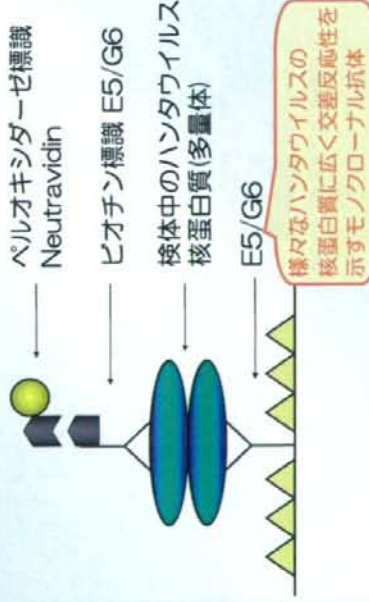
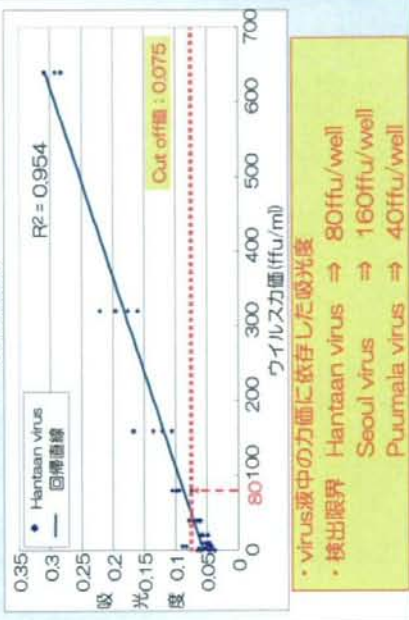


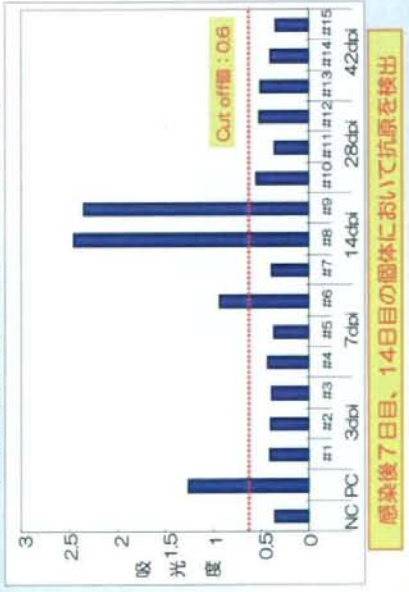
モノクローナル抗体E5/G6を用いた抗原検出ELISA



抗原検出ELISAによる各種ハンタウイルス抗原の検出 (virus液)



抗原検出ELISAによる各種ハンタウイルス抗原の検出 (Puumala virus感染ハムスター肺)

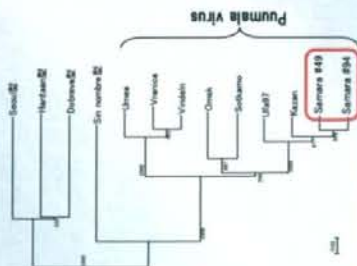


HFRSの多発地帯であるボルガ川流域における疫学調査

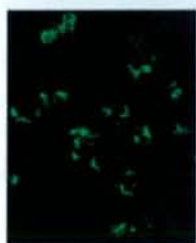


ロシアにおけるハンタウイルス感染症の疫学調査

ハンタウイルスS遺伝子の系統樹

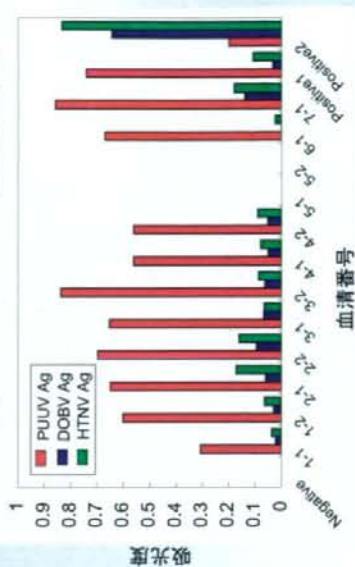


ヨーロツバヤチネズミからのウイルス分離



接種28日後におけるVero E6細胞中のヌクレオキャプシド蛋白質 (p49)

サマラのHFRS患者のハンタウイルス血清型鑑別 (IgG検出ELISA)



ダニ媒介性脳炎の診断法開発

- ① ウイルスの中空粒子を用いた抗体検出用ELISAの確立
 - スクリーニング検査用
- ② 一度のみの感染性を有するウイルス様粒子を用いた中和試験法の確立
 - 血清学的な確定診断用
- ③ 日本の野生げっ歯類における疫学調査
 - 北海道と島根県が陽性地区

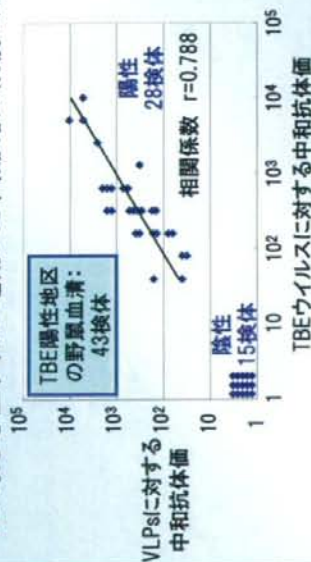
北海道上磯町疫学調査野鼠血清におけるSP-IgG-ELISAと中和試験の成績の比較

SP-IgG-ELISA

中和試験	陽性	陰性	計
陽性	32	3	35
陰性	8	79	87
計	40	82	122

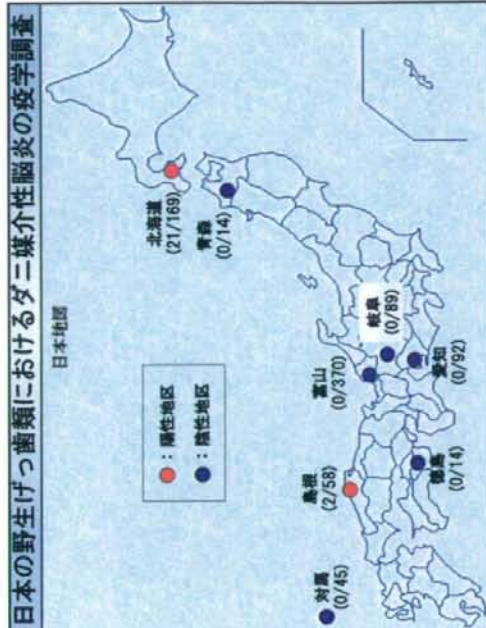
敏感度=91.4% 特異度=90.9%

VLPsおよび生ウイルスを用いた中和試験の成績の比較



▶ 敏感度、特異度は共に100%

ルシフェラーゼ遺伝子を持つVLPsを用いた中和試験は、生ウイルスを用いた中和試験の代替法として有用



日本の野生げっ歯類におけるダニ媒介性脳炎の疫学調査

その他の研究成果

- ハンタウイルスの1つであるタライランドウイルスの簡便な血清鑑別法を開発した。
- Q熱の血清診断法として *Coxiella burnetii* の組換え Com1 蛋白質を用いた ELISA を開発した。
- わが国の野生小型哺乳類の 32.6% がバルトネラ属菌を保有していた。
- Multiplex PCR 法を用いたサルモネラおよびエルシニア感染症の簡便な迅速診断法が開発された。
- LAMP 法によるサル痘の迅速診断法を開発した。
- ダニ媒介性脳炎ウイルス感染マウスにおける脳炎発症機序を解析した。

行政施策への貢献の可能性

- 多種類のハンタウイルス抗原抗体の検出法が開発された。
- ロシアのボルガ川流域で HFRS の原因となっているブーマラウイルスであった。
- ダニ媒介性脳炎の安全で簡便な検査法が確立された。
- 北海道と島根県にダニ媒介性脳炎ウイルスが分布していることが明らかになった。
- わが国の野生げっ歯類にバルトネラ属菌が広く分布していることが判明した。
- サルモネラ感染症、エルシニア感染症、およびサル痘の簡便な検査法が整備された。

平成 20 年度 新興・再興感染症研究事業 成果概要

研究課題：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課題番号：H19-新興一般-013研究代表者：清水博之**I. 研究の意義**

- (1) ポリオ流行国は4ヶ国に減少したが、VDPVによるポリオ流行等、世界ポリオ根絶達成にとって重要な新たな技術的課題が生じている。病原体サーベイランスの質的向上により、ポリオフリーの維持を図るとともに、世界ポリオ根絶達成後を見すえた研究が必要とされる。
- (2) 国内麻疹患者数は、かつてより減少しているものの、いまだに年間数万人単位の患者発生が推定されている。国内麻疹排除計画の進展のためには、ワクチン2回接種の徹底とともに、サーベイランスと実験室診断の強化による正確な確定症例数の把握が、きわめて重要である。
- (3) 急性呼吸器感染症(ARI)のうち、多くのARIウイルスの病原体サーベイランスは、いまだ十分に機能しておらず、病原体サーベイランス体制の確立が必要とされている。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) ポリオおよびエンテロウイルスについては、様々なサーベイランス手法および新たな実験室診断技術に関する評価検討を行うとともに、国内および西太平洋地域のポリオフリーの維持を確認する。
- (2) 2008年に導入された麻疹症例全数報告に対応し、精度の高い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、地方衛生研究所を中心とした麻疹・風疹レファレンスセンターを活用し、実験室診断法の標準化を行う。
- (3) 地方衛生研究所を中心とした実験室ネットワークを活用することにより、日常的に検出される呼吸器・腸管感染症を対象とした病原体サーベイランスシステムを整備する。

III. 2年間の研究成果

・研究代表者

- (1) AFPおよび補助的病原体サーベイランスにより、国内および西太平洋地域のポリオフリーの確認を行うとともに、VDPVによるポリオ流行のリスクを明らかにした。
- (2) 我が国の野生株ポリオウイルス実験室封じ込め報告書(Phase I)をWHO/WPROに提出した。
- (3) 腸管ウイルスの新たな感染動物モデルを確立・検討し、ウイルス弱毒化機構を解析した。
- (4) 新たなウイルス学的知見による病原体サーベイランスと実験室診断法の検討を行った。

・研究分担者(駒瀬勝啓、麻疹ウイルス研究小班統括)

- (1) 2008年に導入された麻疹症例全数報告制度に対応し、9カ所の地方衛生研究所に麻疹・風疹レファレンスセンター(本研究事業による研究協力者)を整備するとともに、感染研・レファレンスセンター・地方衛生研究所の役割分担を明確にした。
- (2) 上記レファレンスセンターと協力し、麻疹診断マニュアルの改訂を行い、運用方法を決定した。

・研究分担者(野田雅博、呼吸器ウイルス研究小班統括)

- (1) 急性呼吸器感染症(ARI)ウイルスのレファレンス活動を強化した。
- (2) ARIウイルス病原体サーベイランスを手法と実験室診断に関する研究の一環として、RSウイルス、ライノウイルス、ヒトメタニューモウイルス等に関する研究を行った。

・研究分担者(多屋馨子)

- (1) 麻疹重症化の実態を具体的に示すため、麻疹重症化例調査を行った。
- (2) 麻疹教育啓発DVDを作成し、約2000の教育機関、行政機関、医療機関に配布した。

・研究分担者(小池智、帖佐徹、岩井雅恵、吉田弘、有田峰太郎、西村順裕)

- (1) ポリオウイルス感染防御に重要なウイルスRNAセンサーをノックアウトマウスを用いて解析した。RD-A細胞に発現するEV71レセプターを同定した。
- (2) 地域内のポリオウイルスの伝播を監視するために、富山県内の2下水処理場に定点を設置し、未処理下水流入水中のポリオウイルスの検出と、型内型鑑別を行った。
- (3) 中国山東省CDCとの共同研究により環境水ウイルス調査を開始した。
- (4) EV71感染モデルマウスの系を確立し、抗エンテロウイルス剤として有望な化合物を同定した。
- (5) CODEHOP PCR法を用いたエンテロウイルス遺伝子検出・同定法の有用性を評価した。

IV. 21年度の課題

- (1) 国内外のポリオフリーを、より高い精度で確認するため、新たなサーベイランス手法の導入の可能性について国内外における評価を継続する。
- (2) ポリオウイルスの変異、組換え、病原性発現メカニズムを解析する小動物モデルを樹立することにより、ポリオ根絶前後のウイルス伝播のリスクを明らかにする。エンテロウイルス宿主受容体の個体内ウイルス伝播における役割を解析する。
- (3) 麻疹実験室ネットワーク機能を評価し、医療機関等へ麻疹実験室診断の周知、協力をはかる。試薬、参照品の供給等を通して、麻疹実験室ネットワークの技術レベルの標準化をはかる。検査法による感度の違い、検体採取方法による検出感度の違い等について検討する。
- (4) ARI ウイルスを対象としたレファレンス活動強化のため、検査標準品の供給体制を整備し、ARI ウイルスについて更に詳細な病原体サーベイランスを継続する。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 国内外におけるポリオフリーを実験室レベルで確認し、WHO 年次レポート等により随時報告する。
- (2) 麻疹・風疹実験室診断体制を整備することにより麻疹症例全数報告の精度向上を図る。
- (3) 地方衛研ネットワークの活用により ARI ウイルス等に対するレファレンス活動を強化する。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

・研究代表者

1. Arita M, Wakita T, Shimizu H: Characterization of pharmacologically active compounds that inhibit poliovirus and enterovirus 71 infection. *J Gen Virol* 89: 2518-2530, 2008
2. Shimizu H: Mouse and Non-human Primate Models for EV71 Disease. *Int J Inf Dis* (in press)
3. 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* 14:828-830, 2008
4. 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
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. 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
7. 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
8. 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
9. Report on Phase I wild poliovirus laboratory containment activities, Japan (WHO report, 2008)
10. Country Progress Report on Maintaining Polio-free Status, Japan, 2006-2007 (WHO report, 2008)

・研究分担者(駒瀬勝啓)

1. Sakata M, Komase K, 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*, in press
2. Haga T, Murayama N, Shimizu Y, Saito A, Sakamoto T, Morita T, Komase K, Nakayama T, Uchida K, Katayama T, Shinohara A, Koshimoto C, Sato H, Miyata H, Katahira K, Goto Y. Analysis of antibody response by temperature-sensitive measles vaccine strain in the cotton rat model. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, in press

・研究分担者(野田雅博)

1. 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 on 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
2. Morita Y, Suzuki T, Shiono M, Shiobara M, Saitoh M, Tsukagoshi H, Yoshizumi M, Ishioka T, Kato M, Kozawa K, Taya-Tanaka K, Yasui Y, Noda M, Okabe N, Kimura H. Phylogenetic analysis of nucleoprotein (N) gene in measles viruses prevalent in Gunma, Japan in 2007. *Jpn J Infect Dis* (in press)

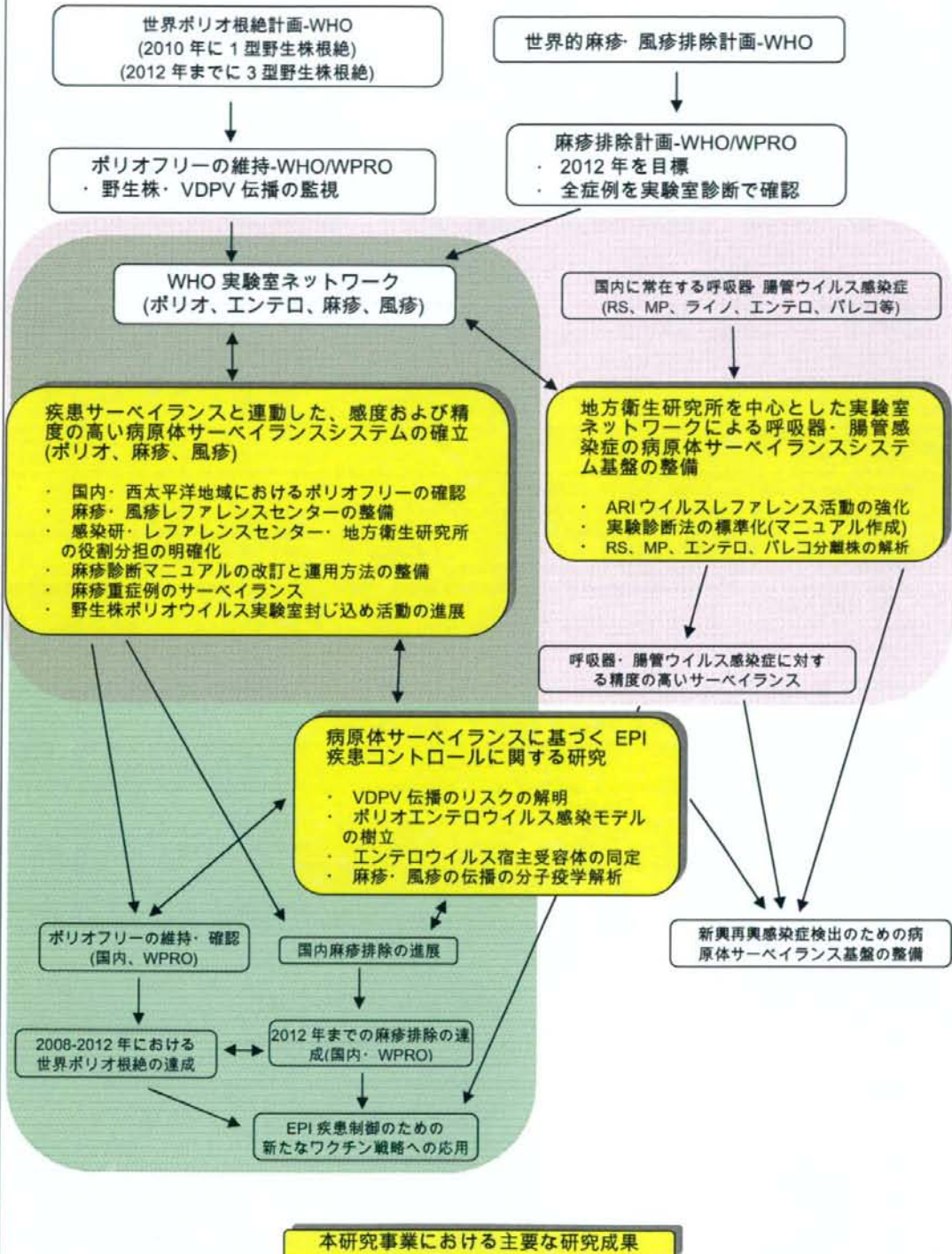
・研究分担者(小池 智)

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

・研究分担者(多屋馨子)

1. 多屋馨子: 麻疹. 化学療法の領域. 24 (10): 1440-1451, 2008
2. 上野久美, 多屋馨子: 2007年麻しん流行と国を挙げた“麻しん排除計画”週刊医学会新聞 2748, 2007

Ⅶ. Ⅲ (2年間の研究成果)の概要図等



○主任研究者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

昭和59年4月	～	平成6年6月	明治製菓(株)薬品総合研究所勤務
昭和62年8月	～	平成3年8月	国立予防衛生研究所 腸内ウイルス部 研究生
平成5年6月			博士号(薬学)取得(千葉大学薬学部)
平成6年7月	～		国立予防衛生研究所ウイルス第2部
平成14年4月	～	現在	国立感染症研究所 ウイルス第2部 第2室室長

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

脇田隆字	(国立感染症研究所 ウイルス第二部)
宮村達男	(国立感染症研究所)
北村 敬	(元国立感染症研究所)
森川 茂	(国立感染症研究所 ウイルス第一部)
Dr Olen Kew	(米国 CDC)
Prof Eckard Wimmer	(ニューヨーク州立大学)

・主な研究課題

- 世界ポリオ根絶達成のための実験室診断に関する研究
- 腸管感染ウイルスの感染伝播と分子進化に関する研究
- ポリオウイルス・エンテロウイルスの病原性発現に関する分子的基盤の研究
- ポリオウイルス・エンテロウイルス感染症の制御戦略に関する研究

・これまでの研究実績

1. Arita M, Wakita T, Shimizu H: Characterization of pharmacologically active compounds that inhibit poliovirus and enterovirus 71 infection. *J Gen Virol* 89: 2518-2530, 2008
2. Shimizu H: Mouse and Non-human Primate Models for EV71 Disease. *Int J Inf Dis* (in press)
3. 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* 14:828-830, 2008
4. 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
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. Tano Y, Shimizu H, Martin J, Nishimura Y, Simizu B, Miyamura T: Antigenic characterization of a formalin-inactivated poliovirus vaccine derived from live-attenuated Sabinstains. *Vaccine* 25: 7041-6, 2007
7. 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.
8. Arita M, Nagata N, Sata T, Miyamura T, Shimizu H: Quantitative analysis of poliomyelitis-like paralysis in mice induced by a poliovirus replicon. *J Gen Virol* 87: 3317-27, 2006.
9. Yang CF, Chen HY, Jorba J, Sun HC, Yang SJ, Lee HC, Huang YC, Lin TY, Chen PJ, Shimizu H, Nishimura Y, Utama A, Pallansch M, Miyamura T, Kew O, Yang JY: Intratypic recombination among lineages of type 1 vaccine-derived poliovirus emerging during chronic infection of an immunodeficient patient. *J Virol* 79: 12623-34, 2005.
10. Kuramitsu M, Kuroiwa C, Yoshida H, Miyoshi M, Okumura J, Shimizu H, Narantuya L, Bat-Ochir D: Non-polio enterovirus isolation among families in Ulaanbaatar and Tov province, Mongolia: prevalence, intrafamilial spread, and risk factors for infection. *Epidemiol Infect* 133: 1131-42, 2005.
11. Huang QS, Greening G, Baker MG, Grimwood K, Hewitt J, Hulston D, van Duin L, Fitzsimons A, Garrett N, Graham D, Lennon D, Shimizu H, Miyamura T, Pallansch MA: Persistence of oral polio vaccine virus after its removal from the immunisation schedule in New Zealand. *Lancet* 366: 394-6, 2005.
12. Arita M, Zhu SL, Yoshida H, Yoneyama T, Miyamura T, Shimizu H: A Sabin 3-derived poliovirus recombinant contained a sequence homologous with indigenous human enterovirus species C in the viral polymerase coding region. *J Virol* 79: 12650-7, 2005.
13. Arita M, Shimizu H, Nagata N, Ami Y, Suzaki Y, Sata T, Iwasaki T, Miyamura T: Temperature-sensitive mutants of enterovirus 71 show attenuation in cynomolgus monkeys. *J Gen Virol* 86: 1391-401, 2005.
14. Shimizu H, Thorley B, Paladin FJ, Brussen KA, Stambos V, Yuen L, Utama A, Tano Y, Arita M, Yoshida H, Yoneyama T, Benegas A, Roesel S, Pallansch M, Kew O, Miyamura T: Circulation of type 1 vaccine-derived poliovirus in the Philippines in 2001. *J Virol* 78:13512-21, 2004
15. Arita M, Shimizu H, Miyamura T: Characterization of in vitro and in vivo phenotypes of poliovirus type 1 mutants with reduced viral protein synthesis activity. *J Gen Virol* 85:1933-44, 2004
16. Nagata N, Iwasaki T, Ami Y, Tano Y, Harashima A, Suzaki Y, Sato Y, Hasegawa H, Sata T, Miyamura T, Shimizu H: Differential localization of neurons susceptible to enterovirus 71 and poliovirus type 1 in the central nervous system of cynomolgus monkeys after intravenous inoculation. *J Gen Virol* 85: 2981-9, 2004
17. Kew O, Morris-Glasgow V, Landaverde M, Burns C, Shaw J, Garib Z, André J, Blackman E, Freeman CJ, Jorba J, Sutter R, Tambini G, Venczel L, Pedreira C, Laender F, Shimizu H, Yoneyama T, Miyamura T, van Der Avoort H, Oberste MS, Kilpatrick D, Cochi S, Pallansch M, de Quadros C: Outbreak of poliomyelitis in Hispaniola associated with circulating type 1 vaccine-derived poliovirus. *Science* 296:356-9, 2002

平成20年度 新生労働科学研究費補助金
新興・再興感染症研究事業研究費委員会

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
国立感染症研究所 ウイルス第二部
清水博之

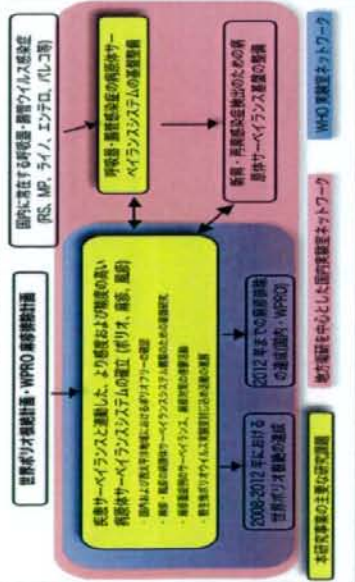
研究代表者 [關管ウイルス研究小班担当]
清水 博之 (国立感染症研究所 ウイルス第二部)

研究分担者
多屋 肇子 (国立感染症研究所 感染症情報センター)
小池 智 (東京都神経科総合研究所)
帖佐 徹 (財)九州産業衛生協会
岩井 雅 薫 (富山県衛生研究所)
吉田 弘 (国立感染症研究所 ウイルス第二部)
有田 崎太郎 (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)
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担当]

駒瀬 勝 啓 (国立感染症研究所 ウイルス第三部)
[麻しんウイルス研究小班担当]

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

研究の概要



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

研究課題および目的

麻しん・WPRO麻しん撲滅計画の進展による。

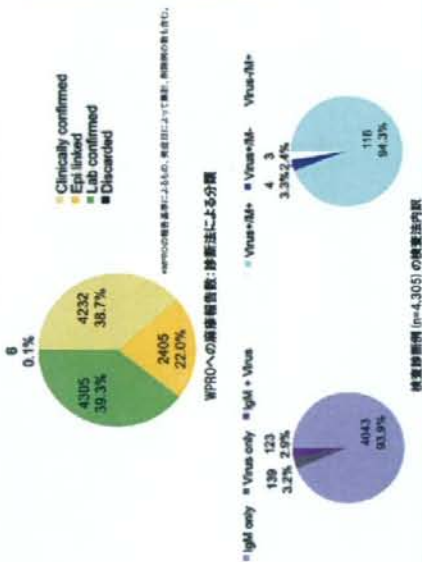
- ・ 感染症・地方衛生研究所を中心とした麻しん・風疹サーベイランスネットワークの確立
- ・ 医療機関・保健所等と麻しん・風疹サーベイランスネットワークの協力体制の整備
- ・ 麻しん・風疹サーベイランスの標準化と精度管理
- ・ 麻しん・風疹サーベイランスの解析およびワクチン接種率向上への取り組み

呼吸器・腸管ウイルス感染症

- ・ 日本および周辺地域に存在する呼吸器・腸管ウイルスのサーベイランスおよび
ウイルス感染症診断手法の研究 (RSV, hMPV, ライノ, ヒトボカ, エンテロ, ハレ
コ, アイチ等)
 - ・ 重症呼吸器・腸管ウイルス感染症のサーベイランス
 - ・ 呼吸器・腸管ウイルス増殖・病原性発現機構の研究
- ポリオ「世界流行才鑑別計画の進展による」

- ・ より感度および精度の高いポリオウイルス病原体サーベイランス手法の研究
- ・ ポリオウイルス実証実験に向けたための検証
- ・ IPV導入後のポリオサーベイランス手法の研究
- ・ ポリオウイルスの感染伝播・病原性発現機構の研究

我が国における麻疹・風疹診断の現状 〔2008年1～12月、n=10,948、(2009年1月6日現在)〕



麻疹排除計画評価のための達成度の指標 (WHO/WPRO)

- Measles incidence <1/1,000,000
- High quality surveillance
 - 国家全体のレポートで麻疹疑い例の報告 > 2100,000
 - 地区報告・麻疹疑い例の報告 > 17100,000 > 80%
 - 疑い例の発生後、48時間以内に適切な情報を報告 > 80%
 - 7日以内での血液サンプルを採取したもの > 80%
 - 7日以内でのラボ診断の結果 > 80%
 - outbreaks 時におけるウイルス分離のための適切な検体の採取 > 80%
- High population immunity
 - 1回、2回目ワクチン接種率 > 95%
 - outbreak 時の罹患率 > 80%
 - 地域固有のウイルス伝播 No virus
- Genotype 解析

麻疹検査室診断ネットワークの確立 (2008年度の主な研究成果)



ウイルス感染症の予防的制御のための高感度サーベイランスシステムの検討 おこな研究成果 (麻疹ウイルス研究小委員会)

- 地方衛生研究所の中から検査ネットワークの中核となる麻疹・風疹リファレンスセンター(9か所)を指定し、感染症・リファレンスセンター・地方衛生研究所間で、技術・情報・検体・標準品等を共有できる実験室ネットワークを確立した。
- 麻疹・風疹診断手法の標準化と徹底管理を行った。
 - 検体検出マニュアル(麻疹・風疹マニュアル(第二版))の作成
 - 麻疹・風疹診断フローチャート(相談問い合わせ、血液)の開発
 - 国際標準・保菌所等と同一水準診断ネットワークの協力体制の構築
 - 国内外における麻疹・風疹診断手法の評価・徹底管理 (IgM-ELISA, 遺伝子検出, ウイルス分離)



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
研究対象と方法 (呼吸器ウイルス研究小班)

本研究の対象とした急性呼吸器 (ARI) ウイルス:

- RSウイルス (RSV)、ヒトメタニューモウイルス (hMPV)、
- パラインフルエンザウイルス (PIV)、
- ライノウイルス (RV)、ボカウイルス (BoCV) など

研究方法 (主として地方衛生研究所実験室ネットワークによる):

- 上記ウイルスの詳細な病原検査・解析、病態の解析、血清疫学
- 臨床分離株の系統保存と遺伝子情報の集積
- ウイルスバンク・ゲノムバンクの構築
- ARIウイルスの標準検査法の確立と普及
- 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の構築

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
おもな研究成果 (呼吸器ウイルス研究小班)

ARIウイルスサーベイランス
2008年度はRSV:102株、hMPV:62株、RV:93株、PIV:85株およびBoCV:14株、その他等を分離・検出

RSVの分子疫学解析
RSVの遺伝子解析結果から、 subgroup AではOAG, subgroup BではBAが主要

RVの分子疫学解析
RV-A型遺伝子解析結果から、近年のRVは大部分がRV-AでRV-Bは1株のみ

BoCVの分子疫学解析
ARI患者から分離されたBoCV遺伝子のうち57株の基盤配列から、group 1が6株、group 2が1株に分類

Adeno_VDの分子疫学

HPVは血清型特異的抗体として原則に反応して検出

RSV、RVと感染病巣

ウイルス感染と喘息発症、発症との関連性も継続的調査、サイトカイン等から検討

RSV感染後のリハビリシステムに対する反応性

RSV26株(2008年度分離株)はいずれの喘息も悪く中等

病原体検出マニュアルの作成

RSウイルス、メタニューモウイルス

ライノウイルス

公衆衛生

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
研究課題および目的 (腸管ウイルス研究小班)

ポリオ (世界ポリオ根絶計画の推移による)

- より感度および精度の高いポリオサーベイランス手法の研究
- 迅速かつ簡便な実験診断手法の研究
- IPV導入後のポリオサーベイランス手法の研究
- ポリオウイルス実験室対策の徹底
- ポリオウイルスの感染伝播・病原性発現機構の研究

非ポリオエンテロウイルス、他のピコルナウイルス

- 重症エンテロウイルス感染症 (EV71等) のサーベイランス
- 日本および周辺地域に存在する腸管ウイルスのサーベイランスおよび実験診断 (エンテロ、パルコ、アイチ等)
- ピコルナウイルス増殖・病原性発現機構の研究

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
おもな研究成果 (腸管ウイルス研究小班)

AFPおよび種別特異的腸管ウイルスサーベイランスにより、国内および西太平洋地域のポリオフリーの検証を行ったにも、VDPVによるポリオ流行のリスクを明らかにした。

地域内の腸管ウイルスの伝播を監視するために、富山県内の2下水処理場にて多点を設置し、水処理下水入水、水中のポリオウイルスの検出と型内型鑑別を行った。

中国山東省 CDCとの共同研究により環境水ウイルス調査を実施した。

CODEHOP PCR法を用いたエンテロウイルス遺伝子検出・固定法の有用性を評価した。

海外渡航者に由来するエンテロウイルスの解析によりユニークなエンテロウイルスを特定した。

重症エンテロウイルス感染症の発症・病原性サーベイランスに関する検討を行った。

ピコルナウイルスの腸管ウイルスサーベイランスのための基礎的検討を行った。

呼吸器感染症を対象としたエンテロウイルス腸管ウイルスサーベイランス手法の検討を行った。

我が国の野生動物ポリオウイルス実験室対策の徹底 (Phase II をWHO/UNPROに提出した)。

ポリオウイルス感染制御に重要なウイルスRNAセンサーモックアウトマウスを用いて解析した。

ICAM-1発現調節におけるエンテロウイルス感受性を検討した。

アイチウイルス非構造蛋白 NS1, 2A) の機能解析を行った。

マウスEV71感染モデルも確立し抗エンテロウイルス剤として有望な化合物を特定した。

ピコルナウイルス増殖・病原性発現機構を解析した。

エンテロウイルス71 (EV71) 感染症

- EV71は、コクサッキーA16型とともに手足口病の主要な原因ウイルスである。
- EV71は、一部のコクサッキーA群ウイルスとともにA群エンテロウイルス (HEV-A) に分類される。
- EV71感染による手足口病症例は、髄膜炎・髄膜炎を併発する頻度が高い。
- EV71は、脳幹腫瘍・卵形細胞腫瘍・神経原性筋水腫等、死亡例を含む重篤な中枢神経障害に罹患している。
- EV71は、日本では比較的多く検出されるエンテロウイルスで、通常、3～4年に1回程度の割合で大きな手足口病流行を起こす。
- 東アジア地域では、本領域の手足口病流行例に重症EV71感染症例が多数、公報誌上、本邦の問題となっている (2009年、中国では、安徽を中心に126例の死に例が報告されている)。
- 日本では、EV71腫瘍の大規模な流行は起きていないが、散発的な重症例 (死亡例) が報告されている。



エンテロウイルス71粒子



EV71感染による細胞内感染 (Liu et al., 1994; ↑ PolioNet)

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
おもな研究成果 (腸管ウイルス研究小班)

特異的EV71受容体の同定

- エンテロウイルス71 (EV71) を含むA群エンテロウイルス (HEV-A) の特異的宿主受容体の探索研究により、複数の異なる宿主受容体が、培養細胞レベルにおけるEV71感染に関与することを明らかにした (結果の一部については現在学術雑誌に投稿中)。
- 特異的EV71受容体の解析とその応用 (今後の課題)
 - EV71の感染伝播・細胞/組織特異性・病原性発現における複数の宿主受容体の機能の解析
 - EV71感染症の重篤化因子の解析
 - 受容体特異性に基づくエンテロウイルス実験室診断システムの検討
 - EV71感染マウスモデルの樹立

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
おもな研究成果 (ガイドライン、マニュアル、ニュースアル、WHO報告書等)

- 病原体検出マニュアル「麻しん検査マニュアル(第二版)」
- 病原体検出マニュアル「RSウイルス検査マニュアル」
- 病原体検出マニュアル「メタニューモウイルス検査マニュアル」
- 麻しん軟膏管専用DVD 「はしかから身を守るために」
- Report on Phase 1 wild poliovirus laboratory containment activities, Japan (WHO report, 2008)
- Country Progress Report on Maintaining Polio-free Status, Japan, 2005-2006 (WHO report, 2007)
- Country Progress Report on Maintaining Polio-free Status, Japan, 2006-2007 (WHO report, 2008)
- 技術研修 (国立保健医療科学院 特別過程ウイルスコース)
- 技術研修 (JICA Laboratory Diagnosis Techniques for the Global Polio Eradication, 2007, 2008)

平成 20 年度 新興・再興感染症研究事業 成果概要

研究課題：中空粒子を用いたウイルス性肝炎の新しい検査・予防法の開発課題番号：H19-新興一般-014研究代表者：武田直和**I. 研究の意義**

- (1) C型肝炎、E型肝炎に対する予防法は未だ整備されていない。
- (2) 酵母発現 HBs 蛋白等をワクチンとする B型肝炎も、抗体獲得率は必ずしも高くない。
- (3) ネイティブなウイルスと同様な形態と抗原性を有するウイルス抗原の産生は極めて困難である。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) HEV-LP に対する単クローン抗体、高度免疫血清を作製する。
- (2) HEV-LP の粘膜ワクチンとしての有効性を評価する。
- (3) HEV 細胞培養系を確立する。
- (4) 各遺伝子型 HBV 由来の中空粒子を利用して遺伝子型特異的な HBV 抗原診断法を開発する。
- (5) HCV 構造蛋白遺伝子の強制発現細胞系で中空粒子を産生させ、新たな HCV 診断法を開発する。

III. 2年間の研究成果

・研究代表者

- (1) 3つの遺伝子型 G1、G3、G4 で HEV-LP を作製した。
- (2) 抗体検出 ELISA、抗原検出 ELISA、HEV 遺伝子検出系を確立した。

・研究分担者(田中智之)

- (1) HEV-LP に対する単クローン抗体、高度免疫血清を作製した。

・研究分担者(恒光 裕)

- (1) ブタを用いて HEV-LP の経口・経鼻免疫を行い、感染防御に必要な量を検討した。

・研究分担者(勝二郁夫)

- (1) HBV genotype A と C のキメラクローンの発現プラスミドを作製した。

・研究分担者(李 天成)

- (1) HEV 培養系を確立し、HEV の熱に対する安定性、塩素、紫外線に対する抵抗性等を検討した。

・研究分担者(石井孝司)

- (1) HCV replicon を保持する HCV-LPs を恒常的に生産する哺乳類細胞を樹立した。

・研究分担者(鈴木哲朗)

- (1) HBV 遺伝子型 A 及び B 由来株について HBV 様粒子を産生した。

IV. 21年度の課題

- (1) 遺伝子型2のHEV-LPを発現し抗原性、免疫学的性状等を解析する。
- (2) ブタを用いHEV-LPの経粘膜ワクチンとしての有効性を評価する。
- (3) HEV培養系を用い各種薬剤、紫外線、温度等の不活化条件を検討し、予防法を確立する。
- (4) HBVのA、B、C各遺伝子型のHBs粒子産生系を作製する。
- (5) HCVクローンの選択を行うとともに、粒子形成、分泌効率のよい発現ベクターを選択する。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 免疫学的手法によるC型およびE型肝炎の迅速診断が期待できる。
- (2) VLPを用いたB型、C型およびE型肝炎の予防と制圧が期待できる。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

- (1) Wang CY, Miyazaki N, Yamashita T, Higashiura A, Nakagawa A, Li T-C, Takeda N, Xing L, Hjalmarsen E, Friberg C, Liou DM, Sung YJ, Tsukihara T, Matsuura Y, Miyamura T, H. CR, 2008. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of recombinant hepatitis E virus-like particle. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun 64: 318-322.
- (2) Ishii K., Murakami K., Hmwe S., Zhang B., Li J., Shirakura M., Morikawa K., Suzuki R., Miyamura T., Wakita T., Suzuki T. Trans-encapsidation of hepatitis C virus subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. 2008 Biochemical and Biophysical Research Communications 371: 446-450
- (3) Nitahara-Kasahara, Y., Fukasawa, M., Shinkai-Ouchi, F., Sato, S., Suzuki, T., Murakami, K., Wakita, T., Hanada, K., Miyamura, T., Nishijima, M. Cellular vimentin content regulates the protein level of hepatitis C virus core protein and the hepatitis C virus production in cultured cells. Virology (in press).
- (4) Murakami K., Kimura T., Osaki M., Ishii K., Miyamura T., Suzuki T., Wakita T., Shoji I. 2008 Virological characterization of HCV JFH-1 strain in lymphocytes. Journal of General Virology 89: 1587-1592
- (5) Matsuura Y, Suzuki M, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I, Yokoyama M, Igota H, Yamauchi K, Ishida S, Fukui D, Bando G, Kosuge M, Tsunemitsu H, Koshimoto C, Sakae K, Chikahira M, Ogawa S, Miyamura T, Takeda N, Li TC. Prevalence of antibody to hepatitis E virus among wild sika deer, *Cervus nippon*, in Japan. Arch Virol. 2007. 152:1375-1381.

VII. III (2年間の研究成果)の概要図等

中空粒子を用いたウイルス性肝炎の新しい検査・予防法の開発 ロードマップ

	平成19年	平成20年	平成21年
E型肝炎ウイルス 中空粒子 (HEV-LP)	組換えバキュロウイルスを用いて G2、G3、G4 HEV-LPを作製する G3、G4 HEV-LPを作製した		
E型肝炎の検査・ 診断法の開発	HEV-LPに対する単クローン抗体を作製する HEV-LPを用いたE型肝炎検査・診断法を開発する HEV-LPに対する単クローン抗体を作製した		
E型肝炎ウイルス 複製系	培養細胞を用いた複製系を確立する 複製系を確立した		
E型肝炎 粘膜ワクチン	HEV-LPを用いた経粘膜 E型肝炎ワクチンを開発する ブタへの経口・経鼻投与を開始した		
B型、C型肝炎 検査・診断法	HBs粒子およびHCV粒子を作製し検査診断へ応用する HBV genotype AとCのキメラクローンを作製した Subgenomic repliconを持つHCV-LPを作製した		

赤色は2年目までの成果を示した。

○研究代表者の研究歴等**・過去に所属した研究機関の履歴**

昭和46年4月 千葉県血清研究所入所

昭和52年4月 国立予防衛生研究所ウイルス中央検査部入部

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

国立予防衛生研究所ウイルス中央検査部 甲野礼作、山崎修道、宮村紀久子
エンテロウイルス70の温度感受性発現機構の解析。

ニューヨーク州立大学医学部 Dr. Eckard Wimmer 教授

ポリオウイルス RNA 複製開始機構の解析。

国立感染症研究所ウイルス第二部 宮村達男、松浦善治、李 天成

HEV 中空粒子の発現と構造解析、ならびに抗原性、免疫原性の解析。

国立感染症研究所ウイルス第二部 染谷雄一、白土東子、片山和彦、岡 智一郎

ノロウイルスの遺伝子解析、中空粒子を用いた各種動物細胞との結合能の解析、プロテアーゼの解析。

・主な研究課題

ピコルナウイルスの分子生物学的研究

ヒトカリシウイルスの分子生物学的研究

E型肝炎ウイルスの分子生物学的研究

不活化ポリオワクチンの開発

・これまでの研究実績

・Wang CY, Miyazaki N, Yamashita T, Higashiura A, Nakagawa A, Li T-C, Takeda N, Xing L, Hjalmarsson E, Friberg C, Liou DM, Sung YJ, Tsukihara T, Matsuura Y, Miyamura T, H. CR, 2008. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of recombinant hepatitis E virus-like particle. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 64: 318-322.

・Shirato H, Ogawa S, Ito H, Sato T, Kameyama A, Narimatsu H, Xiaofan Z, Miyamura T, Wakita T, Ishii K, Takeda N, 2008. Noroviruses distinguish between type 1 and type 2 histo-blood group antigens for binding. *J Virol* 82: 10756-67

・Li TC, Takeda N, Miyamura T, Matsuura Y, Wang JC, Engvall H, Hammar L, Xing L, Cheng RH, 2005. Essential elements of the capsid protein for self-assembly into empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J Virol* 79: 1299-3006.

・Takamura S, Niikura M, Li TC, Takeda N, Kusagawa S, Takebe Y, Miyamura T, Yasutomi Y, 2004. DNA vaccine-encapsulated virus-like particles derived from an orally transmissible virus stimulate mucosal and systemic immune responses by oral administration. *Gene Ther* 11: 628-35.

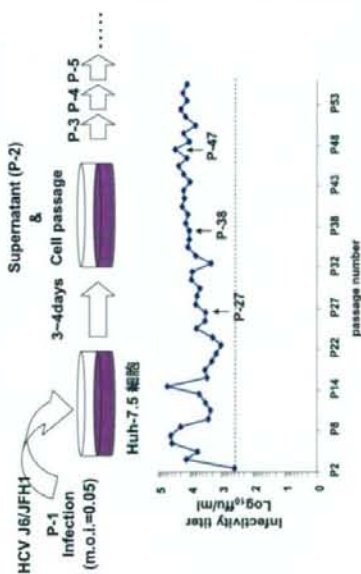
中空粒子を用いたウイルス性肝炎の 新しい検査・予防法の開発 (H19-新興一般-014)

研究代表者
国立感染症研究所ウイルス第二部
武田直和

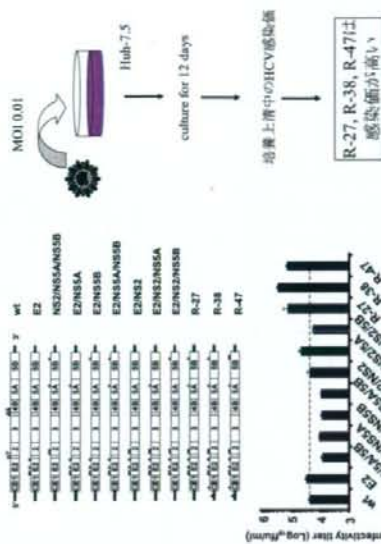
肝炎ウイルス

Virus	HAV Picornaviridae RNA	HBV Hepadnaviridae DNA	HCV Flaviviridae RNA	HDV Deltaviridae RNA	HEV Hepeviridae RNA
EM					
Source of virus	feces	blood/blood-products	blood/blood-products	blood/blood-products	feces
Route of transmission	Fecal-oral	percutaneous	percutaneous	percutaneous	fecal-oral
Chronic infection	no	yes	yes	yes	no
Vaccine	yes	yes	no	no	no

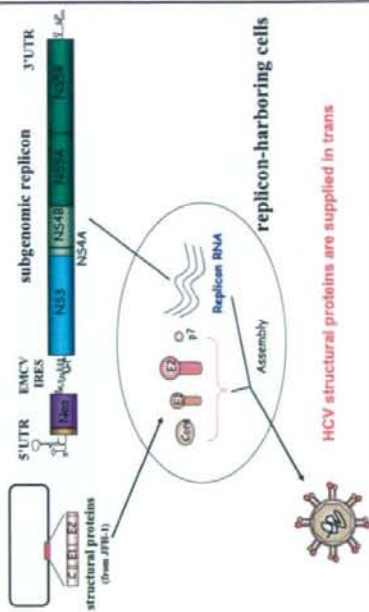
HCV増殖適応変異株の分離



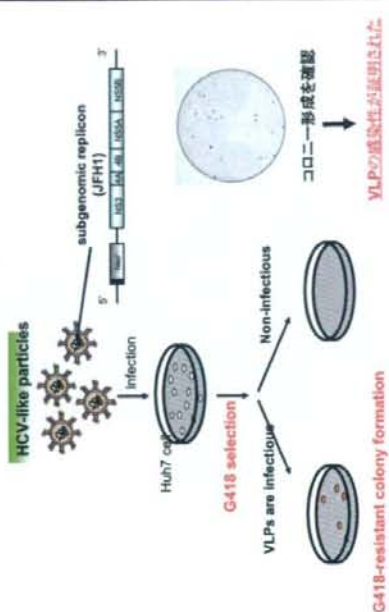
増殖適応変異のウイルス産生への影響



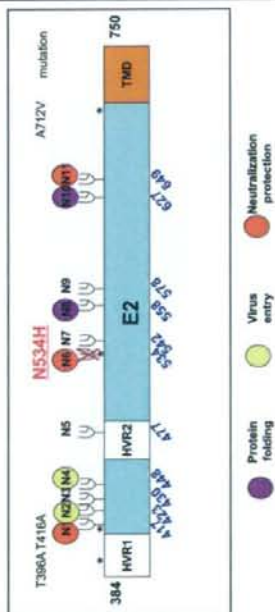
非伝播性感染性HCV粒子の作製と解析



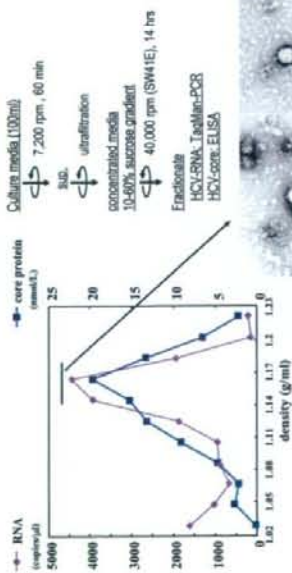
HCV粒子の感染性



N534H変異はHCV侵入効率を上げる

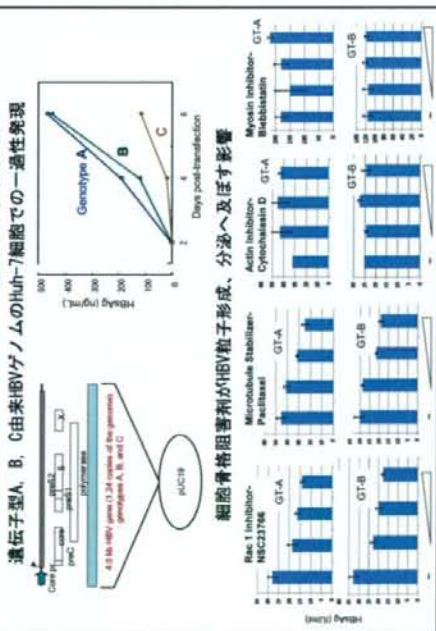


Purification of HCV-LPs



Negative staining of peak fraction

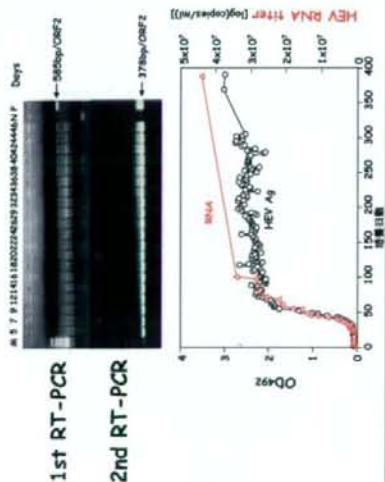
B型肝炎ウイルスの粒子形成機構



PLC/PRF/5細胞でのHEV増殖



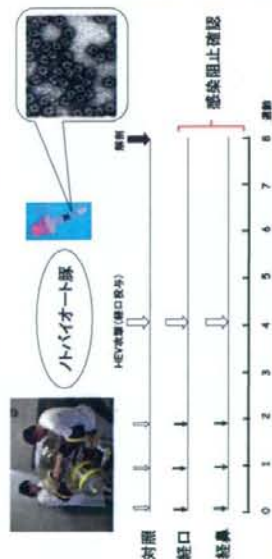
培養上清中のHEV RNAおよび抗原の検出



結果

- PLC/PRF/5 細胞で増殖したHEVは感染性を持っていた
- 継代によってウイルス増殖速度が著しく増加した
- 60°C、10分以上の加熱でHEVは失活した
- 50μw、30分間紫外線照射でHEVは失活した
- HEVの保存は冷凍が望ましい

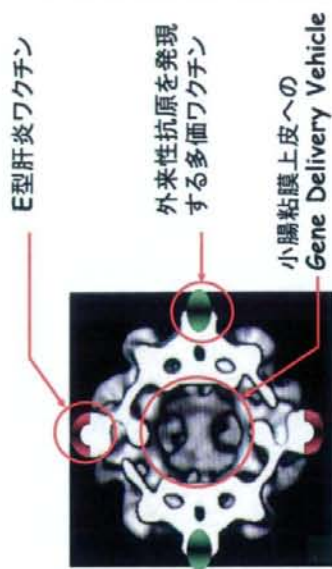
HEV VLP投与による感染防御



HEV VLP を1週間隔で3回投与した時の最小感染阻止量

経口でも経鼻でも0.5 mg/dose

HEV VLPの多機能ワクチンとしての可能性



中空粒子を用いたウイルス性肝炎の新しい検査・予防法の開発 ロードマップ

	平成19年	平成20年	平成21年
E型肝炎ウイルス 中空粒子(HEV-LP)		遺伝子バキュロウイルスを用いて G2, G3, G4 HEV-LPを作製した G3, G4 HEV-LPを作製した	
E型肝炎の検査・ 診断法の開発		HEV-LPに対するモノクローナル抗体を作製する HEV-LPを用いたE型肝炎検査・診断法を開発する HEV-LPに対するモノクローナル抗体を作製した	
E型肝炎ウイルス 複製系		培養細胞を用いた複製系を確立する 複製系を確立した	
E型肝炎 粘膜ワクチン		HEV-LPを用いた粘膜 E型肝炎ワクチンを開発する ブタへの経口・経鼻投与を開始した	
母親・C型肝炎 検査・診断法		HBs粒子およびHCV粒子を作製し検査診断へ応用する HB genotype A,B,C粒子を開発した Subgenomic repliconを持つHCV-LPを作製した	

3 年目研究課題