

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、咽拭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断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験室診断に関する解

ルは、遺伝子検査による手足口病実験室診断に関する解

中国における手足口病サーベイランス体制の整備

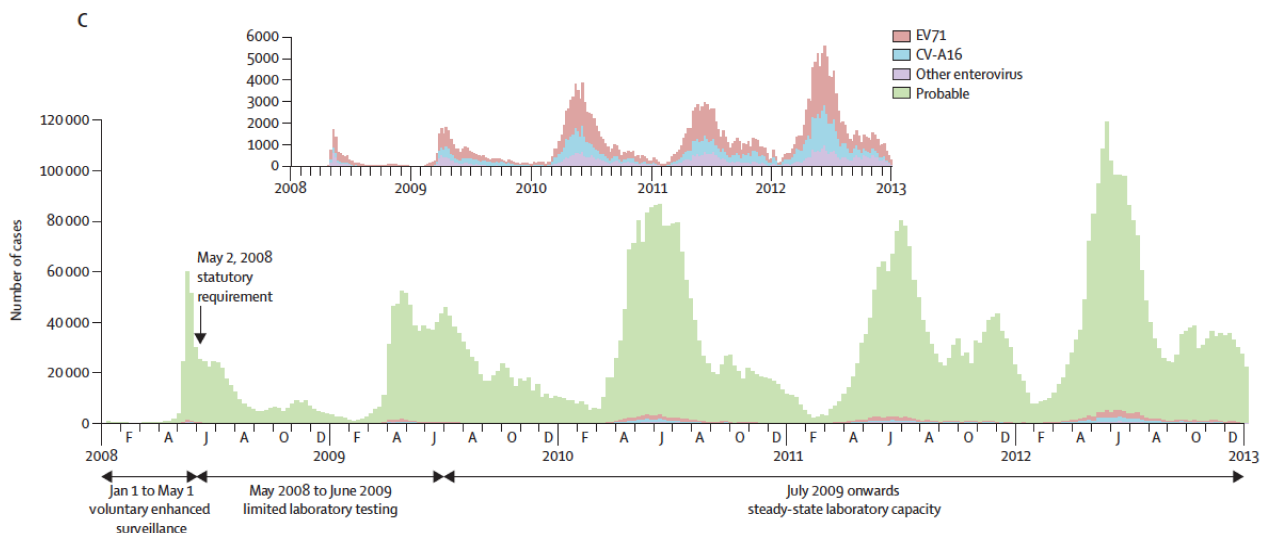
Hand, foot, and mouth disease in China, 2008-12: an epidemiological study

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)

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

- 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(ヘルペンギーナは対象外)
- 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)



ルは、遺伝子検査による手足口病実験室診断に関する解

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。

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。

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、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, 山崎謙台, 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. EUROPIE 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. EUROPIE 2012. Saint Raphaël, France, 3-7 June, 2012