

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

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

平成29年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 清水 博之

平成30（2018）年 5月

目 次

I. 総括研究報告	
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 清水博之	----- 1
II. 分担研究報告	
1. 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 (PEF施設整備・認証の検討) 棚林 清	----- 7
2. 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 (腸管ウイルス検体のバイオリスク管理) 小池 智	----- 9
3. 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 (環境検体のバイオリスク管理) 佐野大輔	----- 10
4. 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 (腸管細菌検体のバイオリスク管理) 飯田哲也	----- 12
5. 呼吸器検体のバイオリスク管理に関する研究 西村秀一	----- 13
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 15

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 20th 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 20th Polio Research Committee Meeting, Tokyo, Japan, 31 October–1 November, 2017
 - 4) Shimizu H. NIID Polio GSL activity, 2017. The 7th 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

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 棚林 清 国立感染症研究所・バイオセーフティ管理室・室長
研究協力者 伊木繁雄、原田俊彦、篠原克明 国立感染症研究所・バイオセーフティ管理室

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講習会が行われた。GAPIII Annex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、国内査察員候補として講習会に参加した。PEF施設認証に向け、NACを中心とした施設認証を実施するための専門家チーム、および、PEF施設認証を受ける側、両方の体制整備が必要とされる。

A. 研究目的

ポリオウイルス取扱い認証施設(Poliovirus-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。また、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。本年度は、NACによるPEF施設認証に必要なとされるバイオリスク管理体制および施設整備について検討を行った。

B. 研究方法

2型ポリオウイルスを保管・使用するPEFは、今後、WHOによるGAPIII-CCSに基づいて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査察員研修会に参加した。

(倫理面への配慮)
該当なし

C. 研究結果

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、国内査察員候補として講習会に参加した。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。

D. 考察

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。2型ポリオウイルスを使用する国内PEF候補施設(感染研およびワクチン製造施設)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検討を進めるとともに、PEF施設認証に向け、NACを中心とした施設認証を実施するための専門家チーム、および、PEF施設認証を受ける側、両方の体制整備が必要とされる。

E. 結論

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、国内査察員候補に対する教育訓練講習会が行われた。GAPIII Annex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、国内査察員候補として講習会に参加した。PEF施設認証に向けた体制整備が必要とされる。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

3. その他
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

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 小池智 （公財）東京都医学総合研究所・プロジェクトリーダー

研究要旨：衛生研究所などでウイルス分離業務を行う際に、検体中にポリオウイルスが混入している場合、現在の方法ではポリオウイルスは非常によく増殖してしまうため、封じ込めを有効に行うことができない。ポリオウイルスの増殖がなく、他のウイルス分離に影響を及ぼさない手法を確立することを試みる。

A. 研究目的

衛生研究所などでウイルス分離業務を行う際に、検体中にポリオウイルスが混入している場合、現在の方法ではポリオウイルスは非常によく増殖してしまうため、封じ込めを有効に行うことができない。ポリオウイルスの増殖がなく、他のウイルス分離に影響を及ぼさない手法を確立することができれば、ポリオの封じ込めに大きく貢献することができる。

B. 研究方法

通常衛生研究所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を行う。その細胞で他のウイルスの分離について影響がないことを確認する。

（倫理面への配慮）
特になし

C. 研究結果

ヒトにおいてはポリオウイルス受容体遺伝子はCD155のみであるため、この遺伝子を破壊するためのガイドRNAの設計を行った。

D. 考察

ヒト細胞でPVR遺伝子の破壊は有効であると思われる。他のウイルスの感染に影響を与えない事を確認する必要がある。

ウイルスの分離はアフリカミドリザルの細胞も用いられているが、旧世界ザルにおい

てはPVR遺伝子は遺伝子重複により複数の遺伝子座からなっていることが知られている。そのため、ヒト細胞よりも感受性を失った細胞を樹立することは困難である可能性がある。

E. 結論

PVR遺伝子ノックアウト細胞の作製は理論的に可能であり、有効であると考えられる。安全性と有効性を実証したい。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

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

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 東北大学大学院工学研究科・准教授

本研究では、ポリオウイルスの病原体バイオリスク管理の標準化を推進する観点から、下水等の環境検体を有する研究所／研究室において求められるRisk Mitigation Strategyについて検討した。その結果、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／研究室では、保管しているPIMのRisk Group Levelは高くてもLevel 2 Lowであり、求められるRisk Mitigation Strategyは1) 環境検体を用いる実験のRisk assessmentに関する規則を所属先規則に追加すること、および2) 実験従事者のワクチン接種履歴を文書で確認し、必要であればワクチン接種を行なった上で実験に従事する、の2点であると考えられた。

A. 研究目的

WHOが公開した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（Global Action Plan）改訂第三版（GAPIII）では、世界ポリオ根絶最終段階において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。ポリオウイルス取扱い施設（認証施設）に該当しない環境工学に関わる研究所や研究室が保有する下水等の環境検体もバイオリスク管理の対象となり、リスク評価に基づいた検体等の廃棄・管理が求められている。そこで本研究では、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ために、環境工学に関わる研究室で保管されている環境検体の種類と、リスク評価に基づいてそれぞれに求められる管理方法について整理した。

B. 研究方法

東北大学大学院工学研究科・環境水質工学研究室に保管されている環境検体の種類を整理し、「Guidance for non-poliovirus facilities to minimize risk of sample collections potentially infectious for polioviruses（以下Guidance for PIM）」の表1を参照することでRisk Group Levelを確認した上で、環境検体を保持する研究所／研究室で求められるRisk Mitigation Strategyを確認した。

（倫理面への配慮）
該当なし

C. 研究結果

東北大学大学院工学研究科・環境水質工学研究室に保管されている環境検体の種類は以下の2つであった。すなわち

1. Concentrate sewage
2. RNA extracted from concentrated sewa

ge

である。これらのサンプルは、下水中に含まれる病原ウイルスのモニタリングを目的として収集されたもので、RT-PCRによるウイルス由来遺伝子の検出・定量を行うものである。したがって、上記2件ともpotentially infectious material (PIM) であるが、ポリオウイルス感受性細胞に接種することもトランスフェクションすることもないことから、Risk Group Levelはそれぞれ

1. Concentrate sewage : Low
2. RNA extracted from concentrated sewage : Lowest

と判断できる。以上から、東北大学大学院工学研究科・環境水質工学研究室で求められるRisk Mitigation Strategyは、Guidance for PIMの表2におけるLevel 2 LowおよびLevel 3 Lowestに示された内容となる。

D. 考察

上述したように、Risk Mitigation Strategyは、Guidance for PIMの表2におけるLevel 2 LowおよびLevel 3 Lowestに示された内容となるが、レベルが高いLevel 2 Lowの対応を統一して採用して上記2件の検体を保管することが望ましいと考えられる。Level 2 LowのRisk Mitigation Strategyは、以下の5件である。

- 1) Declare PIM in National Survey and maintain working inventory
- 2) Biosecurity (locked freezers, limited access)
- 3) Good laboratory/microbiological practices, including documentation and validation of methods/SOPs
- 4) Risk assessment for specific procedures being used
- 5) Polio immunization of staff required

研究室は東北大学内の規則に則り、封じ込め

施設としての登録を行なっていることから、上記5件のうち2)と3)は既に対応済みの状況にある。1)についても、National Surveyに漏れなく対応することでクリアが可能と言える。4)については、研究室内の化学物質についてRisk assessmentが大学規則により求められているが、環境検体についてはRisk assessmentを行う義務が存在していないので、大学担当部署に状況を説明し、関連規則の追加を行う必要があると考えられる。5)のワクチン接種に関しては、日本人スタッフであれば問題ないと考えられるが(年齢によっては免疫が弱い可能性がある点には留意する)、外国人スタッフについてはワクチン履歴を文書で確認することが求められ、確認できない場合には接種した上で従事させることが必要と考えられる。

以上の状況は、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/研究室では、ほぼ同様と考えられる。すなわち、濃縮下水や濃縮下水からの遺伝子抽出物を保管しているが、実験施設は各所属先のルールに基づいて封じ込め施設登録がされており、また感受性細胞に接種したりトランスフェクションを行うことはない。従って、

- ・環境検体を用いる実験のRisk assessmentに関する規則を所属先規則に追加
- ・実験従事者のワクチン接種履歴を文書で確認し、必要であればワクチン接種を行なった

上で実験に従事
の2点が、環境検体を保持する研究所/研究室で共通して求められる対応であると考えられる。

E. 結論

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/研究室では、保管しているPIMのRisk Group Levelは高くてもLevel 2 Lowであり、求められるRisk Mitigation Strategyは1) 環境検体を用いる実験のRisk assessmentに関する規則を所属先規則に追加すること、および2) 実験従事者のワクチン接種履歴を文書で確認し、必要であればワクチン接種を行なった上で実験に従事する、の2点である。

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

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 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。本年度はバイオリスク管理の対象となるものとしてどのような糞便検体が存在するか、研究分担者の施設を対象として検討を行った。その結果、病原体検出および腸内微生物叢解析を目的として、ヒト糞便検体が計約 1,000 検体凍結保存されていた。今後、これらの糞便検体を用いてバイオリスク評価方法について検討していく。

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

本年度は、バイオリスク管理の対象となるものとしてどのような糞便検体が存在するか、研究分担者の施設を対象として検討を行った。

（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

当該施設においては、病原体検出を目的として、ヒト糞便検体が約500検体、また腸内微生物叢解析を目的として、約500検体が保存されていた。いずれもディープフリーザー内に凍結保存されていた。

（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。

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、今後、当該施設の検体を用いてバイオリスク評価方法について検討行っていく。最終的に本事業の研究期間内に提言をまとめることを目指す。

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

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部

研究要旨 本年度は、主に呼吸器系ウイルスの臨床検体からの分離を行っている当研究室におけるワクチン由来のポリオウイルスの分離の実績を、過去、2002年まで遡り調べた。その結果、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。これらの分離ウイルスは、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。なお、廃棄にいたるまで、これらのウイルスは、施錠可能な部屋に設置された -80°C のフリーザー中で保管されていた。2012年以降は一株の分離もなかったが、これは、同年に本邦で接種されるポリオウイルスワクチンが生ワクチンから不活化ワクチンに替わったことを、如実に反映していると考えられた。

A 研究目的

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当施設で、施設内ポリオウイルス感染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、臨床検体の安全な取扱いと封じ込め(バイオリスク管理)の徹底のための研究を行う。

B 研究方法

WHOによる guidance for non-poliovirus facilities to minimize risk of sample collections potentially infectious for polioviruses (draft 4 Sep 2017) (以下WHOガイダンス)の定義でNon-PIM施設に相当し、主に呼吸器系の臨床検体からのウイルス分離を日常的に行っている当施設は、同ガイダンスでは、レベル3のlowest risk groupであり、そのリスク管理は、Annex1-6に示されている。

それに則して、今回我々は、検体採取から分離、そして廃棄に至る一連の過程におけるPV感染リスクを洗い出した。また、これまでのウイルス分離におけるワクチン株ポリオウイルスの分離がどれだけの頻度で分離されていたかを過去16年間にさかのぼって調査した。

C 研究結果

当施設は呼吸器系のウイルス分離を得意としているためか、職員の意識としてポリオウイルスは、ほとんど考慮されていなかった。

だが、低いとはいえリスクは、検体採取、検体の細胞への接種、ウイルス液の回収とウイルス同定、残遺細胞と用いたピペットやプレートの廃棄等に、配慮が必要であることがわかった。

当施設では、2002年から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を分離していた。頻度的には、その間の分離検査検体数は37,427件あり、その中から23件でPVが分離されていた(0.06%)。内訳は、1型が12株、3型が3株で、2型も8株分離されていた。これらの分離ウイルスは、厚生労働省からの通達に従い、すべて2016年2月にすべて高圧蒸気滅菌処理後、廃棄されていた。なお、廃棄にいたるまでは、これらのウイルスは、施錠可能な部屋に設置された -80°C のフリーザー中で保管されていた。

D 考察

可能性は極めて低いとはいえ、当施設でもワクチン株の実験室内感染リスクは、確かにあったといえる。そうしたリスクについても、研究室関係者に周知させておくべきであった。ただし、2012年以降は一株のPV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、如実に反映していると考えられた。

今後は、さらに過去のデータの解析を深め、ガイダンスのAnnex2のPV感受性培養細胞表

のうちのどのような細胞で分離がなされていたか、接種からどれくらいの時間で細胞の変性効果が見られていたかなどのデータを集め、ウイルス分離、培養にかかわる時間軸での実験室内感染のリスクについて考察する必要がある。

また、Annex1-6 は、実験室での感染に由来する地域への感染拡大への懸念に対するリスク軽減に、免疫状態が重要であることについても言及している。もしものことを考えれば、一般地域住民や職員の抗体価についての情報ならびに、職員に不活化ワクチンを接種するような場合、どの程度の免疫が形成されるのかについても、調べておく必要がある。これは今後への宿題である。

E. 結論

可能性は極めて低いとはいえワクチン株ポリオの感染リスクは、たとえ主に呼吸器系のウイルスを扱う施設においても存在する。同リスクについて、具体的に仕事のプロセスごとに明らかにし、研究室関係者に周知させておくべきである。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 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
とくになし

*【健康危険情報】
該当なし

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
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
Thongprachum A, Khamsrin P, Thi Kim Pham N, Takanashi S, Okitsu S, Shimizu H, Maneeakarn 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	2017
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
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
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
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
清水博之	エンテロウイルス感染症.	医師会雑誌	146	259-263	2017
清水博之	ポリオ	化学療法の領域	33	40-48	2017
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