

厚生労働行政推進調査事業費補助金

新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業

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

(H29-新興行政-指定-002)

平成29年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 西條 政幸
(国立感染症研究所)

平成30(2018)年 4月

目 次

I. 総括研究報告

我が国で開発され、備蓄されている細胞培養痘そうワクチンの有効性、安全性、生産性向上および国内外のバイオテロ対策のあり方に関する研究	4
西條政幸	

II. 分担研究報告

1. 研究総括・バイオテロ対策に関する国際動向の調査と国内対応のあり方の検討	12
西條政幸	
2. 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	17
鯉淵智彦	
3. 天然痘バイオテロ対応に関する公衆衛生対応の検討	20
齋藤智也	
4. 出血熱ウイルスを含むバイオテロ関連病原ウイルス検出法の改良	25
下島昌幸	
5. 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの有効性及び安全性評価、特性解析、品質試験法改善、生産性に関する研究	32
園田憲悟	
6. 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの安全性評価における病理学的研究	37
永田典代	
7. 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの特性解析(遺伝子解析)、品質試験法に関する研究	40
森川茂	
8. 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの有効性及び安全性評価に関する研究	44
吉河智城	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	53
---------------------	----

平成 29 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)
我が国で開発され,備蓄されている細胞培養痘そうワクチンの有効性,安全性,生産性向上
および国内外のバイオテロ対策のあり方に関する研究

I . 総括研究報告

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

所 属 国立感染症研究所
ウイルス第一部
研究代表者 西條 政幸

研究要旨:日本では2020年に東京オリンピック・パラリンピックが開催されることから、これまで同様バイオテロ対策を強化する必要がある。日本では痘瘡ウイルスが用いられるバイオテロに備えて、痘瘡ワクチン LC16m8 が性サイイン・備蓄されている。LC16m8 は世界で 2 つしかない第 3 世代のワクチン(安全性が高い)の一つで、国際的にも注目されている。本研究班の目的は、LC16m8 の有効性・安全性、生産性向上に関する研究を実施するとともに、痘瘡ワクチンの生産と備蓄のあり方、備蓄されているワクチンや製造されるワクチンの品質管理のあり方を科学的なデータに基づいて検討し、厚生労働行政に資する提言をまとめることである。2018 年度は、以下の研究成果が得られた。

1. バイオテロ対策の国際的動向と対策のあり方の検討

- 1) 痘瘡ウイルスが用いられるバイオテロに備えた国際動向 [特に世界保健機関 (WHO) が主催する痘瘡ウイルス研究専門家会議, ACVVR] における議論の内容を確認し、対策の国際的な動向を把握した。ワクチン・医薬品については、それぞれ MVA ワクチンと LC16m8, 米国で開発中の 2 医薬品の開発状況に関する情報を収集した。
- 2) 英国と韓国の会議に出席した。英国での会議における議論と指摘事項、提言は、生物テロへの対応を考えた際の、セキュリティ・法執行機関との連携について具体的な手順を含めて検討する必要性を示唆した。韓国での会議に参加することを通じて、マシギザリングイベントが開催される場合には、テロ対応を行う計画を、別途実施プランを検討する必要があることが認識された。

2. 高度弱毒細胞培養痘瘡ワクチン LC16m8 に関する研究

- 1) 痘そうワクチン LC16m8 を 1 回接種された成人初回接種者では、米国で承認、備蓄されている第 1 世代の痘そうワクチンである Dryvax 被接種者におけるのと同程度にサル痘ウイルスに対する中和抗体が誘導されることが確認された。
- 2) サル痘ウイルスがマウスに不顕性感染することを利用し、好中球枯渇マウスにおける重症化機序を明らかにした。好中球の枯渇処理はウイルス増殖と病変形成を亢進した。今年度は、本モデルにおける免疫反応を経時的に明らかにした。一時的な好中球の枯渇処理は、感染後の好中球増多、炎症性サイトカイン・ケモカインの高発現を引き起こした。
- 3) 痘そうワクチン LC16m8 株は、継代培養するとプラークサイズのやや大きい LC16mO 型 (medium size plaque; MSP) の性状を保つウイルスが出現する。MSP のうち、主要な MSP を検出するための定量的 PCR 法を開発し、LC16m8 株と特定の MSP を迅速に、また、定量的に識別することを可能とした。
- 4) 感染性 LC16m8 をリカバリーする LC16m8-(Bacterial Artificial Chromosome; BAC) システムを確立した。

3. 診断法の開発

バイオテロで痘瘡ウイルス、サル痘ウイルス、そして、鑑別を要する水痘・帯状疱疹ウイルスを迅速に、かつ、区別して検出するリアルタイム PCR を構築した。

4. バイオテロ関連ホームページの改定と維持管理

生物テロに関する情報を網羅した『バイオテロ対応ホームページ』に天然痘、ペスト、ウイルス性出血熱 (エボラ出血熱、クリミア・コンゴ出血熱、マールブルグ熱、ラッサ熱)、野兔病、炭疽菌に対して新たな情

研究分担者

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

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

下島昌幸・国立感染症研究所ウイルス第一部第一室・室長

園田憲悟・一般財団法人化学及血清療法研究所・研究開発本部・製品開発部・部長

永田典代・国立感染症研究所感染病理部・室長

森川茂・国立感染症研究所獣医科学部・部長

吉河智城・国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官

A. 研究目的

日本では 2020 年に東京オリンピック・パラリンピックが開催されることから、バイオテロ対策強化が必要とされている。日本では痘瘡ウイルスがバイオテロ病原体として使用されるバイオテロに備えて、痘瘡ワクチン LC16m8 が備蓄されている。LC16m8 は世界で 2 つしかない第 3 世代のワクチン(安全性が高い)の一つで、国際的に注目されているワクチンである。本研究班では、LC16m8 の有効性・安全性、生産性向上に関する研究を継続するとともに、痘瘡ワクチンの生産と備蓄のあり方、備蓄されているワクチンや製造されるワクチンの品質管理のあり方を科学的なデータに基づいて検討し、厚生労働行政に資する提言をまとめる。

具体的には、以下の研究を行う。

1. バイオテロ対策の国際的動向と対策のあり方の検討

バイオテロ対策の国際的な動向を WHO や GHSI(世界健康安全保障イニシアチブ)の活動を通して調査し、日本国内での対策のあり方と検討する。また、バイオテロ(主に天然痘テロ)対応に関する公衆衛生対応の検討を行う。ワクチン含む医薬品のみならず、搬送・診断・治療・除染等公衆衛生対応の技術的検討を行う。

2. 高度弱毒細胞培養痘瘡ワクチン LC16m8 に関する研究

備蓄されている LC16m8 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、等の研究を深める。特に製造から備蓄年数による品質変化の推移について評価する。

細胞培養痘瘡ワクチン LC16m8 を天然痘ウイルス暴露後の発症、重症化予防ワクチンとして

使用した際の効果を検証する。また、LC16m8 の組換えウイルス作製上有用な BAC システムを開発・改良する。

LC16m8 は、継代により B5R 遺伝子の機能復帰変異による MSP(MSP は病原性がワクチン株よりも高まっていると考えられる)が出現するため、製造管理が重要である。継代培養(製造工程に模して実施)により出現する MSP 出現推移と変異パターンに違いを検証する。

痘瘡ワクチンの副反応の発現機構を病理学的に理解するため、オルソポックスウイルス感染症の重症化とウイルス伝播力の変化に関わる宿主側因子を明らかにする。

3. 痘瘡ウイルスおよびその関連ウイルス感染症の診断法の開発

痘瘡ウイルス等、ウイルス性出血熱および致命率の高い新興ウイルス感染症を網羅的に、かつ、迅速に検出するための遺伝子検出法を開発する。

4. バイオテロ関連ホームページの改定と維持管理

バイオテロ対策は急務であるが関連情報を簡便に得られる手段は限られている。そのため、啓発活動ならびに非常時にも利用できる手段として、ホームページ(HP)の充実などバイオテロ対策支援方法を開発する。

B. 研究方法

1. バイオテロ対策の国際的動向と対策のあり方の検討

- 世界保健機関(WHO)が主催する痘瘡ウイルス研究専門会議(Advisory Committee of Variola Virus Research Committee, ACVVR)における最近の議論の中で、治療法開発研究やワクチンの選定・備蓄のあり方に関する議論、そして、2016 年に発表された馬痘ウイルスの人工合成の成功に関する議論について、概要をまとめ、今後のバイオテロ対策のあり方を考察した。
- バイオテロ対策の国際的な動向を調査し、主に日本国内での公衆衛生対策のあり方を検討した。また、バイオテロ(主に天然痘テロ)対応に関する公衆衛生対応の検討として、ワクチン及び医薬品の開発状況について文献的情報を収集した。バイオテロ対策の国際的な動向については、英国と韓国で開催された関連会議に出席し、専門家らと議論を行った。
- ワクチン・医薬品については、MVA ワクチン、主に米国で開発中の 2 医薬品について開発

状況について情報を収集した。

2. 高度弱毒細胞培養痘瘡ワクチン LC16m8 に関する研究

- サル痘ウイルスがマウスに不顕性感染することを利用し、好中球枯渇マウスにおける重症化機序を明らかにすることを目的に、以下の研究がなされた。サル痘ウイルスの皮下接種はマウスに明らかに病変を起こさないが、好中球の枯渇処理はウイルス増殖と病変形成を亢進させた。本モデルにおける免疫反応を経時的に明らかにした。
- 痘そうワクチン LC16m8 を 1 回接種された成人初回接種者についてサル痘ウイルスに対する中和抗体誘導能を評価した。
- MSP のうち、主要な MSP を検出する定量的 PCR 法を開発し、LC16m8 株と特定の MSP を識別可能とした。
- LC16m8 を組換えワクチンベクターとして応用するために、LC16m8 遺伝子を細菌人工染色体(Bacterial Artificial Chromosome; BAC)にクローニングし、そこから感染性 m8 をリカバリーできる m8-BAC システムの確立を目指した。
- LC16m8 を用いた天然痘ウイルス暴露後重症化阻止の可能性を検討するため、エクトロメリアウイルス(ECTV)をマウス感染させると発症するモデル用いて、感染直後に LC16m8 を皮下、筋肉内、皮内、静脈内接種した場合のそれぞれのルート毎の発症阻止効果を比較した。

3. 痘瘡ウイルスおよびその関連ウイルス感染症の診断法の開発

痘瘡ウイルス、サル痘ウイルス、水痘・帯状疱疹ウイルス遺伝子を、迅速にかつ区別して検出するリアルタイム PCR を文献(Maksyutov et al., J Virol Methods, 2016)に基づき構築し、このシステムの性能を評価した。

4. バイオテロ関連ホームページの改定と維持管理

本研究班および先行研究班で開発された生物テロに関する情報を網羅した『バイオテロ対応ホームページ』に最新知見を加えて改訂した。それにより国内でのバイオテロ関連情報源としてより充実させた。天然痘、ペスト、ウイルス性出血熱(エボラ出血熱、クリミア・コンゴ出血熱、マールブルグ熱、ラッサ熱)、野兔病、

炭疽菌に関する新たな情報を追加した。

【倫理面への配慮】

- ヒトを対象とした研究は、一般財団法人化学及血清療法研究所の研究倫理審査委員会の審査を受け、2017 年 11 月 16 日付で承認を得て実施した(受付番号 17-05)。また、個人を特定できないように措置を講じた上で研究を実施した。
- 動物が用いられた研究は、国立感染症研究所・実験動物委員会の審査と承認を得て、動物愛護の精神に則り遂行した。

C. 研究結果

1. バイオテロ対策の国際的動向と対策のあり方の検討

- 本研究班で行われている研究、LC16m8 接種者において感染性痘瘡ウイルスに対する中和抗体が誘導されるとの研究成果が 2016 年および 2017 年に開催された ACVVR(それぞれ第 18 回 ACVVR および第 19 回 ACVVR)で発表された。世界的に痘瘡や痘瘡ウイルス関連オルソポックスウイルス感染症に対するワクチンとして備蓄されている第Ⅲ世代ワクチンは、MVA と日本で製造されている LC16m8 のみである。この研究成果は国内のみでなく、国際的にも注目されている。
- 第 18 回 ACVVR でカナダのオルソポックスウイルス研究の第一人者により、化学物質のみを材料に感染性のある馬痘ウイルスが作製(合成)することに成功したと発表された。馬痘ウイルスを人工合成したことの事実は、一方で痘瘡ウイルス合成が可能であることを示唆している。本研究は科学的な進歩に寄与する研究であるが、一方で、バイオテロ上新たなリスクを生じさせる可能性が発生させたとも考えられる。
- 英国での会議における議論と指摘事項、提言は、生物テロへの対応を考えた際の、セキュリティ・法執行機関との連携について具体的な手順を含めて検討する必要性を示唆するものであった。韓国での会議では、現行の通常時の対応計画(いつテロが発生するかわからない前提での計画)に加えて、マシギザリングイベントのような、ある一定期間、限られた場所でインテンシブに対応を行う計画についても別途オペレーションプランの検討が必要であることが確認された。

2. 高度弱毒細胞培養痘瘡ワクチン LC16m8 に関する研究

1) LC16m8 の有効性に関する研究

痘瘡ワクチン LC16m8 を 1 回接種することで誘導されるサル痘ウイルスに対する中和抗体価は、米国で承認、備蓄されている第 I 世代の痘瘡ワクチンである Dryvax のそれと同程度のサル痘ウイルスに対する中和抗体誘導能であった。

2) LC16m8 の安全性に関する研究

- 継代培養によって MSP が出現する場合に、プラーク馴化した別個の LC16m8 株から RK13 細胞での増幅/Vero E6 細胞での増殖を 3 サイクル行い、開発した定量的 PCR を実施したが、いずれのクローン由来も MSP が検出限界未満であった。3 回の MSP 増幅サイクルでは検出限界の 0.01% 未満しか MSP が増幅されないことが明らかにされた。
- LC16m8 の暴露後接種による予防効果を調べる研究において、マウスにエクトロメリアウイルス感染させるモデルでは、LC16m8 の感染防御効果の程度はウイルスを感染させる際の接種ルート毎に異なることが確認された。
- サル痘ウイルス感染小動物モデル開発に関する研究が実施された。マウス-サル痘ウイルス感染モデルにおいて、一時的な好中球の枯渇処理は、感染後の好中球増多、炎症性サイトカイン・ケモカインの高発現を引き起こすことが確認された。
- LC16m8 をクローニングした BAC プラスミドから感染性 LC16m8 をリカバリーできるシステムが確立された。

3. 痘瘡ウイルスおよびその関連ウイルス感染症の診断法の開発

痘瘡ウイルス、サル痘ウイルス、水痘帯状疱疹ウイルスを同時に且つ迅速に区別して検出するマルチプレックスリアルタイム PCR 法を構築した。構築したリアルタイム PCR 法の検出感度は 10^0 - 10^1 コピー/反応であった。

4. バイオテロ関連ホームページの改定と維持管理

本ホームページは昨年度から一般に公開されている。今年度はアクセス数を解析した。月の平均アクセス数は約 1300 件であり、貴重な情報源として活用されていることが示唆された。医療従事者以外でも閲覧できるようになったた

め、今後はさらに分かりやすい情報提供を行えるよう充実を図る必要がある。また、東京オリンピック等の大規模なイベントを控えた状況においては、医療関係者により広く啓発する機会を設けることも重要であり、関連学会との連携によりシンポジウムの開催機会を検討した。

D. 考察

痘瘡ウイルスがバイオテロ病原体として利用されるリスクが指摘されてから久しい。WHO では毎年 ACVVR を開催し、感染性痘瘡ウイルスの廃棄に関する考え方、感染性痘瘡ウイルスを用いて行われる治療法や予防法の開発に関する研究の申請と許可、感染性痘瘡ウイルスの保管状況の確認等々、幅広いテーマについて議論されている。このようなフレーム以外にも、EU や米国でも将来発生するリスクに備えて、痘瘡に対する治療薬やワクチン備蓄について議論がなされ、それに基づいてバイオテロ対策を強化・維持されている。

国際的に第 III 世代痘瘡ワクチンとして MVA と LC16m8 がある。その意味において、LC16m8 は痘瘡ウイルス感染症、いわゆる天然痘や、痘瘡ウイルス関連オルソポックスウイルス感染症対策において、とても重要な地位を占める。

カナダのオルソポックスウイルス研究の第一人者である、Evans D 教授が世界に先駆けて、化学物質のみを材料として、遺伝子は人工合成することで感染性のある馬痘ウイルスの人工合成に成功した。このことは、痘瘡ウイルスの全塩基配列情報が明らかにされ、公開されていることを鑑みると、痘瘡ウイルスを人工合成することが可能となったことを示している。しかしながら、痘瘡ウイルスが病原体として用いられるバイオテロが発生するリスクが高くなったと短絡的に考える必要はない。これは、科学技術の進歩がその進歩にあわせて、バイオテロ発生リスクが変化し、対策も変更していかなければならないことを示している。

LC16m8 の有効性と安全性を調べる研究の重要性が理解される。また、このような研究は日本でしか行われていない。継続した作業・研究がもためられる。

今年度は、バイオテロ対策ホームページの改訂、痘瘡ウイルス関連感染症の診断システムの改良、有効性と安全性を正確に評価するための感染モデル開発研究、MSP 検出法の開発、LC16m8 の暴露後接種の有効性評価に関する研究が実施された。着実に成果が得られている。

LC16m8-BAC システムが開発された。目的の外来遺伝子を LC16m8 遺伝子に挿入させたり、LC16m8 遺伝子の目的の位置に遺伝子変異を挿入させたりした組換え LC16m8 を比較的容易に作製するシステムである。今後、例えば LC16m8 の温度感受性や細胞選択性(このワクチンの安全性にかかわっている LC16m8 の生物学的特徴)の責任遺伝子の同定に関する研究を進めるための基盤が整備された。

痘瘡が根絶されてからほぼ 40 年が経過し、痘瘡ワクチン接種も中止されている。そのため痘瘡ウイルスおよび関連ウイルスに抵抗性のない人が増加している。それに伴い、アフリカ(中央部、西部)においてサル痘ウイルス感染症流行が増加している。2017 年にはこれまで流行報告のなかったナイジェリア、カメルーンでサル痘ウイルス感染症流行が発生した。US CDC により詳細な調査研究がなされ、これまで比較的病原性が低いとされる西アフリカ型サル痘ウイルスによるとの情報をえた。今後、西アフリカにおいて、サル痘ウイルス感染症流行が増加すると推測される。

また、欧州(特にドイツ)で牛痘ウイルスによるひとの感染事例の報告が増加している。牛痘ウイルスの宿主は齧歯類で、齧歯類を捕食するネコが牛痘ウイルスに感染し、その感染ネコからヒトも感染するのではないかと推測される。さらに、南米ではヒトにおけるワクシニアウイルス感染症事例の報告が増加している。このように、痘瘡ウイルスによるバイオテロ対策だけでなく、痘瘡ウイルス関連オルソポックスウイルス感染症対策を強化することが必要になると考えられる。

LC16m8 は、上記の感染症予防にも有効であり、それは LC16m8 の備蓄が国内外で必要とされていることを示している。

E. 健康危険情報

- ナイジェリア、カメルーンでサル痘ウイルス感染症流行が発生し、死亡例もでた。US CDC により詳細な調査研究がなされ、比較的病原性が低いとされる西アフリカ型サル痘ウイルスによるとの情報をえた。今後、西アフリカにおいて、サル痘ウイルス感染症流行が増加すると推測される。
- 欧州(特にドイツ)で牛痘ウイルスによるひとの感染事例の報告が増加している。牛痘ウイルスの宿主は齧歯類で、齧歯類を捕食するネコが牛痘ウイルスに感染し、その感染ネコからヒトも

感染するのではないかと推測されている。

F. 結論

日本で備蓄されている痘そうワクチン LC16m8 の有効性と安全性に関する研究が実施された。また、国際的なフレームの中で議論されている痘瘡ウイルスを病原体として用いられるバイオテロ対策のあり方を考察した。痘瘡ウイルスおよび関連ウイルス感染症に関する検査体制を向上させた。本研究班で開発・維持・管理されているバイオテロ対策ホームページを改良した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Omura N, Yoshikawa T, Fujii H, Shibamura M, Inagaki T, Kato H, Egawa K, Harada S, Yamada S, Takeyama H, Saijo M. A novel system for constructing a recombinant highly-attenuated vaccinia virus strain (LC16m8) expressing foreign genes and its application for the generation of LC16m8-based vaccines against herpes simplex virus 2. *Jpn J Infect Dis*. In press
- 2) Iizuka I, Ami Y, Suzuki Y, Nagata N, Fukushima S, Ogata M, Morikawa S, Hasegawa H, Mizuguchi M, Kurane I, Saijo M. A Single Vaccination of Nonhuman Primates with Highly Attenuated Smallpox Vaccine, LC16m8, Provides Long-term Protection against Monkeypox. *Jpn J Infect Dis*. 2017.70(4):408-415.
- 3) Suda Y, Chamberlain J, Dowall S, Saijo M, Horimoto T, Hewson R, Shimojima M. The development of a novel diagnostic assay that uses a pseudotyped vesicular stomatitis virus for the detection of neutralising activity to Crimean-Congo haemorrhagic fever virus. *Jpn J Infect Dis*. 2018 Apr 27. doi: 10.7883/yoken.JJID.2017.354.
- 4) Takayama-Ito M, Lim CK, Yamaguchi Y, Posadas-Herrera G, Kato H, Iizuka I, Islam MT, Morimoto K, Saijo M. Replication-incompetent rabies virus vector harboring glycoprotein gene of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) protects mice from LCMV challenge. *PLoS Negl*

- Trop Dis. 2018 Apr 16;12(4):e0006398. doi: 10.1371/journal.pntd.0006398.
- 5) Yoshikawa T, Fujii H, Okutani A, Shibamura M, Omura N, Egawa K, Kato H, Inagaki T, Harada S, Yamada S, Morikawa S, Saijo M. Construction and characterization of bacterial artificial chromosomes harboring the full-length genome of a highly attenuated vaccinia virus LC16m8. PLoS One. 2018 Feb 23;13(2):e0192725. doi: 10.1371/journal.pone.0192725.
 - 6) Egawa K, Shimojima M, Taniguchi S, Nagata N, Tani H, Yoshikawa T, Kurosu T, Watanabe S, Fukushi S, Saijo M. Virulence, pathology, and pathogenesis of Pteropine orthoreovirus (PRV) in BALB/c mice: Development of an animal infection model for PRV. PLoS Negl Trop Dis. 2017 Dec 14;11(12):e0006076. doi: 10.1371/journal.pntd.0006076.
 - 7) Fukushi S, Fukuma A, Kurosu T, Watanabe S, Shimojima M, Shirato K, Iwata-Yoshikawa N, Nagata N, Ohnishi K, Ato M, Melaku SK, Sentsui H, Saijo M. Characterization of novel monoclonal antibodies against the MERS-coronavirus spike protein and their application in species-independent antibody detection by competitive ELISA. J Virol Methods. 2018 Jan;251:22-29. doi: 10.1016/j.jviromet.2017.10.008.
 - 8) Taniguchi S, Maeda K, Horimoto T, Masangkay JS, Puentespina R Jr, Alvarez J, Eres E, Cosico E, Nagata N, Egawa K, Singh H, Fukuma A, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Tsuchiaka S, Omatsu T, Mizutani T, Une Y, Yoshikawa Y, Shimojima M, Saijo M, Kyuwa S. First isolation and characterization of pteropine orthoreoviruses in fruit bats in the Philippines. Arch Virol. 2017 Jun;162(6):1529-1539. doi: 10.1007/s00705-017-3251-2.
 - 9) Takayama-Ito M, Lim CK, Nakamichi K, Kakiuchi S, Horiya M, Posadas-Herrera G, Kurane I, Saijo M. Reduction of animal suffering in rabies vaccine potency testing by introduction of humane endpoints. Biologicals. 2017 Mar;46:38-45. doi: 10.1016/j.biologicals.2016.12.007.
 - 10) Ogawa M, Satoh M, Saijo M, Ando S. Evaluation of a broad-ranging and convenient enzyme-linked immunosorbent assay using the lysate of infected cells with five serotypes of Orientia tsutsugamushi, a causative agent of scrub typhus. BMC Microbiol. 2017 Jan 5;17(1):7. doi: 10.1186/s12866-016-0910-5.
 - 11) Sakata M, Tani H, Anraku M, Kataoka M, Nagata N, Seki F, Tahara M, Otsuki N, Okamoto K, Takeda M, Mori Y. Analysis of VSV pseudotype virus infection mediated by rubella virus envelope proteins. Sci Rep. 2017. 7(1):11607
- ## 2. 学会発表
- 1) Shimojima M, Taniguchi S, Ami Y, Nagata N, Fukushi S, Kurosu T, Watanabe S, Tani H, Fukuma A, Iwata-Yoshikawa N, Saijo M. A non-human primate model for severe fever with thrombocytopenia syndrome SFTS. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2017, Osaka (W2-5-05)
 - 2) 下島昌幸, 谷口怜, 網康至, 永田典代, 福士秀悦, 黒須剛, 渡辺俊平, 谷英樹, 福間藍子, 岩田奈織子, 西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群 SFTS の霊長類モデル 第 160 回日本獣医学会学術集会 2017 年 9 月 13 日
 - 3) 渡辺瑞季, 有井潤, 下島昌幸, 川口寧. 単純ヘルペスウイルス gE と相互作用して細胞間感染を促進する宿主因子の同定 第 160 回日本獣医学会学術集会 2017 年 9 月 13 日
 - 4) 渡辺俊平, 須田遊人, 福士秀悦, 黒須剛, 西條政幸, 下島昌幸. ヘビのアレナウイルスの糖蛋白質(GP)は機能的にフィロウイルスの GP に類似する 第 160 回日本獣医学会学術集会 2017 年 9 月 15 日
 - 5) Inagaki T, Yamada S, Haseve F, Quynh Le MT, Mori K, Fujii H, Yoshikawa T, Harada S, Takayama H, Saijo M. Characterization of alphaherpesvirus isolated from fruits bats in Vietnam. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2017, Osaka (W2-5-05)
 - 6) Kato F, Takayama-Ito M, Iizuka-Shiota I,

- Posadas-Herrera G, Horiya M, Satoh M, Morimoto K, Saijo M, Lim CK. Development of a bivalent-vaccine against MERS-CoV and Rabies virus by using a recombinant replication-deficient rabies virus vector. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2017, Osaka (W2-5-05)
- 7) Saijo M. BSL-4 laboratory in the National Institute of Infectious Diseases (NIID), Tokyo, Japan: preparedness for highly pathogenic emerging virus infections. WHO Consultative Meeting on High Containment (Biosafety level -4) Laboratories Networking, Lyon, France, 13-15 December 2017
- 8) Saito T. Overview of Bioterrorism Preparedness and Response in Japan. NCT Asia Pacific, Seoul, Korea, May 2017
- 9) 下島昌幸. 国際緊急援助隊・感染症対策チームによるコンゴ民主共和国における黄熱対策支援第17回日本バイオセーフティ学会総会・学術集会(教育講演)2017年12月11日
- 10) Kawagishi T, Kanai Y, Nouda R, Tani H, Shimojima M, Saijo M, Matsuura Y, Kobayashi T. Nelson bay orthoreovirus cell attachment protein σ C determines strain-specific differences in viral infectivity and pathogenesis. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2017, Osaka (W2-3-09)
- 11) Kurosu T, Okuzaki D, Limkittikul K, Shimojima M, Fukushi S, Watanabe S, Saijo M. The dynamics of disease progression in severe dengue. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2017, Osaka (W2-4-04)
- 12) Fukushi S, Kurosu T, Watanabe S, Shimojima M, Shirato K, Matsuyama S, Yoshikawa-Iwata N, Nagata N, Ohnishi K, Ato M, Sentsui H, Saijo M. Development of competitive ELISA for detecting serologic responses to MERS-CoV using novel monoclonal antibodies against spike protein. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2017, Osaka (W2-4-11)
- 13) Watanabe M, Arii J, Shimojima M, Kato A, Kawaguchi Y. A host cell membrane protein interacts with HSV-1 gE and promotes viral cell-to-cell spread. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2017, Osaka (W2-6-02)
- 14) Onishi M, Kanai Y, Kawagishi T, Nouda R, Pannacha P, Shimojima M, Saijo M, Matsuura Y, Kobayashi T. Analysis of genome packaging mechanism of Nelson bay orthoreovirus. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 24, 2017, Osaka (P1-DRO-03)
- 15) Nouda R, Kawagishi T, Kanai Y, Shimojima M, Saijo M, Matsuura Y, Kobayashi T. Functional analysis of Nelson bay orthoreovirus p17 protein. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 24, 2017, Osaka (P1-DRO-04)
- 16) Watanabe S, Marsh G, Shimojima M, Fukushi S, Kurosu T, Saijo M. The expression of hendra virus F gene is downregulated by its untranslated region. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2017, Osaka (P2-N1-07)
- 17) Taniguchi S, Shimojima M, Fukushi S, Kurosu T, Tani H, Yoshikawa T, Morikawa S, Kato F, Maeki T, Tajima S, Lim CK, Saijo M. Comparative analysis of viral replication and transcription function of severe fever with thrombocytopenia virus and Heartland virus. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2017, Osaka (P2-N1-08)
- 18) Tani H, Fujii H, Taniguchi S, Fukushi S, Kurosu T, Shimojima M, Morikawa S, Saijo M. The protein kinase inhibitors inhibit entry of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in vitro. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2017, Osaka (P2-N4-13)

- 19)佐藤(大久保)梢, 熊谷由美, 福士秀悦, 下島昌幸, 西條政幸, 山野公明, 大西真. 新興回帰熱の新規抗体検査用抗原の性能評価に関する研究 第 160 回日本獣医学会学術集会 2017 年 9 月 15 日
- 20)Shinmura Y, Takagi S, Yoshimura M, Kameyama K, Sonoda K, Kino Y, Yoksan S, Fuji T. Single administration of live-attenuated tetravalent dengue vaccine candidate, KD-382, induced long-lasting (>2 years) neutralizing antibody against all four serotypes in cynomolgus monkeys, The American Society of Tropical Medicine and Hygiene Annual Meeting 2017, Baltimore, November 2017
- 21)Takagi S, Yoshimura M, Kameyama K, Shinmura Y, Sonoda K, Kino Y, Fuji T. Evaluation of the effect of pre-existing immunity against dengue on neutralizing antibody response induced by a live attenuated tetravalent dengue vaccine candidate, KD-382, in cynomolgus monkeys, The American Society of Tropical Medicine and Hygiene Annual Meeting 2017, Baltimore, November 2017
- 22)吉村昌也, 高木翔太, 亀山和久, 新村靖彦, 園田憲悟, 来海和彦. 4 価弱毒生 Dengue ワクチン開発品のカニクイザルにおける中和抗体応答評価, 第 54 回日本ウイルス学会九州支部総会, 那覇, 2017 年 9 月
- 23)吉村昌也, 高木翔太, 亀山和久, 新村靖彦, 園田憲悟, 城野洋一郎, 藤井隆, 4 価弱毒生 Dengue ワクチン開発品のカニクイザルにおける中和抗体応答評価, 第 52 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 沖縄, 2017 年 5 月
- 24)Shinmura Y, Kino Y, Yoksan S, Sonoda K. Single dose of live attenuated tetravalent dengue vaccine elicits well-balanced immune response for all four serotypes without viremia in monkeys, The 6th Asian Vaccine Conference 2017, Singapore, April 2017
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

平成 29 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)
我が国で開発され,備蓄されている細胞培養痘そうワクチンの有効性,安全性,生産性向上
および国内外のバイオテロ対策のあり方に関する研究

Ⅱ. 分担研究報告

平成 29 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)
我が国で開発され、備蓄されている細胞培養痘そうワクチンの有効性、安全性、生産性向上
および国内外のバイオテロ対策のあり方に関する研究

分担報告書

研究総括・バイオテロ対策に関する国際動向の調査と国内対応のあり方の検討

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: 痘瘡ウイルスが用いられるバイオテロに関連する議論がなされている。世界保健機関(WHO)が主催する痘瘡ウイルス研究専門会議(Advisory Committee of Variola Virus Research Committee, ACVVR)における最近の議論の中で、治療法開発研究、ワクチンに関する議論、そして、2016 年に発表された馬痘ウイルスの人工合成の成功に関する議論について、概要をまとめ、今後のバイオテロ対策のあり方を考察した。本研究班で行われている研究、LC16m8 接種者において感染性痘瘡ウイルスに対する中和抗体が誘導されることこの事実が 2016 年および 2017 年に開催された ACVVR(それぞれ第 18 回 ACVVR および第 19 回 ACVVR)で発表された。世界的に現在痘瘡や痘瘡ウイルス関連オルソポックスウイルス感染症に対するワクチンとして備蓄されている第 III 世代ワクチンは、MVA と日本で製造されている LC16m8 のみである。この研究成果は国内のみでなく、国際的にも注目されている。第 18 回 ACVVR でカナダのオルソポックスウイルス研究の第一人者により、化学物質のみから感染性のある馬痘ウイルスが作製(合成)されたとの発表がなされた。馬痘ウイルスを人工合成したことは、一方で痘瘡ウイルス合成が可能であることを示唆している。本研究は科学的な進歩に寄与する研究であるが、一方で、バイオテロ上において新たなリスクを生じられるとも言える。バイオテロが起こされるリスクを含むオルソポックスウイルス感染症流行は、時代とともに変化していくものと考えられる。治療・予防法の開発、疫学情報の集積、ワクチン備蓄のあり方など、これからも継続して議論され、適切な対策が講じられることが求められる。

研究協力者

下島昌幸・国立感染症研究所ウイルス第一部・室長

A. 研究目的

痘瘡ウイルスはヒトからヒトに容易に伝搬し、致死率の極めて高い天然痘の病原体である。天然痘は 1977 年の患者を最後に、地球上から根絶された、そして、痘瘡ウイルスは、米国の US CDC(アトランタ、ジョージア州)とロシアの State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR(Koltsovo, Novosibirsk)にのみにおいて保管されている。その他の研究期間は痘瘡ウイルスの所持・保管は国際的規程により認められていない。しかし、数年前に米国 NIH で痘瘡ウイルスが意図せず保管されていたことが偶然発見された。また、上記 2 機関以外にも保管されている可能性が示唆されている。

その天然痘の病原体(痘瘡ウイルス)が用いられるバイオテロにおいて用いられる危険性に備えて、世界的にワクチン開発と備蓄等の活動がなされてい

るだけでなく、感染性痘瘡ウイルスを用いて診断法や治療薬開発・評価研究がなされている。

本研究では、これらの活動について定期的に議論されている世界保健機関(WHO)が主催する痘瘡ウイルス研究専門家会議(Advisory Committee of Variola Virus Research Committee, ACVVR)での痘瘡ウイルス研究のあり方の議論や、国際的にどのような研究がなされているかを整理した。

また、痘瘡ワクチン接種が国際的に中止されてから 40 年以上が経過し、それに呼応するかのようにサル痘ウイルス感染症(アフリカ)、牛痘ウイルス感染症(欧州)、ワクシニアウイルス感染症(南米)の発生が見られるようになった。その現状をまとめた。

B. 研究方法

1) 第 18 回 ACVVR(2016 年 11 月, ジュネーブ, スイス)の概要の整理

第 18 回 ACVVR(2016 年 11 月, ジュネーブ, スイス)に参加した際のレポートの概要をまとめた。

尚、このレポートは正式に WHO から公表されて
いる
(<http://www.who.int/csr/resources/publications/mallpox/18-ACVVR-Final.pdf?ua=1>).

- 2) 第 18 回 ACVVR の際に発表された化学物質のみを用いて感染性馬痘ウイルスを作製した研究に関する報告の考察
第 18 回 ACVVR において、Evans D 教授(カナダ)が発表した、化学物質のみから感染性のある馬痘ウイルスを合成した事実について考察する。また、第 18 回 ACVVR(2016 年 11 月, ジュネーブ, スイス)のレポートに記載されている概要についてまとめた。
- 3) 痘瘡ワクチンにより予防することのできる痘瘡ウイルス以外のオルソウイルス感染症流行の文献的考察
近年流行が増加していると考えられるオルソポックスウイルス感染症の流行状況について文献的調査を実施した。
- 4) 国際的な枠組みの中で実施されたオルソポックスウイルス感染症診断技術の評価活動
Global Security Health Action Group-Laboratory Network (GHSAG-LN) のフレームの中で実施されたオルソポックスウイルス感染症の診断技術レベルを評価する活動に参加したので、その内容についてまとめた。

【倫理面への配慮】
特記事項はない。

C. 研究結果

- 1) 第 18 回 ACVVR(2016 年 11 月, ジュネーブ, スイス)の概要の整理
第 18 回 ACVVR(2016 年 11 月, ジュネーブ, スイス)および第 19 回 ACVVR(2017 年 11 月, ジュネーブ, スイス)に出席した。第 19 回 ACVVR(2017 年 11 月, ジュネーブ, スイス)の正式なレポートはまだ発表されていない。WHO-ACVVR が認めているバイオテロ対策に通じる研究を、以下にまとめた。
 - ① US CDC で実施されている humanized mice を用いた痘瘡ウイルス感染動物モデル開発である。現時点では、痘瘡ウイルス感染動物モデルは霊長類を用いることにより痘瘡類似症状を発症させるものしかなく、かつ、それにはかなり高い感染価のウイルスを静注投与することが必要である。
 - ② 抗ウイルス薬に関する研究は、VECTOR および US CDC で実施されている。US CDC ではワ

- クシニアウイルスの感染性を阻害する単クローン抗体を用いた治療薬開発が実施されている。
- ③ 痘瘡に対する治療薬開発には、他のオルソポックスウイルス感染動物モデルを用いて研究がなされている。特に本 ACVVR において報告されている抗ウイルス薬は、TPOXX™/Arestyvr™ (ST-246, SIGA Technology 社)と Brincidofovir (CMX001, Chimerix 社)の 2 剤である。TPOXX™/Arestyvr™ はオルソポックスウイルスに特異的な抗ウイルス薬であり、動物感染モデルでその有効性が評価されている。その成績は米国 FDA により、痘瘡流行に備えたカウンターメジャーとして考える上で参考になる情報と認定されている。ヒトにおける臨床研究も進められている。
一方、オルソポックスウイルスの増殖を抑制する効果のある brincidofovir は多くの DNA ウイルスの増殖を抑制する抗ウイルス薬(シドフォビル, cidofovir の経口投与薬)である。例えば薬剤耐性単純ヘルペスウイルス感染症や造血幹細胞移植患者のアデノウイルス感染症に対する治療薬として用いられる場合がある。特に造血幹細胞移植患者のアデノウイルス感染症に対する治療薬としての臨床研究が実施されている。
 - ④ ACVVR において議論されている痘瘡ワクチン
近年、ACVVR において、バイオテロ対策を含む痘瘡ウイルス感染症に対するカウンターメジャーのためのワクチンとして、MVA と日本で生産・備蓄されている LC16m8 について研究の進捗状況が報告されている。LC16m8 については、本研究班の活動の一環として、LC16m8 接種者において誘導される抗体が感染性のある痘瘡ウイルスに中和活性を有するか否かに関する研究成果についても報告されている。尚、この研究は本研究班と US CDC との共同研究 (ACVVR からの承認の基に)実施されている。
 - 2) 痘瘡ウイルス関連オルソポックスウイルス感染症の最近の流行
痘瘡が根絶されてからほぼ 40 年が経過し、痘瘡ワクチン接種も中止されている。そのため痘瘡ウイルスおよび関連ウイルスに抵抗性のない人が増加している。それに伴い、アフリカ(中央部、西部)においてサル痘ウイルス感染症流行が増加している。2017 年にはこれまで流行報告のなかったナイジェリア、カメルーンでサル痘ウイルス感染症流行が発生し、死亡例も報告された。US CDC により詳細な調査研究がなされ、比較的病原性が低いとされる西アフリカ型サル痘ウイルスによるとの情報を得た。今後、西アフリカにおいて、サ

ル痘ウイルス感染症流行が増加すると推測される。

また、欧州(特にドイツ)で牛痘ウイルスによるひとの感染事例の報告が増加している。牛痘ウイルスの宿主は齧歯類で、齧歯類を捕食するネコが牛痘ウイルスに感染し、その感染ネコからヒトも感染するのではないかと推測される。

さらに、南米ではヒトにおけるワクシニアウイルス感染症事例の報告が増加している。

このように、痘瘡ウイルスによるバイオテロ対策だけではなく、痘瘡ウイルス関連オルソポックスウイルス感染症対策を強化することの必要が高まっている。

3) 国際的な枠組みの中で実施されたオルソポックスウイルス感染症診断技術の評価活動

GHSAG-LN 会議のフレームの中で、関係国感染症研究機関(日本は国立感染症研究所)間でオルソポックスウイルス感染症の診断(遺伝子検査)の能力外部評価が実施された。現在、各機関の成績評価、まとめの作業がなされている。

D. 考察

今年度は痘瘡ウイルスによるバイオテロ対策に関連する議論がなされている ACVVR(2016 年度の報告)から、抗ウイルス薬やワクチンに関する議論の状況について、概要としてまとめた。

WHO においては ACVVR 等において継続して痘瘡ウイルスによるバイオテロ、痘瘡の再流行の発生に備えた議論がなされている。抗ウイルス薬としては 2 剤について議論がなされ、米国ではカウンターメジャーの際の薬剤として認められる方向が示されている。一方、ワクチンとして MVA と LC16m8 について議論されている。痘瘡流行のない現在、痘瘡ワクチンの安全性は最大のプライオリティーとなる。MVA にしても、LC16m8 にしても痘瘡が流行している時代に用いられたワクチンではないので、実際の痘瘡流行阻止に有効か否かは証明されていない。それだけに、MVA や LC16m8 の有効性については霊長類-サル痘ウイルス感染モデル等を用いて評価されてきた。

2017 年 11 月に開催された第 19 回 ACVVR(2017 年 11 月、ジュネーブ、スイス)での議論に関するレポートは報告されていないが、この会議でも本研究班で実施されている LC16m8 接種者における感染性痘瘡ウイルスに対する中和抗体誘導能に関する研究成果が発表された。現在、安全性が確保されている第Ⅲ世代痘瘡ワクチンとして世界で存在するのは、MVA と LC16m8 のみである。そのような状況で LC16m8 接種者における感染性痘瘡ウイルス

に対する中和抗体誘導能に関する研究は、注目されている。本研究班でなされている研究は、国内外のオルソポックスウイルス感染症対策、バイオテロ対策に貢献するものと考えられる。

2003 年に米国で、本来流行していることのないサル痘ウイルス感染症流行が発生した。西アフリカ(ガーナ)から米国テキサス州のペットショップに輸入された。また、痘瘡ワクチン接種が世界規模で中止されてから約 40 年が経過し、痘瘡ウイルス関連オルソポックスウイルス感染症流行が増加していると考えられる。オルソポックスウイルス感染症患者の国内輸入例にも備える必要性と、その対策(治療・予防法)の強化が求められる。その意味で、国内でも、オルソポックスウイルス感染症の診断法を整備・維持していくことが必要と考える。そのためには本研究で実施されたオルソポックスウイルス感染症のような希少感染症に対する検査法の国際的連携のもとに実施される外部評価活動に参画することはこれからも必要である。

第 18 回 ACVVR(2016 年 11 月、ジュネーブ、スイス)では、カナダのオルソポックスウイルス研究の第一人者で、かつ、ACVVR の専門家である Evans D 教授が、化学物質のみから感染性のある馬痘ウイルスを作製した。遺伝子情報、遺伝子合成技術を含む科学技術の向上により、巨大な DNA ウイルスであるオルソポックスウイルス合成に初めて成功した。このプロセスは通常 Synthetic Biology(合成生物学)と呼ばれる。今回の馬痘ウイルスを人工合成したことは、一方で痘瘡ウイルス合成が可能であることを示唆している。本研究は科学的な進歩に寄与する研究であるが、一方で、バイオテロ上において新たなリスクを生じさせることを示している。

E. 結論

オルソポックスウイルス感染症流行は、時代とともに変化していくものと考えられる。治療・予防法の開発、疫学情報の集積、ワクチン備蓄のあり方など、これからも継続して議論され、適切な対策が講じられることが求められる。

F. 健康危険情報

- ナイジェリア、カメルーンでサル痘ウイルス感染症流行が発生し、死亡例もでた。US CDC により詳細な調査研究がなされ、比較的病原性が低いとされる西アフリカ型サル痘ウイルスによるとの情報を受けた。今後、西アフリカにおいて、サル痘ウイルス感染症流行が増加すると推測される。
- 欧州(特にドイツ)で牛痘ウイルスによるひとの感染事例の報告が増加している。牛痘ウイルスの

宿主は齧歯類で、齧歯類を捕食するネコが牛痘ウイルスに感染し、その感染ネコからヒトも感染するのではないかと推測されている。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iizuka I, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Fukushi S, Ogata M, Morikawa S, Hasegawa H, Mizuguchi M, Kurane I, Saijo M. A single vaccination of nonhuman primates with highly attenuated smallpox vaccine, LC16m8, provides long-term protection against monkeypox. *Jpn J Infect Dis*. 2017;70(4):408-415.
- 2) Suda Y, Chamberlain J, Dowall S, Saijo M, Horimoto T, Hewson R, Shimojima M. The development of a novel diagnostic assay that uses a pseudotyped vesicular stomatitis virus for the detection of neutralising activity to Crimean-Congo haemorrhagic fever virus. *Jpn J Infect Dis*. 2018 Apr 27. doi: 10.7883/yoken.JJID.2017.354.
- 3) Takayama-Ito M, Lim CK, Yamaguchi Y, Posadas-Herrera G, Kato H, Iizuka I, Islam MT, Morimoto K, Saijo M. Replication-incompetent rabies virus vector harboring glycoprotein gene of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) protects mice from LCMV challenge. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018 Apr 16;12(4):e0006398. doi: 10.1371/journal.pntd.0006398.
- 4) Yoshikawa T, Fujii H, Okutani A, Shibamura M, Omura N, Egawa K, Kato H, Inagaki T, Harada S, Yamada S, Morikawa S, Saijo M. Construction and characterization of bacterial artificial chromosomes harboring the full-length genome of a highly attenuated vaccinia virus LC16m8. *PLoS One*. 2018 Feb 23;13(2):e0192725. doi: 10.1371/journal.pone.0192725.
- 5) Egawa K, Shimojima M, Taniguchi S, Nagata N, Tani H, Yoshikawa T, Kurosu T, Watanabe S, Fukushi S, Saijo M. Virulence, pathology, and pathogenesis of Pteropine orthoreovirus (PRV) in BALB/c mice: Development of an animal infection model for PRV. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 Dec 14;11(12):e0006076. doi: 10.1371/journal.pntd.0006076.
- 6) Fukushi S, Fukuma A, Kurosu T, Watanabe S, Shimojima M, Shirato K, Iwata-Yoshikawa N, Nagata N, Ohnishi K, Ato M, Melaku SK, Sentsui H, Saijo M. Characterization of novel monoclonal antibodies against the MERS-coronavirus spike protein and their application in species-independent antibody detection by competitive ELISA. *J Virol Methods*. 2018 Jan;251:22-29. doi: 10.1016/j.jviromet.2017.10.008.
- 7) Taniguchi S, Maeda K, Horimoto T, Masangkay JS, Puentes-pina R Jr, Alvarez J, Eres E, Cosico E, Nagata N, Egawa K, Singh H, Fukuma A, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Tsuchiaka S, Omatsu T, Mizutani T, Une Y, Yoshikawa Y, Shimojima M, Saijo M, Kyuwa S. First isolation and characterization of pteropine orthoreoviruses in fruit bats in the Philippines. *Arch Virol*. 2017 Jun;162(6):1529-1539. doi: 10.1007/s00705-017-3251-2.
- 8) Takayama-Ito M, Lim CK, Nakamichi K, Kakiuchi S, Horiya M, Posadas-Herrera G, Kurane I, Saijo M. Reduction of animal suffering in rabies vaccine potency testing by introduction of humane endpoints. *Biologicals*. 2017 Mar;46:38-45. doi: 10.1016/j.biologicals.2016.12.007.
- 9) Ogawa M, Satoh M, Saijo M, Ando S. Evaluation of a broad-ranging and convenient enzyme-linked immunosorbent assay using the lysate of infected cells with five serotypes of *Orientia tsutsugamushi*, a causative agent of scrub typhus. *BMC Microbiol*. 2017 Jan 5;17(1):7. doi: 10.1186/s12866-016-0910-5.

2. 学会発表

- 1) Shimojima M, Taniguchi S, Ami Y, Nagata N, Fukushi S, Kurosu T, Watanabe S, Tani H, Fukuma A, Iwata-Yoshikawa N, Saijo M. A non-human primate model for severe fever with thrombocytopenia syndrome SFTS. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2017, Osaka (W2-5-05)
- 2) 下島昌幸, 谷口怜, 網康至, 永田典代, 福士秀悦, 黒須剛, 渡辺俊平, 谷英樹, 福間藍子, 岩田奈織子, 西條政幸 重症熱性血小板減少症候群 SFTS の霊長類モデル 第 160 回日本獣医学会学術集会 2017 年 9 月 13 日
- 3) Inagaki T, Yamada S, Haseve F, Quynh Le MT, Mori K, Fujii H, Yoshikawa T, Harada S, Takayama H, Saijo M. Characterization of alphaherpesvirus isolated from fruit bats in Vietnam. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2017, Osaka (W2-5-05)
- 4) Kato F, Takayama-Ito M, Iizuka-Shiota I, Posadas-Herrera G, Horiya M, Satoh M, Morimoto K, Saijo

M, Lim CK. Development of a bivalent-vaccine against MERS-CoV and Rabies virus by using a recombinant replication-deficient rabies virus vector. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2017, Osaka (W2-5-05)

- 5) Saijo M. BSL-4 laboratory in the National Institute of Infectious Diseases (NIID), Tokyo, Japan: preparedness for highly pathogenic emerging virus infections. WHO Consultative Meeting on

High Containment (Biosafety level -4)
Laboratories Networking, Lyon, France, 13-15
December 2017

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他

平成 29 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)
我が国で開発され、備蓄されている細胞培養痘そうワクチンの有効性、安全性、生産性向上
および国内外のバイオテロ対策のあり方に関する研究

分担報告書

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付属病院
感染免疫内科・講師
研究分担者 鯉淵 智彦

研究要旨: 生物テロに関する情報を網羅した『バイオテロ対応ホームページ』に最新知見を加えて改訂するより、国内での貴重な情報源としての充実を図った。今年度は天然痘、ペスト、ウイルス性出血熱(エボラ出血熱、クリミア・コンゴ出血熱、マールブルグ熱、ラッサ熱)、野兔病、炭疽菌に対して新たな情報を追加した。本ホームページは昨年度から一般公開を行っており、今年度はアクセス数の解析も行った。月の平均アクセス数は約 1300 件であり、貴重な情報源として活用されていることが示唆された。医療従事者以外でも閲覧できるようになったため、今後はさらに分かりやすい情報提供を行えるよう充実を図りたい。また、東京オリンピック等の大規模なイベントを控えた状況においては、医療関係者により広く啓発する機会を設けることも重要であり、関連学会との連携によりシンポジウムの開催機会を検討した。

研究協力者
菊地正 東京大学医科学研究所感染症分野 助教

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

A. 研究目的

国際的なテロリズムの拡大が懸念される中、東京オリンピックなど大規模なイベントを控えたわが国において、バイオテロへの対応を考えることは不可欠である。しかし、バイオテロに用いられる可能性のある病原微生物は多彩であり、さらに、過去の事例については限られた情報しか公開されていない場合も多く、関連情報を得ることは容易ではない。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や治療法の選択について、インターネットを通じて提供することが重要な対応策の一つとなる。本研究では、これまでに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。新たな情報を不断に追加してより内容を充実させ、啓発を行うと共に、これらの研究を通じて今後のバイオテロ対策に必要な施策を洗い出し、新たな支援方法を開発することを目的とする。

B. 研究方法

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

【倫理面への配慮】

公表された情報のみを研究材料とするため、倫理面への特別な配慮は必要ない。

C. 研究結果

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

今年度は、近年、世界でアウトブレイクがあった病原体、診断や治療面で新たな知見があった病原体について改訂を行った。今年度の主要な改訂内容は以下である。

- 1) 天然痘 (LC16m8 株接種データの追加)
日本では、2005～2010 年に国連の平和維持活動に従事する陸上自衛隊員 268 人に、LC16m8 株による接種を行ったところ(初回接

種：196人，再接種：71人），初回接種の94.4%，再接種の81.7%で善感がみられ，接種後7か月時点においても高い中和抗体価が維持されていた。副反応は重篤なものは認められず，全身反応として，腋窩リンパ節腫脹52人（19.4%），発熱4人（1.5%），倦怠感2人（0.7%），発疹1人（0.4%）であった。

2) ペスト(近年の流行状況の追加)

WHOによると，2010年から2015年までに世界で3248例が報告され，そのうち584例が死亡している。2017年末時点での3大発生国は，マダガスカル共和国，コンゴ民主共和国(DRC)，ペルー共和国である。

3) ウイルス性出血熱

- 2017年 ウガンダでのマールブルグ熱の発生を追加
- ラッサ熱の治療法の改訂(リバビリンの使用量など)
- WHOの「感染性物質の輸送規則に関するガイダンス 2017-2018版」の紹介 (<http://www.who.int/ihr/publications/WHO-WHE-CPI-2017.8/en/>)

4) その他

エボラウイルス病，ならびに野兔病，炭疽菌の項目について治療，予防，疫学等の最近の情報を踏まえたアップデートを行なった。また，今年度はHPへのアクセス数の解析を行った。月別のアクセス数は下図の通りである。

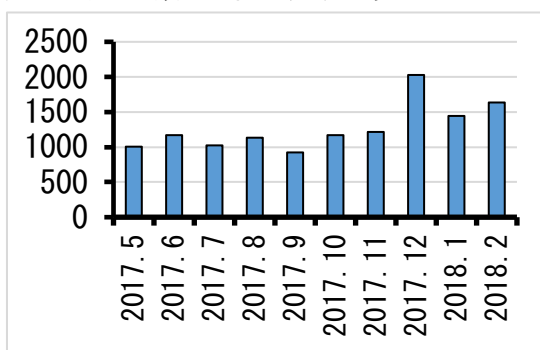


図 バイオテロ対応HP 月別アクセス件数(アクセス数解析は国立保健医療科学院 健康危機管理研究部の田中克則氏のご協力による)

平均すると1,276件/月であり，貴重な情報源として活用されていることが示唆された。さらに，インターネットを通じた情報提供だけでなく，医療関係者にバイオテロ関連情報を広く提供するシンポジウム等の開催も有効な啓発事業と考えられる。日本感染症学会との連携のもと2018年10月に東京で開催される「感染症学会東日

本地方会学術集会・化学療法学会東日本支部総会，合同学会」においてシンポジウムを企画した。演者は4名を予定しており，現時点での演題は，バイオテロ総論，伊勢志摩サミットにおける感染症強化サーベイランス，東京オリンピック・パラリンピックに向けた感染症対策，バイオテロが疑われる疾患の診断と検査体制，を予定している。

D. 考察

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

E. 結論

国際的なテロリズムの拡大が懸念され，2020年には東京オリンピックが開催されるなどバイオテロ対策の重要性は今後も増大していくことが予想される。バイオテロに使用される病原体や各疾患の特徴などを包括的に閲覧できるホームページの継続的な改訂，充実は今後とも継続していく必要がある。学会などと連携したシンポジウム等の開催を通じて，適切な情報提供の場を設けていくことも不可欠であ

る.

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) 足立拓也, 加藤康幸, 古宮伸洋, 岩田健太郎, 鯉淵智彦: 未知の疾患の流行, 国際社会の反応, 揺れ動く世論: 私たちは何に価値を見いだし, 何をめざすのか. シンポジウム 6「国際的に脅威となるウイルス感染症と対策」 第 91

回日本感染症学会総会・学術講演会, 東京,
2017 年 4 月

- 2) 鯉淵智彦「エボラ出血熱流行地における活動経験」平成 29 年度 東京都港区感染対策協議会 講演, 東京, 2018 年 3 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

特になし

分担報告書

天然痘バイオテロ対応に関する公衆衛生対応の検討

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

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

A. 研究目的

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

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

【倫理面への配慮】

該当しない。

B. 研究方法

1. バイオテロ対策の国際的な動向の調査

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

2. バイオテロ(主に天然痘テロ)対応に関する公衆衛生対応の検討

C. 研究結果

1. バイオテロ対策の国際的な動向の調査

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

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

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

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

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

提言としては、

- 公衆衛生、セキュリティ、法執行機関、人道

支援のセクターからの専門家リストを作成し定期的に会合を行う。

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

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

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

MVA ワクチンの現状について

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

¹ The 2014-2015 Ebola outbreak: lessons for

response to a deliberate event (2016 年 9 月)

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

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

TPOXX® (tecovirimat/ST-246)について

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

Brincidofovir について

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

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

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

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

D. 考察

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

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

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

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

MVA ワクチンについては、免疫原性、安全性について知見が蓄積されていた。一方で、非増殖性株が使われていることから、旧来のワクチン接種方法である二又針による接種ではなく皮下あるいは筋注による接種が必要であり、免疫が得られたことを示す皮膚反応である“Take”が認められないこと、2回接種が必要である点は、ワクチン接種オペレーション上使い難い側面があることに注意が必要である。また、液体製品であり、長期保存に難点がある点には注意が必要である。少なくとも、発生時の対応上、国内で LC16m8 が第一選択となる状況は変わらないだろう。発生前に何らかの理由で打つ必要が生じる一方で、接種および接種による免疫反応の確認のための時間的余裕があり、かつ社会接種者や免疫不全者等接種による副反応のリスクを最大限に抑える必要があるような状況で無ければ、MVA ワクチンの必要性は今のところ考えにくい。

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

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

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

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

E. 結論

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

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

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

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

分担報告書

出血熱ウイルスを含むバイオテロ関連病原ウイルス検出法の改良

所 属 国立感染症研究所
ウイルス第一部・室長
研究分担者 下島 昌幸

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

研究協力者
福士秀悦・国立感染症研究所・主任研究官

A. 研究目的

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

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

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

本年度は痘そうウイルスの検出法の改良を行なっ

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

B. 研究方法

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

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

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

【倫理面への配慮】

該当なし

C. 研究結果

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

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

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

D. 考察

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

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

E. 結論

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

F. 健康危険情報 特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Taniguchi S, Fukuma A, Tani H, Fukushi S, Saijo M, Shimojima M. A neutralization assay with a severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strain that makes plaques in inoculated cells. *J Virol Methods*. 2017 Jun;244:4-10.
- 2) Suda Y, Chamberlain J, Dowall S, Saijo M, Horimoto T, Hewson R, Shimojima M. The development of a novel diagnostic assay that uses a pseudotyped vesicular stomatitis virus for the detection of neutralising activity to Crimean-Congo haemorrhagic fever virus. *Jpn J Infect Dis*. In press.

2. 学会発表

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

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



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



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

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

ABSTRACT

Article history:

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

Keywords:

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

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

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

Primer and Probe

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

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

DNA standards (PCR product)

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

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

Reaction setup

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

PCR condition

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



QuantiTect Probe PCR Kits

図 4. リアルタイム PCR の反応液の組成と反応条件

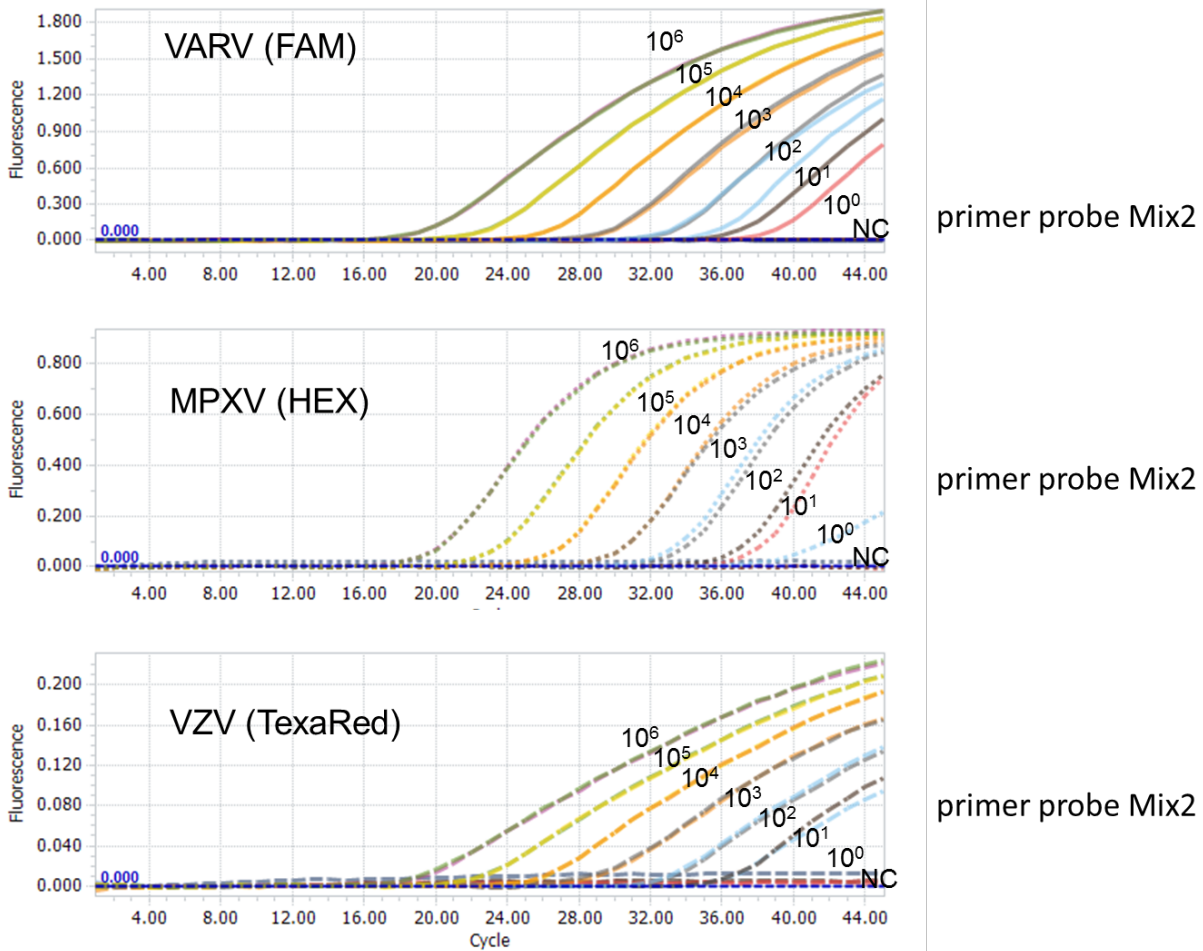
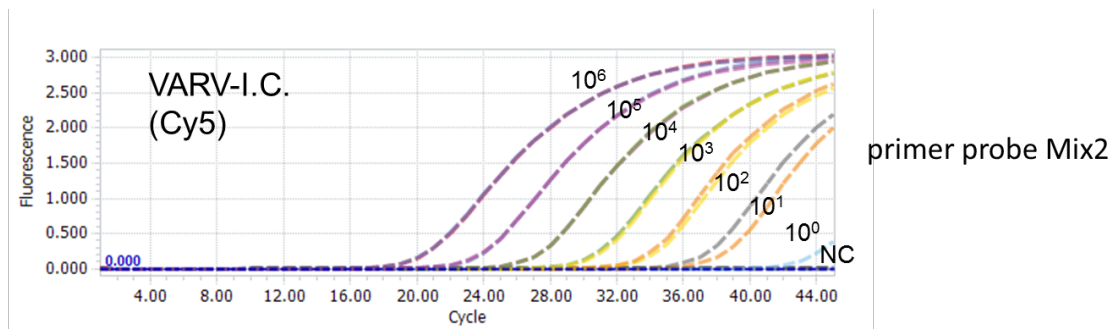


図 5. リアルタイム PCR における添加標準 DNA 量(図中)とシグナルの検出(横軸はサイクル数)



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

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

平成 29 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)
我が国で開発され、備蓄されている細胞培養痘そうワクチンの有効性、安全性、生産性向上
および国内外のバイオテロ対策のあり方に関する研究

分担報告書

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

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

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

研究協力者

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

A. 研究目的

乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 は、有効性を保持しながら弱毒化に成功した弱毒生ウイルスワクチンで、本邦では 1975 年に製造承認が認可された。当時の痘そうワクチンの定期接種は、小児に対して予防目的で池田株、大連 I 株や LC16m8 の親株である Lister 株が 3 期、3 回の接種が実施されていたが、WHO(世界保健機関)の天然痘根絶計画が進み、日本では 1976 年に痘そうワクチンの定期接種が中止となった。

近年天然痘ウイルスによる生物テロの危険性が指摘されたことを受けて、わが国では痘そうワクチン LC16m8 がテロ対抗医薬品として 2001 年以降再製造、国家備蓄されている。また、天然痘テロに対する危機管理対策として初動対応者(ファーストレスポonder)となりうる成人対象者(初種痘者及び再種痘者)に対して LC16m8 が 1 回接種されている。

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

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

B. 研究方法

本調査研究では、過去に種痘歴の無い健康成人(初回接種者)において米国承認備蓄ワクチン Dryvax を比較対照として 2004~2005 年に米国で実施された細胞培養弱毒痘そうワクチン LC16m8 の第 I/II 相無作為二重盲検臨床試験で取得されたヒト血清(LC16m8 接種者 23 名及び Dryvax 接種者 7 名、各被験者のワクチン接種前及び接種後 30 日目採取血清)を用いて実施した。なお、調査対象者は各ワクチン接種群の被験者のうち、接種後 30 日目に採取した血清中のワク

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

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

【倫理面への配慮】

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

C. 研究結果

細胞培養弱毒生痘そうワクチン LC16m8 を 1 回接種された成人被験者が獲得したサル痘ウイルスに対する中和抗体応答を調査するために、過去に種痘歴の無い健康成人において米国承認備蓄ワクチン Dryvax を比較対照として 2004~2005 年に化血研が米国で実施した細胞培養弱毒生痘そうワクチン LC16m8 の第 I/II 相無作為二重盲検臨床試験で取得されたヒト血清を用いて、サル痘ウイルスに対する中和抗体価測定を実施した。各被験者の Anti-Monkeypox PRNT₅₀ を表 1 に示す。次に、中和抗体陽転率は、Anti-Monkeypox PRNT₅₀ が ≥ 10 を基準とした場合、LC16m8 群では 78%(18/23)、Dryvax 群では 86%(6/7)であり、接種前後比で 4 倍の抗体価上昇を基準とした場合、同じく LC16m8 群では 78%(18/23)、Dryvax 群では 86%(6/7)であり、両群は同等であった。また Anti-Monkeypox PRNT₅₀ の幾何平均(GMT)は、LC16m8 群では 35、Dryvax 群では 86 であり、両群の Anti-NYCBH PRNT₅₀ の GMT 比 1.25 倍(LC16m8 群の GMT は 420、Dryvax 群の GMT は 525)と比較して、約 2 倍の GMT 比であった(表 2)。

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

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

D. 考察

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

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

E. 結論

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

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

F. 健康危険情報
該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

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

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

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

表 1. 痘そうワクチン接種後のサル痘ウイルスに対する中和抗体価

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

表 2. 痘そうワクチン接種後のサル痘ウイルスに対する中和抗体陽転率

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

*10 倍以上の中和抗体価を獲得した者を陽性と判定

**ワクチン接種前の抗体価の 4 倍以上の抗体価を獲得した者を陽性と判定

GMT: Geometric mean titer

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

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

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

*陽性判定基準:中和抗体価が 40 倍以上の抗体価を示した者を陽性と判定

分担報告書

細胞培養弱毒生痘そうワクチンの安全性評価における病理学的研究

所属 国立感染症研究所・感染病理部・室長
研究分担者 永田 典代

研究要旨:サル痘ウイルスがマウスに不顕性感染することを利用し、好中球枯渇マウスにおける重症化機序を明らかにする。サル痘ウイルスの皮下接種はマウスに明らかに病変を起こさないが、好中球の枯渇処理はウイルス増殖と病変形成を亢進した。今年度は、本モデルにおける免疫反応を経時的に明らかにした。一時的な好中球の枯渇処理は、感染後の好中球増多、炎症性サイトカイン・ケモカインの高発現を引き起こした。今後、ウイルス感染動態と病像の変化について詳細に解析を進める。

研究協力者

岩田奈織子・国立感染症研究所感染病理部・主任研究官

佐藤由子・国立感染症研究所感染病理部・主任研究官

長谷川秀樹・国立感染症研究所感染病理部・部長

福士秀悦・国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官

吉河智城国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官

西條政幸・国立感染症研究所ウイルス第一部・部長

A. 研究目的

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

B. 研究方法

動物は、日本エスエルシーより購入した BALB/c マウス(接種時、14 週齢メス)を準備し、国立感染症研究所のバイオリスク管理委員会規定に従い、ABSL3 施設にて感染実験を行った。

ウイルスは、サル痘ウイルスの Zr-599 株を用いた。好中球枯渇のため、抗マウス Ly6G 抗体(1A8, BioXcell 社)を、また、アイソタイプコントロールとして rat IgG2a(BioXcell 社)を用いた。

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

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

【倫理面への配慮】

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

C. 研究結果

いずれの接種群においても、サル痘ウイルスの皮下接種後に明らかな肉眼病変を示さなかった。しかし、好中球枯渇処理群はウイルス接種後に体重の有意な増加傾向がみられた。

白血球数について、好中球枯渇処理群ではウイルス接種の有無に関わらずほぼ同様の動態を示したが、アイソタイプコントロール処理群では、ウイルス接種3日後に白血球数の増多がみられ、

それは、リンパ球と単球の増多によるものであった。好中球枯渇群において単球の軽度の増多が3日目に見られた。

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

D. 考察

いくつかの急性ウイルス感染症において、好中球の減少は宿主側の重症化因子の一つと考えられている。ワクチニアウイルスを用いたマウスモデルにおいても、同様な知見が得られている (Fischer MA et al, 2011)。我々はすでに、BALB/c マウスのサル痘ウイルス不顕性感染のモデルにおいて、抗 Ly6G 抗体投与による好中球枯渇によりウイルス増殖と病変形成が亢進することを示した (平成 26-28 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金 (新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業) 報告書)。よって、サル痘ウイルス感染防御において好中球は一定の役割を担っていると考えている。

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

今後は、当該モデル系における知見を考慮しながら、アトピー性皮膚炎等のアレルギーモデルとして知られている、NC/Ng a マウスにおけるポックスウイルス感染の影響について基礎検討も開始する。

E. 結論

好中球枯渇後のサル痘ウイルス感染における宿主応答を血液像、サイトカイン・ケモカイン解析から明らかにした。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakata M, Tani H, Anraku M, Kataoka M, Nagata N, Seki F, Tahara M, Otsuki N, Okamoto K, Takeda M, Mori Y. Analysis of VSV pseudotype virus infection mediated by rubella virus envelope proteins. *Sci Rep*. 2017. 7(1):11607.
- 2) Taniguchi S, Maeda K, Horimoto T, Masangkay JS, Puentespin R Jr, Alvarez J, Eres E, Cosico E, Nagata N, Egawa K, Singh H, Fukuma A, Yoshikawa T, Tani H, Fukushima S, Tsuchiaka S, Omatsu T, Mizutani T, Une Y, Yoshikawa Y, Shimojima M, Saijo M, Kyuwa S. First isolation and characterization of pteropine orthoreoviruses in fruit bats in the Philippines. *Arch Virol*. 2017. 162(6):1529-1539.
- 3) Iizuka I, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Fukushima S, Ogata M, Morikawa S, Hasegawa H, Mizuguchi M, Kurane I, Saijo M. A Single Vaccination of Nonhuman Primates with Highly Attenuated Smallpox Vaccine, LC16m8, Provides Long-term Protection against Monkeypox. *Jpn J Infect Dis*. 2017.70(4):408-415.

2. 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

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

図表

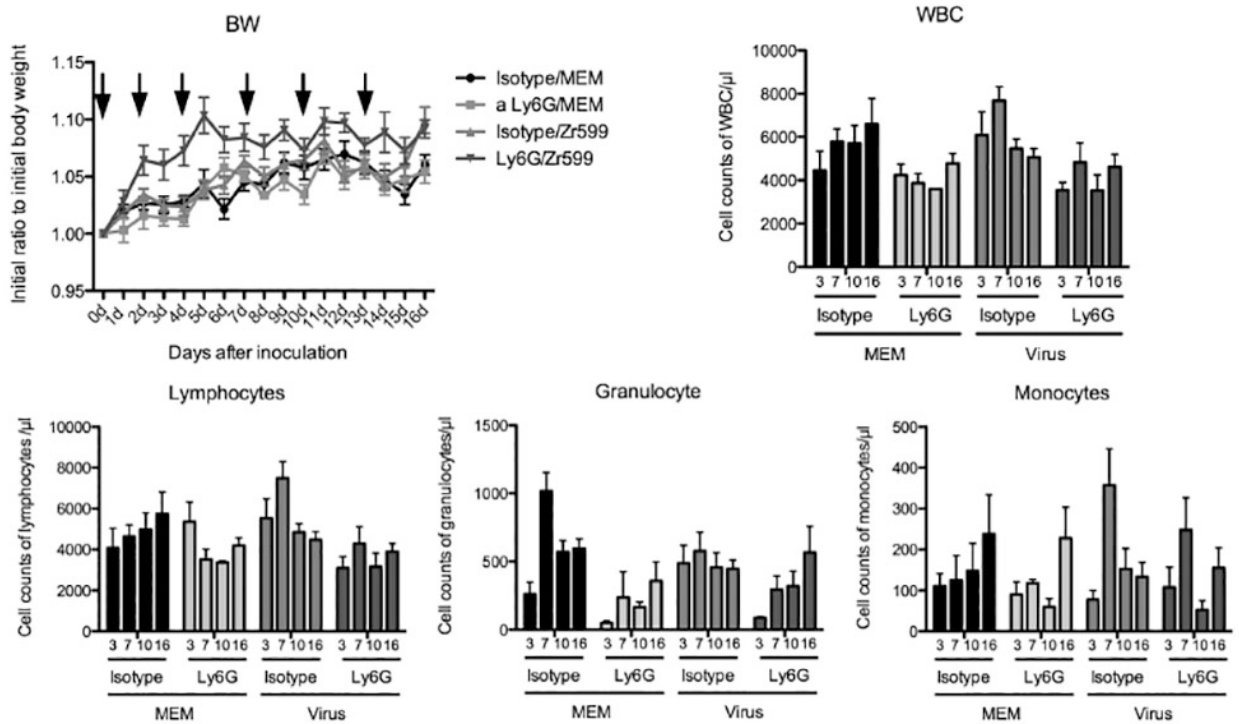


図1 左上はサル痘ウイルス皮下接種後のマウスの体重変化。Isotype/MEM, アイソタイプコントロール処理後細胞培養液接種; aLy6G/MEM, 好中球枯渇後細胞培養液接種; Isotype/Zr599, アイソタイプコントロール処理後ウイルス接種; Ly6G/Zr599, 接種好中球枯渇処理後ウイルス。各群 n=6。矢印は、抗体投与日を示した。右上, 下段は順にWBC, 白血球数; リンパ球数, 顆粒球数, 単球数を示した。ウイルス接種 3, 7, 10, 16 日の血液像。

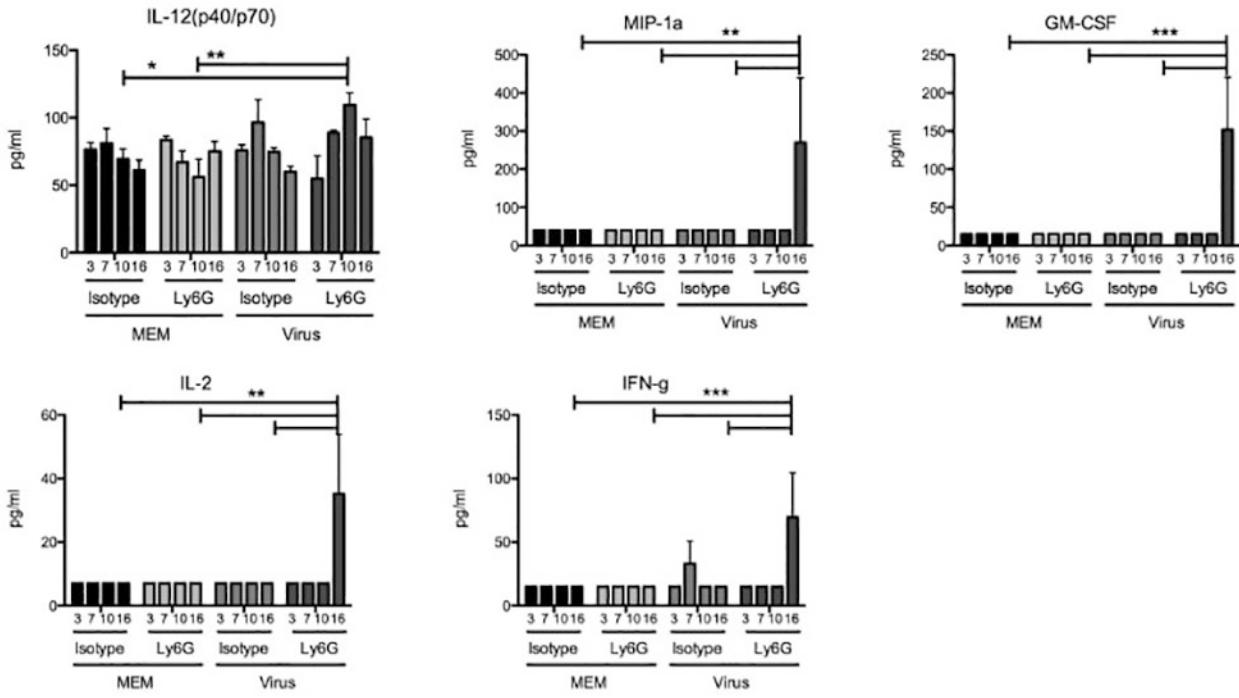


図2. ウイルス感染後 3, 7, 10, 16 日目の血漿中のサイトカイン, ケモカイン発現量。

平成 29 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)
我が国で開発され、備蓄されている細胞培養痘そうワクチンの有効性、安全性、生産性向上
および国内外のバイオテロ対策のあり方に関する研究

分担報告書

細胞培養弱毒生痘そうワクチンの特性解析(遺伝子解析)、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・部長
研究分担者 森川 茂

研究要旨:Lister 株から低温馴化により LC16 株, LC16mO 株を経由して樹立された, 安全性の高い痘そうワクチン製造用株である LC16m8 株は, 継代培養するとプラークサイズのやや大きい LC16mO 型 (medium size plaque; MSP) の性状を保つウイルスが出現する. MSP は b5r 遺伝子の 1 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 1 塩基挿入や 4 塩基挿入等, 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・パターンの解析結果と同様な結果が次世代シーケンス(NGS)解析により得られる. MSP のうち, 主要な MSP を検出する定量的 PCR 法を開発し, LC16m8 株と特定の MSP を識別可能とした. 継代培養によって MSP が出現する場合に, プラーク馴化した別個の LC16m8 株から RK13 細胞での増幅/Vero E6 細胞での増殖を 3 サイクル行い, 開発した定量的 PCR を実施したがいずれのクローン由来も MSP が検出限界未満であったことから, 3回の MSP 増幅サイクルでは検出限界の 0.01%未満しか MSP が増幅されないことがわかった. このため, さらに 3~5 代継代培養して MSP 含有率と MSP 遺伝子型の比率を明らかにする必要がある.

研究協力者

朴ウンシル・国立感染症研究所獣医科学部・主任研究官

奥谷晶子・国立感染症研究所獣医科学部・主任研究官

宇田晶彦・国立感染症研究所獣医科学部・主任研究官

吉河智城・国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官

西條政幸・国立感染症研究所ウイルス第一部・部長

A. 研究目的

細胞培養痘そうワクチンの製造株であるワクチニアウイルス LC16m8 株は, Lister 株から低温馴化により LC16 株, LC16mO 株を経由して樹立された株である. 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から, 安全性の非常に高いワクチン株である. また, 自衛隊での成人への種痘にも用いられ安全性がさらに確認されている. Lister 株は 41℃ 以上でも初代ウサギ腎細胞でのプラーク形成能があるのに対し, LC16mO 株と LC16m8 株は 41℃ ではプラークを形成しない(増殖温度感受性). LC16m8 株は, b5r 遺伝子に 1 塩基欠損があり,

正常な B5 蛋白質が作られないために初代ウサギ腎細胞や RK13 細胞におけるプラークサイズが小さい. また Vero E6 細胞ではプラークを作らない. LC16m8 株を継代するとプラークサイズのやや大きい LC16mO 型のウイルス (medium size plaque; MSP) が出現する. これまでの研究で MSP 含有率が 5%以上になるとウサギ皮膚増殖性が有意に高くなることから, ワクチン製造においては MSP 含有率があるレベル以下であることを保証する試験が行われる. これまでの解析から, MSP は LC16mO 型への復帰株ではなく, b5r 遺伝子の 1 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異なる部位への 1 塩基挿入や 4 塩基挿入等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)解析と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 を検出する定量的 PCR 法を開発し, 同等の結果が得られることを明らかにした. 本研究では, プラーク馴化した LC16m8 株を複数調整し, Vero E6 細胞での MSP 増幅と RK13 細胞でのウイルス増殖を 3 サイクル行い, 得られる MSP

の変異パターンとMSP増幅率を明らかにし、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) LC16m8 株のプラーク馴化

LC16m8 株のストックウイルス液には一定頻度の MSP が含まれている。参照細胞培養ワクチンにも低頻度ではあるが MSP が含まれている。そこで、ウサギ腎細胞由来細胞である RK13 細胞で参照細胞培養ワクチンのウイルスからプラーククローニングを3回行い、プラーク馴化した LC16m8 株を3クローン調整した。

2) プラーク馴化した LC16m8 株のバイオアッセイ

プラーク馴化した LC16m8 株の3クローンを RK13 細胞, Vero E6 細胞でプラークアッセイを行ない、バイオアッセイで各クローンに MSP が含まれるかを検討した。本試験では、極微量の MSP が検出される。

3) プラーク馴化した LC16m8 株からの MSP の増幅

プラーク馴化した LC16m8 株の3クローンを Vero E6 細胞に低 moi で感染させ、培養後に凍結融解し遠心した上清を RK13 細胞で増殖し(1 継代培養)、これを繰り返して3 継代培養した。

4) プラーク馴化した LC16m8 株から3 継代培養後の MSP 検出

3代継代培養したウイルス液から DNA を抽出し、これまでに開発した MSP 特異的定量 PCR を実施した。Mutation specific primer による定量的 PCR では、強い 3'→5' exonuclease 活性をもつ DNA polymerase を用いると、非特異反応により野生型配列(LC16m8 型)の *b5r* 遺伝子も増幅されるため、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) を用いた定量的 PCR で、267A 挿入型, 271T 挿入型, 274ATAC 挿入型 MSP を検出した。

【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) プラーク馴化した LC16m8 株

LC16m8 株のストックウイルス液には一定頻度の MSP が含まれている。そこで、ウサギ腎細胞由来細胞である RK13 細胞でプラーククローニングを3回行ってプラーク馴化した LC16m8 株を3クローン調整した。各クローンを LC16m8 株と MSP のいずれもがプラークを形成できる

RK13 細胞と MSP だけがプラークを形成できる Vero E6 細胞でそれぞれプラークアッセイを行った結果、RK13 細胞で 10^7 pfu/mL, Vero E6 細胞では $<10^2$ pfu/mL と MSP は検出限界未満 ($<10^{-5}$)であった。

2) MSP 特異的定量 PCR

これまでの研究で MSP には、主に7種類の *b5r* 遺伝子の1塩基欠損を相補する1塩基挿入あるいは4塩基挿入するものが知られている(図1)。これらのワクチン試験製造品等や参照細胞培養痘そうワクチン中で、267A 挿入型, 271T 挿入型, 274ATAC 挿入型等が主要な MSP の遺伝子型である。これらを検出する MSP 特異的 real time PCR を用いることにより267A 挿入型, 271T 挿入型, 274ATAC 挿入型の MSP 含有率がそれぞれ0.01%の感度で検出できた(図2)。

3) プラーク馴化した LC16m8 株を Vero E6 細胞で3 継代培養したウイルス中の MSP 頻度

プラーク馴化した LC16m8 株の3クローンを Vero E6 細胞に低 moi で感染させ、培養後に凍結融解し遠心した上清を RK13 細胞で増殖し(1 継代培養)、これを繰り返して3 継代培養した。このウイルス液から DNA を抽出し、MSP 特異的定量 PCR を実施した結果、主な種類の MSP (267A 挿入型, 271T 挿入型, 274ATAC 挿入型) はいずれも検出限界以下であった。また、3 継代培養したウイルス感染 RK13 細胞から抽出した DNA を用いて MSP 特異的 real time PCR を実施したがいずれも検出できなかった。

D. 考察

LC16m8 株のストックウイルス液には一定頻度の MSP が含まれている。そこで、ウサギ腎細胞由来細胞である RK13 細胞でプラーククローニングを3回行ってプラーク馴化した LC16m8 株を3クローン調整した。それぞれの LC16m8 クローンを RK13 細胞, Vero E6 細胞でプラークアッセイを行なうと、RK13 細胞ではサイズの大きいプラークは認められず、Vero E6 細胞ではプラークを形成しなかったことから、3クローンには MSP が含まれないか、極めて低レベルしか含まれないことが分かった。これらのクローンをそれぞれ3代継代培養したウイルスには、主な種類の MSP (267A 挿入型, 271T 挿入型, 274ATAC 挿入型)は MSP 特異的定量 PCR で検出限界の0.01%未満であった。この結果、プラーククローニングした LC16m8 株は、Vero E6 細胞で3代継代しても検出可能なレベルの MSP が含まれないことがわかった。一方、これまでの研究で MSP が0.01%含まれる参照細

胞培養痘そうワクチンを Vero E6 細胞で継代培養すると、3継代で MSP 含有率が 80%ほどまで増加することを確認している。このため、本実験で得られた3代継代からさらに継代数を増やし、MSP 含有率を高くして MSP 特異的 real time PCR によりどの遺伝子型の MSP がどの位の率で含まれるかを、各クローンごとに検証する必要がある。

E. 結論

主要な MSP を検出する MSP 特異的定量 PCR は 0.01%の検出限界がある。これを用いてピラークローニングした LC16m8 クローンを Vero E6 細胞で3継代したが、MSP は検出できなかった。さらに継代数を増やして MSP 含有率をあげて、MSP タイプとそれぞれの率を検証したい。

F. 健康危険情報

ナイジェリアでヒトのサル痘ウイルス感染症が流行している。2017 年 9 月から 12 月に Bayelsa 州でサル痘疑い患者 172 症例のうち 61 例がサル痘であることが実験室診断で確認された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshikawa T, Fujii H, Okutani A, Shibamura M, Omura N, Egawa K, Kato H, Inagaki T, Harada S, Yamada S, Morikawa S, Saijo M. Construction and characterization of bacterial artificial chromosomes harboring the full-length genome of a highly attenuated vaccinia virus LC16m8. PLoS One. 2018, 13(2):e0192725.

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

平成 29 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)
我が国で開発され、備蓄されている細胞培養痘そうワクチンの有効性、安全性、生産性向上
および国内外のバイオテロ対策のあり方に関する研究

分担報告書

細胞培養弱毒生痘そうワクチンの有効性及び安全性評価に関する研究

所 属 国立感染症研究所
ウイルス第一部・主任研究官
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細胞培養弱毒生痘そうワクチン LC16m8(m8)が保管されている。本研究は、1. m8 を組換えワクチンベクターとして応用するために、細菌人工染色体(Bacterial Artificial Chromosome; BAC)にクローニングし、そこから感染性 m8 をリカバリーできる m8-BAC システムの確立を目指した。また、2. 国産の弱毒痘そうワクチン株である m8 を用いた天然痘ウイルス暴露後重症化阻止の可能性を検討するため、天然痘ウイルスの代わりに、エクトロメリアウイルス(ECTV)を用いてマウスを攻撃し、その直後に m8 を皮下、筋肉内、皮内、静脈内接種してルート毎の効果を比較した。結果として 1. m8 をクローニングした BAC プラスミドから感染性 m8 をリカバリーできるシステムを確立できた。2. エクトロメリアウイルス攻撃に対する m8 の感染防御効果の程度はその接種ルート毎に異なることが確認された。

研究協力者

氏名・所属研究機関名・職名

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

A. 研究目的

1. 現在、痘そうワクチンとして第 3 世代にあたる高度弱毒化株の MVA(Modified Vaccinia Ankara)が、組換えワクチンベクターとしての可能性について世界的に活発に検討されている。他方で同じく高度弱毒化株である LC16m8(m8)は、安全性、免疫原性の高さが科学的に証明されているにもかかわらず、組換えワクチンベクターとしての応用検討は MVA に水をあけられている。その理由の一つは、外来遺伝子を保持する組換えワクチニアウイルスを容易に作成するシステムの

有無にあると考えられる。MVA は既に細菌人工染色体(Bacterial Artificial Chromosome; BAC)にクローニングされており、この BAC プラスミドから感染性を持つ MVA を容易にリカバリーする MVA-BAC システムが確立されている。このシステムでは所謂大腸菌の遺伝学を利用して BAC プラスミドへの外来遺伝子導入、組換え MVA のリカバリーを容易に行うことが出来る。そこで本研究では m8 を BAC にクローニングし、BAC プラスミドから感染性 m8 をリカバリーする m8-BAC システムの確立を行った。

2. 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。近年は天然痘ウイルスのバイオテロへの利用が危惧されており、その脅威は未だ無くなっていない。我が国では 40 歳未満の殆どが未種痘であるため、天然痘ウイルスに対して有効な免疫を保持していない。そこで、万が一天然痘ウイルスに暴露された場合には、その直後に痘瘡ワクチンを接種することで発症、重症化を阻止できないかが検討されてきた。無論、天然痘ウイルスは研究に使用できないため、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、m8 の暴露後ワクチンとして接種ルート毎の効果を検討するため、様々なルートで投与した。

B. 研究方法

1. m8-BAC システムの確立は以下の様に行った (図 1)。まず古典的な相同組換え法を用いて大腸菌内で BAC を保持するために必須である mini-F カセットを EGFP カセットと共に導入した組換え m8 (m8-EGFP-BAC) を作製した。次にこの組換え m8 のゲノムを感染細胞から抽出し、大腸菌に導入して形質転換を行った。mini-F カセット内にはクロラムフェニコール耐性遺伝子が含まれているので、薬剤選択が可能である。形質転換された大腸菌が保持する BAC プラスミドの配列を確認した。またこの pLC16m8-BAC を 293FT 細胞にトランスフェクションし、同時に鶏痘ウイルスをヘルパーウイルスとして感染させ、感染性ウイルスがレスキューされるかを検討した。pLC16m8-BAC から更に大腸菌の遺伝学 (Red/ET システム) を用いて、EGFP 及び BAC カセットが、リカバリーされたウイルスから相同配列を介して自己切断され、また m8 または mO タイプの B5R を保持する pLC16m8.8S-BAC と pLC16m8.OS-BAC を作製した (図 2)。更に自己切断しない BAC プラスミドで m8 または mO タイプの B5R を保持する、pLC16m8.8-BAC、pCL16m8.O-BAC も作製し、リカバリーされたウイルスの性状を解析した。
2. 5LD50 相当の ECTV Hampstead 株を経鼻 (i.n.) 経路でマウスに感染させた。その直後に m8、またはその親株である Lister 株を皮下 (s.c.)、筋肉内 (i.m.)、皮内 (i.d.)、静脈内 (i.v.) 接種により 10^7 PFU 接種し、その発症・重症化阻止効果を生存率、体重変化により検討した。

【倫理面への配慮】

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

C. 研究結果

1. m8-EGFP-BAC 感染細胞から抽出したゲノムに

よって形質転換された大腸菌から精製した BAC プラスミド、2 クローンについて組換え m8 の全ゲノムを保持していることが次世代シーケンシングにより確認され、これを pLC16m8-BAC とした。この BAC プラスミドは親株である m8-EGFP-BAC と同一の配列を持ち、293FT 細胞にトランスフェクションしてヘルパーウイルスを感染させると、感染性を持つ組換え m8 (vLC16m8-BAC) をリカバリー出来ることが確認された。この vLC16m8-BAC の RK13 細胞に於ける増殖能は元ウイルスである m8-EGFP-BAC、また m8 と比較して違いは見られなかった (図 3)。pLC16m8.OS-BAC、pLC16m8.8S-BAC からリカバリーしたウイルス (vLC16m8.OS-BAC、vLC16m8.8S-BAC) はそれぞれ mO、m8 タイプの B5R を発現するため、プラークサイズが異なり、また、その内、5-10% のプラークは EGFP を発現していないことが確認された (図 4)。EGFP を発現していないプラークをクロニングしたウイルスは EGFP 及び mini-F カセットも欠失していることが PCR により確認された (図 5)。このウイルスはゲノム配列が m8 と比較しても区別がつかないことが次世代シーケンシングにより確認された。pLC16m8.8/O-BAC からリカバリーされたウイルスについては EGFP を発現していないウイルスは確認できなかった。

2. ECTV 暴露直後に m8 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 10 匹のマウスに 5LD50 の ECTV Hampstead 株で攻撃を行った。その直後に 10^7 PFU/100ul の Lister, m8 を s.c., i.m., i.d., i.v. で接種し、観察、体重測定を行った (図 6)。s.c., i.m. 接種に於いて Lister, または m8 の効果に有意な差は観察されなかった。一方対照である培地接種群と比較した場合、ワクチン接種群は接種ルートによってその効果に違いが現れた。s.c. の場合では対照群とワクチン接種群間で有意な差が無かった。一方、i.m., i.d., i.v. の場合はワクチン接種により培地接種群と比較して有意な生存率の改善が確認された。また、ワクチン接種群の体重変化は i.m., i.d. では ECTV 攻撃 13 日後から増加傾向に転じるのに対して、i.v. では攻撃 7 日後から増加傾向に転じた (図 7)。

D. 考察

1. m8 は、ACAM2000 と共に、天然痘を用いたバイオテロに備えた備蓄用ワクチンとして WHO から推奨される痘そうワクチンの一つであり、その免疫誘導能と安全性は広く認知されている。m8

が組換えワクチンベクターの土台として広く利用されるためには、簡便に組換え m8 が作製できる事が重要であると考えている。本研究で確立した m8-BAC システムは、大腸菌の遺伝学を用いて容易に外来遺伝子を導入することが出来ることから、m8 を組換えワクチンベクターとして応用研究するための一助になると考える。本システムは野生型の m8 がコンタミする事がないため古典的な方法と比較してクローニングが非常に容易である。特に pLC16m8.8S-BAC を用いれば、リカバリーしたウイルスから自己切断によってゲノム内の EGFP 及び BAC カセットがゲノム内に存在しないウイルスが作製できる。このウイルスは、外来遺伝子以外は m8 と同一のゲノムを持ち、EGFP や mini-F カセットに起因する思わぬ副反応などの可能性を考慮する必要はない。

2. 本研究は弱毒痘そうワクチン m8 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。投与ルートにより毎の、m8 の暴露後ワクチン効果の違いは、ECTV 感染を排除するための免疫を獲得する早さが異なる為ではないかと現時点では考察している。次年度では、m8 を異なる投与ルートにより接種したマウスから経時的に脾臓を採取、リンパ球を分離し、これを EVTV 攻撃直後のマウスに移植することで、獲得免疫が準備されるまでの期間の違いを検討したいと考えている。

E. 結論

1. m8 をクローニングした BAC プラスミドから感染性 m8 をリカバリーできる m8-BAC システムを確立した。特に pLC16m8.8S-BAC を用いるシステムは本来の m8 と区別の出来ないゲノムを保持するウイルスをリカバリーすることが可能である。
2. ECTV 攻撃に対する m8 の感染防御効果はその接種ルート毎に異なることが確認された。i.v., i.d., i.d. ルートを用いた接種はマウスの生存率

を有意に増加させる一方で、s.c.では効果が確認されなかった。特に、i.v.は i.d., i.m.よりも、マウスの体重変化が ECTV 感染による減少傾向から、回復に向かう増加傾向に転ずるタイミングが 1 週間近く早いことが判った。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshikawa T, Fujii H, Okutani A, Shibamura M, Omura N, Egawa K, Kato H, Inagaki T, Harada S, Yamada S, Morikawa S, Saijo M. Construction and characterization of bacterial artificial chromosomes harboring the full-length genome of a highly attenuated vaccinia virus LC16m8. PLoS One. 13(2):e0192725, 2018.
- 2) Omura N, Yoshikawa T, Fujii H, Shibamura M, Inagaki T, Kato H, Egawa K, Harada S, Yamada S, Takeyama H, Saijo M. A novel system for constructing a recombinant highly-attenuated vaccinia virus strain (LC16m8) expressing foreign genes and its application for the generation of LC16m8-based vaccines against herpes simplex virus 2. Jpn J Infect Dis. In press

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

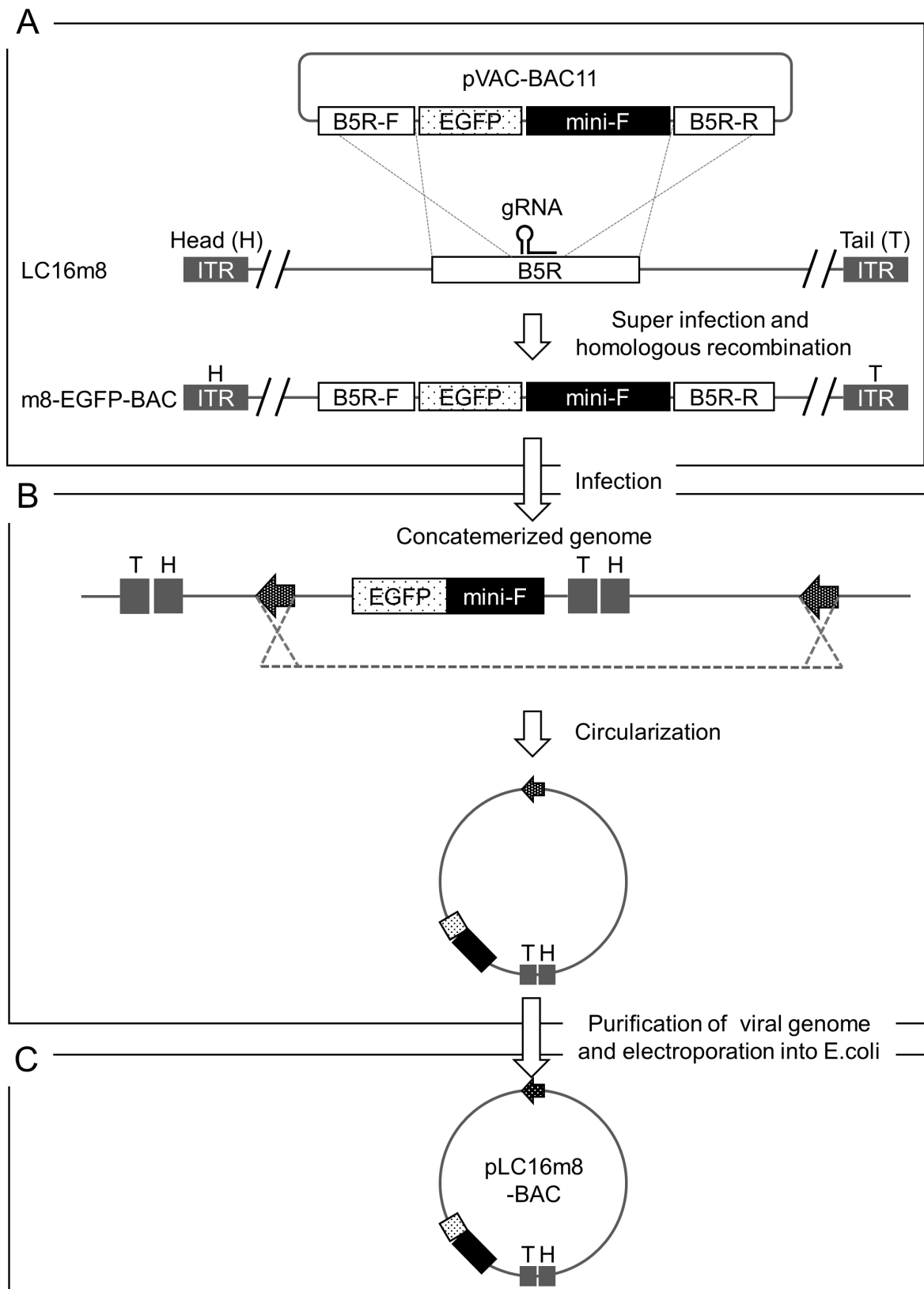


図 1. m8-BAC システムに必要な m8 の全ゲノムを保持する BAC プラスミド, pLC16m8-BAC の作製スキーム. (A) 古典的な相同組換え法に CRISPR-Cas9 システムを導入した方法により EGFP と mini-F カセットを保持する組換え m8, m8-EGFP-BAC を作製した. (B) m8-EGFP-BAC を RK13 細胞に感染させてウイルスゲノムを回収した. ワクシニアウイルスはゲノムの複製時にコンカテマーを形成するが, 相同配列間で組換えが起こり, 環状化したゲノムが存在すると推測される. (C) 回収したウイルスゲノムを用いて大腸菌を形質転換する. mini-F カセット内にクロラムフェニコール耐性遺伝子が存在するため, 形質転換した大腸菌を薬剤選択し, pLC16m8-BAC を得た.

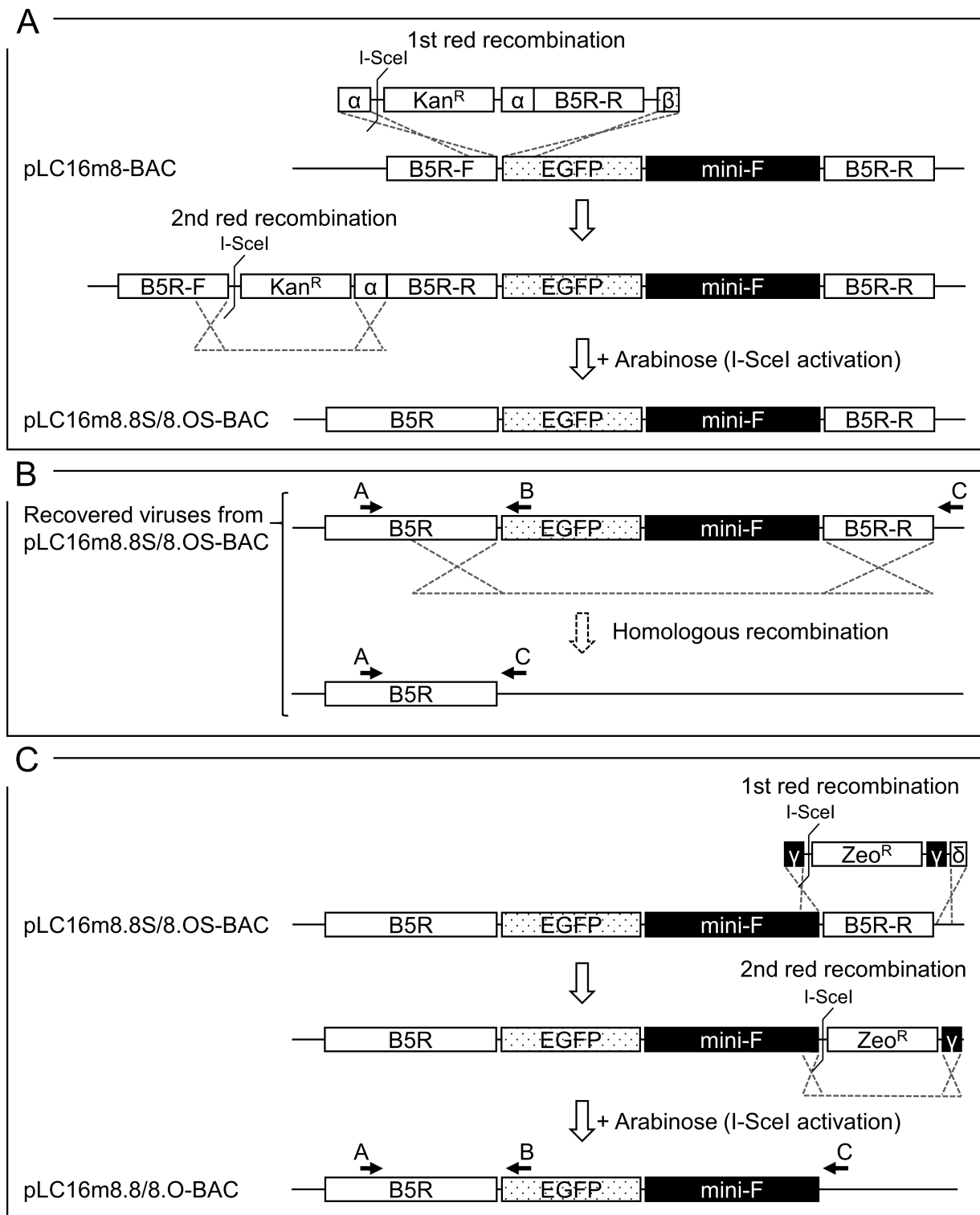


図 2. EGFP 及び mini-F カセットフリーの m8 をリカバリーする m8-BAC システム構築のスキーム. (A) カナマイシン耐性遺伝子と B5R 遺伝子の後部を保持する PCR 産物を Red/ET システムを用いた相同組換えにより pLC16m8-BAC に導入する. 更に 2 回目の組換えによりカナマイシン耐性遺伝子を除き, 完全な B5R の全長を持つ BAC プラスミド (m8 タイプまたは mO タイプの B5R を持つそれぞれ pLC16m8.8S-BAC, pLC16m8.OS-BAC) を作製した. (B) pLC16m8.8S-BAC, pLC16m8.OS-BAC からウイルスをリカバリーすると, 相同組換えにより EGFP と mini-F カセットが脱落したウイルスが出現する. (C) EGFP カセットと mini-F カセットが脱落しない BAC プラスミド pLC16m8.8-BAC, pLC16m8.O-BAC の作製. pLC16m8.8S-BAC, pLC16m8.OS-BAC をもとに mini-F カセットの下流に存在する B5R 遺伝子の後部を除去した. リカバリーしたウイルスゲノム内の EGFP と mini-F カセットを確認する為の PCR プライマー (A, B, C) を図示してある. 結果は図 5 に示している.

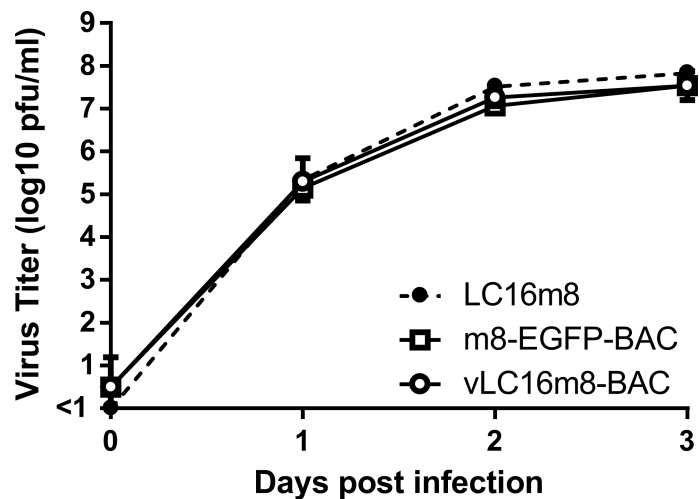


図 3. pLC16m8-BAC からリカバリーしたウイルス vLC16m8-BAC の増殖曲線. RK13 細胞に m8, m8-EGFP-BAC, vLC16m8-BAC を MOI=0.1 で感染させて, 経時的なウイルス量の変化を測定した.

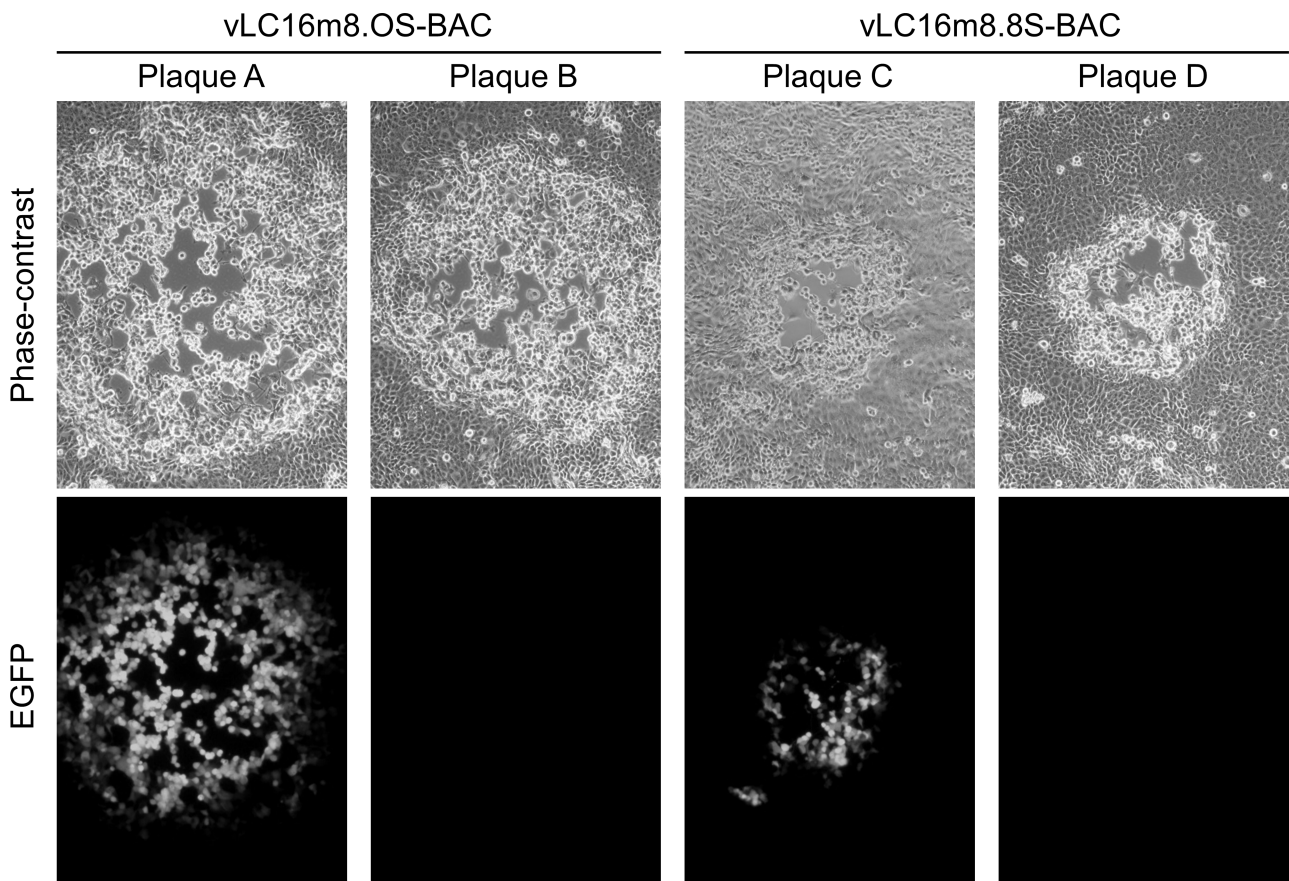


図 4. pLC16m8.8S-BAC, pLC16m8.OS-BAC からリカバリーしたウイルスの性状. プラークの大きさと EGFP の発現を顕微鏡下で観察した. RK13 細胞に pLC16m8.OS-BAC, pLC16m8.8S-BAC からリカバリーしたウイルス(vLC16m8.OS-BAC, vLC16m8.8S-BAC)を感染させた. vLC16m8.OS-BAC (plaque A と B) と vLC16m8.8S-BAC (plaque C と D)のプラークについて EGFP の発現とプラークサイズを検討した.

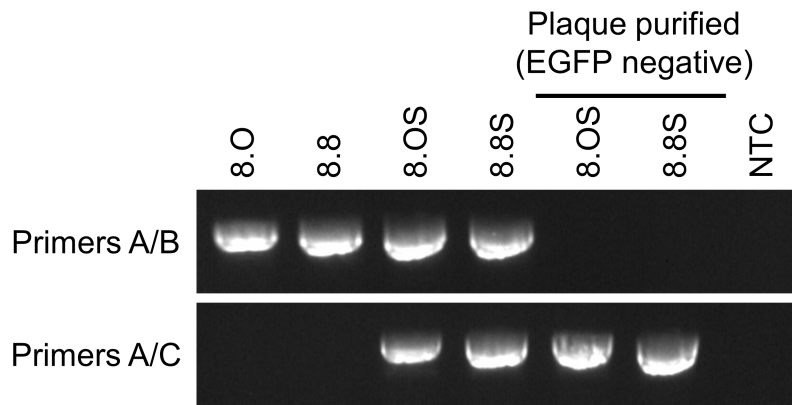


図 5. 自己切断による EGFP と mini-F カセットの脱落の確認. RK13 細胞にプラーク精製をしていない vLC16m8.O-BAC (8.O), プラーク精製をしていない vLC16m8.8-BAC (8.8), プラーク精製されたクローン, またはプラーク精製をしていない vLC16m8.OS-BAC (8.OS), プラーク精製されたクローン, またはプラーク精製をしていない vLC16m8.8S-BAC (8.8S) を感染させた. 回収したウイルスゲノムを鋳型として, 図 3 で示したプライマー A/B または A/C を用いた PCR を行い産物の有無を確認した. NTC は鋳型を含まない対照である.

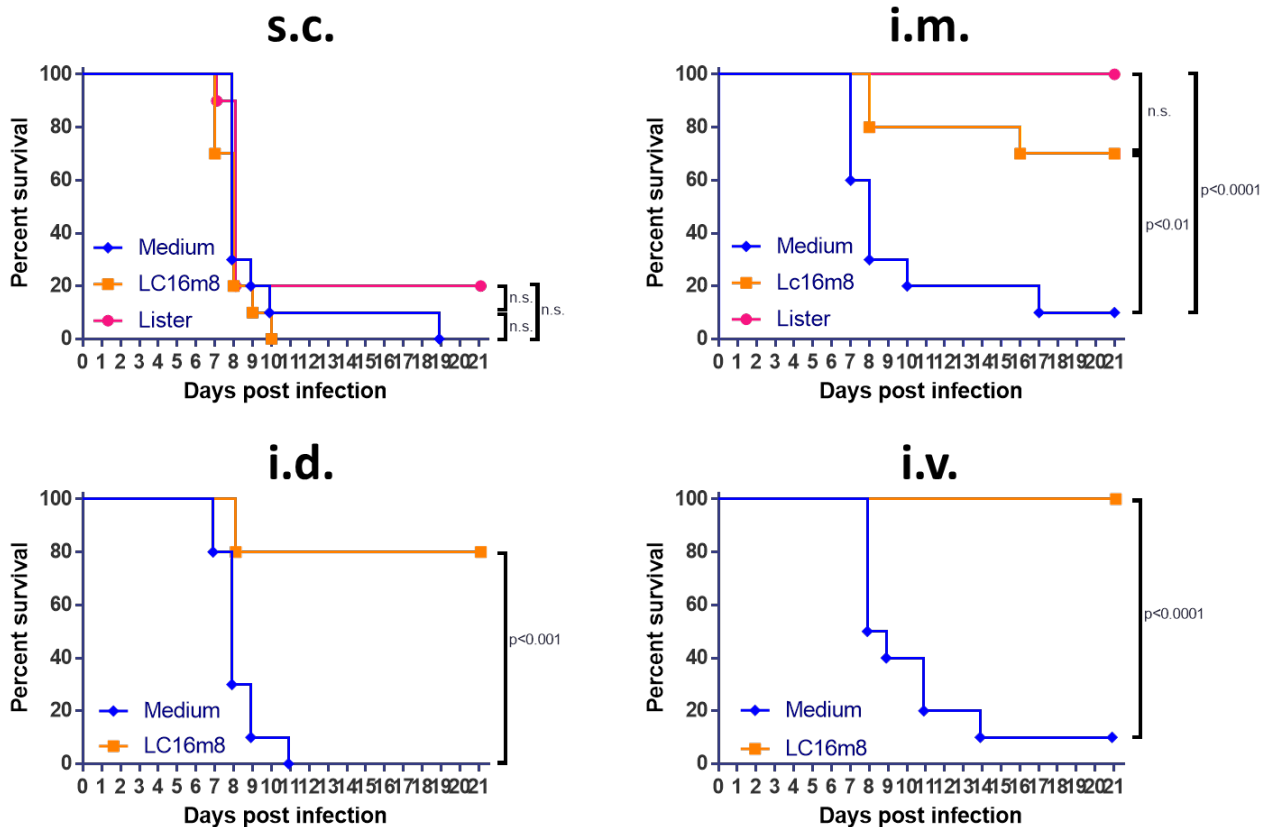


図 6. ECTV を感染させたマウスに, 直後に様々な投与ルートで m8 を接種した際の生存率の違い. 5LD50 相当の ECTV を i.n. で感染させた直後に Lister, m8 または対照として培地を接種した. その後マウスの生存を経時的に観察した.

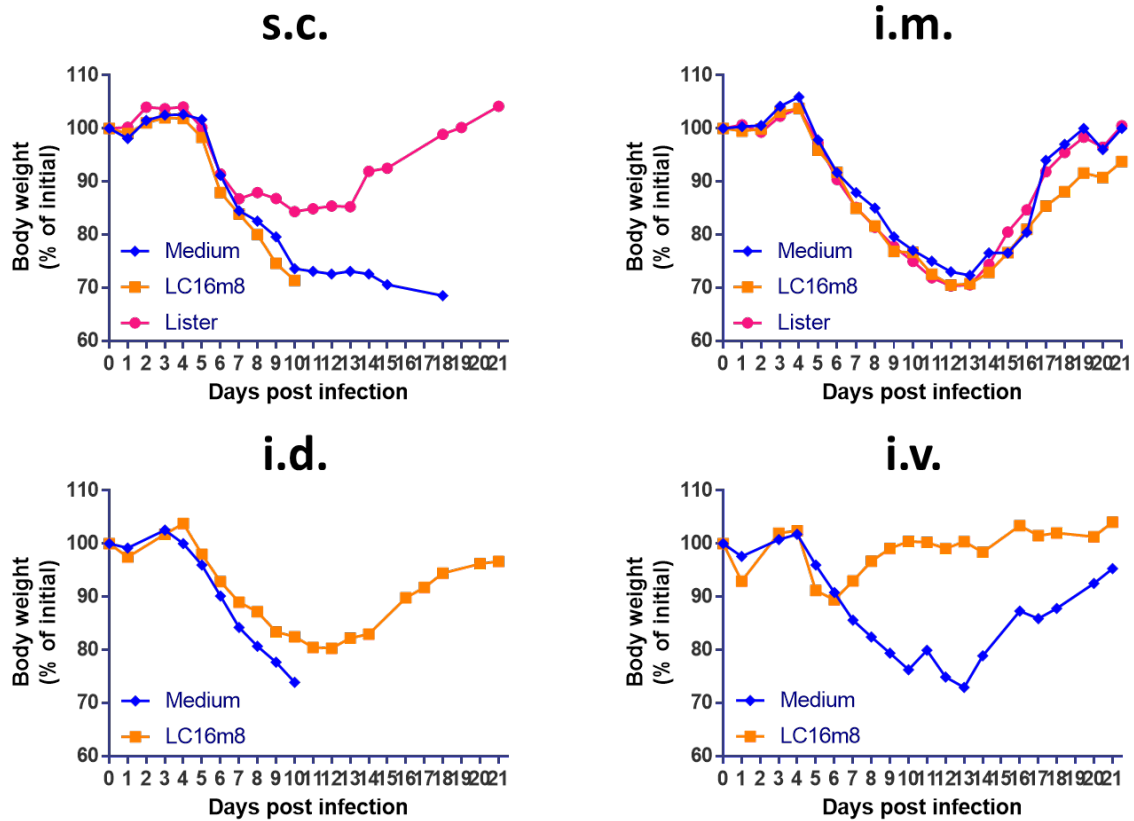


図 7. ECTV を感染させたマウスに、直後に様々な投与ルートで m8 を接種した際の体重変改の違い。図 6 の実験に於いて同時に体重変化も測定した。

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

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

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Omura N, Yoshikawa T, Fujii H, Shibamura M, Inagaki T, Kato H, Egawa K, Harada S, Yamada S, Takeyama H, Saijo M.	A novel system for constructing a recombinant highly-attenuated vaccinia virus strain (LC16m8) expressing foreign genes and its application for the generation of LC16m8-based vaccines against herpes simplex virus 2.	Jpn J Infect Dis		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.	Jpn J Infect Dis	70(4):	408-415	2017

Suda Y, Chamberlain J, Dowall S, Saijo M, Horimoto T, Hewson R, Shimojima M.	The development of a novel diagnostic assay that uses a pseudotyped vesicular stomatitis virus for the detection of neutralising activity to Crimean-Congo haemorrhagic fever virus.	Jpn J Infect Dis	In press		
Takayama-Ito M, Lim CK, Yamaguchi Y, Posadas-Herrera G, Kato H, Iizuka I, Islam MT, Morimoto K, Saijo M.	Replication-incompetent rabies virus vector harboring glycoprotein gene of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) protects mice from LCMV challenge.	PLoS Negl Trop Dis	12(4)	e0006398	2018
Yoshikawa T, Fujii H, Okutani A, Shibamura M, Omura N, Egawa K, Kato H, Inagaki T, Harada S, Yamada S, Morikawa S, Saijo M.	Construction and characterization of bacterial artificial chromosomes harboring the full-length genome of a highly attenuated vaccinia virus LC16m8.	PLoS One	13(2)	e0192725	2018
Egawa K, Shimojima M, Taniguchi S, Nagata N, Tani H, Yoshikawa T, Kurosu T, Watanabe S, Fukushi S, Saijo M.	Virulence, pathology, and pathogenesis of Pteropine orthoreovirus (PRV) in BALB/c mice: Development of an animal infection model for PRV.	PLoS Negl Trop Dis	11(12)	e0006076	2017
Fukushi S, Fukuma A, Kurosu T, Watanabe S, Shimojima M, Shirato K, Iwata-Yoshikawa N, Nagata N, Ohnishi K, Ato M, Melaku SK, Sentsui H, Saijo M.	Characterization of novel monoclonal antibodies against the MERS-coronavirus spike protein and their application in species-independent antibody detection by competitive ELISA.	J Virol Methods	251	22-29	2018

Taniguchi S, Maeda K, Horimoto T, Masangkay JS, Puentespina R Jr, Alvarez J, Eres E, Cosico E, Nagata N, Egawa K, Singh H, Fukuma A, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Tsuchiaka S, Omatsu T, Mizutani T, Une Y, Yoshikawa Y, Shimojima M, Saijo M, Kyuwa S.	First isolation and characterization of pteropine orthoreoviruses in fruit bats in the Philippines.	Arch Virol	162(6)	1529-1539	2017
Takayama-Ito M, Lim CK, Nakamichi K, Kakiuchi S, Horiya M, Posadas-Herrera G, Kurane I, Saijo M.	Reduction of animal suffering in rabies vaccine potency testing by introduction of humane endpoints.	Biologicals	46	38-45	2017
Ogawa M, Satoh M, Saijo M, Ando S.	Evaluation of a broad-ranging and convenient enzyme-linked immunosorbent assay using the lysate of infected cells with five serotypes of Orientia tsutsugamushi, a causative agent of scrub typhus.	BMC Microbiol	17(1)	7	2017
Sakata M, Tani H, Anraku M, Kataoka M, Nagata N, Seki F, Tahara M, Otsuki N, Okamoto K, Takeda M, Mori Y.	Analysis of VSV pseudotype virus infection mediated by rubella virus envelope proteins.	Sci Rep	7(1)	11607	2017