

厚生労働行政推進調査事業費補助金

新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業

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

(H26-新興行政-指定-002)

平成28年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 西條 政幸
(国立感染症研究所)

平成29(2017)年 4月

目 次

・総括研究報告

バイオテロに使用される可能性のある病原体等の新規検出法の確立，及び細胞培養痘そうワクチンの有効性，安全性に関する研究-----	4
西條政幸	

・分担研究報告

1. 研究統括，バイオテロ対策における国際連携のあり方の検討：国家備蓄されている弱毒痘そうワクチンの各ロットの安全性に関する検討としてのMiddle Size Plaque形成ウイルス含有量の解析-----	15
西條政幸	
2. 蚊媒介性ウイルスの鑑別検査法の開発：アルファウイルスに属する馬脳炎ウイルスの遺伝子検出法の開発-----	19
田島茂	
3. ウイルス性出血熱の検査法に関する研究-----	22
下島昌幸	
4. 弱毒痘そうワクチンLC16m8株をボ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-----	29
吉河智城	
5. 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-----	35
森川茂	
6. 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-----	41
梅山隆	
7. 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-----	44
黒田誠	
8. 病原体の病理学的検出法の確立-----	50
中島典子	
9. 病原体の電子顕微鏡学的迅速検出法の確立-----	53
永田典代	
10. 痘そうワクチンの安全性評価における病理学的研究-----	56
永田典代	
11. 地方衛生研究所におけるバイオテロ対応に関する研究-----	58
小林和夫	
12. 細菌性危険病原体の蔓延防止に関わる新規検出法や予防法の開発-----	66
倉園久生	
13. 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-----	74
鯉淵智彦	
14. 各医療機関のバイオテロ対策を支援するための方策-----	77
松本哲哉	
15. 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： 情報管理及び提供法の確立と維持-----	79
金谷泰宏	
16. 痘そうワクチンLC16m8接種者におけるサル痘ウイルス中和抗体に関する調査研究-----	81
横手公幸	

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

・ 総括研究報告

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

所 属 国立感染症研究所ウイルス第一部

研究代表者 西條政幸

研究要旨：研究計画期間の最終年度である H28 年度には，1) 痘瘡ウイルスが用いられるバイオテロに備えた細胞培養痘そうワクチン（LC16m8）に関する研究，2) バイオテロ関連病原体検出法の開発，3) バイオテロにおける臨床的対応に関する研究，4) バイオテロ関連事象発生時に備えた感染研と地方衛生研究所間ネットワーク構築を目的とした研究を実施した。

(1) 細胞培養痘そうワクチン（LC16m8）に関する研究

日本で備蓄されている細胞培養痘そうワクチン LC16m8 (LC16m8 ワクチン) の安全性を確認する 1 方法として、本来の LC16m8 ワクチンのワクチニアウイルスに比較して病原性が高まっていると考えられる Middle Size Plaque (MSP) 形成ウイルスの各ロット（14 ロット）中の含有率を測定した。LC16m8 ワクチンの遺伝学的安定性をより迅速かつ正確に評価する方法として次世代シーケンサー（NGS）技術を導入できるか否か，その有効性を評価した。その有用性が確認された。サル痘ウイルスを用いた感染マウスモデルを作出した。LC16m8 ワクチンの暴露後ワクチンとしての効果を，マウス-エクトロメリアウイルス感染モデルにおいて，LC16m8 株は暴露後投与で効果を示すことが示唆された。

LC16m8 ワクチン接種によって誘導される，ワクチニアウイルスの各抗原に対する抗体誘導を評価するとともに，米国 CDC と共同で痘瘡ウイルスに対する中和抗体誘導能もより詳細に評価した。痘瘡ワクチンに対して中和抗体が誘導されることが初めて証明された。本研究班の研究成績は備蓄されている LC16m8 の安全性と有用性を示すものである。

尚，化血研製造ロット（V03，V04 及び V06）の長期保存安定性試験において，全ての規格試験結果は「適合」であり，現在備蓄されているワクチンの長期安定性も示された。

(2) バイオテロ関連病原体検出法の開発

エボラウイルス遺伝子検出システムの有用性の評価，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遺伝子増幅法，*Paracoccidioides brasiliensis*，*Blastomyces dermatitidis*，*Penicillium marneffeii* 等の DNA を高感度に検出する LAMP 法の開発，黄色ブドウ球菌エンテロトキシン・ボツリヌス A 型毒素・ウェルシュ菌エンテロトキシン・腸炎ピブリオ毒素検出法構築のための抗体の作製，病原体検出するための病理学的検査法（In situ hybridization AT-tailing 法を用いた Zika ウイルスゲノム検出法）の開発，迅速樹脂包埋法，走査電子顕微鏡を利用した新規ウイルス粒子検出法や血中のウイルス粒子の電子顕微鏡による迅速検出法の評価，等の研究により，バイオテロに使用される可能性のある病原体検査法の基盤を強化した。炭疽菌ゲノム情報もちいたゲノム分子系統解析ツール（GcoGSA-BA），デングウイルス遺伝型解析ツールと地理情報を統合した Dengue Genographic Viewer（DGV）を公開し Web 運用するとともに，メタゲノム解析法を用いた環境（公共交通機関の手すり等）中の汚染実態の調査を行い，環境における病原体の存在状況に関するメタゲノムデータを明らかにした。

(3) バイオテロにおける臨床的対応に関する研究

今年度は，実際のバイオテロ遭遇現場で医療従事者が簡便に参照できる資料の必要性を考慮し，「バイオテロを疑う時シート」を作成するとともに，豊富に写真や図表を掲載するなど一覽性・視認性に優れた対応シートを作成し，平成 28 年 3 月に全国の病院（約 990 施設）へ配布した。

(4) バイオテロ関連事象発生時に備えた感染研と地方衛生研究所間等とのネットワークの構築

特定病原体検査対応状況を把握するため，アンケート調査を実施した。地方衛生研究所全国協議会や同感染症対策部会で当該研究の理解や協力を得た。課題の克服改善策を示した。一部の地衛研の参加のもとで，健康危機を想定した検査対応に関する模擬訓練を実施した。

研究分担者

田島茂・国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官

下島昌幸・国立感染症研究所ウイルス第一部第一室・室長

吉河智城・国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官

森川茂・国立感染症研究所獣医科学部・部長

梅山隆・国立感染症研究所真菌部・主任研究官

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・センター長

中島典子・国立感染症研究所感染病理部・室長

永田典代・国立感染症研究所感染病理部・室長

小林和夫・堺市衛生研究所・所長

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・教授

鯉淵智彦・東京大学医科学研究所・附属病院感染免疫内科・講師

松本哲哉・東京医科大学微生物学講座・教授

金谷泰宏・国立保健医療科学院健康危機管理研究部・部長

横手公幸・一般財団法人化学及血清療法研究所・国際戦略室・室長

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、「パ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」と「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。

病原体の迅速検出・同定法の基盤整備は、パイオテロの脅威に対抗する上でとても重要である。患者検体、時には環境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迅速で、かつ、正確な分離同定が必要となる。さらに病原体の由来を知るための塩基配列の解析とデータベースの確立も重要となる。特に初期には全く病原体の予想がつかない可能性がないが、網羅的検出法は特異性等の検討がまだまだ十分ではない。

また、パイオテロの早期検知には一次対応機関で働く医師等のパイオテロに関する知識の普及と臨床診断支援が必須である。本研究の目標は以下の通りである。

さらに、ひとたびパイオテロ事象（疑い事例を含む）が発生した場合には、厚生労働省や政府機関、国立感染症研究所、地方衛生研究所等が連携して対応する必要がある。それには平時からこれらの関係機関の連携のあり方を検討し、問題点を明ら

かにして、パイオテロ事象が発生した場合に備えておかなければならない。上記の目的のために、以下の研究を実施した。

- 1) すでに確立されている特定病原体等に対する、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と標準化
- 2) 網羅的検出法として、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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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、地方衛生研究所や検査機関での対応と検査ネットワークの整備
- 6) パイオテロ対応ホームページを整備し、関係機関への情報提供システムの確立（一般公開を含む）
- 7) 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、等の性状解析
- 8) 備蓄されている LC16m8 ワクチンの各ロットにおける MSP 含有率の測定
- 9) LC16m8 ワクチンの効率的製造法と備蓄のあり方の検討

B. 研究方法

1. 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) 日本で製造・備蓄されている痘そう LC16m8 ワクチン MSP 測定法の開発と日本で製造・備蓄されている痘そう LC16m8 ワクチン中の MSP 含有量の測定

LC16m8 ワクチン由来 MSP と LC16m8 ワクチンウイルスの性状の違いを明らかにし、その特徴の違いを応用して MSP 含有量を測定した。

- 2) LC16m8 ワクチンのポックスウイルス感染暴露後効果に関する研究

オルソポックスウイルスに分類されるエクトロメリアウイルス (ECTV) をマウスに攻撃感染させ、その直後に LC16m8 ワクチン、またはその親株の Lister 株ワクチンを接種してその効果を解析した。

- 3) LC16m8 ワクチン中に含まれる MSP ウイルスの定量的検出のための NGS 法の導入の評価
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、MSP の遺伝子変異特異的配

- 列を 3' 末端とする primer を用いた real-time PCR を導入することで定量的に検出可能な real-time PCR 法を開発した。
- 4) サル痘ウイルス感染マウスモデルの開発
抗 Ly6G 抗体をマウスに投与することにより好中球枯渇させてから、サル痘ウイルス Zr-599 株を 1 匹あたり 10^6 PFU ウイルス量 (100 μ l) を頸背部に皮下接種経路で感染させた。対照群には細胞培養液を接種した。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 日目と 16 日目に動物を安楽殺し、病理学的解析を行った。
 - 5) LC16m8 ワクチン接種による効果・安全性等に関する調査
ヒトにおける長期免疫、マウスにおける強毒株接種時の防御、第 1 世代ワクチンとの比較、繰り返し接種の効果、長期の効果等の解析を行った。
 - 6) ヒトにおける LC16m8 ワクチン接種によるサル痘ウイルスに対する中和抗体の誘導に関する研究
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サル痘ウイルスに対する中和抗体について再調査した。
2. 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) 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遺伝子増幅法の開発
2010 年以降に報告された論文を参考に、これらのウイルスゲノムを検出するリアルタイム RT-PCR 用プライマーおよびプローブを製作した。ウイルス粒子から精製したウイルスゲノムを陽性コントロールとしてゲノムの増幅性および特異性を検討した。
 - 2) エボラウイルス等検出法の外部評価への参加
Robert Koch Institute, Bernard Notch Institute, Philipps University が調製した、陰性コントロール(ウイルスが含まれていないもの)も含む 11 種の不活化サンプルからなる Ebola Proficiency Panel-II を、感染研ウイルス第一部において整備されているエボラウイルス、マールブルグウイルス遺伝子検出法に供し、検査を実施した。
 - 3) 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 の検出法の開発
Paracoccidioides brasiliensis, *Blastomyces dermatitidis*, *Penicillium marneffeii* DNA の LAMP 法による高感度検出系 (LAMP 法) の開発を試みた。
 - 4) 環境中のメタゲノム解析
東京近郊を周回する大江戸線の各駅から手すり等の環境サンプルを採取し、次世代シーケンサーを用いたメタゲノム DNA 解析法にて、特徴的な病原体や薬剤耐性菌の検出を試みた。
 - 5) DNA ウイルス核酸の検出が可能な ISH-AT 法の確立
ホルマリン固定パラフィン包埋剖検組織標本、感染細胞標本を使用した。(アデノウイルス感染細胞は国立感染症研究所・花岡博士、B 型肝炎ウイルス (HBV) 感染細胞は国立感染症研究所・渡士博士から分与) ウイルスゲノム情報をもとに検出用のオリゴプローブを作成し ISH-AT 法で検出を試みた。
 - 6) 病原体の電子顕微鏡学的迅速検出法の確立
電子顕微鏡によるウイルス診断法の精度向上のため、教育訓練の一環としてロベルト・コッホ研究所による外部評価に参加した。
 - 7) バイオテロに関連する可能性のある細菌性毒素検出のためのシステム開発
モルモット抗 TRH 血清、モルモット抗 BoNT/A_{Hc} 血清を、モルモットにそれぞれの精製された抗原を免疫して作製した。また、抗ウェルシュ菌毒素 (CPE) 抗体を、組換え発現 CPE 抗原をウサギに免疫して作製した。
3. 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と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
バイオテロ対応ホームページをアップデートするとともに、バイオテロ遭遇現場で医療従事者が簡便に参照できる資料の必要性を考慮し、「バイオテロを疑う時シート」を作成した。
 4. 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
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 地区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」、「5. NBC テロ発生時の緊急連絡体制の構築や健

「康危機発生を想定した模擬訓練」の視点から、アンケート調査により、課題を抽出し、課題の改善などを検討した。

C. 研究結果

1. 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) 日本で製造・備蓄されている痘そう LC16m8 ワクチン MSP 測定法の開発と日本で製造・備蓄されている痘そう LC16m8 ワクチン中の MSP 含有量の測定

備蓄されはじめた初期の乾燥細胞培養痘そうワクチンロット V01～V05 には比較的高い割合で MSP 形成ウイルスが含まれているが、それ以降に製造され備蓄されているワクチンの各ロットにはほとんど含まれていないことが確認された。

- 2) LC16m8 ワクチンのボックスウイルス感染暴露後効果に関する研究

クトロメリアウイルス暴露直後に LC16m8、または *Listeria* を接種すれば死亡率が減少する傾向が確認された。

- 3) LC16m8 ワクチン中に含まれる MSP ウイルスの定量的検出のための NGS 法の導入の評価

主要な MSP と LC16m8 株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。ワクチン中の MSP のうち L1、L4、L5 の 3 種の頻度の高い MSP を検出した結果、本 PCR はバイオアッセイよりも遥かに簡便に含有率を算出できた。

- 4) サル痘ウイルス感染マウスモデルの開発

抗 Ly6G 抗体をマウスに投与することにより好中球枯渇させると、マウスにおいてサル痘ウイルスが増殖し、かつ、病変形成が亢進することが明らかとなった。

- 5) LC16m8 ワクチン接種による効果・安全性等に関する調査

LC16m8 株はマウスおよびヒトにおいて、第 1 世代ワクチンと同様に、既知の中和抗体を含む多様な抗体を誘導した。LC16m8 株は安全性・有効性を兼ね備えたワクチン株である。

- 6) ヒトにおける LC16m8 ワクチン接種によるサル痘ウイルスに対する中和抗体の誘導に関する研究

痘そうワクチン LC16m8 のサル痘ウイルスに対する中和抗体免疫誘導能が確認された。

2. 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) 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遺伝子増幅法の開発

デザインされた各々のプライマー・プローブセットを用いたリアルタイム RT-PCR 法により、それぞれのウイルス遺伝子の標的遺伝子が特異的に増幅された。今回新たに作製されたプライマー・プローブセットが適切に機能することが確認された。

- 2) エボラウイルス等検出法の外部評価への参加

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法がかなり高い感度と特異度を有していることが判明した。市販キットは試薬が揃っており準備が容易であるが、価格が高くバイオテロで多検体を処理しなくてはならないような状況には不向きであり、詳細な塩基配列情報も得られる現行の検査法の方がより適していると考えられた。

- 3) 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 の検出法の開発

P. brasiliensis および *P. marneffei* については、既報の論文のプライマーセットの導入により、期待通りの検出感度を確保でき、BSL3 真菌検出システムへの組込みに応用できることが示された。しかしながら、新たに設計した *B. dermatitidis* の LAMP プライマーについては、検出感度が低く、実用レベルに達しなかった。

- 4) 環境中のメタゲノム解析

調査対象とした大江戸線においては、ヒト配列が有意な採取箇所やレンサ球菌属配列の多い駅等へ大まかに分類されることが分かった。手すり等の表面は利用者が直接接触する可能性があり、基本的にヒト配列が際立って多い場所であってもおかしくないと推測される一方、ヒト常在菌の *Streptococcus* レンサ球菌属の配列が多数を占める採取箇所もあった。

- 5) DNA ウイルス核酸の検出が可能な ISH-AT 法の確立

アデノウイルス (ADV) 及び B 型肝炎ウイルス (HBV) の検出の確立を試みた。ADV に関しては型特異的な検出を目指している。HBV に関しては、肝癌発生に深く関与していると考えられている cccDNA の検出を目標に様々なプローブの作成、組織の処理法を検討中である。細胞標本及び臨床検体の解析を行って

おり、ADV に関しては双方でウイルスゲノムの検出に成功した。

- 6) 病原体の電子顕微鏡学的迅速検出法の確立
電子顕微鏡によるウイルスの同定は、その粒子の大きさ、形状、エンベロープの有無と形状、検体の由来とその臨床症状がポイントとなることが確認された。
- 7) バイオテロに関連する可能性のある細菌性毒素検出のためのシステム開発
得られた抗 TRH モルモット血清、抗 BoNT/A_{Hc} モルモット血清、ウサギ抗ウェルシュ菌毒素(CPE)抗体は、抗原検出法(例えばイムノクロマト法、ELISA 法、ウエスタンブロット法等)に応用できることが示された。

3. 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と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

- 1) バイオテロ対応ホームページのアップデート
インターネット上で最新の生物テロ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』は、これまでパスワードを知る感染症専門医等のみが閲覧可能であったが、今年度から一般公開を行った。
- 2) 「バイオテロを疑う時シート」の作成
実際のバイオテロ遭遇現場で医療従事者が簡便に参照できる資料の必要性を考慮し、「バイオテロを疑う時シート」を作成した。豊富に写真や図表を掲載するなど一覧性・視認性に優れた対応シートを作成し、平成 28 年 3 月に全国の病院(約 990 施設)へ配布した。

4. 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

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、各地区支部内、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。2016 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。今後に残された主要課題として、1) 特定病原体等を原因とする 1 類感染症(クリミア・コンゴ出血熱、痘瘡、南米出血熱、ラッサ熱)、2 類感染症(結核、中東呼吸器症候群、鳥

インフルエンザ H7N9)や 4 類感染症(17 疾患)に関する病原体検出マニュアルの整備、2) 特定病原体等の規定対象外であるが、アメリカ合衆国 CDC がバイオテロの候補物質(Category B)として指定している毒素(細菌毒素:黄色ブドウ球菌やウエルシュ菌エンテロトキシンや植物毒素:リシン)に関し、所管の明確化や検出マニュアルの整備、3) テロ発生に際し、迅速で円滑な対応をするため、緊急連絡・対応体制の構築や NBC テロを含む健康危機の発生を想定した対応模擬訓練の実施が掲げられる。

【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。

D. 考察

近年、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。2014-15 年には大規模なエボラウイルス病の流行が西アフリカで流行した。また、中東で流は中東呼吸器症候群(MERS)の流行が初めて確認され、その流行は今でも続いている。致命率の高い病原体はバイオテロ病原体として用いられるリスクがあることを理解する必要がある。迅速で正確な診断システム開発が急務となる。

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が生じている。感染症のあり方とバイオテロ対策のあり方が、刻々と変化していることを示している。

本年度の研究を通じて LC16m8 ワクチンの性状、有効性と安全性に関して新知見が加えられた。

日本で備蓄されている天然痘ワクチン LC16m8 の研究においては、痘瘡ウイルスに曝露された後に、早期に LC16m8 ワクチン接種することで天然痘の症状を軽減化することが可能であることが示唆される研究成績が得られた。また、ヒトに LC16m8 ワクチン接種することで、西アフリカ等で流行しているヒトサル痘(サル痘ウイルスによるヒトにおける感染症)の原因ウイルスであるサル痘ウイルスに中和抗体が誘導されることが再確認された。世界的にも安全性が高いと評価されている本ワクチンが、ヒトサル痘に対

して使用されることの正当性を示唆する成績も示された。

バイオテロ関連病原体検査法，迅速検査法の基盤が強化された。アメリカ大陸において流行しているアルファウイルス群による脳炎が，日本を含む非流行地で流行するリスクがあり，それに迅速に対応できるようになった。また，バイオリスク関連真菌感染症への対応のための検査法の開発，病理学的に病原体を正確に，かつ，比較的迅速に検出するための ISH-AT tailing 法を，これまで RNA ウィルスに応用するものであったものと，DNA ウィルスにも応用できるようにした。電子顕微鏡で病原体を迅速に検出するための訓練も Global Security Health Action Group-Laboratory Network 活動の協力を得て，実施された。また，感染研において整備されているエボラウイルス検出システムの外部評価も本活動の協力のもとに実施された。

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。今年度も世界保健機関が主催する Advisory Committee for Variola Virus Research において，本研究班で実施されている研究成果が発表された。この研究班の重要性を示す事例と言える。

バイオテロ対策における医療機関の協力を得られやすくするためのホームページを充実させ，一般公開させた。さらに全国の医療機関にバイオテロ臨床マニュアルとして応用できる「バイオテロを歌額時シート」を配付した。また，バイオテロ事象が発生したり，その恐れのある時の厚労省，感染研，地方衛生研究所の連携のあり方における問題点を洗い出したりして，今後の対策の強化に必要な提言が可能となった。

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。バイオテロ事象が発生した場合の，医療機関，地方衛生研究所との連携のあり方を明らかにするとともに，一部実践した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Taniguchi S, Maeda K, Horimoto T, Masangkay JS, Puentespina Jr. R, Alvarez J, Eres E, Cosico E, Nagata N, Egawa K, Singh H, Fukuma A, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Tsuchiaka S, Omatsu T, Mizutani T, Une Y, Yoshikawa Y, Shimojima M, Saijo M, Kyuwa S. First isolation and characterization of Pteropine orthoreoviruses in fruit bats in the Philippines. *Archives of Virology* (in press)
- 2) Iizuka I, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Fukushi S, Ogata M, Morikawa S, Hasegawa H, Mizuguchi M, Kurane I, Saijo M. A single vaccination of nonhuman primates with highly attenuated smallpox vaccine, LC16m8, provides long-term protection against monkeypox. *Japanese Journal of Infectious Diseases* (in press)
- 3) Taniguchi S, Fukuma A, Tani H, Fukushi S, Saijo M, Shimojima M. A neutralization assay with a severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strain that makes plaques in inoculated cells. *Journal of Virological Methods*. 244:4-10, 2017
- 4) Yoo JR, Heo ST, Park D, Kim H, Fukuma A, Fukushi S, Shimojima M, Lee KH. Family Cluster Analysis of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Infection in Korea. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 95(6):1351-1357, 2016
- 5) Singh H, Shimojima M, Fukushi S, Fukuma A, Tani H, Yoshikawa T, Taniguchi S, Yang M, Sugamata M, Morikawa S, Saijo M. Serologic assays for the detection and strain identification of Pteropine orthoreovirus. *Emerging Microbes and Infection* 5:e44. doi: 10.1038/emi.2016.35, 2016

- 6) Kurihara S, Satoh A, Yu F, Hayasaka D, Shimojima M, Tashiro M, Saijo T, Takazono T, Imamura Y, Miyazaki T, Tsukamoto M, Yanagihara K, Mukae H, Saijo M, Morita K, Kohno S, Izumikawa K. The world first two cases of severe fever with thrombocytopenia syndrome: An epidemiological study in Nagasaki, Japan. *Journal of Infection and Chemotherapy* 22(7):461-465, 2016
- 7) Kitao A, Ieki R, Takatsu H, Tachibana Y, Nagae M, Hino T, Nakaji H, Shimojima M, Saijo M, Okayama M, Kenzaka T. Severe fever with thrombocytopenia syndrome presenting as hemophagocytic syndrome: two case reports. *Springerplus* 5:361, 2016
- 8) Suda Y, Fukushi S, Tani H, Murakami S, Saijo M, Horimoto T, Shimojima M. Analysis of the entry mechanism of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, using a vesicular stomatitis virus pseudotyping system. *Archives of Virology* 161(6):1447-1454, 2016
- 9) Kawagishi T, Kanai Y, Tani H, Shimojima M, Saijo M, Matsuura Y, Kobayashi T. Reverse genetics for fusogenic bat-borne orthoreovirus associated with acute respiratory tract infections in humans: Role of outer capsid protein C in viral replication and pathogenesis. *PLoS Pathogens* 12(2):e1005455, 2016.
- 10) Tani H, Shimojima M, Fukushi S, Yoshikawa T, Fukuma A, Taniguchi S, Morikawa S, Saijo M. Characterization of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus glycoprotein-mediated entry. *Journal of Virology* 90: 5292-5301, 2016
- 11) Fukuma A, Fukushi S, Yoshikawa T, Tani H, Taniguchi S, Kurosu T, Egawa K, Suda Y, Singh H, Nomachi T, Gokuden M, Ando K, Kida K, Kan M, Kato N, Yoshikawa A, Kitamoto H, Sato Y, Suzuki T, Hasegawa H, Morikawa S, Shimojima M, Saijo M. Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Antigen Detection Using Monoclonal Antibodies to the Nucleocapsid Protein. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10(4):e0004595, 2016
- 12) Kimura M, Une Y, Suzuki M, Park E-S, Imaoka K and Morikawa S. Isolation of *Brucella inopinata*-like bacteria from White's and Denny's tree frogs. *Vector Borne Zoonotic Dis* (in press)
- 13) Park ES, Suzuki M, Kimura M, Mizutani H, Saito R, Kubota N, Hasuike Y, Okajima J, Kasai H, Sato Y, Nakajima N, Maruyama K, Imaoka K, Morikawa S. Epidemiological and pathological study of feline morbillivirus infection in domestic cats in Japan. *BMC Veterinary Research* 12(1):228, 2016
- 14) Zamoto-Niikura A, Morikawa S, Hanaki KI, Holman PJ, Ishihara C. *Ixodes persulcatus* ticks as a vector for *Babesia microti* U. S. lineage in Japan. *Applied Environmental Microbiology* 82(22):6624-6632, 2016
- 15) Arai S, Taniguchi S, Aoki K, Yoshikawa Y, Kyuwa S, Tanaka-Taya K, Masangkay JS, Omatsu T, Puentespina R Jr, Watanabe S, Alviola P, Alvarez J, Eres E, Cosico E, Quibod MN, Morikawa S, Yanagihara R, Oishi K. Molecular phylogeny of a genetically divergent hantavirus harbored by the Geoffroy's rousette (*Rousettus amplexicaudatus*), a frugivorous bat species in the Philippines. *Infection and Genetic Evolution* 45:26-32, 2016
- 16) Uda A, Sharma N, Takimoto K, Deyu T, Koyama Y, Park ES, Fujita O, Hotta A, Morikawa S. Pullulanase Is Necessary for the Efficient Intracellular Growth of *Francisella tularensis*. *PLoS One* 11(7):e0159740, 2016
- 17) Arai S, Kang HJ, Gu SH, Ohdachi SD, Cook JA, Yashina LN, Tanaka-Taya K, Abramov SA, Morikawa S, Okabe N, Oishi K, Yanagihara R. Genetic Diversity of Artybash Virus in the Laxmann's Shrew (*Sorex caecutiens*). *Vector Borne Zoonotic Diseases* 16(7):468-475, 2016
- 18) Hotta A, Fujita O, Uda A, Yamamoto Y, Sharma N, Tanabayashi K, Yamada A, Morikawa S. Virulence of Representative Japanese *Francisella tularensis* and Immunologic Consequence of Infection in Mice. *Microbiology and Immunology* 60(3):168-176, 2016
- 19) Kaneyuki S, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Taniguchi S, Fukuma A, Shimojima M, Kurosu T, Morikawa S, Saijo M. Ulcerative lesions with hemorrhage in a patient with severe

- fever with thrombocytopenia syndrome observed via upper gastrointestinal endoscopy. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 69(6): 525-527, 2016
- 20) 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. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 69 (5):431-434, 2016
- 21) 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. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 69(2):131-134, 2016
- 22) Arafa AS, Yamada S, Imai M, Watanabe T, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Kiso M, Sakai-Tagawa Y, Ito M, Imamura T, Nakajima N, Takahashi K, Zhao D, Oishi K, Yasuhara A, Macken CA, Zhong G, Hanson AP, Fan S, Ping J, Hatta M, Lopes TJ, Suzuki Y, El-Husseiny M, Selim A, Hagag N, Soliman M, Neumann G, Hasegawa H, Kawaoka Y. Risk assessment of recent Egyptian H5N1 influenza viruses. *Scientific Reports* 6:38388, 2016
- 23) Iwatsuki-Horimoto K, Nakajima N, Shibata M, Takahashi K, Sato Y, Kiso M, Yamayoshi S, Ito M, Enya S, Otake M, Kangawa A, da Silva Lopes TJ, Ito H, Hasegawa H, Kawaoka Y. The microminipig as an animal model for influenza A virus infection. *Journal of Virology* 91(2):e01716-16, 2017
- 24) Kotani O, Suzuki T, Yokoyama M, Iwata-Yoshikawa N, Nakajima N, Sato H, Hasegawa H, Taguchi F, Shimizu H, Nagata N. Intracerebral inoculation of mouse-passaged Saffold virus type 3 affects cerebellar development in neonatal mice. *Journal of Virology* 90(21):10007-10021, 2016
- 25) Sakai K, Ami Y, Nakajima N, Nakajima K, Kitazawa M, Anraku M, Takayama I, Sangsriratanakul N, Komura M, Sato Y, Asanuma H, Takashita E, Komase K, Takehara K, Tashiro M, Hasegawa H, Odagiri T, Takeda M. TMPrSS2 Independency for Haemagglutinin Cleavage In Vivo Differentiates Influenza B Virus from Influenza A Virus. *Scientific Reports* 6:29430, 2016
- 26) Hayashi K, Yoshida H, Sato Y, Tobiume M, Suzuki Y, Ariyoshi K, Hasegawa H, Nakajima N. Histopathologic findings of lung with A/H1N1pdm09 infection-associated ARDS in the post-pandemic season. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 70(2):197-200, 2017
- 27) Hai Le T, Thach HN, Tuan TA, Nam DH, Dien TM, Sato Y, Kumasaka T, Suzuki T, Hanaoka N, Fujimoto T, Katano H, Hasegawa H, Kawachi S, Nakajima N. Adenovirus Type 7 Pneumonia in Children Who Died from Measles-Associated Pneumonia, Hanoi, Vietnam, 2014. *Emerging Infectious Disease* 22(4):687-690, 2016
- 28) Kotani O, Naeem A, Suzuki T, Iwata-Yoshikawa N, Sato Y, Nakajima N, Hosomi T, Tsukagoshi H, Kozawa K, Hasegawa H, Taguchi F, Shimizu H, Nagata N. Neuropathogenicity of Two Saffold Virus Type 3 Isolates in Mouse Models. *PLoS One* 11(2):e0148184, 2016
- 29) Furihata S, Matsumura T, Hirata M, Mizutani T, Nagata N, Kataoka M, Katayama Y, Omatsu T, Matsumoto H, Hayakawa Y. Characterization of Venom and Oviduct Components of Parasitoid Wasp *Asobara japonica*. *PLoS One* 11(7) e0160210, 2016
- 30) Onodera, T., A. Hosono, T. Odagiri, M. Tashiro, S. Kaminogawa, Y. Okubo, T. Kurosaki, M. Ato, K. Kobayashi, and Y. Takahashi. 2016. Whole-virion influenza vaccine recalls an early burst of high-affinity memory B cell response through Toll-like receptor signaling. *Journal of Immunology* 196: 4172-4184, 2016
- 31) Aryantini NP, Yamasaki E, Kurazono H, Sujaya IN, Urashima T, Fukuda K. In vitro safety assessments and antimicrobial activities of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from a fermented mare's milk. *Animal Science Journal* (in press)
- 32) Nakano M, Yahiro K, Yamasaki E, Kurazono H, Akada J, Yamaoka Y, Niidome T, Hatakeyama M, Suzuki H, Yamamoto T, Moss J, Isomoto H, Hirayama T. *Helicobacter*

- pylori* VacA, acting through receptor protein tyrosine phosphatase, is crucial for CagA phosphorylation in human duodenum carcinoma cell line AZ-521. *Disease Models & Mechanisms* 19(12): 1473-1481, 2016
- 33) Watanabe S, Matsumura K, Iwai H, Funatogawa K, Haishima Y, Fukui C, Okumura K, Kato-Miyazawa M, Hashimoto M, Teramoto K, Kirikae F, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T. A Mutation in the 16S rRNA Decoding Region Attenuates the Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity* 84:2264-2273, 2016
- 34) Fujikura Y, Yuki A, Hamamoto T, Ichimura S, Kawana A, Ohkusu K, Matsumoto T. Evaluation and validity of a polymerase chain reaction-based open reading frame typing method to dissect the molecular epidemiology for *Acinetobacter baumannii* in an epidemiologic study of a hospital outbreak. *American Journal of Infection and Control* 44(11):e275-e278, 2016
- 35) Yonetani S, Ohnishi H, Ohkusu K, Matsumoto T, Watanabe T. Direct identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF MS using an in-house saponin method. *International Journal of Infectious Diseases* 52:37-42, 2016
- 36) Miyazaki H, Shibuya R, Midorikawa N, Chang B, Ohnishi M, Matsumoto T. Serotype distribution and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in Japan after introduction of the routine immunization program. *Journal of Infection and Chemotherapy* (in press)
2. 学会発表
- 1) 西條政幸. ヒト由来ウイルス感染症と動物由来ウイルス感染症の相違および感染症対策のあり方. 第 90 回日本感染症学会総会・学術講演会, 仙台, 2016 年 4 月
- 2) 森川茂, 棚林清, 西條政幸. 国立感染症研究所の BSL-4 施設が大臣指定を受けるまでの道のりと今後の施設内での業務等について. 第 16 回日本バイオセーフティ学会学術総会・学術集会. 大宮, 2016 年 10 月
- 3) Yoshikawa T, Fujii Hi, Shibamura M, Omura N, Harada S, Yamada S, Saijo M. Recovery of infectious vaccinia virus from a bacterial artificial chromosome, which retains the full-length viral genome of a strain, LC16m8. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌 2016 年 10 月
- 4) Egawa K, Shimojima M, Taniguchi S, Nagata N, Tani H, Yoshikawa T, Kurosu T, Fukushi S, Saijo M. Pathogenicity of human-origin Pteropine orthoreovirus (PRV) and bat-origin PRV in BALB/c mice. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2016 年 10 月
- 5) 伊藤(高山)睦代, 林昌宏, 森本金次郎, 堀谷まどか, 山口幸恵, 垣内五月, 塩田(飯塚)愛恵, Posadas Herrera Guillermo, 西條政幸. アレナウイルスに対する非増殖型組換え狂犬病ウイルスワクチンの防御能. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2016 年 10 月
- 6) Kuroasu T, Okuzaki D, Limkittikul K, Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Saijo M. Transcriptome analysis using a fatal mouse model for severe dengue. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2016 年 10 月
- 7) Kawachi K, Tani H, Shimojima M, Fukushi S, Kurosu T, Kamitani W, Saijo M. Determination of the amino acid residue important for fusion of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus glycoprotein. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2016 年 10 月
- 8) Shinomiya H, Kimura T, Fukuma A, Shimojima M, Yamashita Y, Mizota F, Yamashita M, Otsuka Y, Kan M, Saijo M. Seroprevalence of severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) virus antibodies in SFTS endemic areas of Ehime prefecture, Japan. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌 2016 年 10 月
- 9) Egawa K, Shimojima M, Taniguchi S, Nagata N, Tani H, Yoshikawa T, Kurosu T, Fukushi S, Saijo M. Pathogenicity of human-origin Pteropine orthoreovirus (PRV) and bat-origin PRV in BALB/c mice. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2016 年 10 月
- 10) Kawagishi T, Kanai Y, Tani H, Shimojima M, Saijo M, Matsuura Y, Kobayashi T. Nelson Bay Orthoreovirus S1 gene segment determines strain-specific differences in viral infectivity and pathogenesis. 第

- 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2016 年 10 月
- 11) Shiota T, Li T, Yoshizaki S, Nishimura Y, Shimizu H, Shimojima M, Saijo M, Wakita T, Ishii K. Molecular characterization of the hepatitis E virus receptor candidate. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌 2016 年 10 月
 - 12) Fukushi S, Fukuma A, Tani H, Kurosu T, Taniguchi S, Egawa K, Shimojima M, Shirato K, Mastuyama S, Sentsui H, Saijo M. Vesicular stomatitis virus pseudotype-based assay for detecting MERS-CoV neutralizing antibody responses. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌 2016 年 10 月
 - 13) Watanabe S, Edenborough K, Tachedjian M, Todd S, Klein R, Shimojima M, Marsh G. Establishment of an efficient reverse genetics system for Nipah virus Bangladesh strain. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2016 年 10 月
 - 14) Shimojima M, Suda Y, Dowall S, Horimoto T, Saijo M, Hewson R. Development of a novel diagnostic assay using VSV for detection of neutralizing activity to CCHFV. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2016 年 10 月
 - 15) Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Fukushi S, Kurosu T, Koyama Y, Uda A, Morikawa S, Komeno T, Nakajima N, Furuta Y, Shimojima M, Saijo M. Therapeutic effects of favipiravir (T-705) against severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection in a mouse lethal model. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2016 年 10 月
 - 16) 渡辺俊平, 下島昌幸, Glenn A. Marsh. ニパウイルス, バングラディッシュ株の組換えウイルス作出系の確立. 第 159 回日本獣医学会学術集会, 藤沢市, 2016 年 9 月
 - 17) 江川和孝, 下島昌幸, 谷口怜, 永田典代, 谷英樹, 黒須剛, 吉河智城, 福土秀悦, 西條政幸. BALB/c マウスにおけるヒト由来およびコウモリ由来プテロパインオールソレオウイルスの病原性解析. 第 159 回日本獣医学会学術集会, 藤沢市, 2016 年 9 月
 - 18) 田子さやか, 井口成一, 相野田祐介, 平井由児, 鷺澤 豊, 後藤亜江子, 柄澤利子, 鶴岡直樹, 渡辺 哲, 亀井克彦, 名木 稔, 梅山 隆, 宮崎義継, 菊池 賢, 米国カリフォルニア州ベーカーズフィールド滞在後に発症した難治性中耳炎の一例, 第 90 回日本感染症学会総会, 仙台, 2016 年 4 月
 - 19) Nakajima N, Hamamatsu A, Hayashi K, Sato Y, Kumasaka T, Tobiume M, Hasegawa H. Severe lung injury associated with A/H1N1 pdm09 infection in the post-pandemic season. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2016 年 10 月
 - 20) 鈴木忠樹, 片野晴隆, 高橋健太, 佐藤由子, 中島典子, 長谷川秀樹. 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) の病理解析. 第 105 回日本病理学会総会, 仙台, 2016 年 5 月
 - 21) 酒井宏治, 中島典子, 駒瀬勝啓, 竹田誠. 呼吸病ウイルスの病原性発現に関わる宿主プロテアーゼ TMPRSS2 の意義. 第 57 回日本臨床ウイルス学会, 福島, 2016 年 5 月
 - 22) 山崎栄樹, 綿引正則, 磯部順子, 佐多徹太郎, 倉園久生. 腸管出血性大腸菌による国内集団食中毒事件患者の糞便中志賀毒素の定量的解析. 第 37 回日本食品微生物学会学術総会, 東京都, 2016 年 9 月
 - 23) 山崎栄樹, 綿引正則, 磯部順子, 佐多徹太郎, 倉園久生. 国内 EHEC 集団食中毒事件患者の糞便中志賀毒素の定量的解析. 第 20 回 EHEC 感染症研究会, 富山県, 2016 年 11 月
 - 24) Yamasaki E, Watahiki M, Isobe J, Sata T, Kurazono H. Quantitative detection of Shiga toxins directly from stool specimens of patients associated with an outbreak of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Japan. 51st US-Japan Joint Panel Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections, ソウル (韓国), 2017 年 2 月
 - 25) 山崎栄樹, 奥村香世, 江崎孝行, 倉園久生. 生物テロに用いられる細菌・毒素の検出法. 第 90 回日本細菌学会総会, 仙台, 2017 年 3 月
 - 26) Nakamura I, Matsumoto I. Improving hand hygiene behavior by scenario based simulation, ASM Microbe 2016, Boston, June 2016
 - 27) 江藤亜紀子, 上村千草, 金原知美, 齋藤智也, 横手公幸, 金谷泰宏. 天然痘ワクチン LC16m8 による感染防御成立時の抗体産生の網羅的解析. 第 20 回ワクチン学会学術集会, 東京,

2016年10月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

3. その他

出願

発明者：山崎栄樹，倉園久夫

出願番号：特願 2016-121670

発明の名称：サルモネラ属菌の血清型判別用

プローブ及びプライマー並びにその使用

. 分担研究報告

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

分担報告書

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

所 属 国立感染症研究所ウイルス第一部
研究代表者 西條政幸

研究要旨：痘瘡ウイルスが用いられるバイオテロに備えて日本では弱毒生細胞培養痘そうワクチン（LC16m8）が備蓄されている。このワクチンは日本で開発された高度に弱毒化された痘瘡ワクチンであり，その安全性と有効性から国際的に注目されているワクチンの1つである。LC16m8 の B5R 遺伝子に変異が認められることが安全性の因子の1つである。しかし，LC16m8 を増殖させる過程で B5R 遺伝子変異が消失して，性質に変化が生じ，病原性が高まるウイルス（ことが知られている。そこで日本で製造・備蓄されている痘そうワクチン LC16m8 の各ロット中の Middle Size Plaque (MSP) 形成ウイルス含有量を測定した。備蓄されはじめた初期の乾燥細胞培養痘そうワクチンロット V01～V05 には比較的高い割合で MSP 形成ウイルスが含まれているが，それ以降に製造され備蓄されているワクチンの各ロットにはほとんど含まれていないことが確認された。

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

研究協力者

福士秀悦・国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官

下島昌幸・国立感染症研究所ウイルス第一部・第一室長

吉河智城・国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官

黒須剛・国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官

緒方もも子・国立感染症研究所ウイルス第一部・研究員

A. 研究目的

痘そうウイルスを用いたバイオテロ対策の一つとして日本で製造備蓄されている細胞培養痘そうワクチン LC16m8 株は Lister 株から継代培養により LC16 株，LC16m0 株を経由して樹立された安全性の高いワクチン株である。しかし，LC16m8 株を継代するとプラークサイズのやや大きい Middle Size Plaque (MSP) 形成ウイルスが出現

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

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

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

B. 研究方法

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

【倫理面への配慮】

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

C. 研究結果

1. 備蓄されている細胞培養痘そうワクチンの各ロットにおける MSP 形成ウイルス含有率
細胞培養痘そうワクチンのロット V01~V05 の MSP 形成ウイルス含有率は 3~4%であった。これらは 2003 年に製造されたものであった。一方、それ以降に製造され備蓄されているロット V06~V14 の MSP 形成ウイルス含有率は 0.3%程度あるいはそれ以下であった(図 1)。
2. バイオテロ関連国際会議への出席と報告
 - 1) 第 18 回世界保健機構(WHO)痘瘡ウイルス研究アドバイザリーコミティー
第 18 回世界保健機構(WHO)痘瘡ウイルス研究アドバイザリーコミティーでは、米国 CDC およびロシア VECTOR がこれまで本会議で許可され実施している感染性痘瘡ウイルスを用いた研究の経過、および、申請研究課題について

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

2) 第 1 回 EDCARN

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

D. 考察

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

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

E. 結論

日本で備蓄されはじめた初期の乾燥細胞培養痘そうワクチンロット V01～V05 には比較的高い割合で MSP 形成ウイルスが含まれているが、それ以降に製造され備蓄されているワクチンの各ロットには MSP が含まれているがその割合は 03%以下であった。

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

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Taniguchi S, Maeda K, Horimoto T, Masangkay JS, Puentespina Jr. R, Alvarez J, Eres E, Cosico E Nagata N, Egawa K, Singh H, Fukuma A, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Tsuchiaka S, Omatsu T, Mizutani T, Une Y, Yoshikawa Y, Shimojima M, Saijo M, Kyuwa S. First

isolation and characterization of Pteropine orthoreoviruses in fruit bats in the Philippines. Archives of Virology (in press)

2) Iizuka I, Ami Y, Suzuki Y, Nagata N, Fukushi S, Ogata M, Morikawa S, Hasegawa H, Mizuguchi M, Kurane I, Saijo M A Single vaccination of nonhuman primates with highly attenuated smallpox vaccine, LC16m8, provides long-term protection against monkeypox. Japanese Journal of Infectious Diseases (in press)

2. 学会発表

1) 西條政幸 .ヒト由来ウイルス感染症と動物由来ウイルス感染症の相違および感染症対策のあり方 . 第 90 回日本感染症学会総会・学術講演会, 仙台, 2016 年 4 月

2) 森川茂, 棚林清, 西條政幸 . 国立感染症研究所の BSL-4 施設が大臣指定を受けるまでの道のりと今後の施設内での業務等について . 第 16 回日本バイオセーフティ学会学術総会・学術集会 . 大宮, 2016 年 10 月

3) Yoshikawa Tomoki, Hikaru Fujii, Miho Shibamura, Natsumi Omura, Shizuko Harada, Souichi Yamada, Masayuki Saijo . Recovery of infectious vaccinia virus from a bacterial artificial chromosome, which retains the full-length viral genome of a strain, LC16m8 . 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌 (2016 . 10)

4) Kazutaka Egawa, Masayuki Shimojima, Satoshi Taniguchi, Noriyo Nagata, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Takeshi Kurosu, Shuetsu Fukushi, Masayuki Saijo . Pathogenicity of human-origin Pteropine orthoreovirus (PRV) and bat-origin PRV in BALB/c mice . 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌(2016 .10)

5) 伊藤(高山)睦代, 林昌宏, 森本金次郎, 堀谷まどか, 山口幸恵, 垣内五月, 塩田(飯塚)愛恵, Posadas Herrera Guillermo, 西條政幸 . アレナウイルスに対する非増殖型組換え狂犬病ウイルスワクチンの防御能 . 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌 (2016 . 10)

3. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録

なし
3. その他

なし

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

分担報告書

蚊媒介性ウイルスの鑑別検査法の開発：
アルファウイルスに属する馬脳炎ウイルスの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：ベネズエラ馬脳炎，東部馬脳炎，西部馬脳炎はそれぞれ，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より引き起こされる蚊媒介性感染症であり，致死率は 5-35%と推定されている．これらのウイルスはいずれもトガウイルス科アルファウイルス属に属し，アメリカ大陸でのみ生息が確認されている．これらの感染症に対するワクチンはすでに存在するが，一般には使用されていない．これらのウイルスはエアロゾル化しても感染力を維持していることが知られており，またベネズエラ馬脳炎ウイルスは米国において生物兵器として研究されていたとされる．このような性状を有するウイルスであることから，バイオテロなどに利用される可能性も否定できない．そこで本年度はこれらのウイルスを高感度に検出する系の確立を目指した．2010 年以降に報告された論文を参考に，これらのウイルスゲノムを検出するリアルタイム RT-PCR 用プライマーおよびプローブを作製した．ウイルス粒子から精製したウイルスゲノムを陽性コントロールとしてゲノムの増幅性および特異性を検討した．各々のプライマー・プローブセットが特異的に標的遺伝子を増幅することができた．これより，新たに作製したプライマー・プローブセットが適切に機能することが確認された．

研究協力者

氏名・所属研究機関名・職名

藤間大貴・国立感染症研究所・研究生

A. 研究目的

ベネズエラ馬脳炎，東部馬脳炎，西部馬脳炎はそれぞれ，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より引き起こされる蚊媒介性感染症である．

ベネズエラ馬脳炎ウイルス（VEEV）は北～南米大陸に広く分布しており，通常はイエカとげっ歯類の間で感染環が維持されて，ヒトやウマは終宿主に当たる．ヒトが感染した場合の発症率は高いとされるが，その多くが発熱等の急性熱性疾患であり，脳炎にまで至るのは 5%以下とされる．脳炎患者の致死率は 20%前後であるが，小児で高くなる傾向がある．ベネズエラ馬脳炎に対しては生ワクチンと不活化ワクチンが存在するが，一般には使用されていない．ウイルスには I-VI 型のサブタイプがあり，I 型にはさらに 5 亜種に分類される．ヒトへの強い病原性を示すのは IAB 型と IC 型の 2 亜種である．1995

年にはコロンビアとベネズエラで大きな流行があり，約 3000 人が神経症状を呈しうち約 300 人が死亡した．

東部馬脳炎ウイルス（WEEV）は米国のミシシッピ川以東で主に患者が発生するが，カナダの東部州やメキシコでもウイルスが確認されている．米国での患者数は年間数例から多くても 20 例程度である．通常は蚊と鳥との間で感染環を形成している．ヒトが感染してもほとんどが不顕性であるが，脳炎を発症した場合の致死率は約 35%と高い．東部馬脳炎に対する不活化ワクチンがあるが，一般には使用されていない．

西部馬脳炎ウイルス（WEEV）は米国の中央部から西部，カナダ西部やアルゼンチンにまで分布している．通常はイエカと鳥で感染環を形成している．東部馬脳炎と同様不顕性感染率が高いとされる．脳炎を発症した場合の致死率は 5~15%である．西部馬脳炎に対する不活化ワクチンがあるが，やはり一般には使用されていない．

上記 3 種のウイルスはエアロゾル化しても感

染力を維持していることが知られている。またベネズエラ馬脳炎ウイルスは米国において生物兵器として研究されていた経緯もある。そこで本研究では、これらのウイルスが何らかの原因により拡散した場合に迅速に同定できるよう、高感度の遺伝子検出系の確立を目指した。

B. 研究方法

遺伝子検出系は、他のウイルス検出など広範囲で使用され、信頼度も高い TaqMan 系で構成することとした。また、比較的最近（2010 年以降）に発表された論文を基に、プライマーおよびプローブを作製した（VEEV: Qian et al. Chin. J. Virol. 31: 107-113, 2015, WEEV および EEEV: Kang et al. Virology J. 7: 284, 2010）。本研究で使用したプライマー・プローブを表 1 に示す。陽性コントロール用のウイルス RNA は所属研究室で保有する株から抽出・精製したものを使用した（VEEV: TC-83/P1, WEEV および EEEV については株名不明）。ワンステップリアルタイム RT-PCR 反応には東洋紡のキット RNA-direct Realtime PCR Master Mix を使用した。反応条件はキットの推奨プロトコルに従った。ゲノムの複製・検出・解析は StepOne Plus (Thermo 社) を使用した。

【倫理面への配慮】

倫理面に配慮する状況なし

C. 研究結果

上述の論文を参考にして、VEEV, WEEV, および EEEV ゲノム検出用プライマーおよびプローブを作製した。これらと、鋳型用ウイルスゲノム RNA を使用して増幅可能か調べた(図 1)。特異性を確認するために、標的 RNA でない他の 2 種類についても同時に反応を行った。VEEV セットでは VEEV RNA に対して特異的な増幅が確認された。またわずかだが EEEV に対しても反応がみられた。WEEV セットでは WEEV RNA

に対して特異的な増幅が確認され、一方他の 2 種類の RNA には反応しなかった。EEEV セットでは EEEV RNA に対して特異的な増幅が確認された。一方他の 2 種類の RNA には反応しなかった。

D. 考察

今回 VEEV, WEEV, EEEV のゲノム検出用 TaqMan 系を構築した。3 種類ともに標的 RNA を特異的に増幅できることが確認できた。ただし、今回鋳型として用いた RNA はそのコピー数は不明であり、今回構築した系がどの程度の検出感度であるのかは不明である。今後は合成 RNA を作製して検出限界コピー数を明らかにすることにより、これらの系の能力を明確にする必要がある。

E. 結論

VEEV, WEEV, EEEV のゲノム検出用 TaqMan 系を構築し、これらが各標的 RNA を特異的に増幅できることを確認した。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表
特になし
2. 学会発表
特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

表1 本研究で使用したプライマー・プローブセット

Virus	Primer	Probe	Length
VEEV	VEE-F: CAG TTT GAG GTA GAA GC	VEEV-Probe: FAM-AGC AGG TCA CNG AYA AYG ACC ATG C-TAMRA	113
	VEE-R: ATC GTV TCG GAT GGD TC		
WEEV	WEE-F: AGG GAT ACC CCC GAA GGT T	WEE-Probe: FAM-CTT TCG AAT GTC ACG TTC CCA TGC G-TAMRA	103
	WEE-R: GTG AAT AGC ACA CGG GTG GTT		
EEEV	EEE-F: TGT GCG TAC CTC CTC ATC GTT	EEE-Probe: HEX-AGC AGC CTA CCT TTC CGA CAA TGG TTG TC-TAMRA	80
	EEE-R: GAC TGG CGT GAA TCT CTG CTT		

Probe set	VEEV genome (TC-83/P1)	EEEV genome	WEEV genome
VEEV 140pFT	22 . 7	ND (35 . 8)	ND
EEEV 364pFT	ND	15 . 3	ND
WEEV 8274pFT	ND	ND	26 . 7

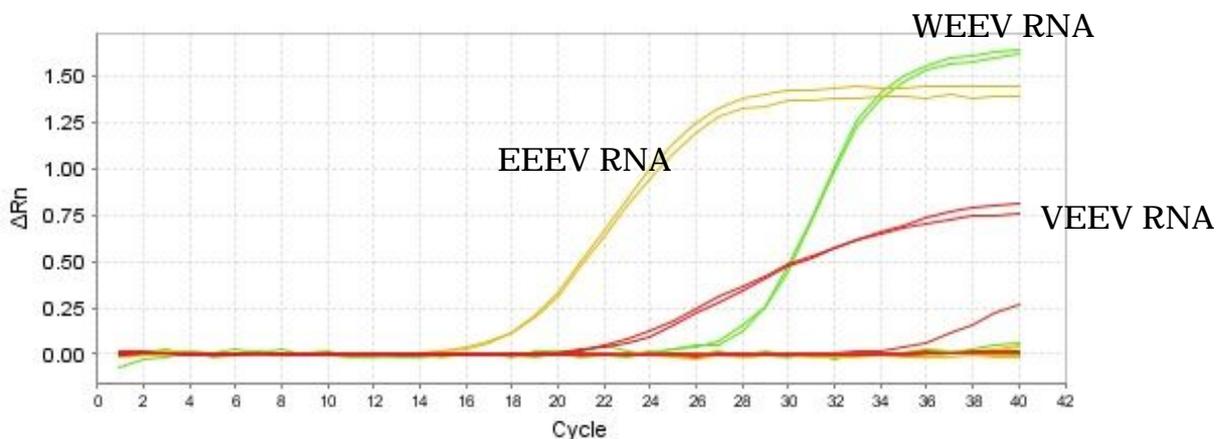


図1 ウィルスクノムを用いた Taqman 法の検出結果

平成 28 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）

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

分担報告書

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：エボラウイルスによるエボラ出血熱など、重篤で高い致死率もたらし承認された予防法や治療法がない病原体はバイオテロに用いられることが懸念される。国立感染症研究所ウイルス第一部ではエボラウイルス等の検出法を準備しているが、その精度や迅速性はバイオテロ発生時の適切な対処に影響すると考えられる。検出法の再評価として GHSAG-LN から提供された Ebola Proficiency Panel-II を用いた外部精度評価 EQA を行なった。11 種のサンプルからなる Ebola Proficiency Panel-II について、国立感染症研究所ウイルス第一部で準備していた conventional RT-PCR, real time RT-PCR, antigen ELISA を用いてエボラウイルスの検出を行なった。11 サンプル中 10 サンプルで正答した。EQA に参加した世界の他のラボで用いている方法や結果を検証したところ、市販キットを用いて完全正答しているラボが多いことが判明した。国立感染症研究所ウイルス第一部で準備しているエボラウイルス検出法がかなり高い水準を持っていることが判明した。市販キットは試薬が揃っており準備が容易であるが、価格が高くバイオテロで多検体を処理しなくてはならないような状況には不向きであり、詳細な塩基配列情報も得られる現行の検査法のほうが適していると判断した。

研究協力者

福士秀悦・国立感染症研究所・ウイルス第一部主任研究官

黒須 剛・国立感染症研究所・ウイルス第一部主任研究官

A. 研究目的

バイオテロに用いられうる病原体は様々考えられる。目的によって病原体に期待される特徴もいくつかあるであろうが、1) 対象に免疫がない、2) 致死率が高い、3) 人から人へ伝播しやすい、4) 有効な治療法がない等の特徴をもつ病原体はバイオテロに利用されうると言える。国立感染症研究所ウイルス第一部では国民の健康増進のため、エボラウイルス等のウイルス性出血熱の疑い事例の発生に備え、エボラウイルスやマールブルグウイルス、ラッサウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス、南米出血熱等の（感染症法で言う）一種病原体の有無を調べる検査法、またそれらに感染した後に体内に作られる抗体の有無を調べる検査法等を準備している。これらはバイオテロが発生した場合に、用いられた病原体や暴露を受けた人の特定、あるいは隔離すべき人・時期の決定など、バイオテロへの対処方針を判断していくうえでも役立つと考えられる。

平成 27 年度までは、エボラウイルス（およびマールブルグウイルス）の検出法として準備していた conventional RT-PCR について、用いる試薬を最新のものにすることで検出に要する時間を短縮するとともに検出の感度を高めることができた。そこで平成 28 年度は Global Health Security Action Group-Laboratory Network (GHSAG-LN) より外部精度評価 EQA として提供された Ebola Proficiency Panel-II を用い、この最新試薬による conventional RT-PCR、および他に準備している検査法の real time RT-PCR, Antigen ELISA の更なる評価を行なった。またこの EQA に参加した世界の 106 のラボの結果及び検査法を解析し、今後のエボラウイルス検出の検査法について考慮した。

B. 研究方法

エボラウイルスおよびマールブルグウイルスの遺伝子を検出する conventional RT-PCR としては前年度までに改良した SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq によるもの（標的は L 遺伝子および NP 遺伝子、NP 遺伝子では nested も含む）を用いた。遺伝子が増幅されバンドが検出された場合には塩基配列の決定を行ないウイルス種の同定も行った。ウイル遺伝子のコピー数を測定するた

めのリアルタイム RT-PCR (標的は L 遺伝子) も行なった . また遺伝子ではなくウイルス蛋白質を検出する抗原検出 ELISA (標的は NP 蛋白質) も行なった .

サンプルとして , Robert Koch Institute , Bernard Notch Institute , Philipps University が調製した , 陰性コントロール (ウイルスが含まれていないもの) も含む 11 種の不活化サンプルからなる Ebola Proficiency Panel-II を用いた (図 1) .

【倫理面への配慮】

倫理面に配慮する状況なし

C. 研究結果

国立感染症研究所ウイルス第一部で準備していた手法による Ebola Proficiency Panel-II の EQA 結果のまとめを図 2 に示した .

サンプル 11 種のうち , 10 種はいずれもコンベンショナル RT-PCR で L 遺伝子および (あるいは) NP 遺伝子が陽性となり , 塩基配列の決定により近いウイルスの株 (ただし 1 つはエボラウイルスではなく近縁のマールブルグウイルス) を示すことができた . そのうち 5 つはウイルスゲノムのコピー数を決定でき , コピー数が多いものについては antigen ELISA でも陽性となった . この結果を提供元に提出した .

Ebola Proficiency Panel-II の提供元から届いた正答とこの EQA に参加したラボの数と国を図 3 に示した . ラボ名は明らかではないが , 南北アメリカ大陸やヨーロッパ , アフリカ大陸の国々からの参加が殆どで , 東アジアからの参加は日本の私たちのみであった . 結果はリアルタイム PCR における Ct 値 (陽性と判断するサイクル数) あるいは陽性/陰性の形に簡素化され , ほとんどのラボが正しい結果を得られていた (図 4) . 匿名化されているとは言え , 結果を当てはめるとこのリストの中で私たちは「74a」と表記されているものであった (図 5) . 1 つの間違いがあり , #1 のサンプルを Zaire ebolavirus の Mayinga 株と判定していたが , 実際にはこれは陰性サンプルであった . Nested PCR (PCR 産物を更に PCR にかける操作) を行なう際のコンタミネーションが疑われる . これ以外はウイルス種 , ウイルス量 , ウイルス株も含め正しい結果が得られており , 私たちが準備している遺伝子検出の検査法はおおむね良好と言える .

図 4 の表から , Ebola Proficiency Panel に

おける遺伝子検出に用いた方法 (市販のキットを用いているかそれ以外か) とそれぞれにおける全正答/誤答のラボ数を数えた (図 6) . 55 のラボが市販キット , 51 のラボが in-house の手法により今回の EQA に取り組んでいた . すべて正答した率は市販のキットで 78% , in-house で 69% と前者の方が高かった . 私たちの in-house の結果がおおむね良好とはいえ 1 つの誤答があったことを考慮すると , 市販キットによる検査法の運用ということも体制として考えられる . 市販のキットがどのメーカーによるものかも明らかにされていないが , 例えば西アフリカにおけるエボラ出血熱の大流行時に WHO より診断での緊急使用許可が得られた RealStar Filovirus Screen RT-PCR kit 1.0 (Altona Diagnostics) あるいは RealStar Filovirus Type RT-PCR kit 1.0 (同社) が考えられる . 本キットは 24 検体分で約 27 万円と高価格で , リアルタイムによる遺伝子検出で短時間によるウイルス種も判定可能であるが , 塩基情報は得られない . 検出の感度も疑問視されている . パイオテロにエボラウイルスが利用された場合 , 多くの検体を処理する必要があることからあまり高価格であると検査に支障をきたす . また塩基情報が得られればウイルスの由来を推測しテロ対策に役立てられる . これらを考慮するとパイオテロ対策としては , 市販キットは不向きと考えられ , 検査法の切り替え等は必要なく , 既に準備している検査法をより一層注意深く実施すれば良いと判断した .

D. 考察

国立感染症研究所ウイルス第一部で準備しているエボラウイルスの検出法 (コンベンショナル RT-PCR , リアルタイム RT-PCR , 抗原検出 ELISA) の精度は十分高く , パイオテロ発生時の検査法として用いることは適切であると考えた .

E. 結論

国立感染症研究所ウイルス第一部で準備しているエボラウイルスの検出法の有用性を確認した .

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Taniguchi S, Fukuma A, Tani H, Fukushi S, Saijo M, Shimojima M. A neutralization assay with a severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strain that makes plaques in inoculated cells. *J Virol Methods*. 2017 Jan 9. pii: S0166-0934(16)30587-0.
 - 2) Yoo JR, Heo ST, Park D, Kim H, Fukuma A, Fukushi S, Shimojima M, Lee KH. Family Cluster Analysis of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Infection in Korea. *Am J Trop Med Hyg*. 2016 Dec 7;95(6):1351-1357.
 - 3) Singh H, Shimojima M, Fukushi S, Fukuma A, Tani H, Yoshikawa T, Taniguchi S, Yang M, Sugamata M, Morikawa S, Saijo M. Serologic assays for the detection and strain identification of Pteropine orthoreovirus. *Emerg Microbes Infect*. 2016 May 11;5:e44. doi: 10.1038/emi.2016.35.
 - 4) Kurihara S, Satoh A, Yu F, Hayasaka D, Shimojima M, Tashiro M, Saijo T, Takazono T, Imamura Y, Miyazaki T, Tsukamoto M, Yanagihara K, Mukae H, Saijo M, Morita K, Kohno S, Izumikawa K. The world first two cases of severe fever with thrombocytopenia syndrome: An epidemiological study in Nagasaki, Japan. *J Infect Chemother*. 2016 Jul;22(7):461-5. doi: 10.1016/j.jiac.2016.04.001.
 - 5) Kitao A, Ieki R, Takatsu H, Tachibana Y, Nagae M, Hino T, Nakaji H, Shimojima M, Saijo M, Okayama M, Kenzaka T. Severe fever with thrombocytopenia syndrome presenting as hemophagocytic syndrome: two case reports. *Springerplus*. 2016 Mar 22;5:361. doi: 10.1186/s40064-016-2010-2.
 - 6) Suda Y, Fukushi S, Tani H, Murakami S, Saijo M, Horimoto T, Shimojima M. Analysis of the entry mechanism of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, using a vesicular stomatitis virus pseudotyping system. *Arch Virol*. 2016 Jun;161(6):1447-54. doi: 10.1007/s00705-016-2803-1.
 - 7) Kawagishi T, Kanai Y, Tani H, Shimojima M, Saijo M, Matsuura Y, Kobayashi T. Reverse Genetics for Fusogenic Bat-Borne Orthoreovirus Associated with Acute Respiratory Tract Infections in Humans: Role of Outer Capsid Protein C in Viral Replication and Pathogenesis. *PLoS Pathog*. 2016 Feb 22;12(2):e1005455. doi: 10.1371/journal.ppat.1005455.
 - 8) Hideki Tani, Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushi, Tomoki Yoshikawa, Aiko Fukuma, Satoshi Taniguchi, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. Characterization of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus glycoprotein-mediated entry. *Journal of Virology*. (2016). 90: 5292-5301. doi: 10.1128/JVI.00110-16.
 - 9) Fukuma A, Fukushi S, Yoshikawa T, Tani H, Taniguchi S, Kurosu T, Egawa K, Suda Y, Singh H, Nomachi T, Gokuden M, Ando K, Kida K, Kan M, Kato N, Yoshikawa A, Kitamoto H, Sato Y, Suzuki T, Hasegawa H, Morikawa S, Shimojima M, Saijo M. Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Antigen Detection Using Monoclonal Antibodies to the Nucleocapsid Protein. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Apr 5;10(4):e0004595.
2. 学会発表
- 1) Kuroasu T, Okuzaki D, Limkittikul K, Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Saijo M. Transcriptome analysis using a fatal mouse model for severe dengue. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 23, 2016, Sapporo (W1-6-10)
 - 2) Kawachi K, Tani H, Shimojima M, Fukushi S, Kurosu T, Kamitani W, Saijo M. Determination of the amino acid residue important for fusion of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus glycoprotein. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 24, 2016, Sapporo (W2-2-12)
 - 3) Shinomiya H, Kimura T, Fukuma A, Shimojima M, Yamashita Y, Mizota F, Yamashita M, Otsuka Y, Kan M, Saijo M. Seroprevalence of severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) virus antibodies in SFTS endemic areas of Ehime prefecture, Japan. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 24, 2016,

- Sapporo (W2-2-15)
- 4) Egawa K, Shimojima M, Taniguchi S, Nagata N, Tani H, Yoshikawa T, Kurosu T, Fukushi S, Saijo M. Pathogenicity of human-origin Pteropine orthoreovirus (PRV) and bat-origin PRV in BALB/c mice. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2016, Sapporo (W3-3-07)
 - 5) Kawagishi T, Kanai Y, Tani H, Shimojima M, Saijo M, Matsuura Y, Kobayashi T. Nelson Bay Orthoreovirus S1 gene segment determines strain-specific differences in viral infectivity and pathogenesis. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2016, Sapporo (W3-3-09)
 - 6) Shiota T, Li T, Yoshizaki S, Nishimura Y, Shimizu H, Shimojima M, Saijo M, Wakita T, Ishii K. Molecular characterization of the hepatitis E virus receptor candidate. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2016, Sapporo (W3-5-07)
 - 7) Fukushi S, Fukuma A, Tani H, Kurosu T, Taniguchi S, Egawa K, Shimojima M, Shirato K, Mastuyama S, Sentsui H, Saijo M. Vesicular stomatitis virus pseudotype-based assay for detecting MERS-CoV neutralizing antibody responses. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2016, Sapporo (W3-6-09)
 - 8) Watanabe S, Edenborough K, Tachedjian M, Todd S, Klein R, Shimojima M, Marsh G. Establishment of an efficient reverse genetics system for Nipah virus Bangladesh strain. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 24, 2016, Sapporo (P2-087)
 - 9) Shimojima M, Suda Y, Dowall S, Horimoto T, Saijo M, Hewson R. Development of a novel diagnostic assay using VSV for detection of neutralizing activity to CCHFV. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 24, 2016, Sapporo (P2-100)
 - 10) Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Fukushi S, Kurosu T, Koyama Y, Uda A, Morikawa S, Komeno T, Nakajima N, Furuta Y, Shimojima M, Saijo M. Therapeutic effects of favipiravir (T-705) against severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection in a mouse lethal model. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 24, 2016, Sapporo (P2-106)
 - 11) 渡辺俊平, 下島昌幸, Glenn A. Marsh. ニパウイルス, バングラディッシュ株の組換えウイルス作出系の確立. 第159回日本獣医学会学術集会, 2016年9月7日, 藤沢
 - 12) 江川和孝, 下島昌幸, 谷口怜, 永田典代, 谷英樹, 黒須剛, 吉河智城, 福土秀悦, 西條政幸. BALB/c マウスにおけるヒト由来およびコウモリ由来プテロパインオルソレオウイルスの病原性解析. 第159回日本獣医学会学術集会, 2016年9月6日, 藤沢
- 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



Proficiency panel - II for Ebola virus PCR diagnostics

To whom it may concern:

2015-05-12

Dear colleagues,

The first Ebola panel we produced at the Robert Koch Institute (RKI) in the autumn 2014 has long been exhausted due to high demand. We are pleased that we can now send the new proficiency panel which has also been developed in close collaboration with the Bernhard-Nocht Institute for Tropical Medicine (BNI) in Hamburg and the Philipps University of Marburg. Without their support preparation of this proficiency panel would not have been possible. This new "Ebola Panel – II" is similar, but **NOT identical** to the previous Ebola panel.

Again we have prepared panels of 11 freeze dried samples for PCR evaluation with different Ebola virus strains including negative controls. The samples should be analysed for the presence of Ebola virus genome, preferably also genome copy numbers should be determined.

All material was thoroughly analysed for absence of infectivity after inactivation by heat and gamma irradiation. According to the inactivation procedures used, we are sure to provide you with safe and non-biohazard material. Nevertheless, all material should be handled with care like all human specimens.

Samples have been diluted in stabilisation buffer prior to aliquoting & freeze drying. **Therefore each sample must be resolved by carefully adding 100µl bi.dest. water before use and the entire sample should be used for analysis.**

For analysis you should handle resolved samples just like you would handle a regular serum sample. In case your kit requires a higher volume please fill up with buffer. But please consider this dilution step for reporting the result.

If you still have questions do not hesitate to contact me or the German contact of the GHSAG Laboratory Network Livia Schünadel (SchuenadelL@rki.de).

Best regards,

Andreas



図 1. エボラウイルス検出の検査法で用いたサンプルの Ebola Proficiency Panel-II

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

図 2. Ebola Proficiency Panel-II の結果

Ebola Proficiency Panel-II (GHSAG-LN)

提供元からの返信

- Panel構成
 - Zaire ebolavirus 2 strainsの希釈列
 - Marburgvirus 1つ
 - Negative 2つ

EBOV Panel composition

	Sample N°										
Panel-1	#3	#6	#9	#4	#5	#8	#7	#2	#10	#1	#11
Panel-2	#3	#6	#9	#5	#4	#8	#7	#2	#10	#1	#11
Virus	Ebola-Zaire	Ebola-Zaire	Ebola-Zaire	Ebola-Zaire	Ebola-Zaire	Ebola-Zaire / Guéckédou	Ebola-Zaire / Guéckédou	Ebola-Zaire / Guéckédou	Marburg	neg.	neg.
Dilution	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸		

Sensitivity
Reproducibility/Specificity
Specificity
Contamination

- 参加したラボ数 106

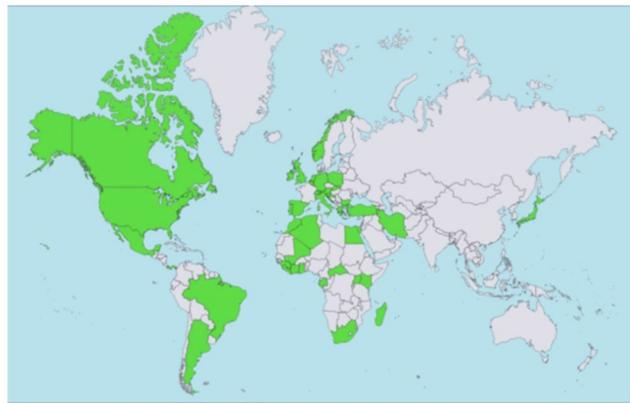


図 3. Ebola Proficiency Panel-II の正答と参加研究機関のある国

Ebola Proficiency Panel-II (GHSAG-LN)

提供元からの返信

- 106のラボ名は匿名化
- 結果はCt値またはpos/neg
- 表の色
 - 緑は正答(濃淡はPanel I/IIの違い)
 - 赤: 高ウイルス量のサンプルをnegと誤答あるいはnegのサンプルをposと誤答
 - オレンジ: 中ウイルス量のサンプルをnegと誤答

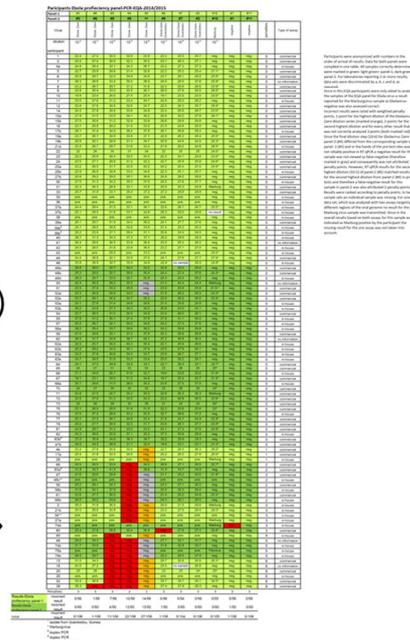


図 4. 各参加研究機関の出した成績

Ebola Proficiency Panel-II (GHSAG-LN)

提供元からの返信

Participants Ebola proficiency panel-PCR-EQA-2014/2015

Panel-1	#3	#6	#9	#4	#5	#8	#7	#2	#10	#1	#11		
Panel-2	#3	#6	#9	#5	#4	#8	#7	#2	#10	#1	#11		
Virus	Ebola-Zaire	Ebola-Zaire	Ebola-Zaire	Ebola-Zaire	Ebola-Zaire	Ebola-Zaire/Gueckedou	Ebola-Zaire/Gueckedou	Ebola-Zaire/Gueckedou	Marburg	negative	negative	penalties	Type of assay
dilution	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻³				
participant													
21b	25.0	28.6	34.8	neg.	neg.	23.2	27.0	26.5	28.5*	neg.	neg.	3	in-house
34**	pos.	pos.	pos.	neg.	neg.	pos.	pos.	pos.	pos.	neg.	neg.	3	in-house
27a	pos.	pos.	pos.	neg.	neg.	pos.	pos.	pos.	Marburg	neg.	neg.	3	in-house
74a	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	Marburg	pos.	neg.	3	in-house
80	25.4	27.8	28.8	32.4	36.9	neg.	27.6	27.4	20.8*	neg.	neg.	3	commercial
45	pos.	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	pos.	pos.	neg.	neg.	neg.	4	in-house
49	29.2	34.3	neg.	neg.	neg.	27.1	32.1	31.7	neg.	neg.	neg.	5	no information



- #1のサンプルを我々はposと判定している →そのような結果を出したラボは1つのみ →74aが我々と判明
- (表にはないが)配列も決定しており、#1以外の結果は良好

図 5 . 国立感染症研究所ウイルス第一部による検査実施成績 (判定結果)

ラボ数	Commercial	Commercial以外 (In-houseかNo information)	計
すべて正答	43	35	78
誤答あり	12	16	28
計	55	51	106

図 6 . 106 参加機関でで用いられた遺伝子検出の方法と正答/誤答

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

分担報告書

弱毒痘そうワクチン LC16m8 株をボ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。故にバイオテロなどで天然痘ウイルスに暴露された場合、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。本研究は国産の弱毒痘そうワクチン株である LC16m8 を用いた天然痘ウイルス暴露後重症化阻止の可能性の検討することを目的とする。天然痘ウイルスの代わりに、同じオルソボックスウイルスに属するエクトロメリアウイルス (ECTV) を用いてマウスを攻撃し、その直後に 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、エクトロメリアウイルス暴露直後に LC16m8、または Lister を接種すれば死亡率が減少する傾向が確認された。更に LC16m8 接種と同時に自然免疫応答を誘導する poly I:C を投与すると防御効果が増強されることが確認された。

研究協力者

山田壮一・国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官
柴村美帆・国立感染症研究所ウイルス第一部・協力研究員
津田美穂子・国立感染症研究所ウイルス第一部・非常勤職員
藤井ひかる・国立感染症研究所ウイルス第一部・協力研究員
福井良子・国立感染症研究所ウイルス第一部・非常勤職員

め、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) と同じオルソボ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証し、更に可能であれば、その防御効果の増強を試みる。

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、その脅威は未だ無くなっていない。我が国では 40 歳未満の殆どが未種痘であるため、天然痘ウイルスに対して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は、その直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た

B. 研究方法

ECTV は Hampstead 株 Moscow 株を用いて i.n. 経路における C57BL/6 マウスでの LD50 を再度決定した。次に 5LD50 相当の ECTV を i.n. 経路でマウスに感染させる前後に 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・重症化阻止効果を検討した。更に poly I:C を i.n. で 100ug 単独、または LC16m8 を i.m. 経路で 10^7 PFU 接種すると同

時に投与した際の感染防御効果を検討した。

【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

前年度に行った実験では ECTV 暴露後に VACV を接種しても有意な発症や重症化の阻止効果は確認できず、これは既報の研究結果と異なっていた。そこで、既報の研究と本研究における実験条件の違いを考察した(表 1)。殆どの部分で実験条件は近似しているが、VACV は既報では MVA と Lister、本研究では LC16m8 と Lister の 2 株を使用している。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 の株が異なることと、攻撃に用いたウイルス量だと考えられる。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。LD50 はそれぞれ 80PFU、1200PFU と 10 倍以上異なることから、病原性に差があるのかもしれない。

そこで、我々は Moscow 株を入手し、再度 Hampstead 株、Moscow 株の両方について LD50 を決定した。前回の実験と同様に 1 群 5 匹のマウスに 10^4 から 10^7 PFU/20ul の ECTV を i.n. で接種し、観察、体重測定を行った。結果を図 1 に示す。LD50 は Hampstead 株で 208PFU、Moscow 株で 316PFU であった。両株の LD50 に違いは見られない一方で、Hampstead 株の LD50 は前年度の結果(1200PFU)と比べて低い値になった。このような違いが出た理由は不明であるものの、本年度の結果の方が過去の報告と照らし合わせても妥当だと考え、以降、LD50 は本年度の結果を基にして実験を行った。

次に ECTV 暴露前後に LC16m8 株を接種した場合の発症・重症化阻止効果を検討した。1 群 5 匹のマウスに 5LD50 の ECTV Hampstead 株、または Moscow 株で攻撃を行った。その後 3 日前(-3)、0、1 日後に 10^7 PFU/100ul の Lister 株、LC16m8 株、HSV-1、または 100ug/100ul の poly I:C を i.m. で接種し、観察、体重測定を行った。図 2 に結果を示す。攻撃に使用した Hampstead 株と Moscow 株で結果に大きな違いは見られなかった。ECTV 攻撃 3 日前に Lister 株、または LC16m8 を接種しておくともマウスは 100%生存し

た。一方で、poly I:C、HSV-1、または対照として Medium を接種した群では有意な発症や重症化の阻止効果は確認できなかった。ECTV 攻撃直後に Lister 株、LC16m8 株、また poly I:C を接種すると、死亡率が減少する傾向が見られた。ECTV 感染 1 日後に VACV 等を投与した場合は、全ての群で有意な発症や重症化の阻止効果は確認できなかった。

実験結果を受けて、我々は poly I:C の投与ルートに着目した。ECTV は接種経路が i.n. 経路であることからウイルスが増殖する主な器官は肺であると考えられる。そこで、poly I:C の投与方法を i.m. から i.n. に変更して実験を行った。1 群 5 匹のマウスに 5LD50 の ECTV Hampstead 株で攻撃を行った。その直後 100ug/100ul の poly I:C を i.n. で接種し、観察、体重測定を行った。図 3 に実験スケジュール、図 4 に結果を示す。統計学的に有意ではなかったが、ECTV 暴露直後に i.n. で poly I:C を投与するとマウスの死亡率が減少する傾向が見られた。

そこで、防御効果の増強を期待して poly I:C と LC16m8 の同時投与を検討した。1 群 5 匹のマウスに 5LD50 の ECTV Hampstead 株で攻撃を行った。その直後に 10^7 PFU/100ul の LC16m8 株を i.m. で接種すると同時に 100ug/100ul の poly I:C を i.n. で接種し、観察、体重測定を行った。図 5 に実験スケジュール、図 6 に結果を示す。この実験に於いて LC16m8 のみ接種した群が ECTV の攻撃に対して 100%の生存率を示したため、生存率の違いは比較できなかったものの、poly I:C と LC16m8 を両方投与した群も 100%の生存率を示した。更に LC16m8 のみ接種した群と比較して体重の減少率に大きな差が見られたことから、ECTV 暴露後に poly I:C と LC16m8 を同時投与することで、LC16m8 単独接種より効果的な防御効果が得られる可能性が示唆された。

D. 考察

既報の研究では ECTV 暴露 3 日後までであれば Lister 株、MVA 株の接種により有意な死亡率の減少効果が確認されている。一方本研究では、ワクチン接種を ECTV 暴露直後にしないと死亡率の減少効果が見られなかった。どちらの研究についても Lister 株を使用しているため、その違いが生じている原因は不明であるが、攻撃に使用した ECTV のウイルス量の差(既報では 3LD50、本研究では 5LD50)などが理由として考

察できる。従って、LC16m8 株についても MVA 株や Lister 株と同様に暴露後ワクチンとして使用できる可能性があると考えている。今回の実験は使用したマウスが 5 匹/実験群であることから、統計学的な検討を行うのが難しい場合があった。そこで今後はマウスの匹数を増やして再度実験を行い、本研究の再現性を確認すると共に統計学的な検討を厳密に行う必要がある。

LC16m8 の接種と同時に poly I:C を投与することで ECTV 感染による体重減少が軽減されることが示唆された。興味深いことに、LC16m8 投与群と、poly I:C 投与群は体重減少が確認されるタイミングが、それぞれ 5 日目と、6 から 7 日目と異なっていた。このことから、LC16m8 の接種と poly I:C の投与による感染防御効果の機序は異なっていることが示唆される。今後はこのメカニズムを詳細に解析し、得られた結果をフィードバックすることで暴露後ワクチンとしての LC16m8 の使用方法を更に改善したと考えている。

E. 結論

天然痘ウイルス暴露後に VACV を接種した場合の発症・重症化阻止効果を検討するため、ECTV 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、ECTV 暴露直後に VACV を接種することで発症・重症化阻止効果が得られる可能性が示唆された。更に VACV と poly

I:C を同時に投与することで、その発症・重症化阻止効果が増強される可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) Tomoki Yoshikawa, Hikaru Fujii, Miho Shibamura, Natsumi Omura, Shizuko Harada, Souichi Yamada, Masayuki Saijo. Recovery of infectious vaccinia virus from a bacterial artificial chromosome, which retains the full-length viral genome of a strain, LC16m8 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌 (2016. 10)

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

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

表 1. 既報の研究と本研究の実験条件の違い

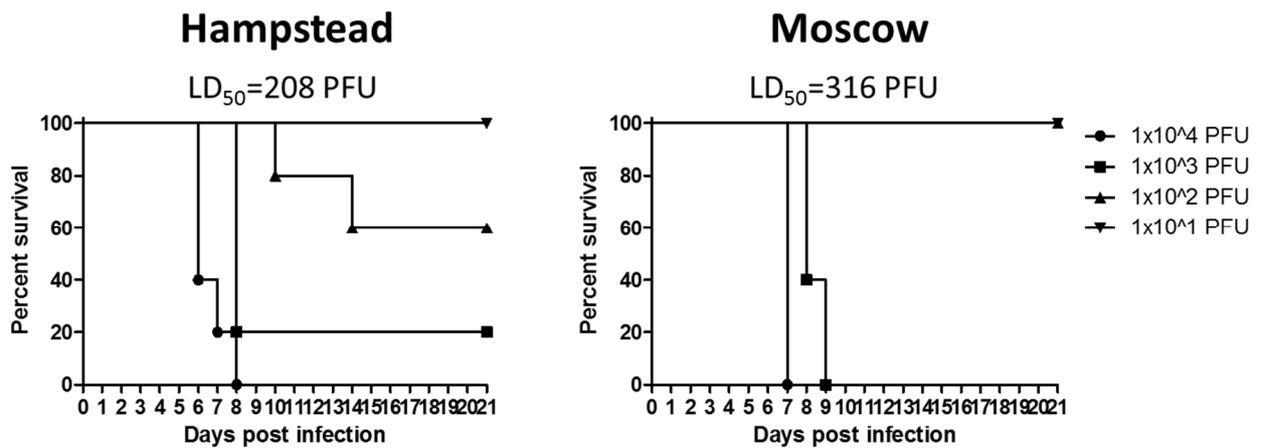


図 1. ECTV Hampstead 株、または Moscow 株を i.n. で接種された C57BL/6 マウスの生存曲線

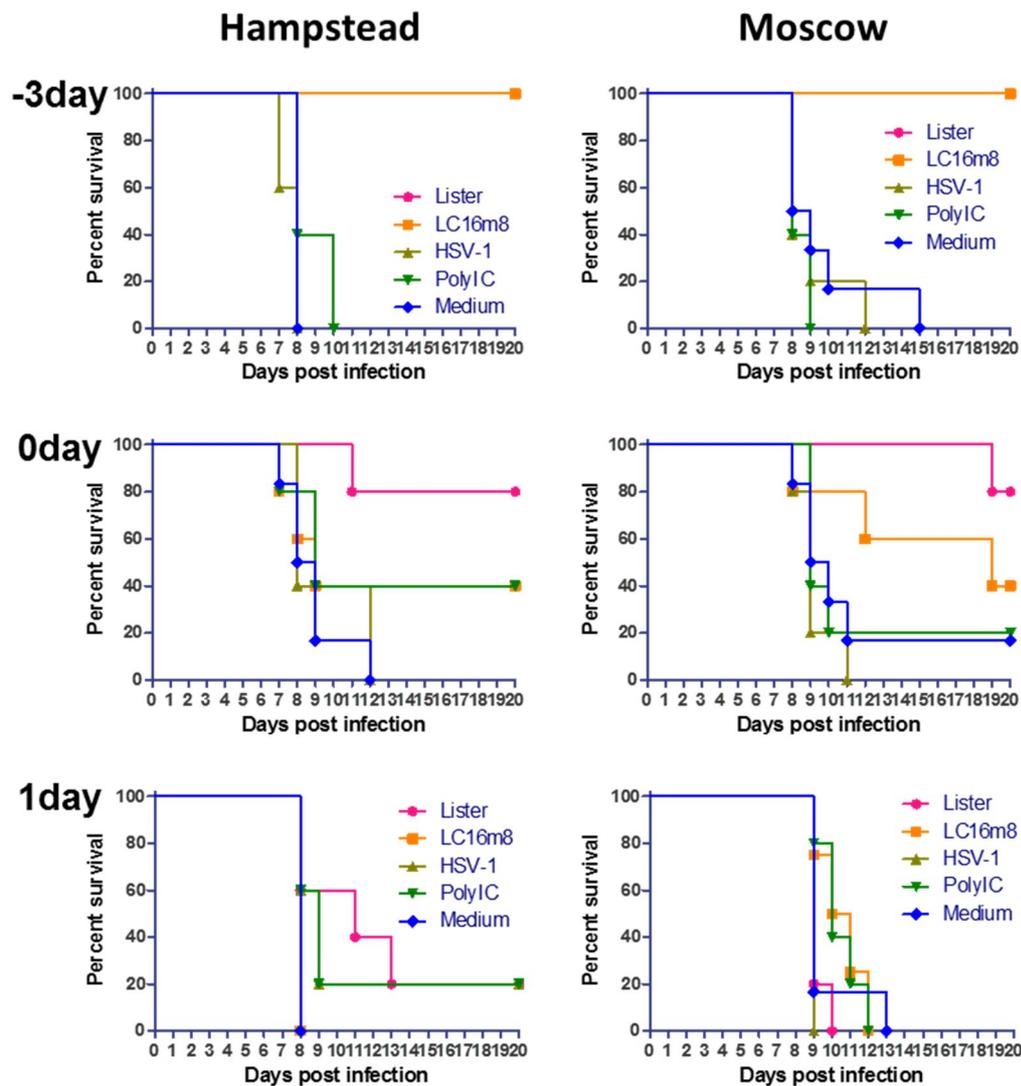


図 2. ECTV 暴露前後にワクシニアウイルス等を接種した場合の発症阻止効果の検討結果

ECTV strain Hampstead
5LD50 (1000 PFU) /10ul/i.n
C57BL/6 (Female, 8 wks), 5 mice/group



- (1) Poly I:C 100ug/20ul/i.n.
- (2) Mock treatment (PBS)

図3 ECTV 暴露直後に i.n. で poly I:C を投与したときの発症阻止効果の検討

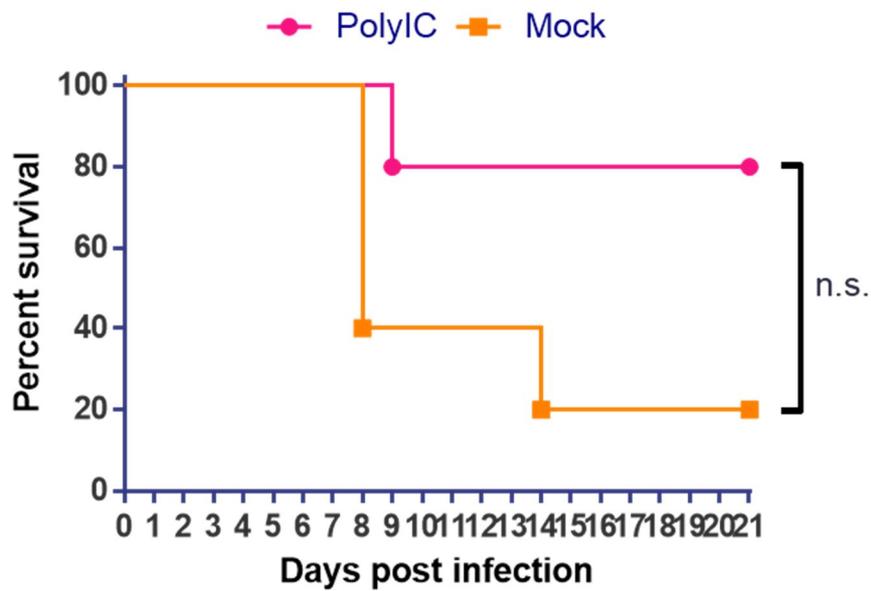
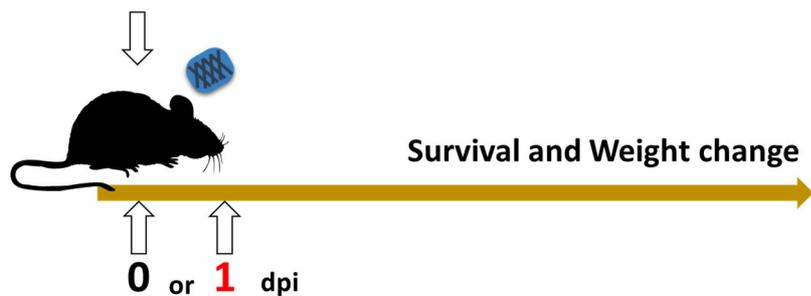


図4. ECTV 暴露直後に i.n. で poly I:C を投与したときの発症阻止効果の検討結果

ECTV strain Hampstead
 5LD50 (1000 PFU) /10ul/i.n
 C57BL/6 (Female, 8 wks), 10 mice/group



	Treatment	
	i.n.	i.m.
1	Poly I:C 100ug/20ul/i.n.	LC16m8 1x10 ⁷ PFU/100ul/i.m.
2	Poly I:C 100ug/20ul/i.n	Mock treatment
3	Mock treatment	LC16m8 1x10 ⁷ PFU/100ul/i.m
4	Mock treatment	Mock treatment

図5. ECTV 暴露直後に i.n. で poly I:C、i.m. で LC16m8 を投与したときの発症阻止効果の検討

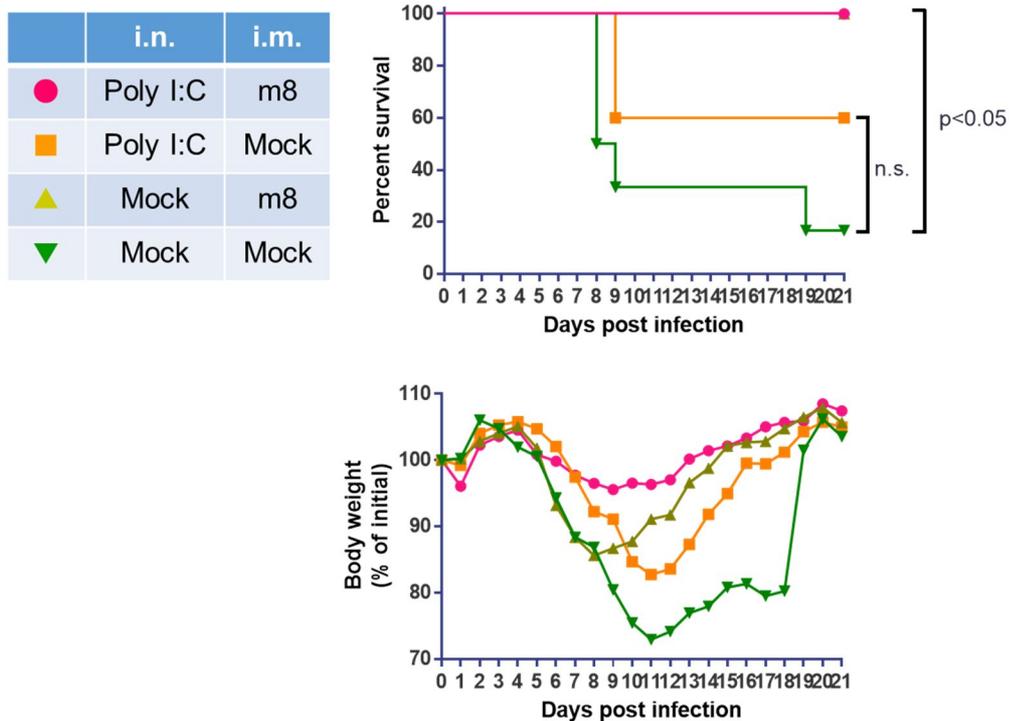


図6. ECTV 暴露直後に i.n. で poly I:C、i.m. で LC16m8 を投与したときの発症阻止効果の検討結果

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

分担報告書

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、LC16m0 株を経由して樹立された安全性の高いワクチン株である LC16m8 株は、継代培養するとプラークサイズのやや大きい LC16m0 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* 遺伝子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 real-time PCR 法を開発した結果、MSP の遺伝子変異特異的配列を 3' 末端とする primer を用いた real-time PCR で、LC16m8 株と特定の MSP を識別できた。本方法で、主要な MSP と LC16m8 株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。ワクチン中の MSP のうち L1, L4, L5 の 3 種の頻度の高い MSP を検出した結果、本 PCR はバイオアッセイよりも遥かに簡便に含有率を算出できた。

研究協力者

朴ウンシル・国立感染症研究所獣医科学部・研究員

奥谷晶子・同獣医科学部・主任研究官

吉河智城・同ウイルス第一部・主任研究官

下島昌幸・同ウイルス第一部・室長

西條政幸・同ウイルス第一部・部長

倉根一郎・国立感染症研究所・所長

横手公幸・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

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ブラック形成能があるのに対し、LC16m0 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 LC16m0 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 LC16m0 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。

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、LC16m0 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

B. 研究方法

1. MSP を検出する real-time 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）。昨年度は、mutation specific primer PCR 法、RNase H2-dependent PCR 法を検討し、定性的に検出できた。そこで、それらの primer を用いて、real-time PCR 法を検討し、定量的検出を試みた。

2. Mutation specific primer を用いた real-time PCR による MSP の検出法

昨年度に L1(267A) specific primer (18mer), L4(272T) specific primer (18mer) および L5(274ATAC) specific primer (19mer)を用いた PCR により MSP 含率 1~0.01% まで検出できた。それらの primer を用いて、real-time PCR を行い、定量化が可能であるかを検討した。各 MSP を特異的に検出できる条件検討(real-time PCR enzyme, T_m, cycles 等)をし、指摘条件を求めた。MSP と LC16m8 株の *b5r* 遺伝子領域を含む plasmid を段階混合してスパイク試験を行った。さらに、細胞培養痘そうワクチン Lot を用いて、MSP 含率を測定し、有効性を検討した。

3. 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。昨年度に MSP それぞれの rhPCR primer を用いた rhPCR により、40 cycles 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確認された。そこで、それらの rhPCR primer を用いて real-time PCR を行い、定量的検出を試みた。1)と同様、MSP と LC16m8 株の *B5R* 遺伝子領域を含む plasmid を段階混合してスパイク試験を行った。さらに、細胞培養痘そうワクチン Lot を用いて、MSP 含率を測定し、有効性を検討した。

4. ワクチンの各ロット中の MSP 検出

これまでに製造された乾燥細胞培養痘そうワクチンの V01~V14 までの 14 ロットに関して、上記 NAT により MSP を検出し、実用的に用いられるかを検討した。ワクチンの各ロット 3 本を溶解液で溶解して希釈後、半量を用いた 6,000rpm, 3min 遠心上清を 16,000rpm, 2hrs 遠心したウイルス分画（沈渣）SepaGene（エーディア株式会社）を用いてウイルス DNA を抽出した。この DNA を用いて NAT による MSP 検出を行った。

【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。備蓄ワクチンの使用は、厚労省の許可を得て各ロット 3 本を使用した。

C. 研究結果及び D. 考察

1. Mutation specific primer real-time PCR による MSP の検出法

昨年度までの結果から、強い 3' 5' exonuclease 活性を有する DNA polymerase を用いると、非特異反応により野生型配列の遺伝子も増幅されることがわかった。一方、3' 5' exonuclease 活性の弱い酵素は、野生型配列の非特異的増幅がおきにくかった。そこで 3' 5' exonuclease 活性の弱い Taq DNA polymerase 由来酵素による SYBR Green Realtime PCR Master mix (TOYOBO)を用いて、real-time PCR を検討した結果、L1(267A)は 18 mer primer で 51 -annealing, L4 (272T) は 18 mer primer で 54 -annealing, L5 (274ATAC) は 19 mer primer で 54 -annealing の条件が、効率よく特異的にそれぞれの MSP を検出できた。

L1 特異的 MSP 検出 real-time PCR では、L1 (267A)と LC16 m8 株の *b5r* 遺伝子を有する plasmid を混合してスパイク試験を行った結果、267A 含有率 0.1%まで検出できた。40 cycles まで非特異的増幅は見られなかった。L4 (272T)も同様、スパイク試験では、272T 含有率 0.01%まで検出でき、40 cycles でも非特異反応は認められなかった。L5 (274ATAC) は 45 cycles まで行った結果、含有率 0.01% まで検出でき、非特異的増幅も見られなかった。この結果を踏まえて、乾燥細胞培養痘そうワクチン株の各ロット中の MSP 含有率を測定した。まず、LC16 m8 株および MSP 株共通に検出する real-time PCR により、検体中のウイルスの DNA copies を測定した(表 2)。また、それぞれ L1, L4, L5 特異的 real-time PCR から各 MSP の検体中の MSP copies 数を算出し、MSP の含有率 (MSP copies 数 / ウイルスの DNA copies) を算出した(表 2)。

その結果、ワクチンのロット 1~5 は MSP 含有率がロット 6 以降よりも高かった(表 2)。ロット 6~14 は 0.2%以下あるいは検出限界以下であった。この結果は、特にロット 6 以降では MSP 含有率が極めて低く保たれていることを証明するものである。Mutation specific primer による real-time PCR はワクチンの

MSP 含有量の測定に有用であると考えられた。なお、L1 特異的 MSP 検出用 real-time PCR では算出された含有率が、これまでバイオアッセイと次世代シーケンサー解析から含有率が既知のロット 3 で 1/10 程となり、他のロットでも比率が低く算出された。L4 と L5 特異的 MSP 検出 real-time PCR では同程度の含有率となった。この理由として考えられるのは、mutation specific primer による real-time PCR では、L1 特異的 MSP 検出用 real-time PCR による L1-MSP の増幅効率が若干他の real-time PCR よりも低いことためであると考えられる。そこで、補正するために L1 含有率の算出値を 10 倍にすると、ロット 3 では 3 種の MSP 比率が過去にバイオアッセイ、次世代シーケンサーで算出した値に近似することがわかった (表 3)。これにロット 1~7 までの 3 種の MSP 含有率を推定するとロット 1 から 5 が MSP 含有率 0.8 から 2.4%、ロット 6、7 が 0.2% となった。なお、ロット 8 以降は検出限界に近いかそれ以下なので補正等による算出を行わなかった。

補正の不要な L4 特異的 MSP 検出用 real-time PCR を行えば、L4 含有率が全 MSP の 30% 程度 (ロット 1~5 の L4 含有率の平均値) であることから、MS 含有率の閾値を定めることにより、定性、定量的いずれの試験としても、バイオアッセイから置き換えることが可能と判断された。

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

昨年度までに、特異的 primer を用いた rhPCR による MSP 検出は、上記 PCR より精度、感度が高いことがわかった。そこで、rh real-time PCR による MSP 含有率算出を試みた。Rh real-time PCR でも SYBR Green Realtime PCR Master mix (TOYOBO) が適することを確認した。L1 (267A) および L4 (271T) 特異的 rh real-time PCR では、64 °C-annealing, L5 (274ATAC) では 62 °C-annealing で特異的に MSP を検出できた。それぞれ MSP と LC16 m8 の *b5r* 遺伝子を有する plasmid の混合によるスパイク試験では、L1 (267A) は 0.1~1%、L4 (271T) は 1% まで検出できた。しかし、L5 (274ATAC) は増幅効率が悪かった。Standard においても 10^6 copies / μ l 以下は検出できなかった。また、細胞培養痘そうワクチンの lot を用いて、MSP を測定した結果、いずれも検出不可で改善する必要があることがわかった。

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、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れば、ワクチンの品質管理に応用可能であると考えられる。昨年度までに、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た。そこで、それぞれのプライマーを用いた real-time PCR により、主要な MSP を構成する L1 (267 位に A 挿入)、L4 (272 位に T 挿入) 及び L5 (274 に ATAC の重複で 4 塩基挿入) (図 1, 表 1) の定量的検出法を確立し、ワクチン中の MSP を検出し得るか検討した。

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ンアウイルスから、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 frameshift 変異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は、RK13 細胞等で若干サイズの大きい LC16m0 株様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上有用であると考えられる。MSP の含有率および MSP の遺伝子型は、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することがこれまでの研究で明らかになっている。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。今年度の研究では、主要な MSP の変異配列相補配列を 3' 末端に持つ primer を用いる mutation specific primer による real-time PCR が rh real-time PCR よりも優れていた。mutation specific primer による real-time PCR では、L1 特異的 MSP 検出用 real-time PCR による L1-MSP 増幅率が若干他の real-time PCR よりも低いことから、算出された MSP 含有率は、実際の含有率よりも 1/10 程度になった。そこで、補正するために L1 含有率の算出値を 10 倍にすると、各 MSP 比率、3 種の MSP 比率がこれまで

にバイオアッセイ，次世代シーケンサーで算出した値に近似することがわかった．これに基づき各ロットの3種のMSP含有率を推定するとロット1から5がMSP含有率0.8から2.4%，ロット6，7が0.2%，ロット8以降はそれ以下あるいは検出限界以下となった．補正の不要なL4特異的MSP検出用real-timePCRを行えば，L4含有率が全MSPの30%程度（ロット1～5のL4含有率の平均値）であることから，MSP含有率の閾値を定めることにより，定性，定量のいずれの試験としても，バイオアッセイから置き換えることが可能と判断された．今後，MSP含有率が数%程度になるようなウイルス培養条件により，MSPの遺伝子型の含有率のばらつきがどの程度かを検証して本試験法の意義をより明らかにしたい．また，各ロットの次世代シーケンスによるMSP含有率の定量およびMSP遺伝子型の含有率を測定する予定である．

E. 結論

MSPを迅速に，かつ，定量的に検出するためのNGSを用いた解析法を開発した．

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kimura M, Une Y, Suzuki M, Park E-S, Imaoka K and Morikawa S. Isolation of *Brucella inopinata*-like bacteria from White's and Denny's tree frogs. *Vector Borne Zoonotic Dis.* in press.
- 2) Iizuka I, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Fukushi S, Ogata M, Morikawa S, Hasegawa H, Mizuguchi M, Kurane I, Saijo M. A Single Vaccination of Nonhuman Primates with Highly Attenuated Smallpox Vaccine, LC16m8, Provides Long-term Protection against Monkeypox. *Jpn J Infect Dis.* 2016 Dec22; in press.
- 3) Park ES, Suzuki M, Kimura M, Mizutani H, Saito R, Kubota N, Hasuike Y, Okajima J, Kasai H, Sato Y, Nakajima N, Maruyama K, Imaoka K, Morikawa S. Epidemiological and pathological study of feline morbillivirus infection in domestic cats in Japan. *BMC Vet Res.* 2016 Oct 11;12(1):228.
- 4) Zamoto-Niikura A, Morikawa S, Hanaki KI, Holman PJ, Ishihara C. *Ixodes persulcatus* ticks as a vector for *Babesia microti* U.S. lineage in Japan. *Appl Environ Microbiol.* 2016 82(22):6624-6632
- 5) Arai S, Taniguchi S, Aoki K, Yoshikawa Y, Kyuwa S, Tanaka-Taya K, Masangkay JS, Omatsu T, Puentespina R Jr, Watanabe S, Alviola P, Alvarez J, Eres E, Cosico E, Quibod MN, Morikawa S, Yanagihara R, Oishi K. Molecular phylogeny of a genetically divergent hantavirus harbored by the Geoffroy's rousette (*Rousettus amplexicaudatus*), a frugivorous bat species in the Philippines. *Infect Genet Evol.* 2016, 45:26-32.
- 6) Uda A, Sharma N, Takimoto K, Deyu T, Koyama Y, Park ES, Fujita O, Hotta A, Morikawa S. Pullulanase Is Necessary for the Efficient Intracellular Growth of *Francisella tularensis*. *PLoS One.* 2016 Jul 22;11(7):e0159740.
- 7) 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.* 2016 Jan 6;1(1).
- 8) Arai S, Kang HJ, Gu SH, Ohdachi SD, Cook JA, Yashina LN, Tanaka-Taya K, Abramov SA, Morikawa S, Okabe N, Oishi K, Yanagihara R. Genetic Diversity of Artybash Virus in the Laxmann's Shrew (*Sorex caecutiens*). *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2016 Jul;16(7):468-75.
- 9) Singh H, Shimojima M, Fukushi S, Fukuma A, Tani H, Yoshikawa T, Taniguchi S, Yang M, Sugamata M, Morikawa S, Saijo M. Serologic assays for the detection and strain identification of Pteropine orthoreovirus. *Emerg Microbes Infect.* 2016 May 11;5:e44.
- 10) Fukuma A, Fukushi S, Yoshikawa T, Tani H, Taniguchi S, Kurosu T, Egawa K, Suda Y, Singh H, Nomachi T, Gokuden M, Ando K, Kida K, Kan M, Kato N, Yoshikawa A, Kitamoto H, Sato Y, Suzuki T, Hasegawa H, Morikawa S, Shimojima M, Saijo M. Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Antigen Detection Using Monoclonal Antibodies to the Nucleocapsid Protein. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Apr 5;10(4):e0004595.
- 11) Tani H, Shimojima M, Fukushi S, Yoshikawa T, Fukuma A, Taniguchi S, Morikawa S, Saijo M. Characterization of

Glycoprotein-Mediated Entry of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus. *J Virol.* 2016, 12;90(11):5292-301.

12) Hotta A, Fujita O, Uda A, Yamamoto Y, Sharma N, Tanabayashi K, Yamada A, Morikawa S. Virulence of Representative Japanese *Francisella tularensis* and Immunologic Consequence of Infection in Mice. *Microbiol Immunol.* 2016, 60(3):168-76.

13) Kaneyuki S, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Taniguchi S, Fukuma A, Shimojima M, Kurosu T, Morikawa S, Saijo M. Ulcerative lesions with hemorrhage in a patient with severe fever with thrombocytopenia syndrome observed via upper gastrointestinal endoscopy. *Jpn J Infect Dis.* 2016, 69(6): 525-527.

14) 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.* 2016, 69(5):431-434.

15) 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.* 2016;69(2):131-134.

16)

2. 学会発表

- 1) 森川茂, 棚林清, 西條政幸. 国立感染症研究所の BSL-4 施設が大臣指定を受けるまでの道のりと今後の施設内での業務等について. 第 16 回日本バイオセーフティ学会学術総会・学術集会. 大宮, 2016 年 10 月
- 2) Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Fukushi S, Kurosu T, Koyama Y, Uda A, Morikawa S, Komeno T, Nakajima N, Furuta Y, Shimojima M, Saijo M. Therapeutic effects of favipiravir (T-705) against severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection in a mouse lethal model. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2016 年 10 月

G. 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

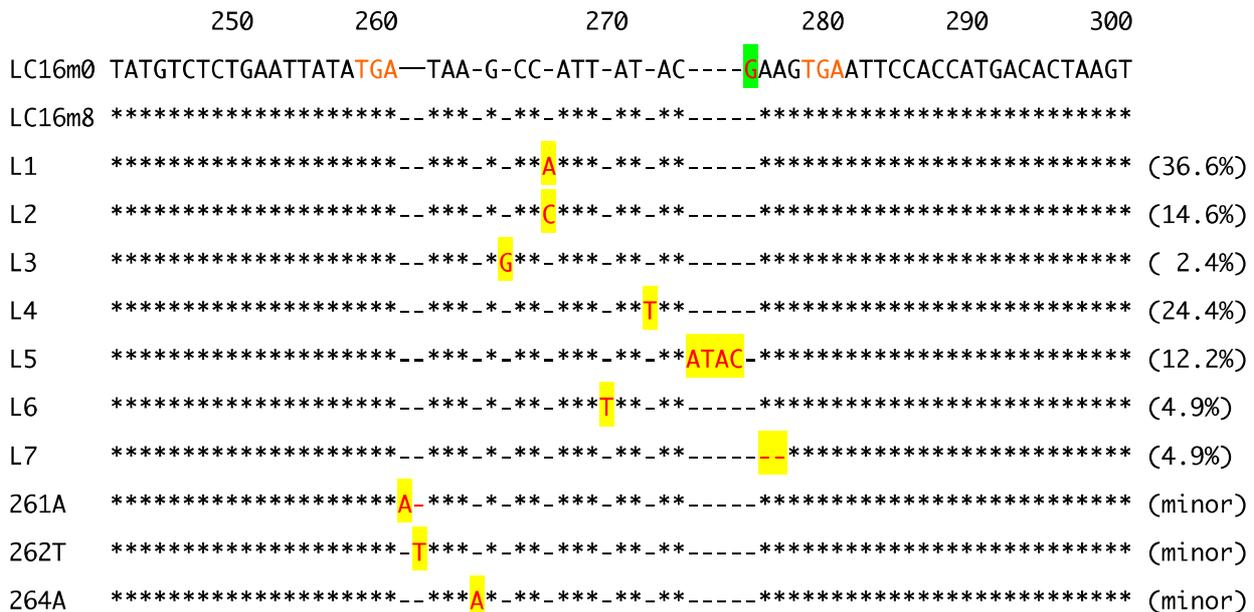


図 1 . K1 から得られた MSP の遺伝子型とその出現頻度
注 : 262A, 262T, 264A は Vero E6 細胞で継代後に得られた MSP

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

表 2 . 各ロット中の B5R コピー数, MSL(L1, L4, L5)のコピー数, 推定 MSP 率

	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	Lot 5	Lot 6	Lot 7	Lot 8	Lot 9	Lot 10	Lot 11	Lot 12	Lot 13	Lot 14
Total (copies/μl)	3.2E+07	1.4E+08	1.2E+08	1.2E+08	1.3E+08	8.4E+07	6.4E+07	1.8E+08	1.7E+08	4.6E+07	3.8E+07	4.6E+07	6.3E+07	8.1E+07
267A	L1	1.0E+04	1.9E+05	6.6E+04	5.5E+04	4.1E+04	1.0E+04	1.0E+04				1.0E+04	1.0E+04	1.0E+04
272T	L4	3.2E+04	8.5E+05	5.3E+05	4.7E+05	5.2E+05	3.2E+04							
274ATAC	L5	1.1E+05	5.5E+05	2.8E+05	3.1E+05	3.1E+05					1.0E+04	1.0E+04	5.0E+04	1.0E+04

%	MSP type	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	Lot 5	Lot 6	Lot 7	Lot 8	Lot 9	Lot 10	Lot 11	Lot 12	Lot 13	Lot 14
267A	L1	0.03	0.14	0.05	0.05	0.03	0.01	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.02	0.01
271T	L4	0.10	0.62	0.43	0.40	0.41	0.04	0.05	0.02	0.07	0.07	0.08	0.07	0.05	0.04
274ATAC	L5	0.34	0.40	0.23	0.26	0.24	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.02	0.08	0.01

sum (%)		Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	Lot 5	Lot 6	Lot 7	Lot 8	Lot 9	Lot 10	Lot 11	Lot 12	Lot 13	Lot 14
267A	L1	6.6%	11.9%	7.6%	6.6%	4.7%	24.0%	24.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	19.4%	10.9%	19.4%
271T	L4	20.7%	53.4%	60.2%	56.7%	59.5%	76.0%	76.0%	100.0%	100.0%	100.0%	76.0%	61.2%	34.5%	61.2%
274ATAC	L5	72.7%	34.7%	32.2%	36.7%	35.7%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	24.0%	19.4%	54.6%	19.4%

Lot 3の以前の次世代データからの推定MSP含有率 (%)

補正率(MSP%/L1,4,5%)

1.38	0.65	1.59	0.99	0.97	0.94	0.07	0.09	0.02	0.03	0.09	0.15	0.16	0.20	0.09
------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

表 3 . L1 の感度補正(x 10)した場合の MSP 含有率等

	MSP type	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	Lot 5	Lot 6	Lot 7
sum		0.752	2.402	1.215	1.128	0.971	0.157	0.210
267A	L1	41.2%	57.5%	45.3%	41.7%	33.0%	76.4%	76.2%
271T	L4	13.0%	25.8%	35.6%	35.5%	41.9%	23.6%	23.8%
274ATAC	L5	45.7%	16.7%	19.1%	22.9%	25.1%	0.0%	0.0%

Lot 3の以前の次世代データからの推定MSP含有率

補正率(MSP%/L1,4,5%)

1.38	1.04	3.31	1.68	1.56	1.34	0.22	0.29
------	------	------	------	------	------	------	------

分担報告書

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

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，培養を介さ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，BSL3 真菌のうち，これまで検討を行っていない *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Penicillium marneffeii* DNA の LAMP 法による高感度検出系の開発を検討した．

研究協力者

名木 稔・国立感染症研究所真菌部・研究員
星野泰隆・国立感染症研究所真菌部・主任研究官
宮崎義継・国立感染症研究所真菌部・部長

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見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．他にも BSL3 に分類される真菌として，*Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Penicillium marneffeii* が定義されており，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，BSL3 真菌については，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，本研究においてまだ検出系を確立していない他の BSL 真菌である，*P. brasiliensis*, *B. dermatitidis*, *P. marneffeii*, 3 菌種について，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

P. brasiliensis 検出のための LAMP 法の標的配列として，既に論文で報告されている主要表層抗原である糖タンパク *gp43* 遺伝子 (Endo S et al., FEMS Microbiol. Lett., 2004) を用いた．LAMP 反応を促進する loop プライマーを設計し，論文中記載のプライマーに加えてプライマーセットとした．

P. marneffeii 検出のための LAMP 法の標的配列として，既に論文で報告されている，ITS (internal transcribed spacer) 領域 (Jiufeng Sun et al., FEMS Immunology and Medical

Microbiology, 2010) を対象とした LAMP プライマーセットを導入した。

B. dermatitidis 検出のための LAMP 法の標的配列については過去に報告が無いため、病原因子 BAD1 のプロモーター領域(Burgess JW et al., Med. Mycol. 2006) を用い、LAMP プライマーを数組設計した。

プライマーの設計には LAMP 法プライマー設計支援ソフトウェア PrimerExplorer (富士通) を利用した。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、サーマルサイクラーで 63 で反応を行った。

使用した BSL3 真菌の菌株については、自施設に保存している株が少なく、千葉大学真菌医学研究センターから分与していただいた。菌株から抽出した DNA を用いて検討を行い、LAMP 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

国立感染症研究所において、これまでコクシジオイデス属、ヒストプラスマ属 BSL3 真菌の菌株は適切数保管しているが、それ以外の BSL3 真菌についてはリソース不足であり、本研究の遂行のために菌株を収集する必要があった。そのために、千葉大学真菌医学研究センターに保存している *P. brasiliensis*, *B. dermatitidis*, *P. marneffei*, 3 菌種について菌株を分与していただいた。

P. brasiliensis 検出のための LAMP 法の導入を検討した。既に論文に報告されている *gp43* 遺伝子を対象とした LAMP プライマーに、本研究で設計したループプライマーを加えて、5 菌株から抽出した DNA に対して LAMP 反応を行ったところ、水のみ陰性コントロールでは 2 時間経過しても検出されなかったが、菌株 DNA では全て 30~60 分以内に検出可能であった(図 1)。

P. marneffei 検出のための LAMP 法の導入のために、既に論文に掲載されている LAMP プライマーおよびループプライマーを用いて、5 菌株から抽出した DNA に対して LAMP 反応を行い、予想通り、30 分から検出可能であった(図 2)。

B. dermatitidis 検出のための LAMP 法については、本研究で 3 組のプライマーセットを設計し、菌株から抽出した DNA を用いて LAMP 反応を行っ

た。*BdBAD1-ID1* のプライマーセットでは 2 時間経過しても検出されず、*BdBAD1-ID10* では 90 分後、*ID12* のプライマーセットでは 2 時間経過後に検出可能であった(図 3)。

D. 考察

本研究では、*P. brasiliensis*, *B. dermatitidis*, *P. marneffei* を検出するための LAMP 法の導入を検討した。*P. brasiliensis* および *P. marneffei* については、既報の論文のプライマーセットの導入により、期待通りの検出感度を確保でき、BSL3 真菌検出システムへの組み込みに応用できることが示された。しかしながら、新たに設計した *B. dermatitidis* の LAMP プライマーについては、検出感度が非常に低く、実用レベルに達していないため、今後、他の特異的配列を標的にして設計を行う必要がある。

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は予想できないので、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 BSL3 真菌を迅速簡便に検出できる。現時点では菌体から調製した 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 *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Penicillium marneffei* の迅速診断系のためのプライマーセットを開発・導入した。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 田子さやか, 井口成一, 相野田祐介, 平井由児童, 鶴澤 豊, 後藤亜江子, 柄澤利子, 鶴岡直樹, 渡辺 哲, 亀井克彦, 名木 稔, 梅山 隆, 宮崎義継, 菊池 賢, 米国カリフォルニア州ベーカーズフィールド滞在後に発症した難治性中耳炎の一例, 第90回日本感染症学会総会, 仙台(2016.4)

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

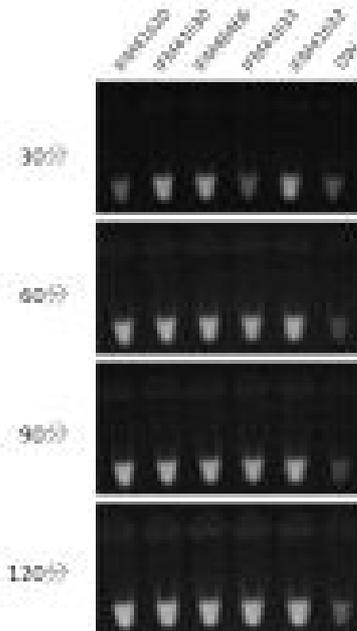


図1 *P. brasiliensis*のLAMP法検出

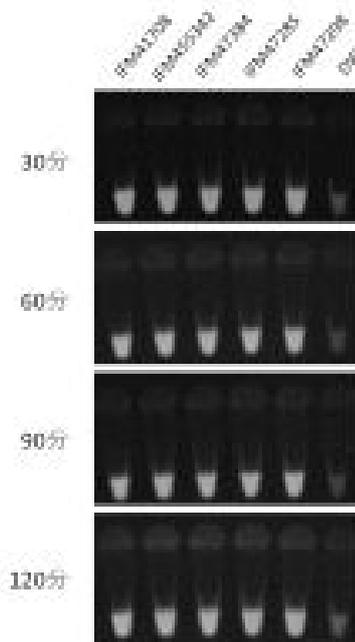


図2 *P. marneffei*のLAMP法検出

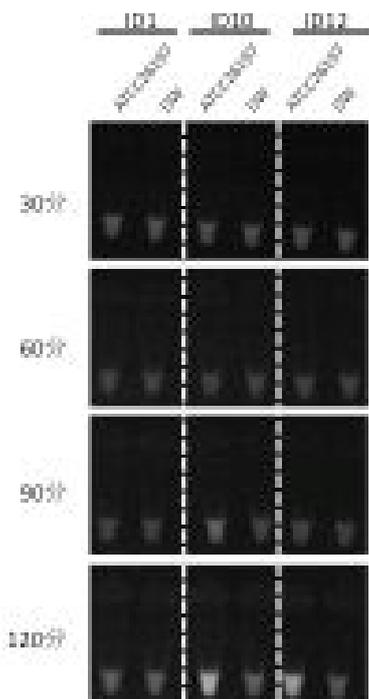


図3 *B. dermatitidis*のLAMP法検出

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

分担報告書

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．

世界的な取組としてコーネル大学 Mason 博士の主催の元，Metagenomics & Metadesign of Subways & Urban Biomes (MetaSUB) プロジェクトが進行中である．ニューヨークの地下鉄の拭き取り調査により得られた検体のメタゲノム DNA 解析し，多種多様な細菌種を同定し，地図上にマップする試みである (<http://graphics.wsj.com/patho-map/?sel=bact>)．都市における感染症リスクを把握するため，ゲノミクスを駆使して評価するアプローチであり，環境保全等の基盤データとして有効に活用されるべきだろう．本計画では，東京近郊を周回する大江戸線の各駅から手すり等の環境サンプルを採取し，次世代シーケンサーを用いたメタゲノム DNA 解析法にて，特徴的な病原体や薬剤耐性菌の検出を試みた．ヒト配列が有意な採取箇所やレンサ球菌属配列の多い駅等へ大まかに分類されることが分かった．手すり等の表面は利用者が直接接触する可能性があり，基本的にヒト配列が際立って多い場所であってもおかしくないと推測される一方，ヒト常在菌の *Streptococcus* レンサ球菌属の配列が多数を占める採取場所もあった．各駅の特徴を示した結果を得ることができたが，ほんの数箇所を拭いて検査しただけに過ぎず，一時的な汚染を検出したスナップショットであることも念頭において評価したほうが良いだろう．

今回の試行では薬剤耐性菌や病原体を検出することは無かったが，環境サンプルのメタゲノム解析法による検出感度・特異度に結果が左右されるため，適正な採取場所の選定や季節変動の影響等，今後評価すべき課題だと考えている．

研究協力者

関塚剛史・国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室

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第三室

加藤健吾・国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室

神沼英里・国立遺伝学研究所 生命情報研究センター 大量遺伝情報研究室

鈴木治夫・慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科

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．最先端の革新技術を応用し，効率的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．

今年度は環境汚染と感染症リスクを相互評価する観点から、公共交通機関の手すり等の付着する感染性因子（推定）に着目し、採取付着物のメタゲノム解析法にて汚染実態の調査を行った。

B. 研究方法

1. 公共交通機関の環境サンプル採取

公共交通機関でのサンプル採取にあたり、東京都交通局電車部営業課に研究計画の骨子と重要性をご説明し、事前の取り決めを遵守することを前提に平成 28 年 2 月 5 日付けでサンプル採取の許可を得た。対象は大江戸線の周回の各駅を広範に選定し Puritan Opti-Swab Liquid Amies Collection & Transport System を用いて手すりおよびトイレドアの付着物を拭き取り回収した。採取日時は平成 28 年 2 月 6 日と平成 28 年 2 月 24 日の 2 回に分けて実施した。採取日のうちに拭き取りサンプルを冷凍保管した。

2. DNA 精製および増幅

拭き取りサンプルを室温溶解し、十分にボルテックスにて攪拌後、浸出液 100 μ l を DNA 精製に供試した。ZymoResearch ZR Soil Microbe DNA MicroPrepTM の手順書に従い、ビーズ破碎からカラム精製と環境不純物の排除を行って純度の高い DNA を精製した。

DNA は高感度の Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) で濃度測定した。

微量 DNA 濃度であったサンプルには超純度 phi29 DNA polymerase (関東化学 http://www.kanto.co.jp/products/siyaku/baioidenshi/idenshi_phi29/phi29_dna_polymerase.html) で NGS ライブラリーの作成に必要な DNA 量まで増幅した。

3. メタゲノム解析

採取サンプルに含まれる精製 DNA は多様な生物種の混合物であると推定されるため、DNA をランダムに配列解読するメタゲノム解読の NGS ライブラリーを作成した。Nextera XT DNA Library Prep kit (Illumina) と 96 index アダプターを用いてインサート長・平均 200-bp のライブラリーを作成した。調整 NGS ライブラリーは 96 index にて分別可能であるため、96 サンプルまとめて MiSeq reagent kit v3 (150 cycle) で配列解読し、解読後にインデックス振り分けによりサンプル個別の解読リードを取得した。1 サンプルあたり平均 20 万本の 150-mer 解読リードが取得できるよ

う調整した。

4. 生物群集の Taxonomy 分類

150-mer 解読リードから skewer スクリプトにてアダプター配列および精度の低い塩基 (Phred Quality score ≤ 15) の除去トリミングを行った。信頼性の担保できた解読リードを公共データベース (NCBI nt および wgs データベース、2016/05/13 版) に対して塩基配列同士の megablast 相同性検索を行った (閾値: blast score ≥ 50 , Top hit のみ抽出)。相同性検索の結果は MEGAN v6 (チュービンゲン大学) にて生物種ごとに検出率を評価した。MEGAN に内包される主座標分析 (Principal Coordinate Analysis; PCoA) を用いて採取場所毎に分類される群集を分類した。

【倫理面への配慮】

国立遺伝学研究所にて「都市公共空間の DNA 環境評価地図構築」の申請課題で倫理申請し、包括承認を受けた。

C. 研究結果

都営地下鉄大江戸線の新宿西口から都庁前までの 23 駅から各 4 箇所を採取し、計 92 箇所の採取サンプル (+コントロールとして 4 サンプル) を本実験に使用した。精製 DNA の回収量が測定限界以下の想定より少なかったため、phi29 DNA polymerase を使った Rolling Circle Amplification 法にて増幅バイアスの少ない DNA の量と質を確保した (http://www.kanto.co.jp/products/siyaku/baioidenshi/idenshi_phi29/phi29_dna_polymerase.html)。

次世代シーケンサー MiSeq にて 96 サンプルをメタゲノム解析し、サンプルごとの特徴を群集として主座標分析した結果、ヒト配列が有意なサンプルやレンサ球菌属配列が多いサンプル等へ分類されることが分かった (図 1)。手すり等の表面は利用者が直接接触する可能性があり、基本的にヒト配列が際立って多い採取場所があってもおかしくないと推測された。一方、ヒト常在菌 (A 群レンサ球菌や肺炎球菌等の病原菌も含む) としてヒトとの関連性の高い Streptococcus レンサ球菌属の配列が多数占める採取場所もあった。雑巾等の清掃用具の悪臭の原因菌と近縁な環境細菌 Enhydrobacter が有意な採取場所もあり、この環境細菌に汚染しているよりもむしろ、清掃により清潔に維持されていると推測もできた。

PCoA では大まかな群集団の分類になるため、各駅・各採取場所の特徴が分かりにくいため、WordCloud 法にて図示化した(図2)。

某駅の S2(手すり)でラット等の齧歯動物の寄生虫として知られる Strongyloides と環境細菌 Burkholderia を検出した(図3)。

某駅の S1S2(手すり)から海浜近くの駅ならではの藍藻類の配列を検出した(図4)。

96 サンプル中 27 サンプルの DNA 量が少なく解析に適していない(<10,000 リード)ものも含まれることから、駅構内の日常清掃により比較的清浄な状況が保たれていると考えられた。

D. 考察

サンプルを拭った箇所によってはヒト配列(Homo)の検出量にバイアスがあり、清掃作業における影響が想定される。他、解読リード数が想定以下の少ないサンプルもあるため、改めて情報解析を試行する必要もあるだろう。各駅で特徴的な配列が検出される事例があったが、ほんの数カ所を拭って検査しただけに過ぎず、一時的な汚染を検出したスナップショットであることも念頭において評価したほうが良いだろう。

今回の試行では薬剤耐性菌や病原体を検出することは無かったが、環境サンプルのメタゲノム法による検出感度・特異度に左右されるため、不正確なデータ取得のまま有無についての議

論は成り立たないと考えられる。

E. 結論

東京近郊を周回する大江戸線の各駅から手すり等の環境サンプルを採取し、次世代シーケンサーを用いたメタゲノム DNA 解析法にて、特徴的な病原体や薬剤耐性菌の検出を試みた。環境中の病原体検出に対してメタゲノム解析を導入する場合の基盤的遺伝子情報(大規模情報)を得た。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

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

主座標分析 (Principal Coordinate Analysis; PCoA)

PCoA
PC1:23.4%
PC2:8.0%



Enhydrobacter が多い
<https://en.wikipedia.org/wiki/Enhydrobacter>
河川等で見られる環境細菌

Streptococcus
レンサ球菌が多い。
ヒトの常在細菌種と
病原性を有する種が混在

ヒトの配列
が多い

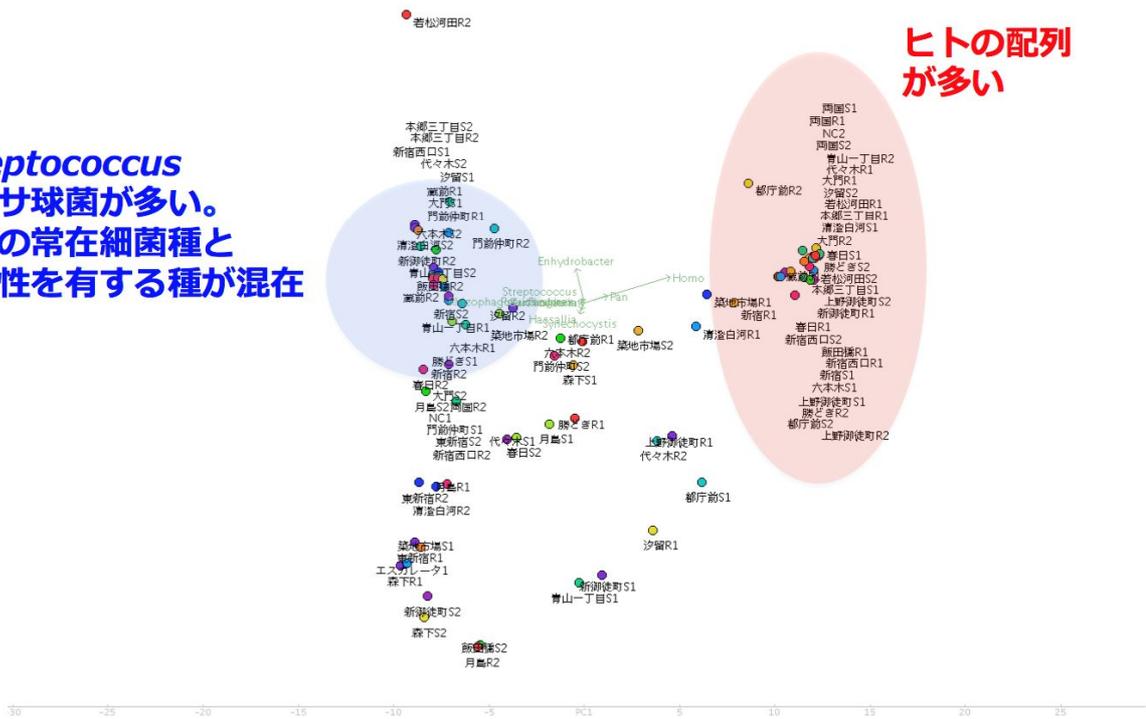
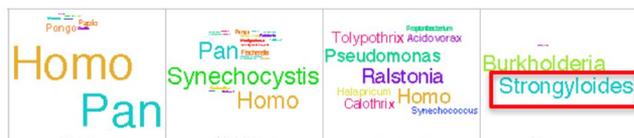


図1 96サンプルから検出された生物種を指標にした主座標分析 PCoA 解析。大江戸線各駅における特徴であるのかサンプリングのバイアスであるのか確かではないが、ヒト配列が多めに検出される駅、ヒト口腔常在菌の多い駅、河川等の環境細菌が多く検出される駅に大きく大別された。

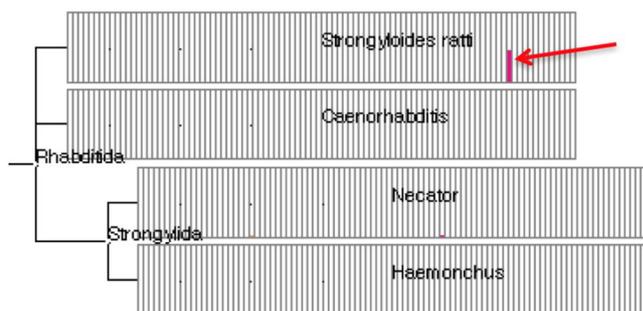


図2 各駅の採取場所から検出された生物種の種類・存在比を図示化した WordCloud. 赤 で囲んだ採取場所は多様な生物種が特定された箇所を示す. 複数種が検出されたからといって, 汚染度が高いことと相関するわけではない.

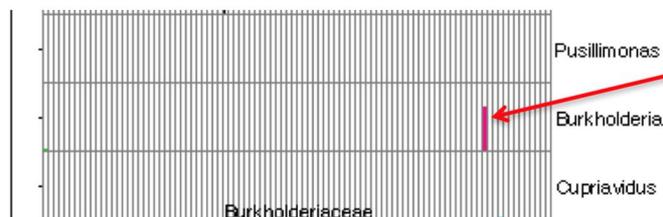
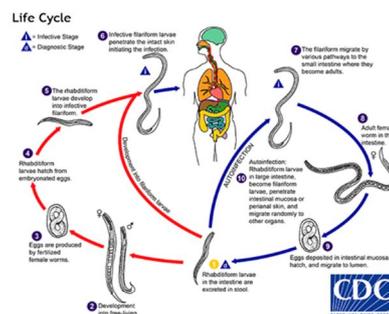


Strongyloides 寄生虫

<http://www.cdc.gov/parasites/strongyloides/biology.html>



ラットの寄生虫



Burkholderia 環境細菌

図3 某駅のメタゲノム結果の特徴．S2（手すり）でラット等の齧歯動物の寄生虫として知られる Strongyloides と環境細菌 Burkholderia を検出した．



• 附着性藍藻

- ネンジュモ目 Nostocales
 - Calothrix
 - ヒゲモ Rivularia
- スチゴネマ目 Stigonematales
 - Brachytrichia



<https://ja.wikipedia.org/wiki/%E8%97%BB%E5%A0%B4>

図4 某駅のメタゲノム結果の特徴．海浜に近い駅の特徴である藍藻類の配列を検出した．

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確立，
及び細胞培養痘そうワクチンの有効性，安全性に関する研究

分担報告書

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。これまでに私たちは、独自に開発した高感度で特異性の高い *in situ* hybridization-AT tailing (ISH-AT) 法を中心に市販の RNA ISH Kit も利用しながら様々な RNA ウイルス拡散の検出を行ってきた。今回私たちは RNA のみでなく DNA にも視野を広げ DNA ウイルス核酸の検出が可能な ISH-AT 法の確立を試みた。現在は、アデノウイルスの核酸検出系を立ち上げることに成功しグループ判別のみでなく血清型の特特定も可能な系の確立を目指して、臨床的に重要と思われる血清型をターゲットにしプローブの作製等を行っている。

研究協力者・

田中道子・国立感染症研究所感染病理部・協力研究員

A. 研究目的

これまでの研究目的である(1)組織中に病原体ゲノムを検出するための *in situ* 核酸検出法を確立し、バイオテロ発生時に備える。(2) バイオテロに使用される可能性のある病原体について、ゲノム検出用のプローブを作成し、検出プロトコルをあらかじめ確立しておく。に加え、本年度は(3)2本鎖 DNA や染色体に組み込まれた DNA も検出できるような *in situ* 核酸検出法を確立する。ことを目的とした。

B. 研究方法

材料：ホルマリン固定パラフィン包埋剖検組織標本、感染細胞標本を使用した。(アデノウイルス感染細胞は国立感染症研究所・花岡博士、B型肝炎ウイルス(HBV)感染細胞は国立感染症研究所・渡士博士から分与) ウイルスゲノム情報をもとに検出用のオリゴプローブを作成し ISH-AT 法で検出を試みた。

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, 1, 5, 10, 100 µg/ml

にして至適濃度を決定した。ホルマリンピグメントの除去が必要な際は脱パラ後に 3%アンモニウム/70%エタノール 5 分で処理した。内因性アルカリフォスファターゼ除去が必要な際は脱パラ後に 5% HCl/エタノール 5 分 及び PK 処理後に 0.2N HCl/0.3M NaCl 常温 15 分で処理した。内因性ビオチン除去が必要な際はハイブリダイゼーション(ハイブリ)後に Biotin blocking system (DAKO) を使用した。内因性ペルオキシダーゼ除去が必要な際は 0.3-3.0% 過酸化水素/メタノール を常温 30 分で処理した。また、DNA プローブは 95 度 10 分で熱処理後、組織に添加し、90 度 10 分ハイブリさせてから急冷し、その後 50 度で 0/N ハイブリを行った。

発色法：アルカリフォスファターゼ-Fast rsd の系と、HRP-DAB の系の両方を試行した。後者では検出感度を上げる際はチラミドで増幅する CSA 法を併用した。

【倫理面への配慮】

依頼検体等人の組織のホルマリン固定パラフィンブロックを使用する場合には個人情報の取り扱いに細心の注意を考慮した。

C. 研究結果

新たに DNA ウイルスをターゲットとし DNA-ISH-AT 法の確立を試みた。主にアデノウイルス (ADV) 及び B 型肝炎ウイルス (HBV) の検出の確立を試みた。ADV に関しては型特異的な検出を目指している。HBV に関しては、肝癌発生に深く関与していると考えられている cccDNA の検出を目標に、様々なプローブの作成、組織の処理法を検討中である。細胞標本及び臨床検体の解析を行っており、ADV に関しては双方でウイルスゲノムの検出に成功した(図 1)。

D. 考察

ADV は流行性角結膜炎、出血性膀胱炎、壊死性肺炎など様々な疾患の病因ウイルスとして知られているが、初感染後持続感染することから、近年移植後感染症の原因として注目されている。ADV の型判別が可能な ISH AT 法を確立することで、眼科や泌尿器領域の検体を用いて型判別を可能とし、臨床現場での診断・治療に貢献できる可能性がおおいにある。HBV に関しては、cccDNA の薬剤除去が不可能な現在、慢性肝炎の組織において cccDNA が検出可能になると臨床的にも肝癌発生の可能性の新たな指標とできる可能性が非常に大きく意義深いと考えられる。

E. 結論

ADV に関してはグループの型判別のみでなくグループ内の血清型判別も試みている。現在のところ特に日本において臨床的に重要とされている幾つかの血清型に対しての特異的プローブを作成し、組織検体での検出を試みている。さらに型特異的なリアルタイム PCR のプライマーセットも作製中であり依頼検体での ADV の血清型判別及びウイルスコピー数の測定にも応用していくつもりである。また、DNA-ISH は現在のところ市販のものがなく、この系を確立することができれば基礎研究にも臨床の場にも低コストで貢献することが可能になり様々な場面で活用できると考える。

F. 健康危険情報 特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Arafa AS, Yamada S, Imai M, Watanabe T, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Kiso M, Sakai-Tagawa Y, Ito M, Imamura T, Nakajima

N, Takahashi K, Zhao D, Oishi K, Yasuhara A, Macken CA, Zhong G, Hanson AP, Fan S, Ping J, Hatta M, Lopes TJ, Suzuki Y, El-Husseiny M, Selim A, Hagag N, Soliman M, Neumann G, Hasegawa H, Kawaoka Y. Risk assessment of recent Egyptian H5N1 influenza viruses. *Sci Rep.* 2016 Dec 6;6:38388

- 2) Iwatsuki-Horimoto K, Nakajima N, Shibata M, Takahashi K, Sato Y, Kiso M, Yamayoshi S, Ito M, Enya S, Otake M, Kangawa A, da Silva Lopes TJ, Ito H, Hasegawa H, Kawaoka Y. The Microminipig as an Animal Model for Influenza A Virus Infection. *J Virol.* 2017 Jan 3;91(2)
- 3) Park ES, Suzuki M, Kimura M, Mizutani H, Saito R, Kubota N, Hasuike Y, Okajima J, Kasai H, Sato Y, Nakajima N, Maruyama K, Imaoka K, Morikawa S Epidemiological and pathological study of feline morbillivirus infection in domestic cats in Japan. *BMC Vet Res.* 2016 Oct 11;12(1):228
- 4) Kotani O, Suzuki T, Yokoyama M, Iwata-Yoshikawa N, Nakajima N, Sato H, Hasegawa H, Taguchi F, Shimizu H, Nagata N. Intracerebral inoculation of mouse-passaged Saffold virus type 3 affects cerebellar development in neonatal mice. *J Virol.* 2016 Aug 31. pii: JVI.00864-16. [Epub ahead of print]
- 5) Sakai K, Ami Y, Nakajima N, Nakajima K, Kitazawa M, Anraku M, Takayama I, Sangsriratanakul N, Komura M, Sato Y, Asanuma H, Takashita E, Komase K, Takehara K, Tashiro M, Hasegawa H, Odagiri T, Takeda M. Tmprss2 Independency for Haemagglutinin Cleavage In Vivo Differentiates Influenza B Virus from Influenza A Virus. *Sci Rep.* 2016 Jul 8;6:29430.
- 6) Hayashi K, Yoshida H, Sato Y, Tobiume M, Suzuki Y, Ariyoshi K, Hasegawa H, Nakajima N. Histopathologic findings of lung with A/H1N1pdm09 infection-associated ARDS in the post-pandemic season. *Jpn J Infect Dis.* 2016 Jun 30.
- 7) Hai Ie T, Thach HN, Tuan TA, Nam DH, Dien TM, Sato Y, Kumasaka T, Suzuki T, Hanaoka

N, Fujimoto T, Katano H, Hasegawa H, Kawachi S, Nakajima N. Adenovirus Type 7 Pneumonia in Children Who Died from Measles-Associated Pneumonia, Hanoi, Vietnam, 2014. *Emerg Infect Dis.* 2016 Apr;22(4):687-90.

- 8) Kotani O, Naeem A, Suzuki T, Iwata-Yoshikawa N, Sato Y, Nakajima N, Hosomi T, Tsukagoshi H, Kozawa K, Hasegawa H, Taguchi F, Shimizu H, Nagata N. Neuropathogenicity of Two Saffold Virus Type 3 Isolates in Mouse Models. *PLoS One.* 2016 Feb 1;11(2):e0148184

2. 学会発表

- 1) Noriko Nakajima, Akihiko Hamamatsu, Kino Hayashi, Yuko Sato, Toshio Kumasaka, Minoru Tobiume, Hideki Hasegawa Severe lung injury associated with A/H1N1 pdm09

infection in the post-pandemic season 第64回日本ウイルス学会学術集会, 札幌 (2016, 10)

- 2) 鈴木忠樹, 片野晴隆, 高橋健太, 佐藤由子, 中島典子, 長谷川秀樹 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) の病理解析. 第105回日本病理学会総会, 仙台 (2016.5)
- 3) 酒井宏治, 中島典子, 駒瀬勝啓, 竹田誠. 呼吸病ウイルスの病原性発現に関わる宿主プロテアーゼ TMPRSS2 の意義 第57回日本臨床ウイルス学会, 福島 (2016,5)

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

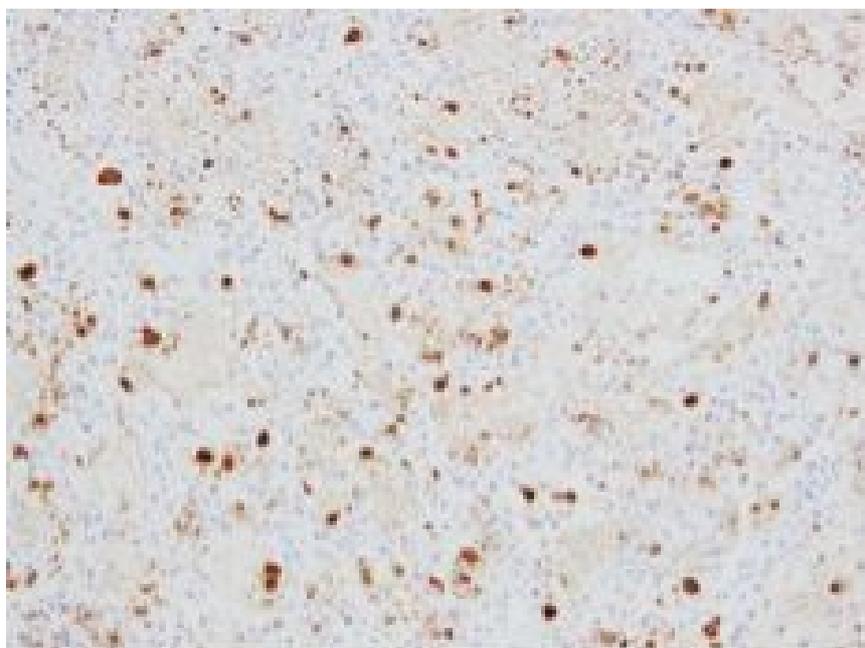


図1. アデノウイルス肺炎の肺剖検組織. DNA ISH-AT 法によるアデノウイルスゲノム検出.

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

分担報告書

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
研究分担者 永田典代

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。私たちは、電子顕微鏡によるウイルス診断法の精度向上のため、教育訓練の一環としてロベルト・コッホ研究所による外部評価に参加している。今年度は5回目の参加となり、合計14種類のウイルス科の粒子を電子顕微鏡観察することができた。電子顕微鏡によるウイルスの同定は、その粒子の大きさ、形状、エンベロープの有無と形状、検体の由来とその臨床症状がポイントとなる。初見での病原体検出は比較的難しく、参照標本での教育と継続的な訓練は必要不可欠である。

研究協力者

岩田（吉河）奈織子・国立感染症研究所感染病理部・主任研究官

片岡紀代・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・部長

A. 研究目的

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、診断法の精度を向上するため、教育訓練の一環として取り入れているロベルト・コッホ研究所による外部評価について過去5年間の評価結果をとりまとめた。

B. 研究方法

平成 23 年度から毎年参加している、ロベルト・コッホ研究所による外部評価（External Quality Assurance Scheme in EM Virus Diagnostics, EQA-EMV）の結果をとりまとめ、その成果を考察した。この外部評価は、電子顕微鏡の教育訓練を目的として Dr. Hans Gelderblom により 1994 年から導入された。ロベルト・コッホ研究所が毎年主催し、世界中の 100 カ所余りのラボが参加している。医学およ

び獣医学領域の臨床検体を対象としている。また、サンプルは、培養細胞でウイルスを増殖した培養上清であり、これが2%ホルマリン0.02%アジ化ナトリウム混合液に調整され、250マイクロリットルずつ分注されたものが参加者に配布（郵送）される。外部評価の際には指定のレファレンスラボ6カ所が同様に参加し、レファレンスラボのうち少なくとも5カ所が正答であればサンプルは適正であるとする。我々は、平成23年（EQA-EMV24）から参加しており、今回で5回目の参加となった。

【倫理面への配慮】

（倫理面への配慮）該当なし

C. 研究結果

いずれのサンプルについても標準的な対応として次の通り観察試料を作製した。

1. 支持膜つきグリッドを親水化処理する。
2. 試料を微量高速遠心機で粗遠心する。
3. パラフィルムを準備し、フィルターを通した蒸留水、染色液、蒸留水の順番で30 μ l程度の大きめの水滴を作る。
4. パラフィルムの上に5~30 μ lの検体を滴下する。
5. 支持膜付きグリッドを（支持膜側を下にして）検体ドロップの上に置く（30秒~10分吸着、試料による）。
6. ピンセットでグリッドを持ち上げ、余分な液をろ紙で吸い取る。

7. これを（支持膜側を下にして）蒸留水に移動し（洗浄），再度ろ紙で吸い取る．
8. 次に（支持膜側を下にして）染色液に移動し，およそ 30 秒染色する．
9. ピンセットでグリッドを持ち上げ，余分な液をろ紙で吸い取る．
10. これを同様に蒸留水で洗浄し，再度ろ紙で吸い取る．
11. ろ紙を敷いたシャーレに（支持膜側を上にして）置き，乾燥する．
12. 透過型電子顕微鏡で観察する．

これまでに 5 回の EQA-EMV に参加し，のべ 30 件のウイルスを観察した（表）．結局，14 種類のウイルス科あるいは属の観察を経験した．観察結果の回答内容は概ね良好であるが，誤答が 3 件あった．

D. 考察

電子顕微鏡によるウイルスの同定は，その粒子の大きさ，形状，エンベロープの有無と形状，検体の由来とその臨床症状がポイントとなる．我々が誤答したうちの 2 件は，比較的小さな球形のウイルス粒子を示すフラビウイルスとヘパドナウイルスであり，同様の形状のウイルスはいずれも初見での鑑別は困難であった．また，1 件は試料に含まれるウイルス粒子数が少ないものであり，われわれの標準的な方法では観察が出来なかった．オルソポックスウイルス，ヘルペスウイルス，パラミクソウイルス，オルソミキソウイルス，ロタウイルス，アデノウイルス，パラポックスウイルスに関しては，特徴的な形状，大きさを示すため，鑑別は比較的容易であった．また，アメーバから発見されたミミウイルスは粗遠心により粒子が沈殿してしまうので，懸濁した試料を直接，観察する必要があった．また，このウイルス粒子周囲の線毛を維持して観察するのは困難であった．ミミウイルスに関しては，由来がアメーバであったため，観察方法を工夫することができた．

E. 結論

初見での病原体検出は比較的難しく，参照標本での教育と継続的な訓練は必要不可欠である．

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Furihata S, Matsumura T, Hirata M, Mizutani T, Nagata N, Kataoka M, Katayama Y, Omatsu T, Matsumoto H, Hayakawa Y. Characterization of Venom and Oviduct Components of Parasitoid Wasp *Asobara japonica*. PLoS One. 2016.11(7) e0160210.
- 2) Taniguchi S, Maeda K, Horimoto T, Masangkay JS, Puentespina R Jr, Alvarez J, Eres E, Cosico E, Nagata N, Egawa K, Singh H, Fukuma A, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Tsuchiaka S, Omatsu T, Mizutani T, Une Y, Yoshikawa Y, Shimojima M, Saijo M, Kyuwa S. First isolation and characterization of pteropine orthoreoviruses in fruit bats in the Philippines. Archives of Virology. 2017. doi. 10.1007/s 00705-017-3251-2

2. 学会発表

特になし

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

表 ロベルト・コッホ研究所による外部評価（第24～28回）で用いられた病原体とその内容

ウイルス科あるいは属	ネガティブ染色像	EQA24	EQA25	EQA26	EQA27	EQA28
<i>Orthopoxvirus</i>		○	○	○		○
<i>Herpesviridae</i>		○		○	○* E	○
<i>Paramyxoviridae</i>		○	○	○		○
<i>Flaviviridae</i>		○ E			○	
<i>Bunyaviridae</i>		○	○			
<i>Mimiviridae</i>		○		○		
<i>Calicivirus</i>			○			○
<i>Coronavirus</i>			○			
<i>Birnavirus</i>			○			
<i>Orthomyxoviridae</i>				○	○	
<i>Rotavirus</i>				○		
<i>Adenoviridae</i>					○	
<i>Hepadnaviridae</i>					○ E	○
<i>Parapoxvirus</i>						○

、出題病原体、E、回答が不適当であったもの、*サンプルに含まれる粒子数が少なかったもの

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

分担報告書

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。サル痘ウイルスのマウス感染実験系において，BALB/c マウスに対しサル痘ウイルスは明らかな病変を起こさなかったが，抗 Ly6G 抗体投与による好中球枯渇により，ウイルス増殖と病変形成を亢進することが判明した。よって，好中球の減少は宿主側の重症化因子の一つと考えられた。

研究協力者

岩田（吉河）奈織子・国立感染症研究所感染病理部・主任研究官

佐藤由子・国立感染症研究所感染病理部・主任研究官

長谷川秀樹・国立感染症研究所感染病理部・部長
福土秀悦・国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官

吉河智城・国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官

西條政幸・国立感染症研究所ウイルス第一部・部長

A. 研究目的

昨年度に引き続き，サル痘感染個体における好中球の減少が重症化に与える影響を明らかにするために，好中球枯渇後のサル痘ウイルス感染マウスの病理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 μ l）を頸背部に皮下接種し

た。対照群には細胞培養液を接種した（各群 10 匹，合計 4 群）。その後，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 日目と 16 日目に動物を安楽殺し，病理学的解析を行った。

【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い行った。

C. 研究結果

いずれの群においても体重変化，皮膚所見，臨床症状の点で，明らかな変化は認められなかったが，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（図 1）。また，副腎周囲の脂肪組織に単球，好酸球を主体とした炎症性細胞浸潤を認めた。好中球は見られなかった。4 匹中 4 匹の肺の間質にわずかな炎症性細胞浸潤を認め，そのうちの 1 匹の肺の結合織に炎症性細胞浸潤をみとめたが，いずれもウイルス抗原は陰性であった。

D. 考察

サル痘ウイルス臨床分離株は，BALB/c に対して感染性を有したが，明らかな病原性を発揮しなかった。そのうち，マウスに白血球減少を引き起こした株を使用して，好中球枯渇実験を行ったところ，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。しかしながら，その他の臓器

にはウイルスの明らかな増殖像は認められなかった。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ることは判明したが、好中球枯渇のための抗体投与の回数を増やす必要がある。具体的には、4日間隔のところを2日間隔とする予定である。さらに好中球枯渇実験を行い、ウイルス感染動態と病変形成機序を明らかにし、サル痘ウイルス感染の重症化における好中球の役割を考察する。

E. 結論

感染初期の好中球減少は宿主側の重症化因子の一つと考えられた。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Iizuka I, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N,

Fukushi S, Ogata M, Morikawa S, Hasegawa H, Mizuguchi M, Kurane I, Saijo M. A Single Vaccination of Nonhuman Primates with Highly Attenuated Smallpox Vaccine, LC16m8, Provides Long-term Protection against Monkeypox. Japanese Journal of Infectious Diseases. 2016. Doi 10.7883/yoken.JJID.2016.417.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

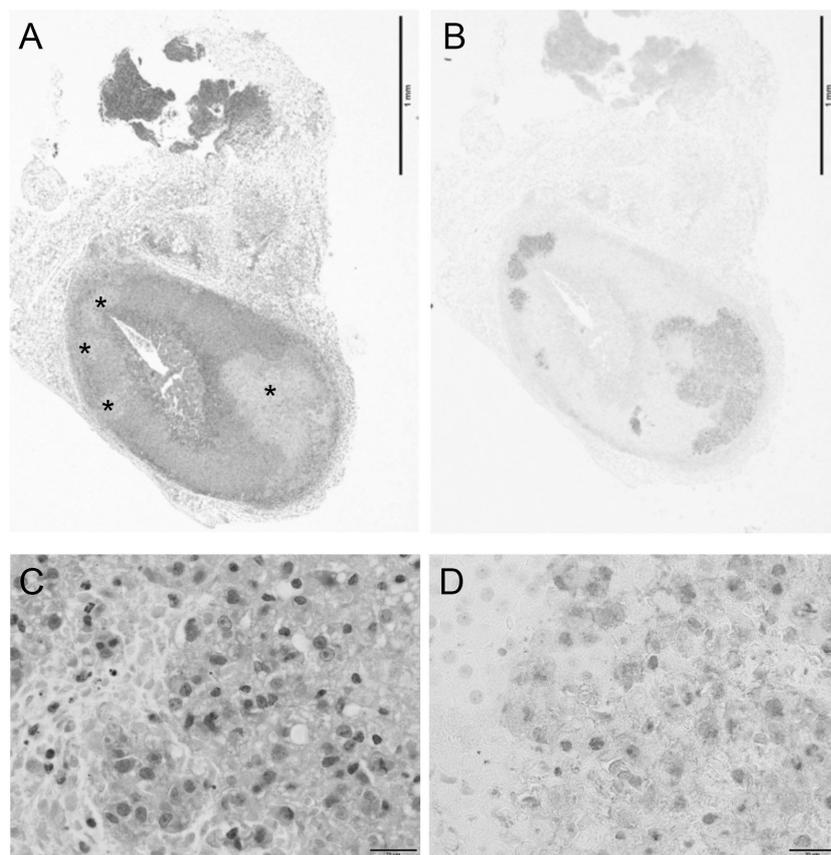


図1. サル痘ウイルス皮下接種後の好中球枯渇マウスの副腎 .A, 副腎皮質に巣状の壊死部が認められる (*). 又, 副腎周囲の脂肪組織に炎症性細胞浸潤が認められた. B, 壊死部に一致してウイルス抗原が検出された. C, D 壊死部の拡大. 壊死部に残存する細胞の核と細胞質は好酸性を呈し, いずれもウイルス抗原陽性であった. A, C, ヘマトキシリン・エオジン染色. B, D, 免疫組織化学法によるウイルス抗原の検出.

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

分担報告書

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 地区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」、「5．NBC テロ発生時の緊急連絡体制の構築や健康危機発生を想定した模擬訓練」の視点から、アンケート調査により、課題を抽出し、課題の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、各地区支部内、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。2016 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。今後に残された主要課題として、1）特定病原体等を原因とする 1 類感染症（クリミア・コンゴ出血熱、痘瘡、南米出血熱、ラッサ熱）、2 類感染症（結核、中東呼吸器症候群、鳥インフルエンザ H7N9）や 4 類感染症（17 疾患）に関する病原体検出マニュアルの整備、2）特定病原体等の規定対象外であるが、アメリカ合衆国 CDC がバイオテロの候補物質（Category B）として指定している毒素（細菌毒素：黄色ブドウ球菌やウエルシュ菌エンテロトキシンや植物毒素：リシン）に関し、所管の明確化や検出マニュアルの整備、3）テロ発生に際し、迅速で円滑な対応をするため、緊急連絡・対応体制の構築や NBC テロを含む健康危機の発生を想定した対応模擬訓練の実施が掲げられる。世界各地でテロ行為が発生している。今後、日本は第 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

（北海道・東北・新潟地区）
水田 克巳・山形県衛生研究所・所長
（関東・甲・信・静岡地区）
岸本 剛・埼玉県衛生研究所・副所長
（東海・北陸地区）
皆川 洋子・愛知県衛生研究所・所長
（近畿地区）
三好 龍也・堺市衛生研究所・ウイルス検査担当・主任研究員
福田 弘美・堺市衛生研究所・細菌検査担当・主任研究員
（中国・四国地区）
調 恒明・山口県環境保健センター・所長
岸本 壽男・岡山県環境保健センター・所長
四宮 博人・愛媛県立衛生環境研究所・所長
山下 育孝・愛媛県立衛生環境研究所・ウイルス科長
（九州地区）
世良 暢之・福岡県保健環境研究所・保健科学部病理細菌課長

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）の検出や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-Seisakujuhou-10900000-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、これらの特定病原体の検査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。

加えて、大阪府や近畿地区における NBC テロ発生時の緊急連絡体制の構築や健康危機発生を想定した模擬訓練実施を報告する。

B. 研究方法

地衛研全国協議会は全国 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)から構成されているため、各支部から研究協力者を選定した。

4項目(下記)について前年度に抽出した課題に関し、各研究者に改善状況を調査した。また、今年度を実施した近畿地区におけるNBCテロを含む健康危機発生を想定した対応模擬訓練を報告する。

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地区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
5. 近畿地区におけるNBCテロを含む健康危機発生を想定した対応模擬訓練

【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、患者など人を研究対象として包含せず、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)の検出方法に関し、地方衛生研究所が主として使用する感染研病原体検出マニュアルの改善状況を調査した。

- 1) 感染研の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
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(17疾患)に関し、記載・リンクが未整備であった(表1)。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、過去2年間に比し、改善した。
- 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(2類感染症)、コレラ(3類感染症)やヘニパウイルス感染症(4類)などで改善し、利便性が向上した。
- 3) 細菌毒素(ボツリヌス毒素や志賀毒素)

ボツリヌス症や腸管出血性大腸菌感染症記載された。しかし、志賀毒素単独(細菌性赤痢や腸管出血性大腸菌感染症)については依然未記載であった(表2)。毒素(細菌毒素:黄色ブドウ球菌やウエルシュ菌エンテロトキシンや植物毒素:リシン)は特定病原体等の規定対象外であるが、アメリカ合衆国疾病管理予防センター(CDC)はCategory Bに分類(http://fas.org/biosecurity/resource/documents/CDC_Bioterrorism_Agents.pdf)し、BCテロに使用される可能性のある毒素としている。しかし、これらは感染研病原体検出マニュアルに未記載である。

2. 新規検査マニュアルの整備の必要性(表3)
 - 1) 痘瘡(1類、一種、BSL-4)はバイオテロで発生が最も危惧され、CDCはCategory Aに分類している(http://fas.org/biosecurity/resource/documents/CDC_Bioterrorism_Agents.pdf)。痘瘡は水痘と類似しているため、鑑別診断が問題となるため、検査マニュアルの整備が必要である。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) 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地区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) 厚生労働科学研究や地域ブロック研修会などを通じ、情報や技術共有を図った。
 - 2) 感染研と地衛研の双方で協議し、かつ、講師を出す研修体制作りが進行している。
 - 3) 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。衛生微生物技術協議会で感染症対策部会を開催し、方針を協議した。
 - 4) 地衛研全国協議会理事会や総会や地衛研ネットワーク等で支部間の連携・情報共有を推進した。
 - 5) 感染研の病原体検出マニュアルの充実・改訂に関し、衛生微生物技術協議会リファレンスセンター会議などで協議し、顕著に改

善した(表2,3も参照)。

4. 地衛研と感染研の連携強化(表5)

- 1) 地衛研が推進している厚生労働科学研究(佐多班や皆川班)は感染研の協力を得、病原体検査の精度管理が向上した。インフルエンザやノロウイルス,野兔病菌,コレラ菌,腸管出血性大腸菌の分子疫学など,精度管理が進展した。
- 2) 感染の研外部精度管理事業企画検討委員会に地衛研委員が参画している。
- 3) 感染研職員が研究代表者の場合,多くの厚生労働科学や日本医療研究開発機構(AMED)研究班に地衛研職員が参画し,共同研究を推進した。
- 4) 人事交流として感染研→地衛研(神奈川県衛生研究所や大阪府立公衆衛生研究所)に転出が散見された。地衛研職員が感染研(感染症疫学センターやウイルス第一部)に転出した事例はあったが,組織的関与(人事の交流制度)はなかった。
- 5) 検査項目・担当官に依存するが,地衛研から感染研に依頼した行政検査(公文書発行前の連絡を含め)で迅速化が図られた。

5. テロ発生時の緊急連絡・対応体制の構築や近畿地区におけるNBCテロを含む健康危機発生を想定した対応模擬訓練(図1,2)

内閣府のNBCテロその他大量殺戮型テロ対処現地関係機関連携モデル(図1)に準じ,大阪府はテロ発生時の緊急連絡・対応体制(図2)を構築している。加えて,近畿地区の14地衛研では未知原因物質(2016年度は食品に多量添加したD-ソルビトール)による健康危機の発生を想定し,検出や特定に関する模擬訓練を実施した。年度により異なるが,未知原因物質として,感染病原体(インフルエンザウイルス),化学物質(有機リン系農薬,食品添加物など)を用いた。地衛研間の情報共有や各地衛研内の部署を越えた連携が図られた。

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1)-6)の全てが該当し,加えて,広域発生の場合,国や自治体間の連携

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)。

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,下記の1)-4)が揚げられる。

- 1) 特定病原体等を原因とする1類感染症(クリミア・コンゴ出血熱,痘瘡,南米出血熱,ラッサ熱),2類感染症(結核,中東呼吸器症候群,鳥インフルエンザH7N9)や4類感染症(17疾患)が未整備であり,国立感染症研究所病原体検出マニュアルの整備が課題である(表1,2)。
- 2) 特定病原体等に規定されていないが,毒素(細菌毒素:黄色ブドウ球菌やウエルシュ菌エンテロトキシンや植物毒素:リシン)に関し,アメリカ合衆国CDCはバイオテロの候補物質(Category B)として指定している。これら毒素に関し,所管や検出マニュアルの整備が必要である。
- 3) 地方衛生研究所と国立感染症研究所の相互人事交流はより活発にすることが望まれる。
- 4) テロ発生時の緊急連絡・対応体制の構築は大阪府では構築されているが,多くの自治体は未整備である。近畿地区地衛研においてNBCテロを含む健康危機発生を想定した対応模擬訓練が実施されているが,他地区地衛研では未実施である。テロ発生の事前準備として,緊急連絡・対応体制の構築や対応模擬訓練の実施が望まれる。

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。世界各地でテロ行為が発生している。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事前準備・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。
- 特定病原体等を原因とする 1 類感染症（クリミア・コンゴ出血熱，痘瘡，南米出血熱，ラッサ熱），2 類感染症（結核，中東呼吸器症候群，鳥インフルエンザ H7N9）や 4 類感染症（17 疾患）が未整備であり，国立感染症研究所病原体検出マニュアルの整備が課題である。
- 特定病原体等に規定されていないが，毒素（細菌毒素：黄色ブドウ球菌やウエルシュ菌エンテロトキシンや植物毒素：リシン）に関し，アメリカ合衆国 CDC はバイオテロの候補物質（Category B）として指定している。これら毒素に関し，所管や検出マニュアルの整備が必要である。
- 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。
- テロ発生に際し，迅速で円滑な対応をするため，緊急連絡・対応体制の構築や NBC テロを含む健康危機発生を想定した対応模擬訓練の実施が望まれる。

F. 健康危険情報 特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Onodera, T., A. Hosono, T. Odagiri, M. Tashiro, S. Kaminogawa, Y. Okubo, T. Kurosaki, M. Ato, K. Kobayashi, and Y. Takahashi. 2016. Whole-virion influenza vaccine recalls an early burst of high-affinity memory B cell response through Toll-like receptor signaling. *J. Immunol.* 196: 4172-4184. doi:10.4049/jimmunol.1600046

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*

1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	一種	ウエストナイル熱	3	四種
痘瘡	4	一種	黄熱	3	四種
南米出血熱	4	一種	オムスク出血熱	3	三種
ラッサ熱	4	一種	オウム病	2	四種
			キャサヌル森林病	3	三種
2類感染症	BSL	特定病原体	Q熱	3	三種
結核	3	三種、四種	サル痘	2	三種
鳥インフルエンザ(H7N9)	3	四種	重症熱性血小板減少症候	3	三種
			腎症候性出血熱	3	三種
3類感染症 全て記載およびリンク済			西部ウマ脳炎	3	三種
			ダニ媒介脳炎	3	三種
			東部ウマ脳炎	3	三種
			日本紅斑熱	3	三種
			ベネズエラウマ脳炎	3	三種
			発しんチフス	3	三種
			リフトバレー熱	3	三種
			ロッキー山紅斑熱	3	三種
			5類感染症	全て記載およびリンク済	

*2017年02月14日現在 (<http://www.nih.go.jp/niid/ja/labo-manual.html>)

*特定病原体は感染症法に基づく特定病原体等の管理規制に準拠 (2015年05月21日)

<http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/hyou150521.pdf>

表2. 現行の国立感染症研究所病原体検出マニュアルに関する改善・未整備事項

課 題	改善した事項	未整備事項
● バイオテロ対象病原体について、検出マニュアルの整備	● 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、顕著に改善している。	● 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(17疾患)に関し、記載・リンクが未整備であった。
● 有無・最終改訂年月日のリスト	● 改訂年月日や照会先の記載も重症呼吸器感染症(2類感染症), コレラ(3類感染症)やヘニパウイルス感染症(4類)などで改善した。	● 左記以外の感染症に関しては未記載である。
● 細菌毒素(ボツリヌス毒素や志賀毒素)	● ボツリヌス症や腸管出血性大腸菌感染症が記載し、改善した。	● 志賀毒素単独(細菌性赤痢や腸管出血性大腸菌感染症)については依然未記載であった。

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	未整備事項
<ul style="list-style-type: none"> ● 水痘ウイルスは特定病原体でないが、痘瘡と鑑別診断を要するため、マニュアル整備 	<ul style="list-style-type: none"> ● 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。 	<ul style="list-style-type: none"> ● 2014 年度厚生労働科研特別研究調班において要望したが、痘瘡は未整備である。
<ul style="list-style-type: none"> ● 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 	<ul style="list-style-type: none"> ● 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、地衛研間で情報共有が進展した。 	<ul style="list-style-type: none"> ● 今後、迅速な更新や情報発信・共有などが望まれる。
<ul style="list-style-type: none"> ● 細菌毒素の検査マニュアル 	<ul style="list-style-type: none"> ● ポツリヌス症や腸管出血性大腸菌感染症が記載し、改善した。 	<ul style="list-style-type: none"> ● 志賀毒素単独(細菌性赤痢や腸管出血性大腸菌感染症)については依然未収載
<ul style="list-style-type: none"> ● 地衛研で実施する可能性の高いウエストナイル熱や日本紅斑熱に関する検査マニュアル 		<ul style="list-style-type: none"> ● ウエストナイル熱や日本紅斑熱は依然未収載 ● 日本紅斑熱を含むリケッチア症検査法は感染研で検討中

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
<ul style="list-style-type: none"> ● 的確な技術伝承と人材育成が不十分 	<ul style="list-style-type: none"> ● 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。 ● 感染研と地衛研の双方で協議し、かつ、講師を出す研修体制作りが進行している。
<ul style="list-style-type: none"> ● 地方衛生研究所全国協議会の感染症対策部会の強化 	<ul style="list-style-type: none"> ● 地衛研全国協議会の感染症対策部会を1名増員し、6地区支部全てから部会員を選出した。 ● 衛生微生物技術協議会で部会を開催し、方針を協議した。
<ul style="list-style-type: none"> ● 異なる支部間の連携構築 	<ul style="list-style-type: none"> ● 地衛研全国協議会理事会や総会や地衛研ネットワーク等で支部間の連携・情報共有を推進した。
<ul style="list-style-type: none"> ● 感染研の病原体検出マニュアルの充実・改訂を要望 	<ul style="list-style-type: none"> ● 病原体検出マニュアルの改訂が進展した(表2,3を参照) ● 衛生微生物技術協議会リファレンスセンター会議などで協議し、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
<ul style="list-style-type: none"> ● 地衛研と感染研の検査精度管理や共同研究の推進 	<ul style="list-style-type: none"> ● 厚生労働科学研究（佐多班や皆川班）により、病原体検査の精度管理が向上した。 ● インフルエンザやノロウイルス、野兔病菌、コレラ菌、腸管出血性大腸菌の分子疫学の精度管理が進展した。 ● 感染研外部精度管理事業企画検討委員会に地衛研委員が参画し、協議できている。 ● 感染研職員が研究代表者の場合、多くの厚労科研・AMED 研究班に地衛研職員が参画し、共同研究を推進した。
<ul style="list-style-type: none"> ● 相互の人事交流の活発化 	<ul style="list-style-type: none"> ● 感染研 > 地衛研（神奈川県衛生研究所や大阪府立公衆衛生研究所）に転出が散見された。 ● 個人的に地衛研職員が感染研（疫学センターやウイルス第一部）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。
<ul style="list-style-type: none"> ● 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 	<ul style="list-style-type: none"> ● 検査項目・担当官に依存するが、地衛研から感染研に依頼した行政検査（公文書発行前の連絡を含め）で迅速化が図られている。

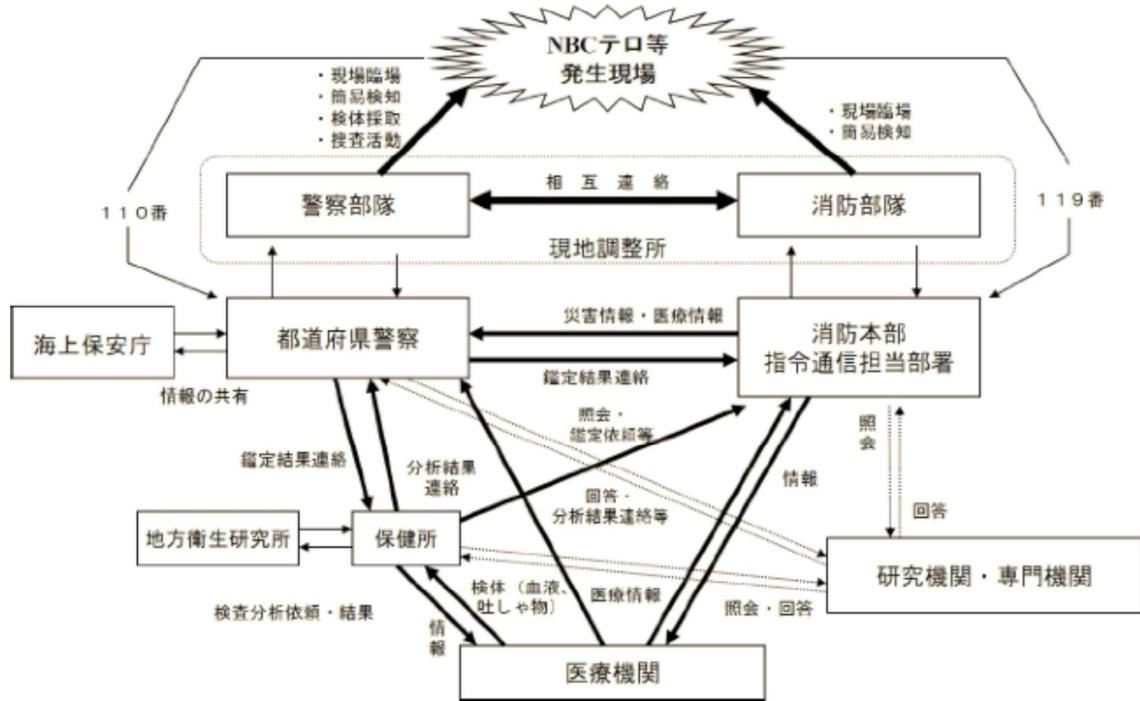


図1 . NBC テロその他大量殺戮型テロ対処現地関係機関連携モデル (内閣府)

大阪府におけるNBCテロ等発生時の緊急連絡体制等

NBCテロ等発生時における救助・救急搬送、救急医療における連携

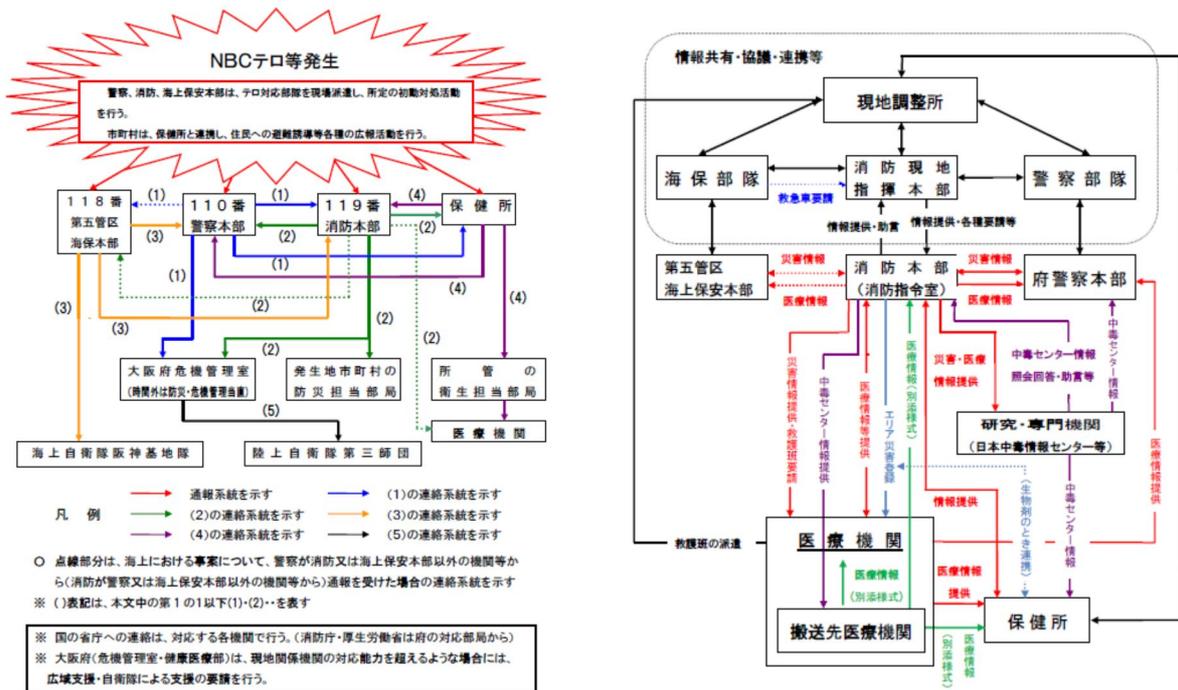


図2 . 大阪府におけるNBCテロ等対応 (大阪府緊急テロ対策合同連絡会議幹事会, 2016年04月)

<http://www.pref.osaka.lg.jp/kikikanri/nbcterotaisyo/index.html>

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

分担報告書

細菌性危険病原体の蔓延防止に関わる新規検出法や予防法の開発

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．

研究協力者

江崎孝行・国立大学法人岐阜大学・教授
川本恵子・国立大学法人帯広畜産大学・教授
山崎栄樹・国立大学法人帯広畜産大学・助教
奥村香世・国立大学法人帯広畜産大学・助教

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,野兎病,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,野兎病,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,野兎病,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.

平成27年度に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,野兎病菌,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.本年度はこの野外仕様の検出系の精度検定を炭疽の流行地であるモンゴルで実施した.

一方,細菌毒素では,CDCにおいて生物兵器に使われる可能性の高い蛋白毒素として挙げられているボツリヌス毒素(Btx)(カテゴリーA),黄色ブドウ球菌のエンテロトキシンB(SEB)(カテゴリーB,コレラ菌のコレラ毒素(CT)(カテゴリーB: Water safety threats),腸管毒素原性大腸菌のLT毒素,腸炎ピブリオのTDH毒素とTRH毒素,およびウェルシュ菌エンテロトキシン(CPE)(カテゴリーB: Food safety threats)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とTRH,およびCPEを精製してそれぞれに対する家兎あるいはモルモット抗血清を作製した.

B. 研究方法

1. 炭疽菌検出用のDNAクロマトの野外試験

野外仕様型のQuick Mobileは1.7 kgの軽量型の遺伝子増幅装置,で25分でtarget遺伝子を増幅する.増幅後,10 μ lのStreptavidin標識 latex とDNA-Stickを加えてクロマトを行い増幅産物を目視で判定する(図1).このQuick Mobileを用いてモンゴル国立感染症研究所の野外分離株並びに汚染土壌対して検査を実施した(図2,図3).

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

1) 抗TRHモルモット血清作製の再試行

昨年度,モルモットに免疫して得られた抗TRH血清は,TRHに対して十分な抗体価の上昇が認められなかった.したがって,再度TRHを前回と同様の方法で精製し,得られた精製タンパク質を,モルモット(オス,9週齢)1匹に免疫し抗血清の作製を試みた(図4).なお,免疫スケジュールや抗原の投与量,抗体の評価法は従前のとおり実施した.

2) 抗BoNT/A_{Hc}モルモット血清の作製

昨年度,精製BoNT/A_{Hc}をモルモットに免疫し,抗BoNT/A_{Hc}血清を得たが,モルモットの生育が伴っておらず,期待される量の半分程度の血清しか得られなかったため,再度モルモットを免疫し,抗血清の作製を試みた.免疫スケジュールや抗原の投与量,抗体の評価法は従前のとおり実施した(図5).

3) 抗ウェルシュ菌毒素(CPE)抗体の作製

CPE(C末端領域部分配列)がHis-tag融合蛋白質として高発現する組換え大腸菌株は,大阪大学微生物病研究所の堀口安彦教授より分与を受けた.組換えCPE蛋白質は,大腸菌の細胞破碎上清に対して硫酸アンモニウム(80%飽和)を加え沈殿化して得られた蛋白質画分をPBSに再懸濁後,Ni-NTA Agarose(Qiagen)充填カラムを用いて精製した.得られた精製組換えCPE(C末端領域部分配列)蛋白質は,以下の条件(初回免

疫 100 µg/rabbit(アジュバント有り) , 2 回目免疫 (初回免疫から 3 週後) 100 µg/rabbit(アジュバント有り) , 以降 1 週間毎に追加免疫 50 µg/rabbit(アジュバント無し) で家兎 2 羽に免疫し, 得られた血清から, 精製組換え CPE 蛋白質結合カラムを用いて特異的 IgG を得た .

C. 研究結果

1. 炭疽菌検出用の DNA クロマトの野外試験

モンゴル国立感染症研究所に保存されている炭疽菌野外分離株に対して Quick Mobile の検出精度を検討したところ, 3 株の野生株全てが陽性を示し, 陰性対象のセレウス菌は陰性を示したことから Quick Mobile の検出精度は問題ないことが分かった(図 2). 2013 年 5 月に炭疽で死亡した牛により汚染された土壌に対して同様に Quick Mobile を用いた検査をしたが陰性であった(図 3).

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

1) 抗 TRH モルモット血清作製の再試行

TF-TRH を精製し, 得られた精製 TRH 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-TRH を免疫したモルモットから得られた血清は, TRH に対して十分な抗体価の上昇が認められた(図 4).

2) 抗 BoNT/A_Hc モルモット血清の作製

前回と同様の方法に従って, 精製 BoNT/A_Hc 蛋白質をモルモットに免疫し血清を回収した . 抗体価の評価をオクタロニー法によって実施したところ, 得られた抗血清は十分な抗体価の上昇が認められた(図 5).

3) 抗ウェルシュ菌毒素(CPE)抗体の作製

免疫抗原として用いた組換え精製 CPE の純度検定の結果を図 6 に示す . 獲得した組換え CPE 蛋白質を家兎に免疫することで, 抗 CPE 抗血清を得た後, 組換え CPE 蛋白質結合カラムを用いて CPE 特異的 IgG を獲得した .

得られた組換え CPE 特異的 IgG とウェルシュ菌由来毒素(野生型毒素)との反応性を検証するために, CPE 産生ウェルシュ菌株の菌体破碎上清に対して CPE 特異的 IgG を一次抗体として用いたウエスタンブロッティングを行った . その結果, 野生型毒素でも良好な反応が確認された(図 7).

D. 考察

1. 炭疽菌検出用の DNA クロマトの野外試験

構築した Quick Mobile の炭疽菌検出精度はモンゴル分離株を用いたスパイク実験で証明できたが, 2013 年 5 月に炭疽で死亡した牛により汚染された土壌からの検出はできなかった . 今後はモンゴル各地から汚染土壌を集めて更にサーベイランスを行って本法の有用性の検討を行う .

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

1) 抗 TRH モルモット血清作製の再試行

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 TRH 血清が得られた . 前年度までに得られた抗 TDH 血清と今回得られた抗 TRH 血清を用いて, 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 .

2) 抗 BoNT/A_Hc モルモット血清の作製

今回実施した免疫スケジュールにおいて, IC の作製に必要なレベルの抗体価を示す抗 BoNT/A_Hc 血清が得られた . 前年度に回収したものと合わせることによって, IC のプロトタイプ作製や予備実験に必要とされる十分量の血清が確保できた . 従って, BoNT/A_Hc に特異的な免疫学的検査法の構築を目指す .

3) 抗ウェルシュ菌毒素(CPE)抗体の作製

本年度の試行で特異性の抗 CPE 抗体の獲得に至っている . 今後, 本抗体を用いた迅速免疫学的検出法(イムノクロマト法, ELISA 法)の構築を目指す . 各検出法構築については過去に行った腸管出血性大腸菌の志賀毒素(カテゴリー B : Food safety threats)に対する検出法構築の際のシステムが利用可能である .

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る .
2. 検出系に使用できる程度の抗体価を示す抗 TRH 血清が得られた .
3. 検出系に使用できる程度の抗体価を示す抗 BoNT/A_Hc 血清が得られた .
4. 検出系に使用可能な高感度の抗 CPE 血清が得られた .

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Aryantini NP, Yamasaki E, Kurazono H, Sujaya IN, Urashima T, Fukuda K. In vitro safety assessments and antimicrobial activities of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from a fermented mare's milk. *Anim Sci J. in press*
- 2) Nakano M, Yahiro K, Yamasaki E, Kurazono H, Akada J, Yamaoka Y, Niidome T, Hatakeyama M, Suzuki H, Yamamoto T, Moss J, Isomoto H, Hirayama T. *Helicobacter pylori* VacA, acting through receptor protein tyrosine phosphatase, is crucial for CagA phosphorylation in human duodenum carcinoma cell line AZ-521. *Dis Model Mech.* 19 (12): 1473-1481, 2016
- 3) Watanabe S, Matsumura K, Iwai H, Funatogawa K, Haishima Y, Fukui C, Okumura K, Kato-Miyazawa M, Hashimoto M, Teramoto K, Kirikae F, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T. A Mutation in the 16S rRNA Decoding Region Attenuates the Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity* 84:2264-2273 (2016)

2. 学会発表

- 1) 山崎栄樹, 綿引正則, 磯部順子, 佐多徹太郎, 倉園久生. 腸管出血性大腸菌による国内集団食中毒事件患者の糞便中志賀毒素の定量的解析. 第 37 回日本食品微生物学会

学術総会, 東京都 (2016.9)

- 2) 山崎栄樹, 綿引正則, 磯部順子, 佐多徹太郎, 倉園久生. 国内 EHEC 集団食中毒事件患者の糞便中志賀毒素の定量的解析. 第 20 回 EHEC 感染症研究会, 富山県 (2016.11)
- 3) E. Yamasaki, M. Watahiki, J. Isobe, T. Sata, H. Kurazono. Quantitative detection of Shiga toxins directly from stool specimens of patients associated with an outbreak of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Japan. 51st US-Japan Joint Panel Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections, ソウル (韓国) (2017.2)
- 4) 山崎栄樹, 奥村香世, 江崎孝行, 倉園久生. 生物テロに用いられる細菌・毒素の検出法. 第 90 回日本細菌学会総会, 仙台 (2017.3)

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
出願
発明者: 山崎栄樹, 倉園久生
出願番号: 特願 2016-121670
発明の名称: サルモネラ属菌の血清型判別用プローブ及びプライマー並びにその使用



図 1 野外仕様型の Quick Mobile

電源に AC アダプター，車載タバコ用電源，リチウム電源の 3 つを選択できる，1.7 kg の軽量型遺伝子増幅装置．乾燥 Primer が入れてある 4 つの Low profile PCR tube に試料 5 μ l，2x の酵素液 5 μ l を加え，全量 10 μ l の反応液で 25 分かけて遺伝子を増幅する．増幅条件はカードに登録済みで，現場ではワンタッチで反応が自動スタートする．増幅後，10 μ l の Streptavidin 標識 latex と DNA-Stick を加えてクロマトを行い，増幅産物を目視で判定する．

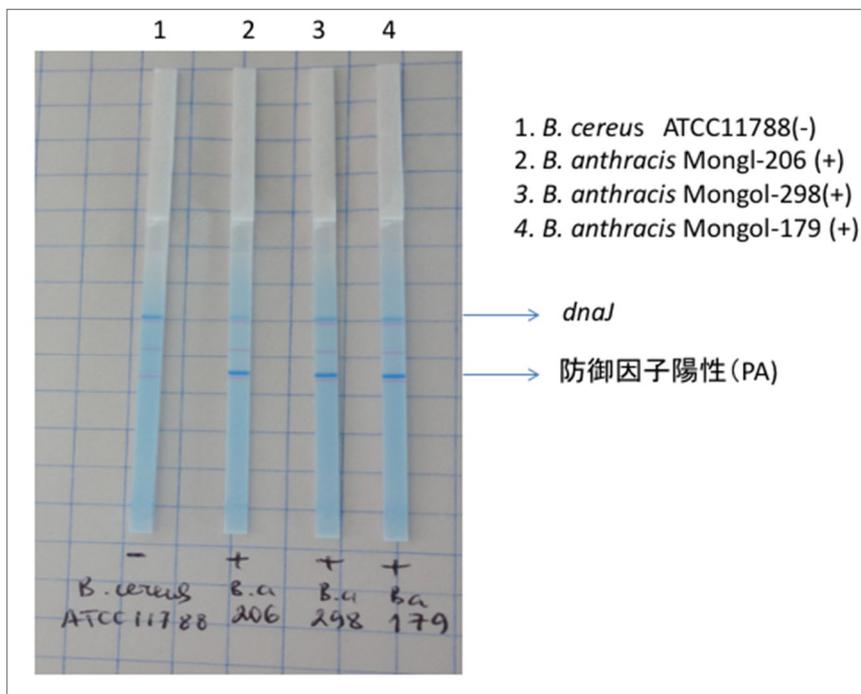


図 2 モンゴル国立感染症研究所保有炭疽菌株を使った DNA クロマトの結果
炭疽菌野外株 (2,3,4) は陽性で，陰性対象のセレウス菌 (1) は陰性を示した．



図 3 2013 年 5 月に炭疽で死亡した牛により汚染された土壌
この土壌サンプルに対して構築した DNA クロマトを実施したが、全て陰性であった。

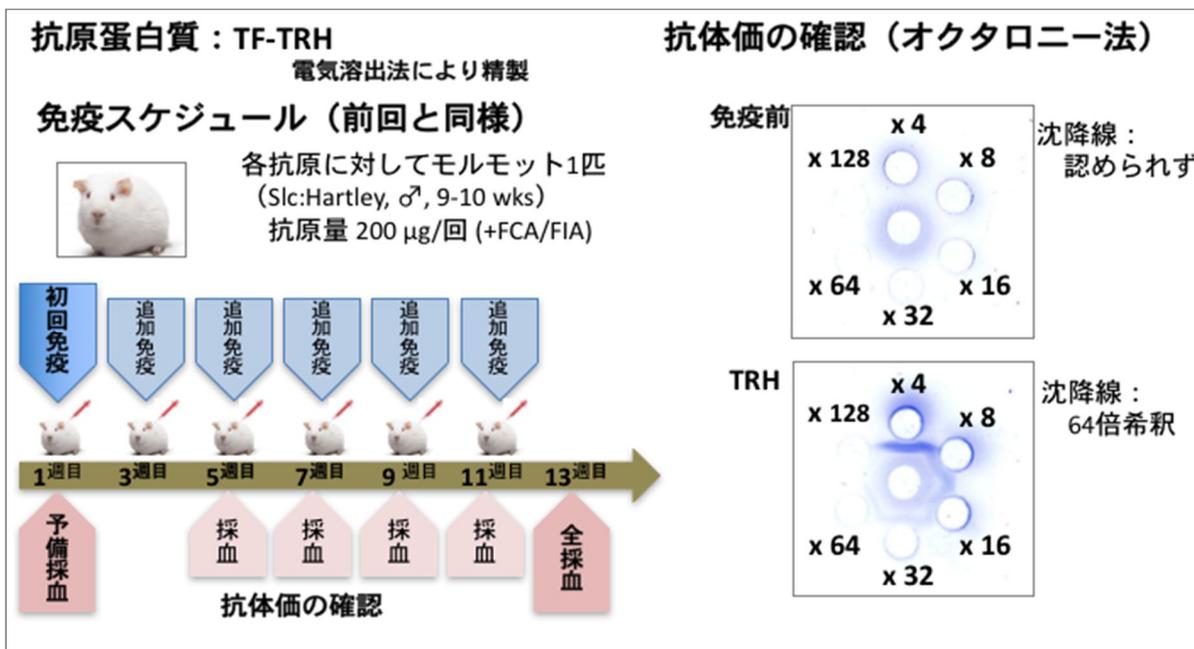


図 4 抗 TRH モルモット血清作製の再試行
前回と同様の方法にて抗 TRH 血清を得た後、抗体価の評価をオクタロニー法によって行った。その結果、64 倍希釈の血清においても沈降線が認められた。

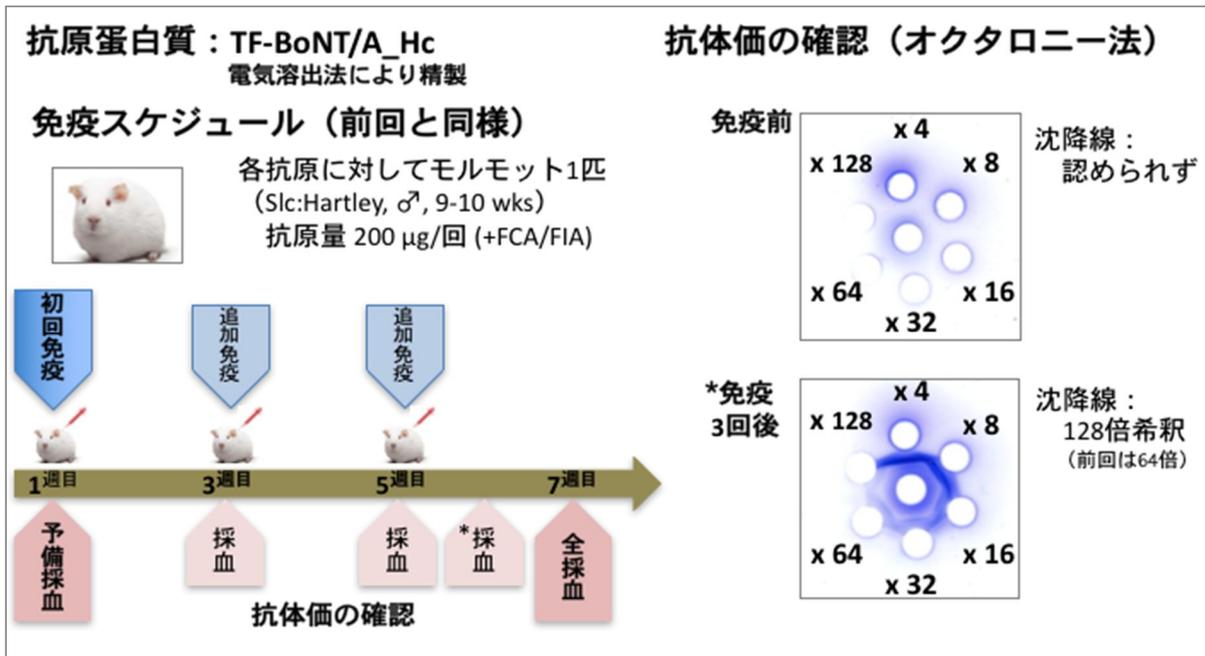


図5 抗 BoNT/A_Hc モルモット血清作製の作製
前回と同様の方法にて抗 BoNT/A_Hc 血清を得た後，抗体価の評価をオクタロニー法によって行った．その結果，128 倍希釈の血清においても沈降線が認められた．

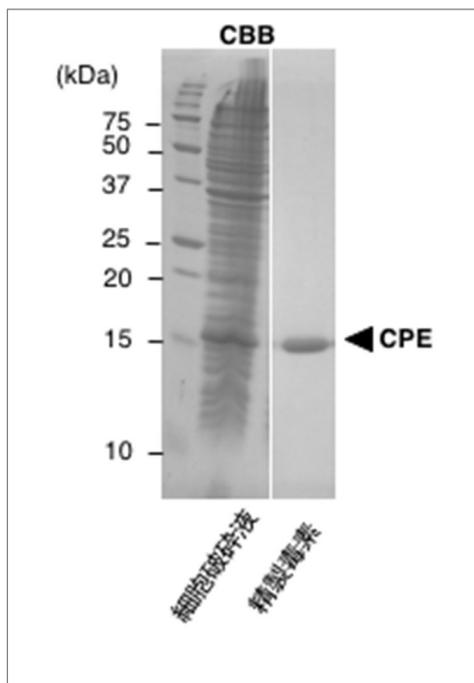


図6 組換え CPE 蛋白質の精製度の確認
組換え大腸菌の細胞破砕液（精製前）および精製標品を SDS-PAGE で展開後，CBB 染色を行った．

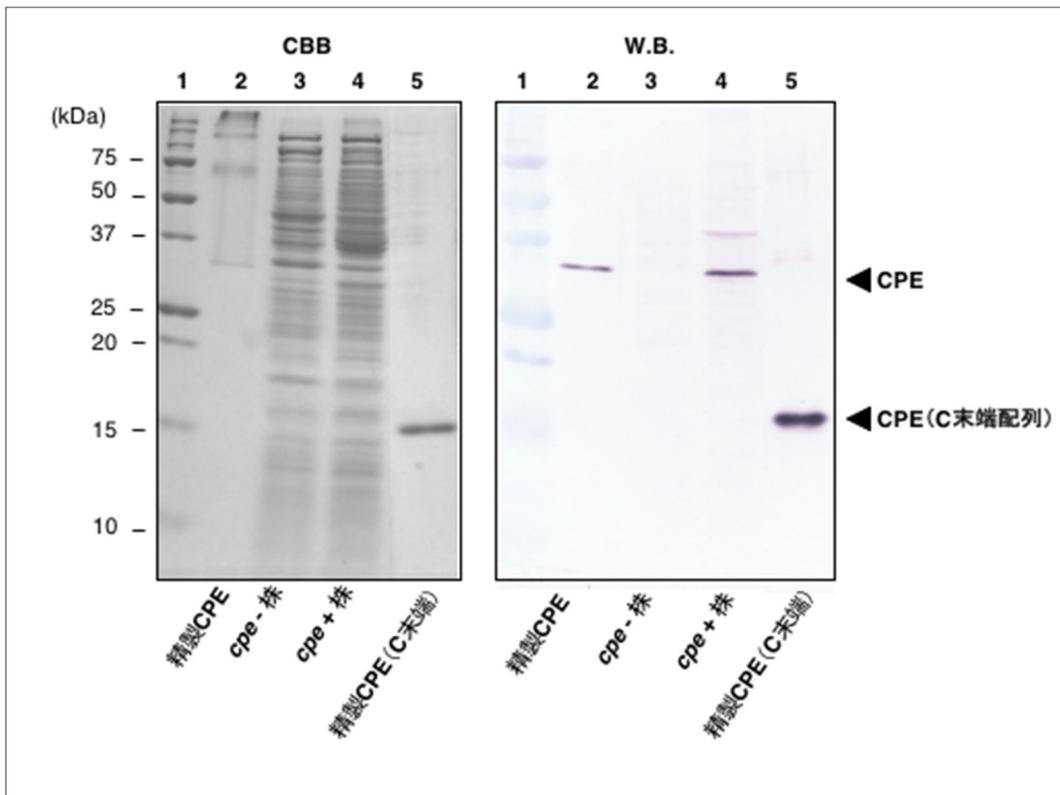


図 7 CPE 特異的 IgG の野生型毒素との反応性解析

CPE 特異的 IgG を一次抗体として用い、ウエスタンブロットティングを行った。レーン 1:分子量マーカー，レーン 2:精製 CPE 蛋白質（バイオアカデミア社より購入），レーン 3:*cpe*-ウェルシュ菌分離株の菌体破碎上清，レーン 4:*cpe*+ウェルシュ菌分離株の菌体破碎上清，レーン 5:免疫抗原として用いた精製組換え CPE（C 末端部分配列）。左に CBB 染色，右にウエスタンブロットティング（W.B.）の結果を示す。

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

分担報告書

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：インターネット上で最新の生物テロ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』は、これまでパスワードを知る感染症専門医等のみが閲覧可能であったが、今年度から一般公開を行った。医療従事者のみならず広く閲覧できるようになったため、今後はより分かりやすい情報提供を行えるようさらなる充実を図りたい。さらに今年度は、実際のバイオテロ遭遇現場で医療従事者が簡便に参照できる資料の必要性を考慮し、「バイオテロを疑う時シート」を作成した。研究分担者である東京医科大学微生物学分野 松本哲哉教授の共に、豊富に写真や図表を掲載するなど一覧性・視認性に優れた対応シートを作成し、平成 28 年 3 月に全国の病院（約 990 施設）へ配布した。

研究協力者

松本哲哉・東京医科大学微生物学講座・教授
菊地 正・東京大学医科学研究所・助教

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、実際のバイオテロ遭遇現場において活用できる資料の必要性を検討し、どのような形態が適切かを検討する。

A. 研究目的

バイオテロはいつどのような状況で発生するか予測は困難である上に、用いられる可能性のある病原微生物は多彩である。その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、バイオ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、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、専門家の意見を取り入れ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たホームページを公開し、啓発を行うと共に、実際の診療現場で支援策の充実をこれらの研究を通じて今後のバイオテロ対策に必要な施策を洗い出し、新たな支援方法を開発することを目的とする。

【倫理面への配慮】

公表された情報のみを研究材料とするため、倫理面への特別な配慮は必要ない。

C. 研究結果

バイオテロ対応ホームページに関しては、これまでパスワードを知る感染症専門医等のみが閲覧可能であったが、今年度から一般公開を行った。改訂の必要性につき国内外の学会や主要雑誌の情報を参照したところ、バイオテロに関する新たな情報や重大な知見は少なく、また国際的に大きなバイオテロ発生事例は報告されていないので、現状の HP 内容を一般公開した。しかしやや専門的な内容が含まれているため、分かりやすい記載に関しては今後の検討課題と考えられる。有効活用してもらうために様々な機会を通じて HP の存在を広く周知することもバイオテロ対策の啓発へもつながると考えている。

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

また、バイオテロ診断支援の一環として、実際のテロ遭遇現場において活用できる資料の必要性を検討した。バイオテロ遭遇現場では著しい混乱や緊張状態にあると予想され、簡便で

携帯性にも優れた参考資料の存在が有用であると判断した。研究分担者である東京医科大学微生物学分野 松本哲哉教授と共に、豊富に写真や図表を掲載するなど一覧性・視認性に優れた対応シートを作成した（下図）。A4版4ページ、A5版8ページを作成し、1施設当たり各版2部ずつ合計4部を全国の病院（約990施設）に配布した。

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、最新の情報や感染症専門家からの知見を加えながら改訂を行ってきた。昨年度までの活動でこの目的はある程度達成されたため、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、今年度から一般公開を行った。しかしながらサイバー攻撃への対応、有事の際のアクセス集中時にサーバーが耐えられるかなどの懸念は残り、今後セキュリティ対策の専門家と十分に検討していく必要がある。さらに医療従事者以外が閲覧する場合、専門的内容のままでは十分な理解ができず、場合によっては誤解を生じうる可能性もあるため記載内容を十分に検討する必要がある。

また、今年度は現場で簡便に情報を得られるよう視認性に優れた「バイオテロを疑う時シート」を作成した。全国の約990施設に配布し、

広く活用してもらうことを期待している。このシートの活用度や評価については来年度以降の課題である。

E. 結論

国際的なテロリズムの拡大が懸念され、2020年には東京オリンピックが開催されるなどバイオテロ対策の重要性は今後も増大していくことが予想される。バイオテロに使用され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。今年度は「バイオテロを疑う時シート」を全国の病院に配布したが、このような活動を通じてバイオテロに対する啓発を持続させていくことも不可欠である。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

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

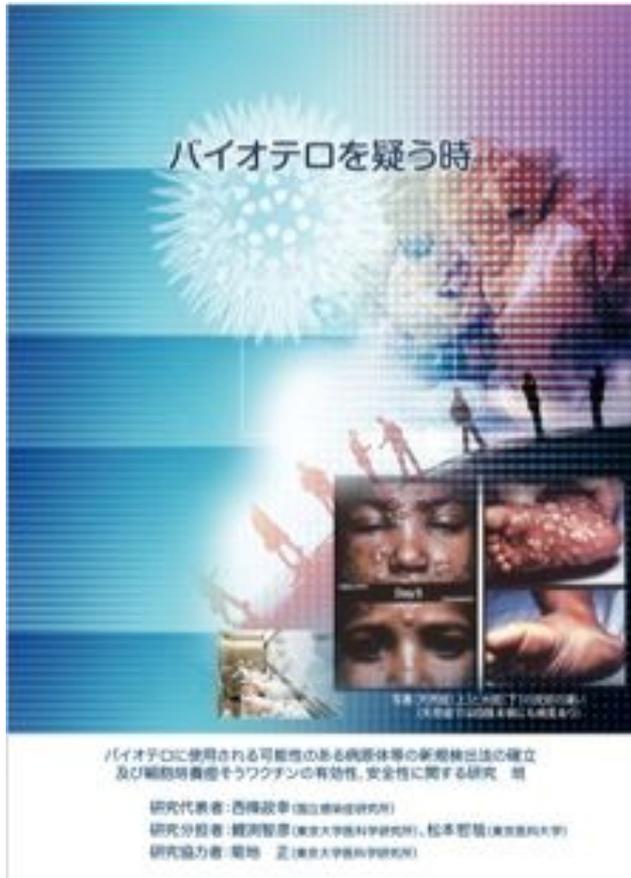


図1 バイオテロを疑う時シートの表紙

1 バイオテロについて

- 意図的に病原体や毒素を散布または混入することにより、社会に混乱を生じさせる。
- ターゲットは、不特定多数・特定の人物・政府要人など様々。似たような症状を呈する複数の患者が発生するなど、「何かおかしな」状況が見られたら人為的な原因の可能性を考慮する。

過去の事例	方法	病原体
1984年 米国	水道や飲食物の汚染	サルモネラ菌
1993年 日本	汚染地でのエアロゾル散布	炭疽菌
1995年 日本(オウム)	地下鉄内での散布	ボツリヌス毒素
2001年 米国	郵便物の送付(信封、箱)	炭疽菌

■ 症状とバイオテロ関連疾患

症状	症状	バイオテロ関連疾患
皮膚・結核 出血症状	発疹、潰瘍や出血症状(膿疱、鼻出血、消化管出血など)	天然痘、痘苗痘、ペスト、ウイルス性出血熱、野兔熱、腎臓炎性出血熱、T-ボツリヌス毒素など
呼吸器症状	熱、咳、喉痛、呼吸困難など	肺炎菌、炭疽ペスト、野兔熱、天然痘、オウム病、コウリンマイアズス症、リシンの毒、ウイルス性肺炎、黄色ブドウ球菌エンテロトキシンの毒など
神経症状	下痢、嘔吐、昏倒など	赤痢、サルモネラ菌、コレラ、腸チフス、肉毒性大腸菌(1157など)、クレブシエリ菌、黄色ブドウ球菌エンテロトキシンの毒など
神経症状	意識障害、痙攣、虚脱、数回繰り返すなど	ボツリヌス症、ペストエラジカ、コリウウイルス感染症など
非特異的 症状	発熱、頭痛、倦怠感、リンパ節腫大など、上記以外の症状にも分類し、悪い兆候	天然痘およびウイルス性出血熱の初期、炭疽ペスト、腸チフス、フルセラ菌など

図2 バイオテロを疑う時シートの内容の一部

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

分担報告書

各医療機関のバイオテロ対策を支援するための方策

所 属 東京医科大学微生物学分野 教授
研究分担者 松本哲哉

研究要旨：国際情勢の最近の変化によって、テロの脅威はさらに深刻化してきている。2020 年には日本でもオリンピックが予定されており、さらにテロのリスクが高まるため、対策の充実は不可欠である。医療機関は NBC テロの中でもバイオテロ対策への対応が重視されるが、現時点では準備が十分になされたとは言えない。その背景には医療機関向けのバイオテロ対策に関連する情報が限られているのも一因と考えられる。そこで今年度、本研究では国内の医療機関向けにバイオテロを疑う時シートを作成することを主な目的としている。本研究班の分担研究員である鯉淵智彦講師（東京大学医科学研究所）らとともに検討し、内容を分担してバイオテロを疑う時シートを作成した。

研究協力者
鯉淵智彦・東京大学医科学研究所附属病院感染免疫内科・講師
菊地正・東京大学医科学研究所附属病院感染免疫内科・助教

テロの被害を受けた患者に対する扱いについては、倫理面での配慮を行いながら執筆を行った。

A. 研究目的

近年、世界の政情が不安定となりテロのリスクが高まっている。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バイオテロを疑う時シートを作成することを目的にしている。

B. 研究方法

現在の医療機関が置かれた状況を考慮して、より実践的で効率的な内容にすることを目標に、バイオテロを疑う時シートを作成し、治療と感染対策に関する部分を分担して執筆した。

【倫理面への配慮】

バイオテロを疑う時シートに患者等の個人情報扱う内容は含まれていない。また、バイオ

C. 研究結果

本研究班の分担研究者でもある鯉淵智彦先生（東京大学医科学研究所）らと協力して、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、バイオテロを疑う時シートの治療と感染対策に関する案を作成した。

バイオテロを疑う時シートの項目は、バイオテロについて、バイオテロに対する感染対策、代表的なバイオテロ疾患、代表的なバイオテロ関連疾患の治療、各種ホームページ・問い合わせ、となっており、主要な疾患を取り上げながら図表を提示し、一目で項目ごとに全体像が把握できるよう工夫した。

なお、バイオテロを疑う時シートの印刷物は全国の病院（約 990 施設）に郵送・配布した。

D. 考察

バイオテロを疑う時シートは全国の病院、約 990 施設に配布しており、非常時に活用してもらおうと同時に、バイオテロ対策の啓発にも有用と考えている。ただし実際に配布できた医療機関は全病院の 1 割を超える程度と推定されるため、今後は印刷物に加えて、PDF としてダウンロード可能にできないか検討する必要がある

と思われる。

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。しかも，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。そこで，必要最小限かつ有効な対処法を提示できるよう，今回作成したバイオテロを疑う時シートを活用していただく必要があると思われる。

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バイオテロを疑う時シートを作成した。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。

F. 健康危険情報 特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Fujikura Y, Yuki A, Hamamoto T, Ichimura S, Kawana A, Ohkusu K, Matsumoto T. Evaluation and validity of a polymerase chain reaction-based open reading frame typing method to dissect the molecular epidemiology for *Acinetobacter baumannii* in an epidemiologic study of a hospital

outbreak. Am J Infect Control. 2016 Nov 1;44(11):e275-e278.

2) Yonetani S, Ohnishi H, Ohkusu K, Matsumoto T, Watanabe T. Direct identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF MS using an in-house saponin method. Int J Infect Dis. 2016 52:37-42.

3) Miyazaki H, Shibuya R, Midorikawa N, Chang B, Ohnishi M, Matsumoto T. Serotype distribution and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in Japan after introduction of the routine immunization program. J Infect Chemother. 2017 Feb 1. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

1) I. Nakamura, T. Matsumoto, Improving Hand Hygiene Behavior by Scenario Based Simulation, ASM Microbe 2016 (Boston) June 16-20, 2016

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

分担報告書

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：
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：私たちは、これまでの研究の中で、LC16m8 が既存の種痘免疫に対してブーストをかけること、一方、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。本研究は LC16m8 株の安全性・有効性を明らかにすることを目的とする。ヒトにおける長期免疫、マウスにおける強毒株接種時の防御、第 1 世代ワクチンとの比較、繰り返し接種の効果、長期の効果等の解析を行った。LC16m8 株はマウスおよびヒトにおいて、第 1 世代ワクチンと同様に、既知の中和抗体を含む多様な抗体を誘導した。LC16m8 株は安全性・有効性を兼ね備えたワクチン株であり、その特性に関する分子基盤について一層の研究が必要である。

研究協力者

藤田真敬・防衛医科大学校 防衛医学研究センター
異常環境衛生研究部門・教授

江藤亜紀子・国立保健医療科学院健康危機管理研究部・上席主任研究官

に参加し、これまでの研究の知見の社会実装に向けた提案を行った。

【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)。

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。我々は、これまでの研究の中で、LC16m8 が既存の種痘免疫に対してブーストをかけること、一方、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。本研究は LC16m8 株の安全性・有効性を明らかにすることを目的とする。

C. 研究結果

ヒトにおける長期免疫、マウスにおける強毒株接種時の防御、第 1 世代ワクチンとの比較、繰り返し接種の効果、長期の効果等の解析を行った。LC16m8 株はマウスおよびヒトにおいて、第 1 世代ワクチンと同様に多様な抗体を誘導した。I1, D13, D8 などに対する抗体誘導が認められた。これらの抗体には、既知の中和抗体も含まれており、中和抗体価との相関を示した。マウスにおいてワクチン接種後に WR 株を暴露した際、マウスは防御されるが、この時、複数の抗体の産生増強が認められた。

B. 研究方法

LC16m8 株のヒトおよびマウスへの接種は既報のとおりである (Saito 2009, Nishiyama 2015, Yokote 2015)。ワクシニアウイルスの抗原を網羅的に搭載したプロテインアレイ測定は Antigen Discovery 社 (米国) で行われた。マウスおよびヒトの血清における抗体産生を解析した。さらに B5 タンパク質の変異が抗原性に与える影響について検討した。

伊勢志摩サミットを踏まえた世界的なパンデミック対応に向けた G20 主催のシナリオ検討専門家会合に参加し、パンデミックの発生の迅速な把握に向けた検体情報の収集と情報の共有化に向けた制度及び情報基盤の構築の必要性について提案を行った。

パンデミック対応に向けた G20 主催のシナリオ検討専門家会合 (ドイツ, ベルリン, 2016)

D. 考察

LC16m8 株は安全性・有効性を兼ね備えたワクチ

ン株と考えられた。

E. 結論

LC16m8 株は安全性・有効性を兼ね備えたワクチン株であり、その特性に関する分子基盤について一層の研究が必要である。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表

- 1) 江藤亜紀子, 上村千草, 金原知美, 齋藤智也, 横手公幸, 金谷泰宏 . 天然痘ワクチン LC16m8 による感染防御成立時の抗体産生の網羅的解析 . 第 20 回ワクチン学会学術集会 ; 2016 年 10 月 ; 東京都

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

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

分担報告書

痘そうワクチン LC16m8 接種者におけるサル痘ウイルス中和抗体に関する調査研究

所 属 一般財団法人 化学及血清療法研究所 所長秘書室
研究分担者 横手公幸

研究要旨：本邦の国際貢献海外派遣先であるアフリカ，中東の地域では，サル痘ウイルス感染症流行が多数報告されており，近年の調査においてヒトヒト感染が 5 代まで確認され，天然痘ワクチン未接種世代の若い世代に発症者多いこと明らかとなった．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サル痘ウイルスに対する中和抗体について再調査した結果，痘そうワクチン LC16m8 のサル痘ウイルスに対する中和抗体免疫誘導能が確認された．

研究協力者

橋爪壯・千葉大学名誉教授

新村靖彦・一般財団法人化学及血清療法研究所

上村千草・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

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ンスの成人対象者（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．

また，本邦の国際貢献では，PKO の積極的平和貢献活動が行われ，自衛隊及び医療関係者等の関係者のアフリカ，中東への派遣が急増している．

これらの地域では，WHO の勧告も指摘しているように，サル痘ウイルス感染症流行が多数報告されている．（図 1）サル痘ウイルスの感染は，かつてはヒトヒト感染（伝搬）が，1-2 代と少なくまたその病原性は致死率 1 % 以下と低いものとされてきた．しかしながら，近年のアフリカでの WHO 及び CDC の調査チームによる報告によると，ヒトヒト感染は，5 代（7 代まで確認されたとのことの情報あり）まで確認されたこと，天然痘ワクチン未接種世代の若い世代に多いこと明らかとされている（図 2，3）．

以上の背景より，痘そうワクチン LC16m8 を 1 回接種された成人対象者に対するサル痘ウイルス中和抗体測定調査が必要と考え，本研究を開始した．

B. 研究方法

本調査研究では，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血清（LC16m8 接種者 26 名，Dryvax 接種者 24 名）を用いて実施したサル痘ウイルス中和抗体測定結果

について、痘そうワクチン LC16m8 接種 30 日後の Anti-MonkeyPox PRNT₅₀ (Congo-8) のデータを再解析し、Anti-MonkeyPox PRNT₅₀ が 10 倍希釈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、本邦の LC16m8 接種者 19 名 (初回接種者 12 名, 再接種者 7 名) について、接種前、接種 1 か月後・4 か月後・7 か月後、接種 3~4 年後に採取された血清サンプルを用いてサル痘ウイルス中和抗体測定を計画した。なお、この測定は Southern Research (431 Aviation Way, Frederick, MD, USA) へ委託し実施し、血清中の MonkeyPox (Zaire-79) に対する中和抗体価を 50% プラーク減少法により測定する。

【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-MonkeyPox PRNT₅₀) を調査するために、化血研が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 年に米国で実施し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成績 (LC16m8 接種者 26 名, Dryvax 接種者 24 名) を再解析した。希釈率 10 倍以上の中和抗体陽性率は接種 30 日後に LC16m8 群では 97% (25/26), Dryvax 群では 100% (24/24) と同様であった。また GMT は、それぞれ 112, 352 となり、Anti-Dryvax PRNT₅₀ と同様に高さの違いがみられた (表 1)。

更に、本邦の海外派遣者における LC16m8 接種者 19 名 (初回接種者 12 名, 再接種者 7 名) の Anti-MonkeyPox PRNT₅₀ の測定を行っており、現在測定中である。

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。また、更なる検証の為、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た。また、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結果、これらの認識抗原群は 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。

これらワクチン株と同類のワクチニア株である Lister 株に対する中和抗体 (Anti-Lister PRNT) 測定によるワクチンの免疫原性の評価結果が、人に感染性及び病原性を有する他のポックスウイルス、例えば天然痘やサル痘等への免疫原性が相関するかなどは、ワクチンの有効性評価において重要な研究課題である。

特にサル痘ウイルスに関しては、米国での愛玩動物のリスザルからの Outbreak 報告や、アフリカ・中東での多数の Outbreak 及び死亡例の報告など感染拡大と WHO 調査チームによる調査が進むにつれて、その実態が重大であることが明らかとなっている。

一方、1980 年天然痘撲滅に際し、全世界での痘そうワクチン接種が中止され、本邦においても 1976 年に痘そうワクチン定期接種が中止され、40 歳以下の世代では痘そうワクチン接種歴がなく、また既接種者においても本研究での研究成果でも明らかのように、抗体陰性化している人の割合が高いことが推察された。

本研究においては、本邦の国家備蓄ワクチンである痘そうワクチン LC16m8 のサル痘ウイルスに対する中和抗体誘導能の評価とその持続を検討することである。

米国で実施し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の成績を再解析した結果、LC16m8 は米国承認備蓄ワクチン Dryvax と同様の抗体陽転率を示したことから、同様の中和抗体免疫誘導を有すると考えられた。一方、中和抗体価（GMT）は、Dryvax に比べて低い値であったが、これは中和抗体法（50% プラーク減少法）の Plaquing Virus Strain の種類によって変化することが知られており、その傾向を示したものと考えられた。

また痘そうワクチン LC16m8 のサル痘ウイルスに対する免疫の持続に関しては、現在測定中である。その結果によっては、このサル痘ウイルスに対する中和抗体価及び抗体陽性率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。

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サル痘ウイルスに対する中和抗体について

再調査した結果、痘そうワクチン LC16m8 のサル痘ウイルスに対する中和抗体免疫誘導能が確認された。

痘そうワクチン LC16m8 のサル痘ウイルスに対する免疫の持続に関しては、現在測定中で、更なる研究が必要であると考えられた。

F. 健康危険情報 特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 江藤亜紀子，上村千草，金原知美，齋藤智也，横手公幸，金谷泰宏．天然痘ワクチン LC16m8 による感染防御成立時の抗体産生の網羅的解析．第 20 回日本ワクチン学会学術集会 東京（2016．10）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

・ 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻	ページ	出版
Taniguchi S, Maeda K, Horimoto T, Masangkay JS, Puentespina Jr . R, Alvarez J, Eres E, Cosico E Nagata N, Egawa K, Singh H, Fukuma A, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Tsuchiaka S, Omatsu T, Mizutani T, Une Y, Yoshikawa Y, Shimojima M, Saijo M, Kyuwa S .	First isolation and characterization of Pteropine orthoreoviruses in fruit bats in the Philippines .	Archives of Virology	(in press)		
Iizuka I, Ami Y, Suzuki Y, Nagata N, Fukushi S, Ogata M, Morikawa S, Hasegawa H, Mizuguchi M, Kurane I, Saijo M	A Single vaccination of nonhuman primates with highly attenuated smallpox vaccine, LC16m8, provides long-term protection against monkeypox .	Japanese Journal of Infectious Diseases	(in press)		
Taniguchi S, Fukuma A, Tani H, Fukushi S, Saijo M, Shimojima M .	A neutralization assay with a severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strain that makes plaques in inoculated cells .	Journal of Virological Methods	244	4-10	2017
Yoo JR, Heo ST, Park D, Kim H, Fukuma A, Fukushi S, Shimojima M, Lee KH .	Family Cluster Analysis of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Infection in Korea .	American Journal of Tropical Medicine and Hygyne	95	1351-1357	2016

Singh H, Shimojima M, Fukushi S, Fukuma A, Tani H, Yoshikawa T, Taniguchi S, Yang M, Sugamata M, Morikawa S, Saijo M .	Serologic assays for the detection and strain identification of Pteropine orthoreovirus .	Emerging Microbes and Infection	5	e44	2016
Kurihara S, Satoh A, Yufu F, Hayasaka D, Shimojima M, Tashiro M, Saijo T, Takazono T, Imamura Y, Miyazaki T, Tsukamoto M, Yanagihara K, Mukae H, Saijo M, Morita K, Kohno S, Izumikawa K .	The world first two cases of severe fever with thrombocytopenia and syndrome: An epidemiological study in Nagasaki, Japan .	Journal of Infection and Chemotherapy	22	461-465	2016
Kitao A, Ieki R, Takatsu H, Tachibana Y, Nagae M, Hino T, Nakaji H, Shimojima M, Saijo M, Okayama M, Kenzaka T .	Severe fever with thrombocytopenia and syndrome presenting as hemophagocytic syndrome: two case reports .	Springerplus	5	361	2016
Suda Y, Fukushi S, Tani H, Murakami S, Saijo M, Horimoto T, Shimojima M .	Analysis of the entry mechanism of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, using a vesicular stomatitis virus pseudotyping system	Archives of Virology	161	1447-1454	2016
Kawagishi T, Kanai Y, Tani H, Shimojima M, Saijo M, Matsuura Y, Kobayashi T .	Reverse genetics for fusogenic bat-borne orthoreovirus associated with acute respiratory tract infections in humans: Role of outer capsid protein C in viral replication and	PLoS Pathogens	12	e1005455	2016
Tani H, Shimojima M, Fukushi S, Yoshikawa T, Fukuma A, Taniguchi S, Morikawa S, Saijo M	Characterization of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus glycoprotein-mediated entry .	Journal of Virology	90	5292-5301	2016

Fukuma A, Fukushi S, Yoshikawa T, Tani H, Taniguchi S, Kurosu T, Egawa K, Suda Y, Singh H, Nomachi T, Gokuden M, Ando K, Kida K, Kan M, Kato N, Yoshikawa A, Kitamoto H, Sato Y, Suzuki T, Hasegawa H, Morikawa S, Shimojima M, Saijo M.	Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Antigen Detection Using Monoclonal Antibodies to the Nucleocapsid Protein .	PLoS Neglected Tropical Diseases	10	e0004595	2016
Kimura M, Une Y, Suzuki M, Park E-S, Imaoka K and Morikawa S .	Isolation of Brucella abortus-like bacteria from White's and Denny's tree	Vector Borne and Zoonotic Diseases	(in press)		
Park ES, Suzuki M, Kimura M, Mizutani H, Saito R, Kubota N, Hasuike Y, Okajima J, Kasai H, Sato Y, Nakajima N, Maruyama K, Imaoka K, Morikawa S.	Epidemiological and pathological study of feline morbillivirus infection in domestic cats in Japan .	BMC Veterinary Research	12	8 228	2016
Zamoto-Niikura A, Morikawa S, Hanaki KI, Holman PJ, Ishihara C.	Ixodes persulcatus ticks as a vector for Babesia microti U.S. lineage in Japan .	Applied Environment Microbiolog	82(22)	6624-6632	2016
Arai S, Taniguchi S, Aoki K, Yoshikawa Y, Kyuwa S, Tanaka-Tayada K, Masangkay JS, Omatsu T, Puentespina R Jr, Watanabe S, Alviola P, Alvarez J, Eres E, Cosico E, Quibod MN, Morikawa S,	Molecular phylogeny of a genetically divergent hantavirus harbored by the Geoffroy's rousette (Rousettus amplexicaudatus), a frugivorous bat species in the	Infection and Genetic Evolution	45	26-32	2016
Uda A, Sharma N, Takimoto K, Deyu T, Koyama Y, Park ES, Fujita O, Hotta A, Morikawa S .	Pullulanase Is Necessary for the Efficient Intracellular Growth of Francisella tularensis	PLoS One	11	e0159740	2016

Arai S, Kang HJ, Gu SH, Ohdachi SD, Cook JA, Yashina LN, Tanaka-Taya K, Abramov SA, Morikawa S, Okabe N, Oishi K, Yanagihara R.	Genetic Diversity of Artybash Virus in the Laxmann's Shrew (<i>Sorex caecutiens</i>).	Vector Borne and Zoonotic Diseases	16(7)	468-475	2016
Hotta A, Fujita O, Uda A, Yamamoto Y, Sharma N, Tanabayashi K, Yamada A, Morikawa S.	Virulence of Representative Japanese <i>Francisella tularensis</i> and immunologic consequence of	Microbiology and Immunology	60(3)	168-176	2016
Kaneyuki S, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Taniguchi S, Fukuma A, Shimojima M, Kurosu T, Morikawa S, Saijo M.	Ulcerative lesions with hemorrhage in a patient with severe fever with thrombocytopenia syndrome observed via upper	Japanese Journal of Infectious Diseases	69(6)	525-527	2016
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 <i>Francisella tularensis</i> in Wild Animals in the Endemic Areas in Japan.	Japanese Journal of Infectious Diseases	69 (5)	431-434	2016
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 <i>Ixodes</i> ticks.	Journal of Infectious Diseases	69(2)	131-134	2016

Arafa AS, Yamada S, Imai M, Watanabe T, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Kiso M, Sakai-Tagawa Y, Ito M, Imamura T, Nakajima N, Takahashi K, Zhao D, Oishi K, Yasuhara A, Macken CA, Zhong G, Hanson AP, Fan S, Ping J, Hatta M, Lopes TJ, Suzuki Y, El-Husseiny M, Selim A, Hagag N, Soliman M, Neumann G, Hasegawa H, Kawaoka Y .	Risk assessment of recent Egyptian H5N1 influenza viruses .	Scientific Reports	6	38388	2016
Iwatsuki-Horimoto K, Nakajima N, Shibata M, Takahashi K, Sato Y, Kiso M, Yamayoshi S, Ito M, Enya S, Otake M, Kangawa A, da Silva Lopes TJ, Ito H, Hasegawa H, Kawaoka Y .	The microminipig as an animal model for influenza A virus infection .	Journal of Virology	91(2)	e01716-16	2017
Kotani O, Suzuki T, Yokoyama M, Iwata-Yoshikawa N, Nakajima N, Sato H, Hasegawa H, Taguchi F, Shimizu H, Nagata N .	Intracerebral inoculation of mouse-passaged Saffold virus type 3 affects cerebellar development in	Journal of Virology	90(21)	10007-10021	2016
Sakai K, Ami Y, Nakajima N, Nakajima K, Kitazawa M, Anraku M, Takayama I, Sangsriratanakul N, Komura M, Sato Y, Asanuma H, Takashita E, Komase K, Takehara K, Tashiro M, Hasegawa H, Odagiri T, Takeda M .	Independency for Haemagglutinin Cleavage In Vivo Differentiates Influenza B Virus from Influenza A Virus .	Scientific Reports	6	29430	2016
Hayashi K, Yoshida H, Sato Y, Tobiume M, Suzuki Y, Ariyoshi K, Hasegawa H, Nakajima N .	Histopathologic findings of lung with A/H1N1pdm09 infection-associated ARDS in the post-pandemic season .	Japanese Journal of Infectious Diseases	70(2)	197-200	2017

Hai Le T, Thach HN, Tuan TA, Nam DH, Dien TM, Sato Y, Kumasaka T, Suzuki T, Hanaoka N, Fujimoto T, Katano H, Hasegawa H, Kawachi S, Nakajima N.	Adenovirus type 7 pneumonia in children who died from measles-associated pneumonia, Hanoi, Vietnam, 2014.	Emerging Infectious Disease	22(4)	687-690	2016
Kotani O, Naeem A, Suzuki T, Iwata-Yoshikawa N, Sato Y, Nakajima N, Hosomi T, Tsukagoshi H, Kozawa K, Hasegawa H, Taguchi F, Shimizu	Neuropathogenicity of Two Saffold Virus Type 3 Isolates in Mouse Models.	PLoS One	11(2)	e0148184	2016
Furihata S, Matsumura T, Hirata M, Mizutani T, Nagata N, Kataoka M, Katayama Y, Omatsu T, Matsumoto H, Hayakawa Y.	Characterization of Venom and Oviduct Components of Parasitoid Wasp <i>Asobara japonica</i> .	PLoS One	11(7)	e0160210	2016
Onodera, T. , A. Hosono, T. Odagiri, M. Tashiro, S. Kaminogawa, Y. Okubo, T. Kurosaki, M. Ato, K. Kobayashi, and Y. Takahashi.	Whole-virion influenza vaccine recalls an early burst of high-affinity memory B cell response through Toll-like receptor signaling.	Journal of Immunology	196	4172-4184	2016
Aryantini NP, Yamasaki E, Kurazono H, Sujaya IN, Urashima T, Fukuda K.	In vitro safety assessments and antimicrobial activities of <i>Lactobacillus rhamnosus</i> strains	Animal Science Journal	(in press)		
Nakano M, Yahiro K, Yamasaki E, Kurazono H, Akada J, Yamaoka Y, Niidome T, Hatakeyama M, Suzuki H, Yamamoto T, Moss J, Isomoto H, Hirayama T.	<i>Helicobacter pylori</i> VacA, acting through receptor protein tyrosine phosphatase, is crucial for CagA phosphorylation in human duodenum carcinoma cell line AZ-521.	Disease Models & Mechanisms	19(12)	1473-1481	2016

Watanabe S, Matsumura K, Iwai H, Funatogawa K, Haishima Y, Fukui C, Okumura K, Kato-Miyazawa M, Hashimoto M, Teramoto K, Kirikae F, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T.	A mutation in the 16S rRNA decoding region attenuates the virulence of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	Infection and Immunity	84	2264-2273	2016
Fujikura Y, Yuki A, Hamamoto T, Ichimura S, Kawana A, Ohkusu K, Matsumoto T.	Evaluation and validity of a polymerase chain reaction-based open reading frame typing method to dissect the molecular epidemiology for <i>Acinetobacter baumannii</i> in an	American Journal of Infection and Control	44(11)	e275-e278	2016
Yonetani S, Ohnishi H, Ohkusu K, Matsumoto T, Watanabe T.	Direct identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF MS using an in-house	International Journal of Infectious Diseases	52	37-42	2016
Miyazaki H, Shibuya R, Midorikawa N, Chang B, Ohnishi M, Matsumoto T.	Serotype distribution and antimicrobial susceptibility of <i>Streptococcus pneumoniae</i> strains isolated in Japan after introduction of the routine immunization program.	Journal of Infection and Chemotherapy (in press)			