

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)

令和元年度 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)

令和2(2020)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-----	3
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-----	16
安達英輔	
3. 天然痘バイオテロ対応に関する公衆衛生対応の検討-----	18
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-----	22
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-----	27
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-----	33
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(1)-----	36
前田健	
8. 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(2)-----	41
前田健	
9. 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-----	61
吉河智城	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	67
--------------------------	----

IV. 添付資料

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 年には東京オリンピック・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強化は求められている。日本では痘瘡ウイルスによ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、国際的にも注目されている。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。これらを研究目的として研究が実施された。

LC16m8 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 システムの確立した。そして m8-BAC システムを利用して任意の領域に外来遺伝子を迅速かつ簡便に導入するシステムを確立した。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及び免疫誘導能に違いがあることが示され、一部の接種法では曝露後効果が示された。痘そうワクチン LC16m8 は、米国で承認、備蓄されている第 1 世代の痘そうワクチンである Dryvax と同程度のサル痘ウイルスに対する中和抗体誘導能を有することが示唆された。一方で、その持続については、Dryvax と同様に、経時的な減衰傾向が認められた。サル痘ウイルスや牛痘ウイルスのヒトにおける感染症患者が増加している今日、LC18m8 がその対策に有用であることを示している。LC16m8 製造工程における検査法を改良する研究が進められた。LC16m8 株は、継代培養するとプラークサイズはやや大きい 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。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。

2018 年 6 月からコンゴ民主共和国(DRC)にて EVD 流行が発生し、その EVD 流行は 2014-2015 年に西アフリカで発生した EVD 大規模流行の様相を呈している。国立感染症研究所は、2019 年 9 月にウイルス性出血熱等の一類感染症に対する検査能力強化、検査法の改良、そのための科学的基盤を整備する目的で、感染性のあるエボラウイルス等一種病原体を入手した。今後、感染性のある一種病原体を用いて、これまで整備されてきた一類感染症の検査法をよりよいものに改良したり、実施できなかった中和抗体測定法を整備したりする予定である。培養細胞を用いたウイルス分離の手法の確認を行なった。エボラウイルス、ラッサウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスを感染させた細胞を作製し、これに各ウイルスに対する抗血清を反応させたところ明瞭な陽性反応を示した。細胞変性効果が認められなくてもウイルス抗原が検出される場合があった。エボラウイルス、ラッサウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスについてはバイオテロでの病原体特定法の 1 つとして分離手法の確認ができたと言える。

2019 年 7 月 GHSAG よりバイオテロに関する細菌系 5 種、炭疽菌・ペスト菌・ブルセラ菌・野兔病菌・類鼻疽菌の検査の外部精度管理(EQA)の実施が提案され、その活動に参加した。

バイオテロ対策用ホームページのアップデートなどを通じて最新の情報提供や啓発活動を行った。2019 年度は髄膜炎菌髄膜炎について、新規の項目を設定したまた、治療が困難で世界的な流行が懸念されている。多剤耐性結核菌について全面的な改定を行ったその他、デング熱など、輸入感染症として、日常的に遭遇する疾患についても適宜改定している 2020 年 1 月に大幅なレイアウト変更を行った。

生物テロの現場対応での公衆衛生と警察の連携の最新の国際動向を明らかにし、米国 CDC と FBI が行う合同捜査・調査ワークショップを国内で実践した。生物テロ対策のための公衆衛生とセキュリティ部門の連携強化演習を開発し、地方自治体で実施した。特に、公衆衛生機関と警察の連携に特化した演習の開発・実施は国内でも初の取り組みであり、演習のさらなる推進により、連携強化の必要性がより強く認識された。

研究分担者氏名

安達 英輔 東京大学医科学研究所・附属病院感染免疫内科・助教

齋藤智也 国立保健医療科学院・健康危機管理研究部・部長

下島昌幸 国立感染症研究所ウイルス第一部・室長

園田憲悟 KMバイオロジクス株式会社・研究開発本部 製品開発部・部長

永田典代 国立感染症研究所感染病理部・室長

前田 健 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

国際情勢の不安定化が進む今日、国際的にバイオテロ対策強化の必要性が認識され、その強化の重要性が認識されている。また、日本では2020年には東京オリンピック・パラリンピックが開催されることから、テロ対策強化はとて重要である。そのバイオテロ対策の一環として日本で備蓄されているLC16m8は、安全な痘瘡ワクチンとして世界的に認識されているワクチンのひとつであり、国際的にも高く評価されている。日本で行われている「痘瘡ウイルスが用いられる可能性のあるバイオテロ」への対策は、国際的に注目されている。

安全性の高い痘瘡ワクチンとして、国際的にはLC16m8の他にドイツで生産されているMVAが存在する。

現在米国CDCとH26-28年同研究班との共同研究で、LC16m8のヒトへの接種により、痘瘡ウイルスに対する感染性阻止抗体(中和抗体)が誘導されるか否かについて明らかにされつつある。この研究は、バイオテロ対策に重要なものとして、国際的にも注目されている。

本研究班の目的は、具体的に以下の項目にまとめることができる。

- 米国CDCと本研究班との共同研究[WHOの痘瘡ウイルス研究に関する専門家会議(ACVVR)により実施の許可を受けている]を通じて、LC16m8の痘瘡ウイルスに対する中和抗体誘導能の解析、サル痘感染への効能評価に関する知見を得る。また、長期凍結保管中の安定性成績を取得する。
- LC16m8の痘瘡ウイルス暴露後に発症、重症化予防ワクチンとして使用した際の効果をより詳細に解析する。
- LC16m8の品質管理に特異的に重要なMSPのより迅速な科学的根拠に基づく試験法を開発する。NATによりドミナントなMSP含有率を測定する試

験法で代替えるために、痘瘡ワクチンの継代培養によるMSP変異パターンに差がないかを検証する。

- ウイルス性出血熱や痘瘡ウイルス感染症の検査法の改良と整備。
- バイオテロ病原体の可能性となる痘瘡ウイルスおよびその関連するウイルス感染症の流行状況、ウイルス性出血熱の流行状況について把握する。
- バオテロ対策に資するホームページ(<https://h-crisis.niph.go.jp/bt/>)の維持改良
- バイオテロ対策に関連する国際会議への参加(今年度は主催)や学術的広報活動の実施
- その他

B. 研究方法

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
ACVVRおよびGHSAG-LN等の会議を通じて、国際的なバイオテロ対策の動向を調査した。2019年12月2-3日に米国NIH(ベセスダ、メリーランド州)で開催された日米バイオディフェンス会議に出席した。2018-2019年エボラウイルス病(EVD)流行の発生状況の報告をもとにその流行状況をまとめた。
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
啓発プログラム「感染症の危機管理・バイオテロ対策」の開催を通じて、現状の問題点を把握し、今後の対策立案に役立てた。また、国内外の主要雑誌や学会などを通じて、バイオテロ関連疾患についての情報を収集し、ホームページに掲載した内容の妥当性・正確性等について確認した。
3. バイオテロに関する公衆衛生対応の検討
生物テロを想定した公衆衛生部局と警察部局の連携強化に資する机上演習の演習資料を作成した。
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
エボラウイルス、ラッサウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスを感染させた細胞を作製し、これに各ウイルスに対する抗血清を反応させたところ、明瞭な陽性反応を示した。細胞変性効果が認められなくてもウイルス抗原が検出される場合があった。エボラウイルス、ラッサウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスについてはバイオテロでの病原体特定法の1つとして分離手法の確認ができたと言える。
5. 細胞培養弱毒生痘瘡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

平成 29, 30 年度より継続して評価対象検体数を増やして, 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。

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

好中球枯渇させたマウスにサル痘ウイルス接種モデルのリンパ系組織および血中におけるウイルスゲノム動態を経時的に明らかにした。

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

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 法を開発する研究を開始した。

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

細胞培養痘そうワクチン株 LC16m8(m8) は高度に弱毒化されている一方で免疫原性が維持されているという特徴から, 外来遺伝子を導入した組換えワクチンとしての利用が期待されている。我々は m8 の全ゲノムを組み込んだ人工細菌染色体 (bacterial artificial chromosome; BAC), pLC16m8.8S-BAC を作製し, ここから感染性を持つ m8 をリカバリーさせるシステム (m8-BAC システム) を確立している。本研究では m8-BAC システムで用いられている既存の組換え法を改良し, 任意の領域に外来遺伝子を迅速かつ簡便に導入するシステムを確立するために蛍光遺伝子, 薬剤耐性遺伝子, そして制限酵素 I-SceI サイトを持つプラスミドを作製した。このプラスミドを鋳型として PCR により作製した遺伝子断片を BAC プラスミドに導入する際, 導入の成否は蛍光確認, 薬剤耐性により確認できる。今回は予備検討としてこれらのプラスミドを用いて大腸菌を形質転換した。

【倫理面への配慮】

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 (研究分担者園田) 本調査研究は,

KM バイオロジクス株式会社の研究倫理審査委員会の審査を受け, 2018 年 8 月 23 日付で研究期間延長承認を得て実施した (受付番号 17-05)。また, 個人を特定できないように措置を講じた上で研究を実施した。

C. 研究結果

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

2019 年 4 月と 12 月にそれぞれベルリン (ドイツ) のロベルト・コッホ研究所とローマ (イタリア) の国立感染症研究所 (Spallanzani) で開催された GHSAG-LN 会議, では, 日本で流行している重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) に対するファビピラビル治療に関する最新の研究成績やワクチン開発について, 関係者に紹介した。新興・再興感染症対策について継続した協力について議論した。2019 年 12 月 2-3 日に米国 NIH (ベセスダ, メリーランド州) で開催された日米バイオディフェンス会議には, 研究代表者の西條政幸と研究分担者の齋藤智也が出席し, また, 米国 CDC のポックスウイルス研究部門の研究者も同会議に出席した。本会議では, 東京オリンピック・パラリンピック等の大規模イベントに関連するバイオテロ対策における共同作業のあり方や痘瘡ウイルスによるバイオテロ対策について, 日米それぞれの立場で意見交換がなされ, また, 共同研究について議論された。

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

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

今年度は髄膜炎菌髄膜炎について, 新規の項目を設定した多剤耐性結核菌について全面的な改定を行う他, その他, デング熱など, 輸入感染症として, 日常的に遭遇する疾患についても適宜改定している。2020 年 1 月に大幅なレイアウト変更を行った。これらの結果, 前年度から大幅なアクセス数の増加があった。

3. バイオテロに関する公衆衛生対応の検討

今年度は, 2000 年の米国炭疽菌テロ事件の対応事例をベースに, 公衆衛生機関と警察の連携強化を目的とした机上演習を開発した。本演習は 2 自治体で実際に使用され, 特に「公衆衛生部門と

警察の連携強化の必要性を認識した」「他の関係機関の基本的な考え方を理解した」という点が評価された、との報告があった。本机上演習が、様々な地域で活用され、公衆衛生部門と警察の連携強化に資することが期待される。

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
感染性のあるエボラウイルス、マールブルグウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスを用いて検出法の1つとして培養細胞を用いたウイルス分離の手法の確認を行なった。
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
痘そうワクチン LC16m8 は、米国で承認、備蓄されている第1世代の痘そうワクチンである Dryvax と同程度のサル痘ウイルスに対する中和抗体誘導能を有することが示唆された。一方で、その持続については、Dryvax と同様に、経時的な減衰傾向が認められた。
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
好中球枯渇マウスにサル痘ウイルスを感染させる動物モデルにおける体内のウイルス伝播と病態の更新に関する解析の結果、好中球が一定の役割を担うと考えられた。本モデルは、今後のオルソポックスウイルスワクチン研究に利用できることが示唆された。
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
LC16m8 株と特定の MSP を識別可能とした。参照細胞培養ワクチン Lot を 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。バイオアッセイからはいずれの Lot においても3回継代することによって MSP 頻度が100%まで増加することが分かった。また、定量的PCRからは各 Lot において主な MSP が検出でき、MSP の種類が異なることが分かった。更に、次世代シーケンス解析と定量的PCRの結果を比較した結果、MSP 出現頻度率がほぼ一致した。総合的に、MSP には主に、4種類の MSP が存在し、その検出にはそれぞれ特異的プライマーを用いた定量的PCRを実施する必要があると考えられた。
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
外来遺伝子を LC16m8 に迅速かつ簡便に導入するシステムを確立した。抗体誘導が確認できるまでの時間と抗体価は接種ルート(皮下(s.c.)、筋

肉内(i.m.)、皮内(i.d.)、静脈内(i.v.)ごとに異なることが明らかとなった。

D. 考察

LC16m8 に関する有効性・安全性・製造管理工程に関連する研究が続けられた。バイオテロ対策の一環として LC16m8 が製造・備蓄され始めてから、約20年が経過した。国際的には LC16m8 に比較して、MVA の存在感が増している。LC16m8 と MVA が第3世代痘瘡ワクチンである。国際的には日本以外の先進国ではもう一つの第三世代痘瘡ワクチン MVA が備蓄されるようになってきている。LC16m8 の利点を考慮するとその国際的地位を高めるための活動が重要である。本研究班では、LC16m8 に関する比較的多くの新規知見が得られた。特に LC16m8 を土台とした(ベクターとした)、ワクチン開発の効率化を可能とする研究である。MVA をベクターとしたエボラウイルスワクチン開発がなされているように、LC16m8 においても工夫することで迅速ワクチン開発が可能になった。

痘瘡ワクチン接種が中止されてから、約40-50年経過した。痘瘡ウイルスに免疫のない人々からなる社会集団となった。そのため、アフリカでは人におけるサル痘ウイルス感染症患者が増加し、これまで報告のなかったナイジェリアでもヒトサル痘患者が発生し、さらに英国とシンガポールで輸入感染事例の発生が確認された。ヨーロッパ、特にドイツでは牛痘ウイルスの人間感染事例の報告が、南米ではワクチニアウイルスによる感染事例の報告が増加している。バイオテロによる痘瘡ウイルス感染症だけでなく、他のオルソポックスウイルス感染症に対する備えも重要な課題となりつつある。

LC16m8 は、霊長類を用いたサル痘ウイルス感染症モデルを用いて、サル痘ウイルス感染症に有効であることが明らかにされていたが、今年度、LC16m8 接種を受けた人において、サル痘ウイルスに対する中和抗体が誘導されることが科学的に証明された。新興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広く用いられるようになることが期待される。

バイオテロ対策を適正に行うには、行政関連部署(本省関係部署、保健所、警察部門等)との連携が求められる。本研究班が共催する形で、国内での対処手法および連携強化手法の検討のため、国内の警察・公衆衛生機関からの参加を得て、生物テロの対処手法に関して、米国およびドイツより講師を招聘し、国際ワークショップが開催された。また、WHO-ACVVR、GHSAG-LN との連携、日米バイオディフェンス会議等を通じたバイオテロ対策

のための国際的な枠組みの中で、情報を収集するとともに、本研究班で得られた研究成績も発表してきた。このような活動は日本の国際的な地位を確保するために重要なこと考えられる。バイオテロ班で開発しているバイオテロ関連ホームページ (<https://h-crisis.niph.go.jp/bt/>) を開設している。本研究班の重要な社会貢献のひとつである。このホームページには、多くの感染症情報が含まれていることから、特に致命率の高い感染症の情報が掲載されていることから、COVID-19 の流行に合わせて、アクセス数が急増した。

2019年6月にはG20大阪サミット2019が開催された。その開催に関連する不測の事態に備えて、本研究班でも対応に貢献した。2020年7月には東京オリパラが開催される予定であったが、COVID-19の世界的流行によって、その開催は2021年7月に延期された。これからも本研究班の果たす役割は大きなものと考えられる。

E. 結論

LC16m8の有用性、安定性、検定・製造工程における品質管理において重要な副作用の原因となるMSPの高感度検出法等の研究が進んだ。今年度は、研究代表者・分担者がGHSAG-LN、日米バイオディフェンス会議に出席した。国際的連携強化が求められる。2020年7月には東京オリパラが開催される予定であったが、COVID-19の世界的流行によって、その開催は2021年7月に延期された。これからも本研究班の果たす役割は大きなものと考えられる。バイオテロ対策に資するホームページ (<https://h-crisis.niph.go.jp/bt/>) の維持改良につとめた。

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州でサル痘疑似患者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) 齋藤智也. 東京2020の生物テロ対策を考える. 公衆衛生. 2020; 84(5). pp. 318-322.
- 2) 齋藤智也. 天然痘の根絶と現在の課題. グローバル時代のウイルス感染症. 東京: 日本医事新報社.; 2019. pp220-224.
- 3) 西條政幸, 安田二郎, 平山謙二. BSL-4施設の重要性と世界への貢献. 最新医学 74:453-463, 2019

- 4) 西條政幸. SFTS, クリミア・コンゴ出血熱. 最新医学 74:483-489, 2019
- 5) 西條政幸. VI章. 大規模イベントと医療体制 – サーベイランスの強化-. 日本医師会雑誌 149・特別号(1):244-245, 2020
- 6) 西條政幸. 世界における新興・再興ウイルス感染症の流行状況. グローバル時代のウイルス感染症, 日本医事新報社, 東京, p2-7, 2019
- 7) 西條政幸. ヒト由来ウイルス感染症と動物由来ウイルス感染症. グローバル時代のウイルス感染症, 日本医事新報社, 東京, p8-14, 2019
- 8) 西條政幸. 日本における新興・再興ウイルス感染症の検査体制. グローバル時代のウイルス感染症, 日本医事新報社, 東京, p42-46, 2019
- 9) 藤間大貴, 西條政幸. 黄熱. グローバル時代のウイルス感染症, 日本医事新報社, 東京, p95-100, 2019
- 10) 西條政幸. クリミア・コンゴ出血熱. グローバル時代のウイルス感染症, 日本医事新報社, 東京, p133-137, 2019
- 11) 西條政幸. エボラウイルス病. グローバル時代のウイルス感染症, 日本医事新報社, 東京, p138-143, 2019
- 12) 江川和孝, 西條政幸. アジアにおけるオルソレオウイルス感染症. グローバル時代のウイルス感染症, 日本医事新報社, 東京, p182-187, 2019
- 13) 谷英樹, 西條政幸. 新興ウイルス感染症における抗ウイルス薬: ファビピラビル. グローバル時代のウイルス感染症, 日本医事新報社, 東京, p248-253, 2019
- 14) 下島昌幸. 世界における節足動物媒介性ウイルス感染症(ブニヤウイルス)感染症の流行状況. グローバル時代のウイルス感染症, 日本医事新報社, 東京, p21-24, 2019
- 15) 吉河智城. サル痘ウイルス感染症およびその他のオルソボックスウイルス感染症. グローバル時代のウイルス感染症, 日本医事新報社, 東京, p177-181, 2019
- 16) Suzuki T, Sato Y, Sano K, Arashiro T, Katano H, Nakajima N, Shimojima M, Kataoka M, Takahashi K, Wada Y, Morikawa S, Fukushima S, Yoshikawa T, Saijo M, Hasegawa H. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus targets B cells in lethal human infections. J Clin Invest. 2020 Jan 6. pii: 129171. doi: 10.1172/JCI129171.
- 17) Tani H, Kawachi K, Kimura M, Taniguchi S, Shimojima M, Fukushima S, Igarashi M,

- Morikawa S, Saijo M. Identification of the amino acid residue important for fusion of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus glycoprotein. *Virology*. 2019 Sep;535:102-110. doi: 10.1016/j.virol.2019.06.014.
- 18) Park ES, Shimojima M, Nagata N, Ami Y, Yoshikawa T, Iwata-Yoshikawa N, Fukushi S, Watanabe S, Kurosu T, Kataoka M, Okutani A, Kimura M, Imaoka K, Hanaki K, Suzuki T, Hasegawa H, Saijo M, Maeda K, Morikawa S. Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Phlebovirus causes lethal viral hemorrhagic fever in cats. *Sci Rep*. 2019 Aug 19;9(1):11990. doi: 10.1038/s41598-019-48317-8.
- 19) Shiota T, Li TC, Nishimura Y, Yoshizaki S, Sugiyama R, Shimojima M, Saijo M, Shimizu H, Suzuki R, Wakita T, Muramatsu M, Ishii K. Integrin $\alpha 3$ is involved in non-enveloped hepatitis E virus infection. *Virology*. 2019 Oct;536:119-124. doi: 10.1016/j.virol.2019.07.025. Epub 2019 Jul 30.
- 20) Kanai Y, Kawagishi T, Sakai Y, Nouda R, Shimojima M, Saijo M, Matsuura Y, Kobayashi T. Cell-cell fusion induced by reovirus FAST proteins enhances replication and pathogenicity of non-enveloped dsRNA viruses. *PLoS Pathog*. 2019 Apr 25;15(4):e1007675. doi: 10.1371/journal.ppat.1007675. eCollection 2019 Apr.
- 21) Iwata-Yoshikawa N, Okamura T, Shimizu Y, Hasegawa H, Takeda M, Nagata N. TMPRSS2 Contributes to Virus Spread and Immunopathology in the Airways of Murine Models after Coronavirus Infection. *J Virol*. 2019. 93(6) doi: 10.1128/JVI.01815-18.
- 22) Iwata-Yoshikawa N, Okamura T, Shimizu Y, Kotani O, Sato H, Sekimukai H, Fukushi S, Suzuki T, Sato Y, Takeda M, Tashiro M, Hasegawa H, Nagata N. Acute Respiratory Infection in Human Dipeptidyl Peptidase 4-Transgenic Mice Infected with Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *J Virol*. 2019. 93(6). doi: 10.1128/JVI.01818-18.
- 23) Matsuyama S, Nao N, Shirato K, Kawase M, Saito S, Takayama I, Nagata N, Sekizuka T, Katoh H, Kato F, Sakata M, Tahara M, Kutsuna S, Ohmagari N, Kuroda M, Suzuki T, Kageyama T, Takeda M. Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 117(13):7001-7003, 2020.
- 24) Sekimukai H, Iwata-Yoshikawa N, Fukushi S, Tani H, Kataoka M, Suzuki T, Hasegawa H, Niikura K, Arai K, Nagata N. Gold nanoparticle-adjuvanted S protein induces a strong antigen-specific IgG response against severe acute respiratory syndrome-related coronavirus infection, but fails to induce protective antibodies and limit eosinophilic infiltration in lungs. *Microbiol Immunol*. 64(1):33-51, 2020.
- 25) Eto K, Fujita M, Nishiyama Y, Saito T, Molina D, Morikawa S, Saijo M, Shinmura Y, Kanatani Y. Profiling of the antibody response to attenuated LC16m8 smallpox vaccine using protein array analysis. *Vaccine*. 37(44). 6588-6593. 2019

2. 学会発表

- 1) 西條政幸, 吉河智城. 海外で発生している希少感染症の診断と治療・予防法の開発. 第 67 回日本化学療法学会, 東京, 2019 年 5 月 9-11 日
- 2) 西條政幸. 輸入感染症の今. 日本小児科学会, 金沢, 2019 年 5 月
- 3) 西條政幸. 国内外の新興再興ウイルス感染症流行状況を踏まえて, 輸入感染症に備える. 日本抗ウイルス療法学会, 東京, 2019 年 7 月 18 日
- 4) 西條政幸. 東京 2020 オリパラ等マシギャザリング開催に備えた輸入感染症対策. SRL 感染症シンポジウム, 2019 年 12 月
- 5) 齋藤智也. 生物テロ準備・対応における公衆衛生とセキュリティ機関の連携強化. 第 25 回日本災害医学会総会・学術集会. 神戸, 2020 年 2 月
- 6) Saito T. Biosecurity Policy Landscape in Japan. UAE 4th Biosecurity Conference 2019. Dubai, 2019 年 10 月
- 7) 齋藤智也. 特別講演: マシギャザリングとバイオテロ対策. 第 88 回日本法医学会学術関東地方集会, 東京, 2019 年 10 月
- 8) Tomoya Saito. Strengthening public health-security interface for bioterrorism preparedness and response in Japan. The 13th CBRNe Protection Symposium. Malmö, Sweden.

2019年9月

- 9) 下島昌幸. 日本と海外の BSL-4 施設の最新事情 ワークショップ「日本における BSL4 施設の現状」. 第 19 回日本バイオセーフティ学会学術集会, 令和元年 11 月 20 日, 東京
- 10) Shimojima M, Sugimoto S, Taniguchi S, Yoshikawa T, Kurosu T, Saijo M. A novel functional screening method to identify severe fever with thrombocytopenia syndrome virus entry factors from cDNA library. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (W1-1-02)
- 11) Kurosu T, Okuzaki D, Phanthanawiboon S, Yoshikawa T, Shimojima M, Saijo M. IL-17A produced from gamma/delta T cells plays a critical role in vascular leakage of severe dengue hemorrhagic fever in mice. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (W1-1-09)
- 12) Phanthanawiboon S, Shimojima M, Fukushi S, Yoshikawa T, Watanabe S, Nagata S, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Okuzaki D, Saijo M, Kurosu T. Flavivirus infection induces suppression of megakaryo-erythro cells in bone marrow. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (O1-2-01)
- 13) Watanabe S, Yoshikawa T, Kurosu T, Fukushi S, Kaku Y, Morikawa S, Shimojima M, Saijo M. Establishment of a recombinant attenuated vaccinia virus, LC16m8, expressing nipah virus surface glycoproteins. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (P-NR-07)
- 14) Yamada H, Kimura M, Tan L, Taniguchi S, Shimojima M, Fukuhara T, Matsuura Y, Komeno T, Nakajima N, Furuta Y, Saijo M, Tani H. Minigenome-based reporter system suitable for high-throughput screening of small compounds able to inhibit replication and/or transcription of SFTSV. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (P-NR-27)
- 15) Sano S, Fukushi S, Yamada S, Harada S, Yoshikawa T, Kurosu T, Shimojima M, Saijo M. Development of an RT-LAMP assay for the rapid detection of SFTS virus. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (P-NR-28)
- 16) Satoh M, Kato H, Ito-Takayama M, Fukushi S, Shimojima M, Yasukawa M, Saijo M. Favipiravir-susceptibility of severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) virus isolated from fatal SFTS patients treated with favipiravir. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (P-NR-29)
- 17) Kato H, Takayama-Ito M, Satoh M, Kinoshita H, Shimojima M, Fukushi S, Yoshikawa T, Kurosu T, Nakajima N, Komeno T, Furuta Y, Saijo M. Evaluation of in vitro antiviral effect of favipiravir on the replication of the different genotypes of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (P-NR-30)
- 18) Takayama Ito M, Sato M, Kato H, Kinoshita H, Shimojima M, Fukushi S, Yoshikawa T, Kurosu T, Nakajima N, Komeno T, Furuta Y, Saijo M. Attempt to make severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV) resistant to favipiravir. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (P-NR-31)
- 19) Fujii H, Tani H, Taniguchi S, Yoshikawa T, Fukushi S, Yamada S, Harada S, Lim C-K, Takayama Ito M, Maeki T, Kurosu T, Shimojima M, Uda A, Komeno T, Nakajima N, Furuta Y, Morikawa S, Saijo M. Establishment of a lethal model of Heartland virus infection in mice and evaluation of the efficacy of ribavirin and T-705 by using the model. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (P-NR-32)
- 20) Tan L, Yamada H, Kimura M, Taniguchi S, Shimojima M, Fukushi S, Morikawa S, Saijo M, Tani H. Generation of single-round infectious particles of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (P-NR-33)
- 21) Sugimoto S, Suda Y, Kurosu T, Yoshikawa T, Oba M, Omatsu T, Horimoto T, Mizutani T, Saijo M, Shimojima M. Characterization of Soft tick bunyavirus isolated from ticks in Japan. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 31, 2019, Tokyo (O3-3-05)
- 22) Suzuki T, Sato Y, Sano K, Arashiro T, Katano H,

Nakajima N, Takahashi K, Kataoka M, Wada Y, Morikawa S, Shimojima M, Fukushi S, Yoshikawa T, Saijo M, Hasegawa H. B cells with immunophenotypic resemblance to plasmablasts are main viral targets in human lethal SFTSV infection. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 31, 2019, Tokyo (O3-3-07)

23) Park E, Shimojima M, Yoshikawa T, Nagata N, Iwata N, Suzuki T, Ainai A, Watanabe S, Kurosu T, Ami Y, Noguchi A, Wada Y, Imaoka K, Saijo M, Hasegawa H, Maeda K, Morikawa S. Development of severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) vaccine for cats. The 67th Annual Meeting of the Japanese

Society for Virology. Oct 31, 2019, Tokyo (O3-3-08)

24) 下島昌幸. 重症熱性血小板減少症候群ウイルスの最新の知見. 第71回日本衛生動物学会大会 市民公開講座「マダニが運ぶ感染症から身を守れ！」. 平成31年4月21日, 山口(山口大学大学会館大ホール

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

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

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

Ⅱ. 分担研究報告

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

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・部長
研究分担者 西條 政幸

研究要旨: 2018年6月からコンゴ民主共和国(DRC)にてEVD流行が発生し、そのEVD流行は2014-2015年に西アフリカで発生したEVD大規模流行の様相を呈している。2020年4月現在でもEVD流行がDRC北東部で続いている。その最中の2019年12月には中国武漢を源とする新規コロナウイルス感染症COVID-19が発生し、2020年1月には日本でもCOVID-19患者が確認され、COVID-19流行は同年3月には世界的流行に発展した。日本国内外で新興・再興ウイルス感染症流行について注視する必要がある。

2020年に東京オリンピック・パラリンピックが日本で開催される予定であったが、2019年3月に上記COVID-19の世界的流行に鑑み、日本国政府は2021年に開催を延期することを決定した。東京オリパラ等の大規模イベントに備えて、バイオテロや輸入感染症対策強化が求められている。国立感染症研究所は、2019年9月にウイルス性出血熱等の一類感染症に対する検査能力強化、検査法の改良、そのための科学的基盤を整備する目的で、感染性のあるエボラウイルス等一種病原体を入手した。今後、感染性のある一種病原体を用いて、これまで整備されてきた一類感染症の検査法をよりよいものに改良したり、実施できなかった中和抗体測定法を整備したりする予定である。今後も病原性の高い新興・再興ウイルス感染症の世界的流行状況を注視し、また、国際連携を含めたバイオテロ対策を強化することが求められる。

A. 研究目的

本研究班の全体の進捗を統括すること、また、WHOの痘瘡ウイルス研究に関する専門家会議(ACVVR)やG7+メキシコの専門機関代表者からなるGlobal Security Health Action Group-Laboratory Network(GSHAG-LN)等の会議に出席してバイオテロ対策に関する国際動向について調査することを目的とした。また、バイオテロ病原体に関連のあるエボラウイルスによるエボラウイルス病をはじめとする一類感染症の流行状況について注視することも目的とした。

今年度はコンゴ民主共和国(Democratic Republic of the Congo, DRC)における流行状況を調べた。また、国立感染症研究所(感染研)が一類感染症の検査システムの改良と開発、その基盤を整備することを目的として感染性のある一種病原体(エボラウイルス等)を所持することに貢献した。今後の検査法開発等について考察した。さらに、今年度開催されたGSHAG-LN会議や日米バイオディフェンス会議に出席し、バイオテロ対策に関する情報も収集した。

B. 研究方法

1. GHSAG-LN 会議および日米バイオディフェンス会議への出席

今年度は2019年4月と12月にそれぞれベルリン(ドイツ)のロベルト・コッホ研究所とローマ(イタリア)の国立感染症研究所(Spallanzani)で開催されたGHSAG-LN会議に出席した。また、2019年12月2-3日に米国NIH(ベセスダ, メリーランド州)で開催された日米バイオディフェンス会議に出席した。

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

2. DRCでのエボラウイルス病流行状況の調査

2018-2020年のEVD第2次流行について、世界保健機関(WHO)やコンゴ民主共和国の国立医学研究所(INRB)の関係者から情報を入手した。また、国際援助隊(感染症部門)で派遣された隊員の活動報告等も参考にした。

3. 感染性のある一種病原体の所持と検査法開発

東京オリパラの開催に備え、輸入感染症対策やバイオテロ対策を強化するために、感染性のある一類感染症病原体[エボラウイルス, マールブ

ルグウイルス、クリミア・コンゴ出血熱、ラッサウイルス、南米出血熱ウイルス(フニンウイルスなど)の入手作業に貢献した。

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

【倫理面への配慮】

該当なし。

C. 研究結果

1. GHSAG-LN 会議および日米バイオディフェンス会議への出席
2019 年 4 月と 12 月にそれぞれベルリン(ドイツ)のロベルト・コッホ研究所とローマ(イタリア)の国立感染症研究所(Spallanzani)で開催された GHSAG-LN 会議では、日本で流行している重症熱性血小板減少症候群(SFTS)に対するファビピラビル治療に関する最新の研究成果やワクチン開発について、関係者に紹介した。新興・再興感染症対策について継続した協力について議論した。
2019 年 12 月 2-3 日に米国 NIH(ベセスダ, メリーランド州)で開催された日米バイオディフェンス会議には、研究代表者の西條政幸と研究分担者の齋藤智也が出席し、また、米国 CDC のポックスウイルス研究部門の研究者も同会議に出席した。本会議では、東京オリンピック・パラリンピック等の大規模イベントに関連するバイオテロ対策における共同作業のあり方や痘瘡ウイルスによるバイオテロ対策について、日米それぞれの立場で意見交換がなされ、また、共同研究について議論された。特に本研究班と米国 CDC との間で実施されている、LC16m8 高度弱毒細胞培養痘瘡ワクチンのワクチン効果を、感染性のある痘瘡ウイルスを用いた中和抗体測定法に基づいて評価する共同研究について本会議関係者に報告された。
2. DRC でのエボラウイルス病流行状況の調査
2018-2020 年の EVD 第 2 次流行は北東部の Nord Kivu 州と Ituri 州で発生した。この流行は 2018 年 8 月頃から発生し、現在(2020 年 4 月)の時点でもその流行は続いている。2019 年 3 月

から 9 月の患者報告数は最も高くなり(ピーク時には週に約 120 人の患者が報告された)、2019 年 10 月から 2020 年 1 月までは、週に 10 人程度の患者が発生する状況となった。2020 年 2 月以降では、ほとんど患者は報告されていないが、2020 年 3 月から 4 月にかけても患者が報告された。2020 年 4 月 26 日現在、3461 人の患者が報告され、そのうち 2279 人が死亡した。単純に計算すると致命率は 66%となる(図 1)。

3. 感染性のある一種病原体の所持と検査法開発
1981 年に国立感染症研究所(村山庁舎)に高度封じ込め施設、いわゆるBSL-4研究施設が建設された。2019 年 9 月に日本で初めて感染性のあるエボラウイルス、マールブルグウイルス、クリミア・コンゴ出血熱、ラッサウイルス、南米出血熱ウイルス(フニンウイルスなど)を、国際的ネットワークの協力のもとに分与を受け、所持した。アジアでは初めてのことで考えられる。今回、分与を受け所持することとなった感染性のあるこれらのウイルスを用いて、検査法の改良し、実施することのできなかった検査法(例えば中和抗体測定法等)を開発することが可能となった。2019 年 7 月に開催予定の東京オリンピック・パラリンピック等の大規模イベントに関連する輸入感染症対策やバイオテロ対策に資するための検査法整備を行うことになっていたが、その準備が開始された。
4. G20 大阪サミット 2019 開催に備えたバイオテロ対策の準備
感染研では、大阪健康安全基盤研究所の依頼に基づき、バイオテロ関連有事の際に、迅速に検査に対応する体制を整備し、備えた。研究代表者の西條政幸は、有事の際に迅速に対応するために、G20 大阪サミット 2019 の会場近くに設置された対策本部に詰めた。幸い、対応すべき事件等はなかった。
5. 厚生労働省一類感染症流行発生時に備えた「一類感染症への行政対応の手引き」作成・改訂への貢献
厚生労働省一類感染症流行発生時に備えた「一類感染症への行政対応の手引き」の作成、改訂に協力した。特に 2019 年の改訂には、その手引きに痘瘡(天然痘)に関する章が追加された。

D. 考察

痘瘡ウイルスに関連するバイオテロ対策は、既に根絶されている感染症であることや致死率が高い感染症(痘瘡・天然痘)を引き起こすことから、特に重要なものと考えられている。その対策には、痘瘡ワクチンの備蓄が欠かせず、それは安全なものでなければならない。世界的には安全で有効と考えられる第3世代の痘瘡ワクチンが二つあり、その一つはMVA、もう一つが研究班で長期にわたり研究が続けられてきたLC16m8である。

WHO が主催する痘瘡ウイルス研究専門家会議(Advisory Committee for Variola Virus Research)にアドバイザーであり、かつ、本研究班の一員である西條、また、KM バイオロジカル社(旧、化血研)の研究分担者が例年出席している。今年度は、都合により両者とも出席できなかったが、LC16m8ワクチンの国際的な位置を高めていく必要があると考えられる。

2014年に西アフリカで大規模なEVD流行が発生した。その後も繰り返し、DRCにてEVD流行が発生している。特に2018-2020年にDRC北西部で発生したEVD流行時の総患者数は、2014年に西アフリカで大規模なEVD流行の時のそれに比較して少ないものの、流行の性質は全く同じと言える。EVDの流行は、条件が整うと長期に渡り続き、多くの患者を死に至らしめることが明らかになった。西アフリカでは、特にナイジェリアではラッサ熱流行が続いている。また、ナイジェリアでは人におけるサル痘ウイルス感染症(ヒトサル痘)流行も続いて発生し、英国やシンガポールで輸入感染症としてのヒトサル痘患者が確認されている。このように頻度は低いものの、ウイルス性出血熱やオルソポックスウイルス感染症輸入感染症対策の重要性が示されている。

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

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

E. 結論

2020年度のバイオテロ対策に関連する国際会議

に積極的に参加した。G20大阪サミット2019が2019年6月に大阪で開催された際には、研究班としてもバイオテロ対策に備えて、検査対応、現場での備えに貢献した。2019年9月に日本で初めて感染性のあるエボラウイルス等、一類感染症の病原体を感染研として所持することになった。これらの病原体を用いた検査法整備、開発作業が始められた。

F. 健康危険情報 特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Eto K, Fujita M, Nishiyama Y, Saito T, Molina D, Morikawa S, Saijo M, Shinmura Y, Kanatani Y. Profiling of the antibody response to attenuated LC16m8 smallpox vaccine using protein array analysis. *Vaccine*. 37(44): 6588-6593. 2019
- 2) 西條政幸, 安田二郎, 平山謙二. BSL-4 施設の重要性と世界への貢献. *最新医学* 74:453-463, 2019
- 3) 西條政幸. SFTS, クリミア・コンゴ出血熱. *最新医学* 74:483-489, 2019
- 4) 西條政幸. VI章. 大規模イベントと医療体制 - サーベイランスの強化 -. *日本医師会雑誌* 149・特別号(1):244-245, 2020
- 5) 西條政幸. 世界における新興・再興ウイルス感染症の流行状況. *グローバル時代のウイルス感染症*, 日本医事新報社, 東京, p2-7, 2019
- 6) 西條政幸. ヒト由来ウイルス感染症と動物由来ウイルス感染症. *グローバル時代のウイルス感染症*, 日本医事新報社, 東京, p8-14, 2019
- 7) 西條政幸. 日本における新興・再興ウイルス感染症の検査体制. *グローバル時代のウイルス感染症*, 日本医事新報社, 東京, p42-46, 2019
- 8) 藤間大貴, 西條政幸. 黄熱. *グローバル時代のウイルス感染症*, 日本医事新報社, 東京, p95-100, 2019
- 9) 西條政幸. クリミア・コンゴ出血熱. *グローバル時代のウイルス感染症*, 日本医事新報社, 東京, p133-137, 2019
- 10) 西條政幸. エボラウイルス病. *グローバル時代のウイルス感染症*, 日本医事新報社, 東京, p138-143, 2019
- 11) 江川和孝, 西條政幸. アジアにおけるオルソレオウイルス感染症. *グローバル時代のウイルス感染症*, 日本医事新報社, 東京, p182-187,

2019

- 12) 谷英樹, 西條政幸. 新興ウイルス感染症における抗ウイルス薬:ファビピラビル. グローバル時代のウイルス感染症, 日本医事新報社, 東京, p248-253, 2019

日本抗ウイルス療法学会, 東京, 2019年7月18日

- 4) 西條政幸. 東京 2020 オリパラ等マシギャザリング開催に備えた輸入感染症対策. SRL 感染症シンポジウム, 2019年12月

2. 学会発表

- 1) 西條政幸, 吉河智城. 海外で発生している希少感染症の診断と治療・予防法の開発. 第67回日本化学療法学会, 東京, 2019年5月9-11日
- 2) 西條政幸. 輸入感染症の今. 日本小児科学会, 金沢, 2019年5月
- 3) 西條政幸. 国内外の新興再興ウイルス感染症流行状況を踏まえて, 輸入感染症に備える.

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

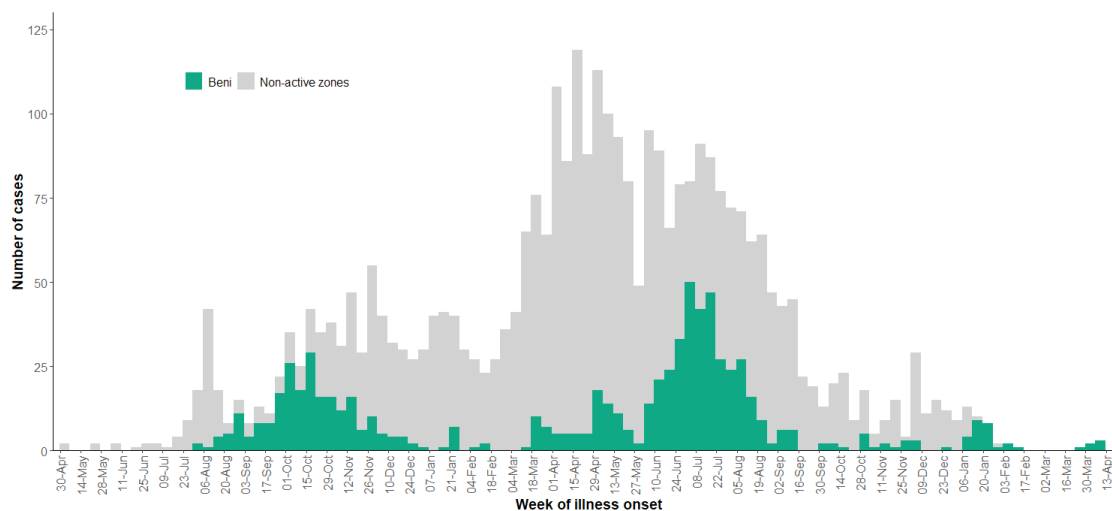
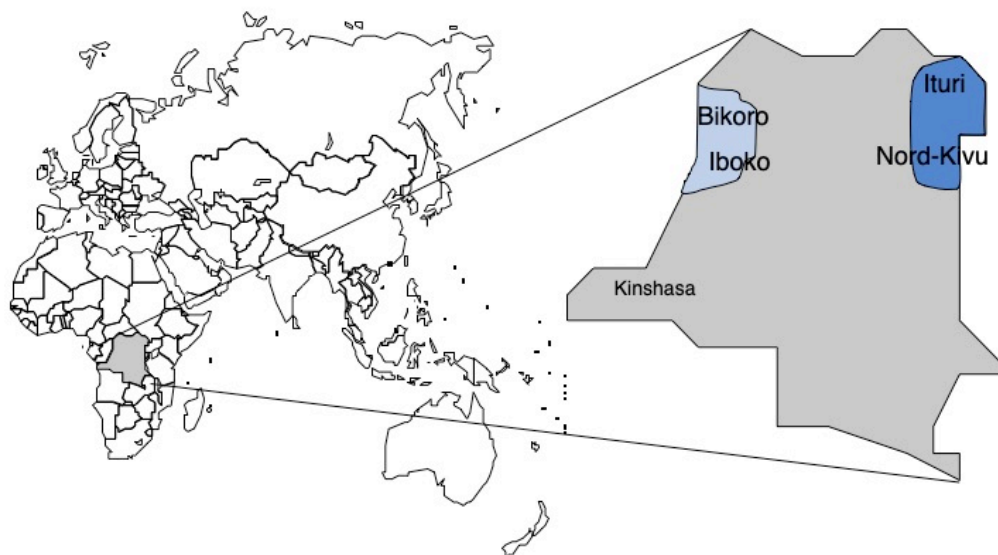


図1. 2018-2020年にDRCで発生したEVD流行における週あたりの報告者数(WHO, Ebola virus disease). WHOからの報告 (<https://www.who.int/emergencies/diseases/ebola/drc-2019/situation-reports>) から引用.

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

分担報告書

バイオテロ対応ホームページのアップデートとバイオテロ対策支援方法の開発

所属 東京大学医科学研究所附属病院
感染免疫内科・助教

研究分担者 安達 英輔

研究要旨:2019年度は髄膜炎菌髄膜炎について、新規の項目を設定したまた、治療が困難で世界的な流行が懸念されている。多剤耐性結核菌について全面的な改定を行ったその他、デング熱など、輸入感染症として、日常的に遭遇しうる疾患についても適宜改定している2020年1月に大幅なレイアウト変更を行った。

研究協力者

池内和彦 東京大学医科学研究所 大学院生
猪狩英俊 千葉大学医学部附属病院 診療教授

定している。2020年1月に大幅なレイアウト変更を行った。これらの結果、前年度から大幅なアクセス数の増加があった。

A. 研究目的

昨今の国際情勢を鑑みるとテロリズムへの懸念は弱まることはなく、生物製剤を用いたバイオテロに対しても十分な対応が必要である。特に2020年の東京オリンピック・パラリンピックを控えた日本では対策強化が不可欠であり、すでに延期が決まっているため、今後も継続していかなくてはならない。本研究では、バイオテロ対応ホームページを通じて、使用される可能性のある病原体の特徴や発生時の応急対応などを広く情報提供し、有事の際の混乱を最小限に留めること目的とするさらに、ホームページ以外の方法でも効果的な支援方法を検討する。

B. 研究方法

バイオテロ対応ホームページ作成担当者と相談して、改訂作業を行った。

【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

今年度は髄膜炎菌髄膜炎について、新規の項目を設定した多剤耐性結核菌について全面的な改定を行う他、その他、デング熱など、輸入感染症として、日常的に遭遇しうる疾患についても適宜改

D. 考察

ホームページ更新のアクセス数については昨年度よりさらに増加した。これは COVID-19 の発生以前の2019年4月-12月でも認められた(図)。また、2020年からは COVID-19 の影響からか、更にアクセス数の増加が認められた。

E. 結論

2019年ホームページアクセス数は増加傾向にあり、情報提供源として一定の役割を果たしていることが確認できた。バイオテロへの認識向上に効果的である可能性が示唆された。COVID-19の流行から SARS など過去のコロナウイルス感染症への情報提供も求められていることなどが伺われた。延期が決定されたが、2021年には東京オリンピックが開催されるなどバイオテロ対策の重要性は今後も増大していくことが予想される。バイオテロに使用されうる病原体や各疾患の特徴などを閲覧できるホームページの継続的な改訂は今後とも継続していく必要がある。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表
該当なし

2. 学会発表

- 1) 池内和彦, 安達英輔, 林阿英, 古賀道子, 堤武也, 四柳宏. 初診時の迅速検査が陰性, 抗核抗体が320倍であったチクングニア熱の一例. 第68回日本感染症学会東日本学術集会, 仙台(2019.10)

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

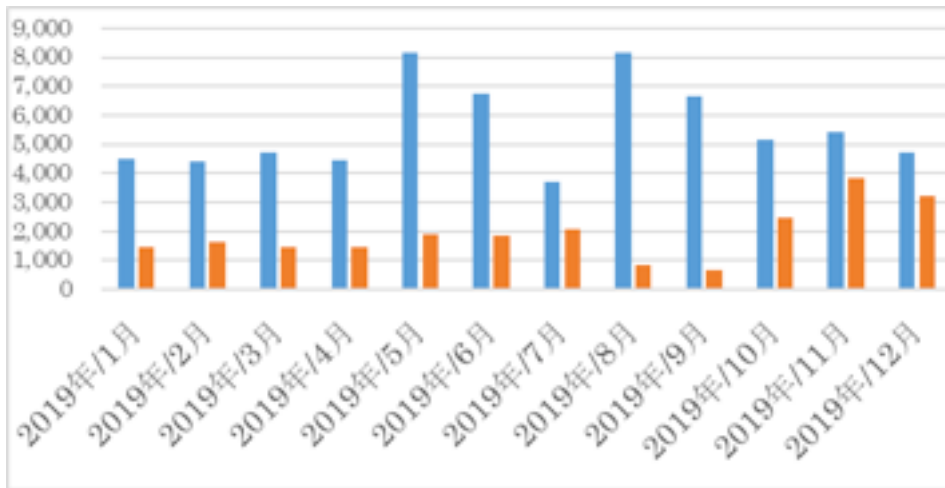


図 2019年ホームページアクセス数

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

分担報告書

天然痘バイオテロ対応に関する公衆衛生対応の検討

所属 国立保健医療科学院
健康危機管理研究部 部長

研究分担者 齋藤 智也

研究要旨: 生物テロ対策において、公衆衛生とセキュリティ機関の連携は不可欠である。これまで、諸外国での事例検討、米国との合同ワークショップ開催を経て、公衆衛生と警察の連携手法の検討を積み重ねてきた。今年度は、2000年の米国炭疽菌テロ事件の対応事例をベースに、公衆衛生機関と警察の連携強化を目的とした机上演習を開発した。本演習は2自治体で実際に使用され、特に「公衆衛生部門と警察の連携強化の必要性を認識した」「他の関係機関の基本的な考え方を理解した」という点が評価された、との報告があった。本机上演習が、様々な地域で活用され、公衆衛生部門と警察の連携強化に資することが期待される。

A. 研究目的

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

近年、生物テロ対策における公衆衛生機関とセキュリティ機関(法執行機関やインテリジェンス機関)との連携の重要性が国際的に広く認識されつつある。特に、2018年3月に日本でも実施された、WHOによる健康危機管理体制の外部評価「JEE(合同外部評価)」においても、評価項目の一つとして挙げられており、また、日本の評価においても、連携強化に関する提言が示されたところである。

本研究では、自治体における公衆衛生部局と警察部局の連携強化に資する机上演習手法を作成することとした。

B. 研究方法

生物テロを想定した公衆衛生部局と警察部局の連携強化に資する机上演習の演習資料を作成した。

【倫理面への配慮】

該当しない。

C. 研究結果

1. 演習の目的

第1に、生物テロについての基礎的知識を得ることとした。第2に、生物テロ対策における多機関連携、特に公衆衛生部門と警察の連携強化の必要性を認識することとした。第3に、共同対応計画の作成、合同演習・訓練への発展等公衆衛生と警察の担当者が担当で顔見知りになり、生物テロの一連の対応の「共通イメージ」を持ち、初動対応のそれぞれの役割を認識し、そして、初動対応の基本的な考え方を相互に理解することで、以後のコミュニケーションを円滑にすることを目的とした。参加者としては、公衆衛生部局と警察部局の都道府県レベルの担当者を想定した。

2. 演習の構成

講義と演習で構成し、全3時間のコースとした(表1)。

表1 生物テロ対策合同ワークショップの構成

講義	近年の生物テロ概況 (40分)
演習1	アイスブレイキング (30分)
1-1	自己紹介:15分
1-2	リスク評価:10分+5分説明
演習2	生物テロへの対処(秘匿的) (40分)
講義	5分
演習説明	5分
演習	15分
事後説明	15分
休憩	(5分)
演習3	生物テロへの対処(明示的) (40分)

分)

演習説明 5分
 演習 20分
 事後説明 15分
 演習4 振り返り (10分)

3. 講義

近年の生物テロに関する概況として、生物兵器に関する基礎的知識、生物テロとして想定されるシナリオと対処法、そして、オリンピック・パラリンピック大会での生物テロのリスクと、大会での対策事例を内容とした。特に、警察と公衆衛生の連携強化の観点から、感染症対策への公衆衛生的アプローチの解説に重点を置いた(表2)。

表2 講義の構成

生物兵器とは
 生物剤(兵器)の開発・使用事例
 近年の生物テロ事例
 生物兵器の特徴
 生物テロへの対処
 感染症対策の基本的な考え方
 感染症アウトブレイクの検知
 生物テロの検知
 対応:被害軽減
 対応:回復
 オリパラと生物テロ対策
 国際的マスギャザリングと感染症
 オリパラと健康危機の発生リスク
 過去のオリンピックの生物テロ対策

4. 演習

演習は、机上演習方式で実施し、各機関の参加者が混合して一班6~7人に分かれて、それぞれの機関の立場から与えられたシナリオへの対応を議論するという形式で実施した。

1) 演習1:アイスブレイキング

本演習は、異なる組織間の構成員の融和を図ることを目的としており、討議型のグループ演習を実施する。議論の活性化を図るために、アイスブレイキングを企画した。まず、自己紹介では、所属・名前・担当業務のほか、最近のイベント準備(またはオリパラの準備)にあたって困ったこと・懸案事項について一言加えることとした。続いて、「ラグビーW杯とオリンピックの対策は何が異なるか?」をテーマとした10分ほどのグループディスカッションを行った。これは、同じイベント準備であっても、それぞれのリスク・脅威の対象や、分析、認識が異なることを共有する機会として設定し

た。

デブリーフィングでは、主に感染症対策の視点から両者の共通点と違いの解説を作成した。共に、世界的に注目度の高いスポーツイベントであり、海外から多くの人が感染に来るため、輸入感染症の持ち込みリスクや多言語対応が必要、という共通点がある。一方、参加国や競技数、選手村の有無、会場の分散性、期間など、感染症対策として大きな違いが出る因子があることを解説する資料とした。

2) 演習2:生物テロへの対処(秘匿的)

演習シナリオは2種類作成した。シナリオはいずれも米国の炭疽菌郵送テロ事件発生時の対応をモチーフとして、秘匿型と明示型の発生様式の2種類を作成した。演習の導入として、炭疽菌に関するミニ講義を入れるものとした(表3)。

表3 炭疽に関するミニ講義

炭疽菌・芽胞
 炭疽菌による病気(ヒト)
 炭疽に対する医療対処
 なぜ炭疽菌なのか?

秘匿型のシナリオは、肺炭疽が疑われる患者が発生したという一報が保健所に入ったという想定である(表4)。各班では、まず保健所の参加者がこの情報をどの様に評価し、関係機関に報告していくかを説明する。続いて、生物テロの可能性をどのように考え、警察にはどの段階で報告するかを説明する。その後、警察は報告を受けた場合にどのような手順で対応するかを説明する。そして、最後に、どの段階で警察から保健所への報告を行うべきかを議論するものとした。

表4 公衆衛生と警察の連携強化のための演習シナリオ1(秘匿型)

都内でテレビ局に勤める30歳女性が重症肺炎で自宅から救急車で〇〇県K市立医療センターに搬送された。髄膜炎様症状で意識低下。髄液染色でグラム陽性桿菌を検出。炭疽菌性髄膜炎、肺炭疽が疑われた。渡航歴はなく、都市部にしか出歩いていない。診断した医師が四類感染症として感染症法に基づき即日保健所に電話した。

演習課題1-1

この第一報をどのように評価し、関係機関に報告していきますか。保健部門の方は、保健

所・保健部門の標準的な報告・対応フローを図示して説明してください。

演習課題1-2

・生物テロの可能性をどのように考えますか。生物テロの可能性を考えた場合、どの段階で警察等に報告しますか。

・警察としてはどの段階で報告をしてほしいですか？

報告を受けた場合、どのような手順で対応しますか？

演習シナリオ1の議論後に、確認すべき事項を提示するものとした(表5)。

表5 演習シナリオ1後の確認事項

どの手順書等に準じて対応しますか？

どこで誰が何を判断するか決まっていますか？

局内の連絡体系は？どの段階で？

警察等関係機関への連絡は？どの段階で？

・その報告のタイミングは適切ですか？

・警察は通報を受けた後、何をしますか？

県や国への報告は？どの段階で？

どの段階で市民に公表しますか？

・テロの可能性に言及しますか？

・誰が伝えますか？

ブリーフィングとしては、この演習のモチーフとした米国・炭疽菌郵送テロ事件のフロリダにおける肺炭疽患者発生時の対応事例を紹介するものとした。

3) 演習3:生物テロへの対処(秘匿的)

明示型のシナリオは、白い粉が含まれた郵便物を開封した、という一報を警察が受けたという想定である。警察の参加者がまず、初動報告、対応手順を説明する。そして、どの段階で警察から保健部門に情報共有されるかを説明する。一方、保健部門はそのような情報提供を受けた場合の対応、炭疽菌が陽性だった場合の保健所の役割を説明する。そして、保健所として、どの段階での警察からの報告が有用であるかを議論するものとした(表6)。

表6 公衆衛生と警察の連携強化のための演習シナリオ2(明示型)

海外某国で大規模な爆弾テロが発生し、日本もテロリストから対象国に名指しされている。警戒を強めている中、W市の高層マンションの1室に住む国会議員より「外国からの封筒を空けたら白い粉が舞い上がった！」と110番通報があった。

演習課題2

・警察での初動・報告・対応手順は？どの段階で警察から保健部門に情報共有されるか？どのようなルートを通じて報告するか

・情報提供されてからの保健部門の対応は？炭疽菌陽性だった場合保健所の役割は？

ブリーフィングとしては、この演習のモチーフとした米国・炭疽菌郵送テロ事件のワシントンDCの議員事務所における「白い粉」への対応事例を紹介するものとした。

4) 振り返り

最後に演習の振り返り時間として、所属部局の抱える問題点・改善すべき点を抽出する時間を設けた。各人が1~3個程度ポストイットに書き出して、ホワイトボード等へ書き出して集約する形式とした。

5) 実践

2自治体(県保健所の一部、政令市)で本演習が活用された研修会が行われた。1事例は、最終的に警察側からの参加者が来られなくなり、保健所関係のみの参加となった。警察と保健所の双方が参加した自治体の事例では、いずれの演習も「良かった・または非常に良かった」との回答が得られ、「生物テロ対策における多機関連携について、特に公衆衛生部門と警察の連携強化の必要性を認識した」「他の関係機関の基本的な考え方を理解した」については、回答者全員が「そう思う」と回答した、との報告を得た。一方、「担当者顔見知りになることができた」「初動対処の関係者とその役割を認識することができた」の項目については、数人「そう思わない」「どちらでもない」との回答があった、との報告を得た。

D. 考察

日本は、世界保健機関(WHO)による合同外部評価(JEE)において公衆衛生とセキュリティの連携強化の必要性を指摘されたところである。本研究では、地方自治体での強化手法として、3時間の机上演習を設計して、実際の自治体の研修に提供することができた。また、高い評価を得た。

生物テロ対策は、非常に稀なイベントであり、普段から対応リソースを十分に振り向けられるわけではないが、多くの部分は日々の感染症対策の積み重ねの上に成り立つ部分がある。一方で、日々の感染症対策の積み重ねではなかなかカバーできない部分があり、その一つが、公衆衛生機関が、

医療・公衆衛生機関以外と連携することであり、特に重要なカウンターパートとなるのが警察である。このような演習を通じて、担当者レベルで顔見知りになり、互いの組織のアプローチや考え方を知るきっかけを作ることが、地域の生物テロ対策の第一歩となる。

多くの公衆衛生部門の担当者は、このようなシナリオをあまり想定したことが無いだろう。手順書等や連絡体系、どの段階で誰が何を判断するのか、など、本演習を通じて順次確認していくことができる。場合によっては、手順の整備等の必要性に気づく機会となるだろう。何より重要なのは、他の関係機関(特に警察)とのリスク認識や活動原則、対応手順の共通理解の醸成である。お互いのリスク認識や活動原則を理解しなければ、協働的なオペレーションは成り立たない。また、他機関と情報共有する際には、その情報にその機関がどのように反応するかは気になる場所である。自機関にとって望ましく無い対応に進んでしまうのではないかと、いった不安があると情報提供を躊躇しがちである。お互いの対応の基本的な考え方やプロセスを理解し、信頼関係を構築することで、適時適切な情報共有に繋がることが期待される。

通常業務では、公衆衛生部門と警察の連携機会は限られる。これまでの参加者の反応を見る限りは、シンプルなシナリオの演習でありながら、両者の顔合わせの機会として、また、生物テロ対応について改めて見直し、連携する必要性を認識する有用な機会となると考える。

テロは社会的な恐怖を煽る行為で何らかの主義主張を訴えようとする行為である。不安に駆られ、過剰に怯え、対応を焦って社会に不安感を与えてしまえばテロリストを利することになる。落ち着いた対応と丁寧なコミュニケーションが行政には求められる。まずは既存の基本的な感染症対策と健康危機管理体制を固め、指差し確認しつつ、机上演習等で生物テロのような応用事例に対する柔軟性を高めていくことが重要である。生物テロ対策を含むCBRN テロ対策は、多数の関係部局にまたがる多機関連携が不可欠である。オリンピックのようなマスコガザリングイベントではさらにその関係機関が増加する。多機関連携の鍵は、相互理解とコミュニケーションであり、組織内外のコミュニケーションルートを再確認する機会としてこのような演習が活用

されることが望まれる。

E. 結論

生物テロ対策のための公衆衛生とセキュリティ部門の連携強化演習を開発し、2自治体での実践事例が得られた。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 齋藤智也. 東京 2020 の生物テロ対策を考える. 公衆衛生. 2020; 84(5). pp. 318-322.
- 2) Eto K, Fujita M, Nishiyama Y, Saito T, Molina D, Morikawa S, Saijo M, Shinmura Y, Kanatani Y. Profiling of the antibody response to attenuated LC16m8 smallpox vaccine using protein array analysis. Vaccine. 37(44). 6588-6593. 2019.

2. 学会発表

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

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

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

分担報告書

出血熱ウイルスを含むバイオテロ関連病原ウイルス検出法の改良

所 属 国立感染症研究所・ウイルス第一部・室長
研究分担者 下島 昌幸

研究要旨: バイオテロで用いられた病原体を特定することはバイオテロによって生じる健康被害や経済的被害を小さくすることに繋がる病原体の特定(あるいは検出)には PCR による遺伝子検出が特異性や感度、所要時間等の面で優れると言える。しかし既知の病原体とは遺伝子情報が異なる新規株や変異株が用いられた場合には PCR では検出できない場合もあり、他の手法による検出を行なう必要がある。検出法の1つとして培養細胞を用いたウイルス分離の手法の確認を行なった。エボラウイルス、ラッサウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスを感染させた細胞を作製し、これに各ウイルスに対する抗血清を反応させたところ、明瞭な陽性反応を示した。細胞変性効果が認められなくてもウイルス抗原が検出される場合があった。エボラウイルス、ラッサウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスについてはバイオテロでの病原体特定法の1つとして分離手法の確認ができたと言える。

研究協力者

黒須剛・国立感染症研究所・主任研究官

吉河智城・国立感染症研究所・主任研究官

A. 研究目的

バイオテロが生じた場合、用いられた病原体を特定することはバイオテロによって生じる健康被害や経済的被害を小さくすることに繋がる病原体の特定には当然ではあるが迅速性や正確性が求められる。

バイオテロで用いられる病原体の特定(あるいは検出)には PCR による遺伝子検出、培養細胞を用いたウイルス分離、電子顕微鏡による病原体の観察等のいくつかの手法があるこれらのうち PCR による遺伝子検出は特異性や感度、所要時間等の面で優れ、迅速かつ正確な病原体の特定になると言える。しかし、PCR による遺伝子検出は病原体が持つ遺伝子情報に基づくものであるため、配列が異なる新規株や変異株が用いられた場合には PCR では検出できない場合もある。他の手法は特に迅速性はあまり期待できないとはいえ、それぞれ PCR による検出では弱い場合でも対応できる特徴を持つこのうちウイルス分離は、通常培養細胞に病原体を感染させ、病原体を増殖させた状態から病原体の抗原検出(場合によっては遺伝子検出)を行なう手法である。遺

伝子配列が多少異なる新規株や変異株であっても抗原性が完全に異なることは科学的に考えにくい。このため、この方法では既知のものと多少異なるものであっても検出することができるバイオテロ対策の1つとして、病原体特定の1つの方法として是非準備しておきたい方法と言える。

これまで日本には感染症法でいう特定一種病原体は存在せず、国立感染症研究所ウイルス第一部では人工合成した病原体遺伝子等を用いて一類感染症を実験室診断する手法を整備してきた。その中で、ウイルスの抗原検出のためのウサギ血清(抗血清)も準備してきた。ただし実際のウイルスを必要とする中和抗体価の測定等は実施不可能だった。2019年9月になり、国立感染症研究所はオリンピックなどのバイオテロが起こりうるイベント等への対策として、海外の研究機関から特定一種病原体(エボラウイルス、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、フニンウイルス、ガナリトウイルス、マチュポウイルス、サビアウイルス)を輸入し、これまで不可能だった中和抗体測定法の整備等を行なうこととした。入手したウイルスを増殖させ、その力

価を測定する必要があるが、この力価測定の作業自体が上述のウイルス分離とほぼ同一であることから、力価測定をウイルス分離の手法の確認と見做して作業を行なった。

B. 研究方法

1. 感染研におけるウイルス(P1 ストック)の作製
入手した特定一種病原体を BSL4 実験室において培養細胞の VeroE6 に接種し、CO₂ インキュベーターで培養した 1 週間後、上清を回収し、分注してディープフリーザーで保存した。
2. 力価測定
分注したウイルスを解凍し、10 倍階段希釈を作製し、各々を VeroE6 細胞(あるいは Vero 細胞もしくは Vero9013 細胞)に接種し、CO₂ インキュベーターで 1 週間培養したホルマリン固定と Triton-X100 処理後、ウサギ抗血清および蛍光 2 次抗体で染色し、蛍光顕微鏡で観察した TCID₅₀/mL を算出した細胞変性効果 (CPE) での力価測定も行なった。

【倫理面への配慮】

該当しない。

C. 研究結果

1. 感染研におけるウイルス(P1 ストック)の作製
ザイルエボラウイルス、スーダンエボラウイルス、ラッサウイルス (Mali 株)、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス (Bagdad12 株) について P1 ストックを作製した接種した VeroE6 細胞で、ザイルエボラウイルス、スーダンエボラウイルスおよびクリミア・コンゴ出血熱ウイルス (Bagdad12 株) の場合に明瞭な CPE が認められた。
2. 演習の構成
ザイルエボラウイルスおよびスーダンエボラウイルス: VeroE6/Vero/Vero9013 細胞のいずれでもウイルス濃度が濃い部分では明瞭な CPE を認めた (図 1)。しかし、ウイルスが増殖し抗原が抗血清で検出される場合でも CPE が明瞭でない場合があった手法の簡素化や統一化が望まれることから、VeroE6 細胞と抗体染色を力価測定に用いることとした。
クリミア・コンゴ出血熱ウイルス (Bagdad12 株): VeroE6/Vero 細胞においては明瞭な CPE が認められ、CPE の有無とウイルス抗原の有無とは一致した (図 2)。Vero9013 細胞では CPE が明瞭でない場合があった手法の簡素化や統一化が望まれることから、VeroE6 細胞と抗体染色を力価測定に用いることとした。

ラッサウイルス (Mali 株): VeroE6 細胞でのみ力価測定を行なった CPE は明瞭でない場合があった手法の簡素化や統一化が望まれることから、VeroE6 細胞と抗体染色を力価測定に用いることとした。

D. 考察

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

E. 結論

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

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

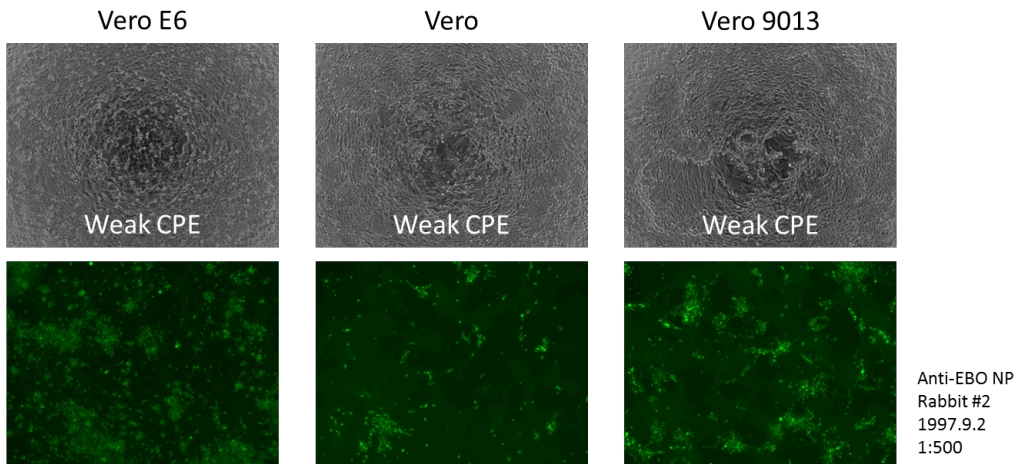
- 1) Suzuki T, Sato Y, Sano K, Arashiro T, Katano H, Nakajima N, Shimojima M, Kataoka M, Takahashi K, Wada Y, Morikawa S, Fukushi S, Yoshikawa T, Saijo M, Hasegawa H. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus targets B cells in lethal human infections. *J Clin Invest.* 2020 Jan 6. pii: 129171. doi: 10.1172/JCI129171.
- 2) Tani H, Kawachi K, Kimura M, Taniguchi S, Shimojima M, Fukushi S, Igarashi M, Morikawa S, Saijo M. Identification of the amino acid residue important for fusion of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus glycoprotein. *Virology.* 2019 Sep;535:102-110. doi: 10.1016/j.virol.2019.06.014.
- 3) Park ES, Shimojima M, Nagata N, Ami Y, Yoshikawa T, Iwata-Yoshikawa N, Fukushi S, Watanabe S, Kurosu T, Kataoka M, Okutani A, Kimura M, Imaoka K, Hanaki K, Suzuki T, Hasegawa H, Saijo M, Maeda K, Morikawa S. Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Phlebovirus causes lethal viral hemorrhagic fever in cats. *Sci Rep.* 2019 Aug 19;9(1):11990. doi: 10.1038/s41598-019-48317-8.
- 4) Shiota T, Li TC, Nishimura Y, Yoshizaki S,

- Sugiyama R, Shimojima M, Saijo M, Shimizu H, Suzuki R, Wakita T, Muramatsu M, Ishii K. Integrin $\alpha 3$ is involved in non-enveloped hepatitis E virus infection. *Virology*. 2019 Oct;536:119-124. doi: 10.1016/j.virol.2019.07.025. Epub 2019 Jul 30.
- 5) Kanai Y, Kawagishi T, Sakai Y, Nouda R, Shimojima M, Saijo M, Matsuura Y, Kobayashi T. Cell-cell fusion induced by reovirus FAST proteins enhances replication and pathogenicity of non-enveloped dsRNA viruses. *PLoS Pathog*. 2019 Apr 25;15(4):e1007675. doi: 10.1371/journal.ppat.1007675. eCollection 2019 Apr.
- 6) 下島昌幸. 世界における節足動物媒介性ウイルス感染症(ブニヤウイルス)感染症の流行状況. *グローバル時代のウイルス感染症*, 日本医事新報社, 東京, p21-24, 2019
2. 学会発表
- 1) 下島昌幸. 日本と海外の BSL-4 施設の最新事情 ワークショップ「日本における BSL4 施設の現状」. 第 19 回日本バイオセーフティ学会 学術集会, 令和元年 11 月 20 日, 東京
- 2) Shimojima M, Sugimoto S, Taniguchi S, Yoshikawa T, Kurosu T, Saijo M. A novel functional screening method to identify severe fever with thrombocytopenia syndrome virus entry factors from cDNA library. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (W1-1-02)
- 3) Kurosu T, Okuzaki D, Phanthanawiboon S, Yoshikawa T, Shimojima M, Saijo M. IL-17A produced from gamma/delta T cells plays a critical role in vascular leakage of severe dengue hemorrhagic fever in mice. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (W1-1-09)
- 4) Phanthanawiboon S, Shimojima M, Fukushi S, Yoshikawa T, Watanabe S, Nagata S, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Okuzaki D, Saijo M, Kurosu T. Flavivirus infection induces suppression of megakaryo-erythro cells in bone marrow. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (O1-2-01)
- 5) Watanabe S, Yoshikawa T, Kurosu T, Fukushi S, Kaku Y, Morikawa S, Shimojima M, Saijo M. Establishment of a recombinant attenuated vaccinia virus, LC16m8, expressing nipah virus surface glycoproteins. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (P-NR-07)
- 6) Yamada H, Kimura M, Tan L, Taniguchi S, Shimojima M, Fukuhara T, Matsuura Y, Komeno T, Nakajima N, Furuta Y, Saijo M, Tani H. Minigenome-based reporter system suitable for high-throughput screening of small compounds able to inhibit replication and/or transcription of SFTSV. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (P-NR-27)
- 7) Sano S, Fukushi S, Yamada S, Harada S, Yoshikawa T, Kurosu T, Shimojima M, Saijo M. Development of an RT-LAMP assay for the rapid detection of SFTS virus. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (P-NR-28)
- 8) Satoh M, Kato H, Ito-Takayama M, Fukushi S, Shimojima M, Yasukawa M, Saijo M. Favipiravir-susceptibility of severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) virus isolated from fatal SFTS patients treated with favipiravir. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (P-NR-29)
- 9) Kato H, Takayama-Ito M, Satoh M, Kinoshita H, Shimojima M, Fukushi S, Yoshikawa T, Kurosu T, Nakajima N, Komeno T, Furuta Y, Saijo M. Evaluation of in vitro antiviral effect of favipiravir on the replication of the different genotypes of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (P-NR-30)
- 10) Takayama Ito M, Sato M, Kato H, Kinoshita H, Shimojima M, Fukushi S, Yoshikawa T, Kurosu T, Nakajima N, Komeno T, Furuta Y, Saijo M. Attempt to make severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV) resistant to favipiravir. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (P-NR-31)
- 11) Fujii H, Tani H, Taniguchi S, Yoshikawa T, Fukushi S, Yamada S, Harada S, Lim C-K, Takayama Ito M, Maeki T, Kurosu T, Shimojima M, Uda A, Komeno T, Nakajima N, Furuta Y,

- Morikawa S, Saijo M. Establishment of a lethal model of Heartland virus infection in mice and evaluation of the efficacy of ribavirin and T-705 by using the model. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (P-NR-32)
- 12) Tan L, Yamada H, Kimura M, Taniguchi S, Shimojima M, Fukushi S, Morikawa S, Saijo M, Tani H. Generation of single-round infectious particles of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2019, Tokyo (P-NR-33)
- 13) Sugimoto S, Suda Y, Kurosu T, Yoshikawa T, Oba M, Omatsu T, Horimoto T, Mizutani T, Saijo M, Shimojima M. Characterization of Soft tick bunyavirus isolated from ticks in Japan. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 31, 2019, Tokyo (O3-3-05)
- 14) Suzuki T, Sato Y, Sano K, Arashiro T, Katano H, Nakajima N, Takahashi K, Kataoka M, Wada Y, Morikawa S, Shimojima M, Fukushi S, Yoshikawa T, Saijo M, Hasegawa H. B cells with immunophenotypic resemblance to plasmablasts are main viral targets in human lethal SFTSV infection. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 31, 2019, Tokyo (O3-3-07)
- 15) Park E, Shimojima M, Yoshikawa T, Nagata N, Iwata N, Suzuki T, Ainai A, Watanabe S, Kurosu T, Ami Y, Noguchi A, Wada Y, Imaoka K, Saijo M, Hasegawa H, Maeda K, Morikawa S. Development of severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) vaccine for cats. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 31, 2019, Tokyo (O3-3-08)
- 16) 下島昌幸. 重症熱性血小板減少症候群ウイルスの最新の知見. 第71回日本衛生動物学会大会 市民公開講座「マダニが運ぶ感染症から身を守れ！」. 平成31年4月21日, 山口 (山口大学大学会館大ホール)
- 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: ザイールエボラウイルスの力価測定

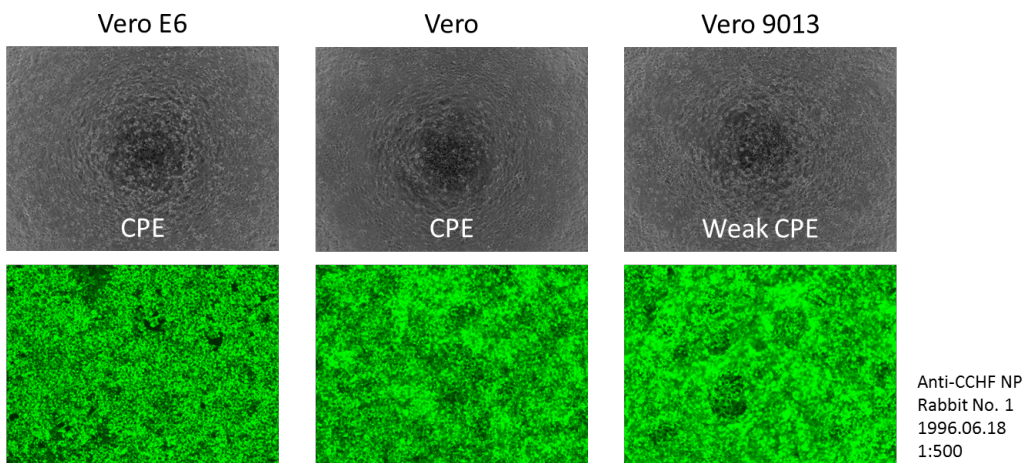
ZEBOV-Yambuku P1 titration



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

図2: クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの力価測定

CCHFV-Bagdad12 P1 titration



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

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

分担報告書

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

所属 KMバイオロジクス株式会社
研究開発本部・製品開発部・部長
研究分担者 園田 憲悟

研究要旨:

日本では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(安全性が高い弱毒株由来)の一つで、且つ、現在世界で唯一、安定的な生産・供給体制が整備された痘そうワクチンであることから、国際的にも注目されている。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、平成29、30年度より継続して評価対象検体数を増やして、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。その結果、痘そうワクチン LC16m8 は、米国で承認、備蓄されている第1世代の痘そうワクチンである Dryvax と同程度のサル痘ウイルスに対する中和抗体誘導能を有することが示唆された。一方で、その持続については、Dryvax と同様に、経時的な減衰傾向が認められた。

研究協力者

氏名・所属研究機関名・職名

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

A. 研究目的

細胞培養痘そうワクチン LC16m8 は、有効性を保持しながら弱毒化に成功した第3世代の弱毒生ウイルスワクチンで、本邦では1975年に製造承認が認可された(凍結乾燥製剤は1980年に認可された)。

当時の痘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1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。しかし、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、本邦では痘そうワクチンLC16m8がテロ対抗医薬品として2001年より製造が再開され、国家備蓄が進められている。また、天然痘テロに対する危機管理対策として初動対応者(ファーストレスポnder)となりうる成人対象者(初種痘者及び再種痘者)に対してLC16m8

が原則1回接種されている。

また、本邦の国際貢献では、国連の平和維持活動(PKO)等を通じた国際平和協力活動や大規模災害時の国際派遣等を通じた国際緊急援助活動が行われ、自衛隊及び医療従事者等の関係者のアフリカ、中東への派遣も行われている。アフリカ地域では、WHOの報告によると、1981年から1986年及び1996年から1997年に数百例規模のヒトでのサル痘ウイルスの大流行(アウトブレイク)が発生し、その後も散発的なアウトブレイクが発生している。近年では特に患者からその家族へのウイルス伝播、つまり、ヒトからヒトへの感染が患者発生地域における流行拡大に起因していること、また、痘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年度より調査研究を開始している。今年度は評価対象者数を増やして、中和抗体の獲得及び持続状況の調査を実施した。

B. 研究方法

本調査研究では、過去に種痘歴の無い健康成人（初回接種者）において米国承認備蓄ワクチン Dryvax を比較対照として 2004～2005 年に一般財団法人化学及血清療法研究所（以下、化血研）が米国で実施した。細胞培養弱毒痘そうワクチン LC16m8 の第 I/II 相無作為二重盲検臨床試験で取得され、平成 29、30 年度の調査対象者以外から追加選択した被験者（LC16m8 接種者 14 名及び Dryvax 接種者 4 名）の保存血清検体（各被験者について、ワクチン接種後 30 日目の採取血清と、60 日目、180 日目又は 360 日目の採取血清のうち利用可能で接種後からの期間が長い方から優先に 2 ポイント選択した計 3 検体）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 640 から 10240 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。

サル痘ウイルスに対する中和抗体価測定は米国の試験受託機関である Southern Research (2000 9th Avenue South, Birmingham, AL 35205, USA)へ委託し、供試検体は盲検状態で提供した測定は研究分担者が承認した。試験プロトコル及び Southern Research 社の作業手順書（SOP）に従い、Vero E6 細胞を用いて、血清中のサル痘ウイルス（Zaire-79 株）に対する中和抗体価（Anti-Monkeypox PRNT₅₀）を 50%プラーク減少法により算出した。

【倫理面への配慮】

本調査研究は、KMバイオロジクス株式会社の研究倫理審査委員会の審査を受け、2018年8月23日付で研究期間延長承認を得て実施した（受付番号 17-05）。また、個人を特定できないように秘匿化措置を講じた上で研究を実施した。

C. 研究結果

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の持続状況を調査するために、過去に種痘歴の無い健康成人において米国承認備蓄ワクチン Dryvax を比較対照として 2004～2005 年に化血研が米国で実施した。細胞培養弱毒生痘そうワクチン LC16m8 の第 I/II 相無作為二重盲検臨床試験で取得され長期間凍結保存しているヒト血清を用いて、サル痘ウイルスに対する中和抗体価測定を実施した。各被験者の Anti-Monkeypox PRNT₅₀ を表 1 に示す。次に、今

回調査した各被験者の各ポイントでの中和抗体陽性率（Anti-Monkeypox PRNT₅₀ が ≥ 10 を陽性基準）及び Anti-Monkeypox PRNT₅₀ の幾何平均（GMT）を表 2 に示す今回調査した。各被験者のワクチン接種後最長時点（180 日目又は 360 日目時点）の中和抗体陽性率は LC16m8 群では 79%（11/14）、Dryvax 群では 100%（4/4）であった。また中和抗体陽性者における Anti-Monkeypox PRNT₅₀ の幾何平均（GMT）は、LC16m8 群では 122、Dryvax 群では 99 であった。

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、また、その持続については、Dryvax と同様に、経時的な減衰傾向が認められることを報告した（平成 29 年度及び平成 30 年度報告）。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。また、アフリカ地域のサル痘アウトブレイクでは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。そこで、今年度も平成 29、30 年度より継続して評価対象検体数を増やして、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獲得状況及びその持続について調査した。LC16m8 接種群では Dryvax 接種群と同様に、経時的な減衰傾向が認められた。なお、本調査では対象とする検体調達の困難さから、採取以降約 15 年間にわたり凍結保管しているヒト血清を用いたため、長期保管中の検体特性の経年劣化による影響は否定できない。

E. 結論

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 は、米国で承認・備蓄されている第 1 世代の痘そうワクチンである Dryvax と同程度のサル痘ウイルスに対する中和抗体誘導能を有することが示唆された。

一方で、その持続については、Dryvax と同様に、経時的な減衰傾向が認められた。なお、本研究は米国で実施された臨床試験で取得された米国人の血清検体を用いて実施しており、今後の追加接種の施策等を検討するためには、更に日本人の痘そうワクチン LC16m8 接種者の血清検体を用いた同様の研究実施も必要となると考えられる。

F. 健康危険情報
特記事項なし

G. 研究発表
1. 論文発表

該当なし
2. 学会発表
該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

表 1. 痘そうワクチン接種後のサル痘ウイルスに対する各被験者の中和抗体価

Sample ID*	Vaccine	Days after vaccination	Anti-NYCBH PRNT50	Anti-Monkeypox PRNT50
HS001	Dryvax	30	1250	394.3
HS002		180	NA	120.7
HS003		360	NA	109.2
HS004	Dryvax	30	2560	156.0
HS005		180	NA	104.3
HS006		360	NA	78.0
HS007	Dryvax	30	1280	390.8
HS008		180	NA	74.8
HS009		360	NA	82.6
HS010	Dryvax	30	1280	400.0
HS011		180	NA	80.9
HS012		360	NA	102.2
HS013	LC16m8	30	2560	392.5
HS014		60	NA	134.3
HS015		180	NA	73.6
HS016	LC16m8	30	1280	425.3
HS017		180	NA	143.4
HS018		360	NA	320.0
HS019	LC16m8	30	2560	43.0
HS020		180	NA	31.8
HS021		360	NA	28.4
HS022	LC16m8	30	640	488.7
HS023		180	NA	32.2
HS024		360	NA	152.5
HS025	LC16m8	30	2560	27.1
HS026		180	NA	20.0
HS027		360	NA	<10
HS028	LC16m8	30	5120	<10
HS029		180	NA	<10
HS030		360	NA	<10
HS031	LC16m8	30	1280	434.3
HS032		60	NA	448.0
HS033		180	NA	327.0
HS034	LC16m8	30	5120	640.0
HS035		180	NA	385.0
HS036		360	NA	473.8

Sample ID*	Vaccine	Days after vaccination	Anti-NYCBH PRNT50	Anti-Monkeypox PRNT50
HS037	LC16m8	30	1280	124.0
HS038		180	NA	<10
HS039		360	NA	<10
HS040	LC16m8	30	1280	115.0
HS041		180	NA	79.1
HS042		360	NA	<10
HS043	LC16m8	30	10240	544.0
HS044		180	NA	148.0
HS045		360	NA	358.6
HS046	LC16m8	30	2560	130.0
HS047		180	NA	123.6
HS048		360	NA	<10
HS049	LC16m8	30	2560	94.0
HS050		180	NA	81.5
HS051		360	NA	<10
HS052	LC16m8	30	2560	233.8
HS053		180	NA	<10
HS054		360	NA	<10

* Sample ID は検査機関へ盲検下で検体を供試するために本研究で付与した連番を示す

NA: Not applicable

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応答

Vaccination	Anti-NYCBH PRNT		Anti-Monkeypox PRNT			
	LC16m8	Dryvax	LC16m8		Dryvax	
N	14	4	14		4	
Days after vaccination	30	30	30	180 or 360	30	180 or 360
Seroconversion Rate*	100% (14/14)	100% (4/4)	93% (13/14)	79% (11/14)	100% (4/4)	100% (4/4)
GMT**	2318	1522	194	122	313	99

*10 倍以上の中和抗体価を獲得した者を陽性と判定

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

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

分担報告書

細胞培養弱毒生痘そうワクチンの安全性評価における病理学的研究

所属 国立感染症研究所・感染病理部・室長
研究分担者 永田 典代

研究要旨:サル痘ウイルスがマウスに不顕性感染することを利用し、好中球枯渇マウスにおける重症化機序を明らかにする。サル痘ウイルスの皮下接種はマウスに明らかに病変を起こさないが、好中球の枯渇処理はウイルス増殖と病変形成を亢進した。今年度は、本モデルのリンパ系組織および血中におけるウイルスゲノム動態を経時的に明らかにした。さらに、これまでに得られた宿主応答と組織変化を総合的に検討したところ、好中球は本モデルにおける体内のウイルス伝播と病態の更新に一定の役割を担うと考えられた。本モデルは、今後のオルソポックスウイルスワクチン研究に利用できると思われる。

研究協力者

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

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、アインタイ 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、心臓採血し血液とリンパ組織を得た(n = 4-6)。材料は解析まで、DNA/RNA Shield(ZYMO Research)中で-80°Cにて保管し、Quick-DNA Kits(ZYMO Research)を用いてDNAを抽出しMonkeypoxウイルスのゲノムをreal time PCR法により検出した。使用したプライマー、プローブは次の通り(Maksyutov RA et al., 2016):

MPXV F3L upper,
5'-CATCTATTATAGCATCAGCATCAGA-3'
MPXV F3L lower,
5'-GATACTCCTCCTCGTTGGTCTAC-3'
MPXV F3L probe,
HEX-5'-TGTAGGCCGTGTATCAGCATCCAT
T-3'-BHQ1

QuantiTect Probe PCR Kits(QIAGEN)を用いてサンプルを調製し、Real time PCR 反応プロトコルは、テンプレート変性・酵素活性化ステップ 95°C10 分、変性 95°C15 秒およびアニーリング・伸長反応

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。昨年度までに、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、感染後の好中球増多と、主に単球系の活性化を引き起こすことが示された。今年度は、ウイルスゲノムの体内動態を評価した。

B. 研究方法

1. 組織材料

初年度に実施した感染実験の組織標本を用いて解析を進めた感染実験は次の通りである。

BALB/c マウス(日本エスエルシー、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

63°C60 秒 45 サイクル, 37°C30 秒とした。

【倫理面への配慮】

該当しない。

C. 研究結果

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

D. 考察

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

E. 結論

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

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Matsuyama S, Nao N, Shirato K, Kawase M, Saito S, Takayama I, Nagata N, Sekizuka T, Katoh H, Kato F, Sakata M, Tahara M, Kutsuna S, Ohmagari N,

Kuroda M, Suzuki T, Kageyama T, Takeda M. Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 117(13):7001-7003, 2020.

2) Sekimukai H, Iwata-Yoshikawa N, Fukushi S, Tani H, Kataoka M, Suzuki T, Hasegawa H, Niikura K, Arai K, Nagata N. Gold nanoparticle-adjuvanted S protein induces a strong antigen-specific IgG response against severe acute respiratory syndrome-related coronavirus infection, but fails to induce protective antibodies and limit eosinophilic infiltration in lungs. Microbiol Immunol. 64(1):33-51, 2020.

2. 学会発表

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

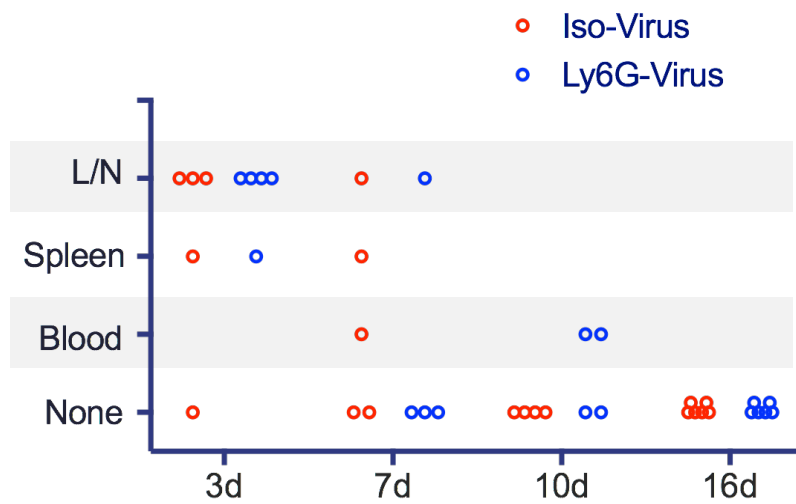


図 頸部リンパ節, 脾 および血液における経時的なウイルスゲノムの検出 (n=4)各ドットは個体を示す. Noneはいずれの材料においてもウイルスゲノムが検出されなかった事を示す.

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・部長
研究分担者 前田 健

研究要旨:Lister 株から低温馴化により LC16 株, LC16mO 株を經由して樹立された, 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. 参照細胞培養ワクチン Lot を 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. バイオアッセイからはいずれの Lot においても 3 回継代することによって MSP 頻度が 100% まで増加することが分かった. また, 定量的 PCR からは各 Lot において主な MSP が検出でき, MSP の種類が異なることが分かった. 更に, 次世代シーケンス解析と定量的 PCR の結果を比較した結果, MSP 出現頻度率がほぼ一致した総合的に, MSP には主に, 4 種類の MSP が存在し, その検出にはそれぞれ特異的プライマーを用いた定量的 PCR を実施する必要があると考えられた. 一方, より簡便に MSP の頻度が測定できるように, 復帰した MSP の B5R 部位を抗原としてウサギ由来の抗ペプチド抗体を作製した今後, その抗血清を用いて, 検出法を開発する予定である.

研究協力者

朴ウンシル, 奥谷晶子, 宇田晶彦(同, 獣医科学部),
吉河智城, 西條政幸(同, ウイルス第一部)

A. 研究目的

細胞培養痘そうワクチンの製造株であるワクシニアウイルス LC16m8 株は, Lister 株から低温馴化により LC16 株, LC16mO 株を經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°C 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°C 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) 解析で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. しかし, 参照細胞培養ワクチン Lot を用いて, 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 増幅率を定量的 PCR による結果と次世代

シーケンス解析結果を比較した結果、今まで主な割合を占めなかった MSP の出現頻度が最も高くなることが分かった。本研究では、その MSP の定量的 PCR 系を開発し、MSP 特異的定量 PCR と次世代シーケンス解析により、継代培養に伴う MSP 変異パターンを比較し、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. 268T 挿入型の MSP の作出

次世代シーケンス解析により、268T 挿入型の頻度が最も高かった Lot10 を RK13 細胞に moi0.1 で感染した感染 7 日目に、プラーク精製を行い、凍結融解を 3 回行った。その上清を LC16m8 及び MSP 共通のプライマーを用いて PCR を行い、direct シーケンスにより 268T 挿入型を選別した 268T 挿入型の MSP を再度 RK13 細胞に感染し、同様にプラーク精製を行ったこの過程をトータル 3 回行い、268T 挿入型 MSP を作出した。

2. 268T 挿入型の定量的 PCR 開発

268T 特異的プライマーを変異部位である T 塩基が最後に来るように、forward は 17mer から 20mer まで、reverse は 11mer から 22mer まで設計した。また、positive control は各 MSP を RK13 細胞に moi0.1 で感染させ、Hirt extraction により、MSP の DNA を抽出し、用いた。まずは、これらを用いて conventional PCR により 268 挿入型を特異的に検出できるプライマーを選別した選別されたプライマーを用いて、定量的 PCR を実施した最終的に選別されたプライマーを用いて検出限界を確認した。

3. MSP 特異的定量的 PCR と次世代シーケンス解析による MSP 変異パターン及び出現頻度比較

6 種類の Lot とそれぞれ Vero E6 細胞で 3 代継代培養した上清を 2) で開発した MSP 特異的定量的 PCR を合わせて、4 種類 (267A 挿入型、272T 挿入型、274ATAC 挿入型及び 268T 挿入型) のプライマーを用いた MSP 検出の定量的 PCR を行った。その結果と次世代シーケンス解析による結果を比較した。

4. MSP の B5R を抗原としたウサギ由来の抗ペプチド抗体作製

MSP は B5R 遺伝子中 1 塩基、または、4 塩基挿入及び 2 塩基欠損により復帰した株であり、LC16m8 とは異なり、LC16mO 株と同様に全長の B5R を有する (図 1)。B5R の中、LC16m8 と異なる SCR (short consensus repeats)

domain 以降、transmembrane domain 以前の 237aa から 275aa までの部位でデザインしたペプチドを抗原とし、ウサギ由来の抗ペプチド抗体を作製した Lot6, 7, 8, 9, 10 及び 12 それぞれの 3 代継代培養した上清を moi 0.1 で RK13 細胞に感染させ、感染 7 日目に、ウサギ由来の抗ペプチド抗体を用いて、FA (1:200~1,000) や IC (1:200~1,000) により MSP を特異的に検出できるかを確認した。

【倫理面への配慮】

該当しない。

C. 研究結果

1. 268T 挿入型の MSP の作出

前年度は今まで開発してきた 267A 挿入型、272 挿入型及び 274ATAC 挿入型検出のための定量的 PCR (図 2) の結果と次世代シーケンス解析による結果を比較すると、MSP 出現頻度が不一致することが分かった。その原因は次世代シーケンス解析によると、Vero E6 細胞で 3 代継代培養すると、268T 挿入型がメジャーに増加することによるものであった。今までの結果では、268T 挿入型は主な MSP ではなかったため、定量的 PCR 系は開発していなかった。そこで、268 挿入型の定量的 PCR を開発するために、まずは、その MSP を作出した次世代シーケンス解析により、268T 挿入型の頻度が最も高かった Lot を RK13 細胞に感染させ、プラーク精製を行った 268T 挿入型であることを PCR 後 direct シーケンスにより確認した。最初にランダムに選んだ 16 個のプラークの中、4 個が 268T 挿入型 MSP を含んでいた。更に、2 回プラーク精製をし、純粋な 268T 挿入型 MSP を作出できた。

2. 268T 挿入型の定量的 PCR 開発

268T 特異的プライマーを変異部位である T 塩基が最後に来るように、forward は 17mer から 20mer まで、reverse は 11mer から 22mer まで設計した。また、positive control は各 MSP を RK13 細胞に moi0.1 で感染させ、Hirt extraction により、MSP の DNA を抽出し、用いたこれらを用いた conventional PCR により forward 17mer 及び 18mer が 54°C、20 cycles で特異的に 268T 挿入型を特異的に検出できることが分かった。更に、その二つのプライマーを用いて定量的 PCR を検討した結果、forward 18mer プライマーがアニリン温度 54°C で 268T 挿入型を特異的に検出できることが分かったその検出限界は 0.3% 程度であった (図 3)。

3. MSP 特異的定量的 PCR と次世代シーケンス解析による MSP 変異パターン及び出現頻度比較

2)で開発した MSP 特異的定量的 PCR を合わせて、4 種類のプライマーを用いた MSP 検出の定量的 PCR の結果と次世代シーケンス解析による結果を比較した。各 Lot を Vero E6 細胞に 3 代継代培養すると、6 種類の Lot 中、5 種類の Lot において、268T 挿入型の出現頻度が顕著に増加することが分かった。また、継代ごとの MSP の変異パターンにおいて両方の結果がほぼ一致した(図4)。

4. MSP の B5R を抗原としたウサギ由来の抗ペプチド抗体作製

B5R の 237aa から 275aa までの配列からのウサギ由来の抗ペプチド抗体(図5)を用いて FA 及び IC を実施した結果、MSP は検出できなかった。それには、ペプチド抗原の限界が一つの原因である可能性が考えられた。今後、感染細胞を用いて immunoblot や flow cytometry によりウサギ由来の抗ペプチド抗体が MSP を検出できるかを検討する予定である。

D. 考察

次世代シーケンス解析により、主な比率を占めなかった 268T 挿入型が増加することが分かった。その MSP を特異的 forward 18mer プライマーより定量的に検出できた更に、4 種類(267A 挿入型、272T 挿入型、274ATAC 挿入型及び 268T 挿入型)のプライマーを用いた MSP 検出の定量的 PCR の結果と次世代シーケンス解析による MSP 出現頻度の結果はほぼ一致した。痘そうワクチン株の Lot を Vero E6 細胞に 3 代継代培養を重ねると、83%の確立で 268T 挿入型の出現頻度が高くなることが分かった。

また、より簡便に MSP を検出できるように、MSP の B5R 部位からペプチドをデザインし、ウサギ由

来の抗ペプチド抗体を作製したが、現在、MSP が検出できないことが分かったそのウサギ由来の抗ペプチド抗体により MSP が検出できる系を検索すると共に、ペプチドではなく、大腸菌から組換え蛋白質を作製し、ウサギ由来の抗血清を作製することを予定している。

E. 結論

MSP 特異的プライマーを用いた real time PCR と次世代シーケンスによる MSP 出現頻度検出率はほぼ一致し、MSP 頻度が 3%以上は検出できた。また、継代培養ごとに MSP の出現頻度が高くなること、また、メジャーな MSP が Lot により異なることから、MSP 検出のためには 4 種類(267A 挿入型、272T 挿入型、274ATAC 挿入型及び 268 挿入型)の特異的プライマーを用いて行う必要があると考えられた。

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
特記事項なし
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

図 1 これまでに得られた MSP の遺伝子型と頻度

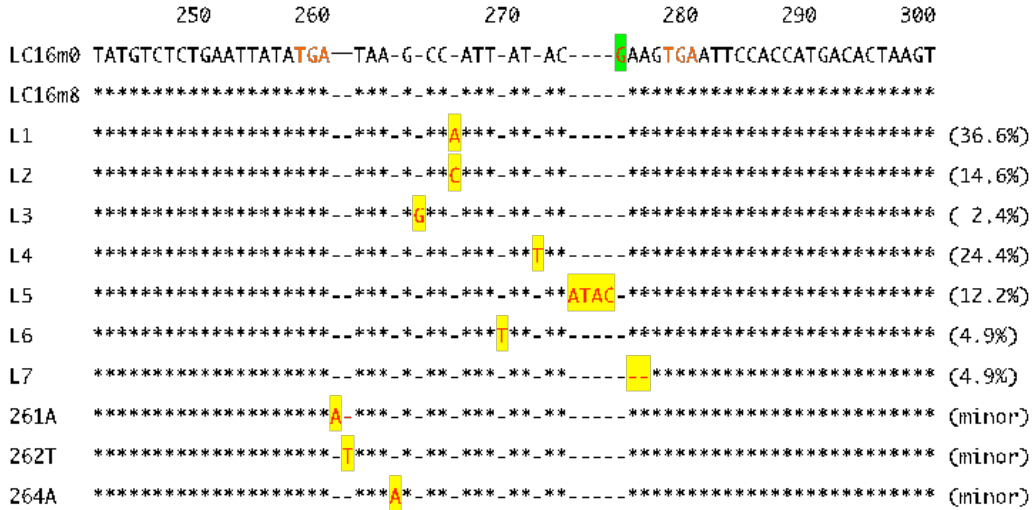


図 2MSP 特異的定量 PCR の検出感度

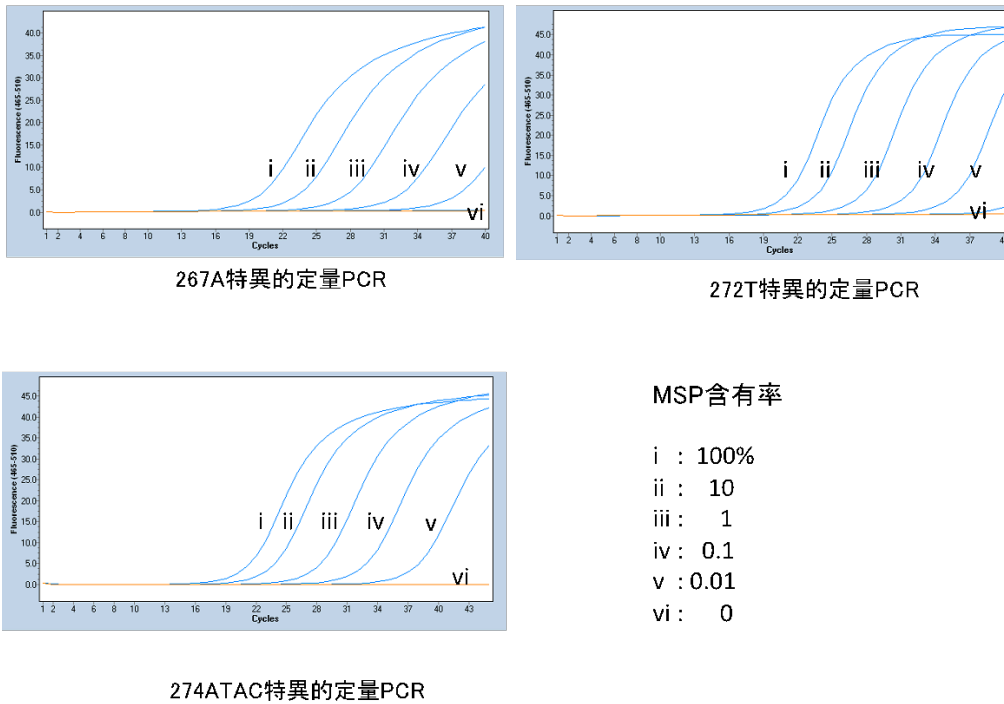
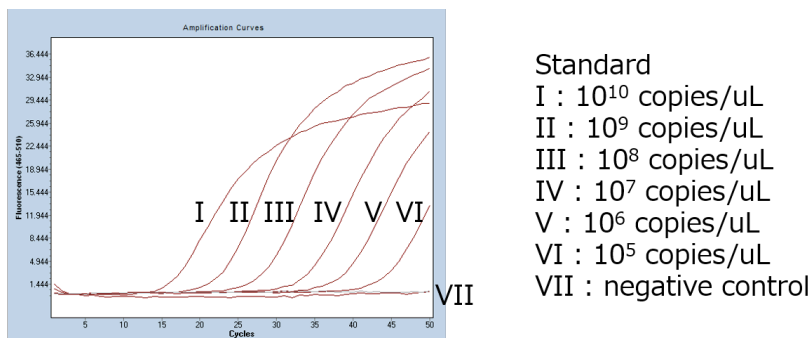


図 3268T 挿入型特異的定量 PCR

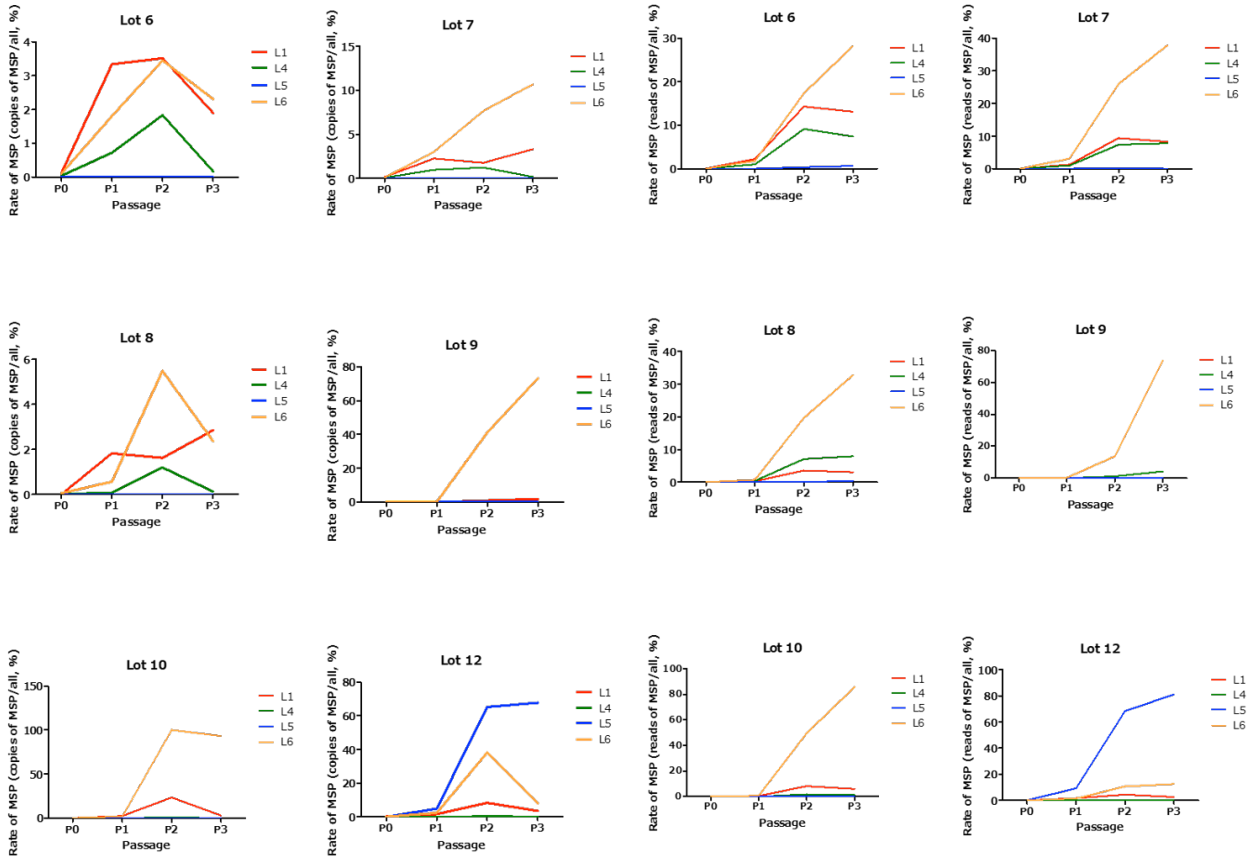


MSP specific primer中, forward 18mer primerがL6を特異的に検出できた。
(Annealing Tm 54°C, 50 cycles)

図4MSP 特異的定量 PCR 及び次世代シーケンス解析による結果比較

Real time PCRによるMSP含有率

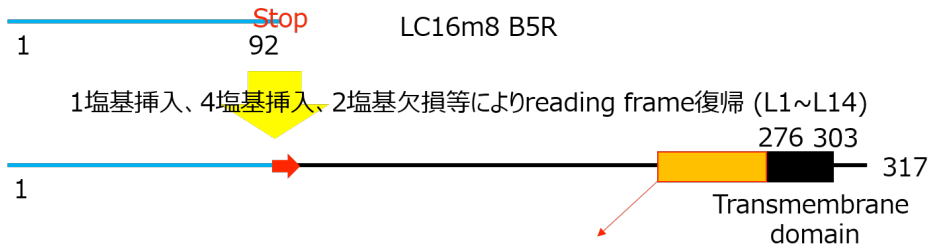
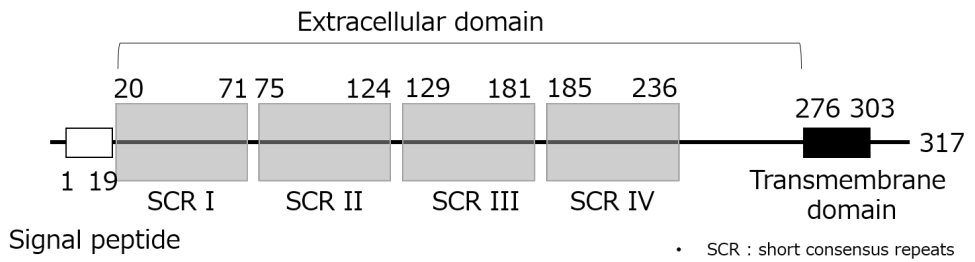
次世代シーケンス解析によるMSP含有率



L1 : 267A 挿入型, L4 : 272T 挿入型, L5 : 274ATAC 挿入型, L6 : 268T 挿入型

図 5MSP の B5R domain の抗ペプチド抗体を作製

Vaccinia virus B5R domain



Reading frame復帰したMSPの共通の抗原として、SCR domain以降の237aa~275aa。

ウサギ由来の抗ペプチド抗体を作製

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

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

分担報告書

細胞培養弱毒生痘そうワクチンの特性解析(遺伝子機能解析)、品質試験法に関する研究(2)

所属 国立感染症研究所・
獣医科学部・部長
研究分担者 前田 健

研究要旨:2019年7月 GHSAG よりバイオテロに関する細菌系5種、炭疽菌・ペスト菌・ブルセラ菌・野兔病菌・類鼻疽菌の検査の外部精度管理(EQA)の実施が提案された。細菌第一部、細菌第二部、獣医科学部の3部で対応した生菌パネルとDNAパネルの選択が提示されたが、日本としてはDNAパネルでの検査対応を行った。その結果を2月14日に報告した。

研究協力者:奥谷晶子,今岡浩一,堀田明豊(同,
獣医科学部)

石原智子,川端寛樹,大西 真(同,細菌一部)

堀田敦子,柴山恵吾(同,細菌二部)

西條政幸(同,ウイルス第一部)

B. 研究方法

カナダより資料1のように生菌のパネルで検査するか、DNAのパネルで検査のどちらかを選択するように依頼が来た。関係者での討議の後、日本ではDNAパネルで検査を実施することを決定した。

【倫理面への配慮】

該当しない。

A. 研究目的

世界健康安全保障イニシアティブ(Global Health Security Initiative:GHSI)にはG7(カナダ,フランス,ドイツ,イタリア,日本,英国,米国),メキシコ,欧州委員会(EC)で構成され、オブザーバーとしてWHOも参加している。世界健康安全保障行動グループ(GHSAG)は各国の局長級実務者で構成され、大臣らの計画と目的を具体的な行動に移し、危機が発生した際に迅速なコミュニケーションのネットワークとして機能することを目的としている。GHSAGのメンバーは、地球規模の健康安全保障の問題について情報を交換し、GHSIネットワークの政策の優先事項を協議し、技術レベルでの行動の進捗状況を確認し、閣僚級会合の準備を支援する。

GHSAGラボネットワークでは議長はカナダとメキシコ診断の質の保証、診断手法・技術の柔軟性と適応性の向上や検体の輸送の問題に取り組んでいる。

2019年7月に議長国のカナダより、炭疽菌、野兔病菌、ペスト菌、ブルセラ属菌、バークホルデリア属菌のEQAが実施された。

C. 研究結果

添付資料2のように2020年1月27日に菌由来のDNAがスキムミルク、グリセロールの入ったDNAが5種類送られてきた中身は不明であった5日以内に結果を出すようにということなので、2月10日検査開始、2月14日を報告期限として検査を実施した。

1日目はDNAの抽出精製を試みたQIAamp DNA blood Mini Kitを用いてDNAを精製後、精製DNAを各菌のDNA検査のために40μずつ送付した。

2日目以降は各菌の担当者により検査が実施されたブルセラ菌の検査は資料3、ペスト菌の検査は資料4、バークホルデリアの検査は資料5、野兔病菌の検査は資料6、炭疽菌の検査は資料7にまとめられている。

2月13日に最終結果として、
15A Bacillus spp

15B Bacillus anthracis
15C Bacillus anthracis and the other bacteria
15D No bacteria
15E Bacillus anthracis
上記のように報告した。

バイオテロの発生した際の対応なども併せて必要だと考えられた。

D. 考察

国立感染症研究所の 3 つの部が協力して、EQA に対応した。結果としては、Bacillus 属の DNA しか存在していなかったが、5 種のバイオテロの対象となる各種病原体に対して専門的に行っている各部が協調し、迅速・適切に対応できた。

E. 結論

国内で細菌系のバイオテロが発生した場合も迅速かつ適切に同定できることが確認された。今後も、DNA ウイルス、RNA ウイルスなどによる

F. 健康危険情報
特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表
特記事項なし
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

資料 1

National Microbiology Laboratory Biothreat Panel Request Survey for the GHSAG Laboratory Network

The NML can offer a variety of security sensitive biological agent (SSBAs) or near neighbors to determine success in identification. These panels would focus only on bacterial agents of security concern and may be provided as non-viable molecular panels. They would be available to labs that have CL3 capability, and preferably those laboratories that have experience in the triage and identification of unknowns for biosecurity investigations. These panels can be offered as live agent panels; however interest and importation requirements will further determine the panel design.

Instructions for use of this table are on page 2.

Country	B. anthracis, F. tularensis, Y. pestis, Brucella spp. Burkholderia spp.		Recipient Contact Name and Institutional Mailing Address	Recipient Telephone, Fax and Email
	Live	Dead		
FRANCE	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Anne LE FLECHE Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence INSTITUT PASTEUR 25-28 rue du Dr Roux 75015 Paris	T: +33 1 40 61 38 08 F: +33 1 40 61 38 07 E: anne.le-fleche@pasteur.fr
GERMANY	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Prof Dr Roland Grunow Robert Koch Institute, ZBS 2 Seestr. 10 13353 Berlin, Germany	T: +49 30 18754 2100 F: +49 30 18754 2110 E: GrunowR@rki.de
ITALY	<input checked="" type="checkbox"/> Y. pestis only	<input checked="" type="checkbox"/>	Dr. Antonino Di Caro Director - Microbiology Laboratory National Institute for Infectious Diseases - Lazzaro Spallanzani Via Portuense, 292 00149 Rome, Italy	T:+390655170685 F:+390655170683 E: antonino.dicaro@inmi.it
JAPAN	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Dr. Ken Maeda Director – Department of Veterinary Medical Science National Institute of Infectious Diseases 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan	T: +81-3-4582-2750 F: +81-3-5285-1179 E: kmaeda@nih.go.jp
MEXICO	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		T: F: E:
UNITED KINGDOM	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		T: F: E:
UNITED STATES	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		T: F: E:

Instructions on the use of this table.

1. Download the survey onto your computer.
2. Select the types of samples you wish to receive by clicking on the boxes.
3. Fill in the details for the appropriate contact person/recipient, institutional mailing address, and contact information for the recipient.
4. Save your survey and email it back to me. I will collate everyone's preferences.

Canadian Laboratory Response Network Annual Proficiency

This proficiency panel will include several elements, including testing and analysis components to identify security sensitive biological agents, as well as the correct and timely reporting of results.

Five (5) samples will be provided to your laboratory from the National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canada.

Please find attached the 'Acknowledgement of Receipt' Form. This must be faxed or emailed to the Bioforensics Assay Development and Diagnostics (BADD) laboratory once the samples are received.

Online reporting must be completed via the Canadian Laboratory Response Network (CLRNI) Collaboration Site using the Canadian Network for Public Health Intelligence (CNPHI) platform. The reporting instructions are included in this package. You must report your results within 5 calendar days from the start of the testing; not from the package receipt.

Your laboratory will conduct testing on the provided nucleic acid material for the detection and identification of any of the following bacteria using your applicable procedures:

- *Bacillus anthracis*
- *Yersinia pestis*
- *Francisella tularensis*
- *Brucella sp*
- *Burkholderia pseudomallei*

If you have any questions, please contact the CLRNI Office.

Good Luck!

Contact info: Bioforensics Assay Development and Diagnostics Laboratory

Email: phac.nml.badd-eedmm.lnm.aspc@canada.ca

Fax: (204) 789-5009

**Canadian Science Centre for Human and Animal Health
1015 Arlington Street
Winnipeg, MB CANADA R3E 3R2**

Instructions for Analysis and Reporting

Upon Receipt of Shipment: Upon arrival, document whether the outer box is intact and in good condition, and record the temperature within the box. Immediately notify the NML of package receipt by faxing or emailing a PDF of the enclosed Acknowledgement of Receipt Form to 1-204-789-5009 or phac.nml.badd-eedmm.lnm.aspc@canada.ca.

The outer packaging, as well as the data logger is the property of the courier and will be taken back immediately by a World Courier representative. Verify the inner box and security seal is intact. Contact the BADD laboratory in case of damage or a broken seal.

Contents: Package contains 5 DNA extracts in skim milk, glycerol and water. Each tube contains 500 uL.

Viability Disclaimer: The proficiency provider follows stringent Containment Level 3 standard operating procedures to assess the viability of hazardous biological material prior to removal from containment. The material provided herein has been extracted using a MasterPure™ DNA Purification Kit (Epicentre-Illumina), passed through a 0.22uM filter and 10% plated for growth. No growth was recovered following these practices but the use of stringent biosafety practices are recommended.

Instructions/Storage: Samples will arrive on dry ice. The samples must be stored at -20°C upon receipt to ensure stability of proficiency material provided.

Confidentiality: This proficiency panel must be completed without consultation with other laboratories.

Testing Instructions: You are receiving samples that mimic a submission requiring microbiological analysis from local law enforcement. The samples have undergone chemical, radiological and explosives screening and should be treated as microbiological samples. Samples are to be tested using processes that are applicable to your facility. As in a real event, timely reporting is critical. Your laboratory must report your preliminary results within 5 calendar days from the start of the testing. Final results are due March 2, 2020.

Reporting: The results will be reported as per “CNPHI CLRN Proficiency Test Database Access and Reporting Instructions (BADD-WI-007)” which is included in this package. This must be completed within the specified time period.

Sample Destruction: Contents of the package and all remaining samples must be destroyed upon completion of proficiency testing. Please find attached the ‘Confirmation of Destruction’ Form. This must be faxed or emailed to the Bioforensics Assay Development and Diagnostics (BADD) laboratory once the samples are destroyed.

Appeal Process: If you do not agree with the proficiency testing evaluation, you may appeal the decision by contacting phac.nml.badd-eedmm.lnm.aspc@canada.ca.

CLRN PROFICIENCY PANEL
CLRN_PT_2020

ACKNOWLEDGEMENT OF RECEIPT OF PROFICIENCY TEST SAMPLES

FAX (204) 789-5009 or email scanned copy to phac.nml.badd-eedmm.lnm.aspc@canada.ca

I Ken Maeda, National Institute of Infectious Diseases
(Laboratory Coordinator / Personnel) (Institution / Agency)

1-23-1 Toyama, Shinjuku, Tokyo, +81-3-4582-2750
(Address) (Telephone)

have received the **CLRN_PT_2020** proficiency test samples from National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canada, located at the Canadian Science Centre for Human and Animal Health in Winnipeg, Manitoba.

- The outer box of the package is intact and the temperature inside the box has been verified. The temperature and time of the shipment upon delivery was appropriate on Jan. 27, 2020.
- The outer packing and data logger have been returned to the World Courier representative.
- Test samples will be destroyed upon completion of panel testing.
- This panel will be run according to the specified procedures of the facility and without consultation with other laboratories.

By signing this document, I confirm that I have received the correct panel that is appropriate for the capabilities within my facility.


(Signature)

Jan 29, 2020
(Date and Time)

Detection of Brucella-Specific Gene

Dr. Koichi IMAOKA

Laboratory Chief

Laboratory of Reservoir Control of Zoonoses

Department of Veterinary Science

National Institute of Infectious Diseases

Outline:

A combinatorial PCR procedure identifies four major species of the genus *Brucella* (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* and *B. canis*), simultaneously. The four pairs of primers targeting the genes encoding a cell surface protein (*BCSP31*) and outer membrane proteins (*omp2b*, *omp2a* and *omp31*) are prepared. PCR using these primers gives rise to specific patterns of amplification for each *Brucella* spp. (Imaoka, K. et al., Simultaneous detection of the genus *Brucella* by combinatorial PCR. Jpn. J. Inf. Dis., 60:137-139, 2007).

Primer pairs:

1. A pair of primers **B4/B5** amplifies a 224-bp DNA fragment from the gene encoding a 31-kDa cell surface protein (*BCSP31*) which is well conserved in all *Brucella* spp. (M20404).
2. Two antisense primers, JPR-ab and JPR-ca, which are specific for *B. abortus* (U26438) and *B. canis* (U26439), respectively, are prepared.

A pair of primers **JPF/JPR-ab** amplifies a 186-bp fragment from *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis* but not from *B. canis*.

A pair of primers **JPF/JPR-ca** amplifies a 187-bp fragment from *B. canis* and *B. suis*.

*(The gene encoding Brucella major outer membrane protein 2 (*omp2*) has two related regions, *omp2b* and *omp2a*, and these two regions are 85% homologous and oriented in opposite directions (U26438).)

3. A pair of primers **1S/1AS** amplifies a 249-bp fragment from the *omp31* gene encoding Brucella outer membrane protein of *B. melitensis*, *B. suis* and *B. canis* but not from *B. abortus* (AF366073), because of the presence of a large deletion in the *omp31* gene of *B. abortus*.

Fig) Summary of PCR target gene, Primer pair, Product size and Brucella strains which show positive amplification

Target gene	Primer pair	Product size	Positive
<i>bcsp31</i>	B4/B5	224 bp	BM, BA, BS, BC
<i>omp2</i>	(abortus type) JPF/JPR-ab	186 bp	BM, BA, BS
	(canis type) JPF/JPR-ca	187 bp	BS, BC
<i>omp31</i>	1S/1AS	249 bp	BM, BS, BC

BM: *Brucella melitensis*, BA: *B. abortus*, BS: *B. suis*, BC: *B. canis*

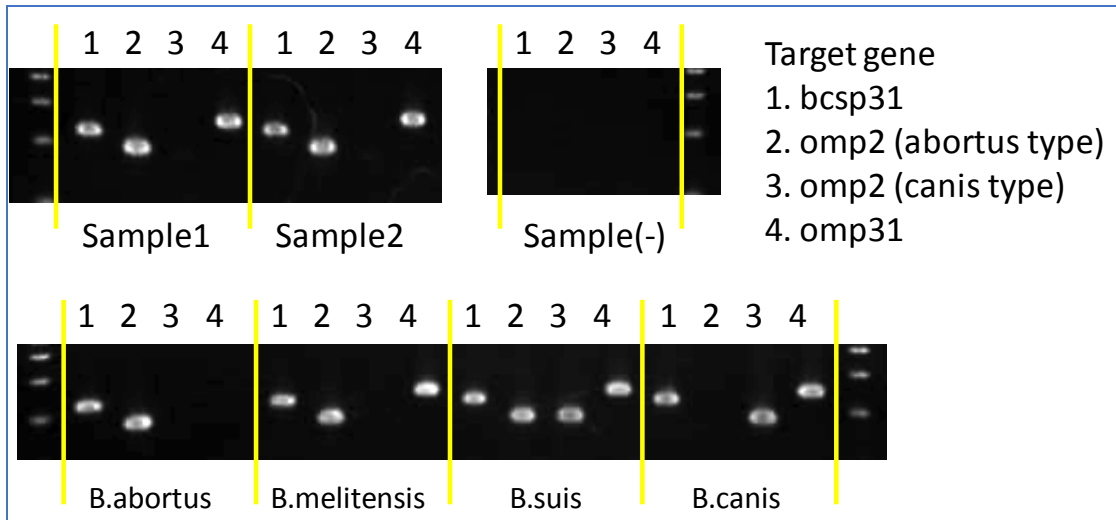
Fig) Primers designated for a combinatorial PCR

Target gene	Primer name	Sequence
<i>BCSP31</i>	B4 (S)	5'-Tgg CTC ggT TgC CAA TAT CAA
	B5 (AS)	5'-CgC gCT TgC CTT TCA ggT CTg
<i>omp2</i>	JPF (S)	5'-gCg CTC Agg CTg CCg ACg CAA
	JPR-ab (AS)	5'-CAT TgC ggT Cgg TAC Cgg Ag
	JPR-ca (AS)	5'-CCT TTA CgA TCC gAg CCg gTA

<i>omp31</i>	1S (S)	5'-gTT CgC TCg ACg TAA CAg CTg
	1AS (AS)	5'-gAC CgC Cgg TAC CAT AAA CCA

Example: Amplification patterns of a combinatorial PCR

(Sample 1&2 are identified as *B. melitensis* from an amplification pattern)



Strains	Positive amplification (primer pair)
<i>B. abortus</i>	bcp31 (B4/B5), omp2 (abortus-type)(JPR/JPF-ab)
<i>B. melitensis</i>	bcp31 (B4/B5), omp2 (abortus-type)(JPR/JPF-ab), omp31 (1S/1AS)
<i>B. suis</i>	All: bcp31 (B4/B5), omp2 (abortus-type)(JPR/JPF-ab), omp2 (canis-type)(JPR/JPF-ca), omp31 (1S/1AS)
<i>B. canis</i>	bcp31 (B4/B5), omp2 (canis-type)(JPR/JPF-ca), omp31 (1S/1AS)

Work sheet for a combinatorial PCR for *Brucella* gene detection

Day1:

1. Profiles of Samples

#1-5 (A-E): Purified DNA samples from each test tubes were used as test samples.

#6: Purified DNA from *Brucella suis* strain 1330 was used as a positive control.

#7: D2W was used as a negative control.

Reaction tube #	1	2	3	4	5	6	7
(Samples)	A	B	C	D	E	PC (BS)	NC (D2W)
DNA conc. (ng/ul)	1.9	2.1	2.5	1.9	1.8	1.0	-

2. PCR

1) Preparation of puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (Start at 9:00)

(RTG PCR Beads : #27-9559-01 : GE Healthcare, 2~2.5unit puReTaq DNA polymerase, 10mM Tris-HCl pH9.0, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 200uM dNTP, BSA)

(1) Prepare 24 tubes of puRe Taq RTG PCR Beads

(2) Mark lids of tubes as b1~b7, a1~a7, c1~c7, o1~o7

2) Preparation of PCR reaction mixture

Prepare volume of each reaction mixture for 8 samples

b) For *bcs31* detection (B4 & B5)

Reagents	1 reaction	8 reaction
D2W	20.5 ul	164 ul
Forward primer: B4 (10uM)	1 ul (0.4uM)	8 ul
Reverse primer: B5 (10uM)	1 ul (0.4uM)	8 ul
Total	22.5 ul	180 ul

Mix reagents in 1.5ml microtube and spin down by a centrifuge

Then, add 22.5ul of reaction mixture to b1~b7 tubes of puRe Taq RTG Beads tubes

a) For *omp2* abortus-type detection (JPF & JPR-ab)

Reagents	1 reaction	8 reaction
D2W	20.5 ul	164 ul
Forward primer: JPF (10uM)	1 ul (0.4uM)	8 ul
Reverse primer: JPR-ab (10uM)	1 ul (0.4uM)	8 ul
Total	22.5 ul	180 ul

Mix reagents in 1.5ml microtube and spin down by a centrifuge

Then, add 22.5ul of reaction mixture to a1~a7 tubes of puRe Taq RTG Beads tubes

c) For *omp2* canis-type detection (JPF & JPR-ca)

Reagents	1 reaction	8 reaction
D2W	20.5 ul	164 ul
Forward primer: JPF (10uM)	1 ul (0.4uM)	8 ul
Reverse primer: JPR-ca (10uM)	1 ul (0.4uM)	8 ul
Total	22.5 ul	180 ul

Mix reagents in 1.5ml microtube and spin down by a centrifuge

Then, add 22.5ul of reaction mixture to c1~c7 tubes of puRe Taq RTG Beads tubes

o) For *omp31* detection (1S & 1AS)

Reagents	1 reaction	8 reaction
D2W	20.5 ul	164 ul

Forward primer: B4 (10uM)	1 ul (0.4uM)	8 ul
Reverse primer: B5 (10uM)	1 ul (0.4uM)	8 ul
Total	22.5 ul	180 ul

Mix reagents in 1.5ml microtube and spin down by a centrifuge

Then, add 22.5ul of reaction mixture to o1~o7 tubes of puRe Taq RTG Beads tubes

3) Enter samples to each tube

- (1) At first, add 2.5ul of Sample 7 (NC: D2W) to b7, a7, c7 and o7 tubes and close lids.
- (2) Then, add 2.5ul of Sample 1 (A) to b1, a1, c1 and o1 tubes and close lids.
Add 2.5ul of Sample 2 (B) to b2, a2, c2 and o2 tubes and close lids.
Add 2.5ul of Sample 3 (C) to b3, a3, c3 and o3 tubes and close lids.
Add 2.5ul of Sample 4 (D) to b4, a4, c4 and o4 tubes and close lids.
Add 2.5ul of Sample 5 (E) to b5, a5, c5 and o5 tubes and close lids.
- (3) Finally, add 2.5ul of Sample 6 (PC: BS) to b6, a6, c6 and o6 tubes and close lids.
- (4) Gently centrifuge each tube

4) PCR

Set tubes to the thermal cycler (ABI: GeneAmp PCR System 9700)

Programs: 95 C, 5 min

⇒ x 35 cycles (95 C, 1 min → 65 C, 1 min → 72 C, 1 min)

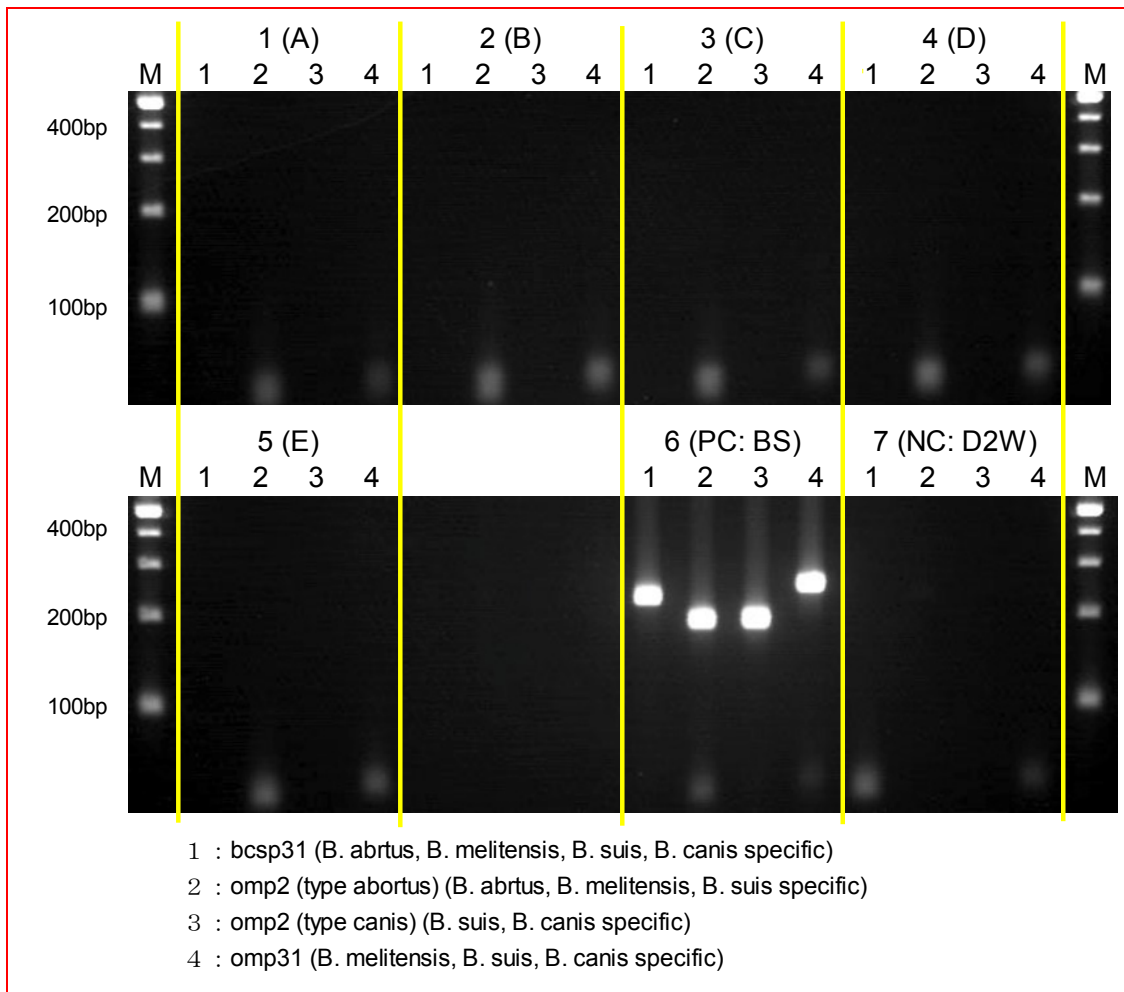
⇒ 72 C, 7 min ⇒ 4 C

Start at 9:30

and Stop PCR at 12:30

5) Electrophoresis

Start at 13:00 and Stop electrophoresis at 13:50



3. Results

Reaction tube #		Amplicons				Identified Brucella strains
		<i>bcsp31</i> (224bp)	<i>omp2-ab</i> (186bp)	<i>omp2-ca</i> (187bp)	<i>omp31</i> (249bp)	
1	A	–	–	–	–	Negative
2	B	–	–	–	–	Negative
3	C	–	–	–	–	Negative
4	D	–	–	–	–	Negative
5	E	–	–	–	–	Negative
6	PC (BS)	+	+	+	+	<i>B. suis</i>
7	NC (D2W)	–	–	–	–	Negative

4. Conclusion

Brucella-specific gene were not detected in any samples from each test tubes (A-E). Samples A-E did not include *Brucella* spp.

Preparation of reaction mixture (for 10 reactions)

10X Ex Taq Buffer	25 µl
dNTP Mixture (2.5 mM each)	20 µl
10 µM caf1-F	25 µl
10 µM caf1-R	25 µl
10 µM inv-F	25 µl
10 µM inv-R	25 µl
10 µM pla-F	25 µl
10 µM pla-R	25 µl
10 µM yopM-F	25 µl
10 µM yopM-R	25 µl
H ₂ O	172.5 µl
TaKaRa Ex Taq (5 units/µl)	2.5 µl

The reaction mixture was devied into 10 tubes (24 µl / tube, 0.2 ml PCR tube). One µl of the template DNA prepared above section was added into each tube.

PCR condition

94 °C, 5 min	} 30 cycles
94 °C, 30 sec	
55 °C, 30sec	
72 °C, 60 sec	

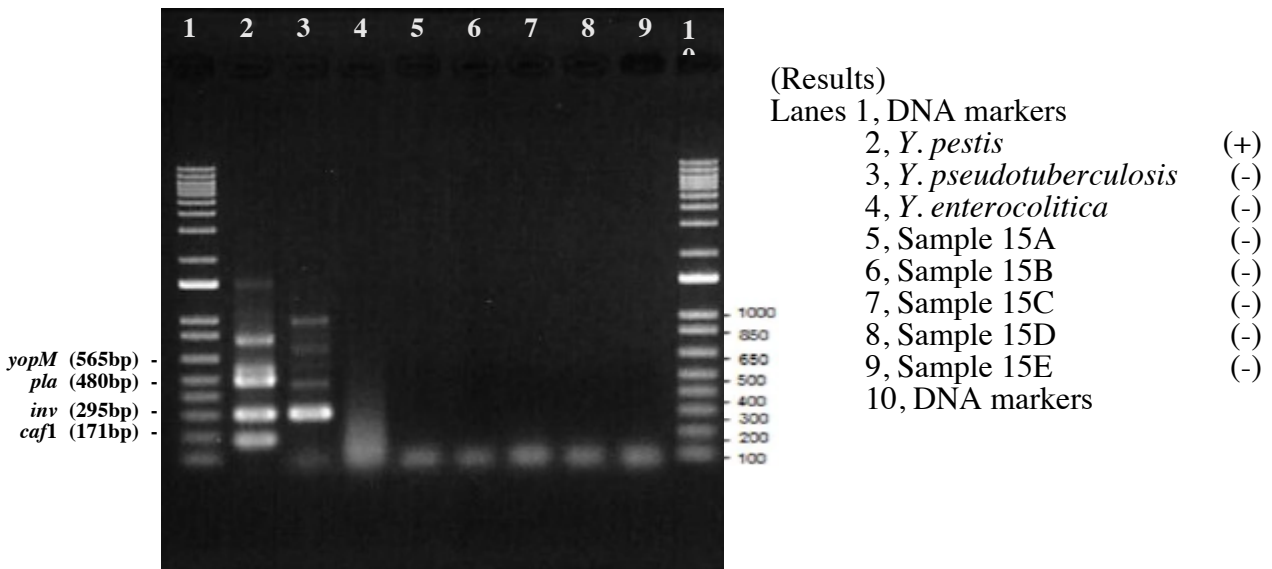
Electrophoresis

An aliquot (5 µl) was applied to 1.5 % agarose gel. Ethidium bromide was used to visualize DNA in agarose gels.

Interpretation

Four amplified products: 171 bp (*cafI*), 295 bp (*inv*), 480 bp (*pla*) and 565 bp (*yopM*) can be observed in case of *Y. pestis* while only one band of 295 bp (*inv*) is found with *Y. pseudotuberculosis*. No band is amplified with the samples of other bacteria such as *Y. enterocolitica*.

< Typical result of multiplex PCR for identification of *Y. pestis*>



資料 5

LAMP method 1

The LAMP method was performed according to the method described by Chantratita N. *et al.* (J Clin Microbiol. 2008; 46 (2): 568-73).

This method is briefly described below:

The LAMP reaction was performed using the Loopamp DNA amplification kit (Eiken Chemical Co., Ltd, Tokyo, Japan). The LAMP master mix contained 12.5 µl of 2X reaction mix, 5 pmol of each of the outer primers (F3, 5'-TCCTGCTCCCACACCG-3' and B3, 5'-GCTTGCGCGTCAT-3'), 40 pmol of each of the inner primers (FIP, 5'-CCACAGCAACGGAAAGAGCAGAGCTTGCGGCGGAGATC-3' and BIP, 5'-GCCTCGATTGCGCGATCGCCTGTTGCTAGCGGATTGTCA-3'), and 1 µl of *Bst* DNA polymerase.

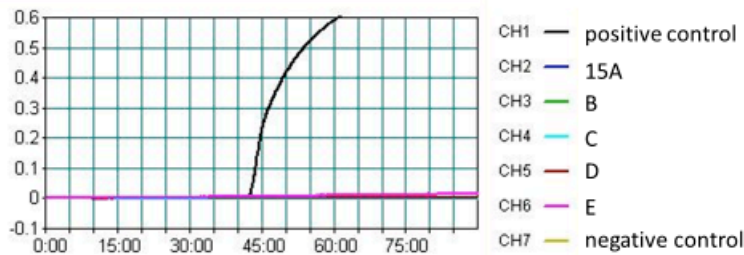
The DNA samples were heated at 95°C for 5 min, before being ice-cooled and used as a template. *Burkholderia pseudomallei* DNA was used for the positive control, and distilled water was used for the negative control. Samples of 5 µl were used for each treatment.

The reagents and primers for each sample were mixed. The total reaction volume was 25 µl; this volume was maintained by reducing the volume of sterile distilled water added.

The amplification was performed at 65°C for 90 min, followed by incubation at 95°C for 2 min to terminate the reaction. The LAMP reaction causes turbidity in the reaction mix that is proportional to the amount of amplified DNA. The degree of turbidity was measured using an LA-320C Realtime Turbidimeter (Eiken), and the results were plotted on a graph.

day2

LAMP method 1

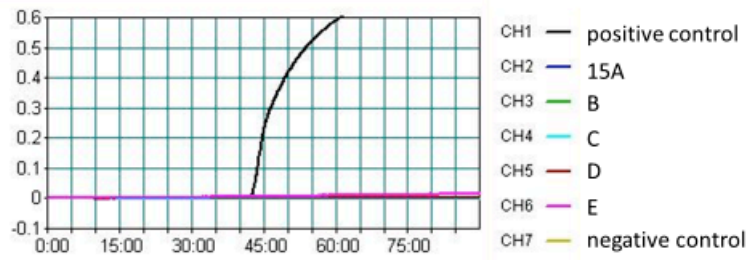


positive control; *B. pseudomallei* purified DNA
negative control; D.W.

J Clin Microbiol. 2008 Feb;46(2):568-73.
Chantratita N. et al.

day2

LAMP method 1

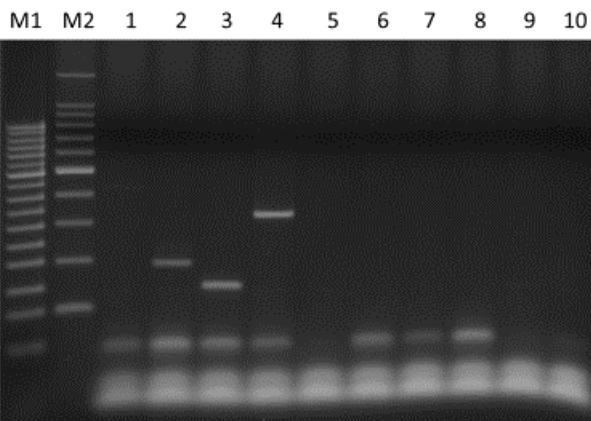


positive control; *B. pseudomallei* purified DNA
negative control; D.W.

J Clin Microbiol. 2008 Feb;46(2):568-73.
Chantratita N. et al.

Multiplex PCR

Day2-day4



1: *Burkholderia mallei* 6: B
2: *Burkholderia pseudomallei* 7: C
3: *Burkholderia thailandensis* 8: D
4: *Burkholderia cepacia* 9: E
5: 15A 10: negative control (D.W.)
M1: 50bp ladder M2: 100bp ladder

Journal of Clinical Microbiology, 2011. P814-821. Vol49, No.3, Ho et al.

資料 6

PCR for detecting *Francisella tularensis*

Amplify and detect the gene sequences specific to *Francisella* spp. (16S rRNA) and the gene sequences specific to *Francisella tularensis*, *Francisella novicida*, and *Francisella hispaniense* (*fopA* and *tuI4*) by conventional PCR. If all 3 genes were amplified from the samples, PCRs for further discriminating subspecies *tularensis* or *holarctica*, with a pair of primers that amplifies the ISFtu2 sequence and the RD1 sequence are required.

Primer pairs

16S rRNA-PCR Forsman M. et al. (1994)

Forward primer F5 (5' to 3') CCTTTTTgAgTTTCgCTCC
Reverse primer F11 (5' to 3') TACCAGTTggAAACgACTgT
Approximate size of amplicon 1,100 bp

fopA-PCR Higgins J. A. et al. (2000)

Forward primer MS1 (5' to 3') CAgCTACTACACAAAgCAgTgg
Reverse primer MA1 (5' to 3') CACCATTTACTgTATAgCACgC
Approximate size of amplicon 700 bp

tuI4-PCR Sjöstedt A. et al. (1997)

Forward primer TUL4-435 (5' to 3') gCTgTATCATCATTTAATAAACTgCTg
Reverse primer TUL4-863 (5' to 3') TTgggAAgCTTgTATCATggCACT
Approximate size of amplicon 400 bp

Program

[94°C, 5 min.] ⇒
[(94°C, 3 sec. → 58°C, 30 sec. → 72°C, 30 sec.) x 35 cycles] ⇒
[72°C, 7min.] ⇒
[4°C, ∞]

【Used reagents】

DW
puRe Taq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare)
Control DNA: *F. tularensis* subsp. *holarctica* NVF1 strain (1 ng/μl)

Prepare reaction mixture (on ice)

Contents	1 reaction	8 reactions
DW	20.5 μL	164 μL
10 μM Forward primer	1 μL	8 μL
10 μM Reverse primer	1 μL	8 μL
Total	22.5 μL	180 μL

Mix the above reagents in a 1.5 mL microtube and then, centrifuge.

Turn `ON` the thermal cycler (ABI GeneAmp PCR System 9700) and set the program.

Dispense 22.5 μL of the prepared reaction solution into the tubes of puRe Taq Ready-To-Go PCR Beads containing reagents

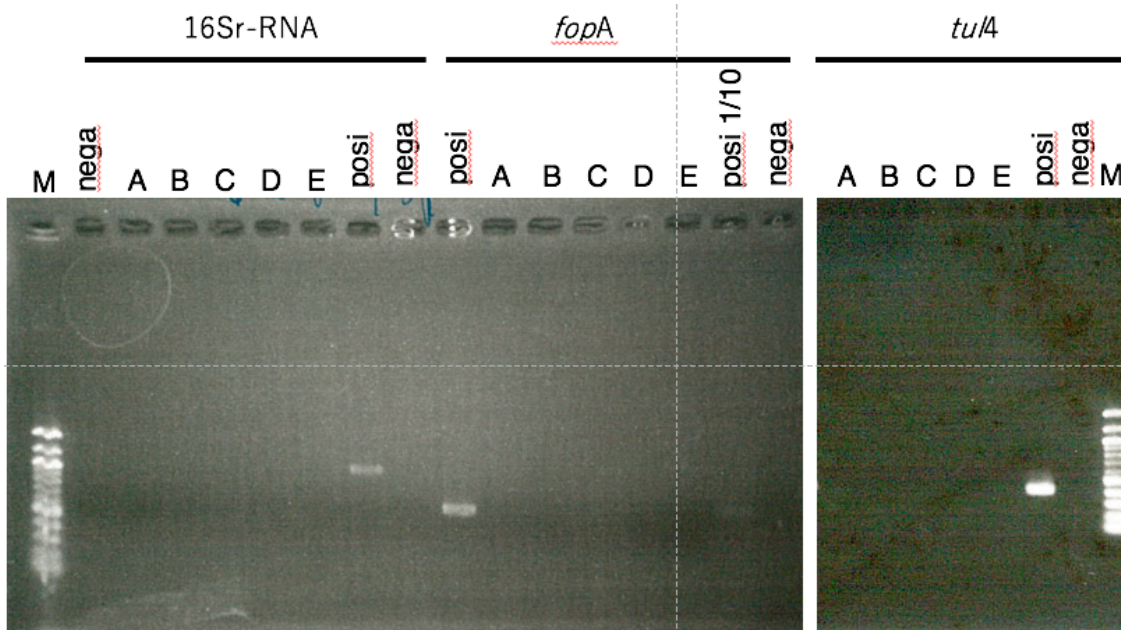
Add 2.5 μL each of the negative control, sample DNA, and positive control, and cap.

Set the PCR tube in the thermal cycler.

Start the program.

PCR products were electrophoresed in 1% agarose gel and were stained with ethidium bromide.

Results



M: 100 bp ladder marker

A, B, C, D, and E: Sample A, B, C, D, and E, respectively.

posi: *F. tularensis* DNA 1ng/ μ l, posi 1/10: *F. tularensis* DNA 0.1ng/ μ l

nega: D.W.

F. tularensis was not detected from all 5 samples, A, B, C, D, and E.

資料 7

Conventional PCR using WHO recommended primers for *Bacillus anthracis*

Day2

Primers

Target gene	Primer name	(5'-3')	Amplicon size
<i>cap</i> gene	CAP1234	CTGAGCCATTAATCGATATG	846 bp
	CAP1301	TCCCACTTACGTAATCTGAG	
<i>pag</i> gene	PA5	TCCTAACACTAACGAAGTCG	596 bp
	PA8	GAGGTAGAAGGATATACGGT	

PCR reaction solution

---TaKaRa ExTaq (TaKaRa, # RR001A)

Distilled Water	33μl
10 x Buffer (TaKaRa Ex Taq)	5.0μl
dNTPs (2.5 mM each)	4.0μl
sense primer (10 pM)	1.0μl
anti-sense primer (10 pM)	1.0μl
TaKaRa ExTaq DNA Polymerase (2.5U/μl)	1.0μl
template	5.0μl
	total 50.0μl

PCR reaction (GeneAmp PCR System 9700)

(a) denaturing : 95°C 5min

(b) 30 cycles

Denaturing: 95°C, 30 s

Annealing: 55°C, 30 s

Extension: 72°C, 30 s

(c) extension: 72°C 5 min

4 hold

Results



1.5% agarose gel electrophoresis

15A- 15E: Sample number

Neg.: Negative control (Distilled Water)

Pos.: Positive control for PCR (shortened size inserted plasmid DNA)

15B, 15C and 15E had positive PCR amplification.

pag gene 596 bp, positive control 322 bp. *cap* gene 846 bp, positive control 720 bp.

Day3-4

BLASTN of sequence of PCR amplicons.

100 % identity to *B. anthracis pag* gene

15B-pag, 15C-pag, 15E-pag amplicon

100 % identity to *B. anthracis cap* gene

15B-cap, 15C-cap, 15E-cap amplicon

Sample number	PCR amplification		Identified as <i>B. anthracis</i>
	<i>cap</i>	<i>pag</i>	
15A	–	–	negative
15B	+	+	positive
15C	+	+	positive
15D	–	–	negative
15E	+	+	positive

16S rRNA amplification

Day2

PCR for sequencing template preparation

16S rRNA primers

- | | | |
|----|----------------------------------|-------|
| 1. | 27f (8-27) -r2L (821-803) | 814bp |
| 2. | f2L (518-536) -1492r (1510-1492) | 993bp |

PCR sample preparation

DEPC-H ₂ O	17.5μL
NEBNext High-Fidelity 2X PCR Master Mix (NEB, #M0541S)	25uL (0.02U/μL, 0.2mM)
Primer Forward (10μM)	2.5μL (0.5μM)
Primer Reverse (10μM)	2.5μL (0.5μM)
Sample DNA (1 ng/μL≤)	2.5μL
Total volume 50μL	

PCR reaction (GeneAmp PCR System 9700)

- (a) denaturing: 98°C 30sec
- (b) 30 cycles
 - denaturing: 98°C, 10s
 - annealing: 62°C, 30s
 - extension: 72°C, 30s
- (c) extension: 72°C, 5min
4 min hold

Results



1.5% agarose gel electrophoresis
15A- 15E: Sample number
15A, 15B, 15C and 15E had positive PCR amplification (both genes) of expected sizes.

Day3-4

BLASTN of sequence of PCR amplicons.

15A-r2L

100 % identity to *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. toyonensis* 16S rRNA gene (36-725bp)

15B-r2L

100% identity to *B. anthracis*, *B. cereus* 16S rRNA gene (11-749bp)

15C

could not identify because of low qualities of sequences

15E-r2L

100% identity to *B. anthracis*, *B. cereus* 16S rRNA gene (24-750bp)

Sample number	PCR amplification		BLASTN results
	27f-r2L	f2L-1492r	
15A	+	+	<i>B. cereus</i> , <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. toyonensis</i>
15B	+	+	<i>B. anthracis</i> , <i>B. cereus</i>
15C	+	+	could not identify
15D	-	-	-
15E	+	+	<i>B. anthracis</i> , <i>B. cereus</i>

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、日本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。m8は高度に弱毒化されている。一方で免疫原性が維持されているという特徴から、外来遺伝子を導入した組換えワクチンとしての利用が期待されている。前年度までに私たちは m8 の全ゲノムを組み込んだ人工細菌染色体(bacterial artificial chromosome; BAC), pLC16m8.8S-BACを作製し、ここから感染性を持つm8をリカバリーさせるシステム(m8-BAC システム)を確立している。本研究は、1. m8-BAC システムで用いられている既存の組換え法を改良し、任意の領域に外来遺伝子を迅速かつ簡便に導入するシステムを確立する。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、m8を皮下、筋肉内、皮内、静脈内接種してルート毎の抗体誘導の速度と抗体価の違いを比較した。結果として 1. 迅速かつ簡便に外来遺伝子を導入するシステムを確立した。2. 抗体誘導が確認できるまでの時間と交代かは接種ルートごとに異なることが明らかとなった。

A. 研究目的

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)は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シ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。既に私たちはm8を細菌人工染色体(Bacterial Artificial Chromosome; BAC)にクローニングしており、このBACプラスミドから感染性を持つm8を容易にリカバリーするm8-BACシステムを確立している。m8-BACシステムはBACプラスミド、pLC16m8.8S-BACにRed/ET相同組換え法(組換え酵素Red/ET遺伝子及び制限酵素I-SceI遺伝子を保持する大腸菌GS1783株を用いる)を用いて外来遺伝子の導入が可能である。本研究は既存の組換え法を改良し、任意の領域に外来遺伝子を迅速かつ簡便に導入するシステムの確立を目指すことを目的とした。

天然痘の根絶が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。日本では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。既にマウスにエクトロメリアウイルスを感染させた直後にm8を皮下、筋肉内、皮内、静脈内接種した場合、ルートによってマウスの生存率の改善は大きく異なる事が明らかとなっている。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は免疫の誘導速度や強さに違いがあるのではないかと考え、マウスに様々なルートでm8投与し血中の中和抗体価の誘導速度と強さを比較した。

B. 研究方法

1. 前年度までに作製した組換え用の遺伝子断片を作製するためのプラスミド 3 種類 (pUC-Kan-S-EGFP, pUC-Zeo-mKO2, pCR-Amp-mApple) にそれぞれラッサウイルスのマトリックス(Z) 遺伝子, エンベロープ糖蛋白質(GPC) 遺伝子, 核タンパク質(NP) 遺伝子を導入し, ここから PCR により遺伝子断片を作製, Red/ET 法により, BAC プラスミド pLC16m8.8S-BAC に各遺伝子断片を導入した. 次に, 作製した BAC プラスミドから蛍光遺伝子と薬剤耐性遺伝子を取り除き, 組込まれた遺伝子はラッサウイルスの遺伝子のみとなるようにした. そして, これらの BAC プラスミドから感染性を持つ組換え m8 のリカバリーを試みた.
2. C57BL/6 マウスに 1×10^7 PFU の m8 を皮下 (s.c.), 筋肉内 (i.m.), 皮内 (i.d.), 静脈内 (i.v.) 接種した. その後 2 日目から経時的に血液を採取し, 血中に含まれる m8 に特異的な中和抗体を m8 のプラーク減少法により決定した.

【倫理面への配慮】

該当しない.

C. 研究結果

1. 図 1 に組換えの概略を示す. Z, GPC, NP の発現カセットが導入された組換え pLC16m8.8S-BAC の作製を行ったところ, GPC と NP の導入が成功した Z についてはカセットの導入が成功しなかった. 次に作製した BAC プラスミド, pLC16m8.8S-Lassa_GPC と pLC16m8.8S-Lassa_NP を用いて感染性を持つ組換え m8 のレスキューを試み, これに成功したこれらの組換え m8, vLc16m8.8S-Lassa_GPC と-Lassa_NP の遺伝子の発現を NP, または GP に対する特異抗体を用いて蛍光抗体法で確認した. どちらについても遺伝子産物の発現が確認された(図 2).
2. マウスに異なるルートで m8 を接種し, その二日後から経時的に採血し, 血中に含まれる m8 に特異的な中和抗体価を測定した. 図 3 に接種ルート毎の中和抗体価の違いを示す. m8 を皮下に接種した場合, 血中の中和抗体が確認されるのは接種から 4 日後で, その後抗体価が上昇することはなかった. 一方で静脈内接種の場合は, 接種 2 日後から抗体の誘導が確認されただけでなく, 4 日後には 2 の 10 乗以上の強い抗体価の誘導が確認された. 皮内, 筋肉内接種について

は皮下接種, 静脈内接種の中間程度の抗体価の誘導が確認された.

D. 考察

迅速かつ簡便な BAC プラスミドの組換え法に必要なのは, BAC プラスミドへの遺伝子導入が成功したこと, その後, 薬剤耐性遺伝子を除去して目的の外来遺伝子のみが BAC プラスミドに保持されたことが容易に確認できる方法である. 本研究では, 薬剤耐性遺伝子と共に蛍光タンパク質遺伝子を利用したこれにより組換えが成功した. 大腸菌コロニーは LED トランスイルミネーター上で蛍光を発する更に薬剤耐性遺伝子除去の際には同時に蛍光タンパク質遺伝子も除去されるように設計してあるため, 今度は LED トランスイルミネーター上で蛍光を発しないコロニーを選択すれば目的の遺伝子のみが導入された組換え BAC プラスミドを取得できる. 本研究ではラッサウイルス GPC と NP 遺伝子を保持する組換え m8 を迅速かつ簡便に樹立することが出来た. 一方で Z 遺伝子を保持する組換え m8 については現時点で樹立することが出来ていない. これは Z 遺伝子を導入するために選んだ m8 ゲノムの位置が何らかの理由で適していない可能性がある. 今後は導入する位置を変えて行う予定である.

前年度までにマウスに致死感染をおこすエクトロメリアウイルスの暴露直後に, m8 を皮下, 筋肉内, 皮内, 静脈内接種すると, 静脈内接種で, マウスの生存率の改善が最も著しく, 続いて皮内と筋肉内が同程度, 最も改善効果が低いのは皮下であることが判明していた. これはエクトロメリアウイルス感染を排除するための免疫を獲得する速さと, 強さが m8 の接種ルート毎に異なるのではないかと考察していた. 今回の中和抗体の誘導速度と, 強さが接種ルート毎に異なるという結果はこの考察をサポートする結果となった.

E. 結論

本研究により m8-BAC システムを利用して任意の領域に外来遺伝子を迅速かつ簡便に導入し, 組換え m8 を作製するシステムを確立した. m8 の投与ルートの違いは誘導される中和抗体の速度と強さに大きく影響を与えることが明らかとなった.

F. 健康危険情報

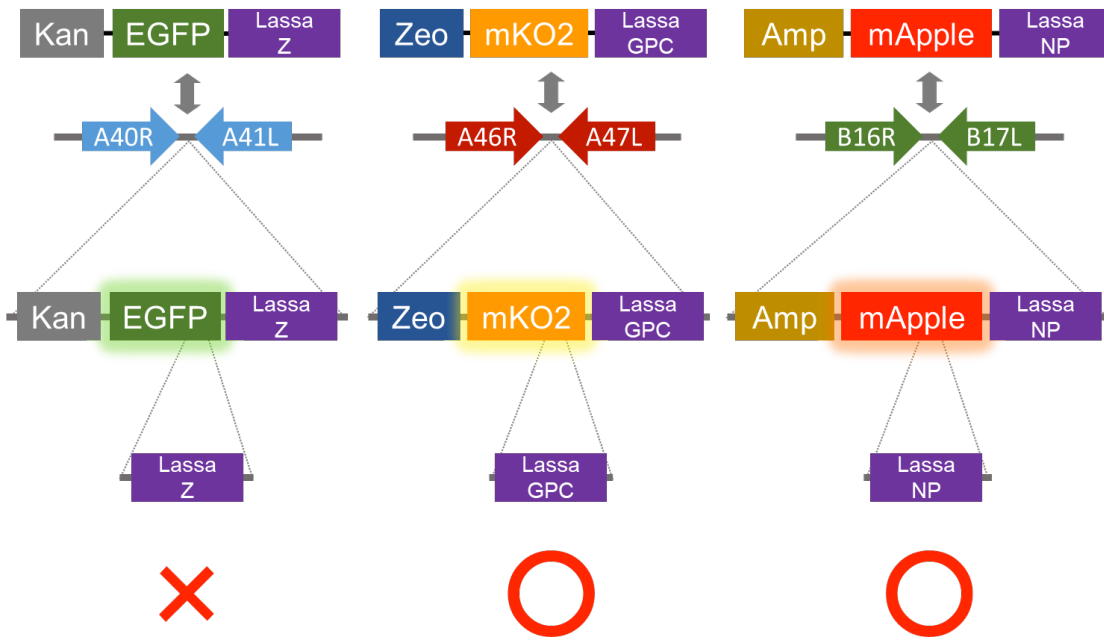
特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 吉河智城. サル痘ウイルス感染症およびその他のオルソポックスウイルス感染症. グローバル時代のウイルス感染症, 日本医事新報社, 東京, p177-181, 2019
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

図表



The improved system works well so far except for Lassa Z

図 1 組換え m8 作製の概略

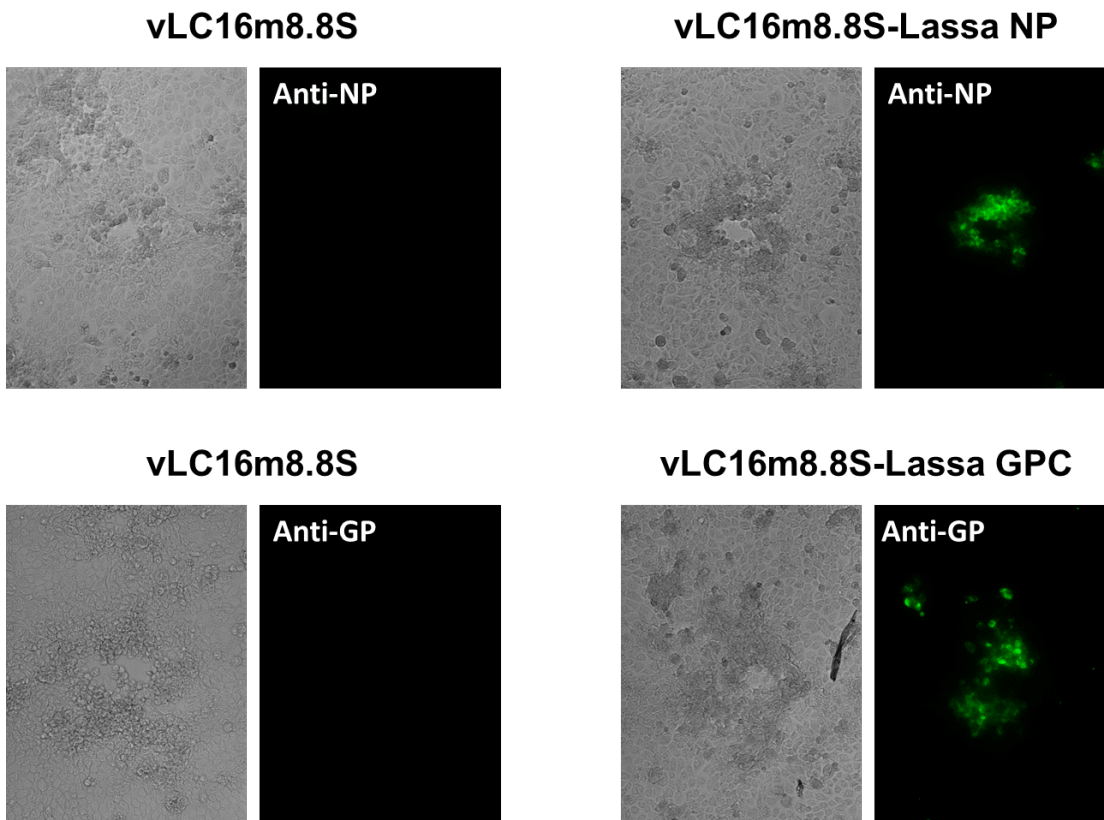


図 2 ラッサウイルス遺伝子を発現する組換え m8 の確認

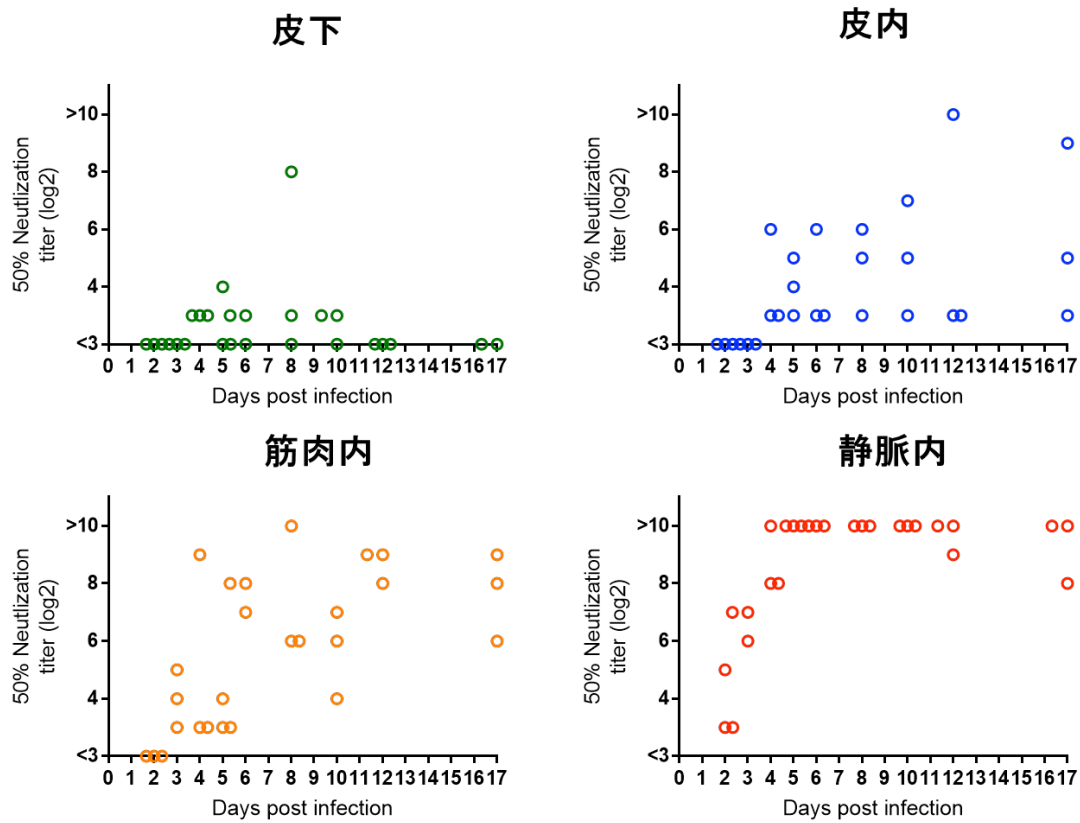


図3 接種ルート毎の中和抗体価の違い

Ⅲ 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
齋藤智也	天然痘の根絶と現在の課題	西條政幸	グローバル時代のウイルス感染症	日本医事新報社	東京	2019	p220-224
西條政幸	世界における新興・再興ウイルス感染症の流行状況	西條政幸	グローバル時代のウイルス感染症	日本医事新報社	東京	2019	p2-7
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	西條政幸	グローバル時代のウイルス感染症	日本医事新報社	東京	2019	p8-14
西條政幸	日本における新興・再興ウイルス感染症の検査体制	西條政幸	グローバル時代のウイルス感染症	日本医事新報社	東京	2019	p42-46
藤間大貴, 西條政幸	黄熱	西條政幸	グローバル時代のウイルス感染症	日本医事新報社	東京	2019	p95-100
西條政幸	クリミア・コンゴ出血熱	西條政幸	グローバル時代のウイルス感染症	日本医事新報社	東京	2019	p133-137
西條政幸	エボラウイルス病	西條政幸	グローバル時代のウイルス感染症	日本医事新報社	東京	2019	p138-143
江川和孝, 西條政幸	アジアにおけるオルソレオウイルス感染症	西條政幸	グローバル時代のウイルス感染症	日本医事新報社	東京	2019	p182-187
下島昌幸	世界における節足動物媒介性ウイルス感染症(ブニヤウイルス)感染症の流	西條政幸	グローバル時代のウイルス感染症	日本医事新報社	東京	2019	p21-24
吉河智城	サル痘ウイルス感染症およびその他のオルソポックスウイルス感染症	西條政幸	グローバル時代のウイルス感染症	日本医事新報社	東京	2019	p177-181
谷英樹, 西條政幸	新興ウイルス感染症における抗ウイルス薬: ファビピラビル	西條政幸	グローバル時代のウイルス感染症	日本医事新報社	東京	2019	p248-253

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
齋藤智也	東京2020の生物テロ対策を考える.	公衆衛生	84	318-322	2020
西條政幸, 安田二郎, 平山謙二	BSL-4施設の重要性と世界への貢献.	最新医学	74	453-463	2019
西條政幸	SFTS, クリミア・コンゴ出血熱.	最新医学	74	483-489	2019
西條政幸	VI章. 大規模イベントと医療体制 -サーベイランスの強化-	日本医師会雑誌	149・特別号(1)	244-245	2020
Eto K, Fujita M, Nishiyama Y, Saito T, Molina D, Morikawa S, Saijo M, Shinmura Y, Kanatani Y.	Profiling of the antibody response to attenuated LC16m8 smallpox vaccine using protein array analysis.	Vaccine	37	6588-6593	2019
Iwata-Yoshikawa N, Okamura T, Shimizu Y, Hasegawa H, Takeda M, Nagata N.	TMPRSS2 Contributes to Virus Spread and Immunopathology in the Airways of Murine Models after Coronavirus Infection.	J Virol	93(6)	01815-18	2019
Iwata-Yoshikawa N, Okamura T, Shimizu Y, Kotani O, Sato H, Sekimukai H, Fukushima S, Suzuki T, Sato Y, Takeda M, Tashiro M, Hasegawa H, Nagata N.	Acute Respiratory Infection in Human Dipeptidyl Peptidase 4-Transgenic Mice Infected with Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus.	J Virol	93(6)	01818-18	2019
Matsuyama S, Nao N, Shirato K, Kawase M, Saito S, Takayama I, Nagata N, Sekizuka T, Katoh H, Kato F, Sakata M, Tahara M, Kutsuna S, Ohmagari N, Kuroda M, Suzuki T, Kageyama T, Takeda M.	Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells.	Proc Natl Acad Sci U S A.	117(13)	7001-7003	2020

Sekimukai H, Iwata-Yoshikawa N, Fukushi S, Tani H, Kataoka M, Suzuki T, Hasegawa H, Niikura K, Arai K, Nagata N.	Gold nanoparticle-adjuvanted S protein induces a strong antigen-specific IgG response against severe acute respiratory syndrome-related coronavirus infection, but fails to induce protective antibodies and limit	Microbiol Immunol.	64(1)	33-51	2020
Suzuki T, Sato Y, Sano K, Arashiro T, Katano H, Nakajima N, Shimojima M, Kataoka M, Takahashi K, Wada Y, Morikawa S, Fukushi S, Yoshikawa T, Saijo M, Hasegawa H.	Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus targets B cells in lethal human infections.	J Clin Invest.		pii: 129171	2020
Tani H, Kawachi K, Kimura M, Taniguchi S, Shimojima M, Fukushi S, Igarashi M, Morikawa S, Saijo M.	Identification of the amino acid residue important for fusion of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus glycoprotein.	Virology.	535	102-110	2019
Park ES, Shimojima M, Nagata N, Ami Y, Yoshikawa T, Iwata-Yoshikawa N, Fukushi S, Watanabe S, Kurosu T, Kataoka M, Okutani A, Kimura M, Imaoka K, Hanaki K, Suzuki T, Hasegawa H, Saijo M, Maeda K, Morikawa S.	Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Phlebovirus causes lethal viral hemorrhagic fever in cats.	Sci Rep.	9(1)	11990	2019
Shiota T, Li TC, Nishimura Y, Yoshizaki S, Sugiyama R, Shimojima M, Saijo M, Shimizu H, Suzuki R, Wakita T, Muramatsu M, Ishii K.	Integrin $\alpha 3$ is involved in non-enveloped hepatitis E virus infection.	Virology.	536	119-124	2019
Kanai Y, Kawagishi T, Sakai Y, Nouda R, Shimojima M, Saijo M, Matsuura Y, Kobayashi T.	Cell-cell fusion induced by reovirus FAST proteins enhances replication and pathogenicity of non-enveloped dsRNA viruses.	PLoS Pathog.	15(4)	e1007675.	2019

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 脇田 隆字



次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業
- 2. 研究課題名 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
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) ウイルス第一部・部長
(氏名・フリガナ) 西條 政幸 ・ サイジョウ マサユキ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

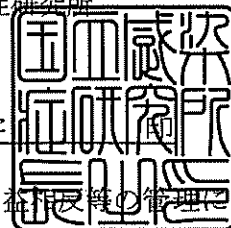
当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 脇田 隆字



次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業
- 2. 研究課題名 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)
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) ウイルス第一部・室長
(氏名・フリガナ) 下島昌幸・シモジママサユキ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項) _____

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

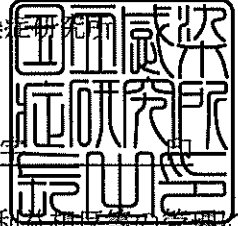
6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所
 所属研究機関長 職名 所長
 氏名 脇田 隆守



次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業
2. 研究課題名 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）
3. 研究者名（所属部局・職名） 感染病理部 室長
 （氏名・フリガナ） 永田典代 ナガタノリヨ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（※3）	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査の場合は、その理由を記載すること。

（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

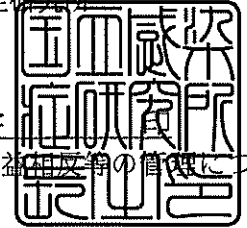
当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

（留意事項） ・該当する□にチェックを入れること。

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 脇田 隆字



次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業

2. 研究課題名 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

3. 研究者名 ウイルス第一部・主任研究官
吉河 智城・ヨシカワ トモキ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立感染症研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

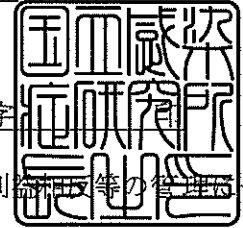
当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する口にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 脇田 隆宇



次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業
- 2. 研究課題名 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
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 獣医科学部 ・ 部長
(氏名・フリガナ) 前田 健 ・ マエダ ケン

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

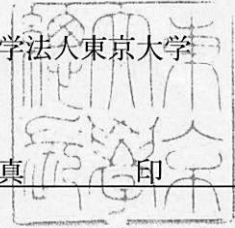
厚生労働大臣

殿

機関名 国立大学法人東京大学

所属研究機関長 職名 総長

氏名 五神 真



次の職員の令和元年度厚生労働行政推進調査事業費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業
2. 研究課題名 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
3. 研究者名 (所属部局・職名) 医科学研究所・助教
(氏名・フリガナ) 安達 英輔・アダチ エイスケ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和2年3月23日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立保健医療科学院

所属研究機関長 職名 院長

氏名 福島 靖正 印



次の職員の令和元年度厚生労働行政推進調査事業費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業
2. 研究課題名 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
3. 研究者名 (所属部局・職名) 健康危機管理研究部・部長
(氏名・フリガナ) 齋藤 智也・サイトウ トモヤ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 KMバイオロジクス株式会社

所属研究機関長 職名 代表取締役社長

氏名 永里 敏秋



次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業
- 2. 研究課題名 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
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 研究開発本部 製品開発部・部長
(氏名・フリガナ) 園田 憲悟・ソノダ ケンゴ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	KMバイオロジクス株式会社	<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。