

播経路の違いが示唆された。

#### E. 結論

HPeV1～3 型の抗体保有状況を解析した。HPeV1 型の抗体保有率は平均 93%で、HPeV3 型は 72%であり、広く国内に蔓延していることが推測された。HPeV2 型の抗体保有率は平均 21%と低く、国内伝播が少なくなっている可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

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、平成 19 年 10 月 21 日～23 日、札幌

#### H.

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

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」  
研究報告書

アイチウイルス複製機構の解析

研究協力者 佐々木 潤 藤田保健衛生大学医学部講師

研究要旨

本研究は、アイチウイルスの複製機構を分子生物学的に明らかにすることを目的とする。今年度は、非構造タンパク質の一つである Leader (L) タンパク質の機能解析を行った。その結果、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、効率良く複製複合体形成を導くという、他のピコルナウイルスの L タンパク質では報告のない、新たな機能を有する可能性が示唆された。

A. 研究目的

アイチウイルスは、カキ関連の胃腸炎集団発生事例から、1989年に我が国で初めて分離されたピコルナウイルスである。胃腸炎との関連の有無の解明に向け、ウイルス発見以来日本とアジアで行われてきた疫学研究に加え、近年、ヨーロッパやブラジルでの血清疫学研究結果や胃腸炎患者便検体からのウイルス検出例が報告されるようになった。一方、病原体の増殖機構の理解が感染制御に不可欠であると考えられるが、本ウイルスの複製機構の解明のための研究はほとんど行われていない。そこで本研究は、アイチウイルスの複製機構を分子生物学的に明らかにすることを目的とする。

アイチウイルスの非構造タンパク質の一つである Leader (L) タンパク質は、他属のピコルナウイルスの L とアミノ酸配列に相同性の認められない、ユニークなタンパク質である。過去に行った L 領域欠失レプリコンの複製能解析により、L がウイルス複製に必須であることが明らかとなっている。今年度は、ウイルス複製における L タンパク質の機能をさらに詳細に検討した。

B. 研究方法

キャプシドコード領域をルシフェラーゼ遺伝子と置換したレプリコンに脳心筋炎ウイルスの IRES を導入し、様々なジストロニック RNA を作成した。これらの RNA について Vero 細胞での複製能を調査した。また、キャプシドタンパク質を EGFP と置換し、さらに 3C プロテアーゼを不活性化させ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 ( $\Delta$ L-EGFP-P2P3) を発現するプラスミドを構築し、Vero 細胞に導入後

EGFP 蛍光を観察して、ポリプロテインの細胞内局在を解析した。

C. 研究結果

ジストロニック RNA の複製能解析により、細胞でのゲノム複製には、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。一方、 $\Delta$ 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。

D. 考察

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いていることが考えられた。

E. 結論

他のピコルナウイルスの L タンパク質では報告のない、アイチウイルスの L 独自の機能が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：

第55回日本ウイルス学会学術集会  
(平成19年10月21-23日、札幌)

「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」

G. 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

「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」

エンテロウイルス 71 のマウス感染モデルの解析

主任研究者 清水博之 (国立感染症研究所 ウイルス第 2 部)

協力研究者 有田峰太郎 (国立感染症研究所 ウイルス第 2 部)

研究要旨 エンテロウイルス 71 (EV71) は、手足口病の原因ウイルスであるが、まれに重篤な神経病変を引き起こす。我々は、これまでにカニクイザルを用いた感染系を用いて、強毒 EV71 (BrCr-TR) 株を弱毒化した株 EV71 (S1-3') を確立した。この弱毒株は、ポリオウイルス 1 型ワクチン株の弱毒化変異のうち一般のエンテロウイルスの間で保存された部位にある変異を利用して構築されたものである。本研究では、EV71 (S1-3') 株に導入された各々の変異の影響を解析するために、NOD/SCID マウスを用いて EV71 のマウス感染モデルを作製した。その結果、EV71 (S1-3') 株の持つ弱毒性は、各々の弱毒化変異が協調的に働くことで生じる強い弱毒化作用により支えられていることを明らかにした。

A. 研究目的

エンテロウイルス 71 (EV71) は、手足口病の原因ウイルスであるが、まれに重篤な神経病変を引き起こす。EV71 の感染モデル系として、サルおよびマウスの実験系が報告されている。しかし、一般の EV71 分離株はマウスには感染できず、マウスへの感染には変異の導入が必要である。マウスにおける実験は、サルと比べ多くの個体数が利用可能であり、飼育や取り扱いが比較的容易であるという利点を持つ。

我々は、これまでにサルにおける感染モデル系を利用して、弱毒株 EV71 (S1-3') の神経毒力および抗原性に関する解析を行ってきた。その結果、EV71 (S1-3') は、中枢神経系の中では脊髄でのみ効率よく複製することを明らかにした。本研究では、EV71 のマウス感染系を構築し、EV71 (S1-3') の弱毒性に関する解析を行った。

B. 研究方法

NOD/SCID マウスに EV71 (Nagoya) 株をアダプトさせ、マウスにアダプトした変異株を分離し、マウスへの感染に必要なとされる変異を同定した。次に、EV71 (Nagoya) 株に同定した変異および EV71 (S1-3') の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。特に、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に注目して解析を行った。

C. 研究結果と考察

EV71 (Nagoya) 株を NOD/SCID マウスの脳内で継代することで、NOD/SCID 株に麻痺をもたらす変異株を得た (EV71 (NOD/SCID) 株)。この変異株の持つ変異のうち、2876 nt の変異により VP1 カプシドタンパクの 145aa がグリシンからグルタミン酸に変異することが、EV71 (Nagoya) 株の NOD/SCID マウスにおける感染に重要であることが明らかとなった。EV71 (Nagoya) 株に、このアダプト変異および EV71 (S1-3') の変異を導

入し、NOD/SCID マウスにおける感染を解析した結果、EV71(S1-3')の弱毒化変異は組織特異性なしにウイルスの複製を低下させることが明らかとなった。また、3週齢のマウスでは、一部の弱毒化変異をいれた変異株では、どの変異株も麻痺を引き起こしたのに対し、4週齢のマウスではどの変異株でも麻痺を生じなかった。特に、高い温度感受性を与える変異(3D polymerase および 3' NTR の変異)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 マウスで麻痺を引き起こさなかった。

なし

#### D. 結論

EV71(S1-3')株の持つ弱毒性は、各々の弱毒化変異が協調的に働くことで生じる強い弱毒化作用により支えられていることが示唆された。

#### E. 健康危険情報

なし

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Minetaro Arita, Yasushi Ami, Takaji Wakita, and Hiroyuki Shimizu. 2008. 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. *Journal of Virology* **82**: 1787-1797

##### 2. 学会発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

研究年度＝2007

分担研究者名＝小池智（東京都神経科学総合研究所）

ポリオウイルス感受性動物モデルに関する研究

**研究要旨**

I. ポリオウイルスレセプタートランスジェニックマウス (PVR-tg) の週令による感受性の違いを検討した。腹腔内接種では3週令以下で非常に高い感受性を示すが、経口感染においても感受性は上昇することが判明した。今後ウイルスの腸管でも増殖の程度などを調べることにより経口感染モデルとなりうるか検討する。

II. ポリオウイルスと同様の急性脳脊髄炎を起こすエンテロウイルス71 (EV71) の遺伝子クローニングを目指し、マウス L929 細胞にヒトゲノム DNA を導入して EV71 感受性の細胞株を樹立することに成功した。この細胞には EV71, CVA16 は感染するが、CVB1, PV は感染しなかったため、ヒト EV71 受容体を発現して感受性を獲得したと考えられる。遺伝子単離ができれば EV71 に選択的なウイルス分離が行なえる可能性がある。

**I. ポリオウイルス感受性マウスモデルの研究**

**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。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を IFN $\alpha$ / $\beta$ レセプターを欠損した PVR-tg マウス (PVR-tg/Ifnar KO) を用いて示した。しかし、Ifnar という特殊な環境での実験はヒトの感染と差異が大きい可能性が高いため、なるべく正常な状況で感染効率が低い条件を探す必要がある。PVR-tg マウスにおいて週令が異なると感受性が変化することは漠然と知られているのみなので、腹腔内接種、経口接種でその差を調べることにした。

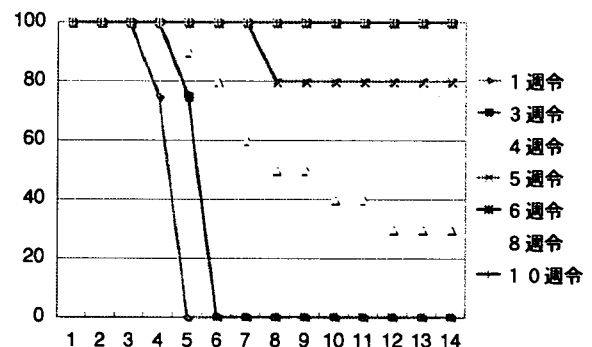
## B. 研究方法

- 1) B6-PVR-Tg21 マウスを交配し、週令の異なる時期に腹腔内もしくは経口でポリオウイルス I 型 Mahoney 株  $10^3$ PFU を接種し生死を観察した。
- 2) 3 週令マウスへの経口接種は前日より給水を停止し、翌日 sucrose を含むウイルス液をマウスにピペットマンで 25 $\mu$ l 程度ずつ合計 25 から 100 $\mu$ l 与えた。
- 3) 3 週令以下のマウスでは腹腔内接種で感受性が高いことが示されたので、 $10^3$ PFU 腹腔内接種後経時的にサンプリングを行ない、組織でのウイルス増殖を調べた。

## C. 研究結果と考察

図 1 に示すように腹腔内接種においては 1、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。1 週令のマウスは離乳しておらず経口感染実験を行なうことは難しいことから、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。

図 1 PVR-tg マウスのウイルス感受性の週令による変化 (腹腔内接種)



3 週令のマウスでポリオウイルス感受性が高くなった原因を探るため、ウイルス接種後の組織のウイルス量を測定したところ、ほとんどの組織においてウイルスのタイターは 6 週令と差がないが、膵臓では非常に大量のウイルスが回収された。週令によっては特定の組織におけるウイルスの増殖が変化すると結論された。

6 週令マウスでは  $10^7$ PFU $\sim$  $10^8$ PFU のウイルス投与によってもほとんど発症しないが、約 3 週令マウスでは  $10^6$  $\sim$  $10^7$ PFU でほとんどマウスが発症し死亡した。

表1 PVR-tg マウスのウイルス感受性の週令による変化（経口接種）

日 齢	Dose (PFU)	接種数	死亡数	死亡率
22	$2 \times 10^7$	6	6	100%
22	$2 \times 10^6$	6	5	83%
20	$6 \times 10^5$	6	2	33%
20	$6 \times 10^4$	6	1	17%

#### D. 結論

PVR-tg マウスは週令によってポリオウイルス感受性が変化し、感受性が高いのは3週令程度までの若いマウスである。腹腔内接種では特に脾臓でウイルス増殖が高くなり、その結果ウイルスが中枢神経系まで到達するチャンスが増えると考えられた。

経口感染経路においても6週令で発症しない  $10^6$ – $10^7$ PFU のウイルス量でも約3週令のマウスでは発症する。

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どうかなどを調べる必要がある。

## II. エンテロウイルス感受性マウス細胞株の樹立

### A. 研究目的

エンテロウイルス 71 (EV71) はピコルナウイルス科エンテロウイルス属グループ A に属し、通常はヒトに手足口病を引き起こすウイルスとして知られている。しかし、稀に重篤な脳脊髄炎、ポリオ様マヒを引き起こすこと

があり、1970年代に東ヨーロッパで、1990年代から2000年代にかけて東アジアで大きな流行が見られた。このウイルスの分離は Vero 細胞や RD 細胞を用いて行なわれているが、ウイルスの増殖効率がよくないことやウイルス分離後さらに他のエンテロウイルスとの識別をおこなわなければならないことが問題である。また野生株の神経毒力の測定はサルを用いることが唯一の現実的に可能な方法であり、マウスなどの小動物を用いた実験系を確立することが望まれる。もし、EV71 receptor (EV71R) が同定できれば、マウス細胞にヒト EV71R 遺伝子を発現させ、他のエンテロウイルスなどは感染しない EV71 特異的なスクリーニングシステムを構築することができ、EV71R 遺伝子を導入したマウスを作成すればトランスジェニック動物系を確立できる可能性がある。我々はその第一歩としてヒトゲノム DNA をマウス L929 細胞にトランスフェクションし、EV71 感受性を獲得したマウス細胞株を樹立した。

### B. 研究方法

#### 1) マウス形質転換細胞の作成

EV71 感受性を持たないマウス L929 細胞に感受性を持つヒト RD-A 細胞ゲノム DNA を neomycin 耐性遺伝子とともにトランスフェクションし、G418 耐性細胞株群を得た。

#### 2) EV71-EGFP の作成

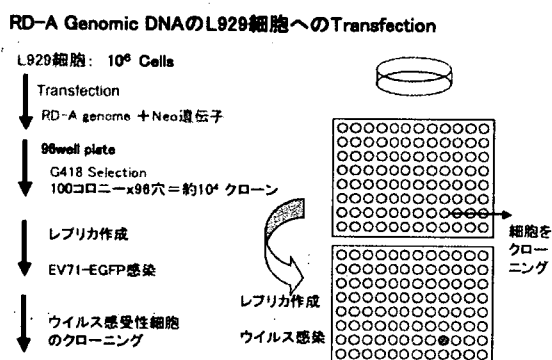
EV71 SK-006/Malaysia 株感染性 cDNA の coding region のはじめに in frame となるよう EGFP ならびに EV71 2A protease の切断

配列を挿入した。この DNA から *in vitro* transcription により RNA を合成し、RD-A 細胞にトランスフェクションして感染性ウイルス粒子を得た。このウイルスは感染すると EGFP を発現し蛍光顕微鏡下でウイルスの感染をモニターすることができる。

### 3) 感受性細胞株の単離

一つのプールに約 100 種類の形質転換細胞が入るように neo 耐性細胞のプールを作成し、増殖後 2 分割してレプリカを作成し、片方に EV71-EGFP を感染させて感受性を獲得した細胞の存否を確認した。感受性細胞が存在した場合は該当するプールから細胞を増やし、さらに小さなプールに分割して感受性を検査する操作を繰り返し、最終的に単一の細胞株とした。(図 2)

図 2



### C. 研究結果と考察

約 70,000 の neo 耐性細胞株群から 2 つの EV71 感受性細胞株を樹立した。この細胞株は SK-006/Malaysia 株以外の臨床分離株を

感染させると CPE が観察され、ウイルスのタイターが上昇した。これにより実験に用いた特殊な株だけが感染できる訳ではなく、この細胞はどの EV71 株でも同様に感受性を示すことが判明した。一方でポリオウイルス、コクサッキーB ウイルスは感染しなかった。調べたウイルスの中では唯一コクサッキー A16 が感染した。(表 2)

表 2 感受性細胞のウイルス特異性

	RD-A	L929	L-EV71S
EV71 SK-006/Malaysia/97	+	-	+
BrCr	+	-	+
C7/Osaka/97	+	-	+
Nagoya/73	+	-	+
Isahara/97	+	-	+
CVA16	+	-	+
CVB1	+	-	-
PV1	+	-	-

調べた形質転換細胞数と感受性細胞数の比率からウイルス感受性獲得にはヒトの遺伝子が 1 つ導入されれば十分であると考えられる。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極めて高い。

感受性獲得細胞株の感染特異性から考えて PVR, Coxsackie-adenovirus receptor (CAR) ではないと考えられる。同じ手足口病を起こしグループ A エンテロウイルスに分類される CVA16 は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。

### D. 結論

この方法で得られた EV71 感受性細胞から



EV71R 遺伝子を単離することが可能であると  
考えられる。この遺伝子を単独でマウスなど  
の細胞に発現することができれば EV71 及び  
CVA16 特異的にウイルス分離を行なうことが  
できるスクリーニングに適した細胞株を樹  
立できると考えられる。他のグループ A エン  
テロウイルスについても感染の特異性を確  
認する必要がある。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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)

##### 2. 学会発表

- 1) 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
- 2) 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,
- 3) 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,

- 4) 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

- 5) 小池智, ポリオウイルスの tissue tropism, 第 31 回阿蘇シンポジウム “ウイルスと戦う”

#### 3. 総説

- 1) 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(10): 1231-1236 (2007)
- 2) 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(10): 827-830 (2007)
- 3) 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(1): 5-11 (2007)
- 4) 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)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## 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

(主任研究者:清水博之)

#### 分担研究報告書

#### 麻疹の効果的制御に関する研究

分担研究者	多屋 馨子	国立感染症研究所感染症情報センター	第三室室長
研究協力者	山本 久美	国立感染症研究所感染症情報センター	第三室研究員
	佐藤 弘	国立感染症研究所感染症情報センター	第三室研究員
	岡部 信彦	国立感染症研究所感染症情報センター	センター長

#### 研究要旨

2012年に、国内から麻疹排除を達成するためには、国民全体が麻疹に対する正しい知識を持ち、その予防の重要性を認識することが重要である。そのためには、国内の患者発生状況を正確に把握し、麻疹が決して小児の軽症疾患ではないことを国民に正しく伝える必要がある。また、迅速に麻疹と実験室診断するためには、医療機関と研究機関の連携が重要であり、迅速診断のための方法の確立も重要である。麻疹の予防と排除には、2回の予防接種を徹底することが不可欠であるが、2008年4月から大きく変更となった予防接種制度を正しく伝えるためには、対象者ならびに一般国民に対する情報伝達手段が必要であり、その一環として、本研究班では教育啓発用DVDを作成した。麻疹についての正しい知識を広く提供し、重症化例調査を用いて、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は、麻疹の伝播予防ならびに排除に向けた取り組みとして重要と考える。本研究班の成果が、麻疹排除に貢献できることを期待したい。

#### A. 研究目的

2007年春、わが国では、10代から20代を中心とする麻疹の全国流行が発生し、特に都内では、多くの学校が休校となったが、麻疹による重症者あるいは死亡者の状況が不明であった。そこで、本研究班の目的である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の中で、特に、麻疹排除に向けた取り組みの一環として、医療機関と研究機関の橋渡しの役割を目的として、特に、麻

疹疑い例の実験室診断を実施し、早期診断に繋げるとともに、2007年1年間の重症化例の実態を早急に把握し、2008年の麻疹対策に役立てることを目的とした。また、中学生・高校生をはじめ、一般国民が誰でも麻疹の基礎知識を得られるような啓発教材を作成し、国民の麻疹に対する知識の向上を図るとともに、麻疹排除に不可欠である予防接種の啓発に必要な教育用資料を作成することを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 麻疹疑い例における検査室診断の実

際：麻疹の流行がピークになった2007年5月より前(1~4月)に発症した麻疹疑い患者9名について、実験室診断を行った。患者から採取された血液および咽頭拭い液について、RT-PCRによる麻疹ウイルスHA(hemagglutinin、赤血球凝集素)及びNP(nucleoprotein、核蛋白)遺伝子の検出を行い、特異的遺伝子断片が検出されたものについては、さらに塩基配列の解読により遺伝子型の決定を行った。また、血液が採取されていた患者については、市販キットを用いたEIA法により麻疹特異的IgM抗体価の測定を行った。

### 2. 麻疹の重症化例に関する検討：2007

年の流行で麻疹による休校が最も多かった東京都を選択し、都内の医療機関で、麻疹患者の診療を行ったと考えられる2129診療科(内科764、呼吸器科180、神経内科123、消化器科232、感染症科13、小児科288、皮膚科278、皮膚泌尿器科40、産科48、産婦人科163)を対象に、2007年の1年間に麻疹の経過中、重症化した症例および死亡した症例について、郵送による質問紙調査を行った。調査対象は、2007年1月1日から12月31日までの1年間に入院した患者で、次の(1)(2)(3)を満たす症例を報告してもらうこととした。(1)24時間以上入院するかまたは死亡退院した、(2)入院あるいは死亡が2007年1月1日から同年12月31日である、(3)入院あるいは死亡の理由、ないしは入院時診断が次のいずれかであった者とした(1)麻疹、麻疹による合

併症、麻疹による基礎疾患の増悪、SSPE、2)麻疹ワクチンあるいは麻疹風疹混合ワクチンによる副反応)。

### 3. 麻疹教育啓発用DVDの作成：中学生・高校生、一般国民を対象として、国立感染症研究所感染症情報センターが作成した麻疹に関する基礎情報を画像資料にまとめ、ナレーションを入れて15分程度に編集した映像を作成し、感染症情報センターホームページに動画として公開し、希望者にはDVDあるいはCD-ROMにて配布した。(作成協力：宮崎徹子、江木香苗、山本明史、谷口無我、竹本小児科医院竹本桂一院長、宏知会ば小児科医院馬場宏一院長、永寿堂医院松永貞一院長)

## C. 研究結果

### 1. 麻疹疑い例における検査室診断の実

際：麻疹疑い例の性別は男性2名、女性4名、性別情報無し3名で、年齢は10歳未満1名、20代1名、30代4名、年齢情報無し3名であった。RT-PCRの結果、遺伝子検出を試みたすべての検体からHA及びNP遺伝子が検出され、NP遺伝子の一部(456bp)の塩基配列の解読を行った結果、各検体の配列は一致した。さらに、参照株の遺伝子配列を用いて行った系統樹解析の結果、麻疹ウイルスD5型(Bangkok.THA/93に近縁)と確認された。また、発症7日後および11日後に採取された2名の患者血漿について麻疹特異的IgM抗体価の測定を行った結果、2名ともIgM抗体陽性であり、血清診断においても麻疹ウイルスの感染が確認された。

### 2. 麻疹の重症化例に関する検討：2008

年3月10日に調査票を送付し、2008年3月11日から13日までの3日間に297診療科(14.0%)から回答を得た。現在回収が継続中である。

**3. 麻疹教育啓発用DVDの作成:**2008年2月28日に完成した。文部科学省関係者への試写の結果、文部科学省から、全国の中学校、高等学校への配布につき本DVDの提供依頼があった。また、多くの関係者に麻疹教育啓発用に使用してもらうことを目的として、3月10日に、国立感染症研究所感染症情報センターのホームページ上(2008年3月現在 URL: <http://idsc.nih.go.jp/disease/measles/Video/measlesVideo.html>)に公開した。DVDでの配布希望を募集したところ、公開から1週間で医療機関、保育所・学校、保健所、自治体、医療関係企業等から、研修会や医療機関、学校での教育啓発用に使用したいとの希望が300通をこえている。

#### D. 考察

麻疹は小児の軽症疾患との印象をもたれがちであるが、感染力が極めて強い上に、現在の国内の流行は10歳以上が患者の約4分の3を占める状態となっており、報告患者の内、予防接種未接種者が約半数となっている。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(麻疹とともに風疹の対策も極めて重要であることから麻疹風疹混合ワクチンの接種が勧奨されている)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、麻疹は実験室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。検出された麻疹ウイルスの遺伝子型は、近年日本で流行しているD5型であり、全国から報告された病原体に関する情報を集計している病原微生物検出情報においても、2006年は85%、2007年は96%がD5型という検出状況であった。2008年1月よりわが国において麻疹患者の全数報告が開始されたことや、また、今後麻疹患者が減少してきた際、および修飾麻疹の患者の診断においても、実験室診断はますます重要となる。今後、検査方法の標準化や判定基準を定めることが必要であると考えられる。

今回作成した麻疹教育啓発用のDVDは各方面から多くの要望が届いており、麻疹の教育啓発に対する関心の高さが伺われるとともに、本DVDがその役割を担うことが期待された。

#### E. 結論

2012年に、国内から麻疹排除を達成するためには、国民全体が麻疹に対する正しい知識を持ち、その予防の重要性を認識することが重要である。そのためには、国内の患者発生状況を正確に把握し、麻疹が決して小児の軽症疾患ではないことを国民に正しく伝える必要がある。また、迅速に麻疹と実験室診断するためには、医療機関と研究機関の連携が重要であり、迅速診断のための方法の確立も重要である。麻疹の予防と排除には、2回の予防接種を徹底することが不可欠であるが、2008年4月から大きく変更となった予防接種制度を正しく伝えるためには、対象者ならびに一般国民に対する情報伝達手段が必要であり、その一環として、本研究班では

教育啓発用 DVD を作成した。麻疹についての正しい知識を広く提供し、重症化例調査を用いて、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は、麻疹の伝播予防ならびに排除に向けた取り組みとして重要と考える。本研究班の成果が、麻疹排除に貢献できることを期待したい。

## **F. 研究発表**

### **1. 論文発表**

なし

### **2. 学会発表**

なし

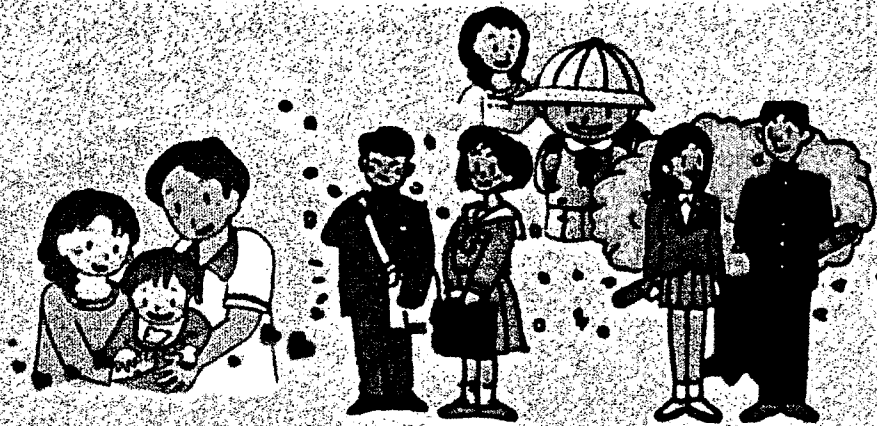
## **G. 知的所有権の取得状況**

なし

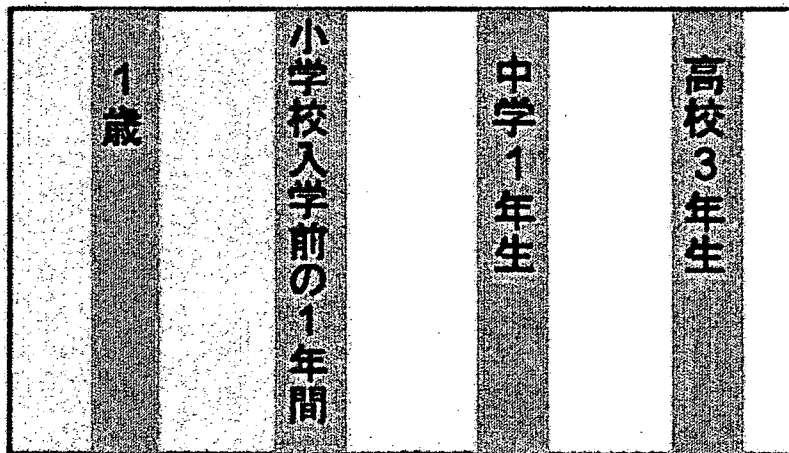
※なお、本分担研究班の成果は、厚生労働省、文部科学省における麻疹対策に用いられた。

# はしかから身を守るために

～ 中・高3で予防接種が始まりました～



## 2008年度から…



**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**

**麻疹ウイルス研究小班**

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

**A. 研究の目的と概要**

わが国の麻疹患者数は、かつてより減少しているものの、いまだに年間1～5万人と推定されている。麻疹は小児において重症度が高く、成人発症も問題となっていることから、その対策は国民全体の健康を守るという点で重要である。麻疹排除にはワクチン接種率の向上とサーベイランスの強化が重要である。また麻疹根絶のためには、疫学的監視体制とウイルス学的及び遺伝子学的特性に基づいた科学的監視体制の充実が不可欠である。

麻疹と風疹をはじめとするそれ以外の発熱性発疹性疾患との鑑別においては臨床診断のみならず実験室診断の実行体制を確立する必要がある。野外流行ウイルス株の分離・収集・保存・分与を通じて麻疹、風疹ウイルス伝播経路の解明のみならず抗原および遺伝子変異の実態とその機序を解明する必要がある。麻疹、風疹ウイルス伝播の監視と証明においては流行の確認、流行初期の臨床診断の確認、麻疹症例の疑診断例の確認、実験室内診断の有効性の確認、確定診断による認

定も必要である。各地域の分離ウイルス株に対してはレファランズに基づく分子疫学的解析を実行し、各機関の分担作業の明確化を計った。

従来のわが国における定点観察による麻疹のサーベイランス・システムでは臨床診断による報告が中心であり、実験室的確証は欠如していた。また従来の麻疹の実験室内診断は血清診断を中心とするが中心であり、実験室的確証は欠如していた。研究・検査機関の全国規模での協力・連携体制も確立されていないのが現状である。麻疹根絶の最終段階においてはこれらの問題の解決が必要である。特に麻疹と風疹の鑑別における実験室的確証は重要である。本研究班では疫学的情報と実験室的情報を統合した麻疹サーベイランスの強化と国内研究・検査機関の協力連携体制の確立を目標とした。

**B. 研究成果の要約**

麻疹ウイルスの sequence のデータベース解析から分子疫学的特性、野生株の由来、ワクチン株との相違

点などが明らかにできた。野生株の遺伝子解析には主に RT-PCR 法による H、N 遺伝子の増幅および遺伝子相同解析、分子系統樹解析が用いられる。またダイレクト・シーケンス法で N 遺伝子配列を決定した。相同解析は配列が決定された N 遺伝子の 493 塩基 (position; 1214-1706) について行い、さらに遺伝子位置 1302 ~ 1686 (385 塩基) を近隣結合法 (Neighbor-joining) 法により分子系統樹解析を行った。1998 年の WHO のガイドラインでは N の COOH 末端の 150 のアミノ酸をコードする 450 塩基のシーケンスが麻疹ウイルスの遺伝子型の決定に最小限度必要とされている。特定の地域で大流行が発生した場合は H 遺伝子の 1854 の全塩基のシーケンスが必要とされている。また新たな麻疹ウイルスの遺伝子型の出現が疑われる場合はウイルス分離株の保存、上記の N 遺伝子のシーケンス、全 H 遺伝子のシーケンスが必要とされる。N 遺伝子解析では 2007 年の関東地方を中心とする分離株は主に D5 分類された。

麻疹の全数報告ではウイルス分離、ゲノム検出、特異的血清 IgM 抗体の検出、急性期と回復期のペア血清での IgG 抗体の有意な上昇の確認などによる実験室的診断の重要性が再認識されている。血清抗体測定には、赤血球凝集抑制(HI)法、中和試験(NT)法、ゼラチン粒子凝集 (PA) 法、酵素抗体 (EIA) 法などがある。これらの検査法の確立、標準化に関しては多くの課題が指摘され早急な対応が必要である。また現在までのところ、臨床現場でも応用が可能な麻疹の迅速診断法は確立されていない。

Vero/hSLAM 細胞でブラック減少法を用いた NT 法は従来の CPE を用いた方法と比較しても再現性、客観性が良好であった。HI 法では EIA IgG の強陽性例でも陰性例が存在した。HI 法は NT 法との比較でも感度と特異性が低値であった。感染直後の高 PA 抗体価の血清においては NT 抗体価との相関が認められた。PA 抗体価のみが高値を持続することもあり、PA は EIA よりも感度、特異性ともに低値であった。イムノクロマト法を用いた麻疹抗原の検出系で麻疹患者の咽頭スワブより抗原の検出が可能であった。

麻疹の抑制対策のための全数報告では実験室的診断の重要性が再認識されているものの、実際には臨床診断に基づく報告が少なくない。麻疹の血清診断における各検査法間の感度と特異性について比較し、抗原検

出による迅速診断法の開発を試みた。麻疹の実験室内診断法の確立においては今後さらに血清診断法の標準化と精度管理が必要と考えられた。

全国的な麻疹の流行により、札幌市でも 2007 年 8 月から麻疹が流行し、学童ばかりでなく 20~30 歳台の成人での発症がみられている。この世代の麻疹抗体保有率を調査するために、妊婦甲状腺機能スクリーニング乾燥濾紙血液の残血液を用いて、麻疹抗体価 (PA 法) を測定した。乾燥濾紙血液と血清を同時に作成した予備実験で、乾燥濾紙血液と血清での麻疹抗体価に良好な相関が見られ、濾紙血液を用いて麻疹抗体価を測定することが可能であることを確認した。

2007 年の北海道における麻疹患者の報告数は、小児麻疹が 461 例、成人麻疹が 387 例で総計 848 例であった。室蘭保健所管内で最初の流行があり、4 月末から約 2 ヶ月間続いた。さらに、夏季にかけて滝川、苫小牧、釧路保健所管内でも流行があった。また、年末には紋別、北見、帯広保健所管内において流行した。患者の年齢構成では 15 歳以上の成人麻疹が約半数の 47% を占めた。予防接種歴については「なし」が 61%、「あり」が 31% であった。麻疹患者の約 30% が予防接種を受けていたことは、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。麻疹ウイルス検査については、供試検体として咽頭拭い液を用いたが、RT-PCR 法にてウイルスゲノムを検出できたのは 37 検体中 25 件で陽性率は 68% であった。この 25 例について NP 遺伝子の系統樹解析を実施し、genotype を調べたところ全例 D5 型であった。

2007 年の 4 月より千葉県で行っている、医療機関と学校からの麻疹全数報告の患者情報、および、病原体サーベイランスでは医療機関報告、学校報告からの報告はそれぞれ 1589 例、1636 例で、小中高生に該当する 7-18 歳は 52.8% で半分以上を占めた。麻疹ワクチンの接種歴は 50.1% で高く、また、流行予測調査における千葉県の麻疹抗体測定では麻疹の発症防御が可能と考えられる PA 法 256 倍の保有率は 4-19 歳で低かったことより、小中高生の罹患率増加は secondary vaccine failure の増加がその理由と考えられた。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、培養陽性のものはすべて PCR 陽性で、PCR 陽性の遺伝子型は A 型 4 例、D5 型 61 例であった。血清 68 検体中、麻疹 IgM 抗体陽性は 18



例、判定保留6例、陰性44例で、これらのPCR陽性例はそれぞれ17例、4例、12例で、陽性の一致率は高かったが、陰性の一致率は低かった。PCR陽性例について病日とIgMの関連を見ると4病日以降に陰性はなく、報告されている発疹出現後4日以降はIgM抗体検出率が高いことと一致した。また、全体にPCR、IgMの陽性率は低く、不適切な検体の採取時期、あるいは、麻疹以外の疾患の紛れ込みこみが原因と考えられた

愛知県衛生研究所では地方衛生研究所における麻疹サーベイランス・システム整備及び実験室診断の精度向上を目的として、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た。さらに麻疹発生を迅速かつ的確に把握し早期の対策を図ることで麻疹の撲滅を目指して2007年2月に開始された愛知県麻疹全数把握事業の報告状況を解析した。

京都市保健所では麻疹ウイルスの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。SYBR Green RT-PCR法により $1 \cdot 10^6$  copy/ $\mu$ lの麻疹ウイルスRNAを検出可能であり、感度は国立感染症研究所マニュアルによるnested RT-PCR法とほぼ同等であった。本方法では、増幅時間は約90分、96穴プレートを用いると30検体の処理が可能、アガロースゲル電気泳動が不必要、また定量的解析が可能であった。

大阪府では平成19年度より大阪小児科医会が中心となり麻疹の全数把握疫学調査を開始した。本研究では、この全数把握システムと連動して、診断に苦慮する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を開発し、疫学研究での有用性を評価した。

岡山県衛生研究所では感染症発生動向調査で病原体

検索を担当する地方衛生研究所において、迅速且つ比較的簡便に実施しうる麻疹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。麻疹ウイルスワクチン株では、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。風疹ウイルスワクチン株では、RT-LAMP法で $\geq 0.012$  PFU/testまで検出し得た。RT-PCR法では、1st-PCRでは検出できなかったが、nested-PCRで $\geq 1.2$  PFU/testまで検出し得た。各検査法における検体前処理～判定までの最短所要時間は、RT-LAMP法では麻疹ウイルス風疹ウイルスともに約155分であった。RT-PCR法では、麻疹ウイルスの場合約665分、風疹ウイルスの場合約490分であった。RT-LAMP法は、増幅産物で詳細な遺伝子解析を行うことが困難であるという欠点はあるが、迅速性・簡便性に優れること、同一条件で麻疹・風疹両ウイルスを同時検索可能であることから、患者の迅速な鑑別診断と病原体スクリーニング検査法として有用であると考えられた。

沖縄県衛生環境研究所のデータによるとPCRが陽性となった沖縄県の32例について遺伝子型の検索を実施したところ、2003年はD5が2例、H1が4例、2004年はD3が3例、H1が5例、2006年はD5が18例であった。また、系統樹解析の結果2003年と2006年の遺伝子型D5は、異なるクラスターを形成していた。

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

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

分担研究者：	沼崎 啓	国立感染症研究所 ウイルス第三部
研究協力者：	堤 裕幸 市村 宏	札幌医科大学 医学部 金沢大学 医学部

**研究要旨**

麻疹の抑制対策のための全数報告では実験室的診断の重要性が再認識されているものの、実際には臨床診断に基づく報告が少なくない。麻疹の血清診断における各検査法間の感度と特異性について比較し、抗原検出による迅速診断法の開発を試みた。麻疹の実験室内診断法の確立においては今後さらに血清診断法の標準化と精度管理が必要と考えられる。実験室内診断に基づく麻疹サーベイランス・システムの確立が早急に必要である。

**A. 研究目的**

麻疹排除にはワクチン接種率の向上とサーベイランスの強化が重要である。また麻疹根絶のためには、疫学的監視体制とウイルス学的及び遺伝子学的特性に基づいた科学的監視体制の充実が不可欠である。麻疹の全数報告ではウイルス分離、ゲノム検出、特異的血清 IgM 抗体の検出、急性期と回復期のペア血清での IgG 抗体の有意な上昇の確認などによる実験室的診断の重要性が再認識されている。血清抗体測定には、赤血球凝集抑制(HI)法、中和試験(NT)法、ゼラチン粒子凝集 (PA) 法、酵素抗体 (EIA) 法などがある。これらの検査法の確立、標準化に関しては多くの課題が指摘され早急な対応が必要である。また現在までのところ、臨床現場でも応用が可能な麻疹の迅速診断法は確立されていない。

**B. 研究方法**

血清抗体測定法のうち、HI 法は感染研、病原体検出マニュアルに準拠した。EIA(IgG,IgM)法はデンカ生研および Dade Behring 社製、PA 法は富士レビオ社製キットを用いて実施した。NT 法に関しては B95a のみ

ならず Vero/hSLAM 細胞で麻疹野生株および Edmonston 株の異なる遺伝子型の麻疹ウイルスを用いたブラック減少法および CPE 抑制法による試験の確立も検討した。また、HI、NT、EIA (IgM、IgG)、PA 法の各検査法間の感度と特異性について比較した。またイムノクロマト法を用いた麻疹抗原の検出系の診断への応用も試みた。

(倫理面への配慮)

実験室内診断に関する手技が主体であり、倫理面での配慮は必要としなかった。

**C. 研究結果**

Vero/hSLAM 細胞でブラック減少法を用いた NT 法は従来の CPE を用いた方法と比較しても再現性、客観性が良好であった。HI 法では EIA IgG の強陽性例でも陰性例が存在した。HI 法は NT 法との比較でも感度と特異性が低値であった。感染直後の高 PA 抗体価の血清においては NT 抗体価との相関が認められた。PA 抗体価のみが高値を持続することもあり、PA は EIA よりも感度、特異性ともに低値であった。イムノクロマト法を用いた麻疹抗原の検出系で麻疹患者の咽頭スワブより抗原の検出が可能であった。

#### D. 考察

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る。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。血清抗体測定法のうち NT 法は感染防御能を反映するとされるが、現状では多数の検体処理は困難な状況にある。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った。EIA 法では国際的標準化、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の実験室内診断法の開発・導入が必要である。

#### E. 結論

麻疹の実験室内診断法の確立においては今後さらに血清診断法の標準化と精度管理が必要と考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Numazaki K. Current problems of measles control in Japan and western pacific region. Vaccine 2007, 25: 3101-3104.

##### 2. 学会発表

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.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

現在までのところ特記すべきこと無し

厚生労働科学研究費補助金  
ウイルス感染症の効果的制御のための病原体サーベランスシステムの検討  
麻疹小班研究報告書

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—  
研究協力者 矢野公一 札幌市衛生研究所所長

### 研究要旨

全国的な麻疹の流行により、札幌市でも 2007 年 8 月から麻疹が流行し、学童ばかりでなく 20～30 歳台の成人での発症がみられている。この世代の麻疹抗体保有率を調査するために、妊婦甲状腺機能スクリーニング乾燥濾紙血液の残血液を用いて、麻疹抗体価 (PA 法) を測定した。乾燥濾紙血液と血清を同時に作成した予備実験で、乾燥濾紙血液と血清での麻疹抗体価に良好な相関が見られ、濾紙血液を用いて麻疹抗体価を測定することが可能であることを確認した。

2005～2006 年の 2 年間の妊婦甲状腺スクリーニング検査受検者のうち 2202 人を対象とし、1961～1990 年の 5 年毎の出生群に分けて検討した。妊婦全体での 1 : 16、1 : 128 および 1 : 256 以上の平均抗体保有率はそれぞれ 96.9%、88.8% および 78.3% であった。若年ほど抗体保有率は低下し、1986～1990 年出生群では 1 : 16、1 : 128 および 1 : 256 以上の抗体保有率はそれぞれ 91.6%、81.4%、68.5% と低値であり、この出生年群の抗体保有率は他の全ての出生年群より有意に低値であった。麻疹抗体保有率は若年ほど低値であったが、若年者での secondary vaccine failure やワクチン未接種に起因するものと推定される。このことは妊婦以外の同世代の女性や男性にも当てはまるものと考えられ、この年代の麻疹感受性者への積極的なワクチン接種が必要である。

以上より、検体の送付や保管が血清に比べ簡便な乾燥濾紙血液を用いた妊婦の麻疹抗体保有率の調査は、麻疹蔓延防止対策に有用である。

#### A. 研究目的

札幌市では、1986 年から市内産科受診の妊婦のうち希望者を対象に、検体の送付や保管が血清に比べ簡便な乾燥濾紙血液を用いて年間約 9000 人の甲状腺機能検査を行い、妊婦の甲状腺機能異常症を早期発見し早期治療することにより、母児の周産期リスクを回避している。

一方、全国的な麻疹の流行により札幌市でも 2007 年 8 月から麻疹が流行し、学童ばかりでなく 20～30 歳台の成人での発症がみられていることから、20～30 歳前後の世代の麻疹抗体保有率を調査するために、妊婦甲状腺機能スクリーニング乾燥濾紙血液の残血液を用いて、麻疹抗体価 (PA 法) を測定した。