

201225015A

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 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 清水 博之

平成 25 年 (2013 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 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 清水 博之

平成 25 年（2013 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  
研究代表者 清水博之 . . . . . 1

### II. 分担・協力研究報告

1. 環境サーベイランス手法を用いた中国山東省のエコーウイルス 6 型の地域間伝播の推定  
吉田 弘 (国立感染症研究所 ウイルス第二部) . . . . . 17
2. 富山県における下水流入水からの腸管系ウイルス検出 (平成 19 年~24 年)  
滝澤剛則 (富山県衛生研究所) . . . . . 21
3. 下水からのアイチウイルス及びイヌ由来コブウイルスの検出と遺伝子解析  
山下照夫 (愛知県衛生研究所) . . . . . 27
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  
世良暢之 (福岡県保健環境研究所) . . . . . 34
5. 臨床検体および環境水中からのエンテロウイルス検出  
山崎謙治 (大阪府立公衆衛生研究所) . . . . . 38
6. 全国情報による 2001~2012 年のコクサッキーウイルス A 群 6 型の病像  
藤本嗣人 (国立感染症研究所 感染症情報センター) . . . . . 41
7. 日本とタイにおける急性胃腸炎に関係するピコルナウイルス  
牛島廣治 (日本大学医学部) . . . . . 48
8. ベトナムにおいて急性呼吸器感染症で入院中の小児におけるライノウイルス  
牛島廣治 (日本大学医学部) . . . . . 56
9. 1,2-diphenyl-6-isopropyl-3-methyl-1,4-dihydro-4-oxoquinoline(MRL-2471) の抗ライノウイルス作用に関する分子解析  
吾郷昌信 (長崎県環境保健研究センター) . . . . . 61
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小児入院症例に関する全国調査  
福島若葉 (大阪市立大学) . . . . . 70
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  
中野貴司 (川崎医科大学) . . . . . 81
12. 2011 年小児無菌性髄膜炎患者髄液から分離されたエコー 6 型の分子疫学的解析  
町田早苗 (埼玉医科大学) . . . . . 88

13. Saffold ウイルスの神経・膵臓に対する病原性の解析と持続感染機序の解明 大原義朗（金沢医科大学）	92
14. 新規カルジオウイルスの病理学的診断法に関する研究 永田典代（国立感染症研究所 感染病理部）	98
15. エンテロウイルス感染マウスモデルの解析 有田峰太郎（国立感染症研究所 ウイルス第二部）	102
16. アイチウイルス複製機構の解析 佐々木潤（藤田保健衛生大学）	103
17. 数理モデル解析によるエンテロウイルス 71 分離株の特性解明 小柳義夫（京都大学ウイルス研究所）	105
18. RD-A 細胞を用いた Human enterovirus A の分離 飯塚節子（島根県保健環境科学研究所）	111
19. エンテロウイルス 71 受容体 SCARB2 の機能解析ならびにエンテロウイルス 71 感染モデルマウスの開発 小池 智（東京都医学総合研究所）	116
20. 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：2012 年調査結果 高山直秀（東京都立駒込病院）	131
Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表	135

厚生労働科学研究費補助金

平成24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 (国立感染症研究所ウイルス第二部)  
滝澤剛則 (富山県衛生研究所)  
藤本嗣人 (国立感染症研究所 感染症情報センター)  
牛島廣治 (日本大学医学部)  
小柳義夫 (京都大学ウイルス研究所)  
小池 智 (東京都医学総合研究所)

研究協力者:

Wang Haiyan, Tao Zexin, Li Yan, Xu Aiqiang (山東省 CDC)  
板持(岩井)雅恵、嶋 一世 (富山県衛生研究所)  
山下照夫、廣瀬絵美、安達啓一、伊藤 雅、平松礼司、藤浦 明、皆川洋子 (愛知県衛生研究所)  
中村朋史、吉富秀亮、石橋哲也、世良暢之 (福岡県保健環境研究所)  
山崎謙治、中田恵子、左近直美 (大阪府立公衆衛生研究所)  
帖佐徹 (聖マリア病院)  
加納和彦、花岡 希、牧野友彦、小長谷昌未 (国立感染症研究所感染症情報センター)  
榎本美貴 (兵庫県立健康生活科学研究所)  
清水英明、松島勇紀 (川崎市衛生研究所)  
小林正明 (小林小児科)  
沖津祥子、Ngan Thi Kim Pham、早川 智 (日本大学医学部)  
Pattara Khamrin (チェンマイ大学医学部)  
Aksara Thongprachum (東京大学大学院医学系研究科)  
吾郷昌信、北川由美香、吉川 亮 (長崎県環境保健研究センター)  
武知茉莉亜、乾未来、福島若葉 (大阪市立大学大学院医学研究科)  
中野貴司、加藤 敦、井上美佳、赤池洋人、尾内一信 (川崎医科大学 小児科)  
福島慎二、濱田篤郎、水野泰孝 (東京医科大学病院)  
Asif Naeem, Rifqiyah Nur Umami、片岡周子 (国立感染症研究所ウイルス第二部)  
町田早苗 (埼玉医科大学 医学部)  
大原義朗、姫田敏樹 (金沢医科大学医学部 微生物学部門)  
永田典代、鈴木忠樹、小谷 治 (国立感染症研究所 感染病理部)  
佐々木 潤 (藤田保健衛生大学 医学部)  
佐藤 佳 (京都大学ウイルス研究所)  
岩見真吾 (九州大学理学研究院)  
福原充子 (京都大学生命科学研究科)  
町田早苗 (埼玉医科大学医学部)  
飯塚節子、滝元大和、木内郁代 (島根県保健環境科学研究所)  
山吉誠也、大岡静衣、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)

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)

Kien Chai Ong, Kum Thong Wong (マラヤ大学・マレーシア)

高山直秀 (東京都立駒込病院)

崎山 弘 (崎山小児科医院院長)

## 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 Jinan 地区、Linyi 地区で 2010-2011 年に検出された下水由来 E6 型の塩基配列を用いて、E6 分離株の共通祖先配列を推定するとともに地域間の伝播時期推定を試みた。2010 年 8 月から 12 月の間に、Jinan 地区から Linyi 地区にウイルスの伝播が起こったことが推定された。
- 2) フィルター吸着溶出法を用いて毎月 1 回富山県の下水流入水のウイルス調査を行った。下水からは生ワクチン接種後 2 ヶ月の間にワクチン様ポリオウイルスが検出され、高感度のリアルタイム PCR 法でも、同様の結果だった。下水サーベイランスはポリオワクチン接種状況をよく反映しているものと考えられた。
- 3) 2011 年 9 月から 2012 年 10 月までに毎週採取された流入下水 56 検体中のアイチウイルスを調べたところ、48 検体 (85.7%) からアイチウイルスが、8 検体 (14.3%) からイヌ由来コブウイルスが検出された。
- 4) IPV 導入のアナウンス後、福岡県内 2 ヶ所の浄化センターで採取した流入水からのポリオウイルス分離数は減少し、平成 24 年 5 月を最後に未分離が続いた。IPV 導入に伴う生ポリオワクチンの打ち控えによる環境中からのポリオワクチン株の消失がその主因と考えられる。
- 5) 大阪府感染症発生動向調査事業におけるウイルス検出に加えて、下水流入水中エンテロウイルス消長について検討を行った。ヒトおよび下水共にエコーウイルス 6、7 が多く検出され、平成 24 年のウイルス流行の主流であったと考えられた。不活化ポリオワクチン導入時期以降の下水からはポリオウイルスは検出されなかった。
- 6) CA6 検出患者で発疹、水疱の発症頻度が増加傾向にあり、2011 年の HFMD 大規模流行時の CA6 陽性患者 28 名の臨床的観察と一致した。2009 年以降、CA6 が非定形的 HFMD を引き起こしていることが示された。
- 7) 日本、タイ、スリランカなどの小児胃腸炎患児・急性呼吸器感染症患児の臨床検体からピコルナウイルス科のヒトパレコウイルス、ヒトコサイルス、サフォールドウイルス、ライノウイルス、エンテロウイルス等の検出を行った。他のウイルスとの共感染が多く、病原性について今後の研究が必要である。
- 8) 新規抗HRV剤MRL-2471の薬剤耐性ウイルスに見出されたアミノ酸置換を伴う変異を導入したcDNAクローンを作製し、作用部位の解析を行った。2BにSer57Pheあるいは3AにCys73Serの単独変異を導入したウイルスはどれもMRL-2471に対して耐性を示したことから、これらの部位のアミノ酸が本薬剤の主要な作用部位であることが明らかとなった。
- 9) 2010年に、手足口病(HFMD)、ヘルパンギーナ(HA)、関連CNS合併症の小児入院症例に関する全国調査を行い、当該症例によって入院した15未満の患者数を推計した。EV71が主流行していた2010年に重症例調査を行い、WPRO症例定義による研究結果と国際的に比較可能な情報を得た。CNS合併症を呈した症例をAMの有無によって2群に分類し、CNS合併症の重篤度によって関連する因子が異なることを示すことができた。
- 10) 定期接種へのIPV導入後は成人に対してもIPVの追加接種を行う機会があることから、成人での免疫原性と安全性の検討を行う分担研究を実施した。健康成人32名を登録し、IPVを2回接種した結果、過去に接種歴がある場合はほとんど全例で、IPV1回接種後に良好な抗体価の上昇が確認された。中和抗体価は、Sabin株と野生株で大きな違いは認められなかった。
- 11) 2011年の患者髄液からエコー6型を分離した。分離株の5' NTR~3D領域(6670bp)の塩基配列について解析し、データベース上で検索したところ同時期に北海道で分離されたエコーウイルス6型と近縁であることが判明した。
- 12) 新規ヒトカルジオウイルスSAFVの神経および臓器に対する病原性に注目し、神経疾患患者の末梢血単核球を対象にしたウイルス遺伝子の検出、およびI型糖尿病、剖検例のパラフィン包埋臓器組織切片を用いたウイルス抗原の検出を行った。SAFVの遺伝子・抗原が検出され、ウイルス持続感染の可能性が示された。持続感染細胞の解析によりSAFV持続感染は受容体発現密度に依存した維持型持続感染であることを明らかにした。
- 13) 髄膜炎の原因として知られている主なピコルナウイルスの参照標準を作製し、免疫組織化学法による各種抗体の交差反応性について検討した。ホルマリン固定標本パラフィン包埋切片におけるSAFV3および各種エンテロウイルス抗原を検出するシステムを確立した。
- 14) 手足口病もしくはヘルパンギーナ患者の臨床検体からEV71を同定するためのTranscription-Reverse

transcription Concerted Reaction (TRCR) 法を開発した。

- 15) AiVの複製に関与する二つの宿主因子ACBD3とPI4KBの機能を明らかにするため、AiV複製複合体形成におけるPI4KBのキナーゼ活性の必要性を検証した。その結果、PI4KB活性が複製複合体形成に重要な働きをしていることが示唆された。
- 16) 数理モデルを起点とした解析により、EV71分離株毎のウイルス産生率と伝播効率が推定され、株間で異なることがあること、細胞死滅効率には差異は見られないことが明らかとなった。
- 17) HEV-A分離へのRD-A細胞の利用について臨床検体を用いて検討した結果、RD-A細胞は、国内で手足口病やヘルパンギーナの原因ウイルスとなっている、ほとんどの血清型のHEV-A分離に有用な培養細胞と考えられた。
- 18) EV71受容体としてSCARB2を同定し、その感染初期過程に於ける機能解析を行った。SCARB2受容体を介したウイルスの細胞表面への結合、細胞内侵入、脱殻過程におけるSCARB2受容体の機能を、同じくEV71の受容体であると報告されているPSGL-1と比較検討した。SCARB2はウイルスの結合だけでなく、侵入、脱殻過程も効率よく引き起こす受容体であることが明らかになった。
- 19) SCARB2発現するトランスジェニックマウス (tgマウス) は、ヒトと同様に急性の中枢神経系に病変を生じ、弛緩性麻痺または運動失調などの神経症状を呈する。tgマウスは、乳のみマウスに対して病原性を示さないEV71分離株に対しても感受性であること、成獣マウスにおいても感受性を維持していることを確認した。また、tgマウスは、SCARB2発現量に依存して感受性も強くなる可能性があることを見出した。
- 20) OPV累積接種率は、2009年、2010年の調査では、顕著な接種率の低下傾向は認められなかったが、2012年の調査では、OPV 1回目と2回目の累積接種率 (生後24ヶ月で、85.8%および71.9%) は前年調査時より大幅に低下していた。
- 21) アジア及び国内のEV71研究者を招聘し” Current Progress in Enterovirus 71 Research in the Asia-Pacific Region“ (2012年 8月30 - 31日、東京、日本神経ウイルス研究会との共催)を開催した。手足口病の疫学、EV71病原性発現機構、EV71ワクチン開発、腸管感染ウイルスサーベイランスと基礎研究について、有意義な研究情報交換の場を提供することが出来た。

## 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、2008-2012年には中国本土で、さらに2011-2012年にかけてはベトナム、カンボジア等において、多数の小児急性死症例を伴う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。我が国では幸い、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発生のリスクが常に存在する。国内外におけるウイルス感染症の発生状況の把握や他国との連携は、我が国で迅速かつ適切な感染症対策を実施する上で必要不可欠である。とくに、アジアを含む日本の周辺諸国における感染症発生動向の正確な把握は、新たな感染症から国民を守る重要な対策となる。このため、重症エンテロウイルス感染症の流行地域である東アジア地域の国々と連携し、病原体サーベイランス体制を整備するとともに、診断・治療法の開発につながる研究を実施する。

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を基盤として、新たなエンテロウイルス検査法の開発・評価を行うと

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。国内外におけるエンテロウイルスサーベイランス体制を強化することにより、重症エンテロウイルス感染症の迅速かつ正確な把握につなげる。エンテロウイルス感染・伝播・病原性発現の分子機構に関する基盤的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。

エンテロウイルス感染症サーベイランスの強化は、国内外におけるポリオフリーの確認のためにも重要である。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 西太平洋地域年次報告書等により随時報告する。2012年9月、不活化ポリオワクチンが、我が国の定期接種に導入された。不活化ポリオワクチン導入・移行期における腸管ウイルス病原体サーベイランス機能の維持・向上は、ポリオウイルス病原体サーベイランスの一環として、きわめて重要である。環境サーベイランス、エンテロウイルスサーベイランス等様々な手法に基づく腸管ウイルス病原体サーベイランスにより、ポリオフリーを確認することが引き続き重要である。

## B. 研究方法

- 1) Jinan 市および Linyi 市の下水処理場における流入水、をそれぞれ0.8Lづつ月1回採取。陰電荷膜を用いて40倍濃縮を行い、ビーフ液で2回溶出し、ウイルス分離に用いた。
- 2) 2011年4月から2012年11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。「フィルター吸着溶出法」及び「ポリエチレングリコール (PEG) 沈殿法」に従って濃縮した。培養細胞によるウイルス分離同定あるいは遺伝子検出を実施した。
- 3) 2006年9月から2012年10月までに毎週採取された流入下水330検体を材料とした。VP1領域にAiV特異的なプライマーを設計してRT-PCRを実施した。PCR陽性産物はpGEM-Tベクターに組み込み塩基配列を決定した。
- 4) 平成22年4月から平成25年1月まで、毎月1回、福岡県北部地区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。フィルター吸着溶出法により濃縮し、培養細胞によるウイルス分離同定あるいは遺伝子検出・解析を実施した。
- 5) 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、および下水処理場にて10gの綿花を未処理流入水中に2日間浸せぎした後、絞り出した下水を材料としてウイルス分離とRT-PCRによる検出を行った。
- 6) 2001年から2012年に報告されIASRで公表されたCA6検体2740件について、臨床症状の発症頻度を年別に調べた。2年ごとの症状別患者数を合計して年ごとのCA6検出数に対する割合について散布図および相関係数解析をおこなった。2011年に一つの医院においてCA6が陽性患者28名等に関してHFMDの症状をまとめた。
- 7) 日本、タイの小児急性胃腸炎と診断された小児の下痢便検体から核酸を抽出し、RT-PCR法によってウイルス遺伝子(HPeV SAFV, HCoV, EV)の検出を行った。陽性検体についてウイルス遺伝子の解析を行った。
- 8) ベトナム・ホーチミン市の第2子ども病院に2010-2011年に急性呼吸器感染症で入院した小児1082例から発症7日以内に採取した鼻咽頭スワブを使用した。スワブからはmultiplex(hemi)-nested PCR法にてインフルエンザウイルスA、B型、RSウイルス、ヒトメタヒューモウイルス、パラインフルエンザウイルス1-4型、コロナウイルス229EとOC43、アデノウイルス、ヒトボカウイルス、ライノウイルス(RV)の検出を行った。
- 9) 新規抗エンテロウイルス剤MRL-2471の*in vitro*における抗ウイルス効果は、HeLa (Ohio)細胞、ブラック純化したHRV89標準株ならびに薬剤耐性ウイルスを使用した。HRV89のcDNAクローンを作製し、部位変異導入法によりMRL-2471の薬剤耐性ウイルスに見出されたアミノ酸置換を伴う変異ウイルスを作製し、作用部位の解析を行った。
- 10) 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 (回答率68.6%) から回答を得た。二次調査では、85診療科から365例について情報を得た (回答率68%)。除外割合を考慮した結果、調査対象期間の入院患者数は、3,500人 (95%CI: 1,350-7,200) と推定された。二次調査で報告された46症例を除外し、306例を解析対象とした。
- 11) IPV 接種臨床研究は、倫理委員会の承認を得たうえで、当時国内未承認であったIPV製剤を健康成人に2回接種し、血中中和抗体価の推移と接種後の有害事象を観察した。出生年や過去のOPV接種歴に関するも考察した。1, 2, 3型ポリオウイルス(OPV株、野生株、VDPV株、計10株)に対する血清中和抗体価を測定した。
- 12) 無菌性髄膜炎を疑う小児患者由来検体からCODEHOP法でエンテロウイルスバンドを検出した。VP1領域の塩基配列解析でエコー6型と判明した髄液5検体をVero細胞、RD-A細胞、HEp-2細胞を用いてウイルス分離を試みた。
- 13) 多発性硬化症23例および視神経脊髄炎7例の末梢血を材料として、血清および単核球から全RNAを抽出し、RT-PCRによりSAFV感染の有無を解析した。対照として、健康者末梢血5例を用いた。とSAFV陽性例については、1年後に再度同様にウイルスゲノムの検出を行い、持続感染の可能性を検討した。
- 14) SAFV および主なピコルナウイルスの参照標本をddY新生仔マウス組織で準備し、免疫組織化学法によるパラフィン切片を用いたウイルス抗原検出法を検討した。
- 15) 手足口病もしくはヘルパンギーナ患者の臨床検体からEV71を、迅速、簡便かつ特異的に同定するため Transcription-Reverse transcription Concerted Reaction (TRCR) 法を開発した。
- 16) CMVプロモーター制御下でAiVポリプロテインを発現するプラスミドを構築し、Vero細胞へトランスフェクトした後、AiVタンパク質、ACBD3, PI4KB, PI4Pの細胞内局在を観察した。PI4KBキナーゼ活性阻害剤T00127-HEV1で処理した細胞で同様の観察を行なった。また、レプリコンRNA導入Vero細胞からPI4Pを抽出した後PI4Pを検出しmock細胞と比較した。
- 17) EV71感染実験は、EV71をRD細胞感染後0,1,2,3,4,5日目に、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、RD細胞を用いた限外希釈法によるウイルス感染価 [CCID<sub>50</sub>]、Alexa488 標識抗VP1抗体を用いたflow cytometry法および細胞数測定により算出した。任意時間*t*における上清中のウイルス量を*v(t)*、非感染細胞数を*x(t)*、感染細胞数を*y(t)*とし、上述の実験における測定値をもとに数理的解析を行った。
- 18) 2005年~2011年に乳のみマウス(SM)およびVero細胞等でHEV-Aが分離され保存されていた157検体と2012年に島根県発生動向調査病原体定点で採取された臨床検体730検体を用いた。RD-A細胞でCPEが出現したら抗血清で中和し、ブラック減少法により型別同定を行った。SMの発症の有無は検体(50μl/匹)を1検体当たり2匹に接種し、発症の

有無で分離陽性を判定した。

- 19) EV71受容体SCARB2の感染初期における機能解析のため、受容体発現細胞における感染効率、受容体との結合効率、細胞内侵入過程、脱殻反応についてPSGL-1受容体との比較解析を行った。
- 20) ヒトSCARB2を発現するtgマウス4系統 (Tg-10、16、22、49) を作製した。EV71感染が成立し、神経症状を呈し、主なウイルス増殖部位は中枢神経系であった。今年度は異なるEV71株を接種し、神経症状の有無を観察した。tgマウスの週齢によるEV71に対する感受性を試験した。さらにtgマウス系統間のヒトSCARB2発現量とEV71に対する感受性を比較した。
- 21) 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OPV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。

#### 【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。

日本における小児急性胃腸炎症例からの検体採取に関しては日本大学医学部で、タイでの小児急性胃腸炎症例からの検体採取に関してはチェンマイ大学で、それぞれ倫理委員会から研究の承認を受けた。ベトナムにおける検体採取に関しては、ホーチミン第2子ども病院にて倫理委員会から研究の承認を受けた。無菌性髄膜炎を疑う小児患者由来検体の解析については、埼玉医科大学病院倫理委員会にて承認を受けた。

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) 2008年以降、中国山東省JinanおよびLinyi地区で分離されたE6株はlineage 1.2に分類された。2011年にLinyi地区で分離頻度が高かったのはsublineage 1aであり、1bはJinan地区において頻度が高かった。系統解析の結果1aの分節位置に2010年8月11日に分離されたE6株が位置した。
- 2) 富山県の下水から生ワクチン定期接種後2ヶ月の間にワクチン様ポリオウイルスが検出された。ワクチン様ポリオウイルスを対象とした高感度のリアルタイムPCR法でも同様の結果だった。下水流入水からは毎月多種のHEV-B群が検出され、不顕性感染も含む地域におけるHEV-B群の流行状況をよく反映しているものと考えられた。
- 3) 特異的プライマーを用いたRT-PCR法により、48検体 (85.7%) からAiVが、8検体 (14.3%) からCaKVが検出された。AiV遺伝子型の内訳はA型が22検体 (39.3%)、B型が33検体 (58.9%) から検出されたが、C型は0件であった。糞便から検出されたウイルスと我々が下水から検出した配列が近縁な関係であることが判った。
- 4) 平成24年度において、ポリオウイルスは北部地区浄化センター流入水のみから分離された。分離時期は北部地区浄化センター周辺の対象自治体における春季のポリオワクチン接種時期と重なっていた。しかしながら、分離株数はこの3年間で最小であり、IPV導入アナウンス後からの打ち控えがあったことが示唆された。
- 5) 平成24年2月から11月の間に培養細胞またはRT-PCRにより臨床検体から95株のウイルスが検出された。EVは13血清型が同定され、E7が多数を占めた。下水流入水からは同期間に52株のウイルスが分離された。EVはE6、7が大半であり、ヒトにおける流行を反映していると考えられた。下水から分離されたPolioはVP1全領域の遺伝子解析からすべてワクチン株と考えられた。
- 6) 12年間に2740名からCA6が検出された。発熱は

- 86.1%、上気道炎は29.5%で報告された。口内炎は2011年には35.8%報告された。発疹は41.5%に見られ、最小9.7%で最大61.0%であり増加傾向が見られた。水疱は平均15.5%、最小0.0%で最大24.0%であった。水疱と発疹で増加傾向が、上気道炎で減少が見られた。発熱、口内炎について発症頻度の増減は見られなかった。
- 7) タイの検体ではSAFVが0.7%、HCoSVは0.2%、日本の検体からはHPeVが4.5%、SAFVが1.5%、EVが7.4%検出された。
  - 8) ベトナムにおいて急性呼吸器感染症で入院した患児の鼻咽頭スワブからヒトRVを検出し、臨床データとの比較を行った。RVは患者の30%から検出され、1年を通して流行しと重篤な下気道感染症を起こすことがわかった。特に乾季では細気管支炎、肺炎におけるRVが重要である。
  - 9) 新規抗HRV剤MRL-2471のHRVにおける主要な作用部位は非構造タンパク質2BのS57あるいは3AのC73に相当するアミノ酸残基であることが明らかとなった。
  - 10) 2010年のHFMD流行期であった、4月1日～9月30日の入院患者数は、3,500人(95%信頼区間:1,350-7,200)と推計された。CNS合併症の関連因子を検討した結果、「Complicationあり」に対する「入院時の発熱 $\geq 39^{\circ}\text{C}$ 」のOR(95%CI)は2.07(1.00-4.28)、「Severe complicationあり」に対する「高血糖」のOR(95%CI)は10.6(1.63-68.5)、「白血球増多」のOR(95%CI)は2.36(0.61-9.17)であった。また、「CRP高値」とCNS合併症の負の関連が示され、OR(95%CI)は「Complicationあり」に対して0.25(0.13-0.47)、「Severe complicationあり」に対して0.23(0.07-0.69)であった。
  - 11) 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を輸入し接種を実施した。本報告書作成時点で、42例が登録され、研究を継続中である。現在のところ、32例の抗体価測定が完了した。安全性については、問題となるような副反応は認められなかった。ほとんどの被験者でIPV1回接種後強い抗体誘導が認められ、接種前に3つの型すべての抗体価が陰性であった1例を除いて、全例で中和抗体価が8倍以上に上昇した。2回接種後は、全ての株に対して、全例が中和抗体価8倍以上となった。
  - 12) 分離エコー6型ウイルスについてVP1領域867bpの塩基配列を系統樹解析すると2011年北海道で分離されたウイルスに近縁であることが判明した。5'UTR～3D領域6670bpをデータベース上に報告された塩基配列と系統樹解析すると、VP1領域の解析結果と同様、2011年北海道で分離されたウイルスに近縁であった。
  - 13) MS 23例、NMO 7例および健常者 5例を対象としたRT-PCRにおいて、MS 1例の単核球からSAFV遺伝子 5' UTR 領域が検出された。1年後に同一患者の末梢血単核球を再調査したところ、単核球のみからSAFVの 5' UTR 領域が検出された。I型糖尿病診断剖検例を用いた免疫組織学的解析から、膵臓の局所リンパ節等の細胞に抗SAFV抗体染色性が認められた。SAFV低感受性HeLa細胞にSAFVを感染させ、SAFV持続感染細胞を作出した。*in vitro*においてSAFVは持続感染することが証明され、持続感染は感染受容体発現密度依存的であることがウイルス結合解析から証明された。
  - 14) ホルマリン固定標本パラフィン包埋切片におけるSAFV3および各種エンテロウイルス抗原を検出するシステムを確立した。抗SAFV抗体は特異性を示し、エンテロウイルスA型、B型に交差反応性は示さなかった。抗EV71抗体はエンテロウイルスA型、B型に交差反応性を示した。抗PV抗体はいずれのウイルスにも交差反応性を示さなかった。抗CVB3抗体はエンテロウイルスA、B型に交差反応性を示した。抗EV-2C抗体はSAFV以外のエンテロウイルス抗原を検出することが可能であった。
  - 15) 手足口病もしくはヘルパンギーナ患者の咽頭拭い液から抽出したRNAには、およそ $10^5$ コピーのウイルスゲノムが含まれていることを明らかにした。 $10^3$ コピー以下の検出限界でEV71の既知の全てのジェノタイプの代表株を検出できる新規TRCR法を開発した。新規TRCR法を用いて、手足口病もしくはヘルパンギーナ患者の咽頭拭い液から抽出したRNAから、EV71を特異的に検出することができると示した。
  - 16) AiV非構造タンパク質と相互作用する宿主因子をスクリーニングした結果、ゴルジタンパク質ACBD3を得た。AiVタンパク質を一過性に発現させた細胞内では、レプリコンRNA導入細胞と同様にACBD3、PI4KB、PI4Pの特徴的斑点様構造が観察され、ウイルスタンパク質2B、2C、3Aとの共局在が認められた。T00127-HEV1で処理すると、ACBD3、PI4KB、PI4Pが共局在する斑点様構造は消失し、AiVタンパク質は不規則な大きさの点状構造として観察された。レプリコンRNA導入細胞では、mock細胞と比べてPI4P量の増加が認められた。
  - 17) EV71分離株感染細胞の寿命、バーストサイズ、基本再生産数が算出され、分離株間で異なることがわかった。RD細胞の倍加時間は、 $10.58 \pm 0.11$ 時間/日であった。EV71分離株のウイルス減衰率は分離株ごとに異なっており、KED005株は安定性が低かった。ウイルス感染増殖数理モデルを構築したところ、095株、KED005株、02363株に感染した細胞の半減期に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では、1095株とKED005株では、02363株のそれと比較して統計的に有意かつ顕著な差異が認められた。
  - 18) RD-A細胞での分離をSMあるいはVero細胞等での分離と比較すると、CVA2、3、4、5、8、10はSMとほぼ同等、CVA6、12、16、EV71は分離可能であったが、分離率は従来より低く1/5～1/2の分離率であった。RD-A細胞はCVA2、3、5、8に対してSMの検出感度の1/10程度、CVA6、12は1/100程度であった。CVA10は同程度であった。
  - 19) EV71はSCARB2を介して結合、侵入、脱殻を行うことができる。SCARB2はpoliovirus receptor (PVR)やCoxsackie-Adenovirus receptor (CAR), major group rhinovirus receptor (ICAM-1)と同様に1種類に分子のみでウイルスの吸着のみならずウイルスの脱殻反応を開始させるタイプの受容体であることが明らかになった。

- 20) 3週齢のTg-10マウスにEV71/BrCr、SK-EV006、C7、Isehara株を $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>脳内接種したところ、全てのウイルス株の感染により、神経症状を発現した。コクサッキーウイルスA16 G-10株脳内接種により神経症状を発現した。Tg-10、16、22、49系統のtgマウスにEV71/Isehara/Japan/99株を $1 \times 10^4$  および $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>静脈内接種し、神経症状発現率を比較したところ、ヒトSCARB2発現量が高かったTg-16系統が最も発現率が高く、他の3系統は同程度であった。
- 21) 2012年の調査では、OPV 1回目と2回目の累積接種率曲線は、生後3、6ヵ月から立ち上がり、生後12ヵ月でそれぞれ78.9%および39.8%、生後24ヵ月でそれぞれ85.8%および71.9%であった。1回目、2回目とも、前年2011年調査時の生後24ヵ月での累積接種率、96.3%および85.2%より大幅に低下していた。
- 22) EV71受容体の構造および機能の解析を進め、新たな検査法の開発、EV71感染伝播および分子進化機構の解析、および、病原性発現機構解明のための基盤的研究を行った。
- 23) 2011年の日本の手足口病大流行の主要な原因ウイルスがCVA6であることを明らかにした。
- 24) 日本におけるIPV導入・移行期に際し、「ポリオワクチンに関するファクトシート」等により、基盤的知見・情報を整理・公開した。IPV導入・移行後に必要な調査研究を実施した。
- 25) アジア及び国内のEV71および腸管感染ウイルス研究者を招聘し”Current Progress in Enterovirus 71 Research in the Asia-Pacific Region“ (2012年 8月30-31日、東京、日本神経ウイルス研究会との共催)を開催した。手足口病の疫学、EV71病原性発現機構、EV71ワクチン開発、腸管感染ウイルスサーベイランスと基礎研究について、有意義な研究情報交換の場を提供することが出来た。

#### D. 考察

- 1) 中国山東省の2地区の定点から検出したE6株の塩基配列情報をもとに、祖先配列の推定、伝播時期、伝播様式の推定を試みた。その結果、伝播時期が推定可能なことを示した。増殖の遅いHEV-A、C群等はHEV-B群の選択圧の影響を受け分離困難であるため、HEV-Bが検出されやすい傾向にあるが、長期間の定点観測を行うことで、エンテロウイルス伝播時期の推定可能性を示唆している。
- 2) 高感度リアルタイムPCRは、分離と同じ検出傾向を示した。下水からのポリオウイルスの検出は、分離培養とリアルタイムPCR法いずれもワクチンの変更をよく反映しているものと考えられた。CoxA群は、発生動向検体からは検出されるが、下水流入水からはほとんど検出されなかった。下水流入水からのウイルス検出を分離培養により行っているため、一般的に分離されにくいCoxA群が、分離されやすいHEV-B群により隠されている可能性が考えられる。
- 3) AiV遺伝子が7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ことが確認された。下水から検出されるAiVは、2008年～2010年まではA型の検出数がB型を上回っていたが、今回、B型の検出数がA型を上回り、東南アジアのウイルスが日本にも多く侵入してきたものと考えられた。2002年～2012年に採水された下水から検出されたウイルスとは塩基配列が異なることから、下水から検出されるCaKVは、日本国内で流行しているイヌ由来のウイルスと考えられた。
- 4) 福岡県南部地区浄化センター流入水から、平成23年11月を最後にポリオウイルスは分離されていない。周辺のワクチン対象人口が少ないことに加えて、下水道普及率も低いことにより接種後に排泄されたポリオウイルスが、下水ではなく、家庭用の浄化槽などの処理設備に流れ込み、未分離となっていることが予想された。
- 5) 臨床検体および下水流入水を用いてEVのサーベイランスを実施したが、下水流入水からのウイルス分離はEVサーベイランスの効率よい手段である。臨床検体からのウイルス検出はEV始め多種のウイルス、また培養不可能なウイルスのサーベイランスに有用な手段である。
- 6) 全国的な発生動向調査の結果、上気道炎の発症頻度が下がり、発疹および水疱が増加している結果が得られた。CA6によるHFMDが多発した地域の医療機関による詳細な解析の結果と一致していた。2011年に感染症発生動向調査で過去最大規模のHFMD流行を引き起こしたCA6はそれまでのCA6と異なる病原性を持つことが強く示唆された。
- 7) HPeVは日本で年間流行していることが確認され、検出率は4.5%であった。41%は他のウイルスとの共感染であった。SAFVはタイでは0.7%、日本では1.5%に検出された。日本の検体では7例中4例は共感染であった。タイでのHCoVの検索では407例中1例検出された。EVは7.4%に検出され、その1/3が他のウイルスとの共感染であった。
- 8) RV感染はベトナムで急性呼吸器感染症によって入院した患児において重篤な下気道感染症を引き起こしていることが示された。乾季においては細気管支炎や肺炎の原因ウイルスとして重要である。
- 9) MRL-2471の抗HRV効果における主要な標的タンパク質は2Bおよび3Aであり、2Bのviroporineや3Aが関与すると考えられるreplication complexの形成等を阻害することによりウイルスRNA複製を特異的に阻害する可能性が示唆された。
- 10) 2010年に、HFMD、HA、および関連CNS合併症の小児入院症例に関する全国調査を行い、HFMD・HA流行期に当該症例によって入院した15才未満の患者数を推計した。EV71は、より重症な中枢神経系の合併症を引き起こすと示されていることから、日本でEV71が主流流行していた2010年に当該重症例について調査を行い、WPRO定義を使用して他の研究結果と国際的に比較可能な情報を得たことは、非常に重要である。CNS合併症を呈した症例をAMの有無によって2群に分類し、CNS合併症の重篤度への関連因子が異なることを明らかにした。前向き研究の手法により、病原検

索の結果も含めて情報を収集し、検討していく必要がある。

- 11) IPVを成人への追加接種に用いた場合、過去に接種歴がある場合はほとんど全例で、IPV1回接種後に良好な抗体価の上昇が確認された。中和抗体価は、Sabin株と野生株標準株で大きな違いは認められなかった。3型に対する抗体誘導は、他の型よりも少し弱い傾向があった。IPV接種前の抗体価が、3型では出生世代に関係なく陰性者が目立つことが影響していると考えられた。
- 12) SAFVは、急性感染により上気道炎、胃腸炎、または不顕性感染を起こすが、SAFVはマクロファージに持続感染し、全身に伝播される可能性が示唆された。SAFVは、膵臓のランゲルハンス氏島細胞に親和性を示すことから、I型糖尿病に関与している可能性が示された。SAFVの持続感染は、受容体発現密度に依存して起こることが証明された。
- 13) マウス組織パラフィン包埋標本を用いても、特異反応の評価には適切な判断が必要である。各種エンテロウイルスA型、B型抗体は特異性に欠けるものの、エンテロウイルス感染症における病理学的診断には有用であることがわかった。これらの抗体は、原因不明の心筋炎・脳炎患者組織標本の病原体検索に有用である。
- 14) EV71感染手足口病患者では、入院後12時間以内に死に至る重篤な症例が多く報告されている。手足口病の流行は規模が大きいため、EV71以外の弱神経毒性の手足口病原因ウイルス(CA10, 16等)による感染患者とEV71感染患者を迅速に区別できるTRCR法は、EV71感染患者のトリアージに有効であると期待される。
- 15) ウイルスタンパク質、ACBD3、PI4KBおよびPI4Pが共局在する細胞内構造の形態が、PI4KBのキナーゼ活性阻害剤により変化したことから、PI4KB活性がAiV複製複合体形成に重要な働きをしていることが示唆された。PI4KBのキナーゼ産物PI4Pは、AiV RNAの複製により細胞内での産生量が上昇することが分かった。AiVでは、ウイルスタンパク質/ACBD3/PI4KB複合体形成がPI4KBを活性化しPI4P産生を増加させる可能性が考えられた。
- 16) 数理科学モデル構築し、感染実験を行いパラメータの補正を行う研究手法により、EV71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た。本手法を用いることにより、通常の実験科学に基づいた解析では求めることができない動的かつ定量的パラメータ(例: バーストサイズ、基本再生産数)を推定することができる。本手法から得られるパラメータは、アウトブレイクが深刻な問題となっているEV71感染症を考える上で、有益な情報をもたらすことが示唆された。
- 17) RD-A細胞は、CVA2、3、4、5、8、10に対してはSMとほぼ同等、CVA6、12ではSMの1/5~1/2の分離率を示し、Vero細胞でよく分離されるCA16、EV71もVero細胞には劣るが分離可能であった。感染症発生動向調査由来検体を用いた結果から、CB5の分離率は劣ったがエコーウイルスは従来法と同様によく分離されており、多様なエンテロウイルスの分離が可能であると推察された。
- 18) SCARB2はウイルスの細胞表面への結合、細胞内への侵入、特にエンドソームへの輸送に関与しており、エンドソームでのpH低下が起るとウイルス粒子に変化を引き起こし、VP4とゲノムRNAを放出する脱殻反応の引き金となることが明らかになった。PSGL-1はSCARB2よりも高い親和性でEV71と結合する能力があり、細胞内へも侵入させることができるが、どのような条件においてもウイルス粒子の脱殻反応産物は検出限界以下であることが判明した。
- 19) 供試EV71株すべてにおいて神経症状発現を観察したことにより、tgマウスではマウス馴化株は必要ないと考えられる。CVA16 G-10感染により、神経症状を発現することから、EV71とCVA16の神経毒力を比較可能であると考えられる。Tgマウス脳内接種においては成獣においても感受性は消失しない。ヒトSCARB2発現量が高いTg-16系統マウスで感受性が高いことから、SCARB2発現量に依存して感受性が高まることが示唆された。
- 20) OPV累積接種率は、2009年、2010年の調査結果では、接種率の低下傾向は認められなかったが、2012年の調査では、OPV 1回目と2回目の累積接種率は前年調査時の生後24ヵ月での累積接種率より大幅に低下していた。2012年9月にIPVが定期接種に導入されて以降、ワクチン未接種者が接種を受けたかについて検証が必要とされる。
- 21) EV71受容体の構造および機能の解析を進め、新たな検査法の開発、EV71感染伝播および分子進化機構の解析、および、病原性発現機構解明のための基盤的研究を行った。
- 22) 2011年の日本の手足口病大流行の主要な原因ウイルスがCVA6であることを明らかにした。CVA6は従来、ヘルパンギーナの流行に関与しており、近年のCVA6関連疾患の病態変化について留意する必要がある。
- 23) WHO西太平洋地域では、2012年にかけても、ベトナム、カンボジア、中国等で、EV71が関与する重症感染症の流行が継続している。本研究事業で構築・整備した腸管ウイルス実験室ネットワークの専門家と協力し、東アジア地域の病原体サーベイランスを継続する必要がある。
- 24) 中国、台湾、マレーシア、韓国等で、重症EV71感染症の発症予防を目的としたワクチン開発が進められており、一部のワクチンについては、広範な臨床試験において有望な成績が得られている(Current Progress in Enterovirus 71 Research in the Asia-Pacific Region (2012年8月30-31日、東京、本研究事業と日本神経ウイルス研究会との共催)。日本では、EV71重症例の大規模な流行は発生しておらず、EV71ワクチン開発は進められていないことから、アジア諸国で開発中の手足口病ワクチンに関する技術的情報交換を継続する必要がある。

## 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。国内および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することにより、エンテロウイルスゲノムデータベース整備を進めた。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。受容体特異性に関する研究成果を応用することにより、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、カルジオウイルス等) の感染増殖・病原性発現に関する研究成果、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、病原性発現機構の解明のみならずワクチン開発等への応用が期待できる。ヒトカルジオウイルス、パレコウイルス、ライノウイルス等、近年新たに同定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、新規腸管感染ウイルスの疫学研究、病原体サーベイランス手法の整備、病原体検出・同定法の改良・標準化を継続することが重要となる。

2012 年 11 月、世界で初めて日本で定期接種に導入された弱毒化 Sabin 株に由来する不活化ポリオワクチン(sIPV)は、世界ポリオ根絶計画最終段階において今後必要とされる新たな IPV として期待されている。その一方、安全性および有効性について膨大な実績を有する従来の IPV(cIPV)と異なり、sIPV は唯一我が国で定期接種に導入されたばかりの不活化ポリオワクチンであることから、sIPV 含有ワクチンの有効性についての科学的知見を蓄積し報告していくことが、今後、より広範な地域で sIPV 導入を進めるため重要となる。また、異なる複数の IPV 含有ワクチンの互換性、sIPV の中長

期的有効性、備蓄ポリオワクチンの必要性と種類、等々、IPV 導入後に検討が必要な課題も多く残されている。我が国では、IPV 導入・移行期 (2011-2012 年) におけるポリオワクチン接種率の低下が懸念されており、腸管ウイルス病原体サーベイランス機能の維持・向上は、ポリオウイルス病原体サーベイランスの一環として、依然としてきわめて重要である。環境サーベイランス、エンテロウイルスサーベイランス等様々な手法に基づく腸管ウイルス病原体サーベイランスにより、ポリオフリーを確認することが引き続き重要である。

## F. 健康危機情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Arita M, Kojima H, Nagano T, Okabe T, Wakita T, Shimizu H. Oxysterol-binding protein (OSBP) family I is the target of minor enviroxime-like compounds. *J Virol* (in press)
- 2) Burns CC, Shaw J, Jorba J, Bukbuk D, Adu F, Gumedé N, Pate MA, Abanida EA, Gasasira A, Iber J, Chen Q, Vincent A, Chenoweth P, Henderson E, Wannemuehler K, Naeem A, Umami RN, Nishimura Y, Shimizu H, Baba M, Adeniji A, Williams AJ, Kilpatrick DR, Oberste MS, Wassilak SG, Tomori O, Pallansch MA, Kew O. Multiple Independent Emergences of Type 2 Vaccine-Derived Polioviruses during a Large Outbreak in northern Nigeria. *J Virol* (in press)
- 3) Kotani O, Shirato K, Nagata N, Ikeda H, Takahashi K, Taguchi F: Neuropathogenesis of a mouse-adapted porcine epidemic diarrhea virus infection in suckling mice. *J Gen Virol* (in press)
- 4) Umeki S, Suzuki R, Ema Y, Shimojima M, Nishimura Y, Okuda M, Mizuno T: Anti-adhesive property of P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) due to steric hindrance effect. *J Cell Biochem* (in press)
- 5) Himeda T, Hosomi T, Okuwa T, Muraki Y, Ohara Y: Saffold virus type 3 (SAFV-3) persists in HeLa cells. *PLoS ONE* (in press)
- 6) Matsushima Y, Shimizu H, Kano A, Nakajima E, Ishimaru Y, Dey SK, Watanabe Y, Adachi F, Mitani K, Fujimoto T, Phang TG, Ushijima H. Genome sequence of a novel species human adenovirus D associated with acute gastroenteritis. *Genome Announcement* 1:e00068-12, 2013
- 7) Yamane S, Lee AW, Hanaoka N, Gonzalez G, Kaneko H, Ishida S, Kitaichi N, Ohno S, Koyanagi KO,

- Aoki K, Fujimoto T, Yawata N, Watanabe H. Identification of contamination in the American type culture collection stock of human adenovirus type 8 by whole-genome sequencing. *J Virol* 87:1285-6, 2013
- 8) Sugiura H, Fujimoto T, Sugawara T, Hanaoka N, Konagaya M, Kikuchi K, Hanada E, Okabe N, Ohkusa Y: Prescription surveillance and polymerase chain reaction testing to identify pathogens during outbreaks of infection. *BioMed Research International* 2013; Article ID 746053, 7 pages, 2013
- 9) Khamrin P, Thongprachum A, Kikuta H, Yamamoto A, Nishimura S, Sugita K, Baba T, Kobayashi M, Okitsu S, Hayakawa S, Shimizu H, Maneekarn N, Ushijima H: Three clusters of Saffold viruses circulating in children with diarrhea in Japan. *Infect Genet Evol*, 13: 339-343, 2013
- 10) Fukuhara M, Iwami S, Sato K, Nishimura Y, Shimizu H, Aihara K, Koyanagi Y: Quantification of the dynamics of enterovirus 71 infection by experimental-mathematical investigation. *J Virol* 87:701-705, 2013
- 11) Yamayoshi S, Ohka S, Fujii K, Koike S: Functional Comparison of SCARB2 and PSGL1 as Receptors for Enterovirus 71. *J Virol* 87:3335-3347, 2013
- 12) 清水博之: 東アジア地域を中心とした手足口病流行の現状、感染症, 2013 (印刷中)
- 13) 清水博之: ポリオ流行のリスクとポリオワクチン. モダンメディア, 2013 (印刷中)
- 14) 山下照夫, 「第4章ウイルス 2各論 4. ウイルス別検査法 (4) アイチウイルス」の項を担当、食品衛生検査指針 (編集)
- 15) 伊藤 雅、山下照夫、廣瀬絵美、安達啓一、平松礼司、皆川洋子、愛知県で2000年~2011年に検出されたエンテロウイルス71型の遺伝子解析、愛知県衛生研究所報 63:1-7, 2013
- 16) 中田恵子、山崎謙治、加瀬哲男: ヘルパンギーナ/不明熱症例における複数のエンテロウイルス検出事例-大阪府. *IASR* 34: 10, 2013
- 17) 清水博之: 不活化ポリオワクチンの現状、*ファルマシア* 49: 211-216, 2013
- 18) 清水博之: 不活化ポリオワクチン導入の現状と今後の課題、*Bio Clinica* 28: 19-24, 2013
- 19) 中野貴司: ポリオワクチン. *化学療法の領域* 29: 219-227, 2013
- 20) 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
- 21) Nishimura Y, Shimizu H. Cellular receptors for human enterovirus species a. *Front Microbiol* 3: 105, 2012
- 22) 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* 50: 1764-1768, 2012
- 23) 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* 38: 443-453, 2012
- 24) 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, Shimizu H: Hand, Foot, and Mouth Disease Caused by Coxsackievirus A6, Japan, 2011. *Emerg Infect Dis* 18: 337-339, 2012
- 25) Miyamoto S, Inoue H, Nakamura T, Yamada M, Sakamoto C, Urata Y, Okazaki T, Marumoto T, Takahashi A, Takayama K, Nakanishi Y, Shimizu H Tani K. Coxsackievirus B3 is an oncolytic virus with immunostimulatory properties that is active against lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 72: 2609-2621, 2012
- 26) Arita M, Wakita T Shimizu H. Valosin-Containing Protein (VCP/p97) Is Required for Poliovirus Replication and Is Involved in Cellular Protein Secretion Pathway in Poliovirus Infection. *J Virol* 86: 5541-5553, 2012
- 27) De W, Huanying Z, Hui L, Corina M, Xue G, Leng L, Hanri Z, Ling F, Yanling M, Huiqiong Z, Huan Z, Jing K, Caiyun L, Yoshida H, Changwen K. Phylogenetic and molecular characterization of Coxsackievirus A24 variant isolates from a 2010 acute hemorrhagic conjunctivitis outbreak in Guangdong, China. *Virol J* 9: 41, 2012
- 28) 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* 44:388-394. 2012
- 29) Tao Z, Song Y, Wang H, Zhang Y, Yoshida H, Ji S, Xu A, Song L, Liu Y, Cui N, Ji F, Li Y, Chen P, Xu W. Intercity Spread of Echovirus 6 in Shandong Province, China: Application of Environmental Surveillance in Tracing

- Circulating Enteroviruses. *Appl Environ Microbiol* 78: 6946-6953, 2012
- 30) Li, Y., Yoshida, H., Wang, L., Tao, Z., Wang, H., Lin, X., Xu, A., An optimized method for elution of enteroviral RNA from a cellulose-based substrate, *Journal of Virological Methods* 186 : 62- 67, 2012
  - 31) Enomoto M, Okafuji T, Okafuji T, Chikahira M, Konagaya M, Hanaoka N, Adhikary AK, Takai D, Sugawara T, Hayashi Y, Oishi K, Fujimoto T. Isolation of an intertypic recombinant human adenovirus (candidate type 56) from the pharyngeal swab of a patient with pharyngoconjunctival fever. *Jpn J Infect Dis* 65:457-9, 2012
  - 32) Adhikary AK, Ushijima H, Fujimoto T. Human adenovirus type 8 genome typing. *J Med Microbiol* 61: 1491-503, 2012
  - 33) Fujimoto T, Matsushima Y, Shimizu H, Ishimaru Y, Kano A, Nakajima E, Adhikary AK, Hanaoka N, Okabe N. A molecular epidemiologic study of human adenovirus type 8 isolates causing epidemic keratoconjunctivitis in Kawasaki City, Japan in 2011. *Jpn J Infect Dis* 65: 260-3, 2012
  - 34) 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* 18: 846-8, 2012
  - 35) Taniguchi K, Yoshihara S, Tamaki H, Fujimoto T, Ikegame K, Kaida K, Nakata J, Inoue T, Kato R, Fujioka T, Okada M, Soma T, Ogawa H. Incidence and treatment strategy for disseminated adenovirus disease after haploidentical stem cell transplantation. *Ann Hematol* 91: 1305-12, 2012
  - 36) Adhikary AK, Fujimoto T, Okabe N. Human adenovirus species C (HAdV-C) fiber protein. *Virology* 242: 1, 2012
  - 37) 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* 8: 81-6, 2012
  - 38) Khamrin P, Chaimongkol N, Malasao R, Suantai B, Saikhruang W, Kongsricharoern T, Ukrapol N, Okitsu S, Shimizu H, Hayakawa S, Ushijima H, Maneekarn N. Detection and molecular characterization of cosavirus in adults with diarrhea, Thailand. *Virus Genes* 44: 244-246, 2012
  - 39) 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 Genes* 44: 253-257, 2012
  - 40) 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: 185-194, 2012
  - 41) Sasaki J, Ishikawa K, Arita M, Taniguchi K: ACBD3-mediated recruitment of PI4KB to picornavirus RNA replication sites. *EMBO J* 31:754-766, 2012
  - 42) 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
  - 43) 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.* 86:2676-2685, 2012
  - 44) 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)
  - 45) Yamayoshi S, Iizuka S, Yamashita T, Minagawa H, Mizuta K, Okamoto M, Nishimura H, Sanjoh S, Katsushima N, Itagaki T, Nagai Y, Fujii K, Koike S.: Human SCARB2-dependent Infection by Coxsackievirus A7, A14, A16 and Enterovirus 71. *J Virol.* 86:5686-5696, 2012
  - 46) Nishimura Y, Shimizu H: Cellular receptors for human enterovirus species A. *Front Microbiol* 3:105, 2012
  - 47) Himeda T, Ohara Y: Saffold virus, a novel human cardiovirus with unknown pathogenicity. *J Virol* 1292-1296, 2012
  - 48) 染谷雄一、清水博之、ポリオウイルスワクチンの品質管理、臨床とウイルス 40: 306-313, 2012
  - 49) 高山直秀、清水博之、梅本哲. 不活化ポリオワクチン接種件数に関する調査 : 2011年の調査結果. *日本医学会雑誌* 141: 1052-1058, 2012
  - 50) 高山直秀, 崎山弘, 岡部信彦, 清水博之, 梅本哲. 2011年度全国 BCG ワクチン, 経口生ポリオワクチン, DPT3 種混合ワクチン累積接種率調査報告. *日本医学会雑誌* 141: 1549-1555, 2012
  - 51) 清水博之: ポリオウイルスの病原体管理、JBSA Newsletter 2: 11-14, 2012
  - 52) 清水博之: 手足口病、特集「感染症動向 2013」、*メディカル朝日* 1、28-30, 2012
  - 53) 清水博之: ポリオの病態とポリオワクチン. *小児科臨床* 65: 2281-2287, 2012
  - 54) 清水博之: 不活化ポリオワクチンの導入と今後

- の課題. 日本医事新報:4613, 70-75, 2012
- 55) 清水博之: 感染症担当者が知っておきたい不活化ポリオワクチンの最新状況. INFECTION CONTROL 21: 1, 2012
- 56) 清水博之: 不活化ポリオワクチン(IPV)と経口生ポリオワクチン(OPV). 小児内科 44: 1234-1237, 2012
- 57) 清水博之: ポリオウイルスワクチン. ウイルス 62: 57-66, 2012
- 58) 清水博之: 手足口病の問題点. 小児科 53: 751-758, 2012
- 59) 清水博之: 不活化ポリオワクチン導入の現状と移行期の問題点. 愛知県小児科医会会報 95: 14-17, 2012
- 60) 清水博之: 世界ポリオ根絶計画とポリオの疫学. パムサジャーナル 24: 32-36, 2012
- 61) 清水博之. 手足口病(エンテロウイルス 71) ワクチン開発の現状. 病原微生物検出情報 33: 65-66, 2012
- 62) 板持(岩井)雅恵, 堀元栄詞, 小沢正次, 名古屋(小原)真弓, 馬淵俊輔, 保科瑛子, 大井哲夫, 南部厚子, 川越久美子, 星山典江, 關口健治, 滝澤剛則: ポリオ流行予測調査(平成23年度). 富山県衛生研究所年報 35: 62-67, 2012
- 63) 増本久人 南 亮仁 野田日登美 江口正宏 古川義朗 鶴田清典 中田恵子 左近(田中)直美 山崎謙治 高尾信一 Tao Zexin Xu Aiqiang Zhang Yong Xu Wenbo 藤本嗣人 花岡 希 小長谷昌未 吉田 弘 清水博之 国内外における手足口病流行に關与するコクサッキーウイルス A6 型の遺伝子解析 IASR Vol. 33 p. 60-61: 2012年3月号
- 64) 藤本嗣人, 花岡希, 小長谷昌未, 岡部信彦, 榎本美貴, 小林正明, 吉田弘, 清水博之. 2011年に手足口病患者から検出されたコクサッキーウイルスA6型の遺伝子配列. 病原微生物検出情報 33: 61-62, 2012
- 65) 菅原民枝, 藤本嗣人, 大日康史, 杉下由行, 小長谷昌未, 杉浦 弘明, 谷口清州, 岡部信彦: 病原体診断を伴うリアルタイムサーベイランスによる流行抑制の可能性—保育園での手足口病流行での事例検討—. 感染症学雑誌 感染症誌 86: 405-410, 2012
- 66) 藤本嗣人, 花岡希, 小長谷昌未: 日常の実験手法となった Polymerase chain reaction (PCR) と電気泳動の進展: 超高速 PCR (Hyper-PCR) および microcapillary electrophoresis (MultiNA). 臨床とウイルス 40: 184-191, 2012
- 67) 藤本嗣人: 病原体検査と遺伝子検査 呼吸器・消化器ウイルス. 臨床と微生物 39(増刊号): 570-574, 2012
- 68) 武知茉莉亜, 乾未来, 福島若葉, 中野貴司, 清水博之. 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(2010年分)—中間集計結果. 病原微生物検出情報 33: 63-64, 2012
- 69) 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—. IASR 33: 57-58, 2012
- 70) 中野貴司: ポリオワクチン〜生と不活化どちらがよいか. 小児科診療 75 (4): 624-630, 2012
- 71) 中野貴司: 序(ミニ特集: 不活化ポリオワクチン). 小児科臨床 65 (11): 2277-2280, 2012.
- 72) 西村順裕: 平成23年度杉浦賞論文 エンテロウイルス 71 の感染機構に関する研究. ウイルス 62: 121-128, 2012
- 73) 飯塚節子, 木内郁代, 日野英輝: 2011年に流行した手足口病及びヘルパンギーナからのウイルス検出—島根県, 2012年3月. 病原微生物検出情報 33: 58, 2012

## 2. 学会発表

- 1) 清水博之: ポリオワクチン. シンポジウム「ウイルス感染症とワクチン」. 第28回 日本環境感染学会総会. 横浜市, 3月1日, 2013
- 2) 小栗 信, 広瀬かおる, 山下照夫, 栂島由佳, 水野英明, 皆川洋子: 愛知県感染症発生動向調査からみた定点把握疾病の長期動向及び2011年にみられた流行. 第26回公衆衛生情報研究協議会研究会, 那覇市, 2013年1月
- 3) 清水博之: ポリオ根絶計画とポリオワクチンの将来. 第16回 日本ワクチン学会学術集会. 横浜市, 11月18日, 2012
- 4) 清水博之: 不活化ポリオワクチン導入とポリオワクチンの将来. 第60回 日本ウイルス学会学術集会. 大阪, 11月15日, 2012
- 5) 有田峰太郎, 脇田隆宇, 清水博之: VCP/p97はポリオウイルスの複製に必要とされる新規宿主因子でありウイルス感染における細胞蛋白質分泌経路に關与する. 第60回 日本ウイルス学会学術集会. 大阪, 11月14日, 2012
- 6) 中村 朋史, 吉富 秀亮, 石橋 哲也, 前田 詠里子, 世良 暢之, 吉田 弘 下水流入水からのエンテロウイルス分離 第60回日本ウイルス学会 大阪市, 2012年11月
- 7) 清水博之: WHOポリオ実験室ネットワークにおけるバイオセーフティ教育訓練. 第12回日本イオセーフティ学会学術集会. 東京, 11月7日, 2012
- 8) 清水博之: 不活化ポリオワクチンの導入と今後の課題. 平成24年度感染症機器管理研修会. 東京, 10月17日, 2012
- 9) 清水博之: 世界のポリオ根絶とポリオワクチン. 理化学研究所 横浜研究所一般公開セミナー. 横浜市, 9月29日, 2012
- 10) 清水博之: 不活化ポリオワクチン導入 - 日本の課題・世界の課題 - 第59回 日本小児保健協会 学術集会, 岡山市, 9月28日, 2012
- 11) 清水博之: 不活化ポリオワクチンと移行期の課題. 相模原市小児科医会講演会, 相模原市, 9月19日, 2012
- 12) 清水博之: ポリオ対策の現状と課題—日本における不活化ポリオワクチン導入の現状と問題点

- 中華人民共和国「国家級公衆衛生政策計画管理プロジェクト」EPIセミナー、北京8月16日、2012
- 13) 清水博之：不活化ポリオワクチンの導入と課題. 東大和市立保健センター、東大和市、2012年 8月 27日
  - 14) 清水博之：新しいポリオワクチン；不活化ポリオワクチン導入と移行期の問題点. 第3回北里感染症教育フォーラム、東京、5月12日、2012
  - 15) 清水博之：ポリオ流行のリスクとポリオワクチン. 第41回国立感染症研究所安全連絡協議会、東京、3月6日、2012
  - 16) 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
  - 17) 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
  - 18) 名古屋（小原）真弓、板持（岩井）雅恵、堀元栄詞、小淵正次、佐多徹太郎、滝澤剛則：富山県における過去3年間のウイルス性胃腸炎発生状況. 第46回富山県公衆衛生学会. 富山市、2012年2月
  - 19) 山下照夫、安達啓一、廣瀬絵美、藤原範子、伊藤 雅、安井善宏、小林慎一、皆川洋子：下水からのアイチウイルス及びイヌ由来コブウイルスの検出と遺伝子解析. 第60回日本ウイルス学会、大阪、2012年11月
  - 20) 中田恵子、尾崎遙子、山崎謙治、加瀬哲男：エンテロウイルス感染症のChild-to-parent transmissionに関する解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会. 大阪市、2012年11月
  - 21) 菅原民枝、藤本嗣人、大日康 史、杉下由行、谷口清州、岡部信彦：症候群サーベイランスと早期の検査による流行抑制の可能性：保育園での手足口病及びRSウイルス感染症の流行での事例. 第86回日本感染症学会学術総会、2012年4月. 長崎市
  - 22) 花岡希、小長谷昌未、藤本嗣人：リアルタイムPCRで陰性でキャピラリー電気泳動で陰性となる微量 エンテロウイルス. 2012年4月. 長崎市
  - 23) 沖津祥子、Thongprachum Aksara、清水博之、早川智、牛島廣治：タイ国の健康なブタ血清中のブタコブウイルス. 第53回日本臨床ウイルス学会、豊中市、2012年6月
  - 24) 久保 亨、吾郷昌信、森内浩幸、森田公一：エンテロウイルス71に対するRT-LAMP法を用いた迅速診断系の開発とその臨床応用に関する研究. 第86回日本感染症学会総会. 長崎、2012年4月
  - 25) 吉川 亮、徳田昌紘、池田秀樹、山口顕徳、北川由美香、鍋島武、井上信吾、森田公一、吾郷昌信：2010、2011年に長崎県で発生した日本脳炎に関する疫学解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会. 大阪、2012年11月
  - 26) 久保 亨、吾郷昌信、森内浩幸、西村秀一、森田公一：エンテロウイルス71に対するRT-LAMP法を用いた迅速診断系の開発とその臨床応用に関する研究. 第60回日本ウイルス学会学術集会. 大阪、2012年11月
  - 27) 中野貴司：シンポジウム11 “わが国における感染症対策の動向と課題”「ポリオとそのワクチンの動向」. 第82回日本衛生学会学術総会. 京都市、2012年3月
  - 28) 中野貴司：シンポジウム3 “乳幼児期に接種するワクチンの現状と展望”「ポリオワクチン」. 第86回日本感染症学会総会・学術講演会. 長崎市、2012年4月
  - 29) 中野貴司：シンポジウム “ポリオワクチンの臨床”「2つのポリオワクチン～生と不活化、光と影」. 第16回日本ワクチン学会学術集会. 横浜市、2012年11月
  - 30) 中野貴司：シンポジウム “International Symposium ; Vaccine Preventable Diseases”「先進国での不活化ポリオワクチン導入」. 第44回日本小児感染症学会総会・学術集会. 北九州市、2012年11月
  - 31) 小谷 治、鈴木 忠樹、Naeem Asif、岩田 奈織子、中島 典子、片野 晴隆、田口 文広、長谷川 秀樹、清水 博之、永田 典代：新生仔マウスにおける新規ヒトカルジオウイルス (Saffold virus) の神経病原性の解析. 第60回日本ウイルス学会. 大阪市、2012年11月
  - 32) 藤井 健、永田 典代、山吉 誠也、島貫 碧、設楽 浩志、多屋 長治、小池 智：EV71感受性マウスモデルの作出と解析. 第60回日本ウイルス学会. 大阪市、2012年11月
  - 33) 佐々木球美子、佐々木潤、前野芳正、守口匡子、河本聡志、富田万祐子、谷口孝喜：アイチウイルスゲノムRNA複製におけるPI4KBのキナーゼ活性の役割. 第60回日本ウイルス学会学術集会. 大阪市、2012年11月
  - 34) 山吉誠也、大岡静衣、藤井健、小池智 2つのエンテロウイルス71受容体 SCARB2 と PSGL1 の機能比較 第60回日本ウイルス学会学術集会 2012. 11. 14 大阪市
  - 35) 藤井健、永田典代、山吉誠也、島貫碧、設楽浩志、多屋長治、小池智 EV71 感受性マウスモデルの作出と解析 第60回日本ウイルス学会学術集会 2012. 11. 14 大阪市
  - 36) 小池智 ポリオウイルス感染と自然免疫 第16回日本ワクチン学会学術集会シンポジウム 2012. 11. 18 横浜市
  - 37) 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. XVII<sup>th</sup> Meeting, in Saint Raphael, France, 2012年6月
  - 38) 有田 峰太郎：Valosin containing protein (VCP/p97) is required for poliovirus replication and involved in cellular protein secretion pathway in poliovirus infection. 第34回内藤コンファレンス. 札幌市、2012年10月
  - 39) Ushijima H, Khamrin P, Thongprachum A, Tran DN, Hayakawa S, Okitsu S, Maneekarn N: Novel picornaviruses in children and adults with diarrhea, Thailand. The 9<sup>th</sup> Japna-China International Conference of Virology. 札幌市、2012年6月

- 40) Thongprachum A, Khamrin P, Tran DN, Okitsu S, Maneekarn N, Mizuguchi M, Hayakawa S, Ushijima H: Picornaviruses associated with gastroenteritis in Japan and Thailand. Symposium "Current progress in enterovirus 71 research in the Asia-Pacific Region" The 16th Annual meeting of Japanese Society for Neurovirology. 新宿区、2012年8月.
- 41) Thongprachum, A, 沖津祥子、牛島廣治: Molecular epidemiology trend of diarrheal viruses circulating in Japanese pediatric patients, 2010-2011. 第44回日本小児感染症学会総会・学術集会. 北九州市、2012年11月
- 42) Shimizu H. Hand, foot, and mouth disease and Enterovirus 71 infection. NIID-China CDC meeting on Collaborative Research meeting, 21 November, Tokyo, 2012
- 43) Shimizu H. Genetic and Phenotypic Diversity of Enterovirus 71. Current Progress in Enterovirus 71 Research in the Asia-Pacific Region, Tokyo, 30 August, 2012
- 44) Lee H, Cifuentes JO, Carnegie MS, Markoff A, Conway J, Shimizu H, Tano Y, Nishimura Y, Hafenstein S. The cryoEM structure of EV71 bound by fragments of neutralizing antibody predicts a mechanism of neutralization by crosslinking and competition with PSGL-1. EUROPIC 2012. Saint Raphaël, France, 3-7 June, 2012
- 45) Arita M, Wakita T, Shimizu H. Valosin containing protein (VCP/p97) is required for replication of poliovirus and inhibition of cellular protein secretion caused by viral proteins. EUROPIC 2012. Saint Raphaël, France, 3-7 June, 2012
- 46) Umami RN, Hosomi T, Nishimura Y, Shimizu H. Genetic analysis of PSGL-1-tropic enterovirus 71 isolates from clinical samples. EUROPIC 2012. Saint Raphaël, France, 3-7 June, 2012
- 47) Shimizu H. Poliovirus Vaccines; Current Status in Japan. The 5th International Vaccinology Workshop in Japan 2012, Tokyo, Feb 19, 2012
- 48) Teruo Yamashita, Emi Hirose, Hirokazu Adachi, Miyabi Ito, Reiji Hiramatsu, and Hiroko Minagawa: Detection and Nucleotide Sequence Analysis of Aichi Virus and Canine Kobuvirus in Sewage Samples, EUROPIC 2012, Saint Raphael, France, June 2012
- 49) Teruo Yamashita, Miyabi Ito, Emi Hirose, Hirokazu Adachi, Reiji Hiramatsu, and Hiroko Minagawa: Enterovirus 71 Surveillance in Aichi Prefecture, Japan, 2000-2011, Symposium "Current Progress in Enterovirus 71 Research in the Asia-Pacific Region", Tokyo, August 2012
- 50) Nagata N: Pathological study of enterovirus 71 in animal models. 第16回日本神経ウイルス研究会シンポジウム Current Progress in Enterovirus 71 Research in the Asia - Pacific Region (東京) 2012年8月
- 51) 木内郁代、飯塚節子: 島根県における手足口病の原因ウイルス. 第53回日本臨床ウイルス学会、大阪市、2012年6月
- 52) Yamayoshi S, Fujii K, Koike S: Functional analyses of Scavenger receptor B2 as a receptor for Enterovirus 71. The XVIIth Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses (EUROPIC 2012), Saint Raphael France. 2012. 6
- 53) Fujii K, Nagata N, Yamayoshi S, Shimanuki M, Shitara H, Taya C, Koike S: Establishment of a transgenic mouse model for EV71 infection. The XVIIth Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses (EUROPIC 2012), Saint Raphael France. 2012. 6
- 54) Koike S, Yamayoshi S, Fujii K: Scavenger receptor B2 is a receptor for Enterovirus 71. The XIth Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji Hyogo. 2012. 9
- 55) Koike S, Yamayoshi S, Fujii K. Scavenger receptor B2-mediated Enterovirus 71 infection in vitro and in vivo. 第16回日本神経ウイルス研究会研究集会シンポジウム 東京 2012. 8
- 56) Fujii K, Nagata N, Yamayoshi S, Shimanuki M, Shitara H, Taya C, Koike S: Generation of novel mouse model for study of EV71 neuropathogenesis, 第16回日本神経ウイルス研究会研究集会 東京 2012. 8
- 57) Fujii K, Nagata N, Yamayoshi S, Shimanuki M, Shitara H, Taya C, Koike S: Development of a transgenic mouse model for EV71 infection. The 34<sup>th</sup> Naito Conference on Infection, Immunity and their control for health: Mucosal Barrier, Pathogen and Vaccine Sapporo 2012. 10
- 58) Koike S.: Scavenger receptor B2-transgenic mouse model for EV71 infection. Singapore International Conference on Dengue and Emerging Infections. 2012. 11. 23 Singapore.

### 3. ガイドライン、その他

- 1) 山下照夫、中田恵子、石橋哲也、清水博之、西村順裕、吉田弘 無菌性髄膜炎病原体検出マニュアル 2012年
- 2) 板持雅恵、飯塚節子、山下照夫、中田恵子、石橋哲也、清水博之、西村順裕、吉田弘 手足口病病原体検出マニュアル 2012年
- 3) 板持雅恵、山下照夫、石橋哲也、清水博之、西村順裕、吉田弘 ヘルパンギーナ病原体検出マニュアル 2012年
- 4) 板持雅恵、世良暢之、石橋哲也、林志直、山下照夫、清水博之、西村順裕、吉田弘 ポリオウイルス

ス感染症の実験室診断マニュアル 2012年

- 5) Country Progress Report on Maintaining Polio-free Status, Japan: WHO report (annual WHO report, 2012) [分担執筆; 清水博之]
- 6) H. ブランズウェル: 根絶計画 詰めの一手. 日経サイエンス 7月号: 98-105, 2012 [監修; 清水博之]

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当無し

## 平成 24 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」

環境サーベイランス手法を用いた中国山東省のエコーウイルス 6 型の地域間伝播の推定

研究分担者 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：中国山東省 Jinan 地区、Linyi 地区で 2010-2011 年に検出された下水由来 E6 型の塩基配列を用いて、E6 分離株の共通祖先配列を推定するとともに地域間の伝播時期推定を試みた。その結果 2010 年 8 月から 12 月の間に、Jinan 地区から Linyi 地区にウイルスの伝播が起こったことが推定された。このように分離時期が明確なウイルス塩基配列を用い、分子進化的解析（ベイズ推定）を行うことで、環境ウイルスサーベイランスは腸管系ウイルスの伝播解析に貢献する可能性を示唆している。

### A. 研究目的

#### E6 の地域内伝播解析

H23 年度は中国山東省 Jinan 市で検出された下水由来 E6 型の塩基配列と分離年代既知の配列を用い、分岐年代を推定した。即ち下水中に存在するウイルスゲノム配列を継時的定点モニタリングすることでエンテロウイルスの伝播時期と流行期間を推定できること示した。H24 年度は同省内 Jinan 市および Linyi 市において検出された E6 分離株の塩基配列より、共通祖先配列を推定し地域内伝播時期の検討を行った。

### B. 材料と方法

#### 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、をそれぞれ 0.8L づつ月 1 回採取。

#### 環境水濃縮

陰電荷膜を用いて 40 倍濃縮を行い、ビーフ液で 2 回溶出し、ウイルス分離に用いた。

#### ウイルス分離同定

L20B, RD, HEp-2 を 24 穴プレートに準備し、1 回目溶出液を 0.2ml づつ 6 穴、2 回目溶出液を 3 穴に接種（合計 9 穴）し 2 代継代を行いウイルス分離を行った。分離株より RNA を抽出し、HEV-B 群の VP1 を増幅する

187-011 プライマーセットで RT-PCR をおこない、ダイレクトシークエンスを行った。増幅産物のうち E6 に関して、過去の分離株情報とともに、祖先配列推定のための解析に用いた。

#### 共通祖先配列及び分岐年代推定

環境分離株の塩基配列 (684 bp) を MEGA 5 に含まれる最尤法にて系統解析を行い、共通祖先配列を推定した。また 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 sublineage 間の分岐時期の推定を行った。

### C. 結果

2008 年以降、Jinan, Linyi 地区で分離された E6 株は lineage 1.2 に分類された。更に 2011 年は Linyi 地区で分離頻度が高かったのは sublineage 1a であり、1b は Jinan 地区において頻度が高かった (図 1)。系統解析の結果 1a の分節位置に 2010 年 8 月 11 日に分離された E6 株 (JNEW100811.24) が位置した。最尤法を用いて 1a に属する株の祖先配列を推定したところ、JNEW100811.24 と塩基配列が 100% 一致した。このため 2010 年 8 月に Jinan 地区で分離された JNEW100811.24 を 1a の共通祖先とした株が、翌年 Linyi 地区で主に流行したことが推定された。