

1008290281

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 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 清水 博之

平成 21 年 (2009 年) 3 月

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 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 清水 博之

平成 21 年 (2009 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
研究代表者 清水博之

II. 分担研究報告

1. ビコルナウイルス研究小班統括報告 ————— 19
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VPDsサーベイランスシステムに関する研究 ————— 27
帖佐 徹 (財団法人九州産業衛生協会)、吉田 弘 (国立感染症研究所 ウイルス第二部)
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 ————— 31
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 ————— 39
山下照夫 (愛知県衛生研究所)
5. 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)
6. 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 ————— 51
中野貴司 (国立病院機構三重病院)
7. ウイルス感染症の効果的制御のためのRNAゲノム抗体ライブラリーの開発 ————— 59
中村貴史 (東京大学医科学研究所)
8. カンボジア糞便検体を用いたヒトパレコウイルスの分子疫学解析 ————— 63
町田早苗 (埼玉医科大学)
9. エンテロウイルス感染マウスモデルの解析 ————— 67
有田峰太郎 (国立感染症研究所 ウイルス第二部)
10. アイチウイルス複製機構の解析 ————— 69
佐々木 潤 (藤田保健衛生大学)
11. ポリオウイルス感受性動物モデルに関する研究 ————— 71
小池 智 (東京都神経科学総合研究所)
12. 国内の麻疹の現状と教育啓発ならびに麻疹重症化例に関する研究 ————— 77
多屋馨子 (国立感染症研究所 感染症情報センター)
13. 麻疹ウイルス研究小班統括報告 ————— 87
駒瀬勝啓 (国立感染症研究所 ウイルス第三部)
14. 堺市における麻疹発生状況—2008年— ————— 97
田中智之 (堺市衛生研究所)

15. 北海道における麻疹について－発生状況と検査診断（2008年）－	105
長野秀樹（北海道立衛生研究所感染症センター）	
16. 東北・新潟ブロックの麻疹ウイルス検査状況	111
青木洋子（山形県衛生研究所）	
17. 2008年 千葉県における麻疹の流行	115
小川知子（千葉県衛生研究所）	
18. 石川県における麻疹のウイルス学的検査状況（2007年）	121
倉本早苗（石川県保健環境センター）	
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－	125
皆川洋子（愛知県衛生研究所）	
20. 2007－2008年大阪府における麻疹診断	127
加瀬哲男（大阪府立公衆衛生研究所）	
21. 中国四国ブロックの麻疹全数把握にむけた実験室検査体制整備	133
小倉肇（岡山県環境保健センター）	
22. 福岡県における麻疹サーベイランス	139
世良暢之（福岡県保健環境研究所）	
23. 2008年の沖縄県における麻疹サーベイランス成績	143
平良勝也（沖縄県衛生環境研究所）	
24. 種々の麻疹ウイルス感染症例の病日による血清麻疹抗体の動き	149
庵原俊昭（国立病院機構 三重病院小児科）	
25. 麻疹 LAMP 法の応用 麻疹ウイルス野生株の性状とワクチン株の鑑別	153
中山哲夫（北里生命科学研究所 ウイルス感染制御 I）	
26. 麻疹検査診断ネットワーク、並びに RT-PCR 法の精度管理用 reference RNA に関して	157
駒瀬勝啓（国立感染症研究所 ウイルス第三部）	
27. 麻疹ウイルス N 遺伝子検出定量のためのリアルタイム RT-PCR 法の開発	161
木村博一（国立感染症研究所 感染症情報センター）	
28. 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－	165
野田雅博（国立感染症研究所 ウイルス第三部）	
29. 地方における呼吸器ウイルス感染症サーベイランス－特にアデノウイルスの疫学－	173
水田克巳（山形県衛生研究所）	
30. 栃木県における呼吸器ウイルス発生動向調査	177
平田明日美（栃木県保健環境センター）	
31. 沖縄県における Respiratory Syncytial Virus 感染症の流行状況と分離株の遺伝子解析	181
中村正治（沖縄県衛生環境研究所）	
32. 気道症状を呈する児における R S ウイルス分離状況と臨床的背景の検討	183

	菅井和子 (国立病院機構 横浜医療センター小児科)	
33.	乳幼児気管支炎患者から分離された Respiratory Syncytial ウイルス(RSV)の主要遺伝子解析について	187
	塚越博之 (群馬県衛生環境研究所)	
34.	東北地域で分離されたライノウイルスの分子疫学	193
	平田明日美 (栃木県保健環境センター)	
35.	ヒトボカウイルスの分子疫学	199
	五十嵐郁美 (福島県衛生研究所)	
36.	重症心身障害児(者)病棟における感染症流行と職員の抗体保有状況について	203
	松田俊二 (国立病院機構愛媛病院)	
37.	呼吸器ウイルス(特にRSウイルス)と感染喘息との相互関係に関する研究	211
	木村博一 (国立感染症研究所 感染症情報センター)	
III.	研究成果の刊行に関する一覧	215

厚生労働科学研究費補助金
平成20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

研究代表者：	清水博之	国立感染症研究所 ウイルス第二部
研究分担者：	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	財団法人 九州産業衛生協会
	吉田 弘	国立感染症研究所 ウイルス第二部
	有田峰太郎	国立感染症研究所 ウイルス第二部
	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
	多屋馨子	国立感染症研究所 感染症情報センター
	駒瀬勝啓	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)：

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	東京大学医科学研究所

研究協力者 (麻疹ウイルス研究小班)：

田中智之、内野晴子、高橋幸三、松尾光子、三好龍也、吉田永洋、狛山雅代	堺市衛生研究所
片桐真二	堺市医師会
藤井史	堺市保健所
長野秀樹、地主 勝、岡野素彦	北海道立衛生研究所感染症センター
青木洋子	山形衛生研究所
小川知子	千葉県衛生研究所ウイルス研究室
倉本早苗	石川県環境保健センター
皆川洋子、秦 真美、瀧木雅子、田中正大、山下照夫	愛知県衛生研究所
加瀬哲男、倉田貴子、宮川広実	大阪府公衆衛生研究所ウイルス課
小倉 肇、濱野雅子	岡山県環境保健センター
世良暢之、中山志幸、石橋哲也、千々和勝巳	福岡県保健環境研究所
平良勝也、岡野祥、仁平 稔、中村正治	沖縄県衛生環境研究所
庵原俊昭、中野貴司、田中孝明	国立病院機構三重病院小児科
中山哲夫	北里生命科学研究所ウイルス制御 I
木村博一	国立感染症研究所感染症情報センター

研究協力者：

山本久美、谷口無我、山本明史、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
五十嵐郁美	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
大内 好美	滋賀県衛生環境センター
小村 珠喜	島根県保健環境科学研究所
南 亮仁	佐賀県衛生薬業センター
中村 正治	沖縄県衛生環境研究所
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	山形県衛生研究所
須藤亜寿佳	山形県衛生研究所
大金 映子	栃木県保健環境センター
田中千香子	滋賀県衛生環境センター
糸数 清正	沖縄県衛生環境研究所
平良 勝也	沖縄県衛生環境研究所
藤塚 麻子	国立病院機構横浜医療センター小児科

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整備するため、以下の研究を行った。

- 1) 中国広東省 CDC との共同研究により環境からのエンテロウイルス検出を行い、分離ウイルスを解析した。
- 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。フィルター吸着溶出法を検討し、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明らかとなった。
- 3) 海外渡航者由来エンテロウイルスを愛知県の実験室と比較したところ、塩基配列や分離時期から海外から持ち込まれたものと推定された。
- 4) 上気道炎患者の咽頭ぬぐい液 216 検体から、CODEHOP PCR 法により HEVs の検出・同定を試みた。

- 5) 無菌性髄膜炎疑い患者由来検体の解析により、EV 感染症における中枢神経合併症は、髄液細胞増多を認めない例でも生じていることが推察され、病因診断が重要であると考えられた。
- 6) GATWAY システムによるプラスミドライブラリーおよび新しいレスキューシステムにより作成した新たな麻疹抗体ライブラリーを用いることにより、短時間で簡便に効率よく scFv を同定できる可能性が示唆された。
- 7) カンボジアの AFP 患者由来の糞便 256 検体から HPeV1、HPeV3、HPeV5 が同定された。HPeV5 は日本では検出例がない血清型であり、地域により伝播する HPeV のタイプが異なることが示唆された。
- 8) EV71 の感染を特異的に阻害する 3 化合物を同定し、PV および EV71 の感染を共通に阻害する化合物として GW5074 を同定した。また、GW5074 に対する耐性変異株は分離されなかった。
- 9) アイチウイルス 2A 変異ウイルスは Vero 細胞でのゲノム複製は認められなかった。無細胞翻訳-複製系を利用した解析では、マイナス鎖合成量が減少していたのに加え、プラス鎖合成はほとんど検出できなかった。
- 10) TRIF ノックアウトマウスはウイルス感受性が大きく増しており、非標的組織においてもウイルス量が増加していた。ヒト genomic 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。
- 11) 我が国のポリオウイルス野生株実験室封じ込め調査を実施するとともに、調査手法および結果の集計・評価を行い、調査報告書を WHO 西太平洋地域ポリオ根絶認定委員会に提出した。
- 12) 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、麻疹患者の診療を行ったと考えられる 2129 診療科を対象に、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。
- 13) 地衛研の中に麻疹・風疹レファレンスセンターを設置し、感染研と各県、政令都市の地衛研を結ぶ麻疹検査診断ネットワークの中核とした。
- 14) 麻しん検査診断の標準法を RT-PCR 法と設定し、H 遺伝子検出法を第一選択とすることを決定した。
- 15) RT-PCR 法の精度管理用のレファレンス RNA を作製し、各地衛研に配布した。
- 16) 2007-2008 年の麻しん届出情報を整理して、各ブロック又は各地区の麻しん流行状況等を把握した。
- 17) 2007-2008 年の麻しん検査診断状況を確認した。
- 18) 検査依頼検体のウイルス遺伝子検出、ウイルス分離、IgM ELISA 法等検査を実施した。
- 19) ブロック内の検査体制等をアンケート等で把握した。
- 20) 麻しん検体の安定的な保存法を検討し、3 週間(4℃)〜4 ヶ月(-20℃)の間、安定であることを示した。
- 21) 麻しん初感染、PVF、SVF、発疹を伴わない麻しん感染の急性期の血清の IgM、IgG 抗体価の動態を示し、IgG 抗体の動きが麻しん診断と病態を知る上で有用であることを示した。
- 22) Lamp 法でワクチン株と野生株の鑑別が可能であることを示し、ワクチン接種後の副反応を疑われた 5 検体の病態を検討した。
- 23) 流行株の H 遺伝子、F 遺伝子を発現プラスミドに組み込み、B95a 細胞での細胞融合能を比較し、株間で差がないことを示した。
- 24) Real-time PCR 法を確立し、麻しんウイルス遺伝子を定量的に測定出来ることを示した。また、この方法を用いて実際の臨床検体に存在するウイルス遺伝子数を計測した。
- 25) ARI 症例由来試料のウイルス検索を試みた結果、RS ウイルス (RSV)、ヒトメタニューモウイルス (hMPV)、ライノウイルス (RV)、ヒトボカウイルス (hBoCV)、パラインフルエンザウイルス (PIV)、アデノウイルス (AdV) 等が多数分離された。
- 26) 1988-2007 年の間に分離された AdV-1、-2、-3、-4、-5 および 6 型のヘキシソ HVR のシーケンズ解析結果から、長期にわたり 99-100% の相同性で塩基が保存されていることが明らかとなった。
- 27) RSV の分子疫学解析を実施した結果、分離 RSV (Subgroup A および B) 株間の *M*、*F* および *G* 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 が流行の主流であることが明らかとなった。
- 28) ARI 患児 62 名の RSV 分離状況と臨床背景に関して検討を行った結果、患児月齢は、平均 13.3 ヶ月 ± 10.5 ヶ月、男児 40 名女児 22 名であった。RSV 培養陽性は 22 名、うち迅速キット陰性が 3 名いた。RSV 培養陽性群での検体採取病日は 3.7 ± 1.4 日、RSV 培養陽性/陰性で入院期間、入院中の治療内容に差はなかった。

- 29) 気管支炎乳幼児患者から分離された RSV17 株の *N*, *G* 及び *F* 遺伝子に関する分子疫学解析を行った。その結果、7 株は Subgroup A, 10 株は Subgroup B に分類され、さらに GA2 および BA に分類された。
- 30) 東北地方で分離された RV 計 91 株の VP4-2 遺伝子の系統解析を行った。系統樹上 90 株は genogroup A, 1 株は genogroup B に分類された。genogroup A に属する株はさらに多数のクラスターに分かれた。
- 31) ARI 患者から採取された臨床検体 701 検体から hBoV の検出を試みた結果、14 検体から hBoV 遺伝子が検出された。全遺伝子全領域 (5,299bp) の系統樹解析の結果、6 株は group1 に 1 株は group2 に分類された。
- 32) 重症心身障害児 (者) 病棟における 2006 年と 2007 年の 2 年間の感染症流行について調査を行った結果、ノロウイルス感染症、インフルエンザ、ヘルパンギーナおよび病原体不明感染症の流行が毎年 2-3 回みられた。
- 33) 愛媛病院職員のウイルス抗体検査を実施した結果、風疹抗体は陰性 7.2%, 疑陽性 2.7%, ムンプス抗体は陰性 3.2%, 疑陽性 14.4% と高頻度であった。麻疹および水痘帯状疱疹抗体はそれぞれ数人が疑陽性であった。
- 34) RSV と好酸球を PAF 存在下共培養した場合 RSV は、有意に好酸球表面に吸着した。このとき好酸球表面の接着因子 (αMβ2, CD11b/CD16) 発現が有意に亢進し、好酸球のエフェクター機能を増強することが示唆された。
- 35) 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 および hBoCV 等の標準株および/あるいは国内臨床分離株等を解析しレファレンス参照株として保存した。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の充実を図るため、ヒトメタニューモウイルス編を公開した。

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) 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に導入するため、広東省 CDC との共同研究により環境からのウイルス検出を行った。
- 2) 輸入野生株や VDPV 伝播を監視するため、平成 20 年 4 月から、富山県内の 2 下水処理場において、月 1 回末処理流入水を採取し、「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、ウイルス分離同定および遺伝子解析を行った。
- 3) 1989 年～1998 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た 25 種類の血清型のウイルス 50 株の VP1 領域の配列を決定した。
- 4) 上気道炎症状を呈した患者の咽頭ぬぐい液 216 検体から、CODEHOP VP1 RT-snPCR 法により HEVs の検出・同定を行い、培養細胞を用いたウイルス分離同定法との比較検討を行った。
- 5) 小児期エンテロウイルス感染症における中枢神経合併症の病態を検討する目的で、2008 年 7 月に無菌性髄膜炎疑いで入院した 12 例について、髄液所見を中心に解析した。
- 6) 弱毒化麻疹ウイルスに一本鎖抗体を提示させた革新的抗体ディスプレイライブラリーを構築するため、GATWAY システムを利用したプラスミッドライブラリーの構築と、T7 ポリメラーゼ発現ワクシニア

- ウイルスを利用したレスキューシステムにより、多様性の高い麻疹ウイルス抗体ライブラリーを作成した。
- 7) 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解析するため、カンボジアの AFP 患者 128 人 から提出された糞便検体から、RealTime-PCR 法を用いて、HPeV1-6 の検出を試みた。
 - 8) PV および EV71 擬似ウイルス粒子を調製し、LOPAC1280 化合物ライブラリーの存在下での複製を、ルシフェラーゼ活性を指標として測定した。PV および EV71 の複製を阻害した化合物について、ウイルス株の感染の阻害効果の測定および耐性変異株の分離を試みた。
 - 9) アイチウイルスの複製機構を明らかにするため、ウイルスゲノムのキャプシド領域をルシフェラーゼ遺伝子と置換したレプリコンを基に 2A 変異体を作成し、Vero 細胞での複製および無細胞翻訳-複製系での RNA 合成能を調査した。また、感染細胞あるいは 2A を単独で一過性発現させた場合の細胞内局在を蛍光免疫染色により観察した。
 - 10) 細胞質内 RNA センサーである RIG-I, MDA5、膜結合型 RNA センサーである TLR3, TLR7 のアダプターノックアウトマウスを用い、ポリオウイルス感染防御におけるそれぞれの経路の重要性を調べた。ヒト genomic DNA を、マウス L929 細胞にトランスフェクションすることにより、EV71 受容体遺伝子のクローニングを行なった。
 - 11) 野生株ポリオウイルス実験室封じ込め調査第一段階報告書を完成させるため、実験室調査のフォローアップと調査結果の評価・解析を行った。
 - 12) 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、麻疹患者の診療を行ったと考えられる 2129 診療科を対象に、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。昨年度、本研究班で作成した教育啓発用 DVD を希望者に配布し、その効果について郵送による調査を行った。
 - 13) 2008 年 6 月に行われた衛生微生物技術協議会研究会・レファレンス委員会において、地衛研、感染研による麻疹、風疹検査診断体制強化のため、麻疹・風疹レファレンスセンターの設置を踏った。
 - 14) 感染研、レファレンスセンターで標準法、ならびに運用法を検討する。
 - 15) 標準法として選択した RT-PCR 法の精度管理法を検討する。
 - 16) 2007、2008 年度の届出情報を整理して、各ブロック又は各地区の流行状況を把握する。
 - 17) 検査依頼検体のウイルス遺伝子検出、ウイルス分離、IgM 抗体測定等の麻しん検査診断を実施する。
 - 18) 得られた検査結果から各検査法の感度の違い、問題点等を検討する。
 - 19) ブロック内の地衛研の検査体制、ならびに麻しん検査状況をアンケート等の方法で把握する。
 - 20) 麻しん集団発生例にはアンケートによる調査等を実施する。
 - 21) 麻しんウイルスの 4℃、-20℃で保存方法による安定性を、遺伝子検出とウイルス分離を指標に検討する。
 - 22) 麻しん初感染、Primary vaccine failure (PVF), Secondary vaccine failure (SVF)、発熱だけで発疹を伴わない麻しん患者の急性期の血清中の IgM 抗体価、IgG 抗体価を計測し、その動態を検討する。
 - 23) Lamp 法で遺伝子検出、塩基配列を決定する事で、ワクチン株と野生株の鑑別ができるかを検討する。
 - 24) 最近の野外流行株の C1, D3, D5, D9 株から H 遺伝子と F 遺伝子をクローニングし、細胞に transfection する事で細胞融合能を検討する。
 - 25) Real time RT-PCR 法を確立し、定量性を検討する。
 - 26) 麻しん患者由来のサンプルに含まれる麻しんウイルスのコピー数を real-time PCR で測定する。
 - 27) 各地域レベルで ARI 分離株のウイルス学的解析および代表株の系統保存・遺伝子情報集積を行う。
 - 28) 病原検索法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うとともに検査法の普及を図る。
 - 29) 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) の供給体制を充実する。
 - 30) 血清疫学調査を試み、それぞれのウイルスの流行実態を血清疫学的に把握する。
 - 31) ARI ウイルス感染と病態について、感染ウイルス側および生体側から種々の検索、解析を実施する。
 - 32) 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証する。

【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、個人情報の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2008年4-11月にかけて、下水処理場流入口1号、3号及び河川水から月2回、合計48回採水を行い、96サンプルが得られた。RD、HEp-2、Vero、L20Bに接種したところ、各々34、27、11、8株のウイルスが分離された。これらのウイルスについて血清型を同定中である。
- 2) 2008年には、26株のポリオウイルスが分離され、すべてOPV-likeポリオウイルスであった。「フィルター吸着溶出法」のウイルス回収方法を検討した結果、31.9%~90.9%のウイルスが回収され、高い回収率が得られた。
- 3) 海外旅行者由来のエンテロウイルス50株の配列は、各々の血清型の既知の塩基配列と75%以上の相同性を示す一方、他の血清型との相同性は70%以下であり、感染症発生动向調査では分離検出経験がない希な血清型であった。
- 4) 培養細胞ではHEVs 49株が分離され、49株中48株はHEV Bに属するウイルスであり、分離率は22.7%であった。これに対して、CODEHOP VP1 RT-snPCR法によるHEVsの検出・同定では、陽性率は48.6%と2倍以上の高値を示した。
- 5) 無菌性髄膜炎疑い患者由来検体の解析により、髄液PCRにてエンテロウイルス陽性が8例、うち3例で髄液細胞数増多を認めた。髄液PCR陽性例では発熱、頭痛、嘔吐、髄膜刺激症状の4症状を、陰性例では2~4症状を認めた。髄液PCR陽性例では、陰性例に比し炎症性サイトカインが有意に上昇していた。
- 6) GATWAYシステムによるプラスミドライブラリーおよび新しいレスキューシステムにより作成した。新たな麻疹抗体ライブラリーは、細胞を利用した抗体スクリーニングにより、短時間で簡便に効率よくscFvを同定できる可能性が示唆された。
- 7) カンボジアのAFP患者由来の糞便256検体から、RealTime-PCR法では、18検体がHPeV陽性(7.0%)となり、陽性検体からHPeV1、HPeV3、HPeV5が同定された。HPeV5は日本では検出例がない血清型/遺伝子型であった。
- 8) EV71の感染を特異的に阻害する3化合物を同定し、またPVおよびEV71の感染を共通に阻害する化合物としてGW5074(Raf-1阻害剤)を同定した。感染細胞の細胞変性効果の発現を指標として両性変異株の分離を試みた結果、GW5074に対する両性変異株は分離されなかった。
- 9) アイチウイルス2A変異ウイルスはVero細胞でのゲノム複製は認められなかった。無細胞翻訳-複製系を利用した解析では、マイナス鎖合成量が減少していたのに加え、プラス鎖合成は、ほとんど検出できないレベルに減少していた。2Aは核と細胞質全体に分布し核周囲に濃い染色像が観察された。
- 10) TRIFノックアウトマウスは野生型マウスと比較してウイルス感受性が大きく増しており、肝臓、脾臓、腎臓などの非標的組織においてもウイルス量が増加していた。MyD88ノックアウトマウスはやや感受性が増している程度であった。ヒトgenomic 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。
- 11) 野生株ポリオウイルス保有施設調査のフォローアップと調査結果の評価・解析を行い、厚生労働省

および WHO 西太平洋地域と協力して、保有施設調査報告書を作成した。

- 12) 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質問紙調査を行ない、2008年12月31日までに990診療科から回答を得た。報告麻疹入院例は748例、死亡1例、ワクチン後の入院2例であった。年齢は日齢22日~84歳に分布し、10~30代が全体の92%を占めた。
- 13) 衛生微生物技術協議会研究会・レファレンス委員会においてレファレンスセンターの設置がまじり、北海道、東北、関東、甲・信・静岡、東海、北陸、近畿、中国・四国、九州、沖縄の9地区の地衛研の中にレファレンスセンターをおいた。
- 14) 感染研・レファレンスセンター・地衛研の役割を決定し、標準検査法としてRT-PCR法を選択した。
- 15) RT-PCR法の精度管理を目的として、陽性対照をかねたreference RNAを作製した。レファレンスセンターを通じて各地方衛生研究所に配布した。
- 16) 大阪府堺市では、41例の麻疹届出があり、そのうち27例が確定診断された。確定診断された例では、成人麻疹が63%を占めた。
- 17) 麻疹検査依頼された44例76検体から遺伝子検出、ウイルス分離を行い、22検体からウイルス遺伝子が検出され、17検体からウイルスが分離された。検出された麻疹ウイルス遺伝子はすべてgenotype D5に属した。
- 18) 末梢血検体31例のうち、遺伝子が検出された10例ではすべてウイルスが分離されたが2例ではIgM抗体が検出されなかった。遺伝子が検出されなかった21例では19例がIgM陰性だが、2例はIgM判定保留であった。
- 19) 北海道では2008年度に1462例の麻疹患者報告があった。20才未満が80%を占めた。
- 20) 咽頭拭い液28検体のうち、20検体からRT-PCR法でウイルス遺伝子が検出され、すべてD5に属した。
- 21) 東北・新潟ブロックではブロック内の地衛研の検査状況を把握した結果、検体としては咽頭拭い液が多く、検査方法は遺伝子検出、PA法によるIgG抗体測定であった。
- 22) 山形では配布されたレファレンスRNAを用いてRT-PCR法の感度を確認した上で、ブロック内の地衛研が過去に診断した23検体を再診断し、結果を

比較した。すべての結果が一致したことから、東北・新潟ブロックの地衛研においては遺伝子検出体制が整備されていると考えられた。

- 23) 2008年の山形県での麻疹患者報告は12件、うち確定診断は10件(臨床診断6、民間の検査センター4件)であった。積極的疫学調査で疑い例2例を検討した。
- 24) 千葉県では2008年度に1071件の報告があり、うち45%がワクチン接種を経験していた。集団発生例では柔道大会から広がった流行を調査した。
- 25) 82検体からウイルス分離、RT-PCRによる遺伝子検出を行い、遺伝子検出されたものは46検体、ウイルス分離されたものは17検体であった。ウイルスgenotypeはD5:41例、H1:2例、A:1例だった。
- 26) 石川県では2007年に134件の届出があり、そのうち74件が確定された。うち、成人麻疹が54人(約73%)であった。検査依頼のあった73検体(咽頭拭い液+血液:46検体、咽頭拭い液:22検体、血液:6検体)のうち、遺伝子検出陽性は34検体(46.6%)であった。遺伝子解析を行った7検体ではD5:6検体、A:1検体であった。
- 27) 患者確定率はRT-PCR診断を実施しなかった成人麻疹疑い例では、RT-PCRを実施しない麻疹例、RT-PCRを実施した麻疹、成人麻疹例と比較して高かった(76.6% vs 40.0%, 47.4%, 42.9%)。
- 28) veal broth、あるいはPBSにグリセロールを添加することにより4℃で3週間後、-20℃で4ヶ月後でもウイルスが安定的に保存出来ることをしめした。
- 29) 愛知県では2008年に198件の麻疹報告があり、麻疹103例、成人麻疹95例であった。
- 30) 大阪府では血液が得られた30検体でRT-PCR法とIgM ELISA測定の結果を比較し、PCR陽性15検体のうちIgM陽性は11検体、陰性は3検体、判定保留は1検体であった。PCR陰性15検体のうちIgM陽性が2検体、陰性が12検体、判定保留は1検体であった。PCR陽性であった15検体はD5が14、H1が2検体であった。
- 31) 中国・四国ブロックでは所轄内の地衛研に検査体制に対するアンケートを実施し、RT-PCR法はすべての地衛研で対応可能であった。ウイルス分離用のVero/SLAM細胞を感染研より入手した。

- 32) 2008年の中国・四国ブロックの検査実施状況は患者数39名、49検体で患者以外のIgG抗体調査等を258件行った。
- 33) 検体の運送に関する行政の関わり方、検査を実施する上での倫理面での扱いなどの問題点を指摘した。
- 34) 福岡県では麻疹検査マニュアルの新たなRT-PCRの評価を行うと共に、8名10検体から得られた検体より麻疹遺伝子検出を試み、6人8検体より遺伝子を検出した。D5:5検体、A:2検体であった。
- 35) 沖縄県では220の麻疹疑い例が報告され、217検体について検査がなされた。結果確定診断例は41例で、うち34例が成人麻疹であった。血液検体136例でIgM抗体価とPCRの結果の相関性を検討した。一致率は陽性例で65%、陰性例88%、全体で84%であった。PCR陽性、IgM陰性の検体はすべて発疹後2日以内であった。
- 36) 麻疹初感染およびPVF例では、急性期(発疹出現後2日以内)IgM抗体は3抗体指数以上の値を示しているが、IgG抗体は4.0EIA価未満であった。また、SVF患者においては、-1~0病日のIgM抗体は1例を除き陰性から弱陽性であるが、1病日を過ぎると多くは3.0抗体指数以上を示していた。麻疹ウイルス感染症例では発熱時IgM抗体は陰性、IgG抗体陽性であり、IgG抗体は極めて短期間に128EIA価以上に上昇した。
- 37) MRワクチン接種後の副反応が疑われた5例を対象にLAMP法を実施し、接種7-9日後に発熱を示した3例はワクチン由来と判定された。
- 38) 最近のC1, D3, D5, D9流行株からH遺伝子、F遺伝子をクローニングし、発現プラスミドを構築して細胞融合能を検討したところ、B95a細胞では融合能を示したが、差は見られなかった。
- 39) 麻疹ウイルスN遺伝子を標的とするreal-time RT-PCR法が確立され、A, D3, D5, D9, H1のgenotypeのウイルスで検体中に含まれるウイルス遺伝子を定量できることが確認された。real-time PCRを用いて患者サンプルより麻疹ウイルス遺伝子のコピー数と測定したところ、 3.9×10^3 ~ 5.2×10^6 copy/mlの遺伝子が含まれていた。
- 40) 山形県、福島県、栃木県、群馬県、滋賀県、高根県、佐賀県、沖縄県域のARIウイルスサーベイランスをそれぞれ実施した。その結果、RSVが79株、hMPVが62株、RVが56株、PIVが85株およびhBoCVが17株それぞれ分離/検出された。
- 41) 山形県においてはウイルスサーベイランスを効果的に実施するための、独自のシステムを開発している。このシステムを活用して1988-2007年間に分離されたAdV-1, -2, -3, -4, -5および6型のヘキソンHVRのシークエンス解析を行った。各血清型では、長期にわたり99-100%の相同性で塩基が保存されていることが明らかとなった。
- 42) 栃木県におけるウイルスサーベイランス検査体制の整備等を図り、これまで検査未対応のARIウイルスを対象にウイルスサーベイランスを実施した。RSV, hMPV, RVおよびhBoCV等が検出された。
- 43) 沖縄県における2006年~2008年間のRSV感染症の発生状況を調査した結果、いずれの年も夏季(雨期)に流行がみられ、全国の流行期(主に冬季)と異なっていた。検出されたRSVの遺伝子解析結果からSubgroup A (GA2)型が主流であったが、Subgroup B (BA)型も確認された。
- 44) 2007年秋~2008年春、気道症状を来たし国立病院機構横浜医療センターを受診した児62名のRSV分離状況と臨床背景に関して検討を行った。対象児の月齢は、生後3週間から生後44ヶ月(平均±SD 13.3ヶ月±10.5ヶ月)。男児40名女児22名。RSV培養陽性は22名、うち迅速キットでは陰性だったが培養陽性だった児が3名いた。RSV培養陽性、陰性で入院期間、入院中の治療内容に差はなかった。
- 45) 入院加療を必要とした気管支炎乳幼児患者から分離されたRSV17株のN、G及びF遺伝子に関する分子疫学解析を行った。7株はSubgroup A、10株はSubgroup Bに分類され、さらにG遺伝子の系統解析から、Subgroup AではGA2、Subgroup BではBAに分類された。
- 46) 2001~07年に山形県および福島県において分離されたRV計91株のVP4-2遺伝子の系統解析を行った。系統樹上、90株はgenogroup A (RV-A)、1株はgenogroup B (RV-B)に分類された。
- 47) 2007年から2008年間にARI患者から採取された臨床検体からヒトボカウイルスhBoVの検出を試みた。701検体のうち14検体からhBoV遺伝子が検出された。検出されたhBoV遺伝子のうちの7株に

ついて全遺伝子領域 (5299bp) を解析し、系統樹解析を行った結果、6株はgroup1に、1株はgroup2に分類された。

- 48) 2008年～2009年の間に分離されたRSV32株の抗RSVヒトモノクローナル抗体(商品名:シナジス、アボット)に対する中和反応性を検討した。その結果、いずれの供試株も抗RSV抗体に対して $100 \times 2^{15-16}$ 倍の中和価が得られた。
- 49) 重症心身障害児(者)病棟における平成19年と20年の2年間の感染症流行について調査を行った。全国の重心病棟では、約0.5回/病棟/年の感染症流行がみられ、ノロウイルス感染症(0.13回/病棟/年)、インフルエンザ(0.1回/病棟/年)より病原体不明感染症(0.2回/病棟/年)の流行頻度が最も高かった。
- 50) 愛媛病院職員のウイルス抗体検査を実施した結果、風疹抗体は陰性7.2%、擬陽性2.7%、ムンプス抗体は陰性3.2%、擬陽性14.4%と高頻度であった。
- 51) RSVと好酸球をPAF存在下、共培養した場合RSVは有意に好酸球表面に吸着した。このとき好酸球表面の接着因子(a μ b2, CD11b/CD16)発現が有意に亢進した。さらに、好酸球からの活性酸素(O_2^-)放出も増強した。以上のことから、RSVは好酸球を活性化し、好酸球のエフェクター機能を増強することが示唆された。
- 52) 昨年度に引き続いてARIウイルス検査に伴う標準品の供給体制を拡充するため、RSV, RV, PIV, hMPV等のそれぞれの国内臨床分離株増殖および遺伝子情報解析を継続実施し、レファレンス参照株として保存した。
- 53) 地方衛生研究所で実施されている病原体サーベイランスを実施する際の標準的な実験室検査法を整備するため、病原体検出マニュアルhMPV編を公開した。さらに、現在RVおよびPIV編等を作成中である。

D. 考察

- 1) L20B細胞は主にポリオウイルス特異的な感受性を示す細胞である。今般8分離株(8/96, 8.3%)が得られたがポリオウイルスかどうかを確認中であ

る。2006年の広東省AFP流行状況によればAFP患者便286検体からPVが13株(4%)分離されている。今後のウイルス同定結果で環境水からのウイルス分離の費用対効果を検討したい。

- 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。「フィルター吸着溶出法」改良法を検討し、エアロゾルの発生が危惧される超音波処理の代わりに、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明らかとなった。
- 3) 海外渡航者由来エンテロウイルスのうち、分離例の多いエコーウイルス6型、11型、18型、25型について、愛知県の実験室と比較したところ、塩基配列や分離時期から海外から持ち込まれたものと推定され、海外から県内へ頻りに多様なエンテロウイルスが持ち込まれているものと推察された。
- 4) CODEHOP VP1 RT-s μ nPCR法により同定されたHEVsの7割以上は、培養細胞で分離しにくいHEV Aに属するウイルスであった。本方法は従来のウイルス分離同定法に比較して、多検体処理への応用も可能な極めて有用な方法である。
- 5) 無菌性髄膜炎患者由来検体の解析により、EV感染症における中枢神経合併症は、髄液細胞増多を認めない例でも生じていることが推察され、病因診断は重要であると考えられた。
- 6) 新たに作製した麻疹抗体ライブラリーを用いることにより、今後、ウイルスそのものや、ウイルス蛋白、又はウイルス感染細胞に対するバイオパンニングを行い、ウイルス特異的抗体の同定を試みる。
- 7) カンボジアのAFP患者糞便検体から、HPeV1, HPeV3, HPeV5が検出された。HPeV5は日本では検出例がない血清型/遺伝子型であり、地域により伝播するHPeVのタイプが異なっていることが示唆された。HPeV陽性18検体のうち10検体からエンテロウイルスが検出され、エンテロウイルスとの重感染が多いことが推測された。
- 8) 同定したEV71感染阻害化合物に対する耐性変異株が分離されたことから、ウイルスタンパク質を標的として感染を阻害することが示唆された。GW5074耐性変異株は分離されなかった。GW5074は、PVおよびEV71の複製の中で非常に保存された部位もしくは複製過程を標的としていることを示唆

- する。
- 9) アイチウイルスの2Aタンパク質は、ゲノム複製に重要な役割を果たしていることが示唆された。核にも2Aが分布していたことから、ゲノム複製に直接関わるだけでなく、感染細胞にも何らかの影響を与えている可能性も考えられた。
 - 10) ポリオウイルスの感染は主にTRIFの関与する経路によって検知され、IFN応答が引き起こされるために効率のよい防御が成立していると考えられた。マウスでの感染効率を上昇させるためには、TLR3経路の消化管でのconditional KOなどの方法が有効である可能性を示唆している。ヒトEV71レセプター発現EV71感受性細胞株を樹立することに成功した。EV71、CVA16に特異的に感染するため、実験室診断への応用が期待できる。
 - 11) 野生株ポリオウイルス保有施設調査のフォローアップと調査結果の評価・解析を行い、WHOポリオ根絶認定委員会に調査報告書を作成・提出した。調査結果のフォローアップを継続するとともに、世界ポリオ根絶に向けた、より厳格なポリオウイルス実験室封じ込め基準に対応する必要がある。
 - 12) 麻しんは従来子どもの疾患と思われてきたが、入院診療科も皮膚科や内科が大半をしめ、最も重症な合併症である麻疹脳炎も都内だけで5例報告されており、死亡例も1例報告された。罹患による重症化の可能性を含め、麻疹に関する正確な情報提供が重要と考えられた。麻疹教育啓発用DVDに対して各方面から多くの要望が届いており、麻疹教育啓発に対する関心の高さが明らかとなった。
 - 13) 麻疹検査診断のよる麻疹サーベイランス体制は、麻疹の感染拡大阻止だけではなく、麻疹排除までの過程に必須な麻疹動向を正確に把握するためにも重要であり、2012年までの麻しん排除のため精度の高いサーベイランス体制は必須である。
 - 14) 検査診断の標準法として採用した麻しんRT-PCR法はすでに広く行き渡っており、地方衛生研究所によっては独自の方法を持っているところもある。今年度は、麻疹検査マニュアルによる方法だけではなく、それ以外の方法においても精度管理ができるよう、reference RNAを調整した。
 - 15) 麻疹遺伝子検出は感染早期の検体においてはIgM抗体検査よりすぐれていた。一方、遺伝子検出陰性の検体からIgM陽性であった例もあった。麻疹IgM抗体の判定保留の中には、例えばカタル期には鑑別診断の困難な他のウイルス感染による交差反応の可能性が考えられた。PCR法も万能とはいえず、麻疹の診断は、IgM抗体の検出、患者の臨床症状やワクチン接種歴、ほかの感染者との接触歴など総合的に判断する必要があると考えられ、診断に関する指針が必要と思われた。
 - 16) 2007-2008年の流行は20歳前後の若者を中心としたものであった。この年齢層の行動範囲の広さ、集団での接触の機械の多さを考慮すると、現在進められている麻疹・風疹ワクチンの3・4期の2回接種法による接種率上昇が封じ込め対策として重要である。特に成人麻しんにおける診断の難しさもあり検査診断がより重要になる。
 - 17) 4℃、或いは-20℃等の比較的高い温度でも検体を長期に保存できる方法は有用であり、検査の融通性を高めると考えられた。
 - 18) 現在は医療機関においては、麻疹検査診断の必要性があまり認識されていない場合があり、典型例であっても検査診断を実施するという認識を共有する事が必要である。その際、採取すべき検体の種類、時期等を明示する事が重要である。検査検体が集まらなかった理由の一つに、定点報告から全数報告となったため、定点医療機関からの検査検体が搬入されなくなった（行政検査の依頼がない）ことが原因となっていると考えられる。検体、情報の伝達、運搬等を担う保健所を含む行政側との積極的な連携、ならびに検査・輸送費用等の予算化が麻疹検査診断体制の強化のため重要である。
 - 19) 麻疹ウイルス感染による血清IgM抗体・IgG抗体パターンは、麻疹ウイルス曝露時の免疫状態に応じて特徴的なパターンをとることが示された。SVF例ではIgG抗体が128EIA単位以上に上昇すると同時にIgM抗体も3.0抗体指数以上を示すが、麻疹ウイルス感染例では、IgG抗体が128EIA価以上を示しても、IgM抗体は陰性または弱陽性であった。麻疹ウイルス感染早期にIgG抗体が上昇すると症状が出現せず、IgG抗体の上昇が遅れると軽症の麻疹を発症すると推察された。
 - 20) 血清IgM抗体またはIgG抗体が検出されても、PBMCから麻疹ウイルスが高頻度に分離された。血中抗

体は細胞内で増殖しているウイルスには働かないという説を裏付けた。

- 21) ワクチン接種後の副反応の原因の調査にLAMP法は有用である。
- 22) real-time PCR法の確立によって、迅速かつ実験室内コンタミを軽減した麻しん診断が可能となった。また、反応液内の麻しん遺伝子の定量が可能になったことから、病態とウイルス数との相関等の解析にも応用できる可能性がある。
- 23) ARI症例の病原検索を試みた我々の研究結果から、RSV, hMPV, RV, PIV, AdV等のウイルスが多数検出され、臨床症状等から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。
- 24) 今年度は新たにRV分離株の分子疫学解析と新興ARIウイルスの一つのhBoCVについて、わが国の株の全領域遺伝子解析を実施したことは特記すべき成果と考える。
- 25) レファレンス機能強化を図るため代表的なARIウイルスについて検査に必要なレファレンス参照株、標準品等の整備、拡充を継続して展開している。とくに検査法の普及が重要であることから、病原体検出マニュアルの整備を継続実施している。今年度はメタニューモウイルス編を公開した。
- 26) さきに実施したARIアンケート調査結果をふまえ、サーベイランスを実施する人材確保の見地から、国立保健医療科学院ウイルス研修の機会を活用してARIウイルスに関する実習(細胞培養、ウイルス分離培養・同定、遺伝子検査、等)を実施した。今後、さまざまな機会を活用して同様の試みを図り、技術の紹介・普及に努める。

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重要であり、地方衛生研究所・感染研間の連携による麻疹検査実施体制が整備されつつある。麻しん検査診断法としてRT-PCR法を選択し、いくつかの優位な点は確認されたが、必ずしも万能でないことも明らかになっている。判定が困難な場合には他の測定結果を含めて総合的に判断する必要がある。今後、検査診断による麻疹サーベイランス体制の強化には、予算措置、保健所との連携等の行政面からのサポートとともに医療機関との認識の共有が重要となってくる。

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った。研究第二年次の成果は以下のとおりである。1) RSV, hMPV, RV, PIVおよびhBoV等のさまざまなウイルスのARIへの関与を確定した。2) RSV, RVおよびhBoV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。3) RSV感染に起因する病態、とくに感染喘息への関与を臨床ウイルスおよび遺伝子学的に解析した。4) 地方衛生研究所におけるARIウイルスサーベイランス実験室体制整備を試み、評価等を行った。5) 限定施設内の感染症流行実態を調査した原因の一部を確定した。6) 一集団のARIウイルスの血清抗体調査を実施した。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wakatsuki K, Kawamoto D, Hiwaki H, Watanabe K, Yoshida H: Identification and characterization of two strains of human parechovirus 4 isolated from two clinical cases in Fukuoka City, Japan. *J Clin Microbiol* 46: 3144-6, 2008
- 2) Iwai M, Takizawa T, Nakayama T, Matsuura K, Yoshida H, Hasegawa S, Obara M, Hirimoto 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* 40: 247-253, 2008
- 3) Sasaki J, Taniguchi K: Aichi virus 2A protein is involved in viral RNA replication. *J Virol* 82: 9765-9769, 2008
- 4) Hamaguchi T, Fujisawa H, Sakai K, Okino S, Kurosaki N, Nishimura Y, Shimizu H, Yamada M: Acute Encephalitis Caused by Intrafamilial Transmission of Enterovirus 71 in Adult. *Emerg Infect Dis* 14: 828-830, 2008
- 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. *J Med Virol* 80: 670-679, 2008
- 6) 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
- 7) Arita M, Wakita T, Shimizu H: Characterization of pharmacologically active compounds that inhibit poliovirus and enterovirus 71 infectivity. *J Gen Virol* 89: 2518-30, 2008
- 8) Thorley BR, Kelly HA, Nishimura Y, Yoon YK, Brussen KA, Roberts JA, Shimizu H: Oral poliovirus vaccine type 3 from a patient with transverse myelitis is neurovirulent in a transgenic mouse model. *J Clin Virol* (in press)
- 9) Final quality assurance report of phase 1 wild poliovirus laboratory containment in Japan: WHO report, December, 2008
- 10) Country Progress Report on Maintaining Polio-free Status, Japan: WHO report, December, 2008
- 11) Sakata, M., Komase, K., and Nakayama, T. Histidine at position 1042 of the p150 region of a KRT live attenuated rubella vaccine strain is responsible for the temperature sensitivity. *Vaccine* 7: 234-42, 2009
- 12) Hata M, Tanaka S, Kumagai N, Noma M, Ichinohe K, Hashimoto M, Yamashita T, Minagawa H: Genetic analysis of HA gene of Influenza A (H3N2) viruses isolated from returning travelers at Chubu International Airport in Aichi Prefecture. *Jpn J Infect Dis* 62:78-80, 2009
- 13) Kurata T, Miyagawa H, Furutani E, Kase T, Takahashi K. An outbreak of measles classified as genotype H1 in 2008 in Osaka Prefecture. *Jpn J Infect Dis* 62:76-77, 2009
- 14) Yoshida N, Fujino M, Miyata A, Nagai T, Kamada M, Sakiyama H, Ihara T, Kumagai T, Okafuji T, Okafuji T, Nakayama T: Mumps virus reinfection is not a rare event confirmed by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *J Med Virol* 80: 517-523, 2008
- 15) Shinjoh M, Miyairi I, Hoshino K, Takahashi T, Nakayama T: Effective and safe immunizations with live-attenuated vaccines for children after living donor liver transplantation. *Vaccine* 26:9859-9863, 2008
- 16) Nagai M, Ji YX, Yoshida N, Miyata A, Fujino M, Ihara T, Yoshikawa T, Asano Y, Nakayama T: Modified adult measles in outbreaks in Japan, 2007-08. *J Med Virol* (in press)
- 17) Taira K, Nakamura M, Okano S, Nidaira M, Kudaka J, Itokazu K, Taira T, Itokazu T, Chinen M, Sunagawa T, Kimura H: Phylogenetic Analysis of Nucleoprotein (N) Gene of Measles Viruses Prevalent in Okinawa, Japan, during 2003-2007. *Jpn J Infect Dis* 61: 247-248, 2008
- 18) Akiyama M, Kimura H, Tsukagoshi H, Taira K,

- Mizuta K, Saitoh M, Nagano M, Sutoh A, Noda M, Morita Y, Sakatsume O, Okabe N, Tashiro M: Development of assay for the detection and quantitation of measles virus nucleoprotein (N) gene using real-time reverse transcription polymerase chain reaction (real-time RT-PCR). *J Med Microbiol* (in press).
- 19) Mizuta K, Abiko C, Aoki Y, Suto A, Hoshina H, Itagaki T, Katsushima N, Matsuzaki Y, Hongo S, Noda M, Kimura H, and Ootani K: Analysis of monthly isolation of respiratory viruses from children by cell culture using a microplate method: a two-year study from 2004 to 2005 in Yamagata, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 61:196-201, 2008
- 20) Mizuta K, Matsuzaki Y, Hongo S, Ohmi A, Okamoto M, Nishimura H, Itagaki T, Katsushima N, Oshitani H, Suzuki A, Furuse Y, Noda M, Kimura H, Ahiko T: Stability of the seven hexon hypervariable region sequences of adenovirus types 1-6 isolated in Yamagata, Japan between 1988 and 2007. *Virus Res* (in press)
- 21) Matsuzaki Y, Itagaki T, Abiko C, Aoki Y, Suto A, Mizuta K: Clinical impact of human metapneumovirus genotypes and genotype-specific seroprevalence in Yamagata, Japan. *J Med Virol* 80:1084-1089, 2008
- 22) Yamaguchi T, Kimura H, Kurabayashi M, Kozawa K, Kato M: Interferon- γ enhances human eosinophil effector functions induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or interleukin-5. *Immunol Lett* 118: 88-95, 2008
- 23) Hishinuma-Igarashi I, Mizuta K, Saito Y, Ohuchi Y, Noda M, Akiyama M, Sato H, Tsukagoshi H, Okabe N, Tashiro M, Kimura H: Phylogenetic analysis of human bocavirus (HBoV) detected from children with acute respiratory infection in Japan. *J Infect* (in press)
- 24) 岩井雅恵, 松浦久美子, 滝澤剛則: 富山県における環境水ウイルスサーベイランスの疫学的意義. *臨床とウイルス* 36: 127-133, 2008
- 25) 正木明夫, 中山亜希代, 岩井雅恵, 滝澤剛則: コクサッキーウイルス B2 型によると考えられた手足口病様発疹症の集団発生. *小児感染免疫* 20: 301-305, 2008
- 26) 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* 31: 70-84, 2008
- 27) 岩井雅恵, 中村一哉, 小原真弓, 長谷川澄代, 堀元栄詞, 倉田毅, 滝澤剛則: 下水流入水の腸管系ウイルス調査 (2006-2008 年). *富山県衛生研究所年報* 31: 96-103, 2008
- 28) 山下照夫, 伊藤 雅, 川口まり子, 田中正大, 秦真美, 小林慎一, 柴 賢司, 皆川洋子: 感染性胃腸炎および流行性角結膜炎からのアデノウイルス検出状況—愛知県, 病原微生物検出情報 29(4): 96-98, 2008
- 29) 中野貴司: ポリオワクチン. *チャイルドヘルス* 11: 161-163, 2008
- 30) 中野貴司 (分担執筆). ポリオおよびポリオ様麻疹. 代表編集 岩田力; 小児疾患診療のための病態生理 (第4版). 1173-1177. 2008. 東京医学社, 東京.
- 31) 中野貴司 (分担執筆). ポリオワクチン (生ポリオワクチンの接種法 P97-99, 生ポリオワクチンの副反応 P100-101, ポリオワクチン未接種者への対応 P102-103, ポリオ根絶計画とポリオの現状 P104-105, 不活化ポリオワクチン P106-107). 総編集 五十嵐隆, 専門編集 渡辺博, 小児科臨床ピクシス 4; 予防接種. 2008 年. 中山書店, 東京.
- 32) 清水博之: ポリオワクチン接種後のワクチン関連麻疹. *日本医事新報* 4376: 114, 2008
- 33) 高山直秀, 弘 崎, 清水博之, 宮村達男, 加藤達夫, 哲 梅: 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: 2007 年度調査報告. *日本医師会雑誌* 137: 1486-1491, 2008
- 34) 清水博之, 武田直和: 不活化ポリオワクチン導入の必要性和問題点. *日本臨床* 66: 1950-5, 2008
- 35) 清水博之: 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. *臨床とウイルス* 26: 149-158, 2008

- 36) 清水博之: ポリオワクチン. *VIRUS REPORT* 5: 56-64, 2008
- 37) 清水博之: 急性灰白髄炎 (ポリオ). *総合臨床* 57: 335-336, 2008
- 38) 清水博之: ポリオ・コクサッキー・エコーウイルス, *バイオセーフティの辞典, みみずく舎*, 263-265, 2008.
- 39) 西村順裕, Umami RN, 弘 吉, 清水博之: CODEHOP PCR によるエンテロウイルス同定. *病原微生物検出情報* 30: 12-13, 2009
- 40) 清水博之: 東アジアにおけるエンテロウイルス 71 型感染症の流行. *病原微生物検出情報* 30: 9-10, 2009
- 41) 吉田弘, 清水博之: エンテロウイルスの実験室診断の現状と問題点. *病原微生物検出情報* 30: 10-12, 2009
- 42) 清水博之: 不活化ポリオワクチン開発の現状. *臨床と微生物* 36: 35-40, 2009
- 43) 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
- 44) 駒瀬勝啓: 風疹ワクチンの効果と再感染. *臨床とウイルス* 35: 32-38, 2008
- 45) 駒瀬裕子, 駒瀬勝啓: インフルエンザ. *Medical Practice* 25(5): 787-793, 2008
- 46) 駒瀬勝啓, 木村博一, 長野秀樹, 岡野素彦, 青木洋子, 小川知子, 皆川洋子, 倉本早苗, 加瀬哲男, 小倉肇, 千々和勝己, 平良勝也, 田中智之: 麻疹診断体制ならびに検査診断法について. *病原微生物検出情報* 30(2): 45-47, 2009
- 47) 地主勝, 伊木繁雄, 長野秀樹, 奥井登代, 岡野素彦: 2007 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, 2008
- 48) 吉岡康, 齊加志津子, 小倉誠, 岡田峰幸, 篠崎邦子, 小川知子, 一戸貞人: 2008 年千葉県における高校柔道大会に起因した麻疹集団発生. *病原微生物検出情報* 30 (2): 32-34, 2009
- 49) 倉本早苗, 尾西一, 大矢英紀, 芹川俊彦, 菊地修一, 近藤邦夫: 石川県における「麻疹迅速把握事業」とウイルス学的検査. *病原微生物検出情報* 28(8): 221-223, 2007
- 50) 倉田貴子, 宮川広実, 加瀬哲男, 高橋和郎, 古谷悦美: 大阪府内で発生した H1 型麻疹ウイルスの国内感染事例. *病原微生物検出情報* 29 (6), 160-161, 2008
- 51) 倉田貴子, 宮川広実, 加瀬哲男, 高橋和郎, 金野浩, 三好洋子, 山本威久: 大阪府内で検出された D4 型麻疹ウイルスの輸入症例. *病原微生物検出情報* 30 (2): 11-12, 2009
- 52) 濱野雅子, 小倉肇: 麻疹及び風疹の迅速診断のための検査法の検討. *岡山県環境保健センター年報* 32: 129-132, 2008
- 53) 平良勝也, 岡野祥, 仁平稔, 糸数清正, 久高潤, 中村正治, 多和田弘, 国吉秀樹, 大嶺悦子, 山川宗貞, 松野朝之, 上野健司, 宮川桂子, 中村孝一, 島袋全哲, 下地崇, 平良セツ子, 川上典子, 小林孝暢, 松野朝之, 知念正雄: 2008 年の麻疹発生状況 - 沖縄県. *病原微生物検出情報* 30 (2): 34-36, 2009
- 54) 平良勝也, 岡野祥, 仁平稔, 糸数清正, 久高潤, 中村正治, 大城志乃, 松野朝之, 松野朝之: 2007 年 10 月に発生した他県からの移入例を発端とした麻疹集団感染事例 - 沖縄県. *病原微生物検出情報* 30 (2): 36, 2009
- 55) 庵原俊昭: 麻疹・風疹・ムンプス (流行性耳下腺炎)・水痘感染対策: 抗体測定とその評価. *CAMPUS HEALTH* 45: 9-14, 2008
- 56) 庵原俊昭: 成人麻疹の診断と対策. *こどもの感染症の診かた* 11, 3-4, 2008
- 57) 庵原俊昭: 麻疹, 風疹, ムンプスワクチンの現状. *メディカル・サイエンス・ダイジェスト* 34(10), 18-21, 2008
- 58) 庵原俊昭: 麻疹. *小児内科* 40 増刊号: 1110-1114, 2008
- 59) 庵原俊昭: ウイルス感染症診断に必要な検査とその読み方. *日本皮膚科学会雑誌* 118: 2727-1730, 2008
- 60) 松田俊二, 野田雅博: 重症心身障害児 (者) 病棟における感染症流行について. *医療* 62, 679-683, 2008

2. 学会発表

- 1) 岩井雅恵, 中村一哉, 吉田弘, 帖佐徹, 小原真弓, 長谷川澄代, 堀元栄詞, 滝澤剛則, 倉田毅: ポリオウイルスの環境水からの効率的検出方法の検討.

- 第56回日本ウイルス学会、岡山市、2008年10月
- 2) 伊藤 雅、山下照夫、皆川洋子: 愛知県におけるヒトパレコウイルス (HPeV) の検出状況、第49回日本臨床ウイルス学会、犬山、2008年6月
 - 3) 山下照夫: 発生動向からみた胃腸炎の新知見—パレコウイルス、コブウイルス、ノロウイルス、第49回日本臨床ウイルス学会、犬山、2008年6月
 - 4) Yamashita T, Ito M, Tsuzuki H, Sakae K, Minagawa H: Molecular Identification of Enteroviruses Including Two New Types (CV-A9 and EV-98) Isolated from Japanese Travelers Returning from Southeast Asia. XIV. International Congress of Virology, Istanbul, August, 2008
 - 5) 山下照夫、伊藤 雅、皆川洋子: 下水から検出された新型アイチウイルスと推定される遺伝子断片の解析、第56回日本ウイルス学会、岡山、2008年10月
 - 6) 浅田和豊、中野貴司、松野紋子、田中孝明、伊東宏明、一見良司、菅秀、藤澤隆夫、庵原俊昭、赤地重宏、田沼正路、大熊和行: 第245回日本小児科学会東海地方会、2008年夏に三重県津市周辺で流行したエンテロウイルス感染症について、名古屋市、2009年2月22日。
 - 7) 石川球美子、佐々木潤、前野芳正、守口匡子、河本聡志、谷口孝喜: アイチウイルス2Aタンパク質の性状解析、第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月
 - 8) 小池智、安部優子、永田典代、佐多徹太郎、竹内理、審良静男: ポリオウイルス感染によるIFN応答発動経路の同定 第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山市、2008年10月
 - 9) 山吉誠也、山下康子、花方信孝、箕輪貴司、竹村太郎、清水博之、小池智: エンテロウイルス71の感染性決定分子の同定 第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山市、2008年10月
 - 10) Koike S: Interferon induction in response to poliovirus infection in the poliovirus receptor transgenic mice. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, 2008. 09
 - 11) 小池 智、安部優子: ポリオウイルスと自然免疫の攻防、第12回日本神経ウイルス研究会、屋久島、2008年7月
 - 12) 山吉誠也、山下康子、花方信孝、箕輪貴司、竹村太郎、清水博之、小池智: 第12回日本神経ウイルス研究会、エンテロウイルス71の感染受容体の同定、屋久島2008年7月
 - 13) Koike S., Abe Y., Studies on poliovirus RNA sensors, XVth Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses, Barcelona, Spain, 2008.5.
 - 14) 福元伸一、長岡健太郎、中野浩輔、須甲憲明、原田真雄、平賀博明、加藤直子、西村順裕、清水博之、長谷川秀樹: コクサッキーウイルスA-16による手足口病に合併した間質性肺炎の1例、第96回日本呼吸器学会北海道地方会、札幌市、2008年9月
 - 15) 實藤雅文、楠原浩一、後藤多奉、吉良龍太郎、清水博之、鳥巢浩幸、原寿郎: コクサッキーウイルスA16の手足口病に伴って菱脳炎を呈した一例、第13回日本神経感染症学会総会、東京、2008年10月
 - 16) 有田峰太郎、脇田隆字、清水博之: GW5074のエンテロウイルス複製阻害機構の関する解析、第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山市、2008年10月
 - 17) 町田早苗、西村順裕、吉崎佐矢香、石井孝司、清水博之: カンボジア糞便検体中ヒトパレコウイルス検出とその分子疫学、第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山市、2008年10月
 - 18) Umami RN, Dhenni R, Jajuli A, Shimizu H, Utama A: Detection and identification of human enteroviruses among healthy children in Antajaya, Bogor. The 4th Indonesian Biotechnology Conference, Bogor, Indonesia, August, 2008
 - 19) Arita M, Wakita T, Shimizu H: A RAF-1 inhibitor GW5074 inhibits poliovirus and enterovirus 71 replication independently of the RAF-1 signaling pathway. Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses (EUROPIC 2008), Sitges, Spain, May, 2008
 - 20) Shimizu H: Mouse and Non-human Primate Models