

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

ポリオ野生株ウイルスの封じ込め対策に関する研究

平成 18 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 清水 博之

平成 19 (2007) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書

ポリオ野生株ウイルスの封じ込め対策に関する研究.....	清水 博之.....	1
------------------------------	------------	---

II. 分担研究報告書

1. 研究実験室等における野生株ポリオウイルス封じ込め

調査手法の研究.....	清水 博之.....	9
--------------	------------	---

参考資料 1 研究実験室等における野生株ポリオウイルス封じ込め調査手法の研究..	15
--	----

参考資料 2 ポリオウイルスおよびポリオウイルスを含む可能性のある	
-----------------------------------	--

検体の保管状況に関する電話地調査によるアンケートのお願い.....	29
-----------------------------------	----

参考資料 3 病原体取扱いの外部評価に資する研究.....	33
-------------------------------	----

参考資料 4 地方衛生研究所におけるポリオウイルス保有に関する研究.....	37
--	----

2. ヒト集団に silent circulation するポリオウイルスに関する研究....	吉田 弘.....	39
---	-----------	----

3. ワクチン由来ポリオウイルスの病原性解析に関する研究.....	西村 順裕.....	41
-----------------------------------	------------	----

4. ポリオウイルス感受性動物モデルに関する研究.....	小池 智.....	45
-------------------------------	-----------	----

5. ポリオウイルス擬似粒子を用いたポリオ様麻痺発症

マウスモデルの開発に関する研究.....	有田 峰太郎.....	49
----------------------	-------------	----

III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	51
--------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別冊.....	53
----------------------	----

ポリオ野生株ウイルスの封じ込め対策に関する研究

主任研究者：清水 博之

国立感染症研究所 ウイルス第二部

研究要旨 世界ポリオ根絶計画の一環として、WHOは「野生株ポリオウイルスの実験室封じ込めに関する世界的行動計画（第二版）」を策定し、全世界で統一された基準のもとポリオウイルス野生株の実験室封じ込めを進めることを各国に要求している。WHO西太平洋地域の中で、2006年段階で、野生株ポリオウイルス保有状況に関する第一段階調査（Phase I）が終了していないのは、日本と中国の2ヶ国だけとされており、調査レポートの早急な作成および提出が求められている。世界ポリオ根絶計画達成後、人為的、非人為的ないかなる理由であれ、ポリオウイルスがヒト集団に再流行することがないように、ポリオ流行のリスクを評価し適切かつ具体的な制御戦略を検討するため、以下の研究を行った。

- 1) ポリオウイルス関連研究論文発表状況調査を行い、リストアップされた研究者を対象として、野生株ポリオウイルス保有施設調査を実施した。
- 2) 地方衛生研究所を対象とした詳細なポリオウイルス保有状況調査を実施した。
- 3) 従来環境サーベイランス手法ではポリオウイルス検出に時間を要するため、リアルタイムPCR法による迅速診断法の開発を試みた。
- 4) 2005-2006年にかけて、カンボジアにおけるポリオ患者から分離された3型VDPVの遺伝子解析および病原性解析を行い、3型組換えポリオウイルス毒性復帰株の伝播によることを明らかにした。
- 5) 自然感染におけるポリオウイルスの排出や伝播について研究するため、PVR-tg/Ifnar-ノックアウトマウスにおける経口感染効率について解析し、マウス胃内pHやIFN-stimulated geneの発現が経口感染効率に影響していることを明らかにした。
- 6) ポリオウイルス擬似粒子を用いた持続的ポリオ様麻痺モデルを確立し、持続麻痺発現メカニズムについて解析を行った。

分研担究者

清水 博之	国立感染症研究所
吉田 弘	国立感染症研究所
有田 峰太郎	国立感染症研究所
西村 順裕	国立感染症研究所
小池 智	東京都神経科学総合研究所

協力研究者

安藤 秀二	国立感染症研究所
永田 典代	国立感染症研究所
遠田 耕平	WHO/カンボジア
小島 和暢	WHO/WPRO
上野 久美	国立感染症研究所
小松 俊彦	バイオメディカルサイエンス研究会
ルナール純子	バイオメディカルサイエンス研究会
斎藤 真紀	バイオメディカルサイエンス研究会

A. 研究目的

現在最終局面にある世界ポリオ根絶計画が達成された後は、人為的、非人為的にかなる理由であれ、ポリオウイルスがヒト集団に再流行することがないように、起こり得るポリオ流行のリスクを評価し、適切な制御戦略を検討することが必要となる。ポリオ根絶の最終段階およびポリオ根絶後における重要なリスク要因のひとつとして、実験室に保管されているポリオウイルスに由来するポリオ流行が想定されており、ポリオウイルスの実験室封じ込め対策についての具体的な行動が求められている。そのため、WHOは「野生株ポリオウイルスの実験室封じ込めに関する世界的行動計画（第二版）」を策定し、全世界で統一された基準の下、ポリオウイルス野生株の実験室封じ込めを進めることを提唱している。WHO 西太平洋地域の中で野生株ポリオウイルス保有施設に関する第一段階調査（Phase I）が終了していないのは、日本と中国の2ヶ国だけとされており、調査レポートの早急な作成および提出が求められている。本年度の研究目的は、以下の通りである。

- 1) 厚生労働省・文部科学省等公的なルートによる野生株ポリオウイルス保有施設調査を補完するため、ポリオウイルス関連研究論文調査により抽出された研究者を対象とした、野生株ポリオウイルス保有状況調査を実施する。
- 2) 野生株ポリオウイルス実験室封じ込めに関する基本資料についての情報提供を行うとともに、地方衛生研究所に対する詳細なアンケート調査を実施する。
- 3) 環境サーベイランスに由来するポリオウイルス解析時間を短縮するため、リアルタイム PCR 法の検討を行う。
- 4) 西太平洋地域において、AFP および他のサーベイランスにより検出されたポリオウイルスのうち、ワクチン由来ポリオウイルス(VDPV)について疫学のおよびウイルス学的解析を行う。今年度はとくに、2005-2006年にかけてカンボジアで分離された3型VDPV についての解析を行う。
- 5) 自然感染におけるポリオウイルスの排出や伝播を解析・評価する in vivo

モデルを確立するため、PVR-tg/Ifnar-ノックアウト (KO) マウスにおける経口感染効率について研究を行う。

- 6) ポリオウイルス疑似粒子を用いた持続的麻痺 TgPVR21 マウスモデルを用いて、持続麻痺発現メカニズムの解析を行う。

B. 研究方法

(1) 日本で発表されたポリオウイルスに関わる研究論文について網羅的に解析するため、データベースを用いたキーワード検索を行い、施設、論文形式、論文内容等の各項目について年度ごとに集計した。

(2) ポリオウイルス関連発表論文調査によりリストアップされた研究者を対象に、電話聞き取り方式およびアンケート調査による野生株ポリオウイルス保有状況調査を実施し、結果の集計・解析をおこなった。

(3) 厚生労働科学研究事業「病原微生物の取扱いにおけるバイオセーフティの強化及びバイオセキュリティシステムの構築に関する研究」研究班による、地方衛生研究所における病原微生物の取扱いに関する調査の一環として、「ポリオウイルスおよびポリオウイルスを含む可能性のある検体の保管状況に関するアンケート調査」を実施し、回収結果を集計した。

(4) 弱毒ポリオウイルス参照株由来 cDNA を用いて、VP1 領域(position 3006-3108, 103bp)を検出するためのリアルタイム PCR の条件検討を行った。ゲノムコピー数算出には VP1 領域 (2998-3228:131bp) に対応するロングオリゴを合成し検量線作成に用いた。

(5) 2005-2006 年に、カンボジアの AFP 症例から分離されたポリオウイルスの型内鑑別を行い、VDPV の可能性がある分

離株については、VP1 領域全長の塩基配列を解析した。VP1 塩基配列解析により、VDPV と同定された場合、当該地域の接触者等からも便検体を採取し、ウイルス分離を試みた。同定された VDPV についてはゲノム全領域の塩基配列解析および TgPVR21 脳内接種マウス感染系における神経毒力解析を行った。

(6) ポリオウイルス経口感染モデルにおける感染効率を改善するため、マウスの胃中におけるポリオウイルスの pH に対する耐性を検討し、胃酸を中和する条件を検討した。また、PVR-tg ならびに PVR-tg/Ifnar KO マウスの消化管などの組織から RNA を調製し、IFN-stimulated gene (ISG) の発現レベルを調べた。

(7) 293T 細胞で作製した感染増殖能を有しないポリオウイルス疑似粒子を、TgPVR21 マウスに脊髄内接種し ($3.2 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^7$ IU)、持続的ポリオ様麻痺を呈したマウスから腰髄を回収し、病理像を解析した。

【倫理面についての配慮】

本研究で用いた臨床材料の採取は、「疫学研究における倫理指針」に基づき、材料提供者および家族の個人の尊厳及び人権の尊重、個人情報の保護に配慮して実施した。

すべての動物実験は、動物福祉、実験倫理、飼育環境に出来る限り配慮した上で、「動物の愛護及び管理に関する法律」「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」「国立感染症研究所動物実験委員会規程」等に基づいて実施した。

組換え生物使用実験は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づいて実施した。文部科学大臣の確認が必要とされている組換え生物実験については、事前に「第二種使用等拡散防止措置確認申請書」を提出し、文部科学大臣から使用する感染動物施設が適切な拡散防止措置

を満たすことの承認を受けたうえで実施した。

C. 研究結果

(1) ポリオウイルス関連研究論文の分析により抽出された、ポリオウイルス取扱いの可能性を有する研究者を対象として、野生株ポリオウイルス保有調査を実施した。

(2) 電話聞き取りおよびアンケート調査によって、15施設が野生株ポリオウイルスを保有することが明らかとなった。野生株ポリオウイルスの種類は様々で、ワクチン由来ポリオウイルス、未同定ポリオウイルス株、未検査臨床検体、クローン化DNA等が含まれていた。半数程度の施設では、作業員に対するポリオウイルス抗体検査やポリオワクチン接種について、徹底されていなかった。

(3) 地方衛生研究所における病原微生物の取扱いに関する調査結果により、野生株ポリオウイルスを保有施設は、調査75施設中9施設であったが、野生株ポリオウイルスを含む可能性のある検体を含めると20%程度の施設が保有する可能性を有することが示された（参考調査資料1～3として「病原微生物の取扱いにおけるバイオセーフティの強化及びバイオセキュリティシステムの構築に関する研究班」平成18年度分担研究報告書を添付）

(4) リアルタイムPCR法により、対照オリゴでは5 copies/ul, ウイルス量として0.6 TCID₅₀/50ulのウイルスを測定可能であり、ほぼ培養細胞を用いたウイルス力価測定と同等の感度であることが示された。測定に要した時間は約2時間20分であった。

(5) 2005-2006年にかけて、カンボジアの3例のAFP患者のうち、2症例より採取された便検体から3型ポリオウイルスが分離され、VP1領域の塩基配列解析により3型VDPVと同定された。全ゲノム配列解析の結果、3型VDPVは、Sabin

3/Sabin 2/HEV-Cの組換えウイルスであり、TgPVR21マウス感染モデルにおいて強毒株と同等の高い神経病原性を示した。

(6) tgマウスモデルにおいては、ポリオウイルスの胃の通過(胃内でのウイルス失活)や消化管での増殖過程(ISGによる増殖阻害)で、ウイルス感染・伝播が阻害されており、ヒトと同様の経口感染が成立しにくいことが示された。

(7) 経口接種ポリオウイルス液に炭酸水素ナトリウムを加えて胃酸を中和することにより、すべてのPVR-tg/Ifnar KOを発症させることができた。

(8) ポリオウイルス疑似粒子TgPVR21マウス感染モデルによる重篤かつ持続的なポリオ様麻痺において、重篤なポリオ様麻痺を示したマウスと軽度の麻痺を示したマウスで腰髄の病理像に際立った差は認められなかった。

D. 考察

(1) 今年度実施したポリオウイルス関連文献調査に基づく野生株ポリオウイルス保有調査では、専門家による電話による聞き取り調査と詳細なアンケート調査により、質の高い保有状況調査が可能となった。

(2) 他のルートによる野生株ポリオウイルス保有調査(公的および研究班等による調査)と今回の調査結果を併せて、できるだけ多くのポリオウイルス保有施設を網羅した第一段階調査リストを、早急に作成する必要がある。

(3) 地方衛生研究所に対するアンケート調査によりワクチン由来ポリオウイルスを含めると約40%、OPV株を含めると約70%の施設がポリオウイルスを保有している可能性が明らかとなり、これらの施設が今後のポリオウイルス実験室封じ込め調査にとって重要な施設であることが確認された。

(4) 野生株ポリオウイルス保有施設を含

めた上記調査結果において、抗体検査およびポリオワクチン接種は、多くの施設で行われていないことが明らかとなり、ポリオウイルス封じ込めに特化したバイオセーフティに対して、今後より一層の周知を図る必要がある。

(5) リアルタイムPCR法により、環境サーベイランスに由来する検体からの迅速なワクチン由来株の定量が可能となると考えられる。今後、ポリオウイルス2型、3型に関しても、リアルタイムPCRによる迅速アッセイ系を確立する必要がある。

(5) 2005年当時、カンボジア全土でのOPV接種率は82%と比較的高かったと推定されているが、接種率の低い地域・コミュニティも存在していた。その結果、潜在的なOPV感染が持続し病原性を回復した3型cVDPVが出現・伝播し、2005年末にポリオ発症にいたったと推測される。これまで世界的に報告されているcVDPV流行は1型および2型のみであったため、3型VDPVの伝播力は弱いと考えられていたが、3型VDPVも1型および2型同様ポリオ流行を起こすことが明らかとなった。

(6) PVR-tg/Ifnar KO マウス導入により、経口感染以外の経路におけるポリオウイルス感染効率が大幅に上昇したが、経口感染での感受性はヒトと同程度までには上昇しなかった。本年度は、その原因を解析し、ポリオウイルスの胃内での失活を抑制することにより、より安定した経口感染モデルを作製することが可能となった。PVR-tg/Ifnar KO マウス経口感染モデルは、より自然感染に近い形の小動物モデルとして、今後、ポリオウイルスの病原性、感染伝播および伝播制御の研究に応用可能である。

(7) ポリオウイルス擬似粒子感染モデルにより、持続的かつ非致命的なポリオ様弛緩性麻痺をTgPVR21 マウスに誘導することができた。本モデルはポリオ発症メカニズムの解析とともに、残存性ポリ

オ麻痺およびポリオ後症候群の治療法の開発に有用であると考えられる

E. 結論

日本における野生株ポリオウイルス保有調査のための効率的かつより精度の高い調査手法を検討し、本年度は2種類の異なる手法による、野生株ポリオウイルス保有施設調査を実施した。これらの調査により、厚生労働省・文部科学省等により進められている公的な保有施設調査を補完する、より精度の高い野生株ポリオウイルス保有状況調査が可能となった。様々なレベルの調査を組みあわせることにより、調査精度を改善するとともに、野生株ポリオウイルス封じ込めの重要性を、関連施設に周知することが出来た。今後、これら研究事業により得られた調査結果と公的調査データの摺り合わせを行い、出来る限り多くの施設を網羅した野生株ポリオウイルス保有施設リストを作成し、我国の第一段階調査レポート(Phase I Containment Report)を、早急に作成・提出する必要がある。

ポリオ根絶最終段階において重要とされるワクチン由来ポリオウイルスを含む野生株ポリオウイルス伝播を感度良く検出するためのサーベイランスシステム(AFP、環境、感染源調査、ポリオ、非ポリオエンテロウイルス等)の評価を行い、様々なサーベイランスおよび診断系の改良により、少なくとも日本では高感度かつ迅速にポリオウイルス伝播の検出が可能であることを示した。

ポリオウイルス伝播を解析するためのin vivo実験系の開発を行った。ポリオウイルスの個体内及び個体間伝播のメカニズムを研究するためのマウス感染実験モデルの開発を行い、効率よく経口感染可能なマウス感染モデル(PVR-tg/Ifnar KO 経口感染モデル)を開発するとともに、ポリオウイルス病原性、感染伝播および伝播制御に関する今後の研究に応用

可能な新たな知見を得ることが出来た。

F.健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mizutani T, Endoh D, Okamoto M, Shirato K, Shimizu H, Arita M, Fukushi S, Saijo M, Sakai K, Limn CK, Ito M, Nerome R, Takasaki T, Ishii K, Suzuki T, Kurane I, Morikawa S, Nishimura H, A new system for rapid genome sequencing of emerging RNA viruses. *Emerg Infect Dis* 13, 322-324, 2007
- 2) Sugieda M, Adachi S, Inayoshi M, Masuda T, Tsubota M, Mano H, Iwama M, Murakami Y, Yoshida H, Shimizu H: Intrafamilial transmission of a Sabin 1-related poliovirus in Shizuoka Prefecture, Japan. *Jpn J Infect Dis* 59: 277-278, 2006.
- 3) Iwai M, Yoshida H, Matsuura K, Fujimoto T, Shimizu H, Takizawa T, Nagai Y: Molecular epidemiology of echoviruses 11 and 13, based on an environmental surveillance conducted in Toyama Prefecture, 2002-2003. *Appl Environ Microbiol* 72: 6381-6387, 2006.
- 4) Iwai M, Nakayama T, Matsuura K, Hasegawa S, Ando S, Obara M, Nagai Y, Yoshida H, Horie H. Assessment of efficacy of a live oral poliovirus vaccine for virulent Sabin-like poliovirus 1 strains in Japan. *Acta Virologica* 50: 139-143, 2006
- 5) Arita M, Nagata N, Sata T, Miyamura T, Shimizu H: Quantitative analysis of poliomyelitis-like paralysis in mice induced by a poliovirus replicon. *J Gen Virol* 87: 3317-3327, 2006.
- 6) Yoshika T, Iwasaki T, Ida-Hosonuma M, Horie H, Yoneyama M, Fujita T, Miyazawa M, Abe S, Simizu B, Koike S. Role of alpha/beta interferon in the acquisition of susceptibility to poliovirus by kidney cells in culture. *J Virol* 80: 4143-4125, 2006.
- 7) ウイルス第二部 第二室、感染症情報センター第三室、ポリオ、平成16年度感染症流行予測調査報告書、8-47, 2006
- 8) 杉枝正明、足立 聡、稲吉 恵、三輪好伸、増田高志、坪田皆利、真野穂積、岩間真人、村上吉男、吉田 弘、清水博之：ポリオワクチン株ウイルスの家族内感染-静岡県。病原微生物検出情報 27, 104, 2006
- 9) 清水博之：経口生ポリオワクチンと薬剤の併用禁忌、日本医事新報 4311, 98, 2006
- 10) 清水博之、武田直和：ポリオワクチン、化学療法の領域 22, 1403-1408, 2006
- 11) 清水博之：ポリオの疫学、*Journal of Clinical Rehabilitation* 16, 114-120, 2007
- 12) 清水博之：手足口病、*日本臨床* 65, 339-342, 2007
- 13) 小池智：培養細胞のポリオウイルス感受性 -Enders への回答-, *ウイルス* 56: 59-66, 2006.
- 14) 小池智：ポリオウイルス、*Drug Delivery System* 21: 630-631, 2006.

2. 学会発表

- 1) Nishimura Y, Arita M, Yoshida H, Ling H, Toda K, Kojima K, Miyamura T, Shimizu H, Wakita T. Characterization of the type 3 vaccine-derived poliovirus in Cambodia, EUROPIC 2006, Finland, November, 2006
- 2) Ohka S, Igarashi H, Nagata N, Sakai M, Koike S, Nochi T, Kiyono H, Nomoto A. Establishment of a poliovirus oral infection system in human poliovirus receptor (hPCR/CD155) -expressing transgenic mice which are deficient in type I interferon receptor. EUROPIC 2006, Finland, November, 2006
- 3) Koike S, Yoshikawa T, Iwasaki T, Takano-Maruyama M, Ohara Y. Role of IFN response in the pathogenicity of neurotropic picornaviruses. EUROPIC 2006, Finland, November, 2006
- 4) Shimizu H. Global Polio Eradication - Remaining issues and new challenges- Capturing Opportunities through Biotechnology, Nov. 2006, Cibining, Indonesia
- 5) 吉田 弘、有田峰太郎、西村順裕、清水博之 ワクチン由来ポリオウイルスの分子疫学、第 27 回衛生微生物技術協議会、札幌、2006 年 6 月
- 6) 吉田弘、田炳均、清水博之、宮村達男:中国雲南省で急性弛緩性麻痺例から分離された非ポリオエンテロウイルス、第 47 回日本臨床ウイルス学会、東京都、2006 年 6 月
- 7) 水谷哲也、遠藤大二、白土憲也、岡本道子、渡辺理恵、福士秀悦、西條政幸、倉根一郎、石井孝司、鈴木哲朗、清水博之、高崎智彦、森川茂、西村秀一、新興・再興感染症に備えた迅速な網羅的ウイルスゲノム検出方法(LAV 法)、日本獣医学会総会、2006 年
- 8) 永田典代、清水博之、武田直和、長谷川秀樹、佐多徹太郎、倉田毅. ポリオウイルスレセプター導入トランスジェニックマウス(TgPVR21)を用いた Sabin 由来不活化ワクチンの免疫効果に関する研究、日本ワクチン学会、泉佐野市、2006 年 10 月
- 9) 有田峰太郎、永田典代、佐多徹太郎、脇田隆字、清水博之、ポリオ様麻痺の発症に関する定量的解析、第 54 回日本ウイルス学会、名古屋市、2006 年 11 月
- 10) 有田峰太郎、網康至、脇田隆字、清水博之、エンテロウイルス 71 のマウス感染モデルに関する解析、第 54 回日本ウイルス学会、名古屋市、2006 年 11 月
- 11) 西村順裕、有田峰太郎、吉田 弘、小島和暢、宮村達男、清水博之、脇田隆字、カンボジア AFP 症例より分離された 3 型ワクチン由来ポリオウイルス、第 54 回日本ウイルス学会、名古屋市、2006 年 11 月
- 12) 大岡静衣、五十嵐博子、永田典代、坂井麻依、小池智、野地智法、清野宏、野本明男、ポリオウイルス経口感染モデルマウスにおける経口感染伝播機構の解析、第 54 回日本ウイルス学会学術集会、名古屋市、2006 年 11 月
- 13) 岩井雅恵、松浦久美子、長谷川澄代、小原真弓、滝澤剛則、倉田毅、吉田弘、富山県でのワクチン由来ポリオウイルス (VDPV) 検出例とその対応、第 65 回日本公衆衛生学会、富山市、平成 18 年 10 月
- 14) 岩井雅恵、滝澤剛則、吉田弘、松浦久美子、長谷川澄代、小原真弓、堀

- 元栄詞, 倉田毅, 白木公康 富山県に
おける 2002 年のエコーウイルス 13
型検出と浸淫状況 日本ウイルス学
会、名古屋市、2006 年 11 月
- 15) Koike S. Role of type I
interferon response in tissue
tropism and pathogenicity of
poliovirus. 第 36 回日本免疫学会学
術集会
- G.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

厚生労働省科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)
分担研究報告書

研究実験室等における野生株ポリオウイルス封じ込め
調査手法の研究

主任研究者	清水博之 (国立感染症研究所)
分担研究者	宮村達男 (国立感染症研究所)
協力研究者	小松俊彦 (バイオメディカルサイエンス研究会) ルナール純子 (バイオメディカルサイエンス研究会)
事務局担当	斎藤真紀 (バイオメディカルサイエンス研究会)

研究要旨 野生株ポリオウイルスの世界的根絶およびその後のポリオワクチン接種停止を視野に入れて、WHO は「野生株ポリオウイルスの実験室封じ込めに関する世界的行動計画(第2版)」を策定し、世界的な基準のもと、ポリオウイルス野生株の実験室封じ込めを進めることを各国に要求している。WHO 西太平洋地域の中で、2006 年段階で WHO による野生株ポリオウイルス実験室封じ込め基準による第一段階調査 (Phase I) が終了していないのは、日本と中国の2ヶ国だけとされており、調査レポートの早急な作成および提出が求められている。厚生労働省等による公的な調査を補完し、より精度の高い野生株ポリオウイルス保有施設調査を実施するため、1) ポリオウイルス関連発表論文調査によりリストアップされた研究者を対象としたポリオウイルス保有施設調査、2) 地方衛生研究所を対象としたポリオウイルス保有状況調査 (厚生労働科学研究費補助金「病原微生物の取扱いにおけるによるバイオセーフティの強化及びバイオセキュリティシステムの構築に関する研究班」、平成 18 年度分担研究)、を実施した。本年度の調査により、従来の調査結果を補完しアップデートする、より精度の高いポリオウイルス保有施設調査を実施することが出来た。また、野生株ポリオウイルス保有施設における、ワクチン由来ポリオウイルスの取扱いやポリオウイルスに特化したバイオセキュリティ対策等に関して、今後必要とされる課題が明らかとなった。

A. 研究目的

世界ポリオ根絶計画は、ワクチン予防可能疾患 (vaccine preventable diseases)の中でも、最も重要かつ世界的な課題である。今日までのワクチン接種の徹底などが功を奏し、多くの国ではポリオの流行は鎮静化している。日本国内においても 1960 年代初頭の大規模なポリオ流行以来約半世紀にわたり、ポリオ流行は発生していない。

経口ポリオウイルスワクチン (oral poliovirus vaccine; OPV) 接種の徹底により、地域固有の野生株ポリオウイルス流行地域は、2006 年現在 4ヶ国 (インド、パキスタン、アフガニスタン、ナイジェリア) にまで減少した。しかし、ポリオ確定症例数の推移で見る限り世界全体のポリオ症例数の減少は、ここ数年顕著でない。また、2004-2006 年にかけて、いったんポリオフリーを達成した多くの地域でポリオ流行が再燃し、大規模なポリオ再流行が発生した。このため、日本を含む西太平洋地域においても、ポリオフリーを維持するためには、従来同様高いポリオワクチン接種率を維持するとともに精度の高いサーベイランスが重要となる。

日本を含む西太平洋地域等ポリオフリーを達成した地域では、世界ポリオ根絶達成の主要な要件のひとつとして、野生株ポリオウイルスの実験室封じ込め対策が重要視されている。そのため、野生株

ポリオウイルスや毒性復帰ワクチン由来ポリオウイルスの実験室からの漏出によるポリオ流行発生のリスクを低下させるための具体的行動が求められている。

WHO 西太平洋地域でポリオウイルス野生株保有施設のリスト作成調査段階 (Phase I) が終了していないのは、2006 年末現在、日本および中国のみであり、速やかな調査レポートの作成および WHO への提出が求められている。

厚生労働省等により進められている公的な調査を補完し、より精度の高い野生株ポリオウイルス保有施設調査を実施するため、本年度は、以下 2 種類のポリオウイルス野生株調査を厚生労働科学研究事業の一環として実施した。ひとつは、地方衛生研究所を対象とした詳細なポリオウイルス保有状況調査で、厚生労働科学研究費補助金「病原微生物の取扱いにおけるによるバイオセーフティの強化及びバイオセキュリティシステムの構築に関する研究班」における平成 18 年度分担研究課題 (分担研究者、清水博之) として実施した。また、本研究事業 (厚生労働科学研究費補助金「ポリオ野生株ウイルスの封じ込め対策に関する研究班」) における分担研究課題「研究実験室等における野生株ポリオウイルス封じ込め調査手法の研究」として、ポリオウイルス関連論文調査によりリストアップされた研究者を対象としたポリオウイルス保管施設調査を実施した。

B. 研究方法

1) 調査対象の選定

日本で発表されたポリオウイルスに関する研究論文について網羅的に解析するため、検索対象資料として医学中央雑誌等のデータベースを用い、検索キーワードとして、「ポリオウイルス」等による検索を行い、施設、論文形式、論文内容等の各項目について年度ごとに集計した。調査に関わる実務については、主任研究者・分担研究者と随時連絡をとりつつ、NPO 法人バイオメディカルサイエンス研究会・野生株ポリオウイルス調査班事務局(以下、バムサ・ポリオ事務局)を中心として実施した。

ポリオウイルスに関連した発表論文調査により、1990年～2006年のあいだに3報以上のポリオウイルス関連論文を公表した研究者をリストアップし、電話聞き取り方式による調査対象者とした(参考資料1)。また、1997年～2006年のあいだに1～2報以上のポリオウイルス関連論文を公表した研究者をリストアップし、アンケート調査対象とした。アンケート調査の内容については、添付資料2に示した。アンケート調査用紙には「野生株ポリオウイルスの実験室封じ込めに関する世界的行動計画(第2版)」(日本語訳)を添付し、野生株ポリオウイルス保有調査の意義と方法についての周知を図った。

2) 調査期間

調査対象へのアンケート用紙発送およ

び集計は、2007年1～3月にかけて、バムサ・ポリオ事務局により行われた。とくに電話聞き取り調査については、ポリオウイルス研究経験を有するバムサ・ポリオ事務局スタッフを中心として進められた。

3) 調査結果の解析

電話による聞き取り調査結果および回収されたアンケート結果は、バムサ・ポリオ事務局が調査項目ごとに集計した。調査結果の概要を添付資料1に示す。調査手法を含めた、より詳細な集計結果のまとめについては現在作成中である。

C. 結果および考察

WHOによる野生株ポリオウイルス実験室封じ込め基準による第一段階調査(Phase I)を早急に完成させるため、厚生労働省および文部科学省を中心とした公的ルートにより、野生株ポリオウイルス保有施設を有すると考えられる研究施設(検査・研究・教育施設、病院、民間企業等)への調査が進められている。

これまで、第一段階調査を完了した国・地域(欧州、米国等)の経験では、野生株ポリオウイルス保有施設の特定のためには、当該施設数等を勘案した、その国に適した調査方法を策定することが重要であり、複数の異なる調査手法を併用することにより、より精度の高い保有施設調査が可能となることが報告されている。他のアジア地域と比較して、検査・

研究施設数が多く、ポリオウイルス研究の歴史が長い日本では、ポリオウイルス関連文献調査による研究者の抽出が、ポリオウイルス野生株の保有可能性を有する施設の特定に有効であることが予想され、本年度、ポリオウイルス関連文献調査をもとにした保有施設および保有実態調査を実施した。

集計結果の概要は、添付資料 1 に示したが、電話聞き取り調査によって 22 施設中 6 施設が、アンケート調査によって回答 58 施設中 9 施設が、野生株ポリオウイルスあるいは野生株ポリオウイルスを含む可能性のある材料を保有していることが明らかとなった。本調査で特定された野生株ポリオウイルス保有施設の多くは、公立研究所であった(9/15 施設)。アンケート回収 58 施設中 15 施設が、過去の他のルートによる保有調査を受けた経験がないと回答したことから、本調査は全体的な調査の精度向上に寄与すると考えられた。今後、他の調査により作成された保有施設リストと今回調査により特定された保有施設リストのすり合わせが必要とされる。

15 施設で保有されている野生株ポリオウイルスの種類は、ワクチン由来ポリオウイルスも含めて多岐にわたっており、未同定ポリオウイルス株、未検査臨床検体、ポリオウイルス由来クローン化 DNA 等が含まれていた。多くの施設では野生株ポリオウイルス保管記録を有していた。回答のあったすべての施設で、ポリオウ

イルスは BSL-2 以上で取扱われており、約半数の研究者(8/15 名)が、今後適切な要請があれば、野生株ポリオウイルスを廃棄する予定があると回答した。一方、ポリオウイルス野生株の取扱い・管理に関わるバイオセキュリティーの中では、作業者に対するポリオウイルス抗体検査やポリオワクチン接種について、かならずしも徹底されていなかった。

D. 結論および今後の課題

今回、ポリオウイルス関連文献調査をもとにした野生株ポリオウイルス保有施設および保有実態調査により、厚生労働省・文部科学省等により進められている公的な調査を補完する、より精度の高い野生株ポリオウイルス保有施設調査が可能となった。

野生株ポリオウイルス実験室封じ込め基準による第一段階調査(Phase I)をすでに完了した WHO 欧州地域(52ヶ国・地域)や米国等の経験から、その国に適した複数の異なる調査手法を併用することにより、保有施設調査精度を上げることが可能であることが示されており、公的データベースを用いたポリオウイルス関連文献調査に基づく野生株ポリオウイルス保有施設調査(citation search)も有効な調査手法のひとつとされている。ポリオウイルス関連文献調査に基づく調査に際しては、研究内容、研究者、研究施設等に理解のある調査担当者による丁寧な調査が必要とされ、本年度の調査では、バ

ムサ事務局の専門家による電話による聞き取り調査とアンケートにより、従来の調査と比較して、質の高い調査が可能となった。今後は、他のルートによる調査(公的および研究班等による調査)と今回の調査結果を併せて、できるだけ多くの野生株ポリオウイルス保有施設を網羅した第一段階(Phase I)調査リストを完成することが重要となる。また、以前の調査により作成された保有施設リストをアップデートする意味合いからも、本調査結果は有用であると考えられる。

本調査および本年度集計した地方衛生研究所を対象としたポリオウイルス保有状況調査において明らかにされたように、ワクチン由来ポリオウイルスの取扱いやポリオウイルスに特化したバイオセキュリティ対策等に関しては、専門的な検査・研究機関においても徹底していない部分があり、今後、ポリオウイルス野生株保有施設担当者に対して、ポリオウイルス実験室封じ込めに関する必要な情報提供を継続する必要がある。

E. 健康危険情報 なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mizutani T, Endoh D, Okamoto M, Shirato K, Shimizu H, Arita M, Fukushima S, Saijo M, Sakai K, Limn CK, Ito M, Nerome R, Takasaki T, Ishii K, Suzuki T, Kurane I,

Morikawa S, Nishimura H, A new system for rapid genome sequencing of emerging RNA viruses. *Emerg Infect Dis* 13, 322-324, 2007

- 2) Sugieda M, Adachi S, Inayoshi M, Masuda T, Tsubota M, Mano H, Iwama M, Murakami Y, Yoshida H, Shimizu H: Intrafamilial transmission of a Sabin 1-related poliovirus in Shizuoka Prefecture, Japan. *Jpn J Infect Dis* 59: 277-8, 2006.
- 3) Iwai M, Yoshida H, Matsuura K, Fujimoto T, Shimizu H, Takizawa T, Nagai Y: Molecular epidemiology of echoviruses 11 and 13, based on an environmental surveillance conducted in Toyama Prefecture, 2002-2003. *Appl Environ Microbiol* 72: 6381-7, 2006.
- 4) Arita M, Nagata N, Sata T, Miyamura T, Shimizu H: Quantitative analysis of poliomyelitis-like paralysis in mice induced by a poliovirus replicon. *J Gen Virol* 87: 3317-27, 2006.
- 5) ウイルス第二部 第二室、感染症情報センター第三室、ポリオ、平成16年度感染症流行予測調査報告書, 8-47, 2006
- 6) 杉枝正明、足立 聡、稲吉 恵、三輪好伸、増田高志、坪田皆利、真野穂積、岩間真人、村上吉男、吉田 弘、清水博之: ポリオワクチン株ウイルスの家族内感染-静岡県. 病原微生物検出情報 27, 104, 2006
- 7) 清水博之: 経口生ポリオワクチンと薬剤の併用禁忌、日本医事新報 4311, 98, 2006
- 8) 清水博之、武田直和: ポリオワクチン、化学療法の領域 22, 1403-1408,

2006

- 9) 清水博之: ポリオの疫学、Journal of Clinical Rehabilitation 16, 114-120, 2007
- 10) 清水博之: 手足口病、日本臨床 65, 339-342, 2007

2. 学会発表

- 1) Nishimura Y, Arita M, Yoshida H, Ling H, Toda K, Kojima K, Miyamura T, Shimizu H, Wakita T. Characterization of the type 3 vaccine-derived poliovirus in Cambodia, EUROPIC 2006, Finland, November, 2006
- 2) Shimizu H. Global Polio Eradication -Remaining issues and new challenges- Capturing Opportunities through Biotechnology, Nov. 2006, Cibining, Indonesia
- 3) 吉田 弘、有田峰太郎、西村順裕、清水博之 ワクチン由来ポリオウイルスの分子疫学、第 27 回衛生微生物技術協議会、札幌、2006 年 6 月
- 4) 吉田弘、田柄均、清水博之、宮村達男: 中国雲南省で急性弛緩性麻痺例から分離された非ポリオエンテロウイルス、第 47 回日本臨床ウイルス学会、東京都、2006 年 6 月
- 5) 水谷哲也、遠藤大二、白土憲也、岡本道子、渡辺理恵、福士秀悦、西條政幸、倉根一郎、石井孝司、鈴木哲朗、清水博之、高崎智彦、森川茂、西村秀一、新興・再興感染症に備えた迅速な網羅的ウイルスゲノム検出

方法(LAV 法)、日本獣医学会総会、2006 年

- 6) 永田典代、清水博之、武田直和、長谷川秀樹、佐多徹太郎、倉田毅. ポリオウイルスレセプター導入トランスジェニックマウス(TgPVR21)を用いた Sabin 由来不活化ワクチンの免疫効果に関する研究、日本ワクチン学会、泉佐野市、2006 年 10 月
- 7) 有田峰太郎、永田典代、佐多徹太郎、脇田隆字、清水博之、ポリオ様麻痺の発症に関する定量的解析、第 54 回日本ウイルス学会、名古屋市、2006 年 11 月
- 8) 有田峰太郎、網康至、脇田隆字、清水博之、エンテロウイルス 71 のマウス感染モデルに関する解析、第 54 回日本ウイルス学会、名古屋市、2006 年 11 月
- 9) 西村順裕、有田峰太郎、吉田 弘、小島和暢、宮村達男、清水博之、脇田隆字、カンボジア AFP 症例より分離された 3 型ワクチン由来ポリオウイルス、第 54 回日本ウイルス学会、名古屋市、2006 年 11 月

G. 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

参考資料 1

厚生労働省科学研究補助金 新興・再興感染症研究事業

**研究実験室等における野生株ポリオウイルス封じ込め
調査手法の研究**

平成 18 年度 調査報告書

平成 19 年 3 月 20 日

主任研究者：国立感染症研究所ウイルス 2 部

清水 博之

分担研究者：国立感染症研究所

宮村 達男

協力研究者：NPO 法人バイオメディカルサイエンス研究会

小松 俊彦・ルナール純子

事務局担当：NPO 法人バイオメディカルサイエンス研究会

斎藤 真紀

1. 調査の背景と目的
2. 調査対象
3. 調査方法
 - 1) 電話による聞き取り方式
 - 2) アンケート回答方式
4. 調査結果
 - 1) 研究者の所属機関と回答状況
 - (1) 電話聞き取り式
 - (2) アンケート回答式
 - (3) 総調査対象者のポリオウイルス保有状況と所属機関
 - (4) 所有ポリオウイルスの廃棄状況と保有の有無
 - 2) 過去ポリオウイルス野生株保管調査を受けたか否か
 - 3) ポリオウイルスの保有状況
 - (1) 機関別保有ウイルス・材料等とその分類
 - (2) 機関別保有野生株ウイルス・VDPVの種類
 - (3) 保有するポリオウイルス株と保有者数
 - (4) ポリオウイルス実験室のバイオセーフティレベルについて
 - (5) 野生株ウイルス・VDPVの処理と記録について
 - (6) 健康管理について
5. まとめ
6. 今後の課題

別添資料

アンケート調査票一式

1. 調査の背景と目的

WHO は野生ポリオウイルスの世界的根絶の最終段階に向けて、「野生ポリオウイルスの実験室封じ込めに関する世界的行動計画」を策定し、加盟各国のポリオ根絶認証委員会に対し、各国の野生ポリオウイルスあるいはワクチン由来毒力復帰株を保管している可能性のある関係施設の把握を徹底するよう要請している。わが国では未だ、ポリオウイルス保有施設のリスト作成等を含む WHO の策定基準による第一段階調査 (Phase I) が終了して居らず、現在速やかな保有施設リスト作成および提出が求められているところである。

本調査は上述の背景を踏まえ、これまでの保有施設調査は各行政省庁の管轄する自然科学系施設を主な対象としたが、今回の調査は更に調査精度を高めるために、これまでに公表されたポリオウイルスを用いた研究発表を基にリストアップした研究者を対象として、より詳しい調査を行うことを目的とした。

2. 調査対象

原著論文発表者---1990/01/01～2006/12/31 間に 3 報以上発表者
---1997/01/01～2006/12/31 間に 1~2 報発表者

3. 調査方法

1) 電話聞き取り方式

---期間 1990/01/01～2006/12/31 間に 3 報以上発表者

2) アンケート回答方式

---期間 1997/01/01～2006/12/31 間に 1~2 報発表者