

厚生労働科学研究費補助金  
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業  
(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)

**バイオテロに使用される可能性のある病原体等の新規検出  
法の確立，及び細胞培養痘そうワクチンの  
有効性，安全性に関する研究**

**(H26-新興行政-指定-002)**

平成 27 年度 総括・分担研究報告書

平成 28 年 3 月

研究代表者 西 條 政 幸  
( 国立感染症研究所 )

平成 27 年度厚生労働科学研究費補助金  
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業  
(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)

バイオテロに使用される可能性のある病原体等の新規検出法の確立, 及び細胞  
培養痘そうワクチンの有効性, 安全性に関する研究

平成 27 年度 研究組織

研究代表者(班長)

西條政幸 国立感染症研究所・ウイルス第一部長

研究分担者

氏名	所属
田島茂	国立感染症研究所ウイルス第一部
下島昌幸	国立感染症研究所ウイルス第一部
吉河智城	国立感染症研究所ウイルス第一部
森川茂	国立感染症研究所獣医科学部
梅山隆	国立感染症研究所真菌部
黒田誠	国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター
中島典子	国立感染症研究所感染病理部
永田典代	国立感染症研究所感染病理部
小林和夫	堺市衛生研究所
倉園久生	帯広畜産大学・畜産衛生学研究部門・食品衛生学分野
鯉淵智彦	東京大学医科学研究所・附属病院感染免疫内科
松本哲哉	東京医科大学微生物学講座
金谷泰宏	国立保健医療科学院健康危機管理研究部
横手公幸	一般財団法人化学及血清療法研究所

研究協力者(順不同)

氏名	所属
朴ウンシル	国立感染症研究所獣医科学部
宇田晶彦	国立感染症研究所獣医科学部
名木稔	国立感染症研究所真菌部
星野泰隆	国立感染症研究所真菌部
宮崎義継	国立感染症研究所真菌部
鈴木忠樹	国立感染症研究所感染病理部
岩田奈織子	国立感染症研究所感染病理部
佐藤由子	国立感染症研究所感染病理部
片岡紀代	国立感染症研究所感染病理部
原嶋綾子	国立感染症研究所感染病理部
長谷川秀樹	国立感染症研究所感染病理部
福土秀悦	国立感染症研究所ウイルス第一部
高崎智彦	国立感染症研究所ウイルス第一部
小谷治	国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター
山下明史	国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター
奥谷晶子	国立感染症研究所・獣医科学部
水田克巳	山形県衛生研究所(北海道・東北・新潟地区)
八柳潤	秋田県健康環境センター(北海道・東北・新潟地区)
岸本剛	埼玉県衛生研究所(関東・甲・信・静岡地区)
皆川洋子	愛知県衛生研究所(東海・北陸地区)
内野清子	堺市衛生研究所(近畿地区)
杉本光伸	堺市衛生研究所(近畿地区)
調恒明	山口県環境保健センター(中国・四国地区)
岸本壽男	岡山県環境保健センター(中国・四国地区)
四宮博人	愛媛県立衛生環境研究(中国・四国地区)
山下育孝	愛媛県立衛生環境研究所(中国・四国地区)
千々和勝己	福岡県保健環境研究所副(九州地区)
江崎孝行	国立大学法人岐阜大学医学部
川本恵子	国立大学法人帯広畜産大学動物・食品検査診断センター
菊地正	東京大学医科学研究所附属病院
江藤亜紀子	国立保健医療科学院健康危機管理研究部
橋爪壯	千葉大学
上村千草	一般財団法人化学及血清療法研究所
内田梓	一般財団法人化学及血清療法研究所

金原知美	一般財団法人化学及血清療法研究所
丸野真一	一般財団法人化学及血清療法研究所
新村靖彦	一般財団法人化学及血清療法研究所
宮本誠二	一般財団法人化学及血清療法研究所

---

## 目次

### I. 総括研究報告書

バイオテロに使用される可能性のある病原体等の新規検出法の確立, 及び細胞培養痘そうワクチンの有効性, 安全性に関する研究	1
西條政幸	

### II. 分担研究報告書

1. 蚊媒介性ウイルスの鑑別検査法の開発: 全 lineage をカバーするウエストナイルウイルス遺伝子検出法の開発	15
田島茂	
2. ウイルス性出血熱の検査法に関する研究	23
下島昌幸	
3. 弱毒痘そうワクチン LC16m8 株をポックスウイルス暴露後に接種した場合の発症・重症化阻止効果について, エクトロメリアウイルスを用いたマウスモデルによる検討	25
吉河智城	
4. 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの特性解析 (遺伝子機能解析), 品質試験法に関する研究	29
森川茂	
5. バイオテロに使用される可能性のある真菌感染症の迅速診断法の確立	35
梅山隆	
6. 超高速病原体ゲノム解読システムの構築と包括的な核酸迅速診断法の確立	37
黒田誠	
7. 病原体の病理学的検出法の確立	41
中島典子	
8. 痘そうワクチンの安全性評価における病理学的研究	45
永田典代	
9. 病原体の電子顕微鏡学的迅速検出法の確立	49
永田典代	
10. 地方衛生研究所におけるバイオテロ対応に関する研究	51
小林和夫	
11. 細菌性バイオテロに対する迅速同定法・診断法およびワクチンの開発	57
倉園久生	
12. 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	63
鯉淵智彦	
13. 各医療機関のバイオテロ対策を支援するための方策	67
松本哲哉	
14. 情報管理及び提供法の確立と維持	73
金谷泰宏	
15. 痘そうワクチン LC16m8 接種者における中和抗体持続に関する調査研究	77
横手公幸	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	85
---------------------	----

厚生労働科学研究費補助金  
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業  
(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)  
総括研究報告書

バイオテロに使用される可能性のある病原体等の新規検出法の確立,  
及び細胞培養痘そうワクチンの有効性,安全性に関する研究  
(H26-新興行政-指定-002)

研究代表者	西條政幸	国立感染症研究所ウイルス第一部
研究分担者	田島茂	国立感染症研究所ウイルス第一部
	下島昌幸	国立感染症研究所ウイルス第一部
	吉河智城	国立感染症研究所ウイルス第一部
	森川茂	国立感染症研究所獣医科学部
	梅山隆	国立感染症研究所真菌部
	黒田誠	国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター
	中島典子	国立感染症研究所感染病理部
	永田典代	国立感染症研究所感染病理部
	小林和夫	堺市衛生研究所
	倉園久生	帯広畜産大学・畜産衛生学研究部門・食品衛生学分野
	鯉淵智彦	東京大学医科学研究所・附属病院感染免疫内科
	松本哲哉	東京医科大学微生物学講座
	金谷泰宏	国立保健医療科学院健康危機管理研究部
	横手公幸	一般財団法人化学及血清療法研究所

## 研究要旨

### 【バイオテロに使用される可能性のある病原体等の新規検出法の確立】

ウエストナイルウイルス, BSL3 に分類されるコクシジオイデス属 (*Coccidioides immitis*, *C. posadasii*), ヒストプラスマ属 (*Histoplasma capsulatum*), BSL2 に分類されるクリプトコックス・ガッティ, 炭疽菌の新規検出法を確立した. 6 種類全ての lineage に分類されるウエストナイルウイルスに対応可能な新規 TaqMan プライマー・プローブセットを開発した. LAMP 法によるクリプトコックス・ガッティ遺伝子の高感度検出系を開発した. 未知病原体や変異病原体による新興感染症の汎発流行, そしてそれらを利用したバイオテロなどの危険性への対処法を立案・整備する上で, バイオテロ病原体を網羅的かつ迅速に配列解読することは最も確かなアプローチの 1 つである. 次世代ゲノムシーケンサー (Next-generation DNA sequencer: NGS) のパフォーマンスを用いて WHO 指定バイオテロ病原体のゲノム配列及び変異情報データベースを充実させる目的で, 炭疽菌の次世代シーケンス (next-generation sequencing: NGS) データをアップロードすると single nucleotide polymorphisms (SNPs) を抽出し, 炭疽菌およびその類縁菌の系統的な位置関係を推定するウェブアプリケーション GcoGSA-BA (Global core Genome SNP Analysis for *Bacillus anthracis*) を開発した. GcoGSA-BA はコアゲノム系統解析だけでなく, pXO1, pXO2 といった病原性を規定するプラスミドや pXO1 上に存在する三つの炭疽菌毒素遺伝子 (lethal factor, LF; edema factor, EF; protective antigen, PA) を検出する機能も有しており, 炭疽菌 (*B. anthracis* Ames Ancestor) ばかりでなく炭疽菌毒素遺伝子を例外的に保持している *B. cereus* G9241 の系統的な位置関係も正しく推定し, 更に炭疽菌毒素遺伝子を検出することが可能となった. GcoGSA-BA による情報解析で, 炭疽菌を含むセレウス属グループ全般の病原性因子の特定も可能にするための改良を加えた. さらに, 2014 年のデング熱感染症・国内発症例を契機に, 輸入感染症による国内拡大にも注視すべき事情が生じ, 2020 年東京オリンピック開催時に発生する可能性の高いデング熱国内対策にも資する, デングウイルス遺伝型を図示化するツール Dengue Genograph Viewer (DGV) を構築した.

### 【バイオテロに使用される可能性のある病原体等の新規検出法の有用性の評価】

エボラ出血熱の致死率は 90% に達する. 国立感染症研究所ウイルス第一部で準備されているエボラウイルス検出方法により 2014-15 年に西アフリカでの流行の原因となったエボラウイルスも検出することが可能か否かを評価した. 組織切片上で病原体遺伝子核酸を検出する *in situ* hybridization (ISH) 法のひとつである, オリゴヌクレオチドプローブを用いた *in situ* ゲノム検出法には 3 種類 (ISH-AT 法, View RNA 法, RNAscope 法) がある. それらの有用性を比較評価した. Global Health Security Action Group Laboratory-Network の活動の一環である, GHSAG Wet-Lab Workshop on Diagnostic Electron Microscopy of Pathogens, Winnipeg 2015 (平成 27 年 9 月 24, 25 日 National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canada 主催) に参加し, バイオテロに使用される可能性のある病原体等の電子顕微鏡を用いた迅速検出法の確立を目的に, 検出感度と精度を向上するための改良法の一つとして, 電子顕微鏡検索のためのサンプルの濃縮方法について評価した.

#### 【バイオテロ対策のためのネットワーク構築】

現在、医療機関向けのバイオテロ対策の指針等が示されておらず、具体的に何をすれば良いのかが明確になっていない状況にある。国内の医療機関向けにバイオテロ対策のガイドラインの作成において、個々の病原体にかかわらず広く対応できるようにすることを目指して、ガイドラインにおける総論部分を充実させた。

地方衛生研究所(地衛研)におけるバイオテロ対応の現状と課題に対する対し方策や改善などを検討した。その結果、これら課題の改善には地衛研、各支部内、地衛研全国協議会、感染研および厚生労働省の理解や連携が重要であることが確認された。改正感染症法(特に、病原体サーベイランスなど感染症に関する情報の収集体制が強化)の施行も関連し、病原体検出マニュアルの整備、標準作業手順書の作成、地衛研全国協議会感染症対策部会員の増員などがあった。

#### 【細胞培養痘そうワクチンの有効性、安全性に関する研究】

国産の弱毒痘そうワクチン株である LC16m8 を用いて暴露後重症化阻止が可能か検討した。オルソポックスウイルスに属するエクトロメリアウイルス(ECTV)を用いたマウスモデル系を確立した。次に ECTV でマウスを攻撃する前後 3 日の間に LC16m8 株、またはその親株の Lister 株を接種して効果を検討した。ECTV 暴露 3 日前に Lister 株を投与した群でのみ発症・重症化阻止効果は確認できたが、ECTV 暴露後の LC16m8、Lister 株の投与による効果は確認されなかった。サル痘ウイルスの BALB/c マウス感染モデル開発に関する研究を推進した。病原性の異なる 2 種類のサル痘ウイルスをそれぞれ BALB/c マウスに皮下接種したところ、ともに感染成立を示唆する所見が得られた。抗 Ly6G 抗体投与による好中球枯渇マウスに対する感染実験のモデルとしての有用性を評価する。

LC16m8 株は、継代培養するとプラークサイズのやや大きい LC16mO 型 (medium size plaque; MSP) ウイルスが出現する。MSP の変異パターン解析で得られた主要な MSP を定量的に検出可能な PCR 法を開発することを試みた。MSP の遺伝子変異特異的配列を 3' 末端とする primer を用いた PCR で、LC16m8 株と特定の MSP を識別できた。そこで、主要タイプの MSP を特異的に検出する PCR を用いて、LC16m8 株と MSP を混合したスパイク試験を実施した結果、MSP 含有率 0.01~1%まで検出できた。さらに RNase H2-dependent PCR により、より特異度の高い MSP 検出 PCR が開発された。

LC16m8 接種血清と Dryvax 接種血清との抗原性の比較、種々の痘そうワクチンを接種したマウス血清のアレイ測定結果の解析、LC16m8 および抗 B5 抗体に関する文献レビュー、抗 B5 抗体の測定系の確立などを引き続き行った。LC16m8 の有効性について、ASEAN 地域フォーラムにおいて報告した。

LC16m8 を 1 回接種された健康成人の抗体陽性率の経時的な推移を調べた。抗体陽性率は時間が経過すると低下傾向が認められた。Proteome Microarray Chip を用いたプロテオミック解析法を用いて、LC16m8 接種 30 日後と接種 1 年後を比較すると、有意に低下した抗原は A11R, A13L, A17L であることが明らかにされた。

【ホームページ】生物テロに関連する疾患について、インターネット上で最新の情報を得ることを目的とした『バイオテロ対応ホームページ』に関して情報の妥当性・正確性を確認した。今後は医療従事者のみならず、一般公開も検討すべきと考えられたため、課題の洗い出しと具体的な対応策を検討した。

## A. 研究目的

本研究班においては、大きく2つの課題に対処する。一つは、「バイオテロに使用される可能性のある病原体等の新規検出法の確立」、もう一つは「細胞培養痘そうワクチンの有効性、安全性に関する研究」の推進である。

バイオテロ対策には迅速検査、分離同定、および血清抗体検査、環境検体を用いた病原体検出が必要となる。さらに病原体の由来を知るためにゲノムデータの整備も重要となる。これまで本研究班では種々のバイオテロ関連病原体等について迅速診断法の開発がなされてきた。しかし、検査ネットワーク整備、さらに病原体の由来の追跡や未知の病原体等への対応にも課題を残している。今年度は、一次対応者や対応機関を支援する目的でバイオテロに関する情報を提供するシステムを準備するとともに、緊急時に患者や環境等からバイオテロ関連病原体等を短時間に検出同定する実験室診断法の開発することを目的とした。また、病原体ゲノムデータベースの整備および検査診断機関のネットワーク化を行うことも目的とした。

具体的には、1)各種病原体等に対する遺伝子検出法、抗原抗体検出法、毒素迅速検出法等の迅速診断法の整備、2)網羅的ウイルス検出法、網羅的細菌検出法、超高速ゲノム解読法の確立、未知の病原体等検出法、病原体のデータベース等の開発と確立、3)電子顕微鏡を用いた検出法、免疫組織化学的検出法の確立、4)検体調整法とスクリーニング法の普及、検査マニュアルの整備を通じた地方衛生研究所と感染研等とのネットワークの整備、5)診断検査支援のため、関係機関への情報提供システムの確立を目的とした。

本年度は特に地方衛生研究所との検査ネットワークの整備とホームページ等の情報発信の整備に重点的に取り組んだ。

日本では、痘瘡ウイルスによるバイオテロに備えて、1975年に細胞培養痘そうワクチンとして製造承認を受けている細胞培養弱毒生痘そうワクチン(LC16m8株)が備蓄されている。本研究ではLC16m8ワクチンの有効性、安全性、その科学的基盤、製造における効率性、安定性、等を明らかにすることを目的とした。具体的には、LC16m8の有効性等を調べるための動物モデル開発、LC16m8の曝露後投与による天然痘類似疾患の発症予防効果の有無、LC16m8接種を受けた人々

における中和抗体や個々の蛋白質に対する抗体の推移を詳細に調査すること、さらにはLC16m8ワクチンの品質管理のための新規解析法の開発等を目的とした。

## B. 研究方法

1. バイオテロに使用される可能性のある病原体等の新規検出法の確立に関する研究

1) ウエストナイルウイルス検出法の開発

国立感染症研究所ウイルス第一部において整備されている、現行および最近発表された方法(TaqMan qRT-PCR法)が全lineageに対応可能かを調べた。さらに新たなTaqMan qRT-PCRセットを開発し、その特異性および検出感度について評価した。

2) エボラウイルス検出のための遺伝子検査の評価

国立感染症研究所ウイルス第一部に整備されている、現行のエボラウイルスの検出方法で最近のエボラウイルスも検出できるか否かを調べ、バイオテロ発生時に対応可能か検討した。

3) LAMP法によるクリプトコックス・ガッティ遺伝子の高感度検出系の開発

クリプトコックス・ガッティ遺伝子検出のためのLAMP法の標的配列として、クリプトコックス属の莢膜の生合成に関与するCAP10遺伝子の配列を標的としたLAMP法を開発することを試みた。LAMP反応は栄研化学のLoopamp DNA増幅試薬キット(乾燥型)および検出試薬としてLoopamp蛍光・目視検出試薬を用いた。

4) 超高速病原体ゲノム解読システムの構築と包括的な核酸迅速診断法の確立

炭疽菌の次世代シーケンス(next-generation sequencing: NGS)データをアップロードするとsingle nucleotide polymorphisms(SNPs)を抽出し、炭疽菌を含むバシラス・セレウス属菌グループ中の系統的位置関係を推定するウェブアプリケーションGcoGSA-BA(Global core Genome SNP Analysis for *Bacillus anthracis*)の開発を試みた。

また、2020年東京オリンピック対策にも資するデングウイルス遺伝型を図示化するツールDengue Genograph Viewer(DGV)を構築した。

5) 組織切片上で病原体遺伝子核酸を検出する *in situ*

hybridization (ISH) 法の評価に関する研究

高感度で特異性の高い *in situ* hybridization-AT tailing (ISH-AT) 法における二重蛍光染色について ISH-AT 法, View RNA 法, RNAscope 法の病理検体 (標本) における遺伝子検出法の利点について比較検討した。

- 6) バイオテロに使用される可能性のある病原体等を中心として電子顕微鏡を用いた病原体の迅速検出法の確立

検出感度と精度を向上するための改良法の一つとして、電子顕微鏡検出のためのサンプルの濃縮方法について Global Health Security Action Group Laboratory-Network の活動の一環である、GHSAG Wet-Lab Workshop on Diagnostic Electron Microscopy of Pathogens, Winnipeg 2015 (平成 27 年 9 月 24, 25 日 National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canada 主催) に参加した。

- 7) 地方衛生研究所 (地衛研) におけるバイオテロ対応の現状と課題に関する研究

1) 「現行の国立感染症研究所 (感染研) 病原体検出マニュアル」, 2) 「新規検査マニュアルの整備の必要性」, 3) 「地方衛生研究所全国協議会 6 支部の支部内連携構築, 支部内連携から広域・全国ネットワークの構築」, 4) 「地衛研と感染研の連携強化」の視点から、課題を抽出し、課題に対し方策や改善などを検討した。

- 8) 細菌性バイオテロに対する迅速同定法・診断法およびワクチンの開発

バイオテロに利用される可能性の高い 5 種類の細菌性病原体 (炭疽菌, 野兔病菌, ブルセラ菌, ペスト菌, 類鼻疽菌) の迅速遺伝子検出系を作成し, 25 分で遺伝子を増幅し, DNA-Chromatography 法で増幅産物を短時間に識別する野外仕様の検出系の開発を試みた。また, 生物兵器に使われる可能性の高い蛋白毒素であるボツリヌス毒素 (Btx, カテゴリー A), コレラ毒素 (CT) と LT (カテゴリー B: Enteric Pathogens), 黄色ブドウ球菌のエンテロトキシン (SEA&SEB, カテゴリー B: Enteric Pathogens) 及び TDH (カテゴリー B: Enteric Pathogens) 等に対する免疫学的迅速同定法を確立して検査・診断マニュアルを作成した。さらに, 重篤な食中毒の原因の 1 つである A 型ボツリヌス毒素, TDH 及び TRH

を精製してそれぞれに対する家兎抗血清を作製することを試みた。

- 9) バイオテロ対応ホームページのアップデートとバイオテロ対策支援方法の開発に関する研究

生物テロに関連する疾患について, インターネット上で最新の情報を得ることを目的とした『バイオテロ対応ホームページ』に関して情報の妥当性・正確性を確認した。一般公開も検討すべきと考えられたため, 課題の洗い出しと具体的な対応策を検討した。さらに, バイオテロ診断支援の一環として行った国内の地方衛生研究所に対する検査可能疾患の状況調査 (アンケート) を詳細に解析した。

- 10) 各医療機関のバイオテロ対策を支援するための方策に関する研究

国内の医療機関向けにバイオテロ対策のガイドライン (項目は, 必要な薬剤の準備, 必要な感染防護具の準備, バイオテロ対応のフローチャート, BCP の作成, 等) を作成し, 改良を加えた。

2. 細胞培養痘そうワクチンの有効性, 安全性に関する研究

- 1) エクトロメリアウイルス (ECTV) を用いたマウスモデルの確立および LC16m8 曝露後投与効果の解析

ECTV を用いたマウスモデル系の確立を試みた。また, 確立された感染モデルを用いた, LC16m8 の 1 回接種による免疫能誘導までの最短期間および曝露後接種効果の有無をウイルス学的に評価した。

- 2) LC16mO 型 (medium size plaque; MSP) の迅速検出システム開発

MSP は B5R の一塩基欠失を相補する変異ウイルスである。MSP の変異パターン解析で得られた主要な MSP を定量的に検出可能な PCR 法を開発することを試みた。

- 3) サル痘ウイルスのマウス感染実験系の基礎検討

サル痘ウイルスのマウス感染実験系の基礎検討を行った。BALB/c マウスに 2 種類のサル痘ウイルスを皮下接種した, 症状の出現や病態の推移を調べた。

- 4) 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの疫学的有効性

及び安全性評価に関する研究における情報管理及び提供法の確立と維持に関する研究

LC16m8 接種血清と Dryvax 接種血清との抗原性の比較, 種々の痘そうワクチンを接種したマウス血清のアレイ測定結果の解析, LC16m8 および抗 B5 抗体に関する文献レビュー, 抗 B5 抗体の測定系の確立などを引き続き行った.

5) 痘そうワクチン LC16m8 接種者における中和抗体持続に関する調査研究

LC16m8 を 1 回接種された健康成人の抗体陽性率の経時的推移を評価した. Proteome Microarray Chip を用いたプロテオミク解析を行い, LC16m8 接種後の中和抗体価とプロテオミク解析における反応強度に相関が見られた抗原を検索した.

### C. 研究結果

#### 1. バイオテロに使用される可能性のある病原体等の新規検出法の確立に関する研究

1) ウエストナイルウイルス検出法の開発

現行のウエストナイルウイルス用プライマー・プローブセットでは, lineage によっては検出不能であることが明らかとなった. 2) 最近報告されたウエストナイルウイルスゲノム検出法(TaqMan 法)の有用性について検討したが, 現行セットと同様検出不能な lineage があることがわかった. 3) すべての lineage に対応可能な新規 TaqMan プライマー・プローブセットを開発した.

2) エボラウイルス検出のための遺伝子検査の評価

現行の病原体検出マニュアルが最新の Makona 株も検出できることが判明した. また conventional RT-PCR (nested), real time RT-PCR, 抗原検出 ELISA の 3 つの診断法では感度はこの順に優れ, コピー数と抗原量は相関しリーズナブルな結果が得られることが判明した.

3) LAMP 法によるクリプトコックス・ガッティ遺伝子の高感度検出系の開発

URA5 の配列を利用した LAMP 法の導入を試みた. また, CAP10 遺伝子の配列を利用して 4 種類の LAMP プライマーセットを設計した. 設計されたすべてのプライマーセットを用いた LAMP により, クリプトコックス・ガッティ遺伝子を 1 時間以内に検

出することが可能であった.

4) 超高速病原体ゲノム解読システムの構築と包括的な核酸迅速診断法の確立

GcoGSA-BA はコアゲノム系統解析だけでなく, pXO1, pXO2 といった病原性を規定するプラスミドや pXO1 上に存在する三つの炭疽菌毒素遺伝子 (lethal factor, LF; edema factor, EF; protective antigen, PA) を検出する機能も有しており, 炭疽菌 (*B. anthracis* Ames Ancestor) ばかりでなく炭疽菌毒素遺伝子を例外的に保持している *B. cereus* G9241 の系統的関係も正しく推定し, 更に炭疽菌毒素遺伝子を検出することができた GcoGSA-BA による情報解析で, 炭疽菌を含むセウス属グループ全般の病原性因子の特定も可能になる改良を加えた.

公開データベースに登録されている全ての Dengue ウイルス配列(1945 -2014 年)を収集し, 分離国・地域と血清型および遺伝型としてデータベース化し Google Maps 上で表現できるようにした.

5) 組織切片上で病原体遺伝子核酸を検出する *in situ* hybridization (ISH) 法の評価に関する研究

組織上での co-localization(共局在)を示すには蛍光二重染色を行った後, 共焦点レーザー顕微鏡で解析することが必要である. 感染細胞を同定するために, *in situ* ハイブリダイゼーション法でウイルスゲノムを検出した後, 細胞マーカー蛋白あるいはウイルス抗原に対する抗体を用いた蛍光免疫組織化学で蛍光二重染色を行い, 感染細胞を同定する系を確立した. ISH-AT 法と RNA Scope 法は蛍光二重染色が可能であった.

6) バイオテロに使用される可能性のある病原体等を中心として電子顕微鏡を用いた病原体の迅速検出法の確立

病原体の電子顕微鏡学的迅速検出法に必要な, 目的粒子が少ない場合のサンプルの濃縮法を習得した.

7) 地方衛生研究所(地衛研)におけるバイオテロ対応の現状と課題に関する研究

抽出されたいくつかの課題の改善には地衛研, 各支部内, 地衛研全国協議会, 感染研および厚生労働省の理解や連携が重要であることが確認された. 2015 年度に改善した事項として, 改正感染症

法(特に,病原体サーベイランスなど感染症に関する情報の収集体制が強化)の施行も関連し,病原体検出マニュアルの整備,標準作業手順書の作成,地衛研全国協議会感染症対策部会員の増員などがあった.特定病原体等に規定されている細菌毒素(ボツリヌス毒素や志賀毒素)に関する独立した検出マニュアルは未整備であり,その整備の必要性が確認された.

バイオテロ診断支援の一環として国内の地方衛生研究所等に対して施行した状況調査(アンケート)調査により,一部の病原体に関しては検査可能施設が限られることが判明した.さらに陽性検体の不足している施設が存在することも明らかとなった.

#### 8) 細菌性バイオテロに対する迅速同定法 診断法およびワクチンの開発

炭疽菌,野兔病菌,ブルセラ菌,ペスト菌,類鼻疽菌)の迅速遺伝子検出系を作成し,25分で遺伝子を増幅し,DNA-Chromatography法で増幅産物を短時間に識別する野外仕様の検出系が開発された.また,生物兵器に使われる可能性のある蛋白毒素であるボツリヌス毒素(Btx,カテゴリーA),コレラ毒素(CT)とLT(カテゴリーB:Enteric Pathogens),黄色ブドウ球菌のエンテロトキシン(SEA&SEB,カテゴリーB:Enteric Pathogens)及びTDH(カテゴリーB:Enteric Pathogens)等に対する免疫学的迅速同定法を確立するとともに,検査・診断マニュアルを作成した.さらに,重篤な食中毒の原因の1つであるA型ボツリヌス毒素,TDH及びTRHを精製してそれぞれに対する家兔抗血清を整備した.

#### 9) バイオテロ対応ホームページのアップデートとバイオテロ対策支援方法の開発に関する研究

ホームページに対しては昨年度に総論部分の見直しとデング熱およびエボラウイルス病のアウトブレイクに関する情報を加えた.今後のホームページのあり方を十分に検討し,限られた医療従事者だけが閲覧出来る状況よりも,将来的には一般公開が望ましいと判断した.ホームページの一般公開のための課題の洗い出しとその対策を検討した.最大の課題はサイバー攻撃であるが,セキュリティの専門家との意見交換を行い,必要十分な対応策を取ることは可能と判断した.また,アクセス集

中時の対策などいくつかの課題に対する具体策を検討し,一般公開に向けての目処を立てた.

#### 10) 各医療機関のバイオテロ対策を支援するための方策に関する研究

各医療機関がバイオテロ対策を実施する上での参考となるガイドラインの作成を計画し,今年度は総論部分の案を作成した.

#### 2. 細胞培養痘そうワクチンの有効性,安全性に関する研究

##### 1) エクトロメリアウイルス(ECTV)を用いたマウスモデルの確立およびLC16m8曝露後投与効果の解析

ECTVを用いたマウスモデル系を確立した. ECTV曝露3日前にLister株を投与した群でのみ発症・重症化阻止効果は確認できた.一方,ECTV曝露後のLC16m8,Lister株の投与による効果は確認されなかった.

##### 2) LC16mO型(medium size plaque; MSP)の迅速検出システム開発

MSPの遺伝子変異特異的配列を3'末端とするprimerを用いたPCRで,LC16m8株と特定のMSPを識別できた.主要タイプのMSPを特異的に検出するPCRを用いて,LC16m8株とMSPを混合したスパイク試験を実施した結果,MSP含有率0.01~1%まで検出できた.さらにRNase H2-dependent PCRを導入することにより,より特異度の高いMSP検出PCRを開発した.

##### 3) サル痘ウイルスのマウス感染実験系の基礎検討

サル痘ウイルス感染がBALB/cマウスにおいて成立する所見が得られた.そこでこの感染系を利用し,抗Ly6G抗体投与による好中球枯渇マウスに対する感染実験を行ったが,適切なマウスモデルを開発するには,好中球枯渇のための抗体投与方法の改良が必要であることが明らかとなった.

##### 4) 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの疫学的有効性及び安全性評価に関する研究における情報管理及び提供法の確立と維持に関する研究

LC16m8接種血清とDryvax接種血清の抗原性はB5タンパク質を除き概ね同様の傾向を示した.国内外の研究,及び,私たちの研究から抗B5抗体の産生は痘そうワクチンによる防御に必ずしも必須ではないという結果が示されているが,有効性・安

全性の点から重要な抗原であり、抗原性、および影響を及ぼす要因について引き続き検討が必要であることが明らかにされた。LC16m8 の有効性について、ASEAN 地域フォーラムにおいて報告を行った。

#### 5) 痘そうワクチン LC16m8 接種者における中和抗体持続に関する調査研究

LC16m8 を 1 回接種された健康成人の抗体陽性率は経時的な低下傾向が認められた。Proteome Microarray Chip を用いたプロテオミク解析を行った結果、LC16m8 接種後の中和抗体価とプロテオミク解析における反応強度に相関が見られた抗原は 11 種類あった。そのうち、LC16m8 接種 30 日後と比較して接種 1 年後にプロテオミク解析における反応強度が有意に低下した抗原は A11R, A13L, A17L であった。

#### D. 考察

近年、特に新興感染症の流行が発見され、再興感染症の大規模流行の発生等が起こっている。中東で流行が確認された中東呼吸器症候群(MERS や 2011 年に中国で流行が確認され、2013 年には日本でも流行が確認された重症熱性血小板減少症候群が、最近の新興感染症の代表例として挙げられる。2015 年には韓国で MERS の比較的大きな流行が発生した。これらの病原体による感染症の致死率はともに約 30%を超え、嚴重な病原体管理、バイオセキュリティ上の対象病原体となる。一方、このような病原体による感染症の発生はテロリズムの結果として発生する可能性のある感染症との鑑別疾患となり、迅速で正確な診断システム開発が急務となる。さらに、2014 年から 2105 年にかけて、西アフリカで未曾有の大規模エボラ出血熱流行が発生した。この経験により大規模エボラ出血熱が発展途上国だけでなく、いわゆる先進国で発生した場合には、それらの流行が当該国のみならず、国際社会に与える影響が計り知れないことが明らかにされた。

新興感染症に加えて、世界規模の食品関連感染症(食中毒)が発生する事例(病原性大腸菌による感染症や狂牛病由来変異型クロイツフェルト・ヤコブ病の流行)は発生している。このような感染症は、バイオテ

ロ対策対象疾患ともなりうる。

天然痘が撲滅されてからほぼ 35 年が経過した。また、ポリオウイルス 2 型によるポリオ(いわゆる小児麻痺)は根絶されたと考えられている。これらの病原体の管理が一層徹底される必要があるが、これらの病原体が再び地球上の自然界に出現することのないよう、新たな病原体管理のための規則が徹底される必要性が生じている。世界保健機関を中心に、いくつかの機関の専門家は、痘瘡ウイルスやポリオウイルスを人工的に製造できる時代になっていることから、病原体研究のあり方や管理のあり方において、これまで想定されていない対応が求められるという認識で一致している。今後、バイオテロ対策において従来の対策に加えて、国際連携のもとにバイオテロ対策を構築していく必要性が生じている。

G7+メキシコの国々の連携に、Global Health Security Action Group-Laboratory Network(GHSAG-LN)という組織が結成されてから久しい。これまで、このフレームの中で、痘瘡ウイルス検査法の診断における有用性、ウイルス性出血検査法の評価、電子顕微鏡による病原体検索の研修、新興感染症の発生を想定した訓練が実施されてきた。今年度においても、エボラウイルス(2014 年流行株)検出法の評価や電子顕微鏡による病原体検索の研修を本研究班の支援のもとに行われた。今後もこのフレームを利用して、バイオテロ対策に資する研究が継続されることが期待される。本研究班の活動の一環として、2015 年に 2 度開催された GHSAG-LN face-to-facing 会議に、研究代表者が出席した。

天然痘が根絶されて久しいことから、天然痘ワクチン(痘瘡ワクチン)を製造できる施設は世界に数える程しかなく、その 1 つ(化血研、熊本)が日本に存在する。しかも、日本で整備されている LC16m8 細胞培養高度弱毒痘瘡ワクチンは、その有効性と高い安全性の特徴を有することから、国際的にも注目されている。痘瘡ウイルスによるバイオテロ対策の重要性は変わらず世界的に存在し、認識されているところである。本研究班で行われている LC16m8 に製造法、安定性の評価、品質管理のあり方に関する研究、オルソポックスウイルス感染症の予防効果に関する研究は、日本国内だけでなく、国際的にも評価が高い。実際、毎年世界保健機関で開催される Advisory Committee for Variola Virus

Research には、本研究班の代表者や分担者が招へいされ、本研究班で実施されている研究成果が発表されている。この研究班の重要性を示す事例と言える。が、特に LC16m8 接種を受けた人々において、感染性の痘瘡ウイルスに対する中和抗体が誘導されること(現在も継続中の研究であり、今年度の報告書には研究成績が記載されていない)が、米国 CDC と本研究班との共同研究によって明らかにされている。

現在の中東や北アフリカにおける社会基盤の崩壊、テロリズムの台頭、大規模新興感染症の発生等、国際社会はいろんな側面で不安定化している。このような状況では、バイオテロ対策の重要性は増すことはあっても、減弱する状況にはない。今後も実効性のあるバイオテロ対策研究を幅広く継続していくことが求められる。

#### E. 結論

バイオテロに用いられる可能性のある病原体・毒素の迅速診断システム開発(検出法の開発を含む)を継続して行った。また、細胞培養高度弱毒痘瘡ワクチン LC16m8 の有効性、安全性、品質管理検査法、等に関する研究を推進した。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tani H, Fukuma A, Fukushi S, Taniguchi S, Yoshikawa T, Iwata-Yoshikawa N, Sato Y, Suzuki T, Nagata N, Hasegawa H, Kawai Y, Uda A, Morikawa S, Shimojima M, Watanabe H, Saijo M. Efficacy of T-705 (Favipiravir) in the treatment of infections with lethal severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *mSphere*, 1 (1): e00061-15.
- 2) Hotta A, Tanabayashi K, Fujita O, Shindo J, Park CH, Kudo N, Hatai H, Oyamada T, Yamamoto Y, Takano A, Kawabata H, Sharma N, Uda A, Yamada A, Morikawa S. Survey of *Francisella tularensis* in Wild Animals in the Endemic Areas in Japan. *Jpn J Infect Dis.* in press
- 3) Ogawa K, Komagata O, Hayashi T, Itokawa K,

Morikawa S, Sawabe K, Tomita T. Field and laboratory evaluations of the efficacy of DEET repellent against *Ixodes* ticks. *Jpn J Infect Dis.* in press

- 4) Okutani A, Osaki M, Takamatsu D, Kaku Y, Inoue S, Morikawa S. Draft genome sequences of *Bacillus anthracis* strains stored for several decades in Japan. *Genome Announc.* 2015, 3(3). pii: e00633-15.
- 5) Sakai K, Hagiwara K, Omatsu T, Hamasaki C, Kuwata R, Shimoda H, Suzuki K, Endoh D, Nagata N, Nagai M, Katayama Y, Oba M, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Mizutani T, Maeda K. Isolation and Characterization of a Novel Rhabdovirus from a Wild Boar (*Sus scrofa*) in Japan. *Vet Microbiol*, 2015, 179(3-4):197-203.
- 6) Hamamoto N, Uda A, Tobiume M, Park CH, Noguchi A, Kaku Y, Okutani A, Morikawa S, Inoue S. Association between RABV G Proteins Transported from the Perinuclear Space to Cell Surface Membrane and N-glycosylation of the Sequon at Asn204. *Jpn J Infect Dis.* 2015, 68(5): 387-93.
- 7) Yoshikawa T, Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Singh H, Suda Y, Shirabe K, Toda S, Shimazu Y, Nomachi T, Gokuden M, Morimitsu T, Ando K, Yoshikawa A, Kan M, Uramoto M, Osako H, Kida K, Takimoto H, Kitamoto H, Terasoma F, Honda A, Maeda K, Takahashi T, Yamagishi T, Oishi K, Morikawa S, Saijo M. Phylogenetic and Geographic Relationships of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in China, South Korea, and Japan. *J Infect Dis.* 2015, 212(6): 889-98.
- 8) Okamoto M, Miyazawa T, Morikawa S, Ono F, Nakamura S, Sato E, Yoshida T, Yoshikawa R, Sakai K, Mizutani T, Nagata N, Takano J, Okabayashi S, Hamano M, Fujimoto K, Nakaya T, Iida T, Horii T, Miyabe-Nishiwaki T, Watanabe A, Kaneko A, Saito A, Matsui A, Hayakawa T, Suzuki J, Akari H, Matsuzawa T, Hirai H. Emergence of infectious malignant thrombocytopenia in Japanese macaques (*Macaca fuscata*) by SRV-4 after transmission to a novel host. *Sci Rep.* 2015, 5:8850.
- 9) Ching PK, de los Reyes VC, Sualdito MN, Tayag E,

- Columna-Vingno AB, Malbas FF Jr, Bolo GC Jr, Sejvar JJ, Eagles D, Playford G, Dueger E, Kaku Y, Morikawa S, Kuroda M, Marsh GA, McCullough S, Foxwell AR. Outbreak of Henipavirus Infection, Philippines. *Emerg Infect Dis*. 2015, 21(2): 328-31.
- 10) Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Fukuma A, Taniguchi S, Suda Y, Maeda K, Takahashi T, Morikawa S, Saijo M. Effects of ribavirin on severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in vitro. *Jpn J Infect Dis*. 2014, 67(6): 423-7.
- 11) Orba Y, Sasaki M, Yamaguchi H, Ishii A, Thomas Y, Hang'ombe BM, Mweene AS, Morikawa S, Saijo M, Sawa H. Orthopoxvirus infection among wildlife in Zambia. *J Gen Virol*. 2015, 96 (Pt 2): 390-4.
- 12) Ikeda-Dantsuji Y, Ohno H, Tanabe K, Umeyama T, Ueno K, Nagi M, Yamagoe S, Kinjo Y, Miyazaki Y. Interferon- promotes phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* but not *Cryptococcus gattii* by murine macrophages. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 21: 831-836, 2015
- 13) Okachi S, Wakahara K, Kato D, Umeyama T, Yagi T, Hasegawa Y. Massive mediastinal cryptococcosis in a young immunocompetent patient. *Respirology Case Reports*. 3: 95-98, 2015
- 14) Sakai K, Sekizuka T, Ami Y, Nakajima N, Kitazawa M, Sato Y, Nakajima K, Anraku M, Kubota T, Komase K, Takehara K, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Kuroda M, Takeda M. A mutant H3N2 influenza virus uses an alternative activation mechanism in Tmprss2 knockout mice by loss of an oligosaccharide in the hemagglutinin stalk region. *J Virol*. ;89(9):5154-8, 2015.
- 15) Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Sato Y, Nakajima N, Koike S, Iwasaki T, Sata T, Yamashita T, Minagawa H, Taguchi F, Hasegawa H, Shimizu H, Nagata N Establishment of a panel of in-house polyclonal antibodies for the diagnosis of enterovirus infections. *Neuropathology* 35(2):107-21, 2015
- 16) 中島典子: 季節性および鳥インフルエンザウイルス感染症の病理 病理と臨床 2015,33:1146-1153.
- 17) Nagata N, Iwata-Yoshikawa N, Hayasaka D, Sato Y, Kojima A, Kariwa H, Takashima I, Takasaki T, Kurane I, Sata T, Hasegawa H. The pathogenesis of 3 neurotropic flaviviruses in a mouse model depends on the route of neuroinvasion after viremia. *J Neuropathol Exp Neurol*. 74(3):250-260, 2015.
- 18) Adachi Y, Onodera T, Yamada Y, Daio R, Tsuji M, Inoue T, Kobayashi K, Kurosaki T, Ato M, Takahashi Y. Distinct germinal center selection at local sites shapes memory B cell response to viral escape. *J. Exp. Med.* 212: 1709-1723, 2015 doi:10.1084/jem.20142284
- 19) Kitada S, Yoshimura K, Miki K, Miki M, Hashimoto H, Matsui H, Kuroyama M, Ageshio F, Kagawa H, Mori M, Maekura R, Kobayashi K. Validation of a commercial serodiagnostic kit for diagnosing pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease. *Int J Tuberc Lung Dis* 19: 97-103, 2015 doi: 10.5588/ijtld.14.0564
- 20) 小林和夫. 2015. マイコバクテリウム属(抗酸菌). 標準微生物学 第12版(中込治, 神谷茂編) 東京: 医学書院. 276-288. ISBN: 978-4-260-02046-6
- 21) Nishiyama Y, Matsukuma S, Matsumura T, Kanatani Y, Saito T. Preparedness for a smallpox pandemic in Japan: public health perspectives. *Disaster Med Public Health Prep*. 2015 Apr;9(2):220-3.
- 22) Eto A, Saito T, Yokote H, Kurane I, Kanatani Y. Recent advances in the study of live attenuated cell-cultured smallpox vaccine LC16m8. *Vaccine*. 2015 Nov 9;33(45):6106-11 Review
- 23) Eto A, Saito T, Yokote H, Kurane I, Kanatani Y. Recent Advances in the Study of the Live Attenuated Cell-Cultured Smallpox Vaccine LC16m8. *Vaccine*. 33:6106-61, 2015
- 24) Nishiyama Y, Fujii T, Kanatani Y, Shinmura Y, Yokote H, Hashizume S. Freeze-dried live attenuated smallpox vaccine prepared in cell culture "LC16-KAKETSUKEN": Post-marketing surveillance study on safety and efficacy compliant with Good Clinical Practice. *Vaccine*. 2015 Nov 9;33(45):6120-7.
- 25) Yokote H, Shinmura Y, Kanehara T, Maruno S, Kuranaga M, Matsui H, Hashizume S. Vaccinia virus strain LC16m8 defective in the B5R gene keeps

strong protection comparable to its parental strain Lister in immunodeficient mice. Vaccine. 33:6112-6119, 2015

- 26) Hayakawa T, Aoi T, Bravery C, Hoogendoorn K, Knezevic I, Koga J, Maeda D, Matsuyama A, McBlane J, Morio T, Petricciani J, Rao M, Ridgway A, Sato D, Sato Y, Stacey G, Sakamoto N, Trouvin JH, Umezawa A, Yamato M, Yano K, Yokote H, Yoshimatsu K, Zorzi- Morre P. Report of the international conference on regulatory endeavors towards the sound development of human cell therapy products. Biologicals. 43(5):283-97,2015
- 27) Mottate K, Yokote H, Mori S, Horita A, Miyatsu Y, Torii Y, Kozai Y, Iwaki M, Takahashi M, Ginnaga A. Retrospective survey to evaluate the safety and efficacy of Japanese botulinum antitoxin therapy in Japan Toxicol. 110:12-18, 2016

## 2. 学会発表

- 1) 黒田誠 微生物ゲノミクスと公衆衛生学的活用 第89回日本感染症学会学術講演会 モーニングセミナー2 京都 (2015.4)
- 2) 黒田誠 NGS 技術による病原体ゲノム情報の大量取得と分子疫学解析への応用 第158回日本獣医学学会学術集会・シンポジウム 十和田市 (2015.9)
- 3) 黒田誠 NGS を応用した感染症診断の可能性 第64回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第62回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会 札幌 (2015.10)
- 4) Nakajima N, Sato Y, Kotani O, Suzuki T, Kamei T, Takahashi T, Sata T, Hasegawa H. Modified *In situ* Hybridization AT-tailing to Visualize the Gene Expression in Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissues. 2015 USCAP Annual Meeting (アメリカ) 2015
- 5) Hayashi K, Nakajima N, Sato Y, Katano H, Nagata N, Suzuki T, Tobiume M, Yoshida H, Suzuki Y, Kumasaka T, Sata T, Ariyoshi K, Hasegawa H. Correlations among Histopathological Characteristics, Viral distribution, and Cytokine/Chemokine Expression level within an Individual with A/H1N1pdm09 induced ARDS. 2015 USCAP Annual Meeting (アメリカ)
- 6) Nakajima N, Thach HN, Tuan TA, Nam DH, Kumasaka T, Sato Y, Kawachi S, Hasegawa H, Dien TM, Hai LT. Pathological and molecular biological study of measles-associated pneumonia during measles outbreak in Vietnam in 2014. Pediatric Scientific Conference 2015 (ベトナム)
- 7) Nakajima N, Thach HN, Tuan TA, Nam DH, Kumasaka T, Sato Y, Kawachi S, Hasegawa H, Dien TM, Hai LT. Post-mortem detection of adenovirus type 7 pneumonia in lungs of measles-associated pneumonia fatalities in a pediatric hospital, Hanoi, Vietnam. U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program, (アメリカ) 2016
- 8) 中島典子, 佐藤由子, 熊坂利夫, 藤本嗣人, 花岡希, 片野晴隆, 鈴木忠樹, 長谷川秀樹 麻疹に併発した肺炎で死亡した19例の肺組織の分子病理学的解析. 第104回日本病理学会総会, 名古屋 (2015.5)
- 9) 岩附研子, 中島典子, 柴田昌利, 高橋健太, 佐藤由子, 木曾真紀, 山吉誠也, 伊藤睦美, 塩谷聡子, 大竹正剛, 寒川章久, 伊東祐孝, 長谷川秀樹, 河岡義裕 マイクロミニピッグのインフルエンザ感染モデル動物としての有用性. 第158回日本獣医学学会学術集会 青森 (2015.9)
- 10) Nakajima N, Ngoc TH, Sato Y, Hanaoka N, Fujimoto T, Suzuki T, Katano H, Thanh HL, Hasegawa H. Humann Adenovirus Serotype 7-associated pneumonia in fatal cases of measles 第63回日本ウイルス学会学術集会, 福岡 (2015, 11)
- 11) Takeda M, Sakai K, Ami Y, Kitazawa M, Nakajima K, Natthanan S, Anraku M, Nakajima N, Komase K, Takehara K, Hasegawa H, Tashiro M. A natural host model revealed the essential role of the host protease TMPRSS2 for respiratory paramyxovirus pathogenicity. 第63回日本ウイルス学会学術集会, 福岡 (2015, 11)
- 12) Sakai K, Sekizawa T, Ami Y, Kitazawa M, Nakajima K, Nakajima N, Anraku M, Komase K, Takehara K, Hasegawa H, Tashiro M, Kuroda M, Takeda M. The stalk oligosaccharide of influenza A virus hemagglutinin protein modulates protease

- specificity for virus activation and pathogenicity. 第  
63 回日本ウイルス学会学術集会, 福岡 (2015,  
11)
- 13) 江藤亜紀子, 齋藤智也, 横手公幸, 金谷泰宏. 天  
然痘ワクチン初回接種時の抗体産生応答に關す  
る日米研究の比較. 第 19 回ワクチン学会学術集  
会. 犬山 (2015.11)

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





分担研究報告書

蚊媒介性ウイルスの鑑別検査法の開発

全 lineage をカバーするウエストナイルウイルス遺伝子検出法の開発

所属 国立感染症研究所ウイルス第一部  
研究分担者 田島茂

研究要旨

ウエストナイルウイルス感染症は北米を中心として患者が発生している蚊媒介性ウイルス感染症である。ウエストナイルウイルスの日本への侵入はまだ確認されていないが、諸要因による侵入・拡大に備え万全な検査体制を整備しておく必要がある。ウエストナイルウイルスは6種類の lineage に分類されるが、現在我々がウイルス同定に使用している検出系やその他国外の研究機関から発表された検出系が全てのウエストナイルウイルスに対応できているかは不明である。そこで本研究では、これら我々が有する現行、および最近発表された方法 (TaqMan qRT-PCR 法) が全 lineage に対応可能かを調べた。さらに新たな TaqMan qRT-PCR セットを開発し、その特異性および検出感度について考察した。その結果 1) 本研究により、現行のウエストナイルウイルス用プライマー・プローブセットでは、lineage によっては検出不能であることが明らかとなった。2) 最近報告されたウエストナイルウイルスゲノム検出法 (TaqMan 法) の有用性について検討したが、現行セットと同様検出不能な lineage があることがわかった。3) すべての lineage に対応可能な新規 TaqMan プライマー・プローブセットを開発した。本セットはすべての lineage のゲノムを高い感度で検出することができた。

A. 研究目的

ウエストナイルウイルス感染症 (ウエストナイル熱・ウエストナイル脳炎) は北米、ヨーロッパ、北・中央アフリカ、インドなどで患者が発生している蚊媒介性ウイルス感染症である。米国では 1999 年にウイルスが侵入後何度かの大流行が発生し、15 年以上経った 2015 年でも 1000 人を超える患者が発生している。ヒトのウエストナイルウイルス感染症に対するワクチンや薬剤はない。幸い日本国内への侵入は確認されていないが、諸要因により侵入した場合に備え、万全の検査体制を整えておく必要がある。ウエストナイルウイルスには lineage が 6 種類 (L1a, L1b, L1c/5, L2, L3, L4) 存在する。北米で蔓延しているのは L1a である。これまでヒトへの病原性が比較的強いものは 2 種類 (L1a, L1c/5) に限られると考えられてきた。しかし近年、L2 でも重篤な中枢神経症状を引き起こす株が同定され、さらに L1c/5 の分離株が以前よりも強毒性を示すとの報告がなされている。一方 L3 と L4 はヒトからは同定されていないが、今後どのように変異するかわからない。このような状況から、ウエストナイルウイルスの侵入に備え、すべての lineage に対応できるようにしなければならない。そこで本年度は、まずは現在我々が使用している、L1a 用に設計されたウエストナイルウイルスゲノム検出系 (リアルタイム RT-PCR) が他の

lineage に対応可能かを調べた。また、比較的最近報告されたウエストナイルウイルスゲノム検出系がどの程度広範の lineage に対応できるか検証した。さらに全 lineage をカバーできる新たなリアルタイム RT-PCR 系の開発を試みた。

B. 研究方法

RT-PCR によるウエストナイルウイルスゲノム検出のための鋳型には、NY99 株 (L1a), EGY101 株 (L1a), g2266 株 (L1c/5), FCG 株 (L2) を使用した。これらを実験室由来株化腎細胞 Vero 細胞に感染させたのち、培養上清から RNA を精製し使用した。

新規 TaqMan プライマー・プローブセットの特異性および感度を調べるために、ウイルスゲノムの NS2A 領域 (500 ヌクレオチド) の DNA を受託合成し、それを鋳型に mMESSAGING mMACHINE kit (Ambion) を使用して *in vitro* で RNA を合成した。合成 RNA は精製後 260nm での吸光度より濃度を算出し、希釈し使用した。

本研究で使用したプライマー・プローブは表 1 に示す。リアルタイム RT-PCR 反応は、RNA-direct Realyime PCR Master Mix (Toyobo) を使用して行った。ゲノムの増幅・検出・解析は StepOnePlus (Thermo) を使用した。また、SYBR Green I で検出する場合は、反応キットとして SuperScript III Platinum SYBR Green

One-Step qRT-PCR kit (Thermo)を使用し、増幅・検出・解析は LightCycler 2.0 (Roche)を使用した。

### C. 研究結果

1) 現行のウエストナイルウイルスゲノム検出用プライマー・プローブセットの評価: 4 種類のウエストナイルウイルス株ゲノム RNA を使用して現行の 3 セット (5NCR, Env, 3NCR) ですべての株の検出が可能か調べた (図 1)。すべてのセットで L1a 株ゲノムを検出できた。しかしいずれのセットでも L1c/5 株ゲノムを検出できなかった。L2 株については、5NCR でのみ検出できたが感度は非常に低かった。上記のセットの他に、日本脳炎ウイルスゲノム検出用のプライマー・プローブセット (NS5) を使用したところ、4 種類のウエストナイルウイルスすべてのゲノムを検出できた (図 2)。

2) ウエストナイルウイルスゲノム検出法の評価: 2013 年に発表された 2 論文 (J. Virol. Methods 189: 321-327, J. Virol. Methods 193: 554-557) に示されているプライマー・プローブセット (WN-LCV, NS2A) を使用し、4 種類のウエストナイル株のゲノム検出を試みた (図 3, 4)。L1a 株の検出感度は WN-LCV が優っていたが、L2 株については NS2A の方が高感度であった。しかし共に L1c/5 株を検出できなかった。

3) 新規ウエストナイルウイルスゲノム検出用プライマー・プローブセットの開発: 全ての lineage のゲノムを増幅可能なプライマー・プローブセットを設計した。塩基配列を比較したところ、非構造蛋白質 NS2A 領域が lineage 間で相同性が高かったため、この領域を選択した。前述の 4 種類のウエストナイルウイルスゲノムを用い、様々なプライマーを試み、最終的に 1 セット (3538p-3490r) に絞り込んだ (表 2, 図 5)。この新規のセットは、すでに発表されている NS2A セットと標的部位が近接しているが、新規セットは L1c/5 株の増幅も可能であった。わずかに日本脳炎ウイルスゲノムにも反応した。次に、全ての lineage から 1 株選択し、各々の NS2A 領域の合成 RNA を作製した。それらを鋳型に使用し、新規セットの検出能を調べた (図 6)。高コピー数で鋳型に用いた場合、全ての lineage の RNA を検出することができた。しかしわずかながら日本脳炎ウイルスと Usutu ウイルスにも反応した。一方 NS2A セットは L1a, L1b 以外の lineage に対しては反応性が非常に低く、L1c/5 と L4 の RNA を検出することが出来なかった。各合成 RNA を階段希釈し、検出感度を調べた (図 7)。全ての lineage において、少なくとも 5 コピー/反応までは検出できることが確認された。日本脳炎ウイルスと Usutu ウイルスについてはそれぞれ  $5 \times 10^5$  コピー/反応、 $5 \times 10^4$  コピー/反応以下では検出されないことが確認された (表 3)。新規セットと合成 RNA を使用して検量線を作成して、3 種類のウエ

ストナイルウイルス株コピー数を算出した (図 8)。

### D. 考察

本研究において我々はウエストナイルウイルスの全 lineage のゲノムを網羅的に検出可能な TaqMan プライマー・プローブセットの開発を試みた。その前に現行およびすでに公表されている検出系が全 lineage に対応できるのかを調べた。すると、ほとんどがアメリカ大陸で流行している L1a やそれに近縁の L1b には反応するものの、他の lineage には反応しないか、反応しても非常に感度が悪いことが明らかとなった。しかし、L1a 以外の株によるウエストナイル感染症の流行がヨーロッパやインドで起こっていることから、これらの lineage への対応も疎かにすることはできない。今回我々が開発したセットは、これまでのものと比べ高感度かつ広範のウイルスに対応できることが示され、非常に有用であると考えられる。ただ一つの欠点は、上記の優れた点があるがゆえに、ウエストナイルウイルスに近縁なウイルスも時に増幅してしまう点である。しかし、検出感度の差異は  $10^4$ - $10^5$  もあり、注意すればあまり問題にならないと思われる。今後この新規セットが国内で広く用いられることを期待する。

現在はトガウイルス科アルファウイルス属のベネズエラ馬脳炎ウイルス、東部馬脳炎ウイルス、西部馬脳炎ウイルスに変え、これらのウイルスゲノムの検出系について解析を進めている。

### E. 結論

1) 本研究により、現行のウエストナイルウイルス用プライマー・プローブセットでは、lineage によっては検出不能であることが明らかとなった。2) 最近報告されたウエストナイルウイルスゲノム検出法 (TaqMan 法) の有用性について検討したが、現行セットと同様検出不能な lineage があることがわかった。3) すべての lineage に対応可能な新規 TaqMan プライマー・プローブセットを開発した。本セットはすべての lineage のゲノムを高い感度で検出することができた。

### F. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

なし。

### G. 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

表 1. 本研究で使したプライマー・プローブセット

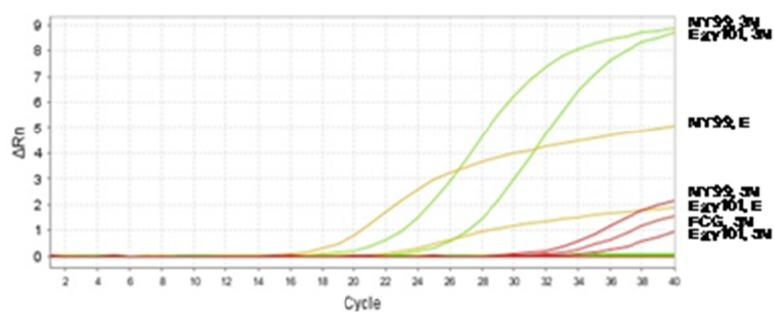
Primer	Sequence	Probe
WN5' NCR-f	CAGGAGGGCCCGGYAARA	WNV5' NCR-p: FAM-CCGGGCTGTCAATATGCTAAAACGCG-TAMRA
WN5' NCR-r	ATCAAGGACAAYMCGCGG	
WNENV-f	TCAGCGATCTCTCCAAAG	WNENV-p: FAM-TGCCCCGACC ATGGGAGAAGCT-TAMRA
WNENV-r	GGGTCAGCACGTTTGTTCATTG	
WN3' NC-f	CAGACCACGCTACGGCG	WN3' NC-p: FAM-TCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGAT-TAMRA
WN3' NC-r	CTAGGGCCGCGTGGG	
*WN-LCV-F1	GTGATCCATGTAAGCCCTCAGAA	S1: FAM-AGGACC CCACATGTT-MGB S2: VIC-AGGACCC CACGTGCT-MGB
*WN-LCV-R1	GTCTGACATTGGGCTTTGAAGTTA	
**NS2A-F	CCTTTTCAGYTGGGCCTTCTG	WNVpNS2A-3612: FAM-AGCCAAGATCA GCATGCCAGC-TAMRA
**NS2A-3R	CAGTGTAAGTVATRCCCCCAA	
WNVcommon.3451f	GGH TGT TGG TAT GGH ATG GA	WNVcom 3538p: FAM-ATGATTGAYCCTTTTCAGYTGGGCCTTCTG -TAMRA
WNVcommon.3590r	TC CTG GGT GGC CAA GAA CAC	

表 2. 新規 TaqMan プライマー・プローブの検討 (ct 値)

Strain	pNS2A-3612	3538p			
		3491r	3490r	3493r	3496r
NY99 (L1a)	21.2	16.9	14.8	16.5	17.1
Egy101 (L1a)	23.9	21.0	19.2	20.7	21.2
g2266 (L1c/5)	ND	25.5	23.7	24.6	25.6
FCG (L2)	25.9	21.1	19.9	23.6	17.8
JEV Mie/41 (GI)	ND	31.7	ND	34.7	26.8
JEV JaTAn1/90 (GIII)	ND	30.0	ND	32.9	25.0
JEV Muar (GV)	ND	ND	35.1	33.8	24.6

表3. 3538p-3490r セットの検出感度の検討結果(ct 値)

Strain	$5 \times 10^7$ *	$5 \times 10^6$	$5 \times 10^5$	$5 \times 10^4$	$5 \times 10^3$	$5 \times 10^2$	$5 \times 10^1$	$5 \times 10^0$
NY99 (1a)	16.6	19.7	23.4	26.9	30.3	33.6	37.9	39.0
Kunjijin (1b)	17.6	18.1	21.6	25.1	28.3	31.6	34.7	38.7
India (1c/5)	13.0	16.6	20.1	23.1	27.0	30.5	34.0	36.0
Italy2011 (2)	14.2	17.9	21.0	24.5	28.5	31.7	34.7	36.6
Rabensburg (3)	12.9	16.1	19.3	21.5	26.5	29.3	33.6	34.8
LEIV (4)	15.9	19.1	22.5	26.0	29.3	32.6	35.5	38.8
Usutu V.	35.5	37.4	39.2	ND	ND	ND	NT	NT
JEV	36.5	39.2	ND	ND	ND	ND	NT	NT

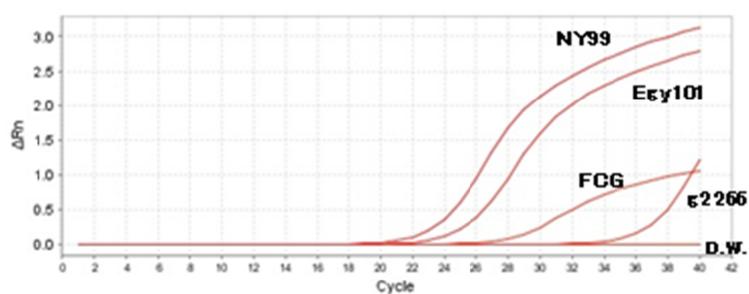


Ct value

Strain	5'NCR	Env	3'NCR
NY99 (L1a)	32.2	18.2	17.0
Egy101 (L1a)	36.0	24.0	21.8
g2266 (L1c/5)	ND	ND	ND
FCG (L2)	33.7	ND	ND

(genome: x100 c.f.u.)

図1. 既存のプライマー・プローブセットを用いたウエストナイルウイルスゲノムの増幅



Strain	Ct value
NY99 (L1a)	23.3
Egy101 (L1a)	25.2
g2266 (L1c/5)	36.8
FCG (L2)	29.9

(genome: x100 dL)

図2. JEV 検出用プライマー・プローブセットを用いたウエストナイルウイルスゲノムの増幅

WN-LCV probe	Sequence
S1(for L1)	FAM-AGG ACC CCA CAT GTT-MGB
S2 (for L2)	VIC-AGG ACC CCA CGT GCT-MGB
S3	FAM-AGG ACC CCA CRT GY-MGB
S5	FAM-TCG GAA RGA GGA CCC-MGB

Strain	Ct value	
	S3	S5
NY99 (L1a)	20.5	19.14
Egy101 (L1a)	23.4	21.08
g2266 (L1c/5)	ND	ND
FCG (L2)	37.0	37.11
D1-4, CHIK	ND	ND
JE (GI)	ND	ND
ZKV	ND	ND

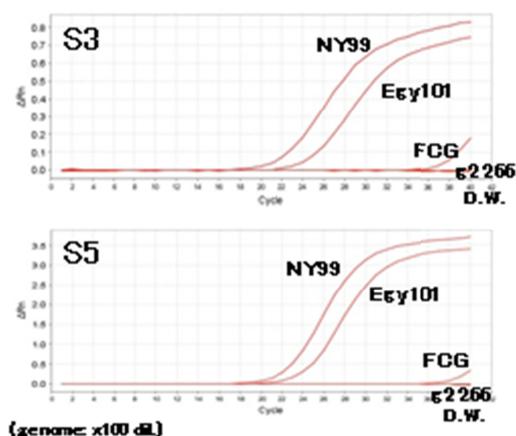


図3. 最近発表されたウエストナイルウイルス検出用プライマー・プローブセットの検討(1)

Probe	Sequence
WNV pNS2A-3612	FAM-AGCCAA GAT CAG CAT GCC AGC-TAMRA

Strain	Ct value
NY99 (L1a)	25.5
Egy101 (L1a)	27.0
g2266 (L1c/5)	ND
FCG (L2)	31.9
D1-4, CHIK	ND
JE (GI)	ND
ZKV	ND

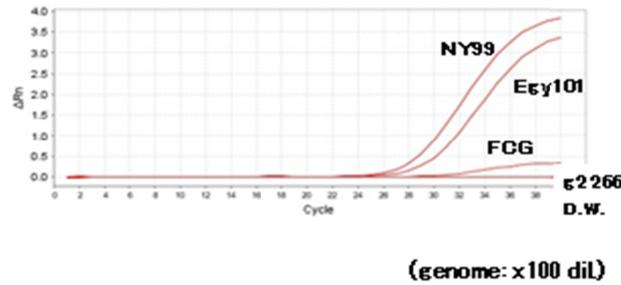


図4. 最近発表されたウエストナイルウイルス検出用プライマー・プローブセットの検討(2)

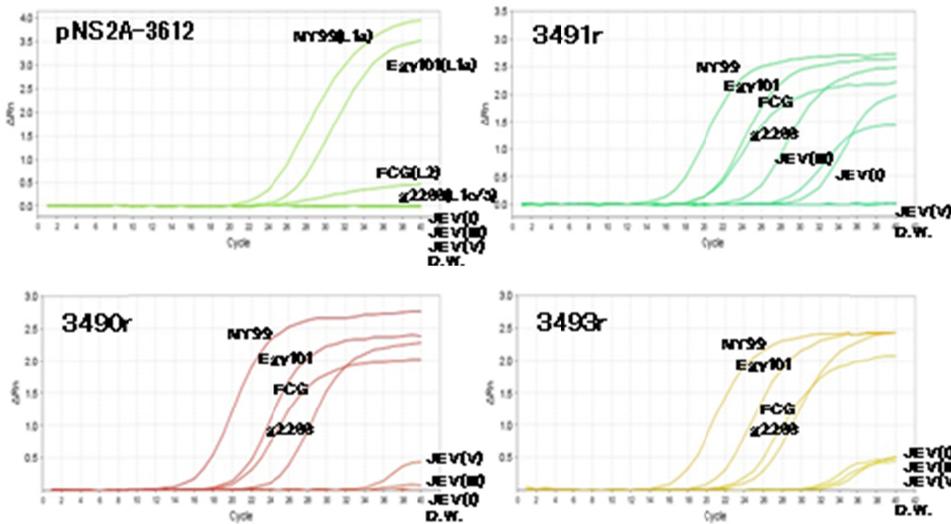


図5. 新規ウエストナイルウイルスゲノム検出用プライマー・プローブセットの検討

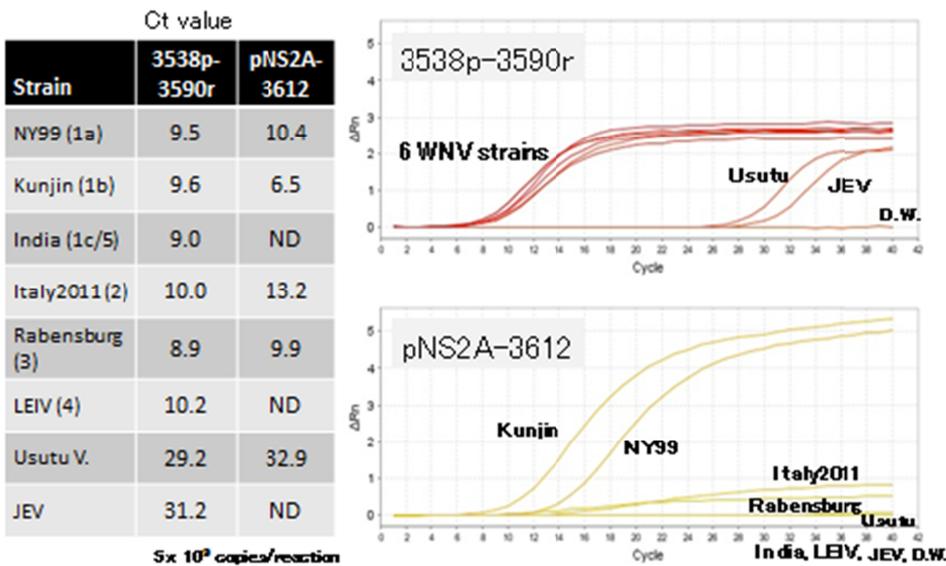


図6. 合成ウイルス RNA を用いたプライマー・プローブセット間の増幅性能の比較

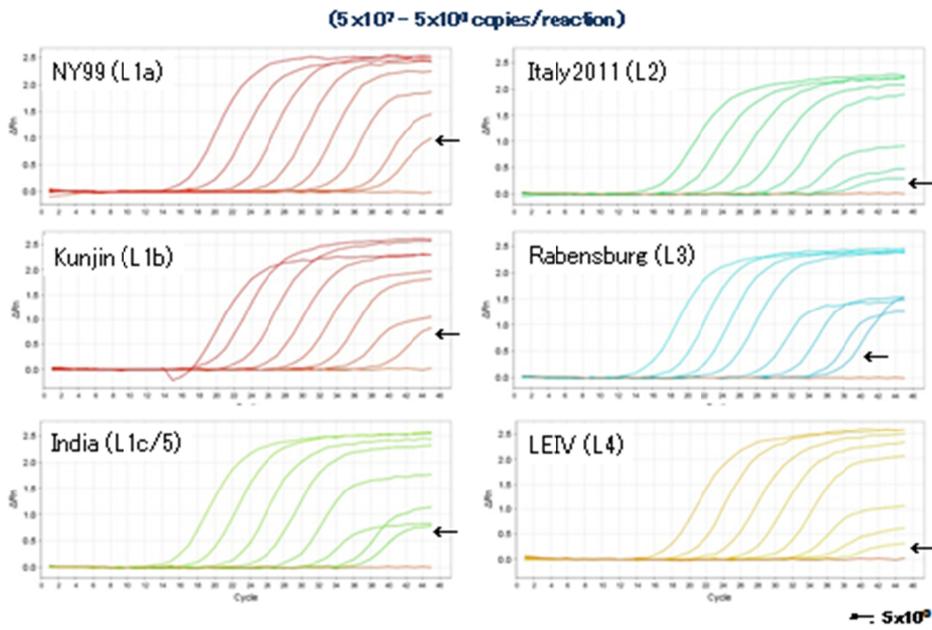


図7. 合成ウイルス RNA を用いた新規プライマー・プローブセットの検出感度試験

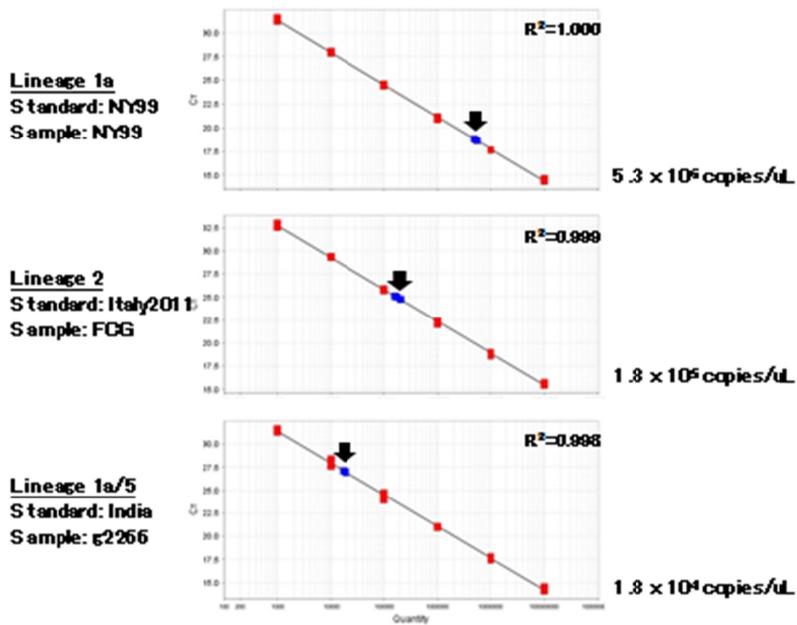


図8. 新規プライマー・プローブセットを用いたウエストナイルウイルス培養上清サンプル中のゲノムコピー数の算出



分担研究報告書

ウイルス性出血熱の検査法に関する研究

所属 国立感染症研究所ウイルス第一部  
研究分担者 下島 昌幸

研究要旨

エボラ出血熱は急性熱性の感染症で、致死率は90%に達する。承認された治療法や予防法は無く、原因ウイルスであるエボラウイルスがバイオテロに利用される可能性は高い。国立感染症研究所ウイルス第一部では、エボラウイルスの診断法を整備しており、エボラ出血熱疑い事例発生時に備えている。一方、近年はエボラ出血熱の発生事例が相次ぎ、2013年末に始まった大規模流行はZaire型ではあるもののこれまでにない変異を持つエボラウイルスによるものであった。本研究では、準備しているエボラウイルスの検出方法で最近のエボラウイルスも検出するか試し、バイオテロ発生時に対応可能か検討した。

A. 研究目的

エボラ出血熱(近年ではエボラ熱ともいう)はフィロウイルス科エボラウイルス属に分類されるエボラウイルスによる急性感染症で、感染した人はインフルエンザ様症状を示したのちショック等を示し死亡する。エボラウイルスには Zaire ebolavirus, Sudan ebolavirus, Bundibugyo ebolavirus, Tai Forest ebolavirus の4つの病原性があるウイルス種と、人に病原性がない Reston ebolavirus が存在する。自然宿主はコウモリが有力視され、コウモリと、あるいは感染した他の動物(人も含む)との接触により人は感染すると考えられる。感染は血液や体液などウイルスを多量に含んだものとの直接の接触により感染は成立し、空気感染は起こらないとされる。Zaire ebolavirus による致死率は特に高く、感染者の90%が死亡することもある。中和抗体や小分子化合物などウイルスの増殖を抑制する抗ウイルス薬の開発や、組換えワクチンの開発が取り組まれているが、未だ承認された治療薬・予防法はない。患者の発生地域によっては医療や経済の破綻、社会のパニックも生じうる。これらのことからエボラウイルスがバイオテロに利用される可能性は高いと言える。

国立感染症研究所ウイルス第一部では、エボラウイルスを含め出血熱ウイルスの実験室診断法を整備している(病原体検出マニュアル)。この診断法は5つの全てのエボラウイルス種を検出するのみでなく、同じフィロウイルス科に属し高い致死率を持つマールブルグ病を引き起こす Marburg virus も検出可能である。国内のエボラ出血熱疑いの発生時にはこの診断法が用いられている。

2013年の末より西アフリカのギニアで始まったエボラ出血熱は隣国のリベリアやシエラレオネにも広まった。このエボラ出血熱は Zaire ebolavirus によるものであるが、ゲノム情報を見る限り病原体検出マニュアルで遺伝子検出の標的としている部位にこれまでにない変異を持つことが判明し、病原体検出マニュアルでは検出できないことが懸念された。

西アフリカで流行した Zaire ebolavirus Makona 株も含めた様々なエボラウイルス種のサンプルを用い、病原体マニュアルに記載の診断法でいずれのエボラウイルスも検出できるか検討した。

B. 研究方法

エボラウイルスの診断は病原体検出マニュアルに記載された conventional RT-PCR (nested), real time RT-PCR, 抗原検出 ELISA により行なった。Conventional RT-PCR (nested)で予想されるサイズの遺伝子が増幅された場合には塩基配列の決定も行なった。

サンプルは世界健康安全保障イニシアティブ(GHSI)内の世界健康安全保障グループラボラトリーネットワーク(GHSAG-LN)より得られた Ebola Proficiency Panel-II を用いた。これは Robert Koch Institute が Bernard Nocht Institute, Philipps University とともに作製したもので、陰性のもも含む11のサンプル(不活化済み)よりなるパネルである。

【倫理面への配慮】

該当なし。

### C. 研究結果(図1)

サンプルより RNA を抽出し行なった conventional RT-PCR (nested) では, 11 のサンプルのうち No.1-No.10 が陽性であった。塩基配列を決定したところ, No.1 は 1976 年の初のエボラ出血熱の流行時に分離された Mayinga 株であった。No. 3-No.6, No.9 は 2003 年にガボンで流行した株であった。No.2, No.7, No.8 は西アフリカで流行した Makona 株であった。No.10 は Marburg marburgvirus の Marburg virus であった。

Real time RT-PCR では, No. 2, No.3, No.6, No.7, No.8 がそれぞれ 10 の 3.9, 4.6, 4, 4.3, 4.7 乗コピー/ml であった。他のサンプルは陰性であった。

抗原検出 ELISA では No.3, No.6, No.7, No.8 がそれぞれ 80, 10, 10, 80 の力価を示した。

No.11 のサンプルは conventional RT-PCR (nested), real time RT-PCR, 抗原検出 ELISA のいずれの方法でも陰性であった。

### D. 考察

Ebola Proficiency Panel-II は複数の Zaire ebolavirus の株(西アフリカの Makona 株を含む)と Marburg marburgvirus, 1 つの陰性サンプルよりなっていた。5 つのサンプルは real time RT-PCR でウイルスゲノムコピー数を決定でき, そのうち高い値を示した 4 サンプルは抗原も検出された。

結果が正しいかは現在提供元に確認中であるが,

少なくとも現行の病原体検出マニュアルが最新の Makona 株も検出できることが判明した。また conventional RT-PCR (nested), real time RT-PCR, 抗原検出 ELISA の 3 つの診断法では感度はこの順に優れ, コピー数と抗原量は相関しリーズナブルな結果が得られることが判明した。

### E. 結論

現行のマニュアルが知られているすべてのエボラウイルスを検出可能であることが確認でき, バイオテロ発生時に対応可能であると考えられた。

### F. 研究発表

1. 論文発表  
該当なし。
2. 学会発表  
該当なし。

### G. 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. Proficiency panel – II for Ebola virus PCR diagnostics

Sample No	Results of Ebola virus PCR diagnostics	Copy numbers (Log10 copies/ml)	Comments	Sequence	Ag-ELISA
1	EBOV		Conv. PCR NP(+)	Mayinga	
2	EBOV	3.9	Conv. PCR FiloA/B (+), NP(+), Real-time PCR (+)	GIN/2014/Makona-C15	
3	EBOV	4.6	Conv. PCR FiloA/B (+), NP(+), Real-time PCR (+)	Gabon 2003	80
4	EBOV		Conv. PCR NP(+)	Gabon 2003	
5	EBOV		Conv. PCR FiloA/B (+)	Gabon 2003	
6	EBOV	4	Conv. PCR FiloA/B (+), NP(+), Real-time PCR (+)	Gabon 2003	10
7	EBOV	4.3	Conv. PCR FiloA/B (+), NP(+), Real-time PCR (+)	GIN/2014/Makona-C15	10
8	EBOV	4.7	Conv. PCR FiloA/B (+), NP(+), Real-time PCR (+)	GIN/2014/Makona-C15	80
9	EBOV		Conv. PCR FiloA/B (+)	Gabon 2003	
10	EBOV		Conv. PCR FiloA/B (+)	MARV Lake Victoria	
11	Negative				

分担研究報告書

弱毒痘そうワクチン LC16m8 株をポックスウイルス暴露後に接種した場合の  
発症・重症化阻止効果について、エクトロメリアウイルスを用いたマウスモデルによる検討

所属 国立感染症研究所ウイルス第一部  
研究分担者 吉河 智城

研究要旨

天然痘ウイルスは撲滅されたものの、バイオテロへの利用が懸念されている。天然痘には痘そうワクチンが有効であり、我が国では万が一の為に保管されている一方、未接種者の割合は 40 代以下の人口のほぼ 100%に達する。諸外国においても状況は似ている。故に天然痘ウイルス暴露された場合、事後に痘瘡ワクチンを接種することで発症、重症化を阻止できないかが検討されてきた。本研究では国産の弱毒痘そうワクチン株である LC16m8 を用いて暴露後重症化阻止が可能か検討を行う。まず、天然痘ウイルスの代わりに同じオルソポックスウイルスに属するエクトロメリアウイルス(ECTV)を用いたマウスモデル系を確立した。次に ECTV でマウスを攻撃する前後 3 日の間に LC16m8 株、またはその親株の Lister 株を接種して効果を検討した。その結果、ECTV 暴露 3 日前に Lister 株を投与した群でのみ発症・重症化阻止効果は確認できた。一方、ECTV 暴露後の LC16m8, Lister 株の投与による効果は確認されなかった。これは既報の研究結果と一致していないため、今後はより詳細な検討を行う予定である。

A. 研究目的

天然痘の撲滅が 1980 年に宣言されてから 40 年近くが経過した。だが、天然痘ウイルスのバイオテロへの利用が危惧されており、その脅威が無くなったわけではない。我が国においても 40 歳未満の殆どが未種痘で有効な免疫を保持していない。そこで、万が一天然痘ウイルスに暴露された場合に暴露後に痘瘡ワクチンを接種することで発症、重症化を阻止できないかが検討されてきた。無論、天然痘ウイルスは研究に使用できない。そこで既報の研究の多くはその代替となるエクトロメリアウイルス(ECTV)を用いたマウスモデルにて行われている。ECTV は天然痘ウイルス、ワクシニアウイルス(VACV)と同じオルソポックスウイルスに属し、血清学的にも交差性がある。既に VACV Lister 株及び Modified Vaccinia Ankara (MVA)株を用いた場合、ECTV 暴露後 3 日目の投与であっても重症化を阻止できることが報告されている (J Infect Dis. 2009 Jan 1;199(1):39-48.)。そこで本研究では、弱毒化細胞培養痘そうワクチン株である LC16m8 の暴露後ワクチンとしての効果を検討する。

B. 研究方法

まず、ECTV を用いたマウスモデルを確立した。ECTV は Hampstead 株を用いて i.n.経路における

C57BL/6 マウスでの LD50 を決定した。

次に 4LD50 相当の ECTV を i.n.経路で感染させた前後に VACV LC16m8, またはその親株である Lister 株を i.m.経路で  $10^7$ PFU 接種し、その発症・重症化阻止の効果を検討した。

【倫理面への配慮】

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

C. 研究結果

1. C57BL/6 マウスにおける ECTV Hampstead 株を i.n. で接種した際の LD50 の決定

1 群 5 匹のマウスに  $10^4$  から  $10^8$ PFU/20ul の Hampstead 株を i.n.で接種し、観察、体重測定を行った。その生存曲線を図 1 に示す。この結果を元にプロビット法により計算した結果、LD<sub>50</sub> は 1200PFU であった。以降 ECTV の攻撃実験には 4LD<sub>50</sub> 相当、4800PFU の Hampstead 株を用いた。

2. ECTV 暴露後に LC16m8 株を接種した場合の発症・重症化阻止効果の検討

1 群 5 匹のマウスに 4LD50 の ECTV で攻撃を行った。その後 0, 1, 2, 3 日後に  $10^7$ PFU/100ul の LC16m8 株を i.m.で接種し、観察、体重測定を行っ

た。図2, 図3にスケジュール及びその結果を示す。LC16m8 を接種した, いずれの群においても対照群である ECTV の攻撃のみを行った群と比較して有意な発症や重症化の阻止効果は確認できなかった。

### 3. ECTV 暴露前後に Lister 株を接種した場合の発症・重症化阻止効果の検討

実験 1 で期待する効果が確認できなかったことから, 今度は既報である Lister 株を用いた実験を行った。1 群 5 匹のマウスに 4LD<sub>50</sub> の ECTV で攻撃を行った。その前後 -3, 0, 1, 2, 3 日後に 10<sup>7</sup>PFU/100ul の Lister 株を i.m. で接種し, 観察, 体重測定を行った。図4, 図5にスケジュール及びその結果を示す。ECTV 攻撃 3 日前に Lister 株を接種した群は ECTV 感染に伴う臨床症状を示すことなく全頭生存した。一方で, それ以外の群, つまり ECTV 攻撃後に Lister 株を接種した場合, いずれの群においても対照群である ECTV の攻撃のみを行った群と比較して有意な発症や重症化の阻止効果は確認できなかった。

### D. 考察

本研究では, ECTV 暴露後に VACV を接種した場合の発症・重症化阻止を検討したものの, 有意な効果を確認することはできなかった。これは既報の研究と結果が異なる。そこで, 既報の研究と本研究における実験条件の違いを図6に示す。殆どの部分で実験条件は近似している。VACV は既報では MVA と Lister, 本研究では LC16m8 と Lister の 2 株を使用した。従って少なくとも Lister 株は共に使用しており, この部分で結果が一致しないとすれば, 最大の違いは

使用した ECTV の株が異なることだと考えられる(図6の赤字強調部分)。ECTV にはいくつかの株が存在することが知られており, 本研究では既報で使用している Moscow 株ではなく Hampstead 株を用いている。LD<sub>50</sub> はそれぞれ 80PFU, 1200PFU と 10 倍以上異なることから, 病原性にも差があることが示唆される。そこで, 我々は Moscow 株を入手した。今後は Moscow 株を用いて既報の実験条件を近似した状況で再度実験を行い, その再現性を検討する予定である。また, それを足がかりに ECTV 暴露後の VACV 接種の効果の有無を含めて, より詳細に検討を行う予定である。

### E. 結論

ポックスウイルス暴露後に VACV 接種した場合の発症・重症化阻止効果を検討するため, エクトロメリアウイルスを用いたマウスモデル系を確立した。確立した系を用いて検討した結果, 現時点ではポックスウイルス暴露後に VACV 接種した場合の発症・重症化阻止効果は確認できなかった。これは既報の研究結果と一致していないため, 今後より詳細な検討が必要である。

### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 既報の研究と本研究の実験条件の違い

	既報	本研究
Mouse	C57BL/6	C57BL/6
ECTV strain	Moscow	Hampstead
Dose	3LD <sub>50</sub> (240PFU)	4LD <sub>50</sub> (5000PFU)
Root of infection	i.n.	i.n.
VACV strain	MVA, Lister	LC16m8, Lister
Dose	10 <sup>6</sup> or 10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup>
Root of infection	i.m.	i.m.

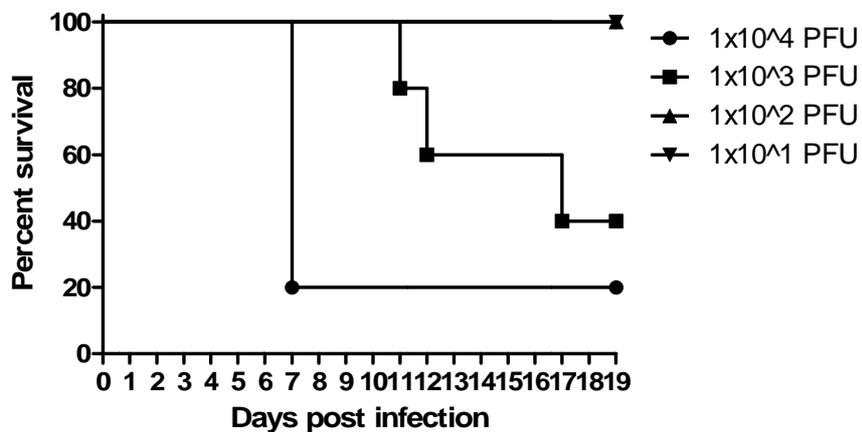


図 1. ECTV Hampstead 株を i.n. で接種された C57BL/6 マウスの生存曲線

ECTV strain Hampstead  
4LD50 (5000PFU) /20ul/i.n  
C57BL/6 (Female, 8 wks)

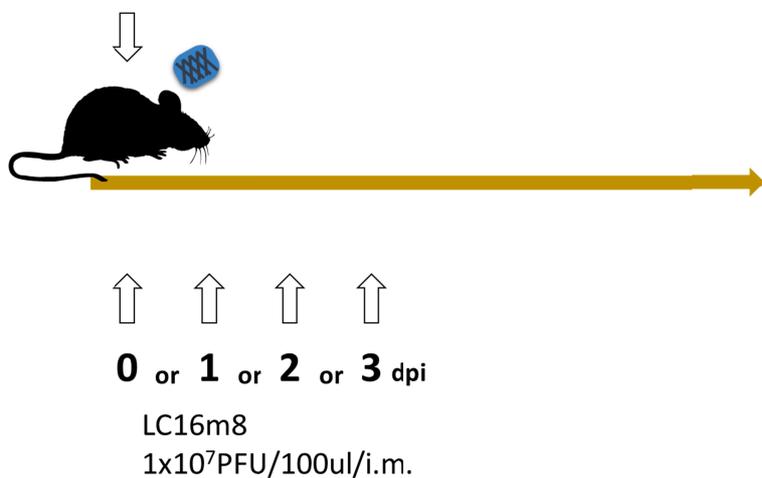


図 2. EVTV 暴露後に LC16m8 株を接種した場合の発症阻止効果の検討

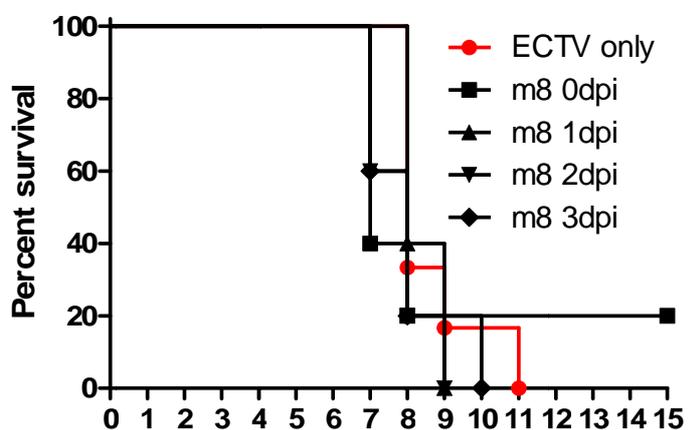


図 3. EVTV 暴露後に LC16m8 株を接種した場合の発症阻止効果の検討結果

ECTV strain Hampstead  
 4LD50 (5000PFU) /20ul/i.n  
 C57BL/6 (Female, 8 wks)



↑    ↑    ↑    ↑  
**-3** or **0** or **1** or **2** dpi

Lister  
 1x10<sup>7</sup>PFU/100ul/i.m.

図 4. ECTV 暴露後に Lister 株を接種した場合の発症阻止効果の検討

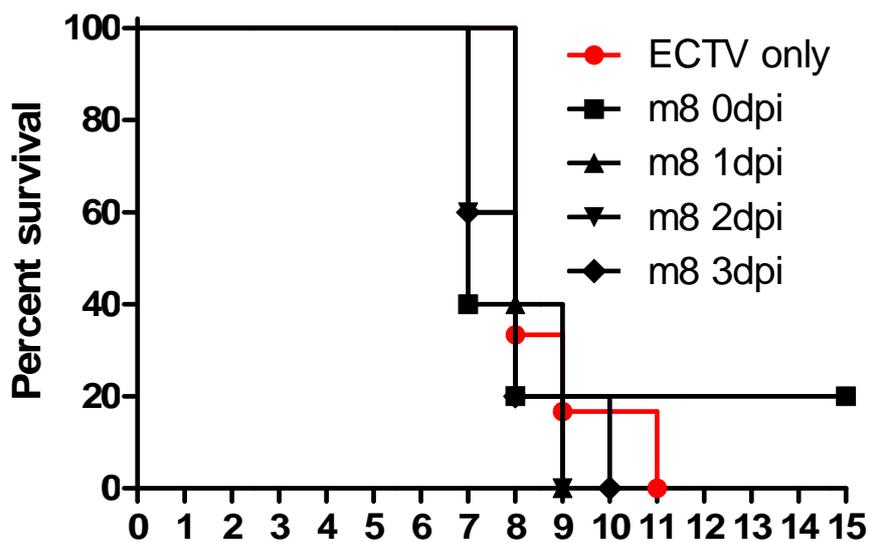


図 5. ECTV 暴露後に Lister 株を接種した場合の発症阻止効果の検討結果

分担研究報告書

細胞培養弱毒生痘そうワクチンの特性解析(遺伝子機能解析), 品質試験法に関する研究

所属 国立感染症研究所獣医科学部  
研究分担者 森川茂

研究要旨

Lister 株から低温馴化により LC16 株, LC16mO 株を経由して樹立された安全性の高いワクチン株である LC16m8 株は, 継代培養するとプラークサイズのやや大きい LC16mO 型 (medium size plaque; MSP) のウイルスが出現する。これまでの解析から, MSP は B5R の一塩基欠失を相補する変異ウイルスであり, その変異のパターンが複数あることが分かっている。これまでに, バイオアッセイで得られる MSP の出現頻度やパターンの解析が次世代シーケンス (NGS) 解析により得られることを示した。NGS 解析は取得データの処理に比較的時間を要することから, これまでの MSP の変異パターン解析で得られた主要な MSP を定量的に検出可能な PCR 法を開発することを試みた。その結果, MSP の遺伝子変異特異的配列を 3' 末端とする primer を用いた PCR で, LC16m8 株と特定の MSP を識別できた。そこで, 主要タイプの MSP を特異的に検出する PCR を用いて, LC16m8 株と MSP を混合したスパイク試験を実施した結果, MSP 含有率 0.01~1% まで検出できた。さらに RNase H2-dependent PCR により, より特異度の高い MSP 検出 PCR が開発された。今後, 主要な MSP を定量的に検出可能な real-time PCR を行う予定である。

研究協力者

朴ウンシル, 宇田晶彦 (国立感染症研究所獣医科学部)  
吉河智城, 西條政幸 (同ウイルス第一部)  
倉根一郎 (同所長)  
横手公幸, 金原知美, 丸野真一, 新村靖彦 (化血研)

A. 研究目的

細胞培養痘そうワクチンの製造株であるワクシニアウイルス LC16m8 株は, Lister 株から低温馴化により LC16 株, LC16mO 株を経由して樹立された株である。サルを用いて行われた神経病原性試験により非常に神経毒性が低いことがわかっている。また, 1970年代には10万人の子供に接種され, その際に重篤な副反応は確認されなかったことより安全性の非常に高いワクチン株といえる。さらに, 自衛隊での成人への種痘にも用いられ安全性がさらに確認されている。Lister 株は 41 以上でも初代ウサギ腎細胞でのプラーク形成能があるのに対し, LC16mO 株と LC16m8 株は 41 ではプラークを形成しない (増殖温度感受性)。LC16m8 株は, *b5r* 遺伝子に 1 塩基欠損があるため, 正常な B5 蛋白質が作られないために初代ウサギ腎細胞におけるプラークサイズが小さい。LC16m8 株を継代するとプラークサイズのやや大きい

LC16mO 型のウイルス (medium size plaque; MSP) が出現する。これまでの解析から, これらは LC16mO 型への復帰株ではなく, *b5r* の一塩基欠失を相補する変異ウイルスであり, その変異のパターンは複数あることが分かっている。これまでに, 次世代シーケンス (NGS) 解析によりバイオアッセイで得られた MSP の情報と同等の成績が得られることを明らかにした。NGS 解析は取得データの処理に比較的時間を要することから, これまでの MSP の変異パターン解析で得られた主要な MSP を, 定量的に検出可能な PCR 法を開発し, 品質管理に資する情報を提供することを目的とした。

B. 研究方法

1. MSP を検出する PCR 法の検討:

LC16m8 株のウイルス標本中に含まれる MSP の含有率を測定するには, 主要なタイプの MSP の含有率を測定すれば良いと考えられる (図 1, 表 1)。そこで, mutation specific primer PCR 法, RNase H2-dependent PCR 法を検討した。

1) Mutation specific primer PCR による MSP の検出法: この PCR では片側のプライマーに MSP の型特異的プライマーを設定した (図 2)。各 MSP を特異的に検出できる条件検討 (PCR enzyme, プライマーの長さ,

Tm, cycles等)し, 指摘条件を求めた. MSPとLC16m8株と段階混合してスパイク試験を行い, 有用性を検討した.

## 2) RNase H2-dependent PCRによるMSPの検出法:

この方法は, 各MSP特異的DNA/RNA hybrid primers (rhPCR用primers), RNase H2および専用のbufferをPCR enzymeに添加してPCRを行う(図4). この方法では, 図4に示すように本来のprimer領域に1塩基のSNP特異的RNAを挟んで4塩基のmatching DNA塩基, 1塩基のmismatch DNA塩基からなる(rhPCR用primers)を用いてPCRを行う. RNAと相補的なDNA塩基があるとRNase H2によりprimerのDNA-RNA間が切断されて機能的primerとなりDNA合成反応がおきる. PCRに用いる酵素の3' 5' exonuclease活性による影響がないため, 1)のmutation specific primer PCRによるPCRと比較してより特異的にSNPが同定できる特徴を持つ. 本法により, 非特異反応がより出難いMSP検出用PCR法の確立を試みた.

### 【倫理面への配慮】

ヒト検体, 動物は使用していないため該当しない.

## C. 研究結果, 及びD. 考察

これまでの研究により, MSPはLC16m8株のb5r遺伝子の1塩基欠失を相補するような1ないし4塩基挿入によることが分かっている. また, MSPに認められるb5r遺伝子の変異には10種類ほどあるが, 主要なMSPは4ないし5種類であり, これらがMSPの85%程度をしめる(図1, 表1). このため, 幾つかの主要なMSPタイプの含有率を定量的に検出できるPCRを開発すれば, ワクチンの品質管理に応用可能と考えられる. 昨年度に, 種々のPCR法を検討した結果, mutation specific primer PCR法が各MSPを最も効率よく検出できる可能性が見出された. そこで, 主要なMSPを構成するL1(267位にA挿入), L2(267位にC挿入), L4(272位にT挿入)及びL5(274位にATACの重複で4塩基挿入)(図1, 表1)の検出を試みた.

### 1) Mutation specific primer PCRによるMSPの検出法:

昨年度は, primeSTAR GXL DNA polymerase (Takara)を用いたPCRを行い, L2の検出が可能であることを示した. しかし, 検出感度を上げるためにPCRのcycle数を増やすと, 非特異反応により非MSP由来産物も増幅されてくる. その原因は, primeSTAR GXL DNA polymeraseの強い3' 5' exonuclease活性によりプライマーの末端が削られる

からと考えられた. そこで, 3' 5' exonuclease活性の弱いTaq DNA polymerase由来酵素によるillustra puRe Taq ready-to-go PCR beads (GE healthcare)を用いて, 同様のPCRを行った結果, 特異性および感度が向上した. そこで, illustra puRe Taq ready-to-go PCR beadsによるPCRで主要なMSPを検出するためのprimersを検討した. 変異部位特異的primerの長さを17merから22merまで替えて検討した結果, L1(267A), L2(267C)およびL4(272T)のMSP検出には長さが18merのprimerを, L5(274ATAC)のMSP検出には19merのprimerを用いた場合に, 最も効率よくMSPが検出できた(図2). これらの各MSP特異的PCRは, LC16m8, LC16mO, 他のMSPに対しては20から25cyclesのPCRでは非特異的増殖が認められず, 特異性が高いことが検証された(図3). しかし, 30cycles以上のPCRでは非特異的反応が生じた.

そこで, 各MSPに特異的なmutation specific primer PCRによるMSP検出感度を検証するために, LC16m8株DNAに各MSPのDNAを種々の割合で混合したサンプルを用いたスパイク試験を実施した. その結果, 20から25cyclesのPCRでは, L1, L2およびL4型MSPでは, 0.01%の頻度まで検出可能で, L5型MSPでは1%の頻度まで検出可能であった(表2).

### 2) RNase H2-dependent PCR (rhPCR)によるMSPの検出法:

Mutation specific primer PCRでは, 実用上十分の感度と特異度でMSPを検出できたが, より精度の高いPCRの開発を試みた. 図4に示すようなL1, L4およびL5MSP特異的DNA/RNA hybrid primers (rhPCR用primer)でrhPCRを行った. その結果, L1, L4およびL5特異的rhPCRとも, LC16m8, LC16mO, 他のMSPに対しては40cyclesでも非特異的増殖が認められず, 特異性が非常に高いことが検証された(図5). 本法では, mutation specific primer PCRと比較して, より特異度・検出感度の高いMSP検出が可能と考えられる. 今後, LC16m8と各MSPのDNAのスパイク試験を行い, 検出感度の検定を行い, 乾燥細胞培養痘そうワクチンV03, V07およびV09由来DNAを用いて実証試験を実施する予定である. また定量的なSybrGを用いたreal-time PCRへの応用も行う予定である.

上記の結果から, mutation specific primerによるPCRおよびrhPCR法によりMSPの特異的検出が可能となると予想される. 最終的にはMSP検出のバイオアッセイと比較して有用性を明らかにしたい.

## E. 結論

乾燥細胞培養痘そうワクチンは, quasispeciesから

なる Lister 株による第1世代の calf lymph ワクチンの製造用ワクチニアウイルスから、低温培養により温度感受性株で小ポックサイズを形成する株として選択された LC16m8 株をウサギ初代腎細胞で増殖して製造される。少ポックサイズは *b5r* 遺伝子の 274 位の G の欠損によることが分かっているが、この欠損を相補するような変異挿入変異が導入されたものが LC16mO 株用のプラーク形成能を持ち MSP と呼ばれる。MSP の含有率を定量することはワクチンの品質管理のうえでも有用であると考えられる。MSP の含有率および遺伝子型は、バイオアッセイと次世代シーケンサーによる解析でよく一致した。そこで主要な MSP 遺伝子型を検出する PCR による MSP の定量法により、より簡便、迅速に MSP 含有率が求められ品質管理条有用であると思われる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Tani H, Fukuma A, Fukushi S, Taniguchi S, Yoshikawa T, Iwata-Yoshikawa N, Sato Y, Suzuki T, Nagata N, Hasegawa H, Kawai Y, Uda A, Morikawa S, Shimojima M, Watanabe H, Saijo M. Efficacy of T-705 (Favipiravir) in the treatment of infections with lethal severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *mSphere*, 1 (1): e00061-15.
- 2) Hotta A, Tanabayashi K, Fujita O, Shindo J, Park CH, Kudo N, Hatai H, Oyamada T, Yamamoto Y, Takano A, Kawabata H, Sharma N, Uda A, Yamada A, Morikawa S. Survey of *Francisella tularensis* in Wild Animals in the Endemic Areas in Japan. *Jpn J Infect Dis.* in press
- 3) Ogawa K, Komagata O, Hayashi T, Itokawa K, Morikawa S, Sawabe K, Tomita T. Field and laboratory evaluations of the efficacy of DEET repellent against *Ixodes* ticks. *Jpn J Infect Dis.* in press
- 4) Okutani A, Osaki M, Takamatsu D, Kaku Y, Inoue S, Morikawa S. Draft genome sequences of *Bacillus anthracis* strains stored for several decades in Japan. *Genome Announc.* 2015, 3(3). pii: e00633-15.
- 5) Sakai K, Hagiwara K, Omatsu T, Hamasaki C, Kuwata R, Shimoda H, Suzuki K, Endoh D, Nagata N, Nagai M, Katayama Y, Oba M, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Mizutani T, Maeda K. Isolation and Characterization of a Novel Rhabdovirus from a Wild Boar (*Sus scrofa*) in Japan. *Vet Microbiol*, 2015, 179(3-4):197-203.
- 6) Hamamoto N, Uda A, Tobiume M, Park CH, Noguchi A, Kaku Y, Okutani A, Morikawa S, Inoue S. Association between RABV G Proteins Transported from the Perinuclear Space to Cell Surface Membrane and N-glycosylation of the Sequon at Asn204. *Jpn J Infect Dis.* 2015, 68(5): 387-93.
- 7) Yoshikawa T, Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Singh H, Suda Y, Shirabe K, Toda S, Shimazu Y, Nomachi T, Gokuden M, Morimitsu T, Ando K, Yoshikawa A, Kan M, Uramoto M, Osako H, Kida K, Takimoto H, Kitamoto H, Terasoma F, Honda A, Maeda K, Takahashi T, Yamagishi T, Oishi K, Morikawa S, Saijo M. Phylogenetic and Geographic Relationships of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in China, South Korea, and Japan. *J Infect Dis.* 2015, 212(6): 889-98.
- 8) Okamoto M, Miyazawa T, Morikawa S, Ono F, Nakamura S, Sato E, Yoshida T, Yoshikawa R, Sakai K, Mizutani T, Nagata N, Takano J, Okabayashi S, Hamano M, Fujimoto K, Nakaya T, Iida T, Horii T, Miyabe-Nishiwaki T, Watanabe A, Kaneko A, Saito A, Matsui A, Hayakawa T, Suzuki J, Akari H, Matsuzawa T, Hirai H. Emergence of infectious malignant thrombocytopenia in Japanese macaques (*Macaca fuscata*) by SRV-4 after transmission to a novel host. *Sci Rep.* 2015, 5:8850.
- 9) Ching PK, de los Reyes VC, Sucaldito MN, Tayag E, Columba-Vingno AB, Malbas FF Jr, Bolo GC Jr, Sejvar JJ, Eagles D, Playford G, Dueger E, Kaku Y, Morikawa S, Kuroda M, Marsh GA, McCullough S, Foxwell AR. Outbreak of Henipavirus Infection, Philippines. *Emerg Infect Dis.* 2015, 21(2): 328-31.
- 10) Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Fukuma A, Taniguchi S, Suda Y, Maeda K, Takahashi T, Morikawa S, Saijo M. Effects of ribavirin on severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in vitro. *Jpn J Infect Dis.* 2014, 67(6): 423-7.
- 11) Orba Y, Sasaki M, Yamaguchi H, Ishii A, Thomas Y, Hang'ombe BM, Mweene AS, Morikawa S, Saijo M, Sawa H. Orthopoxvirus infection among wildlife in Zambia. *J Gen Virol.* 2015, 96 (Pt 2): 390-4.

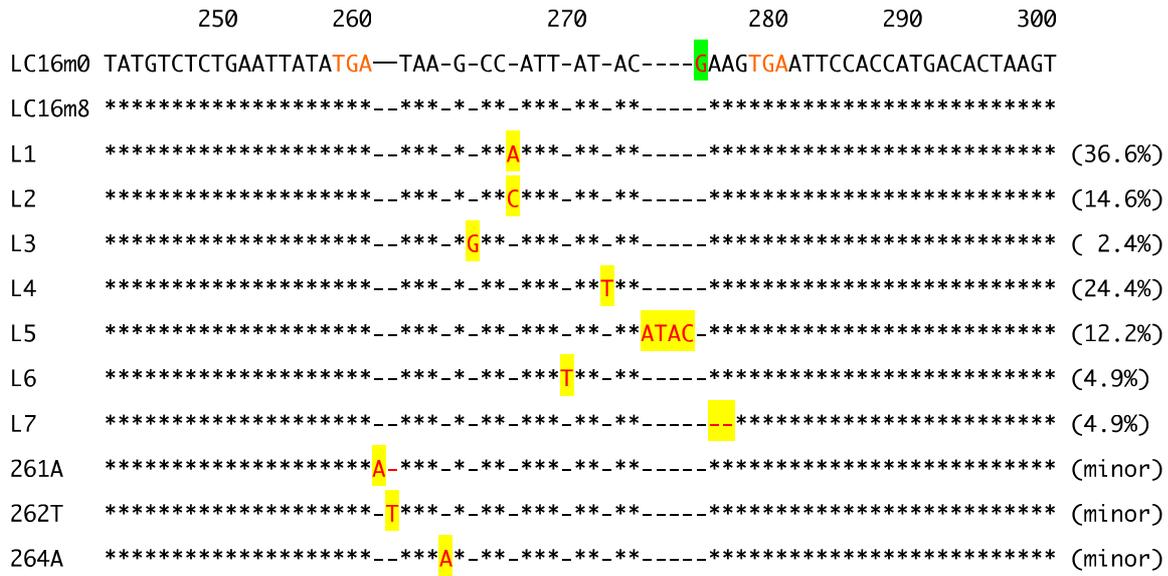


図 1. K1 から得られた MSP の遺伝子型とその出現頻度(注:262A, 262T, 264A は Vero E6 細胞で継代後に得られた MSP)

表 1. K1 に含まれる MSP のブランク法と次世代シーケンサーによる検出頻度の比較

MSPタイプ	遺伝子型	K1から得られたMSP(%)	K1のMSP (deep seq) (%)
L1	267A	36.6	38.9
L2	267C	14.6	6.6
L3	265G	2.4	4.4
L4	271T	24.4	20.6
L5	274 (4Ins)	12.2	12.8
L6	268T	4.9	12.3
L7	275-6 (2del)	4.9	3.8
	261A	0	0
	262T	0	0
	264A	0	0.8
	270-1 (2del)	0	0.5

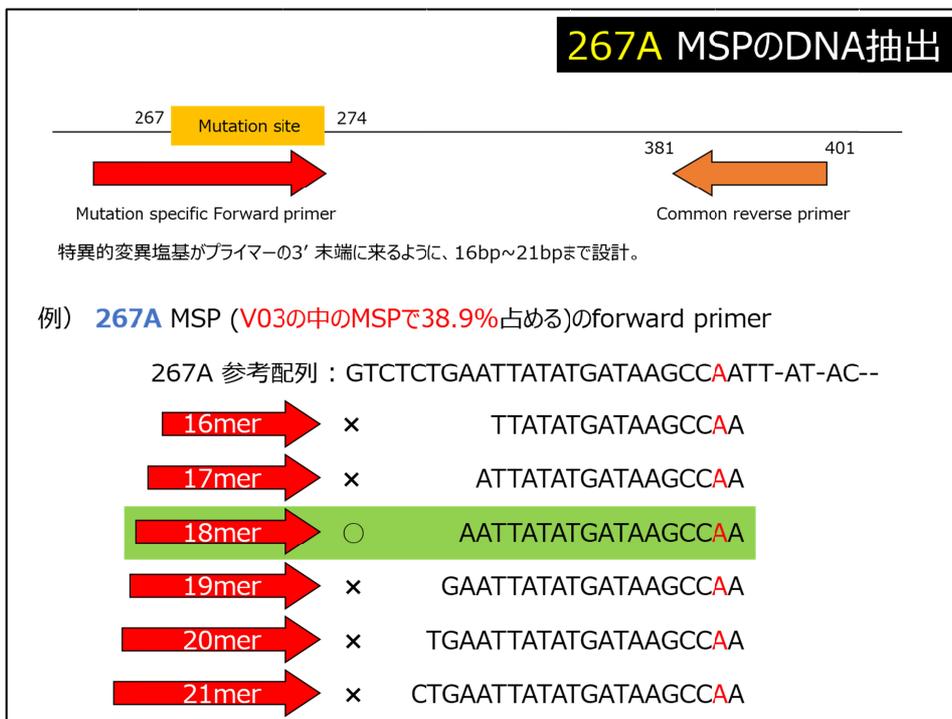


図2. Mutation-specific primer PCR による L1 型 MSP の検出. 種々の長さの変異部位特異的 primers を検討した結果, L1, L2, L4 型 MSP には 18mer primer が, L5 型 MSP には 19mer primer が最適であった.

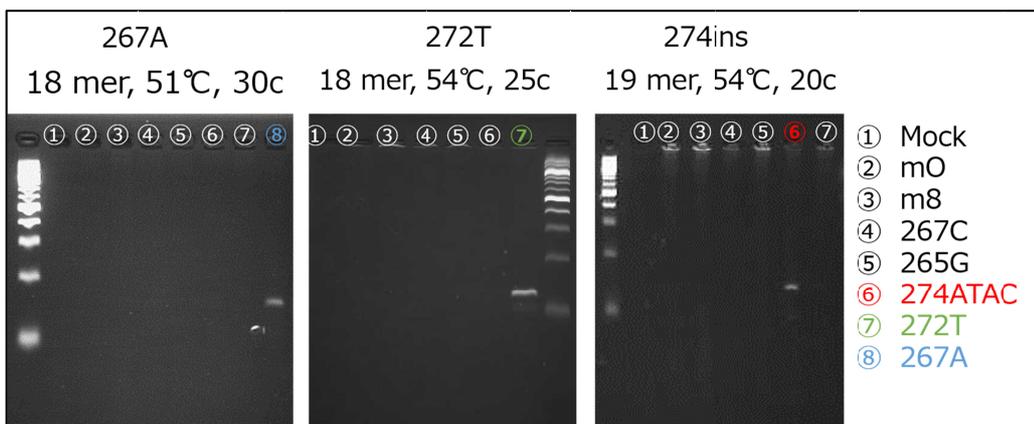


図3. Mutation specific primer PCR による L1, L4 および L5 型 MSP の特異的検出. 各 MSP 特異的 PCR は, LC16m8, LC16mO, 他の MSP に対しては 25cycles までは非特異的増殖が認められず, 特異性が高いことが確認された.

表2. Mutation specific primer PCR による各 MSP 検出のまとめ

MSP	DNA polymerase	Primer	Tm (°C)	Cycles	MSP含率 (%)	検出限度 MSP含率 (%)
267C	PCR RTG beads	18 mer	53	20~30	6.6	0.01
267A	PCR RTG beads	18 mer	51	20~30	38.9	0.01
272T	PCR RTG beads	18 mer	54	25	20.6	0.01
274ATAC	PCR RTG beads	19 mer	54	20	12.8	1

L1, L2, L4 では, 頻度 0.01%でも MSP を検出可能であった.

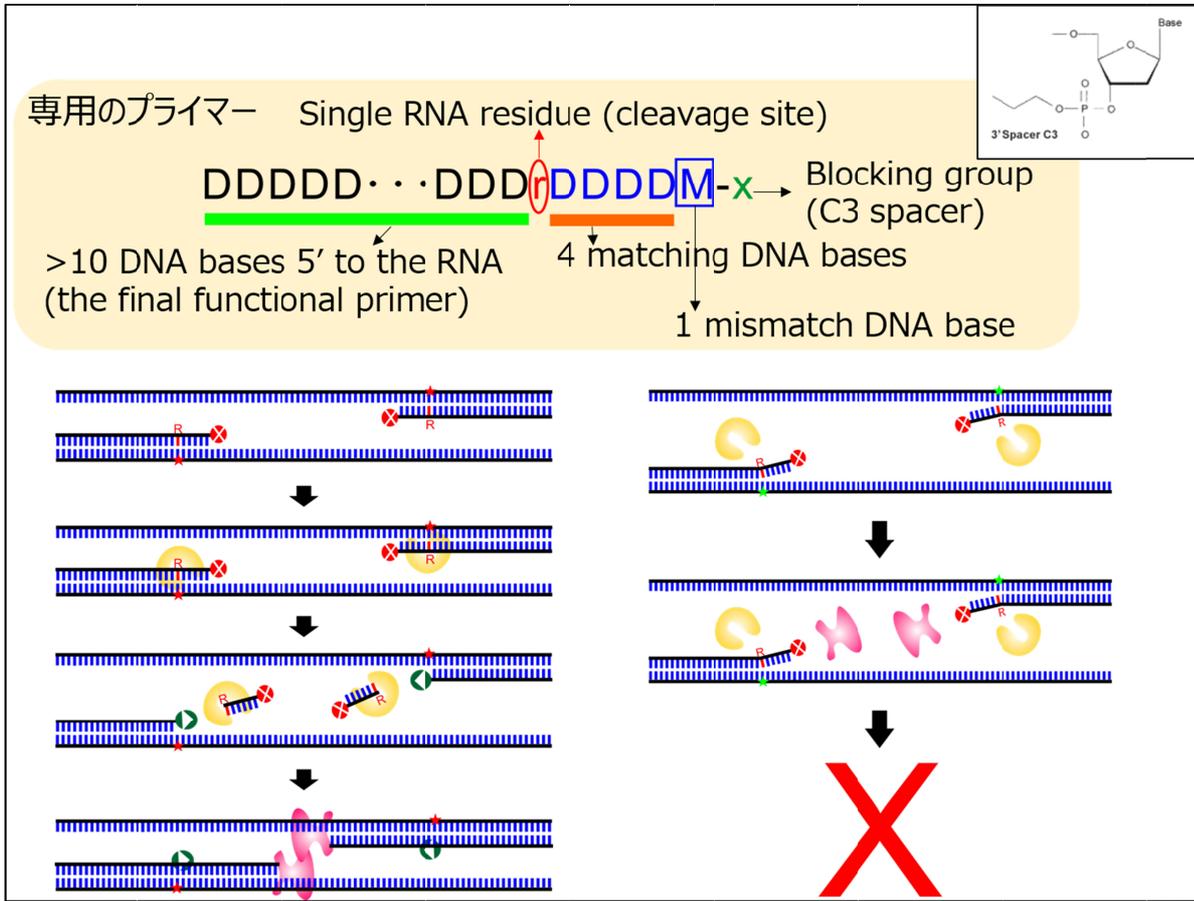


図4. RNase H2-dependent PCR による MSP の検出

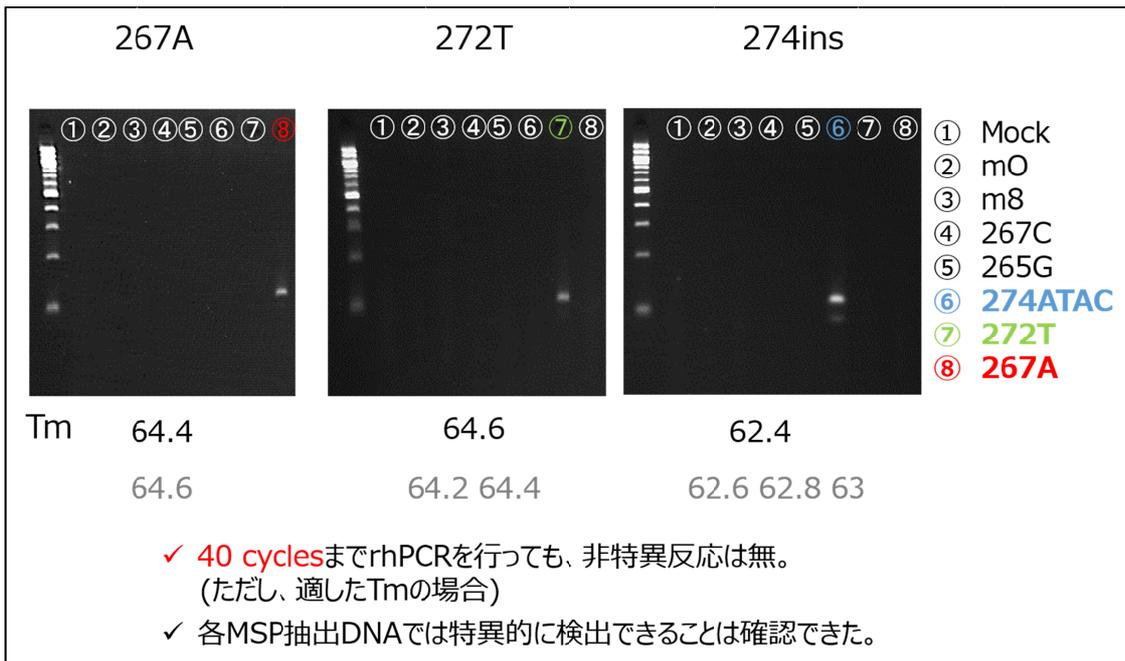


図5. RNase H2-dependent PCR による L1, L4 および L5 型 MSP の検出

分担研究報告書

バイオテロに使用される可能性のある真菌感染症の迅速診断法の確立

所 属 国立感染症研究所真菌部  
研究分担者 梅山隆

研究要旨

バイオテロに用いられる可能性のある病原真菌として、BSL3 に分類されるコクシジオイデス属 (*Coccidioides immitis*, *C. posadasii*)、ヒストプラスマ属 (*Histoplasma capsulatum*)、BSL2 に分類されるクリプトコックス・ガッティ (*Cryptococcus gattii*) が想定される。これらの病原真菌は感染性が高く、分離培養で大量の分生子を飛散させる危険性があることから、培養を要しない検査技術の開発が望まれる。本研究は、臨床検体からコクシジオイデス属などの高病原性真菌 DNA の検出法を検討し、より簡便で成績の良い DNA 検出法を開発し、バイオテロを含めた集団感染事例が起きた際の迅速診断に役立てることを目的とする。今年度は、LAMP 法による *Cryptococcus gattii* DNA の高感度検出系の開発を検討した。

研究協力者

名木稔, 星野泰隆, 宮崎義継 (国立感染症研究所真菌部)

A. 研究目的

真菌症は HIV 感染患者や臓器移植、抗癌剤治療などの免疫不全患者のみでみられる感染症と誤解され、公衆衛生の観点から重要性が認識されにくかった。しかし従前からクリプトコックス症やコクシジオイデス症、ヒストプラスマ症などは健常者に起こることが知られており、健常者における集団感染事例や院内感染事例が報告されるようになってきたことから、他の病原体同様にサーベイランスや疫学研究の重要性が増してきた。

バイオテロに用いられる可能性のある病原真菌としては、BSL3 に分類されるコクシジオイデス属 (*Coccidioides immitis*, *C. posadasii*) とヒストプラスマ属 (*Histoplasma capsulatum*)、BSL2 に分類されるクリプトコックス・ガッティ (*Cryptococcus gattii*) 等が想定される。いずれの真菌も感染性が高く健常者でも感染が成立し、播種性感染に進行すると致死率は極めて高くなるが、これらの病原真菌は日本国内には定着していないと考えられてきた。しかし、近年では海外の流行地への渡航歴のないヒストプラスマ、クリプトコックス・ガッティ感染患者が報告されるようになり、国内にも感染源が存在する可能性が示唆されている。また、コクシジオイデス属、ヒストプラスマ属については、分離培養で大量の分生子を飛散させる危険性があることから、検査室での分離培養は飛散孢子による集団感染を引き起こす危険性が考えられる。

本研究では、分離培養された BSL3 真菌の安全か

つ簡便な診断系を構築し、バイオテロを含めた集団感染事例が起きた際の迅速診断に役立てることを目的とする。今年度は、*Cryptococcus gattii* の簡便かつ高感度な検査法として、LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法の検討を行った。

B. 研究方法

*Cryptococcus gattii* 検出のための LAMP 法の標的配列として、*Cryptococcus* 属の莢膜の生合成に関与する *CAP10* 遺伝子の配列を選択した。LAMP プライマーおよび loop プライマーは LAMP 法プライマー設計支援ソフトウェア PrimerExplorer (<http://primerexplorer.jp>) を利用して数組設計した。その他、既に論文で報告されている *CAP59* (Lucas S et al., Clin. Microbiol. Infect., 2010)、もしくは *URA5* (Amirabadi AR et al., Af. J. Biotechnol. 2012) を利用した LAMP プライマーについても検討した。

LAMP 反応は栄研化学の Loopamp DNA 増幅試薬キット (乾燥型) および検出試薬として Loopamp 蛍光・目視検出試薬を用いた。専用の 200 µl PCR チューブを用い、サーマルサイクラーで 63 で反応を行った。*C. neoformans* H99 株および *C. gattii* R265 株から抽出した DNA を用いて検討を行った。反応後、UV 写真撮影装置で検出を行った。

【倫理面への配慮】

本実験では臨床検体などは使用せず、分離された菌の DNA を用いるのみであったことから、倫理面に関する配慮は不要であった。

C. 研究結果

最初に、既に論文に報告されている *CAP59* の配列

を利用した LAMP 法の導入を試みた。 *C. neoformans* (血清型 A および D) もしくは *C. gattii* (血清型 B および C) の 2 菌種を区別することが出来る LAMP プライマーとして報告されている。論文中の塩基配列を参考にプライマーを合成し、 *C. neoformans* H99 株および *C. gattii* R265 株から抽出したゲノム DNA に対して LAMP 反応を行った。 1 時間の反応では、 *C. neoformans* もしくは *C. gattii* を特異的に検出することが出来たが、 2 時間の反応では、水のみ陰性コントロールにおいて検出されており(データ未掲載)、本プライマーによる検出系ではバックグラウンドが高い可能性が高く、高感度検出系としては不適當であることが示唆された。

次に、別の論文で報告されている *URA5* の配列を利用した LAMP 法の導入を試みた。また、 *CAP10* 遺伝子の配列を利用して 4 種類の LAMP プライマーセットを設計した。すべてのプライマーセットにおいて、1 時間以内に検出可能であった(図 1)。中でも *CAP10-25-Cg* および *CAP10-25-Cn* プライマーセットでは 30 分で検出可能であった。また、 *CAP10-13-Cn* プライマーセットを用いると、 *C. neoformans* 特異的な検出が可能であった。いずれも、水のみ陰性コントロールにおいては、2 時間後でも検出されなかった。

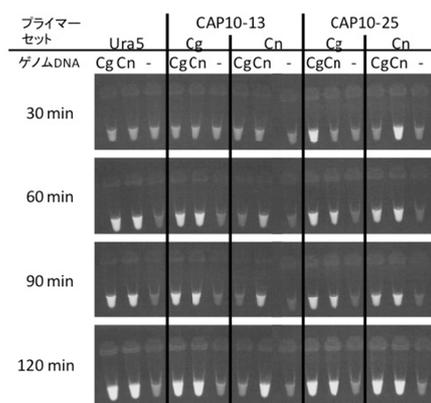


図 1. *C. neoformans* (Cn, H99 株) および *C. gattii* (Cg, R265 株) のゲノム DNA を用いた LAMP 法プライマーセットの検討

#### D. 考察

ヒストプラスマ属やコクシジオイデス属などの BSL3 真菌、クリプトコックス・ガッティがテロ目的で使用され、国内感染者が発生した場合には、検体から菌が分離されるかどうか予想できないので、医療機関の検査室でこれらの菌を偶発的に培養してしまう可能性が考えられる。

病原体の検出法について、PCR 法はサーマルサイクラー・増幅酵素の性能や操作者の技術への依存が強く、検査実施機関によって結果が異なることも多い。LAMP 法の反応系は非常に簡素で、反応温度が定温であるため、サーマルサイクラーの性能に依存しないという利点がある。しかも、1 時間で微量 DNA を検出

することが可能であり、本実験で確立した LAMP 法を用いればクリプトコックス属を迅速簡便に検出できる。現時点ではクリプトコックス属の菌体から調製した DNA でしか検証できていないが、今後、特異性や検出感度について検討し、臨床検体を用いて本研究で確立した LAMP 法が可能になれば、上記のような危険を伴う菌の培養を回避することも可能であるため、今後実験系の改良を進めていきたい。

#### E. 結論

LAMP 法によるクリプトコックス・ガッティの迅速診断系のためのプライマーセットを開発した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yurika Ikeda-Dantsuji, Hideaki Ohno, Koichi Tanabe, Takashi Umeyama, Keigo Ueno, Minoru Nagi, Satoshi Yamagoe, Yuki Kinjo, Yoshitsugu Miyazaki. Interferon- promotes phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* but not *Cryptococcus gattii* by murine macrophages. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 21: 831-836, 2015
- 2) Shotaro Okachi, Keiko Wakahara, Daizo Kato, Takashi Umeyama, Tetsuya Yagi, Yoshinori Hasegawa. Massive mediastinal cryptococcosis in a young immunocompetent patient. *Respirology Case Reports*. 3 : 95-98, 2015

##### 2. 学会発表

- 1) 梅山隆, 中村茂樹, 山越 智, 名木稔, 壇辻百合香, 中山靖子, 浦井誠, 金城雄樹, 上野圭吾, 星野泰隆, 宮崎義継, 治療薬選択に必要な真菌の菌種同定, 第 59 回日本医真菌学会総会・学術集会, 札幌, 10 月 9-10 日, 2015

#### G. 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

厚生労働科学研究補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業  
(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)  
分担研究報告所

超高速病原体ゲノム解読システムの構築と包括的な核酸迅速診断法の確立

所属 国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター  
研究分担者 黒田誠

研究要旨

未知病原体や変異病原体による新興感染症の汎発流行,そしてそれらを利用したバイオテロなどの危険性は近年社会的不安の一つとして認識されつつある.その危険性に対する確な対処法を立案・整備する上で,バイオテロ病原体を網羅的かつ迅速に配列解読することは最も確なアプローチの一つと考える.次世代ゲノムシーケンサー (Next-generation DNA sequencer: NGS) のパフォーマンスを用いて WHO 指定バイオテロ病原体のゲノム配列及び変異情報データベースを充実させ,有事において迅速に対応出来る体制を整えることを本研究課題は目標としている.

炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) は炭疽症の原因となる細菌で,第二次世界大戦以降,生物兵器として各国の軍事機関に研究され,1993 年のオウム真理教によるテロ未遂や 2001 年のアメリカのテロ事件にも利用された事がある.そのため,炭疽症のアウトブレイクが起きた際に,原因菌の出自を詳細に調査することはバイオセキュリティ上の重要な意味を持つ.出自を調査するにはコアゲノムを用いた分子系統解析を行うのが有効であると考えられるが,コアゲノム情報を用いた分子系統解析を容易に行えるツールは存在していなかった.そのため我々は *B. anthracis* の次世代シーケンス (next-generation sequencing: NGS) データをアップロードすると single nucleotide polymorphisms (SNPs) を抽出し, *B. anthracis* を含む *B. cereus* グループ中の系統的な位置関係を推定するウェブアプリケーション GcoGSA-BA (Global core Genome SNP Analysis for *Bacillus anthracis*) を開発した. GcoGSA-BA はコアゲノム系統解析だけでなく, pXO1, pXO2 といった病原性を規定するプラスミドや pXO1 上に存在する三つの炭疽菌毒素遺伝子 (lethal factor, LF; edema factor, EF; protective antigen, PA) を検出する機能も有しており,炭疽菌 (*B. anthracis* Ames Ancestor) ばかりでなく炭疽菌毒素遺伝子を例外的に保持している *B. cereus* G9241 の系統的な位置関係も正しく推定し,更に炭疽菌毒素遺伝子を検出することができた.本年度は GcoGSA-BA による情報解析で,炭疽菌を含むセレスウス属グループ全般の病原性因子の特定も可能になる改良を加えた.

2014 年の Dengue 熱感染症・国内発症例を契機に,輸入感染症による国内拡大にも注視すべき事情が生じ,2020 年東京オリンピック対策にも資する Dengue ウイルス遺伝型を可視化するツール Dengue Genograph Viewer (DGV) を構築した.多様な輸入感染症が国内例として散見されると想定され,恣意的なバイオテロのみならず, Dengue ウイルス等の外来ウイルスも検討課題として引き続きデータベース拡充を行っていく.

研究協力者

山下明史 (国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター)  
奥谷晶子 (国立感染症研究所・獣医科学部)

よび未知病原体をも検査対象とする網羅的解析法を構築することを目的としている.

A. 研究目的

未知病原体や変異病原体による新興感染症の汎発流行,そしてそれらを利用したバイオテロなどの危険性は近年社会的不安の一つとして認識されている.最先端技術を駆使した次世代ゲノムシーケンサーにより,今までは数年を要した全ゲノム解読が数週間で終了することが可能となった.最先端の革新技术を応用し,効率の良かつ安定的に病原体検査システムを運用する体制を整え,WHO 指定バイオテロ病原菌お

B. 研究方法

国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センターで構築した網羅的病原体検査法の情報解析のみをパイプライン化し,インタラクティブに誰でも利用できるソフトを開発した.詳細は研究結果を参照.

【倫理面への配慮】

該当なし

C. 研究結果

1) ネットワーク経由によるバイオテロ病原体検索のための解析システム

現在、感染研・ゲノムセンターにベンチトップ型・次世代シーケンサーと情報解析サーバーが整備されている。感染研に臨床検体が到着後、数日で解析・検査結果を報告できるようにはなっているものの、感染研に検体が送付されるまでには現場で数多くの微生物検査等が行われた後になってしまうケースが少なくない。このような現状の中、各地方自治体にも本研究課題で構築したシステムを導入して頂き、検査体制の一助となるのであれば非常に有効かつ迅速なバイオテロ対策に資するものと考えている。

炭疽菌が候補として浮上した場合、コアゲノム SNPs を利用した炭疽菌・菌株の類縁関係を推定するためのゲノムワイド SNPs 解析システム Global core genome SNP analysis for *Bacillus anthracis* (GcoGSA-BA)

を開発した。炭疽菌ゲノム 5.23 Mb 全体に渡り特徴的な塩基アレール 657,183 箇所を用いたゲノム分子系統樹を作成できる。従来の MLST 法では分解能が非常に悪く、由来特定に難渋した菌株においても高精度に分類することを可能にした。

現在、関係者のみ運用可能としている。GcoGSA-BA は、公開されている炭疽菌ゲノムと比較したゲノムワイド系統樹の生データまで作成し、適当な系統樹ビューワーで閲覧可能なデータのダウンロードを可能にする。炭疽菌は *Bacillus cereus* group に属し、セレウス菌との鑑別間違いを起こさぬよう、Lethal factor (LF), Edema factor (EF), Protective antigen (PA) の炭疽菌の病原性に必須な毒素因子の特定も可能にした。本年度は GcoGSA-BA による情報解析で、炭疽菌を含むセレウス属グループ全般の病原性因子の特定も可能になる改良を加えた(表 1)。

## 2) ウイルスの発生分布を遺伝型として地図上に図示化する

感染症のグローバルな伝播を把握するためには当該病原体の遺伝型を把握することが先決である。インフルエンザウイルス A(H1N1)pdm がほんの数ヶ月で世界中を駆け巡った事実は記憶に新しく、国立感染症研究所・椎野博士の報告によると、国内分離株のゲノム分子系統解析から 2009 年 5 月下旬には様々な防疫体制を超えて複数系統の A(H1N1)pdm が国内に侵入・伝播し、6 月にはパンデミック状況になっていたことが示された。本報告は病原体ゲノム情報に付随する疫学情報(時系列と地域)を十分に精査した点で特筆すべき解析結果であり、パンデミック状況を分子疫学の観点から考察した精度の高いトレーサビリティである。

アウトブレイクは元となる汚染源が必ずどこかに存在し、危機管理対応として被害を最小限に留めるために汚染源の特定は必須である。それ故、出来る限り病原体の遺伝型特定は行なっておきたい。海外か

らの来訪者が増えつつある日本において、2014 年夏のデングウイルスの国内症例を経験した今、病原体の由来特定は重要になってきている。そこで我々は公開データベースに登録されている全てのデングウイルス配列(1945 -2014 年)を収集し、分離国・地域と血清型および遺伝型としてデータベース化し Google Maps 上で表現できるよう作成した(図 1)。血清型 2 と 4 しか図には示していないが、一目瞭然、ある特定の遺伝型ごとに大陸によって生息分布が制限されている。そもそもデングウイルスは蚊媒介感染症であり、中間宿主の蚊の種類を生息域に制限されることが主要因であろう。このデータベースを有効に活用すれば、患者個々の感染デングウイルス株をゲノム情報として取得し、この Dengue Genograph Viewer (DGV) デング・データベース上で検索すれば最も近縁のデングウイルスを検出することができる。残念ながら、現在の公開配列データベースが完全に世界のデングウイルス情報を網羅しているわけではなく、今後、書庫としてのデータベースの更なる充実が期待される。

## D. E. 考察・結論

これまで分担研究として、WHO 指定バイオテロ病原体の配列データベース化を進めてきた。ゲノム情報を活用することにより有効なトレーサビリティに役立てる目的である。構築データベースを有効に活用するためには、迅速な解読リード配列の取得が望ましく、そのためには多くの難題が残っている。本年度の課題として、情報解析の NGS - MePIC - MEGAN - GcoGSA の解読・解析パイプラインの運用と公開を目指した。さらにデングウイルスの分離地域を図示化した Dengue Genograph Viewer を開発し、ゲノム配列を基盤にした分子疫学解析が由来特定にとって非常に有効であることが一目瞭然として理解される。NGS 解読において検査現場からのデータ転送等、迅速にゲノム比較解析を行うために未だ解消されていないボトルネックが残っているが、誰もが簡単に利用できるシステムが先行していけば、シーケンサー等のインフラ整備が後々追いついてくるものと考えている。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

- 1) 黒田誠 微生物ゲノミクスと公衆衛生学的活用 第 89 回日本感染症学会学術講演会 モーニングセミナー 2 京都 (2015.4)
- 2) 黒田誠 NGS 技術による病原体ゲノム情報の大量取得と分子疫学解析への応用 第 158 回日本獣医学会学術集会・シンポジウム 十和田市 (2015.9)
- 3) 黒田誠 NGS を応用した感染症診断の可能性 第

表1 GcoGSA-BA に追加した*Bacillus cereus* の病原性因子のリスト

Capsule genes	gene	product	locus_tag	Reference
cap operon	Bacillus anthracis str. 'Ames Ancestor' plasmid pXO2, complete sequence			
	capB	poly-gamma-glutamate synthase PgsB	GBAA_RS28250	
	capC	poly-gamma-glutamate biosynthesis protein PgsC	GBAA_RS28245	
	capA	capsule biosynthesis protein CapA	GBAA_RS28240	
	capD	capsular polysaccharide biosynthesis protein	GBAA_RS28235	
bpsX operon	Bacillus cereus G9241 plasmid pBC218 cont1893, whole genome shotgun sequence			Mol Microbiol. 2011 April ; 80(2): 455-470. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07582.x.
	pBC218_0073	glycosyl transferase group 2	NC13_RS05360	PNAS June 1, 2004 vol. 101 no. 22 8449-8454
	pBC218_0072	polysaccharide polymerase	NC13_RS05355	
	pBC218_0071	glycosyl transferase WecB/TagA/CpsF family	NC13_RS05350	
	pBC218_0070	hypothetical protein	NC13_RS05345	
	pBC218_0069	hydrolase/polysaccharide capsule synthesis protein	NC13_RS05340	
	pBC218_0068	hypothetical protein	NC13_RS05335	
	bpsX	LytR family transcriptional regulator	NC13_RS05330	
	bpsA	chain length determination	NC13_RS05325	
	bpsB	tyrosin protein kinase	NC13_RS05320	
	bpsC	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	NC13_RS05315	
	bpsD	glycosyl tranferase	NC13_RS05310	
	bpsE	sialic acid synthetase	NC13_RS05305	
	bpsF	UDP-N-acetylglucosamine 2 epimerase	NC13_RS05300	
	bpsG	CMP-sialic acid synthetase	NC13_RS05295	
	bpsH	polysaccharide translocase	NC13_RS05290	
	Bacillus cereus G9241 map unlocalized plasmid pBCXO1 cont1908, whole genome shotgun sequence			
has operon	hasA	presumed hyaluronan synthase	pBCXO1_0108	Mol Microbiol. 2011 April ; 80(2): 455-470. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07582.x.
	hasC	UDP-glucose-pyrophosphorylase	pBCXO1_0109	
	hasB	UDP-glucose dehydrogenase	pBCXO1_0110	
	Bacillus anthracis str. 'Ames Ancestor' plasmid pXO1, complete sequence			
	hasA	presumed hyaluronan synthase	GBAA_RS28975	
	hasC	UDP-glucose-pyrophosphorylase	GBAA_RS28980	
	hasB	UDP-glucose dehydrogenase	GBAA_RS28985	
<b>B. cereus virulence genes</b>				
	Bacillus cereus ATCC 14579 chromosome, complete genome			J. Bacteriol. June 2004, p. 3531-3538
enterotoxin	hblB	hemolysin BL binding component precursor	BC3101	
	hblA	hemolysin BL binding component precursor	BC3102	
hemolysin	hblC	hemolysin BL lytic component L2	BC3104	
	hblD	hemolysin BL lytic component L1	BC3103	
	nheA	non-hemolytic enterotoxin lytic component L2	BC1809	
	nheB	non-hemolytic enterotoxin lytic component L1	BC1810	
	nheC	enterotoxin C	BC1811	
	cytK	cytotoxin K	BC1110	
	enterotoxin1	enterotoxin / cell-wall binding protein, entFM	BC0813	
	enterotoxin2	enterotoxin	BC1953	
	enterotoxin3	enterotoxin / cell-wall binding protein	BC2952	
	enterotoxin4	enterotoxin / cell-wall binding protein	BC5239	
	hlyA	hemolysin A	BC4175	
	hlyII	hemolysin II	BC3523	
	hlyIII	hemolysin III	BC2196, BC5449	
	cerA	cereolysinA/phospholipaseC	BC0670	
	cerB	cereolysinB/sphingomyelin phosphodiesterase	BC0671	
	clo	cereolysinO/clo/perfringolysin O precursor	BC5101	
phospholipases	PI-PLC	phosphatidylinositol-specific phospholipaseC	BC3761	
proteases	ColB	collagenase	BC0556	
	Bacillus anthracis str. Ames chromosome, complete genome			J. Bacteriol. June 2004, p. 3531-3538
plcR	trunca plcR	pleiotropic transcriptional regulator	BA_5595	
	Bacillus cereus ATCC 14579 chromosome, complete genome			
	plcR	pleiotropic transcriptional regulator	BC5350	
	Bacillus cereus plasmid pBCE4810			BMC Microbiology 2006, 6:20 doi:10.1186/1471-2180-6-20
cereulide	cesA	cereulide synthetase A	gene 6845..17020	
	cesB	cereulide synthetase B	gene 17034..25079	

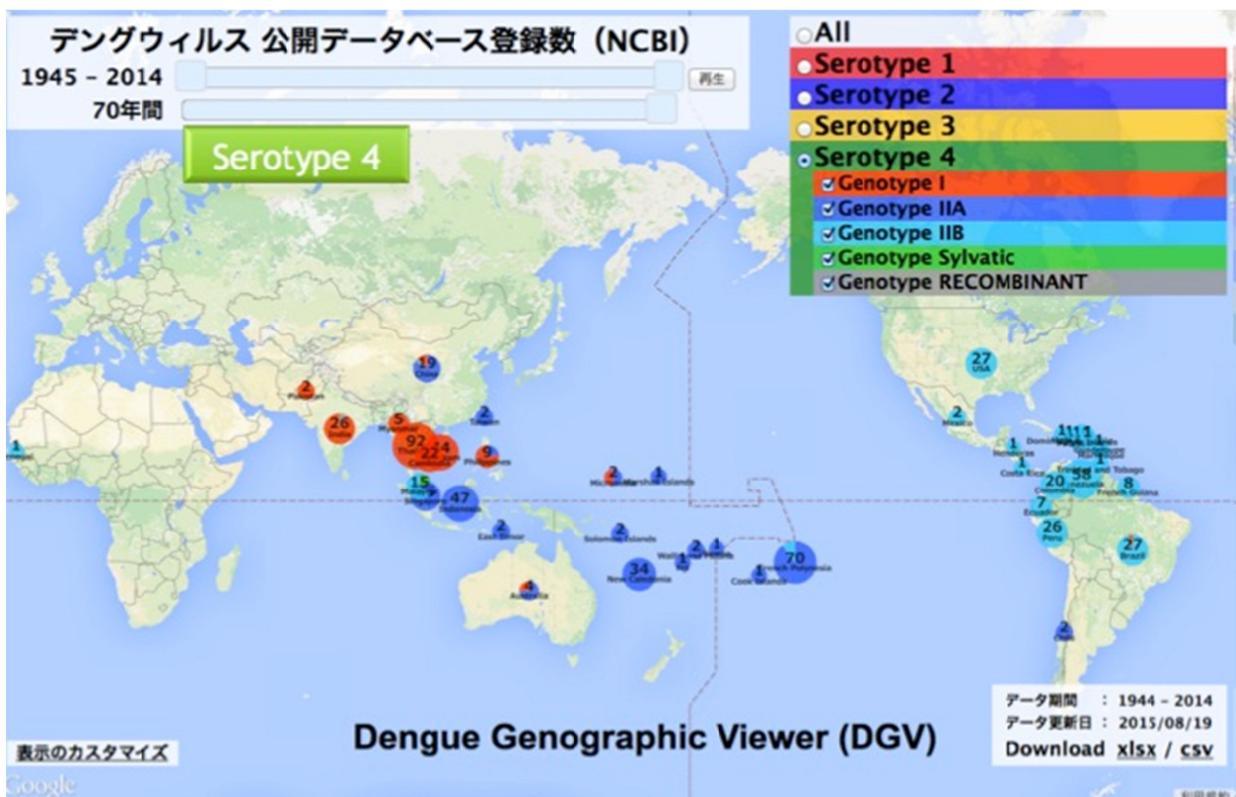
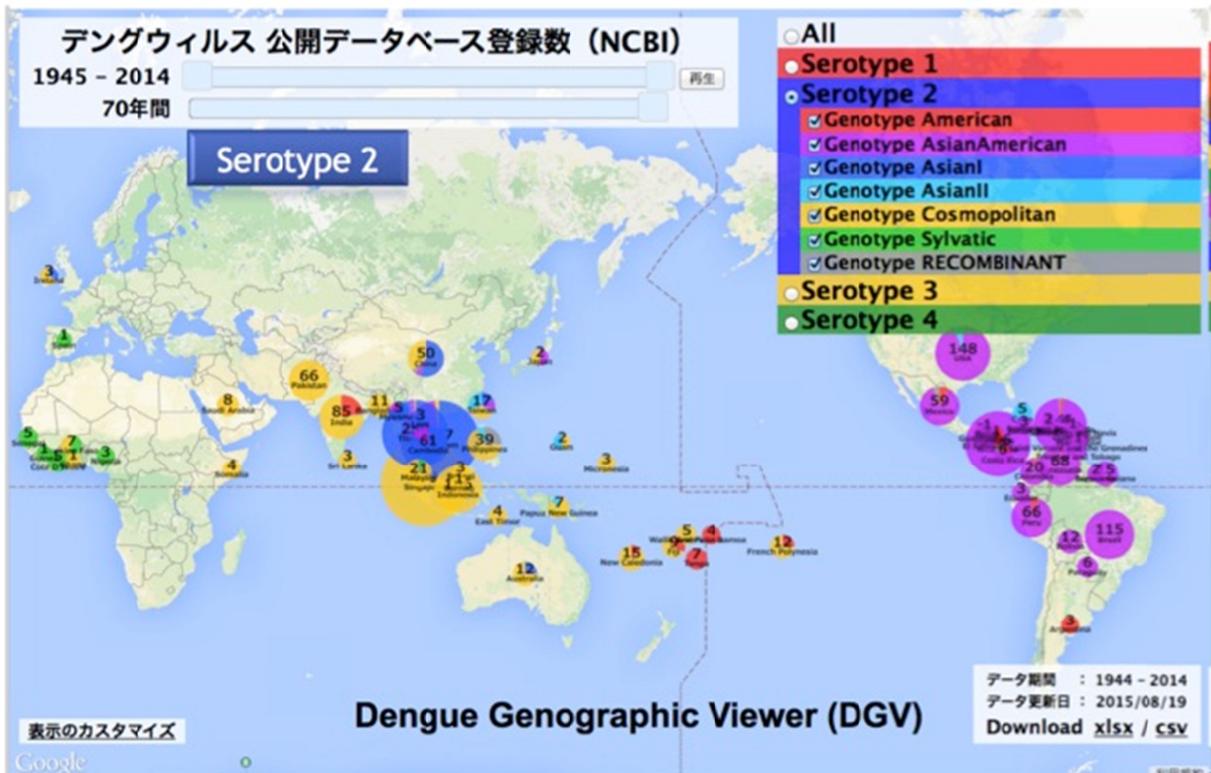


図1 デングウイルス配列(1945 -2014年)の分離国・地域と血清型および遺伝型データベース (図では血清型2, 4の遺伝型分布のみ表示)

分担研究報告書

病原体の病理学的検出法の確立

所属 国立感染症研究所・感染病理部

研究分担者 中島典子

研究要旨

組織切片上で病原体を検出する方法には病原体の蛋白抗原を検出する免疫組織化学と遺伝子核酸を検出する *in situ* hybridization (ISH) 法がある。免疫組織化学は安定した検出系となるが、あらたに特異的な抗体を作製しなければならない場合は時間を要し緊急対応は難しい。外来病原体遺伝子を次世代シーケンス法等により同定できるようになった近年、塩基配列情報に基づいて ISH 法用のオリゴヌクレオチドプローブを作成するのは容易である。我々は現在3種類のオリゴヌクレオチドプローブを用いた *in situ* ゲノム検出法を使用している。第一選択として我々が開発した高感度で特異性の高い *in situ* hybridization-AT tailing (ISH-AT) 法を用い、検出不可能の場合は、市販されている Z 型オリゴヌクレオチドプローブを用いた分岐プローブ-ISH 法である ViewRNA 法ないしは RNAscope 法を試行している。二重蛍光染色について ISH-AT 法, View RNA 法, RNAscope 法を比較検討した。

A. 研究目的

近年、病原体のゲノムをマルチプレックスリアルタイム PCR 法で検出する方法が開発されているが、複数の病原体ゲノムが同時に検出されることも多く、疾病の病態にかかわる主たる病原体を決定することが難しい。病巣の炎症に関与した主たる病原体を同定しその検出部位を明らかにするためには、生検ないしは剖検で採取した組織を病理学的に解析する必要がある。免疫組織化学や *in situ* 核酸検出法は組織切片上で病原体の検出ができる方法であり、病原体の体内分布や病変との関連を考えるうえで重要な病理学的解析法である。

バイオテロに使用される可能性のある病原体ゲノム等を検出する *in situ* 核酸検出法には、我々の開発した ISH-AT 法や市販の Z 型オリゴヌクレオチドプローブと分岐プローブを用いた ISH 法がある。これらは高感度で特異性の高い方法であり、緊急時の迅速病理学的病原体検出法の有力なツールとなる。なお、分岐プローブ ISH 法は現在 QuantiGene View RNA (Affymetrix 社, ベリタス社) と RNAscope (ACD 社, コスモバイオ) の 2 社から販売されている。後者では、HRP-DAB の発色が可能であり、より解像度の発色ができる。今回、特に二重蛍光染色法について ISH-AT 法と ViewRNA 法, RNAscope 法を比較検討した。

B. 研究方法

1) 材料

a) 病理組織標本

ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織を使用。ヒト剖検組織：パンデミックインフルエンザ A/H1N1pdm09 剖検肺組織。

b) プローブ

・ISH-AT 法用のプローブの作成：A/H1N1pdm 09

(AB538390.1)：NP 領域に 2 ヶ所。

・分岐 DNA-ISH 法のプローブの注文：A(H1N1)pdm 09 (AB538390.1) NP 部分に 20 ヶ所の混合プローブ。

c) 抗体

一次抗体は上皮細胞のマーカーである Epithelial cell Membrane Antigen (EMA) 抗原に対する抗体あるいはインフルエンザ NP 抗原を検出するポリクローナル抗体を用いた。二次抗体は Alexa488 抗ラビット IgG 抗体を用いた。

2) 方法

・ISH-AT 法

前処理法：抗原賦活液 (DAKO 社) 中で 95℃, 40 分膜透過処理を行い, Proteinase K (PK) (DAKO 社) 濃度を 0.1 μg/ml で 37℃ 15 分で処理。

・発色法：取り込ませた Biotin 分子を Alexa568-ストレプトアビジンと反応させた。

・分岐プローブ ISH 法

分岐 DNA-ISH 法は基本的に添付説明書に従ったが、ホルマリン再固定のステップは省略した。発色法として、アルカリフォスファターゼ Fast red の系と

Fluorescent(555)の系を使用した。

・蛍光二重染色法

ISH-AT 法ないしは分岐プローブ ISH 法でインフルエンザウイルスゲノムを蛍光 (Alexa568 あるいは Fast red/HNPP あるいは 555) で検出可能とした後, EMA 抗体あるいはインフルエンザウイルス NP 抗原に対する抗体を反応させこれを異なる蛍光色素 (Alexa488) で検出できるようにした。

【倫理面への配慮】

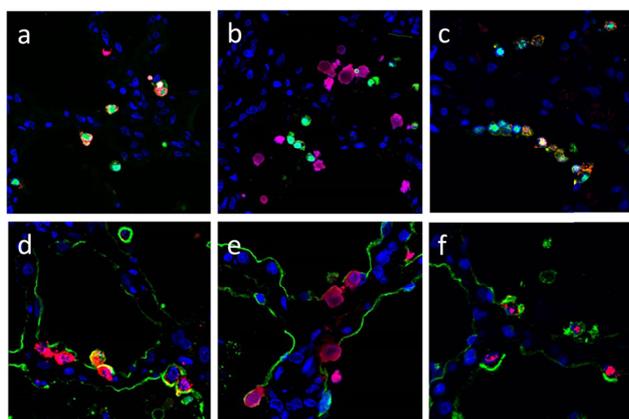
検討材料は剖検組織であり, 剖検時に使用の承諾が得られている。

C. 研究結果

組織上での co-localization(共在)を示すには蛍光二重染色を行った後, 共焦点レーザー顕微鏡で解析することが必要である。感染細胞を同定するために, *in situ* ハイブリダイゼーション法でウイルスゲノムを検出した後, 細胞マーカー蛋白あるいはウイルス抗原に対する抗体を用いた蛍光免疫組織化学で蛍光二重染色を行い, 感染細胞を同定する系を確立した。インフルエンザウイルス感染肺組織を用いた結果を示す(図1)。

図1. 二重蛍光染色

インフルエンザウイルスゲノム (ISH-AT 法, ViewRNA 法, RNA scope 法) とウイルス抗原, 上皮細胞抗原の免疫組織化学



- a: ISH-AT (Alexa568) x IHC (Flu) (Alexa488)
- b: ViewRNA (Fast Red/HNPP) x IHC(Flu) (Alexa488)
- c: RNA scope (555) x IHC (Flu)(Alexa488)
- d: ISH-AT (Alexa568) x IHC (EMA)(Alexa488)
- e: ViewRNA (Fast Red/HNPP) x IHC (EMA)(Alexa488)
- f: RNA scope (555) x IHC (EMA)(Alexa488)

ISH-AT 法と RNA Scope 法は蛍光二重染色が可能であった。View RNA 法においては Fast red/HNPP が免疫組織化学の抗体との結合を阻止している可能性があった。

D. 考察

View RNA 法ではホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織で使用可能な蛍光染色用キットがなく, 細胞標本用のキットを用いたが, 検出に至らなかったため Fast red/HNPP の蛍光色と merge することを期待して二重染色を行った。一方 RNA scope 法では FFPE 組織でも可能な蛍光染色キットがあるためこれを使用した。図に示したように Fast Red/HNPP deposit はその後の抗体の結合を阻害するため 2 つの蛍光色が merge せず共同在する分子に対して二重染色には適さないことが分かった。

E. 結論

バイオテロ対策の面からは, 大量の検体を処理しなくてはいけない場合も考えられ, 5 日でプローブ作製可能であることに加え, コストパフォーマンスの面で ISH-AT 法が優れている(図 2)。非常に少ないコピー数のゲノムを検出する際に限って, プローブ数の多い, 分岐 DNA-ISH 法である RNA scope 法の DAB 染色を試行する予定である。ベリタス社 (QuantiGene View RNA) よりもコスモバイオ (RNAscope ACD 社) が販売している。RNAscope 法のほうが感度がよく, FFPE 標本で蛍光二重染色が可能であることがわかった。また RNAscope 法では DAB 発色も可能であり, 染色標本の永久保存ができる点で使いやすい。

図2. オリゴプローブを用いた ISH 法の比較

	<i>in situ</i> hybridization AT-tailing	View RNA	RNAscope
合成プローブ納期	5-7日(自分で設計)	2~3週間	3~4週間
プローブの塩基長	40塩基	40塩基(公開)	40塩基(非公開)
プローブのデザイン			
混合プローブの数	2個	20個	20個
必要な塩基配列の長さ	40塩基 (GC%~60%)	100-1000塩基	100-1000塩基
プローブの価格	55000円(∞)	62000円(44回分)	200000円(20回分) 113000円(20回分)
検出	✓ALP-FAST RED(赤) ✓HRP-DAB(茶) ✓蛍光	✓ALP-FAST RED(赤) ✓HRP-DAB(茶)	✓ALP-FAST RED(赤) ✓HRP-DAB(茶) ✓蛍光
その他	試薬1500円/1反応	試薬5000円/1反応	試薬10000円/1反応

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Sakai K, Sekizuka T, Ami Y, Nakajima N, Kitazawa M, Sato Y, Nakajima K, Anraku M, Kubota T, Komase K, Takehara K, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Kuroda M, Takeda M. A mutant H3N2 influenza virus uses an alternative activation mechanism in TMPRSS2 knockout mice by loss of an oligosaccharide in the hemagglutinin stalk region. *J Virol.* ;89(9):5154-8, 2015.
- 2) Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Sato Y, Nakajima N, Koike S, Iwasaki T, Sata T, Yamashita T, Minagawa H, Taguchi F, Hasegawa H, Shimizu H, Nagata N Establishment of a panel of in-house polyclonal antibodies for the diagnosis of enterovirus infections. *Neuropathology* 35(2):107-21, 2015
- 3) 中島典子: 季節性および鳥インフルエンザウイルス感染症の病理 病理と臨床 2015,33 : 1146-1153.

### 2. 学会発表

- 1) Noriko Nakajima, Yuko Sato, Osamu Kotani, Tadaki Suzuki, Toshiaki Kamei, Toru Takahashi, Tetsutaro Sata, Hideki Hasegawa Modified *In situ* Hybridization AT-tailing to Visualize the Gene Expression in Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissues. 2015 USCAP Annual Meeting (アメリカ)2015
- 2) Kentaro Hayashi, Noriko Nakajima, Yuko Sato, Harutaka Katano, Noriyo Nagata, Tadaki Suzuki, Minoru Tobiume, Hiroshi Yoshida, Yoshio Suzuki, Toshio Kumasaka, Tetsutaro Sata, Kota Ariyoshi, Hideki Hasegawa Correlations among Histopathological Characteristics, Viral distribution, and Cytokine/Chemokine Expression level within an Individual with A/H1N1pdm09 induced ARDS. 2015USCAP Annual Meeting (アメリカ)2015
- 3) Noriko Nakajima, Hoang Ngoc Thach, Ta Anh Tuan, Dao Huu Nam, Toshio Kumasaka, Yuko Sato, Shoji Kawachi, Hideki Hasegawa, Tran Minh Dien, Le Thanh Hai Pathological and molecular biological study of measles-associated pneumonia during measles outbreak in Vietnam in 2014. *Pediatric Scientific Conference 2015 (ベトナム)*2015
- 4) Noriko Nakajima, Hoang Ngoc Thach, Ta Anh Tuan, Dao Huu Nam, Toshio Kumasaka, Yuko Sato, Shoji Kawachi, Hideki Hasegawa, Tran Minh Dien, Le Thanh Hai Post-mortem detection of adenovirus

type 7 pneumonia in lungs of measles-associated pneumonia fatalities in a pediatric hospital, Hanoi, Vietnam. U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program, (アメリカ)2016

- 5) 中島典子, 佐藤由子, 熊坂利夫, 藤本嗣人, 花岡希, 片野晴隆, 鈴木忠樹, 長谷川秀樹 麻疹に併発した肺炎で死亡した19例の肺組織の分子病理学的解析. 第104回日本病理学会総会, 名古屋 (2015.5)
- 6) 岩附研子, 中島典子, 柴田昌利, 高橋健太, 佐藤由子, 木曾真紀, 山吉誠也, 伊藤睦美, 塩谷聡子, 大竹正剛, 寒川彰久, 伊東祐孝, 長谷川秀樹, 河岡義裕 マイクロミニピッグのインフルエンザ感染モデル動物としての有用性. 第158回日本獣医学会学術集会 青森 (2015.9)
- 7) Noriko Nakajima, Thach Hoang Ngoc, Yuko Sato, Nozomu Hanaoka, Tsuguto Fujimoto, Tadaki Suzuki, Harutaka Katano, Hai Le Thanh, Hideki Hasegawa. Humann Adenovirus Serotype 7-associated pneumonia in fatal cases of measles 第63回日本ウイルス学会学術集会, 福岡 (2015, 11)
- 8) Makoto Takeda, Kouji Sakai, Yasushi Ami, Minori Kitazawa, Kastuhiro Nakajima, Sangsriratanakul Natthanant, Masaki Anraku, Noriko Nakajima, Katsuhiko Komase, Kazuaki Takehara, Hideki Hasegawa, Masato Tashiro A natural host model revealed the essential role of the host protease TMPRSS2 for respiratory paramyxovirus pathogenicity. 第63回日本ウイルス学会学術集会, 福岡 (2015, 11)
- 9) Kouji Sakai, Tsuyoshi Sekizawa, Yasushi Ami, Minori Kitazawa, Kastuhiro Nakajima, Noriko Nakajima, Masaki Anraku, Katsuhiko Komase, Kazuaki Takehara, Hideki Hasegawa, Masato Tashiro, Makoto Kuroda, Makoto Takeda The stalk oligosaccharide of influenza A virus hemagglutinin protein modulates protease specificity for virus activation and pathogenicity. 第63回日本ウイルス学会学術集会, 福岡 (2015, 11)

## G. 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



分担研究報告書

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  
研究分担者 永田典代

研究要旨

オルソポックスウイルス感染症の重症化の宿主側要因を明らかにすることを目的とする。昨年度に引き続き、サル痘ウイルスのマウス感染実験系の基礎検討を行った。BALB/c マウスに2種類のサル痘ウイルスを皮下接種したところ、感染成立を示唆する所見が得られた。そこでこの感染系を利用し、抗 Ly6G 抗体投与による好中球枯渇マウスに対する感染実験を行った。その結果、好中球枯渇のための抗体投与方法の改良が必要であることがわかった。引き続き検討を進めている。

研究協力者

鈴木忠樹, 岩田奈織子, 佐藤由子, 片岡紀代, 原嶋綾子, 長谷川秀樹(国立感染症研究所感染病理部)  
福士秀悦, 高崎智彦, 吉川智城, 西條政幸(国立感染症研究所ウイルス第一部)  
小谷治(国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター)

A. 研究目的

サル痘ウイルスは、ポックスウイルス科オルソポックスウイルスに属し、アフリカ中央部から西部に分布するガンビアンラットなどのげっ歯類を宿主としている。愛玩動物としてアフリカから輸入されたげっ歯類からの感染事例が2003年に米国にて報告されており、免疫抑制状態のヒトでは天然痘類似の全身性疾患(ヒトサル痘)を引き起こす。われわれは、劇症型サル痘の発症機序を明らかにする目的で、サル痘ウイルス実験的感染カニクイザルの死亡例2頭と回復サル2頭の病態病理を解析した。その結果、劇症型では免疫中枢組織における強い壊死を伴う病変形成が、病態に大きく関与することが推察された(Nagata *et al.*, 2014)。劇症型サル痘発症の要因は、脾、免疫不全状態、特に骨髓低形成による好中球低下症が関連していると推察された。そこで、好中球の重症化における役割を明らかにするために、サル痘ウイルスのマウス感染実験系の基礎検討を行ったところ、マウスは無症状で耐過したが感染を示唆する所見が得られた。そこで、今年度は、この感染系を利用し、抗 Ly6G 抗体投与による好中球枯渇の感染後の影響について検索を行った。

B. 研究方法

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、Monkeypox virus 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、半日後にウイルス液(一匹あたり  $10^6$  PFU ウイルス量/100  $\mu$ 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、4 日に 1 回の間隔で合計 3 回の抗体投与を行った。ウイルス接種 7 日目には、一群あたり 4 匹を過麻酔殺し、心臓採血と病理解剖を行った。残りの個体(一群 6 匹)については、臨床症状と体重変化を 16 日間観察した。観察期間終了後、いずれの個体も過麻酔殺し、心臓採血と病理解剖を行った。採取した血液は、ヘパリンを添加し、採血当日に動物用血球計数装置 ベトスキャン HM II(Avaxis 社)で白血球数、リンパ球数、単球数、顆粒球数を測定し、比較した。

【倫理面への配慮】

(倫理面への配慮)本動物実験は、国立感染症研究所の動物実験委員会に承認された実験計画に従って行った。

C. 研究結果

体重変化、皮膚所見、臨床症状の点で、いずれの群も明らかな病変は認められなかった(図 1)。しかしながら、接種 7 日目の末梢血中の白血球数は、好中球枯渇-非ウイルス接種群に比べ、好中球枯渇-ウイルス接種群では顆粒球数は高値であった(図 2)。さらに、接種 16 日目には好中球枯渇-ウイルス接種群

でリンパ球と顆粒球の増加により白血球数は有意に高値を示した。

また、接種7日目の病理学的解析の結果、好中球枯渇-ウイルス接種群で副腎の皮質壊死がみられ、病変部に一致してウイルス抗原が陽性であった(データは示さない)。4匹中4匹の肺にわずかな炎症性細胞浸潤を認めたが、ウイルス抗原は陰性であった。

#### D. 考察

サルに対して強い病原性を発揮する、2つのサル痘ウイルス臨床分離株は、BALB/c に対して感染性を有するが、明らかな病原性を発揮しなかった(昨年度報告書)。今回は、2つのサル痘ウイルス臨床分離株のうち、マウスに白血球減少を引き起こした Zr-599株を使用した。接種7日目の好中球枯渇-非ウイルス接種群において顆粒球は低値であったことから、非感染マウスにおいて抗体投与による好中球枯渇の効果はあったと考えられる。しかしながら、同日の好中球枯渇-ウイルス接種群の顆粒球数は、ウイルス感染群と同程度であったため、ウイルス感染により、抗Ly6G 抗体の枯渇効果は減弱したようにみえるので、抗体投与に関して改良が必要と考えられた。一方で、好中球枯渇-ウイルス接種群で副腎の皮質壊死がみられたことから、好中球枯渇群では皮下接種後にウイルス血症が成立したことが示唆された。接種16日目の好中球枯渇-ウイルス接種群で白血球数は有意に高値であり、それは主にリンパ球数と顆粒球数の

増加によるものであった。以上のことから本動物感染モデルにおいて、感染初期の好中球枯渇が病態になんらかの影響を与えた事が示された。好中球枯渇のための抗体投与方法の改良を行い、引き続き検討を進める。

#### E. 結論

BALB/c マウスのサル痘ウイルス皮下感染モデルを利用し、感染初期の好中球枯渇がウイルス動態と免疫応答に影響を与える事を示した。感染モデルの改良を行い、引き続き検討を進める。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Nagata N, Iwata-Yoshikawa N, Hayasaka D, Sato Y, Kojima A, Kariwa H, Takashima I, Takasaki T, Kurane I, Sata T, Hasegawa H. The pathogenesis of 3 neurotropic flaviviruses in a mouse model depends on the route of neuroinvasion after viremia. J Neuropathol Exp Neurol. 74(3):250-260,2015.

##### 2. 学会発表

該当なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

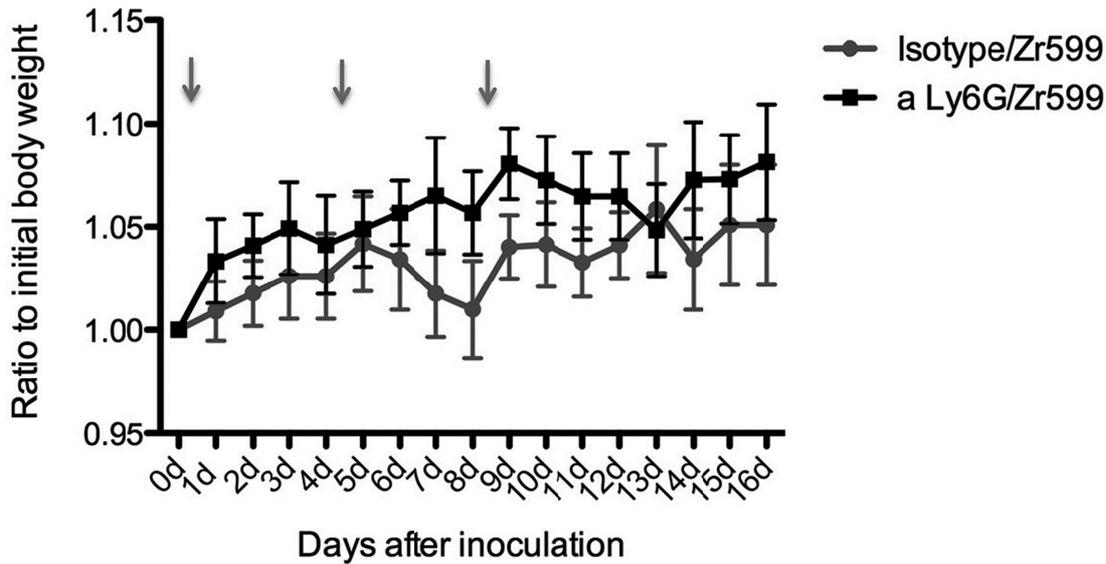


図 1 サル痘ウイルス皮下接種後の好中球枯渇群(a Ly6G/Zr599)および対照群(Isotype/Zr599)マウスの体重変化. 各群 n=6. 各群間で有意差はみられない.

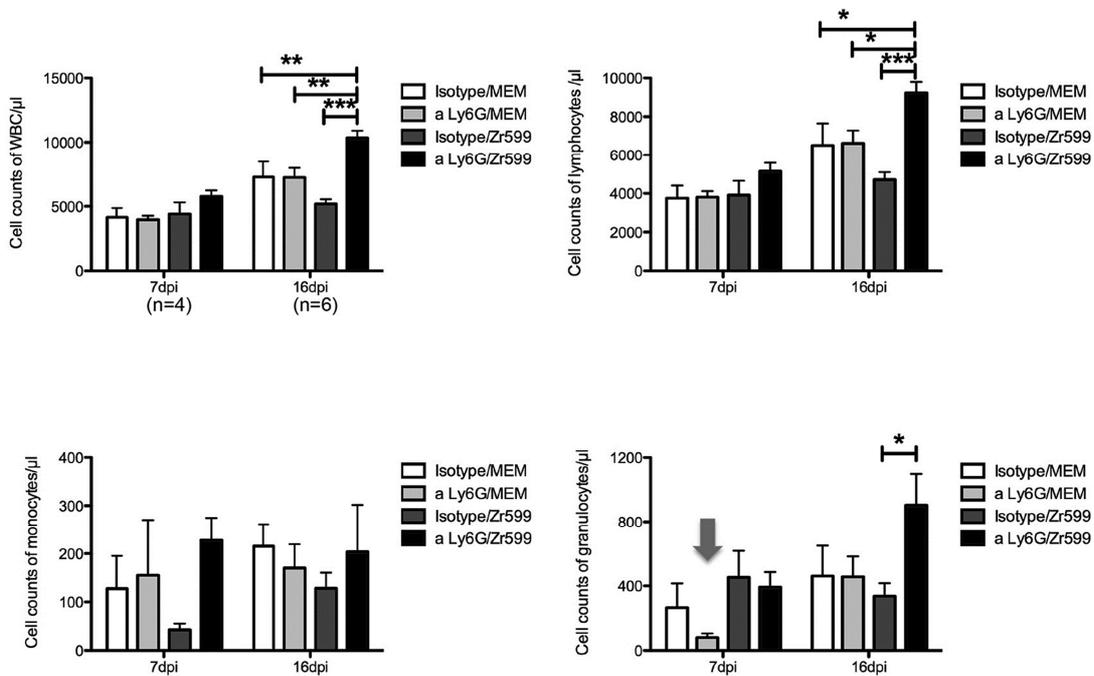


図 2 サル痘ウイルス皮下接種後 7 および 16 日目の血球数の比較. 各群 n=4 または 6. 接種 7 日目の好中球枯渇-非ウイルス接種群(a Ly6G/MEM)において顆粒球は低値であり, 抗体の効果はみられているものの, 同日の好中球枯渇-ウイルス接種群(a Ly6G/Zr599)では, ウイルス感染群(Isotype/Zr599)群と同等であった. さらに, 接種 16 日目には好中球枯渇-ウイルス接種群(a Ly6G/Zr599)で白血球数は有意に高値であり, それは主にリンパ球数と顆粒球数の増加によるものであった.



分担研究報告書

病原体の電子顕微鏡学的迅速検出法の確立

所属 国立感染症研究所感染病理部

研究要旨

バイオテロに使用される可能性のある病原体等を中心として電子顕微鏡を用いた病原体の迅速検出法の確立を目的とする。今年度は、検出感度と精度を向上するための改良法の一つとして、電子顕微鏡検索のためのサンプルの濃縮方法について Global Health Security Action Group Laboratory-Network の活動の一環である、GHSAG Wet-Lab Workshop on Diagnostic Electron Microscopy of Pathogens, Winnipeg 2015 (平成 27 年 9 月 24, 25 日 National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canada 主催)に参加し実習した内容について報告する。

研究協力者

岩田奈織子, 片岡紀代, 長谷川秀樹(国立感染症研究所 感染病理部)  
西條政幸(国立感染症研究所ウイルス第一部)  
森川茂(国立感染症研究所 獣医科学部)  
小谷治(国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター)

A. 研究目的

透過型電子顕微鏡による病原体の検出方法は迅速性、簡便性に優れ、スクリーニングによる包括的な鑑別診断が可能という点でバイオテロ対策や新興・再興感染症のウイルス学的診断の一助となる。本研究では、バイオテロに使用される可能性のある病原体等を中心とした電子顕微鏡を用いた迅速検出法の確立を目的として、1. BSL2, 3 および 4 の病原体に十分対応するための電子顕微鏡学的検査法の標準手順の見直し, 2. ウイルス・細菌の迅速検出法に必要なレファレンス標本の作製, 見直しと改善, 3. 検出の感度・精度を向上するための改良法の 3 点を課題としている。今年度は、検出感度と精度を向上するための改良法の一つとして、電子顕微鏡検索のためのサンプルの濃縮方法について Global Health Security Action Group Laboratory-Network の活動の一環である、GHSAG Wet-Lab Workshop on Diagnostic Electron Microscopy of Pathogens, Winnipeg 2015 (平成 27 年 9 月 24, 25 日 National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canada 主催)に参加し実習した内容について報告する。なお、本ワークショップは、バイオテロリストによるバイオ攻撃や感染症の病原体の電子顕微鏡的迅速診断法に携わる専門家の技術訓練、技術の向上、危機的状況における安全かつ迅速で電子顕微鏡学的診断評価の正確  
研究分担者 永田典代

B. 研究方法 永田典代

電子顕微鏡による検査において、目的の粒子が少ない場合のサンプルの濃縮法 (Beniac DR et al., 2014) を実習した。

まず、ポリカーボネートフィルター (SPI-Pore Standard Polycarbonate Track Etch filter, SPI Supplies, PA, USA) を準備し、フィルターユニット (Millipore 13 mm Swinnex) に装着する。10 µl~50 ml までの液量のサンプルを 5 mL のシリンジに充填し、準備したフィルターユニットに連結する。ただし、サンプルの液量が少ない場合は 2 mL 以上のリン酸緩衝液あるいは生理食塩水に懸濁し、増量する。シリンジ内に充填したサンプルをシリンジポンプ (1,000 µl/分) で濾過し、フィルターユニット内のポリカーボネートフィルターに粒子をトラップする。なお、シリンジポンプで濾過する際には、シリンジを垂直、フィルターは水平に設置する。

使用するフィルターの孔径は対象とする病原体の大きさによって、次のように選択する。

0.1 µm (レプトスピラ, エボラウイルス)

0.08 µm (ワクチニアウイルス)

0.03 µm (ヘルペスウイルス, バクテリオファージ)

また、透過電子顕微鏡用サンプル作製の場合、フィルター上に親水化処理済みのカーボン支持膜 200 メッシュ銅グリッドをのせ、フィルターユニットに装着し、濾過する。走査電子顕微鏡用サンプルの場合は、濾過後に粒子がトラップされたポリカーボネートフィルターをおよそ 9 mm 角にカットし、観察に用いる。

【倫理面への配慮】

(倫理面への配慮) 該当なし

C. 研究結果

実習のために準備されたサンプルには、グルタールアルデヒド固定済みのワクチニアウイルスあるいはレプトスピラが含まれていた。本法を利用する事によ

て、 $5 \times 10^3$  粒子数/1 検体のものから病原体を検出する事ができた。作業に要する時間は 30 分程度であった。ただし、ワクチニアウイルスを含むサンプルには、同程度の大きさ(およそ 500 nm)の夾雑物が含まれていたため、走査電子顕微鏡観察によるウイルス粒子と夾雑物の判別は困難であり、熟練者による指導が必要であった。同じサンプルを用いて、ネガティブ染色法を用いた透過型電子顕微鏡検査では、ウイルス粒子の表面構造が明瞭に観察され、夾雑物との判別は用意であった。一方で、レプトスピラを含むサンプルでは、ネガティブ染色法を用いた透過型電子顕微鏡による検出は全く不可能で、濃縮法と走査電子顕微鏡観察の組み合わせによってはじめて検出する事が可能であった。

#### D. 考察

Beniac DR *et al.* 2014 によれば、今回のフィルターを利用した濃縮法を用いる事に寄って、 $5 \times 10^3$  粒子数/1 検体( $10^2$  粒子/ml)のものから病原体を検出する事が可能である。標準的な電子顕微鏡観察法では、一般にサンプル中の粒子数が  $10^6$  粒子/ml であれば検出が可能とされているが、濃縮法を用いることで、その検出感度を 1000 倍以上高める事ができた。その場合、走査型電子顕微鏡の方が広範囲の面積をスクリーニングできるという利点があり、また、レプトスピラのような大型のバクテリアの場合、本法と走査電子顕微鏡観察の組み合わせは非常に有用であると考えられた。一方で、ウイルス粒子の場合は、その表面構造や内部構造を詳細に観察できる透過型電子顕微鏡法を用いることで鑑別精度が増すことが改めて理解された。本濃縮法に必要な材料は、すべて日本でも入手可能で、フィルターはアイソポア、ポリカーボネート製で代用できる。

本ワークショップは、世界健康安全保障イニシアティブ各国および組織が対象であり、今回は主催者の他、ドイツ、UK、メキシコ、日本の公衆衛生関係の機関とカナダ国内の別の機関(Canadian Food Inspection Agency)から、電子顕微鏡を用いた感染症診断に関わる専門家(各機関 1-2 名、合計 7 名、主催者側 5 名とそのスタッフ 5 名)が参加した。これまではドイツ Robert Koch 研究所が主催していたが、施設の移転のため第 5 回目の今回は、カナダでの初の開催となった。前回までは、透過型電子顕微鏡を用いたネガティブ染色による診断法を主に実習してきたが、今回は、走査電子顕微鏡を使用した粉末状のサンプル解析も同時に実習しそれぞれの利点、欠点を理解することができた。なお、この研究所で使用している走査電子顕微鏡は高病原性病原体対応のため、グローブボックス内に改良された小型の電子顕微鏡を設置したもので、世界に唯一である(Beniac DR *et al.*, 2015)。

#### E. 結論

病原体の電子顕微鏡学的迅速検出法に必要な、目的粒子が少ない場合のサンプルの濃縮法を習得した。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
該当なし
2. 学会発表  
該当なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

分担研究報告書  
地方衛生研究所におけるバイオテロ対応に関する研究

所 属 堺市衛生研究所  
研究分担者 小林和夫

**研究要旨**

地方衛生研究所(地衛研)におけるバイオテロ対応の現状と課題について、「1. 現行の国立感染症研究所(感染研)病原体検出マニュアル」、「2. 新規検査マニュアルの整備の必要性」、「3. 地方衛生研究所全国協議会 6 支部の支部内連携構築, 支部内連携から広域・全国ネットワークの構築」、「4. 地衛研と感染研の連携強化」の視点から, 課題を抽出し, 課題に対し方策や改善などを検討した。その結果, 多くの課題が抽出されたが, これら課題の改善には地衛研, 各支部内, 地衛研全国協議会, 感染研および厚生労働省の理解や連携が重要である。2015 年度に改善した事項として, 改正感染症法(特に, 病原体サーベイランスなど感染症に関する情報の収集体制が強化)の施行も関連し, 病原体検出マニュアルの整備, 標準作業手順書の作成, 地衛研全国協議会感染症対策部会員の増員などがあつた。特定病原体等に規定されている細菌毒素(ボツリヌス毒素や志賀毒素)に関する独立した検出マニュアルは未整備であり, これらの整備は今後の課題である。現代社会において世界中でテロ行為が頻発している。日本は第 42 回先進国首脳会議(2016 年), 第 9 回ラグビーワールドカップ(2019 年), 夏季オリンピック・パラリンピック(2020 年)などの大きな行事を控え, バイオテロも含めテロ対策を準備・強化する必要がある。バイオテロは突発的で緊急を要する健康危機管理対応であり, 平時から対応の準備・構築が強く望まれる。

研究協力者

山形県衛生研究所長(北海道・東北・新潟地区)  
水田克巳  
秋田県健康環境センター 上席研究員(北海道・東北・新潟地区)  
八柳潤  
埼玉県衛生研究所 副所長兼感染症室長  
(関東・甲・信・静岡地区)  
岸本剛  
愛知県衛生研究所長(東海・北陸地区)  
皆川洋子  
堺市衛生研究所 検査担当総括研究員(近畿地区)  
内野清子, 杉本光伸  
山口県環境保健センター所長(中国・四国地区)  
調恒明  
岡山県環境保健センター所長(中国・四国地区)  
岸本壽男  
愛媛県立衛生環境研究所長(中国・四国地区)  
四宮博人  
愛媛県立衛生環境研究所 ウイルス科長(中国・四国地区)  
山下育孝  
福岡県保健環境研究所副所長(九州地区)  
千々和勝己

A. 研究目的

バイオテロ対応において医療機関や地方衛生研究所(地衛研)は診療や原因物質(感染病原体や毒素など)の特定で最前線となることが想定される。本分担研究は地衛研における特定病原体等([http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-1090-0000-Kenkoukyoku/hyou150521\\_1.pdf](http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-1090-0000-Kenkoukyoku/hyou150521_1.pdf))に規定されている原因物質(感染病原体や毒素など)を中心として, これらの特定に関する課題を抽出し, 課題解決の方策や改善を目的とした。

B. 研究方法

地衛研における感染症対策は地衛研全国協議会感染症対策部会を中核として活動していることから, 全国 6 地区支部(北海道・東北・新潟地区, 関東・甲・信・静岡地区, 東海・北陸地区, 近畿地区, 中国・四国地区, 九州地区)の部会員を研究協力者と構成した。

各研究者に 4 項目(下記)から前年度に抽出した課題に関し, 改善状況を調査した。

1. 現行の国立感染症研究所(感染研)病原体検出マニュアル
2. 新規検査マニュアルの整備の必要性
3. 地方衛生研究所全国協議会 6 支部の支部内連携構築, 支部内連携から広域・全国ネットワークの構築
4. 地衛研と感染研の連携強化

倫理面への配慮

本研究は意見聴取型調査研究であり, また, 患者

など研究対象者は包含せず、倫理面に問題ないと判断した。また、利益相反はなかった。

## C. 研究結果

### 1. 現行の感染研病原体検出マニュアル(表1, 2)

本研究の主題であるバイテロに関連する特定病原体等 ([http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/hyou150521\\_1.pdf](http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/hyou150521_1.pdf)) の検出方法に関し、地方衛生研究所で検査に主として使用する感染研病原体検出マニュアルの前年度に抽出した1 - 3) 課題と改善状況を調査した。

1) 感染研の online 病原体検出マニュアル (<http://www.nih.go.jp/niid/ja/labo-manual.html>) でリンク不全

特定病原体が関与する3類感染症や5類感染症の全てが記載・リンクが整備され、改善した。1類(クリミア・コンゴ出血熱、痘瘡、南米出血熱、ラッサ熱)、2類(結核、中東呼吸器症候群、鳥インフルエンザH7N9)、多くの4類感染症に関し、記載・リンクが未整備であった(表1)。

2) 改訂年月日や照会先の記載

改訂年月日や照会先の記載も重症呼吸器感染症やコレラなどで改善が見られた。

3) 細菌毒素(ボツリヌス毒素や志賀毒素)

特定病原体等に記載されている毒素単独については依然未記載であった(表2)。

### 2. 新規検査マニュアルの整備の必要性(表3)

1) 痘瘡はバイオテロで発生が最も危惧され、米国疾病管理予防センター(CDC)のCategory Aに分類されている

([http://fas.org/biosecurity/resource/documents/CD C\\_Bioterrorism\\_Agents.pdf](http://fas.org/biosecurity/resource/documents/CD C_Bioterrorism_Agents.pdf))。痘瘡発生の際、皮疹など症状が類似している水痘との鑑別が問題となるため、整備が必要である。水痘ウイルス(ワクチン株を含む)の病原体検出マニュアルは整備され、改善した。しかし、痘瘡は依然として未整備であった。

2) ボツリヌス毒素検出はボツリヌス症に記載されているが、志賀毒素遺伝子検出は腸管出血性大腸菌感染症に記載されているが、毒素蛋白は未収載である。細菌毒素に関する独立した検出マニュアルは未整備であった。

3) 地衛研で実施する可能性の高い4類感染症(日本紅斑熱やウエストナイル熱など)は未整備であった。

### 3. 地方衛生研究所全国協議会6支部の支部内連携構築、支部内連携から広域・全国ネットワークの構築(表4)

1) 2015年度から地方衛生研究所全国協議会の感染症対策部会員を1名増員し、6支部全てから部会員を選出した。

2) 地方衛生研究所全国協議会理事会や総会及び

地研ネットワーク等で支部間の連携・情報共有を図った。

3) 感染研の病原体検出マニュアルの充実・改訂を要望した。

4) いくつかの支部において厚生労働科学研究や地域ブロック研修会などを通じ、技術共有を図った。

### 4. 地衛研と感染研の連携強化(表5)

1) 特定病原体に限らず、地衛研と感染研の共同研究や連携は不断に行われた。

2) 精度管理の視点から、国内標準である感染研と地衛研の連携が強化された。

3) 個人として地衛研職員が感染研に転出した事例はあったが、組織の関与(人事の交流制度)はなかった。また、感染研から地衛研の転出はほとんどなく、現場と中枢の相互人事交流が望まれる(考察)。

4) 地衛研から感染研に依頼した行政検査で迅速化が図られた。

5) 感染研と地衛研の連携による標準作業手順書(SOP)(案)作成過程で感染研の支援や幹部等による連携が強化された。

## D. 考察

地衛研は地方衛生行政の科学的・技術的中核機関(健発 0731 第8号、厚生労働省健康局長、平成24年7月31日)であり、業務と機能は1)試験検査、2)調査研究、3)研修・指導、4)公衆衛生情報の収集・解析・発信、5)健康危機管理対応、6)衛生行政施策に資する科学的根拠の提供である。地衛研におけるバイオテロ対応として、上述の1) - 6)が該当し、加えて、広域性であり、国と連携が求められる。

地衛研におけるバイオテロ対応の現状と課題について、「1. 現行の感染研病原体検出マニュアル」、「2. 新規検査マニュアルの整備の必要性」、「3. 地方衛生研究所全国協議会6支部の支部内連携構築、支部内連携から広域・全国ネットワークの構築」、「4. 地衛研と感染研の連携強化」の視点から、課題の抽出や解決策を探索し、改善状況についてアンケート調査を実施した(表1. - 5.)。

前年度に抽出された多くの課題に関し、地方衛生研究所、地方衛生研究所全国協議会および国立感染症研究所が真摯に取り組み、改善が認められた。

未克服の主要な課題として、

1) 改正感染症法の施行に備え、特定病原体のみならず、病原体検出マニュアルの更なる整備

2) 特定病原体等に規定されていないが、米国CDCは植物毒(リシン)や細菌毒素(*Clostridium perfringens* 由来イブシロン毒素)に関し、バイオテロの候補物質(Category B)として掲げている。所管や検出マニュアルの整備

3) 地方衛生研究所と国立感染症研究所の相互人事交流などが揚げられる。

課題の解決には各地衛研のみならず，地方自治体や国レベルの連携，理解や支援（財政，人的，技術，情報など）が望まれる。

現代社会において世界中でテロ行為が頻発している。我が国は第42回先進国首脳会議（2016年），第9回ラグビーワールドカップ（2019年），夏季オリンピック・パラリンピック（2020年）などの大きな行事を控え，バイオテロも含めテロ対策を準備・強化する必要がある。テロは突発的で緊急を要する健康危機であり，平時から対応を準備・構築することが求められる。

#### E. 結論

- バイオテロ対応において地衛研の課題を抽出し，改善状況を検証した。
- 地衛研と感染研の連携は向上し，バイオテロのみならず，より良い感染症対策に資することが期待できる。
- 課題の克服には各地衛研のみならず，地方自治体や国レベルの連携，理解や支援（財政，人的，技術，情報など）が望まれる。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Adachi, Y., T. Onodera, Y. Yamada, R. Daio, M. Tsuji, T. Inoue, K. Kobayashi, T. Kurosaki, M. Ato, and Y. Takahashi. 2015. Distinct germinal center selection at local sites shapes memory B cell response to viral escape. *J. Exp. Med.* 212: 1709-1723. doi:10.1084/jem.20142284
- 2) Kitada, S., K. Yoshimura, K. Miki, M. Miki, H. Hashimoto, H. Matsui, M. Kuroyama, F. Ageshio, H. Kagawa, M. Mori, R. Maekura, and K. Kobayashi. 2015. Validation of a commercial serodiagnostic kit for diagnosing pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 19: 97-103. doi: 10.5588/ijtld.14.0564
- 3) 小林和夫. 2015. マイコバクテリウム属(抗酸菌). 標準微生物学 第12版(中込 治, 神谷 茂 編) 東京: 医学書院. 276-288. ISBN: 978-4-260-02046-6

##### 2. 学会発表

特記事項なし。

#### 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。

表1. 感染研の病原体検出マニュアルで記載やリンクがない特定病原体による感染症\*

一類感染症	BSL	特定病原体	4類感染症	BSL	特定病原体
クリミア・コンゴ出血熱	4		ウエストナイル熱		
痘瘡	4		黄熱		
南米出血熱	4		オムスク出血熱		
ラッサ熱	4		オウム病		
			キャサヌル森林熱		
2類感染症			Q熱		
結核	3		サル痘		
MERS	3		重症熱性血小板減少症候群		
			腎症候性出血熱		
鳥インフルエンザ(H7N9)	3		西部ウマ脳炎		
3類感染症(全て記載及びリンク済み)			ダニ媒介性脳炎		
			日本紅斑熱		
			ベネズエラウマ脳炎		
			発疹チフス		
			リフトバレー熱		
			ロッキー山紅斑熱		
			5類感染症(全て記載及びリンク済み)		

\*2016年01月21日現在 (<http://www.nih.go.jp/niid/ja/labo-manual.html>)

表2. 現行の国立感染症研究所病原体検出マニュアルの課題および改善した事項

課題	改善した事項
<ul style="list-style-type: none"> <li>● バイオテロ対象病原体について、検出マニュアルの整備</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 1類(クリミア・コンゴ出血熱, 痘瘡, 南米出血熱, ラッサ熱), 2類(結核, 中東呼吸器症候群, 鳥インフルエンザ H7N9), 多くの4類感染症に関し, 記載・リンクが未整備であった。しかし, 特定病原体が関与する3類感染症や5類感染症の全てが記載・リンクが整備され, 顕著に改善した。</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>● 有無・最終改訂年月日のリスト</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 改訂年月日や照会先の記載も重症呼吸器感染症やコレラなどで改善が見られた。</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>● 細菌毒素(ボツリヌス毒素や志賀毒素)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● ボツリヌス毒素検出はボツリヌス症に記載されているが, 志賀毒素の遺伝子検出は腸管出血性大腸菌感染症に記載されているが, 蛋白毒素は未収載である。</li> </ul>

**表3.新規検査マニュアルの整備の必要性**

問 題 点	改善した事項
● 水痘ウイルスは特定病原体でないが、天然痘と鑑別診断を要するため、マニュアル整備	● 水痘ウイルスの病原体検出マニュアルは整備され、改善したが、痘瘡は未整備である。
● 感染症法改正の施行に伴い、病原体サーベイランスなど感染症に関する情報の収集体制が強化される(2016年4月以降)ため、特定病原体のみならず、感染症法に規定された疾患に関し、検査マニュアル	● 3類感染症や5類感染症の全てが記載・リンクが整備され、また、標準作業手順書(SOP)のひな形が提示された。
● 細菌毒素の検査マニュアル	● 表2に記載した通り。
● 地衛研で実施する可能性の高い日本紅斑熱やウエストナイル熱に関する検査マニュアル	● 未収載・未改善

**表4.地方衛生研究所全国協議会 6支部の支部内連携構築、支部内連携から広域・全国ネットワークの構築**

課 題	改善した事項
● 的確な技術伝承と人材育成が不十分	● いくつかの支部で厚生労働科学研究や地域ブロック研修会などを通じ、技術共有を図った。
● 地方衛生研究所全国協議会の感染症対策部会の強化	● 地衛研全国協議会の感染症対策部会員を1名増員し、6支部全てから部会員を選出した。
● 異なる支部間の連携構築	● 地衛研全国協議会理事会や総会及び地衛研ネットワーク等で支部間の連携・情報共有推進した。
● 感染研の病原体検出マニュアルの充実・改訂を要望	● 感染研は真摯に対応し、顕著に改善した。

**表5.地衛研と国立感染症研究所の連携強化**

課 題	改善した事項
● 地衛研と感染研の精度管理や共同研究の推進	● 検査の精度管理や標準作業手順書(SOP)(案)作成など、持続・有機的連携を構築できた。
● 相互の人事交流の活発化	● 個人として地衛研職員が感染研に転出した事例はあったが、組織の関与(人事の交流制度)はなかった
● 感染研の行政検査成績書が地衛研に返送されるまで長期間(例:数か月)を要することがあり、迅速化	● 検査項目・担当官に依るが、地衛研から感染研に依頼した行政検査で迅速化が図られた



厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業  
(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)

分担研究報告書

細菌性バイオテロに対する迅速同定法・診断法およびワクチンの開発

所属 国立大学法人帯広畜産大学動物・食品検査診断センター

研究分担者 倉園久生

研究要旨

2001年にアメリカで起こった炭疽菌芽胞を使ったバイオテロにより、生物兵器による無差別攻撃に速やかに対応し、安全・安心な社会を構築することが求められている。危険病原体による感染症の蔓延を防ぐ技術開発も危機管理体制の強化の一つとして急務の課題である。本研究では細菌性バイオテロに焦点をあて、危険病原体およびその毒素の迅速同定法・診断法および予防法としてワクチンの開発研究と、広く社会に還元することを目的として研究を遂行する。

協力研究者

江崎孝行 国立大学法人岐阜大学 医学部

川本恵子 国立大学法人帯広畜産大学 動物・食品検査診断センター

A. 研究目的

2001年9月11日の米国ニューヨーク世界貿易センタービルへの航空機テロ後に、炭疽菌芽胞混入郵便物によるバイオ(生物)テロが起こり、世界的に関心が高まった。わが国では「白い粉」による多数の摸倣事件が起こり、その後、2004年の「国民保護法」の制定、2006年の感染症法改正による「特定病原体等」の管理などをはじめとした内閣危機管理室を中心として関係省庁で対応体制が構築されてきた。病原体等の入手と取扱いそして迅速診断・同定法に関する科学的情報は、バイオテロの脅威に対抗する上で、当初より管理ないし制限されてきた。一次対応機関で用いる検査キットの多くはブラックボックス状態で使用せざるを得ない状況にある。病原体等の由来を知るには塩基配列の情報が必要であるが十分公開されていない。対応のアルゴリズムは米国や英国の関連機関からも公表されているが、わが国の実情に即したものを、わが国独自に開発

していくことが必要となる。バイオテロは病原体等が散布されて患者発生までに潜伏期があり、稀な疾患であるため、早期検知には一次医療機関の医師等への臨床診断支援が必須で、環境中および患者検体から原因病原微生物の迅速な検出と同定、かつ確認のために患者の血清抗体検査や病原体等の分離同定が必要となる。BSL4病原体以外は地方衛生研究所や国立感染症研究所の設備で可能である。さらに病原体の由来を知るためには塩基配列の解析とデータベースが重要である。現在までに多くの病原体等(毒素を含む)の迅速診断法を開発し、臨床診断支援のマニュアルやバイオテロ対応ホームページを作製した。またプロトタイプの網羅的迅速診断法も開発した。しかし病原体の入手が困難なことから特異性の検討は十分とはいえず、鑑別診断とその普及および検査ネットワーク整備に問題を残している。ホームページの活用には、画像が有力な情報となるがいまだ少なく、疾患の追加、治療法や除染法を含めた内容のアップデートそして実際の対応体制の整備も不十分である。当分担研究班では、バイオテロ関連病原体等の迅速診断検査、抗体検査、病原体分離同定法、特に特定病原体等の中の細菌性感染症を中心として、網羅的な検出・検

査法を確立し、広く社会に還元することを目的として研究を遂行する。

対象として各種ウイルス、リケッチア、細菌、毒素等のバイオテロに使用される可能性がある病原体が想定されるが、特に炭疽菌は芽胞としての安定性、乾燥や熱に対する抵抗性、比較的簡単に培養ができることなどから生物兵器の最有力候補として常に注目をあびてきた。炭疽菌は危険度レベル3に属する細菌で、他にペスト、鼻疽/類鼻疽、野兔病、結核、チフス、ブルセラが細菌としてこのレベルに入る。その中で、生物兵器として使用可能なものは炭疽以外にペスト、鼻疽/類鼻疽、野兔病、チフス、ブルセラが想定されるが、検査法や治療法、さらには診断法がまだ確立されていない菌種は鼻疽/類鼻疽、野兔病、ブルセラである。そこで、本研究では、危険度を考慮して炭疽菌の検出法の更なる改良・開発、および鼻疽/類鼻疽、野兔病、ブルセラ症などの危険度3に属する病原体に対する検出・診断法の確立及び治療・予防法の開発や改良を行い、患者検体および環境中からの迅速な検出および診断法の開発を行う。診断法の実用化に当たっては事件発生現場での利用が可能な方法と、検査室における方法の両面からの実用化を目指す。さらに、種々の化学物質および薬剤に対する病原体の感受性に関する検討を行い臨床利用に備える。また、従来のワクチンを基盤とした免疫誘導能が高いワクチンの開発を検討する。

生物テロの発生を予防することが最も基本であることは間違いないが、生物テロが発生した場合、いかに被害を最小限に抑えるかが何よりも重要である。被害を低減するには、バイオテロ発生をできるだけ早く検知すること、散布生物剤を正確に迅速に同定することが求められる。さらに、発生現場や患者対応を行う医療施設などの汚染区域の早急な機能回復のためには適切な除染が必要となる。除染とは、消毒や滅菌などにより微生物を受容可能なレベルまで減少させ、使用可能な状態にすることである。適切な除染は患者対応、2次被害の拡大防止、汚染現場の早期復旧に極めて重要である。昨年度はテロ発生後の除染活動を念頭に、これまでに臨

床検体からの迅速検出を目的に開発した検査法を環境検体からの検出へと応用できるよう、環境検体のなかでも病原体の検出が特に困難とされる土壌検体を用いて検体処理法の改良を行った。

本年度はバイオテロに利用される可能性の高い5種類の細菌性病原体(炭疽菌、野兔病菌、ブルセラ菌、ペスト菌、類鼻疽菌)の迅速遺伝子検出系を作成し、25分で遺伝子を増幅し、DNA-Chromatography法で増幅産物を約5分で識別する野外仕様の検出系を完成させた。

細菌毒素に関しては、CDCの生物兵器に使われる可能性の高い蛋白毒素であるボツリヌス毒素(Btx, カテゴリーA)、コレラ毒素(CT)とLT(カテゴリーB: Enteric Pathogens)、黄色ブドウ球菌のエンテロトキシン(SEA&SEB, カテゴリーB: Enteric Pathogens)及びTDH(カテゴリーB: Enteric Pathogens)等に対する免疫学的迅速同定法を確立して検査・診断マニュアルを作成し、その普及を目的としている。研究対象の細菌毒素は食中毒の原因となるため検査キットが市販されているものもあるが、本研究では食品を用いたバイオテロに対する網羅的迅速同定法を国産で供給できるような体制作りを目的とする。本年度はA型ボツリヌス毒素、TDH及びTRHを精製してそれぞれに対する家兔抗血清を作製した。

## B. 研究方法

### B-1. バイオテロに利用される可能性の高い5種類の細菌性病原体(炭疽菌、野兔病菌、ブルセラ菌、ペスト菌、類鼻疽菌)の迅速遺伝子検出系の作成

#### 検出遺伝子の選択:

細菌性病原体の検出系を作成する場合、菌種を検出する遺伝子と病原因子の遺伝子を検出する系の2つの標的が必要になる。菌種を検出遺伝子は株の間で安定して保存されている必要がある。16S rRNA 遺伝子のような多型の少ない配列は菌種内の株では多型が少なく、配列はよく保存されているが、類縁菌の間でも保存されており、菌種の識別に特異 PCR primer を設計するのは困難である。そこ

でこの目的には 16S rRNA 遺伝子より約 10 倍の多型がある house keeping gene である *dnaJ* 遺伝子を使用した。DnaJ 遺伝子は菌種間の識別に有効な配列を多く保有しているが、同一菌種内の株の間での多型はほとんどないので菌種の検出に適しているが、分類学上の不備で識別できない類縁種がある。例えば *Bacillus anthracis* には 16SrRNA 遺伝子配列が全く同じ、3 つの菌種 (*B. thuringiensis*, *B. mycooides*, *B. cereus*) があり、*dnaJ* でも明確に識別できない。そこで *B. anthracis* を明確に識別するにはこの菌種が保有する病原因子、浮腫因子、防御因子、致死因子を顕出する方法が必要になる(表 1)。野外仕様型の検出系には菌種を漏れなく検出する *dnaJ* 遺伝子と病原因子を併用した。病原因子は菌種内の株で保有の有無が異なることから、病原因子検出 primer と菌種検出 primer を両方同時に検出する系が必要になる。環境中、特に土壌には *B. anthracis* と同じ 16SrRNA 遺伝子および *dnaJ* 配列を保有する *B. thuringiensis*, *B. mycooides*, *B. cereus* が高頻度に常在しているので *B. anthracis* の検出には *dnaJ* は使用しなかった。

カクテル primer の作成:

菌種と病原因子を検出し、識別可能なカクテル primer を作成した。表 1 の各 primer の下流の 5 末端には 5 種類の補足用 Tag を準備した。上流側 primer には共通に biotin を標識した。

屋外仕様の Quick Mobile(QM)の作製:

4 つの検体を同時に増幅できる 1.7kg の軽量の PCR 機器を Thermogen 社 (長野)に依頼し、作製した(図 1)。この機器は屋外仕様のため電源としては AC adaptor (100-240V 仕様)、車のタバコで電源、さらにリチウム電源の 3 つを選択できる。PCR tube は low profile tube を採用し、増幅時間は標準 25 分で終了できる。専用の Program card を挿入し、屋外では one touch 操作で program が始動するように迅速化が図られている。使用するカクテル primer は PCR tube に乾燥して準備してあり、使用時には煮沸した試料 5ul と室温保存で数週間は安定して増幅

に使用できる 2xTaq premix 試薬を 5ul 加え、合計 10ul の反応液で増幅するようにした。

DNA クロマトと判定方法:

カクテル核酸増幅産物を識別するため、ニトロセルロース濾紙に anti-tag を print した DNA クロマト濾紙(図 2)を TBA 社(仙台)に依頼し、作成した。カクテル増幅産物に Avidin を固定した青ラテックスを 10ul 加え、約 5 分で DNA クロマト上にプリントしてある anti-tag と反応した PCR 産物が青色のラインとして見えてくる。

## B - 2. バイオテロに利用される細菌毒素に対する免疫学的迅速同定法の確立

TDH と TRH の精製とモルモット抗血清の作製:

前年度までに構築した TF-TDH 及び TF-TRH 発現大腸菌 BL21(DE3) 株は、至適条件下で発現誘導を行った。リコンビナントタンパク質の発現に使用したベクターは、可溶化タグ TF の他に His タグも内蔵している。したがって、得られた培養液から His タグ精製及び電気的溶出によって TF-TDH あるいは TF-TRH を精製した。精製タンパク質は、モルモット(オス、9 週齢)1 匹ずつに免疫して抗血清の作製を試みた。

BoNT/A<sub>Hc</sub> 精製とモルモット抗血清の作製:

BoNT/A<sub>Hc</sub> は大腸菌内で His-TF タグ融合タンパク質 (His-TF-BoNT/A<sub>Hc</sub>) として発現させ、SDS-PAGE 及びウエスタンブロットングにより確認した。リコンビナントタンパク質の精製は、His タグ精製と電気的溶出法によって行った。得られた精製タンパク質は、モルモット(オス、9 週齢)1 匹に免疫して抗血清の作製を試みた。

## C. 研究結果

C - 1. バイオテロに利用される可能性の高い 5 種類の細菌性病原体(炭疽菌、野兔病菌、ブルセラ菌、ペスト菌、類鼻疽菌)の迅速遺伝子検出系の作成

標準株を用いた迅速遺伝子検出系の評価:

作成した primer を GTC で保有する菌株とモンゴル国立研究所 National Center for Infectious Disease with National foci. の保有株で検証を行った。 *Brucella* 菌の基準株 *B.melitensis*NCTC 10094, *B.abortus*NCTC 10093, *B.canis*ATCC 23365 および, GTC 保有で使用している *B.abortus* の血清型 20 株は OMP および *dnaJ* の遺伝子で全て陽性であった。 *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* の基準株 strain B-38, および, わが国で分離され, GTC で保存されている *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* 85 菌株は全て, *dnaJ*, *fopA*, および *tu4* が陽性であった。 GTC 保有の基準株 *Yersinia pestis*NCTC 5923, モンゴルで保有の野生株およびロシアのワクチン株で行った。基準株およびロシアのワクチン株の *pla* 遺伝子は陰性, 野生株 2 株は *pla* 遺伝子及び *dnaJ* 遺伝子はいずれも陽性であった(図 3)。類縁菌の *Yersinia pseudotuberculosis* 基準株 JCM 1676 株は *pla* 遺伝子陰性であるが, *dnaJ* は陽性であった。 *Bacillus anthracis* は GTC 保有株で評価した(表 2)。病原性プラスミッドを脱落させた GTC3P0882, GTC 3P0883, 及び GTC3P0884 はそれぞれの病原因子が欠損していた。ワクチン株 GTC3P1524 は 3 つの病原因子を保有していた。モンゴル国立研究所保有株でも同様の検証を実施した(図 4)。

*B. anthracis*, *F. tularensis*, *B. melitensis*, 及び *Y.pestis* の基準株を使用したスパイク実験では, いずれも 1,000 から 5,000cfu/ml の菌液を 3 分間の煮沸後, 濃縮せず, そのまま 5ul を PCR に使用すれば DNA-クロマト法で増幅産物を検出-確認できる感度があることを確認した。

モンゴルの汚染地域の土壌を用いたスパイク実験: 炭疽菌に汚染されたモンゴルの土壌をサンプリングし *B. anthracis* の protective antigen の検出を試みた。2013 年に炭疽で死亡した牛で汚染された土壌が隔離されており, 動物が立ち入らないように汚染地区を鉄線で囲ってあった(図 5)。この土壌から分離を試みた。土壌 25g を 10 倍量の蒸留水に懸濁,

一夜室温に置いたのち, 上澄みから核酸を抽出したが, 病原因子は検出されなかった。さらに土壌をモンゴルで使用されている peptone-meat broth に入れ, 一夜増菌培養した培地の上澄みから分離を試みたが, 炭疽菌の病原因子は検出されなかった。この方法の検出感度を調べるため, 汚染領域以外のモンゴルの代表的な通常土壌をあらかじめ検疫所の許可を得て国内に持ち帰った。これらの土壌に炭疽菌のワクチン株を加えてスパイク実験を行い検出感度を測定した。

土壌 250g を 10 倍量の 2250ml の peptone-meat broth に加え, 10 分割し, 病原因子を保有する炭疽菌ワクチン株を  $1.2 \times 10^6$  cfu/ml から  $1.2 \times 10^2$  cfu/ml を 1ml ずつ, スパイクした。24 時間培養後, 上澄み 1ml を採取し, 微量卓上遠心機で 12,000g で 3 分間遠心, 上澄みを廃棄後, 200ul の蒸留水に沈渣を懸濁, 100 度で 3 分間煮沸し, その 5ul を遺伝子増幅に使用した。  $1.2 \times 10^2$  cfu をスパイクした培養液から炭疽菌の病原因子を全て検出できたため, この方法で 25g 中に 1 個の炭疽菌が存在すれば検出できると予測した。

## C - 2. バイオテロに利用される細菌毒素に対する免疫学的迅速同定法の確立

TDH と TRH の精製とモルモット抗血清の作製:

TF-TDH 及び TF-TRH を精製し, 得られた精製タンパク質をモルモットに免疫し血清を回収した。抗体価の評価は, オクタロニー法によって実施した。その結果, TF-TDH は十分な抗体価の上昇が認められたのに対し, TF-TRH は十分な抗体価の上昇が認められなかった(図 6, 図 7)。

BoNT/A<sub>Hc</sub> 精製とモルモット抗血清の作製:

His-TF-BoNT/A<sub>Hc</sub> を精製し, 得られた精製タンパク質をモルモットに免疫し血清を回収した。抗体価の評価は, オクタロニー法によって実施した。その結果, His-TF-BoNT/A<sub>Hc</sub> は十分な抗体価の上昇が認められた(図 8)。また, 通常モルモットの免疫スケジュールは, 初回免疫の後, 2 週間間隔で 4 回の追加免疫とされているが, 今回の免疫においては

追加免疫2回目実施後の時点で十分な抗体価の上昇が認められた。

#### D. 考 察

##### D - 1. バイオテロに利用される可能性の高い5種類の細菌性病原体(炭疽菌, 野兔病菌, プルセラ菌, ペスト菌, 類鼻疽菌)の迅速遺伝子検出系の作成

標準株を用いた迅速遺伝子検出系の評価:

構築した迅速遺伝子検出系を岐阜大学とモンゴル獣医学研究所の多種の保存株を用いて検証した結果, いずれも 1,000 から 5,000cfu/ml の菌液を3分間の煮沸後, 濃縮せず, そのまま 5ul を PCR に使用すれば DNA-クロマト法で増幅産物を検出-確認できたことにより実際のバイオテロ事例でも十分に応用可能であると考えられる。

モンゴルの汚染地域の土壌を用いたスパイク実験: モンゴルの汚染土壌を用いて行ったスパイク実験では, 1.2 cfu をスパイクした培養液から炭疽菌の病原因子を全て検出できたため, この方法で 25g 中に1個の炭疽菌が存在すれば検出できることが分かった。この感度は実際のバイオテロ事例でも十分に応用可能であると考えられる。

##### D - 2. バイオテロに利用される細菌毒素に対する免疫学的迅速同定法の確立

TDHとTRHの精製とモルモット抗血清の作製:

今回実施したモルモットへの免疫スケジュールにおいて, ICの作製に使用可能なレベルの抗体価を示す抗TDH血清が得られた。一方, 抗TRH抗体は得られなかったため, 免疫スケジュールや使用するモルモットの週齢等, 各種免疫条件を検討し, 再度免疫を実施する。抗TDH同様, 抗TRH抗体が得られた際には, それらの抗体を用いたTDHあるいはTRHに特異的な免疫学的検査法の構築を目指す。

BoNT/A<sub>Hc</sub>精製とモルモット抗血清の作製:

今回用いた精製His-TF-BoNT/A<sub>Hc</sub>を抗原に使用し, モルモットに免疫を実施した結果, ICの作製に使用可能なレベルの抗体価を示す抗BoNT/A<sub>Hc</sub>血清が得られた。今回実施した免疫方法によって, 通常よりも早い段階で抗血清が得られた一方, モルモットの生育が伴っておらず, 期待される血清の半分程度の血清量しか得られなかった。したがって, 再度同様の免疫方法によってモルモットを免疫し, 今後の抗体精製に十分な量の血清が得られるように試みる。

#### E. 結 論

1. 構築した迅速遺伝子検出法は実際のバイオテロ事例にも応用可能と考えられる。
2. 検出系に使用出来る程度の抗体価を示す抗TDH血清が得られた。
3. 検出系に使用出来る程度の抗体価を示す抗BoNT/A<sub>Hc</sub>血清が得られた。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nakano M, Yamasaki E, Moss J, Hirayama T, Kurazono H: Study of the stn protein in salmonella; a regulator of membrane composition and integrity. *Methods Mol Biol.* 2015;1225:127-138.
- 2) Yamasaki E, Yamada C, Jin X, Nair GB, Kurazono H, Yamamoto S.: Expression of marA is remarkably increased from the early stage of development of fluoroquinolone-resistance in uropathogenic *Escherichia coli*. *J Infect Chemother.* 2015 Feb; 21(2):105-109.
- 3) Nakashima S, Yura H, Tomonaga M, Harada T, Hara A, Hara S, Nakano M, Yamasaki E, Sakamoto N, Ishimatsu Y, Isomoto H, Gochuico R B, Suffredini A F, Mukae H, Kurazono H, Hirayama T, Moss J, Kohno S: Identification of *Helicobacter pylori* VacA in Human Lung and its

- Effects on Lung Cells. BBRC 460 (3): 721-726, 2015.
- 4) Masuda K, Yamamoto S, Kubota K, Kurazono H, Makino S-I, Kasuga F, Ijimi S, Asakura H.: Evaluation of the dynamics of microbiological quality in lightly pickled napa cabbages during manufacture. *J. Food Safety*, doi: 10.1111/jfs.12195, 2015.
- 5) Asakura H, Kawamoto K, Murakami S, Tachibana M, Kurazono H, Makino S, Yamamoto S, Igimi S.: Ex vivo proteomics of *Campylobacter jejuni* 81-176 reveal that FabG affects fatty acid composition to alter bacterial growth fitness in the chicken gut. *Research in Microbiology* 2015 *In press*.
- 6) Eiki Yamasaki , Masanori Watahiki , Junko Isobe , Tetsutaro Sata , G. Balakrish Nair and Hisao Kurazono.: Quantitative Detection of Shiga Toxins Directly from Stool Specimens of Patients Associated with an Outbreak of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Japan—Quantitative Shiga toxin detection from stool during EHEC outbreak. *Toxins*, 2015, 7, 4381-4389; doi:10.3390/toxins7104381112
- 7) Asakura H, M Tachibana, M Taguchi, T Hiroi, H Kurazono, S-I Makino, F Kasuga, S. Igimi: Seasonal and growth-dependent dynamics of bacterial community in radish sprouts. *Journal of Food Safety*. 2015. *In press*
- 8) Li HM, Hiroi T, Zhang Y, Shi A, Chen G, De S, Metter EJ, Wood WH 3rd, Sharov A, Milner JD, Becker KG, Zhan M, Weng NP. TCR repertoire of CD4+ and CD8+ T cells is distinct in richness, distribution, and CDR3 amino acid composition. , *J Leukoc Biol*. 2015 Sep 22. pii: jlb.6A0215-071RR. [Epub ahead of print]

H . 知的財産の出願・登録状況  
特になし

厚生労働科学研究補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業  
(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)

分担研究報告書

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

研究分担者 鯉淵智彦

研究要旨

生物テロに関連する疾患について、インターネット上で最新の情報を得ることを目的とした『バイオテロ対応ホームページ』に関して情報の妥当性・正確性を確認した。今後は医療従事者のみならず、一般公開も検討すべきと考えられたため、課題の洗い出しと具体的な対応策を検討した。さらに、バイオテロ診断支援の一環として行った国内の地方衛生研究所に対する検査可能疾患の状況調査(アンケート)を詳細に解析したところ、一部の病原体に関しては検査可能施設に限られるなどの問題点が挙げられた。今後の国内の検査体制をいかに整備していくかが重要な課題である。

研究協力者

菊地正 東京大学医科学研究所附属病院  
松本哲哉 東京医科大学 微生物学講座

な施策を洗い出し、新たな支援方法を開発することも目的とする。

A. 研究目的

バイオテロに用いられる可能性のある病原微生物は多彩で、その多くは重篤な疾病を引き起こす。中には一般の医療従事者にはほとんど診療経験のない病原体も含まれ、例として炭疽菌や2014年に西アフリカで流行したエボラウイルス病などが挙げられる。感染拡大防止と生命予後改善のためには、生物テロ関連疾患の臨床診断、検査材料および検査方法の選択、治療法の選択について、多くの医療従事者が正確な知識を、インターネットなどを通じて手軽に得られることが重要な対策の一つとなる。本研究においては、これまでに各疾患の情報を入れたCD-ROMを作成・配布したり、専門家の意見を取り入れたりしながらホームページの修正とアップデートを行ってきた。今後とも新たな情報を追加してより内容を充実させ、有用なホームページを公開することを目的とする。また、これらの研究を通じて今後のバイオテロ対策に必要

B. 研究方法

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。

また、昨年度に行ったバイオテロ診断支援に関する地方衛生研究所における検査可能疾患のアンケート調査結果をより詳細に解析し、新たなバイオテロ対策支援方法の開発を行う。

【倫理面への配慮】

特になし

C. 研究結果

ホームページに対しては昨年度に総論部分の見直しとデング熱およびエボラウイルス病のアウトブレイクに関する情報を加えた。今年度は新たなアウトブレイクの発生はほとんど見られず、関連情報の変更や修正が必要な箇所は限られていた。

そこで今後のホームページのあり方を十分に検討した結果、限られた医療従事者だけが閲覧出来る状況よりも、将来的には一般公開が望ましいと考えられたため、課題の洗い出しとその対策を検討した。最大の課題はサイバー攻撃であるが、セキュリティの専門家との意見交換を行い、必要十分な対応策を取ることは可能と判断した。その他、アクセス集中時の対策などいくつかの課題に対する具体策を検討し、一般公開に向けての目処を立てた。また、バイオテロ診断支援の一環として国内の地方衛生研究所等に対して施行した状況調査(アンケート)を詳細に解析し、一部の病原体に関しては検査可能施設に限られることが判明した。さらに陽性検体の不足している施設が存在することも明らかとなった。

#### 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、広い見識を有する感染症専門家からの知見を加えながら常に最新の情報を提供してきた。この目的はある程度達成されつつあり、今後はより広く医療従事者以外にも情報を提供すべき段階にあると考えられる。しかしながらサイバー攻撃への対応、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、これらの課題に対しては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ことになった場合、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。

国内の検査施設との連携も重要な課題である。バイオテロに関連する事態は国内のあらゆる場所で発生しうる。各検査施設の現状把握を目的として全国の地方衛生研究所にアンケート調査を行い、99%という高い回答率を得た。MERS コロナウイルス、SFTS ウイルス、インフルエンザウイルスなどは80%以上の施設で検査可能であったが、一部の病原体に関しては検査可能施設に限られていた(表1)。このアンケート調査により、陽性検体の不足による精度管理の問題や、検査のための研修を希望している施設もあるなど国内の現状を把握することができた。これらの結果をもとに今後の検査体制をいかに整備してゆかが課題と思われる。

#### E. 結論

国際的なテロリズムの拡大が懸念されるなか、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う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充実は今後とも継続していく必要がある。

またバイオテロ疑い事例に対する国内の検査体制の現状を把握し、支援体制を継続して整備していくことが不可欠である。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
発表なし
2. 学会発表  
発表なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表 1. 10-50%の施設で検査可能な病原体

種別	病原体または毒素	CDC(2000)
二種	野兔病菌	A
二種	ペスト菌	A
二種	ボツリヌス毒素	A
三種	鼻疽菌	B
三種	類鼻疽菌	B
三種	発疹チフスリケッチア	B
三種	ブルセラ属菌	B
三種	Q熱コクシエラ	B
三種	ロッキー山紅斑熱リケッチア	
三種	多剤耐性結核菌	
三種	狂犬病ウイルス	
四種	オウム病クラミジア	B
四種	黄熱ウイルス	
四種	インフルエンザウイルス(H2N2)	
その他	サキシトキシン	
その他	T-2マイコトキシン	
その他	アフラトキシン	



分担研究報告書  
各医療機関のバイオテロ対策を支援するための方策

研究分担者 松本哲哉  
東京医科大学微生物学分野 教授

研究要旨

近年、国際情勢の変化に伴い、テロの脅威が深刻化してきている。今後、国内でも各種の世界的な行事が予定されており、テロ対策の充実是不可欠である。医療機関は特にバイオテロに対する対応を迫られる可能性が高いが、現時点では準備が十分になされたとは言えず、ほとんど手つかずの医療機関も多く認められる。その背景には医療機関向けのバイオテロ対策の指針等が示されておらず、具体的に何をすれば良いのかが明確になっていない状況があると考えられる。そこで本研究では国内の医療機関向けにバイオテロ対策のガイドラインを作成することを主な目的としている。昨年度はバイオテロにおける最も重要な疾患のひとつである炭疽に焦点をあて、各論の一部を作成した。今年度は個々の病原体にかかわらず広く対応できるようにすることを目指して、総論部分の案を作成した。

A. 研究目的

世界の政情が不安定な状況において、テロ行為のリスクは高まっている。海外では各地でテロが起こっており、日本でも伊勢志摩サミットやオリンピックなどテロのターゲットとなりやすい行事が予定されていることから、テロに対する対策を十分に行っておく必要がある。ただし一般的にテロの中でもバイオテロに対する関心はやや低い傾向にあるため、その対策は遅れがちであると考えられる。そこで、本研究においては、各医療機関が今後、バイオテロに対する準備を行う上で必要なガイドラインを作成することを目的にしている。

B. 研究方法

バイオテロに関する国内外の各種資料を入手し、それらを参考にして日本の医療現場の現状に合わせて、バイオテロ対策のガイドラインを作成した。

C. 研究結果

医療機関におけるバイオテロ対策ガイドラインの作成

バイオテロ対策のガイドラインについては、現在の医療機関が置かれた状況を考慮した上で、より実践的で効率的な内容にすることを目指して、事業継続計画(Business Continuity Plan:BCP)を含めてガイドラインの総論部分の案を作成した。

ガイドラインの項目とポイントは下記のとおりである。

1) 必要な薬剤の準備

バイオテロに用いられる代表的な病原体に対して推奨される治療薬とその用法用量を提示した(追加資料表1)。

2) 必要な感染防護具の準備

バイオテロに対応する際に必要な感染防護具(PPE)について各医療機関の状況に合わせた準備用の表を作成した。

3) バイオテロ対応のフローチャート

バイオテロ発生当初は原因となる病原体が不明の状態に対応せざるを得ないため、代表的なパターンとして急性感染症を発症した時点から段階的に対応するフローチャートを作成した(追加資料図1)。

4) BCP の作成

BCPは、自然災害、高病原性の感染症のパンデミック、テロ攻撃などの緊急事態に遭遇した場合に、必要とされる医療機関の機能を維持し、診療行為を継続できるように、予め対応すべき内容や手段、必要な物品などを取り決めた計画のことである。

今回、中小規模病院を対象として、バイオテロを想定したBCP作成と対応の例を作成した(追加資料

表2)。

#### D. 考察

現在, IS を始めとして宗教あるいは特定の思想に基づくテロ行為が増し, 国際紛争も激しくなって, 緊張が高まっている。このような状況において, バイオテロに対する備えも重要性が増してきている。

現在, 国内でもテロを警戒する意識は少しずつ高まっているが, バイオテロに対する関心は高いとは言えず, 医療機関においてもその対策はほとんどなされていないのが現状である。

そこで今回は, 新型インフルエンザの流行を見据えて, 国や自治体が推し進めている各医療機関のBCP 作成を参考にして, バイオテロ発生時のBCP 作成について焦点を当てて検討を行った。

ただし問題点としては, バイオテロ発生時は病原体が確定できず, さまざまな状況を広く想定しながら対応せざるを得ないことであり, 必要最小限かつ有効な対処法を提示できるよう検討していく必要がある。

#### E. 結論

各医療機関がバイオテロ対策を実施する上での参考となるガイドラインの作成を計画し, 今年度は総論部分の案を作成した。今後, さらに実際の医療現場で活用できる内容にできるようブラッシュアップを行っていく必要がある。

#### 参考文献

1. 新型インフルエンザ等発生時の診療継続計画作りの手引き 平成24年度 厚生労働科学研究費補助金新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業「新型インフルエンザ発生時の公衆衛生対策の再構築に関する研究」分担研究「新型インフルエンザ等発生時の診療継続計画作りに関する研究」  
研究分担者 吉川 徹  
[http://www.virology.med.tohoku.ac.jp/pandemicflu/i/tool/sinryou\\_tebiki.pdf](http://www.virology.med.tohoku.ac.jp/pandemicflu/i/tool/sinryou_tebiki.pdf)

F. 健康危険情報  
特になし

G. 研究発表  
1. 論文発表  
なし  
2. 学会発表  
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む.)  
1. 特許取得  
特許取得なし  
2. 実用新案登録  
登録なし  
3. その他  
なし

資料

表1. バイオテロに使用される代表的な治療薬の一覧

	推奨商品名(用法用量)	代替商品名(用法用量)	備考
炭疽	シプロキサシ(1回300mg 1日2回 点滴静注)	レボフロキサシ(1回500mg 1日1回, 点滴静注)	ダラシンS,バンコマイシン,チエナム、ペニシリンGも有効。
ブルセラ症	ビブラマイシン(100mg, 2錠 分2) + ゲンタマイシン注(1回5mg/kg 1日1回 筋注, 7日間)	ビブラマイシン(100mg, 2錠 分2) + リファジン(150mg, 4-6カプセル 分1)	内服薬はいずれも42日間の投与を推奨
コレラ	クラビット(500mg, 1錠 分1 3日間)	ビブラマイシン 100mg, 2錠 分2 3日間)	輸液が基本。抗菌薬は排菌期間の短縮を目的として使用
鼻疽	セフトキシム(1日4g 分2~4 点滴静注)	ゲンタマイシン(1日80~120mg 分2~3 筋注・点滴静注)	イミペネム、シプロフロキサシ、ST合剤なども有効
類鼻疽	セフトキシム(1日4g 分2~4 点滴静注)	チエナム(1日2g, 分4 点滴静注)	アモキシシリンクラブラン酸、メロペネムなども有効
ペスト	硫酸ストレプトマイシン(1回1g, 1日2回 筋注)	シプロキサシ(1回400mg 1日2回 静注)	ゲンタシンやビブラマイシンも有効
野兔病	ゲンタマイシン(1日80~120mg 分2~3 筋注・点滴静注) + ミノサイクリン(1日200mg 分2 内服)	硫酸ストレプトマイシン(1回1g, 1日2回 筋注) + ミノサイクリン(1日200mg 分2 内服)	GM+MINOIは7~14日間継続
Q熱	ミノマイシン(1回100mg 1日2回 点滴静注)	クラビット(500mg 1錠 分1 2週間)	重・中等症例はミノマイシン静注を推奨
コクシジオイデス症	アンビゾーム(1日1回 2.5mg/kg, 点滴静注)	ジフルカン(1回400mg 1日1回 静注)	治療期間はジフルカンでは6か月以上
ボツリヌス毒素	乾燥ボツリヌス抗毒素注射液(1V 注射用水20mLに溶解し静注または点滴静注)		症状が軽減しないときは3~4時間ごとに追加

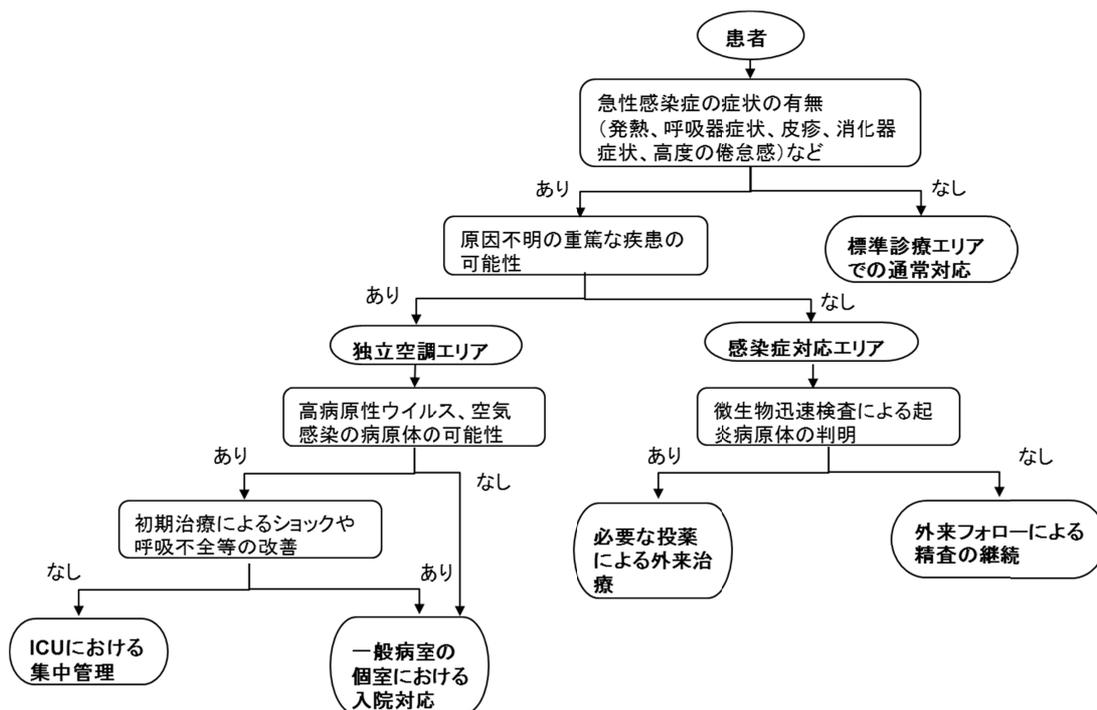


図1. バイオテロが疑われる状況における対応フローチャート

表 2. バイオテロを想定した BCP 作成と対応の例(中小規模病院対象)

(1) 自施設の役割の明確化

要点: 地域における自施設の役割を明らかにすることによって緊急時に対応すべきことを明確にする.

例:

・地域医療を担う立場として, 地域住民が必要な診療を受けられる体制を確保する.

(2) バイオテロ被害の各段階における基本的な対応方針

要点: 発生の初期から深刻な状況まで各段階に合わせた対応を決定する.

例:

・国内発生の段階

さらに警戒の段階を高めて, 必要な物品等や院内体制の再確認を行う

・地域発生の段階(都道府県内での患者の発生)

バイオテロの患者が受診した際の具体的対応の確認.

・地域発生の段階(近隣地域での患者の発生)

バイオテロ専用の外来, 病室の確保. 優先度が低い診療の中止や延期.

(3) 優先すべき診療業務の明確化

要点: 診療業務の内容を以下の3段階の優先度に分けて分類する.

例:

・優先度高: 地域感染期でも継続

外来診療, 透析業務, 緊急手術など

・優先度中: 地域感染期には縮小

慢性疾患の外来, 入院など

・優先度低: 地域感染期には延期

待期的手術, 検診など

(4) 被害の想定

要点: 最も被害が大きい状況を踏まえて想定される被害を考察する.

例:

・感染者: 1日最大30名の感染疑い患者が外来を受診(真の感染者はその1割程度).

・職員の欠勤: 個々の理由等により欠勤率30%

(5) 対応本部の組織作りと構成メンバー, 役割分担の確認

要点: 対策本部の本部長は院長とし, 他の構成員とその役割を明確にする.

例:

・構成員: 院長, 副院長, 診療部長, 看護部長, 検査部長, 薬剤部長, ICTメンバー, その他

・指揮系統: 対策本部長(院長)を頂点として, 以下意志決定の順位を定める.

・役割分担: ICTメンバー(具体的対応の提案と現場指導), 検査部長(流行時の検査対応の指示), 薬剤部長(必要な治療薬の確保と管理)など

(6) 必要な機器や物品等の確認と準備

要点: バイオテロを想定して必要とされる物品や機器およびその数を明らかにし, 緊急時の供給体制について予め業者と相談しておく.

例:

・医薬品: 各種抗菌薬など

・検査キット: 除外対象となるインフルエンザ等の各種感染症の迅速診断キットなど

- ・PPE: マスク(サージカル, N95), 手袋, ガウン, ゴーグルなど
- ・消毒薬: 擦式消毒薬, 次亜塩素酸ナトリウムなど
- ・機器: 人口呼吸器, パルスオキシメーター, 簡易血液・生化学検査機器など

#### (7) 職員向け連絡体制の確立

要点: 緊急時の情報や診療体制の変更, 個別の指示がスムーズに行える連絡体制を築く

例:

- ・緊急連絡網の設置: 職員の連絡先の把握や一斉メール配信システムなどの構築

#### (8) 情報提供

要点: 患者および地域住民向けに自施設の診療対応について情報を提供する。

例:

- ・患者(入院, 外来)への情報提供  
診療体制の変更の通知や協力の依頼を直接および書面を通じて連絡
- ・地域住民への情報提供  
ホームページや掲示物による新しい診療体制の提示

#### (9) 地域連携

要点: 他の医療機関, 国立感染症研究所, 自治体, 保健所, 警察, 消防などとの相互連絡や連携体制を相談しておく

例:

- ・国立感染症研究所への検査依頼の確認  
バイオテロの病原体の確認のための検査依頼の手段や検体輸送等の確認
  - ・医療施設間相互の情報共有  
各施設の患者受け入れ状況や入院可能人数, 薬剤保有状況などの情報共有
  - ・自治体や保健所への報告内容の確認や連絡体制の確認
-



分担研究報告書

情報管理及び提供法の確立と維持

所属 国立保健医療科学院健康危機管理研究部  
研究分担者 金谷泰宏

研究要旨

我々は、LC16m8 が既存の種痘免疫に対してブーストをかけるが、初種痘における B5 タンパク質に対する抗体誘導は既接種群と比して弱いことを明らかにしてきた。さらに、プロテインアレイを用いた網羅的な抗原性の解析は、LC16m8 の有効性を支持すると同時に、LC16m8 の B5 タンパク質について、より詳細な研究の必要性を示唆している。今年度の研究においては、LC16m8 接種血清と Dryvax 接種血清との抗原性の比較、種々の痘そうワクチンを接種したマウス血清のアレイ測定結果の解析、LC16m8 および抗 B5 抗体に関する文献レビュー、抗 B5 抗体の測定系の確立などを引き続き行った。LC16m8 接種血清と Dryvax 接種血清の抗原性は B5 タンパク質を除き概ね同様の傾向を示した。国内外の研究、及び、我々の研究から抗 B5 抗体の産生は痘そうワクチンによる防御に必ずしも必須ではないという結果が示されているが、有効性・安全性の点から重要な抗原であり、抗原性、および影響を及ぼす要因について引き続き検討が必要である。また、LC16m8 の有効性について、ASEAN 地域フォーラムにおいて報告を行った。

研究協力者

江藤亜紀子 (国立保健医療科学院健康危機管理研究部)

これらの免疫的背景を考慮したワクチン接種プログラムを開発することにより、安全性、有効性の高い接種が可能となる。本研究では LC16m8 株の抗原性について検討を行った。

A.研究目的

LC16m8 株は EEV の主要抗原 B5 タンパク質に変異があり切断型として発現しているため、ワクチンとしての有効性の評価には、この変異が抗原性にどのような影響を与えているかを明らかにすることが必要である。一方、抗体産生にはウイルス株の種類、個人の遺伝的要素、生理状態、ワクチン接種歴などの過去における暴露が影響を与えることから、有効なワクチン接種プログラムの開発には、LC16m8 株接種に関わるこれらの要因の関係性を明らかにすることが必要である。

1970 年代以前、わが国では、天然痘のワクチン接種は 3 回の種痘を受けるプログラムであり、1976 年まで実施された。そのため、現在では、76 年以降が生年の世代は免疫がなく、それ以前の世代は出生年によって種痘歴(ワクチン株の種類と接種回数)が異なる世代が混在しており、いずれもワクチンの有効性評価と接種プログラムを構築するにあたり考慮する必要がある。わが国では 1970～1975 年の間に出生した者は 1 回、1964～1969 年の間に出生した者は 2 回、1963 年以前に出生した者は 3 回の接種を受けている。1970 年以前においては池田株、大連 1 株が、1970 年代は Lister 株が使用された。日本人集団においては、

B.研究方法

(1) LC16m8 接種血清と Dryvax 接種血清との抗原性の比較

LC16m8 を接種した日本人血清(Saito 2009)、および Dryvax を接種した米国人血清(Tan et al., 2012, GSE34931)のプロテインアレイ測定データを同時に正規化することにより直説比較を行った。正規化は R の vsn パッケージを用いた。

(2) マウス血清のアレイ測定結果の解析

LC16m8 の長期における有効性、他のワクチン株との有効性・安全性の比較、強毒性ウイルスに対する防御効果などを明らかにするため、マウス血清のプロテインアレイ測定が行われた。測定は数度に渡って行われたため、これらの結果を統合的に評価するため、正規化によりバックグラウンドを揃え、統計解析を行った。

(3) LC16m8 および抗 B5 抗体に関する文献レビュー

B5 タンパク質の変異は LC16m8 の安全性に関わる大きな特徴である。抗 B5 抗体は、痘そうワクチンの防御に必須と言われていたが、最近の国内外の研究は、必ずしも抗 B5 抗体が必要ではないことを示している。抗 B5 抗体の機能と LC16m8 の安全性・有効性について

での知見をまとめた。

#### (4) 抗 B5 抗体の測定系の確立

B5 タンパク質の部分配列に対する抗ペプチド抗体の作成を行った。抗原の配列は野生型の B5 タンパク質の C 末端側に近い配列とした(aa257-273)。常法に従いウサギポリクローナル抗体作成を行っている。

#### 【倫理面への配慮】

本調査研究の実施に当たっては、臨床研究の指針を踏まえるとともに、自衛隊中央病院倫理委員会の承認を得た(No.16-004.平成 16 年 8 月 30 日)。

動物実験については、厚生労働省の動物実験等の実施に関する基本指針を踏まえて行った。

### C.研究結果

#### (1) LC16m8 接種血清と Dryvax 接種血清との抗原性の比較

初種痘で LC16m8 を接種した日本人血清(Saito 2009)と Dryvax を接種した米国人血清(GSE34931)の抗原性の比較では、主要抗原に対する抗体産生の傾向は B5 を除き類似していた。陽性率は米国人血清の方が高い傾向を示したが、接種量の違いが要因の 1 つと考えられた(日本人血清では LC16m8 を 5 回接種に対し、米国人血清では Dryvax 株を 15 回接種)。非主要抗原で、陽性率が大きく異なるものがいくつか認められた。

#### (2) マウス血清のアレイ測定結果の解析

ワクチンの接種とアレイ測定は、LC16m8 の長期の効果、強毒株に対する防御効果に関与する抗原の同定、および、Lister 株などの他のワクチンとの抗原性の比較やブースターの効果などを目的に行われた(図 1)。抗原性の詳細について解析中である。

#### (3) LC16m8 および抗 B5 抗体に関する文献レビュー結果はレビュー論文として発表した。

#### (4) 抗 B5 抗体の測定系の確立

昨年度に引き続き抗体等の調整を行った。また、測定のためのプログラムを作成し動作確認を行った。

#### (5)ASEAN 地域フォーラム (ARF) との連携

LC16m8 の生物テロ発生後の運用について、本研究成果を ASEAN 各国に示すとともに、生物テロを想定した机上演習に参加した(防衛医大 木下学准教授)。

### D.考察

マウスにおけるプロテインアレイ測定結果の統合的な解析は、LC16m8 の有効性に寄与する抗原について重要な情報を与えると考えられる。特に長期の効果については、ヒト検体と合わせて解析を行う予定である。LC16m8 の抗原性については、第一世代ワクチンの抗原性との比較により、その有効性を支持

する結果を得られており、今年度行った Dryvax 接種血清との直接比較によりさらにその類似性が確認された。マウスにおいては LC16m8 株接種により B5 タンパク質に対する抗体が産生されることは報告されており、本研究のプロテインアレイの系でも確認されている。ヒトにおいては、現在までのプロテインアレイ解析の結果から新規の疑問点も生じており、引き続き解析を進めているところである。

### E.結論

本研究では、LC16m8 株接種による抗体産生をについて、抗原を網羅的に搭載したプロテインアレイを用いて解析し、その結果を基に、主要抗原 B5 タンパク質の抗原性について解析を進めている。B5 タンパク質に対する応答は、ワクチンの有効性のみでなく安全性にもかかわることから、LC16m8 株の接種プログラムの確立のためには詳細な解析が必要である。

### F. 研究発表

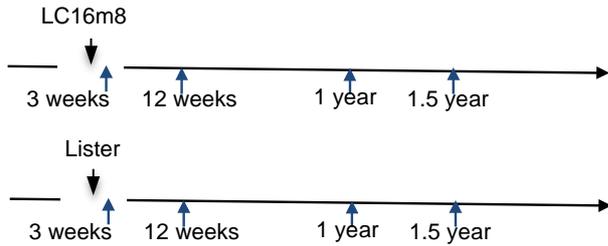
#### 1. 論文発表

- 1) Nishiyama Y, Matsukuma S, Matsumura T, Kanatani Y, Saito T. Preparedness for a smallpox pandemic in Japan: public health perspectives. *Disaster Med Public Health Prep.* 2015 Apr;9(2):220-3.
- 2) Eto A, Saito T, Yokote H, Kurane I, Kanatani Y. Recent advances in the study of live attenuated cell-cultured smallpox vaccine LC16m8. *Vaccine.* 2015 Nov 9;33(45):6106-11 Review
- 3) Eto A, Saito T, Yokote H, Kurane I, Kanatani Y. Key Clinical Research Article. Recent advances in the study of live attenuated cell-cultured smallpox vaccine LC16m8. *Global Medical Discovery.* November 12, 2015  
<https://globalmedicaldiscovery.com/key-clinical-research-articles-global-medical-discovery/recent-advances-in-the-study-of-live-attenuated-cell-cultured-smallpox-vaccine-lc16m8/>
- 4) Nishiyama Y, Fujii T, Kanatani Y, Shinmura Y, Yokote H, Hashizume S. Freeze-dried live attenuated smallpox vaccine prepared in cell culture "LC16-KAKETSUKEN": Post-marketing surveillance study on safety and efficacy compliant with Good Clinical Practice. *Vaccine.* 2015 Nov 9;33(45):6120-7.

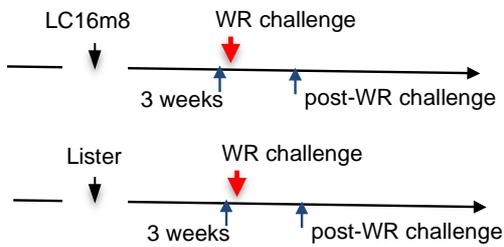
#### 2. 学会発表

- 1) 江藤亜紀子, 齋藤智也, 横手公幸, 金谷泰宏. 天然痘ワクチン初回接種時の抗体産生応答に関する日米研究の比較. 第 19 回ワクチン学会学術集

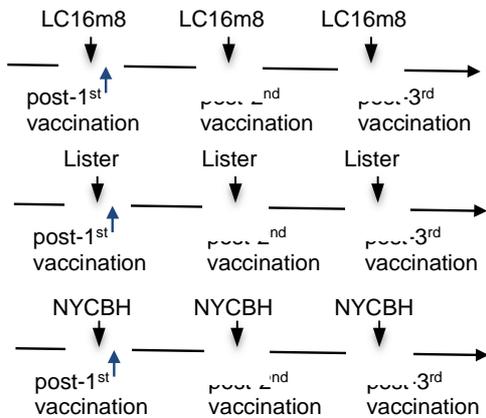
(1) LC16m8の長期の効果(Lister株との比較研究)



(2) LC16m8 の防御効果(Lister株との比較研究)



(3) LC16m8 の複数回接種の効果 (Lister株, NYCBH株との比較研究)



(4) LC16m8 接種後の他のワクチン株のブースター効果 (MVA株との比較研究)

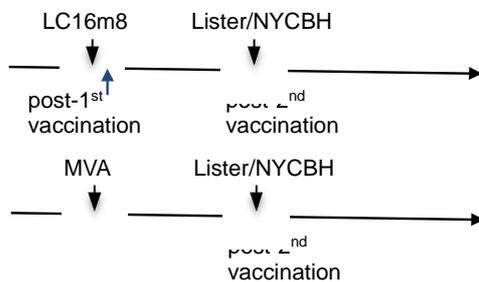


図 1. ワクチン接種とアレイ測定



分担研究報告書

痘そうワクチン LC16m8 接種者における中和抗体持続に関する調査研究

研究分担者 横手公幸

所属 一般財団法人化学及血清療法研究  
所ワクチン事業部門 事業開発部

研究要旨

LC16m8 を 1 回接種された健康成人の抗体陽性率は経時的な低下傾向が認められた。Proteome Microarray Chip を用いたプロテオミク解析を行った結果、LC16m8 接種後の中和抗体価とプロテオミク解析における反応強度に相関が見られた抗原は 11 種類あった。そのうち、LC16m8 接種 30 日後と比較して接種 1 年後にプロテオミク解析における反応強度が有意に低下した抗原は A11R, A13L, A17L であった。

研究協力者

- (1) 橋爪壯(千葉大学 名誉教授)
- (2) 新村靖彦, 上村千草, 内田梓, 金原知美, 丸野真一, 宮本誠二(一般財団法人化学及血清療法研究所)

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生ウイルスワクチンで 1975 年に製造承認が許可された。

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、わが国ではこの痘そうワクチン 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ファーストレスポnderの成人対象者(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。

一方、天然痘流行期に WHO は、天然痘曝露に対する最大限の防御レベルが要求される人(ファーストレスポnderの対象者)に対しては、毎年追加接種を推奨していた。また流行期の疫学調査や種痘経験者に対する最近の血清学的調査(抗体測定)等の文献によると、従来の痘そうワクチンについては、2~3 回の種痘後 10~30 年程度経過した時点においても天然痘の発症または重症化を阻止可能なレベルの抗体が保持されていることが報告されて

いる。

以上の背景より、近年 LC16m8 を 1 回接種された成人対象者に対する免疫持続の調査が必要と考え、本研究を開始した。

昨年度までの研究において我々は LC16m8 単回接種 4 年後の中和抗体(Anti-Lister PRNT)陽性率について、初回接種群では低下傾向が認められ、これに起因している抗原群をプロテオミク解析によって調査してきた。更なる検証の為、同様の被験者群における解析データの蓄積が必要であると考え、本年度は、別の被験者群における LC16m8 単回接種 1 年後までの Dryvax に対する中和抗体価の持続及び抗原認識パターンについて調査を行った。

B.研究方法

本調査研究では、154 名の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サンプルを用いて解析を行った。

中和抗体の持続を評価するために、痘そうワクチン接種前、接種 30 日後、60 日後、180 日後及び 360 日後の Anti-Dryvax PRNT<sub>50</sub> のデータを解析し、Anti-Dryvax PRNT<sub>50</sub> が接種前の値の 4 倍以上となった場合を抗体陽性として抗体陽性率を算出した。

加えて、LC16m8 接種者 11 名について、接種前、接種 30 日後、接種 360 日後に採取された血清サンプルを用いてワクチン接種により誘導された抗体による認識抗原たん白質群を Vaccinia Western Reserve (WR) specific-Proteome Microarray Chip を用いて解析した。なお、この解析は Antigen

Discovery, Inc. (Irvine, CA, USA)へ委託し実施した。

#### 【倫理面への配慮】

本調査研究で再解析した臨床試験成績は、米国 FDA に了承されたプロトコルに従い、米国 GCP に準拠して実施された臨床試験で取得された成績であることを確認した。

#### 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接種者が獲得した中和抗体 (Anti-Dryvax PRNT) の持続を調査するために、化血研が種痘歴の無い健康成人 154 名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成績を再解析した。中和抗体陽性率は接種 30 日後に LC16m8 群では 98%(118/120)、Dryvax 群では 100%(24/24)であったが、接種 360 日後ではそれぞれ 84%(81/97)、88%(15/17)となり、ワクチン株に関係無く抗体陽性率に低下傾向が認められた。(表 1)

次に、LC16m8 接種により誘導された抗体による認識抗原たん白質群を Vaccinia WR specific-Proteome Microarray Chip を用いて解析した。

LC16m8 接種者 11 名について、接種前、接種 30 日後、接種 360 日後の個人毎の PRNT<sub>50</sub> の推移を図 1 に示した。

11 名の被験者は Dryvax に対する中和抗体の持続により、以下の 2 つのグループに分けて解析を行った。

Group A: LC16m8 接種 30 日後及び接種 360 日後で抗体価を維持していた被験者(4 名)

Group B: LC16m8 接種 30 日後から接種 360 日後で抗体価が明らかに低下した被験者(7 名)

Group A, Group B, において、LC16m8 ワクチン接種による抗原認識パターンをヒートマップとして図 2 に示した。これら 52 個の認識抗原群は昨年度に評価した LC16m8 接種 4 年後までの認識抗原群とほぼ類似していた。

また、52 個の認識抗原のうち、Dryvax に対する中和抗体価とプロテオミク解析における反応強度に相関がみられた 11 種類の抗原群を表 2 に、相関図を図 3 に示した。

さらに、この 11 種類の抗原群について、各グループ毎の比較を行った。接種前と比較して蛍光強度に有意差が見られた抗原を表 3 及び表 4 に示した。Group A では、接種前と比較して接種 30 日後の蛍光強度が有意に高かった抗原は A17L, D8L, A10L, D13L, A11R, H3L, A26L, A27L であり、そのうち A17L,

D8L, A10L, D13L, A11R, H3L, A27L は接種 1 年後まで有意に高かった。また、A11R は接種 30 日後と比較して 360 日後では蛍光強度が有意に低下した。Group B では、接種前と比較して 30 日後の蛍光強度が有意に高かった抗原は D8L, A27L, D13L, A17L, H3L, I1L, A10L, A13L, A33R であり、そのすべての抗原が接種 360 日後まで有意に高かった。また、A13L と A17L は接種 30 日後と比較して 360 日後では蛍光強度が有意に低下した。

#### D. 考察

昨年度までの研究において我々は LC16m8 単回接種 4 年後の中和抗体 (Anti-Lister PRNT) 陽性率について、再接種群では経時的な変化は認められなかったが、初回接種群では低下傾向が認められ、これに起因している抗原群をプロテオーム解析によって調査してきた。

更なる検証の為、本年度は、2004～2005 年に米国で実施され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サンプルを用いて中和抗体 (Anti-Dryvax PRNT) の持続を調査した。中和抗体陽性率は LC16m8 群とその比較対照とした Dryvax 群ともに接種 30 日後に最高値となり、その後接種 360 日後まで徐々に低下した。なお、中和抗体価及び抗体陽性率の低下傾向はワクチン株に関係無く確認されたことから、LC16m8 株という弱毒株に特有の事象ではないと考えられる。

更に、この接種 4 年後の抗体価の低下に起因する抗原群が、1 年後でも既に低下しているのかについて調査するため、ワクチニアウイルス WR 株の 95% 以上の構成たん白質を網羅する Proteome Microarray Chip を用いて、LC16m8 接種により誘導された抗体の認識ウイルス抗原を調査した。

その結果、これらの認識抗原群は昨年度に評価した LC16m8 接種 4 年後までの認識抗原群とほぼ類似しており、他の研究において防御や中和に重要であると言われている抗原を含んでいた。これらの抗原群のうち、中和抗体価 (Anti-Dryvax PRNT) とプロテオミク解析における反応強度の間に相関が見られた抗原群は 11 種類であった。

また、接種 1 年後まで Dryvax に対する中和抗体を維持していた被験者群において、接種前と比較して接種 30 日後の蛍光強度が有意に高かった抗原は 8 種類あり、そのうち A11R は接種 30 日後から 1 年後まで有意に低下した。また、接種 30 日後から 1 年後で Dryvax に対する中和抗体価が明らかに低下した被験者群において、接種前と比較して接種 30 日後の蛍光強度が有意に高かった抗原は 9 種類あり、そのうち A13L と A17L は接種 30 日後から接種 1 年後では有

意に低下した。今回の調査では中和抗体価の持続によって2つの被験者群に分けて解析を行ったが、2つの被験者間に明確な違いは見られなかった。しかし、A11RとA13Lは、前回4年後の中和抗体価及び陽性率の低下に起因していると考察した抗原群である。今回は接種1年後の結果であり接種4年後の途中の過程にあると考え、A11RとA13Lは1年後で既に低下が始まっている抗原群であり、これらが中和抗体価の低下に起因する抗原群の一部であることが考察された。

この中和抗体価及び抗体陽性率の低下傾向に起因する認識抗原については被験者数を増やし更に慎重に検証していく必要があると考えられた。加えて、LC16m8 追加接種の要否に関する議論も必要であると考えられた。

#### E. 結論

天然痘テロに対する危機管理対策として、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接種者が獲得した中和抗体の持続を調査した結果、抗体陽性率に経時的な低下傾向が認められた。この低下傾向について原因調査するため、ワクチニアウイルスWR株の95%以上の構成たん白質を網羅するProteome Microarray Chipを用いて、LC16m8接種により誘導された抗体の認識ウイルス抗原を調査した。その結果、LC16m8接種後の中和抗体価とプロテオミク解析における反応強度に相関が見られた抗原は11種類あった。そのうち、LC16m8接種30日後から1年後の反応強度が有意に低下した抗原はA11R、A13L、A17Lであった。

この中和抗体価及び抗体陽性率の低下傾向に起因する認識抗原については被験者数を増やし更に慎重に検証していく必要があると考えられた。加えて、LC16m8 追加接種の要否に関する議論も必要であると考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yokote H, Shinmura Y, Kanehara T, Maruno S, Kuranaga M, Matsui H, Hashizume S. Vaccinia virus strain LC16m8 defective in the B5R gene

keeps strong protection comparable to its parental strain Lister in immunodeficient mice. *Vaccine*. 33:6112-6119, 2015

- 2) Nishiyama Y, Fujii T, Kanatani Y, Shinmura Y, Yokote H, Hashizume S. Freeze-dried live attenuated smallpox vaccine prepared in cell culture "LC16-KAKETSUKEN" Post-marketing surveillance study on safety and efficacy compliant with Good Clinical Practice. *Vaccine*. 33:6120-6127, 2015
- 3) Eto A, Saito T, Yokote H, Kurane I, Kanatani Y. Recent Advances in the Study of the Live Attenuated Cell-Cultured Smallpox Vaccine LC16m8. *Vaccine*. 33:6106-61, 2015
- 4) Hayakawa T, Aoi T, Bravery C, Hoogendoorn K, Knezevic I, Koga J, Maeda D, Matsuyama A, McBlane J, Morio T, Petricciani J, Rao M, Ridgway A, Sato D, Sato Y, Stacey G, Sakamoto N, Trouvin JH, Umezawa A, Yamato M, Yano K, Yokote H, Yoshimatsu K, Zorzi- Morre P. Report of the international conference on regulatory endeavors towards the sound development of human cell therapy products. *Biologicals*. 43(5):283-97, 2015
- 5) Mottate K, Yokote H, Mori S, Horita A, Miyatsu Y, Torii Y, Kozai Y, Iwaki M, Takahashi M, Ginnaga A. Retrospective survey to evaluate the safety and efficacy of Japanese botulinum antitoxin therapy in Japan. *Toxicon*. 110:12-18, 2016

##### 2. 学会発表

- 1) 江藤亜紀子, 齋藤智也, 横手公幸, 金谷泰宏. 天然痘ワクチン初回接種時の抗体産生に関する日米研究の比較. 第19回日本ワクチン学会学術集会 愛知(2015.11)

#### G. 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. 痘そうワクチン接種後の中和抗体価及び抗体陽性率(Anti-Dryvax PRNT)

ワクチン	接種前	接種 30 日後		接種 60 日後		接種 180 日後		接種 360 日後	
	GMT	GMT	陽性率	GMT	陽性率	GMT	陽性率	GMT	陽性率
LC16m8 (N=125)	12	367	98% (118/120)	207	97% (115/120)	109	89% (101/114)	91	84% (81/97)
Dryvax (N=24)	14	1,208	100% (24/24)	433	96% (22/23)	330	91% (21/23)	174	88% (15/17)

GMT: Geometric mean titer

陽性判定基準: 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

表 2. LC16m8 接種後の中和抗体価(Anti-Dryvax PRNT)と

プロテオミク解析における反応強度に相関が見られた抗原群 (11 種)

Membrane		Core (2)	Other (3)
EEV (1)	IMV (5)		
A33R	H3L	A10L	A11R
	D8L	I1L	D13L
	A17L		A26L
	A13L		
	A27L		

A33R: EEV membrane phosphoglycoprotein, H3L: IMV heparin binding surface protein, D8L: IMV membrane protein, A17L: IMV membrane protein, A13L: IMV membrane protein, A27L: IMV surface protein, A10L: precursor p4a of core protein 4a, I1L: putative DNA-binding virion core protein, A11R: hypothetical protein, D13L: rifampicin target, A26L: cowpox A-type inclusion protein.

表 3. 痘そうワクチン LC16m8 接種前と比較してプロテオミク解析における蛍光強度が有意に上昇した抗原

	接種 30 日後*	接種 360 日後*
Group A	A17L, D8L, A10L, D13L, A11R, H3L, A26L, A27L	A11R, A27L, A10L, D13L, D8L, H3L, A17L, A33R
Group B	D8L, A27L, D13L, A17L, H3L, I1L, A10L, A13L, A33R	H3L, D13L, A10L, D8L, I1L, A27L, A13L, A17L, A33R

\* 有意差が大きい順に記載

表 4 . 痘そうワクチン LC16m8 接種 30 日後と比較してプロテオミク解析における蛍光強度が有意に低下した抗原

	接種 360 日後*
Group A	A11R,
Group B	A13L, A17L

\* 有意差が大きい順に記載

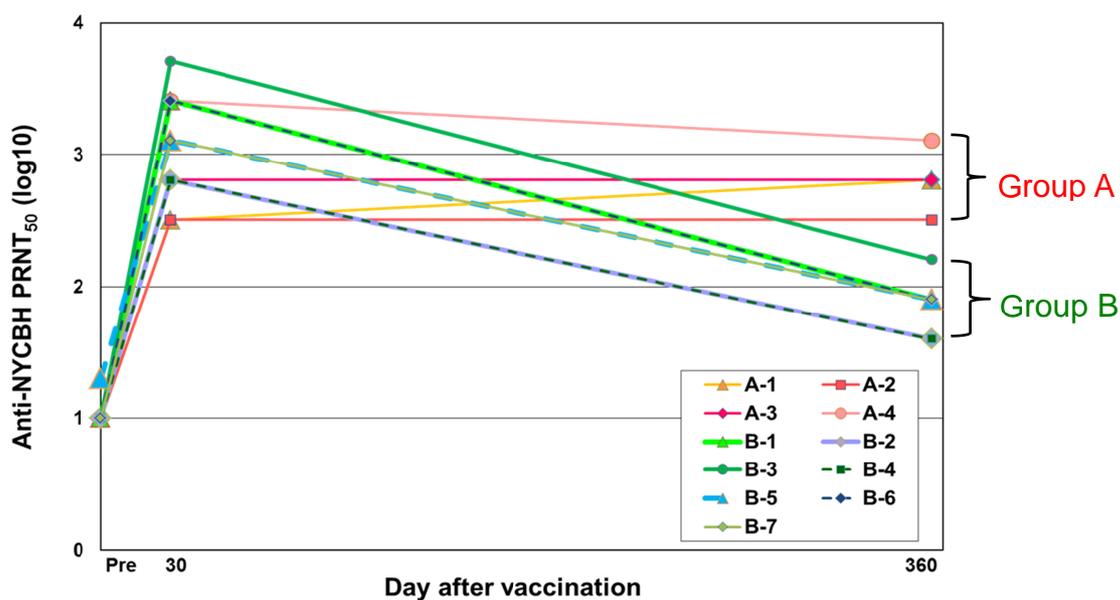


図1 . 痘そうワクチン LC16m8 接種後の中和抗体価推移 (個人別)

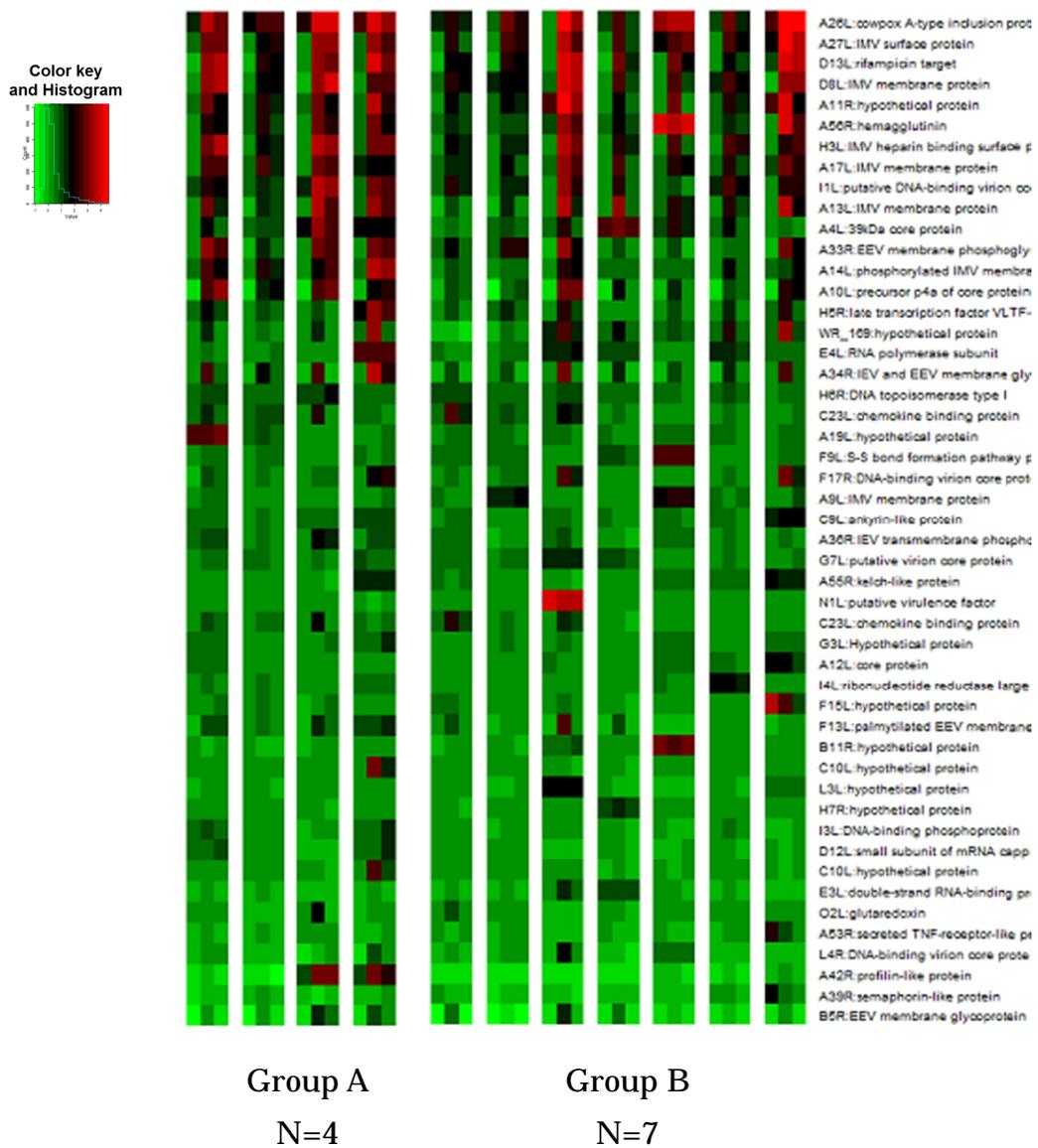


図 2. 痘そうワクチン接種後の認識抗原たん白質プロファイル(Heatmap)

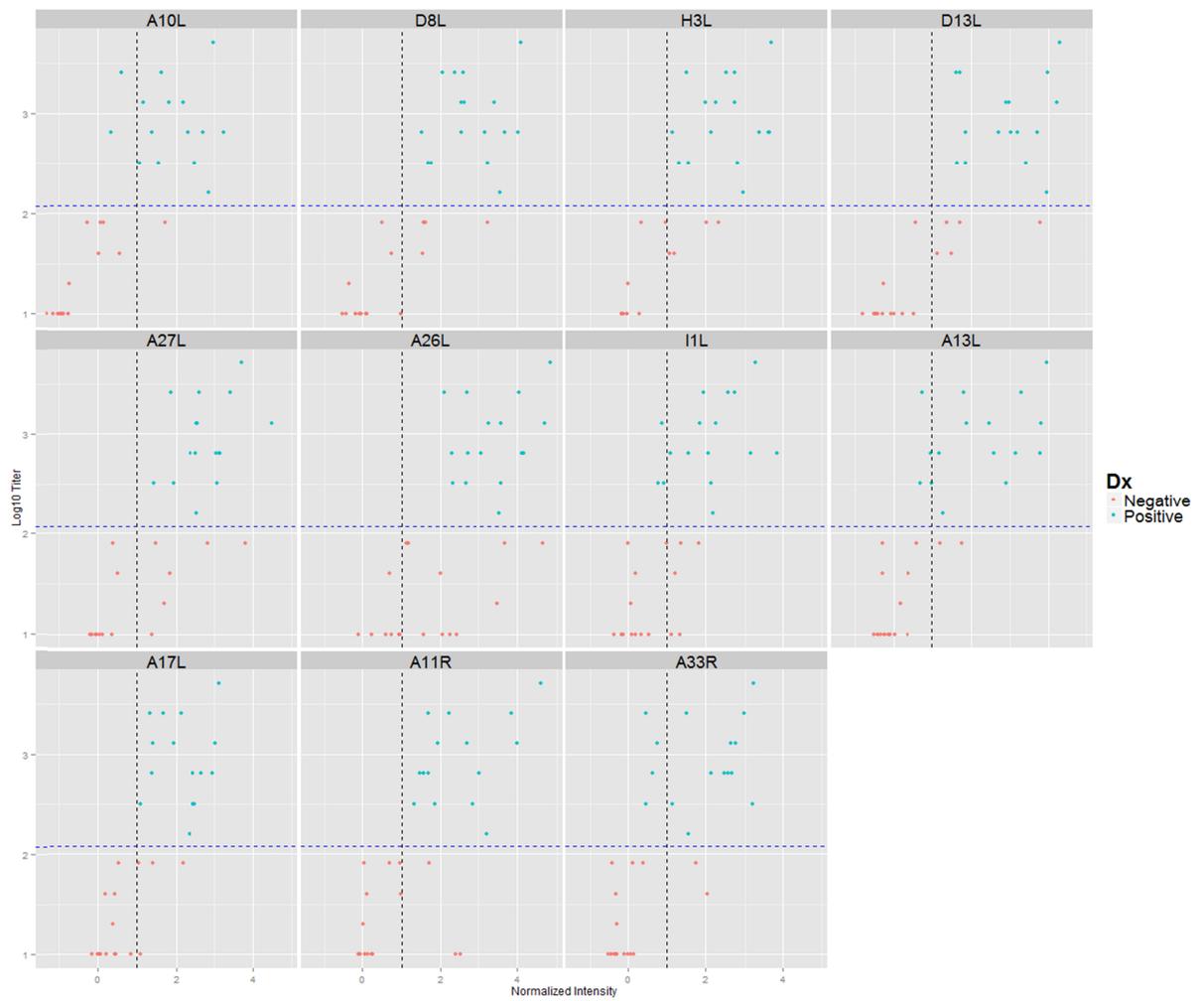


図3. 各抗原のプロテオミック解析における反応強度と中和抗体価 (Anti-Dryvax PRNT) に対する相関図

. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル	書籍全体の 名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
<b>小林和夫</b>	マイコバクテ リウム属 (抗酸菌)	中込 治 , 神谷 茂	標準微生物 学 (第12版)	医学 書院	東京	2015	276 - 288

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sakai K, Sekizuka T, Ami Y, Nakajima N, Kitazawa M, Sato Y, Nakajima K, Anraku M, Kubota T, Komase K, Takehara K, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Kuroda M, Takeda M.	A mutant H3N2 influenza virus uses an alternative activation mechanism in TMPRSS2 knockout mice by loss of an oligosaccharide in the hemagglutinin stalk region.	J Virol	89	5154-5148	2015
Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Sato Y, Nakajima N, Koike S, Iwasaki T, Sata T, Yamashita T, Minagawa H, Taguchi F, Hasegawa H, Shimizu H, Nagata N	Establishment of a panel of in-house polyclonal antibodies for the diagnosis of enterovirus infections.	Neuropathology	35	107-121	2015
中島典子	季節性および鳥インフルエンザウイルス感染症の病理	病理と臨床	33	1146-1153	2015
Nagata N, Iwata-Yoshikawa N, Hayasaka D, Sato Y, Kojima A, Kariwa H, Takashima I, Takasaki T, Kurane I, Sata T, Hasegawa H.	The pathogenesis of neurotropic flaviviruses in a mouse model depends on the route of neuroinvasion after viremia.	J Neuropathol Exp Neurol	374	250-260	2015.
Nishiyama Y, Matsukuma S, Matsumura T, Kanatani Y, Saito T.	Preparedness for a smallpox pandemic in Japan: public health perspectives.	Disaster Med Public Health Prep	9(2)	220-223	2015
Eto A, Saito T, Yokote H, Kurane I, Kanatani Y.	Recent advances in the study of live attenuated cell-cultured smallpox vaccine LC16m8.	Vaccine	33(45)	6106-6111	2015
Nishiyama Y, Fujii T, Kanatani Y, Shinmura Y, Yokote H, Hashizume S	Freeze-dried live attenuated smallpox vaccine prepared in cell culture "LC16-KAKETSUKEN": Post-marketing surveillance study on safety and efficacy compliant with Good Clinical Practice.	Vaccine	33(45)	6120-6127	2015

Yokote H, Shinmura Y, Vaccinia virus strain LC16m8 Kanehara T, Maruno S, defective in the B5R gene Kuranaga M, Matsui H, keeps strong protection Hashizume S. comparable to its parental strain Lister in immunodeficient mice.	Vaccine	33	6112-6119	2015
Hayakawa T, Aoi T, Bravery C, Report of the international Hoogendoorn K, Knezevic I, conference on regulatory Koga J, Maeda D, Matsuyama endeavors towards the sound A, McBlane J, Morio T, development of human cell Petricciani J, Rao M, Ridgway therapy products. A, Sato D, Sato Y, Stacey G, Sakamoto N, Trouvin JH, Umezawa A, Yamato M, Yano K, Yokote H, Yoshimatsu K, Zorzi-Morre P.	Biologicals	43(5)	283-297	2015
Mottate K, Yokote H, Mori S, Retrospective survey to eval Horita A, Miyatsu Y, Torii Y, uate the safety and efficacy Kozai Y, Iwaki M, Takahashi M, of Japanese botulinum Ginnaga A. antitoxin therapy in Japan.	Toxicon	110	12-18	2016
Tani H, Fukuma A, Fukushi S, Efficacy of T-705 (Favipiravir) Taniguchi S, Yoshikawa T, in the treatment of infections Iwata-Yoshikawa N, Sato Y, with lethal severe fever with Suzuki T, Nagata N, Hasegawa thrombocytopenia syndrome H, Kawai Y, Uda A, Morikawa S, virus. Shimajima M, Watanabe H, Saijo M.	mSphere	1 (1)	e00061-15	2016
Hotta A, Tanabayashi K, Fujita Survey of <i>Francisella</i> O, Shindo J, Park CH, Kudo N, <i>tularensis</i> in Wild Animals in Hatai H, Oyamada T, the Endemic Areas in Japan. Yamamoto Y, Takano A, Kawabata H, Sharma N, Uda A, Yamada A, Morikawa S.	Jpn J Infect Dis		in press	
Ogawa K, Komagata O, Hayashi Field and laboratory T, Itokawa K, Morikawa S, evaluations of the efficacy of Sawabe K, Tomita T. DEET repellent against <i>Ixodes</i> ticks.	Jpn J Infect Dis		in press	
Okutani A, Osaki M, Takamatsu Draft genome sequences of D, Kaku Y, Inoue S, Morikawa S. <i>Bacillus anthracis</i> strains stored for several decades in Japan.	Genome Announc	3(3)	e00633-15	2015

Sakai K, Hagiwara K, Omatsu T, Isolation and Characterization of a Novel Rhabdovirus from a Wild Boar ( <i>Sus scrofa</i> ) in Japan. Nagata N, Nagai M, Katayama Y, Oba M, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Mizutani T, Maeda K.	Vet Microbiol	179(3-4)	197-203	2015
Hamamoto N, Uda A, Tobiume M, Park CH, Noguchi A, Kaku Y, Okutani A, Morikawa S, Inoue S. Association between RABV G Proteins Transported from the Perinuclear Space to Cell Surface Membrane and N-glycosylation of the Sequon at Asn204.	Jpn J Infect Di	68(5)	387-393	2015
Yoshikawa T, Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Singh H, Suda Y, Shirabe K, Toda S, Shimazu Y, Nomachi T, Gokuden M, Morimitsu T, Ando K, Yoshikawa A, Kan M, Uramoto M, Osako H, Kida K, Takimoto H, Kitamoto H, Terasoma F, Honda A, Maeda K, Takahashi T, Yamagishi T, Oishi K, Morikawa S, Saijo M. Phylogenetic and Geographic Relationships of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in China, South Korea, and Japan.	J Infect Dis	212(6)	889-898	2015
Okamoto M, Miyazawa T, Morikawa S, Ono F, Nakamura S, Sato E, Yoshida T, Yoshikawa R, Sakai K, Mizutani T, Nagata N, Takano J, Okabayashi S, Hamano M, Fujimoto K, Nakaya T, Iida T, Horii T, Miyabe-Nishiwaki T, Watanabe A, Kaneko A, Saito A, Matsui A, Hayakawa T, Suzuki J, Akari H, Matsuzawa T, Hirai H. Emergence of infectious malignant thrombocytopenia in Japanese macaques ( <i>Macaca fuscata</i> ) by SRV-4 after transmission to a novel host.	Sci Rep	5	8850	2015
Ching PK, de los Reyes VC, Sucaldito MN, Tayag E, Columna-Vingno AB, Malbas FF Jr, Bolo GC Jr, Sejvar JJ, Eagles D, Playford G, Dueger E, Kaku Y, Morikawa S, Kuroda M, Marsh GA, McCullough S, Foxwell AR. Outbreak of Henipavirus Infection, Philippines.	Emerg Infect Dis	21(2)	328-331	2015

Shimajima M, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Fukuma A, Taniguchi S, Suda Y, Maeda K, Takahashi T, Morikawa S, Saijo M.	Effects of ribavirin on severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in vitro.	Jpn J Infect Dis	67(6)	423-427	2014
Orba Y, Sasaki M, Yamaguchi H, Ishii A, Thomas Y, Hang'ombe BM, Mweene AS, Morikawa S, Saijo M, Sawa H.	Orthopoxvirus infection among wildlife in Zambia.	J Gen Virol	96 (Pt 2)	390-394	2015
Ikeda-Dantsuji Y, Ohno H, Tanabe K, Umeyama T, Ueno K, Nagi M, Yamagoe S, Kinjo Y, Miyazaki Y.	Interferon- $\gamma$ promotes phagocytosis of <i>Cryptococcus neoformans</i> but not <i>Cryptococcus gattii</i> by murine macrophages.	J Infect Chemother	21	831-836	2015
Okachi S, Wakahara K, Kato D, Umeyama T, Yagi T, Hasegawa Y.	Massive mediastinal cryptococcosis in a young immunocompetent patient.	Respirology Case Reports	3	95-98	2015