

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）
（総合）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 Essential Facility; PEF)では、GAPIV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。PEF施設認定については、2022年度からGAPIII/GAPIVに基づく本格的な施設認証のための査察が開始されており、PEF候補施設間で問題点を洗い出した。施設認証については査察を実施するNACへの技術的支援についても継続していく必要がある。一方、ポリオウイルス根絶を目指す管理下において、ポリオウイルスを含む可能性のある臨床検体(PIM)から意図せずにポリオウイルスを分離してしまう可能性のない、ポリオウイルス受容体ノックアウト細胞を樹立し、その有用性が明らかとなった。今後はPIMを取扱う際の一つのリスク低減策として提案していく。

ポリオウイルスワクチンの品質管理においては、セービン株由来不活化ポリオワクチン(sIPV)の力価試験をラット免疫原性試験からD抗原含量試験へと移行すべく、関係する3者間における試験法の同等性が確認できた。また、加温処理したsIPV製剤のD抗原含量試験とラット免疫原性試験の測定データの比較した結果、いずれの血清型においてもD抗原含量試験の方が鋭敏に品質異常を検知可能であることが確認できた。これらの結果から、ラット免疫原性試験をD抗原含量試験で代替可能であると考えられる。

現状、野生型ポリオウイルスの根絶は1型を残すのみとなっているが、一方で2型ワクチン由来ポリオウイルス(VDPV2)の感染拡大が問題となっており、その感染を制御するために、新規2型ポリオウイルス生ワクチン(nOPV2)が開発され、流行地域で使用され始めた。本年度パプアニューギニアでnOPV2から生じたワクチン由来ポリオウイルスが検出された。通常の生ワクチンから派生したVDPVと同様に伝播してしまうことがあらためて確認された。

A. 研究目的

WHO は世界的行動計画(Global Action Plan)改訂第四版である GAP IV 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。ポリオウイルスを取扱う施設(Poliovirus Essential Facility: PEF)では、GAPIV 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、2022 年度から実際の監査を伴った施設認証が開始された。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. ポリオウイルス取扱い施設(PEF)では、GAP IV 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る。現行の認証制度では段階的な認証となっており、昨年度国内全 PEF 施設は ICC の認証を受けた。最終的に CC を取得するまで PEF 候補施設担当者、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るとともに(河合、sIPV Working Group; sIPV-WG)、勉強会等を通じて施設に応じたバイオリスク管理の標準化を進める。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・検討を行う。(河合)
2. ポリオウイルスの増殖を特異的に阻害するためにゲノム編集によって PVR 遺伝子のエクソン

2 の部分を破壊した細胞を樹立した(RDΔPVR 細胞)。この細胞株に EV-A に属する他のエンテロウイルスの受容体 SCARB2 と KREMEN1 をレトロウイルスベクターを用いて発現させた(RDΔPVR+hSCARB2+hKREMEN1 細胞)。これらの細胞にポリオウイルス、他のエンテロウイルスを重感染させ感染の特異性を調べた。(小池)

3. ポリオウイルスを取扱わないポリオワクチン評価方法を検証するため、以下の 4 つの試験を行なった(染谷)。
 1. D 抗原含量試験 (TIPV) による 3 者間での検査制度の同等性比較
 2. D 抗原含量試験 (sIPV 製剤)
 3. ラット免疫原性試験と D 抗原含量試験の比較
 4. D 抗原量単位の比較(染谷)
4. ポリオウイルス根絶を見据え、新しい遺伝子組換えポリオウイルスが開発・使用されている。そのひとつで生ワクチンとして投与されているのが nOPV2 である。本年度、パプアニューギニアで nOPV2 から生じたワクチン由来ポリオウイルスが検出された。その遺伝子を解析するとともに、情報を収集した。(西村)
5. ポリオウイルス関連資材等の保有状況の把握については、厚労省と相談、情報共有を行うとともに、調査様式の検討を行う。諸外国での対応状況や体制についての情報収集については、インターネット等で公開情報を把握し、担当者に状況を伺う。また、追加課題として、WHO 会議に出席し議論の様子や関係者のネットワークの状況を把握する。(吉見)

C. 結果

1. PEF 施設の監査を通じて得られた課題について勉強会を開催することで管理の標準化が進められた。(河合)
2. 他の EV の受容体 SCARB2, KREMEN1 を発現させることによりそれぞれの受容体を利用する EV71, CVA6 などの感受性が上昇した。特に CVA6 の臨床分離株の増殖効率の改善が顕著であった。ポリオウイルスとの重感染を行っても増殖するのは EV71, CVA6 の増殖が有利となり、少量のポリオウイルスの混入であれば検出限界以下となった。誤って増殖させる可能性は大幅に低減できることが判明した。(小池)
3.
 1. 3 所社での D 抗原含量試験法の同等性が確認できたと判断した。
 2. NIID は BIKEN、KM バイオロジクスの各社から提供された 5 種混合ワクチン製剤の D 抗原含量を 3 回以上測定し、得られた測定データを試料提供元の製造所へ提供した。各製造所でも 3 回以上測定し、2 者間での同等性を検証した。
 3. いずれの血清型でもラット免疫原性試験より

D 抗原含量試験の方が品質の異常を鋭敏に検知可能であった。

4. NIID、BIKEN、KMバイオロジクスはそれぞれ第一次国際標準品（17/160）と標準物質 1 ロットについて D 抗原含量試験を 3 回以上実施した。（染谷）

4. パプアニューギニアの環境サーベイランス検体から分離された 2 型ポリオウイルス（PNG25-018-LR4）を、FTA カードにてフィリピンの National polio laboratory より入手した。FTA カードより常法にてウイルス RNA を抽出し、RT-PCR で VP1 遺伝子領域を増幅し、遺伝子を解析した。（西村）

5. ポリオウイルス関連資材等の保有状況の把握については、厚労省と相談のうえ情報共有を行い、調査様式の検討を行った。WHO ガイダンスに示されている事項とともに、その前段階で、施設のスクリーニングとなる簡易な調査様式の検討を行った。

諸外国での対応状況や体制についての情報収集については、インターネット等で公開情報を把握し、担当者に状況を伺う。また、追加課題として、WHO 会議に出席し議論の様子や関係者のネットワークの状況を把握する。（吉見）

D. 考察

1. 施設認証を進めていく上で出てきた課題については適宜、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/V 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. エンテロウイルスの受容体はウイルス感受性を決定する最も重要な因子であるため、その発現をなくす、あるいは増強することによりウイルスの感受性を制御することが可能である。PVR 欠損細胞はウイルス感受性がほぼないが、phagocytosisなどで偶発的に取り込まれた PV はごくわずかであるが増殖させてしまう可能性がある。分離したい他のウイルスの受容体を発現させることで、目的のウイルスの増殖効率を高めることにより相対的に PV 増殖のリスクは低減する。しかしながら RDΔPVR+KREMEN1 細胞においては CVA6 が感染しきらない細胞などがあるので、効率をさらに上昇させるためには細胞のクロニングなどの改良が必要かも知れない。（小池）
3. 1. 国家検定での D 抗原含量試験の実施に向けて、製造所毎の sIPV 製剤を用いて NIID と各製造所間での試験法の擦り合わせに移ることが可能となった。
2. 測定データの評価、解析を今後各製造所で実

施する。これに基づき、必要があれば試験法の問題点の洗い出し、再評価を行うことにしている。

3. D 抗原含量試験の規格適否を確認することによってラット免疫原性試験の不適合リスクのある製品を検知可能であることが確認された。このことから、ラット免疫原性試験を D 抗原含量試験で代替化しても製品の品質担保は可能と考える。

4. 3 者の測定データをもとに SDU に対する DU の相対値を算出する。評価結果を踏まえて必要があれば更なる検討を行う。（染谷）

4. nOPV2 は遺伝子変異や組換えを起こしにくい画期的なワクチンと期待されていたが、一旦毒力を回復してしまうと、通常の生ワクチンから派生した VDPV と同様に伝播してしまうことがあらためて確認された。nOPV2 とはいえ、生ワクチンの接種を継続する限り、特に接種地域ではワクチン接種率を高く維持することが非常に重要と思われる。また、どのように接種を止めるのかについての議論も必要と思われる。（西村）
5. 海外での事例から、保有状況に際して「分母」の把握が重要ということが挙げられ、こうした「分母」になりうる施設を把握できるとともに、WHO ガイダンスに示される詳細な調査につなげるための、いわばスクリーニング調査となるような、簡易な調査が有用と考えられた。（吉見）

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/IV に示されたバイオリスク管理基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、今後も海外におけるポリオウイルス根絶計画の進捗情報を確認するとともに、国内における 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・IV 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。（河合）
2. PVR 欠損 RD 細胞はポリオウイルスのリスク管理に有用である。他のエンテロウイルスの感受性を上げることができればさらに有用性が増すと考えられる。（小池）
3. 1. 3 者間で同一試料を測定し、同等の測定データが得られたことで D 抗原含量試験の手法が国内標準化されたと考える。
2. sIPV 製剤を用いて NIID と製造所間で D 抗原含量試験の同等性が確認できれば、国家検定における sIPV 製剤の力価試験をラット免疫原性試験から D 抗原含量試験へ速やかに移行できるものとする。
3. 今回、加温処理した sIPV 製剤の D 抗原含量試

験とラット免疫原性試験の測定データを承認規格で判定する検討においても同様に、D抗原含量試験の方が品質の異常を鋭敏に検知可能であった。したがって、規定量のD抗原含量が確保されていれば、ラット免疫原性試験を省略しても製品の品質担保は可能である。

4. 国内のsIPVは単位DUに基づいてD抗原含量を管理している。sIPVのD抗原含量の測定に使用する第一次国際標準品（17/160）が2018年に確立されたが、これまで国内のsIPVで使用している単位DUと17/160の単位SDUの換算に関する測定データはn数が少なく、更なる検討が必要であった。今回3者での評価を行うことで、換算のためのより正確な情報を得ることができる。

（染谷）

4. 国外でnOPV2の接種が継続されているかぎり、nOPV2から生じるVDPVが日本国内に輸入されるリスクがあることが示唆された。これらの国内への伝播を見逃さないために質の高いAFPサーベイランス維持し継続することと、ポリオワクチン接種率を高く維持することが重要である。

（西村）

5. ポリオウイルス関連資材等の扱いについては、WHO のガイダンスの改訂も予定されているが、ほか封じ込め施策について、WHO での議論も含め、引き続き海外の状況等注視するとともに、スクリーニング調査と詳細調査の2段階を検討していく。また、海外の関係者との情報共有・

交換の機会、ポリオウイルス関連資材等の保有状況の調査について、特に体制や実施内容などが具体的にわかるとともに、その他にも、バイオセーフティ、バイオセキュリティ関連の状況についても話題が広げられるため、非常に重要と考えられた。（吉見）

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) 西村順裕. エンテロウイルスA71と受容体 SCARB2は、細胞表面で出会わない. ウィルス, 2024, 74(2) 153-8, doi: 10.2222/j sv. 74. 153

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