

II. 分担研究報告

平成 29 年度～令和元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

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・部長
研究代表者	西條政幸

研究要旨：本研究班の全体的研究の推進を統括した。痘瘡ウイルスが用いられるバイオテロに関連する議論がなされている。世界保健機関(WHO)が主催する痘瘡ウイルス研究専門会議(Advisory Committee of Variola Virus Research Committee, ACVVR)における最近の議論の中で、治療法開発研究、ワクチンに関する議論、そして、2016年に発表された馬痘ウイルスの人工合成の成功に関する議論について、概要をまとめ、今後のバイオテロ対策のあり方を考察した。第三世代痘瘡ワクチンのMVAが、また、抗ウイルス薬として、米国では抗ウイルス薬TPOXX® [Arestvyr® (ST-246)]の備蓄が開始されることが決定された。着実に対策が強化されつつある。日本では世界で現存する第三世代痘瘡ワクチンLC16m8が生産・備蓄されている。LC16m8ワクチン接種による痘瘡ウイルスに対する中和抗体誘導が認められることが第19回痘瘡ウイルス研究専門家会議(ACVVR)および第20回ACVVRにおいて報告された。痘瘡ワクチン接種が中止されてから40年以上が経過し、世界中の半分以上の人々は痘瘡ウイルスに対する免疫を有さない。それに伴い、痘瘡ウイルスのウイルス科・属をいつにするサル痘ウイルスや牛痘ウイルスのヒトにおける感染症が増加している。2018年6月からコンゴ民主共和国(DRC)にてEVD流行が発生し、そのEVD流行は2014-2015年に西アフリカで発生したEVD大規模流行の様相を呈している。2020年4月現在でもEVD流行がDRC北東部で続いている。その最中の2019年12月には中国武漢を源とする新規コロナウイルス感染症COVID-19が発生し、2020年1月には日本でもCOVID-19患者が確認され、COVID-19流行は同年3月には世界的流行に発展した。日本国内外で新興・再興ウイルス感染症流行について注視する必要がある。2020年に東京オリンピック・パラリンピックが日本で開催される予定であったが、2020年3月に上記COVID-19の世界的流行に鑑み、日本国政府は2021年に開催を延期することを決定した。国立感染症研究所は、2019年9月にウイルス性出血熱等の一類感染症に対する検査能力強化、検査法の改良、そのための科学的基盤を整備する目的で、感染性のあるエボラウイルス等一種病原体を入手した。今後、感染性のある一種病原体を用いて、これまで整備されてきた一類感染症の検査法をよりよいものに改良したり、実施できなかった中和抗体測定法を整備したりする予定である。今後も病原性の高い新興・再興ウイルス感染症の世界的流行状況を注視し、また、国際連携を含めたバイオテロ対策を強化することが求められる。

A. 研究目的

本研究班の全体の進捗を統括すること、また、世界保健機関(World Health Organization, WHO)の痘瘡ウイルス研究に関する専門家会議(ACVVR)やG7+メキシコの専門機関代表者からなるGlobal Security Health Action Group-Laboratory Network(GSHAG-LN)等の会議に出席してバイオテロ対策に関する国際動向について調査ことを目的とした。
痘瘡ウイルスはヒトからヒトに容易に伝搬し、致死

率の極めて高い天然痘の病原体である。天然痘は1977年の患者を最後に、地球上から根絶された。痘瘡ウイルスは、米国のUS CDC(アトランタ、ジョージア州)とロシアのState Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR(Koltsovo, Novosibirsk)にのみ保管されている。その他の研究期間は痘瘡ウイルスの所持・保管は国際的規程により認められていない。しかし、数年前に米国NIHで痘瘡ウイルスが存在していたことが偶然発見されたり、上記2機関以外にも保管されている可能

性が示唆されたりしている。天然痘病原体の痘瘡ウイルスが用いられるバイオテロにおいて用いられる危険性に備えて、世界的にワクチン開発と備蓄等の活動がなされている。本研究では、ACVVR での痘瘡ウイルス研究のあり方の議論の内容を整理し、バイオテロ対策の国際的動向を調査することを目的とした。

痘瘡ワクチン接種が国際的に中止されてから 40 年以上が経過し、それに呼応するかのようにサル痘ウイルス感染症（アフリカ）、牛痘ウイルス感染症（欧州）、ワクシニアウイルス感染症（南米）の発生が見られるようになった。その現状をまとめた。バイオテロ病原体に関連のあるエボラウイルスによるエボラウイルス病をはじめとする一類感染症の流行状況について注視することも目的とした。

国立感染症研究所（感染研）が一類感染症の検査システムの改良と開発、その基盤を整備することを目的として感染性のある一種病原体（エボラウイルス等）を所持することに貢献した。今後の検査法開発等について考察した。

B. 研究方法

1) ACVVR, GHSAG-LN, 日米バイオディフェンス会議

第 19 回 ACVVR (2017 年 11 月, ジュネーブ, スイス), 第 20 回 ACVVR (2018 年 9 月, ジュネーブ, スイス) に, WHO の要請に基づいて出席した。際のレポートの概要をまとめた。尚, このレポートは正式に WHO から公表されている (<https://www.who.int/csr/resources/publications/smallpox/variola-research-november-2017/en/>), <https://www.who.int/csr/resources/publications/smallpox/variola-research-september-2018/en/>)。ACVVR および GHSAG-LN 等の会議を通じて, 国際的なバイオテロ対策の動向を調査した。

第 18 回 ACVVR において, Evans D 教授 (カナダ) が発表した。化学物質のみから感染性のある馬痘ウイルスを合成した事実について考察する。また, 第 18 回 ACVVR (2016 年 11 月, ジュネーブ, スイス) のレポートに記載されている概要についてまとめた。

GHSAG-LN のフレームの中で実施されたオルソポックスウイルス感染症の診断技術レベルを評価する活動に参加した。

2018 年 5 月に国立感染症研究所 (感染研) で GHSAG-LN を開催した。2019 年 4 月と 12 月にそれぞれベルリン (ドイツ) のロベルト・コッホ研

究所とローマ (イタリア) の国立感染症研究所 (Spallanzani) で開催された GHSAG-LN 会議に出席した。

2019 年 12 月 2-3 日に米国 NIH (ベセスダ, メリーランド州) で開催された日米バイオディフェンス会議に出席した。

2) バイオテロ関連病原体による新興・再興ウイルス感染症に関する調査

近年流行が増加していると考えられるオルソポックスウイルス感染症の流行状況について文献的調査を実施した。また, WHO から発表されているコンゴ民主共和国 (DRC) で発生している 2018-2019 年エボラウイルス病 (EVD) 流行の発生状況の報告をもとにその流行状況をまとめた。

3) バイオテロ対策に関する学術的広報活動

2018 年度開催された学術集会 (日本ウイルス学会, 日本感染症学会等) において, バイオテロ対策に関するシンポジウムを共催開催した。

4) 感染性のある一種病原体の所持と検査法開発

東京オリパラの開催に備え, 輸入感染症対策やバイオテロ対策を強化するために, 感染性のある一類感染症病原体 [エボラウイルス, マールブルグウイルス, クリミア・コンゴ出血熱ウイルス, ラッサウイルス, 南米出血熱ウイルス (フニンウイルスなど)] の入手作業に貢献した。

5) G20 大阪サミット 2019 開催に備えたバイオテロ対策の準備

2019 年 6 月 28-29 日に, 世界各国の要人が集まる G20 大阪サミット 2019 が大阪で開催された。厚生労働省がこの開催に関連するバイオテロ対策や輸入感染症対策に, 有事に備えた検査対応に備える体制を整備する活動に研究班として貢献した。

C. 研究結果

1) ACVVR, GHSAG-LN, 日米バイオディフェンス会議

WHO-ACVVR が認めているバイオテロ対策に通じる研究は,

① US CDC で実施されている humanized mice を用いた痘瘡ウイルス感染動物モデル開発である。現時点では, 痘瘡ウイルス感染動物モデルは霊長類を用いることにより痘瘡類似症状を発症させるものしかなく, かつ, それにはかなり高い感染価のウイルスを静注投与することが必要である。

② 抗ウイルス薬に関する研究は, VECTOR および US CDC で実施されている。US CDC では

ワクシニアウイルスの感染性を阻害する単クローン抗体を用いた治療薬開発が実施されている。

- ③ 痘瘡に対する治療薬開発には、他のオルソポックスウイルス感染動物モデルを用いて研究がなされている。特に本 ACVVR において報告されている抗ウイルス薬は、TPOXXTM/ArestyvrTM (ST-246, SIGA Technology 社) と Brincidofovir (CMX001, Chimerix 社) の 2 剤である。
- ④ TPOXXTM/ArestyvrTM はオルソポックスウイルスに特異的な抗ウイルス薬であり、動物感染モデルでその有効性が評価されている。ヒトにおける臨床研究も進められている。尚、Brincidofovir は多くの DNA ウイルスの増殖を抑制する抗ウイルス薬 (シドフォビル, Cidofovir の経口投与薬) である。米国では痘瘡ウイルスが用いられたバイオテロに備えて、抗ウイルス薬 TPOXX[®] [Arestyvr[®] (ST-246)] の備蓄が開始されることが明らかにされた。
- ⑤ ACVVR において議論されている痘瘡ワクチンは MVA と日本で生産・備蓄されている LC16m8 である。LC16m8 については、本研究班の活動の一環として、LC16m8 接種者において誘導される抗体が感染性のある痘瘡ウイルスに中和活性を有するか否かに関する研究成果についても報告されている。尚、この研究は本研究班と US CDC との共同研究 (ACVVR からの承認の基に) 実施されている。

2017 年第 19 回 ACVVR では、LC16m8 の製造メーカーである KM バイオロジクス (KMB) からの出席がなかった。しかし、本研究班と米国 CDC との間で実施されている共同研究成績について米国 CDC の責任者 (Olson V 博士) から発表された。LC16m8 をヒトに接種することで、痘瘡ウイルスに対する中和抗体が誘導されること、その効果は ACAM2000 による誘導力と同等であることが報告された。LC16m8 と同様に第三世代のワクチン MVA (MVA-BN[®] (IMVANEX[®]/IMVAMUNE[®])) が欧州 (EC)、カナダ、米国に認可備蓄されることになった。

痘瘡は世界中から根絶されており、その感染性のある痘瘡ウイルスを地球上からなくする (滅菌廃棄) ことが WHA (World Health Assembly) で決定されている。しかし、現在でも米国 CDC およびロシア VECTOR において保管されている。抗ウイルス薬開発や痘瘡対策のためには、委員の間でも意見がわかれているものの、その破壊は時期

尚早という意見がまとめられた。

GHSAG-LN 会議のフレームの中で、関係国感染症研究機関 (日本は国立感染症研究所) 間でオルソポックスウイルス感染症の診断 (遺伝子検査) の能力外部評価が実施され、その活動に参加した。2019 年 4 月と 12 月にそれぞれベルリン (ドイツ) のロベルト・コッホ研究所とローマ (イタリア) の国立感染症研究所 (Spallanzani) で開催された GHSAG-LN 会議では、日本で流行している重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) に対するファビピラビル治療に関する最新の研究成績やワクチン開発について、関係者に紹介した。新興・再興感染症対策について継続した協力について議論した。

2019 年 12 月 2-3 日に米国 NIH (ベセスダ, メリーランド州) で開催された日米バイオディフェンス会議には、研究代表者の西條政幸と研究分担者の齋藤智也が出席し、また、米国 CDC のボックスウイルス研究部門の研究者も同会議に出席した。本会議では、東京オリンピック・パラリンピック等の大規模イベントに関連するバイオテロ対策における共同作業のあり方や痘瘡ウイルスによるバイオテロ対策について、日米それぞれの立場で意見交換がなされ、また、共同研究について議論された。特に本研究班と米国 CDC との間で実施されている LC16m8 高度弱毒細胞培養痘瘡ワクチンのワクチン効果を、感染性のある痘瘡ウイルスを用いた中和抗体測定法に基づいて評価する共同研究について本会議関係者に報告された。

2) 痘瘡ウイルス関連オルソポックスウイルス感染症の最近の流行

アフリカ (中央部、西部) においてサル痘ウイルス感染症流行が増加している。2017 年にはこれまで流行報告のなかったナイジェリア、カメルーンでサル痘ウイルス感染症流行が発生し、死亡例も報告された。US CDC により詳細な調査研究がなされ、比較的病原性が低いとされる西アフリカ型サル痘ウイルスによるとの情報をえた。また、欧州 (特にドイツ) で牛痘ウイルスによるひとの感染事例の報告が増加している。牛痘ウイルスの宿主は齧歯類で、齧歯類を捕食するネコが牛痘ウイルスに感染し、その感染ネコからヒトも感染するのではないかと推測される。さらに、南米ではヒトにおけるワクシニアウイルス感染症事例の報告が増加している。このように、痘瘡ウイルスによるバイオテロ対策だけでなく、痘瘡ウイルス関連オルソポックスウイルス感染症対策を強化することが必要になると考えられる。

2018年にはDRCにて独立する2つのEVD流行が発生した。第1次流行時には、日本政府(外務省)が災害緊急援助隊(感染症対策)の派遣がなされ、国立感染症研究所等の専門家が派遣された。第一次流行は終息したが、2018年6月頃からDRC東北部(ウガンダ、スーダンとの国境地帯)でEVD流行が発生し、このDRCにおけるEVD流行は2014-15年に西アフリカで発生したEVD大規模流行の流行状況・性状と類似している。2018-2020年のEVD第2次流行は北東部のNord Kivu州とIturi州で発生した。この流行は2018年8月頃から発生し、現在(2020年4月)の時点でもその流行は続いている。2019年3月から9月の患者報告数は最も高くなり(ピーク時には週に約120人の患者が報告された)、2019年10月から2020年1月までは、週に10人程度の患者が発生する状況となった。2020年2月以降では、ほとんど患者は報告されていないが、2020年3月から4月にかけても患者が報告された。2020年4月26日現在、3461人の患者が報告され、そのうち2279人が死亡した。単純に計算すると致死率は66%となる。対策強化が急務である。

3) バイオテロ対策に関する学術的広報活動

本研究班の広報活動の一環として、平成30年10月24日に日本感染症学会と化学療法学会合同学会(開催地:東京)にて本研究班との共催による「感染症の危機管理・バイオテロ対策」シンポジウムを開催した。研究分担者(鯉淵)が座長を担当し、シンポジストの1人として研究代表者の西條が担当した(西條政幸. 高病原性病原体による感染症(バイオテロを含む)の検査体制と備え(シンポジウム:感染症の危機管理・バイオテロ対策)。第67回日本感染症学会東日本地方会・第65回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会, 東京, 2018年10月)。さらに、2018年度の日本ウイルス学会(京都)において開催されたInfection Control Doctor(ICD)講習会において、本研究班の研究成果発表を含めて「生物テロと痘瘡ウイルス」と題する講演を担当した(西條政幸. バイオテロと痘瘡ウイルス。第66回日本ウイルス学会・ICD講習会, 京都2018年, 10月)。

4) 感染性のある一種病原体の所持と検査法開発

1981年に国立感染症研究所(村山庁舎)に高度封じ込め施設、いわゆるBSL-4研究施設が建設された。2019年9月に日本で初めて感染性のあるエボラウイルス、マールブルグウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス、ラッサウイルス、南米

出血熱ウイルス(フニンウイルスなど)を、国際的ネットワークの協力のもとに分与を受け、所持した。アジアでは初めてのことで考えられる。今回、分与を受け所持することとなった感染性のあるこれらのウイルスを用いて、検査法の改良し、実施することのできなかった検査法(例えば中和抗体測定法等)を開発することが可能となった。2019年7月に開催予定の東京オリンピック・パラリンピック等の大規模イベントに関連する輸入感染症対策やバイオテロ対策に資するための検査法整備を行うことになっていたが、その準備が開始された。

5) G20 大阪サミット 2019 開催に備えたバイオテロ対策の準備

感染研では、大阪健康安全基盤研究所の依頼に基づき、バイオテロ関連有事の際に、迅速に検査に対応する体制を整備し、備えた。研究代表者の西條政幸は、有事の際に迅速に対応するために、G20 大阪サミット 2019 の会場近くに設置された対策本部に詰めた。幸い、対応すべき事件等はなかった。

6) 厚生労働省一類感染症流行発生時に備えた「一類感染症への行政対応の手引き」作成・改訂への貢献

厚生労働省一類感染症流行発生時に備えた「一類感染症への行政対応の手引き」の作成、改訂に協力した。特に2019年の改訂には、その手引きに痘瘡(天然痘)に関する章が追加された。

【倫理面への配慮】

特記事項はない。

D. 考察

WHOにおいてはACVVR等において継続して痘瘡ウイルスによるバイオテロ、痘瘡の再流行の発生に備えた議論がなされている。抗ウイルス薬としては2剤について議論がなされ、米国ではカウンターメジャーの際の薬剤として認められる方向が示されているように思われる。一方、ワクチンとしてMVAとLC16m8が議論されている。

第18回ACVVR(2016年11月、ジュネーブ、スイス)では、カナダのオルソポックスウイルス研究の第一人者で、かつ、ACVVRの専門家であるEvans D教授が、化学物質のみから感染性のある馬痘ウイルスを作製した。遺伝子情報、遺伝子合成技術を含む科学技術の向上により、巨大なDNAウイルスであるオルソポックスウイルス合成に初めて成功した。このプロセスは通常 Synthetic

Biology(合成生物学)と呼ばれ、今回の馬痘ウイルスを人工合成したことは、一方で痘瘡ウイルス合成が可能であることを示唆している。本研究は科学的な進歩に寄与する研究であるが、一方で、バイオテロ上において新たなリスクを生じされるといえる。

第 19 回 ACVVR での議論に関するレポートは報告されていないが、この会議でも本研究班で実施されている LC16m8 接種者における感染性痘瘡ウイルスに対する中和抗体誘導能に関する研究成果が発表された。安全性が確保されている第Ⅲ世代痘瘡ワクチンとして世界で存在するのは、MVA と LC16m8 のみである。そのような状況で LC16m8 接種者における感染性痘瘡ウイルスに対する中和抗体誘導能に関する研究は、とても注目されている。本研究班でなされている研究は、国内外のオルソポックスウイルス感染症対策、バイオテロ対策に貢献するものと考えられる。

痘瘡ワクチン接種が世界規模で中止されてから約 40 年が経過し、痘瘡ウイルス関連オルソポックスウイルス感染症流行が増加していると考えられる。オルソポックスウイルス感染症患者の国内輸入例にも備える必要性と、その対策(治療・予防法)の強化が求められる。本研究で実施されたオルソポックスウイルス感染症のような希少感染症に対する検査法の外部評価活動に参画することはこれからも求められることと思われる。

痘瘡ウイルスと同じウイルス科・属に分類されるヒトサル痘(ヒトにおけるサル痘ウイルス感染症)やヒトにおける牛痘ウイルス感染症が今後とも続くことが予想される。サル痘ウイルスにはコンゴ盆地方と西アフリカ型の 2 種類ウイルス型に分類されることが知られ、前者の病原性が後者より高いとされてきた。しかし、現在ナイジェリアやカメルーンで発生しているサル痘ウイルス感染症は西アフリカ型により、さらに死亡例は輸入感染事例が発生している。これらの感染症は痘瘡との鑑別疾患に重要なものであり、対策を強化することも本研究班の重要な課題になるものと考えられる。

現在、DRC の東北部で発生している EVD 流行は 2014-2015 年に西アフリカで発生した EVD 大規模流行の様相を呈している。2019 年にラグビーワールドカップが、2020 年に東京オリンピック・パラリンピックが日本で開催される。輸入感染症対策強化が求められるが、今後も DRC の大規模 EVD 流行について注目していく必要がある。研究論文として日本には EVD 治療に有用性があると報告されている favipiravir が日本の製薬メーカーで開発されている。バイオテロ対策においても重要な

位置を占める薬剤となる可能性がある。

EVD の流行は、条件が整うと長期に渡り続き、多くの患者を死に至らしめることが明らかになった。西アフリカでは、特にナイジェリアではラッサ熱流行が続いている。また、ナイジェリアでは人におけるサル痘ウイルス感染症(ヒトサル痘)流行も続いて発生し、英国やシンガポールで輸入感染症としてのヒトサル痘患者が確認されている。このように頻度は低いものの、ウイルス性出血熱やオルソポックスウイルス感染症輸入感染症対策の重要性が示されている。

GHSAG-LN や日米バイオディフェンス会議、ACVVR に継続して参加することが、バイオテロ対策や輸入感染症対策に貢献することに繋がる。

2019 年には G20 大阪サミット 2019 が大阪で開催され、それに関連するバイオテロや輸入感染症対策に貢献した。2020 年には東京オリパラが開催される予定であったが、COVID-19 の世界的流行によって、2021 年 7 月に開催が延期された。その後も世界万博(大阪)などの大規模イベントの開催が計画されている。バイオテロ対策のための検査法の整備と維持はとても重要なことと考えられるが、実際にこれらの大規模イベントが開催されたときに研究班として対策に貢献することも重要である。

E. 結論

オルソポックスウイルス感染症流行は、時代とともに変化していくものと考えられる。治療・予防法の開発、疫学情報の集積、ワクチン備蓄のあり方など、これからも継続して議論され、適切な対策が講じられることが求められる。G20 大阪サミット 2019 が 2019 年 6 月に大阪で開催された際には、研究班としてもバイオテロ対策に備えて、検査対応、現場での備えに貢献した。2019 年 9 月に日本で初めて感染性のあるエボラウイルス等、一類感染症の病原体を感染研として所持することになった。これらの病原体を用いた検査法整備、開発作業が始められた。

F. 健康危険情報

2018 年に発生した DRC における EVD 流行は、現在もその流行が続き、さらに発生から約 10 ヶ月が経過して現在ではその規模が大きくなっている状況にある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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. *Jpn J Infect Dis.* 2017;70(4):408-415.
- 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.* 2018;71:205-208. doi: 10.7883/yoken.JJID.2017.354.
 - 3) Takayama-Ito M, Lim CK, Yamaguchi Y, Posadas-Herrera G, Kato H, Iizuka I, Islam MT, Morimoto K, Saijo M. Replication-incompetent rabies virus vector harboring glycoprotein gene of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) protects mice from LCMV challenge. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(4):e0006398. doi: 10.1371/journal.pntd.0006398.
 - 4) Yoshikawa T, Fujii H, Okutani A, Shibamura M, Omura N, Egawa K, Kato H, Inagaki T, Harada S, Yamada S, Morikawa S, Saijo M. Construction and characterization of bacterial artificial chromosomes harboring the full-length genome of a highly attenuated vaccinia virus LC16m8. *PLoS One.* 2018;13(2):e0192725. doi: 10.1371/journal.pone.0192725.
 - 5) Egawa K, Shimojima M, Taniguchi S, Nagata N, Tani H, Yoshikawa T, Kurosu T, Watanabe S, Fukushi S, Saijo M. Virulence, pathology, and pathogenesis of Pteropine orthoreovirus (PRV) in BALB/c mice: Development of an animal infection model for PRV. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(12):e0006076. doi: 10.1371/journal.pntd.0006076.
 - 6) Fukushi S, Fukuma A, Kurosu T, Watanabe S, Shimojima M, Shirato K, Iwata-Yoshikawa N, Nagata N, Ohnishi K, Ato M, Melaku SK, Sentsui H, Saijo M. Characterization of novel monoclonal antibodies against the MERS-coronavirus spike protein and their application in species-independent antibody detection by competitive ELISA. *J Virol Methods.* 2018;251:22-29. doi: 10.1016/j.jviromet.2017.10.008.
 - 7) Taniguchi S, Maeda K, Horimoto T, Masangkay JS, Puentespina R Jr, 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. *Arch Virol.* 2017;162(6):1529-1539. doi: 10.1007/s00705-017-3251-2.
 - 8) Takayama-Ito M, Lim CK, Nakamichi K, Kakiuchi S, Horiya M, Posadas-Herrera G, Kurane I, Saijo M. Reduction of animal suffering in rabies vaccine potency testing by introduction of humane endpoints. *Biologicals.* 2017;46:38-45. doi: 10.1016/j.biologicals.2016.12.007.
 - 9) Ogawa M, Satoh M, Saijo M, Ando S. Evaluation of a broad-ranging and convenient enzyme-linked immunosorbent assay using the lysate of infected cells with five serotypes of *Orientia tsutsugamushi*, a causative agent of scrub typhus. *BMC Microbiol.* 2017;17(1):7. doi: 10.1186/s12866-016-0910-5.
 - 10) Eto K, Fujita M, Nishiyama Y, Saito T, Molina D, Morikawa S, Saijo M, Shinmura Y, Kanatani Y. Profiling of the antibody response to attenuated LC16m8 smallpox vaccine using protein array analysis. *Vaccine.* 37(44):6588-6593. 2019
 - 11) 西條政幸. 新興ウイルス感染症とワクチン開発 : 研究の最前線. *Neuroinfection* 23(1):56-61, 2018
 - 12) 西條政幸, 安田二郎, 平山謙二. BSL-4 施設の重要性と世界への貢献. *最新医学* 74:453-463, 2019
 - 13) 西條政幸. SFTS, クリミア・コンゴ出血熱. *最新医学* 74:483-489, 2019
 - 14) 西條政幸. IV章. 大規模イベントと医療体制 – サーベイランスの強化 -. *日本医師会雑誌* 149・特別号(1):244-245, 2020
 - 15) 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. *グローバル時代のウイルス感染症*, 日本医事新報社, 東京, p8-14, 2019
 - 16) 西條政幸. 日本における新興・再興ウイルス感染症の検査体制. *グローバル時代のウイルス*

- 感染症, 日本医事新報社, 東京, p42-46, 2019
- 17) 藤間大貴, 西條政幸. 黄熱. グローバル時代のウイルス感染症, 日本医事新報社, 東京, p95-100, 2019
 - 18) 西條政幸. クリミア・コンゴ出血熱. グローバル時代のウイルス感染症, 日本医事新報社, 東京, p133-137, 2019
 - 19) 西條政幸. エボラウイルス病. グローバル時代のウイルス感染症, 日本医事新報社, 東京, p138-143, 2019
 - 20) 江川和孝, 西條政幸. アジアにおけるオルソオウイルス感染症. グローバル時代のウイルス感染症, 日本医事新報社, 東京, p182-187, 2019
 - 21) 谷英樹, 西條政幸. 新興ウイルス感染症における抗ウイルス薬: ファビピラビル. グローバル時代のウイルス感染症, 日本医事新報社, 東京, p248-253, 2019
2. 学会発表
- 1) 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)
 - 2) 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
 - 3) Inagaki T, Yamada S, Haseve F, Quynh Le MT, Mori K, Fujii H, Yoshikawa T, Harada S, Takayama H, Saijo M. Characterization of alphaherpesvirus isolated from fruits bats in Vietnam. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2017, Osaka (W2-5-05)
 - 4) Kato F, Takayama-Ito M, Iizuka-Shiota I, Posadas-Herrera G, Horiya M, Satoh M, Morimoto K, Saijo M, Lim CK. Development of a bivalent-vaccine against MERS-CoV and Rabies virus by using a recombinant replication-deficient rabies virus vector. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2017, Osaka (W2-5-05)
 - 5) Saijo M. BSL-4 laboratory in the National Institute of Infectious Diseases (NIID), Tokyo, Japan: preparedness for highly pathogenic emerging virus infections. WHO Consultative Meeting on High Containment (Biosafety level -4) Laboratories Networking, Lyon, France, 13-15 December 2017
 - 6) 西條政幸. 高病原性病原体による感染症(バイオテロを含む)の検査体制と備え(シンポジウム: 感染症の危機管理・バイオテロ対策). 第 67 回日本感染症学会東日本地方会・第 65 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会, 東京, 2018 年 10 月
 - 7) 西條政幸. バイオテロと痘瘡ウイルス. 第 66 回日本ウイルス学会・ICD 講習会, 京都 2018 年, 10 月
 - 8) 西條政幸, 吉河智城. 海外で発生している希少感染症の診断と治療・予防法の開発. 第 67 回日本化学療法学会, 東京, 2019 年 5 月 9-11 日
 - 9) 西條政幸. 輸入感染症の今. 日本小児科学会, 金沢, 2019 年 5 月
 - 10) 西條政幸. 国内外の新興再興ウイルス感染症流行状況を踏まえて, 輸入感染症に備える. 日本抗ウイルス療法学会, 東京, 2019 年 7 月 18 日
 - 11) 西條政幸. 東京 2020 オリパラ等マシギャザリング開催に備えた輸入感染症対策. SRL 感染症シンポジウム, 2019 年 12 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
なし

平成 29 年度～令和元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

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

所 属 東京大学医科学研究所
附属病院感染免疫内科・講師
研究分担者 鯉淵 智彦 (H29～H30 年度)

所 属 東京大学医科学研究所
附属病院感染免疫内科・助教
研究分担者 安達 英輔(R01 年度)

研究要旨: 対応策の強化・充実が望まれるバイオテロに関して、ホームページのアップデートなどを通じて最新の情報提供や啓発活動を行った。2017、2018 年度のアップデートは計 5 種の病態(野兔病、炭疽、ブルセラ症、デング熱、チクングニア熱)に関して行った。ホームページの月間平均アクセス数は昨年度比で約 2 倍に増加した。啓発活動としては、日本感染症学会・化学療法学会合同の東日本地方学術集会(東京)にてシンポジウム「感染症の危機管理・バイオテロ対策」を開催した。4 名の演者の講演後には参加者とのディスカッションを行い、問題点を共有し、今後の対策強化策の在り方について議論した。2019 年度は髄膜炎菌髄膜炎について、新規の項目を設定した。また、治療が困難で世界的な流行が懸念されている、多剤耐性結核菌について全面的な改定を行った。その他、デング熱など、輸入感染症として、日常的に遭遇する疾患についても適宜改定している。2020 年 1 月に大幅なレイアウト変更を行った。

A. 研究目的

昨今の国際情勢を鑑みるとテロリズムへの懸念は弱まることはなく、生物製剤を用いるバイオテロに対しても十分な対応が必要である。特に 2020 年の東京オリンピック・パラリンピックを控えた日本では対策の強化や充実が望まれている。本研究では、バイオテロ対応ホームページを用いて、使用される可能性のある病原体の特徴や発生時の応急対応などを広く周知し、有事の際にその被害や混乱を最小限に留めることを最大の目的としている。また、関連団体と連携して平時からバイオテロに対する啓発活動を行うと共に、これらの活動を通じてより効果的なバイオテロ対策支援法を開発することを目的とする。

B. 研究方法

2017、2018 度は、啓発プログラム「感染症の危機管理・バイオテロ対策」の開催を通じて、現状の問題点を把握し、今後の対策立案に役立てる。また、

国内外の主要雑誌や学会などを通じて、バイオテロ関連疾患についての情報を収集し、ホームページに掲載した内容の妥当性・正確性等について確認する。新たなアウトブレイクが生じた場合には迅速に新知見を追加する。

【倫理面への配慮】

公表された情報のみを研究材料とするため、倫理面への特別な配慮は必要ない。

C. 研究結果

バイオテロ対応ホームページでは、これまでにバイオテロに使用されうる病原体を網羅してきた。海外のバイオテロ資料も参考にしつつ、国が所持を把握すべき 1 種病原体から 4 種病原体の合計 50 を超える病原体の情報を提供している。視覚的に把握しやすいよう、写真や図表などをできる限り掲載し、緊急時にも活用できる形態としている。また、昨年度に配布した「バイオテロを疑うときシート」の

PDF も HP より無料でダウンロードできるようにしている(<http://h-crisis.niph.go.jp/bt/>).

2017 年度は、近年、世界でアウトブレイクがあった病原体、診断や治療面で新たな知見があった病原体について改訂を行った。また、啓発プログラムは、日本感染症学会・化学療法学会合同の東日本地方学術集会(東京)にて、下記シンポジウムを平成 30(2018)年 10 月に開催した(図1)。

4 名の演者より、それぞれの視点から問題点や今後の在り方についての講演後に、参加者とのディスカッションを行った。バイオテロが想定される事態では微生物学的な確定診断がつきにくいことから、患者の症状から経験的に病原体を予測して対策を行う経験的症候群別予防策を行う必要性について再認識した。伊勢志摩サミットでの感染症強化サーベイランスは今後の対策立案に非常に参考になったが、2020 年オリンピックは規模や開催期間がこの数倍にのぼるため、それに応じた人員の確保が課題であること、地方衛生研究所や国立感染症研究所における病原体診断の整備についても改善の余地があること、などが浮き彫りとなった。議論内容は今後の対策に反映させていく必要がある。シンポジウム参加者には、本研究班が平成 29 年に作成した「バイオテロを疑うときシート」を配布し、バイオテロ対策への関心をさらに促した。なお、本シンポジウム参加人数は、300～400 名と推定される。

ホームページの内容の妥当性や正確性の評価は年間を通じて行っているが、今年度は平成 30(2018)年 11 月に野兔病、炭疽、ブルセラ症を改訂し、平成 31(2019)年 3 月にはデング熱、チクングニア熱を改訂した。特に、ブルセラ症では病原体の特徴から対応フローチャートまで全面的に見直した。2019 度は髄膜炎菌髄膜炎について、新規の項目を設定した。多剤耐性結核菌について全面的な改定を行う他、その他、デング熱など、輸入感染症として、日常的に遭遇する疾患についても適宜改定している。2020 年 1 月に大幅なレイアウト変更を行った。これらの結果、前年度から大幅なアクセス数の増加があった。

ホームページアクセス数は増加傾向にあり、情報提供源として一定の役割を果たしていることが確認できた。バイオテロへの認識向上に効果的である可能性が示唆された。COVID-19 の流行から SARS など過去のコロナウイルス感染症への情報提供も求められていることなどが伺われた。延期

が決定されたが、2021 年には東京オリンピックが開催されるなどバイオテロ対策の重要性は今後も増大していくことが予想される。バイオテロに使用される病原体や各疾患の特徴などを閲覧できるホームページの継続的な改訂は今後も継続していく必要がある。

D. 考察

バイオテロに利用される恐れのある病原微生物によって引き起こされる疾患は、現在のわが国では診る機会が少ないものが多い。臨床医の大多数は病態に対する十分な知識はなく、また診療疾患対象としての関心も有していないのが現状である。本ホームページの作成にあたっては、一般の臨床医が容易に理解できるような工夫を行うとともに、最新の情報や感染症専門家からの知見を加えながら改訂を行った。アクセス数の解析により、月に 1,200～1,300 件、多い時には 2,000 件以上のアクセスがあり、貴重な情報源として活用されていることが示唆された。なお、2017 年 12 月のアクセス数が 2030 件へ増加したが、明確な原因は特定できていない。推測の域を出ないものの、この時期は、安全保障に関連する報道(漂着船の増加等)が多くなされたことが関与している可能性もある。全体的に安定的な閲覧数を維持しており、これは昨年度全国約 900 の病院に配布した「バイオテロを疑うときシート」に、本ホームページの URL を記載した事も寄与していると考えられる。随時、必要な改訂を行い、最新情報を提供していくことが継続した閲覧につながっていくと考える。しかしながらサイバー攻撃への対応、有事の際のアクセス集中時にサーバーが耐えられるかなどの懸念は残り、今後セキュリティ対策の専門家と十分に検討していく必要がある。さらに医療従事者以外が閲覧する場合、専門的内容のままでは十分な理解ができず、場合によっては誤解を生じうる可能性もあるため記載内容を十分に検討する必要がある。ホームページ更新のアクセス数(図表)については年度毎に増加している。これは COVID-19 の発生以前の 2019 年 4 月-12 月でも認められた(図表)。また、2020 年からは COVID-19 の影響からか、更にアクセス数の増加が認められた。

E. 結論

国際的なテロリズムの拡大が懸念され、東京オリンピックが開催の予定、COVID-19 の流行などバイオテロ対策の重要性は今後も増大していくことが予想される。バイオテロに使用される病原体や各疾患の特徴などを包括的に閲覧できるホー

ムページの継続的な改訂。充実は今後とも継続していく必要がある。学会などと連携したシンポジウム等の開催を通じて、適切な情報提供の場を設けていくことも不可欠である。

ホームページアクセス数(図2, 図3)は増加傾向にあり、情報提供源として一定の役割を果たしていることが確認できた。バイオテロへの認識向上に効果的である可能性が示唆された。COVID-19の流行からSARSなど過去のコロナウイルス感染症への情報提供も求められていることなどが伺われた。延期が決定されたが、2021年には東京オリンピックが開催されるなどバイオテロ対策の重要性は今後も増大していくことが予想される。バイオテロに使用される病原体や各疾患の特徴などを閲覧できるホームページの継続的な改訂は今後とも継続していく必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

- 1) 鯉淵智彦(司会). シンポジウム 1「感染症の危機管理・バイオテロ対策」. 第 67 回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第 65 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会, 東京(2018.10)
- 2) 池内和彦, 安達英輔, 林阿英, 古賀道子, 堤武也, 四柳宏. 初診時の迅速検査が陰性, 抗核抗体が 320 倍であったチクングニア熱の一例 第 68 回日本感染症学会東日本学術集会, 仙台(2019.10)

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
該当なし

シンポジウム 1		10月24日(水) 13:00-15:00 第1会場 (10F 大ホール)
共催：我が国で開発され、評価されている細胞治療用ソラフクチンの有効性、安全性、生薬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会		
S1	感染症の危機管理・バイオテロ対策	司 会：鯉淵智彦（東京大学医科学研究所附属感染症免疫内科） 中島一哉（大東文化大学スポーツ健康科学部健康科学科）
S1-1	バイオテロ対策総論	加東浩吾（四国医科大学校医科学センター・地域感染症学・新興研究部門）
S1-2	G7伊勢志摩サミットにおける強化感染症サーベイランス	谷口清樹（三重県臨床研究部）
S1-3	東京オリンピック 2020 における感染症リスク評価と求められる対応	和田康典（国際医療福祉大学医学部生命衛生学）
S1-4	高病原性病原体による感染症（バイオテロを含む）の検査体制と備え	西條政幸（国立感染症研究所）

図1. バイオテロ関連シンポジウム(10月24日)

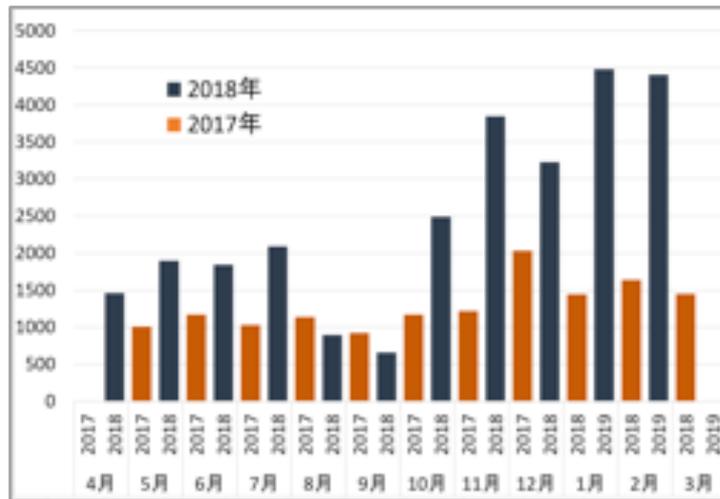


図2. ホームページアクセス数(2017年度, 2018年度)

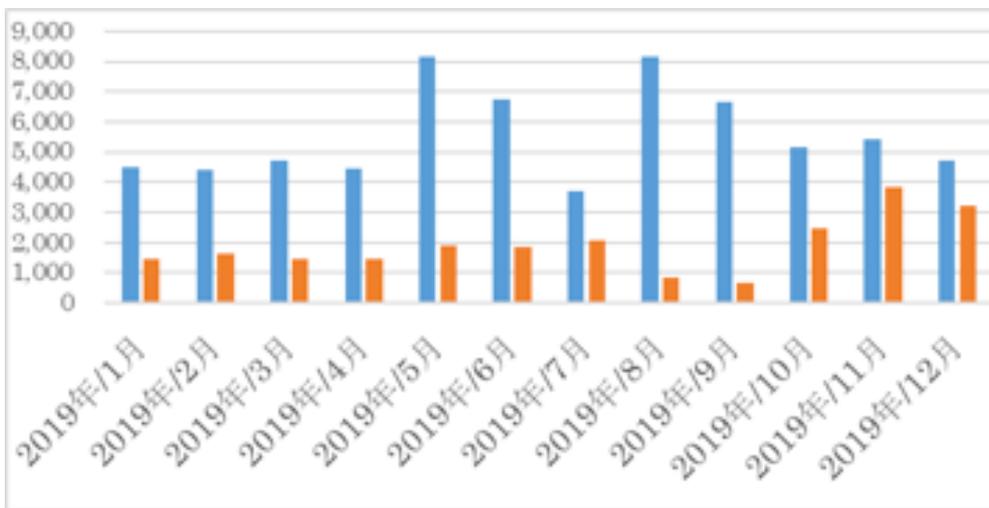


図3. ホームページアクセス数(2019年度12月まで)

平成 29 年度～令和元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

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:天然痘バイオテロを中心としたバイオテロ対応に関する公衆衛生対応の検討を行った。特に、生物テロ対策の国際動向についておよび、天然痘治療薬やワクチンの開発、国際的共有について検討を行った。初年度は、生物テロ対策の国際動向について英国および韓国の会議に出席し情報収集を実施し、また、天然痘治療薬の開発状況について資料収集および関係者の聞き取りを実施した。2年目は、生物テロの現場対応での公衆衛生と警察の連携の最新の国際動向を明らかにし、米国 CDC と FBI が行う合同捜査・調査ワークショップを国内で実践した。3年目は、生物テロ対策のための公衆衛生とセキュリティ部門の連携強化演習を開発し、地方自治体で実施した。特に、公衆衛生機関と警察の連携に特化した演習の開発・実施は国内でも初の取り組みであり、演習のさらなる推進により、連携強化の必要性がより認識され、強化に結びつくことが期待される。

A. 研究目的

日本では、2020年には東京オリンピック・パラリンピックが開催される。また、その前年度にもG20やラグビーW杯が開催されるなど、注目度が高い国際イベントが連続しており、テロの脅威の高まりについても懸念されているところである。特にCBRNE対策の強化が国内でも進められているところであり、生物テロ対策の強化も急務の一つである。

そのため、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。特に天然痘テロ対応に関して、ワクチン含む医薬品等の整備状況、また公衆衛生対応の検討を行う。

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、海外の各種会議等に参加し、専門家との意見交換と資料収集を実施した。初年度は、英国(Responding to deliberate biological release: the requirements for effective, coordinated international action 意図的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)の会議に参加し、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年目は、ドイツで開催されたグローバル・ヘルス・セキュリティ・アクショングループ(GHSAG)公衆衛生・安全保障専門家脅威・リスク評価ワークショップに参加し、セキュリティ機関と連携した。生物テロの脅威・リスク評価手法の検討および現場対処方法について意見交換を行った。

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

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。初年度は、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。

2年目より、国際的な動向の調査に基づき、国内での対処手法および連携強化手法の検討のため、国内の警察・公衆衛生機関からの参加を得て、生物テロの対処手法に関して、米国およびドイツより講師を招聘し、国際ワークショップを開催した。アンケート結果に基づき、連携強化手法についての検討を行った。さらに、3年目には、国内での、生物テロを想定した公衆衛生部局と警察部局の連携強化に資する机上演習の演習資

材を作成した。

【倫理面への配慮】

該当しない。

C. 研究結果

1. バイオテロ対策の国際的な動向の調査

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、平昌オリンピックにおいて、強化サーベイランス、エアロゾル検知の運用計画の実態を把握することができた。現行の通常時の対応計画(いつテロが発生するか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。

2年目のドイツでの会議では、主にG7各国における、セキュリティ機関と連携した、生物テロの脅威・リスク評価手法の検討および現場対処方法について、特にその連携手法と問題点について、最新の知見が得られた。

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

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(TPOXX, Brincidofovir)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、世界健康安全保障行動グループのタスクフォースの一員として、WHOが保管する備蓄天然痘ワクチンの国際共有のための緊急時配送オペレーションメカニズムを検討し、その成果はWHOから2017年12月に発出された。また、一般化した医薬品共有・配送に関する問題点について検討文書を作成し、WHOへの案文提出に貢献した。これらの天然痘に関する知見は、「一類感染症対策の手引き」の作成にあたり、天然痘に関する記載のアップデートに活用される予定である。

国内での対処手法および連携強化手法の検討のため、国内の警察・公衆衛生機関からの参加を得て、生物テロの対処手法に関して、米国およびドイツより講師を招聘し、国際ワークショップを開催し、報告書を作成した(図1)。警察と公衆衛生当局者による情報共有および捜査と疫学調査

の連携、現場対処(犯罪現場管理、証拠採取、観戦者への対応等)における連携の重要性が認識されたほか、東京オリンピック大会に向けて、今後の連携強化方策として、連携手順の整理や合同訓練の必要性が認識された。また、主に警察から、公衆衛生対応との連携機会を望む声が聞かれた。アンケート結果に基づき、連携強化手法についての検討を行った。

2年目から3年目にかけて、生物テロ対策のための公衆衛生とセキュリティ部門の連携強化演習を開発し、二つの地方自治体で実施した。公衆衛生部門と警察部門が共に参加する3時間程度の演習パッケージを準備し、米国炭疽菌郵送テロ事件をモチーフとして、秘匿的・明示的シナリオの検討過程を通じて、連携の必要性を認識し、相互理解を向上させる机上演習とした。実施した自治体からは、特に「公衆衛生部門と警察の連携強化の必要性を認識した」「他の関係機関の基本的な考え方を理解した」という点が評価された。との報告があった。

D. 考察

この3年間の公衆衛生対応に関する国際的な動向調査で得られたのは、公衆衛生機関とセキュリティ機関(特に警察)との連携の重要性であり、各国が真摯に取り組んでいることだった。国内でも、セミナー等で米国等の演者を招聘し、普及啓発が試みられたり、大学でその連携の可能性に関する勉強会が開催されたりするなどといった機会があったが、その連携強化のニーズに関する認識も低く、また、その連携を強化することを目的とした訓練・演習も行われていなかった。2018年3月に世界保健機関(WHO)による合同外部評価(JEE)において、公衆衛生とセキュリティの連携強化の必要性を明確に指摘されたことは、取り組みの一つの追い風となり、本研究を通じて連携を深めた米国、ドイツなどのカウンターパートと共に、省庁レベルで合同対応に関するワークショップを行うことができたのは大きな成果であったと言える。また、さらに現場レベルでの連携強化のための演習素材の開発と実践に結びつけることができた。今後さらに演習が広く実施され、地域での連携強化に結び付けることや、「高度編」の演習資材が開発され、対応能力のレベルアップに寄与することが期待される。さらに、演習を通じて明らかになった課題や改善点がマニュアル等文書にフィードバックされていくことが強く期待される。

本研究の成果は、天然痘対応指針の内容の再検討等、生物テロ対策の見直しに向けて問題点を整

理するための参考資料としていく。医薬品開発の状況については、一般への情報提供の必要性を踏まえて、生物テロ対応ホームページへの反映等を行っていく。このような平時からの絶え間ない継続的な情報収集と最新知見の積み重ねが、いざという時の備えに不可欠である。

E. 結論

バイオテロ対策の国際的な動向の調査を実施し、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い、公衆衛生とセキュリティ部門の連携強化が生物テロ対応強化に不可欠であることを明らかにした。また、地方レベルでの連携強化のための演習素材を作成し、実践した。

F. 健康危険情報 特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 齋藤智也. 東京2020の生物テロ対策を考える. 公衆衛生. 2020; 84(5): p. 318-322.
- 2) 齋藤智也. 天然痘の根絶と現在の課題. グローバル時代のウイルス感染症. 東京:日本医事新報社.; 2019: p220-224.
- 3) Eto K, Fujita M, Nishiyama Y, Saito T, Molina D, Morikawa S, Saijo M, Shinmura Y, Kanatani Y. Profiling of the antibody response to attenuated LC16m8 smallpox vaccine using protein array analysis. Vaccine. 37(44). 6588-6593. 2019.

- 4) 齋藤智也. B(生物剤)テロ災害の最新動向と基礎知識—見えない恐怖との戦い 生物テロの特徴と対処—. NBC 災害活動マニュアル. 東京:イカロス出版. 2017.

2. 学会発表

- 1) 齋藤智也. 生物テロ準備・対応における公衆衛生とセキュリティ機関の連携強化. 第25回日本災害医学会総会・学術集会, 神戸, 2020年2月
- 2) Saito T. Biosecurity Policy Landscape in Japan. UAE 4th Biosecurity Conference 2019, Dubai, 2019年10月
- 3) 齋藤智也. 特別講演: マスギャザリングとバイオテロ対策. 第88回日本法医学会学術関東地方集会, 東京, 2019年10月
- 4) Tomoya Saito. Strengthening public health-security interface for bioterrorism preparedness and response in Japan. The 13th CBRNe Protection Symposium. Malmö, Sweden, 2019年9月
- 5) Saito T. Overview of Bioterrorism Preparedness and Response in Japan. NCT Asia Pacific, Seoul, Korea (2017.05)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特記事項なし
2. 実用新案登録
特記事項なし
3. その他
特記事項なし

生物テロに対する警察/公衆衛生
合同対応に関する国際ワークショップ
開催報告書

International Workshop on Joint Law Enforcement
/Public Health Response to Bioterrorism
Workshop Report

会場/Venue

国立国際医療研究センター国際医療協力センター第4階大会室、4階会議室
Training Center Building, 4th Floor/Meeting Room, 4th Floor
National Center for Global Medicine Hospital, Shinjuku, Tokyo, Japan

開催日程/Date

2019年3月19-20日
March 19-20, 2019

主催/Host

国立国際医療研究センター国際医療協力センター、東京医科大学国際医療協力センターの協賛、
実務的、生物学的および国際法の観点からバイオテロ対策のあり方に関する研究

共同研究員：国立国際医療研究センター国際医療協力センター、東京医科大学国際医療協力センター

Principal Investigators: National Institute of Infectious Diseases (NIID) Molecular Bioterrorism

Co-Investigator: National Institute of Public Health (NIPO) Tokyo Site

共催/Co-host

国立国際医療研究センター National Center for Global Health and Medicine (NCGHM)
在日米国大使館 US Embassy in Japan

図1 国際ワークショップ開催報告書

平成 29 年度～令和元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

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:バイオテロの発生時には、用いられた病原体を正確かつ安全に特定する必要がある。1年目および3年目ではバイオテロで用いられうる病原体の特定法について、2年目では特定の際の検体の安全な取り扱いについて取り組んだ。(1年目)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。(2年目)ニパウイルスは致命率の高い感染症を引き起こし、その予防法や治療法で確立されたものはないため、バイオテロで用いられうる病原体である。バイオテロ対策の1つである実験室診断を安全に行なうため、ニパウイルスを想定し、検体処理条件を明らかにした。ウイルスを添加したヒト血清を熱処理あるいは紫外線処理のみではウイルスの不活化は十分ではなかったが、併用により完全なウイルスの不活化が得られた。血清学的な実験室診断を安全に行なうための検体処理条件の1つを明らかにできた。(3年目)病原体の特定あるいは検出には PCR による遺伝子検出が特異性や感度、所要時間等の面で優れると言える。しかし既知の病原体とは遺伝子情報が異なる新規株や変異株が用いられた場合には PCR では検出できない場合もあり、他の手法による検出を行なう必要がある。検出法の1つとして培養細胞を用いたウイルス分離の手法の確認を行なった。エボラウイルス、ラッサウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスを感染させた細胞を作製し、これに各ウイルスに対する抗血清を反応させたところ明瞭な陽性反応を示した。細胞変性効果が認められなくてもウイルス抗原が検出される場合があった。エボラウイルス、ラッサウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスについてはバイオテロでの病原体特定法の1つとして分離手法の確認ができたと言える。

これらの取り組みにより、我が国でのバイオテロにおける病原体の特定力がより一層強化されたと言える。

研究協力者

福士秀悦・国立感染症研究所・主任研究官
渡辺俊平・岡山理科大学・准教授
黒須剛・国立感染症研究所・主任研究官
吉河智城・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。痘瘡(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1975年以降に誕生した若い人は通常ワクチン接種を受けていない。そのため痘瘡ウイルスもバイオテロに用いられうる病原体の1つに位置付けられている。ニパウイルスは致命率の高い感染症を引き起こし、その予防法や治療法で確立されたものはないため、バイオテロで用いられうる病原体である。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。

迅速性や正確性は当然求められる。また特定作業は安全に行われなくてはならない。

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瘡の実験室診断法を準備しているが、近年の試薬や機器・技術の進歩をとりにれた改良を加えることは常に考慮しておく必要がある。1年目は痘瘡ウイルスの検出法の改良を、2年目はニパウイルスを想定し検体の安全な取り扱い処理を、3年目には迅速性はないが変異ウイルス等でも検出が可能なウイルス分離の手法確認を行なった。

B. 研究方法

Maksyutov らの方法 (J Virol Methods. 2016;236:215-220) (図 1) に基づき、リアルタイム PCR による痘瘡ウイルスの検出法を構築した。痘瘡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 (図 2)。臨床症状での区別は困難なため、痘瘡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 らの方法に基づき調製した。

検体にニパウイルスが含まれると想定し、ニパウイルスを添加したヒト血清を熱処理 (56°C, 30 分) あるいは紫外線処理 (312nm, 2.5mW, 30 分) した。生きたニパウイルスの存在の有無を判断するため、処理した血清を Vero 細胞へ接種し、3 回細胞を継代し、この間の細胞変性効果の出現の有無で判断した。熱と紫外線の双方の処理も行なった。いずれも 3 点ずつで行なった。

海外より入手した特定一種病原体を BSL4 実験室において培養細胞の VeroE6 に接種し、CO2 インキュベーターで培養した。1 週間後、上清を回収し、分注してディープフリーザーで保存した。分注したウイルスを解凍し、10 倍階段希釈を作製し、各々を VeroE6 細胞 (あるいは Vero 細胞もしくは Vero9013 細胞) に接種し、CO2 インキュベーターで 1 週間培養した。ホルマリン固定と Triton-X100 処理後、ウサギ抗血清および蛍光 2 次抗体で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。TCID₅₀/mL を算出した。細胞変性効果 (CPE) での力価測定も行なった。

【倫理面への配慮】

該当なし

C. 研究結果

痘瘡ウイルスは 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 3)、スタンダード DNA も人工合成し PCR で増幅して用いた (図 4)。核酸抽出用のコントロール DNA は痘瘡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 5)。以上のプライマーやプローブ等を図 5 に示す割合で混合し、同図に示す条件で反応させた。痘瘡ウイルスのスタンダード DNA を反応液に加えた場合に FAM (つまり痘瘡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 6)。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 10¹ コピーから 10⁰ コピーであった (図 7)。

検体にニパウイルスが含まれると想定し、実験室診断を行なうための検体処理条件 (ウイルス不活化条件) を検討した。ウイルスを添加したヒト血清を熱処理 (56°C, 30 分) あるいは紫外線処理 (312nm, 2.5mW, 30 分) のみではウイルスの不活化は十分ではなかった (それぞれ 2/3, 1/3 のチューブで不完全) が、併用により完全なウイルスの不活化が得られた (図 8)。

ザイールエボラウイルス、スーダンエボラウイルス、ラッサウイルス (Mali 株)、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス (Bagdad12 株) について P1 ストックを作製した。接種した VeroE6 細胞で、ザイールエボラウイルス、スーダンエボラウイルスおよびクリミア・コンゴ出血熱ウイルス (Bagdad12 株) の場合に明瞭な CPE が認められた。ザイールエボラウイルスおよびスーダンエボラウイルス: VeroE6/Vero/Vero9013 細胞のいずれでもウイルス濃度が濃い部分では明瞭な CPE を認めた (図 9)。しかし、ウイルスが増殖し抗原が抗血清で検出される場合でも CPE が明瞭でない場合があった。手法の簡素化や統一化が望まれることから、VeroE6 細胞と抗体染色を力価測定

に用いることとした。クリミア・コンゴ出血熱ウイルス(Bagdad12株):VeroE6/Vero細胞においては明瞭なCPEが認められ、CPEの有無とウイルス抗原の有無とは一致した(図10)。Vero9013細胞ではCPEが明瞭でない場合があった。手法の簡素化や統一化が望まれることから、VeroE6細胞と抗体染色を力価測定に用いることとした。ラッサウイルス(Mali株):VeroE6細胞でのみ力価測定を行なった。CPEは明瞭でない場合があった。手法の簡素化や統一化が望まれることから、VeroE6細胞と抗体染色を力価測定に用いることとした。

D. 考察

Maksyutovらが報告した痘瘡ウイルス、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。痘瘡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。

ニパウイルス感染症を疑う事例において、血清学的な実験室診断を安全に行なうための検体処理条件を明らかにできた。

ウイルスの増殖に伴うCPEは認められるもののあまり劇的なものではなく、ウイルス抗原の確実な検出には抗血清による染色が安定かつ確実な手法であると考えられた。力価測定、加えてウイルス分離の確認では、抗血清による染色結果に基づくものが良いと考えられた。

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。痘瘡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。

バイオテロ発生時の病原体特定の方法の1つであるウイルス分離の手法を確認した。

日本でのバイオテロにおける病原体の特定力がより一層強化されたと言える。

F. 健康危険情報

該当なし

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 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*. 71(3):205-208
- 3) Tani H, Komeno T, Fukuma A, Fukushi S, Taniguchi S, Shimojima M, Uda A, Morikawa S, Nakajima N, Furuta Y, Saijo M. Therapeutic effects of favipiravir against severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection in a lethal mouse model: Dose-efficacy studies upon oral administration. *PLoS One*. 2018;13(10):e0206416. doi: 10.1371/journal.pone.0206416. eCollection 2018.
- 4) Kimura T, Fukuma A, Shimojima M, Yamashita Y, Mizota F, Yamashita M, Otsuka Y, Kan M, Fukushi S, Tani H, Taniguchi S, Ogata M, Kurosu T, Morikawa S, Saijo M, Shinomiya H. Seroprevalence of severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) virus antibodies in humans and animals in Ehime prefecture, Japan, an endemic region of SFTS. *J Infect Chemother*. 2018;24(10):802-806. doi: 10.1016/j.jiac.2018.06.007. Epub 2018 Jul 13.
- 5) Demetria C, Smith I, Tan T, Villarico D, Simon EM, Centeno R, Tachedjian M, Taniguchi S, Shimojima M, Miranda NLJ, Miranda ME, Rondina MMR, Capistrano R, Tandoc A 3rd, Marsh G, Eagles D, Cruz R, Fukushi S. Reemergence of Reston ebolavirus in Cynomolgus Monkeys, the

- Philippines, 2015. *Emerg Infect Dis.* 2018;24(7):1285-1291. doi: 10.3201/eid2407.171234.
- 6) Yamada S, Shimojima M, Narita R, Tsukamoto Y, Kato H, Saijo M, Fujita T. RIG-I-Like Receptor and Toll-Like Receptor Signaling Pathways Cause Aberrant Production of Inflammatory Cytokines/Chemokines in a Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Infection Mouse Model. *J Virol.* 2018 Jun 13;92(13). pii: e02246-17. doi: 10.1128/JVI.02246-17. Print 2018 Jul 1.
- 7) Ogawa M, Shirasago Y, Ando S, Shimojima M, Saijo M, Fukasawa M. Caffeic acid, a coffee-related organic acid, inhibits infection by severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in vitro. *J Infect Chemother.* 2018;24(8):597-601. doi: 10.1016/j.jiac.2018.03.005. Epub 2018 Apr 5.
- 8) Matsumoto C, Shinohara N, Furuta RA, Tanishige N, Shimojima M, Matsubayashi K, Nagai T, Tsubaki K, Satake M. Investigation of antibody to severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV) in blood samples donated in a SFTS-endemic area in Japan. *Vox Sang.* 2018;113(3):297-299. doi: 10.1111/vox.12629. Epub 2018 Jan 22.
- 9) Egawa K, Shimojima M, Taniguchi S, Nagata N, Tani H, Yoshikawa T, Kurosu T, Watanabe S, Fukushima S, Saijo M. Virulence, pathology, and pathogenesis of Pteropine orthoreovirus (PRV) in BALB/c mice: Development of an animal infection model for PRV. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(12):e0006076. doi: 10.1371/journal.pntd.0006076. eCollection 2017 Dec.
- 10) Taniguchi S, Maeda K, Horimoto T, Masangkay JS, Puentespina R Jr, Alvarez J, Eres E, Cosico E, Nagata N, Egawa K, Singh H, Fukuma A, Yoshikawa T, Tani H, Fukushima 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. *Arch Virol.* 2017;162(6):1529-1539. doi: 10.1007/s00705-017-3251-2. Epub 2017 Feb 11.
- 11) Kaneko M, Shikata, Matsukage S, Maruta M, Shinomiya H, Suzuki T, Hasegawa H, Shimojima M, Saijo M. A patient with severe fever with thrombocytopenia syndrome and hemophagocytic lymphohistiocytosis-associated involvement of the central nervous system. *J Infect Chemother.* 2017;24(4):292-297. doi: 10.1016/j.jiac.2017.10.016.
- 12) Fukushi S, Fukuma A, Kurosu T, Watanabe S, Shimojima M, Shirato K, Iwata-Yoshikawa N, Nagata N, Ohnishi K, Ato M, Melaku SK, Sentsui H, Saijo M. Characterization of novel monoclonal antibodies against the MERS-coronavirus spike protein and their application in species-independent antibody detection by competitive ELISA. *J Virol Methods.* 2018;251:22-29. doi: 10.1016/j.jviromet.2017.10.008..
- 13) Suzuki T, Sato Y, Sano K, Arashiro T, Katano H, Nakajima N, Shimojima M, Kataoka M, Takahashi K, Wada Y, Morikawa S, Fukushima S, Yoshikawa T, Saijo M, Hasegawa H. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus targets B cells in lethal human infections. *J Clin Invest.* 2020: 130(2):799-812. doi: 10.1172/JCI129171.
- 14) Tani H, Kawachi K, Kimura M, Taniguchi S, Shimojima M, Fukushima S, Igarashi M, Morikawa S, Saijo M. Identification of the amino acid residue important for fusion of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus glycoprotein. *Virology.* 2019;535:102-110. doi: 10.1016/j.virol.2019.06.014.
- 15) Park ES, Shimojima M, Nagata N, Ami Y, Yoshikawa T, Iwata-Yoshikawa N, Fukushima S, Watanabe S, Kurosu T, Kataoka M, Okutani A, Kimura M, Imaoka K, Hanaki K, Suzuki T, Hasegawa H, Saijo M, Maeda K, Morikawa S. Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Phlebovirus causes lethal viral hemorrhagic fever in

- cats. *Sci Rep.* 2019;9(1):11990. doi: 10.1038/s41598-019-48317-8.
- 16) Shiota T, Li TC, Nishimura Y, Yoshizaki S, Sugiyama R, Shimojima M, Saijo M, Shimizu H, Suzuki R, Wakita T, Muramatsu M, Ishii K. Integrin $\alpha 3$ is involved in non-enveloped hepatitis E virus infection. *Virology.* 2019;536:119-124. doi: 10.1016/j.virol.2019.07.025. Epub 2019 Jul 30.
 - 17) Kanai Y, Kawagishi T, Sakai Y, Nouda R, Shimojima M, Saijo M, Matsuura Y, Kobayashi T. Cell-cell fusion induced by reovirus FAST proteins enhances replication and pathogenicity of non-enveloped dsRNA viruses. *PLoS Pathog.* 2019;15(4):e1007675. doi: 10.1371/journal.ppat.1007675. eCollection 2019 Apr.
 - 18) 下島昌幸. 世界における節足動物媒介性ウイルス感染症(ブニヤウイルス)感染症の流行状況. グローバル時代のウイルス感染症, 日本医事新報社, 東京, p21-24, 2019
 - 19) 下島昌幸. エボラウイルス. ウイルス検査法—臨床と検査室のための手引き, 春恒社, 東京, p333-335, 2018
- ## 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 σC 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, 福岡藍子, 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, 西条政孝, 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
- 16) Tomoki Yoshikawa, Satoshi Taniguchi, Hirofumi Kato, Hikaru Fujii, Miho Shibamura, Shumpei Watanabe, Kazutaka Egawa, Takuya Inagaki, Satoko Sugimoto, Supranee Phanthanawiboon, Shizuko Harada, Takeshi Kurosu, Shuetsu Fukushi, Masayuki Shimojima, Souichi Yamada, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. Protection of mice from a lethal challenge with SFTS virus by immunization with a novel recombinant LC16m8 expressing SFTS virus genes. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 28, 2018, Kyoto (W1-2-07)
- 17) Shuetsu Fukushi, Satoshi Taniguchi, Shumpei Watanabe, Takeshi Kurosu, Tomoki Yoshikawa, Masayuki Shimojima, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. Re-emergence of Reston Ebola virus in Cynomolgus monkeys in the Philippines, 2015. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 28, 2018, Kyoto (W1-2-19)
- 18) Ryotaro Nouda, Takahiro Kawagishi, Yuta Kanai, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Yoshiharu Matsuura, Takeshi Kobayashi. Fusogenic bat-borne orthoreovirus p17 protein regulates viral replication in a host-specific manner. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 28, 2018, Kyoto (W1-6-03)
- 19) Satoshi Taniguchi, Tomoki Yoshikawa, Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushi, Takeshi Kurosu, Hideki Tani, Fumihiko Kato, Takahiro Maeki, Shigeru Tajima, Chang-Kweng Lim, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. Study of the role of untranslated regions of the S segment genome of Lymphocytic Choriomeningitis Virus. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2018, Kyoto (W2-4-09)
- 20) Eun-Sil Park, Masayuki Shimojima, Tomoki Yoshikawa, Noriyo Nagata, Naoko Iwata, Shuetsu Fukushi, Shumpei Watanabe, Yasushi Ami, Takeshi Kurosu, Ken Maeda, Koichi Imaoka, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa. SFTS virus causes lethal severe fever with thrombocytopenia syndrome in Cats. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2018, Kyoto (W2-4-10)
- 21) Supranee Phanthanawiboon, Takeshi Kurosu, Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushi, Tomoki Yoshikawa, Shumpei Watanabe, Tadaki Suzuki, Noriyo Nagata, Naoko Iwata-Yoshikawa, Masayuki Saijo. Hematopathogenesis of chimeric dengue mouse model. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2018, Kyoto (W2-6-02)
- 22) Takeshi Kurosu, Daisuke Okuzaki, Shuetsu Fukushi, Masayuki Shimojima, Supranee Phanthanawiboon, Masayuki

- Saijo. Inflammation amplifier plays a critical role in severe dengue hemorrhagic fever. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2018, Kyoto (W2-6-06)
- 23) Masayuki Shimojima, Taishi Onodera, Yoshimasa Takahashi, Satoko Sugimoto, Shuetsu Fukushi, Takeshi Kurosu, Tomoki Yoshikawa, Masayuki Saijo. Therapeutic effects of human monoclonal antibodies to SFTS virus. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 30, 2018, Kyoto (W3-5-13)
- 24) Takahiro Kawagishi, Yuta Kanai, Yusuke Sakai, Ryotaro Nouda, Hideki Tani, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Yoshiharu Matsuura, Takeshi Kobayashi. Nelson Bay reovirus σ C body domain is associated with strain-specific differences in viral replication. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 30, 2018, Kyoto (W3-6-03)
- 25) Motohiko Ogawa, Yoshitaka Shirasago, Shuji Ando, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Masayoshi Fukasawa. Caffeic acid, a coffee-related organic acid, inhibits infection with severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 28, 2018, Kyoto (P1-AV-29)
- 26) Hikaru Fujii, Hideki Tani, Kazutaka Egawa, Satoshi Taniguchi, Tomoki Yoshikawa, Chang-Kweng Lim, Mutsuyo Takayama-Ito, Takahiro Maeki, Takeshi Kurosu, Shuetsu Fukushi, Masayuki Shimojima, Akihiko Uda, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. Establishment of an animal model of Heartland virus infection and evaluation of the efficacy of ribavirin and T-705 in vitro and in vivo. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 28, 2018, Kyoto (P1-AV-31)
- 27) Miyuki Kimura, Kazutaka Egawa, Masayuki Shimojima, Hikaru Fujii, Hiroshi Yamada, Long Tan, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo, Hideki Tani. Characterization of pseudotyped vesicular stomatitis virus bearing the Heartland virus envelope protein. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 28, 2018, Kyoto (P1-VE-09)
- 28) 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 の霊長類致死モデル SFTS 研究会 2018 年 9 月 東京
- 29) 藤井ひかる, 谷英樹, 谷口怜, 吉河智城, 林昌宏, 伊藤睦代, 前木孝洋, 黒須剛, 福士秀悦, 下島昌幸, 宇田晶彦, 米納孝, 古田要介, 森川茂, 西条政幸 SFTSV および HRTV 感染におけるリバビリンおよびファビピラビルの抗ウイルス効果の比較(シンポジウム) SFTS 研究会 2018 年 9 月 東京
- 30) 末盛浩一郎, 東太一, 山中篤志, 姫路大輔, 川村昌史, 葉久貴司, 大毛宏喜, 谷口智宏, 今滝修, 高橋徹, 石田正之, 日高道弘, 金子正彦, 池田賢一, 上国料千夏, 垣花泰之, 石丸敏之, 竹中克斗, 下島昌幸, 河野茂, 西条政幸, 安川正貴 重症熱性血小板減少症候群に対するファビピラビルの有効性と安全性の検討(シンポジウム) SFTS 研究会 2018 年 9 月 東京
- 31) Masayuki Shimojima. Epidemiological study on severe fever with thrombocytopenia syndrome. 15th Taiwan-Japan Symposium on Communicable Diseases and Prevention, and Collaborative Project Reports. Sep 3-4, 2018, Taipei
- 32) 下島昌幸 日本と海外の BSL-4 施設の最新事情 ワークショップ「日本における BSL4 施設の現状」第 19 回日本バイオセーフティ学会学術集会 令和元年 11 月 20 日 戸山サンライズ
- 33) Shimojima M, Sugimoto S, Taniguchi S, Yoshikawa T, Kurosu T, Saijo M. A novel functional screening method to identify severe fever with thrombocytopenia syndrome virus entry factors from cDNA library. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (W1-1-02)
- 34) Kurosu T, Okuzaki D, Phanthanawiboon S, Yoshikawa T, Shimojima M, Saijo M. IL-17A produced from gamma/delta T cells plays a critical role in vascular leakage of severe dengue hemorrhagic fever in mice. The 67th Annual Meeting of the Japanese

- Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (W1-1-09)
- 35) Phanthanawiboon S, Shimojima M, Fukushi S, Yoshikawa T, Watanabe S, Nagata S, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Okuzaki D, Saijo M, Kurosu T. Flavivirus infection induces suppression of megakaryo-erythro cells in bone marrow. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (O1-2-01)
- 36) Watanabe S, Yoshikawa T, Kurosu T, Fukushi S, Kaku Y, Morikawa S, Shimojima M, Saijo M. Establishment of a recombinant attenuated vaccinia virus, LC16m8, expressing nipah virus surface glycoproteins. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (P-NR-07)
- 37) Yamada H, Kimura M, Tan L, Taniguchi S, Shimojima M, Fukuhara T, Matsuura Y, Komeno T, Nakajima N, Furuta Y, Saijo M, Tani H. Minigenome-based reporter system suitable for high-throughput screening of small compounds able to inhibit replication and/or transcription of SFTSV. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (P-NR-27)
- 38) Sano S, Fukushi S, Yamada S, Harada S, Yoshikawa T, Kurosu T, Shimojima M, Saijo M. Development of an RT-LAMP assay for the rapid detection of SFTS virus. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (P-NR-28)
- 39) Satoh M, Kato H, Ito-Takayama M, Fukushi S, Shimojima M, Yasukawa M, Saijo M. Favipiravir-susceptibility of severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) virus isolated from fatal SFTS patients treated with favipiravir. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (P-NR-29)
- 40) Kato H, Takayama-Ito M, Satoh M, Kinoshita H, Shimojima M, Fukushi S, Yoshikawa T, Kurosu T, Nakajima N, Komeno T, Furuta Y, Saijo M. Evaluation of in vitro antiviral effect of favipiravir on the replication of the different genotypes of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (P-NR-30)
- 41) Takayama Ito M, Sato M, Kato H, Kinoshita H, Shimojima M, Fukushi S, Yoshikawa T, Kurosu T, Nakajima N, Komeno T, Furuta Y, Saijo M. Attempt to make severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV) resistant to favipiravir. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (P-NR-31)
- 42) Fujii H, Tani H, Taniguchi S, Yoshikawa T, Fukushi S, Yamada S, Harada S, Lim C-K, Takayama Ito M, Maeki T, Kurosu T, Shimojima M, Uda A, Komeno T, Nakajima N, Furuta Y, Morikawa S, Saijo M. Establishment of a lethal model of Heartland virus infection in mice and evaluation of the efficacy of ribavirin and T-705 by using the model. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (P-NR-32)
- 43) Tan L, Yamada H, Kimura M, Taniguchi S, Shimojima M, Fukushi S, Morikawa S, Saijo M, Tani H. Generation of single-round infectious particles of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (P-NR-33)
- 44) Sugimoto S, Suda Y, Kurosu T, Yoshikawa T, Oba M, Omatsu T, Horimoto T, Mizutani T, Saijo M, Shimojima M. Characterization of Soft tick bunyavirus isolated from ticks in Japan. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 31, 2019, Tokyo (O3-3-05)
- 45) Suzuki T, Sato Y, Sano K, Arashiro T, Katano H, Nakajima N, Takahashi K, Kataoka M, Wada Y, Morikawa S, Shimojima M, Fukushi S, Yoshikawa T, Saijo M, Hasegawa H. B cells with immunophenotypic resemblance to plasmablasts are main viral targets in human lethal SFTSV infection. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 31, 2019, Tokyo (O3-3-07)
- 46) Park E, Shimojima M, Yoshikawa T,

Nagata N, Iwata N, Suzuki T, Ainai A, Watanabe S, Kurosu T, Ami Y, Noguchi A, Wada Y, Imaoka K, Saijo M, Hasegawa H, Maeda K, Morikawa S. Development of severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) vaccine for cats. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 31, 2019, Tokyo (O3-3-08)

47) 下島昌幸 重症熱性血小板減少症候群ウイルスの最新の知見 第71回日本衛生動物

学会大会 市民公開講座「マダニが運ぶ感染症から身を守れ！」平成31年4月21日 於：山口大学学生会館大ホール

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特記事項なし
2. 実用新案登録
特記事項なし
3. その他
特記事項なし



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Virological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jviromet



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: 痘瘡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

天然痘 Smallpox

鑑別が重要！



ヒト サル痘



天然痘

水疱瘡



図2: 痘瘡(天然痘)の特徴的な臨床症状(体表の水疱)とサル痘および水痘(水疱瘡)の臨床症状

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-CTGTCGGAGCCACAGTTTCGAGACG-BHQ1
MPXV F3L probe	HEX-TGTAGGCCGTGTATCAGCATCCATT-BHQ1
VZV ORF38 probe	TexasRed-ACAATGAGTAGTGGCTTTATGGCGAG-BHQ3
VARV-I.C. probe	Cy5-TTGCTTGTGCTGCTCGTATCGTCC-BHQ3

図3: 痘瘡ウイルス (VARV), サル痘ウイルス (MPXV), 水痘・帯状疱疹ウイルス (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 GAGGATCCCAAATGTCCATTACCCGGGGGATGGTCT AATCTTCGA
VARV B12R-I.C. (119 bp)	GATCATGTTCAAGCTGTTAATATCAATCTCGATAAACG TGAACAGGTTGCTTGTGCTGCTCGTATCGTCCAGGAG ATTTAGAAATGTTGGGATTATTGCATGATAGAATGGT CAGTGGCAAATCGA

図4: 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	

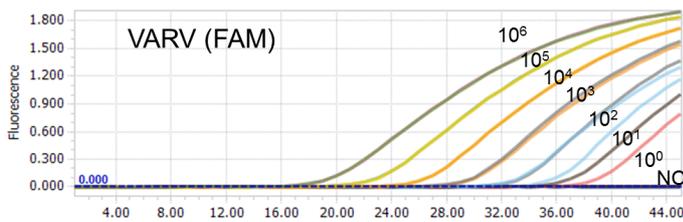
PCR condition

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

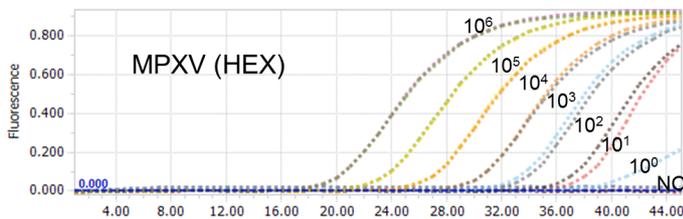


QuantiTect Probe PCR Kits

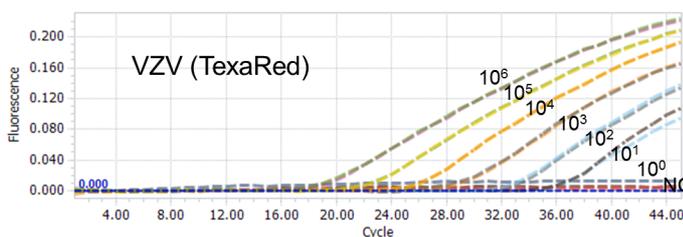
図5:リアルタイム PCR の反応液の組成と反応条件



primer probe Mix2

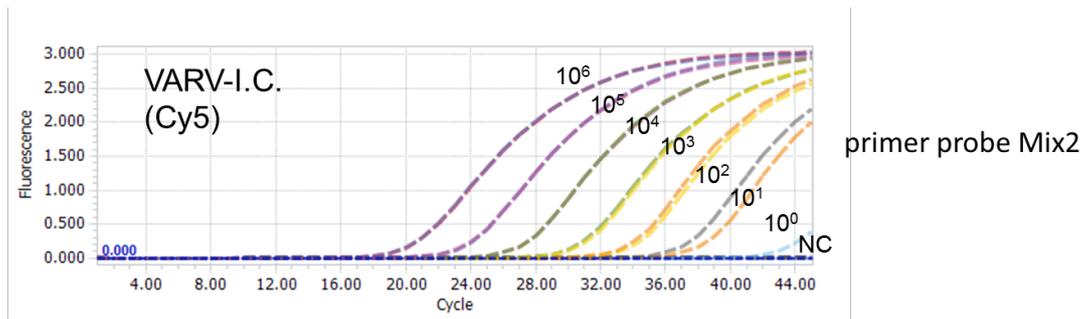


primer probe Mix2



primer probe Mix2

図6:リアルタイム PCR における添加スタンダード DNA 量(図中)とシグナルの検出(横軸はサイクル数)



primer probe Mix1					primer probe Mix2				
copies (Log10)	Cq				copies (Log10)	Cq			
	VARV FAM	MPXV HEX	VZV Texas Red	VARV-I.C. Cy5		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/(-)

図7: 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

平成30年: ニパウイルスの不活化条件の検討

- ニパウイルスもバイオテロで用いられる
- 実験室診断の安全な実施の確保

成果

- 疑似検体におけるウイルスの完全な不活化は熱処理と紫外線処理の併用で得られることが判明
 - 熱処理のみ(56°C, 30分)では不完全
 - 紫外線処理のみ(312nm, 2.5mW, 30分)でも不完全

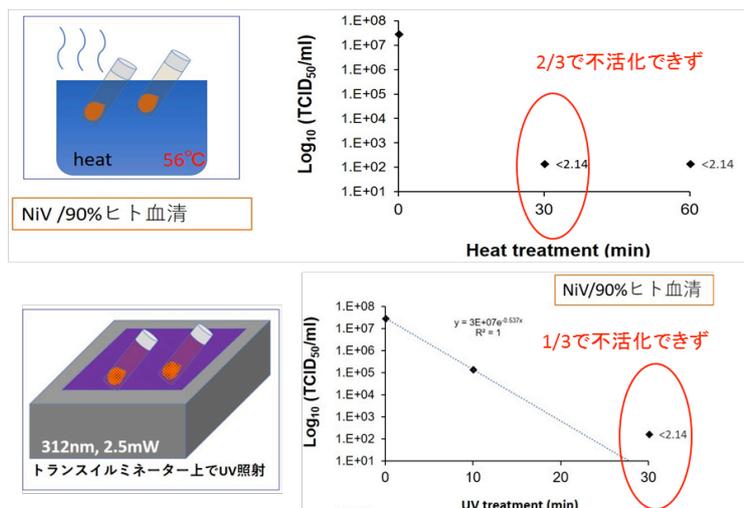
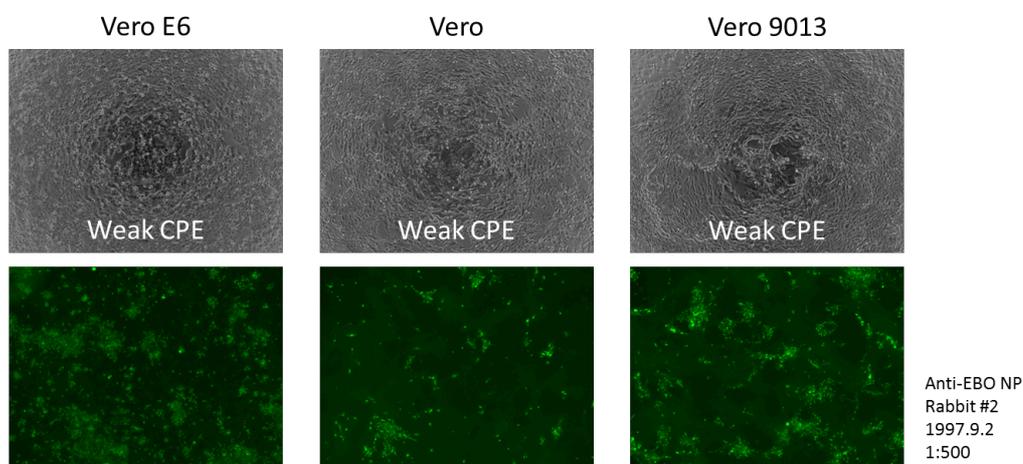


図8: ニパウイルスを含む検体のウイルス不活化処理の条件検討

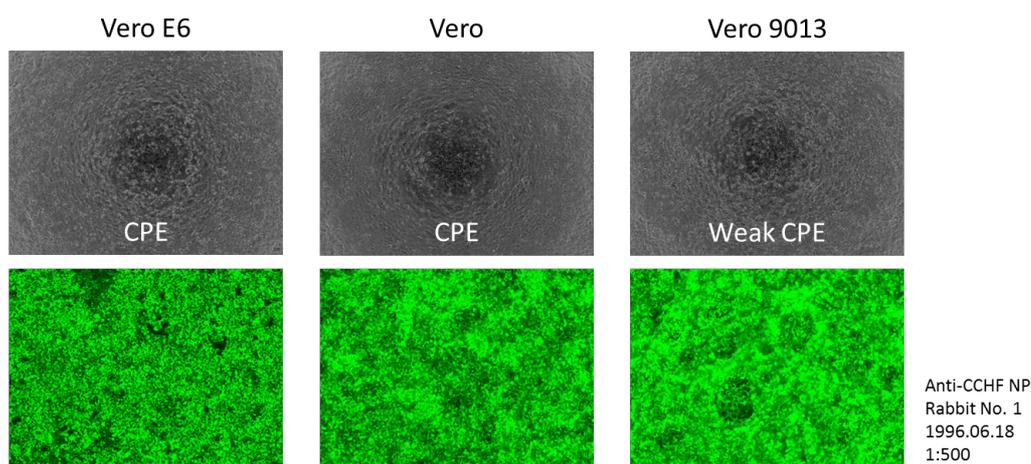
ZEBOV-Yambuku P1 titration



TCID ₅₀ /mL (log ₁₀)	Vero E6	Vero	Vero9013
CPE-based	ND	5.5-7	5.75-7.5
IFA-based	7.5	8	8

図9: ザイールエボラウイルスの力価測定

CCHFV-Bagdad12 P1 titration



TCID ₅₀ /mL (log ₁₀)	Vero E6	Vero	Vero9013
CPE-based	5.5	5.25	4.75-6.5
IFA-based	5.5	5.5	5

図10: クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの力価測定

平成 29 年度～令和元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 KMバイオロジクス株式会社
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:日本では痘瘡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(安全性が高い弱毒株由来)の一つで、且つ、現在世界で唯一、安定的な生産・供給体制が整備された痘そうワクチンであることから、国際的にも注目されている。LC16m8 の長期保存安定性成績(製剤:10年間、原薬:5年間)により、LC16m8 の高い保存安定性を確認した。また、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。一方で、その持続については、Dryvax と同様に、経時的な減衰傾向が認められた。

研究協力者

新村 靖彦・KMバイオロジクス株式会社 研究開発
本部 製品開発部 開発第四課・課長

A. 研究目的

細胞培養痘瘡ワクチン LC16m8 は、有効性を保持しながら弱毒化に成功した第3世代の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(凍結乾燥製剤は1980年に認可された)。当時の痘瘡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年に痘瘡ワクチンの定期接種が中止となった。

近年痘瘡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、本邦では痘瘡ワクチン LC16m8 がテロ対抗医薬品として2001年より製造が再開され、国家備蓄が進められている。そこで、日本国内に備蓄されている痘瘡ワクチン(LC16m8)の製造から備蓄年数による品質変化の推移を評価するために、これまでの研究で指定された3つの製造ロットの長期保存安定性成績

(製剤:10年間、原薬:5年間)を評価した。

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nder)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 が原則1回接種されている。本邦の国際貢献では、国連の平和維持活動(PKO)等を通じた国際平和協力活動や大規模災害時の国際派遣等を通じた国際緊急援助活動が行われ、自衛隊及び医療従事者等の関係者のアフリカ、中東への派遣も行われている。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患者発生地域における流行拡大に起因していること、また、痘瘡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、痘瘡ワクチン 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年度より調査研究を

開始している。平成 29 年度から令和元年度の調査研究では評価対象者数を増やして、中和抗体の獲得及び持続状況の調査を実施した。

B. 研究方法

1. 国家備蓄されている痘瘡ワクチン LC16m8 の製品品質の継続した確認

日本国内に備蓄されている痘瘡ワクチン(LC16m8)の製造から備蓄年数による品質変化の推移を評価するために、これまでの研究で指定された 3 つの製造ロットの長期保存安定性成績(製剤:10 年間, 原薬:5 年間)を評価した。

2. サル痘ウイルスに対する中和抗体誘導能の評価

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 年に一般財団法人化学及血清療法研究所(以下, 化血研)が米国で実施した細胞培養弱毒痘瘡ワクチン LC16m8 の第 I/II 相無作為二重盲検臨床試験で取得され、凍結保管されている血清検体を用いて実施した。3 年間の調査で、48 名の対象者の計 173 検体について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)を測定した。

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。測定は研究分担者が承認した試験プロトコル及び Southern Research 社の作業手順書(SOP)に従い、Vero E6 細胞を用いて、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、2017 年 11 月に KM バイオロジクス株式会社の研究倫理審査委員会の審査を受け、2018 年 8 月 23 日付で研究期間延長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秘匿化措置を講じた上で研究を実施した。

C. 研究結果

1. 国家備蓄されている痘瘡ワクチン LC16m8 の製品品質の継続した確認

LC16m8 の長期保存安定性成績(製剤:10 年間, 原薬:5 年間)により、LC16m8 の高い保存安定

性を確認した(表 1, 表 2)。また、成績は WHO 痘瘡ウイルス専門家会議(WHO 本部, 2018 年 9 月 26 日)でも報告し、高い評価を得た。

2. サル痘ウイルスに対する中和抗体誘導能の評価

細胞培養弱毒生痘瘡ワクチン 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の持続状況を調査するために、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痘瘡ワクチン LC16m8 の第 I/II 相無作為二重盲検臨床試験で取得され長期凍結保存しているヒト血清を用いて、サル痘ウイルスに対する中和抗体価測定を実施した。各ワクチン接種群の各ポイントでの中和抗体陽性率(Anti-Monkeypox PRNT₅₀ が ≥ 10 を陽性基準)及び Anti-Monkeypox PRNT₅₀ の幾何平均(GMT)を表 3 に示す。痘瘡ワクチン 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、痘瘡ワクチン LC16m8 は、米国で承認、備蓄されている第 1 世代の痘瘡ワクチンである 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、その持続については、Dryvax と同様に、経時的な減衰傾向が認められた。

D. 考察

本研究により、痘瘡ワクチン LC16m8 は製剤及び原薬ともに高い長期保存安定性を有していることから、有事に備えて長期保存が要求される生物テロ対応医薬品としての要件を満たすことが確認できた。

1980 年の天然痘撲滅宣言を受けて、全世界での痘瘡ワクチン接種が中止され、本邦においても 1976 年に痘瘡ワクチン定期接種が中止され、40 歳以下の世代では痘瘡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。また、アフリカ地域のサル痘アウトブレイクでは痘瘡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。そこで、本研究では痘瘡ワクチン 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獲得状況及びその持続について調査した。その結果、LC16m8 接種群では Dryvax 接種群と同様に、経時的な減衰傾向

が認められた。なお、本調査では対象とする検体調達の困難さから、採取以降約 15 年間にわたり凍結保管しているヒト血清を用いたため、長期保管中の検体特性の経年劣化による影響は否定できない。

E. 結論

LC16m8 は世界で 2 つしかない第 3 世代のワクチン(安全性が高い弱毒株由来)の一つで、かつ、現在世界で唯一、安定的な生産・供給体制が整備された痘瘡ワクチンであるが、更に高い長期保存安定性も有しており、生物テロ対抗医薬品としての高い有用性が示唆された。

細胞培養弱毒生痘瘡ワクチン LC16m8 を 1 回接種された過去に種痘歴のない成人被験者について調査した結果、痘瘡ワクチン LC16m8 は、米国で承認・備蓄されている第 1 世代の痘瘡ワクチンである 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、その持続については、Dryvax と同様に、経時的な減衰傾向が認められた。なお、本研究は米国で実施された臨床試験で取得された米国人の血清検体を用いて実施しており、今後の追加接種

の施策等を検討するためには、更に日本人の痘瘡ワクチン LC16m8 接種者の血清検体を用いた同様の研究実施も必要となると考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
該当なし

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
該当なし

表1. 痘瘡ワクチン LC16m8 の製剤の長期保存安定性成績

(遮光して-35℃以上-20℃以下で保存)

Month	0	3	6	9	12	18	24	36	48	60	72	84	96	108	120	
Appearance	Pass															
Sterility	Pass	-	-	-	Pass	-	Pass	Pass	-	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	
Weight Variation	Pass	-	-	-	-	-	-	Pass	-	-	Pass	Pass	Pass	-	-	
Moisture (%)	V03	0.42	0.87	0.66	0.44	0.47	0.46	0.62	0.56	0.80	0.60	0.51	0.35	0.60	0.43	0.43
	V04	0.47	0.81	0.69	0.41	0.58	0.44	0.57	0.58	0.73	0.60	0.43	0.35	0.60	0.32	0.32
	V06	0.47	0.86	0.77	0.21	0.77	0.46	0.76	0.54	0.66	0.61	0.54	0.26	0.61	0.36	0.36
Potency (Log ₁₀ PFU/mL)*	V03	8.80	8.83	8.57	8.85	8.87	8.82	8.72	8.83	8.78	8.79	8.78	8.72	8.81	8.83	8.83
	V04	8.79	8.91	8.72	8.87	8.87	8.78	8.82	8.77	8.83	8.84	8.83	8.76	8.76	8.86	8.86
	V06	8.49	8.60	8.39	8.57	8.57	8.49	8.56	8.50	8.57	8.57	8.54	8.49	8.52	8.57	8.57
Stability at 37°C for 4 wks (Pre/Post)	V03	Pass				Pass		Pass								
	V04	Pass	-	-	-	Pass	-	Pass								
	V06	Pass				Pass		Pass								

*: Specification of Potency : ≥ 8 Log₁₀PFU/mL
 -: Not applicable

表2. 痘瘡ワクチン LC16m8 の原薬の長期保存安定性成績

(-80℃±10℃で保存)

Month	0	1	3	6	9	12	18	24	36	48	60	
Appearance (LCDS0001,2,3)	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass
Sterility (LCDS0001,2,3)	Pass	-	-	-	-	Pass	-	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass
Potency*	LCDS0001	9.0	8.9	8.8	8.9	8.9	8.8	8.9	8.9	8.9	8.8	8.9
	LCDS0002	9.0	8.9	9.0	8.9	8.9	9.1	8.9	9.0	9.0	8.9	8.9
	LCDS0003	8.9	8.9	8.9	8.8	8.9	8.9	8.8	8.9	8.8	8.8	8.8

*: Specification of Potency : ≥ 8 Log₁₀PFU/mL
 -: Not applicable

表3. 痘瘡ワクチン接種後のサル痘ウイルスに対する中和抗体応答

Vaccination	Anti-NYCBH PRNT		Anti-Monkeypox PRNT			
	LC16m8	Dryvax	LC16m8		Dryvax	
N	37	11	37		11	
Days after vaccination	30	30	30	180 or 360	30	180 or 360
Seroconversion Rate*	100% (37/37)	100% (11/11)	84% (31/37)	41% (15/37)	91% (10/11)	64% (7/11)
GMT**	801	773	98	73	191	83

*10倍以上の中和抗体価を獲得した者を陽性と判定

**GMT: Geometric mean titer(中和抗体陽性者の抗体価のみを対象とし, 180日目と360日目の抗体価はいずれか高い方をGMT算出に用いた)

平成 29 年度～令和元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安全性評価における病理学的研究

所属 国立感染症研究所・感染病理部・室長
研究分担者 永田 典代

研究要旨：サル痘ウイルスがマウスに不顕性感染することを利用し、好中球枯渇マウスにおける重症化機序を明らかにする。サル痘ウイルスの皮下接種はマウスに明らかに病変を起こさないが、好中球の枯渇処理はウイルス増殖と病変形成を亢進した。本モデルにおける免疫反応を経時的に明らかにした。一時的な好中球の枯渇処理は、感染後の好中球増多、炎症性サイトカイン・ケモカインの高発現を引き起こした。そこで、肝組織におけるクッパー細胞の活性化に着眼し、ウイルス感染の影響の評価を試みた。その結果、好中球枯渇群において有意な肝クッパー細胞の活性化が示された。さらに、リンパ系組織および血中におけるウイルスゲノム動態を経時的に明らかにした。これまでに得られた宿主応答と組織変化を総合的に検討し、好中球は本モデルにおける体内のウイルス伝播と病態の更新に一定の役割を担うと結論した。本モデルは、今後のオルソポックスウイルスワクチンの開発研究に利用できると考える。

研究協力者

岩田奈織子・佐藤由子・長谷川秀樹・鈴木忠樹
国立感染症研究所 感染病理部
福士秀悦・吉河智城・西條政幸
国立感染症研究所 ウイルス第一部

A. 研究目的

痘瘡ワクチンの副反応の発現機構を病理学的に理解するため、オルソポックスウイルス感染症の重症化とウイルス伝播力の変化に関わる宿主側因子を明らかにする。具体的には、サル痘ウイルスがマウスに不顕性感染することを利用し、その重症化機序について好中球枯渇マウスを利用し免疫学的、病理学的、ウイルス学的に明らかにする。

B. 研究方法

1. 感染実験と材料採取

動物は、日本エスエルシーより購入した BALB/c マウス(接種時、14 週齢メス)を準備し、国立感染症研究所のバイオリスク管理委員会規定に従い、ABSL3 施設にて感染実験を行った。
ウイルスは、サル痘ウイルスの Zr-599 株を用いた。好中球枯渇のため、抗マウス Ly6G 抗体(1A8, BioXcell 社)を、また、アイソタイプコント

ロールとして rat IgG2a(BioXcell 社)を用いた。これらの抗体をマウスの腹腔内に投与し(一匹あたり 500 μ g/500 μ L)、半日後にウイルス液(一匹あたり 2×10^5 PFU ウイルス量/100 μ l)を頸背部に皮下接種した。対照群には細胞培養液を接種した(各群 10 匹、合計4群)、その後、接種 2, 4, 7, 10, 13 日目に抗体投与を行った。16 日間、臨床症状と体重変化を観察した(n = 6)。

ウイルス接種 3, 7, 10, 16 日目に一部の動物を安楽殺し、心臓採血後に解剖し材料を採取した(n = 4-6)、採血は、事前にヘパリンを含んだ注射筒で実施し、ヘパリン処理血液を得た。これを用いて、動物用血球計数装置(ベトスキャン HM II, 株式会社セントラル科学貿易)にて血球計測を行った。また、血漿を分離し、サイトカイン・ケモカインを測定した(Cytokine 20-Plex Mouse Panel, Thermo Fisher Scientific)。

2. 免疫組織化学法と画像解析法

活性化マクロファージのマーカーである Iba-1 抗原のパラフィン包埋組織上の検出を免疫組織化学法により行った。pH6.0 抗原賦活化液(ニチレイ)を用いて 121 度 10 分の抗原賦活化処理後、一次抗体には抗 Iba-1 ポリクローナル抗体

(Wako)を用いた。ポリマー法によるペルオキシダーゼ標識を行い、ジアミノベンチジンによる可視化後、対比染色にはマイヤーのヘマトキシリンを用いた。

検索対象は中心静脈を撮影中心とした顕微鏡撮影デジタル画像で、撮影倍率 400 倍で画像を得た。計算上、対象面積はおよそ 150,000 μm^2 であった。各個体の肝組織切片から 3 カ所を撮影した。色域選択による抗原陽性部位の抽出には、画像解析ソフト Neurolucida (MBF Bioscience)を用い、抽出した画像から解析ソフト Neurolucida explorer (MBF Bioscience)による面積の自動計算を行った。各個体の平均値を統計解析に用いた(n=6)。統計解析は統計解析ソフト Prism 7 (MDF)を用いた。

感染実験において、ウイルス接種 3, 7, 10, 16 日目に一部の動物を安楽殺し、血液とリンパ組織を得た(n = 4-6)。材料は解析まで、DNA/RNA Shield (ZYMO Research) 中で -80°C にて保管し、Quick-DNA Kits (ZYMO Research)を用いて DNA を抽出し Monkeypox ウイルスのゲノムを real time PCR 法により検出した。使用したプライマー、プローブは次の通り (Maksyutov RA et al., 2016)。MPXV F3L upper ,
5'-CATCTATTATAGCATCAGCATCAGA-3' ,
MPXV F3L lower ,
5'-GATACTCCTCCTCGTTGGTCTAC-3' ,
MPXV F3L probe ,
HEX-5'-TGTAGGCCGTGTATCAGCATCCAT T-3'-BHQ1 , QuantiTect Probe PCR Kits (QIAGEN)を用いてサンプルを調製し、Real time PCR 反応プロトコルは、テンプレート変性・酵素活性化ステップ 95°C10 分、変性 95°C15 秒 およびアニーリング・伸長反応 63°C60 秒 45 サイクル、37°C30 秒とした。

【倫理面への配慮】

動物を扱う研究においては、国立感染症研究所 実験動物委員会の審査と承認を得て、動物愛護の精神に則り遂行した。

C. 研究結果

1. 感染実験結果

いずれの接種群においても、サル痘ウイルスの皮下接種後に明らかな肉眼病変を示さなかった。しかし、好中球枯渇処理群はウイルス接種後に体重の有意な増加傾向がみられた。白血球数について、好中球枯渇処理群ではウイルス接種の有無に関わらずほぼ同様の動態を

示したが、アイトタイプコントロール処理群では、ウイルス接種3日後に白血球数の増多がみられ、それは、リンパ球と単球の増多によるものであった。好中球枯渇群において単球の軽度の増多が3日目に見られた。

アイトタイプコントロール処理後のウイルス接種群では、IL-12 と IFN-gの軽度の上昇を認めた。一方、好中球枯渇処理群ではウイルス接種 10 日目に IL-12 の高値がみられ、16 日目には MIP-1a, GM-CSF, IL-2 と IFN-gの有意な上昇が見られた。

2. 肝組織の免疫組織化学的解析

接種 16 日目の肝組織を HE 染色で評価したところ、ウイルス接種群において腫大したクッパ細胞が散見された。抗 Iba-1 抗体を用いた免疫組織化学法により、肝の類洞内に Iba-1 抗原を検出した。抗原陽性部位を色域選択 (RGB スペクトル R, G, B はそれぞれ 197, 176, 147 とした) によってトレースし、その輪郭内の面積を自動計算により算出し各群における面積値を比較した。その結果、抗原陽性面積によるクッパ細胞の活性化の評価はそれぞれ次の様になった。

非感染群において、アイトタイプコントロール投与と Ly6G 抗体投与によるクッパ細胞の活性化への影響に有意な差はみられなかった(p=0.20)。また、アイトタイプコントロール群に対するウイルス接種の影響としては、感染によるクッパ細胞の活性化が有意にみられた (p=0.013)。Ly6G 抗体投与後のウイルスの皮下接種により、クッパ細胞の活性化はいずれの群に対しても有意であり (p<0.01)、好中球の枯渇によって、肝臓内のクッパ細胞に対する感染の影響が強くと認められることが示された。

3. ウイルス動態

アイトタイプコントロールおよび Ly6G 抗体投与後のウイルスの皮下接種により、3 日目の頸部リンパ節あるいは脾臓においてそれぞれ 5 匹中 4 匹あるいは 5 匹からウイルスゲノムが検出された。また、Ly6G 抗体投与群においては、4 匹中 2 匹で 10 日目の血中からウイルスゲノムが検出された。16 日目にはいずれの個体からもウイルスゲノムは検出されなかった。好中球の枯渇によってウイルス血症が遷延することが示唆された。

D. 考察

いくつかの急性ウイルス感染症において、好中球の減少は宿主側の重症化因子の一つと考えられている。ワクチニアウイルスを用いたマウスモデル

においても、同様な知見が得られている (Fischer MA et al, 2011). 我々はすでに、BALB/c マウスのサル痘ウイルス不顕性感染のモデルにおいて、抗 Ly6G 抗体投与による好中球枯渇によりウイルス増殖と病変形成が亢進することを示した (平成 26-28 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) 報告書). よって、サル痘ウイルス感染防御において好中球は一定の役割を担っていると考えている.

今回は、この感染モデルを用いて、経時的な免疫反応を血液動態、サイトカイン・ケモカインの変化から検討した. 好中球枯渇後のウイルス感染において、血球動態にあまり大きな変化は見られなかったが、サイトカイン・ケモカイン産生については IL-12 を始めとした、IFN-gamma, IL-2, MIP-1alpha, GM-CSF を含む明らかな Th1 応答であった. なお、好中球枯渇後のウイルス感染群での体重増加は、これまでの実験結果と再現性のある結果であった. 食欲亢進等が示唆されたが、その原因は不明である.

Iba1 (別名: G1, Daintain / AIF-1) は、単球あるいはマクロファージの細胞質で発現し、炎症応答に関与するタンパク質であり、マクロファージの活性化に関与することが知られている. そのため、活性化マクロファージやミクログリアのマーカーとしてよく利用されている. 一方、細胞の活性化についての形態的評価は困難で、主観的となるため、Iba-1 抗原陽性部位の面積値を評価対象とすることとした.

その結果、Iba-1 抗原の陽性面積値は、ケモカイン・サイトカイン反応の結果と一致した. 本解析法は、ポックスウイルス感染後の宿主応答を組織学的に調べる上で新たな指標となりえる.

オルソポックスウイルスの小動物モデル開発のために種々の経路や系統でマウスの実験的感染が試されてきた. 新生仔マウスや免疫不全マウスでは全身感染や致死感染を示すが、成マウスではほぼ不顕性感染を示すのみであった. 本研究では、成 BALB/c マウスに好中球枯渇処理を施すことによって、サル痘ウイルスの易感染状態を作り出すことが出来ることを示した. また、好中球枯渇状態ではウイルス血症が遷延し、ウイルス増殖と病変形成が亢進されることも示唆された. 本研究で用いたウイルス量は一匹あたり 2×10^5 PFU ウイルス量/100 μ l であったが、今後はウイルス量をさらに高くすることで安定した動物モデル系となると考えている. 以上から、新たなオルソポックスウイルス感染マウスモデルを提示した.

E. 結論

サル痘感染マウスモデルの検討結果から、オルソポックスウイルス感染症の重症化の宿主因子として好中球を中心とした免疫応答の関与が示唆された. 本モデルは、今後のオルソポックスウイルスのワクチン開発研究に利用できると思う.

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakata M, Tani H, Anraku M, Kataoka M, Nagata N, Seki F, Tahara M, Otsuki N, Okamoto K, Takeda M, Mori Y. Analysis of VSV pseudotype virus infection mediated by rubella virus envelope proteins. *Sci Rep*. 2017. 7(1):11607.
- 2) Taniguchi S, Maeda K, Horimoto T, Masangkay JS, Puentespina R Jr, 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. *Arch Virol*. 2017. 162(6):1529-1539.
- 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. *Jpn J Infect Dis*. 2017.70(4):408-415.
- 4) Iwata-Yoshikawa N, Okamura T, Shimizu Y, Hasegawa H, Takeda M, Nagata N. TMPRSS2 Contributes to Virus Spread and Immunopathology in the Airways of Murine Models after Coronavirus Infection. *J Virol*. 2019. 93(6) doi: 10.1128/JVI.01815-18.
- 5) Iwata-Yoshikawa N, Okamura T, Shimizu Y, Kotani O, Sato H, Sekimukai H, Fukushi S, Suzuki T, Sato Y, Takeda M, Tashiro M, Hasegawa H, Nagata N. Acute Respiratory Infection in Human Dipeptidyl Peptidase 4-Transgenic Mice Infected with Middle East

- Respiratory Syndrome Coronavirus. *J Virol.* 2019. 93(6). doi: 10.1128/JVI.01818-18.
- 6) Matsuyama S, Nao N, Shirato K, Kawase M, Saito S, Takayama I, Nagata N, Sekizuka T, Katoh H, Kato F, Sakata M, Tahara M, Kutsuna S, Ohmagari N, Kuroda M, Suzuki T, Kageyama T, Takeda M. Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 117(13):7001-7003, 2020.
- 7) Sekimukai H, Iwata-Yoshikawa N, Fukushi S, Tani H, Kataoka M, Suzuki T, Hasegawa H, Niikura K, Arai K, Nagata N. Gold nanoparticle-adjuvanted S protein induces a strong antigen-specific IgG response against severe acute respiratory syndrome-related

coronavirus infection, but fails to induce protective antibodies and limit eosinophilic infiltration in lungs. *Microbiol Immunol.* 64(1):33-51, 2020.

2. 学会発表
該当なし

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
該当なし

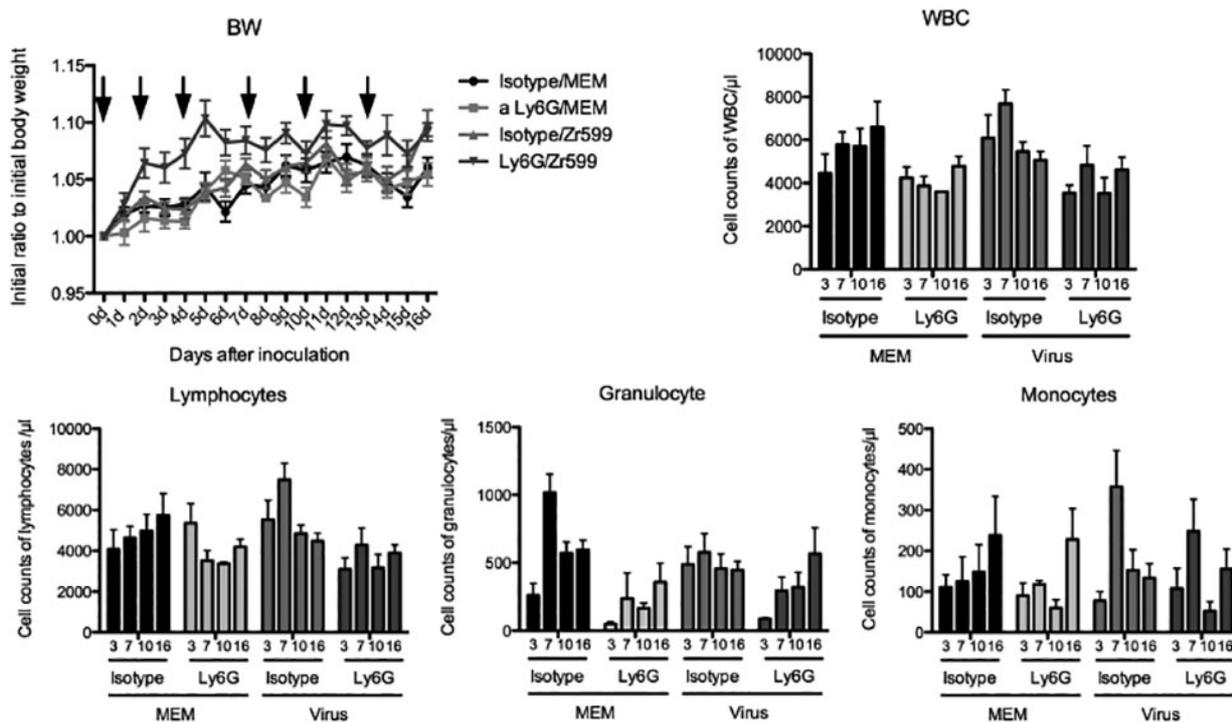


図 1 左上はサル痘ウイルス皮下接種後のマウスの体重変化. Isotype/MEM, アイソタイプコントロール処理後細胞培養液接種; aLy6G/MEM, 好中球枯渇後細胞培養液接種; Isotype/Zr599, アイソタイプコントロール処理後ウイルス接種; Ly6G/Zr599, 接種好中球枯渇処理後ウイルス, 各群 n=6, 矢印は, 抗体投与日を示した. 右上, 下段は順に WBC, 白血球数;リンパ球数, 顆粒球数, 単球数を示した. ウイルス接種 3, 7, 10, 16 日の血液像.

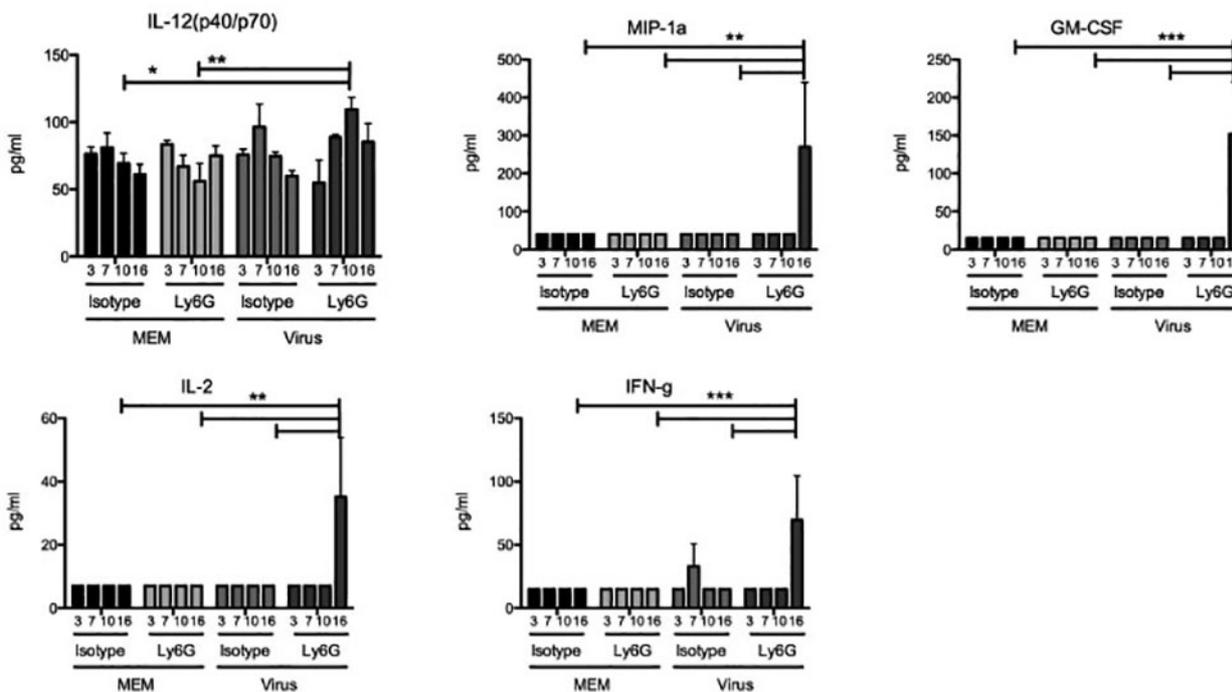


図 2 ウイルス感染後 3, 7, 10, 16 日目の血漿中のサイトカイン, ケモカイン発現量.

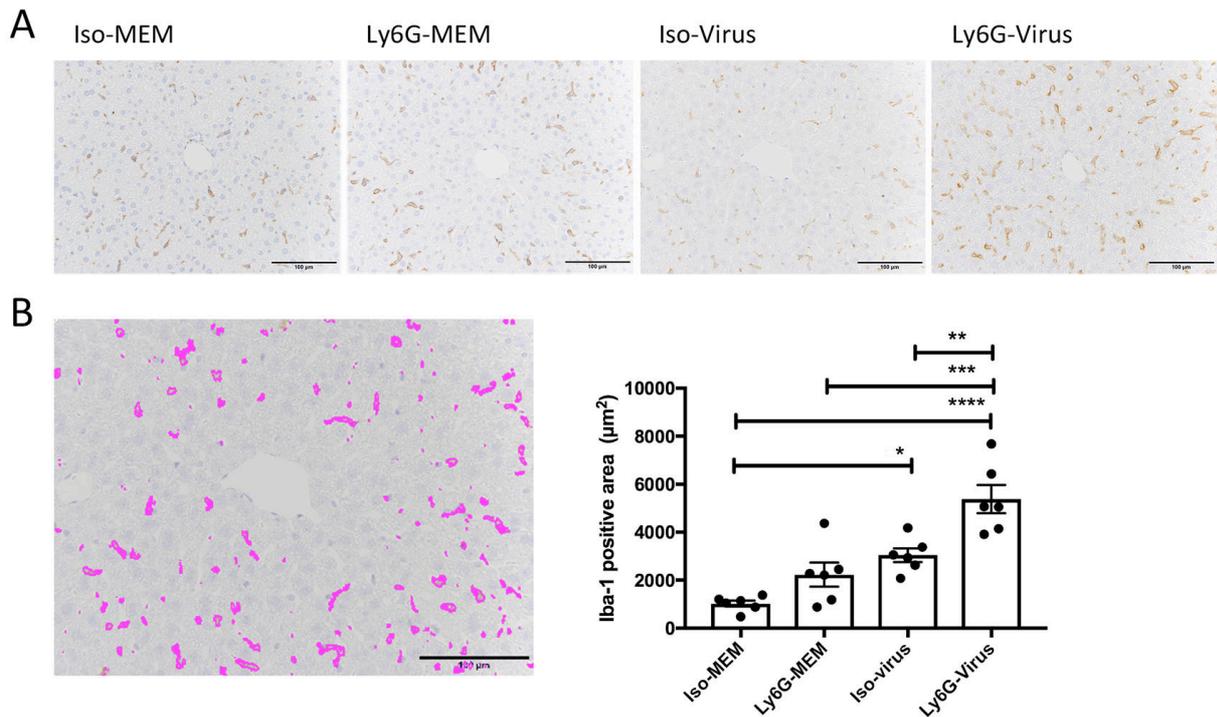


図3 サル痘ウイルス皮下接種 16 日目の肝組織における Iba-1 陽性細胞の評価。A. 抗 Iba-1 抗体を用いた免疫組織化学法の組織像。中心静脈を撮影中心として、撮影倍率 400 倍の画像(面積 約 150,000 μm^2)を得た。Iso-MEM, アイソタイプコントロール処理後細胞培養液接種; Ly6G-MEM, 好中球枯渇後細胞培養液接種; Iso-Virus, アイソタイプコントロール処理後ウイルス接種; Ly6G-Virus, 接種好中球枯渇処理後ウイルス, 各群 $n=6$ 。B. 左図 Iba-1 抗原陽性部位を色域により抽出しトレースした画像, 右図 トレース画像から面積を算出し, Iba-1 陽性面積とし One-way ANOVA 解析により比較解析した。*, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$; ****, $p<0.0001$ 。

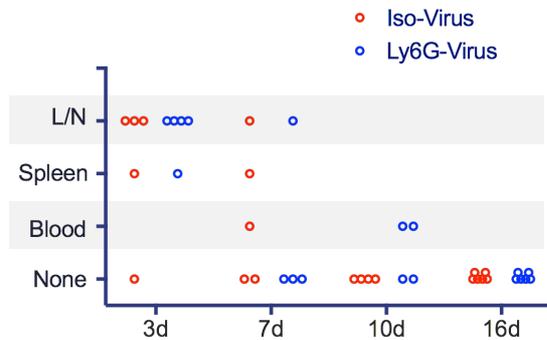


図4 頸部リンパ節, 脾 および血液における経時的なウイルスゲノムの検出 ($n=4$). 各ドットは個体を示す。None はいずれの材料においてもウイルスゲノムが検出されなかった事を示す。