

Table 6. Associations between hygiene behaviours and non-polio enterovirus isolation, Ulaanbaatar and Tov province, Mongolia, late summer 2003

Variables	No.	OR	95% CI
Hand washing after defecation			
Always	55	1.0	
Not always	37	2.5	1.1-5.8
Hand washing before eating			
Always	46	1.0	
Not always	46	1.3	0.6-3.0
Hand washing before cooking			
Always	57	1.0	
Not always	13	0.8	0.2-2.8
Bathing frequency			
More than 2 times a week	41	1.0	
Weekly or less frequent	51	0.6	0.3-1.4
How bottom is cleaned			
Toilet paper	83	1.0	
Other (cotton, newspaper)	6	0.5	0.1-2.7
How many times hands washed*		Mean (s.d.)	<i>P</i> value
Negative	47	4.1 (0.3)	<i>P</i> =0.394
Positive	45	3.7 (0.3)	

OR, Odds ratio (calculated by univariate logistic regression); CI, confidence interval; s.d., standard deviation.

* *t* test. Question was asked for subjects to recall how many times they washed their hands the day before the questionnaire survey was conducted.

to poliovirus types 1 and 3 after administration of three doses of OPV [28]. Factors such as sub-optimal vaccine potency, breaks in the cold chain, sub-optimal vaccine schedule, and concurrent enteric infections have been postulated as reasons for the poor seroconversion rate. The effect of concurrent enteroviral infections in reducing seroconversion rate has been repeatedly suggested [29-31], and low rates of seroconversion have been reported more frequently during summer than in winter [32, 33].

Our study showed that there was high transmission by multiple types of non-polio enteroviruses in the summer season in Mongolia. Mongolia has reduced its OPV schedule to birth, 2, 3, and 4 months of age from 2003. To avoid interference by non-polio enteroviruses during OPV immunization, attention must be paid to children who will be receiving most of their OPV in the summer season. We discovered infants concurrently yielding multiple non-polio enteroviruses, and the efficacy of OPV administered to such infants is doubtful. A study of immunity to poliovirus in children receiving OPV in the summer season may be required. This is considered important to maintain high herd immunity

and to avoid the risk of vaccine-derived poliovirus infection.

Detection of enterovirus on hands

The finding that persons who do not always wash their hands after defecation are 2.5 times more likely to be infected compared to those who answered that they always washed their hands highlights the importance of hand contact in the transmission pathway. This was consistent with studies of echovirus 30 which showed that hand washing was protective against infection [34, 35]. However, despite the high isolation rate of non-polio enteroviruses from stools, no enterovirus was detected from any of the hand swabs. The lack of detection may have been associated with the hands being rubbed onto many other objects or body parts, therefore, the chance of isolating virus from hands at random times in a real-life setting was very small. The PCR method was adopted due to the limited amount of samples and due to its high sensitivity for virus detection; however, the detection limit of the method may have overlooked the presence of virus due to a small virus load.

Table 7. Associations of living environment and demographic character with degree of intrafamilial spread of non-polio enterovirus in Ulaanbaatar and Tov province, Mongolia, late summer 2003

Variables	No. of households	Mean (s.d.)†	95% CI	P value
Residence				
Ger	5	0.73 (0.25)	0.42–1.05	$P=0.097^*$
House	14	0.55 (0.42)	0.31–0.80	
Apartment	10	0.30 (0.35)	0.05–0.55	
Kitchen				
Sole use	17	0.40 (0.42)	0.18–0.62	$P=0.095^*$
Shared	3	0.92 (0.14)	0.56–1.28	
None	9	0.55 (0.30)	0.32–0.77	
Bathroom				
Sole use	10	0.38 (0.41)	0.08–0.67	$P=0.041^{**}$
Shared	4	0.94 (0.13)	0.74–1.14	
None	15	0.46 (0.36)	0.26–0.66	
Waste				
Tube	10	0.68 (0.43)	0.37–0.98	$P=0.053^*$
Special hollow outside	12	0.51 (0.37)	0.28–0.75	
Outside, no special place	7	0.21 (0.23)	0.01–0.42	
Toilet‡				
Inside	5	0.95 (0.11)	0.81–1.09	$P=0.003^{***}$
Outside	9	0.33 (0.35)	0.06–0.61	
Income (Togrog)§				
1–50 000	7	0.71 (0.39)	0.35–1.08	$P=0.136$
50 001–100 000	17	0.48 (0.39)	0.28–0.68	
100 001–150 000	2	0.50 (0.35)	–2.68–3.68	
150 001–200 000	3	0.08 (0.14)	–0.28–0.44	

CI, confidence interval.

* $P<0.1$, ** $P<0.05$, *** $P<0.01$.

† ANOVA. Degree of intrafamilial spread was calculated by number of family member(s) infected divided by total number of family members in the household. s.d., standard deviation.

‡ Only households residing in house are included.

§ \$1.00 = 1140 Togrog as of July 2003.

Intrafamilial spread and transmissibility of non-polio enterovirus

Examination of the order of virus excretion among family members revealed that siblings or young children aged 2–10 years were chiefly responsible for introducing virus into the household. Our study provides direct evidence that young children are the most important transmitters of enteroviruses compared to studies in which statistics were used to associate number of young children and number of infected family members.

Transmissibility of echovirus was high, while coxsackie A virus infection was self-limiting. The low

transmissibility of coxsackie A virus may be explained by multiple reasons: herd immunity may have been established due to previous infection, supported by an indication that coxsackievirus infections peaked in early summer whereas echovirus tended to be restricted to late summer [8]; transmissibility of coxsackie A virus may be lower than coxsackie B virus; the dry climate of Mongolia may have limited the transmissibility of coxsackie A virus; relatively low sensitivity of the used cell lines towards coxsackie A virus [1] may have limited its detection; and coxsackie A virus may spread mainly through the respiratory route rather than the faecal–oral route, therefore lack of throat swabs may have decreased

our detection rate. Additionally, it is indicated that coxsackie A24 variant spreads primarily by direct or indirect contact with eye secretions [36], thereby limiting its detection. There were limitations in comparing transmissibility of echovirus and coxsackie A virus, however, echoviruses showed considerably higher transmissibility than coxsackie A viruses when stool specimens were examined using the L20B, Hep-2, and RD-A cell lines.

Risk factors of non-polio enterovirus infection

We observed difference in the degree of intrafamilial spread by type of residence. *Ger* dwellers had the highest risk of intrafamilial infection. Although not statistically evident, low accessibility to water and high density and intimacy among family members due to small housing space [4.3 m² (1.10 m² per person)] appeared to be the major reasons for the high infection rate.

For those living in a house or apartment, multiple families sharing a kitchen and/or bathroom was a significant risk factor for promoting intrafamilial spread of non-polio enterovirus. Additionally, for those living in a house, a higher risk of intrafamilial infection was associated with an inside toilet rather than an outside toilet. A virological study of families whose infants were recently vaccinated with OPV showed that 15 and 10% of swab samples taken from bathroom/toilet and kitchen respectively were positive for poliovirus [37]. The absence of such facilities inside the residence may have decreased the chance of contracting virus, and on the other hand, having and sharing such facilities increased the introduction of virus into the household as well as the chance of infection. Cleaning of kitchens, bathrooms, toilets, and waste disposal areas as well as hand washing, especially after defecation, are probably the most important factors to prevent infection in the home environment.

Our findings contradict previous studies of pathogens which are transmitted by the faecal-oral route. In a study of *Helicobacter pylori*, infection among those who used outdoor toilets was significantly higher than those who used indoor toilets [38]. In a study of hepatitis A, the absence of a toilet [39] and a kitchen [40] were associated with a higher prevalence of anti-hepatitis A virus antibodies. The difference in study finding may reflect differences in hygiene practices and knowledge of hygiene among the different populations. Urban areas of Mongolia have gone through a transition of housing during the 70

years of Soviet dominance. Soviet-style apartments providing a toilet, bathroom, kitchen, and piped water were built, and the lifestyle changed drastically for those who moved into apartments from a *ger*, lacking such facilities. The reasons for contradiction with previous studies may be because Mongolians living in urban areas are going through a transition in lifestyle; however, the knowledge of hygiene and hygiene practices has not yet reached the standards required for the new lifestyle.

Access to improved sanitation is one of the millennium goals targeted by the United Nations. Our study findings show that the mere presence of hygienic facilities is not sufficient to decrease infection with enteric viruses. Hygiene education, stressing the importance of cleaning hygienic facilities, and hand washing after defecation is required. A comprehensive sanitation programme encompassing provision of sanitary facilities as well as education in hygiene is indispensable for improved health.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was funded by an international research cooperation grant from the International Medical Center of Japan. Hiroyuki Shimizu and Hiromu Yoshida were supported by grants-in-aid for 'Promotion of Polio Eradication' from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan. Hiroyuki Shimizu was supported by a grant for health research from the Regional Office for the Western Pacific, World Health Organization. The authors thank Dr Enkhtuya, Dr Gerelsuren, Dr Surehand, Dr Naryad, Dr Gantulga, Dr Orgil of the Ministry of Health of Mongolia and hygienist Ms. Nyamragchaa and family doctors and health staffs for their sincere cooperation to this study.

REFERENCES

1. **Pallansch M, Roos R.** Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Fields B, Knipe DM, Howley PM, et al., eds. *Fields virology*, 3rd edn. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996: 746-757.
2. **Grist NR, Bell EJ, Assaad F.** Enteroviruses in human disease. *Prog Med Virol* 1978; **24**: 114-157.
3. **Chonmaitree T, Mann L.** Respiratory infections. In: Rotbard HA, ed. *Human enterovirus infections*. Washington, DC: ASM Press, 1995: 255-270.

4. **Beyesh-Melnick M, Melnick JL, Rawls WE.** Studies of the immunogenicity, communicability and genetic stability of oral poliovaccine administered during the winter. *Am J Epidemiol* 1967; **86**: 112–136.
5. **Fox JP.** Factors influencing dissemination of wild and vaccine strains of poliovirus in Louisiana. In: Choumakov MP, ed. *Oral live poliovirus vaccine*. Moscow: Academy of Medical Sciences of the USSR, 1961: 531–545.
6. **Gelfand HM, Potash L, Leblanc DR, Fox JP.** Intrafamilial and interfamilial spread of living vaccine strains of polioviruses. *J Am Med Assoc* 1959; **170**: 2039–2048.
7. **Kogon A, Spigland I, Frothingham T, et al.** The virus watch program: a continuing surveillance of viral infections in metropolitan New York families. VII. Observations on viral excretion, seroimmunity, intrafamilial spread and illness association in coxsackie and echovirus infections. *Am J Epidemiol* 1969; **89**: 51–61.
8. **Froeschle JE, Feorino PM, Gelfand HM.** A continuing surveillance of enterovirus infection in healthy children in six United States cities. II. Surveillance enterovirus isolates 1960–1963 and comparison with enterovirus isolates from cases of acute central nervous system disease. *Am J Epidemiol* 1966; **83**: 455–469.
9. **Honig EI, Melnick JL, Isacson P, Parr R, Myers IL, Walton M.** An epidemiological study of enteric virus infections: poliomyelitis, coxsackie, and orphan (ECHO) viruses isolated from normal children in two socioeconomic groups. *J Exp Med* 1956; **103**: 247–262.
10. **Ginter V.** Spread of vaccine virus in boarding children's institutions and households during immunization with live poliovirus vaccine. In: Choumakov MP, ed. *Oral live poliovirus vaccine*. Moscow: Academy of Medical Sciences of the USSR, 1961: 588–590.
11. **Zhevandrova V.** The dynamics of vaccine strain excretion in oral immunization with trivalent live poliomyelitis vaccine. In: Choumakov MP, ed. *Oral live poliovirus vaccine*. Moscow: Academy of Medical Sciences of the USSR, 1961: 174–180.
12. **Domok I, Molnar E, Jancso A, Daniel M.** Enterovirus survey in children after mass vaccination with live attenuated polioviruses. *Br Med J* 1962; **5280**: 743–746.
13. **Otatume S, Addy P.** Ecology of enteroviruses in tropics. I. Circulation of enteroviruses in healthy infants in tropical urban area. *Jpn J Microbiol* 1975; **19**: 201–209.
14. **Asian Development Bank.** Mongolia National Immunization Program Financing Assessment. Manila, Philippines: Asian Development Bank, 2001.
15. **Ebright JR, Altantsetseg T, Oyungerel R.** Emerging infectious diseases in Mongolia. *Emerg Infect Dis* [serial online], December 2003 (<http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol9no12/02-0520.htm>).
16. **World Health Organization.** Polio Laboratory Manual. Geneva: Department of Vaccines and Biologicals, World Health Organization, 2001.
17. **Yoshida H, Hong Z, Yoneyama T, et al.** Phylogenetic analysis of echovirus type 30 isolated from a large epidemic of aseptic meningitis in Japan during 1997–1998. *Jpn J Infect Dis* 1999; **52**: 160–163.
18. **Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994; **22**: 4673–4680.
19. **Oberste MS, Maher K, Flemister MR, Marchetti G, Kilpatrick DR, Pallansch MA.** Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 1170–1174.
20. **Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Pallansch MA.** Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J Virol* 1999; **73**: 1941–1948.
21. **Balanant J, Guillot S, Candrea A, Delpeyroux F, Crainic R.** The natural genomic variability of poliovirus analyzed by a restriction fragment length polymorphism assay. *Virology* 1991; **184**: 645–654.
22. **Olive DM, Al-Mufti S, Al-Mulla W, et al.** Detection and differentiation of picornaviruses in clinical samples following genomic amplification. *J Gen Virol* 1990; **71**: 2141–2147.
23. **Assaad F, Cockburn WC.** Four-year study of WHO virus reports on enteroviruses other than poliovirus. *Bull World Health Organ* 1972; **46**: 329–336.
24. **Gelfand HM.** The incidence of certain endemic enteric virus infections in southern Louisiana. *South Med J* 1959; **52**: 819–827.
25. **Gondo K, Kusuhara K, Take H, Ueda K.** Echovirus type 9 epidemic in Kagoshima, southern Japan: seroepidemiology and clinical observation of aseptic meningitis. *Pediatr Infect Dis J* 1995; **14**: 787–791.
26. **Moore M, Kaplan MH, McPhee J, Bregman DJ, Klein SW.** Epidemiologic, clinical, and laboratory features of Coxsackie B1-B5 infections in the United States, 1970–79. *Public Health Rep* 1984; **99**: 515–522.
27. **Gelfand HM, Holguin AH, Marchetti GE, Feorino PM.** A continuing surveillance of enterovirus infections in healthy children in six United States cities. I. Viruses isolated during 1960 and 1961. *Am J Hyg* 1963; **78**: 358–375.
28. **Patriarca PA, Wright PF, John TJ.** Factors affecting the immunogenicity of oral poliovirus vaccine in developing countries: review. *Rev Infect Dis* 1991; **13**: 926–939.
29. **Sabin AB, Ramos-Alvarez M, Alvarez-Amezquita J, et al.** Live, orally given poliovirus vaccine. Effects of rapid mass immunization on population under conditions of massive enteric infection with other viruses. *J Am Med Assoc* 1960; **173**: 1521–1526.
30. **Feldman RA, Holguin AH, Gelfand HM.** Oral poliovirus vaccination in children: a study suggesting enterovirus interference. *Pediatrics* 1964; **33**: 526–533.
31. **Triki H, Abdallah MV, Ben Aissa R, et al.** Influence of host related factors on the antibody response to trivalent oral polio vaccine in Tunisian infants. *Vaccine* 1997; **15**: 1123–1129.

32. **Pangi NS, Master JM, Dave KH.** Efficacy of oral polio-vaccine in infancy. *Indian Pediatr* 1977; **14**: 523–528.
33. **Swartz TA, Skalska P, Gerichter CG, Cockburn WC.** Routine administration of oral polio vaccine in a sub-tropical area. Factors possibly influencing seroconversion rates. *J Hyg (Lond)* 1972; **70**: 719–726.
34. **Mohle-Boetani JC, Matkin C, Pallansch M, et al.** Viral meningitis in child care center staff and parents: an outbreak of echovirus 30 infections. *Public Health Rep* 1999; **114**: 249–256.
35. **Helfand RF, Khan AS, Pallansch MA, et al.** Echovirus 30 infection and aseptic meningitis in parents of children attending a child care center. *J Infect Dis* 1994; **169**: 1133–1137.
36. **Kono R.** Apollo 11 disease or acute hemorrhagic conjunctivitis: a pandemic of a new enterovirus infection of the eyes. *Am J Epidemiol* 1975; **101**: 383–390.
37. **Curtis V, Biran A, Deverell K, Hughes C, Bellamy K, Drasar B.** Hygiene in the home: relating bugs and behaviour. *Soc Sci Med* 2003; **57**: 657–672.
38. **Nurgalieva ZZ, Malaty HM, Graham DY, et al.** *Helicobacter pylori* infection in Kazakhstan: effect of water source and household hygiene. *Am J Trop Med Hyg* 2002; **67**: 201–206.
39. **Fix AD, Martin OS, Gallicchio L, Vial PA, Lagos R.** Age-specific prevalence of antibodies to hepatitis A in Santiago, Chile: risk factors and shift in age of infection among children and young adults. *Am J Trop Med Hyg* 2002; **66**: 628–632.
40. **Almeida LM, Werneck GL, Cairncross S, Coeli CM, Costa MCE, Coletty PE.** The epidemiology of hepatitis A in Rio de Janeiro: environmental and domestic risk factors. *Epidemiol Infect* 2001; **127**: 327–333.

ヒトエンテロウイルスの分類と命名法

清水博之 国立感染症研究所 ウイルス第二部

〔論文要旨〕

ヒトエンテロウイルス (Human enterovirus) は、ピコルナウイルス科 (family *Picornaviridae*) エンテロウイルス属 (genus *Enterovirus*) に分類される RNA ウイルスで、血清型および病原性の違いにより、ポリオウイルス、コクサッキーウイルス、エコーウイルスおよびその他のエンテロウイルスに分類されてきた。近年、ゲノム塩基配列情報の集積を基盤とした分子系統解析により、ヒトエンテロウイルスは、5つのウイルス種 (species) である、*Human enterovirus A, B, C, D* (HEV-A, B, C, D) およびポリオウイルス (*Poliovirus*) に再分類された。ヒトエンテロウイルスの新たな分類体系は、病原性、宿主域、分子疫学等エンテロウイルスの生物学的性質の解析のための新たな視座を提供している。エンテロウイルスゲノム塩基配列情報の整備に伴い、近年、遺伝子解析による新型ヒトエンテロウイルスの同定が多数報告されている。その一方、エンテロウイルスの同定、命名および分類に用いられてきた血清型 (serotype) は、現在に至るまでエンテロウイルス同定の基本単位として維持されており、少なくとも当面は血清型を基盤としたエンテロウイルスの命名が継続されると考えられる。

1. はじめに

エンテロウイルスは、ピコルナウイルス科エンテロウイルス属 (family *Picornaviridae*, genus *Enterovirus*) に分類される、エンペロープを有しない positive sense の一本鎖 RNA ゲノムを持つ比較的小型 (25-30nm) の RNA ウイルスである。エンテロウイルスゲノムは、5'末端から順に、5'非翻訳領域、構造蛋白質 (VP4-VP2-VP3-VP1) 領域、非構造蛋白質 (2A^{pro}-2B-2C-3A-3B^{VPg}-3C^{pro}-3D^{pol}) 領域および3'非翻訳領域により構成されている。エンテロウイルス蛋白質およびゲノム RNA 上の主要な機能部位は、構造上類似しており、すべてのエンテロウイルスにおいて、ほぼ同様の機能を有すると考えられている。

単にエンテロウイルスと述べた場合、ピコルナウイルス科に属するヒト以外の動物に由来するエンテロウイルスを含む場合がある

が、本稿では、エンテロウイルス属 (genus *Enterovirus*) に分類されるヒトエンテロウイルスの分類と命名法の歴史的経緯と現状について概説したのち、エンテロウイルス分類に関する現時点での問題点について整理する。属 (genus) および種 (species) の命名については、国際ウイルス分類委員会 (International Committee on Taxonomy of Viruses; ICTV) 第7次報告¹⁾ に準じたが、2002年のICTVによる追補 (http://www.ictvdb.rothamsted.ac.uk/Ictv/fs_picor.htm) およびその後論文等により公表された情報についても一部加え解説する²⁾。尚、血清型 (serotype) より下位のエンテロウイルス分離株の分類および命名 (genotype/genogroup および strain) については決められたルールはなく報告者ごとに異なる場合が多いため、本稿では、エンテロウイルスの属、種および血清型の分類および命名についてのみ言及する。

Taxonomic and nomenclatural structure of human enteroviruses
Hiroyuki SHIMIZU, Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases

2. エンテロウイルスの分類学的位置づけ

ウイルスの分類は、ウイルスの命名法の基盤となる。生物種の分類は、様々な生物学的情報の集積により導き出されるため、結果、生物分類学というひとつの学問体系を必要とするほど広範かつ複雑な側面を有しており、ウイルス分類学についても例外ではない。ウイルス分類の基盤となる生物学的情報に関する理解の進展とともに分類体系自体が変わることも多く、分類体系の変更に伴いウイルス名についても変更が加えられる場合がある。近年の塩基配列情報の集積に基づくウイルス分子進化についての理解の進展は、ウイルス分類体系の大幅な見直しをもたらしている。一方で、ウイルス名の変更は、ウイルス名を検査、診断および治療に用いる実用的側面から混乱を招くおそれがあるため、歴史的経緯により過去に決定されたウイルス名が踏襲される場合も少なくない。そのため、現在用いられている分類法およびウイルス名が、最新の分類体系を必ずしも反映していないことが

ある。エンテロウイルスの命名法に関しても、歴史的経緯を有するウイルス名と分子系統解析に基づいた最新の分類体系の間には、多少の齟齬や未解決の問題点が認められ、今後も必要に応じて修正されていくと考えられる。

ピコルナウイルス科は、エンテロウイルス属 (genus *Enterovirus*)、ライノウイルス属 (genus *Rhinovirus*)、カルジオウイルス属 (genus *Cardiovirus*)、アフソウイルス属 (genus *Aphthovirus*)、ヘパトウイルス属 (genus *Hepatovirus*) およびパレコウイルス属 (genus *Parechovirus*) の6属により構成されていたが¹⁾、最近、エルボウイルス属 (genus *Erbovirus*)、コブウイルス属 (genus *Kobuvirus*) およびテシオウイルス属 (genus *Teschovirus*) が、独立したウイルス属として新たに加えられ、現在計9属が報告されている²⁾ (表1) (http://www.ictvdb.rothamsted.ac.uk/Ictv/fs_picor.htm)。このうち、ヒトから分離され、ヒト疾患に関与すると考えられているのは、エンテロウイルス、ライノウイルス、ヘパトウイ

表1 ピコルナウイルス科を構成するウイルス属

属 (genus)	代表種 (type species)	ウイルス種 (species)
エンテロウイルス <i>Enterovirus</i>	ポリオウイルス <i>Poliovirus</i>	Human enterovirus A, B, C, D Poliovirus Bovine enterovirus Porcine enterovirus A, B
ライノウイルス <i>Rhinovirus</i>	ヒトライノウイルス A <i>Human rhinovirus A</i>	Human rhinovirus A, B
カルジオウイルス <i>Cardiovirus</i>	脳心筋炎ウイルス <i>Encephalomyocarditis virus</i>	Encephalomyocarditis virus Theilovirus
アフソウイルス <i>Aphthovirus</i>	口蹄疫ウイルス <i>Foot-and-mouth disease virus</i>	Equine rhinitis virus Foot-and-mouth disease virus
ヘパトウイルス <i>Hepatovirus</i>	A型肝炎ウイルス <i>Hepatitis A virus</i>	Hepatitis A virus
パレコウイルス <i>Parechovirus</i>	ヒトパレコウイルス <i>Human parechovirus</i>	Human parechovirus Ljungun virus
エルボウイルス <i>Erbovirus</i>	ウマ鼻炎 B ウイルス <i>Equine rhinitis B virus</i>	Equine rhinitis B virus
コブウイルス <i>Kobuvirus</i>	アイチウイルス <i>Aichi virus</i>	Aichi virus
テシオウイルス <i>Teschovirus</i>	豚テシオウイルス <i>Porcine teschovirus</i>	Porcine teschovirus

ルス, パレコウイルス, コブウイルスであり, 他の多くのピコルナウイルスは, 主としてヒト以外の動物から分離される. エンテロウイルスおよびライノウイルスは, 多くの血清型を有し, 中でもエンテロウイルスは, ポリオウイルス感染による小児麻痺から, エコーウイルス等多くのエンテロウイルス感染による無菌性髄膜炎, さらに不顕性感染に至る, きわめて多様なウイルス感染症に関与しており, ピコルナウイルスの中でも臨床上重要なウイルス属である.

3. エンテロウイルスの分類および命名の歴史的経緯

エンテロウイルスは, 従来, 血清型に基づいて同定されており, 血清型は現在に至るまでエンテロウイルスの分類および命名の基本単位とされている. 血清型は, 標準株あるいは分離株に対して作製された免疫抗血清による中和活性の有無により決定されるウイルス抗原性の違いに基づいた型別である. 中和法による血清型同定は, 歴史的経緯および実用的側面から, エンテロウイルスの基本的同定方法であり, 適切な抗血清を使用した場合信頼性が高い.

各血清型のエンテロウイルスは, 主としてヒトおよび実験動物に対する病原性により, ポリオウイルス, コクサッキー A 群ウイルス, コクサッキー B 群ウイルス, エコーウイルスおよびそれ以外のエンテロウイルスに分類され, それに基づき命名されてきた (表 2). ポ

リオウイルスは小児麻痺の起因ウイルスとして, コクサッキーウイルスは乳のみマウスに対して病原性を有するエンテロウイルスとして分類され, それ以外のエンテロウイルスはエコーウイルスとされた. コクサッキーウイルスは, 乳のみマウスに対する病原性の違いに基づいて, さらに, 弛緩性麻痺を起こすコクサッキー A 群ウイルスと強直性麻痺を起こすコクサッキー B 群ウイルスに分類される. エンテロウイルス 68 以降新たに同定された血清型については, 単にエンテロウイルス 68~71 と命名された.

その後の解析で独立した血清型ではないとされたコクサッキー A23, エコーウイルス 8 およびエコーウイルス 34 は欠番となっている. また, エコーウイルス 10 はレオウイルス, エコーウイルス 28 はライノウイルス A1 に再分類され, エコーウイルス 22 および 23 については, ピコルナウイルス科の他の独立した属であるパレコウイルス 1 および 2 としてエンテロウイルス属から外されている²⁾. また, 当初エンテロウイルス 72 と命名された A 型肝炎ウイルスは, 現在ヘパトウイルス属に再分類されている (表 2).

4. 分子系統解析によるエンテロウイルスの再分類

近年, エンテロウイルス標準株および分離株のゲノム塩基配列情報の集積に基づく分子系統解析により, エンテロウイルスの再分類が進め

表 2 ヒトエンテロウイルスのウイルス種 (species) と血清型 (serotype)

ウイルス種 (species)	血清型 (serotype)
<i>Human enterovirus A</i> (HEV-A)	コクサッキーウイルス A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A10, A12, A14, A16 エンテロウイルス 71
<i>Human enterovirus B</i> (HEV-B)	エコーウイルス 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33 コクサッキーウイルス B1, B2, B3, B4, B5, B6 コクサッキーウイルス A9 エンテロウイルス 69
<i>Human enterovirus C</i> (HEV-C)	コクサッキーウイルス A1, A11, A13, A15, A17, A18, A19, A20, A21, A22, A24
<i>Human enterovirus D</i> (HEV-D)	エンテロウイルス 68, 70
<i>Poliovirus</i>	ポリオウイルス 1, 2, 3

られている。ゲノム塩基配列による分子系統解析は、ウイルスの分子進化に基づく遺伝的系統関係を直接反映しているという点において、ウイルスの諸性質の異動に根拠をおいた従来の分類手法と比較して、より妥当性の高い分類体系を提供することが出来ると考えられている。

主としてVP1等カプシド領域の塩基配列に基づく分子系統解析により、エンテロウイルスは、5つのウイルス種 (species) である *Human Enterovirus A* (HEV-A), *B* (HEV-B), *C* (HEV-C), *D* (HEV-D) およびポリオウイルス (*Poliovirus*) に分類されることが明らかとなっている³⁾。表2及び図1の分子系統樹に示したように、HEV-AはコクサッキーA群ウイルスの一部とエンテロウイルス71, HEV-Bはすべてのエコーウイルス, コクサッキーB群ウイルス, コクサッキーA9およびエンテロウイルス69, HEV-Cはその他のコクサッキーA群ウイルス, HEV-Dはエンテロウイルス68および70をそれぞれ含む。ピコルナウイルス全体の分子系統解析により、動物由来エンテ

ロウイルスの一部 (*Bovine enterovirus*, *Porcine enterovirus A* および *B*) が, それぞれ独立したウイルス種として, エンテロウイルス属に分類されることが明らかとなっている (表1)。

血清型および病原性を基盤とした従来のエンテロウイルス分類と分子系統解析による新たな分類体系を比較すると, 新旧の分類体系は, 結果として, ある程度の相関性を有していることが理解される。その一方で, コクサッキーA群ウイルスが, HEV-A, HEV-B および HEV-C に再分類されるという事実を含め, 新たなエンテロウイルス分類体系により初めて明らかとなる点も多い。新たな分類体系により, 各ウイルス種のエンテロウイルスの諸性質を比較する上での, より明解な視点が提供されることが期待されている。

5. エンテロウイルス同定の基本単位としての血清型

塩基配列を基盤とする分子系統解析によりエンテロウイルスが再分類されたことにより, エ

表3 最近報告された新型エンテロウイルス

血清型 (serotype)	ウイルス種 (species)	代表的株名* (strain)	accession number		関連文献
			VP1	full genome	
エンテロウイルス 73	HEV-B	CA55-1988	AF241359	AF241359	9
エンテロウイルス 74	HEV-B	USA/CA75-10213	AY556057	AY556057	4
エンテロウイルス 75	HEV-B	USA/OK85-10362	AY556070	AY556070	4
エンテロウイルス 76	HEV-A	FRA91-10369	AY697458	AY697458	6
エンテロウイルス 77	HEV-B	CF496-99	AJ493062	AJ493062	5
エンテロウイルス 78	HEV-B	W137-126/99	AY208120	未公開	10
エンテロウイルス 79	HEV-B	未発表	未公開	未公開	未発表
エンテロウイルス 80	HEV-B	未発表	未公開	未公開	未発表
エンテロウイルス 81	HEV-B	未発表	未公開	未公開	未発表
エンテロウイルス 82	HEV-B	未発表	未公開	未公開	未発表
エンテロウイルス 83	HEV-B	未発表	未公開	未公開	未発表
エンテロウイルス 84	HEV-B	未発表	未公開	未公開	未発表
エンテロウイルス 85	HEV-B	未発表	未公開	未公開	未発表
エンテロウイルス 86	HEV-B	未発表	未公開	未公開	未発表
エンテロウイルス 87	HEV-B	未発表	未公開	未公開	未発表
エンテロウイルス 88	HEV-B	未発表	未公開	未公開	未発表
エンテロウイルス 89	HEV-A	BAN00-10359	AY697459	AY697459	6
エンテロウイルス 90	HEV-A	BAN99-10399	AY697460	AY697460	6
エンテロウイルス 91	HEV-A	BAN00-10406	AY697461	AY697461	6

株名* : エンテロウイルス74以降の血清型の prototype strain は確定していない。

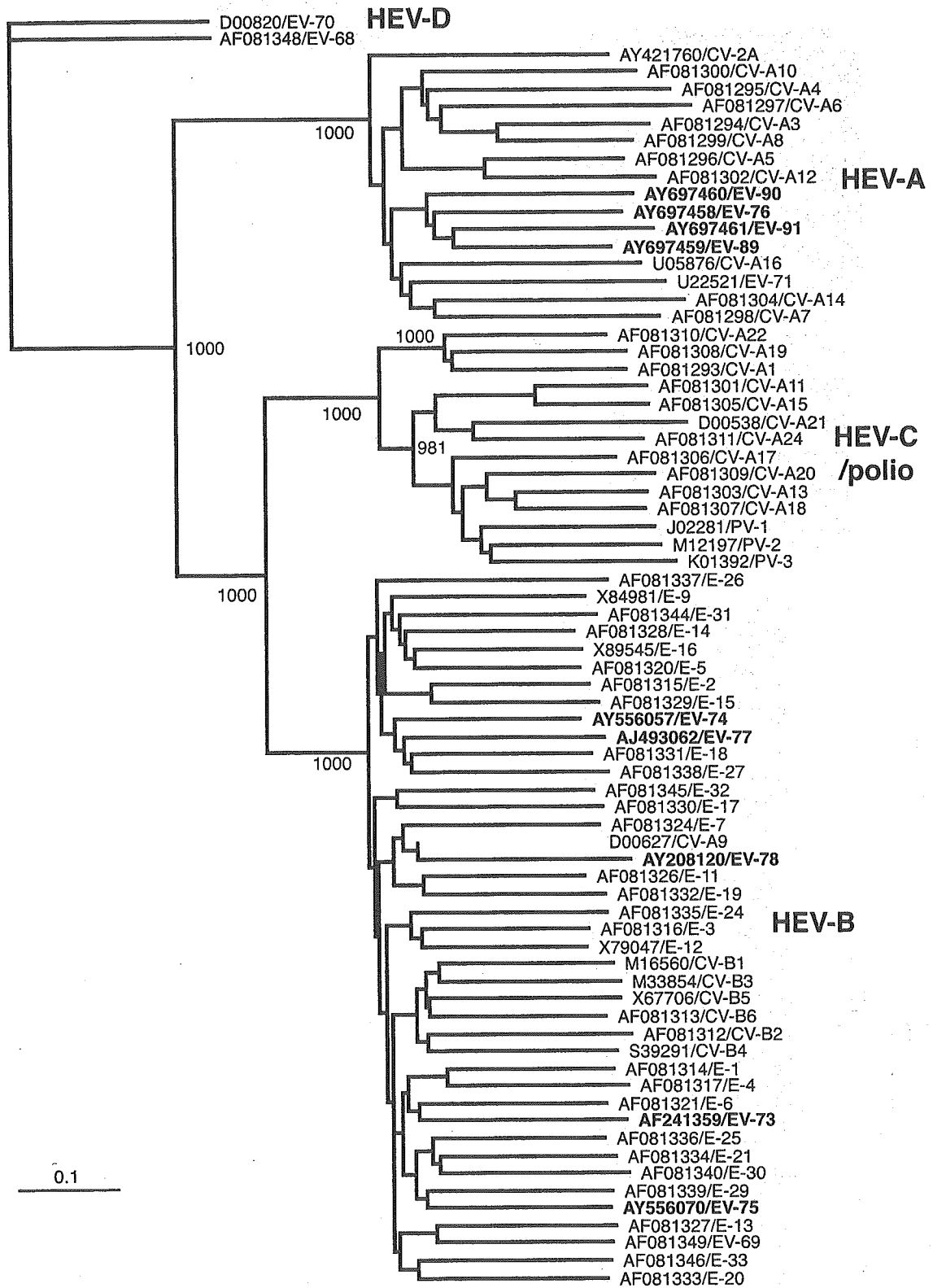


図1 ヒトエンテロウイルスの分子系統解析

各エンテロウイルス血清型標準株のVP1領域の塩基配列に基づいた分子系統解析。基本的には、accession number を表記した標準株の塩基配列を用いたが、太字で示した新型エンテロウイルスの多くでは標準株が確定していない。系統樹は近隣結合法により作成し、一部の分岐についてはブートストラップ法による検定値 (1,000回あたり) を示した。また、各ウイルス種 (HEV-A, B, C/polio, D) について図示した。

エンテロウイルス同定の基本単位として従来用いられてきた血清型による命名を、遺伝子型に完全に置き換えるべきだという議論がある。つまり、従来名であるコクサッキーウイルス A1 やエコーウイルス 1 について、ウイルス種名および遺伝子型を反映させた名称、例えば HEV-C1 あるいは HEV-B1 として再命名するという考え方である。しかし、「エンテロウイルス研究者のあいだで、より適切な命名についてのコンセンサスが得られるまでは、遺伝子解析により同定されたエンテロウイルス分離株の命名に関しても“serotype”が維持されるべきである」⁴⁾ という見解に代表されるとおり、エンテロウイルス同定の基本単位として「血清型」を基盤としたウイルス名を当面使用していくというのが、現時点での多くの研究者の意見であると考えられる。実際、最近同定された新型エンテロウイルスは、遺伝子解析のみにより同定されているものにも関わらず、“new enterovirus serotype”として報告されている⁴⁻⁶⁾。

6. 遺伝子解析による新型エンテロウイルスの同定

既知のエンテロウイルス標準株の VP1 領域の相同性解析によると、2 種類のウイルス株の VP1 領域が、おおむね、塩基配列において 25% 以上、アミノ酸配列において 12% 以上異なる場合、両者は異なる血清型であることが示されている³⁾。エンテロウイルス標準株および分離株を用いた解析により、Oberste らは、VP1 領域の塩基配列の相同性が既知の血清型と 75% 以上で、2 番目に相同性の高い血清型と 70% 以下である場合、最も相同性の高い配列を有するウイルスと同一の血清型と同定され、すべての既知の配列と比較して 70% 以下である場合は、新型エンテロウイルスである可能性が高いことを報告している^{4,7,8)}。

従来、新型エンテロウイルスの同定のためには、分離株が既存のすべてのエンテロウイルス抗血清により中和されず、その上で新たなエンテロウイルス分離株に対する抗血清が既存のすべてのエンテロウイルス標準株を中和しないことを確認することにより、ユニークな抗原性を証明する必要があった。抗原性解析の代替法

としての遺伝子解析により、最近、多くの新型エンテロウイルスが報告されている^{4-6,9,10)}。表 3 にエンテロウイルス 73 以降に報告された新型エンテロウイルスを示した。すでに多くの既存の血清型を有している HEV-B においては 15 以上の新たな血清型の存在が示唆されており、HEV-A についても、4 つの新型エンテロウイルス（エンテロウイルス 76, 89, 90, 91）が最近報告された⁶⁾。

これまで同定不能とされてきたエンテロウイルス分離株について、塩基配列解析が可能であれば、新型エンテロウイルスの可能性について容易に検討できる⁴⁾。論文として報告されておらず、GenBank 上でも塩基配列が公表されていない新型エンテロウイルスも多いため、新型エンテロウイルス候補株を発見した場合、候補株が新型であるかについての判定と命名を自ら行うのは困難である。筆者の経験では、新型エンテロウイルス候補株の VP1 塩基配列を解析し、GenBank に登録されている既知のエンテロウイルス株との相同性がすべて 70% 以下であることをまず確認し、その後 ICTV ピコルナウイルス部会の座長である Dr Glyn Stanway に直接塩基配列データを提示し、新型エンテロウイルスの命名についての照会を行った。その結果、他のグループが、当時、投稿準備中であったエンテロウイルス 90 と同じ血清型であるとの回答を得ることが出来た。

7. エンテロウイルス分類および命名に関する問題点

エンテロウイルスの分類および命名に関連した、現時点におけるいくつかの議論および問題点について、以下簡単に述べる。これらの論点の多くは、エンテロウイルスゲノム遺伝子解析の進展の結果明らかとなった新たな知見に基づくものである。

1) エンテロウイルスのゲノム遺伝子組換え

最近、エンテロウイルス標準株の全ゲノム塩基配列が公表されたことにより、従来多く解析が行われてきたカプシド領域以外のゲノム部位の分子系統解析の基盤が整備された¹¹⁻¹³⁾。異なるゲノム領域におけるエンテロ

ウイルス臨床分離株の分子系統解析を行うことにより、異なる血清型間のゲノム遺伝子組換えが、きわめて頻繁に起きることが示された^{11,12,14,15}。3D領域の分子系統学的関連性は、カプシド領域と明らかに異なり、血清型との関連性は低く、3'末端ほど高い頻度で組換えが起きていると考えられた。カプシド領域での組換え頻度は低いが、異なる血清型のポリオウイルスにおいては、カプシド領域内での組換えが報告されている。

エンテロウイルスのゲノム遺伝子組換えは、単一の species 内の異なる血清型間のウイルスでのみ起きており、異なる species 間での組換えは報告されていない。この事実は、HEV-A, B, C および D が、それぞれ独立した異なるウイルス種 (species) であるという現行の分類体系を支持する結果である。一方、長期間伝播したワクチン由来ポリオウイルスの多くが、HEV-C との組換えウイルスであるという報告^{16,17} は、HEV-C とポリオウイルスは、宿主レセプターの違いにより異なる病原性を示すものの、分子遺伝学的には同一のウイルス種 (species) に属するという議論を支持する。このように、通常のウイルス同定あるいは系統解析には、非カプシド領域は適しておらず、例えば3D領域の塩基配列から血清型を同定することは、一般的には困難である。5'非翻訳領域におけるゲノム遺伝子組換えの可能性もあるため¹⁸、血清型によるウイルス同定のためには、VP1等カプシド領域の塩基配列を用いる必要がある。

2) ヒトエンテロウイルスの分類学的位置づけ

一般的にヒトエンテロウイルスの宿主域は狭いと考えられており、豚水疱病ウイルス (swine vesicular disease virus) とコクサッキーウイルス B5 の関連性等ごく一部の例外を除くと、ヒトエンテロウイルスがヒト以外の動物から分離されることはなく、また、動物に由来するエンテロウイルスがヒトに広く伝播した証拠はない。しかし、最近報告されたサルエンテロウイルス (simian enterovirus) の分子系統解析の結果から、A13, SV19等一部のサルエンテロウイルスは、ヒトエンテロ

ウイルスと同一のウイルス種である HEV-A に分類されることが明らかとなった¹⁹。また、HEV-A に属する新型ヒトエンテロウイルスであるエンテロウイルス76, 89, 90 および91は、HEV-A の中で、既知のヒトエンテロウイルスおよびサルエンテロウイルスとはほぼ等距離の分子系統学的関連性を示す独立したグループを形成していた⁹。いまのところ家畜以外の動物に由来するエンテロウイルス伝播の実態について、ほとんど解析されていないので、エンテロウイルス人獣共通感染の可能性を完全に否定することは出来ない。

3) エンテロウイルスとライノウイルスの分類学上の位置づけ

ライノウイルスは、エンテロウイルス同様多数の血清型を有し、主として上気道感染症に関与している。分子系統解析により、ライノウイルス属は現在、2つのウイルス種である *Human rhinovirus A* および *B* (HRV-A, B) に分類されている^{20,21}。唯一の例外はライノウイルス87で、分子系統解析においてエンテロウイルス68と高い類縁関係を有しており、HEV-D への再分類が示唆されている^{22,23}。その後の解析により、エンテロウイルス68とライノウイルス87は、温度感受性や低 pH 感受性などのウイルス学的性状においてライノウイルスと類似しており、エンテロウイルスとライノウイルスの両者の性質を有するユニークなウイルスであることが明らかとなった^{22,24}。

これまで、エンテロウイルスおよびライノウイルスは、病原性およびウイルス学的性状において明らかな違いがあるため、独立した異なるウイルス属として記載されてきた。しかし、ピコルナウイルス全体の分子系統解析およびゲノム遺伝子構成から見ると、単一の大きなウイルス属 (genus *Enterovirus/Rhinovirus*) の中に、HEV-A, HEV-B, HEV-C/polio, HEV-D, HRV-A, HRV-B および他の動物由来のエンテロウイルスがそれぞれ独立したウイルス種として含まれる、という議論がある^{2,25}。ウイルスの分子遺伝学的関連性、宿主域、病原性やウイルス学的性状といった多くの異

なる視点から、エンテロウイルス属の分類の大枠についても再考することが必要である。

8. おわりに

既知の血清型のエンテロウイルスゲノム情報が整理され、現在、エンテロウイルス臨床分離株の塩基配列情報の集積が進められている。その結果、新型ヒトエンテロウイルスが多数同定され、ヒトエンテロウイルスは、80以上の血清型のウイルスを有する、いままで考えていた以上に大きなウイルス属であることが明らかとなってきた。また、ヒト以外の宿主に由来するエンテロウイルスとヒトエンテロウイルスの分子遺伝学的関連性についても、今後明らかにされていくことが期待される。これら多くの血清型を有するエンテロウイルスが、病原性、宿主域、ウイルス学的性状において、きわめて多様であることを理解するためにも、出来るだけ体系的かつ客観性の高いエンテロウイルスの分類が必要とされる。そのため、現在もエンテロウイルス感染症の検査および診断の基準として用いられている血清型を基盤としたエンテロウイルスの分類および命名についても、今後、必要に応じて修正が加えられていくと考えられる。

参考文献

- 1) King AMQ, Brown F, Christian P, Hovi T, Hyypia T, Knowles NJ, Lemon SM, Minor PD, Palmenberg AC, Skern T, Stanway G : Family Picornaviridae. *In* Virus taxonomy : classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses. eds. van Regenmortel MHV, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, and Wickner RB. Academic Press, San Diego, California, 2000, pp. 657-678
- 2) Stanway G, Hovi T, Knowles NJ, Hyypia T : Molecular and Biological Basis of Picornavirus Taxonomy. *In* Molecular Biology of Picornaviruses. eds. Semler BL, Wimmer E. ASM press, Washington, DC, 2002, pp. 17-24
- 3) Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Pallansch MA : Molecular evolution of the human enteroviruses : correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J Virol* 73 : 1941-1948, 1999
- 4) Oberste MS, Michele SM, Maher K, Schnurr D, Cisterna D, Junttila N, Uddin M, Chomel JJ, Lau CS, Ridha W, al-Busaidy S, Norder H, Magnus LO, Pallansch MA : Molecular identification and characterization of two proposed new enterovirus serotypes, EV74 and EV75. *J Gen Virol* 85 : 3205-3212, 2004
- 5) Bailly JL, Cardoso MC, Labbe A, Peigue-Lafeuille H : Isolation and identification of an enterovirus 77 recovered from a refugee child from Kosovo, and characterization of the complete virus genome. *Virus Res* 99 : 147-155, 2004
- 6) Oberste MS, Maher K, Michele SM, Belliot G, Uddin M, Pallansch MA : Enteroviruses 76, 89, 90 and 91 represent a novel group within the species Human enterovirus A. *J Gen Virol* 86 : 445-451, 2005
- 7) Oberste MS, Maher K, Flemister MR, Marchetti G, Kilpatrick DR, Pallansch MA : Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. *J Clin Microbiol* 38 : 1170-1174, 2000
- 8) Oberste MS, Nix WA, Maher K, Pallansch MA : Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing. *J Clin Virol* 26 : 375-377, 2003
- 9) Oberste M, Schnurr D, Maher K, al-Busaidy S, Pallansch M : Molecular identification of new picornaviruses and characterization of a proposed enterovirus 73 serotype. *J Gen Virol* 82 : 409-416, 2001
- 10) Norder H, Bjerregaard L, Magnus L, Lina B, Aymard M, Chomel JJ : Sequencing of 'untypable' enteroviruses reveals two new types, EV-77 and EV-78, within human enterovirus type B and substitutions in the BC loop of the VP1 protein for known types. *J Gen Virol* 84 : 827-836, 2003
- 11) Brown BA, Oberste MS, Maher K, Pallansch M : Complete genomic sequencing shows that polioviruses and members of human enterovirus

- species C are closely related in the non-capsid coding region. *J Virol* 77 : 8973-8984, 2003
- 12) Oberste MS, Maher K, Pallansch MA : Evidence for frequent recombination within species human enterovirus B based on complete genomic sequences of all thirty-seven serotypes. *J Virol* 78 : 855-867, 2004
- 13) Oberste MS, Penaranda S, Maher K, Pallansch MA : Complete genome sequences of all members of the species Human enterovirus A. *J Gen Virol* 85 : 1597-1607, 2004
- 14) Lindberg AM, Andersson P, Savolainen C, Mulders MN, Hovi T : Evolution of the genome of Human enterovirus B : incongruence between phylogenies of the VP1 and 3CD regions indicates frequent recombination within the species. *J Gen Virol* 84 : 1223-1235, 2003
- 15) Oberste MS, Penaranda S, Pallansch MA : RNA recombination plays a major role in genomic change during circulation of coxsackie B viruses. *J Virol* 78 : 2948-2955, 2004
- 16) Kew OM, Wright PF, Agol VI, Delpeyroux F, Shimizu H, Nathanson N, Pallansch MA : Circulating vaccine-derived polioviruses : current state of knowledge. *Bull WHO* 82 : 16-23, 2004
- 17) Shimizu H, Thorley B, Paladin FJ, Brussen KA, Stambos V, Yuen L, Utama A, Tano Y, Arita M, Yoshida H, Yoneyama T, Benegas A, Roesel S, Pallansch M, Kew O, Miyamura T : Circulation of type 1 vaccine-derived poliovirus in the Philippines in 2001. *J Virol* 78 : 13512-13521, 2004
- 18) Thoelen I, Moes E, Lemey P, Mostmans S, Wollants E, Lindberg AM, Vandamme AM, Van Ranst M : Analysis of the serotype and genotype correlation of VP1 and the 5' noncoding region in an epidemiological survey of the human enterovirus B species. *J Clin Microbiol* 42 : 963-971, 2004
- 19) Oberste MS, Maher K, Pallansch MA : Molecular phylogeny and proposed classification of the simian picornaviruses. *J Virol* 76 : 1244-1251, 2002
- 20) Savolainen C, Blomqvist S, Mulders MN, Hovi T : Genetic clustering of all 102 human rhinovirus prototype strains : serotype 87 is close to human enterovirus 70. *J Gen Virol* 83 : 333-340, 2002
- 21) Vlasak M, Blomqvist S, Hovi T, Hewat E, Blaas D : Sequence and structure of human rhinoviruses reveal the basis of receptor discrimination. *J Virol* 77 : 6923-6930, 2003
- 22) Blomqvist S, Savolainen C, Raman L, Roivainen M, Hovi T : Human rhinovirus 87 and enterovirus 68 represent a unique serotype with rhinovirus and enterovirus features. *J Clin Microbiol* 40 : 4218-4223, 2002
- 23) Ishiko H, Miura R, Shimada Y, Hayashi A, Nakajima H, Yamazaki S, Takeda N : Human rhinovirus 87 identified as human enterovirus 68 by VP4-based molecular diagnosis. *Intervirology* 45 : 136-141, 2002
- 24) Oberste MS, Maher K, Schnurr D, Flemister MR, Lovchik JC, Peters H, Sessions W, Kirk C, Chatterjee N, Fuller S, Hanauer JM, Pallansch MA : Enterovirus 68 is associated with respiratory illness and shares biological features with both the enteroviruses and the rhinoviruses. *J Gen Virol* 85 : 2577-2584, 2004
- 25) Laine P, Savolainen C, Blomqvist S, Hovi T : Phylogenetic analysis of human rhinovirus capsid protein VP1 and 2A protease coding sequences confirms shared genus-like relationships with human enteroviruses. *J Gen Virol* 86 : 697-706, 2005

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

はじめに

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。

◎〒208-0011 武蔵村山市学園4-7-1

■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、さらなる広がりを見せ、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

臨床と微生物 Vol.32 No.5 2005.9. — 441 ● 013

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 発生のリスクを有する。 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 類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

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.

VIII 免疫学的検査 F. ウイルス感染症関連検査(抗原および抗体を含む)

ポリオウイルス感染症の実験室診断

Laboratory diagnosis of poliovirus

清水博之

Key words: ポリオウイルス, 実験室診断, ポリオワクチン, ポリオ根絶計画

はじめに

ポリオウイルスはヒトエンテロウイルスに属するRNAウイルスであり, 抗原性により3種類の血清型, 1型, 2型および3型に分けられる. 特異的レセプターであるヒトポリオウイルスレセプター(poliovirus receptor(PVR): CD155)を介してヒト細胞に感染する. 急性灰白髄炎(poliomyelitis: ポリオ)は, ポリオウイルスの中枢神経組織への感染により引き起こされる急性ウイルス感染症で, 一般的には小児麻痺として知られている. 経口感染したポリオウイルスは, 腸管や咽頭で良く増殖し, 糞便中に多くのウイルスが排泄される. ポリオウイルスの主要な伝播経路は, 糞口感染あるいは経口飛沫感染であると考えられている.

1988年, 世界保健機関(World Health Organization: WHO)により世界ポリオ根絶計画が提唱され, その結果, 世界の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カ国にまで減少しており, ここ数年内の世界的ポリオ根絶が期待されている¹⁾. ポリオウイルス感染は不顕性感染の割合が高く, また, ポリオウイルス感染症の典型的な臨床症状である急性弛緩性麻痺(acute flaccid paralysis: AFP)は, ポリオウイルス感染以外にも発症する場合があるので, ポリオウイルスの実験室診断は, ポリオ確定診断として位置づけられている.

本稿では, WHOの世界ポリオ実験室ネットワーク(Global Polio Laboratory Network: Polio LabNet)により高度に標準化され, 世界中の

ポリオ実験室で用いられている手法を中心として, 基本的な実験室診断法について解説する²⁾.

1. 検査の目的

ポリオウイルス感染症の疾患サーベイランスとして, 一般的に用いられているのは, AFPサーベイランスである. しかし, AFPは, ポリオウイルス以外のエンテロウイルスやGuillain-Barré症候群により発症する場合も多いため, 臨床検体からのポリオウイルスの分離・同定により確定診断を行う必要がある. 発症後速やかに糞便検体を採取して, 細胞培養によりウイルスを分離した後, 中和法によりポリオウイルスの同定を行う. ポリオウイルスが分離された場合は, 遺伝子解析などの方法により, 弱毒化生ワクチンに由来するポリオウイルスなのか, 強毒型野生株なのかについて判別する必要がある. 我が国では, ポリオは感染症法により2類感染症に分類されており, 診断した医師は直ちに保健所に届け出る必要がある. また, まれに, 弱毒化経口生ワクチン(oral poliovirus vaccine: OPV)の副反応によりワクチン接種者や接触者がポリオを発症する場合がある. いずれの場合も, 臨床症状からポリオ様疾患が疑われる場合は, 発症後できるだけ速やかに糞便検体を採取し, ウイルス分離・同定により確定診断を行う必要がある.

2. 試料の採取方法, 保存条件

一般のエンテロウイルス感染症においては, 様々な臨床検体が検査対象となり得るが, 少なくともポリオ根絶計画における実験室診断にお

Hiroiyuki Shimizu: Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases 国立感染症研究所 ウイルス第二部

いては、AFP 患者からの糞便検体のみが、ポリオ実験室診断のため適切な臨床検体とされる。AFP 発症後できるだけ速やかに、少なくとも発症後 14 日以内に、2 回採便することが規定されている²⁾。採取した糞便検体は、ウイルス力価を低下させないため、できるだけ低い温度、可能であれば凍結条件で保管および輸送を行う。

3. ウイルス分離および同定

ポリオウイルス感染症の確定診断は、ウイルス分離・同定により行う。血清学的診断や臨床検体からのウイルス遺伝子検出などの方法も利用可能であるが、世界中のポリオウイルス実験室における手技の標準化および均一化の観点から、Polio LabNet の標準的手法としては培養細胞によるウイルス分離・同定法のみが推奨されている²⁾。そのため、本稿では、WHO 標準法によるポリオウイルス分離・同定の手技について解説し、他の方法による実験室診断については詳述しない³⁾。

a. 糞便検体の処理

糞便検体約 2g に、リン酸緩衝液 10ml およびクロロホルム 1ml を加える。強力なシェーカーあるいはガラスビーズ添加により、糞便乳剤を 20 分以上よく攪拌し、1,500g で 20 分間遠心分離した上清を採取する。すぐにウイルス分離に使用しない場合は凍結保存しておく。

b. ウイルス分離

ウイルス分離には、RD 細胞および L20B 細胞の少なくとも 2 種類の細胞を用いる。RD 細胞は、ポリオウイルスだけでなく、エコーウイルスなど、多くの血清型のエンテロウイルスに対して感受性が高い。L20B 細胞は、エンテロウイルスおよびポリオウイルスに対して感受性をもたないマウス L 細胞に PVR 遺伝子を導入し恒常的に細胞表面に PVR を発現させることにより、ポリオウイルスに対する感受性を獲得した細胞である⁴⁾。L20B 細胞は、ポリオウイルス以外の一般的なエンテロウイルスに対する感受性をもたないので、L20B 細胞で特徴的な CPE を示した検体は、ほぼポリオウイルスであると判別される(図 1)。L20B 細胞は、ポリオウイルス

の迅速な同定、および、ポリオウイルスとエンテロウイルスが混在した検体からのポリオウイルスの選択的分離・同定に、極めて有用である。実際には、L20B 細胞で CPE を呈する非ポリオウイルスがまれに存在すること、および、分離後速やかにポリオウイルス血清型の同定を行う必要があるため、中和法によりポリオウイルスであることを再確認する。2 種類の細胞を用いた、ポリオウイルス分離・同定のフローチャートを図 2 に示した。ポリオウイルスに対する感受性を維持するため、WHO 標準法では、細胞継代数の制限、定期的な感受性試験およびマイコプラズマ検出など、様々な手法により細胞の品質管理を行うよう規定されている²⁾。

c. ポリオウイルスの同定

ポリオウイルス同定の基本は、血清型特異的抗血清による中和法であり、適切な抗血清を使用すれば信頼性が高い。同一の糞便検体から複数の血清型のポリオウイルスが分離されることも少なくないため、各血清型の抗血清を混合したプール血清を用いるのが一般的である³⁾。表 1 に、WHO ポリオ実験室で用いられているポリオ抗血清プールによるポリオウイルス同定結果について示した。中和試験に際しての注意事項は、接種ウイルス量を、約 100 CCID₅₀/50 μ l/well に調整することで、これよりも極端に高い、あるいは低いウイルス接種量を用いた場合は再試験の必要がある。接種ウイルス量を判定するため、中和試験の際ウイルス力価測定を同時に行うのが一般的である。

4. ポリオウイルス分離株の型内鑑別試験

血清型を同定したポリオウイルス分離株は、型内鑑別試験を行いワクチン株か否かについての検査を行う。型内鑑別試験は、ワクチン株と野生株ポリオウイルスを判別するために開発された方法であり、表 2 にあげた方法が標準法とされている⁵⁻⁷⁾。いずれの方法でも、遺伝子レベルあるいは抗原性の違いにより、ワクチン株と野生株ポリオウイルスを判別することが可能である。近年、ワクチン接種後コミュニティーで長期間伝播することにより変異を蓄積したワク