

Human enterovirus A 臨床分離株および臨床検体を用いた L-SCARB2 細胞感染実験

研究協力者	飯塚 節子	島根県保健環境科学研究所
研究分担者	小池 智	東京都臨床医学総合研究所

研究要旨

エンテロウイルス 71 (EV71) 特異的受容体発現細胞 (L-SCARB2 細胞) の Human enterovirus A (HEV-A) に対する感受性を調べる目的で、コクサッキーウイルス A3 (CVA3)、5、6、8、16 の臨床分離株を細胞に接種したところ、CVA16 はすべての株で細胞変性効果 (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。また、CVA16 あるいは EV71 が分離された臨床検体を L-SCARB 細胞に接種したが、ウイルスは分離できなかった。

A. 研究目的

東アジア地域では 1990 年代後半から多数の小児急性死亡例を伴う EV71 による手足口病の大規模な流行が発生し、公衆衛生上の脅威となっている。日本では重症 EV71 感染症の大規模な流行は認められていないが、EV71 流行時には散発的な重症例、死亡例が報告されており、重症エンテロウイルス感染症の大規模流行のリスクが常に存在し、迅速かつ正確な検査が望まれている。

小池らは EV71 受容体の一つである scavenger receptor B2 (SCARB2) 遺伝子の導入によって EV71 感受性を獲得したマウス L929 細胞 (L-SCARB2 細胞) を樹立し、いくつかの EV71 分離株で感染が成立するこ

とを明らかにした (小池智, ウイルス 59 : 189-194, 2009)。L-SCARB2 細胞の感受性を明らかにすることを目的に、昨年度 EV71 臨床分離株および EV71 と同じ HEV-A に属するウイルス CVA12、CVA14 の臨床分離株で感染が成立するかどうかを検討した。本年度は CVA3、5、6、8、16 の臨床分離株で感染が成立するかどうかの検討と L-SCARB2 細胞を使って臨床検体から EV71 等のウイルス分離が可能かどうかの検討を行った。

B. 研究方法

1. 材料

感染実験に用いた臨床分離株は、島根県感染症発生動向調査事業の一環として、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、-20°C保存していた CVA3 17 株、CVA5 8 株、CVA6 15 株、CVA8 14 株、CVA16 10 株を用いた。分離株の分離年、分離場所、患者の病態等は表 1 のとおりである。

臨床検体からのウイルス分離には 2010 年、2011 年に流行した手足口病患者検体のうち、Vero 細胞、RD-A 細胞等で EV71 が分離された検体 16 検体、CVA16 が分離された検体 13 検体を用いた。

2. 方法

臨床分離株を用いた感染実験は昨年度の報告書と同様の方法でおこなった。

L-SCARB2 細胞による臨床検体からのウイルス分離の検討は、細胞に検体 100 μ l/well を接種し、1 週間観察、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。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1. 臨床分離株の感染実験

CVA3、5、6、8 はすべての分離株が 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 10 希釈液あるいは原液ですべての株で CPE が認められた。(表 2)

2. 臨床検体からのウイルス分離

EV71、CVA16 陽性検体とも L-SCARB2 細胞でウイルスは分離できなかった。

D. 考察

今回実験に用いた HEV-A に属するウイルスのうち、L-SCARB2 細胞に感染したのは CVA16 のみであり、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。昨年度の結果を踏まえてまとめると、CVA3、5、6、8、12、14、16、EV71 の臨床分離株のうち 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。

次に、L-SCARB2 細胞を用いて臨床検体から CVA16 および EV71 が分離可能であるかどうか検討したが、いずれのウイルスも分離できなかった。このことは分離株を用いた感染実験で、CVA16、EV71 とも株によってはウイルス原液でないと感染が成立しなかったことから、L-SCARB2 細胞への感染には高力価のウイルスが必要であり、検体中のウイルス力価が低かった可能性が考えられる。

E. 結論

L-SCARB2 細胞は EV71 および CVA14、CVA16 の臨床分離株に感受性であることが明らかとなった。

L-SCARB2 細胞を用いた臨床検体からの CVA16、EV71 の分離はできず、通常のウイルス検査に使用するのには困難と思われた。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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

2) Fujimoto T, Iizuka S, Enomoto M, Abe K, Yamashita K, Hanaoka N, Okabe N, Yoshida H, Yasui Y, Kobayashi M, Fujii Y, Tanaka H, Yamamoto M and Shimizu H: Hand, Foot, and Mouth Disease Caused by Coxsackievirus A6, Japan, 2011. EID. 18:337, 2011

2. 学会発表

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

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
3. その他：なし

表1. 感染実験株一覧

Virus	Strain	Place (city)	Year	Month	Day	Clinical diagnosis or outcome
CAV3	2063-Shimane-90	Hamada city	1990	August	11	Herpangina
CAV3	2207-Shimane-90	Hamada city	1990	September	17	Herpangina
CAV3	2310-Shimane-90	Hamada city	1990	September	27	Herpangina
CAV3	2333-Shimane-90	Goutu city	1990	July	26	Pharyngitis
CAV3	2769-Shimane-90	Hamada city	1990	November	2	Pharyngitis
CAV3	2897-Shimane-90	Hamada city	1990	November	26	Pharyngitis
CAV3	443-Shimane-07	Hamada city	2007	June	4	Pharyngitis
CAV3	455-Shimane-07	Hamada city	2007	June	11	Herpangina
CAV3	460-Shimane-07	Matsue city	2007	June	8	Herpangina
CAV3	465-Shimane-07	Matsue city	2007	June	15	Herpangina
CAV3	469-Shimane-07	Hamada city	2007	June	14	Herpangina
CAV3	470-Shimane-07	Hamada city	2007	June	14	Herpangina
CAV3	472-Shimane-07	Matsue city	2007	June	15	Pharyngitis
CAV3	486-Shimane-07	Hamada city	2007	June	19	Fever
CAV3	496-Shimane-07	Hamada city	2007	July	2	Herpangina
CAV3	509-Shimane-07	Matsue city	2007	July	9	Herpangina
CAV3	513-Shimane-07	Matsue city	2007	July	6	Herpangina
CAV5	1907-Shimane-00	Goutu city	2000	July	25	HFMD
CAV5	165-Shimane-02	Izumo city	2002	January	26	Exanthema
CAV5	2131-Shimane-02	Izumo city	2002	October	11	HFMD
CAV5	438-Shimane-03	Matsue city	2003	February	10	HFMD
CAV5	467-Shimane-06	Matsue city	2006	June	14	HFMD
CAV5	677-Shimane-06	Matsue city	2006	August	28	Herpangina
CAV5	545-Shimane-07	Matsue city	2007	July	20	Herpangina
CAV5	140-Shimane-10	Matsue city	2010	March	23	HFMD
CAV6	1908-Shimane-00	Matsue city	2000	July	24	HFMD
CAV6	1729-Shimane-01	Matsue city	2001	July	19	HFMD
CAV6	1721-Shimane-04	Izumo city	2004	November	22	HFMD
CAV6	422-Shimane-05	Matsue city	2005	March	5	HFMD
CAV6	514-Shimane-07	Matsue city	2007	July	6	HFMD
CAV6	781-Shimane-09	Matsue city	2009	September	9	HFMD
CAV6	456-shimane-11	Izumo city	2011	May	24	HFMD
CAV6	483-shimane-11	Hamada city	2011	June	4	HFMD
CAV6	509-shimane-11	Hamada city	2011	June	21	HFMD
CAV6	512-shimane-11	Unnnann city	2011	June	17	HFMD
CAV6	515-shimane-11	Unnnann city	2011	June	20	HFMD
CAV6	521-shimane-11	Matsue city	2011	June	28	HFMD
CAV6	530-shimane-11	Unnnann city	2011	June	22	Herpangina
CAV6	531-shimane-11	Unnnann city	2011	June	22	Herpangina
CAV6	532-shimane-11	Unnnann city	2011	June	23	HFMD
CAV8	2167-Shimane-00	Matsue city	2000	August	29	Pharyngitis
CAV8	2260-Shimane-00	Matsue city	2000	September	14	Pharyngitis
CAV8	2329-Shimane-00	Matsue city	2000	September	21	Pharyngitis
CAV8	1493-Shimane-01	Matsue city	2001	June	15	Pharyngitis
CAV8	1520-Shimane-01	Matsue city	2001	June	20	Pharyngitis
CAV8	1575-Shimane-01	Matsue city	2001	June	27	Pharyngitis
CAV8	1615-Shimane-01	Izumo city	2001	July	2	Herpangina
CAV8	1638-Shimane-01	Matsue city	2001	July	6	Herpangina
CAV8	1659-Shimane-01	Matsue city	2001	July	3	Herpangina
CAV8	1665-Shimane-01	Izumo city	2001	July	6	Herpangina
CAV8	1694-Shimane-01	Matsue city	2001	July	9	Herpangina
CAV8	1810-Shimane-01	Izumo city	2001	July	27	Herpangina
CAV8	1904-Shimane-01	Hamada city	2001	August	8	Herpangina
CAV8	1817-Shimane-02	Matsue city	2002	August	19	Pharyngitis
CAV16	2748-Shimane-00	Okinosima chou	2000	October	26	HFMD
CAV16	1922-Shimane-01	Matsue city	2001	August	6	HFMD
CAV16	1303-Shimane-02	Matsue city	2002	June	5	HFMD
CAV16	1451-Shimane-04	Hamada city	2004	August	26	Pharyngitis
CAV16	1668-Shimane-04	Izumo city	2004	October	21	HFMD
CAV16	674-Shimane-05	Hamada city	2005	June	14	HFMD
CAV16	738-Shimane-05	Matsue city	2005	July	7	HFMD
CAV16	264-Shimane-06	Matsue city	2006	March	9	HFMD
CAV16	890-Shimane-07	Matsue city	2007	November	11	HFMD
CAV16	47-Shimane-08	Matsue city	2008	January	18	HFMD

表2. CVA16感染実験

Strain	Clinical diagnosis or outcome	X10希釈液を50 μ l添加			原液を25 μ l添加		
		RDA	L-SCARB2	L-Empty	RDA	L-SCARB2	L-Empty
2748-Shimane-00	HFMD	++	+	-	+++	++	-
1922-Shimane-01	HFMD	+++	+++	-			
1303-Shimane-02	HFMD	+++	+++	-			
1451-Shimane-04	Pharyngitis	+++	++	-	+++	+++	-
1668-Shimane-04	HFMD	+++	+++	-			
674-Shimane-05	HFMD	+++	+++	-			
738-Shimane-05	HFMD	+	-	-	+++	++	-
264-Shimane-06	HFMD	+++	+++	-			
890-Shimane-07	HFMD	+++	+++	-			
47-Shimane-08	HFMD	+++	+++	-			

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)
「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」
分担研究報告書

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

研究分担者

小池智 (財) 東京都医学総合研究所・副参事研究員

研究協力者

山吉誠也、藤井健 (東京都医学総合研究所・ウイルス感染プロジェクト)

水田克巳 (山形県衛生研究所)、

西村秀一 (仙台医療センター・仙台ウイルスセンター)、

山下照夫、皆川洋子 (愛知県衛生研究所)、

飯塚節子 (島根県保健環境科学研究所)

永田典代 (国立感染症研究所・感染病理部)

多屋長治、設楽浩志、島貫碧 (東京都医学総合研究所・遺伝子改変動物室)

研究要旨

手足口病の原因ウイルスであるエンテロウイルス 71 (EV71) は、近年、アジア太平洋地域で大規模な流行が起こっており、稀に中枢神経合併症による死亡例が報告されている。我々は重要エンテロウイルス感染症の制御に必要な以下の 2 つの項目について研究を行った。

1. 我々は EV71 の受容体である Scavenger receptor B2 (SCARB2) を発現する L929 細胞 (L-SCARB2 細胞) を作製し、この細胞が EV71 の特異的分離に利用できるかどうか調べた。昨年度までに L-SCARB2 細胞ではすべての EV71 株、その他にコクサッキーウイルス (CV) A7、CVA14、CVA16 に対しても感受性であったことを報告した。今年度はこれらのウイルスが SCARB2 を共通のレセプターとして利用していることを証明した。これらのウイルスは共通のレセプターを利用しているため共通の病態 (手足口病) を発症するものと考えられた。L-SCARB2 細胞はこれらのウイルスの一群のウイルスの分離に有効であるが、EV71 特異的な分離に用いるに

はむしろ不向きであった。

2. EV71 の神経病原性を試験可能でかつ操作性の容易なモデル動物はまだ樹立されておらず、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。我々はヒト SCARB2 を発現するトランスジェニックマウスとヒト SCARB2 のウイルス結合領域だけをマウス SCARB2 遺伝子と相同組換えを行ったノックイン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。これらの知見は SCARB2 トランスジェニックマウスが EV71 神経病原性試験やワクチン検定法の確立のためのモデル動物として有用であることを示している。

1. EV71 株分離細胞系の開発

A. 研究背景と目的

EV71 を特異的かつ効率よく分離する細胞系の確立はサーベイランスを行う上で有用であると考えられる。我々は SCARB2 が EV71 の受容体であることを見だし、これを発現する L-SCARB2 細胞を作製した。L-SCARB2 細胞が EV71 の分離・同定に有用であるかを検討した結果、EV71 の全株に加え、CVA7、CVA14 および CVA16 も L-SCARB2 細胞において CPE を示すことが明らかとなり、昨年度報告した。そこで、今年度は CVA7、CVA14 および CVA16 が本当に SCARB2 を感染受容体として利用しているのかをウイルス学的、生化学的に詳細に検討した。

B. 研究方法

(1) SCARB2 依存的感染

まず、CVA7、CVA14 および CVA16 が SCARB2 依存的に細胞に感染するのを確

認するために、CVA7、CVA14 および CVA16 が効率良く感染する RD 細胞の SCARB2 の発現を siRNA により抑制し、それらの細胞に CVA7、CVA14 および CVA16 と L-SCARB2 細胞で CPE を誘導しなかった CVA6 および CVA10 を感染させ、24 時間後に細胞を固定後、蛍光抗体法によりウイルス抗原を検出した。ウイルス抗原陽性細胞数を比較することで、SCARB2 依存的な感染が起こっているか検証した。

(2) ウイルスと SCARB2 の結合

CVA7、CVA14 および CVA16 が SCARB2 を感染受容体として利用しているのであれば、ウイルスと SCARB2 の結合が確認出来るはずである。そこで、SCARB2 の細胞外領域と IgG の Fc 領域を融合した可溶性 SCARB2 (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。

C. 研究結果

(1) SCARB2 依存的感染

RD 細胞および siRNA で処理した RD 細胞における SCARB2 の発現を Western Blot により確認した結果、SCARB2 に対する siRNA (siSCARB2) を処理した RD 細胞において SCARB2 の発現が抑制されていた (図 1A)。CVA6 および CVA10 では、3 つの条件のそれぞれで同程度のウイルス抗原陽性細胞が検出された。つまり、これらウイルスの感染は、SCARB2 に依存しない。一方、CVA7、CVA14 および CVA16 は、SCARB2 の発現を抑制した条件でウイルス抗原陽性細胞数が、他の 2 つの条件より明らかに低下していた。つまり、CVA7、CVA14 および CVA16 の RD 細胞への感染は、SCARB2 依存的に起こっていた。

(2) ウイルスと SCARB2 の結合

CVA7、CVA14 および CVA16 のウイルス蛋白質は SCARB2-Fc のレーンに検出され、Control Fc のレーンでは検出されなかった (図 2)。CVA6 および CVA10 のウイルス蛋白質は、Control Fc および SCARB2-Fc のどちらのレーンにおいても検出されなかった。つまり、CVA7、CVA14 および CVA16 は SCARB2 と結合し、CVA6 および CVA10 は SCARB2 と結合しないことがわかった。

D. 考察

今回の結果から、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、手足口病を発症した患者から分離

されることの多いウイルスであることが、疫学調査より明らかとなっている。つまり、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。しかし、CVA5 や CVA6 等は、臨床的に手足口病と診断された患者から分離される場合もある。そのような株であっても、RD 細胞への感染は SCARB2 非依存的である。これらのウイルスの感染受容体が何であるか明らかにすることも、SCARB2 依存的なウイルスによる手足口病や EV71 の神経病原性を理解する上で、重要な知見をもたらす可能性があると考えられる。

E. 結論

L-SCARB2 細胞を用いて臨床検体からウイルス分離をする際には、4 種のウイルス (EV71、CVA7、CVA14、および CVA16) を区別無く拾う可能性が高いと考えられる。また、飯塚らの本年度報告書にあるように L-SCARB2 細胞は RD 細胞よりも感受性が低く、臨床検体からの直接のウイルス分離に利用することは困難なことが示唆されている。一方で、EV71 の臨床分離株の中には、RD 細胞では良く増えるが L-SCARB2 細胞での増殖が若干悪い株が存在していることが明らかになっている。これらの株は、SCARB2 を利用するステップ以外の過程で増殖抑制がかかっていることも明らかとなっている。これらの事から、L-SCARB2 細胞は“特異的・選択的 EV71 分離 “というよりは、むしろ分離さ

れた株の同定・型別のツールとして用いるのに有用であると考えられる。

2. EV71 感染モデルマウスの開発

A. 研究目的

現在、EV71 感染による神経病原性発現機構を解析するためのモデル動物として“サル”と“乳のみマウス”が用いられている。サルモデルはヒトでの病態に類似した病態を示すが、取扱いが簡便ではない。乳のみマウスは生後 1 週間程度で感受性を消失する他、筋肉組織でのウイルス増殖が顕著に見られるなどヒトでの感染様式と異なっていると考えられるためモデル動物として最適でない。従って EV71 神経病原性解析のための最適な動物モデルは現在のところ存在しておらず、ウイルス病原性試験やワクチン検定法の確立に至っていない。ヒトポリオウイルスレセプター-発現マウスはポリオウイルス感受性を獲得し、病原性解析およびワクチン検定に有用である。そこで同様にヒト SCARB2 を発現する遺伝子改変マウスを作製し、ヒトでの感染様式と病態を模した EV71 感受性マウスモデルの確立を目指した。

B. 研究方法

(1) SCARB2 トランスジェニックマウスの作製
昨年度までに、ヒト SCARB2 遺伝子全領域を含む Bacterial Artificial Chromosome (BAC) クローンのマイクロインジェクシ

ョンによりヒト SCARB2 遺伝子陽性マウスを 6 系統選別した。今年度はウエスタンブロット法や免疫組織化学によりトランスジェニックマウスのヒト 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た。更に神経病原性発現マウスの組織中のウイルスカ価測定および組織染色によりウイルス増殖部位を特定した。

(2) ヒト SCARB2 ノックインマウス

昨年度までにマウス SCARB2 エクソン 4 領域をヒト型に組換えターゲットベクターの作製し、マウス ES 細胞への導入後、キメラマウスを作出した。今年度はキメラマウスと cre recombinase を発現するマウスとの交配により、knock-in allele を持つマウスを作製した。このマウス臓器もしくは初代培養細胞から RNA を抽出し、狙い通りの転写並びにスプライシングが起こっているかを調べた。さらにマウス個体に EV71 を感染させ、感受性を獲得したかどうか調べた。

C. 研究結果

(1) ヒト SCARB2 発現トランスジェニックマウス

ヒト 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。また免疫組織化学を行ったところ多数の臓器においてヒト SCARB2 陽性であった。特に中枢神経系においては神経細胞が最も強く染色され、

発現レベルが高いことが推測された。次に EV71/Isehara/Japan/99 株を脳内接種したところ 4 系統で四肢の弛緩性麻痺や運動失調などの神経症状を示した (図 3)。同様に静脈内、腹腔内接種においても上記のような神経症状が観察された (表 1)。また神経症状を呈しているマウスから臓器を採取し、ウイルスカ価を測定したところ脳および脊髄で高いウイルスカ価を示した (図 4)。また組織染色により脳および脊髄の神経細胞にウイルス抗原を検出した (図 5)。

(2) ヒト SCARB2 ノックインマウス
ノックインマウスの作製過程は図 6 に示す通りであり、そこから予想される mRNA の構造は図 7A に示した通りである。ところが、予想外にノックインマウスでは図 7B に示したようなエクソン 4 を飛ばしてスプライシングが起こる mRNA が殆どであり、狙い通りの mRNA は殆どできていないことが判明した。個体にウイルスを感染させた場合もトランスジェニックマウスで観察されたような神経症状は観察されなかった。

D. 考察

(1) ヒト SCARB2 発現トランスジェニックマウス

タンパク質発現分布の解析から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。また EV71 接種によりトランスジェニ

ックマウスが神経病原性を発現したことからヒト SCARB2 は個体内においても感染受容体として機能しておりかつ神経病原性発現に寄与することが明らかになった。発症にはヒト SCARB2 の発現だけで十分であった。さらに脳および脊髄で高いウイルスカ価を検出したこと、組織染色により神経細胞に抗原が検出されたことから EV71 は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。

(2) ヒト SCARB2 ノックインマウス
ターゲティングベクターの設計には大きな問題があるように思われない。設計通りにできたノックインマウスで正確なスプライシングが起こらずウイルスと結合しないレセプターを多く発現しているために、マウス個体レベルでは感受性が見られなかったと推測される。

E. 結論

ヒト SCARB2 発現トランスジェニックマウス

EV71 感受性マウスを作出した。今後はこのトランスジェニックマウスの性状解析を行うとともに EV71 ウイルス株間での神経毒力の違いを解析していく。

ヒト SCARB2 ノックインマウス

スプライシング異常の原因を追求して新たなマウスを作製することが正当な手段

であるが、トランスジェニックマウスが良い成績を残していることからノックインマウスの作製は一時中断することにする。

H. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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
2. 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
3. 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
4. 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. Vol 3. Article 32 (on line publication), 2012

5. McWilliam Leitch EC, Cabrerizo M, Cardoso 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.
6. 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.

2. 学会発表

1. Yamayoshi S, Iizuka S, Yamashita T, Minagawa H, Sanjoh K, Kasushima 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
2. 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

3. 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
4. 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
5. 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
6. 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

7.

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

3. その他

なし

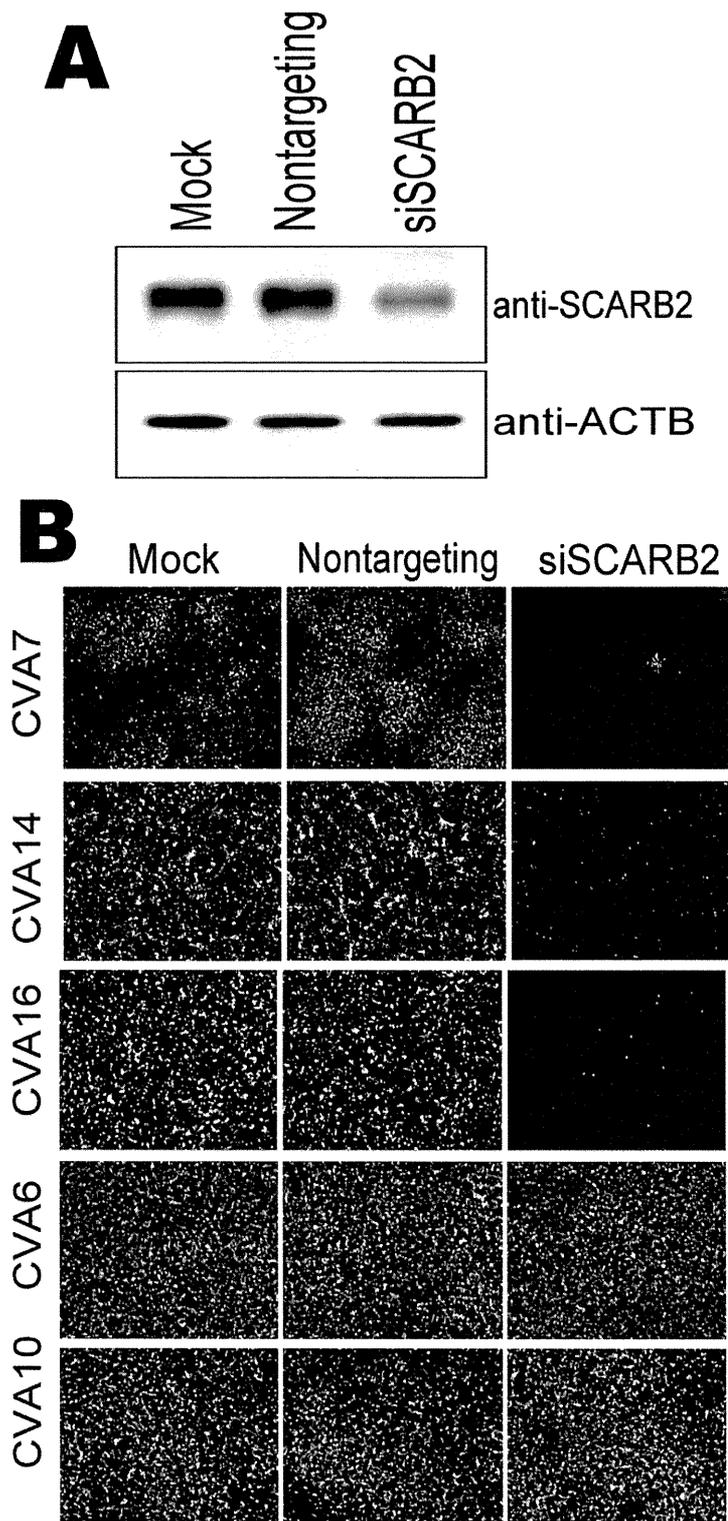


図1 SCARB2発現抑制RD細胞におけるウイルスの感染

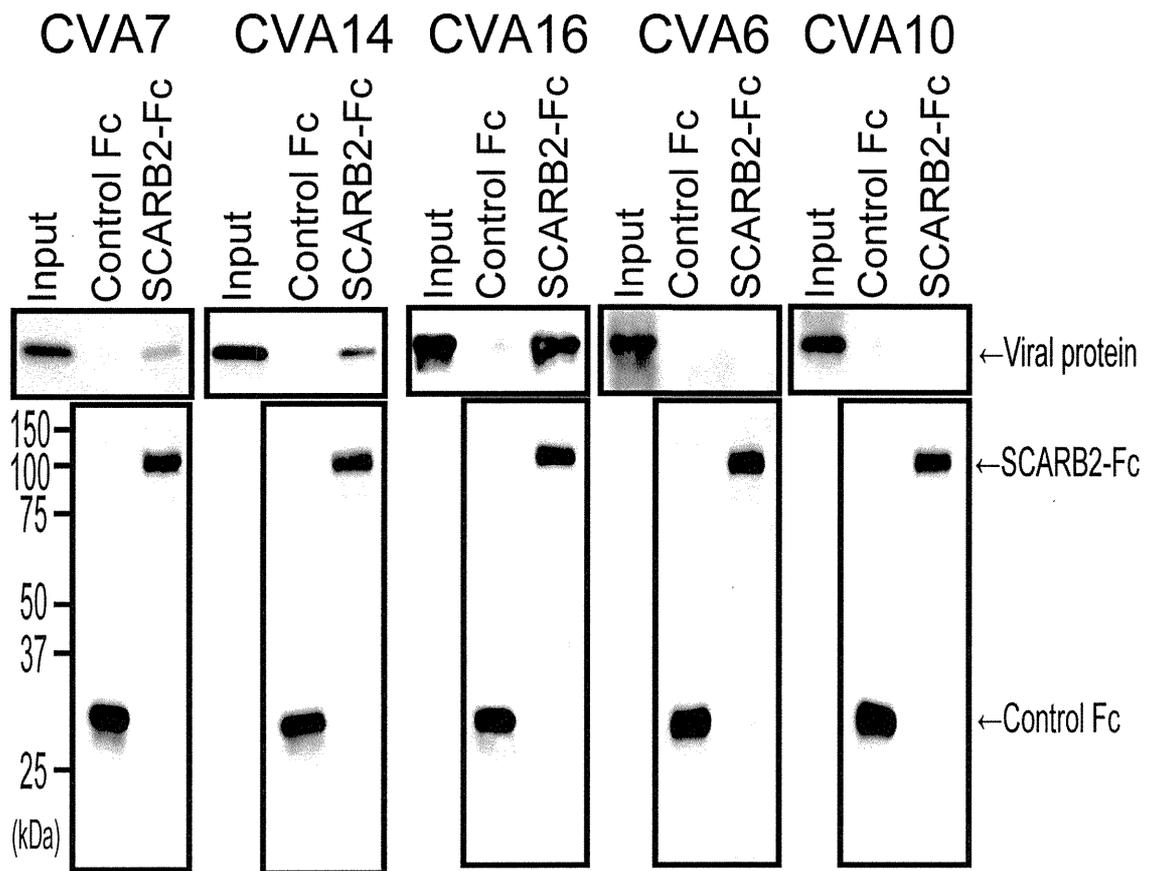


図2 ウイルスとSCARB2の結合

表1 ウイルス接種経路およびウイルス接種量による神経症状発現率

接種経路	系統	接種ウイルス量 (Log ₁₀ TCID ₅₀)						
		0	1	2	3	4	5	6
脳内	NonTg	-**	-	-	-	-	0/6*	-
	Tg	0/6	0/6	2/6	4/6	2/6	4/6	-
静脈内	NonTg	-	-	-	-	-	-	0/6
	Tg	-	0/6	2/6	2/6	2/6	2/6	6/6
腹腔内	NonTg	-	-	-	-	-	-	0/6
	Tg	-	-	0/6	1/6	2/6	2/6	6/6
胃内	NonTg	-	-	-	-	-	-	0/6
	Tg	-	-	-	-	-	-	0/5

*神経症状発現マウス匹数/接種マウス匹数

**実施していない。



図3 EV71接種により神経症状を示したトランスジェニックマウス。左後肢に麻痺が観察される。

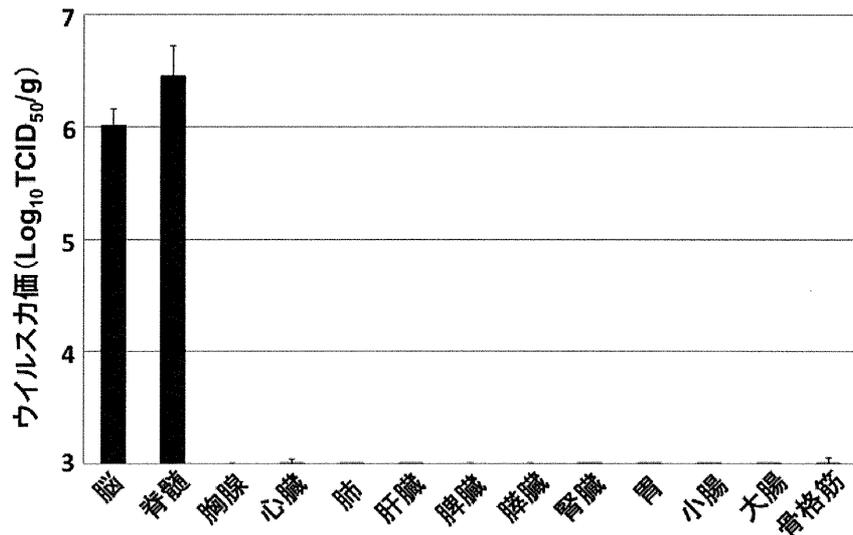


図4 静脈内接種により神経症状を示したマウスでは脳および脊髄にEV71を検出した。

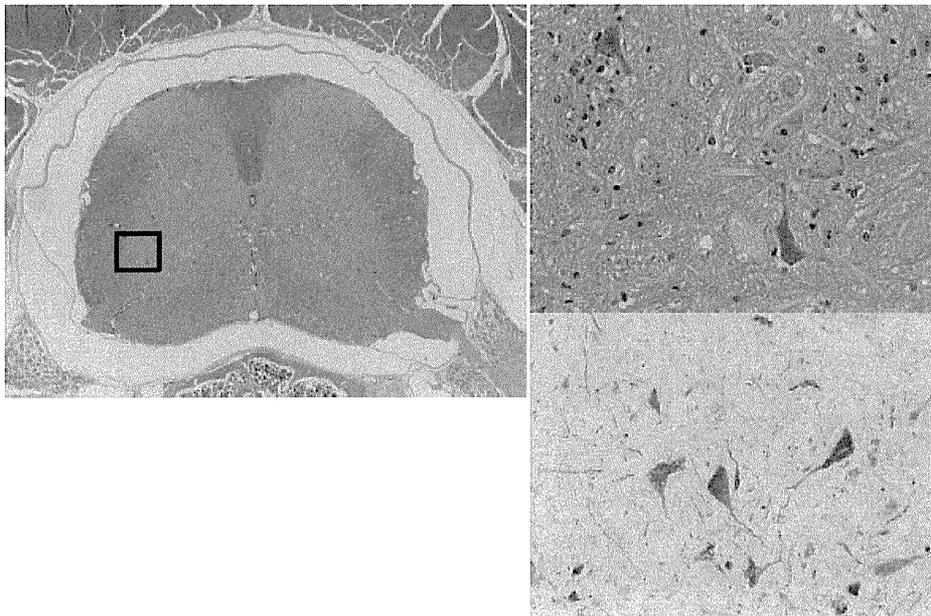


図5 神経症状を示したトランスジェニックマウスの脊椎におけるウイルス抗原

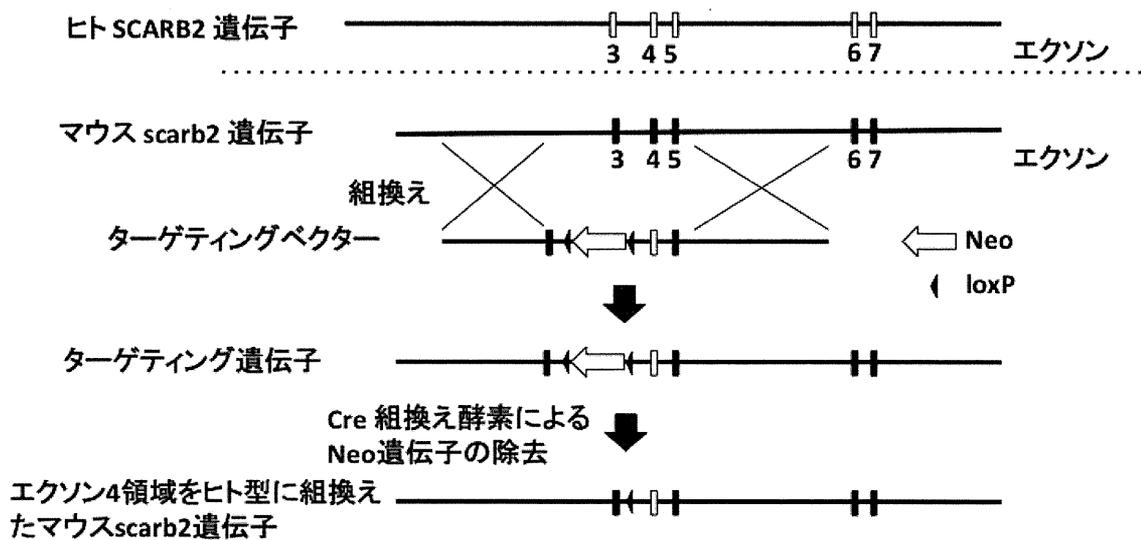


図6 ヒトSCARB2 ノックインマウス作製方法

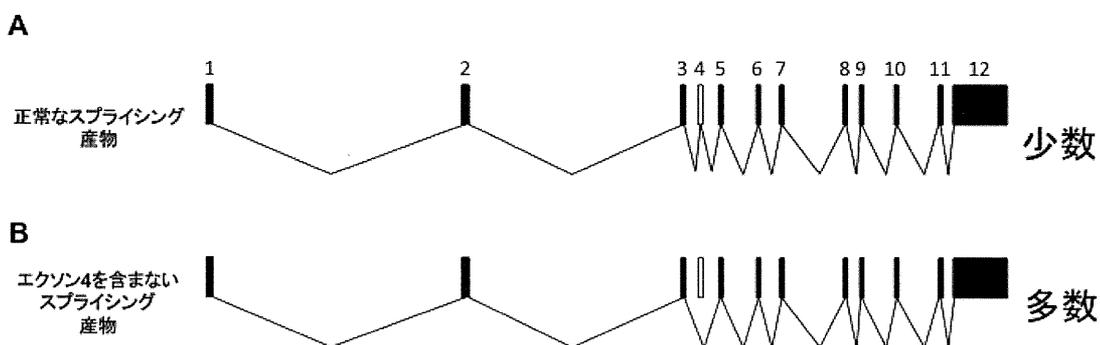


図7 エクソン4領域をヒト型に組換えたマウス *scarb2* 遺伝子からの転写産物

厚生労働科学研究費補助（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」研究報告書

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

研究代表者 清水 博之 国立感染症研究所ウイルス 2 部室長
協力研究者 高山 直秀 東京都立駒込病院小児科医師

研究要旨 2010 年に続き、2011 年も 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。OPV 1 回目と 2 回目の累積接種率曲線は、それぞれ生後 3，6 ヶ月から立ち上がり、階段状に上昇して、生後 12 ヶ月でそれぞれ 90.3%，47.4%，生後 24 ヶ月でそれぞれ 96.3%，85.2% に達していた。なお、2010 年の調査では、生後 12 ヶ月における、OPV 1 回目及び 2 回目の累積接種率は、それぞれ 88.8%，44.0%，生後 24 ヶ月における累積接種率は、各 96.3%，85.4% であった。接種時期が早いロタウイルスワクチン、ヒブワクチン、結合型肺炎球菌ワクチンが OPV 累積接種率に影響するか否かを知るために、今後も同様の調査を続ける必要がある。

A. 研究目的

ワクチン接種は感染症予防ないし制圧に有効な手段であり、費用対効果比も大きいことが知られている。しかし、ワクチン接種が感染症予防手段として十分な効果をあげるためには小児期の適切な時期に高い接種率を達成することが必要である。一方で、接種率を高めるためには、接種率の現状を正しく把握して、予防接種政策を進める必要がある。全国の予防接種率を十分正確に把握するために、我々は 3 歳児を対象として 2002 年から麻疹ワクチンについて、無作為抽出標本による月齢別ワクチン累積接種率（一定の月齢までにワクチン接種を受けた人の割合）調査を実施し、2003 年からは経口生ポリオワクチン（OPV）1，2 回目の調査も同時に行った。2009 年からは、調査対象を 3 歳児から 2 歳児に変更して実施してきた。2011 年も昨年同様 2 歳児を対象として調査を行った。

B. 研究方法

2011 年は、2009，2010 年と同様に、2 歳児を対象として OPV 1，2 回目の累積接種率調査を実施した。また、集計対象を OPV 接種済みで接種日が明らかな標本と未接種標本のみとし、ワクチン接種は済んでいるものの、接種日不明の標本を除外した点も昨年度調査時と同様である。

調査方法は、例年と同様に 2011 年 4 月に、全国から 5,000 人の 2 歳児を無作為抽出し、同年 10 月に、抽出された 2 歳児が居住する市区町村において予防接種を担当する方々に、OPV1 回目及び 2 回目の接種月齢の調査を依頼し、返送された調査票を基に、累積接種率を算定した。ただし、本年は東日本大震災により大きな被害を受けた岩手県、宮城県、福島県、栃木県、茨城県の全市区町村、および青森県と千葉県の一部市町村を調査対象から除外した。

C. 研究結果

1. 回収率

2011年4月1日現在で満2歳に達した小児を全国から5,000名抽出し、2011年10月に、これらの2歳児が居住する1,065カ所の自治体に調査依頼状を発送した。2011年12月27日現在で、903カ所の自治体から回答が寄せられたので、市区町村数から算出した回収率は84.8%となった。

無作為抽出した2歳児の数(標本数)は5,000名おり、うち4,376名分の記録が返送されたので、標本数から算出した回収率は87.5%となった。この回収率は、2008年の85.7%、2009年の82.5%、2010年の84.0%を上回っていた。

OPV 1回目の被接種者数は、生後2ヵ月で4例、3ヵ月で10例、4ヵ月で56例と増加し、生後6ヵ月、7ヵ月でそれぞれ1,223例、1,227例に増加したのち減少に転じ、生後10ヵ月では32例となった。その後、再び増加し、生後12ヵ月で219例と第2のピークを形成した。生後14～17ヵ月は10例台で推移し、生後18ヵ月で60例となって第3のピークを形成した。OPV 2回目の被接種者数は生後8ヵ月が125例で第1のピークとなり、生後12ヵ月で953例で第2のピーク、生後18ヵ月が380例で第3のピーク、生後24ヵ月が108例で第4のピークを形成した。OPV 1回目と2回目の累積接種率曲線は、それぞれ生後3、6ヵ月から立ち上がり、階段状に上昇して、生後12ヵ月でそれぞれ90.3%、47.4%、生後24ヵ月でそれぞれ96.3%、85.2%に達した。なお、2009年の調査では、生後12ヵ月における、OPV 1回目及び2回目の累積接種率は、それぞれ89.3%、46.5%、生

後24ヵ月における累積接種率は、各96.9%、85.2%であり、2010年の調査では、生後12ヵ月における、OPV 1回目及び2回目の累積接種率は、それぞれ88.8%、44.0%、生後24ヵ月における累積接種率は、各96.3%、85.4%であった。

D. 考察

2011年の調査は東日本大震災の被災地を除外して実施した。しかし、2010年の調査結果を、今回の調査で除外した地域と調査対象とした地域に分けて累積接種率を比較した結果では、両者の累積接種率に差がなかったため、被災地を除外しても、全国累積接種率と見なしてよいと判断できる。

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、累積接種率の低下傾向は認められなかった。

最近、OPVに由来する健康被害を恐れて、不活化ポリオワクチン(IPV)接種を希望する保護者が増加しているため、OPV接種率の低下が懸念されている。しかし、このようなOPV接種率の低下が一部の地域などに限定的に起きている場合には、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我々の調査法では、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。

E. 結論

2010年に0歳であった小児群におけるOPV累積接種率は、それ以前の累積接種率と同等であり、全国的な低下傾向は見られなかったが、今後も継続的な調査が必要である。

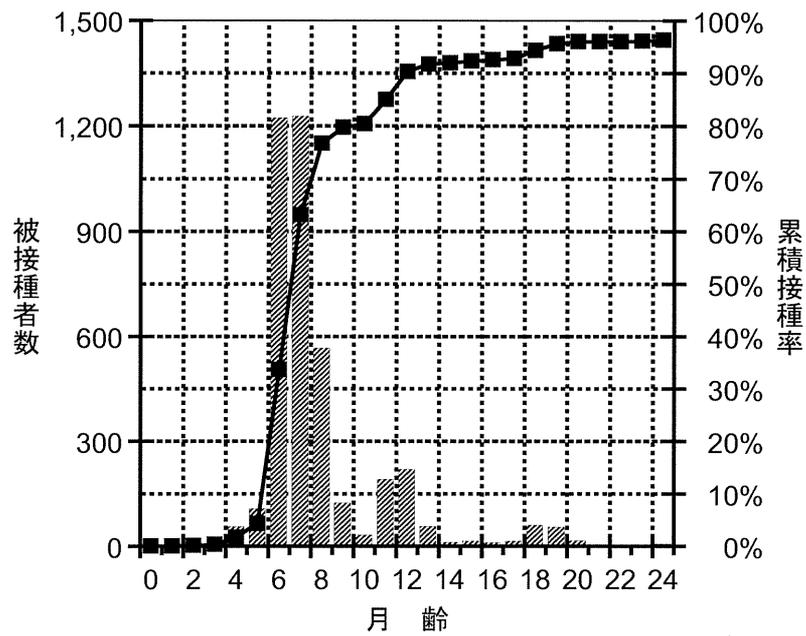


図 1. 経口生ポリオワクチン 1 回目の被接種者数及び累積接種率

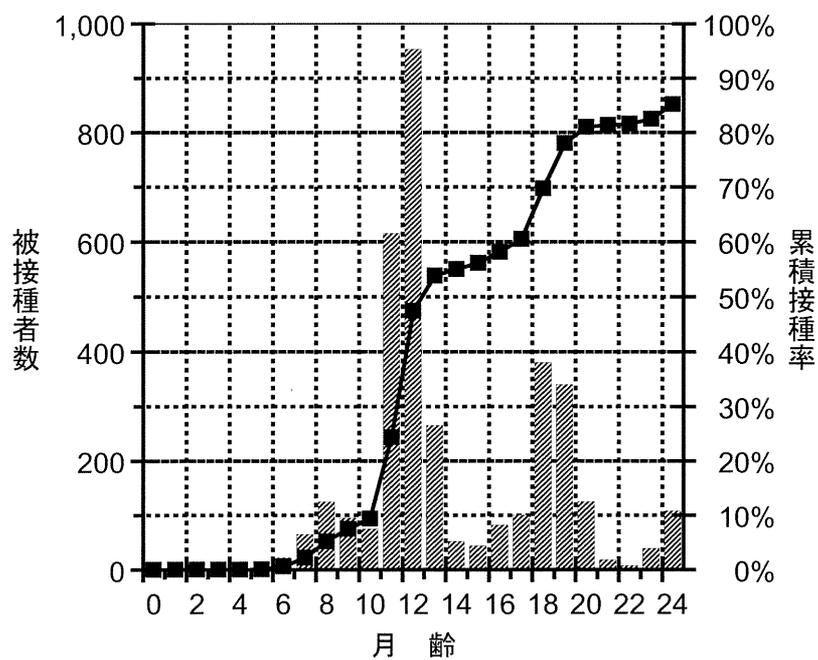


図 2. 経口生ポリオワクチン 2 回目の被接種者数及び累積接種率