

経合併症例を把握し、効果的なサーベイランスの実施に役立てることを目的として、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た。これら患者のうち、脳炎や脊髄炎など中枢神経障害を呈した例について解析を行った

- 5) 夏かぜにおけるエンテロウイルスの侵淫状況を明らかにするため、2007年、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216検体を材料とした。ウイルス分離にはHEp-2、RD-18S、Caco-2、Vero細胞を使用した。ウイルスの同定は、抗血清を用いて中和法により行った。
- 6) ポリオを対象とした急性弛緩性麻痺 (AFP) サーベイランスに由来する糞便検体を利用し、アジア地域のウイルスゲノム情報の比較解析を行うため、中国雲南省CDCとの共同研究を実施し、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) ポリオウイルスを含むエンテロウイルスの迅速診断のため、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による、VP1遺伝子の増幅、シーケンス、ゲノタイピングを試み、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、エンテロ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解析法により、ウイルス増殖性は細胞における簡易ウイルス力価測定法によって検討した。
- 9) 我が国における、ヒトパレコウイルス(HPeV)の伝播状況および特定疾患と関連性については不明な点が多い。HPeV感染症の効果的な制御法や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) アイチウイルスの複製機構を明らかにするため、レプリコンに脳心筋炎ウイルスのIRESを導入した様々なジシストロニックRNAを作製しVero細胞での複製能を調査した。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(L-EGFP-P2P3)およびそのL領域欠失変異体(Δ

L-EGFP-P2P3)を発現するプラスミドを構築し、ポリプロテインの細胞内局在を解析した。

- 11) EV71感染マウスモデルを用いて、神経毒力および抗原性に関する解析を行うため、NOD/SCIDマウスにEV71(Nagoya)株をアダプトさせ、マウスへの感染に必要とされる変異を同定した。EV71(Nagoya)株に、マウスアダプト変異および弱毒化変異を導入し、NOD/SCIDマウスにおける感染への影響を解析した。EV71感染の組織特異性および週齢への依存性に与える弱毒化変異の影響を解析した。
- 12) ポリオウイルス感染伝播メカニズムの解析のためのマウスモデルを樹立するため、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。ポリオウイルス同様、重篤な中枢神経疾患を起こすEV71の病原体サーベイランスや感染実験モデルに応用するため、ヒトゲノムDNAをL929細胞にトランスフェクションし、EV71感受性細胞をスクリーニングすることにより、EV71特異的受容体の同定を試みた。

【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(北京市)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雲南省、広東省、山東省にフィールドを選定した。対象3省のうち山東省でのみ事前試験が行われ、広東省、雲南省では現在準備中である。
- 2) 2006年4月から2008年3月の間に、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。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を明らかにした。
- 3) 主に東南アジア諸国を旅行者に由来する、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株は既知のエンテロウイルスとは異なり新たにEV-98とされ、1株はコクサッキーウイルスA9型に近縁であった。
- 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され(分離率40%)、HEV49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CDCとの共同研究を実施し、エンテロウイルスの分子系統学的解析を行った。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、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・同定することができた。検出感度は、細胞培養法と同程度以上であった。
- 8) FACS解析より、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(CAV11、CAV13、CAV15、CAV18)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型の抗体保有率は平均93%で、HPeV3型は72%であった。HPeV1型とHPeV3型は国内に広く蔓延している可能性があり、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) アイチウイルスレプリコンに由来する様々なジシストロニックRNAの複製能解析により、ゲノム複製には、Lが他の非構造タンパク質全て、あるいは2A以外の全てと同一分子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、感染細胞でのウイルスRNA複製部位に類似して、細胞質にdot状の局在を示したが、 Δ L-EGFP-P2P3は細胞質に存在するものの、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週齢のマウスにおける病原性を顕著に低下させた。一方、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) 週齢の異なるPVR-tg/Ifnar KOを用いたポリオウイルス感染実験により、3週齢のマウスは接種後1週間以内に全頭が死亡し、4週齢以降徐々に抵抗性が高くなった。週齢によって特定の組織にお

けるウイルスの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し、EV71 感受性細胞をスクリーニングすることにより、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。

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の予備的試験では定性的なウイルスの回収試験を行ったが、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、ボルテックス攪拌によりウイルスが効率的に回収できることがわかった。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である。
- 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。完全な同定型別には至らなかった残り 1 株についても、CV-A9 と関連した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、適切な検体採取法ならびに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% と極めて高率であったが、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である。
- 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 VP1 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。CODEHOP PCR は、タイピングまで二日間以内で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) ウイルス増殖とエンテロウイルスレセプターの相互作用に焦点を当て解析した。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・培養に役立つことが期待される。
- 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% と比較的低いだが、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た。
- 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 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。EV71(S1-3') 株の持つ弱毒性は、各弱毒化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離乳直後の 3 週令が適当であると考えられた。今後、3 週令のマウスの腸管でウイルスが効率よく増殖し、ヒトなどと同様に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遺伝子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、同じ手足口病を起こす A 群エンテロウイルスである 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。

E. 結論

野生株あるいは 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、より精度および感度の高いポリオウイルス病原体サーベイランスについて研究を行った。ポリオウイルス病原体サーベイランスの世界的基準は、AFP サーベイランス由来の糞便検体からのポリオウイルス分離同定による。今回、AFP サーベイランス以外の病原体サーベイランス、とくに環境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。

ポリオウイルス以外の腸管ウイルス感染症の病原体サーベイランスは、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、AFP 由来糞便検体、海外渡航者からの糞便、中枢神経合併症例由来検体、呼吸器感染症由来検体、等に由来する臨床検体からの腸管ウイルスの検出が報告された。今後、特定疾患の流行との関連を含めた、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。また、本年度の研究成果で示されたように、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・同定法の開発が必要である。

ピコルナウイルス (ポリオウイルス、エンテロウイルス 71、アイチウイルス) 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、今後、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・システムを開発する際に応用が期待できる。

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, and Shimizu: 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 and 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, Simizu B, Miyamura T: Antigenic characterization of a formalin-inactivated poliovirus vaccine derived from live-attenuated Sabin strains. **Vaccine** 25: 7041-6, 2007
- 12) Report on Phase I wild poliovirus laboratory containment activities, Japan: draft WHO report, 2007
- 13) Country Progress Report on Maintaining Polio-free Status, Japan, 2006-2008: draft WHO report, 2007
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 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
- 17) 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
- 18) 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
- 19) 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
- 20) 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
- 21) 中野貴司: ポリオワクチン. **日本医師会雑誌** 135: 2191-2195, 2007
- 22) 中野貴司: ポリオワクチン. **小児科臨床** 60: 1787-1794, 2007
- 23) 中野貴司: 予防接種Q & A~ポリオ. **小児内科** 39: 1661-1671, 2007
- 24) 清水博之: ポリオの疫学. **Journal of Clinical Rehabilitation** 16: 114-120, 2007
- 25) 清水博之: エンテロウイルス感染症, **感染症** 37: 117-126, 2007
- 26) 清水博之: 手足口病, **日本臨床** 65: 339-342, 2007
- 27) 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
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応答発動に關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、福土秀悦、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

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成 19 年度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」
分担研究報告書

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
分担研究者 帖佐徹 国立国際医療センター
研究協力者 岩井雅恵 富山県衛生研究所、吉田弘 国立感染症研究所

研究要旨

環境ウイルスサーベイランス手法は腸管系ウイルス感染症を疾患報告によらず環境水から検出する方法である。中国 CDC、山東省 CDC、雲南省 CDC、広東省 CDC との共同研究により本法の費用対効果の検討を開始した。

A. 研究目的

途上国では、下痢症及び急性呼吸器感染症の小児死亡率・罹患率が極めて高く、その多くは水系腸管感染症である。しかし、これら疾患の流行予測及び感染源特定は、現在の疾患サーベイランスシステムでは困難である。環境ウイルスサーベイランスは、河川や汚水を濃縮し、直接病原体分離を行なう方法であり、途上国への導入の成功は、信頼性と経済効率性の高いサーベイランス確立を期待でき、研究の意義が高い。

環境ウイルスサーベイランス手法は、標準的な方法論が確立されておらず、特に環境水の濃縮法及び濃縮液からのウイルス検出法について都市工学分野を中心に様々な手法が考案されている。しかし途上国にて持続可能な方法論については十分な知見が得られておらず、導入の妥当性を評価する必要がある。そのため初年度は先行研究にて既に日本国内にて実績のある陰電荷膜吸着法の導入を図るため技術研修会、ならびに対象エリアの選定を行い予備実験を実施することで導入の妥当性を検討した。

B. 研究方法

2007 年 7 月 23-27 日中国 CDC (北京市)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 E P I 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及び実技研修会を実施した。腸管系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、2008 年 1 月よりウイルス濃縮法について回収法の予備試験を行っている。

予備試験はポリオワクチン株を用い、河川水を用いて添加実験を行うこととした。20, 50, 100CCID₅₀/ml のウイルス液を滅菌処理した下水 500 ml に加えたのち、MgCl₂ (最終濃度 0.05M) pH=3.5 に調整したものを準備。加圧式ろ過装置 (アドバンテック、K S T 142) にポアサイズ 0.45 μm のニトロセルロース膜 (アドバンテック A045A142C) を装着、濃縮を行った。そして膜を裁断し 10 ml の beef extract 中にいれ超音波ホモジナイザー (TAITEC, VP-5S, 50W 20kHz) で 1 分間処理し膜からウイルスを回収した。抽出液中のウイルスは細胞培養法で検出を行った。

C. 結果及び考察

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。そのため今回は定性的な試験としてウイルスの回収を定性的に行ったが今後は定量的な回収率を検討するものとする。なお対象 3 省のうち山東省でのみ事前試験が行われ、広東省、雲南省では現在準備中である。山東省の結果

では 20 CCID₅₀/ml のポリオウイルス添加実験の結果からでもウイルス検出が可能であった。今後定量的なデータを取りまとめ予定である。また山東省済南市にて 3 箇所（河川 1 箇所、下水 2 箇所）からサンプル採取を行う予定である。

D. 結論

共同研究の一環として中国山東省、雲南省、広東省で環境ウイルス調査を開始することとしたが、現地における研究セットアップに時間を要する。早急に採取ポイントの設定、ウイルス検出法を確立し、ウイルス検索を行うことを次年度の目標とする。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takao S, Wakatsuki K, Yoshida H, Shimizu H and Wakita T Neutralization Assays for Echovirus 18 Isolates in 2006 Japanese Journal of Infectious Diseases Jpn. J. Infect. Dis., 60 (1), 65-66, 2007
- 2) Tuul R, Enkhtuya B, Nymadawa P, Kobune F, Suzuki K, Yoshida H and Hachiya M Measles Outbreak after a Post-Honeymoon Period in Mongolia, 2001 Japanese Journal of Infectious Diseases Vol. 60 No. 4, P. 198-199, 2007
- 3) Fujimoto T, Shinohara M, Ito M, Okafuji T, 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. Clinical Laboratory 605-609, 2007

4) 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. Scandinavian Journal of Infectious Diseases. 2008, 40(3), 247 - 253 "

5) 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. Journal of Medical Virology 80:670-679, 2008

2. 学会発表

- 1) 吉田弘 シンポジウムⅡ「環境水系の感染症」環境水系の感染症：オーバービュー 第 48 回臨床ウイルス学会, 2007 年 6 月 2-3 日、富山市
- 2) 帖佐徹 シンポジウムⅡ「環境水系の感染症」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, 2007 年 6 月 2-3 日、富山市
- 3) 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, 2007 年 6 月 2-3 日、富山市

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」
協力研究報告書

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

協力研究者 岩井雅恵（富山県衛生研究所）

研究要旨

不顕性感染を含めた地域住民のポリオウイルス感染状況を把握することを目的に、ヒトの感染源調査とあわせて、下水流入水などの環境水中のポリオウイルス分離を行った。2006年4月から2008年3月の間に、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。今回の調査では、下水および乳幼児から野生株やワクチン由来ポリオウイルス（VDPV）は分離されなかったが、これらのウイルスの侵入や伝播の監視は、今後も必要であると考えられる。また、環境水からのウイルス検出方法を効率的にすべく、「フィルター吸着溶出法」のウイルス回収方法を検討したところ、ボルテックス攪拌によりウイルスが効率的に回収できることがわかった。

A. 研究目的

小児麻痺（ポリオ）の原因であるポリオウイルスを、世界中から根絶させることを目標として、世界保健機関（WHO）の主導によりワクチン接種等の感染予防対策が推進されている。WHOによるポリオ根絶計画は、AFPサーベイランス（急性弛緩性麻痺患者の報告とウイルス検査）をもとに進められている。しかしながら、ポリオウイルスは、ヒトへの感染時の麻痺発症率が約0.1%であり、不顕性感染例が多い。さらに、ヒトの腸管で増殖したポリオウイルスは、

糞便中に排泄された後、下水や河川を汚染させるため、ポリオ麻痺患者が報告されていない地域でも河川や下水から野生株が検出されることがある。ポリオ根絶とは麻痺患者がいなくなるだけではなく、ウイルスの根絶も意味するため、環境水ウイルス調査によるポリオウイルスの監視は、ポリオの根絶証明に必要であると考えられる。日本では野生株は根絶されているが、今後ポリオ流行地からウイルスが侵入する可能性は否定できない。また、生ワクチン接種者から二次感染によって麻痺患者が発生する

可能性や、免疫不全者等からワクチン由来ポリオウイルス（VDPV）が長期排泄される可能性等、問題が残る。

そこで、本研究では、乳幼児のポリオウイルス感染源調査と合わせて、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することで、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伝播の監視に役立てることを目的とした。また、環境水からのポリオウイルス検出方法には、「フィルター吸着溶出法」の他に、ポリエチレングリコールやガラスビーズを用いる方法等、種々の方法があるが、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に、検討を試みた。

B. 研究方法

1. 下水流入水の採取と濃縮

平成18年4月～平成20年3月の間に、富山県内の下水処理場において、月1回前処理水を2リットル採取した。下水処理場は、県西部地区の流域下水道の処理施設であり、処理人口は約30万人である。

下水流入水は、3000rpm、30分間粗遠心し上清を回収後、以下の2方法「ポリエチレングリコール法」「フィルター吸着溶出法」により濃縮した。

「ポリエチレングリコール法」：粗遠心上清に、最終濃度8%になるようにポリエチレングリコール6000を添加し、4℃、2時間攪拌した後、10,000rpm、30分間遠心しウイルスを濃縮沈殿させた。沈殿は4mLのリン酸緩衝液に懸濁し、ポアサイズ0.45 μ mのフィルターを通して雑菌を除き、ウイル

ス分離材料とした。

「フィルター吸着溶出法」：粗遠心上清にMgCl₂を最終濃度0.05Mとなるように加え、さらに0.5N HClを加えてpH3.5に調整し、陰電荷膜（Mixed cellulose ester type membrane フィルター、直径142mm、ポアサイズ0.45 μ m、ADVANTEC）にろ過することによりウイルスを吸着させた。次いでフィルターを細断して10mLの3%Beef extract液中で、超音波処理装置（TAITEC VP-5S、出力50W、周波数20kHz）を用いて1分間超音波処理することによりウイルスを誘出した。誘出液の雑菌を除き、ウイルス分離材料とした。

2. ポリオ感染源調査

ポリオ流行予測調査事業において、健康な乳幼児を対象にし、ポリオワクチン投与後2ヶ月以上経過した平成18年9月に12名、平成19年1月に61名、9月に10名、平成20年1月に51名の糞便を採取した。年齢区分ごとの検査対象者数は、0歳児14名、1歳児10名、2歳児2名、3歳児21名、5歳児5名、6歳児21名の計73名であった。ウイルスの検索は、厚生労働省・国立感染症研究所の「感染症流行予測調査事業検査術式」に準じて行った。また、ポリオワクチン接種歴も調査した。当該地区のワクチン接種率は、予防接種の手引き<第11版>に従い、接種者数を対象人員{0歳の人口の9/12+1歳の人口の6/12}×12/15}で除して求めた。なお、検体を採取するにあたり、本調査の主旨、およびプライバシーの保護に対する適切な予防措置が行われることなどについて説明し、承諾の得られた場合のみ検査を行った。

2. ウイルス分離同定

上記の各処理により得られた検体を、培養細胞 (Vero, MA104, RD-18S, HEp-2) に接種し、細胞変性効果を指標にウイルスを分離した。分離株は、エンテロウイルス NT 試薬 (デンカ生研) を用いた中和試験により同定した。

3. ポリオウイルス分離株の塩基配列の解析

分離株は、RNA 抽出キット (QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAGEN) を用いて RNA を抽出した。抽出 RNA にオリゴ dT₁₅ ~₁₈ および Super Script III Reverse Transcriptase (Invitrogen) を加え、逆転写反応で cDNA を作製後、PureTaq Ready-To-Go PCR beads (GE ヘルスケア) を用いて RT-PCR を行った。PCR 産物は、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。分離株の塩基配列は、ワクチン株 Sabin1, Sabin2, Sabin3 の塩基配列 (GenBank アクセション番号はそれぞれ AY184219, AY184220, X00596) と比較した。

4. ウイルス定量

マイクロタイター法によるウイルス定量は、ポリオウイルス 1 型 (Sabin1) では RD-18S 細胞、コクサッキーウイルス B1 型では MA104 細胞を用いて行い、ウイルス接種後 7 日目の CPE によって TCID₅₀/25 μ l を算出した。

5. 「フィルター吸着溶出法」におけるウイルス回収条件の検討

10ml の 0.05M MgCl₂ (pH3.5) を含む生理食塩水中に、ポリオウイルス 1 型または

コクサッキーウイルス B1 型を 10⁴TCID₅₀/25 μ l となるように加え、Mixed ester type cellulose フィルター (直径 47mm) に吸着させた。フィルターを細断し、10ml の 3% Beef Extract 液中に浸して、結果に示した各条件でウイルスをフィルターから溶出させた。ウイルス回収率 (%) は、各条件を 3 回ずつ繰り返して求めた。ウイルス量は、測定時に二次定量を行った。

C. 研究結果

1. 下水流入水中のポリオウイルス検出状況

2006 年 4 月から 2008 年 3 月までの 2 年間で、35 株のポリオウイルスが分離された (図 1)。血清型別では、1 型が 2006 年 4 月に 2 株、2007 年 11 月に 1 株、12 月に 1 株の計 4 株、2 型が 2006 年 5 月、6 月に 1 株ずつ、10 月に 5 株、11 月に 7 株、2007 年 5 月に 1 株、6 月に 3 株、11 月に 1 株の計 19 株、3 型が 2006 年 10 月に 1 株、11 月に 5 株、12 月に 1 株、2007 年 6 月および 10 月に 1 株ずつ、11 月に 3 株の計 12 株が分離された。下水処理場流域のポリオワクチン集団接種時期は、2006 年春期が 4/13-5/24、秋期が 9/7-10/18、2007 年春期が 4/11-5/24、秋期が 9/5-10/18 であり、ポリオウイルスは、ワクチン接種時期から約 2 ヶ月の間に検出された (図 1)。健康人の場合、腸管で増殖したウイルスは、通常 2 週間~1 ヶ月間排出されることから、これらのウイルスは、流域の地域のワクチン接種に関連して検出されたことが推測された。

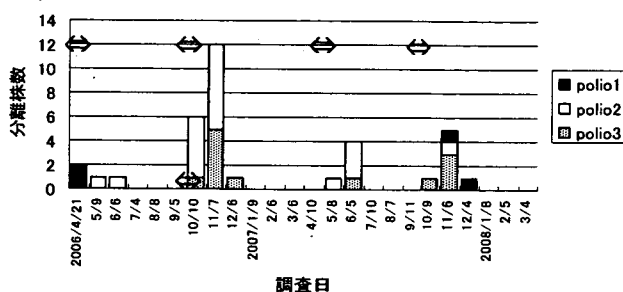


図 1. 下水流入水からのポリオウイルス検出状況. 矢印 (⇔) は、ポリオワクチン集団接種時期を示す。

2. ポリオウイルス分離株の遺伝子解析

下水から分離された 35 株について、ワクチン株や野生株と比較するために、VP1 領域 (1 型 906 塩基、2 型 903 塩基、3 型 900 塩基) の塩基配列を決定した (表 1)。その結果、分離株とワクチン株との VP1 領域の塩基配列の差異は、1 型では、0~0.33%、2 型では、0~0.22%、3 型では、0.11~0.56% であった。いずれもワクチン株と 1% 未満の差であるため、WHO の基準による OPV-like ポリオウイルスであった。野生株や VDPV はみられなかった。

分離株の遺伝子の組み換えの有無を検討するために、3D 領域の一部分 (384 塩基、Mahoney 株を基準にした position : 6110-6493) の塩基配列を、ワクチン株と比較した。その結果、2006 年 11 月、12 月および 2007 年 6 月に検出された 3 型 6 株 (Se/Nov-10/06 、 Se/Nov-11/06 、 Se/Nov-19/06、Se/Nov-20/06、Se/Dec-1/06、Se/Jun-7/07) は、3 型ワクチン株の 3D 部分領域の塩基配列とは 16.2% 異なり、他方、2 型ワクチン株とは 99.7%~100% 一致したため、2 型との組み換え株であると考えられた。また、2006 年 11 月に検出された 2

型 1 株 (Se/Nov-1/06) は、2 型ワクチン株の 3D 部分領域塩基配列と 6.6% 異なっており、Similarity Plot の結果から、position6340 付近で 1 型と組み換わっていると考えられた。残りの 28 株の分離株 28 株の 3D 部分領域塩基配列は、それぞれの型のワクチン株と 98.7~100% 一致していた。

表 1. 下水由来ポリオウイルス分離株の塩基配列のワクチン株との差異 (VP1 領域および 3D 領域)。

ポリオウイルス1型

分離株	ワクチン株との差異			
	VP1(906nt)	VP1(302aa)	partial 3D(384nt)	partial 3D(128aa)
Se/Apr-1/06	0%	0	0%	0
Se/Apr-4/06	0%	0	0%	0
Se/Nov-4/07	0.22%	0	0%	0
Se/Dec-1/07	0.33%	2(T108S, V244D)	1.0%	1(L43F)

ポリオウイルス2型

分離株	ワクチン株との差異			
	VP1(903nt)	VP1(301aa)	partial 3D(384nt)	partial 3D(128aa)
Se/May-1/06	0%	0	1.0%	K(L45P, T44S, L50F, T52S)
Se/Jun-12/06	0.11%	1(I1143T)	1.3%	K(L45P, L50F, K187R, V188G)
Se/Oct-1/06	0%	0	0.52%	2(L43P, T44S)
Se/Oct-3/06	0%	0	0%	0
Se/Oct-4/06	0%	0	0%	0
Se/Oct-5/06	0%	0	0%	0
Se/Oct-6/06	0%	0	0%	0
Se/Nov-1/06	0.11%	1(I1143V)	6.8%	2(R142Q, R143K)
Se/Nov-3/06	0.22%	1(I1143V)	0%	0
Se/Nov-4/06	0.22%	1(I1143V)	0%	0
Se/Nov-5/06	0.22%	1(I1143V)	0%	0
Se/Nov-6/06	0.22%	1(I1143V)	0%	0
Se/Nov-7/06	0%	0	0%	0
Se/Nov-18/06	0.22%	1(I1143V)	0%	0
Se/May-4/07	0.11%	1(I1143N)	0%	0
Se/Jun-8/07	0.11%	1(I1143T)	0%	0
Se/Jun-9/07	0.11%	1(I1143T)	0%	0
Se/Jun-11/07	0.22%	1(I1143V)	0%	0
Se/Nov-1/07	0%	0	0%	0

ポリオウイルス3型

分離株	ワクチン株との差異			
	VP1(900nt)	VP1(300aa)	partial 3D(384nt)	partial 3D(128aa)
Se/Oct-2/06	0.44%	1(T6I)	0%	0
Se/Nov-2/06	0.56%	2(T6I, M105T)	0.26%	1(A147V)
Se/Nov-10/06	0.11%	1(T6I)	18.2%	K(R18A, S20A, S21A, S121, S128, A217T)
Se/Nov-11/06	0.11%	1(T6I)	18.2%	K(R18A, S20A, S21A, S121, S128, A217T)
Se/Nov-19/06	0.11%	1(T6I)	18.2%	K(R18A, S20A, S21A, S121, S128, A217T)
Se/Nov-20/06	0.11%	1(T6I)	18.2%	K(R18A, S20A, S21A, S121, S128, A217T)
Se/Dec-1/06	0.44%	2(A54T, M105V)	18.5%	K(R18A, S20A, S21A, S121, S128, A217T)
Se/Jun-7/07	0.22%	2(T6I, A54V)	18.2%	K(R18A, S20A, S21A, S121, S128, A217T)
Se/Oct-2/07	0.11%	1(T6I)	0%	0
Se/Nov-2/07	0.44%	1(T6I)	0%	0
Se/Nov-3/07	0.56%	2(T6I, V39I)	0%	0
Se/Nov-5/07	0.56%	2(T6I, A54V)	0%	0

3. 乳幼児の糞便からのポリオウイルス検索

ポリオ流行予測調査感染源調査において検索した計 134 名の乳幼児の便からは、ポリオウイルスは分離されなかった (表 2)。これらの乳幼児のポリオワクチン接種時期

は、糞便採取日の 3 ヶ月～6 年前と様々であった。また、糞便採取日は、当該地区のワクチン集団接種日からは、3～4 ヶ月経過した時期であった。当該地区のワクチン接種率は、100～109%と高かった。

表 2. 乳幼児の糞便からのウイルス分離結果とワクチン接種状況

便採取日	年齢(歳)	検査数(人)	ポリオウイルス検出者数(人)	ワクチン接種者(人)	ワクチン接種者の最終接種日(人)						当該地区のワクチン集団接種状況		
					3～5ヶ月前	6～11ヶ月前	1～2年前	3～4年前	5～6年前	時期不明	日程	接種率(%)	
2006.9月13, 14日	0	12	0	9	9							2006.5月9～31日	100%
2007.1月29, 30日	0	2	0	1	1							2006.10月3日 ～11月3日	109%
	1	10	0	10	7	3							
	2	2	0	2			2						
	3	21	0	20		1	17			2			
	4	0	0										
	5	5	0	5				5					
	6	21	0	20	1			5	14				
2007.9月12, 13日	0	10	0	9	9						2007.5月1～30日	102%	
2008.1月28～30日	0	0	0									2007.10月3日 ～11月5日	102%
	1	15	0	15	7	8							
	2	3	0	3			3						
	3	9	0	9			9						
	4	8	0	8			2	6					
	5	3	0	3				3					
	6	13	0	12				3	9				
計		134	0	126	34	12	33	22	23	2			

4. ポリオウイルスの環境水からの効率的な検出方法の検討

下水からのウイルス検出方法のうち、「フィルター吸着溶出法」は、「ポリエチレングリコール法」よりもウイルス検出感度が高い。しかしながら、「フィルター吸着溶出法」は、超音波処理時のエアロゾルの発生による周囲へのウイルス汚染や、装置を実験室外へ持ち出せないなどのデメリットがある。先行研究で、ポリオウイルスは、0.05M MgCl₂ (pH3.5) では、ほぼ 100%、陰電荷フィルターに吸着することを確認している。そこで、フィルターから超音波処理を用いずに、ウイルスを効率よく回収できる条件

を見出すために、以下の 2 項目について溶出条件を検討した。

1) 溶出方法の検討: ボルテックスミキサーによる攪拌、超音波処理、手作業で攪拌の 3 方法により、それぞれ 0 分、30 秒、1 分 30 秒、2 分、2 分 30 秒、5 分間、3% Beef Extract 液 (pH9) 中でウイルスを溶出させた。

2) 溶出液の検討: Beef Extract (最終濃度 3%) の溶媒に、水 (pH9)、PBS (pH7.3)、0.05M EDTA、0.1% Tween 80、0.1% TritonX を用い、ボルテックスミキサーにより 0～5 分間攪拌させてウイルスを溶出させた。

図 3a、3b に、ポリオウイルス 1 型、またはコクサッキーウイルス B1 型の溶出方法ごとのウイルス回収率を示した。回収率の高さは、ポリオウイルス 1 型、コクサッキーウイルス B1 型ともに、ボルテックス ≧ 超音波処理 > 手で攪拌の順であった。処理時間は、ボルテックスミキサーで攪拌し

た場合、ポリオウイルス 1 型では 2 分間で、コクサッキーウイルス B1 型では 1 分間で、80% 以上のウイルスが回収された。図 3c、3d に、溶出液の検討結果を示した。Beef Extract の溶媒の種類によるウイルス回収率に差はみられなかった。

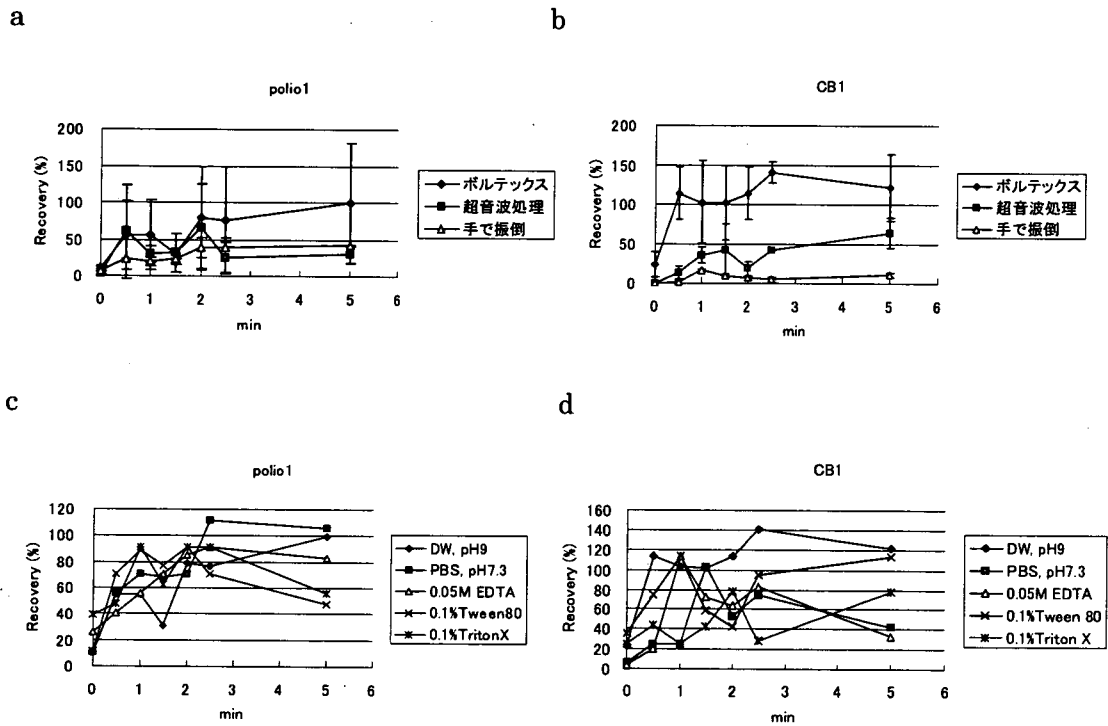


図 3. 「フィルター吸着溶出法」における種々の溶出条件下でのウイルス回収率。a, b は、それぞれポリオウイルス 1 型 (polio1)、コクサッキーウイルス B1 型 (CB1) の、ボルテックスミキサーによる攪拌、超音波処理、手作業で攪拌の 3 方法によるフィルターからのウイルス回収率の比較。c, d は、溶出液に用いる 3% Beef Extract 液の溶媒の違いによるウイルス溶出率の比較。

D. 考察

下水流入水からポリオウイルスが検出された時期は、流域地域のワクチン接種時期から約2ヶ月以内に限られ、それ以外の時期ではウイルスは検出されなかったため、いずれも生ワクチン接種に関連したものと推測された。分離株の塩基配列の解析結果から、これらはすべて OPV-like ポリオウイルスであり、野生株や VDPV はみられなかった。また、ポリオ流行予測感染源調査において、健康な乳幼児の便からポリオウイルスは検出されなかった。乳幼児の採便日は、ワクチン接種日から3ヶ月～6年前と様々であり、ポリオ生ワクチンの長期排泄者はみられなかった。このように、今回の調査期間中は、野生株および VDPV が検出されず、野生株の侵入の可能性は低いと考えられた。しかしながら、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。

より効率的なウイルス濃縮方法を探索するため、「フィルター吸着溶出法」におけるフィルターからのウイルス回収条件を検討した。その結果、ウイルス回収率は、ポリオウイルス1型、コクサッキーウイルス B1 型ともに、ボルテックスミキサーによる攪拌が超音波処理と同等もしくは上回った。したがって、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であることが明らかになった。溶出液の検討では、Beef Extract の溶媒の種類による回収率に差はみられなかったため、溶媒は水でよいことが判明した。今回は、生理食塩水中のウイルスを用いたため、今後は、下水または河川水を用いてウイルス回収条件を検討する予定である。また、リアルタイム PCR

により、ウイルス RNA の定量を行い、回収率を測定する予定である。

E. 結論

1. 下水流入水と乳幼児のポリオウイルス調査

2006年4月から2008年3月の間に、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 ポリオウイルスであった。健康な乳幼児の糞便のポリオウイルス調査では、ワクチン接種から2ヶ月以上経過した時点で採取された134名の便からは、ポリオウイルスは検出されなかった。下水流入水、乳幼児ともに野生株および 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存在するため、ウイルス伝播の監視を続ける必要があると考えられる。

2. ポリオウイルスの環境水からの効率的な検出方法の検討（生理食塩水）

「フィルター吸着溶出法」において、生理食塩水中のポリオウイルス1型およびコクサッキーウイルス B1 型を吸着させたフィルターを、3% Beef Extract 液中でボルテックスミキサーにより約2分間攪拌することで、80%以上のウイルスが回収された。超音波処理の代替にボルテックスミキサーを使用できる可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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. 2007; 28, 1-7.

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. 2007, 30, 75-80.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

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

分担研究者 清水博之 国立感染症研究所

協力研究者 山下照夫、伊藤 雅、皆川洋子 愛知県衛生研究所

研究要旨

海外旅行者から分離されたエンテロウイルスのうち中和型別不能であった 8 株の遺伝子解析を行った。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 株がエンテロウイルス 73 型 (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 株は既知のエンテロウイルスとは異なり新たに EV-98 とされ、1 株はコクサッキーウイルス A9 型に近縁であったが、構造タンパク質をコードする遺伝子の両端で組み換えが起きて中和されなくなった株と考えられた。エンテロウイルスの型別に遺伝子解析は有効な手段であった。海外、特に東南アジアからの旅行帰国者により、国内に存在しないウイルスは常に運び込まれているものと推測されるので、病原体検出サーベイランスシステムのような監視体制が求められる。

A. 研究目的

エンテロウイルスはピコルナウイルス科に属するウイルスで、各種の動物から分離される。ヒトエンテロウイルスは、中和反応を用いて 66 種の血清型に分類されていたが、近年これらの遺伝子解析が進み、同一の血清型であれば VP1 領域の塩基配列の相同性が 75% (アミノ酸で 88%) 以上あり、他の血清型とは 70% (同 75%) 以下の相同性である事が報告された。その結果に基づいて、多くの新型エンテロウイルスが同定されている。新型エンテロウイルスの抗血清の入手はほぼ不可能であるため、遺伝子解析による同定が必要とされる。我々は、本方法の有用性を確認するために、海外旅行者から分離されたウイルスで、血清型別分類が不能であった 8 株のウイルス同定を目的として、VP1 領域の遺伝子解析を実施

した。また、エンテロウイルスは自然界で組み換え現象が起きることが知られており、その遺伝子の特徴を知るためには VP1 領域の解析のみでは不十分とされている。そこで、VP1 領域以外の情報がない 4 つの分離株については、全塩基配列を調べた。

B. 研究方法

研究対象としたウイルスには 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 株を用いた。表 1 に各株が分離された旅行者の渡航国を示した。8 株全てを RD-18S 細胞に接種し、遠心上清からトリゾールを用いてウイルス RNA を抽出した。VP1 領域の遺伝子増幅のた

め Oberste らのプライマー 187(+) と 011(-)を用いて、one-step RT-PCR 法を行った。さらに、全塩基配列を決定するため Rotbart らの報告による MD91(+) および Olive らの OL68(-)プライマーをもちいて 5' UTR 領域から VP2 領域を、Caro らの報告による EUG3(+) および EUC2(-)プライマーをもちいて VP1 領域から 2C 領域を増幅した。さらに、既知の配列から 3C 領域から 3D 領域を増幅する EVB-3CP (+: 5' -CAYGTTGGTGARAATGGNCA-3') と EVB-3DN (-: 5' -ACRTGRTCTTGRGTGTTYTKGGA-3') を設計し増幅した。これらの領域の塩基配列から得た情報に基づき新たなプライマーを個々のウイルスについて設計し、残りの領域を増幅した。増幅した PCR 産物は精製後、pGEM-T ベクター (Promega) に組み込み、その配列を決定した。

塩基配列の相同性および系統樹解析は Genetyx program で行った。

コクサッキーウイルス A9 (CV-A9) 型との関連性が推察された TN94-0349 株については RD-18S 細胞で増殖後、塩化セシウムで精製し、モルモットで免疫血清を作成した。CV-A9 標準株と抗血清は国立感染研に分与されたものを用いた。これらの抗体価を中和反応で測定した。

C. 研究結果

VP1 領域の塩基配列を比較したところ、TN97-0487 株はエコーウイルス 9 型 (E-9) 標準株 (Hill 株) と 78.3% (アミノ酸で 88.5%) の相同性を示した (表 1)。そこで、力価の高い抗 E-9 血清 (100 単位) で中和反応を行ったところ中和が確認された。

TAS92-1482 株および T97-1831 株は、塩基配列により初めて新型エンテロウイルスとされたエンテロウイルス 73 型 (EV-73) と 77.4% (同 89.9%) および 83.7% (同 95.7%) と最も高い相同性を示した。TS94-0534 株および NH95-0601 株は EV-79 (バングラデシュにおける急性弛緩性麻痺患者からの分離株) と 86.7% (同 94.6%) および 92.6% (99.1%) の相同性を認めた。DT94-0227 株は EV-97 (同じくバングラデシュ分離株) と 85.3% (同 97.5%) の相同性であった。一方、T92-1499 株は 75% (同 88%) 以上の相同性を示す型が存在せず、エコーウイルス 17 型が最も高くて 67.1% (同 71.2%) であった。また、TN94-0349 株は CV-A9 標準株と 73.3% (同 79.9%) の相同性で、既知の株の中では最も高い相同性であったが、75% (同 88%) 以上という基準値を超えていなかった。CV-A9 標準株や分離株は VP1 領域 C 末端に RGD 配列を持つが、TN94-0349 株は RGD 配列を欠いていた。また、その抗血清は CV-A9 標準株を中和しなかった (表 2)。そこで、T92-1499 株と TN94-0349 株の VP1 領域の配列を国際ウイルス分類委員会 (ICTV) のピコルナウイルスグループに送付したところ、T92-1499 株は非公開株を含めて 75% 以上の相同性のウイルスが存在せず新型のウイルス (EV-98) とされた。TN94-0349 株は CV-A9 関連株だが RGD 配列が欠如しているという点からも従来の CV-A9 と同型とするには問題があるとされた。

T92-1499 株 (EV-98)、TN94-0349 株 ('CV-A9r'), NH95-0601 株 (EV-79)、および DT94-0227 株 (EV-97) の遺伝子は 7,413 ~ 7,427 塩基で構成されていた。非構造タ

ンパク領域 (P2 と P3) および 3' UTR 領域の塩基数は 4,106 塩基と 4 株とも同じであった。これら 4 株と既知の B 群エンテロウイルスについて、13 領域に分けて系統樹解析をおこなったところ非構造タンパク領域をコードする 2C、3AB、3C、3D、および 3' UTR 領域の系統樹解析では、我々の分離した 4 株と E-30、バングラデッシュで分離された EV-74、EV-75、EV-77、EV-85、EV-86、EV-87、EV-88、および EV-97 は同一クラスターを形成した (図 1)。これらの株間相同性は 85% 以上なのに対し、TN94-0349 株と CV-A9 標準株の相同性は 79.4% であった。両株は VP1、VP2、および VP3 の構造タンパクをコードする領域では同一クラスターを形成するが、VP4 および 5' UTR 領域では再びクラスターを形成せず、5' UTR 領域では TN94-0349 株は、NH95-0601 株 (EV-79)、EV-74、EV-77、EV-86、および EV-97 と再びクラスター形成をした (図 1)。

D. 考察

遺伝子解析により、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できた。さらに 7 株中 6 株は抗血清が入手困難な新型のエンテロウイルスであることが判明した。また、完全な同定型別には至らなかった残り 1 株 (TN94-0349) についても、CV-A9 と関連した株であることは明らかになった。これらのことは、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を示すものである。

CV-A9 関連株とされた TN94-0349 株は、VP1、VP2、及び VP3 の構造タンパク質をコードする領域においてのみ CV-A9 と近縁であり、他の領域ではクラスター形成がされ

なかった。エンテロウイルスは、自然界において構造タンパク領域の両側で遺伝子組み換えが起こる事が知られている。TN94-0349 株も構造タンパクの両側で遺伝子組み換えが生じていることが推察できる。さらに、VP1 領域 C 末端の RDG 配列が存在しない事は、VP1 領域末端で組み換えが起こった可能性があり、そのために中和反応も起きず、相同性が 75% を超えない結果に繋がったものと考えられる。

今回、全塩基配列を決定した 4 株は全て、2C から 3' UTR の各領域で E-30 など 9 つの血清型のウイルスと同一のクラスターを形成した。E-30 以外は全てバングラデッシュで分離された株である。我々の 4 株はタイやネパールを旅行した人から分離されたものである。この事から、過去にこの地域で E-30 の様な増殖力の強いウイルスが流行し、これらの新型エンテロウイルスと同時感染し遺伝子組み換えが起こった可能性が指摘されている。

今回海外旅行者から分離された新型エンテロウイルス 7 株は、RD-18S 細胞上で容易に分離されたが、同時期から最近に至るまで日本国内での分離報告は見られない。このウイルスに対する抗体を日本人は保有していないと思われるもののこれらのウイルス感染症は幸い日本国内に広がらなかったと考えられた。今回分離同定型別した新型エンテロウイルスの病原性は明らかにされていないが、一旦国内に拡大した場合大きな流行につながる可能性もある。さらに、移行抗体を保有しない新生児が感染した場合重篤な症状になることが知られている。海外、特に東南アジア旅行により、これら国内に存在しないウイルスは常に運び込ま

れているものと推測されるので、病原体検出サーベイランスシステムのような監視体制が求められる。

E. 結論

海外旅行者から分離されたエンテロウイルスで、中和型別不能であった 8 株の遺伝子解析を行ったところ、6 株の型別ができた。1 株は既知エンテロウイルスとは異なる新型ウイルス（エンテロウイルス 98 型）であった。型別できない 1 株はコクサッキーウイルス A9 型が遺伝子組み換えされた株と推測された。エンテロウイルスの同定に遺伝子型別は有効な手段であった。

G. 研究発表

1. 論文発表

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(3)：160-169, 2007

2. 学会発表

山下照夫、伊藤 雅、長谷川晶子、柴 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、札幌、2007 10 月。

H. 知的財産の出願・登録状況

なし。