

201205001A

厚生労働科学研究費補助金

平成24年度 厚生労働科学特別研究事業

不活化ポリオワクチンの導入に向けた
各種ポリオワクチンの抗原性比較および
ワクチン由来ポリオウイルスに対する防御免疫誘導能に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 片山 和彦

平成25(2013)年3月

厚生労働科学研究費補助金

平成24年度 厚生労働科学特別研究事業

不活化ポリオワクチンの導入に向けた
各種ポリオワクチンの抗原性比較および
ワクチン由来ポリオウイルスに対する防御免疫誘導能に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 片山 和彦

平成25(2013)年3月

目次

I. 総合研究報告書

不活化ポリオウイルスワクチンの導入に向けた各種ポリオワクチンの抗原性比較およびワクチン由来ポリオウイルスに対する防御免疫誘導能に関する研究

片山 和彦・・・・・・・・・・7

II. 分担研究報告書

野生株由来およびセービン株由来ポリオウイルスワクチンの抗原性に関する研究

染谷 雄一・・・・・・・・・・17

不活化ポリオウイルスワクチンの導入に向けた各種ポリオワクチンの抗原性比較およびワクチン由来ポリオウイルスに対する防御免疫誘導能に関する研究

清水 博之・・・・・・・・・・21

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・31

IV. 研究成果の刊行物・別冊・・・・・・・・・・・・・・・・・・35

I. 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金 平成24年度 特別研究事業

不活化ポリオウイルスワクチンの導入に向けた各種ポリオワクチンの抗原性比較および
ワクチン由来ポリオウイルスに対する防御免疫誘導能に関する研究

研究代表者：	片山和彦	国立感染症研究所	ウイルス第二部
研究分担者：	清水博之	国立感染症研究所	ウイルス第二部
研究分担者：	染谷雄一	国立感染症研究所	ウイルス第二部

研究要旨

我が国では、これまでポリオの定期の予防接種に経口生ワクチン（OPV）が使用されてきたが、2012年4月に単独不活化ポリオウイルスワクチン（cIPV）が薬事承認され、2012年9月に定期接種に導入された。また、二種類の百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ（セービン株由来IPV；sIPV）混合ワクチンの製造承認申請が提出されており、2012年秋に導入された。定期接種へのsIPV含有ワクチンの導入は世界で初めてであり、DPT-sIPV導入後は、世界で初めて認可されたsIPV製剤として、有効性、安全性、および、互換性等に関する調査研究が必要とされる。DPT-sIPVと従来のポリオウイルスワクチン（cIPVおよびOPV）との抗原性および免疫原性の比較研究は、国内外の今後のポリオワクチン戦略にとってきわめて重要である。現在sIPV成分の力価試験として実施されているラットによるsIPV成分の免疫原性試験は、DPT-sIPVワクチンのヒト集団に対する免疫誘導能を評価する上で重要な指標であるが、cIPVの力価試験との互換性を考慮し、*in vitro*試験であるポリオウイルスD抗原試験に置き換わる可能性がある。本研究では、3価混合不活化ポリオワクチン（sIPV）原液のD抗原定量ELISA法をもとにDPT-sIPV製剤中のsIPV成分の定量を行った。その結果、抗原抗体反応に用いられる緩衝液成分および反応条件の変更で3つの型のD抗原量はほぼ正確に測定可能であった。今後、ラットを用いた免疫原性試験、ヒト集団におけるポリオウイルスに対する抗体保有調査研究と合わせて継続して調査、データ蓄積を行い、D抗原定量ELISAでDPT-sIPV製剤の力価評価ができるか否かを探る必要がある。一方、世界のワクチン接種状況を見ると、今後しばらくは、OPVとcIPV、sIPVの混在が続くことが予想される。世界的ポリオ根絶最終段階では、1型および3型野生株ポリオウイルスによるポリオ流行の相対的なリスクが低下する中、2型ワクチン由来ポリオウイルス（vaccine-derived poliovirus；VDPV）によるポリオ流行が、野生株ポリオウイルス流行地・非流行地で多発している。2型ポリオウイルスに対する集団免疫低下による2型VDPV伝播のリスクについて、留意する必要がある。本研究では、VDPV伝播によるポリオ流行が長期間継続しているナイジェリアで分離された2型VDPV、および、2012年に2型VDPV孤発例2症例が報告されたベトナムで分離された2型VDPVの遺伝子およびウイルス学的性状を解析した。ナイジェリアで分離された2型VDPVは、多様な遺伝子変異の蓄積およびC群エンテロウイルスとの組換えにより高い神経病原性を示すcVDPVであり、ベトナムで分離された2型VDPVは、ワクチン株からの変異が少なく長期的伝播の可能性が低い孤発性VDPVと考えられた。しかし、これらのウイルスには、アミノ酸変異による中和抗原性の変化は認められず、OPV、cIPV、sIPVそれぞれで惹起される中和抗体により感染防御可能であると考えられた。

A. 研究目的

我が国では、IPV単独ワクチンが2012年4月に薬事承認され、2012年9月より定期接種に導入された。また、2社からの百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ混合ワクチン（DPT-IPV）製剤（4種混合ワクチン）は2012年11

月に定期接種に導入された。国によるsIPV含有ワクチンの導入は、従来のcIPVとは異なる不活化ポリオウイルス抗原を含むワクチンとして、世界で初めてのケースとなった。DPT-sIPV導入後は、世界で初めて認可されたsIPV製剤として、有効性、安全性、および、互換性等に關す

る調査研究が必要とされている。とくに、sIPVと従来のポリオウイルスワクチン(cIPVおよびOPV)との抗原性および免疫原性の比較研究は、国内外の今後のポリオワクチン戦略にとって重要である。現在、sIPV成分の力価試験として実施されているラットによるsIPV成分の免疫原性試験は、DPT-sIPVワクチンのヒト集団に対する免疫誘導能を評価する上で重要な指標であるが、cIPVの力価試験との互換性を考慮し、*in vitro*試験であるポリオウイルスD抗原試験に置き換わる可能性がある。

sIPV力価試験(抗原性試験)は国際的に標準化されておらず、sIPVのD抗原量測定法は、使用する抗体や測定方法は施設により異なる。また、cIPV抗原量の測定に用いられているD抗原量測定法とも測定方法が異なるため、現行cIPV製剤中のD抗原量(1型40DU、2型8DU、3型32DU)とsIPVのD抗原量を、そのまま比較することは出来ない。本研究では、異なる手法によるIPV抗原量測定法を比較するとともに、sIPV抗原量測定および免疫原性評価におけるD抗原量測定の必要性について検討した。また、国内外の今後のポリオウイルスワクチン戦略の観点から重要視されている、ワクチン由来ポリオウイルスの変異と抗原性変化について、IPV(cIPVおよびsIPV)の抗原性および免疫原性を踏まえた解析を行った。

世界保健機関(World Health Organization; WHO)を中心として進められている世界ポリオ根絶計画は、2000年までに、ポリオ症例数の顕著な減少が認められたが、その後10年以上にわたり、世界のポリオ症例数は、一進一退を繰り返している。WHOは、ポリオ根絶計画の達成を、公衆衛生上、もっとも重要な世界的課題と位置づけ、ポリオ国際緊急行動計画(Polio Global Emergency Action Plan 2012-2013)を策定し、国際社会による協力体制の整備とポリオ流行国における具体的対策を進めている。ここ最近の世界的ポリオ根絶最終段階では、1型および3型野生株ポリオウイルスによるポリオ流行の相対的なリスクが低下する中、2型ワクチン由来ポリオウイルス(vaccine-derived poliovirus; VDPV)によるポリオ流行が、野生株ポリオウイルス流行地・非流行地で多発している。2型ポリオウイルスに対する集団免疫低下による2型VDPV伝播のリスクについて、留意する必要がある。

本研究では、VDPV伝播によるポリオ流行が長期間継続しているナイジェリアで分離された2型VDPV、およ

び、2012年に2型VDPV 孤発例2症例が報告されたベトナムで分離された2型VDPVの遺伝子およびウイルス学的性状を解析した。

B. 研究方法

D 抗原 ELISA による sIPV 成分測定

1. 不活化ポリオワクチン (IPV)

- (1) cIPV 製剤：イモバックスポリオ皮下注 (サノフィパスツール社)
- (2) sIPV 製剤：テトラビック皮下注 (阪大微生物病研究会)、クアトロバック皮下注 (化学及血清療法研究所)
- (3) sIPV 原液：3 価混合不活化ポリオワクチン原液 (日本ポリオ研究所)

2. D 抗原定量 ELISA に用いる抗ポリオウイルス抗体

- (1) cIPV 試験用：捕獲抗体として型別ウシ抗体、一次抗体として型別ウサギ抗体 (サノフィパスツール社)
- (2) sIPV 試験用：捕獲抗体として型別マウスモノクローナル抗体、一次抗体として型別ウサギ抗体 (日本ポリオ研究所)

3. D 抗原定量 ELISA 法

イモバックスポリオのD抗原定量ELISAは国家検定試験法として用いられている方法を用いた。一方、sIPV製剤のD抗原定量ELISAは日本ポリオ研究所のsIPV原液のためのD抗原定量法に準じて行い、試薬、緩衝液等はイモバックスポリオの検定試験と可能な限り共通化を図った。

2 型 VDPV の遺伝子およびウイルス学的性状を解析

VDPVによる世界的なポリオ流行の現状とリスクについては、WHO等による公開情報をもとに検討した。ナイジェリアで長期間伝播している2型cVDPVのウイルス学的解析は、米国CDC等との共同研究により実施し、ポリオウイルス受容体(PVR)発現トランスジェニックマウスを用いた神経病原性の解析、および、ヒト血清中の中和抗体価測定による抗原性解析については、感染研ウイルス二部で実施した。ナイジェリアで分離された2型cVDPV分離株のうち代表的な6株について、PVR発現トランスジェニックマウス(PVR-Tg21) [(財)実験動物中央研究所]を用いた神経病原性の解析を行った。対照として、2型弱毒Sabin 2株および強毒株MEF-1株を用いた。10倍段階希釈したウイルス液

30 μ l/mouse (1.5–6.5 log TCID₅₀/mouse) をマウス脳内に接種し、麻痺の発現等の臨床症状と感染死の発現を接種後 14 日間観察した。Kärber 法により、50%麻痺を発現するウイルス量を算出し、PD₅₀ 値(TCID₅₀/mouse)とした。

ベトナムにおけるポリオサーベイランスに由来する急性弛緩性麻痺(AFP)症例の糞便検体は、ベトナムの国家ポリオ実験室でウイルス分離試験が行われ、ポリオ様株(L20B 細胞陽性検体)が分離された場合は、WHO Global Specialized Polio Laboratory である感染研ウイルス第二部で、確認検査(型内鑑別試験)を実施することになっている。ポリオ様分離株の型内鑑別試験は常法に従い、型内鑑別 real-time RT-PCR 試験およびVP1 領域の塩基配列解析により行った。VP1 全領域の塩基配列を親株である Sabin 株と比較し、6 個所以上の塩基置換を有する場合、2 型 VDPV と同定した。

2 型 VDPV 分離株の中和抗体価は、OPV ワクチン株 (Sabin1, Sabin2, Sabin3) と野生株標準株 (Mahoney, MEF-1, Saukett)、さらにベトナムとナイジェリアで分離された 2 型 VDPV 4 株 (SV3128, SV3130, 11196, 11198) について測定した。中和抗原性比較試験には、厚生労働科学研究事業 (新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)「エンテロウイルス感染症制御のための診断・予防治療に関する国際連携研究」における分担研究「エンテロウイルス感染症の制御に関する臨床医学的研究」で使用したヒト血清検体を用いた。血清中和抗体価の測定は国立感染症研究所ウイルス第二部で行った。各種ポリオウイルス株に対する血清中和抗体価の測定に関しては、国立感染症研究所の倫理委員会において承認済みである。尚、中和試験未実施の血清検体が残されているため、本研究で示した平均中和抗体価のデータ(表 4)は、解析済の結果をまとめた途中経過である。

C. 研究結果と考察

1. 緩衝液、発色試薬の共通化

ポリオ研の SOP によると sIPV 原液の D 抗原定量 ELISA では緩衝液として PBS が用いられる。これに対し、イモバックスポリオの検定試験では D-PBS (Dulbecco's PBS) が用いられている。今後、sIPV 製剤の D 抗原定量が現行の力価試験 (ラット免疫原性試験) の代替として採用される可能性を考え、D-PBS に置き換えて sIPV 原液の D 抗原定量を行ったところ、問題なく測定可能であった。

また、最終段階に用いられる発色試薬は、sIPV 原液の試験では OPD であるのに対し、イモバックスポリオの試験では ABTS が用いられる。sIPV 原液の試験で ABTS を用いても算出される D 抗原量に問題はなかった。

2. 抗原抗体反応液、反応条件の検討

クアトロバックは免疫補助剤として 1 用量 (0.5 mL) あたり最大 1.5 mg の塩化アルミニウムを含有する (添付文書には 1.5 mg 以下と記載される)。これはアルミニウムイオン濃度として 22.5 mM に相当する。一方、テトラビックには塩化アルミニウムと水酸化アルミニウムが含まれ、それぞれアルミニウム換算で 1 用量 (0.5 mL) あたり 0.08 mg、0.02 mg、モル濃度に換算すると、5.9 mM、1.5 mM になる。特に、水酸化アルミニウムはゲル状で、溶解しにくい性質を有し、その影響を回避するのは困難が予想される。

一般に、ELISA による抗原定量試験では免疫補助剤の影響を減弱ないし消滅させるよう、検体 (ワクチン) に前処理が施されるが、本研究では、抗原抗体反応時の緩衝液を工夫することで、免疫補助剤の影響を受けることなく ELISA による抗原定量が可能であるかどうか検討した。

EDTA はアルミニウムイオンに対して高いキレート能を有するので、抗原抗体反応液に EDTA を 10 mM あるいは 50 mM 添加して試験を行った。その結果、クアトロバックでは、検体の初発希釈倍数の大きい 2 型 (60 倍希釈から開始) および 3 型 (20 倍希釈から開始) の D 抗原量は EDTA の存在に関わらず、通常用いられる希釈液 (1 % BSA, 0.5 % Tween 20 in D-PBS) で問題なく測定できた。また、50 mM まで EDTA が存在しても測定される D 抗原量にほとんど影響は認められなかった。1 型 (2 倍希釈から開始) の D 抗原量は 50 mM EDTA を含有する希釈液で最適な測定結果を得た。いずれも抗原抗体反応は sIPV の試験と同様、4 °C で一晩行った。

これに対し、テトラビックでは、2 型および 3 型の D 抗原量は 10 mM EDTA 含有希釈液を用い、4 °C ではなく室温 (25 °C) で一晩反応させることで最も良好な結果を得た。一方、1 型は 50 mM EDTA 含有希釈液を用いる必要があるのはクアトロバックと同様であるが、これに加えて、37 °C で 2 時間処理した後、4 °C に一晩放置することが、正確な D 抗原量を測定する上で重要であった。

2. 2 型 VDPV 伝播によるポリオ流行のリスク

2 型 VDPV によるポリオ流行は、近年、ナイジェリア以外のアフリカ諸国でも頻りに報告されており、コンゴ民主共和国やソマリア等では、2 型 VDPV の長期伝播がポリオ流行に関与している。2 型 VDPV によるポリオ流行の発生は、2 型ワクチン株が他の血清型と比較してヒ

ト集団での伝播能に優れていること、さらに、定期接種による trivalent OPV 接種率低下による特定地域での 2 型ポリオに対する集団免疫の低下を反映しているものと考えられている。2005-2011 年にかけて分離された 2 型 cVDPV 株の遺伝子解析と分子系統解析によると、ナイジェリアの 2 型 cVDPV は、同一の genetic lineage には属しておらず、異なる genetic lineage が頻りに消長を繰り返す、そのうち、7 つの genetic lineage が、比較的長期間伝播したことが明らかとなった。

解析したすべての 2 型 cVDPV 分離株はカプシド VP1-143 にアミノ酸置換を有しており、ほとんどの cVDPV 株ではワクチン型から野生株型アミノ酸 (VP1-143 Ile→Thr) への置換が認められた。また、ほとんどの 2 型 cVDPV 分離株 (396/403 株) は、C 群エンテロウイルスとゲノム遺伝子組換えを起こした組換えポリオウイルスであった。PVR 発現トランスジェニックマウスを用いた神経病原性試験の結果は、神経細胞由来 HEK293 細胞でのウイルス増殖効率、および、RD 細胞における温度感受性試験の結果と、よく相関しており、11200 株以外の 2 型 cVDPV 分離株 5 株は、野生型 MEF-1 株と同等のウイルス学的性状を有することが明らかとなった。強毒型 2 型 cVDPV 分離株のうち、特徴的なカプシドアミノ酸置換を有する 11196 株 ($PD_{50}=2.0$) と 11198 株 ($PD_{50}=2.1$) を、後述する中和抗原性試験に供した。

ベトナムでは、1990 年代後半に地域固有の野生株ポリオウイルス伝播が終息して以来、野生株あるいは VDPV によるポリオ症例は発生しておらず、ポリオフリーを維持している。2012 年 2 月 14 日に発症した Soc Trang 省の急性弛緩性麻痺患者 (1 才 9 ヶ月) 由来糞便検体から、ベトナム国家ポリオ実験室 (パスツール研究所) において、ポリオウイルス様分離株が検出された。感染研ウイルス第二部での型内鑑別および塩基配列解析試験の結果、分離株は VP1 領域に 6 個所の塩基置換を有する 2 型 VDPV と同定された (SV3127/3128、表 3-1)。その後、Dong Nai 省の急性弛緩性麻痺患者 (5 才) から、VP1 領域に 5-6 個所の塩基置換を有する 2 型 VDPV 株が分離同定された (SV3129/3130、表 3-2)。2 例の急性弛緩性麻痺症例から 2 型 VDPV 株が検出されたことから、分離株間の塩基配列相同性を確認したところ、SV3127/3128 と SV3129/3130 の共通した塩基置換部位は 1 個所のみであった。この塩基置換部位は、2 型 VDPV

分離株のほとんどが有するアミノ酸置換部位 (VP1-143Ile→Thr) に対応することから、SV3127/3128 と SV3129/3130 の間には、遺伝的関連性は認められないことが明らかとなった。以上の結果より、2012 年にベトナムの 2 例の急性弛緩性麻痺症例から分離された 2 型 VDPV は、それぞれ、独立した VDPV 孤発例と考えられ、長期にわたり 2 型 VDPV 伝播が継続している可能性は低いことが示唆された。

ナイジェリアおよびベトナムで分離された 2 型 VDPV 分離株と親株である Sabin 2 型とのアミノ酸配列の比較によると、2 型 VDPV 分離株は、カプシド抗原性決定部位にアミノ酸変異を有していたため、2 型 VDPV 株の中和抗原性の変化について検討した。本試験に用いたヒト血清検体は、日本の健康成人 32 名に由来する血清検体で、イモバックスポリオ (conventional IPV; cIPV) 追加接種前後の血清を用いた。

cIPV 追加接種前の中和抗体は、乳幼児期の OPV 接種による基礎免疫と考えられる。1 型と 3 型ポリオウイルスに対する平均中和抗体価は、Sabin 株と強毒株で違いが認められ、強毒株 (Mahoney 株および Saukett 株) に対する中和抗体価は、Sabin 株に対する抗体価より低い傾向が認められた (表 4)。1 型および 3 型ポリオウイルスについては、Sabin 株と強毒株で、ある程度抗原性の違いがあり、OPV 接種により誘導される中和抗体は、Sabin 株に対して高い中和活性を示すことが示唆された。2 型ポリオウイルスに対する平均中和抗体価は、Sabin 株と強毒株で大きな違いは認められなかった。2 型 VDPV 株に対する中和抗体価も、Sabin 株に対する中和抗体価と、ほぼ同等であったが、SV3130 株と 11198 株に対する中和抗体価は、多少低い傾向が認められた。

cIPV 追加接種後、すべてのポリオウイルス株に対する平均中和抗体価は顕著に上昇した。cIPV 追加接種後の中和抗体価は、すべての血清型において、Sabin 株と強毒株での違いは認められなかった。2 型 VDPV 株に対する平均中和抗体価も、Sabin 2 株に対する抗体価と同等であった。強毒株 (cIPV) 追加接種により誘導される中和抗体は、強毒株の抗原性を反映し、強毒株に対しても高い中和活性を示すことが示唆された。

本研究により、ナイジェリアにおける 2 型 cVDPV の出現および伝播が、長年断続的に発生しており、複数の 2 型 cVDPV genetic lineage が消長を繰り返していることが明らかとなった。また、本研究で解析した

ナイジェリアの2型cVDPV株の多くは、伝播の過程における変異の蓄積やC群エンテロウイルスとのゲノム遺伝子組換えにより顕著な毒性復帰を起こしており、野生株ポリオウイルス同様、ポリオ流行に関与することが確認された。ナイジェリアにおける2型cVDPVの長期的伝播の原因は、1型および3型野生株ポリオウイルスに対して高い有効性が期待できる monovalent OPV(1型および3型)が集团的に使用されたこと、また、2010年から、Sabin 2型を除いた bivalent OPV が Supplemental Immunization Vaccine として用いられ、2型ポリオウイルスに対する集団免疫が低い状態が、北部ナイジェリアで長期間継続していることによるものと考えられた。ベトナムで、2型VDPVが検出された地域では、不十分なワクチン接種による集団免疫低下の懸念があることから、サーベイランスの強化とともに、追加接種キャンペーンが実施された。その後、あらたな2型VDPVは検出されておらず、同地域で2型VDPVが長期間伝播している可能性は低いと思われた。

ナイジェリアおよびベトナムで分離された2型VDPV株に対する血清中和抗体価は、親株であるSabin 2株と、ほとんど同じであり、アミノ酸変異による中和抗原性の変化は認められなかった。cIPV追加接種によるMEF-1抗原に対する中和抗体は、2型VDPV株に対しても、MEF-1株およびSabin 2株と、ほぼ同等の中和活性を有することが明らかとなった。本研究で用いた血清検体は、OPV接種により誘導された抗Sabin 2中和抗体(cIPV接種前検体)と、cIPV追加免疫により誘導された抗MEF-1中和抗体(cIPV接種後検体)を、ある程度反映するものと考えられるが、結果的には、異なる2型ポリオウイルス抗原により誘導される中和活性の違いは認められなかった。

本研究において、2型VDPVに対する集団免疫を評価するための血清疫学的解析にあたっては、強毒型VDPV分離株や2型強毒株を用いる必要はなく、中和抗原性が同等であるSabin 2型に対する中和抗体測定価測定により評価可能であることが示された。我が国の流行予測調査事業におけるポリオ血清疫学調査は、弱毒化Sabin株を用いて行われているが、2型ポリオウイルスに対する集団免疫は、Sabin 2株を用いた抗体保有率調査により評価可能であると考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表 (分担執筆した報告書等を含む)

- 1) Burns CC, Shaw J, Jorba J, Bukbuk D, Adu F, Gumede N, Pate MA, Abanida EA, Gasasira A, Iber J, Chen Q, Vincent A, Chenoweth P, Henderson E, Wannemuehler K, Naeem A, Umami RN, Nishimura Y, Shimizu H, Baba M, Adeniji A, Williams AJ, Kilpatrick DR, Oberste MS, Wassilak SG, Tomori O, Pallansch MA, Kew O. Multiple Independent Emergences of Type 2 Vaccine-Derived Polioviruses during a Large Outbreak in northern Nigeria. *J Virol* (in press)
- 2) Arita M, Kojima H, Nagano T, Okabe T, Wakita T, Shimizu H. Oxysterol-binding protein (OSBP) family I is the target of minor enviroxime-like compounds. *J Virol* (in press)
- 3) Arita M, Iwai-Itamochi M, Wakita T, Shimizu H. Reply to "poliovirus-neutralization test with poliovirus pseudovirus to measure neutralizing antibody in humans". *Clin Vaccine Immunol* 19: 459, 2012
- 4) Arita M, Iwai M, Wakita T, Shimizu H. Development of a poliovirus neutralizing test with poliovirus pseudovirus for measurement of neutralizing antibody titer in human serum. *Clin Vaccine Immunol* 18: 1889-1894, 2011
- 5) Fukuhara M, Iwami S, Sato K, Nishimura Y, Shimizu H, Aihara K, Koyanagi Y. Quantification of the dynamics of enterovirus 71 infection by experimental-mathematical investigation. *J Virol* 87: 701-705, 2012
- 6) Nishimura Y, Shimizu H. Cellular receptors for human enterovirus species a. *Front Microbiol* 3: 105, 2012
- 7) Nakajima N, Kitamori Y, Ohnaka S, Mitoma Y, Mizuta K, Wakita T, Shimizu H, Arita M. Development of a transcription-reverse transcription concerted reaction method for specific detection of human enterovirus 71 from clinical specimen. *J Clin Microbiol* 50: 1764-1768, 2012
- 8) Wong KT, Ng KY, Ong KC, Ng WF, Shankar SK, Mahadevan A, Radotra B, Su JI, Lau G, Ling AE, Chan KP, Macorelles P, Desai AS, Ravi V, Nagata N, Shimizu H, Takasaki T. Enterovirus

- 71 encephalomyelitis and Japanese encephalitis can be distinguished by topographic distribution of inflammation and specific intraneuronal detection of viral antigen and RNA in the central nervous system. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 38: 443-453, 2012
- 9) Fujimoto T, Iizuka S, Enomoto M, Abe K, Yamashita K, Hanaoka N, Okabe N, Yoshida H, Yasui Y, Kobayashi M, Fujii Y, Tanaka H, Yamamoto M, Shimizu H: Hand, Foot, and Mouth Disease Caused by Coxsackievirus A6, Japan, 2011. *Emerg Infect Dis* 18: 337-339, 2012
 - 10) Miyamoto S, Inoue H, Nakamura T, Yamada M, Sakamoto C, Urata Y, Okazaki T, Marumoto T, Takahashi A, Takayama K, Nakanishi Y, Shimizu H, Tani K. Coxsackievirus B3 is an oncolytic virus with immunostimulatory properties that is active against lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 72: 2609-2621, 2012
 - 11) Arita M, Wakita T, Shimizu H. Valosin-Containing Protein (VCP/p97) Is Required for Poliovirus Replication and Is Involved in Cellular Protein Secretion Pathway in Poliovirus Infection. *J Virol* 86: 5541-5553, 2012
 - 12) 染谷雄一、清水博之、ポリオウイルスワクチンの品質管理、臨床とウイルス 40: 306-313, 2012
 - 13) 高山直秀、清水博之、梅本哲. 不活化ポリオワクチン接種件数に関する調査：2011年の調査結果. *日本医学会雑誌* 141: 1052-1058, 2012
 - 14) 高山直秀、崎山弘、岡部信彦、清水博之、梅本哲. 2011年度全国BCGワクチン、経口生ポリオワクチン、DPT3種混合ワクチン累積接種率調査報告. *日本医学会雑誌* 141: 1549-1555, 2012
 - 15) 清水博之: 不活化ポリオワクチンの現状、ファルマシア 49: 211-216, 2013
 - 16) 清水博之: 東アジア地域を中心とした手足口病流行の現状、感染症 2013 (印刷中)
 - 17) 清水博之: 不活化ポリオワクチン導入の現状と今後の課題、*Bio Clinica* 28: 19-24, 2013
 - 18) 清水博之: ポリオ流行のリスクとポリオワクチン. *モダンメディア*, 2013 (印刷中)
 - 19) 清水博之: ポリオウイルスの病原体管理、*JBSA Newsletter* 2: 11-14, 2012
 - 20) 清水博之: 手足口病、特集「感染症動向2013」、*メディカル朝日* 1、28-30, 2012
 - 21) 清水博之: ポリオの病態とポリオワクチン. *小児科臨床* 65: 2281-2287, 2012
 - 22) 清水博之: 不活化ポリオワクチンの導入と今後の課題. *日本医事新報*:4613, 70-75, 2012
 - 23) 清水博之: 感染症担当者が知っておきたい不活化ポリオワクチンの最新状況. *INFECTION CONTROL* 21: 1, 2012
 - 24) 清水博之: 不活化ポリオワクチン(IPV)と経口生ポリオワクチン(OPV). *小児内科* 44: 1234-1237, 2012
 - 25) 清水博之: ポリオウイルスワクチン. *ウイルス* 62: 57-66, 2012
 - 26) 清水博之: 手足口病の問題点. *小児科* 53: 751-758, 2012
 - 27) 清水博之: 不活化ポリオワクチン導入の現状と移行期の問題点. *愛知県小児科医会会報* 95: 14-17, 2012
 - 28) 清水博之: 世界ポリオ根絶計画とポリオの疫学. *バムサジャーナル* 24: 32-36, 2012
 - 29) 清水博之. 手足口病(エンテロウイルス71)ワクチン開発の現状. *病原微生物検出情報* 33: 65-66, 2012
 - 30) H. ブランズウェル: 根絶計画 詰めの一歩. *日経サイエンス* 7月号: 98-105, 2012 (監修)
 - 31) Country Progress Report on Maintaining Polio-free Status, Japan: WHO report (annual WHO report, 2012)
 - 32) ポリオ 病原体検出マニュアル 改訂版 2012年 [分担執筆]
- ## 2. 学会発表等
- 1) 清水博之: ポリオワクチン. シンポジウム「ウイルス感染症とワクチン」. 第28回日本環境感染学会総会. 横浜市, 3月1日, 2013
 - 2) 清水博之: ポリオ根絶計画とポリオワクチンの将来. 第16回日本ワクチン学会学術集会. 横浜市, 11月18日, 2012
 - 3) 清水博之: 不活化ポリオワクチン導入とポリオワクチンの将来. 第60回日本ウイルス学会学術集会. 大阪, 11月15日, 2012
 - 4) 有田峰太郎、脇田隆宇、清水博之: VCP/p97はポリオウイルスの複製に必要とされる新規宿主因子でありウイルス感染における細

- 胞蛋白質分泌経路に関する. 第 60 回 日本ウイルス学会学術集会. 大阪、11 月 14 日, 2012
- 5) 清水博之: WHO ポリオ実験室ネットワークにおけるバイオセーフティ教育訓練 第 12 回 日本イオセーフティ学会学術集会. 東京、11 月 7 日, 2012
 - 6) 清水博之: 不活化ポリオワクチンの導入と今後の課題. 平成 24 年度感染症機器管理研修会. 東京、10 月 17 日, 2012
 - 7) 清水博之: 世界のポリオ根絶とポリオワクチン. 理化学研究所 横浜研究所一般公開セミナー、横浜市、9 月 29 日, 2012
 - 8) 清水博之: 不活化ポリオワクチン導入 - 日本の課題・世界の課題 -第 59 回 日本小児保健協会 学術集会、岡山市、9 月 28 日, 2012
 - 9) 不活化ポリオワクチンと移行期の課題. 相模原市小児科医会講演会、相模原市、9 月 19 日, 2012
 - 10) 清水博之: ポリオ対策の現状と課題- 日本における不活化ポリオワクチン導入の現状と問題点 -中華人民共和国 「国家級公衆衛生政策計画管理プロジェクト」 EPI セミナー、北京 8 月 16 日、2012
 - 11) 清水博之: 不活化ポリオワクチンの導入と課題. 東大和市立保健センター、東大和市、2012 年 8 月 27 日
 - 12) 清水博之: 新しいポリオワクチン; 不活化ポリオワクチン導入と移行期の問題点. 第 3 回北里感染症教育フォーラム、東京、5 月 12 日, 2012
 - 13) Shimizu H. Hand, foot, and mouth disease and Enterovirus 71 infection. NIID-China CDC meeting on Collaborative Research meeting, 21 November, Tokyo, 2012
 - 14) Shimizu H. Genetic and Phenotypic Diversity of Enterovirus 71. Current Progress in Enterovirus 71 Research in the Asia-Pacific Region, Tokyo, 30 August, 2012
 - 15) Lee H, Cifuentes JO, Carnegie MS, Markoff A, Conway J, Shimizu H, Tano Y, Nishimura Y, Hafenstein S. The cryoEM structure of EV71 bound by fragments of neutralizing antibody predicts a mechanism of neutralization by crosslinking and competition with PSGL-1. EUROPIC 2012. Saint Raphaël, France, 3-7 June, 2012
 - 16) Arita M, Wakita T Shimizu H. Valosin containing protein (VCP/p97) is required for replication of poliovirus and inhibition of cellular protein secretion caused by viral proteins. EUROPIC 2012. Saint Raphaël, France, 3-7 June, 2012
 - 17) Umami RN, Hosomi T, Nishimura Y, Shimizu H. Genetic analysis of PSGL-1-tropic enterovirus 71 isolates from clinical samples. EUROPIC 2012. Saint Raphaël, France, 3-7 June, 2012

II. 分担研究報告書

野生株由来およびセービン株由来ポリオウイルスワクチンの抗原性に関する研究

研究分担者 染谷 雄一 (国立感染症研究所 ウイルス第二部)

研究要旨：DPT-sIPV 製剤（テトラビック、クアトロバック）の国家検定試験で、IPV 力価試験としてラット免疫原性試験が行われている。動物を用いた試験を極力なくすという昨今の流れの中、イモバックスポリオの国家検定試験で *in vitro* 試験（D 抗原定量試験）が行われている現状を考えると、近い将来 DPT-sIPV 製剤の IPV 試験も *in vitro* 試験に置き換わる可能性がある。3 価混合不活化ポリオワクチン（sIPV）原液の D 抗原定量 ELISA 法をもとに DPT-sIPV 製剤中の sIPV 成分の定量を行った。抗原抗体反応に用いられる緩衝液成分および反応条件の変更で 3 つの型の D 抗原量はほぼ正確に測定可能であった。

A. 目的

従来の生ポリオウイルスワクチン（OPV）に代わって、2012 年（平成 24 年）9 月 1 日に野生株ポリオウイルスに由来する不活化ワクチン（cIPV）が、同年 11 月 1 日にはセービン株由来の不活化ワクチン（sIPV）を含む四種混合ワクチンが定期接種ワクチンとして導入された。我が国の sIPV 含有製剤は世界で初めて認可された不活化ポリオワクチンであり、その抗原性、免疫原性、並びに、cIPV や OPV との互換性に関して世界の注目するところであり、今後も引き続き調査研究が必要である。

cIPV 製剤は海外の多くの国で導入され、その有効性が確立しているという背景から、cIPV 製剤の国家検定には国際的に標準化された定量法に基づく D 抗原定量試験が採用されている。一方、sIPV 製剤にはラットを用いた力価試験（免疫原性試験）が採用された。sIPV 製剤の D 抗原量は sIPV の開発元である日本ポリオ研究所が作成した抗体を用いて測定することは可能であるが、国家検定試験項目になっていない。今後、動物試験の代替法として D

抗原定量試験が採用される可能性は大きい。sIPV 製剤は我が国の他いくつかの国でも開発が進められているが、D 抗原定量試験法は国際的に標準化されておらず、用いる抗体が異なり、それぞれの試験で算出される D 抗原量が必ずしも一致しないなど課題が残されている。また、cIPV と sIPV の D 抗原量も単純に比較することはできない。

本研究では、今後国家検定試験として導入される可能性のある sIPV 製剤の D 抗原量試験について検討した。sIPV を含有する四種混合ワクチンには免疫補助剤としてアルミニウム塩が含まれており、しばしば ELISA の結果に影響する。ここではできる限り簡便な処理でアルミニウム塩の影響を回避できるよう D 抗原定量 ELISA のプロトコールを見直すことにした。

B. 材料と方法

1. 不活化ポリオワクチン（IPV）

- (1) cIPV 製剤：イモバックスポリオ皮下注（サノフィパスツール社）

- (2) sIPV 製剤：テトラビック皮下注（阪大微生物病研究会）、クアトロバック皮下注（化学及血清療法研究所）
- (3) sIPV 原液：3 価混合不活化ポリオワクチン原液（日本ポリオ研究所）

2. D 抗原定量 ELISA に用いる抗ポリオウイルス抗体

- (1) cIPV 試験用：捕獲抗体として型別ウシ抗体、一次抗体として型別ウサギ抗体（サノフィパスツール社）
- (2) sIPV 試験用：捕獲抗体として型別マウスモノクローナル抗体、一次抗体として型別ウサギ抗体（日本ポリオ研究所）

3. D 抗原定量 ELISA 法

イモバックスポリオの D 抗原定量 ELISA は国家検定試験法として用いられている方法を用いた。一方、sIPV 製剤の D 抗原定量 ELISA は日本ポリオ研究所の sIPV 原液のための D 抗原定量法に準じて行い、試薬、緩衝液等はイモバックスポリオの検定試験と可能な限り共通化を図った。

C. 結果と考察

1. 緩衝液、発色試薬の共通化

ポリオ研の SOP によると sIPV 原液の D 抗原定量 ELISA では緩衝液として PBS が用いられる。これに対し、イモバックスポリオの検定試験では D-PBS (Dulbecco's PBS) が用いられている。今後、sIPV 製剤の D 抗原定量が現行の力価試験（ラット免疫原性試験）の代替として採用される可能性を考え、D-PBS に置き換えて sIPV 原液の D 抗原定量を行ったところ、問題なく測定可能であった。

また、最終段階に用いられる発色試薬は、sIPV 原液の試験では OPD であるのに対し、イモバックスポリオの試験では ABTS が用いられる。sIPV 原液の試験で ABTS を用いても算出される D 抗原量に問題はなかった。

2. 抗原抗体反応液、反応条件の検討

クアトロバックは免疫補助剤として 1 用量 (0.5 mL) あたり最大 1.5 mg の塩化アルミニウムを含有する（添付文書には 1.5 mg 以下と記載される）。これはアルミニウムイオン濃度として 22.5 mM に相当する。一方、テトラビックには塩化アルミニウムと水酸化アルミニウムが含まれ、それぞれアルミニウム換算で 1 用量 (0.5 mL) あたり 0.08 mg、0.02 mg、モル濃度に換算すると、5.9 mM、1.5 mM になる。特に、水酸化アルミニウムはゲル状で、溶解しにくい性質を有し、その影響を回避するのは困難が予想される。

一般に、ELISA による抗原定量試験では免疫補助剤の影響を減弱ないし消滅させるよう、検体（ワクチン）に前処理が施されるが、本研究では、抗原抗体反応時の緩衝液を工夫することで、免疫補助剤の影響を受けることなく ELISA による抗原定量が可能であるかどうか検討した。

EDTA はアルミニウムイオンに対して高いキレート能を有するので、抗原抗体反応液に EDTA を 10 mM あるいは 50 mM 添加して試験を行った。その結果、クアトロバックでは、検体の初発希釈倍数の大きい 2 型（60 倍希釈から開始）および 3 型（20 倍希釈から開始）の D 抗原量は EDTA の存在に関わらず、通常用いられる希釈液（1 % BSA, 0.5 % Tween 20 in D-PBS）で問題なく測定できた。また、50 mM まで EDTA が存在しても測定される D 抗原量にほとんど影響は認められなかった。1 型（2 倍希釈から開始）の D 抗原量は 50 mM EDTA を含有する希釈液で最適な測定結果を得た。いずれも抗原抗体反応は sIPV の試験と同様、4 °C で一晩行った。

これに対し、テトラビックでは、2 型および 3 型の D 抗原量は 10 mM EDTA 含有希釈液を用い、4 °C ではなく室温 (25 °C) で一晩反応させることで最も良好な結果を得た。一方、1 型は 50 mM EDTA 含有希釈液を用いる必要があるのはクアトロバックと同様であるが、これに加えて、

37℃で2時間処理した後、4℃に一晩放置することが、正確なD抗原量を測定する上で重要であった。現時点では、テトラビックの1型D抗原量測定は抗原抗体反応を室温(25℃)、一晩の条件で試みていないので、すべての型で反応条件をそろえることはできていない。今後検討する。

D. 文献

1) 染谷雄一、清水博之「ポリオウイルスワクチンの品質管理」臨床とウイルス 40巻5号、pp. 306-313、2012年(日本臨床ウイルス学会)

厚生労働科学研究費補助金 平成 24 年度 特別研究事業

不活化ポリオウイルスワクチンの導入に向けた各種ポリオワクチンの抗原性比較および
ワクチン由来ポリオウイルスに対する防御免疫誘導能に関する研究

分担研究課題

ワクチン由来ポリオウイルスの抗原性変異の研究

研究分担者:清水博之	国立感染症研究所	ウイルス第二部
研究協力者:中野貴司	川崎医科大学	小児科
研究協力者:福島慎二	東京医科大学	渡航者医療センター

研究要旨

世界的ポリオ根絶最終段階では、1型および3型野生株ポリオウイルスによるポリオ流行の相対的なリスクが低下している一方、2型ワクチン由来ポリオウイルス(vaccine-derived poliovirus; VDPV)によるポリオ流行が、野生株ポリオウイルス流行地・非流行地で多発している。WHOは、現行の trivalent OPV に替わり、Sabin 2型を除いた bivalent OPV を世界的に導入する方針を固めており、今後、2型ポリオウイルスに対する集団免疫低下による2型 VDPV 伝播のリスクについて、より一層留意する必要がある。VDPV 伝播によるポリオ流行が長期間継続しているナイジェリアで分離された2型 VDPV、および、2012年に2型 VDPV 孤発例2症例が報告されたベトナムで分離された2型 VDPV の遺伝子およびウイルス学的性状を解析した。ナイジェリアで分離された2型 VDPV は、多様な遺伝子変異の蓄積およびC群エンテロウイルスとの組換えにより高い神経病原性を示す cVDPV であり、ベトナムで分離された2型 VDPV は、ワクチン株からの変異が少なく長期的伝播の可能性が低い孤発性 VDPV と考えられた。これら2型 VDPV 分離株と親株である Sabin 2型とのアミノ酸配列の比較によると、2型 VDPV 分離株は、 capsid 抗原性決定部位にアミノ酸変異を有していたため、中和抗原性の変化について検討した。ナイジェリアおよびベトナムで分離された2型 VDPV 株に対する血清中和抗体価は、親株である Sabin 2型株と、ほとんど同じであり、アミノ酸変異による中和抗原性の変化は認められなかった。Sabin 2型あるいはMEF-1型を抗原として誘導された中和抗体は、2型 VDPV 株に対しても、ほぼ同等の中和活性を有することが明らかとなった。2型 VDPV に対する集団免疫を評価するための血清疫学的解析にあたっては、VDPV 分離株や2型野生株を用いる必要はなく、中和抗原性が同等である Sabin 2型に対する中和抗体価測定により評価可能であることが示唆された。

A. 研究目的

世界保健機関(World Health Organization; WHO)を中心として進められている世界ポリオ根絶計画は、計画が開始された1988年から、当初根絶の目標としていた2000年まで、ポリオ症例数の顕著な減少が認められ、世界的ポリオ根絶達成が、いったんは視野に入った。しかし、その後10年以上にわたり、世界のポリオ症例数は、一進一退を繰り返しており、ここ数年以内に世界的ポリオ根絶が達成できるか今も予断を許さない。WHOは、ポリオ根絶計画の達成を、公衆衛生上、もっとも重要な世界的課題と位置づけ、ポリオ国際緊急行動計画(Polio Global Emergency Action Plan 2012-2013)を策定し、国際社会による協力体制の整備とポリオ流行国における具体的対策を進めている。残された野生株ポリオウイルス流行国である、アフガニスタン、パキスタンおよびナイジェリアでは、2012年後半にかけて、確定ポリオ症例数の減少傾向が認められており、近い将来の野生株ポリオウイルス伝播終息が期待されている。

2000-2001年にかけてヒスパニオラ島(ハイチおよびドミニカ共和国)で発生した1型ワクチン由来ポリオウイルス(vaccine-derived poliovirus; VDPV)伝播による大規模なポリオ流行が報告されて以来、VDPVによるポリオ流行の発生は、様々な地域で毎年のように報告されており、野生株ポリオ根絶前後におけるポリオ流行のリスク要因として重要視されている。とくに、ここ数年、野生株ポリオウイルス流行地やポリオ流行のハイリスク地域と考えられているアフリカ諸国やアジアの多くの地域で、2型 circulating VDPV(cVDPV)によるポリオ流行事例が報告されている。1型および3型野生株ポリオウイルスによるポリオ症例および野生株ポリオウイルス伝播地域の減少にともない、2型 VDPV 伝播によるポリオ流行のリスクに対応した2型ポリオウイルス集団免疫の維持が、ポリオ根絶最終段階(Polio Endgame)において、きわめて重要であると考えられている。

本研究では、2型 VDPV によるポリオ流行の現状とリスクについて検討するとともに、もっとも大規模かつ長期間にわたり cVDPV 流行が継続しているナイジェリアで分離された2型 cVDPV 株のウイルス学的解析を行う。さらに、2012年にベトナムで2例の急性弛緩性麻痺患者から検出された2型 VDPV の遺伝子解析を行う。ナイジェリアおよびベトナムで分離された2型 VDPV は、多様な遺伝子変異

の蓄積とC群エンテロウイルスとの遺伝子組換え部位を有する強毒型2型cVDPVとワクチン株からの変異が少ない孤発性VDPVの代表的分離株と考えられることから、これら代表的2型VDPV分離株の中和抗原性をSabin2株等と比較する。2型VDPV分離株の中和抗原性を解析することにより、2型VDPV伝播のリスクと2型ポリオウイルスに対する集団免疫の評価法について検討する。

B. 研究方法

VDPVによる世界的なポリオ流行の現状とリスクについては、WHO等による公開情報をもとに検討した。

ナイジェリアで長期間伝播している2型cVDPVのウイルス学的解析は、米国CDC等との共同研究により実施し、ポリオウイルス受容体(PVR)発現トランスジェニックマウスを用いた神経病原性の解析、および、ヒト血清中の中和抗体価測定による抗原性解析については、感染研ウイルス第二部で実施した。ナイジェリアで分離された2型cVDPV分離株のうち代表的な6株について、PVR発現トランスジェニックマウス(PVR-Tg21)〔(財)実験動物中央研究所〕を用いた神経病原性の解析を行った。対照として、2型弱毒Sabin2株および強毒株MEF-1株を用いた。10倍段階希釈したウイルス液30 μ l/mouse(1.5-6.5 log TCID₅₀/mouse)をマウス脳内に接種し、麻痺の発現等の臨床症状と感染死の発現を接種後14日間観察した。Kärber法により、50%麻痺を発現するウイルス量を算出し、PD₅₀値(TCID₅₀/mouse)とした。

ベトナムにおけるポリオサーベイランスに由来する急性弛緩性麻痺(AFP)症例の糞便検体は、ベトナムの国家ポリオ実験室でウイルス分離試験が行われ、ポリオ様株(L20B細胞陽性検体)が分離された場合は、WHO Global Specialized Polio Laboratoryである感染研ウイルス第二部で、確認検査(型内鑑別試験)を実施することになっている。ポリオ様分離株の型内鑑別試験は常法に従い、型内鑑別 real-time RT-PCR 試験およびVP1領域の塩基配列解析により行った。VP1全領域の塩基配列を親株であるSabin株と比較し、6個所以上の塩基置換を有する場合、2型VDPVと同定した。

表1 cVDPVによるポリオ流行事例 (2010-2013)

Country	cVDPV type 1*													Most recent transmission chain			
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	First case	Most recent case	Duration in weeks
Mozambique												2			10-Feb-11	02-Jun-11	16
Myanmar							1	4							30-Apr-07	06-Dec-07	31
Indonesia						46									09-Jul-05	26-Oct-05	15
China				2											13-Jun-04	11-Nov-04	21
Philippines		3													15-Mar-01	26-Jul-01	19
DOR/Haiti	12	9													12-Jul-00	12-Jul-01	52
Total type 1	12	12	0	0	2	46	1	4	0	0	0	2	0	0			
Country	cVDPV type 2*													Most recent transmission chain			
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	First case	Most recent case	Duration in weeks
Afghanistan										5	1	9	1		10-Jun-10	22-Jan-13	136
Somalia								1	6	1	9	1	1		19-Apr-11	09-Jan-13	90
Pakistan												16	1		30-Aug-12	11-Jan-13	19
Nigeria						3	22	71	66	154	27	34	8		02-Jul-05	24-Nov-12	388
Chad										1			12		12-Sep-12	20-Oct-12	5
Kenya													3		18-Apr-12	25-Jun-12	9
DR Congo								13	5	18	11	17			04-Nov-11	04-Apr-12	21
Niger							2			2	1	1			11-Nov-11	11-Nov-11	<1
Yemen												9			09-Apr-11	05-Oct-11	25
India										15	2				19-Oct-09	18-Jan-10	13
Ethiopia								3	1						04-Oct-08	18-Feb-09	19
Madagascar		1	4			3									26-Jun-05	13-Jul-05	2
Total type 2	0	1	4	0	0	6	24	71	83	183	55	65	66	3			
Country	cVDPV type 3*													Most recent transmission chain			
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	First case	Most recent case	Duration in weeks
Yemen													2		27-Apr-12	24-Aug-12	17
Ethiopia										1	6				27-Apr-09	17-May-10	55
Cambodia						1	1								26-Nov-05	15-Jan-06	7
Total type 3	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	6	0	2	0			

WHO/HQ 提供資料 2013年2月26日現在

2型VDPV分離株の中和抗体価は、OPVワクチン株(Sabin1, Sabin2, Sabin3)と野生株標準株(Mahoney, MEF-1, Saukett)、さらにベトナムとナイジェリアで分離された2型VDPV 4株(SV3128, SV3130, 11196, 11198)について測定した。中和抗原性比較試験には、厚生労働科学研究事業(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)「エンテロウイルス感染症制御のための診断・予防治療に関する国際連携研究」における分担研究「エンテロウイルス感染症の制御に関する臨床医学的研究」で使用したヒト血清検体を用いた。血清中和抗体価の測定は国立感染症研究所ウイルス第二部で行った。各種ポリオウイルス株に対する血清中和抗体価の測定に関しては、国立感染症研究所の倫理委員会において承認済みである。尚、中和試験未実施の血清検体が残されているため、本研究で示した平均中和抗体価のデータ(表4)は、解析済の結果をまとめた途中経過である。

C. 研究結果

1) 2型VDPV伝播によるポリオ流行のリスク

VDPVによるポリオ流行事例が確認された当初、1型VDPVによる比較的大規模なポリオ流行が、ヒスパニオラやインドネシアのマドゥラ島で報告されたが、最近報告されているVDPVによるポリオ流行事例の多くは2型cVDPVによる(表1)。3型VDPVによる大規模なポリオ流行は発生していない。

ナイジェリア北部の野生株ポリオウイルス常在地では、1型と3型野生株だけでなく、7年以上の長期にわたり2型cVDPVによるポリオ流行が継続しており、最長かつ最大規模のcVDPVによるポリオ流行となっている。ナイジェリアの2型cVDPVによるポリオ患者は、2009年の154例から比較すると減少傾向にあるが、2012年にも、2型cVDPVによるポリオ患者が発生しており、cVDPV伝播は完全には

終息していない。

2 型 VDPV によるポリオ流行は、近年、ナイジェリア以外のアフリカ諸国でも頻繁に報告されており、コンゴ民主共和国やソマリア等では、2 型 VDPV の長期伝播がポリオ流行に関与している。2 型 VDPV によるポリオ流行の発生は、2 型ワクチン株が他の血清型と比較してヒト集団での伝播能に優れていること、さらに、定期接種による trivalent OPV 接種率低下による特定地域での 2 型ポリオに対する集団免疫の低下を反映しているものと考えられている。

2) ナイジェリアの 2 型 VDPV の病原性解析

2005-2011 年にかけて分離された 2 型 cVDPV 株の遺伝子解析と分子系統解析によると、ナイジェリアの 2 型 cVDPV は、同一の genetic lineage には属しておらず、異なる genetic lineage が頻繁に消長を繰り返し、そのうち、7 つの genetic lineage が、比較的長期間伝播したことが明らかとなった。

解析したすべての 2 型 cVDPV 分離株はカプシド VP1-143 にアミノ酸置換を有しており、ほとんどの cVDPV 株ではワクチン型から野生株型アミノ酸 (VP1-143 Ile→Thr) への置換が認められた。また、ほとんどの 2 型 cVDPV 分離株 (396/403 株) は、C 群エンテロウイルスとゲノム遺伝子組

換えを起こした組換えポリオウイルスであった。

異なる genetic lineage に属する代表的 2 型 cVDPV 6 株について、PVR 発現トランスジェニックマウス (PVR-Tg21) を用いた神経病原性の解析を行った。対照として、2 型弱毒 Sabin 2 株および強毒株 MEF-1 株を用いた。解析した 6 株の 2 型 cVDPV3 株 (11169, 11197, 11198 株) は、野生株 (MEF-1) と同程度の高い神経病原性を有し、明らかな毒性復帰を示した ($PD_{50}=2.1-2.4$, 表 2)。これら 3 株と比較すると 11195 株および 11199 株は、若干弱い神経病原性を示したが ($PD_{50}=3.3-3.8$)、親株である Sabin 2 株と比較すると神経病原性は顕著に高かった。C 群エンテロウイルスとの組換えウイルスではない 11200 株の神経病原性は、弱毒 Sabin 2 株と強毒株 MEF-1 株の間に位置していた ($PD_{50}=5.9$)。PVR 発現トランスジェニックマウスを用いた神経病原性試験の結果は、神経細胞由来 HEK293 細胞でのウイルス増殖効率、および、RD 細胞における温度感受性試験の結果と、よく相関しており、11200 株以外の 2 型 cVDPV 分離株 5 株は、野生型 MEF-1 株と同等のウイルス学的性状を有することが明らかとなった。強毒型 2 型 cVDPV 分離株のうち、特徴的なカプシドアミノ酸置換を有する 11196 株 ($PD_{50}=2.0$) と 11198 株 ($PD_{50}=2.1$) を、中和抗原性試験に供した。

表2 ナイジェリア2型cVDPV分離株の神経病原性

Virus (CDC ID)	Genetic lineage	Virus titer (logCCID ₅₀)		Titer (logCCID ₅₀ /30μl/mouse)						PD ₅₀	
		100μl	30μl	7.0	6.5	5.5	4.5	3.5	2.5		1.5
Sabin 2		7.5	7.0	0/8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	≥ 7.5
MEF-1		8.0	7.5		ND	ND	8/8	6/8	3/8	3/8	2.5
11195 (JIS06-01)	2005-8	7.0	6.5		ND	7/8	6/7*	4/8	3/7*	0/7*	3.3
11196 (KTS09-02)	2005-8	7.0	6.5		ND	7/7*	8/8	7/8	5/6*	2/7*	2.0
11197 (BOS06-03)	2005-6	7.0	6.5		ND	7/8	8/8	6/8	6/7*	1/8	2.4
11198 (BOS07-02)	2005-6	7.0	6.5		ND	8/8	8/8	6/8	6/8	3/7*	2.1
11199 (SOS07-01)	2005-10	7.0	6.5		ND	7/7*	6/8	4/8	0/8	0/8	3.8
11200 (BOS06-02)	2006-1	7.0	6.5		ND	0/8	1/8	0/7*	0/7*	0/8	5.9

表3-1 ベトナムで分離された2型VDPVの解析 (SV3127/3128)

VIRUS ISOLATE/SPECIMEN DETAILS									RRL ISOLATE CHARACTERIZATION						
DATE RECEIVED (original stool)	NIID SAMPLE NO.	SENDER'S LAB REF #	COUNTRY OF SAMPLE	COUNTRY ID	FAECAL/ ISOLATE	AFP/ NON-AFP	ISOLATE CONDITIO N	NATIONAL LAB RESULT	RRL ITD RESULT				RRL FINAL RESULT	REPORT DATE	SEQUENCING RESULTS
									Date received for ITD	Identification (NT test)	ITD (real-time PCR)	VP1 sequence			
	SV3127LR		Vietnam(PI)	12014A	isolate	AFP	good	suspected poliovirus	12-Apr-12	ND	PV2- discordant	Sabin 2 (99.3% identical to Sabin 2)	type 2 VDPV*	16-Apr-12	type 2 VDPV*
	SV3128LR		Vietnam(PI)	12014B	isolate	AFP	good	suspected poliovirus	12-Apr-12	ND	PV2- discordant	Sabin 2 (99.3% identical to Sabin 2)	type 2 VDPV*	16-Apr-12	type 2 VDPV*

Type 2 VDPV*: According to the revised VDPV criteria by the report on 16th Informal Consultation Of The Global Polio Laboratory Network, 2010 (differ from Sabin 2 by 6 nt changes in VP1 will be considered VDPV for the purposes of reporting to the Programme)

表3-2 ベトナムで分離された2型VDPVの解析 (SV3129/3130)

VIRUS ISOLATE/SPECIMEN DETAILS									RRL ISOLATE CHARACTERIZATION						
DATE RECEIVED (original stool)	NIID SAMPLE NO.	SENDER'S LAB REF #	COUNTRY OF SAMPLE	COUNTRY ID	FAECAL/ ISOLATE	AFP/ NON-AFP	ISOLATE CONDITIO N	NATIONAL LAB RESULT	RRL ITD RESULT				RRL FINAL RESULT	REPORT DATE	SEQUENCING RESULTS
									Date received for ITD	Identification (NT test)	ITD (real-time PCR)	VP1 sequence			
	SV3129LR	12062A-LR	Vietnam(PI)		isolate	AFP	good	suspected poliovirus	31-May-12	ND	PV2- discordant	Sabin 2 (99.4% identical to Sabin 2)	Sabin 2	4-Jun-12	Sabin 2
	SV3130LR	12062B-LR	Vietnam(PI)		isolate	AFP	good	suspected poliovirus	31-May-12	ND	PV2- discordant	Sabin 2 (99.3% identical to Sabin 2)	type 2 VDPV*	4-Jun-12	type 2 VDPV*

3) ベトナムで2012年に検出された2型VDPVのウイルス学的性状の解析

ベトナムでは、1990年代後半に地域固有の野生株ポリオウイルス伝播が終息して以来、野生株あるいはVDPVによるポリオ症例は発生しておらず、ポリオフリーを維持している。2012年2月14日に発症したSoc Trang省の急性弛緩性麻痺患者(1才9ヶ月)由来糞便検体から、ベトナム国家ポリオ実験室(パスツール研究所)において、ポリオウイルス様分離株が検出された。感染研ウイルス第二部での型内鑑別および塩基配列解析試験の結果、分離株はVP1領域に6個所の塩基置換を有する2型VDPVと同定された(SV3127/3128、表3-1)。その後、Dong Nai省の急性弛緩性麻痺患者(5才)からも、VP1領域に5-6個所の塩基置換を有する2型VDPV株が分離同定された(SV3129/3130、表3-2)。2例の急性弛緩性麻痺症例から2型VDPV株が検出されたことから、分離株間の塩基配列相同性を確認したところ、SV3127/3128とSV3129/3130の共通した塩基置換部位は1個所のみであった。この塩基置換部位は、2型VDPV分離株のほとんどが有するアミノ酸置換部位(VP1-143Ile→Thr)に対応することから、SV3127/3128とSV3129/3130の間には、遺伝的関連性は認められないことが明らかとなった。Real-time RT-PCRによると、SV3127/3128の3D領域はSabin 2型と同定された。一方、SV3129/3130の3D領域はSabin 1型と同定されたことから、SV3129/3130は

Sabin株同士の組換えウイルスである可能性が高い。以上の結果より、2012年にベトナムの2例の急性弛緩性麻痺症例から分離された2型VDPVは、それぞれ、独立したVDPV孤発例と考えられ、長期にわたり2型VDPV伝播が継続している可能性は低いことが示唆された。

4) 2型VDPV分離株の中和抗原性解析

ナイジェリアおよびベトナムで分離された2型VDPV分離株と親株であるSabin 2型とのアミノ酸配列の比較によると、2型VDPV分離株は、 capsid抗原性決定部位にアミノ酸変異を有していたため、2型VDPV株の中和抗原性の変化について検討した。本試験に用いたヒト血清検体は、日本の健常成人32名に由来する血清検体で、イモバックスポリオ(conventional IPV; cIPV)追加接種前後の血清を用いた。

cIPV追加接種前の中和抗体は、乳幼児期のOPV接種による基礎免疫と考えられる。1型と3型ポリオウイルスに対する平均中和抗体価は、Sabin株と強毒株で違いが認められ、強毒株(Mahoney株およびSaukett株)に対する中和抗体価は、Sabin株に対する抗体価より低い傾向が認められた(表4)。1型および3型ポリオウイルスについては、Sabin株と強毒株で、ある程度抗原性の違いがあり、OPV接種により誘導される中和抗体は、Sabin株に対して高い中和活性を示すことが示唆された。2型ポリオウイルスに