

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

ウイルス感染症の効果的制御のための病原体サーベイランスシステムの検討

平成 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 清水 博之

平成 20 年 (2008 年) 3 月

## 目 次

### I. 総括研究報告

- ウイルス感染症の効果的制御のための病原体サーベイランスシステムの検討 ----- 1  
主任研究者 清水博之

### II. 分担研究報告

1. ピコルナウイルス研究小班統括報告 ----- 17  
清水博之 (国立感染症研究所 ウイルス第二部)
2. 中国における環境ウイルスサーベイランス手法の導入研究 ----- 25  
帖佐 徹 (国立国際医療センター)
3. 環境水サーベイランスによるポリオウイルス伝播の監視 ----- 27  
岩井雅恵 (富山県衛生研究所)
4. 海外旅行者から分離されたエンテロウイルスの遺伝子解析に関する研究 ----- 35  
山下照夫 (愛知県衛生研究所)
5. エンテロウイルスによる小児期中枢神経合併症サーベイランスについて ----- 41  
中野貴司 (国立病院機構三重病院)
6. 上気道炎患者由来検体からの高感度エンテロウイルス検出法に関する検討 ----- 45  
吾郷昌信 (長崎県環境保健研究センター)
7. ヒトコミュニティに循環する腸管系ウイルスの研究 ----- 49  
吉田 弘 (国立感染症研究所 ウイルス第二部)
8. 便乳剤からのエンテロウイルス遺伝子検出 ----- 53  
西村順裕 (国立感染症研究所 ウイルス第二部)
9. 臨床分離株のウイルス増殖性と細胞レセプターとの相互作用の検討に関する研究 ----- 57  
中村貴史 (千葉県がんセンター)
10. パレコウイルスの抗体保有状況の解析 ----- 61  
町田早苗 (埼玉医科大学)
11. アイチウイルス複製機構の解析 ----- 65  
佐々木 潤 (藤田保健衛生大学)
12. エンテロウイルス 71 のマウス感染モデルの解析 ----- 67  
有田峰太郎 (国立感染症研究所 ウイルス第二部)
13. ポリオウイルス感受性動物モデルに関する研究 ----- 69  
小池 智 (東京都神経科学総合研究所)
14. 麻疹の効果的制御に関する研究 ----- 75  
多屋 馨子 (国立感染症研究所 感染症情報センター)

|   |     |
|---|-----|
| 14. 麻疹ウイルス研究小班統括報告 -----                                    | 81  |
| 沼崎 啓 (国立感染症研究所 ウイルス第三部)                                     |     |
| 15. 麻疹の実験室内診断法とサーベイランス・システムの確立に関する研究 -----                  | 85  |
| 沼崎 啓 (国立感染症研究所 ウイルス第三部)                                     |     |
| 16. 札幌市における麻疹抗体価の疫学調査—妊婦甲状腺機能スクリーニング乾燥濾紙血液を用いた検討— -----     | 87  |
| 矢野公一 (札幌市衛生研究所)   |     |
| 17. 2007年の北海道における麻疹について-----                                | 93  |
| 岡野素彦 (北海道立衛生研究所)  |     |
| 18. 2007年 千葉県における麻疹の流行-----                                 | 99  |
| 一戸貞人 (千葉縣市原健康福祉センター)  |     |
| 19. 麻疹ウイルス実験室診断の向上—検体搬送・保存温度の検出感度への影響に関する研究— -----          | 105 |
| 皆川洋子 (愛知県衛生研究所)   |     |
| 20. 麻疹のサーベイランス・システムの確立「麻疹の遺伝子検査方法に関する検討」-----               | 107 |
| 伊藤正寛 (京都市東山保健所)   |     |
| 21. 堺市におけるこれまでの麻しん対応と2007年の発生状況について -----                   | 111 |
| 田中智之 (堺市衛生研究所)  |     |
| 22. 沖縄地方における麻疹サーベイランスシステムの確立 -----                          | 119 |
| 平良勝也 (沖縄県衛生環境研究所)   |     |
| 23. 麻しん及び風疹の全数把握のための迅速な検査法の検討 -----                         | 123 |
| 小倉 肇 (岡山県環境保健センター), 寺田喜平 (川崎医科大学)                           |     |
| 24. 麻疹のサーベイランス・システムの確立 -----                                | 129 |
| 高橋和郎 (大阪府立公衆衛生研究所)  |     |
| 25. 風疹ウイルス遺伝子の変異 -----                                      | 133 |
| 駒瀬勝啓 (国立感染症研究所 ウイルス第三部)                                     |     |
| 26. 呼吸器ウイルス感染症の実験室診断法の研究—呼吸器ウイルス研究小班統括報告— -----             | 137 |
| 野田雅博 (国立感染症研究所 ウイルス第三部)                                     |     |
| 27. 山形県における呼吸器ウイルス感染症サーベイランス—特にヒトメタニューモウイルスの疫学— -----       | 143 |
| 水田克巳 (山形県衛生研究所)   |     |
| 28. 乳幼児気管支炎患者から分離されたRespiratory Syncytial ウイルス(RSV)の分子疫学 -- | 145 |
| 木村博一 (国立感染症研究所 ウイルス第三部)                                     |     |
| 29. 小児気管支喘息患者から検出されたウイルスについて -----                          | 149 |
| 加藤政彦 (群馬県衛生環境研究所)   |     |
| 30. 重症心身障害児(者)病棟における感染症流行について-----                          | 151 |
| 松田俊二 (国立病院機構愛媛病院)   |     |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧 -----                                    | 157 |

厚生労働科学研究費補助金  
平成19年度 新興・再興感染症研究事業  
総括研究報告書

ウイルス感染症の効果的制御のための病原体サーベイランスシステムの検討

主任研究者： 清水博之 国立感染症研究所 ウイルス第二部

分担研究者： 小池 智 東京都神経科学総合研究所 微生物研究部門  
帖佐 徹 国立国際医療センター 国際医療協力局  
多屋馨子 国立感染症研究所 感染症情報センター  
沼崎 啓 国立感染症研究所 ウイルス第三部 (麻疹ウイルス研究小班統括)  
野田雅博 国立感染症研究所 ウイルス第三部 (呼吸器ウイルス研究小班統括)

研究協力者 (ピコルナウイルス研究小班)：

吉田 弘、有田峰太郎、西村順裕 国立感染症研究所 ウイルス第二部  
岩井雅恵 富山県衛生研究所  
山下照夫、伊藤 雅、皆川洋子 愛知県衛生研究所  
佐々木 潤 藤田保健衛生大学 医学部  
町田早苗 埼玉医科大学 医学部  
吾郷昌信 長崎県環境保健研究センター  
中野貴司 国立病院機構三重病院 臨床研究部  
中村貴史 千葉県がんセンター 研究局

研究協力者 (麻疹ウイルス研究小班)：

堤 裕幸 札幌医科大学 医学部  
市村 宏 金沢大学 医学部  
矢野公一 札幌市衛生研究所  
岡野素彦、長野秀樹、地主 勝 北海道立衛生研究所 微生物部  
一戸貞人 千葉県市原健康福祉センター  
小川知子、小倉 誠、斉加志津子 千葉県衛生研究所  
皆川 洋子、續木雅子、田中正大、秦 真美、山下照夫 愛知県衛生研究所  
伊藤正寛 京都市東山保健所、京都市衛生公害研究所  
田中智之、狩山雅代、内野清子、吉田永祥 堺市衛生研究所  
片桐真二、西垣正憲、樋上 忍 堺市医師会  
平良勝也 沖縄県衛生環境研究所  
小倉 肇、濱野雅子 岡山県環境保健センター  
寺田喜平 川崎医科大学  
駒瀬勝啓 国立感染症研究所、ウイルス第三部  
川瀬貴子、宮川広実、廣井 聡、加瀬哲男、高橋和郎 大阪府立公衆衛生研究所

研究協力者：

山本久美、佐藤 弘、岡部信彦

国立感染症研究所 感染症情報センター

研究協力者・協力研究員（呼吸器ウイルス研究小班）：

木村博一

国立感染症研究所 感染症情報センター

水田克巳

山形県衛生研究所

加藤政彦

群馬県衛生環境研究所

斎藤義弘

東京慈恵会医科大学 小児科

松田俊二

国立病院機構愛媛病院

菅井和子

国立病院機構横浜医療センター

秋山美穂

国立感染症研究所 感染症情報センター

青木洋子、須藤亜寿佳

山形県衛生研究所

菱沼郁美、金成篤子

福島県衛生研究所

塚越博之

群馬県衛生環境研究所

平田明日美

栃木県保健環境センター

横井 一、北橋智子

千葉県環境衛生研究所

七種美和子、川上千春

横浜市衛生研究所

大内好美、田中千香子

滋賀県衛生環境センター

大瀬戸光明

愛媛県立衛生環境研究所

坂本晃子

佐賀県薬業センター

平良勝也

沖縄県衛生環境研究所

## 研究要旨

本研究の主要な目的は、ワクチン予防可能疾患のうち世界的根絶計画が進められているポリオおよびポリオの次のターゲットとされている麻疹について、病原体サーベイランスの質的向上を行うとともに、ポリオおよび麻疹の制御過程で得られた知見を、未だサーベイランスシステムが確立していない他のウイルス感染症に応用することにある。野生株あるいはワクチン由来ポリオウイルス伝播の検出およびポリオウイルス伝播機構の解析のため、腸管ウイルス病原体サーベイランスについての研究を行った。世界的麻疹制御政略に基づいた適切な病原体サーベイランスシステムを日本国内で整備するための精度の高い麻疹実験室診断について、以下の研究を実施した。さらに日常的に検出される呼吸器ウイルス感染症の病原体サーベイランスシステムを構築することにより、新興・再興ウイルス感染症の発生を迅速かつ感度良く検出するため、以下の研究を行った。

- 1) 中国CDCにて、環境ウイルスサーベイランス手法に関する実技研修会を実施し、フィールド調査のための事前試験を実施した。
- 2) 富山県内の下水流入水から 35 株のポリオウイルスが分離されたが、すべて OPV-like ポリオウイルスであった。健康な乳幼児 134 名からもポリオウイルスは分離されなかった。
- 3) 主に東南アジア旅行者に由来する未同定エンテロウイルスの遺伝子解析により、ユニークな血清型・遺伝子型のエンテロウイルスを同定した。
- 4) 小児科入院患者 4232 例中、15 例の脳炎、脳症、脊髄炎があり、エンテロウイルスが原因のものは 3 例で原因として最多であり、エンテロウイルスの関与が疑われた例が 2 例あった。
- 5) 上気道炎患者 157 名から採取した咽頭ぬぐい液から 62 株のウイルスが分離され、分離ウイルス中、エンテロウイルスは 79.0%を占めた。

- 6) 中国雲南省のAFP患者から分離された195株の非ポリオエンテロウイルスには、多様な血清型が含まれており、EV81, 83, 96等日本では報告のない血清型の流行が推定された。
- 7) エンテロウイルスVP1領域のゲノムを高感度に増幅するVP1 CODEHOP PCRにより、多くの糞便検体において、高感度にエンテロウイルスを検出・同定することが可能であった。
- 8) RD細胞は、高いエンテロウイルス増殖性を示したが、C群エンテロウイルスの増殖に抵抗を示した。ICAM-1発現RD細胞は、C群エンテロウイルスに対する高い増殖性を獲得した。
- 9) パレコウイルス1型および3型の抗体保有率は平均93%、72%であり、不顕性感染として広く蔓延している可能性が示唆された。2型抗体保有率は比較的低く、年齢群による抗体保有率の違いが認められた。
- 10) アイチウイルスRNA複製には、L蛋白質が他の非構造タンパク質全て、あるいは2A以外のポリプロテインとして翻訳される必要があることを示した。L-EGFP-P2P3は細胞質にdot状に局在していた。
- 11) NOD/SCIDマウスで、マウスアダプトEV71変異株を分離し、マウス感染に関わる変異を同定した。EV71(S1-3')の全ての弱毒化変異を導入した変異株は、NOD/SCIDマウスで顕著な弱毒化を示した。
- 12) 週令の異なるPVR-tg/Ifnar KOを用いたポリオウイルス感染実験により、週令による感受性の違いを明らかにした。ヒトゲノムDNAをマウス細胞にトランスフェクションし、EV71感受性細胞株を樹立した。
- 13) 野生株ポリオウイルス実験室封じ込め第一段階調査報告書ドラフトを作成し、2007年12月に開催されたWHO西太平洋地域ポリオ根絶認定委員会に提出した。2008年6月末までに最終報告書を提出するため、野生株ポリオウイルス保有施設の調査・確認作業を実施した。
- 14) 2008年から大きく変更となる予防接種制度を正しく伝えるため、教育啓発用DVDを作成した。麻疹重症化例調査により、麻疹の疾病としてのインパクトを正確に把握するとともに、迅速な実験室診断に向けた取り組みを行った。
- 15) 麻疹の血清診断における各検査法(HI法、NT法、PA法、EIA法)の感度と特異性について比較した。イムノクロマト法を用いた抗原検出による麻疹迅速診断法の開発を試みた。
- 16) 濾紙血液を用いて麻疹抗体価(PA法)を測定することが可能であることを確認した。乾燥濾紙血液を用いた妊婦の麻疹抗体保有率調査により、麻疹感受性群を明らかにした。
- 17) 2007年の北海道における麻疹流行では、成人麻疹が47%を占めた。麻疹患者の約30%が予防接種を受けており、1回接種では不十分であることが示唆された。RT-PCR陽性率は68%であった。
- 18) 2007年より千葉県で行っている麻疹サーベイランスで得られた麻疹疑い患者の検体を検討し、咽頭拭い液137検体中、培養陽性は42検体、PCR陽性は65検体で、培養陽性のものはすべてPCR陽性であった。病日初期はIgM陰性PCR陽性を示す検体が認められた。
- 19) 麻疹疑い患者からの実験室診断用検体の搬送及び保存温度が検出感度に及ぼす影響について検討し、Vero/hSLAM細胞を用いたウイルス分離の有用性を検討した。2007年に開始された愛知県麻疹全数把握事業は、15歳以上の成人麻疹把握に有効であった。
- 20) 麻疹ウイルスのH領域に設定したprimerを用いてreal-time RT-PCR法を構築し、他の方法と比較した。1-10<sup>6</sup> copy/ $\mu$ lの麻疹ウイルスRNAを検出可能であり、nested RT-PCR法とほぼ同等の感度であった。
- 21) 2007年、堺市での全数把握による麻疹患者の報告数は203例であり、麻疹確定診断は116例であった。麻疹ウイルス遺伝子検出法による確定診断が最も多く(52.6%)、今後の検査方法の再考が必要とされる。
- 22) 沖縄県における麻疹全数把握システムの有効性を検証するため、2003-2007年のサーベイランス成績を分析した。全数把握システム導入後、麻疹患者は年間20例前後で推移し、2006年と2007年の事例では、感染源及び症例間の疫学的関連性がすべて明らかとなった。
- 23) 麻しんウイルス及び風疹ウイルスの遺伝子検出法として、RT-LAMP法とRT-PCR法を比較検討した。RT-LAMP法は、迅速性・簡便性に優れており、同一条件で麻しん・風疹両ウイルスを同時検索可能であった。
- 24) 大阪府ではH19年度より麻疹の全数把握疫学調査を開始した。全数把握システムと連動し、麻疹疑い症例について既法よりさらに迅速で高感度の麻疹遺伝子検出法(RT-nest PCR)を開発し有用性を評価した。

- 25) 過去約 30 年間に日本で流行し分離された風疹ウイルス約 20 株の遺伝子解析を行ない、現行の病原体検出マニュアルにおける RT-PCR 法の有効性を検証した。
- 26) 急性呼吸器感染症 (ARI) 症例由来試料のウイルス検索を試みた、RS ウイルス (RSV)、ヒトメタニューモウイルス (hMPV)、パラインフルエンザウイルス (PIV)、ライノウイルス (RV) 等が多数分離された。
- 27) 気管支炎乳幼児患者から分離された RSV 株間の N 遺伝子の塩基配列のホモロジーは高く、遺伝学的に近縁な RSV が本疾患に関与していた。一方、hMPV では年毎に異なった遺伝子型株の流行が認められた。
- 28) 喘息児から得られた試料を用いてウイルス検索を行った。その結果、RV および RSV が優位に検出された。
- 29) 重症心身障害児(者)施設内の年間の感染症の発生動向を調査した結果、ノロウイルス、インフルエンザ、ヘルパンギーナ、原因不明の発熱疾患の流行が認められた。アンケート調査でも、病原体不明の呼吸器感染症の流行が頻繁に認められた (0.2 回/病棟/年)。
- 30) ARI ウイルス検査に伴う標準品の供給体制を構築するため、RSV、RV、PIV、hMPV のそれぞれの標準株および国内臨床分離株を増殖、遺伝子情報等を解析し、レファレンス参照株として保存した。
- 31) 地方衛生研究所等で頻繁に使用する病原体検出マニュアル充実のため、hMPV 検出マニュアルを作成した。

## A. 研究目的

本研究班全体の主要な目的は、ワクチン予防可能疾患のうち世界的根絶計画が進められているポリオおよびポリオの次のターゲットとされている麻疹について病原体サーベイランスの質的向上を行うとともに、ポリオおよび麻疹の制御過程で得られた知見を、未だサーベイランスシステムが確立していない他のウイルス感染症に応用することにある。ポリオサーベイランスシステムの改良は、日本および西太平洋地域におけるポリオフリーを維持するため、きわめて重要である。また、2012年の麻疹排除へ向け、世界的麻疹制御戦略に基づいた適切な病原体サーベイランスシステムを国内で整備することにより、我が国の麻疹コントロールの進展を精度の高い実験室診断により検証する必要がある。さらに、日常的に検出される腸管・呼吸器感染症の病原体サーベイランスシステムを構築することにより、新興・再興ウイルス感染症の発生を迅速かつ感度良く検出するための基盤情報および研究資源の蓄積を図る。

## B. 研究方法

質の高い疾患サーベイランスと連動した精度および感度の高い病原体サーベイランスによる、ウイルス伝播の検出および伝播機構の解析のため、以下の研究を行った。

1) 環境ウイルスサーベイランスを中国へ導入するた

め、サーベイランス手法に関する実技研修会を実施した。雲南省、広東省、山東省にフィールドを選定し、ウイルス濃縮法の予備試験を実施した。

- 2) 輸入野生株や VDPV 伝播を監視するため、富山県の下水流入水中のポリオウイルスを検出し、分離株の性状を解析した。環境水からのウイルス検出法の改良を試みた。
- 3) 主に東南アジア諸国を旅行し、帰国時に名古屋空港検疫所で胃腸炎症状を訴えた人から分離されたウイルスのうち難中中性株を用い、遺伝子解析によるエンテロウイルス同定を実施した。
- 4) 2005～2007 年の 3 年間に三重病院小児科病棟に入院した児を調査対象とし、脳炎や脊髄炎など中枢神経障害を呈した症例について解析を行った
- 5) 長崎県下の小児科医院において、上気道炎症状を呈した患者より採取された咽頭ぬぐい液検体より、ウイルス分離・エンテロウイルス同定を行った。
- 6) 中国雲南省 CDC との共同研究により、AFP 検体に由来する非ポリオウイルスエンテロウイルスの分子系統学的解析を行った。
- 7) エンテロウイルス VP1 領域のゲノムを高感度に増幅する VP1 CODEHOP PCR の有用性について基礎データの蓄積を行った。
- 8) ヒトエンテロウイルス標準株について、ウイルスレセプターの発現とウイルス増殖を検討した。HEp2 細胞、RD 細胞、Vero 細胞のレセプター発現は 4 種類の抗体を用いた FACS により解析した。
- 9) ヒトパレコウイルス (HPeV) 感染症の効果的な制御および感染源の解析のため、年齢別健康人血清を

- 用いて HPeV1~3 型の抗体保有状況を解析した。
- 10) アイチウイルス複製機構を明らかにするため、レプリコン RNA を作製し Vero 細胞での複製能を解析した。キャプシドタンパク質を EGFP と置換したウイルスポリプロテインおよびその L 領域欠失体の細胞内局在を解析した。
  - 11) NOD/SCID マウスに EV71 をアダプトさせ、マウス感染に必要とされる変異を同定した。マウスアダプト変異および弱毒化変異を導入し、EV71 感染の組織特異性および過齢に与える弱毒化変異の影響を解析した。
  - 12) 週令の異なる IFN レセプター欠損 PVR-tg マウス (PVR-tg/Ifnar KO) を用いて、ポリオウイルス経口感染マウスモデルの改良を行った。EV71 病原体サーベイランスおよび感染実験モデル樹立のため、EV71 特異的受容体の同定を試みた。
  - 13) これまでに実施された野生株ポリオウイルス保有施設調査手法と調査結果の再評価を実施し、WHO のフォーマットによる、野生株ポリオウイルス実験室封じ込め調査報告書 (ドラフト) を作成した。
  - 14) 麻疹疑い患者から採取された血液および咽頭拭い液について、麻疹遺伝子検出、特異的 IgM 抗体測定を行った。2007 年、麻疹による休校が最も多かった東京都において、麻疹重症化例および死亡例に関する調査を行った。麻疹に関する基礎情報を DVD 等配布可能な画像資料にまとめた。
  - 15) 血清抗体測定法のうち、HI 法は病原体検出マニュアルに準拠し、EIA 法および PA 法は、市販キットを用いて実施した。NT 法に関しては Vero/hSLAM 細胞を用いた試験法を検討した。イムノクロマト法による麻疹抗原検出法を検討した。
  - 16) 乾燥濾紙血液と血清を同時に作成し、麻疹抗体価の相関を検討した。抗体価測定は、セロディア麻疹抗体価測定キット (PA 法) を用いた。
  - 17) 小児麻疹については小児科定点等から、成人麻疹については基幹定点等からの情報について検討した。咽頭拭い液からの抽出 RNA を鋳型とした RT-PCR 法により、N 蛋白遺伝子を増幅した。
  - 18) 2007 年に千葉県で実施した全数報告に基づく医療機関および学校からの麻疹患者報告、また、感染症発生動向調査定点報告結果を解析した。サーベイランスに基づく病原体定点医療機関から収集した検体、集団発生時、散発発生時に依頼のあった検体について検討した。
  - 19) 感染力麻疹ウイルスの長期保存には不相当とされる温度条件で保存した検体について、Vero/hSLAM 細胞上でのウイルス分離と nested RT-PCR 法を比較した。愛知県感染症情報センターに寄せられた麻しん全数把握事業への報告及び感染症発生動向調査の定点報告結果を解析した。
  - 20) 麻疹患者から分離された D5 型野生株ウイルス由来合成 RNA を標準 RNA として用いて、病原体検出マニュアルによる RT-PCR 法および種々の Real-time RT-PCR 法について比較した。
  - 21) 堺市内の麻疹疑い患者に由来する 90 例の咽頭ぬぐい液および末梢血液を対象に Vero SLAM 細胞によるウイルス分離と遺伝子検出を行った。2007 年の麻しん流行期は、内科医師会、皮膚科医会が参画したサーベイランスを実施した。
  - 22) 沖縄県の麻疹疑い例の咽頭ぬぐい液及び末梢血液が採取した。これらの臨床検体は、常法にて RNA 抽出後、病原体検査マニュアルに基づいて N 遺伝子の RT-PCR、nested-PCR を実施した。また、咽頭ぬぐい液は前処理後、常法にて Vero/hSLAM 細胞に接種した。PCR 陽性検体についてはダイレクトシーケンスを行い、得られた MV の N 遺伝子について分子系統樹を作成した。
  - 23) RT-LAMP 法は、報告されている primer を用い、Loopamp 濁度測定装置により 63°C、60 分間増幅を行い、濁度を経時的に測定した。麻疹および風疹ウイルスの RT-PCR 法は、病原体検出マニュアルに準じて、1st-PCR、nested-PCR を実施した。
  - 24) 大阪府の麻疹疑い症例の咽頭拭い液あるいは EDTA 血液を採取し RNA を抽出した。HA 遺伝子の増幅は、病原体検査マニュアルのプライマー、NP 遺伝子の増幅には新規に作製したプライマーを組み合わせた RT-hemi-nested PCR を用いた。
  - 25) 1970 年代~2007 年までに分離された風疹ウイルス、19 株の E1 領域の遺伝子配列を決定した。日本のワクチン株ならびにその親株等、16 株とともに遺伝子配列を比較し、病原体検出マニュアルの RT-PCR 法の有効性を検証した。
  - 26) ARI ウイルス感染と病態について、感染ウイルス検索・解析を実施し、ウイルス型別、抗体の動態



等を検討した。

- 27) 医療施設内における ARI の感染実態を調査し、院内感染制御に関する方策を検討した。
- 28) 病原検索法（ウイルス分離培養法、遺伝子増幅法等）及び血清抗体測定法などの検査法の標準化、精度の向上等に関する検討を行った。
- 29) 全国レベルで ARI 分離株のウイルス学的解析および代表株の系統保存・遺伝子情報の集積を行った。
- 30) ARI ウイルス検査に伴う標準品（ウイルス株、抗血清、プローブ等）の供給体制を構築した。

#### 【倫理面についての配慮】

本研究で用いた臨床材料の採取は、「疫学研究における倫理指針」に基づき、材料提供者および家族の個人の尊厳及び人権の尊重、個人情報保護に配慮して実施した。

すべての動物実験は、動物福祉、実験倫理、飼育環境に出来る限り配慮した上で、「動物の愛護及び管理に関する法律」「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」「国立感染症研究所動物実験委員会規程」等に基づき使用動物数を最小限となるよう実施した。

組換え生物使用実験は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づいて実施した。文部科学大臣の確認が必要とされている組換え生物実験については、事前に「第二種使用等拡散防止措置確認申請書」を提出し、文部科学大臣から、使用する感染動物施設が適切な拡散防止措置を満たすことについての承認を受けたうえで実施した。

#### C. 研究結果

- 1) 2007 年 7 月、中国 CDC にて、北京市、上海市、山東省、広東省、広西省、四川省、貴州省、雲南省 CDC のポリオ実験室スタッフ及び EPI 疫学スタッフが参加し、環境ウイルスサーベイランス手法に関する実技研修会を実施した。腸管ウイルス検査技術について経験を有する 3 省にフィールドを選定し、山東省で事前試験を行った。
- 2) 2006 年から 2008 年の間に、富山県内の下水流入水から 35 株のポリオウイルスが分離されたが、すべて OPV-like ウイルスであった。健康な乳幼

児 134 名からもポリオウイルスは分離されなかった。環境水からの簡便かつ安全なウイルス回収法を検討し、ボルテックス攪拌による効率的なウイルス回収が可能であった。

- 3) 主に東南アジア諸国への旅行者に由来する、難中和株 8 株のうち、1 株はエコーウイルス 9 型であった。5 株は既知の「新型」エンテロウイルスで、2 株が EV-73、2 株は EV-79、1 株が EV-97 であった。のこり 2 株のうち 1 株は EV-98 とされ、1 株はコクサッキーウイルス A9 型近縁株であった。
- 4) 3 年間の小児科入院患者 4232 例中、15 例の脳炎、脳症、脊髄炎があり、エンテロウイルスが原因のものは 3 例で、原因として最多であった。エンテロウイルスの関与が疑われた例が 2 例あった。
- 5) 上気道炎患者 157 名から採取した咽頭ぬぐい液から 62 株のウイルスが分離され、HEV 49 株、ヒトパレコウイルス 1 株、アデノウイルス 3 株、未同定ウイルス 10 株であった。上気道炎患者から分離されたウイルス中、HEV は 79.0% を占めた。
- 6) 中国雲南省の AFP 患者から分離された 195 株の非ポリオエンテロウイルスは、HEV-A, B, C 群に、それぞれ、5, 34, 5 種類の血清型が含まれており、EV81, 83, 96 等日本では報告のない血清型が検出された。
- 7) エンテロウイルス VP1 領域のゲノムを高感度に増幅する VP1 CODEHOP PCR により、臨床検体から直接 PCR による VP1 遺伝子検出を試みたところ、多くの糞便検体において、細胞培養を経ることなくエンテロウイルスを検出・同定できた。検出感度は、細胞培養法と同程度以上であった。
- 8) HEp2 細胞は全てのレセプターを、RD 細胞は CAR と DAF を、Vero 細胞は CAR を発現していた。RD 細胞では、35 種類のウイルスの中、29 種類のウイルスが最も高い増殖性を示した。RD 細胞は、C 群エンテロウイルスの増殖に抵抗を示したが、レンチウイルスベクターにより ICAM-1 を発現させることにより、高い増殖性を獲得した。
- 9) HPeV1 抗体保有率は平均 93% で、HPeV3 は 72% であった。HPeV1 と HPeV3 は国内に広く蔓延しており、乳幼児期の不顕性感染が示唆された。HPeV2 抗体保有率は平均 21% と比較的 low、年齢群による抗体保有率の違いが認められた。

- 10) アイチウイルスレプリコンに由来する様々なジシストロニック RNA 複製能の解析により、L が他の非構造タンパク質全て、あるいは 2A 以外の全てのポリプロテインとして翻訳される必要が示された。L-EGFP-P2P3 は、感染細胞でのウイルス複製部位同様、細胞質に dot 状の局在を示したが、L 欠損蛋白では、dot 形成は認められなかった。
- 11) NOD/SCID マウスで、EV71 マウスアダプト変異株を分離し、マウスへの感染に必要なとされる変異を同定した。強い温度感受性を与える変異は、4 週齢マウスにおける病原性を顕著に低下させた。EV71 (S1-3') の全ての弱毒化変異を導入した変異株は、3~4 週齢のマウスで顕著な弱毒化を示した。
- 12) 週令の異なる PVR-tg/Ifnar KO を用いたポリオウイルス感染実験により、3 週令のマウスは接種後 1 週間以内に全頭が死亡し、4 週令以降抵抗性が高くなった。週令により特定の組織におけるウイルス増殖性が異なっていた。ヒトゲノム DNA を L929 細胞にトランスフェクション後 EV71 感受性細胞をスクリーニングし、感受性細胞株を樹立した。この細胞には EV71, CVA16 は感染するが、CVB1, PV は感染しなかった。
- 13) これまでに実施されたポリオウイルス保有率調査結果の再評価をもとに、野生株ポリオ実験室封じ込め調査報告書を作成し、2007 年 12 月の WHO 西太平洋地域ポリオ根絶認定委員会に提出した。
- 14) 麻疹疑い患者 9 名すべての検体から HA 及び NP 遺伝子が検出され、分子系統樹解析の結果、D5 (Bangkok, THA/93 に近縁) と確認された。東京都の麻疹重症化例についての調査は、297 診療科 (14.0%) から回答され、回収を継続中である。麻疹啓発 DVD の文部科学省関係者への試写の結果、全国の中学校、高等学校への配布依頼があった。より多くの関係者に使用してもらうことを目的として、感染症情報センターのホームページ (<http://idsc.nih.go.jp/disease/measles/Video/measlesVideo.html>) に公開した。
- 15) Vero/hSLAM 細胞でのブラック減少法を用いた NT 法は、CPE を用いた方法と比較して再現性が良好であった。HI 法は NT 法との比較で感度と特異性が低値であった。感染直後の高 PA 抗体血清においては NT 抗体価との相関が認められた。イムノクロマト法を用いた麻疹抗原検出系で咽頭スワブより抗原の検出が可能であった。
- 16) 妊婦全体での 1 : 16 以上の平均抗体保有率は、96.9%であったが、1986~1990 年出生群の抗体保有率は 91.6%と低値であった。1986~1990 年出生群を、それ以前の出生年群と比較すると、1 : 16 以上、1 : 128 以上、1 : 256 以上の抗体保有率が全ての出生年群より有意に低値であった。
- 17) 北海道における 2007 年の小児麻疹は、5 月から 6 月にかけてピークがみられ、10 月から再び上昇した。年齢階層別報告数は、10-14 歳の階層が最も多く、次いで 15-19 歳であった。37 例の咽頭拭い液のうち RT-PCR 陽性は 25 例 (68%) であり、全例が D5 型であった。
- 18) 千葉県の 2007 年の麻疹流行において、医療機関報告、学校報告、定点報告それぞれ 608 例、1699 例、193 例であった。年齢別報告数では、7-18 歳が 52.8%で半分以上を占めた。咽頭拭い液 137 検体中、培養陽性は 42 検体、PCR 陽性は 65 検体で、培養陽性のはすべて PCR 陽性であった。血清 68 検体中、IgM 陽性は 18 例、判定保留 6 例、陰性 44 例で、発症後 3 日目までは PCR 陽性 IgM 陰性例が認められた。
- 19) 室温保存検体は、ウイルス分離により 48 から 72 時間まで、PCR によっては 96 時間まで検出可能であった。4℃及び -20℃とも PCR では、21 日まで検出された。
- 20) 病原体検出マニュアルによる RT-PCR 法および種々の Real-time RT-PCR 法について比較したところ、SYBR Green RT-PCR 法により  $1-10^6$  copy/ $\mu$ l の麻疹ウイルス RNA を検出可能であり、nested RT-PCR 法とほぼ同等の感度であった。
- 21) 堺市の麻疹患者は、6 月に報告のピークがあり、小児の麻しんが 49 例 (42%)、15 歳以上の成人麻しん 67 例 (58%) と成人麻しんが優位を占めた。確定診断症例は 116 例 (57.1%) であり、単独の方法での陽性率は、RT-PCR 法 46 例 (39.7%)、抗体検査 26 例 (22.4%)、臨床診断 28 例 (24.1%) で、ウイルス分離は 1%に満たなかった。
- 22) 沖縄県の麻疹疑い例のうち、PCR 及びウイルス分離が実施されたのは 259 例 (89%) であり、麻疹確定症例は、5 年間で合計 75 例であった。麻疹確

定例のうち臨床症状のみによる診断は 2003 年の 9 例と 2004 年の 2 例であり、64 例 (85%) は検査による診断が行われた。検査 259 例中、52 例が PCR 陽性、そのうち 35 例でウイルスが分離された。県内で検出された遺伝子型 H1、D3、D5 の MV 株は、それぞれ国内他地域で検出されたウイルス株と同じクラスターに位置していた。

- 23) 麻疹ワクチン株を用いた解析により、RT-LAMP 法で  $\geq 0.11$  CCID<sub>50</sub> / test まで検出し得た。RT-PCR 法では、1st-PCR で  $\geq 1.1$  CCID<sub>50</sub> / test、nested-PCR で  $\geq 0.0011$  CCID<sub>50</sub> / test まで検出し得た。風疹ワクチン株では、RT-LAMP 法で  $\geq 0.012$  PFU / test まで検出し得た。RT-PCR 法では、 $\geq 1.2$  PFU / test まで検出し得た。
- 24) 大阪府内での 2007 年の麻疹発生者数は 907 名で、年齢別区分では 5 歳未満が 191 名、5 歳以上 14 歳未満が 284 名、15 歳以上が 431 名であった。52 症例のうち 22 症例は PCR 検査陽性、13 症例はウイルス分離陽性で、分離陽性の検体は全て PCR 陽性であった。麻疹ウイルス PCR の検出感度は HA および NP 遺伝子において  $10^{-0.4}$ TCID<sub>50</sub> で、所要時間は 1st PCR が 2 時間 36 分、2ndPCR が 2 時間 24 分であった。
- 25) 1970 年代～2007 年までに分離された風疹ウイルス、19 株の E1 領域の遺伝子配列を決定した。病原体検出マニュアルには nested RT-PCR で増幅できる 2 つの領域が記載されているが、すべての primer 配列内には、いずれかの株で変異があり、株間で検出感度が異なると予想された。日本の流行株は 10～20 年毎に Genotype が変化していた。
- 26) 山形県および群馬県の病原体サーベイランスの結果、2,250 件の鼻咽頭スワブから 808 株のウイルスが分離され、RSV が 76 株、hMPV が 62 株、RV が 32 株および PIV が 92 株であった。
- 27) 2003～2006 年間に群馬県立小児医療センター外来受診および入院した喘息児から得られた 157 検体を用いてウイルス検索を行ったところ、RV が 46 例、RSV が 43 例、エンテロウイルスが 18 例、その他のウイルスが 18 例、それぞれ検出された。
- 28) 山形県において分離された hMPV146 株について F 遺伝子の分子疫学解析を行い、多様な genotype の伝播を明らかにした。神奈川県 of RSV の N 遺伝

子に関する分子疫学解析の結果、Subgroup 間のホモロジーは高く、遺伝学的に近縁な RSV が関与していた。

- 29) 2002～2008 年間に分離された RSV (SubgroupA : 73 株, SubgroupB : 42 株) の抗 RSV ヒト化モノクローナル抗体に対する中和反応性を検討したところ、 $100_2^{15-16}$  倍の中和価が得られ、Subgroup 間で差はみられなかった
- 30) 新たに開発されたウイルス保存輸送液およびスワブ採取セットは、遺伝子検査にも適しており病原体サーベイランスへの活用が期待できる。JM cell culture tube は使用培養細胞によって増殖、維持培養が困難であること等の理由から病原体サーベイランスへの応用は限られていた。96well micro plate 改良法により、ARI ウイルスおよびその他のウイルスが効率良く検出可能となった。
- 31) 愛媛病院の重症心身障害児 (者) 病棟では、ノロウイルス、インフルエンザ、ヘルパンギーナ、原因不明の発熱疾患の流行が認められた。全国 74 重症心身障害児 (者) 施設を対象としたアンケート調査では、病棟内での感染症流行回数は合計 61 回であり、ノロウイルス、インフルエンザの流行が多く各々 16 回、12 回であった。最も多いのは病原体不明の呼吸器感染症の流行であった (0.2 回/病棟/年)。
- 32) ARI ウイルス検査標準品の供給体制を構築するため、RSV, RV, PIV, hMPV のそれぞれの標準株および国内臨床分離株の遺伝子情報を解析し、レファレンス参照株として保存した。
- 33) ARI ウイルス病原体検査マニュアルとして、RSV 病原体検査マニュアルについて遺伝子検査の追補版を作成中であり、新たに hMPV 編を稿了した。
- 34) 地方衛生研究所における ARI ウイルス病原体サーベイランスに関するアンケート調査の結果、インフルエンザ以外の、RSV, PIV, RV, hMPV などの検査に常時対応している機関は僅かであった。病原体検査法は遺伝子検査が主であり、分離培養を併行している機関は僅かであった。

#### D. 考察

- 1) 環境水、特に下水は産業廃液も含んでおり、サン

プル対象ポイントの状況により、ウイルス濃縮、回収、検出に影響を与える様々な物質が含まれている。中国における環境ウイルスサーベイランスにおけるウイルスの回収試験では、今後、定量的な回収率を検討する。

- 2) 富山県内の下水流入水からポリオウイルスが分離されたが、すべて OPV-like ポリオウイルスであった。調査期間中は、野生株および VDPV は検出されなかったが、これらのウイルスが侵入する可能性は常に存在するため、伝播の監視を続ける必要がある。「フィルター吸着溶出法」の改良法を検討した結果、エアロゾルの発生が危惧される超音波処理の代わりに、簡便なボルテックスミキサーを用いることが可能となった。
- 3) 海外渡航者の帰国時の糞便検体由来ウイルスから、従来の中和反応では同定されなかった 8 株中 7 株を新たに同定型別した。完全な同定には至らなかった残り 1 株についても、CV-A9 関連株であることが明らかになった。遺伝子解析が、エンテロウイルスの同定に有効な手段となることが示された。旅行帰国者により、国内に常在しない腸管ウイルスが常に運び込まれていることが明らかとなった。
- 4) 小児科入院患者の解析から、エンテロウイルス感染症と中枢神経合併症を迅速かつ正確に把握するためのサーベイランスシステムを強化するには、適切な検体採取・実験室診断法に関する指針の作成と、診断基準の統一が有用であると考えられた。
- 5) 上気道炎患者から分離されたウイルスのうち、HEV が約 80% と高率であったが、夏かぜの流行期間全体を通じたウイルス分離を行う必要がある。現行の培養細胞では高率に CV-A を分離することは難しいため、遺伝子解析等を用いた高感度検出法が必要である。
- 6) 中国雲南省のエンテロウイルスの分子系統学的解析により、他のアジア地域と異なる塩基配列を持つウイルスが雲南省で流行していることが明らかになった。molecular typing は迅速な血清型の同定を可能とするだけでなく、地域間伝播を推定するための有用なツールといえる。
- 7) エンテロウイルス VP1 領域のゲノムを高感度に増幅する CODEHOP PCR は、従来法に比べて高感度であるのみならず、多様性の高い VP1 遺伝子の配列を得ることができタイピングも容易である。二日間以内で同定を行うことが可能であり、高感度かつ迅速な遺伝子検出法として利用価値が高い。
- 8) ICAM-1 発現 RD 細胞は、臨床検体サンプルからの広範なエンテロウイルスの分離・培養に役立つと考えられる。
- 9) HPeV1 型と HPeV3 型は国内に広く蔓延している可能性が高く、乳幼児期の不顕性感染が示唆された。HPeV2 型の抗体保有率は平均 21% と比較的低い、ある程度の抗体保有が認められ、不顕性伝播の可能性が示された。
- 10) アイチウイルス L タンパク質は翻訳直後、ポリプロテインの一部として存在している間にポリプロテインの細胞内局在を決定し、複製複合体形成を導くと考えられる。
- 11) EV71 (Nagoya) 株に高い温度感受性を与える変異は、4 週齢のマウスにおける EV71 感染を顕著に低下させ、EV71 (S1-3') の全ての弱毒化変異を導入した変異株は、3-4 週齢の NOD/SCID マウスで顕著な弱毒化を示した。S1-3' 株の弱毒性は、各変異の協調的に働きによることが示唆された。
- 12) PVR-tg/Ifnar KO を用いたポリオウイルス感染実験により、経口感染を行なう週令は 3 週令が適当であると考えられた。今後、マウスの腸管でウイルスが効率よく増殖し、ヒトと同様、糞便からウイルス分離が行なえるか調べる必要がある。形質転換 L929 細胞数と EV71 感受性細胞数の比率から、導入された遺伝子はウイルスレセプターである可能性が高い。感受性細胞の感染特異性から既知の PVR や CAR ではないと考えられる。EV71 は、手足口病を起こす CVA16 と同一分子をレセプターとして利用している可能性が高い。
- 13) WHO 西太平洋地域ポリオ根絶認定委員会に提出した野生株ポリオ実験室封じ込め調査報告書ドラフトに対するコメントに対応し、今後、追加調査等を実施する。2008 年 6 月までに報告書最終版を作成し、ポリオ根絶認定委員会に再提出する。
- 14) 麻疹重症化例の早期把握と国民への情報提供は、今後の麻疹含有ワクチンの接種率向上と国内からの麻疹排除に極めて重要である。また、麻疹疑い症例の実験室確定診断が求められており、疑い時点での医療機関と研究機関との連携は迅速診断と

その後の早期対応に不可欠であると考えられた。今回作成した麻疹教育啓発用 DVD に対して各方面から多くの要望があり、麻疹教育啓発への活用が期待できる。

- 15) 世界レベルでの麻疹抑制対策の実現には実験室的確証に基づくサーベイランスシステムの構築が不可欠であり、わが国においても全数報告を踏まえた検査の必須化が必要とされる。HI、CF、PA 各法では感度と特異性のみならず、手技上の問題点も明らかになり、EIA 法による国際的標準化、統一化は可能なものと判断された。今後更に多くの施設で実施が可能な簡便で信頼度の高い麻疹実験室内診断法の開発・導入が必要である。
- 16) 検体の送付や保管が血清に比べ簡便な乾燥濾紙血液での抗体価測定は、麻疹抗体価測定にも応用可能であった。「北海道はしかゼロ作戦」以降、札幌市では高い接種率が維持されているが、若年者での secondary vaccine failure やワクチン未接種に起因する麻疹感受性者への積極的なワクチン接種が必要と考えられる。
- 17) 北海道における麻疹流行の開始時期と genotype 分析から、首都圏を中心とした本州での流行株が北海道に波及したと推察された。2007 年の流行のパターンとして、10 代の患者が多いことが特徴としてあげられる。その中にはワクチン接種歴のある例も含まれ、これまで実施されてきた 1 回接種では、不十分であることを示唆している。
- 18) 2007 年に行った千葉県の麻疹全数報告の学校報告、医療機関報告では、共に 1600 例前後の麻疹報告があり、小中高校生が半分以上を占めていた。封じ込め対策では、麻疹患者の早期診断が重要であり、培養陽性検体すべては PCR 陽性で PCR 陽性検体のすべてが培養陰性ではなく、PCR の検出感度が高いことが示唆された。麻疹疑い症例において、PCR および IgM 陰性例が目立ち、麻疹以外の症例が紛れ込んでいる可能性が示唆された。
- 19) Vero/hSLAM 細胞を用いたウイルス分離で陰性となった検体について PCR 法を行ったところ、4℃及び-20℃保存で 21 日間経過後も検出可能であった。今後患者検体を用いた検討が必要である。
- 20) 今後麻疹患者の発生が減少すると、ワクチン接種後の麻疹、修飾麻疹が増加することが予想される。

修飾麻疹の臨床症状は非定型的のことが多く、統一された方法による検査診断が必要である。現行マニュアルの nested RT-PCR 法は迅速性に欠けるため、異なった施設における共同研究による改良が必要である。

- 21) 1999 年、堺市で始まった麻しんの流行が大阪府内に拡大した苦い経験を持っており、2003 年から「麻しん全数報告の試み」を開始している。このシステムは医師会小児科医会と情報センターが連携して、麻しん患者発生情報をリアルタイムに市内の医療機関等に連絡するシステムであるが、ワクチン接種による根本的予防策が不十分であったことが本年の麻疹流行から推察された。
- 22) 沖縄県における PCR 検査及びウイルス分離は、2005 年以降 90%以上の高い実施率を維持しており、検査の重要性は各医療機関に認識されている。2006-2007 年の麻疹確定症例は、すべての症例について感染源及び感染経路が特定され、感染源はすべて県外と推定された。2 次・3 次感染例は短期間で終息し、PCR 検査による迅速診断と速やかな情報還元が、麻疹発生時における迅速かつ効果的な対応に寄与していた。
- 23) RT-LAMP 法と RT-PCR 法の検出感度を比較すると、RT-LAMP 法は RT-PCR 法(nested) の 100 分の 1 であり、RT-LAMP 法が優れているとはいえなかった。風疹ウイルスの場合は、RT-PCR 法 (nested) と比較しても RT-LAMP 法が勝っていた。検査所要時間では、RT-LAMP 法が麻疹・風疹ウイルスともに迅速性に優れていた。麻疹・風疹ウイルスの RT-LAMP 法は同一の増幅条件であるため、少数の検体であれば同時検索が可能であった。
- 24) 短時間かつ効率的な麻疹ウイルス RT-nested PCR 検査法を確立した。従来の方法では 1 回の PCR で 5 時間程度、2 回の PCR で 10 時間以上の時間が必要であったが、本法では 2 回の PCR で 5 時間程度と所要時間が従来法の半分となった。本法での検出感度は  $10^{-0.4}$ TCID<sub>50</sub> で、従来法より 10 倍感度が高い。得られた増幅産物は偽陽性なく全て麻疹ウイルス由来遺伝子であった。
- 25) 日本で過去に分離された風疹ウイルスの遺伝子配列を検討した。病原体検出マニュアルの RT-PCR 法に用いるすべての primer 配列内で変異が見つ

かり、反応条件によっては検出されない可能性が示された。プライマーの3'末端配列に変異がある株があり、検出不可能なウイルスの存在が示された。これらの情報を踏まえ、風疹ウイルス遺伝子をより広範囲に検出できる方法を今後検討する。

- 26) 地方衛生研究所におけるARIウイルスを対象にした病原体サーベイランスに関するアンケート調査結果から、インフルエンザ以外のARIウイルスに対する対応はさまざまであった。担当職員の在任期間が短く技術の定着が困難になりつつあるとの回答が散見された。
- 27) ARI症例の病原検索に関する研究結果から、RSV、hMPV、RV、PIV等のウイルスが数多く検出され、呼吸器症状のみならず感染喘息をはじめとした多様な疾患に関与していることが推定された。また地域で流行したRSVやhMPVの分子疫学解析から興味ある知見が得られた。
- 28) ARIレファレンス機能強化をはかるためレファレンス参照株、標準品等の整備を展開した。
- 29) 病原体検出マニュアルの整備を実施し、今年度はhMPV編を作成した。既刊のRSウイルス編では新たな技法を用いた病原検出方法を追補する予定である。今後、他のウイルスについても同様の対応が必要である。

## E. 結論

野生株ポリオウイルスあるいはVDPV伝播の検出および腸管ウイルス伝播機構の解析のため、より精度および感度の高い腸管ウイルス病原体サーベイランスについて研究を行った。AFPサーベイランス以外の病原体サーベイランスについて、国内および周辺国での技術評価・検討を行い、より感度の高い病原体サーベイランス手法の開発を行った。環境サーベイランスは、AFPサーベイランスを補完するポリオサーベイランスとして、今後重要であり、ポリオウイルス以外の腸管ウイルス感染症の検出にも応用可能である。腸管ウイルス感染症の病原体サーベイランス整備のためには、病原体の特性に合わせたサーベイランス手法の確立が重要であり、特定疾患の流行との関連を含め、疾患・病原体サーベイランス手法の整備と病原体検出・同定法の改良および標準化が必要である。ウイルス遺伝子

検出あるいはレセプター特異性を用いた新たな手法による病原体検出・同定法の開発が、今後必要とされる。また、ピコルナウイルスの感染増殖・病原性発現の比較解析に関する研究成果、および、これらの研究を通じて確立された感染動物モデルは、ウイルス感染伝播機構の理解に基づいた新たな病原体サーベイランスシステムを開発への応用が期待できる。

2008年から導入された臨床診断に基づく麻疹全数報告に対応した実験室診断体制の確立が、我が国でも急がれている。今年度の研究成果からも明らかのように、地方衛生研究所を中心とした公的検査機関では、現在、様々な手法により麻疹実験室診断を実施しており、麻疹疑い症例に由来する臨床検体を用いた各種検査法の比較評価が、きわめて重要である。本年度の研究結果から、地方衛生研究所では、麻疹ウイルス遺伝子検出あるいはウイルス分離による検査を主として用いており、検出された麻疹ウイルスの遺伝子型別・分子疫学的解析も広く実施されていることが明らかとなった。RT-PCR等による遺伝子検出は、WHOが推奨する世界的標準手法であるIgM-ELISAによる血清学的診断と比較して、発症初期における検出感度が高い結果が得られており、検査の迅速性のうえでも優れている。今後、国内麻疹実験室ネットワークにより標準化された遺伝子検出法とIgM-ELISAによる血清学的診断について、国内外の標準検査法を踏まえた上での検査精度・感度の比較データの蓄積が必要である。2007-2008年時点では、国内の麻疹流行は依然継続しており、麻疹疑い症例由来検体すべてに対する実験室確定診断は現実的ではないが、2012年の麻疹排除に向けて、今後、麻疹疑い症例が急減することが想定され、できるだけ多くの麻疹疑い症例について実験室確定診断を実施する必要がある。すでに麻疹疑い症例の全数報告が導入されている地域における実験室診断結果から、麻疹疑い症例由来検体における麻疹確定検査陽性率は必ずしも高くないことが明らかにされており、実験室診断の重要性は、我が国における麻疹排除の検証に向けて、今後より高くなると考えられる。

ARIの効果的なサーベイランス体制構築のため包括的な研究を行い、RSV、hMPV、RV等のさまざまなウイルスのARIへの関与を確定した。RSV、RVの感染喘息への関与を明らかにし、限定医療施設内の感染症流行実態を調査し原因の一部を確定した。RSV、hMPVにつ

いて詳細な分子疫学解析, 流行株の生物学的性状検討を行った。また、病原体サーベイランスに関わる実験室検査手法の改良, 新器材の評価等を行った。

## F. 健康危機情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Hamaguchi T, Fujisawa H, Sakai K, Okino S, Kurosaki N, Nishimura Y, Shimizu H, Yamada M: Acute encephalitis in an adult due to intrafamilial transmission of enterovirus 71. *Emerg Infect Dis* (in press)
- 2) Arita M, Ami Y, Wakita T, Shimizu H: Cooperative effect of the attenuation determinants derived from poliovirus Sabin 1 strain is essential for attenuation of enterovirus 71 in the NOD/SCID mouse infection model. *J Virol* 82: 1787-1797, 2008
- 3) Bingjun T, Yoshida H, Yan W, Lin L, Tsuji T, Shimizu H, Miyamura T: Molecular typing and epidemiology of non-polio enteroviruses isolated from Yunnan Province, the People's Republic of China. *J Med Virol* 80: 670-679, 2008
- 4) 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-expressing transgenic mice that are deficient in alpha/beta interferon receptor. *J Virol* 81:7902-7912, 2007
- 5) Takao S, Wakatsuki K, Yoshida H, Shimizu H, Wakita T: Neutralization Assays for Echovirus 18 Isolates in 2006. *Jpn J Infect Dis* 60: 65-66, 2007
- 6) Tuul R, Enkhtuya B, Nymadawa P, Kobune F, Suzuki K, Yoshida H, Hachiya M: Measles Outbreak after a Post-Honeymoon Period in Mongolia, 2001. *Jpn J Infect Dis* 60: 98-199, 2007
- 7) Fujimoto T, Shinohara M, Ito M, Okafuji T, Nishio O, Yoshida H, Shimizu H, Chikahira M, Phan GT, Ushijima H: Detection of dual-infected cases of adenoviruses and coxsackieviruses type B by real-time PCR but not by the conventional viral culture technique. *Clin Lab* 53: 605-9, 2007
- 8) Iwai M, Takizawa T, Nakayama T, Matsuura K, Yoshida H, Hasegawa S, Obara M, Horimoto E, Kurata T, Horie H: Evaluation of a two-dose administration of live oral poliovirus vaccine for wild and virulent vaccine-derived poliovirus type 1, 2, 3 strains in Japan. *Scand J Infect Dis*: 1-7, 2007
- 9) Mizutani T, Endoh D, Okamoto M, Shirato K, Shimizu H, Arita M, Fukushi 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: 322-24, 2007
- 10) Arita M, Nagata N, Iwata N, Ami Y, Suzaki Y, Mizuta K, Iwasaki T, Sata T, Wakita T, Shimizu H: An attenuated strain of enterovirus 71 belonging to genotype a showed a broad spectrum of antigenicity with attenuated neurovirulence in cynomolgus monkeys. *J Virol* 81: 9386-95, 2007
- 11) Tano Y, Shimizu H, Martin J, Nishimura Y, Shimizu B, Miyamura T: Antigenic characterization of a formalin-inactivated poliovirus vaccine derived from live-attenuated Sabin strains. *Vaccine* 25: 7041-6, 2007
- 12) Abiko C, Mizuta K, Itagaki T, Katsushima N, Ito S, Matsuzaki Y, Okamoto M, Nishimura H, Aoki Y, Murata T, Hoshina H, Hongo S, Ootani K: Outbreak of human metapneumovirus detected by use of the Vero E6 cell line in isolates collected in Yamagata, Japan between 2004 and 2005. *J Clin Microbiol* 45: 1912-1919, 2007
- 13) Numazaki K: Current problems of measles control in Japan and western pacific region.

- Vaccine 25: 3101-3104, 2007
- 14) Haga T, Murayama N, Shimizu Y, Saito A, Sakamoto T, Morita T, Komase K, Nakayama T, Uchida K, Katayama T, Shinohara A, Koshimoto C, Sato H, Miyata H, Katahira K, Goto Y: Analysis of antibody response by temperature-sensitive measles vaccine strain in the cotton rat model. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis (in press)* 2008
  - 15) Momose F, Kikuchi Y, Komase K, Morikawa, Y: Visualization of micro-tubule-mediated transport of influenza viral progeny ribonucleoprotein. *Microbes Infect* 9: 1422-33. 2007
  - 16) Fujino M, Yoshida N, Kimura K, Zho J, Motegi Y, Komase K, Nakayama T. Development of a new neutralization test for measles virus. *J Virol Methods* 142: 15-20. 2007
  - 17) Report on Phase I wild poliovirus laboratory containment activities, Japan: Draft WHO report, 2007
  - 18) Country Progress Report on Maintaining Polio-free Status, Japan, 2006-2008: Draft WHO report, 2007
  - 19) 岩井雅恵, 堀元栄詞, 小原真弓, 長谷川澄代, 滝澤剛則, 倉田毅, 田中有易知, 田中桂子, 南部厚子, 上田順子, 嶋尻悟志. ポリオ流行予測調査: 富山県衛生研究所年報 30: 75-80, 2007
  - 20) 山下照夫, 伊藤 雅, 皆川洋子: 感染症発生動向調査におけるコクサッキーウイルス検出と臨床診断 1990年~2006年の総括(愛知県). *臨床とウイルス* 35: 160-169, 2007
  - 21) 高山直秀, 崎山 弘, 清水博之, 宮村達男, 加藤達夫, 梅本 哲: 麻疹ワクチン, 風疹ワクチン, ポリオ生ワクチン全国累計接種率 2006年度調査結果: *小児科臨床* 60: 41-48, 2007
  - 22) 小池智: ポリオウイルスの神経トロピズム. *蛋白質・核酸・酵素* 52: 1231-1236, 2007
  - 23) 小池智: ポリオの病態発現-遺伝子改変動物モデルを用いたアプローチ-, *J Vet Med 獣医畜産新報* 60: 827-830, 2007
  - 24) 小池智: ポリオウイルスのトロピズムと自然免疫. *臨床とウイルス* 35: 5-11, 2007
  - 25) 小池智: ポリオウイルスレセプタートランスジェニックマウス. *LABIO21* 31: 10-13, 2008
  - 26) 中野貴司: ポリオワクチン. *日本医師会雑誌* 135: 2191-2195, 2007
  - 27) 中野貴司: ポリオワクチン. *小児科臨床* 60: 1787-1794, 2007
  - 28) 中野貴司: 予防接種Q&A~ポリオ. *小児内科* 39: 1661-1671, 2007
  - 29) 清水博之: ポリオの疫学. *Journal of Clinical Rehabilitation* 16: 114-120, 2007
  - 30) 清水博之: エンテロウイルス感染症, *感染症* 37: 117-126, 2007
  - 31) 清水博之: 手足口病. *日本臨床* 65: 339-342, 2007
  - 32) 清水博之: ポリオワクチン接種後のワクチン関連麻痺. *日本医事新報* 4376: 114, 2008
  - 33) 大内好美, 田中千香子, 横井 一, 秋山美穂, 木村博一, 野田雅博, 田代真人, 市販ウイルス保存輸送液およびスワブ採取キットの評価. *臨床とウイルス*, 36, 1, 2008 (印刷中)
  - 34) 長野秀樹, 伊木繁雄, 佐藤千秋, 地主勝, 石田勢津子, 奥井登代, 岡野素彦. 北海道における麻疹PA抗体保有状況-過去5年(2002年から2006年まで)における感染症流行予測調査から-. *北海道立衛生研究所報*. 57: 79-82. 2007
  - 35) 地主勝, 伊木繁雄, 長野秀樹, 奥井登代, 岡野素彦. 2006年度の北海道における麻疹PA抗体保有調査. *北海道立衛生研究所報*. 57: 83-85. 2007
  - 36) 皆川洋子: 図説: 発症様式からみた遅発性ウイルス感染症の特徴. *日本臨床*, 65: 1356-1359, 2007
  - 37) 知念正雄, 浜端宏英, 糸数公, 譜久山民子, 平良勝也, 麻疹排除に向けた取り組み 沖縄県はしか'0'プロジェクト-全数把握事業と移入麻疹発生について-, *臨床と微生物*, 35, 1, 2008
  - 38) 駒瀬勝啓, 麻疹と麻疹ウイルス, *診療研究*, 431: 10-16.
2. 学会発表
- 1) 若月紀代子, 川本大輔, 香月隆延, 渡邊香奈子, 吉田弘: 福岡市における Human Parechovirus 4



- の分離 第 48 回臨床ウイルス学会. 富山市、2007 年 6 月
- 2) 吉田弘: シンポジウムⅡ「環境水系の感染症」: 第 48 回臨床ウイルス学会. 富山市、2007 年 6 月
  - 3) 帖佐徹: シンポジウムⅡ「環境水系の感染症」: 新興再興感染症対策へのアプライの現状 なぜ環境サーベイランスが必要か. 第 48 回臨床ウイルス学会. 富山市、2007 年 6 月
  - 4) 清水博之: シンポジウムⅡ「環境水系の感染症」: ポリオウイルスとエンテロウイルスにおけるゲノム遺伝子組換え. 第 48 回臨床ウイルス学会. 富山市、2007 年 6 月
  - 5) Shimizu H: Emergence and transmission of vaccine-derived polioviruses - Genetic recombination and prevalence of HEV-C- . Emerging Infectious Disease Workshop, Taipei, August, 2007
  - 6) 安部優子、小池智: ポリオウイルス感染による IFN 応答発動に関与するレセプターの検索. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌、2007 年 10 月
  - 7) 山下康子、清水博之、小池智: エンテロウイルス 71 感受性マウス L929 細胞の樹立. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌、2007 年 10 月
  - 8) 町田早苗、西村順裕、名和 優、伊藤 雅、清水博之: Human parechovirus (HPeV) 抗体保有状況の解析. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌、2007 年 10 月
  - 9) 水谷哲也、西村秀一、酒井宏治、前田 建、清水博之、遠藤大二、福士秀悦、西條政幸、緒方もも子、倉根一郎、森川茂: 新興ウイルス感染症の網羅的検出方法の確立と応用. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌、2007 年 10 月
  - 10) 有田峰太郎、脇田隆字、清水博之: エンテロウイルス疑似粒子を用いた抗エンテロウイルス薬の探索・評価. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌、2007 年 10 月
  - 11) 山下照夫、伊藤 雅、長谷川晶子、栄 賢司、皆川洋子: 海外帰国者から持ち込まれる多様なエンテロウイルスの遺伝子解析. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌、2007 年 10 月
  - 12) 佐々木潤ら: アイチウイルス L タンパク質がポリプロテインの細胞内局在におよぼす影響の解析. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌、2007 年 10 月
  - 13) 山下照夫、伊藤 雅、長谷川晶子、栄 賢司、皆川洋子: 海外帰国者から持ち込まれる多様なエンテロウイルスの遺伝子解析. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌、2007 年 10 月
  - 14) 永田典代、清水博之、阿部忍、長谷川秀樹、佐多徹太郎、倉田毅: Sabin 株由来不活化ポリオワクチンの経粘膜ワクチンへの応用の可能性. 日本ワクチン学会、横浜市、2007 年 12 月
  - 15) Koike S: Role of IFN response in the pathogenicity of neurotropic picornaviruses. 第 7 回あわじしま感染症・免疫フォーラム、
  - 16) 小池智, ポリオの病態発現—遺伝子改変動物モデルを用いたアプローチ—, 第 143 回日本獣医学会微生物分科会シンポジウム
  - 17) 小池智, ポリオウイルスの tissue tropism , 第 31 回阿蘇シンポジウム
  - 18) 永嶋有希子、一見良司、中野貴司、延時達朗、高橋純哉、庵原俊昭、堀内功一: 第 10 回東海小児感染症研究会. 気管支喘息発作後に左下肢麻痺を発症した 11 女児の 1 例. 名古屋市、2006 年 12 月
  - 19) 鈴木由紀、中野貴司、松野紋子、田中孝明、一見良司、延時達朗、高橋純哉、下野吉樹、庵原俊昭: 第 242 回日本小児科学会東海地方会. エンテロウイルス感染症による中枢神経合併症について. 津市、2008 年 2 月
  - 20) Numazaki K. Current strategies of measles elimination in western pacific region. 5th World Congress of the World Society for Pediatric Infectious Diseases, Bangkok, Thailand , November 15-18, 2007
  - 21) 続木雅子ほか: 愛知県麻しん全数把握事業における平成 19 年患者発生状況について. 平成 19 年度愛知県公衆衛生研究会、愛知県大府市、2008 1 月
  - 22) 内野清子、三好龍也、田中智之. 堺市における 2007 年麻しん流行疫学と麻しん対策. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌、2007 年 10 月
  - 23) 平良勝也、岡野祥、仁平稔、中村正治、沖縄県における麻疹全数把握システムの実施状況. 日本

獣医公衆衛生学会、香川、2008年2月

- 24) 海野幸子、大槻紀之、庵原俊昭、浅野喜造、岡田賢司、田代真人、駒瀬勝啓、風疹パネル血清候補の評価: 中和抗体価に関して、第 48 回日本臨床ウイルス学会、富山、2007年6月
- 25) 樋口彰、駒瀬勝啓、中山哲夫、SSPE(亜急性硬化性全脳炎) ウイルスの細胞融合能の解析。第 55 回日本ウイルス学会学術集会。札幌、2007年10月
- 26) 二宮健吾、中山哲夫、駒瀬勝啓、竹内薫、永田恭介、ムンプスウイルス星野株のリバースジェネテックス系構築。第 55 回日本ウイルス学会学術集会。札幌、2007年10月
- 27) 澤田成史、駒瀬勝啓、中山哲夫、RS ウイルスの外殻蛋白を発現するキメラ麻疹ウイルスの作製。第 55 回日本ウイルス学会学術集会。札幌、2007年10月
- 28) 坂田真史、駒瀬勝啓、中山哲夫、弱毒麻疹生ワクチン KRT 株が示す温度感受性を担うゲノム領域の同定。第 55 回日本ウイルス学会学術集会。札幌、2007年10月
- 29) 百瀬文隆、菊池雄士、駒瀬勝啓、森川裕子、新

規抗インフルエンザウイルス NP モノクローナル抗体によるウイルス RNP 複合体の可視化。第 55 回日本ウイルス学会学術集会。札幌、2007年10月

- 30) 大橋喬、菊池雄士、駒瀬勝啓、百瀬文隆、森川裕子、H5N1 型高病原性鳥インフルエンザウイルス HA に結合する中和モノクローナル抗体のエピトープ解析。第 55 回日本ウイルス学会学術集会。札幌、2007年10月
- 31) 佐藤弘、多屋馨子、駒瀬勝啓、田代真人、岡部信彦、我が国における麻疹及び風疹に対する抗体保有状況 (2006 年度感染症流行予測調査より)、第 11 回日本ワクチン学会学術集会。横浜、2007年12月
- 32) 大槻紀之、田代真人、駒瀬勝啓、風しんワクチン株の全塩基配列の決定とワクチン品質管理への応用、第 11 回日本ワクチン学会学術集会。横浜、2007年12月

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

**厚生労働科学研究費補助金**  
**平成 19 年度 新興・再興感染症研究推進事業**  
**ウイルス感染症の効果的制御のための病原体サーベイランスシステムの検討**

**ピコルナウイルス研究小班**

|        |  |  |
|--------|--|--|
| 主任研究者： | 清水博之   | 国立感染症研究所 ウイルス第二部   |
| 分担研究者： | 小池 智<br>帖佐 徹   | 東京都神経科学総合研究所 微生物研究部門<br>国立国際医療センター 国際医療協力局   |
| 研究協力者： | 吉田 弘、有田峰太郎、西村順裕<br>岩井雅恵<br>山下照夫、伊藤 雅、皆川洋子<br>佐々木 潤<br>町田早苗<br>吾郷昌信<br>中野貴司<br>中村貴史 | 国立感染症研究所 ウイルス第二部<br>富山県衛生研究所<br>愛知県衛生研究所<br>藤田保健衛生大学 医学部<br>埼玉医科大学 医学部<br>長崎県環境保健研究センター<br>国立病院機構三重病院 臨床研究部<br>千葉県がんセンター 研究局 |

**研究要旨**

野生株あるいはワクチン由来ポリオウイルス伝播の検出およびポリオウイルス伝播機構の解析のため、ポリオウイルス病原体サーベイランスについての研究を行った。世界的根絶に向けて、さらに高い感度および精度のサーベイランスが要求されているポリオウイルスの病原体サーベイランスの改良に関する研究を進めるとともに、多様な疾患に関与する腸管ウイルス感染症に対する病原体サーベイランス・システムに関して、以下の研究を行った。

- 1) 中国CDCにて、環境ウイルスサーベイランス手法に関する実技研修会を実施した。中国国内3省にフィールドを選定し、事前試験を実施した。
- 2) 2006～2008年に、富山県内の下水流入水から35株のポリオウイルスが分離されたが、すべてOPV-likeポリオウイルスであった。健康な乳幼児134名からもポリオウイルスは分離されなかった。ボルテックス攪拌による効率的なウイルス回収が可能であった。
- 3) 主に東南アジア旅行者に由来する未同定エンテロウイルス8株の遺伝子解析により、1株はエコー9型、5株は新型エンテロウイルスと同定された。他はEV-98およびコクサッキーウイルスA9型近縁株であった。
- 4) 3年間の小児科入院患者4232例中、15例の脳炎、脳症、脊髄炎があり、エンテロウイルスが原因のものは3例で、原因として最多であった。それ以外に、エンテロウイルスの関与が疑われた例が2例あった。
- 5) 上気道炎患者157名から採取した咽頭ぬぐい液から62株のウイルスが分離(分離率40%)され、分離されたウイルス中、エンテロウイルスは79.0%を占めた。
- 6) 中国雲南省のAFP患者から分離された195株の非ポリオエンテロウイルスは、A、B、C群エンテロウイルスには、それぞれ、5、34、5種類の血清型が含まれていた。EV81、83、96等日本では報告のない血清型の流行が推定された。
- 7) エンテロウイルスVP1領域のゲノムを高感度に増幅するVP1 CODEHOP PCRにより、多くの糞便検体において、細胞培養を経ることなく、高感度にエンテロウイルスを検出・同定することが可能であった。

- 8) RD 細胞は、35 種類のエンテロウイルスの中、29 種類が高い増殖性を示したが、C 群エンテロウイルスの増殖に抵抗を示した。ICAM-1 発現 RD 細胞は、C 群エンテロウイルスに対する高い増殖性を獲得した。
- 9) HPeV1 型の抗体保有率は平均 93%、HPeV3 型は 72%であり、乳幼児期における不顕性感染として広く蔓延している可能性が示唆された。HPeV2 抗体保有率は比較的強く年齢群による抗体保有率の違いが認められた。
- 10) アイチウイルス RNA 複製能の解析により、ゲノム複製には、L 蛋白質が他の非構造タンパク質全て、あるいは 2A 以外のポリプロテインとして翻訳される必要があることが示された。L-EGFP-P2P3 は、細胞質に dot 状の局在を示したが、 $\Delta$ L-EGFP-P2P3 では dot 形成は認められなかった。
- 11) NOD/SCID マウスで、EV71(Nagoya)マウスアダプト変異株を分離し、マウスへの感染に必要とされる変異を同定した。強い温度感受性を与える変異は、4 週齢のマウスにおける病原性を顕著に低下させ、EV71(S1-3') の全ての弱毒化変異を導入した変異株は、3 週齢および 4 週齢の NOD/SCID マウスで顕著な弱毒化を示した。
- 12) 週令の異なる PVR-tg/Ifnar KO を用いたポリオウイルス感染実験により、3 週令のマウスは接種後 1 週間以内に全頭が死亡し、4 週令以降徐々に抵抗性が高くなった。ヒトゲノム DNA を L929 細胞にトランスフェクションし、EV71 感受性細胞株を樹立した。この細胞には EV71, CVA16 は感染するが、CVB1, PV は感染しなかった。

## A. 研究目的

本研究班全体の主要な目的は、ワクチン予防可能疾患のうち世界的根絶計画が進められているポリオおよびポリオの次のターゲットとされている麻疹について病原体サーベイランスの質的向上を行うとともに、ポリオおよび麻疹の制御過程で得られた知見を、未だサーベイランス・システムが確立していない他のウイルス感染症に応用することにある。ピコルナウイルス研究小班においては、世界的な病原体サーベイランス体制が確立しているものの、世界的根絶に向けて、さらに高い感度および精度のサーベイランスが要求されているポリオウイルスの病原体サーベイランスの改良に関する研究を進めるとともに、多様な疾患に関与する多くの腸管ウイルス感染症に対する病原体サーベイランス・システムの検討を行う。日常的に検出される腸管ウイルス感染症の病原体サーベイランス・システムを整備することにより、新興・再興ウイルス感染症の発生を迅速かつ感度良く検出するための基盤情報および研究資源の蓄積を図る。

## B. 研究方法

精度および感度の高い腸管ウイルス病原体サーベイランスによる、野生株あるいはワクチン由来ポリオウイルス (vaccine-derived poliovirus; VDPV) 伝播の検出およびポリオウイルス伝播機構の解析のため、以下の研究を行った。また、ポリオウイルス以外の腸管

ウイルス感染症 (非ポリオエンテロウイルス、パレコウイルス、アイチウイルス、等) の病原体サーベイランスおよび感染・伝播・病原性発現機構について、以下の研究を行った。

- 1) 疾患に依存しないウイルス病原体サーベイランス・システムである環境ウイルスサーベイランスを、中国へ導入するため、サーベイランス手法に関する実技研修会を実施した。腸管ウイルス検査技術について経験を有する雲南省、広東省、山東省にフィールドを選定し、環境ウイルスサーベイランスのためのウイルス濃縮法の子備試験を実施した。
- 2) 顕性・不顕性を含めた地域住民のウイルス感染状況を把握し、輸入野生株や VDPV 伝播を監視するため、富山県の下水流入水中のポリオウイルスを検出し、分離株の性状を解析した。環境水からのウイルス検出感度の高い「フィルター吸着溶出法」を改良し、より簡便、かつ安全な方法となるよう検討を試みた。
- 3) 1989 年～2001 年に、主に東南アジア諸国を旅行し、帰国時に名古屋空港検疫所で胃腸炎症状を訴えた人 3,115 名中 58 名から分離されたウイルスのうち、既知のエンテロウイルス抗血清で中和されなかった 8 株を用い、遺伝子解析によるエンテロウイルス同定のため VP1 領域の遺伝子解析を実施した。
- 4) 小児におけるエンテロウイルス 71 (EV71) 中枢神