

201028047A

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

エンテロウイルス感染症制御のための診断・予防治療に関する国際連携研究

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 清水 博之

平成 23 年 (2011 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

エンテロウイルス感染症制御のための診断・予防治療に関する国際連携研究

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 清水 博之

平成 23 年（2011 年） 3 月

目 次

I. 総括研究報告

- エンテロウイルス感染症制御のための診断・予防治療に関する国際連携研究 ----- 1
研究代表者 清水 博之

II. 分担・協力研究報告

1. 東アジアにおける環境ウイルスサーベイランスの有効性に関する研究 ----- 17
吉田 弘 (国立感染症研究所 ウイルス第二部)
2. 下水中のポリオウイルス性状解析と下水処理過程におけるエンテロウイルス量の変化に関する調査 ----- 22
岩井 雅恵 (富山県衛生研究所)
3. アイチウイルスの検出と遺伝子解析—下水から検出されるアイチウイルス遺伝子 ----- 28
山下 照夫 (愛知県衛生研究所)
4. 浄化センターへの下水流入水からのウイルス分離について ----- 33
世良 暢之 (福岡県保健環境研究所)
5. エンテロウイルス流行株の分子疫学的解析 ----- 37
山崎 謙治 (大阪府立公衆衛生研究所)
6. RD-A 細胞の継代培養法の基礎的検討 ----- 40
藤本 嗣人 (国立感染症研究所感染症情報センター)
7. ブタコブウイルスのウイルス血症と VP1 遺伝子領域の解析 ----- 47
牛島 廣治 (藍野大学)
8. 日本、タイ、スリランカの小児のヒトパレコウイルスによる急性下痢症 ----- 52
牛島 廣治 (藍野大学)
9. ヒトライノウイルスの高感度検出同定法に関する検討 ----- 56
吾郷 昌信 (長崎県環境保健研究センター)
10. 本邦における、手足口病、ヘルパンギーナ、および関連合併症の入院症例に関する全国調査 ----- 62
福島 若葉 (大阪市立大学)
11. エンテロウイルス感染症の制御に関する臨床医学的研究 ----- 73
中野 貴司 (川崎医科大学)
12. 無菌性髄膜炎を疑う熱性痙攣小児患者からのエンテロウイルスの検出 ----- 76
町田 早苗 (埼玉医科大学)
13. 高知県における Saffold virus に関する血清免疫学及び分子疫学的調査について ----- 79
細見 卓司 (高知県衛生研究所)
14. ヒトカルジオウイルス (Saffold ウイルス) の病原性解析<第一報> ----- 87
大原 義朗 (金沢医科大学)

15. 新規カルジオウイルスの病理学的診断法に関する研究 -----	91
永田 典代 (国立感染症研究所 感染病理部)	
16. エンテロウイルス感染マウスモデルの解析 -----	94
有田峰太郎 (国立感染症研究所 ウイルス第二部)	
17. アイチウイルス複製機構の解析 -----	95
佐々木 潤 (藤田保健衛生大学)	
18. ヒト白血球/ヒト化マウスを用いたエンテロウイルス 71 感染モデルの作製に関する研究 -----	97
小柳 義夫 (京都大学ウイルス研究所)	
19. エンテロウイルス 71 と PSGL-1 受容体との結合における PSGL-1 チロシン硫酸化の解析 -----	102
西村 順裕 (国立感染症研究所 ウイルス第二部)	
20. Human enterovirus A 臨床分離株を用いた L-SCARB2 細胞感染実験 -----	108
飯塚 節子 (島根県保健環境科学研究所)	
21. エンテロウイルス 71 株分離細胞系ならびにエンテロウイルス 71 感染モデルマウスの開発 -----	114
小池 智 (東京都臨床医学総合研究所)	
22. 不活化ポリオワクチン導入の際の円滑な切り替えについての研究 -----	122
清水 博之 (国立感染症研究所 ウイルス第二部)	
23. 不活化ポリオワクチン接種者数に関する調査：2010 年度の調査結果 -----	127
高山 直秀 (東京都立駒込病院)	
24. ポリオ野生株ウイルスの封じ込め対策に関する研究 -----	135
小松俊彦・ルナール純子 (NPO 法人バイオメディカルサイエンス研究会)	
25. ポリオワクチンに関するファクトシート (参考資料) -----	138
III. 研究成果の刊行に関する一覧 -----	157

厚生労働科学研究費補助金

平成22年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究推進事業

エンテロウイルス感染症制御のための診断・予防治療に関する国際連携研究

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：	吉田 弘、有田峰太郎、西村順裕 岩井雅恵 山崎謙治 藤本嗣人 牛島廣治 小柳義夫 小池 智	国立感染症研究所 ウイルス第二部 富山県衛生研究所 大阪府立公衆衛生研究所 国立感染症研究所 感染症情報センター 藍野大学医療保健学部藍野健康科学センター 京都大学ウイルス研究所 東京都神経科学総合研究所 微生物研究部門
研究協力者：	山下照夫、水谷絵美、安齋一、伊藤 雅、藤浦 明、皆川祥子 世良暢之、石橋哲也、吉富秀亮、田上四郎 中田恵子、左近直美 花岡 希、小長谷昌未、木村 愛 清水英明 近野真由美 榎本美貴 沖津祥子 Ngan Thi Kim Pham Pattara Khamrin 吾郷昌信 福島若葉、武知葉莉亜、熊谷桂子、乾未来 中野貴司 細見卓司 大原義朗、姫田敏樹 永田典代、鈴木忠樹、佐藤由子 佐々木 潤 佐藤 佳 町田早苗 吾郷昌信 中野貴司 飯塚節子 山吉誠也、藤井健 水田克巳 西村秀一 高山直秀 小松俊彦・ルナール純子	愛知県衛生研究所 福岡県保健環境研究所 大阪府立公衆衛生研究所 国立感染症研究所 感染症情報センター 川崎市衛生研究所 京都市衛生環境研究所 兵庫県立健康生活科学研究所 東京大学大学院医学系研究科 チェンマイ大学医学部 長崎県環境保健研究センター 大阪市立大学大学院医学研究科 公衆衛生学 川崎医科大学 小児科 高知県衛生研究所 金沢医科大学医学部 微生物学部門 国立感染症研究所 感染病理部 藤田保健衛生大学 医学部 京都大学ウイルス研究所 埼玉医科大学 医学部 長崎県環境保健研究センター 国立病院機構三重病院 臨床研究部 島根県保健環境科学研究所 東京都臨床医学総合研究所 山形県衛生研究所 仙台医療センター・仙台ウイルスセンター 東京都立駒込病院 NPO 法人バイオメディカルサイエンス研究会

研究要旨

重症エンテロウイルス感染症の主たる流行地域であるアジア地域の国々と連携し、国内外における腸管ウイルス感染症サーベイランス体制を整備し、重症エンテロウイルス感染症の診断および予防治療法を開発するために、以下の研究を実施した。

- 1) 山東省における下水からのエコーウイルス 6 型の分離同定、及びウイルスゲノム解析の結果は、疾患サーベイを構築することなく、ヒト集団で流行しているウイルスをモニタリングできる可能性を示した。
- 2) 2010 年は、富山県内の下水流入水から 48 株のポリオウイルスが分離されたが、すべて OPV-like ウイルスであった。エンテロウイルスの下水処理効果を調べたところ、二次処理水中のウイルス量は流入水よりも 10^{-1} ~ 10^{-2} 少なく、活性汚泥処理後、ウイルス量が減少していた。
- 3) ウイルス分離には至っていないが、アイチウイルスに血清型の異なる株の存在が示唆された。下水中からの検出件数は既知の A 型アイチウイルスと比較して少ないが、新型ウイルス由来の PCR 産物を解析すると多様であった。
- 4) 福岡県の下水流入水からのウイルス分離はポリオウイルス及びエンテロウイルス等の腸管系ウイルスの環境ウイルスサーベイランスとして有用であり、地域のヒト集団で顕性、不顕性感染として流行しているウイルスの状況を包括的な把握が可能であることが示唆された。
- 5) 平成 22 年に大阪府内で採取された小児の臨床検体から培養細胞または RT-PCR により 171 株のエンテロウイルスウイルスが検出された。RT-PCR による検出は VP4 領域を増幅する PCR 法の検出感度が高く、シーケンスによるウイルス同定は VP1 領域によるものの方が確実であった。
- 6) RD-A 細胞の培養には、一般的に用いられている MEM 培地でなく、DMEM 培地を用いた方が、細胞がコンフルエントになりやすく、その後の維持も長期間出来ることが示唆された。
- 7) タイの健康なブタの血清中にブタコブウイルス RNA が検出された。ハンガリーや中国のブタコブウイルスの VP1 領域の解析結果では核酸の配列は 84-98% 一致したが、タイ、日本の分離株にはこれより低い一致度であった。
- 8) 急性下痢症の原因ウイルスとしてのヒトパレコウイルスの検出を遺伝子検出で行った。小児を中心に、ウイルス性下痢症と思われる検体の 8~15% の頻度でヒトパレコウイルスが見られた。1~4 型の頻度が高いが、10、11 型をスリランカで見出した。
- 9) CODEHOP VP1 RT-snPCR 法による冬期普通感冒の主要な原因ウイルスであるヒトライノウイルス (HRV) の検出同定について検討を行った。HRV-A および B に加えて、HRV-C も検出同定可能であった。迅速高感度な本法は、HEV のみならず HRV の検出同定にも有用である可能性が示唆された。
- 10) 手足口病等による入院症例の臨床疫学像を把握するために全国調査を実施した。一次調査により入院症例数および死亡症例数を推計し、二次調査により、各症例の臨床症状などの詳細情報を収集する。2011 年 2 月 25 日現在、392 診療科 (52.3%) から回答を得た。報告症例数は 748 症例で、うち死亡症例数は 4 例であった。
- 11) 手足口病様症状に下肢筋力低下を呈した 1 歳 8 か月男児を経験した。後遺症なく麻痺は回復した。糞便検体からアデノウイルスが分離されたが、咽頭ぬぐい液や脳脊髄液はウイルス分離陰性であった。
- 12) 2008 年~2010 年の無菌性髄膜炎を疑う熱性痙攣小児患者を対象として、患者の髄液、咽頭ぬぐい液、便から CODEHOP PCR 法を用いてエンテロウイルス検出を試みた。164 検体中 33 検体が陽性 (20.1%) となり、髄液検体からコクサッキー A9 が検出された。咽頭ぬぐい液と便からは主に A 群エンテロウイルスが検出された。
- 13) 高知県に在住する 488 名を対象に Saffold virus (SAFV) genotype 2 及び 3 に対する血清中和抗体価を測定したところ、中和抗体保有率はそれぞれ 71.9%、67.4% であった。感染症発生動向調査等の検体から SAFV の検出を試みたところ、SAFV-2 が 7 検体、SAFV-3 が 2 検体、SAFV-NT が 1 検体から検出された。

- 14) ヒトを自然宿主とするカルジオウイルス (Saffold virus, SAFV) が 2007年に同定された。SAFVの病原性を分子ウイルス学的に解析することを目的とし、T7プロモーターを利用してSAFV感染性RNAを作製することが可能な SAFV (SAFV-3) 感染性cDNAクローンを樹立した。
- 15) 新規ヒトカルジオウイルスの病理学的診断法を確立するため、陽性参照標本の作製とウイルス抗原検出のための抗体の検討を行った。脳内接種後の乳のみマウス脳組織標本では、抗EMCV抗体を用いて抗原検出が可能であることが判明した。
- 16) ゼラチン粒子凝集法を利用したポリオウイルスの新規同定法を開発した。
- 17) 新規抗エンテロウイルス化合物 T-00127-HEV1 を同定し、T-00127-HEV1 が宿主タンパク質 PI4KB に対する特異的阻害剤であることを明らかにした。
- 18) アイチウイルス複製に関与する宿主因子の解析のため、HeLa 細胞 cDNA ライブラリーの酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行い、その結果、3A と相互作用する宿主タンパク質を得た。哺乳動物細胞ツーハイブリッド解析や免疫沈降による解析により、この宿主タンパク質は、3A 以外にも 2B、2BC、2C、3AB とも相互作用することが明らかとなった。
- 19) EV71 の生体内における細胞指向性を明らかにすることを目的として、ヒト白血球初代培養系およびヒト化マウス実験系を用いた EV71 感染実験を行った。その結果、EV71 は試みたヒト白血球では効率的な複製が得られないことが明らかになった。
- 20) EV71 はヒト PSGL-1 のアミノ末端領域に結合する。この領域には、PSGL-1 と本来のリガンドとの結合に重要な翻訳後修飾 (チロシン硫酸化と O 型糖鎖付加) が起こる。これらの翻訳後修飾と EV71 との相互作用を詳細に解析し、チロシン硫酸化が EV71 との結合に必須であることを明らかにした。
- 21) EV71 特異的受容体発現細胞 (L-SCARB2 細胞) の HEV-A に対する感受性を調べる目的で、EV71、CVA12、CVA14 の臨床分離株を細胞に接種したところ、EV71 および CVA14 はすべての株で CPE が認められ感染が成立したが、CVA12 は感染しなかった。EV71 は株によって感染効率が悪い株が存在した。
- 22) EV71 の受容体である SCARB2 を発現する L929 細胞 (L-SCARB2 細胞) を作製し、この細胞が EV71、CVA14、CVA16 に対して感受性であることを明らかにした。L-SCARB2 細胞はこれらのウイルスの特異的な分離に有効である可能性を示した。
- 23) EV71 神経病原性試験やワクチン検定法は確立されていないことが大きな問題であるが、神経病原性を検定可能で操作性の容易なモデル動物はまだ樹立されていない。SCARB2 の発見と培養系での知見を基に SCARB2 を発現する EV71 感受性マウスモデルの確立を開始した。
- 24) 我が国では、OPV から IPV 含有ワクチンへ早急な切り替えが必要とされているが、将来的なポリオワクチン備蓄に関する具体的検討は行われていない。定期予防接種への IPV 含有ワクチンの迅速かつ円滑な導入と平行して、定期外ワクチンとしてのポリオワクチン備蓄の必要性に関する検討が必要とされる。
- 25) アンケート調査により、定期接種でない IPV の接種件数を自治体は把握できていないこと、IPV を個人輸入して接種している医療機関での IPV 接種件数は増加傾向にあり、接種医療機関そのものが増加傾向にあることが判明した。
- 26) 新たな野生株ポリオウイルス保有実態の把握のため、ポリオウイルス関連研究論文について文献検索を行った。継続してリストアップされたのは 1 名で、他の 5 名はポリオウイルスに関わる新たな研究者と見なされた。

A. 研究目的

1990年代後半～2000年代にかけて、マレーシア・台湾・ベトナム等で、また、2008-2010年には中国本土で、多数の小児急性死症例を伴う非ポリオエンテロウイルスによる手足口病の大規模な流行が発生し、アジア地域における大きな公衆衛生上の脅威となっている。我が国では、重症エンテロウイルス71 (EV71) 感染症の大規模な流行は認められていないが、重症エンテロウイルス感染症流行のリスクが常に存在する。このため、重症エンテロウイルス感染症の主たる流行地域であるアジア地域の国々と連携し、国内外における腸管ウイルス感染症サーベイランス体制を整備する。重症エンテロウイルス感染症の診断および予防治療法に関するアジア諸国との研究協力のため、新たなエンテロウイルス検査法の開発・評価を行うとともに、地方衛生研究所を中心とした国内エンテロウイルス実験室ネットワークとアジア地域のウイルス実験室との国際的技術協力・感染症情報共有体制を整備する。エンテロウイルス感染の分子メカニズムに関する研究成果を応用することにより、新たな検査法やエンテロウイルス感染動物モデル開発等、研究基盤の整備を行う。

腸管ウイルス病原体サーベイランスの一環として、アジア太平洋地域におけるポリオフリーを確認し、流行予測調査報告書、WHO年次レポート等により随時報告する。また、我が国において予定されている不活化ポリオワクチン導入において、現行のOPVから不活化ポリオワクチンへの円滑な切り替えに資する基礎的調査研究を行う。

B. 研究方法

重症エンテロウイルス感染症の主たる流行地域であるアジア地域の国々と連携し、国内外における腸管ウイルス感染症サーベイランス体制を整備するため、以下の研究を行った。エンテロウイルス感染の分子メカニズムに関する研究成果を応用した新たな検査法やエンテロウイルス感染動物モデル開発等について、以下の研究を行った。アジア太平洋地域におけるポリオフリーを確認し、我が国における不活化ポリオワクチンへの円滑な切り替えのための調査・研究を行った。また、ポリオウイルス、エンテロウイルス以外の腸管ウイルス感染症（非ポリオエンテロウイルス、パレコウ

イルス、アイチウイルス、ヒトカルジオウイルス等）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) 中国は大都市では流動人口問題を抱え、また日本のような定点サーベイランス網を整備することは困難な状況である。2008年2月から2010年の間、山東省にて分離されたエンテロウイルスのうちエコー6型について地域分布像を解析した。
- 2) 河川水や下水等のウイルス調査は、環境水のウイルス汚染状況を把握するために世界各地で行われている。本調査では、下水流入水のウイルス調査を行い、下水から分離されたポリオウイルスの性状解析を行った。また、エンテロウイルスの下水処理効果を明らかにするために、下水処理工程ごとのウイルス量の変化を調べた。
- 3) アイチウイルス (AiV) の既知の血清型は単一であるが3つの遺伝子型に分類されている。下水中のAiVをRNAポリメラーゼ領域の一部を増幅するRT-PCR法を用いて検査した。
- 4) 2010年4月から9月にかけて、月1回、福岡県北部地区の浄化センター及び南部地区の浄化センターの2箇所において、下水流入水を採取し、分離同定後、塩基配列解析を行った。
- 5) 平成22年度大阪府感染症発生動向調査事業検査定点の医療機関で採取された患者材料を用いた。分離ウイルスはVP1領域を増幅するRT-PCRおよびダイレクトシーケンシングにより血清型を決定した。検体からの直接的検出にはVP4領域を増幅するseminested RT-PCRを行った。
- 6) エンテロウイルス分離によく用いられるRD細胞の安定培養のため、マイコプラズマ汚染をチェックし、マイコプラズマフリーを確認した。培地の種類、牛血清濃度、非必須アミノ酸等、異なった条件で培養し、細胞の状態を観察比較した。
- 7) 2004—2008年にタイの健康なブタ376例から得た血清を使用した。日本とタイのブタコブウイルス陽性便検体から各10検体を選び、VP1領域に新しく設定したprimerで増幅を行い、得られたPCR産物の遺伝子解析を行った。
- 8) 2005年から2008年まで、日本、タイ、スリランカの幼児の下痢便からのヒトパレコウイルスの検出を行い、さらに分子疫学的検討を行った。

- 9) HRVs は、HeLa (Ohio)細胞で増殖させ、その培養上清を用いた。臨床材料としては、来院時、かぜ症状を呈した患者より採取された咽頭ぬぐい液 238 検体を用いた。CODEHOP VP1 RT-snPCR は、Nix らの方法に準じた。
- 10) 手足口病等による入院症例の臨床疫学像を把握するための全国調査を実施している。一次調査により、全国の入院症例数および死亡症例数を推計し、二次調査により、各症例の臨床症状、検査値、病原検索結果などの詳細情報を収集する。
- 11) 研究協力者らが診療した、手足口病様症状に一過性の下肢運動麻痺を合併した症例について臨床症状およびウイルス検査結果をまとめた。
- 12) 2008 年 4 月から 2010 年 10 月までの期間に小児科を受診した小児患者 77 名を対象とした。細菌性髄膜炎を否定、インフルエンザウイルス簡易キット陰性、後部硬直など無菌性髄膜炎の疑いがある熱性痙攣患者由来検体から、ウイルス分離および CODEHOP PCR 法によるエンテロウイルス遺伝子検出を試みた。
- 13) 主として高知県に在住する 488 名の血清を 2010 年 6 月～10 月に採取した。中和抗体測定用のウイルス株については、SAFV-2 は高知県のヘルパンギーナ患者の咽頭ぬぐい液由来 10-534 株、SAFV-3 は 2008 年に無菌性髄膜炎患者髄液から分離された JPN08-404 株、細胞は LLC-MK2 細胞を用いた。
- 14) 高知県で分離された SAFV-3 臨床分離株 JPN08-404 を材料として、Oligo dT (20) プライマーを用いた逆転写反応により、cDNA を作製し、T7 プロモーター配列の下流に SAFV の 5' 末端配列を繋げたプライマーと SAFV の 3' 末端の相補配列を持つプライマーを用いて、long PCR を行い、ウイルスゲノムをクローニングした。
- 15) 感染実験には SAFV-3 を用い、BALB/c 乳のみマウス脳内に 10 μ l 量を接種した。その後 27 日間経過を観察した。接種 3 日目、7 日目、10 日目に各群 2 匹ずつ解剖し、大脳、小脳、脳幹を含む左側脳と全身臓器を病理組織標本とした。
- 16) PV受容体の細胞外ドメインとマウス IgG2a抗体の Fc部分を持つキメラ分子PVR-IgG2aを精製し、ゼラチン粒子に結合させた。
- 17) PV擬似ウイルス粒子を用い、化合物ライブラリーを用いて、複製阻害剤の探索を行った。
- 18) ウイルス非構造タンパク質と相互作用する宿主タンパク質を同定するため、HeLa細胞cDNAライブラリーの酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行った。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相互作用を確認した。
- 19) ヒト末梢血およびヒト臍帯血から、密度勾配遠心によりPBMCsを得た。EV71 PB株、およびnon-PB株のウイルス液は、RD細胞に感染させ、感染後1週間の細胞培養上清を回収した。EV71感染後の細胞は10%FCS含 RPMI1640で2度洗浄し、CO2インキュベーターで培養し、細胞培養上清を適宜回収し、細胞培養上清中の感染性EV71量を、RD細胞を用いた限外希釈法により定量した。
- 20) EV71-PBとPSGL-1との相互作用におけるPSGL-1翻訳後修飾の役割を詳細に解析した。Jurkat細胞を1 CCID₅₀/cellのウイルスで1 h感染させ、洗浄後34°Cで培養した。Sodium chlorateによる硫酸化阻害実験においては、10～30 mMのsodium chlorate存在下で培養したJurkat細胞を用いた。
- 21) 病原体定点においてウイルス感染症を疑い採取された発症初期の検体からVero細胞あるいは哺乳マウスを用いて分離し凍結保存していたEV71 32株、CVA12 8株、CVA14 14株を使用した。L-SCARB2細胞、L929細胞、RD細胞をそれぞれ24wellマルチプレートにまき、細胞にウイルス原液を10倍希釈したウイルス液を接種し、CPEの出現を観察した。
- 22) L-SCARB2細胞がEV71の分離・同定に有用であるかを検討するために、既に分離・同定されているEV71やそれに近縁なA群コクサッキーウイルスの感染に対してL-SCARB2細胞が感受性を示すかを確認し感染の選択性並びに感受性を検討した。
- 23) ヒトSCARB2をマウス培養細胞に発現させるとほぼ全てのEV71株に対する感受性が極めて高くなることから、トランスジェニックとノックイン技術を用いて人工的にヒトSCARB2をマウスの遺伝子に導入し、ヒトでの感染様式と病態を模したEV71感受性マウスを作製する。
- 24) 定期予防接種に用いられるワクチンが、現行のOPVからIPV含有ワクチンに変更される場合、将来的に我が国が必要とされる備蓄ポリオワクチンの種類と必要量に関する検討が必要とされる。ポリオワクチン備蓄の整備がすでに進められている米国の事例、および、WHO等による世界的なポリオワ

チン備蓄の考え方について整理した。

- 25) 2010 年秋に実施した OPV 累積接種率調査の際に、未接種との回答を寄せた小児が居住する自治体の予防接種担当者に対して、OPV 未接種か、すでに IPV 接種を受けたかについて問い合わせ、管轄地域内に IPV 接種医療機関があるか否かの質問を郵送で行った。
- 26) 2007 年～2010 年に公表されたポリオウイルスに関連する研究テーマで発表された論文、日本語並びに英語、を検索することにより、新たなポリオウイルス保有施設の調査を実施した。関連論文の検索には医学中央誌および PubMed を用いた。

【倫理面についての配慮】

本研究で用いた臨床材料の採取は、「疫学研究における倫理指針」に基づき、材料提供者および家族の個人の尊厳及び人権の尊重、個人情報の保護に配慮して実施した。手足口病等による入院症例の臨床調査においては、厚生労働科学研究費補助金・難治性疾患克服研究事業「特定疾患の疫学に関する研究班」によって作成された「難病の患者数と臨床疫学像把握のための全国疫学調査マニュアル第 2 版」に沿って実施した。

すべての動物実験は、動物福祉、実験倫理、飼育環境に出来る限り配慮した上で、「動物の愛護及び管理に関する法律」「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」「国立感染症研究所動物実験委員会規程」等に基づき使用動物数を最小限となるよう実施した。

組換え生物使用実験は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づいて実施した。文部科学大臣の確認が必要とされている組換え生物実験については、事前に「第二種使用等拡散防止措置確認申請書」を提出し、文部科学大臣から、使用する感染動物施設が適切な拡散防止措置を満たすことについての承認を受けたうえで実施した。

C. 研究結果

- 1) 2008-2010 年、E6 は 30 株分離された。30 株の E6 は 2 つのクラスターに分かれ、クラスター間の塩基配列の違いは 20-22%であり、クラスター内での違いは最大 6.3%であった。山東省における代表的な下水由来株 16 株と患者由来 17 株の系統解析を行った。その結果 A-F の 6 つのクラスターに分かれていた。
- 2) 2010 年 4 月から 12 月まで、48 株のポリオウイルスが分離された。ポリオウイルス 3 型 1 株を除き、ワクチン接種時期から約 2 ヶ月の間に検出され、すべて OPV-like ウイルスであった。二次処理水中のウイルス量は流入水よりも 10^{-1} ~ 10^{-2} 少なく、活性汚泥処理後、ウイルス量が減少していた。
- 3) 新型 AiV が存在すると考えられた Y12/04 検体を調べたところ、VP3 領域下流から 3D 領域中流に至る 4,987 塩基の配列が判明した。AiV 標準株との相同性は VP1 領域で 69.1%、2A 領域で 73.6%、以下 2B で 76.8%、2C で 80.0%、3AB で 68.5%、3C で 81.0%、であった。
- 4) 福岡県で下水流入水から分離された 30 株のポリオウイルスはすべてワクチン株であり、1 型が 4 株（北部地区浄化センター 1 株、南部地区浄化センター 3 株）、2 型が 18 株（北部地区 13 株、南部地区 5 株）及び 3 型が 8 株（北部地区 5 株、南部地区 3 株）分離された。
- 5) 大阪府の患者材料 588 検体から培養細胞により 74 株のウイルスが分離され（分離率 12.6%）、RT-PCR により 164 株のウイルスが検出された（検出率 27.9%）。主な流行ウイルスは CoxA2, CoxB2, エコーウイルス Echo6, EV71 であった。
- 6) RD-A 細胞がマイコプラズマに汚染されていないことを確認した。DMEM を使用した場合の方が MEM より細胞の増殖が速いように観察されたが明確な差は見られなかった。7 日目では DMEM を用いた場合のみコンフルエントとなった。
- 7) 健康ブタ血清中のブタコブウイルス検出率は月齢とともに上昇し、4 カ月齢で 47%とピークとなり、6 カ月齢で 47%となった。タイ、日本の陽性検体 20 例の遺伝子解析により、日本とタイの検体の一部は過去のウイルスとは異なるクラスターを作って

- いることがわかった。
- 8) 日本の 247 検体のうち 20 検体 (8.1%) からパレコウイルスは検出された。患者の半数は 18 か月以下であった。スリランカ検体では、362 検体中 30 検体 (8.3%) が陽性であった。1 型が 11 検体、3 型が 1 検体、4 型が 5 検体、5 型が 3 検体、10 型が 5 検体、11 型が 2 検体であった。
 - 9) 感冒症状を呈した患者由来材料 238 検体からヒトのエンテロウイルス 185 株が同定された。185 株のうち、ヒトエンテロウイルス HEV-A 及び HEV-B に属するウイルスが 181 株、HRV に属するウイルスが 4 株であった。4 株の HRV は、何れも HRV-C に属するウイルスで、4 株中 3 株が下気道炎(気管支炎)患者から検出された。
 - 10) 一次調査の対象となったのは 750 診療科である。抽出率は全体として 29.9%であり、392 診療科 (52.3%) から回答を得た。返信率は、各層で 40~60%となっている。報告症例数は 748 症例、うち死亡症例数は 4 例であった。
 - 11) 1 歳 8 か月男児は、両手掌・足底・臀部の発疹、口腔内の丘疹とアフタを認め、手足口病様症状を呈した。糞便検体に由来する CPE 陽性 HEp-2 細胞培養上清は、アデノウイルスと同定された。
 - 12) エンテロウイルス CODEHOP PCR 陽性検体は 33 検体 (20.1%)、検体別に見ると髄液 3 検体 (10.7%)、咽頭ぬぐい液 17 検体 (23.9%)、便検体 (20.1%) であった。Genotype が同定できたのは髄液 1 検体、咽頭ぬぐい液 8 検体、便 5 検体であった。
 - 13) SAFV-2、SAFV-3 の中和抗体陽性率はそれぞれ 71.9% (351/488)、67.4% (329/488)、中和抗体陽性者の抗体価の幾何平均値はそれぞれ $2^{6.6}$ (95.7)、 $2^{6.8}$ (110.9) であった。2010 年は、SAFV-2 が 7 株、SAFV-NT が 1 株検出された。
 - 14) SAFV-3 臨床分離株を元に作製した pSAF404 を鋳型として、T7 RNAP により、SAFV 感染性 RNA の合成を行った。転写終結 PTH シグナルの影響を受けない T7 RNAP の変異体 *CUGA* 7 RNAP を用いて RNA 合成を行ったところ、感染性 RNA であることが確認された。
 - 15) 咽頭拭い液接種群では 8-10 日目に 10 匹中 4 匹、髄液由来株接種群では 9-10 日目に 7 匹中 6 匹が跛行、よろめき歩行、片側への傾斜などを示し、運動失調と判断された。接種 3 日目の脳神経細胞にわずかなウイルス抗原が検出され、同部位に軽微な炎症性細胞浸潤が認められた。
 - 16) PVR-IgG2a を結合させたゼラチン粒子は、PV の存在下で凝集を示した。抗 PV 抗体を用いることで、PV の簡便な同定が可能となった。
 - 17) 高い抗 PV 阻害活性を示す化合物として、T-00127-HEV1 が同定された。T-00127-HEV1 は、ウイルスの耐性変異から enviroxime 様化合物に分類され、特異的な PI4KB 阻害活性を有することを明らかにした。
 - 18) HeLa 細胞 cDNA ライブラリーの酵母ツーハイブリッドスクリーニングにより、3A と相互作用する宿主タンパク質を同定した。哺乳動物細胞ツーハイブリッド解析により、全てのウイルス非構造タンパク質との相互作用を解析したところ、2B、2BC、2C、3AB とも相互作用することが明らかとなった。
 - 19) ヒト白血球表面の PSGL-1 発現を flow cytometry により解析した結果、CD3 陽性 CD4 陽性ならびに CD3 陽性 CD8 陽性 T 細胞の両画分において比較的高レベルの PSGL-1 発現が確認された。PHA 刺激有無の PBMCs に、EV71 PB 株を MOI=10 で接種し、細胞培養上清中の感染性 EV71 量を経時的に測定したが有意な感染は確認されなかった。
 - 20) PSGL-1 を発現させた 293T 細胞を用い、P セレクチン-Fc あるいは EV71 との結合を解析した。T57 を置換した PSGL-1 変異体には、P セレクチン-Fc は結合しなかったが、EV71-PB は結合した。PSGL-1 のチロシン (Y46、Y48、Y51) をフェニルアラニンに置換した変異体を 293T 細胞に発現させ、EV71 との結合を検討したところ、チロシンの硫酸化が阻害され、EV71-PB 結合も低下した。
 - 21) すべての EV71 分離株が L-SCARB2 細胞と RD 細胞に感染し CPE が出現したが、L929 細胞では CPE は認められなかった。CPE の程度を RD 細胞と比較すると、L-SCARB2 細胞での CPE が弱い株が認められ、分離年によっていた。すべての CVA12 株が RD 細胞に感染したが、L-SCARB2 細胞と L929 細胞には感染しなかった。すべての CVA14 分離株が L-SCARB2 細胞と RD 細胞に感染したが L929 細胞では CPE は認められなかった。
 - 22) 全ての EV71 の臨床分離株は、L-SCARB2 細胞におい

て CPE を引き起こした。ウイルス株によって CPE の出現が早い株と遅い株が存在していた。CVA2、CVA3、CVA4、CVA5、CVA6、CVA8、CVA10 および CVA12 は、RD 細胞において CPE を示したが L-SCARB2 細胞および L929 細胞においては CPE を示さなかった。CVA14、16 株は L-SCARB2 細胞において CPE を示したが、1 株は CPE を示さなかった。CVA16 は、供試した全ての株が L-SCARB2 細胞において CPE を示した。

- 23) Bac クローンを C57BL/6 マウス受精卵へマイクロインジェクションし、99 匹の仔マウスのジェノミック PCR を行ったところ 6 匹がヒト SCARB2 遺伝子陽性であった。ヒト SCARB2 遺伝子陽性マウス 2 系統から尾部由来繊維芽細胞を調整し EV71-GFP を感染させたところ GFP 陽性細胞を確認した。ヒト SCARB2 エクソン 4 を置換するためのターゲティングベクターを作製し、C57BL/6 マウス ES 細胞へ導入し、生まれた仔マウスを調べたところ優良キメラマウス 6 匹を得た。
- 24) 米国では、備蓄ワクチンとしての IPV 備蓄の整備が進められており、アウトブレイク対応への必要性から、国際的な単味 OPV 備蓄についても検討が進められている。WHO 等による世界的なポリオワクチン備蓄については、世界的にアクセス可能な、単味 OPV の国際的備蓄体制の整備に向けた計画が進められている。
- 25) 調査依頼書を発送した市区町村から報告された、IPV 接種を受けた OPV 未接種児の数は、関東地方からの 2 例に過ぎなかった。各市区町村の管轄地域に IPV 接種医療機関があるかとの質問に、ありと回答した市区町村は、関東地方 4 ヲ所、北海道、中部地方、近畿地方各 1 ヲ所、合計 7 ヲ所であった。
- 26) 医中誌由来 5 1 報の原著論文から同一著者を除外すると、実質は 3 6 名、他方 PubMed 由来 6 2 報からは 4 8 名が選択された。ウイルス保有の可能性を持つ研究者検索条件に設定した 3 報以上の原著論文を発表した者として医中誌由来研究者 3 6 名のうちから 3 名、PubMed 由来 4 8 名のうちからは 3 名、計 6 名が保有候補者として抽出された。

D. 考察

- 1) 中国ではエンテロウイルスに関するサーベイランスはポリオと手足口病にて確立されているが、他のエンテロウイルス感染症に関しては未確立である。山東省の過去の分離株と環境分離株を比較することで地域伝播の様相についての知見を得た。連携研究を通じ、分離株のゲノム情報を登録することで、国内外のウイルス伝播監視に貢献するものと考えられる。
- 2) 二次処理水中のウイルス量は流入水よりも $10^1 \sim 10^2$ 少なく、活性汚泥処理後、ウイルス量が減少していた。生汚泥に吸着されなかったウイルスは活性汚泥に吸着または取り込まれることで、二次処理水中のウイルス量が減少したことが推測された。
- 3) AiV にも血清型の異なる分離株が存在することが示唆された。新型 AiV が 4 グループに分けられたことから、既知 AiV 以外に多様な新型 AiV が浸淫しているものと思われた。
- 4) 福岡県で下水流入水から分離されたポリオウイルスはすべてワクチン株であり、分離時期はワクチン接種期間中及びその約 2 ヲ月以内であった。両地区で分離されたエンテロウイルスの種類は類似しており、両地域の住民の間で流行していた可能性が推測された。
- 5) 全体として RT-PCR の検出率が高く、CoxA5、CoxA6、CoxA9、EV68 およびライノウイルスは培養細胞では分離されなかった。VP4 領域の PCR は VP1 領域の PCR よりもほぼ 1.4 倍検出感度が高いことが明らかとなった。
- 6) RD-A 細胞の培養には MEM でなく、DMEM を用いることでコンフルエント細胞が得られやすかった。添加 FBS 濃度は 5% でも 10% でも 7 日では大きな違いがなかった。RD-A 細胞の維持管理には DMEM が有効であることが示唆された。
- 7) タイの健康なブタにおいてブタコブウイルスが蔓延していることが再確認され、ウイルスが血清中に漏出していることが確認された。ブタコブウイルスの遺伝子 VP1 領域はいくつかのクラスターに分類することが可能であった。
- 8) 日本、タイ、スリランカでの急性胃腸炎検体を調べた結果、それぞれ 8.1%、14.6%、8.3% にパレ

- コウイルス陽性で、特に6か月から24か月の乳幼児に認められた。10、11型は最初の報告である。
- 9) 検体を採取した時期が主として4月から10月であり、採取時期が冬期感冒の主要な原因ウイルスとされるHRVの検出率に影響している可能性が考えられることから初秋から春先までの期間に採取された検体についてもさらに検討が必要であると思われる。
 - 10) 一次調査の調査票返信率は全体で52.3%であるが、返信率、報告症例数ともに増えることが見込まれる。手足口病流行期間における、エンテロウイルス感染による中枢神経障害の発生頻度、およびその重症度を把握するため、二次調査で報告症例の臨床経過や病原検索結果等の情報を収集する。
 - 11) 手足口病様症状に一過性の運動麻痺を併発した症例を経験した。ウイルス学的検査では、EV71を含めエンテロウイルス属は分離されず、糞便検体でアデノウイルスが陽性であった。本症例の経験より、問題となる症例に対してはウイルス学的検討を実施することが不可欠であることが示された。
 - 12) 無菌性髄膜炎はB群エンテロウイルス検出率が高いが、今回のサンプルでは、コクサッキーA9とエコー30以外はA群エンテロウイルスとライノウイルスであった。唾液、ぬぐい液、便からA群エンテロウイルスが高頻度に検出された。
 - 13) 高知県の中和抗体陽性率は、SAFV-2とSAFV-3について、0-4才では両方25%であったが、8-9才~10-11才では72.9-83.5%、63.5-77.2%と急激な上昇が確認された。抗体価の幾何平均値は全年齢階層中でも8-9才及び10-11才が高い値を示していた。8-11才付近でSAFV-2、SAFV-3感染者が増加していると考えられた。
 - 14) T7 RNAPを利用したSAFVの感染性RNAの合成は、SAFVゲノム上に存在するPTHシグナル相同配列により途中で終結することが明らかとなった。PTHシグナルを認識しないT7 RNAPの変異体を用いるか、または、PTHシグナルを壊す変異を導入する必要があることが示された。
 - 15) 乳のみマウス脳組織にSAFVは感受性を示し、一過性の神経症状を発症させることが明らかとなった。ウイルス抗原の局在から、小脳神経伝達の一時的な傷害を引き起こしていることが推察されるが、今後、詳細な検討が必要である。
 - 16) 今回開発した新規PV同定法は、現在のポリオ根絶計画において有用である可能性がある。
 - 17) PI4KBは、enviroxime様化合物の一つのターゲットであることが明らかとなった。
 - 18) 本研究で得られた宿主タンパク質は2B、2BC、2C、3Aおよび3ABと結合し、アイチウイルスゲノム複製において重要な役割を果たしていることが示唆された。
 - 19) ヒト白血球では高レベルのPSGL-1が発現していたが、EV71 PB株の増殖はほとんど確認できなかった。ヒト白血球でEV71 PB株がほとんど増殖しない理由として、ヒト白血球におけるインターフェロン応答、あるいは、ヒト白血球PSGL-1分子の硫酸化修飾、等の可能性が考えられた。
 - 20) PSGL-1とEV71-PBとの結合には特にY48とY51の硫酸化チロシンが重要である。T57のO型糖鎖やシアリルルイスxはEV71-PBとの結合に不要であった。EV71とPセレクトインは、PSGL-1結合において異なる様式をとることを明らかにした。
 - 21) 2000年以降に臨床検体から分離したEV71 32株すべてがL-SCARB2細胞でCPEを示し感染した。分離株によってCPEに強弱が観察されたが、患者の病態ではなく、分離年と相関が認められた。CVA14のL-SCARB2細胞での感受性については標準株ではL929細胞にも感染することが明らかになっているが、臨床分離株はすべての株がL-SCARB2細胞には感染するがL929細胞には感染しないことが明らかとなった。
 - 22) SCARB2はEV71のみならず、CVA16やCVA14に対する受容体としても機能することが判明した。他のウイルスに対してL-SCARB2細胞は感受性を示さなかったことからL-SCARB2細胞を用いることによって、EV71、CVA16およびCVA14の3種類のウイルスを選択的に分離できる可能性が示された。
 - 23) ジェノミックPCRの結果からヒトSCARB2発現トランスジェニックマウスを6系統作出することができ、2系統では少なくとも繊維芽細胞においてEV71感染を成立させる機能的なヒトSCARB2が発現していると考えられ、マウス個体においてもEV71の感染成立が予想される。キメラマウスが得られたことからターゲット遺伝子が生殖細胞に含まれてい

ると予想される。

- 24) 我が国では、OPV から IPV 含有ワクチンへ早急な切り替えが必要とされているが、将来的なポリオワクチン備蓄に関する具体的検討は行われていない。定期予防接種への IPV 含有ワクチンの迅速かつ円滑な導入と平行して、定期外ワクチンとしてのポリオワクチン備蓄の必要性、および、具体的な備蓄ワクチン整備に関する検討が必要とされる。
- 25) 今回の調査により、定期接種でない IPV の接種件数は、各自治体では把握できていないことが確認できた。IPV 接種医療機関を対象とした調査では、平成 23 年 11 月の IPV 接種件数が 573 件、同 12 月が 880 件と大幅に増加していた。3 ヶ月足らずの間に IPV 接種医療機関が存在する都道府県数は 2 倍になり、接種医療機関数も 2 倍以上に増加していた。
- 26) 2007～2010 年の、ポリオウイルス関連論文検索結果は、2006 年以降にポリオウイルス研究に従事する者と保有の可能性を有する施設との変更状況を把握する上で貴重な情報を提供している。本調査は、あくまでも文献調査に基づくものであり、具体的なフォローアップ調査が必要とされる。

E. 結論

重症エンテロウイルス感染症の主たる流行地域であるアジア地域の国々と連携し、国内外における腸管ウイルス感染症サーベイランス体制を整備し、重症エンテロウイルス感染症の診断および予防治療法を開発するための研究を実施した。アジア地域のエンテロウイルス実験室におけるエンテロウイルス同定・遺伝子解析に関する技術協力を実施した。病原体の国外移動は困難な場合が多いため、当該国で遺伝子解析結果を公開し、エンテロウイルスゲノムデータベース整備を進めた。また、環境サーベイランス手法の開発研究を進め、中国における環境サーベイランス導入のための基盤的研究を実施した。

EV71 特異的受容体である PSGL-1 および SCARB2 の機能解析を進め、受容体機能を利用したエンテロウイルス検査法のへの応用研究や EV71 病原性発現機構解析のための研究を進めた。受容体特異性に基づいた EV71 感染マウスモデルの開発研究を開始した。腸管ウイルス

(ポリオウイルス、エンテロウイルス 71、アイチウイルス、カルジオウイルス) の感染増殖・病原性発現の比較解析に関する研究成果、および、これらの研究を通じて確立された感染動物モデルは、今後、ウイルス感染伝播の分子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。本年度の研究成果で示されたように、ウイルス遺伝子検出あるいはレセプター特異性を用いた新たな手法による病原体検出・同定法の開発が重要である。

近年新たに発見された様々な腸管ウイルスの遺伝子解析により、アジア諸国における腸管ウイルス伝播状況を解析した。今後、特定疾患の流行との関連を含めた、疾患・病原体サーベイランス手法の整備と病原体検出・同定法の改良および標準化が必要である。

ポリオウイルス新規分離検出・同定法を開発し、実用性評価を実施した。ポリオウイルス病原体サーベイランスにより国内のポリオフリーを確認し、WHO 年次報告書を作成提出した。我が国における IPV 導入にむけ、「ポリオワクチンに関するファクトシート」等により、基盤的疫学情報の提供を行った。IPV 含有ワクチンの定期予防接種への導入に向けて、迅速かつ円滑な IPV 導入のための調査研究が必要とされる。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sun LM, Zheng HY, Zhen HZ, Guo X, He JF, Guan DW, Kang M, Liu ZH, Ke CW, Li JS, Liu Leng, Guo RN, Yoshida H, Lin JY. Epidemic of enterovirus 71 infection in Guangdong Province of China, 2008: epidemiologic, clinical and virogenic manifestations *JJID* 64:13-18, 2011.
- 2) Iwai M, Yoshida H, Obara M, Horimoto E, Nakamura K, Takizawa T, Kurata T, Mizuguchi M, Daikoku T, Shiraki K: Widespread circulation of echovirus type 13 demonstrated by increased seroprevalence in Toyama, Japan, between 2000 and 2003. *Clin Vaccine Immunol* 17: 764-770, 2010

- 3) Enomoto M, Fujimoto T, Konagaya M, Hanaoka N, Chikahira M, Taniguchi K, Okabe N: Cultivation for 21 days should be considered to isolate respiratory adenoviruses from samples containing small numbers of adenoviral genomes. *Jpn J Infect Dis.* 63(5): 338-341, 2010.
- 4) Kaneko H, Aoki K, Ohno S, Ishiko H, Fujimoto T, Kikuchi M, Harada S, Gonzales G, Koyanagi K, Watanabe H, Suzutani T: Complete genome analysis of a novel intertypic recombinant human adenovirus causing epidemic keratoconjunctivitis in Japan. *J Clin Microbiol.* 49(2): 484-490, 2010
- 5) Konno M, Yoshioka M, Sugie M, Maguchi T, Nakamura T, Kizawa M, Umegaki Y, Yasutake H, Ishikawa Y, Hanaoka N, Okabe N, Taniguchi K, Shimizu H, Fujimoto T: Fourteen years surveillance of Coxsackie virus group A in Kyoto 1996-2009, by using mouse, RS-18S and Vero cells. *Jpn J Infect Dis.* in press.
- 6) Khamrin P, Maneekarn N, Hidaka S, Kishikawa S, Ushijima K, Okitsu S, Ushijima H. Molecular characterization of kobuviruses in stool samples collected from healthy pigs in Japan. *Infect Gen Evol.* 10:950-954. 2010.
- 7) Pham NT, Trinh QD, Chan-It W, Khamrin P, Shimizu H, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. A novel RT-multiplex PCR for detection of Aichi virus, human parechovirus, enterovirus, and human bocavirus among infants and children with acute gastroenteritis. *J Virol Methods.* 169(1):193-197, 2010.
- 8) Pham NT, Chan-it W, Khamrin P, Nishimura S, Kikuta H, Sugita K, Baba T, Yamamoto A, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. Detection of human parechovirus in stool samples collected from children with acute gastroenteritis in Japan during 2007-2008. *J Med Virol.* 83(2): 331-336, 2011.
- 9) Pham NTK, Takanashi S, Tran DN, Quang DT, Abeysekera C, Abeygunawardene A, Khamrin P, Okitsu S, Shimizu H, Mizuguchi M, Ushijima H. Human parechovirus infection in children hospitalized with acute gastroenteritis in Sri Lanka. *J Clin Microbiol.* 49(1):364-366, 2011.
- 10) Himeda T, Hosomi T, Asif N, Shimizu H, Okuwa T, Muraki Y, Ohara Y: Evasion of a human preproparathyroid hormone (PTH) signal is essential for the synthesis of infectious Saffold virus type 3 RNA by T7 RNA polymerase. *Virol J* (in press)
- 11) Himeda T, Ohara Y: The roles of two non-structural viral proteins in virus-induced demyelination. (投稿中)
- 12) Himeda T, Okuwa T, Nojiri M, Muraki Y, Ohara Y: The anti-apoptotic protein L* of Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) contains a mitochondrial targeting signal. *Virus Res* 155: 381-388, 2011
- 13) Okuwa T, Taniura N, Saito M, Himeda T, Ohara Y: Opposite effects of two nonstructural proteins of Theiler's murine encephalomyelitis virus regulates apoptotic cell death in BHK-21 cells. *Microbiol Immunol* 54: 639-643, 2010
- 14) Himeda T, Okuwa T, Muraki Y, Ohara Y: Cytokine/chemokine profile in J774 macrophage cells persistently infected with DA strain of Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV). *J Neurovirol* 16: 219-229, 2010
- 15) Arita M, Masujima S, Wakita T, Shimizu H. Development of a particle agglutination method with soluble virus receptor for identification of poliovirus. *J Clin Microb* 48: 2698-2702, 2010
- 16) Arita M, Kojima H, Nagano T, Okabe T, Wakita T, Shimizu H. Phosphatidylinositol 4-kinase III beta is a target of enviroxime-like

- compounds for antipoliovirus activity. *J Virol* **85**: 2364–2372, 2011
- 17) Nishimura Y, Wakita T, Shimizu H: Tyrosine sulfation of the amino terminus of PSGL-1 is critical for enterovirus 71 infection. *PLoS Pathog* **6**: e1001174, 2010
- 18) Miyamura K, Nishimura Y, Abo M, Wakita T, Shimizu H: Adaptive mutations in the genomes of enterovirus 71 strains following infection of mouse cells expressing human P-selectin glycoprotein ligand-1. *J Gen Virol* **92**: 287–91, 2011
- 19) Parameswaran P, Sklan E, Wilkins C, Burgon T, Samuel MA, Lu R, Ansel KM, Heissmeyer V, Einav S, Jackson W, Doukas T, Paranjape S, Polacek C, dos Santos FB, Jalili R, Babrzadeh F, Gharizadeh B, Grimm D, Kay M, Koike S, Sarnow P, Ronaghi M, Ding SW, Harris E, Chow M, Diamond MS, Kirkegaard K, Glenn JS, Fire AZ. : Six RNA viruses and forty-one hosts: viral small RNAs and modulation of small RNA repertoires in vertebrate and invertebrate systems. *PLoS Pathog.* **6**(2):e1000764, 2010
- 20) Koike S, & Nomoto A: Poliomyelitis. In *The Picornaviruses*, ed. E. Ehrenfeld, E. Domingo, & R.P. Roos. Washington DC, ASM press. 339–351, 2010
- 21) Sato K, Nie C, Misawa N, Tanaka Y, Ito M, Koyanagi Y. Dynamics of memory and naive CD8⁺ T lymphocytes in humanized NOD/SCID/IL-2R^{gnull} mice infected with CCR5-tropic HIV-1. *Vaccine*, **28**S2:B32–37, 2010
- 22) Sato K, Izumi T, Misawa N, Kobayashi T, Yamashita Y, Ohnishi M, Ito M, Takaori-Kondo A, Koyanagi Y. Remarkable lethal G-to-A mutations in vif-proficient HIV-1 provirus by individual APOBEC3 proteins in humanized mice. *J. Virol.* **84**:9546–9556, 2010
- 23) Zhang Y, Wang H, Zhu S, Li Y, Song L, Liu Y, Liu G, Nishimura Y, Chen L, Yan D, Wang D, An H, Shimizu H, Xu A, Xu W. 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, 2010
- 24) 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
- 25) Miyoshi M, Yoshizumi S, Jinushi M, Ishida S, Okui T, Okano M, Shouji M, Tanaka S, Saigusa J, MorH, Yamaguchi R, Nishimura, Y, Shimizu H. A case of paralytic poliomyelitis associated with poliovirus vaccine strains in hokkaido, Japan. *Jpn J Infect Dis* **63**: 216–217, 2010
- 26) Country Progress Report on Maintaining Polio-free Status, Japan: WHO report, 2010
- 27) A Guide to Clinical management and Public Health Response for Hand Foot Mouth Disease (HFMD), draft WHO report, 2010

- 1) 岩井雅恵、堀元栄詞、小原真弓、小淵正次、倉田毅、川越久美子、中村純香、清水博之、吉田弘 滝澤剛則：2010年に富山県で検出されたエコーウイルス30型の遺伝子解析. 病原微生物検出情報月報 31: 298-300, 2010
- 2) 岩井雅恵、堀元栄詞、小原真弓、長谷川澄代、倉田毅、中村純香、高田厚史、南部厚子、清原美千代、春木加奈、植田陽子、滝澤剛則：ポリオ流行予測調査(平成21年度). 富山県衛生研究所年報 33: 82-87, 2010
- 3) 水谷絵美 安達啓一 藤原範子 伊藤 雅 山下照夫 藤浦 明 皆川洋子、2006年から2010年に流入下水から分離されたエンテロウイルスの消長、愛知県衛生研究所報 61, 2011
- 4) 榎本美貴、高井伝仕、藤本嗣人、近平雅嗣：兵庫県におけるポリオ感染源調査(2002年～2009年)―健常児の糞便からのウイルス分離―. 兵庫県立健康生活科学研究所健康科学研究センター研究報告. 1: 5-8, 2010.
- 5) 藤本嗣人、花岡希、安井良則、小長谷昌未、岡部信彦、高崎智彦、清水博之：エンテロウイルス遺伝子が検出されEV71抗体上昇が確認された急性脳炎(辺縁系脳炎)症例、2010年4月. 病原微生物検出情報. 31: 235, 2010.
- 6) 中村雅子、平野映子、小和田和誠、石畝史、望月典郎、藤本嗣人、花岡希、谷口清州、岡部信彦、山岸善也：2004～2009年の6年間における流行性角結膜炎患者113名からのアデノウイルス検出―福井県. 病原微生物検出情報, 31: 237-238, 2010.
- 7) 近野真由美、吉岡政純、杉江真理子、馬口敏和、中村剛、木澤正人、梅垣康弘、安武廣、木戸毅、三宅健市、石川和弘、藤本嗣人：14年間(1996年～2009年)におけるコクサッキーA群ウイルスの乳のみマウス、RD-18SおよびVero細胞による分離状況―京都市. 病原微生物検出情報, 32: 20-21, 2011.
- 8) 山崎謙治、中田恵子：エンテロウイルス71による手足口病の成人例. 小児科 52: 377-381, 2011
- 9) 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
エコーウイルス30型髄膜炎における髄液および血清中サイトカイン/ケモカイン解析. 日本小児科学会雑誌 114巻3号, P479-484, 2010年3月.
- 10) 佐藤 佳、小柳義夫 HIV-1のウイルス-宿主相互作用と新規治療薬の開発 実験医学 28, 2961-2968, 2010
- 11) 清水博之：世界ポリオ根絶の失われた10年とポリオ根絶計画のこれから. ウイルス 60: 49-58, 2010
- 12) 高山直秀, 崎山弘, 清水博之, 宮村達男, 岡部信彦 梅本哲. 麻疹ワクチン、風疹ワクチン、ポリオ生ワクチン全国累積接種率 - 2008年度調査結果-. 小児科臨床 63: 1127-1134, 2010
- 13) 清水博之：不活化ポリオワクチン. 小児内科 42: 1949-1952, 2010
- 14) 清水博之：ポリオウイルス. 日本臨床 68: 422-426, 2010
- 15) 清水博之：エンテロウイルス. 日本臨床 68: 427-430, 2010
- 16) 清水博之、「急性灰白髄炎(ポリオ)」の項を担当、分子予防環境医学研究会編、分子予防環境医学、改訂版 201-209、東京、本の泉社、2010
- 17) 清水博之、「急性灰白髄炎とポリオ様疾患」の項を担当、家庭医学大全科、六訂版 2632-2633、東京、法研、2010
- 18) 第11回厚生科学審議会感染症分科会予防接種部会資料「ポリオワクチンファクトシート」、2010

2. 学会発表

- 1) 岩井雅恵、小原真弓、堀元栄詞、倉田毅、滝澤剛則、高井宗央、山本博英：下水流入水中の腸管系ウイルスの季節消長と下水処理工程ごとのウイルス量の変化. 第47回下水道研究発表会. 名古屋市、2010年7月
- 2) 山下照夫、伊藤 雅、皆川洋子：新型アイチウイルス遺伝子の検出、第57回日本ウイルス学会学術集会 東京 2009年10月
- 3) 水谷絵美、安達啓一、藤原範子、伊藤 雅、山下照夫、藤浦 明、皆川洋子：流入下水から分離されるエンテロウイルスについて、第58回

- 日本ウイルス学会学術集会 徳島 2010年10月
- 4) 山崎謙治、中田恵子: 日本国内における急性胃腸炎患者からのピコビルナウイルスの検出. 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島市、2010年10月
 - 5) 藤本嗣人: パネルディスカッション1 感染症の遺伝子診断の進歩と今後の方向性: ウイルス疾患 (アデノウイルスなど) の迅速疾患. 第84回日本感染症学会総会学術集会. 京都市2010年4月
 - 6) 藤本嗣人、小長谷昌未、清水英明、石丸陽子、谷口清州、岡部信彦: インフルエンザ A/H1pdm の新規超高速 PCR (Hyper-PCR) による短時間検出同定. 第84回日本感染症学会総会学術集会. 京都市2010年4月
 - 7) 藤本嗣人、谷口清州、岡部信彦: インフルエンザ A H1N1 パンデミック時の他項目ウイルス検索. 第51回日本臨床ウイルス学会. 高松市2010年6月
 - 8) 藤本嗣人: 日本のアデノウイルス感染症サーベイランス. 第11回日本アデノウイルス研究会シンポジウム. 東京都2010年10月
 - 9) 中村 雅子、平野 映子、小和田和誠、石畝 史、望月 典郎、藤本 嗣人、花岡 希、岡部 信彦: アデノウイルス 54 型と 53 型の福井県への侵淫状況. 第58回日本ウイルス学会学術総会. 徳島市2010年11月
 - 10) 林 昌宏、藤本嗣人、小長谷昌未、モイ メンリン、小滝徹、倉根一郎、高崎 智彦: 近年のチクングニヤ熱の流行と迅速診断法の検討. 第58回日本ウイルス学会学術総会. 徳島市2010年11月
 - 11) Khamrin P, Okitsu S, Ushijima H. Molecular epidemiology of human and animal kobuviruses 第51回日本臨床ウイルス学会 (2010. 6. 19-20) 高松
 - 12) Pham TKN, Chan-it W, Khamrin P, 清水英明、沖津祥子、牛島廣治. Human parechovirus from stool in Japan, Thailand, and Sri Lanka, 2005-2008. 第58回日本ウイルス学会学術集会 (2010. 11. 7-9) 徳島
 - 13) Pham NTK, Thongprachum A, Nishimura S, Sugita K, Baba T, Yamamoto A, Kikuta H, Okitsu S, Ushijima H. Detection and molecular characterization of human parechovirus from stool samples collected from children with acute gastroenteritis in Japan during 2007-2008. 第7回日本小児消化管感染症研究会 (2011. 2. 12) 大阪
 - 14) Khamrin P, Okitsu S, Ushijima H. Molecular epidemiology of human and animal kobuviruses 第51回日本臨床ウイルス学会 (2010. 6. 19-20) 高松
 - 15) Pham TKN, Chan-it W, Khamrin P, 清水英明、沖津祥子、牛島廣治. Human parechovirus from stool in Japan, Thailand, and Sri Lanka, 2005-2008. 第58回日本ウイルス学会学術集会 (2010. 11. 7-9) 徳島
 - 16) Pham NTK, Thongprachum A, Nishimura S, Sugita K, Baba T, Yamamoto A, Kikuta H, Okitsu S, Ushijima H. Detection and molecular characterization of human parechovirus from stool samples collected from children with acute gastroenteritis in Japan during 2007-2008. 第7回日本小児消化管感染症研究会 (2011. 2. 12) 大阪
 - 17) 吾郷昌信、山口顕徳、平野 学、吉川 亮、西村順裕、清水博之: ヒトライノウイルスの高感度検出同定法. 第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年 (徳島)
 - 18) 町田早苗、西村順裕、清水博之: 無菌性髄膜炎を疑う熱性痙攣小児患者からのエンテロウイルスの検出. 第58回日本ウイルス学会学術集会. 徳島市. 2010年11月
 - 19) Ohara Y, Himeda T, Okuwa T, Muraki Y: The profile of cytokine expression involved with virus persistence and virus-induced demyelination. 第10回 国際神経免疫学会、バルセロナ、2010年10月
 - 20) Himeda T, Nojiri M, Okuwa T, Muraki Y, Ohara Y: Mitochondrial targeting of anti-apoptotic protein L* of Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV).

- Europic2010, セントアンドリュース, 2010年9月
- 21) 姫田敏樹、大桑孝子、村木 靖、大原義朗: タイラーウイルス抗アポトーシス蛋白L*のミトコンドリア移行. 第58回 日本ウイルス学会、徳島市、2010年11月
- 22) 姫田敏樹、大桑孝子、村木 靖、大原義朗: タイラーウイルス抗アポトーシス蛋白L*の細胞内局在. 第47回 日本細菌学会中部支部総会、新潟市、2010年10月
- 23) 大原義朗、姫田敏樹、大桑孝子、村木 靖: タイラーウイルス持続感染において特異的に変動するサイトカイン産生. 第15回 神経感染症学会、福島市、2010年10月
- 24) Sato K, and Koyanagi Y. A novel HIV-1 infection model using humanized mice, 1st international young investigator symposium, Kumamoto, Japan, 2010
- 25) Sato K, Izumi T, Misawa N, Ito M, Takaori-Kondo A, Koyanagi Y. Evidence for HIV-1 G-to-A hepermutation in vivo by Apobec3 proteins. Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2010
- 26) Sato K. A novel animal model for active EBV infection in humanized mice, The 16th East Asia Joint Conference on Biomedical Research, Taipei, Taiwan, 2010
- 27) Sato K, Misawa N, Nie C, Satou Y, Matsuoka M, Ito M, Koyanagi Y. Investigation of HIV-1 pathogenesis in humanized mice. 14th International Congress of Immunology, Kobe, 2010
- 28) Iwami S, Sato K, Misawa N, Kobayashi T, Rob J. de Boer, and Koyanagi Y. DNA labeling system by peripheral blood of humanized mouse, the 2nd synthetic immunology workshop, Kyoto, Japan, 2010.
- 29) Sato K, Izumi T, Misawa N, Kobayashi T, Ito M, Takaori-Kondo A, and Koyanagi Y. G-to-A mutations in HIV-1 provirus by APOBEC3 proteins contribute to abrogation of virus replication in humanized mice, 第10回あわじしま感染症・免疫フォーラム, 淡路島, 2010
- 30) 佐藤佳, 岩見真吾, 三沢尚子, 伊藤守, 小柳義夫. ヒト化マウス末梢血によるDNAラベリング系の確立 - 動物実験 -, 第20回日本数理生物学会大会, 札幌, 2010.
- 31) 岩見真吾, 佐藤佳, Rob J. de Boer, 小柳義夫. ヒト化マウス末梢血によるDNAラベリング系の確立 - 数理モデル -, 第20回日本数理生物学会大会, 札幌, 2010
- 32) 佐藤佳, 三沢尚子, Chuanyi Nie, 佐藤賢文, 松岡雅雄, 高橋玲, 伊藤守, 高田賢蔵, 小柳義夫. ヒト化マウスを用いたEBV関連血球貪食性リンパ組織球症モデルマウスの確立, 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島, 2010
- 33) Sato K, Koyanagi Y, Remarkable and lethal G-to-A mutations in wild-type HIV-1 provirus by individual APOBEC3 proteins in infected humanized mice model. 第24回日本エイズ学会学術集会、東京、2010
- 34) Nishimura Y, Wakita T, Shimizu H: Tyrosine sulfation of the amino terminus of PSGL-1 is critical for enterovirus 71 infection. 16th Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses. St. Andrews, UK, 2010年9月
- 35) 西村順裕、脇田隆宇、清水博之: コクサッキーA16型ウイルスの白血球系細胞株における増殖の解析. 第58回日本ウイルス学会. 徳島市、2010年11月
- 36) 山吉誠也、小池智: エンテロウイルス71受容体 Scavenger receptor B2の同定と機能解析 第13回日本神経ウイルス研究会 2010年1月 岩手県安比高原
- 37) 鳥羽優子、小池智: ポリオウイルス感染によるIFN応答にはTLR3経路が最も重要である 第13回日本神経ウイルス研究会 2010年1月 岩手県安比高原
- 38) 山吉誠也: エンテロウイルス71の感染受容体 SCRAB2の機能領域の解析 第7回ウイルス学キャンプ in 湯河原、熱海市、2010年8月
- 39) 清水博之: 腸管ウイルス感染症の現状と実験

- 室診断、野生株ポリオウイルスの実験室封じ込め。平成21年度希少感染症診断技術研修会、東京、2010
- 40) Yamayoshi, S., & Koike, S.: Important region of human SCARB2 for an efficient Enterovirus 71 infection, The 10th Awaji International Forum of Infection and Immunity. Awaji Yumebutai International Conference center, Awaji, Hyogo, 2010.9.8
- 41) Yamayoshi, S., & Koike, S.: Identification of important region of human SCARB2 for an Enterovirus 71 infection. XVIth Meeting of European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses (EUROPIC 2010) St Andrews, Scotland, 2010.9.
- 42) Abe, Y., & Koike, S.: Toll like receptor 3 is the most important sensor for poliovirus infection in mice. XVIth Meeting of European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses (EUROPIC 2010) St Andrews, Scotland, 2010.9.
- 43) Koike, S.: Scavenger receptor B2: a cellular receptor for enterovirus 71. The 2nd International Symposium on Vaccine from Research to Product Launch. Zhunan Town, Miaoli, Taiwan, 2010.10.
- 44) Koike S.: Identification and functional analysis of a cellular receptor for enterovirus 71 (Scavenger receptor B2). Symposium on Receptor, Immunopathogenesis, and Therapy of Enterovirus 71 Infection. Tainan, Taiwan, 2010.10.
- 45) Asif N, Hosomi T, Nishimura Y, Umami RN, Kobayashi S, Zaidi S, Shimizu H: Human Cardioviruses (Saffold viruses): Epidemiology of different genotypes and growth in cell culture, 16th Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses. Scotland, 2010
- 46) Nishimura Y, Miyamura K, Shimizu H: Characterization of cellular and viral factors involved in PSGL-1-dependent viral replication of enterovirus 71. EV71 workshop at National Cheng Kung University, Taiwan, 2010
- 47) Nishimura Y, Miyamura K, Shimizu H: Involvement of host and viral factors for interaction of PSGL-1 with enterovirus 71. The 2nd International Vaccine Symposium, Taiwan, 2010
- 48) Mistry N, Inoue H, Storm R, Shimizu H, Koike S, Arnberg N: Coxsackievirus A24 variant uses O-linked glycoconjugates with terminal sialic acid as cellular receptors on human ocular cells. 16th Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses. Scotland, 2010
- 49) Shimizu H: Laboratory Diagnosis of Enterovirus 71 Infection, Informal Consultation Meeting for Hand Foot Mouth Disease, Malaysia. 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況

3. その他

遺伝子配列のGenBankへの登録

GU272016

GQ329778-GQ329785, HQ399470-HQ399495,

HQ829944-HQ829961.

AB610510 ~AB610545