

## 厚生労働科学研究費補助金

### 平成 24 年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 (アジア指定研究)

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

Epidemiology of HFMD and genetic characterization of HEV71 and CVA16

手足口病の疫学とエンテロウイルス 71 およびコクサッキーウイルス A16 の遺伝子解析

研究分担者：	清水博之	国立感染症研究所 ウイルス第二部
研究分担者：	Xu Wenbo	Chinese Center for Disease Control and Prevention
研究協力者：	Zhang Yong	Chinese Center for Disease Control and Prevention

#### 研究要旨

中国本土では、2008 年以来、多数の死亡例を含む手足口病あるいはエンテロウイルス 71 (EV71) 感染症の流行が報告されている。2010 年には、中国全土で 900 例以上の手足口病死亡例が発生し、公衆衛生上の大きな問題となっている。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、中国で伝播している EV71 分離株の分子疫学的解析を行ったところ、ほとんどの EV71 分離株が、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。中国の遺伝子型 C4 は、1998-2013 年にかけて検出されているが、より詳細には C4b (1998-2004 年) と C4a (2003-2012 年) に分類される。中国本土で検出される EV71 株のほとんどすべてが遺伝子型 C4 である点は、中国および東アジア地域における EV71 ワクチン開発にとって重要な疫学的特徴と考えられる。

#### A. 研究目的

手足口病は、発疹を特徴とした発熱性疾患で、予後の良い一般的なエンテロウイルス感染症のうちの 1 つである。しかし、1990 年代後半以降、とくに東アジア地域で、エンテロウイルス 71 (EV71) による小児の急性死症例を含む重症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。1990 年代後半には、マレーシアおよび台湾で EV71 脳炎による多数の死亡例を伴う大規模な手足口病流行が発生し、2000 年代に入ってから、シンガポール、オーストラリア、香港、ベトナム、日本等アジア各国で、EV71 等による手足口病流行が報告されている。中国本土では、2008 年に手足口病の大流行が発生し、126 例の死亡例が報告された。重症例・死亡例の多くで EV71 が検出されており、重症例の臨床像は、台湾等における EV71 急性脳炎症例と類似していた。中国本土では、その後も、重症例を伴う手足口病流行が継続し、2009 年および 2010 年には、それぞれ、353 例および 905 例の死亡例が報告されており、公衆衛生上の大きな問題となっている。

EV71 の伝播様態を解析するため、また、強い神経病原

性を有する特定の遺伝子型の EV71 が伝播している可能性を検討するため、EV71 分離株の分子系統学的解析が進められている。カプシド VP1 領域の塩基配列をもとにした分子系統解析によると、近年、東アジア地域で分離された EV71 は、すべての分離株が、2 種類の遺伝子型である genogroup B および genogroup C に大きく分かれ、さらに B1~B5 および C1~C5 に細分類される。1990 年代後半以降、おもに、B3 および B4、C1 および C2 が、東アジアの多くの地域で分離されており、1997 年のマレーシア、1998 年の台湾における EV71 脳炎をともなう大規模な手足口病流行では、それぞれ、B3 および C2 が主要な流行株であった。中国の手足口病重症例からは遺伝子型 C4 が検出され、2008 年以降の中国の EV71 株は、ほとんど C4 であるとされているが、詳細については、引き続き解析が必要とされる。

東アジアの多くの地域からは、多様な遺伝子型を有し、かつ、他の地域で分離されるウイルスと分子疫学的関連性の高い EV71 が多く分離されている。EV71 分離株の分子系統解析によると、特定の EV71 遺伝子型と疾患の重篤化との明確な関連性は認められていないが、多数の重症例・死亡例を伴う大規模な手足口病流行が発生している中国本

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。

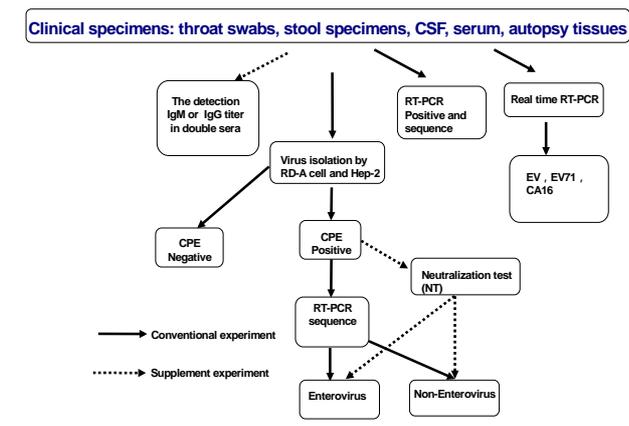
## B. 研究方法

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 年以來、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 ベトナムパストゥール研および 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 が黒竜江省(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關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