

I . 総括研究報告

バイオテロ対策のための備蓄されている細胞培養痘そうワクチンの備蓄等、バイオテロ病原体への検査対応、
公衆衛生との関連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:バイオテロ対策に貢献するための調査・研究、ワクチン開発等の研究活動が実施された。その内容は、バイオテロ対策のために日本国内で備蓄されているLC16m8の品質評価法の改良に関する研究、LC16m8を土台とした高病原性病原体へのワクチン開発基盤を整備する研究、この開発された基盤を用いた新型コロナウイルス感染症(COVID-19)に対するワクチン開発、感染性ウイルスを用いて1類感染症(エボラ出血熱等)の検査法の開発・改良、運用中のバイオテロ対応ホームページの維持と新規項目の追加、バイオテロ対策のための国際連携(世界保健機関(WHO)が主催する痘瘡ウイルス研究専門家アドバイザリーコミティー(ACVVR)やWHOによるScientific Advisory Group for the Origins of Novel Pathogens(SAGO)の委員として、SARS-CoV-2の起源やそれを調べるための調査研究のあり方に関する会議への出席などの活動が実施された。本研究班の活動を通じて国内での感染症疫学調査、検査法の整備と検査の適切な受入、国立感染症研究所と関係機関との情報共有、本研究班で開設されているホームページの充実(OVID-19に関する簡単な項目の追加と、メリオイドーシス(鼻疽菌・類鼻疽菌)のアロマスプレーを介した米国の事例などによる注意喚起)などの活動を通して、2021年に東京等で開催された東京オリンピックに開催の安全に貢献した。

オリンピック・パラリンピック東京大会期間中に、疑似症サーベイランスが強化された。米国疾病予防管理センターが提唱するサーベイランス評価の手法を参考に、定量的な手法と定性的な手法をあわせた方法で大会の前後と大会中の期間を対象に疑似症サーベイランスシステムの効果を評価した。感染性のあるクリミア・コンゴ出血熱ウイルスを用いた中和抗体測定法を開発した。米国で発生した類鼻疽の流行事例を調査研究した。LC16m8を土台としたSARS-CoV-2ワクチン(COVID-19ワクチン)開発に関する研究を継続した。その有効性が確認された。また、LC16m8を土台とした狂犬病ワクチン開発研究も継続された。さらにLC16m8の品質保証管理目的の新規検査法の開発研究も継続された。

研究分担者氏名

安達英輔 東京大学医科学研究所・附属病院感染免疫
内科・助教
齋藤智也 国立感染症研究所感染症危機管理研究セン
ター・センター長
鈴木基 国立感染症研究所感染症疫学センター・センタ
ー長
下島昌幸 国立感染症研究所ウイルス第一部・室長
永田典代 国立感染症研究所感染病理部・室長
前田健 国立感染症研究所獣医科学部・部長
吉河智城 国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研
究官

A. 研究目的

国際情勢の不安定化が進んでいる。現在ロシアが
ウクライナに軍事的侵攻が国際社会の安全性を不
安定化させ、生物・化学兵器の使用についても危惧
されている。日本では2021年に東京オリンピされて
いる。今後のバイオテロ対策に資する活動基盤を整
備する

B. 研究方法

1) 高度弱毒化痘瘡ワクチン(LC16m8)研究

【LC16m8の品質評価法開発のための研究】

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く、Vero E6細胞ではプラ
ークを形成しないことが判明している。LC16m8株を
培養細胞で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。MSPをウイルスレベルでより
簡便、迅速、かつ特異的に検出できる検査法の開
発のために、LC16m8及びMSPの共通抗体及び
MSP特異抗体を作製し、その品質評価における
有用性を評価した。

【LC16m8を土台とした高病原性ウイルス感染症
に対するワクチン開発】

① 狂犬病ワクチン開発

昨年度までに街上毒である狂犬病ウイルス (Toyohashi 株) の G 蛋白質遺伝子を組み替えた狂犬病ウイルス G 蛋白質組換えワクシニアウイルスの中間体まで作製できた。その中間体は狂犬病ウイルスの G 蛋白質のみではなく、レポートとして mCherry を保有しているため、レポート遺伝子を除去する作業を実施した。その後、プラーク純化法により精製し、P1 の狂犬病ウイルス G 蛋白質組換えワクシニアウイルスを作製した。

② COVID-19 ワクチン開発

昨年度までに作製した SARS-CoV-2 WK-521 株の S、S1、S2 遺伝子をコードする組換え m8 (m8-S_full, m8-S1, m8-S2) の *in vitro* に於ける感染細胞での遺伝子発現をウェスタンブロットングにより確認した。これらの組換え m8 と、対照として野生型の m8 1×10^6 PFU/100ul をシリアンハムスターに 2 週間間隔で 2 回皮内接種した。最終免疫より 2 週間後に SARS-CoV-2 WK-521 株 1×10^3 TCID50/80ul を経鼻接種によりチャレンジした。その 4 日後にハムスターを安楽死処置し、肺、血清を採取した。肺乳剤中に含まれる SARS-CoV-2 の量を TCID50 法にて求めると共に、血清中の SARS-CoV-2 WK-521 株に対する 100% 中和抗体価についてもバイオアッセイにより決定した。

ワクチン開発のために作出された SARS-CoV-2 と LC16m8 の組換えウイルスを皮下免疫後、SARS-CoV-2 を経鼻接種されたシリアンハムスターの肺組織について病理組織学的に検索を行った。

2) 高病原性病原体検査法開発・改良、維持

ウイルス・クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの Bagdad 株 (アジア 1 型)、Kosova Hoti 株 (ヨーロッパ 1 型)、IbAr10200 株 (アフリカ 3 型)、UK 株 (アジア 1 型) を VeroE6 細胞で増殖させ、ウイルスカ価はウサギ抗 NP 抗体を用い FFU/mL で算出した。

3) 国際連携強化

バイオテロ対策関連国際会議への出席: 2021 年 11 月 3-4 日に開催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家アドバイザリー委員会 (ACVVR) に参加した。また、WHO が、今後バイオセキュリティ上重要な病原体となる SARS-CoV-2 を含む新興ウイルス感染症の病原体の起源に関する調査研究のあり方を議論する委員会 (Scientific Advisory Group for the Origins of Novel Pathogens (SAGO)) の委員会委員の公募に、研究代表者である西條が応募し、選考された。

さらに、東京オリパラ開催時において、東京都の依頼により対策本部感染症対策アドバイザー (東京 2020 大会開催に伴う都市オペレーションセンタ

ー医療統括責任者へのアドバイザー) を担当した。

- 4) 感染症情報、疫学の調査手法の改良と開発
米国疾病予防管理センターが提唱するサーベイランス評価の手法を参考に、定量的な手法と定性的な手法をあわせた方法で疑似症サーベイランスシステムを、疑似症サーベイランスデータ、疑似症サーベイランスに関連する資料、症例 (事例) を報告した自治体、病院関係者からの聞き取った情報に基づいて評価した。
- 5) バイオテロ対策の強化に関する研究
米国 CDC 及び厚労省の HP を中心に関係文書、関連記事、文献等を渉猟し、米国類鼻疽事案について基本情報を収集し、それらを基にして日本における類鼻疽のリスクを検討し、類鼻疽の原因菌 *B. pseudomallei* を利用したバイオテロについても考察した。
- 6) 情報提供 (ホームページ) 関連活動
バイオテロホームページの作成と最新の情報への更新を行う。

【倫理面への配慮】

動物実験は、国立感染症研究所の動物実験委員会からの許可のもとに実施された。

C. 研究結果

- 1) 高度弱毒化痘瘡ワクチン (LC16m8) 研究
【LC16m8 の品質評価法開発のための研究】
昨年度まで作製できた LC16m8、LC16mO 及び MSP の B5R 共通抗原 (Ag1、Ag2-1、Ag2-2) 及び LC16mO 及び MSP の B5R 特異的抗原 (Ag3) を用いて、本年度はそれぞれの抗原に対するウサギ由来抗血清が作製できた。Ag1、Ag2-1 に対するウサギ抗血清は LC16m8、LC16mO 及び MSP の B5R を特異的に認識でき、それぞれのウイルス感染細胞においても特異的に検出できた。また、Ag3 に対するウサギ抗血清は LC16mO 及び MSP の B5R 及びそれらのウイルスの感染細胞のみを特異的に認識できた。そのため、これらの抗体を用いて、flow cytometry や蛍光抗体法により、ウイルスレベルでの MSP を検出できることが示唆された。

【LC16m8 を土台とした高病原性ウイルス感染症に対するワクチン開発】

① LC16m8 を土台とした狂犬病ウイルスワクチン開発

昨年度までプラーク純化した中間体組換えワクシニアウイルスが作製できた。本年度は、その中間体

組換えウイルスから mCherry 遺伝子を除去する段階に入り、中間体組換えワクシニアウイルスを RK13 細胞に感染させ、選択薬剤を抜いたアガロースゲルで培養した。その後、mCherry の発光が認められないプラークを 10 個回収し、蛍光抗体法により狂犬病ウイルスの G 蛋白が発現している組換えワクシニアウイルスを選別した。このようなプラーク純化を 3 回繰り返し、最終的な狂犬病ウイルス G 蛋白発現組換え LC16m8 を作製した。こちらの組換えウイルスを RK13 細胞を撒いた 96 well のマイクロプレートに感染させ、蛍光抗体法により確認した結果、CPE が確認される細胞はすべて狂犬病ウイルス G 蛋白質に対する抗体に陽性を示し、mCherry は陰性を示した。このウイルスを P1 としてシードウイルスとした。

② LC16m8 を土台とした COVID-19 ワクチン開発

予め m8-S_full、m8-S1、m8-S2、そして対照として m8 を免疫したハムスターに SARS-CoV-2 をチャレンジした後 4 日間の体重推移と、4 日目の肺中のウイルス量、及び血中の中和抗体価を調べた。対照群である m8 と比較して m8-S_full、m8-S1、m8-S2 は体重の減少が緩やかであった。感染 4 日後の肺中のウイルス量は m8 を免疫しておいた群と比較して m8-S_full、m8-S1、m8-S2 を免疫した群は有意にウイルス量が減少した。特に m8-S_full 免疫群は 5 匹中 2 匹でウイルス量が検出限界以下となっており、そのワクチン効果は m8-S1、m8-S2 を大きく上回った。血中の中和抗体価は肺中のウイルス量が最も少なかった m8-S_full が最も高かった。

非免疫群において接種 4 日目の肺に SARS-CoV-2 の増殖を伴う種々の段階の急性肺炎所見が認められた。病変は細気管支～肺胞野を中心に形成され、炎症反応が比較的弱い部分においてウイルス抗原陽性細胞が多数認められた。また、炎症が比較的強い部分ではリンパ球、マクロファージ、好中球を混じり、出血を伴った。S1 および S2 免疫群では、非免疫群よりやや激しい炎症反応を伴う急性肺炎所見が認められた。好中球、リンパ球、マクロファージを混じり、出血を伴う炎症巣においてウイルス抗原陽性細胞が観察された。スパイク全長免疫群では、リンパ球の浸潤を伴った細気管支腔内の脱落上皮にウイルス抗原を認めるのみで、肺胞野において急性肺炎を示唆する所見はなかった。

2) 高病原性病原体検査法開発・改良、維持

クリミア・コンゴ出血熱ウイルス 4 株に対して作製したマウス抗血清(1 株あたり 3 匹分)それぞれに

ついて、ウイルス 4 株に対する中和抗体価を算出した。抗血清作製時に用いたウイルス株で測定した中和抗体価が必ずしも最も中和抗体価が高いわけではなく、どの抗血清も UK 株での中和抗体価が最も高かった。

3) 国際連携強化

バイオテロ対策関連国際会議への出席:2021 年 11 月 3-4 日に開催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家アドバイザリーコミティー(ACVVR)に出席し、痘瘡ワクチン備蓄や痘瘡ウイルスが用いられるバイオテロ対策のための研究のあり方に関する情報を収集した。また、SAGO の会議に出席し、SARS-CoV-2 を含む新興ウイルス感染症の病原体の起源に関する調査研究のあり方を議論に参画した。

4) 感染症情報、疫学の調査手法の改良と開発

東京オリンピック・パラリンピックが開催された 2021 年 7 月 1 日から同年 9 月 19 日対象期間中に 1 件の事例が報告された。尚、同期間に 3310 件のゼロ報告がなされた。

5) バイオテロ対策の強化に関する研究

今般発生した米国の 2 事案に関しては、どちらも輸入製品あるいは輸入観賞魚からの感染であり、幸い症例数も感染拡大も限定的であり、短期間で終息した。

6) 情報提供(ホームページ)関連活動

COVID-19に関する簡単な項目の追加と、メリオイドシス(鼻疽菌・類鼻疽菌)のアロマスプレーを介した米国の事例などによる注意喚起を追加した。

D. 考察

LC16m8 は世界で二つしかない第 3 世代の痘瘡ワクチンのうちの一つであり、本研究班で行われている LC16m8 の安全性と有効性に関する研究は、痘瘡や類似するウイルス感染症対策に強く貢献するものである。痘瘡ワクチン接種が行われなくなっただけから既に半世紀程度が経過した。痘瘡ワクチンにより誘導されるオルソポックスに対する免疫を持たない人口は増加の一途を辿っている。それに伴い、人獣共通感染症に含まれるサル痘ウイルスや牛痘ウイルスによるヒトの感染事例が報告されている。バイオテロによる痘瘡患者の発生やその流行に備えることのできる国はそれほど多くはなく、痘瘡ウイルスによるバイオテロに備える上では LC16m8 を生産・備蓄している日本はとても重要な役割を果たしている。

COVID-19 の大規模流行が発生した。本研究班および先行研究班で、LC16m8 を土台とした高病

原性病原体に対する組換え LC16m8 ワクチン作出法が開発されている。この手法を用いて COVID-19 ワクチンが開発された。動物モデルでそのワクチン候補品の有効性が示唆された。

2021 年度には東京等で東京オリンピック・パラリンピックが開催された。本研究班としてもバイオテロに備えて疫学調査、検査への支援体制の整備、東京都の依頼により対策本部感染症対策アドバイザー(東京 2020 大会開催に伴う都市オペレーションセンター医療統括責任者へのアドバイザー)を担当するなどして、東京オリンピック・パラリンピックの安全対策に貢献した。これらの経験や基盤は、今後日本で開催されるであろう大規模マスコガザリングの安全にも貢献できる基盤となるものと考えられる。

バイオテロ対策の強化にはワクチンや治療薬開発、疫学情報の正確で迅速な収集、検査体制の整備と受付、社会への正確で適切な情報の提供、国際連携の強化が必要である。その意味では、本研究ではこれらの多岐にわたる課題に関する研究が進められていると言える。

E. 結論

バイオテロ対策強化に貢献するための、多岐にわたる研究が実施された。それぞれの研究課題は、まだ開発途上のももある。国内のバイオテロ対策強化に貢献するとともに、国際連携を通じた国際的にも貢献することが求められる。痘瘡ワクチン LC16m8 を用いた高病原性病原体に対する新規ワクチン候補品(COVID-19 ワクチン、狂犬病ワクチン)が作製された。今後も LC16m8 に関連する研究、品質管理法の改良、バイオテロ早期探知のための疫学調査のあり方の検討、国際連携、社会に対する情報提供のあり方を検討する必要がある。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sano S, Fukushi S, Yamada S, Harada S, Kinoshita H, Sugimoto S, Yoshikawa T, Kurosu T, Takamatsu Y, Shimojima M, Toda S, Hamada Y, Fujisawa N, Sugimoto T, Saijo M. Development of an RT-LAMP Assay for the Rapid Detection of SFTS Virus. *Viruses*. 2021 Apr 16;13(4):693. doi: 10.3390/v13040693.
- 2) Kato H, Takayama-Ito M, Satoh M, Kawahara

M, Kitaura S, Yoshikawa T, Fukushi S, Nakajima N, Komeno T, Furuta Y, Saijo M. Favipiravir treatment prolongs the survival in a lethal mouse model intracerebrally inoculated with Jamestown Canyon virus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021 Jul 2;15(7):e0009553. doi:10.1371/journal.pntd.0009553.

- 3) Nosaki Y, Maeda K, Watanabe M, Yokoi T, Iwai K, Noguchi A, Tobiume M, Satoh M, Kaku Y, Sato Y, Kato H, Okutani A, Kawahara M, Harada M, Inoue S, Maeda K, Suzuki T, Saijo M, Takayama-Ito M. Fourth imported rabies case since the eradication of rabies in Japan in 1957. *J Travel Med*. 2021 Dec 29;28(8):taab151. doi: 10.1093/jtm/taab151. PMID: 34542626.
- 4) Inagaki T, Taniguchi S, Kawai Y, Maeki T, Nakayama E, Tajima S, Takeyama H, Lim CK, Saijo M. Leu-to-Phe substitution at prM₁₄₆ decreases the growth ability of Zika virus and partially reduces its pathogenicity in mice. *Sci Rep*. 2021 Oct 4;11(1):19635. doi: 10.1038/s41598-021-99086-2.
- 5) Oshima H, Okumura H, Maeda K, Ishijima K, Yoshikawa T, Kurosu T, Fukushi S, Shimojima M, Saijo M. A Patient with Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome (SFTS) Infected from a Sick Dog with SFTS Virus Infection. *Jpn J Infect Dis*. doi: 10.7883/yoken.JJID.2021.796, 2022
- 6) Taniguchi S, Inagaki T, Tajima S, Suzuki T, Yoshikawa T, Fukushi S, Park ES, Fujii H, Morikawa S, Tani H, Nakayama E, Maeki T, Shimojima M, Lim CK, Saijo M. Reverse Genetics System for Heartland Bandavirus: NSs Protein Contributes to Heartland Bandavirus Virulence. *J Virol*. 13;96(7):e0004922. doi:10.1128/jvi.00049-22, 2022
- 7) Saijo M. Severe fever with thrombocytopenia syndrome, a viral hemorrhagic fever, endemic to Japan: achievements and directions to the future in the scientific and medical research. *Jpn J Infect Dis*. doi:10.7883/yoken.JJID.2021.851, 2022
- 8) Adachi E, Nagai E, Saito M, Isobe M, Konuma T, Koga M, Tsutsumi T, Nannya Y, Yotsuyanagi H. Anti-spike protein antibody titer

at the time of breakthrough infection of SARS-CoV-2 omicron. J Infect Chemother. S1341-321X(22)00100-32022, 2022

- 9) Adachi E, Saito M, Nagai H, Ikeuchi K, Tsutsumi T, Yotsuyanagi H, Transient depletion of T cells during COVID-19 and seasonal influenza in people living with HIV. J Med Virol. 94(5):1789-1791. 2022
- 10) Yoshikawa T. Third-generation smallpox vaccine strain-based recombinant vaccines for viral hemorrhagic fevers. Vaccine. 39(41):6174-81, 2021
- 11) Yoshikawa T. Vaccine Development for Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome. Viruses. 13:627 (doi:10.3390/v13040627), 2021

2. 学会発表

- 1) 西條政幸. 新規ウイルス感染症, 重症熱性血小板減少症候群(SFTS), の日本国内流行の発見から特異的治療・ワクチン開発まで. 第 90 回日本寄生虫学会, 第 32 回日本臨床寄生虫学会合同大会, 奈良(2021. 4)
- 2) 西條政幸. 蚊媒介感染症. 第95回日本感染症学会学術講演会. 東京(2021. 4)
- 3) 西條政幸. COVID-19とSARS-CoV-2. 第20回みちのくウイルス塾, 仙台(2021. 6)
- 4) 西條政幸. COVID-19 のウイルス学・感染症学的特徴と治療、予防、対策. 第45回北海道救急医学学会, 札幌(2021.10)
- 5) 安達英輔、池内和彦、齊藤誠、古賀道子、堤武也、四柳宏 COVID-19患者のCD4+T細胞及びCD8+T細胞数の変化 第71回日本感染症学会東日本地方学術集会, 東京(2021.10)
- 6) 安達英輔、池内和彦、齊藤誠、古賀道子、堤武也、四柳宏 季節性インフルエンザ感染症, 及びCOVID-19罹患に伴うT細胞サブセットの変化 第35回日本エイズ学会学術集会, 東京(2021.11)
- 7) Mendoza MV, Park E, Ishijima K, Kuroda Y, Tatemoto K, Inoue Y, Harada M, Morikawa S, Saijo, M Maeda K. Differentiation of live attenuated vaccine from the other orthopoxviruses. 第68回日本ウイルス学会学術集会, 神戸(2021.11)

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