

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 総括・分担研究報告書

主任研究者 宮村 達男

平成17（2005）年 4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 宮村 達男	----- 1
II. 分担研究報告書	
1. 組換えポリオウイルス出現・伝播のメカニズムと その制御に関する研究 清水 博之	----- 9
2. コミュニティに Silent circulation するポリオ ウイルスに関する研究 吉田 弘	----- 15
3. ポリオウイルス感受性動物モデルに関する研究 小池 智	----- 21
III. 資料	
1. 富山県で確認された VDPV 事例 清水 博之、小林 秀幸	----- 25
2. WHO GAP-II 和訳	----- 29
IV. 野生株ポリオウイルス保管状況調査 バイオメディカルサイエンス研究会	----- 59
V. 研究成果の刊行に関する一覧	----- 110
VI. 研究成果の刊行物・別冊	----- 123

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 宮村達男 国立感染症研究所ウイルス第二部長

研究要旨 日本における野生株ポリオウイルス保管施設のリストを完成させるため、情報収集体制を確立した。又、世界で頻発しているワクチン由来ポリオ変異株ウイルスの遺伝子解析、病原性解析を行った。一方で環境サーベイランスにより、環境中に存在するポリオウイルスの検出を行い、河川水からワクチン由来2型ポリオウイルスを検出し、その解析を行った。更に、IFN α / β レセプターをノックアウトした PVR-Tg マウスではウイルス感受性が高まり、組織特異性に変化を認めた。この系が変異ポリオウイルスの病原性、組織局性の変化を解析するのに有用であることを示した。

分担研究者

清水博之 国立感染症研究所
ウイルス第二部 室長
吉田 弘 国立感染症研究所
ウイルス第二部 主任研究官
小池 智 東京都神経科学総合研究所
副参事研究員

オ根絶は間近に迫っている。世界ポリオ根絶の最終段階においては、重要であるが困難な以下のような諸課題、たとえば、1) インド、パキスタン、ナイジェリア等に残されたポリオ流行地域での野生株ポリオ根絶の達成、2) ワクチン由来変異株ポリオウイルスによるポリオ流行の阻止、3) ポリオウイルス野生株の封じ込めと廃棄の推進、等の諸課題を解決していく必要がある。WHOは、現在改訂中のポリオ根絶戦略計画において、2004-2005 年を野生株ポリオ世界的根絶のための期間、2006-2008 年はポリオ根絶の確認期間、2009 年以降を OPV 接種停止の検討期間と位置づけて、具体的な対応を開始した。日本でも、すでに始められているポリオウイルス野生株の封じ込めについ

A. 研究目的

日本も含む西太平洋地域では、1997 年のカンボジアでの 1 例を最後にポリオ流行は終息し、2000 年にポリオフリーの宣言がなされた。当初 2000 年の達成を目標にしていた世界ポリオ根絶計画は、計画の遅れはあるものの、ポリオ流行地域および症例数は減少しており、地球レベルでの野生株ポリ

て、より具体的かつ現実的な計画に基づき、実際の封じ込めおよび廃棄作業を、早急に進めていく必要がある。本研究班は、ポリオウイルス野生株保管施設のリストアップの完成および確認、それに引き続く野生株の廃棄と移動およびそれらの確認作業に関する具体案の策定を目的とする。また、野生株根絶後に問題となるワクチン株流行に関するリスクアセスメントについて、ポリオウイルスの封じ込め対策の一環としての研究を行う。

本研究の主要な目的は、自然界で伝播している野生株ポリオウイルスが世界レベルで根絶された後、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ことが無いように、様々なレベルでポリオウイルスの封じ込めおよび廃棄を徹底することにある。野生株ポリオ根絶後に、特に問題となる経口生ワクチン(OPV)由来ウイルスによるポリオ流行の可能性については、疫学およびウイルス学的解析により、その可能性およびメカニズムについての解析を行い、OPV由来株によるポリオ流行を検出し、制御する方法を確立する。また、野生株ポリオ根絶後に、ポリオウイルス再流行の原因となりうるポリオウイルス保管に関する調査を徹底するための効率的な調査方法の導入および実際の封じ込めを徹底していくための現実的なプロトコルの策定を行う。当該申請計画が達成されれば、我が国におけるポリオウイルスの封じ込めが完成している。そして、最終的にはポリオという宿痾の疾患の根絶が

達成され、ワクチンを停止することができる(最終目標)。

B. 研究方法

I. 日本における野生株ポリオウイルス保管施設リストの完成

既に約 7,000 の生物学、医学研究室への調査票を配付し、約 3,000 からの回収を終了している。その中でポリオウイルス野生株を保有している施設の登録を終えた。ポリオウイルスを含む可能性のある糞便検体についてはウイルス分離を行い、分離ウイルスの解析を行う。更に、調査票未回収の施設への調査を確認、完結させる。

II. 野生株ポリオウイルス保管施設におけるウイルスの封じ込め、廃棄、移動に関する具体的方法の検討

現在WHOで準備中のGlobal Action Plan IIにのっとり、封じ込めを完成させる。

III. ワクチン由来ポリオウイルスの保管施設の確認とワクチン株の今後の取扱いについての検討

WHOの現在の勧告では、ワクチン由来株は該当しないが、病原性復帰株についても封じ込めを完成させる。

IV. OPV由来株によるポリオ流行発生の可能性とメカニズムについての研究

① OPV由来ポリオ株の遺伝子解析を行い、高頻度におこっている遺伝子組み換えのターゲットを決定すると共に、組み換えウイルスの病原性および伝播能についての解析を行う。

② ポリオウイルスレセプター発現トランス

ジェニック (tg) マウスを I 型 IFN レセプターノックアウトマウスと交配して得た IFN 応答がない tg マウスをポリオウイルス経口感染系として用いる。この新規 tg マウスを用いることにより、ワクチンウイルスの増殖部位を明らかにすることにより、変異組換えウイルスの経口感染による感染伝播経路、神経毒性発現機構を解析する。

③ ヒト集団内におけるポリオウイルスの silent circulation の有無について、検出感度がよいとされている環境サーベイランスを通じ追跡する。下水など生活排水が集積するポイントを設定し、ウイルスの分離を行い性状を解析する。同時にフィールドで対応可能な簡便な検出方法について検討を行う。

(倫理面への配慮)

本研究にあつては、糞便以外の人体由来材料、試料は扱わない。動物実験に関しては「動物の保護及び管理に関する法律」(昭和 48 年法律第 105 号) 及び「実験動物の飼育及び保管に関する基準」(昭和 55 年総理府公示第 6 号) の法律及び基準の他、「大学等における実験動物について」(文部省国際学術局長通知、文学情大 141 号) の通知を踏まえつつ、動物実験が有効かつ適切に行われるよう配慮する。また感染研における動物実験指針に基づき、用いる動物の数は最小限とし、採血時には麻酔を施し動物愛護の精神のもとに実験を行う。

C. 研究結果

(1) 日本における野生株ポリオウイルス

及び野生株ポリオウイルスを含む可能性のある臨床検体保管施設リストを調査した。

(i) WHO で勧めている Global Action Plan I (GAP-I) に基づき、2001~2004 年までに調査した結果をまとめた。31 施設に野生株ウイルスが、現在のところ保管されている。

(ii) WHO が勧めている GAP-II に基づき、調査対象とするウイルス株を定義し、わが国で調査対象とする施設を設定し、調査方法、評価方法を定めて体制を整えた。

(iii) 厚生労働省からの生物テロに使用される恐れのある病原性微生物の保有状況及び管理状況の調査により、現在わが国でポリオウイルスを保有している施設 25 を確認した。

(2) ワクチン由来ポリオウイルス株 (VDPV) について遺伝子解析を行った。AFP 例から分離されたフィリピンにおける 1 型 cVDPV、中国貴州省における 1 型 cVDPV、ラオスにおける 2 型 VDPV について変異及び組み換えの解析を行った。更に 2004 年、わが国富山県の健康児から分離されたワクチン由来株の遺伝子解析も行った。

(3) IFN α/β レセプターをノックアウトした PVR-Tg マウスではウイルス感受性が増大し組織特異性に変化が認められた。分離したポリオウイルスの性状、病原性を調べる系が確立した。

(4) ヒト集団内におけるポリオウイルスの silent circulation の有無について検出感度が良いとされている環境サーベイランスを通じて追求した。多くのエンテロウイルスの分離された中に、ワクチン由来の 2

型ポリオウイルスも検出された。

D. 考察

(1) GAP-I によって得られた野生株保管施設には、その責任者を明らかにし、株についての情報を得る。将来、必ずしも必要でない野生株ウイルスについては廃棄を勧める。

(2) GAP-II に基づいての保管状況については調査を開始する。雑誌「ウイルス」など、学会誌や感染症学会などでの学会発表で、GAP-II の趣旨、調査目的の徹底をはかる。医療機関、試験研究機関、公的研究機関だけでなく、大学、病院、検査機関を対象を拡大する。更に、1990～2005 にかけてわが国でポリオウイルスに関する研究発表を行った研究者にも、直接アンケート方式により調査の徹底をはかる。

(3) cVDPV は国全体のワクチン接種率が極端に低くなくとも、発生・伝播のリスクが存在することが明らかとなった。世界中のワクチン関連症例の監視を続け、解析を進める。又 PVR-tg/IFN α / β KO マウスを用いて、変異ウイルスや組み換えウイルスの増殖能や伝播能を、更には神経毒性発現機構について調べることが可能となった。

(4) 環境中から分離されたポリオウイルス株は、型内鑑別法でワクチン株と考えられ、塩基配列解析の結果もワクチン株との違いは 1%以下であった。一方、富山で健康児から分離されたワクチン株は 1.2%の配列の違いを有していたが、周辺に silent に circulate しているという証拠は得られな

かった。孤発例と考えられる。ポリオの発生を抑えているのはワクチン、しかしそこから変異株が発生する。しかし、このウイルスの伝播拡大を防ぐのもワクチンというバランスの上にポリオコントロールは成り立っている。又、富山県での定点観測は第 1 回の 1979 年から今回で 4 回目になるが、開始時より分離率が大きく減少している。下水道普及率の向上が寄与していると考えられる。

E. 結論

世界ポリオ根絶計画達成の為の必須条件である野生株ポリオウイルス封じ込めについて、WHO が推奨する世界行動計画 I (GAP-I) に基づいた調査を終了した。更に、GAP-II に基づいた病原性を有し得るポリオウイルス株すべてについての封じ込めを完遂する為の態勢を整えた。一方、根絶の計画の最終段階で問題となるワクチン由来株によるポリオ流行例の遺伝子解析を行った。更に、環境中からの効率の良いポリオウイルスの検出法や、得られたポリオウイルスの病原性の評価法を研究し、野生株ポリオウイルスが地球上から一掃された後の廃止に到るまでのワクチン戦略について、これからウイルス学的な提言を行っていく。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Arita M, Shimizu H, Nagata N, Ami Y, Suzuki 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.
- 2) Huang QS, Greening G, Baker M, Grimwood K, Hewitt J, Hulston D, Webber L, Fitzsimons A, Garrett N, Graham D, Lennon D, Shimizu H, Miyamura T, Pallansch M. No longterm oral polio vaccine virus persistence after its removal from the immunisation schedule in New Zealand. *Lancet* (in press).
- 3) Kuramitsu M, Kuroiwa C, Yoshida H, Miyoshi M, Okurmura 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* (in press).
- 4) Shimizu H, Thorley B, Paladin FJ, 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.
- 5) 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.
- 6) Nagata N, Iwasaki T, Ami Y, Tano Y, Harashima A, Suzuki Y, Sato Y, Hasegawa H, Sata T, Miyamura T, 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.
- 7) Kew OM, Wright PF, Agol V, Delpeyroux IF, Shimizu H, Nathanson N, Pallansch MA. Circulating vaccine-derived polioviruses: current state of knowledge. *Bull World Health Organ* 82:16-23, 2004.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.

- 11) Kuramitsu M, Kuroiwa C, Yoshida H, Miyoshi M, Okurmura 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.* 143 (in press)
- 12) Hansman GS, Kuramitsu M, Yoshida H, Katayama K, Takeda N, Ushijima H, Surenkhand G, Gantulga D, Kuroiwa C. Viral gastroenteritis in Mongolian infants. *Emerging Infect. Dis.* 11: 181-182, 2005.
- 13) 高尾信一, 下菌広行, 柏 弘, 松原啓太, 坂野 堯, 池田政憲, 岡本尚子, 吉田 弘, 島津幸枝, 福田伸治. 本邦において初めて流行が確認された小児の human metapneumovirus 感染症の臨床的, 疫学的解析. *感染症学雑誌*, 78: 129-137, 2004.
- 14) 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.
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) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 有田峰太郎, 清水博之, 永田典代, 網康, 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.
- 7) Hiroyuki Shimizu, Nguyen Thi Thanh Thao, Phan Van Tu, Nguyen Thanh Binh, Nguyen Thi Hien Thanh, Circulation of Enterovirus 71 in the Western Pacific Region JSPS Workshop on Infectious

- Diseases in Vietnam, 2004年11月, 長崎.
- 8) 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.
 - 9) 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.
 - 10) 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.
 - 11) 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.
 - 12) 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. 5th Japan-China International Congress of Virology. Osaka, Japan, June 2004.
 - 13) 吉田 弘, 椛 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.
 - 14) 小池 智, 細沼美樹, 岩崎琢也, 吉河智城, 永田典代, 佐藤由子, 佐多徹太郎, 多屋長治, 米川博通. インターフェロン応答によるポリオウイルスの感染特異性決定機構. 第52回日本ウイルス学会学術集会ワークショップ, 東京, 2004.
 - 15) 大岡静衣, 坂井麻依, 藤巻智一, 五十嵐博子, 小池 智, 遠山稿二郎, 野本明男. ポリオウイルス体内伝播経路及び伝播機構の解析. 第52回日本ウイルス学会学術集会ワークショップ, 東京, 2004.
3. 総説
- 1) 小池 智. ピコルナウイルスベクター. *Mebio* 21: 42-49, 2004.
 - 2) 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.
- H. 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

組換えポリオウイルス出現・伝播のメカニズムとその制御に関する研究

分担研究者 清水博之 国立感染症研究所ウイルス第二部

研究要旨 ポリオ根絶最終段階における重要な課題のひとつであるワクチン由来ポリオウイルス (VDPV) によるポリオ流行の実態および今後のリスクを調査するため、西太平洋地域で分離同定された VDPV の性状の解析を行った。フィリピン、中国貴州省、ラオス、富山県において、異なる疫学的背景に由来する検体から分離された 1 型および 2 型 VDPV の遺伝子解析を行った。フィリピンで分離された 1 型 VDPV のみが比較的長期間伝播した cVDPV であり、伝播過程における非ポリオエンテロウイルスとのゲノム遺伝子組換えが示された。他の VDPV においては、1 年程度の伝播あるいは持続感染が示唆されたが、ワクチン接種率が低い地域では VDPV 長期伝播のリスクが存在するものと考えられた。

A. 研究目的

ヒスパニオラ、エジプト、フィリピン、マダガスカルにおけるワクチン由来ポリオウイルス (VDPV) によるポリオ流行は、VDPV がその地域で一定期間伝播していたことを明らかにすることにより、ワクチン接種率が低い地域では、病原性が復帰した VDPV (circulating VDPV: cVDPV) により麻痺患者を伴うポリオ流行が発生する可能性があることを実証した。WHO は現在、VP1 領域の塩基配列が、親株である Sabin 株と比較して 1 - 15 % の変異を有するポリオ分離株を VDPV と分類し、AFP 患者から VDPV が分離された場合、より詳細なサーベイランスにより、cVDPV あるいは iVDPV (immunodeficient VDPV) の可能性について調査を行うことと

している。cVDPV、iVDPV および由来不明の孤発例 VDPV は、ウイルス学的に明瞭な差異は認められないが、これまで報告された cVDPV によるポリオ流行は、4 事例とも組換えポリオウイルスによることが報告されている。いずれの cVDPV も非構造蛋白質領域のほとんどが、未同定の C 群エンテロウイルス (Human enterovirus species C ; HEV-C) に由来する組換えウイルスであり、非ポリオウイルスとの組換えは cVDPV のウイルス学的特徴のひとつ考えられている。しかし、cVDPV と組換えを起こした HEV-C は特定されておらず、VDPV 伝播過程における、ゲノム遺伝子組換え、VDPV 出現のメカニズム、組換え頻度および組換えウイルスの病原性・ウイルス伝播能等、ゲノム遺伝

子組換えの生物学的意義については、ほとんど明らかにされていない。

近年、WHO ポリオ実験室ネットワークにより VDPV 検出感度の向上が図られていることに対応して、西太平洋地域においても、いくつかの地域において様々な疫学的背景を有する VDPV の分離が報告されている。本研究では、近年、西太平洋地域で分離同定された VDPV 事例についての疫学的背景およびウイルス学的解析結果についてまとめる。これら疫学的背景およびウイルス学的性状の異なる VDPV 分離株を比較解析することにより、組換え VDPV 出現・伝播のメカニズムを解析するための基盤的情報の集積を図る。

B. 研究方法

AFP 患者、健常人等に由来する糞便検体からのウイルス分離は、RD, HEp-2 および L20B 細胞を用い常法にしたがって行った。ポリオウイルスは、RIVM ポリオ抗血清を用いた中和法により同定し、WHO の指定する型内鑑別法によりワクチン株か否かの判別を行った。非 Sabin 株の可能性のあるポリオウイルス分離株については、VP1 全領域の遺伝子解析により VDPV の判別を行った。さらに、組換えの有無を確認するため、3D 部分領域の遺伝子解析を行なった。一部の組換え cVDPV については、より広い領域のゲノム遺伝子解析を行い、組換え部位および組換え対象のエンテロウイルスゲノムの解析を試みた。

(倫理面への配慮)

ウイルス分離に使用する糞便検体は、WHO による世界ポリオ根絶計画に基づく、各国のポリオサーベイランス過程で集められた検体で倫理上の問題はない。糞便以外の人体由来材料、試料は扱わない。動物実験に関しては、感染研における動物実験指針に基づき、用いる動物の数は最小限とし、動物愛護の精神のもとに実験を行う。

C. 研究結果

a) フィリピンにおける 1 型 cVDPV

2001 年、フィリピンで、3 例の AFP 症例および接触者 1 例から分離された 1 型ポリオウイルス計 4 株は、VP1 領域の塩基配列が Sabin 1 株と比較して 3%以上変異した VDPV であることが示され、4 株の VDPV 同士が高い相同性を有していたことから、1 型 cVDPV の長期伝播によるポリオ流行であることが確認された。いずれの cVDPV も 2B 領域に単一の組換え部位を有する組換えウイルスであり、非構造蛋白質領域に HEV-C に属する未同定のエンテロウイルスに由来するゲノム遺伝子を有することが示された。フィリピンの 1 型 cVDPV は、病原性、抗原性、温度感受性等に関して野生株ポリオウイルスウイルスと同等のウイルス学的性状を有していた。フィリピンの 1 型 cVDPV によるポリオ流行事例は、国全体のワクチン接種率が極端に低くなくとも、cVDPV の発生・伝播のリスクが存在することを明らかにした。

b) 中国貴州省における 1 型 cVDPV

2004 年に貴州省で、2 例の AFP 患者およ

び 3 例の接触者から分離された 8 株のポリオウイルスは、ELISA 試験により非 Sabin 型と判定され、1 型 VDPV であることが VP1 領域の塩基配列解析により明らかとなった。いずれの VDPV も親株と比較して、1.0-1.2% の変異を有しており、分離株同士が共通部位の遺伝子変異を有していることから、VDPV が同地域で 1 年程度伝播していたことが示唆された。貴州省の 1 型 cVDPV は非組換えウイルスであり、ゲノム全領域において Sabin 1 株から 1%程度の変異を有していた。VDPV が検出された地域は、OPV 接種率が低いことが報告されており、長期伝播の初期段階で検出された VDPV であると考えられた。

c) ラオスにおける 2 型 VDPV

2004 年にラオスで、1 例の AFP 患者および 2 例の接触者から分離された 2 型ポリオウイルスは、VP1 領域の塩基配列解析の結果、2 型 VDPV であると同定された。ラオスの 2 型 VDPV は Sabin 2 株と比較して 1.1-1.3% の変異を有しており、分離株同士が共通部位の遺伝子変異を有していることから、VDPV が 1 年程度伝播したか、iVDPV 長期排泄者が同地域に存在する可能性が示唆された。3D 部分領域の解析により、2 型 VDPV は Sabin 2 - Sabin 1 組換えウイルスであることが示唆された。VDPV が検出された地域は、OPV 接種率が低い可能性が指摘されており、現在、同地域および周辺地域において、潜在的 VDPV 伝播を遮断するためのワクチン接種キャンペーンを行っている。同時に、接触者あるいは健常児由来の糞便検体からのポリオウイルス分離株の解析による

VDPV 持続的伝播の有無の確認を行っている。

d) 富山県で検出された 2 型 VDPV

2004 年、富山県において感染症流行予測調査事業における感染源調査により健常児由来糞便検体から分離された 2 型ポリオウイルス 1 株は、Sabin 2 株と比較して 1.2% の変異を有しており、2 型 VDPV であると同定された。本分離株は、3D 部分領域の解析により Sabin 2 由来非組換え VDPV であることが明らかとなった。その後の調査で、同地域および周辺地域は高い OPV 接種率を維持しており、VDPV 伝播および iVDPV 排出者は検出されていないことから、非 AFP 高感度サーベイランスにより検出された由来不明の孤発例 VDPV であると考えられた。

D. 考察

近年、西太平洋地域で報告された 4 例の VDPV 事例について要約した。このうち、フィリピンの 1 型 cVDPV は、比較的長期間(2 年以上)伝播後、複数の AFP 症例から分離されており、ウイルス学的には、HEV-C との組換え cVDPV であった。中国貴州省およびラオスの VDPV は、変異率から推定して 1 年程度伝播あるいは持続感染した後検出された VDPV と考えられ、HEV-C との組換えウイルスではなかった。両地域における低い OPV 接種率が VDPV 初期伝播過程に寄与していた可能性が高い。富山県で検出された VDPV は、AFP サーベイランス以外の高感度サーベイランスシステムを有する地域でしばしば分離される孤発例 VDPV の範疇に属すると考えられ、OPV を使用している地域は、VDPV 伝

播の潜在的リスクを有することが確認された。

以上、貴州省、ラオス、富山県において、異なる疫学的背景に由来する検体から最近分離された 1 型および 2 型 VDPV は、VDPV 長期伝播の初期段階で検出された VDPV として、これまで報告された cVDPV とウイルス学的に異なる性状を有することが示唆されたため、現在比較解析を進めている。また、上記 3 事例に由来する VDPV は、HEV-C との組換えが認められて居らず、ゲノム遺伝子組換えの観点からも、さらなる比較解析が必要とされる。

E. 結論

ポリオ根絶最終段階における重要な課題のひとつである VDPV によるポリオ流行の実態および今後のリスクを調査するため、西太平洋地域で分離同定された VDPV の性状の解析を行った。フィリピン、貴州省、ラオス、富山県において、異なる疫学的背景に由来する検体から最近分離された 1 型および 2 型 VDPV の解析を行い、フィリピンで分離された 1 型 cVDPV のみが非ポリオエンテロウイルスとの組換えウイルスであることが明らかとなった。ゲノム遺伝子組換えと cVDPV 長期伝播のメカニズムおよびリスクについて、今後さらに検討が必要とされる。

F. 健康危険情報

なし

G. 発表論文

1. 論文発表

1. Arita, M., H. Shimizu, N. Nagata, Y. Ami, Y. Suzaki, T. Sata, T. Iwasaki, and T. Miyamura. Temperature-sensitive mutants of enterovirus 71 show attenuation in cynomolgus monkeys. *J Gen Virol* 86: 1391-1401, 2005.
2. Huang, Q. S., G. Greening, M. Baker, K. Grimwood, J. Hewitt, D. Hulston, L. Webber, A. Fitzsimons, N. Garrett, D. Graham, D. Lennon, H. Shimizu, T. Miyamura, and M. Pallansch. 2005. No longterm oral polio vaccine virus persistence after its removal from the immunisation schedule in New Zealand. *Lancet* (in press)
3. Kuramitsu, M., C. Kuroiwa, H. Yoshida, M. Miyoshi, J. Okurmura, H. Shimizu, L. Narantuya, and D. Bat-Ochir. 2005. Non-polio enterovirus isolation among families in Ulaanbaatar and Tov province, Mongolia: prevalence, intrafamilial spread, and risk factors for infection. *Epidemiology and Infect* (in press)
4. 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. Circulation of type 1

- vaccine-derived poliovirus in the Philippines in 2001. *J Virol* 78: 13512-13521, 2004.
5. Arita, M., H. Shimizu, and T. Miyamura. 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.
 6. Nagata, N., T. Iwasaki, Y. Ami, Y. Tano, A. Harashima, Y. Suzaki, Y. Sato, H. Hasegawa, T. Sata, T. Miyamura, and H. Shimizu. 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.
 7. Kew, O. M., P. F. Wright, V. I. Agol, F. Delpeyroux, H. Shimizu, N. Nathanson, and M. A. Pallansch. Circulating vaccine-derived polioviruses: current state of knowledge. *Bull World Health Organ* 82:16-23, 2004.
 8. Shimizu, H., A. Utama, N. Onnimala, C. Li, Z. Li-Bi, M. Yu-Jie, Y. Pongsuwanna, and T. Miyamura. Molecular epidemiology of enterovirus 71 infection in the Western Pacific Region. *Pediatr Int* 46: 231-235, 2004.
 9. 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.
 10. 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.
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. 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.
 3. 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.
 4. 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.
 5. 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

- | | |
|---|-------------------------|
| <p>の遺伝子解析. 第 52 回日本ウイルス学会, 2004 年 11 月, 横浜.</p> | <p>2. 実用新案登録
なし</p> |
| <p>6. 有田峰太郎, 清水博之, 永田典代, 網康, 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.</p> | <p>3. その他
なし</p> |
| <p>7. Hiroyuki Shimizu, Nguyen Thi Thanh Thao, Phan Van Tu, Nguyen Thanh Binh, Nguyen Thi Hien Thanh, Circulation of Enterovirus 71 in the Western Pacific Region JSPS Workshop on Infectious Diseases in Vietnam, 2004 年 11 月, 長崎.</p> | |
| <p>8. 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.</p> | |
| <p>9. 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.</p> | |
| <p>10. 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.</p> | |
| <p>11. 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.</p> | |

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

研究報告書

コミュニティに Silent circulation するポリオウイルスに関する研究

分担研究者 吉田 弘 国立感染症研究所ウイルス第二部

共同研究者 岩井雅恵、松浦久美子 富山県衛生研究所

研究要旨

エコー13型をモデルとしてコミュニティに silent circulation するポリオウイルス検出法を検討した。無菌性髄膜炎患者分離株と環境分離株のゲノムは極めてよく相関していた。環境サーベイランスはコミュニティで流行するポリオウイルスを高感度に検出する方法として有効であると考えられる。

A. 研究目的

ポリオ根絶計画の最終段階において環境サーベイランス手法はコミュニティに循環するウイルスを高感度に検出する方法として注目されている。更にヒト集団に存在するエンテロウイルスの性状は環境ウイルスサーベイランスで分離されたウイルスの性状とよく相関することが想定される。富山県では過去3回河川水のウイルス汚染調査を行ってきており第4回目は02-03年に実施した。02年は全国レベルでエコーウイルス13型(E13)による無菌性髄膜炎が流行した年である。本研究では河川水から分離されたE13と検査定点から分離された株のゲノムの相関を検討した。これらの知見はコミュニティに循環するポリオウイルスを検出する場合のモデルとなると考えられ

る。

B. 研究方法

富山県内の3河川（小矢部川、千保川、いたち川）に定点をさだめ、2002年4月から2003年3月まで毎月1~2回河川水800mLを採取した。採取検体は陰電化膜（mixed cellulose ester membrane, Advantec Co. Ltd）を用いて濃縮処理後、Vero、MA104、RD-18S、Hep-2 cellsに接種し、ウイルス分離、同定を行った。ポリオウイルスに関してはPCR-RFLPにより型内鑑別を行った。同定されたウイルスのうちE13型についてOberste等の方法によりVP1部分領域の塩基配列を決定した。また2002年に検査定点において5例の無菌性髄膜炎患者から分離、同定されたE13についても同様に塩基

配列を決定した。更にこれらの配列は Genbank より得られた他の E13 塩基配列と比較を行った。

C. 研究結果

(結果と考察)

調査期間中 E4, 7, 11, 13, CB2, 3, 4 型、ポリオウイルス 2 型が合計 40 株分離された(表 1)。その内 12 株が E13 型であった。これらの株は 2002 年 5 月から 9 月まで、いずれの 3 河川からも分離された。VP1 部分領域における塩基配列比較では標準株と 80-81% 一致した。環境分離株と患者分離株の塩基配列の違いは 1% 以下であり同一のクラスターを形成した。2002 年に国内で分離された他の E13 患者分離株と比較したところ最大 3% 以下の違いに過ぎず同一のゲノタイプであると考えられた(図 1)。ポリオ 2 型は 11 月に採取した河川水から 1 定点で分離され、ITD の結果ワクチン由来のウイルスだった。

E11, 13 型は、全国的に 2002 年夏に無菌性髄膜炎等の患者からよく検出されており、富山県においても河川水調査の結果と相関している。過去の結果と第 4 回目の調査結果を比較すると、検出されるウイルスの種類や頻度は少なくなっている。ポリオウイルスに関しては、第 1-2 回の調査ではポリオ生ワクチン投与時期に必ず分離されていたが、最近の調査では検出数が少なくなっている。これは、第 1 回調査時 1979 年頃の富山県における下水道普及率は約 30% で生活排水のほとんどが河川に流入している状

態であったが、その後下水道普及率が上昇(2002 年 63.1%)したことによると考えられる。

E. 結論

E13 型については同一エリアの無菌性髄膜炎患者由来株と環境分離株の遺伝子解析を行ったところ同一のクラスターを形成していた。ポリオウイルスは検査定点から分離されなかったが、環境水から分離されることからコミュニティに存在するウイルスを高感度に検出する方法として有意義と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kuramitsu M, Kuroiwa C, Yoshida H, Miyoshi M, Okurmura 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.* 143 (in press)
- 2) Hansman GS, Kuramitsu M, Yoshida H, Katayama K, Takeda N, Ushijima H, Surenkhand G, Gantulga D, Kuroiwa C. Viral gastroenteritis in Mongolian infants. *Emerging Infect. Dis.* 11:

181-182, 2005.

- 3) 高尾信一, 下菌広行, 柏 弘, 松原啓太, 坂野 堯, 池田政憲, 岡本尚子, 吉田 弘, 島津幸枝, 福田伸治. 本邦において初めて流行が確認された小児の human metapneumovirus 感染症の臨床的, 疫学的解析. 感染症学雑誌, 78: 129-137, 2004.

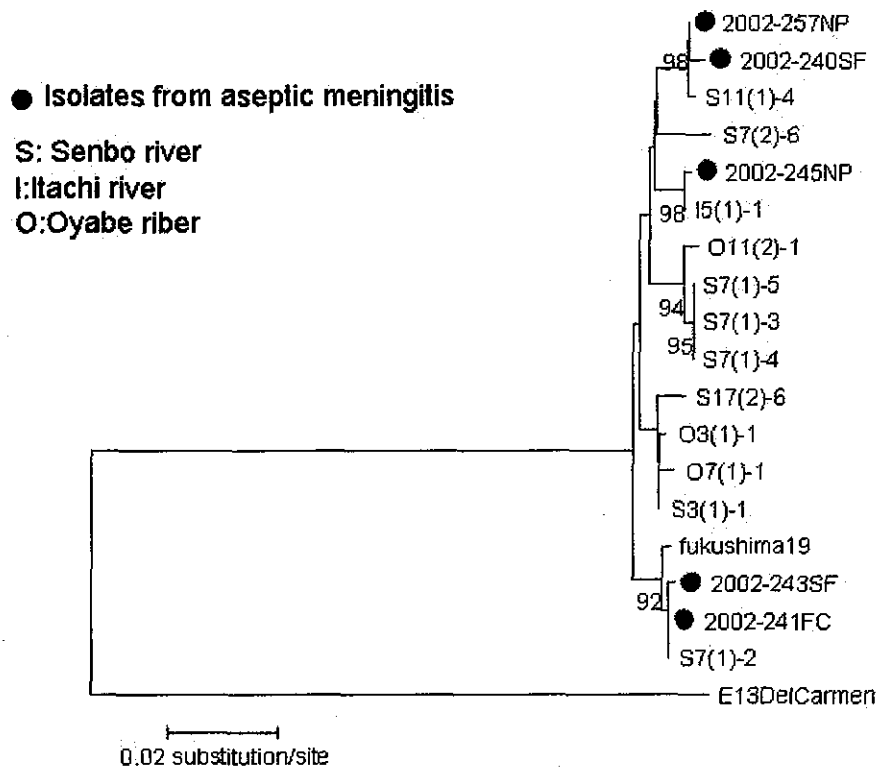
2. 学会発表

- 1) Yokota Y, Yamazaki K, Sakon N, Yoshida T, Ohuchi Y, Hayashi K, Tatsumi H, Yoshida H, and Yamada A. Characterizing echovirus type 4 in an outbreak in Shiga, Japan. 5th Japan-China International Congress of Virology. Osaka, Japan, June 2004.
- 2) 吉田 弘, 椛 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.

H. 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

☒ 1



Phylogenetic analysis on VP1 region (726bp) between environmental and clinical isolates

表 1

4th virus surveillance (Apr 2002~Mar 2003)

	2002						2003					
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
Itachi			E13(1) R1(1)		R2(7)	R2(3)		R2(3)	CB2(1) R2(20) +(1)	E11(3) R1(2) +(1)		
Serbo		E13(1) R2(2) +(1)		E13(5) CB2(1) R2(1) R2(3) +(2)		E11(5) E13(1) CB3(2) R2(7)	E11(5) P2(1)		E11(2) E13(1) CB4(2) R2(15)	E11(1)	E4(1) E7(2) R2(5) R2(15)	+(2)
Oyabe		E13(1) +(1)		E13(1) +(1)		E13(1) R2(4)			CB3(1) R2(10) R1(1) R2(5)	E11(1) R2(7)	R2 (6)	R2 (6)

P, poliovirus; E, echovirus; CB, coxsackievirus type B; Ad, adenovirus; R, reovirus; +, untype (CPE+)