

ヒト集団に 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)

研究要旨

ヒト集団に循環するポリオウイルスを高感度に検出手法として環境サーベイランスの研究を行ってきた。しかし従来の環境サーベイランス手法ではウイルス検出に時間を要するため、迅速診断法の開発を試みた。

A.研究目的

環境水に存在するワクチン由来ポリオウイルスは微量であるため最初に陰電荷フィルター膜等の各種方法で濃縮後、細胞培養によるウイルス分離同定あるいは RT-PCR にて検出可能である。しかし細胞培養法ではウイルス分離に通常 2-3 週間が必要であり、最終結果を得るまで煩雑な手技を要する。一方ポリオウイルス特異的プライマーを用いた RT-PCR は迅速ではあるが定性的である。今般環境水に存在するポリオウイルスを定量的に検出するためリアルタイム PCR の適応を検討した。

B.研究方法

1.ウイルス及び cDNA 合成

英国 N I B S C 由来弱毒ポリオウイルス参照株を用いた(logTCID₅₀/50ul=-8.5)。RNA 抽出には Viral RNA kit (QIAGEN)を用いた。cDNA 合成には d(N)₆ プライマーを用いた。得られた cDNA は 10 段階希釈しリアルタイム PCR 法にて定量を行った。

2.リアルタイム PCR 法

VP1 領域(position 3006-3108, 103bp)についてリアルタイム PCR を行った。PCR 反応には TaqMan PCR core Reagent kit (ABI)を用いた。プライマーの配列は sense 側に

CGACGGTTTTTCCAAAGTACCA, antisense 側に TCTAACAGCCAAAATACCGAAGTCA を用い、最終濃度 300nM にて PCR 反応を行った。用いたプローブには probe:FAM-CTCCCTCTATGGTGCAGCATC TCT-TAMRA を用い最終濃度 200 nM とした。プライマー、プローブの設計には Primer Express 1. (ABI)を用いた。ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System を用いて、50℃ 2min,95℃ 10min 反応後、95℃ 15sec,56℃ 1min を 50 サイクル増幅を行った。

またウイルスゲノムコピー数算出には VP1 領域 (2998-3228:131bp) のロングオリゴを合成し検量線作成に用いた。

C. 結果及び考察

1. ウイルス定量のため用いたオリゴは 5 copies/ul まで検出可能であった。測定に要した時間は約 2 時間 20 分である。
2. cDNA の検出結果より換算すると約 0.6TCID₅₀/50ul のウイルスを測定可能であった。
3. これらの結果はリアルタイム PCR 法がほぼウイルス力価測定と同等の感度であることを示している。
4. 従来の力価測定が 1 週間要することを

考えるとわずか 2 時間強で定量可能であることから迅速診断の目的に適していると考えられる。

5. 今回 1 型ポリオウイルスワクチン株の定量系を作成したが、今後 2 型、3 型に関しても同様にアッセイ系を確立し、水環境に存在するワクチン由来株の定量を予定している。

D.研究発表

1.論文発表

1)M. Iwai, T. Nakayama, K. Matsuura, S. Hasegawa, S Ando, M. Obara, Y. Nagai, H. Yoshida, H. Horie. Assessment of efficacy of a live oral poliovirus vaccine for virulent Sabin-like poliovirus 1 strains in Japan. Acta virologica 50:139-143, 2006

2) 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. 2006 Sep;72(9):6381-7.

2.学会発表

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、東京都、2006 年 6 月 3-4 日

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、富山、平成 18 年 10 月 25~27 日

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 19-21 日、名古屋市

E. 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

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

ワクチン由来ポリオウイルスの病原性解析に関する研究

分担研究者 西村 順裕 （国立感染症研究所ウイルス第二部）

研究要旨

経口生ポリオワクチン (OPV) は途上国を中心に使用されているが、接種率が低い地域では、変異を起こした OPV が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。実際、近年ワクチン由来ポリオウイルス (VDPV) のアウトブレイクがいくつか報告されている。2005 年から 2006 年にかけては、カンボジアで 3 型 VDPV が発生したので、遺伝子解析および病原性解析を行った。カンボジア VDPV 株も従来報告された VDPV 株と同様に、ゲノム組換えを起こしたポリオウイルスであった。また、VP1 領域のゲノム変異率からも 1-2 年間にわたり複製していたことが示唆された。さらに野性株ポリオウイルスと同程度以上の神経病原性を獲得していたことも確認した。

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。しかし、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、マダガスカル、ラオス、および中国で 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。

2005 年 11 月 26 日、カンボジアの女児が急性弛緩性麻痺 (AFP) を呈した (index case)。この患者からは 3 型 VDPV が分離された。さらに別の地域に居住す

る男児からも 3 型 VDPV が分離された。これらの VDPV について、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。さらにその病原性を解析した。

B. 研究方法

カンボジアの 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。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。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同定 (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、シーケンス解析した。VDPV と確認したウイルスについては、ゲノム全長の塩基配列を同定、解析した。VDPV の神経病原性については、ポリオウイルスレセプタートランスジェニックマウスでの脳内接種法により検討した。

C. 研究結果および考察

Index case からは、2005 年 12 月に採取された便検体から 3 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 3、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 double-reactive と判定された。VP1 領域のシーケンス解析では、Sabin 3 株 VP1 領域と比較して、1 % 以上の変異を伴っていた。例えば CAM2906 分離株は Sabin 3 に対し、1.89 % 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 human enterovirus species C との組換えを起こしていることが示された。さらにゲノム全長シーケンス解析により、2A から 2B の一部は Sabin 2 由来であることも判明した。つまり 5' - Sabin 3 - Sabin 2 - human enterovirus species C -3' という、二つの組換え部位をもつポリオウイルスと考えられた。

VDPV が分離されたことをうけ、カンボジアでは index case の近隣に麻痺を起こした患者がいるかどうか調査された。その結果、index case の自宅から 10 m ほど離れた家に住んでいた男児が、2005 年 11 月 30 日 (index case の AFP 発症の 4 日後) に AFP を起こしていたことが判明した。このケースについては AFP サーベイランスに報告されていなかった。2006 年 1 月にこの男児から便検体を採取しウイルス分離を試みたが、VDPV は分離できなかった。この原因としては、便検体採取時期が遅すぎたためと考えられる。

2006 年 1 月 15 日には、前述の AFP 患

者とは別の地域に居住する男児が AFP を発症した。この患者の便検体からも 3 型 VDPV が分離された。遺伝子解析の結果、このウイルスと index case からの分離株とはゲノム全長で 98% の identity をもっており、お互い遺伝学的に近縁であることが示された。以上のことから、VDPV がカンボジアに広まっていることが確認された。

AFP 患者二人から分離された VDPV の神経病原性については、ポリオウイルスレセプタートランスジェニックマウスにて評価した。その結果、カンボジア VDPV は二株とも、3 型ポリオウイルス野性株標準株である Leon 株よりも強毒であることが確認できた。

2006 年 3 月から 5 月にかけて、VDPV が確認された地域を中心にカンボジア人口の 50% をカバーする地域で、OPV キャンペーンが実施された。2006 年 2 月以降の AFP 患者より採取された便検体からは VDPV は分離されていない。したがって、VDPV の伝播は制圧されたものと推測された。

カンボジア全土での 2005 年 OPV 接種率は 82% と比較的高いが、接種率の低い地域も存在していた。そのような地域で潜在的な OPV 感染が持続した結果、病原性を回復した cVDPV が出現し、AFP を起こしたものと推測される。これまで報告されていた cVDPV 流行は 1 型および 2 型のみであったため、3 型 VDPV の伝播力は弱いと考えられていた。しかし今回の事例から、3 型も 1 型および 2 型同様に広がり得るこ

とが確認された。

D. 結論

OPV が社会において長期間複製し続けると、ゲノムに変異および組換えが起こる頻度が高くなり、それに伴って病原性を獲得した VDPV が出現する可能性も高くなる。したがって、OPV の長期複製を阻止することが VDPV 出現を阻止することとなる。つまり高い OPV 投与率を維持することが必須である。

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、カンボジアのみならず OPV が使用されている国において、あらゆる地域で高い OPV 投与率を維持し、さらに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) Intratypic Recombination among Lineages of Type 1 Vaccine-Derived Poliovirus Emerging during Chronic Infection of an Immunodeficient Patient. *Journal of Virology* 79:12623-34 (2005)

2. 学会発表

ポスター

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 (横浜)

2005 年 11 月

F. 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

口頭発表

西村順裕、有田峰太郎、吉田弘、小島和暢、上野久美、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 (名古屋)

2006 年 11 月

口頭発表

Yorihiro Nishimura, Minetaro Arita, Hiromu Yoshida, Hua Ling, Kohei Toda, Kazunobu Kojima, Kumi Ueno, Tatsuo Miyamura, Hiroyuki Shimizu, Takaji Wakita

Characterization of the type 3 vaccine-derived poliovirus in Cambodia
XIV Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses (Inari, Finland)

2006 年 11 月

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
研究報告書

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 小池智（東京都神経科学総合研究所）
共同研究者 大岡静衣（東京大学大学院・医学系研究科）

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程度までは上昇しなかった。そこでマウスにおける経口感染効率が悪い理由を検索したところ、マウスの胃の pH は非常に低くそのためにポリオウイルスが小腸に到達する以前に失活すること、Ifnar KO の消化管では IFN シグリングが遮断されているにも関わらず OAS などの抗ウイルス作用をもつ IFN-stimulated gene の発現が高くウイルスが容易に増殖できない環境にあることを見いだした。

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糞口感染によりヒトの間を伝播していく。すなわち経口的に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。消化管では必ずしも激しい病変を生ずることはないが糞便中にウイルスが排出され次の感染源となる。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や伝播の過程での変異の発生などを調べることは重要である。カニクイ

ザルなどの旧世界ザルをモデル動物としても経口感染は効率が悪く、実験系として大掛かりなものとなる。効率よく研究する上では経口感染をする小動物モデルが必要である。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マウス (tg) モデルを開発した。PVR-tg はウイルスの脳内接種、静脈内接種、筋肉内接種、腹腔内接種などでは効率よく感染が成立し、中枢神経系にウイルスが到達しマヒが観察された。ところが経口感染は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。一昨年度までに我々はポリオウイルスの感染成立には IFN 応答が強く影響を与えていることという仮説も持つに至った。そこで PVR-tg マ

ウスと IFN α / β レセプターノックアウトマウス (Ifnar KO) を交配することにより、マウスのウイルス感受性が増大することを示した。PVR-tg/Ifnar KO 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程度までは上昇しなかった。そのため、今年度は昨年度に引き続きその原因を調べた。

B. 研究方法

PVR-tg に様々な経路でウイルスを接種すると感染が成立しマヒに至るが、中枢神経系に直接ウイルスを接種するよりも末梢組織に接種する方が多くのウイルスを必要とする。PVR-tg/Ifnar KO ではウイルス感受性が増し、腹腔内接種や静脈内接種でも脳内接種と同レベルのウイルスで感染・発症が観察された。ところが経口感染経路では感染効率は改善するものの感染は成立しにくく、ウイルス接種からウイルスが血中に入るまでの過程に大きなバリアが存在していると考えられた。そこでウイルスが消化管まで実際に到達しているのか？ PVR-tg/Ifnar KO の消化管においてウイルス増殖を許容しない原因があるか？などを検証することにした。実際に行ったことは

- 1) ウイルスのマウスの胃中の pH に対するウイルスの耐性を検討した。
- 2) 胃酸を中和する条件を検索することにより感染効率を上昇させることができるかを検討した。
- 3) PVR-tg ならびに PVR-tg/Ifnar KO 消化管などの組織から RNA を調製し、real

time RT-PCR 法によって、2',5'-oligoadenylate synthetase (OAS), PKR, RIG-I, IRF-7 などの IFN-stimulated gene (ISG) の発現レベルを調べた。

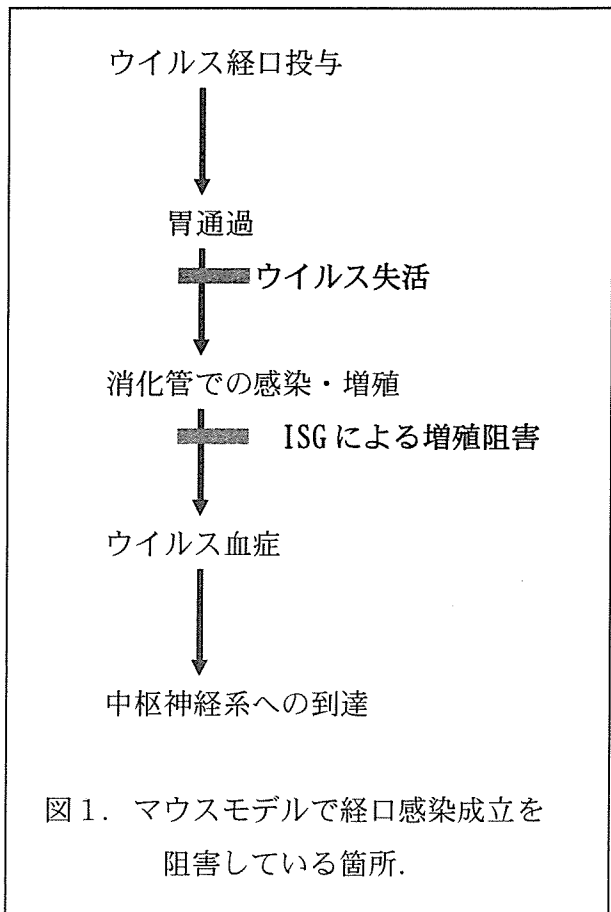
C. 研究結果と考察

- 1) マウスの胃内容物もしくはそれと同程度の pH をもつ液とポリオウイルスを混合し 37 度で保温するとウイルスのタイターが大きく低下することが認められた。従って PVR-tg あるいは PVR-tg/Ifnar KO において経口感染効率を低下させている原因として胃酸の pH によるウイルスの失活が考えられた。
- 2) PVR-tg の胃の中に直接ウイルス液 (ウイルス培養上清) を入れる方法により 10^6 PFU のウイルスで約半数のマウスが死亡する程度であったが、ウイルス液に炭酸水素ナトリウムを加えて胃酸を中和できるようにし、給水瓶で供給するようになったところ全頭の PVR-tg/Ifnar KO を発症させることができた。
- 3) 未感染の PVR-tg において消化管の OAS などの ISG の発現レベルが他の内臓と比較して高いレベルの発現があることは昨年までに確認した。PVR-tg/Ifnar KO マウスの経口感染の感受性が改善しない理由として Ifnar KO であっても消化管の OAS などの発現レベルが高いのではないかと仮説をもった。実際に測定したところ Oas1a, IRF-7 の発現は Ifnar KO の消化管以外の組織ではほとんどゼロになり、

これらの組織でのウイルス増殖が容易になることを裏付けたが、消化管においては IFN シグナリングが遮断されているにも関わらず依然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の一つとして消化管においては他の組織と異なり 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 ISG の発現の影響が考えられる。

D. 結論

ウイルスが増殖し病原性を発揮するためには、ウイルスが標的組織まで到達すること、ウイルスが細胞内で増殖できることなどが必要である。ヒトにおいてはウイルスの物理的な到達や標的に至るまでに途中で経由する細胞・組織でのウイルスの増殖が問題なく進行するが、tg マウスモデルにおいてはウイルスの胃の通過、消化管での増殖が阻害されており、ヒトと同様の経口感染が成立しにくいことが判明した (図 1)。胃酸中和を行ってウイルスを投与方法はこのシステムの大きな進歩であると考えられる。



E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.* 80:4143-4125 (2006)

2. 学会発表

- 1) 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

- | | |
|--|--|
| <p>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学術集会</p> <p>2) 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. XIVth Meeting of European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses,</p> <p>3) Koike S, Yoshikawa T, Iwasaki T, Takano-Maruyama M, Ohara Y. Role of IFN response in the pathogenicity of neurotropic picornaviruses. XIVth Meeting of European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses,</p> <p>4) 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</p> <p>3. 総説</p> <p>1) 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)</p> <p>2) 小池智, ポリオウイルス. <i>Drug Delivery System</i> 21: 630-631 (2006)</p> | <p>2. 実用新案登録
なし</p> <p>3. その他
なし</p> |
|--|--|

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

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に関する研究

分担研究者 有田 峰太郎（国立感染症研究所ウイルス第二部）

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 (4)。現在、サルおよびトランスジェニックマウス (TgPVR21) 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, 3, 5)。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。これまでの研究により、ポリオウイルス擬似粒子の大量調製法の確立、TgPVR21 の脊髄内における複製の解析、擬似粒子の接種による TgPVR21 への非致死性ポリオ様麻痺の誘導条件の確立、ルシフェラーゼ活性の測定により重篤なポリオ様麻痺を呈したマウスの腰髄では全運動神経細胞のうち 1.4% 以下でレプリコンの複製が生じていることを報告した。今回は、擬似粒子の接種によりポ

リオ様麻痺を呈した TgPVR21 の腰髄の病理解析を行った。特に、重篤なポリオ様麻痺を呈したマウスではどの程度の運動神経が破壊されているのか、ルシフェラーゼ活性の測定によって得られた見積もり（腰髄の全運動神経細胞の 1.4% 以下）と一致するかどうかを調べた。

B. 研究方法

ポリオウイルス擬似粒子を TgPVR21 マウスに脊髄内接種し ($3.2 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^7$ IU)、ポリオ様麻痺を呈したマウスから腰髄を回収し、病理像を解析した。

C. 結果

ポリオ様麻痺を呈した TgPVR21 マウスの腰髄における病理像の解析：ポリオ様麻痺を呈した TgPVR21 マウスの腰髄の病理解析を行った。結果、擬似粒子を 1.5×10^7 IU 接種した場合には（ルシフェラーゼ活性から、腰髄中のほとんどの運動神経が破壊されていると見積もられた）、重篤なポリオ様麻痺が両方の後肢に誘導され、接種部位近傍およびその周り（接種部位から頭および尻尾側に 3 mm 離れた

部位)で運動神経が破壊されていた。

一方、擬似粒子を $3.2 \times 10^3 \sim 3.2 \times 10^5$ IU 接種した場合には (ルシフェラーゼ活性から、腰髄中の運動神経の 0.13~6.1%が破壊されていると見積もられた)、ポリオ様弛緩性麻痺が接種部位に相当する後肢 (左) に軽度もしくは重篤なポリオ様麻痺が誘導されたが、接種部位近傍で一部の運動神経が破壊されているのみであった。この場合、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、病理像に際立った差は認められなかった。このことは、きわめて限定された数の運動神経が破壊されることで、重篤なポリオ様麻痺が誘導されたことを示唆し、ルシフェラーゼ活性によって得られた見積もりと一致した。

D. 考察

擬似粒子を TgPVR21 マウスに脊髄内接種した場合には、脊髄内のごく一部の運動神経細胞が擬似粒子の感染により破壊されて (腰髄中の全運動神経細胞の 1.4%以下)、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示唆された。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 (2)。

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. Arita, M., N. Nagata, T. Sata, T. Miyamura, and H. Shimizu. 2006.

Quantitative analysis of poliomyelitis-like paralysis in mice induced by a poliovirus replicon. *J. Gen. Virol.* 87:3317-3327.

3. 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.

4. Minor, P. 1998. Picornaviruses. *Microbiology and Microbial Infections*, 9th edn, eds Collier L, Balows A, Sussman M, Arnold, London 1:485-509.

5. 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) Mizutani T, Endoh D, Okamoto M, Shirato K, Shimizu H, Arita M, Fukushima 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.

- 10) 清水博之: ポリオの疫学、*Journal of Clinical Rehabilitation* 16, 114-120, 2007.
- 11) 清水博之: 手足口病、*日本臨床* 65, 339-342, 2007.
- 12) 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.
- 13) 小池智: ポリオウイルス、*Drug Delivery System* 21: 630-631, 2006.

Rapid Genome Sequencing of RNA Viruses

Tetsuya Mizutani,* Daiji Endoh,†
 Michiko Okamoto,‡ Kazuya Shirato,*
 Hiroyuki Shimizu,* Minetaro Arita,*
 Shuetsu Fukushi,* Masayuki Saijo,*
 Kouji Sakai,* Chang Kweng Lim,* Mikako Ito,*
 Reiko Nerome,* Tomohiko Takasaki,* Koji Ishii,*
 Tetsuro Suzuki,* Ichiro Kurane,*
 Shigeru Morikawa,* and Hidekazu Nishimura‡

We developed a system for rapid determination of viral RNA sequences whereby genomic sequence is obtained from cultured virus isolates without subcloning into plasmid vectors. This method affords new opportunities to address the challenges of unknown or untypeable emerging viruses.

Over the past few years, global migration has led to emerging infectious diseases that pose substantial risks to public health. To prevent potential outbreaks, early detection of infectious pathogens is necessary. In particular, the recent outbreak of severe acute respiratory syndrome (SARS) provided important lessons on how unknown viruses should be detected rapidly. Thus, a standardized and qualified system is required for rapid nucleic acid sequence determination for newly emerging viruses.

Recently, we developed a new method for detecting RNA viruses. This method, based on cDNA representational difference analysis (cDNA RDA), uses 96 hexanucleotides that are not suitable for priming ribosomal RNAs but that normally prime most of the genome of an RNA virus as primers for reverse transcription in cDNA RDA (1). However, the RDA method with a cloning step requires at least 1 week for the determination of the nucleic acid sequence.

The Method

Our new system for rapid determination of viral RNA sequence (RDV) uses whole-genome amplification and direct sequencing techniques (Figure 1). The RDV method comprises 6 procedures: 1) effective destruction of cellular RNA and DNA for semipurification of viral particles, 2) effective elimination of DNA fragments by using a pre-

filtration column system and elution of small amounts of RNA, 3) effective synthesis of first- and second-strand cDNAs, 4) construction and amplification of a cDNA library, 5) construction of a second cDNA library, and 6) direct sequencing using optimized primers. The RDV method enables a broad range of partial nucleotide sequences within the entire viral RNA genome to be obtained within 2 days without cloning into plasmids.

To eliminate contaminating cellular RNA and DNA from the samples, 0.001 µg of RNase A (Qiagen, Hilden, Germany) and 1 µL (2 U) of Turbo DNA-free DNase I (Ambion, Austin, TX, USA) with 1× Turbo DNA-free buffer were incubated at 37°C for 30 min under conditions that prevented destruction of viral RNA in the viral particles. The RNA in the viral particles was then extracted within 30 min by using a total RNA isolation mini kit (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, USA). We confirmed that DNA was effectively eliminated by this RNA extraction kit.

In accordance with the Invitrogen manual, cDNA was synthesized, by using random hexamers (Takara Bio Inc., Kyoto, Japan) and Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) lacking RNase H activity, at 50°C for 1 h. Then 60 U of RNase H (Takara Bio Inc.) added before synthesis of second-strand cDNA at 50°C for 1 h. In accordance with the manual, a whole genome amplification system (WGA; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), which was developed for amplification of genomic DNA, was used to amplify viral double-stranded cDNA. This process was

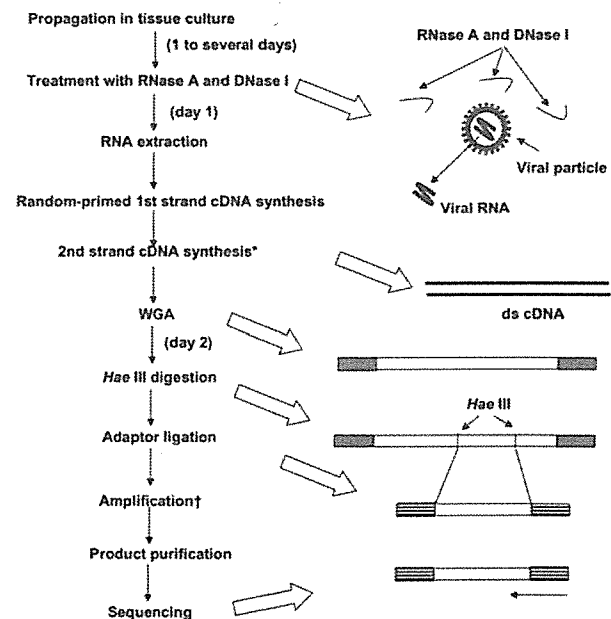


Figure 1. Overall scheme of the rapid determination of viral RNA sequence method. *By adding RNase H; WGA, whole genome amplification; †With specially designed primer sets as shown in Figure 2.

*National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan; †Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Japan; and ‡Sendai Medical Center, Sendai, Japan

performed within 90 min. Instead of the Taq polymerase recommended in the kit, we used 1.25 U of AmpliTaq Gold LD (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) to obtain a high yield of the PCR products. Primers were provided in the WGA kit, but no information regarding their sequences was obtained. The reaction mixture was heated at 95°C for 9 min (for activation of AmpliTaq Gold), followed by 70 cycles of amplification using Mastercycler (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Each PCR cycle consisted of annealing at 68°C for 1 min, primer extension at 72°C for 5 min, and denaturation at 94°C for 1 min.

The 1st cDNA library was digested with 40 U of *Hae*III (Takara Bio Inc.) at 37°C for 30 min. DNA was purified by using the MonoFas DNA isolation system (GL Science, Tokyo, Japan), and a blunt *Eco*RI-*Not*I-*Bam*HI adaptor (10 pmol; Takara Bio Inc.) was ligated at 16°C for 30 min by using DNA Ligation Kit, Mighty Mix (Takara Bio Inc.). The second cDNA library was amplified by PCR with specially designed primer sets in which 6 nucleotides composed of CC (*Hae*III-digested sequence) and 4 variable nucleotides were added to the 3' end of the adaptor sequence (Figure 2). For example, 1 primer set was as follows: forward primer, H1-1: 5'-AATTCGGCGCCGCGGATCCCCGGG-3'; reverse primer H9-3: 5'-AATTCGGCGCCGCGGATCCCCAGGA-3' (the adaptor sequence is underlined, and the *Hae*III-digested sequence is shown in italics) (Figure 2).

We always used >12 primer sets and 0.83 μmol of each primer per cDNA library. PCR was performed with AmpliTaq Gold Master Mix (Applied Biosystems). The reaction mixture was heated at 95°C for 12 min, followed by 70 cycles of amplification. Each PCR cycle consisted of annealing and primer extension at 72°C for 30 s and denaturation at 94°C for 30 s. A single band was consistently obtained in ≈50% of the reactions. DNA was purified from the PCR by using MonoFas. Occasionally, we purified DNA fragments from the gels when >2 bands were detected. Direct sequencing was performed with the forward primer, reverse primer, or both.

When the number of viral particles in the sample was high, we omitted the RNase A and DNase I treatments and used the RNeasy Mini Kit (Qiagen) for RNA extraction. We occasionally used a whole transcriptome amplification kit (Rubicon Genomics Inc, Ann Arbor, MI, USA) instead of the WGA kit because both kits yielded similar amplification results.

In preliminary studies that used referential RNA viruses, we attempted to determine the nucleic acid sequences of SARS coronavirus, mouse hepatitis virus, West Nile virus, Japanese encephalitis virus, and dengue virus type 2 in culture supernatants (10–100 μL) by using the RDV method. The percentages of positive fragments (number of fragments containing viral nucleic acid/total number of

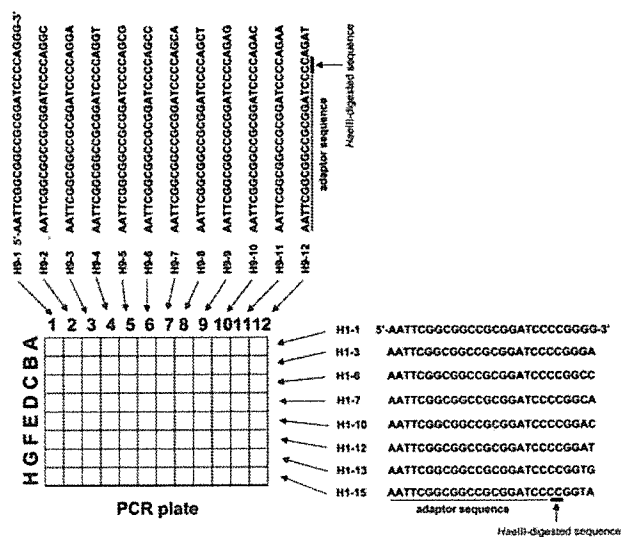


Figure 2. Primers used in rapid determination of viral RNA sequence method.

sequenced fragments) in the reactions for detection of these 5 viruses were 60% (3/5), 45% (5/11), 100% (12/12), 50% (5/10), and 40% (4/10), respectively. As a clinical application, a throat swab specimen from a patient with fever and upper respiratory infection was characterized. Although the specimen exhibited enterovirus-like cytopathic effect by inoculation into HEF and GMK cells when cell culture system for virus isolation was used (2), extracted RNA from the supernatant of the cells showed no amplification by reverse transcription-PCR (RT-PCR) when 1 of the conventional primer sets for human enteroviruses was used (3,4). In the cell culture supernatant analysis by the RDV method, the specimen exhibited amplification of the partial nucleotide sequences of coxsackie A14 virus (nucleotide sequence data are available in the DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession nos. AB275848–AB275853). Thus, the RDV method could detect unidentified cytopathic-effect agents such as enterovirus that could not be detected by RT-PCR when the conventional primer set for enteroviruses was used.

Conclusions

The RDV method is a rapid method for the direct determination of viral RNA sequences without using the cDNA cloning procedure. The limitations of the RDV method are the requirement for cell culture isolate and the large number of steps. However, RDV would be useful for species-independent detection of RNA viruses including unknown or untypeable emerging RNA viruses. Furthermore, with minor modifications, this method would also be applicable to the detection of DNA viruses and bacteria.

Acknowledgments

We thank F. Taguchi and R. Watanabe for helpful discussions and M. Ogata for assistance.

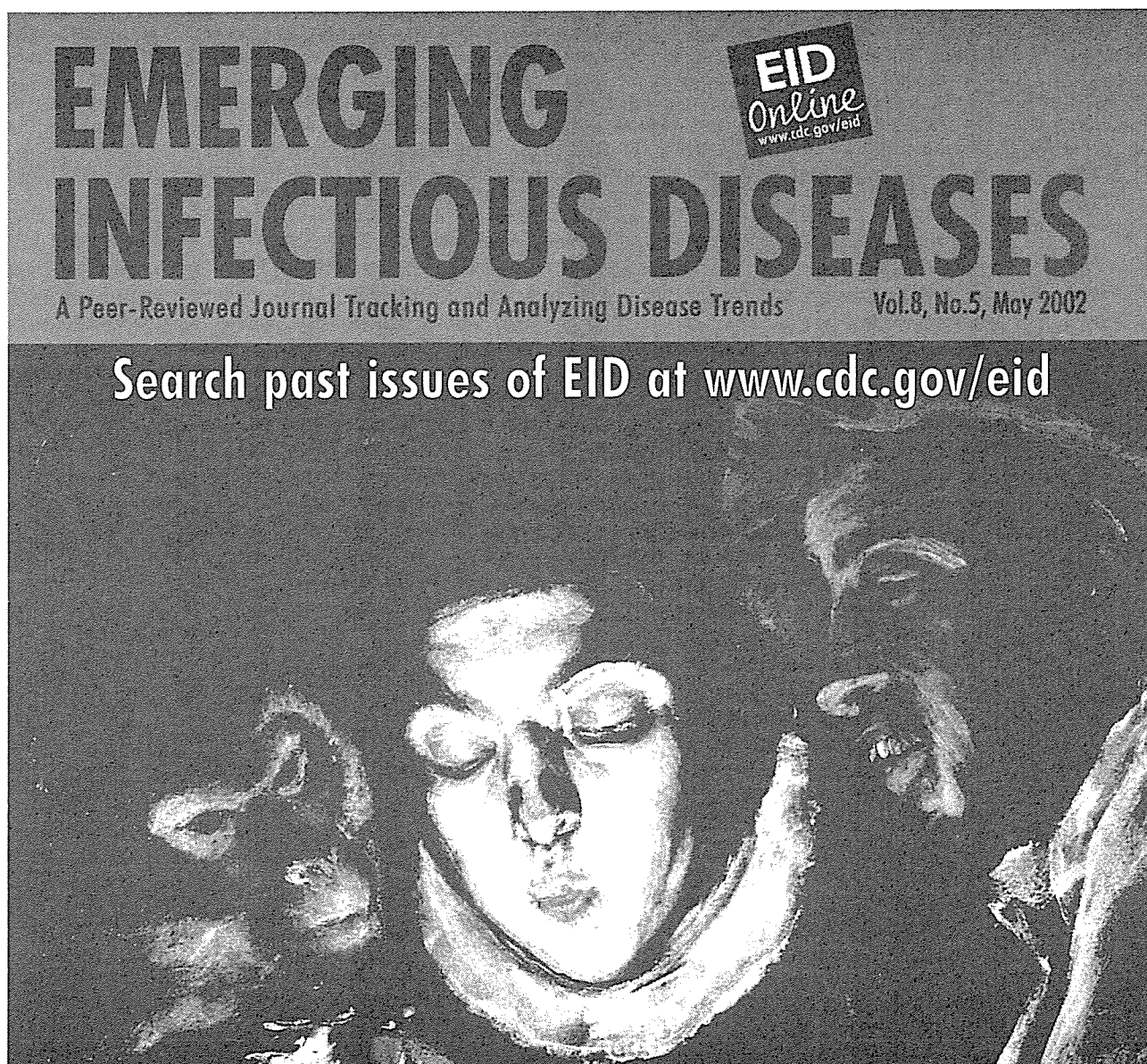
This work was supported in part by the Japan Society for Promotion of Science, Tokyo, Japan.

Dr Mizutani is a senior researcher at the National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan. His current research focus is infectious disease surveillance by using new technologies.

References

1. Endoh D, Mizutani T, Kirisawa R, Maki Y, Saito H, Kon Y, et al. Species-independent detection of RNA virus by representational difference analysis using non-ribosomal hexanucleotides for reverse transcription. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:e65.
2. Numazaki Y, Oahima T, Ohmi A, Tanaka A, Oizumi Y, Komatsu S, et al. A microplate method for isolation of viruses from infants and children with acute respiratory infections. *Microbiol Immunol.* 1987;31:1085-95.
3. Olive DM, Al-Mufti S, Al-Mulla W, Khan MA, Pasca A, Stanway G, et al. Detection and differentiation of picornaviruses in clinical samples following genomic amplification. *J Gen Virol.* 1990;71:2141-7.
4. Ishiko H, Shimada Y, Yonaha M, Hashimoto O, Hayashi A, Sakae K, et al. Molecular diagnosis of human enteroviruses by phylogeny-based classification by use of the VP4 sequence. *J Infect Dis.* 2002;185:744-54.

Address for correspondence: Tetsuya Mizutani, Department of Virology 1, National Institute of Infectious Diseases, Gakuen 4-7-1, Musashimurayama City, Tokyo 208-0011, Japan; email: tmizutan@nih.go.jp



Laboratory and Epidemiology Communications

Intrafamilial Transmission of a Sabin 1-Related Poliovirus in Shizuoka Prefecture, Japan

Masaaki Sugieda, Satoshi Adachi, Megumi Inayoshi, Takashi Masuda, Munetoshi Tsubota¹, Hozumi Mano¹, Masato Iwama¹, Yoshio Murakami², Hiromu Yoshida³ and Hiroyuki Shimizu^{3*}

Shizuoka Institute of Environment and Hygiene, Shizuoka 420-8637; ¹Shizuoka Prefectural of Atami Pubic Health Center, Atami 413-0016; ²Kawana Seaside School Clinic, Ito 414-0044; and ³Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 208-0011, Japan

Communicated by Takaji Wakita

(Accepted June 6, 2006)

On June 6, 2005, a 41-year-old male presented with fever (39.0°C) and malaise, and was admitted to a clinic in Shizuoka Prefecture, Japan. Immediately before the onset, the patient had taken care of his 9-month-old daughter, who had diarrhea and who had previously received her first dose of oral poliovirus vaccine (OPV) on May 30, 2005.

To address the possibility of vaccine-associated paralytic poliomyelitis (VAPP) due to intrafamilial poliovirus transmission, clinical samples were collected from the patient and his vaccinated daughter on June 10 for virus isolation and identification. Polioviruses were isolated from a throat swab of the patient and from a stool sample of the daughter in Vero cells (1). Both isolates were identified as a type 1 poliovirus by the microneutralization test (Table 1). Two different methods, which were based on genetic and antigenic approaches and which used PCR-restriction enzyme fragment length polymorphism and Sabin-specific monoclonal antibodies, respectively, were employed for intratypic differentiation (ITD) of polioviruses to distinguish between the vaccine and wild polioviruses (2,3). As shown in Table 1, the ITD assays identified both type 1 poliovirus isolates as Sabin 1-like polioviruses, which were commonly found in the stool samples from healthy OPV recipients and their close contacts (4,5).

During clinical follow-up, the patient and his daughter completely recovered without any sequelae, although intrafamilial transmission of the type 1 OPV strain was epidemiologically suspected. However, another possible VAPP case, that of a 36-year-old male who had a contact infection with type 3 OPV strain from his son, was recently reported in Ehime Prefecture, Japan (6). These incidents revealed the existence

of susceptible populations and the risk for VAPP as long as OPV is still used in Japan (7), and provide a strong argument for the introduction of an inactivated poliovirus vaccine instead of OPV to reduce the risk of VAPP, concomitant with routine OPV immunization (8,9). In the meantime, highly qualified disease and laboratory surveillance activities for VAPP are also needed.

This article appeared in the Infectious Agents Surveillance Report (IASR), vol. 27, p. 104, 2006 in Japanese.

REFERENCES

1. World Health Organization (2004): Polio Laboratory Manual. 4th ed. WHO/IVB/04.10. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
2. van der Avoort, H. G., Hull, B. P., Hovi, T., Pallansch, M. A., Kew, O. M., Crainic, R., Wood, D. J., Mulders, M. N. and van Loon, A. M. (1995): Comparative study of five methods for intratypic differentiation of polioviruses. *J. Clin. Microbiol.*, 33, 2562-2566.
3. World Health Organization (2005): Laboratory surveillance for wild and vaccine-derived polioviruses, January 2004-June 2005. *Wkly. Epidemiol. Rec.*, 80, 335-340.
4. Georgescu, M. M., Balanant, J., Macadam, A., Otelea, D., Combiescu, M., Combiescu, A. A., Crainic, R. and Delpeyroux, F. (1997): Evolution of the Sabin type 1 poliovirus in humans: characterization of strains isolated from patients with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J. Virol.*, 71, 7758-7768.
5. Kuramitsu, M., Kuroiwa, C., Yoshida, H., Miyoshi,

Table 1. Virus isolation and characterization of polioviruses

Virus ID	Sample			Poliovirus isolate			
	Source	Sample	Date of sampling	Serotype	ITD		Final result
					PCR-RFLP ¹⁾	MoAb ²⁾	
0517	Patient	Throat swab	June 10, 2005	Type 1	Sabin 1	Sabin-like	Sabin 1
0518	Daughter	Stool	June 10, 2005	Type 1	Sabin 1	Sabin-like	Sabin 1

¹⁾ PCR-restriction enzyme fragment length polymorphism test as a genetic intratypic differentiation (ITD) assay.

²⁾ Neutralization test using Sabin-specific monoclonal antibodies as a antigenic ITD assay.

*Corresponding author: Mailing address: Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, Gakuen 4-7-1, Musashimurayama, Tokyo 208-0011, Japan. Tel: +81-42-561-0771, Fax: +81-42-561-4729, E-mail: hshimizu@nih.go.jp

- M., Okumura, J., Shimizu, H., Narantuya, L. and Bat-Ochir, D. (2005): 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.
6. Okuda, B., Uetani, E. and Okamoto, K. (2006): Vaccine-associated paralytic poliomyelitis caused by contact infection. *Intern. Med.* 45, 373-375.
 7. Shimizu, H., Yoshida, H., Utama, A., Nakayama, T., Saito, T., Watanabe, K., Iizuka, S., Noda, S., Yoneyama, T. and Miyamura, T. (2003): Surveillance of poliovirus isolates in Japan, 2002. *Jpn. J. Infect. Dis.* 56, 218-219.
 8. Kew, O. M., Wright, P. F., Agol, V. I., Delpeyroux, F., Shimizu, H., Nathanson, N. and Pallansch, M. P. (2004): Circulating vaccine-derived polioviruses: current state of knowledge. *Bull. World Health Organ.*, 82, 16-23.
 9. Kew, O. M., Sutter, R. W., de Gourville, E. M., Dowdle, W. R. and Pallansch, M. A. (2005): Vaccine-derived polioviruses and the endgame strategy for global polio eradication. *Annu. Rev. Microbiol.*, 59, 587-635.

Molecular Epidemiology of Echoviruses 11 and 13, Based on an Environmental Surveillance Conducted in Toyama Prefecture, 2002–2003†

Masae Iwai,^{1‡} Hiromu Yoshida,^{2‡*} Kumiko Matsuura,¹ Tsuguto Fujimoto,³ Hiroyuki Shimizu,² Takenori Takizawa,¹ and Yoshiyuki Nagai¹

Department of Virology, Toyama Institute of Health, Nakataikouyama, Kosugi-machi, Imizu-shi, Toyama 939-0363, Japan¹;
Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, Gakuen 4-7-1, Musashimurayama, Tokyo 208-0011, Japan²; and Infectious Disease Research Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, 2-1-29 Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe, Hyogo 652-0032, Japan³

Received 7 November 2005/Accepted 5 July 2006

Nineteen echovirus 11 (E11) and 12 E13 isolates were isolated from three rivers in Toyama Prefecture, Japan, during an environmental surveillance conducted from April 2002 to March 2003. The nucleotide sequences of E13 isolates were closely related to those from patients with aseptic meningitis, with less than 1.3% divergence in the VP1 region of the viral capsid gene, and belonged to the same clade responsible for a worldwide outbreak that started in 2000. In contrast, E11 isolates were clustered into three genomic groups and were not closely related to echovirus strains isolated from patients. These results suggest that the combination of both virus isolation from environmental sources and phylogenetic analysis could be complementary assessment approaches to trace prevalent and minor circulating enteroviruses in the human population.

Environmental surveillance has been conducted in Toyama Prefecture, Japan, four times since 1979 in order to study enteric virus water pollution (18–20). Assessment of enteric viruses found in the environment also plays a role in understanding virus circulation in the community (26, 27). In particular, environmental surveillance for human poliovirus (genus *Enterovirus*) under an eradication program is reported to be the most sensitive method to detect wild or vaccine-derived polioviruses circulating in the human population (7, 32, 33).

Large outbreaks of aseptic meningitis caused by human echovirus 13 (E13) (genus *Enterovirus*) have been reported in various areas in the world since 2000 (3, 4, 22, 23, 30). In addition, a nationwide outbreak of aseptic meningitis caused by E13 occurred in Japan during the summer of 2002 (19) after a small outbreak in a limited area in 2001. According to an Infectious Agents Surveillance Report of Japan, E13 was the most common causative agent (67.2%) isolated from aseptic meningitis patients in 2002, followed by human echovirus 11 (E11) (genus *Enterovirus*) (12.3%) (10). However, E13 had not been isolated clinically during the previous 20 years in Japan (9), and its isolation was rare until 2000. Thus, the outbreaks of aseptic meningitis caused by E13 seem to be a case of reemerging enterovirus infection (21, 29).

Human enterovirus infection is known to be generally asymptomatic, and thus, environmental surveillance has been reported to be a sensitive method to detect silently circulating viruses (26, 27). We show here several enteroviruses isolated

during an environmental surveillance conducted in Toyama, and we especially analyzed E13 and E11 phylogenetically and compared their genetic sequences to available clinical isolates.

Virus isolation from rivers. Water samples (800 ml each) were collected from fixed points of three rivers (Oyabe, Itachi, and Sembo) (Fig. 1) twice a month from April 2002 to March 2003, as described previously (18). On the day of collection, samples were concentrated using a negatively charged membrane filter (mixed cellulose ester membrane filter; Advantec Co. Ltd., Tokyo, Japan) as described previously (18). After the initial collection, water samples were centrifuged at 3,000 rpm for 30 min, MgCl₂ was added to the supernatant to a final concentration of 0.05 M, and the pH was adjusted to 3.5. The samples were then absorbed to the filter under positive pressure. Absorbents on the filter were next eluted with 3% beef extract solution by sonication for 5 min and then centrifuged at 12,000 rpm for 30 min. The supernatants were collected and stored at 4°C until virus isolation.

A total of 0.2 ml of the supernatant was inoculated onto Vero, MA104, RD-18S, and Hep2 cell lines. Eight tubes for each cell line were used for virus isolation (18). Isolates were identified by specific antisera against each enterovirus (Denka Co. Ltd., Tokyo, Japan). Reoviruses (mammalian orthoreovirus) were characterized using neutralization and hemagglutination inhibition tests with type-specific antisera (19).

A total of 171 viruses were isolated at fixed points of three rivers in Toyama twice a month from April 2002 to March 2003 (Table 1). Reoviruses were the most common virus isolates, followed by E11 and E13. Three isolates could not be typed. Cell lines in which viruses were isolated are shown in Table S2 of the supplemental material.

There were two periods when viruses were frequently isolated: one was from July to September 2002, and the other was from December 2002 to February 2003 (Fig. 2). Twelve E13

* Corresponding author. Mailing address: Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, Gakuen 4-7-1, Musashimurayama, Tokyo 208-0011, Japan. Phone: 81-42-561-0771. Fax: 81-42-561-4729. E-mail: hyoshida@nih.go.jp.

† Supplemental material for this article may be found at <http://aem.asm.org/>.

‡ M.I. and H.Y. contributed equally to this work.