

6. WHO Enterovirus Collaborating Center の役割と機能

清水 博之

国立感染症研究所 ウイルス第二部

国立感染症研究所ウイルス第二部第二室は、WHO から指定された WHO Collaborating Center for Virus Reference and Research (Enterovirus) として機能しており、ポリオをはじめとするエンテロウイルス感染症の実験室診断のためのウイルス分離同定、新たな実験室診断法の開発・評価・精度管理、技術者・専門家への研修、標準試薬・参照品の調整・維持・供給等の活動を実施している。ポリオウイルス病原体サーベイランスは、世界ポリオ根絶計画において不可欠な機能のひとつであり、非ポリオエンテロウイルス実験室診断は、エンテロウイルス 71 による近年の手足口病流行においても重要である。世界的および地域レベルにおけるポリオ実験室ネットワークを基盤とした人的資源および継続的な国際協力は、西太平洋地域における非ポリオエンテロウイルス感染症サーベイランスにおいても重要な役割を果たしている。

1. はじめに

国立感染症研究所ウイルス第二部 (Laboratory of Enteroviruses) は、世界保健機関 (World Health Organization; WHO) から指定された国内唯一の WHO Collaborating Center for Virus Reference and Research (Enterovirus) として、ポリオウイルスをはじめとするエンテロウイルスの分離同定、実験室診断法の開発・評価・精度管理、技術者・専門家への研修、標準参照品の調整・維持・供給等の活動を実施している。本稿では、WHO Enterovirus Collaborating Center の機能と意義について概説するとともに、ポリオウイルス・エンテロウイルス国際的実験室ネットワークを基盤とした我々の研究活動の一端について紹介したい。

2. WHO Collaborating Center

WHO Collaborating Center は、国際保健活動に関わる WHO 所管事業の遂行をサポートするため、WHO により指

定 (designation) された各加盟国・地域の研究施設・実験室である。WHO Collaborating Center は、WHO により独自に設立・運営される研究施設ではなく、すでに機能している各加盟国・地域の研究施設・実験室が、WHO の所管する国際保健事業に協力することを前提として、WHO 事務局長からの指定を受けて活動する体制となっている。

国立感染症研究所 (感染研) では、現在、表 1 に示した各研究部が、免疫学的製剤、エンテロウイルス、インフルエンザウイルスの WHO Collaborating Center として指定され、機能している。また、WHO Collaborating Center としての活動のほか、感染研の多くの研究部・センターが、WHO 感染症ラボラトリーネットワークの中核実験室として機能している (表 1)。ウイルス第二部は、WHO Enterovirus Collaborating Center としての活動とともに、ポリオ世界特別専門ラボラトリー (Global Specialized Polio Laboratory) およびポリオ地域レファレンスラボラトリー (Regional Reference Polio Laboratory) としての役割も同時に果たしている (表 1)。

WHO Enterovirus Collaborating Center としての活動の概要について 2008 年年次報告書の Terms of Reference (TOR) をもとに示すと、以下の通りである。

1. Western Pacific Region (WHO 西太平洋地域) の加盟国・地域で分離されたポリオウイルスの解析、とくに適切な検査手法に基づいて、型内鑑別 (ワクチン株と野生株を含む非ワクチン株との鑑別) を行う。

連絡先

〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1
 国立感染症研究所 ウイルス第二部 第2室
 TEL: 042-561-0771
 FAX: 042-561-4729
 E-mail: hshimizu@nih.go.jp

表1 国立感染症研究所における WHO 指定センター・レファレンスラボラトリー

WHO-designated Center; WHO 指定センター WHO Reference Laboratory; WHO レファレンスラボラトリー		担当部・センター
Collaborating Center for Research and Reference Services for Immunological and Biological Products	生物学的製剤の研究とレファレンスに関する協力センター	細菌第二部
Collaborating Center for Virus Reference and Research (Enterovirus)	エンテロウイルス協力センター	ウイルス第二部
Collaborating Center for Reference and Research on Influenza	インフルエンザ協力センター	インフルエンザウイルス研究センター
Polio Global Specialized Laboratory	ポリオ世界特別専門ラボラトリー	ウイルス第二部
Polio Regional Reference Laboratory	ポリオ地域レファレンスラボラトリー	ウイルス第二部
H5 Influenza Reference Laboratory	H5 インフルエンザレファレンスラボラトリー	インフルエンザウイルス研究センター
SARS Research Network Laboratory	SARS 研究ネットワークラボラトリー	ウイルス第三部
Global Specialized Laboratory for Measles and Rubella	麻疹・風疹世界特別専門ラボラトリー	ウイルス第三部
Regional Reference Laboratory for Measles and Rubella	麻疹・風疹地域レファレンスラボラトリー	ウイルス第三部
Regional Human Papilloma Virus Reference Laboratory	パピローマ地域レファレンスラボラトリー	病原体ゲノム解析研究センター
Japanese Encephalitis Global Specialized Laboratory	日本脳炎世界特別専門ラボラトリー	ウイルス第一部

- エンテロウイルス標準株，エンテロウイルス抗血清等標準品の維持管理を行う。
- ポリオウイルス実験室診断に必要な試薬（細胞，血清等）の提供を行う。
- ポリオ実験室診断法および検査技術，とくに方法・手技の標準化に関する共同研究を実施する。
- 専門家・技術者に対する技術指導を行う。
- WHO に疫学情報を提供する。

以下，上記 TOR の各項目に則して，WHO Enterovirus Collaborating Center としての具体的な活動について説明する。

3. WHO Enterovirus Collaborating Center としての具体的な活動

1) 西太平洋地域のポリオウイルス分離株の解析

ポリオウイルス感染は不顕性感染の割合が高く，また，ポリオウイルス感染症の典型的な臨床症状である急性弛緩性麻痺 (acute flaccid paralysis; AFP) は，ポリオウイルス感染以外の要因によっても発症する場合が多いため，実

験室検査による確定診断は，ポリオ根絶計画にとって不可欠な機能として位置づけられている。WHO 世界ポリオ実験室ネットワークにより整備された，高度に標準化された実験室診断法により，世界中すべての国・地域をカバーしうる病原体サーベイランス体制が確立・維持されている。

WHO 西太平洋地域では，1997年3月のカンボジアのポリオ症例を最後に，野生株ポリオウイルスによるポリオ流行は報告されておらず，10年以上にわたり，ポリオフリーが維持されている¹⁾。しかし，この間，西太平洋地域以外の野生株ポリオウイルス流行地に由来する輸入ポリオ症例が数例報告されており^{2,3)}，また，変異型ワクチン由来ポリオウイルス (vaccine-derived poliovirus; VDPV) 伝播によるポリオ流行の発生が，フィリピン (1型，2001年)，中国 (1型，2004年)，カンボジア (3型，2005-2006年) において検出されている⁴⁻⁸⁾。

WHO 世界ポリオ実験室ネットワークは，その機能により，National Laboratory, Regional Reference Laboratory (RRL) および Global Specialized Laboratory (GSL) として，明確な役割分担がなされている。各国の National Laboratory は，AFP 患者由来の糞便検体から，2種類の培養細胞を用

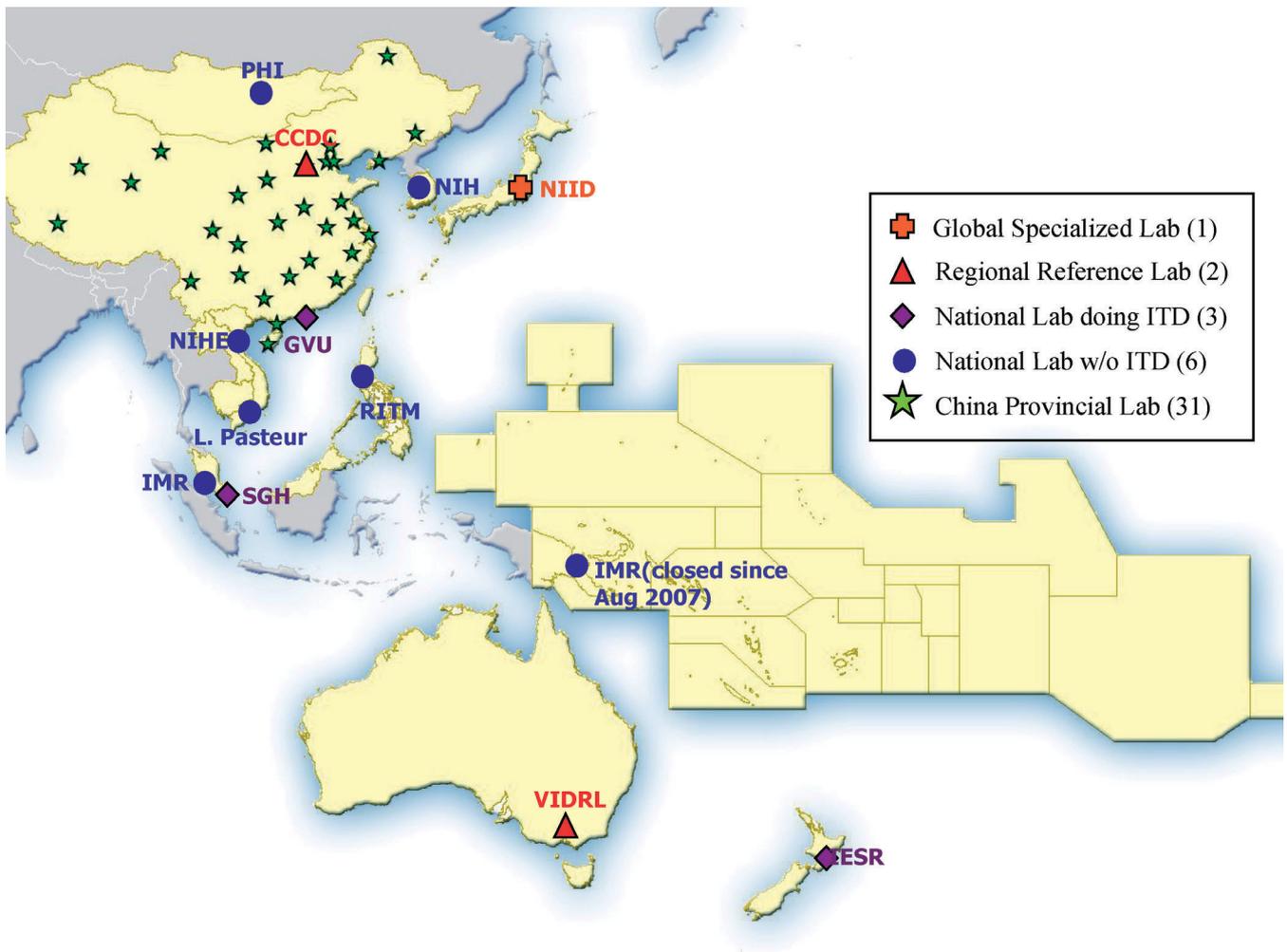


図1 WHO 西太平洋地域のポリオ実験室ネットワーク

WHO 西太平洋地域では、2009年現在、43個所のポリオネットワークラボラトリーが機能している。中国の Provincial Laboratory は、Sub-national Laboratory としてポリオウイルスの分離同定を担当している。[WHO 提供資料を一部改変]

いてポリオウイルスを分離し、分離されたポリオウイルスは RRL において、ワクチン株か野生株（VDPV を含む）かの型内鑑別が行われる。VDPV を含む野生株が検出された場合、GSL においてより詳細な遺伝子解析・ウイルス学的解析が行われる。現在、ポリオ GSL として、世界で7個所の研究施設が活動している。感染研ウイルス第二部は、西太平洋地域唯一の GSL として、同地域におけるポリオウイルス分離株の最終的な解析を担当しており、WHO Enterovirus Collaborating Center としての主要な機能の一つとなっている（図1）。

2) エンテロウイルス標準株・標準品の維持管理

100種類近くの多くの血清型を有するエンテロウイルスの実験室診断に必要とされる標準株を維持管理し、必要に

応じて供給可能な体制を出来る限り整備している。従来、エンテロウイルスの同定は、各血清型のウイルスに対する中和抗血清あるいは中和抗血清を混合した抗血清パネルを用いた中和法により行われてきた。現在、多くの実験室において遺伝子検出・解析によるウイルス同定が一般化しているが、多検体のスクリーニングや遺伝子解析が導入されていない検査施設では、中和法による同定は依然有用であり、国内外のネットワーク実験室等からの要望に応じて自家調整した抗血清の供給を行っている。高い頻度で検出されるエンテロウイルス血清型の多くに対する抗血清が供給可能である。西太平洋地域における近年の手足口病流行に対応して、エンテロウイルス 71 (EV71) およびコクサッキーウイルス A16 (CAV16) 同定用の抗血清の分与を実施した。

3) ポリオウイルス実験室診断試薬の提供

ポリオウイルス実験室診断手法は、世界ポリオ実験室ネットワークにより高度に標準化されており、定期的な精度管理が導入されている。とくに、National Laboratory におけるポリオウイルス分離は、実験室診断の感度・精度に大きな影響を与えるため、培養細胞の品質管理には大きな力点が置かれている⁹⁾。GSLでは、由来および培養歴の明らかな精度管理済の標準細胞バンクを維持しており、National Laboratoryの培養細胞に問題が認められた場合、細胞バンクに由来する細胞を送付し、適切な細胞に入れ替える体制を確立している。その他、ポリオ実験室診断に必要な基本的試薬の多くは、WHOあるいはRRL/GSLから供給可能となっている（市販品として入手可能な試薬は除く）。

ポリオ実験室の精度管理の一環として、WHO実験室ネットワークにより調整された試験検体（blind sample）を用いた定期的な精度管理試験が、すべてのネットワーク実験室に義務づけられている。ウイルス分離用の精度管理試験検体は、GSLのひとつであるオランダRIVMで調整され、西太平洋地域ではオーストラリアのRRLを介して、各国のポリオ実験室に送付される。指定された期限内に、最終的なウイルス分離同定結果を1次記録用紙のコピーとともに、RRL等に送付する。ウイルス分離同定結果のスコアが合格点に達しない場合、検査記録に問題点が認められた場合には、WHO地域事務局を介して技術的問題点の抽出・改善が図られる。RRL/GSLで実施されるポリオウイルス型内鑑別試験（ITD-PCR, ITD-ELISA試験等）についても、定期的な精度管理試験の実施が義務づけられており、合格点に達しない場合には、早急な技術的改善および再試験が求められる。

4) ポリオ実験室診断法および検査技術に関する共同研究

ポリオウイルス実験室診断の標準的手法はすでに確立されているが、世界ポリオ根絶計画の最終段階に向けて、より迅速かつ精度の高いポリオウイルス検査手法の開発が行われている。より迅速に野生株ポリオウイルスを検出・同定し、タイムリーな強化予防接種対策に役立てるため、ポリオ流行地域の実験室ネットワークを中心として、ポリオ実験室診断の“New algorithm”が導入されている¹⁰⁾。“New algorithm”では、ポリオウイルス分離の際の培養時間を短縮するとともに、CPE発現後、中和法によるウイルス同定の代わりにPCRによる型内鑑別（ITD-PCR）を導入することにより、全体的な検査時間の短縮を図っている。National Laboratoryのうち、ポリオ流行地域や検体数が多い実験室にITD-PCR等を導入することにより、地域ネットワークにおける検査日数の大幅な短縮が図られた。西太平洋地域では、地域全体として“New algorithm”を導入する計画は、今のところないが、可能な実験室で“New algorithm”導入が進められている。また、米国CDCが

conventional PCRによるITD-PCRを改良したreal-time ITD-PCR法を開発中であり¹¹⁾、臨床分離株を用いた精度・感度の評価試験が進行中である。我々も、西太平洋地域で検出されたユニークなポリオウイルス分離株を用いた評価試験を実施している。

ポリオウイルス感染症の診断には、血清学的診断や臨床検体からのウイルス遺伝子検出等の方法も技術的には利用可能であるが、疾患サーベイランスおよび病原体検査の標準化の観点から、糞便検体を用いた培養細胞によるウイルス分離同定法のみが推奨されている。ウイルス分離同定に基づくポリオウイルス検査法を継続する場合、検査の迅速化には限界がある。そのため、糞便検体から、直接ポリオウイルスを検出同定する、まったく新たな検査手法の基礎的検討が進められている¹²⁾。しかし、検体からのポリオウイルス直接検出には、検査感度・精度の問題が存在し、他種類のポリオウイルス・エンテロウイルスが混在する検体からの検出の問題等、解決が必要な技術的課題が多く残されている。ポリオ・エンテロウイルスの遺伝子検出・解析技術の改良が進められているが、今のところ培養によるポリオウイルス分離・同定に替わる手法は見いだされていない。高価な機器あるいは高度な技術を要する検査手法は、技術レベルの異なる多くのネットワーク実験室への導入にそぐわないことも、新技術開発のハードルを高くしている。我々は、そのため、出来るだけ多くの実験室への導入が可能な簡便なポリオウイルス検出法（遺伝子検出・抗原検出）に関する基礎的技術の開発を試みている。

5) 専門家・技術者に対する技術指導

ネットワーク実験室においてポリオ・エンテロウイルス検査に従事する技術者・研究者への技術指導・技術研修は、WHO Collaborating Centerとしての重要な役割のひとつである。WHO地域事務局により実施される不定期的なワークショップだけでなく、我々は、JICA 集団研修の枠組みを活用し、定期的な技術研修を実施している。表2に示したように、平成3年から実施しているJICAポリオ実験室診断技術研修コースでは、現在までに、のべ31ヶ国から160名以上の研修員を受け入れている。現在は、培養細胞の品質管理を含むポリオウイルス分離同定に関する技術の習得・再確認に重点を置いた3週間の研修を、毎年実施している（Laboratory Diagnosis Techniques for Global Polio Eradication; 世界ポリオ根絶のための実験室診断技術、図2）。研修期間中、WHO専門家等外部講師による講義や、研修生のプレゼンテーションに基づく討論会の機会を設けることにより、WHO実験室ネットワークの人的・技術的交流の促進に努めている。18年間継続したJICA研修の結果、WHOネットワークラボラトリーにおいてポリオ・エンテロウイルス検査に従事している技術者・研究者の多くが、我が国での技術研修に参加した経験を有するまでに至った。

表2 JICA 集団コース ポリオ実験室診断技術 研修員受入実績

国名	平成 3年度	4年度	5年度	6年度	7年度	8年度	9年度	10年度	11年度	12年度	13年度	14年度	15年度	16年度	17年度	18年度	19年度	20年度	計
バングラデシュ								1		1		1	1		1				5
カンボディア	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1									10
中国	1	1		2(1)	1	2(1)	4(3)	5(4)	3(2)	1	1						2	(1)	23 (14)
エクアドル						1													1
インドネシア	2																		2
ラオス		1		1	1	1	1		1		1	1							8
マレーシア	1	1	1		1	1	1	1											7
モンゴル						1(1)		1(1)	1		1						1		5 (2)
ミャンマー							2(1)	2(1)	1		1	1	1	1	1	1			11 (2)
ネパール														1					1
パキスタン												1		1	1		1	1	5
トルコ															1				1
タイ							1	1	1				1						4
ヴィエトナム			1	1	1	1	1	2(1)			1(1)							2	10 (2)
パプア・ニューギニア		1	1		1	1		1	1										6
フィリピン			1	1	1	1			1	1					1				7
パナマ														1					1
イエーメン																1(1)			(1)
エジプト																	1		1
アルジェリア													1						1
ナイジェリア																	2	1	3
ケニア													1		1	1			3
ジンバブエ														1					
タンザニア									1(1)				2	1		1			5 (1)
ザンビア													1						
ガーナ																	1		1
スーダン																1			1
ニジェール																1			1
トーゴ														1					1
コートジボワール															1		1		2
エチオピア											2(2)	2(2)	2(2)			1		1	8 (6)
合計	5	5	5	6(1)	7	10(2)	11(4)	15(7)	11(3)	4	7(3)	6(2)	10(2)	7	7	7	9	5(1)	137 (28)

() は個別研修員数の内数



図2 2008年度 JICA ポリオ実験室コースの研修風景

昨年度(2008年度)の JICA 集団コース「世界ポリオ根絶のための実験室診断技術」では、ポリオ流行地を含む5ヶ国6名(中国、パキスタン、ベトナム、ナイジェリア、エチオピア)の研修員に対して、実習を中心とした技術研修を実施した。

受入れ国や適切な研修生の選定、技術研修の内容については、いまだに試行錯誤を続けているが、JICA ポリオコースは、ポリオ実験室診断に特化した技術研修として定着し、国内外で高い評価を受けている。

また、必要に応じて現地実験室における技術指導や技術講習会等への参加を行っている。とくに中国に対しては、かねてより JICA プロジェクト（中国ポリオ対策プロジェクト、中国予防接種事業強化プロジェクト等）の枠組みによる集団・個別研修や中国国内の技術研修コースへの協力を通じて、中国 RRL および各省実験室（Sub-national Polio Laboratory）への技術協力を継続している。また、ポリオ実験室ネットワークにおける実験室精度管理の一貫として定期的に行われている WHO 実験室査察へ、西太平洋地域事務局等の依頼により参加する機会も多い。

6) WHO への疫学情報の提供

感染研ウイルス第二部は、ポリオ RRL/GSL としての役

割以外に、ポリオ実験室が存在しない、ラオスおよびカンボジアの National Laboratory としての機能を果たしており、両国から定期的に送られてくる AFP 糞便検体からのポリオウイルス分離同定を担当している。ポリオウイルス分離同定、型内鑑別、遺伝子解析等の検査結果は、決められた期限内に、WHO 西太平洋地域事務局等への報告を行う。通常、西太平洋地域におけるポリオウイルスの分離同定結果については地域事務局で取りまとめられるが、野生株ポリオウイルスや VDPV の検出等、その後の速やかな対応が必要とされる検査情報に関しては、WHO 本部、地域事務局、RRL/GSL のネットワークにより、迅速かつ緊密な情報共有が図られる。

ポリオウイルス以外のエンテロウイルスの病原体サーベイランスについては、WHO 等世界規模の実験室ネットワークが公的には整備されておらず、その国・地域における疾患・病原体サーベイランスの情報を、どのように各国間で共有して利用するかについて、いまのところ定まった方

表3 世界各地におけるエンテロウイルス 71 感染症の流行

地域	発生時期	主要な臨床症状
米国	1969 - 1973	無菌性髄膜炎、脳炎
日本	1973	脳炎、無菌性髄膜炎、手足口病
ブルガリア	1975	脳炎、無菌性髄膜炎
ハンガリー	1978	脳炎、ポリオ様麻痺
オーストラリア	1986	脳炎
香港	1986	ポリオ様麻痺
マレーシア	1997	脳炎、手足口病
日本（大阪）	1997	脳炎、手足口病
台湾	1998	脳炎、手足口病
オーストラリア	1999	ポリオ様麻痺
韓国	2000	手足口病、脳炎、ポリオ様麻痺
日本（兵庫）	2000	手足口病、無菌性髄膜炎、脳炎
シンガポール	2000	手足口病、脳炎
台湾	2000 - 2001	手足口病、脳炎
ベトナム	2005	手足口病、脳炎
中国（安徽省、他）	2008	手足口病、脳炎
ベトナム	2008	手足口病、脳炎
台湾	2008	手足口病、脳炎
モンゴル	2008	手足口病
シンガポール	2008	手足口病

向性はない。

4. ポリオ実験室ネットワークの重要性

ポリオウイルス実験室ネットワークの中で、感染研 Enterovirus Collaborating Center が実際にどのような機能を果たしているのか、最近のいくつかの事例を挙げて説明する。

2005年11月から2006年1月にかけて、カンボジアのプノンペンおよびその近郊で発生した3例のAFP症例のうち2例から、3型ポリオウイルスが分離された。感染研での解析の結果、3型ポリオウイルス分離株は、 capsid VP1 領域の塩基配列が Sabin 3 株と比較して 2% 程度の変異を有する 3 型 VDPV であることが明らかとなった⁶⁻⁸⁾。カンボジアの 3 型 VDPV は WHO の基準による cVDPV と判定されたため、当該地域および周辺のハイリスク地域において複数回の OPV 接種キャンペーン（2006年3-5月）および強化サーベイランスを行った。その結果、2006年2月以降、cVDPV 伝播の継続がないことが確認された。本事例の場合、ウイルス分離同定、遺伝子解析、抗原性解析および TgPVR21 マウスを用いた神経病原性試験を感染研で実施した。そのため、検査結果を速やかに WHO 地域事務局およびカンボジア現地事務所と共有することにより的確かつ迅

速な対策が可能となった。

2007年7月、下肢麻痺を発症したパキスタン人留学生が、オーストラリア、メルボルンの病院に入院した。臨床診断からポリオが強く疑われたため、オーストラリア RRL において、各種臨床検体からのウイルス分離が行われ、その結果、1型ポリオウイルスが分離された³⁾。 capsid VP1 領域の遺伝子解析の結果、1型ポリオウイルス分離株は野生株ポリオウイルスであり、パキスタンの流行株と高い相同性を有することが明らかとなった。オーストラリア RRL における同定後、1型野生株分離株は、すぐに、GSL である感染研に送付され確認試験が行われた。その結果、RRL と GSL の解析結果は一致したが、この間、逐次、検査情報の共有が行われた。本事例は、ポリオフィアの西太平洋地域においても、常に流行地からの野生株ポリオウイルス輸入のリスクが存在することを示している。2007年に発効された改正国際保健規則（International Health Regulations; IHR）では、野生株によるポリオは、公衆衛生に深刻な影響を与える感染症として通告の対象となっており¹³⁾、本事例は IHR の枠組みにより WHO への通告が行われた。その後、オーストラリア RRL において、接触者等の病原体サーベイランスが行われたが、ポリオウイルスは検出されず、野生株ウイルス伝播は認められなかった。世界レベルの感

染症コントロールのためには、実験室ネットワークによる適切な実験室診断と情報共有の果たす役割が大きいことが再確認された。

5. エンテロウイルス実験室ネットワーク

感染研ウイルス第二部は、Enterovirus Collaborating Center として、エンテロウイルス感染症についてもレファレンス活動を実施しているが、エンテロウイルスの病原体サーベイランスに関する国際的実験室ネットワークは整備されておらず、大規模な手足口病流行の発生等、必要に応じその都度、対応が行われている。1990年代後半以降、西太平洋地域では、マレーシア、台湾、ベトナム、中国等において、EV71による大規模な手足口病流行時に、小児の急性死症例が多発し、公衆衛生上大きな問題となっている^{14,15)}(表3)。死亡原因の多くは、EV71の中枢神経感染による急性脳炎およびそれに起因する神経原性肺水腫であることが示され、手足口病および重症EV71感染症流行サーベイランスの重要性が増している。

2008年の3-6月を中心として、中国本土で大規模な手足口病流行が発生し、とくに安徽省では、短期間に20名以上の急性死症例が報告された¹⁵⁻¹⁷⁾。2008年の手足口病流行当初から、中国RRL等における病原体検査により、重症例の主要な原因ウイルスはEV71であることが示されており、中国RRLから、感染研へ検査方法と検査試薬に関する照会がなされた。同時に、西太平洋地域の他のポリオネットワーク実験室から、手足口病の検査試薬等の供給について、WHO地域事務局を介して、あるいは直接、感染研への依頼がなされた。調整の結果、感染研から、中国、ベトナム、モンゴルのネットワーク実験室に対して、同定用抗血清、病理組織免疫染色用抗体、遺伝子解析用プライマー等の送付を行った。モンゴル National Polio Laboratory は、エンテロウイルス同定の経験に乏しかったことから、感染研で一部の臨床検体を受け入れて、ウイルス分離同定・遺伝子解析を行った。その結果、2008年のモンゴルの手足口病の主要な原因ウイルスはEV71であったが、中国本土で多く検出されている subgenogroup C4ではなく^{16,18)}、C2であることが明らかとなった。

2008年は、中国、モンゴルだけでなく、台湾、ベトナム、シンガポール等でもEV71による手足口病流行が発生し、WHO西太平洋事務局において疫学情報の集約が行われた。地域内の病原体サーベイランス情報について、非公式の情報交換が継続していたが、2009年1月に、WHO、中国CDC、米国CDC共催により行われた Beijing International Symposium on Hand, Foot and Mouth Disease の場で、西太平洋地域の多くの国・地域における2008年の手足口病流行状況が報告され、地域全体の疫学情報の共有化の機会が持たれた。本シンポジウムでは、手足口病流行に関して多くの経験を有する台湾の専門家が多数招待され、有意義な技

術情報の交換が行われた。台湾と中国の技術交流は、西太平洋地域の感染症対策の観点から重要な意味を持つ。本会議の参加者の多くは、中国国内および西太平洋地域のポリオネットワークラボラトリーの専門家であり、同地域のポリオ実験室ネットワークが、エンテロウイルス感染症対策においても十分に機能していることが示された。

6. ポリオウイルス・エンテロウイルス実験室ネットワーク活動を基盤とした基礎研究の推進とその応用

本稿では、感染研 Enterovirus Collaborating Center の機能について、主としてポリオ・エンテロウイルス実験室ネットワークを基盤とした病原体サーベイランスの観点から解説した。我々は同時に Enterovirus Collaborating Center 活動の過程で、ポリオ・エンテロウイルス病原体サーベイランスにより得られた疫学情報やウイルス分離株を用いた基礎研究を積極的に進めている。

例えば、西太平洋地域で大規模な手足口病流行が発生した1997-1998年当時から、我々は、マレーシアや台湾のポリオ実験室と協力して、ウイルス分離同定・遺伝子解析を行い、EV71が急性脳炎流行に関与することを明らかにしてきた¹⁹⁻²³⁾。その後、西太平洋地域各地で分離されたEV71を用いることにより、EV71の遺伝的多様性を明らかにし、中枢神経病原性との関連について研究を行った^{19,21,24)}。カニクイザルやマウス感染モデルにより、EV71中枢神経病原性の分子的基盤を明らかにするとともに、エンテロウイルス感染症に対するワクチンや治療薬開発につながる研究を継続している²⁴⁻²⁹⁾。さらに、我々は、最近、世界に先駆けて、EV71特異的宿主受容体の同定に成功した。これらの研究成果は、ウイルス学的に重要な研究成果であるのみならず、新たなウイルス検査システム、ワクチン・治療薬の開発、ウイルス病原性発現機構の解明を通じて、ポリオ根絶計画やエンテロウイルス感染症の制御戦略への応用が期待できる。

7. おわりに

WHO Collaborating Center 活動の多くは、地道な実験室診断の積み重ねと検査結果を保証するための日常的な精度管理の継続であり、様々な枠組による国際的な技術協力が必要とされる。また、Collaborating Center 活動の基盤となるラボラトリーネットワークの整備と質的向上のためには、人的資源および技術的交流の継続性が要求される³⁰⁾。

本稿で紹介したWHO Collaborating Center 活動は、感染研ウイルス第二部第二室の、吉田弘主任研究官、有田峰太郎主任研究官、西村順裕主任研究官、和田純子さんを中心として行われているが、ウイルス第二部脇田隆字部長をはじめとした感染研内外からの幅広いご協力により、なんとか継続しているというのが、本当のところである。とくに、JICA 集団コースの実施にあたっては、JICA、WHO、

地方衛生研究所等から、多くの継続的なサポートを受けていることを申し添える。

文献

- 1) Hagiwara A, Yoneyama T, Yoshii K, Yoshida H, Shimizu H, Wada J, Thanh NT, Van Tu P, Miyamura T: Genetic analysis of wild polioviruses towards the eradication of poliomyelitis from the Western Pacific Region. *Jpn J Infect Dis* 52: 146-149, 1999.
- 2) Chiba Y, Murakami H, Kobayashi M, Shimizu H, Yoshida H, Yoneyama T, Miyamura T, Jingjin Y, Libi Z : A case of poliomyelitis associated with infection of wild poliovirus in Qinghai Province, China, in October 1999. *Jpn J Infect Dis* 53: 135-136, 2000.
- 3) Stewardson AJ, Roberts JA, Beckett CL, Prime HT, Loh PS, Thorley BR, Daffy JR: Imported case of poliomyelitis, Melbourne, Australia, 2007. *Emerg Infect Dis* 15: 63-65, 2009.
- 4) Shimizu H, Thorley B, Paladin FJ, Brussen KA, Stambos V, Yuen L, Utama A, Tano Y, Arita M, Yoshida H, Yoneyama T, Benegas A, Roesel S, Pallansch M, Kew O, Miyamura T: Circulation of type 1 vaccine-derived poliovirus in the Philippines in 2001. *J Virol* 78: 13512-13521, 2004.
- 5) Liang X, Zhang Y, Xu W, Wen N, Zuo S, Lee LA, Yu J: An outbreak of poliomyelitis caused by type 1 vaccine-derived poliovirus in China. *J Infect Dis* 194: 545-551, 2006.
- 6) Kew OM, Sutter RW, de Gourville EM, Dowdle WR, Pallansch MA: Vaccine-derived polioviruses and the endgame strategy for global polio eradication. *Annu Rev Microbiol* 59: 587-635, 2005.
- 7) WHO: Vaccine-derived polioviruses-update. *Wkly Epidemiol Rec* 81: 398-404, 2005.
- 8) 清水博之: ポリオウイルスとエンテロウイルスにおけるゲノム遺伝子組換え. *臨床とウイルス* 26: 149-158, 2008.
- 9) WHO: Polio laboratory manual (4th edition) (WHO/IVB/04.10), 2003.
- 10) WHO: Supplement to the WHO Polio Laboratory Manual (http://www.who.int/immunization_monitoring/Supplement_polio_lab_manual.pdf)
- 11) Kilpatrick DR, Yang CF, Ching K, Vincent A, Iber J, Campagnoli R, Mandelbaum M, De L, Yang SJ, Nix A, Kew OM: Rapid Group-, Serotype-, and Vaccine Strain-Specific Identification of Poliovirus Isolates by Real-Time Reverse Transcription PCR Using Degenerate Primers and Probes Containing Deoxyinosine Residues. *J Clin Microbiol* (in press)
- 12) Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA: Sensitive, semi-nested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J Clin Microbiol* 44: 2698-2704, 2006.
- 13) Wilder-Smith A, Leder K, Tambyah PA: Importation of poliomyelitis by travelers. *Emerg Infect Dis* 14: 351-352, 2008.
- 14) McMinn PC: An overview of the evolution of enterovirus 71 and its clinical and public health significance. *FEMS Microbiol Rev* 26: 91-107, 2002.
- 15) Qiu J: Enterovirus 71 infection: a new threat to global public health? *Lancet Neurol* 7: 868-869, 2008.
- 16) China CDC: Report on the HFMD in Anhui (http://www.wpro.who.int/NR/rdonlyres/591D6A7B-FB15-4E94-A1E9-1D3381847D60/0/HFMDC_CDC20080515ENG.pdf), 2008.
- 17) Qiu J: Viral Outbreak in China tests government efforts. *Nature* 458, 554-555, 2009.
- 18) Zhang Y, Tan XJ, Wang HY, Yan DM, Zhu SL, Wang DY, Ji F, Wang XJ, Gao YJ, Chen L, An HQ, Li DX, Wang SW, Xu AQ, Wang ZJ, Xu WB: An outbreak of hand, foot, and mouth disease associated with subgenotype C4 of human enterovirus 71 in Shandong, China. *J Clin Virol* 44: 262-267, 2009.
- 19) Shimizu H, Utama A, Yoshii K, Yoshida H, Yoneyama T, Sinniah M, Yusof MA, Okuno Y, Okabe N, Shih SR, Chen HY, Wang GR, Kao CL, Chang KS, Miyamura T, Hagiwara A: Enterovirus 71 from fatal and nonfatal cases of hand, foot and mouth disease epidemics in Malaysia, Japan and Taiwan in 1997-1998. *Jpn J Infect Dis* 52: 12-15, 1999.
- 20) Munemura T, Saikusa M, Kawakami C, Shimizu H, Oseto M, Hagiwara A, Kimura H, Miyamura T: Genetic diversity of enterovirus 71 isolated from cases of hand, foot and mouth disease in Yokohama City between 1982 and 2000. *Arch Virol* 148: 253-263, 2003.
- 21) Shimizu H, Utama A, Onnimala N, Li C, Li-Bi Z, Yu-Jie M, Pongsuwanna Y, Miyamura T: Molecular epidemiology of enterovirus 71 infection in the Western Pacific Region. *Pediatr Int* 46: 231-235, 2004.
- 22) Hamaguchi T, Fujisawa H, Sakai K, Okino S, Kurosaki N, Nishimura Y, Shimizu H, Yamada M: Acute Encephalitis Caused by Intrafamilial Transmission of Enterovirus 71 in Adult. *Emerg Infect Dis* 14: 828-830, 2008.
- 23) Mizuta K, Aoki Y, Suto A, Ootani K, Katsushima N, Itagaki T, Ohmi A, M. O, Nishimura H, Matsuzaki Y, Hongo S, Sugawara K, Shimizu H, Ahiko T: Cross-antigenicity among EV71 strains from different genogroups isolated in Yamagata, Japan, between 1990 and 2007. *Vaccine* (in press)
- 24) Nagata N, Shimizu H, Ami Y, Tano Y, Harashima A, Suzaki Y, Sato Y, Miyamura T, Sata T, Iwasaki T: Pyramidal and extrapyramidal involvement in experimental infection of cynomolgus monkeys with enterovirus 71. *J Med Virol* 67: 207-216, 2002.
- 25) Nagata N, Iwasaki T, Ami Y, Tano Y, Harashima A, Suzaki Y, Sato Y, Hasegawa H, Sata T, Miyamura T, Shimizu H: Differential localization of neurons susceptible to enterovirus 71 and poliovirus type 1 in the central nervous system of cynomolgus monkeys after intravenous inoculation. *J Gen Virol* 85: 2981-2989, 2004.
- 26) Arita M, Shimizu H, Nagata N, Ami Y, Suzaki Y, Sata T, Iwasaki T, Miyamura T: Temperature-sensitive mutants of enterovirus 71 show attenuation in cynomolgus monkeys. *J Gen Virol* 86: 1391-1401, 2005.
- 27) Arita M, Nagata N, Iwata N, Ami Y, Suzaki Y, Mizuta K, Iwasaki T, Sata T, Wakita T, Shimizu H: An attenu-

- ated strain of enterovirus 71 belonging to genotype a showed a broad spectrum of antigenicity with attenuated neurovirulence in cynomolgus monkeys. *J Virol* 81: 9386-9395, 2007.
- 28) Arita M, Ami Y, Wakita T, Shimizu H: Cooperative effect of the attenuation determinants derived from poliovirus sabin 1 strain is essential for attenuation of enterovirus 71 in the NOD/SCID mouse infection model. *J Virol* 82: 1787-1797, 2008.
- 29) Arita M, Wakita T, Shimizu H: Characterization of pharmacologically active compounds that inhibit poliovirus and enterovirus 71 infectivity. *J Gen Virol* 89: 2518-2530, 2008.
- 30) 岡本仁子, 永井美之: 「新興・再興感染症研究拠点形成プログラム」の現況と展望. *ウイルス* 57: 207-216, 2007.

Roles and Functions of WHO Enterovirus Collaborating Center

Hiroyuki SHIMIZU

Department of Virology II
National Institute of Infectious Diseases
4-7-1 Gakuen, Musashimurayama-shi
Tokyo 208-0011, Japan

The Laboratory of Enteroviruses of the Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, is functioning as a WHO-designated Collaborating Center for Virus Reference and Research (Enterovirus) in virus isolation and identification, development, evaluation, and quality control of new laboratory diagnosis methods, training technical staffs and experts, preparing, maintaining and supplying of standard reagents and reference materials for the laboratory diagnosis of enterovirus infections including poliomyelitis. The infectious agents surveillance of polioviruses is one of the critical components for the Global Polio Eradication Initiative, and the laboratory diagnosis of non-polio enteroviruses is also important in current outbreaks of hand, foot and mouth disease, mainly due to enterovirus 71. Thus, human resources and consistent international cooperation among technical staffs, based on the global and regional polio laboratory networks, are playing critical roles also in the surveillance activities for non-polio enterovirus infections in the Western Pacific Region.