

201420035A

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 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 清水 博之

平成 27 年 (2015 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 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 清水 博之

平成 27 年（2015 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導入前後の予防接種状況および抗体保有状況に関する研究
多屋馨子（国立感染症研究所 感染症疫学センター） 21
2. 不活化ポリオワクチン製剤の D 抗原定量試験法の確立
染谷雄一（国立感染症研究所 ウイルス第二部） 24
3. 不活化ポリオワクチンの品質管理に関する研究
落合 晋（一般財団法人阪大微生物病研究会ポリオ研究所） 27
4. 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
中野貴司（川崎医科大学） 36
5. 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） 41
6. 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） 47
7. 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） 49
8. 日本および世界で流行しているエンテロウイルス71のサブジェノグループとその
活用法に関する検討
藤本嗣人（国立感染症研究所 感染症疫学センター） 52
9. 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） 56
10. 日本の急性胃腸炎患者および日本・タイのブタ便検体からのヒトコサウイルスの検
出とその遺伝的解析
牛島廣治（日本大学医学部） 62

11. ベトナムにおける入院中の子どものヒトライノウイルス感染症の臨床、疫学およびウイルス学的研究 牛島廣治（日本大学医学部）	71
12. 劇症型新生児心筋炎を惹起したコクサッキーウイルス B2 型の性状解析 吾郷昌信（長崎大学熱帯医学研究所）	74
13. 埼玉県西部地域で 2014 年に検出されたヒトパレコウイルス 3 型 町田早苗（埼玉医科大学）	84
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）	88
15. Scaffold ウイルス感染受容体同定の試み 大原義朗（金沢医科大学）	92
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）	96
17. EV71 感染症に対する新たな分子標的治療に関する研究 中田恵子（大阪府立公衆衛生研究所）	98
18. Development of an Enterovirus 71 Vaccine (Takeda Vaccines Pte Ltd)	106
19. 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）	112
20. hSCARB2-Tg マウスを用いた EV71 感染モデル系の構築 小池 智（東京都医学総合研究所）	114
21. ノロウイルスチバ株 VLP の X 線結晶構造解析 長谷川和也（高輝度光科学研究センター）	122
22. ノロウイルス VLP および抗原決定部位の構造解析に関する研究 染谷友美（理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター）	125
23. ノロウイルスワクチンに関する研究 片山和彦（国立感染症研究所ウイルス第二部）	132
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	145

平成 26 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
新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業

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)
長谷川和也 ((公財)高輝度光科学研究センター)
染谷友美 ((独)理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター)
片山和彦 (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)
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 (一般財団法人阪大微生物病研究会ポリオ研究所)
中野貴司 (川崎医科大学)
福島慎二、濱田篤郎 (東京医科大学病院)
花岡 希、加納和彦、椎野禎一郎、牧野 友彦、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)
橋爪芽衣 (北海道大学 工学部)
渡邊日出海 (北海道大学 大学院情報科学研究科)
志田洋子、鈴木葉子 (東京女子医科大学 東医療センター小児科)
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 (東京大学 大学院)
吾郷昌信 (長崎大学 熱帯医学研究所)
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、岩田奈織子、鈴木忠樹 (国立感染症研究所 感染病理部)
濱口 陽、森内浩幸 (長崎大学大学院)
町田早苗 (埼玉医科大学 医学部)
姫田敏樹、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)
駒野 淳 (名古屋医療センター)
藤井 健 (東京都医学総合研究所)
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)
 伊藤雅 (愛知県衛生研究所)
 重松秀樹、岩崎わかな (独理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター)
 岡智一郎、藤井克樹、村上耕介、芳賀 慧、戸高玲子、三木元博 (国立感染症研究所 ウイルス第二部)
 高橋直聖 (国立感染症研究所 免疫部)
 中西 章 (国立長寿医療センター)
 村田和義 (自然科学研究機構生理学研究所)
 朴英 斌、団 海燕、藤本 陽 (国際厚生事業団)
 Joseph Santangelo、福田 滋 ((株)武田薬品工業)

研究要旨

- (1) 2013 年度感染症流行予測調査の結果を用いて定期接種におけるポリオワクチン変更前後の予防接種状況および抗体保有状況を検討した結果、5 歳未満での 1 回以上接種率は高く、2011～2012 年に問題となった未接種者の蓄積は解消されたと考えられた。0 歳では IPV 含有ワクチン被接種者の割合が高く、抗体保有率の血清型間の差は小さかった。3 型に対しては、0 歳 (94%) と比較して、1 歳以降では低い抗体保有率であった。
- (2) 世界に先駆けて、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。阪大微研会ポリオ研究所の抗セービン株抗体はソークワクチンを認識し、ソーク株標準物質に対して正しく D 抗原量を定量することができた。また、仏サノフィ社の抗ソーク株抗体はセービンワクチンを認識し、セービン株標準物質に対して正しく D 抗原量を定量することができた。sIPV の D 抗原量を測定する ELISA の二次抗体であるポリオウイルス型特異的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行い、ウサギ抗体が大量に調製可能であることが示唆された。
- (3) 2013 年 4 月から 12 月までの間に全国 13 か所において分離された環境水サーベイランス由来エンテロウイルス遺伝子を解析し、ヒト集団内のエンテロウイルス多型を効率よく追跡出来ることを明らかにした。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、ポリオウイルス新規同定法 (ECRA 法) および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進めた。
- (4) 新規腸管ウイルスワクチン開発のための研究基盤整備を進めた。EV71 病原性発現機構の解析、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 株の毒力試験の結果、ウイルス株間で毒力が異なることから hSCARB2-Tg マウスにより毒力判定が可能であると考えられた。EV 71 感染・病原性発現機構解析のため、EV71-PSGL-1 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カプシド VP1 アミノ酸を同定した。PSGL-1 受容体結合に関与

する EV71 のカプシドアミノ酸 VP1-145 は、カンクイザル感染モデルにおいて、ウイルス適応変異および病原性発現に関与することを明らかにした。

- (5) ノロウイルスワクチン開発を目的とし、VLP の立体構造解析を進めた。ヒトノロウイルス VLP を基盤とする第一世代ワクチンのシーズ候補である各種遺伝子型 VLP の作製に成功し、マスターシードウイルスを作出した。シードロットシステムでの品質管理のための次世代シーケンサーによる管理手法を構築した。各種遺伝子型 VLP を特異的に識別可能なポリクローナル抗体・モノクローナル抗体により、原薬もしくは最終剤型の小分け製品に関する品質管理試験が可能になると思われる。

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。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有複数の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

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、国内外の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認定委員会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。ヒトに感染するノロウイルス (HuNoV) は、感染性胃腸炎の主要な原因ウイルスであり、冬季に多発する非細菌性食中毒の原因ウイルスとしてもよく知られている。HuNoV 感染症による患者数は数万人規模に達するなど、社会的、経済的ダメージは極めて深刻である。そのため、本研究では、HuNoV の VLP を基盤とした第一世代ワクチンの開発研究を行う。

B. 研究方法

- 1) 本研究では、2013 年度感染症流行予測調査のポリオ感受性調査の結果を用いた。2013 年度は 9 都道府県と各都道府県の衛生研究所の協力により、2,309 名の結果が報告され、このうち IPV 含有ワクチン導入前後のポリオワクチン被接種者が多く存在する 5 歳未満児 416 名について検討した。
- 2) 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。sIPVD 抗原量試験法は阪大微研会ポリオ研究所が開発した方法を用いた。ポリオ研あるいは仏サノフィ社の捕獲抗体を固定化した 96 ウェルアッセイプレートに、ソーク株標準物質および参照物質、あるいは、セービン株標準物質および参照物質等を添加し、抗原抗体反応を行わせる。ついで、ポリオ研あるいは仏サノフィ社の一次抗体を加えた後、HRP 標識二次抗体を加える。ABTS 発色試薬を加えた後、マイクロプレートリーダーで吸光度を測定し、Bioassay Assist をもちいて D 抗原量の定量を行った。
- 3) sIPV の D 抗原定量 ELISA の二次抗体候補として血清型特異的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個体別ウサギ抗血清を使用した。個体別ウサギ抗血清について 1~3 型ポリオウイルスに対する中和抗体価を測定した。各型 D 抗原との反応性および免疫抗原と同型の加熱 D 抗原 (C 抗原) との反応性について抗原を固相した ELISA で検討した。個体別ウサギ抗血清についての検討結果から、試験的に血清型別の抗血清プールを調製し、現行品の 2 次抗体を抗血清プールに置き換えたサンドイッチ ELISA の検討を行った。
- 4) 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 (Imovax Polio®) 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。1~3 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、血清中和抗体価を測定した。
- 5) 2013 年 4-12 月の間、全国 13 地方衛生研究所の協力を得て下水処理場を定点とし、流入下水を月 1 回採水した。下水利用人口は延べ約 450 万人である。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。非ポリオウイルス分離株は中和試験法、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。
- 6) エンテロウイルスゲノムで 5' NTR と Cre 領域内に保存された配列に対するプライマーを設計し、PV ゲノムの capsid 領域全体を増幅する効率のよい RT-PCR 系を構築した (ECRA 法)。PV 陽性便検体 88 サンプルからウイルスゲノム RNA を精製し、ECRA 法でウイルスゲノムを増幅し、リアルタイム RT-PCR 法を用いて PV の検出を試みた。
- 7) 力価既知の PV を用いて陰電荷膜と PVR-MB を組み合わせた新規検出法と従来法の検出感度の比較を行った。従来法においては、RD-A および L20B 細胞にウイルス抽出液を接種し CPE の観察を行った。新規法では 2.0 mL のウイルス抽出液に 10 mL の PVR-MB を添加し、回転下で 1 時間インキュベートした。PV が吸着した PVR-MB を回収し、RNA 抽出キットにて vRNA を抽出した。rRT-PCR には PVITD rRT-PCR を用い、回収した PV の定量および同定を行った。
- 8) 2014 年 12 月に GenBank に登録されていた日本の EV71 についてサブジェノグループを調べた。感染症発生動向調査における病原体検出情報でサブジェノグループの登録が出来るかどうか調査しサブジェノグループ同定手法について検討した。
- 9) 2013 年に、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 分離株 38 件を用いた。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 法により遺伝子を増幅し 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。NJ 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。
- 10) 2010 年 11 月から 2012 年 4 月までに日本の 6 カ所の小児科外来を受診した急性胃腸炎患者から 630 件の糞便検体を得た。検体から核酸を抽出し、(RT)-PCR 法にて、各種腸管ウイルスおよび HCoSV の検出を行った。ベトナム・ホーチミン市でホーチミン第二子ども病院に入院中の呼吸器感

- 染症の中で、スクリーニングにより RV と判定された 329 検体の中でランダムに 58 検体を選び VP4/2 配列の詳細な検討と臨床成績を解析した。
- 11) 周産期垂直感染による劇症型新生児心筋炎患者より分離されたウイルスの性状について比較解析を行った。経胎盤垂直感染により劇症型心筋炎を発症し死亡した新生児の心筋組織より分離株および髄液より分離した株、劇症型心筋炎を発症し死亡した新生児の心筋組織より分離した株、重症性呼吸障害を発症した新生児の糞便より分離した株および髄液分離した株および同時期に上気道炎を発症した小児の咽頭拭い液より分離した株の 6 株と標準株である Ohio-1 株を解析した。
 - 12) 2014 年 5 月～9 月末までの期間に埼玉医科大学小児科を受診した小児患者を対象とした。対象条件として細菌性髄膜炎を否定、インフルエンザウイルス簡易キット陰性、無菌性髄膜炎、ウイルス性脳炎の疑い患者とした。患者のうち家族の同意を得られた患者 6 名から検体が提出され、髄液 4 検体、咽頭拭い液 8 検体、血清 6 検体、直腸拭い液 8 件の計 26 検体を HPeV 解析に用いた。
 - 13) ヒトカルジオウイルス Saffold virus はまれに髄膜炎や急性弛緩性麻痺患児から検出される。SAFV の病原性を明らかにすることを目的として、無菌性髄膜炎由来あるいは上気道炎由来の分離株を非ヒト霊長類であるカニクイザルに対し静脈内接種し、その病態・病理像を検討した。
 - 14) SAFV 感染受容体を同定するために 3 種の手法で候補分子をスクリーニングした。SAFV 感受性細胞 (HeLa 細胞) から作製した cDNA ライブラリーを、SAFV 非感受性 BHK 細胞にトランスフェクトし SAFV-GFP 感染細胞を回収単離した。SAFV 低感受性 HeLa 細胞と SAFV 高感受性 HeLa 細胞における膜タンパクの発現差異を DNA マイクロアレイにより解析した。SAFV 高感受性 HeLa 細胞 genomic DNA を非感受性 BHK 細胞に導入した安定発現株を作製し、SAFV-GFP 感受性細胞クローンをスクリーニングした。
 - 15) アイチウイルスゲノム複製における OSBP の関与の有無を調査するために、siRNA を用いてノックダウンした後、ホタル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ルシフェラーゼアッセイを行った。OSBP によるコレステロール輸送阻害剤である 25-HC 処理による、コレステロール細胞内局在変化を解析した。
 - 16) ヒト glioma 細胞株 U251 から常法に基づいて作製した cDNA ライブラリーを MLV ベクターで U251、RD18S、293T 細胞に導入し、EV71 感染抵抗性細胞クローンを確立した。細胞クローンの EV71 抵抗性は、感染後に細胞の CPE を観察すると同時に細胞の生存率を CellTiter-Glo にて定量化した。
 - 17) Takeda is developing a vaccine for prophylactic immunization for prevention of Hand, Foot and Mouth Disease (HFMD) caused by EV71. We have conducted a series of non-clinical evaluations including characterization of immune response and a repeat-dose toxicology study, as well as a Phase I clinical study in healthy adults.
 - 18) EV71-02363 株 感染性 クローン 由来 EV71 株 (non-PB 型; 02363-KE)、および、PSGL-1 結合性を規定する VP1 アミノ酸に変異を導入した感染性クローン由来株 (PB 型; 02363-EG) をそれぞれ $10^{6.3}$ CCID₅₀、8 頭のカニクイザル (non-PB、PB それぞれ 4 頭ずつ) に静脈内接種し、中枢神経症状を含む臨床症状の発現を観察した。感染後 0・3・7・10 日目に臨床検体を採取した。感染 10 日目に解剖し心臓・肝臓・脾臓などの主要臓器や脳・脊髄などの中中枢神経系組織を採取した。
 - 19) EV71 13 株を 6-7 週令の Tg-10 マウスに 1×10^5 TCID₅₀ もしくは 1×10^6 TCID₅₀ 脳内接種後、病態スコア、神経症状発現率、死亡率で毒力を比較した。VP1-145 アミノ酸と毒力の相関性を調べるため、CODEHOP PCR 法により VP1 領域の一部の塩基配列を決定後、アミノ酸と毒力とを比較した。EV71 13 株の 37°C と 39°C におけるウイルス力価をマイクロタイテーション法により決定した。ウイルス力価の比 ($\Delta 37^\circ\text{C}/39^\circ\text{C}$) を算出後、 $\Delta 37^\circ\text{C}/39^\circ\text{C}$ が 2 未満と温度抵抗性、2 以上を温度感受性株とし、毒力と比較した。
 - 20) ノロウイルスチバ株の 3 重変異体 VP1 が形成する VLP を用いて結晶化を行った。VLP の結晶化は、ウイルスの立体構造に関するデータベース VIPERdb に登録されている結晶化条件を参考にし、PEG とイオンを組み合わせた条件を中心にスクリーニングを行った。回折データ測定は大型放

射光施設 SPring-8 のタンパク質結晶解析ビームライン BL41XU で行った。広角領域の回折強度を精度よく測定するため、高感度 CCD 検出器 MX225HE を低ノイズモードで用いて回折像を記録した。

- 21) 組み換え発現・精製されたノロウイルス genogroup I 株の VLP の電子顕微鏡観察は、負染色により行った。染色試料は、透過型電子顕微鏡 Tecnai F20 を用い、Eagle2k CCD により約 60,000 倍の倍率で画像を取得した。VPI タンパク質の N 末端側領域、P ドメイン、及び全長領域について、PCR 断片を鋳型とした大腸菌無細胞タンパク質合成を微量スケールで行い、可溶性発現量を検討した。
- 22) HuNoV GI については、GI.1 から GI.9 についてデータベース上の塩基配列に基づき、遺伝子配列を合成し、シャトルベクターにクローニングした。HuNoV GII に関しては、GII.11, 18, 19 以外の遺伝子型をクローニングした。HuNoV 遺伝子は、シャトルベクターから、Bac to Bac システムを用いてバキュロウイルスゲノムにサブクローニングした。組換えバキュロウイルスをプラーク純化しマスターシードウイルス候補を作製した。マスターシードウイルス候補は、濃縮後に次世代シーケンサーにより全長塩基配列を決定し、変異を持たないことを確認した。シードウイルスを Sf9 細胞にて増殖させ、ワーキングシードを作製した。ワーキングシードを Hi5 細胞に感染させ VLP を分離精製した。VLP をウサギ、モルモット、マウスにそれぞれ免疫し、ポリクローナル抗体を得た。ポリクローナル抗体の交差反応性を VLP-ELISA にて調べ、交差反応性のある VLP に関しては、型特異的モノクローナル抗体の作成し特異性を ELISA によって確認した。マスターシードバキュロウイルス液から抽出した DNA より cDNA ライブラリーを調整し、MiSeq に用いた。得られた塩基配列により、マスターシードのゲノム上の核酸変異、アミノ酸変異、quasispecies の頻度を検出した。(本研究「ノロウイルスワクチンの研究」は、そのほかの研究補助金によりサポートされている研究内容を分断して記載すると内容の把握が難しいため、厚生労働科学研究委託費(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業) 新興・再

興感染症に対する画期的な新規ワクチン開発および実用化に関する研究 (H26-新興実用化- 一般- 017)、“下痢症ウイルスの分子疫学と感染制御に関する研究” (H26-新興実用化- 一般- 004) によって実施された研究も一部併せて記載した)

【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。

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。なお、本研究は東京医科大学倫理委員会において承認済みである。また血清中和抗体価の測定に関して、国立感染症研究所の倫理委員会においても承認済みである。

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。

【利益相反開示】

国立感染症研究所利益相反委員会からの指導・勧告により、班会議等の機会に、以下の企業からの研究参加について研究班の中で周知した。また、以下の企業の研究参加について、本研究報告書等により開示を行う。

<相手方企業名> (財) 阪大微生物病研究会
<研究課題> Sabin株由来不活化ポリオワクチン品質管理の国際的な標準化に向けた研究

<研究協力者> 落合晋 ((財) 阪大微生物病研究会)

<相手方企業名> (財) 阪大微生物病研究会

<研究課題> ポリオウイルス抗原性解析のためのリ
バースジェネティクス

<研究協力者> 落合晋 ((財) 阪大微生物病研究会)

<相手方企業名> (株)武田薬品工業

<研究課題> Review Takeda' s EV71 vaccine
development program - past, present
and future

<研究協力者> Joseph Santangelo、福田 滋
(株)武田薬品工業)

C. 研究結果

- 1) 接種歴が不明であった者を除くと、すべての年齢で95%以上の者にOPVまたはIPV含有ワクチンについて1回以上の接種歴があった。ワクチン歴が明らかかな者についてみると、0歳はすべてIPV含有ワクチンのみの被接種者であり、1歳でもIPV含有ワクチンのみの被接種者が91%と大半を占めた。1型および2型に対する抗体保有率はすべての年齢で概ね95%以上であり、年齢による差はほとんどみられなかった。しかし、3型に対しては0歳(94%)と比較して、1歳以降では低い抗体保有率であった。
- 2) 仏サノフィ社の抗体セットを用いて、ソーク株標準物質に対してソーク株参照物質を定量したところ、1型53.1 cDU/mL、2型12.1 cDU/mL、3型40.2 cDU/mLであった。これに対し、ポリオ研の抗体セットを用いて定量したところ、1型50.8 cDU/mL、2型12.0 cDU/mL、3型39.4 cDU/mLであった。いずれの測定値も規格値範囲内に収まっている。ポリオ研の抗体セットを用いて、セービン株標準物質に対してセービン株由来3価混合不活化ポリオ原液を定量したところ、1型25.8sDU/mL、2型1,043.7.1 cDU/mL、3型987.8 cDU/mLであった。これに対し、仏サノフィ社の抗体セットを用いて定量したところ、1型20.4cDU/mL、2型985.7cDU/mL、3型996.9 cDU/mLであった。いずれの測定値も規格値範囲内に収まっている。
- 3) 試験的に調製した抗血清プールはいずれもD抗原との反応性および中和抗体価が現行法の2次抗体

と同等で、型間の交差反応およびC抗原との反応は現行法の2次抗体と同様に低いことが確認された。

このことからELISAの2次抗体として血清型特異的抗ポリオウイルスウサギポリクロナル抗体が大量に調製可能であることが示唆された。

- 4) 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た。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。接種前の抗体価が陽性であった型に対してはほとんど全例で、IPV1回接種後に1非常に高い抗体価が獲得され、強いブースター効果が認められた。
- 5) 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うちEV-Bの遺伝子解析により、13か所で検出されたCB3は3系統に分類され、うち2系統は東北から九州まで伝播していた。CB5も3系統のうち1系統は近畿から東北に伝播していた。CB3は国内では3つのsublineage間で約20%程度の違いがあり、アジア株あるいはヨーロッパ株とのクラスターを形成するものがみられた。
- 6) ECRA法により、50コピーのPVゲノムから、カプシド領域全体を増幅することに成功した。PV陽性便検体88サンプルを用いた評価では、96%(81/84)でPVを検出でき、93%(78/84)で、PV VP1領域を検出できた。PVが検出されなかった便抽出液に対して、PVR MBを用いてPVを抽出してから、ウイルスゲノムRNAを精製し、ECRA法でウイルスゲノムを増幅リアルタイム RT-PCR法を用いてPVの検出を試みた結果、PVR MB未処理サンプルと併せて、100%(84/84)でPVを検出でき、98%(82/84)でPV VP1領域を検出できた。
- 7) 陰電荷膜に吸着したPVおよびPVR-MBで回収されたPVのRNA濃度をITD rRT-PCRにてそれぞれ定量した。その結果、陰電荷膜では約150倍に、PVR-MBでは約5,000-6,500倍にPVを濃縮できた。力価既知PVを用いてスパイク試験を行った結果、従来法での検出下限はSabin 1で $10^{0.7}$ CCID₅₀、Sabin 2で 10^0 CCID₅₀、Sabin 3で $10^{0.7}$ CCID₅₀であった。新規法ではITD rRT-PCRによる型別判定まで含めた検出下限がそれぞれ $10^{1.73.0}$ CCID₅₀であり、従来法と比べ $10^{1.0-2.0}$ 程度劣る結果となった。
- 8) 登録された301件のVP1配列の解析によると、日

本の EV71 サブジェノグループは、B4(23 株)、B5(56 株)、C1 (10 株)、C2(95 株)、C4(117 株)に分類された。GenBank に登録されていた 301 株のうち 92 株(30%)で VP1 完全配列(891bp)が登録されていた。

- 9) 2013 年の EV71 分離株のうち、38 株中 16 株 (42.1 %) は B5 型、22 株 (57.9 %) は C2 型であった。いずれも 2012 年に東南アジアや山形県で検出されたものと近縁であったが、2012 年に愛知県で分離された株とは異なっていた。無菌性髄膜炎患者からの検出割合は B5 型で 19 % (3/16)、C2 型で 18 % (4/22) と同じであった。
- 10) 日本の急性胃腸炎患者の解析により、1 例が HCoV 陽性であった (陽性率: 0.16%)。患者は 6 ヶ月の男児で発熱や嘔吐、上気道炎の症状はなくプロバイティックスの投与で症状は軽快した。ベトナムにおける入院中の子どものヒトライノウイルス解析の結果、HRV-A は 44/58(75.9%)、HRV-C は 14/58(24.1%)で見出され、HRV-B は検出されなかった。HRV-A では 21 の遺伝子型が見出された。HRV-C は 10 の異なる型が見いだされた。一番多いのは C-10 (n=3)であった。
- 11) 周産期垂直感染による劇症型新生児心筋炎患者より分離された CVB2 の性状について比較解析を行った。ゲノム全長の遺伝子解析により、これらの CVB2 は構造タンパク質領域が CVB2、非構造タンパク質領域が他のエンテロウイルスとのキメラウイルスである可能性が示唆された。心筋炎患者から採取した臓器内のウイルス量を比較したところ、肺の CVB2 量は検出限界値未満であったのに対し、心筋内には他の臓器の 7 万倍以上もの CVB2 が存在した。
- 12) HPeV 遺伝子が検出された患者年齢は生後 1 カ月～1 歳 1 カ月で、うち 3 名が生後 1 カ月であった。4 症例のうち 3 症例で VP1 塩基配列の相同性解析から HPeV3 が同定された。
- 13) SAFV カニクイザル感染モデルにおいて、髄膜炎株は接種後、2 頭とも中和抗体価の上昇が観察されたが、各拭い液と血液においてウイルスゲノムは検出されなかった。上気道炎株接種群では接種 3 日以降の各拭い液からウイルスゲノムが検出された。さらに、全頭において、接種 3～6 日に後肢の握力低下がみられ、接種 1 週間以降に中和抗体価は明らかに上昇した。上気道炎株接種群のうち 2 頭の中枢神経系の血管周囲あるいは髄膜に軽度の細胞浸潤がみられ、髄膜炎と判断した。
- 14) SAFV-GFP 接種後、GFP 陽性を示した 50 個の細胞について、各々を単離し導入されている cDNA を決定した。プロッキングアッセイでは SAFV の感染は抑制されず、SAFV 感染受容体の同定には至らなかった。DNA マイクロアレイ解析の結果、SAFV 高感受性 HeLa 細胞で 3 倍以上高発現している膜タンパクとして 57 の分子が挙げられた。7 つの遺伝子の組み合わせで発現させた細胞において、SAFV-GFP の感染が確認されたが、個別の発現系では、SAFV 感染は認められなかった。SAFV 高感受性 HeLa 細胞 genomic DNA 導入 BHK 細胞のうち、2 つのクローンにおいて細胞変性効果様の変化が認められた。ウイルス増殖の解析を試みたが、細胞の継代培養により細胞変性効果は見られなくなった。
- 15) OSBP ノックダウン細胞での AiV ゲノムの複製は顕著に抑制された。レプリコン RNA 導入細胞において、OSBP は AiV ゲノム複製部位に局在した。また、AiV ゲノム複製部位におけるコレステロールの蓄積が観察されたが、25-HC 処理により阻害された。さらに、25-HC 処理により AiV ゲノムの複製が抑制された。
- 16) EV71 複製制御機構解析のため、機能的スクリーニングによるウイルス複製制御因子の同定を試み、glucosidase, beta, acid 1 (GBA1)が同定された。GBA1 は EV71 の内在性複製阻害因子であることが示され、EV71 複製制御の新たな分子メカニズムと考えられる。
- 17) Data show that 'Takeda' s EV71 vaccine candidate was generally well tolerated in rabbits and in humans and induced good immune responses after administration of two doses in healthy adult subjects. The candidate vaccine was immunogenic, and all vaccinees seroconverted, i.e. displayed a four-fold or greater increase in EV71 neutralizing titer in healthy adults.
- 18) EV71-non-PB 接種群は神経症状を示し、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、

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 が高頻度に検出された。両感染群サルの血清中のサイトカイン濃度を測定したところ、non-PB 接種群は感染により炎症性サイトカイン誘導が認められたが、PB 接種群では顕著でなかった。

- 19) EV71 13 株の毒力比較の結果、接種株により病態スコア、神経症状発現率、死亡率が異なっていた。Isehara、Nagoya、KOR 株が病態スコア、神経症状発現率、死亡率が高かった。NETH、KED005、THAI、VN 株は病態スコア、神経症状発現率、死亡率が低かった。VP1-145 番目のアミノ酸を比較したところ、Isehara、Nagoya、BrCr、Hungary、THAI、VN 株はグルタミン酸 (E) であった。SK、C7、1095 株はグリシン (G)、KOR、NETH、KED005 株はグルタミン (Q) であった。Bulgaria と CAV16 株ではそれぞれアラニン (A) とバリン (V) であった。毒力との相関性を調べたところ、VP1-145 アミノ酸に E を持つ株でも毒力の低い株が、それ以外のアミノ酸を持つ株でも毒力の高い株が存在した。VP1-145 アミノ酸が E の場合でもそれ以外のアミノ酸の場合でも温度抵抗性株の方が高い毒力を示す傾向が見られた。
- 20) 初期スクリーニングで得た結晶は形状がいびつであったが、この結晶を種結晶としてマイクロシーディングを行ったところ、大きさ $200\mu\text{m} \times 100\mu\text{m} \times 30\mu\text{m}$ のきれいな単結晶を得ることができた。これにより、回折反射の分解能が向上し、 3.5Å 分解能までの回折データを測定することに成功した。充填モデルから計算される粒子の直径は 280Å であり、感染性粒子と同じサブユニット配置を持つ直径 38nm の VLP よりも小さい事がわかった。
- 21) ノロウイルス VLP のうち、Kashiwa 株 (GL3)、WUG1 株 (GL6)、GII 株について、電子顕微鏡による構造解析に適した均一な粒子を形成しているかを観察し、一部の株において、密度勾配遠心の高密度面分では、比較的均一な粒子が観察されたが粒子径が 30nm 以下と、予想より小さな粒子が多く見られた。ノロウイルス抗原性決定部位と考えられている VP1 タンパク質について、大腸菌無細胞タンパク質合成系で発現可能か検討した。その結果、非常

に均一性と純度の高いサンプルの調製が可能であることが示された。

- 22) 大腸菌-バキュロウイルスシャトルベクターにクローニングした HuNoV の ORF2, 3 領域は、それぞれ 2~3 クローンの全塩基配列を決定し、デザイン通りのクローンである事を確認した。2014 年の時点で、論文上に報告されている全ての遺伝子型の VLP 作製準備が整った。大腸菌-バキュロウイルスシャトルベクターを用いて組み換えバキュロウイルスゲノムを作製した。Sf9 細胞にトランスフェクションし、イルミナ社の DNA シーケンスキットにより、次世代シーケンスを実施した。シードウイルスより作製したワーキングシードと、Hi5 細胞を用いて VLP の大量発現を行ない、多くの VLP については、抗体作製用 VLP の作製が終了した。異なる遺伝子型の VLP に交差反応するか否かを、VLP-ELISA を用いて調べ、GL3, 6, GII.1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 13 は特異性が高いこと予想された。モノクローナル抗体作製が必要と判断された遺伝子型に関して、定法に従ってモノクローナル抗体を作製し、特異的抗体をクローニングした。

D. 考察

- 1) 2013 年度の調査結果から、0 歳児の予防種率および抗体保有率は高く、従来 OPV でみられていた 3 型に対する抗体保有率が低い傾向はみられなかった。IPV 含有ワクチンでは OPV のような腸管内におけるウイルス干渉作用がないことから、各血清型に対する抗体保有率の差が小さくなったと考えられた。1 歳以降では、接種を受けたワクチンの種類が年齢により異なるが、1 回以上接種率は 95% 以上であり、1 型および 2 型に対する抗体保有率も概ね 95% 以上を示した。これらのことから、OPV の接種控えによる未接種者の蓄積は解消されたと考えられた。
- 2) セービン標準物質に対するセービンワクチンの D 抗原定量、また、ソーク標準物質に対するソークワクチンの D 抗原定量のそれぞれの試験において、ポリオ研の抗セービン抗体を用いた場合の測定値と、仏サノフィ社の抗ソーク抗体を用いた場合の測定値との間に有意な差はなかった。正しく評価された抗体を用いれば、その種類によらず、単位付けされた標準物質に対してそれと同種の参照物質、および、ワクチンの D 抗原量を正しく定

- 量することが可能である。
- 3) 個体別ウサギ抗血清についての血清型特異性、中和活性、D 抗原との反応性などの検討結果から、試作プールを調製した。これらの試作プールをサンドイッチ ELISA により測定したところ、現行法での測定値と変わらない結果となったことから、検出対象の型以外のウイルスと交差反応している可能性は低いと考えられた。D 抗原液を加熱処理した C 抗原液を測定すると反応が大きく減少することから、一次抗体が ELISA での D 抗原特異性を高めていることが示唆された。
 - 4) cIPV 接種により誘導された 1 型に対する中和抗体価は、Sabin 1 株と Mahoney 株で多少の違いが認められたが、抗体価の大きな差は認められなかった。2 型については、Sabin 2 株と強毒株(MEF-1)、あるいは、4 株の VDPV 株で、中和抗体価に、ほとんど差は無く、抗原性の違いは認められなかった。Sabin 3 株と強毒株(Saukett)のあいだには、抗原性の違いは認められなかった。2 型と 3 型については、Sabin 株に対する中和抗体価を測定すれば他の株に対する中和活性も同程度であることが示唆された。
 - 5) 環境水由来 141 株のエンテロウイルス塩基情報の解析を行ったが、すべての地点の情報ではなく、全国レベルの解析としては偏りがあることに留意する必要がある。同一の血清型が国内の多くの地点で検出されていること、イコール同じ遺伝子型でないことを明らかにした。また同じ地点で検出された血清型内で、sublineage に分かれていることを示した。このことは環境サーベイランスが、ヒト集団中に存在するウイルスの多型を効率よく追跡する方法として有用であることを示す。
 - 6) 新たに開発した ECRA 法によって、微量 PV (ウイルスゲノム 50 コピー程度) から、カプシド領域全体を増幅することが可能となった。ECRA 法により、従来のリアルタイム RT-PCR 法の低感度の問題と、VP1 領域の核酸配列解析の低感度の問題の両方が解決された。ECRA 法と PVR MB を用いることで、従来の PV 検出・解析方法の低感度の問題は、根本的にはほぼ解決されると思われる。今後は、PVR MB による PV の抽出工程を含めた PV 同定法を確立する必要がある。
 - 7) 陰電荷膜および PVR-MB を組み合わせた新規濃縮法では PV を効率的に濃縮 (RNA 濃度で約 5,000-6,500 倍) することが可能であることが示された。しかし、細胞分離を用いる従来法との比較では、力価ベースで $10^{10.20}$ CCID₅₀ 程度劣っていた。新規法は細胞によるウイルス分離を経ないため、従来法と比較して作業効率および作業時間の面で大きなメリットがある。
 - 8) EV71 サブジェノグループを登録する仕組みが感染症発生動向調査にない。地方衛生研究所で簡易にサブジェノグループを同定できる手法をマニュアル等で示したのちに、その重要性を周知して、そのうえで、「その他生化学的性状」として感染症発生動向調査で報告してもらうことが効率的と考えられる。
 - 9) EV71 型が多く分離される年は、1 つの遺伝子型が優勢となっていたが、2013 年は B5 型と C2 型が同程度に分離されており、2003 年以後の同時に 2 つの遺伝子型が流行した。塩基配列を詳細に比較すると、同じ遺伝子型でも侵入経路は単一ではなく、近隣諸国流行株の影響が示唆された。
 - 10) 日本の小児急性胃腸炎の患者 630 検体から HCoV を 1 例検出した。HCoV による胃腸炎と考えられ、日本の臨床検体からの報告は初めてである。日本の健康なブタおよびタイの下痢、健康な仔ブタから高率で HCoV が検出され、人獣共通感染症である可能性が考えられた。ライノウイルスは入院患児の重篤な下気道感染の原因であった。ライノウイルスの多様な遺伝子型の存在とその流行の変化、新しい型の存在を示した。
 - 11) 2013 年の HEV 流行期に 7 例もの周産期 CVB2 感染による新生児重症例が続発した。生活様式の変化により 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、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。
 - 12) 2014 年 ISAR の報告患者年齢は月齢 1 ヶ月が多く、今回の症例と合致していた。VP1 領域の塩基配列を系統樹解析すると 2008 年に山形で分離された株と 2014 年埼玉で検出した HPeV3 は近縁であった。HPeV3 も脳炎症例や髄液からウイルス遺伝子が検出されることから、HPeV3 の重症化等を検討する上で注視したい。
 - 13) SAFV 接種サルはいずれも中和抗体の上昇がみら

れたことから、カニクイザルに対して感染性を有すると考えられた。上気道炎株は、髄膜炎株に比べてサル由来培養細胞での増殖率が良く、今回の結果は、*in vitro*での結果と相関した。上気道炎株は、静脈内接種後、各拭い液、血中にウイルスゲノムが検出され、解剖時のリンパ節、扁桃、脾、腸管、中枢神経系からウイルスゲノムが検出されたことから、リンパ系組織でウイルスが増殖し、その後、中枢神経系に侵入したと推察した。今回の結果は SAFV のヒトにおける病態・病理を解明する上で重要な知見である。

- 14) SAFV 感染受容体の同定を目指し、3つの方法でその同定を試みたが、残念ながら同定には至らなかった。genomic DNA を用いた解析においても感受性獲得を示唆する細胞変性効果が確認されたことから、SAFV 感染受容体の同定は不可能なものではないと期待される。SAFV 感染受容体は、単一分子ではなく複合体として存在している可能性も考えられ、より慎重にスクリーニングを進めていく必要がある。
- 15) AiV ゲノム複製には、OSBP を介したコレステロールの蓄積が必須であることが示唆され、エンテロウイルスや HCV と共通の性状が認められた。今後は、ゲノム複製におけるコレステロールの役割を検討していく必要がある。
- 16) 細胞表面で GBA1 と相互作用すると LIMP-2-GBA1 複合体は速やかに lysosome に移行して、細胞表面の LIMP-2 レベルを下げ、これが Cerezyme による Gaucher Disease に対する治療効果、および、EV71 複製阻害に関与する可能性がある。GBA1 はヒトの Gaucher's disease 治療に使用されている分子療法剤であるため、EV71 感染症治療に応用できるかもしれない。
- 17) EV71, one of the major causes of severe HFMD, however, there is no treatment or vaccine available to prevent disease. Takeda's EV71 vaccine candidate has been shown to induce neutralizing antibodies in animals, which were demonstrated to cross-neutralize other EV71 sub-genogroups *in vitro*. Data from Phase I clinical study demonstrated that the vaccine candidate was generally well tolerated at two dose levels and

after two injections in a group of healthy adults. The vaccine candidate induced antibodies with broad cross reactivity against other EV71 sub-genogroups.

- 18) PSGL-1 結合性の異なる2種類の感染性クローン由来 EV71 を感染動物モデルである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。VP1-145 のアミノ酸変異/選択のメカニズムは未解明であるが、VP1-145 に強い選択を受けつつ PSGL-1 非依存的に増殖し、*in vivo* において変異適応した non-PB が効率良く増殖し、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。
- 19) Tg-10 マウスの EV71 接種により、病態スコア、神経症状発現率、死亡率が異なるウイルス株が存在することが明らかとなったことから、Tg-10 マウスにより毒力判定が可能であると考えられる。VP1-145 アミノ酸比較からは必ずしも毒力の違いが VP1-145 アミノ酸に起因するか否かは結論できなかった。温度抵抗性株は比較的毒力が強い傾向にある可能性が考えられる。
- 20) 電子顕微鏡では 23 nm VLP の外径が 26nm~27nm と見積もられており、我々の VLP 充填モデルから計算される値とよく一致する。したがって、今回得た結晶は 23nmVLP の結晶であると考えられる。今回見つけた結晶化条件のリザーバーの pH は 8 近辺であったことから、38nmVLP が徐々に壊れ、一部が 23nmVLP を形成し結晶として析出したと考えられる。
- 21) VLP のような巨大な分子集合体の結晶化は極めて難しく、多種の VLP 構造解析に対応することができない。そのため、本研究では異なる構造解析手法を用い、電子顕微鏡による構造解析用サンプルは、精製過程を株により設定する必要性が示された。VP1 タンパク質およびその部分タンパク質については、大腸菌無細胞タンパク質合成系にて非常に均一性と純度の高いサンプルの調製が可能であることが示された。結晶化および結晶構造解析により、詳細構造の一部を解明できると期待される。また、抗体との複合体として共結晶構造解析を行うことで、中和抗体の抗原認識部位情報や、その認識機構が解明できると考えられる。
- 22) HuNoV ワクチン品質管理試験において、ワクチ

ンの力価試験、つまりワクチン有効性を測る試験に関しては、来年度以降に開発研究を進める必要がある。現時点で想定している力価試験法は、ワクチン接種した動物体内で誘導される抗体が、VLP の細胞への吸着を阻害するか否かを測定する方法である。上記方法についても、腸管粘膜、細胞で引き起こされる感染とその防御に関する現象を、血清中に誘導される抗体の性質を調べることによって予測可能か否かなど、明らかにすべき問題は山積している。本年度は、実際にノロウイルス感染患者の腸管で起きる抗体誘導とその抗体が症状の改善、ウイルスの排除に対し、どのように影響を与えているのかを調べることを目的とした臨床症例の解析を試みた。本研究により、腸管に分泌される IgA2 分子とウイルスのせめぎ合いが起きること、患者体内でのウイルスに対する総合的な抗ウイルス状態の誘導が、便中ウイルス RNA タイターを下降させ、症状の軽減を導くこと等が示唆された。このような状況をあらかじめワクチンで誘導することで、ノロウイルス感染による症状を抑えることができるかもしれない。

E. 結論

- (1) 2013 年度感染症流行予測調査の結果を用いて定期接種におけるポリオワクチン変更前後の予防接種状況および抗体保有状況を検討した結果、5 歳未満での 1 回以上接種率は高く、2011~2012 年に問題となった未接種者の蓄積は解消されたと考えられた。また、0 歳では IPV 含有ワクチン被接種者の割合が高く、抗体保有率の血清型間の差は小さかった。
- (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。阪大微研会ポリオ研究所の抗サービン株抗体はソークワクチンを認識し、ソーク株標準物質に対して正しく D 抗原量を定量することができ、また、仏サノフィ社の抗ソーク株抗体はサービンワクチンを認識し、サービン株標準物質に対して正しく D 抗原量を定量することができた。2 製造所の抗体は互換性を有する。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行い、ウサギポリクローナル抗体が大量に調製可能であることが示唆された。

- (3) 我が国の環境水サーベイランスにより 2013 年 4 月から 12 月までの間、全国 13 か所で分離されたエンテロウイルス遺伝子を解析し、ヒト集団内のエンテロウイルス多型を効率よく追跡出来ることを明らかにした。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、ポリオウイルス新規同定法 (ECRA 法) および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進めた。国内外の腸管感染ウイルス病原体サーベイランスを基盤とし、腸管感染ウイルスの発生伝播動向、および、腸管感染ウイルス病原性の発現機序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整備を進めた。EV71 病原性発現機構の解析、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 株の毒力試験の結果、ウイルス株間で毒力が異なることから、hSCARB2-Tg マウスにより毒力判定が可能であると考えられた。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カプシド VP1 アミノ酸を同定した。受容体結合に関与する EV71 の VP1-145 は、カニクイザルおよびマウス感染モデルにおいて、in vivo におけるウイルス病原性に関与することを明らかにした。不活化 EV71 ワクチン候補(武田薬品工業)は、動物実験およびヒトにおける第一相試験で、効果的な中和抗体誘導効果を示した。
- (5) ノロウイルスワクチン開発を目的とし、ウイルス粒子の立体構造解析を進めた。ヒトノロウイルス VLP を基盤とする第一世代ワクチンのシーズ候補である各種遺伝子型の VLP の作製に成功し、マスターシードウイルスを作出した。シードロットシステムでの品質管理のための次世代シーケンサーによる管理手法を構築した。各種遺伝子型 VLP を特異的に識別可能なポリクローナル抗体、モノクローナル抗体作製が継続しているが、これらの抗体を用いた原薬もしくは、最終剤型の小分け製

品に関する品質管理試験が可能になると思われる。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimizu H. Development and introduction of inactivated poliovirus vaccines derived from Sabin strains in Japan. *Vaccine* 2015 (in press)
- 2) 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](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70342-6)) 2014
- 3) Naeem A, Hosomi T, Nishimura Y, Alam MM, Oka T, Zaidi SS, Shimizu H. Genetic diversity of circulating Saffold viruses in Pakistan and Afghanistan. *J Gen Virol* 95: 1945-1957, 2014
- 4) Shirato H, Someya Y, Ochiai M, Horiuchi Y, Takahashi M, Takeda N, Wakabayashi K, Ouchi Y, Ota Y, Tano Y, Abe S, Yamazaki S, Wakita T, the sIPV Evaluation Group of NIID-Virology II. A national reference for inactivated polio vaccine derived from Sabin strains in Japan. *Vaccine* 32(40): 5163-5169, 2014
- 5) Wang H, Tao Z, Li Y, Lin X, Yoshida H, Song L, Zhang Y, Wang S, Cui N, Xu W, Song Y, Xu A. Environmental Surveillance of Human Enteroviruses in Shandong Province, China, 2008-2012: Serotypes, Temporal Fluctuation and Molecular Epidemiology. *Appl Environ Microbiol* 80(15): 4683-4691, 2014
- 6) Nakamura T, Hamasaki M, Yoshitomi H, Ishibashi T, Yoshiyama C, Maeda E, Sera N, Yoshida H. Environmental Surveillance of Poliovirus in Sewage Water around the Introduction Period of Inactivated Polio Vaccine in Japan. *Appl Environ Microbiol*. 2015 (in press)
- 7) Lu J, Zheng H, Guo X, Zhang Y, Li H, Liu L, Zeng H, Fang L, Mo Y, Yoshida H, Yi L, Liu T, Rutherford S, Xu W, Ke CW. Continuing environmental surveillance elucidates Echovirus 30 origin and transmission during the Aseptic Meningitis Outbreak in Guangdong, China, 2012. *Appl Environ Microbiol*. 2015 (in press)
- 8) Nidaira, M., Kuba, Y., Saitoh, M., Taira, K., Maeshiro, N., Mahoe, Y., Kyan, H., Takara, T., Okano, S., Kudaka, J., Yoshida, H., Oishi, K. and Kimura, H., Molecular evolution of VP3, VP1, 3Cpro and 3Dpol coding regions in coxsackievirus group A type 24 variant isolates from acute hemorrhagic conjunctivitis in 2011 in Okinawa, Japan. *Microbiology and Immunology* 58: 227- 238. 2014
- 9) Tang, J., Yoshida, H., Ding, Z., Tao, Z., Zhang, J., Tian, B., Zhang, L.. Molecular Epidemiology and Recombination of Human Enteroviruses from AFP surveillance in Yunnan, China from 2006 to 2010. *Scientific reports* 4: 6058, 2014
- 10) Arita M, Kilpatrick DR, Nakamura T, Burns CC, Bukbuk D, Oderinde SB, Oberste MS, Kew OM, Pallansch MA, Shimizu H: Development of an Efficient Entire-Capsid-Coding-Region Amplification Method for Direct Detection of Poliovirus from Stool Extracts. *J Clin Microbiol*, 53: 73-78, 2015
- 11) Li TC, Yang T, Yoshizaki S, Ami Y, Suzaki Y, Ishii K, Haga K, Nakamura T, Ochiai S, Takaji W, Johne R: Construction and characterization of an infectious cDNA clone of rat hepatitis E virus. *J Gen Virol*. 2015 (in press)
- 12) Ushijima H, Fujimoto T, Müller WEG, Hayakawa S: Norovirus and Foodborne Disease: A Review. *Food safety* 3: 37-54, 2014
- 13) Ushijima H, Thongprachum A, Tran DN, Fujimoto T, Hanaoka N, Okitsu S, Takanashi S, Mizuguchi M, Hayakawa S: Rapid Diagnostic Tests Apply for Pediatric Infections at Outpatient Clinic Setting. *Clin Lab* 61: 195-199, 2015
- 14) Matsushima Y, Nakajima E, Ishikawa M, Kano A, Komane A, Fujimoto T, Hanaoka N, Okabe N, Shimizu H. Construction of new primer sets for corresponding to Genetic Evolution of Human Adenoviruses in Major Capsid Genes through Frequent Recombination. *Jpn J Infect Dis* 67:495-502, 2014
- 15) Fujimoto T, Yamane S, Ogawa T, Hanaoka N, Ogura A, Hotta C, Niwa T, Chiba Y, Gonzalez G, Aoki K, Koyanagi KO, Watanabe H. A novel complex recombinant form of type 48-related human adenovirus species D isolated in Japan. *Jpn J Infect Dis* 67:282-7, 2014
- 16) Adhikary AK, Hanaoka N, Fujimoto T: Simple and cost-effective restriction endonuclease analysis of human adenoviruses. *Biomed Res Int* 363790, 2014
- 17) Yamashita T, Adachi H, Hirose E, Nakamura N, Ito M, Yasui Y, Kobayashi S, Minagawa H: Molecular detection and nucleotide sequence

- analysis of a new Aichi virus closely related to canine kobuvirus in sewage samples. *J Med Microbiol* 63(5): 715-720, 2014
- 18) Hara S, Kawada J, Kawano 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(1):15-19, 2014
 - 19) Thongprachum A, Takanashi S, Kalesaran AFC, Okitsu S, Mizuguchi M, Hayakawa S, Ushijima H: A four-year study of viruses that cause diarrhea in Japanese pediatric outpatients. *J Med Virol*, 2015 (in press)
 - 20) Tran DN, Pham TMH, Ha MT, Hayakawa S, Mizuguchi M, Ushijima H: Molecular epidemiology of influenza A virus infection among hospitalized children in Vietnam during postpandemic period. *J Med Virol*: 2015 (in press)
 - 21) Khamrin P, Thongprachum A, Okitsu S, Maneekarn N, Hayakawa S, Ushijima H: Comparison of three rapid tests for detection of norovirus in stool samples of acute gastroenteritis pediatric patients. *J Trop Pediatr* 60: 481-483, 2014
 - 22) Saikruang W, Khamrin P, Suantai B, Okitsu S, Hayakawa S, Ushijima H, Maneekarn N: Detection of diarrheal viruses circulating in adult patients in Thailand. *Arch Virol* 159: 3371-3375, 2014
 - 23) Okitsu S, Khamrin P, Thongprachum A, Nishimura S, Kalesaran AFC, Takanashi S, Shimizu H, Hayakawa S, Mizuguchi M, Ushijima H: Detection and molecular characterization of human cosavirus in a pediatric patient with acute gastroenteritis, Japan. *Infect Genet Evol* 28: 125-129, 2014
 - 24) Okitsu S, Khamrin P, Thongprachum A, Kalesaran AF, Takanashi S, Shimizu H, Maneekarn N, Mizuguchi M, Hayakawa S, Ushijima H: Molecular characterization and sequence analysis of the 2B region of Aichivirus C strains in Japan and Thailand. *Infect Genet Evol* 26: 89-94, 2014
 - 25) Ushijima H, Nishimura S, Thongprachum A, Shimizu-Onda Y, Tran DN, Pham NTK, Takanashi S, Dey SK, Okitsu S, Yamazaki W, Mizuguchi M, Hayakawa S: Sensitive and rapid detection of *Campylobacter* species from stools of diarrheal children in Japan by LAMP method. *Jap J Infect Dis* 67: 374-378, 2014
 - 26) Saikruang W, Khamrin P, Suantai B, Ushijima H, Maneekarn N: Molecular detection and characterization of Aichivirus A in adult patients with diarrhea in Thailand. *J Med Virol* 86: 983-987, 2014
 - 27) Thongprachum A, Chan-it W, Khamrin P, Saparpakorn P, Okitsu S, Takanashi S, Mizuguchi M, Hayakawa S, Maneekarn N, Ushijima H: Molecular Epidemiology of Norovirus Associated with Gastroenteritis and Emergence of Norovirus GI.4 Variant 2012 in Japanese Pediatric Patients. *Infect Genet Evol* 23: 65-74, 2014
 - 28) 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* 9: e89071, 2014
 - 29) Tran DN, Nguyen TQ, Nguyen TA, Hayakawa S, Mizuguchi M, Ushijima H: Human bocavirus in children with acute respiratory infections in Vietnam. *J Med Virol* 86: 988-994, 2014
 - 30) Chaimongkol N, Khamrin P, Malasao R, Thongprachum A, Kongsricharoern T, Ukarapol N, Ushijima H, Maneekarn N: Molecular characterization of norovirus variants and genetic diversity of noroviruses and sapoviruses in Thailand. *J Med Virol* 86: 1210-1218, 2014
 - 31) Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Sato Y, Nakajima N, Koike S, Iwasaki T, Sata T, Yamashita T, Minagawa H, Taguchi F, Hasegawa H, Shimizu H, Nagata N: Establishment of a panel of in-house polyclonal antibodies for the diagnosis of enterovirus infections. *Neuropathology*. doi: 10.1111/neup.12171, 2015
 - 32) Shimizu A, Himeda T, Okuwa T, Muraki Y, Ohara Y : Role(s) of Leader protein of Saffold virus., *Clin. Exp. Neuroimmunol.*, 5: 362-366, 2014
 - 33) Y.Ohara : Cell-to-cell- transmission in the pathogenesis of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, *Clin. Exp. Neuroimmunol.*, 5: 117-119, 2014
 - 34) Y.Ohara : Fingolimod effects as a neuroprotectant as well as an immunosuppressant. , *Clin. Exp. Neuroimmunol.* 5: 281-282, 2014
 - 35) Ishikawa-Sasaki K, Sasaki J, Taniguchi K. A complex comprising phosphatidylinositol 4-kinase III β , ACBD3, and Aichi virus proteins enhances phosphatidylinositol

- 4-phosphate synthesis and is critical for formation of the viral replication complex. *J Virol* 88:6586-6598, 2014
- 36) Kurata T, Kanbayashi D, Nishimura H, Komano J, Kase T, Takahashi K. Increased reports of measles in a low endemic region of Japan during a rubella outbreak in 2013. *Am J Infect Control*. (in press)
- 37) Takeda S, Hisano M, Komano J, Yamamoto H, Sago H, Yamaguchi K. Influenza vaccination during pregnancy and its usefulness to mothers and their young infants (Review). *J Infect Chemother*. (in press)
- 38) Kurata T, Kanbayashi D, Komano J, Kase T, Takahashi K. Pitfalls of National Surveillance Systems for Vaccine-associated Measles. *Am J Med*. In press. doi: 10.1016/j.amjmed.2014.04.027, 2014
- 39) Sakon N, Yamazaki K, Nakata K, Kanbayashi D, Yoda T, Mantani M, Kase T, Takahashi K, Komano J. Impact of Herd Immunity on the Circulatory Dynamism of Norovirus: A 10-year Longitudinal Study of Viral Acute Gastroenteritis. *J Infect Dis*. pii: jiu496. 2014
- 40) Kurata T, Kanbayashi D, Kinoshita H, Arai S, Matsui Y, Fukumura K, Matsumoto H, Odaira F, Murata A, Konishi M, Yamamoto K, Nakano R, Ohara T, Otsuru E, Komano J, Kase T, Takahashi K. Late onset of vaccine-associated measles in an adult with severe clinical symptoms: a case report. *Am J Med* 127(4): e3-4. doi: 10.1016/j.amjmed.2013.10.015, 2014
- 41) Matsui M, Shindo K, Izumi T, Io K, Shinohara M, Komano J, Kobayashi M, Kadowaki N, Harris RS, Takaori-Kondo A. Small molecules that inhibit Vif-induced degradation of APOBEC3G. *Virol J* 11(1):122. doi: 10.1186/1743-422X-11-122, 2014
- 42) Yamayoshi S, Fujii K, Koike S: Receptors for enterovirus 71. *Emerging Microbes & Infection* 3: e53, 2014
- 43) Koike S: A pH-dependent molecular switch for virion uncoating. *Protein Cell*, 5: 653– 654, 2014
- 44) Tanabe H, Motoyama K, Ikeda M, Wakiyama M, Terada T, Ohsawa N, Hosaka T, Hato M, Fujii Y, Nakamura Y, Ogasawara S, Hino T, Murata T, Iwata S, Okada-Iwabu M, Iwabu M, Hirata K, Kawano Y, Yamamoto M, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Yamauchi T, Kadowaki T, Yokoyama S: Expression, purification, crystallization, and preliminary X-ray crystallographic studies of the human adiponectin receptors, AdipoR1 and AdipoR2. *J Struct Funct Genomics*. 16: 11-23, 2015
- 45) Takeo K, Tanimura S, Shinoda S, Osawa S, Zahariev I, Takegami N, Ishizuka-Katsura Y, Shinya N, Takagi-Niidome S, Tominaga A, Ohsawa N, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Yokoshima S, Yokoyama S, Fukuyama T, Tomita T, Iwatsubo T: Allosteric regulation of γ -secretase activity by a phenylimidazole-type γ -secretase modulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111: 10544-10549, 2014
- 46) Bin BH, Hojyo S, Hosaka T, Bhin J, Kano H, Miyai T, Ikeda M, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Cho EG, Fukue K, Kambe T, Ohashi W, Kim KH, Seo J, Choi DH, Nam YJ, Hwang D, Fukunaka A, Fujitani Y, Yokoyama S, Superti-Furga A, Ikegawa S, Lee TR, Fukada T: Molecular pathogenesis of spondylocheirodysplastic Ehlers-Danlos syndrome caused by mutant ZIP13 proteins. *EMBO Mol. Med.* 6: 1028-1042, 2014
- 47) Shigematsu H, Iida K, Nakano M, Chaudhuri P, Iida H, Nagayama K. Structural characterization of the mechanosensitive channel candidate MCA2 from *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*. 9: e87724, 2014
- 48) Kimura-Soyema T, Shirouzu M, Yokoyama S: Cell-free membrane protein expression. *Methods Mol. Biol.* 1118: 267-273, 2014
- 49) Fang-TzyWu, MS, Hsieh-Cheng Chen, MS, Catherine Yen, MD MPH, Ching-Yi Wu, MS, Kazuhiko Katayama, Jason C. Huang, Ho-Sheng Wu. Epidemiology and Molecular Characteristics of Norovirus GII.4 Sydney 2012 Gastroenteritis Outbreaks in Taiwan, January 2012– December 2013. *Arch Virol*. (in press) 2015
- 50) Sato G, Ido H, Kiuchi M, Kataoka M, Katayama K and Tohya Y. Characterization of St-Valerien-Like Virus Genome Detected in Japan. Doi: 10.1292/jvms.13-0468; *J. Vet. Med. Sci.* 76(7):1045-1050, 2014
- 51) Katayama K, Murakami K, Sharp TM, Guix S, Oka T, Takai-Todaka R, Nakanishi A, Crawford SE, Atmar RL, Estes MK. Plasmid-based human norovirus reverse genetics system produces reporter-tagged progeny virus containing infectious genomic RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111 (38) ; E4043-52, Epub Sep 5, 2014
- 52) 清水博之、「VAPP/VDPV」「D抗原」の項を担当、まるわかりワクチン Q&A、日本医事新報社、東京、2015 (in press)
- 53) 清水博之、「消化器ウイルス篇 エンテロウイルス-ポリオウイルスおよび非ポリオエンテロウイルス」の項を担当、臨床医のための呼吸器・消化

- 管ウイルス感染症、103-109, 診断と治療社、東京、2014
- 54) 高山直秀, 崎山 弘, 清水博之, 梅本 哲. 経口生ポリオワクチン 1~2 回目および不活化ポリオワクチン1~4回目接種の全国累積接種率: 2013年の調査結果. 日本医師会雑誌 143: 609-614, 2014
- 55) 清水博之: 急増した手足口病 感染・炎症・免疫 44,94-96, 2014
- 56) 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 2014
- 57) 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
- 58) 中野貴司: ポリオワクチン. 感染症内科2巻3号: 264-273, 2014
- 59) 中野貴司: トピックスIII「ポリオについて」. 日本ワクチン学会ニュースレター 第 26 号: 9-10, 2014
- 60) 中野貴司: 新しく導入されたワクチン〜不活化ポリオワクチンを含むワクチン. チャイルドヘルス 17巻9号: 629-633, 2014
- 61) 中野貴司: 予防接種各論5章. ポリオワクチン. 総編集 五十嵐隆, 専門編集 渡辺博, 小児科臨床ピクシス4; 予防接種 全訂新版 中山書店, 東京: 136 -145, 2014
- 62) 中野貴司: エンテロウイルス- ポリオウイルスおよび非ポリオエンテロウイルス- Case Study. 堤裕幸, 中野貴司, 寺田喜平. 臨床医のための呼吸器・消化管ウイルス感染症 診断と治療社, 東京: 68-74, 2014
- 63) 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
- 64) 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
- 65) 伊藤雅, 岩切章, 内野清子, 小澤広規, 北川和寛, 葛口 剛, 下野尚悦, 神保達也, 高橋雅輝, 板持雅恵, 筒井理華, 濱崎光宏. 山崎謙治 中田恵子, 吉田弘 平成 25 年度感染症流行予測調査事業ポリオ環境水調査期間中 (2013 年 4~12 月) に検出されたエンテロウイルスについて IASR Vol. 35 p. 275-276: 2014
- 66) 藤本嗣人: アデノウイルス感染症. 小児内科 46 増刊: 1022~1026, 2014
- 67) 藤本嗣人, 花岡希, 小林正明: アデノウイルス. 臨床医のための呼吸器・消化管ウイルス感染症: 56~59, 2014
- 68) 吉田弘. 水環境中のウイルス情報の収集と活用 ポリオウイルス-不活化ワクチン開発後の野生株侵入状況把握 臨床とウイルス 42 (5) 224-230. 2014
- 69) 井上菜南, 高梨さやか, 牛島廣治, 沖津祥子, 崎山弘, 水口雅: 定期接種ワクチンとロタウイルスワクチン累積接種率の比較. 日本小児科学会雑誌 印刷中, 2015
- 70) 牛島廣治, 沖津祥子, 早川智, Kittigul L, 高梨さやか: ロタウイルスワクチンによるヒトと 環境中のロタウイルスの動向. 臨床とウイルス 42: 231-236, 2014
- 71) 牛島廣治, Thongprachum A, 沖津祥子, 秋原志穂: 変異株 (シドニー型) の国内動向. 感染対策 ICT ジャーナル 9: 348-354, 2014
- 72) Tran DN, Nguyen TQN, Okitsu S, Hayakawa S, Mizuguchi M, Ushijima H: Epidemiology of rubella epidemic in Vietnam. 臨床とウイルス 42: 35-46, 2014
- 73) 大原義朗, 森田明彦: 医学と医療の最前線 脳髄膜炎の遺伝子診断, 日内会誌, 103: 1942-1947, 2014
- 74) 小池 智: ポリオウイルスの神経指向性のメカニズム. NEUROINFECTION, 19:7-12, 2014
- 75) 片山和彦. ノーウォークウイルス (ノロウイルス) の遺伝子型 2014 年版 IASR ノロウイルス特集号 vol.35 No.7 July 2014
- 76) 片山和彦. ノロウイルス感染症とその対策 救命救急 vol.17 No.1 12-15, 2014
- 77) 片山和彦. 質疑応答臨床一般 夏場にノロウイルスによる胃腸炎や食中毒が発生する可能性. 日本医事新報 No.4723, 59-60, 2014
- 78) 片山和彦. 特集 ノロウイルス感染症 ノロウイルスとは 調剤と情報 vol.20 No.12, 10-12, 2014
- 79) 片山和彦. 特集 ノロウイルス感染症 ノロウイルスの感染拡大を防ぐには 調剤と情報 vol.20 No.12, 14-19, 2014
- 80) 片山和彦. 備えて立ち向かう感染性胃腸炎 ノロウイルス・ロタウイルス ノロウイルス感染症とは ウイルスの特徴・流行変遷・臨床病態 感染症対策 ICT ジャーナル vol.9 No.4 2014
- 81) 片山和彦. 少年写真新聞社 中学保健ニュース ノロウイルスの感染予防 Dec.18, 2014
- 82) 片山和彦. 少年写真新聞社 高校保健ニュース ノロウイルスの感染予防 Dec.18, 2014

2. 学会発表

- 1) Shimizu H. The host cellular receptors for enterovirus 71. The 2nd Symposium on Research and Quality Control of Vaccines, NIID/Toyama, Tokyo, 3 March, 2015
- 2) Shimizu H. WHO Collaborating Centre for Virus Reference and Research (Enteroviruses). The First Regional Forum Of Who Collaborating Centres in the Western Pacific, Manila, the Philippines, 13-14 November, 2014
- 3) Shimizu H. Molecular basis of virus-host interaction and pathogenesis of enterovirus 71 infection. Monto Ho Memorial Lectures on Enterovirus 71, 2014 International