

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

我が国で開発され、備蓄されている細胞培養  
痘そうワクチンの有効性、安全性、生産性向上および  
国内外のバイオテロ対策のあり方に関する研究  
(H29-新興行政-指定-002)

平成29年度～令和元年度 総合研究報告書

研究代表者 西條 政幸  
(国立感染症研究所)

令和 2(2020)年 4 月

## 目 次

### I. 総合研究報告

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

### II. 分担研究報告

1. 研究統括, バイオテロ対策における国際連携のあり方の検討	16
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	22
鯉淵 智彦(H29~H30年度)	
安達 英輔(R01年度)	
3. 天然痘バイオテロ対応に関する公衆衛生対応の検討	26
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	30
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	46
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	50
永田典代	
7. 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの特性解析(遺伝子機能解析), 品質試験法に関する研究	56
森川 茂(H29-30年度)	
前田 健(R01年度)	
8. 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	63
前田 健(R01年度)	
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	83
吉河智城	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	94
---------------------	----

平成 29 年度～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

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。

世界保健機関(WHO)が主催する痘瘡ウイルス研究専門会議(Advisory Committee of Variola Virus Research Committee, ACVVR)において痘瘡ウイルスが用いられるバイオテロに関連する議論がなされている。第三世代痘瘡ワクチンの MVA が、また、抗ウイルス薬として、米国では抗ウイルス薬 TPOXX<sup>®</sup> [Arestvyr<sup>®</sup> (ST-246)]の備蓄が開始されることが決定された。化学物質から馬ポックスウイルスを合成する研究が実施され、それが痘瘡ウイルス合成に繋がる懸念についても議論された。LC16m8 ワクチン接種による痘瘡ウイルスに対する中和抗体誘導が認められることが報告された。

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。

LC16m8 の長期保存安定性成績(製剤:10年間、原薬:5年間)により、LC16m8 の高い保存安定性を確認した。また、LC16m8 を1回接種された成人初回接種者について調査した結果、痘瘡ワクチン LC16m8 は、米国で承認、備蓄されている第1世代の痘瘡ワクチンである 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。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。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。

サル痘ウイルスや牛痘ウイルスのヒトにおける感染症が増加している。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。2017、2018年度のアップデートは計5種の病態(野兔病、炭疽、ブルセラ症、デング熱、チクングニア熱)に関して行った。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

鯉淵 智彦 (H29~H30 年度) 東京大学医科学研究所附属病院感染免疫内科・講師

安達 英輔 (R01 年度) 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・上席主任研究官(H29-H30 年度), 同部長(R01 年度)

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

森川 茂(H29-30 年度) 国立感染症研究所・獣医科学部・部長

前田 健(R01 年度) 国立感染症研究所・獣医科学部・部長

吉河 智城 国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官

## A. 研究目的

日本では 2020 年に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。

具体的には, 以下の研究を行う。

- ① バイオテロ対策の国際的な動向を WHO や GHSI(世界健康安全保障イニシアチブ)の活動を等して調査し, 日本国内での対策のあり方と検討する。
- ② 国家備蓄されている LC16m8 の有効性, 安全性, その科学的基盤, 製造における効率性, 安定性, 等の研究を深める。特に製造から備蓄年数による品質変化の推移について評価する。
- ③ 細胞培養痘瘡ワクチン LC16m8 を痘瘡ウイルス暴露後の発症, 重症化予防ワクチンとして使用した際の効果を検証する。また, LC16m8 の組み換えウイルス作製上有用な BAC システムを開発・改良する。
- ④ LC16m8 は, 継代により B5R 遺伝子の機能復帰変異による MSP(MSP は弱毒化効果が低下していると考えられる)が出現するため, 製造管理が重要である。継代培養(製造工程に模して実施)により出現する MSP 出現推移と変異パターンに違いを検証する。品質管理に重要な情報

が得られる。

- ⑤ 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。
- ⑥ バイオテロ(主に天然痘テロ)対応に関する公衆衛生対応の検討を行う。ワクチン含む医薬品のみならず, 搬送・診断・治療・除染等公衆衛生対応の技術的検討を行う。
- ⑦ バイオテロ対策は急務であるが関連情報を簡便に得られる手段は限られている。啓発活動ならびに非常時にも利用できる手段として, ホームページ(HP)の充実などバイオテロ対策支援方法を開発する。
- ⑧ 痘瘡ウイルス等, ウイルス性出血熱および致死率の高い新興ウイルス感染症を網羅的に, かつ, 迅速に検出するための遺伝子検出法を開発する。

## B. 研究方法

- 1) 研究統括, バイオテロ対策における国際連携のあり方の検討  
本研究班の全体的研究の推進を統括した。痘瘡ウイルスが用いられるバイオテロに関連する議論がなされている。世界保健機関(WHO)が主催する痘瘡ウイルス研究専門会議(Advisory Committee of Variola Virus Research Committee, ACVVR)における最近の議論の中で, 治療法開発研究, ワクチンに関する議論, そして, 2016 年に発表された馬痘ウイルスの人工合成の成功に関する議論について, 概要をまとめ, 今後のバイオテロ対策のあり方を考察した。サル痘ウイルスや牛痘ウイルスのヒトにおける感染症が増加している。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。これらの感染症の流行状況について調査した。
- 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  
バイオテロ対応策の強化・充実が望まれるバイオテロに関して, 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。
- 3) 天然痘バイオテロ対応に関する公衆衛生対応の検討  
天然痘バイオテロを中心としたバイオテロ対応に関する公衆衛生対応の検討を行った。特に, 生物テロ対策の国際動向について, および, 天然痘治療薬やワクチンの開発, 国際的共有について検討を行った。
- 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

文献 (Maksyutov et al., J Virol Methods, 2016) に基づき構築した、痘瘡ウイルス、サル痘ウイルス、水痘帯状疱疹ウイルスを同時に且つ迅速に区別して検出するマルチプレックスリアルタイム PCR 法を構築した、バイオテロ対策の 1 つである実験室診断を安全に行なうため、ニパウイルスを想定し、検体処理条件を明らかにした、感染性のあるエボラウイルス、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。

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。委員であり、かつ、本研究班の研究代表者の依頼に基づき、細菌第一部、細菌第二部、獣医科学部の三つの部で対応した。

- 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

LC16m8 の長期保存安定性成績(製剤:10 年間、原薬:5 年間)により、LC16m8 の高い保存安定性を評価した。

- 6) 細胞培養弱毒生痘瘡ワクチンの安全性評価における病理学的研究

サル痘ウイルスがマウスに不顕性感染することを利用し、好中球枯渇マウスにおける重症化機序を明らかにするための動物モデル開発に関する研究を実施した。

- 7) 細胞培養弱毒生痘瘡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 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ズ(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進めた。

- 8) 細胞培養弱毒生痘瘡ワクチンの有効性及び安全性評価に関する研究

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、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の確立を試みた。LC16m8 を用いた痘瘡ウイルス暴露後重症化阻止の可能性を検討するため、痘瘡ウイルスの代わりに、エクト

ロメリアウイルス (ECTV) を用いてマウスを攻撃し、その直後に m8 を皮下、筋肉内、皮内、静脈内接種してルート毎の効果及び免疫誘導能の違いを検討した。

### C. 研究結果

- 1) 研究統括、バイオテロ対策における国際連携のあり方の検討

WHO-ACVVR が認めているバイオテロ対策に通じる研究は、

- ① US CDC で実施されている humanized mice を用いた痘瘡ウイルス感染動物モデル開発である。現時点では、痘瘡ウイルス感染動物モデルは霊長類を用いることにより痘瘡類似症状を発症させるものしかなく、かつ、それにはかなり高い感染価のウイルスを静注投与することが必要である。

- ② 抗ウイルス薬に関する研究は、VECTOR および US CDC で実施されている。US CDC ではワクシニアウイルスの感染性を阻害する単クローン抗体を用いた治療薬開発が実施されている。

- ③ 痘瘡に対する治療薬開発には、他のオルソポックスウイルス感染動物モデルを用いて研究がなされている。特に本 ACVVR において報告されている抗ウイルス薬は、TPOXX<sup>TM</sup>/Arestyvr<sup>TM</sup> (ST-246, SIGA Technology 社) と Brincidofovir (CMX001, Chimerix 社) の 2 剤である。

- ④ TPOXX<sup>TM</sup>/Arestyvr<sup>TM</sup> はオルソポックスウイルスに特異的な抗ウイルス薬であり、動物感染モデルでその有効性が評価されている。ヒトにおける臨床研究も進められている。尚、Brincidofovir は多くの DNA ウイルスの増殖を抑制する抗ウイルス薬(シドフォビル, Cidofovir の経口投与薬)である。米国では痘瘡ウイルスが用いられたバイオテロに備えて、抗ウイルス薬 TPOXX<sup>®</sup> [Arestyvr<sup>®</sup> (ST-246)] の備蓄が開始されることが明らかにされた。

- ⑤ ACVVR において議論されている痘瘡ワクチンは MVA と日本で生産・備蓄されている LC16m8 である。LC16m8 については、本研究班の活動の一環として、LC16m8 接種者において誘導される抗体が感染性のある痘瘡ウイルスに中和活性を有するか否かに関する研究成果についても報告されている。尚、この研究は本研究班と US CDC との共同研究 (ACVVR からの承認の基に) 実施されている。

2017 年第 19 回 ACVVR では、LC16m8 の製造メーカーである KM バイオロジクス (KMB) からの出席がなかった。しかし、本研究班と米国 CDC との間で実施されている共同研究成績について米国 CDC の責任者 (Olson V 博士) から

発表された。LC16m8 をヒトに接種することで、痘瘡ウイルスに対する中和抗体が誘導されること、その効果は ACAM2000 による誘導力と同等であることが報告された。LC16m8 と同様に第三世代のワクチン MVA (MVA-BN<sup>®</sup> (IMVANEX<sup>®</sup>/ IMVAMUNE<sup>®</sup>)) が欧州 (EC)、カナダ、米国に認可備蓄されることになった。痘瘡は世界中から根絶されており、その感染性のある痘瘡ウイルスを地球上からなくする (滅菌廃棄する) ことが WHA (World Health Assembly) で決定されているが、現在でも米国 CDC およびロシア VECTOR において保管されている。抗ウイルス薬開発や痘瘡対策のためには、委員の間でも意見がわかれているものの、その破壊は時期尚早という意見がまとめられた。

GHSAG-LN 会議のフレームの中で、関係国感染症研究機関 (日本は国立感染症研究所) 間でオルソポックスウイルス感染症の診断 (遺伝子検査) の能力外部評価が実施され、その活動に参加した。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

2017、2018 年度のアップデートは計 5 種の病態 (野兔病、炭疽、ブルセラ症、デング熱、チクングニア熱) に関して行った。ホームページの月間平均アクセス数は昨年度比で約 2 倍に増加した。啓発活動としては、日本感染症学会・化学療法学会合同の東日本地方学術集会 (東京) にてシンポジウム「感染症の危機管理・バイオテロ対策」を開催した。4 名の演者の講演後には参加者とのディスカッションを行い、問題点を共有し、今後の対策強化策の在り方について議論した。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。

## 3) 天然痘バイオテロ対応に関する公衆衛生対応の検討

初年度は、生物テロ対策の国際動向について英国および韓国の会議に出席し情報収集を実施し、また、天然痘治療薬の開発状況について資料収集および関係者の聞き取りを実施した。2 年目は、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。3 年目は、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認識され、強化に結びつくことが期待される。

## 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

アフリカ (中央部、西部) においてサル痘ウイルス感染症流行が増加している。2017 年にはこれまで流行報告のなかったナイジェリア、カメルーンでサル痘ウイルス感染症流行が発生し、死亡例も報告された。US CDC により詳細な調査研究がなされ、比較的病原性が低いとされる西アフリカ型サル痘ウイルスによるとの情報をえた。また、欧州 (特にドイツ) で牛痘ウイルスによるひとの感染事例の報告が増加している。痘瘡ウイルス関連オルソポックスウイルス感染症対策を強化することが必要になると考えられる。

文献 (Maksyutov et al., J Virol Methods, 2016) に基づき構築された痘瘡ウイルス、サル痘ウイルス、水痘带状疱疹ウイルスを同時に且つ迅速に区別して検出するマルチプレックスリアルタイム PCR 法の各ウイルス遺伝子検出感度は  $10^1$ - $10^0$  コピー/反応であった。ニパウイルスを想定し、検体処理条件を明らかにした。ウイルスを添加したヒト血清を熱処理あるいは紫外線処理のみではウイルスの不活化は十分ではなかったが、併用により完全なウイルスの不活化が得られた。感染性のあるエボラウイルス等を用いた検査法の改良・開発作業が開始された。

GHSAG-LN 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) への参加が提案され、国立感染症研究所細菌第一部、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。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パネルでの検査に対応し、その結果をEQA責任施設 National Microbiology Laboratory of Canada に報告した。

- 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

LC16m8の長期保存安定性成績(製剤:10年間、原薬:5年間)により、LC16m8の高い保存安定性が確認された。

- 6) 細胞培養弱毒生痘瘡ワクチンの安全性評価における病理学的研究

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。本モデルにおける免疫反応を経時的に明らかにした。一時的な好中球の枯渇処理は、感染後の好中球増多、炎症性サイトカイン・ケモカインの高発現を引き起こした。そこで、肝組織におけるクッパ細胞の活性化に着眼し、ウイルス感染の影響の評価を試みた。その結果、好中球枯渇群において有意な肝クッパ細胞の活性化が示された。さらに、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) 細胞培養弱毒生痘瘡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

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。

- 8) 細胞培養弱毒生痘瘡ワクチンの有効性及び安全性評価に関する研究

痘瘡ワクチンLC16m8を1回接種された成人初回接種者について調査した結果、痘瘡ワクチンLC16m8は、米国で承認、備蓄されている第1世代の痘瘡ワクチンである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確認された。

マウスにマウスポックスウイルス(エクトロメリア

ウイルス)を感染させるモデルで、LC16m8の曝露後予防効果を調べたところ、効果が誘導されることが証明された。

ラッサウイルス遺伝子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について導入が成功した(図6)。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ところ、どちらについても遺伝子産物の発現が確認された。

- 9) その他の活動

- 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。
- 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。
- 日本感染症学会・化学療法学会合同の東日本地方学術集会(東京)にて、下記シンポジウムを平成30(2018)年10月に開催した。
- 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を開催した。

#### 【倫理面への配慮】

LC16m8の人における免疫誘導能に関する調査研究は、2017年11月に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。動物を扱う研究においては、国立感染症研究所 実験動物委員会の審査と承認を得て、動物愛護の精神に則り遂行した。

#### D. 考察

1980年にWHOが天然痘(痘瘡)の根絶を宣言して40年が経過した。その後一度だけ、痘瘡ウイルスによる実験室感染による痘瘡患者発生が確認されたことがある。現在痘瘡ウイルスの保管は、WHAの合意に基づき、米国CDCとロシア

VECTER の 2 カ所だけに限られている。保管されている痘瘡ウイルスの管理は厳重になされ、しかも、それをを用いて診断・治療・ワクチン開発や保管されている痘瘡ウイルスの性状解析などの研究は、ACVVR の議論に基づいて許可がなされたものだけが行われている。主な研究は、バイオテロ対策としての痘瘡ウイルス関連研究だけが行われている。国際的には、痘瘡ウイルス関連バイオテロ対策は大きな課題となっている。現在のところ、ACVVR で議論となり、また、各国で備蓄されているワクチンは MVA が主なもので、日本では LC16m8 である。MVA と LC16m8 はともに第 3 世代の痘瘡ワクチンであり、安全なワクチンとして認められている。第 3 世代痘瘡ワクチンを生産する能力のある国は、現状、日本とドイツだけであり、痘瘡が根絶された現在においてもワクチン備蓄は重要であることから、日本の果たす役割は大きい。日本で痘瘡ウイルスやオルソポックスウイルス研究を行っている研究者は少なく、日本で行われているオルソポックスウイルス研究のほとんどは本研究班で行われていると言っても過言ではない。この 3 年間で、備蓄保管されている痘瘡ワクチンの品質管理、安定性について調査を継続した。生産されてから 10 年以上が経過しても品質に問題はなく、安定していることが確認された。LC16m8 の特徴としての安全性は、温度感受性と細胞選択性という性質に裏付けられている。ところが、LC16m8 を生産する過程において、細胞選択性という性質を失うウイルスが増殖することが明らかにされている。それは、B5R と呼ばれる膜タンパク質に認められる変異が回復することによることが明らかにされている。そのような株を Middle Size Plaque 形成株(MSP)と呼ぶ。つまり、LC16m8 の安全性を維持するには、MSP の含有量を一定の基準以内に抑える必要がある。本研究班では、その MSP 含有量を正確に、また、迅速に測定するための次世代シーケンス法を用いた方法を開発した。その他、LC16m8 の曝露後ワクチン接種による予防効果に関する新規知見、病理学的特徴を解明した。痘瘡ワクチン接種が中止されてから、約 40-50 年が経過した。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。2016 年にカナダの研究者により化学物質だけから、塩基配列情報をもとに、馬ポックスウイルス

が合成された。塩基配列情報があれば、痘瘡ウイルスを合成することも可能であることを示しており、合成生物学(synthetic biology)の管理の重要性も新たに加わっている。今後とも痘瘡ワクチン研究、とりわけ LC16m8 に関する研究を通じた感染症対策に貢献することは国内だけでなく、国際的にも重要なものとなる。

LC16m8 は安全なワクチンであり、遺伝子も比較的大きな DNA ウイルスである。これをベクター(土台)とした他のウイルス感染症に対するワクチン開発も重要なテーマである。本研究班では、その作製プラットフォームを構築する研究も進められた。2019 年 9 月には、感染症対策能力強化を目的に、特に東京オリパラ等の大規模イベントに関連する輸入感染症・バイオテロに備える目的もかねて、国立感染症研究所は感染性のあるエボラウイルス等一類感染症の病原体を所持するに至った。これまでバイオテロ関連病原体の検査法の整備、改良を本研究班でも行われてきたが、よりその作業が強化される環境が整備された。

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(図 1)。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。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

バイオテロ対策の一環として、日本で備蓄されている痘瘡ワクチン LC16m8 に関する安全性、有効性、生産性に関する研究が実施され、新規知見が得られた。その研究成績は国内外のバイオテロ対

策に資するものである。本研究班では、バイオテロ関連病原体の検査法の整備、バイオテロ関連疾患のホームページを通じた方法発信、国際連携等の活動が継続的になされた。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。

#### F. 健康危険情報

2018年に発生したDRCにおけるEVD流行は、現在もその流行が続き、さらに発生から約10ヶ月が経過して現在ではその規模が大きくなっている状況にある。

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) 齋藤智也. B(生物剤)テロ災害の最新動向と基礎知識—見えない恐怖との戦い 生物テロの特徴と対処—. NBC 災害活動マニュアル. 東京: イカロス出版. 2017.
- 4) Taniguchi S, Fukuma A, Tani H, Fukushi S, Saijo M, Shimojima M. A neutralization assay with a severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strain that makes plaques in inoculated cells. *J Virol Methods*. 2017 244:4-10
- 5) Tani H, Komeno T, Fukuma A, Fukushi S, Taniguchi S, Shimojima M, Uda A, Morikawa S, Nakajima N, Furuta Y, Saijo M. Therapeutic effects of favipiravir against severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection in a lethal mouse model: Dose-efficacy studies upon oral administration. *PLoS One*. 2018 Oct 26;13(10):e0206416. doi: 10.1371/journal.pone.0206416. eCollection 2018.
- 6) Kimura T, Fukuma A, Shimojima M, Yamashita Y, Mizota F, Yamashita M, Otsuka Y, Kan M, Fukushi S, Tani H, Taniguchi S, Ogata M, Kurosu T, Morikawa S, Saijo M, Shinomiya H. Seroprevalence of severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) virus antibodies in humans and animals in Ehime prefecture, Japan, an endemic region of SFTS. *J Infect*

*Chemother*. 2018 Oct;24(10):802-806. doi: 10.1016/j.jiac.2018.06.007. Epub 2018 Jul 13.

- 7) Demetria C, Smith I, Tan T, Villarico D, Simon EM, Centeno R, Tachedjian M, Taniguchi S, Shimojima M, Miranda NLJ, Miranda ME, Rondina MMR, Capistrano R, Tandoc A 3rd, Marsh G, Eagles D, Cruz R, Fukushi S. Reemergence of Reston ebolavirus in Cynomolgus Monkeys, the Philippines, 2015. *Emerg Infect Dis*. 2018 Jul;24(7):1285-1291. doi: 10.3201/eid2407.171234.
- 8) Yamada S, Shimojima M, Narita R, Tsukamoto Y, Kato H, Saijo M, Fujita T. RIG-I-Like Receptor and Toll-Like Receptor Signaling Pathways Cause Aberrant Production of Inflammatory Cytokines/Chemokines in a Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Infection Mouse Model. *J Virol*. 2018 Jun 13;92(13). pii: e02246-17. doi: 10.1128/JVI.02246-17. Print 2018 Jul 1.
- 9) Ogawa M, Shirasago Y, Ando S, Shimojima M, Saijo M, Fukasawa M. Caffeic acid, a coffee-related organic acid, inhibits infection by severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in vitro. *J Infect Chemother*. 2018 Aug;24(8):597-601. doi: 10.1016/j.jiac.2018.03.005. Epub 2018 Apr 5.
- 10) Matsumoto C, Shinohara N, Furuta RA, Tanishige N, Shimojima M, Matsubayashi K, Nagai T, Tsubaki K, Satake M. Investigation of antibody to severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV) in blood samples donated in a SFTS-endemic area in Japan. *Vox Sang*. 2018 Apr;113(3):297-299. doi: 10.1111/vox.12629. Epub 2018 Jan 22.
- 11) Kaneko M, Shikata, Matsukage S, Maruta M, Shinomiya H, Suzuki T, Hasegawa H, Shimojima M, Saijo M. A patient with severe fever with thrombocytopenia syndrome and hemophagocytic lymphohistiocytosis-associated involvement of the central nervous system. *J Infect Chemother*. 2017 Nov 11. pii: S1341-321X(17)30249-0. doi: 10.1016/j.jiac.2017.10.016. [Epub ahead of print]
- 12) 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.

- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) Sakata M, Tani H, Anraku M, Kataoka M, Nagata N, Seki F, Tahara M, Otsuki N, Okamoto K, Takeda M, Mori Y. Analysis of VSV pseudotype virus infection mediated by rubella virus envelope proteins. *Sci Rep*. 2017. 7(1):11607.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) Iizuka I, Ami Y, Suzuki Y, Nagata N, Fukushi S, Ogata M, Morikawa S, Hasegawa H, Mizuguchi M, Kurane I, Saijo M. A single vaccination of nonhuman primates with highly attenuated smallpox vaccine, LC16m8, provides long-term protection against monkeypox. *Jpn J Infect Dis*. 2017.70(4):408-415.
- 23) Suda Y, Chamberlain J, Dowall S, Saijo M, Horimoto T, Hewson R, Shimojima M. The development of a novel diagnostic assay that uses a pseudotyped vesicular stomatitis virus for the detection of neutralising activity to Crimean-Congo haemorrhagic fever virus. *Jpn J Infect Dis*. 2018;71:205-208. doi: 10.7883/yoken.JJID.2017.354.
- 24) Takayama-Ito M, Lim CK, Yamaguchi Y, Posadas-Herrera G, Kato H, Iizuka I, Islam MT, Morimoto K, Saijo M. Replication-incompetent rabies virus vector harboring glycoprotein gene of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) protects mice from LCMV challenge. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018 Apr 16;12(4):e0006398. doi: 10.1371/journal.pntd.0006398.
- 25) Yoshikawa T, Fujii H, Okutani A, Shibamura M, Omura N, Egawa K, Kato H, Inagaki T, Harada S, Yamada S, Morikawa S, Saijo M. Construction and characterization of bacterial artificial chromosomes harboring the full-length genome of a highly attenuated vaccinia virus LC16m8. *PLoS One*. 2018 Feb 23;13(2):e0192725. doi: 10.1371/journal.pone.0192725.
- 26) Egawa K, Shimojima M, Taniguchi S, Nagata N, Tani H, Yoshikawa T, Kurosu T, Watanabe S, Fukushi S, Saijo M. Virulence, pathology, and pathogenesis of Pteropine orthoreovirus (PRV) in BALB/c mice: Development of an animal infection model for PRV. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 Dec 14;11(12):e0006076. doi: 10.1371/journal.pntd.0006076.
- 27) Fukushi S, Fukuma A, Kurosu T, Watanabe S, Shimojima M, Shirato K, Iwata-Yoshikawa N, Nagata N, Ohnishi K,

- Ato M, Melaku SK, Sentsui H, Saijo M. Characterization of novel monoclonal antibodies against the MERS-coronavirus spike protein and their application in species-independent antibody detection by competitive ELISA. *J Virol Methods*. 2018 Jan;251:22-29. doi: 10.1016/j.jviromet.2017.10.008.
- 28) Taniguchi S, Maeda K, Horimoto T, Masangkay JS, Puentespina R Jr, Alvarez J, Eres E, Cosico E, Nagata N, Egawa K, Singh H, Fukuma A, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Tsuchiaka S, Omatsu T, Mizutani T, Une Y, Yoshikawa Y, Shimojima M, Saijo M, Kyuwa S. First isolation and characterization of pteropine orthoreoviruses in fruit bats in the Philippines. *Arch Virol*. 2017 Jun;162(6):1529-1539. doi: 10.1007/s00705-017-3251-2.
- 29) Takayama-Ito M, Lim CK, Nakamichi K, Kakiuchi S, Horiya M, Posadas-Herrera G, Kurane I, Saijo M. Reduction of animal suffering in rabies vaccine potency testing by introduction of humane endpoints. *Biologicals*. 2017;46:38-45. doi: 10.1016/j.biologicals.2016.12.007.
- 30) Ogawa M, Satoh M, Saijo M, Ando S. Evaluation of a broad-ranging and convenient enzyme-linked immunosorbent assay using the lysate of infected cells with five serotypes of *Orientia tsutsugamushi*, a causative agent of scrub typhus. *BMC Microbiol*. 2017 Jan 5;17(1):7. doi: 10.1186/s12866-016-0910-5.
- 31) 西條政幸. 新興ウイルス感染症とワクチン開発 : 研究の最前線 . *Neuroinfection* 23(1):56-61, 2018
- 32) 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
- 33) 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
- 34) 西條政幸. SFTS, クリミア・コンゴ出血熱. *最新医学* 74:483-489, 2019
- 35) 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
- 36) 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
- 37) 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
- 38) 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
- 39) 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
- 40) 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
- 41) 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
- 42) 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
- 43) 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
- 44) 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
- 45) 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
- 46) 下島昌幸. エボラウイルス. *ウイルス検査法—臨床と検査室のための手引き*, 春恒社, 東京, p333-335, 2018

## 2. 学会発表

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

- 4) Kato F, Takayama-Ito M, Iizuka-Shiota I, Posadas-Herrera G, Horiya M, Satoh M, Morimoto K, Saijo M, Lim CK. Development of a bivalent-vaccine against MERS-CoV and Rabies virus by using a recombinant replication-deficient rabies virus vector. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2017, Osaka (W2-5-05)
  - 5) Saijo M. BSL-4 laboratory in the National Institute of Infectious Diseases (NIID), Tokyo, Japan: preparedness for highly pathogenic emerging virus infections. WHO Consultative Meeting on High Containment (Biosafety level -4) Laboratories Networking, Lyon, France, 13-15 December 2017
  - 6) 西條政幸. 高病原性病原体による感染症(バイオテロを含む)の検査体制と備え(シンポジウム:感染症の危機管理・バイオテロ対策). 第67回日本感染症学会東日本地方会・第65回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会, 東京, 2018年10月
  - 7) 西條政幸. バイオテロと痘瘡ウイルス. 第66回日本ウイルス学会・ICD 講習会, 京都 2018年, 10月
  - 8) 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
  - 9) 西條政幸. 輸入感染症の今. 日本小児科学会, 金沢, 2019年5月
  - 10) 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
  - 11) 西條政幸. 東京 2020 オリパラ等マス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
- 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

## 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

研究統括、バイオテロ対策における国際連携のあり方の検討

所 属	国立感染症研究所 ウイルス第一部・部長
研究代表者	西條政幸

研究要旨：本研究班の全体的研究の推進を統括した。痘瘡ウイルスが用いられるバイオテロに関連する議論がなされている。世界保健機関(WHO)が主催する痘瘡ウイルス研究専門会議(Advisory Committee of Variola Virus Research Committee, ACVVR)における最近の議論の中で、治療法開発研究、ワクチンに関する議論、そして、2016年に発表された馬痘ウイルスの人工合成の成功に関する議論について、概要をまとめ、今後のバイオテロ対策のあり方を考察した。第三世代痘瘡ワクチンのMVAが、また、抗ウイルス薬として、米国では抗ウイルス薬TPOXX® [Arestvyr® (ST-246)]の備蓄が開始されることが決定された。着実に対策が強化されつつある。日本では世界で現存する第三世代痘瘡ワクチンLC16m8が生産・備蓄されている。LC16m8ワクチン接種による痘瘡ウイルスに対する中和抗体誘導が認められることが第19回痘瘡ウイルス研究専門家会議(ACVVR)および第20回ACVVRにおいて報告された。痘瘡ワクチン接種が中止されてから40年以上が経過し、世界中の半分以上の人々は痘瘡ウイルスに対する免疫を有さない。それに伴い、痘瘡ウイルスのウイルス科・属をいつにするサル痘ウイルスや牛痘ウイルスのヒトにおける感染症が増加している。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、2020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。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、世界保健機関(World Health Organization, 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ことを目的とした。  
痘瘡ウイルスはヒトからヒトに容易に伝搬し、致死

率の極めて高い天然痘の病原体である。天然痘は1977年の患者を最後に、地球上から根絶された。痘瘡ウイルスは、米国のUS CDC(アトランタ、ジョージア州)とロシアのState Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR(Koltsovo, Novosibirsk)にのみ保管されている。その他の研究期間は痘瘡ウイルスの所持・保管は国際的規程により認められていない。しかし、数年前に米国NIHで痘瘡ウイルスが存在していたことが偶然発見されたり、上記2機関以外にも保管されている可能

性が示唆されたりしている。天然痘病原体の痘瘡ウイルスが用いられるバイオテロにおいて用いられる危険性に備えて、世界的にワクチン開発と備蓄等の活動がなされている。本研究では、ACVVR での痘瘡ウイルス研究のあり方の議論の内容を整理し、バイオテロ対策の国際的動向を調査することを目的とした。

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

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。

## B. 研究方法

### 1) ACVVR, GHSAG-LN, 日米バイオディフェンス会議

第 19 回 ACVVR (2017 年 11 月, ジュネーブ, スイス), 第 20 回 ACVVR (2018 年 9 月, ジュネーブ, スイス) に, WHO の要請に基づいて出席した。際のレポートの概要をまとめた。尚, このレポートは正式に WHO から公表されている (<https://www.who.int/csr/resources/publications/smallpox/variola-research-november-2017/en/>), <https://www.who.int/csr/resources/publications/smallpox/variola-research-september-2018/en/>)。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。

第 18 回 ACVVR において, Evans D 教授 (カナダ) が発表した。化学物質のみから感染性のある馬痘ウイルスを合成した事実について考察する。また, 第 18 回 ACVVR (2016 年 11 月, ジュネーブ, スイス) のレポートに記載されている概要についてまとめた。

GHSAG-LN のフレームの中で実施されたオルソポックスウイルス感染症の診断技術レベルを評価する活動に参加した。

2018 年 5 月に国立感染症研究所 (感染研) で GHSAG-LN を開催した。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。

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) バイオテロ関連病原体による新興・再興ウイルス感染症に関する調査

近年流行が増加していると考えられるオルソポックスウイルス感染症の流行状況について文献的調査を実施した。また, WHO から発表されているコンゴ民主共和国 (DRC) で発生している 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。

### 3) バイオテロ対策に関する学術的広報活動

2018 年度開催された学術集会 (日本ウイルス学会, 日本感染症学会等) において, バイオテロ対策に関するシンポジウムを共催開催した。

### 4) 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・コンゴ出血熱ウイルス, 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。

### 5) 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。

## C. 研究結果

### 1) ACVVR, GHSAG-LN, 日米バイオディフェンス会議

WHO-ACVVR が認めているバイオテロ対策に通じる研究は,

① US CDC で実施されている humanized mice を用いた痘瘡ウイルス感染動物モデル開発である。現時点では, 痘瘡ウイルス感染動物モデルは霊長類を用いることにより痘瘡類似症状を発症させるものしかなく, かつ, それにはかなり高い感染価のウイルスを静注投与することが必要である。

② 抗ウイルス薬に関する研究は, VECTOR および US CDC で実施されている。US CDC では

ワクシニアウイルスの感染性を阻害する単クローン抗体を用いた治療薬開発が実施されている。

- ③ 痘瘡に対する治療薬開発には、他のオルソポックスウイルス感染動物モデルを用いて研究がなされている。特に本 ACVVR において報告されている抗ウイルス薬は、TPOXX<sup>TM</sup>/Arestvyr<sup>TM</sup> (ST-246, SIGA Technology 社) と Brincidofovir (CMX001, Chimerix 社) の 2 剤である。
- ④ TPOXX<sup>TM</sup>/Arestvyr<sup>TM</sup> はオルソポックスウイルスに特異的な抗ウイルス薬であり、動物感染モデルでその有効性が評価されている。ヒトにおける臨床研究も進められている。尚、Brincidofovir は多くの DNA ウイルスの増殖を抑制する抗ウイルス薬 (シドフォビル, Cidofovir の経口投与薬) である。米国では痘瘡ウイルスが用いられたバイオテロに備えて、抗ウイルス薬 TPOXX<sup>®</sup> [Arestvyr<sup>®</sup> (ST-246)] の備蓄が開始されることが明らかにされた。
- ⑤ ACVVR において議論されている痘瘡ワクチンは MVA と日本で生産・備蓄されている LC16m8 である。LC16m8 については、本研究班の活動の一環として、LC16m8 接種者において誘導される抗体が感染性のある痘瘡ウイルスに中和活性を有するか否かに関する研究成果についても報告されている。尚、この研究は本研究班と US CDC との共同研究 (ACVVR からの承認の基に) 実施されている。

2017 年第 19 回 ACVVR では、LC16m8 の製造メーカーである KM バイオロジクス (KMB) からの出席がなかった。しかし、本研究班と米国 CDC との間で実施されている共同研究成績について米国 CDC の責任者 (Olson V 博士) から発表された。LC16m8 をヒトに接種することで、痘瘡ウイルスに対する中和抗体が誘導されること、その効果は ACAM2000 による誘導力と同等であることが報告された。LC16m8 と同様に第三世代のワクチン MVA (MVA-BN<sup>®</sup> (IMVANEX<sup>®</sup>/IMVAMUNE<sup>®</sup>)) が欧州 (EC)、カナダ、米国に認可備蓄されることになった。

痘瘡は世界中から根絶されており、その感染性のある痘瘡ウイルスを地球上からなくする (滅菌廃棄) ことが WHA (World Health Assembly) で決定されている。しかし、現在でも米国 CDC およびロシア VECTOR において保管されている。抗ウイルス薬開発や痘瘡対策のためには、委員の間でも意見がわかれているものの、その破壊は時期

尚早という意見がまとめられた。

GHSAG-LN 会議のフレームの中で、関係国感染症研究機関 (日本は国立感染症研究所) 間でオルソポックスウイルス感染症の診断 (遺伝子検査) の能力外部評価が実施され、その活動に参加した。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 のボ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) 痘瘡ウイルス関連オルソポックスウイルス感染症の最近の流行

アフリカ (中央部、西部) においてサル痘ウイルス感染症流行が増加している。2017 年にはこれまで流行報告のなかったナイジェリア、カメルーンでサル痘ウイルス感染症流行が発生し、死亡例も報告された。US CDC により詳細な調査研究がなされ、比較的病原性が低いとされる西アフリカ型サル痘ウイルスによるとの情報をえた。また、欧州 (特にドイツ) で牛痘ウイルスによるひとの感染事例の報告が増加している。牛痘ウイルスの宿主は齧歯類で、齧歯類を捕食するネコが牛痘ウイルスに感染し、その感染ネコからヒトも感染するのではないかと推測される。さらに、南米ではヒトにおけるワクシニアウイルス感染症事例の報告が増加している。このように、痘瘡ウイルスによるバイオテロ対策だけでなく、痘瘡ウイルス関連オルソポックスウイルス感染症対策を強化することが必要になると考えられる。

2018年にはDRCにて独立する2つのEVD流行が発生した。第1次流行時には、日本政府(外務省)が災害緊急援助隊(感染症対策)の派遣がなされ、国立感染症研究所等の専門家が派遣された。第一次流行は終息したが、2018年6月頃からDRC東北部(ウガンダ、スーダンとの国境地帯)でEVD流行が発生し、このDRCにおけるEVD流行は2014-15年に西アフリカで発生したEVD大規模流行の流行状況・性状と類似している。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死率は66%となる。対策強化が急務である。

### 3) バイオテロ対策に関する学術的広報活動

本研究班の広報活動の一環として、平成30年10月24日に日本感染症学会と化学療法学会合同学会(開催地:東京)にて本研究班との共催による「感染症の危機管理・バイオテロ対策」シンポジウムを開催した。研究分担者(鯉淵)が座長を担当し、シンポジストの1人として研究代表者の西條が担当した(西條政幸。高病原性病原体による感染症(バイオテロを含む)の検査体制と備え(シンポジウム:感染症の危機管理・バイオテロ対策)。第67回日本感染症学会東日本地方会・第65回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会, 東京, 2018年10月)。さらに、2018年度の日本ウイルス学会(京都)において開催されたInfection Control Doctor(ICD)講習会において、本研究班の研究成果発表を含めて「生物テロと痘瘡ウイルス」と題する講演を担当した(西條政幸。バイオテロと痘瘡ウイルス。第66回日本ウイルス学会・ICD講習会, 京都2018年, 10月)。

### 4) 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・コンゴ出血熱ウイルス、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。

### 5) 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。

### 6) 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。

### 【倫理面への配慮】

特記事項はない。

### D. 考察

WHOにおいてはACVVR等において継続して痘瘡ウイルスによるバイオテロ、痘瘡の再流行の発生に備えた議論がなされている。抗ウイルス薬としては2剤について議論がなされ、米国ではカウンターメジャーの際の薬剤として認められる方向が示されているように思われる。一方、ワクチンとしてMVAとLC16m8が議論されている。

第18回ACVVR(2016年11月、ジュネーブ、スイス)では、カナダのオルソポックスウイルス研究の第一人者で、かつ、ACVVRの専門家であるEvans D教授が、化学物質のみから感染性のある馬痘ウイルスを作製した。遺伝子情報、遺伝子合成技術を含む科学技術の向上により、巨大なDNAウイルスであるオルソポックスウイルス合成に初めて成功した。このプロセスは通常 Synthetic

Biology(合成生物学)と呼ばれ、今回の馬痘ウイルスを人工合成したことは、一方で痘瘡ウイルス合成が可能であることを示唆している。本研究は科学的な進歩に寄与する研究であるが、一方で、バイオテロ上において新たなリスクを生じされるといえる。

第 19 回 ACVVR での議論に関するレポートは報告されていないが、この会議でも本研究班で実施されている LC16m8 接種者における感染性痘瘡ウイルスに対する中和抗体誘導能に関する研究成果が発表された。安全性が確保されている第Ⅲ世代痘瘡ワクチンとして世界で存在するのは、MVA と LC16m8 のみである。そのような状況で LC16m8 接種者における感染性痘瘡ウイルスに対する中和抗体誘導能に関する研究は、とても注目されている。本研究班でなされている研究は、国内外のオルソポックスウイルス感染症対策、バイオテロ対策に貢献するものと考えられる。

痘瘡ワクチン接種が世界規模で中止されてから約 40 年が経過し、痘瘡ウイルス関連オルソポックスウイルス感染症流行が増加していると考えられる。オルソポックスウイルス感染症患者の国内輸入例にも備える必要性と、その対策(治療・予防法)の強化が求められる。本研究で実施されたオルソポックスウイルス感染症のような希少感染症に対する検査法の外部評価活動に参画することはこれからも求められることと思われる。

痘瘡ウイルスと同じウイルス科・属に分類されるヒトサル痘(ヒトにおけるサル痘ウイルス感染症)やヒトにおける牛痘ウイルス感染症が今後とも続くことが予想される。サル痘ウイルスにはコンゴ盆地方と西アフリカ型の 2 種類ウイルス型に分類されることが知られ、前者の病原性が後者より高いとされてきた。しかし、現在ナイジェリアやカメルーンで発生しているサル痘ウイルス感染症は西アフリカ型により、さらに死亡例は輸入感染事例が発生している。これらの感染症は痘瘡との鑑別疾患に重要なものであり、対策を強化することも本研究班の重要な課題になるものと考えられる。

現在、DRC の東北部で発生している 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。2019 年にラグビーワールドカップが、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。輸入感染症対策強化が求められるが、今後も DRC の大規模 EVD 流行について注目していく必要がある。研究論文として日本には EVD 治療に有用性があると報告されている favipiravir が日本の製薬メーカーで開発されている。バイオテロ対策においても重要な

位置を占める薬剤となる可能性がある。

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

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

2018 年に発生した DRC における EVD 流行は、現在もその流行が続き、さらに発生から約 10 ヶ月が経過して現在ではその規模が大きくなっている状況にある。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

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

- S, Ogata M, Morikawa S, Hasegawa H, Mizuguchi M, Kurane I, Saijo M. A single vaccination of nonhuman primates with highly attenuated smallpox vaccine, LC16m8, provides long-term protection against monkeypox. *Jpn J Infect Dis.* 2017;70(4):408-415.
- 2) Suda Y, Chamberlain J, Dowall S, Saijo M, Horimoto T, Hewson R, Shimojima M. The development of a novel diagnostic assay that uses a pseudotyped vesicular stomatitis virus for the detection of neutralising activity to Crimean-Congo haemorrhagic fever virus. *Jpn J Infect Dis.* 2018;71:205-208. doi: 10.7883/yoken.JJID.2017.354.
  - 3) Takayama-Ito M, Lim CK, Yamaguchi Y, Posadas-Herrera G, Kato H, Iizuka I, Islam MT, Morimoto K, Saijo M. Replication-incompetent rabies virus vector harboring glycoprotein gene of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) protects mice from LCMV challenge. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(4):e0006398. doi: 10.1371/journal.pntd.0006398.
  - 4) Yoshikawa T, Fujii H, Okutani A, Shibamura M, Omura N, Egawa K, Kato H, Inagaki T, Harada S, Yamada S, Morikawa S, Saijo M. Construction and characterization of bacterial artificial chromosomes harboring the full-length genome of a highly attenuated vaccinia virus LC16m8. *PLoS One.* 2018;13(2):e0192725. doi: 10.1371/journal.pone.0192725.
  - 5) Egawa K, Shimojima M, Taniguchi S, Nagata N, Tani H, Yoshikawa T, Kurosu T, Watanabe S, Fukushi S, Saijo M. Virulence, pathology, and pathogenesis of Pteropine orthoreovirus (PRV) in BALB/c mice: Development of an animal infection model for PRV. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(12):e0006076. doi: 10.1371/journal.pntd.0006076.
  - 6) Fukushi S, Fukuma A, Kurosu T, Watanabe S, Shimojima M, Shirato K, Iwata-Yoshikawa N, Nagata N, Ohnishi K, Ato M, Melaku SK, Sentsui H, Saijo M. Characterization of novel monoclonal antibodies against the MERS-coronavirus spike protein and their application in species-independent antibody detection by competitive ELISA. *J Virol Methods.* 2018;251:22-29. doi: 10.1016/j.jviromet.2017.10.008.
  - 7) Taniguchi S, Maeda K, Horimoto T, Masangkay JS, Puentespina R Jr, Alvarez J, Eres E, Cosico E, Nagata N, Egawa K, Singh H, Fukuma A, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Tsuchiaka S, Omatsu T, Mizutani T, Une Y, Yoshikawa Y, Shimojima M, Saijo M, Kyuwa S. First isolation and characterization of pteropine orthoreoviruses in fruit bats in the Philippines. *Arch Virol.* 2017;162(6):1529-1539. doi: 10.1007/s00705-017-3251-2.
  - 8) Takayama-Ito M, Lim CK, Nakamichi K, Kakiuchi S, Horiya M, Posadas-Herrera G, Kurane I, Saijo M. Reduction of animal suffering in rabies vaccine potency testing by introduction of humane endpoints. *Biologicals.* 2017;46:38-45. doi: 10.1016/j.biologicals.2016.12.007.
  - 9) Ogawa M, Satoh M, Saijo M, Ando S. Evaluation of a broad-ranging and convenient enzyme-linked immunosorbent assay using the lysate of infected cells with five serotypes of *Orientia tsutsugamushi*, a causative agent of scrub typhus. *BMC Microbiol.* 2017;17(1):7. doi: 10.1186/s12866-016-0910-5.
  - 10) 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
  - 11) 西條政幸. 新興ウイルス感染症とワクチン開発 : 研究の最前線. *Neuroinfection* 23(1):56-61, 2018
  - 12) 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
  - 13) 西條政幸. SFTS, クリミア・コンゴ出血熱. *最新医学* 74:483-489, 2019
  - 14) 西條政幸. IV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
  - 15) 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
  - 16) 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

- 17) 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
- 18) 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
- 19) 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
- 20) 江川和孝, 西條政幸. アジアにおけるオルソオウイルス感染症. 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
- 21) 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

## 2. 学会発表

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

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

- 5) Saijo M. BSL-4 laboratory in the National Institute of Infectious Diseases (NIID), Tokyo, Japan: preparedness for highly pathogenic emerging virus infections. WHO Consultative Meeting on High Containment (Biosafety level -4) Laboratories Networking, Lyon, France, 13-15 December 2017
- 6) 西條政幸. 高病原性病原体による感染症(バイオテロを含む)の検査体制と備え(シンポジウム: 感染症の危機管理・バイオテロ対策). 第 67 回日本感染症学会東日本地方会・第 65 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会, 東京, 2018 年 10 月
- 7) 西條政幸. バイオテロと痘瘡ウイルス. 第 66 回日本ウイルス学会・ICD 講習会, 京都 2018 年, 10 月
- 8) 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
- 9) 西條政幸. 輸入感染症の今. 日本小児科学会, 金沢, 2019 年 5 月
- 10) 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
- 11) 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

## H. 知的財産権の出願・登録状況

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

平成 29 年度～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

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・講師  
研究分担者 鯉淵 智彦 (H29～H30 年度)

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(R01 年度)

研究要旨: 対応策の強化・充実が望まれるバイオテロに関して、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。2017、2018 年度のアップデートは計 5 種の病態(野兔病、炭疽、ブルセラ症、デング熱、チクングニア熱)に関して行った。ホームページの月間平均アクセス数は昨年度比で約 2 倍に増加した。啓発活動としては、日本感染症学会・化学療法学会合同の東日本地方学術集会(東京)にてシンポジウム「感染症の危機管理・バイオテロ対策」を開催した。4 名の演者の講演後には参加者とのディスカッションを行い、問題点を共有し、今後の対策強化策の在り方について議論した。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。

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、生物製剤を用いる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の強化や充実が望まれている。本研究では、バイオテロ対応ホームページを用いて、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周知し、有事の際にその被害や混乱を最小限に留めることを最大の目的としている。また、関連団体と連携して平時からバイオテロに対する啓発活動を行うと共に、これらの活動を通じてより効果的なバイオテロ対策支援法を開発することを目的とする。

B. 研究方法

2017、2018 度は、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る。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する。新たなアウトブレイクが生じた場合には迅速に新知見を追加する。

【倫理面への配慮】

公表された情報のみを研究材料とするため、倫理面への特別な配慮は必要ない。

C. 研究結果

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

PDF も HP より無料でダウンロードできるようにしている(<http://h-crisis.niph.go.jp/bt/>).

2017 年度は、近年、世界でアウトブレイクがあった病原体、診断や治療面で新たな知見があった病原体について改訂を行った。また、啓発プログラムは、日本感染症学会・化学療法学会合同の東日本地方学術集会(東京)にて、下記シンポジウムを平成 30(2018)年 10 月に開催した(図1)。

4 名の演者より、それぞれの視点から問題点や今後の在り方についての講演後に、参加者とのディスカッションを行った。バイオテロが想定される事態では微生物学的な確定診断がつきにくいことから、患者の症状から経験的に病原体を予測して対策を行う経験的症候群別予防策を行う必要性について再認識した。伊勢志摩サミットでの感染症強化サーベイランスは今後の対策立案に非常に参考になったが、2020 年オリンピックは規模や開催期間がこの数倍にのぼるため、それに応じた人員の確保が課題であること、地方衛生研究所や国立感染症研究所における病原体診断の整備についても改善の余地があること、などが浮き彫りとなった。議論内容は今後の対策に反映させていく必要がある。シンポジウム参加者には、本研究班が平成 29 年に作成した「バイオテロを疑うときシート」を配布し、バイオテロ対策への関心をさらに促した。なお、本シンポジウム参加人数は、300～400 名と推定される。

ホームページの内容の妥当性や正確性の評価は年間を通じて行っているが、今年度は平成 30(2018)年 11 月に野兔病、炭疽、ブルセラ症を改訂し、平成 31(2019)年 3 月には Dengue 熱、チクングニア熱を改訂した。特に、ブルセラ症では病原体の特徴から対応フローチャートまで全面的に見直した。2019 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、Dengue 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。

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も継続していく必要がある。

#### D. 考察

バイオテロに利用される恐れのある病原微生物によって引き起こされる疾患は、現在のわが国では診る機会が少ないものが多い。臨床医の大多数は病態に対する十分な知識はなく、また診療疾患対象としての関心も有していないのが現状である。本ホームページの作成にあたっては、一般の臨床医が容易に理解できるような工夫を行うとともに、最新の情報や感染症専門家からの知見を加えながら改訂を行った。アクセス数の解析により、月に 1,200～1,300 件、多い時には 2,000 件以上のアクセスがあり、貴重な情報源として活用されていることが示唆された。なお、2017 年 12 月のアクセス数が 2030 件へ増加したが、明確な原因は特定できていない。推測の域を出ないものの、この時期は、安全保障に関連する報道(漂着船の増加等)が多くなされたことが関与している可能性もある。全体的に安定的な閲覧数を維持しており、これは昨年度全国約 900 の病院に配布した「バイオテロを疑うときシート」に、本ホームページの URL を記載した事も寄与していると考えられる。随時、必要な改訂を行い、最新情報を提供していくことが継続した閲覧につながっていくと考える。しかしながらサイバー攻撃への対応、有事の際のアクセス集中時にサーバーが耐えられるかなどの懸念は残り、今後セキュリティ対策の専門家と十分に検討していく必要がある。さらに医療従事者以外が閲覧する場合、専門的内容のままでは十分な理解ができず、場合によっては誤解を生じうる可能性もあるため記載内容を十分に検討する必要がある。ホームページ更新のアクセス数(図表)については年度毎に増加している。これは COVID-19 の発生以前の 2019 年 4 月-12 月でも認められた(図表)。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

国際的なテロリズムの拡大が懸念され、東京オリンピックが開催の予定、COVID-19 の流行などバイオテロ対策の重要性は今後も増大していくことが予想される。バイオテロに使用される病原体や各疾患の特徴などを包括的に閲覧できるホー

ムページの継続的な改訂。充実は今後とも継続していく必要がある。学会などと連携したシンポジウム等の開催を通じて、適切な情報提供の場を設けていくことも不可欠である。

ホームページアクセス数(図2, 図3)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

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

該当なし

#### 2. 学会発表

- 1) 鯉淵智彦(司会). シンポジウム 1「感染症の危機管理・バイオテロ対策」. 第 67 回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第 65 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会, 東京(2018.10)
- 2) 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

シンポジウム 1		10月24日(水) 13:00-15:00 第1会場 (10F 大ホール)
共催：我が国で開発され、評価されている細胞治療用ソラフクチンの有効性、安全性、生薬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会		
S1	感染症の危機管理・バイオテロ対策	司 会：鯉淵智彦（東京大学医科学研究所附属感染症免疫内科） 中島一哉（大東文化大学スポーツ健康科学部健康科学科）
S1-1	バイオテロ対策総論	加東浩吾（西京医科大学校医局医学研究センター・地域感染症学・新興研究部門）
S1-2	G7伊勢志摩サミットにおける強化感染症サーベイランス	谷口清樹（三重県臨床研究部）
S1-3	東京オリンピック 2020 における感染症リスク評価と求められる対応	和田康典（国際医療福祉大学医学部生命衛生学）
S1-4	高病原性病原体による感染症（バイオテロを含む）の検査体制と備え	西條政幸（国立感染症研究所）

図1. バイオテロ関連シンポジウム(10月24日)

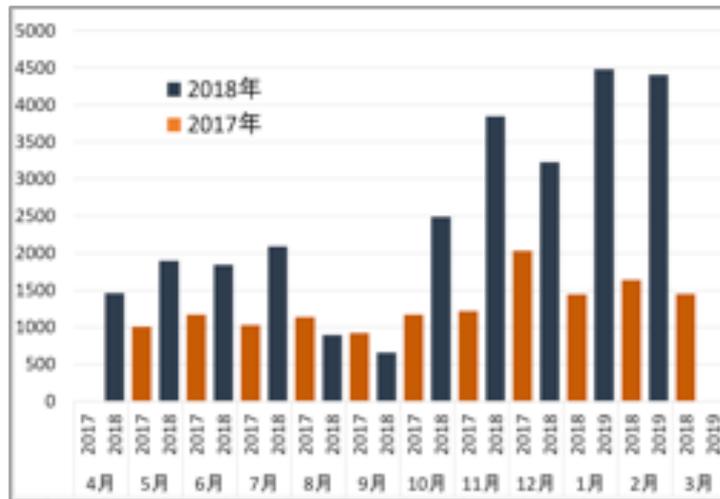


図2. ホームページアクセス数(2017年度, 2018年度)

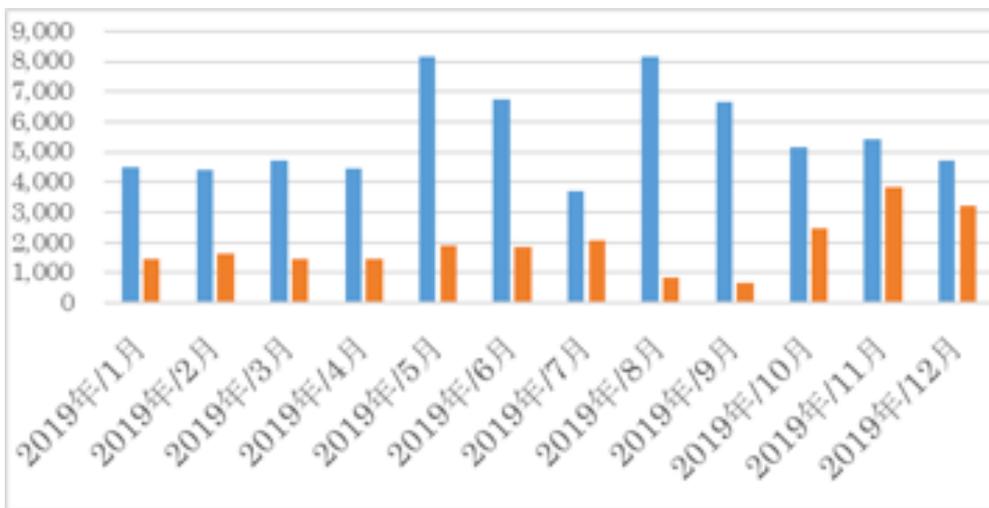


図3. ホームページアクセス数(2019年度12月まで)

平成 29 年度～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

天然痘バイオテロ対応に関する公衆衛生対応の検討

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

研究要旨:天然痘バイオテロを中心としたバイオテロ対応に関する公衆衛生対応の検討を行った。特に、生物テロ対策の国際動向についておよび、天然痘治療薬やワクチンの開発、国際的共有について検討を行った。初年度は、生物テロ対策の国際動向について英国および韓国の会議に出席し情報収集を実施し、また、天然痘治療薬の開発状況について資料収集および関係者の聞き取りを実施した。2年目は、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。3年目は、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認識され、強化に結びつくことが期待される。

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。

そのため、バイオテロ対策の国際的な動向を調査し、日本国内での対策のあり方を検討する。特に天然痘テロ対応に関して、ワクチン含む医薬品等の整備状況、また公衆衛生対応の検討を行う。

B. 研究方法

1. バイオテロ対策の国際的な動向の調査

生物テロ対策の動向について、海外の各種会議等に参加し、専門家との意見交換と資料収集を実施した。初年度は、英国(Responding to deliberate biological release: the requirements for effective, coordinated international action 意図的的生物剤散布への対処:効果的で調和された国際的な行動のための要件)および韓国(The International Symposium and Workshop on Mass Gathering Medicine and Olympic Winter Games Pyeong Chang 2018 マスギャザリング

医療・平昌オリンピック冬季大会シンポジウム・ワークショップ)の会議に参加し、生物テロ対策の世界的状況に関する情報収集を実施した。2年目は、ドイツで開催されたグローバル・ヘルス・セキュリティ・アクショングループ(GHSAG)公衆衛生・安全保障専門家脅威・リスク評価ワークショップに参加し、セキュリティ機関と連携した。生物テロの脅威・リスク評価手法の検討および現場対処方法について意見交換を行った。

2. バイオテロ(主に天然痘テロ)対応に関する公衆衛生対応の検討

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

2年目より、国際的な動向の調査に基づき、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を開催した。アンケート結果に基づき、連携強化手法についての検討を行った。さらに、3年目には、国内での、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

材を作成した。

【倫理面への配慮】  
該当しない。

## C. 研究結果

### 1. バイオテロ対策の国際的な動向の調査

英国での会議における議論と指摘事項、提言は、生物テロへの対応を考えた際の、セキュリティ・法執行機関との連携について具体的な手順を含めて検討する必要性を示唆するものであった。韓国での会議では、平昌オリンピックにおいて、強化サーベイランス、エアロゾル検知の運用計画の実態を把握することができた。現行の通常時の対応計画(いつテロが発生するかわからない前提での計画)に加えて、マスギャザリングイベントのような、ある一定期間、限られた場所でインテンシブに対応を行う計画についても別途オペレーションプランの検討が必要であることを認識した。

2年目のドイツでの会議では、主にG7各国における、セキュリティ機関と連携した、生物テロの脅威・リスク評価手法の検討および現場対処方法について、特にその連携手法と問題点について、最新の知見が得られた。

### 2. バイオテロ(主に天然痘テロ)対応に関する公衆衛生対応の検討

ワクチン・医薬品については、MVA ワクチン、主に米国で開発中の2医薬品(TPOXX, Brincidofovir)について開発状況の情報収集を行った。今後の開発状況を注視しつつ、発生時の対応オペレーションの中での必要性等検討を進めていく必要がある。また、世界健康安全保障行動グループのタスクフォースの一員として、WHOが保管する備蓄天然痘ワクチンの国際共有のための緊急時配送オペレーションメカニズムを検討し、その成果はWHOから2017年12月に発出された。また、一般化した医薬品共有・配送に関する問題点について検討文書を作成し、WHOへの案文提出に貢献した。これらの天然痘に関する知見は、「一類感染症対策の手引き」の作成にあたり、天然痘に関する記載のアップデートに活用される予定である。

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を開催し、報告書を作成した(図1)。警察と公衆衛生当局者による情報共有および捜査と疫学調査

の連携、現場対処(犯罪現場管理、証拠採取、観戦者への対応等)における連携の重要性が認識されたほか、東京オリンピック大会に向けて、今後の連携強化方策として、連携手順の整理や合同訓練の必要性が認識された。また、主に警察から、公衆衛生対応との連携機会を望む声が聞かれた。アンケート結果に基づき、連携強化手法についての検討を行った。

2年目から3年目にかけて、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、二つの地方自治体で実施した。公衆衛生部門と警察部門が共に参加する3時間程度の演習パッケージを準備し、米国炭疽菌郵送テロ事件をモチーフとして、秘匿的・明示的シナリオの検討過程を通じて、連携の必要性を認識し、相互理解を向上させる机上演習とした。実施した自治体からは、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。

## D. 考察

この3年間の公衆衛生対応に関する国際的な動向調査で得られたのは、公衆衛生機関とセキュリティ機関(特に警察)との連携の重要性であり、各国が真摯に取り組んでいることだった。国内でも、セミナー等で米国等の演者を招聘し、普及啓発が試みられたり、大学でその連携の可能性に関する勉強会が開催されたりするなどといった機会があったが、その連携強化のニーズに関する認識も低く、また、その連携を強化することを目的とした訓練・演習も行われていなかった。2018年3月に世界保健機関(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明確に指摘されたことは、取り組みの一つの追い風となり、本研究を通じて連携を深めた米国、ドイツなどのカウンターパートと共に、省庁レベルで合同対応に関するワークショップを行うことができたのは大きな成果であったと言える。また、さらに現場レベルでの連携強化のための演習素材の開発と実践に結びつけることができた。今後さらに演習が広く実施され、地域での連携強化に結び付けることや、「高度編」の演習資材が開発され、対応能力のレベルアップに寄与することが期待される。さらに、演習を通じて明らかになった課題や改善点がマニュアル等文書にフィードバックされていくことが強く期待される。

本研究の成果は、天然痘対応指針の内容の再検討等、生物テロ対策の見直しに向けて問題点を整

理するための参考資料としていく。医薬品開発の状況については、一般への情報提供の必要性を踏まえて、生物テロ対応ホームページへの反映等を行っていく。このような平時からの絶え間ない継続的な情報収集と最新知見の積み重ねが、いざという時の備えに不可欠である。

#### E. 結論

バイオテロ対策の国際的な動向の調査を実施し、また、バイオテロ(主に天然痘テロ)対応に関する公衆衛生対応の検討を行い、公衆衛生とセキュリティ部門の連携強化が生物テロ対応強化に不可欠であることを明らかにした。また、地方レベルでの連携強化のための演習素材を作成し、実践した。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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): p. 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: p220-224.
- 3) 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.

- 4) 齋藤智也. B(生物剤)テロ災害の最新動向と基礎知識—見えない恐怖との戦い 生物テロの特徴と対処—. NBC 災害活動マニュアル. 東京:イカロス出版. 2017.

##### 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
- 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
- 5) Saito T. Overview of Bioterrorism Preparedness and Response in Japan. NCT Asia Pacific, Seoul, Korea (2017.05)

#### 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

---

生物テロに対する警察/公衆衛生  
合同対応に関する国際ワークショップ  
開催報告書

International Workshop on Joint Law Enforcement  
/Public Health Response to Bioterrorism  
Workshop Report

---

**会場/Venue**

国立国際医療研究センター国際医療協力センター第4階大会室、4階会議室  
Training Center Building, 4th Floor/Meeting Room, 4<sup>th</sup> Floor  
National Center for Global Medicine Hospital, Shinjuku, Tokyo, Japan

**開催日程/Date**

2019年3月19-20日  
March 19-20, 2019

**主催/Host**

国立国際医療研究センター国際医療協力センター、東京医科大学国際医療協力センターの協賛、  
実務的、生物学的および国際法の観点からバイオテロ対策のあり方に関する研究

共同研究員：国立国際医療研究センター国際医療協力センター、東京医科大学国際医療協力センター

Principal Investigators: National Institute of Infectious Diseases (NIID) Molecular Bioterrorism

Co-Investigator: National Institute of Public Health (NIPO) Tokyo Site

**共催/Co-host**

国立国際医療研究センター National Center for Global Health and Medicine (NCGHM)  
在日米国大使館 US Embassy in Japan

図1 国際ワークショップ開催報告書

平成 29 年度～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

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:バイオテロの発生時には、用いられた病原体を正確かつ安全に特定する必要がある。1年目および3年目ではバイオテロで用いられうる病原体の特定法について、2年目では特定の際の検体の安全な取り扱いについて取り組んだ。(1年目)バイオテロで痘そうウイルスが用いられる可能性がある。痘そうの特徴的な臨床症状の1つに体表の水疱があるが、類似の症状はヒトのサル痘や水痘でも認められる。これらの病原体を迅速に且つ区別して検出するリアルタイム PCR を文献(Maksyutov et al., J Virol Methods, 2016)に基づき構築した。痘そうウイルス、サル痘ウイルス、水痘帯状疱疹ウイルスを同時に且つ迅速に区別して検出するマルチプレックスなリアルタイム PCR 法を構築した。構築したリアルタイム PCR 法の検出感度は  $10^1$ – $10^0$  コピー/反応と良好であった。(2年目)ニパウイルスは致命率の高い感染症を引き起こし、その予防法や治療法で確立されたものはないため、バイオテロで用いられうる病原体である。バイオテロ対策の1つである実験室診断を安全に行なうため、ニパウイルスを想定し、検体処理条件を明らかにした。ウイルスを添加したヒト血清を熱処理あるいは紫外線処理のみではウイルスの不活化は十分ではなかったが、併用により完全なウイルスの不活化が得られた。血清学的な実験室診断を安全に行なうための検体処理条件の1つを明らかにできた。(3年目)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。

これらの取り組みにより、我が国でのバイオテロにおける病原体の特定力がより一層強化されたと言える。

研究協力者

福士秀悦・国立感染症研究所・主任研究官  
渡辺俊平・岡山理科大学・准教授  
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

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

状が重篤で致命率が高い感染症であるが、優れた予防法としてワクチンが開発され世界的に用いられ、1980年には世界保健機関より根絶宣言がなされた。ワクチンも用いられなくなったため、例えば日本では1975年以降に誕生した若い人は通常ワクチン接種を受けていない。そのため痘瘡ウイルスもバイオテロに用いられうる病原体の1つに位置付けられている。ニパウイルスは致命率の高い感染症を引き起こし、その予防法や治療法で確立されたものはないため、バイオテロで用いられうる病原体である。バイオテロと考えられる事案が発生した場合に、その病原体を特定することは重要な課題の1つである。

迅速性及び正確性は当然求められる。また特定作業は安全に行われなくてはならない。

国立感染症研究所ウイルス第一部では既にウイルス性出血熱や痘瘡の実験室診断法を準備しているが、近年の試薬や機器・技術の進歩をとりにれた改良を加えることは常に考慮しておく必要がある。1年目は痘瘡ウイルスの検出法の改良を、2年目はニパウイルスを想定し検体の安全な取り扱い処理を、3年目には迅速性はないが変異ウイルス等でも検出が可能なウイルス分離の手法確認を行なった。

## B. 研究方法

Maksyutov らの方法 (J Virol Methods. 2016;236:215-220) (図 1) に基づき、リアルタイム PCR による痘瘡ウイルスの検出法を構築した。痘瘡の特徴的な臨床症状の1つに体表の水疱形成があるが、同様の症状はサル痘および水痘でも認められる (図 2)。臨床症状での区別は困難なため、痘瘡疑い事例の発生の際はこれらとの鑑別は重要である。Maksyutov et al. の方法は合わせてこれらの病原体 (サル痘ウイルスおよび水痘・帯状疱疹ウイルス) も検出するリアルタイム PCR となっているため、サル痘ウイルスおよび水痘・帯状疱疹ウイルスも検出するよう構築した。核酸抽出のコントロール、感度や特異性を評価するスタンダードも Maksyutov らの方法に基づき調製した。

検体にニパウイルスが含まれると想定し、ニパウイルスを添加したヒト血清を熱処理 (56°C, 30 分) あるいは紫外線処理 (312nm, 2.5mW, 30 分) した。生きたニパウイルスの存在の有無を判断するため、処理した血清を Vero 細胞へ接種し、3 回細胞を継代し、この間の細胞変性効果の出現の有無で判断した。熱と紫外線の双方の処理も行なった。いずれも 3 点ずつで行なった。

海外より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。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。TCID<sub>50</sub>/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】

該当なし

## C. 研究結果

痘瘡ウイルスは B12 遺伝子を、サル痘ウイルスは F3 遺伝子を、水痘・帯状疱疹ウイルスは ORF38 遺伝子を標的とするプライマーとプローブを人工合成し調製した。プローブの色素はそれぞれ FAM, HEX, Texas Red のラベルとした。核酸抽出のコントロールの検出プローブは Cy5 ラベルとした (図 3)、スタンダード DNA も人工合成し PCR で増幅して用いた (図 4)。核酸抽出用のコントロール DNA は痘瘡ウイルスのプライマーで増幅されコントロール用のプローブで検出されるよう人工合成した (図 5)。以上のプライマーやプローブ等を図 5 に示す割合で混合し、同図に示す条件で反応させた。痘瘡ウイルスのスタンダード DNA を反応液に加えた場合に FAM (つまり痘瘡ウイルス検出用のプローブの色素) のシグナルのみが検出された (図 6)。サル痘ウイルスのスタンダード DNA、水痘・帯状疱疹ウイルスのスタンダード DNA の場合もそれぞれの色素のシグナルのみが検出された (図 6)。核酸抽出用のコントロール DNA を反応液に加えた場合も特異的な色素 (Cy5) のシグナルのみが検出された (図 7)。いずれの感度も 10<sup>1</sup> コピーから 10<sup>0</sup> コピーであった (図 7)。

検体にニパウイルスが含まれると想定し、実験室診断を行なうための検体処理条件 (ウイルス不活化条件) を検討した。ウイルスを添加したヒト血清を熱処理 (56°C, 30 分) あるいは紫外線処理 (312nm, 2.5mW, 30 分) のみではウイルスの不活化は十分ではなかった (それぞれ 2/3, 1/3 のチューブで不完全) が、併用により完全なウイルスの不活化が得られた (図 8)。

ザイールエボラウイルス、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、ザイールエボラウイルス、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。ザイー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 9)。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 10)。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

Maksyutov らが報告した痘瘡ウイルス, サル痘ウイルス, 水痘・帯状疱疹ウイルスを区別して検出するリアルタイム PCR を国立感染症研究所ウイルス第一部の実験室に導入し, 同程度(以上)の感度が観察された。痘瘡ウイルスが用いられたと考えられるバイオテロの発生時において, 迅速に病原体を特定する方法として活用できると考えられる。導入したリアルタイム PCR は現時点では合成した DNA を用いて評価しているため, 感度や特異性については実際のウイルスを用いた確認が必要である。サル痘ウイルスを含めいくつか関連ウイルスが手元にあるので, それらを用いた確認が今後必要である。

ニパウイルス感染症を疑う事例において, 血清学的な実験室診断を安全に行なうための検体処理条件を明らかにできた。

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

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

バイオテロ発生時の病原体特定の方法の一つであるウイルス分離の手法を確認した。

日本でのバイオテロにおける病原体の特定力がより一層強化されたと言える。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Taniguchi S, Fukuma A, Tani H, Fukushi S, Saijo M, Shimojima M. A neutralization assay with a severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strain that makes plaques in inoculated cells. *J Virol Methods*. 2017 244:4-10.
- 2) Suda Y, Chamberlain J, Dowall S, Saijo M, Horimoto T, Hewson R, Shimojima M. The development of a novel diagnostic assay that uses a pseudotyped vesicular stomatitis virus for the detection of neutralising activity to Crimean-Congo haemorrhagic fever virus. *Jpn J Infect Dis*. 71(3):205-208
- 3) Tani H, Komeno T, Fukuma A, Fukushi S, Taniguchi S, Shimojima M, Uda A, Morikawa S, Nakajima N, Furuta Y, Saijo M. Therapeutic effects of favipiravir against severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection in a lethal mouse model: Dose-efficacy studies upon oral administration. *PLoS One*. 2018;13(10):e0206416. doi: 10.1371/journal.pone.0206416. eCollection 2018.
- 4) Kimura T, Fukuma A, Shimojima M, Yamashita Y, Mizota F, Yamashita M, Otsuka Y, Kan M, Fukushi S, Tani H, Taniguchi S, Ogata M, Kurosu T, Morikawa S, Saijo M, Shinomiya H. Seroprevalence of severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) virus antibodies in humans and animals in Ehime prefecture, Japan, an endemic region of SFTS. *J Infect Chemother*. 2018;24(10):802-806. doi: 10.1016/j.jiac.2018.06.007. Epub 2018 Jul 13.
- 5) Demetria C, Smith I, Tan T, Villarico D, Simon EM, Centeno R, Tachedjian M, Taniguchi S, Shimojima M, Miranda NLJ, Miranda ME, Rondina MMR, Capistrano R, Tandoc A 3rd, Marsh G, Eagles D, Cruz R, Fukushi S. Reemergence of Reston ebolavirus in Cynomolgus Monkeys, the

- Philippines, 2015. *Emerg Infect Dis.* 2018;24(7):1285-1291. doi: 10.3201/eid2407.171234.
- 6) Yamada S, Shimojima M, Narita R, Tsukamoto Y, Kato H, Saijo M, Fujita T. RIG-I-Like Receptor and Toll-Like Receptor Signaling Pathways Cause Aberrant Production of Inflammatory Cytokines/Chemokines in a Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Infection Mouse Model. *J Virol.* 2018 Jun 13;92(13). pii: e02246-17. doi: 10.1128/JVI.02246-17. Print 2018 Jul 1.
- 7) Ogawa M, Shirasago Y, Ando S, Shimojima M, Saijo M, Fukasawa M. Caffeic acid, a coffee-related organic acid, inhibits infection by severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in vitro. *J Infect Chemother.* 2018;24(8):597-601. doi: 10.1016/j.jiac.2018.03.005. Epub 2018 Apr 5.
- 8) Matsumoto C, Shinohara N, Furuta RA, Tanishige N, Shimojima M, Matsubayashi K, Nagai T, Tsubaki K, Satake M. Investigation of antibody to severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV) in blood samples donated in a SFTS-endemic area in Japan. *Vox Sang.* 2018;113(3):297-299. doi: 10.1111/vox.12629. Epub 2018 Jan 22.
- 9) Egawa K, Shimojima M, Taniguchi S, Nagata N, Tani H, Yoshikawa T, Kurosu T, Watanabe S, Fukushima S, Saijo M. Virulence, pathology, and pathogenesis of Pteropine orthoreovirus (PRV) in BALB/c mice: Development of an animal infection model for PRV. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(12):e0006076. doi: 10.1371/journal.pntd.0006076. eCollection 2017 Dec.
- 10) Taniguchi S, Maeda K, Horimoto T, Masangkay JS, Puentespina R Jr, Alvarez J, Eres E, Cosico E, Nagata N, Egawa K, Singh H, Fukuma A, Yoshikawa T, Tani H, Fukushima S, Tsuchiaka S, Omatsu T, Mizutani T, Une Y, Yoshikawa Y, Shimojima M, Saijo M, Kyuwa S. First isolation and characterization of pteropine orthoreoviruses in fruit bats in the Philippines. *Arch Virol.* 2017;162(6):1529-1539. doi: 10.1007/s00705-017-3251-2. Epub 2017 Feb 11.
- 11) Kaneko M, Shikata, Matsukage S, Maruta M, Shinomiya H, Suzuki T, Hasegawa H, Shimojima M, Saijo M. A patient with severe fever with thrombocytopenia syndrome and hemophagocytic lymphohistiocytosis-associated involvement of the central nervous system. *J Infect Chemother.* 2017;24(4):292-297. doi: 10.1016/j.jiac.2017.10.016.
- 12) Fukushi S, Fukuma A, Kurosu T, Watanabe S, Shimojima M, Shirato K, Iwata-Yoshikawa N, Nagata N, Ohnishi K, Ato M, Melaku SK, Sentsui H, Saijo M. Characterization of novel monoclonal antibodies against the MERS-coronavirus spike protein and their application in species-independent antibody detection by competitive ELISA. *J Virol Methods.* 2018;251:22-29. doi: 10.1016/j.jviromet.2017.10.008..
- 13) 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: 130(2):799-812. doi: 10.1172/JCI129171.
- 14) 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;535:102-110. doi: 10.1016/j.virol.2019.06.014.
- 15) Park ES, Shimojima M, Nagata N, Ami Y, Yoshikawa T, Iwata-Yoshikawa N, Fukushima 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;9(1):11990. doi: 10.1038/s41598-019-48317-8.
- 16) 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;536:119-124. doi: 10.1016/j.virol.2019.07.025. Epub 2019 Jul 30.
  - 17) 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;15(4):e1007675. doi: 10.1371/journal.ppat.1007675. eCollection 2019 Apr.
  - 18) 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
  - 19) 下島昌幸. エボラウイルス. ウイルス検査法—臨床と検査室のための手引き, 春恒社, 東京, p333-335, 2018
2. 学会発表
- 1) 下島昌幸. 国際緊急援助隊・感染症対策チームによるコンゴ民主共和国における黄熱対策支援. 第 17 回日本バイオセーフティ学会総会・学術集会(教育講演), 2017 年 12 月 11 日
  - 2) Kawagishi T, Kanai Y, Nouda R, Tani H, Shimojima M, Saijo M, Matsuura Y, Kobayashi T. Nelson bay orthoreovirus cell attachment protein  $\sigma C$  determines strain-specific differences in viral infectivity and pathogenesis. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2017, Osaka (W2-3-09)
  - 3) Kurosu T, Okuzaki D, Limkittikul K, Shimojima M, Fukushi S, Watanabe S, Saijo M. The dynamics of disease progression in severe dengue. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2017, Osaka (W2-4-04)
  - 4) Fukushi S, Kurosu T, Watanabe S, Shimojima M, Shirato K, Matsuyama S, Yoshikawa-Iwata N, Nagata N, Ohnishi K, Ato M, Sentsui H, Saijo M. Development of competitive ELISA for detecting serologic responses to MERS-CoV using novel monoclonal antibodies against spike protein. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2017, Osaka (W2-4-11)
  - 5) Shimojima M, Taniguchi S, Ami Y, Nagata N, Fukushi S, Kurosu T, Watanabe S, Tani H, Fukuma A, Iwata-Yoshikawa N, Saijo M. A non-human primate model for severe fever with thrombocytopenia syndrome SFTS. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2017, Osaka (W2-5-05)
  - 6) Watanabe M, Arii J, Shimojima M, Kato A, Kawaguchi Y. A host cell membrane protein interacts with HSV-1 gE and promotes viral cell-to-cell spread. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2017, Osaka (W2-6-02)
  - 7) Onishi M, Kanai Y, Kawagishi T, Nouda R, Pannacha P, Shimojima M, Saijo M, Matsuura Y, Kobayashi T. Analysis of genome packaging mechanism of Nelson bay orthoreovirus. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 24, 2017, Osaka (P1-DRO-03)
  - 8) Nouda R, Kawagishi T, Kanai Y, Shimojima M, Saijo M, Matsuura Y, Kobayashi T. Functional analysis of Nelson bay orthoreovirus p17 protein. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 24, 2017, Osaka (P1-DRO-04)
  - 9) Watanabe S, Marsh G, Shimojima M, Fukushi S, Kurosu T, Saijo M. The expression of hendra virus F gene is downregulated by its untranslated region. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2017, Osaka (P2-N1-07)
  - 10) Taniguchi S, Shimojima M, Fukushi S, Kurosu T, Tani H, Yoshikawa T, Morikawa

- S, Kato F, Maeki T, Tajima S, Lim CK, Saijo M. Comparative analysis of viral replication and transcription function of severe fever with thrombocytopenia virus and Heartland virus. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2017, Osaka (P2-N1-08)
- 11) Tani H, Fujii H, Taniguchi S, Fukushi S, Kurosu T, Shimojima M, Morikawa S, Saijo M. The protein kinase inhibitors inhibit entry of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in vitro. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2017, Osaka (P2-N4-13)
- 12) 渡辺瑞季, 有井潤, 下島昌幸, 川口寧 単純ヘルペスウイルス gE と相互作用して細胞間感染を促進する宿主因子の同定 第 160 回日本獣医学会学術集会 2017 年 9 月 13 日
- 13) 下島昌幸, 谷口怜, 網康至, 永田典代, 福士秀悦, 黒須剛, 渡辺俊平, 谷英樹, 福岡藍子, 岩田奈織子, 西條政幸 重症熱性血小板減少症候群 SFTS の霊長類モデル 第 160 回日本獣医学会学術集会 2017 年 9 月 13 日
- 14) 渡辺俊平, 須田遊人, 福士秀悦, 黒須剛, 西條政幸, 下島昌幸 ヘビのアレナウイルスの糖蛋白質 (GP) は機能的にフィロウイルスの GP に類似する 第 160 回日本獣医学会学術集会 2017 年 9 月 15 日
- 15) 佐藤(大久保)梢, 熊谷由美, 福士秀悦, 下島昌幸, 西条政孝, 山野公明, 大西真 新興回帰熱の新規抗体検査用抗原の性能評価に関する研究 第 160 回日本獣医学会学術集会 2017 年 9 月 15 日
- 16) Tomoki Yoshikawa, Satoshi Taniguchi, Hirofumi Kato, Hikaru Fujii, Miho Shibamura, Shumpei Watanabe, Kazutaka Egawa, Takuya Inagaki, Satoko Sugimoto, Supranee Phanthanawiboon, Shizuko Harada, Takeshi Kurosu, Shuetsu Fukushi, Masayuki Shimojima, Souichi Yamada, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. Protection of mice from a lethal challenge with SFTS virus by immunization with a novel recombinant LC16m8 expressing SFTS virus genes. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 28, 2018, Kyoto (W1-2-07)
- 17) Shuetsu Fukushi, Satoshi Taniguchi, Shumpei Watanabe, Takeshi Kurosu, Tomoki Yoshikawa, Masayuki Shimojima, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. Re-emergence of Reston Ebola virus in Cynomolgus monkeys in the Philippines, 2015. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 28, 2018, Kyoto (W1-2-19)
- 18) Ryotaro Nouda, Takahiro Kawagishi, Yuta Kanai, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Yoshiharu Matsuura, Takeshi Kobayashi. Fusogenic bat-borne orthoreovirus p17 protein regulates viral replication in a host-specific manner. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 28, 2018, Kyoto (W1-6-03)
- 19) Satoshi Taniguchi, Tomoki Yoshikawa, Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushi, Takeshi Kurosu, Hideki Tani, Fumihiko Kato, Takahiro Maeki, Shigeru Tajima, Chang-Kweng Lim, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. Study of the role of untranslated regions of the S segment genome of Lymphocytic Choriomeningitis Virus. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2018, Kyoto (W2-4-09)
- 20) Eun-Sil Park, Masayuki Shimojima, Tomoki Yoshikawa, Noriyo Nagata, Naoko Iwata, Shuetsu Fukushi, Shumpei Watanabe, Yasushi Ami, Takeshi Kurosu, Ken Maeda, Koichi Imaoka, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa. SFTS virus causes lethal severe fever with thrombocytopenia syndrome in Cats. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2018, Kyoto (W2-4-10)
- 21) Supranee Phanthanawiboon, Takeshi Kurosu, Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushi, Tomoki Yoshikawa, Shumpei Watanabe, Tadaki Suzuki, Noriyo Nagata, Naoko Iwata-Yoshikawa, Masayuki Saijo. Hematopathogenesis of chimeric dengue mouse model. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2018, Kyoto (W2-6-02)
- 22) Takeshi Kurosu, Daisuke Okuzaki, Shuetsu Fukushi, Masayuki Shimojima, Supranee Phanthanawiboon, Masayuki

- Saijo. Inflammation amplifier plays a critical role in severe dengue hemorrhagic fever. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 29, 2018, Kyoto (W2-6-06)
- 23) Masayuki Shimojima, Taishi Onodera, Yoshimasa Takahashi, Satoko Sugimoto, Shuetsu Fukushi, Takeshi Kurosu, Tomoki Yoshikawa, Masayuki Saijo. Therapeutic effects of human monoclonal antibodies to SFTS virus. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 30, 2018, Kyoto (W3-5-13)
- 24) Takahiro Kawagishi, Yuta Kanai, Yusuke Sakai, Ryotaro Nouda, Hideki Tani, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Yoshiharu Matsuura, Takeshi Kobayashi. Nelson Bay reovirus  $\sigma$ C body domain is associated with strain-specific differences in viral replication. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 30, 2018, Kyoto (W3-6-03)
- 25) Motohiko Ogawa, Yoshitaka Shirasago, Shuji Ando, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Masayoshi Fukasawa. Caffeic acid, a coffee-related organic acid, inhibits infection with severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 28, 2018, Kyoto (P1-AV-29)
- 26) Hikaru Fujii, Hideki Tani, Kazutaka Egawa, Satoshi Taniguchi, Tomoki Yoshikawa, Chang-Kweng Lim, Mutsuyo Takayama-Ito, Takahiro Maeki, Takeshi Kurosu, Shuetsu Fukushi, Masayuki Shimojima, Akihiko Uda, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. Establishment of an animal model of Heartland virus infection and evaluation of the efficacy of ribavirin and T-705 in vitro and in vivo. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 28, 2018, Kyoto (P1-AV-31)
- 27) Miyuki Kimura, Kazutaka Egawa, Masayuki Shimojima, Hikaru Fujii, Hiroshi Yamada, Long Tan, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo, Hideki Tani. Characterization of pseudotyped vesicular stomatitis virus bearing the Heartland virus envelope protein. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 28, 2018, Kyoto (P1-VE-09)
- 28) 下島昌幸, 谷口怜, 網康至, 永田典代, 福士秀悦, 黒須剛, 渡辺俊平, 谷英樹, 福間藍子, 岩田奈織子, 西條政幸 重症熱性血小板減少症候群 SFTS の霊長類致死モデル SFTS 研究会 2018 年 9 月 東京
- 29) 藤井ひかる, 谷英樹, 谷口怜, 吉河智城, 林昌宏, 伊藤睦代, 前木孝洋, 黒須剛, 福士秀悦, 下島昌幸, 宇田晶彦, 米納孝, 古田要介, 森川茂, 西条政幸 SFTSV および HRTV 感染におけるリバビリンおよびファビピラビルの抗ウイルス効果の比較(シンポジウム) SFTS 研究会 2018 年 9 月 東京
- 30) 末盛浩一郎, 東太一, 山中篤志, 姫路大輔, 川村昌史, 葉久貴司, 大毛宏喜, 谷口智宏, 今滝修, 高橋徹, 石田正之, 日高道弘, 金子正彦, 池田賢一, 上国料千夏, 垣花泰之, 石丸敏之, 竹中克斗, 下島昌幸, 河野茂, 西条政幸, 安川正貴 重症熱性血小板減少症候群に対するファビピラビルの有効性と安全性の検討(シンポジウム) SFTS 研究会 2018 年 9 月 東京
- 31) Masayuki Shimojima. Epidemiological study on severe fever with thrombocytopenia syndrome. 15th Taiwan-Japan Symposium on Communicable Diseases and Prevention, and Collaborative Project Reports. Sep 3-4, 2018, Taipei
- 32) 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 戸山サンライズ
- 33) 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)
- 34) 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)
- 35) 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)
- 36) 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)
- 37) 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)
- 38) 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)
- 39) 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)
- 40) 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)
- 41) 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)
- 42) 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)
- 43) 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)
- 44) 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)
- 45) 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)
- 46) 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)

47) 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 於：山口大学学生会館大ホール

#### 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



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Virological Methods

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jviromet](http://www.elsevier.com/locate/jviromet)



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



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

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

### ABSTRACT

**Article history:**  
Received 9 February 2016  
Received in revised form 23 July 2016  
Accepted 25 July 2016  
Available online 28 July 2016

**Keywords:**  
Variola virus  
Monkeypox virus  
Varicella-zoster virus  
Real-time PCR

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

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

## 天然痘 Smallpox

# 鑑別が重要！



ヒト サル痘



天然痘

## 水疱瘡



図2: 痘瘡(天然痘)の特徴的な臨床症状(体表の水疱)とサル痘および水痘(水疱瘡)の臨床症状

# Primer and Probe

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

図3: 痘瘡ウイルス (VARV), サル痘ウイルス (MPXV), 水痘・帯状疱疹ウイルス (VZV) の表示遺伝子を検出するプライマーおよびプローブの配列とラベル, 核酸抽出コントロールのプローブの配列とラベル

## DNA standards (PCR product)

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

図4: 人工合成した各ウイルスのスタンダード DNA および核酸抽出コントロールの配列

Reaction setup

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

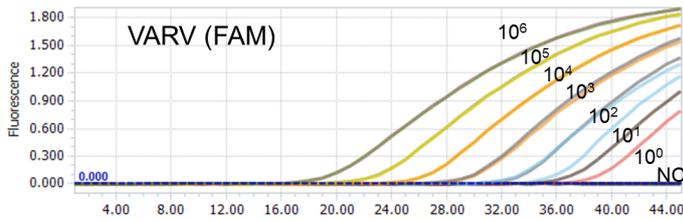
PCR condition

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

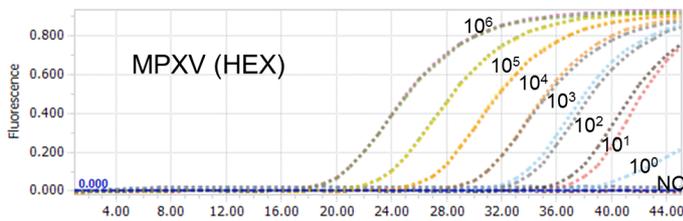


QuantiTect Probe PCR Kits

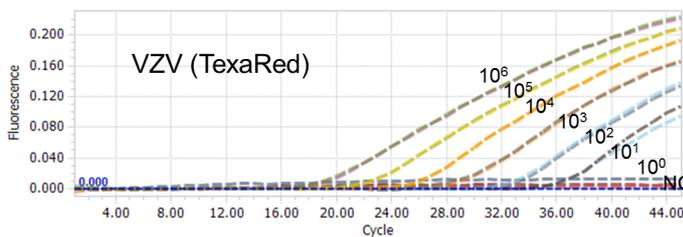
図5:リアルタイム PCR の反応液の組成と反応条件



primer probe Mix2

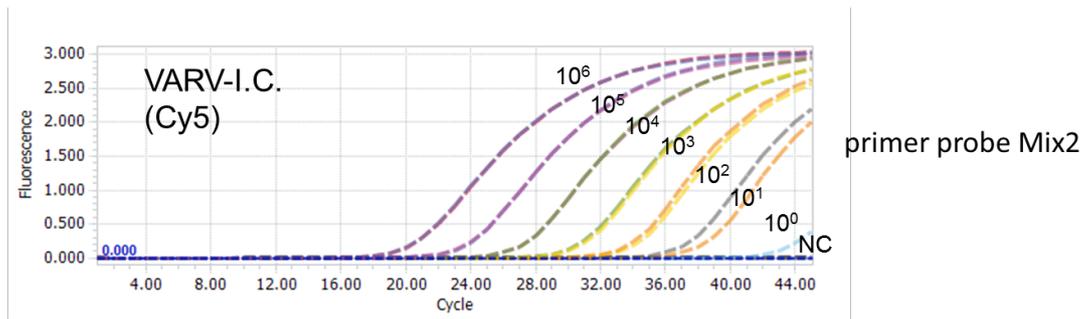


primer probe Mix2



primer probe Mix2

図6:リアルタイム PCR における添加スタンダード DNA 量(図中)とシグナルの検出(横軸はサイクル数)



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

図7: 核酸抽出コントロールの添加量(図中)とシグナルの検出(横軸はサイクル数), Ct 値

## 平成30年: ニパウイルスの不活化条件の検討

- ニパウイルスもバイオテロで用いられる
- 実験室診断の安全な実施の確保

### 成果

- 疑似検体におけるウイルスの完全な不活化は熱処理と紫外線処理の併用で得られることが判明
  - 熱処理のみ(56°C, 30分)では不完全
  - 紫外線処理のみ(312nm, 2.5mW, 30分)でも不完全

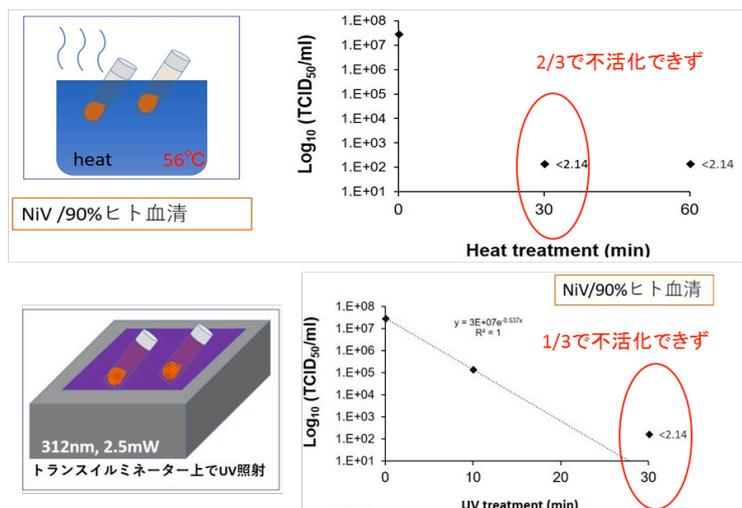
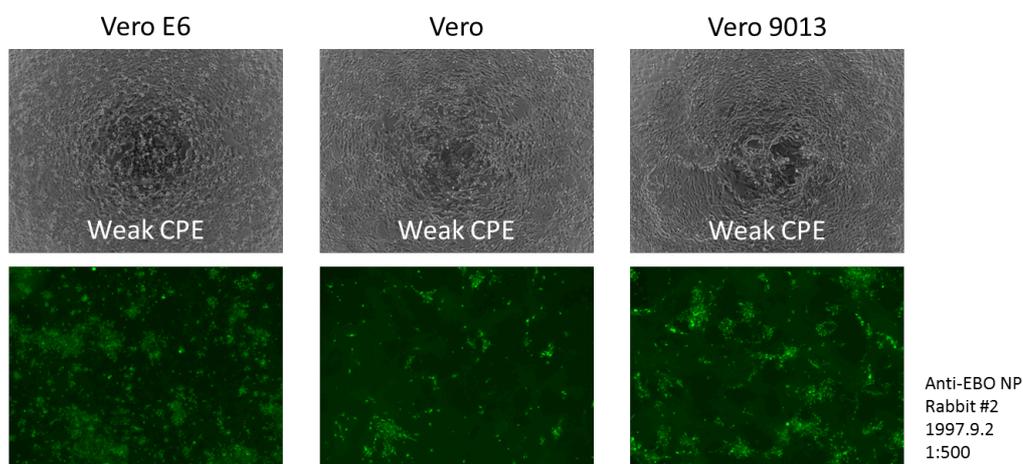


図8: ニパウイルスを含む検体のウイルス不活化処理の条件検討

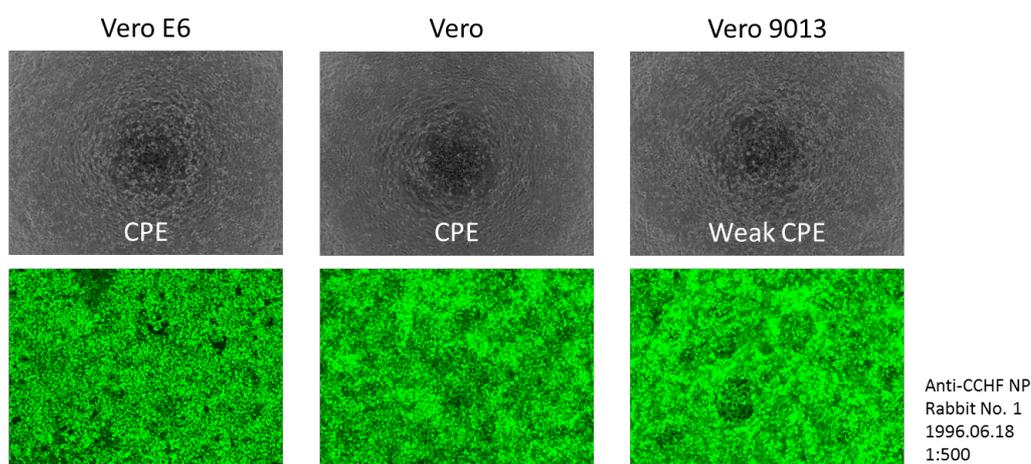
## ZEBOV-Yambuku P1 titration



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

図9: ザイールエボラウイルスの力価測定

## CCHFV-Bagdad12 P1 titration



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

図10: クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの力価測定



平成 29 年度～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:日本では痘瘡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。LC16m8 の長期保存安定性成績(製剤:10年間, 原薬:5年間)により、LC16m8 の高い保存安定性を確認した。また、本邦の国際貢献海外派遣先であるアフリカ地域では、サル痘ウイルスの散発的な流行が報告されており、近年の調査ではヒトからヒトへの伝播が発生し、痘そうワクチン未接種の若い世代に発症者が多いことが報告されている。そこで、痘そうワクチン LC16m8 を1回接種された成人初回接種者について調査した結果、痘そうワクチン LC16m8 は、米国で承認、備蓄されている第1世代の痘そうワクチンである Dryvax と同程度のサル痘ウイルスに対する中和抗体誘導能を有することが示唆された。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

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

細胞培養痘瘡ワクチン 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)。当時の痘瘡ワクチンの定期接種は、小児に対して予防目的で池田株、大連 I 株や LC16m8 の親株である Lister 株が3期、3回の接種が実施されていたが、WHO(世界保健機関)の天然痘根絶計画が進み、日本では1976年に痘瘡ワクチンの定期接種が中止となった。

近年痘瘡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、本邦では痘瘡ワクチン 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。そこで、日本国内に備蓄されている痘瘡ワクチン(LC16m8)の製造から備蓄年数による品質変化の推移を評価するために、これまでの研究で指定された3つの製造ロットの長期保存安定性成績

(製剤:10年間, 原薬:5年間)を評価した。

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。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、痘瘡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、痘瘡ワクチン 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。平成 29 年度から令和元年度の調査研究で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

### 1. 国家備蓄されている痘瘡ワクチン LC16m8 の製品品質の継続した確認

日本国内に備蓄されている痘瘡ワクチン(LC16m8)の製造から備蓄年数による品質変化の推移を評価するために、これまでの研究で指定された 3 つの製造ロットの長期保存安定性成績(製剤:10 年間, 原薬:5 年間)を評価した。

### 2. サル痘ウイルスに対する中和抗体誘導能の評価

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瘡ワクチン LC16m8 の第 I/II 相無作為二重盲検臨床試験で取得され、凍結保管されている血清検体を用いて実施した。3 年間の調査で、48 名の対象者の計 173 検体について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 PRNT<sub>50</sub>)を測定した。

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 PRNT<sub>50</sub>)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、2017 年 11 月に 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

### 1. 国家備蓄されている痘瘡ワクチン LC16m8 の製品品質の継続した確認

LC16m8 の長期保存安定性成績(製剤:10 年間, 原薬:5 年間)により、LC16m8 の高い保存安定

性を確認した(表 1, 表 2)。また、成績は WHO 痘瘡ウイルス専門家会議(WHO 本部, 2018 年 9 月 26 日)でも報告し、高い評価を得た。

### 2. サル痘ウイルスに対する中和抗体誘導能の評価

細胞培養弱毒生痘瘡ワクチン 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痘瘡ワクチン 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。各ワクチン接種群の各ポイントでの中和抗体陽性率(Anti-Monkeypox PRNT<sub>50</sub> が  $\geq 10$  を陽性基準)及び Anti-Monkeypox PRNT<sub>50</sub> の幾何平均(GMT)を表 3 に示す。痘瘡ワクチン LC16m8 を 1 回接種された成人初回接種者について調査した結果、痘瘡ワクチン LC16m8 は、米国で承認、備蓄されている第 1 世代の痘瘡ワクチンである 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。

## D. 考察

本研究により、痘瘡ワクチン LC16m8 は製剤及び原薬ともに高い長期保存安定性を有していることから、有事に備えて長期保存が要求される生物テロ対応医薬品としての要件を満たすことが確認できた。

1980 年の天然痘撲滅宣言を受けて、全世界での痘瘡ワクチン接種が中止され、本邦においても 1976 年に痘瘡ワクチン定期接種が中止され、40 歳以下の世代では痘瘡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瘡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、本研究では痘瘡ワクチン 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。その結果、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

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、かつ、現在世界で唯一、安定的な生産・供給体制が整備された痘瘡ワクチンであるが、更に高い長期保存安定性も有しており、生物テロ対抗医薬品としての高い有用性が示唆された。

細胞培養弱毒生痘瘡ワクチン LC16m8 を 1 回接種された過去に種痘歴のない成人被験者について調査した結果、痘瘡ワクチン LC16m8 は、米国で承認・備蓄されている第 1 世代の痘瘡ワクチンである 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、更に日本人の痘瘡ワクチン 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

該当なし

#### 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  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし
3. その他  
該当なし

表1. 痘瘡ワクチン LC16m8 の製剤の長期保存安定性成績

(遮光して-35℃以上-20℃以下で保存)

Month	0	3	6	9	12	18	24	36	48	60	72	84	96	108	120	
Appearance	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	
Sterility	Pass	-	-	-	Pass	-	Pass	Pass	-	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	
Weight Variation	Pass	-	-	-	-	-	-	Pass	-	-	Pass	Pass	Pass	-	-	
Moisture (%)	V03	0.42	0.87	0.66	0.44	0.47	0.46	0.62	0.56	0.80	0.60	0.51	0.35	0.60	0.43	0.43
	V04	0.47	0.81	0.69	0.41	0.58	0.44	0.57	0.58	0.73	0.60	0.43	0.35	0.60	0.32	0.32
	V06	0.47	0.86	0.77	0.21	0.77	0.46	0.76	0.54	0.66	0.61	0.54	0.26	0.61	0.36	0.36
Potency (Log <sub>10</sub> PFU/mL)*	V03	8.80	8.83	8.57	8.85	8.87	8.82	8.72	8.83	8.78	8.79	8.78	8.72	8.81	8.83	8.83
	V04	8.79	8.91	8.72	8.87	8.87	8.78	8.82	8.77	8.83	8.84	8.83	8.76	8.76	8.86	8.86
	V06	8.49	8.60	8.39	8.57	8.57	8.49	8.56	8.50	8.57	8.57	8.54	8.49	8.52	8.57	8.57
Stability at 37°C for 4 wks (Pre/Post)	V03	Pass				Pass		Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass
	V04	Pass	-	-	-	Pass	-	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass
	V06	Pass				Pass		Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass

\*: Specification of Potency : ≥ 8 Log<sub>10</sub>PFU/mL  
 -: Not applicable

表2. 痘瘡ワクチン LC16m8 の原薬の長期保存安定性成績

(-80℃±10℃で保存)

Month	0	1	3	6	9	12	18	24	36	48	60	
Appearance (LCDS0001,2,3)	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass
Sterility (LCDS0001,2,3)	Pass	-	-	-	-	Pass	-	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass
Potency*	LCDS0001	9.0	8.9	8.8	8.9	8.9	8.8	8.9	8.9	8.9	8.8	8.9
	LCDS0002	9.0	8.9	9.0	8.9	8.9	9.1	8.9	9.0	9.0	8.9	8.9
	LCDS0003	8.9	8.9	8.9	8.8	8.9	8.9	8.8	8.9	8.8	8.8	8.8

\*: Specification of Potency : ≥ 8 Log<sub>10</sub>PFU/mL  
 -: Not applicable

表3. 痘瘡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	37	11	37		11	
Days after vaccination	30	30	30	180 or 360	30	180 or 360
Seroconversion Rate*	100% (37/37)	100% (11/11)	84% (31/37)	41% (15/37)	91% (10/11)	64% (7/11)
GMT**	801	773	98	73	191	83

\*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)

平成 29 年度～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。本モデルにおける免疫反応を経時的に明らかにした。一時的な好中球の枯渇処理は、感染後の好中球増多、炎症性サイトカイン・ケモカインの高発現を引き起こした。そこで、肝組織におけるクッパー細胞の活性化に着眼し、ウイルス感染の影響の評価を試みた。その結果、好中球枯渇群において有意な肝クッパー細胞の活性化が示された。さらに、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。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、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結論した。本モデルは、今後のオルソポックスウイルスワクチンの開発研究に利用できると考える。

研究協力者

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法

1. 感染実験と材料採取

動物は、日本エスエルシーより購入した BALB/c マウス(接種時、14 週齢メス)を準備し、国立感染症研究所のバイオリスク管理委員会規定に従い、ABSL3 施設にて感染実験を行った。  
ウイルスは、サル痘ウイルスの Zr-599 株を用いた。好中球枯渇のため、抗マウス Ly6G 抗体(1A8, BioXcell 社)を、また、アイソタイプコント

ロールとして rat IgG2a(BioXcell 社)を用いた。これらの抗体をマウスの腹腔内に投与し(一匹あたり 500 µg/500 µL)、半日後にウイルス液(一匹あたり  $2 \times 10^5$  PFU ウイルス量/100 µl)を頸背部に皮下接種した。対照群には細胞培養液を接種した(各群 10 匹、合計4群)、その後、接種 2, 4, 7, 10, 13 日目に抗体投与を行った。16 日間、臨床症状と体重変化を観察した(n = 6)。

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

2. 免疫組織化学法と画像解析法

活性化マクロファージのマーカーである Iba-1 抗原のパラフィン包埋組織上の検出を免疫組織化学法により行った。pH6.0 抗原賦活化液(ニチレイ)を用いて 121 度 10 分の抗原賦活化処理後、一次抗体には抗 Iba-1 ポリクローナル抗体

(Wako)を用いた。ポリマー法によるペルオキシダーゼ標識を行い、ジアミノベンチジンによる可視化後、対比染色にはマイヤーのヘマトキシリンを用いた。

検索対象は中心静脈を撮影中心とした顕微鏡撮影デジタル画像で、撮影倍率 400 倍で画像を得た。計算上、対象面積はおよそ 150,000  $\mu\text{m}^2$  であった。各個体の肝組織切片から 3 カ所を撮影した。色域選択による抗原陽性部位の抽出には、画像解析ソフト Neurolucida (MBF Bioscience)を用い、抽出した画像から解析ソフト Neurolucida explorer (MBF Bioscience)による面積の自動計算を行った。各個体の平均値を統計解析に用いた(n=6)。統計解析は統計解析ソフト Prism 7 (MDF)を用いた。

感染実験において、ウイルス接種 3, 7, 10, 16 日目に一部の動物を安楽殺し、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 63°C60 秒 45 サイクル、37°C30 秒とした。

#### 【倫理面への配慮】

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

### C. 研究結果

#### 1. 感染実験結果

いずれの接種群においても、サル痘ウイルスの皮下接種後に明らかな肉眼病変を示さなかった。しかし、好中球枯渇処理群はウイルス接種後に体重の有意な増加傾向がみられた。白血球数について、好中球枯渇処理群ではウイルス接種の有無に関わらずほぼ同様の動態を

示したが、アイトタイプコントロール処理群では、ウイルス接種3日後に白血球数の増多がみられ、それは、リンパ球と単球の増多によるものであった。好中球枯渇群において単球の軽度の増多が3日目に見られた。

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

#### 2. 肝組織の免疫組織化学的解析

接種 16 日目の肝組織を HE 染色で評価したところ、ウイルス接種群において腫大したクッパ細胞が散見された。抗 Iba-1 抗体を用いた免疫組織化学法により、肝の類洞内に Iba-1 抗原を検出した。抗原陽性部位を色域選択 (RGB スペクトル R, G, B はそれぞれ 197, 176, 147 とした) によってトレースし、その輪郭内の面積を自動計算により算出し各群における面積値を比較した。その結果、抗原陽性面積によるクッパ細胞の活性化の評価はそれぞれ次の様になった。

非感染群において、アイトタイプコントロール投与と Ly6G 抗体投与によるクッパ細胞の活性化への影響に有意な差はみられなかった(p=0.20)。また、アイトタイプコントロール群に対するウイルス接種の影響としては、感染によるクッパ細胞の活性化が有意にみられた (p=0.013)。Ly6G 抗体投与後のウイルスの皮下接種により、クッパ細胞の活性化はいずれの群に対しても有意であり (p<0.01)、好中球の枯渇によって、肝臓内のクッパ細胞に対する感染の影響が強くと認められることが示された。

#### 3. ウイルス動態

アイト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。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

いくつかの急性ウイルス感染症において、好中球の減少は宿主側の重症化因子の一つと考えられている。ワクチニアウイルスを用いたマウスモデル

においても、同様な知見が得られている (Fischer MA et al, 2011). 我々はすでに、BALB/c マウスのサル痘ウイルス不顕性感染のモデルにおいて、抗 Ly6G 抗体投与による好中球枯渇によりウイルス増殖と病変形成が亢進することを示した (平成 26-28 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金 (新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業) 報告書). よって、サル痘ウイルス感染防御において好中球は一定の役割を担っていると考えられている.

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

Iba1 (別名: G1, Daintain/AIF-1) は、単球あるいはマクロファージの細胞質で発現し、炎症応答に関与するタンパク質であり、マクロファージの活性化に関与することが知られている. そのため、活性化マクロファージやミクログリアのマーカーとしてよく利用されている. 一方、細胞の活性化についての形態的評価は困難で、主観的となるため、Iba-1 抗原陽性部位の面積値を評価対象とすることとした.

その結果、Iba-1 抗原の陽性面積値は、ケモカイン・サイトカイン反応の結果と一致した. 本解析法は、ポックスウイルス感染後の宿主応答を組織学的に調べる上で新たな指標となりえる.

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  $2 \times 10^5$  PFU ウイルス量/100  $\mu$ 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思う.

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Sakata M, Tani H, Anraku M, Kataoka M, Nagata N, Seki F, Tahara M, Otsuki N, Okamoto K, Takeda M, Mori Y. Analysis of VSV pseudotype virus infection mediated by rubella virus envelope proteins. *Sci Rep*. 2017. 7(1):11607.
- 2) Taniguchi S, Maeda K, Horimoto T, Masangkay JS, Puentespina R Jr, Alvarez J, Eres E, Cosico E, Nagata N, Egawa K, Singh H, Fukuma A, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Tsuchiaka S, Omatsu T, Mizutani T, Une Y, Yoshikawa Y, Shimojima M, Saijo M, Kyuwa S. First isolation and characterization of pteropine orthoreoviruses in fruit bats in the Philippines. *Arch Virol*. 2017. 162(6):1529-1539.
- 3) Iizuka I, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Fukushi S, Ogata M, Morikawa S, Hasegawa H, Mizuguchi M, Kurane I, Saijo M. A Single Vaccination of Nonhuman Primates with Highly Attenuated Smallpox Vaccine, LC16m8, Provides Long-term Protection against Monkeypox. *Jpn J Infect Dis*. 2017.70(4):408-415.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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  
該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

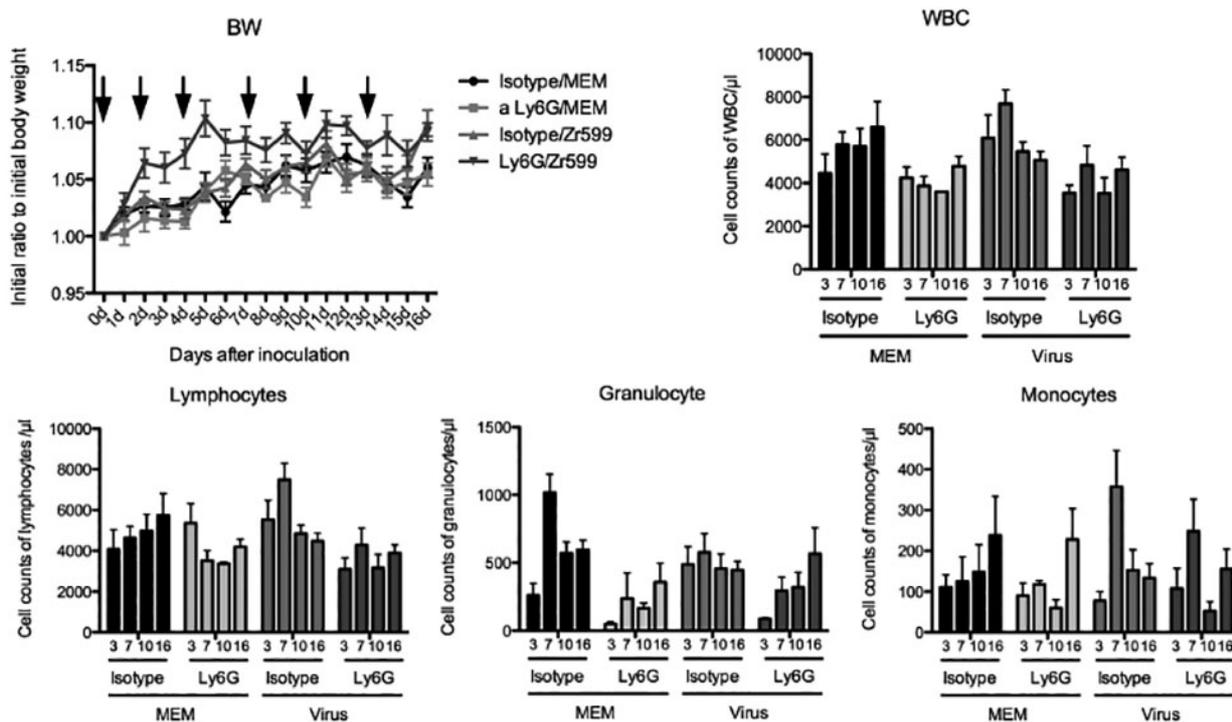


図 1 左上はサル痘ウイルス皮下接種後のマウスの体重変化. Isotype/MEM, アイソタイプコントロール処理後細胞培養液接種; aLy6G/MEM, 好中球枯渇後細胞培養液接種; Isotype/Zr599, アイソタイプコントロール処理後ウイルス接種; Ly6G/Zr599, 接種好中球枯渇処理後ウイルス, 各群 n=6, 矢印は, 抗体投与日を示した. 右上, 下段は順に WBC, 白血球数;リンパ球数, 顆粒球数, 単球数を示した. ウイルス接種 3, 7, 10, 16 日の血液像.

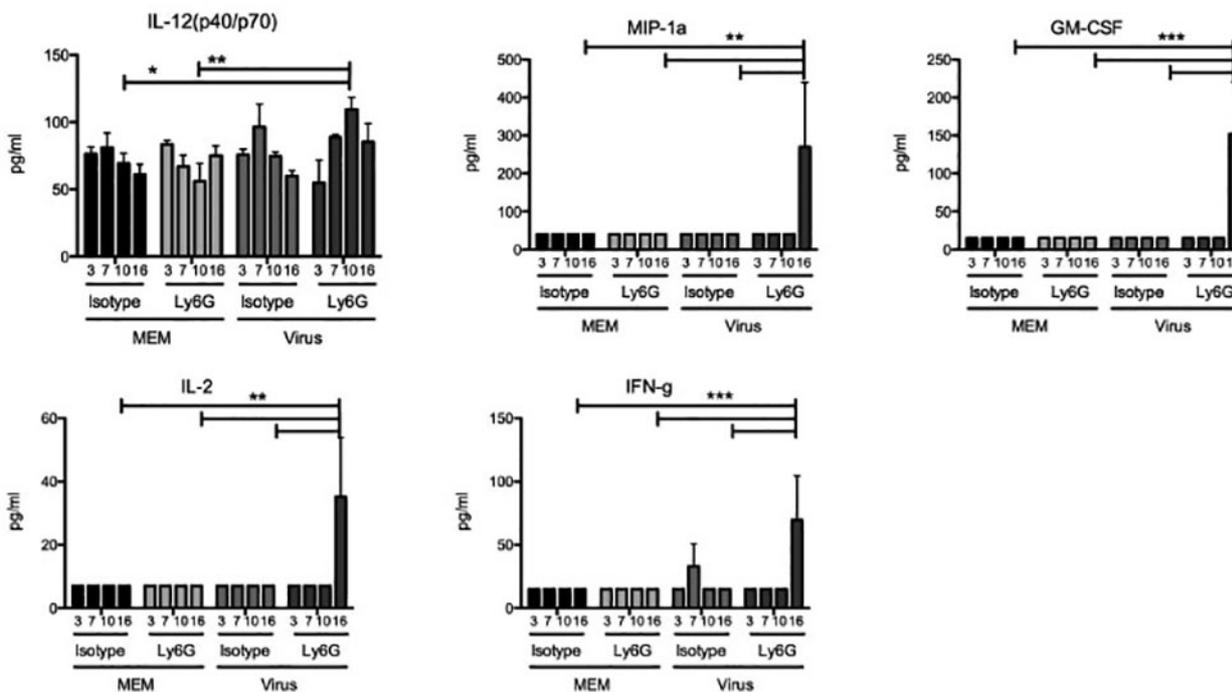


図 2 ウイルス感染後 3, 7, 10, 16 日目の血漿中のサイトカイン, ケモカイン発現量.

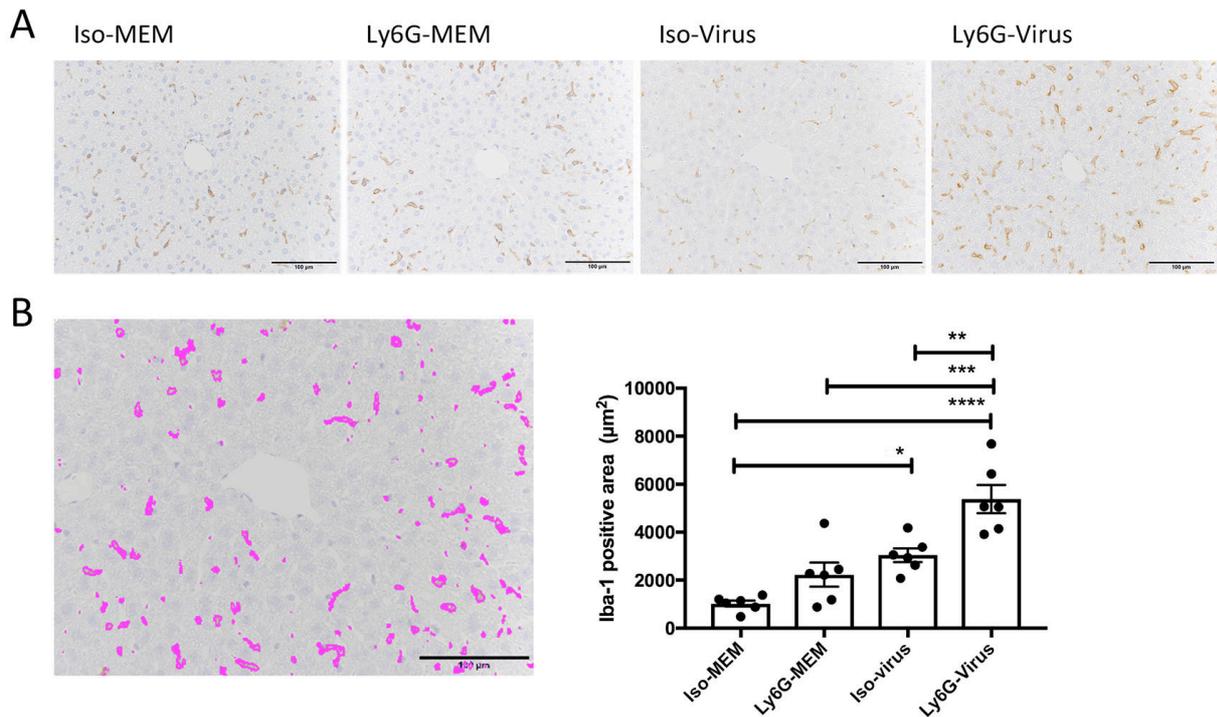


図3 サル痘ウイルス皮下接種16日目の肝組織におけるIba-1陽性細胞の評価。A. 抗Iba-1抗体を用いた免疫組織化学法の組織像。中心静脈を撮影中心として、撮影倍率400倍の画像(面積 約150,000  $\mu\text{m}^2$ )を得た。Iso-MEM, アイソタイプコントロール処理後細胞培養液接種; Ly6G-MEM, 好中球枯渇後細胞培養液接種; Iso-Virus, アイソタイプコントロール処理後ウイルス接種; Ly6G-Virus, 接種好中球枯渇処理後ウイルス, 各群  $n=6$ 。B. 左図 Iba-1 抗原陽性部位を色域により抽出しトレースした画像, 右図 トレース画像から面積を算出し, Iba-1 陽性面積とし One-way ANOVA 解析により比較解析した。\*,  $p<0.05$ ; \*\*,  $p<0.01$ ; \*\*\*,  $p<0.001$ ; \*\*\*\*,  $p<0.0001$ 。

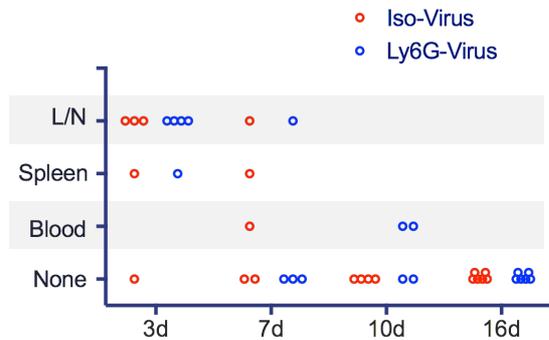


図4 頸部リンパ節, 脾 および血液における経時的なウイルスゲノムの検出 ( $n=4$ ). 各ドットは個体を示す。None はいずれの材料においてもウイルスゲノムが検出されなかった事を示す。

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 森川 茂(H29-30 年度)

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(R01 年度)

研究要旨:Lister 株から低温馴化により LC16 株, LC16mO 株を経由して樹立された. 安全性の高い痘そうワクチン製造用株である LC16m8 株は, 継代培養するとプラークサイズのやや大きい LC16mO 型 (medium size plaque; MSP) の性状を保つウイルスが出現する. MSP は b5r 遺伝子の 1 塩基欠失を相補する変異ウイルスであり, その変異のパターンは 1 塩基挿入や 4 塩基挿入等, 複数あることが分かっている. バイオアッセイで得られる MSP の出現頻度・パターンの解析結果と同様な結果が次世代シーケンス (NGS) 解析により得られる. MSP のうち, 主要な MSP を検出する定量的 PCR 法を開発し, LC16m8 株と特定の MSP を識別可能とした. 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 からはいずれの 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 (国立感染症研究所, 獣医科学部)  
吉河智城, 西條政幸 (同, ウイルス第一部)

#### A. 研究目的

細胞培養痘瘡ワクチンの製造株であるワクシニアウイルス LC16m8 株は, Lister 株から低温馴化により LC16 株, LC16mO 株を経由して樹立された株である. 1970 年代には 10 万人の子供に接種され, その際に重篤な副反応は確認されなかったことから, 安全性の非常に高いワクチン株である. また, 自衛隊での成人への種痘にも用いられ安全性がさらに確認されている. Lister 株は 41℃ 以上でも初代ウサギ腎細胞でのブラック形成能があるのに対し, LC16mO 株と LC16m8 株は 41℃ ではプラークを形成しない (増殖温度感受性), LC16m8 株は, b5r 遺伝子に 1 塩基欠損があり,

正常な B5 蛋白質が作られないために初代ウサギ腎細胞や RK13 細胞におけるプラークサイズが小さい. また Vero E6 細胞ではプラークを作らない. LC16m8 株を継代するとプラークサイズのやや大きい LC16mO 型のウイルス (medium size plaque; MSP) が出現する. これまでの研究で MSP 含有率が 5% 以上になるとウサギ皮膚増殖性が有意に高くなることから, ワクチン製造においては MSP 含有率があるレベル以下であることを保証する試験が行われる. これまでの解析から, MSP は LC16mO 型への復帰株ではなく, b5r 遺伝子の 1 塩基欠失を相補する変異ウイルスであり, その変異のパターンは異なる部位への 1 塩基挿入や 4 塩基挿入等複数あることが分かっている. これまでに, 次世代シーケンス (NGS) 解析とバイオアッセイで得られた MSP の情報と同等の成績が得られることを明らかにした. NGS 解析は取得データの処理に比較的時間を要することから,

簡便にかつ特異的に MSP を検出する方法の開発を目的とし、研究を進めてきた。その結果、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。そこで、品質管理に資する知見として、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. 参照細胞培養ワクチンからの MSP 増幅

参照細胞培養ワクチンには低頻度ではあるが MSP が含まれている。そこで、次世代シーケンスにより多様な SNP が検出された Lot6, 7, 8, 9, 10 及び 12 を Vero E6 細胞に低 moi で感染させ、35°C で 1 週間培養後に凍結融解し遠心した上清を回収した(1 継代培養)、これを繰り返し 3 継代培養した。

### 2. 継代培養した Lot のバイオアッセイ

1) で継代培養したウイルス液を  $10^{-1} \sim 10^{-6}/100 \mu\text{l}$  まで階段希釈し、RK13 細胞、Vero E6 細胞に感染させ、35°C で 1 週間培養した。その後、メチレンブルーにより、プラークを数え、MSP の比率を算出した(バイオアッセイ; Vero E6 における力価/RK13 における力価 $\times 100$ )、それにより、各 Lot に MSP がどの程度含まれるかを検討した。本試験では、極微量の MSP が検出される。

### 3. 継代培養した Lot からの MSP 検出

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

### 4. 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、同様にプラーククローニングを行った。この過程をトータル 3 回行い、268T 挿入型 MSP を作出した。

### 5. 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。

### 6. 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(5)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。

### 7. 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 moi0.1 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】

ヒト検体、動物は使用していないため該当しない。

## C. 研究結果

### 1. MSP 特異的定量 PCR

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

### 2. 参照細胞培養ワクチンからの MSP 増幅

次世代シーケンスにより多様な SNP を含んでいる Lot6, 7, 8, 9, 10 及び 12 を LC16m8 株と MSP のいずれもがプラークを形成できる RK13 細胞と MSP だけがプラークを形成できる Vero E6 細胞でそれぞれバイオアッセイを行った結果, RK13 細胞で  $10^8$  pfu/mL, Vero E6 細胞では  $<10^2$  pfu/mL と MSP は検出限界未満 ( $<10^6$ ) であった。各 Lot を Vero E6 細胞において moi0.01 で 3 回継代培養し, 同様にバイオアッセイを行った結果, 2~3 回継代培養で MSP 出現頻度がほぼ 100%に達した(図3)。

### 3. Vero E6 細胞で 3 代継代培養した参照細胞培養ワクチン Lot 中の MSP 頻度

上記で調製した Vero E6 細胞で継代培養した Lot ウイルス液から DNA を抽出し, MSP 特異的定量 PCR を実施した。その結果, 多数の Lot において継代培養するごとに 267A 挿入型 MSP の比率が増えたため, 267A 挿入型 MSP がメジャーであると推測された。さらに, Lot12 においては 274ATAC 挿入型 MSP のみが検出され, 継代培養ごとに比率が増えたため, MSP 検出には 3 種類(267A 挿入型, 271T 挿入型および 274ATAC 挿入型)のプライマーを用いて行う必要があると考えられた。

### 4. 268T 挿入型の MSP の作出

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 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 シークエ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。

### 5. 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グ温度 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)。

### 6. 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ところ, 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)。

### 7. 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。その結果, 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。

プライマーを用いて行う必要があると考えられた。

#### D. 考察

次世代シーケンスにより多様な SNP を含んでいる 6 種類の Lot を Vero E6 細胞で 3 回継代培養するとバイオアッセイでは 2~3 回継代により MSP の出現頻度がほぼ 100% に達することが分かった。また、その内訳には、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。参照細胞培養ワクチンの 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、主に 268T 挿入型ではあるが、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

#### F. 健康危険情報

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

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tani H, Iha K, Shimojima M, Fukushi S, Taniguchi S, Yoshikawa T, Kawaoka Y, Nakasone N, Ninomiya H, Saijo M, Morikawa S. Analysis of Lujovirus Cell Entry using Pseudotype Vesicular Stomatitis Virus. J Virol. 88(13):7317-7330, 2014

##### 2. 研究発表

- 1) 吉河智城, 福士秀悦, 谷英樹, 福間藍子, 谷口怜, 須田遊人, Harpal Singh, 江川和孝, 下島昌幸, 森川茂, 西條政幸. ワクシニアウイルス LC16m8 株を土台とした組換えワクシニアウイルス作出システムの確立. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜 (2014.11)

#### 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

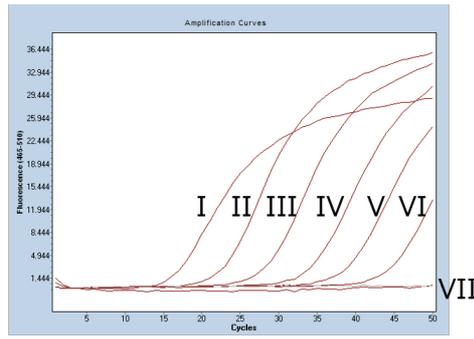
特記事項なし

##### 3. その他

特記事項なし



図 4 268T 挿入型特異的定量 PCR



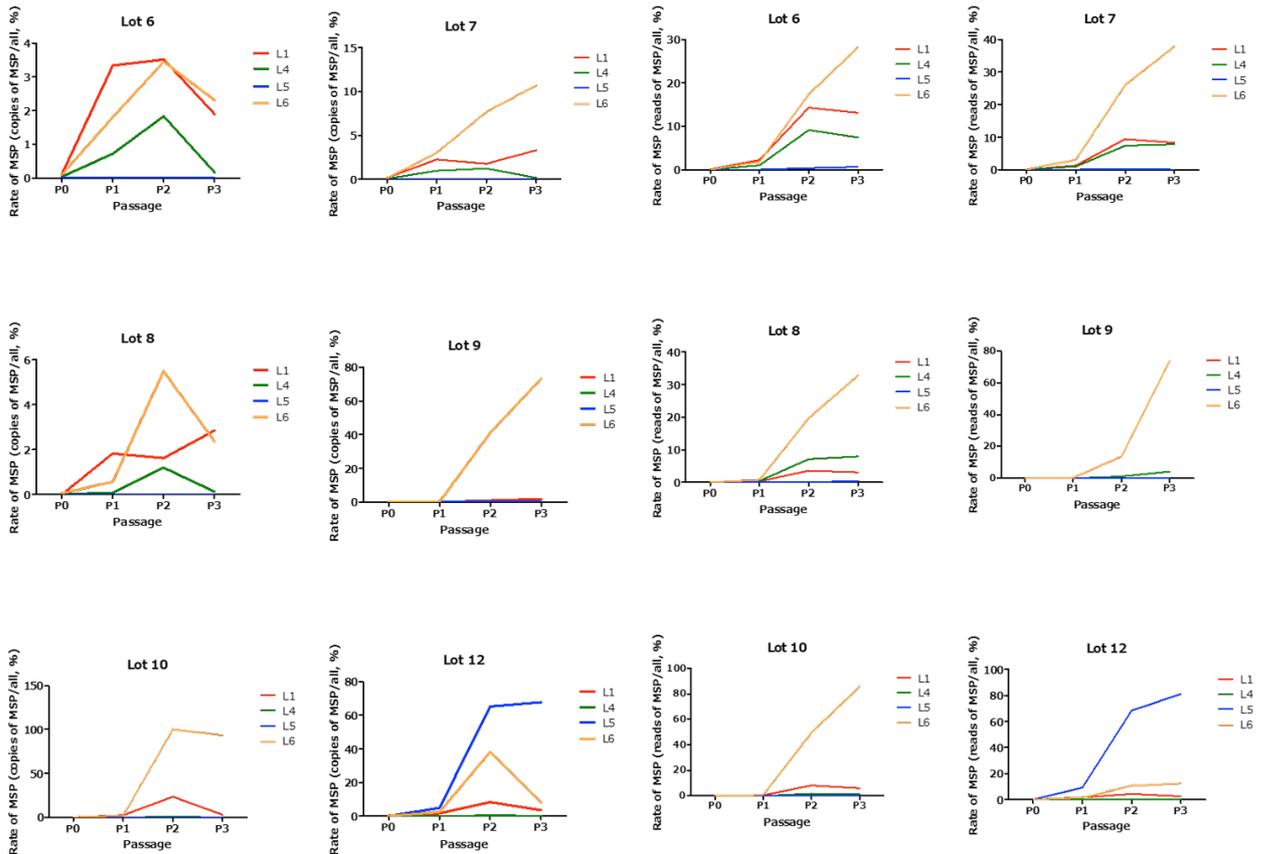
Standard  
 I :  $10^{10}$  copies/uL  
 II :  $10^9$  copies/uL  
 III :  $10^8$  copies/uL  
 IV :  $10^7$  copies/uL  
 V :  $10^6$  copies/uL  
 VI :  $10^5$  copies/uL  
 VII : negative control

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

図 5 MSP 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

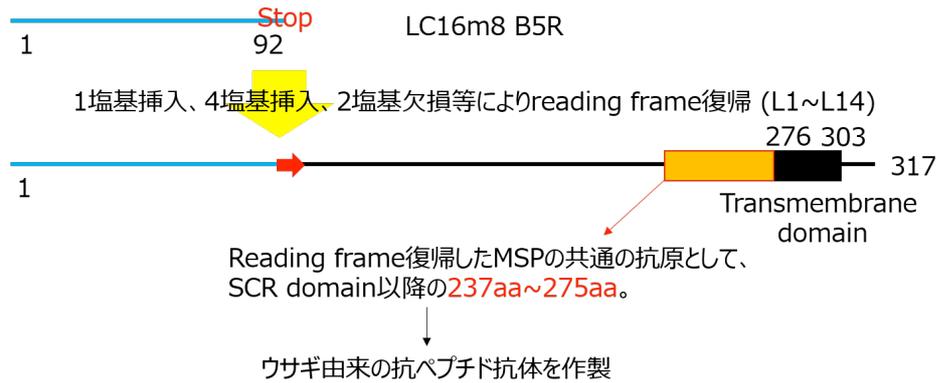
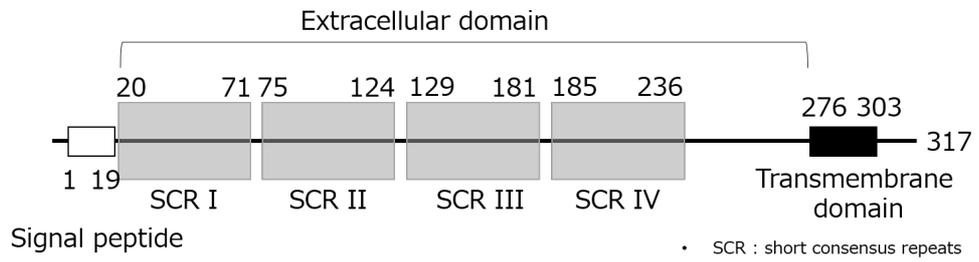
次世代シーケンス解析によるMSP含有率



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

図 6 MSP の B5R domain の抗ペプチド抗体を作製

Vaccinia virus B5R domain



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

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月に Global Health Security Action Group-Laboratory Network(GHSAG-LN)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。GHSAG-LNの日本の責任者であり、かつ、本研究班の研究代表者でもある西條博士の指導のもと、国立感染症研究所の細菌第一部、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)

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。

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。

【倫理面への配慮】

該当しない。

B. 研究方法

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。

カナダより資料1のように生菌のパネルで検査

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40μL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と報告した。

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々が協調し、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。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

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<sup>4</sup>

<sup>4</sup>

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: <a href="mailto:anne.le-fleche@pasteur.fr">anne.le-fleche@pasteur.fr</a> . .
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: <a href="mailto:GrunowR@rki.de">GrunowR@rki.de</a> . .
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: <a href="mailto:antonino.dicaro@inmi.it">antonino.dicaro@inmi.it</a> . .
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: <a href="mailto:kmaeda@nih.go.jp">kmaeda@nih.go.jp</a> . .
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 (CLRN) 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 CLRN Office.

Good Luck!

**Contact info: Bioforensics Assay Development and Diagnostics Laboratory**

**Email: [phac.nml.badd-eedmm.lnm.aspc@canada.ca](mailto: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](mailto: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](mailto: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-cedmm.lnm.aspc@canada.ca](mailto:phac.nml.badd-cedmm.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

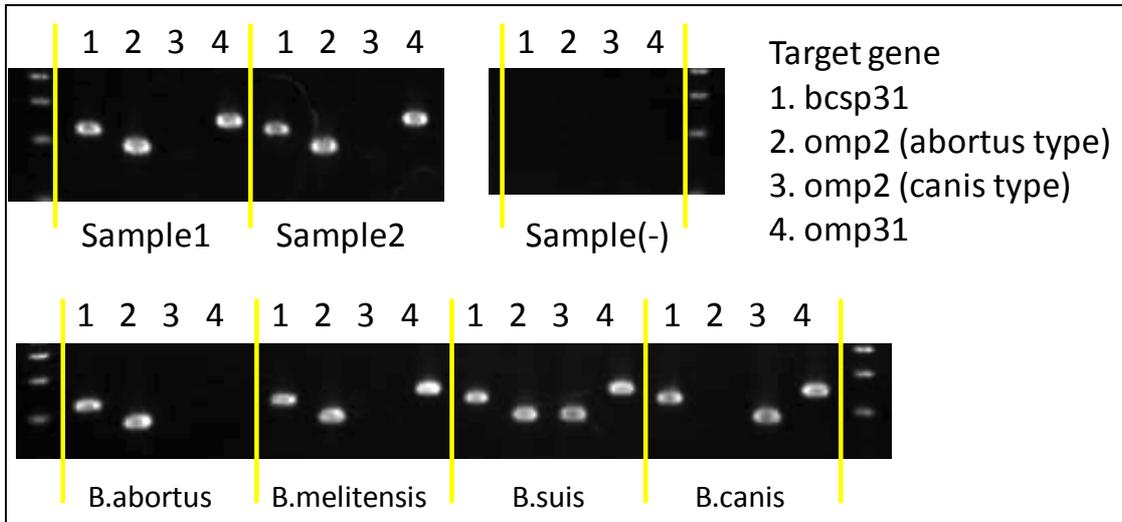
BM: *Brucella melitensis*, BA: *B. abortus*, BS: *B. suis*, BC: *B. canis*

### 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 ( <b>primer pair</b> )
<i>B. abortus</i>	bcsp31 ( <b>B4/B5</b> ), omp2 (abortus-type)( <b>JPR/JPF-ab</b> )
<i>B. melitensis</i>	bcsp31 ( <b>B4/B5</b> ), omp2 (abortus-type)( <b>JPR/JPF-ab</b> ), omp31 ( <b>1S/1AS</b> )
<i>B. suis</i>	All: bcsp31 ( <b>B4/B5</b> ), omp2 (abortus-type)( <b>JPR/JPF-ab</b> ), omp2 (canis-type)( <b>JPR/JPF-ca</b> ), omp31 ( <b>1S/1AS</b> )
<i>B. canis</i>	bcsp31 ( <b>B4/B5</b> ), omp2 (canis-type)( <b>JPR/JPF-ca</b> ), omp31 ( <b>1S/1AS</b> )

## 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 MgCl<sub>2</sub>, 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 µl	164 µl
Forward primer: B4 (10µM)	1 µl (0.4µM)	8 µl
Reverse primer: B5 (10µM)	1 µl (0.4µM)	8 µl
<b>Total</b>	<b>22.5 µl</b>	<b>180 µl</b>

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 µl	164 µl
Forward primer: JPF (10µM)	1 µl (0.4µM)	8 µl
Reverse primer: JPR-ab (10µM)	1 µl (0.4µM)	8 µl
<b>Total</b>	<b>22.5 µl</b>	<b>180 µl</b>

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 µl	164 µl
Forward primer: JPF (10µM)	1 µl (0.4µM)	8 µl
Reverse primer: JPR-ca (10µM)	1 µl (0.4µM)	8 µl
<b>Total</b>	<b>22.5 µl</b>	<b>180 µl</b>

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

##### 0) For *omp31* detection (1S & 1AS)

Reagents	1 reaction	8 reaction
D2W	20.5 µl	164 µl
Forward primer: B4 (10uM)	1 µl (0.4uM)	8 µl
Reverse primer: B5 (10uM)	1 µl (0.4uM)	8 µl

---

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)

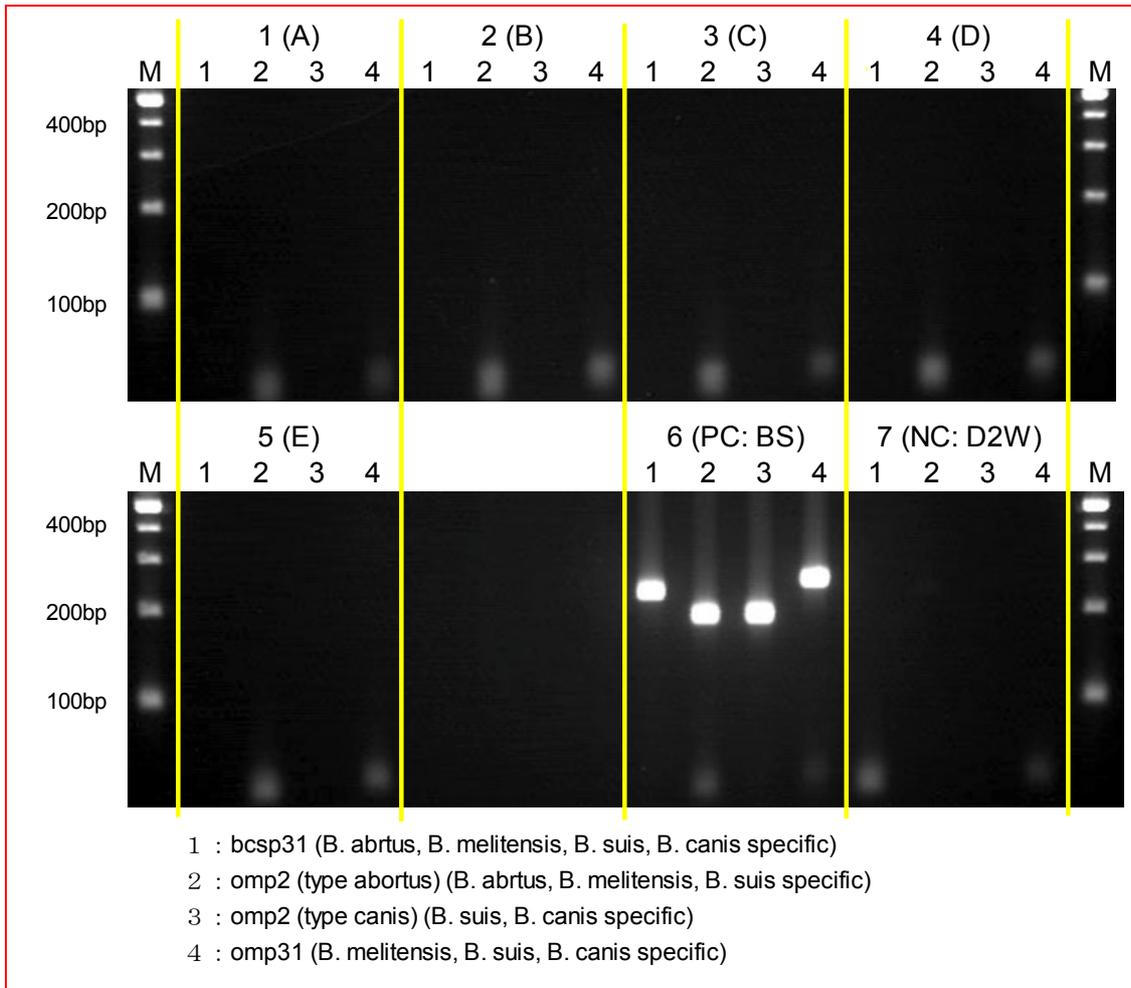
→ 72 °C, 7 min → 4 °C

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>bcp31</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 ml
dNTP Mixture (2.5 mM each)	20 ml
10 mM caf1-F	25 ml
10 mM caf1-R	25 ml
10 mM inv-F	25 ml
10 mM inv-R	25 ml
10 mM pla-F	25 ml
10 mM pla-R	25 ml
10 mM yopM-F	25 ml
10 mM yopM-R	25 ml
H <sub>2</sub> O	172.5 ml
TaKaRa Ex Taq (5 units/μl)	2.5 ml

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

**PCR condition**

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

} 30 cycles

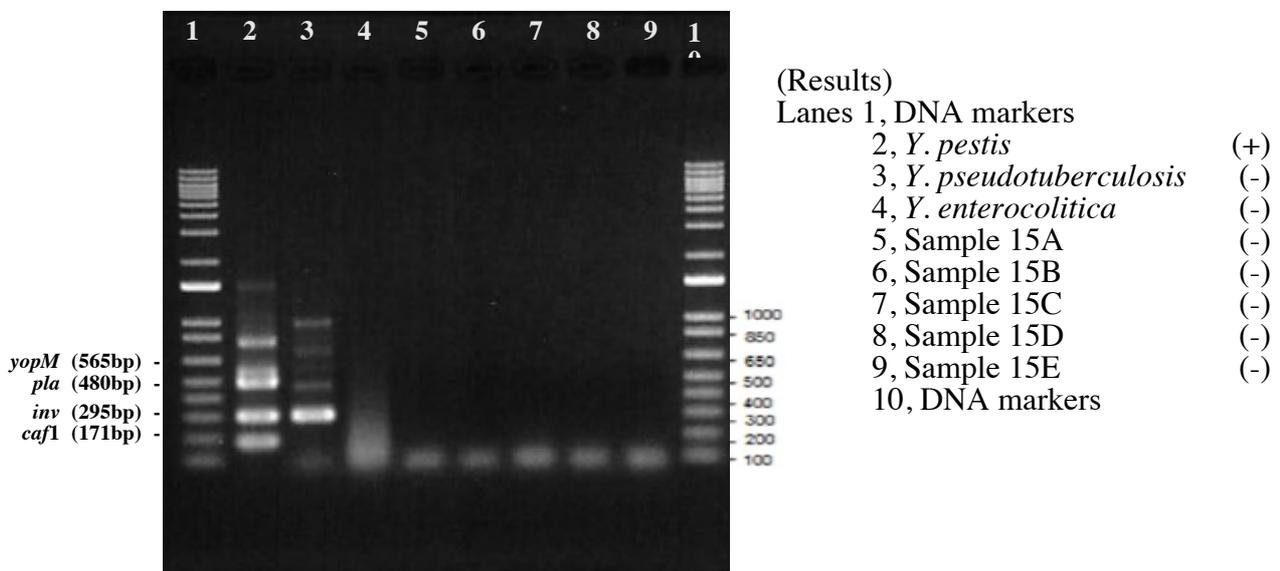
**Electrophoresis**

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

**Interpretation**

Four amplified products: 171 bp (*caf1*), 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  $\mu$ l 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'-CCACAGCAACGGAAAGAGCAGAGCTTGCGGCCGAGATC-3' and BIP, 5'-GCCTCGATTGCGCGATCGCCTGTTGCTAGCGGATTGTCA-3'), and 1  $\mu$ l of *Bst* DNA polymerase.

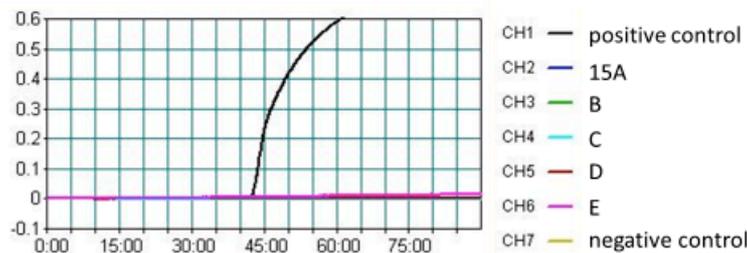
The DNA samples were heated at 95°C for 5 min, before being ice-cooled and used as a template. *Burkholderia pseudomallei* DNA was used for the positive control, and distilled water was used for the negative control. Samples of 5  $\mu$ l were used for each treatment.

The reagents and primers for each sample were mixed. The total reaction volume was 25  $\mu$ l; 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

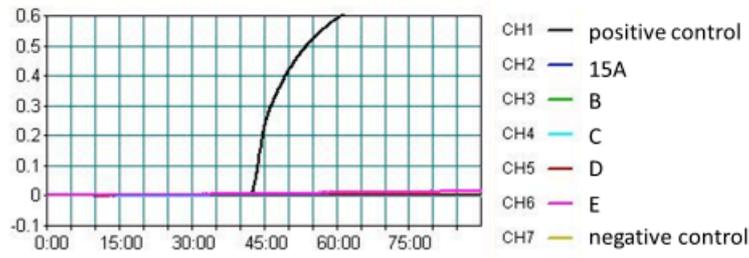


positive control; *B. pseudomallei* purified DNA  
negative control; D.W.

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

day2

### LAMP method 1

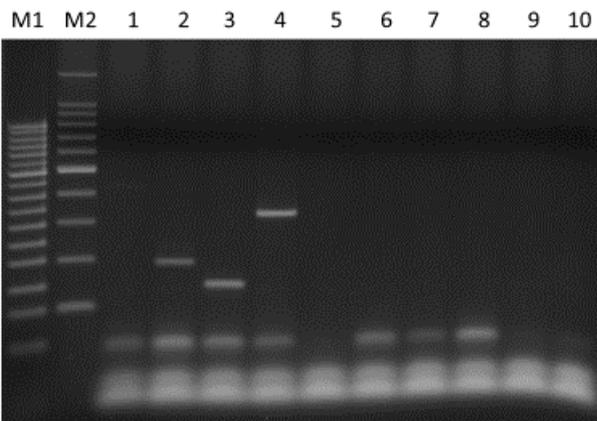


positive control; *B. pseudomallei* purified DNA  
negative control; D.W.

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

### Multiplex PCR

Day2-day4



1: <i>Burkholderia mallei</i>	6: B
2: <i>Burkholderia pseudomallei</i>	7: C
3: <i>Burkholderia thailandensis</i>	8: D
4: <i>Burkholderia cepacia</i>	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 hispaniensis* (*fopA* and *tul4*) 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

##### *tul4*-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(1ng/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

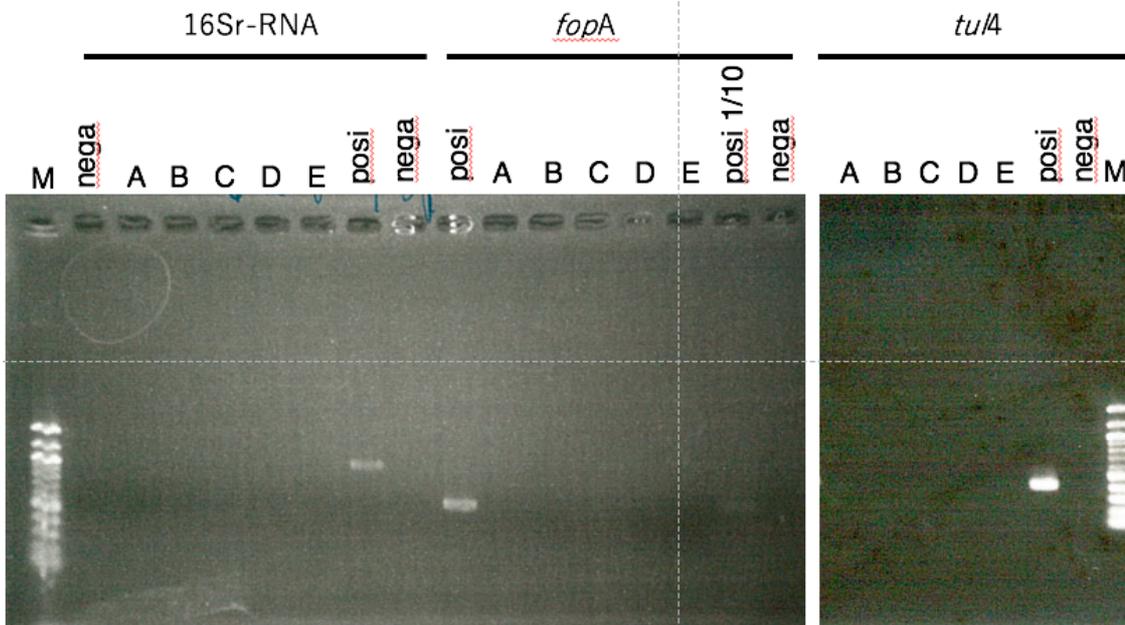
Add 2.5 μL each of the negative control, sample DNA, and positive control, and cap.

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/  $\mu$ l, posi 1/10: *F. tularensis* DNA 0.1ng/  $\mu$ 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	TCCCACCTTACGTAATCTGAG	
<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 min 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 <sub>2</sub> 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)	2.5μ L (0.5μM)
Sample DNA (1 ng/μL≤)	2.5μL
	Total volume 50μL

#### PCR reaction (GeneAmp PCR System 9700)

- denaturing: 98 °C 30sec
- 30 cycles
  - denaturing: 98 °C, 10s
  - annealing: 62 °C, 30s
  - extension: 72 °C, 30s
- 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 be identified
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:痘瘡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。本研究は、1. m8 を組換えワクチンベクターとして応用するために、細菌人工染色体(Bacterial Artificial Chromosome; BAC)にクローニングし、そこから感染性 m8 をリカバリーできる m8-BAC システムの確立、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の確立を試みた。2. 国産の弱毒痘そうワクチン株である m8 を用いた痘瘡ウイルス暴露後重症化阻止の可能性を検討するため、痘瘡ウイルスの代わりに、エクトロメリアウイルス(ECTV)を用いてマウスを攻撃し、その直後に m8 を皮下、筋肉内、皮内、静脈内接種してルート毎の効果及び免疫誘導能の違いを検討した。

研究協力者

山田壮一・国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官

柴村美帆・国立感染症研究所ウイルス第一部・協力研究員

津田美穂子・国立感染症研究所ウイルス第一部・非常勤職員

藤井ひかる・国立感染症研究所ウイルス第一部・協力研究員

福井良子・国立感染症研究所ウイルス第一部・非常勤職員

A. 研究目的

現在、痘瘡ワクチンとして第 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が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。MVA は既に細菌人工染色体(Bacterial Artificial Chromosome; BAC)にクローニングされており、この BAC プラスミドから感染性を持つ MVA を容易にリカバリーする MVA-BAC システムが確立さ

れている。このシステムでは所謂大腸菌の遺伝学を利用して BAC プラスミドへの外来遺伝子導入、組換え MVA のリカバリーを容易に行うことが出来る。そこで本研究では m8 を BAC にクローニングし、BAC プラスミドから感染性 m8 をリカバリーする m8-BAC システムの確立を行った。また、m8-BAC システムの場合は 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。そこで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試みた。また、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試みた。

天然痘の撲滅が 1980 年に宣言されてから 40 年近くが経過した。近年は痘瘡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、痘瘡ウイルスに対して有効な免疫を保持していない。そこで、万が一痘瘡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、痘瘡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

モデルにて行われている。ECTV は痘瘡ウイルス、ワクシニアウイルス(VACV)と同じオルソポックスウイルスに属し、血清学的にも交差性がある。既に VACV Lister 株及び Modified Vaccinia Ankara (MVA)株を用いた場合、ECTV 暴露後 3 日目の投与であっても重症化を阻止できることが報告されている (J Infect Dis. 2009 Jan 1;199(1):39-48.)。そこで本研究では、m8 の暴露後ワクチンとして接種ルート毎の効果を検討するため、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、静脈内接種した時の生存率を検討した。また、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 を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. m8-BAC システムの確立は以下の様に行った (図 1)。まず古典的な相同組換え法を用いて大腸菌内で BAC を保持するために必須である mini-F カセットを EGFP カセットと共に導入した組換え m8(m8-EGFP-BAC)を作製した。次にこの組換え m8 のゲノムを感染細胞から抽出し、大腸菌に導入して形質転換を行った。mini-F カセット内にはクロラムフェニコール耐性遺伝子が含まれているので、薬剤選択が可能である。形質転換された大腸菌が保持する BAC プラスミドの配列を確認した。またこの pLC16m8-BAC を 293FT 細胞にトランスフェクションし、同時に鶏痘ウイルスをヘルパーウイルスとして感染させ、感染性ウイルスがレスキューされるかを検討した。pLC16m8-BAC から更に大腸菌の遺伝学 (Red/ET システム)を用いて、EGFP 及び BAC カセットが、リカバリーされたウイルスから相同配列を介して自己切断され、また m8 または mO タイプの B5R を保持する pLC16m8.8S-BAC と pLC16m8.OS-BAC を作製した (図 2)。更に自己切断しない BAC プラスミドで m8 または mO タイプの B5R を保持する pLC16m8.8-BAC, pCL16m8.O-BAC も作製し、リカバリーされたウイルスの性状を解析した。次に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、エンベロップ糖蛋白質 (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. 5LD<sub>50</sub> 相当の ECTV Hampstead 株を経鼻 (i.n.) 経路でマウスに感染させた。その直後に m8、またはその親株である Lister 株を皮下 (s.c.)、筋肉内 (i.m.)、皮内 (i.d.)、静脈内 (i.v.) 接種により 10<sup>7</sup>PFU 接種し、その発症・重症化阻止効果を生存率、体重変化により検討した。次に 1x10<sup>7</sup>PFU の m8 を皮下、筋肉内、皮内、静脈内接種した。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】

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

## C. 研究結果

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

いウイルスは確認できなかった。ラッサウイルス遺伝子 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(図 6)。GPC と、NP について導入が成功した。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ところ、どちらについても遺伝子産物の発現が確認された(図 7)。

2. ECTV 暴露直後に m8 株を接種した場合の発症・重症化阻止効果を検討した。1 群 10 匹のマウスに 5LD50 の ECTV Hampstead 株で攻撃を行った。その直後に  $10^7$  PFU/100ul の Lister, m8 を s.c., i.m., i.d., i.v. で接種し、観察、体重測定を行った(図 8)。s.c., i.m. 接種に於いて Lister, または m8 の効果に有意な差は観察されなかった。一方対照である培地接種群と比較した場合、ワクチン接種群は接種ルートによってその効果に違いが現れた。s.c の場合では対照群とワクチン接種群間で有意な差が無かった。一方、i.m., i.d., i.v. の場合はワクチン接種により培地接種群と比較して有意な生存率の改善が確認された。また、ワクチン接種群の体重変化は i.m., i.d. では ECTV 攻撃 13 日後から増加傾向に転じるのに対して、i.v. では攻撃 7 日後から増加傾向に転じた(図 9)。

次に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 10 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 日後でその後強く誘導されることはなかった。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

1. m8 は、ACAM2000 と共に、天然痘を用いたバイオテロに備えた備蓄用ワクチンとして WHO から推奨される痘瘡ワクチンの一つであり、その

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

2. 本研究は弱毒痘瘡ワクチン m8 株の痘瘡ウイルス暴露後ワクチンとしての発症・重症化阻止効果を検討し、可能であれば改良を行うことを目的としている。投与ルートにより毎の、m8 の暴露後ワクチン効果の違いは、ECTV 感染を排除するための免疫を獲得する早さが異なる為ではないか仮説と立てて検証したところ、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となり仮説をサポートする結果となった。

## E. 結論

m8 をクローニングした BAC プラスミドから感染性 m8 をリカバリーできる m8-BAC システムを確立し、また 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。特に pLC16m8.8S-BAC を用いるシステムは本来の m8 と区別の出来ないゲノムを保持するウイルスをリカバリーすることが可能である。

ECTV 攻撃に対する m8 の感染防御効果はその接種ルート毎に異なること、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. 論文発表

### 1. 論文発表

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

One 13:e0192725.

- 2) Omura N, Yoshikawa T, Fujii H, Shibamura M, Inagaki T, Kato H, Egawa K, Harada S, Yamada S, Takeyama H, Saijo M. 2018. A Novel System for Constructing a Recombinant Highly-Attenuated Vaccinia Virus Strain (LC16m8) Expressing Foreign Genes and Its Application for the Generation of LC16m8-Based Vaccines against Herpes Simplex Virus 2. Jpn J Infect Dis 71:229-233.2.
- 3) 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

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

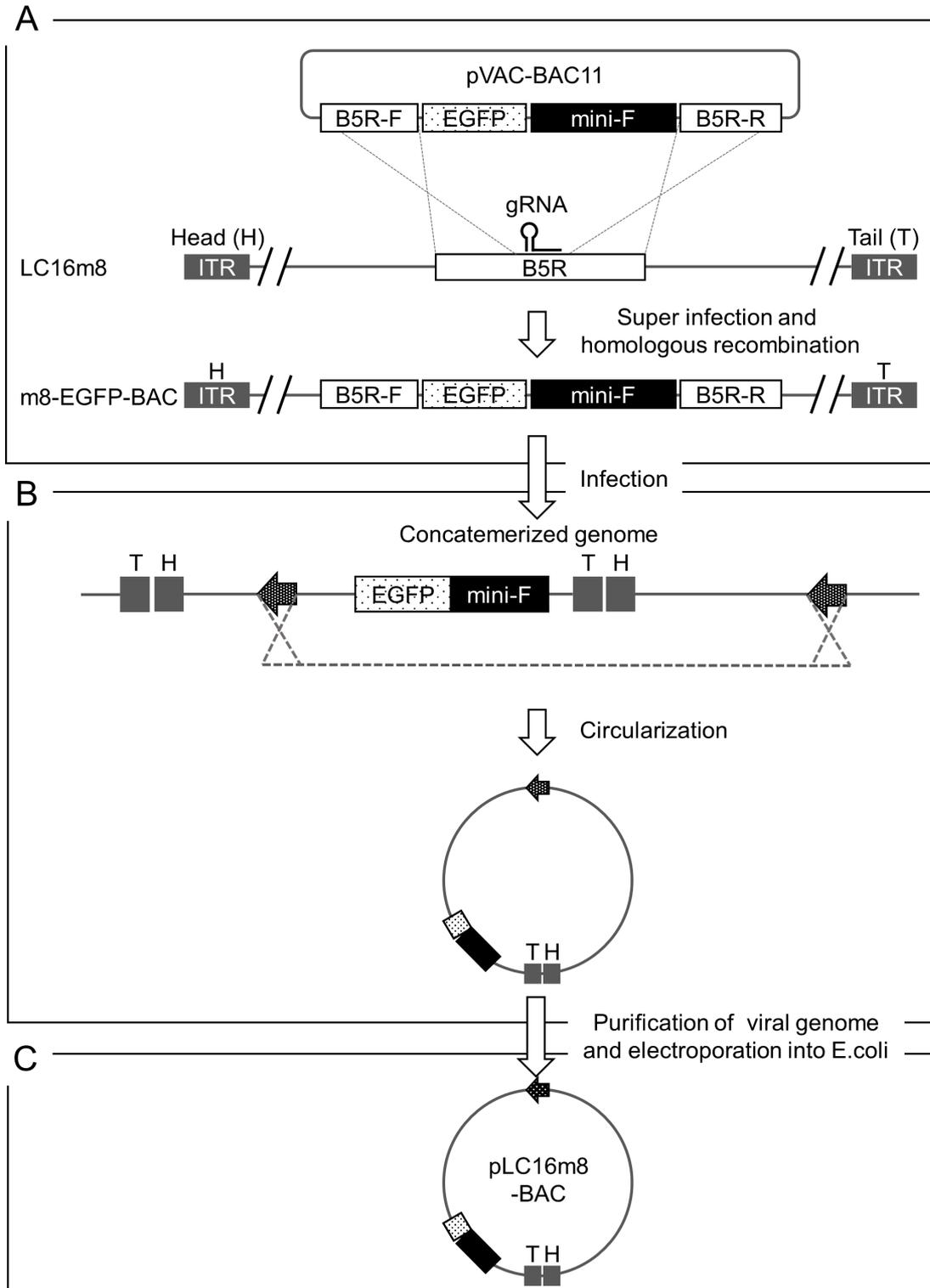


図1 m8-BACシステムに必要なm8の全ゲノムを保持するBACプラスミド、pLC16m8-BACの作製スキーム。(A)古典的な相同組換え法にCRISPR-Cas9システムを導入した方法によりEGFPとmini-Fカセットを保持する組換えm8, m8-EGFP-BACを作製した。(B)m8-EGFP-BACをRK13細胞に感染させてウイルスゲノムを回収した。ワクシニアウイルスはゲノムの複製時にコンカテマーを形成するが、相同配列間で組換えが起こり、環状化したゲノムが存在すると推測される。(C)回収したウイルスゲノムを用いて大腸菌を形質転換する。mini-Fカセット内にクロラムフェニコール耐性遺伝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

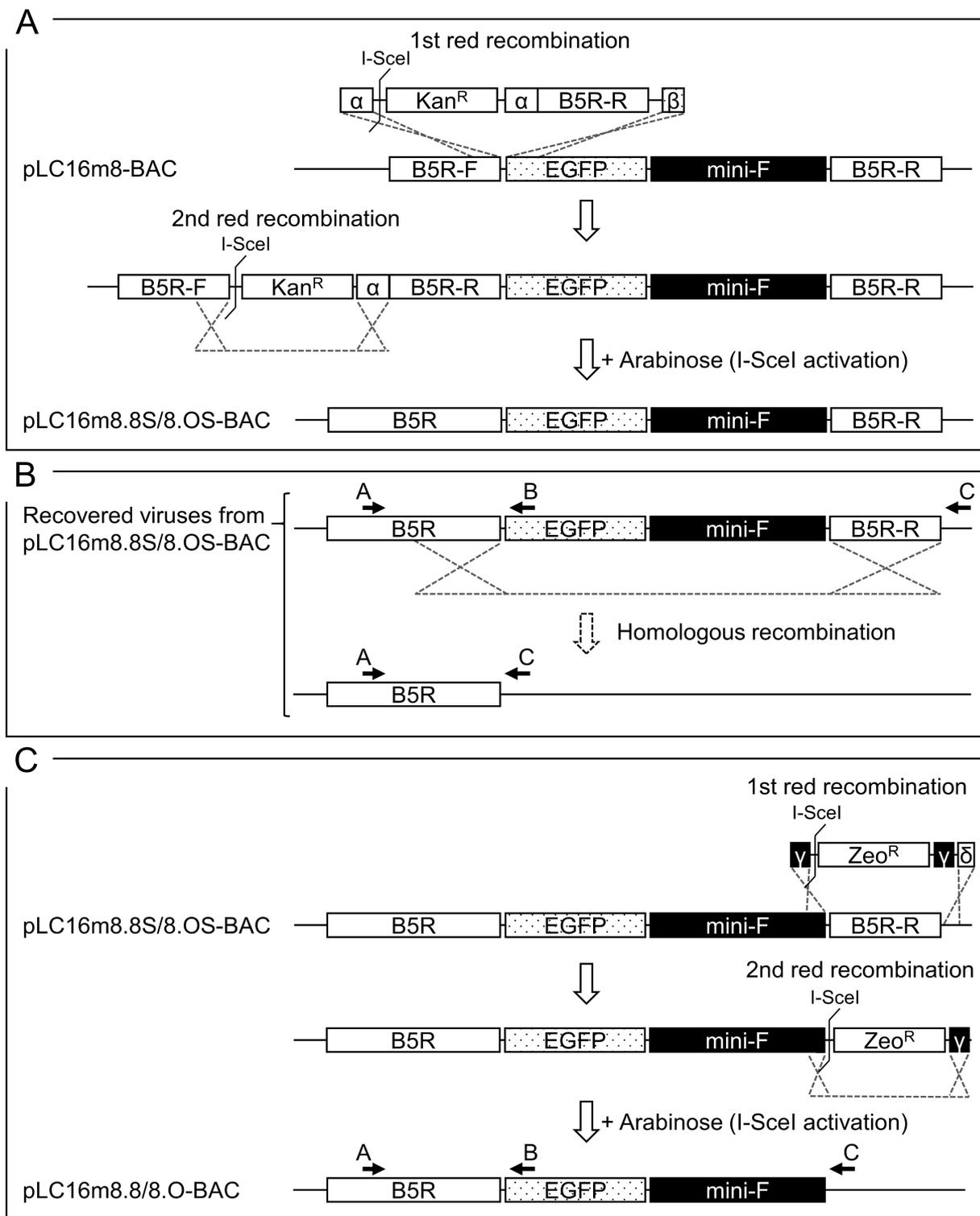


図2 EFGEF及び mini-F カセットフリーの m8 をリカバリーする m8-BAC システム構築のスキーム, (A)カナマイシン耐性遺伝子と B5R 遺伝子の後部を保持する PCR 産物を Red/ET システムを用いた相同組換えにより pLC16m8-BAC に導入する. 更に2回目の組換えによりカナマイシン耐性遺伝子を除き, 完全な B5R の全長を持つ BAC プラスミド(m8 タイプまたは mO タイプの B5R を持つそれぞれ pLC16m8.8S-BAC, pLC16m8.OS-BAC) を作製した. (B)pLC16m8.8S-BAC, pLC16m8.OS-BAC から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

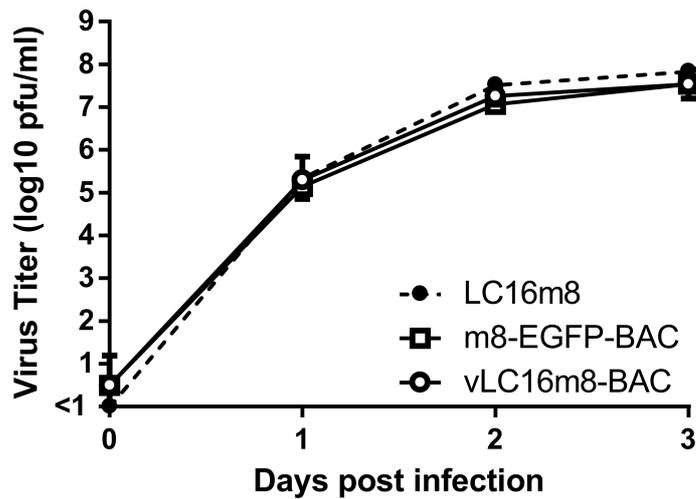


図3 pLC16m8-BAC からリカバリーしたウイルス vLC16m8-BAC の増殖曲線. RK13 細胞に m8, m8-EGFP-BAC, vLC16m8-BAC を MOI=0.1 で感染させて, 経時的なウイルス量の変化を測定した.

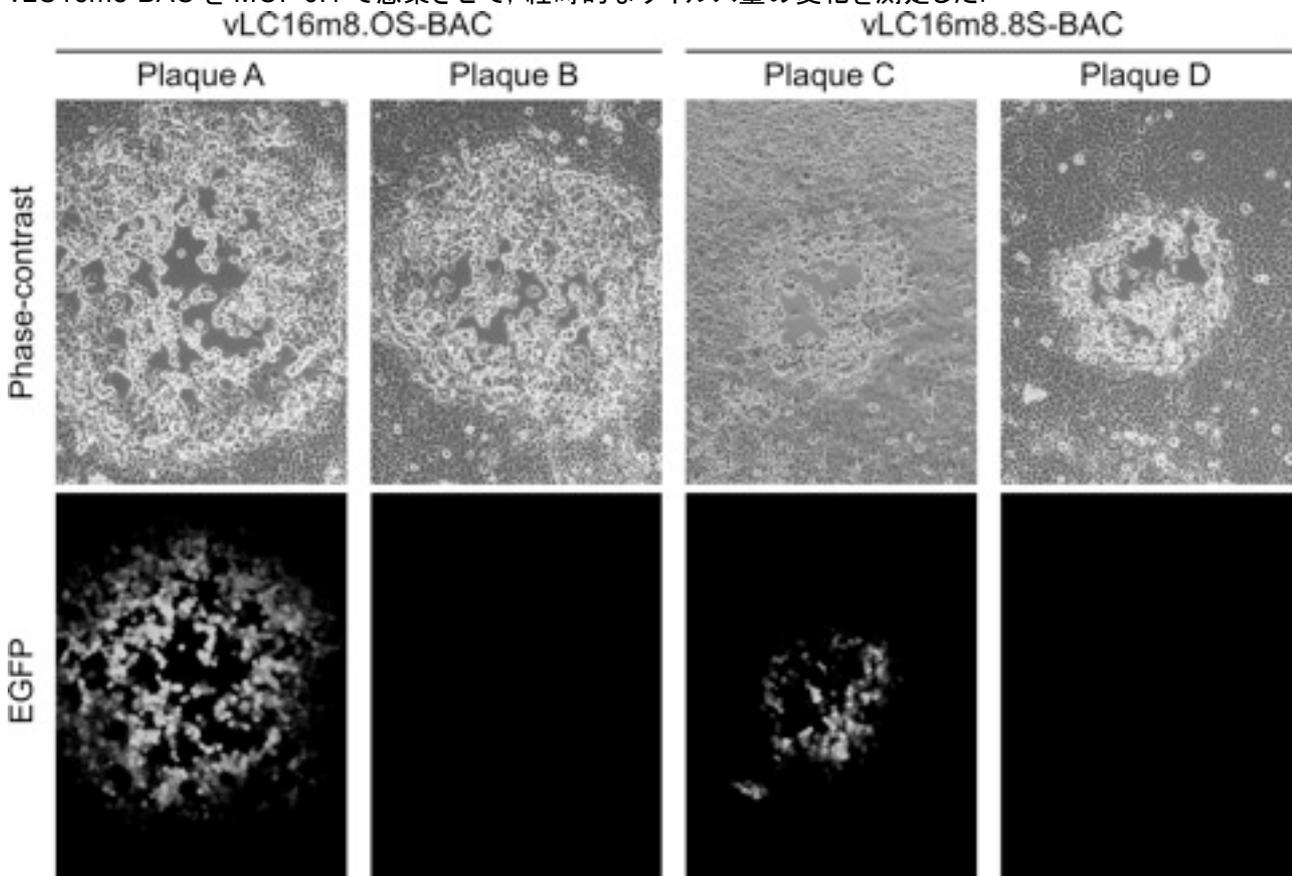


図4 pLC16m8.8S-BAC, pLC16m8.OS-BAC からリカバリーしたウイルスの性状. プラークの大きさとEGFPの発現を顕微鏡下で観察した. RK13 細胞に pLC16m8.OS-BAC, pLC16m8.8S-BAC からリカバリーしたウイルス (vLC16m8.OS-BAC, vLC16m8.8S-BAC)を感染させた. vLC16m8.OS-BAC (plaque A と B) と vLC16m8.8S-BAC (plaque C と D)のプラークについてEGFPの発現とプラークサイズを検討した.

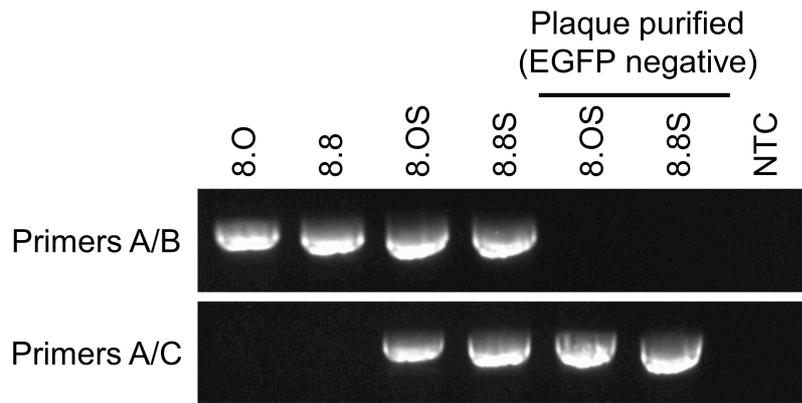
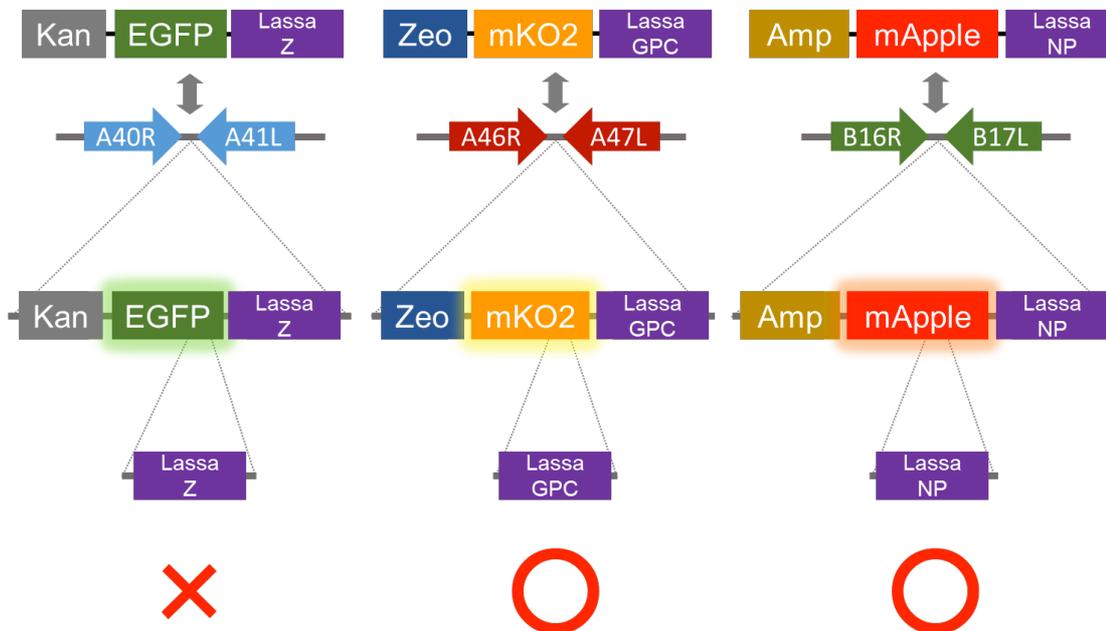


図 5 自己切断による EGFP と mini-F カセットの脱落の確認. RK13 細胞にプラーク精製をしていない vLC16m8.O-BAC (8.O), プラーク精製をしていない vLC16m8.8-BAC (8.8), プラーク精製されたクローン, またはプラーク精製をしていない vLC16m8.OS-BAC (8.OS), プラーク精製されたクローン, またはプラーク精製をしていない vLC16m8.8S-BAC (8.8S)を感染させた. 回収したウイルスゲノムを鋳型として, 図3で示したプライマーA/BまたはA/Cを用いたPCRを行い産物の有無を確認した. NTCは鋳型を含まない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



The improved system works well so far except for Lassa Z

図 6 組換え m8 作製の概略

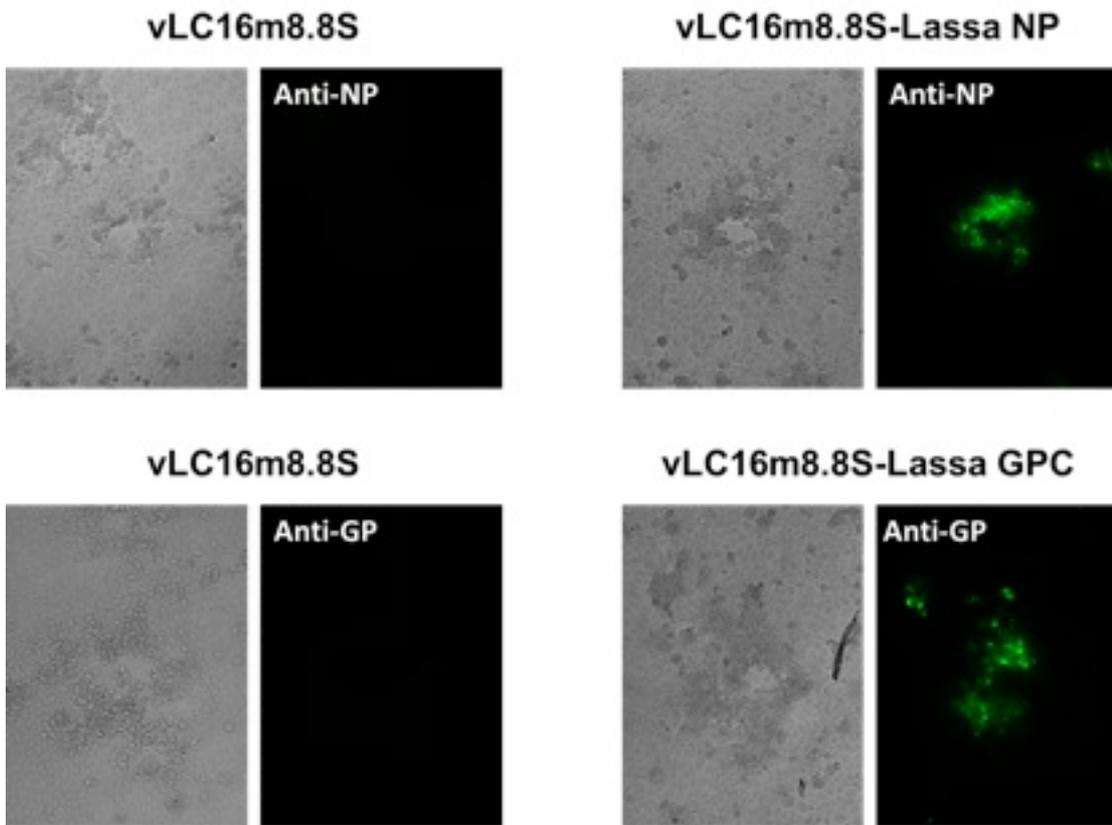


図7 ラッサウイルス遺伝子を発現する組換え m8 の確認

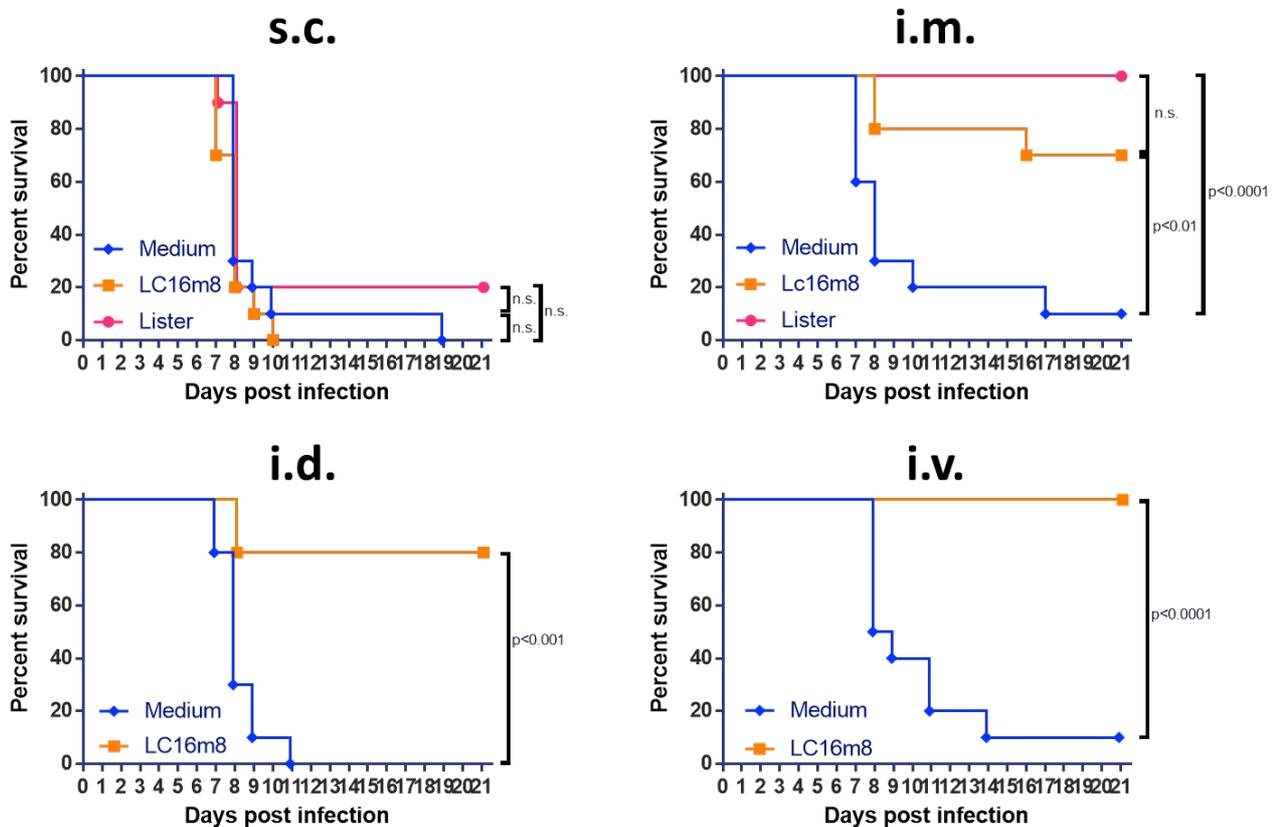


図8 ECTV を感染させたマウスに、直後に様々な投与ルートで m8 を接種した際の生存率の違い. 5LD50 相当の ECTV を i.n. で感染させた直後に Lister, m8 または対照として培地を接種した. その後マウスの生存を経時的に観察した.

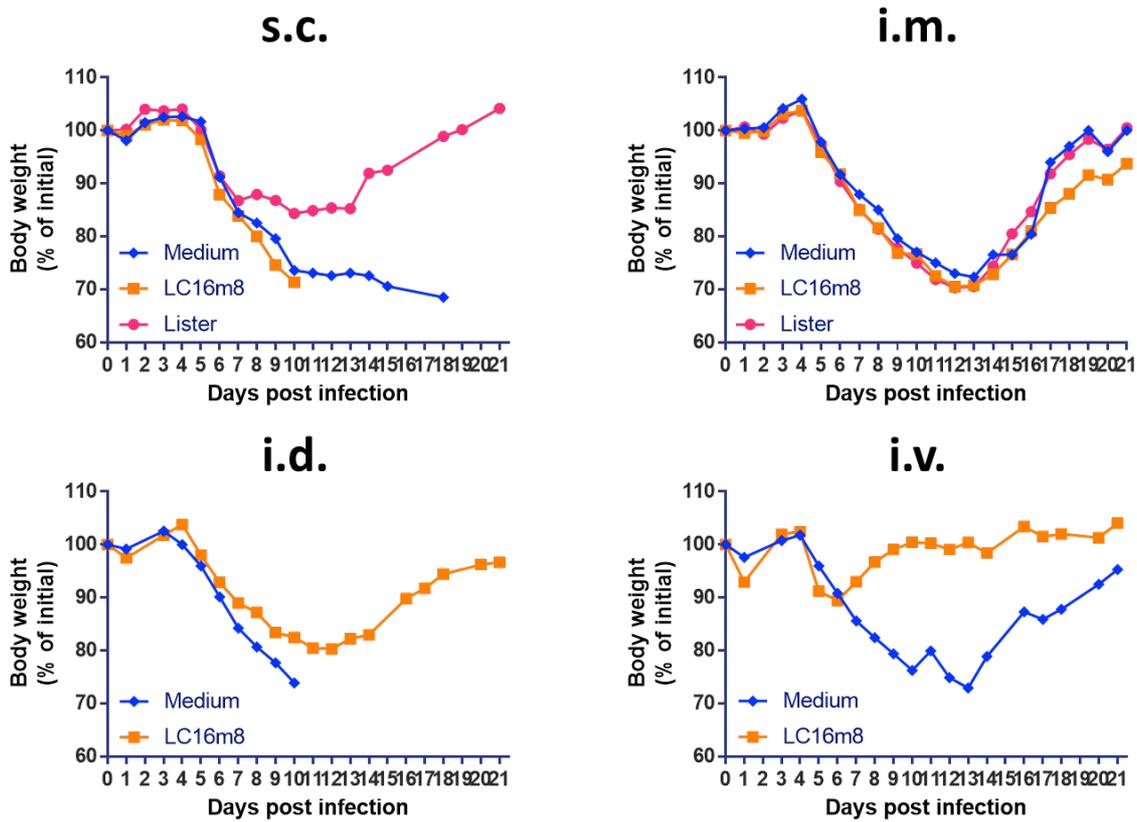


図9 ECTVを感染させたマウスに、直後に様々な投与ルートでm8を接種した際の体重変改の違い。図6の実験に於いて同時に体重変化も測定した。

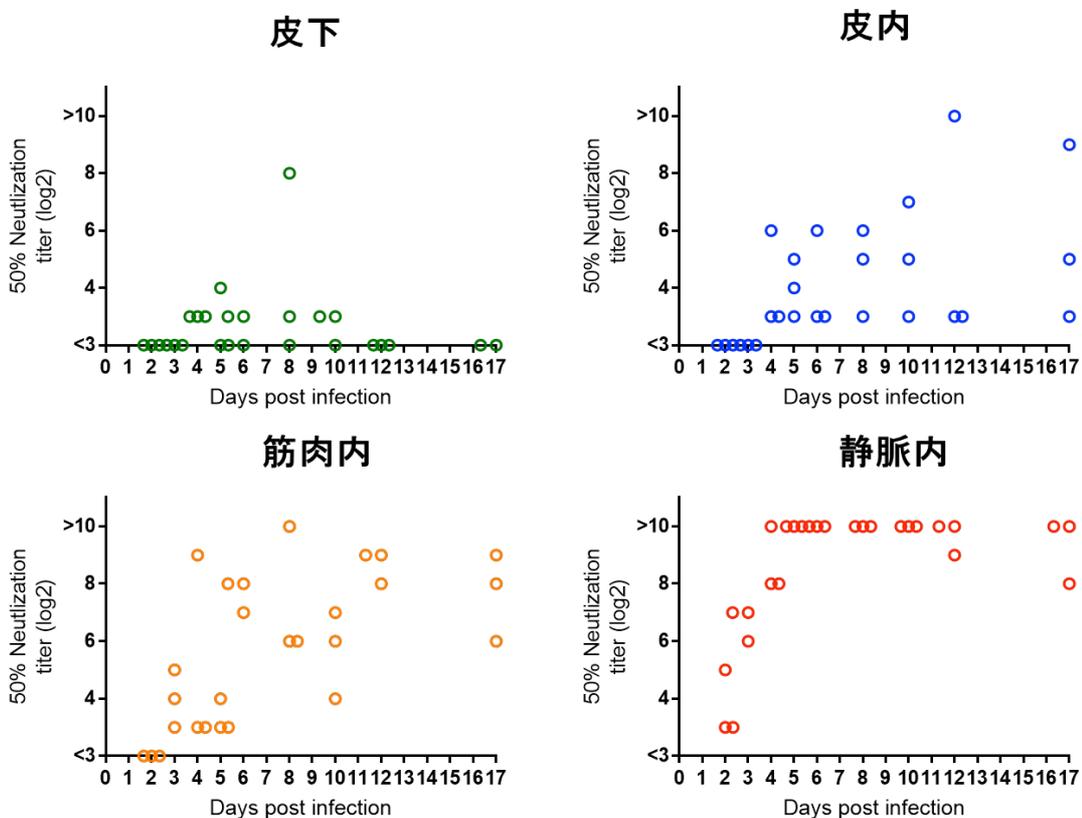


図10 接種ルート毎の中和抗体価の違い

### 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	B(生物剤)テロ災害の最新動向と基礎知識—見えない恐怖との戦い—生物テロの特徴と対処—		NBC災害活動マニュアル	イカロス出版	東京	2017	p43-50
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	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
下島昌幸	エボラウイルス		ウイルス検査法—臨床と検査室のための手引き	春恒社	東京	2018	p333-335

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻	ページ	出版
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
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
Takayama-Ito M, Lim CK, Yamaguchi Y, Posadas-Herrera G, Kato H, Iizuka I, Islam MT, Morimoto K, Saijo M.	Replication-incompetent rabies virus vector harboring glycoprotein gene of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) protects mice from LCMV challenge.	PLoS Negl Trop Dis	12(4)	e0006398	2018
Takayama-Ito M, Lim CK, Nakamichi K, Kakiuchi S, Horiya M, Posadas-Herrera G, Kurane I, Saijo M.	Reduction of animal suffering in rabies vaccine potency testing by introduction of humane endpoints.	Biologicals	46	38-45	2017
Taniguchi S, Fukuma A, Tani H, Fukushi S, Saijo M, Shimojima M.	A neutralization assay with a severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strain that makes plaques in inoculated cells.	J Virol Methods	244	4-10	2017
Suda Y, Chamberlain J, Dowall S, Saijo M, Horimoto T, Hewson R, Shimojima M.	The development of a novel diagnostic assay that uses a pseudotyped vesicular stomatitis virus for the detection of neutralising activity to Crimean-Congo haemorrhagic fever virus.	Jpn J Infect Dis.	71(3)	205-208	2018
Tani H, Komeno T, Fukuma A, Fukushi S, Taniguchi S, Shimojima M, Uda A, Morikawa S, Nakajima N, Furuta Y, Saijo M.	Therapeutic effects of favipiravir against severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection in a lethal mouse model: Dose-efficacy studies upon oral administration	PLoS One	13(10)	e0206416	2018

Kimura T, Fukuma A, Shimojima M, Yamashita Y, Mizota F, Yamashita M, Otsuka Y, Kan M, Fukushi S, Tani H, Taniguchi S, Ogata M, Kurosusu T, Morikawa S, Saijo M, Shinomiya H.	Seroprevalence of severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) virus antibodies in humans and animals in Ehime prefecture, Japan, an endemic region of SFTS	J Infect Chemother	24(10)	802-806	2018
Demetria C, Smith I, Tan T, Villarico D, Simon EM, Centeno R, Tachedjian M, Taniguchi S, Shimojima M, Miranda NLJ, Miranda ME, Rondina MMR, Capistrano R, Tandoc A 3rd, Marsh G, Eagles D, Cruz R, Fukushi S.	Reemergence of Reston ebolavirus in Cynomolgus Monkeys, the Philippines, 2015	Emerg Infect Dis	24(7)	1285-1291	2018
Yamada S, Shimojima M, Narita R, Tsukamoto Y, Kato H, Saijo M, Fujita T.	RIG-I-Like Receptor and Toll-Like Receptor Signaling Pathways Cause Aberrant Production of Inflammatory Cytokines/Chemokines in a Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Infection Mouse Model	J Virol	92(13)	e02246-17	2018
Ogawa M, Shirasago Y, Ando S, Shimojima M, Saijo M, Fukasawa M.	Caffeic acid, a coffee-related organic acid, inhibits infection by severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in vitro.	J Infect Chemother	24(8)	597-601	2018
Matsumoto C, Shinohara N, Furuta RA, Tanishige N, Shimojima M, Matsubayashi K, Nagai T, Tsubaki K, Satake M.	Investigation of antibody titer to severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV) in blood samples donated in a SFTS-endemic area in Japan.	Vox Sang	113(3)	297-299	2018
Suda Y, Chamberlain J, Dowall S, Saijo M, Horimoto T, Hewson R, Shimojima M.	The development of a novel diagnostic assay that uses a pseudotyped vesicular stomatitis virus for the detection of neutralising activity to Crimean-Congo haemorrhagic fever virus.	Jpn J Infect Dis	71(3)	205-208	2018
Egawa K, Shimojima M, Taniguchi S, Nagata N, Tani H, Yoshikawa T, Kurosusu T, Watanabe S, Fukushi S, Saijo M.	Virulence, pathology, and pathogenesis of Pteropine orthoreovirus (PRV) in BALB/c mice: Development of an animal infection model for PRV	PLoS Negl Trop Dis	11(12)	e0006076	2017

Taniguchi S, Maeda K, Horimoto T, Masangkay JS, Puentespina R Jr, Alvarez J, Eres E, Cosioco E, Nagata N, Egawa K, Singh H, Fukuma A, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Tsuchiaka S, Omatsu T, Mizutani T, Une Y, Yoshikawa Y, Shimojima M, Saijo M, Kyuwa S.	First isolation and characterization of pteropine orthoreoviruses in fruit bats in the Philippines	Arch Virol	162(6)	1529-1539	2017
Kaneko M, Shikata, Matsukage S, Maruta M, Shinomiya H, Suzuki T, Hasegawa H, Shimojima M, Saijo M.	A patient with severe fever with thrombocytopenia syndrome and hemophagocytic lymphohistiocytosis-associated involvement of the central nervous system	J Infect Chemother	24(4)	292-297	2018
Fukushi S, Fukuma A, Kurosu T, Watanabe S, Shimojima M, Shirato K, Iwata-Yoshikawa N, Nagata N, Ohnishi K, Arimoto M, Melaku SK, Sentsui H, Saijo M.	Characterization of novel monoclonal antibodies against the MERS-coronavirus spike protein and their application in species-independent antibody detection by competitive ELISA	J Virol Methods	251	22-29	2018
Taniguchi S, Fukuma A, Tani H, Fukushi S, Saijo M, Shimojima M.	A neutralization assay with a severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strain that makes plaques in inoculated cells	J Virol Methods	244	4-10	2017
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 Phebovirus 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, Matsumura 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
Sakata M, Tani H, Anraku M, Kataoka M, Nagata N, Seki F, Tahara M, Otsuki N, Okamoto K, Takeda M, Mori Y.	Analysis of VSV pseudotype virus infection mediated by rubella virus envelope proteins.	Sci Rep.	7(1)	11607	2017
Taniguchi S, Maeda K, Horimoto T, Masangkay JS, Puentespina R Jr, Alvarez J, Eres E, Cosico E, Nagata N, Egawa K, Singh H, Fukuma A, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Tsuchiaka S, Omatsu T, Mizutani T, Une Y, Yoshikawa Y, Shimojima M, Saijo M, Kyuwa S.	First isolation and characterization of pteropine orthoreoviruses in fruit bats in the Philippines.	Arch Virol.	162(6)	1529-1539	2017
Iizuka I, Ami Y, Suzuki Y, Nagata N, Fukushi S, Ogata M, Morikawa S, Hasegawa H, Mizuguchi M, Kurane I, Saijo M.	A Single Vaccination of Nonhuman Primates with Highly Attenuated Smallpox Vaccine, LC16m8, Provides Long-term Protection against Monkeypox.	Jpn J Infect Dis.	70(4)	408-415	2017.
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, 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	93(6)	01818-18	2019
Matsuyama S, Nao N, Shirato K, Kawase M, Saito S, Takayama I, Nagata N, Sekizuka T, Kato 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 eosinophilic infiltration in lungs.	Microbiol Immunol.	64(1)	33-51	2020
Yoshikawa T, Fujii H, Okutani A, Shibamura M, Omura N, Egawa K, Kato H, Inagaki T, Harada S, Yamada S, Morikawa S, Saijo M	Construction and characterization of bacterial artificial chromosomes harboring the full-length genome of a highly attenuated vaccinia virus LC16m8	PLoS One	13	e0192725	2018
Omura N, Yoshikawa T, Fujii H, Shibamura M, Inagaki T, Kato H, Egawa K, Harada S, Yamada S, Takeyama H, Saijo M	A Novel System for Constructing a Recombinant Highly-Attenuated Vaccinia Virus Strain (LC16m8) Expressing Foreign Genes and Its Application for the Generation of LC16m8-Based Vaccines against Herpes Simplex Virus 2	Jpn J Infect Dis	71	229-233	2018
西條政幸.	新興ウイルス感染症とワクチン開発:研究の最前線.	Neuroinfection	23(1)	56-61	2018
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

## 作成上の留意事項

1. 「A. 研究目的」について  
厚生労働行政の課題との関連性を含めて記入すること、
2. 「B. 研究方法」について
  - (1) 実施経過が分かるように具体的に記入すること、
  - (2) 「(倫理面への配慮)」には、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と同意(インフォームド・コンセント)に関わる状況、実験動物に対する動物愛護上の配慮など、当該研究を行った際に実施した倫理面への配慮の内容及び方法について、具体的に記入すること、倫理面の問題がないと判断した場合には、その旨を記入するとともに必ず理由を明記すること、  
なお、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成25年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針(平成26年文部科学省・厚生労働省告示第3号)、遺伝子治療等臨床研究に関する指針(平成31年厚生労働省告示第48号)、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(平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)及び申請者が所属する研究機関で定めた倫理規定等を遵守するとともに、あらかじめ当該研究機関の長等の承認、届出、確認等が必要な研究については、研究開始前に所定の手続を行うこと、
3. 「C. 研究結果」について  
・全体の研究成果が明らかになるように具体的に記入すること、
4. その他
  - (1) 日本工業規格A列4番の用紙を用いること、
  - (2) 文字の大きさは、10～12ポイント程度とする、