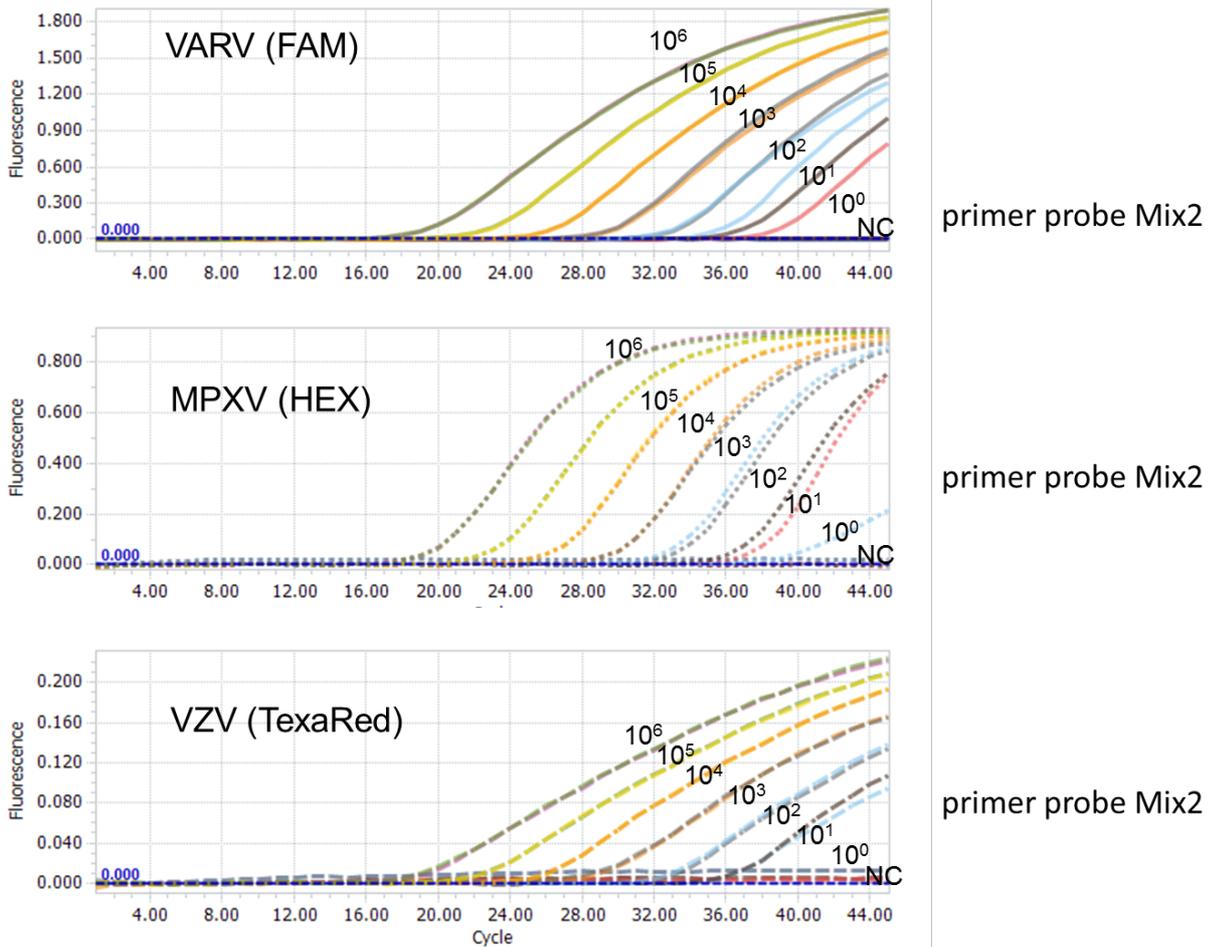


図 5. リアルタイム PCR における添加標準 DNA 量(図中)とシグナルの検出(横軸はサイクル数)

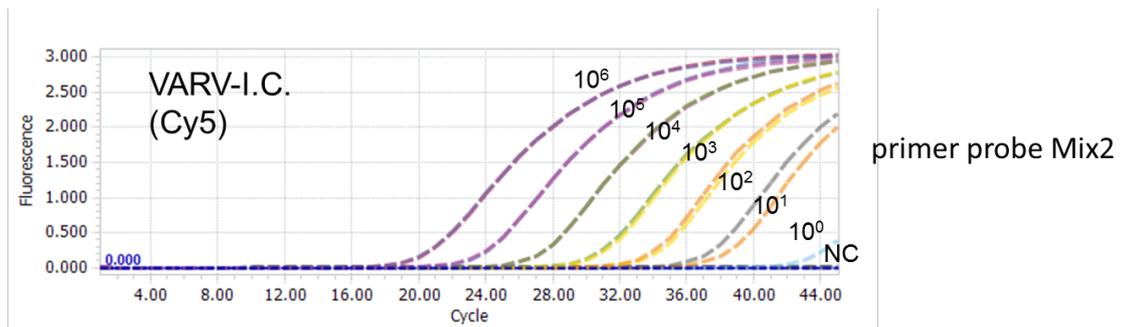


図 6. 核酸抽出コントロールの添加量(図中)とシグナルの検出(横軸はサイクル数), Ct 値

primer probe Mix1					primer probe Mix2				
	Cq					Cq			
copies (Log10)	VARV FAM	MPXV HEX	VZV Texas Red	VARV-I.C. Cy5	copies (Log10)	VARV FAM	MPXV HEX	VZV Texas Red	VARV-I.C. Cy5
6	18.8/18.7	19.41/19.87	23.31/23.02	18.77/18.82	6	18.39/18.48	19.51/19.44	23.46/23.58	18.45/18.54
5	26.44/22.27	27.06/23.17	29.86/26.2	22.21/22.2	5	21.96/21.92	22.85/22.81	26.5/26.57	21.92/21.97
4	25.75/25.78	26.68/26.67	29.48/29.33	25.66/25.73	4	25.53/25.51	26.28/26.3	29.7/29.69	25.47/25.43
3	29.34/29.22	30.04/30.08	32.9/32.81	29.13/29.03	3	28.88/29.12	29.89/29.89	33.13/33.34	29.06/28.85
2	32.71/32.79	33.52/33.31	37.14/36.39	32.69/32.59	2	32.31/32.6	32.69/33.25	36.54/36.79	32/32.26
1	36.65/36.74	38.04/38.21	40.34/38.84	35.87/36.33	1	36.28/35.05	36.43/40.14	39.91/40.39	35.36/36.44
0	38.7/40.54	38.99/(-)	(-)/(-)	(-)/(-)	0	38.16/(-)	37.5/(-)	(-)/(-)	42.12/(-)

平成 29 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)
我が国で開発され、備蓄されている細胞培養痘そうワクチンの有効性、安全性、生産性向上
および国内外のバイオテロ対策のあり方に関する研究

分担報告書

細胞培養弱毒生痘そうワクチンの有効性及び安全性評価、特性解析、品質試験法改善、
生産性に関する研究

所 属 一般財団法人化学及血清療法研究所
研究開発本部 製品開発部 部長
研究分担者 園田 憲悟

研究要旨：日本では天然痘ウイルスによるバイオテロに備えて、痘そうワクチン LC16m8 が備蓄されている。LC16m8 は世界で2つしかない第3世代のワクチン(安全性が高い)の一つで、国際的にも注目されている。本邦の国際貢献海外派遣先であるアフリカ地域では、サル痘ウイルスの散発的な流行が報告されており、近年の調査ではヒトからヒトへの伝播が発生し、痘そうワクチン未接種の若い世代に発症者が多いことが報告されている。そこで、痘そうワクチン LC16m8 を1回接種された成人初回接種者について調査した結果、痘そうワクチン LC16m8 は、米国で承認、備蓄されている第1世代の痘そうワクチンである Dryvax と同程度のサル痘ウイルスに対する中和抗体誘導能を有することが示唆された。

研究協力者

新村靖彦・一般財団法人化学及血清療法研究所
研究開発本部製品開発部開発第五課・課長

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弱毒生ウイルスワクチンで、本邦では 1975 年に製造承認が認可された。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初動対応者(ファーストレスポンドー)となりうる成人対象者(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。

また、本邦の国際貢献では、国連の平和維持活動(PKO)への積極的貢献活動が行われ、自衛隊及び医療従事者等の関係者のアフリカ、中東への派遣が行われている。アフリカ地域では、WHO の

報告によると、1981 年から 1986 年及び 1996 年から 1997 年に数百例規模のヒトでのサル痘ウイルスの大流行(アウトブレイク)が発生し、その後も散発的なアウトブレイクが発生している。近年では特に患者からその家族へのウイルス伝播、つまり、ヒトからヒトへの感染が地域における流行拡大に起因していること、また、痘そうワクチン未接種の若い世代において発症者が多いことが報告されている(Rimoin et al. 2010, Nolen, et al. 2016)。以上の背景より、痘そうワクチン LC16m8 を 1 回接種された成人対象者においてサル痘ウイルスに対する中和抗体の獲得状況の調査が必要と考え、平成 28 年度より本研究を開始し、今年度も調査を継続した。

B. 研究方法

本調査研究では、過去に種痘歴の無い健康成人(初回接種者)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ヒト血清(LC16m8 接種者 23 名及び Dryvax 接種者 7 名、各被験者のワクチン接種前及び接種後 30 日目採取血清)を用いて実施した。なお、調査対象者は各ワクチン接種群の被験者のうち、接種後 30 日目に採取した血清中のワク

チニアウイルス NYCBH 株に対する中和抗体価 (Anti-NYCBH PRNT₅₀) が 320 から 1280 の範囲の者から両群で高低の偏りが可能な限り無いように選定した(表 1)。

サル痘ウイルスに対する中和抗体価測定は米国の試験受託機関である Southern Research (2000 9th Avenue South, Birmingham, AL 35205, USA)へ委託し、供試検体は盲検状態で提供した。測定は分担研究者である園田が承認した試験プロトコルに従い、Vero E6 細胞を用いて実施され、血清中のサル痘ウイルス(Zaire-79 株)に対する中和抗体価(Anti-Monkeypox PRNT₅₀)を 50%プラーク減少法により算出した。

【倫理面への配慮】

本調査研究は、一般財団法人化学及血清療法研究所の研究倫理審査委員会の審査を受け、2017 年 11 月 16 日付で承認を得て実施した(受付番号 17-05)。また、個人を特定できないように措置を講じた上で研究を実施した。

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験者が獲得したサル痘ウイルスに対する中和抗体応答を調査するために、過去に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 年に化血研が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ヒト血清を用いて、サル痘ウイルスに対する中和抗体価測定を実施した。各被験者の Anti-Monkeypox PRNT₅₀ を表 1 に示す。次に、中和抗体陽転率は、Anti-Monkeypox PRNT₅₀ が ≥ 10 を基準とした場合、LC16m8 群では 78%(18/23)、Dryvax 群では 86%(6/7)であり、接種前後比で 4 倍の抗体価上昇を基準とした場合、同じく LC16m8 群では 78%(18/23)、Dryvax 群では 86%(6/7)であり、両群は同等であった。また Anti-Monkeypox PRNT₅₀ の幾何平均(GMT)は、LC16m8 群では 35、Dryvax 群では 86 であり、両群の Anti-NYCBH PRNT₅₀ の GMT 比 1.25 倍(LC16m8 群の GMT は 420、Dryvax 群の GMT は 525)と比較して、約 2 倍の GMT 比であった(表 2)。

更に、平成 28 年度の研究において実施された、本邦の海外派遣対象の LC16m8 接種者 19 名(初回接種者 12 名、再接種者 7 名)の Anti-Monkeypox PRNT₅₀ の結果が未報告であったため、今年度の成績と合わせて報告する。初回接種

者及び再接種者の各タイムポイントにおける Anti-Monkeypox PRNT₅₀ の GMT 及び抗体陽性率を表 3 に示す。

D. 考察

本研究により、過去に種痘歴の無い健康成人において、痘そうワクチン LC16m8 は米国で承認、備蓄されている第 1 世代痘そうワクチンである Dryvax と同程度のサル痘ウイルスに対する中和抗体誘導能を有することが示唆された。一方で、Anti-Monkeypox PRNT₅₀ の GMT については、LC16m8 接種群の方が若干低い値となったが、これはワクチン株と中和抗体価測定に用いる攻撃用ウイルス株の遺伝的な近縁性や相同性の違いによって生じる変化であることが知られており、その傾向を示したものと考えられた(Kennedy et al., 2011)。

次に、1980 年の天然痘撲滅宣言を受けて、全世界での痘そうワクチン接種が中止され、本邦においても 1976 年に痘そうワクチン定期接種が中止され、40 歳以下の世代では痘そうワクチン接種歴が無く、また既接種者においても本研究班でのこれまでの研究成果で示されているように、ワクチニアウイルス Lister 株等のポックスウイルスに対する中和抗体が接種後の年数を経て徐々に陰性化しているヒトの割合が高まりつつあることが懸念される。そこで、痘そうワクチン LC16m8 により誘導されたサル痘ウイルスに対する中和抗体応答の持続期間に関する調査が重要であると考え、その調査が平成 28 年度に開始された。なお、当該調査では試験受託機関で中和抗体価測定の試験系の陽性対照として設定されている抗ワクチニアウイルスイムノグロブリン(VIG)の Anti-Monkeypox PRNT₅₀ が想定値よりも 10 倍程度低く、各供試検体の Anti-Monkeypox PRNT₅₀ についても、それらの Anti-Lister PRNT₅₀ からの想定値よりも総じて低い値となり、サル痘ウイルスに対する中和抗体応答の持続について正確な評価を行うためには十分な成績が得られなかった。

E. 結論

細胞培養弱毒生痘そうワクチン LC16m8 を 1 回接種された過去に種痘歴の無い成人被験者について調査した結果、痘そうワクチン LC16m8 のサル痘ウイルスに対する中和抗体誘導能が確認された。また、それは米国で承認、備蓄されている第 1 世代痘そうワクチンである Dryvax と同等であることが確認された。一方で、痘そうワクチン LC16m8 により誘導されたサル痘ウイルスに対す

る中和抗体応答の持続については、調査対象者数を増やし成績を補充するなど、更なる調査研究が必要であると考えられた。

F. 健康危険情報
該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

- 1) Shinmura Y, Takagi S, Yoshimura M, Kameyama K, Sonoda K, Kino Y, Yoksan S, Fuji T, Single administration of live-attenuated tetravalent dengue vaccine candidate, KD-382, induced long-lasting (>2 years) neutralizing antibody against all four serotypes in cynomolgus monkeys, The American Society of Tropical Medicine and Hygiene Annual Meeting 2017, Baltimore, November 2017
- 2) Takagi S, Yoshimura M, Kameyama K, Shinmura Y, Sonoda K, Kino Y, Fuji T, Evaluation of the effect of pre-existing immunity against dengue on neutralizing antibody response induced by a live attenuated tetravalent dengue vaccine candidate, KD-382, in cynomolgus monkeys, The American

Society of Tropical Medicine and Hygiene Annual Meeting 2017, , Baltimore, November 2017

- 3) 吉村昌也, 高木翔太, 亀山和久, 新村靖彦, 園田憲悟, 来海和彦, 4 価弱毒生 Dengue ワクチン開発品のカニクイザルにおける中和抗体応答評価, 第 54 回日本ウイルス学会九州支部総会, 那覇, 2017 年 9 月
- 4) 吉村昌也, 高木翔太, 亀山和久, 新村靖彦, 園田憲悟, 城野洋一郎, 藤井隆, 4 価弱毒生 Dengue ワクチン開発品のカニクイザルにおける中和抗体応答評価, 第 52 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 沖縄, 2017 年 5 月
- 5) Shinmura Y, Kino Y, Yoksan S, Sonoda K, Single dose of live attenuated tetravalent dengue vaccine elicits well-balanced immune response for all four serotypes without viremia in monkeys, The 6th Asian Vaccine Conference 2017, Singapore, April 2017

H. 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
特になし

表 1. 痘そうワクチン接種後のサル痘ウイルスに対する中和抗体価

Sample ID	Vaccine	Day after vaccination	Anti-NYCBH PRNT ₅₀	Anti-Monkeypox PRNT ₅₀	Sample ID	Vaccine	Day after vaccination	Anti-NYCBH PRNT ₅₀	Anti-Monkeypox PRNT ₅₀
HS001	LC16	0	<10	<10	HS031	Dryva	0	<10	<10
HS002	m8	30	320	23	HS032	x	30	320	150
HS003	Dryv	0	<10	<10	HS033	Dryva	0	20	<10
HS004	ax	30	320	157	HS034	x	30	1280	192
HS005	LC16	0	10	<10	HS035	LC16	0	10	<10
HS006	m8	30	320	<10	HS036	m8	30	320	64
HS007	LC16	0	<10	<10	HS037	LC16	0	<10	<10
HS008	m8	30	320	123	HS038	m8	30	640	<10
HS009	Dryv	0	<10	<10	HS039	LC16	0	20	19
HS010	ax	30	1280	<10	HS040	m8	30	640	120
HS011	LC16	0	<10	<10	HS041	LC16	0	<10	<10
HS012	m8	30	320	138	HS042	m8	30	640	155
HS013	LC16	0	<10	<10	HS043	LC16	0	10	<10
HS014	m8	30	320	39	HS044	m8	30	640	111
HS015	LC16	0	<10	<10	HS045	LC16	0	<10	<10
HS016	m8	30	320	<10	HS046	m8	30	640	<10
HS017	LC16	0	<10	<10	HS047	Dryva	0	10	<10
HS018	m8	30	320	30	HS048	x	30	320	103
HS019	LC16	0	10	<10	HS049	LC16	0	80	<10
HS020	m8	30	640	23	HS050	m8	30	640	129
HS021	LC16	0	<10	<10	HS051	LC16	0	<10	<10
HS022	m8	30	320	27	HS052	m8	30	320	<10
HS023	Dryv	0	<10	<10	HS053	LC16	0	<10	<10
HS024	ax	30	320	204	HS054	m8	30	640	71
HS025	Dryv	0	20	<10	HS055	LC16	0	<10	<10
HS026	ax	30	640	74	HS056	m8	30	320	82
HS027	LC16	0	<10	<10	HS057	LC16	0	80	<10
HS028	m8	30	320	80	HS058	m8	30	320	26
HS029	LC16	0	<10	<10	HS059	LC16	0	<10	<10
HS030	m8	30	640	26	HS060	m8	30	320	73

表 2. 痘そうワクチン接種後のサル痘ウイルスに対する中和抗体陽転率

Vaccination	Anti-NYCBH PRNT		Anti-Monkeypox PRNT			
	LC16m8	Dryvax	LC16m8		Dryvax	
N	23	7	23		7	
Seroconversion rate	100%* (23/23)	100%* (7/7)	78%* (18/23)	78%** (18/23)	86%* (6/7)	86%** (6/7)
GMT	420	525	35		86	
GMT ratio	1.25		2.45			

*10 倍以上の中和抗体価を獲得した者を陽性と判定

**ワクチン接種前の抗体価の 4 倍以上の抗体価を獲得した者を陽性と判定

GMT: Geometric mean titer

表 3. 痘そうワクチン LC16m8 接種後のサル痘ウイルスに対する中和抗体価及び抗体陽性率

Subjects	Before vaccination		1 month		4 or 7 months		3~4 years	
	GMT	Positive rate*	GMT	Positive rate*	GMT	Positive rate*	GMT	Positive rate*
Primary (N=12)	22	17% (2/12)	28	50% (3/6)	25	33% (2/6)	28	33% (4/12)
Revaccinee (N=7)	33	43% (3/7)	88	71% (5/7)	N/A	N/A	N/A	N/A

GMT: Geometric mean titer, Positive rate: seroconversion/seropositive rate, N/A: not applicable

*陽性判定基準:中和抗体価が 40 倍以上の抗体価を示した者を陽性と判定