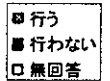
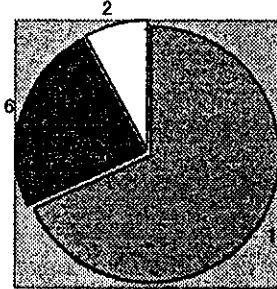


7. 提供したシーケンスデータはすべてご自分でジーンバンクに登録しますか。

シーケンスデータを提供すると回答した25施設のうち17施設（68%）は自身でジーンバンクへ登録すると回答した。

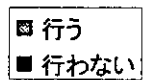
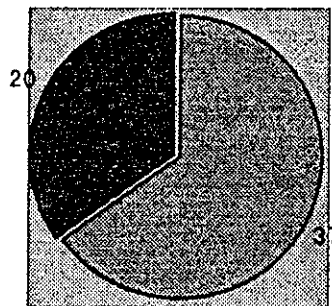
シーケンスデータの自己登録



8. 提供したPCR産物又は病原体のシーケンスが出来たらご自分でジーンバンクに登録しますか。

PCR産物あるいは病原体を提供すると回答した57施設のうち37施設（64.9%）は自身でジーンバンクへ登録すると回答した。

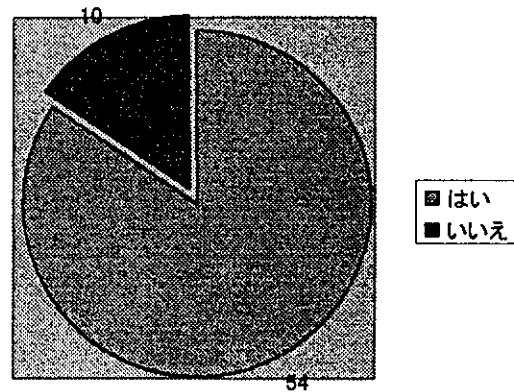
提供病原体シーケンスの自己登録



9. 提供したデータの公表については、協力研究所の代表者を共同研究者とし、データバンクが設置された研究所が行ってよろしいか。

データの公表については回答した64施設中54施設(84.4%)がデータバンクが設置された研究所が行なつてよいと回答した。更にデータの公表の方法について問10で質問した。

データバンク設置研究所によるデータの公表



10. データの公表はどのようにすべきかご意見ををお願いします。

詳細は別紙2に掲載したが、その内容をまとめると、基本的にはQ9の方法が良いが、データバンク設置研究所と協力研究所との話し合いを充分に行うように望む回答が多かった(6/14)。また、情報が皆の共有財産として利用されることを制度的に保証する必要性を述べている施設もあった。しかしながら、未発表のデータはデータ所有者が発表すべきであり、データバンク設置研究所が全国のデータとして発表すべきではない、との意見もあった。

別紙1 問20：感染研の血清バンクをより使い易くするために、何を改善する必要がありますか。に対する回答

情報公開(14)

- + 収集してある血清の情報を出して欲しい
- + 保存リストの公開
- + バンクに保存している血清の公表
- + 保存血清に関する情報
- + 血清バンクの性状の公開
- + 使用規定、使用例等の情報不足
- + 詳しい情報が必要
- + バンクの内容（保存血清の年齢、生別、住所（県、市位まで）の公開
- + 保存している血清についての情報提供
- + 収集データの公開
- + 数、質等の情報を地研へ公表する必要
- + 詳しいリストの配布
- + 保存している血清のリストを公開し、感染研のホームページで見れるようにする。
- + バンクのリスト（保存血清利用可、不可等）の一覧が欲しい

宣伝(10)

- + 感染研での存在のアピール不足
- + 手続き等も含め利用可能であることを周知させていただきたい
- + 利用方法・条件のパンフレットの配布
- + 保有血清の一覧表及び利用申込書を毎年1回程度配布願いたい
- + 内容や使用手続きの広報
- + 内容の広報
- + 利用するに当たっての条件を広報する。
- + 感染研の血清バンクを利用できることを地研に周知することが必要
- + リストがインターネットで閲覧出来ると良い
- + 利用する場合の事務手続き等の周知

手続きの簡素化(7)

- + 手続きの簡素化（5件）
- + 手続システムの簡素化
- + 簡単に利用できる体制整備

その他(11)

- + 窓口の明確化
- + 血清の種類を多くしてほしい
- + インフォームドコンセントを得ること
- + データーのプライバシーの問題について明確化する
- + 血清収集にあたって保健所、医療機関の協力体制の整備
- + 血清収集にあたって協力が得られやすい世論づくり
- + 使用目的の明確化
- + 血清を預け入れた所には、払い出しの時、分注して送ってほしい。
- + 原則無償（供与）
- + 保存血清データの一覧化 内容の充実
- + 血清バンクの法的整備

別紙2 問10：データの公表はどのようにすべきかご意見を申し上げます。
に対する回答

- 1) データ使用の目的が公衆衛生上の見地から問題ないとされる限り原則公開
- 2) 基本的にはQ9の方法でよいと思うが、データの公表・利用方法についてデータバンクを設置する際に規約（取り決め）を設ける必要があると思う。その内容をによってどの範囲でデータが提供できるか具体的に検討する。
- 3) WISHネット等を利用していつでもデータを取り出せる様にして欲しい。
- 4) 協力研究所の代表者、担当者を共同研究者とする。
- 5) 当該研究所等機関の担当研究者の同意を得ること
- 6) 公表についてはプライバシーに配慮し、原則としてデータバンク設置研究所と協力研究所との話し合いの上、行政的に公表可能なもののみを公表すべきである。したがってデータの入手・利用は、これらの機関に限定する必要がある。例えば、国立感染研と地研のみの利用とし、公表は関係機関で話し合う。
- 7) データをシーケンスした機関の承認あるいは、シーケンスデータの入手先を明記（論文中）すればよいと考える。
- 8) 病原微生物検出情報を利用して適宜公表する。ある程度まとまったら論文として発表する。
- 9) データ使用は機関に限る
- 10) Sequenceから取られたdataは可能な限り、論文として発表するとともに*Gene bankに登録すればよいと考えます。しかし、論文等の発表する機会がない等であれば、このような病原体遺伝子バンクからの登録をすればよいと考えます。*Gene bank, DBGET//WWW.genome.ad.jp.
- 11) 前もって連絡をいただきたい。目的、発表方法等の同意を取ってから利用してほしい。知らない間にデータの一人歩きはデータ収集の妨げになるのでは。
- 12) 無条件で公表可能なものと、条件つきで可能（提供者の了解を要する）なものと区分する必要がある。
- 13) 質問の意味がよく分からないところがあるが、現在公開されているジーンバンクがあり、そこへ登録する場合、登録者はそのことを承知した上で行っている。今後、遺伝子データバンクを国研や地研に設置する場合には、その登録データを一部の者のみが利用することを禁じるか、そのようなことを行えなくするなどしてその情報が皆の共有財産として利用されることを制度的に保証することが必要である。
- 14) 未発表のデータは、データ所有者がこれを発表すべきであって、データバンク側で発表すべきでは決してないと考えます。緊急性を要する場合などはデータ所有者とデータバンク側が相談の上、データの取り扱いを決めるべきです。データバンク側で発表できるのは、すでに公表されたデータのレビューにとどめるべきです。参考までにMLST websits のpolicy documentを添付します。

調査票

機関名 ()
回答者 所属 ()
氏名 ()

血清バンクに関するアンケート調査

以下の設問にお答え下さい。

1. 貴研究所には血清バンクがありますか
①ある ②血清バンクとは呼ばないが同等のものはある ③ない——→11.へ
2. 血清バンクあるいはそれと同等の事業は予算化されていますか。
①はい ②いいえ
3. 予算額はいくらくらいですか。
約 千円
4. 血清はどのようにして集めていますか。(複数回答可)
①抗体検査の残り ②血液センターから分与 ③保健センター・保健所から分与
④病院から分与 ⑤血清バンク用に採血 ⑥その他 ()
5. 血清の収集に際してどのようにしてインフォームドコンセントを取っていますか。
6. いつ頃からの血清がありますか。
1-①1940年代から、 1-②1950年代から、 1-③1960年代から、
1-④1970年代から、 1-⑤1980年代から、 1-⑥1990年代から、
7. 何本くらいありますか。
2-① 1,000本以内、 2-②1,000～5,000、 2-③5,000～10,000
2-④10,000～50,000 2-⑤50,000本以上
8. どんな状態で保存していますか。
①-20℃ ②-80℃
9. 保存血清を使って抗体調査を行ったことがありますか。
①ある ②ない
10. 具体例を挙げてください
11. 他の機関のバンクと共同で調査や研究を実施した経験がありますか？
①はい ②いいえ
12. 共同調査・研究の相手機関は？
①地衛研 ②国立感染症研 ③大学 ④その他 ()
13. 国立感染症研(以下、感染症研)に血清バンクが有ることをご存じですか。
①はい ②いいえ

- 14 感染研の血清バンクを利用したいと思ったことがありますか。
①ある ②ない →19. へ
15. 実際に利用しましたか
①利用した ②利用しなかった →18. へ
16. 利用したことがある場合何に使用しましたか。
17. 利用に際して何か問題はありましたか。
18. 利用したことがない場合なぜ利用しませんでしたか。
①これから利用する予定である。
②目的とする血清が無いあるいは少ない。
③手続きが面倒。
④使用を断られた。
19. 利用したいと思わない施設へ、なぜ利用しないのですか。
①利用する予定がない。
②手持ちの血清で充分である。
③インフォームドコンセントが得られているのか心配。
④その他
20. 感染研の血清バンクをより使い易くするために、何を改善する必要がありますか。
①
②
③
21. 貴研究所独自の血清バンクを整備する必要があると思いますか。
①ある ②ない
22. 主にどんな目的に使用する予定ですか。
23. 血清バンクの整備に当たって何が問題となっていますか。(複数回答)
①血清のデータが散逸している。
②血清提供者に対してインフォームドコンセントが採れない。
③血清管理用プログラムの開発が困難。
④血清保存用フリーザーが確保できない。
⑤血清が集まらない。
⑥その他

7. 提供したシーケンスデータはすべてご自分でジーンバンクに登録しますか。

①はい

②いいえ

8 提供したPCR産物又は病原体のシーケンスが出来たらご自分でジーンバンクに登録しますか。

①はい

②いいえ

9 提供したデータの公表については、協力研究所の代表者を共同研究者とし、データバンクが設置された研究所が行ってよろしいか。

①はい

②いいえ → 10. へ

10 データの公表はどのようにすべきかご意見をお願いします。

平成11年度分担研究報告書

微生物系統株の収集・保存事業（感染症ライブラリー）の構築に関する研究
分担研究者 渡辺 治雄 国立感染症研究所細菌部長

研究要旨：病原体を系統的に収集・保存するシステムの構築を行った。現在細菌部に、地方衛生研究所等から検査のために送付されてくる菌に関する情報（分離日、場所、患者性別年齢、主な臨床症状、菌学的解析結果（菌種、血清型、毒素型、遺伝型及びその他の解析結果））のデータベースを、エクセルにおいて作成し、一定のルールの基に管理・保存を行った。また、菌株は、各菌の長期保存に最も適した条件において保管した。新たな流行が発生した場合の菌学的解析に生かせるシステムになることが期待される。

目的：昨今、腸管出血性大腸菌 O157 感染症や新型インフルエンザ等の新興・再興感染症の台頭がみられ、行政的立場からも感染症にたいする関心が高まってきている。WHO, CDC 等の機関は、21 世紀に向けての長期的な展望に立った感染症対策の必要性を唱えている。このような時期に、新しい感染症の出現や既存の感染症の異常的拡大等を疫学的観点から解明していく体制を確立すると同時に、病原体を科学的に解析しその遺伝学的、進化論的および病原学的位置づけを明らかにしていくことは的確な感染症対策を構築する上に必要不可欠なことである。その第一歩として、病原体の系統的な収集・保存を行い、病原体の遺伝学的特徴付けをデータベース化し比較検討できるようにしておくことにより、起こり得る新しい病原体の出現に備えることが可能となる。今年度は、各病原体に関する種々の情報

のデータベース化を行う。

方法：細菌部に保存されている各菌株に関し、菌株番号、及びその菌に係わる種々の情報を、情報処理ソフト、エクセルを用い整理する。その情報に対応できるように、菌株を -80°C で冷凍庫にあるいはその菌種にとって安定な形での保存方法で保管を行う。

結果：

1) 例えば、腸管出血性大腸菌 O157 に関して、図1のように菌株の情報をエクセルに打ち込んだ。菌株情報としては、(1) 菌株番号、(2) 患者発症日、(3) 患者発症場所、(4) 年齢、(5) 性別、(6) 主な症状、(7) 散発あるいは集団発生、(8) 菌の血清型、(9) 毒素型 (VT1, VT2)、(10) 遺伝型 (PFGE 型)、(11) ファージ型、(12) 菌株入手先；地研他。が入力されている。エクセルを用いる

と、この情報を適切に処理できる。例えば、分離日時、場所等の希望する項目で、情報を収集整理できる利点がある。腸管出血性大腸菌 O157 に関しては、1996 年から毎年収集して、現在では 5000 株の情報を収集してある。これらの情報を基に、10 歳以下の子供に臨床症状を伴う排菌者が多いが、20—40 代の成人ではむしろ無症状で排菌している感染者が多い傾向がみられることを明らかにしている。家族内において、成人が 2 次感染の媒介者になっている可能性を示唆するものと考えられる。

2) 他の菌種としては、サルモネラ(チフス菌を含む)、コレラ、腸炎ピブリオ、劇症型由来 A 群レンサ球菌、レジオネラ、ボレリア、レプトスピラ、等を対象にしてデータバンクを構築している。

考察・結論：

菌株の保管、その情報の整理・保存を一元化することにより、各疾患とその病原体の関連性の解析、如いては新たな病原体が出現したときの比較検討に有効に利用可能である。今後は、感染研内の病原体情報の保存及び地方衛生研究所とのデータの相互利用を計って、感染症対策に生かせる道を確立させることが重要である。もちろ

ん個人情報の秘匿を前提におこなう。

研究発表：

1) Jun Terajima, Hidemasa Izumiya, Akihito Wada, Kazumichi Tamura, and Haruo Watanabe. Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. *Emerg. Inf. Diseases*. 5: 301-302, 1999.

2) Watanabe, H., J. Terajima, Izumiya, J., Wada A., and Tamura, K. Molecular analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolated in Japan and its application to epidemiological investigation. *Pediatrics International*. 41: 202-208, 1999.

3) Iyoda, S., Wada, A., Weller, J., Flood, J.A.S., and Watanabe, H. Investigation of the AFLP, high resolution DNA fingerprinting method, as a tool for molecular subtyping of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiol. Immunol.* 43: 803-806, 1999.

4) Watanabe, H., Shalkh, N., and Terajima, J. Interaction of Ipa protein involved in *Shigella* invasiveness with host factor. *Asian Network on Microbial Research* (ed. RIKEN). pp. 57-64, 1999.

5) Izumiya, H., Tamura, K., Terajima, J., and Watanabe, H. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium definitive phage type 104 and other multi-drug resistant strains in Japan. *J. J. Infect. Diseases*. 52: 133. 1999.

厚生科学研究費補助金（新興、再興感染症研究事業）
分担研究報告書

微生物系統株の収集、保存事業（感染症ライブラリー）の構築に関する調査研究
ーアデノウイルスバンクの構築ー

分担研究者 井上 栄（国立感染症研究所、感染症情報センター長）

研究要旨 感染症発生動向調査の病原体サーベイランスは新法下で拡大、強化が求められている。このさい、病原体の正確で迅速な検査、診断はこのサーベイランスの基礎をなすものと考えられる。基礎的診断法としての分離、同定のさい、標準株や過去の分離株との比較、検討が疫学的解析やワクチン選定などの予防対策上必須となる。旧サーベイランス下で古くからおこなわれていたアデノウイルス分離株の血清型同定及び保存という過去の蓄積があったことにより、1995年4月から始まったアデノ7型の流行のいち早い検出が可能となった。さらに、遺伝子型や変異部位の同定、病原性、流行規模さらには近隣諸国との疫学的関連性の解析に極めて有用であることが実証された。

はじめに

感染症新法下における病原体発生動向調査対象疾患が大幅に増加し、これに伴って病原体診断および検査体制の拡大、整備充実が求められている。正確な感染症サーベイランスのための基盤として、迅速で正確な病原体の診断、検査が不可欠であることは周知であるが、その手技等に関しては細菌、ウイルス等、必ずしも一様ではない。従って、1. 標準株、分離株の系統的な保存
2. 検査手技および検体採取、輸送の定型化、標準化
3. 患者血清の収集、保存
4. レファレンス試薬の整備（プライマー、プローブ、抗血清等）等が課題となってくる。病原体サーベイランスにおいて標準株、分離株の系統的収集、保存の意義として、流行株の血清型、遺伝子型を決定し過去の型と比較出来、疫学的解析、ワクチン株の選定等が可能となる。アデノウイルスは多数の血清型があり、惹起する病態は多彩である。エンテロウイルスと並んでサーベイランスは古くから行われており、分離株は血清型を決定し報告される。その大部分は感染研および地研に保存されていると考えられる。このような系統的なサーベイランスを行っているのは世界的にも例を見ない。1995年4月より始まった今回のアデノ7型の爆発的流行のいち早い検知は、こうした正確なサーベイランスの蓄積があったためと考えられる。しかし、詳細な疫学的解析には従来の血清型のみでは不十分で、ゲノムタイピングが要求される。本研究はアデノウイルス7型感染症を例に病原体サーベイランスのなかでのウイルス分離株の収集、保存の意義について考察する。

アデノウイルスバンク構築の目的

ヒトアデノウイルス標準株および分離株を収集、保存し、流行の疫学的解析、病原性解析、ワクチン製造など予防対策に資する。

方法

1. アデノウイルスバンク構築に協力する地研や医療機関の確認および連絡会の設定
2. アデノウイルスにより引き起こされる主要な疾患は、呼吸器、消化器、眼、泌尿器病である。これらの原因となるB亜属（3、7、11型）、C亜属（1、2、5、6型）、D亜属（8、19、34、35、37型）、E亜属（4型）、F亜属（40、41型）について各地から分離された流行株の血清型を収集する。このさい、出来るだけ遺伝子型（全ゲノムの制限酵素切断パターンによる分類）を決定するようにする。これを各地研、感染研へ情報として伝達する。このさい、病原体サーベイランス伝達システムの利用を考慮する。
3. 流行ウイルスの分離株情報を提供した地研、感染研、医療機関は責任をもってその代表株を保存、管理する。このさい、株に関する情報（分離年月日、検体、患者情報）および分離細胞などを統一的フォーマットで作製し、ネットワークへ流す。
4. バンク加入機関の間は原則として無条件で分与可とする。研究発表は原則的に共著とするが、個々のケースにゆだねられる。
5. バンク維持費は感染症ライブラリー予算などを充てる。

アデノウイルス7型 (A d 7) 感染症の分子疫学 の解析

研究方法

1980年より始まった病原体サーベイランス以来、アデノウイルスの分離は3型が最も多く、以下2、5型であり、7型は極めて少なかった(計30件、年平均約2件)。諸外国では、アデノ7型の流行はしばしばみられており、アデノウイルス感染症のなかでも病原性の強い型として重要な地位を占めている。大きな問題点は2才以下の乳幼児に重い肺炎を引き起こすことであり、病院内での流行で心や肺に基礎疾患のある小児に死亡例がでていた。1980年以前の状況は、サーベイランスが行われていないため、比較解析出来ないが、A d 7は、サーベイランス以前、かなり分離されていたといわれており、これは血清疫学的調査から裏づけられている。1980年以前およびサーベイランスが始まって以来分離されたA d 7を現在流行中の株の遺伝子型と比較した。

結果

A d 7ゲノムDNAをB a m H Iで切断したパターンでゲノムタイプが分類されている(国際分類)。今回の大流行以前にまれに分離されている株のゲノムタイプは7 dで、今回の流行株はそれがわずかに変異した7 d 2と判明した。流行株はほぼ全国から分離され同一のパターンを呈しているため、その起源は単一なものと推定される。従って、以前の7 dがわずかに変異した7 d変異株の大流行となったものと考えられるが、その増殖力、感染力、病原性などに違いがあるのではないかと考えられた。そこでゲノム全塩基配列を決定し、比較してみた。その結果、蛋白をコードする領域においてアミノ酸の変化を伴う変異部位を数カ所特定出来た。(図1) これらの変異とウイルスの感染力、増殖力、病原性あるいは流行との関連などを検討している。

南米由来7 h型および韓国のA d 7流行

世界的にみるとA d 7のゲノムタイプは地理的分布に差があり、流行に伴って変化している。南米では、A d 3型と組み換えをおこした7 h型が猛威をふるっているが、この型が少数ながら、本邦でも分離されるようになった。おそらく南米からの輸入例と思われる。中国では、7 dがドミナントに分離されるが、韓国のゲノムタイプは分かっていない。ソウル大の李教授は、日本とほぼ同時期からA d 7の大流行を経験した。そのゲノムタイプを共同で調べた所、A d 7 d型と判明した。

考察

ウイルス感染症の流行疫学の解析に分子疫学的手法が非常に有用であることが証明されている。臨床的に重要なA d 7型の最近の流行の解析に過去のサーベイランスデータの蓄積とその分離株の収集、保存が、今回の流行の解明に大きく寄与していることが判明した。アデノウイルスは多くの血清型が存在し、引き起こされる疾病も多彩である。個々の血清型の疫学、病原性解明に遺伝子型の検査が有用であり、このためアデノウイルスバンクの構築が不可欠であることが実証された。

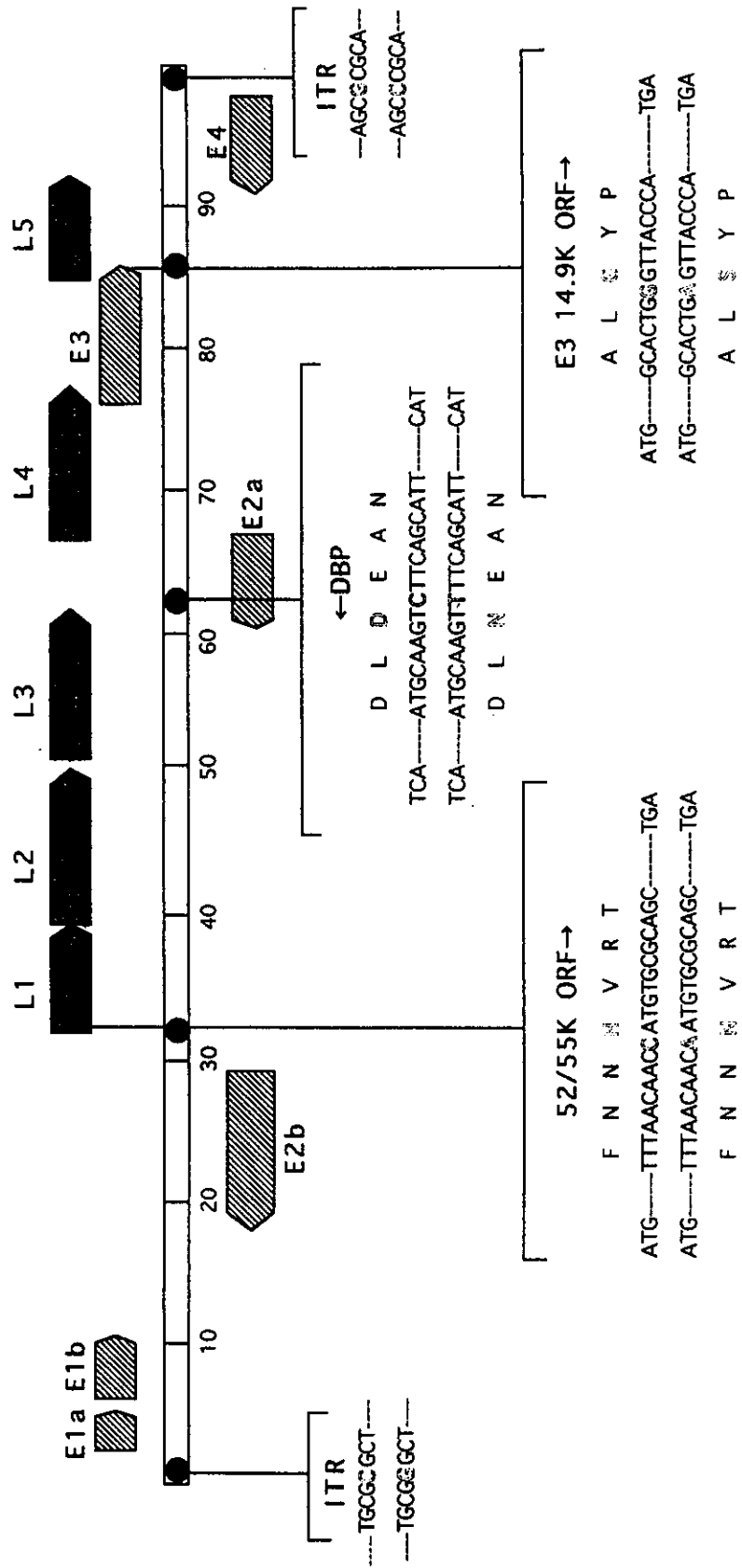
文献

1. Yamadera S., Yamashita K., Akatsuka M., Kato N. & Inouye S. : Trend of adenovirus type 7 infection, an emerging disease in Japan. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 51, 43-51, 1998.
2. Yamadera S., Inada T., Mukouyama A., Yamashita K., Akatsuka M., Kato N. & Inouye S. : Trends of adenovirus type 7 in Japan. 38th Inter-Science Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. p338, September 1998, San Diego, USA. (abstract)
3. Hashido M., Mukouyama A., Sakae K., Tsuzuki H., Yamashita T., Inada T. & Inouye S. : Molecular and serological characterization of adenovirus genome type 7h isolated in Japan. *Epidemiol. Infect.* 122, 281-286, 1999.

研究協力者

稲田敏樹、山寺静子、向山淳司、橋戸 円

図1。流行株 (7 d 2) と流行前分離株 (7 d) の塩基配列比較



ノーウォーク様ウイルスの系統株収集・保存に関する研究

分担研究者 宮村達男 国立感染症研究所ウイルス第二部 部長

共同研究者 武田直和 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長

名取克郎 国立感染症研究所ウイルス第二部 主任研究官

研究要旨

ノーウォーク様ウイルス (NLVs) を迅速に同定し分類するため、RNA ポリメラーゼの一部あるいは構造蛋白領域の 5' 末端 (300bp) を増幅し、その遺伝子の塩基配列を解析した。GenBank に登録されている NLVs の RNA ポリメラーゼおよび構造蛋白領域の配列を抽出しそれぞれのデータベースを作成した。このデータベースに本年度新規に解析した配列を統合した。新たに Genogroup I の 10種類、Genogroup II の 16種類の NLVs RNA 遺伝子を収集・保存した。これらのうちの 4 種類のウイルスについてウイルス様中空粒子を作製して保存した遺伝子の正確度を確認した。

A. 研究目的

ノーウォーク様ウイルス (NLVs) は RNA ポリメラーゼの一部、構造蛋白の一部あるいは全領域、および機能未定同定蛋白をコードする ORF3 領域の比較から、遺伝学的に大きく Genogroup I (GI)、および Genogroup II (GII) の 2 群に分類される。GI と GII を構成する NLVs はわが国では小型球形ウイルス (Small Round Structural Virus : SRSV) と呼ばれているウイルスであるが、これらは小児の急性胃腸炎、大人の嘔吐下痢症および急性胃腸炎の原因ウイルスである。わが国において冬季に頻発するウイルス性集団食中毒の病因ウイルスでもある。NLVs が原因である下痢症の患者は先進国、発展途上国を問わず毎年多数発生し、NLVs は地域を問わず広範に浸潤していることが血清疫学調査から明らかになっている。またカキ関連集団食中毒の原因ウイルスとして食品衛生行政上重要視されているウイルスでもある。

NLVs は 1972年にその実体が電子顕微鏡下でとらえられた、その後多くの研究者によって培養細胞、器官培養及び実験動物で培養が試みられたにもかかわらず現在においてもなお増殖ができないウイルスである。したがって、現状では培養細胞で増幅したウイルスとして NLVs を収集・保存することは不可能である。患者糞便材料をそのまま凍結保存することも可能であるが、超低温庫のスペースにも限度がある。また、たとえ凍結状態であっても長期間のうちにウイルス粒子が壊れてしまう可能性が十分考えられる。

本研究では、将来 NLVs が増殖可能である培養細胞が確立された場合を想定し、かつ現時点で可能と考えられる NLVs 感染性 cDNA のクローニングを目指し、患者糞便材料から抽出した NLVs RNA および cDNA を超低温で遺伝子の状態で保存することを目的とする。また、NLVs の遺伝子解析を迅速に行い、保存したウイルスを遺伝学的に分類する手法を確立することを目的とした。ウ

ウイルス様中空粒子を作出することによって増幅した遺伝子の正確度を評価することも目的の一つである。

B. 研究方法

(1) データベースの構築：遺伝子解析ソフトウェアパッケージ GCG の Fasta プログラムによって GenBank、EMBL および DDBJ に登録されている NLVs 遺伝子を検索し、昨年度作成した我々独自の NLVs 用データベースに追加登録した。

(2) プライマーの設計：NLVs 構造蛋白領域を再度検索し、Pretty プログラムで consensus sequence を抽出してこの領域を増幅するプライマーを設計した。

(3) 保存ウイルスの遺伝子解析と分類：収集した NLVs 遺伝子の構造蛋白領域の 5' 末端 (300bp) を上記のプライマーを用いて増幅し、その遺伝子の塩基配列を解析した。これらをデータベースに登録し、Pileup プログラムによってこの領域のアラインメントならびに系統解析を行った。収集した GI と GII の NLVs RNA 遺伝子を超低温庫に保存した。

(4) ウイルス様中空粒子の作製：増幅した遺伝子の正確度を確認するため構造蛋白を発現する組換えバキュロウイルスを作出し、ウイルス様中空粒子産生の有無を生化学的、免疫化学的に解析した。

C. 研究結果

平成 12 年 2 月現在 GenBank、EMBL、DDBJ に登録されている NLVs の RNA ポリメラーゼ領域を抽出し、昨年作成したポリメラーゼ領域のデータベースに追加しこれらを統合した。200 以上の配列の比較が可能になっている。ウイルポリメラーゼ領域の解析から、新規の NLVs は遺伝子型から GI (Norwork-lik) および GII (Snowmountain-like) の 2 種のグループに分類されることを確認した。新規の配列を含めデータベースに蓄積さ

れた全ての NLVs がサッポロウイルスに代表される Classical human calicivirus の遺伝子構造と明らかに異っていた。

本年度は新たに 7 種の構造蛋白全領域の塩基配列データ (1,600 bp) を収集・解析してデータベースを作成した。また、NLVs を迅速に分類するために構造蛋白領域の 5' 末端 (300bp) を増幅して遺伝子の塩基配列を解析し、GenBank、EMBL、DDBJ に登録されている配列と統合してデータベースを作成した。これら NLVs 構造蛋白 (ORF2) の塩基配列を解析すると、塩基のホモロジーは GI と GII の間で約 50%、同グループ間でも 70% 程度であった。25 株の国内の NLVs の構造蛋白遺伝子を増幅してその塩基配列を解読し分子系統学的に解析した結果、塩基配列から GI、GII にはそれぞれ少なくとも 6 種類と 9 種類の遺伝子型が存在すると予想された。これらはこれまでの血清学的な分類法の結果と矛盾しない。これらの RNA を超低温庫に保存した。

一方、NLVs は培養できないために抗原および免疫原として用いるウイルス粒子を得ることができなかったが、1993 年米国の Jiang らによってバキュロウイルス発現系で形態的にも抗原的にもネイティブなウイルスと変わらない Norwork virus の中空ウイルス粒子 (VLPs) が作られた。その後、米国および英国で計 8 株の NLVs VLPs が発現されている。本年度は日本で流行した株の中から遺伝子型の異なる 4 株の NLVs で組換えバキュロウイルスを用いて VLPs の発現に成功した (GI の 2 株、GII の 2 株)。したがってこれらの 4 株に関しては正確な遺伝子をクローン化したことが証明された。各発現 VLPs は血清学的にも異なり、それら 4 株について NLVs 抗体測定が可能となった。現在、抗体測定のための ELISA 抗原を分与できる体制にある。またこれまでのものとは血清型の異なる VLPs の発現と、抗 VLPs 免疫血清を用いた高感度ウイルス検出系の確立を試みている。

D. 考察

ヒトカリシウイルスはプラス一本鎖 RNA 遺伝子を芯に、このまわりに分子量約 60,000 ダルトンの構造蛋白が 180 分子集合して形成される正二十面体構造を有している。1993年に米国の Jiang らがノーウォークウイルス (GI) を、ほぼ同時に英国の Lambden らはサザンプトンウイルス (GI) の全塩基配列を解読して以来、1995年にはローズデールウイルス (GII) とマンチェスターウイルス (GIII) の全一次配列が明らかになった。マンチェスターウイルスはおよそ 7.2k の、それ以外のウイルスは 7.6k の長さの遺伝子である。ウイルス蛋白のアミノ酸配列には他の RNA ウィルスに共通に見いだされるヘリカーゼ、プロテアーゼ、RNA ポリメラーゼ等の機能モチーフが並び、その配列順序もほぼ明らかになっている。その後、患者の糞便から効率良く NLVs RNA を抽出する手法、およびプライマーの開発に伴い、この数年は世界各国で PCR による NLVs 遺伝子の増幅、解析が行われている。ただ現在 RNA ポリメラーゼ領域の塩基配列が势力的に解析されてきているが、解析の領域によっては本来 GII であるべきウイルスが GI に分類されることもあり多少の混乱が生じてきた。ヒトカリシウイルスは遺伝学的にあるいは血清学的に新種のウイルスが同定されてくる可能性が多分に考えられるウイルスであるから、今後構造蛋白領域 ORF2 の 5' 末端 (300bp) の塩基配列データベースを収集・解析することによってデータベースの充実をはかり、より有効なプライマーの開発を進めてゆく必要がある。

本年度は新たに Genogroup I の 10種類、Genogroup II の 16種類の NLVs RNA 遺伝子を収集・保存した。昨年度収集・保存した株を加えると Genogroup I で15種類、Genogroup II で 23種類、合計 38種類を保存した。本年度は 4 株の中空粒子を作製することに成功し、昨年度の 7 株を加えて11株の中空粒子を作出することができ

た。これらの中空粒子とこれらを抗原にして作製した高力価血清を用いた ELISA によって、11株が血清学的に異なるウイルスであることも明らかとなった。これらを迅速に検出するための抗原 ELISA の開発が急務である。

E. 結論

NLVs は現時点で培養細胞、器官培養及び実験動物で培養ができないウイルスで、ウイルス株の収集・保存が不可能である。本年度は患者糞便材料から抽出した 25株の NLVs RNA を超低温で遺伝子として保存した。このうちの 4 株は構造遺伝子を組換えバキュロウィルスで発現することによってウイルス様中空粒子を産出し、収集遺伝子の正確度を確認した。

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

微生物系統株の収集・保存事業（感染症ライブラリー）の構築に関する調査研究
～保存ウイルスの遺伝型とSVF解析～

分担研究者 田代 真人（国立感染症研究所部長）

研究要旨 1977～2000年の国内の野外麻疹ウイルス(MV) 69株の遺伝型を決定した。その結果、わが国では1984年C1型の流行を契機にD3、D5遺伝型の野外MVが流行の主役であった。1998～1999年に国内各地にD3型が流行、ワクチン既接種者の多数が罹患(SVF)した。SVF症例での麻疹罹患はワクチン接種後6～12年であった。今後、ワクチンの接種法の検討と共に野外MVの変異動向の監視を継続する必要がある。

はじめに

麻疹ワクチンが定期接種となって20余年が経過した。しかし、依然として、麻疹は各地で数百～数千人規模で流行し¹⁾、年間罹患数は数万例にのぼっている。近年、乳幼児に加えて成人の重症麻疹（成人麻疹）、罹患妊婦の早・死産も注目されている²⁾。さらに、ワクチン既接種者の麻疹（SVF:Secondary vaccine failure）が小学校高学年～中・高校生を中心に増加しつつあり、麻疹ワクチンによる終生免疫について検討を要する状況にある。

麻疹は小児科のみならず、内科、産科の対応疾患としても、その予防対策が必要になっている。先進諸外国、とくに米国での麻疹はすでに制圧され、全米での年間罹患は100例にすぎない。『もはや麻疹は米国の常在病ではない』⁴⁾ 状況にある。

しかしながら、地球規模では年間100万人に及ぶ乳幼児が麻疹で死亡しており、その制圧、撲滅を目標とする予防接種拡大計画（EPI）の進展が待たれている。

本研究で構築された麻疹ウイルスバンクはSVFの発生機序、野外流行ウイルスの疫学調査等に不可欠な存在となっている。

本年度は野外麻疹ウイルス株の遺伝型解析とSVF症例を解析した。

1.目的

麻疹ウイルスバンクとしてウイルス株の分離、収集、遺伝型決定、保存など分子疫学的解析を行う。さらに、流行ウイルスの性状と変異動向の監視、ワクチン副反応調査、成人麻疹（妊婦を含む）調査、国際協力など麻疹ワクチンおよび麻疹の予防など厚生行政に資することを目的とする。今年度は2000年2月までにわが国で分離、収集された野外MVの遺伝型決定とSVF症例からのウイルス分離を試み、ワクチンによる免疫持続期間を検討した。

2.方法

ウイルス分離：昨年に引き続いて臨床検体（咽頭拭い液、末梢血液）よりウイルスの分離、収集を行った。分離用細胞としてB95a細胞の他に、本年度成果として新たに樹立したヒト臍帯血（Cord Blood）由来のモノレイヤー細胞培養系のCOBL細胞（別報）を用いた。

遺伝型の決定：ゲノム特異的プライマーペ

ア (sense 1194 AGATTAGGGCAAGAGAT
G G T 1213, anti-sense 1726
GAGGGTAGGCGGATGTTGTT 1707) を用
いてゲノムRNAよりRT-PCR法にてN
遺伝子の5' 端の532塩基を増幅した。
また、上記についてDye Terminator 法にて
同部位の塩基配列を決定した。

遺伝型の決定：DDBJ / EMBL / GenBank
より利用可能な39株と前年度の報告に続
き今年度は当バンク保有のMVから42株
を解析した。各ウイルス株の1320位～
1686位の385塩基配列をCLUSTAL
W program (Thompson et al., 1994) および
TREEVIEW 1.4 program (Page, 1996) を用い
て解析、系統樹を作成した。さらにWHO
の報告⁵⁾ にしたがって遺伝型を決定した。

ウイルス株：B95a細胞、またわCOBL細胞
を用い、患者末梢血、咽頭拭い液より分
離されたウイルス株（下記）を用いた。
BK23(9918), BK24(9930), BK25(9932),
BK26(9933), BK27(9937)*, BK28(9938)*,
BK29(9939)*, BK30(9940)*, BK31(9942),
BK32(9954), BK33(9961), BK34(9962),
BK35(9969), BK36(9970), BK37(9971),
BK38(9972), BK39(9974), BK40(9973),
BK41(9975), BK42(9976), BK43(9977),
BK44(9978), BK45(9979), BK46(9982),
BK47(9983), BK48(9955), BK49(9957),
BK50(9963), BK51(9990), BK54(9993),
BK56(9703), BK57(9704), BK58(9705),
BK59(9711), BK60(9714), BK61(9716),
BK62(9717), BK63(0001), BK64(0007),
BK65(0010), BK66(0012), BK67(0013),
BK-68(8802), BK-69(0017) (*SVF症例)

SVF症例：1999年沖縄県八重山地区
の中学、高校で集団発生したSVF**⁶⁾
からワクチン接種記録の明確な4症例よ
り分離したウイルス(BK27～30)の遺伝型

を決定した。また、協力医療機関から送
付されたSVF6症例の発疹出現後2日
までに採取された末梢血液からウイルス
を分離した。

MV株の命名：国際的に統一されたMV株
の命名法⁵⁾ に従った。

3. 結果

遺伝型：検索結果は図-1の通りである。
遺伝型は昨年と同様、D3およびD5であ
った。今年度は特にD3タイプが北海道、青
森、千葉、群馬、東京で流行した。佐賀で
はD3、D5タイプが混在した。

SVF症例からの分離ウイルス：沖縄の
4症例（ワクチン接種後11～12年）の
何れもから分離された（表-1）。医療機
関から送付された別のSVF6症例（ワ
クチン接種後6～9年）からは3株が分離さ
れた。これらのウイルスは北海道、青森佐
賀、千葉、神奈川、佐賀での流行ウイルス
と同一の遺伝子配列のD3タイプであった。

4. 考察

昨年度構築されたMV株バンクは順調に
機能した。これまでの成績と考え併せると
わが国の流行ウイルスは1970年代のE型、
1980年代のC1、D3、1990年代のD3、D5
型の4タイプであった。1999年沖縄県八重
山保健所管内の定点病院（石垣小児科）に
おける同年第11週の麻疹罹患は17例、その
16/17例(94%)がワクチン既接種者であり、
いずれもワクチン接種後11～12年の罹患で
あった。これまでに医療機関から提供され
たSVF症例ではワクチン接種後6～7年
の罹患例からウイルスが分離されている。
これらの成績は現行麻疹ワクチンの1回接
種で獲得される感染防御免疫は概ねワクチ
ン接種から6～10年程度であることを示
唆し、これが近年、中学、高校生など年長

児のSVF増加の主要因と考えられる。麻疹ウイルスバンクの機能としてSVFの発生状況についても検索を継続する必要がある。

流行MV株を1950年代のEdmonston株（遺伝型A）と比較した結果、1984年流行BK-2（遺伝型C1）株との間にH遺伝子に58塩基に置換（アミノ酸置換13を伴う）を認め、F遺伝子では35塩基に置換（アミノ酸置換は0）を認めた。1990年代にはいりF遺伝子にも2～3カ所にアミノ酸置換を認め（未発表）、野外MVの変異は新たな段階を迎えているものと推測される。さらに、1984年以降の野外MVはH蛋白の少なくとも2ヶ所の抗原決定基で変異をしめしている⁷⁾。これら感染防御蛋白での変異はワクチンの有効性と直結する予防行政上重要な問題となろう。

麻疹の罹患状況はワクチンの接種率と密接に関連する。ワクチン接種率の高い米国での麻疹はすでに稀な感染症になっている⁴⁾。米国での麻疹は輸入麻疹であり、わが国は麻疹の輸出国であると断定されている。

激的な伝播力を示す麻疹の制圧、撲滅にはワクチン接種率96%⁸⁾を実現する必要がある。わが国のワクチン接種率は75%にとどまっており、現状では麻疹の制圧は望めない。事実、1998年後半から東京⁹⁾および近県（茨木、群馬¹⁾、神奈川）、北海道、青森、佐賀、沖縄に麻疹の流行があり、これら地域だけでも6,000人以上が罹患し、肺炎の併発により9名が死亡した。先進国においてこのような状況にあるのはわが国のみであり、麻疹対策の立ち遅れは国際的に指摘されている。ワクチンの接種率を高め、麻疹を制圧することは国際社会の一員としての責務である。麻疹の制圧に向けて第一にワクチン接種率96%を実現し、ワクチンの2回接種を導入する必

要があろう。MVバンクは麻疹のサーベイランス、制圧に有用な情報を提供するものと考えられる。

文 献

- 1) 木村博一、大月邦夫、疋田博之、森川昭広、竹田 誠、小船 富美夫： 群馬県で1998年に起こった麻疹流行の解析。日本医事新報3936, 45-49, 1999
- 2) Eberhart-Phillips JE, Frederick PD, Baron RC, Mascola L: Measles in pregnancy: a descriptive study of 58 cases. *Obstet Gynecol* 82: 797-801, 1993
- 3) 久川 浩章, 倉繁 隆信：麻疹ワクチン既接種者における麻疹（様疾患）の多発。感染症 22, 186-190, 1992
- 4) CDC, MMWR, 48, No.34, 749, 1999
- 5) Standardization of the nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles virus. WHO, *Weekly Epidemiologic Record* ; 73:265-272, 1998
- 6) 小船富美夫、田代真人ほか：麻疹ワクチン既接種者の麻疹罹患とわが国の麻疹対策-沖縄県八重山地区での麻疹流行- 臨床とウイルス（印刷中）
- 7) F.Kobune, M.Funatu, H.Takahashi, M. Fukushima, A.Kawamoto, S.Iizuka, H.Sakata, S.Yamazaki, M.Arita, Xu Wenbo and Zhang Li-Bi.: Characterization of measles viruses isolated after measles vaccination. *Vaccine*, 13, 370-372, 1995
- 8) Anderson, R.M. and R.M. May: *Nature*, 318, 1985.
- 9) 臼井信男、宍倉章浩、笹本和広、鈴木健一：東京都葛飾区周辺地域での麻疹流行。IASR 19, 33, 1998

研究協力者

小船富美夫、片山未来、岡田晴恵、竹田誠、小浜友昭、佐藤 威（国立感染研）