

- for EV71 disease. 13th International Congress on Infectious Diseases. Kuala Lumpur, Malaysia, June, 2008
- 21) Ong K, Shimizu H, Nishimura Y, Arita M, Shamala D, Cardosa M, Wong K: Phenotypic and genotypic characterization of two mouse adapted enterovirus 71 strains that showed differences in murine CNS infection. 13th International Congress on Infectious Diseases. Kuala Lumpur, Malaysia, June, 2008
- 22) Shimizu H: Molecular basis of the pathogenicity of enterovirus 71 in experimental animal models. 20th Anniversary Symposium of Department of Pediatric National Cheng-Kung Hospital, Tainan, Taiwan, July, 2008
- 23) Kelly H, Shimizu H, Nishimura Y, Thorley B: Oral poliovirus vaccine causes transverse myelitis. Public Health Association of Australia conference. Brisbane, Australia, September, 2008
- 24) Shimizu H: Current Knowledge on the Molecular Pathogenesis of Enterovirus 71. Beijing International Symposium on Hand, foot and Mouse Disease. Beijing, January, 2009
- 25) 大槻紀之、田代真人、駒瀬勝啓、clade の異なる風疹ウイルスに対する人血清中の中和活性の比較、第49回日本臨床ウイルス学会、名古屋市 2008年6月
- 26) 鈴木潤、駒瀬勝啓、後藤浩、第62回日本臨床眼科学会、東京、2008年10月
- 27) Phengxay M, Komase K, Tanaka-Takya K, Ueno-Yamamoto K, Phengta V, Ushijima H. ラオス人民民主共和国ビエンチャン市の小学校における風疹および麻疹抗体保有率 第23回日本国際保健医療学会学術集会、東京、2008年10月
- 28) 加藤誠一、扇本真治、Luna Batta Sharma、綾田稔、竹田誠、竹内薫、駒瀬勝啓、庵原俊昭、小倉壽、麻疹ウイルスワクチン株 CAM-70 H 蛋白の CD46 と SLAM の利用能は低い、第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山市、2008年10月
- 29) 關文緒、山田健太郎、染谷健二、駒瀬勝啓、田代真人、SSPE ウイルス SI 株のリバースジェネティクス系の構築、第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山市、2008年10月
- 30) 竹内薫、藤枝奈緒、中山哲夫、駒瀬勝啓、永田恭介、神経芽腫細胞 (SH-SY5Y) におけるムンプスウイルス増殖に重要な領域の同定、第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山市、2008年10月
- 31) Yi Xin Ji, 駒瀬勝啓、庵原俊昭、中山哲夫、Amino acid substitutions in matrix (M), fusion (F) and hemagglutinin (H) proteins of wild measles virus for adaptation to Vero cells, 第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山市、2008年10月
- 32) 佐藤弘、多屋馨子、駒瀬勝啓、田代真人、岡部信彦、わが国における麻疹および風疹に対する抗体保有状況 (2007 年度感染症流行予測調査事業より)、第12回日本ワクチン学会学術集会、熊本市、2008年11月
- 33) 樋口彰、駒瀬勝啓、中山哲夫、風疹、ムンプスウイルスの envelope 蛋白を発現する組換え麻疹ワクチン株の作製、第12回日本ワクチン学会学術集会、熊本市、2008年11月
- 34) 澤田成史、駒瀬勝啓、中山哲夫、RS ウイルス、インフルエンザウイルスの外殻タンパク質を発現するキメラ麻疹ウイルスの作製、第12回日本ワクチン学会学術集会、熊本市、2008年11月
- 35) 地主勝、伊木繁雄、長野秀樹、工藤伸一、岡野素彦: 2007 年の北海道における麻疹発生状況について、第60回北海道公衆衛生学会、札幌市、2008年11月
- 36) 倉本早苗、児玉洋江、尾西 一、川島ひろ子: 石川県の麻疹流行時におけるウイルス学的検査結果についての一考察 (2007 年)、第36回北陸公衆衛生学会、福井県、2008年11月
- 37) 續木雅子、櫻井博貴、広瀬かおる、竹内一仁、皆川洋子: 愛知県における 2007 年・2008 年麻疹患者発生状況 平成 20 年度愛知県公衆衛生研究会、愛知県大府市、2009年1月
- 38) 倉田貴子、宮川広実、古谷悦美、三好洋子、金野浩、山本威久、加瀬哲男、高橋和郎: 大阪府内における麻疹ウイルスの分離・検出状況 第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山市、2008年10月

- 39) 田中孝明、中野貴司、松野紋子、伊東宏明、長尾みづほ、一見良司、下野吉樹、高橋純哉、藤澤隆夫、井口光正、庵原俊昭：小児病棟内における麻疹伝播に関する考察、第244回日本小児科学会東海地方会、名古屋市、2008年10月
- 40) 庵原俊昭、中野貴司、神谷 齊：成人における年代群別の麻疹・風疹・水痘・ムンプス抗体価の比較検討、第12回日本ワクチン学会、熊本市、2008年11月
- 41) 庵原俊昭、一見良司、中野貴司、神谷 齊：年による献血スルフォ化 IVIG に含まれる麻疹抗体価と IVIG 投与後の麻疹抗体価の検討、第40回日本小児感染症学会、名古屋、2008年11月
- 42) RSウイルス再感染と quasispecies - 20 シーズン(1985-2005)の調査 -、由井郁子、藤野元子、中山哲夫、第49回日本臨床ウイルス学会、犬山市 2008年6月
- 43) 森地振一郎、河島尚志、長尾竜兵、五百井寛明、牛尾方信、熊田篤、柏木保代、竹隈孝治、星加明徳、中山哲夫：臓器よりエンテロウイルスが陽性であった心内膜線維弹性症の一例、第49回日本臨床ウイルス学会、犬山市 2008年6月
- 44) 松原啓太、中山哲夫、岩田敏、落合仁、長井崇雄、宮田章子：ムンプスウイルスにおける EIA 値と F, HN, N 蛋白抗体の関連についての検討、第49回日本臨床ウイルス学会、犬山市 2008年6月
- 45) 岡田純、中山哲夫：集団感染防止のための入学前麻疹抗体検査とワクチン接種の検討、第12回日本ワクチン学会、熊本市、2008年11月
- 46) 小河原修、五反田亨、中山哲夫、神谷齊：新型インフルエンザワクチンの臨床試験(2)、第12回日本ワクチン学会、熊本市、2008年11月
- 47) 中山哲夫：麻疹ウイルスワクチン株と野生株の鑑別、第40回日本小児感染症学会、名古屋、2008年11月
- 48) 中山哲夫：教育セミナー、麻疹・新たな展開、第49回日本臨床ウイルス学会、犬山市 2008年6月
- 49) 中山哲夫：ワクチン推進ワーキンググループ設立の経緯と活動計画、第12回日本ワクチン学会、熊本市、2008年11月
- 50) 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、第62回国立病院総合医学会、東京、2008年11月
- 51) 松田俊二：重症心身障害児(者)病棟における感染症流行について、第78回日本感染症学会西日本地方会、広島市、2008年12月
3. 報道取材等
- 1) 清水博之：アボット感染症アワー「東アジアにおける重症エンテロウイルス71感染症の流行と分子疫学」、ラジオNIKKEI、2008年10月
- 2) 皆川洋子：金曜トーク「今年も懸念される麻疹流行」、NHK名古屋、2008年5月
- 3) 皆川洋子：アイランドEYE「はしか予防追加接種について」、東海ラジオ 2008年10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20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

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
研究協力者：	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、ポリオウイルスを含めた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) 中国広東省 CDC との共同研究により、環境からのエンテロ/ポリオウイルス検出を行い、分離ウイルスの解析を開始した。
- 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分離株と比較したところ、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) 上気道炎症状を呈した患者の唾頭ぬぐい液 216 検体から、CODEHOP VP1 RT-snPCR 法により HEVs の検出・同定を試みた。培養細胞で検出されにくい HEVs も検出可能であった。
- 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。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) 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、Final quality assurance report of phase 1 wild poliovirus laboratory containment in Japanとして、WHO西太平洋地域ポリオ根絶認定委員会に提出した。

## 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。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

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エンテロ/ポリオ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回未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-snpPCR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。

#### 【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) 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か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耐性変異株の分離を試みた結果、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いレベルにまで減少していた。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。

#### 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、愛知県分離株と比較したところ、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、海外から県内へ頻繁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-snPCR 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バニングを行い、ウイルス特異的抗体の同定を試みる。それを元にして精度の高い実験室診断システムの確立を目指す。
- 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。一方、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、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。

## 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、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、平成19-20年度の研究成果で明らかにされたように、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、パレコウイルス、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開発への応用が期待できる。

## F. 健康危機情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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 I 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) 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
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 中野貴司: ポリオワクチン. *チャイルドヘルス* 11: 161-163, 2008
- 17) 中野貴司 (分担執筆). ポリオおよびポリオ様麻痺. 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.
- 18) 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.
- 19) 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
- 20) 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
- 21) 清水博之, 武田直和: 不活化ポリオワクチン導入の必要性と問題点 [Universal use of inactivated poliovirus vaccine—the needs and challenges]. *日本臨床* 66: 1950-5, 2008
- 22) 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
- 23) 清水博之: ポリオワクチン. *VIRUS REPORT* 5: 56-64, 2008
- 24) 清水博之: 急性灰白髄炎 (ポリオ). *総合臨床* 57: 335-336, 2008
- 25) 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.
- 26) 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
- 27) 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

- 28) 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
- 29) 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
- 30) 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

## 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: 発生动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-A9r' 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 8<sup>th</sup> 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, 後藤多幸, 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, 脇田隆宇, 清水博之: GW5074のエンテロウイルス複製阻害機構に関する解析. 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 for EV71 disease. 13th International Congress on Infectious Diseases. Kuala Lumpur, Malaysia, June, 2008
- 21) Ong K, Shimizu H, Nishimura Y, Arita M, Shamala D, Cardoso M, Wong K: Phenotypic and genotypic characterization of two mouse adapted enterovirus 71 strains that showed differences in murine CNS infection. 13th International Congress on Infectious Diseases. Kuala Lumpur, Malaysia, June, 2008
- 22) Shimizu H: Molecular basis of the pathogenicity of enterovirus 71 in experimental animal models. 20th Anniversary Symposium of Department of Pediatric National Cheng-Kung Hospital, Tainan, Taiwan, July, 2008
- 23) Kelly H, Shimizu H, Nishimura Y, Thorley B: Oral poliovirus vaccine causes transverse myelitis. Public Health Association of Australia conference. Brisbane, Australia, September, 2008
- 24) Shimizu H: Current Knowledge on the Molecular Pathogenesis of Enterovirus 71. Beijing International Symposium on Hand, foot and Mouth Disease. Beijing, January, 2009
3. 報道取材等
- 1) 清水博之:アボット感染症アワー「東アジアにおける重症エンテロウイルス71感染症の流行と分子疫学」、ラジオNIKKEI、2008年10月
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

#### 研究要旨

中国は10年以上ポリオフリーであるが、野生株流行地に隣接しかつ輸入リスクを有する。また大都市部は流動人口を抱え疾患サーベイランスは困難な状況。広東省広州市をパイロットエリアとして、環境サーベイランスによるポリオ/エンテロウイルスの地域流行像を把握することを目的とした。2008年4月から11月までの流入下水、河川水調査の結果は様々な腸管系ウイルスの流行を示唆した。

#### A. 研究目的

ポリオ根絶計画はヒト集団に流行するポリオウイルス(PV)野生株を、生ワクチン投与によりワクチン型に置き換えることを基本とする。そしてAFPサーベイランスによって患者便を実験室診断にもとづき野生株の消失を確認するものである。西太平洋地域では2000年にポリオフリー宣言が出されたが、依然としてナイジェリア、インド、パキスタン、アフガニスタンでは流行が続いている。このため流行国からポリオフリー地域への野生株の輸出の脅威が存在する。理想的には早期探知し、迅速な対応することが伝播阻止に貢献するが、感染症サーベイランスシステムが脆弱な開発途上国において早期探知することは困難である。

中国は10年以上野生株フリーの状況であるが、隣接国からの輸入のリスクは高い。これはPV感染の多くが不顕性であり健康者がリザーバーになるためである。他方OPVの変異が蓄積したワクチン由来株(VDPV)による流行が貴州省他で問題となった。環境サーベイランスは、ヒトから環境水に排泄されたPVを調べることで、顕性、不顕性感染に関わらず地域に流行するウイルスを高感度に検出する。実際2007年にスイスジュネーブ市では、感染例はなかったがチャド由来野生株が下水中より検出されたことにより、輸入リスク評価のツ

ルとして有用性が認められている。最近、中国からアフリカなど流行地への出稼ぎ者が増加しており、ヒトがリザーバーになって持ち込まれるリスクが高くなっている。本研究では、広東省CDCとの共同研究により環境からのエンテロ/ポリオウイルス検出を行い野生株輸入・VDPVリスク対策方法として検討する。20年度報告として2008年4月から11月まで研究経過を報告する。

#### B. 材料と方法

環境水採取エリア：広東省広州市内（人口約1000万人、流動人口約300万人）を流れる珠江（1箇所）及び天河地区猎德下水処理場の流入下水（2箇所）にて、2008年4月から月2回の頻度で11月までサンプリングを行った。なお採水は以後2010年3月まで2年間継続する予定。なお既に河川、下水処理場について広州市監督官庁からは採取に関して承認済み。

ウイルス分離同定：流入下水（500ml）、河川水（4L）を出発材料に試料は遠心（3000rpm、30分）後、上清にMgCl<sub>2</sub>を添加（最終濃度0.05M）、pH3.5に調整後、陰電荷膜にてウイルス吸着。10ml 3% beef extract 存在下、1分間超音波処理を行いウイルス誘出を2回行った。濃縮産物をウイルスに対する感受性の異なる各種細胞（RD, HEp-2, Vero, L20B）に接種。分離されたウイルスは、エンテロ/ポリオ抗血清を用

いた中和法にて同定を行う。

### C. 結果

環境水採取：2008年4月から11月まで、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サンプル得られた。

ウイルス分離、同定：96試料をRD、HEp-2、Vero、L20Bに接種したところ、各々34,27,11,8株分離された。これらのウイルスについて2009年1月現在、血清型を同定中である(表1.2)。

### D. 考察

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。

### E. 結論

#### ウイルス解析

1) 得られたウイルスは血清型による分類を行い、ポリオに関しては遺伝子解析によりワクチン株との変異について分子進化学的解析を行うこととする。

2) 広東省にて実施しているAFPサーベイランスおよび健康児童群より得られた便材料、また流動人口を対象とした健康児童の糞便調査から得られたPVを環境水由来株と遺伝子レベルで比較する。すでに広東省で実施しているOPV抗体保有状況調査と併せてVDPV流行のリスクについて考察する。

3) エンテロウイルスに関してはAFPサーベイランスで得られた分離株と比較を行い、

地域流行像について検討する。

### G. 論文発表

1) Wakatsuki K, Kawamoto D, Hiwaki H, Watanabe K, Yoshida H Identification and Characterization of 2 Strains of Human Parechovirus 4 Isolated from 2 Clinical Cases in Fukuoka City, Japan. Journal of Clinical Microbiology 46(9); 3144-3146, 2008

2) 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 病原体検出情報, 30(1), 10-12, 2009.

表1 天河地区猎德下水処理場の流入下（2箇所）におけるウイルス分離

月	採取数	分離結果			
		RD-A	HEp-2	Vero	L20B
4	4	4	2	0	2
5	4	4	2	0	1
6	4	4	4	0	1
7	4	4	4	1	0
8	4	4	3	2	2
9	4	4	4	3	0
10	4	4	4	2	0
11	4	4	4	3	2
合計	32	32	27	11	8

表2 珠江（1箇所）におけるウイルス分離

採取月	採取数	分離結果			
		RD-A	HEp-2	Vero	L20B
4	2	0	0	0	0
5	2	0	0	0	0
6	2	0	0	0	0
7	2	0	0	0	0
8	2	0	0	0	0
9	2	1	0	0	0
10	2	0	0	0	0
11	2	1	0	0	0
合計	16	2	0	0	0

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

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

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し、野生株やワクチン由来ポリオウイルス（VDPV）の侵入や伝播の監視に役立てることを目的に、下水流入水からのウイルス検出を試みた。2008年4月から12月の間に、富山県内の下水流入水から26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。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。その結果、下水流入水および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（溶媒：水）中でボルテックスミキサーにより約1分間攪拌することで、31.9%～90.9%のウイルスが回収され、高い回収率が得られた。

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、下水や河川を汚染するため、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ワクチン由来ポリオウイルス（VDPV）や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、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、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、不顕性感染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、「フィルター吸着溶出法」はウイルス感度が高い。しかしながら、「フィルター吸着溶出法」は、ウイルス溶出に超音波処理を用いる際に、エアロゾルの発生による周囲へのウイルス汚染などの可能性がある。先行研究で、ポリオウイルスは、0.05M MgCl<sub>2</sub> (pH3.5) では、ほぼ100%、陰電荷フィルターに吸着することが確認されている。そこで、超音波処理を用いずに、ウイルスを効率よく回収できる、簡便、かつ安全な方法となるように、ウイルス溶出方法について検討した。

## B. 研究方法

### 1. 下水流入水の採取と濃縮

平成20年4月からは、富山県内の2下水処理場において、月1回未処理流入水を2L採取した。下水処理場は、県東部と西部の市街地の下流に位置する施設である。

下水流入水は、4℃で3000rpm、30分間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1L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0.45μm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1LにMgCl<sub>2</sub>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0.45μm、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切断して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溶出した。溶出液の雑菌を除き、ウイルス分離材料とした。

### 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(国立感染症研究所より分与、またはデンカ生研)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にランダムヘキサマーおよびSuper Script III Reverse Transcriptase (Invitrogen)を加え、逆転写反応でcDNAを作製後、ExTaq (TaKaRa)を用いてPCRを行った。PCR産物は、ダイレクトシーケンシ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. 「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 MgCl<sub>2</sub> (pH3.5) を含む生理食塩水または 121°C20 分間高圧蒸気滅菌した下水流入水中に、ポリオウイルス 1 型 (Polio1) Sabin 株またはコクサッキーウイルス B1 型 (CB1) を約 10<sup>4</sup>TCID<sub>50</sub>/25μl とするように加え、Mixed ester type cellulose フィルター (直径 47mm、ポアサイズ 0.45 μm、ADVANTEC) に吸着させた。下水流入水のフィルターを細断し、10ml の 3% Beef Extract 液中に浸して、以下の各条件でウイルスをフィルターから溶出させた。ウイルス溶出量は、各条件を 3 回ずつ繰り返して求めた。

1) 溶出方法の検討: ボルテックスミキサーによる攪拌、超音波処理の 2 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) を加えた 50ml のプラスチックチューブ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)、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。

マイクロタイター法によるウイルス定量は、Polio1 では RD-18S 細胞、CB1 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 TCID<sub>50</sub>/25μl を算出した。リアルタイム PCR 法によるウイルス定量は、Katayama, H. らの方法 (Appl Environ Microbiol. 2002. 68: 1033-9) を用

いた。

### C. 研究結果

#### 1. 下水流入水からのポリオウイルス検出状況

2008 年 4 月から 12 月まで、26 株のポリオウイルスが分離された (表 1)。血清型別では、1 型が 10 株、2 型が 5 株、3 型が 11 株分離された。下水処理場流域のポリオワクチン集団接種時期は、県東部地区の 2008 年春期が 5/8-5/30、秋期が 10/1-10/31、県西部地区の春期が 4/21-5/19、秋期が 9/16-10/10 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 (表 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。また、これらのウイルスについて、VP1 領域 (1 型 906 塩基、2 型 903 塩基、3 型 900 塩基) の塩基配列の差異は、1 型では、0~0.44%、2 型では、0.11~0.33%、3 型では、0.11~0.56%であった (表 2)。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。

#### 2. 地区別の腸管系ウイルス検出状況の比較

今年度は、地域ごとのウイルス検出状況に違いがあるかどうかを調べるために、県東部に新たに定点を設けた。東部と西部の下水流入水からは、ポリオウイルス、コクサッキーウイルス B 群、エコーウイルス、レオウイルス、アデノウイルスなどが検出され、ウイルスの種類は類似していた。し



かしながら、コクサッキーウイルス B 群が東部で 2 種類 11 株、西部で 4 種類 27 株、エコーウイルスが東部で 4 種類 10 株、西部で 7 種類 36 株検出され、東部よりも西部の方が検出されるウイルスの種類や分離株数が多かった。

### 3. 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

図 1 および図 2 に、「フィルター吸着溶出法」による Polio1 および CB1 の溶出方法ごとのウイルス回収量を示した。生理食塩水中および下水流入水中の Polio1 と CB1 は、ボルテックスミキサーを用いた溶出では、1 分間の攪拌で 31.9%~90.9%のウイルスが回収された(図 1)。リアルタイム PCR によるウイルス遺伝子の回収量を定量したところ、ボルテックスミキサーを用いた溶出では、1 分間の攪拌で 18.4%~76.1%のウイルス遺伝子が回収された(図 2)。Polio1 と CB1 を生理食塩水または下水流入水に添加したいずれの場合も、ボルテックスミキサーによる攪拌時のウイルス回収量は、超音波処理とほぼ同等であった。Beef Extract の溶媒に 0.1%Triton X や 0.1%Tween 80、0.05M EDTA を加えた場合や、溶出前に 10ml の  $1 \times 10^{-3}N$   $H_2SO_4$  水溶液 (pH3) を用いて洗浄を行った場合も、ウイルス回収量に大きな差はみられなかった。

### 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、平成 20 年度のポリオ流行予測感染源調査において、富山県内の健康な乳幼児 66 名 (2008 年 9 月および 2009 年 1 月) の便からポリオウイルスは検出されなかった (データは示していない)。このように、野生株および VDPV が検出されなかったため、富山県におけるポリオウイルス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と考えられる。

県東部と西部の下水流入水から検出された腸管系ウイルスの種類が類似したのは、東部と西部の住民におけるウイルス感染状況が類似していたためではないかと考えられる。しかしながら、コクサッキーウイルス B 群やエコーウイルス等の B 群エンテロウイルスについては、東部よりも西部の方がウイルスの種類や分離株数が多かったため、この原因については、今後検討する必要がある。

より効率的な環境水の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方法を検討した。その結果、ウイルス回収量は、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であった。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と考えられる。溶出液の検討では、Beef Extract の溶媒の種類による回収量に差はみられなかったため、溶媒は水でよいと考

えられる。今後は、今回検討した方法を実際の下水調査に導入し、ウイルス回収状況について検証する予定である。

#### E. 結論

##### 1. 下水流入水のウイルス調査

2008年4月から12月の間に、富山県内の下水流入水から26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。県東部と西部の下水流入水から検出された腸管系ウイルスの種類は類似したが、西部地区の方がエンテロウイルスの種類や分離株数が多かった。

##### 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

「フィルター吸着溶出法」において、下水流入水および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1分間攪拌することで、31.9%~90.9%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可能であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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

2. 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

3. 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

4. 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

5. 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

##### 2. 学会発表

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

#### 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

表 1. 下水処理場別の下水流入水からの腸管系ウイルス検出状況.

東部地区										西部地区																			
ウイルス		2008年												計	ウイルス		2008年												計
		4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月			4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月								
ポリオ	Polio1								1									3	2	1				9					
	Polio2									1										1					2				
HEV-B	CoxB2																								11				
	CoxB3																								1				
																									17				
																									8				
																									1				
																									1				
Echo11	Echo11																								10				
	Echo18																								1				
	Echo25																								4				
	Echo30																								4				
																									18				
レオ	Reo1																								1				
	Reo2																								11				
アデノ	Ad1																								5				
	Ad2																								12				
	Ad5																								2				

表中の数値は、ウイルスの分離株数。矢印は、ポリオワクチン集団接種時期を示す。

表 2. 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).

Type 1			
下水処理場	株名	ワクチン株との差異	
		VP1(906nt)	VP1(302aa)
西部	Fu/May-5/08	0.11%	0
	Fu/May-6/08	0%	0
	Fu/May-7/08	0.22%	1 (A190T)
	Fu/Oct-2/08	0%	0
	Fu/Oct-3/08	0.22%	0
	Fu/Oct-5/08	0%	0
	Fu/Nov-5/08	0%	0
	Fu/Nov-15/08	0.33%	1 (I90L)
東部	Fu/Dec-24/08	0.44%	4 (V56L I90M, K99N, I194F)
	Ha/Nov-4/08	0.11%	1 (V160I)

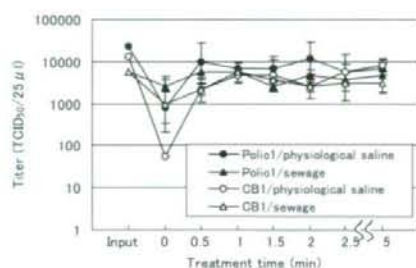
Type 2			
下水処理場	株名	ワクチン株との差異	
		VP1(903nt)	VP1(301aa)
西部	Fu/May-9/08	0.11%	0
	Fu/Nov-13/08	0.22%	1
東部	Ha/Jun-2/08	0.22%	1
	Ha/Jun-5/08	0.11%	1
	Ha/Dec-9/08	0.33%	1

Type 3			
下水処理場	株名	ワクチン株との差異	
		VP1(900nt)	VP1(300aa)
西部	Fu/May-2/08	0.11%	1 (T6I)
	Fu/May-4/08	0.11%	1 (T6I)
	Fu/Jun-7/08	0.22%	1 (T6I)
	Fu/Jun-9/08	0.44%	3 (I2V, T6I, A54V)
	Fu/Jun-11/08	0.22%	2 (T6I, A54T)
	Fu/Jun-13/08	0.56%	2 (T6I, A54T)
	Fu/Jul-5/08	0.22%	2 (T6I, A54T)
	Fu/Nov-6/08	0.11%	1 (T6I)
	Fu/Nov-10/08	0.11%	1 (T6I)
	Fu/Nov-11/08	0.33%	1 (T6I)
	Fu/Nov-14/08	0.11%	1 (T6I)

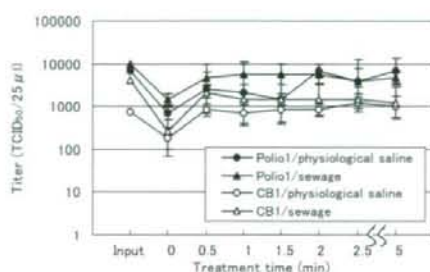
### A. 超音波処理

{3%BeefExtract (溶媒:水)}



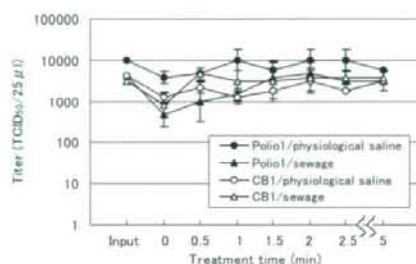
### B. ボルテックス

{3%BeefExtract (溶媒:水)}



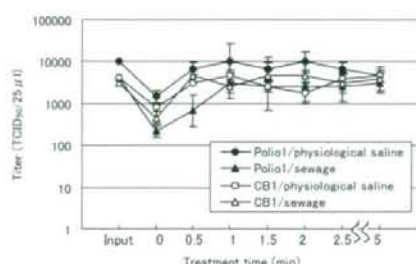
### C. ボルテックス

{3%BeefExtract (溶媒:0.1% Triton X)}



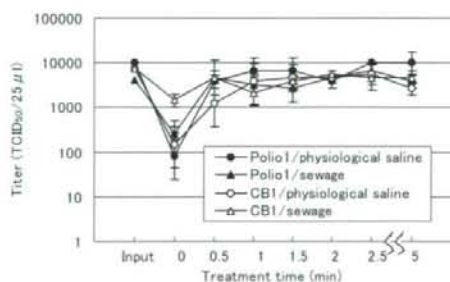
### D. ボルテックス

{3%BeefExtract (溶媒:0.1% Tween 80)}



### E. ボルテックス

{3%BeefExtract (溶媒:0.05M EDTA)}



### F. 酸洗浄後、ボルテックス

{3%BeefExtract (溶媒:水)}

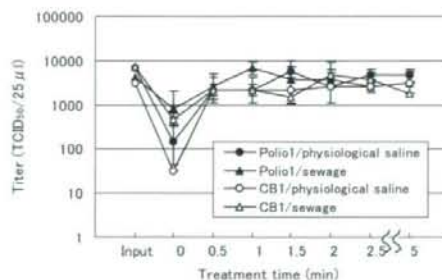


図1. 溶出方法別の Polio1 および CB1 の回収量。ウイルスは、マイクロタイター法により定量した。A, 超音波処理; B, ボルテックスミキサーによる攪拌により、3% Beef Extract 水溶液 (溶媒:水) 中でウイルスを溶出させた。C, 0.1% Triton X, D, 0.1% Tween 80、E, 0.05M EDTA をそれぞれ Beef Extract 水溶液に加え、ボルテックスミキサーによる攪拌によりウイルスを溶出させた。F, 3% Beef Extract 水溶液 (溶媒:水) による溶出前に、10ml の  $1 \times 10^{-3}N$   $H_2SO_4$  水溶液 (pH3) により酸洗浄を行った。\* Input, 陰電荷フィルターに吸着させたウイルス量。ウイルス量は、各条件を3回ずつ繰り返して求めた。