

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26年度～平成28年度 総合研究報告書

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

・総合研究報告

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，倉根一郎	

・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-----	23
西條政幸	
2. 蚊媒介性ウイルスの鑑別検査法の開発：ウエストナイルウイルスおよびアルファウイルス属脳炎ウイルスの遺伝子検出法の開発-----	27
田島茂	
3. ウイルス性出血熱の検査法に関する研究-----	33
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-----	43
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-----	52
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-----	63
宮崎義継，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-----	71
黒田誠	
8. 病原体の病理学的検出法の確立-----	80
中島典子	
9. 病原体の電子顕微鏡学的迅速検出法の確立-----	89
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-----	97
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-----	103
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-----	110
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-----	119
鯉淵智彦	
14. 医療機関のバイオテロ対策を支援するための方策-----	122
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-----	125
金谷泰宏	
16. 痘そうワクチン LC16m8 接種者における中和抗体持続に関する調査研究-----	127
横手公幸	
・研究成果の刊行に関する一覧表-----	135

. 総合研究報告

平成 26 年度～平成 28 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金
(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)

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

部	所 属	国立感染症研究所ウイルス第一
	研究代表者	西條政幸 (H27 年度から H28 年度)
	所 属	国立感染症研究所
	研究代表者	倉根一郎 (H26 年度)

研究要旨：バイオテロ事象に備えた研究として、以下の5項目、1)日本に備蓄されている細胞培養痘そうワクチンLC16m8 (LC16m8ワクチン)の有効性、安全性、安定性等に関する研究、2)バイオテロに用いられる危険性のある病原体の迅速検査、分離同定、血清抗体検査、環境検体を用いた病原体検出法の開発に関する研究、3)診断検査支援のため、関係機関への情報提供システムの確立、4) 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あり方、現状における問題点と改善点を明らかにする研究、5) バイオテロ対策における国際連携のあり方の検討、に関する研究を実施した。

- 1) 日本に備蓄されている細胞培養痘そうワクチンLC16m8 (LC16m8ワクチン)の有効性、安全性、安定性等に関する研究：LC16m8ワクチンをヒトに接種した場合に誘導される免疫が、痘瘡ウイルス [痘瘡 (天然痘) の病原ウイルス] に対しても防御的に働く科学的根拠を明らかにした。その他、ヒトにLC16m8ワクチンを接種した場合における免疫誘導される抗体の詳細な解析、オルソポックスウイルスに感染後早期にLC16m8ワクチンを接種することで引き起こされる疾患を軽症化できる可能性を示唆する成績を得た。備蓄されているLC16m8ワクチンの安定性も確認された。LC16m8ワクチンの有効性を評価するためのサル痘ウイルス感染マウスモデルを確立した。
- 2) バイオテロに用いられる危険性のある病原体の迅速検査、分離同定、血清抗体検査、環境検体を用いた病原体検出法の開発に関する研究：ウイルス性出血熱ウイルス、特にエボラウイルス検出法の整備とGlobal Health Security Action Group (GHSAG) の活動の一環としての外部評価を実施した。蚊媒介性ウイルス感染症診断法の開発、バイオテロに用いられる危険性のある細菌毒素検出法の開発、病理学的にウイルス性病原体を検出するための新規検出法 (AT-tailing法) の開発、電子顕微鏡による病原体迅速検出法の整備、網羅的に遺伝子検出することによる病原体検出法の整備のための基盤的研究、等の課題について研究成果が得られた。
- 3) 診断検査支援のため、関係機関への情報提供システムの確立：一般医療機関の医師や関連する人々がバイオテロ事象 (疑い事例を含む) に対応するときに役立つホームページを立ち上げ、一般公開した (<http://h-crisis.niph.go.jp/bt/>)。また、医療機関向けのバイオテロ対策に参考とするための書籍冊子体「バイオテロを疑う時シート (資料写真や図表を掲載するなど一覧性・視認性に優れたものとなるように工夫されている)」を作成し、全国の病院 (約990施設) に郵送・配布した。
- 4) 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あり方、現状における問題点と改善点を明らかにする研究：国立感染症研究所が公開している病原体検出マニュアル徐々には改善が認められるものの、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) に関する検出マニュアルの整備が課題となる。毒素 (細菌毒素：黄色ブドウ球菌、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、所管や検出マニュアルの整備、バイオテロ発生に備えた緊急連絡・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などが課題として抽出された。
- 5) バイオテロ対策における国際連携
研究期間を通じて、バイオテロに関連する議論がなされる会議や学会に参加し、バイオテロ対策に資する情報を収集した。GHSAG-LNの活動の中で、エボラウイルス等検出システム外部評価、電子顕微鏡による病原体検出のための訓練への参加、外部評価への参画等の活動がなされた。

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

迅速診断・同定法の基盤整備は、バイオテロの脅威に対抗する上で必須である。バイオテロの早期検知には一次対応機関で働く医師等のバ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。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。

バイオテロ対策により適切に対応するための研究として、以下の研究目標が設定された。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)バ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、等である。

現在の世界で有効で安全な痘瘡ワクチンを製造する能力のあるメーカーが存在するのは、日本とドイツのみであると言え、それだけにLC16m8株の性状解析と製造法、備蓄法、品質管理法に関する研究は日本だけでなく、海外の国々におけるバイオテロ対策に資する重要な情報を提供することに貢献する。

B. 研究方法

本研究班の活動概要について図にまとめた。

研究代表者、各研究分担者の研究方法については、各研究報告(分担研究報告)を参照する。

1. 日本に備蓄されている細胞培養痘そうワクチンLC16m8(LC16m8ワクチン)の有効性、安全性、安定性等に関する研究
2. バイオテロに用いられる危険性のある病原体の迅速検査、分離同定、血清抗体検査、環境検体を用いた病原体検出法の開発に関する研究
3. 診断検査支援のため、関係機関への情報提供システムの確立
4. 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あり方、現状における問題点と改善点を明らかにする研究
5. バイオテロ対策における国際連携
6. その他、
上記の研究項目について研究班で問題点、克服すべき課題を議論し、研究を実施した。

C. 研究結果

研究代表者、各研究分担者の研究結果については、各研究報告(分担研究報告)を参照する。

1. 日本に備蓄されている細胞培養痘そうワクチンLC16m8(LC16m8ワクチン)の有効性、安全性、安定性等に関する研究
LC16m8ワクチンをヒトに接種した場合に誘導される免疫が、痘瘡ウイルス[痘瘡(天然痘)の病原ウイルス]に対しても防御的に働く科学

的根拠を明らかにした。その他、ヒトに LC16m8 ワクチンを接種した場合における免疫誘導される抗体の詳細な解析、オルソポックスウイルスに感染後早期に LC16m8 ワクチンを接種することで引き起こされる疾患を軽症化できる可能性を示唆する成績を得た。継続して備蓄されている LC16m8 ワクチンの安定性も確認した。LC16m8 ワクチンの有効性を評価するためのサル痘ウイルス感染マウスモデルを確立した。さらに備蓄されている LC16m8 ワクチンの安全性についても確認した。

2. バイオテロに用いられる危険性のある病原体の迅速検査，分離同定，血清抗体検査，環境検体を用いた病原体検出法の開発に関する研究
ウイルス性出血熱ウイルス，特にエボラウイルス検出法の整備と Global Health Security Action Group (GHSAG) の活動の一環としての外部評価を実施した。蚊媒介性ウイルス感染症診断法の開発，バイオテロに用いられる危険性のある細菌毒素検出法の開発，病理学的にウイルス性病原体を検出するための新規検出法 (AT-tailing 法) の開発，電子顕微鏡による病原体迅速検出法の整備，網羅的に遺伝子検出することによる病原体検出法の整備のための基盤的研究，等の課題について研究成果が得られた。
3. 診断検査支援のため，関係機関への情報提供システムの確立
一般医療機関の医師や関連する人々がバイオテロ事象 (疑い事例を含む) に対応するときに役立つホームページを立ち上げ，一般公開した (<http://h-crisis.niph.go.jp/bt/>)。また，医療機関向けのバイオテロ対策に参考とするための書籍冊子体「バイオテロを疑う時シート」を作成し，全国の病院 (約 990 施設) に郵送・配布した。この冊子体はバイオテロ遭遇現場で活用できる資料写真や図表を掲載するなど一覽性・視認性に優れたものとなるように工夫されている。
4. 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あり方，現状における問題点と改善点を明らかにする研究
アンケート調査等を通じて，バイオテロ対応 (特に，特定病原体検出) における地衛研や国立感染症研究所が提供している病原体検出マニュアルの課題を抽出し，課題提起，そして改善状況を検証した。病原体検出マニュアル徐々には記載事項の増加や充実など改善が認められるものの，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) に関する検出マニュアルの整備が課題となる。毒素 (細菌毒素：黄色ブドウ球菌，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，所管や検出マニュアルの整備，バイオテロ発生に備えた緊急連絡・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などがも課題として抽出された。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) が必要と考えられた。

5. バイオテロ対策における国際連携
研究期間を通じて，GHSAG-Laboratory Network，世界保健機関が開催する痘瘡ウイルス関連研究専門家会議，バイオテロに関連する議論がなされる学会等に参加し，バイオテロ対策に資する情報を収集した。GHSAG-LN の活動の中で，エボラウイルス等検出システム外部評価，電子顕微鏡による病原体検出のための訓練への参加，外部評価への参画等の活動がなされた。

D. 考察

上記のバイオテロ対策に貢献するための各研究課題について 3 年間にわたり研究してきた。LC16m8 ワクチンは，現在では世界で使用可能な痘瘡ワクチンとして 2 つ存在するワクチンの 1 つである。LC16m8 ワクチン研究は比較的長期にわたり実施されてきたことから，有効性については議論のないものと言える。しかし，それはこれまで動物感染モデル (霊長類におけるサル痘ウイルス感染モデル等) で実施された研究成果に基づいている。しかし，本研究班で行われた研究に，米国 CDC と本研究班との共同研究として，ヒトに LC16m8 ワクチンを接種することで，痘瘡の原因ウイルス (痘瘡ウイルス) に対して中和抗体を誘導できることを世界で初めて証明した。LC16m8 ワクチンの有効性を示す結果と言える。

病原体検出法の整備，開発等の研究が推進された。詳細は各分担研究報告を参照していただきたいが，細菌毒素検出システム開発，高病原性病原体検出システム，病理学的病原体検出において成果が得られた。また，次世代シーケンズ法を基盤としたバイオテロ病原体検出法の開発はこれからの課題とも言えるが，その基盤となる研究成果が得られている。これからも継続した研究が求められる。

日本の医療機関，公衆衛生対応機関 (地方衛

生研究所), 国レベルの機関との連携が必要である。本研究班では, 独自に開発した医療機関向けのバイオテロ対応に参考となるホームページを立ち上げ, 国立保健医療科学院の支援を得て一般公開した。関連資料等を作成し, 全国の主な医療機関に配布することもできた。国レベルの機関(国立感染症研究所を含む), 地方衛生研究所, 地方自治体等の連携が図られ, 日本のバイオテロに対する備えがより強固になることが期待される。

E. 結論

バイオテロ対策の強化に繋がる研究として, 1) 日本に備蓄されている細胞培養痘そうワクチン LC16m8(LC16m8 ワクチン)の有効性, 安全性, 安定性等に関する研究, 2) バイオテロに用いられる危険性のある病原体の迅速検査, 分離同定, 血清抗体検査, 環境検体を用いた病原体検出法の開発に関する研究, 3) 診断検査支援のため, 関係機関への情報提供システムの確立, 4) 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あり方, 現状における問題点と改善点を明らかにする研究, 5) バイオテロ対策における国際連携に関する研究が実施され, 一定の成果が得られた。

F. 健康危険情報 特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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. J Virol Methods (in press)
- 4) Kimura M, Une Y, Suzuki M, Park E-S, Imaoka K, Morikawa S. Isolation of Brucella inopinata-like bacteria from White's and Denny's tree frogs. Vector Borne Zoonotic Diseases (in press)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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
- 8) 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):201716-16, 2017
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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):461-455, 2016
 - 12) 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
 - 13) 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
 - 14) 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
 - 15) 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
 - 16) 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 Disease* 10(4):e0004595, 2016
 - 17) 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* 69:525-527, 2016
 - 18) Tani H, Fukuma A, Fukushi S, Taniguchi S, Yoshikawa T, Iwata-Yoshikawa N, Sato Y, Suzuki T, Nagata N, Hasegawa H, Kawai Y, Uda A, Morikawa S, Shimojima M, Watanabe H, Saijo M. Efficacy of T-705 (Favipiravir) in the treatment of infections with lethal severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *mSphere* 1(1): e00061-15, 2016
 - 19) Singh H, Morioka K, Shimojima M, An LV, Nakajima H, Hemmi A, Uchiyama K, Loong SK, AbuBakar S, Yang M, Sugamata M. A handy field portable ELISA-system for rapid onsite diagnosis of infectious diseases. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 69:435-488, 2016
 - 20) 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
 - 21) 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 and Environmental Microbiology* 82(22):6624-6632, 2016
 - 22) Arai S, Taniguchi S, Aoki K, Yoshikawa Y, Kyuwa S, Tanaka-Taya K, Masangkay JS, Omatsu T, Puentes-pina 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
- 23) 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
- 24) 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
- 25) 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
- 26) 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
- 27) 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
- 28) Yamashita A, Sakamoto T, Sekizuka T, Kato K, Takasaki T, Kuroda M. DGV: Dengue Genographic Viewer. *Frontiers in Microbiology* 7:875, 2016
- 29) Yamashita A, Sekizuka T, Kuroda M. VirusTAP: Viral Genome-Targeted Assembly Pipeline. *Frontiers in Microbiology* 7:32, 2016
- 30) 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
- 31) 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. TMRSS2 independency for haemagglutinin cleavage in vivo differentiates influenza B virus from influenza A virus. *Scientific Reports* 6:29430, 2016
- 32) 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 Diseases* 22(4):687-690, 2016
- 33) 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
- 34) 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
- 35) 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

- 36) Onodera T, Hosono A, Odagiri T, Tashiro M, Kaminogawa S, Okubo Y, Kurosaki T, Ato M, Kobayashi K, Takahashi Y. 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
- 37) Asakura H, Kawamoto K, Murakami S, Tachibana M, Kurazono H, Makino S, Yamamoto S, Igimi S. Ex vivo proteomics of *Campylobacter jejuni* 81-176 reveal that FabG affects fatty acid composition to alter bacterial growth fitness in the chicken gut. *Research in Microbiology* 167:63-71, 2016
- 38) Asakura H, Tachibana M, Taguchi M, Hiroi T, Kurazono H, Makino S-I, Kasuga F, Igimi S. Seasonal and growth-dependent dynamics of bacterial community in radish sprouts. *Journal of Food Safety* 36:392-401, 2016
- 39) 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
- 40) 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. *Diseases Models & Mechanisms* 19(12):1473-1481, 2016
- 41) 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
- 42) 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
- 43) Mottate K, Yokote H, Mori S, Horita A, Miyatsu Y, Torii Y, Kozai Y, Iwaki M, Takahashi M, Ginnaga A. Retrospective survey to evaluate the safety and efficacy of Japanese botulinum antitoxin therapy in Japan. *Toxicon* 110:12-18, 2016
- 44) Singh H, Morita T, Suzuki Y, Shimojima M, Le Van A, Sugamata M, Yang M. High sensitivity, high surface area Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Bio-Medical Materials and Engineering* 26(3-4):115-127, 2015
- 45) Singh H, Shimojima M, Ngoc TC, Quoc Huy NV, Chuong TX, Le Van A, Saijo M, Yang M, Sugamata M. Serological evidence of human infection with Pteropine orthoreovirus in Central Vietnam. *Journal of Medical Virology* 87(12):2145-2148, 2015
- 46) Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Taniguchi S, Fukuma A, Saijo M. Combination effects of ribavirin and interferons on severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection. *Virology Journal* 12:181, 2015
- 47) Singh H, Yoshikawa T, Kobayashi T, Fukushi S, Tani H, Taniguchi S, Fukuma A, Yang M, Sugamata M, Shimojima M, Saijo M. Rapid whole genome sequencing of Miyazaki-Bali/2007 Pteropine orthoreovirus by modified rolling circular amplification with adaptor ligation-next generation sequencing. *Scientific Reports* 5:16517, 2015
- 48) Singh H, Shimojima M, Shiratori T, An le V, Sugamata M, Yang M. Application of 3D printing technology in increasing the diagnostic performance of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for infectious diseases. *Sensors (Basel)* 15(7):16503-16515, 2015
- 49) Okutani A, Osaki M, Takamatsu D, Kaku Y, Inoue S, Morikawa S. Draft genome sequences of *Bacillus anthracis* strains

- stored for several decades in Japan. *Genome Announcement* 3(3): e00633-15, 2015
- 50) Sakai K, Hagiwara K, Omatsu T, Hamasaki C, Kuwata R, Shimoda H, Suzuki K, Endoh D, Nagata N, Nagai M, Katayama Y, Oba M, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Mizutani T, Maeda K. Isolation and characterization of a novel Rhabdovirus from a wild boar (*Sus scrofa*) in Japan. *Veterinary Microbiology* 179(3-4):197-203, 2015
- 51) Hamamoto N, Uda A, Tobiume M, Park CH, Noguchi A, Kaku Y, Okutani A, Morikawa S, Inoue S. Association between RABV G proteins transported from the perinuclear space to cell surface membrane and N-glycosylation of the sequon at Asn204. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 68(5): 387-393, 2015
- 52) Okamoto M, Miyazawa T, Morikawa S, Ono F, Nakamura S, Sato E, Yoshida T, Yoshikawa R, Sakai K, Mizutani T, Nagata N, Takano J, Okabayashi S, Hamano M, Fujimoto K, Nakaya T, Iida T, Horii T, Miyabe-Nishiwaki T, Watanabe A, Kaneko A, Saito A, Matsui A, Hayakawa T, Suzuki J, Akari H, Matsuzawa T, Hirai H. Emergence of infectious malignant thrombocytopenia in Japanese macaques (*Macaca fuscata*) by SRV-4 after transmission to a novel host. *Scientific Reports* 5:8850, 2015
- 53) Ching PK, de los Reyes VC, Sucaldito MN, Tayag E, Columa-Vingno AB, Malbas FF Jr, Bolo GC Jr, Sejvar JJ, Eagles D, Playford G, Dueger E, Kaku Y, Morikawa S, Kuroda M, Marsh GA, McCullough S, Foxwell AR. Outbreak of henipavirus infection, Philippines. *Emerging Infectious Diseases* 21(2): 328-331, 2015
- 54) Orba Y, Sasaki M, Yamaguchi H, Ishii A, Thomas Y, Hang'ombe BM, Mweene AS, Morikawa S, Saijo M, Sawa H. Orthopoxvirus infection among wildlife in Zambia. *Journal of General Virology* 96 (Pt 2): 390-394, 2015
- 55) Ikeda-Dantsuji Y, Ohno H, Tanabe K, Umeyama T, Ueno K, Nagi M, Yamagoe S, Kinjo Y, Miyazaki Y. Interferon- promotes phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* but not *Cryptococcus gattii* by murine macrophages. *Journal of Infection and Chemotherapy* 21:831-836, 2015
- 56) Okachi S, Wakahara K, Kato D, Umeyama T, Yagi T, Hasegawa Y. Massive mediastinal cryptococcosis in a young immunocompetent patient. *Respirology Case Reports* 3:95-98, 2015
- 57) Sakai K, Sekizuka T, Ami Y, Nakajima N, Kitazawa M, Sato Y, Nakajima K, Anraku M, Kubota T, Komase K, Takehara K, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Kuroda M, Takeda M. A mutant H3N2 influenza virus uses an alternative activation mechanism in TMPRSS2 knockout mice by loss of an oligosaccharide in the hemagglutinin stalk region. *Journal of Virology* 89(9):5154-5158, 2015
- 58) Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Sato Y, Nakajima N, Koike S, Iwasaki T, Sata T, Yamashita T, Minagawa H, Taguchi F, Hasegawa H, Shimizu H, Nagata N. Establishment of a panel of in-house polyclonal antibodies for the diagnosis of enterovirus infections. *Neuropathology* 35(2):107-121, 2015
- 59) Yamaguchi T, Okamura S, Miura Y, Koyama S, Yanagisawa H, Matsumoto T. Molecular characterization of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from skin and pus samples of outpatients in Japan. *Microbial Drug Resistance* 21(4):441-447, 2015
- 60) Nishiyama Y, Matsukuma S, Matsumura T, Kanatani Y, Saito T. Preparedness for a smallpox pandemic in Japan: public health perspectives. *Disaster Medicine and Public Health Preparedness* 9(2):220-223, 2015
- 61) Eto A, Saito T, Yokote H, Kurane I, Kanatani Y. Recent advances in the study of live attenuated cell-cultured smallpox vaccine LC16m8. *Vaccine* 33(45):6106-6111, 2015
- 62) Nishiyama Y, Fujii T, Kanatani Y, Shinmura Y, Yokote H, Hashizume S. Freeze-dried live attenuated smallpox vaccine prepared in cell culture "LC16-KAKETSUKEN": Post-marketing surveillance study on safety and efficacy

- compliant with Good Clinical Practice. *Vaccine* 33(45):6120-6127, 2015
- 63) Yokote H, Shinmura Y, Kanehara T, Maruno S, Kuranaga M, Matsui H, Hashizume S. Vaccinia virus strain LC16m8 defective in the B5R gene keeps strong protection comparable to its parental strain Lister in immunodeficient mice. *Vaccine* 33:6112-6119, 2015
- 64) Hayakawa T, Aoi T, Bravery C, Hoogendoorn K, Knezevic I, Koga J, Maeda D, Matsuyama A, McBlane J, Morio T, Petricciani J, Rao M, Ridgway A, Sato D, Sato Y, Stacey G, Sakamoto N, Trouvin JH, Umezawa A, Yamato M, Yano K, Yokote H, Yoshimatsu K, Zorzi-Morre P. Report of the international conference on regulatory endeavors towards the sound development of human cell therapy products. *Biologicals* 43(5):283-297, 2015
- 65) Nagata N, Iwata-Yoshikawa N, Hayasaka D, Sato Y, Kojima A, Kariwa H, Takashima I, Takasaki T, Kurane I, Sata T, Hasegawa H. The pathogenesis of 3 neurotropic flaviviruses in a mouse model depends on the route of neuroinvasion after viremia. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 74(3):250-260, 2015
- 66) Adachi Y, Onodera T, Yamada Y, Daio R, Tsuji M, Inoue T, Kobayashi K, Kurosaki T, Ato M, Takahashi Y. Distinct germinal center selection at local sites shapes memory B cell response to viral escape. *Journal of Experimental Medicine* 212:1709-1723, 2015
- 67) Kitada S, Yoshimura K, Miki K, Miki M, Hashimoto H, Matsui H, Kuroyama M, Agheshio F, Kagawa H, Mori M, Maekura R, Kobayashi K. Validation of a commercial serodiagnostic kit for diagnosing pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease. *International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases* 19:97-103, 2015
- 68) Nakano M, Yamasaki E, Moss J, Hirayama T, Kurazono H. Study of the stn protein in salmonella; a regulator of membrane composition and integrity. *Methods in Molecular Biology* 1225:127-138, 2015
- 69) Yamasaki E, Yamada C, Jin X, Nair GB, Kurazono H, Yamamoto S. Expression of *marA* is remarkably increased from the early stage of development of fluoroquinolone-resistance in uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Infection and Chemotherapy* 21(2):105-109, 2015
- 70) Nakashima S, Yura H, Tomonaga M, Harada T, Hara A, Hara S, Nakano M, Yamasaki E, Sakamoto N, Ishimatsu Y, Isomoto H, Gochuico R B, Suffredini A F, Mukae H, Kurazono H, Hirayama T, Moss J, Kohno S. Identification of *Helicobacter pylori* VacA in human lung and its effects on lung cells. *BBRC* 460(3):721-726, 2015
- 71) Masuda K, Yamamoto S, Kubota K, Kurazono H, Makino S-I, Kasuga F, Ijimi S, Asakura H. Evaluation of the dynamics of microbiological quality in lightly pickled napa cabbages during manufacture. *Journal of Food Safety* doi: 10.1111/jfs.12195, 2015
- 72) Yamasaki E, Watahiki M, Isobe J, Sata T, G. Nair B, Kurazono H. Quantitative detection of Shiga toxins directly from stool specimens of patients associated with an outbreak of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Japan—Quantitative Shiga toxin detection from stool during EHEC outbreak. *Toxins* 7:4381-4389, 2015
- 73) Okumura K, Kato M, Kirikae T, Kayano M, Miyoshi-Akiyama T. Construction of a virtual *Mycobacterium tuberculosis* consensus genome and its application to data from a next generation sequencer. *BMC Genomics* 16:218, 2015
- 74) 小林和夫 . 2015 . マイコバクテリウム属 (抗酸菌) . 標準微生物学 第12版(中込治, 神谷茂編) p276-288, 医学書院, 東京
- 75) 中島典子 . 季節性および鳥インフルエンザウイルス感染症の病理 . 病理と臨床 33 : 1146-1153, 2015
- 76) Yoshikawa T, Fukushi S, Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Toda S, Shimazu Y, Yano K, Morimitsu T, Ando K, Yoshikawa A, Kan M, Kato N, Motoya T, Kuzuguchi T, Nishino Y,

- Osako H, Yumisashi T, Kida K, Suzuki F, Takimoto H, Kitamoto H, Maeda K, Takahashi T, Yamagishi T, Oishi K, Morikawa S, Saijo M, Shimojima M. Sensitive and specific PCR systems for the detection of both Chinese and Japanese severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strains, and the prediction of the patient survival based on the viral load. *Journal of Clinical Microbiology* 52(9):3325-3333, 2014
- 77) Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Fukuma A, Taniguchi S, Suda Y, Maeda K, Takahashi T, Morikawa S, Saijo M. Effects of ribavirin on severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in vitro. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 67(6): 423-427, 2014
- 78) Saraya T, Tanabe K, Araki K, Yonetani S, Makino H, Watanabe T, Tsujimoto N, Takata S, Kurai D, Ishii H, Miyazaki Y, Takizawa H, Goto H. Breakthrough invasive *Candida glabrata* in patients on micafungin: a novel *FKS* gene conversion correlated with sequential elevation of MIC. *Journal of Clinical Microbiology* 52(7):2709-2712, 2014
- 79) Urai M, Kaneko Y, Niki M, Inoue M, Tanabe K, Umeyama T, Fukazawa H, Ohno H, Miyazaki Y. Potent drugs that attenuate anti-*Candida albicans* activity of fluconazole and their possible mechanisms of action. *Journal of Infection and Chemotherapy* 20(10):612-615, 2014
- 80) Ikeda I, Ohno T, Ohno H, Miyazaki Y, Nishimoto K, Fukushima S, Makino T, Ihn H. A case of *Fusarium paronychia* successfully treated with occlusive dressing of antifungal cream. *Journal of Dermatology* 41(4):340-342, 2014
- 81) Tarumoto N, Kinjo Y, Kitano N, Sasai D, Ueno K, Okawara A, Izawa Y, Shinozaki M, Watarai H, Taniguchi M, Takeyama H, Maesaki S, Shibuya K, Miyazaki Y. Exacerbation of invasive *Candida albicans* infection by commensal bacteria or a glycolipid through IFN- γ produced in part by iNKT cells. *Journal of Infectious Diseases* 209(5):799-810, 2014
- 82) Seki M, Ohno H, Gotoh K, Motooka D, Nakamura S, Iida T, Miyazaki Y, Tomono K. Allergic bronchopulmonary mycosis due to co-infection with *Aspergillus fumigatus* and *Schizophyllum commune*. *IDCases* 1:5-8, 2014
- 83) Moritake H, Kamimura S, Nunoi H, Nakayama H, Suminoe A, Inada H, Inagaki J, Yanai F, Okamoto Y, Shinkoda Y, Shimomura M, Itonaga N, Hotta N, Hidaka Y, Ohara O, Yanagimachi M, Nakajima N, Okamura J, Kawano Y. Clinical characteristics and genetic analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia with hemophagocytic lymphohistiocytosis: a Japanese retrospective study by the Kyushu-Yamaguchi Children's Cancer Study Group. *International Journal of Hematology* 100(1):70-78, 2014
- 84) Watanabe T, Zhong G, Russell CA, Nakajima N, Hatta M, Hanson A, McBride R, Burke DF, Takahashi K, Fukuyama S, Tomita Y, Maher EA, Watanabe S, Imai M, Neumann G, Hasegawa H, Paulson JC, Smith DJ, Kawaoka Y. Circulating avian influenza viruses closely related to the 1918 virus have pandemic potential. *Cell Host & Microbe* 15(6):692-705, 2014
- 85) Sakai K, Ami Y, Tahara M, Kubota T, Anraku M, Abe M, Nakajima N, Sekizuka T, Shirato K, Suzaki Y, Aina A, Nakatsu Y, Kanou K, Nakamura K, Suzuki T, Komase K, Nobusawa E, Maenaka K, Kuroda M, Hasegawa H, Kawaoka Y, Tashiro M, Takeda M. The host protease TMPRSS2 plays a major role in in vivo replication of emerging H7N9 and seasonal influenza viruses. *Journal of Virology* 88(10):5608-16, 2014
- 86) Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, Ishido A, Shigeoka T, Tominaga T, Kamei T, Honda M, Ninomiya D, Sakai T, Senba T, Kaneyuki S, Sakaguchi S, Satoh A, Hosokawa T, Kawabe Y, Kurihara S, Izumikawa K, Kohno S, Azuma T, Suemori K, Yasukawa M, Mizutani T, Omatsu T, Katayama Y, Miyahara M, Ijuin M, Doi K, Okuda M, Umeki K, Saito T, Fukushima K, Nakajima K, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Fukuma A, Ogata M, Shimojima M, Nakajima N, Nagata N, Katano

- H, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Yamagishi T, Oishi K, Kurane I, Morikawa S, Saijo M. The first identification and retrospective study of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Japan. *Journal of Infectious Diseases* 209(6):816-27, 2014
- 87) Kenri T, Sekizuka T, Yamamoto A, Iwaki M, Komiya T, Hatakeyama T, Nakajima H, Takahashi M, Kuroda M, Shibayama K. Genetic characterization and comparison of *Clostridium botulinum* isolates from botulism cases in Japan between 2006 and 2011. *Applied and Environmental Microbiology* 80(22):6954-6964, 2014
- 88) Iwata-Yoshikawa N, Uda A, Suzuki T, Tsunetsugu-Yokota Y, Sato Y, Morikawa S, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H, Nagata N. Effects of Toll-like receptor stimulation on eosinophilic infiltration in lungs of BALB/c mice immunized with UV-inactivated severe acute respiratory syndrome-related coronavirus vaccine. *Journal of Virology* 88:8597-8614, 2014
- 89) Koma T, Yoshimatsu K, Nagata N, Sato Y, Shimizu K, Yasuda SP, Amada T, Nishio S, Hasegawa H, Arikawa J. Neutrophil depletion suppresses pulmonary vascular hyperpermeability and occurrence of pulmonary edema caused by hantavirus infection in C.B-17 SCID mice. *Journal of Virology* 88:7178-7188, 2014
- 90) Kanehara T, Maruno S, Kuranaga M, Matsui H, Hashizume S. Safety of attenuated smallpox vaccine LC16m8 in immunodeficient mice. *Clinical and Vaccine Immunology* 21(9):1261-1266, 2014
- 91) Kobayashi K. Serodiagnosis of *Mycobacterium avium* complex disease in humans. Translational research from basic mycobacteriology to clinical medicine. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 67: 329-332, 2014
- 92) Matsuzaki Y, Sugawara K, Nakauchi M, Takahashi Y, Onodera T, Tsunetsugu-Yokota Y, Matsumura T, Ato M, Kobayashi K, Shimotai Y, Mizuta K, Hongo S, Tashiro M, Nobusawa E. Epitope mapping of the hemagglutinin molecule of A/(H1N1)pdm09 influenza virus by using monoclonal antibody escape mutants. *Journal of Virology* 88:12364-12373, 2014
- 93) Sugamata R, Sugawara A, Nagao T, Suzuki K, Hirose T, Yamamoto K, Oshima M, Kobayashi, K. Sunazuka T, Akagawa KS, Omura S, Nakayama T, Suzuki K.. Leucomycin A₃, a 16-membered macrolide antibiotic, inhibits Influenza A virus infection and disease progression. *Journal of Antibiotics* 67:213-222, 2014
- 94) Nagata N, Saijo M, Kataoka M, Ami Y, Suzaki Y, Sato Y, Iwata-Yoshikawa N, Ogata M, Kurane I, Morikawa S, Sata T, Hasegawa H. Pathogenesis of fulminant monkeypox with bacterial sepsis after experimental infection with West African monkeypox virus in a cynomolgus monkey. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 7:4359-4370, 2014
- 95) Sukegawa S, Ihara Y, Yuge K, Rao S, Oka K, Arakawa F, Fujimura T, Murakami H, Kurazono H, Takahashi M, Morimatsu F. Effects of oral administration of heat-killed *Enterococcus faecium* strain NHRD IHARA in post-weaning piglets. *Animal Science Journal* 85 (4):454-460, 2014
- 96) Ohji S, Yamazoe A, Hosoyama A, Tsuchikane K, Ezaki T, Fujita N. The complete genome sequence of *Pseudomonas putida* NBRC 14164T confirms high intraspecies variation. *Genome Announcement* 2(1):e00029-14, 2014
- 97) Kikuchi M, Ito S, Yasuda M, Tsuchiya T, Hatazaki K, Takanashi M, Ezaki T, Deguchi T. Remarkable increase in fluoroquinolone-resistant *Mycoplasma genitalium* in Japan. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy* 69(9):2376-2382, 2014
- 98) Arai R, Miyoshi-Akiyama T, Okumura K, Morinaga Y, Wu M, Sugimura Y, Yoshiyama M, Okura M, Kirikae T, Takamatsu D. Development of duplex PCR assay for detection and differentiation of typical and atypical *Melissococcus plutonius* strains. *Journal of Veterinary Medical Science* 76(4):491-498, 2014

- 99) Yamashita A, Sekizuka T, Kuroda M. GcoGSA-BA: A Global Core Genome SNP Analysis for *Bacillus anthracis*. Health Secur. 2015 Jan-Feb;13(1):64-8. PubMed PMID: 25812430; PubMed Central PMCID: PMC4389694.
- 100) 梅山隆, 宮崎義継. 侵襲性カンジダ症の診断～血清診断～遺伝子診断. 侵襲性カンジダ症. pp115-117, 2014
- 101) 宮崎義継, 金子幸弘, 樽本憲人. V. 感染症検査・真菌. パーフェクトガイド検査値事典[第2版] p477-481, 2014
- 102) 梅山隆, 大野秀明, 宮崎義継. 真菌症～よく目にする真菌症から今後注意すべき真菌症まで-Aspergillus: 病態と抗原価の関連. 感染症内科 2(6):575-580, 2014
- 103) 金子幸弘, 浦井誠, 宮崎義継. III 診断・治療法から見た大切な真菌症, 4 治療薬の選択と投与. 目で見る真菌と真菌症. p192-202, 2014
- 104) 河野茂, 亀井克彦, 二木芳人, 宮崎義継. 座談会: 深在性真菌症の診断・治療ガイドラインを読み解く. 呼吸 33(5):435-443, 2014年
- 105) 大野秀明, 宮崎義継. 日本にも現れたクリプトコックス・ガッティ. 日経サイエンス 44(5):76p76, 2014
- 106) 田辺公一, 宮崎義継. 耐性病原体 up-to-date～耐性メカニズムから治療戦略まで～, 1 抗微生物薬に対する耐性メカニズム, 2 抗真菌薬耐性. 化学療法の領域 30(S-1):20-25, 2014
- 107) 宮崎義継, 砂川富正, 大石和徳. ミニ特集: 病原体サーベイランス体制とその利用, 国立感染症研究所の立場から. 小児科 55(4):403-406, 2014
- 108) 浦井誠, 金子幸弘, 宮崎義継. どう変わり, どう攻める? 深在性真菌症の新しい治療: 深在性真菌症における治療薬の選択の変化 ガイドライン改訂から見えてくる今後の治療展望. 感染と抗菌薬 17(1):5-13, 2014
- 109) 梅山隆, 大野秀明, 宮崎義継. ムーコル症: 診断の実際とピットフォール. 呼吸器内科 25(1):32-37, 2014
- 110) 樽本憲人, 金城雄樹, 北野尚樹, 渋谷和俊, 前崎繁文, 宮崎義継. 全身性カンジダ感染増悪における iNKT 細胞の関与. Medical Mycology Journal 55J:J115-J122, 2014
- 111) 大野秀明, 荒岡秀樹, 梅山隆, 金子幸弘, 宮崎義継. 接合菌症. 臨床検査 58(1):97-103, 2014
- 112) 中島典子. H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスに感染したヒトの臨床, 病理およびウイルス学的知見. 化学療法の領域 30:40-48, 2014
- 113) 中島典子, 佐藤由子, 片野晴隆, 長谷川秀樹. ウイルス性肺炎. 病理と臨床 32:1146-1153, 2014
- 114) 中島典子. オリゴヌクレオチドプローブを用いた新しい in situ ハイブリダイゼーション法. 呼吸 33:152-159, 2014
- 115) 高橋健太, 鈴木忠樹, 中島典子, 飛梅実, 佐藤由子, 片野晴隆, 長谷川秀樹. 脳炎・脳症の病理. Neuroinfection 神経感染症 19:32-39, 2014
- 116) 中島典子. インフルエンザ感染症の病理. 小児内科 45:1935-1941, 2014
- 117) 小林和夫. 2014. 細菌および真菌による呼吸器感染症(§9・2・1). 病原微生物学. 基礎と臨床(荒川宣親, 神谷茂, 柳雄介 編) p239-244, 東京化学同人, 東京
- 118) Miyazato A, Ohkusu K, Tachi Y, Hashikita G, Ezaki T, Mitsutake K. Two cases of infective endocarditis caused by *Streptococcus tigurinus*. 感染症学雑誌 88(3):304-306, 2014

2. 学会発表

- 1) 吉河智城, 福士秀悦, 谷英樹, 福間藍子, 谷口怜, 須田遊人, Harpal Singh, 江川和孝, 下島昌幸, 森川茂, 西條政幸. ワクシニアウイルス LC16m8 株を土台とした組換えワクシニアウイルス作出システムの確立. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 横浜 (2014.11)
- 2) 福間藍子, 福士秀悦, 吉河智城, 鈴木忠樹, 谷英樹, 谷口怜, 下島昌幸, 西條政幸. SFTS ウイルスの核蛋白質に対するモノクローナル抗体の作製と抗原検出 ELISA への応用. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜 (2014.11)
- 3) 西條政幸, 吉河智城, 福士秀悦, 谷英樹, 福間藍子, 谷口怜, 須田遊人, Harpal Singh, 前田健, 高橋徹, 森川茂, 下島昌幸. 重症熱性血小板減少症候群ウイルスの分子系統学的特徴とその地理的分布. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014年11月
- 4) Fukuma A, Fukushi S, Taniguchi S, Tani H,

- Yoshikawa T, Suzuki T, Hasegawa H, Saijo M, Shimojima M. Development of antigen-capture ELISA for the detection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus nucleoprotein. The 10th China-Japan International Conference of Virology. Changchun, China, 2014. 08
- 5) 西條政幸 .ヒト由来ウイルス感染症と動物由来ウイルス感染症の相違および感染症対策のあり方 . 第 90 回日本感染症学会総会・学術講演会, 仙台, 2016 年 4 月
 - 6) 森川茂, 棚林清, 西條政幸 . 国立感染症研究所の BSL-4 施設が大臣指定を受けるまでの道のりと今後の施設内での業務等について . 第 16 回日本バイオセーフティ学会学術総会・学術集会 . 大宮, 2016 年 10 月
 - 7) Yoshikawa Tomoki, Hikaru Fujii, Miho Shibamura, Natsumi Omura, Shizuko Harada, Souichi Yamada, Masayuki Saijo . Recovery of infectious vaccinia virus from a bacterial artificial chromosome, which retains the full-length viral genome of a strain, LC16m8 . 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2016 年 10 月
 - 8) Kazutaka Egawa, Masayuki Shimojima, Satoshi Taniguchi, Noriyo Nagata, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Takeshi Kurosu, Shuetsu Fukushi, Masayuki Saijo . Pathogenicity of human-origin Pteropine orthoreovirus (PRV) and bat-origin PRV in BALB/c mice . 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2016 年 10 月
 - 9) 伊藤(高山)睦代, 林昌宏, 森本金次郎, 堀谷まどか, 山口幸恵, 垣内五月, 塩田(飯塚)愛恵, Posadas Herrera Guillermo, 西條政幸 . アレナウイルスに対する非増殖型組換え狂犬病ウイルスワクチンの防御能 . 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2016 年 10 月
 - 10) 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
 - 11) 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
 - 12) 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
 - 13) 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
 - 14) 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
 - 15) 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
 - 16) 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
 - 17) 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
 - 18) 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
- 19) 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
- 20) 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 回日本獣医学学会学術集会, 藤沢 2016 年 9 月
- 21) 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, 福士秀悦, 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. 藤沢, 第 159 回日本獣医学学会学術集会, 藤沢 2016 年 9 月
- 22) Tani H, Shimojima M, Fukushi S, Yoshikawa T, Taniguchi S, Fukuma A, Morikawa S, Saijo M. Analyses of cell entry and fusion mechanisms of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. XVIth International Conference on Negative Strand Viruses. Italy, June 2015
- 23) Fukuma A, Fukushi S, Taniguchi S, Tani H, Yoshikawa T, Suzuki T, Hasegawa H, Morikawa S, Shimojima M, Saijo M. Development of nucleocapsid protein monoclonal antibody based antigen-capture ELISA for detection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. XVIth International Conference on Negative Strand Viruses. Italy, June 2015
- 24) 金城雄樹, 上野圭吾, 浦井誠, 金子幸弘, 大久保陽一郎, 清水公德, 大野秀明, 亀井克彦, 川本進, 澁谷和俊, 宮崎義継. シンポジウム 3 病原性真菌の感染成立機構, クリプトコックスの莢膜多糖による免疫回避機構の解析及びその制御法の開発. 第 58 回日本医真菌学会総会, 横浜. 2014 年 11 月
- 25) 梅山隆, 山越智, 田辺公一, 名木稔, 大野秀明, 宮崎義継. アスペルギルスの抗真菌薬耐性. 第 58 回日本医真菌学会総会, 横浜. 2014 年 11 月
- 26) 壇辻百合香, 大野秀明, 梅山隆, 上野圭吾, 大久保陽一郎, 田辺公一, 名木稔, 山越智, 金城雄樹, 杉田隆, 澁谷和利, 宮崎義継. マクロファージの貪食を指標とした *Cryptococcus gattii* 感染病態の評価. 第 58 回日本医真菌学会総会, 横浜. 2014 年 11 月
- 27) 上野圭吾, 金城雄樹, 大久保陽一郎, 清水公德, 金子幸弘, 浦井誠, 川本進, 亀井克彦, 大野秀明, 澁谷和俊, 宮崎義継. 高病原性 *Cryptococcus gattii* の感染防衛に寄与する樹状細胞ワクチンの作用. 第 58 回日本医真菌学会総会, 横浜. 2014 年 11 月
- 28) 浦井誠, 金子幸弘, 上野圭吾, 田辺公一, 梅山隆, 山越智, 金城雄樹, 大野秀明, 杉田隆, 宮崎義継. 高病原性 *Cryptococcus gattii* の莢膜多糖成分が免疫細胞に及ぼす影響. 第 58 回日本医真菌学会総会, 横浜. 2014 年 11 月
- 29) 田辺公一, 宮崎義継. カンジダ症における薬剤耐性. 第 97 回日本細菌学会関東支部総会, 東京, 2014 年 10 月
- 30) 上野圭吾, 金城雄樹, 大久保陽一郎, 浦井誠, 金子幸弘, 大野秀明, 亀井克彦, 澁谷和俊, 宮崎義継. 高病原性 *Cryptococcus gattii* の感染防衛に寄与する樹状細胞ワクチン. 第 63 回日本感染症学会東日本地方会学術集会, 東京, 2014 年 10 月
- 31) 名木稔, 田辺公一, 石野敬子, 梅山隆, 山越智, 大野秀明, 宮崎義継. 真菌の薬剤耐性の現状と課題. 第 63 回日本感染症学会東日本地方会学術集会, 東京, 2014 年 10 月
- 32) 本川奈々, 福田雄一, 今村圭文, 宮崎泰可, 泉川公一, 大野秀明, 柳原克紀, 宮崎義継, 早田宏, 田代隆良, 河野茂. 肺アスペルギローマとの鑑別が困難であった *Pseudallescheria boydii* による肺菌球症の 1 例. 第 62 回日本化学療法学会西日本支部総会・第 57 回日本感染症学会中日本地方会学術集会・第 84 回日本感染症学会西日本地方会学術集会 合同開催, 岡山, 2014 年 10 月
- 33) 多田明子, 山本剛伸, 藤本亘, 河口豊, 浦井誠, 梅山隆, 宮崎義継. 黒色菌糸症の 1 例. 第 263 回日本皮膚科学会岡山地方会. 岡山, 2014 年 9 月
- 34) 上野圭吾, 大久保陽一郎, 清水公德, 金子幸弘, 浦井誠, 水口裕紀, 奈良拓也, 川本進, 大野秀明, 澁谷和俊, 宮崎義継, 金城雄樹. 高病原性クリプトコックス症に対

- する樹状細胞ワクチンの効果. 第 25 回日本生体防御学会学術総会. 仙台, 2014 年 7 月
- 35) 田辺公一, 大野秀明, 名木稔, 浦井誠, 金子幸弘, 梅山隆, 山越智, 宮崎義継. カンジダ属の抗真菌薬耐性. 第 35 回関東医真菌懇話会. 東京, 2014 年 6 月
- 36) 田辺公一, 大野秀明, 名木 稔, 浦井 誠, 金子幸弘, 梅山隆, 山越智, 荒木光二, 皿谷健, 宮崎義継. ミカファンギン耐性 *Candida glabrata* 株の in vitro 性状解析. 第 35 回関東医真菌懇話会. 東京, 2014 年 6 月
- 37) 浦井誠, 金子幸弘, 稲垣浩司, 狩谷哲芳, 政本大二郎, 水谷真, 名木稔, 上野圭吾, 山越智, 田辺公一, 梅山隆, 大川原明子, 金城雄樹, 大野秀明, 宮崎義継. 腹膜透析中に発症した *Cryptococcus laurentii* による腹膜炎の一例. 第 35 回関東医真菌懇話会. 東京, 2014 年 6 月
- 38) 金城雄樹, 金子幸弘, 梅山隆, 川上和義, 大石和徳, 宮崎義継. マウスモデルでの肺炎球菌蛋白・糖脂質併用ワクチンの感染防御効果の解析. 第 88 回日本感染症学会学術講演会・第 62 回日本化学療法学会総会合同学会. 福岡, 2014 年 6 月
- 39) 梅山隆, 大野秀明, 田辺公一, 山越智, 名木稔, 宮崎義継. 症例から学ぶ感染症セミナーⅠ-コル症の真菌同定検査. 第 88 回日本感染症学会学術講演会・第 62 回日本化学療法学会総会合同学会. 福岡, 2014 年 6 月
- 40) 梅山隆, 山越智, 田辺公一, 名木稔, 金子幸弘, 金城雄樹, 大野秀明, 宮崎義継. 病原糸状菌 *Aspergillus fumigatus* の Polo-like キナーゼ遺伝子破壊株の菌系成長・分生子形成・抗真菌薬感受性への影響. 第 88 回日本感染症学会学術講演会・第 62 回日本化学療法学会総会合同学会. 福岡, 2014 年 6 月
- 41) 田辺公一, 大野秀明, 名木稔, 浦井誠, 金子幸弘, 梅山隆, 山越智, 知花博治, 亀井克彦, 宮崎義継. カンジダ属の抗真菌薬感受性の変貌. 第 88 回日本感染症学会学術講演会・第 62 回日本化学療法学会総会合同学会. 福岡, 2014 年 6 月
- 42) 浦井誠, 金子幸弘, 田辺公一, 梅山隆, 山越智, 金城雄樹, 大野秀明, 杉田隆, 宮崎義継. 高病原性 *Cryptococcus gattii* 由来 莢膜多糖の免疫細胞に及ぼす影響. 第 88 回日本感染症学会学術講演会・第 62 回日本化学療法学会総会合同学会. 福岡, 2014 年 6 月
- 43) 宮崎義継. 真菌感染症について: 薬剤耐性真菌. 第 3 回日本微生物学連盟市民公開フォーラム<薬が効かない感染症の話-薬剤耐性感染症の現状とその対策>. 東京, 2014 年 4 月
- 44) 梅山隆, 中村茂樹, 山越智, 名木稔, 壇辻百合香, 中山靖子, 浦井誠, 金城雄樹, 上野圭吾, 星野泰隆, 宮崎義継, 治療薬選択に必要な真菌の菌種同定. 第 59 回日本医真菌学会総会・学術集会, 札幌, 2015 年 10 月
- 45) 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 年 4 月
- 46) 山下明史, 関塚剛, 黒田誠. GcoGSA-BA NGS データから炭疽菌のコアゲノム系統解析を行うウェブアプリケーション. 第 88 回日本細菌学会総会, 岐阜市, 2015 年 3 月
- 47) Kenri T, Sekizuka T, Yamamoto A, Iwaki M, Takahashi M, Kuroda M, Shibayama K. Whole genome single-nucleotide polymorphism (SNP) Analysis of *Clostridium botulinum* isolates from botulism cases in Japan. 51th Interagency Botulism Research Coordinating Committee (IBRCC 2014), Philadelphia PA, USA. October 2014
- 48) 黒田誠. 微生物ゲノミクスと公衆衛生学的活用. 第 89 回日本感染症学会学術講演会 モーニングセミナー2, 京都, 2015 年 4 月
- 49) 黒田誠. NGS 技術による病原体ゲノム情報の大量取得と分子疫学解析への応用. 第 158 回日本獣医学会学術集会・シンポジウム. 十和田市, 2015 年 9 月
- 50) 黒田誠. NGS を応用した感染症診断の可能性. 第 64 回日本感染症学会東日本地方学術集会・第 62 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会, 札幌, 2015 年 10 月
- 51) Nakajima N, Sato Y, Kotani O, Suzuki T, Kamei T, Takahashi T, Sata T, Hasegawa H. Modified In situ hybridization AT-tailing to visualize the gene expression in formalin-fixed and

- paraffin-embedded tissues. 2015 USCAP Annual Meeting, USA, 2015
- 52) Hayashi K, Nakajima N, Sato Y, Katano H, Nagata N, Suzuki T, Tobiume M, Yoshida H, Suzuki Y, Kumasaka T, Sata T, Ariyoshi K, Hasegawa H. Correlations among histopathological characteristics, viral distribution, and cytokine/chemokine expression level within an individual with A/H1N1pdm09 induced ARDS. 2015 USCAP Annual Meeting, USA, 2015
- 53) Nakajima N, Thach HN, Tuan TA, Nam DH, Kumasaka T, Sato Y, Kawachi S, Hasegawa H, Dien TM, Hai LT. Pathological and molecular biological study of measles-associated pneumonia during measles outbreak in Vietnam in 2014. Pediatric Scientific Conference, Vietnam, 2015
- 54) Nakajima N, Thach HN, Tuan TA, Nam DH, Kumasaka T, Sato Y, Kawachi S, Hasegawa H, Dien TM, Hai LT. Post-mortem detection of adenovirus type 7 pneumonia in lungs of measles-associated pneumonia fatalities in a pediatric hospital, Hanoi, Vietnam. U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program, USA, 2016
- 55) Sakai K, Ami Y, Tahara M, Nakajima N, Kuroda M, Hasegawa H, Kawaoka Y, Tashiro M, Takeda M. The host protease TMPRSS2 play a major role for influenza virus replication in vivo. International Union of Microbiological Societies(IUMS 2014)-XIVth International congress of Bacteriology and Applied Microbiology, XIVth International Congress of Mycology, XVIth International Congress of Virology, Montreal, 2014
- 56) Kotani O, Asif N, Suzuki T, Iwata N, Nakajima N, Katano H, Hosomi T, Tsukagoshi H, Hasegawa H, Taguchi F, Shimizu H, Nagata N. Comparative analyses of the pathogenicity of two isolates of Saffold virus in neonatal mouse. International Picornavirus Meeting (Europic2014), Belgium, 2014
- 57) Nakajima N, Sato Y, Hasegawa H, Thach HN, Thuy NT, Dien TM, Liem NT, Kawachi S, Suzuki K. Pathological study of severe ARDS cases in NHP-Hanoi. International symposium and Teikyo-Harvard program, Tokyo, 2014
- 58) 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
- 59) 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
- 60) 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)
- 61) 中島典子, 佐藤由子, 熊坂利夫. 藤本嗣人, 花岡希, 片野晴隆, 鈴木忠樹, 長谷川秀樹. 麻疹に併発した肺炎で死亡した 19 例の肺組織の分子病理学的解析. 第 104 回日本病理学会総会, 名古屋, 2015 年 5 月
- 62) 岩附研子, 中島典子, 柴田昌利, 高橋健太, 佐藤由子, 木曾真紀, 山吉誠也, 伊藤睦美, 塩谷聡子, 大竹正剛, 寒川彰久, 伊東祐孝, 長谷川秀樹, 河岡義裕. マイクロミニピッグのインフルエンザ感染モデル動物としての有用性. 第 158 回日本獣医学会学術集会, 青森, 2015 年 9 月
- 63) Nakajima N, Ngoc TH, Sato Y, Hanaoka N, Fujimoto T, Suzuki T, Katano H, Thanh HL, Hasegawa H. Humann adenovirus serotype 7-associated pneumonia in fatal cases of measles. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会, 福岡 2015 年 11 月
- 64) Takeda M, Sakai K, Ami Y, Kitazawa M, Nakajima K, Natthan S, Anraku M, Nakajima N, Komase K, Takehara K, Hasegawa H, Tashiro M. A natural host model revealed the essential role of the host protease TMPRSS2 for respiratory paramyxovirus pathogenicity. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会, 福岡, 2015 年 11 月
- 65) Sakai K, Sekizawa T, Ami Y, Kitazawa M, Nakajima K, Nakajima N, Anraku M, Komase K, Takehara K, Hasegawa H, Tashiro M, Kuroda Ma, Takeda M. The stalk oligosaccharide of influenza A virus

- hemagglutinin protein modulators protease specificity for virus activation and pathogenicity. 第63回日本ウイルス学会学術集会, 福岡, 2015年11月
- 66) 酒井宏治, 網康至, 田原舞乃, 久保田耐, 安楽正輝, 中島典子, 高下恵美, 関塚剛史, 駒瀬勝啓, 信澤枝里, 小田切孝人, 前仲勝実, 黒田誠, 長谷川秀樹, 河岡義裕, 田代真人, 竹田誠. II型膜貫通型セリンプロテアーゼTMPRSS2は, HA開裂部位にmono-basicなアミノ酸配列をもつA型インフルエンザウイルスに対する肺内必須活性化酵素である. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014年11月
- 67) 渡辺登喜子, Gongxun Zhong, Colin Russell, 中島典子, 八田正人, Anthony Handson, 高橋健太, 渡辺真治, 今井正樹, 長谷川秀樹, 河岡義裕. スペイン風邪ウイルスに類似の鳥インフルエンザウイルスのパンデミックポテンシャル. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014年11月
- 68) 福本瞳, 高橋健太, 佐藤由子, 峰宗太郎, 保科しほ, 中島典子, 佐伯秀久, 長谷川秀樹, 黒田誠, 片野晴隆. 網羅的ウイルス検出法multivirus real-time PCRの改良と臨床検体への応用. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014年11月
- 69) 竹田誠, 中島典子, 河岡義裕. TMPRSS2は, インフルエンザの病原性発現に必須の宿主プロテアーゼである. 第88回日本感染症学会学術講演会, 福岡, 2014年4月
- 70) 竹田誠, 中島典子, 水田克巳. 宿主プロテアーゼTMPRSS2は, 急性呼吸器感染症ウイルスの生体内活性化酵素である. 第55回日本臨床ウイルス学会, 札幌, 2014
- 71) 仲里巖, 喜舎場由香, 新垣和也, 加藤誠也, 中島典子, 片野晴隆, 長谷川秀樹. 新生児心筋炎の3剖検例. 第103回日本病理学会総会, 広島, 2014年4月
- 72) 秋田英貴, 鄭子文, 中島典子, 星本和種, 笹島ゆう子, 瀧本雅文. 風疹感染胎盤の一例. 第103回日本病理学会総会, 広島, 2014年4月
- 73) 中島典子, 渡辺登喜子, 佐藤由子, 高橋健太, 鈴木忠樹, 田代真人, 河岡義裕, 長谷川秀樹. ヒトから分離されたH7N9亜型鳥インフルエンザウイルス感染動物モデルの病理学的解析. 第103回日本病理学会総会, 広島, 2014年4月
- 74) 長谷川秀樹, 亀井敏昭, 高橋徹, 鈴木忠樹, 片野晴隆, 中島典子, 森川茂, 西條政幸, 倉田毅. 日本国内で発生した重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の病理解析. 第103回日本病理学会総会, 広島, 2014年4月
- 75) 岩田奈織子, 福士秀悦, 福間藍子, 鈴木忠樹, 竹田誠, 田代真人, 長谷川秀樹, 永田典代. 中東呼吸器症候群コロナウイルスに対するマウスおよびラットの感受性について. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014年11月
- 76) Okumura K, Kato M, Kirikae T, Kayano M, Miyoshi-Akiyama T. Construction of a virtual *Mycobacterium tuberculosis* consensus genome and its application to data from a next generation sequencer. 114th General Meeting American Society for Microbiology, ボストン, 2014年5月
- 77) 山崎栄樹, 竹内薫, 廣井豊子, 倉園久生. サルモネラ属菌特異的遺伝子のジェノタイプングによる迅速血清型別法の開発. 第81回日本細菌学会北海道支部学術集会, 北海道, 2014年8月
- 78) 山崎栄樹, 竹内薫, 廣井豊子, 倉園久生. サルモネラ属菌特異的遺伝子のジェノタイプングによる迅速血清型別法の開発. 第157回日本獣医学会学術集会, 北海道, 2014年9月
- 79) Yamasaki E, Nakano M, Hirayama T, Kurazono H. Rapid serotyping method based on SNP profiles of a *Salmonella* specific gene. 49th U.S.-Japan Conference on Cholera and Other Enteric Bacterial Infections, フロリダ, 2015年1月
- 80) Yamasaki E, Takeuchi K, Kurazono H. Rapid serotyping method based on SNP profiles of a *Salmonella* specific gene. Global Health Institute 2015 researchers conference, チェンマイ, 2015年2月
- 81) 山崎栄樹, 倉園久生. サルモネラ属菌特異的遺伝子のジェノタイプングによる迅速血清型別法の開発. 第88回日本細菌学会総会, 岐阜, 2015年3月
- 82) 山崎栄樹, 綿引正則, 磯辺順子, 佐多徹太郎, 倉園久生. 国内EHEC食中毒事件患者の糞便中志賀毒素濃度の解析. 第89回日本細菌学会総会, 大阪, 2016年3月
- 83) 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, 2016 年 9 月
- 84) 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
- 85) 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, 2017 年 2 月
- 86) 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
- 87) Nakamura I, Matsumoto T. Improving hand hygiene behavior by scenario based simulation, ASM Microbe 2016, Boston, June 2016
- 88) 江藤亜紀子, 齋藤智也, 西山靖将, 横手公幸, 金谷泰宏. 種痘による長期免疫に寄与する抗原の同定および LC16m8 株接種に対する影響についての解析. 第 18 回ワクチン学会学術集会, 福岡, 2014 年 12 月
- 89) 江藤亜紀子, 齋藤智也, 横手公幸, 金谷泰宏. 天然痘ワクチン初回接種時の抗体産生
 応答に関する日米研究の比較. 第 19 回ワクチン学会学術集会, 犬山, 2015 年 11 月
- 90) 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, 2017 年 10 月
- 91) Hudson PN, Olson V, Smith S, Reed Z, Kondas A, Davidson W, Yokote H, Saijo M, Morikawa S, Kurane I, Damon I. Assessing the neutralization efficiency of serum from LC18m8-vaccinated individuals against two variola virus strains. 2014 International Poxvirus, Asfarvirus & Iridovirus Conference. Victoria, Canada, September 2014
- 92) 丸野真一, 金原知美, 新村靖彦, 横手公幸, 齋藤智也, 橋爪壮. 国産第三世代痘そうワクチン LC16m8 の WHO 推奨. 第 18 回日本ワクチン学会学術集会, 福岡, 2014 年 12 月
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
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

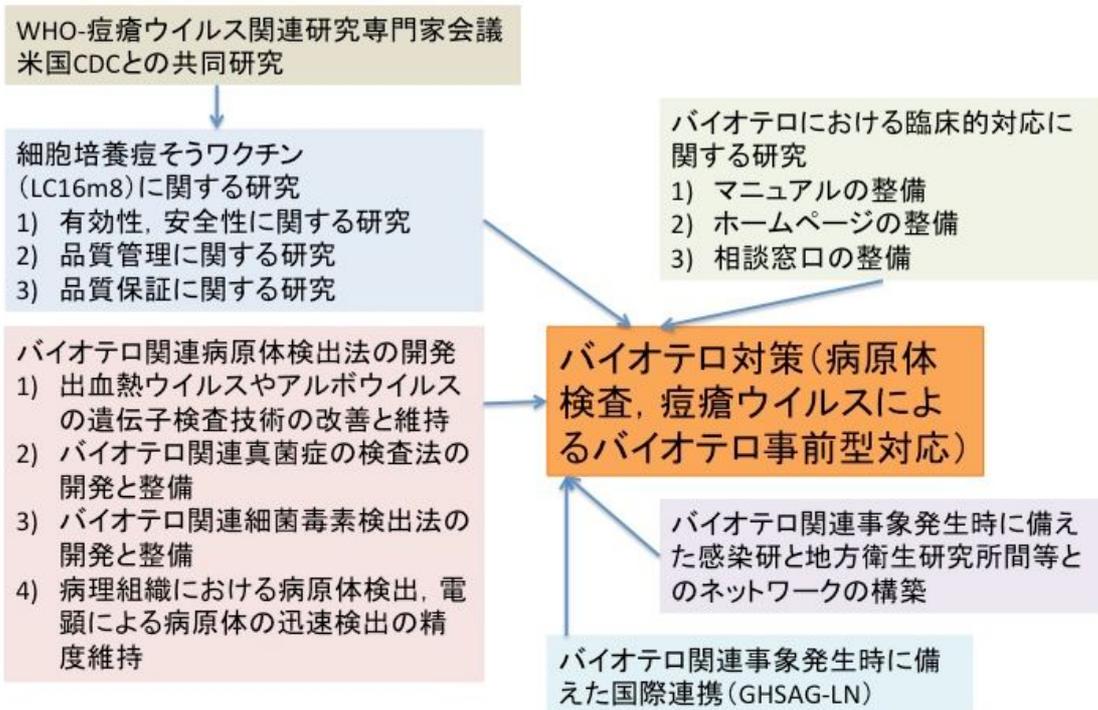


図. 本給班の活動は, 細胞培養痘そうワクチン (LC6m8 ワクチン) に関する研究, バイオテロ関連病原外
検出法の開発, バイオテロにおける臨床対応に関する研究, 国内関連機関との連携のあり方に関する研究,
国際連携に関連する研究を柱として実施された.

. 分担研究報告

平成 26 年度～平成 28 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金
(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)

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

分担報告書

研究統括，バイオテロ対策における国際連携のあり方の検討

所 属 国立感染症研究所ウイルス第一部
研究分担者 西條政幸

研究要旨：H26 年度には 2014-2015 年にかけて西アフリカでの流行のエボラウイルス病の原因となったエボラウイルス株に国立感染症研究所で整備されている .エボラウイルス検出用 PCR プライマー，プローブが「西アフリカ型」に対応できるかどうか検討した．従来のコンベンショナル PCR，リアルタイム PCR の両方で行うエボラウイルス検査で「西アフリカ型」の検出に対応できることを確認した．

H26-28 年度には，LC16m8 ワクチンの安全性という特徴を踏まえて，このワクチンを土台とした新規ワクチン開発の基盤を立ち上げる研究を実施した．具体的にはより簡便に外来遺伝子を LC16m8 ワクチンに挿入させる技術を開発した．また，日本で製造・備蓄されている痘そうワクチン LC16m8 の各ロット中の Middle Size Plaque (MSP) 形成ウイルス含有量を測定した．備蓄されはじめた初期の乾燥細胞培養痘そうワクチンロット V01～V05 には比較的高い割合で MSP 形成ウイルスが含まれているが，それ以降に製造され備蓄されているワクチンの各ロットにはほとんど含まれていないことが確認された．

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

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

研究協力者

福士秀悦・国立感染症研究所ウイルス第一部・主任
研究官

下島昌幸・国立感染症研究所ウイルス第一部・第一
室長

吉河智城・国立感染症研究所ウイルス第一部・主任
研究官

黒須剛・国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研
究官

緒方もも子・国立感染症研究所ウイルス第一部・研
究員

A. 研究目的

ウイルス性出血熱の診断方法の開発 (エボラウイルス病の遺伝子増幅法の評価) ,LC16m8 ワクチンの安全性に関する研究 (日本で製造・備蓄されている痘そうワクチン LC16m8 の各ロット中の Middle Size Plaque (MSP) 形成ウイルス含有量

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

B. 研究方法

1. エボラウイルス遺伝子検出法の再評価

国立感染症研究所で整備されてきたエボラウイルス検出用 PCR プライマー，プローブが「西アフリカ型」に対応できるかどうか検討した．

2. LC16m8 ワクチンの安全性に関する研究

1) LC16m8 ワクチンを土台とした組換えワクシニアウイルス作製システムの改良

相同組換えを利用する ,LC16 系統のワクシニアウイルスを土台とした組換えワクシニアウイルス作製システムの改良を試みた．具体的には，組換えワクチニアウイルス選択力

セット(薬剤耐性遺伝子と蛍光タンパク質を含む遺伝子カセット)を人為的に、ある薬剤を用いることで効率的かつ選択的に取り除く技術の開発を試みた。

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

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

3) バイオテロ関連国際会議への出席と情報収集

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

【倫理面への配慮】

遺伝子組換えに当っては、文部科学省の承認を得た上で行った。本研究にて行われた動物実験は国立感染症研究所動物実験委員会の審議を受け適切であると承認された。

C. 研究結果

1. エボラウイルス遺伝子検出法の再評価

塩基配列の比較から NP 遺伝子をターゲットにしたコンベンショナル PCR 用プライマーは「西アフリカ型」を検出できると考えられた。一方、L 遺伝子をターゲットにしたリアルタイム PCR 用プライマー、プローブにいくつかの塩基配列の違いが認められた。「西アフリカ型」に完全に一致した配列のプローブを用いたリアルタイム PCR と従来のプローブを用いたリアルタイム PCR は同等の感度で「西アフリカ型」を検出可能であった。これらの結果から、従来のコンベンショナル PCR、リアルタイム PCR の両方で行うエボラウイルス検査で「西アフリカ型」の検出に対応できると考えられた。

2. LC16m8 ワクチンの安全性に関する研究

1) LC16m8 ワクチンを土台とした組換えワクシニアウイルス作製システムの改良

薬剤(キサンチンのアナログである 2-チオキサンチン)を用いて選択圧をかけることで、組換えワクシニアウイルス選択カセットが脱落することを人為的に促進する「負の選択システム」を組み込んだ改良版組換えワクシニアウイルス作製システムを確立することに成功した。

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

細胞培養痘そうワクチンのロット V01 ~ V05 の MSP 形成ウイルス含有率は 3 ~ 4%であった。これらは 2003 年に製造されたものであった。一方、それ以降に製造され備蓄されているロット V06 ~ V14 の MSP 形成ウイルス含有率は 0.3%程度あるいはそれ以下であった。

3. バイオテロ関連国際会議への出席と情報収集

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

D. 考察

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

近年、特に新興感染症の流行が発見され、再興感染症の大規模流行の発生等が起こっている。中東で流行が確認された中東呼吸器症候群(MERS)や 2011 年に中国で流行が確認され 2013 年には日本でも流行が確認された重症熱性血小板減少症候群(SFTS)が、最近の新興感染症の

代表例として挙げられる。これらの病原体による感染症の致命率はともに約 30%を超え、嚴重な病原体管理、バイオセキュリティ上の対象病原体となる。一方、このような病原体による感染症の発生はテロリズムの結果として発生する可能性のある感染症との鑑別疾患となり、迅速で正確な診断システム開発が急務となる。2014年から2105年にかけて、西アフリカで未曾有の大規模エボラ出血熱流行が発生した。

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

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

E. 結論

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

F. 健康危険情報 特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yoshikawa T, Fukushi S, Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Toda S, Shimazu Y, Yano K, Morimitsu T, Ando K, Yoshikawa A, Kan M, Kato N, Motoya T, Kuzuguchi T, Nishino Y, Osako H, Yumisashi T, Kida K, Suzuki F,

Takimoto H, Kitamoto H, Maeda K, Takahashi T, Yamagishi T, Oishi K, Morikawa S, Saijo M, Shimojima M. Sensitive and specific PCR systems for the detection of both Chinese and Japanese severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strains, and the prediction of the patient survival based on the viral load. *Journal of Clinical Microbiology* 52(9):3325-3333, 2014

- 2) Taniguchi S, Maeda K, Horimoto T, Masangkay JS, Puentespina Jr. R, Alvarez J, Eres E, Cosico E, Nagata N, Egawa K, Singh H, Fukuma A, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Tsuchiaka S, Omatsu T, Mizutani T, Une Y, Yoshikawa Y, Shimojima M, Saijo M, Kyuwa S. First isolation and characterization of Pteropine orthoreoviruses in fruit bats in the Philippines. *Archives of Virology* (in press)
- 3) Iizuka I, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Fukushi S, Ogata M, Morikawa S, Hasegawa H, Mizuguchi M, Kurane I, Saijo M. A single vaccination of nonhuman primates with highly attenuated smallpox vaccine, LC16m8, provides long-term protection against monkeypox. *Japanese Journal of Infectious Diseases* (in press)

2. 学会発表

- 1) 吉河智城, 福士秀悦, 谷英樹, 福間藍子, 谷口怜, 須田遊人, Harpal Singh, 江川和孝, 下島昌幸, 森川茂, 西條政幸. ワクシニアウイルス LC16m8 株を土台とした組換えワクシニアウイルス作出システムの確立. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜 (2014.11)
- 2) 福間藍子, 福士秀悦, 吉河智城, 鈴木忠樹, 谷英樹, 谷口怜, 下島昌幸, 西條政幸. SFTS ウイルスの核蛋白質に対するモノクローナル抗体の作製と抗原検出 ELISA への応用. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜 (2014.11)
- 3) 西條政幸, 吉河智城, 福士秀悦, 谷英樹, 福間藍子, 谷口怜, 須田遊人, Harpal Singh, 前田健, 高橋徹, 森川茂, 下島昌幸. 重症熱性血小板減少症候群ウイルスの分子系統学的特徴とその地理的分布. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014.11)
- 4) Fukuma A, Fukushi S, Taniguchi S, Tani H, Yoshikawa T, Suzuki T, Hasegawa H, Saijo

- M, Shimojima M. Development of antigen-capture ELISA for the detection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus nucleoprotein. The 10th China-Japan International Conference of Virology. Changchun, China, (2014. 08)
- 5) 西條政幸. ヒト由来ウイルス感染症と動物由来ウイルス感染症の相違および感染症対策のあり方. 第 90 回日本感染症学会総会・学術講演会, 仙台, 2016 年 4 月
- 6) 森川茂, 棚林清, 西條政幸. 国立感染症研究所の BSL-4 施設が大臣指定を受けるまでの道のりと今後の施設内での業務等について. 第 16 回日本バイオセーフティ学会学術総会・学術集会. 大宮, 2016 年 10 月
- 7) Yoshikawa Tomoki, Hikaru Fujii, Miho Shibamura, Natsumi Omura, Shizuko Harada, Souichi Yamada, Masayuki Saijo. Recovery of infectious vaccinia virus from a bacterial artificial chromosome, which retains the full-length viral genome of a strain, LC16m8. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌 (2016 . 10)
- 8) Kazutaka Egawa, Masayuki Shimojima, Satoshi Taniguchi, Noriyo Nagata, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Takeshi Kurosu, Shuetsu Fukushi, Masayuki Saijo. Pathogenicity of human-origin Pteropine orthoreovirus (PRV) and bat-origin PRV in BALB/c mice. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌 (2016 . 10)
- 9) 伊藤 (高山) 睦代, 林昌宏, 森本金次郎, 堀谷まどか, 山口幸恵, 垣内五月, 塩田 (飯塚) 愛恵, Posadas Herrera Guillermo, 西條政幸. アレナウイルスに対する非増殖型組換え狂犬病ウイルスワクチンの防御能. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌 (2016 . 10)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

平成 26 年度～平成 28 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金
(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)

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

分担報告書

蚊媒介性ウイルスの鑑別検査法の開発：

ウエストナイルウイルスおよびアルファウイルス属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：近年熱帯亜熱帯地域を中心にデングウイルスやジカウイルス，チクングニアウイルスなどの蚊媒介性ウイルスが猛威をふるっている．デングウイルスやジカウイルスと同じフラビウイルス属に属するウエストナイルウイルスは，今なお米国で毎年流行しており，ウエストナイルウイルス感染症患者数は年間千人を超えている．ウエストナイルウイルス感染症に対する人用のワクチンおよび薬剤は存在しない．一方，チクングニアウイルスと同じアルファウイルス属に属するベネズエラ馬脳炎ウイルス，東部馬脳炎ウイルス，および西部馬脳炎ウイルスはヒトに対しても重篤な脳炎を引き起こす．これらのウイルス性疾患に対する薬剤も存在せず，ワクチンは一般には使用されていない．本研究では上記 4 種類のウイルスに対する高感度検出法の開発を行った．従来使用されてきたウエストナイルゲノム検出法では，すべての lineage には対応できなかったが，今回新たに作製したものはすべての lineage を高感度に検出可能なことが明らかとなった．アルファウイルス属馬脳炎ウイルスそれぞれに対する特異的遺伝子検出系を今回初めて構築し，それらが特異的にウイルスゲノムを増幅可能であることを確認した．

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

近年熱帯亜熱帯地域を中心にデングウイルスやジカウイルス，チクングニアウイルスなどの蚊媒介性ウイルスが猛威をふるっている．ウエストナイルウイルス感染症（ウエストナイル熱・ウエストナイル脳炎）は北米，ヨーロッパ，北・中央アフリカ，インドなどで患者が発生している蚊媒介性ウイルス感染症である．米国では 1999 年にウイルスが侵入後何度かの大流行が発生し，15 年以上経った 2016 年でも 1000 人を超える患者が発生している．ヒトのウエストナイルウイルス感染症に対するワクチンや薬剤はない．幸い日本国内への侵入は確認されていないが，諸要因により侵入した場

合に備え，万全の検査体制を整えておく必要がある．ウエストナイルウイルスには lineage が 6 種類（L1a, L1b, L1c/5, L2, L3, L4）存在する．北米で蔓延しているのは L1a である．これまでヒトへの病原性が比較的強いものは 2 種類（L1a, L1c/5）に限られると考えられてきた．しかし近年，L2 でも重篤な中枢神経症状を引き起こす株が同定され，さらに L1c/5 の分離株が以前よりも強毒性を示すとの報告がなされている．一方 L3 と L4 はヒトからは同定されていないが，今後どのように変異するかわからない．このような状況から，ウエストナイルウイルスの侵入に備え，すべての lineage に対応できるようにしなければならない．

そこでまずは現在私たちが使用している，L1a 用に設計されたウエストナイルウイルスゲノム検出系（リアルタイム RT-PCR）が他の lineage に対応可能かを調べた．また比較的最近報告されたウエストナイルウイルスゲノム検出系がどの程度広範の lineage に対応できるか検証した．さらに全 lineage をカバーできる新たなリアルタイム RT-PCR 系の開発を試みた．

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．これら 3 種の馬脳炎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

RT-PCR によるウエストナイルウイルスゲノム検出のための鑄型には，NY99 株 (L1a)，Egy101 株 (L1a)，g2266 株 (L1c/5)，FCG 株 (L2) を使用した．これらを一アフリカミドリザル由来株化腎細胞 Vero 細胞に感染させたのち，その培養上清からウイルス RNA を精製し使用した．新規 TaqMan プライマー・プローブセットの特異性および感度を調べるために，ウイルスゲノムの NS2A 領域 (500 ヌクレオチド) の DNA を受託合成し，それを鑄型に mMESAGE mMACHINE kit (Ambion) を使用して *in vitro* で RNA を合成した．合成 RNA は精製後 260nm での吸光度より濃度を算出し，適当に希釈し使用した．使用したプライマー・プローブを表 1 に示す．リアルタイム RT-PCR 反応は，RNA-direct Realyime PCR Master Mix (Toyobo) を使用して行った．ゲノムの増幅・検出・解析は StepOnePlus (Thermo) を使用した．また，SYBR Green I で検出する場合は，反応キットとして SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR kit (Thermo) を使用し，増幅・検出・解析は LightCycler 2.0 (Roche) を使用した．馬脳炎ウイルスの検出系については，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)．使用したプライマー・プローブを表 2 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・解析は前述のキットおよび機器を使
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

1. 現行のウエストナイルウイルスゲノム
検出用プライマー・プローブセットの
評価: 4 種類のウエストナイルウイル
ス株ゲノム RNA を使用して現行の 3 セ
ット (5NCR, Env, 3NCR) ですべての株
の検出が可能か調べた. すべてのセッ
トで L1a 株ゲノムを検出できた. しか
しいずれのセットでも L1c/5 株ゲノム
を検出できなかった L2 株については,
5NCR でのみ検出できたが感度は非常に
低かった. 上記のセットの他に, 日本
脳炎ウイルスゲノム検出用のプライマ
ー・プローブセット (NS5) を使用した
ところ, 4 種類のウエストナイルウイル
スすべてのゲノムを検出できた.
2. 最近報告されたウエストナイルウイル
スゲノム検出法の評価: 2013 年に発表
された 2 論文 (J. Virol. Methods 189:
321-327, J. Virol. Methods 193:
554-557) に示されているプライマー・
プローブセット (WN-LCV, NS2A) を使
用し, 4 種類のウエストナイル株のゲ
ノム検出を試みた. L1a 株の検出感度
は WN-LCV が優っていたが, L2 株につ
いては NS2A の方が高感度であった. し
かし共に L1c/5 株を検出できなかった.
3. 新規ウエストナイルウイルスゲノム検
出用プライマー・プローブセットの開
発: 全ての lineage のゲノムを増幅可
能なプライマー・プローブセットを設
計した. 塩基配列を比較したところ,
非構造蛋白質 NS2A 領域が lineage 間で
相同性が高かったため, この領域を選
択した. 前述の 4 種類のウエストナ
イルウイルスゲノムを用い, 様々なプ
ライマーを試み, 最終的に 1 セット
(3538p-3490r) に絞り込んだ. この新
規のセットは, すでに発表されている
NS2A セットと標的部位が近接してい
るが, 新規セットは L1c/5 株の増幅も可

能であった. しかしわずかに日本脳炎
ウイルスゲノムにも反応した. 次に,
全ての lineage から 1 株選択し, 各々
の NS2A 領域の合成 RNA を作製した. そ
れらを鋳型に使用し, 新規セットの検
出能を調べた. 高コピー数で鋳型に用
いた場合, 全ての lineage の RNA を検
出することができた. しかしわずかな
がら日本脳炎ウイルスと Usutu ウイル
スにも反応することがわかった. 一方
NS2A セットは L1a, L1b 以外の lineage
に対しては反応性が非常に低く, L1c/5
と L4 の RNA を検出することが出来な
かった. 各合成 RNA を段階希釈し, 検出
感度を調べた. 全ての lineage におい
て, 少なくとも 5 コピー/反応までは検
出できることが確認された. 一方日本
脳炎ウイルスと Usutu ウイルスにつ
いてはそれぞれ 5×10^5 コピー/反応, 5×10^4
コピー/反応以下では検出されないこ
とが確認された. 新規セットと合成 RNA
を使用して検量線を作成することによ
り, 3 種類のウエストナイルウイルス
株のコピー数の算出をした (図 1).

4. 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 (図 2).

D. 考察

平成 27 年度は, ウエストナイルウイル
スの全 lineage のゲノムを網羅的に検出
可能な TaqMan プライマー・プローブセ
ットの開発を試みた. その前に現行およ
びすでに公表されている検出系が全
lineage に対応できるのかをか調べた.
すると, ほとんどがアメリカ大陸で流行

している L1a やそれに近縁の L1b には反応するものの、他の lineage には反応しないか、反応しても非常に感度が悪いことが明らかとなった。しかし、L1a 以外の株によるウエストナイル感染症の流行がヨーロッパやインドで起こっていることから、これらの lineage への対応も疎かにすることはできない。今回私たちが開発したセットは、これまでのものと比べ高感度かつ広範のウイルスに対応できることが示され、非常に有用であると考えられる。ただ一つの欠点は、上記の優れた点があるがゆえに、ウエストナイルウイルスに近縁なウイルスも時に増幅してしまう点である。しかし、検出感度の差異は 10^4 - 10^5 もあり、注意すればあまり問題にならないと思われる。今後この新規セットが国内で広く用いられることを期待する。

平成 28 年度は、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

1. 本研究により、現行のウエストナイルウイルス用プライマー・プローブセッ

トでは、lineage によっては検出不能であることが明らかとなった。2) 最近報告されたウエストナイルウイルスゲノム検出法(TaqMan 法)の有用性について検討したが、現行セットと同様検出不能な lineage があることがわかった。

2. すべての lineage に対応可能な新規 TaqMan プライマー・プローブセットを開発した。本セットはすべての lineage のゲノムを高い感度で検出することができた。
3. 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. ウエストナイルウイルスゲノム検出用プライマー・プローブセット

Primer	Sequence	Probe
WN5 ' NCR - f	CAGGAGGGCCCGGYAARA	WNV5 ' NCR-p: FAM-CCGGGCTGTCAATATGCTAAAACGCG-TAMRA
WN5 ' NCR - r	ATCAAGGACAAYMCGCGG	
WNENV - f	TCAGCGATCTCTCCAAAG	WNENV-p: FAM-TGCCCGACC ATGGGAGAAGCT-TAMRA
WNENV - r	GGGTCAGCACGTTTGTTCATTG	
WN3 ' NC - f	CAGACCACGCTACGGCG	WN3 ' NC-p: FAM-TCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGAT-TAMRA
WN3 ' NC - r	CTAGGGCCCGGTGGG	
*WN-LCV-F1	GTGATCCATGTAAGCCCTCAGAA	S1: FAM-AGGACC CCACATGTT-MGB S2: VIC-AGGACCC CACGTGCT-MGB
*WN-LCV-R1	GTCTGACATTGGGCTTTGAAGTTA	
**NS2A-F	CCTTTTCAGYGGGCCTTCTG	WNVpNS2A-3612: FAM-AGCCAAGATCA GCATGCCAGC-TAMRA
**NS2A-3R	CAGTGTAAGTVATRCCCCCAA	
WNVcommon.345 1f	GGH TGT TGG TAT GGH ATG GA	WNVcom 3538p: FAM-ATGATTGAYCCTTTTCAGYGGGCCTTCTG-TAMRA
WNVcommon.359 Or	TC CTG GGT GGC CAA GAA CAC	

表 2. 馬脳炎ウイルスゲノム検出用プライマー・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		

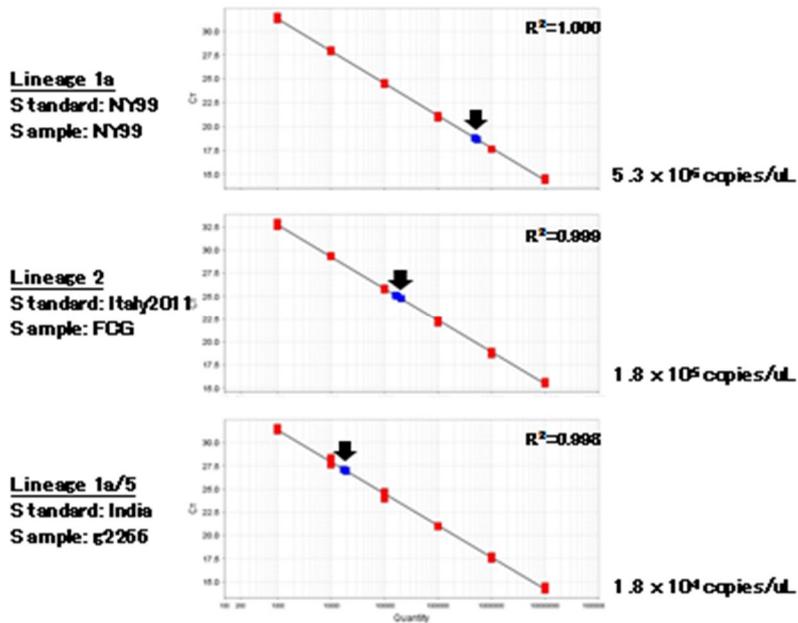


図1 新規プライマー・プローブセットを用いたウエストナイルウイルス培養上清サンプル中のゲノムコピー数の算出

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

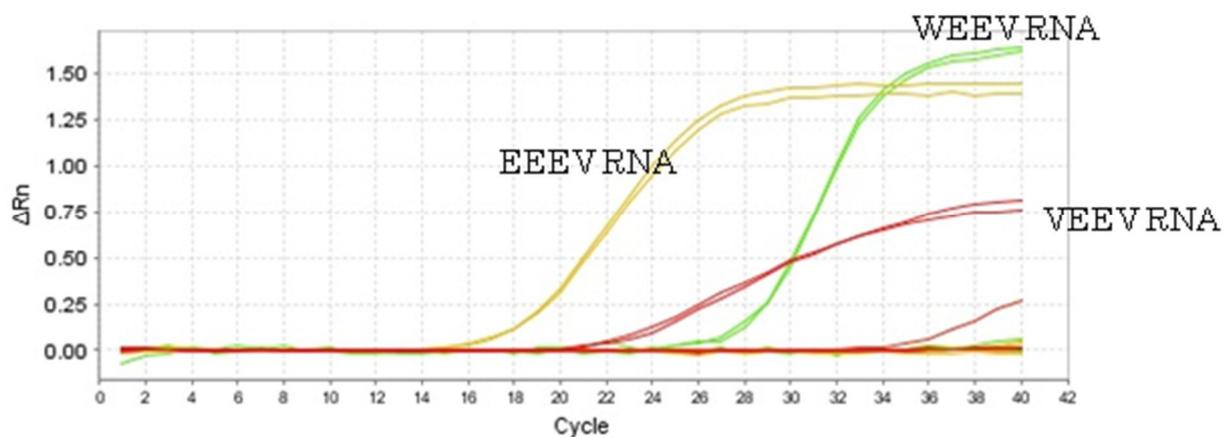


図2 馬脳炎ウイルスゲノムを用いた TaqMan 法の検討

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。エボラウイルスの遺伝子検出法の迅速性を得るため、conventional RT-PCR で用いていた試薬を最新のものと置き換え、また陽性 RNA コントロールを準備した。これにより conventional RT-PCR の感度の上昇と時間短縮を達することができた。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。これらの取り組みにより、国立感染症研究所ウイルス第一部で準備していたエボラウイルスの遺伝子検出はその精度と迅速性をより高めることができ、バイオテロ対策の一部ではあるが強固なものとする事ができた。

研究協力者

氏名・所属研究機関名・職名

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

谷口怜・国立感染症研究所・ウイルス第一部研究員

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 年度には、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事で検出に要する時間を短縮できるか検討した。陽性 RNA コントロールを準備し感度の評価を行なった。

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 について、標的としている L および NP 遺伝子の cDNA を pGEM-T ベクターに組み込み、T7 RNA polymerase を用いてそれぞれの遺伝子の RNA を in vitro 合成し陽性 RNA コントロールとした。またこれまで用いていた 2 ステップの RT-PCR (PCR の部分は Roche 社の Expanding High Fidelity PCR System) と、1 ステップの RT-PCR (Invitrogen 社の SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq) を用い、合成した陽性 RNA コントロールの希釈列からのエボラウイルス遺伝子の検出を行なった (図 1 および図 2)。

EQA のサンプルとして、Robert Koch Institute, Bernard Nocht 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 3)。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 1 ステップの 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なった。ウイルス遺伝子のコピー数を測定するための real time 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 antigen ELISA (標的は NP 蛋白質) も行なった。

【倫理面への配慮】

倫理面に配慮する状況なし

C. 研究結果

エボラウイルス(およびマールブルグウイルス)を検出する conventional RT-PCR で、従来は RNA 抽出後結果が得られるまで約 5 時間半が必要であった (図 1)。用いる試薬を変更したところ、結果が得られるまでの時間を約 2 時間 15 分に短縮 (3 時間以上の短縮) することができた (図 2)。この際に遺伝子検出の感度が下がることは無く、L 遺伝子の場合は 10^5 レベルから 10^1 レベルまで、NP 遺伝子の場合は 10^4 レベルから 10^1 レベルまで感度が上昇した (図 1 および図 2)。

Ebola Proficiency Panel-II の EQA 結果のまとめを図 3 に示した。

サンプル 11 種のうち、10 種はいずれも conventional 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 5 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6)。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7)。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commercial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8)。55のラボがcommercial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commercial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、commercial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。Commercial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。バ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大きい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バ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 (conventional RT-PCR, real time RT-PCR, antigen ELISA)の精度、迅速性はより高められ、バ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を改善しそ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.
 - 10) Singh H, Morita T, Suzuki Y, Shimojima M, Le Van A, Sugamata M, Yang M. High sensitivity, high surface area Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Biomed Mater Eng.* 2015;26(3-4):115-27. doi: 10.3233/BME-151561.
 - 11) 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 Jan 8.
 - 12) 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). pii: e00061-15.
 - 13) Serological evidence of human infection with Pteropine orthoreovirus in Central Vietnam. Singh H, Shimojima M, Ngoc TC, Quoc Huy NV, Chuong TX, Le Van A, Saijo M, Yang M, Sugamata M. *J Med Virol.* 2015 Dec;87(12):2145-8. doi: 10.1002/jmv.24274. Epub 2015 Jun 2.
 - 14) Harpal Singh, Kazuhiro Morioka, Masayuki Shimojima, Le Van An, Hizuru Nakajima, Akihide Hemmi, Katsumi Uchiyama, Shih Keng Loong, Sazaly AbuBakar, Ming

- Yang, Masami Sugamata. A Handy Field Portable ELISA-system for Rapid Onsite Diagnosis of Infectious Diseases. DOI: 10.7883/yoken.JJID.2015.417
- 15) Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Satoshi Taniguchi, Aiko Fukuma and Masayuki Saijo. Combination effects of ribavirin and interferons on severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection. *Virology Journal* (2015) 12:181. DOI 10.1186/s12985-015-0412-3
 - 16) Harpal Singh, Tomoki Yoshikawa, Takeshi Kobayashi, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Satoshi Taniguchi, Aiko Fukuma, Ming Yang, Masami Sugamata, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo. Rapid whole genome sequencing of Miyazaki-Bali/2007 Pteropine Orthoreovirus by modified rolling circular amplification with adaptor ligation - next generation sequencing. *Scientific Reports*. 2015 Nov 12;5:16517. doi: 10.1038/srep16517.
 - 17) Singh H, Shimojima M, Ngoc TC, Quoc Huy NV, Chuong TX, Le Van A, Saijo M, Yang M, Sugamata M. Serological evidence of human infection with Pteropine orthoreovirus in Central Vietnam. *J Med Virol*. 2015 Dec;87(12):2145-8. doi: 10.1002/jmv.24274. Epub 2015 Jun 2.
 - 18) Fukuma A, Tani H, Taniguchi S, Shimojima M, Saijo M, Fukushi S. Inability of rat DPP4 to allow MERS-CoV infection revealed by using a VSV pseudotype bearing truncated MERS-CoV spike protein. *Arch Virol*. 2015 Sep;160(9):2293-300. doi: 10.1007/s00705-015-2506-z. Epub 2015 Jul 4.
 - 19) Shinohara N, Matsumoto C, Chatani M, Uchida S, Yoshikawa T, Shimojima M, Satake M, Tadokoro K. Efficacy of the Mirasol pathogen reduction technology system against severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV). *Vox Sang*. 2015 Jun 1. doi: 10.1111/vox.12305. [Epub ahead of print]
 - 20) Singh H, Shimojima M, Fukushi S, Le Van A, Sugamata M, Yang M. Increased sensitivity of 3D-Well enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for infectious disease detection using 3D-printing fabrication technology. *Biomed Mater Eng*. 2015 Aug 17;26 Suppl 1:S45-53. doi: 10.3233/BME-151288.
 - 21) Singh H, Shimojima M, Shiratori T, An le V, Sugamata M, Yang M. Application of 3D Printing Technology in Increasing the Diagnostic Performance of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Infectious Diseases. *Sensors (Basel)*. 2015 Jul 8;15(7):16503-15. doi: 10.3390/s150716503.
- ## 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, 福士秀悦, 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
 - 13) Hideki Tani, Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushi, Tomoki Yoshikawa, Satoshi Taniguchi, Aiko Fukuma, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo: Analyses of cell entry and fusion mechanisms of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. XVIth International Conference on Negative Strand Viruses. Italy, 14-19 June 2015.
 - 14) Aiko Fukuma, Shuetsu Fukushi, Satoshi Taniguchi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Tadaki Suzuki, Hideki Hasegawa, Shigeru Morikawa, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo: Development of nucleocapsid protein monoclonal antibody based antigen-capture ELISA for detection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus.

XVIth International Conference on
Negative Strand Viruses. Italy,
14-19 June 2015.

- なし
- 2. 実用新案登録
なし
- 3. その他
特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得

コンベンショナルRT-PCR (Two stepの従来法)を用いた エボラウイルス遺伝子検出の検討

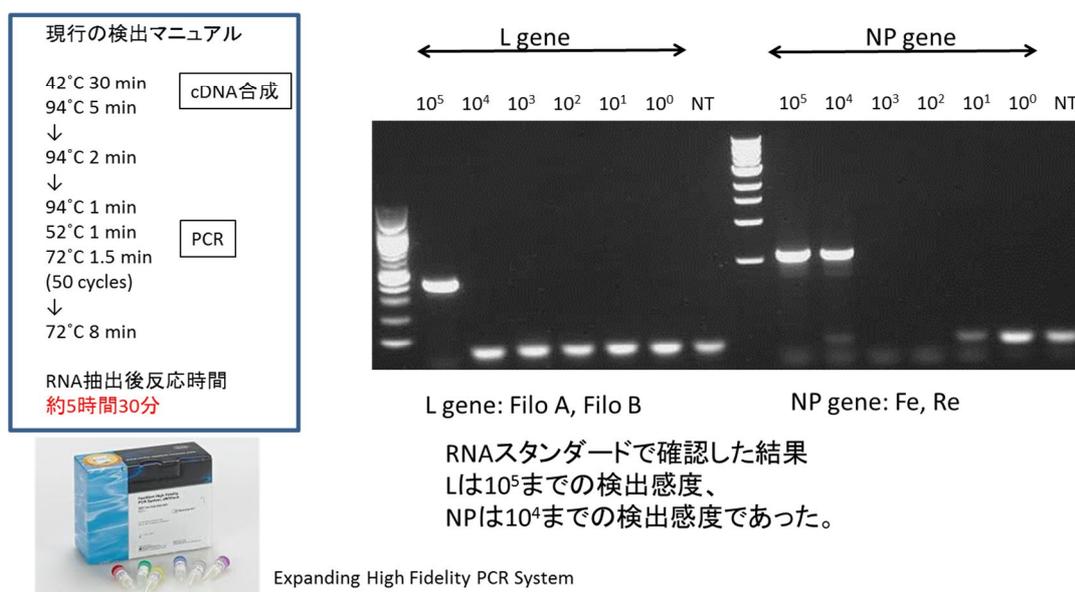


図 1. 従来のエボラウイルス遺伝子検出の conventional RT-PCR

コンベンショナルRT-PCR (One step)法を用いた エボラウイルス遺伝子検出の検討

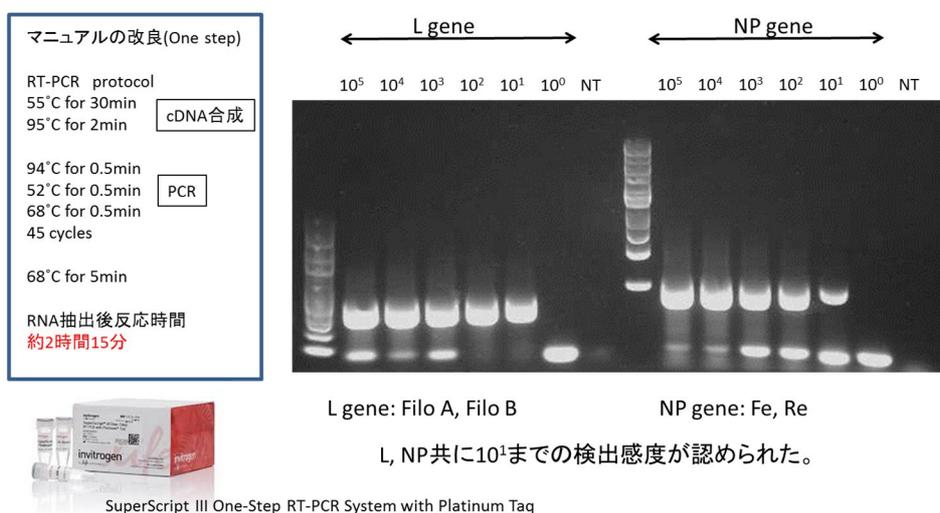


図 2. 改良版のエボラウイルス遺伝子検出の conventional RT-PCR



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 3. 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 Vivtoria	
11	Negative				

図 4. 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 / Guineédou	Ebola-Zaire / Guineédou	Ebola-Zaire / Guineédou	Marburg	neg.	neg.
Dilution	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴		

Sensitivity
Reproducibility/Specificity
Specificity
Contamination

- 参加したラボ数106



図5. Ebola Proficiency Panel-IIの正答と参加ラボ

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

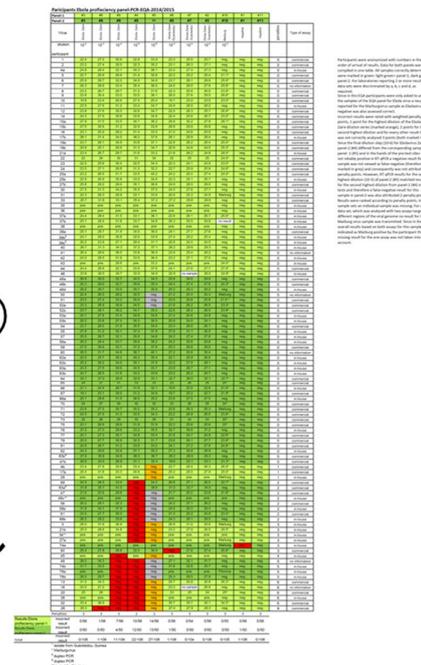


図6. 参加ラボの結果

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 / 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7. 国立感染症研究所ウイルス第一部による結果の判定

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8. 106のラボで用いられた遺伝子検出の方法と正答/誤答について

平成 26 年度～平成 28 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金
(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)

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

分担報告書

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

所 属 国立感染症研究所ウイルス第一部
研究分担者 吉河智城

研究要旨：天然痘ウイルスは撲滅されたものの、バイオテロへの利用が懸念されている。天然痘には痘そうワクチンが有効であり、我が国では万が一の為に保管されている一方、未接種者の割合は 40 代以下の人口のほぼ 100% に達する。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。平成 27 年度は天然痘ウイルスの代わりに、同じオルソポックスウイルスに属するエクトロメリアウイルス(ECTV)を用いたマウスモデル系を確立した。平成 28 年度は ECTV でマウスを攻撃直後に 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

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)と同じオルソポックスウイルスに属し、血清学的にも交差性がある。既に VACV Lister 株及び Modified Vaccinia Ankara (MVA)株を用いた場合、ECTV 暴露後 3 日目の投与であっても重症化を阻止できることが報告されている (J Infect Dis. 2009 Jan 1;199(1):39-48.)。そこで本研究では、弱毒化細胞培養痘そうワクチン株である LC16m8 の暴露後ワクチンとしての効果を検証し、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

B. 研究方法

ECTV を用いたマウスモデルを確立した。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 を決定した。次に 4 または 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

平成 27 年度 : C57BL/6 マウスに ECTV Hampstead 株を i.n. で接種した際の LD50 を決定した。1 群 5 匹のマウスに 10^4 から 10^1 PFU/20ul の Hampstead 株を i.n. で接種し, 観察, 体重測定を行った。その生存曲線を図 1 に示す。この結果を元にした LD50 は 1200PFU であった。そこで, それ以降の ECTV の攻撃実験には 4LD50 相当, 4800PFU の Hampstead 株を用いた。次に ECTV 暴露後に 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 4LD50 の ECTV で攻撃を行った。その後 0, 1, 2, 3 日後に 10^7 PFU/100ul の LC16m8 株を i.m. で接種し, 観察, 体重測定を行った。図 2, 図 3 にスケジュール及びその結果を示す。LC16m8 を接種した, いずれの群においても対照群である ECTV の攻撃のみを行った群と比較して有意な発症や重症化の阻止効果は確認できなかった。既報で示されていた ECTV 暴露後のワクチン効果が確認できなかったことから, 今度は既報で用いられていた Lister 株による実験を行った。1 群 5 匹のマウスに 4LD50 の ECTV で攻撃を行った。その後 -3, 0, 1, 2, 3 日後に 10^7 PFU/100ul の Lister 株を i.m. で接種し, 観察, 体重測定を行った。図 4, 図 5 にスケジュール及びその結果を示す。ECTV 攻撃 3 日前に Lister 株を接種した群は ECTV 感染に伴う臨床症状を示すことなく全頭生存した。一方で, それ以外の群, つまり ECTV 攻撃後に Lister 株を接種した場

合, いずれの群においても対照群である ECTV の攻撃のみを行った群と比較して有意な発症や重症化の阻止効果は確認できなかった。

平成 28 年度 : 前年度で得られた結果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, 私たちは 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 10^1 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 6 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 7 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, 私たちは 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 8 に実験スケジュール, 図 9 に結果を示す。統計学的に有意では無かったが, 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 10⁷PFU/100ul の LC16m8 株を i.m. で接種すると同時に 100ug/10ul の poly I:C を i.n. で接種し, 観察, 体重測定を行った。図 10 に実験スケジュール, 図 11 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

本研究は弱毒痘そうワクチン LC16m8 株の天然痘ウイルス暴露後ワクチンとしての発症・重症化阻止効果を検討し, 可能であれば改良を行うことを目的と

している。実験に使用不可能である天然痘ウイルスを用いる代わりに, ECTV を用いたマウスモデルを構築できたことが本研究を円滑に行うことができた要因の一つだと考えている。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。

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)

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

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

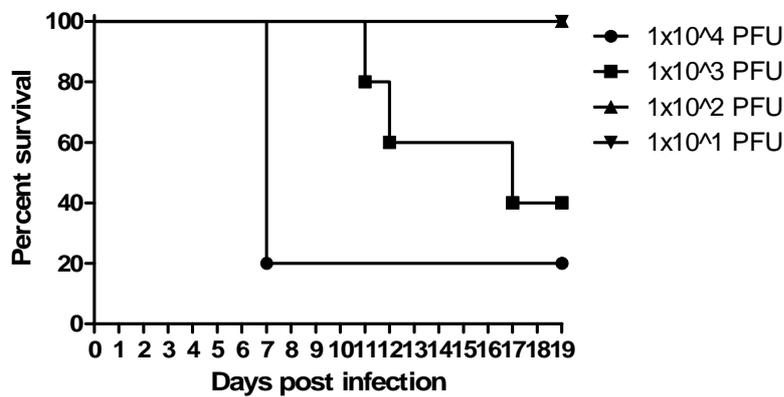


図 1. ECTV Hampstead 株を i.n. で接種された C57BL/6 マウスの生存曲線

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

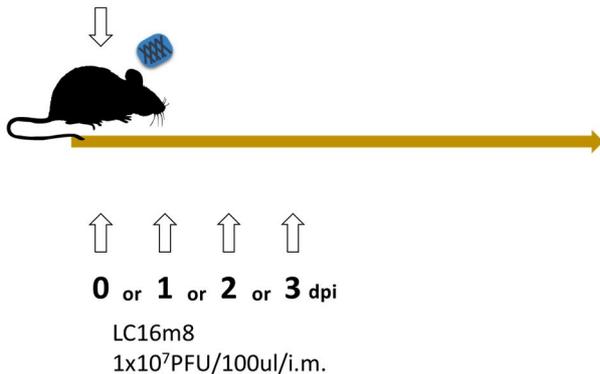


図 2. ECTV 暴露後に LC16m8 株を接種した場合の発症阻止効果の検討

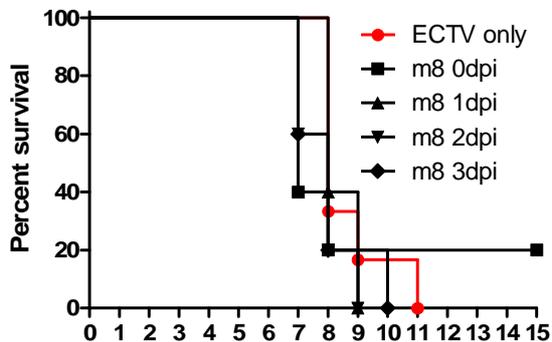
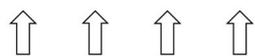


図 3. ECTV 暴露後に LC16m8 株を接種した場合の発症阻止効果の検討結果

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



-3 or 0 or 1 or 2 dpi

Lister

1×10^7 PFU/100ul/i.m.

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

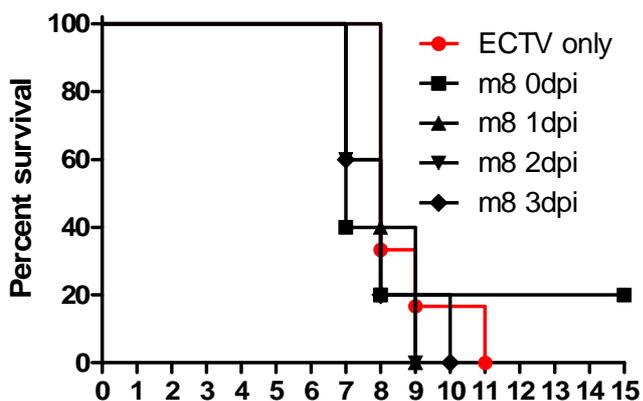


図 5. ECTV 暴露後に Lister 株を接種した場合の発症阻止効果の検討結果

表 1. 既報の研究と本研究の実験条件の違い

	既報	本研究
Mouse	C57BL/6	C57BL/6
ECTV strain	Moscow	Hampstead
Dose	3LD 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.

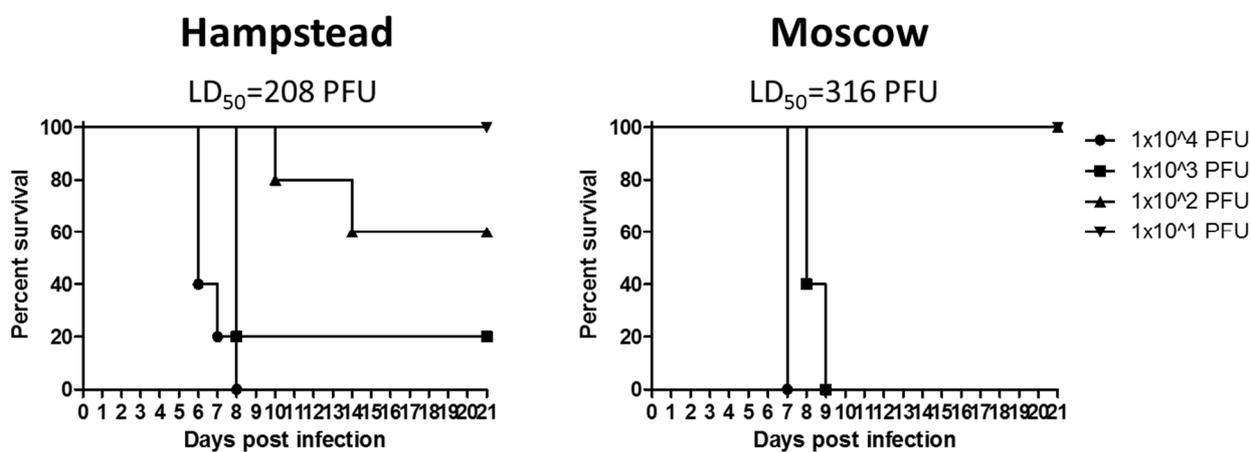


図 6. ECTV Hampstead 株, または Moscow 株を i.n. で接種された C57BL/6 マウスの生存曲線

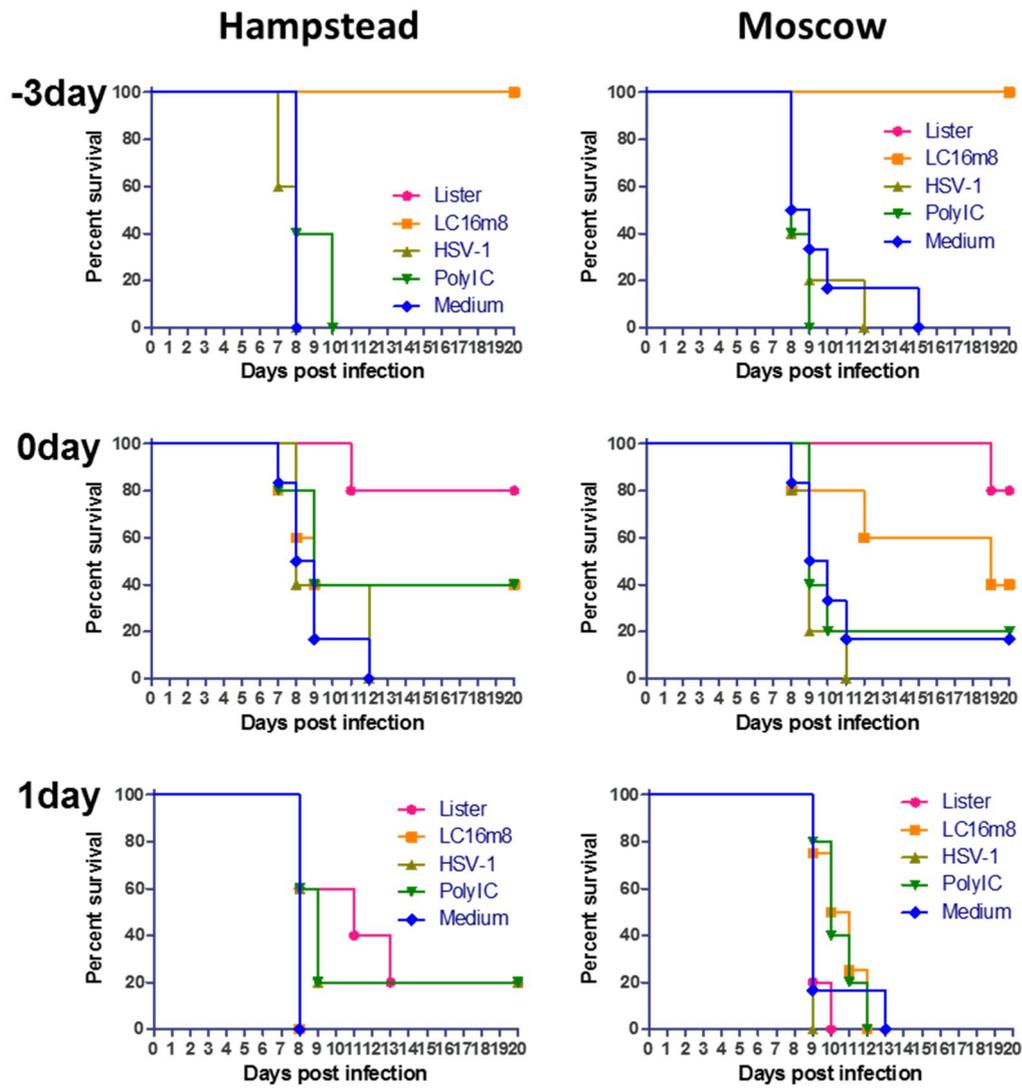


図7. ECTV 暴露前後にワクシニアウイルス等を接種した場合の発症阻止効果の検討結果

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 8. 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

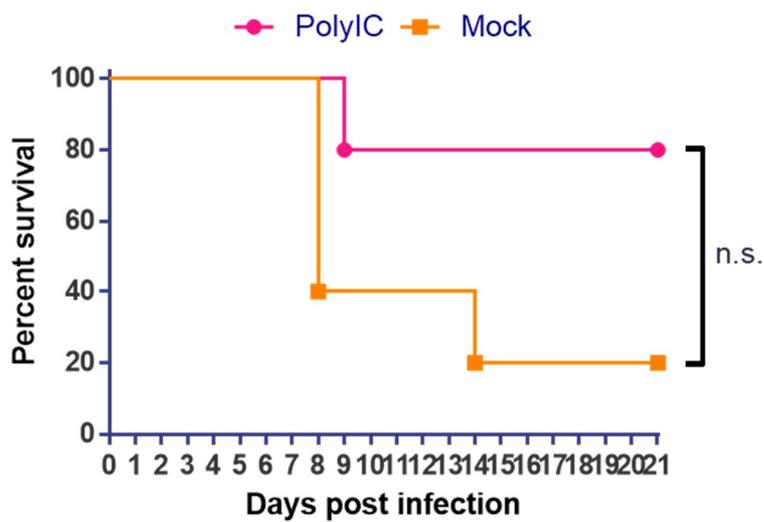


図 9. ECTV 暴露直後に i.n. で poly I:C を投与したときの発症阻止効果の検討結果

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 10. 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

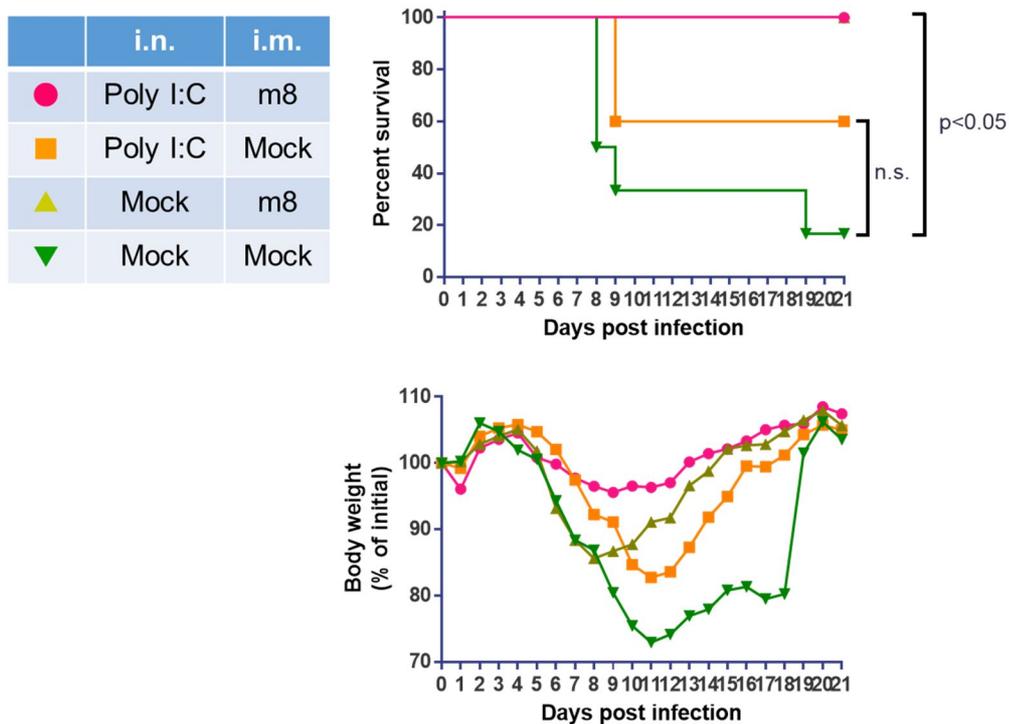


図 11. ECTV 暴露直後に i.n. で poly I:C、i.m. で LC16m8 を投与したときの発症阻止効果の検討結果

平成 26 年度～平成 28 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金
(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)

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

分担報告書

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．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を次世代シーケンス（NGS）解析により得られた．そこで，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 法を開発した．その結果，MSP の遺伝子変異特異的配列を 3' 末端とする primer を用いた PCR で，LC16m8 株と特定の MSP を識別できた．そこで，主要タイプの MSP を特異的に検出する PCR を用いて，LC16m8 株と MSP を混合したスパイク試験を実施した結果，MSP 含有率 0.01～1%まで検出できた．そこで，これらをリアルタイム PCR 化して，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・獣医科学部・
研究員

奥谷晶子・国立感染症研究・獣医科学部・
主任研究官

宇田晶彦・国立感染症研究・獣医科学部・
主任研究官

吉河智城・国立感染症研究・ウイルス第一
部・主任研究官

西條政幸・国立感染症研究・ウイルス第一
部・部長

倉根一郎・国立感染症研究・所長

横手公幸・化学及血清療法研究所

金原知美・化学及血清療法研究所

丸野真一・化学及血清療法研究所

新村靖彦・化学及血清療法研究所

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確認されている．Lister 株は 41 以上でも初代ウサギ腎細胞でのプラーク形成能があるのに対し，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。

B. 研究方法

1. MSPを検出するPCR法の検討

1) 概要

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

2) Mutation specific primer PCRによるMSPの検出法

このPCRでは片側のプライマーにMSPの型特異的プライマーを設定した（図2）。各MSPを特異的に検出できる条件検討（PCR enzyme、プライマーの長さ、 T_m 、cycles等）し、指摘条件を求めた。MSPとLC16m8株と段階混合してスパイク試験を行い、有用性を検討した。

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（図4）。この方法では、図4に示すように本来のprimer領域に1塩基のSNP特異的RNAを挟んで4塩基のmatching DNA塩基、1塩基のmismatch DNA塩基からなる(rhPCR用 primers)を用いてPCRを行う。RNAと相補的なDNA塩基があるとRNase H2によりprimerのDNA-RNA間が切断されて機能的primerとなりDNA合成反応がおきる。PCRに用いる酵素の3' 5' exonuclease活性による影響がない

ため、1)のmutation specific primer PCRによるPCRと比較してより特異的にSNPが同定できる特徴を持つ。本法により、非特異反応がより出難いMSP検出用PCR法の確立を試みた。

4) 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。

5) 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、定性的検出を試みた。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。

6) 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。

C. 研究結果

1. 概要

これまでの研究により, MSP は LC16m8 株の *b5r* 遺伝子の 1 塩基欠失を相補するような 1 ないし 4 塩基挿入によることが分かっている。また, MSP に認められる *b5r* 遺伝子の変異には 10 種類ほどあるが, 主要な MSP は 4 ないし 5 種類であり, これらが MSP の 85% 程度をしめる(図 1, 表 1)。このため, 幾つかの主要な MSP タイプの含有率を定量的に検出できる PCR を開発すれば, ワクチンの品質管理に応用可能と考えられる。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, 主要な MSP を構成する L1(267 位に A 挿入), L2(267 位に C 挿入), L4(271 位に T 挿入) 及び L5(274 に ATAC の重複で 4 塩基挿入)(図 1, 表 1) の検出を試みた。

2. Mutation specific primer PCR による MSP の検出法

primeSTAR GXL DNA polymerase (Takara)を用いる PCR を行い, L2 の検出が可能だった。しかし, PCR の cycle 数を増やすと, 非特異反応により非 MSP 由来産物も増幅された。そこで, 3' 5' exonuclease 活性の弱い Taq DNA polymerase 由来酵素による illustra puRe Taq ready-to-go PCR beads (GE healthcare) を用いて, 同様の PCR を行った結果, 特異性および感度が向上した。そこで, illustra puRe Taq ready-to-go PCR beads による PCR で主要な MSP を検出するための primers を検討した。その結果, L1(267A), L2(267C) および L4(272T) の MSP 検出に

は長さが 18mer の primer を, L5(274ATAC) の MSP 検出には 19mer の primer を用いた場合に, 最も効率よく MSP が検出できた(図 2)。これらの各 MSP 特異的 PCR は, LC16m8, LC16m0, 他の MSP に対しては 20 から 25cycles の PCR では非特異的増殖が認められず, 特異性が高いことが検証された(図 3)。しかし, 30cycles 以上の PCR では非特異的反応が生じた。

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

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

Mutation specific primer PCR では, 実用上十分の感度と特異度で MSP を検出できたが, より精度の高い PCR の開発を試みた。図 4 に示すような L1, L4 および L5MSP 特異的 DNA/RNA hybrid primers (rhPCR 用 primer) で rhPCR を行った。その結果, L1, L4 および L5 特異的 rhPCR とともに LC16m8, LC16m0, 他の MSP に対しては 40cycles でも非特異的増殖が認められず, 特異性が非常に高いことが検証された(図 5)。

4. 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 °C -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 3)。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 3)。

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 3)。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 4)。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が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。

5. 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。

D. 考察

LC16m8 ワクチンは、quasispecies からなる Lister 株による第 1 世代の calf lymph ワクチンの製造用ワクチニアウイルスから、低温培養により温度感受性株で小ポックサイズを形成する株として選択された LC16m8 株をウサギ初代腎細

胞で増殖して製造される。少ポックサイズは *b5r* 遺伝子の 274 位の G の欠損による 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明らかになった。そこで主要な MSP 遺伝子型を検出する PCR による MSP の定量法により、より簡便、迅速に MSP 含有率が求められ品質管理上有用であると思われる。

ただし、さらなる改良が必要である。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する必要がある。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し、その値と実際に MSP ウイルスと LC16m8 ウイルスの特徴の違いを利用して測定した値との相関を調べる必要がある。

E. 結論

本研究で開発された、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-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、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。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 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):431-4.
 - 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):131-4.
 - 16) Tani H, Fukuma A, Fukushi S, Taniguchi S, Yoshikawa T, Iwata-Yoshikawa N, Sato Y, Suzuki T,

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

Mweene AS, Morikawa S, Saijo M, Sawa H. Orthopoxvirus infection among wildlife in Zambia. J Gen Virol. 2015, 96 (Pt 2): 390-4.

Negative Strand Viruses. Italy, 14-19 June 2015.

2. 学会発表

- 1) 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)
- 2) Hideki Tani, Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushi, Tomoki Yoshikawa, Satoshi Taniguchi, Aiko Fukuma, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo: Analyses of cell entry and fusion mechanisms of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. XVIth International Conference on

- 3) Aiko Fukuma, Shuetsu Fukushi, Satoshi Taniguchi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Tadaki Suzuki, Hideki Hasegawa, Shigeru Morikawa, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo: Development of nucleocapsid protein monoclonal antibody based antigen-capture ELISA for detection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. XVIth International Conference on Negative Strand Viruses. Italy, 14-19 June 2015.

4) 他

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

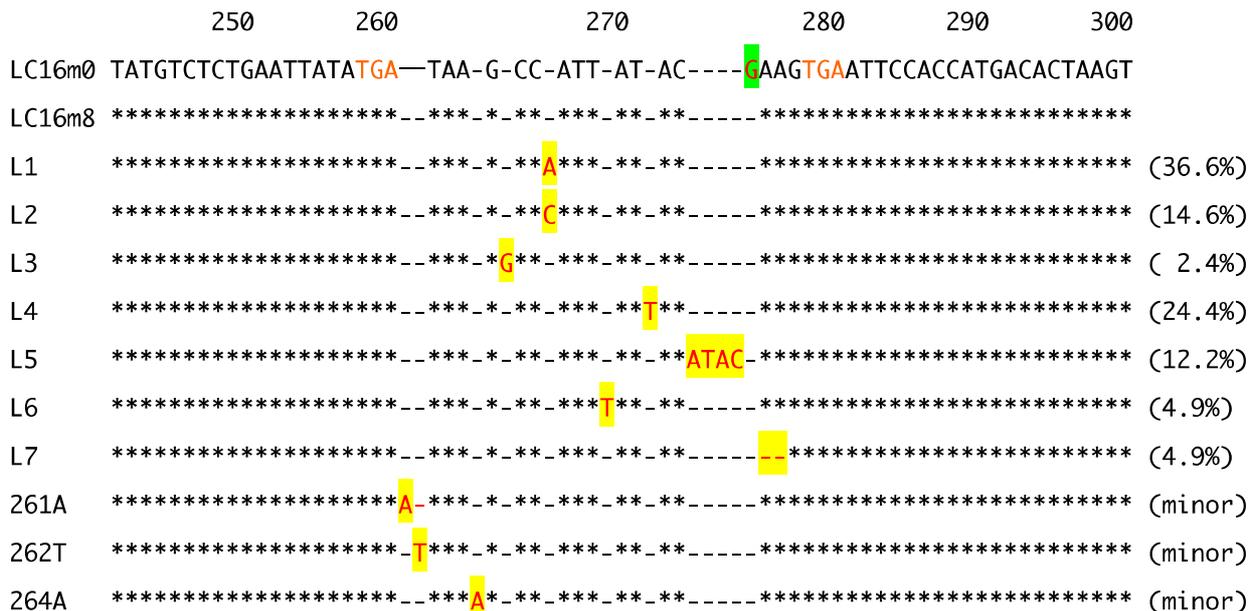


図 1. K1 から得られた MSP の遺伝子型とその出現頻度

注: 262A, 262T, 264A は Vero E6 細胞で継代後に得られた MSP

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

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

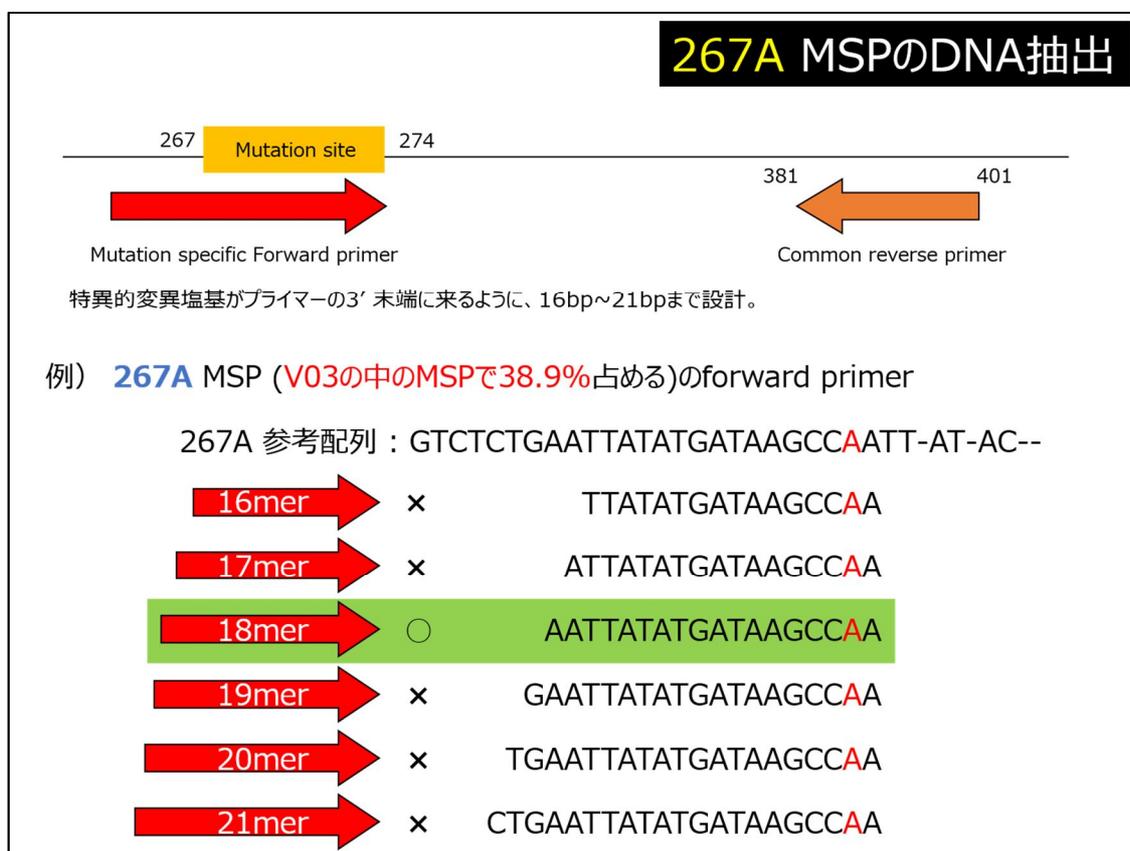


図 2. Mutation-specific primer PCR による L1 型 MSP の検出 . 種々の長さの変異部位特異的 primers を検討した結果 , L1, L2, L4 型 MSP には 18mer primer が , L5 型 MSP には 19mer primer が最適であった .

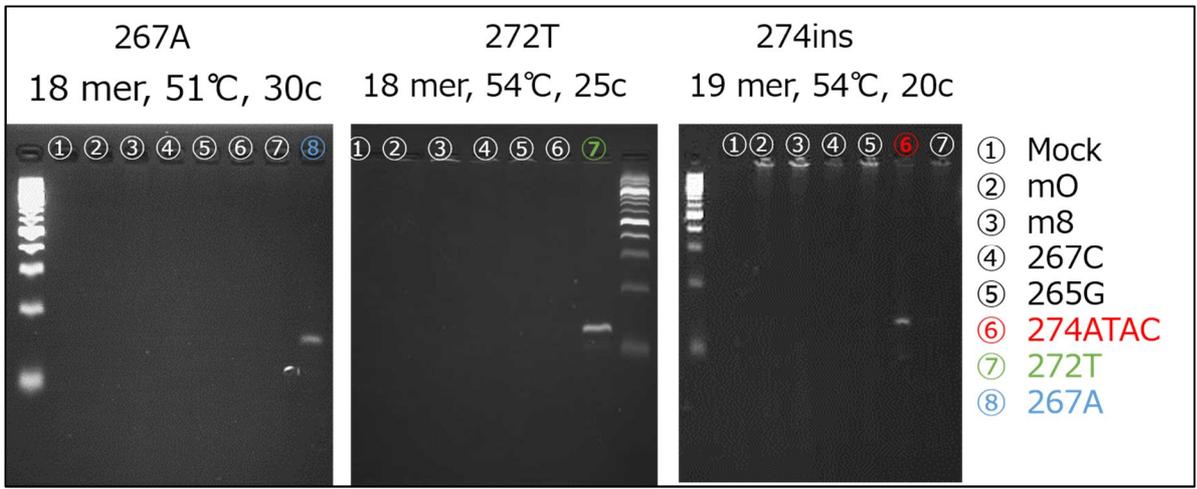


図 3. Mutation specific primer PCR による L1, L4 および L5 型 MSP の特異的検出 . 各 MSP 特異的 PCR は , LC16m8, LC16m0, 他の MSP に対しては 25cycles までは非特異的増殖が認められず , 特異性が高いことが確認された .

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

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

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

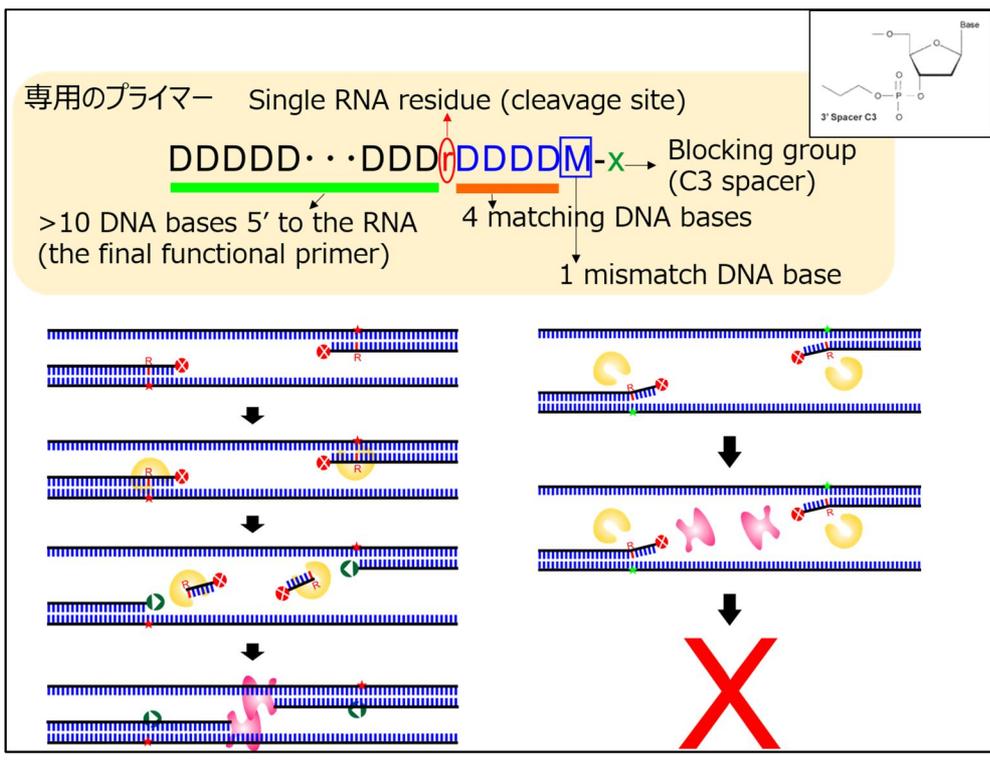


図 4. RNase H2-dependent PCR による MSP の検出 .

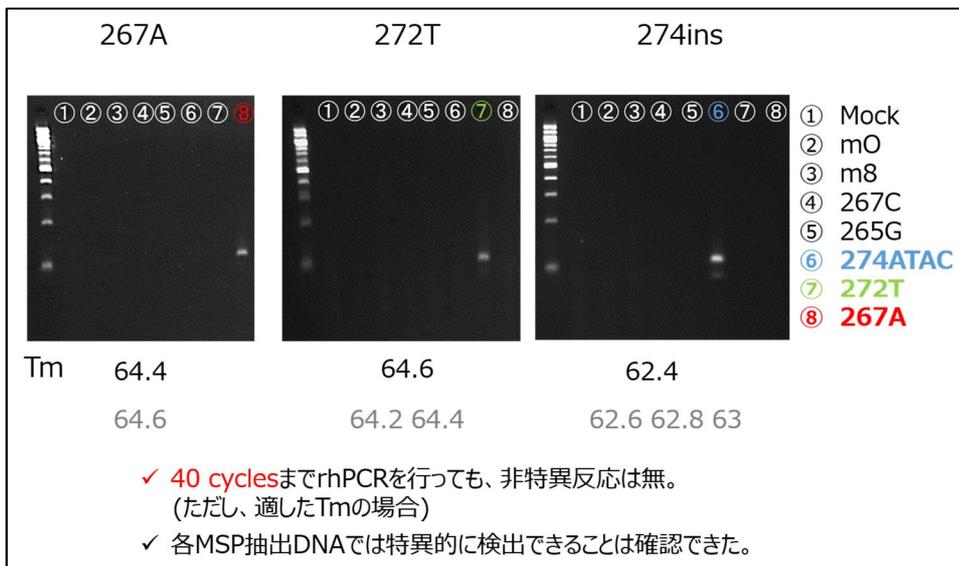


図 5. RNase H2-dependent PCR による L1, L4 および L5 型 MSP の検出 .

表 3. 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	3.2E+04					3.2E+04	3.2E+04	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

%	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	0.02	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 (%)		0.47	1.16	0.72	0.71	0.68	0.05	0.07	0.02	0.02	0.07	0.11	0.11	0.15	0.06
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	0.73	0.09	0.02	0.03	0.09	0.15	0.16	0.20	0.09
--------------------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

表 4. 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
------	------	------	------	------	------	------	------

平成 26 年度～平成 28 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金
(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)

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

分担報告書

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	宮崎義継 (平成 26 年度) 梅山隆 (平成 27-28 年度)

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*), ヒストプラズマ属 (*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. LAMP 法によるコクシジオイデスおよびヒストプラズマ DNA の高感度検出系の実用化を目指し, 乾燥ポリメラーゼの有用性を検討し, 菌体取り扱いマニュアル, プライマーセットおよび乾燥ポリメラーゼを使用した検査キットを作製して集団感染時に検査機関, 医療機関に送付する準備を整えた. 他の BSL3 真菌である *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Penicillium marneffei* および BSL2 真菌である *Cryptococcus gattii* の LAMP 法による検出系の開発・導入を行った.

研究協力者

平成 26 年度

田辺公一 国立感染症研究所・真菌部・室長
梅山 隆 国立感染症研究所・真菌部・主任研究官

名木 稔 国立感染症研究所・真菌部・研究員

平成 27-28 年度

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みられる感染症と誤解され, 公衆衛生の観点から重要性が認識されにくかった. しかし従前からクリプトコックス症やコクシジオイデス症, ヒストプラズ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*) とヒストプラズマ属 (*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 marneffei* 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ズマ, 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。平成 26 年度は、コクシジオイデス属およびヒストプラスマ属の簡便かつ高感度な検査法である LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法を実用化レベルまで改良する目的で、乾燥ポリメラーゼの有用性の検討、乾燥ポリメラーゼを用いた LAMP 法キットの作製、感度および特異度の検討、菌体取り扱いマニュアルの作製を行った。平成 27 年度は、*Cryptococcus gattii* の、平成 28 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. marneffei*、3 菌種について、簡便かつ高感度な検査法として、LAMP 法の検討を行った。

B. 研究方法

コクシジオイデス属検出のための LAMP 法の標的配列として、以前開発したコクシジオイデス特異的 PCR の標的である *Coi9-1* 領域を用いた。ヒストプラスマの標的配列として、M 抗原遺伝子を用いた。

Cryptococcus gattii 検出のための LAMP 法の標的配列として、*Cryptococcus* 属の莢膜の生合成に關与する *CAP10* 遺伝子の配列を選択した。その他、既に論文で報告されている *CAP59* (Lucas S et al., Clin. Microbiol. Infect., 2010)、もしくは *URA5* (Amirabadi AR et al., Af. J. Biotechnol. 2012) を利用した LAMP プライマーについても検討した。

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面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. marneffei 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。検討に用いた *C. immitis*、*Coccidioides posadasii* および *H. capsulatum* の DNA は臨床分離株 (各 4 株ずつ) から抽出した。陰性コントロールとして *Aspergillus fumigatus* AfS35 と *Candida albicans* SC5314 の DNA を用いた。反応後、UV 写真撮影装置で検出を行った。

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

1. BSL3 真菌リソースの整備

国立感染症研究所において、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 *C. immitis*、*C. posadasii*、*H. capsulatum*、*P. brasiliensis*、*B. dermatitidis*、*P. marneffei* について菌株を分与していただいた。

2. 乾燥ポリメラーゼを使用した LAMP 法の検討

C. immitis および *H. capsulatum* から抽出したゲノム DNA を定量し、10 倍ずつの希釈系列を作製して、乾燥ポリメラーゼを使用して LAMP 反応を行った。(図 1)。

C. immitis、*H. capsulatum* 共に 2 時間反応後の検出限界は 1 pg であった。以前行った、通常のポリメラーゼ (液体品) を用いた検討では、*Coccidioides* の検出限界は 100 fg であった (*Histoplasma* は未実施)。乾燥ポリメラーゼを用いた場合、感度は 10 分の 1 に低下したが、十分に高感度であると考え、長期間保存可能である乾燥ポリメラーゼを用いて今後の検討を行うこととした。

3. 複数の *Coccidioides* および *Histoplasma* 臨床分離株を用いた検討

これまで、*Coccidioides* 属、*Histoplasma* 属各 1 株ずつの臨床分離株から抽出し、精製した DNA を用いて LAMP 法の検討を行ってきた。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を用いて LAMP 法の特異度を検討した(図 2)。また、検査をより簡便に行うことを目的に、DNA 抽出には精製キット等を使用せず、エタノール滅菌後の菌体を煮沸した上清を用いた。今回検討した各 4 株の臨床分離株は全て LAMP 法によって検出された。また、120 分の反応では陰性コントロールは検出されなかった。さらに、DNA を精製することなく菌体煮沸液を用いて検査を行うことができることがわかった。

4. *Cryptococcus gattii* の LAMP 法の開発

まず最初に、既に論文に報告されている CAP59 の配列を利用した LAMP 法の導入を試みた。*C. neoformans* (血清型 A および D) もしくは *C. gattii* (血清型 B および C) の 2 菌種を区別することが出来る LAMP プライマーとして報告されている。論文中の塩基配列を参考にプライマーを合成し、*C. neoformans* H99 株および *C. gattii* R265 株から抽出したゲノム DNA に対して LAMP 反応を行った。1 時間の反応では、*C. neoformans* もしくは *C. gattii* を特異的に検出することが出来たが、2 時間の反応では、水のみ陰性コントロールにおいて検出されており(データ未掲載)、本プライマーによる検出系ではバックグラウンドが高い可能性が高く、高感度検出系としては不適当であることが示唆された。

次に、別の論文で報告されている *URA5* の配列を利用した LAMP 法の導入を試みた。また、CAP10 遺伝子の配列を利用して 4 種類の LAMP プライマーセットを設計した。すべてのプライマーセットにおいて、1 時間以内に検出可能であった(図 3)。その中でも CAP10-25-Cg および CAP10-25-Cn プライマーセットでは 30 分で検出可能であった。また、CAP10-13-Cn プライマーセットを用いると、*C. neoformans* 特異的な検出が可能であった。いずれも、水のみ陰性コントロールにおいては、2 時間後でも検出されなかった。

5. *P. brasiliensis* 検出のための LAMP 法の導入

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 4)。

6. *P. marneffeii* 検出のための LAMP 法の導入

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 5)。

7. *B. dermatitidis* 検出のための LAMP 法の開発

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 6)。

D. 考察

本研究では、過去の研究で開発したコクシジオイデス属・ヒストプラスマ属の実用化、*C. gattii*、*P. brasiliensis*、*B. dermatitidis*、*P. marneffeii* を検出するための LAMP 法の開発・導入を検討した。*C. gattii* および *C. neoformans* の LAMP 法については、2 菌種の鑑別は困難であるが、検出においては実用に耐えうるプライマーセットを開発できた。*P. brasiliensis* および *P. marneffeii* 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 法によるコクシジオイデス属およびヒストプラスマ属の迅速診断キットを作製し，集団感染時に検査機関，医療機関に送付する準備を整えた．LAMP 法による *Cryptococcus gattii* , *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

- 1) Saraya T, Tanabe K, Araki K, Yonetani S, Makino H, Watanabe T, Tsujimoto N, Takata S, Kurai D, Ishii H, Miyazaki Y, Takizawa H, Goto H. Breakthrough invasive *Candida glabrata* in patients on micafungin: a novel *FKS* gene conversion correlated with sequential elevation of MIC. *Journal of Clinical Microbiology*. 52(7):2709-2712, 2014.
- 2) Urai M, Kaneko Y, Niki M, Inoue M, Tanabe K, Umeyama T, Fukazawa H, Ohno H, Miyazaki Y. Potent drugs that attenuate anti-*Candida albicans* activity of fluconazole and their possible mechanisms of action. *J Infect Chemother*. 20(10):612-615, 2014.
- 3) Ikeda I, Ohno T, Ohno H, Miyazaki Y, Nishimoto K, Fukushima S, Makino T, Ihn H. A case of *Fusarium paronychia* successfully treated with occlusive dressing of antifungal cream. *J Dermatol*. 41(4):340-2, 2014.
- 4) Tarumoto N, Kinjo Y, Kitano N, Sasai D, Ueno K, Okawara A, Izawa Y, Shinozaki M, Watarai H, Taniguchi M, Takeyama H,

Maesaki S, Shibuya K, Miyazaki Y. Exacerbation of Invasive *Candida albicans* Infection by Commensal Bacteria or a Glycolipid Through IFN- Produced in Part by iNKT Cells. *J Infect Dis*. , 2014.

- 5) Seki M, Ohno H, Gotoh K, Motooka D, Nakamura S, Iida T, Miyazaki Y, Tomono K. Allergic bronchopulmonary mycosis due to co-infection with *Aspergillus fumigatus* and *Schizophyllum commune*. *IDCases*. 1:5-8, 2014.
- 6) 梅山 隆, 宮崎義継. 侵襲性カンジダ症の診断～血清診断～遺伝子診断. . 侵襲性カンジダ症. 115-117, 2014年, 医薬ジャーナル社.
- 7) 宮崎義継, 金子幸弘, 樽本憲人. V. 感染症検査・真菌. パーフェクトガイド検査値事典 [第2版]. 477-481, 2014年, 総合医学社.
- 8) 梅山 隆, 大野秀明, 宮崎義継. 真菌症-よく目にする真菌症から今後注意すべき真菌症まで-*Aspergillus*: 病態と抗原価の関連. *感染症内科*. 2(6):575-580, 2014年.
- 9) 金子幸弘, 浦井 誠, 宮崎義継. III 診断・治療法から見た大切な真菌症 4 治療薬の選択と投与. 目で見る真菌と真菌症. p192-202, 2014年, 医薬ジャーナル社, 大阪.
- 10) 河野 茂, 亀井克彦, 二木芳人, 宮崎義継. 座談会: 深在性真菌症の診断・治療ガイドラインを読み解く. *呼吸*. 33(5):435-43, 2014年.
- 11) 大野秀明, 宮崎義継. 日本にも現れたクリプトコックス・ガッティ. *日経サイエンス*. 44(5):76p76, 2014年, 日本経済新聞出版社, 東京.
- 12) 田辺 公一, 宮崎義継. 耐性病原体 up-to-date ~ 耐性メカニズムから治療戦略まで ~ ,I 抗微生物薬に対する耐性メカニズム, 2 抗真菌薬耐性. *化学療法の領域*. 30(S-1):20-5, 2014年.
- 13) 宮崎義継, 砂川富正, 大石和徳. ミニ特集: 病原体サーベイランス体制とその利用, 国立感染症研究所の立場から. *小児科*. 55(4):403-6, 2014年.
- 14) 浦井 誠, 金子幸弘, 宮崎義継. どう変わり, どう攻める? 深在性真菌症の新しい治療: 深在性真菌症における治療薬の選択の変化 ガイドライン改訂から見てくる今後の治療展望. *感染と抗菌薬*. 17(1):5-13,

2014年.

- 15) 梅山 隆, 大野秀明, 宮崎義継. ムーコル症: 診断の実際とピットフォール. 呼吸器内科. 25(1):32-7, 2014年.
 - 16) 樽本憲人, 金城雄樹, 北野尚樹, 渋谷和俊, 前崎繁文, 宮崎義継. 全身性カンジダ感染増悪における iNKT 細胞の関与. Med Mycol J. 55J:J115-J122, 2014年.
 - 17) 大野秀明, 荒岡秀樹, 梅山 隆, 金子幸弘, 宮崎義継. 接合菌症. 臨床検査. 58(1):97-103, 2014年.
 - 18) Yurika Ikeda-Dantsuji, Hideaki Ohno, Koichi Tanabe, Takashi Umeyama, Keigo Ueno, Minoru Nagi, Satoshi Yamagoe, Yuki Kinjo, Yoshitsugu Miyazaki. Interferon- promotes phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* but not *Cryptococcus gattii* by murine macrophages. Journal of Infection and Chemotherapy. 21: 831-836, 2015
 - 19) Shotaro Okachi, Keiko Wakahara, Daizo Kato, Takashi Umeyama, Tetsuya Yagi, Yoshinori Hasegawa. Massive mediastinal cryptococcosis in a young immunocompetent patient. Respiriology Case Reports. 3 : 95-98, 2015
2. 学会発表
- 1) 金城雄樹, 上野圭吾, 浦井 誠, 金子幸弘, 大久保陽一郎, 清水公德, 大野秀明, 亀井克彦, 川本 進, 渋谷和俊, 宮崎義継. シンポジウム 3 病原性真菌の感染成立機構クリプトコックスの莢膜多糖による免疫回避機構の解析及びその制御法の開発. 第 58 回日本医真菌学会総会. 11月1-2日, 2014年, 横浜.
 - 2) 梅山 隆, 山越 智, 田辺公一, 名木 稔, 大野秀明, 宮崎義継. アスペルギルスの抗真菌薬耐性. 第 58 回日本医真菌学会総会・学術集会. 11月1-2日, 2014年, 横浜.
 - 3) 壇辻百合香, 大野秀明, 梅山 隆, 上野圭吾, 大久保陽一郎, 田辺公一, 名木 稔, 山越智, 金城雄樹, 杉田 隆, 渋谷和利, 宮崎義継. マクロファージの貪食を指標とした *Cryptococcus gattii* 感染病態の評価. 第 58 回日本医真菌学会総会・学術集会. 11月1-2日, 2014年, 横浜.
 - 4) 上野圭吾, 金城雄樹, 大久保陽一郎, 清水公德, 金子幸弘, 浦井 誠, 川本 進, 亀井克彦, 大野秀明, 渋谷和俊, 宮崎義継. 高病原性 *Cryptococcus gattii* の感染防衛に寄与する樹状細胞ワクチンの作用. 第 58 回日本医真菌学会総会. 11月1-2日, 2014年, 横浜.
 - 5) 浦井 誠, 金子幸弘, 上野圭吾, 田辺公一, 梅山 隆, 山越 智, 金城雄樹, 大野秀明, 杉田 隆, 宮崎義継. 高病原性 *Cryptococcus gattii* の莢膜多糖成分が免疫細胞に及ぼす影響. 第 58 回日本医真菌学会総会. 11月1-2日, 2014年, 横浜.
 - 6) 田辺公一, 宮崎義継. カンジダ症における薬剤耐性. 第 97 回日本細菌学会関東支部総会. 10月30-31日, 2014年, 東京.
 - 7) 上野圭吾, 金城雄樹, 大久保陽一郎, 浦井誠, 金子幸弘, 大野秀明, 亀井克彦, 渋谷和俊, 宮崎義継. 高病原性 *Cryptococcus gattii* の感染防衛に寄与する樹状細胞ワクチン. 第 63 回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 10月29-31日, 2014年, 東京.
 - 8) 名木 稔, 田辺公一, 石野敬子, 梅山 隆, 山越 智, 大野秀明, 宮崎義継. 真菌の薬剤耐性の現状と課題. 第 63 回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 10月29-31日, 2014年, 東京.
 - 9) 本川奈々, 福田雄一, 今村圭文, 宮崎泰可, 泉川公一, 大野秀明, 柳原克紀, 宮崎義継, 早田 宏, 田代隆良, 河野 茂. 肺アスペルギローマとの鑑別が困難であった *Pseudallescheria boydii* による肺菌球症の 1 例. 第 62 回日本化学療法学会西日本支部総会・第 57 回日本感染症学会中日本地方会学術集会・第 84 回日本感染症学会西日本地方会学術集会 合同開催. 10月23日-25日, 2014年, 岡山.
 - 10) 多田明子, 山本剛伸, 藤本亘, 河口 豊, 浦井 誠, 梅山 隆, 宮崎義継. 黒色菌糸症の 1 例. 第 263 回日本皮膚科学会岡山地方会. 9月21日, 2014年, 岡山.
 - 11) 上野 圭吾, 大久保陽一郎, 清水公德, 金子幸弘, 浦井 誠, 水口裕紀, 奈良拓也, 川本 進, 大野秀明, 渋谷和俊, 宮崎義継, 金城雄樹. 高病原性クリプトコックス症に対する樹状細胞ワクチンの効果. 第 25 回日本生体防御学会学術総会. 7月9-11日, 2014年, 仙台.
 - 12) 田辺公一, 大野秀明, 名木 稔, 浦井 誠, 金子幸弘, 梅山 隆, 山越 智, 宮崎義継. カンジダ属の抗真菌薬耐性. 第 35 回関東医真菌懇話会. 6月7日, 2014年, 東京.

- 13) 田辺公一, 大野秀明, 名木 稔, 浦井 誠, 金子幸弘, 梅山 隆, 山越 智, 荒木光二, 皿谷 健, 宮崎義継. ミカファンギン耐性 *Candida glabrata* 株の in vitro 性状解析. 第 35 回関東医真菌懇話会. 6 月 7 日, 2014 年, 東京.
- 14) 浦井 誠, 金子幸弘, 稲垣浩司, 狩谷哲芳, 政本大二郎, 水谷 真, 名木 稔, 上野圭吾, 山越 智, 田辺公一, 梅山 隆, 大川原明子, 金城雄樹, 大野秀明, 宮崎義継. 腹膜透析中に発症した *Cryptococcus laurentii* による腹膜炎の一例. 第 35 回関東医真菌懇話会. 6 月 7 日, 2014 年, 東京.
- 15) 金城雄樹, 金子幸弘, 梅山 隆, 川上和義, 大石和徳, 宮崎義継. マウスモデルでの肺炎球菌蛋白・糖脂質併用ワクチンの感染防御効果の解析. 第 88 回日本感染症学会学術講演会・第 62 回日本化学療法学会総会合同学会. 6 月 18 日-20 日, 2014 年, 福岡.
- 16) 梅山 隆, 大野秀明, 田辺公一, 山越智, 名木稔, 宮崎義継. 症例から学ぶ感染症セミナームーコル症の真菌同定検査. 第 88 回日本感染症学会学術講演会・第 62 回日本化学療法学会総会合同学会. 6 月 18 日-20 日, 2014 年, 福岡.
- 17) 梅山 隆, 山越 智, 田辺公一, 名木稔, 金子幸弘, 金城雄樹, 大野秀明, 宮崎義継. 病原糸状菌 *Aspergillus fumigatus* の Polo-like キナーゼ遺伝子破壊株の菌系成長・分生子形成・抗真菌薬感受性への影響. 第 88 回日本感染症学会学術講演会・第 62 回日本化学療法学会総会合同学会. 6 月 18 日-20 日, 2014 年, 福岡.
- 18) 田辺公一, 大野秀明, 名木 稔, 浦井 誠, 金子幸弘, 梅山 隆, 山越 智, 知花博治, 亀井克彦, 宮崎義継. カンジダ属の抗真菌薬感受性の変貌. 第 88 回日本感染症学会学術講演会第 62 回日本化学療法学会総会合同学会. 6 月 18-20 日, 2014 年, 博多.
- 19) 浦井 誠, 金子幸弘, 田辺公一, 梅山 隆, 山越 智, 金城雄樹, 大野秀明, 杉田 隆, 宮崎義継. 高病原性 *Cryptococcus gattii* 由来荚膜多糖の免疫細胞に及ぼす影響. 第 88 回日本感染症学会学術講演会第 62 回日本化学療法学会総会合同学会. 6 月 18-20 日, 2014 年, 博多.
- 20) 宮崎義継. 真菌感染症について: 薬剤耐性真菌. 第 3 回日本微生物学連盟市民公開フォーラム<薬が効かない感染症の話-薬剤耐性感染症の現状とその対策>. 4 月 26 日, 2014 年.
- 21) 梅山 隆, 中村茂樹, 山越 智, 名木 稔, 壇辻百合香, 中山靖子, 浦井 誠, 金城雄樹, 上野圭吾, 星野泰隆, 宮崎義継, 治療薬選択に必要な真菌の菌種同定, 第 59 回日本医真菌学会総会・学術集会, 札幌, 10 月 9-10 日, 2015
- 22) 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

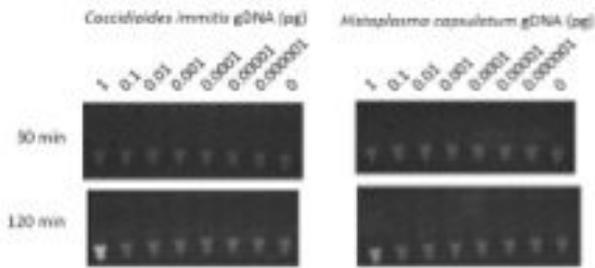


図 1. 乾燥ポリメラーゼを使用した LAMP 法の感度測定 .

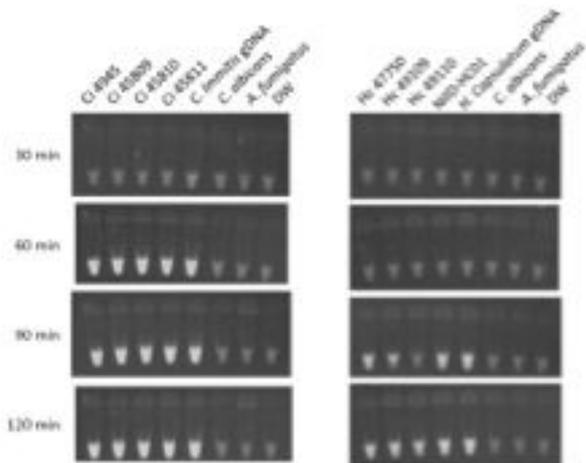


図 2. 複数の臨床分離株を用いた LAMP 法特異度の検討 .

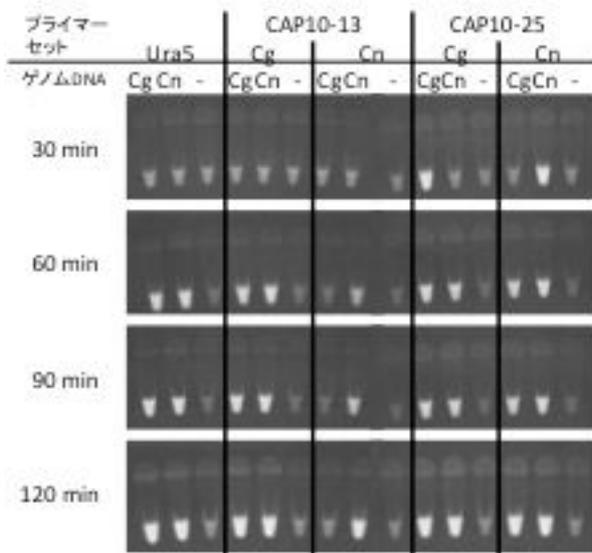


図 3. *C. neoformans* (Cn, H99 株) および *C. gattii* (Cg, R265 株) のゲノム DNA を用いた LAMP 法プライマーセットの検討 .

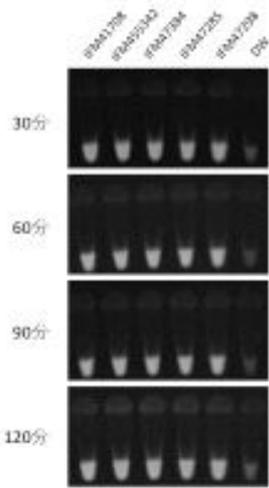


図 4 . *P. brasiliensis* の LAMP 法検出 .

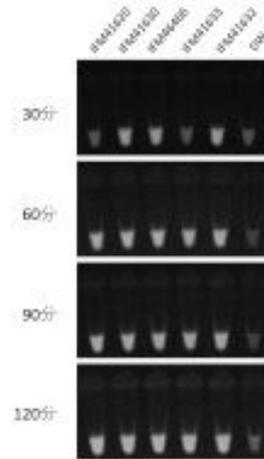


図 5 . *P. marneffei* の LAMP 法検出 .

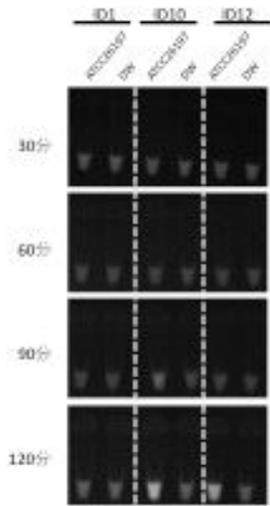


図 6 . *B. dermatitidis* の LAMP 法検出 .

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かな対処法を立案・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かなアプローチの一つと考える．次世代ゲノムシーケンサー（Next-generation DNA sequencer: NGS）のパフォーマンスを用いて WHO 指定バイオテロ病原体のゲノム配列及び変異情報データベースを充実させ，有事において迅速に対応出来る体制を整えることを本研究課題は目標としている．

炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) は炭疽症の原因となる細菌で，第二次世界大戦以降，生物兵器として各国の軍事機関に研究され，1993 年のオウム真理教によるテロ未遂や 2001 年のアメリカのテロ事件にも利用された事がある．そのため，炭疽症のアウトブレイクが起きた際に，原因菌の出自を詳細に調査することはバイオセキュリティ上の重要な意味を持つ．出自を調査するにはコアゲノムを用いた分子系統解析を行うのが有効であると考えられるが，コアゲノム情報を用いた分子系統解析を容易に行えるツールは存在していなかった．そのため私たちは *B. anthracis* の次世代シーケンス (next-generation sequencing: NGS) データをアップロードすると single nucleotide polymorphisms (SNPs) を抽出し，*B. anthracis* を含む *B. cereus* グループ中の系統的な位置関係を推定するウェブアプリケーション GcoGSA-BA (Global core Genome SNP Analysis for *Bacillus anthracis*) を開発した．

2014 年のデング熱感染症・国内発症例を契機に，輸入感染症による国内拡大にも注視すべき事情が生じ，2020 年東京オリンピック対策にも資するデングウイルス遺伝型を図示化するツール Dengue Genograph Viewer (DGV) を構築した．多様な輸入感染症が国内例として散見されると想定され，恣意的なバイオテロのみならず，デングウイルス等の外来ウイルスも検討課題としてデータベース拡充が肝要だと考えている．

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．大都市における感染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．本分担研究にて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 解析法による環境微生物のモニタリングを実施して特徴的な病原体や薬剤耐性菌の検出を試みた．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，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
見理剛・国立感染症研究所・細菌第二部

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

口などの危険性は近年社会的不安の一つとして認識されている。最先端技術を駆使した次世代ゲノムシーケンサーにより、今までは数年を要した全ゲノム解読が数週間で終了することが可能となった。最先端の革新技术を応用し、効率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体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。

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。

2. DNA 精製および増幅法

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 MicroPrep™ 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

1. ネットワーク経路によるバイオテロ病原体検索のための解析システム

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

炭疽菌が候補として浮上した場合、コアゲノム SNPs を利用した炭疽菌・菌株の類縁関係を推定するためのゲノムワイド SNPs 解析システム Global core genome SNP analysis for *Bacillus anthracis* (GcoGSA-BA) を開発した (図 1 と 2)。炭疽菌ゲノム 5.23 Mb 全体に渡り特徴的な塩基アレル 657,183 箇所を用いたゲノム分子系統樹を作成できる (図 3)。従来の MLST 法では分解能が非常に悪く、由来特定に難渋した菌株においても高精度に分類することを可能にした。

2. 国内分離ボツリヌス菌のゲノム分子疫学解析

国内分離ボツリヌス菌のゲノム分子疫学解

析を行った(感染研・細菌第二部・見理先生との共同研究).公開ゲノム配列とのコアゲノム比較解析から,144,896箇所 の SNPs サイトを抽出し,ゲノム分子系統樹を作成した(図4).従来の分子疫学解析を精度よく評価することに成功し,茨城県と岩手県 の分離県と年代が異なる分離株においても由来特定と同一性を議論する基盤情報を収集解析することができた.

3. ウイルスの発生分布を遺伝型として地図上に図示化する

感染症のグローバルな伝播を把握するためには当該病原体の遺伝型を把握することが先決である.アウトブレイクは元となる汚染源が必ずどこかに存在し,危機管理対応として被害を最小限に留めるために汚染源の特定は必須である.海外からの来訪者が増えつつある日本において,2014年夏のデングウイルスの国内症例を経験した今,病原体の由来特定は重要になってきている.そこで私たちは公開データベースに登録されている全てのデングウイルス配列(1945-2016年)を収集し,分離国・地域と血清型および遺伝型としてデータベース化し Google Maps 上で表現できるよう作成した(図5).血清型2と4しか図には示していないが,一目瞭然,ある特定の遺伝型ごとに大陸によって生息分布が制限されている.そもそもデングウイルスは蚊媒介感染症であり,中間宿主の蚊の種類を生息域に制限されることが主要因であろう.このデータベースを有効に活用すれば,患者個々の感染デングウイルス株をゲノム情報として取得し,この Dengue Genograph Viewer (DGV) デング・データベース上で検索すれば最も近縁のデングウイルスを検出することができる.

4. 首都圏地下鉄の微生物モニタリング

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.

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団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6).手すり等の表面は利用者が直接触れる可能性があり,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 *Streptococcus* レンサ球菌属の配列が多数占める採取場所もあった.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,清掃用具により清潔に維持されていると推測もできた.

D. 考察

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

首都圏地下鉄における環境微生物モニタリングを実施した.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解析法による検出感度・特異度に左右されるため,更なる検体採取や季節変動も考慮した解析が必須であると思われる.

E. 結論

バイオテロ対策に超高速病原体ゲノム解読システムを導入するための基盤を整備した.

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kenri T, Sekizuka T, Yamamoto A, Iwaki M, Komiya T, Hatakeyama T, Nakajima H, Takahashi M, Kuroda M, Shibayama K. Genetic characterization and comparison of *Clostridium botulinum* isolates from botulism cases in Japan between 2006 and 2011. *Appl Environ Microbiol.* 2014 Nov;80(22):6954-64. doi: 10.1128/AEM.02134-14. Epub 2014 Sep 5. PubMed PMID: 25192986; PubMed Central PMCID: PMC4249013.
- 2) Yamashita A, Sekizuka T, Kuroda M. GcoGSA-BA: A Global Core Genome SNP Analysis for *Bacillus anthracis*. *Health Secur.* 2015 Jan-Feb;13(1):64-8. PubMed PMID: 25812430; PubMed Central PMCID: PMC4389694.
- 3) Yamashita A, Sakamoto T, Sekizuka T, Kato K, Takasaki T, Kuroda M. DGV: Dengue Genographic Viewer. *Front Microbiol.* 2016 Jun 7;7:875. doi: 10.3389/fmicb.2016.00875. PubMed PMID: 27375595; PubMed Central PMCID: PMC4894901.
- 4) Yamashita A, Sekizuka T, Kuroda M. VirusTAP: Viral Genome-Targeted Assembly Pipeline. *Front Microbiol.* 2016 Feb 2;7:32. doi: 10.3389/fmicb.2016.00032. PubMed PMID: 26870004; PubMed Central PMCID: PMC4735447.

2. 学会発表

- 1) 山下明史, 関塚剛, 黒田誠. GcoGSA-BA NGS データから炭疽菌のコアゲノム系統解析を行うウェブアプリケーション. 第88回日本細菌学会総会 岐阜市 平成27年3月26-28日(ポスター発表)
- 2) Kenri T, Sekizuka T, Yamamoto A, Iwaki M, Takahashi M, Kuroda M, Shibayama K. Whole genome single-nucleotide polymorphism (SNP) Analysis of *Clostridium botulinum* isolates from botulism cases in Japan. 51th Interagency Botulism Research Coordinating Committee (IBRCC 2014), Philadelphia PA, USA. October 26-29, 2014. (Poster presentation).
- 3) 黒田誠 微生物ゲノミクスと公衆衛生学的活用 第89回日本感染症学会学術講演会 モーニングセミナー2 京都 (2015.4)
- 4) 黒田誠 NGS 技術による病原体ゲノム情報の大量取得と分子疫学解析への応用 第158回日本獣医学会学術集会・シンポジウム 十和田市 (2015.9)
- 5) 黒田誠 NGS を応用した感染症診断の可能性 第64回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第62回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会 札幌 (2015.10)

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

炭疽菌 *Bacillus anthracis* のゲノム分子疫学

GcoGSA BA

Global core Genome SNP Analysis for *Bacillus anthracis*

Project name:

Input your sequence reads (Only .fastq.gz up to 2GBytes in total are acceptable.)

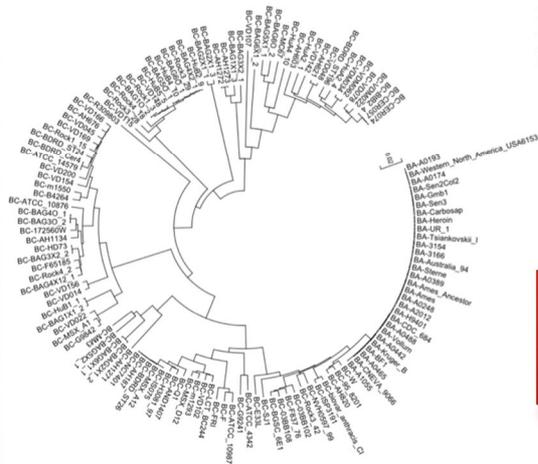
Strain Name	Read file 1	Read file 2
1	<input type="button" value="選択..."/> ファイルが選択されていません。	<input type="button" value="選択..."/> ファイルが選択されていません。
2	<input type="button" value="選択..."/> ファイルが選択されていません。	<input type="button" value="選択..."/> ファイルが選択されていません。
3	<input type="button" value="選択..."/> ファイルが選択されていません。	<input type="button" value="選択..."/> ファイルが選択されていません。
4	<input type="button" value="選択..."/> ファイルが選択されていません。	<input type="button" value="選択..."/> ファイルが選択されていません。
5	<input type="button" value="選択..."/> ファイルが選択されていません。	<input type="button" value="選択..."/> ファイルが選択されていません。

Send an e-mail after finished analyzing.
Mail address:

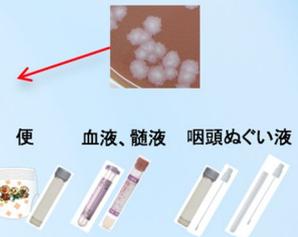
Change number of samples

Reference genome: *Bacillus anthracis* str. 'Ames Ancestor' chromosome, complete genome. (gil50196905iref|NC_007530.2)

Phylogenetic tree of the original data set.



[Traditional tree shape](#)
[Newick formatted data](#)
[MEGA formatted data](#)
[SNP allere table](#) (compressed 13MBytes)



SNP判定のエラーが多い

Mapping status

Strain	Raw reads	After Trimming	Mapping
S6 sequence	7631281	4926893 (64.6%)	4896388 (64.2%)
S5 sequence	6850274	4814255 (70.3%)	4775247 (69.7%)

Mapped region

Sequence or region	Whole length	Mapped bp (%) (depth >=5)	
		S5 sequence	S6 sequence
gil50196905iref NC_007530.2l	5227419	4914301 (94.0%)	4827010 (92.3%)
gil20520075 gbl AE011190.1l	181677	163651 (90.1%)	161559 (88.9%)
gil50118566 gbl AE017335.3l	94830	84018 (88.6%)	81139 (85.6%)
lethal factor (AE011190 149357-151786)	2429	1865 (76.8%)	1767 (72.7%)
edema factor (AE011190 122608-125010)	2402	1946 (81.0%)	2187 (91.0%)
protective antigen (AE011190 143779-146073)	2294	2225 (97.0%)	2161 (94.2%)

Number of SNPs used: 636038 / 657183 (96.8%)

[Download SNP data in tabular format. \(8.6 MBytes\)](#)
[Download SNP data in fasta format. \(83.3 MBytes\)](#)
[Download phylogenetic tree in Newick format. \(5.5 KBytes\)](#)
[Download phylogenetic tree in PDF format. \(9.3 KBytes\)](#)

図1. MePIC - MEGAN による病原体検索の結果, 炭疽菌が候補として浮上した場合, 先に使用した解読リードを用いたゲノムワイド SNPs 解析システム Global core genome SNP analysis for *Bacillus anthracis* (GcoGSA-BA) を開発した. 現在, 関係者のみ運用可能としている. 公開されている炭疽菌ゲノムと比較したゲノムワイド系統樹の生データまで作成し, 適当な系統樹ビューワーで閲覧可能なデータをダウンロード可能である. 炭疽菌は *Bacillus cereus* group に属し, セレウス菌との鑑別間違いを起さぬよう, Lethal factor (LF), Edema factor (EF), Protective antigen (PA)の炭疽菌の病原因子の特定も可能にした.

GcoGSA *Bacillus anthracis* based on phylocoregenomics

14'10/20-11:17 Test data
GcoGSA-BA

Raw data

Feces Blood, spinal fluid Nasal

Strain	Raw reads	After trimming	Mapped reads	'Ames Ancestor' chromosome (NC_007530.2) 5,227,419 bp		pXO1 (NC_007322.2) 181,677 bp		pXO2 (NC_007323.3) 94,830 bp		lethal factor (LF) (NC_007322 149357-151786) 2,430 bp		edema factor (EF) (NC_007322 122608-125010) 2,403 bp		protective antigen (PA) (NC_007322 143779-146073) 2,295 bp	
				Covered region	Avg. depth	Covered region	Avg. depth	Covered region	Avg. depth	Covered region	Avg. depth	Covered region	Avg. depth	Covered region	Avg. depth
Ames Ancestor	4,000,000	4,000,000 100.00%	4,000,000 100.00%	5,195,033 99.38%	109.0x	181,663 99.99%	108.9x	94,802 99.97%	109.0x	2,428 99.92%	109.4x	2,401 99.92%	103.5x	2,293 99.91%	107.2x
B. anthracis A0149	1,859,992	1,859,470 99.97%	1,848,018 99.36%	5,201,804 99.51%	84.2x	181,677 100.00%	287.1x	94,830 100.00%	143.4x	2,428 99.92%	294.6x	2,401 99.92%	305.1x	2,293 99.91%	276.2x
B. cereus G9241	4,000,004	4,000,004 100.00%	3,292,809 82.32%	4,407,208 84.31%	86.7x	178,796 98.41%	153.9x	4,275 4.51%	2.5x	2,428 99.92%	100.2x	2,401 99.92%	103.0x	2,293 99.91%	105.1x
B. cereus VD166	14,203,532	12,634,595 88.95%	7,772,083 54.72%	4,280,466 81.88%	136.0x	44,953 24.74%	42.4x	4,370 4.61%	2.8x	0 0.00%	0.0x	0 0.00%	0.0x	0 0.00%	0.0x

Number of SNPs used: 646,749 / 657,183 (98.41%)

657,183 SNPsサイトを使用!

[SNP data in tabular format. \(11.2 MBytes\)](#)
[SNP data in fasta format. \(85.9 MBytes\)](#)
[NJ phylocore genome tree in Newick format. \(5.6 KBytes\)](#)
[NJ phylocore genome tree in PDF format. \(9.4 KBytes\)](#)

Download All

Anthrax plasmids

LF, EF, PA toxins

GcoGSA-BA. Yamashita A., Sekizuka T., Kuroda M. *Biosecurity and Bioterrorism: Biodefense Strategy, Practice, and Science* 2014. In press

図 2. GcoGSA-BA を用いたコアゲノム SNPs 分子系統解析と炭疽菌プラスミド・毒素因子(LF, EF, PA 毒素)の特定

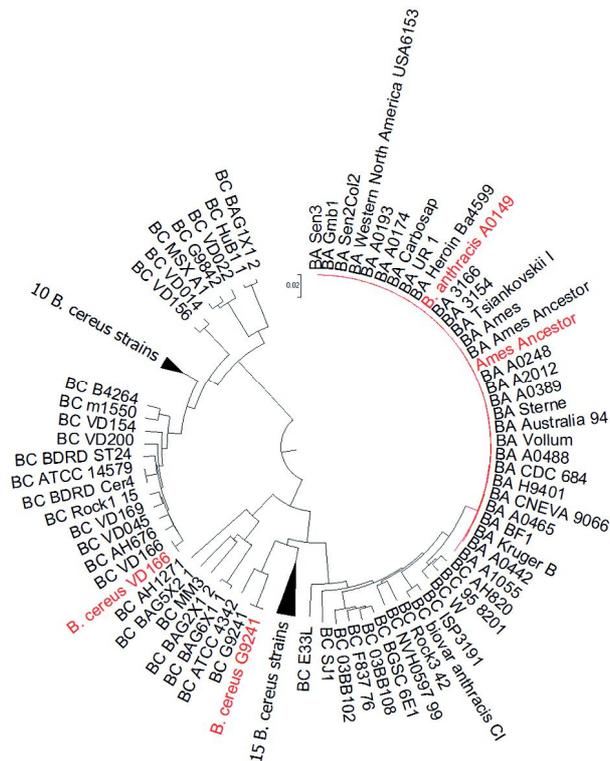


図 3. コアゲノム SNPs 分子系統解析の 1 例. 炭疽菌と類縁のセレウス菌との鑑別を容易にするだけでなく, 炭疽菌株グループの中の詳細な分子疫学を可能とした.

Genetic characterization and comparison of Clostridium botulinum strains isolated from botulism cases in Japan between 2006 and 2011.

Kenri T¹, Sekizuka T², Yamamoto A³, Iwaki M³, Komiya T³, Hatakeyama T⁴, Nakajima H⁵, Takahashi M³, Kuroda M², Shibayama K³.

Figure 5

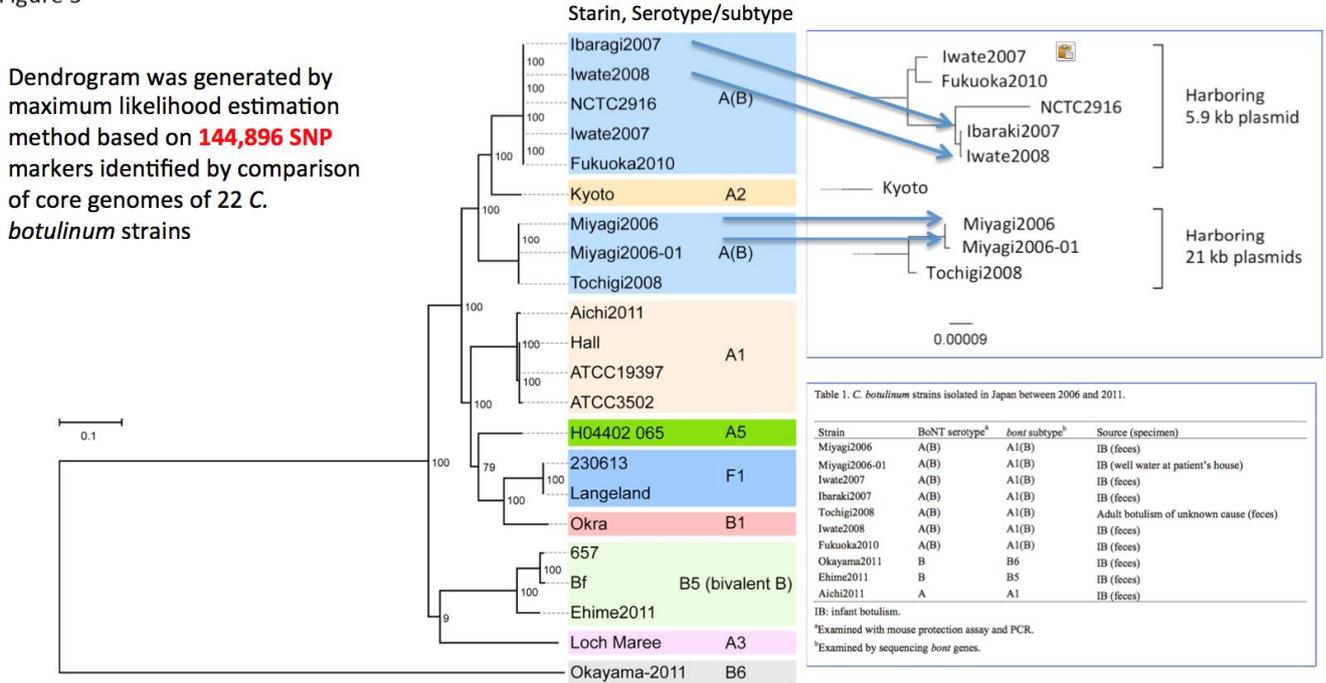


図4. 国内分離ボツリヌス菌のゲノム分子疫学解析 (感染研・細菌第二部 見理先生との共同研究). 国内分離株と公開ゲノム配列のコアゲノム比較解析から, 144,896箇所の SNPs サイトを抽出し, ゲノム分子系統樹を作成した. 従来の分子疫学解析を精度よく評価することに成功し, 分離県と年代が異なる分離株においても由来特定と同一性を議論する基盤情報を収集解析することができた.

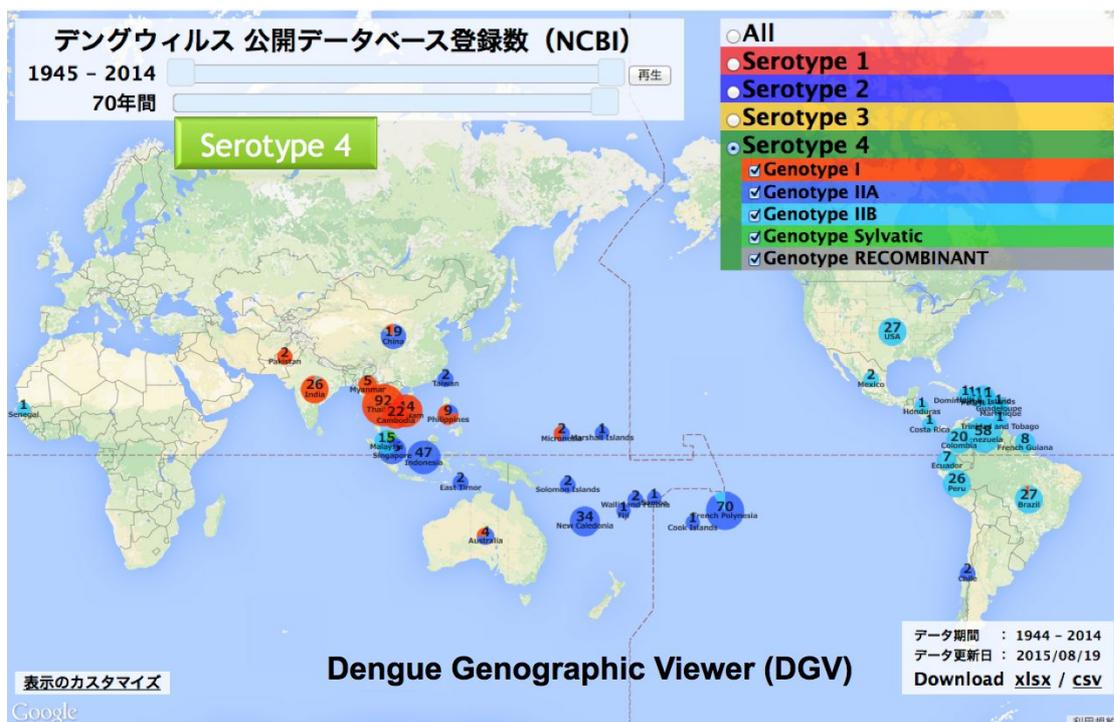
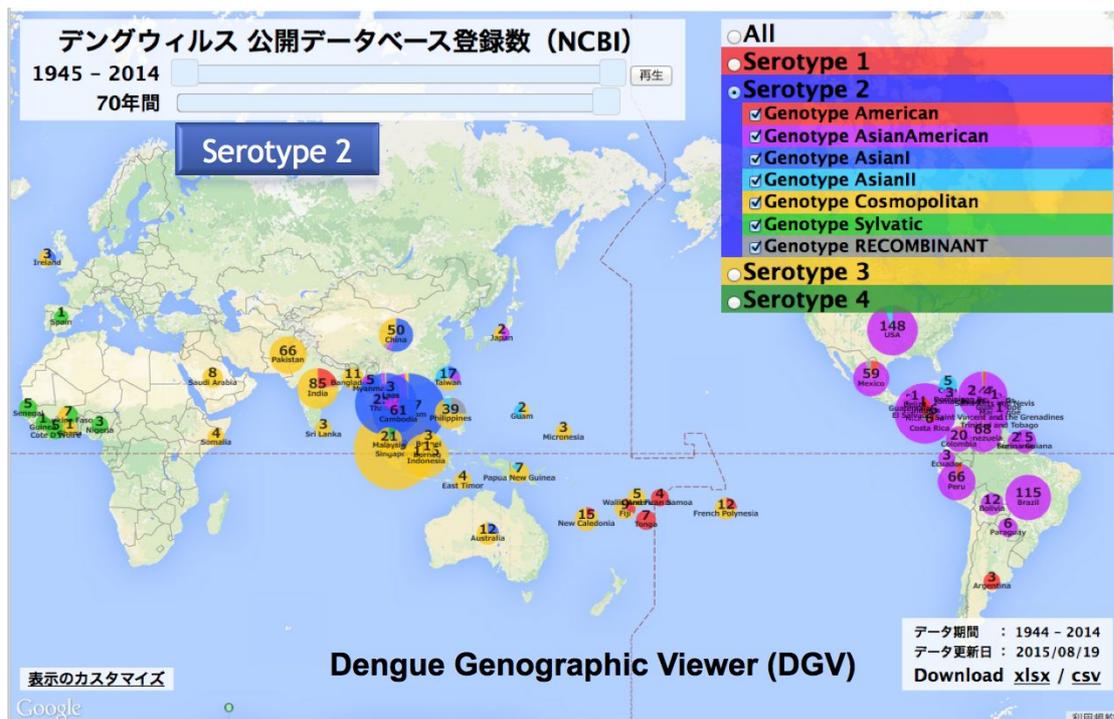


図5. デングウイルス配列(1945 -2014年)の分離国・地域と血清型および遺伝型データベース (図では血清型2, 4の遺伝型分布のみ表示)

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

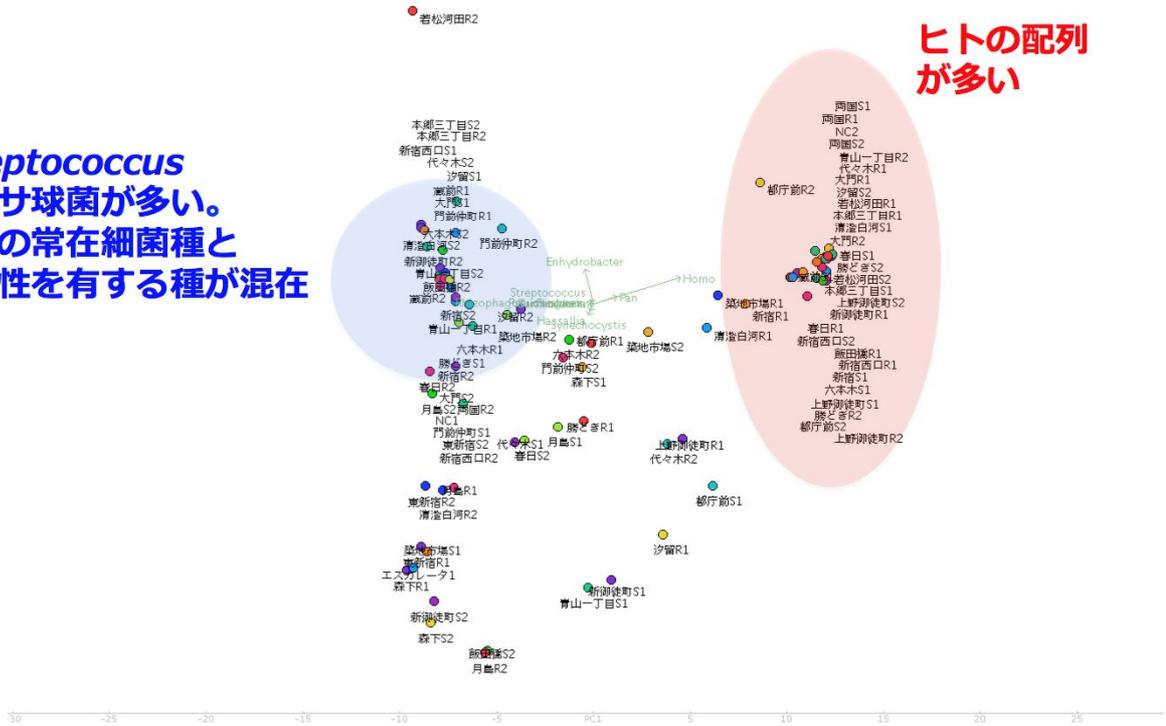


図 6 . 大江戸線各駅から採取した環境 96 サンプルからメタゲノム解析法にて検出された生物種を指標にした主座標分析 PCoA 解析 . 大江戸線各駅における特徴であるのかサンプリングのバイアスであるのか確かではないが , ヒト配列が多めに検出される駅 , ヒト口腔常在菌の多い駅 , 河川等の環境細菌が多く検出される駅に大きく大別された .

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：バイオテロに使用された既知あるいは未知の病原体を病理組織中に検出する方法として，病原体のゲノムを検出する *in situ* hybridization 法がある．まず，私たちが開発した 3' 末に (AT)₁₀ を付加したオリゴプローブを用いる *in situ* hybridization-AT tailing (ISH-AT) 法と Z 型オリゴヌクレオチドプローブを用いた分岐 DNA-ISH 法を原理とする市販されている ViewRNA 法と RNAscope 法を比較検討した．標的核酸のコピー数が 100/細胞の場合は両者とも検出可能であり，プローブ作製までの日数，とコストパフォーマンスの面からも，ISH-AT 法を第 1 選択としてよいことがわかった．RNAscope 法については蛍光二重染色が可能であり，ISH-AT 法と同様に感染細胞を同定することもできた．これらの方法を用いて，MERS コロナウイルス，デングウイルス，SFTS ウイルス，ジカウイルスの RNA の検出プロトコルを確立した．また，DNA ウイルスであるアデノウイルスゲノムの感染細胞，感染肺組織，肝臓組織での検出系を確立した．

研究協力者
田中道子・国立感染症研究所・感染病理部

A. 研究目的

病原体の病理学的検出法の確立は，バイオテロ対策としても重要である．組織上での病原体の検出は，病原体の体内分布や病変との関連を考えるうえで必須である．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．特異性の高い検出用の抗体がすでにある場合，免疫組織化学は安定した検出系となるが，未知の病原体等の場合，あらたに特異的な抗体を作製しなければならず，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迅速に同定できるようになった現在，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．従来，オリゴヌクレオチドプローブによる ISH 法は感度が低く実用的でなかったが，私たちの開発した ISH-AT 法や市販の Z 型オリゴヌク

レオチドプローブ (ターゲットハイブリ) と分岐 DNA プローブを用いた ISH 法は，高感度で特異性の高い方法であり，緊急時の迅速病理学的病原体検出法の有力なツールとなる．分岐 DNA-ISH 法は現在 2 社から販売されている．QuantiGene View RNA (Affymetrix 社，ベリタス社) と RNAscope (ACD 社，コスモバイオ) があり，後者の方において反応ステップが多いが，それだけ感度がいい．また後者では，HRP-DAB の発色が可能であり，より解像度の高い染色像が得られる．この方法で用いるプローブは標的遺伝子の塩基配列情報 (最低 300 塩基長以上) を提供するだけで検出用の混合プローブを注文できる．

本研究の目的の 1 つは，実際の生物テロや新興・再興感染症発生に備え，最良の検出方法を確立するために，ISH-AT 法と ViewRNA 法，RNAscope 法を比較検討することである．一方，DNA の *in situ* 検出キットは市販されていない．DNA は二重鎖構造や環状構造をとるため，前処理方法が複雑である．2 つ目の研究目的は，主に RNA の検出に使用している ISH-AT 法を DNA in

situ 検出法に応用し, DNA ウイルスゲノムの ISH-AT 法を確立することである.

B. 研究方法

1. 材料

1) 病理組織標本

ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織を使用.(ヒト剖検組織): パンデミックインフルエンザ A/H1N1pdm09 剖検肺組織, 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)剖検リンパ節. アデノウイルス感染肺剖検組織, 肝臓組織,(動物実験剖検組織): 中東呼吸器症候群コロナウイルス(MERS CoV)感染マウス組織(国立感染症研究所・感染病理部岩田博士より分与).(感染細胞): ジカイルス感染 Vero 細胞(国立感染症研究所・高崎先生より分与) アデノウイルス感染細胞(国立感染症研究所・花岡博士より分与). B 型肝炎ウイルス(HBV)感染細胞(国立感染症研究所・渡士博士より分与).

2) プローブ

● ISH-AT 法用のプローブの作成

- ・ A/H1N1pdm 09 (AB538390.1): NP 領域に 2 ヶ所に設計した.
- ・ SFTSV: S 鎖領域 1 ヶ所, L 鎖領域 1 ヶ所に設計した.
- ・ MERS-CoV: NP 及び Env 領域に 1 種類ずつ作製した.
- ・ ZIKA ウイルス: 8MR766, Uganda strain, LC002520.1 1784-1823 部分を標的とした.
- ・ ADV: ADV cDNA Hexon (保存性の高い領域)部分にプローブを設計した.

● 分岐 DNA-ISH 法のプローブの注文 (Affymetrix 社)

- ・ A(H1N1)pdm 09 (AB538390.1) NP 部分 20 ヶ所の混合プローブと 2 ヶ所の混合プローブ
- ・ SFTSV S 鎖 領域に 20 ヶ所 (Affymetrix 社)あるいは 19 ヶ所の混合プローブ(ACD 社)
- ・ ZIKA ウイルス 66-1763 of LC002520.1 に 20 ヶ所の混合プローブ(ACD 社)を作成した.

●

3) 抗体

一次抗体は上皮細胞のマーカーである

Epithelial cell Membrane Antigen(EMA) 抗原に対する抗体あるいはインフルエンザ NP 抗原を検出するポリクローナル抗体を用いた. 二次抗体は Alexa488 抗ラビット IgG 抗体を用いた.

2. 方法

1) ISH-AT 法

(RNA)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. また RNAscope 法のキットの Pretreatment 2 液で煮沸 15 分, Pretreatment 3 液 40℃ 処理を 15 あるいは 30 分行った.

(DNA)前処理法: 抗原賦活液(DAKO 社)中で 95℃, 40 分, 膜透過処理を行い, PK 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 5min 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 5min 及び PK 処理後に 0.2N HCl/0.3M NaCl を常温 15min で処理した.内因性ビオチン除去が必要な際はハイブリ後に 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 30min で処理した. DNA プローブは 95 度 10 分で denature を行い, 90 度 10 分組織上でハイブリさせてから on ice で急冷し, その後 50 度で 0/N ハイブリを行った.

2) 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. 蛍光検出では, 取り込ませた Biotin 分子を Alexa568-ストレプトアビジンと反応させた.

3) 分岐プローブ ISH 法

分岐 DNA-ISH 法は基本的に添付説明書に従ったが,ホルマリン再固定のステップは省略した.発色法として,アルカリフォスファターゼ-Fast rsd の系 Fluorescent(555)の系を使用した.

4) 蛍光二重染色法

ISH-AT 法ないしは分岐プローブ ISH 法でインフルエンザウイルスゲノムを蛍光 (Alexa5 あるいは Fast red/HNPP あるいは 555) で検出可能とした後, EMA 抗体あるいはインフルエンザウイルス NP 抗原に対する抗体を反応させこれを異なる蛍光色素 (Alexa488) で検出できるようにした。

【倫理面への配慮】

検討材料は剖検組織であり, 剖検時に使用の承諾が得られている。感染動物標本に関しては動物実験委員会の承認を得て実験が行われた。

C. 研究結果

1. ISH-AT 法の前処理

前処理の条件はサンプルによって至適化しないといけないが, これまで PK はまず 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で試行し, 検出できない場合は 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ にしてきた。A/H1N1pdm09 肺炎の剖検肺組織 (100 コピー/細胞) を用いて前処理で結果がどのように変わるか確認したところ, PK=1 がもっとも検出率がよく, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ にすると抗原シグナルが増えても組織の形態が損傷されて (過消化) いた。RNAscope の試薬を用いた前処理ではヒト肺組織で推奨されている strong という条件で PK1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と同等の結果が得られた。

2. ISH-AT 法による MERS CoV 感染

マウス組織におけるウイルス RNA の検出においては, 以下の結果が得られた。免疫組織化学で示されたウイルス抗原の局在に一致してウイルスゲノムが検出された。ウイルスコピー数が 10^5 コピーと 10^3 コピーの検体で試行したが, コピー数が多い切片でより多くの陽性シグナルが検出された。 10^3 コピーの検体でも陽性シグナルが得られた。

3. ISH-AT 法と分岐 DNA-ISH に用いるプローブの比較

双方とも標的核酸の 40 塩基に対し, 1 つあるいは 1 組のオリゴプローブがハイブリする。A/H1N1pdm09 の NP 領域 2 ヶ所に ISH-AT 用オリゴヌクレオチドプローブを作成し混合プローブとした。分岐 DNA-ISH 法用には NP 領域 20 ヶ所の混合プローブと 2 ヶ所の混合プローブを用意

した。切片中の mRNA のコピー数が 104 コピー/細胞である切片において, 2 ヶ所の混合プローブを用いた ISH-AT 法では十分量検出できたが, 2 ヶ所の混合 Z 型プローブを用いた分岐プローブ-ISH 法ではほとんど検出できなかった。よって 2 ヶ所の probe (結合部分は計 80 塩基長) での検出感度は ISH-AT 法のほうが高感度といえる。RNAscope 法では標的核酸について最低 300 塩基長を要するので ISH-AT 法と同等の感度には 5-7 組のプローブ mixture を要することが予想される。逆に ISH-AT 法ではプローブ数を増やすことで検出感度を上げられる可能性が十分考えられた。

4. SFTS 剖検リンパ節におけるウイルスゲノムの検出

ISH-AT 法と ViewRNA 法で比較すると, 迅速・簡便性, 感度はほぼ同等であった。(図 1) ISH-AT-CSA 法と RNAscope 法を比較するとコピー数の多い切片では両者の検出感度はほぼ同等であったが, コピー数が少なくなると RNAscope 法のほうがよりシグナル/ノイズ比が高く, 陽性シグナルが多かった。

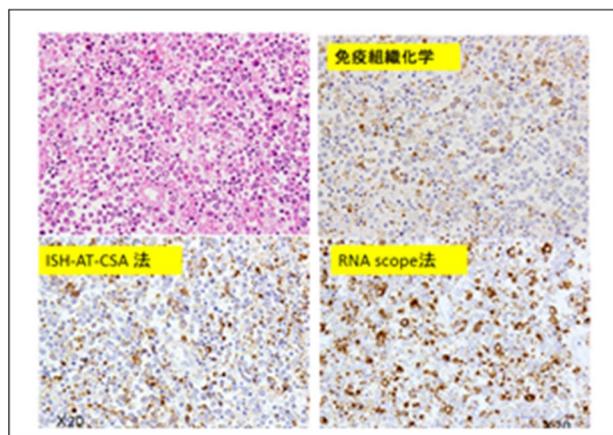


図 1 . SFTSV 感染リンパ節

HE 染色, 免疫組織化学, ISH-AT 法と市販 RNAscope 法による SFTSV-RNA の検出

5. 蛍光二重染色

組織上での co-localization (共在) を示すには蛍光二重染色を行った後, 共焦点レーザー顕微鏡で解析することが必要である。感染細胞を同定するために, in situ ハイブリダイゼーション法でウイルスゲノムを検出した後, 細胞マーカー蛋白あるいはウイルス抗原に対する抗体

を用いた蛍光免疫組織化学で蛍光二重染色を行い、感染細胞を同定する系を確立
 ISH-AT 法と RNA Scope 法は蛍光二重染色が可能であった。View RNA 法においては Fast red/HNPP が免疫組織化学の抗体との結合を阻止している可能性があった。インフルエンザウイルス感染肺組織を用いた結果を示すした(図 2)。

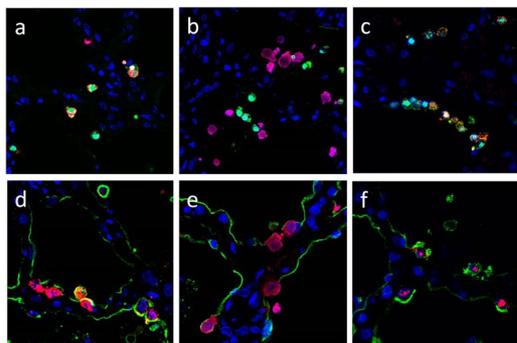


図 2 . 二重蛍光染色

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

a : ISH-AT (Alexa568) x IHC (Flu) (Alexa488)

b : ViewRNA (Fast Red/HNPP) x IHC(Flu) (Alexa488)

c: RNA scope (555) x IHC (Flu)(Alexa488)

d: ISH-AT (Alexa568) x IHC (EMA)(Alexa488)

e:ViewRNA (Fast Red/HNPP) x IHC (EMA)(Alexa488)

f: RNA scope (555) x IHC (EMA)(Alexa488)

6. DNA *in situ* 検出法

新たに DNA ウイルスをターゲットとした 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) の検出の確立を検討した。ADV-DNA に関しては細胞標本及び臨床検体でウイルスゲノムの検出に成功した。

D. 考察

次世代シーケンス法などにより患者あるいは死亡者から採取した検体中の病原体遺伝子が同定され、塩基配列の一部でも確定できれば、速やかに ISH 用のオリゴヌクレオチドプローブを作成し、病理切片中で病原体遺伝子検出し、その体内分布 (局

在) を明らかにできる。検出方法としてはコピー数がある程度あれば ISH-AT 法が最もはやく対処できる。死亡時にはすでに組織中に残存するウイルスコピー数が少ない場合はリアルタイム RT-PCR で切片中に残存する標的遺伝子の量を測定し、1000 コピー以上であれば ISH-AT 法で検出できる可能性があると判断している。コピー数が少ない場合、市販の分岐 DNA-ISH 法も試行してみるべきである。現在国内ではベリタス社 (QuantiGene View RNA) とコスモバイオ (RNAscope ACD 社) が販売している。難点は非常にコストがかかることである。RNAscope 法のほうが感度がよいと思われるが、リアルタイム RT-PCR により解析したコピー数とつぎ合わせてより詳細な検出感度を検討する必要がある。また非特異シグナルなども併せて検討する必要がある。View RNA 法ではホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織で使用可能な蛍光染色用キットがなく、細胞標本用のキットを用いたが、検出に至らなかったため Fast red/HNPP の蛍光色と merge することを期待して二重染色を行ったが、Fast Red/HNPP deposit はその後の抗体の結合を阻害するため 2 つの蛍光色が merge せず二重染色には適さないことが分かった。(図 2b,e)。一方 RNA scope 法では FFPE 組織でも可能な蛍光染色キットがあるためこれを使用したところ 2 つの蛍光色が merge した(図 2c,f)。

DNA ウイルスゲノムの検出において、前処理を工夫することで、アデノウイルス (ADV) ゲノムの検出法を確立できた。型特異的なプローブを現在作成中である。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であり、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。

E. 結論

病原体遺伝子の *in situ* 検出法を比較検討した結果、ISH-AT 法、ViewRNA 法、RNAscope 法では、標的核酸のコピー数が 100/細胞の場合はほぼ同様の検出感度

あった。プローブ作製までの日数，とコストパフォーマンスの面からも，ISH-AT法を第1選択としてよいことがわかった。非常に少ないコピー数のゲノムを検出する際は，ISH-AT法の前処理やプローブ数を増やすなどの工夫をしながら，プローブ数の多い，分岐DNA-ISH法も試行する予定である。バイオテロ対策の面からは，大量の検体を処理しなくてはいけない場合も考えられ，5日でプローブ作製可能であることに加え，コストパフォーマンスの面でISH-AT法が優れている(表)。非常に少ないコピー数のゲノムを検出する際に限って，プローブ数の多い，分岐DNA-ISH法であるRNA scope法のDAB染色を試行する予定である。ベリタス社(QuantiGene View RNA)よりもコスモバイオ(RNAScope ACD社)が販売している。RNAscope法のほうが感度がよく，FFPE標本で蛍光二重染色が可能であることがわかった。またRNAscope法ではDAB発色も可能であり，染色標本の永久保存ができる点で使いやすい。

DNAウイルスゲノムの検出系については染色体に組み込まれたプロウイルスや核内染色体外の環状二重鎖DNAウイルスゲノムの検出法へ発展させることであらゆる病原体ゲノムのin situ検出が可能である系を確立することが今後の目標である。

表．検出法の比較

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

F. 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 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. *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
 - 9) Sakai K, Sekizuka T, Ami Y, Nakajima N, Kitazawa M, Sato Y, Nakajima K, Anraku M, Kubota T, Komase K, Takehara K, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Kuroda M, Takeda M. A mutant H3N2 influenza virus uses an alternative activation mechanism in Tmprss2 knockout mice by loss of an oligosaccharide in the hemagglutinin stalk region. *J Virol.* ;89(9):5154-8, 2015.
 - 10) Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Sato Y, Nakajima N, Koike S, Iwasaki T, Sata T, Yamashita T, Minagawa H, Taguchi F, Hasegawa H, Shimizu H, Nagata N Establishment of a panel of in-house polyclonal antibodies for the diagnosis of enterovirus infections. *Neuropathology* 35(2):107-21, 2015
 - 11) Moritake H, Kamimura S, Nunoi H, Nakayama H, Suminoe A, Inada H, Inagaki J, Yanai F, Okamoto Y, Shinkoda Y, Shimomura M, Itonaga N, Hotta N, Hidaka Y, Ohara O, Yanagimachi M, Nakajima N, Okamura J, Kawano Y. Clinical characteristics and genetic analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia with hemophagocytic lymphohistiocytosis: a Japanese retrospective study by the Kyushu-Yamaguchi Children's Cancer Study Group. *Int J Hematol.* 100(1):70-8, 2014
 - 12) Watanabe T, Zhong G, Russell CA, Nakajima N, Hatta M, Hanson A, McBride R, Burke DF, Takahashi K, Fukuyama S, Tomita Y, Maher EA, Watanabe S, Imai M, Neumann G, Hasegawa H, Paulson JC, Smith DJ, Kawaoka Y. Circulating avian influenza viruses closely related to the 1918 virus have pandemic potential. *Cell Host Microbe.* 15(6):692-705, 2014
 - 13) Sakai K, Ami Y, Tahara M, Kubota T, Anraku M, Abe M, Nakajima N, Sekizuka T, Shirato K, Suzaki Y, Aina A, Nakatsu Y, Kanou K, Nakamura K, Suzuki T, Komase K, Nobusawa E, Maenaka K, Kuroda M, Hasegawa H, Kawaoka Y, Tashiro M, Takeda M. The host protease Tmprss2 plays a major role in in vivo replication of emerging H7N9 and seasonal influenza viruses. *J Virol.* 88(10):5608-16, 2014
 - 14) Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, Ishido A, Shigeoka T, Tominaga T, Kamei T, Honda M, Ninomiya D, Sakai T, Senba T, Kaneyuki S, Sakaguchi S, Satoh A, Hosokawa T, Kawabe Y, Kurihara S, Izumikawa K, Kohno S, Azuma T, Suemori K, Yasukawa M, Mizutani T, Omatsu T, Katayama Y, Miyahara M, Ijuin M, Doi K, Okuda M, Umeki K, Saito T, Fukushima K, Nakajima K, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Fukuma A, Ogata M, Shimojima M, Nakajima N, Nagata N, Katano H, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Yamagishi T, Oishi K, Kurane I, Morikawa S, Saijo M. The first identification and retrospective study of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Japan. *J Infect Dis.* 209(6):816-27, 2014
 - 15) 中島典子：季節性および鳥インフルエンザウイルス感染症の病理 病理と臨床 2015,33 : 1146-1153.

- 16) 中島典子 H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスに感染したヒトの臨床, 病理およびウイルス学的知見 化学療法の領域 30:40-48, 2014
- 17) 中島典子, 佐藤由子, 片野晴隆, 長谷川秀樹 ウイルス性肺炎 病理と臨床 32: 1146-1153, 2014
- 18) 中島典子 オリゴヌクレオチドプローブを用いた新しい in situ ハイブリダイゼーション法 呼吸 33: 152-159, 2014
- 19) 高橋健太, 鈴木忠樹, 中島典子, 飛梅実, 佐藤由子, 片野晴隆, 長谷川秀樹. 脳炎・脳症の病理. Neuroinfection 神経感染症 19:32-39, 2014
- 20) 中島典子. インフルエンザ感染症の病理 小児内科 2014, 45:1935-1941
2. 学会発表
- 1) Noriko Nakajima, Yuko Sato, Osamu Kotani, Tadaki Suzuki, Toshiaki Kamei, Toru Takahashi, Tetsutaro Sata, Hideki Hasegawa. Modified In situ Hybridization AT-tailing to Visualize the Gene Expression in Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissues. 2015 USCAP Annual Meeting (アメリカ)2015
- 2) Kentaro Hayashi, Noriko Nakajima, Yuko Sato, Harutaka Katano, Noriyo Nagata, Tadaki Suzuki, Minoru Tobiume, Hiroshi Yoshida, Yoshio Suzuki, Toshio Kumasaka, Tetsutaro Sata, Kota Ariyoshi, Hideki Hasegawa Correlations among Histopathological Characteristics, Viral distribution, and Cytokine/Chemokine Expression level within an Individual with A/H1N1pdm09 induced ARDS. 2015USCAP Annual Meeting (アメリカ)2015
- 3) Noriko Nakajima, Hoang Ngoc Thach, Ta Anh Tuan, Dao Huu Nam, Toshio Kumasaka, Yuko Sato, Shoji Kawachi, Hideki Hasegawa, Tran Minh Dien, Le Thanh Hai Pathological and molecular biological study of measles-associated pneumonia during measles outbreak in Vietnam in 2014. Pediatric Scientific Conference 2015 (ベトナム)2015
- 4) Noriko Nakajima, Hoang Ngoc Thach, Ta Anh Tuan, Dao Huu Nam, Toshio Kumasaka, Yuko Sato, Shoji Kawachi, Hideki Hasegawa, Tran Minh Dien, Le Thanh Hai Post-mortem detection of adenovirus type 7 pneumonia in lungs of measles-associated pneumonia fatalities in a pediatric hospital, Hanoi, Vietnam. U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program, (アメリカ)2016
- 5) Kouji Sakai, Yasushi Ami, Maino Tahara, Noriko Nakajima, Makoto Kuroda, Hideki Hasegawa, Yoshihiro Kawaoka, Masato Tashiro, Makoto Takeda. The host protease TMPRSS2 play a major role for influenza virus replication in vivo. International Union of Microbiological Societies(IUMS 2014)-XIVth International congress of Bacteriology and Applied Microbiology, XIVth International Congress of Mycology, XVIth International Congress of Virology (カナダ) 2014
- 6) Osamu Kotani, Naeem Asif, Tadaki Suzuki, Naoko Iwata, Noriko Nakajima, Harutaka Katano, Takushi Hosomi, Hiroyuki Tsukagoshi, Hideki Hasegawa, Fumihiro Taguchi, Hiroyuki Shimizu, Noriyo Nagata Comparative analyses of the pathogenicity of two isolates of Saffold virus in neonatal mouse. International Picornavirus meeting (Europic2014) (ベルギー) 2014
- 7) Noriko Nakajima, Yuko Sato, Hideki Hasegawa, Hoang Ngoc Thach, Nguyen Trung Thuy, Tran Minh Dien, Nguyen Thanh Liem, Shoji Kawachi, Kazuo Suzuki Pathological study of Severe ARDS cases in NHP-Hanoi International symposium and Teikyo-Harvard program (東京) 2014
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) 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)
- 11) 中島典子, 佐藤由子, 熊坂利夫, 藤本嗣人, 花岡希, 片野晴隆, 鈴木忠樹, 長谷川秀樹 麻疹に併発した肺炎で死亡した 19 例の肺組織の分子病理学的解析. 第 104 回日本病理学会総会, 名古屋 (2015.5)
- 12) 岩附研子, 中島典子, 柴田昌利, 高橋健太, 佐藤由子, 木曾真紀, 山吉誠也, 伊藤睦美, 塩谷聡子, 大竹正剛, 寒川彰久, 伊東祐孝, 長谷川秀樹, 河岡義裕 マイクロミニピッグのインフルエンザ感染モデル動物としての有用性. 第 158 回日本獣医学会学術集会 青森 (2015.9)
- 13) Noriko Nakajima, Thach Hoang Ngoc, Yuko Sato, Nozomu Hanaoka, Tsuguto Fujimoto, Tadaki Suzuki, Harutaka Katano, Hai Le Thanh, Hideki Hasegawa, Humann Adenovirus Serotype 7-associated pneumonia in fatal cases of measles 第 63 回日本ウイルス学会学術集会, 福岡 (2015, 6)
- 14) Makoto Takeda, Kouji Sakai, Yasushi Ami, Minori Kitazawa, Kastuhiro Nakajima, Sangsriatanakul Natthan, Masaki Anraku, Noriko Nakajima, Katsuhiro Komase, Kazuaki Takehara, Hideki Hasegawa, Masato Tashiro A natural host model revealed the essential role of the host protease TMPRSS2 for respiratory paramyxovirus pathogenicity. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会, 福岡 (2015, 11)
- 15) Kouji Sakai, Tsuyoshi Sekizawa, Yasushi Ami, Minori Kitazawa, Kastuhiro Nakajima, Noriko Nakajima, Masaki Anraku, Katsuhiro Komase, Kazuaki Takehara, Hideki Hasegawa, Masato Tashiro, Makoto Kuroda, Makoto Takeda. The stalk oligosaccharide of influenza A virus hemagglutinin protein modulates protease specificity for virus activation and pathogenicity. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会, 福岡 (2015, 11)
- 16) 酒井宏治, 網康至, 田原舞乃, 久保田耐, 安楽正輝, 中島典子, 高下恵美, 関塚剛史, 駒瀬勝啓, 信澤枝里, 小田切孝人, 前仲勝実, 黒田誠, 長谷川秀樹 河岡義裕, 田代真人, 竹田誠. II 型膜貫通型セリンプロテアーゼ TMPRSS2 は, HA 開裂部位に mono-basic なアミノ酸配列をもつ A 型インフルエンザウイルスに対する肺内必須活性化酵素である 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 2014 年 11 月
- 17) 渡辺登喜子 Gongxun Zhong Colin Russell 中島典子 八田正人 Anthony Handson 高橋健太 渡辺真治 今井正樹 長谷川秀樹 河岡義裕 スペイン風邪ウイルスに類似の鳥インフルエンザウイルスのパンデミックポテンシャル 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 2014 年 11 月
- 18) 朴ウンシル 佐藤由子 中島典子 古屋哲也 水谷哲也 今岡浩一 森川茂. 日本国内ネコにおける新規モルビリウイルス (feline morbillivirus, FMV) の疫学調査 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 2014 年 11 月
- 19) 福本瞳 高橋健太 佐藤由子 峰宗太郎 保科しほ 中島典子 佐伯秀久 長谷川秀樹 黒田誠 片野晴隆 網羅的ウイルス検出法 multivirus real-time PCR の改良と臨床検体への応用 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 2014 年 11 月
- 20) 竹田誠 中島典子 河岡義裕 TMPRSS2 は, インフルエンザの病原性発現に必須の宿主プロテアーゼである 第 88 回日本感染症学会学術講演会 (福岡) 2014
- 21) 竹田誠, 中島典子, 水田克巳 宿主プロテアーゼ TMPRSS2 は, 急性呼吸器感染症ウイルスの生体内活性化酵素である 第 55 回日本臨床ウイルス学会 (札幌) 2014

- 22)仲里巖,喜舎場由香,新垣和也,加藤誠也,中島典子,片野晴隆,長谷川秀樹. 新生児心筋炎の3剖検例 第103回日本病理学会総会(広島)2014
- 23)秋田英貴,鄭子文,中島典子,星本和種,笹島ゆう子,瀧本雅文.風疹感染胎盤の一例 第103回日本病理学会総会(広島)2014
- 24)中島典子,渡辺登喜子,佐藤由子,高橋健太,鈴木忠樹,田代真人,河岡義裕,長谷川秀樹. ヒトから分離された H7N9 亜型鳥インフルエンザウイルス感染動物モデルの病理学的解析.第103回日本病理学会総会(広島)2014

- 25)長谷川秀樹,亀井敏昭,高橋徹,鈴木忠樹,片野晴隆,中島典子,森川茂,西條政幸,倉田毅 日本国内で発生した重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の病理解析. 第103回日本病理学会総会(広島)2014

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

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した。1. ウイルス血症を引き起こすウイルス感染症を対象として，血中のウイルス粒子の電子顕微鏡学的検出法について検討し，手順を整理した。2. 検出感度と精度を向上するための改良法の一つとして，電子顕微鏡検索のためのサンプルの濃縮方法について Global Health Security Action Group Laboratory-Network の活動の一環である，GHSAG Wet-Lab Workshop on Diagnostic Electron Microscopy of Pathogens, Winnipeg 2015 (平成 27 年 9 月 24, 25 日 National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canada 主催) に参加し実習した内容について報告した。3. 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。5 回の参加を通し，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

鈴木忠樹・国立感染症研究所感染病理部・室長

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

片岡紀代・国立感染症研究所感染病理部・非常勤職員

長谷川秀樹・国立感染症研究所感染病理部・部長

高崎智彦・国立感染症研究所ウイルス第一部・室長

西條政幸・国立感染症研究所ウイルス第一部・部長

森川茂・国立感染症研究所獣医科学部・部長

A. 研究目的

透過型電子顕微鏡による病原体の検出方法は迅速性，簡便性に優れ，スクリーニングによる包括的な鑑別診断が可能という点でバイオテロ対策や新興・再興感染症の

ウイルス学的診断の一助となる。本研究では，バイオテロに使用される可能性のある病原体等を中心とした電子顕微鏡を用いた迅速検出法の確立を目的として，1. BSL3, BSL2 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。

(1) 血液検体からの病原体の電子顕微鏡学的検出法について

2014 年は，デング出血熱の日本国内発生や西アフリカにおけるエボラウイルスのアウトブレイクによる輸入感染疑い例の発生が問題となった。いずれも高いウイルス血症が特徴的であり，患者血清を用いたウイルス粒子の検出が可能な感染症である。そこで，血液検体からのウイルス粒子の検出法の標準手順書の見直しを行った。

(2) 電子顕微鏡検索のためのサ

サンプルの濃縮方法について

検出感度と精度を向上するための改良法の一つとして、電子顕微鏡検索のためのサンプルの濃縮方法について Global Health Security Action Group Laboratory-Network の活動の一環である、GHSAG Wet-Lab Workshop on Diagnostic Electron Microscopy of Pathogens, Winnipeg 2015（平成 27 年 9 月 24、25 日 National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canada 主催）に参加し実習した内容について報告する。なお、本ワークショップは、バイオテロリストによるバイオ攻撃や感染症の病原体の電子顕微鏡的迅速診断法に携わる専門家の技術訓練、技術の向上、危機的状況における安全かつ迅速で電子顕微鏡学的診断評価の正確性の訓練と向上を目的としている。

- (3) 電子顕微鏡を用いた病原体の検出に関する外部評価について
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

1. 血液検体からの病原体の電子顕微鏡学的検出法について

高いウイルス血症を引き起こすウイルス感染症を文献的にリストし、各ウイルス粒子電子顕微鏡像のリファレンス標本を整理した。また、不活化法を文献的に調査し、標準手順を見直した。対象とするウイルス粒子の標本は、これまでにわれわれが当該研究で準備し、撮影したもの（表中に NIID と表記）、Koch 研究所による外部評価の際にわれわれが撮影したもの（同、EQA）、および、2010 年 12 月 1-2 日に Koch 研究所主催された GHSAG wet-lab workshop on diagnostic electron microscopy of pathogens でわれわれが撮影した画像（同、GHSAG）を含む。

2. 電子顕微鏡検索のためのサンプルの濃縮方法について

電子顕微鏡による検査において、目的の粒子が少ない場合のサンプルの濃縮法

（Beniac DR et al., 2014）を実習した。まず、ポリカーボネートフィルター（SPI-Pore Standard Polycarbonate Track Etch filter, SPI Supplies, PA, USA）を準備し、フィルターユニット（Millipore 13 mm Swinnex）に装着する。10 μ l～50 ml までの液量のサンプルを 5 mL のシリンジに充填し、準備したフィルターユニットに連結する。ただし、サンプルの液量が少ない場合は 2 mL 以上のリン酸緩衝液あるいは生理食塩水に懸濁し、増量する。シリンジ内に充填したサンプルをシリンジポンプ（1000 μ l/分）で濾過し、フィルターユニット内のポリカーボネートフィルターに粒子をトラップする。なお、シリンジポンプで濾過する際には、シリンジを垂直、フィルターは水平に設置する。

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

- 0.1 μ m（レプトスピラ、エボラウイルス）
- 0.08 μ m（ワクチニアウイルス）
- 0.03 μ m（ヘルペスウイルス、バクテリオファージ）

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

3. 電子顕微鏡を用いた病原体の検出に関する外部評価について

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，リ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．私たちは，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】

該当なし

C. 研究結果

1. 血液検体からの病原体の電子顕微鏡学的検出法について

高ウイルス血症を引き起こす可能性のある主なウイルスの粒子の特徴と電子顕微鏡像を表1にまとめた．他にA型肝炎ウイルス (*Picornaviridae*, *Hepatovirus*)，パルボウイルス B19 (*Parvoviridae*, *Erythrovirus*) が主なウイルスとして挙げられる．また，血液中のウイルス粒子の迅速検出法の標準手順を図1にまとめた．不活化処理は，文献的に調査し，Koch 研究所および CDC の標準手順を考慮した結果，2%-4% グルタルアルデヒドもしくは2%パラホルムアルデヒド液で30分～2時間室温固定(200 μ l で十分)し，紫外線照射との組み合わせで行うこととした．

2. 電子顕微鏡検索のためのサンプルの濃縮方法について

実習のために準備されたサンプルには，グルタルアルデヒド固定済みのワクチニアウイルスあるいはレプトスピラが含まれていた．本法を利用する事によって， 5×10^3 粒子数/1 検体のものから病原体を検出する事ができた．作業に要する時間は30分程度であった．ただし，ワクチニアウイルスを含むサンプルには，同程度の大きさ(およそ500 nm)の夾雑物が含まれていたため，走査電子顕微鏡観察によるウイルス粒子と夾雑物の判別は困難であり，熟練者による指導が必要であった．同じサンプルを用いて，ネガティブ染色法を用いた透過型電子顕微鏡検査では，ウイルス粒子の表面構造が明瞭に観

察され，夾雑物との判別は用意であった．一方で，レプトスピラを含むサンプルでは，ネガティブ染色法を用いた透過型電子顕微鏡による検出は全く不可能で，濃縮法と走査電子顕微鏡観察の組み合わせによってはじめて検出する事が可能であった．

3. 電子顕微鏡を用いた病原体の検出に関する外部評価について

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2)．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

1. 血液検体からの病原体の電子顕微鏡学的検出法について

実際に高ウイルス血症発症時の Dengue 熱患者の血清を用いて電子顕微鏡学的にウイルス粒子の検出を試みると，直接法

の場合は、染色液は酢酸ウラン液を用いるよりもリンタングステン酸を用いた方が、染色液の浸透が効率よく、血清原液でも粒子を検出することが可能であった（データは示さない）。しかしながら、血清由来タンパクなどの夾雑物が多いため、10倍以上のリン酸緩衝液による希釈を行った方が、検出効率が高かった。よって、実際に患者血清を検索する場合は、血清原液をある程度、段階希釈し、リンタングステン酸染色を選択した方がよいであろう。しかしながら、電子顕微鏡学的観察には、少なくとも 10^6 /ml 以上のウイルス粒子が存在しないと検出が困難となり、病期によっては、ウイルス量が低く、超遠心等を利用したウイルス粒子の濃縮が必要となる。また、病原体によっては、白血球への感染が優勢との報告があるため（エボラウイルス、オルソポックスウイルス、細胞内寄生性細菌など）、白血球を回収し、これを迅速包埋し検索に用いた方が効率がよい可能性もある。また、2014年の西アフリカにおけるエボラウイルスの大流行をうけ、今後は、BSL4 病原体にも十分対応ができるように標準手順書を見直す必要がある。

2. 電子顕微鏡検索のためのサンプルの濃縮方法について

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

で代用できる。

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

3. 電子顕微鏡を用いた病原体の検出に関する外部評価について

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。私たちが誤答したうちの 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

1. 血液中のウイルス粒子の電子顕微鏡学的検出法について検討し、手順を整理した。
2. 病原体の電子顕微鏡学的迅速検出法に必要な、目的粒子が少ない場合のサンプルの濃縮法を習得した。
3. 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) Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Sato Y, Nakajima N, Koike S, Iwasaki T, Sata T, Yamashita T, Minagawa H, Taguchi F, Hasegawa H, Shimizu H, Nagata N. Establishment of a panel of in-house polyclonal antibodies for the diagnosis of enterovirus infections. *Neuropathology*. 2014. doi: 10.1111/neup.12171.
- 2) Iwata-Yoshikawa N, Uda A, Suzuki T, Tsunetsugu-Yokota Y, Sato Y, Morikawa S, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H, Nagata N. Effects of Toll-like receptor stimulation on eosinophilic infiltration in lungs of BALB/c mice immunized with UV-inactivated severe acute respiratory syndrome-related coronavirus vaccine. *J Virol*. 2014. 88:8597-8614
- 3) Koma T, Yoshimatsu K, Nagata N, Sato Y, Shimizu K, Yasuda SP, Amada T, Nishio S, Hasegawa H, Arikawa J. Neutrophil depletion suppresses

pulmonary vascular hyperpermeability and occurrence of pulmonary edema caused by hantavirus infection in C.B-17 SCID mice. *J Virol*. 2014. 88:7178-7188

- 4) 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.
- 5) 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/s00705-017-3251-2

2. 学会発表

- 1) 岩田奈織子, 福士秀悦, 福間藍子, 鈴木忠樹, 竹田誠, 田代真人, 長谷川秀樹, 永田 典代. 中東呼吸器症候群コロナウイルスに対するマウスおよびラットの感受性について. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 2014 年 11 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表1. 高ウイルス血症を引き起こす可能性のある主なウイルスの粒子の特徴と電子顕微鏡像

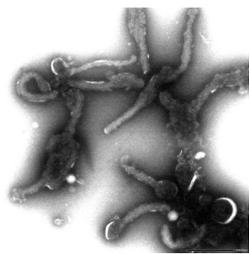
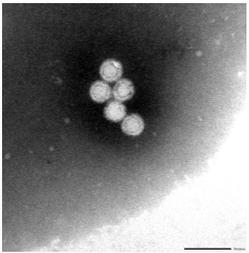
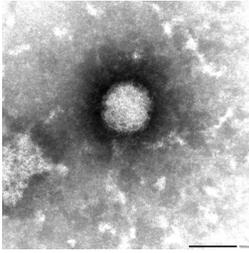
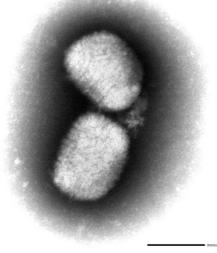
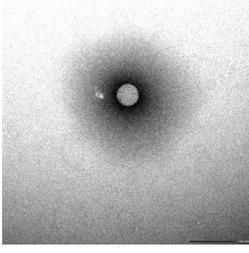
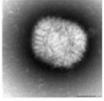
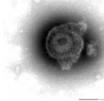
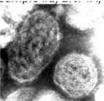
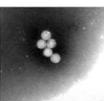
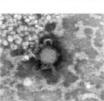
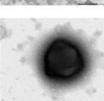
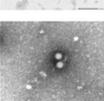
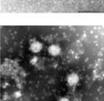
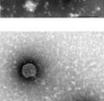
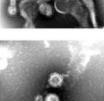
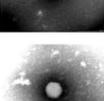
ウイルス名 (科 Family 属 Genus)	エンベ ロープ (核 酸)	形状	粒子の径 (ヌクレオ カプシド 径)	電子顕微鏡像 .PTA 染色 によるネガティブ像 (ウイルス名と撮影)	同科の感染 症法に基づ く特定病原 体(属)
エボラウイルス (Filoviridae Ebolavirus)	あり (- 鎖 RNA)	フィラ メント 状が優 勢	80 × 1200 nm (50 nm)		エボラウイ ルス属, マー ルブルグウ イルス属
				(Zaire EV/GHSAG2010)	
デングウイルス (Flaviviridae Flavivirus)	あり (+ 鎖 RNA)	球状	40-60 nm (30 nm)		フラビウイ ルス属
				(flavivirus / EQA24)	
SFTS ウイルス (Bunyaviridae Phlebovirus)	あり ファジ ー状 (- 鎖 RNA (3分 節))	球状	90 -120 nm (9 nm)		ナイロウイ ルス属, ハン タウイルス 属, フレボウ イルス属
				(SFTS virus/NIID)	
痘瘡ウイルス (Poxviridae Orthopoxvirus)	あり (2本 鎖直鎖 DNA)	レンガ 状, 楕 円形	200-350 × 115-260		オルソポッ クスウイル ス属
				(Vaccinia/EQA25)	
B 型肝炎ウイルス (HBV) Hepadnaviridae Orthohepadnavirus	あり (2本 鎖 DNA)	球状	42 nm (28 nm)		該当なし
				(HBV/EQA27)	

表 2. 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



図 1. 血液中のウイルス粒子の迅速検出法の標準手順。不活化は 2%-4% グルタルアルデヒドもしくは 2% パラフォルムアルデヒド液で 30 分～2 時間室温固定 (200 μ l で十分) し、紫外線照射との組み合わせで行う。

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。まず，サル痘ウイルスのマウス感染実験系の基礎検討をおこなった。BALB/c マウスに 2 種類のサル痘ウイルスを皮下接種したところ，感染成立を示唆する所見が得られた。そこでこの感染系を利用し，抗 Ly6G 抗体投与による好中球枯渇マウスに対する感染実験を行った。その結果，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

原嶋綾子・国立感染症研究所感染病理部・非常勤職員

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

森川茂・国立感染症研究所獣医科学部・部長

例 2 頭と回復サル 2 頭の病態病理を解析した。その結果，劇症型では免疫中枢組織における強い壊死を伴う病変形成が，病態に大きく関与することが推察された (Nagata *et al.*, 2014)。劇症型サル痘発症の要因は，脾，免疫不全状態，特に骨髓低形成による好中球低下症が関連していると推察された。そこで，好中球の重症化における役割を明らかにするために，サル痘ウイルスのマウス感染実験系の基礎検討を行ったところ，マウスは無症状で耐過したが感染を示唆する所見が得られた。そこで，この感染系を利用し，抗 Ly6G 抗体投与による好中球枯渇の感染後の影響について検索を行った。

A. 研究目的

サル痘ウイルスは，ポックスウイルス科オルソポックスウイルスに属し，アフリカ中央部から西部に分布するガンビアンラットなどのげっ歯類を宿主としている。愛玩動物としてアフリカから輸入されたげっ歯類からの感染事例が 2003 年に米国にて報告されており，免疫抑制状態のヒトでは天然痘類似の全身性疾患（ヒトサル痘）を引き起こす。われわれは，劇症型サル痘の発症機序を明らかにする目的で，サル痘ウイルス実験的感染カニクイザルの死亡

B. 研究方法

1. 概要

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。

2. 二つの分離株を用いた基礎検討

ウイルスは，Monkeypox virus の Liberia 株および Zr-599 株を用い，ウイルス液（一匹あたり 10^6 PFU ウイルス量 / 50 μ l）を頸背部に皮下接種し，臨床症状と体重変化を 16 日間観察した（一群 6

匹). 接種 7 日目には, 一群あたり 4 匹を過麻酔殺し, 心臓採血と病理解剖を行った. 採取した血液は, ヘパリンを添加し, 動物用血球計数装置 ベトスキャン HM II (Avaxis 社) で白血球数, リンパ球数, 単球数, 顆粒球数を測定し, 比較した.

3. 好中球枯渇実験

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 日目には, 一群あたり 4 匹を過麻酔殺し, 心臓採血と病理解剖を行った. 残りの個体 (一群 6 匹) については, 臨床症状と体重変化を 16 日間観察した. 観察期間終了後, いずれの個体も過麻酔殺し, 心臓採血と病理解剖を行った. 採取した血液は, ヘパリンを添加し, 採血当日に動物用血球計数装置 ベトスキャン HM II (Avaxis 社) で白血球数, リンパ球数, 単球数, 顆粒球数を測定し, 比較した.

【倫理面への配慮】

本動物実験は, 国立感染症研究所の動物実験委員会に承認された実験計画に従って行った.

C. 研究結果

1. 二つの分離株を用いた基礎検討

体重変化, 皮膚所見, 臨床症状の点で, いずれの株も皮下接種後の BALB/c マウスに対して明らかな病原性を発揮しなかった (図 1). 接種 7 日目の末梢血中の白血球数は, 対照群に比べてウイルス接種群で有意に少なく, それは, リンパ球数と顆粒球数の減少によるものであった (図 2). 病理解剖を行ったところ, Zr-599 株接種群の脾の軽度の腫大がみられ, 光顕的に T 細胞領域の軽度の拡大が確認された (データは示さない). その他の腹腔, 胸腔内臓器に著変は認められな

かった.

2. 好中球枯渇実験

体重変化, 皮膚所見, 臨床症状の点で, いずれの群も明らかな病変は認められなかった (図 3). しかしながら, 接種 7 日目の末梢血中の白血球数は, 好中球枯渇-非ウイルス接種群に比べ, 好中球枯渇-ウイルス接種群では顆粒球数は高値であった (図 4). さらに, 接種 16 日目には好中球枯渇-ウイルス接種群でリンパ球と顆粒球の増加により白血球数は有意に高値を示した.

接種 7 日目の病理解剖の結果, 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 5). 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

私たちは, オルソポックスウイルス感染後の重症化の宿主側因子を明らかにして, 最終的には, 痘瘡ワクチン (弱毒株) 接種者における重篤な副反応要因を明らかにすることを目標としている. さらに, サル痘サルモデルに代わる, 小動物感染モデルの作出が望ましい. マウス痘の原因となるエクトロメリアウイルスは, BALB/c マウス等, 一部の近交系マウスに対して強い病原性を発揮する. よって, 私たちの研究目的の第一選択とするウイルスとしては不相当と考え, 比較的, 弱い毒力を発揮するウイルスを選択することとした.

Hutson らは, 2003 年にアメリカ合衆国でおきたサル痘アウトブレイクと同年にコンゴでのアウトブレイクでそれぞれ分離されたサル痘ポックスウイルスを BALB/c マウスと C57BL/6 マウスの足蹠皮下あるいは経鼻接種を行い, いずれも致死的是ではなかったものの, 一時的な足蹠の腫脹 (皮下接種), 体重減少 (経鼻接種) と中和抗体価の上昇がみられたことから近交系マウスでもサル痘ウイルス感染が成立し, マウスモデルとして使用できると結論づけた

(Hutson et al., 2009).

今回使用したサル痘ウイルスは、Hutsonらの報告と同様、BALB/c に対して強い病原性を発揮しなかった。しかしながら、血球像、脾の変化が認められたことから、感染は成立していることが予想された。

次に 2 つのサル痘ウイルス臨床分離株のうち、マウスに白血球減少を引き起こした Zr-599 株を使用し、好中球枯渇実験を行った。接種 7 日目の好中球枯渇-非ウイルス接種群において顆粒球は低値であったことから、非感染マウスにおいて抗体投与による好中球枯渇の効果はあったと考えられる。しかしながら、同日の好中球枯渇-ウイルス接種群の顆粒球数は、ウイルス感染群と同程度であったため、ウイルス感染により、抗 Ly6G 抗体の枯渇効果は減弱したようにみえるので、抗体投与に関して改良が必要と考えられた。一方で、好中球枯渇-ウイルス接種群で副腎の皮質壊死がみられたことから、好中球枯渇群では皮下接種後にウイルス血症が成立したことが示唆された。接種 16 日目の好中球枯渇-ウイルス接種群で白血球数は有意に高値であり、それは主にリンパ球数と顆粒球数の増加によるものであった。

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が、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

BALB/c マウスのサル痘ウイルス皮下感染モデルを利用し、感染初期の好中球枯渇がウイルス動態と免疫応答に影響を与える事を示した。よって、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) Nagata N, Saijo M, Kataoka M, Ami Y, Suzuki Y, Sato Y, Iwata-Yoshikawa N, Ogata M, Kurane I, Morikawa S, Sata T, Hasegawa H. Pathogenesis of fulminant monkeypox with bacterial sepsis after experimental infection with West African monkeypox virus in a cynomolgus monkey. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014. 7:4359-4370
- 2) Nagata N, Iwata-Yoshikawa N, Hayasaka D, Sato Y, Kojima A, Kariwa H, Takashima I, Takasaki T, Kurane I, Sata T, Hasegawa H. The pathogenesis of 3 neurotropic flaviviruses in a mouse model depends on the route of neuroinvasion after viremia. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2015. 74(3):250-260.
- 3) 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*. 2016. Doi 10.7883/yoken.JJID.2016. 417.

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

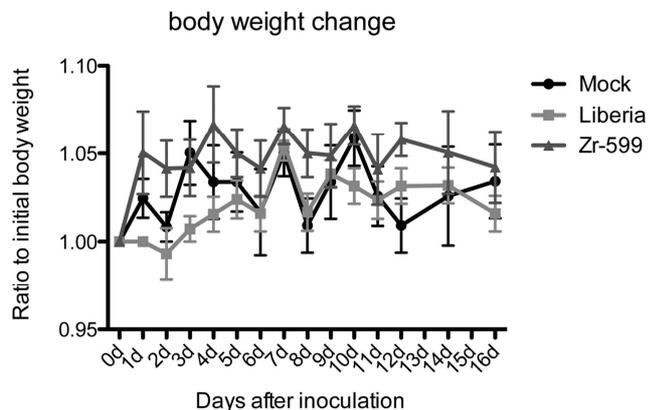


図 1. サル痘ウイルス皮下接種後のマウスの体重変化 .各群 n=6 .各群間で有意差はみられない .

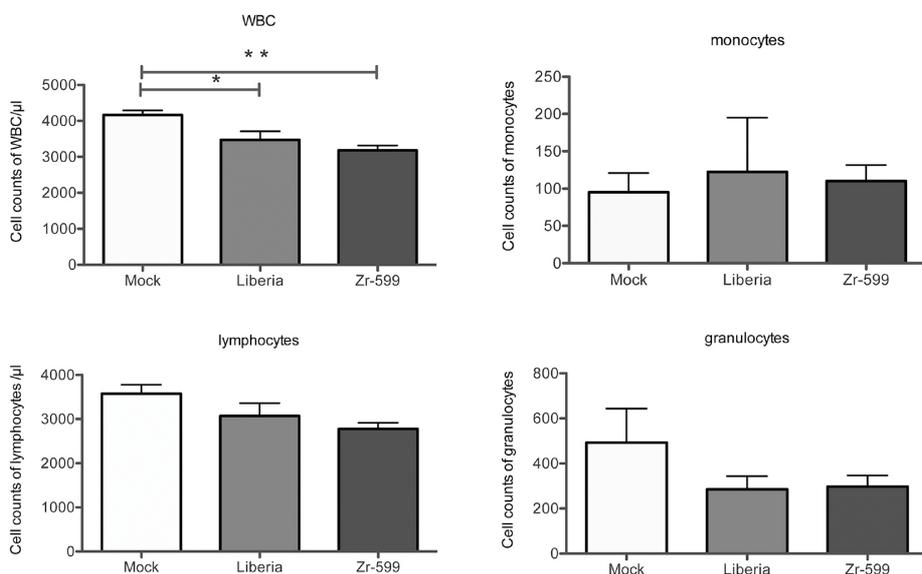


図 2. サル痘ウイルス皮下接種後 7 日目の血球数の比較 .各群 n=4 .白血球数に有意差がみられ , それは主にリンパ球数と顆粒球数の減少によるものであった .

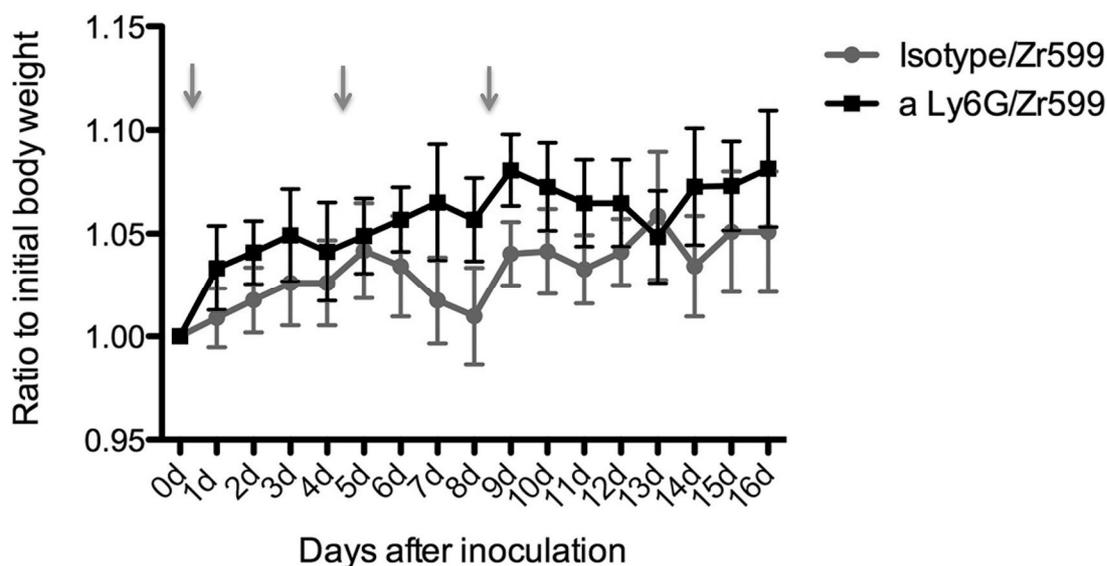


図 3. サル痘ウイルス皮下接種後の好中球枯渇群(a Ly6G/Zr599)および対照群 (Isotype/Zr599) マウスの体重変化 . 各群 n=6 . 各群間で有意差はみられない .

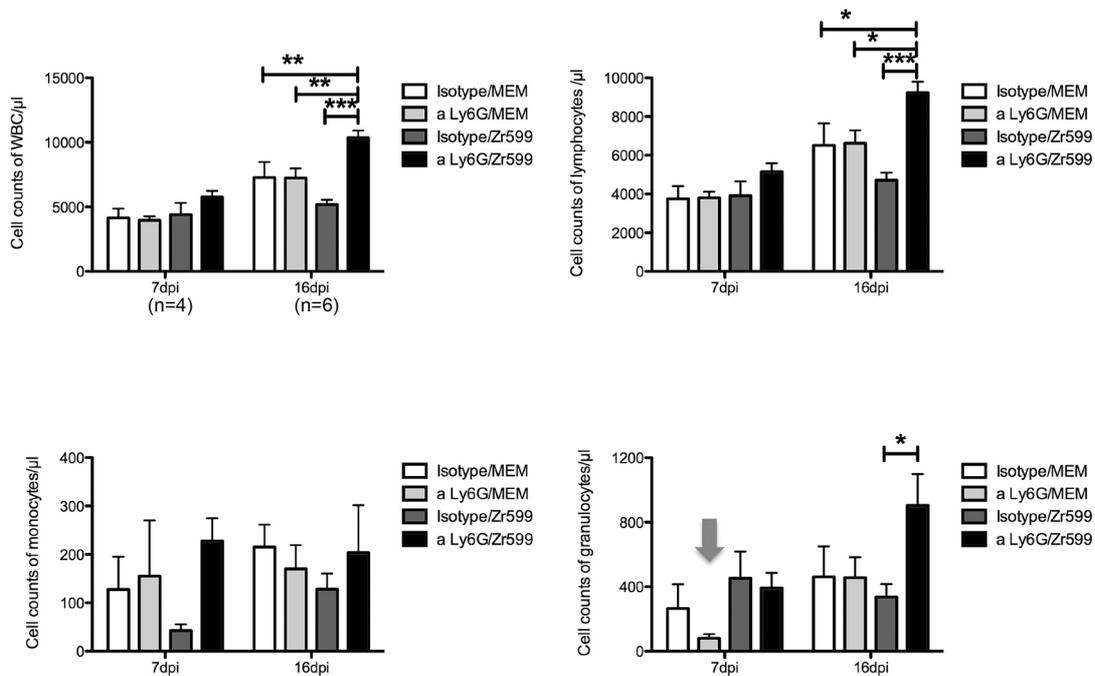


図4．サル痘ウイルス皮下接種後7および16日目の血球数の比較．各群 n=4または6．接種7日目の好中球枯渇-非ウイルス接種群(a Ly6G/MEM)において顆粒球は低値であり，抗体の効果はみられているものの，同日の好中球枯渇-ウイルス接種群(a Ly6G/Zr599)では，ウイルス感染群(Isotype/Zr599)群と同等であった．さらに，接種16日目には好中球枯渇-ウイルス接種群(a Ly6G/Zr599)で白血球数は有意に高値であり，それは主にリンパ球数と顆粒球数の増加によるものであった．

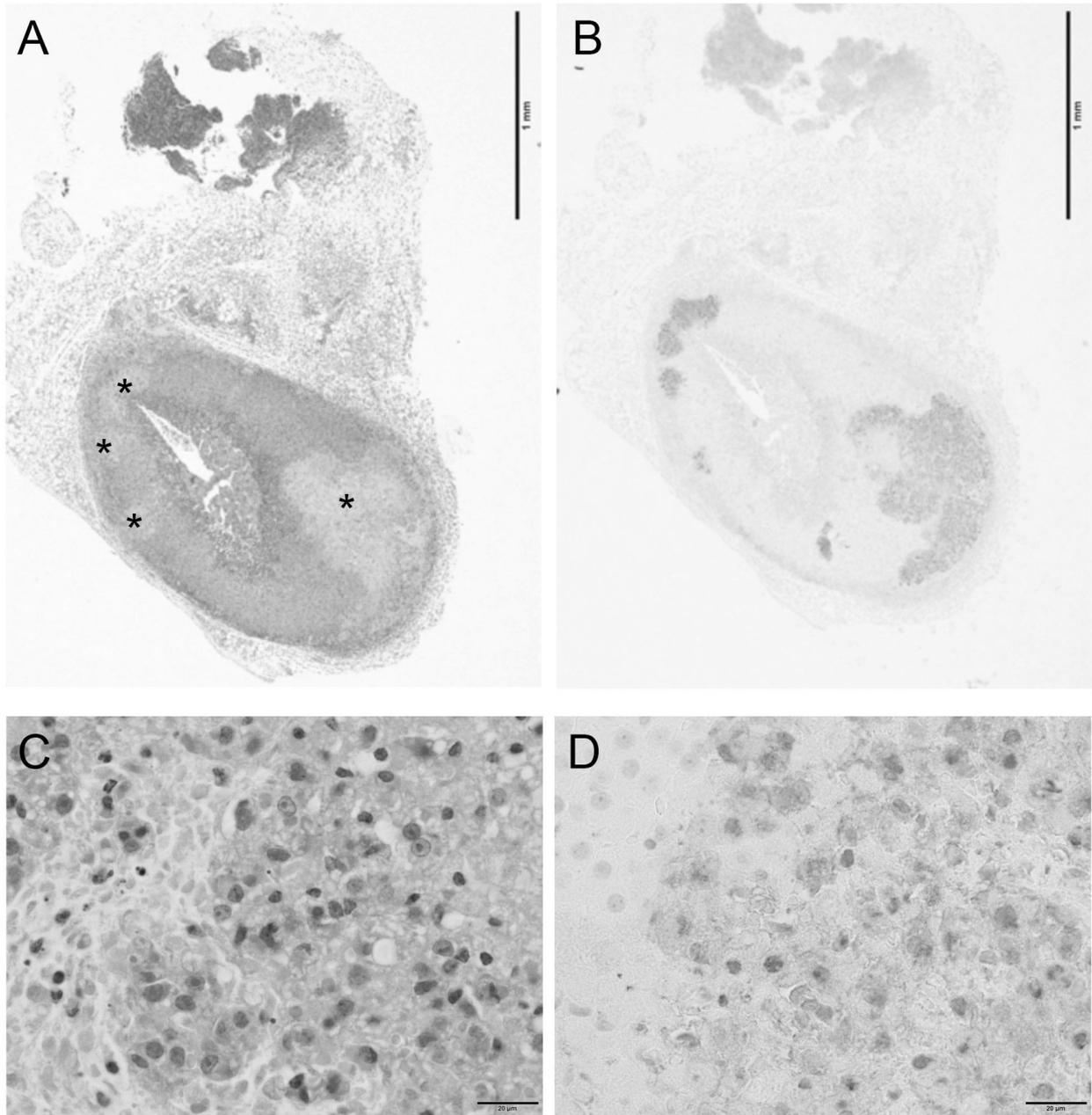


図5. サル痘ウイルス皮下接種後の好中球枯渇マウスの副腎. A, 副腎皮質に巣状の壊死部が認められる (*). 又, 副腎周囲の脂肪組織に炎症性細胞浸潤が認められた. B, 壊死部に一致してウイルス抗原が検出された. C, D 壊死部の拡大. 壊死部に残存する細胞の核と細胞質は好酸性を呈し, いずれもウイルス抗原陽性であった. A, C, ヘマトキシリン・エオジン染色. B, D, 免疫組織化学法によるウイルス抗原の検出.

平成 26 年度～平成 28 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金
(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)

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

分担報告書

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：バイオテロ対応において地方衛生研究所（地衛研）は原因物質（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。本分担研究は特定病原体等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、地衛研における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。3年間に亘り、アンケート調査を実施し、バイオテロ対応（特に、特定病原体検出）における地衛研や国立感染症研究所が提供している病原体検出マニュアルの課題を抽出し、課題提起、そして改善状況を検証した。病原体検出マニュアルは課題提起により記載事項の増加や充実など、年度毎に改善した。現在、残存する課題として、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）に関する検出マニュアルの整備、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）に関し、所管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発生を想定した対応模擬訓練の実施（大阪府や近畿地区は整備・実施しているが、他地区は未整備・未実施）などが、抽出された。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。

研究協力者（所属機関・職名は当時）
（北海道・東北・新潟地区）
水田克巳・山形県衛生研究所・所長
八柳潤・秋田県健康環境センター・上席研究員
（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）
内野清子・堺市衛生研究所・ウイルス検査担当・総括研究員
三好龍也・堺市衛生研究所・ウイルス検査担当・主任研究員
杉本光伸・堺市衛生研究所・細菌検査担当・総括研究員
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）
千々和勝己・福岡県保健環境研究所・副所長
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地方衛生研究所（地衛研）は原因物質（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。本分担研究は特定病原体等（http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisaku-jouhou-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、地衛研における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

地衛研の全国組織である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，近畿地区で実施した 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，患者など研究対象者は包含せず，倫理面に問題ないと判断した。また，利益相反はなかった。

C. 研究結果

1. 現行の感染研病原体検出マニュアル（表 1）

3 年間に亘る問題提起や課題解決により，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・未整備は 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），4 類感染症（17 疾患）となり，記載事項の増加や充実など改善した（表 1）。また，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。

2. 新規検査マニュアルの整備の必要性（表 2）

痘瘡（1 類，一種，BSL-4）はバイオテロで発生が最も危惧され，アメリカ合衆国疾病管理予防センター（CDC）の Category A に分類されている（http://fas.org/biosecurity/resource/documents/CDC_Bioterrorism_Agents.pdf）。しかし，痘瘡ウイルスの検出マニュアルは依然として未整備であった。皮疹の性状は痘瘡と水痘で類似しているため，鑑別診断が求められ，痘瘡の検出検出マニュアル整備は必要である。なお，水痘ウイルス（ワクチン株を含む）の検出マニュアルは整備され，改善した。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。

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（表 2）。しかし，これら毒素は感染研病原体検出マニュアルに未記載であった。

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

厚生労働科学研究や地域ブロック研修会などを通じ，情報共有や技術習得が進展した。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も進行している。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，各支部の感染症対策部会が充実した。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。

4. 地衛研と感染研の連携強化

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，精度管理が推進された。感染研の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，連携が強化された。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。

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。未知原因物質は年度により異なるが、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、

地衛研におけるバイオテロ対応の現状と課題について、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。国や自治体間の連携が求められる。

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、多くの改善が認められた。

未克服の主要な課題として、下記の1) - 4)が挙げられる。

- 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。

- 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(表2)。
- 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。近畿地区の地衛研において NBC テロを含む健康危機の発生を想定した対応模擬訓練が毎年度実施されているが、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。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) Adachi, Y., T. Onodera, Y. Yamada, R. Daio, M. Tsuji, T. Inoue, K. Kobayashi, T. Kurosaki, M. Ato, and Y. Takahashi. 2015. Distinct germinal center selection at local sites shapes memory B cell response to viral escape. *J. Exp. Med.* 212: 1709-1723. doi:10.1084/jem.20142284
- 3) Kitada, S., K. Yoshimura, K. Miki, M. Miki, H. Hashimoto, H. Matsui, M. Kuroyama, F. Agheshio, H. Kagawa, M. Mori, R. Maekura, and K. Kobayashi. 2015. Validation of a commercial serodiagnostic kit for diagnosing pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 19: 97-103. doi: 10.5588/ijtld.14.0564
- 4) 小林和夫. 2015. マイコバクテリウム属（抗酸菌）. 標準微生物学 第12版（中込治，神谷茂編）東京：医学書院. 276-288. ISBN: 978-4-260-02046-6

- 5) Kobayashi, K. 2014. Review. Serodiagnosis of *Mycobacterium avium* complex disease in humans. Translational research from basic mycobacteriology to clinical medicine. *Jpn. J. Infect. Dis.* 67: 329-332. doi.org/10.7883/yoken.67.329
 - 6) Matsuzaki, Y., K. Sugawara, M. Nakauchi, Y. Takahashi, T. Onodera, Y. Tsunetsugu-Yokota, T. Matsumura, M. Ato, K. Kobayashi, Y. Shimotai, K. Mizuta, S. Hongo, M. Tashiro, and E. Nobusawa. 2014. Epitope mapping of the hemagglutinin molecule of A/(H1N1)pdm09 influenza virus by using monoclonal antibody escape mutants. *J. Virol.* 88: 12364-12373. doi:10.1128/JVI.01381-14
 - 7) Sugamata, R., A. Sugawara, T. Nagao, K. Suzuki, T. Hirose, K. Yamamoto, M. Oshima, K. Kobayashi, T. Sunazuka, K.S. Akagawa, S. Omura, T. Nakayama, and K. Suzuki. 2014. Leucomycin A₃, a 16-membered macrolide antibiotic, inhibits Influenza A virus infection and disease progression. *J. Antibiot.* 67: 213-222. doi: 10.1038/ja.2013.132
 - 8) 小林和夫. 2014. 細菌および真菌による呼吸器感染症（§ 9・2・1）. 病原微生物学. 基礎と臨床（荒川宣親，神谷茂，柳雄介編）東京：東京化学同人. 239-244. ISBN: 978-4-8079-0827-1
- ##### 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
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
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
3類感染症	全て記載およびリンク済		腎症候性出血熱	3	三種
			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>)

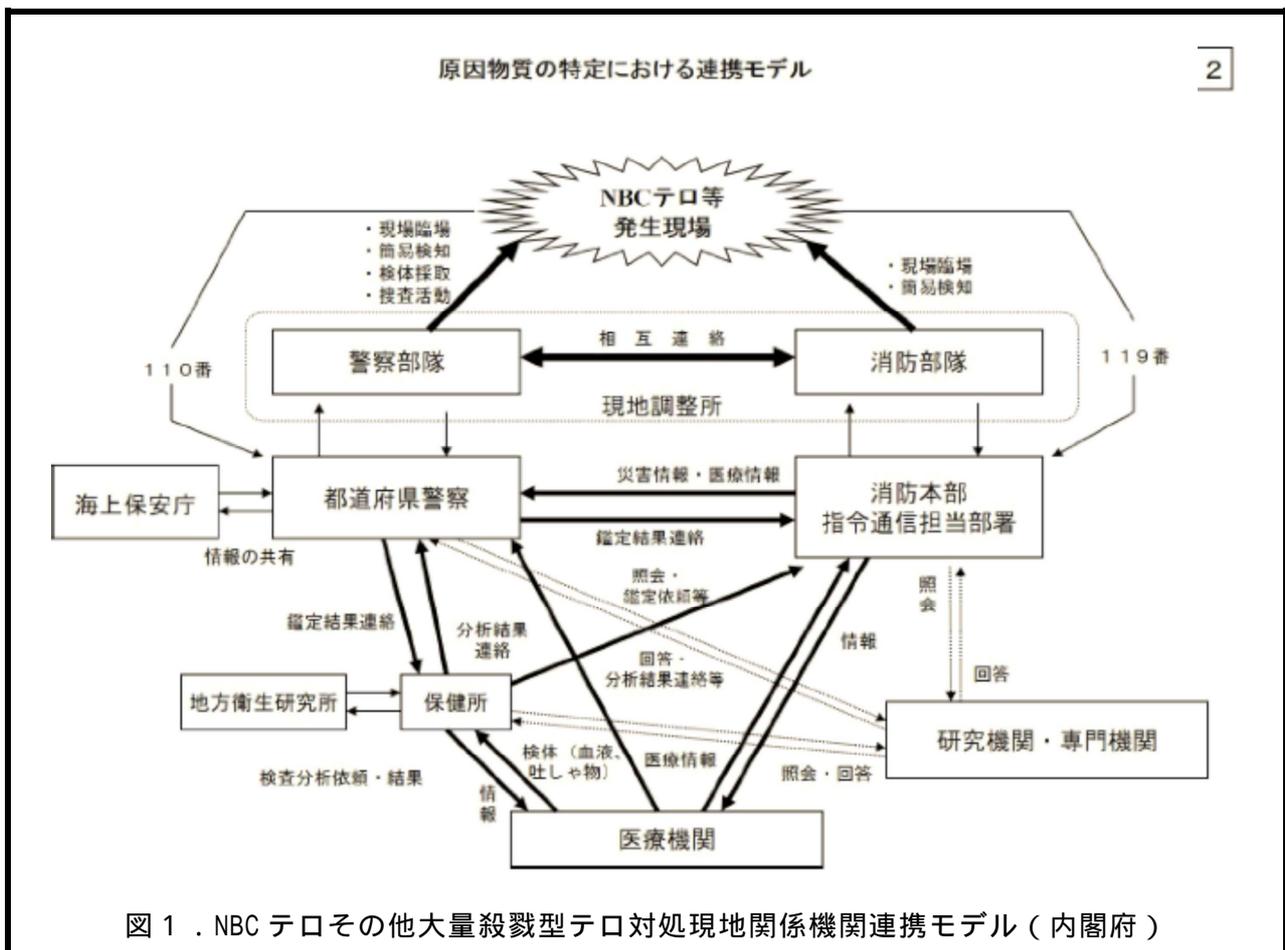
*特定病原体は感染症法に基づく特定病原体等の管理規制に準拠(2015年05月21日)

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

表2. バイオテロに用いられる可能性のある分類: 米国疾病管理予防センター (CDC)

Category A
➤ Anthrax (<i>Bacillus anthracis</i>)
➤ Botulism (<i>Clostridium botulinum</i> toxin)
➤ Plague (<i>Yersinia pestis</i>)
➤ Smallpox (<i>variola major</i>)
➤ Tularemia (<i>Francisella tularensis</i>)
➤ Viral hemorrhagic fevers (filoviruses [e.g., Ebola, Marburg] and arenaviruses [e.g., Lassa, Machupo])
Category B
➤ Brucellosis (<i>Brucella species</i>)
➤ Epsilon toxin of <i>Clostridium perfringens</i>
➤ Food safety threats (e.g., <i>Salmonella species</i> , <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Shigella</i>)
➤ Glanders (<i>Burkholderia mallei</i>)
➤ Melioidosis (<i>Burkholderia pseudomallei</i>)
➤ Psittacosis (<i>Chlamydia psittaci</i>)
➤ Q fever (<i>Coxiella burnetii</i>)
➤ Ricin toxin from <i>Ricinus communis</i> (castor beans)
➤ Staphylococcal enterotoxin B
➤ Typhus fever (<i>Rickettsia prowazekii</i>)
➤ Viral encephalitis (alphaviruses [e.g., Venezuelan equine encephalitis, eastern equine encephalitis, western equine encephalitis])
➤ Water safety threats (e.g., <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Cryptosporidium parvum</i>)
Category C
➤ Emerging infectious diseases such as Nipah virus and hantavirus

https://fas.org/biosecurity/resource/documents/CDC_Bioterrorism_Agents.pdf



平成 26 年度～平成 28 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金
(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)

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

分担報告書

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 of 網羅的迅速診断法も開発した．しかし病原体の入手が困難なことから特異性の検討は十分とはいえず，鑑別診断とその普及および検査ネットワーク整備に問題を残している．ホームページの活用には，画像が有力な情報となるがいまだ少なく，疾患の追加，治療法や除染法を含めた内容のアップデートそして実際の対応体制の整備も不十分である．当分担研究班では，バイオテロ関連病原体等の迅速診断検査，抗体検査，病原体分離同定法，特に特定病原体等の中の細菌性感染症を中心として，網羅的な検出・検査法を確立し，広く社会に還元することを目的として研究を遂行する．

対象として各種ウイルス，リケッチア，細

菌,毒素等のバイオテロに使用される可能性がある病原体が想定されるが,特に炭疽菌は芽胞としての安定性,乾燥や熱に対する抵抗性,比較的簡単に培養ができることなどから生物兵器の最有力候補として常に注目をあびてきた.炭疽菌は危険度レベル3に属する細菌で,他にペスト,鼻疽/類鼻疽,野兔病,結核,チフス,ブルセラが細菌としてこのレベルに入る.その中で,生物兵器として使用可能なものは炭疽以外にペスト,鼻疽/類鼻疽,野兔病,チフス,ブルセラが想定されるが,検査法や治療法,さらには診断法がまだ確立されていない菌種は鼻疽/類鼻疽,野兔病,ブルセラである.そこで,本研究では,危険度を考慮して炭疽菌の検出法の更なる改良・開発,および鼻疽/類鼻疽,野兔病,ブルセラ症などの危険度3に属する病原体に対する検出・診断法の確立及び治療・予防法の開発や改良を行い,患者検体および環境中からの迅速な検出および診断法の開発を行う.診断法の実用化に当たっては事件発生現場での利用が可能な方法と,検査室における方法の両面からの実用化を目指す.さらに,種々の化学物質および薬剤に対する病原体の感受性に関する検討を行い臨床利用に備える.また,従来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.従って,テロ発生後の除染活動を念頭に,これまでに臨床検体からの迅速検出を目的に開発した検査法を環境検体からの検出へと応用できるよう,環境検体のなかでも病原体の検出が特に困難とされる土壌検体を用いて検体処理法の改良を行った.研究には,バイオテロに利用される可能性の高い5種類の細菌性病原体(炭

疽菌,野兔病菌,ブルセラ菌,ペスト菌,類鼻疽菌)を検査対象と設定して,これら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.更に,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.

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1.7kg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) SEA および SEB の精製と家兔抗血清の作製

sea および seb は大腸菌内で His タグ融合蛋白質(His-SEA, His-SEB)として発現させ,SDS-PAGE およびウエスタンブロッティングにより確認した.リコンビナント蛋白質の精製は,カラムクロマトグラフィーと電氣的溶出法によって行った.

精製した毒素タンパク質は、家兔に免疫して抗血清の作製を試みた。

2) TDH と TRH の精製とモルモット抗血清の作製

初年度に構築した TF-TDH および TF-TRH 発現大腸菌 BL21(DE3) 株は、至適条件下で発現誘導を行った。リコンビナント蛋白質の発現に使用したベクターは、可溶化タグ TF の他に His タグも内蔵している。この性質を利用し、得られた培養液から His タグ精製および電気的溶出法により TF-TDH あるいは TF-TRH を精製した。精製蛋白質は、モルモット（オス、9 週齢）1 匹ずつに免疫して抗血清の作製を試みた。得られた血清は、オクタロニー法によってそれぞれの抗原に対する抗体価を確認した。なお、TRH は 1 度目の試行で十分は抗体価の上昇が認められなかったため、同様の実験を 2 度行った。

3) BoNT/A_Hc 精製とモルモット抗血清の作製

BoNT/A_Hc は大腸菌内で His-TF タグ融合蛋白質 (His-TF-BoNT/A_Hc) として発現させ、SDS-PAGE およびウエスタンブロッティングにより確認した。リコンビナント蛋白質の精製は、His タグ精製と電気的溶出法によって行った。得られた精製蛋白質は、モルモット（オス、9 週齢）2 匹に免疫して抗血清の作製を試みた。得られた血清は、オクタロニー法によってそれぞれの抗原に対する抗体価を確認した。

4) 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 タグ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 $\mu\text{g}/\text{rabbit}$ (アジュバント有り)、2 回目免疫 (初回免疫から 3 週後) 100 $\mu\text{g}/\text{rabbit}$ (アジュバント有り)、以降 1 週間毎に追加免疫 50

$\mu\text{g}/\text{rabbit}$ (アジュバント無し)) で家兔 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。

【倫理面への配慮】

本研究を実施するにあたって、遺伝子組換え実験委員会、動物実験委員会等の承認を得た。

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) SEA および SEB の精製と家兔抗血清の作製

精製した His-SEA および His-SEB を SDS-PAGE とウエスタンブロッティングにより検出したところ、予想されるサイズのシグナルが得られ、目的蛋白質の発現が確認できた。本研究で構築したリコンビナント・プラスミドによる大腸菌内での目的蛋白質の発現量は高く、常に効率よく目的蛋白質が得られた。Ni-NTA アガロースビーズによる精製の後、電気的溶出法によって目的蛋白質を精製し、得られた精製蛋白質を家兔に免疫し血清を回収したが、十分な抗体価の上昇は認められなかった。

2) TDH と TRH の精製とモルモット抗血清の作製

TF-TDH および TF-TRH を精製し、得られた精製 TDH と 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-TDH あるいは TF-TRH を免疫したモルモットから得られた血清は、それぞれ TDH、TRH に対して十分な抗体価の上

昇が認められた(図4,5). 抗 TRH 血清の作製に関しては,1度目の試行では十分な抗体価の上昇が認められなかったが,2度目の試行において,TRH 検出系の作製に使用可能なレベルの高い抗体価の上昇を示す抗血清が得られた(図5).

3) BoNT/A_{Hc} 精製とモルモット抗血清の作製

His-TF-BoNT/A_{Hc} を精製し,得られた精製蛋白質をモルモットに免疫し血清を回収した.抗体価の評価は,オクタロニー法によって実施した.その結果,His-TF-BoNT/A_{Hc} は十分な抗体価の上昇が認められた(図6).また,通常モルモットの免疫スケジュールは,初回免疫の後,2週間間隔で4回の追加免疫とされているが,今回の免疫においては追加免疫2回目実施後の時点で十分な抗体価の上昇が認められた.しかしながら,通常よりも早い段階で抗血清が得られたため,モルモットの生育が伴っておらず,期待される血清の半分程度の血清量しか得られなかった.したがって,再度同様の免疫方法によってモルモットを免疫し,抗 BoNT/A_{Hc} 血清を回収した.

4) 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7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8).

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) SEA と SEB の精製と家兎抗血清の作製

得られた精製蛋白質(SEA,SEB)を家兎に免疫し血清を回収したが,十分な抗体価の上昇は認められなかった.SEA および SEB は銀染色で1本になるまでの高い純度で,かつ免疫に必要な十分量の精製蛋白質を確保できたため,今後アジュバンドや免疫スケジュールの検討を行い,高感度かつ簡便な SE 検出法を構築する.

2) TDH と TRH の精製とモルモット抗血清の作製

本研究で実施したモルモットへの免疫スケジュールにおいて,IC の作製に使用可能なレベルの抗体価を示す抗 TDH および抗 TRH 血清が得られた.したがって,得られたこれらのモルモット抗血清を用いて,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.さらに,今回は免疫動物としてモルモットを使用したが,血清のより高い収量が期待できる家兎などへの動物種の変更も視野に入れ,血清の作製を進める.

3) 抗 BoNT/A_{Hc} モルモット血清の作製

本研究で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.また,同じ実験を2度実施することによって,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.したがって,BoNT/A_{Hc} に特異的な免疫学的検査法の構築を目指す.さらに,今回は免疫動物としてモルモットを使用したが,血清のより高い収量が期待できる家兎などへの動物種の変更も視野に入れつつ,血清の作製を進める.

4) 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. 抗SEA血清および抗SEB血清の作製のため、免役条件の検討など、課題が見出された。
3. 検出系に使用できる程度の抗体価を示す抗TDHおよびTRH血清が得られた。
4. 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。
5. 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) Sukegawa S, Ihara Y, Yuge K, Rao S, Oka K, Arakawa F, Fujimura T, Murakami H, Kurazono H, Takahashi M, Morimatsu F. Effects of oral administration of heat-killed *Enterococcus faecium* strain NHRD IHARA in post-weaning piglets. *Animal Science Journal* 85 (4): 454-460, 2014.
- 2) Ohji S, Yamazoe A, Hosoyama A, Tsuchikane K, Ezaki T, Fujita N. The Complete Genome Sequence of *Pseudomonas putida* NBRC 14164T Confirms High Intraspecies Variation. *Genome Announc.* 2(1), 2014
- 3) Kikuchi M, Ito S, Yasuda M, Tsuchiya T, Hatazaki K, Takanashi M, Ezaki T, Deguchi T. Remarkable increase in fluoroquinolone-resistant *Mycoplasma genitalium* in Japan. *J Antimicrob Chemother.* 69(9):2376-2382, 2014.
- 4) Miyazato A, Ohkusu K, Tachi Y, Hashikita G, Ezaki T, Mitsutake K. Two cases of infective endocarditis caused by *Streptococcus tigurinus*. *感染症学雑誌* 88 (3): 304-306, 2014.
- 5) Arai R, Miyoshi-Akiyama T, Okumura K,

- Morinaga Y, Wu M, Sugimura Y, Yoshiyama M, Okura M, Kirikae T, Takamatsu D. Development of duplex PCR assay for detection and differentiation of typical and atypical *Melissococcus plutonius* strains. *The Journal of Veterinary Medical Science* 76(4):491-498, 2014
- 6) Nakano M, Yamasaki E, Moss J, Hirayama T, Kurazono H. Study of the stn protein in salmonella; a regulator of membrane composition and integrity. *Method Mol. Biol.* 1225: 127-138, 2015.
 - 7) Yamasaki E, Yamada C, Jin X, Nair GB, Kurazono H, Yamamoto S. Expression of *marA* is remarkably increased from the early stage of development of fluoroquinolone-resistance in uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Chemother.* 21 (2): 105-109, 2015.
 - 8) Nakashima S, Yura H, Tomonaga M, Harada T, Hara A, Hara S, Nakano M, Yamasaki E, Sakamoto N, Ishimatsu Y, Isomoto H, Gochuico R B, Suffredini A F, Mukae H, Kurazono H, Hirayama T, Moss J, Kohno S. Identification of *Helicobacter pylori* VacA in Human Lung and its Effects on Lung Cells. *BBRC* 460 (3): 721-726, 2015.
 - 9) Masuda K, Yamamoto S, Kubota K, Kurazono H, Makino S-I, Kasuga F, Ijimi S, Asakura H. Evaluation of the dynamics of microbiological quality in lightly pickled napa cabbages during manufacture. *J. Food Safety*, doi: 10.1111/jfs.12195, 2015.
 - 10) Eiki Yamasaki, Masanori Watahiki, Junko Isobe, Tetsutaro Sata, G. Balakrish Nair and Hisao Kurazono. Quantitative Detection of Shiga Toxins Directly from Stool Specimens of Patients Associated with an Outbreak of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Japan—Quantitative Shiga toxin detection from stool during EHEC

- outbreak. *Toxins*, 2015, 7, 4381-4389; doi:10.3390/toxins7104381112
- 11) Okumura K, Kato M, Kirikae T, Kayano M, Miyoshi-Akiyama T. Construction of a virtual *Mycobacterium tuberculosis* consensus genome and its application to data from a next generation sequencer. *BMC Genomics* 16:218 (2015) doi: 10.1186/s12864-015-1368-9.
 - 12) Asakura H, M Tachibana, M Taguchi, T Hiroi, H Kurazono, S-I Makino, F Kasuga, S. Igimi. Seasonal and growth-dependent dynamics of bacterial community in radish sprouts. *Journal of Food Safety*, 36,392-401, 2016.
 - 13) Asakura H, Kawamoto K, Murakami S, Tachibana M, Kurazono H, Makino S, Yamamoto S, Igimi S. Ex vivo proteomics of *Campylobacter jejuni* 81-176 reveal that FabG affects fatty acid composition to alter bacterial growth fitness in the chicken gut. *Research in Microbiology*, 167, 63-71, 2016.
 - 14) 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*
 - 15) 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
 - 16) 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) K. Okumura, M. Kato, T. Kirikae, M. Kayano, T. Miyoshi-Akiyama. Construction of a Virtual *Mycobacterium tuberculosis* Consensus Genome and Its Application to Data from a Next Generation Sequencer. 114th General Meeting American Society for Microbiology, ボストン (米国) (2014.5)
 - 2) 山崎栄樹, 竹内薫, 廣井豊子, 倉園久生. サルモネラ属菌特異的遺伝子のジェノタイピングによる迅速血清型別法の開発. 第81回日本細菌学会北海道支部学術集会, 北海道 (2014.8)
 - 3) 山崎栄樹, 竹内薫, 廣井豊子, 倉園久生. サルモネラ属菌特異的遺伝子のジェノタイピングによる迅速血清型別法の開発. 第157回日本獣医学会学術集会, 北海道 (2014.9)
 - 4) E Yamasaki, M Nakano, T Hirayama, H Kurazono. Rapid serotyping method based on SNP profiles of a *Salmonella* specific gene. 49th U.S.-Japan Conference on Cholera and Other Enteric Bacterial Infections, フロリダ (米国) (2015.1).
 - 5) E Yamasaki, K Takeuchi, H Kurazono. Rapid serotyping method based on SNP profiles of a *Salmonella* specific gene. Global Health Institute 2015 researchers conference, チェンマイ (タイ) (2015.2)
 - 6) 山崎栄樹, 倉園久生. サルモネラ属菌特異的遺伝子のジェノタイピングによる迅速血清型別法の開発. 第88回日本細菌学会総会, 岐阜 (2015.3)
 - 7) 山崎栄樹, 綿引正則, 磯辺順子, 佐多徹太郎, 倉園久生. 国内 EHEC 食中毒事件患者の糞便中志賀毒素濃度の解析. 第89回日本細菌学会総会, 大阪, (2016.3)

- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) 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)

- 11) 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.

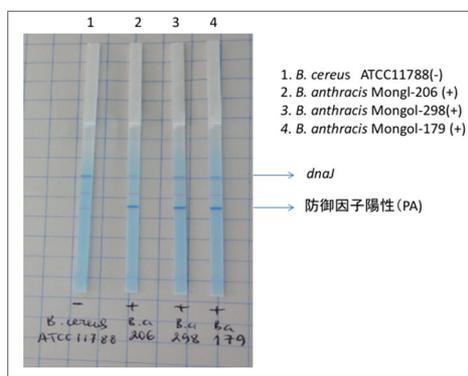


図 2. モンゴル国立感染症研究所保有炭疽菌株を使った DNA クロマトの結果
炭疽菌野外株 (2,3,4) は陽性で, 陰性対象のセレウス菌 (1) は陰性を示した.



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。

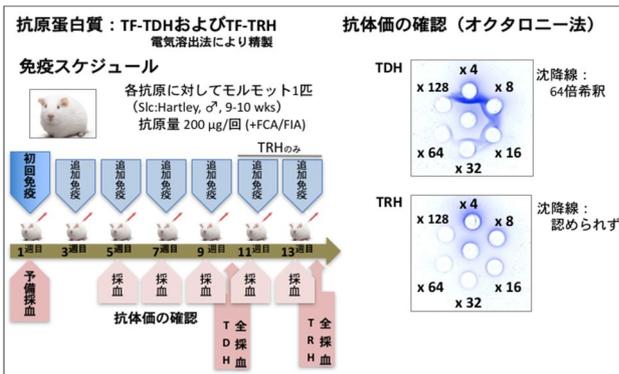


図 4. 抗 TDH および抗 TRH モルモット血清の作製

左に示した免疫条件に従って抗 TDH および抗 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 (右図)。その結果、抗 TDH 血清では 64 倍希釈血清においても沈降線が認められたのに対し、抗 TRH 血清では沈降線が認められなかった。

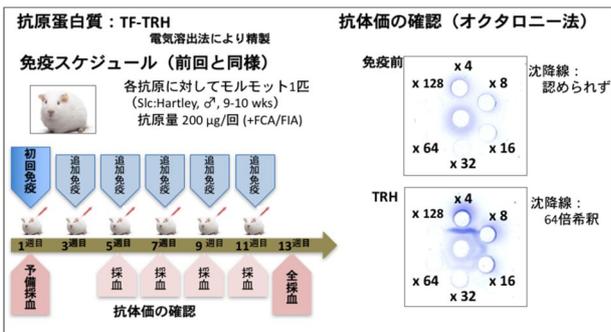


図 5. 抗 TRH モルモット血清作製の再試行

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。

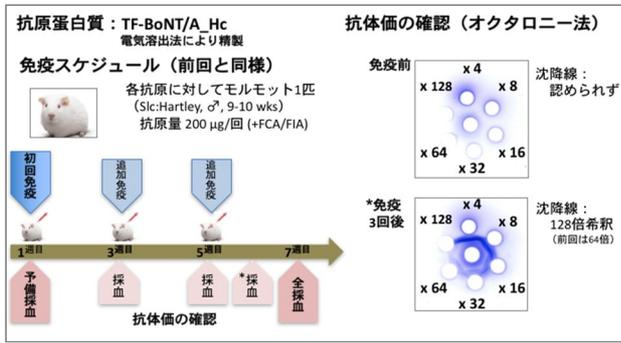


図 6 . 抗 BoNT/A_Hc モルモット血清の作製

左に示した免疫スケジュールに従って免疫し，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．図は，2 度目の試行の結果を示した．

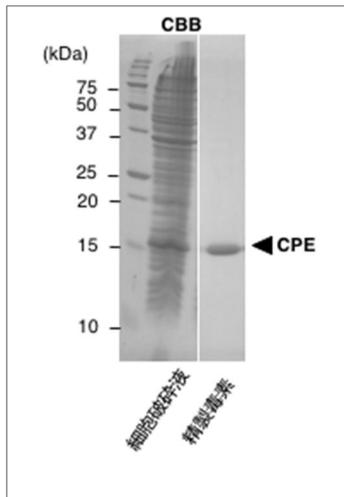


図 7 . 組換え CPE 蛋白質の精製度の確認

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．

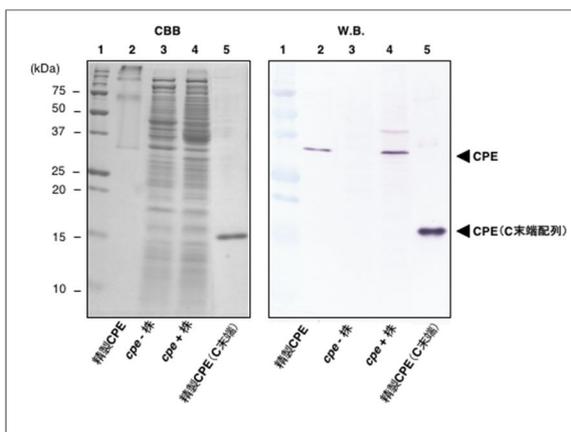


図 8 . CPE 特異的 IgG の野生型毒素との反応性解析

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砕上清，レーン 4:*cpe*+ウェルシュ菌分離株の菌体破砕上清，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：バイオテロ対応ホームページ（HP）の改訂など情報提供システムの整備ならびに国内の検査体制の把握，バイオテロ遭遇現場で活用できる資材の作成を中心に研究を遂行した．使用される可能性のある病原体の知見やアウトブレイク情報を加えてバイオテロ対応 HP の充実を図り，平成 28 年度には HP の一般公開を行った．また全国の地方衛生研究所 79 施設にアンケート調査を実施し，国内の検査体制の現状を把握した．頻度の高い病原体や国内発生の可能性のある新興・再興感染症については，多くの施設で検査が可能であることが判明した．一方で，陽性検体の不足による精度管理の懸念や，検査のための研修を希望している施設がある等の課題も明らかとなり，今後の改善点として検討していく必要がある．また，バイオテロ遭遇現場で活用できる資料「バイオテロを疑う時シート」を作成し，全国の病院（約 990 施設）に郵送・配布した．写真や図表を掲載するなど一覧性・視認性に優れた資料としたが，その評価や利用者からのフィードバックなどは今後の課題である．

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

る手段を提供することを目指す．また，ホームページの改訂や各種学会での議論等を通して実際に現場で必要とされる支援策のニーズを把握し，今後のバイオテロ対策に必要な施策の検討を行うことも目的とする．

A. 研究目的

昨今の国際情勢を鑑みるとバイオテロはいつどのような状況下でも発生しうる．用いられる可能性のある病原微生物は多彩であり，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る．例えば炭疽菌や 2014 年に西アフリカで流行したエボラウイルス病などである．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，正確な知識を簡便に得られる体制を整えることが重要な対策となる．その手段の一つとしてインターネットは極めて有用であり本研究においては，これまで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．引き続き新たな情報を追加してより内容を充実させ，正確かつ迅速に情報を得

B. 研究方法

国内外の主要雑誌や学会などを通じて，バイオテロ関連疾患についての情報を収集し，ホームページに掲載した内容の妥当性・正確性等について不断に確認する．必要に応じて改訂を行う．全国の地方衛生研究所 79 施設にアンケート調査を行い，国内の検査体制を把握する．また，実際にバイオテロ遭遇現場で第一線の医療者に活用・参照できる資料の作成を検討する．

【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

ホームページの改訂については平成 26 年度に総論の改訂を行い、日本でのデング熱の発生ならびに西アフリカでのエボラ出血熱アウトブレイクの情報を追加した。このホームページは、これまで感染症専門医のいる施設だけにパスワードを周知し、アクセス可能なのは一部の関係者のみであったが平成 28 年度には一般公開を実施した。

さらに今後のバイオテロ対策に必要な施策を立案するために基礎資料として、全国の地方衛生研究所の検査体制の把握が必要と考え、全国の 79 施設にアンケート調査を行った。78 施設から回答を得られた。主な解析結果は下記である。

表 1. 80%以上の施設で検査可能な病原体

種別	病原体または毒素	CDC(2000)
三種	MERSコロナウイルス	
三種	SFTSウイルス	
四種	コレラ菌	B
四種	赤痢菌属	B
四種	チフス菌	B
四種	腸管出血性大腸菌	B
四種	ポリオウイルス	
四種	志賀毒素	
四種	インフルエンザウイルス(H5N1,H7N7,H7N9)	
四種	デングウイルス	
四種	パラチフスA菌	
その他	黄色ブドウ球菌エンテロトキシンB	B
その他	ウエルシュ菌エンテロトキシン	B

表 2. 10-50%の施設で検査可能な病原体

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

MERS コロナウイルス、SFTS ウイルス、インフルエンザウイルスなどは 80%以上の施設で検査可能であったが、一部の病原体に関しては検査可能施設が限られていた

(表 1, 表 2)。この結果により、陽性検体の不足による精度管理の問題や、検査のための研修を希望している施設もあるなど国内の現状を把握することができた。これらの結果をもとに今後の検査体制をいかに整備してゆかが課題と思われる(本アンケートの施行に当たり、ご尽力頂いた倉根一郎前班長、地方衛生研究所全国協議会会長 小澤邦壽先生(群馬県衛生環境研究所長)、小林和夫先生(堺市衛生研究所所長)に厚く御礼申し上げます。また、アンケートにご協力下さった各衛生研究所の方々はこの場を借りて感謝申し上げます)。

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実感し、簡便で携帯性にも優れた参考資料を作成した(図 1, 2)。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・視認性に優れた資料とした。A4 版 4 ページ、A5 版 8 ページとし、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。ホームページを通じて一般の臨床医への適切な情報提供は今後も重要であると共に、啓発活動の側面も有している。平成 28 年度からは医療従事者以外も閲覧できるよう一般公開を行ったが、より分かりやすい記載を考慮するとともに、サイバー攻撃への対応や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に対して、セキュリティ対策の専門家と今後十分に検討していく必要がある。

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るなか、バイオテロ対策の重要性は今後も増大していくことが予想される。バイオテロに使用されうる病原体や各疾患の特徴などを包括的に閲覧できるホームページの充実など情報提供システムの整備は今後とも継続していく必要がある。また、有事の際に現場で必要とされるシステム(例えば地方衛生研究所と国立感染症研究所との連携体制)の構築に向けてさらなる研究を続けていく必要がある。

F. 健康危険情報
特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表
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の内容(一部)

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	市街地でのエアロノル散布	炭疽菌
1995年 日本(未遂)	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(白い粉)	炭疽菌

症 状	バイオテロ関連疾患
皮膚・粘膜・出血症状 (発疹、潰瘍や出血症状(紫斑、鼻出血、消化管出血など))	天然痘、皮膚炭疽、ペスト、ウイルス性出血熱、野兎病、腎症候性出血熱、T-2マイコトキシンなど
呼吸器症状 (咳、痰、咽頭痛、呼吸困難など)	肺炎炭疽、腫ベスト、野兎病、Q熱、オウム病、コクシジオイデス症、リシン中毒、ウェルシュ毒素中毒、黄色ブドウ球菌エンテロトキシンBなど
胃腸症状 (下痢、嘔吐、腹痛など)	赤痢、サルモネラ菌、コレラ、腸チフス、病原性大腸菌(O157など)、クリプトスポリジウム症、黄色ブドウ球菌エンテロトキシンBなど
神経症状 (意識障害、麻痺、痙攣、髄膜刺激症状など)	ボツリヌス症、ベネズエラ馬脳炎、ニバウイルス感染症など
非特異的 症状 (発熱、頭痛、倦怠感、リンノ節腫大など、上記のいずれにも分類し難いもの)	天然痘およびウイルス性出血熱の初期、腫ベスト、腸チフス、ブルセラ症など

図2. バイオテロを疑う時シート

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

医療機関のバイオテロ対策を支援するための方策

所 属
研究分担者

東京医科大学微生物学分野 教授
松本哲哉

研究要旨：近年，国際情勢の変化に伴い，テロの脅威が深刻化してきている．今後，国内でも各種の世界的な行事が予定されており，テロ対策の充実は不可欠である．医療機関は特にバイオテロに対する対応を迫られる可能性が高いが，現時点では準備が十分になされたとは言えず，ほとんど手つかずの医療機関も多く認められる．その背景には医療機関向けのバイオテロ対策の指針等が示されておらず，具体的に何をすれば良いのかが明確になっていない状況があると考えられる．そこで本研究では国内の医療機関向けにバイオテロ対策ガイドを作成することを目的として研究を進め，総論に加えてバイオテロにおける最も重要な疾患のひとつである炭疽に焦点をあて各論を作成した．なお，上記のガイドで提供する情報は，すでに公開中のバイオテロ対策ホームページに加えてさらに実践的な内容を補完することをひとつの目的としている．しかし実際に医療機関においてバイオテロが疑われる事例に遭遇した場合，とりあえず必要な最低限の情報をすぐに得られるかどうかも重要なポイントとなるため，東京大学医科学研究所の鯉淵智彦講師らとともにバイオテロを疑う時シートを作成し，全国約 990 の医療機関に郵送・配布を行った．

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

ように，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．

A. 研究目的

世界の政情が不安定な状況において，テロ行為のリスクは高まっている．海外では各地でテロが起こっており，日本でも 2020 年の東京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参考資料となるバイオテロ対策ガイドを作成することを目的としている．さらにまだ診断が決定していない段階でも最低限必要な対応ができる

B. 研究方法

1. バイオテロ対策ガイドの作成
バイオテロに関する国内外の各種資料を入手し，それらを参考にして日本の医療現場の現状に合わせて，バイオテロ対策のガイドを作成した．
2. バイオテロを疑う時シートの作成
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た．

【倫理面への配慮】

バイオテロ対策ガイド，およびバイオテロを疑う時シートともに患者等の個人情報扱内容を含まれていない．また，バイオ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。

配布した。

C. 研究結果

1. バイオテロ対策ガイドの作成

当初は各医療機関向けにバイオテロ対策ガイドラインとして作成することを検討していたが、現在、ガイドラインとして正式に承認されるものを作成するためには日本医療機能評価機構よる Minds の認証を受けることが望ましいと考えられている。その条件を満たすためには、相当数の委員が議論して作り上げるとともに、クリニカルクエスションの項目においてはメタ解析を含めた検討が求められる。これらはいずれも膨大な作業であり、少なくとも 20 名程度の委員の協力が必要と考えられる。

さらにガイドラインにおいては、個々の推奨事項において、臨床試験等のエビデンスに基づいた記述が必要である。しかしバイオテロの疾患に関する治療や対策を臨床試験で検証することは困難であり、明らかにエビデンスが不足している。そのため、これらの状況を踏まえて Minds の基準を満たした上でのガイドラインの作成は困難であることが判明した。

そこで、本研究班においては、バイオテロ対策ガイドとして、バイオテロ対策ホームページに記載されている内容を補完する位置づけで総論や各論の炭疽の項目などを作成した。

2. バイオテロを疑う時シートの作成

本研究班の分担研究者でもある鯉淵智彦博士（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・

D. 考察

米国でのトランプ大統領の就任に伴う各国との緊張の高まりや、ISIS に関連した各種の紛争やテロなど、テロのリスクは以前よりもさらに高まっていると考えられる。それに加えて、日本では海外からの旅行者をさらに増やす政策を掲げ、2020 年には東京オリンピックも開催され、テロに対する対策はこれまで以上に力を入れていかなければいけない課題である。しかし、現在、国内でももしバイオテロが起こったら適切に対処できるかという点、まだ何も準備ができてない医療機関が多数存在すると考えられる。その背景には、実際に起こるかどうかわからないバイオテロに対して、人的、金銭的負担を増やすことへの懸念があることや、具体的に何を準備すべきなのかわからないという点が理由に挙げられると思う。そこで、各医療機関向けにある程度具体性を持って準備すべき項目の提案ができる情報提供を行うことは重要な課題であると考えられる。

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対策ガイドの作成について検討するとともに、バイオテロを疑う時シートを完成させて全国の病院に配布した。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]
- 4) Yamaguchi T, Okamura S, Miura Y, Koyama S, Yanagisawa H, Matsumoto T. Molecular Characterization of Community-Associated

Methicillin-Resistant

Staphylococcus aureus Isolated from Skin and Pus Samples of Outpatients in Japan. *Microb Drug Resist.* 2015 21(4):441-7.

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

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。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

木下学・防衛医科大学校免疫微生物学教室・准教授

齋藤智也・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

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

て、ASEAN 地域フォーラム主催の生物テロ・パンデミック対処図上演習ワークショップ及び G20 主催のパンデミック対処専門家ワークショップでの検討に参加した。

【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

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。

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)。プロテインアレイ測定は Antigen Discovery 社 (米国) で行われた。アレイデータの解析、および、そこから得られた知見に基づく抗原性の解析を行った。

これまでの研究知見の社会実装に向け

C. 研究結果

1. LC16m8 株を接種したアメリカ人の血清中の抗体を網羅的に測定したデータを解析し、日本人の血清中との抗体の解析結果と比較を行い、相違を明らかにした。LC16m8 株の有効性評価に寄与する知見である。
2. Dryvax 株を接種したアメリカ人血清 (GE034931) と LC16m8 株を接種した日本人血清とにおいて、網羅的に測定した血清中の抗体について直接比較を行い、相違を明らかにした。LC16m8 株の有効性評価に寄与する知見である。
3. LC16m8 株の B5 タンパク質の抗原性の検討を行った。
4. ワクチン接種後、数年の長期にわたりヒト血清中で維持されている抗体について

の解析を行った。ワクチンの有効性評価に必要な長期の免疫維持についての理解につながる知見である。

5. ワクチン接種後の抗体産生について、マウスのモデル系において、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い、関与する抗原を明らかにした。
6. 本研究における知見を踏まえ、ASEAN 地域フォーラムが主催する生物テロ・パンデミック対処図上演習ワークショップに参加し、日本の生物テロ対策を紹介するとともに生物テロ図上演習に参加した（フィリピン、2015）。また2016年においては、ドイツで開催されたG20 専門家会合において各国保健相参加のシナリオ検討における検討項目として検体確保と情報共有化に向けた制度及びシステムの構築に向けた提案を行った。

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

- 1) Nishiyama Y, Matsukuma S, Matsumura T, Kanatani Y, Saito T. Preparedness for a smallpox pandemic in Japan: public health perspectives. *Disaster Med Public Health Prep.* 2015 Apr;9(2):220-3.
- 2) Eto A, Saito T, Yokote H, Kurane I, Kanatani Y. Recent advances in the study of live attenuated

cell-cultured smallpox vaccine LC16m8. *Vaccine.* 2015 Nov 9;33(45):6106-11 Review

- 3) Eto A, Saito T, Yokote H, Kurane I, Kanatani Y. Key Clinical Research Article. Recent advances in the study of live attenuated cell-cultured smallpox vaccine LC16m8. *Global Medical Discovery.* November 12, 2015
- 4) Nishiyama Y, Fujii T, Kanatani Y, Shinmura Y, Yokote H, Hashizume S. Freeze-dried live attenuated smallpox vaccine prepared in cell culture "LC16-KAKETSUKEN": Post-marketing surveillance study on safety and efficacy compliant with Good Clinical Practice. *Vaccine.* 2015 Nov 9;33(45):6120-7.

2. 学会発表

- 1) 江藤亜紀子, 齋藤智也, 西山靖将, 横手公幸, 金谷泰宏. 種痘による長期免疫に寄与する抗原の同定および LC16m8 株接種に対する影響についての解析. 第18回ワクチン学会学術集会プログラム・抄録集 p130
- 2) 江藤亜紀子, 齋藤智也, 横手公幸, 金谷泰宏. 天然痘ワクチン初回接種時の抗体産生応答に関する日米研究の比較. 第19回ワクチン学会学術集会プログラム・抄録集 p103
- 3) 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プログラム・抄録集 p90

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 接種者における中和抗体持続に関する調査研究

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：LC16m8 を 1 回接種された健康成人の抗体陽性率は経時的な低下傾向が認められた。Proteome Microarray Chip を用いたプロテオミク解析を行った結果，LC16m8 接種後の中和抗体価とプロテオミク解析における反応強度に相関が見られた抗原は 11 種類あった。そのうち，LC16m8 接種 30 日後と比較して接種 1 年後にプロテオミク解析における反応強度が有意に低下した抗原は A11R，A13L，A17L であった。
アフリカ，中東の地域では，サル痘ウイルスの OutBreak が多数報告されており，ヒトヒト感染は 5 代まで確認されている。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

内田梓・一般財団法人化学及血清療法研究所

金原知美・一般財団法人化学及血清療法研究所

丸野真一・一般財団法人化学及血清療法研究所

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ドアの成人対象者（初種痘者及び再種痘者）に対して LC16m8 が 1 回接種されている。

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

天然痘患者の発生が認められていた 1970 年代と現在の痘そうワクチンの使用目的や状況を比較分析した。接種回数が異なること及びその調査研究がほとんど行われていないことに注目し，マウスを用いたワクチン接種回数（国内外のワクチン株の組合せ接種含む）と免疫賦活効果に関する調査を実施した。

研究において，LC16m8 単回接種 4 年後の中和抗体（Anti-Lister PRNT）陽性率につ

いて、初回接種群では低下傾向が認められたことから、LC16m8により誘導された抗体が認識する抗原タンパク群の軽時的な変化を調査するために、ワクチニアウイルスWR株の95%以上の構成タンパクを網羅するProteome Microarray Chipを用いたプロテオミク解析を実施した。

また、本邦の国際貢献では、PKOの積極的平和貢献活動が実施され、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、サル痘ウイルスのOutBreakが多数報告されている。サル痘ウイルスの感染は、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。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の調査が必要と考え、本研究を開始した。

B. 研究方法

1. ワクチン接種誘導抗体が認識する抗原プロファイルの経時的な調査

本調査研究では、154名の種痘歴の無い健康成人において米国承認備蓄ワクチンDryvaxを比較対照として2004~2005年に米国で実施された細胞培養弱毒痘そうワクチンLC16m8の第I/II相無作為二重盲検臨床試験で取得されたサンプルを用いて解析を行った。

中和抗体の持続を評価するために、痘そうワクチン接種前、接種30日後、60日後、180日後及び360日後のAnti-Dryvax PRNT₅₀のデータを解析し、Anti-Dryvax PRNT₅₀が接種前の値の4倍以上となった場合を抗体陽性として抗体陽性率を算出した。

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

2. サル痘ウイルスに対する中和抗体免疫誘導能の調査

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。

【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

1. ワクチン接種誘導抗体が認識する抗原プロファイルの経時的な調査

細胞培養弱毒生痘そうワクチンLC16m8を1回接種された成人被接種者が獲得した中和抗体(Anti-Dryvax PRNT)の持続を調査するために、化血研が種痘歴の無い健康成人154名において米国承認備蓄ワクチンDryvaxを比較対照として2004~2005年に米国で実施した細胞培養弱毒痘そうワクチンLC16m8の第I/II相無作為二重盲検臨床試験で取得された成績を再解析した。中和抗体陽性率は接種30日後にLC16m8群では98%(118/120)、Dryvax群では100%(24/24)であったが、接種360日後ではそれぞれ84%(81/97)、88%(15/17)となり、ワクチン株に関係無く抗体陽性率に低下傾向が認められた(表1)。

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

LC16m8接種者11名について、接種前、接種30日後、接種360日後の個人毎の

PRNT₅₀の推移を図1に示し、Dryvax に対する中和抗体の持続により、以下の2つのグループに分けて解析を行った。

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

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

52個の認識抗原のうち、Dryvax に対する中和抗体価とプロテオミク解析における反応強度に相関がみられた11種類の抗原群を表2に示し、この11種類の抗原群について、グループ毎の比較を行った。接種前と比較して蛍光強度に有意差が見られた抗原を表3及び表4に示した。

Group A では、接種前と比較して接種30日後の蛍光強度が有意に高かった抗原は A17L, D8L, A10L, D13L, A11R, H3L, A26L, A27L であり、そのうち A17L, D8L, A10L, D13L, A11R, H3L, A27L は接種1年後まで有意に高かった。また、A11R は接種30日後と比較して360日後では蛍光強度が有意に低下した。

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

2. サル痘ウイルスに対する中和抗体免疫誘導能の調査

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生痘そうワクチン LC16m8 の第I/II相無作為二重盲検臨床試験で取得された成績(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5)。

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

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

更なる検証の為に、2004~2005年に米国で実施された細胞培養弱毒生痘そうワクチン LC16m8 の第I/II相無作為二重盲検臨床試験で取得されたサンプルを用いて中和抗体(Anti-Dryvax PRNT)の持続を調査した。中和抗体陽性率は LC16m8 群とその比較対照とした Dryvax 群ともに接種30日後に最高値となり、その後接種360日後まで徐々に低下した。なお、中和抗体価及び抗体陽性率の低下傾向はワクチン株に関係無く確認されたことから、LC16m8 株という弱毒株に特有の事象ではないと考えられる。

更に、この接種4年後の抗体価の低下に起因する抗原群が、1年後でも既に低下しているのかについて調査するため、ワクチニアウイルス WR 株の95%以上の構成たん白質を網羅する Proteome Microarray Chip を用いて、LC16m8 接種により誘導された抗体の認識ウイルス抗原を調査した。その結果、これらの認識抗原群は、LC16m8 接種4年後までの認識抗原群とほぼ類似しており、他の研究において防御や中和に重要であると言われている抗原を含んでいた。これらの抗原群のうち、中和抗体価(Anti-Dryvax PRNT)とプロテオミク解析における反応強度の間に相関が見られた抗原群は11種類であった。

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

かに低下した被験者群において、接種前と比較して接種 30 日後の蛍光強度が有意に高かった抗原は 9 種類あり、そのうち A13L と A17L は接種 30 日後から接種 1 年後では有意に低下した。中和抗体価の持続によって 2 つの被験者群に分けて解析を行ったが、2 つの被験者間に明確な違いは見られなかった。しかし、A11R と A13L は、4 年後の中和抗体価及び陽性率の低下に起因していると考察した抗原群である。接種 1 年後の結果であり接種 4 年後の途中の過程にあると考えると、A11R と A13L は 1 年後で既に低下が始まっている抗原群であり、これらが中和抗体価の低下に起因する抗原群の一部であることが考察された。

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

また、アフリカ、中東の地域では、サル痘ウイルスの Outbreak が多数報告されており、ヒトヒト感染は 5 代まで確認されている。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。

E. 結論

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

この中和抗体価及び抗体陽性率の低下

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

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ズガルからの 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。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hiroyuki Yokote, Yasuhiko Shinmura, Tomomi Kanehara, Shinichi Maruno, Masahiko Kuranaga, Hajime Matsui and So Hashizume. Safety of attenuated smallpox vaccine LC16m8 in immunodeficient mice. Clin. Vaccine Immunol. 2014, 21(9):1261-66
- 2) Yokote H, Shinmura Y, Kanehara T, Maruno S, Kuranaga M, Matsui H, Hashizume S. Vaccinia virus strain LC16m8 defective in the B5R gene keeps strong protection comparable to its parental strain Lister in immunodeficient mice. Vaccine. 33:6112-6119,2015
- 3) Nishiyama Y, Fujii T, Kanatani Y, Shinmura Y, Yokote H, Hashizume S. Freeze-dried live attenuated smallpox vaccine prepared in cell culture “LC16-KAKETSUKEN” Post-marketing surveillance study on safety and efficacy compliant with Good Clinical Practice. Vaccine. 33:6120-6127, 2015
- 4) Eto A, Saito T, Yokote H, Kurane I, Kanatani Y. Recent Advances in the Study of the Live Attenuated Cell-Cultured Smallpox Vaccine LC16m8. Vaccine. 33:6106-61, 2015
- 5) Hayakawa T, Aoi T, Bravery C, Hoogendoorn K, Knezevic I, Koga J, Maeda D, Matsuyama A, McBlane J, Morio T, Petriccioni J, Rao M, Ridgway A, Sato D, Sato Y, Stacey G, Sakamoto N, Trouvin JH, Umezawa A, Yamato M, Yano K, Yokote H, Yoshimatsu K, Zorzi-Morre P. Report of the international conference on regulatory endeavors towards the sound development of human cell therapy products. Biologicals. 43(5):283-97,2015

- 6) Mottate K, Yokote H, Mori S, Horita A, Miyatsu Y, Torii Y, Kozai Y, Iwaki M, Takahashi M, Ginnaga A, Retrospective survey to evaluate the safety and efficacy of Japanese botulinum antitoxin therapy in Japan Toxicon. 110:12-18, 2016

2. 学会発表

- 1) Paul N. Hudson, V. Olson, S. Smith, Z. Reed, A. Kondas, W. Davidson, H. Yokote, M. Saijo, S. Morikawa, I. Kurane, I. Damon. ASSESSING THE NEUTRALIZATION EFFICIENCY OF SERUM FROM LC16m8-VACCINATED INDIVIDUALS AGAINST TWO VARIOLA VIRUS STRAINS. 2014 International Poxvirus, Asfarvirus & Iridovirus Conference. Victoria, Canada (2014, 09)
- 2) 丸野真一, 金原知美, 新村靖彦, 横手公幸, 齋藤智也, 橋爪壮. 国産第三世代痘そうワクチン LC16m8 の WHO 推奨. 第 18 回日本ワクチン学会学術集会 福岡(2014.12)
- 3) 江藤亜紀子, 齋藤智也, 西山靖将, 横手公幸, 金谷泰宏. 種痘による長期免疫に寄与する抗原の同定および LC16m8 株に対する影響についての解析. 第 18 回日本ワクチン学会学術集会 福岡(2014.12)
- 4) 江藤亜紀子, 齋藤智也, 横手公幸, 金谷泰宏. 天然痘ワクチン初回接種時の抗体産生に関する日米研究の比較. 第 19 回日本ワクチン学会学術集会 愛知(2015.11)
- 5) 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

表 1 . 痘そうワクチン接種後の中和抗体価及び抗体陽性率 (Anti-Dryvax PRNT)

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

GMT: Geometric mean titer

陽性判定基準: 接種前の抗体価の 4 倍以上の抗体価を獲得した者を陽性と判定

表 2 . LC16m8 接種後の中和抗体価 (Anti-Dryvax PRNT) と
プロテオミク解析における反応強度に相関が見られた抗原群 (11 種)

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

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

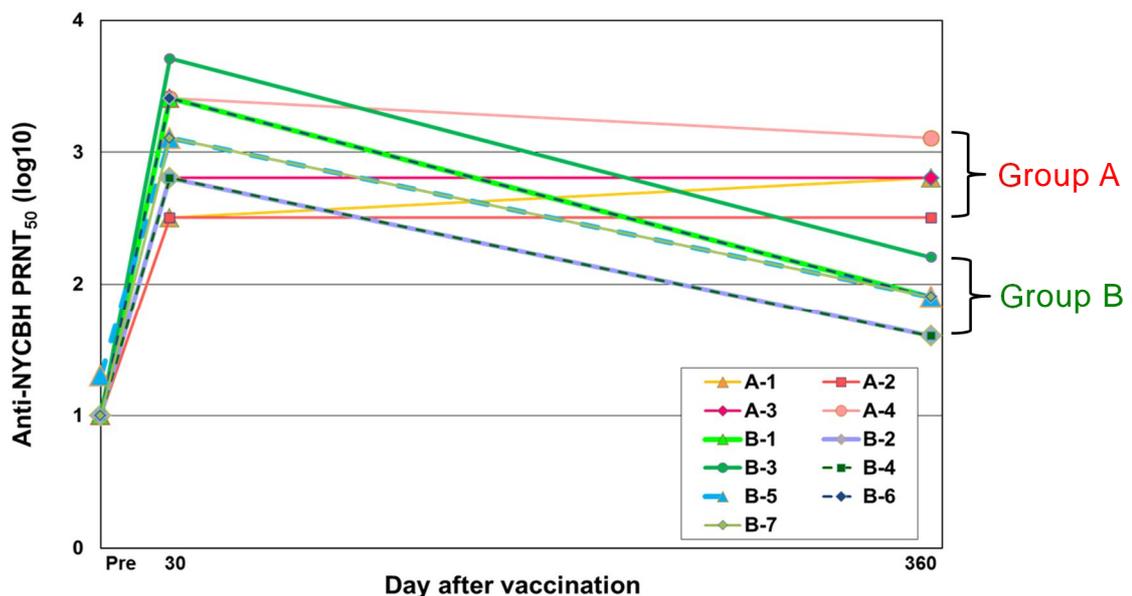


図 1 . 痘そうワクチン LC16m8 接種後の中和抗体価推移 (個人別)

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

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

* 有意差が大きい順に記載

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

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

* 有意差が大きい順に記載

表 5 . 痘そうワクチン接種後のポックスウイルスに対する中和抗体価及び抗体陽性率

Plaquing Virus Strain	Monkeypox(Cong-8)		Vaccinia(Dryvax)		Vaccinia(LC16m8)	
	Dryvax	LC16m8	Dryvax	LC16m8	Dryvax	LC16m8
Vaccine						
N	24	26	24	26	24	26
S/N*	100% (24/24)	96.2% (25/26)	100% (24/24)	100% (26/26)	100% (24/24)	100% (26/26)
GMT	352	112	932	329	447	733
95% CI	(219, 564)	(70, 179)	(585, 1483)	(228, 474)	(286, 696)	(400, 1343)

*陽性判定基準：10 倍以上の抗体価を獲得した者を陽性と判定

GMT: Geometric mean titer

・ 研究成果の刊行に関する一覧表

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
小林和夫	マイコバクテリア属(抗酸菌)	中込治, 神谷茂(編)	標準微生物学 第12版	医学書院	東京	2015	p276-288
梅山隆, 宮崎義継	侵襲性カンジダ症の診断～血清診断～遺伝子診断	竹末芳夫, 三鴨廣繁(編)	侵襲性カンジダ症	医薬ジャーナル社	東京	2014	p115-117
宮崎義継, 金子幸弘, 樽本憲人	V. 感染症検査・真菌	中原一彦(監)	パーフェクトガイド検査値事典[第2版]	総合医学社	東京	2014	p477-481
金子幸弘, 浦井誠, 宮崎義継	III 診断・治療法から見た大切な真菌症, 4 治療薬の選択と投与.	亀井克彦(編)	目で見える真菌と真菌症	医薬ジャーナル社	東京	2014	p192-202
小林和夫 2014.	細菌および真菌による呼吸器感染症(§ 9・2・1)	荒川宣親, 神谷茂, 雄介(編)	病原微生物学. 基礎と臨床	東京化学同人	東京		p239-244

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Taniguchi S, Maeda K, Horimoto T, Masangkay JS, Puentespina Jr. R, Alvarez J, Eres R, 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.	J Virol Methods (in press)			
Kimura M, Une Y, Suzuki M, Park E-S, Imaoka K, Morikawa S.	Isolation of Brucella inopinata-like bacteria from White's and Denny's tree frogs.	Vector Borne & Zoonotic Diseases (in press)			
Aryantini NP, Yamasaki E, Kurazono H, Sujanta IN, Urashima T, Fukuda K.	In vitro safety assessments and antimicrobial activities of <i>Lactobacillus rhamnosus</i> strains isolated from a fermented material.	Animal Science Journal (in press)			
Miyazaki H, Shibuya R, Midorikawa N, Chang B, Ohnishi M, Shimamoto 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)			
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
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	The microminipig as an animal model for influenza A virus infection.	Journal of Virology	91(2)	201716-116	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 Hygiene	95(6)	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, 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)	461-455	2016

Kitao A, Ieki R, Takatsuru H, Tachibana Y, Nagae M, Hino T, Nakajima 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
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 pseudotyp	Archives of Virology	161(6)	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 pathogenesis.	PLoS Pathogens	12(2)	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 ent	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, Goto 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
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	525-527	2016
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, Singh H, Morioka K, Shimojima M, An LV, Nakajima H, Hemmi A, Uchiyama K, Loong SK, AbuBakar S, Yang M, Sugamata M.	Efficacy of T-705 (Favipiravir) in the treatment of infections with lethal severe fever with thrombocytopenia syndrome virus.	mSphere	1(1)	e00061-15	2016
Singh H, Morioka K, Shimojima M, An LV, Nakajima H, Hemmi A, Uchiyama K, Loong SK, AbuBakar S, Yang M, Sugamata M.	A handy field portable ELISA-system for rapid on-site diagnosis of infectious diseases. Japanese Journal of Infectious Diseases 69:435-488, 2016				

Park ES, Suzuki M, Kimura M, Mizutani H, Saito R, Kubota N, Hashiike 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
Zamoto-Niikura A, Morikawa S, Hanaki KI, Holman PJ, Ishihara C.	<i>Ixodes persulcatus</i> ticks as a vector for <i>Babesia microti</i> U.S. lineage in Japan.	Applied and Environmental Microbiology	82(22)	6624-6632	2016
Arai S, Taniguchi S, Aoki K, Yoshikawa Y, Kyuwa S, Tanaka-Taya K, Masangkay JS, Omatu T, Puentespina R Jr, Watanabe S, Alviola P, Alvarez J, Eres E, Cosico E, Quibodan N, Morikawa S, Yanagihara R, Oishi K.	Molecular phylogeny of a genetically divergent hantavirus harbored by the Geoffroy's rousette (<i>Rousettus amplexicaudatus</i>), a frugivorous bat species in the Philippine Islands.	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 <i>Francisella tularensis</i> .	PLoS One	11(7)	e0159740	2016
Arai S, Kang HJ, Gu SH, Ohdachi SD, Cook J, Yashina LN, Tanaka-Taya K, Abramov SA, Morikawa S, Okabe N, Oishi K, Yanagihara R.	Genetic diversity of Arbovirus 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 infection in mice.	Microbiology and Immunology	60(3)	168-176	2016
Hotta A, Tanabayashi K, Fujita O, Shindo J, Park CH, Kudo N, Hatatai 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.	Japanese Journal of Infectious Diseases	69(2)	131-134	2016
Yamashita A, Sakamoto T, Sekizuka T, Kato K, Takasaki T, Kuroda M.	DGV: Dengue Genographic Viewer.	Frontiers in Microbiology	7	875	2016
Yamashita A, Sekizuka T, Kuroda M.	VirusTAP: Viral Genome-Targeted Assembly Pipeline	Frontiers in Microbiology	7	32	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, Lopez TJ, Suzuki Y, El-Husseiny M, Selim A, Haggag N, Soliman M, Neumann G, Hasegawa H, Kawakubo Y.	Risk assessment of recent Egyptian H5N1 influenza viruses.	Scientific Reports	6	38388	2016
Sakai K, Ami Y, Nakajima N, Nakajima K, Kitazawa M, Anraku M, Takayama I, Sangsrirat-anakul 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
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 Diseases	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 H, Nagata N.	Neuropathogenicity of two novel influenza A virus isolates in mouse models.	PLoS One	11(2)	e0148184	2016
Kotani O, Suzuki T, Yoshikoyama 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
Furihata S, Matsumura T, Hirata M, Mizutani T, Nagata N, Kataoka M, Katayama Y, Omatsumu 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, Hosono A, Odagiri T, Tashiro M, Kaminogawa S, Okubo Y, Kurosaki T, Ato M, Kobayashi K, Takahashi Y.	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

Asakura H, Kawamoto K, Murakami S, Tachibana M, Kurazono H, Makino S, Yamamoto S, Igimi S.	Ex vivo proteomics of <i>Campylobacter jejuni</i> 81-176 reveal that FabG affects its fatty acid composition to alter bacterial growth fitness in the chick	Research in Microbiology	167	63-71	2016
Asakura H, Tachibana M, Taguchi M, Hiroi T, Kurazono H, Makino S-I, Kasuga F, Igimi S.	Seasonal and growth-dependent dynamics of bacterial community in radish sprouts.	Journal of Food Safety	36	392-401	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 epidemiologic study of a hospital outbreak	American Journal of Infection and Control	44(11)	e275-e278	2016
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.	Diseases 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
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
Mottate K, Yokote H, Mori S, Horita A, Miyatsu Y, Torii Y, Kozae Y, Iwaki M, Takahashi M, Ginnaga A.	Retrospective survey to evaluate the safety and efficacy of Japanese botulinum antitoxin therapy in Japan	Toxicon	110	12-18	2016
Singh H, Morita T, Suzuki Y, Shimojima M, Le Van A, Sugamata M, Yang M.	High sensitivity, high surface area Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).	Bio-Medical Materials and Engineering	26 (3-4)	115-127	2015
Singh H, Shimojima M, Ngoc TC, Quoc Huy N, Chuong TX, Le Van A, Saijo M, Yang M, Sugamata M.	Serological evidence of human infection with Pteropine orthoreovirus in Central Vietnam.	Journal of Medical Virology	87(12)	2145-2148	2015

Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Taniguchi S, Fukuma A, Saijo M.	Combination effects of ribavirin and interferons on severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection.	Virology Journal	12	181	2015
Singh H, Yoshikawa T, Kobayashi T, Fukushi S, Tani H, Taniguchi S, Fukuma A, Yang M, Sugamata M, Shimojima M, Saijo M.	Rapid whole genome sequencing of Miyazaki-Bali/2007 Pteropine orthoreovirus by modified rolling circular amplification with adaptor ligation-next generation sequencing.	Scientific Reports	5	16517	2015
Singh H, Shimojima M, Shiratori T, Anlev, Sugamata M, Yang M.	Application of 3D printing technology in increasing the diagnostic performance of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for infectious diseases.	Sensors (Basel)	15(7)	16503-16515	2015
Okutani A, Osaki M, Takamatsu D, Kaku Y, Inoue S, Morikawa S.	Draft genome sequences of <i>Bacillus anthracis</i> strains stored for several decades in Japan.	Genome Announcements	3(3)	e00633-15	2015
Sakai K, Hagiwara K, Omatsu T, Hamasaki C, Kuwata R, Shimoda H, Suzuki K, Endoh D, Nagata N, Nagai M, Katayama Y, Oba M, Kuranaka I, Saijo M, Morikawa S, Mizutani T, Maeda K.	Isolation and characterization of a novel Rhabdovirus from a wild boar (<i>Sus scrofa</i>) in Japan.	Veterinary Microbiology	179(3-4)	197-203	2015
Hamamoto N, Uda A, Tomiube M, Park CH, Noguchi A, Kaku Y, Okutani A, Morikawa S, Inoue S.	Association between RABV G proteins transported from the perinuclear space to cell surface membrane and N-glycosylation of the sequon at Asn204.	Japanese Journal of Infectious Diseases	68(5)	387-393	2015
Okamoto M, Miyazawa T, Morikawa S, Ono F, Nakamura S, Sato E, Yoshida T, Yoshikawa R, Sakai K, Mizutani T, Nagata N, Takano J, Okabayashi S, Hamano M, Fujimoto K, Nakaya T, Iida T, Horii T, Miyabe-Nishiwaki T, Watanabe A, Kaneko A, Saito A, Matsui A, Hayakawa T, Suzuki J, Akari H, Matsuzawa T, Hirai H.	Emergence of infectious malignant thrombocytopenia in Japanese macaques (<i>Macaca fuscata</i>) by SRV-4 after transmission to a novel host.	Scientific Reports	5	8850	2015

Ching PK, de los Reyes VC, Sucaldito MN, Tanyag E, Columa-Vingno AB, Malbas FF Jr, Bolo GC Jr, Sejvar JJ, Eagles D, Playford G, Dueger E, Kaku Y, Morikawa S, Kuroda M, Marsh GA, McCullough S, Foxwell AR.	Outbreak of henipavirus infection, Philippines.	Emerging Infectious Diseases	21(2)	328-331	2015
Orba Y, Sasaki M, Yamaguchi H, Ishii A, Thomas Y, Hang'ombe BM, Mweene AS, Morikawa S, Saijo M, Sawa H.	Orthopoxvirus infection among wildlife in Zambia.	Journal of General Virology	96 (Pt 2)	390-394	2015
Ikeda-Dantsuji Y, Ohno H, Tanabe K, Umeyama T, Ueno K, Nagi M, Yamagoe S, Kinjo Y, Miyazaki Y.	Interferon- promotes phagocytosis of <i>Cryptococcus neoformans</i> but not <i>Cryptococcus gattii</i> by murine macrophages.	Journal of Infection and Chemotherapy	21	831-836	2015
Okachi S, Wakahara K, Kato D, Umeyama T, Yagi T, Hasegawa Y.	Massive mediastinal cryptococcosis in a young immunocompetent patient.	Respirology Case Reports	3	95-98	2015
Sakai K, Sekizuka T, Ami Y, Nakajima N, Kiyotazawa M, Sato Y, Nakajima K, Anraku M, Kubota T, Komase K, Takahara K, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Kuroda M, Takeda M.	A mutant H3N2 influenza virus uses an alternative activation mechanism in TMPRSS2 knockout mice by loss of an oligosaccharide in the hemagglutinin stalk region.	Journal of Virology	89(9)	5154-5158	2015
Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Sato Y, Nakajima N, Koike S, Iwasaki T, Sata T, Yamashita T, Minagawa H, Taguchi F, Hasegawa H, Shimizu H, Nishida N.	Establishment of a panel of in-house polyclonal antibodies for the diagnosis of enterovirus infections.	Neuropathology	35(2)	107-121	2015
Yamaguchi T, Okamura S, Miura Y, Koyama S, Yanagisawa H, Matsumoto T.	Molecular characterization of community-associated methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> isolated from skin and pus samples of outpatients	Microbial Drug Resistance	21(4)	441-447	2015
Nishiyama Y, Matsukuma S, Matsumura T, Kanatani Y, Saito T.	Preparedness for a smallpox pandemic in Japan: a public health perspective.	Disaster Medicine and Public Health Preparedness	9(2)	220-223	2015
Eto A, Saito T, Yokote H, Kurane I, Kanatani Y.	Recent advances in the study of live attenuated cell-cultured smallpox vaccine LC16m8.	Vaccine	33(45)	6106-6111	2015

Nishiyama Y, Fujii T, Kanatani Y, Shinmura Y, Yokote H, Hashizume S.	Freeze-dried live attenuated smallpox vaccine prepared in cell culture "LC16-KAKETSUKEN": Post-marketing surveillance study on safety and efficacy compliant with Good Clinical Practice.	Vaccine	33(45)	6120-6127	2015
Yokote H, Shinmura Y, Kanehara T, Maruno S, Kuranaga M, Matsui H, Hashizume S.	Vaccinia virus strain LC16m8 defective in the B5R gene keeps strong protection comparable to its parental strain Lister in immunodeficient mice.	Vaccine	33	6112-6119	2015
Hayakawa T, Aoi T, Bravery C, Hooqendoorn K, Knezevic I, Koga J, Maeda D, Matsuyama A, McBlane J, Morio T, Petricciani J, Rao M, Ridgway A, Sato D, Sato Y, Stacey G, Sakamoto N, Trouvin J H, Umezawa A, Yamato M, Yano K, Yokote H, Yoshimatsu K, Zorzi-Mazza P.	Report of the international conference on regulatory endeavors towards the sound development of human cell therapy products.	Biologicals	43(5)	283-297	2015
Nagata N, Iwata-Yoshikawa N, Hayasaka D, Surotomo Y, Kojima A, Kariwa H, Takashima I, Taokasaki T, Kurane I, Sasagata T, Hasegawa H.	The pathogenesis of 3 neurotropic flaviviruses in a mouse model depends on the route of neuroinvasion after viremia.	Journal of Neuro pathology and Experimental Neurology	74(3)	250-260	2015
Adachi Y, Onodera T, Yamada Y, Daio R, Tsuji M, Inoue T, Kobayashi K, Kurosaki T, Atsuo M, Takahashi Y.	Distinct germinal center selection at local sites shapes memory B cell response to viral escape.	Journal of Experimental Medicine	212	1709-1723	2015
Kitada S, Yoshimura K, Miki K, Miki M, Hashimoto H, Matsui H, Kuroyama M, Ageshio F, Kagawa H, Mori M, Maekura R, Kobayashi	Validation of a commercial serodiagnostic kit for diagnosing pulmonary <i>Mycobacterium avium</i> complex disease.	International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases	19	97-103	2015
Nakano M, Yamasaki E, Moss J, Hirayama T, Kurazono H.	Study of the stn protein in salmonella; a regulator of membrane composition and integrity.	Methods in Molecular Biology	1225	127-138	2015
Yamasaki E, Yamada C, Jin X, Nair GB, Kurazono H, Yamamoto S.	Expression of <i>marA</i> is remarkably increased from the early stage of development of fluoroquinolone-resistance in uropathogenic <i>Escherichia coli</i> .	Journal of Infection and Chemotherapy	21(2)	105-109	2015

Nakashima S, Yura H, Tomonaga M, Harada T, Hara A, Hara S, Nakano M, Yamasaki E, Sakamoto N, Ishimatsu Y, Isomoto H, Gochuico R B, Suffredini A F, Mukae H, Kurazono H, Hirayama T, Moss J, K	Identification of <i>Helicobacter pylori</i> VacA in human lung and its effects on lung cells.	BBRC	460(3)	721-726	2015
Masuda K, Yamamoto S, Kubota K, Kurazono H, Makino S-I, Kasuga F, Ijimi S, Asakura	Evaluation of the dynamics of microbiological quality in lightly pickled napa cabbages during ma	Journal of Food Safety	doi: 10.1111/jfs.12195		2015
Yamasaki E, Watahiki M, Isoke J, Sata T, G. Nair B, Kurazono H.	Quantitative detection of Shiga toxins directly from stool specimens of patients associated with an outbreak of enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> in Japan—Quantitative Shiga toxin detection from stool during EHEC ou	Toxins	7	4381-4389	2015
Okumura K, Kato M, Kirikae T, Kayano M, Miyoshi-Akiyama T.	Construction of a virtual <i>Mycobacterium tuberculosis</i> consensus genome and its application to data from a next generation sequencer.	BMC Genomics	16	218	2015
中島典子 .	季節性および鳥インフルエンザウイルス感染症の病	病理と臨床	33	1146-1153	2015
Yoshikawa T, Fukushi S, Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Toda S, Shimazu Y, Yano K, Morimitsu T, Ando K, Yoshikawa A, Kan M, Kato N, Motoya T, Kuzuguchi T, Nishino Y, Osaka H, Yumisashi T, Kitada K, Suzuki F, Takimoto H, Kitamoto H, Maeda K, Takahashi T, Yamagishi T, Oishi K, Morikawa S, Saijo M,	Sensitive and specific PCR systems for the detection of both Chinese and Japanese severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strains, and the prediction of the patient survival based on the viral load.	Journal of Clinical Microbiology	52(9)	3325-3333	2014
Shimajima M, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Fukuma A, Taniguchi S, Suda Y, Maeda K, Takahashi T, Morikawa S, Saijo M.	Effects of ribavirin on severe fever with thrombocytopenia syndrome viruses in vitro.	Japanese Journal of Infectious Diseases	67(6)	423-427	2014
Saraya T, Tanabe K, Araki K, Yonetani S, Makino H, Watanabe T, Tsujimoto N, Takata S, Kurai D, Ishii H, Miyazaki Y, Takizawa	Breakthrough invasive <i>Candida glabrata</i> in patients on micafungin: a novel <i>FKS</i> gene conversion correlated with sequential elevation of MIC.	Journal of Clinical Microbiology	52(7)	2709-2712	2014

Urai M, Kaneko Y, Niki M, Inoue M, Tanabe K, Umeyama T, Fukazawa H, Ohno H, Miyazaki Y.	Potent drugs that attenuate anti- <i>Candida albicans</i> activity of fluconazole and their possible mechanisms of action.	Journal of Infection and Chemotherapy	20(10)	612-615	2014
Ikeda I, Ohno T, Ohno H, Miyazaki Y, Nishimoto K, Fukushima S, Makino T, Ihn H.	A case of <i>Fusarium paronychia</i> successfully treated with occlusive dressing of antifungal cream.	Journal of Dermatology	41(4)	340-342	2014
Tarumoto N, Kinjo Y, Kitano N, Sasai D, Ueno K, Okawara A, Izawa Y, Shinozaki M, Watarai H, Taniguchi M, Takeyama H, Maesaki S, Shibuya K, Miyazaki Y.	Exacerbation of invasive <i>Candida albicans</i> infection by commensal bacteria or a glycolipid through IFN- γ produced in part by iNKT cells.	Journal of Infectious Diseases	209(5)	799-810	2014
Seki M, Ohno H, Gotoh K, Motooka D, Nakamura S, Iida T, Miyazaki Y, Tomono K.	Allergic bronchopulmonary mycosis due to co-infection with <i>Aspergillus fumigatus</i> and <i>Schizophyllum commune</i> .	IDCases	1	5-8	2014
Moritake H, Kamimura S, Nunoi H, Nakayama H, Suminoe A, Inada H, Inagaki J, Yanai F, Okamoto Y, Shinkoda Y, Shimomura M, Itonaga N, Hotta N, Hidaka Y, Ohara O, Yanagimachi M, Nakajima N, Okamura J, Kawano Y.	Clinical characteristics and genetic analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia with hemophagocytic lymphohistiocytosis: a Japanese retrospective study by the Kyushu-Yamaguchi Children's Cancer Study Group.	International Journal of Hematology	100(1)	70-78	2014
Watanabe T, Zhong G, Russell CA, Nakajima N, Hatta M, Hanson A, McBride R, Burke DF, Takahashi K, Fukuyama S, Tomita Y, Maher EA, Watanabe S, Imai M, Neumann G, Hasegawa H, Paulson JC, Smith DJ, Kawaoka Y.	Circulating avian influenza viruses closely related to the 1918 virus have pandemic potential.	Cell Host & Microbe	15(6)	692-705	2014
Sakai K, Ami Y, Tahara M, Kubota T, Anraku M, Abe M, Nakajima N, Sekizuka T, Shiratani K, Suzuki Y, Ainai A, Nakatsu Y, Kanou K, Nakamura K, Suzuki T, Komase K, Nobusawa E, Maenaka K, Kuroda M, Hasegawa H, Kawaoka Y, Tashiro M, Takeda M.	The host protease TMPRSS2 plays a major role in vivo replication of emerging H7N9 and seasonal influenza viruses.	Journal of Virology	88(10)	5608-16	2014

Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, Ishido A, Shigeoka T, Tominaga T, Kamei T, Honda M, Ninomiya D, Sakai T, Senba T, Kaneyuki S, Sakaguchi S, Satoh A, Hosokawa T, Kawabe Y, Kurihara S, Izumikawa K, Kohno S, Azuma T, Suemori K, Yasukawa M, Mizutani T, Omatsumu T, Katayama Y, Miyahara M, Ijuin M, Doi K, Okuda M, Umeki K, Saito T, Fukushima K, Nakajima K, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Fukuma A, Ogata M, Shimojima M, Nakajima N, Nagata N, Katano H, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Yamagishi T, Oishi K, Ku	The first identification and retrospective study of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Japan.	Journal of Infectious Diseases	209(6)	816-27	2014
Kenri T, Sekizuka T, Yamamoto A, Iwaki M, Komiya T, Hatakeyama T, Nakajima H, Takahashi M, Kuroda M, Shibayama K.	Genetic characterization and comparison of <i>Clostridium botulinum</i> isolates from botulism cases in Japan between 2006 and 2011.	Applied and Environmental Microbiology	80(22)	6954-6964	2014
Iwata-Yoshikawa N, Ueda A, Suzuki T, Tsunetsugu-Yokota Y, Sato Y, Morikawa S, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H, Nagata N.	Effects of Toll-like receptor stimulation on eosinophilic infiltration in lungs of BALB/c mice immunized with UV-inactivated severe acute respiratory syndrome-related coronavirus vaccine.	Journal of Virology	88	8597-8614	2014
Koma T, Yoshimatsu K, Nagata N, Sato Y, Shimizu K, Yasuda SP, Amada T, Nishio S, Hasegawa H, Arikawa J.	Neutrophil depletion suppresses pulmonary vascular hyperpermeability and occurrence of pulmonary edema caused by hantavirus infection in C.B-17 SCID mice.	Journal of Virology	88	7178-7188	2014
Kanehara T, Maruno S, Kuranaga M, Matsui H, Hashizume S.	Safety of attenuated smallpox vaccine LC16m8 in immunodeficient mice.	Clinical and Vaccine Immunology	21(9)	1261-1266	2014
Kobayashi K.	Serodiagnosis of <i>Mycobacterium avium</i> complex disease in humans. Translational research from basic mycobacteriology to clinical medicine.	Japanese Journal of Infectious Diseases	67	329-332	2014

Matsuzaki Y, Sugawara K, Nakauchi M, Takahashi Y, Onodera T, Tsunetsugu-Yokota Y, Matsumura T, Ato M, Kobayashi K, Shimotai Y, Mizuta K, Hongo S, Tashiro M, Nobusawa E.	Epitope mapping of the hemagglutinin molecule of A/(H1N1)pdm09 influenza virus by using monoclonal antibody escape mutants.	Journal of Virology	88	12364-12373	2014
Sugamata R, Sugawara A, Nagao T, Suzuki K, Hirose T, Yamamoto K, Oshima M, Kobayashi K, Sunazuka T, Akagawa KS, Omura S, Nakayama T, Suzuki K.	Leucomycin A ₃ , a 16-membered macrolide antibiotic, inhibits Influenza A virus infection and disease progression.	Journal of Antibiotics	67	213-222,	2014
Nagata N, Saijo M, Kataoka M, Ami Y, Suzuki Y, Sato Y, Iwata-Yoshikawa N, Ogata M, Kururane I, Morikawa S, Sata T, Hasegawa H.	Pathogenesis of fulminant monkeypox with bacterial sepsis after experimental infection with West African monkeypox virus in a cynomolgus monkey.	International Journal of Clinical and Experimental Pathology	7	4359-4370	2014
Sukegawa S, Ihara Y, Yuge K, Rao S, Oka K, Arakawa F, Fujimura T, Murakami H, Kurazono H, Takahashi M, Morimatsu F.	Effects of oral administration of heat-killed <i>Enterococcus faecium</i> strain NHRD IHARA in post-weaning piglets.	Animal Science Journal	85(4)	454-460	2014
Ohji S, Yamazoe A, Hosooyama A, Tsuchikane K, Ezaki T, Fujita N.	The complete genome sequence of <i>Pseudomonas putida</i> NBRC 14164T confirms high intraspecies variation.	Genome Announcement	2(1)	e00029-14	2014
Kikuchi M, Ito S, Yasuda M, Tsuchiya T, Hattazaki K, Takanashi M, Ezaki T, Deguchi T.	Remarkable increase in fluoroquinolone-resistant <i>Mycoplasma genitalium</i> in Japan.	Journal of Antimicrobial and Chemotherapy	69(9)	2376-2382	2014
Arai R, Miyoshi-Akiyama T, Okumura K, Morinaga Y, Wu M, Sugimura Y, Yoshiyama M, Okura M, Kirikae T, Takamatsu D.	Development of duplex PCR assay for detection and differentiation of typical and atypical <i>Melissococcus plutonius</i> strains.	Journal of Veterinary Medical Science	76(4)	491-498	2014
梅山隆, 大野秀明, 宮崎義継.	真菌症-よく目にする真菌症から今後注意すべき真菌症まで-Aspergillus: 病態と抗原価の関連.	感染症内科	2(6)	575-580	2014
河野茂, 亀井克彦, 二木芳人, 宮崎義継.	座談会: 深在性真菌症の診断・治療ガイドラインを読み解く.	呼吸	33(5)	435-443	2014
大野秀明, 宮崎義継.	日本にも現れたクリプトコックス・ガッティ.	日経サイエンス	44(5)	76	2014

田辺公一，宮崎義継．	耐性病原体up-to-date～耐性メカニズムから治療戦略まで～，1 抗微生物薬に対する耐性メカニズム，2 抗真菌薬耐性．	化学療法領域	30(S-1)	20-25	2014
宮崎義継，砂川富正，大石和徳．	ミニ特集：病原体サーベイランス体制とその利用，国立感染症研究所の立場か	小児科	55(4)	403-406	2014
浦井誠，金子幸弘，宮崎義継．	どう変わり，どう攻める？深在性真菌症の新しい治療：深在性真菌症における治療薬の選択の変化 ガイドライン改訂から見えてくる今後の治療展望．	感染と抗菌薬	17(1)	5-13	2014
梅山隆，大野秀明，宮崎義継．	ムーコル症：診断の実際とピットフォール．	呼吸器内科	25(1)	32-37	2014
樽本憲人，金城雄樹，北野尚樹，渋谷和俊，前崎繁文，宮崎義継．	全身性カンジダ感染増悪におけるiNKT細胞の関与．	Medical Mycology Journal	55J	J115-J122	2014
大野秀明，荒岡秀樹，梅山隆，金子幸弘，宮崎義継．	接合菌症．	臨床検査	58(1)	97-103	2014
中島典子．	H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスに感染したヒトの臨床，病理およびウイルス学的知見．	化学療法領域	30	40-48	2014
中島典子，佐藤由子，片野晴隆，長谷川秀樹．	ウイルス性肺炎．	病理と臨床	32	1146-1153	2014
中島典子．	オリゴヌクレオチドプローブを用いた新しいin situ ハイブリダイゼーション	呼吸	33	152-159	2014
高橋健太，鈴木忠樹，中島典子，飛梅実，佐藤由子，片野晴隆，長谷川秀樹．	脳炎・脳症の病理．	Neuroinfection	19	32-39	2014
中島典子．	インフルエンザ感染症の病理．	小児内科	45	1935-1941	2014
Miyazato A, Ohkusu K, Tachi Y, Hashikita G, Ezaki T, Mitsutake K	Two cases of infective endocarditis caused by <i>Streptococcus tigurinus</i> .	感染症学雑誌	88(3)	304-306	2014