

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）
分担研究報告書

ポリオウイルス非感受性細胞株の樹立

研究分担者 小池智 東京都医学総合研究所

研究要旨： PVR遺伝子を破壊したHeLa細胞にポリオウイルス、EV71、CVA3を感染させた。KO細胞はポリオウイルス非感受性であったが、他の2つのウイルスに対する感受性は野生型とほぼ同一であった。PVR KO細胞はポリオを増殖させずに他のウイルスの分離を行うに適した細胞である。

A. 研究目的

直腸拭い液、咽頭拭い液、便検体などから種々のウイルスの分離などを試みる際に通常のヒトあるいはサル由来の細胞を用いると、ポリオウイルスが混入している可能性がある場合(PIM)、意図せずに増殖させてしまう可能性がある。ポリオウイルス受容体のノックアウト細胞を樹立し、ノックアウトによって他のウイルスに対する感受性を失っていないければ、危険を伴わない細胞株となると考えられる。このような細胞の樹立することが目的である

B. 研究方法

ポリオウイルスの増殖を特異的に阻害するために PVR 遺伝子のノックアウトが最も有効であると考えた。そこで PVR 遺伝子のエクソン2の部分（ウイルス結合部位をコードしている）を標的とする sgRNA を設計してプラスミド構築した。このプラスミドを HeLa 細胞にとランスフェクションして遺伝子を破壊した。細胞のクローニングをおこなった後、ポリオウイルスを感染させ、ウイルス耐性を示した細胞を取得した。非感受性細胞のゲノム DNA をチェックし、PVR 遺伝子が破壊されていることを確認した。野生型と PVR KO の HeLa に EV71、CVA3 を感染させ、感受性を比較した。

C. 研究結果

PVR KO 細胞はポリオウイルス非感受性で、全く CPE が観察されなかった。他方では、他の2つのウイルスに対する感受性は野生型とほぼ同一であった。

D. 考察

PVR ノックアウトによりポリオウイルスの感染は抑えることができた。昨年樹立した PVR KO RD-A 細胞と比較すると RD-A 細胞の方がウイルス感受性は高く、なおかつ CVA2, 3, 6, 10 などにも高い感受性を示す。

E. 結論

PVR ノックアウト細胞がこの目的に最適であると考えられる。ポリオ根絶に際してはこのような細胞を普及させ、PIM からの他のウイルス分離操作において利用することが望ましい。基本となる細胞としてはエンテロウイルスの分離が目的であれば RD-A 細胞を用いることがより望ましい。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

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）
分担研究報告書

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

研究分担者 佐野大輔 東北大学大学院環境科学研究科准教授

研究要旨：水や河川水等、環境サンプル中に含まれるウイルスの分析に関する専門家が一堂に会する第20回健康関連水中微生物国際シンポジウムの機会を利用し、海外の研究室における環境検体のバイオリスク管理実態を調査した。

A. 研究目的

感染性のポリオウイルスもしくはポリオウイルス遺伝子が含まれている可能性がゼロではない環境由来試料（未処理下水、下水処理水、河川水等）を研究材料として扱っている海外の研究室におけるバイオリスク管理の実態を調査することを目的とした。

B. 研究方法

令和元年9月15日～20日にオーストリア・ウィーンで開催された第20回健康関連水中微生物国際シンポジウムに参加予定の海外研究者に対し、事前に趣旨を説明した上で、学会会場でヒアリングを行った。（倫理面への配慮）聞き取り結果の公表において、個人情報保護を適切に行った。

C. 研究結果

計4研究室（スペイン2、オーストリア1、南アフリカ1）に所属する研究者から各研究室における検体の管理状況をヒアリングした。その結果、全ての研究室において、WPV/VDPV感染性材料、及びOPV/Savin感染性材料の保管は行ってないとの回答が得られた。OPV/Sabin感染性を有する可能性のある材料（PIM）に関しては、全研究室が「保有したことがある」との回答であった。しかしながら、PV感受性細胞への接種実験及びトランスフェクションは一切行わないため、リスクレベルはいずれも「低」もしくは「最低」と判定された。

D. 考察

環境検体を扱う研究室は海外にも数多く存在するが、最近では遺伝子解析に重きが置かれ、細胞培養等を行うことがほとんどないため、PIMの保管に関するリスクレベルはいずれも低い状況であった。各研究室において、所属先のルールに従った検体の保存がなされていることも併せて確認された。

E. 結論

環境検体を扱う海外の研究室におけるPIMの保管に関するリスクレベルはいずれも低いことが明らかとなった。

F. 研究発表
該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む。）
該当なし

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

研究分担者 飯田哲也 大阪大学 教授

研究要旨

近年、腸内微生物叢の健康や疾患への関与についての興味の高まりにより、企業を含むさまざまな施設においてヒト糞便検体の収集・保存が進んでいる。本研究ではヒト糞便検体のバイオリスク評価手法について検討し、バイオリスク管理の方法について提言することを目的とした。本年度は厚生労働省および文部科学省ライフサイエンス課からの「ポリオウイルスに感染する可能性のある検体等の試料の保持状況に関する調査」への対応を行うとともに、本研究で得られた成果の取りまとめを行った。

A. 研究目的

腸管病原体の検索や腸内微生物叢の解析等を目的として、現在、さまざまな施設において数多くのヒト糞便検体が収集・保管されている。これらはポリオウイルスのバイオリスク管理の対象となる。本研究ではこれらヒト糞便検体のバイオリスク評価手法について検討し、バイオリスク管理の方法について提言することを目的とする。

B. 研究方法

厚生労働省および文部科学省ライフサイエンス課からの「ポリオウイルスに感染する可能性のある検体等の試料の保持状況に関する調査」への対応を行った。また、本研究で得られた成果の取りまとめを行った。

（倫理面への配慮）

当該研究期間においては、倫理面への配慮を必要とする研究はなかった。

C. 研究結果

厚生労働省および文部科学省ライフサイエンス課からの「ポリオウイルスに感染する可能性のある検体等の試料の保持状況に関する調査」への対応を行った。また、昨年度の予備調査でのアンケート結果は以下である。

- ウイルス学のバックグラウンドがない者には説明も質問もとっつきにくい。
- 説明の字が多過ぎ。詰め過ぎ。
- 1型2型3型ウイルスについての簡潔

な説明がほしい。

- PV1/Sabin1 および PV3/Sabin3 の PIM になる検体がどういうものか（日本および海外の国で）についての表がない？（PV2/Sabin2 の Table A2.1 に相当するもの）
- 「PV2/Sabin2 の PIM となる検体を持っているか？」という設問より、「xx 年～xx 年の国内臨床検体を保有しているか」「それは糞便検体か、呼吸器検体か？」というような設問の方が、ウイルス研究者以外には回答しやすいと考える。
- 全項目に○か×をつける必要があるが、該当するところにだけに○をつける方式でよいのでは？
- 省略表記が多すぎる。冒頭のみでの表示では不親切ではないか。
- ポリオウイルスのことを熟知している研究者がいる部署では記入の判断が適切にできるが、それ以外の部署では「感染性材料・感染性を有する可能性のある材料」の判断が難しい気がする。可能性のある材料に関してはもう少し具体例を挙げて強調した方がいい。
- ポリオウイルスを扱っているウイルス研究者だと理解できると思うが、それ以外の場合だと判断の内容が細かいかと思う。おそらく、微研のような研究所であれば、ウイルスの専門がいるので何とかなるが、そうでないところだと

少し判断が難しい印象。あと、VDPV と OPV の区別が明確に書かれていないように思う。

- 可能であれば、もう少しフローチャート形式の Yes No 形式で設問が進むといい。
- 施設報告フォームの page3 のポリオウイルス 3 月はポリオウイルス 3 型のタイプミスでは。

(倫理面への配慮)

当該研究期間においては、倫理面への配慮を必要とする研究はなかった。

E. 結論

近年、腸内微生物叢の健康や疾患への関与についての興味の高まりにより、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ヒト糞便検体が収集・保存されつつある。これらの糞便検体に対するバイオリスク管理の標準化が必要であり、本研究において、当施設の検体を対象にバイオリスク評価方法について検討を行った。

保有施設の調査にあたっては、ウイルス学の専門家以外も調査対象になることを考

慮し、可能な限り、ポリオウイルスとワクチンについての分かりやすく簡潔な説明と質問内容が望まれた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

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

【健康危険情報】

なし

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）
分担研究報告書

呼吸器検体のバイオリスク管理に関する研究

分担研究者 西村秀一 国立病院機構仙台医療センター臨床研究

研究要旨

本年度は、昨年実施したアンケートに対する意見の聞き取り調査結果をまとめて整理し、再度検討した。これにより各施設における検体保有の有無とバイオリスクに対する考え方が明らかにされ、本格調査に向けての改良すべき点が明らかにすることができた。

A 研究目的

感染性ウイルスを含む可能性のある感染性材料を取扱う大学関連、地方衛生研究所、病院関連とくに呼吸器系ウイルス感染症の臨床検体を扱う機会の多い施設に対し、本研究班で準備したバイオリスク管理の対象となる糞便、咽頭ぬぐい等の臨床検体の扱いについてのWHOのPIMガイダンスならびに同関連資料の和訳版等の資料および国内調査用調査票原案（暫定版）の資料についての意見の聞き取り調査

B 研究方法

本年度は、昨年実施した予備調査としてのアンケートの結果を再度まとめ、再度吟味した。

C 研究結果

結果的に、昨年度報告した内容は、的確であったことが確認された。

病院関連 1 施設を除いた全部で 10 施設から回答を得た。

1. 施設報告フォーム暫定版調査票集計全施設資料を読み、すべてに回答し、現状のWPV/VDPV IMの保持に関し全施設が保持していないと回答。廃棄日に関しては、2つの地方衛生研究所と1大学施設が記載していた。WPV/VDPV PIMに関しては、地方衛生研究所と病院附属研究施設それぞれ1施設が、1980年—2012年のポリオウイルス以外が分離された呼吸器系ウイルス培養株を保持していると回答したが、ほかの8施設は保持していないと回答した。OPV/Sabin IMに関しては、OPV2については、全施設で保持なしで、OPV1および3については2つの地方衛生研究所が、厚生労働省流行予測事業の調査抗原用に保持していた。またPV核酸については1衛生研究所がPCRの陽性コントロールとして保持していた。

一方で、OPV/Sabin PIMに関しては、2衛生研究所施設が具体的保持で具体的に答えているのに非保持Yes、No回でYesであった。結局、保持に関しては全施設がOPV1, 2, 3のPIMを保持しており、リスクレベルはおおむね糞便検体で中～低、呼吸器検体で低～最低との自己評価であった。具体的には、糞便検体では各種培養細胞を用いて分離されたエンテロウイルスをはじめとする胃腸炎関連ウイルスあるいは抽出されたウイルス核酸を保持しており、呼吸器検体でも同様にイン

フルエンザをはじめとする種々の呼吸器系ウイルスの分離材料あるいは抽出核酸を保持していた。

2. アンケートへの回答

調査担当およびアンケート回答は、病原体取扱者で研究者であり、Q2の調査関連資料については9割近くが「ある程度理解」以上の理解であった。ただ、2-GAPIIIについてのそれは7割であった。Q3の調査票についてのそれは、8割であり、またQ4のOPV2/Sabin2 IM/PIMについては、7割であったが、OPV2/Sabin IM/PIMについては4割に留まった。それについては、「一部可能だが理解できず対応未定の項目もあり。実施を求めるとであれば雛型を示してほしい」との意見が寄せられている。

3. 自由記載について、

調査票や資料がわかりにくいという意見がいくつかの施設から寄せられていた。同じ質問の繰り返しを集約する、訳をもっとわかりやすくする、略語の使い方をもっと考えるべき、略語表記がわかりにくい、あるいは途中でわからなくなる、不活化と廃棄を分ける必要があるのか、PIMについて、ウイルス分離現場では、ウイルスの継代も含めさまざまな産物が出るが、それぞれどれがPIMに相当することになるのか、わからないといった苦言もあった。

以下、箇条書き重要と思われるコメント。

- ・日本では、平成27年12月18日の事務連絡“不必要なポリオウイルスの廃棄について”に対応している施設がほとんどだと思う。

- ・過去には保有したことはあると思われるが、確証がなく○×では答えられない。しかし、すべて廃棄済み。

- ・日常から臨床検体を採取、保管する一般病院、個人クリニックにPIMに関してどこまで徹底、実施できるか、どの回答者も理解しやすい文章、回答しやすい書式が重要。

- ・GAPIIIの基準で感染性材料を保管、管理できる施設は限られ、ほとんどは2012年以前検体や分離ウイルスおよび（その継代ウイルス）を廃棄する必要がある？

- ・1963年から2012年までのうち、呼吸器系ウイルスが分離されなかった検体はPIM？

- ・類似している略語が多く各資料を読むのに

時間を要した。

- ・記入すべき部分が黄色の網掛けとなっており、大変わかりやすかった。

- ・WHOの今回の調査について。何でも「可能性」でくるのではなく、網をかけないことで起きる弊害のprobabilityのrealityを考慮し、網かけの範囲をもっと狭めるべき。

- ・ポリオのウイルス血症は、ワクチンではどうなのか？小児科の保存血清まで可能性を言えば、調査対象を病院や診療所まで広げる必要が出てくると思われるが、生ワクチン接種歴をどう調べるか。生ワクチンを受けた年齢層は、全例保存血清は廃棄？歴史的保存血清は？

- ・分離ウイルスの保存で、ヒトやサル由来の細胞を介した分離が規制の範疇に入るのであれば、ヒト由来の培養細胞で分離した呼吸器系ウイルスの保存ウイルス液は、すべてPIM？primary cultureは？HEp2、HEFは？具体的に問題になる細胞名を挙げるべき。増殖「可能性」だけでなく、根拠となるような各細胞でのポリオウイルス（ワクチン株を含め）の増殖データも示すべき。

- ・感染リスクごと対処が違うことは作業手順のアルゴリズムでよく分かりました。施設報告フォームにも冒頭に簡単なアルゴリズムがあると流れがわかりやすい。

- ・材料の種類が4項目それぞれに1A、1B、2A、2Bなどのコード、各表にも番号コードがほしい。

- ・略号が直感的にわかりにくい。冒頭だけでなく各表の下にも日本語の意味を書いていたけると記入時間が短くなり助かる。

D 考察

質問にあったようにPIMとして保存血清検体まで含むのか、含むとなると調査は困難を極める。血清を保存しているような一般医療施設は、研究室よりもすそ野が広く、絶対数から無視できない存在であり、調査の趣旨の完遂のためにはそれらのカバーは不可避であり、またワクチン接種歴まで遡って調査することは不可能だからである。だが、もし含まないのであれば、非ポリオの分離ウイルスや、もしかしたらその継代ストックまでもPIMに含めることとの整合性がとれないのではないだろうか。意見にあったように、網を

張る範囲について現実的リスクに基づいた再考の必要はないだろうか。

最終的に回答のなかった医療施設においては、日常診療に関わる検査業務の合間に膨大な説明を読まざるを得ない調査方式に対応できなかったとのことであった。諸施設からのアンケートにも、もっと短時間で理解し簡潔に答えられるようにしてほしい旨の回答が多かったが、日常的にウイルスを扱ういわば専門的施設でさえそうであれば、一般の臨床現場は、なおさらであろう。本調査においては、大いに配慮すべきであろう。

E. 結論

各施設における検体保有の有無とバイオリスクに対する考え方が明らかにされ、本格調査に向けての改良すべき点を明らかにすることができた。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kadji FMN, Nishimura H, et al.
Fluctuations in antibody titers
against enterovirus D68 in pediatric
sera collected in a community before,
during, and after a possible outbreak.
Jpn J Infect Dis. 2020 Jan 23;73(1):
55-57. doi: 10.7883/yoken.

2. 学会発表

なし

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 |