

平成 30 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)
我が国で開発され、備蓄されている細胞培養痘そうワクチンの有効性、安全性、生産性向上
および国内外のバイオテロ対策のあり方に関する研究

I . 総括研究報告

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

所 属 国立感染症研究所
ウイルス第一部
研究代表者 西條 政幸

研究要旨:

日本では2020年に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。本研究班では、バイオテロ対策の一環として、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する。

1. バイオテロ対策の国際的動向調査と対策のあり方の検討（研修会・講習会の開催を含む）

- 1) 痘瘡ウイルスが用いられるバイオテロに備えた国際動向（特に世界保健機関が主催する痘瘡ウイルス研究専門家会議、ACVVR）の最近の議論の内容を確認し、対策の国際的な動向を把握した。ドイツで開催されたグローバルヘルスセキュリティイニシアチブに基づく会合における、生物テロに関するリスク・脅威評価会議に出席し、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) 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。
- 3) 本年度は特に、近年の国際的なトピックとなっている、生物テロ対応における公衆衛生機関とセキュリティ機関（法執行機関やインテリジェンス機関）との連携についてそのあり方や、連携強化方策を検討した。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。

2. 高度弱毒細胞培養痘瘡ワクチン LC16m8 に関する研究

- 1) 痘そうワクチン LC16m8 を 1 回接種された成人初回接種者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、Dryvax の場合と同様に、経時的な減衰傾向が認められた。
- 2) 好中球枯渇化マウスにおけるサル痘ウイルス感染による肝組織におけるクッパー細胞の活性化に着目し、ウイルス感染の影響の評価を試みた。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。
- 3) 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 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 が検出された。
- 4) 組換え感染性 LC16m8 をリカバリーできる LC16m8-(Bacterial Artificial Chromosome; BAC) システムの改良を試みた。

3. ウイルス性出血熱の流行状況の調査と診断法の開発

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（ウイルス不活化条件）を明らかにした。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。輸入感染症対策強化が求められるが、今後もこの大規模EVD流行について注目していく必要がある。

4. バイオテロ関連ホームページの改定と維持管理

生物テロに関する情報を網羅した『バイオテロ対応ホームページ』に最新知見を加えて改訂するより、国内での貴重な情報源としての充実を図った。今年度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。

研究分担者氏名

鯉淵智彦 東京大学医科学研究所・附属病院感染免疫内科・講師

齋藤智也 国立保健医療科学院・健康危機管理研究部・上席主任研究官

下島昌幸 国立感染症研究所ウイルス第一部・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 国立感染症研究所獣医学部・部長

吉河智城 国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官

A. 研究目的

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

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

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

本研究班の目的は、具体的に以下の項目にまとめることができる。

- 米国CDCと本研究班との共同研究[WHOの痘瘡ウイルス研究に関する専門家会議(ACVVR)により実施の許可を受けている]を通じて、LC16m8の痘瘡ウイルスに対する中和抗体誘導能の解析、サル痘感染への効能評価に関する知見を得る。また、

長期凍結保管中の安定性成績を取得する。

- LC16m8の痘瘡ウイルス暴露後に発症、重症化予防ワクチンとして使用した際の効果をより詳細に解析する。
- LC16m8の品質管理に特異的に重要なMSPのより迅速な科学的根拠に基づく試験法を開発する。NATによりドミナントなMSP含有率を測定する試験法で代替えるために、痘瘡ワクチンの継代培養によるMSP変異パターンに差がないかを検証する。
- ウイルス性出血熱や痘瘡ウイルス感染症の検査法の改良と整備。
- バイオテロ病原体の可能性となる痘瘡ウイルスおよびその関連するウイルス感染症の流行状況、ウイルス性出血熱の流行状況について把握する。
- バイオテロ対策に資するホームページ(<https://h-crisis.niph.go.jp/bt/>)の維持改良
- バイオテロ対策に関連する国際会議への参加(今年度は主催)や学術的広報活動の実施
- その他

B. 研究方法

1. 研究総括・バイオテロ対策に関する国際動向の調査と国内対応のあり方の検討
第19回ACVVR(2017年11月,ジュネーブ,スイス)の報告書(<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272441/WHO-WHE-IHM-2018.2-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y&ua=1>)の概要を調査した。また、第20回ACVVR(2018年9月,ジュネーブ,スイス)に出席した。また、2018年5月に国立感染症研究所でGHSAG-LNを開催した。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。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。さらに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。
2. バイオテロ対応ホームページのアップデートとバイオテロ対策支援方法の開発
今年度は、啓発プログラム「感染症の危機管理・バイオテロ対策」の開催を通じて、現状の問題点を把握し、今後の対策立案に役立てた。また、国内外の主要雑誌や学会などを通じて、バイオテロ関連疾患についての情報を収集し、ホームページに掲載した内容の妥当性・正確性等について確認した。
 3. バイオテロに関する公衆衛生対応の検討
生物テロ対策の動向について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出席し、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。また、関する情報収集を実施した。
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。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。
 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
検体にニパウイルスが含まれる事態を想定し、ニパウイルスの不活化条件を検討した。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。
 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
平成 29 年度の調査対象者として選定した被験者 (LC16m8 接種者 23 名及び Dryvax 接種者 7 名) の保存血清検体(各被験者のワクチン接種後 60 日目, 180 日目または 360 日目の採取血清)を用いて、接種後 30 日目に採取した血清中のワクチニアウイルス NYCBH 株に対する中和抗体価 (Anti-NYCBH PRNT₅₀) が 320 から 1280 の範囲の者から両群で高低の偏りが可能な限り無いように選定した(表 1)。サル痘ウイルスに対する中和抗体価測定は米国の試験受託機関である Southern Research (2000 9th Avenue South, Birmingham, AL 35205, USA) へ委託し、供試検体は盲検状態で提供した。測定は研究者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 細胞を用いて実施され、血清中のサル痘ウイルス (Zaire-79 株) に対する中和抗体価 (Anti-Monkeypox PRNT₅₀) を 50% ブラーク減少法により算出した。
 6. 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの安全性評価における病理学的研究
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 2x10⁵ 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)。常法どおり 10%ホルマリン緩衝液で浸漬固定した組織をパラフィン包埋し、組織切片を得た。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。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。
 7. 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの特性解析(遺伝子解析)、品質試験法に関する研究
次世代シーケンズにより多様な 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、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。継代培養した Lot を RK13 細胞, Vero E6 細胞でバイオアッセイにより、各 Lot に MSP が含まれるかを検討した。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。
 8. 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの有効性及び安全性評価に関する研究
細胞培養弱毒生痘そうワクチン株 LC16m8(m8) は高度に弱毒化されている一方で免疫原性が維持されてい

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

【倫理面への配慮】

細胞培養弱毒生痘そうワクチンの有効性及び安全性評価、特性解析、品質試験法改善、生産性に関する研究 (研究分担者園田) 本調査研究は、KMバイオロジクス株式会社の研究倫理審査委員会の審査を受け、2018 年 8 月 23 日付で研究期間延長承認を得て実施した (受付番号 17-05)。また、個人を特定できないように措置を講じた上で研究を実施した。

C. 研究結果

1. 研究総括・バイオテロ対策に関する国際動向の調査と国内対応のあり方の検討

痘瘡ウイルスがバイオテロ病原体として用いられるバイオテロ対策に関する国際動向について調査した。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、国際的なバイオテロ対策が着実に強化されつつあることが確認された。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。これらの感染症対策にも貢献する必要があることが示唆された。

2018 年 6 月からコンゴ民主共和国 (DRC) にて EVD 流行が発生し、その EVD 流行は 2014-2015 年に西アフリカで発生した EVD 大規模流行の様相を呈している。

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

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。今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。

3. バイオテロに関する公衆衛生対応の検討

バイオテロ対策の国際的な動向を調査し、主に日本国内での公衆衛生対策のあり方を検討した。本年度は特に、近年の国際的なトピックとなっている、生物テロ対応における公衆衛生機関とセキュリティ機関 (法執行機関やインテリジェンス機関) との連携についてそのあり方や、連携強化方策を検討した。

ドイツで開催されたグローバルヘルスセキュリティイニシアチブに基づく会合における、生物テロに関するリスク・脅威評価会議に出席し、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。

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。これらの活動によって、検討すべき対処シナリオや、多機関による連携のあり方、連携強化のためのニーズ等に関する多数の示唆が得られた。

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

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 (ウイルス不活化条件) 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。

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

各被験者のワクチン接種後 60 日目、180 日目また

は 360 日目の採取血清における Anti-Monkeypox PRNT₅₀ を解析した。今回調査した各被験者のワクチン接種後最長時点(180 日目または 360 日目時点)での中和抗体陽性率は、Anti-Monkeypox PRNT₅₀ が ≥ 10 を陽性基準とした場合、LC16m8 群では 17%(4/23)、Dryvax 群では 43%(3/7)であり、両群には統計学的差は認められなかった。また中和抗体陽性者における Anti-Monkeypox PRNT₅₀ の幾何平均(GMT)は、LC16m8 群では 17、Dryvax 群では 66 であった。

6. 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの安全性評価における病理学的研究

好中球枯渇させたマウスにサル痘ウイルス接種 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ー細胞が散見された。肝の類洞内に Iba-1 抗原が検出された。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、抗原陽性面積によるクッパー細胞の活性化を評価した。非感染群において、アイソタイプコントロール投与と Ly6G 抗体投与によるクッパー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、アイソ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、感染によるクッパー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、クッパー細胞の活性化はいずれの群に対しても有意であり($p<0.01$)、好中球枯渇によって、肝臓内のクッパー細胞に対する感染の影響が強く認められることが示された。

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

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 を実施したところ、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 が検出できた。

8. 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの有効性及び安全性評価に関する研究

単独の蛍光遺伝子を保持する当該プラスミドで形質転換した大腸菌では明確な蛍光色の違いが確認できた。その一方で複数の蛍光遺伝子を発現するプラスミドの場合、明確な違いは確認されなかった。今後は蛍光用バンドパスフィルターを用いるな

どの複数の蛍光色が混ざった状態を区別する方法が必要であると考えられた。

D. 考察

1. バイオテロ対策の国際動向調査

国際的にも、また、国内においても感染性痘瘡ウイルスを用いた痘瘡対策研究が進められている。日本では、世界に存在する第三世代痘瘡ワクチンのひとつ、LC16m8 が製造されている。国際的には日本以外の先進国ではもう一つの第三世代痘瘡ワクチン MVA が備蓄されるようになってきている。また、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。痘瘡ウイルスが用いられるバイオテロ対策研究とそれへの対策が着実に進められている。今後も、日本においても研究開発を続けるとともに、国際動向に注目していくことが必要と考えられる。

2. バイオテロ対策ホームページの維持・改良

ホームページの充実については、今年度は 5 つの病態(野兔病、炭疽、ブルセラ症、デング熱、チクングニア熱)について、新たな知見と最新情報を追加した。フローチャートを改訂するなど、閲覧者により見やすい内容になったと考えている。平成 30 (2018)年 10 月以降のホームページ閲覧数の増加の要因は明らかではないが、シンポジウム開催時期と一致しており、その波及効果であった可能性もある。関連機関と協力してバイオテロ対策を広く効果的に周知する方法をさらに検討していく必要がある。

3. 研修会/国際会議の主催

日本感染症学会・化学療法学会との共催で行ったバイオテロ関連シンポジウムでは(10 月 24 日)、2 時間という限られた時間ではあるものの、有意義な議論を展開することができた。多くの参加者とのディスカッションを通じ、現状の把握と問題点の共有について、一定の役割は果たせたと考えている。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「生物テロと天然痘ウイルス」と題する講演を担当した(西條政幸、バイオテロと天然痘ウイルス、第 66 回日本ウイルス学会・ICD 講習会、京都 2018 年、10 月)。今後も、このような学術的活動を積極的に行うことが期待される。

国際会議への出席を通じ、生物テロ対策における公衆衛生部局とセキュリティ部局の連携に関する関心が高まっており、また、ドイツの事例で具体的なメリットが関係者に認識されていることが明らかになった。生物テロ対策を行う上で、使われる可

能性のある剤やシナリオを知らずして公衆衛生側は準備を進められない。一方で、セキュリティ側は生物剤が使われた際のインパクトを評価する知見を持たない。そのため、両機関が協働で脅威・リスク評価を行うことは欠かせないが、そのリスク認識の共有は容易ではない。GHSAGが開発した脅威・リスク評価ツールは、考慮すべきパラメーターを明示的に示し、それぞれのパラメーターの重み付けを系統的に実施することで、バイアスを最小限に抑えて、その評価根拠が明らかな形でリスク・脅威評価を提示することができるツールである。このツールによって、共通のフレームワーク、そして共通の言語を用いて、セキュリティ・公衆衛生機関が相互にリスク認識を共有することができることが期待される。脅威とリスクの評価は、日本ではしばしば「ブラックボックス」である。リスク評価は、政策形成過程の中で何かしら行われているとは思われるが、どのような項目に基づき、それぞれの項目にどのように重み付けされてその結論に達したのかが明らかからかではない。リスク・脅威評価の手法とその重要性について、国内でも今後理解が深まることが期待される。公衆衛生側が機微情報を取り扱うには、セキュリティクリアランスや通信機材や情報取扱手順の整備等、さまざまな追加コストの負担も検討する必要があると考えられる。今年度、本研究班が主催した国際ワークショップ・合同訓練を通じ、自治体の警察・公衆衛生部門が顔を合わせる良い機会となった。まずはこのような顔を合わせる機会が存在することが重要である。

4. LC16m8 に安全性、有効性、安定性に関する研究
本研究(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)により、過去に種痘歴のない健康成人において、痘そうワクチン LC16m8 は米国で承認、備蓄されている第1世代痘そうワクチンである Dryvax と同程度のサル痘ウイルスに対する中和抗体誘導能を有することが示唆された(平成 29 年度報告済み)。1980 年の天然痘撲滅宣言を受けて、全世界での痘そうワクチン接種が中止され、本邦においても 1976 年に痘そうワクチン定期接種が中止され、40 歳以下の世代では痘そうワクチン接種歴が無く、また既接種者においても本研究班でのこれまでの研究成果で示されている。ワクチニアウイルス Lister 株等のボックスウイルスに対する中和抗体が接種後の年数を経て徐々に陰性化しているヒトの割合が高まりつつあることが懸念される。また、アフリカ地域のサル痘アウトブレイクでは痘そうワクチン未接種の若い世代において発症者が多いことが報告されている。そこで、

痘そうワクチン LC16m8 により誘導されたサル痘ウイルスに対する中和抗体応答の持続について調査した結果、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、陽性率は共に 50%を下回った。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。LC16m8 は、B5R 遺伝子に一塩基欠損により安全性が確保されているが、その生産・細胞で増殖させる過程で一塩基欠損が回復するいわゆる MSP が増加する。その病原性は高まる(副作用誘導リスクが高まる可能性がある)。MSP の適切な管理は LC16m8 製造過程では重要な検査項目となる。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。これら Lot のそれぞれ3代継代培養したウイルスから主な種類の MSP の中でも 267A 挿入型が高い頻度で検出され、その比率も継代ごとに増えていた。しかし、Lot によっては 274ATAC 挿入型のみが検出され、継代することによってその比率が増えていたため、MSP 検出には 3 種類のプライマーを用いて定量的 PCR を行う必要があることが分かった。今後はこれら Lot の Vero E6 細胞で継代培養したウイルス液を、次世代シーケンス解析を行い、その結果を比較することによって、定量的 PCR の結果との相同性を確認する必要がある。今年度は、組織中の単球・マクロファージに着眼することとした。HE 染色による組織の評価結果から、肝組織の評価が容易と判断し、肝組織内のクッパー細胞の活性化について組織上での評価を試みた。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、ボ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。今回の結果についてはウイルス動態とともにその意義を考察する必要がある。血中及び臓器中のウイルス感染動態を検索予定であるが、現在、検出系について評価中である。第三世代痘瘡ワクチン LC16m8 への外来遺伝子挿入およびそれによるベクターとしての有用性はこれまで比較的多くの論文で発表されている。現在、私たちは LC16m8 をベクターとしたワクチン開発研究が実施されているが、LC16m8 への外来遺伝子挿入法の改良研究が本研究班で行われている。今年度は m8-BAC システムで用いられている

既存の組換え法を改良し、任意の領域に外来遺伝子を迅速かつ簡便に導入するシステムを確立するために蛍光遺伝子、薬剤耐性遺伝子、そして制限酵素 I-SceI サイトを持つプラスミドを作製した。予備検討としてこれらのプラスミドを用いて大腸菌を形質転換した。単独の蛍光遺伝子を保持するプラスミドで形質転換した大腸菌では明確な蛍光色の違いが確認できたが、一方で複数の蛍光遺伝子を発現するプラスミドの場合、明確な違いは確認されなかった。さらなる改良研究が必要である。

5. ウイルス性出血熱に関する研究

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。

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。また、私たちの研究では、重症熱性血小板減少症候群ウイルスやアレンウイルスが含まれる臨床検体(血清)中の不活化条件についても検討しているが、ウイルス毎にその条件がことなる。不活化条件の標準手順書の整備が必要である。

E. 結論

バイオテロ対策の国際動向において、痘瘡ワクチン開発研究、備蓄に関する進捗があった。MVA が欧州、カナダや米国で備蓄されることになった。また、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。LC16m8 の有用性、安定性、検定・製造工程における品質管理において重要な副作用の原因となる MSP の高感度検出法とこの研究が進んだ。2020 年東京オリンピック・パラリンピック開催に備え、その対策に必要な関連感染症

の流行状況について調査した。バイオテロ対策に資するホームページ(<https://h-crisis.niph.go.jp/bt/>)の維持改良につとめた。

F. 健康危険情報

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) 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
- 2) Suda Y, Chamberlain J, Dowall SD, Saijo M, Horimoto T, Hewson R, Shimojima M. The Development of a Novel Diagnostic Assay That Utilizes a Pseudotyped Vesicular Stomatitis Virus for the Detection of Neutralizing Activity against Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. Jpn J Infect Dis71(3):205-208, 2018
- 3) 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
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.

- 7) 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.
 - 8) 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.
2. 学会発表
- 1) 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
 - 2) 西條政幸. バイオテロと天然痘ウイルス. 第 66 回日本ウイルス学会・ICD 講習会, 京都 2018 年, 10 月
 - 3) 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.年 10 月
 - 4) 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)
 - 5) 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)
 - 6) Ryotaro Nouda, Takahiro Kawagishi, Yuta Kanai, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Yoshiharu Matsuura, Takeshi 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)
 - 7) 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)
 - 8) 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)
 - 9) 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)
 - 10) 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)
 - 11) 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)
 - 12) Takahiro Kawagishi, Yuta Kanai, Yusuke Sakai, Ryotaro Nouda, Hideki Tani, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Yoshiharu Matsuura, Takeshi

- Kobayashi. Nelson Bay reovirus σ 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)
- 13) 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)
- 14) 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)
- 15) 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)
- 16) 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, 西条政幸 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
- 17) 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
- 18) 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
- 19) 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
- 20) Yasuhiko Shinmura, Shota Takagi, Masaya Yoshimura, Kazuhisa Kameyama, Kengo Sonoda, Yoichiro Kino, Sutee Yoksan, Takashi Fujii, Single administration of live-attenuated tetravalent dengue vaccine candidate, KD-382, induced long-lasting (>2 years) neutralizing antibody against all four serotypes in cynomolgus monkeys, The American Society of Tropical Medicine and Hygiene Annual Meeting 2017
- 21) Shota Takagi, Masaya Yoshimura, Kazuhisa Kameyama, Yasuhiko Shinmura, Kengo Sonoda, Yoichiro Kino, Takashi Fujii, Evaluation of the effect of pre-existing immunity against dengue on neutralizing antibody response induced by a live attenuated tetravalent dengue vaccine candidate, KD-382, in cynomolgus monkeys, The American Society of Tropical Medicine and Hygiene Annual Meeting 2017
- 22) 吉村昌也, 高木翔太, 亀山和久, 新村靖彦, 園田憲悟, 来海和彦, 4 価弱毒生 Dengue ワクチン開発品のカニクイザルにおける中和抗体応答評価, 第 54 回日本ウイルス学会九州支部総会, 2017 年
- 23) 吉村昌也, 高木翔太, 亀山和久, 新村靖彦, 園田憲悟, 城野洋一郎, 藤井隆, 4 価弱毒生 Dengue ワクチン開発品のカニクイザルにおける中和抗体応答評価, 第 52 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 2017 年
- 24) Yasuhiko Shinmura, Yoichiro Kino, Sutee Yoksan, Kengo Sonoda, Single dose of live attenuated tetravalent dengue vaccine elicits well-balanced immune response for all four serotypes without viremia in monkeys, The 6th Asian Vaccine Conference 2017
- 25) Hiroyuki Yokote, Kengo Sonoda. Japanese Vaccine Development. U.S. - JAPAN ANNUAL MEDICAL BIODEFENSE RESEARCH SYMPOSIUM, 2016
- 26) Kengo Sonoda. Session I: Manufacturing for Investigational Products, Chemical Manufacturing Control for Submission, 16th Thailand Towards Excellent in Clinical Trials Annual Meeting 2016
- 27) Kengo Sonoda. Session I: Manufacturing for Investigational Products, Manufacturing for

- Investigational Products, 16th Thailand Towards Excellent in Clinical Trials Annual Meeting 2016
- 28) Kengo Sonoda. Experiments of Vaccine Development for Flavivirus Infectious Diseases. Workshop on Cooperation Studies for Zika Virus between Japan and Brazil, 2016
- 29) 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.
- 30) 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.

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