

## A Sabin 3-Derived Poliovirus Recombinant Contained a Sequence Homologous with Indigenous Human Enterovirus Species C in the Viral Polymerase Coding Region†

Minetaro Arita,<sup>1\*</sup> Shuang-Li Zhu,<sup>2</sup> Hiromu Yoshida,<sup>1</sup> Tetsuo Yoneyama,<sup>1</sup>  
Tatsuo Miyamura,<sup>1</sup> and Hiroyuki Shimizu<sup>1</sup>

Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Gakuen, Musashimurayama-shi, Tokyo 208-0011, Japan,<sup>1</sup> and National Reference Laboratory of Poliomyelitis, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing, China<sup>2</sup>

Received 14 April 2005/Accepted 20 July 2005

Outbreaks of poliomyelitis caused by circulating vaccine-derived polioviruses (cVDPVs) have been reported in areas where indigenous wild polioviruses (PVs) were eliminated by vaccination. Most of these cVDPVs contained unidentified sequences in the nonstructural protein coding region which were considered to be derived from human enterovirus species C (HEV-C) by recombination. In this study, we report isolation of a Sabin 3-derived PV recombinant (Cambodia-02) from an acute flaccid paralysis (AFP) case in Cambodia in 2002. We attempted to identify the putative recombination counterpart of Cambodia-02 by sequence analysis of nonpolio enterovirus isolates from AFP cases in Cambodia from 1999 to 2003. Based on the previously estimated evolution rates of PVs, the recombination event resulting in Cambodia-02 was estimated to have occurred within 6 months after the administration of oral PV vaccine (99.3% nucleotide identity in VP1 region). The 2BC and the 3D<sup>pol</sup> coding regions of Cambodia-02 were grouped into the genetic cluster of indigenous coxsackie A virus type 17 (CAV17) (the highest [87.1%] nucleotide identity) and the cluster of indigenous CAV13-CAV18 (the highest [94.9%] nucleotide identity) by the phylogenetic analysis of the HEV-C isolates in 2002, respectively. CAV13-CAV18 and CAV17 were the dominant HEV-C serotypes in 2002 but not in 2001 and in 2003. We found a putative recombination between CAV13-CAV18 and CAV17 in the 3CD<sup>pro</sup> coding region of a CAV17 isolate. These results suggested that a part of the 3D<sup>pol</sup> coding region of PV3(Cambodia-02) was derived from a HEV-C strain genetically related to indigenous CAV13-CAV18 strains in 2002 in Cambodia.

*Poliovirus* (PV) is a small nonenveloped virus with a single-strand positive genomic RNA of about 7,500 nucleotides (nt) belonging to the family *Picornaviridae*, known as the causative agent of poliomyelitis. Currently, the global eradication program for poliomyelitis is continuing by utilizing both inactivated and live attenuated vaccines (44, 46). The endemicity of indigenous wild PVs was confirmed to be restricted to Afghanistan, Egypt, India, Niger, Nigeria, and Pakistan as of 2004 (<http://www.polioeradication.org/progress.asp>).

The Sabin strains (Sabin 1, 2, and 3) are attenuated PV strains and have been widely used as live oral PV vaccine (OPV) (44). Following the administration of OPV, the viruses infect the mucosal tissues and are commonly excreted for 3 to 7 weeks from immunocompetent individuals (1, 18) and occasionally for 10 to 22 years from immunodeficient patients (2, 25, 32; reviewed in reference 48). During the replication of the Sabin strains, revertants with increased virulence could emerge and cause vaccine-associated paralytic poliomyelitis in rare cases. The rate of vaccine-associated paralytic poliomyelitis has been estimated as one case per 520,000 doses associated with the first dose of OPV (35). The revertants have been isolated

from healthy individuals and also from the environment (21, 52).

Recently, outbreaks of poliomyelitis caused by circulating vaccine-derived PV (cVDPV) have been reported in Egypt, Hispaniola, the Philippines, and Madagascar (6, 8, 10, 24, 51). Sequence analysis of the genomes of cVDPVs showed unidentified sequences in the nonstructural protein coding region. These sequences are considered to be derived from recombination with unidentified nonpolio enterovirus (NPEV) during the circulation of VDPVs for 1 to 10 years (6, 8, 10, 24, 49, 51). However, a highly evolved derivative of Sabin strains without recombination by an unidentified counterpart has been isolated from an acute flaccid paralysis (AFP) case after a long-term circulation (12). Therefore, the biological role of the recombination of cVDPVs with unidentified counterpart remains to be elucidated. At present, increased transmissibility of cVDPVs compared with that of the parental Sabin strains has been proposed as a result of the recombination (3, 16); however, no virological evidence has been provided so far.

Indigenous wild PVs have been eliminated in regions where cVDPVs have been reported (1991 in the Americas [42], 1993 in the Philippines [11], and 1998 in Madagascar [41]) except Egypt. Therefore, the field NPEVs genetically closely related to PV or highly mutated Sabin derivatives are considered the possible counterparts of the recombination. Among NPEVs, coxsackie A viruses (CAVs) belonging to human enterovirus species C (HEV-C) are the suspected origin of the recombination because of the higher similarity of the genomic se-

\* Corresponding author. Mailing address: Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Gakuen, Musashimurayama-shi, Tokyo 208-0011, Japan. Phone: 81-42-561-0771. Fax: 81-42-561-4729. E-mail: minetaro@nih.go.jp.

† Supplemental material for this article may be found at <http://jvi.asm.org>.

TABLE 1. Primers used for sequence analysis of enterovirus isolates

Primer	Sequence <sup>a</sup>	Corresponding site on Sabin 3 genome (nt)
UG16	GTGGTGGGAACGGTTCACA	5912–5931
EcoRI-3END-	ACTGGAATCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	7432–poly(A)tail
UC12	TCAATTAGTCTGGATTTCCCTG	6485–6507
EVP4	CTACTTTGGGTGTCCGTGTT	544–563
OL68-1	GGTAAATTCCACCACCANCC	1178–1197
2A2+	TTTKCNGMACCWGGKAYTGYGGYGG	3683–3708
2C-	GGYTCAATACGGYRTTTGCTTTGAACTG	4451–4479
292	MIGCIGYIGARACNGG	2604–2619
222	CICCGGGIYRACAT	2942–2960

<sup>a</sup> Variable sequence positions in the primers are expressed according to the IUPAC system. Sequences read from the 5' position at the left end.

quence with that of PV compared with those of other NPEVs belonging to HEV-A, HEV-B, or HEV-D (4, 22). A recent report indicated that HEV-C was frequently isolated in Madagascar (around 50% of NEPV isolates), suggesting the possible involvement of HEV-C in the emergence of the recombinant *vDPVs* (41).

Here, we report an isolation and genetic characterization of a Sabin 3-derived PV recombinant (Cambodia-02) from an AFP case in Cambodia in 2002. Based on the previously estimated evolution rates of PVs, it was estimated that Cambodia-02 was isolated within 6 months after the administration of OPV, suggesting that the recombination occurred within 6 months before the isolation. This prompted us to identify the recombination counterpart of Cambodia-02 among the HEV-C isolates in Cambodia. We performed phylogenetic analysis and identification of NPEV isolates from AFP cases in Cambodia from 1999 to 2003.

#### MATERIALS AND METHODS

**Cells and viruses.** RD cells (derived from human rhabdomyosarcoma), HEp-2c cells (derived from human larynx epidermoid carcinoma) and L20B cells (derived from mouse L tk<sup>-</sup> aprt<sup>-</sup> fibroblast) were cultured as monolayers in Eagle's minimum essential medium supplemented with 2% fetal calf serum (33, 50). RD, HEp-2c, and L20B cells were used for the virus isolation from fecal samples of AFP cases. Virus stocks were stored at -70°C.

**Sequence analysis of the genomes of enterovirus isolates.** Viral genomic RNA was isolated from the culture fluid of infected cells by using a High Pure viral RNA purification kit (Roche). DNA fragments used for the DNA sequencing were prepared by reverse transcription-PCR (RT-PCR) using the viral genomic RNA as the template by use of a Titan one-tube RT-PCR system (Roche). PCR products were purified by using a QIAquick PCR purification kit (QIAGEN). DNA sequencing was performed using a BigDye Terminator v3.0 cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems), and then sequences were analyzed by use of an ABI PRISM 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems). The sequences of the 5' end of the viral genomes were determined by the 5' rapid amplification of cDNA ends method by using a 5' rapid amplification of cDNA ends system, version 2.0 (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. The sequence of the 3' end of the viral genomes was determined from an RT-PCR product obtained with UG16 primer (20) and EcoRI-3END- (Table 1). The percentage of the mutated synonymous sites among all synonymous sites (*K<sub>s</sub>*) was calculated for the VP1 coding region as previously reported (2, 12, 17). Phylogenetic trees were constructed by the neighbor-joining method after bootstrapping 1,000 times (14, 45) using PHYLIP software (Joseph Felsenstein 1990, University of Washington). The nucleotide substitutions among the isolates were estimated by the Kimura-2 parameter method (26). The rate of transition-transversion was set at 2.0. Similarity plot analysis of HEV-C isolates was performed by using SimPlot (29).

Primers used for the sequence analysis are listed on Table 1. Primers UG16 and UC12 were used for the analysis of a part of the 3D<sup>pol</sup> coding region (20). Primers EVP4 and OL68-1 were used for the analysis of the VP4 coding region (39, 43). Primers 2A2+ and 2C- were designed and used for the analysis of a

part of the 2BC coding region. Primers 292 and 222 were used for the initial analysis of the VP1 coding region (37). Genomic sequences used for the phylogenetic analysis were as follows: 207 nt of the VP4 coding region (corresponding to nt 743 to 949 of the Sabin 3 genome), 337 nt of the 2BC coding region (corresponding to nt 3854 to 4190 of the Sabin 3 genome), and 352 nt of the 3D<sup>pol</sup> coding region (corresponding to nt 6137 to 6488 of the Sabin 3 genome).

**Identification of NPEV isolates.** A panel of horse antisera against commonly found NPEVs (RIVM, Bilthoven, The Netherlands), which include echo and coxsackie B viruses, was used for the identification of HEV-B. Antisera against CAVs were purchased from the American Type Culture Collection. A total of 100 50% cell culture infectious doses of enterovirus isolates were incubated with 20 units of antiserum for 2 h in 37°C, and then HEp-2c cell or RD cell suspensions in 10% fetal calf serum–minimum essential medium were added and incubated at 35.5°C (50). Inoculated cells were observed for cytopathic effect until 24 h after the complete appearance of cytopathic effect in the cells inoculated with the isolates in the absence of antiserum.

**Accession numbers of the nucleotide sequences.** All the nucleotide sequences determined in this study were submitted to the DNA Data Bank of Japan (DDBJ). The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers of each sequence were as follows. The accession numbers of the VP4 coding region, the 2BC coding region, and the 3D<sup>pol</sup> coding region of the NPEV isolates are AB206334 to AB206380, AB206709 to AB206757, and AB205529 to AB205546, respectively (see Fig. 2, 3, and 5 and the supplemental material). The accession numbers of the VP1 coding region of CAM1952, CAM2033, CAM2038, and CAM2083 are AB207264, AB207263, AB207265, and AB207266, respectively (Table 1). The accession numbers of the genomic sequences of Cambodia-02, CAM1900, CAM1972, CAM2069, and CAM2101 are AB205395, AB205397, AB205396, AB205398, and AB205399, respectively.

#### RESULTS

**Isolation of a type 3 PV recombinant from an AFP case.** In 2002, type 3 PVs were isolated from three AFP cases in Cambodia. These PV isolates were initially characterized by sequencing of the VP1 coding region, and all the isolates were classified as OPV-like PVs according to the criteria of the World Health Organization (less than 1% nucleotide difference from the parental Sabin 3) (50). However, we found that one of these PV isolates (Cambodia-02) contained an unidentified sequence in the 3D<sup>pol</sup> coding region which was apparently not related to those of the Sabin strains (Fig. 1). Further sequence analysis of the genome of Cambodia-02 showed that the 5' part of the genome (from nt 1 to 3777), including the 5' nontranslated region (5'NTR), the structural protein coding region, and a part of the 2A<sup>pro</sup> coding region, was derived from Sabin 3 followed by an unidentified sequence from the 2A<sup>pro</sup> coding region to the 3' end of the genome (from nt 3778 to the 3' end) (Fig. 1B and C). The nonstructural protein coding region of Cambodia-02 showed only low similarity with those of Sabin strains (Fig. 1B).

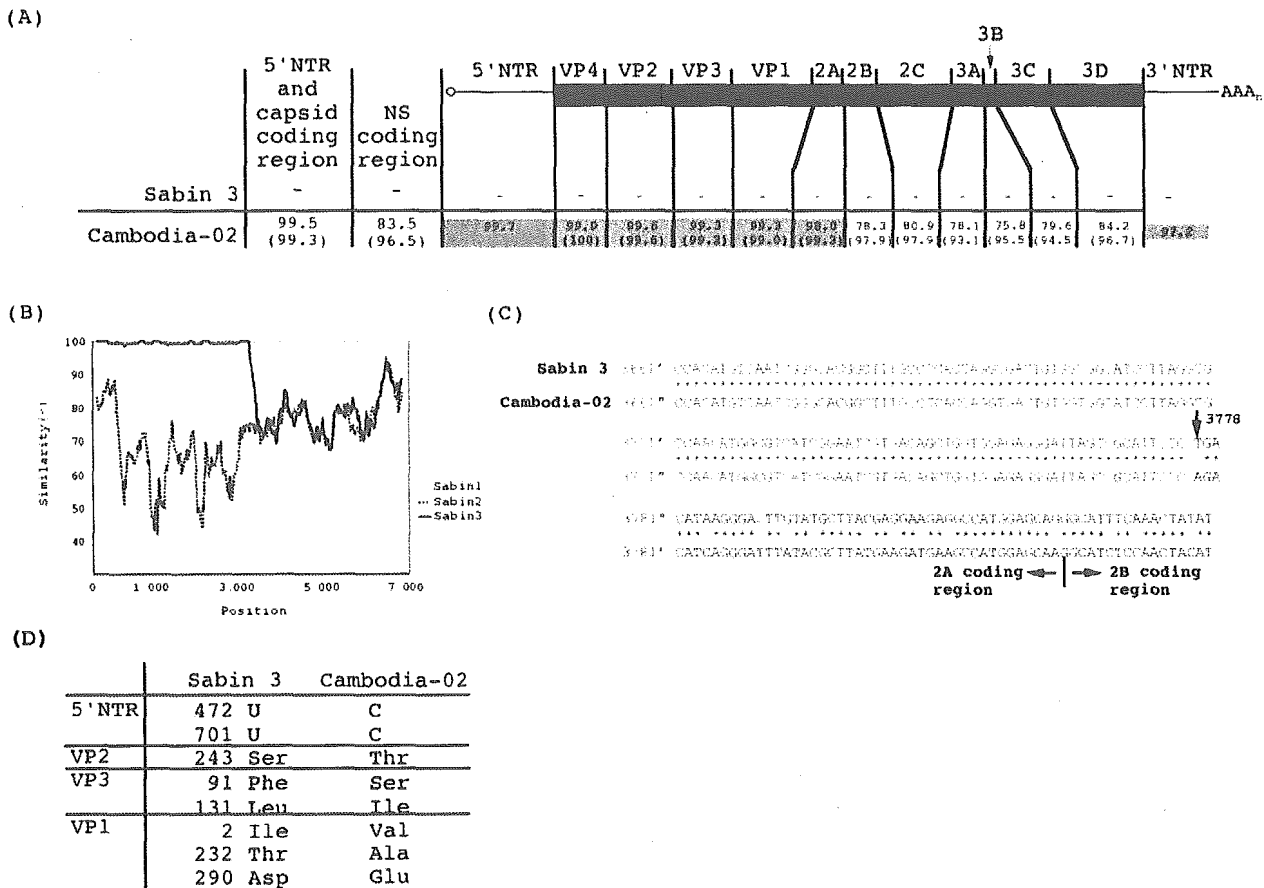


FIG. 1. The genomic sequence of Cambodia-02. (A) Alignment of the genome of Cambodia-02 (accession no. AB205395) with that of Sabin 3 (accession no. X00925). The numbers in each region represent the percentages of nucleotide identity with the Sabin 3 genome. The numbers in parentheses represent the percentages of amino acid identity. The genomic regions that showed more than 90% amino acid identity are colored with light gray, and genomic regions that showed more than 96% nucleotide identity are colored with dark gray. The nucleotide identity in the 5' part of the genome (including the 5' NTR and the structural protein coding region) and in the nonstructural protein (NS) coding region are also shown. (B) Similarity plot analysis of Cambodia-02 and Sabin strains (Sabin 1, accession no. AY184219; Sabin 2, accession no. AY184220) calculated by SimPlot. The nucleotide sequence of the Cambodia-02 genome was used as the reference. A window size of 200 bp with an increment of 20 bp was used. (C) Alignment of the genome of Cambodia-02 with that of Sabin 3 near the putative recombination junction in the 2A<sup>pro</sup> coding region. The part representing unidentified sequence (from nt 3778 to the 3' end) is colored with light gray. (D) The nucleotide and amino acid differences in the 5' NTR and the capsid proteins of Cambodia-02. Numbers represent the positions of nucleotides in the 5' NTR or of the amino acid residues in each capsid protein.

The nucleotide identity of the 5' part of the Cambodia-02 genome to Sabin 3 was 99.5%. The  $K_1$  value of Cambodia-02 calculated for the VP1 coding region was  $1.35 \times 10^{-2}$  (with a standard error of  $0.77 \times 10^{-2}$ ). Using evolution rates of PV observed for immunodeficiency cases ( $2.85 \times 10^{-2}$  to  $3.28 \times 10^{-2}$  synonymous substitutions per synonymous site per year) or for transmission of wild PV recombinants ( $3.45 \times 10^{-2}$  synonymous substitutions per synonymous site per year) (2, 17, 28), we estimated that Cambodia-02 was isolated within 6 months after the administration of OPV. Cambodia-02 had reversions at the major attenuation determinants of Sabin 3 at nt 472 (U to C) and nt 2034, which resulted in an amino acid change of VP3 Phe91 to Ser (13, 31) (Fig. 1D). The Cambodia-02 genome contained multiple mutations in the structural protein coding region in addition to VP3 Phe91, as previously reported for temperature-resistant revertants of Sabin 3 (15, 31, 34).

**Isolation and identification of HEV-C from AFP cases in Cambodia.** We analyzed the genome of NPEV isolates from AFP cases around 2002 in Cambodia to identify the putative recombination counterpart of Cambodia-02. In 2002, we isolated NPEVs from 53 AFP cases (one was from a mixed case with PV) among a total of 155 AFP cases (Table 2). For the initial molecular typing of the isolates, we analyzed the VP4 coding region (nt 743 to 949 of the Sabin 3 genome; 207 nt) to classify the isolates into each genomic species (HEV-A, HEV-B, and HEV-C) (23). We found that 21 isolates were grouped into HEV-C by the phylogenetic tree analysis of the sequence of the VP4 coding region (data not shown). We identified the serotype of HEV-C isolates by a neutralization assay using type-specific antisera or by sequence analysis of the VP1 coding region. We could not discriminate CAV13 from CAV18 or CAV11 from CAV15 by the sequence analysis or by the neutralization assay, consistent with previous reports (4,

TABLE 2. Virus isolation from AFP cases in Cambodia from 1999 to 2003

Identification	No. of cases				
	1999	2000	2001	2002	2003
AFP	149	230	168	155	128
Virus isolated	49	73	46	55	39
Poliovirus <sup>a</sup>	3	9	4	3	4
Nonenterovirus	6	8	4	3	3
HEV-A	3	6	0	9	3
HEV-B	25	26	24	20	13
HEV-C	12	24	15	21	16

<sup>a</sup> OPV-related isolates.

36). The deduced amino acid sequence of the VP1 protein of CAM2033 and CAM2038 showed a high nucleotide identity with those of CAV17 (94.1%) and CAV11-CAV15 (96.7%), respectively. We could not identify the serotype of CAM2083 from the deduced amino acid sequence of the VP1 protein, which showed low similarity with known enteroviruses. We observed the highest amino acid identity only with CAV24 (DN-19 strain) (74.1%) or with a CAV24 variant (73.1%). Consequently, HEV-C isolates in Cambodia in 2002 consisted of CAV1, CAV11-CAV15, CAV17, CAV13-CAV18, CAV20, CAV24, and an untypable HEV-C strain CAM2083 (Table 3).

**Sequence analysis of HEV-C isolates in the 3D<sup>pol</sup> coding region.** We then analyzed the genomic sequence in the 3D<sup>pol</sup> coding region of the HEV-C isolates. The phylogenetic analysis of a part of the 3D<sup>pol</sup> coding region (corresponding to a region of nt 6137 to 6488 of the Sabin 3 genome; 352 nt) showed that the isolates formed distinct genetic clusters from those of the prototype HEV-C strains, as observed for the sequence analysis of the VP4 coding region (Fig. 2). The phylogenetic analysis of the 3D<sup>pol</sup> coding region failed to show a clear relationship between the serotypes of isolates and their genetic clusters. For CAM1974, CAM2083, and CAM2091, we could not obtain the corresponding DNA fragment by RT-PCR. In the phylogenetic analysis, a genetic cluster of indigenous CAV13-CAV18 strains was the closest to Cambodia-02. We found that a CAV13-CAV18 isolate (CAM1900) showed the highest nucleotide identity (94.0%) to Cambodia-02 among the HEV-C isolates. We further analyzed the nonstructural protein coding region of CAM1900 and found that CAM1900 showed a high identity to

TABLE 3. Isolation of HEV-C from AFP cases in Cambodia from 1999 to 2003

HEV-C isolate	No. of isolates				
	1999	2000	2001	2002	2003
CAV1	0	0	0	1	1
CAV11/15	2	3	0	1	3
CAV13/18	2	3	0	7	2
CAV17	1	2	4	7	0
CAV20	2	5	2	2	3
CAV21	0	1	0	0	0
CAV24	2	4	7	2	6
CAM2083	3	6	2	1	1
Total	12	24	15	21	16

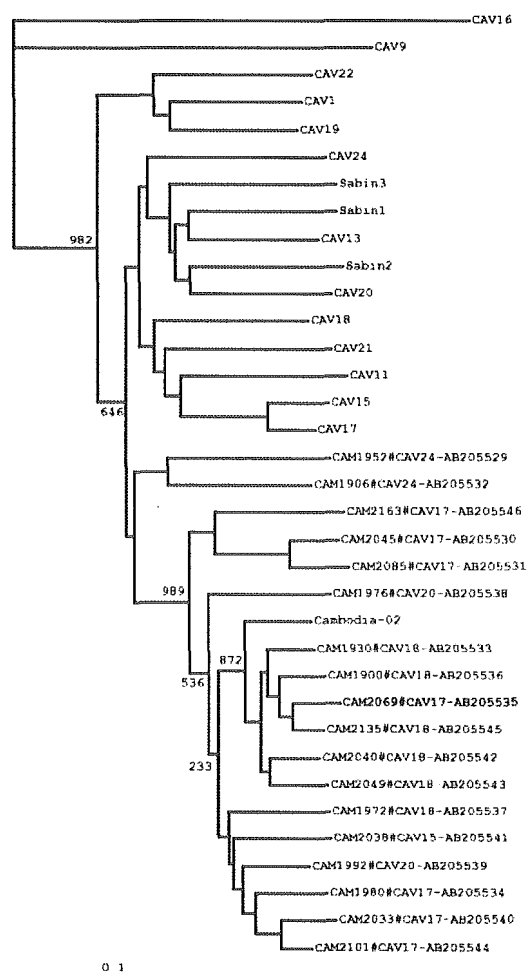


FIG. 2. Phylogenetic analysis of the 3D<sup>pol</sup> coding region. The phylogenetic tree was generated from the nucleotide sequences of the 3D<sup>pol</sup> coding region of Cambodian HEV-C isolates, prototype HEV-C strains, and Sabin strains. The location of Cambodia-02 is indicated by an arrow. A putative HEV-C recombinant (CAM2069) is colored with light gray. The nomenclature of the isolates indicates the names of the isolates, serotypes, and the GenBank/EMBL/DBJ accession numbers. Bootstrap values are shown at the branch nodes. Bar, 0.1 substitution per site.

Cambodia-02 only in the 3D<sup>pol</sup> coding region (94.9%) but not in other regions (Fig. 3A and C).

In the phylogenetic analysis of the 3D<sup>pol</sup> coding region, we found that a CAV17 isolate, CAM2069, was located apart from other CAV17 isolates in a genetic cluster of indigenous CAV13-CAV18 strains. The sequence analysis of CAM2069 showed that CAM2069 exhibited a high (95.5 to 97.7%) nucleotide identity to CAM2101 (a CAV17 isolate) for the 2C and the 3AB coding regions. However, the 3CD<sup>pro</sup> coding region of CAM2069 showed high (93.3 to 95.5%) nucleotide identity to that of CAV13-CAV18, as observed in the phylogenetic analysis of the 3D<sup>pol</sup> coding region (Fig. 2) and in the similarity plot analysis (Fig. 3C). This observation suggested that recombination between CAV13-CAV18 and CAV17 could occur at least in the 3CD<sup>pro</sup> coding region.

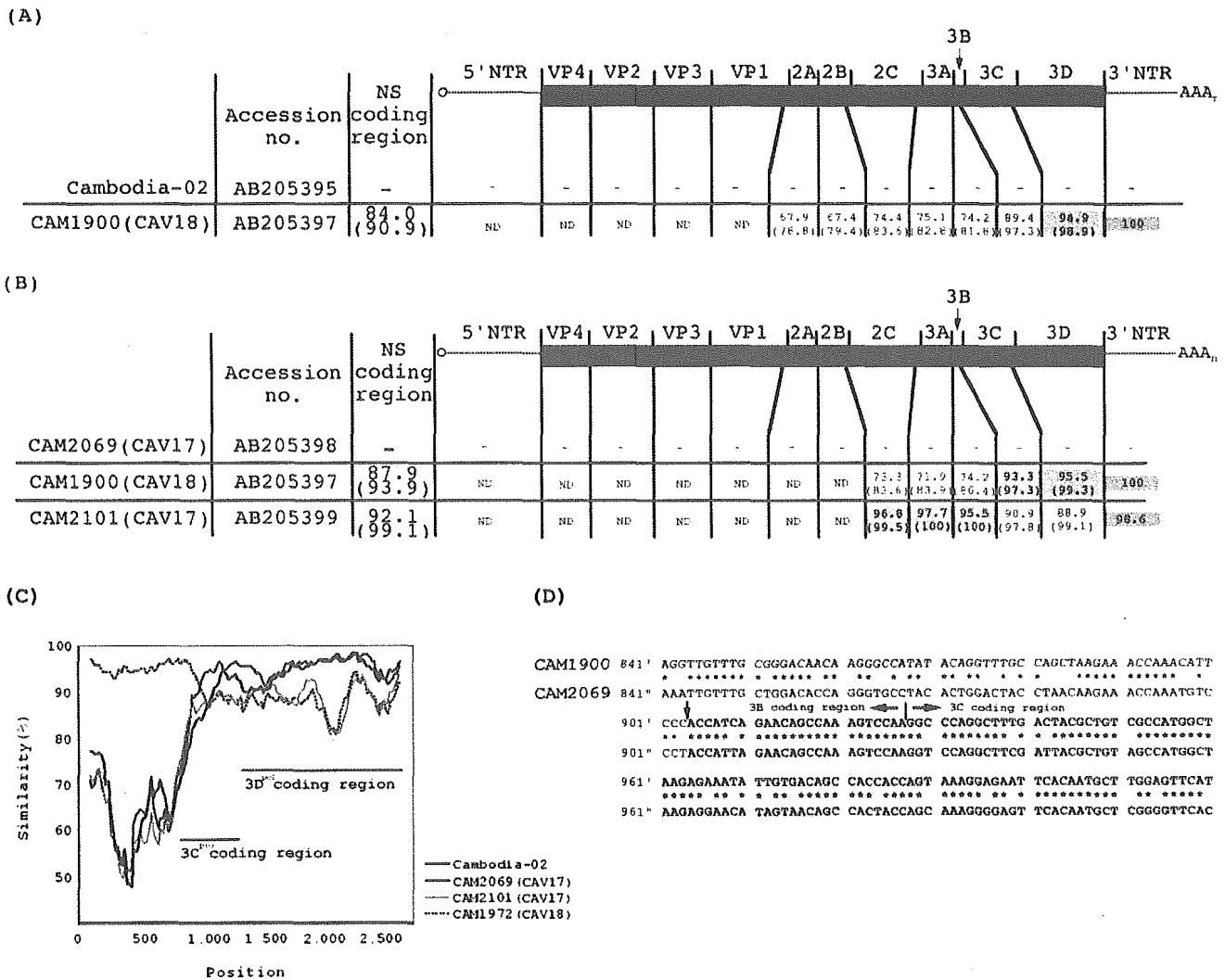


FIG. 3. Alignment of the genomes of Cambodian HEV-C isolates. The numbers in each region represent the percentages of nucleotide identity, and the numbers in parentheses represent the percentages of amino acid identity. The genomic regions that showed more than 90% amino acid identity are colored with light gray, and the genomic regions that showed more than 92% nucleotide identity are colored with dark gray. (A) Alignment of Cambodia-02 with a CAV13-CAV18 isolate (CAM1900). (B) Alignment of a CAV17 isolate (CAM2069) with CAM1900 (CAV13-CAV18) and CAM2101 (CAV17). (C) Multisequence analysis of HEV-C isolates and Cambodia-02 by similarity plot analysis calculated by SimPlot. CAM1900 was used as the reference. A window size of 200 bp with an increment of 20 bp was used. The locations of 3C<sup>pro</sup> and 3D<sup>pro</sup> coding regions are shown in the plot. (D) Alignment of a part of the genome of CAM1900 with that of CAM2069 around the putative recombination junction near the 3C<sup>pro</sup> coding region. The part representing unidentified sequence is colored with gray. NS; nonstructural protein, ND; not determined.

**Sequence analysis of HEV-C isolates in the 2BC coding region.** Next, we analyzed the sequence of another nonstructural protein coding region of HEV-C isolates, because the analysis in the 3D<sup>pro</sup> coding region failed to identify the recombination counterpart. For this purpose, we designed a new primer set for RT-PCR and DNA sequencing, 2A<sup>+</sup> and 2C<sup>-</sup>, in the 2A<sup>pro</sup> coding region and in a *cis*-acting replication element in the 2C coding region (19, 40), respectively. By using this primer set, we analyzed a sequence of the 2BC coding region (corresponding to nt 3854 to 4190 of the Sabin 3 genome; 337 nt) for all the NPEV isolates (Fig. 4). We then analyzed the sequence of three isolates (CAM1920, CAM1936, and CAM2034) for which we could not analyze the sequence of the VP4 coding region. However, one isolate (CAM1952, a

CAV24 strain) failed to give an RT-PCR product. In the phylogenetic analysis of the 2BC coding region, we observed a close relationship between the serotypes of isolates and the genetic clusters. In this phylogenetic analysis, Cambodia-02 was again located close to the genetic clusters of indigenous HEV-C but not to those of the HEV-C prototypes. CAM2101 (a CAV17 isolate) showed the highest nucleotide identity to Cambodia-02 in the 2BC coding region; however, the identity was not significantly high (86.9%).

**HEV-C isolates from AFP cases in Cambodia from 1999 to 2003.** To identify the recombination counterpart of Cambodia-02, we further analyzed the NPEV isolates from 1999 to 2003 in Cambodia. HEV-C was a dominant HEV species isolated from AFP cases in this period, suggesting that the prevalence

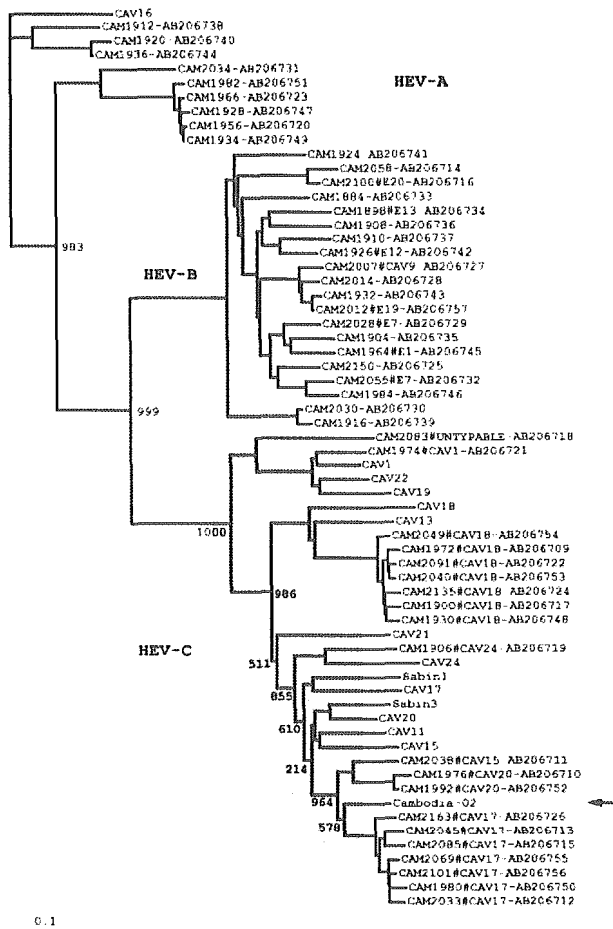


FIG. 4. Phylogenetic analysis of the 2BC coding region. The phylogenetic tree was generated from the nucleotide sequences in the 2BC coding region of Cambodian NPEV isolates, prototype HEV-C strains, and Sabin strains. The location of Cambodia-02 is indicated by an arrow. The nomenclature of the isolates indicates the names of the isolates, serotypes, and the GenBank/EMBL/DBJ accession numbers. Bootstrap values are shown at the branch nodes. Bar, 0.1 substitution per site.

of HEV-C was consistently high in Cambodia (Table 2 and 3). The dominant serotypes of HEV-C were different from year to year; in 2002, they were CAV17 and CAV13-CAV18. In the phylogenetic analysis of the 2BC coding region, Cambodia-02 was grouped into a cluster of the indigenous CAV15-CAV17-CAV20 isolates. However, the nucleotide identity was not significantly high, and the highest (90.1%) was found with a CAV17 isolate in 2000 (data not shown). Therefore, we could not identify the exact recombination counterpart among the HEV-C isolates examined. However, these results suggested that the recombination counterpart of Cambodia-02 was genetically closely related to the indigenous HEV-C strains in Cambodia.

DISCUSSION

A Sabin 3-derived PV recombinant (Cambodia-02) analyzed in this study was isolated from an AFP case in Cambodia in 2002. Cambodia-02 was classified as OPV-like PV by sequence

analysis in the VP1 coding region. In 2002, we isolated three type 3 PVs, including Cambodia-02, from AFP cases in Cambodia, but these PV isolates were genetically unrelated to each other (data not shown). Therefore, this evidence suggested that Cambodia-02 was isolated from a sporadic AFP case and did not result from a circulating strain.

Cambodia-02 was isolated within 6 months after the administration of OPV, as determined on the basis of the previous estimation of the evolution rate of PVs (2, 17). Thus, the unidentified sequence of Cambodia-02 should have retained the original genetic feature of the recombination counterpart. The last indigenous PV case in Cambodia was reported in 1997 (7); therefore, we examined HEV-C strains for the recombination counterpart. We examined HEV-C isolates from AFP cases in Cambodia; however, these isolates represented only a minor population of circulating HEV-C strains that would mostly result in asymptomatic infection. Therefore, through this strategy, we could expect to find some HEV-C strains that were only related to the recombination counterpart. We found that HEV-C was a dominant enterovirus species that could be isolated from the AFP cases in Cambodia (Table 2). The HEV-C isolates consisted of CAV1, CAV11-CAV15, CAV13-CAV18, CAV17, CAV20, CAV21, CAV24, and an untypable serotype represented by CAM2083 (Table 3). HEV-C strains have not been isolated as major NPEVs through the established enterovirus surveillance systems (5, 9) (<http://idsc.nih.gov/ja/iasr/prompt/circle-g/meningi/menin.html> [in Japanese]). However, recently, a high frequency of HEV-C isolation (~50% of the isolates) was reported in Madagascar, where type 2 cVDPVs emerged in 2002 (10, 41). Therefore, HEV-C might be a dominant HEV species among the circulating enteroviruses in tropical areas. However, the prevalence of HEV-C in other tropical areas remained to be further investigated.

We performed a comprehensive sequence analysis of HEV-C isolates in three different genomic regions, including the 2BC coding region and the 3D<sup>pol</sup> coding region (20, 39, 43) (Fig. 2 and 4). We designed a new primer set, 2A2+ and 2C-, for the analysis of the 2BC coding region (Table 1). The 2A2+ primer was designed in the 2A<sup>pro</sup> coding region, and the 2C- primer was designed in a cis-acting replication element of the enterovirus (19, 40). This primer set showed a broad spectrum of applicability for HEV-A, HEV-B, and HEV-C isolates, and sequence analysis using this primer set failed for only one isolate (CAM1952 [CAV24]) among 216 NPEV isolates. Recombination junctions of cVDPV have been identified in the 2AB coding region (6, 8, 10, 24). Therefore, with a wide spectrum of applicability for NPEV, this primer set would serve as a useful tool to identify HEV-C strains related to the recombination counterpart of cVDPV.

From the sequence analysis, we found that the nonstructural protein coding regions of Cambodia-02 were grouped into the genetic clusters of the indigenous CAV17 and CAV13-CAV18 strains in Cambodia, distinct from those of the HEV-C prototype strains (Fig. 2 and 4). We isolated CAV17 from 2001 to 2002 and CAV13-CAV18 from 2002 to 2003. Thus, both CAV17 and CAV13-CAV18 were highly prevalent and could be available as the recombination counterpart of Cambodia-02 in 2002. One of the CAV13-CAV18 isolates (CAM1900) showed the highest (94.9%) nucleotide identity to Cambo-

dia-02 in the 3D<sup>pol</sup> coding region (Fig. 4). The nucleotide identities in the 3D<sup>pol</sup> coding region among isolates with the same HEV-C serotype isolated in 2002 were 95 to 96% (Fig. 3), and Cambodia-02 showed a nucleotide identity comparable to indigenous HEV-C isolates in 2002. This suggested that these HEV-C isolates had evolved independently before the putative epidemic in 2002. Interestingly, we found a putative CAV recombinant (CAM2069) in the 3CD<sup>pro</sup> coding region, suggesting frequent interserotypic recombination between CAV17 and CAV13-CAV18 in this region (Fig. 4). Actually, the 3CD<sup>pro</sup> coding region showed high similarities among CAV13-CAV18, CAV11-CAV15, CAV17, and CAV20 (4, 22). This was reminiscent of frequent recombination among HEV-B strains and also among human rhinoviruses where the 3D<sup>pol</sup> coding regions of the same serotype were not monophyletic (27, 30, 38, 47). However, we could not find the exact recombination counterpart among the indigenous HEV-C isolates from AFP cases, although their nonstructural protein coding region was closely related to that of Cambodia-02.

In summary, we isolated a type 3 PV recombinant from an AFP case in Cambodia and suggested that the unidentified sequence of the recombinant was derived from an indigenous HEV-C strain in Cambodia. In addition to the poor population immunity, the high prevalence of HEV-C would be another critical factor for the emergence and/or the evolution of cVDPV. The biological roles of the recombination of cVDPV remain to be further studied.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Keith Feldon and Cambodian local and regional EPI staffs for their expert surveillance. We are grateful to Junko Wada for her excellent assistance.

This work was supported by grants-in-aid for "Promotion of Polio Eradication" from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan, and by a grant for health research from the regional office for the Western Pacific, World Health Organization. H.S. was supported in part by grants-in-aid for "Development of Expanded Programme on Immunization and Accelerating Measles Control in the Polio-free Era" from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan.

#### REFERENCES

- Alexander, J. P., Jr., H. E. Gary, Jr., and M. A. Pallansch. 1997. Duration of poliovirus excretion and its implications for acute flaccid paralysis surveillance: a review of the literature. *J. Infect. Dis.* 175:5176-5182.
- Bellmont, A., G. May, R. Zell, P. Pring-Akerblom, W. Verhagen, and A. Heim. 1999. Evolution of poliovirus type 1 during 5.5 years of prolonged enteral replication in an immunodeficient patient. *Virology* 265:178-184.
- Boot, H. J., D. T. Kasteel, A. M. Buisman, and T. G. Kimman. 2003. Excretion of wild-type and vaccine-derived poliovirus in the feces of poliovirus receptor-transgenic mice. *J. Virol.* 77:6541-6545.
- Brown, B., M. S. Oberste, K. Maher, and M. A. Pallansch. 2003. Complete genomic sequencing shows that polioviruses and members of human enterovirus species C are closely related in the noncapsid coding region. *J. Virol.* 77:8973-8984.
- Caro, V., S. Guillot, F. Delpeyroux, and R. Crainic. 2001. Molecular strategy for 'serotyping' of human enteroviruses. *J. Gen. Virol.* 82:79-91.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2001. Acute flaccid paralysis associated with circulating vaccine-derived poliovirus—Philippines, 2001. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 50:874-875.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2001. Certification of poliomyelitis eradication—Western Pacific Region, October 2000. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 50:1-3.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2001. Circulation of a type 2 vaccine-derived poliovirus—Egypt, 1982-1993. *JAMA* 285:1148-1149.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2002. Enterovirus surveillance—United States, 2000-2001. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 51:1047-1049.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2002. Poliomyelitis—Madagascar, 2002. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 51:622.
- Centers for Disease Control and Prevention. 1997. Progress toward poliomyelitis eradication—Western Pacific Region, January 1, 1996-September 27, 1997. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 46:1113-1117.
- Cherkasova, E. A., E. A. Korotkova, M. L. Yakovenko, O. E. Ivanova, T. P. Eremeeva, K. M. Chumakov, and V. I. Agol. 2002. Long-term circulation of vaccine-derived poliovirus that causes paralytic disease. *J. Virol.* 76:6791-6799.
- Evans, D. M., G. Dunn, P. D. Minor, G. C. Schild, A. J. Cann, G. Stanway, J. W. Almond, K. Currey, and J. V. Maizel. 1985. Increased neurovirulence associated with a single nucleotide change in a noncoding region of the Sabin type 3 poliovaccine genome. *Nature* 314:548-550.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Filman, D. J., R. Syed, M. Chow, A. J. Macadam, P. D. Minor, and J. M. Hogle. 1989. Structural factors that control conformational transitions and serotype specificity in type 3 poliovirus. *EMBO J.* 8:1567-1579.
- Fine, P. E., and I. A. Carneiro. 1999. Transmissibility and persistence of oral polio vaccine viruses: implications for the global poliomyelitis eradication initiative. *Am. J. Epidemiol.* 150:1001-1021.
- Gavrilin, G. V., E. A. Cherkasova, G. Y. Lipskaya, O. M. Kew, and V. I. Agol. 2000. Evolution of circulating wild poliovirus and of vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient: a unifying model. *J. Virol.* 74:7381-7390.
- Gelfand, H. M., P. L., D. R. LeBlanc, and J. P. Fox. 1959. Revised preliminary report on the Louisiana observations of the natural spread within families of living vaccine strains of poliovirus, p. 203-217. First international conference on live poliovirus vaccines. Pan American Sanitary Bureau, Washington, D.C.
- Goodfellow, I., Y. Chaudhry, A. Richardson, J. Meredith, J. W. Almond, W. Barclay, and D. J. Evans. 2000. Identification of a cis-acting replication element within the poliovirus coding region. *J. Virol.* 74:4590-4600.
- Guillot, S., V. Caro, N. Cuervo, E. Korotkova, M. Combiescu, A. Persu, A. Aubert-Combiescu, F. Delpeyroux, and R. Crainic. 2000. Natural genetic exchanges between vaccine and wild poliovirus strains in humans. *J. Virol.* 74:8434-8443.
- Horie, H., H. Yoshida, K. Matsuura, M. Miyazawa, Y. Ota, T. Nakayama, Y. Doi, and S. Hashizume. 2002. Neurovirulence of type 1 polioviruses isolated from sewage in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:138-142.
- Hyypia, T., T. Hovi, N. J. Knowles, and G. Stanway. 1997. Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties. *J. Gen. Virol.* 78:1-11.
- Ishiko, H., Y. Shimada, M. Yonaha, O. Hashimoto, A. Hayashi, K. Sakae, and N. Takeda. 2002. Molecular diagnosis of human enteroviruses by phylogeny-based classification by use of the VP4 sequence. *J. Infect. Dis.* 185:744-754.
- Kew, O. V. Morris-Glasgow, M. Landaverde, C. Burns, J. Shaw, Z. Garib, J. Andre, E. Blackman, C. J. Freeman, J. Jorba, R. Sutter, G. Tambini, L. Venczel, C. Pedreira, F. Laender, H. Shimizu, T. Yoneyama, T. Miyamura, H. van Der Avoort, M. S. Oberste, D. Kilpatrick, S. Cochi, M. Pallansch, and C. deq Uadros. 2002. Outbreak of poliomyelitis in Hispaniola associated with circulating type 1 vaccine-derived poliovirus. *Science* 296:356-359.
- Kew, O. M., R. W. Sutter, B. K. Nottay, M. J. McDonough, D. R. Prevots, L. Quick, and M. A. Pallansch. 1998. Prolonged replication of a type 1 vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient. *J. Clin. Microbiol.* 36:2893-2899.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16:111-120.
- Lindberg, A. M., P. Andersson, C. Savolainen, M. N. Mulders, and T. Hovi. 2003. 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.
- Liu, H. M., D. P. Zheng, L. B. Zhang, M. S. Oberste, O. M. Kew, and M. A. Pallansch. 2003. Serial recombination during circulation of type 1 wild-vaccine recombinant polioviruses in China. *J. Virol.* 77:10994-11005.
- Lole, K. S., R. C. Bollinger, R. S. Paranjape, D. Gadkari, S. S. Kulkarni, N. G. Novak, R. Ingersoll, H. W. Sheppard, and S. C. Ray. 1999. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J. Virol.* 73:152-160.
- Lukashchev, A. N., V. A. Lashkevich, O. E. Ivanova, G. A. Koroleva, A. E. Hinkkanen, and J. Honen. 2003. Recombination in circulating enteroviruses. *J. Virol.* 77:10423-10431.
- Macadam, A. J., C. Arnold, J. Howlett, A. John, S. Marsden, F. Taffs, P. Reeve, N. Hamada, K. Wareham, J. Almond, N. Cammack, and P. D. Minor. 1989. Reversion of the attenuated and temperature-sensitive phenotypes of the Sabin type 3 strain of poliovirus in vaccinees. *Virology* 172:408-414.
- MacLennan, C., G. Dunn, A. P. Huissoon, D. S. Kumararatne, J. Martin, P. O'Leary, R. A. Thompson, H. Osman, P. Wood, P. Minor, D. J. Wood, and D. Pillay. 2004. Failure to clear persistent vaccine-derived neurovirulent poliovirus infection in an immunodeficient man. *Lancet* 363:1509-1513.
- Mendelsohn, C. L., E. Wimmer, and V. R. Racaniello. 1989. Cellular recep-

- tor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell* **56**:855–865.
34. **Minor, P. D.** 1992. The molecular biology of polio vaccines. *J. Gen. Virol.* **73**:3065–3077.
  35. **Nkowane, B. M., S. G. Wassilak, W. A. Orenstein, K. J. Bart, L. B. Schonberger, A. R. Hinman, and O. M. Kew.** 1987. Vaccine-associated paralytic poliomyelitis. United States: 1973 through 1984. *JAMA* **257**:1335–1340.
  36. **Oberste, M. S., K. Maher, D. R. Kilpatrick, and M. A. Pallansch.** 1999. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J. Virol.* **73**:1941–1948.
  37. **Oberste, M. S., W. A. Nix, K. Maher, and M. A. Pallansch.** 2003. Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing. *J. Clin. Virol.* **26**:375–377.
  38. **Oberste, M. S., S. Penaranda, and M. A. Pallansch.** 2004. RNA recombination plays a major role in genomic change during circulation of coxsackie B viruses. *J. Virol.* **78**:2948–2955.
  39. **Olive, D. M., S. Al-Mufti, W. Al-Mulla, M. A. Khan, A. Pasca, G. Stanway, and W. Al-Nakib.** 1990. Detection and differentiation of picornaviruses in clinical samples following genomic amplification. *J. Gen. Virol.* **71**:2141–2147.
  40. **Paul, A. V., E. Rieder, D. W. Kim, J. H. van Boom, and E. Wimmer.** 2000. Identification of an RNA hairpin in poliovirus RNA that serves as the primary template in the *in vitro* uridylation of VPg. *J. Virol.* **74**:10359–10370.
  41. **Rakoto-Andrianarivelo, M., D. Rousset, R. Razafindratsimandresy, S. Chevaliez, S. Guillot, J. Balanant, and F. Delpeyroux.** 2005. High frequency of human enterovirus species C circulation in Madagascar. *J. Clin. Microbiol.* **43**:242–249.
  42. **Robbins, F. C., and C. A. de Quadros.** 1997. Certification of the eradication of indigenous transmission of wild poliovirus in the Americas. *J. Infect. Dis.* **175**:S281–S285.
  43. **Rotbart, H. A.** 1990. Enzymatic RNA amplification of the enteroviruses. *J. Clin. Microbiol.* **28**:438–442.
  44. **Sabin, A. B.** 1965. Oral poliovirus vaccine. History of its development and prospects for eradication of poliomyelitis. *JAMA* **194**:872–876.
  45. **Saitou, N., and M. Nei.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406–425.
  46. **Salk, J. E.** 1960. Persistence of immunity after administration of formalin-treated poliovirus vaccine. *Lancet* **ii**:715–723.
  47. **Savolainen, C., P. Laine, M. N. Mulders, and T. Hovi.** 2004. Sequence analysis of human rhinoviruses in the RNA-dependent RNA polymerase coding region reveals large within-species variation. *J. Gen. Virol.* **85**:2271–2277.
  48. **Semler, B. L., and E. Wimmer.** 2002. Molecular biology of picornavirus, p. 387. ASM Press, Washington, D.C.
  49. **Shimizu, H., B. Thorley, F. J. Paladin, K. A. Brussen, V. Stambos, L. Yuen, A. Utama, Y. Tano, M. Arita, H. Yoshida, T. Yoneyama, A. Benegas, S. Roesel, M. Pallansch, O. Kew, and T. Miyamura.** 2004. Circulation of type 1 vaccine-derived poliovirus in the Philippines in 2001. *J. Virol.* **78**:13512–13521.
  50. **World Health Organization.** 2004. Polio laboratory manual, 4th ed. W.H.O./IVB/04.10. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
  51. **Yang, C. F., T. Naguib, S. J. Yang, E. Nasr, J. Jorba, N. Ahmed, R. Campagnoli, H. van der Avoort, H. Shimizu, T. Yoneyama, T. Miyamura, M. Pallansch, and O. Kew.** 2003. Circulation of endemic type 2 vaccine-derived poliovirus in Egypt from 1983 to 1993. *J. Virol.* **77**:8366–8377.
  52. **Yoshida, H., H. Horie, K. Matsuura, and T. Miyamura.** 2000. Characterisation of vaccine-derived polioviruses isolated from sewage and river water in Japan. *Lancet* **356**:1461–1463.





## Persistence of oral polio vaccine virus after its removal from the immunisation schedule in New Zealand

Q Sue Huang, Gail Greening, Michael G Baker, Keith Grimwood, Joanne Hewitt, Debbie Hulston, Lisa van Duin, Amanda Fitzsimons, Nick Garrett, David Graham, Diana Lennon, Hiroyuki Shimizu, Tatsuo Miyamura, Mark A Pallansch

Lancet 2005; 366: 394–96  
Published online  
May 3, 2005  
DOI: 10.1016/S0140-6736(05)66386-6

See Comment page 351

Institute of Environmental Science and Research, PO Box 50348, Porirua, New Zealand (Q S Huang PhD, G Greening PhD, M G Baker FAFPHM, J Hewitt MSc, D Hulston NZCS, L van Duin BMLS, A Fitzsimons BSc); Department of Paediatrics, Wellington School of Medicine and Health Sciences, University of Otago, Wellington, New Zealand (Prof K Grimwood MD); Faculty of Health, Auckland University of Technology, Auckland, New Zealand (N Garrett MSc); Waikato Hospital, Hamilton, New Zealand (D Graham FRACP); South Auckland Clinical School, Middlemore Hospital, Auckland, New Zealand (Prof D Lennon FRACP); Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan (H Shimizu PhD, T Miyamura MD);

On Feb 1, 2002, inactivated poliomyelitis vaccines replaced live-attenuated oral poliovirus vaccine (OPV) in New Zealand's immunisation schedule, allowing systematic monitoring of OPV virus circulation. Findings of paediatric-inpatient surveillance indicate that 7% of children excreted polioviruses before this switch, but none did so 1 month afterwards. Acute flaccid paralysis surveillance detected no poliovirus during and after the switch, whereas enterovirus surveillance detected poliovirus only once during the switch. Environmental surveillance identified polioviruses in sewage samples until May, 2002, after which they were detected infrequently. Intratypic differentiation and sequencing showed that all polioviruses were Sabin-like. Multiple surveillance methods hence showed that OPV strains did not persist for extended periods after a vaccine switch in a developed country with a temperate climate. Sequence homology with Sabin vaccine parent strains indicated that polioviruses detected more than 4 months after the switch were of recent origin, consistent with importation from OPV-using countries.

The global eradication of wildtype poliomyelitis by mass immunisation campaigns with live-attenuated oral poliovirus vaccine (OPV) is imminent, despite outbreaks of this disease in Nigeria in 2004–05 and persisting small reservoirs in Africa and Asia (<http://www.polioeradication.org>). A priority is to develop strategies of when and how to stop OPV immunisation once poliomyelitis is eradicated. However, whether vaccine virus transmission is sustained after withdrawal of OPV from immunisation schedules remains unknown. This question is important, since persistent circulation of OPV viruses increases the risk of reversion to fully neurovirulent vaccine-derived poliovirus strains in unvaccinated populations.<sup>1</sup>

After OPV vaccination, poliovirus is excreted by healthy children for 2–3 months and its persistence in populations is limited.<sup>1</sup> Reports<sup>2</sup> from several developing countries though indicate that circulating neurovirulent

vaccine-derived poliovirus strains can be sustained for extended periods and cause poliomyelitis when population immunity is low. Since 1961, New Zealand has maintained OPV coverage of about 85%. However, after two instances of vaccine-associated paralytic poliomyelitis, inactivated poliovirus vaccine (IPV) replaced OPV in the infant immunisation schedule on Feb 1, 2002. This change provided an opportunity to monitor the persistence of OPV strains excreted by the last cohorts of children immunised with OPV. We did systematic population-based surveillance for OPV virus circulation and evolution before, during, and after the OPV/IPV switch with combined paediatric-inpatient, acute flaccid paralysis, enterovirus laboratory, and environmental surveillance systems. Based on Cuba's experience of annual mass immunisation campaigns, we postulated that polioviruses would be isolated during the preswitch period and then decline over a 2-month transitional period, after which no further polioviruses would be isolated.<sup>3</sup>

The Wellington Ethics Committee approved this study on behalf of Auckland and Waikato Ethics Committees. All patients or their parents or guardians provided written consent. We surveyed paediatric inpatients for 8 months (3 months before, 2 months during, and 3 months after the OPV/IPV switch) at three hospitals in Auckland, Hamilton, and Wellington. To detect a decline in OPV strain prevalence from 4.5% (previous national enterovirus surveillance data) to 0.5% (80% power, 95% significance, two-tailed test of difference in proportions), we approached every month 35 children (younger than age 15 years) consecutively admitted to each of the three hospitals with expectation of 80% participation.

Of 861 patients recruited, 633 (74%) provided stool samples for testing. The results of paediatric-inpatient surveillance indicate that vaccine viruses disappeared quickly after the switch (figure 1). During the preswitch and transition periods, we isolated polioviruses from 18

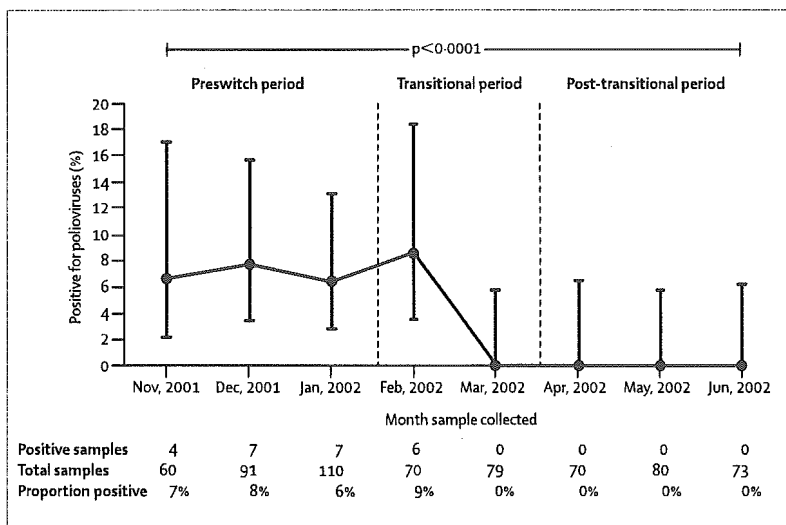


Figure 1: Poliovirus prevalence (95% CI) between November, 2001, and June, 2002 by paediatric inpatient surveillance

of 261 (7%, 95% CI 4.1–10.7) and six of 149 children (4%, 1.7–8.2), respectively. We isolated the last poliovirus from a stool sample collected 1 month after the OPV/IPV switch. We did not detect any polioviruses in 223 stool samples collected during the post-transitional period. The Cochran-Armitage test shows a significant trend ( $p < 0.0001$ ) in prevalence across the three periods. We recorded the demographic features of the 24 poliovirus-positive and 609 poliovirus-negative children (webappendix 1). All polioviruses were isolated from vaccinees who had OPV within 10 weeks of being admitted to hospital and who were younger than age 6 months. Poliovirus isolation rates were similar across all socioeconomic groups. 24 inpatients yielded 30 Sabin-like polioviruses (seven type 1, 12 type 2, 11 type 3).

Since 1997 there has been continued monitoring of acute flaccid paralysis in children younger than age 15 years.<sup>4</sup> Between January, 2001, and September, 2003, we analysed stool samples from 22 of 33 reported cases of acute flaccid paralysis. Only one child, aged 2 months and with spinal muscular atrophy, had Sabin-like polioviruses type 1 and type 2 isolated from each of two stool samples collected on Feb 28 and March 1, 2001. She had received her first dose of OPV 11 days previously.

Enterovirus surveillance used the national laboratory network, which investigates mainly inpatients with febrile illnesses not associated with acute flaccid paralysis (about 1200 stool samples annually).<sup>5</sup> We analysed data for 33 months (13 months before, 2 months during, and 18 months after the switch) and noted that polioviruses disappeared rapidly after the OPV/IPV switch (webappendix 2). Before the switch, we

identified 38 poliovirus-positive children. In the transition period, we isolated Sabin-like polioviruses type 1 and type 2 from a 2-month-old boy without acute flaccid paralysis, whose stool sample was collected 5 days after the OPV/IPV switch. 19 months later, we identified a Sabin-like poliovirus type 2 in a 10-month-old girl with conjunctivitis. Sequencing in the VP1 region showed 99.9% homology to the parental Sabin strain. Almost all poliovirus-positive cases from enterovirus surveillance were aged 6 weeks to 5 months. 40 children without acute flaccid paralysis yielded 48 Sabin-like polioviruses (19 type 1, 18 type 2, 11 type 3).

For environmental surveillance, we collected weekly sewage samples over 18 months (3 months before, 2 months during, and 13 months after the switch) from three sewage treatment plants in Auckland, Hamilton, and Porirua (a satellite city of Wellington) where the surveillance hospitals were located. The catchment populations were 900 000, 100 000, and 65 000, respectively. Before the OPV/IPV switch, the poliovirus isolation rate was 94%. This proportion decreased after the switch, but not as rapidly as with other surveillance methods (figure 2). The decline was maintained in the post-transitional period (April, 2002, to April, 2003), such that after May, 2002, polioviruses were only detected once every 3 months.

We isolated 71 Sabin-like polioviruses as a result of environmental surveillance (nine type 1, 36 type 2, 26 type 3). Sequencing of environmental polioviruses during the post-transitional period confirmed these as Sabin-like with more than 99% homology with parental Sabin strains (webappendix 3). In particular, the five Sabin-like polioviruses identified by environmental

and Enterovirus Section, National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA (M A Pallansch PhD)

Correspondence to: Dr Q Sue Huang Sue.Huang@esr.cri.nz

See Lancet Online for webappendix 1

See Lancet Online for webappendix 2 and webappendix 3

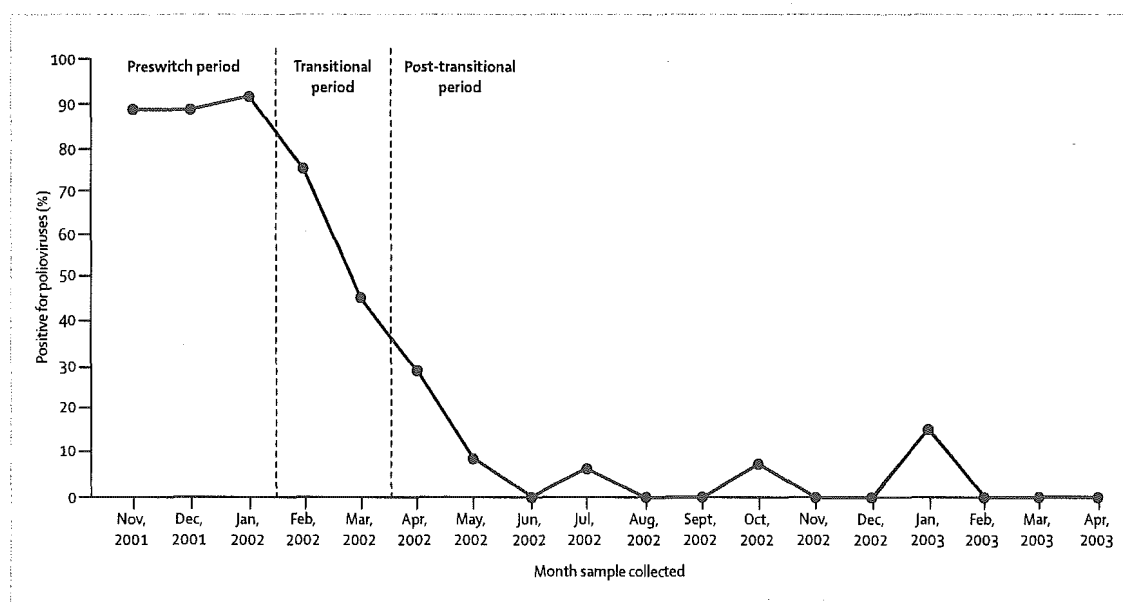


Figure 2: Poliovirus prevalence between November, 2001, and April, 2003, by environmental surveillance

surveillance 6, 9, and 12 months after the OPV/IPV switch had 99.7–100% homology with parental strains.

We noted limited circulation of OPV strains in New Zealand after the switch to IPV. First, with one exception, all polioviruses isolated from enterovirus surveillance during 2001–02 were from children aged 6 weeks to 5 months who should have received at least one dose of OPV. Second, OPV viruses detected by paediatric-inpatient surveillance were found only in vaccinees. Third, intratypic differentiation and sequence data for polioviruses obtained from paediatric-inpatient, acute flaccid paralysis, and enterovirus surveillance confirmed that all polioviruses were Sabin-like.

Since polioviruses evolve at a constant rate of 1% nucleotide substitutions per year,<sup>6</sup> environmental isolates 6–12-months post-switch with 99.7–100% sequence homology to parental Sabin strains infer that these viruses were derived from OPV administered 1–3-months previously. Rather than being from either the last cohorts of OPV immunised children or immune-deficient long-term excretors,<sup>7</sup> these viruses are more likely to have originated in recently vaccinated children or their close contacts from an OPV-using country. This finding shows that New Zealand remains vulnerable to vaccine or wildtype virus importation.

Every surveillance method revealed a different rate of OPV virus decline. Acute flaccid paralysis surveillance examines as few as 1 in 100 000 children younger than 15 years for poliovirus excretion. Its sensitivity for detecting sporadic vaccine-derived poliovirus is limited since only 0.1–0.5% of non-immune children infected with virulent strains will manifest paralytic poliomyelitis. Every year, enterovirus surveillance examines stool samples from roughly one in 3000 (1200 of 3 737 277) New Zealanders suspected of enteroviral infections. Paediatric-inpatient surveillance attempted to measure poliovirus excretion in a moderately representative population by sampling one in 648 (633 of 410 181) children living in three cities. Environmental surveillance obtained composite samples from sewage systems that serve 28% of the population. The higher and more prolonged poliovirus detection rates in sewage indicate the increased sensitivity of this method of surveillance over that of paediatric-inpatient surveillance in the same urban areas.

OPV strains do not persist for long after an OPV/IPV switch in a developed country with a temperate climate. Our study should be repeated in tropical, developing countries, however, where transmission of OPV viruses is likely to be more intense. The findings of such studies are vital to formulate polio immunisation policies in the postcertification era. Simultaneous global cessation of

OPV after a mass immunisation campaign to maximise population immunity and minimise vaccine-derived poliovirus circulation could be adopted if there is minimum risk of sustained vaccine-derived poliovirus circulation.<sup>2</sup> Meanwhile, the continued risk of poliovirus importation means that New Zealand should maintain high IPV coverage. Finally, multiple surveillance methods, particularly environmental surveys, provide increased sensitivity for detection of poliovirus circulation, which will be essential in the posteradication era.

#### Contributors

Q S Huang, G Greening, M G Baker, and K Grimwood designed the study, supervised the virological, clinical, and environmental components, interpreted the data and their analysis, and wrote the report. J Hewitt, D Hulston, L van Duin, and A Fitzsimons established and did the laboratory tests. N Garrett did the study size calculations, contributed to the design, and undertook statistical analyses. K Grimwood, D Graham, and D Lennon established paediatric-inpatient surveillance. H Shimizu and T Miyamura undertook the sequence analysis and interpretation. M A Pallansch assisted in study design and interpretation.

#### Conflict of interest statement

We declare that we have no conflict of interest.

#### Acknowledgments

We thank David Wood, David Featherstone, and Walter Dowdle for their helpful advice; Elizabeth Sneyd and Ruth Pirie for help with data analysis; Andi Utama for sequence analysis; the paediatric nurses at Middlemore, Waikato, and Wellington Hospitals for stool and questionnaire collection; staff at the Porirua, Hamilton, and Mangere sewage treatment plants for sewage collection; and staff at the Institute of Environmental Science and Research who provided logistic, administrative, and technical support.

The study was supported by a grant (B3/181/124) from the Department of Vaccines and Biologicals, WHO. Surveillance of enterovirus and acute flaccid paralysis received financial support from the New Zealand Ministry of Health who permitted publication of the relevant data. The sponsors of the study had no role in study design, data collection, data analysis, data interpretation, or writing of the report. The corresponding author had full access to all the data in the study and had final responsibility for the decision to submit for publication.

#### References

- 1 Wood DJ, Sutter RW, Dowdle WR. Stopping poliovirus vaccination after eradication: issues and challenges. *Bull World Health Organ* 2000; 78: 347–57.
- 2 Dowdle WR, De Gourville E, Kew OM, Pallansch MA, Wood DJ. Polio eradication: the OPV paradox. *Rev Med Virol* 2003; 13: 277–91.
- 3 Mas Lago P. Eradication of poliomyelitis in Cuba: a historical perspective. *Bull World Health Organ* 1999; 77: 681–87.
- 4 Heffernan H, Edwards E, Grant C, Huang QS. A case of vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *New Zealand Public Health Report* 1999; 6: 33–35.
- 5 Huang QS, Carr JM, Nix WA, et al. An echovirus type 33 winter outbreak in New Zealand. *Clin Infect Dis* 2003; 37: 650–57.
- 6 Yang CF, Naguib T, Yang SJ, et al. Circulation of endemic type 2 vaccine-derived poliovirus in Egypt from 1983 to 1993. *J Virol* 2003; 77: 8366–77.
- 7 Halsey NA, Pinto J, Espinosa-Rosales F, et al. Search for poliovirus carriers among people with primary immune deficiency diseases in the United States, Mexico, Brazil, and the United Kingdom. *Bull World Health Organ* 2004; 82: 3–8.

## 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。<sup>1)</sup> 実験室から一般社会への野生株ポリオウイルス伝播の可能性は小さい。しかしポリオフリーの地域が増加し、ポリオに対する予防接種活動が低下あるいは停止するにしたいが、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<sup>2)</sup>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。<sup>3)</sup> 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。<sup>4)</sup>

#### 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されることがある。

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。<sup>5)</sup>

#### 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。<sup>3)</sup> 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。<sup>3)</sup>

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。<sup>5)</sup>

#### 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。<sup>6)</sup>

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。<sup>7)</sup> 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。<sup>8, 9)</sup> 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。<sup>10)</sup>

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。<sup>11)</sup> 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。<sup>12)</sup> これまでに、19 例このような症例が認められている。十分な免疫を持たない集団におけるワクチンポリオウイルスの、より長期間の継続的なヒトからヒトへの伝播は、神経病原性や伝播能が野生株ポリオウイルスと同等となる遺伝子変異をもたらす可能性がある。<sup>13)</sup> 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。<sup>14)</sup> 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。<sup>15)</sup> 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。<sup>16)</sup> 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。<sup>17)</sup> ポリオが根絶された場合、同じように野生株ポリオウイルスが、実験室から次第に増加する感受性集団へ伝播することがないように、あらゆる努力が払われるべきである。

理論的には、ポリオウイルスは実験室外部の人間に感染する可能性がある。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。<sup>18-21)</sup> 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。<sup>22)</sup> 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。<sup>23)</sup> 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<sup>24)</sup>、他は南アフリカの症例であった。<sup>25)</sup>

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。<sup>26, 27)</sup> 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。<sup>28)</sup> 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。<sup>29)</sup>

## 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 : ポリオウイルスの定義**

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。<sup>13)</sup>

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(KessselおよびStimpert) Leon 12a,b/KP4である。<sup>7)</sup>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。<sup>29)</sup> 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。<sup>30)</sup>

**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。<sup>31, 32)</sup> 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。<sup>33)</sup> 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。<sup>34, 35)</sup> 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。

<sup>2)</sup> 世界根絶認定の時点での封じ込めの条件は、世界的な予

<b>Box 4 : 封じ込めと世界ポリオ根絶の進展</b>	
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。<sup>2)</sup> 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。<sup>36)</sup> 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。