

厚生労働科学研究費補助金

平成 25 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た。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、多くの 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。中国で検出される EV71 株のほとんどすべては遺伝子型 C4 であるが、PSGL-1 受容体特異性や抗原性の変化に関与するカプシド VP1 アミノ酸の一部 (VP1-145 等) は、高度のアミノ酸多様性を有していた。EV71 遺伝子型に反映されない少数のカプシドアミノ酸変異により、EV71 のウイルス学的性状が大きく変化することが示唆された。

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 型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土で分離された 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。

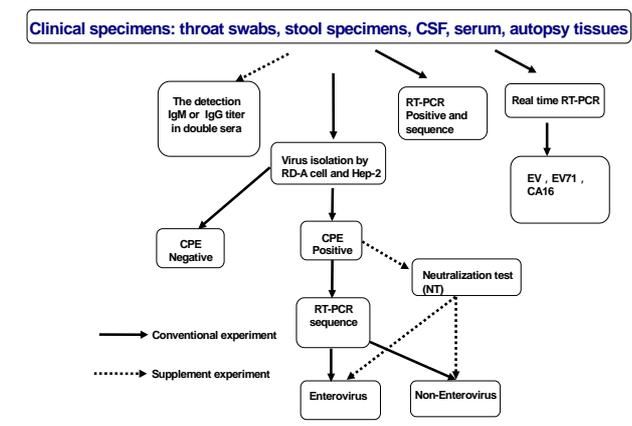
B. 研究方法

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、手足口病は、2008 年 5 月より、全国レベルのサーベイランスによる全数届出対象疾患となり、2008～2012 年の期間で、約 720 例の手足口病症例が報告された。手足口病報告例のうち、約 3.7%について実験室診断が行われた。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)。

図 1

HFMD Cases Flow Chart for Laboratory Identification



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 株の分与を受けることは出来なかった。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 標準株パネルを作成し、遺伝子解析、および、受容体特異性・抗原

性等のウイルス学的性状の解析を行った。

C. 研究結果

1) 中国で分離された EV71 株の分子疫学解析

手足口病サーベイランスにより得られた中国全土の EV71 分離株の分子疫学的解析を行い、1996～2012 年にかけて中国で検出された EV71 分離株のほとんどが遺伝子型 C4 に属することが確認された。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。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(2011～2013 年)、カンボジア(2012 年)等でも近年報告されており、ベトナムおよびカンボジアでは、死亡例を含む EV71 感染症重症例の流行に関与している。

2) 異なる EV71 遺伝子型株のウイルス学的性状の解析

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 標準株以外の標準株については、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。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を調整し、中国 CDC へ分与した。EV71 標準株パネル中、日本で分離された C4 株(75-Yamagata 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ことから、遺伝子型 C4 標準株として受容体特異性等ウイルス学的性状の解析に用いた。

EV71 分離株には、リンパ球特異的宿主受容体 PSGL-1 に結合する株、結合しない株が存在する。Jurkat 細胞を用いた PSGL-1 依存性増殖の解析により、EV71 標準株パネルでは、EV71 プロトタイプ株 (BrCr-A 株)、Nagoya-B1 株、02363-C1 株等が、PSGL-1 非結合株 (Non-PB 株) と同定された (表 1)。また、C7-Osaka-B4 株、KED005-C1 株等が PSGL-1 結合株 (PB 株) であることが明らかとなった。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 75-Yamagata-C4 株は PB 株と同定された。PB 株および Non-PB 株の EV71 のカプシド領域のアミノ酸配列のアライメントにより、多くの PB 株では VP1-98E/145G がみられ、一方、Non-PB 株では VP1-98K/145E が多く認められることが明らかとなり、VP1-98/145 は、PSGL-1 受容体結合性を規定する重要なアミノ酸であることが示唆された。感染性クローン由来 PB 株および Non-PB 株を用いたその後の解析により、PSGL-1 受容体結合性を規定する主要なアミノ酸は VP1-145 であること、VP1-145G あるいは VP1-145Q を有する EV71 株は PSGL-1 に結合すること、また、VP1-145E を有する EV71 は PSGL-1 に結合しないことが明らかとなった。EV71 結晶構造では VP1-145 はウイルス表面で VP1-244 リシンと隣接し、リシン側鎖の向きに影響すると推測された。VP1-145 のアミノ酸の種類がスイッチとなり VP1-244 リシン側鎖の向きを変え、PSGL-1 結合性を制御すると考えられる。

表1 異なる遺伝子型のEV71標準株のPSGL-1受容体結合性

Strain (genogroup)	PSGL-1-binding	VP1-98	VP1-145
BrCr (A)	Non-PB	K	R
Nagoya (B1)	Non-PB	E	E
Taiwan (B1)	Non-PB	E	E
02363 (C1)	Non-PB	K	E
209-VN (C5)	Non-PB	K	E
11316 (B2)	PB	E	Q
SK-EV006 (B3)	PB	E	G
C7/Osaka (B4)	PB	E	G
2972-Yamagata (B5)	PB	E	G
KED005 (C1)	PB	E	G/Q
1095 (C2)	PB	E	G
KOR-EV71-01 (C3)	PB	K/E	E
75-Yamagata (C4)	PB	E	Q

3) EV71 カプシド PV1 amino acid polymorphism とウイルス学的性状の関連性

異なる受容体特異性を有する EV71 標準株パネルを用い

た解析により、PSGL-1 受容体結合性を規定する主要なアミノ酸は VP1-145 であることが明らかとなった。現在、多くの EV71 分離株のカプシド VP1 遺伝子情報が、データベースに報告されているため、ウイルス学的性状に寄与する可能性が高いアミノ酸部位の PV1 amino acid polymorphism を解析した。データベース上の EV71 分離株のカプシド塩基配列解析によると、VP1-145E を有する EV71 株の頻度がもっとも高く、VP1-145G あるいは VP1-145Q も認められたが、VP1-145E と比較すると検出頻度は低かった (表 2)。以上の結果から、Non-PB 株の頻度が高いものの、VP1-145G あるいは VP1-145Q を有する PB 株も、ある程度の頻度で認められることが明らかとなった。VP1-145 は、VP1 領域の中では、高頻度の変異により多様性を有するアミノ酸部位であり、アミノ酸多様性と受容体特異性の関連性について、今後の検討が必要とされる。中国で近年分離されている EV71-C4 株のほとんどは VP1-145E を有しており、中国の EV71 株の多くは Non-PB 株であることが示唆される。しかし、頻度は低いものの、VP1-145G/Q 株の検出も報告されており、VP1-145 の多様性とその意義について、さらなる解析が必要とされる。

表2 データベース上のEV71株におけるPSGL-1受容体結合部位 (VP1-98/VP1-145)のamino acid polymorphism (1701株)

98	145					
	G	Q	E	R	K	A
E	156	155	1209	2	5	5
K	0	0	161	1	0	0
Q	0	0	2	0	0	0
N	0	0	1	0	0	0
G	0	0	1	0	0	0

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、ほぼすべての 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・伝播が頻り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。

PSGL-1 受容体結合性を規定する主要なアミノ酸は VP1-145 であり、VP1-145 のアミノ酸の種類がスイッチとなり VP1-244 リシン側鎖の向きを変え、PSGL-1 結合性を制御することが明らかとなった。VP1-244 リシンは、ほとんどの EV71 分離株で保存されているが、VP1-145 は高頻度に変異し、高度のアミノ酸多様性を有している。我々は最近、VP1-98/145 が EV71 中和抗体結合に關与する主要な抗原エピトープのひとつであることを明らかにした。このことは、EV71 遺伝子型に反映されない、ひとつ、あるいは、数個のカプシドアミノ酸変異により、抗原性や受容体特異性等 EV71 のウイルス学的性状が大きく変化することを示唆している。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いる。一部のワクチン候補については、現在、臨床試験が終了し、近い将来の導入が期待されている。EV71 の遺伝的・ウイルス学的多様性および抗原性の違いについての解析が、今後のワクチン開発・導入にとって重要となる。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimizu H, Nakashima K. Surveillance of hand, foot, and mouth disease for a vaccine. *Lancet Infect Dis.* (in press) 2014
- 2) Yasui Y, Makino T, Hanaoka N, Shimizu H, Kanou K, Kobayashi M, Konagaya M, Fujimoto T. A Case of Atypical Hand-Foot-and-Mouth Disease Caused by Coxsackievirus A6: Differential Diagnosis from Varicella in a Pediatric Intensive Care Unit, *Jpn J Infect Dis* 66, 564-566, 2013
- 3) Lee H, Cifuentes JO, Ashley RE, Conway JF, Makhov AM, Tano Y, Shimizu H, Nishimura Y, Hafenstein S. A

Strain-Specific Epitope of Enterovirus 71 Identified by Cryo-Electron Microscopy of the Complex with Fab from Neutralizing Antibody. *J Virol*; 87(21): 11363-11370. 2013

- 4) Nishimura Y, Lee H, Hafenstein S, Kataoka C, Wakita T, Bergelson JM, Shimizu H. Enterovirus 71 Binding to PSGL-1 on Leukocytes: VP1-145 Acts as a Molecular Switch to Control Receptor Interaction. *PLoS Pathog*;9(7):e1003511. 2013
- 5) Hovi T, Paananen A, Blomqvist S, Savolainen-Kopra C, Al-Hello H, Smura T, Shimizu H, Nadova K, Sobotova Z, Gavrilin E, Roivainen M. Characteristics of an Environmentally Monitored Prolonged Type 2 Vaccine Derived Poliovirus Shedding Episode that Stopped without Intervention. *PLoS One*;8(7):e66849. 2013
- 6) Kobayashi, M., Makino, T., Hanaoka, N., Shimizu, H., Enomoto, M., Okabe, N., Kanou, K., Konagaya, M., Oishi, K., Fujimoto, T. Clinical manifestations of coxsackievirus a6 infection associated with a major outbreak of hand, foot, and mouth disease in Japan. *Jpn J Infect Dis* 66, 260-261, 2013
- 7) 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* 87: 4907-4922, 2013
- 8) Arita M, Kojima H, Nagano T, Okabe T, Wakita T, Shimizu H. Oxysterol-binding protein (OSBP) family I is the target of minor enviroxime-like compounds. *J Virol* 87: 4252-4260, 2013
- 9) Khamrin P, Thongprachum A, Kikuta H, Yamamoto A, Nishimura S, Sugita K, Baba T, Kobayashi M, Okitsu S, Hayakawa S, Shimizu H, Maneekarn N, Ushijima H. Three clusters of Saffold viruses circulating in children with diarrhea in Japan. *Infect Genet Evol* 13: 339-343, 2013
- 10) 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, 2013
- 11) 清水博之: 手足口病の大規模流行と原因ウイルス. *日本医事新報* 4673, 56-57, 2013
- 12) 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, 2013

2. 学会発表等

- 1) Shimizu H. Hand, Foot, and Mouth Disease and

- infectious agent surveillance in Japan. International Workshop on Hand, Foot and Mouth Disease. Hanoi, Vietnam, 4-5 April, 2013
- 2) Shimizu H. Molecular Epidemiology and Virulence (viral) factors of EV71. International Workshop on Hand, Foot and Mouth Disease. Hanoi, Vietnam, 4-5 April, 2013
 - 3) Shimizu H. Current status of hand, foot, and mouth disease outbreaks and EV71 infection in Japan and Asian countries, The 7th China-Korea-Japan Forum on Communicable Disease Control and Prevention, Beijing, China, 25 November, 2013
 - 4) 有田峰太郎、小島宏建、長野哲雄、岡部隆義、脇田隆字、清水博之: OSBP ファミリーI は minor enviroxime 様化合物の標的である。第61回日本ウイルス学会学術集会。神戸市、11月10~12日、2013
 - 5) 西村順裕、Hyunwook Lee、Susan Hafenstein、片岡周子、脇田隆字、Jeffrey M. Bergelson、清水博之: エンテロウイルス71と受容体PSGL-1との結合: VP1-145は受容体特異性を制御する分子スイッチである。第61回日本ウイルス学会学術集会。神戸市、11月10~12日、2013
 - 6) 潮田和佳、小谷治、岩田奈織子、鈴木忠樹、中島典子、長谷川秀樹、清水博之、永田典代: コクサッキーウイルス B2 実験室株脳内接種後のマウスにおける水頭症の発症機序。第61回日本ウイルス学会学術集会。神戸市、11月10~12日、2013
 - 7) 飯塚節子、清水博之: RD-A 細胞を用いた Human enterovirus A の分離。第61回日本ウイルス学会学術集会。神戸市、11月10~12日、2013
 - 8) 片岡周子、西村順裕、鈴木忠樹、小谷治、岩田奈織子、永田典代、網康至、清水博之: 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。第61回日本ウイルス学会学術集会。神戸市、11月10~12日、2013
 - 9) 小谷治、Naeem Asif、鈴木忠樹、岩田奈織子、中島典子、片野晴隆、長谷川秀樹、田口文広、清水博之、永田典代: 新生仔マウスを用いた Saffold virus 小脳継代株の作出とその病原性の解析。第61回日本ウイルス学会学術集会。神戸市、11月10~12日、2013
 - 10) 小谷治、Naeem Asif、鈴木忠樹、岩田奈織子、中島典子、片野晴隆、細見卓司、塚越博之、長谷川秀樹、田口文広、清水博之、永田典代: 新生仔マウスを用いた Saffold virus (SAFV) 患者由来株の病原性の比較解析。岐阜市、9月20~22日、2013
 - 11) 清水博之: アジアにおける手足口病とエンテロウイルス感染症流行の現状。第87回日本感染症学会学術講演会・第61回日本化学療法学会総会合同学会、シンポジウム「世界的視野でみる感染症疫学とその対策」。横浜市、6月5日、2013