

ポリオの根絶について

はじめに

子をもつ親が小児麻痺と恐れた、急性灰白髄炎（ポリオ）を引き起こすポリオウイルスは1960年代までは全世界で猛威をふるっていた。先進国では予防接種によって大流行を阻止し、ポリオを撲滅して、既に四半世紀余になる。しかし、発展途上国では現在、依然として流行を阻止できない国、再発生を許す国などがある。また、ポリオ先進国でも、これらの国からの持ち込みが心配され、油断のできない状態にある。WHOは1977年ソマリアでの発生を最後に天然痘を地球上から根絶した。そして、次の標的はポリオと、1988年に2,000年を目標に地球上からポリオを根絶するための活動を始めた。しかし、この活動は余すところ7年となり、根絶を達成することができるかどうか、わが国を含む先進国の現況と役割、そして、世界のポリオの状況をまとめた。

日本におけるポリオ撲滅の歴史と現況

わが国では1960年にポリオが大流行した。患者は5,606名を数え、愛知県でも319名が発症し、14名が死亡した。特に知多保健所管内では患者発生数は43名、死者も4名となり、人口10万人に対する罹患率は36.6人（全国は約15人）と子を持つ親を震えあがらせた。翌61年はソ連製のポンポン生ワクチン1,000万人とカナダ製生ワクチン300万人分が緊急接種され、患者は2,436名と半減し、62年にはカナダ製のワクチンが13歳以下の子供に接種されて、289名と激減した。以後は国産ワクチンが継続して接種され、1970年以降は野生株による患者はほとんど出ていない。

厚生省は伝染病流行予測事業を1961年に起こし、ポリオウイルスの監視を行ってきた。愛知県でもウイルスの監視を知多保健所管内の小児を対象に、毎年、検査を行っているが、全国の調査結果と同様、野生の強毒ポリオウイルスは分離されておらず、わが国から駆逐されたと考えられている。一方、ワクチンの効果を判定するために、豊橋保健所管内の小児の抗体保有調査を行っているが、1975～77年（現19～21歳）の接種者はI型の抗

体獲得率が約40%と低く（全国も同様）、この年齢層はポリオウイルスの汚染地への旅行や、親になったとき子供からワクチン株の感染をうけて発症することが懸念される。最近ではポリオ先進国の共通の問題として、ワクチン由来のウイルスに感染し、発病した可能性を疑う例が少数みられている。わが国でも同様であり、乳児期に完全接種をしていたならば予防できる事故と考えられ、ワクチンによる免疫付与の重要性が指摘される。

また、国外から強毒ポリオ野生株が持ち込まれる危険性も早くから指摘されており、いくつかの事例も報告されている。すなわち、甲原らは1980年から82年の3年間に、成田空港に到着した、主として南回りのヨーロッパ線および東南アジア29線、369機のトイレ汚水からポリオI型ウイルスを2株分離して、持ち込みの危険性を指摘した。そして、1980年8月、長野県坂城町に住むワクチン接種歴のない8才の男児が右下肢の筋力低下をおこし、ポリオI型が分離され、マーカー試験で野生株と判定された。また、1984年6月には豊橋市に住むワクチン1回接種の7歳の女児が脳炎症状を呈し、咽頭拭い液からポリオI型を分離し、これも強毒野生株と判定された。いずれの株もクエート株との間に関係が認められ、国外から持ち込まれたウイルスに感染したと推定された。一方、麻痺には至らなかったが、1993年1月、滋賀県に住むワクチン1回接種の13歳男児からポリオIII型野生株が分離され、前年の秋にオランダで流行した株との関連が疑われている。

本邦ではポリオの野生株は流行予測事業や感染症サーベイランス事業などの監視結果から常在していないと考えられているが、国際交流の盛んな現今、地球上からポリオが根絶されないかぎり、今後も、ワクチンの完全皆接種とサーベイランスを続ける必要を痛感する。

国外の状況

世界のポリオについて、WHO, WER, 68, No. 31, 1993に掲載された“1992年のポリオ”から引用する。ポリオ報告数は14,467名で1991年の14,176名より2%増であった。

また発生しなかった国は1991年の129か国から136か国に増えた。1992年の状況を、地域ごとにみると、アフリカ地域は40/46(87%)か国が報告し、1,742名という数は前年より34%減少した。患者はエチオピア、ケニア、ナイジェリア3国が85%を占め、15か国はゼロの報告であった。南北アメリカ地域は42/47(89%)か国は3年以上、残りは18か月以上、患者の報告はなく撲滅が達成されたと考えられる。地中海東部地区は21/23(91%)か国が報告し、1,478名は前年より27%減少した。患者はエジプト338名とパキスタン958名で88%を占めた。他に、ヨルダンでは1991~1992年の冬に免疫が完了している地方のなかで33名の流行があった。そして、9か国はゼロの報告であった。ヨーロッパは47/48(98%)か国が報告し、169名の内64名はオランダでワクチンを拒否する宗教集団、74名は旧ソ連で83%を占めている。27か国は3年以上連続して報告ゼロの国である。東南アジア地域は10/11(91%)か国が報告し、9,184名は前年より40%増である。患者はインドが8,756名で95%を占めた。モルジブとブータンは3年間ゼロの報告であった。西太平洋地区は35の国と地域全部が報告し、1,890名は前年より28%減少した。患者は中国が1,287名とベトナム490名で95%を占めた。29か国はゼロで、内28か国は3年間ゼロの報告であった。マレーシアは1986年が最後の患者であったが、1992年には3名の再発生が認められた。

1992年はインドでポリオが大流行し、このウイルスがヨルダン、マレーシア、オランダ、イギリスでみられたような輸入例となったことが特に注目された。そのうち、オランダではワクチンを拒否する宗教集団を中心に広がり、患者は生後1か月から53歳(平均18.9歳)にわたっていた。また、患者は出なかったが、カナダのアルバータ州で、この集団と交流のある人々から便材料を採取して検査をした結果、45名の材料から21株のポリオⅢ型ウイルスを分離した。そのうちの数株は遺伝子をPCR法で増幅し、塩基配列を決定して、オランダで分離された株と比較したところ、カナダ株はNBT-P3の5'非コード領域とは99%以上、VP/2A領域とは100%のホモロジーを示し、同一であることが証明された。このことから、隠れた伝播が明らかとなり、先進国においてもウイルスの輸入については一層の監視が必要である。

ポリオ根絶計画と成果

ポリオはWHOの推計によると1986年末までは毎年25万人以上発生していた。しかし、WHOは1)ポリオウイルスは人以外の動物の自然宿主はなく、長期間自然界では生存できない。2)強い免疫を生涯にわたって付与でき、

先進各国ではすでに経口ポリオ生ワクチンを導入して国内のポリオを撲滅していることなどから、地球上から根絶が可能と考えられ、1988年5月の総会で拡大予防接種計画(Expanded Program on Immunization;EPI)を決議し、ポリオの予防接種を徹底することにした。この活動はアフリカ地域、南北アメリカ地域、東地中海地域、ヨーロッパ地域、東南アジア地域、西太平洋地域に分けて実施されている。実際の活動方法は、南北アメリカ地域の47か国では1991年ペルーの症例を最後に事実上根絶を達成したといわれているので、その活動状況を示す。1985年に汎米保健機関(Pan American Health Organization;PAHO)は野生ポリオウイルスの感染をなくす計画をWHOより一歩早く発足させた。その計画は1)生後1年以内の小児のワクチン接種率を80%以上にあげる。2)サーベイランス体制を地方・国レベルで整備して、麻痺性ポリオの確定診断と伝播経路を究明し予防をする。1987年からは疑似患者についてはウイルス分離を行う検査体制も整備された。その結果、1990年末までには1歳以下の小児のワクチン接種率は70~73%に達した。そして、サーベイランス網の整備により急性弛緩性麻痺(AFP)の報告数は1985年の1,100名から1989年は2,094名と倍増したが、血清学的、ウイルス学的にポリオと確認されたものは、130名(1988年は340名)と確実に減少した。そして1990年はメキシコ、エクアドル、ペルーで各1名となった。今後は1)ワクチン接種率の高水準の達成と維持。2)臨床的・ウイルス学的サーベイランスの維持。3)専用の予防接種活動の維持の3本柱で根絶活動を行い、再発生の防止に努めることとしている。

日本を含む西太平洋地域は1984年は4,515名から毎年減少し、1988年には1,305名まで減少した。しかし、1990年は5,963名と激増した。これは中国の5,065名という大流行をもたらしたものである。中国の発表したワクチン接種率が96%であるにもかかわらず、これだけ多数の患者発生をみたのは一人っ子政策の歪みによる無戸籍の子供達の接種もれに起因するといわれている。

WHOはこの西太平洋地域のポリオ患者の85%を占める中国を最も重要なポリオ撲滅の対象国と位置付け、1990年にWHOとUNICEFは中国周辺の自治区を、WHOとUNICEFそれにJICA(日本国際協力事業団)は中国の5省を受け持ち、ポリオの撲滅活動を手助けすることになった。その活動は南北アメリカ地域と同じ方法であるが、中国はワクチンの製造と接種はすでに実施しているので、ワクチン接種を強力に押し進めていくこと。そして、日本が協力する計画の重点はポリオ・サーベイランス・ネットワークの構築、ウイルス検査体制の整備と検査技術

者の教育である。サーベイランスについては国立医療センターが、検査体制の整備と技術者の教育は国立予防衛生研究所が中心になって撲滅に寄与しており、当所も予研の行う活動の一部を担っている。

中国ではこの活動の結果、1991年は7,100万、1992年は10,500万、1993年は18,600万回分のワクチンを接種し、患者は1992年には2,615名、1993年8月までの報告数は348名と激減した。そして1994年には10,000万人の子供に接種する計画で、すでに実施されつつあると報じられており、撲滅まであと一步の所にきているようである。

1993年度からは当所もポリオ様麻痺患者から分離されたウイルス株についてStringent Hybridizationによりワクチン由来株か野生株かの鑑別を3年間担当することになった。分離されたポリオウイルスがワクチン株か野生株かの判別はマックブライド法、モノクローナル抗体による方法があるが、一長一短で、当所ではパキスタンで分離した多数のポリオウイルス株についてウイルスの特定部分の遺伝子を増幅させ、この方法により鑑別をおこなったところ、優れた方法であることがわかった。また、分離されたウイルスをプローブとして他の分離株との違いも判別でき、1つの国内で血清型は同じでも異なった株の流行か、全く同一の株による流行であるかの疫学的な追及も可能となり、その成果が目目されている。

2,000年までに根絶するための問題点

南北アメリカ地域、ヨーロッパ地域ではほぼ根絶を手中にした。西太平洋地域では1995年を根絶の目標としており、35か国のうち5か国（中国、ベトナム、カンボジア、ラオス、フィリピン）を残すだけとなった。中国を始め4か国は目標達成が可能と考えられているが1月20日付けの朝日新聞によるとカンボジアでは予防接種を2月に行うものの、プノンペン近郊だけで、全国一斉に行う目途がたたず、西太平洋地域の目標達成はカンボジア次第と報じている。

疾病の根絶には多くの要因をクリアしないと不可能である。ITFDE(International Task Force for Disease Eradication)が2年間(1988,89年)に涉って、医学的、社会的、政治的、国際協力の面から、8種の疾患について、地球上から根絶の可能性を検討した。それによると、麻疹(死亡200万人)と結核(死亡200~300万人)と癩(症例1,100~1,200万人)は現状では根絶不可能。狂犬病(死亡52,000人)は都市においては根絶可能。フランベジアと地方性梅毒(症例250万人)は伝播を断ち切ることは不可能。オンコセルカ症(症例1,800万,失明34万人)については関連して起こる失明の予防は可能。そして、メジ

ナ虫病とポリオは根絶可能と報告されており、カンボジアのポリオ撲滅は現時点で医学的、社会的、政治的、国際協力のうちの何かが欠けていることになる。

患者発生数をWHOに報告しない国が1992年は10か国あり、特にアフリカ地域は6か国を数える。報告をしない理由は、恐らく政治的な問題によるのではないかと推察され、情報が把握できないためにポリオ根絶の空白地となる可能性が高い。

ポリオ根絶に関わる問題点は多くの要因が考えられるが、医学的な問題に絞ってとりあげてみる。

ポリオウイルスに感染しても麻痺にいたる例は0.1%と低いため、1名の患者の周りには約1,000名の不顕性感染者が存在することになり、彼等が隠れてウイルスをまき散らす。さらに、ウイルスの排泄期間が約1か月に及ぶため伝播の危険性はより高くなり、ウイルスの根絶を困難にしている。しかし、ウイルスが散布されても、周りの人々が免疫を獲得しておれば、1部のワクチン接種もれの者か不完全接種者には感染するが、それ以外の感染は予防され、拡散を防ぐことができる。このため全世界で一斉に接種を行えば、地球上から根絶することは可能である。しかし、世界の15歳以下の子供は179,000万人、そのうちの85%は途上国の子であり、ワクチンの供給は2,000年までに100億回分以上を必要とするといわれており、国際協力がなければ達成は困難である。

一方、発展途上国ではポリオのサーベイランスシステムは殆どなく、患者は報告されないか、されても、ポリオ以外の疾病が混ざり、なかなか正確な情報はつかめず、状況の把握を困難にしている。また、ポリオの確認には血清学的、ウイルス学的な診断技術が要求されるが、そのレベルが低い国も多い。これらの問題を解決するにはやはり先進国の協力による、監視システムの構築やウイルス検査の技術移転が必須で、単にワクチン接種の率を上げるだけでは、根絶は難しい。

おわりに

地球上からポリオは減少しているが、目標の2,000年までに根絶が達成できるかどうかは微妙である。それは、根絶を達成した天然痘とは違った困難を乗り越えなければならないからである。しかし、1960年の悲惨な大流行に関わった者として、1日も早い達成を願うものである。

文献 (1)臨床とウイルス, Vol. 13, No. 1, 1985 (2)CDC MM WR, Vol. 41~Vol. 42, No. 43, November 5, 1993 (3)WHO WER, Vol. 67~Vol. 68, No. 31, July 30, 1993 (4)病原微生物検出情報, Vol. 14~15, No. 1, 1994 (ウイルス部 石原佑式)

PCRによる病原細菌の診断

DNAによる病原菌の診断法について、各種の検討がなされてきているが、中でも、PCRが広く応用されはじめている。PCRは、今後、日常検査のなかで重要な位置を占めてくる可能性が高いので、今回はその概略について述べてみたい。

1 DNA診断の必要性

細菌学的手段による感染症の診断は、従来、患者からの病原菌の検出によって実施されてきた。しかしながら、細菌学の研究が進むにつれて、これまで考えられていた病原菌の中には非病原菌、或いは病原性の弱い菌が存在し、それは病原因子の保有に関係することが判明してきた。病原因子は細菌の染色体やプラスミド等にコードされており、その遺伝子の有無によって病原性の発現が左右される。従って、感染症の細菌学的な診断には病原因子の検出が不可欠であるので、その病原性物質を培地中等に産生させ、それを検出することによって判定してきた。しかしながら、病原因子の検出は産生のための適当な培地や培養方法の選択、或いは病原因子の検出法の開発等が必要である。また、病原因子の産生の条件は株によって異なっている場合もあって、適当な方法が選択されなければならない。さらに、これらの方法は、高度な熟練や検出までに数日の期間を要するものもある。また、病原因子の検出法は主としてin vitroにおける検出であり、in vivoにおける状況を必ずしも反映していない欠点があった。そこで、この方法に代わって病原因子の産生をコードしている遺伝子を直接検出することが、これまでの方法に代わるものとして、急速に注目されるようになった。これがDNA診断である。さらに、DNA診断はこれまで長時間を要していた分離同定の検査や、培養が困難な病原体を短時間で的確に検出することを可能にした。なかでもPCRの方法は高感度な方法であり、あまり熟練を要しないこともあって、病原体や病原因子の検出に利用されてきている。

2 PCRについて

PCRはpolymerase chain reactionの略で、日本語ではポリメラーゼ連鎖反応と訳されている。PCRはDNAポリメラーゼの酵素反応を利用して、試験管内で短時間のうちに目的とする領域のDNAを増幅させる方法であり、高感度で特異性が高いとされている。

3 PCRの原理

細菌の染色体やプラスミドDNAは2本鎖のDNAである。この2本鎖のDNAに熱を加えると、1本鎖に遊離し、温度を元にもどすと前と同じ2本鎖にもどる性質をもっている。PCRはこの性質を利用し、温度を3段階に変えることで、目的とするDNA断片を増幅する手段である。即ち、その反応は次の3つの段階から成っている。①2本鎖DNAの1本鎖への分離を行なうために、細菌のDNAを90℃以上の高温で短時間処理する(1本鎖DNAへの変性)。②次に合成プライマーの1本鎖へのアニーリング(プライマーの結合)を行なう。プライマーとは、増幅したいDNA断片のセンス鎖・アンチセンス鎖に相補的な20前後の塩基対から成るオリゴヌクレオチドであり、それぞれ1本が必要である。プライマーのDNAへの結合のために、30℃~65℃で反応させる。但し、このアニーリングのための適当な温度は、細菌の種類によって異なるので、検討されなければならない。③プライマーの結合後、プライマーを伸長させるために、反応温度を72℃に上げる。DNAポリメラーゼの助けをかりて、DNAの伸長合成が始まり、相補的なDNAができあがる。ポリメラーゼは1本鎖DNAへの変性のための温度で失活しないように、高温細菌の*Thermus aquaticus* から精製されたTaqポリメラーゼが使用される。この3つのステップを1サイクルとして、25~35回行ない、目的とするDNAを増幅させる。増幅後の反応液の数μlを、1~1.5%のアガロースゲルを用いて電気泳動にかける。エチジウム・ブロマイドにて染色後、トランスイルミネーターを用いて写真撮影を行な

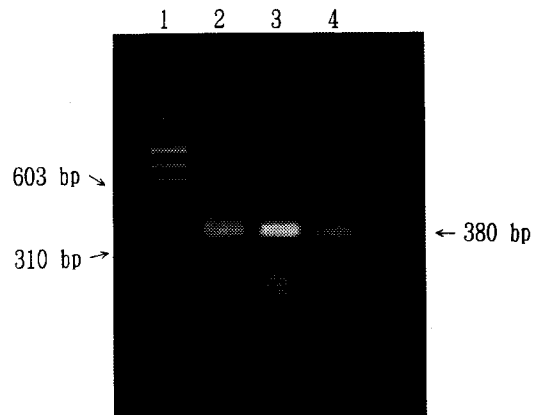


図 PCR増幅後の電気泳動

レーン1 : Marker 4 (0×174/HaeIII digest)
2 ~ 4 : 被検コレラ菌 コレラ毒素陽性

い、次の点を観察、或いは検討する。①検出されたDNA断片が目的とした大きさをもっているか（図参照）。②増幅されたDNA断片が目的のDNA sequenceを持っているか（制限酵素による切断パターンによって得られたDNA断片を観察する）。

4 病原細菌への応用の状況

PCRの応用の一つである病原因子の遺伝子の検出に関しては、種々検討されてきている。主なものは表に示した通りである。病原因子を検出する方法には、次の2つが考えられる。①検体から菌を分離し、その菌からDNAを抽出して行なう場合。②菌を分離しないで、大便等の検体を直接PCRに応用する場合。検査の効率化又は検査時間の短縮化のためには、後者の方法が極めて有効な方法である。しかしながら、検体から直接検出する場合には、検体中の様々な夾雑物のために反応がうまくいかない場合が多いので、工夫が必要といわれている。

以上のような病原因子の検出に関する研究の他に、病原菌の同定に関する研究も進んできている。これは当然のことながら同定までの時間が非常に長くなるもの、或いは培養が困難なもの等について行なわれており、主なものとしては結核菌、レジオネラ等がある。

5 コレラ菌からのコレラ毒素遺伝子の検出

当所にて行なっているコレラ菌株からのコレラ毒素遺伝子の検出方法の概要は、次の通りである。コレラ菌の1夜ブイオン培養液約50 μ lを沸騰水中で5～10分加熱して溶菌させ、テンプレートDNAとする。この5 μ lを反応液中に添加し全量を50 μ lとする。これに、蒸発を防ぐためにミネラルオイルを2～3滴加え、温度変換装置（プログラマブル・インキュベーター、理工化学研究所）によって94 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C及び72 $^{\circ}$ Cを1サイクルとした培養を25回実施する。反応終了後、5 μ lをアガロースゲルにて電気泳動を実施し、トランスイルミネーターを用いて写真撮影を行ない、コレラ毒素遺伝子の有無を判定する。この方法によって、培養後1日でコレラ毒素遺伝子を確認することができる。コレラ毒素遺伝子のDNA断片は、図に示す通り380bpのDNAのバンドが検出される。

PCRによるコレラ遺伝子の検出を、RPLAのコレラ毒素の検出の成績と比較した小林らの検討では、PCRによってコレラ菌110株中99株が陽性を示した。これに対して、RPLAでは95株が陽性を示したが、PCRで陽性を示した残りの4株は陰性であった。これは検査法の感度の違いによるものか、或いは培地中に毒素産生が

表 PCRの主な応用例

菌名	病原因子等の遺伝子
コレラ菌	コレラ毒素
病原性大腸菌	VT ST LT 侵入性
赤痢菌	侵入性
ウエルシュ菌	エンテロトキシン
腸炎ビブリオ	耐熱性溶血毒
ディフィシル菌	toxin A, toxin B
破傷風菌	神経毒
ブドウ球菌	mecA
レジオネラ	mip
結核菌	染色体
エルシニア	染色体

なかったのではないかと考えられ、PCRの有用性が示唆された。

6 PCRの問題点

PCRには種々な利点があるが、次のような問題点も指摘されている。①既知の塩基配列を持ったプライマーを合成する必要があるために、増幅する遺伝子又は核酸の構造が決定されていなければならない。②増幅を適切に進行させるために、系に応じて反応条件を確立しなければならない。③必ずしも定量性が得られない。

7 PCRの注意点

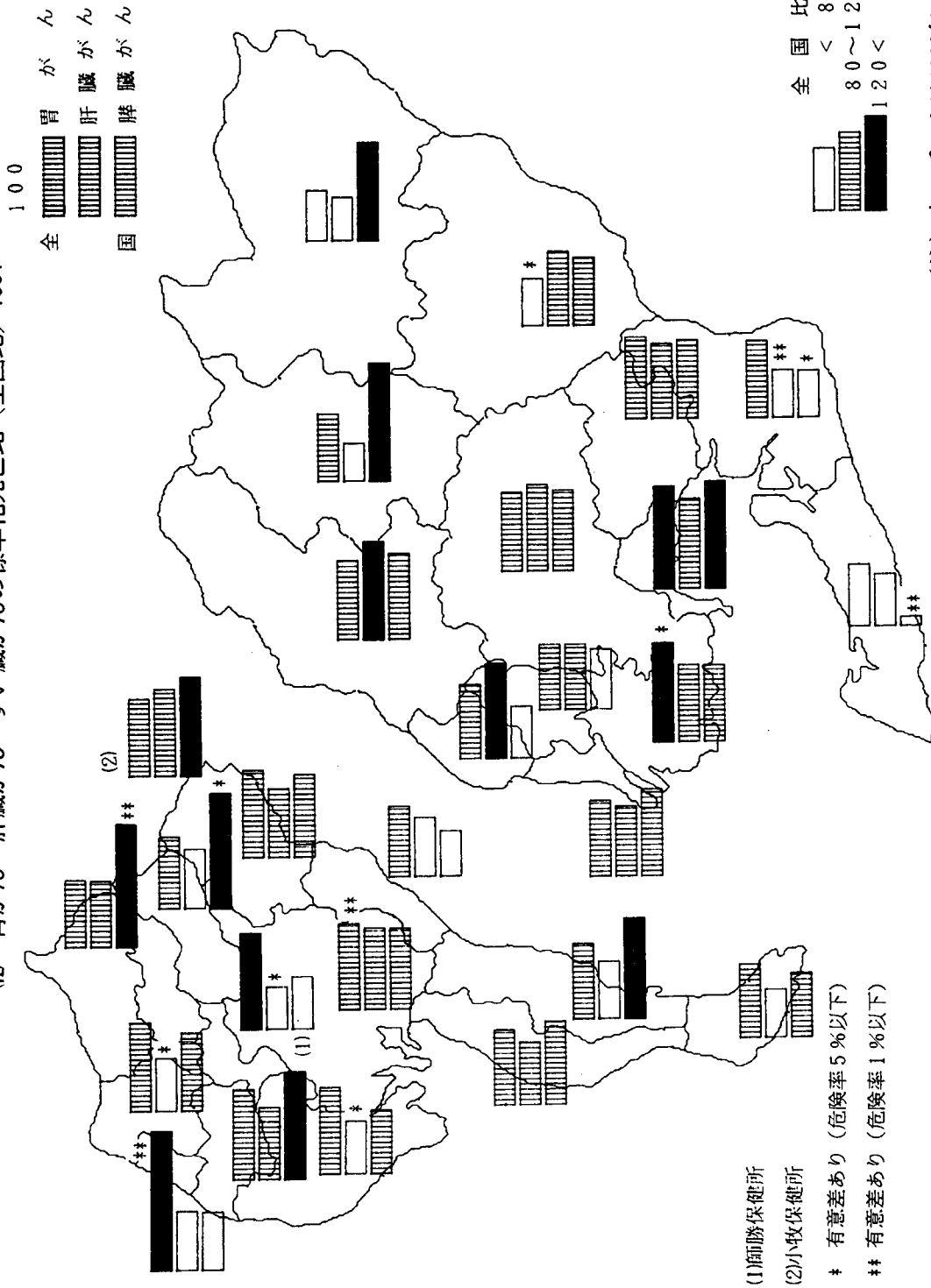
PCRは高感度なため、微量の目的外のDNAの混入によっては、陽性又は偽陽性の結果にもつながり、検出結果の判定を誤らせてしまう危険性を有しているので次の様な点に注意する必要がある。①実験中のDNAの汚染を防止するため、空気が動かないような実験室で、又は、安全キャビネット内等で実験を行なうのが望ましい。サンプルチューブ、チップ、蒸留水等は高圧滅菌をして使用し、増幅前に使用するピペットと増幅後に使用するピペットは混用しない。②プライマーは20塩基程度のものが適当であり、GC含量は50%程度のsequenceが良い。又、大過剰量を使用するが、あまり多すぎると非特異反応がでてしまう。プライマー自身がアニーリングしない構造のものであり、繰り返し構造がないこと。③アニーリングの時間を短くすると特異性がある。Taqポリメラーゼが多すぎると非特異反応が出やすい。

以上のように、PCRは各種の利点を持っているので、病原因子の遺伝子の検出、菌種の同定、各種性状の遺伝子の検出等に応用されている。今後、その利用範囲は益々広がっていくであろう。そのためにも、更に検討を重ね、各問題点を解明し、PCRをより確実な方法へと高めなければならない。

（細菌部 齋藤 眞）

〔I〕 地域特性

(12) 胃がん・肝臓がん・すい臓がんの標準化死亡率 (全国比) 1991



この図を見てご意見・ご感想などありましたら、ご連絡下さい。

(注) 人口データは1990年のものを使用した
(厚生省地域保健医療計画支援システムより)
(保健情報室)