

士で分離された EV71 分離株の分子疫学的解析およびウイルス学的解析は、きわめて重要である。本研究では、中国 CDC および感染研ウイルス第二部とのあいだの疫学および実験室診断技術に関する情報共有体制を基盤として、EV71 分離株の分子疫学的解析およびウイルス学的解析を行う。

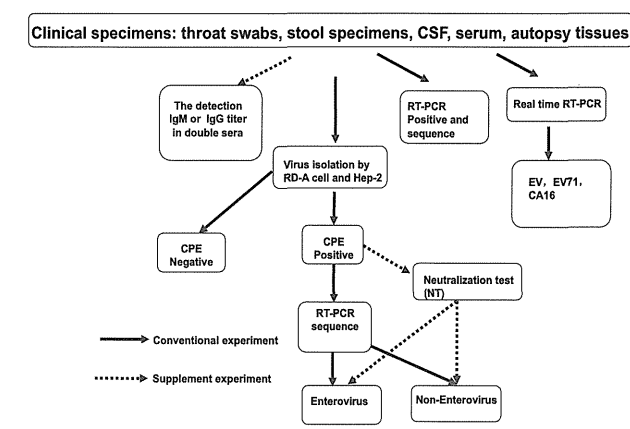
B. 研究方法

中国における手足口病流行および病原体サーベイランスに関する最新情報は、中国 CDC 側研究分担者である Dr Xu Wenbo および研究協力者である Dr Zhang Yong から情報提供を受けた。

中国では、2008 年以来、手足口病は全数報告対象感染症となっており、臨床診断による手足口病症例数が報告されている。手足口病実験室診断は、中国国内エンテロウイルス実験室ネットワークにおいて実施されており、咽頭拭い液や糞便等の臨床検体を用いた、培養細胞を用いたウイルス分離、RT-PCR 法、あるいは real-time PCR 法による遺伝子検出が行われている。中国における手足口病実験室診断フローの概要を以下に示す(図 1. Dr Xu Wenbo 提供資料)。

図 1

HFMD Cases Flow Chart for Laboratory Identification



中国 CDC において、手足口病患者から分離された EV71 および CA16 株について VP1 領域の塩基配列解析を行い、分子系統解析を行った。一部の EV71 および CA16 分離株については、非カプシド領域あるいは全ゲノム遺伝子解析を行い、ゲノム遺伝子組換えについて解析を行った。

現在、中国で分離された病原体の外国研究機関への分与は非常に困難であり、今回の共同研究においても、中国で

分離された EV71 株の分与を受けるのは非常に困難である。そのため、感染研ウイルス第二部では、現在中国で伝播している EV71 株(遺伝子型 C4)と分子系統学的な近縁な遺伝子型 C4 株を含む、これまで報告されている全ての遺伝子型の EV71 株を含む EV71 標準株パネルを作成し、遺伝子解析およびウイルス学的性状の解析を行った。

C. 研究結果

1) WHO 手足口病ガイドラインの作成・公開

1990 年代後半より、東アジア地域では、手足口病および EV71 感染によるものと考えられる中枢神経合併症重症例が頻発しているが、手足口病および重症例の症例定義、および、症例定義に基づく疾患および病原体サーベイランスが、かならずしも標準化されておらず、諸外国との疫学情報の比較は困難であった。そのため、WHO 西太平洋地域事務局、中国 CDC、台湾 CDC ベトナムパスツール研および NIHE 等からの専門家の協力の下、手足口病ガイドライン”A Guide to Clinical Management and Public Health Response for Hand Foot Mouth Disease (HFMD)”を作成した。本ガイドラインは、2011 年に公開され、手足口病、ヘルパンギーナ、および関連合併症の症例定義や標準的な実験室診断手法等に関する基盤情報の共有が可能となった。

2) 中国で分離された EV71 株の分子疫学解析

中国の手足口病患者から分離された EV71 分離株について VP1 領域の塩基配列解析を行い、分子系統解析を行った。2008 年の手足口病流行時、重症例が多発した安徽省の症例から検出された EV71 株は、VP1 領域の塩基配列に基づく分子系統解析により遺伝子型 C4 に分類された。中国各地で分離された EV71 株の分子系統解析を行ったが、すべての EV71 株は遺伝子型 C4 に分類されることが、これまでの研究で明らかになっている。

本年度は、中国全土で検出された EV71 分離株の、より詳細な分子疫学的解析を行い、1996~2012 年にかけて検出された EV71 分離株のうち、99.9%は遺伝子型 C4 に属することが確認された(添付資料 Figure 1)。しかし、今回の詳細な解析により、遺伝子型 C2 が山東省(1996 年)、遺伝子型 C3 が黒龍江省(1997 年)、遺伝子型 C5 が河南省の

小規模な流行事例(2010年)から検出されていることが明らかになった(添付資料 Figure 1)。

中国のEV71分離株の、より詳細な系等解析によると、中国の遺伝子型C4は、C4aとC4bに細分類される。遺伝子型C4b株は、1998～2004年にかけて深圳や上海等中国の一部地域で検出され、台湾やタイでも近縁株が報告されているが、中国では2005年以降検出されていない。遺伝子型C4a株は、遺伝子型C4b株と入れ替わるように、2003年以降出現し、現在中国全土で、ほぼ唯一のEV71遺伝子型として広範に伝播している(添付資料 Figure 2)。2007年以降、中国では重症EV71感染症症例からのEV71検出事例が増加しているが、これらの近年の重症例には遺伝子型C4a株が関与している。中国で分離された遺伝子型C4のEV71株と分子系統学的に近縁なEV71分離株は、中国本土以外の、台湾、日本、ベトナム等でも近年報告されている。他の地域では、異なる遺伝子型の流行・伝播が頻繁に認められるのに対し、中国本土で検出されるEV71株は、ほとんどすべて遺伝子型C4しか検出できない点は、中国で伝播しているEV71の分子疫学的特徴と考えられる。

3) EV71 遺伝子型標準株パネルの作成とウイルス学的性状の解析 (感染研ウイルス第二部)

現在報告されている11種類のEV71遺伝子型A、B1～B5およびC1～C5について、標準ウイルス株を収集した。従来、当室で、研究・検査等に使用し、論文として報告済みのEV71標準株(当室の責任で分与可)以外の標準株については、感染研から他の研究施設への研究目的での分与についての了解を得た上で、台湾CDC、韓国CDC、オランダRIVM、山形衛研等から分与を受けた。当室で新たにウイルスストックを調整するとともに、ウイルス力価やカプシド領域の塩基配列、EV71特異的受容体結合性等、基本的ウイルス学的性状を解析し、EV71遺伝子型標準株パネルとした。日本で分離されたC4株は、現在、中国本土で伝播しているC4株と分子系統学的に近縁であるため、受容体特異性等C4型のウイルス学的性状の解析に使用可能と考えられる。

感染研で作製したEV71標準株パネルを中国CDCに分与し、遺伝子検査による手足口病実験室診断に関する解析・評価・精度管理を行うための標準ウイルス株として利用するため、病原体送付に関わる手続きを2012年8月に開始した。中国への輸送承認手続きに時間を要し、2013年1

月に輸入許可書が発行され、現在も病原体輸送に関わる手続きが続けられている。

D. 考察および今後の研究方針

1990年代後半以降、東アジア地域で、小児急性死症例を含む重症EV71エンテロウイルス感染症の大規模な流行が多発し大きな社会問題となっているが、中国本土では、2008年以来、多数の死亡例を含む手足口病流行が報告されている。中国で近年伝播しているEV71分離株の分子疫学的解析を行ったところ、すべてのEV71株が、中国本土固有の遺伝子型C4に属することが明らかとなった。中国で分離された遺伝子型C4のEV71株と分子系統学的に近縁なEV71分離株は、中国本土以外の、台湾、日本、ベトナム等でも近年報告されている。他の地域では、異なる遺伝子型の流行・伝播が頻繁に認められるのに対し、中国本土で検出されるEV71株は、ほとんどすべて遺伝子型C4しか検出できない点は、中国で伝播しているEV71の分子疫学的特徴と考えられる。中国では現在、数施設により不活化EV71ワクチン開発が進められており、一部のワクチン候補については、現在、大規模な第Ⅲ相臨床試験が進められている。そのため、EV71の遺伝的多様性および異なる遺伝子型間の抗原性の違いについての解析が重要となる。

E. 研究発表

1. 論文発表 (分担執筆した報告書等を含む)

- 1) Burns CC, Shaw J, Jorba J, Bukbuk D, Adu F, Gumedé N, Pate MA, Abanida EA, Gasasira A, Iber J, Chen Q, Vincent A, Chenoweth P, Henderson E, Wannemuehler K, Naeem A, Umami RN, Nishimura Y, Shimizu H, Baba M, Adeniji A, Williams AJ, Kilpatrick DR, Oberste MS, Wassilak SG, Tomori O, Pallansch MA, Kew O. Multiple Independent Emergences of Type 2 Vaccine-Derived Polioviruses during a Large Outbreak in northern Nigeria. *J Virol* (in press)
- 2) Fukuhara M, Iwami S, Sato K, Nishimura Y, Shimizu H, Aihara K, Koyanagi Y. Quantification of the dynamics of enterovirus 71 infection by experimental-mathematical investigation. *J Virol* 87: 701-705, 2012
- 3) Nishimura Y, Shimizu H. Cellular receptors for human enterovirus species a. *Front Microbiol* 3: 105, 2012

- 4) Nakajima N, Kitamori Y, Ohnaka S, Mitoma Y, Mizuta K, Wakita T, Shimizu H, Arita M. Development of a transcription-reverse transcription concerted reaction method for specific detection of human enterovirus 71 from clinical specimen. *J Clin Microbiol* 50: 1764-1768, 2012
 - 5) Wong KT, Ng KY, Ong KC, Ng WF, Shankar SK, Mahadevan A, Radotra B, Su JI, Lau G, Ling AE, Chan KP, Macorelles P, Desai AS, Ravi V, Nagata N, Shimizu H, Takasaki T. Enterovirus 71 encephalomyelitis and Japanese encephalitis can be distinguished by topographic distribution of inflammation and specific intraneuronal detection of viral antigen and RNA in the central nervous system. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 38: 443-453, 2012
 - 6) Fujimoto T, Iizuka S, Enomoto M, Abe K, Yamashita K, Hanaoka N, Okabe N, Yoshida H, Yasui Y, Kobayashi M, Fujii Y, Tanaka H, Yamamoto M, Shimizu H: Hand, Foot, and Mouth Disease Caused by Coxsackievirus A6, Japan, 2011. *Emerg Infect Dis* 18: 337-339, 2012
 - 7) Sun Q, Zhang Y, Zhu S, Cui H, Tian H, Yan D, Huang G, Zhu Z, Wang D, Li X, Jiang H, An H, Xu W. Complete genome sequence of two coxsackievirus A1 strains that were cytotoxic to human rhabdomyosarcoma cells. *J Virol* 86: 10228-10229, 2012
 - 8) 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 2013 (印刷中)
 - 9) 清水博之: 手足口病、特集「感染症動向 2013」、*メディカル朝日* 1、28-30, 2012
 - 10) 清水博之: 手足口病の問題点. *小児科* 53: 751-758, 2012
 - 11) 増本久人、南亮仁、野田日登美、江口正宏、古川義朗、鶴田清典、中田恵子、左近(田中)直美、山崎謙治、高尾信一、Tao Zexin, Xu Aiqiang, Zhang Yong, Xu Wenbo, 藤本嗣人、花岡希、小長谷昌未、吉田弘、清水博之. 国内外における手足口病流行に関与するコクサッキーウイルスA6型の遺伝子解析. *病原微生物検出情報* 33: 60-61, 2012
 - 12) 藤本嗣人、花岡希、小長谷昌未、岡部信彦、榎本美貴、小林正明、吉田弘、清水博之. 2011年に手足口病患者から検出されたコクサッキーウイルスA6型の遺伝子配列. *病原微生物検出情報* 33: 61-62, 2012
 - 13) 武知茉莉亜, 乾未来, 福島若葉, 中野貴司, 清水博之. 手足口病・ヘルパンギーナおよび関連合併症の入院症例に関する全国調査(2010年分) —中間集計結果. *病原微生物検出情報* 33: 63-64, 2012
 - 14) 清水博之. 手足口病(エンテロウイルス71)ワクチン開発の現状. *病原微生物検出情報* 33: 65-66, 2012
 - 15) A Guide to Clinical management and Public Health Response for Hand Foot Mouth Disease (HFMD), WHO report, 2011 (分担執筆)
2. 学会発表等
- 1) 町田早苗、清水博之: 小児無菌性髄膜炎患者から検出されたエンテロウイルスの分子疫学的解析. 第60回 日本ウイルス学会学術集会. 大阪, 11月14日, 2012
 - 2) Shimizu H. Hand, foot, and mouth disease and Enterovirus 71 infection. NIID-China CDC meeting on Collaborative Research meeting, 21 November, Tokyo, 2012
 - 3) Shimizu H. Genetic and Phenotypic Diversity of Enterovirus 71. Current Progress in Enterovirus 71 Research in the Asia-Pacific Region, Tokyo, 30 August, 2012
 - 4) Lee H, Cifuentes JO, Carnegie MS, Markoff A, Conway J, Shimizu H, Tano Y, Nishimura Y, Hafenstein S. The cryoEM structure of EV71 bound by fragments of neutralizing antibody predicts a mechanism of neutralization by crosslinking and competition with PSGL-1. EUROPIC 2012. Saint Raphaël, France, 3-7 June, 2012
 - 5) Umami RN, Hosomi T, Nishimura Y, Shimizu H. Genetic analysis of PSGL-1-tropic enterovirus 71 isolates from clinical samples. EUROPIC 2012. Saint Raphaël, France, 3-7 June, 2012

Annual report of collaborative research-2012

1, C4a is the predominant genotype of HEV71 that circulated in mainland China

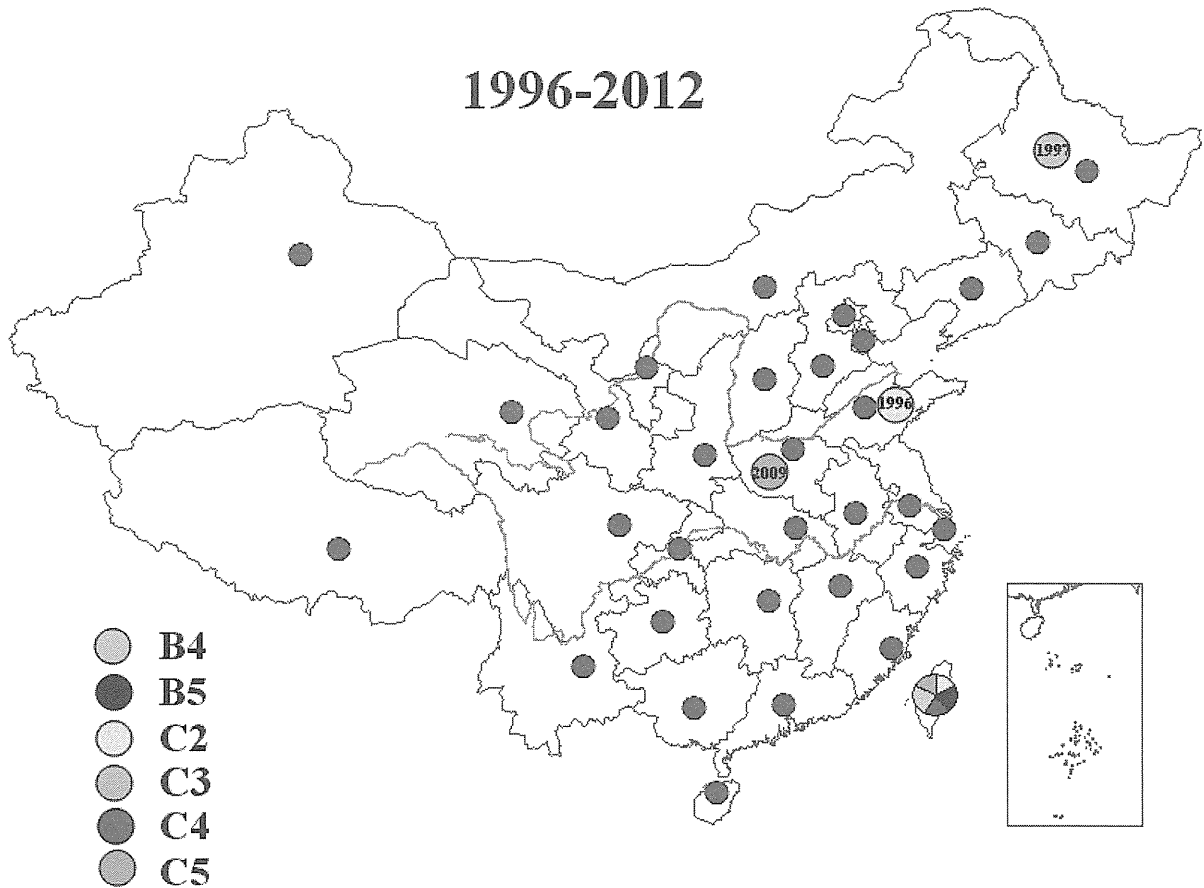


Figure 1, HEV71 genotypes distribution in mainland China

As in a previous study, all HEV71 isolates could be grouped into genotypes A, B, and C. Furthermore, the HEV71 isolates from mainland China (99.9%) clearly belonged to subgenotype C4, as did those collected from mainland China from 1998 to 2012. The sequences in subgenotype C4 could be further divided into C4a and C4b evolutionary branches, and the mean p -distance between these 2 evolutionary branches was 7.1% (Figure 1). The C4b evolutionary branch was found in Shenzhen and Shanghai during 1998–2004 as well as in Taiwan and Thailand. The mean p -distance within evolutionary branch C4b was 5.1%. Evolutionary branch C4a was found in mainland China beginning in 2003 and in Taiwan, Japan, Vietnam, and Thailand during the same period. The mean p -distance within evolutionary branch

C4a was 2.9%.

In addition, in a retrospective study, a C2 HEV71 strain (collected in 1996) was found in Shandong province, a C3 HEV1 (collected in 1997) was found in Heilongjiang province; in a recent study, a small endemic caused by C5 HEV71 (collected in 2010) was found in Henan province.

2, Two stages of HEV71 circulation have occurred in mainland China since 1998.

The molecular epidemiology of HEV71 in mainland China during the last 15 years (1998-2013) reflects the pattern of endemic circulation of subgenotype C4 viruses. To determine the molecular epidemiology of HEV71 strains associated with the HFMD epidemic in mainland China, a phylogenetic dendrogram was constructed.

It was clearly showed that there were 2 stages of HEV71 circulation in mainland China between 1998 and 2012, and a shift from evolutionary branch C4b to C4a occurred during 2003–2004. In the first stage, from 1998 to 2004, HEV71 isolates from Shenzhen and Shanghai belonged to evolutionary branch C4b, which was seldom associated with high morbidity and mortality and has now disappeared. Almost concurrent with the disappearance of evolutionary branch C4b, evolutionary branch C4a emerged and has spread since 2003. It continued to evolve for 4 years before beginning to cause high morbidity and mortality in 2007 and has become the predominant HEV71 type circulating in mainland China (Figure 2).

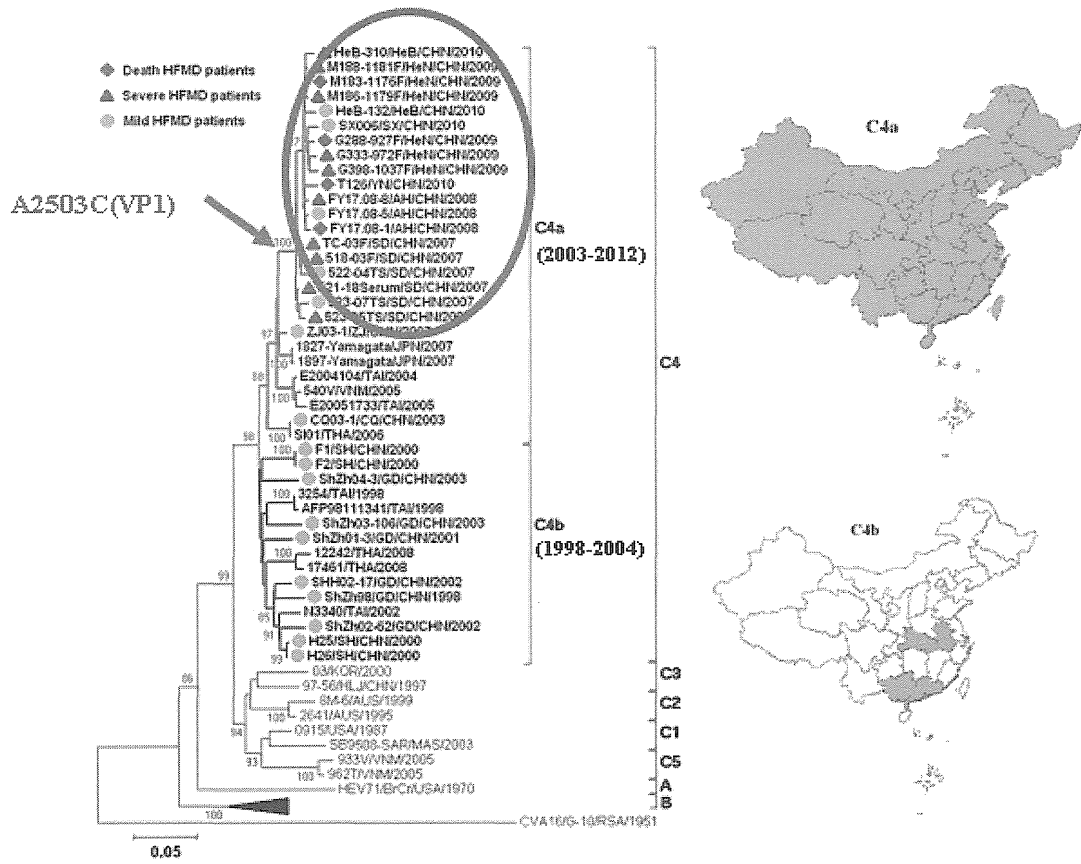


Figure 2, Two stages (C4a and C4b) of HEV71 circulation have occurred in mainland China since 1998

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）

アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進と
共同研究体制の強化に関する研究

レジオネラと肺炎球菌の分子疫学

研究分担者	倉 文明	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	前川純子	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	常 彬	国立感染症研究所	細菌第一部

研究要旨：レジオネラ症の主要起因菌である *Legionella pneumophila* について、分子疫学的手法である sequenced-based typing (SBT) 法は有用である。肺炎球菌についても分子疫学解析に Multi Locus Sequencing Typing (MLST) 法は有用である。MLST 法/SBT 法は結果が ST 型で示されるので、菌株間の異同の確認が容易で、データベース化され、世界規模でのデータが蓄積してきている。日本、中国両国の分離株についても MLST 法/SBT 法による比較が可能である。

Molecular epidemiology of *Legionella pneumophila* and *Streptococcus pneumoniae*

Research member	Fumiaki Kura	Department of Bacteriology I, NIID
Research collaborator	Junko Amemura-Maekawa	Department of Bacteriology I, NIID
Research collaborator	Bin Chang	Department of Bacteriology I, NIID

Legionella pneumophila is a major causative agent of legionellosis (mainly as *Legionella pneumoniae*) and *Streptococcus pneumoniae* causes meningitis, bacteremia, and also pneumonia. Sequence-based typing (SBT) and Multi Locus Sequencing Typing (MLST) are two similar methods and useful for molecular epidemiology analysis of *Legionella pneumophila* and *Streptococcus pneumoniae*, respectively. The specific sequence types (STs) for each strain around the world given by MLST/SBT methods as digital numbers have been compiled in databases. Comparing STs among isolates derived from different patients and/or areas in Japan and China becomes realistic, speedy, and easy in hard settings of delivering bacteria between different countries.

A. 研究目的

レジオネラ症はレジオネラ属菌を起因菌とした呼吸器感染症で、日本では入浴施設においてしばしば集団感染事例が起きる。諸外国ではホテルの給湯設備や、空調の冷却塔水などによる集団感染事例が報告されている。レジオネラ症の感染源を明らかにするためには患者から分離された菌株と感染源と推測される環境水から分離された菌株の異同を確認する必要がある。Sequence Based Typing (SBT) 法はレジオネラ症の主要な起因菌である *Legionella pneumophila* の遺伝子型別法だが、デジタルデータであるため、年代、場所を超えた比較が容易であるため近年広く普及している。

昨年度は日本各地の冷却塔から独立に得られた *L. pneumophila* 血清群 1 分離株 65 株について SBT を行った結果を報告した。今年度は新たに 13 株の冷却塔由来分離株の ST 型を調べ、さらに由来による違いがみられるかどうか噴水・修景水由来の 11 株、シャワー水 6 株についても調べた。

肺炎球菌は肺炎などの呼吸器感染症において最も高頻度に分離される病原細菌のひとつであり、臨床上極めて重要な細菌である。本菌の構成成分である莢膜は複合多糖体で構成され、これによって血清型が決定される。2011 年現在では、肺炎球菌は 93 種類の血清型に分離された。近年、同一血清型の肺炎球菌を分類するため、Multi Locus Sequencing Typing (MLST) 法が広く使われている。本年度は小児侵襲性感染症患者から分離された肺炎球菌 86 株の MLST を調べた。

B. 方法

EWGLI (European Working Group for *Legionella* Infections) の方法 (<http://www.ewgli.org/>) に従って、*flaA*、*pilE*、*asd*、*mip*、*mompS*、*proA*、*neuA* 遺伝子の一部の領域の塩基配列に基づく型別 (SBT) を行い、遺伝子型を決定した^{1,2)}。*flaA* は鞭毛 (flagellin) タンパク質、*pilE* は IV 型線毛 (type IV pilin) タンパク質、*asd* はスレオニン生合成系酵素であるアスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (aspartate-b-semialdehyde dehydrogenase)、*mip* は宿主マクロファージへの感染に寄与する (macrophage infectivity potentiator) タンパク質、*mompS* は主要外膜タンパク質 (major outer membrane protein)、*proA* は亜鉛メタロプロテアーゼ (zinc metalloprotease)、*neuA* は N-アシルノイラミン酸シチジルトランスフェラーゼ (*N*-acetylneuraminic acid cytidyltransferase) をそれぞれコードする遺伝子である。7 遺伝子の遺伝子型が決まった分離株を EWGLI のデータベース³⁾に登録すると、新しい遺伝子型の組み合わせについては ST (sequence type) ナンバーが付与される。

肺炎球菌の MLST では、分離株の 7 つ Housekeeping gene (*aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt*, *ddl*) の配列を決定し、<http://spneumoniae.mlst.net> にて検索を行い、Sequence type (ST) を決定した。7 つ遺伝子のうち、5 つ以上の遺伝子が同じである場合、同一の Clonal Complex (CC) に分類する。

C. 研究結果

今年度解析した *L. pneumophila* 血清群 1 分離株の遺伝子型別の結果を表 1 に示した。冷却塔関連株 13 株のうち、6 株が ST1 となり、昨年度の 77% より頻度は低かったものの主要な遺伝子型が ST1 である傾向は変わらなかった。噴水・修景水については 11 株中 9 株が ST1 となり、冷却塔水由来株とよく似た傾向を示すことがわかった。シャワー水分離株 6 株のうち ST1 は 1 株のみで、遺伝子型の分布が冷却塔水由来株や噴水・修景水由来株とは異なっていた。

86 株肺炎球菌のうち、2 株はデータベースに登録されていない新規 ST タイプであった。肺炎球菌は血清型によって、違った ST 型を示すことが多く見られた。血清型 15A、15B、15C、9V 肺炎球菌は、同じ ST 型ないしその近縁にある ST 型 (同じ CC に属する) を示した (表 2)。一方、同一な血清型にもかかわらず、多様な ST 型を示す血清型が多かった。世界中多くの地区から分離される ST 型 (血清型 3 型の ST180、15A 型の ST63、19F 型の ST236、23F 型の ST224、6B 型の ST90 など) は日本での分離も見られた。日本国内の分離株のみが登録された ST 型もあった (血清型 19A 型の ST2331 と ST3111、14 型の ST5240)。欧米や韓国などで 7-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) が導入された以後に分離率の増加が見られた ST320 型 19A 肺炎球菌⁴⁾は日本国内からも多数が分離された (7 株)。

D. 考察

日本のレジオネラ症の半数近くの感染源が入浴施設と推定されているが、言い換えれば、半数以上は感染源が不明であり、入浴施設以外の感染源についても注意を払う必要がある。今年度解析した冷却塔水、噴水・修景水、シャワー水からの分離株の遺伝子型の多くは臨床分離株からも見出されるものであり、レジオネラ症の感染源となる危険があり、十分な衛生管理が必要である。

SBT 法は、データベース化が容易であり、異なる時期、場所での結果の比較が可能である。2013 年 2 月 18 日現在、レジオネラ SBT データベースに 6,862 株の *L. pneumophila* の遺伝子型が登録されているが、そのうち日本由来の分離株は 405 株、中国由来の分離株は 224 株となっており、特にこの 1、2 年の中国からの登録数は増えている。中国からの登録のほとんどは環境分離株で、臨床分離株は香港からの登録のみであり、臨床からの分離は今後協調して取り組んでいきたい中国側の課題である。

肺炎球菌感染において、最も重要な病原因子が莢膜であるため、血清型別は疫学調査には不可欠な方法となっている。しかし、MLST 解析は同一血清型を示す肺炎球菌をさらに分類できる方法で、得られた ST 型は肺炎球菌の遺伝情報を示し、異なる地域や時期に分離された肺炎球菌の違いを比較できる再現性の良い方法である。また、肺炎球菌においては、MLST 法は PCV7 ワクチン導入後の Capsular switching (ワクチンに含まれる血清型の肺炎球菌の莢膜遺伝子が非ワクチン血清型の遺伝子と置き換わる現象)⁴⁾を観測できる有効な方法である。中国においても 2009

年に PCV7 ワクチンが導入されていたが、侵襲性感染症を含む肺炎球菌感染症の実態およびワクチンの効果が不明である。中国側の肺炎球菌感染症由来株の血清型と共に MLST の疫学調査および日本の分離株との比較は今後取り組んでいく課題である。

E. 結論

MLST 法/SBT 法により、分離株の遺伝子型別・比較が容易に行えるようになった。データベースも完備しているので、世界各国の菌株との比較が容易である。

謝辞

今回解析した分離株を分与くださった縣邦雄・井上浩章（アクアス株式会社）、猪又雄子（東京都健康安全研究センター）、江川 武・佐々木林子（文京保健所）、清水 寧（北九州市環境科学研究所）、高瀬佳彦（荒川区保健所）、山本一成（新潟市衛生環境研究所）、吉野修司（宮崎県衛生環境研究所）（敬称略）の諸氏に感謝いたします。

F. 参考文献

- 1) Gaia, V, Fry, NK, Afshar, B, Lück, PC, Meugnier, H, Etienne, J, Peduzzi, R, and Harrison, TG. 2005. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. J. Clin. Microbiol. 43:2047-52.
- 2) Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK, Lück PC. 2007. Addition of *neuA*, the gene

encoding N-acetylneuraminyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. J. Clin. Microbiol. 45:1965-8.

- 3) http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php
- 4) Pillai DR, Shahinas D, Buzina A, Pollock RA, Lau R, Khairnar K, Wong A, Farrell DJ, Green K, McGeer A, and Low DE. 2009. Genome-wide dissection of globally emergent multi-drug resistant serotype 19A *Streptococcus pneumoniae*. BMC Genomics 10:642.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Amemura-Maekawa J, Kikukawa K, Helbig JH, Kaneko S, Suzuki-Hashimoto A, Furuhashi K, Chang B, Murai M, Ichinose M, Ohnishi M, Kura F; Working Group for *Legionella* in Japan. 2012. Distribution of monoclonal antibody subgroups and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates derived from cooling tower water, bathwater, and soil in Japan. Appl Environ Microbiol. 12:4263-70.
- 2) Tomohiro Oishi, Naruhiko Ishiwada, Kousaku Matsubara, Junichiro Nishi, Bin Chang, Kazuyo Tamura, Yukihiro Akeda,

Toshiaki Ihara, Moon H. Nahm, Kazunori Oishi, the Japanese IPD Study Group. Low opsonic activity to the infecting serotype in pediatric patients with invasive pneumococcal disease. *Vaccine*. 31:845–849, 2013.

2. 学会発表

1) Junko Amemura-Maekawa, Fumiaki Kura, Hiroyuki Tawara, Yuko Watanabe, Junko Isobe, Shinobu Tanaka, Hiroshi Nakajima Shuji Yoshino, Shinjiro Abe, Takako Misaki, Tomoe Shimada, Taku Wakui, Yuki Tada, Makoto Ohnishi. Grouping of

clinical isolates of *Legionella pneumophila* SG1 in Japan, using SBT analysis and environmental habitats. ESGLI 2012 (1st Meeting of the ESCMID Study Group for *Legionella* Infections), Dresden, Germany, Sep. 2012.

2) 成相昭吉、常彬。2012年。7価肺炎球菌結合型ワクチン接種普及による乳幼児下気道感染症例の上咽頭から検出された肺炎球菌株における血清型および遺伝子型の変化。第16回日本ワクチン学会学術集会。横浜、2012年11月。

表1 *L. pneumophila* 血清群1環境分離株の遺伝子型別

NIB番号	由来	由来	検体採取日	CFU	ST	flaA	pilE	asd	mip	mompS	proA	neuA	ST備考
NIB2709	冷却塔水	新潟市	2006.6.30	180	986	1	14	16	16	15	13	2	新規遺伝子型
NIB2710	冷却塔水	新潟市	2006.7.26	400	986	1	14	16	16	15	13	2	新規遺伝子型
NIB2711	冷却塔水	新潟市	2006.8.8	560	1	1	4	3	1	1	1	1	国内外の臨床・環境で多数
NIB2712	冷却塔水	新潟市	2007.8.3	1000	1008	1	4	3	1	1	41	1	新規遺伝子型
NIB2713	冷却塔水	新潟市	2007.8.3	980	1	1	4	3	1	1	1	1	国内外の臨床・環境で多数。日本では特に冷却塔水
NIB2714	冷却塔水	新潟市	2007.10.12	12000	1	1	4	3	1	1	1	1	国内外の臨床・環境で多数。日本では特に冷却塔水
NIB2715	冷却塔水	新潟市	2008.7.22	40	48	5	2	22	27	6	10	12	土壌最多、冷却塔水1、温泉水1、浴槽水(水道水)1(以上国内)。ヨーロッパでは臨床・環境有り
NIB2716	冷却塔水	新潟市	2008.8.11	280	1008	1	4	3	1	1	41	1	新規遺伝子型
NIB2717	冷却塔水	新潟市	2008.8.11	20	1	1	4	3	1	1	1	1	国内外の臨床・環境で多数。日本では特に冷却塔水
NIB2718	冷却塔水	新潟市	2008.8.12	2800	1	1	4	3	1	1	1	1	国内外の臨床・環境で多数。日本では特に冷却塔水
NIB2765	冷却塔水	福岡市	2000.6.7	739	12	8	11	2	10	12	2	1	国内臨床1株・環境2株
NIB2766	噴水	福岡市	2001.8.13	1	1	4	3	1	1	1	1	1	国内外の臨床・環境株多数
NIB2767	噴水	福岡市	2001.8.14	1	1	4	3	1	1	1	1	1	国内外の臨床・環境株多数
NIB2768	噴水	福岡市	2001.8.15	876	2	3	6	15	51	1	6	1	国内臨床2株
NIB2753	噴水	宮城県	2004.4.12	1	1	4	3	1	1	1	1	1	国内外の臨床・環境株多数
NIB2769	修景水	福岡市	2003.3.5	1	1	4	3	1	1	1	1	1	国内外の臨床・環境株多数
NIB2770	修景水	福岡市	2003.3.5	1	1	4	3	1	1	1	1	1	国内外の臨床・環境株多数
NIB2771	修景水	福岡市	2003.3.19	1	1	4	3	1	1	1	1	1	国内外の臨床・環境株多数
NIB2772	修景水	福岡市	2003.3.19	1	1	4	3	1	1	1	1	1	国内外の臨床・環境株多数
NIB2773	修景水	福岡市	2003.8.6	1	1	4	3	1	1	1	1	1	国内外の臨床・環境株多数
NIB2774	修景水	福岡市	2003.8.13	1	1	4	3	1	1	1	1	1	国内外の臨床・環境株多数
NIB2725	修景水	新潟市	2007.8.27	493	3	13	1	28	14	9	11	1	国外で臨床2、環境1
NIB2833	公衆浴場シャワー水	荒川区	2011.11.9	1	1	4	3	1	1	1	1	1	国内外の臨床・環境株多数
NIB2823	公衆浴場シャワー水	荒川区	2011.10.18	1144	2	10	15	12	9	14	11	1	新規
NIB2649	公衆浴場シャワー水	文京区	2009.10.29	954	3	6	1	10	14	11	6	1	新規(感染源として臨床分離株と一致)
NIB2740	冷却塔補給水(水道水)	東京都	2010.8.23	55	1385	6	21	33	19	41	1	1	新規遺伝子型
NIB2686	冷却塔水(患者関連、一致せず)	福岡市	2010.10.6	1	1	4	3	1	1	1	1	1	国内外の臨床・環境で多数。日本では特に冷却塔水
NIB2845	シャワー水	茨城県	2011.10.25	20	1008	1	4	3	1	1	41	1	国内冷却塔水
NIB2848	シャワー水	茨城県	2011.9.27	310	256	6	10	14	5	39	14	9	国内臨床1、国外臨床多
NIB2850	シャワー水	茨城県	2011.9.30	20	22	2	3	6	10	2	1	6	国外臨床環境、国内土壌

表2. 日本国内小児侵襲性感染症患者から分離された肺炎球菌の ST 型

血清型	ST	<i>aroE</i>	<i>gdh</i>	<i>gki</i>	<i>recP</i>	<i>spi</i>	<i>xpt</i>	<i>ddl</i>	CC
1	5239	12	8	13	5	16	336	20	
3	8458	7	372	2	10	6	1	22	CC180
	180	7	15	2	10	6	1	22	
4	695	16	13	4	4	6	113	18	
14	343	8	8	4	15	39	12	14	
	2922	1	5	4	5	5	20	8	
	5240	5	19	2	17	6	22	14	
	5240	5	19	2	17	6	22	14	
	5240	5	19	2	17	6	22	14	
	5240	5	19	2	17	6	22	14	
	5240	5	19	2	17	6	22	14	
38	393	10	43	41	18	13	49	6	
	6429	8	175	40	1	6	234	270	
10A	1263	15	13	4	16	6	1	17	
15A	7773	15	13	4	4	6	1	17	CC1263
	63	2	5	36	12	17	21	14	
	63	2	5	36	12	17	21	14	
	63	2	5	36	12	17	21	14	
	63	2	5	36	12	17	21	14	
	63	2	5	36	12	17	21	14	
	63	2	5	36	12	17	21	14	
	63	2	5	36	12	17	21	14	
	63	2	5	36	12	17	21	14	
	63	2	5	36	12	17	21	14	
	63	2	5	36	12	17	21	14	
8459	2	9	36	16	17	21	14	CC63	
8459	2	9	36	16	17	21	14	CC63	
新規 ST 型	2	5	36	12	17	新規	14	CC63	
15B	199	8	13	14	4	17	4	14	
	199	8	13	14	4	17	4	14	
	199	8	13	14	4	17	4	14	
新規 ST 型	8	13	14	5	30	4	14	CC199	
15C	199	8	13	14	4	17	4	14	
	199	8	13	14	4	17	4	14	
	199	8	13	14	4	17	4	14	
	199	8	13	14	4	17	4	14	
	199	8	13	14	4	17	4	14	
	199	8	13	14	4	17	4	14	
	199	8	13	14	4	17	4	14	
19A	320	4	16	19	15	6	20	1	
	320	4	16	19	15	6	20	1	
	320	4	16	19	15	6	20	1	
	320	4	16	19	15	6	20	1	
	320	4	16	19	15	6	20	1	
	320	4	16	19	15	6	20	1	
	320	4	16	19	15	6	20	1	
	320	4	16	19	15	6	20	1	
	320	4	16	19	15	6	20	1	
	320	4	16	19	15	6	20	1	
	320	4	16	19	15	6	20	1	
	2331	10	16	150	1	17	1	29	
	3111	61	60	67	16	10	104	14	
	3111	61	60	67	16	10	104	14	
	3111	61	60	67	16	10	104	14	
	3111	61	60	67	16	10	104	14	
	3111	61	60	67	16	10	104	14	
	3111	61	60	67	16	10	104	14	
	3111	61	60	67	16	10	104	14	
	3111	61	60	67	16	10	104	14	
	3111	61	60	67	16	10	104	14	
3111	61	60	67	16	10	104	14		
3111	61	60	67	16	10	104	14		
3111	61	60	67	16	10	104	14		
3111	61	60	67	16	10	104	14		
3111	61	60	67	16	10	104	14		
3111	61	60	67	16	10	104	14		
3111	61	60	67	16	10	104	14		
3111	61	60	67	16	10	104	14	CC3111	
19F	236	15	16	19	15	6	20	26	
	236	15	16	19	15	6	20	26	
	236	15	16	19	15	6	20	26	
22F	433	1	1	4	1	18	58	17	
	433	1	1	4	1	18	58	17	
	433	1	1	4	1	18	58	17	
	433	1	1	4	1	18	58	17	
	433	1	1	4	1	18	58	17	
23F	7158	7	12	1	1	10	1	14	
	242	15	29	4	21	30	1	14	
	242	15	29	4	21	30	1	14	
3543	1	32	4	6	6	1	14		
35B	7809	18	12	4	44	14	469	97	
	7809	18	12	4	44	14	469	97	
6A	282	30	4	2	4	4	1	1	
	282	30	4	2	4	4	1	1	
6B	90	5	6	1	2	6	3	4	
	90	5	6	1	2	6	3	4	
	5830	5	6	1	2	6	1	42	CC90
	6415	5	6	1	2	6	403	4	CC90
2224	7	12	7	1	116	14	29		
6410	7	6	4	2	10	28	14		
8733	12	205	208	16	197	268	6		
6C	5241	7	9	8	6	1	6	384	
	5241	7	9	8	6	1	6	384	
	5241	7	9	8	6	1	6	14	
	6183	1	5	2	173	6	1	384	
	280	15	17	4	16	6	1	17	
9V	280	15	17	4	16	6	1	17	
	280	15	17	4	16	6	1	17	
	5231	15	17	4	148	6	1	17	CC280

厚生労働科学研究費 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進と共同研究体制の
強化に関する研究 (H23-新興-指定-020)

(分担)研究報告書

Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome (SFTS: 重症発熱性血小板減少症)の
実験室診断法に関する研究

研究分担者 森川 茂 国立感染症研究所獣医科学部

研究要旨： 2009年に中国で発生した重症発熱性血小板減少症(SFTS)の原因ウイルスは、
ブニヤウイルス科フレボウイルス属の新種のウイルス(SFTS ウイルス: SFTSV)であること
が中国 CDC によって報告された。SFTSV を媒介するフタトゲチマダニは中国のみならず、
日本を含めアジア、太平洋地域に広く生息している。今年度は、組み換え SFTSV 核蛋白質
を抗原とした ELISA および間接蛍光抗体法による SFTSV 抗体の検出法を用いて、シカを
中心とした血清疫学調査を実施した。これまでに、シカ血清を用いて検査系の評価を行っ
た。

研究協力者：福士秀悦、福間藍子、吉河智
城、谷英樹、下島昌幸、西條政幸（国立感
染症研究所ウイルス第一部）、新倉綾（同、
実験動物管理室）

A 研究目的

2009年3月から7月にかけて、中国湖北
省と河南省の山岳地域に住む農民の間で、
発熱、血小板減少、胃腸症状、白血球減少
を示す急性の疾患としてSevere Fever
with Thrombocytopenia Syndrome
(SFTS: 重症発熱性血小板減少症候群)が報告
された。当初、*Anaplasma*
*phagocytophilum*などの細菌感染による顆
粒球アナプラズマ症が疑われたが、細菌感

染は検出されず原因は不明であった。中国
疾病防疫センター(CDC)によって、患者末
梢血サンプルからのウイルス分離が試みら
れ、2011年、新種のSFTSウイルス(SFTSV)
の感染が原因であることが報告された。そ
の後の疫学調査でSFTSの高い致死率(感染
患者の約12%が死亡)が明らかになり、
ヒトからヒトへの感染事例も報告されたこ
とから、公衆衛生上重要なウイルス感染症
の一つとして注目されている。

中国CDCにより行われた調査では、
SFTS 流行地域の *Haemaphysalis*
longicornis (フタトゲチマダニ) の5.4%
がRT-PCR陽性であった。フタトゲチマダ
ニは中国だけではなく、日本を含めアジア、

太平洋沿岸の多くの地域に生息し、ヒツジ、ウシ、ネズミなど多くの哺乳動物を宿主としている。このため、日本を含め、広い地域でSFTSV感染サーベイランスを行う必要性がある。

そこで、今年度は、SFTSV 核蛋白に対する抗体検出法を確立し、日本の野外動物における血清疫学調査を開始し、検査法の検証を含めて検討した。また、SFTSV-GP シュードタイプ VSV を作製した。

B 研究方法

バキュロウイルス発現系による SFTSV NP 調製

SFTSV NP を発現するバキュロウイルスを昆虫細胞 Tn5 に感染後、細胞から組換え SFTSV NP を精製した。

哺乳動物細胞での SFTSV NP 発現

SFTSV NP cDNA を哺乳動物細胞発現ベクター pKS336 にクローニングし、HeLa 細胞にトランスフェクションし、ブラストサイジンで SFTSV NP 発現細胞細胞を選択した。細胞浮遊液をスライドガラス上に塗布し乾燥、固定させ間接蛍光抗体法 (IFA) 用抗原とした。

ウサギ抗 SFTSV NP 血清

バキュロウイルス発現系で調整、精製した SFTSV NP をウサギに免疫して得られた抗 SFTSV NP 血清を血清検査法の陽性対照とした。

SFTSV-GP シュードタイプ VSV

SFTS ウイルス GP 発現プラスミドを作製し、シュードタイプ VSV を調整した。このシュードタイプの感染域を調べた。

C 結果

組み換え SFTSV NP とウサギ抗 SFTSV NP 血清との反応

バキュロウイルス発現系を用いて調整した組換え SFTSV NP を免疫して得られたウサギ抗 SFTSV NP 血清と組換え SFTSV NP との ELISA 及び IFA での反応性を調べた結果、同じフレボウイルスに属するリフトバレー熱ウイルスの NP に対するウサギ抗血清 (抗 RVFV NP) や、他のウイルスの NP に対するウサギ抗血清 (抗 CCHFV NP, 抗 LASV NP, 抗 JUNV NP) などは SFTSV の NP に反応せず、抗 SFTSV NP 血清のみが反応したことから特異度が高かった。

SFTSV NP 特異的 ELISA の野生動物への適用

組み換え SFTSV NP を抗原とした IgG-ELISA を野生動物に適用するため、これまでに採取されたシカの血清を用いて検討した。その結果、陰性対照抗原に対する非特異反応が強くてた。二次血清として抗シカ IgG-HRPD と protein A/G-HRPD を比較した結果、前者を採用することとした。予備的に 96 血清を用いて ELISA を実施した結果、血清の 100 倍希釈での OD 値の分

布が 0 から 0.3 であった。OD 値の分布からは陽性検体はないと判断された。なお、これらの血清は北海道から九州で捕獲されたシカから採取されたものである。

SFTSV NP 特異的 IFA の野生動物への適用

SFTSV NP を HeLa 細胞で発現させ、細胞塗抹標本をアセトン固定し IFA 抗原とした。ウサギ anti-SFTSV NP は SFTSV NP 発現 HeLa 細胞に特異的に反応し、抗体価 2560 倍であった。RVFV とは交差が認められなかった。本 IFA によりシカ血清を調べた結果すべてが陰性であった (20 倍未満)。

SFTSV-GP シュードタイプ VSV

SFTSV-GP シュードタイプ VSV を調整し、感受性細胞を調べた。その結果、SFTS ウイルス感受性細胞である Vero E6, DH82 細胞に効率よく感染した。一方一部のリンパ球系細胞には感染しなかった。

D 考察

SFTS はその高い致死率と、ヒト-ヒト感染を起こす可能性があることから、公衆衛生上重要なウイルス感染症である。SFTSV を媒介するフタトゲチマダニは中国のみならず日本全国に分布し、多くの野外動物、家畜を宿主とすることから、我が国においてもマダニ類が SFTSV あるいは近縁のウイルスを保有するかどうか調査することが必要である。今年度の予備的調査では野生動物から抗体陽性動物は見出されていない。

しかし、国内で SFTS 患者が発生したこと、その遺伝子解析等から、遺伝子検出法、特にダニからの検出に必要な高感度な遺伝子検出法の開発が必要ながわかった。国内患者が発生したことから、国内にウイルスが存在することが明らかになったが、野生動物からの抗体陽性が見出されていないことは矛盾するように思われる。これは、シカがウイルスに感染しにくいこと、NP に対する抗体応答が感染動物では高いこと、調べた動物の捕獲されたい地域にはウイルスが分布しないことなどが考えられる。また、ウイルスを用いずに迅速に中和抗体を検出するために SFTSV-GP シュードタイプ VSV を調整した結果、SFTS ウイルスと同様の細胞感染性を示した。今後、よりハイスループットな中和試験法を開発し、疑い患者や動物等からの抗体検出がより確実に行える体制を整備する予定である。

一方、本研究班の枠組みの中で日中韓で協議を重ねた結果、2012 年 11 月に中国 CDC から SFTS ウイルスが分与された。来年度は、組み換え抗原とウイルス抗原との比較も行い、より感度、精度の高い血清診断法を確立したい。

E 結論

(1) 組み換え抗原による血清診断法をシカなどに適用するための検討を行った。予備的な調査では抗体陽性動物は見いだせていない。

(2) SFTSV を用いない中和抗体測定法を開発するため SFTSV-GP シュードタイプ VSV を調整した。

(3) 中国 CDC から SFTS ウイルスが分与された。

F. Summary of the research

Severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS), emerged in 2009 in China, has been reported by China CDC to be caused by a novel virus, named SFTS virus (SFTSV), belonging to family *Bunyaviridae*, genus *Phlebovirus*. SFTSV is mainly transmitted by ticks, especially *H. longicornis*, in China. The tick species is widely distributed in China, Japan and other Asian and the Pacific regions. We have prepared recombinant nucleoprotein based ELISA and immunofluorescent antibody assay and applied them to detect SFTSV specific antibodies in Japanese deer. At the moment, antibody positive animals are not found in the assay.

G. 研究発表

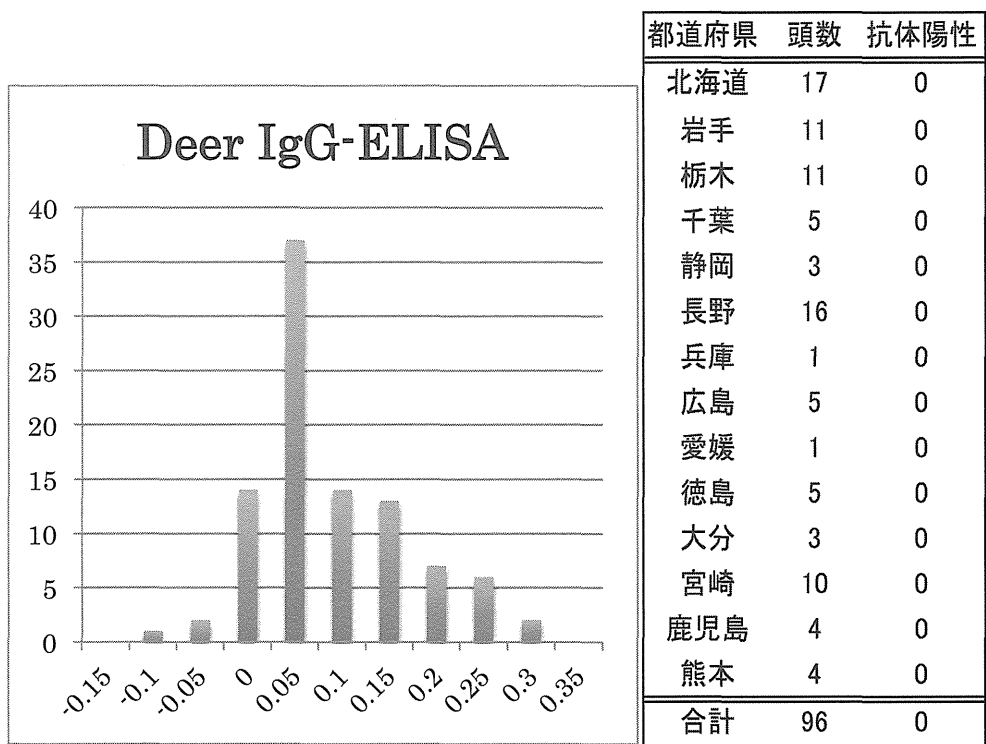
1. 論文発表

1) Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzaki Y, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Fukushi S, Mizutani T, Yoshikawa T, Otsuki N, Kurane I, Komase K, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Takeda M, Morikawa S. Lethal Canine Distemper Virus Outbreak in Cynomolgus Monkeys in Japan in 2008. *J Virol.* 2013, 87(2):

1105-1114

- 2) Neekun Sharma, Akitoyo Hotta, Yoshie Yamamoto, Osamu Fujita, Akihiko Uda, Shigeru Morikawa, Akio Yamadaa, Kiyoshi Tanabayashia . Detection of *Francisella tularensis*-specific antibodies in patients with tularemia using a novel competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical and Vaccine Immunology*, *in press*
- 3) Satoshi Taniguchi, Yusuke Sayama, Noriyo Nagata, Tetsuro Ikegami, Mary E Miranda, Shumpei Watanabe, Itoe Iizuka, Shuetsu Fukushi, Tetsuya Mizutani, Yoshiyuki Ishii, Masayuki Saijo, Hiroomi Akashi, Yasuhiro Yoshikawa, Shigeru Kyuwa and Shigeru Morikawa. Analysis of the humoral immune responses among cynomolgus macaque naturally infected with Reston virus during the 1996 outbreak in the Philippines. *BMC Veterinary Research*, 2012 Oct 11;8(1):189.
- 4) Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa. Serological assays based on recombinant viral proteins for the diagnosis of arenavirus hemorrhagic fevers. *Viruses*, 2012 Oct 12;4(10):2097-114. (special issue: Arenaviruses).
- 5) Harutaka Katano, Seiichi Sato, Tsuyoshi Sekizuka, Akiko Kinumaki, Hitomi

- Fukumoto, Yuko Sato, Hideki Hasegawa, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo, Tetsuya Mizutani, Makoto Kuroda. Pathogenic characterization of a cervical lymph node derived from a patient with Kawasaki disease. *Int J Clin Exp Pathol* 2012;5(8):814-823
- 6) Sayama Y, Demetria C, Saito M, Azul RR, Taniguchi S, Fukushi S, Yoshikawa T, Iizuka I, Mizutani T, Kurane I, Malbas FF Jr, Lupisan S, Catbagan DP, Animas SB, Morales RG, Lopez EL, Dazo KR, Cruz MS, Olveda R, Saijo M, Oshitani H, Morikawa S. A seroepidemiologic study of Reston ebolavirus in swine in the Philippines. *BMC Vet Res*. 2012 Jun 18;8:82.
- 7) Lihoradova O, Kalveram B, Indran SV, Lokugamage N, Juelich TL, Hill TE, Tseng CT, Gong B, Fukushi S, Morikawa S, Freiberg AN, Ikegami T. The dominant-negative inhibition of double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR increases the efficacy of Rift Valley fever virus MP-12 vaccine. *J Virol*. 2012 Jul;86(14):7650-61.
- 8) Fukushi S, Nakauchi M, Mizutani T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Antigen-capture ELISA for the detection of Rift Valley fever virus nucleoprotein using new monoclonal antibodies. *J Virol Methods*. 2012 Mar;180(1-2):68-74.
- 9) Arai S, Gu SH, Baek LJ, Tabara K, Bennett SN, Oh HS, Takada N, Kang HJ, Tanaka-Taya K, Morikawa S, Okabe N, Yanagihara R, Song JW. Divergent ancestral lineages of newfound hantaviruses harbored by phylogenetically related crocidurine shrew species in Korea. *Virology*. 2012 Mar 15;424(2):99-105.
- 10) Kennedy JS, Gurwith M, Dekker CL, Frey SE, Edwards KM, Kenner J, Lock M, Empig C, Morikawa S, Saijo M, Yokote H, Karem K, Damon I, Perlroth M, and Greenberg RN. Safety and Immunogenicity of LC16m8, an Attenuated Smallpox Vaccine in Vaccinia-Naive Adults. *J Inf Dis* 2011, 204(9):1395-402
- 11) Shirato K, Maeda K, Tsuda S, Suzuki K, Watanabe S, Shimoda H, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Kyuwa S, Endoh D, Matsuyama S, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Yoshikawa Y, Akashi H, Mizutani T. Detection of bat coronaviruses from *Miniopterus fuliginosus* in Japan. *Virus Genes*. 2012 Feb;44(1):40-4.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
該当なし
 2. 実用新案登録
該当なし
 3. その他
該当なし



都道府県	頭数	抗体陽性
北海道	17	0
岩手	11	0
栃木	11	0
千葉	5	0
静岡	3	0
長野	16	0
兵庫	1	0
広島	5	0
愛媛	1	0
徳島	5	0
大分	3	0
宮崎	10	0
鹿児島	4	0
熊本	4	0
合計	96	0

図1. 予備的なシカの抗体調査結果

「Molecular analysis and control of acute respiratory virus infections」

分担研究者 松山州徳 国立感染症研究所 ウイルス第三部四室

研究要旨

我々は、急性呼吸器感染症 (ARI) の検査に利用するための、ウイルス高感受性細胞の作成を試みている。数種の ARI ウイルス (インフルエンザ、メタニューモ、コロナ) は肺に特異的に発現している膜貫通型セリンプロテアーゼ TMPRSS2 を利用して細胞に感染することが報告されている。我々は、TMPRSS2 の発現した Vero 及び HeLa 細胞を作成し、既存のヒトコロナウイルス (229E、NL63、SARS) と新型コロナウイルス (HCoV-EMC) に対する感受性を比較した。TCID₅₀、ウイルス増殖、感染細胞の免疫染色を行ったが、いずれのウイルスでも TMPRSS2 発現細胞の方が非発現細胞よりも感受性が高かった。特に新型コロナウイルスでは 100 倍もの高い感受性が見られた。またウイルス増殖が非常に低いと考えられている NL63 において、51 倍の増殖が見られた。TMPRSS2 細胞はコロナウイルスの研究とサーベイランスの分野に貢献できるものと考えられる。

A. 研究目的

急性呼吸器感染症 (ARI) は小児死亡原因の第一位であり、世界では毎日 5,000 人の子供が死亡しているといわれている。多くの ARI ウイルスは咳を介して感染することから感染力が強く、瞬く間に世界中に広がる可能性を内包している。このような感染症に立ち向かうために、我々研究者は国際的なネットワークを構築し、情報を交換できる環境をつくることが必要不可欠であると考え。我々は中国 CDC のインフルエンザ研究センターと連絡をとり、ARI の共同研究体勢の構築を試みている。

ARI ウイルスの研究を難しくしている原因は様々あるが、その一つは、肺胞の性質を維持している良い培養細胞株が無いことにある。培養細胞で増殖が不可能なウイルスは研究が遅れる傾向がある。ヒト肺胞上皮細胞の初代培養は比較的難しく、数代の継代で肺胞の性質が無くな

ってしまうことが知られている。最新の培養法を用いれば、肺胞の性質とインフルエンザウイルスの感受性を維持したまま長時間培養できることが報告されているが、極めて特殊な技術であることに加え高価であり、簡単に扱えるものではない。また、Calu-3 や MRC5 等のよく研究に利用されている肺胞由来の細胞株は、肺胞の性質をある程度維持しており、低いながら様々な ARI ウイルスに感受性があるが、増殖が遅く性状が不安定であり、培養も難しい。肺胞の性質を維持しつつ扱いやすい培養細胞があれば、新たな ARI ウイルスの分離や既存の ARI ウイルスの基礎研究が劇的に進展することが期待できるだけでなく、病原体診断やサーベイランスの分野でも利用できるはずである。我々は様々なウイルスに対して感受性の高い Vero 細胞を用い、ARI ウイルスの感受性がより高くなるように改良を行う。

B. 研究方法

TMPRSS2 発現細胞と非発現細胞を HeLa と Vero 細胞で作成し、様々なヒトコロナウイルス (229E、NL63、OC43、SARS、EMC) を感染させ、細胞変性効果、TCID50、ウイルス増殖を比較した。また、細胞変性を示さなかった NL63 については、抗スパイク蛋白抗体を用いて免疫染色をおこない、感染価を比較した。

C. 研究結果

HCoV-EMC は TMPRSS2 非発現細胞では感染48時間で細胞のラウンディングが起こるのに対し、発現細胞では 16 時間程度で、著しく大きい細胞融合が見られた(図B)。同じ感染価のウイルスを用いて TCID50 で比較した場合、TMPRSS2 発現細胞ではウイルス感受性が 100 倍程度高くなっていた(表)。しかしウイルスの増殖は数倍程度の上昇が見られるのみであった。著しい細胞融合活性がウイルス増殖を阻害していると考えられる。

SARS-CoV については、既に 2010 年に報告している結果と同様であるが、TMPRSS2 発現細胞で、TCID50は7.9倍、ウイルス増殖は2.5倍であった(表)。

鼻風邪、上気道炎のコロナウイルス NL63 については、細胞変性効果は見られなかったが、免疫染色(図A)による感染細胞の計測結果 (FFU)では TMPRSS2発現細胞では51倍感受性が高くなっていた(表)。

また他の鼻風邪、上気道炎コロナウイルス

229E には 1966 年に分離され、長年研究室で継代されているラボ株と、2008 年に分離された臨床株があるが、ラボ株で 1.4 倍、臨床株で 11.5 倍の HeLa/TMPRSS2 での感受性が見られた(表)。

さらに、鼻風邪、上気道炎コロナウイルスの OC43 は HeLa では全く細胞変性効果が見られなかったが HeLa/TMPRSS2 では細胞の浮遊が見られた。感受性細胞として知られる RD 細胞との比較では、HeLa/TMPRSS2 の方が 10 倍程度ウイルス感受性が高くなっていた(表)。

D. 考察

コロナウイルスのスパイク蛋白の活性化にはプロテアーゼが必要と考えられており、本研究で用いた細胞では TMPRSS2 がスパイクを活性化したと考えられる。生体内のウイルスは肺胞特異的なプロテアーゼ、特に TMPRSS2 を利用して感染すると考えられるので、生体内にあるウイルスそのものを分離するためには、TMPRSS2 発現細胞を使うことが望ましいと思われる。

E. 結論

HeLa 及び Vero の TMPRSS2 発現細胞はコロナウイルスの分離に有効な細胞である。

F. 研究発表

無し

G. 知的所有権の取得状況

無し