

財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2010 年 3 月 11 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 吉田 弘

所属機関名：国立感染症研究所

所属部署名：ウイルス第二部

職名：主任研究官

所在地：東京都武蔵村山市学園 4-7-1

電話：042-561-0771

内線：3358

1. 助成金額：1, 000, 000 円

2. 研究テーマ

広東省における環境水調査によるポリオウイルス検出法の研究

3. 成果の概要

広東省広州市をパイロットエリアとして、ポリオウイルスを検出する環境ウイルスサーベイランスを行った結果、①AFP(急性弛緩性麻痺)サーベイランスと比べ、ウイルス分離頻度が高いこと、②ポリオウイルスは1-3型ともコンスタントに分離されており、VP1領域における塩基置換は生ワクチン株と比較して1%未満であることから、OPV定期接種のアセスメントツールとして有用であることを示した。このことは広東省のような流動人口を多く抱える省において、従来のAFPサーベイランスの補助的な役割として、高感度にワクチン由来ポリオウイルス(VDPV)や輸入野生株を検出する方法として期待できる。

※発表論文等：なし

4. 研究組織

日本側研究者氏名：吉田 弘

所属機関名：国立感染症研究所

中国側研究者氏名：郑焕英

所属機関名：広東省CDC

職名：主任研究官

部署名：ウイルス第二部

職名：副主任技師

部署名：ポリオ実験室

広東省における環境水調査によるポリオウイルス検出法の研究

研究者氏名	吉田 弘
日本研究機関	国立感染症研究所 ウイルス二部主任研究官
共同研究者氏名	郑 煥英
中国所属機関	広東省CDCポリオ実験室 副主任技師

研究要旨

広東省広州市をパイロットエリアとして、ポリオウイルスを検出するべく環境ウイルスサーベイランスを行った。2008年4月から2009年11月までの流入下水調査の結果、①AFP(急性弛緩性麻痺)サーベイランスと比べ、ウイルス分離頻度が高いこと、②ポリオウイルスは1-3型ともコンスタントに分離されており、VP1領域における塩基置換は生ワクチン株と比較して1%未満であることから、OPV定期接種のアセスメントツールとして有用であること、を示した。このことは広東省のような流動人口を多く抱える省において、従来のAFPサーベイランスの補助的な役割として、高感度にワクチン由来ポリオウイルス(VDPV)や輸入野生株を検出する方法として期待できる。

Key words : ポリオ根絶計画、環境サーベイランス

緒言

ポリオ根絶計画では、生ポリオワクチン(OPV)投与によりヒト集団中の野生株ポリオ(PV)ウイルスの消失を、AFP(急性弛緩性麻痺)サーベイランス下の実験室診断で確認をしている。中国は10年以上野生株フリーの状況であるが、近隣のパキスタン、インド等で流行しているため野生株の輸入のリスクは依然として存在する。これはPV感染の多くが不顕性であり健常者がリザーバーになるためである。

OPV接種後、ワクチン株はヒトの腸管で増殖し免疫を誘導するが、同時にウイルスゲノム上ではわずかに変異が起こり、糞便中に排泄される。集団免疫が高ければ排泄されたウイルスがヒト集団に広まることはないが、OPV接種率が低下すると、ヒト-ヒト感染を繰り返しゲノム上に変異が蓄積した強毒型ワクチン由来株(VDPV)が出現する。中国ではVDPVによる流行が貴州省(2004年)他で問題となった。

環境ウイルスサーベイランスは、ヒトから環境水に排泄されたPVを調べることで、顕性、不顕性感染に関わらず地域に流行するウイルスを高感度に検出できる可能性がある(1)。実際2007年にスイスジュネーブ市では、患者感染例はなかったがチャド由来野生株が下水中より検出されたことにより、輸入リスク評価のツールとして有用性が認められている。WHOは“2010-12年行動計画”(2)の中で環境ウイルスサーベイランスを導入する計画である。本課題では、2008年以来、広東省CDCと共同研究を行っている環境ウイルスサーベイランスにより、ポリオウイルス野生株輸入・VDPVリスク対策方法として導入可能か検討する。

材料と方法

環境水採取エリア：広東省広州市内（人口約 1000 万人、流動人口約 300 万人）を流れる珠江（1 箇所）及び天河地区猎德下水処理場の流入下水（2 箇所）にて、2008 年 4 月から月 2 回の頻度で 2010 年 3 月まで 2 年間継続した。なお既に河川、下水処理場からのサンプリングについては広州市監督官庁から承認済み。

ウイルス分離同定：流入下水（500m l）を出発材料に、疎遠心（3000 r p m、30 分）後、上清に塩化マグネシウムを添加（最終濃度 0.05M）し、pH3.5 に調整。加圧ろ過装置（KST142、アドバンテック）に装着した陰電荷膜（A045A142、アドバンテック）にてウイルス吸着。3% beef extract（10m l）存在下、2 mmプローブを用いて 1 分間超音波処理（VP-5S、タイテック）を行いウイルス誘出を 2 回行った。膜より誘出した濃縮液を 0.45um フィルターにてろ過後、RD, HEp-2、Vero、L20B 細胞へ 0.2m l ずつ接種、2 代継代を行った。なお RD, HEp-2、Vero で CPE 陽性の場合は L20B に再接種しポリオウイルスの有無を確認した。分離ウイルスは、ポリオ抗血清を用いて中和法にて型別同定を行った。

ポリオウイルス遺伝子解析

ポリオウイルスはRNA抽出後、ウイルスゲノムVP1領域をターゲットとしたUG1, UC11プライマーセットを用いてRT-PCRにて増幅。得られたPCR産物をダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定し、1-3型ワクチン株と比較した。

結果

環境水採取：2008 年 4 月から 2009 年 11 月まで、下水処理場流入口 1 号、3 号から月 2 回、合計 20 回採水。80 試料を得た。

ウイルス分離、同定：80 試料を RD、HEp-2、Vero、L20B に接種したところ、各々 80、61、15、29 株分離された。これらのウイルスについてはポリオ以外のエンテロウイルスも混ざっているため検査続行中である。

L20B に接種/再接種して分離されたポリオウイルスに関しては 2008 年 3 月から 2009 年 11 月までに 1 型 14 株、2 型 32 株、3 型 14 株、計 60 株が分離された。また 2008 年 6 月を除き毎月ポリオウイルスが分離されている（表 1）。これは広東省における AFP サーベイランスより高い分離頻度である(3)

1-3 型分離株について、VP1 領域の塩基配列を調べたところ、ワクチン株と 1%以下の違いであり、すべて Sabin-like 株と判定された（図 1）。

考察

本研究では従来の AFP サーベイランスとポリオウイルス分離頻度の比較検討を行い野生株輸入・VDPV 検出法としての妥当性、ヒト集団中のエンテロウイルス流行を包括的に把握するツールとしての適用性を研究目的とした。先行研究を含め 2 年間の調査を通じ、①AFP サーベイランスによるポリオ分離率に比べ高頻度にポリオウイルスが分離できること、②VP1 領域の遺伝子解析により分離株は Sabin-like 株であったことから、OPV 定期接種状況を把握するモニタリングツールとしても適用できる可能性、③未同定ではあるものの多種のエンテロウイルスの地域流行の可能性、を示唆している。

野生株ポリオフリー地域では、集団免疫低下に伴う VDPV のアウトブレイクの危険性が存在する。本研究で行った遺伝子解析の結果、分離ウイルス株の変異が 1%以内であることから、広東省広州市では、OPV 接種状況が良好であることが示唆される。このこ

とは広東省のような流動人口を多く抱え、疾患サーベイランスが困難な省において、従来のAFPサーベイランスの補助的な役割として、高感度にワクチン由来ポリオウイルス（VDPV）や輸入野生株を検出する方法として期待できる。

他方、新疆ウイグル自治区のように広大な面積を有し、流行国であるパキスタンに隣接するような省では、国境地域に環境ウイルスサーベイランスを導入することで輸入リスク対応として期待できる。

（研究協力者）

中国広東省 CDC Dr. Ke Changwen

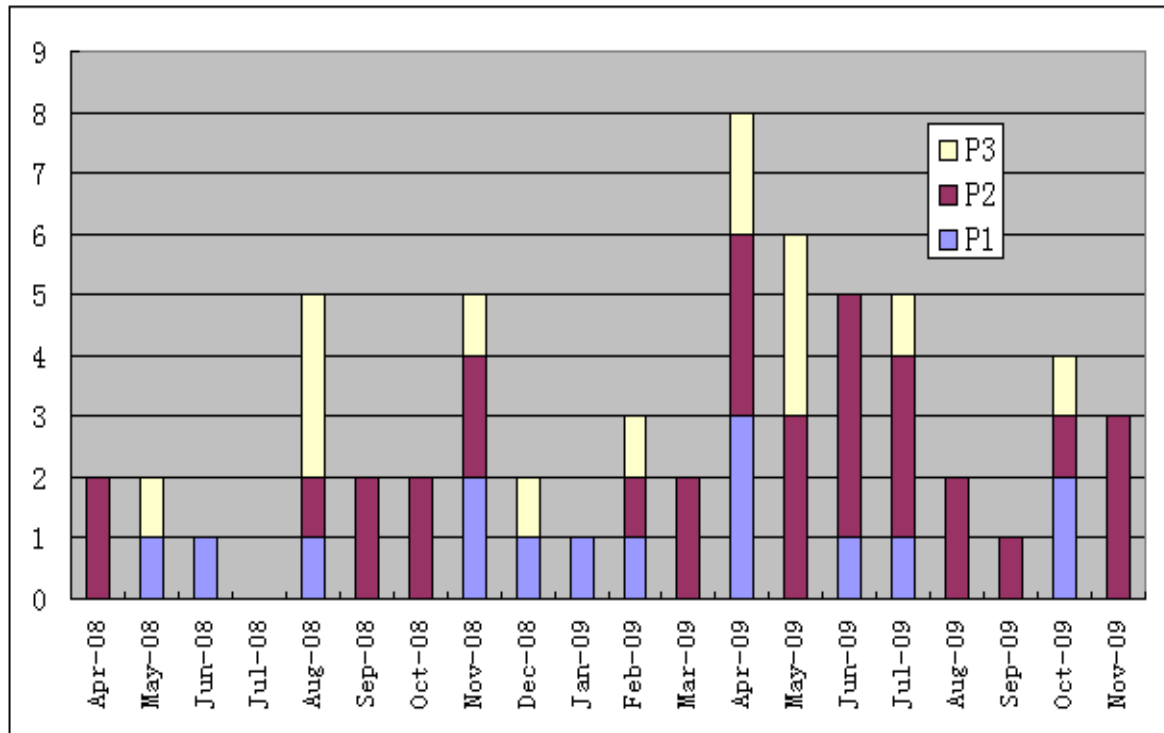
中国 CDC ポリオ実験室 Dr. XuWenbo, Dr. ZhangYong.

参考文献

- 1) 岩井雅恵 中村一哉 小原真弓 堀元栄詞 長谷川澄代 倉田 毅 滝澤剛則
吉田 弘 環境水サーベイランスによるポリオウイルス伝播の監視－富山県 IASR
Vol. 30 p. 180-181: 2009 年 7 月号
- 2) <http://www.wpro.who.int/sites/epi/documents/PolioWeeklyBulletin.htm>
- 3) http://www.polioeradication.org/content/publications/GPEI_ProgrammeofWorkStructureNovember2009.pdf

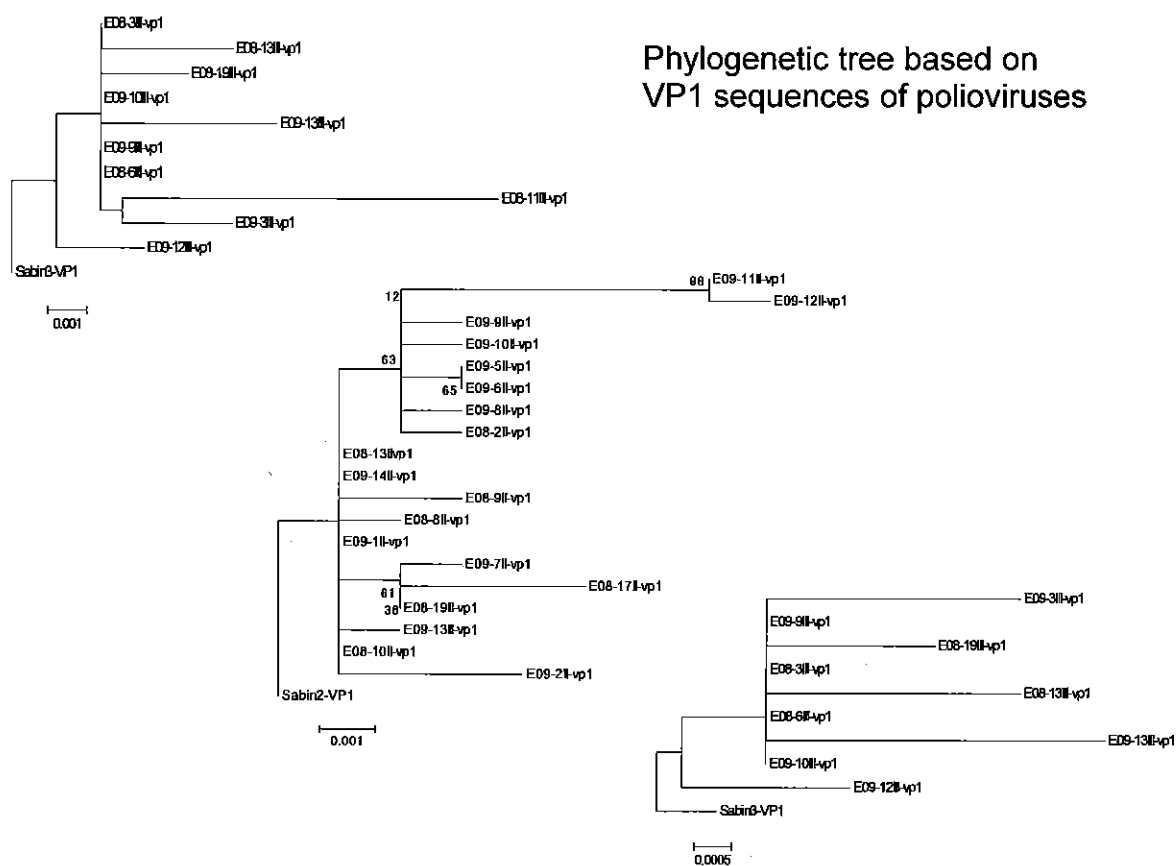
作成日：2010 年 3 月 11 日

図1 天河地区猎德下水処理場の流入下水（2箇所）におけるポリオウイルス分離
(2008.4-2009.11)



横軸は採取月、縦軸は分離数を示す。P1, 2, 3 はそれぞれポリオ1型、2型、3型。

図 2



広東省広州市内の下水由来ポリオウイルス 1-3 型とのワクチン株と VP1 領域にて 1%以下の塩基置換であることを示す。