

Saukett が検出されたものの、それ以外の株は検出されなかった (表 1)。また、異なる血清型のポリオウイルスや、エコーウイルス 9、11、13、18 型、コクサッキーウイルス A10、B2 型、エンテロウイルス 71 型、レオウイルス 1、2 型、ノロウイルス GII.4、サポウイルス GI.1 は検出されなかった。

4. 下水流入水中のポリオウイルス遺伝子量

2008 年 1 月から 2009 年 12 月までの富山県西部地区における下水流入水中のポリオウイルス及びエンテロウイルスの遺伝子量を図 2 に示す。

ポリオウイルス遺伝子は、細胞培養法によりポリオウイルスが分離された日とほぼ同一日に検出された。調査期間を通しての各型のポリオウイルス遺伝子量は下水流入水 2.5mL あたり 0~67copies であった。

D. 考察

富山県内で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り、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いた。また、厚生労働省ポリオ流行予測感染源調査において、2007 年から 2009 年まで県内の健康な乳幼児 199 名の便からも、ポリオウイルスは検出されていない。これらのことから、富山県におけるポリオウイルス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。

地区別の腸管系ウイルスの流行を把握するために、県西部地区と砺波地区の下水流入水からの腸管系ウイルス検出状況を比較したが、両地区で検出されたウイルスの種類や時期は類似していた。このことから、

西部地区と砺波地区の住民におけるウイルス流行状況が類似していたことが推測された。分離株数が、砺波地区よりも西部地区の方が多かったのは、西部地区が砺波地区の下流であり、人口が多いためであると推測された。

今回の研究で作製したポリオウイルスのリアルタイム PCR 法は、ワクチン株様のポリオウイルスの検出が可能であったが、野生株のポリオウイルスは検出されなかった。今後は、野生株も検出可能な高感度リアルタイム PCR 法を開発することで、環境水や臨床検体からの直接的なポリオウイルスの検出に活用し、迅速なポリオの診断に役立てたい。

E. 結論

1. 下水流入水のウイルス調査

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。

2. 新規ポリオウイルスリアルタイム PCR 法の作製

ポリオウイルスワクチン株の血清型別が可能なりアルタイム PCR 法を作製した。本法の検出感度は、 10^1 copies/assay 以上と高かった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 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: 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. *Infectious Agents Surveillance Report* 30: 180-181, 2009

2. 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

3. 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

4. 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

5. 岩井雅恵、中村一哉、小原真弓、長谷川澄代、堀元栄詞、倉田毅、滝澤剛則：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

2. 学会発表

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

表 1. リアルタイム PCR 法の検討に用いたウイルスの種類及び定量結果

ウイルス	株名	ポリオウイルス の定義 ^a	ウイルス量 (TCID ₅₀ /25 μL)	リアルタイムPCR結果 (copies/25μL)			
				ポリオ1型	ポリオ2型	ポリオ3型	
Poliovirus 1	Sabin 1	ワクチン株	1.0 × 10 ⁵	+	(9.3 × 10 ⁶)	-	
	G4-12	OPV-like	5.6 × 10 ⁶	+	(2.0 × 10 ⁹)	-	
	Fu-May-7/Toyama/2008	OPV-like	1.0 × 10 ⁵	+	(8.1 × 10 ⁸)	-	
	Fu-Dec-24/Toyama/2008	OPV-like	1.0 × 10 ⁵	+	(4.4 × 10 ⁹)	-	
	Mahoney	Wild	1.0 × 10 ⁶	+	(1.1 × 10 ⁸)	-	
	7. Mb25-82	Wild	? ^b	-	-	-	
	12.NV134-93	Wild	? ^b	-	-	-	
Poliovirus 2	Sabin 2	ワクチン株	1.0 × 10 ⁵	-	+	(2.8 × 10 ⁷)	
	G18-2	OPV-like	3.2 × 10 ⁶	-	+	(5.7 × 10 ⁸)	
	Fu-May-13/Toyama/2009	OPV-like	3.2 × 10 ⁵	-	+	(1.3 × 10 ⁹)	
	Fu-Jun-13/Toyama/2009	OPV-like	3.2 × 10 ⁵	-	+	(1.6 × 10 ⁹)	
	309-FC/Toyama/2004	VDPV	1.0 × 10 ⁶	-	+	(7.1 × 10 ⁷)	
	Lansing	Wild	1.8 × 10 ⁶	-	-	-	
Poliovirus 3	Sabin 3	ワクチン株	1.0 × 10 ⁵	-	-	+	(2.7 × 10 ⁷)
	G5-1	OPV-like	5.6 × 10 ⁶	-	-	+	(3.4 × 10 ⁸)
	Fu-Jun-9/Toyama/2008	OPV-like	3.2 × 10 ⁵	-	-	+	(2.9 × 10 ⁹)
	Fu-Jul-5/Toyama/2008	OPV-like	1.0 × 10 ⁶	-	-	+	(2.4 × 10 ⁹)
	Fu-Jun-5/Toyama/2009	OPV-like	3.2 × 10 ⁴	-	-	+	(1.3 × 10 ⁷)
	Saukett	Wild	3.16 × 10 ⁶	-	-	+	(6.5 × 10 ⁶)
Echovirus 9	Hill		3.2 × 10 ⁶	-	-	-	
Echovirus 11	Gregory		1.0 × 10 ⁶	-	-	-	
Echovirus 13	Del Carmen		5.6 × 10 ⁵	-	-	-	
Echovirus 18	Metcalf		3.2 × 10 ⁴	-	-	-	
Coxsackievirus A10	Kowalik		5.6 × 10 ⁴	-	-	-	
Coxsackievirus B2	Ohio-1		5.6 × 10 ³	-	-	-	
Enterovirus 71	BrCr		1.8 × 10 ⁴	-	-	-	
Reovirus 1	Lang		3.2 × 10 ¹	-	-	-	
Reovirus 2	Amy		5.6 × 10 ¹	-	-	-	
Norovirus GI.4	Hu/409/Toyama/2006		? ^b	-	-	-	
Sapovirus GI.1	Hu/Ni22/Toyama/2009		? ^b	-	-	-	

a, VP1領域の塩基配列のワクチン株との違いによる。0~1%: OPV-like、1~15%: VDPV、15%以上: Wild。
b, ?: ウイルス量は不明であるが、PCRによりウイルス遺伝子が検出されることを確認した。

表 2. ポリオウイルス (ワクチン株) リアルタイム PCR 用のプライマー及びプローブ

	プライマー/プローブ	Sequence (5' to 3') ^a	Positions ^b
ポリオ1型	PolioS1F	CTTCGGTATTTTTGGCTGTTAGAGTAGT	3187-3213
	PolioS1R	GACGCGGGCACCAGACT	3296-3280
	PolioS1_Probe	FAM-ATCACAACCCGACCAAGGTCACCTCC-BHQ	3219-3244
ポリオ2型	PolioS2F	GTGGAGTGTCTGGTAGGGAATG	1499-1519
	PolioS2R	TTTGTCTATGCTATCTATTGAGAGTGAGTT	1619-1591
	PolioS2_Probe	FAM-TAAACCTGCGCACTAACAACCTGTGCTACGC-BHQ	1544-1573
ポリオ3型	PolioS3F	TGGCACCATCCGACACAGT	2636-2654
	PolioS3R	CCGCGTGCGAAGAATGAT	2723-2706
	PolioS3_Probe	FAM-AAACGCGCCACGTAGTCCAACGAC-BHQ	2657-2680

a, FAM: 6-carboxyfluorescein reporter dye; BHQ: Black Hole Quencher.

b, 塩基配列の position は、Sabin1、2、3型を参考にした (GenBank アクセッション番号はそれぞれ AY184219、AY184220、X00596)。

表 3. 下水処理場別の下水流入水からの腸管系ウイルス検出状況

西部地区		2009年																					
ウイルス		4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	2009年												
ポリオ	1型		1						2														
	2型		4	1							1												
	3型	3		6					2														
HEV-B	CoxB3	1	4		2	1																	
	CoxB4																						
	CoxA9		1		1																		
	Echo3							2															
	Echo6				1	9																	
	Echo11						6	2	10	3													
Echo30							5	5	5														
レオ	2型		9	5	14		11	1															
アデノ	1型				2																		
	2型		1	6	2																		
	5型		1																				
ノロ	GI/4																						
	GI/8																						
	GII/3																						
	GII/4																						
サボ	GI/1																						
	GII/1																						

表中の数値はウイルス分離株数を、灰色の四角は PCR によってウイルスが検出された調査月を示す。

表 4. 下水由来ポリオウイルス分離株の VP1 領域塩基配列のワクチン株との差異

Type 1

地区	株名	ワクチン株との差異	
		VP1(906nt)	VP1(302aa)
西部	Fu/May-12/09	0%	
	Fu/Oct-13/09	0.22%	2 (K101N, T106S)
	Fu/Oct-15/09	0.22%	2 (K101N, T106A)
砺波	Tn/Jun-6/09	0.33%	2 (T106A, A190T)
	Tn/Jun-7/09	0.55%	4 (K98T, T106A, A190T, V253)

Type 2

地区	株名	ワクチン株との差異	
		VP1(903nt)	VP1(301aa)
西部	Fu/May-2/09	0.22%	1 (I143T)
	Fu/May-8/09	0.11%	1 (I267V)
	Fu/May-9/09	0%	
	Fu/May-13/09	0.11%	1 (I143V)
	Fu/Jun-13/09	0.22%	2 (K39R, I143N)
	Fu/Nov-12/09	0%	

Type 3

地区	株名	ワクチン株との差異	
		VP1(900nt)	VP1(300aa)
西部	Fu/Apr-1/09	0%	
	Fu/Apr-2/09	0%	
	Fu/Apr-3/09	0%	
	Fu/Jun-1/09	0%	
	Fu/Jun-2/09	0%	
	Fu/Jun-3/09	0.11%	1(A54T)
	Fu/Jun-4/09	0.11%	1(N145D)
	Fu/Jun-5/09	0.11%	
	Fu/Jun-9/09	0.11%	
	Fu/Oct-12/09	0.22%	1(A54T)
	Fu/Oct-16/09	0.11%	
砺波	Tn/Oct-8/09	0.67%	

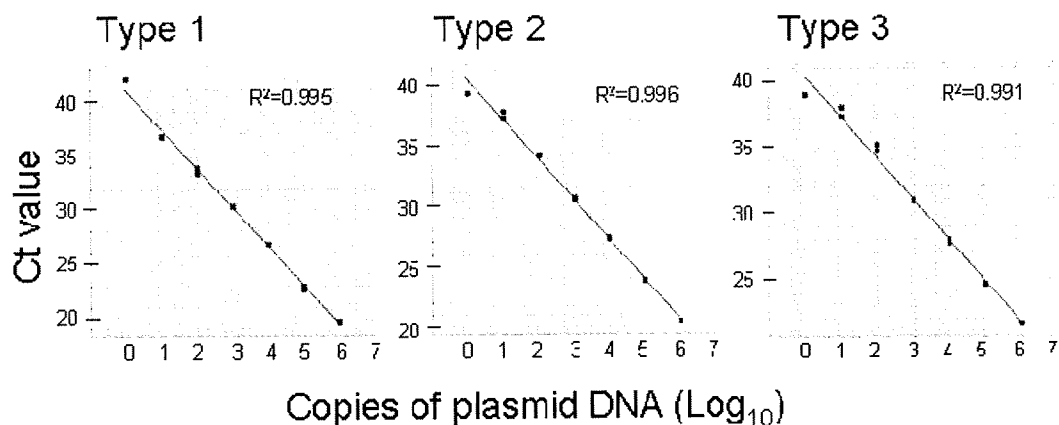


図 1.リアルタイム PCR 法の検量線. (プラスミド DNA を 10 倍段階希釈した)

表 5.リアルタイム PCR 法によるポリオウイルスワクチン株の検出感度

Real time PCR	Strain	Ct value ^a					
		Stock (10 ⁴ TCID ₅₀ /25 μL)	×10 ⁻¹	×10 ⁻²	×10 ⁻³	×10 ⁻⁴	×10 ⁻⁵
Type 1	Sabin 1	23.2	26.5	30.3	34.2	38.4	41.0
	Sabin 2	—	—	—	—	—	—
	Sabin 3	—	—	—	—	—	—
Type 2	Sabin 1	—	—	—	—	—	—
	Sabin 2	21.9	25.1	28.8	32.2	36.0	39.3
	Sabin 3	—	—	—	—	—	—
Type 3	Sabin 1	—	—	—	—	—	—
	Sabin 2	—	—	—	—	—	—
	Sabin 3	19.3	22.2	25.7	29.1	33.1	35.4

a, Ct value: 測定 2 回の平均値

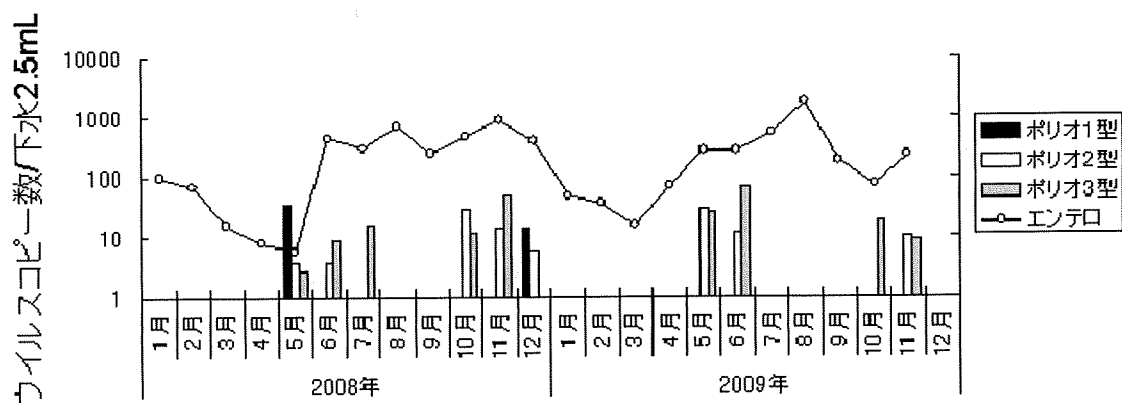


図 2. リアルタイム PCR 法による、富山県西部地区の下水流入水中のポリオウイルス量. ポリオウイルス 1、2、3 型は本研究の方法、エンテロウイルスは、Katayama H らの方法 (Appl Environ Microbiol. 2002. 68: 1033-9) により定量した。

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）

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

研究代表者 清水博之 国立感染症研究所

協力研究者 山下照夫、伊藤 雅、皆川洋子 愛知県衛生研究所

研究要旨

海外旅行者から分離されたエンテロウイルスのうち中和型別不能で、遺伝子解析により新型エンテロウイルスと同定された7株5血清型のVP1領域の塩基配列について、公的データベースを用いて近縁の株を検索し、比較した。我々以外にエンテロウイルス73型（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。我々の分離株は、他の分離株と比較して殆どが10%以上の相違が認められ他に報告のない独立した株と考えられた。これらのウイルスの国内流行状況を把握する目的で年齢階層別に中和抗体保有率を調べたところ、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。他の4型に対する保有状況は1～3%と低く、国内に侵入しても流行には至らなかったと考えられた。海外、特に東南アジアからの旅行帰国者により、国内に存在しないウイルスは常に運び込まれているものと推測されるので、病原体検出サーベイランスシステムの強化が求められる。

A. 研究目的

エンテロウイルス（EV）はピコルナウイルス科に属するウイルスで、各種の動物から分離される。ヒトエンテロウイルスは、中和反応を用いて66種の血清型に分類されていたが、近年これらの遺伝子解析が進み、同一の血清型であればVP1領域の塩基配列の相同性が75%（アミノ酸で88%）以上あり、他の血清型とは70%（同75%）以下の相同性である事が報告された。その結果に基づいて、多くの新型エンテロウイルスが同定されている。我々は、海外旅行者から分離されたウイルスを調べたところ、遺伝子解析により新型エンテロウイルスと同定された7株5血清型（EV-73、EV-79：各2件、EV-97、EV-98、EV-107：各1件）を得た。これらのウイルスの国内における

分離報告はない。そこで、海外での流行状況を知るために、公的データベースに報告された同一血清型のウイルスを調べるとともに、国内の流行の有無を把握するために年齢階層別に中和抗体保有率を調べた。

B. 研究方法

研究対象としたウイルスは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人3,115名中58名から分離されたウイルスのうち、既知のエンテロウイルス抗血清で中和されず、VP1領域の遺伝子配列から新型エンテロウイルス（73型、79型、97型、98型および107型）と同定された7株を用いた。表1に用いた株の型名、名前、分離年、分離された旅行者の渡航国、

Accession 番号を示した。

各分離株の VP1 領域の塩基配列を用い、公的遺伝子データベースにおいて BLAST 検索を実施し同じ型のウイルスの塩基配列の情報を得た。得られた配列に基づき解析ソフト (Genetixy program) により相同性を調べるとともに、系統樹解析を行った。

各分離株を RD-18S 細胞で培養し、100TCID₅₀/25 μl に調整したものを中和抗体測定に用いた。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。これらは、愛知県内 2 カ所の病院小児科を受診した患者と、日本赤十字社に献血に訪れた健康者由来で、親または本人の同意を得たものである。血清は 4 倍から階段希釈し、中和抗体価 8 倍以上を陽性とした。

C. 研究結果

VP1 領域の塩基配列を BLAST 検索したところ、今回対照としたウイルスは全て外国で分離されたもので、我が国での分離株は我々のものだけであった。EV-73 は、タイ、インドネシア、シンガポールを旅行した人から分離された TAS92-1482 株は韓国分離株 (2276-82) や米国分離株 (CA54-4454) と比較的近いが 85% の相同性であった。タイ旅行者から分離された T97-1831 株は、オマーン分離株と 90% の相同性であった。BLAST 検索で得られた株の配列を系統樹解析で比較したものを図 1 に示した。バングラデシュとインドで分離された 6 株 (10484、10545、22-00vp1、57-99vp1、10536、10544) は同一のクラスターを形成したが、我々の分離株 2 株を含めた 7 株は独立して存在した。

EV-79 は、我々の分離株 2 株以外に米国

で分離された 2 株 (CA79-10384、CA82-10385) とバングラデシュ分離株 (10460) が検索された。我々の分離株はバングラデシュ分離株に比較的近く、ネパール、香港旅行者から分離された NH95-0601 株は 92%、トルコ、シンガポール旅行者から分離された TS94-0534 株は 87% の相同性であった。

EV-97 は、バングラデシュ分離株 (BAN99-10355)、パキスタンで分離された 2 株 (0968/PAK/08、Pak/CS2/2008)、フィンランド分離株 (FIN03-2875) が検索されたが、我々がインド、タイ旅行者から分離した DT94-0227 株はいずれの株とも約 85% の相同性であった。

EV-98 は我々がタイ旅行者から分離した T92-1499 株が標準株となっているが、同じ型のウイルスの情報はなかった。EV-88 が最も近縁で VP1 領域の相同性は 70% であった。EV-107 も我々がタイ、ネパール旅行者から分離した TN95-0349 株が標準株とされている。BLAST 検索の結果、パキスタンで分離された PAK5443 株が報告されていた。EV-107 はコクサッキーウイルス A9 型と近く VP1 領域の相同性が 73% である。そのため全領域の塩基配列を比較し、さらに EV-107 と CV-A9 が交差中和反応を示さない点から、異なる血清型のウイルスとなった。EV-79、EV-97、EV-98、EV-107 分離株の VP1 領域の系統樹解析の結果を図 2 に示した。

新型エンテロウイルスに対する中和抗体保有率を表 2 に示した。EV-73 に対する中和抗体保有率は比較的高く、4 歳～19 歳の年齢層で約 10%、30 歳以上で 30% であった。他の EV-79、EV-97、EV-98、及び EV-107 に対する抗体保有率は低く 1.4%～3.8% であった。

D. 考察

平成19年度の報告書でCV-A9関連株としたTN94-0349株は、VP1、VP2、及びVP3の構造タンパク質をコードする領域においてのみCV-A9と比較的高い相同性を示したが、他の領域ではCV-A9とはクラスター形成がされなかった。また、CV-A9標準株(Grigg)とTN94-0349株が交差中和反応陰性であったため、新たな血清型としてEV-107とされた。従って、本ウイルスはVP1領域の相同性が73.5%と70%~75%の値で異なる血清型とされた初めての例となった。

BLAST検索の結果から、EV-73は世界各国で多様なウイルスが分離されている事が伺える。また、中和抗体保有状況から、我が国でも過去に流行した可能性が高い。各実験室で同定不能とされたウイルスの中にEV-73が存在する事が予測される。EV-79とEV-97も比較的多くの国で分離されているが、抗体保有状況から我が国では過去に流行していないと思われた。我々が初めて分離して標準株となったEV-98とEV-107は報告例も少なく、EV-107の1例(パキスタン)のみであった。分離報告が新しい事も理由にあげられるが、抗体保有状況から、我が国での流行はなかったと考えられる。

我々の分離株と、他の国で分離された株の相同性は90%前後の値で、同一ウイルスは存在しなかった。同一血清型でも多様なウイルスの存在が推察された。

今回分離した新型エンテロウイルスの病原性は明らかにされていないが、一旦国内に拡大した場合大きな流行につながる可能性もある。さらに、移行抗体を保有しない新生児が感染した場合重篤な症状になることが知られている。海外、特に東南アジア

旅行により、これら国内に存在しないウイルスは常に運び込まれているものと推測されるので、病原体検出サーベイランスシステムのような監視体制が求められる。

E. 結論

海外旅行者から分離された新型エンテロウイルス7株5血清型のVP1領域の塩基配列について、公的データベースを用いて近縁の株を検索し、比較した。我々以外にエンテロウイルス73型(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。我々の分離株は、他の分離株と比較して殆どが10%以上の相違が認められ他に報告のない独立した株と考えられた。これらのウイルスの中和抗体保有率を調べたところ、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型に対する保有状況は1~3%と低く、国内に侵入しても流行には至らなかったと考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

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(in press)

2. 学会発表

なし

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

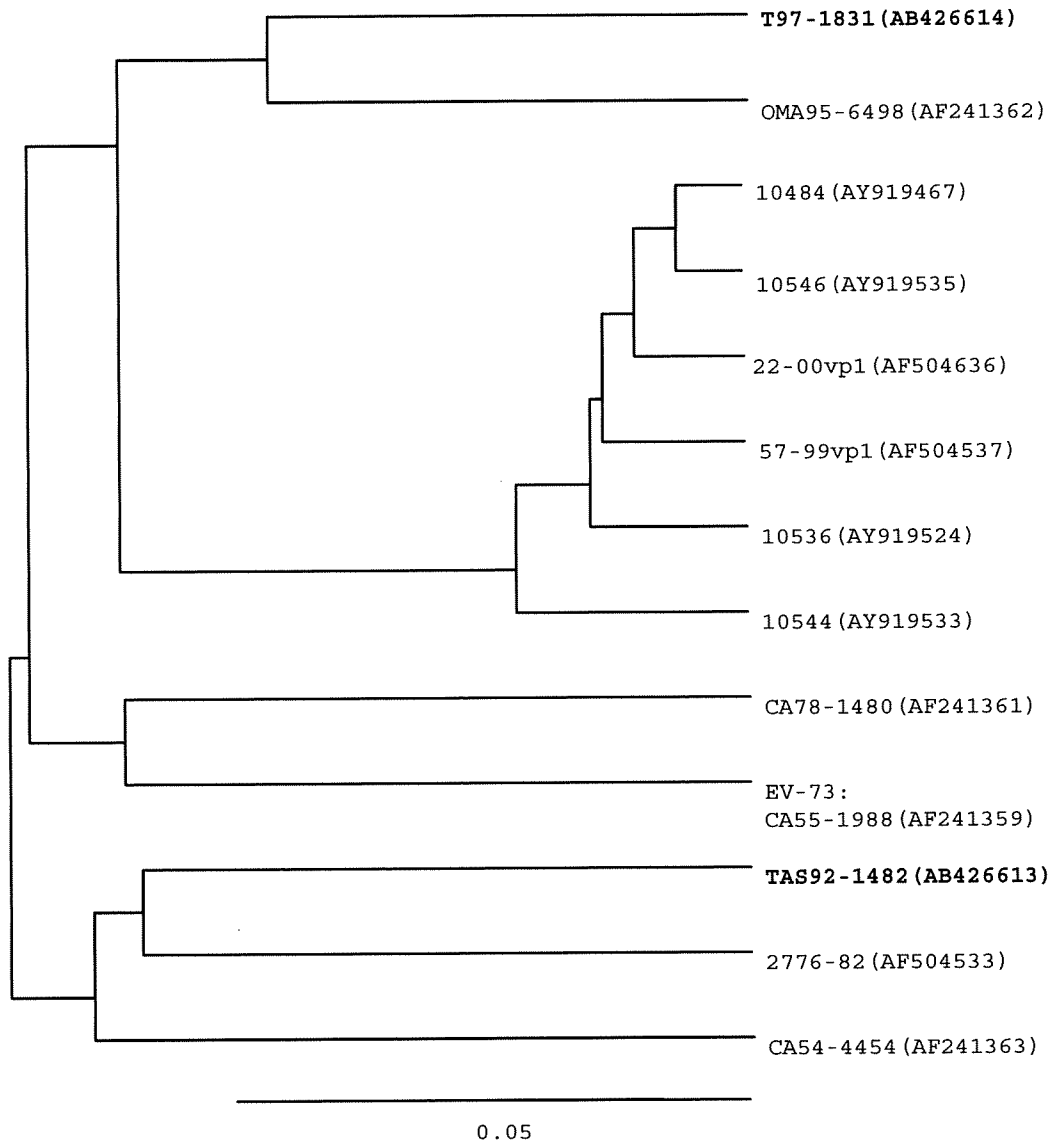


図1 海外旅行者から分離された2株のエンテロウイルス73型と標準株及び他の分離株のVP1領域における系統樹解析 (UPGMA法)
 標準株の株名の前に型名を記す。本研究における分離株を太字で示す。

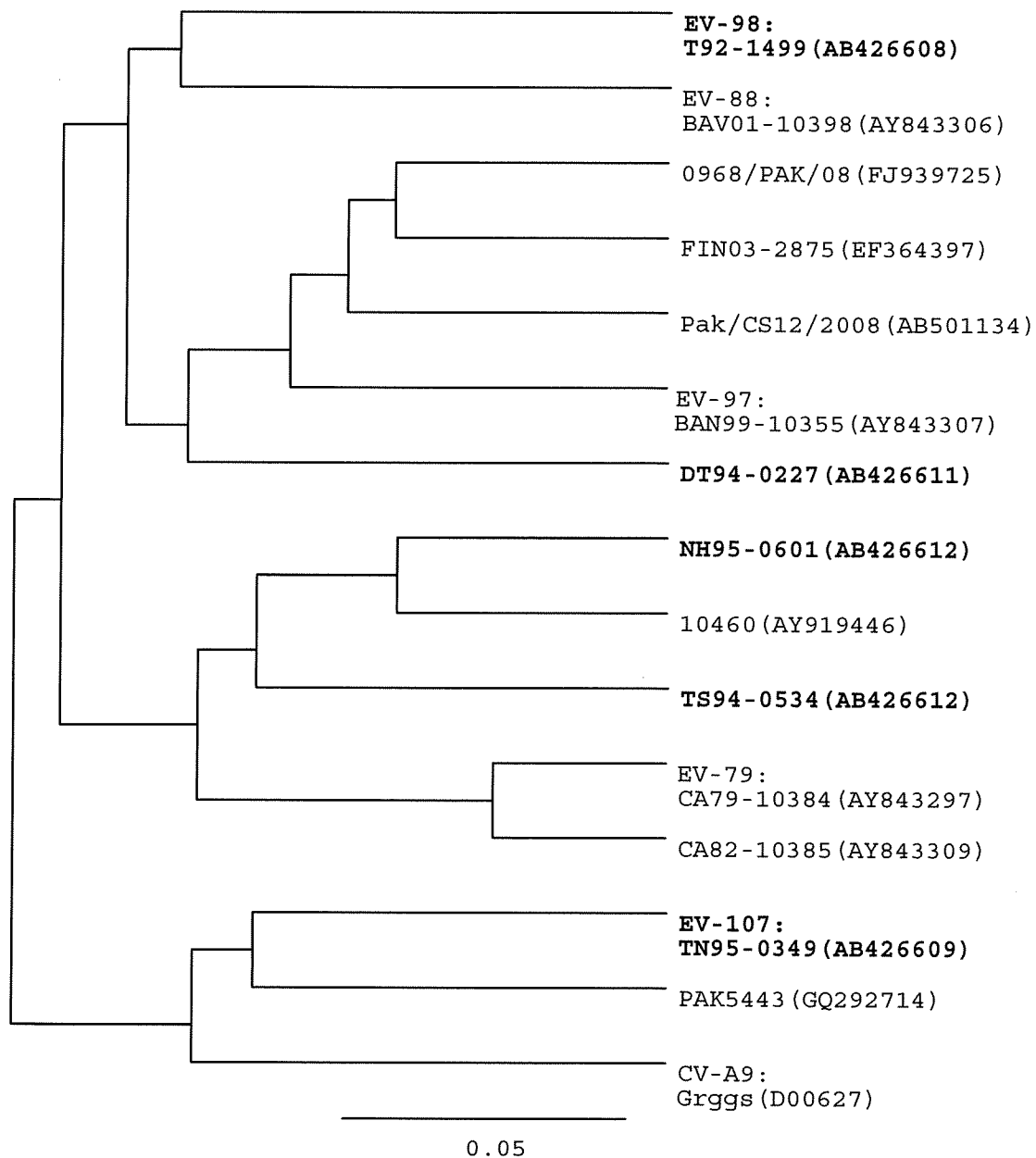


図2 海外旅行者から分離されたエンテロウイルス79型、97型、98型、及び107型と標準株及び他国の分離株のVP1領域における系統樹解析 (UPGMA法)
 標準株の株名の前に型名を記す。本研究における分離株を太字で示す。

表1 VP1 領域の塩基配列により同定された海外旅行者からのエンテロウイルス分離株

番号	型	株名	分離年	旅行先	Accession 番号
1	73 型	TAS92-1482	1992	THA, INA, SIN	AB426613
2	73 型	T97-1831	1997	THA	AB426614
3	79 型	TS94-0534	1994	TUR, SIN	AB426612
4	79 型	NH95-0601	1995	NEP, HKG	AB426610
5	97 型	DT94-0227	1994	IND, THA	AB426611
6	98 型	T92-1499	1992	THA	AB426608
7	107 型	TN94-0349	1994	THA, NEP	AB426609

旅行先: HKG; 香港、INA; インドネシア、IND; インド、NEP; ネパール、SIN; シンガポール、THA; タイ、TUR; トルコ

表2 新型エンテロウイルス(73 型、79 型、97 型、98 型、107 型)の年齢別中和抗体保有率

年齢階層	被検者数	陽性者数(%)				
		T97-1831 (EV-73)	NH95-0601 (EV-79)	DT94-0227 (EV-97)	T92-1499 (EV-98)	TN94-0349 (EV-107)
0-1	19	1 (5.3)	0 (0)	1 (5.2)	1 (5.2)	0 (0)
2-3	21	0 (0)	1 (4.8)	0 (0)	2 (9.5)	1 (4.8)
4-6	21	3 (14.2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
7-9	20	2 (10.0)	1 (5.0)	0 (0)	0 (0)	2 (10.0)
10-14	29	3 (10.3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
15-19	20	2 (10.0)	0 (0)	1 (5.0)	0 (0)	0 (0)
20-24	20	1 (5.0)	1 (5.0)	0 (0)	1 (5.0)	0 (0)
25-29	20	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (5.0)
30-39	20	6 (30.0)	0 (0)	1 (5.0)	0 (0)	2 (10.0)
40-	20	6 (30.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (10.0)
合計	210	24 (11.4)	3 (1.4)	3 (1.4)	4 (1.9)	8 (3.8)

厚生労働省科学研究費補助金
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事業
分担研究報告書

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

吾郷昌信 長崎県環境保健研究センター 保健科長

研究要旨

これまでに、ヘルパンギーナおよび手足口病と診断された患者由来咽頭ぬぐい液から原因となるヒトエンテロウイルス (HEV) A に属するウイルスは、当初使用した HEp-2、RD-18S、Caco-2、Vero 細胞では分離できなかった。これに対し、エンテロウイルス間で多様性のある VP1 領域を増幅する Consensus-Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primers (CODEHOP)を用いた CODEHOP VP1 RT-snPCR 法では、ヘルパンギーナ患者の 9 検体のうち 7 検体からコクサッキーウイルス A3 (CV-A3) 1 株、CV-A5 が 4 株および 2 株の CV-A6 が同定され、手足口病患者由来検体からは、55 検体中 51 検体から CV-A16 が 50 株、CV-A3 が 1 株同定された。今回、ヒトエンテロウイルス A (HEV A)に属するウイルスに感受性の高い 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、ヘルパンギーナ患者由来検体からは CODEHOP VP1 RT-snPCR 法で CV-A5 が検出同定された 1 検体から同じ 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 CV-A16 が改めて分離され、1 検体からは CV-A16 と CV-A5、2 種類のウイルスが分離同定された。さらに、冬期普通感冒の主要な原因ウイルスであり 100 以上の血清型が存在するヒトライノウイルス(HRV)のうち 48 血清型について、CODEHOP VP1 RT-snPCR 法の検出同定率を検討したところ、供試した全ての血清型において同定可能であった。以上の結果より、本法は臨床検体から原因となる HEV を迅速に検出同定できるだけでなく、同定されたウイルスによって感受性の高い細胞を選択して効率の良いウイルス分離に役立つと共に、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。

A. 研究目的

ピコルナウイルス科に属するエンテロウイルス属は、現在 10 の種に分類されている。このうち、ヒトに対して病原性を有するものは、ヒトエンテロウイルス (HEV) A~D およびヒトライノウイルス

(HRV) A~C の 7 種に分類され、200 以上にも上る多数の血清型が存在する。

HEVs は、上気道炎、ヘルパンギーナ、手足口病等のように比較的軽微な症状を示す疾患から無菌性髄膜炎や脳炎などのような重篤な中枢神経症状を呈する疾患

Table 1. Primers used for cDNA synthesis, PCR1, snPCR2, and sequencing (Nix *et al.*, 2006)

Primers	5'-3' Sequences ^a	Amino acid motif	Location ^c
AN32	GTYTGCCA	WQT	3009--3002
AN33	GAYTGCCA	WQS	3009--3002
AN34	CCRTCRTA	YDG	3111--3104
AN35	RCTYTGCCA	WQS	3009--3002
SO224	GCIATGYTIGGIACICAYRT	AMLGTH(I/L/M)	1977--1996
SO222	CICCIGGIGGIAYRWACAT	M(F/Y)(I/V)PPG(A/G)	2969--2951
AN89	<u>CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG</u> ^b	PALTA(A/V)E(I/T)G	2602--2627
AN88	<u>TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT</u> ^b	M(F/Y)(I/V)PPGGPV	2977--2951

^aAmbiguity codes based on Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB) are as follows: G, guanine; A, adenine; C, cytosine; T, thymine; R, A/G; Y, C/T; W, A/T; N, A/C/G/T; I, inosine.

^bThe nondegenerate clamp regions within AN88 and AN89 sequences are underlined.

^cThe locations of all primers are those relative to the genome of PV1 Mahoney strain (GenBank accession number J02281).

まで、多彩な疾病の原因ウイルスである。一般に、HEVsはアデノウイルスと並んで夏期における普通感冒(夏かぜ)の原因ウイルスとして知られる。一方、HRVsは冬期普通感冒の代表的な原因ウイルスとして知られ、その50%が本ウイルスに因るものと考えられ、最近では喘息発作の要因としての重要性が指摘されている。しかしながら、両ウイルスともわが国の上気道炎における実態の詳細は明らかにされていない。

HEVsの分離同定は、培養細胞を用いた組織培養法でウイルスを分離し、中和試験によって血清学的に行われてきた。しかし、検査方法が煩雑な上に検査に長時間を要し、さらに、培養細胞で分離困難なウイルスや、型別困難なウイルスが出現するなどの問題点がある。培養細胞で分離困難なウイルス、特にコクサッキーウイルスA(CV-A)に属するウイルスは、乳呑みマウスを用いて分離同定が行われてきたが、培養細胞を用いた方法よりさらに煩雑である。また、HRVの分離には

主にヒト初代培養細胞や正常2倍体細胞などが用いられてきたが、高率に分離できる前者は近年入手が困難であり、後者をはじめとする他の培養細胞では高効率に分離することは難しい。さらに、わが国におけるHRVの研究者人口が極端に少ないために抗血清の入手が難しく中和法による型別同定は困難な状況下にある。

近年、臨床検体から直接RT-PCR法でウイルス遺伝子を増幅し、VP4領域の塩基配列を解読することにより迅速にウイルスの型別同定が行われるようになってきたが、比較的保存された領域のためエンテロウイルスであることは確認できるものの、型別同定が困難な場合も多い。最近、Nixらによって開発された Consensus-Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primers (CODEHOP)を用いてエンテロウイルス間で多様性のあるVP1領域を増幅するCODEHOP VP1 RT-snPCR法が、より高率にエンテロウイルスの型別同定を可能にする方法として注目されている。CODEHOPとは、関連した遺伝子を増幅す

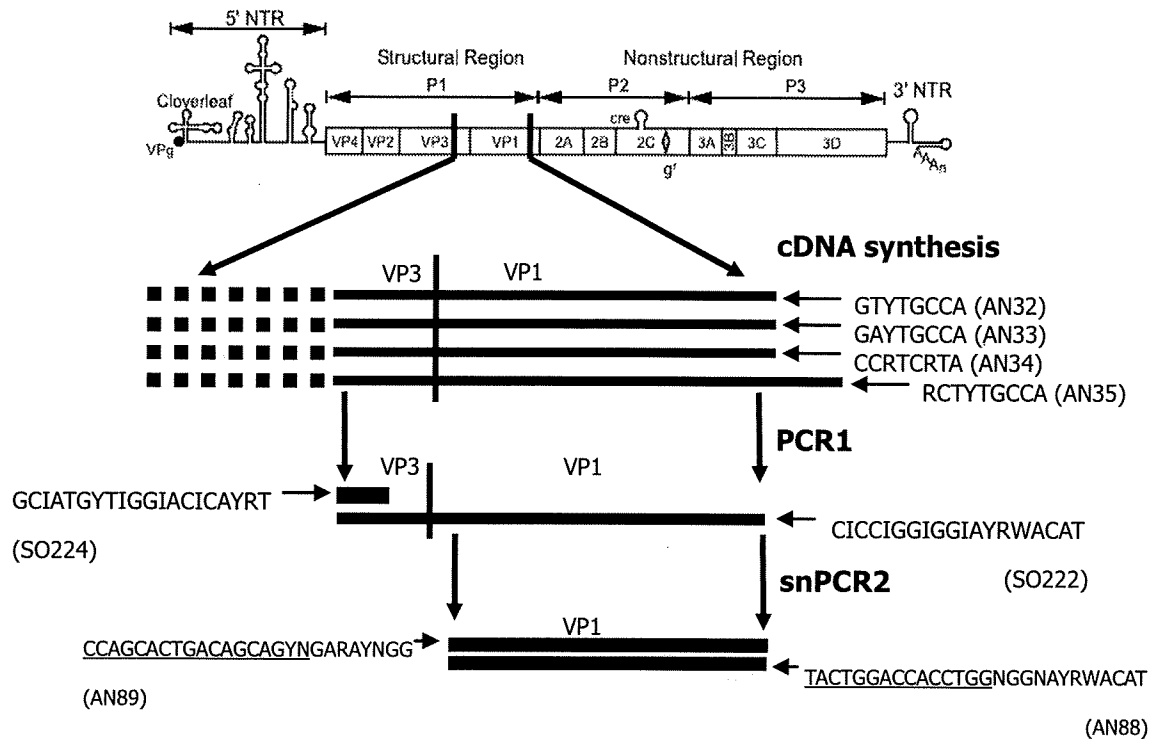


Figure 1. Schematic of the locations of the primers used and the representation of the steps in the partial VP1 amplification method

るための、効率的な混合塩基プライマー設計法である。この設計法は、目的とするタンパク質ファミリー間で高度に保存されている3~4アミノ酸をもとに、3'側に多くの混合塩基を有するプライマーをデザインすることが特徴である。

これまでに我々は、夏かぜにおけるHEVの侵淫状況を明らかにするために、臨床検体からCODEHOP VP1 RT-snPCR法を用いたHEV高感度検出同定法の有効性を確認すると共に、培養細胞を用いたウイルス分離・同定との比較検討を行った。本研究では、通常ウイルス分離に使用する培養細胞では分離し難いHEV Aが原因となるヘルパンギーナおよび手足口病患者の臨床検体でVP1 RT-snPCR法により

原因ウイルスが特定された検体について、特異性の高い細胞を用いて再分離できる可能性について検討した。さらに、これまで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、その有用性を検討した。

B. 研究方法

HEVsの再分離および同定には、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、最終的に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、それぞれ55検体および9検体のうちVP1 RT-snPCR法により原因ウイルスが特定されたそれぞれ51検体および7検体を接種材料とし、

Table 2. Human rhinovirus reference strains amplified by VP1 RT-snPCR

Serotype	Strain	Species	Receptor group
HRV1A	2060	A	Minor
HRV1B	B632	A	Minor
HRV2	HGP	A	Minor
HRV3	FEB	B	Major
HRV5	Norman	B	Major
HRV8	MRH	A	Major
HRV9	211-CV13	A	Major
HRV10	204-CV14	A	Major
HRV12	181-CV16	A	Major
HRV13	353	A	Major
HRV14	1059	B	Major
HRV15	1734	A	Major
HRV16	11757	A	Major
HRV19	6072-CV18	A	Major
HRV21	47	A	Major
HRV22	127-CV22	A	Major
HRV25	5426-CV26	A	Minor
HRV28	6101-CV29	A	Major
HRV29	5582	A	Minor
HRV30	106F	A	Minor
HRV31	140F	A	Minor
HRV32	363	A	Major
HRV33	1200	A	Major
HRV36	342H	A	Major
HRV39	209	A	Major
HRV41	56110	A	Major
HRV44	71560	A	Minor
HRV47	Baylor 3	A	Minor
HRV49	8213	A	Minor
HRV50	A2 #58	A	Major
HRV54	F01-3774	A	Major
HRV56	CH82	A	Major
HRV58	21-CV20	A	Major
HRV61	6609-CV39	A	Major
HRV67	1857-CV51	A	Major
HRV68	F02-2317	A	Major
HRV72	K2207	B	Major
HRV75	328F	A	Major
HRV77	130-63	A	Major
HRV78	2030-65	A	Major
HRV81	483F	A	Major
HRV86	121564-Johnson	B	Major
HRV88	CVD01-0165-Dambranskas	A	Major
HRV89	41467 Gallo	A	Major
HRV92	SF-1622	B	Major
HRV95	SF-998	A	Major
HRV98	SF-4006	A	Major
HRV100	K6579	A	Major

HEV A に対して感受性の高い RD-A 細胞を用いた。ウイルスの型別同定は、抗血清を用いた中和法により行った。

HRV 2 および 14 は、川名林治博士より分与され、その他の HRV は ATCC より購入した。HRVs は、HeLa (Ohio)細胞で増殖させ、その培養上清を用いた。

ウイルス RNA の抽出は、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を用いて行った。CODEHOP VP1 RT-snPCR は、Table 1 に示すプライマーを用いて、Nix らの方法に準じて行った。手順の概略を Fig. 1 に示す。RT-PCR によって増幅された遺伝子産物は、BigDye Terminator v1.1 および ABI Prism 3130(何れも Applied Biosystems)を用いて塩基配列を決定した。Sequencing primer には AN89 および AN88 を使用した。決定した VP1 領域の塩基配列は、Blast により相同性の検索を行い、最も高いスコアを示したデータベースに基づいて型別同定した。

C. 研究結果および考察

(1) ウイルスの再分離・同定

これまでに、当初使用した HEp-2、RD-18S、Caco-2、Vero 細胞ではウイルスが分離できなかったヘルパンギーナおよび手足口病と診断された患者由来咽頭ぬぐい液から VP1 RT-snPCR 法では、ヘルパンギーナ患者の 9 検体のうち 7 検体からコクサッキーウイルス A3 (CV-A3) 1 株、CV-A5 4 株および 2 株の CV-A6 が同定され、手足口病患者由来検体からは、55 検体中 51 検体から CV-A16 が 50 株、CV-A3 が 1 株、検出同定された。原因ウイルスが検出されたこれら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 検体からヒトエンテロウイルス A (HEV A)に

属するウイルスに感受性の高い RD-A 細胞を用いて、ウイルスの再分離を試みた。その結果、ヘルパンギーナ患者由来検体からは CODEHOP VP1 RT-snPCR 法で CV-A5 が検出同定された 1 検体から同じ CV-A5 が分離された。さらに、手足口病患者由来 55 検体からは、CV-A16 が 6 検体から改めて分離された。また、1 検体からは CV-A16 と CV-A5 が分離同定され、この手足口病患者は 2 種類のウイルスに重感染していたことが判明した。

臨床検体から VP1 RT-snPCR 法による HEV の検出同定は、約 2 日間程度で完了する迅速かつ高感度なウイルス検出同定法である。また、現在、HEV の特異的レセプター分子が続々と解明され、これらを発現するウイルス特異的な細胞株が樹立されている。即ち、臨床検体を先ず VP1 RT-snPCR 法によって疾患の原因となるウイルスを検出し、この結果に基づいてウイルス特異的な細胞株を選択的に用いることにより効率の良い原因ウイルスの分離同定が可能になるものと思われる。特に、培養細胞では分離し難い HEV A に属するウイルスが原因と疑われる疾患由来検体からの検出、分離、同定には極めて有用な方法であるものと考える。

(2) VP1 RT-snPCR 法による HRVs の検出同定。

HRVs 標準株 48 株を用いて VP1 RT-snPCR 法による検出同定の有効性について検討した。供試した HRVs 標準株を Table 2 に示す。その結果、供試した標準株 48 株は、VP1 RT-snPCR で全て増幅され、VP1 領域の増幅産物は一致率 92~100%で同定可能であった。一部に増幅効率が低い HRV も存在したが、AN89 および AN88 を用いて再度増幅することによ

り、塩基配列を解析するために十分な量の増幅産物が得られた。これらの primer は、増幅産物の塩基配列解析に sequencing primer としても使用したが、(+)鎖の解析に使用した AN89 では一部に解析不十分な株が存在したのに対し、(-)鎖の解析に使用した AN88 では、供試した全ての HRV で解析が可能であった。今後、増幅産物における HRV(+)鎖の解析に使用する sequencing primer については、さらに検討する必要があるものと考えられる。

以上の結果より、現在血清型で分類されている HRV の約半数は、species A または B、あるいはレセプターグループに関係なく VP1 RT-snPCR 法により検出同定されたことから、HRV の検出同定における本法の有用性が示唆された。したがって、培養細胞を用いた分離同定が困難な HRV のうち HRV A および B についても HEV 同様、本法により検出同定が十分可能であると思われる。現在、臨床検体より分離された HRVs の型別同定および臨床検体からの HRV の検出同定における有用性について検討中である。また、培養細胞で増殖困難な HRV が最近、新たに HRV C として分類されたが、これらについても本法による検出同定の可能性について検討する予定である。

D 結論

CODEHOP VP1 RT-snPCR 法は、100 以上もの血清型が存在し、夏かぜの主要原因となる HEV A~C に属するウイルスを臨床検体から迅速かつ高感度に検出・同定する方法として極めて有用な方法である。また、本法により原因ウイルスを検出同定し、その結果に基づいてウイルス特異的な細胞を選択、使用することに

より効率の良いウイルス分離同定が可能である。さらに本法は、HEVs だけでなく、少なくとも HRV A および B に属するウイルスの検出同定における有用性が示唆された。

研究発表

1. 論文発表

Kubo, T., Agoh, M., Mai, L. Q., Fukushima, K., Nishimura, H., Yamaguchi, A., Hirano, M., Yoshikawa, A., Hasebe, F., Kohno, S., and 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, in press, 2010.

2. 学会発表

- (1) 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学術集会、2009 年（東京）
- (2) 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学術集会、2009 年（東京）

知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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）
分担研究報告書（平成 21 年度）

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
～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～

研究協力者：中野貴司（国立病院機構三重病院 臨床研究部 国際保健医療研究室長）

共同研究者：赤地重宏、田沼正路、大熊和行（三重県保健環境研究所）

東川正宗、井上正和（山田赤十字病院）、庵原俊昭（国立病院機構三重病院）

研究要旨

ポリオワクチン関連麻痺（vaccine-associated paralytic poliomyelitis, VAPP）が疑われる症例について、自験例とわが国における過去の報告例の臨床症状、検査・画像所見、ウイルス学的検査について比較検討した。病原診断のために、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は不可欠である。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は適切な対処を行いたい。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、経口生ポリオワクチンから不活化ポリオワクチンへ早期に転換することが望ましい。

A. 研究目的

ポリオウイルスはエンテロウイルス属（EV）に属し、代表的な臨床症状として“麻痺”が知られている。現在わが国で定期接種として用いられている経口生ポリオワクチン（oral poliovirus vaccine, OPV）は、非常に有効なワクチンであるが、頻度は低いながらも弱毒株の病原性復帰による麻痺を来すことが知られている。今回私たちは、OPV 関連麻痺が疑われた症例を経験した。OPV 初回内服 3 週間後の発症で、肛門周囲膿瘍のある 7 か月男児であった。ワクチン関連麻痺症例（vaccine-associated paralytic poliomyelitis, VAPP）の臨床経過、発症リスク因子、ウイルス検査所見について、その病像を明らかにする目的で、本症例とわが国における過去の報告例をもとに

検討した。

B. 研究方法

今回の症例、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。

（倫理面への配慮）

患者の個人情報特定されないことのないように十分注意するとともに、解析に用いたデータについても個人の人権やプライバシーが侵害されることのないよう、取り扱いに配慮した。

C. 研究結果

I. 今回の症例

（年齢・性別）7 か月 男児

(主訴) 右下肢を動かさない

(周産期歴・発達歴) 周産期の異常無し。
精神運動発達歴正常。

(既往歴) 生後 3 週頃から肛門周囲膿瘍があり、近医で数回の切開排膿を行った。自然排膿も時々認めた。OPV 内服時にも肛門周囲膿瘍は存在した。

(予防接種歴) BCG1 回、DPT3 回接種済み、いずれも問題となる副反応の出現なし。OPV を 9 月 9 日に 1 回内服済み。

(現病歴) 9 月 28 日 (OPV 内服 19 日目) 頃に 37℃ 台の発熱を認め、29 日は 38℃ まで発熱し、近医で投薬を受けた。10 月 2 日に解熱したが、やや元気が無く、それまで出来ていたハイハイやつかまり立ちをしにくそうであった。10 月 5 日は元気であったが、右下肢に力が入らず、つかまり立ちさせると右側に崩れるように倒れた。10 月 6 日に右下肢を動かさないため近医受診、精査加療目的で 2 次病院へ入院となった。

(ウイルス学的検査) 糞便から、ポリオウイルスワクチン株 (Sabin3 型) が分離された。髄液からのウイルス分離は陰性、咽頭ぬぐい液では Rhinovirus 陽性であった。

II. 過去の論文や学会報告例

今回私たちが経験した症例と併せて、過去の報告例を一覧表として表 1-4 に示した。

VAPP が疑われた例は、男児、OPV 初回内服後が大多数を占めた。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。

多くの例は、OPV 内服 2~3 週間後に発熱し、その数日~5 日後に麻痺を来した。髄液細胞数は中等度に増多しており、蛋白は正常から微増であった。画像所見では、T2 強調画像における脊髄前角の高信号が特徴的な画像所見であったが、必ずしも認められるとは限らなかった。神経生理検査では、罹患部位の運動神経活動電位の低下や、伝

導速度が低下していた例があった。全例で後遺症を残した。

免疫能異常の有無を検索した例で、明らかな免疫不全が見つかった者は居なかった。ポリオウイルスワクチン株が分離された例は多くはなかったが、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。10 例中 5 例において、糞便でウイルス陽性の確認が成され、ウイルス型別では 2 型と 3 型ウイルスであった。髄液からポリオウイルスが検出された例は無かった。

D. 考察

男児、OPV 初回内服例で VAPP の頻度が高いことは以前からよく知られている。今回過去の VAPP 疑い報告例をレビューしたが、同様の結果であった。さらに、最近 10 年間に報告された VAPP 疑い 10 例のうち 2 例は、肛門周囲膿瘍を有する児であった。海外の文献でも、肛門周囲膿瘍が VAPP 発症の危険因子であることを指摘している報告があり、今後検討を要する。現状のわが国の OPV 添付文書には、OPV 内服 1 ヶ月以内の抜歯、扁桃摘出、緊急を要しない手術、頻回の筋肉注射は VAPP 発症の危険因子であり避けることが望ましいと記載されているが、肛門周囲膿瘍については触れられていない (表 5)。

液性免疫異常など免疫不全症があると、OPV の副反応として VAPP が起こりやすいといわれる。宿主因子の関与を解明するためにも、VAPP 症例については免疫学的異常の有無について詳細な検討が実施されることが望ましい。

OPV 内服後に麻痺を来し VAPP が疑われても、麻痺発症早期の適切な時期に検体が採取されウイルス分離が実施されている例は少なかった。また、これまでの報告例から考えると、髄液でウイルス陽性を確認

することはなかなか困難であり、陽性と判定できる期間がより長期と考えられる糞便からのウイルス分離の重要性を繰り返し喚起する必要がある。

MRI による画像所見や神経生理検査は、特徴的な病的所見が得られて診断に有用な場合がある。しかし、必ずしも VAPP の全例で陽性所見が得られるとは限らない。病状の進行や程度と検査のタイミング、あるいは検査手技や MRI 撮像断面も関係するのかもしれない。

今回の VAPP が疑われた例は、全例で運動機能障害や変形萎縮など後遺症を残していた。VAPP も野生株ポリオウイルスによる麻痺と同様に、一旦麻痺を来たせばその予後は不良である。野生株ポリオウイルスの流行が長年見られていないわが国の現状において、頻度は低いながらも後遺症につながる VAPP は一刻も早く発生をゼロにすることが必要である。定期接種を OPV から不活化ポリオワクチン (inactivated poliovirus vaccine, IPV) へ早期に転換することが望ましい。

E. 結論

VAPP は、OPV 内服歴と特徴的な臨床症状や検査所見により診断される。ウイルス学的診断のために、麻痺発症早期に糞便検体を忘れずに採取することが大切である。男児、OPV 初回内服、免疫不全症、OPV 内服 1 ヶ月以内の手術・組織への侵襲・頻回の筋肉注射など OPV 発症の危険因子としてすでに以前より指摘されている要件がいくつかある。これらに注意するとともに、肛門周囲膿瘍についても、危険因子としての関与の有無を検討する必要がある。VAPP は後遺症を残す重篤な副反応であり、わが国の状況を考えれば、一刻も早い OPV から IPV への転換が望ましい。

F. 研究発表

(論文発表)

1. 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.
2. 中野貴司 : ポリオ. 母子保健情報 59 号 : 70-73, 2009 年 5 月.
3. 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.
4. 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.
5. 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.

(学会発表)

1. 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 18 日.

G. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし