

- Philippines in 2001. *J Virol*. 2004; 78: 13512-21.
- 2) Kew OM, Wright PF, Agol VI, Delpeyroux F, Shimizu H, Nathanson N, Pallansch MA. Circulating vaccine-derived polioviruses: current state of knowledge. *Bull WHO*. 2004; 82: 16-23.
  - 3) 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* 2005;86:1391-1401.
  - 4) 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* 2005;366:394-396.
  - 5) 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* 2005;79:12650-12657.
  - 6) 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* 2005;79:12623-12634.
  - 7) 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* 2005;133:1131-1142.
  - 8) ウイルス第二部第二室、感染症情報センター第三室、ポリオ、平成15年度感染症流行予測調査報告書、8-41, 2004
  - 9) 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
  - 10) 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, 377-381 2005
  - 11) 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
  - 12) 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
  - 13) 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

## 2. 学会発表

- 1) 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 XIIIth Meeting, Lunteren, Netherlands, May 23-29, 2005.
- 2) 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. *ibid.*
- 3) Shimizu H: Surveillance, epidemiology and laboratory diagnosis for enterovirus infections. Emerging and Re-emerging Infectious Disease Symposium, Taipei, June, 2005.
- 4) Shimizu H: Vaccine-derived polioviruses - current understanding and the implication for laboratory diagnosis. Seminar on Eradication of Vaccine Preventable Diseases (II), Kumamoto, July, 2005.
- 5) Shimizu H: Epidemiology and Genetic Analysis of Vaccine-derived Polioviruses, International Symposium on Emerging and Re-emerging Enteric Viral Diseases., Seoul, Dec. 2005

6) 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、日本感染症学会総会、名古屋、2005年4月

7) 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、日本感染症学会総会、名古屋、2005年4月

8) 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10月

## 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

## 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2部)

### A. 研究目的

中国雲南省はラオス、ベトナム、ミャンマーと国境を接し人口 4200 万人を擁する中国南部の省である。ポリオウイルス検出を目的とした AFP (急性弛緩性麻痺) サーベイランスでは、非ポリオエンテロウイルス (NPEV) も分離される。しかしポリオ根絶計画下では NPEV の血清型を決めることは推奨されていないこともあり、AFP サーベイランス下で分離された NPEV の詳細は不明であった。

一方 NPEV は 64 の血清型に分かれており、ポリオ以外に無菌性髄膜炎、ヘルパンギーナ、手足口病など様々な疾患の起因ウイルスが含まれている。1999 年に塩基配列解析により新たな分類法が提唱され、クラスター毎に human enterovirus-A-D (HEV-A-D) グループ及びポリオの 5 グループに分類されることになった。

さて従来は型特異的な抗血清を用いて中和反応による同定が標準法であったが、抗血清では難中和性の変異株が存在することも知られている。米国 CDC のグループがウイルス capsid 蛋白の主な抗原性を決定する VP1 領域を標的としたプライマーセットを報告して以来、新たな血清型が相次いで提唱されている。更に系統解析によれば

HEV-C 群がポリオウイルスと比較的近縁であり、ワクチン株とのリコンビネーションが起こる可能性が示唆されている。

今般中国雲南省で分離された 1997 年から 2004 年までの利用可能な NPEV のうちポリオウイルスと近縁とされる HEV-C 群について分子系統的に解析を行った。

### B. 研究方法

AFP サーベイランスのもと 1997-2000 年及び 2004 年に計 1219 人の AFP 患者より糞便が採取された。糞便材料は常法に従い便乳剤を調製し RD-A、Hep-2、L20B 細胞に接種した。ポリオウイルスとして同定された分離株以外のウイルスについて、Oberste 等の方法により VP1 領域の部分塩基配列を決定した。更にこれらの配列は Genbank より得られた標準株と比較を行った。得られた塩基配列はクラスタリングを行い標準株とアミノ酸配列で 88%以上相同なものを同一血清型とした。同一クラスターを形成する分離株について代表的な株を選び、中和反応により確定した。アデノウイルスは簡易キットを用いて判定した。

### C. 研究結果

1219 患者より 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。また HEV-A、B、C 群には各々 5、34、5 血清型が含まれていた (表 1 a-c)。なお B 群に属する判別不能株は 2 株、C に属する判別不能株は 4 株だった。なお D 群に属するウイルスは分離されなかった。エンテロウイルス以外にアデノウイルス 12 株及び判別不能な 3 株も分離された。

HEV-C に含まれる 32 分離株の内 28 株は CA17,18,20,24, EV96 に分類された。表 2 に各分離株数及び塩基、アミノ酸の違いを示す。解析に用いた塩基配列は VP1 の上流域、配列長 353bp である。分類不能な 4 株については系統解析の結果同一クラスターを形成したが (分離株内の塩基の相違 0.9-7.9%。アミノ酸の相違 2.6%以下)、GenBank 中で利用できる最も近縁な CA18 標準株と塩基で 29.5-30.6%の違い、アミノ酸で 16.2-17.1%の違いであった。

CA20,24, EV96 は複数年にわたり分離され、分離株内で各々 5.7-19.4%、8.3-18.1%、10.7-16.1%の塩基の違いが見られサブゲノミックグループの存在が示唆された。系統解析の結果を図 1 に示す。

またポリオウイルスとの塩基の違いは 32.9-41.3%であり比較的近縁であるといえる。

#### D. 考察

AFP 患者にはポリオ以外にも NPEV 感染による麻痺患者が含まれている可能性があるが、その血清型に関する報告は少ない。今般

1997 年以來 5 年分の NPEV の浸淫状況を解析した。AFP サーベイランス下では B 群の分離が最も多く、しかも 34 血清型以上存在していることが明らかになった。また比較的ポリオウイルスと系統的に近い C 群も多様性に富んで存在していた。更に日本では報告のない血清型 (EV81,83,96 など) も見られる。臨床像の詳細な検討及び検出法の設定など今後の課題である。

#### E. 結論

非ポリオエンテロウイルスについて VP1 領域の遺伝子解析により、従来の中和法に比べ多くの血清型同定可能であった。また雲南省ではポリオウイルスに近いとされる HEV-C に属する分離株も同定され、分離株内の比較より非常に多様性に富んで存在していることが明らかになった。

#### F. 謝辞

本研究は Tian Bin jun (雲南省 CDC) との共同研究である。

表 1 a Serotype composition of common HEV-B isolates, Yunnan Province, 1997-2000 and 2004

Serotype	No. of isolates					Total
	97	98	99	00	04	
E-13	4	1	2	3	3	13
E-14	2	0	3	5	1	11
E-12	0	3	0	5	3	11
CB-3	1	0	3	4	1	9
E-2	2	1	2	3	1	9
E-6	3	4	2	0	0	9
E-1	2	0	4	2	0	8
E-7	1	3	0	3	0	7
E-29	1	0	2	0	4	7
E-11	0	1	1	0	4	6
E-3	2	0	3	0	0	5
E-19	2	3	0	0	0	5
E-20	2	3	0	0	0	5
E-27	0	0	0	5	0	5
CB-5	2	0	0	2	0	4
CA-9	1	1	0	2	0	4
E-21	0	0	4	0	0	4
E-24	3	0	0	1	0	4
E-30	0	0	0	1	2	3

Serotype	No. of isolates						Total
	97	98	99	00	04	04	
CB-1	0	0	2	1	0	3	
E-25	0	1	0	2	0	3	
EV75	0	0	0	3	0	3	
CB-4	0	1	0	1	0	2	
E-9	0	0	0	2	0	2	
E-15	0	0	1	1	0	2	
E-18	0	0	0	2	0	2	
E-33	0	0	0	0	2	2	
EV83	0	0	2	0	0	2	
Not typed	0	0	1	1	0	2	
CB-2	0	0	0	1	0	1	
CB-6	0	0	0	1	0	1	
E-4	0	0	0	1	0	1	
E-26	0	0	0	1	0	1	
E-31	1	0	0	0	0	1	
EV81	0	1	0	0	0	1	
Total	29	23	32	53	21	158	

表1b. HEV-C serotype isolation and their distribution by year, Yunnan Province

Serotype	1997	1998	1999	2000	2004	Total
CA24	1	2	5	3	0	11
EV96	0	1	3	4	1	9
CA20	2	0	0	4	0	6
Not typed	0	3	0	1	0	4
CA18	0	0	1	0	0	1
CA17	0	0	1	0	0	1
Total	4	6	9	12	1	32

表1c HEV-A

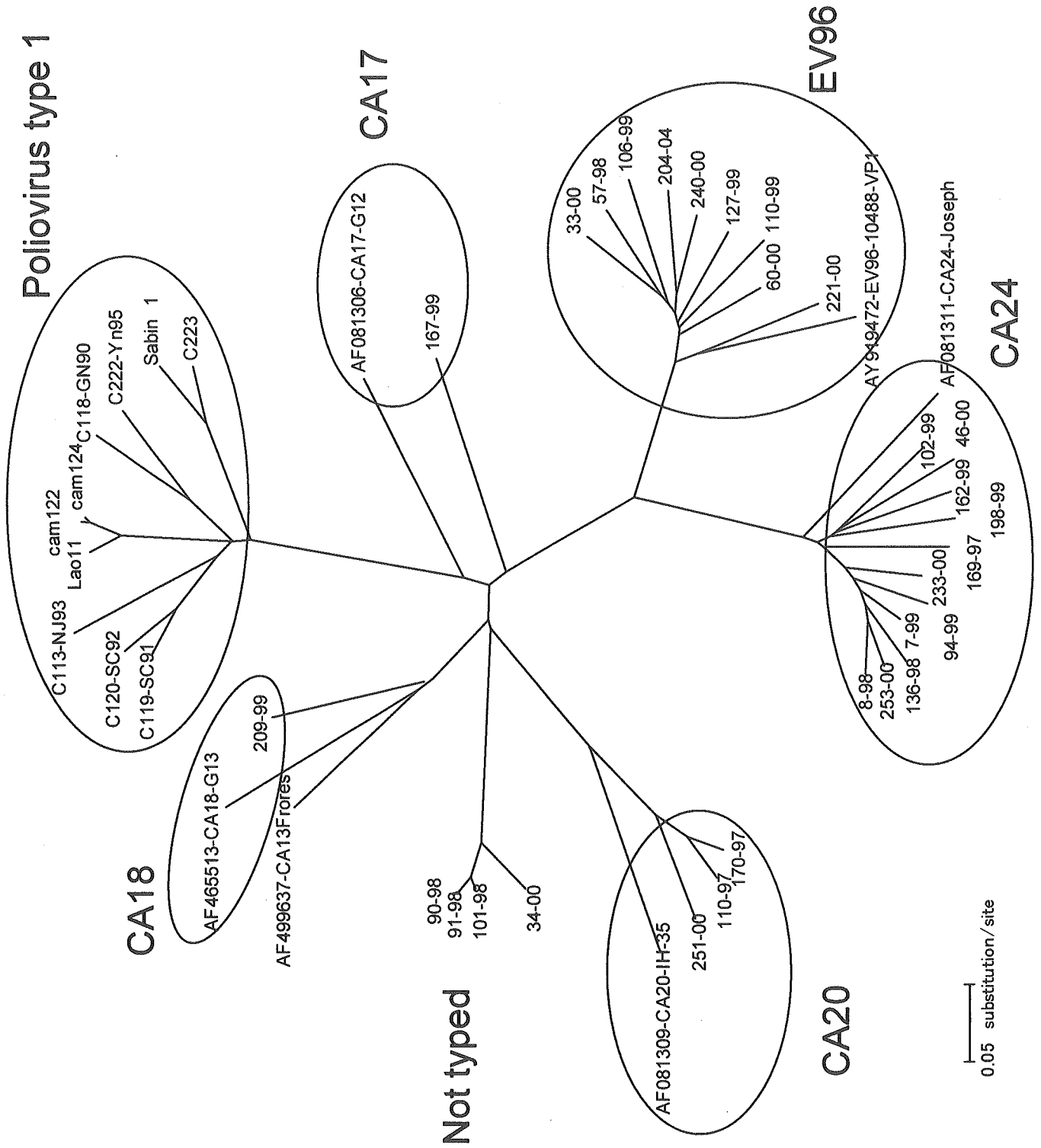
Serotype	1997	1998	1999	2000	2004	Total
CA4	0	0	0	0	1	1
CA6	0	0	0	0	1	1
CA8	0	0	0	1	0	1
EV71	0	0	0	0	1	1
EV76	0	0	1	0	0	1
Total	0	0	1	1	3	5

表2 HEV-C分離株の標準株との違い及び分離株間の違い

serotype	分離株数	標準株との違い		分離株内の違い	
		塩基(%)	アミノ酸(%)	塩基(%)	アミノ酸(%)
CA17	1	24.62	9.17	nc	nc
CA18	1	22.1	7	nc	nc
CA20	6	20.9-22.4	4.6-6.4	5.7-19.4	1.0-3.7
CA24	11	17.1-21.0	1.9-7.7	8.3-18.1	1.0-8.7
EV96	9	18.4-23.5	3.4-6.8	10.7-16.1	1.7-7.7
not typed	4	NA	NA	0.9-7.9	0-2.6



# Poliovirus type 1





## ポリオウイルス感受性動物モデルに関する研究

分担研究者名：小池智（東京都神経科学総合研究所）

**研究要旨** ポリオウイルスの経口感染が可能な実験動物モデルを作成する目的でポリオウイルスレセプターを発現するトランスジェニックマウス(PVR-tg)とI型インターフェロン(IFN)レセプターノックアウトマウス(Ifnar KO)を交配した。このマウスのポリオウイルス感受性は経口以外の経路では大幅に上昇したが、経口感染の効率はヒトと同等までは上昇しなかった。PVR-tgではウイルスの増殖ができない組織は感染以前からIFN-stimulated gene (ISG)の発現レベルが比較的高く、ウイルス感染によってさらに上昇することにより、抗ウイルス状態となっていることが分かっているが、消化管のISGの発現は他の組織と比較してより高く、IFN応答が遮断されているはずのPVR-tg/Ifnar KOマウスにおいてもOASなどの抗ウイルス作用を担う遺伝子の発現レベルが高かった。このような発現制御機構により消化管でのポリオウイルスの増殖は制限されていると考えられた。

### A. 研究目的

急性灰白髄炎の原因ウイルスであるポリオウイルスは神経指向性を持つ。経口感染によりヒトの体内にはいったPVは消化管、リンパ節で増殖し、ウイルス血症となる。神経系に侵入したウイルスは脊髄や脳幹の神経細胞で増殖し、これらを破壊することにより、四肢のマヒなどに至る。しかし非神経組織においてはウイルスが到達しているにもかかわらず顕著な病変を生ずることがない。このような神経系に選択的な病原性はウイルスの吸着、侵入のレベルやウイルス遺伝子の発現（特にInternal ribosome entry site(IRES)からのタンパク合成開始）レベルで制御されていると考えられてきた。ところがポリオウ

イルスレセプター(PVR)やIRES-trans activating factorが同定されてみるとこれらの宿主因子は非標的組織でも広く発現が認められ、「ウイルス複製に必須の宿主因子が揃っている組織が標的になる」というウイルス学上の常識的な考え方では説明できないことが分かってきた。

我々はこれまでヒトPVR遺伝子を発現するトランスジェニック(tg)マウスモデルを開発した。これまでPVR-tgマウスでは経口感染が成立し難かったため、ヒト以外の経口感染動物モデルとはならなかった。ポリオウイルスの封じ込め対策を考える上で経口感染のできる動物モデルを作成し、ワクチンの投与後などのウイルスの排出を調べること

は重要であると考えられる。昨年度までに IFN $\alpha/\beta$  レセプターノックアウトマウス (Ifnar KO) を用いることにより、ウイルス感受性が増大することを示した。PVR-tg/Ifnar KO マウスは経口感染以外の経路では感染効率が大幅に上昇したが、経口感染経路での感受性はヒトと同等までは上昇しなかった。そのため、今年度はその原因を調べた。

## B. 研究方法

・Ifnar 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。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 ならびに PVR-tg/Ifnar KO マウスにおけるウイルス接種前後の組織から RNA を調製し、real time RT-PCR 法によって、IFN-stimulated gene (ISG) の発現レベルの変化を調べた。ISG としては 2', 5'-oligoadenylate synthetase (OAS), PKR, RIG-I, IRF-7 などを調べた。

## C. 研究結果と考察

PVR-tg マウスと PVR-tg/Ifnar KO マウスを比較すると腹腔内接種、静脈内接種においては PVR-tg/Ifnar KO マウスはウイルス感受性が非常に高くなっていた。PVR-tg マウスはこれまで経口感染が殆ど成立しなかったが、 $10^6$  PFU のウイルスで約半数の PVR-tg/Ifnar KO マウスで麻痺発症が見られた。すなわち IFN 応答のできない状況では経口感染の効率が上昇するが、ヒトほど効率は

高くない。

通常の PVR-tg マウスでは肝臓、脾臓、膵臓などの組織はウイルスを感染させても激しい病変を生ずることがない。これは正常な IFN 応答をもつ PVR-tg マウスの非神経組織ではウイルス感染前から OAS, PKR などの抗ウイルス活性をもたらす酵素や RIG-I, MDA5, IRF-7 などの IFN 誘導に関わっている制御因子の発現レベルが高く保たれており、ウイルス感染に際し速やかで強い IFN 応答が可能であるためである。逆に神経組織においてはウイルス感染前からこれらの遺伝子の発現レベルが低く、ウイルス感染直後に速やかで十分な IFN 応答ができずそのために感染が広がってしまうことが判明している。そこで小腸などの消化管において ISG の発現レベルを調べた。すると消化管では他の内臓組織と比較しても特に ISG の発現レベルが高いことが判明した。さらに OAS, RIG-I, MDA5 などの遺伝子は Ifnar KO マウスにおいても、IFN シグナリングが遮断されているにも関わらず、高いレベルの発現が見られた。tg マウスモデルにおいて経口感染効率が低く、さらに Ifnar KO マウスにおいてもまだ感染効率が十分に高くない理由は IFN シグナリングと無関係に発現して抗ウイルス状態に寄与している OAS のような遺伝子によるものであると推測された。しかし、この ISG の発現のみがヒトにおいて経口感染効率が高く、マウスモデルにおいては効率が低い原因であるかどうか結論をつけるためにはさらに詳しい解析を必要とする。

## D. 結論

ポリオウイルスの病原性発現には IFN 応答は非常に重要で、ウイルス感受性の程度を決定している他、ウイルスのトロピズムも決定する因子として機能していることが明らかになった。特に消化管では OAS などの抗ウイルス作用をもつ遺伝子が IFN シグナリングと無関係に高いレベルで発現しており、経口感染の効率を低くしていると考えられた。消化管で抗ウイルス作用をもつ遺伝子の発現が高いことは消化管からのウイルスの侵入を絶えず防御する意味では合理的である。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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) 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. *The Journal of Neuroscience.* 25: 2547-2556 2005
- 3) Yoshika 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.* in press.

##### 2. 学会発表

- 1) 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., XIIIth Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses, Lunteren, Netherlands (2005, 5.23)
- 2) 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、パシフィコ横浜 (2005, 11.22)
- 3) 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、福岡 (2005, 12.9)
- 4) 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 (2005, 7.26)
- 5) 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、浜松 (2005, 6.10)
- 6) 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, パシフィコ  
横浜 (2005, 11.21)

- 7) 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, 7.20)
- 8) 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」,  
東京 (2006, 2.12)
- 9) 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, 福岡 (2005, 12.11)

## 総説

- 1) 小池 智 ポリオウイルスのトロピズ  
ムに関与するインターフェロン応答  
実験医学 23:2602-2608. 2005

## 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

## ラオス 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

西村順裕、有田峰太郎、吉田弘、清水博之、宮村達男

国立感染症研究所ウイルス第二部

### A. 研究目的

WHO によるポリオ根絶計画推進においては経口生ポリオワクチン (OPV) が大きく寄与し続けているが、野生株ポリオ根絶を目前としていくつかの問題点が指摘されている。たとえば、OPV 接種率が低い地域では、OPV が変異を起こし野生株と同様な神経毒性と伝播性を獲得する可能性があるとして WHO ポリオ根絶技術会議(2001 年 3 月)において指摘されている。

WHO は VP1 領域核酸配列において Sabin 株と 1-15% の変異をもつ臨床分離ポリオウイルスをワクチン由来ポリオウイルス (VDPV) と呼ぶこととしている。変異を多くもつということは、VDPV が長くその社会で伝播していた、あるいは長期にわたり個人の体内で複製していたことを示している。実際近年、ヒスパニョーラ、エジプト、フィリピン、そしてマダガスカルで circulating VDPV によるポリオウイルスのアウトブレイクが起こっている。幸いなことに、circulating VDPV が発生した地域では迅速に OPV によるワクチンキャンペーンが展開され、その後の伝播は阻止されている。

2004 年 10 月 24 日、ラオスの OPV 未接種 1 歳男児が急性弛緩性麻痺 (AFP) を呈した

(index case)。さらに、この患者からは 2 型の VDPV が分離された。国立感染症研究所 (NIID) においては、常法に従ったポリオウイルス同定を行うとともに、遺伝子学的解析を行った。

### B. 研究方法

ラオスの AFP 患者便検体からのポリオウイルス分離は、WHO ポリオラボラトリーマニュアルに従って行った。分離されたすべてのポリオウイルスについて、野生株ポリオウイルスかワクチン由来ポリオウイルスかを型内鑑別 (intratypic differentiation) するために、RT-PCR RFLP 法、モノクローナル抗体による中和法、ELISA 法を用いた。VDPV の可能性があるサンプルについては、ウイルスゲノムの VP1 領域全長および 3D 領域の一部を RT-PCR により増幅し、シークエンス解析した。VDPV が分離された場合は、その感染者と密に接触していた健常者から便検体を採取し、ウイルス分離を試みた。

### C. 研究結果および考察

Index case からは、2004 年 11 月 2 日および 3 日に採取された便検体から 2 型ポリオウイルスが分離された。Intratypic

differentiation の結果は、RT-PCR RFLP において Sabin 2-like (drifted; Sabin 2 株と若干異なる RFLP パターン)、モノクローナル抗体による中和において non-Sabin-like であった。ELISA においては non-reactive と判定された。VP1 領域のシーケンス解析では、Sabin 2 株 VP1 領域の 903 塩基と比較して、10-12 塩基の変異を伴っていた。例えば L1225L2 分離株は Sabin 2 に対し、1.11 % (10/903 塩基)の変異をもっていた。3D 領域の部分的シーケンス解析においては、ウイルスゲノム 3'領域が Sabin 1 との組換えを起こしていることが示された(Sabin 1 と比較して、4/385 塩基の変異)。つまり 5'領域は Sabin 2、3'領域は Sabin 1 という組換えを起こしたポリオウイルスと考えられた。この AFP 患者から分離された他の 2 型ポリオウイルス株も同様な 2 型 VDPV と判明した。

その後、2004 年 12 月 10 日前後に採取された index case と 6 人の健康な contact case からの便検体を解析した。その結果、2 型ポリオウイルスが index case および contact case No.6 から分離された。VP1 および 3D 領域の部分的シーケンス解析において、これらのウイルスは当初の index case からの分離株とお互い遺伝学的に近縁であることが示された。健康な人からも VDPV が分離されたことから、VDPV がこの地域に伝播していたことが示された。

2005 年 1 月 27 日から 30 日にかけて、index case、contact case No.6 を含む 19 人の contact case、計 20 人から便検体が採取された。同様にウイルス分離を試みたところ、新

た contact case No.12 から 2 型 VDPV が分離された。この VDPV も index case から分離されていたウイルスと遺伝学的に近縁であることが示された。以上の結果から、少なくとも 2004 年 10 月から 2005 年 1 月にかけて VDPV が伝播していたことが明らかとなった。Index case および contact case No.6 からはポリオウイルスが分離されなかったことから、その後長期間にわたって VDPV が排出される可能性はほとんどないものと考えられた。しかし、ラオスのこの地域に VDPV が潜在していないことを確認するためにも、少なくとも再度、index case および多数の健康な人から便検体を集め、ウイルス分離を試みる必要があった。

2005 年 2 月、index case の居住する村および周辺地域で OPV キャンペーンが展開された。その後採取された大量の便検体 (100 検体) について、ポリオウイルスの分離を試みた。通常、接種後 2 ヶ月程度は OPV が便検体に排出される。今回の検体は OPV 接種後 2 ヶ月を待たずして採取されたため、分離されるポリオウイルスはほとんど Sabin 株由来であろうと推測されていた。実際、分離された 2 型ポリオウイルス 19 株は、VP1 シーケンス解析により、すべて OPV 由来の Sabin 2 であることが確認された。Index case と近縁のポリオウイルスは分離されなかったことから、VDPV の伝播は制圧されたものと推測された。

また、index case および contact case No.6、No.12 より血清を採取し、免疫グロブリン量を測定した。その結果、免疫グロブリン量で

みる限り、免疫異常は認められなかった。現在までのウイルス分離結果を踏まえると、少なくともこの3例のなかにはVDPV持続感染者はいないものと考えられた。

#### D. 結論

Index case と contact case から分離されたVDPV は遺伝学的に近縁であった。また、index case からは1ヶ月以上にもわたってVDPV が排出されていた。さらに健康な人から分離されたことから、この地域にVDPV が流行していたことは間違いないであろう。今回は周辺地域でのOPV キャンペーンが速やかに行われ、VDPV の伝播は一段落したように思われる。しかし、問題は index case, contact case No.6, No.12 の3人ともがOPV 未接種であったことである。このようなOPV 未接種率の高い地域ではVDPV が潜在的に広がって行く危険性が高い。今回の contact case のOPV 接種率からも、ラオスに接種率の低い地域が存在することが強く示唆される。今後、ラオスにおいてOPV 接種率を高く維持し、またサーベイランスを適切に行うことが重要である。この点についてEPI の専門家あるいはスタッフに理解を得るためには、VDPV 出現の重要性・危険性についての適切かつ最新の情報を提供することが必要であろう。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Yang, C., Chen, H., Jorba, J., Sun, H., Yang, S., Lee, H., Huang, Y., Lin, T., Chen, P.,

Shimizu, H., Nishimura, Y., Utama, A., Pallansch, M., Miyamura, T., Kew, O., and Yang, J., Intratypic Recombination among Lineages of Type 1 Vaccine-Derived Poliovirus Emerging during Chronic Infection of an Immunodeficient Patient. *J Virol*, 2005. 79(20): 12623-12634.

##### 2. 学会発表

1) 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、第53回日本ウイルス学会総会、横浜、2005年11月

# ポリオウイルス擬似粒子を用いたポリオ様麻痺発症マウスモデルの開発

有田峰太郎、清水博之、宮村達男

(国立感染症研究所ウイルス二部)

## A. 研究目的

ポリオウイルス (PV) は、感染者の 0.1-2% にポリオ麻痺を発症させ、ポリオ麻痺を発症した患者のほぼ 80% に重篤な麻痺を残す (3)。現在、サルおよびトランスジェニックマウスを用いた PV 感染モデルが確立され、PV の神経毒力の測定に有用なモデルとして用いられている (1, 2, 4)。しかし、これらの感染モデルでは、一般に PV を接種した動物に致死的な感染をもたらすために、持続的なポリオ麻痺の解析を行うことができない。本研究では、PV 擬似粒子を用いて脊髄内の運動神経を定量的に破壊することで、持続的なポリオ様麻痺を呈する感染モデルの開発を試みた。

## B. 研究方法

293T 細胞に PV capsid を大量に発現させ、その細胞内にルシフェラーゼ発現 PV replicon の RNA を導入し、擬似粒子を産生させた。回収した擬似粒子を、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。脊髄内接種は、当研究所感染病理部の永田典代先生にお願いした。

## C. 研究結果

**擬似粒子の産生** : 293T 細胞を用いた擬似粒子の新しい産生方法を開発することにより、非常に高い力価の擬似粒子を産生することに成功した。得られた擬似粒子は、PV 弱毒 Sabin 1 株と同程度の力価を示した。擬似粒子サンプル中のウイルスの有無を確認したところ、少なくとも擬似粒子  $10^7$  CCID<sub>50</sub> 中には感染性ウイルスが含まれていないことが確認された。

**TgPVR21 マウス脊髄内における PV replicon の複製** : 得られた擬似粒子を、HEp-2c 培養細胞および TgPVR21 マウス脊髄内に接種し、その複製を観察した。脊髄内における PV replicon の複製は、HEp-2c 細胞における複製とほぼ同じ挙動を示したが、若干、複製の立ち上がりおよび plateau に達する時間が遅かった (HEp-2c 細胞では感染後 6-8 時間、マウス脊髄内では感染後 10 時間)。接種した PV replicon の量とルシフェラーゼ活性はほぼ比例していた。これらの結果から、マウス脊髄内の運動神経は、PV replicon の複製に関して、HEp-2c 培養細胞と似た性質を有することが示唆された。



**TgPVR21 マウスにおけるポリオ様麻痺の誘導**： 擬似粒子を TgPVR21 マウスに脊髄内接種することにより、脊髄内の運動神経を破壊し、ポリオ様麻痺を誘導することを試みた。結果、擬似粒子  $1.5 \times 10^6$  CCID<sub>50</sub> を接種した場合に、接種したマウスの後肢に弛緩性麻痺が観察された。擬似粒子接種後 10-24 時間に麻痺が観察され始め、麻痺は 1 ヶ月以上持続的であったが致死的是ではなかった。一方、Sabin 1 株  $1.5 \times 10^2$ - $1.5 \times 10^6$  CCID<sub>50</sub> を脊髄内接種した場合には、いずれも致死的な麻痺を生じた。よって、擬似粒子を脊髄内接種することにより、持続的かつ非致死的な弛緩性麻痺を TgPVR21 マウスに誘導できることが示された。

**TgPVR21 マウスにおけるポリオ様麻痺誘導に必要とされる粒子数の決定**： TgPVR21 マウスに弛緩性麻痺を誘導するために必要とされる擬似粒子量の決定を試みた。結果、擬似粒子を  $2.0 \times 10^7$  CCID<sub>50</sub> 以上脊髄内接種した場合に、接種したほぼ全てのマウスで完全な弛緩性麻痺が観察された。擬似粒子  $1.5 \times 10^6$  CCID<sub>50</sub> を脊髄内接種した場合には、ほぼ半分のマウスに完全な弛緩性麻痺を誘導し、残りのマウスでは何らかの麻痺症状（握力の低下もしくは後肢筋力の低下）が観察された。HEp-2c 細胞における PV replicon の複製から、マウス脊髄内の感染細胞数の見積もりを行ったところ、最大およそ  $10^4$  個の細胞が脊髄内で感染しうることが示唆された。この見積もりから、lumber cord 内接種部位近傍の  $10^2$  個の運動神経細胞（全体の 1.4% 以下の運動神経細胞）が感染することで、重篤な麻痺

症状が顕れることが示唆された。

#### D. 考察

擬似粒子を TgPVR21 マウスに脊髄内接種することにより、持続的かつ非致死的な弛緩性麻痺を誘導する系を確立した。本研究で開発した感染モデルは、残存性ポリオ麻痺およびポリオ後症候群の病態および治療法の開発に有用であると考えられる。

#### E. 参考文献

- 1) Abe, S., Y. Ota, S. Koike, T. Kurata, H. Horie, T. Nomura, S. Hashizume, and A. Nomoto. 1995. Neurovirulence test for oral live poliovaccines using poliovirus-sensitive transgenic mice. *Virology* 206:1075-1083.
- 2) Horie, H., S. Koike, T. Kurata, Y. Sato-Yoshida, I. Ise, Y. Ota, S. Abe, K. Hioki, H. Kato, C. Taya, T. Nomura, S. Hashizume, H. Yonekawa, and A. Nomoto. 1994. Transgenic mice carrying the human poliovirus receptor: new animal models for study of poliovirus neurovirulence. *J. Virol.* 68:681-688.
- 3) Minor, P. 1998. Picornaviruses. *Microbiology and Microbial Infections*, 9th edn, eds Collier L, Balows A, Sussman M, Arnold, London 1:485-509.
- 4) Omata, T., M. Kohara, S. Kuge, T. Komatsu, S. Abe, B. L. Semler, A. Kameda, H. Itoh, M. Arita, E. Wimmer, and A. Nomoto. 1986. Genetic analysis of the attenuation phenotype of poliovirus type 1. *J. Virol.* 58:348-358.

## 研究成果の刊行に関する一覧表

- 1) 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* 2005;79:12650-12657.
- 2) 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* 2005; 79: 12623-12634
- 3) 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* 2005; 366: 394-396.
- 4) 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* 2005; 86: 1391-1401.
- 5) 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.
- 6) 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* 2005; 25: 2547-2556.
- 7) Yoshika 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* (in press)

- 8) 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* 2005; 133: 1131-1142.
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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

## 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>.