

衛生学会雑誌 56:674-681, 2009

- 61) 平良勝也、岡野祥、仁平 稔、糸数清正、久高潤、中村正治、中村優理、和氣亨、中村孝一、小林孝暢、山川宗貞、譜久山民子、石川裕一、糸数公：遺伝子型 D8 麻疹ウイルスの検出 病原微生物検出情報 30:299-300, 2009
  - 62) 庵原俊昭：麻疹風疹(MR)混合ワクチン-麻疹ウイルス排除を目指して-。小児科診療 62:2563-2570, 2009
2. 学会発表 (シンポジウム・講演等を含む)
- 1) 岩井雅恵、小原真弓、堀元栄詞、長谷川澄代、倉田毅、滝澤剛則、遠藤京子、中村純香、高田厚史、南部厚子、清原美千代、宮田英喜、嶋尻悟志：富山県における無菌性髄膜炎、脳炎・脳症の原因ウイルスの検索-最近5年間のまとめ。第44回富山県公衆衛生学会、富山市、2010年2月
  - 2) 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：第112回日本小児科学会学術集会、エンテロウイルス感染症における中枢神経合併症について。奈良、2009年4月
  - 3) 笈紘子、酒井哲郎、植田穰、山岡明子、中野裕史、町田早苗、清水博之、大竹明、雨宮伸：髄液よりヒトパレコウイルスが検出された新生児の1例。小児科学会埼玉地方会、2009年5月
  - 4) 清水博之。東アジアにおけるエンテロウイルス71感染症の流行衛生微生物協議会 第30回研究会。堺市、2009年7月
  - 5) 吾郷昌信、平野 学、山口顕徳、吉川 亮、Qifqiyar Nur Umami、西村順裕、清水博之：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同定法。第57回日本ウイルス学会、東京、2009年10月
  - 6) 吉川 亮、井上真吾、吾郷昌信、森田公一：長崎県におけるイノシシの日本脳炎ウイルス感染状況。第57回日本ウイルス学会、東京、2009年10月
  - 7) 町田早苗、岩井雅恵、西村順裕、滝澤剛則、清水博之：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。第57回日本ウイルス学会、東京、2009年10月
  - 8) 西村順裕、宮村達男、脇田隆字、清水博之：エンテロウイルス71とPSGL-1受容体との結合にはPSGL-1アミノ末端領域のチロシン硫酸化が重要である。第57回日本ウイルス学会、東京、2009年10月
  - 9) 宮村紘平、西村順裕、安保雅博、脇田隆字、清水博之：ヒトPSGL-1発現マウスL929細胞におけるエンテロウイルス71増殖とウイルス遺伝子変異の解析。第57回日本ウイルス学会、東京、2009年10月
  - 10) 有田峰太郎、脇田隆字、清水博之。RT-LAMP法による便検体からのエンテロウイルスの直接検出。第57回日本ウイルス学会、東京、2009年10月
  - 11) 有田峰太郎、脇田隆字、清水博之。細胞のキナーゼ阻害剤の持つエンテロウイルス複製阻害機構に関する解析。第57回日本ウイルス学会、東京、2009年10月
  - 12) 佐々木潤、石川球美子、前野芳正、河本聡志、守口匡子、谷口孝喜：アイチウイルス3CDによる2AのN末端の切断。第57回日本ウイルス学会学術集会。東京、2009年10月
  - 13) 小池智：ポリオウイルス感染モデルマウスの研究。第57回日本ウイルス学会学術集会シンポジウム。東京、2009年10月
  - 14) 清水博之：世界ポリオ根絶計画とポリオウイルス研究。第57回日本ウイルス学会学術集会シンポジウム。東京、2009年10月
  - 15) 大岡静衣、永田典代、小池智、野本明男：カニクイザルを用いたポリオウイルス経口感染実験 第57回日本ウイルス学会学術集会。東京、2009年10月
  - 16) 鳥羽 (安部) 優子、永田典代、佐多徹太郎、竹内理、審良静男、小池智：ポリオウイルス感染によるIFN応答にはTRIFを介するTLR経路が重要である 第57回日本ウイルス学会学術集会。東京、2009年10月
  - 17) 多屋馨子：わが国の麻疹排除計画とその実践~2012年の排除を目指して~。第57回日本ウイルス学会学術集会シンポジウム。東京、2009年10月
  - 18) 多屋馨子：地衛研フォーラム 麻疹排除 (2012年)計画に向けた保健所、地衛研、感染研の果たす役割。第68回日本公衆衛生学会総会。奈良、2009年10月
  - 19) 清水博之、斉藤真紀、小松俊彦、杉山和良、小林一司、大坪寛子：野生株ポリオウイルス実験室封じ込めの現状と今後の課題。第9回日本バイオセーフティ学会 総会・学術集会。仙台、2009年12月
  - 20) 駒瀬勝啓、大槻紀之、フックス虹彩萎縮性虹彩毛様体炎患者から検出された風疹ウイルスゲノムの解析。

- 第50回日本臨床ウイルス学会 高知、平成21年6月
- 21) 大倉喬、菊池雄士、駒瀬勝啓、百瀬文隆、森川裕子、H5N1 亜型トリインフルエンザウイルス HA に対する中和抗体エピトープ解析とその一本鎖抗体の作製、第57回日本ウイルス学会学術集会 東京 2009年10月
- 22) 坂田真史、駒瀬勝啓、中山哲夫、風疹ウイルス、野生株が温度感受性を獲得する必要条件、第57回日本ウイルス学会学術集会 東京 2009年10月
- 23) 岡本貴世子、大槻紀之、駒瀬勝啓、風疹ウイルス遺伝子検出 Real time PCR 法の作製、第57回日本ウイルス学会学術集会 東京 2009年10月
- 24) 關文緒、染谷健二、山田健太郎、竹田誠、駒瀬勝啓、亜急性硬化性全脳炎患者に由来する組換え麻疹ウイルス SI 株の H 蛋白質機能および感染性の変化、第57回日本ウイルス学会学術集会 東京 2009年10月
- 25) 木所稔、駒瀬勝啓、Renchin Tuul、モンゴル国内で分離された新規 genotype ムンプスウイルスの性状について、第57回日本ウイルス学会学術集会 東京 2009年10月
- 26) Jian-bao Dong, 齊藤暁、駒瀬勝啓、中山哲夫、宮田博規、芳賀猛、Adaptation of Wild-type Measles Virus to cotton rat lung cells: E89K mutation of Matrix protein contribute to the fitness、第57回日本ウイルス学会学術集会 東京 2009年10月
- 27) 長野秀樹、地主勝、工藤伸一、岡野素彦、藤田正人、滝沢慶彦：麻疹発生状況と流行予測調査(2008)、第61回北海道公衆衛生学会、札幌市、2009年11月
- 28) 皆川洋子：平成21年度東海地区麻疹・風疹レファレンスセンター報告、平成21年度地方衛生研究所全国協議会東海・北陸支部微生物部会、岐阜県岐阜市、2010年3月5日
- 29) 倉本早苗、児玉洋江、杉盛耕益、尾西 一：石川県における麻疹ウイルスの抗体調査(2007~2009年)、第37回北陸公衆衛生学会、石川県、2009年11月
- 30) 中山哲夫、澤田成史：麻疹ウイルスワクチン株と野生株の鑑別 第13回日本ワクチン学会、札幌、2009年9月
- 31) 駒瀬勝啓 麻疹排除にむけた WHO の取り組みと日本の麻疹サーベイランス体制について、シンポジウム麻疹 衛生微生物技術協議会第30回研究会 境市 平成21年7月9日~10日
- 32) 駒瀬勝啓、麻疹排除の現状と麻疹サーベイランス体制について、地衛研フォーラム、麻疹排除(2012年) 計画に向けた保健所、地衛研、感染研の果たす役割、第68回日本公衆衛生学会総会 奈良 平成21年10月
- 33) 平田明日美、水田克巳、五十嵐郁美、秋山美穂、木村博一、岡部信彦、野田雅博、田代真人：東北地域で分離されたライノウイルスの分子疫学、第50回日本臨床ウイルス学会、高知、2009年6月
- 34) 五十嵐郁美、水田克巳、大内好美、田中千香子、齋藤義弘、秋山美穂、木村博一、岡部信彦、野田雅博、田代真人：最近検出されたヒトボカウイルス(HBoV)の分子疫学、第50回日本臨床ウイルス学会、高知、2009年6月
- 35) 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、福岡市、平成21年11月
- 36) Yamayoshi S, Koike S: Species specificity of enterovirus 71 is determined by quality and quantity of viral receptor. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, 9.9-11, 2009
- 37) Shimizu H: Current Knowledge on the Molecular Pathogenesis of Enterovirus 71. Beijing International Symposium on Hand, foot and Mouth Disease, Beijing, January 2009
- 38) 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. Gordon Research Conferences, Lucca, Italy, June 2009
- 39) Shimizu H: Identification of Specific Cellular Receptors for Enterovirus 71: APEC Conference for Surveillance, Treatment, Laboratory Diagnosis and Vaccine Development of Enteroviruses. Taipei, August 2009
- 40) Shimizu H: Identification of Distinct Cellular Receptors for Enterovirus 71. The Sixth Japan-Taiwan Infectious Disease Symposium, Tokyo, September 2009
- 41) Nishimura Y: Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71. The Sixth Japan-Taiwan Infectious Disease Symposium, Tokyo, September 2009

42) Shimizu H: Genetic and Phenotypic Diversities of Enterovirus 71 in the Asia-Pacific Region. The Third Japan -China -Korea Forum on Communicable Disease Control and Prevention, Tokyo, November 2009

43) Shimizu H: Laboratory Diagnosis of EV71 Infection. Informal Consultation Meeting for Hand Foot Mouth Disease, Kuala Lumpur, March 2010

44) Fujitsuka A, Sugai K, Kobayashi Y, Kimura H, Noda M, Kaburagi Y: Risk factors for bronchial asthma in infants after respiratory syncytial virus infection. European Respiratory Society Annual Congress, Vienna, 12-16 Sept. 2009

3. 報道取材等、その他

清水博之: サイエンス「感染症、どこまでなくせる?」  
日本経済新聞、2010年1月10日

リーフレット「麻しんを疑ったら、検査診断にご協力を!麻しんは全例、検査診断を!~2012年の麻しん排除をめざして~」

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

「エンテロウイルス感染症の診断薬および予防・治療用薬剤」出願番号:特願 2008-330983  
(平成20年12月25日)

「ヒトエンテロウイルス71受容体を用いたウイルス感染実験系」出願番号:特願 2009-120748  
(平成21年5月19日)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金  
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  
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：	多屋 馨子	国立感染症研究所 感染症情報センター
	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
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ウイルスの伝播・病原性発現機構の解析のため、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ついて、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。また、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の対処について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。

## 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、未だ病原体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、エンテロウイルス71 (EV71) を始めと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の検討を行う。重症感染症および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、ポリオ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。また、ポリオウイルス以外の腸管ウイルス感染症 (EV71、パレコウイルス、アイチウイルス、等) の病原体サーベイランスおよび感染・伝播・病原性発現機構について、以下の研究を行った。

- 1) 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関連麻疹(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。リバース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[<sup>35</sup>S]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12月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。

#### 【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) 80試料を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。これらのウイルスについてはエンテロウイルスも混ざっているため検査続行中である。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4月から12月までに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、塩基配列解析により OPV-like ポリオウイルスと同定された。リアルタイム PCR 法により、ポリオウイルス各血清型のワクチン株を用いて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11件、EV-79は3件、EV-97は4件、EV-98は0件、EV-107は1件の報告があった。中和抗体は、EV-73は30歳以上の年齢階層で30%の保有率があり、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、CODEHOP VP1 RT-snPCR法で検出された1検体からCV-A5が分離され、手足口病患者由来55検体のうち6検体からCVA16が分離された。HRV48血清型について、CODEHOP VP1 RT-snPCR法の検出同定を検討したところ、供試した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) 1:1000のライブラリーにおいては、1ラウンド目ではGFP発現を伴う細胞融合はごくわずかであったが、ラウンドを繰り返すうちに、多数のGFP発現を伴う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。ユビキチン感染麻疹ウイルスの中に少量含まれているEGFR感染麻疹ウイルスが、EGFR発現腫瘍細胞でのパイオパ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(5月~11月)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。また、チロシンキナーゼ阻害剤Flt3 Inhibitor IIは、単独で抗エンテロウイルス活性を示した。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。急性弛緩性麻痺症例の便検体を用いて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のに対し、3Cでは2AのN末端の切断効率が著しく低下していた。ツーハイブリッド解析および免疫沈降による解析の結果、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, MyD88 ノックアウトマウスのうち、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、野生型が死亡することのない  $10^3$  PFU 程度のウイルスによっても死亡した。TLR3 ノックアウトマウスにおいてもほぼ同等に感受性が增大していることが認められ、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細胞で高レベルに発現していたヒト遺伝子の一つ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Ltr051細胞に発現している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。SCARB2 抗体により免疫染色によりヒト神経細胞に発現が確認された。

- 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、厚生労働省結核感染症課および WHO 西太平洋地域と協力して、野生株ポリオウイルス実験室封じ込め調査第一段階 WHO 報告後のフォローアップを実施した。

#### D. 考察

- 1) 中国広東省 CDC 等との共同研究により、①AFP 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、②VP1 領域の遺伝子解析により分離株は Sabin-like 株であったことから、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、③未同定ではあるもの多量のエンテロウイルス流行の可能性、を示唆している。
- 2) 富山県内の下水流入水から分離されたポリオウイルスは、すべて OPV-like ポリオウイルスであった。検出時期は流域地域のワクチン接種時期から約 2 ヶ月以内に限定されており、野生株や変異ウイルスの侵入や伝播の可能性は低いと考えられた。高感度リアルタイム PCR 法は、環境水や臨床検体からの迅速ポリオ診断に役立つことが期待される。
- 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ものと推測された。
- 4) CODEHOP VP1 RT-snpPCR 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、感受性の高い細胞を選択することによる効率の良いウイルス分離に役立つ。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。わが国におけるポリオ予防のための定期接種ワクチンは、OPV から IPV へ早期に転換することが望ましい。
- 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。現在、ヒト末梢血リンパ球から合成した cDNA より scFv 遺伝子ライブラリーを調整し、これらを提示する麻疹ウイルス抗体ライブラリーを構築中である。
- 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 は HPeV1、HPeV3、HPeV6 であった。血清疫学的解析同様、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。RD 細胞等の PSGL-1 をほとんど発現していない非白血球系細胞において EV71 は PSGL-1 非依存的に増殖すること、つまり、PSGL-1 以外の EV71 受容体が存在することを示した。
- 11) アイチウイルスのポリプロテインの切断部位のうち、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、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と考えられる。
- 13) Ltr246 細胞に発現する EV71 受容体や PSGL-1 と異なり、すべての EV71 株に対して受容体として機能することから SCARB2 が主要な 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) 2008 年 12 月に提出した、野生株ポリオウイルス実験室封じ込め調査第一段階 WHO 報告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。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。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。

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。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、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とされる。また、平成19～21年度の研究成果で明らかにされたように、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も重要な意味を持つ。特に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貢献が期待できる。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、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（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, Cardoso 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) 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年7月号
  - 17) 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
  - 18) 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
  - 19) 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.
  - 20) 中野貴司: ポリオ. *母子保健情報* 59号:70-73, 2009年5月.
  - 21) 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.
  - 22) 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.
  - 23) 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.
  - 24) 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
  - 25) 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

- 26) 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
- 27) 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
- 28) 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
- 29) 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
- 30) 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
- 31) 清水博之: ポリオ(急性灰白髄炎). 診断と治療 97: 83-85, 2009
- 32) 清水博之: WHO Enterovirus Collaborating Center の役割と機能. ウイルス 59: 43-52, 2009
- 33) 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
- 34) 小池智 ポリオウイルスのトロピズム 実験医学 27: 1585-1589, 2009
- 35) 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
- 36) 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
- 37) 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
- 38) 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

## 2. 学会発表

- 1) Yamayoshi S, Koike S: Species specificity of enterovirus 71 is determined by quality and quantity of viral receptor. The 9th Awaji International Forum on Infection and

Immunity, Awaji, 2009.9.9-11

- 2) 岩井雅恵, 小原真弓, 堀元栄詞, 長谷川澄代, 倉田毅, 滝澤剛則, 遠藤京子, 中村純香, 高田厚史, 南部厚子, 清原美千代, 宮田英喜, 嶋尻悟志: 富山県における無菌性髄膜炎, 脳炎・脳症の原因ウイルスの検索 -最近 5 年間のまとめ. 第 44 回富山県公衆衛生学会. 富山市, 2010 年 2 月
- 3) 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: 第 112 回日本小児科学会学術集会. エンテロウイルス感染症における中枢神経合併症について. 奈良. 2009 年 4 月
- 4) 笥紘子, 酒井哲郎, 植田穰, 山岡明子, 中野裕史, 町田早苗, 清水博之, 大竹明, 雨宮伸: 髄液よりヒトパレコウイルスが検出された新生児の 1 例. 小児科学会埼玉地方会, 2009 年 5 月
- 5) 清水博之. 東アジアにおけるエンテロウイルス 71 感染症の流行衛生微生物協議会 第 30 回研究会. 堺市, 2009 年 7 月
- 6) 吾郷昌信, 平野 学, 山口顕徳, 吉川 亮, Qifqiyar Nur Umami, 西村順裕, 清水博之: 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同定法. 第 57 回日本ウイルス学会, 東京, 2009 年 10 月
- 7) 吉川 亮, 井上真吾, 吾郷昌信, 森田公一: 長崎県におけるイノシシの日本脳炎ウイルス感染状況. 第 57 回日本ウイルス学会, 東京, 2009 年 10 月
- 8) 町田早苗, 岩井雅恵, 西村順裕, 滝澤剛則, 清水博之: 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. 第 57 回日本ウイルス学会, 東京, 2009 年 10 月
- 9) 西村順裕, 宮村達男, 脇田隆宇, 清水博之: エンテロウイルス 71 と PSGL-1 受容体との結合には PSGL-1 アミノ末端領域のチロシン硫酸化が重要である. 第 57 回日本ウイルス学会, 東京, 2009 年 10 月
- 10) 宮村紘平, 西村順裕, 安保雅博, 脇田隆宇, 清水博之: ヒト PSGL-1 発現マウス L929 細胞におけるエンテロウイルス 71 増殖とウイルス遺

- 伝子変異の解析. 第57回日本ウイルス学会、東京、2009年10月
- 11) 有田峰太郎, 脇田隆宇, 清水博之. RT-LAMP法による便検体からのエンテロウイルスの直接検出. 第57回日本ウイルス学会、東京、2009年10月
  - 12) 有田峰太郎, 脇田隆宇, 清水博之. 細胞のキナーゼ阻害剤の持つエンテロウイルス複製阻害機構に関する解析. 第57回日本ウイルス学会、東京、2009年10月
  - 13) 佐々木潤, 石川球美子, 前野芳正, 河本聡志, 守口匡子, 谷口孝喜: アイチウイルス3CDによる2AのN末端の切断. 第57回日本ウイルス学会学術集会. 東京、2009年10月
  - 14) 小池智: ポリオウイルス感染モデルマウスの研究. 第57回日本ウイルス学会学術集会シンポジウム. 東京、2009年10月
  - 15) 清水博之: 世界ポリオ根絶計画とポリオウイルス研究. 第57回日本ウイルス学会学術集会シンポジウム. 東京、2009年10月
  - 16) 大岡静衣, 永田典代, 小池智, 野本明男: カニクイザルを用いたポリオウイルス経口感染実験. 第57回日本ウイルス学会学術集会. 東京、2009年10月
  - 17) 鳥羽 (安部) 優子, 永田典代, 佐多徹太郎, 竹内理, 審良静男, 小池智: ポリオウイルス感染によるIFN応答にはTRIFを介するTLR経路が重要である. 第57回日本ウイルス学会学術集会. 東京、2009年10月
  - 18) 多屋馨子: シンポジウム グローバル化する感染症とその対策 ポリオ根絶計画と麻疹排除計画 わが国の麻疹排除計画とその実践～2012年の排除を目指して～. 第57回日本ウイルス学会学術集会. 東京、2009年10月
  - 19) 多屋馨子: 地衛研フォーラム 麻疹排除(2012年)計画に向けた保健所、地衛研、感染研の果たす役割. 第68回日本公衆衛生学会総会. 奈良、2009年10月
  - 20) 清水博之, 斉藤真紀, 小松俊彦, 杉山和良, 小林一司, 大坪寛子: 野生株ポリオウイルス実験室封じ込めの現状と今後の課題. 第9回日本バイオセーフティ学会 総会・学術集会、仙台、2009年12月
  - 21) Shimizu H: Current Knowledge on the Molecular Pathogenesis of Enterovirus 71. Beijing International Symposium on Hand, foot and Mouse Disease, Beijing, January 2009
  - 22) 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. Gordon Research Conferences, Lucca, Italy, June 2009
  - 23) Shimizu H: Identification of Specific Cellular Receptors for Enterovirus 71: APEC Conference for Surveillance, Treatment, Laboratory Diagnosis and Vaccine Development of Enteroviruses. Taipei, August 2009
  - 24) Shimizu H: Identification of Distinct Cellular Receptors for Enterovirus 71. The Sixth Japan-Taiwan Infectious Disease Symposium, Tokyo, September 2009
  - 25) Nishimura Y: Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71. The Sixth Japan-Taiwan Infectious Disease Symposium, Tokyo, September 2009
  - 26) Shimizu H: Genetic and Phenotypic Diversities of Enterovirus 71 in the Asia-Pacific Region. The Third Japan -China -Korea Forum on Communicable Disease Control and Prevention, Tokyo, November 2009
  - 27) Shimizu H: Laboratory Diagnosis of EV71 Infection. Informal Consultation Meeting for Hand Foot Mouth Disease, Kuala Lumpur, March 2010
3. 報道取材等
- 1) 清水博之: サイエンス「感染症、どこまでなくせる?」 日本経済新聞、2010年1月10日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

「エンテロウイルス感染症の診断薬および予  
防・治療用薬剤」出願番号：特願 2008-330983  
(平成 20 年 12 月 25 日 国内出願)

「ヒトエンテロウイルス 71 受容体を用いたウ  
イルス感染実験系」出願番号：特願  
2009-120748 (平成 21 年 5 月 19 日 国内出願)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

#### 研究要旨

広東省広州市をパイロットエリアとして、腸管系ウイルスの包括的なモニタリングを行うべく環境ウイルスサーベイランスの導入を行った。2008年4月から2009年11月までの流入下水調査の結果、①ポリオウイルスは1-3型ともコンスタントに分離されており、VP1領域における塩基置換が1%未満であることから、OPV 定期接種のアセスメントツールとして有用であること、②AFP サーベイランスよりポリオウイルスの分離頻度が高いこと、③各種エンテロウイルスの流行が示唆されること、より疾患サーベイランスシステムを構築することなく包括的に腸管系ウイルス感染症を把握するツールとしての可能性を示唆した。

#### 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が基本。効果判定のためには AFP サーベイランスにより野生株の消失を確認するもの。

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。このため非流行国においても流行国から野生株輸入の脅威が存在する。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、疾患ベースによる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。

他方 OPV を使用している限り、集団免疫の低下した地域ではワクチン由来株（VDPV）による流行のリスクが存在する。

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。

2010-2012 年の世界ポリオ根絶計画では環境ウイルスサーベイランスの導入が盛り込まれ、根絶証明の補足的ツールとして流行国を中心に実施されることとなった。

本研究では環境サーベイランス導入により、野生株輸入・VDPV リスク対策方法、そしてヒト集団中のエンテロウイルス流行を包括的に把握するツールとしての適応可能性を検討する。

前年度に引き続き 21 年度報告として 2008 年 4 月から 2009 年 11 月まで研究経過を報告する。なお本研究は、中国 CDC、広東省 CDC との共同研究である。

#### 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 年間継続した。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）、を出発材料に試料は遠心（3000 rpm、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 4 種細胞（RD, HEp-2、

Vero, L20B)に0.2ml 1つずつ接種。なおRD, HEp-2、Vero で分離されたウイルスはL20Bに再接種しポリオウイルスの有無を確認した。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。

#### ポリオウイルス遺伝子解析

ポリオウイルスゲノム VP1 領域についてUG1, UC11 プライマーセットを用いてRT-PCRにて増幅。得られた産物をダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定した。

#### C. 結果

環境水採取：2008年4月から2009年11月まで、下水処理場流入口1号、3号から月2回、合計20回採水。80試料を得た。

ウイルス分離、同定：80試料をRD, HEp-2、Vero, L20Bに接種したところ、各々80、61、15、29株分離された。これらのウイルスについてはポリオ以外のエンテロウイルスも混ざっているため検査続行中である。

L20Bあるいは他の細胞で分離されL20Bに再接種して分離されたポリオウイルスに関しては2008年3月から2009年11月までに1型14株、2型32株：3型14株、計60株が分離された。また2008年6月を除き毎月ポリオウイルスが分離されている(表1)。これは広東省におけるAFPサーベイランスによるポリオ分離率より高い頻度である(<http://www.wpro.who.int/sites/epi/documents/PolioWeeklyBulletin.htm>)。

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(図1)。

#### D. 考察

本研究では従来のAFPサーベイランスとの

比較検討を行い野生株輸入・VDPV検出法としての妥当性、ヒト集団中のエンテロウイルス流行を包括的に把握するツールとしての適用性を研究目的としたが、実質2年間の共同研究にて、①AFPサーベイランスによるポリオ分離率に比し、高頻度にポリオウイルスが分離できること、②VP1領域の遺伝子解析により分離株はSabin-like株であったことから、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、③未同定ではあるもの多量のエンテロウイルスの流行の可能性、を示唆している。

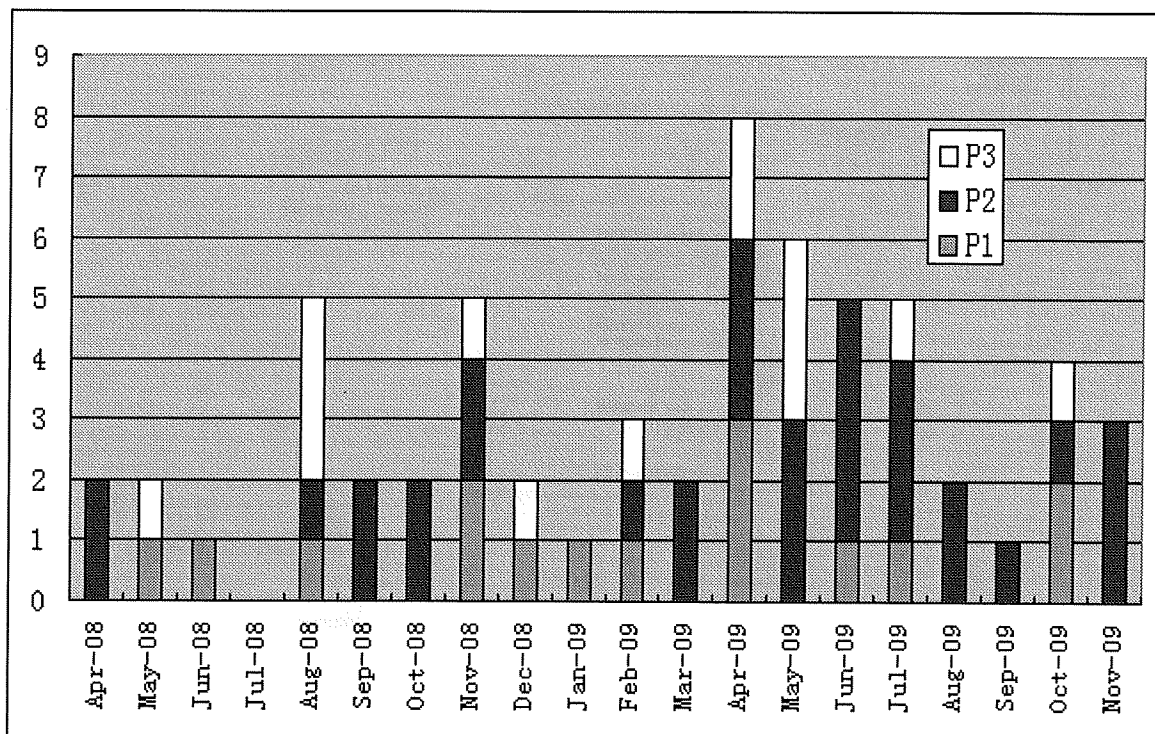
#### E. 結論

下水からのウイルス分離は腸管系ウイルス感染症サーベイランス手法として、疾患サーベイを構築することなく、ヒト集団に循環するウイルスを包括的にモニタリングできる可能性、及びOPV接種状況のアセスメントツールとしての適用可能性を示唆した。

#### G. 論文発表

1) 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 IASR Vol. 30 p. 180-181: 2009年7月号

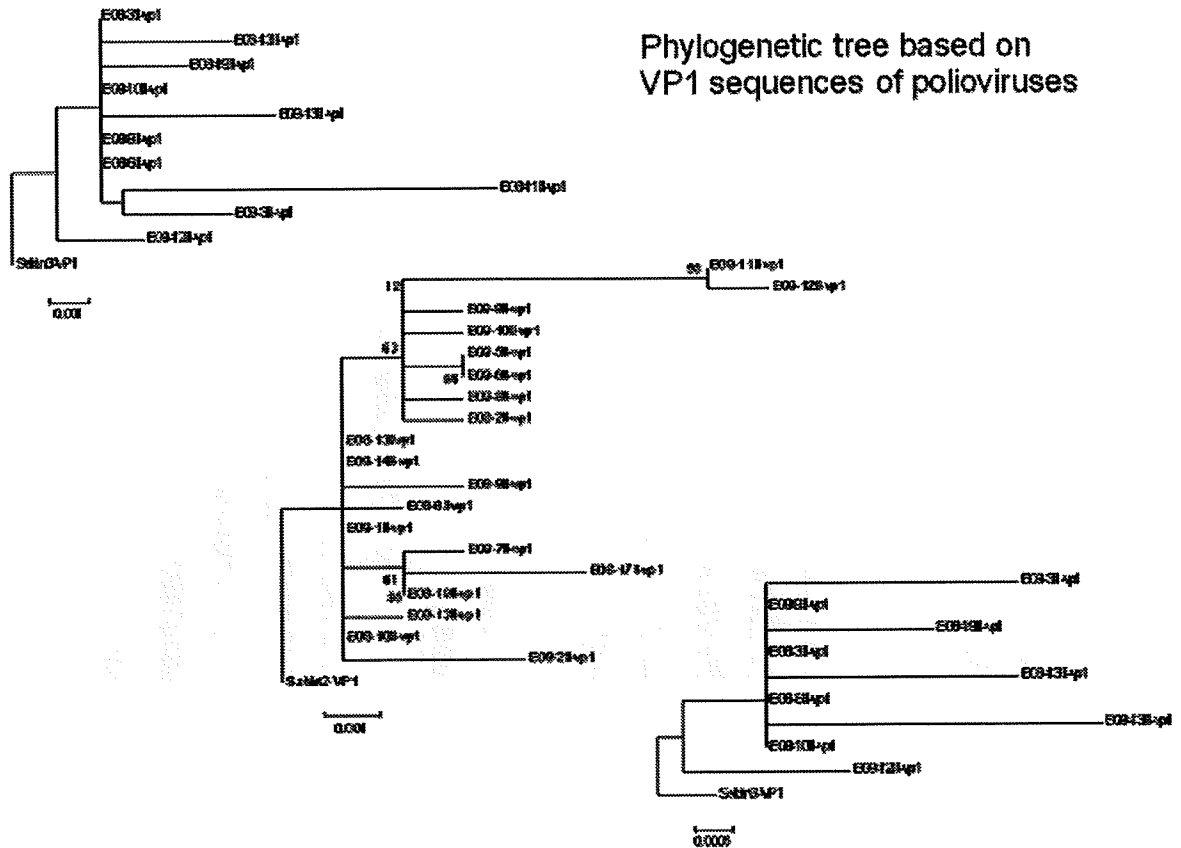
図1 天河地区猎德下水処理場の流入下水（2箇所）におけるポリオウイルス分離  
 (2008.4-2009.11)



横軸は採取月、縦軸は分離数を示す。P1, 2, 3 はそれぞれポリオ1型、2型、3型。



図 2



広東省広州市内の下水由来ポリオウイルス 1-3 型とのワクチン株と VP1 領域にて 1%以下の塩基置換であることを示す。

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」  
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

研究分担者 岩井雅恵 富山県衛生研究所

研究要旨

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、県内の西部地区及び砺波地区における下水流入水からのウイルス検索を行った。2009年4月から12月の間に、富山県内の下水流入水から23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、ワクチン様のポリオウイルスの血清型別可能なリアルタイムPCR法を新規に作製し、下水流入水中のポリオウイルス量を測定した。

A. 研究目的

世界保健機関（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。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。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の分離と性状解析により、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、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。平成21年度は、富山県内の西部地区の下水処理場と砺波地区の下水管渠に定点を設置し、地区別のウイルス検出状況を比較した。

一方、ポリオウイルスのリアルタイムPCR法については、血清型別が可能な方法としてKilpatrick DRら（J Clin Microbiol. 2009. 47:1939-1941.）が報告している。この方法でポリオウイルスを検出するためには $10^3$ コピー/assay以上のポリオウイルス遺伝子が必要であるため、臨床検体または

環境水中の微量のウイルスを直接検出することが難しい。そこで、まず、ワクチン様のポリオウイルス (OPV-like poliovirus) の血清型別が可能な、高感度リアルタイム PCR 法を作製し、富山県内の下水流入水中のポリオウイルス量を測定した。

## B. 研究方法

### 1. 調査期間及び調査地点

平成 21 年 4 月から 12 月にかけて、月 1 回、富山県内西部地区に位置する 1 下水処理場 (分流式)、及び上流の砺波地区における管渠の計 2 箇所において、月 1 回下水流入水を採取した。

### 2. 下水流入水の濃縮

約 2L の下水流入水を、4℃で 3000rpm、30 分間遠心し上清を回収後、「ポリエチレングリコール法」及び「フィルター吸着溶出法」により濃縮した。

### 3. ウイルス分離同定

下水濃縮液を培養細胞 (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。

### 4. 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

レクトシーケン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 アクセッション番号はそれぞれ AY184219、AY184220、AY082683) と比較した。

## 5. 新規リアルタイム PCR 法の作製

### 5-1. ウイルス

表 1 にリアルタイム PCR 法の評価に用いたウイルスとウイルス量を示した。野性株のポリオウイルスは、国立感染症研究所ウイルス第 2 部吉田弘先生より分与を受けた。

ウイルス量は、マイクロタイター法により定量した。ポリオウイルスでは Vero 細胞、エコーウイルスでは RD-18S 細胞、コクサッキーウイルス B1 型では MA104 細胞にウイルスを用い、TCID<sub>50</sub>/25µl を算出した。ウイルスは、前項と同様の方法で RNA 抽出、及び逆転写反応を行った。

エンテロウイルスのリアルタイム PCR 法による定量は、Katayama H.らの方法 (Appl Environ Microbiol. 2002, 68: 1033-9) を用いた。

### 5-2. プライマー、プローブの設計、及び反応条件

ポリオウイルスワクチン株のカプシド領域塩基配列を基に、プライマー及びプローブを設計した (表 2)。

リアルタイム PCR 法は、TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) を用い、cDNA 2.5µL、プライマー各 400nM、プローブ 200nM を加えて反応させた。反応条件は次のとおりである。

50°C 2min  
95°C 10min  
( 95°C 15sec )  
( 56°C 1min ) × 45 cycles  
25°C ∞

### 5-3. 検量線用プラスミド DNA

表 2 のプライマーを用いて、ポリオウイルス 1、2、3 型 (Sabin 株) の PCR を行い、この PCR 産物を p-GEM-T Easy vector (Promega) に組み込んだ。次に、リコンビナントプラスミド DNA を大腸菌に導入した後、プラスミド DNA を精製した。得られたプラスミド DNA を定量し、PCR 産物も含めたプラスミド DNA 全体の分子量を用いて、検量線用プラスミド DNA のコピー数を求めた。

本実験は、「遺伝子組み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」に基づき、富山県衛生研究所遺伝子組み換え実験安全委員会の承認を得て実施した。

## 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

2009 年 4 月から 12 月まで、23 株のポリオウイルスが分離された (表 3)。血清型別では、1 型が 5 株、2 型が 6 株、3 型が 12 株分離された。下水処理場流域のポリオワクチン集団接種時期は、西部地区の春期が 4/20-5/18、秋期が 9/16-10/13、砺波地区の春期が 4/22-5/27、秋期が 9/25-10/26 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。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、0~0.55%、2 型では、0~0.22%、3 型では、0~0.67% であった (表 4)。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 は検出されなかった。

### 2. 地区別の下水流入水からの腸管系ウイルス検出状況

西部地区と砺波地区の下水流入水から検出されたウイルスを比較すると、上流の砺波地区で検出されたウイルスは、下流の西部地区でも検出されており、ウイルスの種類や検出時期が類似していた。しかしながら、砺波地区では、エコーウイルス 11 型やノロウイルス GII/3、GII/4 がよく検出されたため、これらのウイルスが砺波地域で流行していた可能性が考えられた。

### 3. 血清型別可能なポリオウイルスリアルタイム PCR 法の作製

本法の感度について、プラスミド DNA による定量直線を図 1 に示す。本法は、ポリオウイルス 1 型、2 型、3 型のそれぞれの系において  $10^1 \sim 10^6$  copies/assay の間で良好な定量直線性を示した。また、ポリオウイルス各型のワクチン株 (Sabin1、Sabin2、Sabin3) を Vero 細胞により培養して得たストック液 ( $10^4$ TCID<sub>50</sub>/25  $\mu$ L) を 10 倍段階希釈し、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 (表 5)。

本法の特異性に関して、ポリオウイルス 1 型、2 型、3 型ともに、それぞれの型のワクチン株および OPV-like poliovirus が検出された。一方、野生株のポリオウイルスについては、1 型では Mahoney、3 型では