

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・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を推進するための研究に関する研究

研究代表者： 河合 康洋 国立感染症研究所安全実感管理部第一室長

研究分担者

小池 智 公益財団法人東京都医学総合研究所・疾患制御研究分野・分野長
染谷雄一 国立感染症研究所・ウイルス第二部・室長
西村順裕 国立感染症研究所・ウイルス第二部・主任研究官

研究要旨： 世界ポリオ根絶最終段階では、ポリオウイルス・バイオリスク管理の徹底が求められており、ポリオウイルス基幹施設 (Poliovirus Esseantioi Facility; PEF) では、GAPIIIに示されたバイオリスク管理基準に基づいて2型ポリオウイルスを取扱う必要がある。また、ポリオ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(糞便、呼吸器、環境)の廃棄・管理が必要とされる。

国内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評価・検討および標準化等、リスク低減に向けた取り組みを行った。国内PEF施設認証のための準備を進め、2019年12月までに、国内PEF候補施設からPEF施設認証申請 (CP) が提出された。2018年5月に、WHOによる感染性ポリオウイルスを含む可能性のある材料を取扱う施設を対象としたガイダンス (PIMガイダンス) が公開されたことから、PIMガイダンスと関連資料の和訳版、および国内調査で使用する調査票案を作成し、ポリオウイルスとは直接関係のない検査・研究施設等を対象としたPIM保有施設予備調査を実施した。予備調査結果および専門家からのコメントを反映し、調査資料の改良を図った。作成した資料を用いて「世界的なポリオ根絶に向けた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について」(令和元年8月29日付、厚労省事務連絡)による施設調査が実施され、調査結果の概要はWHO年次報告書に反映された。

A. 研究目的

WHO は世界的行動計画(Global Action Plan)改訂第三版である 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。これを取扱う施設 (Poliovirus Essential Facility: PEF) では、GAPIII に示された管理標準に準じてポリオウイルスを取扱う必要があり、我が国でも、来年度から実際の監査を伴った施設認証が始まる。現行の認証制度では段階的な認証となっており、最終的な施設認証を受けるまで、施設に応じたバイオリスク管理の標準化が必要とされる。PEF 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。我々は 2 型ポリオウイルス株を含む検体等を保有する可能性のある関連研究機関に調査を実施し保有状況を実施したが、今後、より網羅的な施設調査が必要とされる。また、昨年 3 型野生株も撲滅宣言が発表され、近い将来、全型への対応が必要となる。近年、強毒変異・長期伝播の無い遺伝子組み換えポリオワクチン(nOPV2)が開発され、WHO は積極的にこれをアウトブレイク抑止に使用しようとしている。したがって国内に持ち込まれる可能性があり、nOPV2 の有用性や検査方法について検討する必要がある。

上記の背景から実際の監査結果を受け、PEF における国内バイオリスク管理体制の標準化について進める必要がある。また、ポリオリオウイルスに関するバイオリスク管理の国内外の対応について、広範な医学生物学施設に対する周知を進め、今後全型の野生株を対象とした厳格な管理を実施するための準備が必要である。さらに病原体管理の厳格化に伴って病原体を利用しない新たな検査方法の構築も必要であり、新規ワクチン株の情報収集、および国内での検査系構築が必要である。

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のための情報共有を進める。また、国内 PEF 候補施設におけるバイオリスク管理基準について技術的評価・検討を行い、PEF 施設認証申請(CP)を提出、承認を受け、令和二年度中に施設認証プログラムが開始される予定であったが、新型コロナウイルスによるパンデミックを受けて大幅に予定が見直されることとなり、今後の認証プログラム実施に向け、国家封じ込め認証機関(National Authority

of Containment; NAC)、WHO 担当者等と情報共有を進めた(河合、sIPV Working Group; sIPV-WG)。

2. 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 細胞あるいは RD-A 細胞にト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、CVB3、CVA10、EMCV を感染させ、感受性を比較した。(小池)
3. 不活化抗原を用いた標準物質の検討: D 抗原含量試験では、これまで感染性ポリオウイルス(生ポリオウイルス)が用いられていた。D 抗原含量試験を開発した阪大微研では不活化抗原を標準物質とする変更作業を進め、その候補品(不活化ポリオ 3 価混合原液)の評価(3 型 D 抗原含量の確認作業)を感染研でも行った。従来標準物質(生標準)とともに標準物質候補品(不活化標準)を同一プレート上にのせ、常法に従い D 抗原含量試験を行い、生標準に対して不活化標準を定量、また、不活化標準に対して生標準を定量した。(染谷)
4. 遺伝子組換えポリオウイルスの開発に関わる論文・情報を収集するとともに、ウイルスゲノムに導入された組換え・変異を詳細に解析した。(西村)

(倫理面への配慮)
特になし

C. 研究結果

本年度は、以下の調査研究を実施した。

1. CP 承認を得た国内 PEF 候補施設担当者現状の共有を図るとともに施設認証に向けた問題点の洗い出しを行なった。また、得られた情報は NAC とも共有し施設認証プログラムの実施に向けた動きを支援した。また、第 26 回 Regional Certification Commission (RCC) 会議、および Global Polio Eradication Initiative (GPEI) 会議が開催され、世界におけるポリオウイルス根絶計画の進捗状況(PEF 施設の認証プログラムの状況、3 型野生株の根絶宣言、今後の GAPIII の改定、nOPV2 の封じ込め等)が報告された。得られた情報については国内関係者と情報共有を行なった。(河合、sIPV Working Group; sIPV-WG)

2. 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、他のウイルスに対する感受性は野生型とほぼ同一であった。(小池)
3. 4回の試験を実施し、3型生標準(12.6 DU/mL)に対して不活化標準を定量したところ、978 DU/mLと算出された。これは不活化標準の3型D抗原含量として与えられた単位、976 DU/mLにきわめて近い値であった。また、不活化標準に対して3型生標準を定量したところ、12.6 DU/mLと算出され、3型生標準に与えられたD抗原含量と一致した。(染谷)
4. nOPV2には2種類の候補ワクチン株があるCandidate 1に加えられた変異は下記3点であった。
 - (1) cre (cis-acting replication element) を本来の2Aから5' UTRに移動。
 - (2) 5' UTR領域にあるIRES domain Vに弱毒化(安定化)変異を導入(翻訳効率を低下)。
 - (3) RNAポリメラーゼに忠実度を上げる変異、組換えを起こしにくい変異を導入。Candidate 2に加えられた変異は上記(2)とキャプシド領域コドンのde-optimizationであった。Candidate 1, 2とも、Phase 2 trialが進行しており、良好な安全性・ワクチン効果が示されていた。(西村)

1.

D. 考察

1. 令和二年度からPEF施設認証プログラムが再開される。認証を進めていく上で課題も出てくると思われるが適宜、NAC、およびPEF候補施設担当者等とポリオウイルス・バイオリスク管理基準整備のための情報共有を進める必要があると考えられた。また、世界におけるGAPIIIの進捗状況についても随時フォローしていく必要があると考えられた。(河合)
2. HeLa Δ PVR細胞とRD Δ PVR細胞ともにポリオウイルスの感染は非常に低いレベルに抑えることができた。HeLa Δ PVR細胞とRD Δ PVR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。HeLa細胞は広範に使用されている細胞であるが、多くのエンテロウイルスに対する感受性が低い点が何点である。(小池)
3. D抗原量試験では、従来の生ポリオウイルスに基づく標準物質と同様に、不活化抗原に基づく標準物質を用いることができ、置換可能であることが示された。(染谷)
4. nOPV2には遺伝子組換え・変異が導入されているが、ポリオウイルス以外の生物・ウイルスの遺伝子が導入されているわけではない。したがって、ナチュラルオカランス、あるいはセルフク

ローニングと解釈できる可能性が考えられた。(西村)

E. 結論

1. 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る。
2. PVRノックアウト細胞が意図せずポリオウイルスを増殖させてしまうことを未然に防ぐ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RD Δ PVR細胞の方が他のエンテロウイルス一般の感受性が高いことから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。
3. 国家検定での力価試験として採用されているラット免疫原性試験(in vivo試験)では、血清中の中和抗体価を測定するため、感染性ポリオウイルスの使用が欠かせない。D抗原含量試験(in vitro試験)はもうひとつの不活化ポリオワクチン力価試験法であり、実際、強毒株由来不活化ポリオワクチン(ソークワクチン)の国家検定試験として実施されている。セービン株由来不活化ポリオワクチンに関しても、in vivo試験からin vitro試験への移行作業が進んでおり、将来的には、国家検定として全く感染性ポリオウイルスを使用しない試験を実施することができるようになった。
4. nOPV2の安全性・ワクチン効果が良好であることから、2021年よりアフリカなどで使用される予定である。現在、新型コロナウイルスの世界的大流行により渡航が制限されているため、nOPV2接種者が来日する頻度は非常に低い。しかしながら、国内でnOPV2を検査し取扱う体制を早急に確立する必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Koike S. The risk of unintentional propagation of poliovirus can be minimized by using human cell lines lacking the functional CD155 gene. *Microbiol. Immunol.* 2020; 1-5. doi: 10.1111/1348-0421.12843.

Murakami K, Fujii Y, Someya Y. Effects of the thermal denaturation of Sabin-derived inactivated polio vaccines on the D-antigenicity and the immunogenicity in rat

s. Vaccine, 38(17), 3295-3299, 2020.
doi: 10.1016/j.vaccine.2020.03.027.

2. 学会発表

ポリオ根絶計画の最終段階, 西村順裕, 第6
9回日本感染症学会 東日本地方会学術集会
第67回日本化学療法学会 東日本支部総会 合
同学会, ミニシンポジウム, 2020/10/23, 国
内, 口頭

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