

図1 ポリオウイルスによる細胞変性効果

L20B細胞(1-4)およびRD細胞(5-8)における、ポリオウイルス感染による典型的な細胞変性効果を示した。1および5は非感染細胞、4および8は強い細胞変性効果により100%の細胞が死滅している(4+)。2は非特異的な細胞障害の発現、3、6および7は、進行中の細胞変性効果を示している。(Polio Laboratory Manual, 4th ed(WHO, 2003)より許可を得て転載した)

チン由来ポリオウイルス(vaccine-derived poliovirus: VDPV)が、野生株同様のポリオ流行を起こし得ることが知られるようになった⁸⁾。そのため、型内鑑別試験により、通常のワクチン株とVDPVを判別することが必要とされている。現在、WHO標準法では少なくとも2種類の方法を用いた型内鑑別試験を行うこととしている⁹⁾(表2)。

5. ポリオウイルス分離株の遺伝子解析

2種類の型内鑑別試験のいずれかの方法で、Sabin型ポリオウイルスと判別されなかった場合、約900塩基のVP1全領域の塩基配列解析により、確認試験を行う。親株であるOPV株と比

較し、1.0%以下の塩基置換であれば、一般的なワクチン株ウイルス、1.0-15%であればVDPVとして分類される。VP1領域の塩基配列が15%以上OPV株と異なる場合は、野生株ポリオウイルスである可能性が高いので、疫学的背景を考慮のうえ、その地域固有のポリオウイルスであるか、輸入症例であるかについて分子系統解析により検討する。

6. 検査結果の解釈

適切に採取されたAFP患者の糞便検体からポリオウイルスが分離された場合、ポリオ確定症例となる。更に、分離されたポリオウイルスが型内鑑別により野生株であると判定された場

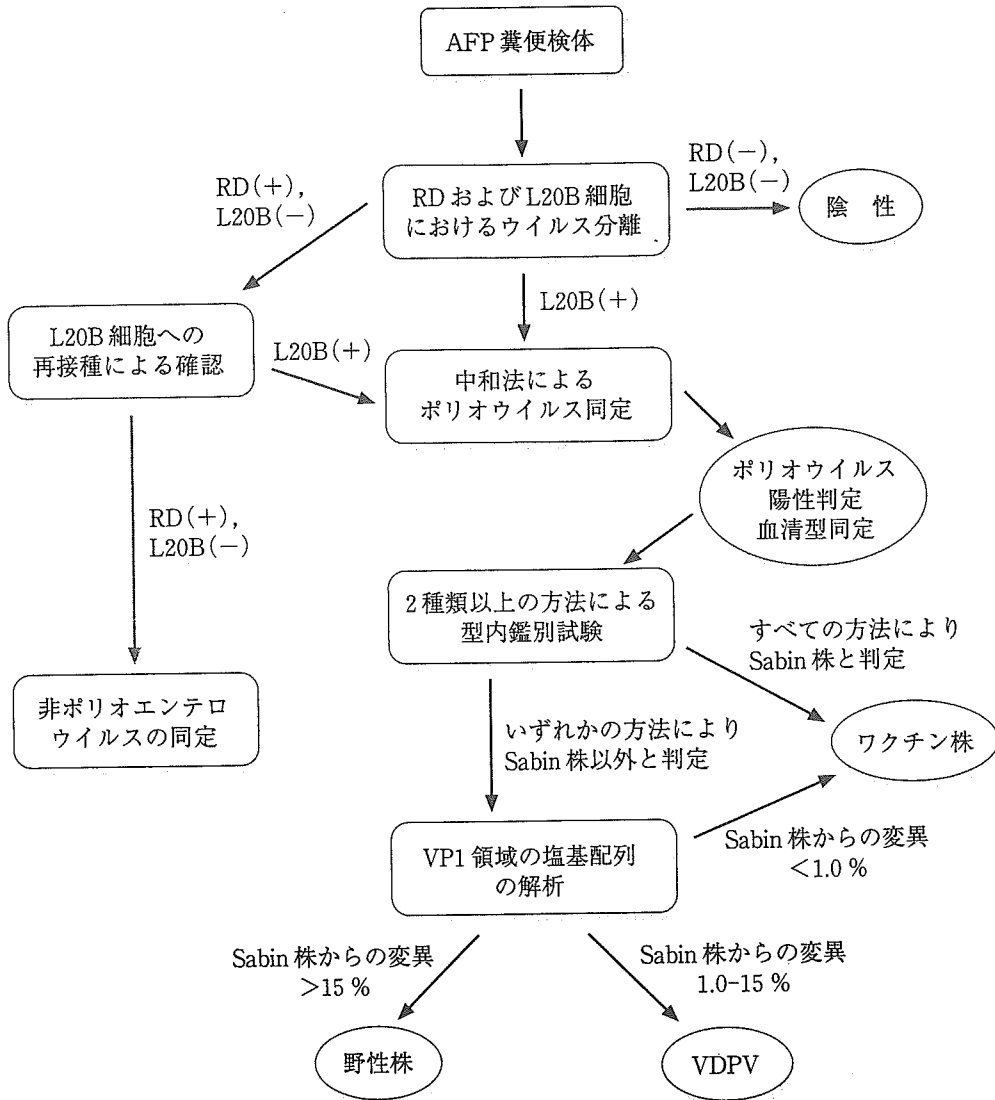


図2 ポリオウイルス分離・同定のフローチャート

合は、地域固有のポリオ流行によるポリオ症例か輸入例であるか判断する。AFP患者から分離されたポリオウイルスが、通常のワクチン株と同定された場合は、残存麻痺の有無など臨床経過を総合的に判断して、ワクチン関連麻痺症例

であるか否かの診断を行う。分離されたポリオウイルスが、VDPVであった場合は、AFP患者自身および周辺の疫学的解析により、VDPV伝播および持続感染者の有無について調査する必要がある。

■ 文献

- 1) World Health Organization: Wkly Epidemiol Rec 78: 138-144, 2003.
- 2) World Health Organization: Polio Laboratory Manual, 4th ed (WHO/IVB/04.10), 2003.
- 3) 萩原昭夫: 臨床とウイルス 23: 156-163, 1995.
- 4) Pipkin PA: J Virol Methods 41: 333-340, 1993.
- 5) De L, et al: J Clin Microbiol 33: 562-571, 1995.
- 6) Balanant J, et al: Virology 184: 645-654, 1991.
- 7) van der Avoort H, et al: J Clin Microbiol 33: 2562-2566, 1995.

表1 ポリオウイルス同定結果の解釈

| CPEのパターン | | | | 同定結果 |
|------------------|---------------|---------------|---------------|------------|
| Pool P1+P2+P3 | Pool P1+P2 | Pool P1+P3 | Pool P2+P3 | |
| — | — | — | + | 1型ポリオウイルス |
| — | — | + | — | 2型ポリオウイルス |
| — | + | — | — | 3型ポリオウイルス |
| — | — | + | + | 1型+2型混合 |
| — | + | — | + | 1型+3型混合 |
| — | + | + | — | 2型+3型混合 |
| — | + | + | + | 1型+2型+3型混合 |
| + | + | + | + | 非ポリオウイルス |

+: CPE 陽性, -: CPE 陰性

表2 ポリオウイルスの型内鑑別試験

| 方法 | 原理 | 判別 | | おもな判定結果* | 精度管理システム** |
|---------------------|---------|---------------|----------------|------------------------|------------|
| | | 野性株と ワクチン株 | VDPVと ワクチン株 | | |
| ELISA | 抗原性の違い | ○ | ○ | Sabin, NSL, DR, NR | ○ |
| モノクローナル抗体 | 抗原性の違い | ○ | △ | Sabin, NSL | △ |
| PCR-RFLP | 塩基配列の違い | ○ | △ | Sabin, SL, NSL | △ |
| probe hybridization | 塩基配列の違い | ○ | × | NEV, NPEV, Sabin, Wild | ○ |
| diagnostic PCR | 塩基配列の違い | ○ | × | Sabin, Wild | ○ |

*判定結果の詳細については試験ごとに異なるので詳述しないが、いずれかの試験により Sabin 型と判定されなかったポリオウイルス分離株は、塩基配列解析による確認試験を行う。(SL: Sabin-like, NSL: non Sabin-like, DR: double-reactive, NR: non-reactive, NEV: non-enterovirus, NPEV: non-polio enterovirus)

**適切な陽性・陰性コントロールおよび精度管理試験の有無により判断

- 8) Kew O, et al: Science 296: 356-359, 2002.
- 9) Centers for Disease Control and Prevention: MMWR Morb Mortal Wkly Rep 52: 913-916, 2003.

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)

非ポリオエンテロウイルス感染症の実験室診断

Laboratory diagnosis of non-polio enteroviruses

清水博之

Key words: エンテロウイルス, 実験室診断, 遺伝子診断, 分子系統解析

はじめに

エンテロウイルスは、多数の血清型に分類されており、ヒトに対して多様な病原性を示す。このうち、ポリオウイルス、エンテロウイルス71など、特定のエンテロウイルスに関する実験室診断については別稿に譲り、本稿では、エンテロウイルス一般に関する実験室診断、特に遺伝子解析によるエンテロウイルス同定法について解説する。また、最近、遺伝子解析により同定された新型エンテロウイルスについて簡単に触れる。

1. エンテロウイルスの分類

従来ヒトエンテロウイルスの分類は抗原性の違いに基づく血清型を基盤としており、ヒトおよび実験動物に対する病原性により、更に、ポリオ、コクサッキーA群、コクサッキーB群、エコーウイルスとそれ以外に分類されている(表1)。近年、分子系統解析によるエンテロウイルスの再分類が行われ、血清型と遺伝子型による分類の異同についての理解が進んだ。抗原性との関連が深いVP1領域に基づいたエンテロウイルス標準株の分子系統樹によると、ヒトエンテロウイルス(human enterovirus: HEV)は大きく4種類の遺伝子型(HEV-A~D)に分類される¹⁾。遺伝子解析によるエンテロウイルスの型別は、血清型とは異なる方法によるウイルス分類であり、本来は血清型と異なる命名を行うべきである。しかし実際は、同一血清型内の分離株の分類に遺伝子型(genotype/genogroup)という名称を用いることが多く、混乱を

避けるため、遺伝子解析により同定されたエンテロウイルスに関しても便宜的に‘血清型’という用語を用いている。

2. エンテロウイルスによる疾患

多くの血清型を有するヒトエンテロウイルスは、不顕性感染から小児麻痺や致死性の脳炎に至る多様なヒト疾患に関与することが知られている。遺伝子型によるエンテロウイルス分類は、ある程度、エンテロウイルス関連疾患に対応していると考えられる。HEV-Aに属するコクサッキーA群ウイルスおよびエンテロウイルス71は、ヘルパンギーナおよび手足口病の起因ウイルスであり、HEV-Bに属するエコーウイルスおよびコクサッキーB群ウイルスは、無菌性髄膜炎の主要な起因ウイルスである。一方、HEV-Cに属するコクサッキーA群ウイルスは、ヘルパンギーナ、手足口病および無菌性髄膜炎の流行には関与していない(散発例から分離されることはあるが、各疾患との強い関連性は認められない)。しかし、急性出血性結膜炎は、遺伝子型の異なるエンテロウイルス70とコクサッキー24変異株を原因ウイルスとしており、遺伝子型と病原性の相関が明らかでないエンテロウイルスも存在する。

3. 検体の採取・保存

ウイルス分離のため一般的の検体として、糞便、咽頭拭い液、髄液などがあげられる。急性出血性結膜炎の場合、眼拭い液、手足口病およびヘルパンギーナの場合、糞便および水疱・咽頭拭い液を採取する。無菌性髄膜炎の場合、髄

Hiroyuki 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

表1 血清型および遺伝子型に基づくエンテロウイルス分類

| 従来法による分類 | | 遺伝子型による分類 | |
|-----------------------|-----------------------------|-----------|--|
| ウイルス | 血清型 | VP1 遺伝子型 | 血清型 |
| ポリオウイルス (PV) | 1~3 | HEV-A | CAV-2~8, 10, 12, 14, 16, EV-71, 76 |
| コクサッキー A 群 ウイルス (CAV) | 1~22, 24 | HEV-B | Echo-1~7, 9, 11~21, 24~27, 29~33 CBV-1~6, CAV-9, EV-69, 73~75, 77, 78 |
| コクサッキー B 群 ウイルス (CBV) | 1~6 | HEV-C | PV-1~3 CAV-1, 11, 13, 15, 17~22, 24 |
| エコーウイルス (Echo) | 1~7, 9, 11~21, 24~27, 29~33 | HEV-D | EV-68, 70 |
| エンテロウイルス (EV) | 68~71 | | |
| total | 64 血清型 | total | 70 血清型 |

血清型および病原性(ヒトおよびマウス)に基づいた従来法によるエンテロウイルス分類と VP1 遺伝子の系統解析による遺伝子型の比較. 最近報告された新型エンテロウイルス (enterovirus 73~78; EV-73~78) について, 遺伝子型による分類の項目に加えた.

液検体も重要な検体であるが, 血清型によりウイルス分離率は大きく異なる. いずれの検体もすぐに検査に用いない場合は凍結保存する. 血清学的検査のためには, 急性期血清と発症後2週間以上経過した回復期の血清を採取する.

4. ウイルス分離および同定

a. ウイルス分離

エンテロウイルス感染症の確定診断は, 基本的にはウイルス分離・同定をもって行う. 血清型により感受性細胞および増殖効率が大きく異なるため, 1つの細胞ですべてのエンテロウイルスを効率良く分離することは困難である. 一般的には, RD, HEp-2, Vero, HELなどの細胞を複数用いる. 細胞培養による分離が困難なエンテロウイルスに関しては, 従来, 乳のみマウス接種による分離や電子顕微鏡による確認が行われてきたが, 最近では検体からの直接的ウイルス遺伝子検出も行われている.

b. エンテロウイルスの同定

1) 中和法

エンテロウイルスの同定の基本であり, 適切

な抗血清を使用すれば信頼性が高い. エンテロウイルスには多数の血清型が存在するので, 何種類かの抗血清を組み合わせたプール血清を用いて血清型を同定する²⁾. しかし, ほとんどのコクサッキー A 群ウイルスおよびエンテロウイルス 68 以降のエンテロウイルスに対する抗血清は, 多くのプール血清には含まれておらず, それぞれのウイルスに対する単味の抗血清を用いる必要がある.

2) 蛍光抗体法

ウイルス抗原に対する特異的抗体を用いた蛍光抗体法により同定する. 市販の抗エンテロウイルスモノクローナル抗体などが使われるが, 使用する際, 抗体の反応性・特異性を確認しておく.

3) 補体結合反応

HEV-A に属するエンテロウイルスは, 各種培養細胞で増殖しにくい臨床分離株が多く, 乳のみマウス接種によるウイルス分離が行われる. 乳のみマウスにより分離された HEV-A 同定法として, 免疫腹水パネルによる補体結合反応が用いられる³⁾.

表 2 エンテロウイルス同定に用いられるプライマー

| 名称 | position * | sense/antisense | 増幅部位 | 塩基配列** |
|--------|-------------|-----------------|----------------|-----------------------------------|
| MD91 | nt444-468 | sense | 5' UTR/VP4/VP2 | CCT CCG GCC CCT GAA TGC GGC TAA T |
| EVP4 | nt541-560 | sense | 5' UTR/VP4/VP2 | CTA CTT TGG GTG TCC GTG TT |
| OL68-1 | nt1197-1178 | antisense | 5' UTR/VP4/VP2 | GGT AAY TTC CAC CAC CAN |
| 292 | nt2613-2628 | sense | VP1 | MIG CIG YIG ARA CNG G |
| 187 | nt2612-2631 | sense | VP1 | ACI GCI GYI GAR ACI GGN CA |
| 188 | nt2612-2630 | sense | VP1 | ACI GCI GTI GAR ACI GGN G |
| 189 | nt2612-2631 | sense | VP1 | CAR GCI GCI GAR ACI GGN GC |
| 222 | nt2969-2951 | antisense | VP1 | CIC CIG GIG GIA YRW ACA T |
| 012 | nt2951-2970 | sense | VP1 | ATG TAY GTI CCI CCI GGI GG |
| 040 | nt2951-2970 | sense | VP1 | ATG TAY RTI CCI MCI GGI GC |
| 011 | nt3408-3389 | antisense | VP1 | GCI CCI GAY TGI TGI CCR AA |

* position はポリオ 1 型 Mahoney 株を基準とした。

** 混合塩基については, IUB コードにより表記した。

5. 血清学的診断

すべての実験室で日常的にウイルス分離検査を行うのは困難であるため, ウイルス感染の間接的な証明として血清学的診断法を利用する。急性期と回復期の血清を比較して 4 倍以上の抗体価の上昇があれば, ウイルス感染の証明とされる。中和試験には標準株を用いるが, 適切な臨床分離株を併用すると, より正確に中和抗体価が測定できる場合がある。

6. 遺伝子解析を利用したウイルス検査

a. RT-PCR によるエンテロウイルス遺伝子検出

ウイルス遺伝子検査は, ウイルス分離後にウイルス同定や分子疫学的解析に利用する場合と, ウイルス分離を行わずに臨床検体から直接ウイルス遺伝子を検出・解析する場合に分けられる⁴⁾。いずれの場合も, ウイルスゲノム RNA を鋳型として, 特異的プライマーを用いた RT-PCR によりウイルス cDNA を増幅する方法が用いられる。増幅した cDNA を解析する方法としては, RFLP, ハイブリダイゼーション, 塩基配列解析などの手法が用いられる。

b. エンテロウイルス同定のためのゲノム遺伝子領域

非カプシド領域においては, 血清型と遺伝子

型が必ずしも対応しない場合があるので, カプシド領域の塩基配列データにより同定を行う。

カプシド領域内では VP4 領域および VP1 部分領域の遺伝子解析が多く報告されている(表 2)。VP4 領域に関しては, RT-PCR によりほぼすべての血清型のエンテロウイルスの遺伝子を効率良く増幅可能な優れたプライマーが報告されている⁵⁾。VP2 領域の一部を加えた VP4/VP2 領域の配列を用いると同定の精度はより高くなる。遺伝子多様性の高い VP1 領域については, 増幅および塩基配列解析可能な適切なプライマーを選択する必要があるが, 抗原性と直接関与していることから, 血清型と対応したより正確な同定が期待できる^{1,6)}。

c. 塩基配列解析によるエンテロウイルス同定

RT-PCR により増幅した DNA を鋳型に塩基配列を決定する。塩基配列解析によるエンテロウイルス同定は, 通常, GenBank に登録されている既知のエンテロウイルス遺伝子との相同性解析および分子系統解析により行う。現在, 新型エンテロウイルスを除くすべてのエンテロウイルス標準株の全塩基配列が GenBank に登録されており相同性解析が可能である。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

表3 最近報告された新型エンテロウイルス

| 新型エンテロウイルス | VP1 遺伝子型 | 分離が報告された地域 | 分離時期 |
|---------------------|-------------|----------------------------|-----------|
| エンテロウイルス 73 (EV-73) | HEV-B | 米国, 韓国, インド, バングラデシュ | 1955-1995 |
| エンテロウイルス 74 (EV-74) | HEV-B | 米国, 中国, フランス, バングラデシュ, イラク | 1975-2000 |
| エンテロウイルス 75 (EV-75) | HEV-B | 米国, エチオピア, オマーン, バングラデシュ | 1974-2000 |
| エンテロウイルス 76 (EV-76) | HEV-A | 未発表 | |
| エンテロウイルス 77 (EV-77) | HEV-B | フランス, コソボ | 1999 |
| エンテロウイルス 78 (EV-78) | HEV-B | フランス | 1999 |

血清型と同定されると報告している⁷⁾。ほとんどの臨床分離株は、この方法で同定可能であるが、同定不能の場合は分子系統解析を行い既知の標準株および臨床分離株と単一のクラスターを形成するか検討する。VP1領域の塩基配列の相同性が、すべてのエンテロウイルスと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。

d. 遺伝子解析により同定された新型エンテロウイルス

従来、新型エンテロウイルスの同定のためには、既知のエンテロウイルスと交差中和活性を有しないことを、すべての既知のエンテロウイルス標準株について確認する必要があった。しかし、VP1遺伝子の相同性解析により新型エンテロウイルスの同定が可能であるとの観点から、近年、多くの新型エンテロウイルスが報告されている⁸⁻¹⁰⁾。表3に最近報告された新型エンテロウイルスについてまとめた。多くの血清型を

有しているHEV-Bは、更に多くの新型エンテロウイルスが、あらたに報告されている。現在、論文発表あるいはGenBankへの塩基配列の登録により、新型エンテロウイルスとして公表されているのは、エンテロウイルス78までであるが、更に多くの新型エンテロウイルスが存在すると考えられている。

7. 検査結果の解釈

臨床検体からエンテロウイルスが分離された場合、特に、病巣からウイルスが分離された場合は、その疾患の原因ウイルスである可能性が高い。ウイルス分離を行うことができない場合、ウイルス感染の間接的な証明として血清学的診断法を用いる。エンテロウイルスはしばしば不顕性感染を起こすので、臨床経過と総合的に判断して、ウイルス実験室診断結果の意義を慎重に解釈する必要がある。

■文献

- 1) Oberste MS, et al: J Virol 73: 1941-1948, 1999.
- 2) 萩原昭夫: 臨床とウイルス 23: 156-163, 1995.
- 3) 国立感染症研究所, 地方衛生研究所全国協議会: ヘルパンギーナ病原体検査マニュアル, p1-28, 2003.
- 4) Muir P, et al: Clin Microbiol Rev 11: 202-227, 1998.
- 5) Ishiko H, et al: J Infect Dis 185: 744-754, 2002.
- 6) Oberste MS, et al: J Clin Microbiol 37: 1288-1293, 1999.
- 7) Oberste MS, et al: J Clin Virol 26: 375-377, 2003.
- 8) Oberste MS, et al: J Gen Virol 82: 409-416, 2001.
- 9) Norder N, et al: J Gen Virol 84: 827-836, 2003.
- 10) Oberste MS, et al: J Gen Virol 85: 3205-3212, 2004.

トピックス

野生株ポリオウイルスの実験室封じ込めに関する WHO 世界的行動計画 第2版

清水 博之, 吉田 弘, 宮村 達男

国立感染症研究所 ウイルス第2部

本稿は、WHO global action plan for laboratory containment of wild polioviruses (Second edition) の全訳である。天然痘やSARS コロナウイルスの例を挙げるまでもなく、実験室に由来する感染症流行の社会的リスクは、きわめて現実的な問題である。野生株ポリオウイルス根絶が間近となり、ポリオワクチン接種停止について議論されている現在、野生株ポリオウイルスの実験室封じ込めについても具体的な行動が求められている。日本語訳作成の主たる目的のひとつは、必ずしも周知されていないポリオウイルス野生株の定義や実験室封じ込めの基準に関する現時点におけるWHO指針を明確にすることにある。同時にまた、感染症以外の広範な施設がポリオウイルスを保有する可能性について、担当者に理解していただくための基本的資料を提供することを目的としている。

略 語

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

目 的

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

計画を準備すること。

連絡先

〒208-0011 東京都武蔵村山市学園4-7-1

TEL : 042-561-0771 ・ FAX : 042-561-4729

E-mail : hshimizu@nih.go.jp

要 約

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

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

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

国内の実験室調査・保有記録の作成

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

1. 野生株ポリオウイルス感染性材料あるいは野生株ポリオウイルスを含む可能性のある材料を有する医科学実験室を特定するため、すべての実験室を調査し不必要な材料の廃棄を促す。
2. 上記材料を有する実験室のリストを作成し、地域根絶認定委員会 (Regional Certification Commission ; RCC) に報告する。
3. 野生株ポリオウイルス感染性材料あるいは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

ている実験室に、安全な取扱いのため、強化したバイオセーフティレベル-2 (BSL-2/polio) 基準を施行するよう指導する。

4. 世界ポリオ根絶認定についての準備を行う。

世界ポリオ根絶の認定

本段階は、世界のすべての地域で野生株ポリオウイルスが分離されず1年間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各医科学研究室に通知する。
2. 国内保有記録にリストアップされた実験室に対し、以下の選択肢のうち、ひとつを選択するよう指示する。
 - 野生株ポリオウイルスに関連した材料を不活化するか、適切な方法により廃棄する (Annex 2)。
 - 野生株ポリオウイルス感染性材料、あるいは野生株ポリオウイルスを含む可能性のある材料を、必要なバイオセーフティ基準を満たすことが可能な実験室に移動する。
 - BSL-2/polioあるいはBSL-3/polio実験室として運用するのに相応しいバイオセーフティ対策を実施する。
3. 世界ポリオ根絶認定のため必要とされる封じ込めに関するすべての要求事項に関する達成状況を記録する。

ポリオ根絶認定後

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

本計画の発行について

一般社会への偶発的なポリオウイルス伝播のリスクに対応した実験施設およびバイオセーフティの実践を確実なものとするための背景、理論的根拠および戦略を本稿で示す。

本稿とは別の WHO 文章²⁾として、野生株ポリオウイルスから製造される IPV の安全な製造と品質管理についてのガイドラインが提供されている。ポリオが次世代にとっての脅威とならないことを確実にするため、すべての関連分野における全面的な協力と関与が重要である。

小児麻痺 (ポリオ)

定義

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

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

伝播経路

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

ポリオウイルスの性質

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

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

いは不適切に処理された下水の流出により、あるいは、汚染された土壌からの溶出により汚染することがある。

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

ポリオウイルスの残存

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

安定した実験室の条件下では、臨床および環境に由来する検体中のポリオウイルスは、凍結保存で数年、冷蔵保存で数ヶ月、室温で数日か数週間残存する。³⁾

自然界におけるポリオウイルス不活化の速度は環境に強く影響される。冬期には 20 日ごと、夏期には 1.5 日ごとに、土壌中のポリオウイルスの感染性は 90% 減少し、常温において、下水では 26 日ごと、真水では 5.5 日ごと、海水では 2.5 日ごとに 90% 減少する。⁵⁾

ポリオワクチン

ポリオに対する防御免疫は、予防接種あるいはポリオウイルスの自然感染により付与される。免疫は、ポリオウイルスの血清型に特異的である。発症防御効果は、血流中の抗体に依存しており、ウイルスの中枢神経組織への伝達を阻止する。感染防御は、血中抗体および腸管や上気道上の分泌型抗体と関連している。⁶⁾

弱毒化経口ポリオワクチン (OPV) および注射による不活化ポリオワクチン (IPV) はいずれも、麻痺性ポリオに対する予防効果を有する。⁷⁾ しかし、どちらのワクチンもポリオウイルス感染および再感染を完全に防ぐ効果はない。IPV は、血中の感染防御抗体を誘導し (液性免疫)、それにより、腸管のポリオウイルスが中枢神経組織に侵入・増殖することを防ぐ。北ヨーロッパで使われていた IPV は、効果的に野生株ポリオウイルスの流行をなくすことに成功した。^{8, 9)} 腸管で増殖するウイルスを含有する OPV は、加えて、腸管でのウイルス増殖を抑制する粘膜免疫を誘導する。その結果、糞便中への排泄ウイルス量を減少させることになり他人への伝播を抑制する。このことが世界ポリオ根絶計画にとって、OPV の重要な選択要因となっている。ポリオ根絶計画に参画している多くの国々で、OPV の使用により野生株ポリオウイルス流行は効果的に抑えられてきた。¹⁰⁾

一方、生ワクチンである OPV は、250 万接種に 1 例程度の割合で起きるワクチン関連麻痺性ポリオ (VAPP) に関与している。¹¹⁾ B 細胞欠損を有する免疫不全患者は、より長期間ウイルス排泄し続ける場合があり、排出するポリオウイルスの遺伝子変異の蓄積をもたらす。¹²⁾ これまでに、19 例このような症例が認められている。十分な免疫を持たない集団におけるワクチンポリオウイルスの、より長期間の継続的なヒトからヒトへの伝播は、神経原性や伝播能が野生株ポリオウイルスと同等となる遺伝子変異をもたらす可能性がある。¹³⁾ このようなウイルスは、自然界に存在するポリオウイルスと同様のリスクをもたらす。

野生株ポリオウイルス伝播の停止

ポリオは、1950 年代中頃の予防接種の登場以前には世界中で発生していた。ポリオ患者数を減少させるのに予防接種はきわめて効果的であった。¹⁴⁾ さらに、ポリオ根絶計画における改良を加えた小児への定期予防接種および戦略的な OPV の使用により、大規模流行地でも患者数は減少した。¹⁵⁾ 野生株ポリオウイルス伝播を遮断するというコンセプトは、予防接種によりワクチン株で感受性ヒト宿主を奪いつくした時点で、野生株ポリオウイルス伝播は終息するという仮定に基づいている。¹⁶⁾ 多くの国でポリオ症例は減少し続けており、続々とポリオウイルスの遺伝学的系統が消失してゆくことは、ポリオウイルスのヒトからヒトへの伝播の遮断が達成可能であることを示している。

封じ込めの理論的根拠

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

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

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

1941 年に発表された実験室感染の最初の症例は、サルに感染するため用意していた感染組織を洗浄し、すりつぶす作業の結果感染したと考えられるポリオ症例であった。²²⁾ 1943 年には、マウスへの感染を試みている際、2 名の実験室作業者が標準株である Lansing (Amstrong) 株に感染した。²³⁾ 他に報告されている実験室作業者のポリオ症例は死亡例であり、1 例は米国²⁴⁾、他は南アフリカの症例であった。²⁵⁾

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

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

腸管感染そして糞便へのウイルス排泄を完全に抑えるワクチンが存在しない以上、実験室作業者のポリオ感染および伝播の予防のため、適切なバイオセーフティ対策が重要となる。完璧な封じ込めを想定することはできない。故意であるか否かに関わらず対策が遵守されない懸念は残る。しかし、効果的な封じ込め、すなわち、一般社会への不用意なポリオウイルス再侵入のリスクを減らすことは現実的な目標である。²⁹⁾

定 義

ポリオウイルス (box 1)

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

野生株ポリオウイルスは、感受性ヒト集団において持続的に伝播する。分子生物学的研究により、野生株ポリオウイルスのカプシド配列の系統はウイルス伝播経路に従い保持されるが、非カプシドおよび非翻訳領域の配列は、伝播過程で他のエンテロウイルスとの組換えより交換される可能性がある。結果として、カプシド以外の塩基配列による「ポリオウイルス」の同定は、妥当性を欠く可能性がある。

Box 1 : ポリオウイロスの定義

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

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

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

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

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

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

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

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

文献上弱毒化されていると記載されている他の株もある。そのうち、いくつかの株については広範な臨床試験が行われた。しかし、現行の認可済みのOPV株のみが長年の経験によりヒト集団における弱毒化に関する数多くの証拠を

有している。

現在不活化ポリオワクチン(IPV)の製造のために用いられているポリオウイルス株は、1型Mahoney(スウェーデンではBrunenders), 2型(MEF1)および3型(Saukett)である。3株とも野生型である。弱毒化Sabin株から製造されるIPVは、現在開発中である。

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

野生株ポリオウイルス感染性材料(box 2)

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

下水や上水等、環境中の検体に含まれる野生株ポリオウイルスは、ヒト集団におけるポリオウイルスの存在に対応

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

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法 | ✓ | ✓ |
| 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 | ✓ | ✓ |
| ・ 区域内のオーククレープ | ✓ | |
| ・ 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.