

2013/80 YPA

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

不活化ポリオワクチンの有効性・安全性の検証及び国内外で進められている
新規腸管ウイルスワクチン開発に関する研究

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 清水 博之

平成 26 年（2014 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

不活化ポリオワクチンの有効性・安全性の検証及び国内外で進められている
新規腸管ウイルスワクチン開発に関する研究

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 清水 博之

平成 26 年（2014 年）3 月

目 次

I. 総括研究報告

不活化ポリオワクチンの有効性・安全性の検証及び国内外で進められている新規腸管ウイルスワクチン開発に関する研究

研究代表者 清水博之 1

II. 分担・協力研究報告

1. 不活化ポリオワクチン及び生ポリオワクチンの予防接種状況ならびに抗体保有状況
多屋馨子（国立感染症研究所 感染症疫学センター） 17
2. ポリオワクチンの全国累積接種率：2013年調査結果
高山直秀（東京都立駒込病院） 21
3. 不活化ポリオワクチン製剤のD抗原定量法に関する考察
染谷雄一（国立感染症研究所 ウイルス第二部） 28
4. 不活化ポリオワクチン品質管理に関する研究
落合 晋（日本ポリオ研究所） 32
5. 不活化ポリオワクチンの有効性・安全性の検証及び国内外で進められている新規腸管ウイルスワクチン開発に関する研究
中野貴司（川崎医科大学） 34
6. アジア地域における腸管系ウイルスゲノムの分子疫学研究
吉田 弘（国立感染症研究所 ウイルス第二部） 40
7. 不活化ポリオワクチンの有効性・安全性の検証及び国内外で進められている新規腸管ウイルスワクチン開発に関する研究
有田峰太郎（国立感染症研究所 ウイルス第二部） 46
8. 環境試料からのポリオウイルス直接検出法の検討
中村 朋史（国立感染症研究所 ウイルス第二部） 48
9. エンテロウイルス71の全塩基配列登録株と2000年に兵庫県で脳炎を含む中枢神経感染症を多発させた株の全塩基配列
藤本嗣人（国立感染症研究所 感染症疫学センター） 51
10. 1973年～2013年に愛知県で分離されたエンテロウイルス71型の遺伝子解析
山下照夫（愛知県衛生研究所） 55

11. ベトナムにおいて入院中の小児におけるヒトライノウイルスに関する研究 牛島廣治（日本大学医学部）	60
12. 周産期垂直感染により新生児重症感染を惹起したコクサッキーウイルス B2 型 吾郷昌信（長崎県環境保健研究センター）	72
13. ヒトパレコウイルス 3 型に対する感受性細胞の検討 町田早苗（埼玉医科大学）	81
14. サフォード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）	84
15. Saffold ウイルスの脾臓に対する病原性の解析 大原義朗（金沢医科大学）	88
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）	91
17. エンテロウイルス 71 のカニクイザルにおける病原性の解析 片岡周子（国立感染症研究所 ウイルス第二部）	93
18. ヒト SCARB2 発現マウスを利用した EV71 毒力検定系の構築 小池 智（東京都医学総合研究所）	95
Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表	105

厚生労働科学研究費補助金
平成 25 年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

不活化ポリオワクチンの有効性・安全性の検証及び国内外で進められている

新規腸管ウイルスワクチン開発に関する研究

- 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： 多屋馨子 (国立感染症研究所 感染症疫学センター)
染谷雄一 (国立感染症研究所 ウイルス第二部)
藤本嗣人 (国立感染症研究所 感染症疫学センター)
小池 智 (東京都医学総合研究所)
吉田 弘 (国立感染症研究所 ウイルス第二部)
- 研究協力者： 佐藤 弘 (国立感染症研究所 感染症疫学センター)
高山直秀 (東京都立駒込病院)
崎山 弘 (崎山小児科医院)
有田峰太郎、中村朋史、片岡周子 (国立感染症研究所 ウイルス第二部)
落合 晋 (日本ポリオ研究所)
中野貴司 (川崎医科大学)
片山和彦 (国立感染症研究所 ウイルス第二部)
福島慎二、濱田篤郎 (東京医科大学病院)
花岡 希、加納和彦、小長谷昌未 (国立感染症研究所 感染症疫学センター)
荻 美貴 (兵庫県立健康生活科学研究所)
藤巻明日香 (東京北社会保険病院)
小林正明 (小林小児科)
山下照夫、伊藤 雅、安達啓一、広瀬絵美、小林慎一、皆川洋子 (愛知県衛生研究所)
牛島廣治、沖津祥子、早川 智 (日本大学医学部)
Tran Dinh Nguyen, Thongprachum Aksara (東京大学大学院)
Khamrin Pattara (チェンマイ大学医学部)
吾郷昌信、北川由美香、松本文昭、吉川 亮 (長崎県環境保健研究センター)
陣内久美子、高柳利光 ((独)国立病院機構 佐賀病院)
永田典代、小谷 治、片野晴隆、佐藤由子、鈴木忠樹 (国立感染症研究所 感染病理部)
森内浩幸 (長崎大学大学院)
町田早苗 (埼玉医科大学医学部)
畑田敏樹、大原義朗 (金沢医科大学医学部)
佐々木 潤 (藤田保健衛生大学医学部)
大岡静衣、藤井健、多屋長治、設楽浩志、島貫碧 (東京都医学総合研究所)
網 康至 (国立感染症研究所 動物管理室)
滝澤剛則 (富山県衛生研究所)
濱崎光宏 (福岡県保健環境研究所)

山崎謙治、中田恵子（大阪府立公衆衛生研究所）
高橋雅輝（岩手県環境保健研究センター）
堀田千恵美（千葉県衛生研究所）
筒井理華（青森県環境保健センター）
内野清子（堺市衛生研究所）
小澤広規（横浜市衛生研究所）
岩切章（宮崎県衛生環境研究所）
神保達也（浜松市保健環境研究所）
下野尚悦（和歌山県環境衛生研究センター）
北川和寛（福島県衛生研究所）
葛口剛（岐阜県保健環境研究所）
中島一敏（国立感染症研究所 感染症疫学センター）

研究要旨

- (1) IPV 導入後のポリオ集団免疫状況について検討した。5 歳未満のワクチン接種状況を検討した結果、年長になるとともに OPV のみ接種者の割合は増加し、IPV 含有ワクチンのみ接種者の割合は減少する傾向がみられた。ポリオワクチン（OPV あるいは IPV 含有ワクチン）の 1 回以上接種率はいずれの年齢も 95%以上であった。1~4 歳では 3 型の抗体保有率が 1 型や 2 型と比較して 10 ポイント以上低かったが、0 歳では血清型間の抗体保有率の差は小さかった。ポリオワクチン累積接種率調査によると、2012 年 9 月から開始された IPV の 2 回目、3 回目累積接種率は生後 24 ヶ月で 78%以上に達しており、IPV への切り替えは順調に進んでいると推定された。
- (2) 世界で始めて、わが国で導入された sIPV は、定期接種導入後も品質管理に関する検討が必要とされている。sIPV の国家検定が将来的に D 抗原定量試験に置き換わる可能性があるため、cIPV および sIPV の D 抗原定量試験方法を比較し、試薬、機器等の共通化に向けての検討を行った。sIPV の D 抗原量を測定する ELISA の二次抗体である型特異的抗ポリオウイルスウサギポリクロノアル抗体について、中長期的な試薬供給のための検討を開始した。
- (3) 全国 13 か所の地方衛生研究所で 2013 年春より随時ポリオ環境サーベイランス調査を開始し、下水利用人口は延べ約 450 万人に達した。2014 年 1 月現在、ポリオウイルスの検出は見られていない。臨床検体や環境水から、より迅速にポリオウイルスを検出・同定するため、ポリオウイルス受容体ビーズを用いた特異的濃縮法を開発し、培養細胞を用いないポリオウイルス検出システムへの応用研究を開始した。国内外の腸管感染ウイルス疾患・病原体サーベイランスを基盤として、エンテロウイルス感染症重症例の発生動向調査、および、手足口病関連ウイルス伝播状況に関する解析を行った。
- (4) 新規腸管ウイルスワクチン開発のための研究基盤を進めた。エンテロウイルス(EV71)病原性研究、ワクチン・抗ウイルス薬の in vivo 評価系として hSCARB2-Tg マウスを作製し、EV71 感染モデルとしての有用性を評価した。EV71 分離株が hSCARB2-Tg マウスで異なる病原性を示すことから、EV71 株の病原性評価への有用性が示唆された。hSCARB2-Tg マウスで異なる病原性を示す EV71 株の病原性を、カニクイザルモデル感染モデルで確認中である。EV 71 感染・病原性発現機構解析のため、EV71-受容体結合の構造学的基盤を明らかにし、PSGL-1 受容体結合に関与する EV71 カプシドアミノ酸 VP1-145 を同定した。カニクイザル感染モデルを用いて、PSGL-1 受容体結合に関与する VP1-145 が、in vivo におけるウイルスの複製と病原性に関わる病原性決定部位のひとつであることを明らかにした。

A. 研究目的

2012年9月から、海外ですでに広く使われている強毒株由来不活化ポリオワクチン (conventional IPV; cIPV) 抗原を含有する単独IPVが、また、2012年11月からは、日本であらたに開発された弱毒化IPV抗原 (Sabin-derived IPV; sIPV) を含む4種混合ワクチンが定期接種に導入された。現在も、複数のメーカーにより、sIPVおよびcIPV抗原を含む4種混合ワクチンの開発が進められている。定期接種へのIPV導入は、わが国における長年の懸案であり、ポリオ予防接種の大きな転換点といえる。その一方、とくにsIPVは、世界で始めて国としての定期接種に導入された新たなsIPV抗原含有ワクチンであることから、IPV導入後においても引き続き検討が必要な研究課題が多く残されている。

IPV導入・移行期 (2011-2012年) に際しては、定期によるOPV接種率が一時的に低下し、ポリオワクチン未接種児の増加が危惧された。2012年9月のIPV導入以降、未接種児のキャッチアップにより、ポリオ集団免疫が回復することが期待されている。本研究では、IPV導入後の集団免疫とワクチン接種率の動向について継続的な調査研究を行う。また、IPV (cIPV、DPT-sIPV等) 接種後の中和抗体保有率調査により、IPVの中長期的有効性についての検討を行う。

わが国では、異なる不活化ポリオウイルス抗原を含む複数のIPV含有ワクチンが定期接種に導入されたことから、異なるIPV含有ワクチンに対応した品質管理システムが必要とされる。本研究では、sIPV含有4種混合ワクチン (導入済み、および、開発中) の品質管理に関する研究を実施する。異なるIPV含有ワクチン製剤中のsIPV抗原量測定法の国際的な標準化と抗原量の比較評価は、現在、国内外で導入・開発が進められているsIPV含有ワクチンの将来的な品質管理の面からも重要である。

IPV導入後の腸管ウイルス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、エンテロウイルス感染症サーベイランス等様々な手法に基づくサーベイランスにより、ポリオフリーを確認する必要がある。IPV導入後も持続可能な高感度病原体サーベイランス体制を整備するため、国内地方衛

生研究所による実験室ネットワークを基盤とした腸管ウイルス病原体サーベイランス強化に資する調査・研究を実施する。腸管ウイルス病原体サーベイランス等のデータに基づき、ポリオフリーを確認し、感染症流行予測調査報告書、WHO西太平洋地域ポリオ根絶年次報告書等により随時報告する。

sIPVは、日本が世界に先駆けて開発・導入した新たな不活化ポリオワクチンだが、近年、アジア諸国では、エンテロウイルス71 (EV71)、E型肝炎、ノロウイルス等、新規腸管ウイルスワクチン開発が積極的に進められている。我が国では、これら腸管ウイルス感染症に関する多くの優れた基礎的研究成果、および、地方衛生研究所等を中心として機能している腸管ウイルス病原体サーベイランス体制を有するが、具体的な腸管感染症ワクチン開発研究は、いまのところほとんど進められていない。そのため、本研究では、腸管ウイルス感染・病原性発現機構の分子的基盤の理解に基づいた感染動物モデルの開発、ウイルス抗原性の分子進化等、新規腸管ウイルスワクチン開発のための研究基盤整備に関する研究を行う。とくに、近年、アジア諸国を中心として公衆衛生上大きな問題となっている、重症EV71感染症に対する予防治療法の開発のための基盤的研究・調査を実施する。

B. 研究方法

- 1) 定期接種対象疾患の予防接種状況や抗体保有状況等に関して、感染症流行予測調査の結果を用いて、各種ポリオワクチンの接種状況ならびに抗体保有状況について検討を行った。2013年度感染症流行予測調査において報告された2014年2月現在の結果を用いた。
- 2) 全国から5,000人の2歳児を無作為抽出し、市区町村における予防接種担当者へ、OPV、IPV、DPT-IPV接種月齢の調査を依頼し、調査票を基に累積接種率を算定した。OPV累積接種率算定時には、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、IPV累積接種率算定時には、IPV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、接種日不明の標本を除外した。
- 3) cIPVのD抗原量試験法は仏サノフィ社の方法に由

- 来し、感染研ウイルス第二部が一部修正を加えた。sIPVのD抗原量試験法は、日本ポリオ研究所が開発した方法を取り入れた。両者の手法を比較し、主として、試薬（緩衝液、ブロッキング剤、発色試薬等）、器具（96ウェルマイクロタイタープレート、ピペット、チップ等）、機器、定量解析法について共通化可能かどうか検討した。
- 4) sIPVのD抗原量測定法を国際標準として、国内外に中長期的に安定供給するため、まず、D抗原量を測定するELISAの二次抗体として使用している抗ポリオウイルスウサギポリクローナル抗体を大量に調製することを目的とした。sIPVのD抗原定量ELISAの二次抗体として用いる抗ポリオウイルスウサギポリクローナル抗体は各型強毒株もしくは弱毒株を免疫原にして作製したものを使用し、中和抗体価を測定した。
 - 5) cIPV接種臨床研究は、倫理委員会の承認を得たうえで、cIPV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。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。健康成人50名を登録し、49名に対してIPVを2回接種するプロトコルを終了し、42名の血清中和抗体価を測定した。
 - 6) 2013年4月より13地方衛生研究所の協力を得て環境水調査を開始した。各自治体の下水処理場を定点とし、流入下水を月1回採水した。H25年度流行予測調査事業術式により、下水流入水からのウイルス濃縮・ウイルス検出を実施した。非ポリオウイルスは、中和試験法、VP4-VP2、あるいは、VP1領域PCR-ダイレクトシーケンスにより同定した。
 - 7) 培養細胞によるウイルス分離を用いない新規ポリオウイルス検出・同定法開発の一環として、便検体のような不純物の多いサンプルから、ポリオウイルスを効果的に抽出する方法を検討した。ポリオウイルスレセプター分子で感作したナノ磁気ビーズを調製し、便抽出液の中に含まれるポリオウイルスの抽出を試みた。
 - 8) 環境サーベイランス由来検体からのポリオウイルス特異的濃縮法開発のため、ポリオウイルスレセプター分子を結合させたナノ磁性ビーズ(PVR-MB)を応用した濃縮手法を検討した。従来用いられてきた陰電荷膜によるウイルス吸着にPVR-MBによるウイルス濃縮を組み合わせ、培養を経ない直接的な新規PV検出法の開発・標準化を目的とする。
 - 9) 日本ではこれまで、EV71感染症重症例の報告は少ない。2000年に兵庫県で多発したEV71感染症重症例に由来するEV71分離株について、完全長の塩基配列を決定し、2014年現在登録されている国内外のEV71株と比較して、その特徴を調べる。
 - 10) 1973年から2013年までの41年間に、愛知県感染症発生動向調査事業の病原体定点(名古屋市を除き中核市病原体定点を含む)より採取・搬入された検体から検出されたEV71の遺伝子解析を行い、流行株の遺伝子型の推移を検討した。
 - 11) 国内外のヒトおよびブタに由来する各種臨床検体から、ピコルナウイルス(ライノウイルス、パレコウイルス・エンテロウイルス・アイチウイルスを含む各種腸管ウイルス、アイチウイルスC株)等の遺伝子検出・同定を実施し、ウイルス伝播様態と病原性について検討した。
 - 12) HEV-Bに属するコクサッキーウイルスB(CVB)は主に夏季に流行し、予後は比較的良好であるが、特に新生児にはウイルス血症により深刻な全身感染病態を惹き起こすことがある。周産期垂直感染が強く疑われる新生児重症感染例よりCVB2を検出、分離・同定し、分離ウイルスの性状について検討を行った。
 - 13) ヒトパレコウイルス3型(HPeV3)特異的受容体解析を目的とし、HPeV3分離に良く用いられる細胞株であるVero-A細胞とVero-E6細胞、RD-A細胞とRD-18S細胞を用いて、HPeV3の感染を検討した。
 - 14) 2007年に同定されたヒトカルジオウイルス(サフォードウイルス;SAFV)の病理学的診断法確立を目的として、参照標本の作製、抗体の作製、鑑別診断のための交差反応性の検討を行った。髄膜炎や心筋炎の原因として知られている主なピコルナウイルスの患者分離株を用いて感染細胞を準備し、各種抗ウイルス抗体の特異性と交差反応性を免疫組織化学法により検討した。
 - 15) 他のカルジオウイルス同様、SAFVは、膵臓、中

中枢神経、心臓に対して病原性を発揮する可能性が示唆され、2012年には、重症急性膵炎患者の便から SAFV が検出および分離された。SAFV の膵臓に対する病原性を明らかにすることを目的とし、糖尿病患者の剖検例を対象として、疫学的に調査解析した。

- 16) アイチウイルス (AiV) ゲノム複製における phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) の役割を明らかにすることを目的として、siRNA を用いて Vero 細胞での発現をノックダウンした後、ホタルシフェラーゼ遺伝子を有する AiV のレプリコン RNA をトランスフェクトし、経時的に細胞溶解液を調製しシフェラーゼアッセイを行った。
- 17) 東アジア地域の小児において死亡例を伴う EV71 感染症流行が問題になっているが、EV71 感染症における中枢神経病原性発現機構はまだ分かっていない。in vivo における EV71 受容体 PSGL-1 依存的 EV71 感染増殖・病原性発現機構を明らかにすることを目的とし、PSGL-1 結合 (PB) および PSGL-1 非結合 (non-PB) EV71 とカニクイザルを用いた感染実験を行った。
- 18) EV71 毒力検定系やワクチン検定に必要な EV71 感染動物モデルは確立されていない。EV71 感染に必要な受容体である hSCARB2 をマウスに発現させたトランスジェニックマウス (hSCARB2-Tg マウス) は、ヒトと同様、急性神経症状を呈することから hSCARB2 発現マウスは EV71 神経発症マウスモデルとして有用である。hSCARB2 発現マウスを EV71 毒力検定系やワクチン検定法に適用すべく、1) EV71 毒力のマウスモデルとサルモデルとの比較、2) より高い EV71 感受性を示す遺伝子組換えマウス作製、について検討を行った。

【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。

I 型糖尿病および緩徐進行型 I 型糖尿病と診断された剖検例由来検体は、金沢医科大学医学部臨床病理学および仙台市立病院・病理診断科において連結可能匿

名化を行った上で、検体のみの提供を受けた。連結可能匿名化の対応表は、検体提供施設において管理され、解析後、氏名等を除く診断名等の情報提供を受け、疾患とウイルス感染の関連を解析した。この間、被験者を特定できる氏名等の情報は一切提供を受けていない。また、既存の資料のみを用いた研究であるため、当該倫理指針に則り必ずしもインフォームド・コンセントを必要としない。

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) 5歳未満のワクチン接種状況に関する検討の結果、年長になるとともに OPV のみ接種者の割合は増加し、IPV 含有ワクチンのみ接種者の割合は減少する傾向がみられた。ポリオワクチン (OPV あるいは IPV 含有ワクチン) の1回以上接種率はいずれの年齢も95%以上であった。5歳未満の抗体保有状況については、1~4歳では3型の抗体保有率が1型や2型と比較して10ポイント以上低かったが、0歳では IPV 含有ワクチンの導入により、血清型間の差は小さくなり、5ポイント未満となった。
- 2) ポリオワクチン累積接種率調査によると、2013年に調査対象となった2歳児における OPV 累積接種

- 率は、1回目は生後9ヵ月以降上昇が止まり、生後24ヵ月で約43%、2回目は生後12ヵ月以降上昇が止まり、生後24ヵ月で約10%であった。2012年9月1日から開始されたIPVの2回目、3回目累積接種率は生後24ヵ月で78%以上に達していた。
- 3) cIPVとsIPVのD抗原量試験法について、両者の手法を比較し、試薬、器具、機器、定量解析法等について共通化可能かどうか検討した。マイクロプレート、コーティング法、緩衝液、洗浄法、インキュベータ、反応濃度、二次抗体、発色試薬等について検討した結果、ほとんどの行程で共通化が可能であったが、ブロッキング液、抗体希釈液等の一部行程については共通化が困難であった。
 - 4) sIPVのD抗原量を測定するELISAの二次抗体である型特異的抗ポリオウイルスウサギポリクローナル抗体について、必要とする研究機関等に中長期的に供給できるよう一定量を確保するため、ウサギの個体別抗血清を中和反応で検討した。選ばれた抗血清をプールし一定量の二次抗体が調製できる可能性が得られた。
 - 5) cIPV接種臨床研究の結果、42名の中和抗体価測定が完了し、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。同一血清中の中和抗体価は、Sabin株と野生型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。
 - 6) 全国13か所の地方衛生研究所で2013年春より随時ポリオ環境サーベイランス調査を開始し、下水利用人口は延べ約450万人に達した。2014年1月現在、ポリオウイルスの検出は見られないが、エンテロウイルスは様々な種類が検出されている。CB3は13か所のうち11ヶ所、CB5、E11は7か所、E6は6か所、CB1、CB4、E30、Ad2は4か所、E7は3か所、E3、E18、E2は2か所より検出された。
 - 7) ポリオウイルスレセプター分子を高密度で固定したナノ磁気ビーズ (PVR-MB) を調製し、細胞培養用の培地もしくは便抽出液中に添加したポリオウイルスを効率よく抽出することができた (>90%の抽出効率)。便抽出液からの抽出は、培地からの抽出と比べて効率が悪かったが、ビーズ量を増やすことで抽出効率は改善された。最終的に決定された条件で、便抽出液 150 サンプルを用いて 3 型ポリオウイルスの抽出を行った結果、95%の便抽出液で>90%の抽出効率が達成できた。
 - 8) 環境検体からのポリオウイルス新規濃縮・検出法として、PVR-MB を応用した手法を検討した。培地にポリオウイルスを外部添加したモデル試験において、ポリオウイルスを効率的に回収・濃縮可能であることが明らかとなった。また、陰電荷膜と PVR-MB を組み合わせた手法により、PV を高効率に濃縮することが可能であった。陰電荷膜および PVR-MB で処理した後、Real-Time PCR を用いたポリオウイルス型別により、100 mL の培地に添加した 10^1 CCID₅₀ のポリオウイルス検出が可能であった。
 - 9) 世界各地の EV71 分離株の完全長塩基配列は、2014 年 1 月の段階で 336 配列登録されており、大まかに 6 種類に分類され、兵庫 2000 に系統解析で近い株は 66 配列であった。兵庫 2000 の塩基配列を BLAST 解析で調べると、2000 年に台湾で重症化例多発時に検出された株と最も近く、1997～2002 年に日本、台湾、マレーシア、シンガポールで分離された subgenogroup B4 に分類された。
 - 10) 1973 年～2013 年の 41 年間に分離された 223 株の EV71 の VP1 領域 298 塩基の配列を決定し、遺伝子型別を行った。B1～B5 及び C1～C4 の 9 つの遺伝子型に分類された。B 型は 1973 年から 1984 年まで分離され、以降、B2 型、B3 型、B4 型と年を経るごとに型が変遷し 2003 年～2013 年までは B5 型であった。C 型は、C1 型が 1987 年から分離され、1997 年から C2 型と C4 型が検出され、2010 年以降は C2 型が主に分離された。
 - 11) ライノウイルスは、ARI で入院している患者にとって最も一般的 (約 30%) なウイルスであった。小児科外来を急性胃腸炎で受診した患者から EV、HPeV、AiV の検出を行ったところ、それぞれ 6.1%、6.6%、0.1% 検出された。アイチウイルス C の 2B 領域を調べたところ、下痢症の仔ブタ、健康なブタ、日本の健康なブタからの検出株はすべて変異型であった。
 - 12) 相次いで発生した、周産期垂直感染が強く疑われる新生児重症感染症例より原因ウイルスの検出及び分離・同定を行ったところ、すべての検体から

VP1 増幅領域において同一塩基配列の CVB2 遺伝子が検出され、一部の検体からは CVB2 が分離された。

- 13) Vero-A 細胞、Vero-E6 細胞と RD-A 細胞は、CPE、蛍光抗体法、ウイルス力価測定で HPeV3 増殖が確認された。RD-18S 細胞では顕微鏡下で明確な CPE は認められず、ウイルス力価の顕著な増加は認められなかったが、蛍光抗体法で HPeV3 感染が確認された。
- 14) SAFV の病理学的診断法を確立することを目的とし、SAFV の他、主要なエンテロウイルス臨床分離株の感染細胞を用いてホルマリン固定パラフィン包埋切片を作製し、当部で作製した抗ウイルスポリクローナル抗体の有用性について検討した。その結果、抗 SAFV3 抗体は SAFV を特異的に検出した。
- 15) SAFV の膵臓に対する病原性に注目し、I 型糖尿病の剖検例パラフィン包埋膵臓組織切片を用いたウイルス抗原の検出を行った。膵臓の浸潤組織球において強い染色性が認められ、ランゲルハンス氏島において淡い染色性が認められた。この特徴的な染色性は、II 型糖尿病や非糖尿病の剖検例では観察されなかった。
- 16) アイチウイルス複製部位に産生された PI4P のウイルスゲノム複製における役割を検討した結果、ゲノム複製に影響を与える複数の PI4P 結合タンパク質を見出した。
- 17) EV71 ウイルス粒子および EV71 特異的受容体 PSGL-1 の構造および機能の解析を進めた。VP1-145 は、ウイルス粒子上で VP1-244K と隣接しており、VP1-145 におけるアミノ酸変異が、VP1-244 のリジン側鎖の方向性の変化を介することにより、PSGL-1 の N 末端領域のチロシン硫酸化部位と VP1-244K との結合を規定する構造的基盤を明らかにした。ほとんどの EV71 分離株では VP1-244K は保存されているため、多様性を有する VP1-145 のアミノ酸置換が、PSGL-1 接合性を規定することが示唆された。
- 18) PSGL-1 結合 (PB) および PSGL-1 非結合 (non-PB) EV71 を用いたカニクイザル感染実験の結果、non-PB 接種群では、振戦などの神経症状を示し、直腸拭い液、咽頭拭い液及び血清から高頻度にウ

イルス及びウイルス遺伝子が検出された。PB 接種群では明らかな神経症状を示さなかったが、感染後期の血清や PBMC、剖検時の中枢神経系組織からウイルス及びウイルス遺伝子が検出された。どちらの接種群においても、拭い液や血清および中枢神経系を含む各種組織から検出されたウイルスの多くは VP1-98 あるいは VP1-145 にアミノ酸変異を有しており、non-PB 型 (02363-EE) が高頻度に検出された。

- 19) 6 週令の hSCARB2-Tg10 マウスに、EV71 を脳内接種した結果、BrCr 株よりも Isehara 株の方が神経症状発症個体数および死亡個体数が多かった。カニクイザルモデルでは、全ての個体で神経症状を示した。明確な神経症状を示した個体では免疫細胞の動態に大きな変動が起きていた。血中中和抗体価はどの個体も上昇しており、Isehara 株接種群が高い中和抗体価を示していた。ウイルス学的解析を行ったところ、中枢神経系で感染性ウイルスを検出したが、その他の一般臓器、咽頭拭い液、直腸拭い液、血清では検出限界以下であった。
- 20) hSCARB2-Tg マウスの多重交配により hSCARB2 遺伝子のコピー数を増やした Tg10x22、Tg22x49 マウスの作製を行った。

D. 考察

- 1) 2013 年度調査における 5 歳未満の予防接種状況について、接種ワクチンおよび接種回数が明らかであった者のみでみると、0 歳児では、OPV 接種者はおらず、すべてが IPV 含有ワクチンのみの接種者であった。接種ワクチンの割合は年齢により異なるが、1 回以上接種率は 96.6~100.0% と高く、定期接種で使用されるワクチンの変更による変動はみられなかった。抗体保有状況についてみると、IPV 含有ワクチン接種者が多いと考えられる 0 歳では 3 型の抗体保有率も高く、これは本調査で初めて確認された結果であった。IPV 含有ワクチンが導入されている国々では、中和抗体価 1:8 以上を抗体陽性としている国もあることから、中和抗体陽性の基準について検討が必要である。今後、複数年度の調査結果を用いて、接種歴別の抗体保有状況や、野生株由来と弱毒株由来の IPV による抗体保有率の比較についても検討したい。

- 2) 2013 年のポリオワクチン累積接種率調査によると、2012 年 9 月から開始された IPV の 2 回目、3 回目累積接種率は生後 24 ヶ月で 78%以上に達しており、IPV から OPV への切り替えは順調に進んでいると推定された。今年度の調査では DPT-IPV を受けた標本は、DPT-IPV の開始時期の関係から、きわめて少数であったが、今後どのように変化して行くか注意深く観察する必要がある。
- 3) cIPV と sIPV の D 抗原量試験法について、両者の手法を比較し、マイクロプレート、マイクロプレートウォッシャー、マイクロプレートリーダーといった器具、設備のほか、コーティング液、D-PBS、HRP 標識抗体、HRP 発色試薬といった試薬類、抗原抗体反応条件、データ解析手法を共通化することができた。これにより、試薬調製など煩雑な操作を軽減することができる。また、機器や器具の共通化により、今後想定される検定業務に関わるコストの削減が期待できる。
- 4) 中和抗体価が高く、型間の交差反応が低いウサギポリクローナル抗体が各型で数羽ずつ確認されたことから、現在の D 抗原定量 ELISA の二次抗体と同等の反応性を示す抗体と成り得る可能性が高い。今後は各型の個別抗体と各型 D 抗原の反応、加熱抗原との反応を ELISA で確認し、型別有力候補の個別抗体をプールし ELISA での反応性を確認しながら次期二次抗体の大量調製を行ってゆく予定である。
- 5) cIPV 接種により誘導された中和抗体価は、Sabin 株と野生株標準株、および 2 型 VDPV 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、他の型よりも弱い傾向があったが、IPV 接種前の抗体価が、3 型では陰性者が目立つことが影響していると考えられた。1975-77 年生まれとその他の世代を比較するには、OPV 接種歴の確認ができた症例数が十分ではなかった。過去の接種歴が無く、中和抗体を保有しない場合、1 回の IPV 接種では免疫獲得は不十分な場合があるものと考えられた。
- 6) 初年度は下水定点の立ち上げを中心とした。環境水サーベイランスにより、①長期間検出されているもの、②複数のサイトで検出されたもの、があり、今後、患者発生動向調査、ゲノム解析によりエンテロウイルスの国内外伝播のパターンが明らかになる可能性がある。国外の情報の多くは VP1 領域のため、国内外の伝播を比較するために、今後 VP1 領域を調べ、利用可能な海外分離株情報と比較を行うことで、伝播様式を解析する予定としている。
- 7) 一般的なウイルスの検出・抽出方法では、ウイルスに対する抗体を用いるが、ポリオウイルスは 3 つの異なる血清型を含み、伝播の過程で抗原性の変化した変異型ウイルスが発生する。レセプターを用いた抽出方法を用いることで、全ての型のポリオウイルスおよび変異株を抽出できることが期待される。ウイルス量が低い場合には、少ない量のビーズでどの型のポリオウイルスも >90% の効率で抽出できたことから、抽出効率がウイルス量に依存することが示された。便抽出液のような粗サンプルから効率よくウイルスを抽出できる系は、これまでに報告されていない。今回開発した方法は、便検体や環境水から直接ポリオウイルスを検出するために必要な濃縮過程に有用であると考えられる。
- 8) 陰電荷膜および PVR-MB を組み合わせた新規濃縮法により、環境水検体から、ポリオウイルスを高効率に濃縮することが可能であることが示された。バッファー中での PV の回収効率はあまり高くないため (20-40%)、反応温度や反応時間の検討など改良の余地がある。TD rRT-PCR の型別反応に用いられているプライマーにはイノシンが用いられているためアニーリング温度が低く、反応性が低い。より高効率な型別反応を行うためには、プライマーの変更も含めた検出・同定系の検討が必要である。
- 9) 2000 年に兵庫県において致死性脳炎を含む中枢神経系感染症の多発を引き起こした EV71 は 1997~2002 年に日本、台湾、シンガポール、マレーシアで分離された株に近縁の株であった。これら近縁の株は Subgenogroup では B4 に分類されている。特に台湾で 2000 年に分離された FJ357377 と最も近縁であった。これらの結果は、兵庫 2000 が、台湾で同じ年に流行した株と分子系統学的関連性を有することを示唆している。
- 10) 近年、東アジアでは、遺伝子型 B および C の EV-71

が同時に伝播している。1997年以降、国内で分離される遺伝子型はB4, B5及びC2, C4に変化している。本研究により愛知県でも1997年にC2型とC4型が、2000年にB4型とC4型が、2003年にB5型とC1型、2006年にC4型が、2010年にはC2型が流行の主流であることが明らかとなった。同時期もしくは直前に東アジア地域から国内に持ち込まれたEV71が、流行したことが推測され、近隣諸国との交流がより活発に進められていることが影響しているものと考えられた。

- 11) 国内外の臨床検体に由来するピコルナウイルスの検出・遺伝子解析を行った結果、ライノウイルスはARI入院患者にとって最も一般的で、急性胃腸炎患者では、EV、HPeVの検出頻度が高かった。アイチウイルスCの2B領域を調べたところ、下痢症の仔ブタ、および、健康なブタからの検出株はすべて変異型であり、2B領域は病原性の遺伝因子ではないことが示唆された。
- 12) 2013年のエンテロウイルス流行期に周産期CVB2感染疑いによる新生児重症例の続発をみた。CVB2に対する抗体を保有していない成人が増加しているものと推察され、ひとたびCVB2が流行すれば周産期のCVB2感染は新生児に重篤な症状をもたらす、重症例が多発する可能性がある。CVB2を周産期感染ウイルスとして再認識し、早期に感染予防対策を講ずる必要がある。
- 13) HPeV3は、Vero細胞他サルの腎臓細胞で増殖し、細胞がもつ受容体がHPeV3感染に関与していると考えられる。RD-A細胞を用いたHPeV3の分離報告はないが、今回の結果からHPeV3の増殖することが確認された。
- 14) 今年度は、実際に患者から分離された株を用いて鑑別診断のための抗ピコルナウイルス抗体の交差反応性の検討を行った。今回用いた、抗ウイルスポリクローナル抗体は、抗ピコルナウイルス抗体パネルとして診断に応用することができると考えられた。原因不明の心筋炎・脳炎患者組織標本の病原体スクリーニングに有用である。
- 15) I型糖尿病剖検例のFFPE臓器組織切片における浸潤組織球、および、ランゲルハンス氏島における抗SAFV-3抗体染色性の検出は、ウイルス抗原の存在を強く示唆しており、臓器に対するSAFV

親和性の証拠として非常に興味深い。さらに、II型糖尿病18例および非糖尿病2例においては、全く染色性が認められなかったことから、SAFVはI型糖尿病と関連している可能性が示唆された。I型糖尿病剖検例は、19歳時にI型糖尿病と診断され44歳で亡くなっていることから、*in vivo*におけるSAFV持続感染の可能性を示唆する。

- 16) 今回見出されたPI4P結合タンパク質について、今後、細胞内局在や、ウイルスタンパク質やACBD3、PI4KBとの相互作用の有無などを調査し、アイチウイルス複製への関与をさらに明らかにしていく予定である。PI4Pは、特定のタンパク質を膜上にリクルートすることにより、脂質輸送や膜小胞輸送に関わっていることが明らかにされている。今回見出されたタンパク質を介して、細胞内の輸送システムがどのようにウイルス複製に利用されているのかも明らかにしていきたいと考えている。
- 17) PSGL-1結合性の異なる2種類の感染性クローン由来EV71をカニクイザルに感染させ、ウイルスの*in vivo*における病原性や増殖性などの違いを比較した。その結果、non-PBが*in vivo*において効率良く増殖し、中枢神経系におけるウイルス増殖と病原性発現に関与することが示唆された。PB(02363-EG)は感染後早い段階で145番目のGがEに変異したnon-PB変異体(EE)となりPSGL-1非依存的にCNSまで到達したと考えられる。145番目のアミノ酸の変異/選択のメカニズムは未解明であるが、非ヒト霊長類モデルにおいてウイルスの複製と病原性に関わる決定因子であることが分かった。
- 18) クローン由来のBrCr株とIsehara株の毒力は、hSCARB2-Tgマウスにおいて異なっており、Isehara株の方が強い毒力を示した。hSCARB2-Tgマウス感染モデルにより、毒力に関与するウイルス因子を同定できる可能性がある。カニクイザルモデルにおいて、血中に中和抗体価を検出したこと、免疫細胞の動態が変化したことから全ての感染サル個体でもウイルス感染は成立していたと結論された。しかし、マウスで明確に見られていたBrCr株とIsehara株の毒力の違いは、カニクイザルモデルにおいては明らかではなかった。接種ウイルス株によるサイトカイン誘導、ウイルス感染

部位および病変部位などに違いが生じれば毒力との相関性についての知見が得られると考えられる。

E. 結論

- (1) IPV 導入後のポリオ集団免疫状況について検討した。5歳未満のワクチン接種状況を検討した結果、年長になるとともに OPV のみ接種者の割合は増加し、IPV 含有ワクチンのみ接種者の割合は減少する傾向がみられた。ポリオワクチン (OPV あるいは IPV 含有ワクチン) の 1 回以上接種率はいずれの年齢も 95%以上であった。抗体保有状況については、1~4 歳では 3 型の抗体保有率が 1 型や 2 型と比較して 10 ポイント以上低かったが、0 歳では IPV 含有ワクチンの導入により血清型間の差は小さかった。累積接種率調査によると、2012 年 9 月から開始された IPV の 2 回目、3 回目累積接種率は生後 24 ヶ月で 78%以上に達しており、IPV から OPV への切り替えは順調に進んでいると推定された。
- (2) 世界で始めて、わが国で導入された sIPV は、定期接種導入後も品質管理に関する検討が必要とされている。sIPV の国家検定が将来的に D 抗原定量試験に置き換わる可能性があるため、試験方法を検討し、cIPV および sIPV の D 抗原定量試験と試薬、機器等の共通化についての検討を行った。sIPV の D 抗原量を測定する ELISA の二次抗体である型特異的抗ポリオウイルスウサギポリクローナル抗体について中長期的な試薬の確保のための検討を開始した。
- (3) 全国 13 か所の地方衛生研究所で 2013 年春より随時ポリオ環境サーベイランス調査を開始し、下水利用人口は延べ約 450 万人に達した。2014 年 1 月現在、ポリオウイルスの検出は見られていない。臨床検体や環境水から、より迅速にポリオウイルスを検出・同定するため、ポリオウイルス受容体ビーズを用いた特異的濃縮法を開発し、培養細胞を用いないポリオウイルス検出システムへの応用研究を開始した。国内外の疾患・病原体サーベイランスを基盤とし、エンテロウイルス感染

症重症例の発生動向、および、手足口病関連ウイルス伝播の推移に関する解析を行った。

- (4) 新規腸管ウイルスワクチン開発のための研究基盤を進めた。EV71 病原性研究、ワクチン・抗ウイルス薬の評価系として hSCARB2-Tg マウスを作製し EV71 感染モデルとしての有用性を評価した。EV71 分離株が hSCARB2-Tg マウスで異なる病原性を示すことから、EV71 株の病原性評価への有用性が示唆された。hSCARB2-Tg マウスで異なる病原性を示す EV71 株の病原性を、カニクイザルモデルで確認中である。EV 71 感染・病原性発現機構解析のため、EV71-受容体結合の構造的基盤を明らかにし、PSGL-1 受容体結合に関与するカプシド VP1 アミノ酸を同定した。カニクイザル感染モデルを用いて、EV71 の VP1-145 が、in vivo におけるウイルスの複製と病原性に関わる決定因子であることを明らかにした。

F. 健康危機情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimizu H, Nakashima K. Surveillance of hand, foot, and mouth disease for a vaccine. *Lancet Infect Dis*. (http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70342-6) 2014
- 2) Lee H, Cifuentes JO, Ashley RE, Conway JF, Makhov AM, Tano Y, Shimizu H, Nishimura Y, Hafenstein S. A Strain-Specific Epitope of Enterovirus 71 Identified by Cryo-Electron Microscopy of the Complex with Fab from Neutralizing Antibody. *J Virol* 87: 11363-11370, 2013
- 3) Nishimura Y, Lee H, Hafenstein S, Kataoka C, Wakita T, Bergelson JM, Shimizu H. Enterovirus 71 Binding to PSGL-1 on Leukocytes: VP1-145 Acts as a Molecular Switch to Control Receptor Interaction. *PLoS Pathog* 9: e1003511, 2013
- 4) Hovi T, Paananen A, Blomqvist S, Savolainen-Kopra C, Al-Hello H, Smura T, Shimizu H, Nadova K, Sobotova Z, Gavrilin E, Roivainen M. Characteristics of an Environmentally Monitored Prolonged Type 2

- Vaccine Derived Poliovirus Shedding Episode that Stopped without Intervention. *PLoS One* 8: e66849, 2013
- 5) Burns CC, Shaw J, Jorba J, Bukbuk D, Adu F, Gumede 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* 87: 4907-4922, 2013
 - 6) 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* 87: 4252-4260, 2013
 - 7) Zheng H, Lu J, Zhang Y, Yoshida H, Guo X, Liu L, Li H, Zeng H, Fang L, Mo Y, Yi L, Chosa T, Xu W, Ke C. Prevalence of Non-polio Enteroviruses in the Sewage of Guangzhou City, China, from 2009 to 2012. *Appl Environ Microbiol* 79: 7679-83, 2013
 - 8) Tao Z, Zhang Y, Liu Y, Xu A, Lin X, Yoshida H, Xiong P, Zhu S, Wang S, Yan D, Song L, Wang H, Cui N, Xu W. Isolation and Characterization of a Type 2 Vaccine-Derived Poliovirus from Environmental Surveillance in China, 2012. *PLoS ONE* 8: e83975. doi:10.1371/journal.pone.0083975, 2013
 - 9) Li TC, Yang T, Shiota T, Yoshizaki S, Yoshida H, Saito M, Imagawa T, Malbas F, Lupisan S, Oshitani Hi, Wakita T, Ishii K. Molecular detection of Hepatitis E virus in rivers in the Philippines. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2014 (in press)
 - 10) Arita M. 2013. Development of poliovirus extraction method from the stool extracts by using magnetic nanoparticles sensitized with soluble poliovirus receptor. *Journal of Clinical Microbiology* 51: 2717-2720, 2013
 - 11) Kobayashi M, Makino T, Hanaoka N, Shimizu H, Enomoto M, Okabe N, Kanou K, Konagaya M, Oishi K, Fujimoto T: Clinical manifestations of coxsackievirus A6 infection associated with a major outbreak of hand, foot, and mouth disease in Japan. *Jpn J Infect Dis* 66: 260-261, 2013
 - 12) Yasui Y, Makino T, Hanaoka N, Owa K, Horikoshi A, Tanaka A, Suehiro Y, Shimizu H, Kanou K, Kobayashi M, Konagaya M, Fujimoto T: A case of atypical hand-foot-and-mouth disease caused by coxsackievirus A6: differential diagnosis from varicella in a pediatric intensive care unit. *Jpn J Infect Dis* 66: 564-566, 2013
 - 13) Miyata I, Hanaoka N, Okabe N, Fujimoto T, Sakamoto S, Kasahara M, Saitoh A: Echovirus 3 as another enterovirus causing life-threatening neonatal fulminant hepatitis. *J Clin Virol*. Dec 7. pii: S1386-6532(13)00511-8, 2013
 - 14) Fujimoto T, Yamane S, Ogawa T, Hanaoka N, Ogura A, Hotta C, Niwa T, Yakou C, Gonzalez G, Aoki K, Koyanagi KO, Watanabe H: A novel complex recombinant form of human adenovirus species D, the first type 48-associated isolate in Japan, *JJID* (in press)
 - 15) Adhikary AK, Nozomu H, Fujimoto T, Simple and cost-effective restriction endonuclease analysis of human adenoviruses, *BioMed Res. Int* (in press)
 - 16) Kitajima M, Hata A, Yamashita T, Haramoto E, Minagawa H, Katayama H: Development of a reverse transcription-quantitative PCR system for detection and genotyping of Aichi viruses in clinical and environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 79: 3952-3958, 2013
 - 17) Hara S, Kawada J, Kawamoto Y, Yamashita T, Minagawa H, Okumura N, Ito Y: Hyperferritinemia in neonatal and infantile human parechovirus-3 infection in comparison with other infectious diseases. *J Infect Chemother* 20: 15-19, 2014
 - 18) Dey SK, Hoq I, Okitsu S, Hayakawa S, Ushijima H: prevalence, seasonality, and peak age of infection of enteric adenoviruses in Japan, 1995-2009. *Epidemiol Infect* 141: 958-960, 2013
 - 19) Trinh QD, Pham NT, Le Nguyen NT, Lam BQ, Le Phan KT, Troonq KH, Le TQ, Nguyen HT, Tang TC, Izumi Y, Komine-Aizawa S, Ushijima H, Hayakawa S: Seroprevalence of chlamydia pneumoniae in HIV-infected children in Vietnam. *J Infect Chemother* 19: 538-541, 2013
 - 20) Shimizu-Onda Y, Akasaka T, Yagyu F, Komine-Aizawa S, Tohya Y, Hayakawa S, Ushijima H: The virucidal effect against murine norovirus and feline calicivirus as surrogates for human norovirus by ethanol-based sanitizers. *J Infect Chemother* 19: 779-781, 2013
 - 21) Thongprachum A, Khamrin P, Chan-It W, Malasao R, Chaimongkol N, Okitsu S, Mizuguchi M, Maneekarn N, Hayakawa S,

- Ushijima H: Emergence of Norovirus GII/4 2006a and 2006b Variants in Hospitalized Children with Acute Gastroenteritis in Thailand. *Clin Lab* 59: 271-276, 2013
- 22) Khamrin P, Okitsu S, Ushijima H, Maneekarn N: Complete genome sequence analysis of novel human bocavirus reveals genetic recombination between human bocavirus 2 and human bocavirus 4. *Infect Genet Evol.* 17: 132-136, 2013
- 23) Okitsu S, Khamrin P, Thongprachum A, Kongkaew A, Maneekarn N, Mizuguchi M, Hayakawa S, Ushijima H: Whole-genomic analysis of G3P[23], G9P[23] and G3P[13] rotavirus strains isolated from piglets with diarrhea in Thailand, 2006-2008. *Infect. Genet. Evol* 18: 74-86, 2013
- 24) Müller WE, Schröder HC, Schlossmacher U, Grebenjuk VA, Ushijima H, Wang X: Induction of carbonic anhydrase in SaOS-2 cells, exposed to bicarbonate and consequences for calcium phosphate crystal formation. *Biomaterials* 34:8671-8680, 2013
- 25) Yazawa S, Yokobori T, Ueta G, Ide M, Altan B, Thongprachum A, Nishimura T, Nakajima T, Kominato Y, Asao T, Saniabadi AR, Furukawa K, Kuwano H, Pendu JL, Ushijima H: Blood group substances as potential therapeutic agents for the prevention and treatment of infection with norovirus: proving novel binding patterns in human tissues. *Plos One* 2014 (in press)
- 26) Himeda T, Hosomi T, Okuwa T, Muraki Y, Ohara Y: Saffold virus type 3 (SAFV-3) persists in HeLa cells. *PLoS ONE* 8: e53194, 2013
- 27) Fujii K, Nagata N, Sato Y, Ong KC, Wong KT, Yamayoshi S, Shimanuki M, Shitara H, Taya C, Koike S. Transgenic mouse model for the study of enterovirus 71 neuropathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 14753-14758, 2013
- 28) Ng CS, Jogi M, Yoo JS, Onomoto K, Koike S, Iwasaki T, Yoneyama M, Kato H, Fujita T: Encephalomyocarditis virus disrupts stress granules, the critical platform for triggering antiviral innate immune responses. *J Virol.* 87:9511-9522, 2013
- 29) 高山直秀, 崎山 弘, 清水博之, 梅本哲. 経口生ポリオワクチン1回目および2回目接種の全国累積接種率: 2012年調査結果. *日本医学会雑誌* 142: 597-601, 2013
- 30) 清水博之. ライノウイルスの分類と疾患への関与. *日本医事新報* 4689: 53-55, 2014
- 31) 清水博之: 手足口病の大規模流行と原因ウイルス. *日本医事新報* 4673, 56-57, 2013
- 32) 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
- 33) 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* 43, 50-51, 54-59, 2013
- 34) 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
- 35) 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* 54, 85-92, 2013
- 36) 清水博之: わが国のポリオ流行とポリオワクチンの歴史. *小児内科* 45 増刊号「予防接種 Q&A 改訂第3版」, 286-290, 2013
- 37) 清水博之: わが国と世界のポリオの現状と問題点. *小児内科* 45 増刊号「予防接種 Q&A 改訂第3版」, 291-295, 2013
- 38) 清水博之: 生ワクチンの存続. *小児内科* 45 増刊号「予防接種 Q&A 改訂第3版」, 300-301, 2013
- 39) 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
- 40) 大原義朗, 長山成美: 5. 感染症疾患「ウイルス性脳炎」今日の神経疾患治療指針第2版 (水澤英洋他編), *医学書院*, p388-390, 2013
- 41) 大原義朗, 姫田敏樹: 新しいピコルナウイルス感染症—ヒトカルジオウイルスを中心に—. *小児感染免疫* 25: 446-451, 2013
- 42) 吉田弘道, 山中龍宏, 巷野悟郎, 太田百合子, 山口規容子, 牛島廣治: 育児不安尺度の作成に関する研究 その1 *小児保健研究* 72: 680-689, 2013
- 43) Homma K, Wakana N, Ushijima H, Tanaka E. Immune factors in breast milk. - Immunoglobulin and apoptosis of human milk cells. *日本母乳哺育学会雑誌*, 7: 42-54, 2013
- 44) 藤本嗣人: アデノウイルス感染症. *日本臨床別冊*. No24: 373~376, 2013
- 45) 榎本美貴, 高井伝仕, 押部智宏, 藤本嗣人, 近平雅嗣, 吉田昌史: 兵庫県の感染症発生動向調査において検出されたエンテロウイルス (2008~2012年). *兵庫県立健康生活科学研究所 研究報告*; No.4: 13~18, 2013
- 46) 藤本嗣人: 手足口病. *化学療法の領域(新興・再興感染症 up to date)*, 増刊号: 176~181, 2013
- 47) 中野貴司: 新しく国内に導入された不活化ポリオワクチン. *医薬ジャーナル* 49:1925-1934, 2013
- 48) 中野貴司: ポリオ根絶に向けた世界の現状と不活化ポリオワクチンの導入. *公衆衛生* 78:109-115, 2014
- 49) 中野貴司: 子どものときに接種しなかったワクチン; ポリオワクチン. *渡辺彰, 尾内一信 編集* *そこ知りたい! 成人の予防接種パーフェクト・ガイド*. 診断と治療社, 東京: 40-44, 2014

2. 学会発表

- 1) Kataoka C, Nishimura Y, Suzuki T, Kotani O, Iwata N, Nagata A, Ami Y, Shimizu H.

- VP1-145 of enterovirus 71 is one of the determinants for pathogenicity in a cynomolgus monkey model. *Europic 2014*, Belgium, Marh 2014
- 2) Shimizu H. Current status of hand, foot, and mouth disease outbreaks and EV71 infection in Japan and Asian countries, The 7th China-Korea-Japan Forum on Communicable Disease Control and Prevention, Beijing, China, 25 November, 2013
 - 3) Fukushima S, Nakano T, Shimizu H, Hamada A. Immunogenicity and Safety of Booster Doses of Inactivated Polio Vaccine. The 7th Vaccine and ISV Congress, Barcelona, Spain, 27-29 October, 2013
 - 4) Shimizu H. Introduction of Inactivated Poliovirus Vaccines in Japan: Global and Local Status of Polio Immunization. The 10th Japan-Taiwan Symposium on Vaccine Preventable Diseases and Vector-Borne Diseases. Tokyo, 12 September, 2013
 - 5) Shimizu H. Hand, Foot, and Mouth Disease and infectious agent surveillance in Japan. International Workshop on Hand, Foot and Mouth Disease. Hanoi, Vietnam, 4-5 April, 2013
 - 6) Shimizu H. Molecular Epidemiology and Virulence (viral) factors of EV71. International Workshop on Hand, Foot and Mouth Disease. Hanoi, Vietnam, 4-5 April, 2013
 - 7) Nakamura T, Hamasaki M, Hideaki Yoshitomi H, Ishibashi T, Yoshiyama C, Maeda E, Sera N, Yoshida H Environmental Surveillance of Poliovirus in Sewage Water during the Introduction Period of Inactivated Polio Vaccine in Japan *Europic 2014*, Belgium, Marh 2014
 - 8) Fujimoto T, Enomoto M, Kanou K, Hanaoka N, Adhikary AK, Yoshida S, Kobayashi M: Hand foot and mouth disease in Japan, 1st conference on Asian pediatric infectious diseases. Tokyo, Japan, August 24-25, 2013
 - 9) Adhikary AK, Ushijima H, Fujimoto T: Updated restriction endonuclease analysis based genome typing method of HAdV: application in pediatric infectious diseases caused by HAdV, 1st conference on Asian pediatric infectious diseases. Tokyo, Japan, August 24-25, 2013
 - 10) Oishi K, Ohkusa Y, Fujimoto T: Surveillance of hand foot and mouth disease in Japan, 1st ASEAN Hand Foot and Mouth Disease Workshop., Singapore, April 11-12, 2013
 - 11) Kotani O, Asif N, Suzuki T, Iwata N, Nakajima N, Katano H, Hosomi T, Tsukagoshi H, Hasegawa H, Taguchi F, Shimizu H, Nagata N. Comparative analyses of the pathogenicity of two isolates of Saffold virus in neonatal mouse. *Europic 2014* (Belgium) 2014. 3
 - 12) Nagata N, Kotani O, Iwata N, Suzuki T, Sato Y, Koike S, Iwasaki T, Taguchi F, Hasegawa H, Shimizu H. A comparison of human enterovirus detection in experimentally infected neonatal mice using immunohistochemistry. *Europic 2014*, (Belgium) 2014. 3
 - 13) Fujii K and Koike S: A SCARB2-transgenic mouse model for the study of enterovirus 71 pathogenesis. The XIIth Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji Hyogo. 2013年9月
 - 14) Ohka S, Fujii K, Kaneda S, Nakamura H, Fujii T, Koike S. Analysis of Enterovirus infection in motor neuron using microfluidic culture platform. The XIIth Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji Hyogo. 2013年9月
 - 15) 清水博之: アジアにおける手足口病とエンテロウイルス感染症流行の現状. 第87回日本感染症学会学術講演会・第61回日本化学療法学会総会合同学会、シンポジウム「世界的視野でみる感染症疫学とその対策」. 横浜市, 6月5日, 2013
 - 16) 清水博之: エンテロウイルス71感染と病原性発現の分子的基盤. 金沢医科大学大学院医学研究セミナー. 金沢, 10月25日, 2013
 - 17) 佐藤 弘, 多屋馨子, 大石和徳: 麻疹および風疹に対する抗体保有状況 (感染症流行予測調査より). 第45回日本小児感染症学会 (2013年10月、北海道)
 - 18) 佐藤 弘, 多屋馨子, 大石和徳: 風疹抗体価の読み替えに関する検討 (HI抗体価と国際単位). 第17回日本ワクチン学会 (2013年11月、三重)
 - 19) 福島慎二, 中野貴司, 清水博之, 濱田篤郎: 日本人渡航者への不活化ポリオワクチン追加接種. 第17回日本渡航医学会. 東京, 2013年7月
 - 20) 福島慎二, 中野貴司, 清水博之, 濱田篤郎: 日本人成人に対する不活化ポリオワクチン追加接種の免疫原性. 第17回日本ワクチン学会. 三重県津市, 2013年12月
 - 21) 中村 朋史, 吉富 秀亮, 石橋 哲也, 前田 詠里子, 世良 暢之, 吉田 弘 IPV移行時におけるポリオウイルスサーベイランス第61回日本ウイルス学会 神戸市, 平成25年11月
 - 22) 永田典代, 岩田奈織子, 鈴木忠樹, 佐藤由子, 中島典子, 片野晴隆, 長谷川秀樹: 脳炎・髄膜炎関連ウイルスの病理学的検索のための参照標本の作製と抗体の検討. 第102回日本病理学会 (札幌) 2013年4月
 - 23) 潮田和佳, 小谷治, 岩田奈織子, 鈴木忠樹, 中島典子, 長谷川秀樹, 清水博之, 永田典代: コクサッキーウイルスB2実験室株脳内接種後のマウスにおける水頭症の発症機序. 第61回日本ウイルス学会学術集会 (神戸) 2013年11月

- 24) 小谷治, Naem Asif, 鈴木忠樹, 岩田奈織子, 中島典子, 片野晴隆, 長谷川秀樹, 田口文広, 清水博之, 永田典代. 新生仔マウスを用いたSaffold virus小脳継代株の作出とその病原性の解析. 第61回日本ウイルス学会学術集会 (神戸) 2013年11月
- 25) 藤本嗣人, 小川知子, 花岡希, 小倉惇, 堀田千恵美, 仁和岳史, Gabriel G, 渡邊日出海. 結膜炎患者の眼から分離されたアデノウイルスD種48, 60および65型(候補株)のリコンビナント型の新しいアデノウイルス. 第61回ウイルス学会学術集会, 神戸市, 2013年11月
- 26) 加納和彦, 牧野友彦, 藤本嗣人. コクサッキーウイルスA6ウイルスの病像変化に関する研究. 第61回ウイルス学会学術集会. 神戸市, 2013年11月
- 27) 榎本美貴, 押部智宏, 近平雅嗣, 藤本嗣人, 林祥剛. 兵庫県における無菌性髄膜炎患者からのエンテロウイルス検出状況. 第61回ウイルス学会学術集会. 神戸市, 2013年11月
- 28) 藤本嗣人, 榎本美貴, 花岡希, 谷口清州. アデノウイルス感染にともなう胃腸炎の発症頻度. 第54回日本臨床ウイルス学会, 倉敷市, 2013年6月
- 29) 菅原民枝, 藤本嗣人, 花岡希, 大日康史. 流行初期段階のコクサッキーA群9型の検出・同定—保育所の発疹集団発生の事例. 第54回日本臨床ウイルス学会, 倉敷市, 2013年6月
- 30) 菅原民枝, 藤本嗣人, 大日康史, 安井良則, 大石和徳. 保育所の集団発生におけるコクサッキーA群9型の検出・同定. 第54回日本臨床ウイルス学会, 倉敷市, 2013年6月
- 31) 山元佳, 金川修造, 藤本嗣人. コクサッキーウイルスによる無菌性髄膜炎を契機に発見された本邦初のエンテロウイルス99類似株検出例. 第44回日本小児感染症学会, 札幌市, 2013年10月
- 32) 山下照夫, 伊藤 雅, 皆川洋子. アイチウイルスとヒトパレコウイルス3型の発見と臨床像. 第54回日本臨床ウイルス学会, 倉敷市, 2013年6月
- 33) 山下照夫, 安達啓一, 廣瀬絵美, 中村範子, 伊藤 雅, 安井善宏, 小林慎一, 皆川洋子. イヌ糞便及び下水からのコブウイルスの検出と遺伝子解析. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸市, 2013年11月
- 34) Thongprachum A, 高梨さやか, 沖津祥子, 早川智, 牛島廣治. Increased of norovirus in Japanese pediatric patients associated with the emergence of GII/4 variant 2012. 第54回日本臨床ウイルス学会. 倉敷市, 2013年6月
- 35) Tran DN, 高梨さやか, 沖津祥子, 早川智, 水口雅, 牛島廣治. Genetic characterization of human influenza A virus in Vietnam from 2010 to 2011. 第45回日本小児感染症学会総会・学術集会. 札幌市, 2013年10月
- 36) 牛島廣治, 西村修一, Thongprachum A, Tran DN, Pham NTK, 高梨さやか, 沖津祥子, 水口雅, 早川智. LAMP, PCRおよび培養法を用いた小児下痢便からのカンピロバクターの検出. 第45回日本小児感染症学会総会・学術集会. 札幌市, 2013年10月
- 37) 沖津祥子, Khamrin P, Thongprachum A, 高梨さやか, 早川智, 牛島廣治. タイでブタから検出されたporcine kobuvirus 一株の全長排列の決定, およびタイ, 日本の株における2B領域の解析. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 神戸市, 2013年11月
- 38) 牛島廣治, Thongprachum A, Khamrin P, 高梨さやか, 沖津祥子, 小林正明, 西村修一, 菊田英明, 山本あつ子, 杉田久美子, 馬場常嘉, 水口雅, 早川智. The emergence of norovirus GII.4 variant 2012 in Japanese pediatric patients. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 神戸市, 2013年11月
- 39) Tran DN, 高梨さやか, 沖津祥子, Nguyen TQN, Ha MT, Tran TTL, 水口雅, 早川智, 牛島廣治. Human Rhinovirus infections in hospitalized children in Vietnam. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 神戸市, 2013年11月
- 40) Thongprachum A, Khamrin P, 高梨さやか, 沖津祥子, 小林正明, 西村修一, 菊田英明, 山本あつ子, 杉田久美子, 馬場常嘉, 水口雅, 早川智, 牛島廣治. A wide variety of gastroenteritis viruses circulating in Japanese pediatric patients. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 神戸市, 2013年11月
- 41) 井上菜南, 高梨さやか, 牛島廣治, 沖津祥子, 崎山弘, 水口雅. 府中市におけるロタウイルスワクチン累積接種率の検討—定期接種ワクチンとの比較. 第10回日本小児消化管感染症研究会. 東京都港区, 2014年2月
- 42) Thongprachum A, Takanashi S, Okitus S, Kobayashi M, Nishimura S, Kikuta H, Yamamoto A, Sigita K, Baba T, Mizuguchi M, Hayakawa S, Ushijima H. Molecular and epidemiological trend of sapovirus and astrovirus infection in Japanese pediatric patient, 2009-2013. 第10回日本小児消化管感染症研究会. 東京都港区, 2014年2月
- 43) 里龍晴, 森内浩幸, 吾郷昌信. 血球貪食症候群様病態を合併したコクサッキーウイルスB4髄膜炎の新生児例. 第54回日本臨床ウイルス学会, 2013年 (倉敷)
- 44) 吾郷昌信, 北川由美香, 松本文昭, 吉川 亮, 陣内久美子, 高柳俊光, 森内浩幸. 垂直感染による新生児重症ウイルス感染症2例を惹起したコクサッキーウイルスB2型. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 2013年 (神戸)
- 45) 大原義朗, 姫田敏樹, 大桑孝子, 村木靖. 小児脳炎への関与が疑われるSaffoldウイルスの*in vitro*持続感染. 第54回日本神経学会. 東京都, 2013年5月
- 46) 大原義朗, 姫田敏樹, 大桑孝子, 村木靖, 西山修平, 高橋利幸, 藤盛寿一, 三須建郎, 中島一郎, 藤原一男, 糸山泰人, 青木正志, 石崎義人, 原寿郎, 中村龍文. Saffoldウイルスの持続感染と神経病原

- 性の可能性. 第18回日本神経感染症学会. 宮崎市, 2013年10月
- 47) 姫田敏樹, 大桑孝子, 村木靖, 大原義朗: Saffoldウイルス (SAFV) Leader 蛋白のIFN産生抑制能の解析. 第25回日本神経免疫学会. 下関, 2013年11月
- 48) 齊藤峰輝, 塩浜康雄, 後川潤, 高嶋博, 大原義朗: HTLV-1 標的遺伝子CCLIのHAM発症における病因的意義. 第25回日本神経免疫学会. 下関, 2013年11月
- 49) 片岡周子, 西村順裕, 鈴木忠樹, 小谷 治, 岩田奈織子, 永田典代, 網康至, 清水博之: エンテロウイルス71のカニクイザルにおける病原性の解析: 第61回日本ウイルス学会総会, 神戸, 11月10日-12日, 2013
- 50) 西村順裕, Lee Hyunwook, Hafenstein Susan, 片岡周子, 脇田隆字, Bergelson Jeffrey M., 清水博之: エンテロウイルス71の受容体PSGL-1との結合: VP1-145は受容体特異性を制御する分子スイッチである: 第61回日本ウイルス学会総会, 神戸, 11月10日-12日, 2013
- 51) 小池智: エンテロウイルス71受容体の解析 第61回日本ウイルス学会学術集会 神戸市 2013年11月
- 52) 藤井健, 永田典代, 小池智: hSCARB2-Tgマウスを用いたEV71標的組織決定機構の解析 第61回日本ウイルス学会学術集会 神戸市 2013年11月
- 53) 大岡静衣, 藤井健, 金田祥平, 中村寛子, 藤井輝夫, 小池智: 運動神経初代培養細胞の軸索終末側からのみの感染を可能にするマイクロ流体デバイスを用いたエンテロウイルス感染機構解析 第61回日本ウイルス学会学術集会 神戸市 2013年11月

3. ガイドライン、その他

- 1) Country Progress Report on Maintaining Polio-free Status, Japan: WHO report (annual WHO report, 2013) [分担執筆; 清水博之]

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

不活化ポリオワクチン及び生ポリオワクチンの予防接種状況ならびに抗体保有状況

研究分担者 多屋馨子（国立感染症研究所 感染症疫学センター）

研究協力者 佐藤 弘（国立感染症研究所 感染症疫学センター）

研究要旨 ポリオの定期接種に用いられるワクチンが、2012年9月にOPVからIPVに変更され、同年11月からはDPT-IPVの使用が開始された。IPV含有ワクチン（IPVまたはDPT-IPV）の導入にともなう予防接種状況ならびに抗体保有状況について、2013年度感染症流行予測調査の結果を用いて検討を行った。5歳未満の予防接種状況をみると、年長になるとともにOPVのみ接種者の割合は増加し、IPV含有ワクチンのみ接種者の割合は減少する傾向がみられたが、ポリオワクチン（OPVあるいはIPV含有ワクチン）の1回以上接種率はいずれの年齢も95%以上であった。5歳未満の抗体保有状況については、1～4歳では3型の抗体保有率が1型や2型と比較して10ポイント以上低かったが、0歳ではIPV含有ワクチンの導入により、血清型間の差は小さくなり、5ポイント未満となった。

A. 研究目的

わが国におけるポリオの定期接種は、1964年以降、弱毒株であるセービン株を用いた経口生ワクチン（OPV）により実施されてきたが、2012年9月に野生株を由来とした不活化ポリオワクチン（IPV）に変更となった。さらに、同年11月には百日咳ジフテリア破傷風混合ワクチン（DPT）にセービン株由来の不活化ワクチンを混合した四種混合ワクチン（DPT-sIPV）による接種が開始された。

定期接種で使用されるワクチンの変更により、2012年9月または11月時点でOPVの接種が2回完了している者はIPVまたはDPT-IPV（IPV含有ワクチン）による接種は必要ないが、1回だけの者は、その後IPV含有ワクチンによる3回の接種が必要であり、さらに1回も接種を受けていない者はIPV含有ワクチンによる4回の接種が必要となった。したがって、OPVのみ接種者、IPV含有ワクチンのみ接種者、OPVとIPV含有ワクチ

チンを組み合わせた（OPV+IPV含有ワクチン）接種者が存在することから、これらの者における接種状況および免疫獲得状況（抗体保有状況）について検討する必要がある。

本研究では、定期接種対象疾患の予防接種状況や抗体保有状況等に関して毎年実施されている感染症流行予測調査の結果を用いて、各ワクチンの接種状況ならびに抗体保有状況について検討を行った。

B. 研究方法

2013年度感染症流行予測調査において報告された2014年2月現在の結果を用いた。2013年度は北海道、山形県、群馬県、千葉県、東京都、富山県、愛知県、山口県、愛媛県において調査が実施され、2,309名の結果が報告された。このうち、5歳未満の416名の内訳は、0歳49名、1歳133名、2歳83名、3歳88名、4歳は63名であった。