

ポリオウイルス感受性動物モデルに関する研究

分担研究者 小池 智 東京都神経科学総合研究所

研究要旨 ポリオウイルスの感染特異性を決定する因子を探る目的並びにポリオウイルス経口感染が可能な実験動物モデルを作成する目的でポリオウイルスレセプターを発現するトランスジェニックマウスと I 型インターフェロンノックアウトマウスを交配した。マウスのポリオウイルス感受性は経口感染経路を含めて上昇した他、通常のトランスジェニックマウスと比較して広い範囲の組織で病変が観察されるようになった。これから I 型インターフェロン応答はポリオウイルス感染の組織特異性や病原性の強さに大きな影響を与えているのが結論された。

A. 研究目的

急性灰白髄炎の原因ウイルスであるポリオウイルスは神経指向性を持つ。経口感染によりヒトの体内にはいった PV は消化管、リンパ節で増殖し、ウイルス血症となる。神経系に侵入したウイルスは脊髄や脳幹の神経細胞で増殖し、これらを破壊することにより、四肢のマヒなどに至る。しかし非神経組織においてはウイルスが到達しているにも関わらず顕著な病変を生ずることがない。このような神経系に選択的な病原性はウイルスの吸着、侵入のレベルやウイルス遺伝子の発現（特に Internal ribosome entry site (IRES) からのタンパク合成開始）レベルで制御されていると考えられて

きた。ところがポリオウイルスレセプター (PVR) や IRES-trans activating factor が同定されてみるとこれらの宿主因子は非標的組織でも広く発現が認められ、「ウイルス複製に必須の宿主因子が揃っている組織が標的になる」というウイルス学上の常識的な考え方では説明できないことが分かってきた。

我々はこれまでヒト PVR 遺伝子を発現するトランスジェニック (tg) マウスモデルを用いて組織特異性の解明を目指してきた。新たに自然免疫によるウイルス複製の阻害を考慮に入れる必要があると発想を転換し、IFN 応答とウイルス複製の関係を調べた。

また、これまで PVR-tg マウスでは経口

感染が成立し難かったため、ヒト以外の経口感染動物モデルが存在しなかった。IFN α / β レセプターノックアウトマウスを用いることにより、ウイルス感受性が増大し、経口感染動物モデルができることを期待した。

B. 研究方法

・IFN α / β レセプターノックアウトマウスとPVR-tg マウスを交配し、PVR-tg/Ifnar KO マウスを作成した。このマウスと通常のPVR-tg マウスを比較し、I 型 IFN 応答とウイルス感染の特異性の関係を調べた。PVR-tg マウスと PVR-tg/Ifnar KO マウスにポリオウイルス I 型 Mahoney 株を脳内接種、腹腔内接種、静脈内接種、経口接種し、病原性の強さを調べた。

・静脈内接種後の 2 系統のマウスにおけるウイルス抗原や病変の有無を検索した。

・PVR-tg マウスにおけるウイルス接種前後の組織から RNA を調製し、real time RT-PCR 法によって、IFN-stimulated gene (ISG) の発現レベルの変化を調べた。ISG としては 2',5'-oligoadenylate synthetase, PKR, RIG-I, IRF-7 などを調べた。

C. 研究結果と考察

PVR-tg マウスと PVR-tg/Ifnar KO マウスを比較すると脳内接種、腹腔内接種、静脈内接種、経口接種、いずれの接種ルートにおいても PVR-tg/Ifnar KO マウスはウイルス感受性が高くなっていた。特に PVR-tg マウスはこれまで経口感染が殆ど成立

しなかったが、106PFU のウイルスで約半数の PVR-tg/Ifnar KO マウスで麻痺発症が見られた。

通常の PVR-tg マウスでは肝臓、脾臓、膵臓などの組織はウイルスを感染させても激しい病変を生ずることがない。ところが PVR-tg/Ifnar KO マウスでは標的とならないはずのこれらの組織でもウイルスが効率良く増殖し、ウイルス抗原が検出されたほか、細胞の変性や炎症反応などの病変を生じた。すなわち PV は潜在的に増殖可能であったものが IFN 応答によって抑制されていたと考えられた。

次に、正常な IFN 応答をもつ PVR-tg マウスの組織ごとの IFN 応答を調べた。するとマウス個体においては非神経組織ではウイルス感染前から 2',5'-oligoadenylate synthetase, PKR などの抗ウイルス活性をもたらす酵素や RIG-I などの IFN 誘導に関わっている制御因子の発現レベルが高く保たれており、ウイルス感染に際し速やかで強い IFN 応答が可能であった。逆に神経組織においてはウイルス感染前からこれらの遺伝子の発現レベルが低く、ウイルス感染直後に速やかで十分な IFN 応答ができずそのために感染が広がってしまうことが判明した。このように PV 感染の組織特異性は IFN 応答が組織によって不均一であるために生じていることが判明した。

D. 結論

ポリオウイルスの病原性発現には IFN 応答は非常に重要で、ウイルス感受性の程度

を決定している他、ウイルスのトロピズムも決定する因子として機能していることが明らかになった。

2) 小池 智 ポリオウイルスの標的組織特異性決定機構 ウイルス 54: 205-212 2004.

E. 健康危険情報

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

F. 研究発表

2. 実用新案登録

なし

1. 論文発表

3. その他

なし

1) Ida-Hosomuma M, Iwasaki T, Yoshikawa T, Nagata N, Sato Y, Sata T, Yoneyama M, Fujita T, Taya C, Yonekawa H, Koike S. Alpha/beta interferon controls tissue tropism and pathogenicity of poliovirus. J. Virol. 79: 4460-4469, 2005.

2. 学会発表

1) 小池 智, 細沼美樹, 岩崎琢也, 吉河智城, 永田典代, 佐藤由子, 佐多徹太郎, 多屋長治, 米川博通. インターフェロン応答によるポリオウイルスの感染特異性決定機構、第 52 回日本ウイルス学会学術集会ワークショップ, 東京, 2004.

2) 大岡静衣, 坂井麻依, 藤巻智一, 五十嵐博子, 小池 智, 遠山稿二郎, 野本明男. ポリオウイルス体内伝播経路及び伝播機構の解析. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会ワークショップ, 東京, 2004.

3. 総説

1) 小池 智 ピコルナウイルスベクター, Mebio, 21: 42-49 2004

富山県で確認された VDPV 事例

国立感染症研究所 ウイルス 2 部 清水博之
厚生労働省 結核感染症課 小林秀幸

2004 年に、感染症流行予測調査事業の一環として、富山県在住の健常児から採取した糞便検体から、VDPV が検出された。当該児に既往歴はなく、麻痺等の症状は認められていない。同居家族にも症状は認められていない。被検児の居住地において、急性弛緩性麻痺（AFP）患者の発生状況調査を実施したが、調査対象病院から 2004 年 1 年間に AFP は報告されておらず、当該地域において、被検児を発端としたポリオ患者は発生していないと結論づけた。

1. 感染症流行予測調査

感染症流行予測調査事業は、予防接種法の対象疾患について、集団免疫の現状把握及び病原体の検索等の調査を行い、予防接種の効果的な運用を図ることを目的とした調査であり、国が各都道府県の協力を得て実施している。

ポリオ感染源調査は感染症流行予測調査事業の一項目として 1962 年から毎年実施しており、「ポリオ流行地域からのポリオウイルス野生株の輸入及び VDPV 伝播の可能性を調査する病原体サーベイランスの一環として、健常児から採取された糞便検体からのポリオウイルスの分類頻度と分離ウイルスの性状を、日本各地において毎年継続的に調査する」ことを目的としている。

ポリオ感染源調査は、OPV 接種後 2 ヶ月以上経過した健康な乳幼児を対象として、従来は毎年、17 都道府県から計 2000 検体程度について調査を実施していたが、1995 年からは規模を縮小し、2004 年は 15 都道府県において計 900 検体を同定した。

（なお、対象者の選定は、各都道府県において、属性に偏りがないよう考慮して行われている。）

今回、VDPV が検出されたのは、ポリオ感染源調査において、富山県在住の健常児から採取された一検体である。

2. VDPV の検出された児

（1）被検児の居住地

VDPV が検出されたのは、富山県小矢部市在住の男児から採取された便検体である。

富山県は人口約 111 万 6 千人、面積 4,246 平方キロメートルの県であり、現在は 27 の市町村で構成されている。小矢部市は、富山県の西部に位置する人口約 3 万 4 千人、面積 134 平方キロメートルの市である。

なお、富山県には6つの保健所が存在し、小矢部市を所管するのは砺波保健所である。砺波保健所が管轄する市町村の人口は約15万6千人、面積は989平方キロメートルである。

(2) 被検児に関する基本情報

年齢・性：2003年11月生まれの男児

OPV接種歴：

2004年5月27日にOPV1回目接種（接種時年齢生後6か月）

9月9日にポリオ感染源調査のため糞便採取

10月6日にOPV2回目接種

既往歴：出生後、特段の既往歴は無し（保健所スタッフの聞き取りによる）

子育て状態：保育所に入所しておらず、自宅保育である

家族構成：本人、父、母、祖父、祖母、祖祖母の6人家族

本人及び同居家族に、急性弛緩性麻痺患者は存在しない

3. VDPVのウイルス学的所見

今回、感染源調査により健常児由来糞便検体から分離された2型ポリオウイルス1株は、型内鑑別試験の結果、PCR-RFLPではSabin 2-like, モノクローナル抗体はNSLおよびELISA試験ではSLの結果を示した(表3)。VP1領域の塩基配列解析の結果、Sabin 2株と比較して1.2%の変異を有しており、最終的に2型VDPVであると同定された。3D部分領域の塩基配列解析により、Sabin 2由来非組換えVDPVであることが明らかとなった。

富山県で分離されたVDPVの型内鑑別および遺伝子解析

ウイルス株	#117/Toyama/P2	
	中和試験	Poliovirus type 2型
	PCR-RFLP	Sabin 2-like
	VP1	
	3D	ND
試験結果	MoAb	NSL
	ELISA	SL
	塩基配列解析	VP1 11/903nt different (1.22%) from Sabin 2
		p3D 4/385nt different (1.04%) from Sabin 2
最終判定	2型VDPV (非組換えウイルス)	

4. フォローアップ調査

VDPVの検出を受け、①本人及び同居家族の糞便検査、②被検児の居住地の急性弛緩性麻痺患者調査、③被検児の居住地のOPV接種率の確認、を行った。

(1) 本人及び同居家族の糞便検査

被検児の便から VDPV が検出されたことを親に説明の上、便の再検査を 12 月 16 日に実施した。また、併せて、同居家族 5 人にも同日に採便を実施した。

結果は、被検児の便からアデノウイルス 2 型が検出されたものの、ポリオウイルスは分離されたなかった。同居家族 5 人からウイルスは分離されなかった。

なお、被検児に対する更なる追加の糞便検査は、親の同意が得られず実施できなかった。

(2) 急性弛緩性麻痺患者調査

被検児の居住地域において、ポリオの発生の有無を確認するため、急性弛緩性麻痺 (AFP) 患者の発生状況調査を実施した。

調査方法は、小児科を診療科として標榜する砺波保健所管内の 6 病院を対象として、2004 年の 1 年間に、ギランバレー症候群、横断性脊髄炎、その他の AFP と診断された患者に関する報告を求めた。

結果は、調査対象の 6 病院のうち、いずれの病院からも AFP は報告されなかった。

(3) OPV 接種率

2004 年の接種者数は集計中であるため、参考として、小矢部市、富山県、全国における 2003 年、2002 年の接種率を示す。

2003 年

		小矢部市	富山県	日本全国
第 1 回	対象者	268	9,791	1,143,000
	接種者数	275	9,575	1,135,484
	接種率	102.6%	97.8%	99.3%
第 2 回	対象者	268	9,791	1,143,000
	接種者数	252	9,781	1,113,237
	接種率	94.0%	99.9%	97.4%

2002 年

		小矢部市	富山県	日本全国
第 1 回	対象者	265	10,103	1,169,200
	接種者数	238	10,123	1,159,752
	接種率	89.8%	100.2%	99.2%
第 2 回	対象者	265	10,103	1,169,200
	接種者数	266	10,144	1,136,170
	接種率	100.4%	100.4%	97.2%

富山県の接種者数は、県内の全市町村における接種者実数を合計したものである。同様に、日本全国の接種者数は、全国約3千の市町村から報告された接種者実数を集計したものである。

日本におけるOPVの接種年齢は、法律上は「生後3～90か月」の者であるが、別に「生後3～18か月」を推奨期間と定められており、大半の者がこの推奨期間内で接種を受けている。このため接種率を算定するに当たって、分母（対象者）は「生後3～18か月」の人口としている。

一方、分子（接種者数）は、「生後3～90か月」の年齢で接種を受けた者全員を集計しており、仮にある年次において、生後18か月以降に接種を受けた者が多い場合には、接種率が100%を超えることがある。

以上の点に留意が必要であるが、いずれにしても、被検児が居住する小矢部市では90%以上の高いOPVの接種率が維持されていると考えられる。

5. 考察

2003年11月に出生し、2004年5月27日にOPV接種を受けた男児から、9月9日に採取した便検体を検査したところ、VDPVが確認された。その後、12月15日の再検査ではポリオウイルスは検出されていない。ウイルス排泄持続の有無の確認のための更なる追加の糞便検査及び被検児の免疫不全の有無を確認するための採血検査は、家族の同意が得られず実施できなかった。なお、基礎疾患に免疫不全を有する小児では、通常、生後間もない頃に易感染性などの症状を発するが多いが、被検児は特段の既往歴を認めないことから、免疫不全の可能性は低く、ウイルスの持続排泄の可能性は低いと考えられる。同居家族にもポリオ様症状は認めず、また、糞便からポリオウイルスが分離されなかったことから、同居家族への二次感染は生じていないと考えられる。

被検児の居住地域において、急性弛緩性麻痺（AFP）患者の発生状況調査を実施したが、調査対象となった6病院のいずれからも2004年1年間にAFPは報告されておらず、当該地域において、被検児を発端としたポリオ患者は発生していないと考えられる。

被検児の居住地域を含め、日本ではOPVの接種率は90%以上の高い水準で維持されており、cVDPVの発生が懸念される状態にはないと考えられる。

WHO global action plan for laboratory containment of wild polioviruses

Second edition

目的

実験室から一般社会への野生株ポリオウイルスの再侵入のリスクを最小限とするための活動の体系的かつ包括的な計画を準備すること。

略語

BSL	biosafety level	バイオセーフティ・レベル
CNS	central nervous system	中枢神経系
GCC	Global Commission for the Certification of the Eradication of Poliomyelitis	世界ポリオ根絶認定委員会
HEPA	high efficiency particulate air filter	高性能微粒子フィルター
IPV	inactivated polio vaccine	不活化ポリオワクチン
OPV	oral polio vaccine	経口ポリオワクチン
SOP	Standard Operating Procedure	標準作業手順書
PVR	poliovirus receptor	ポリオウイルス受容体
VAPP	vaccine-associated paralytic poliomyelitis	ワクチン関連麻痺性ポリオ
VDPV	vaccine-derived poliovirus	ワクチン由来ポリオウイルス
WHO	World Health Organization	世界保健機関

要約

すべての地域が、最低過去 3 年間継続して野生株ポリオウイルスの伝播が存在しないこと、および、野生株ポリオウイルス材料を保管している実験室が適切な封じ込め処理を施したことを立証し、世界ポリオ根絶認定委員会(Global Commission for the Certification of the Eradication of Poliomyelitis; GCC)により確認された時点で、世界ポリオ根絶宣言が可能となる(1)。実験室から一般社会への野生株ポリオウイルス伝播の可能性は小さい。しかしポリオフリーの地域が増加し、ポリオに対する予防接種活動が低下あるいは停止するにしたいがい、実験室からのウイルス伝播の潜在的な重要性は、いつそう大きくなる。野生株ポリオウイルス感染性材料および野生株ポリオウイルスを含む可能性がある材料について安全な取扱い、最終的には、適切な実験室封じ込めを達成することが重要である。

Global action plan for laboratory containment of wild polioviruses (WHO/V&B/99.32) の初版は、1999 年 12 月に WHO から発行された。初版は、バイオセーフティの専門家、疫学者、実験科学者、厚生省およびワクチン製造業者からの広範な意見に基づくものであった。

Global action plan 第 2 版は、初版を改訂するものである。第 2 版には、WHO 管轄の世界 6 地域のうち 5 地域における 100 カ国以上での医科学実験室の調査と保有記録作成から得られた教訓が含まれている。第 2 版では、ワクチン由来ポリオウイルス(vaccine-derived poliovirus; VDPV)を含むよう初版における勧告が拡張されている。そしてリスクに関してバイオセーフティの条件を定義している。また封じ込めを達成するための活動に関する 2 つの段階を説明している、すなわち、実験室調査および保有記録作成の段階、および、世界ポリオ根絶の認定段階である。第 2 版では最後に、ポリオウイルスのバイオセーフティの必要性和ポリオ根絶認定後の予防接種政策との兼ね合いについて検討する。

国内の実験室調査・保有記録の作成

本段階では、ポリオフリーの国・地域が増加しているが、同時に野生株ポリオウイルスが世界のどこかの地域で未だ伝播し続けている。各国は;

1. 野生株ポリオウイルス感染性材料あるいはそれを含む可能性のある材料を有する医科学実験室を特定するためすべての実験室を調査し不必要な材料の廃棄を促す。
2. 上記材料を有する実験室のリストを作成し、地域根絶認定委員会(Regional Certification Commission; RCC)に報告する。
3. 野生株ポリオウイルス感染性材料あるいはそれを含む可能性のある材料を保有している実験室に、安全な取扱いのため、強化したバイオセーフティレベル-2 (BSL-2/polio) 基準を施行するよう指導する。
4. 世界ポリオ根絶認定についての準備を行う。

世界ポリオ根絶の認定

本段階は、世界のすべての地域で野生株ポリオウイルスが分離されず 1 年間に経過した時点で開始する。各国は;

1. 野生株ポリオウイルス伝播の終息を各医科学研究室に通知する。
2. 国内保有記録にリストアップされた実験室に対し、以下の選択枝のうち、ひとつを選択するよう指示する。
 - ポリオウイルスに関して材料を非感染性にするか、適切な方法により廃棄する(Annex 2)。
 - 野生株ポリオウイルス感染性材料、あるいはそれを含む可能性のある材料を、必要なバイオセーフティ基準を満たすことができる実験室に移動する。
 - BSL-2/polio あるいは BSL-3/polio 実験室として運用するのに相応しいバイオセーフティ対策を実施する。
3. 世界ポリオ根絶認定のため必要とされる、封じ込めに関するすべての要求事項に関する達成状況を記録する。

ポリオ根絶認定後

第2版は、世界的なポリオ根絶認定に必要とされる野生株ポリオウイルス封じ込め基準を示すものである。この基準は、現行のポリオ予防接種方針が継続するかぎり有効であると考えられる。ポリオ根絶認定後に、もし全世界が OPV 定期接種停止を決めるのであれば、IPV の導入の如何にかかわらず、野生株および OPV ウイルスに対する封じ込めの基準は、本稿で述べた以上に厳格となると考えられる。あらたなバイオセーフティ基準は、OPV 接種停止戦略、および、世界的に次第に増加するポリオ感受性集団への不用意なポリオウイルス伝播のリスクとその重要性に対応するものとなると想定される。世界ポリオ根絶認定以降のバイオセーフティ基準を規定する、すべてのポリオウイルスを対象とする Global Action Plan 第3版は、OPV 接種停止のための戦略策定と平行する形で、準備および刊行される予定である。

本計画の発行について

一般社会への偶発的なポリオウイルス伝播のリスクに対応した実験施設およびバイオセーフティの実践を確実なものとするための背景、理論的根拠および戦略を本稿で示す。これとは別に WHO では (2)、野生株ポリオウイルスから製造される IPV の安全な製造と品質管理についてのガイドラインが作成されている。ポリオが次世代にとっての脅威でなくなるのを確実にするため、各分野にまたがる全面的な協力と関与が重要である。

小児麻痺 (ポリオ)

定義

小児麻痺あるいはポリオは、エンテロウイルス属のメンバーであるポリオウイルスにより起きる感染症である。ポリオウイルスには、3種類の血清型 1, 2 および 3 型が存在する。感受性ヒト細胞の特異的蛋白質レセプターがウイルス吸着および侵入をつかさどる。ポリオウイルスは、咽頭、扁桃、頸部リンパ節および小腸の細胞に感染する。いったん腸管感染が成立すると、ポリオウイルスは血液脳関門を介した侵入あるいは神経線維を介した伝達により中枢神経組織(CNS)へ侵入する。

免疫を持たないヒトがポリオウイルスに感染した場合、無症状、軽度の症状、無菌性髄膜炎から麻痺を伴うポリオまで、さまざまな症状を呈する(3)。感染者の約 1%に神経症状が認められる。潜伏期間は 4~35 日であるが、通常は 7~14 日の間とされる。初期症状として、発熱、疲労、頭痛、嘔吐、便秘、肩こり、手足の痛み、が含まれる。ポリオウイルスは、運動神経細胞で増殖し細胞を破壊することにより、感染した神経細胞支配下の筋肉の恒久的な麻痺をもたらす。

伝播経路

ポリオウイルスは、感染初期には上気道からの飛沫を介して、より一般的には、衛生状態が良くない環境において、感染性を有する糞便材料を経口摂取することにより、ヒトからヒトへ伝播する(4)。

ポリオウイルスの性質

感染後、ポリオウイルスは、無症状の感染者においても、咽頭に 1~2 週間、血液中に約 1 週間、糞便中に 1~2 ヶ月の期間認められる。死亡した感染者の剖検材料においては、糞便、腸管内容物、リンパ節、脳および脊髄組織から、ポリオウイルスが回収される。

感染者の 1%以下が麻痺性ポリオを呈する。流行期のあいだは、臨床的には健康な多くの子供がポリオウイルスを排出している。環境中のポリオウイルスの存在は、ヒト集団における最近のポリオウイルス感染の直接的な結果である。土壌は、住居の近隣におけるヒトの排泄、未処理あるいは不適切な処理を施した下肥や下水による作物への施肥、灌漑のための排水の再利用の結果、ポリオウイルスに汚染されることがある。表層水(地上の流水)は、未処理あるいは不適切に処理された下水の流出により、あるいは、汚染された土壌からの溶出により汚染することがある。

ヒトはポリオウイルスの唯一の自然宿主である。ヒト以外の高等霊長類(チンパンジーやゴリラ)は、ポリオウイルスに感染・発症しうるが、ヒトへの感染なしにポリオウイルスの伝播を維持するには個体数が少なすぎる(5)。

ポリオウイルスの残存

ポリオウイルスは、一般的な実験室の消毒剤であるアルコールやクレゾールによる不活化に対して耐性である。ポリオウイルスは、50℃以上の温度、オートクレーブあるいは焼却により、速やかに不活化される(3)。希釈したホルムアルデヒド溶液、遊離塩素剤(漂白剤)、紫外線照射、加熱乾燥により、ポリオウイルスは容易に不活化される。付着した有機物の存在により、ポリオウイルス不活化の速度は低下する。ポリオウイルスを取扱っている実験室における消毒には、塩素系漂白剤(0.5%)が薦められる。

安定した実験室の条件下では、臨床および環境に由来する検体中のポリオウイルスは、凍結保存で数年、冷蔵保存で数ヶ月、室温で数日か数週間残存する。

自然界におけるポリオウイルス不活化の速度は環境に強く影響される。冬期には20日ごと、夏期には1.5日ごとに、土壌中のポリオウイルスの感染性は90%減少し、常温において、下水では26日ごと、真水では5.5日ごと、海水では2.5日ごとに90%減少する。

ポリオワクチン

ポリオに対する防御免疫は、予防接種あるいはポリオウイルスの自然感染により付与される。免疫は、ポリオウイルスの血清型に特異的である。発症防御効果は、血流中の抗体に依存しており、ウイルスの中樞神経組織への伝達を阻止する。感染防御は、血中抗体および腸管や上気道上の分泌型抗体と関連している。

弱毒化経口ポリオワクチン(OPV)および注射による不活化ポリオワクチン(IPV)はいずれも、麻痺性ポリオに対する予防効果を有する。しかし、どちらのワクチンもポリオウイルス感染および再感染を完全に防ぐ効果はない。IPVは、血中の感染防御抗体を誘導し(液性免疫)、それにより、腸管のポリオウイルスが中樞神経組織に侵入・増殖することを防ぐ。北ヨーロッパで使われていたIPVは、効果的に野生株ポリオウイルスの流行をなくすことに成功した(8, 9)。腸管で増殖するウイルスを含むOPVは、更に腸管でのウイルス増殖を抑制する粘膜免疫を誘導する。その結果、糞便中への排泄ウイルス量の減少により、他者へ伝播しにくくなる。このことが世界ポリオ根絶計画にとって、OPVの重要な選択要因となっている。ポリオ根絶計画に参画している多くの国々で、OPVの使用により野生株ポリオウイルス流行は効果的に抑えられてきた(10)。

一方、生ワクチンであるOPVは、250万接種に1例程度の割合で起きるワクチン由来麻痺性ポリオ(VAPP)に関与している。B細胞欠損を有する免疫不全患者は、より長期間ウイルス排泄しつづけ、排出するポリオウイルスの遺伝子変異の蓄積をもたらす(12)。これまでに、19例このような症例が認められている。十分な免疫を持たない集団における、ワクチンポリオウイルスの、より長期間の継続的なヒトからヒトへの伝播は、神経病原性や伝播能が野生株ポリオウイルスと同等となるような遺伝子変異をもたらす可能性がある(13)。このようなウイルスは、自然界に存在するポリオウイルスと同様のリスクをもたらす。

野生株ポリオウイルス伝播の停止

ポリオは、1950年代中頃の予防接種の登場以前には世界中で発生していた。ポリオ患者数を減少させるのに予防接種はきわめて効果的であった(14)。さらに、ポリオ根絶計画では改良した小児への定期接種および戦略的な OPV の使用により、大流行地でも患者数は減少した。野生株ポリオウイルス伝播を遮断するというコンセプトは、予防接種によりワクチン株で感受性ヒト宿主を奪いつくした時点で、野生株ポリオウイルス伝播は終息する、という仮定に基づいている(16)。多くの国でポリオ症例は減少し続けており、続々とポリオウイルスの遺伝学的な関連性が消失してゆくことは、ポリオウイルスのヒトからヒトへの伝播の遮断が達成可能であることを示している。

封じ込めの理論的根拠

1977年に天然痘が根絶されてから1年以内に、天然痘実験室に関係した2例が英国で起きた。第1例は実験室のすぐ上に位置する部屋で働いていた。2名が亡くなった。第1例は感染により、実験室の責任者は事故の責任により自殺した(17)。ポリオが根絶された場合、同じように野生株ポリオウイルスが、実験室から、次第に増加する感受性集団へ伝播することがないように、あらゆる努力が払われるべきである。

理論的には、ポリオウイルスは実験室外部の人間に感染するかもしれない。つまり下水へ流れ込む汚染した実験室廃水、ゴミ埋め立て地へ送られる固形ゴミ、周辺への排気、汚染した作業者の皮膚や衣服、を介してである。しかし、自然感染や予防接種により得られた高いレベルの免疫が維持されている状態では、このような伝播経路を特定することは、きわめて困難である。

より容易に確認できるのは、一般社会への伝播の可能性となりうる実験室作業者のポリオウイルス感染である。1941年から1976年にかけて、2例の死亡例を含む12例の実験室感染ポリオ症例が記録されている(18-21)。これらの症例のうち、7例については公表されていない。ほとんどの症例は、ワクチン導入前、細胞培養の登場以前に起きている。

1941年に発表された実験室感染の最初の症例は、サルに感染するため用意していた感染組織を洗浄し、すりつぶす作業の結果感染したと考えられるポリオ症例であった(22)。1943年には、マウスへの感染を試みている際、2名の実験室作業者が標準株である Lansing (Amstrong) 株に感染した。他に報告されている実験室作業者のポリオ症例は死亡例であり、1例は米国、他は南アフリカの症例であった(25)。

ワクチンが導入されて以降、実験室感染の報告が少ないという事実は、ワクチンの有効性および実験施設、技術および手技が大幅に改善されたことを示している(26,27)。しかし、最近の事例は実験室からのポリオウイルス伝播の可能性が依然として残されていることを示している。1992年、IPV製造に用いられた1型野生株ワクチンが、製造施設の従業員から、彼の幼い息子へ伝播したことが確認された(28)。他の事例では、ある小児が、研究やIPV製造に一般的に用いられている3型標準株に感染していたことが報告されている。この事例の感染源は不明である。

IPVは、疾患を予防することに関しては、きわめて有効であるが、実験室作業者の潜伏感染を防ぐこととは出来ないと考えられている。OPVは効果的なバリアーであるが、それでも潜伏感染が起きる可能性がある。実験室作業者におけるポリオウイルスの不顕性感染の頻度は明らかではない。

腸管感染そして糞便へのウイルス排泄を完全に抑えるワクチンが存在しない以上、実験室作業者のポリオ感染および伝播の予防のため、適切なバイオセーフティ対策が重要となる。完璧な封じ込めを想定することはできない。故意であるか否かに関わらず対策が遵守されない

懸念は残る。しかし、効果的な封じ込め、すなわち、一般社会への不用意なポリオウイルス再侵入のリスクを減らすことは現実的な目標となる。

定義

ポリオウイルス(Box 1)

ポリオウイルスは、特異的抗血清を用いた標準的な中和試験により同定される。3種類の血清型からなるポリオウイルスは、ヒトエンテロウイルスの中で固有の遺伝子群を形成している。そして特異的な宿主細胞レセプター(PVR:CD155)への結合により感染が誘導される。他のエンテロウイルスのなかにも急性弛緩性麻痺に関与するものがあるが、ポリオウイルスではなく、PVRには結合しない。

野生株ポリオウイルスは、感受性ヒト集団では、いつまでも伝播しつづける。分子生物学的研究により、野生株ポリオウイルスのカプシド配列の系統は、ウイルス伝播ルートに従い維持されるが、非カプシドおよび非翻訳領域配列は、伝播しているうちに他のエンテロウイルスとの組換えより交換される可能性がある。結果として、カプシド以外の塩基配列による「ポリオウイルス」の同定は、妥当性を欠くであろう。

伝播しているすべてのポリオウイルスでは遺伝子変異が起きる。VP1領域の変異は、野生株ポリオウイルス分離株の遺伝子型と系統を識別するための基本となる。遺伝子変異により、OPV由来分離株を分類することが可能である。VP1全領域の塩基配列の相同性が親株であるOPV株から0-1%の範囲の変異であれば、一般的なウイルスの排出か限定的なヒトからヒトへの伝播を意味する。変異の範囲が1-15%であれば、OPV由来ポリオウイルス(VDPV)流行に関与する分離株として位置づけられ、長期間の伝播および麻痺性疾患を起こす能力に関与している(13)。

封じ込め目的には、現時点で国家検定機関によりOPVとしての使用が承認された株以外のすべてのポリオウイルスは野生株とみなされる。広く解釈すれば最近ワクチン接種を受けた人の臨床材料にはごく普通に含まれるOPV類似ウイルスは「野生株ではない」と考えられる。ポリオウイルスは、現時点でのワクチン接種者に由来する臨床材料に認められる通常のOPV由来ウイルスも含まれる。「野生株ではない」ポリオウイルスを用いて作業しようとする実験室は、信頼できる認可済みのOPV保存株を用いるべきである。

世界中ほとんどの地域では、認可済みのOPV株は、弱毒化Sabin由来(SO)株1型(LiおよびSchaefer), LS-c, 2ab/KP3; 2型(FoxおよびGelfand) P712, CH, 2ab/KP2; 3型(KesselおよびStimpert) Leon 12a,b/KP4である(7)。中国では、認可されている2型および3型のOPV株は、それぞれ、Zhong IIおよびZhong IIIである。

文献上弱毒化されていると記載されている他の株もある。そのうち、いくつかの株については広範な臨床試験が行われた。しかし、現行の認可済みのOPV株のみ長年の経験でヒト集団では弱毒化に関する数多くの証拠を有している。

現在不活化ポリオウイルスワクチン(IPV)の製造のために用いられているポリオウイルス株は、1型 Mahoney (スウェーデンでは Brunenders)、2型(MEF1)および3型(Saukett)である。3

株とも野生型である。弱毒化 Sabin 株から製造される IPV は、現在開発中である。

Box 1: ポリオウイルスの定義

ポリオウイルス: (well-defined) 明確に同定可能な 3 種の血清型からなるヒトエンテロウイルスで、特異的レセプターである PVR:CD155 を介して細胞に感染する。

野生株ポリオウイルス: 一般社会で持続的に伝播していたことが知られている、あるいは、伝播していたと考えられているポリオウイルス分離株、あるいはそれらの分離株に由来する参照株。

経口ポリオウイルスワクチン(OPV)株: 国家検定機関により経口ワクチンとしての使用が認可された弱毒化ポリオウイルス。未認定株は野生株とみなす。

OPV 様ポリオウイルス: 限られた期間のウイルス排泄、あるいは、限られた期間のヒトからヒトへの伝播に由来するポリオウイルス分離株。通常、親株である OPV からの VP1 全領域の変異率が 1%以下であることにより同定される。塩基配列は決定されていないが、WHO の推奨する 2 種類の型内鑑別試験により OPV 様ウイルスであることが示された分離株を含む。

ワクチン由来ポリオウイルス(VDPV): 通常より長期間のウイルス排出、あるいは、通常より長期間の地域社会でのウイルス伝播に由来するポリオウイルス分離株。通常、親株である OPV からの VP1 全領域の変異率が 1-15%であることにより示される。VDPV は、ポリオ根絶および封じ込めの目的の上では、野生株として分類される。

材料は、さらに、野生株ポリオウイルス感染性材料およびその可能性のある材料に区分される。これら両方のカテゴリーに含まれるのは、臨床および環境に由来する材料およびこれらの材料に由来する実験室産物である。

野生株ポリオウイルス感染性材料 (box 2)

野生株ポリオウイルス(VDPV を含む)は、様々な臨床材料、一般的には糞便や咽頭に由来する検体、まれに血液に存在しているかもしれない。非麻痺性のあるいは麻痺性の感染において、は髄液中に存在することは非常にまれである。致死的な感染の場合、野生株ポリオウイルスは、糞便、腸管内容物、リンパ節、脳組織、脊髄組織に存在する可能性がある(29)。ポリオウイルスは、中和抗体が現れる前の感染後 1 週間程度血中に存在している。しかし中枢神経障害の臨床症状が発現してからは、血中に見いだすことは稀である。急性ポリオを発症した患者に由来する上記臨床材料はすべて、ウイルスの存在が確認されていなくとも、感染

性を有するものとみなされる。

下水や上水等、環境中の検体に含まれる野生株ポリオウイルスは、ヒト集団におけるポリオウイルスの存在に対応している。下水中のウイルス含有量は、多くの環境要因により、大幅に変動する可能性がある。

感染性実験室産物には、ウイルス保存株、野生株ポリオウイルスが感染した培養細胞、ヒト以外の霊長類およびトランスジェニックマウスに由来する材料が含まれる(30)。

Box 2:野生株ポリオウイルス感染性材料の定義

野生株ポリオウイルス(VDPV を含む)感染確定例からの臨床材料、野生株ポリオウイルスが存在する環境中の下水、環境水、および、これらのウイルスを増殖させた実験室産物で、以下を含む。

- 培養細胞での分離株、標準株、不活化ワクチンの種ウイルス
- PVR トランスジェニックマウスを含む感染動物および感染動物由来の検体
- 実験室で作製された野生株ポリオウイルスに由来するカプシド配列を有する誘導體
- 野生株ポリオウイルスに由来するカプシド配列を含む全長 RNA および cDNA
- 野生株ポリオウイルスに由来するカプシド配列を有する野生株ポリオウイルス株持続感染細胞

野生株ポリオウイルスを含む可能性のある材料 (box 3)

野生株ポリオウイルス感染のうち少なくとも 99%は顕性の麻痺性疾患を起こさないが、糞便中や気道分泌物に多量の野生株ポリオウイルスが排泄される可能性がある。ポリオが常在している地域の流行期には、健常児の便から野生株ポリオウイルスが 8 - 19%の割合で分離されることが報告されている(31,32)。糞便、咽頭および環境に由来する検体が保管収集されている研究室は、検体の処理方法、保管歴、由来国名、採取年度、当該国における最後の地域固有の野生株ポリオウイルスが得られた時期に基づいて、該当する材料に野生株ポリオウイルスが存在する可能性について検証するべきである。(Annex 1) 上記検体に由来する、細胞より分離された未同定のエンテロウイルス様分離株、および、型別を行っていないポリオウイルスは、何らかの方法で確認されるまでは、野生株ポリオウイルスを含む可能性のある材料と見なされる(33)。流行期の小児からの凍結糞便検体は、おそらくもっとも高い確率で感染性野生株ポリオウイルスを含んでいる。ポリオが常在している地域で、他の目的のため採取された血液および髄液は、感染性ポリオウイルスを有する可能性が低いので、野生株ポリオウイルスが含まれる可能性のある材料とは見なされない。

Box 3: 野生株ポリオウイルスを含む可能性のある材料の定義

由来が不明、あるいは、野生株ポリオウイルス(VDPV を含む)が存在していたと疑われる時期および地域(Annex 1)において、目的の如何を問わず集められた、糞便、呼吸器分泌物、環境中の下水および未処理の環境水検体。同じく、これらの感染性材料をポリオウイルス感受性細胞あるいは動物へ感染させた実験室産物で、以下を含む。

- ポリオウイルスおよびエンテロウイルスかどうか検査されていないもの。
- 同定されていないエンテロウイルス様細胞培養分離株
- 型内鑑別されていないポリオウイルス分離株

野生株ポリオウイルスを取扱っている、あるいは過去に取扱ったことのある実験室では、野生株ポリオウイルスを含む可能性のある材料にポリオウイルスに汚染された他のウイルスの実験室保存株、とりわけライノウイルス、エンテロウイルス、Sabin ワクチン株、が該当する。適切な実験室操作(GLP)の一環として、実験室のすべてのウイルス保存株について、きちんとした由来純度の確認が要求される。

野生株ポリオウイルス実験室封じ込めのための行動計画

野生株ポリオウイルスの実験室封じ込めの目的は、実験室から一般社会へのポリオウイルス野生株の再侵入のリスクを最小限とすることにある。ポリオ根絶計画の異なる段階においてリスクの本質が変化する観点から、封じ込め計画は、三つの段階に分けられている。各段階の実行計画は、定められた根絶目標の達成状況による。第1段階-実験室の調査および国内保有記録の作成-では、封じ込めに向けた最初の段階を説明する。すなわちポリオフリーの国・地域の数が増加している時期に該当する。第2の段階-世界的な根絶認定-では世界中どの地域においても野生株ポリオウイルス分離されずに1年が経過したときから実行に移し、2年目が経過するまで有効とされる封じ込め要件について述べている。世界的な根絶認定が提出されるために、第2段階の封じ込めの状態の実施についての証拠書類が、次の3年目に作成される必要がある。野生株ポリオウイルスから製造されるIPVの安全な製造および品質管理のための特別なバイオセーフティのガイドラインは、本稿とは別のWHO資料で取扱われている(2)。世界根絶認定の時点での封じ込めの条件は、一般的な予防接種の推奨が有効である限り、依然として有効である。第3の段階-世界的ポリオ根絶認定後-では、世界中でOPV定期接種を停止し、野生株とSabin株を対象としたより厳格な封じ込めの必要性が想定される世界的ポリオ根絶認定以降の時期について述べる。(Box 4)

Box 4: 封じ込めと世界ポリオ根絶の進展	
ポリオ根絶へ向けての進展	封じ込めの段階
世界的に野生株ポリオ症例が減少中	I. 実験室の調査と保有記録作成の段階
世界的に野生株ポリオ症例が報告されず 1年が経過	II. 世界的根絶認定の段階
世界的に野生株ポリオ症例が報告されず 2年が経過	
世界的に野生株ポリオ症例が報告されず 3年以上が経過	<ul style="list-style-type: none"> ● 封じ込めの実施 ● 封じ込めの完了およびその証明の提出 ● 世界ポリオ根絶の確認
世界的根絶認定後の予防接種戦略の確立	III. 世界的根絶認定以降の段階