

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組換え産物
- 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

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について検査されていない実験室産物
- 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

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⁾

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，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。

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，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 ワクチン株が野生株ポリオウイルスを含む可能性のある材料に該当する。^{34, 35)} 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，きちんとした由来および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という観点から，封じ込め計画は，三つの段階に分けられている。封じ込めの各段階における計画は，定められた根絶目標の達成状況により実行される。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規定する。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施行され，2 年目が経過するまで有効とされる封じ込めの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に関する証拠書類が，引き続き 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 文書で取扱われている。²⁾ 世界根絶認定の時点での封じ込めの条件は，世界的な予

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
野生株ポリオ症例が世界的に減少中	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 世界的に野生株ポリオ症例が報告されず2年が経過	II. 世界的根絶認定の段階 ● 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
世界的に野生株ポリオ症例が報告されず3年以上が経過	
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

防接種の推奨が行われている限り、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)

実験室の調査および国内保有記録作成

本段階は、ポリオフリーの国・地域の数が増加するが、世界のどこかの地域において野生株ポリオウイルスが伝播し続けている時期である。各国は、

1. 野生株ポリオウイルス感染性材料あるいは野生株ポリオウイルス感染可能性のある材料を保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の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。(Annex 3)
4. 世界ポリオ根絶認定についての準備を行う。

野生株ポリオウイルス感染性材料あるいは野生株ポリオウイルス感染の可能性のある材料を保管しているすべての研究所/実験室に関する、国家、地域および世界的な調査記録は、野生株ポリオウイルス伝播が終息した際の世界的な実験室封じ込めの基盤となる。この段階における4つの基本的な活動について以下に述べる。

1. 実験室の調査

国ごとの調査の目的は、野生株ポリオウイルス感染性材料あるいはその可能性のある材料を保管しているすべての

研究所/実験室を特定することにある。この調査のおもな役割は、すでに必要とされていない材料の廃棄を促すことにある。国ごとの調査は段階的に行われ、WHOから各国政府への通知に始まり、厚生省あるいは他の関係省庁を通じて、各部署、研究所、個々の実験室へと進められる。上記感染材料を保有する多くの実験室は、保健医療分野以外にも存在する。従って国ごとの調査の達成には、厚生省が、文部省、防衛庁、環境省等、他省庁の協力を取り付けることが必要である。(box 5) 広範囲の分野にわたる国家的な調査の計画・実行、そしてこれらすべての活動が達成されていることの証明のため、各国は国家的な対策委員会あるいはコーディネーターを任命する必要がある。

多くの様々な実験室が、野生株ポリオウイルス感染材料あるいは、野生株ポリオウイルス感染の可能性のある材料を保管している可能性を有する。このような実験室を特定するためには、国家的な実験室登録、登録認定制度、専門家組織、国あるいは民間のバイオセーフティに関するネットワーク、および他の情報源に照会することが必要となる。野生株ポリオウイルス感染材料を保有している可能性のある実験室の種類を以下に示し、box 5に要約した。

ポリオウイルス/エンテロウイルス実験室：現在ポリオウイルスを取扱っている、あるいは、過去に取扱った実験室は、野生株ポリオウイルス材料を保管している可能性がある。研究あるいは、検査機能を持つこのような実験室の多くは、大学や政府の保健医療機関に認められる。

一般的なウイルス実験室：必ずしもポリオウイルス実験室と特定されていないウイルス実験室においても、野生株ポリオウイルス/エンテロウイルスを扱っている可能性がある。過去に、検査、研究あるいは教育実習のために、これらのウイルスを扱っていた可能性を有する検査あるいは公衆衛生に携わる実験室は、ポリオ流行期あるいはポリオ輸入症例の検査に由来するポリオウイルス分離株や臨床材料

Box 5 : 野生株ポリオウイルス感染性材料および感染の可能性のある材料を保有している可能性のある部門、組織/施設および実験室

部門の種類	機関あるいは施設の種類	実験室の種類
保健医療	生物学的標準/品質管理機関	ウイルス学
教育	医科学研究施設	細菌学
防衛	大学	寄生虫学
環境	細胞, 病原体等の収集施設	消化器病学
農業	環境に関わる機関 (上水/下水)	病理学
科学技術	病院/診療所	分子生物学
国土・土木部門	軍の施設 (保健医療, 研究)	栄養学
	製造施設 (生物製剤, ワクチン, 消毒剤)	遺伝学
	公衆衛生機関	環境学
	国土・土木に関わる機関	獣医学
		医学

を保管しているかもしれない。いくつかの実験室は、コントロールあるいは参照品として複数のウイルス株を保管しているかもしれない。教育機関は、実習の材料として野生株ポリオウイルスを保有している可能性があり、ウイルス研究に関わる実験室は、生物学、生化学およびウイルスの遺伝的性質の研究のために、ポリオウイルス保存株や感染性材料を保有しているかもしれない。このような実験室は、公衆衛生に関わる研究所、国の品質管理機関、医療機関、民間施設、研究教育機関を含む多くの組織に認められる。

環境検査に関わる実験室：環境に関わる実験室は、野生株ポリオウイルスで汚染された材料（下水や環境水の検体；box 3）を保有している可能性があり、また、参照株やコントロールとして、野生株ポリオウイルス分離株を保有している可能性がある。

産業分野の実験室：ワクチン製造業者は、IPV 製造のため、また、しばしばOPVの品質管理試験のため、野生株ポリオウイルスを保有している。このようなワクチン製造に関わる実験室は、さほど多くはなく、国の管理当局により把握されている。WHOは、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特別なガイドラインを作成した。²⁾ 消毒剤やフィルターの製造業者のような、関連企業は、ウイルス不活化試薬の有効性を調べるための参照標準品として、野生株ポリオウイルスを使用している可能性がある。

野生株ポリオウイルスを含む可能性のある材料を保管している実験室を特定するのは、より困難である。これらの材料は、ポリオウイルス検査と無関係の目的で集められた

臨床および環境に由来する様々な検体を含む。たとえば、ある種の実験室は、野生株ポリオウイルスが流行している地域および時期に下痢症の研究のため集められた糞便検体を保有している可能性がある。

これまでに述べたすべてのカテゴリーの実験室は、野生株ポリオウイルスを含む可能性のある材料を保有している可能性を有する。他の実験室で、このような材料を保持している可能性があるのは、(民間および国立の)病院、学術研究施設あるいは民間部門に属する臨床細菌学、寄生虫学、病理学、消化器病学、栄養学の実験室が含まれる。このような観点から、腸管疾患、コレラ、寄生虫感染症あるいは栄養学の研究室は、とくに重要である。(box 5)

各実験室は、野生株ポリオウイルス感染性材料を保有するか、野生株ポリオウイルスを含む可能性のある材料の定義に該当するものについて徹底的な調査を行うべきである。野生株ポリオウイルス感染性を有する可能性のある材料を保管する実験室は、材料を収集した場所と日時について検証する必要がある。その国で最後に確認されたポリオ症例の1年後には、その地域の検体は、ポリオウイルスフリーであると見なされる。(Annex 1) 経験上、最後のポリオ症例の前に、広範囲のウイルス伝播は、ほぼ終息することがわかっている。その時期以降に、偶然に野生株ポリオウイルス陽性検体を採取する可能性はわずかである。

各実験室は、いかなる野生株ポリオウイルスについても、保管する必要性を注意深く検討する必要がある。実験計画上あるいは研究の目的上不必要であるすべての材料について廃棄する必要がある。多くの診断試験では、野生株ポリ

オウウイルスは、OPV 株や不活化抗原あるいは非ポリオエンテロウイルスにより代替が可能である。もし、野生株ポリオウイルスが必要であれば、遺伝子解析により容易に同定できるウイルスのみを用いるべきである。野生株ポリオウイルス感染性材料あるいはその可能性のある材料を保管している実験室は、各国の調査記録にリストアップされているはずであり、バイオセーフティレベル-2/polio (BSL-2/polio) 基準に基づいて運用されるべきである。

ポリオウイルス、エンテロウイルス、ライノ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は、すべてのウイルス保存株、標準株およびポリオウイルス感受性培養細胞で増殖した、上記ウイルス産物の特定を行うべきである。由来が不明あるいは多くの継代歴を有する保存株は、実験者自身あるいは国際的なウイルス収集機関により安全が確認された保存株と置き換えるべきである。適切な標準技術により保管されているウイルス保存株の同一性を確認する必要がある。野生株ポリオウイルス参照株は、認定済 Sabin 株 (WHO が由来を認定した Sabin 株) で置き換えるべきであり、実験計画上の価値ない残ったすべてのウイルス材料を廃棄する必要がある。

2. 国内保有記録の作成

国内保有記録の目的は、野生株ポリオウイルス感染性材料あるいは野生株ポリオウイルスを含む可能性のある材料を保有している実験室の所在を明らかにすることにより、ポリオフリー地域の認定のための国ごとの必要条件を満たすことにあり、また、最後の野生株ポリオウイルスが検出されてから1年以内に適切な封じ込め手順の開始を通知するための最新の実験室リストを更新することにある。

国内保有記録は、各国政府により維持管理され定期的に更新されるその時点における記録である。附帯する資料を含む完成した国内保有記録は、当該国の国内根絶委員会における評価および承認のために準備、提案され、ポリオ根絶認定のための資料の一部として地域ポリオ根絶認定委員会へ提出される。

野生株ポリオウイルス感染材料あるいは野生株ポリオウイルスを含む可能性のある材料を保管している実験室の国内保有記録は、WHO 地域事務局により作成される地域ごとの保有記録として取りまとめられる。WHO 管轄6地域すべての保有記録は、WHO 本部により作成される全世界の保有記録にまとめられる。

3. BSL2/polio の適用

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持しているとして国内保有記録に掲載された実験室は、バイオセーフティレベル-2/polio (BSL-2/polio) 基準のもとで作業する必要がある。BSL-2/polio

が必要とされる目的は、世界の多くの地域でポリオウイルス伝播が減少しつつあり、世界中の多くの地域でもはやポリオが存在しない状況において、実験室から一般社会への野生株ポリオウイルス再侵入のリスクを減少させることにある。強化された BSL-2/polio は、標準的な BSL-2 基準に野生株ポリオウイルスのための追加条件を加えたものである。

BSL-2 は、適切に整備された基本的な微生物実験室における優良な微生物学的作業として説明することができる。

BSL-2 特有の基準については、WHO *Laboratory Biosafety Manual* (第3版, 2003) に記載されている。³⁶⁾ 簡単に述べると、BSL-2 は、安全な実験室作業、適切な消毒、滅菌、ゴミの廃棄方法、および、危険性を減少あるいは除去するために設計された設備の有効性および使用方法を含んでいる。基本的な微生物学実験室として、実験室に設置されたオートクレーブ、開放系で感染性材料を取扱う場合は必ず使用する認定済のクラス1あるいはクラス2の生物学的安全キャビネットによって構成される。陰圧の機械的室内空調システムを有することが望ましい。

BSL-2/polio は、野生株ポリオウイルスを保有する実験室において特に、以下のような予防措置を含む。

- 作業手順：実験室への立ち入りは制限される。サポートスタッフ（清掃、保守作業員等）を含む、実験室へ入るすべての要員は、国内の予防接種方針に従って、IPV あるいは OPV により予防接種を受ける。野生株ポリオウイルスの正確な記録を保管する。開放系で野生株ポリオウイルスあるいはそれを含む可能性のある材料を取扱う場合は必ず、認定済のクラス1あるいはクラス2の安全キャビネットを用いる。
- 保管：野生株ポリオウイルスは、立ち入りが制限された安全な区域に保管する。フリーザーは施錠し、特定の人員のみに鍵の使用を制限する。フリーザー内容物の詳細な保管記録および、取り出しと受け入れに関する記録を保管する。保管されている野生株ポリオウイルス材料は、はっきり分かるよう表示する。フリーザーは、BSL-2/polio かそれと同様の施設内に設置することが望ましい。
- 材料の移動：野生株ポリオウイルスあるいはそれを含む可能性のある材料をフリーザーから移動する場合、漏出や破損がないよう十分注意する。すべての材料は、漏出が起きた場合消毒可能な、漏出や破損のおそれがない2次容器中で運ぶ。実験室は、フリーザーへの材料の安全な出し入れに関する特定の標準作業手順書 (SOP) を用意する。SOP には、材料の移動中に起きうる漏出、破損および事故に対応するための明確な手順を記載する。

Box 6：野生株ポリオウイルスに対するバイオセーフティの追加必要条件（BSL-2/polio）

WHO Laboratory biosafety manual 第3版³⁶⁾に概説されたBSL-2バイオセーフティ基準に追加して、BSL-2/polio施設は以下の基準を含む。

作業手順

- 実験室への立ち入りは制限される。
- 実験室へ立ち入るすべての人員は、ポリオに対する予防接種を受ける。
- 野生株ポリオウイルス感染性材料あるいは感染の可能性のある材料を開放系で取扱う場合は必ず、認定済のクラスIあるいはIIの生物学的安全キャビネットを用いて行う。

保管

- 野生株ポリオウイルス感染材料あるいは感染の可能性のある材料は、立ち入りが制限された安全な区域に保管する。
- フリーザーおよび冷蔵庫は、特定の人員のみに鍵の使用を制限した上で施錠し、野生株ポリオウイルス材料を含むことを明示する。
- フリーザーの保管記録は、材料の状態、容量あるいは数量フリーザー内の場所を含む最新かつ完全なものとする。
- 保管記録は、検体の地理的由来と収集した日時を含む、すべての材料に関する最新の記録とする。

感染材料の移動

- 感染材料のフリーザーからの出し入れは必ず、漏出および破損のおそれのない2次容器中で行う。
- 標準作業手順（SOP）を作成し、漏出、ウイルス保管容器の破損、ウイルスが放出される可能性のある事故への対応について定期的な訓練を行う。

BSL-2/polioの必要条件について、box6に要約しAnnex 3に詳述した。

世界的根絶認定作業の準備

各国は、国内保有記録にある実験室と定期的に連絡を取る体制を作り、野生株ポリオウイルス伝播の終息に向けた進展状況、最新の保有記録の必要性、バイオセーフティに関する勧告の変更について定期的な通知を行う。今後、これらのルートは、適切なバイオセーフティ基準を適用する日時を各実験室へ通知するために使われる。WHOからの通告以降、世界的根絶認定の基準を適用するまでの期間は、1年間しかない。そのため前もって十分に準備しておく必要がある。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残すことを決めた国々は、指定された実験室が施設およびスタッフの訓練に関して適切なバイオセーフティ基準に適合することについての確認作業を早急に開始する必要がある。

世界的根絶認定段階

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年が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医科学実験室に通知する。
2. 国内保有記録に記載された実験室に連絡し、以下の選択肢のうち一つを選ぶよう指導する。
 - ポリオウイルスを不活化するか、適切な方法により廃棄する。
 - 野生株ポリオウイルス感染性材料あるいは感染の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. 世界的ポリオ根絶認定のためのすべての封じ込め基準の完了についての証明を行う。

この段階における目標は、全体的な予防接種が継続し、世界のどの地域においても、もはや野生株ポリオウイルス伝播がない時点において、保管されたウイルス保存株や臨床材料に由来する野生株ポリオウイルス伝播のリスクを低下させることである。

Box 7 : 世界ポリオ根絶認定段階における野生株ポリオウイルス材料のためのバイオセーフティ基準		
材料の分類	実験室における作業	バイオセーフティ・レベル
野生株ポリオウイルス 感染性材料 (box 2)	保管を含む, 全作業	BSL-3/polio
野生株ポリオウイルスを含む 可能性のある材料 (box 3)	ポリオウイルス感受性細胞あるいは 動物を用いた作業	BSL-3/polio
	他の作業	認定済のクラス1あるいはIIの 安全キャビネット内での BSL-2/polio

1. ポリオウイルス伝播が終息した時点での実験室への通知

世界のどの地域においても野生株ポリオウイルス伝播が確認されず1年が経過した時点で、WHOは野生株ポリオウイルス伝播が終息したと考えられるということ、全世界に通知する。各国は、野生株ポリオウイルス伝播が終息したことを、一般の実験室コミュニティーに通知し、国内保有記録にリストアップされている部門/施設および実験室に、通知の日から1年以内、すなわち、最後の野生株ポリオウイルス検出の2年目の日までに、世界的根絶認定のためのバイオセーフティ基準を施行するよう求める。その次の年度には、各国は、効果的な封じ込めの用意ができたことを示す証拠書類を世界根絶認定委員会に提出する。(box 4)

2. バイオセーフティに関するオプションの適用

野生株ポリオウイルスの実験室封じ込めの基本原理は、ほとんどの実験室が、野生株ポリオウイルス感染性材料あるいはその可能性のある材料を長期間保管しておく必要性が無いことにある。この様な材料の廃棄が強く薦められる。

各実験室は、もはや自然界に存在しないウイルスを保管することによって個人あるいは施設に重要な責務が生ずることについて、真剣に検討すべきである。

必要とされる封じ込め基準を施行しない実験室は、すべての野生株ポリオウイルス材料を不活化、あるいは、オートクレーブ・焼却により滅菌するか (Annex 2)、適切な封じ込め基準に適合した実験室に感染性材料を移動しなければならない。

定義にしたがえば、ポリオウイルスが再流行するかVDPVが検出されない限り、世界的ポリオ根絶認定の段階で集められた臨床検体は、野生株ポリオウイルス感染性を有するものではない。実験室感染のおそれは、もっぱら野生株ポリオウイルス伝播が終息する以前に集められた保存材料に由来する。ごくわずかな実験室が、研究目的で野生株ポリオウイルス材料を保管していると予想される。

広範囲の研究施設における他の研究室が、疾患の研究のために野生株ポリオウイルスを含む可能性のある材料を、貴重な採取検体としての保管を望むことが予想される。このような材料を保管する実験室は、研究活動が行われるのに適したバイオセーフティ基準を施行する必要がある。(box 7) 野生株ポリオウイルス感染性材料 (box 2) は必ず、BSL-3/polio 基準に基づいて取扱われなければならない。野生株ポリオウイルスを含む可能性のある材料 (box 3) を用いたポリオウイルス感受性細胞や動物への接種 (ポリオウイルス増殖を伴う生物学的実験) はすべて BSL-3/polio 条件のもとで行う必要がある。

野生株ポリオウイルスを含む可能性のある材料を扱う他のすべて作業は、BSL-2/polio 実験室において、認定済のクラス1あるいはクラス2の安全キャビネットの中で、安全に行うことが可能である (box 6)。シールしたキャップあるいは遠心用安全キャップを用い、検体を安全キャビネット内で開けるのであれば、野生株ポリオウイルスを含む可能性のある材料を開放系の実験室で遠心分離することが可能である。

バイオセーフティレベル 3/polio (高度封じ込め実験室) は、近隣の地域、社会および環境における社会集団の防御に、より重点が置かれており、BSL-2 に関わるすべての基準を含んでいる。BSL-3/polio 固有の基準として、作業者の保護衣、実験室のデザイン、実験室機器の使用法、実験室要員の医学的検診が規定されている。実験室は、建物内において人通りが多い区域と区分されるべきであり、登録された要員にのみ立ち入りは制限されるべきである。WHO *Laboratory Biosafety Manual* (3rd edition, 2003)³⁶⁾ で示したように、バイオセーフティ設備に関しては、実験室を出入りする材料、空気、水に関して配慮する必要がある。

BSL-2 と BSL-3 のおもな特徴の比較について box 8 に示し、BSL-3/polio に関する詳細な記載は、Annex 4 に示した。

世界的根絶認定の時点で、野生株ポリオウイルス感染材

Box 8 : バイオセーフティレベル 2/polio (Annex 3) と 3/polio (Annex 4) のおもな特徴		
	BSL-2/polio	BSL-3/polio
適切な微生物学的手技	✓	✓
作業従事者		
・ 予防接種	✓	✓
・ 健康診断		✓
・ 保護実験着	✓	✓
施設		
・ 実験室の分離		✓
・ 立ち入り制限	✓	✓
・ 液体に対する表面防水	✓	✓
・ 除染のためのシーリング		✓
・ 陰圧空調		✓
・ HEPA 排気フィルター		✓
・ 認定された生物学的安全キャビネットクラス I あるいはクラス II	✓	✓
・ 区域内のオータクレープ	✓	
・ 室内のオートクレープ		✓
野生株ポリオウイルスの保管 (box 9)	✓	✓
国内保有記録への登録	✓	✓

料あるいは野生株ポリオウイルスを含む可能性のある材料を保有しているすべての実験室は、適切なバイオセーフティ基準 (box7) に適合し、以下の項目 (box9) を実行しなければならない。

- 作業手順：実験室への立ち入りは制限される。サポート要員（清掃、保守管理要員）を含む実験室に立ち入るスタッフ全員は、国内の予防接種方針に従い IPV か OPV による予防接種を受ける。野生株ポリオウイルス保存株の正確な記録を保管する。開放系での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の取扱いは、必ず認定済のクラス 1 あるいはクラス 2 の安全キャビネットで行う。
- 保管：野生株ポリオウイルス感染性材料は、伝播の潜在的リスクがないことが示された安全な条件のもとに保管する。感染材料が保管場所から取り出された時点で、リスクが生じる。そのため、感染材料は、出来れば封じ込め区域の内側で、立ち入りが制限された BSL-3/polio 施設内の施錠されたフリーザーの中に保管する。野生株ポリオウイルスを含む可能性のある材料は、それと分かるようにはっきりと表示し、立ち入りが制限された区域の施錠されたフリーザーに保管する。その上、保管記録を作成する。これらのフリーザーは、BSL-2/polio 施設内の実験室に設置することが望ましい。
- 材料の移動：BSL-2/polio に関して述べたとおり、感染性材料をフリーザーから安全キャビネットへ移動する場合には、漏出や破損を防ぐため、漏出および破損

のおそれのない 2 次容器を用いる必要がある。この操作は、野生株ポリオウイルスを含む可能性のある材料が実験室以外に設置されているフリーザーに保管されている場合、とくに重要である。実験手順書に、感染材料の移動時に起こりうる漏出、破損や事故に対応するための明確な手順について記載する。

3. 世界ポリオ根絶認定のための封じ込めに関する証拠書類のとりまとめ

各地域の根絶認定委員会は、世界根絶認定委員会へ、以下の事項を含む十分な証拠書類を提出しなければならない。

各地域の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管しているすべての実験室は：

- 適切なバイオセーフティ (BSL-2/polio あるいは BSL-3/polio) 基準を施行する。あるいは、
- WHO が認定した保管場所へ、材料を移動する。あるいは、
- 感染材料を不活化するか、適切な方法で廃棄する¹⁾。

封じ込めの証拠書類は、以下の項目を含む必要がある。

- 野生株ポリオウイルス感染材料あるいはそれを含む可能性のある材料を保管している全実験室をリストアップした最新の国内保有記録；
- 実験室調査および保有記録作成に関する精度評価；
- 野生株ポリオウイルス感染材料あるいはそれを含む可能性のある材料を保管している実験室が、必要な

Box9：世界ポリオ根絶認定のためのバイオセーフティの追加基準		
WHO Laboratory Biosafety Manual ³⁶⁾ で概説した BSL-2 あるいは BSL-3 のバイオセーフティ基準に適合することに加えて (box 7), 下記の感染材料を保有する実験室は, 世界ポリオ根絶認定の基準に適合するため, 以下の項目を適用しなければならない。		
	野生株ポリオウイルス感染性材料	野生株ポリオウイルスを含む可能性のある材料
保管場所	安全な区域, 出来れば BSL-3/polio 実験室内	施設内の安全な区域
証拠書類	すべての感染性材料について作成された最新の証拠書類で, 以下を含む。 ● 地理的な由来と採取/分離の日付 ● 採取検体の由来および性状 ● 細胞継代の履歴 ● 分離株のゲノム配列 ● 研究産物である場合, ウイルスの全体的な構造, 由来および性状	すべての材料に関して作成された, 完全かつ最新の証拠書類で, 以下を含む。 ● 地理的な由来および採取/分離の日付 ● 採取検体の由来および性状
作業手順	実験室への立ち入りは制限される 実験室に立ち入る全作業従事者はポリオに対する予防接種を受ける。 開放系での操作はすべて, 認証済のクラス I あるいは II の生物学的安全キャビネットを用いて行う。	
安全性	施錠可能なフリーザーに保管し特定の人員のみに鍵の使用を制限する	
材料	独自の識別番号および責任者の名前を付けて, 漏出のおそれのないスクリーキャップの容器で保管する	
フリーザーの保管記録	完全かつ最新の保管リストで, 以下を含む ● 材料の名称 ● 容量あるいは数量 ● フリーザー内の位置	
感染材料の移動	漏出および破損のおそれのない 2 次容器 漏出への対応に関する特定の作業手順	

バイオセーフティ基準に適合していることに関する証明。

世界ポリオ根絶認定委員会は, 根絶認定のアプローチとして, 封じ込めの評価および証明のための詳細について今後情報提供していく。

ポリオ根絶認定以降

ポリオ根絶認定以降

本稿は, ポリオ根絶の世界的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。世界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ための, 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, 刊行される予定である。

文 献

- 1) World Health Organization. Report of the Third Meeting of the Global Commission for the Certification of Eradication of Polio, 9 July 1998. Geneva : World Health Organization ; 1999 (WHO/EPI/GEN/981.17).
- 2) World Health Organization. Guidelines for the safe production and quality control of IPV manufactured from wild polioviruses. Geneva : World Health Organization ; (in press) for latest publication information visit [http : //www.who.int/biologicals/](http://www.who.int/biologicals/)
- 3) Melnick J. Enteroviruses : polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In : Fields BN, Knipe DM, et al. Virology. 3rd edition. Philadelphia : Lippincott-Rosen ; 1996. p. 655-712.
- 4) Benenson AS, editor. Control of communicable diseases manual. 16th edition. Washington DC : American Public Health Association ; 1995. p. 370.
- 5) Dowdle WR, Birmingham ME. The biologic principles of poliovirus eradication. *Journal of Infectious Diseases* 1997 ; 175(Suppl 1) : S286-92.
- 6) Ghendon Y, Robertson SE. Interrupting the transmission of wild polioviruses with vaccines : immunological considerations. *Bulletin of the World Health Organization* 1994 ; 72: 973-83.
- 7) Sutter RW, Cockhi SL, Melnick JL. In : Politkin SA, Orenstein WA, editors. Vaccines. Philadelphia : W.B. Saunders ; 1999. P. 365-408.
- 8) Bijkerk H. Surveillance and Control of Poliomyelitis in The Netherlands. *Reviews of Infectious Diseases* 1984 ; Vol 6, Suppl 2: S451-S457.
- 9) Lapinleimu K. Elimination of Poliomyelitis in Finland. *Reviews of Infectious Diseases* 1984 ; Vol 6, Suppl 2: S457-S460.
- 10) CDC. Progress Toward Global Eradication of Poliomyelitis 2002 2003 ; 52(16) ; 344-369.
- 11) Strebel PM, Sutter RW, Cochi SL, Biellik RJ, Brink EW, Kew OM, Pallansch MA, Orenstein WA, Hinman AR. Epidemiology of poliomyelitis in the United States : One decade after the last reported case of indigenous wild virus-associated disease. *Clinical Infectious Diseases* 1992 ; 14: 568-579.
- 12) Kew O, Sutter R, Nottay B, et al. Prolonged replication of a type 1 vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient. *Journal of Clinical Microbiology* 1998 ; 36: 2893-9.
- 13) Kew OMV, Morris-Glasgow M, Landaverde C, Burns J, Shaw Z, Garib J, et al. Outbreak of poliomyelitis in Hispaniola associated with circulating type 1 vaccine-derived poliovirus. *Science* 2002 ; 296,5566: 356-9.
- 14) World Health Organization. Progress towards the global eradication of poliomyelitis, 2001. *Weekly Epidemiological Record* 2002 ; 13: 98-107.
- 15) World Health Organization. Expanded Programme on Immunization - poliomyelitis eradication : the WHO Global Laboratory Network. *Weekly Epidemiological Record* 1997 ; 245.
- 16) Eichner M, Dietz K. Eradication of poliomyelitis : when can one be sure that poliovirus transmission has been terminated? *American Journal of Epidemiology*. 1995 ; 143: 816-22.
- 17) Her Majesty's Stationery Office. Report on an investigation into the cause of the 1978 Birmingham small-pox occurrence. London : Her Majesty's Stationery Office ; 1980.
- 18) Sulkin SE, Pike RM. Survey of laboratory-acquired infections. *American Journal of Public Health and The Nation's Health* 1951 ; 41: 769-81.
- 19) Pike RM, Sulkin SE, Schulze ML. Continuing importance of laboratory-acquired infections. *American Journal of Public Health* 1965 ; 55: 190-9.
- 20) Pike RM. Laboratory associated infections : summary and analysis of 3921 cases. *Health Laboratory Science* 1976 ; 13: 105-14.
- 21) Pike RM. Laboratory-associated infections : incidence, fatalities, causes and preventions. *Annual Review of Microbiology* 1979 ; 33: 5.
- 22) Sabin AB, Ward RL. Poliomyelitis in a laboratory worker exposed to the virus. *Science* 1941 ; 94: 113-4.
- 23) Beller K. Laboratoriumsinfektion mit dem Lansing-Virus. *Zentralblatt fuer Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene Abt. 1 Orig.* 1949 ; 153: 269-75.
- 24) Wenner HA, Paul JR. Fatal infection with poliomyelitis virus in a laboratory technician. *American Journal of Medical Science* 1947 ; 213: 9-18.
- 25) Gear JHS, Rodger LM. Poliomyelitis in northern Rhodesia with special reference to an outbreak occurring on the Roan Antelope Copper Mine, Luanshya in 1946. *South African Medical Journal* 1946 ; 20: 670-3.
- 26) Miller BM, et al. Laboratory safety : principles and practices. Washington DC : American Society for Microbiology ; 1986. p. 322.
- 27) Sewell DL. Laboratory-associated infections and biosafety. *Clinical Microbiology Review* 1995 ; 389-405.
- 28) Mulders MN, Reimerink JHJ, Koopmans MPG, van Loon AM, van der Avoort HGAM. Genetic analysis of wild type poliovirus importation into the Netherlands (1979-1995). *Journal of Infectious Diseases* 1997 ; 176: 617-24.
- 29) Dowdle WR, Gary HE, Sanders R, van Loon AM. Can post-eradication laboratory containment of wild polioviruses be achieved? *Bulletin of the World Health Organization* 2002 ; 80: 311-6.
- 30) World Health Organization. Maintenance and distribution of transgenic mice susceptible to human viruses : memorandum from a WHO meeting. *Bulletin of the World Health Organization* 1993 ; 71: 497.
- 31) Tambini G, Andrus JK, Marques E, Boshell J, Pallansch M, de Quadros CA, et al. Direct detection of wild poliovirus circulation by stool surveys of healthy children and analysis of community wastewater. *Journal of Infectious Diseases* 1997 ; 168: 1510-4.

- 32) Desphande JM, Kamat JR, Rao VK, Nadkarni SS, Kher AS, Salgaokar SD, et al. Prevalence of antibodies to polioviruses and enteroviruses excreted by healthy children in Bombay. *Indian Journal of Medical Research* 1995 ; 158: 707-12.
- 33) Pallansch M, Staples M. Wild poliovirus found in stored potential infectious materials. *World Health Organization Polio Laboratory Network Quarterly Update* 2002 ; 8: 1-2.
- 34) Davies M, Bruce C, Bewley K, Outlaw M, Mioulet V, Lloyd G, Clegg C. Poliovirus type 1 in working stocks of typed human rhinoviruses. *Lancet* 2003 ; 361: 1187-8.
- 35) Savolainen C, Hovi T. Caveat : poliovirus may be hiding under other labels. *Lancet* 2003 ; 361 : 1145-6.
- 36) World Health Organization. Laboratory biosafety manual. 3rd edition. Geneva : World Health Organization ; 2003. ([http : //www.who.int/csr/labepidemiology/en/](http://www.who.int/csr/labepidemiology/en/)).
- 37) World Health Organization. Guidelines for the safe transport of infectious substances and diagnostic specimen. Geneva : World Health Organization ; 1997.
- 38) Wood DJ, Sutter RW, Dowdle WR. Stopping poliovirus vaccination after eradication : issues and challenges. *Bulletin of the World Health Organization* 2000 ; 78(3): 347-63
- 39) Technical Consultative Group on Global Eradication of Poliomyelitis. "Endgame" issues for the global polio eradication initiative. *Clinical Infectious Diseases* 2002 ; 34: 72-7.

Annex 1

その国/地域で最後に報告された地域固有のポリオウイルス症例の年次

国/地域	最後のポリオ症例の年次	国/地域	最後のポリオ症例の年次	国/地域	最後のポリオ症例の年次	国/地域	最後のポリオ症例の年次
アフガニスタン	Endemic	ジブチ	1999 ²	リビア	1991 ¹	セントヘレナ	NR
アルバニア	1978	ドミニカ	<1980	リトアニア	1972 ¹	セントキッツ・ネビス	1969 ¹
アルジェリア	1996	ドミニカ共和国	1985 ²	ルクセンブルグ	1963 ¹	セントルシア	1970 ¹
アメリカ領サモア	1950年代 ¹	エクアドル	1990	マカオ特別行政区	1975 ¹	セントビンセント・グレナディン	1977 ¹
アンドラ	1959 ¹	エジプト	Endemic	マケドニア共和国	1987 ¹	サモア	1950年代
アンゴラ	2002	エルサルバドル	1987 ¹	マダガスカル	1997	サンマリノ	1982
アンギラ	1962	赤道ギニア	1992 ¹	マラウイ	1991 ¹	サントメ・プリンシペ	1983
アンチグア・バーブーダ	1965 ¹	エリトリア	<1992	マレーシア	1985 ¹	サウジアラビア	1995
アルゼンチン	1984 ¹	エストニア	1961	モルジブ諸島	1980 ¹	セネガル	1998
アルメニア	1995	エチオピア	2001	マリ	1999	セルビア・モンテネグロ	1996
オーストラリア	1972 ²	ミクロネシア連邦	1970年代 ¹	マルタ	1964 ¹	セイシェル諸島	1980年代 ¹
オーストリア	1980 ¹	フィジー	1962 ²	マリアナ諸島	1960年代 ¹	シエラレオネ	1999
アゼルバイジャン	1995	フィンランド	1985	マーシャル諸島	1976 ¹	シンガポール	1973
バハマ	1967 ¹	フランス	1989	マルティニック	NR	スロバキア	1960
バーレーン	1993 ¹	フランス領ギニア	1983 ¹	モーリタニア	1999	スロベニア	1978 ¹
バングラデシュ	2000	フランス領ポリネシア	1982 ²	モリシヤス諸島	1980 ¹	ソロモン諸島	<1972
バルバドス	1967 ¹	ガボン	1996 ²	メキシコ	1990	ソマリア	2002
ベラルーシ	1999 ¹	ガンビア	1997 ²	モナコ	1964	南アフリカ	1989
ベルギー	1979 ¹	グルジア	1991 ¹	モンゴ	1993 ²	スペイン	1988
ベリーズ	1981 ¹	ドイツ	1990	モントセラト	1976	スリランカ	1993
ベナン	2000	ガーナ	2000	モロッコ	1989 ¹	スウェーデン	2001
バミューダ	NR	ギリシア	1982	モザンビーク	1993 ¹	スリナム	1982 ¹
ブータン	1986 ²	グレナダ	1970 ¹	ミャンマー	2000	スワジランド	1989 ¹
ボリビア	1989	グアドループ	NR	ナミビア	1995	スウェーデン	1977
ボスニア・ヘルツェゴビナ	1993	グアム	1964 ¹	ナウル	1910 ¹	スイス	1982
ボツワナ	1989 ¹	グアテマラ	1990 ¹	ネパール	2000	シリアアラブ共和国	1998
ブラジル	1989	ギニア	1999	オランダ	1993	タジキスタン	1997 ²
イギリス領バージン諸島	NR	ギニア・ビサオ	1999	オランダ領アンティル諸島	1981	タイ	1997
ブルネイ	1978 ²	ガイアナ	1962	ニュージーランド	1962 ¹	東チモール	1995
ブルガリア	1982	ハイチ	1989 ¹	ニューカレドニア	1982	トーゴ	1999
ブルキナ・ファソ	2000	ホンジュラス	1989 ¹	ニカラグア	1981 ¹	トケラウ	1950年代 ¹
ブルンジ	1999 ²	香港特別行政区	1983	ニジェール	Endemic	トンガ	1982 ¹
カンボジア	1997	ハンガリー	1969	ナイジェリア	Endemic	トリニダード・トバゴ	1972
カメルーン	1999	アイスランド	1960 ¹	ニウエ	1950年代 ¹	チュニジア	1994
カナダ	1979	インド	Endemic	ノルウェイ	1969	トルコ	1998
カーボヴェルデ	1988 ¹	インドネシア	1995	オマーン	1993 ¹	トルクメニスタン	1996
ケイマン諸島	1958 ¹	イラン(イスラム共和国)	1997	パキスタン	Endemic	タークス・ケイカス諸島	1977
中央アフリカ共和国	2000	イラク	2000	パラオ	1940年代 ¹	ツバル	1936 ¹
チャド	2000	アイルランド	1965 ¹	パレスチナ自治区	1988	ウガンダ	1996
チリ	1975	イスラエル	1988	パナマ	1972 ¹	ウクライナ	1996 ²
中国	1994	イタリア	1982	パプアニューギニア	1996 ¹	アラブ首長国連邦	1992 ¹
コロンビア	1991	ジャマイカ	1982	パラグアイ	1985 ¹	イギリス連合王国	1982
コモロ連合	1983 ¹	日本	1980	ペルー	1991	タンザニア連合共和国	1996
コンゴ	2000	ヨルダン	1988 ¹	フィリピン	1993	アメリカ合衆国	1979
クック諸島	1959	カザフスタン	1995 ¹	ポーランド	1984	ウルグアイ	1978 ¹
コスタリカ	1972	ケニア	1988 ¹	ポルトガル	1986	イギリス領バージン諸島	NR
コートジボワール	2000	キリバス	NR	プエルトリコ	1974	ウズベキスタン	1995
クロアチア	1990	クウェート	1985 ¹	カタール	1990 ¹	バヌアツ	1989 ²
キューバ	1962 ¹	キルギスタン	1993	大韓民国	1983 ²	ベネズエラ	1989
キプロス	1995	ラトビア	1962 ¹	モルドバ共和国	1991 ²	ベトナム	1997
チェコ共和国	1960	ラオス人民民主主義共和国	1996	レユニオン	1979 ¹	ウォリス・フトゥーナ諸島	1972 ²
朝鮮民主主義人民共和国	1996	レバノン	1994 ¹	ルーマニア	1992	イエメン	1999 ²
コンゴ民主共和国	2000	レソト	1987 ¹	ロシア連邦	1996 ²	ザンビア	1995
デンマーク	1976	リベリア	1999	ルワンダ	1999 ²	ジンバブエ	1991 ²

注：ウイルス学的に確認された最後の地域固有症例の年次を用いた。輸入野生株ポリオウイルスあるいはワクチン由来ポリオウイルスによる症例は、この表には含まれていない。"Endemic"は、2003年時点で、野生株ポリオウイルスが伝播している国を示している。

- ¹ 症例の詳細は不明
- ² 臨床的確定症例
- NR 未報告

Annex 2

野生株ポリオウイルス感染性材料およびそれを含む感染の可能性のある材料の処分方法

滅菌（オートクレーブの使用）

加圧条件下での水蒸気の利用は、実験室材料の滅菌のため、もっとも有効な方法である。

- すべての培養産物および汚染された材料は、通常、処分に先立ち、オートクレーブ耐性の表示のあるプラスチック袋等、漏出のおそれのない容器に入れてオートクレーブする必要がある。（注:理論的には加温中に滅菌釜の中の水蒸気は外部に出てゆく。そのためきちんと密閉した状態で滅菌すべきである）
- 蒸気が入り込めるパッケージとする必要がある。
- オートクレーブ後、処理済み材料は、処分場所への移動のため移動用の容器に入れる。
- オートクレーブは、滅菌のすべての条件が満たされていることを確認できるような性能保証をする必要がある。

焼却

焼却は、可能であれば、オートクレーブ処理後の実験動物の死体を含む汚染された廃棄物の最終的な処理方法の選択肢のひとつである。感染性材料の焼却は、もし焼却炉が以下の条件を満たしていれば、オートクレーブの代替となる。

- 実験室の管理下にある。
- 温度管理のための効果的方法および二次燃焼室を有している。

最終的な処分

実験室および医療廃棄物の処理は、各国の様々な規定に準じて行う。一般的には、焼却炉からの灰燼は一般の家庭ゴミと同様の方法で処理され、地域の担当部署により廃棄される。オートクレーブ処理済み廃棄物は、外部の焼却所あるいは認可された埋め立て処理所で処分される。

Annex 3

BSL-2/polio バイオセーフティの必要条件

BSL-2/polio は、WHO Laboratory biosafety manual に記載されている標準的な BSL-2 の条件に、野生株ポリオウイルス特有の追加基準を含むものである。

野生株ポリオウイルス特有の条件

実験室への立ち入りが制限される。

実験室に立ち入る要員は、かならずポリオに対する予防接種を受ける。

野生株ポリオウイルス感染性材料および感染の可能性の

ある材料を取扱うすべての操作は、認定済の class I か II の生物学的安全キャビネットを用いて行う。

野生株ポリオウイルス感染性材料および感染の可能性のある材料は、立ち入りが制限された安全な区域に保管する。

フリーザーおよび冷蔵庫は、特定の人員のみに鍵の使用を制限した上で施錠し、野生株ポリオウイルス材料を含むことを、明確に表示する。

フリーザー保管記録は、材料の状態、容量、数量およびフリーザー内の位置を含む、最新かつ完全なものとする。

保管記録は、すべての材料に関する最新のものとし、地理的な由来および検体採取日を含むものとする。

すべての材料は、フリーザーからの出し入れの際、漏出および破損のおそれのない 2 次容器に入れて移動する。

漏出、ウイルス保管容器の破損、ウイルスが放出するような事故に対応した標準作業手順書（SOP）を作製し、定期的な訓練を行う。

Annex 4

BSL-3/polio バイオセーフティの必要条件

BSL-3/polio は、WHO Laboratory biosafety manual に記載されている標準的な BSL-3 の条件に、野生株ポリオウイルス特有の追加基準を含むものである。

野生株ポリオウイルス特有の条件

実験室への立ち入りが制限される。

実験室に立ち入る要員は、かならずポリオに対する予防接種を受ける。

野生株ポリオウイルス感染性材料および感染の可能性のある材料を取扱うすべての操作は、認定済の class I か II の生物学的安全キャビネットを用いて行う。

すべての野生株ポリオウイルス感染性材料は安全な区域、出来れば BSL-3/polio 実験室内に保管する。

すべての野生株ポリオウイルス感染材料に関する、以下の項目を含む最新の保管記録を作成する。

- 地域的な由来および検体採取/分離の日付
- 検体の採取源の性状
- 培養履歴
- 分離株のゲノム塩基配列
- 研究産物の場合、全体の構造、由来およびウイルスの性状

実験室は、以下の項目を含む野生株ポリオウイルス感染材料の完全かつ最新の保管記録を作成する。

- 感染材料の性状
- 容量および数量
- フリーザー内での位置

野生株ポリオウイルス感染性材料はすべて、特定の人員のみに鍵の使用を制限した上で、施錠したフリーザーに保

管する。

野生株ポリオウイルス感染性材料は、必ず、固有の識別番号および管理者の名前が表示された、漏出のおそれのな

いスクリーキャップ容器に保管する。

実験室は、漏出に対応した作業手順書を作成する。

定期接種対象疾患

ポリオワクチン

SHIMIZU HIROYUKI/TAKEDA NAOKAZU/ MIYAMURA TATSUO

清水博之/武田直和/宮村達男

◎国立感染症研究所ウイルス第2部

世界保健機関(World Health Organization: WHO)を中心として進められている世界ポリオ根絶計画は、さまざまな意味で正念場にさしかかっている。経口生ポリオウイルスワクチン(oral poliovirus vaccine: OPV)接種の徹底により、野生株ポリオウイルス流行地域は着実に減少しているが、2004~2005年にかけて、いったんポリオ根絶が達成されたアフリカおよびアジアの多くの国々において、野生株ポリオウイルスの再流行が報告されている。一方、先進国を中心とし世界のほとんどの地域を占めるポリオフリーの地域では、OPVによるワクチン由来麻痺(vaccine-derived paralytic poliomyelitis: VAPP)発生のリスクを無視できないため、不活化ポリオワクチン(inactivated poliovirus vaccine: IPV)を使用する国も多い。

ポリオ根絶最終段階における諸課題を克服するため、現在「新しいポリオワクチン」の導入が進められている(表1)。ひとつは、単一の血清型を抗原として含む monovalent OPV(mOPV)であり、もうひとつは、弱毒化ポリオウイルス(Sabin株)不活化抗原を用いた Sabin-IPV(sIPV)である。いずれも、既存のワクチン製造方法を見直すことにより再びクローズアップされた、いわばリニューアルワクチンである。

■世界ポリオ根絶の現状

1988年、WHOにより世界ポリオ根絶計画が提唱されて以来、ポリオ患者数は激減している。2003年におけるポリオ流行国は、ナイジェリア、インドなど6カ国にまで減少し、アジア地域では2005年内の野生株ポリオ根絶達成が期待されている。現時点における最大のポリオ流行地域は、西部アフリカであり、ナイジェリアの2004年のポリオ確定症例は783例を数えた。2004年後半から2005年にかけて、西部アフリカに由来する1型野生株ポリオウイルスは、さらなる広がりをみせ、多くのナイジェリア周辺国、スーダン、エチオピア、サウジアラビアなどにおいてウイルス伝播およびポリオ患者が確認された後¹⁾、2005年6月現在、イエメンおよびインドネシアで大規模なポリオ流行を引き起こしている(<http://www.polioeradication.org/>)。現在のポリオ流行は、ポリオ根絶達成後しばらく経過した地域において、ワクチン接種率が低下していることを示唆しており、ポリオ再流行の地域的広がりが予想以上に大きいことから、ポリオ根絶に携わる関係者に大きな衝撃を与えている。

■ポリオワクチンの現状と問題点

WHOは最近、野生株ポリオ根絶達成後、できるだけ速やかに世界的OPV接種停止を行うべき

表1 現行および現在開発中のポリオワクチン

ワクチンの種類	抗原	主要なワクチンメーカー	主なメリット	主なデメリット
trivalent OPV (tOPV)	各血清型弱毒化 Sabin 株を混合したもの	BioFarma(インドネシア) など、欧米以外の国際的 ワクチンメーカーおよびローカルなワクチンメーカー。	<ul style="list-style-type: none"> ・長年の使用経験により有効性および安全性が保証されている。 ・ローカルワクチンメーカーも含めて、多くの製造施設が生産しており、安価で安定供給が可能である。 ・現段階では、低いレベルのバイオセーフティ基準で製造可能である。 	<ul style="list-style-type: none"> ・VAPP 発生リスクを有する。 ・VDPV によるポリオ流行の原因となる可能性がある。 ・インド、エジプトなど一部の熱帯地域では、tOPV 頻回接種後も野生株伝播が持続している。 ・ポリオ根絶後は、より高いレベルのバイオセーフティ基準が必要とされる。
monovalent OPV (mOPV)	各血清型弱毒化 Sabin 株の単一血清型	現時点で製造ライセンスを有するのは Sanofi Pasteur 社、Panacea 社がインドにおける製品のライセンスを取得している。	<ul style="list-style-type: none"> ・初回接種で高い効果が期待できる。 ・アウトブレイク対応のための国際的備蓄ワクチンとして適している。 ・tOPV 製造施設であれば、技術的には生産可能である。 	<ul style="list-style-type: none"> ・多くの tOPV メーカーは、mOPV の製造承認を受けていない。 ・多くの国で、今後、mOPV のライセンスを取得する必要がある。 ・大規模かつ長期間使用した場合の安全性および有効性に関するデータが不足している。 ・OPV 接種停止以降の需要が不明確であり、メーカー独自の対応が難しい。
conventional IPV (cIPV)	各血清型強毒株のホルマリン不活化抗原を混合したもの	欧米の世界的大規模ワクチンメーカー。	<ul style="list-style-type: none"> ・長年の使用経験により有効性および安全性が保証されている。 ・多くの種類の抗原を含む多価ワクチンが実用化されている。 ・現在 cIPV を生産している大規模ワクチンメーカーは、高いレベルのバイオセーフティ基準に対応可能である。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ポリオ根絶後は、高いレベルのバイオセーフティ基準に対応した施設で製造する必要がある。 ・OPV 接種停止後は、より厳格なバイオセーフティ基準に対応した施設で製造する必要がある。 ・ほかのポリオウイルスワクチンと比較して高価である。
Sabin-IPV (sIPV)	各血清型弱毒化 Sabin 株のホルマリン不活化抗原を混合したもの	日本ポリオ研究所が開発中。	<ul style="list-style-type: none"> ・現段階では、cIPV より低いレベルのバイオセーフティ基準で製造可能である。 ・現行の tOPV メーカーが IPV を導入する際、技術移転が容易である。 ・sIPV 製造用 Sabin 株を備蓄用 mOPV として利用可能である。 	<ul style="list-style-type: none"> ・臨床試験を含めた有効性および品質管理に関するデータが不足している。 ・sIPV 製造承認を受けたメーカーはない。 ・新規ワクチンとして、国ごとのライセンスを取得する必要がある。

であるとの方針を明確にし、OPV 使用国に対して具体的な提案を行っている^{2, 3)}。OPV 接種を今後も継続した場合の主要な問題点は、①OPV 接種者やその接触者にまれに起きる VAPP の発生⁴⁾、②ワクチン由来ポリオウイルス(vaccine-derived poliovirus: VDPV)によるポリオ流行のリスク⁵⁾、③ポリオウイルス長期排泄者に由来するポリオ流行のリスク⁶⁾、があげられる。低所得国において、高い OPV 接種率と質の高いサーベイランス活動を維持することが、金銭的および人的コストの面から困難であることも、OPV 接種停止が不可避とされる要因である^{3, 7)}。IPV 導入により OPV 接種停止のリスクを低下させることが可能であるが、高価で注射による接種が必要な IPV を導入し高いワクチン接種率を維持できる国は限られているため、OPV 接種停止に対して慎重な意見も少なくない⁸⁾。

■monovalent OPV

3種類の血清型のポリオウイルスを抗原として含む現行の trivalent OPV (tOPV) が有効性、安全性および価格の面から、きわめて優れたワクチンであるということは、世界のほとんどの地域において、tOPV 接種の徹底によりポリオ根絶が達成されたという歴史的成果からも明らかである。にもかかわらず、この時期あえて mOPV 導入が必要とされるのは、ポリオ根絶前後におけるワクチンの必要性に関する以下の要因による。

今後危惧される VDPV や実験室保管野生株ポリオウイルスによるポリオ流行制御のため、WHO は、各血清型の mOPV を国際的備蓄ワクチンとして保管することを提唱している^{7, 9)}。mOPV は、tOPV と比較すると初回接種後の有効性に優れていると考えられるため、万一、ポリオ流行が起きた場合は、流行株に対応する血清型の mOPV を迅速に導入することによりウイルス伝播をより効果的に封じ込めることが期待できる。

さらに、1型 mOPV 導入により、インド北部やエジプトなどに残された1型野生株ポリオウイ

ルス伝播を抑止することが期待されている^{3, 10)}。かねてから、インドなど、衛生状態の悪い熱帯諸国においては、頻回のワクチン接種キャンペーンにより記録上は多くの tOPV 接種歴を有する子供が、しばしばポリオに罹患することが知られている。衛生・栄養状態、ほかのエンテロウイルス感染、ワクチンのコールドチェーンなどさまざまな要因が、tOPV の有効性を低下させる可能性が指摘されているが、原因の特定は困難である¹¹⁾。mOPV と tOPV の大規模集団レベルの有効性や安全性を客観的に比較、評価するのは困難であるが、1型 mOPV 初回接種後の抗体保有率は、熱帯地方においても80%以上に達するとの報告がなされている^{9, 10)}。日本でも、tOPV 導入以前、試験的に1型、3型および2型の順に mOPV を接種した場合の有効性についての報告があるが、1型 mOPV 接種16週後の抗体保有率は95%以上であり、優れた免疫原性を示している¹²⁾。1999年のインド北部の症例を最後に2型野生株はすでに地球上から一掃され、3型野生株伝播もわずかであることから、1型 mOPV 導入により、残された1型野生株の伝播をより効率的に遮断することが期待されている。

■Sabin-IPV

現在用いられているすべての IPV は、強毒野生株ポリオウイルスを原料として製造されている (conventional IPV: cIPV)。IPV 製造施設で取扱う多量かつ高濃度の野生株ポリオウイルスは、適切なウイルス封じ込め対策 (BSL-3 以上) が徹底されない場合、OPV 接種停止後、ポリオ流行の原因となる最大の危険性を有する^{13, 14)}。ワクチン製造施設由来のポリオ流行のリスクを減らすため、弱毒化 Sabin 株を原料とした IPV (sIPV) の実用化が検討されている。日本ポリオ研究所により開発が進められている sIPV 抗原は、cIPV 抗原と比較すると多少抗原性が異なるが、抗原含有量の調整により cIPV と同等の中和抗体産生能を有するとされている^{15, 16)}。現在、cIPV を供給

しているのは世界的大規模ワクチンメーカーのみであり、今後、中低所得国で必要とされる安価で大量の IPV の安定供給を可能とするためには、IPV 製造施設のバイオセーフティ基準のハードルが低い sIPV 製造技術を早急に確立する必要がある。

■新たなポリオワクチン導入に際しての問題点

現行の tOPV および cIPV は、これまで世界中で長期間使用されてきた経験から、有効性・安全性において確固たる実績を有する。そのため、mOPV や sIPV など「新たなポリオワクチン」を世界市場に投入するためには、きわめて高いレベルの安全性の証明や、製造施設およびワクチン使用国におけるライセンスの取得、また価格や将来的な安定供給の担保などが必要である。このような条件をクリアするには、ワクチンメーカーや国ごとの対応では不十分で、さまざまなレベルでの国際協力が不可欠となる。WHO の強力な支援の下、ワクチンメーカー、ライセンスにかかわる各国当局および資金提供を引き受ける国際援助組織との間の連携により、1 型 mOPV が、2005 年 4 月から順次、インド、エジプトおよびイエメンで実用化された。今後、安全性を中心とした市場化後調査を継続するとともに、最大のポリオ流行地である西部アフリカへの 1 型 mOPV 導入の可能性とタイミングについて慎重に検討する必要がある。

本稿で述べた「新しいポリオワクチン」である mOPV と sIPV は、ポリオ根絶および世界的 OPV 接種停止前後において、重要な役割を果たすことが期待されている。mOPV および sIPV の開発、導入を可能とするのは、決して派手な最新技術ではないが、長年のワクチン製造技術や疫学調査に関する情報を基盤としており、国際協力の枠組みの中で実用化が模索されている。日本で開発されている sIPV は、国内のライセンス取得段階で足踏みしているが、その優れた製造技術を、

中低所得国におけるポリオ流行のリスクを減らすためのツールとして、世界レベルで活用することが強く望まれている¹⁷⁾。

- 1) Heymann DL, Aylward RB : Eradicating polio. *N Engl J Med* 351 : 1275-1277, 2004.
- 2) World Health Organization : Cessation of routine oral polio vaccine(OPV) use after global polio eradication - Framework for National Policy Makers in OPV-Using Countries, 1-10, 2005.
- 3) Heymann DL, Sutter RW, Aylward RB : A global call for new polio vaccines. *Nature* 434 : 699-700, 2005.
- 4) John TJ : A developing country perspective on vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *Bull WHO* 82 : 53-57, 2004.
- 5) Kew O, Wright PF, Agol VI *et al.* : Circulating vaccine-derived polioviruses : current state of knowledge. *Bull WHO* 82 : 16-23, 2004.
- 6) Halsey NA, Pinto J, Espinosa-Rosales F : Search for poliovirus carriers among people with primary immune deficiency diseases in the United States, Mexico, Brazil, and the United Kingdom. *Bull WHO* 82 : 3-7, 2004.
- 7) World Health Organization : Global Polio Eradication Initiative Strategic Plan 2004-2008, 1-40, 2003.
- 8) Agol VI, Chumakov K, Ehrenfeld E *et al.* : Don't drop current vaccine until we have new ones. *Nature* 435 : 881, 2005.
- 9) Caceres VM, Sutter RW : Sabin monovalent oral polio vaccines : review of past experiences and their potential use after polio eradication. *Clin Infect Dis* 33 : 531-541, 2001.
- 10) Roberts L : Polio eradication effort adds new weapon to its armory. *Science* 307 : 190, 2005.
- 11) Paul Y : Evaluation of OPV efficacy is required for polio eradication in India. *Vaccine* 23 : 3097-3098, 2005.
- 12) 高津忠夫, 平山宗宏, 沢田啓司 : 弱毒化ポリオウイルスワクチン投与成績. *小児科診療* 25 : 142-147, 1962.
- 13) World Health Organization : WHO global action plan for laboratory containment of wild polioviruses(second edition), 1-37, 2004.
- 14) Dowdle WR, Wolff C, Sanders R *et al.* : Will containment of wild poliovirus in laboratories and inactivated poliovirus vaccine production sites be effective for global certification? *Bull WHO* 82 : 59-62, 2004.
- 15) Doi Y, Abe S, Yamamoto S *et al.* : Progress with inactivated poliovirus vaccines derived from the Sabin stains. *Dev Biol* 105 : 163-169, 2001.
- 16) 橋爪 壮 : 国産 IPV の特徴とポリオ根絶への役割. *臨床とウイルス* 30 : 326-343, 2002.
- 17) 清水博之, 武田直和, 宮村達男 : 不活化ポリオワクチン. *総合臨床* 53 : 1860-1865, 2004.

Intratypic Recombination among Lineages of Type 1 Vaccine-Derived Poliovirus Emerging during Chronic Infection of an Immunodeficient Patient

Chen-Fu Yang,¹ Hour-Young Chen,² Jaume Jorba,¹ Hui-Chih Sun,² Su-Ju Yang,¹ Hsiang-Chi Lee,² Yhu-Chering Huang,³ Tzou-Yien Lin,³ Pei-Jer Chen,⁴ Hiroyuki Shimizu,⁵ Yorihiro Nishimura,⁵ Andi Utama,⁵† Mark Pallansch,¹ Tatsuo Miyamura,⁵ Olen Kew,¹ and Jyh-Yuan Yang^{2,*}

Division of Viral and Rickettsial Diseases, National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia 30333¹; Division of Research and Diagnostics, Center for Disease Control, Taipei, Taiwan 115²; Division of Pediatric Infectious Diseases, Chang Gung Children's Hospital, Taoyuan, Taiwan³; Graduate Institute of Clinical Medicine, National Taiwan University, Taipei, Taiwan 110⁴; and Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 208-0011, Japan⁵

Received 27 April 2005/Accepted 20 July 2005

We determined the complete genomic sequences of nine type 1 immunodeficient vaccine-derived poliovirus (iVDPV) isolates obtained over a 337-day period from a poliomyelitis patient from Taiwan with common variable immunodeficiency. The iVDPV isolates differed from the Sabin type 1 oral poliovirus vaccine (OPV) strain at 1.84% to 3.15% of total open reading frame positions and had diverged into at least five distinct lineages. Phylogenetic analysis suggested that the chronic infection was initiated by the fifth and last OPV dose, given 567 days before onset of paralysis, and that divergence of major lineages began very early in the chronic infection. Key determinants of attenuation in Sabin 1 had reverted in the iVDPV isolates, and representative isolates of each lineage showed increased neurovirulence for PVR-Tg21 transgenic mice. None of the isolates had retained the temperature-sensitive phenotype of Sabin 1. All isolates were antigenic variants of Sabin 1, having multiple amino acid substitutions within or near neutralizing antigenic sites 1, 2, and 3a. Antigenic divergence of the iVDPV variants from Sabin 1 followed two major independent evolutionary pathways. The emergence of distinct coreplicating lineages suggests that iVDPVs can replicate for many months at separate sites in the gastrointestinal tract. Some isolates had mosaic genome structures indicative of recombination across and within lineages. iVDPV excretion apparently ceased after 30 to 35 months of chronic infection. The appearance of a chronic VDPV excretor in a tropical, developing country has important implications for the strategy to stop OPV immunization after eradication of wild polioviruses.

The central strategy of the World Health Organization Global Polio Eradication Initiative is widespread use of oral poliovirus vaccine (OPV) at high rates of coverage. This strategy has reduced the global incidence of polio by over 99% since the start of the Initiative in 1988 and restricted wild poliovirus circulation to countries in western and central Africa and southern Asia (87). However, use of OPV is associated with some rare adverse events, including the appearance of cases of vaccine-associated paralytic poliomyelitis among OPV recipients and contacts (76), and the occurrence of polio outbreaks associated with circulating vaccine-derived poliovirus (cVDPV) (36). While cVDPV outbreaks can be prevented by maintenance of high rates of OPV coverage, the occurrence of vaccine-associated paralytic poliomyelitis is associated with the inherent genetic instability of the live, attenuated OPV strains (56).

In immunocompetent individuals, the risk of vaccine-associated paralytic poliomyelitis is very low, estimated in the United States at 1 case per 2.4 million OPV doses distributed (75, 76).

The risk of vaccine-associated paralytic poliomyelitis is over 3,000-fold higher in patients with B-cell immunodeficiencies such as common variable immunodeficiency, X-linked agammaglobulinemia, and severe combined immunodeficiency (77). Moreover, whereas the period of poliovirus excretion is usually 2 to 6 weeks in susceptible immunocompetent individuals (2), it can be prolonged for up to 10 years or more in immunodeficient patients (35, 52, 76). Chronic poliovirus excretion (>12 months) appears to be very rare (37) and appears to be largely, but perhaps not exclusively (31, 54), associated with B-cell immunodeficiencies. Fewer than 25 immunodeficient chronic excretors have so far been identified since the introduction of OPV in 1961 (27, 76), and most of the patients have been from high-income countries (27, 76) such as the United States (35, 77), the United Kingdom (52, 53), Germany (5), Italy (11), and Japan (29, 91).

In this report, we describe a case of immunodeficient vaccine-associated paralytic poliomyelitis in a child from Taiwan diagnosed with common variable immunodeficiency (18, 69). The patient was found to have excreted type 1 immunodeficient vaccine-derived polioviruses (iVDPVs) for 10 months after onset of paralysis. From the evolution rate of the iVDPV isolate genomes, we estimated that the total period of excretion was from 30 to 35 months, and that the chronic infection most likely began with administration of the fifth and last dose

* Corresponding author. Mailing address: 161 Kun Yang Street, Nan-Kang District, Taipei, Taiwan 115. Phone: 886-2-2653-1375. Fax: 886-2-2653-0403. E-mail: jyyang@cdc.gov.tw.

† Present address: Research Center for Biotechnology, Bogor, Indonesia.

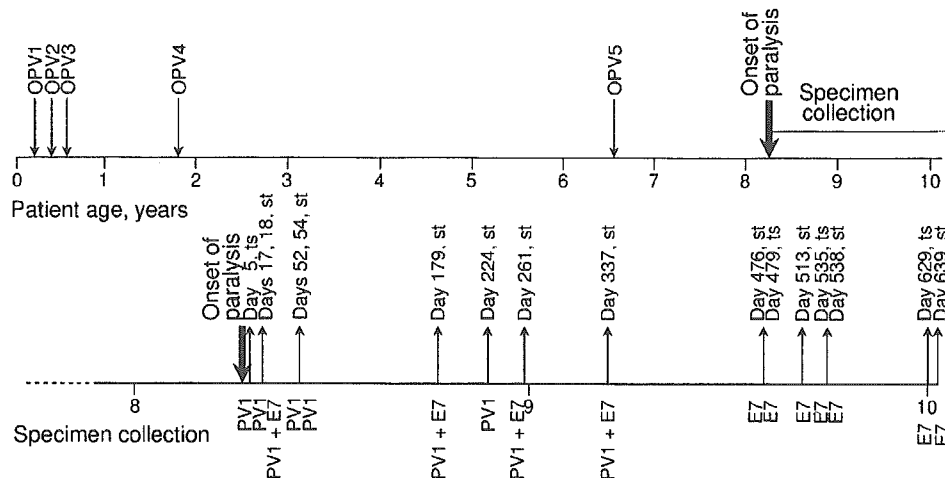


FIG. 1. Time line summarizing immunization history, age at onset of paralysis, and time of specimen collection for the immunodeficient chronic excretor (upper line). The lower line is an expansion of the time line from the patient at age 8 years to 10.1 years showing times (in days after onset of paralysis) of collection of specimens (st, stool specimen; ts, throat swab) found to contain poliovirus type 1 (PV1) iVDPV or echovirus type 7 (E7) or both.

of OPV. The iVDPV isolates obtained from the patient represented five main lineages derived from the common-source infection. All isolates were antigenic variants of the Sabin type 1 OPV strain (LSc 2ab; Sabin 1), but lineages differed in the pattern of amino acid substitution within or near neutralization antigenic sites. Divergence of the separate lineages appeared to have started very early in the chronic infection, with the earliest diverging lineage evolving largely independently. Some iVDPV isolates had mosaic genome structures indicative of recombination across and within lineages. Representative isolates from each lineage were tested for neurovirulence in PVR-Tg21 transgenic mice expressing the human receptor for poliovirus and were found to be either highly or moderately neurovirulent in this animal model. In addition, all isolates when grown in HeLa cells at 39.5°C had lost the temperature-sensitive phenotype of Sabin 1.

There was no evidence of spread of iVDPV to contacts of the case-patient. However, Taiwan currently maintains the high rates of OPV coverage needed to limit iVDPV spread. The appearance of a chronic VDPV excretor in a tropical, developing country underscores the challenges inherent to the development of a global strategy for cessation of OPV use after eradication of wild polioviruses.

MATERIALS AND METHODS

Patient. The case patient, a boy born in 1993, had received a primary series of trivalent OPV doses at ages 2, 4, 6, and 21 months and a booster dose at age 6.7 years (Fig. 1). In April 2001, at age 8 years, the patient developed acute paralysis and was diagnosed with bulbo-spinal poliomyelitis. Throat swabs and stool specimens were taken for virus culture, and blood specimens were taken for immunologic studies. The patient was diagnosed with common variable immunodeficiency on the basis of quantitative serum immunoglobulin readings and was placed on intravenous immunoglobulin therapy (47).

Virus isolation and typing. Clinical specimens obtained from the case patient included throat swabs taken at 5, 479, 535, and 629 days after onset of paralysis, and stool specimens taken at 17, 18, 52, 54, 179, 224, 261, 337, 476, 513, 538, 639, 688, and 752 days after onset. Stool specimens were also obtained from 62 contacts, including four siblings of the case patient. Virus was isolated by culture in RD (human rhabdomyosarcoma cell line; ATCC CCL 136), L20B (mouse L cells expressing the human poliovirus receptor) (65), and HEp-2 (human cervical

carcinoma cell line; ATCC CCL 23) cells (86). Echovirus type 7 (E7) isolates were initially identified by patterns of neutralization with Lim Benyesh-Melnick pools and confirmed by neutralization with E7-specific antisera and VP1 sequencing (86). Poliovirus isolates were initially characterized by immunofluorescence assay, microneutralization, diagnostic PCR (39, 40, 88), and VP1 sequencing (35, 86). Several of the poliovirus isolates had mixed-base sequences at multiple sites, and isolates from specimens taken at days 5, 17, 54, 179, 224, 261, and 337 were plaque purified before complete genomic sequencing.

Antigenic characterization. Initial intratypic differentiation of VDPV isolates used highly specific cross-absorbed antisera in an enzyme-linked immunosorbent assay format (82). Briefly, clinical isolates were tested with two different antiserum preparations, one that reacts with Sabin 1 and another that reacts primarily with wild type 1 polioviruses. In this assay, isolates can have one of four different antigenic properties: (i) vaccine-like (reaction only with the anti-Sabin strain sera), (ii) non-vaccine-like (reaction only with anti-wild poliovirus sera), (iii) double-reactive (reaction with both anti-Sabin strain and anti-wild poliovirus sera), and (iv) nonreactive (no reaction with either anti-Sabin strain or anti-wild poliovirus sera). Only Sabin 1-related isolates have vaccine-like antigenic properties, some Sabin 1-related isolates have double reactive antigenic properties, most wild polioviruses and some Sabin 1-related antigenic variants have non-vaccine-like antigenic properties, and a small number of wild polioviruses and Sabin 1-related antigenic variants have nonreactive antigenic properties (82).

Nucleic acid sequencing. Conditions for reverse transcription-PCR amplification and cycle sequencing were as described previously (50). Sequencing was performed in both directions, and every nucleotide position was sequenced at least once from each strand. Terminal sequences were determined by using the 5' rapid amplification of cDNA ends (RACE) and 3' RACE system kits (Life Technologies, Gaithersburg, Md.) according to the manufacturer's instructions.

Phylogenetic analysis. P1/capsid, P2/noncapsid, P3/noncapsid, and complete open reading frame (ORF) sequence relationships among the nine iVDPV isolates and Sabin 1 were constructed from the corresponding regions using the maximum-likelihood method implemented in the DNAm1 program of the PHYLIP 3.5c package (21). The topology of the trees was obtained by majority-rule consensus among 1,000 bootstrap replicates (20, 21). The corresponding branch lengths were evaluated by likelihood ratio tests among nested models of nucleotide evolution as implemented in the program Modeltest (67). The tree with the best likelihood ratio test score was rooted to the sequences of Sabin 1 and displayed using the program TreeExplorer (K. Tamura, http://evolgen.biol.metro-u.ac.jp/TE/TE_man.html). Insertion/deletion 5' untranslated region (5'-UTR) differences were treated as single-nucleotide substitutions.

Analysis for recombination across lineages. Discontinuities across different genomic intervals among the day 5, 18, and 52 isolates and among the day 52, 179, and 224 isolates were initially visualized by using distance plot and bootscan functions of the Simplot program (51). The program DnaSP (71) was used to localize the likely sites of recombination by alignment of polymorphic nucleotide sites and analysis of the statistical significance of discontinuities in the extent of

nucleotide sequence identity. Paired estimates of corrected nucleotide substitutions and standard errors among the recombinant sequence blocks were calculated using the MEGA software package (45).

Estimation of the time of the initiating OPV dose. The time of the initiating OPV dose was estimated from the rate of fixation of nucleotide substitutions into the nine iVDPV isolates. The maximum-likelihood estimates of the number of synonymous substitutions at synonymous sites (K_s) that accumulated during the Sabin 1 sequence were computed according to the method of Goldman and Yang (25) as implemented in the CODEML program within the PAML package (90). This method corrects for the transition/transversion rate bias, the codon frequency bias, and for multiple substitutions at a site. Corrected K_s values relative to the root sequence (Sabin 1; K_s set to zero) for each iVDPV isolate were plotted as a function of the date of sample collection. The rate of accumulation of synonymous substitutions was estimated by weighted linear regression (where the weight for each data point was proportional to the reciprocal of the error variance for the corrected K_s value) using statistical applications within the SAS system, version 9 (SAS Institute, Inc., Cary, N.C.). The date of the initiating OPV dose was estimated from the intercept on the abscissa at $K_s = 0$, and the 95% confidence limits around the regression line were calculated following procedures described by Sokal and Rohlf (74).

Estimation of time of divergence of iVDPV lineages. Maximum-likelihood estimates of divergence times were obtained assuming a unique common ancestor and a single linear rate of evolution for all iVDPV lineages, as shown by the linear regression analysis. Under these assumptions, a maximum-likelihood tree was constructed using third codon positions after an exhaustive search (78), and further analyzed under the single rate dated tips model (68) implemented in the PAML package (90) with dated internodes scaled according to the time of the last OPV dose. The parental root sequence was that of the P1/capsid region of Sabin 1 and zero time was assumed to be the date of the last OPV dose (567 days before onset of paralysis).

Numbering of nucleotide and amino acid positions. The ORF sequences of all iVDPV isolates were colinear with those of Sabin 1, but their 5'-UTR sequences were not. To facilitate comparisons, numbering of nucleotide positions of all isolates followed that described for Sabin 1 (59), with insertions assigned serial letters. Amino acid positions were indicated by the name of the viral protein and numbered consecutively from residue 1 of each protein. Amino acid substitutions were indicated by the following convention: viral protein:original residue–position–substituted residue. For example, VP1:T106A indicates a threonine-to-alanine substitution at amino acid position 106 of VP1.

Neurovirulence testing in PVR-Tg21 mice. Neurovirulence tests on iVDPV isolates were carried out on PVR-Tg21 mice as previously described (43, 46, 73). The mice were purchased from the Central Laboratories for Experimental Animals (Kanagawa, Japan). The type 1 reference strains were Mahoney/USA41 (neurovirulent) and Sabin 1 (attenuated). Six or eight mice (equal numbers of males and females) were inoculated (30 μ l/mouse) intracerebrally for each virus dilution (in 10-fold increments; range, 1.5 to 7.5 log 50% cell culture infectious dose (CCID₅₀/mouse). Mice were examined daily for 14 days postinoculation, and the times of paralysis or death were recorded. The virus titer that induced paralysis or death in 50% of inoculated mice was calculated by the method of Kärber (32) and expressed as CCID₅₀/mouse.

Measurement of temperature-sensitive phenotype. The temperature sensitivity of the iVDPV isolates was measured by the efficiency of plating at 39.5°C compared with 34.5°C. The efficiency of plating values were determined by plaque assays performed on monolayers of HeLa cells as described previously (73, 89).

Nucleotide sequence accession numbers. Complete genomic sequences of the nine iVDPV isolates described in this study were submitted to the GenBank library under accession numbers AF538840, AF538841, AF538842, AF538843, AY928383, AY928384, AY928385, AY928386, and AY928387 (corresponding to the day 5, 17, 52, 337, 261, 224, 54, 179, and 18 isolates, respectively).

RESULTS

Clinical and epidemiologic investigations. The last case of poliomyelitis in Taiwan associated with circulating wild poliovirus occurred in 1982, at the end of a large outbreak (1,043 reported cases with 98 deaths) associated with an imported type 1 poliovirus (13, 41). All subsequent poliovirus isolates obtained since 1982 have been derived from the oral poliovirus vaccine. Taiwan introduced immunization with OPV in 1966 and has maintained high rates of OPV coverage since 1982 and

intensive surveillance for cases of acute flaccid paralysis since 1994. In 2000, all countries within the Western Pacific Region of the World Health Organization were certified as polio-free (1, 84).

The case patient developed poliomyelitis in April 2001, 19 years after the last case associated with wild poliovirus in Taiwan. Clinical records indicated that the case patient received five doses of OPV at ages 2, 4, 6, and 21 months and 6.7 years, the last dose given 567 days (~19 months) before onset of paralysis (Fig. 1). At age 8 years, the patient developed fever and upper respiratory tract infection followed by acute left-arm paralysis. Paralysis progressed to his right arm and both legs, and further involved difficulties in swallowing, impairment of tongue and eye movement, and respiratory muscle paralysis. The clinical diagnosis was bulbospinal poliomyelitis. A month after paralysis, the patient was diagnosed with common variable immunodeficiency, a defect in antibody production (18, 69), on the basis of quantitative serum immunoglobulin readings of 270 mg/dl for immunoglobulin G (normal range: 639 to 1,349 mg/dl), 6.2 mg/dl for immunoglobulin M (normal range: 56 to 352 mg/dl), and <5.9 mg/dl for immunoglobulin A (normal range: 70 to 132 mg/dl) (15, 28). He was immediately placed on a therapeutic regimen of monthly injections of intravenous immunoglobulin. The patient continued to have atrophy and residual paralysis in both legs more than 3 years after onset of paralysis.

Clinical specimens were obtained from the patient at days 5 (throat swab), 17, 18, 52, 54, 179, 224, 261, 337, 476, 479 (throat swab), 513, 535 (throat swab), 538, 629 (throat swab), 639, 688, and 752 (all were stool specimens if not otherwise indicated) after onset (Fig. 1). Poliovirus type 1 was isolated from all specimens taken up to day 337. Echovirus type 7 and poliovirus type 1 were isolated from the day 18, 179, 261, and 337 specimens; E7 was isolated from all specimens taken from day 476 to day 639; no virus was isolated from the day 688 and day 752 specimens.

The local bureau of health investigated the polio immunization status of schoolmates of the case patient and children in his neighborhood and community (1,682 children in all). All of the children had been vaccinated with at least 3 doses of OPV, and three contact children under 5 years had received catch-up vaccinations between July and September 2000. In addition, stool specimens were taken from 62 suspected contacts of the case patient (including his four siblings) for virus isolation. None of the contacts were found to be infected with poliovirus.

Sequence properties of poliovirus isolates. Characterization of the early poliovirus isolates (from the days 5, 17, and 18 specimens) by enzyme-linked immunosorbent assay using cross-absorbed neutralizing antisera (82) showed that all were antigenically distinct (nonreactive or non-vaccine-like) from Sabin 1, a property subsequently confirmed for all nine isolates. However, characterization by diagnostic PCR and by sequencing of the VP1 region (906 nucleotides) showed that all isolates were derived from the Sabin 1 strain. The nine isolates differed from Sabin 1 at 2.43% to 3.53% of VP1 nucleotide sequences, from each other at 0.22% (excepting the day 52 and day 54 isolates, which had identical VP1 sequences) to 5.28% of VP1 nucleotide sequences, and from contemporary wild type 1 polioviruses (including representative isolates from the 1982 Taiwan outbreak) at >18% of VP1 nucleotide sequences