

## E. 結論と今後の展望

成人に対する IPV 接種の臨床研究を策定し、有効性と安全性を検討した。現在、49 名に対してプロトコルを完了した。免疫獲得による有効性の検討については、42 例で接種前後の血清を採取し抗体価を測定した。成人を対象とした本研究では、1 回の IPV 接種により、おおむね良好な抗体価の上昇が確認された。ただし、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。

この IPV(イモバックスポリオ皮下注®) という製品は 2012 年 9 月に国内でも承認された。現在は、イモバックスポリオ皮下注を用いて、研究を継続中である。

## F. 研究発表

(論文発表)

- (1) 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.
- (2) 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.
- (3) 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 そこが知りたい! 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.

(学会発表)

- (1) 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.
- (2) 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.

(3) Shinji Fukushima, Takashi Nakano, Hiroyuki Shimizu, Atsuo Hamada : Immunogenicity and Safety of Booster Doses of Inactivated Polio Vaccine. 7th Vaccine & ISV Annual Global Congress 2013, Barcelona, Spain, October 2013.

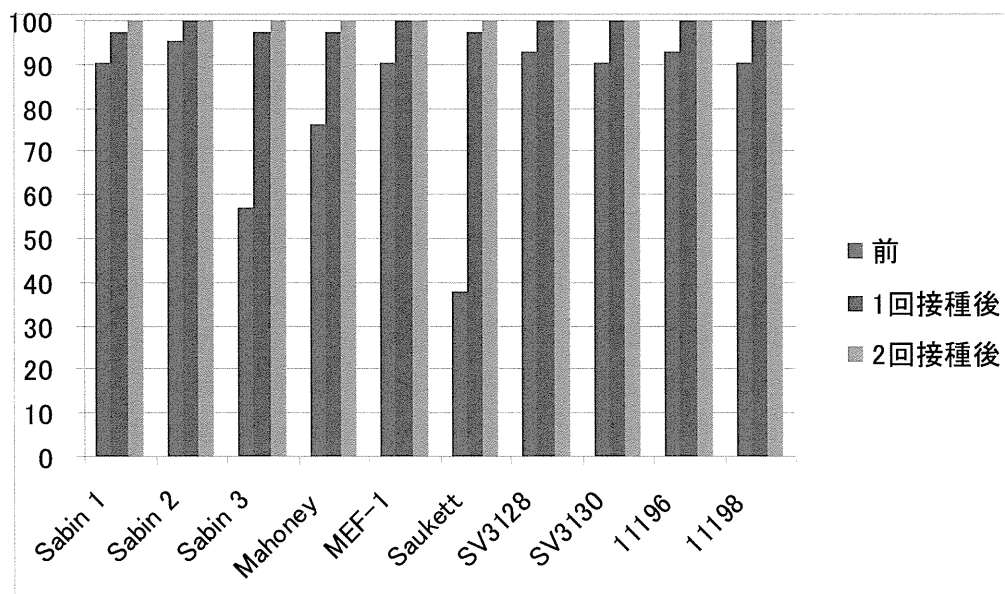
## G. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

表. 血清中のポリオウイルス中和抗体価保有率 (N=42)

全体:42名分

	抗体価 8 倍以上の人数			抗体価 8 倍以上の割合		
	前	1 回接種後	2 回接種後	前	1 回接種後	2 回接種後
①Sabin 1	38	41	42	90.5	97.6	100.0
②Sabin 2	40	42	42	95.2	100.0	100.0
③Sabin 3	24	41	42	57.1	97.6	100.0
④Mahoney	32	41	42	76.2	97.6	100.0
⑤MEF-1	38	42	42	90.5	100.0	100.0
⑥Saukett	16	41	42	38.1	97.6	100.0
⑦SV3128	39	42	42	92.9	100.0	100.0
⑧SV3130	38	42	42	90.5	100.0	100.0
⑨11196	39	42	42	92.9	100.0	100.0
⑩11198	38	42	42	90.5	100.0	100.0



「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」

研究分担者 吉田 弘 国立感染症研究所

研究協力者 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）、

**研究要旨：**我が国に伝播しているエンテロウイルスを包括的に捕捉し、かつ国内外のエンテロウイルス伝播を調べるため、初年度は環境水サーベイランスの立ち上げを行った。全国 13 か所で 2013 年春より随時調査を開始し、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（2013 年 12 月現在）。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。

## A 研究目的

我が国は H25 年度感染症流行予測事業にてポリオ環境サーベイランスを開始した。環境サーベイランスは輸入が想定されるポリオを検出する目的で実施している。本法の特徴として同時にエンテロウイルス等も検出される。環境水由来株、患者由来ウイルスゲノムを国内外の情報と比較することでエンテロウイルスのアジア内伝播を監視する。

初年度は 13 か所の協力を得て環境水調査を開始した。

## B 研究方法

### (1) 調査地点

2013 年 4 月より順次 13 地方衛生研究所（青森、岩手、福島、富山、愛知、岐阜、和歌山、福岡、横浜、浜松、大阪府、堺、宮崎県）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(1-3 か所)とし、流入下水を月 1 回採水している。下水利用人口は延べ約 450 万人である。

### (2) 下水流入水からのウイルス検出法

下水流入水 (500ml-1L) を、4℃で 3000rpm、30 分間粗遠心後、上清に塩化マグネシウムを添加（最終濃度 0.05M）、pH3.5 に調整後、陰電荷膜を用いてろ過（ウイルス吸着）、吸着後、膜より 3%ビーフエキストラクト存在下でウイルス誘出を行い 50-100 倍濃縮液を得た (H25 年

度流行予測調査事業術式)。大阪府は約 200ml の下水を用いポリビニルピロリドンによる濃縮(20倍)を行った。

濃縮産物をウイルスに対する感受性の異なる3-6種類の培養細胞に0.05-0.1m<sup>2</sup>ずつ接種した。分離株はL20Bに再接種しポリオの有無を確認を行った。非ポリオウイルスは中和試験法(EP95 プール抗血清、デンカ生研エンテロ抗血清)、或いはVP4-VP2、或いはVP1領域PCR-ダイレクトシーケンスにより同定した(表1)。

### C. 研究結果

#### (1) 下水からのポリオワクチン株検出

2013年4月以降、国内13か所の下水処理場を定点とし、ポリオ検出を行ったところ、2014年1月まで、対象地域における流入下水からワクチン株の検出は見られない。

分離株はL20B細胞に再接種したが、ポリオは分離されなかったが、アデノウイルス、レオウイルスはCPEを示し、ポリオ抗血清による中和、或いはレオ、アデノ特異的PCRを実施し、ポリオウイルスを否定した。

#### (2) 流入下水より分離されたウイルス

2013年4月から12月までの調査で環境水より検出されたウイルスの種類と時期を図1に示す。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。また2カ月以上同一地点で検出されたウイルスはCB1、CB3、CB4、CB5、E6、E7、E11、E25、Ad2、Ad5、Ad41、Reo2であった。複数箇所検出、或いは2カ月以上検出されているウイルスは前者が広域伝播、後者は地域内流行している可能性を示唆する。

### D 考察

初年度は下水定点の立ち上げを中心とした。エンテロウイルスのゲノム解析は各衛研で実

施中の方法(中和法、VP4-VP2部分領域、或いはVP1領域)に基づいたため、ゲノム情報の全国的な比較はできない。また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。なお広域伝播、地域内伝播を確認するため感染症発生動向調査で検出されたウイルスゲノムの解析も行ってゆく予定である。

### E. 結論

(1) 2013年度は環境水サーベイランスの立ち上げを行い全国13か所で2013年春より随時調査を開始した。下水利用人口は延べ約450万人である。

(2) 2014年1月現在ポリオウイルスの検出は見られない。

(3) 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、患者発生動向調査、ゲノム解析により伝播のパターンが今後明らかになる可能性がある。

### F. 健康危険情報

### G 研究発表

#### 1. 論文発表

- (1) 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
- (2) 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. (2013) Isolation and Characterization of a Type 2 Vaccine-Derived Poliovirus from Environmental Surveillance in China, 2012. PLoS ONE 8(12): e83975. doi:10.1371/journal.pone.0083975

- (3) 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)

## 2. 学会発表

- (1) 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

- (2) H 知的所有権の取得情報

なし

表 1

採 水 箇 所	サ ン プ ル 量	濃 縮 法	濃 縮 倍 率	分 離 細 胞 の 種 類	同 定 法
青森 県	1 500ml	フィルタ ー法	50 倍	RD-A,HEp-2,Vero,(L20B)	VP4,VP1 ダイレクトシ ーケンス
岩手 県	1 1000ml	フィルタ ー法	100 倍	RD-A,HEp-2,Vero,(L20B)	VP4,VP1 ダイレクトシ ーケンス
福島 県	1 500ml	フィルタ ー法	100 倍	RD-18S,A549,RD-A,Vero, LLC-MK2,(L20B)	VP4,VP1 ダイレクトシ ーケンス
横浜 市	2 500ml	フィルタ ー法	50倍	RD-A,HEp-2,Vero,(L20B)	VP1 ダイレクトシーケ ンス
浜松 市	1 500ml	フィルタ ー法	100 倍	RD-A,HEp-2,Vero,(L20B)	VP1 ダイレクトシーケ ンス
富山 県	1 1000ml	フィルタ ー法	100 倍	RD18S,HEp-2,Vero,MA104, (L20B)	中和(EP95,デンカ抗 血清)、VP1 ダイレクト シーケンス
岐阜 県	1 500ml	フィルタ ー法	100 倍	RD18S,HEp-2,VeroE6,A549 ,(L20B)	VP4 ダイレクトシーケ ンス
大阪 府	2 タンポン法 により 400 ml	PVP 法	20 倍	RD-A,FL,Caco2,Vero, (L20B)	VP1 ダイレクトシーケ ンス
堺市	3 1000ml	フィルタ ー法	200 倍	RD-A,HEp-2,VeroE6, (L20B)	中和(デンカ 1-4 号),VP1 ダイレクトシー ケンス
和歌 山県	1 500ml	フィルタ ー法	50 倍	RD-18S,HEp-2,VeroE6, A549	中和(デンカ 2 号、 EP95),VP4 ダイレクト シーケンス
福岡 県	2 1000ml	フィルタ ー法	100 倍	RD18S,HEp-2,Vero,FL, LLC-MK2,,(L20B)	VP1 ダイレクトシーケ ンス
宮崎 県	1 500ml	フィルタ ー法	100 倍	RD-A,Caco2,Vero,L20B	中和(デンカ)

図1 2013年4月以降、環境サーベイランスで検出されたウイルス(検査途中につき2013年12月現在の中間報告)

(連続して検出されたウイルスは灰色で示した)

月	4	5	6	7	8	9	10	11	12	ウイルス種
青森 2013年 3月開始	CB3	CB3	CB3	CB3		CB3	CB3		CB5 E11	CB3 CB5 E11 CB3 CB5 E7 E18 E25 E30 CB3 E11
岩手 2012年 10月開始	E7	E7		CB3	CB3		CB3		E7	Ad2 AdNT CB1 CB3 CB4 CB5 E3 E6 E7 E11 E11 E25 Ad2 Ad5 ReoNT
福島 2013年 4月開始			Ad2		CB3	CB3	CB3		E11	Ad2 AdNT CB1 CB3 CB4 CB5 E3 E6 E7 E11 E25 Ad2 Ad5 ReoNT
横浜A 2013年 4月開始	CB3	CB1	CB1	CB3	CB3	CB3	CB3			Ad2 Ad5 ReoNT
横浜B 4月開始	E3	E6	E7	E11	E11	E11	E11	E11		CB3 CB4 CB5 E6 E7 E11 E25 Ad1 Ad2 Ad5
	Ad5	Ad2	Ad2	Ad5		Ad2	Ad2			CB3 CB4 CB5 E6 E7 E11 E25 Ad1 Ad2 Ad5
	ReoNT	ReoNT	ReoNT		CB3	CB3	CB3	CB3		CB3 CB4 CB5 E6 E7 E11 E25 Ad1 Ad2 Ad5
	E6	E6	E6	CB5	CB5	CB5	CB5	CB5		CB3 CB4 CB5 E6 E7 E11 E25 Ad1 Ad2 Ad5
				E25	E25	E25				CB3 CB4 CB5 E6 E7 E11 E25 Ad1 Ad2 Ad5
				Ad2	Ad2			Ad2		CB3 CB4 CB5 E6 E7 E11 E25 Ad1 Ad2 Ad5
				Ad5		Ad5				CB3 CB4 CB5 E6 E7 E11 E25 Ad1 Ad2 Ad5
				ReoNT	ReoNT	ReoNT				CB3 CB4 CB5 E6 E7 E11 E25 Ad1 Ad2 Ad5
富山 1979年	NPEV	NPEV	NPEV	NPEV	NPEV	NPEV	NPEV	NPEV		NPEV
浜松 5月開始				CB4	CB5	CB5		検査中		CB4 CB5 E6 E11 NPEV
岐阜 6月開始		NPEV	NPEV	NPEV	NPEV	NPEV	NPEV			NPEV
			CB3	CB3	CB3	CB3	CB3			CB3 CB4 AdNT NPEV
			AdNT	AdNT	AdNT	AdNT	AdNT	AdNT	検査中	CB3 CB4 AdNT NPEV
			NPEV	NPEV	NPEV	NPEV	NPEV	検査中	検査中	NPEV
大阪 20121月					CB3	CB3	CB3	CB3	CB5	CB3 CB5
2か所	E6			E6	E6	E6	E6			E6
					E11			E11	E11	E11
和歌山 4月開始	CB3	CB3	CB3						検査中	CB1 CB3 Ad1 Ad2 Ad31
	Ad31		Ad2							Ad1 Ad2 Ad31
				NPEV	NPEV	NPEV				NPEV

		4	5	6	7	8	9	10	11	12
堺市B	3月開始		CB3		CB3 E6					
堺市C	3月開始			E11	E11	E11	E11	検査中		
		CB3	CB3	CB3	E11	CB3	E11	検査中		
堺市D	3月開始			CB1	CB3					
				CB3	CB5	E11	E11	E11	検査中	
福岡E	2010年				CB2		CB2	検査中		
				E30			CB3	E18		
福岡F	2010年	Ad4	Ad4	Ad4	NPEV	NPEV		検査中		
					CB3	CB3	E18			
宮崎	4月開始				Ad3					
				E30	Ad5	Ad31				
		Ad4	Ad4	Ad4	Ad41	Ad41	Ad56	Ad56		
								NPEV		
		NPEV						NPEV		
					CB3	CB3				
		CB4	CB4						CB4	
							E30			

CB3  
 E6  
 E11  
 CB3  
 E11  
 NPEV  
 CB1  
 CB3  
 CB5  
 E11  
 NPEV  
 CB2  
 CB3  
 CB3  
 E18  
 E30  
 Ad4  
 NPEV  
 CB2  
 CB3  
 E18  
 E30  
 Ad3  
 Ad4  
 Ad5  
 Ad31  
 Ad41  
 Ad56  
 NPEV  
 CB3  
 CB4  
 E30



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  
協力研究報告書

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

研究協力者： 有田峰太郎 国立感染症研究所 ウイルス第二部

## 研究要旨

ポリオウイルス(PV)の新規濃縮法を開発した。この方法により、便抽出液のような粗サンプル中にある PV を抽出できるようになった。そのため、便検体や環境水から直接 PV を検出するために必要な濃縮過程に本方法は有用であると考えられる。

## A. 研究方法

全世界的なポリオ根絶計画において、実験室診断は PV 感染患者を同定するために必須の役割を果たしている。具体的には、疫学調査により見つかった急性弛緩性麻痺患者を対象として、その便検体から PV の分離を試みることで、PV 感染患者を同定している。現在行われている細胞培養を用いたウイルス分離法では、人の経験を必要とする過程があること（顕微鏡での観察によるウイルス感染細胞の細胞変性効果の検出）や必要とされる時間が長いこと（陰性の結果を出すために 10 日必要である）など、効率の面でのデメリットが指摘されている。

我々は、より効率のよいウイルス分離方法として、便検体中の PV を直接検出する系の開発を行ってきた。その中で、大きな問題として浮かび上がってきたのが、便検体中の PV の量が極めて微量であることであった。現在、野生株およびワクチン由来の PV を検出できる方法としては、リアルタイム PCR 法が知られているが、現在報告されている系では検出感度が極めて低いため（25,000 コピーのウイルスゲノムが必要）、この微量の PV を検出することができな

い。

そこで、便検体のような極めて不純物の多いサンプルから、PV を抽出する方法を確立することを目的として、今回の研究を行った。具体的には、PV 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 PV の抽出を試みた。

## B. 研究結果

- 1) PV レセプター分子を高密度（ビーズ当たり最大 1600 分子）で固定したナノ磁気ビーズを調製した。
- 2) 調製したビーズにより、細胞培養用の培地もしくは便抽出液中に添加した PV を効率よく抽出することができた（>90%の抽出効率）。添加するビーズ量が少ない場合には、3 型の PV の抽出効率が 1, 2 型の PV の抽出と比べ若干低くなることが観察された（60-80%の抽出効率）。また、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（4  $\mu$ L のビーズ液を 100  $\mu$ L の便抽出液に加え、4°C 1-2 h 保温して抽出）、便抽出液 150 サンプルを用いて

3 型 PV の抽出を行った結果、95%の便抽出液で >90%の PV 抽出効率が達成できた。

- 3) PV 感染患者の便検体からも、PV を効率よく抽出することができた (>90%以上の抽出効率)。

### C. 考察

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。しかし、PV は3つの異なる血清型を含み、また、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。そのため、特定の抗体を用いた抽出方法では、その抗体に結合できないウイルス株を取りこぼす可能性がある。現在まで、PV レセプター (CD155) を使わない PV 変異ウイルスは分離されず、存在する全ての PV 株は、PV レセプターとの結合能を維持していると考えられている。そのため、PV 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 PV および変異株を抽出できることが期待される。しかし、添加するビーズ量が少ない場合には、3 型の PV は、1, 2 型の PV と比べて若干 PV レセプターとの反応性が低い傾向が見られた。このことは、PV レセプターを用いた抽出においても、PV 株間で若干の反応性の違いがあることを示唆している。また、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 PV 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も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 PV 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。

### D. 健康危機情報

特になし

### E. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) **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

### F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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）  
研究報告書

「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」  
「環境試料からのポリオウイルス直接検出法の検討」

研究協力者 中村 朋史

**研究要旨**

ポリオウイルス (PV) の新規濃縮検出法として、PV レセプターを結合させたナノ磁性ビーズ (PVR-MB) を応用した手法を検討した。培地に PV を外部添加したモデル試験において、PVR-MB は PV を効率的に回収・濃縮可能であることが明らかとなった。次に環境水を模したバッファーに PV を添加したスパイク試験を行った。環境ウイルスサーベイランスで用いられる陰電荷膜と 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なことが示された。米国 CDC が開発した PV 型別同定用の Real-Time PCR (rRT-PCR) により、100 mL の培地に添加した  $10^1$  CCID<sub>50</sub> の PV を陰電荷膜および PVR-MB で処理した後に検出することが可能であった。

**A 研究目的**

一般的に小児麻痺と呼ばれる急性灰白髄炎 (ポリオ) はポリオウイルス (PV) による感染症であり、ときに乳幼児の下肢に終生回復することのない弛緩性麻痺を引き起こす。ポリオ根絶を目指してきた WHO による大規模な経口生ポリオワクチン (OPV) 接種キャンペーンの結果、世界的なポリオ症例数は大幅に減少した (2012 年で 223 例)。しかしながら、PV 常在国であるナイジェリア、パキスタン、アフガニスタンでは流行が終息せず、2013 年にはソマリアやケニアを中心とした野生株アウトブレイクなどにより約 400 例と倍増した。また、同年には不活化ポリオワクチン (IPV) による高いワクチン摂取率を維持してきたイスラエルにおいて、広い地域の環境由来検体から 1 型野生株 PV が検出され、ポリオ流行地およびポリオフリーの地

域における環境サーベイランスの重要性が認識されることとなった。

現在、急性麻痺 (AFP) サーベイランスおよび環境中からの PV の分離・同定は培養細胞 (RD および L20B など) によるウイルス分離がゴールドスタンダードとなっている。この手法は検出感度が高いという利点を有しているものの、検体処理から結果判明まで 1-2 週間程度と時間を要する点や細胞変成効果 (CPE) を確認するためのトレーニングが必要である点が課題である。そのため、細胞分離を経ない直接的かつ迅速で高感度な PV 検出法の研究開発が WHO/GPEI によって強く推奨されてきた。

本研究室では有田により PV レセプターを結合させたナノ磁性ビーズ (PVR-MB) が開発され、特異的かつ効率的な PV の濃縮検出法として注目を集めている (Arita M. J Clin Microbiol.

51(8):2717-2720, 2013)。そこで本研究では、環境ウイルスサーベイランスで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・標準化を進めることを目的とする。本手法の開発は世界的なポリオ根絶活動の推進における環境 PV サーベイランス事業への貢献が期待される。

## B 研究方法

### 1. モデル試験

始めに、培地に力価既知 ( $10^5$  CCID<sub>50</sub>) の PV (Sabin1-3) を外部添加した系でのモデル試験を行い PVR-MB の機能を評価した。PV を含む培地 (E-MEM) 1.0 mL に PVR-MB を添加し、回転下 (6 rpm) で 1 時間インキュベートした。PVR-MB は 1.5 mL チューブ中で磁石スタンド (多摩川精機) を用いて回収し、PBS によって非特異的結合物の洗浄を行った。PVR-MB は 10  $\mu$ L の PBS で再懸濁した。PV 粒子から vRNA をリリースさせるため 95°C で 5 分処理した後、リアルタイム RT-PCR (rRT-PCR) に供し定量を行った。

### 2. スパイク試験

次に、力価既知 ( $10^{1-8}$  CCID<sub>50</sub>) の PV (Sabin1) を用いて陰電荷膜と PVR-MB を組み合わせた新規濃縮検出法の検討を行った。100 mL の PBS バッファーに PV を添加し、シリンジにコネクターを用いて連結した陰電荷膜 (0.45  $\mu$ M、ADVANTEC) を通過させることにより PV を吸着回収した。陰電荷膜は解剖用の小型ハサミで裁断し、1.5 mL チューブに回収した。陰電荷膜は 1 mL の 3% ビーフエキストラクト存在下で激しく攪拌 (Vortex) し、ウイルスの誘出を行った。遠心分離にて残渣を除いた後、モデル試験と同様に PVR-MB 処理を行い PV vRNA を回収した。

得られた PV vRNA を用いて rRT-PCR による定量を行った。

### 3. リアルタイム RT-PCR (rRT-PCR)

米国 CDC が開発した PV の型別同定法である Poliovirus intratypic differentiation Real-Time PCR (PVITD rRT-PCR) を用いて回収した PV の定量および同定を行った。反応は二段階で産物の増幅を行うことにより高感度な検出が可能な Dual Stage を採用した。

## C 研究結果及び考察

### 1. モデル試験

図 1 にモデル試験の結果を示した。Sabin1、Sabin2 および Sabin3 を用いた試験全てにおいて添加する PVR-MB の量に従って回収率が向上した。しかしながら、回収率は 20-40% にとどまった。少量のバッファー中 (100  $\mu$ L) での反応では 100% に近い回収率が得られていることから (Arita M. 前述)、1 mL のバッファー中での PV と PVR-MB の相互作用が少ないことが予想された。

### 2. スパイク試験

スパイク試験を行った結果、Sanbin1 を  $10^1$  CCID<sub>50</sub> 添加した系においても rRT-PCR にて検出することが可能であった (表 1)。また、陰電荷膜に吸着した PV および PVR-MB で回収された PV の濃度をそれぞれ定量した結果、陰電荷膜では約 35-55 倍に、PVR-MB では約 700-1,800 倍に PV を濃縮できることが示された。

## D 結論

本研究では、細胞分離を経ない直接的かつ迅速で高感度な PV 検出法の検討を行った。陰電荷膜および PVR-MB を組み合わせた新規濃縮法では PV を高効率に濃縮することが可能である

ことが示された。一方、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と考えている。また、PVITD rRT-PCR の PV 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討が必要であるかもしれない。標準法の作成へ向けて、精査を続けていく予定である。

## G 研究発表

1. 論文発表           なし
2. 学会発表

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学術集会。神戸市、2013 年 11 月

## H 知的所有権の取得情報

なし

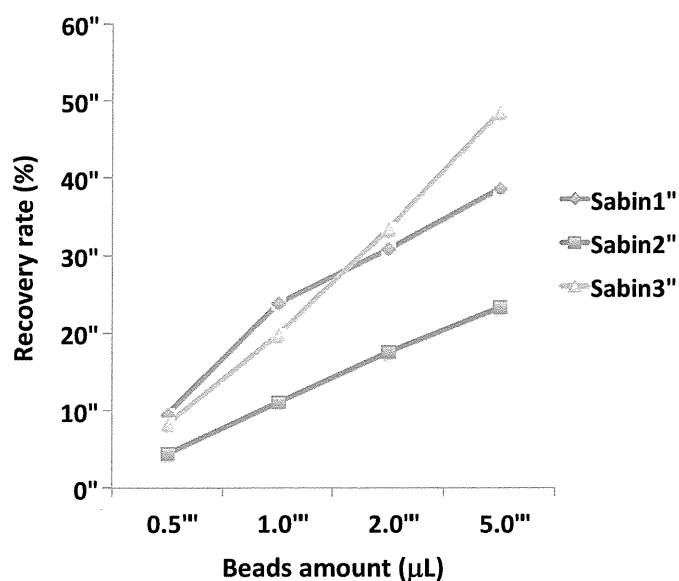


図 1 モデル試験における PV 回収率と PVR-MB 添加量の関係

表 1 陰電荷膜および PVR-MB による回収率

CCID <sub>50</sub>	陰電荷膜		PVR-MB	
	回収率 (%)	濃縮率 (x)	回収率 (%)	濃縮率 (x)
10 <sup>8</sup>	37.6	37.6	7.8	775.9
10 <sup>7</sup>	31.6	31.6	8.2	824.2
10 <sup>6</sup>	46.9	46.9	11.1	1111.5
10 <sup>5</sup>	40.7	40.7	9.7	966.4
10 <sup>4</sup>	37.1	37.1	8.0	795.9
10 <sup>3</sup>	54.8	54.8	9.6	955.1
10 <sup>2</sup>	ND	ND	7.2	721.6
10 <sup>1</sup>	ND	ND	18.4	1837.3

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」

#### 分担研究報告書

### 「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」

研究分担者	藤本嗣人	国立感染症研究所	感染症疫学センター
研究協力者	花岡 希	国立感染症研究所	感染症疫学センター
	加納 和彦	国立感染症研究所	感染症疫学センター
	小長谷 昌未	〃	〃
	荻 美貴	兵庫県立健康生活科学研究所	感染症部
	藤巻 明日香	東京北社会保険病院	小児科
	小林 正明	小林小児科	
	清水 博之	国立感染症研究所	ウイルス第二部

#### 研究要旨

エンテロウイルス71(EV71)は世界、ことにアジアを中心に手足口病とともに髄膜炎、さらに重症な場合は脳炎や麻痺を引き起こしときに致死性的である。ところが、日本においては手足口病を多く引き起こしているが重症例の報告は少ない。2000年に兵庫県で脳炎死亡例を含む重症例の多発が見られた地域流行は日本における代表的な事例である。今回その重症化例からのウイルスについてほぼ完全長の塩基配列(兵庫2000)を得た。世界においてNCBIから入手可能なEV71の完全長塩基配列は2014年1月の段階で336配列であり、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年台湾で重症化例多発時に検出された株と最も近く、これを含めて9株が97%以上の相同性を持っており1997～2002年に日本、台湾、マレーシア、シンガポールで分離され、subgenogroupでB4に分類された。これらの結果は兵庫2000が、特に台湾で同じ年に流行した株と強い関連を持っていることを強く示唆している。

#### A. 研究目的

2000年に兵庫県で重症例を多発させたエンテロウイルス71型(EV71)について完全長の塩基配列を決定し、2014年1月現在で登録されている株と比較してその特徴を調べる。

#### B. 研究方法

##### 1. 2000年流行株の塩基配列の決定

兵庫県の2000年流行株のうち死亡例関連の株の全塩基配列を決定した。

##### 2. 報告されているEV71塩基配列

1) すでに報告されているEV71のうちJN992282(Virus Res. 2012)をクエリにして、塩基配列データベースにblast解析を行った。2014年1月現在、アライメントカ

パー率が 98%以上のもので entero,71 という記載があるものを抽出した。

2) 得られた 336 件を Sequencher (日立ソリューションズ)を用いて解析すると 6つの contig 配列に分かれた。

3) 配列 1 (59 配列)

配列 2 (201 配列)

配列 3 (66 配列)

配列 4 (5 配列)

配列 5 (3 配列)

配列 6 (2 配列)

兵庫 2000 年配列

これらについて、塩基配列のうち N を除いて multi-Fasta 形式で保存した。

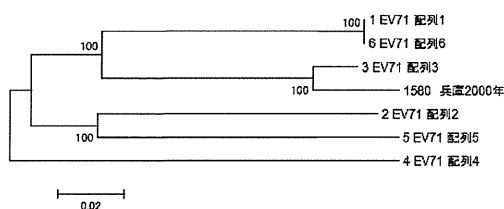
4) MEGA5 により上記の 7 配列をアライメントして NJ 法で解析した。

3. 兵庫株に関して、DDBJ BLAST により最も相同性が高い配列を解析した。

## C. 研究結果

### 1. 系統樹解析の結果

兵庫株は配列 3 と最も近い結果が得られた。



配列 1 (59 配列)と配列 6(2 配列)は、MEGA5 での解析では同じと判定された。

配列 3 に分類された 66 配列は、次のとおりであった。

AB4689183, EF373575, JN964686,

FJ357380, FJ357383, FJ357381,  
FJ357384, FJ357382, FJ357375,  
FJ357377, EU364841, HQ189392,  
FJ357379, AB482183, FJ357376,  
AB747374, EU376004, EU376005,  
DQ341354, JQ724182, AB747373,  
DQ341364, FJ357378, DQ341363,  
DQ341362, AB550336, KF154355,  
JN992284, AB550337, JN992282,  
GQ231943, GQ231941, GQ231942,  
GQ231925, DQ341368, DQ341367,  
AF352027, DQ341366, U22522,  
GQ231935, GQ231936, FJ357385,  
DQ341365, GQ231934, AF316321,  
AB469182, AB550334, AB550335,  
AM396587, AM396586, AJ586873,  
KF134486, AM396588, FJ461781,  
EU527985, HM622390, AB575917,  
AB575915, AB575923, AB575928,  
AB575916, AB575918, AB575927,  
AB575914, AB575913, JF73800  
(二重線かつ太字は Hyogo2000 株と 97%以上の相同性を保有していた株)

### 2. BLAST 解析の結果

97%以上の相同性が見られた株は 9 株であった。スコアが高い順に、

- 1) FJ357377: country="Taiwan" /collection date="2000"
- 2) AF316321 country="Singapore" /collection date="2000"
- 3) AF352027 同上
- 4) DQ341366 country="Malaysia" /collection date="2000"
- 5) DQ341365 country="Malaysia" /collection date="2001"
- 6) FJ357376 country="Taiwan"

/collection date="2001"

7) EF373575 country="Taiwan"

/collection date="2002"

8) AB550336 country="Japan (Osaka)"

/collection date="1997"

9) AB550337 country="Japan (Osaka)"

/collection date="1997"

#### D. 考 察

2000年に兵庫県において致死的脳炎を含む中枢神経系感染症の多発を引き起こしたウイルスは1997年～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。

2014年1月現在、ほぼ全塩基配列が登録されているEV71は336件あって、兵庫2000年株に近い配列は66見られた。

#### E. 結 論

兵庫県において2000年の重症例多発時に見られた株の全塩基配列を解析した結果、同年にマレーシア、台湾、シンガポールで重症例を多発させた株と極めて近縁であった。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし

#### G. 研究発表

論文発表 (太字は本研究班の研究)

1. 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(3): 260-261, 2013.

2. 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(6): 564-566, 2013.
3. 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.
4. **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.
5. Adhikary AK, Nozomu H, **Fujimoto T**, Simple and cost-effective restriction endonuclease analysis of human adenoviruses, *BioMed Res. Int.* in press
6. 藤本嗣人: アデノウイルス感染症. 日本臨牀別冊. No24: 373～376, 2013.
7. 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.

8. 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.

#### 学会発表

##### 国際学会

1. Fujimoto T, Enomoto M, Kanou K, Hanaoka N, Adhikary AK, Yoshida S, Kobayashi M: Hand foot and mouth disease in Japan, 1<sup>st</sup> conference on Asian pediatric infectious diseases. Tokyo, Japan, August 24-25 2013.
2. Adhikary AK, Ushijima H, Fujimoto T: Updated restriction endonuclease analysis based genome typing method of HAdV: application in pediatric infectious diseases caused by HAdV, 1<sup>st</sup> conference on Asian pediatric infectious diseases. Tokyo, Japan, August 24-25, 2013.
3. 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.

##### 国内学会

1. 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.
2. 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.
3. 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.

4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
特記事項なし
2. 実用新案登録  
特記事項なし
3. その他  
特記事項なし

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）

「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」研究報告書

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

研究代表者 清水博之 国立感染症研究所

研究協力者 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

研究要旨 1973年～2013年の41年間に、愛知県感染症発生動向調査事業において分離されたエンテロウイルス71型223株のVP1領域298塩基の配列を決定し型別を行った。その結果、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型が主に分離されている。1993年までは、1つの遺伝子型が分離されていたが、1997年以降は近隣諸国と同様に複数の遺伝子型が流行する傾向が認められ、国際交流の活発化が影響しているものと考えられた。

#### A. 研究目的

エンテロウイルス71型(EV-71)は、ピコルナウイルス科エンテロウイルス属エンテロウイルスAに分類されるヒトの病原ウイルスであり、1969年にアメリカ合衆国で最初に分離された。EV-71 発見当初から手足口病のみでなく中枢神経系感染症を起こすウイルスとされていたが、1990年代後半以降、東アジア地域における大規模な手足口病流行時に、小児の急性死亡例が多くあったことから関心が強まり、様々な国から多様な遺伝子型の解析結果が報告され、ワクチン開発も進められている。1970年代以降、東アジア地域を含む世界各地で分離されたEV-71は、1970年にアメリカ合衆国で分離された標準株 BrCr 株 (A型) と世界各地で分離されたB1～B5及びC1～C5型の11遺伝

子型に分類されている。我が国でも1970年に分離が確認され、愛知県でも1973年以降に分離確認されるようになった。

本研究は1973年4月から2013年3月までの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EV-71の遺伝子解析を行い流行株の遺伝子型の推移をまとめたものである。

#### B. 研究方法

##### 1. 検査検体

1973年から2013年の41年間に、感染症発生動向調査事業等において名古屋市を除く県内全保健所管内の医療機関の協力を得て採取された感染症患者から得たEV-71分

分離株 488 件中 223 件を用いた。

## 2. 遺伝子検査法

分離ウイルスから High Pure Viral RNA Kit (Roche, Germany) を用いてウイルス RNA を抽出した。EV-71 の VP1 遺伝子領域の解析には 189-222 プライマーを用いた One-step RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction: 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応) 法 (Promega, USA) により遺伝子を増幅した。1.5%アガロースゲル電気泳動後、ethidium bromide 染色下に検出した PCR 産物を pGEM-T ベクターに組み込みクローニング後、塩基配列を決定した。検出された EV-71 については、データベース上に登録されている海外分離株の遺伝子配列をもとに NJ (Neighbor-Joining) 法を用いた分子系統樹解析を行い、遺伝子型を決定し解析した。

## C. 研究結果

EV-71 は 1973～2013 年の 41 年のうち 1974～77 年、1979～1981 年、1993～1996 年、1999 年、2002 年を除く 31 年で検出された。表 1 に各年の EV-71 分離株数と遺伝子解析で得た遺伝子型とその株数を示した。B1 型は 1973～1984 年、B2 型は 1982～1985 年、B4 型は 2000～2001 年、B5 型は 2003～2013 年に分離された。一方 C 型は、C1 型が 1987～1993 年と 2003 年、C2 型は 1997～2013 年、C4 型は 1997～2010 年に分離された。

これらの株を系統樹解析した結果を図 1 に示した。各遺伝子型は、年代ごとにグループを形成し、各々 2～4 グループに大別された。B1 型は 1973 年と 1978 年分離株は、1983 年分離株とは異なったクラスターを形成した。B5 型は、ほかの B 型と比べて長く分離

されているが、2003 年～2009 年の分離株と 2012 年の分離株とは異なっていた。最も多く分離された C2 型は、1997 年～1998 年の分離株と 2009 年～2013 年の分離株で異なるクラスターを形成している。C1 型も 1987 年～1993 年と、2003 年の分離株は異なっていた。2003 年に分離された B5 型と C1 型は、各々 2003 年と 1997 年にマレーシアで分離された株と近縁であった。

## D. 考察

EV-71 の B 型は、1973 年から 1984 年までは、B1 型が分離され、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。一方、C 型は、C1 型が 1987 年から分離され、1997 年から C2 型と C4 型が検出されはじめ、2010 年以降は C2 型が主に分離されている。1973 年～1993 年までの分離株の検出時期と遺伝子型は、欧米及びオーストラリアの報告と一致した。世界で流行する株が愛知県内の流行株にも直接影響を与えていたことがわかる。また、愛知県では 1993 年まで、1 年に 1 遺伝子型が分離されていたことが特徴としてあげられる。

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。さらに、1990 年代後半以降、B3, B4 及び C1, C2, C4 が、東アジアの多くの地域で分離されている。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 EV-71 が、本県においても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。

#### E. 結論

エンテロウイルス流行株は、時代の変遷とともに変化し、1973 年からの流行当初は単一の遺伝子型が分離されたが、1997 年以降は、複数の遺伝子型が分離される傾向にあり、近隣諸国の流行株の影響を受けていると思われる。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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.

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

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

##### 2. 学会発表

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

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