

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）  
総括研究報告書

ポリオウイルスの病原体バイオリスク管理の標準化等を推進するための研究

研究代表者： 清水 博之 国立感染症研究所 ウイルス第二部・第二室室長

研究分担者

棚林 清 国立感染症研究所・バイオセーフティ管理室・室長  
小池 智 公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・分野長  
佐野大輔 東北大学・大学院工学研究科・准教授  
飯田哲也 大阪大学・微生物病研究所・教授  
西村秀一 仙台医療センター・臨床研究部・ウイルス疾患研究室長

研究協力者

落合 晋 一般財団法人阪大微生物病研究会（sIPV Working Group）  
佐藤達記 武田薬品工業株式会社（sIPV Working Group）  
中島和幸 一般財団法人 化学及血清療法研究所（sIPV Working Group）  
伊木繁雄 国立感染症研究所・バイオセーフティ管理室  
原田俊彦 国立感染症研究所・バイオセーフティ管理室  
篠原克明 国立感染症研究所・バイオセーフティ管理室  
有田峰太郎 国立感染症研究所・ウイルス第二部  
染谷雄一 国立感染症研究所・ウイルス第二部

研究要旨：

2型ポリオウイルスを使用するポリオウイルス取扱い認証施設(PEF)では、GAPIIIに示されたバイオリスク管理標準に準じてポリオウイルスを取扱う必要がある。本研究では、PEF候補施設を対象として、GAPIIIに準じたポリオウイルス・バイオリスク管理体制の標準化、不活化抗原を用いたD抗原価測定や感染性ポリオウイルスを用いない中和抗体測定法の開発等、リスク低減に向けた取り組みを進めた。また、PEF施設認証にむけた体制整備を進めた。

糞便、咽頭拭い等の臨床検体、下水等の環境検体もポリオウイルス感染の可能性のある材料(PIM)として、バイオリスク管理の対象となることから、ポリオ以外の検査・研究施設における、環境水検体、呼吸器検体、病原体検出あるいは腸内微生物叢解析を目的とした糞便検体等のリスク評価を開始した。2018年3月に、WHO-PIMガイダンス最終版が公開されたことから、保有検体のリスク評価に基づいたリスク低減策の導入が必要とされる。WHO-PIMガイダンスに基づいた国内施設調査・報告が求められており、WHO-PIMガイダンスの内容を国内で周知することが重要となる。

## A. 研究目的

世界ポリオ根絶最終段階では、ポリオウイルス取扱い施設から地域社会へのポリオウイルス再侵入のリスクを最小限とするためのポリオウイルスの安全な取扱いと封じ込め(バイオリスク管理)の徹底が求められている。そのため、WHOは、ポリオウイルス病原体バイオリスク管理に関する世界的行動計画改訂第三版である(WHO global action plan to minimize poliovirus facility-associated risk after type-specific eradication of wild polioviruses and sequential cessation of OPV use: GAPIII)を公開し、ワクチン株を含む2型ポリオウイルス感染性材料管理の厳格化を求めている。ポリオウイルス取扱い認証施設(Poliavirus-Essential Facility; PEF)では、GAPIIIに示されたバイオリスク管理標準に準じてポリオウイルスを取扱う必要がある。認証施設以外では、ワクチン株を含む2型ポリオウイルス感染性材料の廃棄が必要とされる。糞便、咽頭拭い等の臨床検体、下水等の環境検体もバイオリスク管理の対象となることから、今後、ポリオ・エンテロウイルス以外の腸管感染症の検査・研究施設、インフルエンザ等呼吸器感染症の検査・研究施設でもリスク評価に基づいた検体等の廃棄・管理が必要となる。本年度は、GAPIIIで求められているポリオウイルス病原体バイオリスク管理体制整備の推進に資する以下の研究を行った。

## B. 研究方法

1. 不活化ポリオワクチン製造および品質管理を実施している国内施設では、PEF候補施設として、GAPIIIに対応したポリオウイルス・バイオリスク管理体制整備を進めている。そのため、国内PEF候補施設におけるバイオリスク管理標準について、技術的評価・検討を進めた(清水、sIPV Working Group[感染研、阪大微研会、化血研、武田薬品])。
2. 不活化ポリオワクチン品質管理において、出来る限り感染性ポリオウイルスを用いない手法を開発するため、sIPV抗原量測定のためのD抗原ELISA試験について、不活化抗原を用いる方法の技術的検討を進めた(清水、sIPV Working Group)。
3. 2型ポリオウイルスを保管・使用するPEFは、今後、WHOによる封じ込め認証計画(Containment certification; GAPIII-CCS)に基づいて国家封じ込め認証機関(National Authority of Containment; NAC)による認証を受ける必要がある。PEF認証を担当する査察員

として必要な知識と手続きに関する理解を深めるため、2017年8月に感染研で実施したWHO査察員研修に参加した(小池、棚林)。

4. 従来、地方衛生研究所(地衛研)で実施してきた、感染症流行予測調査事業におけるポリオ血清疫学調査のうち、2型ポリオウイルス中和抗体価測定について、感染研で実施する方向で担当地衛研・事務局と調整を進め中和抗体価測定を実施した(清水)。
5. 糞便、咽頭拭い等の臨床検体および環境検体もポリオウイルス・バイオリスク管理の対象となることから、広範な施設における検体保有の実態とバイオリスク評価手法について検討を行った(清水、小池、西村、佐野、飯田、棚林)。

(倫理面への配慮)  
特になし

## C. 研究結果

本研究事業は、第三次公募採択課題のため、当該年度(平成29年度)の研究実施期間は、平成29年10月23日～平成30年度3月31日であり、研究事業開始前の準備期間を含め、以下の調査研究を実施した。

1. 不活化ポリオワクチン製造および品質管理を実施している国内施設では、GAPIIIに対応したPEFとしてのバイオリスク管理体制の整備を進めている。国内PEF候補施設におけるバイオリスク管理標準について、sIPV Working Group(sIPV-WG)として、技術的な評価・検討を進めた。本年度のsIPV-WG会議では、以下の課題について検討した(清水、sIPV-WG)。
  - ① H29年度第1回sIPV-WG会議(4/10)
    - D抗原測定試験の標準品の不活化抗原への変更検討
    - 国内のGAPIII対応に関する問題点の整理
    - GAPIII-CCS概要説明
  - ② H29年度第2回sIPV-WG会議(9/11)
    - D抗原測定試験標準品の不活化抗原への変更検討
    - 今後の各施設でのバリデーション作業について
  - ③ H29年度第3回sIPV-WG会議(1/17)
    - 各施設における不活化抗原D抗原ELISA試験成績の概要説明
    - 今後の予定

2. 不活化ポリオワクチン品質管理において、できるかぎり感染性ウイルスを用いない手法の開発を進めた。D 抗原測定試験において、感染性ポリオウイルスの代わりに不活化抗原を標準品として使用することを目指し、バリデーションを行った。免疫原性試験の国内参照品を用いて、現行の標準ウイルス（型別 OPV）とともに 1 型、2 型、及び、3 型の不活化単価バルクの D 抗原量測定を行った。定量限界、定量範囲は、直線性の判断により、1 型、2 型、3 型とも、十分に広範囲の D 抗原量を測定できると判断し、異なる施設におけるバリデーションを進めた。各施設 3 回繰り返し試験を行い、多少のばらつきは認められたが、各型について不活化標準品を用いて測定した試験結果は標準感染性ウイルスを用いて測定した試験結果と同等であり、標準品を不活化抗原に切り替えることに問題が無い事を確認した。IPV 製造に関する WHO ガイドライン (Guidelines for the safe production and quality control of poliomyelitis vaccine; Annex 2 of WHO Technical Report Series, No. 926) ドラフトについて、国内関連施設のコメントを集約し、WHO 担当部署に提出した (清水、sIPV-WG)。
3. 2 型ポリオウイルスを保管・使用する PEF は、WHO GAPIII-CCS に基づいて NAC による認証を受ける必要がある。施設認証の過程では、NAC をサポートし施設査察等を実施する専門家チームを組織する必要があることから、国内査察員 (Auditor) 候補に対する教育訓練が実施された (WHO GAPIII Auditors Training Workshop, 7/31-8/4, 2017)。GAPIII Annex 2/Annex 3 に含まれる 16 項目 (element 1~16) のバイオリスク管理標準の内容に関して詳細な講習が行われた。施設査察を含む実際の施設認証も、GAPIII バイオリスク管理標準 16 項目に即して進められる予定である (小池、棚林)。
4. 現在、PEF 候補施設として感染性 2 型ポリオウイルスを取扱うことが出来るのは、ワクチン製造施設を除くと、国内では感染研村山庁舎のみである。これまで、感染症流行予測調査事業におけるポリオウイルス中和抗体価測定は地衛研で実施されてきたが (2016 年度は 7 地域の約 1700 検体)。すべての地衛研

で、2 型ポリオウイルスを廃棄したことから、2017 年度調査から、2 型ポリオウイルス中和抗体価測定試験は、感染研ウイルス第二部で実施することとなった。地衛研で、従来通り、1 型および 3 型ポリオウイルスに対する中和抗体価測定を実施し、残りの血清検体を感染研ウイルス第二部に送付し、2 型中和抗体価測定を行った。今年度は、PEF における 2 型中和抗体価測定 SOP を整備し、6 地域からの約 1400 血清検体について、中和抗体価測定を実施し、結果を各地衛研に送付した。感染性ポリオウイルスを用いない中和試験法に用いる Sabin 1~3 株由来カプシドを有する Polio pseudovirus の作製を進めている (有田、清水)。

5. 糞便、咽頭拭い等の臨床検体および環境検体もポリオウイルス・バイオリスク管理の対象となることから、第一回研究会議 (平成 30 年 1 月 23 日) において、検体保有の実態と WHO-PIM ガイドライン (Guidance for non-poliovirus facilities to minimize risk of sample collections potentially infectious for polioviruses) ドラフトを基にしたバイオリスク評価手法の検討を行った。その後の検討により、日本国内で下水中病原ウイルスモニタリングを行なっている研究所/研究室で保管している PIM の Risk Group Level は高くても Level 2 Low であり、ガイドラインで求められるリスク低減策は、1) 環境検体を用いる実験の Risk assessment に関する規則、2) 実験従事者ワクチン接種履歴の確認の 2 点であった (佐野)。最近、病院や公的研究機関、臨床検査施設等の専門的な微生物検査施設のみならず、企業を含むさまざまな施設において、病原体検出あるいは腸内微生物叢解析を目的として、ヒト糞便検体が収集・保存されつつあることから、バイオリスク評価方法についての検討が必要とされる (飯田)。呼吸器系ウイルス感染症の臨床検体からのウイルス分離の作業を日常的に実施している施設で、ワクチン株ポリオウイルス分離の実績を、過去、2002 年まで遡り調べた結果、2011 年まで毎年のようにワクチン株と思われるポリオウイルスが分離されていた。内訳は 1 型が 12 株、3 型が 3 株であったが、2 型も 8 株分離されていたが、分離ウイルスは、厚生

労働省からの通達に従い、2016年2月にすべて高圧蒸気滅菌処理後、廃棄されていた(西村)。非ポリオ実験室で、糞便あるいは呼吸器検体から、培養細胞を用いたウイルス分離を行う際の、意図しないポリオウイルス増殖のリスクを低減させるため、地衛研等でウイルス分離に用いている株化細胞のポリオウイルス受容体をCrispr/Cas9システムで破壊し、ポリオウイルスにだけ感受性を持たなくなった細胞株の樹立に向けた検討を開始した(小池)。

#### D. 考察

本研究では、今後も2型ポリオウイルスを使用するPEF候補施設を対象として、GAPIIIに準じたポリオウイルス・バイオリスク管理体制の標準化、リスク低減に向けた取り組みを進めた。一方、糞便、咽頭拭い等の臨床検体、下水等の環境検体もポリオウイルス・バイオリスク管理の対象となることから、ポリオウイルス実験室以外の検査・研究施設における、リスク評価に基づいた検体等の廃棄・管理のための検討を開始した。

不活化ポリオワクチン品質管理において、できるかぎり感染性ウイルスを用いない手法の開発を進め、感染性ポリオウイルスの代わりに不活化抗原を標準品として使用するD抗原測定試験のバリデーションを行った。不活化抗原を用いたD抗原測定試験により、従来法と同様、D抗原量を測定できることが明らかとなった。現在、不活化抗原を用いたD抗原測定試験のSOP作成を進めている。

感染症流行予測調査事業におけるポリオウイルス中和抗体価測定は、これまで、地衛研で実施されてきたが、2017年度調査から、2型ポリオウイルス中和抗体価測定試験は、感染研ウイルス第二部で実施することとなった。感染研で2型中和抗体価測定を実施し、結果を各地衛研に送付した。PEF施設で2型中和抗体価測定に際して方法等の変更を行ったので、次年度は、感染研PEFにおける中和抗体価測定SOPの整備を図る。将来的には、1型および3型ポリオウイルスも、病原体管理の対象となることが想定されており、感染性ポリオウイルスを用いない中和試験法の検討が必要とされる。環境検体、細菌検出あるいは腸内微生物叢解析のための糞便材料、およびインフルエンザウイルス等の検出を目的とした呼吸器検体等について、ポリオウイルス・バイオリスク評価を開始した。2012年以前に採取した呼吸器検体は、潜在的に2型を含む感染性ポリオウイルスを含む可能性が明らかとなった。2012年以降は一株のポリオウイルスも分離されていなかった。これは、同年に本邦のポリオウイルスワクチン接種が生ワクチンから不活化ワクチンに替わったことを反映していると考えられた。一方、環境水ウイルスモニタリングを行なっている研究所／研究室で保管している環境水検

体のリスクアセスメントによると、Risk Group Levelは高くてもLevel 2 Lowであった。2018年3月に、WHO-PIMガイダンス(Guidance for non-poliovirus facilities to minimize risk of sample collections potentially infectious for polioviruses)最終版が公開されたことから、PIMガイダンスにおける保有検体のリスクアセスメントに基づいたリスク低減策の導入が求められる。WHO/WPROによると、今後1年以内を目処に、WHO-PIMガイダンスに基づいた国内施設調査・報告が必要とされており、PIMガイダンスの内容を国内で周知することが重要となる。

#### E. 結論

今後も2型ポリオウイルスを使用するPEF候補施設では、GAPIIIに示されたバイオリスク管理標準に準じてポリオウイルスを取扱う必要がある。本研究では、今後も2型ポリオウイルスを使用するPEF候補施設を対象として、GAPIIIに準じたポリオウイルス・バイオリスク管理体制の標準化、リスク低減に向けた取り組みを進めた。また、PEF施設認証にむけた体制整備を進めた。

糞便、咽頭拭い等の臨床検体、下水等の環境検体もバイオリスク管理の対象となることから、今後、ポリオ・エンテロウイルス以外の腸管感染症の検査・研究施設、インフルエンザ等呼吸器感染症の検査・研究施設でもリスク評価に基づいた検体等の廃棄・管理が必要となる。本年度は、GAPIIIで求められているポリオウイルス病原体バイオリスク管理体制整備の推進に資する研究を進めた。2018年3月に、WHO-PIMガイダンス最終版が公開されたことから、保有検体のリスクアセスメントに基づいたリスク低減策の導入が求められる。WHO-PIMガイダンスに基づいた国内施設調査・報告が必要とされており、PIMガイダンスの内容を国内で周知することが重要となる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Utsumi T, Wahyuni RM, Doan YH, Dinana Z, Soegijanto S, Fujii Y, Juniastuti, Yamani LN, Matsui C, Deng L, Abe T, Soetjipto, Lusida MI, Ishii K, Shimizu H, Katayama K Shoji I. Equine-like G3 rotavirus strains as predominant strains among children in Indonesia in 2015–2016. *Infect Genet Evol* 2018 (in press)
- 2) Cooper G, Mao Q, Crawl L, Wang Y, Dougall T, Rigsby P, Liang Z, Xu M, Collaborative Study G, Minor P, Wang J, Martin J. Establishment of the 1st WHO International Standard for anti-EV71 serum (Human). *Biologicals* 2018 [contributed as

- one of the the Collaborative Study Group members] (in press)
- 3) Pham NTK, Thongprachum A, Trinh QD, Okitsu S, Komine-Aizawa S, Shimizu H, Hayakawa S Ushijima H. Detection and genetic characterization of enterovirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Japan during 2014-2016. *Infect Genet Evol* 61: 16-19, 2018
  - 4) Chong PF, Kira R, Mori H, Okumura A, Torisu H, Yasumoto S, Shimizu H, Fujimoto T, Hanaoka N, Kusunoki S, Takahashi T, Oishi K, Tanaka-Taya K. Acute Flaccid Myelitis Collaborative Study I. Clinical Features of Acute Flaccid Myelitis Temporally Associated With an Enterovirus D68 Outbreak: Results of a Nationwide Survey of Acute Flaccid Paralysis in Japan, August-December 2015. *Clin Infect Dis* 66: 653-664, 2018
  - 5) Kotani O, Suzuki T, Yokoyama M, Iwata-Yoshikawa N, Nakajima N, Sato H, Hasegawa H, Taguchi F, Shimizu H, Nagata N. Intracerebral inoculation of mouse-passaged Saffold virus type 3 affects cerebellar development in neonatal mice. *J Virol* (in press) 2017
  - 6) Pham NTK, Thongprachum A, Baba T, Okitsu S, Trinh QD, Komine-Aizawa S, Shimizu H, Hayakawa S, Ushijima H. A 3-month-old child of acute gastroenteritis with enterovirus D68 detected from stool specimen. *Clin. Lab* 63: 1269-1272, 2017
  - 7) Thongprachum A, Khamrin P, Thi Kim Pham N, Takanashi S, Okitsu S, Shimizu H, Maneekarn N, Hayakawa S Ushijima H. Multiplex RT-PCR for rapid detection of viruses commonly causing diarrhea in pediatric patients. *J Med Virol* 89: 818-824, 2017
  - 8) 清水博之: エンテロウイルス (ポリオウイルスを含む) 臨床とウイルス ウイルス検査法 2018 (in press)
  - 9) 清水博之: 世界ポリオ根絶に向けた動きとわが国の対応. 小児科ワクチン Up-To-Date 4: 2017
  - 10) 斎藤博之、秋野和華子、佐藤寛子、藤谷陽子、柴田ちひろ、佐藤了悦、清水博之: 乳飲みマウスによるエンテロウイルスD68型の分離-秋田県. 病原微生物検出情報 38: 10-11, 2017
  - 11) 清水博之: エンテロウイルスD68のウイルス学的性状. 神経感染症学雑誌, 2017 (in press)
  - 12) 清水博之: エンテロウイルスD68感染症の大規模流行、その後. 臨床とウイルス 45: 256-263, 2017
  - 13) 清水博之: アジア諸国における手足口病 (エンテロウイルスA71)ワクチン開発と導入. 病原微生物検出情報 38: 13-14, 2017
  - 14) 藤本嗣人、花岡希、小長谷昌未、清水博之: 2000~2017年における2000~2017年におけるエンテロウイルスA71(EV-A71)の全国および世界における検出状況. 病原微生物検出情報 38: 11-12, 2017
  - 15) 清水博之: エンテロウイルスと子どもの麻痺. 小児保健研究 76, 208-217 2017
  - 16) 清水博之: 世界ポリオ根絶に向けた最終段階計画. 公衆衛生 81, 584-590, 2017
  - 17) 清水博之: エンテロウイルス感染症. 医師会雑誌 146, 259-263, 2017
  - 18) 清水博之: ポリオ. 化学療法の領域 33 : 40-48, 2017
  - 19) 清水博之: ポリオウイルス病原体バイオリスク管理に関するWHO行動計画(GAP III)と今後の課題. JBSA Newsletter, 6, 2017
- ## 2. 学会発表
- 1) Shimizu H. Nationwide survey of acute flaccid paralysis in August-December 2015 during an enterovirus D68 outbreak in Japan. U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program Viral Diseases Panel Meeting, Shenzhen, China, 8 January, 2018
  - 2) Shimizu H. Understanding of the pathogenesis of enterovirus 71 infection based on the identification of the receptors. The 20<sup>th</sup> International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim, Shenzhen, China, 8 January, 2018

- 3) Shimizu H. sIPV introduction in Japan; Lessons learned. The 20<sup>th</sup> Polio Research Committee Meeting, Tokyo, Japan, 31 October–1 November, 2017
  - 4) Shimizu H. NIID Polio GSL activity, 2017. The 7<sup>th</sup> Meeting on Vaccine-preventable Diseases Laboratory Networks in the Western Pacific Region. WHO/WPRO, Manila, the Philippines, 26–27 September, 2017
  - 5) Shimizu H. Surveillance and Laboratory Diagnosis of Enterovirus Infections in Vietnam and Japan. A Joint Meeting on Collaborative Research between NIID and NIHE, Tokyo, 22 August, 2017
  - 6) Shimizu H. Enterovirus D68 outbreak in Japan during autumn 2015, The 3rd Symposium on Research and Quality Control of Vaccines. Beijing, China, 8 May, 2017
  - 7) 清水博之. エンテロウイルス D68 のウイルス学的性状, シンポジウム 2 急性弛緩性脊髄炎. 第 22 回日本神経感染症学会学術大会、北九州、2017 年 10 月 14 日
  - 8) 清水博之. 世界ポリオ根絶の現状と今後の課題. 衛生微生物技術協議会第 38 回研究会、東京、2017 年 6 月 27 日
  - 9) 福島慎二、中野貴司、清水博之、濱田篤郎. 日本人成人に対する不活化ポリオワクチン追加接種直後と 3 年後の中和抗体価. 第 91 回日本感染症学会総会・学術講演会・第 65 回日本化学療法学会学術集会 合同学会 2017 年 4 月 6 日～8 日、東京
  - 10) 清水博之、ポリオ根絶に向けた検査と病原体管理. 平成 28 年度希少感染症診断技術研修会、東京、2017
- G. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし