

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

ポリオ野生株ウイルスの封じ込め対策に関する研究

平成 16 年度～平成 18 年度 総合研究報告書

主任研究者 清水 博之

平成 19 (2007) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書

ポリオ野生株ウイルスの封じ込め対策に関する研究.....清水 博之..... 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表.....17

III. 研究成果の刊行物・別冊.....19

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

総合研究報告書

ポリオ野生株ウイルスの封じ込め対策に関する研究

主任研究者（平成 16～17 年度）

宮村 達男

国立感染症研究所

主任研究者（平成 18 年度）

清水 博之

国立感染症研究所ウイルス第二部

研究要旨 世界ポリオ根絶計画達成後、人為的、非人為的ないかなる理由であれ、ポリオウイルスがヒト集団に再流行する可能性について検討し、具体的な制御戦略に関して以下の研究を行った。

- 1) 世界ポリオ根絶計画の一環として WHO を中心として進められているポリオウイルス野生株の実験室封じ込めのための行動計画に基づく、我が国における野生株ポリオウイルス保有施設調査のための具体的手法について検討し、いくつかの異なる手法による保有施設調査を実施した。
- 2) ポリオウイルス野生株保有施設調査に対応して、ポリオウイルスの実験室封じ込めのために必要とされるバイオセーフティ・バイオセキュリティに関して、必要とされる情報提供を行った。
- 3) ポリオフリー地域において、ワクチン由来ポリオウイルスおよび野生株ポリオウイルス伝播を迅速かつ高感度に検出するために必要とされるサーベイランスと実験室診断系について検討し、複数の異なるサーベイランス手法を用いることにより、より精度の高いウイルス伝播の検出が可能であることを示した。
- 4) 日本および西太平洋地域等において分離されたワクチン由来ポリオウイルスの詳細な解析を行った。それにより、病原性復帰ワクチン由来ポリオウイルスが、ポリオ根絶後におけるポリオ流行発生の大きなリスク要因となることを明らかにし、ワクチン由来ポリオウイルスの発生・伝播メカニズムに関する研究を行った。
- 5) 自然感染におけるポリオウイルスの病原性発現機構および感染・伝播過程について研究するための新たな小動物感染モデルとして、PVR-tg/インターフェロン受容体ノックアウトマウスにおけるポリオウイルスの組織特異性発現機構について解析した。研究成果に基づき、効率よく経口感染可能なマウス感染モデルを樹立した。
- 6) ポリオウイルス擬似粒子を用いたポリオ様麻痺モデルを確立し、持続麻痺発現メカニズムについて解析を行った。

分研担究者

吉田 弘 国立感染症研究所
有田 峰太郎 国立感染症研究所
西村 順裕 国立感染症研究所
小池 智 東京都神経科学総合研究所

岩井 雅恵 富山県衛生研究所
松浦 久美子 富山県衛生研究所
Tian Bingjun 中国雲南省 CDC
遠田 耕平 WHO/カンボジア
小島 和暢 WHO/WPRO
大岡 静衣 東京大学大学院

協力研究者

安藤 秀二 国立感染症研究所
杉山 和良 国立感染症研究所
上野 久美 国立感染症研究所

小松 俊彦 バイオメディカルサイエンス研究会
ルナル純子 バイオメディカルサイエンス研究会
斎藤 真紀 バイオメディカルサイエンス研究会

A. 研究目的

現在最終局面にある世界ポリオ根絶計画が達成された後は、人為的、非人為的ないかなる理由であれ、ポリオウイルスがヒト集団に再流行することがないように、起こり得るポリオ流行のリスクを評価し、適切な制御戦略を検討することが必要となる。

ポリオ根絶の最終段階およびポリオ根絶後における重要なリスク要因のひとつとして、実験室に保管されているポリオウイルスに由来するポリオ流行が想定されており、ポリオウイルスの実験室封じ込め対策についての具体的な行動が求められている。そのため、WHOは「野生株ポリオウイルスの実験室封じ込めに関する世界的行動計画（第一版および第二版）」を策定し、全世界で統一された基準の下、ポリオウイルス野生株の実験室封じ込めを進めることを提唱している。

WHO 西太平洋地域の中で野生株ポリオウイルス保有施設に関する第一段階調査 (Phase I) が終了していないのは、日本と中国の2ヶ国だけとされており、調査レポートの早急な作成および提出が求められている。そのため、本研究においては我が国における野生株ポリオウイルス保有施設調査のための効率的かつ具体

的な調査手法について検討した。同時に、ポリオウイルスの実験室封じ込めを進めていくうえで重要であるポリオウイルス封じ込めの意義と原理、ポリオウイルスに関するバイオセーフティ・バイオセキュリティ、に関する関係者の周知の徹底を図った。

日本を含む WHO 西太平洋地域のようなポリオフリーを達成した地域においては、ワクチン由来ポリオウイルスおよび輸入野生株ポリオウイルス伝播によるポリオ流行のリスクを、いかに最小限とするかが、現在きわめて重要である。世界ポリオ根絶達成後は、ワクチン由来ポリオウイルスおよび野生株ポリオウイルス伝播のリスクをどのように制御するが世界的な課題となる。そこで本研究においては、ポリオフリー地域において、ワクチン由来ポリオウイルスおよび野生株ポリオウイルス伝播を検出するために必要なサーベイランスと実験室診断系について検討し、より迅速かつ高感度にポリオウイルス伝播を検出可能なサーベイランスと実験室診断システムについて研究を行った。また、近年、WHO 西太平洋地域を含めた世界各地で報告されているワクチン由来ポリオウイルス (VDPV) によるポリオ流行について詳細な研究を行い、

VDPV の発生・伝播のメカニズムを解析することにより、VDPV 制御戦略を検討した。

VDPV を含むポリオウイルス感染伝播・病原性発現のメカニズムについては、いまだ不明な点が多く残されている。自然感染に近い感染動物モデルを樹立するため、効率的に感染発症可能な経口感染マウスモデルの検討を行なう。ポリオウイルスレセプター発現マウス (PVR-tg マウス) 個体内におけるポリオウイルス組織特異性を規定する宿主因子についての研究成果を応用することにより、効率よく腸管感染が成立する感染モデルの検討を行う。また、ポリオウイルス感染による持続的麻痺を反映したマウスモデルを開発することにより、病原性発現のメカニズムについて解析しポリオおよびポリオ後症候群治療の可能性についての研究を行う。

B. 研究方法

(1) ポリオウイルス保有施設調査

WHO により提唱された「野生株ポリオウイルスの実験室封じ込めに関する世界的行動計画 (第一版)」に基づいて 2001～2004 年に実施された、野生株ポリオウイルス保有施設調査結果についてまとめた。調査終了以降に組織変更があった施設について整理し、再調査対象を明らかにした。

厚生労働省により実施されたバイオテロリズム関連調査の中にポリオウイルスに関する質問事項を設け、野生株ポリオウイルス保有施設について調査集計した。

日本で発表されたポリオウイルスに関する研究論文について網羅的に解析するため、データベースを用いたキーワード検索を行い、施設、論文形式、論文内容等の各項目について年度ごとに集計した。

ポリオウイルス関連発表論文調査によりリストアップされた研究者を対象に、

電話聞き取り方式およびアンケート調査による野生株ポリオウイルス保有状況調査を実施し、結果の集計・解析をおこなった。

地方衛生研究所における病原微生物の取扱いに関する調査の一環として、「ポリオウイルスおよびポリオウイルスを含む可能性のある検体の保管状況に関するアンケート調査」を実施し、回収結果を集計した。

(2) ポリオウイルス実験室封じ込めに関する情報提供

WHO による「野生株ポリオウイルスの実験室封じ込めに関する世界的行動計画 (第二版)」全編の日本語訳を作成し、日本ウイルス学会学術誌「ウイルス」に掲載することにより野生株ポリオウイルス実験室封じ込めの基本的情報を明確にした。

ポリオウイルス保有実態調査におけるアンケートへの添付資料として「行動計画 (第二版)」日本語訳を添付し、野生株ポリオウイルスの実験室封じ込めの必要性と方法について情報提供を行った。

ポリオウイルスを取扱う可能性のある研究者が参加する学会・研究会等において、ポリオ根絶および野生株ポリオウイルス実験室封じ込めに関わる情報提供を行った。

(3) ポリオフリーを維持するためのサーベイランスおよび実験室診断

日本を含む WHO 西太平洋地域のようなポリオフリーを達成した地域において、ワクチン由来ポリオウイルスおよび輸入野生株ポリオウイルス伝播を迅速かつ高感度に検出するため、既存の急性弛緩性麻痺 (AFP) サーベイランスを補完するサーベイランスシステムの検討を行った。

我が国で現在機能しているサーベイランスシステムの有効性を検証するため、

様々なサーベイランスにより検出された VDPV を含むポリオウイルス分離株について、疫学のおよびウイルス学的解析を行った。

AFP 以外のサーベイランスの中でも、感度が高いと考えられている環境サーベイランスにより分離された非ポリオエンテロウイルスについて遺伝子解析を行った。環境サーベイランス由来のポリオウイルスの迅速検出法確立のため、リアルタイム PCR 法についての条件検討を実施した。

AFP 以外の疾患サーベイランスシステムを構築するのが困難な中国雲南省において、AFP 患者の糞便材料から非ポリオエンテロウイルスを分離し、VP1 領域の部分塩基配列によるエンテロウイルス同定および分子系統解析を行った。

(4) ワクチン由来ポリオウイルス (VDPV) によるポリオ流行のリスク調査と VDPV 制御戦略の検討

日本を含む WHO 西太平洋地域で検出された VDPV について、疫学のおよびウイルス学的解析を行った。日本で、AFP 以外のサーベイランスにより検出されたポリオウイルス分離株について、型内鑑別試験および VP1 領域の塩基配列解析により、VDPV を同定した。

日本以外の WHO 西太平洋地域において、主として AFP 症例から検出された VDPV についても同様に、疫学のおよびウイルス学的解析を行った。ラオス、中国貴州省、カンボジアで分離された VDPV については、ゲノム全領域の塩基配列解析、TgPVR21 マウスにおける神経病原性の比較、抗原性解析等、より詳細な解析を行った。

長期的な伝播が推定された VDPV 分離株については、非ポリオウイルスとのゲノム遺伝子組換えの有無について遺伝子

解析および分子系統解析を行った。また、中国四川省、カンボジア等においては、ポリオウイルスとのゲノム遺伝子組換えの対象となりうる非ポリオエンテロウイルス伝播動向について解析を行った。

(5) ポリオウイルス感染伝播・病原性発現メカニズムを研究するための新たな小動物モデルの開発

ポリオウイルス感染効率を上昇させ、経口感染可能な、新たなマウス感染モデルを確立するため、Ifnar ノックアウト (KO) マウスと PVR-tg マウスを交配し、PVR-tg/Ifnar KO マウスを作製した。PVR-tg マウスと PVR-tg/Ifnar KO マウスにポリオウイルス I 型 Mahoney 株を経口接種し病原性の強さを調べた。

PVR-tg/Ifnar KO マウスにおけるポリオウイルス増殖の組織特異性についてより詳細に解析するため、PVR-tg ならびに PVR-tg/Ifnar KO マウスの消化管などの組織から RNA を調製し、IFN-stimulated gene (ISG) の発現レベルを調べた。経口感染モデルにおける感染効率を改善するため、マウスの胃中におけるポリオウイルスの pH に対する耐性を検討し、胃酸を中和する条件を検討した。

293T 細胞で作製した、感染性を有しない高力価ポリオウイルス擬似粒子 (ポリオウイルスレプリコン) を、TgPVR21 マウスに脊髄内接種し、マウス脊髄内における replicon の複製および誘導される麻痺を観察した。ポリオウイルス擬似粒子を接種し持続的ポリオ様麻痺を呈した TgPVR マウスから腰髄等を回収し、病理像を解析した。

【倫理面についての配慮】

本研究で用いた臨床材料の採取は、「疫学研究における倫理指針」に基づき、材料提供者および家族の個人の尊厳及び人権の尊重、個人情報保護に配慮して実施した。

すべての動物実験は、動物福祉、実験倫理、飼育環境に出来る限り配慮した上で、「動物の愛護及び管理に関する法律」「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」「国立感染症研究所動物実験委員会規程」等に基づいて実施した。

組換え生物使用実験は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づいて実施した。文部科学大臣の確認が必要とされている組換え生物実験については、事前に「第二種使用等拡散防止措置確認申請書」を提出し、文部科学大臣から使用する感染動物施設が適切な拡散防止措置を満たすことの承認を受けたうえで実施した。

C. 研究結果

(1) ポリオウイルス保有施設調査

WHOにより提唱されていた「野生株ポリオウイルスの実験室封じ込めに関する世界的行動計画（第一版）」に基づいて2001～2004年に実施された野生株ポリオウイルス保有施設調査により、31施設が野生株ポリオウイルスを保有していることが明らかとなった。

大学とその附属機関、共同利用機関などの統廃合により、全国教育・研究機関の整備が行なわれたため、調査の対象を自然科学系のうち環境科学・生命科学などに関連深い医学・薬学・農学・理学・工学とし、新規分類に則って今後の調査対象施設を整理した。

厚生労働省により実施されたバイオテロリズム関連調査により、ポリオウイルスに関する質問事項を設け、25施設が野生株ポリオウイルスを保有していることが明らかとなった。

ポリオウイルス関連研究論文の分析により抽出されたポリオウイルス取扱いの可能性を有する研究者を対象として、野生株ポリオウイルス保有調査を実施した。電話聞き取りおよびアンケート調査

によって、15施設が野生株ポリオウイルスを保有することが明らかとなった。野生株ポリオウイルスの種類は様々で、ワクチン由来ポリオウイルス、未同定ポリオウイルス株、未検査臨床検体、クローン化DNA等が含まれていた。

地方衛生研究所における病原微生物の取扱いに関する調査結果により、野生株ポリオウイルスを保有施設は、調査75施設中9施設であったが、野生株ポリオウイルスを含む可能性のある検体を含めると20%程度の地方衛生研究所が保有可能性を有することが示された

(2) ポリオウイルス実験室封じ込めに関わる情報提供

WHOによる「野生株ポリオウイルスの実験室封じ込めに関する世界的行動計画（第二版）」日本語訳を「ウイルス」誌に掲載することにより野生株ポリオウイルス実験室封じ込めの基本的情報を明確にした。日本語訳PDFファイルは、「ウイルス」誌ウェブサイトから入手可能である。とくに「行動計画（第二版）」で、野生株ポリオウイルスと同様に実験室封じ込めの対象として取扱うことが明記された、ワクチン由来ポリオウイルス(VDPV)の定義について明確にし、専門家への周知を図った。

ポリオウイルス取扱いの可能性のある研究者が参加する学会・研究会（ウイルス学会、臨床ウイルス学会、感染症学会、衛生微生物協議会）等において、ポリオ根絶および野生株ポリオウイルス実験室封じ込めに関わる情報提供を実施した。

ポリオウイルス関連発表論文調査によりリストアップされた研究者を対象とした保有施設調査および地方衛生研究所を対象とした保有実態調査の結果、半数程度の施設では、ポリオウイルス取扱施設の作業者に対するポリオウイルス抗体検査やポリオワクチン接種について、徹底

されていなかった。

(3) ポリオフリーを維持するためのサーベイランスおよび実験室診断

日本を含む西太平洋地域等ポリオフリーを達成した地域において、VDPV および輸入野生株ポリオウイルス伝播を迅速かつ高感度に検出するためのサーベイランスシステムの検討を行った。

日本では現在、ワクチン関連麻痺症例、非ポリオエンテロウイルス感染症、健常児糞便検体からのエンテロウイルス分離等様々なサーベイランスを組み合わせることによるポリオウイルスサーベイランスが機能しており、日常的にワクチン株ポリオウイルスが検出される。感染症流行予測調査事業における感染源調査により、富山県の健常児糞便検体から 2 型 VDPV が分離された。また、長崎県のワクチン関連麻痺疑い症例から、3 型 VDPV が分離された。いずれの地域でも、VDPV が持続的に伝播していないことが確認された。

ヒト集団に潜在的に伝播しているポリオウイルスを高感度で検出するためのサーベイランスシステムとして環境サーベイランスの検討を行い、エコー13型においては、無菌性髄膜炎患者からの分離株と環境由来株が高い相同性を有することから、環境サーベイランスの有用性が確認された。環境由来検体を用いたリアルタイムPCR法は、培養細胞を用いたウイルス力価測定と同等の感度であることが示された。測定に要した時間は約 2 時間 20 分であった。

AFP 以外のポリオサーベイランスシステムを構築するのが困難である中国雲南省の AFP 患者から、210 株のウイルスが分離された (17.2%)。うち HEV-A、B、C 群に属する分離株は各 5、158、32 株であった。HEV-C は CA17、18、20、24、EV96 に分類された。ポリオウイルスとの塩基の違いは 33-41% であり比較的

縁であった。カンボジア・ラオス等における AFP 患者由来エンテロウイルスにおいても、比較的高頻度に HEV-C が検出された。

(4) ワクチン由来ポリオウイルス (VDPV) によるポリオ流行のリスク調査と VDPV 制御戦略の検討

日本を含む WHO 西太平洋地域において、近年様々な地域 (フィリピン、中国貴州省、ラオス、カンボジア等) で検出された VDPV について、疫学およびウイルス学的解析を行った。

2004 年に中国貴州省で 2 例の AFP 患者と接触者から分離された 1 型 VDPV は、親株と比較して 1% 程度の変異を有しており、OPV 接種率が低い地域において 1 年弱伝播したことが示唆された。貴州省の 1 型 VDPV は、他のエンテロウイルスとの遺伝子組換えは認められず、また、TgPVR21 マウスにおける神経病原性試験により、顕著な病原性復帰が認められた。

2004-2005 年に、ラオスの AFP 症例 1 例と接触者 2 名から分離された 2 型ポリオウイルスは、Sabin 2 型と比較して 1.1-1.3% 変異を有する 2 型 VDPV と同定された。ラオスでは、OPV 接種率が低い地域において VDPV 伝播のリスクが高いことが示唆された。

2005-2006 年にかけて、カンボジアの 3 例の AFP 患者のうち、2 症例から Sabin 3 型と比較して 2% 程度の変異を有する 3 型 VDPV が分離された。全ゲノム配列解析の結果、3 型 VDPV は、Sabin 3/Sabin 2/HEV-C の組換えウイルスであり、TgPVR21 マウス感染モデルにおいて強毒株と同等の高い神経病原性を示した。

WHO 西太平洋地域では、上記の VDPV 検出後、速やかにサーベイランス体制およびワクチン接種キャンペーンの強化を図り、その結果、VDPV の長期にわたる伝播は認められていない。

(5) ポリオウイルス感染伝播・病原性発現メカニズムを研究するための新たな小動物モデルの開発

ポリオウイルス感染効率を上昇させ、経口感染可能な、新たなマウス感染モデルを確立するため、Ifnar ノックアウト (KO)マウスと PVR-tg マウスを交配し、PVR-tg/Ifnar KO マウスを作成した。ポリオウイルス強毒株を接種し病原性の強さを調べたところ、PVR-tg/Ifnar KO マウスは、PVR-tg と比較して、各種感染経路による感受性が増加していることが明らかとなった。また、PVR-tg/Ifnar KO マウスでは、より広い範囲の組織で、ポリオウイルス感染による病変が認められた。

PVR-tg マウスにおいては、ポリオウイルスの胃の通過(胃内でのウイルス失活)や消化管での増殖過程 (ISG による増殖阻害)で、ウイルス感染・伝播が阻害されているためヒトと同様の経口感染が成立しにくいことが示唆されたため、炭酸水素ナトリウムを加えて胃酸を中和することにより、すべての PVR-tg/Ifnar KO マウスが発症した。

293T 細胞で作製した、感染増殖能を有しない高力価ポリオウイルス擬似粒子(ポリオウイルスレプリコン)を、TgPVR21 マウスに脊髄内接種し、致死感染を伴わない持続的ポリオ様麻痺発現マウスモデルを樹立した。重篤なポリオ様麻痺を示したマウスと軽度の麻痺を示したマウスで腰髄の病理像に際立った差は認められなかった。

D. 考察

(1) ポリオウイルス保有施設調査

WHO により提唱されている「野生株ポリオウイルスの実験室封じ込めに関する世界的行動計画」に対応して、厚生労働省・文部科学省等による野生株ポリオウイルス保有施設調査が継続的に実施され

ている。本研究では、これら公的な調査を補完しアップデートするため、他の調査手法の評価研究を行った。その結果、複数の異なる手法を用いた調査を平行して実施することにより調査精度が上がることを示し、それに基づき一部追加調査を実施し結果の集計解析を行った。また、調査対象施設の継続的な把握が重要であることから、調査対象施設の確認整理を行った。

ポリオウイルス関連文献調査に基づく野生株ポリオウイルス保有調査では、通常の調査手法ではリストアップされにくい広範な研究分野の研究者を特定することが可能であり、専門家による電話による聞き取り調査と詳細なアンケート調査により、質の高い保有状況調査が可能となった。

地方衛生研究所に対するアンケート調査によりワクチン由来ポリオウイルスを含めると約 40%、OPV 株を含めると約 70%の施設がポリオウイルスを保有している可能性が明らかとなり、これらの施設が今後のポリオウイルス実験室封じ込め調査対象として重要な施設であることが確認された。

今後、他のルートによる野生株ポリオウイルス保有施設調査 (公的および研究班等による調査) と今回の調査結果を併せて、できるだけ多くのポリオウイルス保有施設を網羅した調査リストを作成し第一段階調査報告書 (Phase I Containment Report) を、早急に完成・提出する必要がある。

(2) ポリオウイルス実験室封じ込めに関する情報提供

本研究による野生株ポリオウイルス保有施設調査の過程で、実験室封じ込めの根拠と重要性に関して専門家への周知を図ることができた。今後、発行が予定されている、ワクチン株ポリオウイルスを封じ込め対象に含めた「行動計画(第三

版)」の内容についても情報提供を継続する必要がある。また、病原体取扱いの専門家以外に対しても、ポリオウイルスの実験室封じ込めに対する情報を伝えていくための効果的手法について検討する必要がある。

野生株ポリオウイルス保有施設では、今後、世界的野生株ポリオウイルス封じ込めの進展に対応したバイオセーフティ・バイオセキュリティに関する対応(適切な施設での病原体の管理、不要な病原体の廃棄、等)が要求される可能性があり、ポリオウイルス保有施設としてリストアップされた施設の担当者と封じ込め対策担当者(National laboratory containment coordinator)との間で、緊密に情報交換できる体制を確立する必要がある。

(3) ポリオフリーを維持するためのサーベイランスおよび実験室診断

日本では現在、複数のサーベイランスを組み合わせることにより、感度の高いポリオウイルスサーベイランスが機能していることが確認できた。本研究において、我が国でも数例のVDPV 孤発例が検出されたが、ウイルス長期伝播は認められなかった。OPV 使用国では、潜在的なVDPV 発生は認められるが、地域のワクチン接種率と感度の高いサーベイランスが維持されていれば、VDPV 伝播によるポリオ流行のリスクを制御できることが示された。世界ポリオ根絶最終段階およびポリオワクチン接種停止過程においては、環境サーベイランス等、より精度の高いサーベイランスや迅速かつ精度の高い実験室診断系の導入が重要であるが、個々の地域に合わせた具体的かつ適切なサーベイランスシステムについて研究を継続する必要がある。また、VDPV 伝播のリスクを大幅に低下させるためには、IPV の導入およびIPV 接種率の維持が不可欠である。

(4) ワクチン由来ポリオウイルス(VDPV)によるポリオ流行のリスク調査とVDPV 制御戦略の検討

日本を含む WHO 西太平洋地域(フィリピン、中国貴州省、ラオス、カンボジア、日本等)において検出されたVDPV について、疫学のおよびウイルス学的解析を行うことにより、OPV を使用している地域ではどこでも、1, 2 及び3 型VDPV 伝播によるポリオ流行のリスクを有することが明らかにされた。世界ポリオ根絶達成後のポリオワクチン接種停止を念頭に置いた場合、VDPV によるポリオ流行は、今後最も重要なポリオ流行のリスク要因である。WHO 西太平洋地域では、VDPV の長期にわたる伝播は認められていないが、より感度・精度の高いサーベイランスと迅速診断技術の研究を継続することにより、VDPV 伝播によるポリオ流行のリスクを最小限とする必要がある。また、VDPV 出現、伝播、分子進化、病原性発現、ゲノム遺伝子組換え等のメカニズムに関する研究は、VDPV の効果的制御に寄与するとともに、非ポリオエンテロウイルス感染症のコントロールにとっても重要であると考えられる。

(5) ポリオウイルス感染伝播・病原性発現メカニズムを研究するための新たな小動物モデルの開発

本研究では、ポリオウイルスの宿主特異性・組織特異性を規定する宿主側およびウイルス側因子として知られていたポリオウイルスレセプターおよびIRES 機能依存性の組織特異性ウイルス増殖機構と併せて、組織特異的インターフェロン応答がウイルスの特異的増殖(および抵抗性)にとって重要であることを明らかにした。これらの研究成果を応用することにより、これまで経口感染効率が低いとされてきたPVR-tg マウス感染モデルにお

いて、効率よく経口感染可能なマウスモデルを樹立した。経口感染マウスモデルを用いることにより自然感染に近い感染実験が可能となることから、VDPVを含むポリオウイルスの病原性発現機構の解析のみならず、個体内および個体間におけるポリオウイルス感染伝播および伝播制御研究への応用が期待される。

293T細胞で作製した、感染増殖能を有しない高力価ポリオウイルス擬似粒子(ポリオウイルスレプリコン)感染モデルにより、持続的かつ非致死的なポリオ様弛緩性麻痺を TgPVR21 マウスに誘導することができた。本モデルはポリオ発症メカニズムの解析とともに、残存性ポリオ麻痺およびポリオ後症候群の動物モデルとして有用であると考えられる

E. 結論

日本における野生株ポリオウイルス保有調査のための効率的かつより精度の高い調査手法について検討し、いくつかの異なる手法による野生株ポリオウイルス保有施設調査を実施した。これらの調査により、厚生労働省・文部科学省等により進められている公的な保有施設調査を補完する、より精度の高い野生株ポリオウイルス保有状況調査が可能となった。様々なルートの調査を組みあわせることにより、調査精度を改善するとともに、野生株ポリオウイルス封じ込めの重要性を、関連施設に周知することが出来た。今後、本研究により得られた調査結果と公的調査データの摺り合わせを行い、出来る限り多くの施設を網羅した野生株ポリオウイルス保有施設リストを作成し、我が国のポリオウイルス保有施設第一段階調査レポート(Phase I Containment Report)を、早急に作成・提出する必要がある。

ポリオ根絶最終段階において重要とされるワクチン由来ポリオウイルスおよび野生株ポリオウイルス伝播を感度良く検

出するためのサーベイランスシステムの評価を行い、様々なサーベイランスの併用および診断系の改良により、高感度かつ迅速にポリオウイルス伝播の検出が可能であることを明らかにした。本研究により、ポリオフリー地域を含むOPVを使用している地域ではどこでも、VDPV伝播によるポリオ流行のリスクを有することが明らかにされた。世界ポリオ根絶最終段階およびポリオワクチン接種停止後には、VDPVによるポリオ流行が最も重要なポリオ流行のリスク要因となるため、今後もVDPV制御戦略についての研究を継続する必要がある。

ポリオウイルス感染伝播、病原性発現機構を解析するための *in vivo* 実験系の開発を行った。ポリオウイルスの個体内及び個体間伝播のメカニズムを研究するための *in vivo* 感染実験モデルの開発を行い、効率よく経口感染可能なPVR-tg/Ifnar KO マウス感染モデルを樹立した。経口感染マウスモデルにより自然感染に近い感染実験が可能となるため、ポリオウイルス感染伝播および伝播制御研究への応用が期待される。

F.健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimizu H, Thorley B, Paladin JF, Brussen KA, Stambos V, Yuen L, Utama A, Tano Y, Arita M, Yoshida H, Yoneyama T, Benegas A, Roesel S, Pallansch M, Kew O, Miyamura T: Circulation of type 1 vaccine-derived poliovirus in the Philippines in 2001. *J Virol* 78: 13512-13521, 2004.
- 2) Arita M, Shimizu H, Miyamura T: Characterization of *in vitro* and *in vivo* phenotypes of poliovirus type 1 mutants with reduced viral protein

- synthesis activity. *J Gen Virol* 85:1933-1944, 2004.
- 3) Nagata N, Iwasaki T, Ami Y, Tano Y, Harashima A, Suzaki Y, Sato Y, Hasegawa H, Sata T, Miyamura Y, Shimizu H: Differential localization of neurons susceptible to enterovirus 71 and poliovirus type 1 in the central nervous system of cynomolgus monkeys after intravenous inoculation. *J Gen Virol* 85: 2981-2989, 2004.
 - 4) Kew OM, Wright PF, Agol VI, F. Delpeyroux F, Shimizu H, Nathanson N, Pallansch MA: Circulating vaccine-derived polioviruses: current state of knowledge. *Bull World Health Organ* 82:16-23. 2004.
 - 5) Shimizu H, Utama A, Onnimala N, Li C, Li-Bi Z, Yu-Jie M, Pongsuwanna Y, Miyamura T: Molecular epidemiology of enterovirus 71 infection in the Western Pacific Region. *Pediatr Int* 46:231-235, 2004.
 - 6) Arita M, Shimizu H, Nagata N, Ami Y, Suzaki Y, Sata T, Iwasaki T, Miyamura T: Temperature-sensitive mutants of enterovirus 71 show attenuation in cynomolgus monkeys. *J Gen Virol* 86: 1391-1401, 2005.
 - 7) Huang QS, Greening G, Baker MG, Grimwood K, Hewitt J, Hulston D, van Duin L, Fitzsimons A, Garrett N, Graham D, Lennon D, Shimizu H, Miyamura T, Pallansch MA: Persistence of oral polio vaccine virus after its removal from the immunisation schedule in New Zealand. *Lancet* 366: 394-396, 2005.
 - 8) Arita M, Zhu SL, Yoshida H, Yoneyama T, Miyamura T, Shimizu H: A Sabin 3-derived poliovirus recombinant contained a sequence homologous with indigenous human enterovirus species C in the viral polymerase coding region. *J Virol* 79:12650-12657, 2005.
 - 9) Yang CF, Chen HY, Jorba J, Sun HC, Yang SJ, Lee HC, Huang YC, Lin TY, Chen PJ, Shimizu H, Nishimura Y, Utama A, Pallansch M, Miyamura T, Kew O, Yang JY: Intratypic recombination among lineages of type 1 vaccine-derived poliovirus emerging during chronic infection of an immunodeficient patient. *J Virol* 79: 12623-12634, 2005.
 - 10) Ida-Hosomuma M, Iwasaki T, Yoshikawa T, Nagata N, Sato Y, Sata T, Yoneyama M, Fujita T, Taya C, Yonekawa H, Koike S. Alpha/beta interferon controls tissue tropism and pathogenicity of poliovirus. *J Virol* 2005; 79: 4460-4469.
 - 11) Hansman GS, Kuramitsu M, Yoshida H, Katayama K, Takeda N, Ushijima H, Surenkhand G, Gantulga D, Kuroiwa C: Viral Gastroenteritis in Mongolian Infants, *Emerging Infectious Diseases* 11:181-182, 2005.
 - 12) Miyachi S, Lu X, Inoue S., Iwasaki T., Koike S, Nambu A, Takada M, Organization of multisynaptic inputs from prefrontal cortex to primary motor cortex as revealed by retrograde transneuronal transport of rabies virus. *J Neuroscience* 25: 2547-2556. 2005.
 - 13) Kuramitsu M, Kuroiwa C, Yoshida H, Miyoshi M, Okumura J, Shimizu H, Narantuya L, Bat-Ochir D: Non-polio enterovirus isolation among families in Ulaanbaatar and Tov province, Mongolia: prevalence, intrafamilial spread, and risk factors for infection. *Epidemiol Infect* 133: 1131-1142, 2005.
 - 14) Sugieda M, Adachi S, Inayoshi M, Masuda T, Tsubota M, Mano H, Iwama M, Murakami Y, Yoshida H, Shimizu H: Intrafamilial transmission of a Sabin 1-related poliovirus in

- Shizuoka Prefecture, Japan. *Jpn J Infect Dis* 59: 277-278, 2006.
- 15) Iwai M, Yoshida H, Matsuura K, Fujimoto T, Shimizu H, Takizawa T, Nagai Y: Molecular epidemiology of echoviruses 11 and 13, based on an environmental surveillance conducted in Toyama Prefecture, 2002-2003. *Appl Environ Microbiol* 72: 6381-6387, 2006.
 - 16) Iwai M, Nakayama T, Matsuura K, Hasegawa S, Ando S, Obara M, Nagai Y, Yoshida H, Horie H: Assessment of efficacy of a live oral poliovirus vaccine for virulent Sabin-like poliovirus 1 strains in Japan. *Acta Virologica* 50: 139-143, 2006.
 - 17) Arita M, Nagata N, Sata T, Miyamura T, Shimizu H: Quantitative analysis of poliomyelitis-like paralysis in mice induced by a poliovirus replicon. *J Gen Virol* 87: 3317-3327, 2006.
 - 18) Yoshikawa T, Iwasaki T, Ida-Hosonuma M, Horie H, Yoneyama M, Fujita T, Miyazawa M, Abe S, Simizu B, Koike S. Role of alpha/beta interferon in the acquisition of susceptibility to poliovirus by kidney cells in culture. *J Virol* 80: 4143-4125, 2006.
 - 19) Mizutani T, Endoh D, Okamoto M, Shirato K, Shimizu H, Arita M, Fukushi S, Saijo M, Sakai K, Limn CK, Ito M, Nerome R, Takasaki T, Ishii K, Suzuki T, Kurane I, Morikawa S, Nishimura H, A new system for rapid genome sequencing of emerging RNA viruses. *Emerg Infect Dis* 13, 322-324, 2007.
 - 20) 清水博之, 武田直和, 宮村達男: ポリオワクチン. *小児科診療* 67: 1843-1849, 2004.
 - 21) 清水博之, 武田直和, 宮村達男: 不活化ポリオワクチン. *総合臨床* 53:1860-1865, 2004.
 - 22) 小池智: ピコルナウイルスベクター. *Mebio* 21: 42-49, 2004.
 - 23) 小池智: ポリオウイルスの標的組織特異性決定機構. *ウイルス* 54: 205-212, 2004.
 - 24) 清水博之: ヒトエンテロウイルスの分類と命名法. *臨床とウイルス* 34, 211-219, 2005
 - 25) 清水博之: ポリオウイルス感染症の実験室診断. *日本臨床* 63,372-375, 2005
 - 26) 清水博之: 非ポリオウイルス感染症の実験室診断. *日本臨床* 63,377-381, 2005
 - 27) 岩井雅恵, 松浦久美子, 長谷川澄代, 小原真弓, 堀元栄詞, 永井美之, 田中有易知, 吉田弘, 清水博之: ポリオ流行予測調査感染源調査においてワクチン由来ポリオウイルスが検出された一例について. *富山県衛生研究所年報* 28, 80-84, 2005
 - 28) 清水博之, 武田直和, 宮村達男: ポリオワクチン. *臨床と微生物* 32:441-444, 2005
 - 29) 小池 智: ポリオウイルスのトロピズムに関するインターフェロン応答. *実験医学* 23:2602-2608. 2005
 - 30) 清水博之, 吉田 弘, 宮村達男: 野生株ポリオウイルス実験室封じ込めに関するWHO世界的行動計画第2版. *ウイルス* 55:161-178, 2005
 - 31) 藤本嗣人, 近平正嗣, 吉田真策, 宗村徹也, 岡藤輝夫, 岡藤隆夫, 吉田弘, 西尾治: コクサッキーウイルスA群6型によると考えられた脳炎ケースの臨床及び分子疫学的検討. *臨床とウイルス*,33;141-145, 2005
 - 32) 若月紀代子, 岩切章, 高尾信一, 濱野雅子, 藤本嗣人, 山崎謙治, 岩井雅恵, 宗村徹也, 嶋貴子, 篠原美千代, 渡邊香奈子, 吉田弘, 清水博之: エンテロウイルスの遺伝子解析に関する諸問題. *病原微生物検出情報* 26, 37-238, 2005
 - 33) 高尾信一, 吉田智子, 豊嶋千俊, 吉田弘,

- 清水博之: 2003~2005年シーズンに分離されたEP95にて同定困難なエンテロウイルス. 病原微生物検出情報 26: 238-238, 2005
- 34) 高尾信一, 若月紀代子, 吉田弘, 清水博之: 2006年シーズンに分離されたエコーウイルス18型の性状について. 病原微生物検出情報 27, 230-231: 2006
- 35) 杉枝正明, 足立 聡, 稲吉 恵, 三輪好伸, 増田高志, 坪田皆利, 真野穂積, 岩間真人, 村上吉男, 吉田 弘, 清水博之: ポリオワクチン株ウイルスの家族内感染-静岡県. 病原微生物検出情報 27, 104, 2006
- 36) 清水博之: 経口生ポリオワクチンと薬剤の併用禁忌. 日本医事新報4311, 98, 2006
- 37) 清水博之, 武田直和: ポリオワクチン. 化学療法の領域 22, 1403-1408, 2006
- 38) 清水博之: 手足口病. 日本臨床 65, 339-342, 2007
- 39) 小池智: 培養細胞のポリオウイルス感受性 -Endersへの回答-. ウイルス 56: 59-66, 2006
- 40) 小池智: ポリオウイルス. *Drug Delivery System* 21: 630-631, 2006
- 41) 清水博之: ポリオの疫学. *Journal of Clinical Rehabilitation* 16, 114-120, 2007
2. 学会発表
- 1) 吉田弘, 椋清美, 濱野雅子, 渡辺香奈子, 高尾信一, 清水博之, 宮村達男, 1999-2003年に分離されたエコーウイルス30型の分子系統解析, 第45回日本臨床ウイルス学会, 2004年6月, 大阪
- 2) Yokota Y, Yamazaki K, Sakon N, Yoshida T, Ohuchi Y, Hayashi K, Tatsumi H, Yoshida H, Yamada A: Characterizing Echovirus Type 4 in an Outbreak in Shiga, Japan, 第5回日中ウイルス学会, 2004年6月, 大阪
- 3) 清水博之, アンディ・ウタマ, 有田峰太郎, 宮村達男, エンテロウイルスの分子進化とゲノム遺伝子組換え, 第25回衛生微生物協議会, 2004年7月, 埼玉
- 4) 有田峰太郎, 祝双利, 清水博之, 宮村達男, C群エンテロウイルスの分子疫学, 第25回衛生微生物協議会, 2004年7月, 埼玉
- 5) 永田典代, 岩崎琢也, 清水博之, 波多野いく持, 吉河智城, 佐多徹太郎, 野本明男, 倉田毅: ポリオウイルスレセプター導入トランスジェニックマウス (TgPVR21) を用いたポリオウイルス経粘膜免疫実験モデルの確立, 第8回日本ワクチン学会, 2004年10月, 札幌
- 6) 清水博之, Chen Li, Andi Utama, 有田峰太郎, 宮村達男, カンボジアで分離された新たなA群エンテロウイルスの遺伝子解析, 第52回日本ウイルス学会, 2004年11月, 横浜
- 7) 有田峰太郎, 清水博之, 永田典代, 網康至, 須崎百合子, 佐多徹太郎, 岩崎琢也, 宮村達男, エンテロウイルス71温度感受性変異株の神経毒性に関する解析, 第52回日本ウイルス学会, 2004年11月, 横浜
- 8) Shimizu H, Thao NTT, Tu PV, Binh NT, Thanh NTH, Circulation of Enterovirus 71 in the Western Pacific Region, JSPS Workshop on Infectious Diseases in Vietnam, 2004年11月, 長崎
- 9) Arita M, Zhu SL, Yoshida H, Yoneyama H, Miyamura T, Shimizu H: A type 3 poliovirus recombinant contains a sequence highly homologous with indigenous human enterovirus species C in viral polymerase coding region. EUROPIC 2005, Netherlands, May, 2005.
- 10) Shimizu H, Utama A, Nishimura Y, Miyamura T: Construction and characterization of chimeric polioviruses between a type 1 vaccine-derived poliovirus and species C enteroviruses. EUROPIC 2005, Netherlands, May, 2005.
- 11) Ida-Hosonuma M, Iwasaki T,

- Yoshikawa T, Nagata N, Sata T, Yoneyama M, Fujita T, Taya C, Yonekawa H, Koike S. Type I interferon response is an important determinant of poliovirus tissue tropism. EUROPIC 2005, Netherlands, May, 2005.
- 12) Shimizu H: Surveillance, epidemiology and laboratory diagnosis for enterovirus infections. Emerging and Re-emerging Infectious Disease Symposium, Taipei, June, 2005.
- 13) Shimizu H: Vaccine-derived polioviruses - current understanding and the implication for laboratory diagnosis. Seminar on Eradication of Vaccine Preventable Diseases (II), Kumamoto, July, 2005.
- 14) Shimizu H: Epidemiology and Genetic Analysis of Vaccine-derived Polioviruses, International Symposium on Emerging and Re-emerging Enteric Viral Diseases, Seoul, Dec. 2005
- 15) Yoshikawa T, Ida-Hosonuma M, Iwasaki T, Nagata N, Sato Y, Sata T, Yoneyama M, Fujita T, Taya C, Yonekawa H, Koike S. Role of type I interferon in tissue and cell tropism of poliovirus, The XIIIth International Congress of Virology, San Francisco, July, 2005
- 16) 清水博之、ポリオ根絶をめざして、第6回感染症フォーラム「感染症の制御戦略」、2005年2月、大阪
- 17) 清水博之、ポリオ根絶の進展とポリオウイルスの実験室封じ込め、平成16年度希少感染症診断技術研修会、2005年2月、東京
- 18) 宮村達男、清水博之、ポリオ根絶計画の進展とポリオワクチン戦略、第79回日本感染症学会、2005年4月、名古屋
- 19) 清水博之、宮村達男、ワクチン由来ポリオウイルスによるポリオ流行、第79回日本感染症学会、2005年4月、名古屋
- 20) 吉田弘、ポリオ根絶計画と環境ウイルスサーベイランス、第8回マリノバイオテクノロジー学会、シンポジウム「水圏ウイルス研究の最前線とバイオテクノロジー」2005年5月、熊本市
- 21) 清水博之、カニクイザル感染モデルによるエンテロウイルス71神経病原性の解析、「サルを用いた感染症研究」の現状と今後、2005年9月、京都市
- 22) 吉河智城、岩崎琢也、細沼美樹、宮沢美和子、安部忍、清水文七、小池智、初代培養腎細胞のポリオウイルス感受性獲得へのI型インターフェロンの関与、第53回日本ウイルス学会学術集会、2005年11月、横浜市
- 23) 小池智、I型IFN応答に依存したポリオウイルスの標的組織決定機構、第53回日本ウイルス学会学術集会、2005年11月、横浜市
- 24) 西村順裕、有田峰太郎、吉田弘、小島和暢、清水博之、宮村達男ラオスのAFP症例より分離された2型ワクチン由来ポリオウイルス、日本ウイルス学会学術集会、2005年11月、横浜市
- 25) 小池智、ポリオウイルスの感染特異性を支配する宿主因子、第28回日本分子生物学会年会、2005年12月、福岡市
- 26) 小池智、I型インターフェロン応答に依存したポリオウイルスの標的組織決定、第9回日本神経ウイルス研究会、2005年6月、浜松市
- 27) 小池智、I型インターフェロン応答に依存したポリオウイルスの標的組織決定、第70回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、京都、2005年7月

- 28) 小池智, ポリオウイルスの感染と自然免疫応答, 感染現象のマトリックス 基盤研究(C) (企画調査)「感染現象のマトリックス的解明をめざす企画調査研究」, 2006年2月、東京
- 29) 小池智, ポリオウイルス感染の特異性決定と自然免疫, ウイルス感染と自然免疫応答:その役割とメカニズム 特定領域研究「感染の成立と宿主応答の分子基盤」支援 基盤研究(C)「感染現象の研究マトリックスを構築するための企画調査研究」共催, 2005年12月、福岡
- 30) 吉田 弘、有田峰太郎、西村順裕、清水博之 ワクチン由来ポリオウイルスの分子疫学、第 27 回衛生微生物技術協議会、2006年6月、札幌
- 31) 吉田弘、田柄均、清水博之、宮村達男: 中国雲南省で急性弛緩性麻痺例から分離された非ポリオエンテロウイルス、第 47 回日本臨床ウイルス学会、2006年6月、東京
- 32) 水谷哲也、遠藤大二、白土憲也、岡本道子、渡辺理恵、福士秀悦、西條政幸、倉根一郎、石井孝司、鈴木哲朗、清水博之、高崎智彦、森川茂、西村秀一、新興・再興感染症に備えた迅速な網羅的ウイルスゲノム検出方法(LAV 法)、日本獣医学会総会、2006年
- 33) 永田典代、清水博之、武田直和、長谷川秀樹、佐多徹太郎、倉田毅、ポリオウイルスレセプター導入トランスジェニックマウス(TgPVR21)を用いた Sabin 由来不活化ワクチンの免疫効果に関する研究、日本ワクチン学会、2006年10月、泉佐野市
- 34) 有田峰太郎、永田典代、佐多徹太郎、脇田隆字、清水博之、ポリオ様麻痺の発症に関する定量的解析、第 54 回日本ウイルス学会、2006年11月、名古屋市
- 35) 有田峰太郎、網康至、脇田隆字、清水博之、エンテロウイルス 71 のマウス感染モデルに関する解析、第 54 回日本ウイルス学会、2006年11月、名古屋市
- 36) 西村順裕、有田峰太郎、吉田 弘、小島和暢、宮村達男、清水博之、脇田隆字、カンボジア AFP 症例より分離された 3 型ワクチン由来ポリオウイルス、第 54 回日本ウイルス学会、2006年11月、名古屋市
- 37) 大岡静衣、五十嵐博子、永田典代、坂井麻依、小池智、野地智法、清野宏、野本明男、ポリオウイルス経口感染モデルマウスにおける経口感染伝播機構の解析、第 54 回日本ウイルス学会、2006年11月、名古屋市
- 38) Koike S. Role of type I interferon response in tissue tropism and pathogenicity of poliovirus. 第 36 回日本免疫学会学術集会、2006年
- 39) 岩井雅恵、滝澤剛則、吉田弘、松浦久美子、長谷川澄代、小原真弓、堀元栄詞、倉田毅、白木公康、富山県における 2002 年のエコーウイルス 13 型検出と浸淫状況 日本ウイルス学会、2006年11月、名古屋市
- 40) 岩井雅恵、松浦久美子、長谷川澄代、小原真弓、滝澤剛則、倉田毅、吉田弘、富山県でのワクチン由来ポリオウイルス (VDPV) 検出例とその対応、第 65 回日本公衆衛生学会、2006年10月富山市、
- 41) Nishimura Y, Arita M, Yoshida H, Ling H, Toda K, Kojima K, Miyamura T, Shimizu H, Wakita T. Characterization of the type 3 vaccine-derived poliovirus in Cambodia, EUROPIC 2006, Finland, November, 2006
- 42) Ohka S, Igarashi H, Nagata N, Sakai M, Koike S, Nochi T, Kiyono H, Nomoto A. Establishment of a poliovirus oral infection system in human poliovirus receptor (hPCR/CD155) -expressing transgenic mice which are deficient in type I interferon receptor. EUROPIC 2006, Finland, November, 2006

- 43) Koike S, Yoshikawa T, Iwasaki T, Takano-Maruyama M, Ohara Y. Role of IFN response in the pathogenicity of neurotropic picornaviruses. EUROPIC 2006, Finland, November, 2006
- 44) Shimizu H. Global Polio Eradication - Remaining issues and new challenges- Capturing Opportunities through Biotechnology, Nov. 2006, Cibining, Indonesia

G.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

- 1) Shimizu H, Thorley B, Paladin JF, Brussen KA, Stambos V, Yuen L, Utama A, Tano Y, Arita M, Yoshida H, Yoneyama T, Benegas A, Roesel S, Pallansch M, Kew O, Miyamura T: Circulation of type 1 vaccine-derived poliovirus in the Philippines in 2001. **J Virol** 78: 13512-13521, 2004.
- 2) Arita M, Shimizu H, Miyamura T: Characterization of in vitro and in vivo phenotypes of poliovirus type 1 mutants with reduced viral protein synthesis activity. **J Gen Virol** 85:1933-1944, 2004.
- 3) Nagata N, Iwasaki T, Ami Y, Tano Y, Harashima A, Suzaki Y, Sato Y, Hasegawa H, Sata T, Miyamura Y, Shimizu H: Differential localization of neurons susceptible to enterovirus 71 and poliovirus type 1 in the central nervous system of cynomolgus monkeys after intravenous inoculation. **J Gen Virol** 85: 2981- 2989, 2004.
- 4) Kew OM, Wright PF, Agol VI, F. Delpeyroux F, Shimizu H, Nathanson N, Pallansch MA: Circulating vaccine-derived polioviruses: current state of knowledge. **Bull World Health Organ** 82:16-23. 2004.
- 5) Shimizu H, Utama A, Onnimala N, Li C, Li-Bi Z, Yu-Jie M, Pongsuwanna Y, Miyamura T: Molecular epidemiology of enterovirus 71 infection in the Western Pacific Region. **Pediatr Int** 46:231-235, 2004.
- 6) Arita M, Shimizu H, Nagata N, Ami Y, Suzaki Y, Sata T, Iwasaki T, Miyamura T: Temperature-sensitive mutants of enterovirus 71 show attenuation in cynomolgus monkeys. **J Gen Virol** 86: 1391-1401, 2005.
- 7) Huang QS, Greening G, Baker MG, Grimwood K, Hewitt J, Hulston D, van Duin L, Fitzsimons A, Garrett N, Graham D, Lennon D, Shimizu H, Miyamura T, Pallansch MA: Persistence of oral polio vaccine virus after its removal from the immunisation schedule in New Zealand. **Lancet** 366: 394-396, 2005.
- 8) Arita M, Zhu SL, Yoshida H, Yoneyama T, Miyamura T, Shimizu H: A Sabin 3-derived poliovirus recombinant contained a sequence homologous with indigenous human enterovirus species C in the viral polymerase coding region. **J Virol** 79:12650-12657, 2005.
- 9) Yang CF, Chen HY, Jorba J, Sun HC, Yang SJ, Lee HC, Huang YC, Lin TY, Chen PJ, Shimizu H, Nishimura Y, Utama A, Pallansch M, Miyamura T, Kew O, Yang JY: Intratypic recombination among lineages of type 1 vaccine-derived poliovirus emerging during chronic infection of an immunodeficient patient. **J Virol** 79: 12623-12634, 2005.

- 10) Ida-Hosomuma M, Iwasaki T, Yoshikawa T, Nagata N, Sato Y, Sata T, Yoneyama M, Fujita T, Taya C, Yonekawa H, Koike S: Alpha/beta interferon controls tissue tropism and pathogenicity of poliovirus. **J Virol** 79: 4460–4469, 2005.
- 11) Hansman GS, Kuramitsu M, Yoshida H, Katayama K, Takeda N, Ushijima H, Surenkhand G, Gantulga D, Kuroiwa C: Viral Gastroenteritis in Mongolian Infants, **Emerg Infect Dis** 11:181–182, 2005.
- 12) Miyachi S, Lu X, Inoue S., Iwasaki T., Koike S, Nambu A, Takada M: Organization of multisynaptic inputs from prefrontal cortex to primary motor cortex as revealed by retrograde transneuronal transport of rabies virus. **J Neuroscience** 25: 2547–2556. 2005.
- 13) Kuramitsu M, Kuroiwa C, Yoshida H, Miyoshi M, Okumura J, Shimizu H, Narantuya L, Bat-Ochir D: Non-polio enterovirus isolation among families in Ulaanbaatar and Tov province, Mongolia: prevalence, intrafamilial spread, and risk factors for infection. **Epidemiol Infect** 133: 1131–1142, 2005.
- 14) Sugieda M, Adachi S, Inayoshi M, Masuda T, Tsubota M, Mano H, Iwama M, Murakami Y, Yoshida H, Shimizu H: Intrafamilial transmission of a Sabin 1-related poliovirus in Shizuoka Prefecture, Japan. **Jpn J Infect Dis** 59: 277–278, 2006.
- 15) Iwai M, Yoshida H, Matsuura K, Fujimoto T, Shimizu H, Takizawa T, Nagai Y: Molecular epidemiology of echoviruses 11 and 13, based on an environmental surveillance conducted in Toyama Prefecture, 2002–2003. **Appl Environ Microbiol** 72: 6381–6387, 2006.
- 16) Iwai M, Nakayama T, Matsuura K, Hasegawa S, Ando S, Obara M, Nagai Y, Yoshida H, Horie H: Assessment of efficacy of a live oral poliovirus vaccine for virulent Sabin-like poliovirus 1 strains in Japan. **Acta Virologica** 50: 139–143, 2006.
- 17) Arita M, Nagata N, Sata T, Miyamura T, Shimizu H: Quantitative analysis of poliomyelitis-like paralysis in mice induced by a poliovirus replicon. **J Gen Virol** 87: 3317–3327, 2006.
- 18) Yoshikawa T, Iwasaki T, Ida-Hosonuma M, Horie H, Yoneyama M, Fujita T, Miyazawa M, Abe S, Simizu B, Koike S: Role of alpha/beta interferon in the acquisition of susceptibility to poliovirus by kidney cells in culture. **J Virol** 80: 4143–4125, 2006.
- 19) Mizutani T, Endoh D, Okamoto M, Shirato K, Shimizu H, Arita M, Fukushi S, Saijo M, Sakai K, Limn CK, Ito M, Nerome R, Takasaki T, Ishii K, Suzuki T, Kurane I, Morikawa S, Nishimura H: A new system for rapid genome sequencing of emerging RNA viruses. **Emerg Infect Dis** 13, 322–324, 2007.

Circulation of Type 1 Vaccine-Derived Poliovirus in the Philippines in 2001

Hiroyuki Shimizu,^{1*} Bruce Thorley,² Fem Julia Paladin,³ Kerri Anne Brussen,² Vicki Stambos,² Lilly Yuen,² Andi Utama,¹ Yoshio Tano,^{1†} Minetaro Arita,¹ Hiromu Yoshida,¹ Tetsuo Yoneyama,¹ Agnes Benegas,⁴ Sigrun Roesel,⁵ Mark Pallansch,⁶ Olen Kew,⁶ and Tatsuo Miyamura¹

Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan¹; Victorian Infectious Diseases Reference Laboratory, North Melbourne 3051, Victoria, Australia²; Research Institute for Tropical Medicine, Muntinlupa City,³ and National Epidemiology Center, Department of Health,⁴ and Regional Office for the Western Pacific, World Health Organization,⁵ Manila, The Philippines; and Respiratory and Enteric Viruses Branch, Division of Viral and Rickettsial Diseases, National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia⁶

Received 2 June 2004/Accepted 29 July 2004

In 2001, highly evolved type 1 circulating vaccine-derived poliovirus (cVDPV) was isolated from three acute flaccid paralysis patients and one contact from three separate communities in the Philippines. Complete genomic sequencing of these four cVDPV isolates revealed that the capsid region was derived from the Sabin 1 vaccine strain but most of the noncapsid region was derived from an unidentified enterovirus unrelated to the oral poliovirus vaccine (OPV) strains. The sequences of the cVDPV isolates were closely related to each other, and the isolates had a common recombination site. Most of the genetic and biological properties of the cVDPV isolates were indistinguishable from those of wild polioviruses. However, the most recently identified cVDPV isolate from a healthy contact retained the temperature sensitivity and partial attenuation phenotypes. The sequence relationships among the isolates and Sabin 1 suggested that cVDPV originated from an OPV dose given in 1998 to 1999 and that cVDPV circulated along a narrow chain of transmission. Type 1 cVDPV was last detected in the Philippines in September 2001, and population immunity to polio was raised by extensive OPV campaigns in late 2001 and early 2002.

Immunization with the oral poliovirus vaccine (OPV) is the cornerstone of the World Health Organization's program for the global eradication of poliomyelitis (15, 44, 55, 56, 65). The attenuated OPV strains of the three poliovirus serotypes (Sabin 1, 2, and 3) replicate in the gut of OPV recipients and can efficiently induce type-specific humoral and mucosal immunity (55), mimicking natural infection. However, replication of OPV in humans is frequently accompanied by genetic change of the vaccine virus, including reversion of key attenuating mutations (5, 42), introduction of other mutations throughout the genome, and intertypic recombination among OPV strains (7, 16). The phenotypic reversion of the OPV strains to neurovirulence is the underlying mechanism for the rare cases of vaccine-associated paralytic poliomyelitis among OPV recipients or their close contacts (41, 54, 55). Cases of vaccine-associated paralytic poliomyelitis in immunocompetent persons are generally associated with poliovirus types 2 and 3 and very rarely with type 1 (54). The large majority of OPV isolates from healthy individuals, the environment, or patients with vaccine-associated paralytic poliomyelitis are closely related to the original OPV strain (Sabin-like), diverging by <1.0% of nucleotide sequences encoding the major capsid protein VP1 (8, 9, 39). The low nucleotide sequence

diversities from the respective OPV strains are consistent with the short duration of most poliovirus infections (1) and the usually restricted spread of OPV virus (3).

It is now apparent that in areas with widening gaps in population immunity to poliovirus, especially where wild poliovirus circulation has ceased, viruses derived from OPV may circulate within a population, cause cases of paralytic poliomyelitis, and accumulate further mutations. OPV-derived polioviruses with 1 to 15% sequence divergence from the Sabin strains are now defined as vaccine-derived polioviruses (VDPVs) (8, 9), with the extent of divergence roughly proportional to the duration of viral replication (2, 27, 37) or circulation (25, 30, 66) since administration of the initiating OPV dose. In 2000 to 2001, a poliomyelitis outbreak associated with circulating VDPVs (cVDPVs) occurred on the island of Hispaniola (which is divided into the Dominican Republic and Haiti), underscoring the risk of using OPV at low rates of coverage in polio-free areas (15, 25, 28, 30, 44). Furthermore, retrospective genetic studies identified the endemic circulation of a type 2 cVDPV in Egypt from about 1983 to 1993 (66). More recently, intensified acute flaccid paralysis and laboratory surveillance led to the identification of cVDPV outbreaks in the Philippines in 2001 (type 1) (58, 62) and Madagascar in 2001 to 2002 (type 2) (51).

In this report, we describe the circulation of the type 1 cVDPV in the Philippines in 2001 and the genetic and biological properties of the four cVDPV isolates. Three of the isolates were from children with acute flaccid paralysis, a common clinical manifestation of poliomyelitis. The first case was iden-

* Corresponding author. Mailing address: 4-7-1 Gakuen, Musashimurayama-shi, Tokyo 208-0011, Japan. Phone: 81-42-561-0771. Fax: 81-42-561-4729. E-mail: hshimizu@nih.go.jp.

† Present address: Japan Poliomyelitis Research Institute, Tokyo, Japan.