

論文の内容の要旨

論文題目	Controlling monkeypox virus infection in human: Establishment of a rapid diagnostic system and evaluation of highly attenuated smallpox vaccine for prevention of monkeypox using non-human primate model (ヒトサル痘の迅速診断法の開発および高度弱毒痘そうワクチンの霊長類をモデルとした評価)
氏名	飯塚 愛恵

近年、国際保健学と感染症学の新しい接点として、人獣共通・輸入感染症の問題が重要となってきた。これらを視野に入れながら、私はサル痘ウイルスと高度弱毒痘そうワクチンについて研究した。

サル痘は、1958年に霊長類実験施設でカニクイザルの天然痘様疾患として初めて報告された。サル痘ウイルスは、天然痘の病原体である痘瘡ウイルスと同様、ポックスウイルス科オルソポックスウイルス属に分類される2本鎖DNAウイルスである。ヒトのサル痘は、1970年にコンゴ民主共和国(旧ザイール)で天然痘様疾患として初めて報告され、その後、中央・西アフリカの主に熱帯雨林で散発的に流行していた。天然痘流行時は、ヒトのサル痘は注目されていなかったが、天然痘が根絶された1980年以降、アフリカでの流行が注目されるようになった。WHOの報告によると、1981年から1986年のヒトのサル痘患者数は338人で、1996年から97年にはコンゴ民主共和国で511人にのぼる。2001年から現在にかけて、引き続きコンゴ民主共和国、スーダンにおいても、数十名から数百名の規模で流行は継続している。流行地での動物の血清疫学的調査等から、サル痘ウイルスの自然宿主はアフリカのリリス等の齧歯類であることが明らかにされている。また、2003年に、アフリカからアメリカ合衆国へ愛玩用に輸入された齧歯類を介してサル痘ウイルスが持ち込まれ、ヒトのサル痘患者が発生した。このことからサル痘が輸入ウイルス感染症として注目されるようになり、その実験室診断法および予防法の確立は重要な課題となった。なお、サル痘予防用に承認されたワクチンはないが、天然痘のワクチンである痘そうワクチンがサル痘にも有効であることが実験的に明らかにされている。

日本で承認されている天然痘のワクチンには、天然痘根絶時に広く使用された旧世代の痘そうワクチンと高度弱毒痘そうワクチンがある。前者は、天然痘には極めて有効なワクチンであったが、現在では容認できないレベルの強い副反応を持っている。アメリカ合衆国で起きた9.11テロ事件以降、天然痘によるバイオテロが脅威となり多くの国で痘そうワクチンの製造が開始され、改良が続けられている。日本でも、高度弱毒痘そうワクチンの製造が再開されており、サル痘が輸入感染症として日本で発生した場合に使

用される可能性がある。そこで、本研究では、国際保健学の観点からアフリカで流行しているサル痘ウイルス感染症対策として、I 章でサル痘の迅速診断法の開発を行い、さらに予防対策として II 章では高度弱毒痘そうワクチン LC16m8 のサル痘感染予防効果持続能について霊長類モデルでの評価を行った。

第 I 章において、流行地域でのサル痘の簡便な診断系として、世界で初めて Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を用いた遺伝子検出法を開発した。背景としてサル痘の実験室診断には、電子顕微鏡によるウイルス粒子検出、免疫病理組織学的検査によるウイルス抗原検出、ウイルス分離・同定、PCR などがある。前二者ではサル痘ウイルスと他のオルソポックスウイルスとは鑑別できない。また、抗原・抗体検出において、オルソポックスウイルス間では抗原性が強く交差するため、血清診断でもヒトのサル痘と他のオルソポックスウイルス感染症を鑑別できない。そのため、サル痘を特異的に診断するには、ウイルスを分離・同定するか、サル痘ウイルス遺伝子の特異的に検出する必要がある。これまでサル痘ウイルス遺伝子の特異的に検出する方法として、PCR や定量的リアルタイム PCR などの遺伝子増幅法が開発されているが、高額な装置を要する。近年日本で開発された LAMP 法は、標的遺伝子に対して 6 種類のプライマーを設定し、鎖置換型 DNA 合成酵素による鎖置換反応を利用して一定温度で遺伝子を増幅する方法であるため、特別な装置を必要としない利点が挙げられる。LAMP 法では、検体、プライマー、鎖置換型 DNA 合成酵素、基質等を混合し、一定温度 (65° C 付近) で反応させることによって DNA 合成が進み、検出までの工程を 1 ステップで行うことができる。LAMP 法では遺伝子増幅効率が高いことから、標的遺伝子を 15min ~ 1hr で約 1010 倍に増幅することが可能である。さらに、LAMP 法は既にいくつかのウイルス感染症の診断法として応用されている。そこで、本研究では、LAMP 法によるサル痘ウイルス遺伝子の検出システムを用いたサル痘診断法を開発した。さらに、病原性が強く致死的なコンゴ盆地型と病原性の低い西アフリカ型のサル痘ウイルスを、それぞれ特異的に検出するシステムも開発した。コンゴ盆地型および西アフリカ型サル痘ウイルス遺伝子を検出する LAMP 法 (COM-LAMP) に用いるプライマーは、A-type inclusion body (ATI) 遺伝子を標的領域として設計された。コンゴ盆地型を特異的に検出する LAMP 法 (C-LAMP) 用、および西アフリカ型を特異的に検出する LAMP 法 (W-LAMP) 用プライマーは、それぞれに特異的な領域において設計された。今回開発された LAMP 法の診断における感度と精度を、種々の程度のサル痘症状を示すカニクイザル 17 頭から経時的に採取された末梢血液および咽頭ぬぐい液を検体として、高感度遺伝子検出法である nested PCR と比較して検討した。COM-LAMP の感度 (LAMP 陽性検体数 / nested PCR 陽性検体数) と精度 (LAMP 陰性検体数 / nested PCR 陰性検体数) は、それぞれ 57/78 (73%) および 67/67 (100%)、C-LAMP の感度と精度は、それぞれ 32/46 (70%) および 27/27 (100%)、W-LAMP の感度と精度は、それぞれ 23/32 (70%)、40/40 (100%) であった。また、C-LAMP と W-LAMP は、それぞれコンゴ盆地型と西

アフリカ型を特異的に検出した。また、サル痘症状が重い個体ほど、ウイルス血症レベルが高く、その持続期間も長かった。本研究で開発された LAMP 法により、高い感度と精度でサル痘ウイルス遺伝子が検出され、LAMP 法はサル痘ウイルス感染症の診断法として有用であることが確認された。COM-LAMP、C-LAMP、W-LAMP を診断法として用いることにより、型特異的サル痘ウイルス感染症の診断が可能となり、かつ、定量的にウイルス血症レベルを測定できることから、これらの診断法は、ヒトのサル痘の病勢、予後、疫学的診断にも有用と考えられる。

第Ⅱ章において、サル痘の予防対策として有効である痘そうワクチン LC16m8 のサル痘に対する免疫持続能を評価した。天然痘根絶時に広く使用された痘そうワクチンは副反応が強かった。そこで、1970 年代に、副反応の低い弱毒ワクチン株を作製するために、Lister 株から LC16m8 株が選抜された。開発当時の臨床治験から、LC16m8 株ワクチンは副作用が少なく、善感率も従来のワクチン株と変わりなく、抗体価の上昇も親株である Lister 株と同程度かやや良いことが証明され、1975 年にワクチン株として製造承認された。しかし、WHO の天然痘根絶計画が進み、その翌年に日本では定期種痘が中止となったため、2002 年まで製造が中止されていた。サル痘予防効果については、限定された施設以外でのウイルス使用を禁止されているため、その評価は行われてこなかった。しかし 2006 年、LC16m8 をサル痘ウイルス感染サルモデルを用いて評価した西條らの先行研究において、ワクチン接種後約 1 ヶ月後にウイルスを皮下接種にて感染させたサルのサル痘発症を予防することが証明された。本研究では、LC16m8 のサルへの単回投与がもたらす、サル痘免疫予防効果の持続能についてサル痘感染サルを用いて評価した。カニクイザル 24 頭のうち、LC16m8 (各 3 頭ずつ) または Lister (各 2 頭ずつ) を投与したサル群、およびワクチン投与しないサル群 (4 頭) をコントロールとしておき、ワクチン接種から約半年または 1 年後にサル痘ウイルス強毒株を 106PFU/ml 皮下接種させ、約 1 ヶ月経過観察を行った。LC16m8 の効果は、Lister あるいはワクチン非投与群と比較し、サル痘ウイルス感染後、食餌摂取量、体重、体温、糞便性情、皮膚症状などの臨床症状を毎日観察した。3 または 4 日毎に全身麻酔下で約 5ml の末梢血液を採取し、末梢血液検査 (ウイルス量、IgG 抗体価、各種サイトカインレベルの検査)、末梢血液の buffy coat 分画や咽頭スワブからのウイルス分離検査を実施した。結果として、ワクチン非投与群ではサル痘症状が致命的だったのに対し、LC16m8 投与サル群では、ウイルス感染部位における局所的で軽い潰瘍以外の臨床症状は見られず、ウイルス血症レベルも早期に低下した。Lister 投与群においても、臨床症状は見られなかった。また、体重推移については、ワクチン非投与群においてはワクチン投与群に比較して有意に減少し、感染後 21 日目には約 2 割減少した。それに対し、ワクチン投与群の体重は増加傾向が見られた。LC16m8 投与群におけるウイルス血症レベルは Lister 投与群と比較して有意に上昇したが、どちらも早期 (感染後 10 日) に低下した。また、ワクチン投与後の IgG 抗体価は、ワクチン投与後半年後にウイルスを感染させた群では、LC16m8 投与

群のみ半年後に一度抗体価が低下したが、ウイルス感染後ワクチン非投与群と比較して迅速に抗体価の上昇する経過が見られた。それに対し、1年後にウイルスを感染させた群では LC16m8、Lister 投与群ともにウイルス感染前後において抗体価は高度に維持された。また、ワクチン非投与群とワクチン群のサル血清中のサイトカインレベルを比較したところ、ワクチン非投与群では炎症性サイトカインが上昇するのに対し、ワクチン群での上昇は1頭を除いて見られなかった。上昇したワクチン群1頭 (LC16m8 接種)の結果については、解析した全てのサイトカインにおいて上昇が見られたため個体差によるものと考えられた。以上から、LC16m8 投与群によるサル痘ウイルス感染症への予防効果は、IgG 抗体価が長期的には一度低下する経過も見られたが、全てのサルにおいてウイルス感染後免疫応答が迅速に惹起されると結論づけられた。以上の結果から、LC16m8 は単回投与のみで、サルに対するサル痘予防効果が少なくとも1年以上持続することがわかった。現在、日本ではバイオテロ対策として、LC16m8 が備蓄されている。本研究から、当ワクチンのヒトへの免疫が、サル痘だけでなく天然痘予防効果も長期に持続することが示唆された。

第I章、第II章の研究結果は、どちらも世界で初めて得られた知見であり、サル痘対策に与える貢献度は大きいと考えられる。現在、世界でサル痘サーベイランスが活発に行われるようになってきており、本研究で開発された迅速診断法は鑑別診断も可能であるため臨床応用されることを期待する。また、弱毒痘そうワクチン LC16m8 ほど接種方法が簡便で善感率が良いワクチンは現在世界でも開発されていないため、本研究結果がその普及に大きく貢献することを期待する。