

200931013A

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・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 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 清水 博之

平成 22 年 (2010 年) 3 月

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 清水 博之

平成22年（2010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. ピ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. 中国における環境ウイルスサーベイランスシステムに関する研究 ----- 29
帖佐 徹 (財団法人 福岡県すこやか健康事業団)
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 ----- 33
岩井 雅恵 (富山県環境衛生研究所)
4. 海外旅行者から分離された新型エンテロウイルスの遺伝子解析と血清疫学に関する研究 -- 41
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 ----- 47
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 ----- 53
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 ----- 57
中村 貴史 (東京大学医科学研究所)
8. 環境水中のヒトパレコウイルス(HPeV)検出と地域流行との関連 ----- 59
町田 早苗 (埼玉医科大学 医学部)
9. エンテロウイルス感染マウスモデルの解析 ----- 63
有田 峰太郎 (国立感染症研究所 ウイルス第二部)
10. エンテロウイルス 71 受容体としての P-selectin glycoprotein ligand-1 の同定 ----- 65
西村 順裕 (国立感染症研究所 ウイルス第二部)
11. アイチウイルス複製機構の解析 ----- 71
佐々木 潤 (藤田保健衛生大学 医学部)
12. ポリオウイルス感受性動物モデルに関する研究 ----- 73
小池 智 (東京都臨床医学総合研究所)
13. 国内の麻疹の現状と教育啓発ならびに検査診断の必要性に関する研究 ----- 79
多屋 馨子 (国立感染症研究所 感染症情報センター)

14. 麻疹ウイルス研究小班統括報告	91
駒瀬 勝啓 (国立感染症研究所 ウイルス第三部)	
15. 堺市における麻疹発生状況—2009年—	101
田中 智之 (堺市衛生研究所)	
16. 北海道における麻疹の現況	107
長野 秀樹 (北海道立衛生研究所 感染症センター)	
17. 東北・新潟ブロックの麻疹ウイルス検査状況2	111
青木 洋子 (山形県衛生研究所)	
18. 麻疹の診断および抗体保有に関する検討	115
小川 知子 (千葉県衛生研究所)	
19. 横浜市におけるかぜ様疾患の患者を対象とした麻疹ウイルスのスクリーニング調査	121
七種 美和子 (横浜市衛生研究所)	
20. 石川県における麻疹抗体価調査結果について(2007~2009年)	127
倉本 早苗 (石川県保健環境センター)	
21. 麻疹ウイルス実験室診断の向上—検体搬送・保存溶液の検出感度への影響に関する研究及び東海地区麻疹レファレンスセンターの活動等について	131
皆川 洋子 (愛知県衛生研究所)	
22. 近畿ブロックレファレンス活動と2009年の麻疹検査	135
加瀬 哲男 (大阪府立公衆衛生研究所)	
23. 中国・四国ブロックにおける地方衛生研究所での麻疹検査実績について	139
戸田 昌一 (山口県環境保健センター)	
24. 麻疹ウイルス研究小班 RT-PCR ワーキンググループ	145
駒瀬 勝啓 (国立感染症研究所ウイルス第三部)	
25. 沖縄県における麻疹全数サーベイランス(2009年)	153
平良 勝也 (沖縄県衛生環境研究所)	
26. 麻疹の実験室診断法:血清診断、ウイルス分離、遺伝子診断	159
庵原 俊昭 (国立病院機構三重病院 小児科)	
27. 第Ⅱ期麻疹・風疹混合ワクチン接種によるブースター効果について	163
中山 哲夫 (北里生命科学研究所 ウイルス感染制御Ⅰ)	
28. 麻疹ウイルス野生株とワクチン株の鑑別	165
中山 哲夫 (北里生命科学研究所 ウイルス感染制御Ⅰ)	
29. 麻疹ウイルスN遺伝子検出定量のための One-step リアルタイム RT-PCR 法の開発	169
木村 博一 (国立感染症研究所 感染症情報センター)	
30. 呼吸器ウイルス研究小班統括報告	173
野田 雅博 (国立感染症研究所 ウイルス第三部)	

31. インフルエンザ様患者から検出された呼吸器ウイルス -----	179
中村 正治 (沖縄県衛生環境研究所)	
32. 島根県における呼吸器ウイルスサーベイランス -----	183
小村 珠喜 (島根県保健環境科学研究所)	
33. 小児急性下気道感染患者における急性呼吸器ウイルス遺伝子検出と解析 -----	187
-特に RS virus および Rhinovirus について-	
荒川 美果 (栃木県保健環境センター)	
34. 山形県におけるパラインフルエンザウイルス3型分離株の分子疫学解析-中間報告-----	191
平田 明日美 (栃木県保健環境センター)	
35. RS ウイルス感染後の乳幼児の気管支喘息発症のリスク因子の検討 -----	197
藤塚 麻子 (国立病院機構横浜医療センター 小児科)	
36. 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 -----	201
塚越 博之 (群馬県衛生環境研究所)	
37. 重症心身障害児(者)病棟における感染症の流行について -----	209
松田 俊二 (国立病院機構愛媛病院)	
38. ヒトメタニューモウイルスサーベイランス -----	215
調 恒明 (山口県環境保健センター)	
39. 地方における呼吸器ウイルス感染症サーベイランス -特にヒトメタニューモウイルスの疫学- --	221
水田 克巳 (山形県衛生研究所)	
40. ヒトマスト細胞による気管支喘息の発症と気道リモデリングについて、RSウイルス感染も含めて -	223
岡山 吉道 (日本大学大学院医学研究科)	
41. ライノウイルスの詳細な分子疫学解析に関する研究 -----	227
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 -----	 235

厚生労働科学研究費補助金
平成 21 年度 新型インフルエンザ等新興・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 東京都臨床医学総合研究所
帖佐 徹 財団法人 福岡県すこやか健康事業団
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:

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
中村貴史 東京大学医科学研究所
山本久美、島田智恵、岡部信彦、麻しん対策技術支援チーム 国立感染症研究所 感染症情報センター

研究協力者 (麻疹ウイルス研究小班):

田中智之、内野清子、高橋幸三、松尾光子、三好龍也、吉田永祥、狩山雅代 堺市衛生研究所
片桐真二 堺市医師会
藤井史敏 堺市保健所
長野秀樹、駒込里佳、井上真紀、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、篠崎邦子 千葉県衛生研究所
齊加志津子 元千葉県衛生研究所
一戸貞人 千葉県市原健康福祉センター
七種美和子 横浜市衛生研究所
倉本早苗 石川県環境保健センター
皆川洋子、小林慎一、續木雅子、広瀬かおる、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
戸田昌一 山口県環境保健センター

世良暢之、吉富秀亮、石橋哲也、千々和勝巳、小野塚大輔
中山志幸
川本大輔、樋脇 弘
平良勝也、岡野祥、仁平稔、中村正治
庵原俊昭、中野貴司、田中孝明
伊藤正寛
秋吉京子
中山哲夫
岡藤輝夫、岡藤隆夫
木村博一
齋藤美香、小澤邦壽
竹田 誠

福岡県保健環境研究所
福岡県保健環境研究所、福岡県筑紫保健福祉環境事務所
福岡市保健環境研究所
沖縄県衛生環境研究所
国立病院機構三重病院小児科
京都市公衆衛生研究所
神戸市環境保健研究所
北里生命科学研究所ウイルス制御Ⅰ
岡藤小児科
国立感染症研究所感染症情報センター
群馬県衛生環境研究所
国立感染症研究所ウイルス第三部

研究協力者(呼吸器ウイルス研究小班):

青木洋子	山形県衛生研究所
秋山美穂	国立感染症研究所感染症情報センター (現：株式会社サラヤ)
荒川美果	栃木県保健環境センター
五十嵐郁美	福島県衛生研究所
大内好美	滋賀県衛生科学センター
岡山吉道	日本大学大学院医学研究科先端医学系
小村珠喜	島根県保健環境科学研究所
木村博一	国立感染症研究所感染症情報センター
小林慈典	国立病院機構横浜医療センター小児科
齋藤義弘	東京慈恵会医科大学小児科
調 恒明	山口県環境保健センター
菅井和子	国立病院機構横浜医療センター小児科
平良勝也	沖縄県衛生環境研究所
田中千香子	滋賀県衛生科学センター
塚越博之	群馬県衛生環境研究所
戸田昌一	山口県環境保健センター
中村正治	沖縄県衛生環境研究所
仁平 稔	沖縄県衛生環境研究所
平田明日美	栃木県保健環境センター
藤塚麻子	国立病院機構横浜医療センター小児科
松田俊二	国立病院機構愛媛病院
水田克巳	山形県衛生研究所
南 亮仁	佐賀県衛生薬業センター

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。世界的麻疹制御政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 等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、AFP サーベイランスに比し、高頻度にポリオウイルスが分離できることを明らかにした。
- 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。ポリオウイルスワクチン株の血清型別が可能なリアルタイム PCR 法を作製した。
- 3) 海外渡航者由来新型エンテロウイルスの遺伝子解析および血清疫学解析から、旅行帰国者により国内に存在しないエンテロウイルスが常に運び込まれていることが示された。
- 4) 上気道炎症状を呈した患者の咽頭ぬぐい液検体から、CODEHOP VP1 RT-snPCR 法により HEVs の検出・同定を試みた。多数の血清型が存在する HRV の検出同定にも有用である可能性が示唆された。
- 5) VAPP の病原診断のためには、麻痺発症後早期の病原体サーベイランスが不可欠であることが示された。VAPP 発症の危険因子を評価することにより、回避可能なリスクへの対処を考慮する必要がある。
- 6) ウイルス抗体ライブラリーと細胞を用いたバイオニング法により、短時間で簡便に効率よく目的の scFv を同定できることが示唆された。
- 7) 下水流入水試料から検出され VP1 塩基配列解析により同定された HPeV 血清型は HPeV1、HPeV3、HPeV6 であった。血清疫学的解析の結果同様、日本では HPeV1、HPeV3、HPeV6 の不顕性感染が多いことが示唆された。
- 8) enviroxime 様メカニズムによるエンテロウイルス増殖阻害活性発現には、キナーゼ阻害作用が関与することが示唆された。
- 9) RT-LAMP 法は、エンテロウイルス陽性便検体を迅速に特定し、ウイルス分離の作業効率を上げるために有用であることが示唆された。
- 10) Jurkat T 細胞などの PSGL-1 発現白血球細胞においては、PSGL-1 が EV71-PB 株の宿主受容体であることを明らかにした。RD 細胞等 PSGL-1 をほとんど発現していない非白血球系細胞には PSGL-1 以外の EV71 受容体が存在することを明らかにした。
- 11) アイチウイルスのポリプロテイン切断部位のうち、2A の N 末端のみが効率良く切断されるために 3C ではなく 3CD を必要とし、その切断には 3CD と 2A 間の相互作用が深く関与している可能性を明らかにした。
- 12) ポリオウイルス感染は主に TRIF の関与する経路特に TLR3 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。
- 13) Ltr051 細胞発現遺伝子の一つ SCARB2 を L929 細胞で単独で発現させたところ、EV71 感受性を示した。さらに EV71 感染が抗 SCARB2 抗体により阻害されることなどから SCARB2 は EV71 受容体であることが示された。Ltr051 細胞ではすべての EV71 株に対して効率よく感染が成立した。
- 14) 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を行い、厚生労働省および WHO 西太平洋地域事務局と協力して、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後のフォローアップを実施した。

- 15) 2009年の麻疹患者報告数は2010年1月7日現在741人で、検査診断がなされていない例は40.9%、検査診断例33.1%、修飾麻疹例が26.0%であり、2008年と比較すると検査診断例が増加した。
- 16) 麻疹・風疹ワクチンの接種率調査によると、2008年度は、第1,2期はあと僅かで目標の95%達成であるが、第3,4期はかなり未接種者が残存した。2009年度の目標までには30~40ポイントの上昇が必要である。
- 17) 全国地衛研と感染研によるラボネットワークの存在と麻疹検査診断の必要性の周知を目的に、啓発リーフレットを作成した。
- 18) 2008年度には全国77の地衛研の中に、10ヵ所の麻疹・風疹レファレンスセンターを設置し、感染研、レファレンスセンター中心とした麻疹検査診断ネットワークを構築した。2009年は実際に本ネットワークを運用し麻疹検査診断にあたった。2009年に感染症発生動向調査に届出のあった麻疹例は741例、検査診断例は438例であったがその多くは検査センターで実施されており、地衛研には届けられない実態が明らかになった。
- 19) 2009年における麻疹届出情報を整理して、各ブロック又は各地区の麻疹流行状況等を把握した。また地衛研における麻疹検査診断状況を確認した。
- 20) 一部のブロックでは、所轄の衛生研究所を対象にRT-PCR法の精度管理や研修を実施した。
- 21) 麻疹抗体保有調査を実施し、保有抗体価がやや減衰している傾向にある事がわかった。自然感染ではなくワクチンにより獲得された免疫のためと考えられた。10代の抗体価がやや上昇しており、2008年より開始された補足的ワクチン接種の効果と考えられた。2期MRワクチンのブースター効果が明らかになった。
- 22) veal Broth を用いて-20℃に保存することで、8ヶ月後でもウイルスは分離が可能である事を示した。ゲノム検出、ウイルス分離による麻疹診断検体としてはPBMCが最も優れており次いで尿、咽頭拭い液であった。
- 23) 麻疹輸入例を2例経験した。疫学的調査およびウイルス遺伝子型の解析よりタイ、インドでの感染例と考えられた。麻疹ウイルスゲノム解析の重要性が示された。
- 24) 風邪様症状と診断された検体の中にも麻疹例がある事をしめした。
- 25) PCR陰性で低い陽性域のIgM抗体価を示す検体がかなりある事が示唆され、複数の検査結果による総合的な麻疹診断の必要性が考えられた。
- 26) 反応チューブを開放せずにワクチン株と野生株の鑑別できるLAMP法等を開発した。またより簡便なone step real-time法の開発を試みた。
- 27) 急性呼吸器感染症(ARI)の総合的なサーベイランス体制の整備・構築およびレファレンス機能強化をはかる目的で以下の研究を実施した。ARI症例由来試料のウイルス検索を試みた結果、Respiratory Syncytial ウイルス(RSV)、ヒトメタニューモウイルス(hMPV)、ヒトライノウイルス(hRV)、ヒトボカウイルス(HBoV)、パラインフルエンザウイルス(PIV)、アデノウイルス等が多数分離された。それぞれのウイルスについて分子疫学解析を行い、我が国で流行しているウイルス株の詳細な遺伝学的性状の把握を継続した。
- 28) ARIウイルス制御のための効果的なサーベイランス実施を目的として、ウイルスサーベイランス担当者を対象にした技術研修の実施、ARIウイルス検出マニュアルの作成などを行った。

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、WHO西太平洋地域における2012年の麻疹排除へ向け、世界的麻疹制御政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検査・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) 広東省広州市内を流れる珠江および天河地区猎德下水処理場の流入下水にて、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。流入下水サンプルから、ポリオウイルスを分離同定し遺伝子解析を行った。
- 2) 平成21年4月から12月にかけて、富山県内計2箇所において、月1回下水流入水を採取し、ウイルス分離同定・ポリオウイルス遺伝子解析を行った。ポリオウイルス血清型別が可能な高感度リアルタイムPCR法を作製し、下水流入水中のポリオウイルス量を測定した。
- 3) 1989年～2001年に、主に東南アジア諸国を旅行し、帰国時に名古屋空港検疫所で胃腸炎症状を訴えた58名から分離されたウイルスのうち、新型エンテロウイルスと同定された7株を解析した。血清疫学解析のため、ヒト血清は0歳から60歳までを10階層に分け、各階層20名前後を検査対象とした。
- 4) 2007年8月から10月までの期間に長崎県下の小児科医院において、手足口病およびヘルパンギーナと診断された患者より採取された咽頭ぬぐい液、VP1 RT-snPCR陽性を用いた。さらに本法による検出同定が殆ど試みられていなかったHRVについて有用性を検討した。
- 5) OPV関連麻痺(VAPP)が疑われた症例およびこれまでにわが国で文献や学会に報告されたVAPPが疑われた例について、臨床経過、リスク因子、ウイルス検査所見を比較検討した。
- 6) 抗体スクリーニングのモデル系を確立するため、EGFR又はユビキチンに対するscFvを、それぞれ麻疹ウイルスゲノムに挿入したプラスミドを構築し、GFPあるいはDsRedを発現するよう麻疹ウイルスゲノムへ挿入した。リバーシジェネティクス法にて組換え麻疹ウイルスを回収し、各ウイルス液をEGFR発現細胞に感染させバイオパニングを行った。
- 7) 2006年4月から2009年3月までA地域の下水流入水2Lを毎月1回(計36回、36試料)採取し、フィルター吸着溶出法で濃縮した。濃縮液からRNAを抽出しHPeV1～V6を検出するReal-time PCR法を施行した。
- 8) PVおよびEV71擬似ウイルス粒子を用い、GW5074の抗エンテロウイルス活性を増強する活性を持つキナーゼ阻害剤の探索を行った。
- 9) エンテロウイルスのうち、PV-like 5' NTRを持つウイルスを標的としたRT-LAMP法のためのプライマーをデザインし、ウイルス株および便検体を用いて検出感度および特異性を確認した。
- 10) Jurkat T細胞よりレトロウイルスcDNAライブラリーを作製し、浮遊系マウス細胞を組み合わせた発現クローニング法により、EV71 1095株結合分子のクローニングを行った。プレート上に形成された細胞のゲノムを回収し、ライブラリー由来遺伝子をPCRで増幅した。EV71結合分子としてPSGL-1を同定し、PSGL-1導入マウスL929細胞等によりEV71受容体機能を解析した。
- 11) Vero細胞抽出液中で各種ウイルスタンパク質を翻訳し³⁵S]Met/Cysで標識した。タンパク質間の相互作用を哺乳動物細胞ツーハイブリッド解析および免疫沈降により調べた。
- 12) ポリオウイルスの感染防御にはIFN応答が重要であることを昨年度までに示した。今年度はさらにTLR3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本経路の重要性を調べた。
- 13) EV71感受性を獲得したマウス細胞株Ltr051,Ltr246細胞からRNAを調整し、Whole Human Genome MicroarrayによってヒトmRNA発現を解析した。cDNAを単離しEV71受容体機能を調べた。
- 14) 2008年に提出した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の内容について、専門家委員会およびWHO/WPROからの指摘に基づいたフォローアップを実施した。

- 15) 感染症法に基づいた麻疹患者報告を臨床診断例、検査診断例、修飾麻疹（検査診断例）において集計した
- 16) 厚生労働省健康局結核感染症課が調査した麻疹・風疹ワクチン接種率を、国立感染症研究所で集計・解析した。
- 17) 医療機関、保健所、地方衛生研究所、国立感染症研究所の連携を強化し検査診断実施を啓発するためのリーフレットを作成した。
- 18) 2009 年度の届出情報を整理し各ブロック又は各地区の流行状況を把握する。
- 19) 検査依頼検体のウイルス遺伝子検出、ウイルス分離、IgM 抗体測定等の麻疹検査診断を実施する。N 遺伝子が検出された場合、系統樹解析により遺伝子型を決定する。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。ブロック内の地衛研の検査体制、ならびに麻疹検査状況をアンケート等で把握する。また、ブロック内の地衛研の精度管理、研修等を実施する
- 20) 様々な年齢層の血清から麻疹抗体価を測定し、抗体保有状況を検討する。中和法、EIA 法、PA 法等で血清中の麻疹抗体価を測定し、感染防御抗体価を検討しそれぞれの測定系での相関性を比較する。
- 21) 麻疹ウイルスの-20°C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) 過去 10 年間の発疹性カゼ様疾患患者の検体から麻疹ウイルスゲノムの検出を行い、カゼ様疾患と分類された患者における麻疹感染の可能性を検討する。
- 23) 地方衛生研究所の検査実績をとりまとめ確定診断数、および否定診断数を病原体発生動向調査の麻疹患者報告数を比較する。
- 24) Syber Green real-time PCR 法を確立し、感染研が推奨する Nested PCR 法の感度を比較し、尿、咽頭拭い液、PBMC の検出感度を検討する。Lamp 法、real-time PCR Tm assay 法、Taqman PCR 法で塩基配列を決定することなく、ワクチン株と野生株の鑑別ができる方法、条件を検討する。
- 25) 2006 年から開始された MR ワクチン 2 期接種のブースター効果を、接種群と非接種群の麻疹抗体価、風しん抗体価を測定する事で検討する。
- 26) より迅速で簡便な One Step Real time RT-PCR 法を検討する。
- 27) 各地域レベルでARIウイルス分離検出株の解析、代表株の系統保存・遺伝子情報の集積を行う。
- 28) 病原体検索法（ウイルス分離培養法、遺伝子検出法等）およ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ならびに検査法の普及を図る。ARIウイルス検査に伴う標準品の供給体制を充実する。
- 29) 血清疫学調査を試み、ウイルスの流行実態を血清疫学的に把握する。
- 30) 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検討する。ARI ウイルスによる気管支喘息発症のリスク因子とウイルス学的要因について検討し、喘息発症機序の分子レベルでの解明を行う。
- 31) 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) 流入下水サンプルを RD、HEp-2、Vero、L20B 細胞に接種したところ、各々61,15, 29 株のウイルスが分離された。L20B 細胞で分離されたポリオウイルス 1-3 型分離株について VP1 領域の塩基配列

- を調べたところ、ワクチン株と1%以下の違いであり、すべてSabin-like株と判定された
- 2) 2009年に富山県内の下水流入水サンプルから23株のポリオウイルスが分離された。血清型別では、1型が5株、2型が6株、3型が12株分離され、すべてOPV-likeポリオウイルスと同定された。リアルタイムPCR法の検出感度を測定したところ、ストック液の 10^{-5} 倍の希釈倍率まで検出された。
 - 3) 新型エンテロウイルスと同定された7株のVP1領域の塩基配列について、データベースを用いて近縁の株を検索し比較した。EV-73は30歳以上の年齢階層で30%の抗体保有率があり、過去に国内で流行した可能性が示唆されたが、他の4型に対する抗体保有状況は1~3%と低かった。
 - 4) HEV-Aに感受性の高いRD-A細胞を用いて、ヘルパンギーナおよび手足口病患者由来咽頭ぬぐい液64検体からウイルスの再分離を試みたところ、1検体からCV-A5が分離され、手足口病患者由来6検体からCVA16が分離された。HRV48血清型について、CODEHOP VP1 RT-snPCR法による検出同定を検討したところ、全ての血清型において同定可能であった。
 - 5) 肛門周囲膿瘍のある7か月男児が、OPV初回内服3週間後、発熱後麻痺を発症し、VAPPが疑われた。過去のVAPP症例の解析により、男児、OPV初回内服後がVAPP症例の大多数を占めた。10例のうち2例では、OPV内服前の時点で肛門周囲膿瘍を有していた。必ずしもすべての症例で麻痺発症直後の適切な時期に検体が採取されてはいなかった。
 - 6) バイオパンニング1ラウンド目ではGFP発現細胞融合はわずかであったが、ラウンドを繰り返すうちに、多数のGFP発現細胞融合が観察された。GFP発現と細胞融合が見られたウイルスプラークでは、7/10クローンがEGFR scFvであった。EGFR感染麻疹ウイルスが、腫瘍細胞でのバイオパンニングによって簡単に分離できることを確認した。
 - 7) 2006年4月から2009年3月まで毎月1回下水流入水、計36試料を採取し、HPeVの検出を試みた。その結果、病原微生物検出情報でのHPeV検出時期と同時期に検出されHPeVが春から初冬に伝播している可能性が示唆された。
 - 8) MEK1/2阻害剤、wortmanninおよびEGFR阻害剤は、GW5074の抗エンテロウイルス活性を増強した。耐性ウイルスの解析により、GW5074はenviroximeと共通のターゲットを有することが示唆された。
 - 9) RT-LAMP法により、少なくともSabin株400コピーを検出できた。CBV-like 5' NTRを持つエンテロウイルスに対しては、7,400~28,000コピーを検出できた。便検体を用いてRT-LAMP法を行ったところ、PV、A、C群のエンテロウイルスを効率よく検出できた。
 - 10) EV71-1095は、ヒトPSGL-1のアミノ末端領域に特異的に結合し、また、ヒトPSGL-1はEV71の侵入および増殖にもかかわる機能的受容体であることが明らかとなった。
 - 11) アイチウイルスポリプロテインのプロセッシングに関与するプロテアーゼは3Cおよびその前駆体のみであった。3CDが全ての切断部位を効率良く切断できた。ツーハイブリッド解析の結果、3CDは2Aに強く結合したが、3Cには強い2A結合能は認められなかった。
 - 12) 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、TLR3ノックアウトマウスにおいてもほぼ同等に感受性が増大していることが認められた。TLR3を介したtype I IFN誘導経路がポリオウイルスの感染防御に重要であることが明らかになった。
 - 13) Ltr051細胞で発現しているヒト遺伝子SCARB2をL929細胞で単独で発現させたところ、発現細胞はEV71感受性を示した。さらに感染はSCARB2抗体により阻害されることなどからSCARB2がEV71受容体であると結論づけた。Ltr051細胞ではすべてのEV71株に対して効率よく感染が成立した。
 - 14) 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、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後のフォローアップを実施した。
 - 15) 2009年の麻疹患者報告数は2010年1月7日現在741人で、臨床診断のみで検査診断がなされていない例は40.9%、検査診断例33.1%、修飾麻疹例が26.0%であり、2008年と比較すると検査診断例が多くなっていた。

- 16) 厚生労働省が実施主体となり調査している麻疹・風疹ワクチンの接種率を感染症情報センターで集計した。2008年度は、第1, 2期はあと僅かで目標の95%達成であるが、第3, 4期はかなり未接種者が残存した。2009年度は現時点では目標まであと30~40ポイントの上昇が必要である。
- 17) 全国地衛研と感染研(駒瀬分担研究班)によるラボネットワークの存在と麻疹の検査診断をお願いすることを目的に、啓発リーフレットを作成した。
- 18) 麻疹診断ネットワークの運用を開始したが、検体の大部分が検査センターに送付され、地衛研には送付される例は少なかった。一部のブロックで所轄の衛生研究所を対象にRT-PCR法の精度管理を実施した。
- 19) 北海道ブロックでは、管轄の保健所から情報を集計、解析した。17例の麻疹報告があり、うち11例は検査診断例であった。麻疹患者は北海道に広く分布しており発症時期からも必ずしもリンクするものではなかった。上記の検体以外の2検体の検査は保健所からのルートではなく、医師からの直接の依頼であった。1歳未満の子供の16倍以上の麻疹抗体価保有率は、4ヶ月で50%以下になり、7ヶ月で22%、9ヶ月で0%となった。
- 20) 東北地方9県の地衛研においては麻疹診断検査依頼が6件あり、すべて陰性であった。遺伝子診断技術を調査した結果、一部の県ではH, Nどちらかのプライマーを保有しておらず、他のプライマーを使用している地衛研もあった。
- 21) 山形衛研で遺伝子型D9のウイルスを検出した。旅行歴からタイで感染したものと考えられた。
- 22) 石川県では2007-2009年に得た695血清を用いて抗体保有調査を実施した。2009年は若年層での抗体価の上昇がみられた。これは補足的予防接種によるものと考えられた。
- 23) 千葉県で2007-2008年に回収された検体のうち、ウイルス分離ができたものはすべてRT-PCR陽性であった。また、IgM陽性検体はすべてPCR陽性だが、IgM陰性検体の中にもPCR陽性があり、PCRの優位性が示された。抗体保有調査では、中和抗体価8未満は20歳代では33%となりワクチン世代での保有抗体価の減少が危惧された。各測定法による感染阻止抗体価を求めたところ、測定法間で相関性が認められた。
- 24) 横浜では、発疹を伴う風邪様疾患を示した小児から採取した99検体から麻疹遺伝子の検出を試み、2000年の2検体、2007年の1検体、2008年の3検体から麻疹遺伝子が検出され、風邪様症状を示す患者からも麻疹ウイルスが検出される事が示された。H遺伝子検出法では検出されたがN遺伝子検出法では検出されていない検体が2例あり、H遺伝子検出法の優位性が確認された。
- 25) 東海ブロックでは管内の5つの地衛研すべてがRT-PCR法で良好に麻疹ウイルスゲノムを検出できる事を確認した。従来の基幹定点だけでなく、内科、皮膚科からの成人麻疹の報告があり、全数報告の有効性が示された。
- 26) 愛知県における検査診断はほとんどが検査センターによるIgMあるいはペア血清による抗体上昇であった。veal Brothを用いて、-20℃で保存することで、8ヶ月後でもウイルスは分離が可能である事を示した。
- 27) 近畿ブロックの大阪公衛研では、希望する4地衛研に対して遺伝子検出法に関する研修を実施した。74検体の検査を実施したが、陽性例は大阪の1例(A型)のみであった。大阪公衛研での検査結果は18人31検体を検査し、遺伝子検出されたのはA型のみであった。また、6人のIgM抗体価は比較的低いながらも陽性域であった。
- 28) 堺市では、2009年に8例の麻疹届け出があり、すべてが検査診断例であった。16例の検査を実施したが、すべてが陰性であり、また、届け出されていないものだった。
- 29) 中国・四国ブロック内の10地方衛生研究所の検査実績をとりまとめ麻疹患者報告数と比較した。発生動向調査では51例が報告され、うち36例が検査診断とされた。一方、地衛研では20検体中1検体のみが陽性であった。地衛研での陽性例は病日5日目に採取した検体で、PCR陰性、IgM陽性であった。
- 30) 福岡県では九州ブロックの11施設の検査診断状況をとりまとめた。九州地区で22検体より地衛研で検査がなされ、1検体がPCR陽性でありD5の遺伝子型に属した。福岡県では24の麻疹症例があり、うち5例は臨床診断、残り19例はIgMある

- いは IgG ペア血清で診断されていた。平成 15 年～21 年度に検出された麻疹ウイルスの遺伝子型は D5 型、H1 型および A 型であった。
- 31) 沖縄県では 60 人の麻疹疑い例が報告され、全例検査がなされた。確定診断例は 5 例のうち 4 例が成人麻疹であった。4 例からウイルス遺伝子が検出され、遺伝子型は D5 および D8 であった。D8 株は日本では過去に報告されておらず、空手大会に参加し、発疹、発熱で病院を訪れたインド人に由来すると考えられた。60 例中 41 例で血液が入手でき、IgM 抗体価を測定し PCR の結果の相関性を検討した。発疹出現後 1 日以内の 3 検体ではすべて PCR 陽性、IgM 陰性であったが、PCR 陰性、IgM 陽性の検体も認められた。
 - 32) Syber Green Real-Time PCR 法を確立し、標準法としている nested RT-PCR 法との感度の比較を行ったところほぼ同等の感度を示した。
 - 33) 検体の種類による感度を比較したところ、ウイルス分離率では PBMC、尿、咽頭拭い液の順であった。ウイルス遺伝子の検出では PBMC はウイルス分離と同程度であり、咽頭拭い液ではウイルス分離より特異度が高かった。検体としては PBMC が最も優れており次いで尿、咽頭拭い液であった。
 - 34) 2008 年に採取した血清をワクチン接種後の年数、2 期 MR ワクチン接種の有無により分類し、麻疹中和抗体価、風しん HI 抗体価を測定比較した。初回 MR ワクチン接種後、4.5-8 年経た小児では、2 期 MR ワクチン接種群の方が非接種群より有意に高い抗体価を維持していることがわかり、2 期接種によるブースター効果が明らかとなった。
 - 35) D5 流行株等からプライマーを調整して、塩基配列をしなくてもワクチン株と野生株を鑑別できる Lamp 法、real-time PCR Tm assay、Taqman PCR 法を確立した。
 - 36) 麻疹ウイルス N 遺伝子を標的とする One step real-time RT-PCR 法を検討したところ検出感度は two step 法と比較してやや低かったが 30 分程度の短縮が可能であった。
 - 37) 山形県、福島県、栃木県、群馬県、滋賀県、島根県、山口県、佐賀県および沖縄県域の ARI ウイルスサーベイランスの結果、RSV41 株、hMPV82 株、HRV52 株、PIV182 株および HBoV4 株それぞれ分離/検出された。
 - 38) 沖縄県における新型インフルエンザ様患者の ARI ウイルス検索を実施した結果、H1N1pdm 陰性患者の 18.8%から RSV、HRV、hMPV および PIV が検出された。
 - 39) 島根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、RSV、hMPV、PIV および HRV 等が新たに検出された。
 - 40) 国立病院機構横浜医療センターを受診した小児下気道疾患患者の ARI ウイルス検索を実施した結果、RSV ; 83 株、HRV ; 64 株、hMPV ; 2 株、PIV ; 2 株および HBoV ; 3 株が検出された。
 - 41) 2002～08 年に山形県で分離された PIV3 計 91 株の HN 遺伝子の分子系統樹解析を実施した結果、大きく 3 つのクラスターに分類された。
 - 42) 国立病院機構横浜医療センター小児科に入院加療を必要とした 3 歳未満児 58 名を対象に、ウイルス学的検索ならびに気管支喘息発症のリスク評価を行った。呼吸症状の重症度では前者が有意に高い度数を示した。
 - 43) 2005～2006 年にかけて、入院加療を必要とした神奈川県在住の気管支炎乳幼児患者から分離された RSV17 株の分子疫学解析を行った。その結果、7 株は Subgroup A、10 株は Subgroup B に分類された。
 - 44) 全国 49 施設重症心身障害児(者)施設のアンケート調査から、1 施設内の感染症流行は平均 0.5 回/年であった。中四国の愛媛病院を含む 10 施設では 1 施設あたり 1～2 回/年であった。愛媛病院における ARI 流行例の原因究明を試みた結果、HRV の施設内流行が確認された。
 - 45) 2009 年、山口県内の 1 小児科医院において気管支炎もしくは肺炎と診断された乳幼児患者 18 例から hMPV 特異的遺伝子が検出された。
 - 46) 2004-2009 年間の山形県における ARI サーベイランスの結果、計 280 株の hMPV が分離された。hMPV は春に多数検出され、秋に少なくなる傾向を示した。地域における流行の主体は genotype A2 および B2 である可能性が示唆された。
 - 47) 病因が特定されなかった ARI 患者の HBoV 検索を継続実施した結果、新たに 8 株検出された。

- 48) 2003～07年に山形県で分離された76株のHRV-AのVP4/VP2遺伝子領域の分子疫学解析を行った結果、系統解析ではそれぞれ11あるいは8クラスターに分類された。
- 49) ヒト肺マスト細胞はTSLPおよびPAF受容体を発現し、血管内皮細胞の接着因子発現、顆粒球遊走・活性化や生存延長を誘導することによる炎症の持続および気道リモデリングへの関与が示唆された。
- 50) 今年度分離されたRSV臨床株22株の抗RSVヒト化モノクローナル抗体中和反応性を検討した。その結果、いずれの供試株も中和抗体価を有し、非感受性株は検出されなかった。
- 51) 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、昨年度に引き続いてRSV, HRV, 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。
- 52) 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とするため、病原体検出マニュアルHRV編, PIV編およびHBoV編を作成した。
- 53) 地方衛生研究所等の技術者を対象とした短期研修ウイルス研修等におけるARIウイルスサーベイランスに関する研修を実施した。
- 5) VAPPの病原診断のためには麻痺発症後早期に糞便検体を採取してウイルス分離を実施することが不可欠である。VAPP発症の危険因子がいくつか知られており、回避できるものについて適切な対処が必要とされる。
- 6) ウイルス抗体ライブラリーの細胞を用いたバイオパニング法により、短時間で簡便に効率よく目的のscFvを同定できることが示唆された。
- 7) 下水流入水試料から検出されVP1塩基配列解析で同定されたHPeV血清型はHPeV1, HPeV3, HPeV6であった。HPeV1, HPeV3, HPeV6による不顕性感染の存在が示唆された。
- 8) enviroxime様のメカニズムによりエンテロウイルス阻害活性を示すためには、キナーゼ阻害作用が重要であることが示唆された。
- 9) RT-LAMP法は、エンテロウイルス陽性便検体を仕分け、ウイルス分離の作業効率を上げるために有用であることが示唆された。
- 10) Jurkat T細胞などのPSGL-1発現白血球細胞において、PSGL-1がEV71-PB株の宿主受容体であることを明らかにした。非白血球系細胞においてPSGL-1以外のEV71受容体が存在することを示した。

D. 考察

- 1) 中国広東省CDC等との共同研究により、環境サーベイランスはAFPサーベイランスに比し、高頻度にポリオウイルスが分離できること、OPV定期接種状況を把握するモニタリングツールとしても適用できる可能性を明らかにした。
- 2) 富山県内の下水流入水からのOPV-likeポリオウイルス検出時期は流域地域のワクチン接種時期から約2ヶ月以内に限られており、野生株や変異ウイルスの侵入や伝播の可能性は低い。
- 3) 海外旅行者から分離された新型エンテロウイルスの遺伝子解析および血清疫学解析から、旅行帰国者により、国内に存在しないエンテロウイルスが常に運び込まれている可能性が示された。
- 4) CODEHOP VP1 RT-snPCR法は臨床検体からHEVを迅速に検出同定できるだけでなく、HRVの検出同定にも有用である可能性が示された。
- 11) アイチウイルスのポリプロテイン切断部位のうち、2AのN末端のみが効率良く切断されるために3Cではなく3CDを必要とすることを示し、その切断には3CDと2A間の相互作用が関与する可能性を明らかにした。
- 12) ポリオウイルス感染は主にTRIFの関与する経路特にTLR3によって検知され、効率のよい防御が成立していると考えられた。新規マウスモデルとしてTLR3経路のconditional KOなどの方法が有効であると考えられる。
- 13) SCARB2は、すべてのEV71株に対して受容体として機能することから主要なEV71受容体である可能性が高い。SCARB2は中枢神経細胞にも発現が見られ、EV71脳炎の際も、SCARB2受容体を介して感染する可能性が示された。
- 14) 野生株ポリオウイルス実験室封じ込め調査第一段階WHO報告のフォローアップを継続するとともに、今後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。
- 15) 2009年はパンデミック(H1N1)発生もあり、麻疹ワクチン接種率が伸び悩んでいることが予想さ

れるが、あと1ヵ月半の積極的な勧奨成果に期待する。予防接種啓発に関しては、本研究班で初年度に作成したDVDを送付し予防接種の重要性を知ってもらうための啓発を継続している。

- 16) 麻疹患者報告数は、2008年の11,015人から2009年の741人に93%減少したことは特筆すべきである。特に第3期、第4期対象年齢層である10代の患者が激減した。
- 17) 麻疹検査診断例が増加しているが、多くはIgM抗体による確認であり、医療機関から保健所を通じて全国の地方衛生研究所に臨床検体が搬送されていない現状もわかってきた。医療機関、保健所に、地方衛生研究所への臨床検体の搬送をお願いし検査診断の充実に寄与することを目的とし啓発のためのリーフレットを作成し全国自治体に配布した。
- 18) 検査診断に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重要であり、2012年までの麻疹排除の要件とされている。日本では、感染初期に病因を特定し麻疹の拡大を防ぐ事を目的として、発症初期に感度が高いRT-PCRによる麻疹ウイルスゲノム検出法を標準法として採用し、麻疹検査診断ネットワークを構築した。2009年には741例の麻疹症例が感染症発生動向調査に報告され、そのうちの438例が検査診断とされているが、大部分が民間検査センター等で実施され、地衛研への依頼数は少なかった。地衛研に送られた検体の多くが医療施設からの直接の依頼と思われるものであった。麻疹症例が減少したことによる関心の低下、新型インフルエンザ対応、保健所との不十分な連携、行政からの通知等の不徹底等も原因と考えられた。今後はより保健所と緊密に連携を取れる体制を構築していく必要がある。沖縄県等検査体制が整備されている地域のあり方を参考にすることがある。
- 19) 東北・新潟ブロック、東海ブロック、近畿ブロックでは研修、RT-PCRの精度管理を実施した。また、他のブロックでも所轄の地衛研との連携をとって、情報を共有した。
- 20) 2009年には輸入例と考えられる麻疹例が2例あった。ウイルスの遺伝子型はそれぞれD4とD8であり、タイ、インドで感染、日本で発症したと考えられた。麻疹排除の最終段階において麻疹の原因ウイルスが地域固有ウイルスか輸入ウイルスかの鑑別が重要になる。
- 21) 地衛研で検査した検体の中で、PCR陰性でIgM陽性の検体はいくつかあった。多くはIgMが低値の

ものであり、必ずしも麻疹感染の結果ではないと考えられた。低IgM値を示す患者には他の方法での診断を行う必要がある。

- 22) 人口全体で抗体価の低下の傾向があり、1歳以下では数ヶ月で感染阻止ができるレベルの抗体保有者は20%前後になることが明らかになった。補足的ワクチン接種を受けた年代では抗体価が上昇した事、ならびに第2期のMRワクチンのブースター効果が認められた。
- 23) 検体を-20℃等の比較的高い温度で8ヶ月以上保存できる方法は有用である。ウイルス分離、遺伝子検出にはPBMC、尿、咽頭拭い液の順に感度が高い事が報告された。
- 24) LAMP法、real-time PCR Tm assay法等で塩基配列の決定やRFLP法等を用いなくてもワクチン株と野生株の鑑別が可能となった。
- 25) 現在、nested RT-PCR法を麻疹診断の標準診断法としているが、実験室汚染の可能性がある。今後はreal-time PCR法の導入を考慮すべきであろう。
- 26) ARIサーベイランスおよび重症例等の病原検索を試みた結果、RSV、hMPV、HRV、PIV、HBoV等のARI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。
- 27) RSV、hMPV、HRVおよびPIV等の分子疫学解析の結果、我が国で流行したPIV-3は大きく3つのクラスターに分類される株であった。またHRVのVP4/VP2遺伝子領域の系統解析の結果、我が国で流行したHRV-Aは8~11クラスターに分類された。
- 28) HBoVの分子疫学解析は今年度さらに調査範囲等を拡大して継続実施している。遺伝学上、近縁と考えられる動物由来のパルボウイルスとの間で、生物学的、遺伝子学的性状の異同を検討するための予備検討に着手した。
- 29) 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成績から、本研究事業により、ARIウイルスサーベイランスを実施する機関が増加していると思われた。レファレンス機能強化に向けた課題として検査法の標準化と普及が重要であり、ARIウイルス病原体検出マニュアルを新たに3編作成した。

E. 結論

ポリオフリー地域におけるポリオ病原体サーベイラ

ンスの一環として、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。OPV を使用する以上避けることが出来ない VAPP 症例の病原体サーベイランスも依然重要である。現在、広範なアジア地域で流行している EV71 による重症手足口病等、特定疾患の流行との関連を含めた、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とされる。また、基礎的研究成果に基づいた新たな手法による病原体検出・同定法の開発は病原体サーベイランスにとって重要な意味を持つ。特に本研究事業による EV71 特異的受容体の同定はウイルス学的にきわめて重要な知見であるのみならず、今後新たな検査法や感染動物モデル開発への技術的応用が期待できる。

2012 年を目標とする麻疹排除達成に向け、本研究事業を中心に昨年度構築した、地衛研・感染研間の連携による麻疹検査実施体制の運営を開始したところ、多くの検体が地衛研に集約されなかった。実効性のある、WHO のかかげる要件も満たす検査診断による麻疹サーベイランス体制を強化するには、保健所との強い連携が必要であり、行政面からのサポートが重要である。麻疹排除のためのサーベイランスの意味を医療関係者等へ周知し、すべての麻疹疑い例は、地衛研で検査診断をしなければならないという認識を再度植え付けていく必要がある。2008 年と比較すると患者報告数は激減したが、報告数が一定数以下になった場合は、全例検査診断する方向が厚生労働省からの通知にも記載されているところである。全数検査診断に向けた取り組みが重要である。

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い、RSV, hMPV, HRV, PIV および HBoV 等のさまざまなウイルスの ARI への関与を明らかにした。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。また、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学および遺伝学的に検討した。地方衛生研究所における ARI ウイルスサーベイランスに関わる実験室体制整備に係る側面的支援を行った。

F. 健康危機情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表（総説等を含む）

- 1) Iwai M, Hasegawa S, Obara M, Nakamura K, Horimoto E, Takizawa T, Kurata T, Sogen S, Shiraki K: Continuous presence of noroviruses and sapoviruses in raw sewage reflects infections among inhabitants of Toyama, Japan (2006 to 2008). *Appl Environ Microbiol* 75: 1264 - 1270, 2009
- 2) Iwai M, Masaki A, Hasegawa S, Obara M, Horimoto E, Nakamura K, Tanaka Y, Endo K, Tanaka K, Ueda J, Shiraki K, Kurata T, Takizawa T: Genetic changes of coxsackievirus A16 and enterovirus 71 isolated from hand, foot, and mouth disease patients in Toyama, Japan between 1981 and 2007. *Jpn J Infect Dis* 62: 254 - 259, 2009
- 3) Yamashita T, Ito M, Tsuzuki H, Sakae K, Minagawa H: Molecular Identification of Enteroviruses Including Two New Types (EV-98 and EV-107) Isolated from Japanese Travelers from Asian countries. *J Gen Virol* 91: 1963-1966, 2010
- 4) Kubo T, Agoh M, Mai LQ, Fukushima K, Nishimura H, Yamaguchi A, Hirano M, Yoshikawa A, Hasebe F, Kohno S, Morita K: Development of reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for pandemic (H1N1) 2009 virus as a novel molecular based testing for pandemic influenza even in resource limited. *J Clin Microbiol* 48: 728-735, 2010
- 5) Arita M, Wakita T, Shimizu H: Cellular kinase inhibitors that suppress enterovirus replication have a conserved target in the viral protein 3A similar to that of enviroxime. *J Gen Virol* 90: 1869-1879, 2009
- 6) Arita M, Ling H, Yan D, Nishimura Y, Yoshida

- H, Wakita T, and Shimizu H. Development of a reverse transcription -loop- mediated isothermal amplification (RT-LAMP) system for a highly sensitive detection of enterovirus in the stool samples of acute flaccid paralysis case. *BMC Infect Dis* 9: 208, 2009
- 7) Nishimura Y, Shimojima M, Tano Y, Miyamura T, Wakita T, Shimizu H: Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71. *Nat Med* 15: 794-797, 2009
 - 8) Tao Z, Wang H, Xu A, Zhang Y, Song L, Zhu S, Li Y, Yan D, Liu G, Yoshida H, Liu Y, Feng L, Chosa T, Xu W: Isolation of a recombinant type 3/type 2 poliovirus with a chimeric capsid VP1 from sewage in Shandong, China. *Virus Res* (in press) 2010
 - 9) Perera D, Shimizu H, Yoshida H, Tu PV, Ishiko H, McMinn PC, Cardosa MJ: A comparison of the VP1, VP2, and VP4 regions for molecular typing of human enteroviruses. *J Med Virol* 82: 649-657, 2010
 - 10) Zhang Y, Wang HY, Zhu SL, Li Y, Song LZ, Liu Y, Liu GF, Nishimura Y, Chen L, Yan DM, Wang DY, An HQ, Shimizu H, Xu AQ, Xu WB: Characterization of a Rare Natural Intertypic Type 2/ Type 3 Penta- Recombinant Vaccine-Derived Poliovirus Isolated from a Child with Acute Flaccid Paralysis. *J Gen Virol* 91: 421-429, 2009
 - 11) Thorley B, Kelly H, Nishimura Y, Yoon YK, Brussen KA, Roberts J, Shimizu H: Oral poliovirus vaccine type 3 from a patient with transverse myelitis is neurovirulent in a transgenic mouse model. *J Clin Virol* 44: 268-271, 2009
 - 12) Mizuta K, Aoki Y, Suto A, Ootani K, Katsushima N, Itagaki T, Ohmi A, Okamoto M, Nishimura H, Matsuzaki Y, Hongo S, Sugawara K, Shimizu H, Ahiko T: Cross-antigenicity among EV71 strains from different genogroups isolated in Yamagata, Japan, between 1990 and 2007. *Vaccine* 27: 3153-3158, 2009
 - 13) Goto K, Sanefuji M, Kusuhara K, Nishimura Y, Shimizu H, Kira R, Torisu H, Hara T: Rhombencephalitis and coxsackievirus A16. *Emerg Infect Dis* 15: 1689-1691, 2009
 - 14) Ishikawa K, Sasaki J, Taniguchi K: Overall linkage map of the nonstructural proteins of Aichi virus. *Virus Res* 147: 77-84, 2010
 - 15) Yamayoshi S, Yamashita Y, Li J, Hanagata N, Minowa T, Takemura T, Koike S: Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71. *Nat Med* 15: 789-801, 2009
 - 16) Dong JB, Saito A, Mine Y, Sakuraba Y, Nibe K, Goto Y, Komase K, Nakayama T, Miyata H, Iwata H, Haga T. Adaptation of wild-type measles virus to cotton rat lung cells: E89K mutation in matrix protein contributes to its fitness. *Virus Genes*. 2009 Oct 14. [Epub ahead of print]
 - 17) Ninomiya K, Kanayama T, Fujieda N, Nakayama T, Komase K, Nagata K, Takeuchi K. Amino acid substitution at position 464 in the haemagglutinin- neuraminidase protein of a mumps virus Urabe strain enhanced the virus growth in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Vaccine* 27: 6160-5, 2009
 - 18) Kato S, Ohgimoto S, Sharma LB, Kurazono S, Ayata M, Komase K, Takeda M, Takeuchi K, Ihara T, Ogura H. Reduced ability of hemagglutinin of the CAM-70 measles virus vaccine strain to use receptors CD46 and SLAM. *Vaccine* 27: 3838-48. 2009
 - 19) 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* 27:234-42. 2009
 - 20) 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** 32:395-406, 2009
- 21) Nagano H, Jinushi M, Tanabe H, Yamaguchi R, Okano M: Epidemiological and molecular studies of measles at different clusters in Hokkaido district, Japan, 2007. **Jpn J Infect Dis** 62: 209-11, 2009
- 22) Aoki Y, Mizuta K, Suto A, Ikeda T, Abiko C, Yamaguchi I, Miura K, Ahiko T. Importation of the evolving measles virus genotype d9 to Yamagata, Japan from Thailand in 2009. **Jpn J Infect Dis** 62: 481-482, 2009
- 23) Nagai M, Ihara T, et al: Modified adult measles outbreaks in Japan. **J Med Virol** 81: 1094-1101, 2009
- 24) Nagai M, Xin JY, Yoshida N, Miyata A, Fujino M, Ihara T, Yoshikawa T, Asano Y, Nakayama T. Modified adult measles in outbreaks in Japan, 2007-2008. **J Med Virol** 81: 1094-1101, 2009
- 25) 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** 58: 638-643, 2009
- 26) Sakano C, Morita Y, Shiono M, Yokota Y, Mokudai T, Sato-Motoi Y, Noda A, Nobusawa T, Sakaniwa H, Nagai A, Kabeya H, Maruyama S, Sato H, Kimura H: Prevalence of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars (*Sus scrofa leucomystax*) and pigs in Gunma Prefecture, Japan. **J Vet Med Sci** 71: 21-25, 2009
- 27) Nakagawa-Okamoto R, Arita-Nishida T, Toda S, Kato H, Iwata H, Akiyama M, Nishio O, Kimura H, Noda M, Oka T, Takeda N: Detection of Multiple Sapovirus Genotypes and Genogroups in Oyster-Associated Outbreaks. **Jpn J Infect Dis** 62: 63-66, 2009
- 28) Mizuta K, Matsuzaki Y, Hongo S, Ohmi A, Okamoto M, Nishimura H, Itagaki T, Noriko, Katsushima H, Oshitani K, 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** 140: 32-40, 2009
- 29) Nakamura M, Itokazu K, Taira K, Kawaki T, Kudaka J, Nidaira M, Okano S, Koja Y, Tamanaha K, Kimura H, Noda M. Genotypic and phylogenetic analysis of the G gene of respiratory syncytial virus isolates in Okinawa, Japan, 2008. **Jpn J Infect Dis** 82; 326-327, 2009
- 30) 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** 58: 311-3, 2009
- 31) Mizuta K, Hirata A, Suto A, Aoki Y, Ahiko T, Itagaki T, Tsukagoshi H, Morita Y, Obuchi M, Akiyama M, Okabe N, Noda M, Tashiro M, and Kimura H: Phylogenetic and cluster analysis of human rhinovirus species A (HRV-A) isolated from children with acute respiratory infections in Yamagata, Japan. **Virus Res** 147: 265-274, 2010
- 32) Honma Y, Yoshii Y, Watanabe Y, Aoki N, Komiya T, Iwaki M, Arai H, Arakawa Y, Takahashi M, Kimura H: A case of afebrile pneumonia caused by non-toxicigenic *Corynebacterium diphtheriae*. **Jpn J Infect Dis** 62, 327-329, 2009
- 33) Toda S, Kimura H, Noda M, Mizuta K, Matsumoto T, Suzuki E, Shirabe K: Phylogenetic analysis of human

- metapneumovirus from children with acute respiratory infection in Yamaguchi, Japan during summer 2009. *Jpn J Infect Dis* (in press)
- 34) 岩井雅恵, 中村一哉, 小原真弓, 堀元栄詞, 長谷川澄代, 倉田 毅, 滝澤剛則, 吉田 弘: 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—富山県. *病原微生物検出情報* 30: 180-181, 2009
- 35) 岩井雅恵, 堀元栄詞, 小原真弓, 中村一哉, 長谷川澄代, 倉田毅, 原田慎太郎, 高田厚史, 南部厚子, 清原美千代, 嶋尻悟志, 滝澤剛則: ポリオ流行予測調査 (平成 20 年度). *富山県衛生研究所年報* 32: 68-73, 2009
- 36) 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: 富山県における下水流入水中の腸管系ウイルス検出状況 (平成 20 年度). *富山県衛生研究所年報* 32: 135-137, 2009
- 37) 中野貴司 (分担執筆): 第 3 章, *日本旅行医学会編集, 旅行医学質問箱*, P48-57, P60-63, 2009 年 4 月, メジカルビュー社, 東京.
- 38) 中野貴司: ポリオ. *母子保健情報* 59: 70-73, 2009
- 39) 中野貴司: 不活化ポリオワクチン. *日本医師会雑誌* 138: 709-711, 2009 年 7 月.
- 40) 中野貴司: 不活化ポリオワクチン. *チャイルドヘルス* 13: 46-49, 2010 年 1 月.
- 41) 中野貴司: 不活化ポリオワクチン. *小児科診療* 72: 2297-2301, 2009 年 12 月.
- 42) 多屋馨子: 麻疹排除と麻疹風疹混合 (MR) ワクチン追加接種の取り組み. *公衆衛生* 73: 726-731, 2009
- 43) 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
- 44) 西村順裕, Umami RN, 吉田 弘, 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
- 45) 多屋馨子, 佐藤 弘, 岡部信彦, 清水博之: ポリオ中和抗体保有状況ならびにポリオワクチン接種状況. *病原微生物検出情報* 30:178-180, 2009
- 46) 清水博之: ワクチン由来ポリオウイルスによるポリオ流行. *病原微生物検出情報* 30:174-176, 2009
- 47) 清水博之, 小林一司: 野生株ポリオウイルスの実験室封じ込め. *病原微生物検出情報* 30: 181-182, 2009
- 48) 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
- 49) 清水博之: ポリオ (急性灰白髄炎). *診断と治療* 97: 83-85, 2009
- 50) 清水博之: WHO Enterovirus Collaborating Center の役割と機能. *ウイルス* 59: 43-52, 2009
- 51) 西村順裕, 清水博之: エンテロウイルス 71 受容体としての P-selectin glycoprotein ligand-1 の同定. *ウイルス* 59: 145-204, 2009
- 52) 小池智 ポリオウイルスのトロピズム *実験医学* 27: 1585-1589, 2009
- 53) 小池智 ポリオウイルス病原性と自然免疫 *医学のあゆみ* 229: 1065-1069, 2009
- 54) 小池智 ポリオウイルス感染と自然免疫 *メディカル・サイエンス・ダイジェスト* 35: 222-225, 2009
- 55) 山吉誠也, 小池智: SCARB2 はエンテロウイルス 71 の受容体である *細胞工学* 28: 1044-1045, 2009
- 56) 小池智: エンテロウイルス 71 受容体 SCARB2 の同定 *ウイルス* 59: 189-194, 2009
- 57) 地主勝, 長野秀樹, 岡野素彦: 麻疹の現況と問題点—北海道における麻疹発生状況とその分析から—, *小児科* 50: 495-500, 2009
- 58) 長野秀樹, 地主勝, 工藤伸一, 岡野素彦: 北海道における麻疹 (2008 年) —発生状況と感染症流行予測調査—, *道衛研所報* 59: 75-7, 2009
- 59) 山口通代, 広瀬かおる, 續木雅子, 櫻井博貴, 竹内一仁, 木村隆, 増井恒夫, 皆川洋子: 麻しん患者における麻しんの予防接種歴と症状との関係—愛知県感染症対策協議会事業「麻しんに関するアンケート調査」から—, *愛知県衛生研究所報* 59: 1-9, 2009
- 60) 續木雅子, 広瀬かおる, 増井恒夫, 皆川洋子: 愛知県麻しん全数把握事業における 2007 年患者報告状況と感染症発生動向調査との比較, *日本公衆*