

学的事項に関して研究所間の太いきずなが維持されていく努力を行っていく必要がある。

感染症の伝播には国境はない。いつどのような病原体の勃発、その拡散が起こるか予期できない。その発生を迅速に検知するためにも、近隣諸国との連携、および病原体の検出技術の標準化が重要である。幸いにも我が国は科学的にも技術的にもアジア諸国のなかでは先んじている。我が国がリーダーシップをとり、アジア諸国の感染症対応の責任を担う国立の研究機関とのネットワークを構築し、人的、技術的な交流を深めておくことが、強いては我が国への新規病原体の侵入防止、および拡大の迅速把握に結びつき、我が国の感染症対策に役立つこととなる。構築されつつあるネットワークのさらなる発展および維持に当該研究の果たす役割は大きいと考える。

E. 結論：

一国で発生した感染症の原因となる病原体は、ヒトあるいは物を介して瞬く間に世界中に拡散し、時には莫大なる被害をもたらす。いつ発生するかまたはどのような状況で伝播するかわからない、予期することが難しい感染症に対しては、常時に監視体制をする仕組みを構築していくことが必要である。そのためには国を越えての協力体制が求められる。アジア諸国を中心として感染症対策に関与する各国の国立の研究機

関と国立感染症研究所とのネットワークを構築し、研究促進を図ると共に、感染研との人的交流及び情報の交換を促進し、迅速に対応できる仕組みがこの3年間の研究事業を通して確立された。

F. 健康危機情報

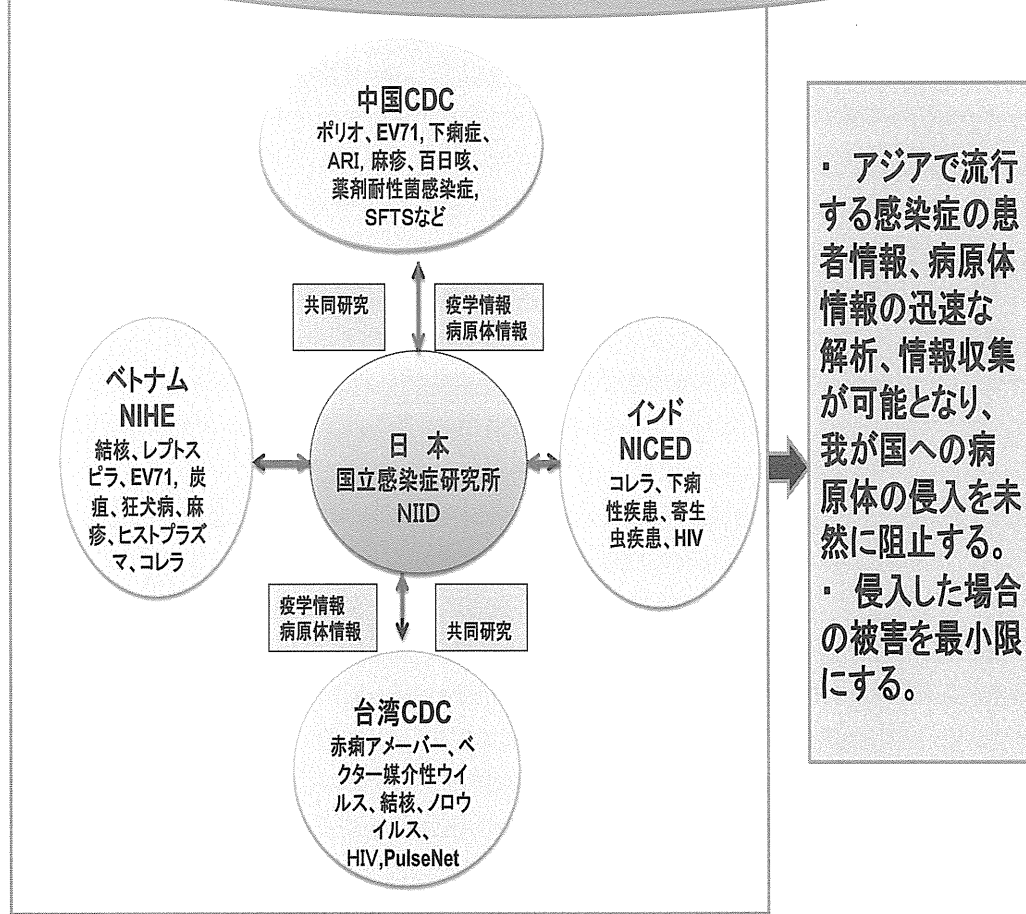
1) 中国において 2009 年にブニヤウイルス科フレボウイルス属の新種のウイルス (SFTS ウイルス: SFTSV) による重症発熱性血小板減少症 (SFTS) が発見され、現在も患者が発生している。

2) 中国、ベトナム等で EV71 による重症髄膜炎が流行しており、中国等では予防のために不活化ワクチンを開発し、臨床試験を行った。近い将来実用化される見込みである。

3) ベトナム等のアジア地区ではカルバペネム耐性の腸内細菌の分離率が上昇している。処方箋無しで、市中で薬をたやすく買えることが、耐性菌が選択される一因となっている。途上国に旅行中に現地の医療機関に入院し、帰国して国内の医療機関に再入院する患者については NDM-1 等のカルバペネム耐性菌のことに留意する必要がある。

4) 中国、ベトナム等では、狂犬病罹患犬が食用として交易している。家畜からの狂犬病の淘汰が難しい事情にある。東南アジアへの旅行時には狂犬病が存在することに注意が必要である。

図1. アジア各国の国立研究機関等との連携強化・共同研究の促進



プロジェクト1：中国

厚生労働科学研究費補助金

平成 23 - 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
総合研究報告書

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おり、ワクチン開発が進められている。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い、以下の結果を得た。

- 1) 中国では、2008 年 5 月から手足口病が全国サーベイランスによる届出対象疾患となった。2008～2012 年にかけて、約 720 万人の手足口病症例、2000 名強の死亡例が報告された。
- 2) 手足口病症例報告体制とともに、中国国内エンテロウイルス実験室ネットワークによる実験室診断体制が整備され、手足口病症例の約 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、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、real-time PCR 法による遺伝子検出により行われている。
- 3) 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 に属し、遺伝子型 C4 は、C4a と C4b に細分類されることが明らかとなった。
- 4) 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、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。
- 5) 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た EV71 標準株パネルを調整し、中国 CDC へ分与した。
- 6) WHO 西太平洋地域事務局、感染研、CCDC を含む専門家の協力の下、WHO 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・公開した。

中国では、重症 EV71 感染症を含む手足口病流行が漸続的に発生しており、現在、EV71 不活化ワクチンの国内開発が進められている。中国における EV71 ワクチン開発・導入にあたっては、手足口病関連エンテロウイルスの病原体サーベイランスが、きわめて重要となる。

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 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。

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。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。

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。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

標準株パネルは、遺伝子検査による手足口病実証診断に関する解析・評価・精度管理を行うための標準ウイルス株として利用可能である。

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 (PB 株)、結合しない株 (Non-PB 株) が存在する。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。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、

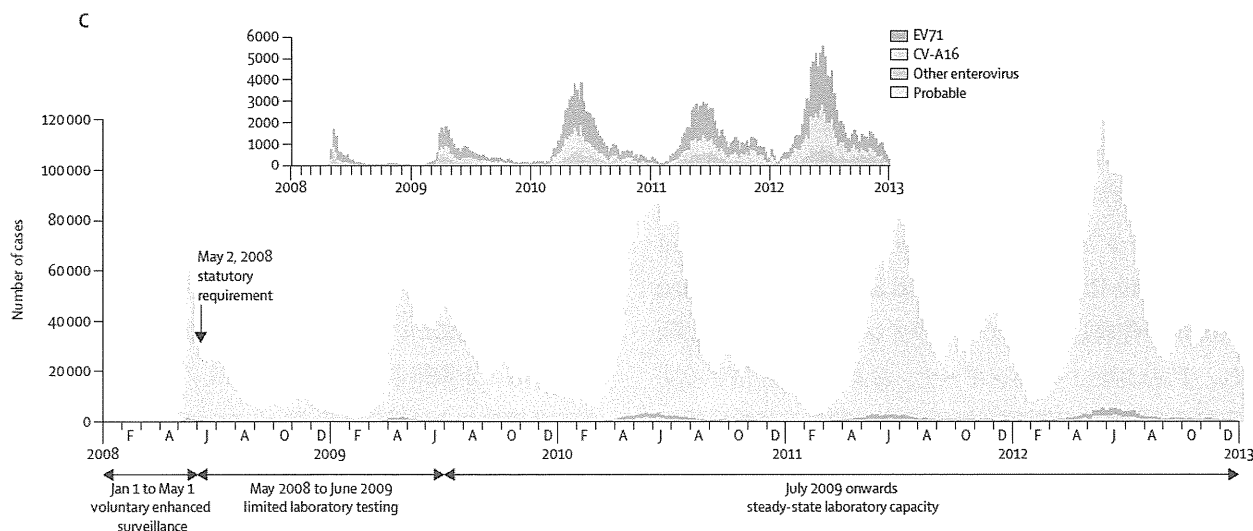
中国における手足口病サーベイランス体制の整備

Hand, foot, and mouth disease in China, 2008–12: an epidemiological study

Weijia Xing*, Qiaohong Liao*, Cécile Viboud*, Jing Zhang*, Junling Sun, Joseph T Wu, Zhaonui Chang, Fengfeng Liu, Vicky J Fang, Yingdong Zheng, Benjamin J Cowling, Jay K Varma, Jeremy J Farrar, Gabriel M Leung, Hongjie Yu

Lancet Infect Dis 2014
Published Online
January 31, 2014
[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70342-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70342-6)

- 2007-2008年に死亡例・重症例を伴う手足口病流行が発生 (安徽省等)
- 2008年5月から手足口病は全数報告対象疾患 (ヘルパンギーナは対象外)
- 2008-2012年の手足口病報告数(臨床鑑別例)は720万症例
- 手足口病報告例のうち3.7%について実験室診断を実施
- 2008-2012年のcase-fatalityは0.03% (2000人強)、case-severityは1.1% (7万人強)



PSGL-1 結合性を制御すると考えられる。

3) EV71 カプシド VP1 amino acid polymorphism とウイルス学的性状の関連性

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 VP1 amino acid polymorphism を解析した。データベース上の EV71 分離株のカプシドアミノ酸配列解析によると、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。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。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。

4) 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、感染研、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。

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 年以來、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。

中国における EV71 を含めたエンテロウイルス感染症実験室診断では、遺伝子検査が汎用されている。エンテロウイルス遺伝子検査の標準化と精度管理のため、感染研ウイルス二部で保有している、異なる遺伝子型の EV71 標準株パネルを中国 CDC に分与した。中国エンテロウイルス実験室ネットワークにおける遺伝子検査標準化のためのレファレンスパネルとしての活用が期待できる。

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 中和抗体結合に関与する主要な抗原エпит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、少数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) 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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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
- 11) Nishimura Y, Shimizu H. Cellular receptors for human enterovirus species a. *Front Microbiol* 3: 105, 2012
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 清水博之: 手足口病の問題点. *小児科* 53: 751-758, 2012
- 17) 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
- 18) 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
- 19) 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關する全国調査(2010年分) —中間集計結果. *病原微生物検出情報* 33: 63-64, 2012
- 20) 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
- 21) Konno M, Yoshioka M, Sugie M, Maguchi T, Nakamura T, Kizawa M, Umegaki Y, Yasutake H, Ishikawa Y, Hanaoka N, Okabe N, Taniguchi T, Shimizu H, Fujimoto T: Fourteen years' surveillance of coxsackievirus group A in Kyoto 1996-2009 using mouse, RD-18S, and Vero Cells. *Jpn J Infect Dis* 64:167-168, 2011
- 22) Miyamura K, Nishimura Y, Abo M, Wakita T, and

Shimizu H: Adaptive mutations in the genomes of enterovirus 71 strains following infection of mouse cells expressing human P-selectin glycoprotein ligand-1. *J Gen Virol* 92: 287-291, 2011

- 23) A Guide to Clinical management and Public Health Response for Hand Foot Mouth Disease (HFMD), WHO report, 2011 (分担執筆)
- 24) Zhang Y, Wang J, Guo W, Wang H, Zhu S, Wang D, Bai R, Li X, Yan D, Zhu Z, Tan X, An H, Xu A, Xu W. Emergence and transmission pathways of rapidly evolving evolutionary branch c4a strains of human enterovirus 71 in the central plain of china. *PLoS One* 6: e27895, 2011
- 25) Tan X, Huang X, Zhu S, Chen H, Yu Q, Wang H, Huo X, Zhou J, Wu Y, Yan D, Zhang Y, Wang D, Cui A, An H, Xu W. The persistent circulation of enterovirus 71 in People's Republic of China: causing emerging nationwide epidemics since 2008. *PLoS One* 6: e25662, 2011

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) 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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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
- 10) Shimizu H. Hand, foot, and mouth disease and Enterovirus 71 infection. NIID-China CDC meeting on Collaborative Research meeting, 21 November, Tokyo, 2012
- 11) Shimizu H. Genetic and Phenotypic Diversity of Enterovirus 71. Current Progress in Enterovirus 71 Research in the Asia-Pacific Region, Tokyo, 30 August, 2012
- 12) 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
- 13) 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

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

平成 23-25 年度 分担研究報告書

侵襲性肺炎球菌感染症由来肺炎球菌の疫学的解析および
呼吸器感染症起因菌である *Legionella pneumophila* の遺伝子解析

研究分担者 倉 文明 国立感染症研究所 細菌第一部

研究要旨

研究協力者

前川純子 国立感染症研究所 細菌第一部

常 彬 国立感染症研究所 細菌第一部

A. 研究目的

レジオネラ属菌は湖沼や土壌に生息する環境細菌だが、冷却塔水や浴槽水などの衛生管理が不十分だと増殖し、そこから生じる本菌を含んだエアロゾルを人が吸い込んだ場合に経気道感染し、レジオネラ肺炎やポンティアック熱などの呼吸器感染症を引き起こすことがある。予防ワクチンはなく、人が吸入する可能性のあるさまざまな水利用施設の水を適切に衛生管理することが重要である。

侵襲性肺炎球菌感染症 (IPD) は、ワクチン接種により予防可能な疾患となっている。7 価肺炎球菌コンジュゲートワクチン(PCV7)は、日本には 2010 年 2 月に導入され、2013 年 4 月 1 日から定期接種の対象となり、さらに 2013 年 11 月 1 日からは PCV7 に新たに 6 種類の血清型ポリサッカライドを加えた 13 価肺炎球菌結合型ワクチン (PCV13) に定期接種用ワクチンは変更された。一方、65 歳以上の高齢者またはハイリスクの 2 歳以上の個人には、23 価肺炎球菌ポリサッカライドワクチン (PPSV23) の使用は可能であった。各ワクチンの当該ワクチンに含まれる血清型肺炎球菌が引き起す IPD に対する予防効果が期待され

ている。一方、ワクチンに含まれない血清型による侵襲性感染罹患率の増加 (serotype replacement) の懸念がもたれている。ワクチン導入後の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、いわゆる capsular switching (遺伝子組み換え) は serotype replacement の重要な原因といわれている。Multi Locus Sequencing Type (MLST) 法は capsular switching を観測できる有効な方法である。さらに、MLST 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。レジオネラ属菌の代表菌種である *Legionella pneumophila* についても MLST 法と同様の手法で、用いる遺伝子の種類が異なる Sequence-Based Typing (SBT) 法が行われている。MLST 法および SBT 法は、データベースも完備しているので、中国を初め、世界各国の菌株との比較が容易である。我々は本研究で、レジオネラ症を引き起こす可能性のある日本国内の環境に生息する *L. pneumophila* の SBT、および IPD 由来肺炎球菌の MLST を調べ、基礎疫学データを蓄積し、中国の分離株と比較を行った。

B. 研究対象と方法

1 *L. pneumophila* 血清群 1 の解析

日本国内の様々な環境から分離された *L. pneumophila* 血清群 1 分離株 141 株について、

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、sequence type (ST)を決定した。7 遺伝子のアリアル配列が決まった分離株を EWGLI のデータベースに登録すると、新しいアリアル配列の組み合わせについては新たな ST ナンバーが付与される。

2 IPD 由来肺炎球菌に関する解析

2011 年から 2014 年 2 月現在まで、日本国内 IPD 由来肺炎球菌 441 株の血清型および MLST 解析を行った。血清型は、Statens Serum Institut 製血清を用い、莢膜膨潤法により決定した。薬剤感受性試験は微量液体希釈法で測定した。MLST 解析では、分離株の 7 つのアリアル (*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 つ以上の遺伝子は同じである場合、同一の clonal complex (CC) に分類する。本報告書のすべての集計は症例数をもとに行った。

C. 研究結果

1 : *L. pneumophila* 血清群 1 環境分離株の解析結果

冷却塔水由来 90 株、浴槽水由来 20 株、噴水・修景水由来 18 株、シャワー水由来 8 株、給湯水由来 3 株、土壌由来 2 株の遺伝子型を決定したところ、合わせて 141 株は 39 種類の遺伝子型に分かれた。ST1 が 85 株と全体の 60%を占めた。冷却塔水由来株の 74%、噴水・修景水由来株の 72%が ST1 だった。シャワー水では 38%、給湯水では 33%が ST1 で、浴槽水では 5%が ST1 で、由来により ST1 の頻度は異なっていた。2 種類の環境にまたがって検出された ST は 5 種類あった。冷却塔水あるいは浴槽水からそれぞれ複数株検出された ST が 7 種類あり、残りの 26 種類の ST は 1 株のみの検出だった。ST1 が環境分離株の優占 ST だったが、それ以外の遺伝子型は多様であった。

2 : 肺炎球菌の解析結果

1) : IPD 由来肺炎球菌の ST 型

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。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、22F 型の ST433 など) は日本でも分離された。同一血清型の肺炎球菌でも異なる ST 型を示すケースが多くみられた (H25 年度分担研究報告書「レジオネラおよび肺炎球菌の分子疫学」を参照)。

2) : 19A 型肺炎球菌に関して解析

19A 型肺炎球菌は PCV7 が導入後 replacement serotype として、世界各国で注目されていた。日本国内においても 19A 型肺炎球菌による小児 IPD 症例の増加がみられた (IASR 34: No.3 特集肺炎球菌感染症 2013 年 3 月現在)。本研究で収集した IPD 由来肺炎球菌 441 株のうち、19A 型は 103 株 (23.4%) で、最も多かった。

19A 型肺炎球菌は ST(CC)3111、ST320、ST(CC)2331、3 つのグループに分けられた。CC3111 は 75 株 (72.8%)、ST320 は 21 株 (20.4%)、CC2331 は 7 株 (6.8%) であった。CC3111 および CC2331 型肺炎球菌は日本各地の症例より分離されたが、ST320 型肺炎球菌は沖縄県のみでの分離であった。本研究で解析を行った 21 株の ST320 型 19A 肺炎球菌も β -lactam 抗菌薬のペニシリン G に 2-4 mg/mL、セフトキシムに 1-8 mg/mL、メロペネムに 0.5-1 mg/mL の MIC を示した。CC3111 および CC2331 型 19A 肺炎球菌の各抗菌薬に対する MIC より高く、低感受性や耐性であった (図1)。

現在まで、日本国内から ST320 型 19F 肺炎球菌が分離された報告がなく、さらに PCV7 が日本に導入される前の 2009 年に ST320 型 19A は沖縄県の症例から分離されたことから、日本国内に分離された ST320 型 19A 肺炎球菌は 19F の

capsular switching による変換されたタイプではなく、もともと存在していた可能性が示唆された。

D. 考 察

中国における *L. pneumophila* 血清群 1 の環境分離株 164 株 (冷却塔水由来 96 株、温泉由来 42 株、水道水由来 26 株) の遺伝子型別の結果も、ST1 が 49.4% を占め (Appl Environ Microbiol doi:10.1128, 2014)、次いで ST154 が中国 (6%) でも日本 (3%) でも多く、中国と日本で同様の傾向があることがわかった。日本の環境分離株の SBT 解析の結果、冷却塔水分離株は大きく 2 つのグループ (ST1 を含む C1 グループ、および ST154 を含む C2 グループ) に分かれた (Appl Environ Microbiol 12:4263, 2012) が、中国でも同様だった。温泉分離株の遺伝子型が多様であることも同様の結果だったが、冷却塔水分離株の多くが共通、あるいは似た遺伝子型であったのに対し、浴槽水・温泉分離株で共通の遺伝子型は、この 2 つの論文の比較では見られなかった。日本と中国で共通の遺伝子型についても、それぞれ独自の遺伝子型についても、臨床からも分離される遺伝子型が多くあり、それらの菌が生息する環境水が感染源となりうる危険性が示唆された。

本研究は、日本国内の IPD 由来肺炎球菌の MLST 解析を行った結果、アジアを含む世界各国で多く分離されている多剤薬剤耐性 ST320 型 19A 肺炎球菌は日本の特定な地域に分離された。欧米では、ST320 型 19A 肺炎球菌は PCV7 が導入された後、多剤耐性 ST320 型 19F 肺炎球菌の capsular switching によって変換されたタイプで、ワクチンによるセレクションされたと報告されている (BMC Genomics 10:642, 2009)。しかし、韓国 (Emerg Infect Dis 14:275, 2008)、中国 (PLOS ONE 8:e82361, 2013) では、日本と同様に、PCV7 が導入される前から ST320 型 19A 肺炎球菌の分離がみられた。欧米と異なって、ST320 型 19A 肺炎球菌による感染症の増加は抗菌薬によるセレクト

ションされたと推測された (PLOS ONE 8:e82361, 2013)。

E. 結 論

SBT (MLST) 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ため、世界各国の菌株との比較が容易である。レジオネラ症は旅行に関連して発症することが知られており、日本と中国で菌株の情報を共有することが重要であると考えられた。肺炎球菌においては、血清型、ST 型および薬剤感受性の結果を総合的に解析することによって、capsular switching、serotype replacement および薬剤耐性菌の発生を観測し、早期に対策を講じることができるようにデータの蓄積を行う必要がある。

F. 健康危機情報

特記すべきもの無し。

G. 研究発表

Oishi T, Wada A, Chang B, Toyabe S, and Uchiyama M. 2011. Serotyping and multilocus sequence typing of *Streptococcus pneumoniae* isolates from the blood and posterior nares of Japanese children prior to the introduction of 7-Valent pneumococcal conjugate vaccine. Jpn. J. Infect. Dis. 64:341-344.

西山明宏, 石田直, 興梶陽平, 小西聡史, 坪内和哉, 伊賀知也, 國政啓, 岩破将博, 福山一, 仲川宏昭, 伊藤明広, 生方智, 吉岡弘鎮, 橘洋正, 有田真知子, 橋本徹, 前川純子. 2011. *Legionella pneumophila* serogroup 3 による呼吸器感染症の 4 症例. 感染症学雑誌 85:373-379.

Tanaka J, Ishiwata N, Wada A, Chang B, Hishiki H, Kurosaki T, and Khono Y. 2012. Incidence of childhood pneumonia and serotype and sequence-type distribution in *Streptococcus pneumoniae* isolates in

Japan. Epidemiol. Infect. 140:1111-1121.

Amemura-Maekawa J, Kikukawa K, Helbig JH, Kaneko S, Suzuki-Hashimoto A, Furuhata 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.

Ueno M, Ishii Y, Tateda A, Anahara Y, Ebata A, Iida M, Inamura S, Takahata K, Suzuki Y, Chang B, Wada A, Sugita M, Tanaka T, and Nishiwaki Y. 2013. Prevalence and risk factors of nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in healthy children in Japan. Jpn. J. Infect. Dis. 66:22-25.

Oishi T, Ishiwada N, Matsubara K, Nishi J, Chang B, Tamura K, Akeda Y, Ihara T, Nahm MH, Oishi K, the Japanese IPD Study Group. 2013. Low opsonic activity to the infecting serotype in pediatric patients with invasive pneumococcal disease. Vaccine. 31:845-849.

Otsuka T, Chang B, Wada A, and Okazaki M. 2013. Molecular epidemiology and serogroup 6 capsular gene evolution of pneumococcal carriage in a Japanese birth cohort study. J. Med. Microbiol. 62:1868-1875.

Kanatani JI, Isobe J, Kimata K, Shima T, Shimizu M,

Kura F, Sata T, and Watahiki M. 2013. Close genetic relationship between *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from sputum specimens and puddles on roads by sequence-based typing. Appl. Environ. Microbiol. 79(13):3959-3966.

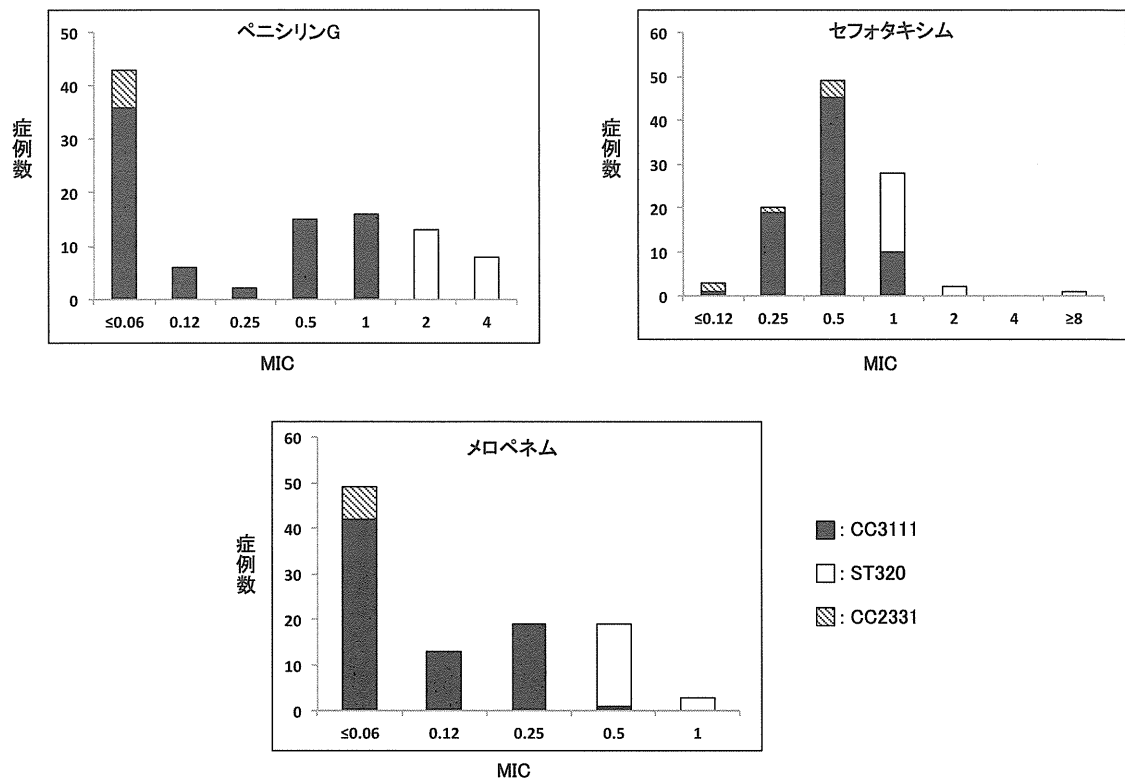
Kanatani J, Isobe J, Kimata K, Shima T, Shimizu M, Kura F, Sata T, and Watahiki M. 2013. Molecular epidemiology of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates identify a prevalent sequence type, ST505, and a distinct clonal group of clinical isolates in Toyama prefecture, Japan. J. Infect. Chemother. 19:644-52,

Ueno M, Ishii Y, Tateda K, Anahara Y, Ebata A, Iida M, Mizuno F, Inamura S, Takahata K, Suzuki Y, Chang B, Wada A, Sugita M, Tanaka T, Nishiwaki Y. 2014. Changes in *Streptococcus pneumoniae* serotypes in the nasopharynx of Japanese children after inoculation with a heptavalent pneumococcal conjugate vaccine. Jpn. J. Infect. Dis. 67:40-43.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図1:血清型19A分離株のシーケンスタイプと β -lactam 抗菌薬感受性の関係 (n=103)



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）
総合分担研究報告書

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）

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2011年に中国 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ことから、中国 CDC から情報を入手して、組換えウイルス蛋白による血清診断系の開発、組換えウイルス蛋白に対する抗体作成、患者診断用の RT-PCR 等を準備した。予備調査で組換え抗原により動物の血清疫学調査を行ったが、2012年時点では抗体陽性動物は検出できなかった。また、ダニからのウイルス遺伝子も検出できなかった。2013年1月には本ウイルスに感染した国内初の SFTS 患者が報告された。患者の実験室診断には、1) 患者診断用 RT-PCR が有効であった、2) ウイルス分離同定や、免疫組織学的染色に、組換えウイルス蛋白に対する抗体が極めて有用であった。一方、組換えウイルス蛋白による血清診断系とダニからのウイルス遺伝子検出法は、感度が充分でないことがわかった。2012年11月に中国 CDC の Prof. Mifang Liang, Prof. Li Dexin に分与された SFTS ウイルス HB29 株を用いて作製した抗体検出法は感度が高く、その後の動物の血清疫学調査等に活用された。マダニからのウイルス遺伝子検出は、MGB プローブによるリアルタイム RT-PCR 法を確立し、反応が陽性対照コンタミによるのか否かを同時に確認できる系へと改良された。

研究協力者：宇田晶彦、木村昌伸、加来義浩、野口章、今岡浩一（同、獣医科学部）、福士秀悦、福岡藍子、吉河智城、谷英樹、下島昌幸、西條政幸（同、ウイルス第1部）、新倉綾（同、実験動物管理室）

A. 研究目的

重症発熱性血小板減少症(SFTS)ウイルスは2011年に中国で同定された新規ブニヤウイルスである。このウイルスに感染したヒトの症状は、発熱、消化器症状、血小

板減少、白血球数減少等を特徴とし、年齢が高いほど重症例と死亡率が高くなる傾向がある。本研究の目的は、患者の実験室診断を整備して患者発生に備えること、動物の血清疫学を行うための抗体検出法を開発すること、マダニから効率よく SFTS ウイルス遺伝子を検出するリアルタイム RT-PCR を開発することである。

まず、2011年にはウイルスの入手が困難であったため、初年度は、遺伝子配列情報

を中国 CDC より入手し、N 蛋白質(NP) cDNA を化学合成し、各種組換え系によりウイルス蛋白を発現し、血清診断系を作製することを目的とした。また、組換え蛋白をウサギに免疫して作製した特異抗血清を作製した。

二年度には、作製した血清診断系を用いてシカなどの血清疫学を予備的に開始した。また、2012 年 11 月に中国 CDC の Prof. Mifang Liang, Prof. Li Dexin に SFTS ウイルス HB29 株が分与された。これを受けて、ウイルス感染細胞を用いた血清診断系を作製した。血清診断 ELISA を組換え抗原と SFTS ウイルス抗原で比較した結果、組換え蛋白免疫ウサギ血清の抗体検出感度は 30 倍以上後者が優れていることが明らかとなった。このため、SFTS ウイルス感染細胞を用いた ELISA 抗原、感染細胞を用いた間接蛍光抗体法用抗原を調整した。また、2013 年 1 月に国内の SFTS 患者が確認されたが、この実験室診断には、初年度に整備していた RT-PCR が有効であった。現在では RT-PCR 法による患者の診断検査体制が全国に整備されている。また、病理組織学的解析には、初年度に作製した組換え蛋白をウサギに免疫して作製した特異抗血清が極めて有効であった。その後の死亡患者の免疫組織学的解析にも、本抗体が用いられている。

中国においてフタトゲチマダニ (5.4%) およびオウシマダニ (0.6%) から SFTS ウイルス遺伝子が検出され、SFTS はマダニ媒介性の感染症であると考えられている。初年度にはヒトの実験室診断に用いている RT-PCR 法でマダニの予備的調査を行ったが、陽性マダニは検出できなかった。最終

年度の 2013 年 4 月の段階において、国内の SFTS ウイルスを保持するダニ種、陽性率、個体あたりのウイルス量、季節性変動性、陽性マダニの国内分布等は全く不明であった。そこで、三年度は、マダニにおける SFTS ウイルス検出用リアルタイム RT-PCR 法の確立と陽性対照由来のコンタミをモニターできる方法を至適化した。

B. 研究方法

SFTSV 特異的プライマーセット (患者診断用)

セット 1 :

SFTSV NP-1F: 5'-ATC GTC AAG GCA
TCA GGG AA-3'

SFTSV NP-1Rd: 5'-TTC AGC CAC TTC
ACC CGR A-3'

セット 2 :

SFTSV NP-2F: 5'-CAT CAT TGT CTT
TGC CCT GA-3'

SFTSV NP-2R: 5'-AGA AGA CAG AGT
TCA CAG CA-3'

バキュロウイルス発現系による SFTSV NP 調製

SFTSV NP cDNA (Invitrogen 社で合成) をバキュロウイルストランスファーベクター pAcYM1 にクローニングし、バキュロウイルス DNA とともに昆虫細胞 Tn5 にトランスフェクション後、昆虫細胞抽出液から組換え SFTSV NP を調製した。

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、プラスト

サイジンで SFTSV NP 発現細胞細胞を選択した。NP 遺伝子非導入細胞と混合後、スライドガラス上に塗布し乾燥、固定させ IFA 抗原とした。

ウサギ抗 SFTSV NP 血清の調製

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、ウサギ抗 SFTSV NP 血清を調製した。

陽性コントロールプラスミドの構築

SFTS ウイルス YG1 株由来部分 S セグメント cDNA のリアルタイム RT-PCR 標的領域に両端に制限酵素サイト (BamHI、EcoRV) を有する 36bp の挿入配列を導入したプラスミドを作製した。

リアルタイム RT-PCR

SFTS ウイルスを検出するためのリアルタイム RT-PCR 試薬は TakaraOne Step PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (Takara) および RNA-direct Realtime PCR Master Mix (Toyobo) を使用した。このリアルタイム RT-PCR には SFTSV-S2-237 プライマー: GCA ACA AGA TCG TCA AGG CAT CAG G、SFTSV-S2-400a プライマー: TGC TGC AGC ACA TGT CCA AGT GG、SFTSV-S2-317MGB プローブ (FAM 標識): CTG GTT GAG AGG GCA を用いた。陽性対照由来 DNA のコンタミを判別するためには、PosiContTaqman プローブ (HEX 標識): CAT CCT GCA CCA CCA ACT GCT TAG CC を用いた。

リアルタイム RT-PCR の増幅産物の特異性

確認試験

制限酵素処理を行わない場合にはリアルタイム RT-PCR 反応液を電気泳動しウイルス由来増幅産物 (164bp) および陽性対照プラスミド由来増幅産物 (201bp) を識別した。制限酵素処理を行う場合には PCR 産物を制限酵素 (BamHI または EcoRV) 処理後、4%アガロースゲルでウイルス由来増幅産物 (164bp) およびプラスミド由来増幅産物 ((157+44 bp または 126+75bp) を確認した。

C. 研究結果

SFTSV NP の発現とウサギ抗 SFTSV NP 血清の作製

2011年時点には、中国側の規制で SFTSV 遺伝子は入手出来なかったため、SFTSV NP cDNA を化学合成し、バキュロウイルス発現系を用いて組換え SFTSV NP を調製した。これをウサギに免疫し、ウサギ抗 SFTSV NP 血清を作製した (図1)。

SFTSV NP ELISA

バキュロウイルス発現系で調製した SFTSV NP を抗原として IgG-ELISA を行ったところ、SFTSV NP はウサギ抗 SFTSV NP 血清 (anti-SFTSV NP) に反応した (希釈倍率 6,400 倍以上)。しかし、SFTS ウイルス感染細胞から調整した抗原による ELISA では、20 万倍以上の希釈でも反応したことから、後者の感度が 30 倍以上高いことがわかった。この原因の一つは、精製組換え抗原が失活しやすいためであることがわかった。一方、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 (anti-RVVFV NP) およ

び、他のウイルスの NP に対するウサギ抗血清 (anti-CCHFV NP, anti-LASV NP, anti-JUNV NP) は SFTSV の NP に反応しなかった (図 2)。

IFA による SFTSV NP 検出

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、RVFV 感染細胞には反応しなかった。一方、ウサギ anti-RVFV NP は SFTSV NP 発現 HeLa 細胞に反応しなかった (図 3)。

陽性コントロールプラスミドの構築

リアルタイム RT-PCR のコピー数を算出するための陽性コントロールプラスミドの構築を試みた。最初に構築したプラスミドはリアルタイム RT-PCR で増幅するウイルスの塩基配列 164bp を含む 520bp をプラスミドベクターに挿入した (図 4 左)。しかし、このプラスミドを陽性コントロールが増幅して得られた塩基配列と、ダニに含まれる SFTSV ウイルス由来の増幅産物の塩基配列は一致するためコンタミネーションを識別することが困難である。そこで、新規の陽性コントロールプラスミドではリアルタイム RT-PCR で増幅する領域に、2 種類の制限酵素サイト (BamHI : GGATCC、EcoRV : GATATC) と TaqMan プロブ標的配列 (ggctaagcagttggtggtgcaggatg) を含む配列を挿入した。この結果、リアルタイム RT-PCR による増幅がウイルス由来の PCR 産物か、プラスミドのコンタミか否かが迅速に判定可能となった (図 4 右)。

電気泳動によるコンタミネーションの判定法の確認

最初に作出したプラスミド (旧陽性コントロールプラスミド) とウイルス由来の PCR 増幅産物のサイズは両者ともに 164 bp であり、電気泳動によるコンタミ識別は不可能であった (図 5)。一方で新プラスミド由来の PCR 増幅産物のサイズ (201 bp) はウイルス由来の増幅産物 (164 bp) よりも 37bp 大きく、4%アガロースゲルによる電気泳動でコンタミ識別が可能となった。更に新プラスミドの増幅産物は BamHI (157 および 44 bp) または EcoRV (126 および 75 bp) 制限酵素によって消化されるが、ウイルス由来の増幅産物には両制限酵素サイトは存在しない為、制限酵素処理を行っても 164 bp のままであるのでコンタミネーションを容易に判定可能となった (図 5)。

2 色法リアルタイム RT-PCR によるコンタミネーションの判定法の確認

新しい陽性コントロールプラスミドを用いたリアルタイム RT-PCR 法では、反応液にウイルス配列と相補する FAM 標識 MGB プロブ (SFTSV-S2-317MGB) と陽性コントロールプラスミドと特異的に相補する HEX 標識 TaqMan プロブ (PosiContTaqman) を同時に添加すると、ウイルス由来増幅産物では FAM 標識 MGB プロブしか増幅されないが、プラスミド由来増幅産物では FAM 標識 MGB プロブおよび HEX 標識 PosiContTaqman probe の増幅が認められ、コンタミネーションをリアルタイム RT-PCR 反応中にモニタリング可能となった (図 6)。

リアルタイム RT-PCR 法に用いる増幅試薬の選択

SFTS ウイルスを検出するためのリアルタイム RT-PCR 試薬は TakaraOne Step PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (Takara) および RNA-direct Realtime PCR Master Mix (Toyobo) を各々の推奨反応条件に改編を加え施行した (図 7)。両試薬の性能比較検討を行うにあたり同一のプライマー (SFTS-S2-237s、SFTS-S2-400a) と 10^3 から 10^1 コピー/反応に段階希釈した陽性コントロール用プラスミドを用意し解析を行った (図 8)。この結果、TakaraOne Step PrimeScript RT-PCR Kit では確実に 10 コピーに希釈した陽性コントロールプラスミドを検出することができたが、40 サイクル以降で鋳型を添加していない陰性コントロールでも偽増幅が観察された。一方で、RNA-direct Realtime PCR Master Mix 場合には陰性コントロールの義増幅は観察されないが、10 コピーに希釈した陽性コントロールプラスミドで 1/3 の割合で増幅が見られなかった。これらの結果から RNA-direct Realtime PCR Master Mix はやや増幅効率は劣るが非特異増幅が見られないことから、ダニサンプルの SFTS ウイルス検出に適していると推測された。

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、公衆衛生上重要な新興ウイルス感染症として注目されている。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。また、2011 年の時点で SFTS が輸入感染症として持ち込まれる可能性を考慮して、SFTSV 抗体検出等の実験室診断法を整備することとした。そこで、ウイルスの NP cDNA を化学合成して組換え蛋白を作製し、ELISA あるいは IFA による SFTS ウイルス抗体検出系を作製した。しかし、2012 年 11 月に中国 CDC より SFTS ウイルスの分与を受け、ウイルス感染細胞由来抗原による ELISA を開発し、組換え抗原による ELISA と比較した結果、後者が 30 倍以上高感度であることがわかった。精製組換え抗原が失活しやすいことが原因の一つであると考えられた。その後の動物の血清疫学や回復患者の抗体検出に後者が用いられている。

疑い患者の血中 SFTS ウイルスの検出には、初年度に開発した RT-PCR が有効であることがわかり、地方衛生研究所での疑い患者の実験室診断にも採用されている。一方、マダニからのウイルス遺伝子検出には、この RT-PCR では感度が充分でないことが、予備実験及び中国 CDC の Prof. Mifang Liang、Prof. Li-Dexin らとの協議でわかった。そこで、より高感度なリアルタイム RT-PCR を開発した。当初開発した方法で、フタトゲチマダニやタカサゴキララマダニ等複数種のマダニから SFTS ウイルスを検出できたが、一部の機器では非特異反応が出ること、陽性対照のコンタミを識別できない等の問題があった。そこで、最終年には、これらの問題を解消できる改良を加えた。そこで陽性対照には、2 種類の制限酵

素サイトと TaqMan プローブサイトを含む 37bp の DNA 断片を挿入したプラスミドを作製した。この陽性コントロールプラスミドを用いれば陽性対照のコンタミネーションによる反応の有無を迅速かつ簡単に判定できた。今後本研究で確立したプロトコルを用いて日本国内の SFTS 陽性ダニの種、ウイルス陽性率、個体あたりのウイルス量、ウイルス陽性ダニの季節性変動性、国内分布等を調査に行いたい。また、複数の機器で非特異反応が出ないことも確認していることから、地方衛研や大学等でマダニの分子疫学調査を行う際にも本リアルタイム RT-PCR 法は、有用である。

E. 結論

SFTS 疑い患者の実験室診断、血清診断が確立された。また、多くの動物種の血清疫学調査を行う抗体検出系も開発された。国内のマダニから SFTS ウイルス検出用リアルタイム RT-PCR 法を確立、改善した。今後の国内での種々の調査が可能となった。

F. 健康危険情報

SFTS は、2013 年に国内で患者が確認され、その後さかのぼり調査で 12 名、2013 年 3 月からの患者が 40 名確認されている。国内では複数種のマダニから SFTS ウイルス遺伝子が検出されている。

1. 論文発表

- 1) Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, Ishido A, Shigeoka T, Tominaga T, Kamei T, Honda M, Ninomiya D, Sakai T, Senba T, Kaneyuki S, Sakaguchi S, Satoh A, Hosokawa T,

Kawabe Y, Kurihara S, Izumikawa K, Kohno S, Azuma T, Suemori K, Yasukawa M, Mizutani T, Omatsu T, Katayama Y, Miyahara M, Ijuin M, Doi K, Okuda M, Umeki K, Saito T, Fukushima K, Nakajima K, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Fukuma A, Ogata M, Shimojima M, Nakajima N, Nagata N, Katano H, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Yamagishi T, Oishi K, Kurane I, Morikawa S, Saijo M. The First Identification and Retrospective Study of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Japan. *J Infect Dis.* 2013 Nov 14. in press

- 2) 下島昌幸、福士秀悦、谷 英樹、吉河智城、森川 茂、西條政幸：日本における重症熱性血小板減少症候群、ウイルス 63: 7-12, 2013.
- 3) 森川 茂：重症熱性血小板減少症候群、獣疫学雑誌17(2)142-143, 2014.

2. 学会発表

- 1) 前田健、高橋徹、奥田優、水谷哲也、山岸拓也、森川茂、下島昌幸、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) ウイルスの分離・同定 第 156 回日本獣医学会学術集会 2013.9.20~22 岐阜大学
- 2) 森川茂、木村昌伸、福士秀悦、加来義浩、朴ウンシル、鈴木道雄、井上智、今岡浩一、柳井徳磨、下島昌幸、西條政幸、前田健 動物の SFTS ウイルス抗体調査 第 156 回日本獣医学会学術