

201123030A

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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 清水 博之

平成 24 年 (2012 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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 清水 博之

平成 24 年 (2012 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. 下水流入水中の腸管系ウイルス検出状況 (2011 年次) および下水中のウイルス濃縮
方法の検討----- 23
岩井雅恵 (富山県衛生研究所)
3. 下水から検出されるアイチウイルスの遺伝子型別と消長 ----- 29
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 ----- 36
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 ----- 40
山崎謙治 (大阪府立公衆衛生研究所)
6. 2011 年に手足口病を引き起こしたコクサッキーウイルス A 群 6 型----- 46
藤本嗣人 (国立感染症研究所 感染症情報センター)
7. タイ国の小児下痢症便からのサフォールド・カルジオウイルスの検出----- 52
牛島廣治 (日本大学医学部)
8. タイ国の成人下痢症患者からのコサウイルスの検出と特徴----- 56
牛島廣治 (日本大学医学部)
9. タイ国の健康なブタ血清中のブタコブウイルス----- 60
牛島廣治 (日本大学医学部)
10. エンテロウイルス 71 型およびコクサッキーウイルス A6 型に対する新規抗エンテロ
ウイルス剤 MRL-1237 の抗ウイルス作用----- 64
吾郷昌信 (長崎県環境保健研究センター)
11. 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----- 71
福島若葉 (大阪市立大学)
12. 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----- 81
中野貴司 (川崎医科大学)
13. 無菌性髄膜炎を疑う小児患者からのエンテロウイルスの検出----- 84
町田早苗 (埼玉医科大学)

14. Saffold virus に関する研究 (ヒト・動物の SAFV 調査、SAFV2 と SAFV3 間の免疫交差反応性検討、アンホテリシン B 添加による SAFV の分離高感度化検討) -----	87
細見卓司 (高知県衛生研究所)	
15. ヒトカルジオウイルス (Saffold ウイルス) の病原性解析<第二報> -----	97
大原義朗 (金沢医科大学)	
16. 新規カルジオウイルスの病理学的診断法に関する研究 -----	101
永田典代 (国立感染症研究所 感染病理部)	
17. ポリオウイルス新規中和抗体価測定法の開発 -----	104
有田峰太郎 (国立感染症研究所 ウイルス第二部)	
18. アイチウイルス複製機構の解析 -----	105
佐々木 潤 (藤田保健衛生大学)	
19. エンテロウイルス71感染増殖解析のための数理モデルに関する研究 -----	107
小柳義夫 (京都大学ウイルス研究所)	
20. 受容体 PSGL-1 結合性を規定する EV71 キャプシドアミノ酸の同定 -----	113
西村順裕 (国立感染症研究所 ウイルス第二部)	
21. Human enterovirus A 臨床分離株を用いた L-SCARB2 細胞感染実験 -----	118
飯塚節子 (島根県保健環境科学研究所)	
22. 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 -----	123
小池 智 (東京都医学総合研究所)	
23. 経口生ポリオワクチン 1 回目及び 2 回目接種の全国累積接種率：2011 年調査結果 -----	135
高山直秀 (東京都立駒込病院)	
24. 不活化ポリオワクチン接種者数に関する調査：2011 年度の調査結果 -----	138
高山直秀 (東京都立駒込病院)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧 -----	149

厚生労働科学研究費補助金

平成23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 板持 (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 日本大学医学部 京都大学ウイルス研究所 (財) 東京都医学総合研究所
研究協力者:	Tao Zexin, Wang Haiyan, Li Yan, Xu Aiqiang 山下照夫、廣瀬美、安達啓一、伊藤 雅、平松礼司、皆川洋子 世良暢之、石橋哲也、前田詠里子、吉富秀亮 中田恵子、左近直美 花岡 希、小長谷昌未、木村 愛 榎本美貴 小林正明 近野由美、吉岡敏純、杉江真理子、馬口敏和、中村 剛、木澤正人、梅垣康弘、石川和弘 沖津祥子 Ngan Thi Kim Pham Pattara Khamrin 吾郷昌信 福島若葉、武知茉莉亜、乾未来 中野貴司 福島慎二、濱田篤郎、水野泰孝 細見卓司 大原義朗、姫田敏樹 永田典代、鈴木忠樹、小谷 治 佐々木 潤 佐藤 佳 岩見真吾 福原充子 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	中国山東省 CDC 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 兵庫県立健康生活科学研究所 小林小児科 京都市衛生環境研究所 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 東京医科大学病院 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 九州大学理学研究院 京都大学理学部 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 (財) 東京都医学総合研究所 山形県衛生研究所

西村秀一
多屋長治、設楽浩志、島貫碧
高山直秀

仙台医療センター・仙台ウイルスセンター
東京都医学総合研究所・遺伝子改変動物室
東京都立駒込病院

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) 中国山東省で検出された下水由来エンテロウイルスの遺伝子解析により、クラスターの分岐年代と検出年との時間差から地域における流行期間を推定した。
- 2) 下水流入水中のウイルス濃縮方法を検討するために、「フィルター吸着溶出法」及び「PEG 沈殿法」による、ポリオウイルス等の検出件数を比較した。すべてのウイルスで「フィルター吸着溶出法」の方がウイルス分離株数や検出件数が多かった。
- 3) 2006～2011年に愛知県で採取された流入下水 274 件中 158 件 (57.7%) からアイチウイルス遺伝子が検出された。A 型は 130 件 (47.4%)、B 型は 30 件 (10.9%)、C 型は 0 件であった。
- 4) 福岡県内の流入水から、ポリオウイルスが接種時期及びその 3 ヶ月後まで分離された。分離されたポリオウイルスは全てワクチン株であった。
- 5) 平成 23 年度における小児のエンテロウイルス感染症で特徴的であったのは手足口病の大流行であり、コクサッキーウイルス A6(CVA6)が新たな原因ウイルスとして位置づけられた。
- 6) 2011 年に分離した CVA6 代表株の全塩基配列を決定して DDBJ に登録した。
- 7) チェンマイ 150 名の小児胃腸炎児におけるサフォールド・カルジオウイルスを分子疫学的手法で調べた。4 名 (2.7%) が陽性であった。すべて他の下痢症ウイルスとの混合感染であった。
- 8) タイ国においてそれぞれ 150 名の下痢症小児および成人の便から RT-PCR でヒトコサウイルスの疫学解析を行った。1 名の成人で陽性であり、ヒトコサウイルス遺伝子型 D に属していた。
- 9) タイの健康なブタから 2003-2008 年に採取した血清からブタコブウイルス RNA を検出した。検出率は 19% で、4 カ月齢と 6 カ月齢で検出率が高かった。
- 10) 新規抗エンテロウイルス剤 MRL-1237 の *in vitro* における抗ウイルス効果について CPE inhibition assay により検討したところ、EV71 および CVA6 の増殖を阻害した。
- 11) 手足口病、ヘルパンギーナおよび関連合併症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。一次調査の結果、2010 年の HFMD 流行期である、4～9 月の入院患者数は、4,273 人と推計された。
- 12) 不活化ポリオワクチン(IPV)導入に際して、成人への IPV 追加接種が想定されるため、免疫原性と安全性について検討を開始した。
- 13) 無菌性髄膜炎を疑う小児患者の検体から CODEHOP PCR 法で高率にエコー 6 型が検出され、そのうち 2 検体の髄液からエコー 6 型が分離された。
- 14) 2010～2012 年の高知県における患者検体からのサフォールドウイルス(SAFV)検出陽性は 17 検体(1.3%)で、うち、塩基配列解析に成功した 11 株総てが SAFV2 であった。
- 15) SAFV カプシド蛋白の組換えが起る可能性は低いことが示された。また、SAFV leader 蛋白は、TMEV leader 蛋白と同様、IFN 産生抑制能を有しており、ウイルスの増殖に重要な役割を担っていることが示唆された。
- 16) 各種エンテロウイルス抗体、カルジオウイルス抗体の交差反応性について検討し、ホルマリン固定標本パラフィン包埋切片上の SAFV3 抗原を検出するシステムを確立した。

- 17) 疑似ウイルス粒子を用いたポリオウイルス新規中和抗体価測定法を開発した。
- 18) アイチウイルス複製に関与する二つの宿主因子、ACBD3あるいはPI4KBを同定し、ウイルスタンパク質/ACBD3/PI4KB複合体形成がウイルスRNA複製に重要な役割を果たすことを明らかにした。
- 19) 実験科学と数理科学の融合により、EV71の複製ダイナミクスを定量的に解析する実験手法を開発し、EV71株の複製における動的なパラメーターを定量的に算出した。
- 20) PSGL-1結合性を規定する、EV71キャプシドアミノ酸を解析した。その結果、VP1領域の二箇所のアミノ酸によりPSGL-1結合性が決定することを明らかにした。
- 21) L-SCARB2細胞のHuman enterovirusAに対する感受性を解析したところ、CVA16はすべての株でCPEが認められ感染が成立したが、CVA3、5、6、8は感染しなかった。
- 22) EV71受容体SCARB2を発現するL-SCARB2細胞を作製し、EV71の特異的分離に利用できるかどうか調べた。CVA7、CVA14、CVA16が、SCARB2を共通のレセプターとして利用することを証明した。
- 23) ヒトSCARB2発現トランスジェニックマウスの作製を試みた。SCARB2トランスジェニックマウスはEV71感受性を獲得すること、ヒトと同様に中枢神経系に急性の病変を生じ、弛緩性麻痺または運動失調などの神経症状を呈することを見いだした。
- 24) 2歳児を対象として経口生ポリオワクチン(OPV)1, 2回目の累積接種率調査を実施した。2010年の調査では、生後24ヵ月における累積接種率は、それぞれ、96.3%および85.4%であった。
- 25) 医療機関を対象にしてIPV接種件数調査を実施した。2011年のIPV接種件数および接種医療機関数は昨年より大幅に増加しており、保護者のIPVへの需要は日を追って増大しているものと推測された。

A. 研究目的

1990年代後半～2000年代にかけて、マレーシア・台湾等で、また、2008-2010年には中国本土で2011-2012年にかけてはベトナムにおいて、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、死亡例を含むEV71重症例が散発的に報告されており、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必要がある。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・病原体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国内外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。不活化ポリオワクチン移行期におけるポリオサーベイランス等に関する基盤的調査研究を行う。

B. 研究方法

- 1) 陰電荷膜を用いて下水を濃縮後、ウイルス分離を行った。山東省の環境由来エコー6型株16、AFP患者、無菌性髄膜炎患者由来株19、Genbankより得られた43株に関するVP1領域の塩基配列情報を用いた。BEASTを用いてベイズMCMCにより分岐年代の推定を行った。
- 2) 2006年7月から2011年12月まで、富山県内西部地区に位置する下水処理場において、月1回下水流入水を採取した。下水流入水より「フィルター吸着溶出法」あるいは「ポリエチレングリコール(PEG)沈殿法」によりウイルスを濃縮した。
- 3) 2006～2011年の5年間に愛知県で毎週採取された、流入下水274件を材料とした。濃縮液から核酸抽出しAiV特異的プライマーを用いてRT-PCRを実施し、クローニング後塩基配列を決定した。
- 4) 平成22年4月から平成23年9月まで、毎月1回、

- 福岡県北部及び南部地区の浄化センターにおいて、下水流入水を採取した。下水流入水由来ポリオウイルス分離株は RT-PCR で増幅、塩基配列を決定しワクチン株の配列と比較した。
- 5) 大阪府感染症発生動向調査事業に基づき手足口病の疫学的解析、分離株の塩基配列登録を実施した。
 - 6) 静岡県の手足口病患者から分離された CVA6 について RT-PCR およびサンガー法により全塩基配列を決定した。京都市、兵庫県等で採取された CVA6 株について VP4 領域を比較して系統解析した。
 - 7) 2007 年 1 月から 12 月までチェンマイの病院に入院した 150 名の小児の下痢便を用い SAFV 特異プライマーを用いた 5' UTR 領域 nested PCR を実施した。
 - 8) 2008 年 1 月から 12 月までチェンマイのそれぞれ 150 名の小児、大人の患者下痢便を用いた。ヒトコサウイルス(HCoSV)検出用 RT-nested PCR を行った。
 - 9) タイ国チェンマイ地方の農場で 2003-2008 年に採取した健康なブタ 376 例から得た血清を対象とした。RNA を抽出し、コブウイルス特異的 PCR プライマーで増幅し、陽性検体の一部について遺伝子配列を解析した。
 - 10) MRL-1237 の抗ウイルス活性を CPE inhibition assay により測定した。EV71 は標準株および臨床分離株を用い、2011 年の手足口病流行時に分離された CVA6 臨床分離株を使用した。
 - 11) 手足口病、ヘルパンギーナ、および関連合併症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。全国の病院の小児科から、層化無作為抽出法にて病床規模別に選定した。一次調査票を用いて入院症例数と死亡症例数の情報を収集し、患者数を推定した。二次調査では調査個人票により臨床疫学特性に関する情報を収集した。
 - 12) IPV 接種臨床研究は、20 歳以上の成人を対象とし Imovax Polio® を 4 週間間隔で 2 回接種する。血清中和抗体価を、接種前、2 回目接種前、2 回目接種の 4 週間後、計 3 回の検体について測定する。
 - 13) 2011 年に埼玉医科大学小児科を受診した小児患者に由来する、髄液 17 検体、咽頭拭い液 15 検体、14 便検体、計 46 検体を用いて、COODEHOP PCR 法によるエンテロウイルス遺伝子検出および Vero 細胞等によるウイルス分離を行った。
 - 14) 2010～2012 年の感染症発生動向調査の 1,287 検体について SAFV 遺伝子検出を行った。動物血清中の SAFV3 中和抗体保有状況および SAFV 遺伝子検出を実施した。SAFV2 株および SAFV3 株を用いて、交差中和活性を解析した。
 - 15) SAFV 感染性 cDNA クローンおよび TMEV クローンを材料とし、カプシドあるいは leader 蛋白質領域におけるキメラウイルスの作製を試みた。
 - 16) SAFV 感染乳のみマウス脳組織を用いて、SAFV3 型高度免疫ウサギ血清を一次抗体としたストレプトアビジン-ビオチン(sABC)法を検討した。他のピコルナウイルス感染材料を用いて、sABC法による交差反応性を評価した。
 - 17) PV1,2,3型のカプシドを持つ擬似ウイルス粒子を作製し、ヒト血清中の抗PV中和抗体価の新規測定系を開発した。
 - 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酵母two-hybridスクリーニングにより探索した。タンパク質間相互作用は哺乳動物細胞two-hybrid解析および免疫沈降により解析した。ウイルスタンパク質および宿主タンパク質の細胞内局在を解析し、siRNAによるノックダウンによりウイルス複製への影響を調べた。
 - 19) ヒトRD細胞の倍加時間を、細胞数計数および数理科学解析により推定した。EV71 1095株、KED005株、02363株のウイルス液をMOI 0.01で感染させ、i) 培養上清中のウイルス量、ii) 感染細胞数、iii) 非感染細胞数をそれぞれ算出し、数理科学解析に用いた。
 - 20) EV71-1095およびEV71-02363を基にゲノム全長をRT-PCRにより増幅し感染性クローンを作製した。アミノ酸変異はPCRによるsite-directed mutagenesisにより導入した。In vitro transcriptionによりRNAを合成し、RD細胞にトランスフェクションし、組替えウイルスを含む培養液を回収した。
 - 21) 島根県感染症発生動向調査由来検体から、Vero細胞あるいは哺乳マウスを用いて分離した臨床分離株を用いた。L-SCARB2細胞に検体 100 μ l/well を接種し、CPE が出現したら抗血清で型別同定、2代継代しCPE が認められなければ分離陰性と判定した。
 - 22) RD細胞のSCARB2発現をsiRNAにより抑制し、

ウイルス抗原陽性細胞数を比較することで、CVA7、CVA14、CVA16のSCARB2依存的感染を検証した。SCARB2細胞外領域と可溶性SCARB2-Fcを用いた免疫沈降法により、ウイルスとSCARB2との結合を確認した。

- 23) ウェスタンブロット法や免疫組織化学によりヒトSCARB2トランスジェニックマウスのSCARB2タンパク質発現分布を解析した。EV71を異なる経路で接種し、神経病原性発現の有無を観察し、組織中ウイルス力価測定およびウイルス増殖部位を特定した。
- 24) 全国から5,000人の2歳児を無作為抽出し、抽出された2歳児が居住する市区町村における予防接種担当者へOPV1回目及び2回目の接種月齢の調査を依頼した。返送された調査票を基に累積接種率を算定した。
- 25) インターネット上で公開されている不活化ポリオワクチン接種医療機関リストに挙げられた医療機関のうち、機関のホームページ上でIPV接種が確認できた医院ないし病院を対象にして、IPV含有ワクチン接種総件数及び初回接種件数を調査票により問い合わせた。

【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。

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。二次調査では、診療録より既存情報を収集するため、個人情報保護への配慮のうえ実施した。本調査の実施については、大阪市立大学大学院医学研究科の倫理審査にて承認を受けた。

不活化ポリオワクチン接種研究への参加は、受診者の自由意思によるものであり、受診者は研究への参加を随時拒否または撤回することができる。また拒否・撤回によって受診者が不利な扱いを受けることはない。本研究については東京医科大学および国立感染症研究

所倫理委員会において承認済みである。

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) 進化速度及び分岐年代をベイズ法により解析し、クラスター内の共通祖先の分岐時間を推定した。山東省E6株はA,B,Cの3クラスターに分かれた。E11は1-4クラスターに分かれ、クラスター1にはJinan,Linyi株が属し、クラスター4にはLinyi株が属していた。
- 2) 「フィルター吸着溶出法」の方が「PEG沈殿法」よりも分離株数や検出件数が多かった。ポリオウイルス、HEV-B等では差が大きかったのに対し、ノロウイルス、サポウイルスでは濃縮方法の違いによる検出件数の差が小さかった。
- 3) VPIプライマーを用いたRT-PCR法により、274件中158件(57.7%)からAiV遺伝子が検出された。遺伝子型の内訳はA型130件(47.4%)、B型30件(10.9%)、C型0件であった。
- 4) ポリオウイルスは、ポリオワクチン接種時期から3ヶ月後まで分離された。ワクチン株との変異率を解析したところ、1型及び3型では1%未満、2型では0.5%未満であり、全てワクチン株であった。
- 5) 2010-2011年にかけて、大阪府においてCVA6が多数検出され、その大半が2011年に採取された検体から検出された。CVA6陽性患者の診断名は手足口病がもっとも多く(59.6%)、次いでヘルパンギーナ(28.1%)であった。
- 6) 2011年に分離したCVA6代表株の塩基配列

- (7,434bp)を決定した。1996～2011年に京都市等で検出された合計76件のCVA6についてVP4領域の塩基配列を決定し系統解析をおこなった。
- 7) 150検体中4検体(2.7%)がSAFV陽性を示した。SAFV陽性検体はノロウイルス等との混合感染であった。VP1遺伝子解析により、SAFV1あるいはSAFV2と同定された。
 - 8) 全検体中、成人の1検体が陽性となった。登録されているDI株の5' UTRと93.6%から95.4%の類似性があった。5' UTR領域では陽性検体はHCoSV-Dに属していた。
 - 9) 1カ月齢ではすべてブタコブウイルス遺伝子陰性であったが、2カ月から陽性率は上昇し、4カ月でピークとなった。7-8カ月齢の成熟ブタでは24%がウイルスを保有していた。
 - 10) EV71標準株並びに国内外分離株、何れに対しても明らかな抗ウイルス作用が認められ、 IC_{50} 値は0.086 - 0.28 mg/mlであった。CVA6臨床分離株9株に対する IC_{50} 値は0.12-0.25 mg/mlで、ほぼ同程度の感受性を示した。
 - 11) 全国の小児科2507科から760科を抽出して調査を実施し、521科(68.6%)から回答を得た。「症例あり」と回答した126科より1094例(うち死亡5例)の入院症例数が報告された。2011年6月に二次調査を開始し、86科(68.3%)より365例(うち死亡2例)の情報を収集した。
 - 12) 成人に対するIPV接種に関する臨床研究プロトコールを作成し、倫理委員会での承認を経て、海外からIPVを輸入し、接種を開始した。20名が登録され、研究を継続中である。
 - 13) CODEHOP PCR法での陽性率は、髄液17検体中7検体(41.2%)、咽頭拭い液15検体中12検体(80.0%)、便12検体中7検体(58.3%)であった。塩基配列により同定可能であった陽性検体は全てエコー6型と同定された。
 - 14) 2010～2012年の高知県における患者検体からのSAFV検出は17検体(1.3%)で、遺伝子解析に成功した11株総てがSAFV2であった。各動物種でSAFV3中和抗体陽性検体が認められ、イヌ、ネコで、比較的高力価の中和抗体が認められた。マウス、ウサギ抗血清は、SAFV2およびSAFV3のあいだで比較的高い交差反応が認められた。
 - 15) SAFVとTMEVとの間で、カプシド蛋白の組換えが起こる可能性は極めて低いことが示された。SAFV leader蛋白は、TMEV leader蛋白と同様、IFN産生抑制能を有しており、ウイルスの増殖に重要な役割を担っていることが示唆された。
 - 16) 抗SAFV3抗体を用いたsABC法によりウイルス抗原を検出することが可能であった。抗SAFV3抗体と抗EMCV抗体はいずれもSAFV3感染組織におけるウイルス抗原陽性細胞を検出した。
 - 17) PV1,2,3型のカプシドを持つ擬似ウイルスを作製した。各々の型の擬似ウイルスは、型特異的抗体によってのみ中和された。擬似ウイルスを用いてヒト血清中の中和抗体価を測定したところ、従来法による測定結果とよい相関を示した。
 - 18) 3Aタンパク質と相互作用する宿主タンパク質として、ゴルジタンパク質ACBD3を得た。ACBD3は3Aに加え、2B、2BC、2C、3AB、宿主蛋白質PI4KBと相互作用することが示された。感染細胞の免疫染色により、ACBD3、PI4KBがウイルスRNA複製部位に存在することが示された。ACBD3あるいはPI4KBのノックダウンにより、ウイルスRNA複製が阻害された。
 - 19) EV71感染実験の時系列データを数理科学解析することにより、ウイルス感染細胞の寿命、バーストサイズ、基本再生産数を算出した。1095株、KED005株、02363株に感染した細胞の寿命は、ほとんど差異がなかった。バーストサイズおよび基本再生産数において、1095株とKED005株は、02363株と比較して統計的に有意かつ顕著な差異が認められた。
 - 20) cDNA由来ウイルスのPSGL-1結合性を、PSGL-1-Fcとの共沈により検討した。PB型アミノ酸をもつEV71-1095株およびEV71-02363EG株は、PSGL-1-Fcと共沈した。アミノ変異とPSGL-1依存性EV71増殖の関連を検討したところ、PB株にnon-PB型アミノ酸を導入することにより、PB株のもつPSGL-1依存性増殖が阻害された。
 - 21) CVA3、5、6、8分離株感染RD-A細胞ではCPEが出現したが、L-SCARB2細胞ではウイルス原液でもCPEは認められなかった。CVA16は希釈液あるいは原液ですべての株でCPEが認められた。
 - 22) siRNA処理によりSCARB2の発現を抑制したRD細胞では、CVA7、CVA14およびCVA16感染によるウイルス抗原陽性細胞数が、明らかに低下し

た。免疫沈降法により、CVA7、CVA14 および CVA16 は SCARB2 と結合し、CVA6 および CVA10 は結合しないことがわかった。

- 23) ヒト SCARB2 トランスジェニックマウスにおける SCARB2 発現部位をウエスタンブロット法により確認したところ、全身の臓器で発現を確認した。免疫組織化学解析では多数の臓器においてヒト SCARB2 陽性で、中枢神経系においては神経細胞が最も強く染色された。EV71/Isehara/Japan/99 株を脳内接種したところ 4 系統で神経症状を呈し、脳および脊髄で高いウイルス力価を示した。
- 24) OPV 1 回目と 2 回目の累積接種率曲線は、生後 3, 6 ヶ月から立ち上がり、生後 12 ヶ月でそれぞれ 90.3% および 47.4%、生後 24 ヶ月でそれぞれ 96.3% および 85.2% に達した。
- 25) IPV 含有ワクチン接種医療機関における 2011 年 10 月の IPV 報告接種件数は、全体で 16,339 件であった。都道府県別の接種件数では、東京都が 6,098 件で全体の 37.3 % を占めていた。IPV 接種件数および接種医療機関数は 2010 年と比較して大幅に増加していた。

D. 考察

- 1) 2010 年はエンテロウイルス感染症の流行が観察されないにも関わらず下水中より E6 が多数分離された。下水中ウイルスモニタリングは流行時のベースラインデータとして適応可能と考えられた。
- 2) ウイルスの違いにより、下水流入水検体由来検体の濃縮方法別の分離株数や検出件数に差が生じた原因は不明であるが、分離培養法と PCR 法等、検出方法の違いについての検討が必要である。
- 3) AiV 遺伝子が 6 年間に亘り流入下水から高率に検出されたことから、AiV が我々の間で常に感染を繰り返している事が確認された。流入下水調査により、海外由来腸管系ウイルスを検出できる可能性が示唆された。
- 4) エンテロウイルス環境ウイルスサーベイランスが、都市部と地方部のいずれにおいても適用可能であることが示唆された。遺伝子解析により中国などアジア地域との密接な関係があることが伺われた。
- 5) CVA6 の系統樹解析により、2011 年シーズンの静

岡株、2008 年のフィンランド株および 2010 年の中国株は同じクラスターに分類された。

- 6) CVA6 非構造タンパク領域で標準株との違いが目立った。2011 年に流行した CVA6 は京都市、兵庫県、東京都でほぼ同じ配列であり、2009 年に流行した株と近縁であった。
- 7) タイで検出された SAFV4 株はノロウイルス等の腸管ウイルスとの混合感染であり、SAFV 感染と病原性の関係は明らかではない。
- 8) タイでの HCoV の報告は今までない。HCoV 陽性例は HCoV-D に属していた。陽性検体数が少ないので臨床的意義ははっきりしない。
- 9) 健康なブタの血清中にブタコブウイルスの核酸が検出された。月齢に伴い、検出率が変化した。6 ヶ月以降ではすべての月齢で検出され、2003-2008 年にわたって類似の株が蔓延していることがわかった。
- 10) 手足口病の原因となる EV71 および CVA6 に対する MRL-1237 の抗ウイルス効果について検討したところ、高い選択性を示したことから、本薬剤はこれらのウイルス感染症治療薬として期待できる。
- 11) 二次調査への協力依頼にあたって、「エンテロウイルス以外の病原体が、病因として明らかであった症例」「病原体は明らかではないが、エンテロウイルス感染以外の病因であると担当医が判断した症例」についての報告を不要としたところ二次調査で報告された症例は 32% 減少した。今後、適格でないと考えられる症例の割合を考慮した補正を行う。
- 12) 我が国でも、2012 年の秋頃には IPV の導入が見込まれる状況である。過去の接種歴が無い者、あるいは不明な者に対する IPV の追加接種について出生年にかかわらず検討しておく必要がある。
- 13) E6 は無菌性髄膜炎患者から毎年検出されているが、2010~2011 年に無菌性髄膜炎の起因ウイルスの首位に報告されている。2011 年埼玉の無菌性髄膜炎の起因ウイルスと同定された E6 は、中国山東省の下水から分離された E6 と近縁であった。
- 14) SAFV は気道炎や胃腸炎の原因ウイルスの一つであると考えられているが、疫学的特性や病原性等について不明な点が多い。ヒトや各種動物における血清疫学および SAFV 遺伝子検出等により、ウ

ウイルス伝播の実態を調査することが必要である。

- 15) キメラウイルス解析により、SAFV と TMEV の間でカプシド蛋白の組換えが起こる可能性は極めて低いことが示された。SAFV leader 蛋白は、TMEV leader 蛋白より強い IFN 産生抑制能を有していた。
- 16) 抗 SAFV3 抗体はサル組織標本で血管平滑筋に強い非特異反応がみられた。sABC 法によるウイルス抗原の検出で、抗 EMCV 抗体と抗 SAFV 抗体の交差反応性が認められたことから、抗体の特異性を考慮する必要がある。
- 17) 抗 PV 中和抗体価を把握することは、その国の PV 感染および再流行に対する脆弱性を監視する上で重要である。新規抗 PV 中和抗体価測定法は感染性のウイルスを使わないため、将来的な抗 PV 中和抗体価測定法として有用である。
- 18) アイチウイルスゲノム複製部位では、ウイルスタンパク質/ACBD3/PI4KB 複合体が形成され、PI4P を産生することが RNA 複製に重要であることが示唆された。ACBD3 や PI4KB は、ピコルナウイルス感染制御のためのターゲットとなりうる。
- 19) バーストサイズおよび基本再生産数には、統計学的に有意かつ顕著な差異が認められ、ウイルス株の複製効率/transmissibility を示す値である。今回の解析で求められたバーストサイズおよび基本再生産数は、分離ウイルスの流行効率を示唆する値であると考えられた。
- 20) EV71 の PSGL-1 結合性および Jurkat 細胞における PSGL-1 依存性増殖は、VP1 の 2 アミノ酸 (VP1-98, VP1-145) で規定されることが明らかとなった。
- 21) 2011 年に手足口病の大流行を起こした CVA6 を含め、CVA3、5、6、8 の臨床分離株は RD-A 細胞には感染したが、L-SCARB2 細胞には感染しなかった。L-SCARB2 細胞に感染したのは CVA14、CVA16、EV71 のみであり、これらの株は分離年、株由来患者の病態によらず、すべての株が感染した。
- 22) EV71 に加えて、CVA7、CVA14、および CVA16 の 3 種類のウイルスが、SCARB2 を感染受容体として利用していることが証明された。これらのウイルスは、手足口病患者から分離されることの多いウイルスであり、SCARB2 依存的な感染をするウイルスは“手足口病を引き起こしやすいウイルス”であると考えることが出来る。

- 23) ヒト SCARB2 トランスジェニックマウスの SCARB2 発現はヒト個体内のものと類似していると考えられる。ヒト SCARB2 は個体内においても感染受容体として機能しており神経病原性発現に寄与することが明らかになった。EV71 はトランスジェニックマウスの脳および脊髄の神経細胞を標的とし増殖することで高い神経病原性を示すと考えられる。
- 24) 2011 年調査による OPV1 回目および 2 回目接種の累積接種率は、2009 年、2010 年の調査結果と同等であり接種率の低下傾向は認められなかった。全国から無作為抽出した 5,000 件の標本からデータを得ている本調査では、OPV 接種率の低下がある程度に達するまでは感知できないと考えられる。
- 25) IPV を個人輸入して接種する医療機関数および IPV 接種件数が急速に増加している実態が明らかになった。保護者からの強い要望に応じる形で、多数の医師が、国が認可していない IPV 接種を実施しているという事態はきわめて異常であり、一刻も早い IPV 導入が必要とされる。

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、中国等における環境サーベイランス導入のための基盤的研究・技術協力を実施した。

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実施した。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、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。ヒトカルジオウイルス等、近年新たに発見された様々な腸管ウイルスの解析により、アジア諸国における腸管ウイルス伝播状況を解析した。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のための研究を継続する。

IPV 含有ワクチンの導入に向けて、OPV 累積接種率および IPV 接種件数調査を実施した。IPV を個人輸入して接種する医療機関数および IPV 接種件数が急速に増加している実態が明らかになり、一刻も早い IPV 導入が必要と考えられた。IPV 移行期における OPV 接種控えの増加が懸念されており、様々な手法による腸管ウイルス病原体サーベイランスにより、国内外のポリオフリーを確認することが重要である。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tao Z, Wang H, Li Y, Xu A, Zhang Y, Song L, Yoshida H, Xu Q, Yang J, Zhang Y, Liu Y, Feng L, Xu W. Environmental surveillance and sequence analysis reveal co-circulation of two transmission chains of echovirus 6 in Jinan city, China. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 3786 – 3792, 2011
- 2) Yang J, Cui N, Wang H, Tao Z, Liu Y, Zhang H, Yoshida H, Song Y, Zhang Y, Song L, Li Y, Lin X, Ji S, Xu W, Xu A. Evaluating the prevalence and molecular epidemiology of echovirus 11 isolated from sewage in Shandong Province, China in 2010. *Virus Genes* [Epub ahead of print], 2012
- 3) Iwai M, Horimoto E, Obara M, Obuchi M, Kurata T, Kawagoshi K, Nakamura S,

Shimizu H, Yoshida H, Takizawa T: Endemic transmission of echovirus 30 in Toyama, Japan in 2010 is verified by environmental surveillance. *Jpn J Infect Dis* 64: 165-167, 2011

- 4) Fujimoto T, Iizuka S, Enomoto, M, Yamashita K, Abe K, Hanaoka N, Okabe N, Yoshida H, Yasui Y, Kobayashi M, Fujii, Y, Tanaka H, Yamamoto M, Shimizu H. An outbreak of hand, foot, and mouth disease due to coxsackievirus A6 in Japan, 2011. *Emerg Infect Dis* 18: 337-9, 2012
- 5) Adhikary AK, Banik U, Okabe N, Fujimoto T. Molecular characterization of human adenovirus type 8 (HAdV-8), including a novel genome type detected in Japan. *Jpn J Infect Dis* 64: 493-8, 2011
- 6) Adhikary AK, Fujimoto T, Okabe N.: Human adenovirus species C (HAdV-C) fiber protein. *Virology* 424:1, 2011
- 7) Nakamura M, Hirano E, Kowada K, Ishiguro F, Yamagishi Z, Adhikary AK, Hanaoka N, Okabe N, Taniguchi K, Fujimoto T. Surveillance of Adenovirus D in patients with epidemic keratoconjunctivitis from Fukui Prefecture, Japan, 1995-2010. *J Med Virol* 84: 81-6, 2012
- 8) Akiyoshi K, Suga T, Fukui K, Taniguchi K, Okabe N, Fujimoto T. Outbreak of epidemic keratoconjunctivitis caused by adenovirus type 54 in a nursery school in Kobe City, Japan in 2008. *Jpn J Infect Dis* 64: 353-5, 2011
- 9) 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 coxsackievirus group A in Kyoto 1996-2009 using mouse, RD-18S, and Vero cells. *Jpn J Infect Dis*. 64: 167-8, 2011

- 10) Matsushima Y, Shimizu H, Kano A, Nakajima E, Ishimaru Y, Dey SK, Watanabe Y, Adachi F, Suzuki K, Mitani K, Fujimoto T, Phan TG, Ushijima H. Novel Human Adenovirus Strain, Bangladesh. *Emerg Infect Dis* (in press)
- 11) Khamrin P, Chaimongkol N, Malasao R, Suantai B, Saikhruang W, Kongsricharoern T, Ukorapol N, Okitsu S, Shimizu H, Hayakawa S, Ushijima H, Maneekarn N. Detection and molecular characterization of cosavirus in adults with diarrhea, Thailand. *Virus Gene* (in press)
- 12) Okitsu S, Khamrin P, Thongprachum A, Hidaka S, Kongkaew S, Kongkaew A, Maneekarn N, Mizuguchi M, Hayakawa S, Ushijima H. Sequence analysis of porcine kobuvirus VP1 region detected in pigs in Japan and Thailand. *Virus Gene* 2011 (in press)
- 13) Khamrin P, Okitsu S, Ushijima H. A single-tube multiplex PCR for rapid detection of 10 diarrheal viruses in stool samples collected from children with diarrhea. *J Virol Methods* 173: 380-393, 2011
- 14) Khamrin P, Okitsu S, Ushijima H. Saffold cardioviruses in children with diarrhea, Thailand. *Emerg Infect Dis* 17:1150-1152, 2011.
- 15) Nakano T. Japanese vaccinations and practices, with particular attention to polio and pertussis. *Travel Med Infect Dis* 9, 169-175, 2011
- 16) Himeda T, Ohara Y: Saffold virus, a novel human cardiovirus with unknown pathogenicity. *J Virol* 86: 1292-1296, 2012
- 17) Himeda T, Nojiri M, Okuwa T, Muraki Y, Ohara Y. Reverse Genetic Analysis of the Recombination in Theilovirus based on the Infectious cDNA Clones. *J Plant Pathol Microbiol* 2: 112, 2011
- 18) Himeda T, Ohara Y: Roles of two non-structural viral proteins in virus-induced demyelination. *J Clin Exp Neuroimmunol.* 2: 49– 58, 2011
- 19) Himeda T, Hosomi T, Asif N, Shimizu H, Okuwa T, Muraki Y, Ohara Y: The preparation of an infectious full-length cDNA clone of Saffold virus. *Virol J.* 8: 110, 2011
- 20) 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
- 21) Arita M, Iwai M, Wakita T, Shimizu H. Development of poliovirus neutralization test with poliovirus pseudovirus for measurement of neutralizing antibody titer in human serum. *Clinical and Vaccine Immunology*, 18: 1889-1894, 2011
- 22) Arita M, Masujima S, Wakita T and Shimizu H. Particle Agglutination Method for Poliovirus Identification. *Journal of Visualized Experiments* 50, doi: 10.3791/2824, 2011
- 23) Sasaki J, Ishikawa K, Arita M, Taniguchi K: ACBD3-mediated recruitment of PI4KB to picornavirus RNA replication sites. *EMBO J* 31:754-766, 2012
- 24) Sasaki J, Ishikawa K, Taniguchi K: 3CD, but not 3C, cleaves the VP1/2A site efficiently during Aichi virus polyprotein processing through interaction with 2A. *Virus Res* 163: 592-598, 2012
- 25) Sato K, Misawa N, Nie C, Satou Y, Iwakiri D, Matsuoka M, Takahashi R, Kuzushima K, Ito M, Takada K, Koyanagi Y: A novel animal model of Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in humanized mice. *Blood* 117: 5663-5673, 2011

- 26) Gee P, Ando Y, Kitayama H, Yamamoto SP, Kanemura Y, Ebina H, Kawaguchi Y, Koyanagi Y: APOBEC1-mediated editing and attenuation of herpes simplex virus 1 DNA indicate that neurons have an antiviral role during herpes simplex encephalitis. *J Virol* 85: 9726-9736, 2011
- 27) Yamayoshi S, Koike S: Identification of the Human SCARB2 Region That Is Important for Enterovirus 71 Binding and Infection. *J Virol* 85: 4937-4936, 2011
- 28) Oshiumi H, Okamoto M, Fujii K, Kawanishi T, Matsumoto M, Koike S, Seya T: The TLR3/TICAM-1 pathway is mandatory for innate immune responses to poliovirus infection. *J Immunol* 187: 5320-5327, 2011
- 29) Abe Y, Fujii K, Nagata N, Takeuchi O, Akira S, Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T, Koike S.: The toll-like receptor 3-mediated antiviral response is important for protection against poliovirus infection in poliovirus receptor transgenic mice. *J Virol* 86: 185-94, 2012
- 30) Yamayoshi S, Fujii K, Koike S. Scavenger receptor B2 as a receptor for hand, foot and mouth disease and severe neurological diseases. *Frontiers in Virology* 3: (on line publication), 2012
- 31) McWilliam Leitch EC, Cabrerizo M, Cardosa J, Harvala H, Ivanova OE, Koike S, Kroes AC, Lukashev A, Perera D, Roivainen M, Susi P, Trallero G, Evans DJ, Simmonds P. The association of recombination events in the founding and emergence of subgenogroup evolutionary lineages of human enterovirus 71. *J Virol* (in press)
- 32) Yamayoshi S, Iizuka S, Yamashita T, Minagawa H, Mizuta K, Okamoto M, Nishimura H, Sanjoh K, Katsushima N, Itagaki T, Nagai Y, Fujii K, Koike S: Human SCARB2-dependent Infection by Coxsackievirus A7, A14, A16 and Enterovirus 71. *J Virol* (in press)
- 33) Arita M, Wakita T, Shimizu H: Valosin containing protein (VCP/p97) is required for poliovirus replication and involved in cellular protein secretion pathway in poliovirus infection. *J Virol* (in press)
- 34) Nakajima N, Kitamori Y, Ohnaka S, Mitoma Y, Mizuta K, Wakita T, Shimizu H, Arita M. Development of a transcription-reverse transcription concerted reaction method for specific detection of human enterovirus 71 from clinical specimen. *J Clin Microbiol* (in press)
- 35) Arita M, Iwai-Itamochi M, Wakita T Shimizu H. Reply to "poliovirus-neutralization test with poliovirus pseudovirus to measure neutralizing antibody in humans". *Clin Vaccine Immunol* 19: 459, 2012
- 36) Wong KT, Ng KY, Ong KC, Ng WF, Shankar SK, Mahadevan A, Radotra B, Su JI, Lau G, Ling AE, Chan KP, Macorelles P, Desai AS, Ravi V, Nagata N, Shimizu H, Takasaki T Enterovirus 71 encephalomyelitis and Japanese encephalitis can be distinguished by topographic distribution of inflammation and specific intraneuronal detection of viral antigen and RNA in the central nervous system. *Neuropathology and Applied Neurobiology* (in press)
- 37) Nishimura Y, Shimizu H. Cellular receptors for human enterovirus species A. *Frontiers in Virology* (in press)
- 38) Arita M, Kojima H, Nagano T, Okabe T, Wakita T, and Shimizu H: Phosphatidylinositol-4 kinase III beta is a target of enviroxime-like compounds for anti-poliovirus activity. *J Virol* 85:

- 2364-2372, 2011
- 39) Miyamura K, Nishimura Y, Abo M, Wakita T, and 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: 287-291, 2011
- 40) Country Progress Report on Maintaining Polio-free Status, Japan: WHO report, 2011
- 41) WHO/WPRO, A Guide to Clinical Management and Public Health Response for Hand, Foot and Mouth disease (HFMD) (http://www.wpro.who.int/publications/PUB_9789290615255.htm) 2011
- 42) 岩井雅恵、堀元栄詞、小原真弓、馬淵俊輔、高田厚史、南部厚子、川越久美子、嶋尻悟志、關口健治、滝澤剛則：ポリオ流行予測調査(平成22年度). 富山県衛生研究所年報 34: 62-64, 2011
- 43) 岩井雅恵、吉田弘、小原真弓、堀元栄詞、倉田毅、滝澤剛則：新規リアルタイムPCRによる下水流入水中のワクチン様のポリオウイルスの検出. 富山県衛生研究所年報 34: 80-87, 2011
- 44) 山下照夫、「第5章消化器症候群 5. アイチウイルス」の項を担当、ウイルス感染症の検査・診断スタンダード、143-145、東京、羊土社、2011
- 45) 山崎謙治：エンテロウイルス感染症. 防菌防黴学雑誌 39: 319-327, 2011
- 46) 中田恵子、山崎謙治、加瀬哲男：コクサッキーA6 (CA6) 型による手足口病の成人例—大阪府—. 病原微生物情報 32: 16-17, 2011
- 47) 中田恵子、山崎謙治、左近直美、加瀬哲男：2010～2011年の手足口病流行の疫学的・ウイルス学的解析—大阪府—. 病原微生物情報 33, 2012
- 48) 富岡鉄平、島田智恵、藤本嗣人、松井珠乃、佐藤弘、八幡裕一郎、橘とも子、岡部信彦：日本紅斑熱発生地域および近隣の発生が少ない地域における知識および受診行動. 感染症誌 85: 180～183, 2011
- 49) 藤本嗣人、花岡希：アデノウイルス感染症の病原体迅速診断. 小児科 52: 1923～1929, 2011
- 50) 小林正明、藤本嗣人、岡部信彦：コクサッキーウイルス A6 ウイルス感染が明らかになった手足口病. 小児科 52: 1443～1444, 2011.
- 51) 藤本嗣人、竹田誠、中村雅子、榎本美貴、岡部信彦：RSウイルスの検査診断. 小児科 52: 1463～1469, 2011
- 52) 山口展正、藤本嗣人、岡部信彦：アデノウイルスを中心に 耳鼻咽喉科領域よりアデノウイルスを診る. 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 83: 195～200, 2011
- 53) 藤本嗣人、花岡希、谷口清州、岡部信彦：病原体検査のための検体採取 10 原則. 小児科 52: 471～475, 2011
- 54) 榎本美貴、高井伝仕、藤本嗣人、岡藤輝夫、飯尾潤、吉田真策、近平雅嗣：兵庫県の手足口病患者から検出したエンテロウイルス71型の分子疫学解析(2008-2010). 兵庫県立健康生活科学研究所研究報告 2: 10～14, 2011
- 55) 小林正明、藤本嗣人、花岡希、小長谷昌未、安井良則、谷口清州、岡部信彦：2011年のコクサッキーウイルス A6 型感染による手足口病の臨床的特徴—静岡県. 病原微生物検出情報(2011/7/20 速報)
- 56) 榎本美貴、高井伝仕、近平雅嗣、花岡希、岡部信彦、谷口清州、清水博之、藤本嗣人、岡藤輝夫、岡藤隆夫、飯尾潤、田中一宏：2010～2011年の手足口病患者からのコクサッキーウイルス A6 型の検出状況—兵庫県. 病原微生物検出情報 (Vol. 32 p. 196: 2011年7月号)
- 57) 飯塚節子、糸川浩司、木内郁代、日野英輝：コクサッキーウイルス A6 型による手足口病の流行 島根県. 病原微生物検出情報. 32: 195, 2011
- 58) 甘利昭一郎、生田陽二、小田新、滝有希子、内山健太郎、吉田知広、大場邦弘、野田絵理、河野寿夫、清水博之、水谷哲也. 中枢神経病変を来したコクサッキーウイルス B4 感染症の7例. 日本小児科学会雑誌 115: 1418-1422, 2011

- 59) 高山直秀, 崎山弘, 岡部信彦, 清水博之, 宮村達男, 梅本哲. BCG ワクチン、ジフテリア・百日咳・破傷風 3 種混合ワクチン、経口生ポリオワクチン、麻疹・風疹混合ワクチン 1 期の全国累積接種率 - 2009 年度調査報告. 小児科臨床 64: 963-971, 2011
- 60) 清水博之. ポリオ. 総合臨床 60: 2225-2232, 2011
- 61) 清水博之. Sabin 株由来不活化ポリオワクチン開発の必要性和問題点. Bio Clinica 26: 19-23, 2011
- 62) ナイーム アシフ, 清水博之. ヒトカルジオウイルス感染症. 臨床とウイルス 39: 132-138, 2011
- 63) 清水博之. 不活化ポリオワクチン. 日本臨床 69: 1604-1608, 2011
- 64) 清水博之. 「ポリオワクチン」「予防接種」の項を担当、免疫の事典、282-283, 425、朝倉書店、2011

2. 学会発表

- 1) Iwai M, Yoshida H, Obara M, Horimoto E, Obuchi M, Kurata T, Takizawa T: Efficient elimination of polioviruses in sewage water after activated sludge process, evaluated by cell culture and newly developed real-time PCR. XV International Congress of Virology (第 59 回日本ウイルス学会), 札幌市、2011 年 9 月
- 2) Teruo Yamashita, Emi Mizutani, Hirokazu Adachi, Miyabi Ito, Akira Fujiura, and Hiroko Minagawa : Detection and Nucleotide Sequence Analysis of New Aichi Virus in Wastewater Samples, IUMS 2011, Sapporo, Sept 2011
- 3) 世良暢之、前田詠里子、吉富英亮、田上四郎、石橋哲也、吉田 弘、Environmental Surveillance of Enterovirus in the sewage water in Fukuoka prefecture of Japan, Asia Environmental Surveillance、久留米市、平成 23 年 7 月
- 4) Ushijima H, Khamrin P, Pham TK, Thongprachum A, Okitsu S, Hayakawa S, Maneekarn N. RT-multiplex PCR for detection of diarrheal viruses. International Union of Microbiology Society International Congress of Virology. 2011.9. 15 Sapporo
- 5) Khamrin P, Chaimongkol N, Nantachit N, Okitsu S, Ushijima H, Maneekarn N. Saffold cardioviruses in pediatric patients with diarrhea, Thailand. International Union of Microbiology Society International Congress of Virology. 2011.9. 15 Sapporo
- 6) Okitsu S, Khamrin P, Thongprachum A, Hayakawa S, Maneekarn N, Ushijima H. Molecular characterization of VPI region of porcine kobuvirus. International Union of Microbiology Society International Congress of Virology. 2011.9. 15 Sapporo
- 7) 牛島廣治: ウイルス性下痢症の最近の動向第 49 回埼玉県小児感染免疫懇話会 平成 23 年 7 月 30 日大宮ソニックシティ
- 8) Takushi Hosomi, et al. Prevalence of neutralizing antibody against Saffold virus genotypes 2 and 3 in Kochi, Japan、International Congress of Virology, 2011、札幌市、2011 年 9 月
- 9) ヒトカルジオウイルス感染性クローンの樹立とリコンビネーションの検討、第 48 回細菌学会中部支部総会、名古屋、2011 年 10 月
- 10) Himeda T, Hosomi T, Asif N, Shimizu H, Okuwa T, Muraki Y, Ohara Y: Synthesis of infectious Saffold virus type 3 RNA by T7 RNA polymerase is terminated by a human preproparathyroid hormone (PTH) signal in the viral genome. IUMS 2011、札幌、2011 年 9 月
- 11) 姫田敏樹、大桑孝子、村木 靖、大原義朗: 感染応答を制御する 2 つのウイルス非構成蛋白、第 23 回日本神経免疫学会、東京、2011 年 9 月

- 12) 姫田敏樹、大桑孝子、村木 靖、大原義朗：無菌性髄膜炎患者の髄液から分離されたヒトカルジオウイルス (Saffold virus type-3) のリバースジェネティクス、平成 23 年度 北陸腸内細菌研究会、富山、2011 年 7 月
- 13) 姫田敏樹、細見卓司、Naeem Asif、清水博之、大桑孝子、村木 靖、大原義朗：ヒトカルジオウイルス (Saffold ウイルス) 感染性クローンの作製、第 15 回神経ウイルス研究会、金沢、2011 年 5 月
- 14) Kotani O, Shirato K, Nagata N, Miyazaki A, Ikeda H, Taguchi F, Takahashi K. Neuropathogenesis of mouse-adapted porcine epidemic virus infection in suckling mouse. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo, 2011.9.
- 15) Ishikawa K, Sasaki J, Maeno Y, Moriguchi K, Komoto S, Taniguchi K: A Golgi protein interacting with 2B, 2BC, 2C, 3A and 3AB is a host factor required for Aichi virus RNA replication. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo, 2011 年 9 月
- 16) Sato K, Misawa N, Koyanagi Y: Dynamics of human-specific virus infection in humanized mice. T lymphocyte dynamics in acute and chronic viral infection – Infectious Disease Research Network. London, England, 2011 年 1 月
- 17) Iwami S, Sato K, Misawa N, Kobayashi T, De Boer R, Koyanagi Y: DNA labeling system by peripheral blood of humanized mouse. 1st International Symposium on Innovative Mathematical Modeling. 東京、2011 年 3 月
- 18) Koyanagi Y: Intracellular anti-HIV factor, International Symposium. Virus, host and diseases. 京都市、2011 年 3 月
- 19) 小柳義夫、Peter Gee, 川口寧、北山裕子、安藤良徳: APOBEC1 による HSV-1 DNA の editing と抗ウイルス効果. 第 18 回ヘルペス感染症フォーラム (JHIF) 札幌市 2011 年 8 月
- 20) Iwami S, Sato K, Koyanagi Y: Mathematical modeling and in vitro experiments in virology. Korean Society for Mathematical Biology 2011 annual meeting, Ulsan. Korea, 2011 年 8 月
- 21) Sato K, Misawa N, Ito M, Koyanagi Y: HIV-1 Vpr protein accelerates HIV-1 replication during acute phase in vivo. XV International Congress of Virology. 札幌市、2011 年 9 月
- 22) Sato K, Misawa N, Ito M, Koyanagi Y: HIV-1 Vpr protein accelerates HIV-1 replication during acute phase in vivo. 3rd International Workshop on Humanized mice. Pittsburgh, USA, 2011 年 10 月
- 23) Sato K, Misawa N, Nie C, Satou Y, Matsuoka M, Ito M, Koyanagi Y: Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in humanized mice. 3rd International Workshop on Humanized mice, Pittsburgh. USA, 2011 年 10 月
- 24) 佐藤佳, 三沢尚子, 佐藤賢文, 松岡雅雄, 伊藤守, 小柳義夫: 急性感染期の HIV-1 増殖における制御性 T 細胞と Vpr の寄与. 第 25 回日本エイズ学会. 東京、2011 年 12 月
- 25) Nishimura Y, Wakita T, Shimizu H: Analysis of amino acid determinants of enterovirus 71 responsible for the PSGL-1-binding phenotype. IUMS 2011 Sapporo. 札幌市、2011 年 9 月
- 26) Yamayoshi S, Iizuka S, Yamashita T, Minagawa H, Sanjoh K, Katsushima N, Itagaki T, Nagai Y, Okamoto M, Nishimura H, Fujii K and Koike S. Human SCARB2-dependent infection of clinical isolates of coxsackievirus A14, A16 and Enterovirus 71, ICV 2011/2011, Sapporo
- 27) Yamayoshi S, Iizuka S, Yamashita T, Minagawa H, Sanjoh K, Katsushima N, Itagaki T, Mizuta K, Nagai Y, Okamoto M,

- Nishimura H, Fujii K, & Koike S: Human SCARB2-dependent infection of clinical isolates of coxsackievirus A14, A16 and Enterovirus 71. The XVth International Congress of Virology, Sapporo, Hokkaido, September 2011
- 28) Koike S, Yamayoshi S, Fujii K.: Scavenger receptor B2: A cellular receptor for Enterovirus 71 . Japan-Singapore Joint Forum. Emerging Concepts in Microbiology Singapore, November 2011
- 29) 山吉誠也, 藤井健, 小池智 エンテロウイルス71 感染受容体の機能解析 第15回日本神経ウイルス研究会石川県金沢市2011年5月
- 30) 藤井健, 山吉誠也, 設楽浩志, 多屋長治, 小池智: EV71 感染受容体ヒト SCARB2 発現マウス作出の試み 第15回日本神経ウイルス研究会 石川県金沢市 2011年5月
- 31) 山吉誠也, 藤井健, 小池智: エンテロウイルス71 感染受容体の機能比較 感染症若手フォーラム 長崎県長崎市 2012年2月
- 32) 藤井健, 山吉誠也, 小池智: エンテロウイルス71 感染モデルマウスの作出 感染症若手フォーラム 長崎県長崎市 2012年2月
- 33) Shimizu H. Poliovirus Vaccines; Current Status in Japan. The 5th International Vaccinology Workshop in Japan 2012, Tokyo, Feb 19, 2012
- 34) Shimizu H. Hand, foot, and mouth disease outbreaks in the Asia-Pacific region. Pasteur Institute in Ho Chi Minh City 120 Years for Control and Prevention of Communicable Diseases, Ho Chi Minh City, Nov 17, 2011
- 35) Shimizu H. PSGL-1-dependent and -independent replication of enterovirus 71. The 1st International Symposium of Vaccine Development against Human Hand-Foot-and-Mouth Diseases. ZhuNan, Taiwan. Sept. 4, 2011
- 36) 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 antipoliavirus activity. XV International Congress of Virology. Sapporo, 2011
- 37) Mistry N, Inoue H, Jamshidi F, Storm R, Nishimura Y, Shimizu H, Koike S, Arnberg N. Coxsackievirus A24 variant uses O-Linked glycoconjugates with terminal sialic acid as cellular receptors on human ocular cells. XV International Congress of Virology. Sapporo, 2011
- 38) Asif N, Hosomi T, Nishimura Y, Alam MM, Oka T, Zaidi S, Shimizu H. Comprehensive full length sequence analysis of saffold viruses: Reevaluating classification. XV International Congress of Virology. Sapporo, 2011
- 39) 清水博之: ポリオ根絶とポリオワクチン. 感染研市民セミナー, 東京, 2月25日, 2012
- 40) 清水博之: 世界ポリオ根絶計画とポリオの疫学. 第21回トラベラーズワクチンフォーラム 研修会, 東京, 2月18日, 2012
- 41) 清水博之: 不活化ポリオワクチン導入と移行期対策. 第15回日本ワクチン学会学術集会. 東京, 2011年12月11日
- 42) 清水博之: 不活化ポリオワクチン. 平成23年度感染症危機管理研修会. 東京, 10月, 2011
- 43) 清水博之: エンテロウイルス感染症の現状とポリオワクチンについて. 愛知県小児科医会. 9月25日, 2011
- 44) 清水博之: アジア地域におけるエンテロウイルス71 感染症の流行. 第52回日本臨床ウイルス学会. 津市, 2011年6月
- 45) 清水博之: 世界ポリオ根絶計画の現状とポリオワクチンについて 栃木県小児科医会 学術講演会, 2011年5月14日
- H. 知的財産権の出願・登録状況
該当無し

平成 23 年度 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

「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」

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

分担研究者 吉田 弘 国立感染症研究所ウイルス二部主任研究官

研究協力者 Tao Zexin、Wang Haiyan、Li Yan, Xu Aiqiang 中国山東省 CDC

研究要旨：①H22 年度研究に引き続き、中国山東省 Jinan 市で検出された下水由来エコーウイルス 6 型の塩基配列と分離年代が既知の配列を用い、ベイズ法により分岐年代を推定した。更に得られた 3 つのクラスターの分岐年代と検出年との時間差から地域における流行期間を推定した。このことは環境サーベイランスにより継時的定点モニタリングをすることでエンテロウイルスの伝播時期と期間を推定できることを示唆する。②また新たに定点として追加した Linyi 市と Jinan 市で検出された E11 の系統解析結果は、地域間で異なった伝播像を示しており、監視を継続することにより流行時のベースラインデータとしての適応可能性を示唆した。

A. 研究目的

①E6 の分岐年代推定

中国山東省で継続している環境ウイルスサーベイランスにより、2008 年 2 月から 2010 年 12 月までの間、様々なエンテロウイルスが分離されている。このうち 2010 年 8 月に最も分離頻度の高かったエコー 6 型 (E6) に着目し、VP1 遺伝子解析を行ったことを昨年度報告 (H22 年度) した。今年度は保有する分離年既知の配列と比較し、地域内伝播時期の推定を試みた。

②2010 年 2 地域で検出された E11 の分子疫学解析

環境サーベイランス手法により、同省内 Jinan 市および Linyi 市において検出されたエコー 11 型 (E11) について疫学状況及びウイルスゲノム情報の比較を行い伝播の特性について考察した。

B. 材料と方法

①E6 の分岐年代推定

ウイルス塩基配列

E6 について分離年が既知の山東省の環境由来株 16、同地域で過去に分離された AFP 患者、無菌性髄膜炎患者由来株 19、Genbank より得られた 43 株に関する VP1 領域の塩基配列情報を用いた。

分岐年代推定

BEAST (1.61) を用いてベイズ MCMC (マルコフ連鎖モンテカルロシミュレーション、3,000,000 回) により E6 の分岐年代の推定を行った。

②2010 年 2 地域で検出された E11 の分子疫学解析

環境水採取エリア

Jinan 市 (省都) : 人口 260 万人の下水処理場における流入水

Linyi 市: Jinan 市から南に 217 km 位置する人口 180 万人の下水処理場における流入水。

ウイルス分離、同定、系統解析

新たに採取点として加わった Linyi 市にて H22 年度研究で行った Jinan 市と同様、陰電荷膜を用いて下水を濃縮後、ウイルス分離を行った。得られたウイルスは Obersteらが報告した VP1 領域を増幅する 008-013 プライマーセットおよび 187-011 プライマーセットにて RT-PCR を行いた。ダイレクトシーケンス法にて遺伝子配列を決定し、標準株と比較後、型別同定を行った。分子系統解析には MEGA4.0 を用いた。

C. 結果

①E6 の分岐年代推定

E6 の分子進化解析