

25-hydroxycholesterol (25-HC)処理による、コレステロールの細胞内局在変化を調査した。

C. 研究結果

OSBP ノックダウン細胞での AiV ゲノムの複製は顕著に抑制された。レプリコン RNA 導入細胞において、OSBP は AiV ゲノム複製部位に局在した。また、AiV ゲノム複製部位におけるコレステロールの蓄積が観察されたが、これは 25-HC 処理により阻害された。さらに、25-HC 処理により AiV ゲノムの複製が抑制された。

D. 考察

AiV のゲノム複製には、OSBP を介したコレステロールの蓄積が必須であることが示唆され、エンテロウイルスや HCV と共通の性状が認められた。今後は、ゲノム複製におけるコレステロールの役割を検討していく必要がある。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Ishikawa-Sasaki K, Sasaki J, Taniguchi K.

A complex comprising phosphatidylinositol 4-kinase III β , ACBD3, and Aichi virus proteins enhances phosphatidylinositol 4-phosphate synthesis and is critical for formation of the viral replication complex. J Virol 88:6586-6598, 2014.

2. 学会発表

1) 佐々木球美子、佐々木潤、前野芳正、守口匡子、河本聡志、谷口孝喜. アイチウイルスゲノムの複製には OSBP とそれを介する複製部位へのコレステロール蓄積が必須である. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜市、2014 年 11 月

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成26年度 厚生労働科学省研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
「不活化ポリオワクチンの有効性・安全性の検証及び国内外で進められている新規腸管ウイルスワ
クチン開発に関する研究」

課題番号：H25-新興-一般-012

分担研究報告書

分担研究課題：EV71 感染症に対する新たな分子標的治療に関する研究

研究協力者 中田恵子 大阪府立公衆衛生研究所 感染症部ウイルス課
研究協力者 駒野 淳 名古屋医療センター 統括診療部 臨床検査科

研究要旨 Enterovirus 71 (EV71)は手足口病の主要な原因ウイルスである。通常、手足口病は予後良好だが、中枢神経合併症や重度の呼吸器合併症を引き起こすことがある。分子レベルでのEV71-宿主相互作用は十分に解明されていない。本研究ではEV71複製制御に関する理解を深化させるため、機能的スクリーニングによるウイルス複製制御因子の同定を試み、glucosidase, beta, acid 1 (GBA1)が同定された。GBA1はEV71の内在性複製阻害因子であることが示され、EV71複製を制御する細胞の分子メカニズムに新たな理解を付け加えた。精製したGBA1を細胞に作用させるとEV71感染が抑制された。GBA1はヒトのGaucher's disease治療に使用されている安全な分子療法剤であるため、EV71感染症の治療に応用できるかもしれない。

A. 研究目的

手足口病（HFMD）は、手、足、口腔粘膜に広がる水疱性の発疹が特徴で、温帯地域では夏期に、乳幼児や幼児間で流行する。また、手足口病は穏やかな臨床経過であることが多く、予後は良好な疾患である。病原体はピコルナウイルス科エンテロウイルス属に属するコクサッキーウイルス(CAV)A16やエンテロウイルス71(EV71)が主である。EV71に起因する一部のHFMDは、急性弛緩性麻痺や無菌性髄膜炎、脳幹脳炎などを惹起し、死に至る転機をとる場合がある。HFMDに対する治療法は存在せず、有効なワクチンの開発が期待されている。

近年、EV71によるHFMD発生が中国、マレーシア、シンガポール、台湾、日本を含む東南

アジア諸国で報告された。2008年から2012年間に、中国では合併症による死者が2000人以上報告された。

近年、分子レベルでのEV71-宿主相互作用で大きな進展がもたらされた。2009年、二つのEV71受容体が発見された。LIMP-2/SCARB2/CD36bとPSGL-1/CD162である。PSGL-1が血球と内皮細胞に限られるのに対し、LIMP-2は殆どの種類の細胞に発現する。EV71感染症の病態形成においては、生体内で二つのレセプターは異なる役割を示すと推測される。EV71受容体としての機能とは別に、LIMP-2の重要な生理学的機能は酸性βグルコシダーゼ(GBA1)/βグルコセレブロンダーゼ(bCG)を運搬するもので、これは糖脂質代謝を促進するために重要である。GBA1は、細胞質網

状構造(ER)で合成された後すぐに LIMP-2 と結合する。この分子複合体は golgi 体を通してリソソームに運ばれる。その酸性条件下で LIMP-2 から GBA1 が解離して機能する。LIMP-2 が変異すると、上皮細胞における GBA1 発現が減弱する。これは、LIMP-2 が GBA1 の分子シャペロンとして機能する事を意味する。一方、PSGL-1 については、P-、E-、L-セレクトインの受容体としての機能する分子で、リンパ球の遊走に関係する。その他、EV71 の感染に関連する分子としてアネキシン II とヘパラン硫酸が知られている。さらに、EV71 複製を正に制御する細胞性因子として FBP1、PCBP1、HSP90、Sam68 などが報告されている。

遺伝的手法は、ウイルス複製を制御する細胞因子を特定するために極めて有用である。EV71 感受性が異なる細胞株は、このような手法を利用するための基礎となる。本研究において我々は、ウイルス複製効率が悪い細胞をヒントにして、EV71 の複製を負に制御する細胞性因子を同定したのでここに報告する。

B. 研究方法

ヒト glioma 細胞株 U251 から常法に基づいて作製した cDNA ライブラリーを MLV ベクターで U251、RD18S、293T 細胞に導入した。細胞は MLV ベクター感染の 2 日後から puromycin 存在下で培養して、選択をはじめて 1 週間後に EV71 を繰り返し感染させ EV71 感染に抵抗性の細胞クローンを確立した。細胞クローンの EV71 抵抗性は、感染後に細胞の CPE を観察すると同時に細胞の生存率を CellTiter-Glo にて定量化した。使用した主なウイルス株は市中分離株の ME40 と 42 である。候補遺伝子の抗 EV71 活性は一過性の強制発現と siRNA による発現抑制系にて評価した。

(倫理面への配慮)

特記すべきことなし。

C. 研究結果

EV71 の複製を多種の細胞で試験したところ、U251MG にて複製効率が悪いことがわかった。臨床分離に使用される RD18S 細胞では細胞培養上清に 10^{5-6} TCID₅₀ のウイルス量が含まれるが、U251 では 10^{3-4} TCID₅₀ だった。U251 に EV71 に対する抑制的な調節因子があると考え、同定を試みた。U251 から作製した cDNA ライブラリーを MLV ベクターで U251、RD18S、293T 細胞に導入し、これに EV71 を繰り返し感染させ EV71 感染に抵抗性の細胞を確立した。生存する細胞が回収できたのは U251 だけだった。樹立した 3 つの細胞クローンにおいて EV71 を感染させて感染感受性を評価した。2 つのクローン、clone 2 と 3 が明らかな EV71 耐性を示した。半数の細胞を死滅させるウイルス感染価は、親株 U251 細胞の 50 倍以上の差があった(図.1)。細胞の RNA を分離してレトロウイルスベクターの cDNA insert を標的としたプライマーで細胞に導入された cDNA を増幅したところ、2 つのクローンから長さの違う増幅産物が得られた(図.1)。PCR amplicon を sequencing したところ、2 つとも全長の GBA1 cDNA を含んでいた。GBA1 の発現がクローンで亢進しているかを immunoblot 法で調べると、発現レベルは親細胞より高かった(図.1)。蛍光抗体法でも親細胞よりも高い発現レベルが確かめられた。GBA1 の活性を測定しても活性価は高くなっていた(図.1)。

GBA1 の anti-EV71 効果を再現する実験を試みた。U251 にクローニングした全長の GBA1 を遺伝子導入して、puromycin 選択して得られたクローン 6 つと陰性対照で得られた 3 つの

クローンについて、EV71 による細胞障害性と GBA1 の発現を比較すると、GBA1 発現細胞の EV71 耐性度合いは有意に高かった(図.2)。発現量を immunoblot 法でみると、GBA1 の発現は高く、中でも発現量の高い4つがウイルス抵抗性が高かった(図.2)。

他の細胞で U251-GBA1 関係を調査した。293T 細胞は我々が使用する EV71 株に感受性を有する。293T は U251 より内在性の GBA1 発現が高い。しかし、transient transfection によって ectopic expression させると、EV71 感染による細胞死誘導効率は顕著に低下した (図.2)。これは対照として利用した cytoplasmic compartment に存在する GBA3 では同様の活性はなかった。また、発現量依存的な生物活性を認めた。siRNA によって endogenous GBA1 の発現を低下させると、EV71 の感染感受性が増大した(図.2)。これは発現抑制効率と相関が認められた。以上の結果は、GBA1 の抗 EV71 活性が U251 にとどまらないことを示している。

GBA1 の anti-EV71 活性がどのようなメカニズムかを探索した。GBA1 は EV71 受容体として知られる LIMP-2 と相互作用する。Antiviral activity がこの相互作用と関与することが想定される。GBA1 が EV71 の感染を阻害するのは細胞表面の LIMP-2 の量を少なくしているからと仮定した。それを検証するために、フローサイトメトリーを実施した。抗 LIMP-2 抗体の認識エピトープが GBA1 で隠されない、polyclonal 抗体を2種類使った。上記の実験で樹立した stable GBA1 expressor U251 clones とその陰性対照に対して、細胞表面の LIMP-2 をみると、そもそも U251 にはかなり低いレベルでしか LIMP-2 は発現していないが、そのレベルが GBA1 発現でさらに低下していた(図.3)。これは

陰性対照と同じくらいのレベルだった。

精製 GBA1 が EV71 の複製を阻害できるのであれば、これは複製阻害剤として治療に使用できるかもしれない。GBA1 はすでに製剤化されている。これは Gaushe's disease に対して使用される Cerezyme(immiglutarase)である。これはヒト GBA1 を CHO で発現精製したものを有効成分とする。Cerezyme が細胞培養レベルで EV71 の複製を阻害できるかを試験した。すると U251 細胞において濃度 10-100ug/ml にて阻害が確認できた。293, RD18S でも同様に阻害が確認できた。

内在性と外来性の GBA1 の作用機序は同じなのか？これを確かめるためにフローサイトのデータを解析した。セレザイム処理で細胞表面の LIMP-2 レベルは微増となった(図.3)。細胞表面への新たな LIMP-2 recruitment が起こることを想定すると、感染効率の上昇が予想される。そこで、GBA1 が競合的に LIMP-2-EV71 結合を阻害するかを生化学的に検討した。精製 LIMP-2 細胞外ドメインと精製 GBA1 を混合し、そこにウイルスを添加し、GBA1 活性があるかを調べた。その結果、GBA1 活性が検出されたが、バックグラウンドに対して 1.9 倍程度であった。コントロールでウイルスの代わりに protein A 磁気ビーズを添加しても活性が検出された。この磁気ビーズと LIMP-2 相互作用面は cargo/virus との結合ドメインとは離れているため、阻害されないと考えられる。実際、GBA1 活性は、バックグラウンドシグナルに比べて 5.2 倍程度であった(図.3)。これは、相互作用が弱まるのが大きな原因で、もしかするとウイルスは弱く GBA1 と相互作用するのが一因となっているのかもしれない。いずれにせよ、内因性 GBA1 の発現亢進によるウイルス複製抑制のメカニズ

ムとは異なる。

D. 考察

我々は複数の細胞株を標的にしたが、U251 でしか cDNA が回収できなかつた。なぜ U251 で cDNA がとれたのか？ほかの細胞では GBA1 の ectopic expression では LIMP-2 の細胞表面発現を「ウイルス感染が誘導する細胞死を逃れさせるだけの発現量」にまで十分に低下させることができなかつたためと思われる。つまり、LIMP-2 の発現が高いとかレトロウイルスベクターによる GBA1 の発現効率が低かつたという可能性である。U251 はその点、そもそも EV71 レセプターの発現量が低く、GBA1 の発現量も低かつたことが幸いしたのであろう。それ以外にも、EV71 には LIMP-2 以外の受容体も示唆されている。したがって、その発現が U251 で幸運にも少なかつたことにも影響されたのではないかとと思われる。実際、EV71 の受容体である PSGL-2 はリンパ球系細胞に多く発現されると考えられており、Cerezyme によるウイルス複製制御活性はリンパ球の一部で低かつた実験結果とよく一致する。

LIMP-2 と GBA1 は transporter と cargo の関係にある。GBA1 は ER で合成されるとすぐに LIMP-2 と会合し、lysosome に輸送されて、酸性 pH 条件下で乖離して、代謝酵素として機能する。GBA1 高発現は LIMP-2 と complex を形成して ER-Golgi-lysosomal path を行くのをより優先的にするため、細胞表面の LIMP-2 発現レベルが低下すると思われた。実際、U251 の GBA1 レベルも低いので、ectopic expression の効果が見えやすいと思われる。GBA1 の発現レベルが上がると LIMP-2 の細胞表面レベルが上がることから、LIMP-2-GBA1 複合体が通常細胞表面に行くことはないと考えられる。LIMP-2

変異があると繊維芽細胞の GBA 発現も大きく下がる。この現象はリンパ球ではみられないので、リンパ球では LIMP-2 の機能を相補する分子があると思われる。一方、GBA1 と相互作用しない LIMP-2 は単独で少量が細胞表面に移行すると思われる。LIMP-2 変異があると Cerezyme の効果が減弱する。Cerezyme は EV71 の複製を阻害する。これらを考えあわせると、細胞表面で exogenous な GBA1 と相互作用すると LIMP-2-GBA1 複合体は速やかに lysosome に移行して、細胞表面の LIMP-2 レベルを下げるのではないか。これが Cerezyme が Gaucher Disease で治療効果を持ち、EV71 複製を阻害する理由と思われる。

E. 結論

我々は EV71 の抵抗性遺伝子を機能的にスクリーニングすることを通じて同定した。さらに、これを応用すると重症の EV71 感染症に対して効果が期待できることも証明した。重症の EV71 感染症はそれほど高い頻度ではないが、現在は特異的な治療法がないので、我々の知見は非常に有用と思われる。

F. 健康危機情報

総括研究報告書を参照。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kurata T, Kanbayashi D, Nishimura H, Komano J*, Kase T, Takahashi K. Increased reports of measles in a low endemic region of Japan during a rubella outbreak in 2013. *Am J Infect Control*. In press.
2. Takeda S, Hisano M, Komano J, Yamamoto H, Sago H, *Yamaguchi K. Influenza vaccination during pregnancy and its usefulness to mothers

- and their young infants (Review). *J Infect Chemother*. In press.
3. Kurata T, Kanbayashi D, Komano J*, Kase T, Takahashi K. Pitfalls of National Surveillance Systems for Vaccine-associated Measles. *Am J Med*. In press. doi: 10.1016/j.amjmed.2014.04.027
 4. Sakon N, Yamazaki K, Nakata K, Kanbayashi D, Yoda T, Mantani M, Kase T, Takahashi K, *Komano J. Impact of Herd Immunity on the Circulatory Dynamism of Norovirus: A 10-year Longitudinal Study of Viral Acute Gastroenteritis. *J Infect Dis*. 2014 Sep 9. pii: jiu496.
 5. Kurata T, Kanbayashi D, Kinoshita H, Arai S, Matsui Y, Fukumura K, Matsumoto H, Odaira F, Murata A, Konishi M, Yamamoto K, Nakano R, Ohara T, Otsuru E, Komano J*, Kase T, Takahashi K. Late onset of vaccine-associated measles in an adult with severe clinical symptoms: a case report. *Am J Med*. 2014 Apr;127(4):e3-4. doi: 10.1016/j.amjmed.2013.10.015.
 6. Matsui M, Shindo K, Izumi T, Io K, Shinohara M, Komano J, Kobayashi M, Kadowaki N, Harris RS, Takaori-Kondo A. Small molecules that inhibit Vif-induced degradation of APOBEC3G. *Viral J*. 2014 Jul 1;11(1):122. doi: 10.1186/1743-422X-11-122.
2. 学会発表
(国際学会)
- 1) Naomi Sakon, Kenji Yamazaki, Keiko Nakata, Daiki Kanbayashi, Tomoko Yada, Masanobu Mantani, Tetsuo Kase, Kazuo Takahashi, Jun Komano. Genotype Analysis of Circulating Norovirus-Implication to Immunity against Norovirus. The 13th Awaji International Forum on Infection and Immunity Awaji in Nara. Sept 24-25, 2014. Nara.
 - 2) Daiki Kanbayashi, Takako Kurata, Tetsuo Kase, Kazuo Takahashi, Jun Komano. Cross Neutralization of Human Sera against Rubella Virus Strains Measured by A Novel High-Throughput Neutralization Assay. The 13th Awaji International Forum on Infection and Immunity Awaji in Nara. Sept 24-25, 2014. Nara.
(国内学会)
 - 1) 中田恵子、加瀬哲男：大阪府における新生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特徴(2013-14 シーズン). 第 55 回日本臨床ウイルス学会. 2014 年 6 月 14-15 日. 札幌.
 - 2) 武田 哲, 上林大起, 倉田貴子, 吉山 裕樹, 駒野 淳. Measles virus as a potential oncolytic virotherapy against B cell lymphomas. 第 73 回日本癌学会学術総会. 2014 年 9 月 25-26 日. 横浜.
 - 3) 中田恵子、山崎謙治、駒野淳、加瀬哲男：新生児無菌性髄膜炎の原因としてのコクサッキーB ウイルスの重要性. 第 46 回日本小児感染症学会. 2014 年 10 月 18-19 日. 東京.
 - 4) 倉田貴子, 上林大起, 西村公志, 加瀬哲男, 駒野 淳. 水面下における麻疹の流行レベルの推定. 第 73 回日本公衆衛生学会総会. 2014 年 11 月 5-6 日. 宇都宮.
 - 5) 上林大起, 倉田貴子, 駒野 淳. 生物発光を利用した風疹ウイルス検出系の実験室診断への応用~流行要因解明に向けて~. 第 73 回日本公衆衛生学会総会. 2014 年 11 月 5-6 日. 宇都宮.
 - 6) 中田恵子, 駒野 淳. β グルコセレブロシダーゼが持つエンテロウイルス 71 感

- 染症の分子標的治療薬としての潜在性。第 62 回日本ウイルス学会学術集会。2014 年 11 月 10-12 日。横浜。
- 7) 上林 大起, 倉田 貴子, 駒野 淳, 加瀬 哲男, 高橋 和郎。HI 抗体価で評価されてきた風疹に対する感染防御力は流行ウイルスに対して正しい判断をあたえるのか? 第 62 回日本ウイルス学会学術集会。2014 年 11 月 10-12 日。横浜。
- 8) 左近 直美, 駒野 淳, 加瀬 哲男。小児集団胃腸炎におけるノロウイルス感染症の有症期間～ウイルス遺伝子型と年齢に関する解析～。第 62 回日本ウイルス学会学術集会。2014 年 11 月 10-12 日。横浜。
- 9) 倉田 貴子, 上林 大起, 加瀬 哲男, 高橋 和郎, 駒野 淳。ヒト胎盤由来細胞における麻疹ウイルスの増殖 kinetics。第 62 回日本ウイルス学会学術集会。2014 年 11 月 10-12 日。横浜。
- 10) 湯浅 恵理, 伊藤 千紗, 中川 光, 棚橋 真規夫, 駒野 淳, 杉浦 亙, 永井 宏和, 飯田 浩充, 宮田 泰彦。フローサイトメトリ検査における 5-color 解析法の導入による影響。第 68 回国立病院総合医学会。2014 年 11 月 14-15 日。横浜。
- 11) 森 治代, 小島洋子, 川畑拓也, 駒野 淳。急速な病期進行をみた感染初期例群に共通して検出された新規変異 HIV-1 の流行実態。第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会。2014 年 12 月 3-5 日。大阪。
- 12) 野村 涉, 水口貴章, 大橋南美, Mathieu Metifiot, 藤野真之, Yves Pommier, 駒野 淳, 村上 努, 玉村啓和。HIV-1 遺伝子産物由来のインテグラーゼ阻害活性を持ったステープルペプチド。第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会。2014 年 12 月 3-5 日。大阪。
- 13) 上林大起, 倉田貴子, 福村和美, 畑中己穂, 田邊雅章, 松本治子, 駒野 淳, 加瀬哲男, 高橋和郎。麻疹と修飾麻疹について～MR ワクチン 2 回接種の重要性～。第 18 回日本ワクチン学会学術集会。2014 年 12 月 6-7 日。福岡。
- 14) 中田恵子, 駒野淳, 加瀬哲男。環境水サーベイランスによるポリオウイルス探知法の評価(続報)。第 18 回日本ワクチン学会学術集会。2014 年 12 月 6-7 日。福岡。
- 15) 加瀬哲男, 倉田貴子, 上林大起, 高橋和郎, 駒野 淳。麻疹における家族内 2 次発生について。第 18 回日本ワクチン学会学術集会。2014 年 12 月 6-7 日。福岡。
- 16) 倉田貴子, 上林大起, 加瀬哲男, 高橋和郎, 福村和美, 畑中己穂, 田邊雅章, 松本治子, 五十嵐愛子, 北島博之, 駒野 淳。大阪府における風疹の流行と先天性風疹症候群の検査診断。第 18 回日本ワクチン学会学術集会。2014 年 12 月 6-7 日。福岡。
- 17) 上林大起, 倉田貴子, 福村和美, 畑中己穂, 田邊雅章, 松本治子, 駒野 淳, 加瀬哲男, 高橋和郎, 五十嵐愛, 北島博之。先天性風疹症候群の追跡調査の現状と出生時診断の留意点について。第 26 回日本臨床微生物学会総会・学術集会。2015 年 1 月 31 日-2 月 1 日。東京。
- 18) 左近 直美, 駒野 淳。ノロウイルス感染症の流行と遺伝子型。第 45 回日本小児消化管機能研究会。2015 年 2 月 14 日。埼玉。

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

1. 特許取得

特記すべきことなし

2. 実用新案登録

特記すべきことなし

3. その他

特記すべきことなし

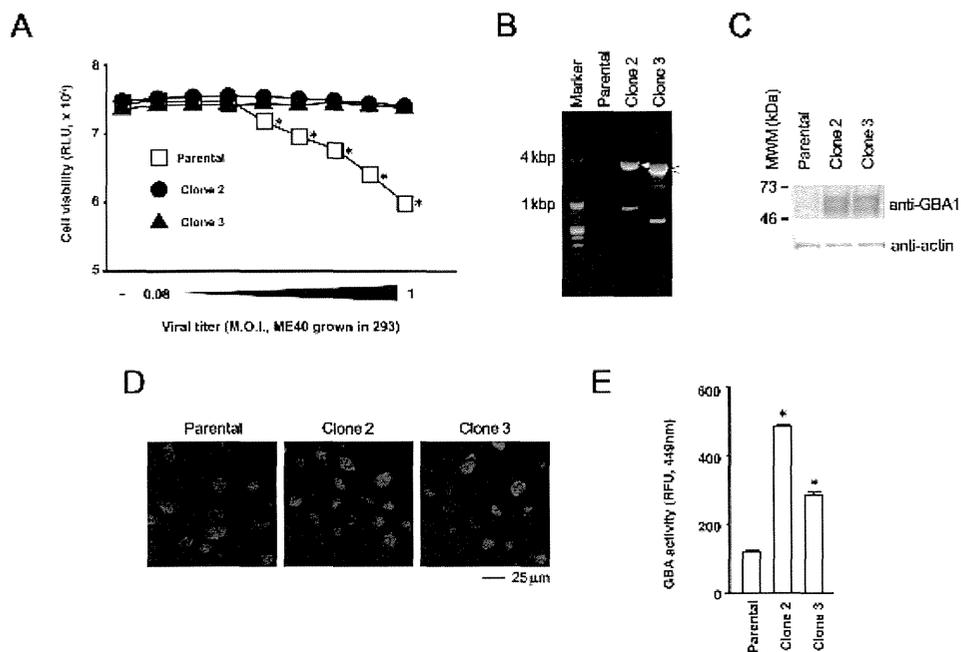


図1. EV71複製の負の制御因子GBA1の同定

(A) EV71感染によるU251MG細胞の生存率減少。U251MG親細胞株(□)と2つのクローン(●と▲)にEV71を感染させた結果 ($P < 0.001$, Student's two-tailed t -test)。(B) RT-PCR増幅産物のアガロースゲル電気泳動型像。

(C) イムノブロット法によるEV71耐性U251クローン 2、3におけるGBA1発現の解析。(D) IFAを用いたU251MG親細胞株、EV71耐性U251クローン 2、3におけるGBA1発現の解析。(E) U251MG親細胞株、EV71耐性U251クローン 2、3でのβ-グルコシダーゼ活性の解析 ($P < 0.05$, Student's two-sided t -test)。

図2. ヒト上皮細胞におけるGBA1の抗EV71活性検証

(A) EV71感染後のGBA1過剰発現U251MGクローンの生存率 ($P < 0.05$, Student's two-sided t-test)。 (B) GBA1過剰発現293T細胞におけるEV71誘導細胞死からの抑止 ($P < 0.001$, Student's two-sided t-test)。 (C) GBA1の量依存的なEV71誘導性細胞死の抑制。 (D) IFAによる293T細胞でのGBA1の発現分布解析。 (E) siRNAによるGBA1発現抑制がEV71感染に与える影響 ($P < 0.001$, Student's two-sided t-test)。

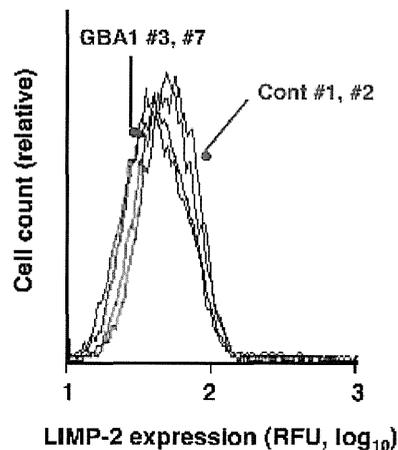
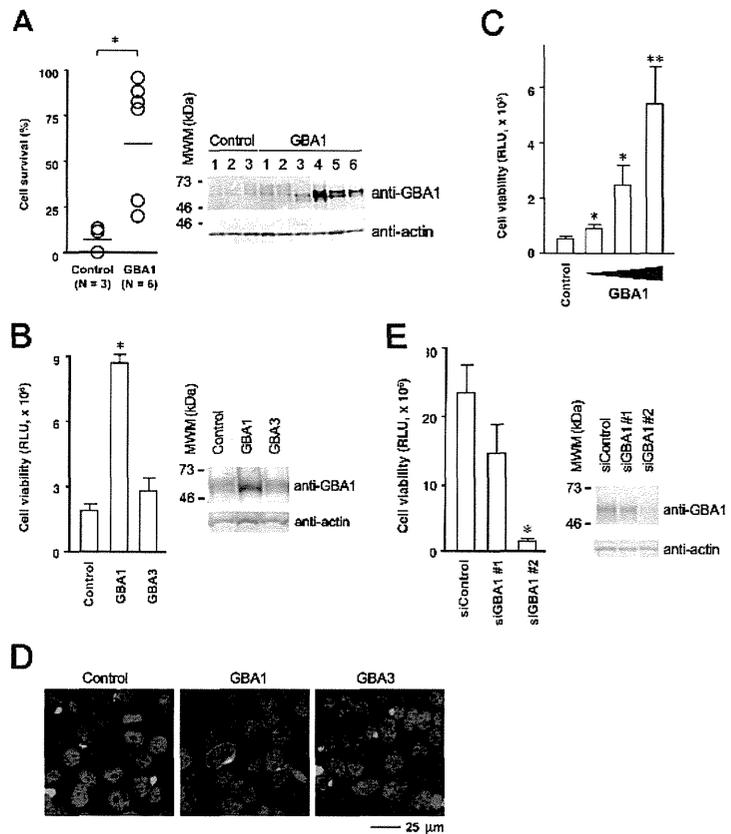


図3. GBA1過剰発現によるLIMP-2細胞表面発現への影響

フローサイトメトリーによるGBA1過剰発現細胞と陰性対照のそれぞれ代表的な二つのクローンにおける解析。

Health Labour Sciences Research Grant
(new-type influenza etc. emerging and reemerging infectious diseases research project)
Contributory (collaboration) research report

Development of an Enterovirus 71 Vaccine

Takeda Vaccines Pte Ltd, 21 Biopolis Road, Singapore 138567

Representative researcher: Hiroyuki Shimizu

Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases

Research summary

Human enterovirus 71 (EV71) is a significant cause of morbidity, neurological complications and mortality from Hand, Foot and Mouth Disease (HFMD), particularly in young children in the Asia-Pacific region. There are no vaccines or antiviral therapies currently available for prevention or treatment of HFMD caused by EV71. Therefore, the development of preventive strategies against EV71 and HFMD is of growing importance. Takeda is developing a vaccine for prophylactic immunization for prevention of Hand, Foot and Mouth Disease (HFMD) caused by EV71. We have conducted a series of non-clinical evaluations including characterization of immune response and a repeat-dose toxicology study, as well as a Phase 1 clinical study in healthy adults. Data show that Takeda's EV71 vaccine candidate was generally well tolerated in rabbits and in humans and induced good immune responses after administration of two doses in healthy adult subjects.

A. Research objectives

Enterovirus 71 (EV71) is one of the major causes of severe hand, foot and mouth disease (HFMD), which is a significant public health concern in the Asia-Pacific region, affecting mainly infants and young children [1,2]. In a majority of cases, infection is silent or sub-clinical and self-limiting, usually manifesting as ulceration of the hands, feet and oral cavity. However, during outbreaks, increasing numbers of severe cases have been recognized, with a range of neurologic symptoms including meningitis, encephalitis and polio-like paralysis, leading to serious complications of the CNS, pulmonary, and cardiac systems, and occasionally fatality [3,4].

There have been recent fatal outbreaks in Southeast Asia [5], raising a great deal of concern in the region.

There is no specific therapy for EV71 infection and treatment is restricted to management of the symptoms. Prevention is reliant upon surveillance and isolation of infected individuals together with enhanced infection control, but several strategies are currently being applied to develop vaccine candidates.

Takeda is developing a vaccine for prophylactic immunization for prevention of HFMD caused by EV71. We have conducted a series of non-clinical evaluations including characterization of immune response and a

repeated-dose toxicology study, as well as a randomized, placebo-controlled dose escalation Phase 1 clinical study in healthy adults.

B. Research methods

Immunogenicity of Takeda's EV71 vaccine candidate in mice [6]

Immunogenicity of EV71 antigen formulated with or without aluminum hydroxide: Groups of mice (N=8) were injected on Days 0 and 28 with the following doses of purified inactivated EV71 antigen (0.12 µg, 0.6 µg, or 3.0 µg) in PBST only or with aluminum hydroxide (Alhydrogel; 0.5 mg/dose). Two groups of control animals (N=8) were injected with PBST or Alhydrogel using the same immunization protocol as above. Blood samples were collected on day 0, 28, 42, 56, 91, and 120; sera were stored at -20°C until testing for neutralizing activity.

Determination of neutralizing antibody responses [6]

Vero cells were seeded into 96-well microtiter plates at 10^4 cells per well in 100 µL growth medium (MEM+10% FBS). Individual serum samples were heat-inactivated at 56°C for 30 min. Two-fold serial dilutions of serum samples in assay medium (MEM+2% FBS) were mixed with equal volumes of an EV71 (vaccine strain) suspension at 2000 units of 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀) per mL and incubated at 37°C for 1.5 hours. 100 µL of each serum-virus mixture was added to three wells (final virus titre 100 TCID₅₀ per well). Each well was scored for CPE at 5 days post-infection. The end-point neutralizing titer was defined as the highest serum dilution in

which at least two of the three replicates were negative for CPE.

Cross-neutralization of EV71 antiserum against other EV71 subgenotypes

Human rhabdomyosarcoma (RD) cells seeded in a 96-well format were inoculated with a virus-serum mixture and incubated for 2-3 days. EV71 subgenotypes tested included B2, B4, B5 and C4. Serum samples (low and high titer) were obtained from terminal bleeds from immunizations in rats and rabbits using Takeda's EV71 vaccine candidate. Subsequently, the presence of viral antigens was detected by indirect ELISA using a mouse monoclonal antibody and goat anti-mouse HRP conjugated antibody.

Repeated-dose toxicology study in rabbits [6]

The toxicology study was conducted according to Good Laboratory Practice (GLP). New Zealand White rabbits were used as the test species with equal number of females and males included in each group. Low and high dose vaccines were formulated as planned for a Phase 1 clinical trial, containing 0.6 µg and 3.0 µg EV71 antigen respectively, formulated with Alhydrogel (0.5 mg/dose). Twenty rabbits received each vaccine formulation. Control groups received normal saline (PBS, N=12) or 0.5 mg Alhydrogel alone (vaccine placebo, N=16). Test articles were administered by IM injection. All animals received a booster injection of the same dose and route on day 28; the animals in the high dose group received a second booster on day 42. Animals were observed for morbidity and mortality at least twice daily during the treatment and

observation periods, in addition to weekly clinical examinations.

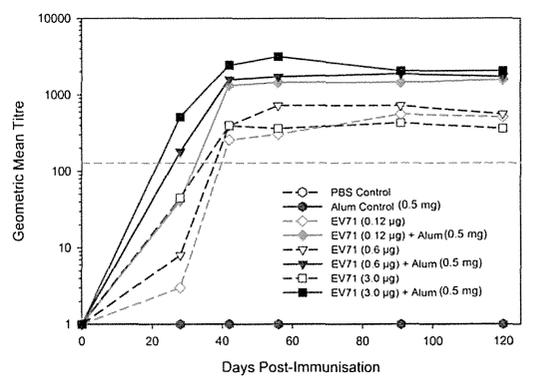
Safety and immunogenicity of Takeda’s EV71 vaccine candidate in healthy adults [7]

A single center, double blind, placebo controlled, randomized, dose escalation study Phase 1 study was performed to investigate the safety, tolerability and immunogenicity of two different doses of Takeda’s candidate EV71 vaccine candidate in healthy adults. The trial was performed at the Investigational Medicine Unit, National University Hospital, Singapore following approval of the study protocol by the site Domain Specific Review Board, and carried out according to the current principles of GCP and the Declaration of Helsinki. Eligible subjects were aged 21 to 45 years, inclusive, in good health at the time of screening and provided written, informed consent at enrolment. After screening for their baseline EV71 antibody levels subjects were included based on their antibody levels at screening, those eligible being enrolled into two groups. Within each group subjects were randomized to receive either Low Dose vaccine (0.6 µg EV71/dose [N=12]) or placebo [N=6], or High Dose vaccine (3.0 µg EV71/dose [N=12]) or placebo [N=6]. Subjects received two intramuscular (IM) injections (Day 0, Day 28) and were followed for safety and immunogenicity assessments through Day 196 (6 months post second dose). Adverse events were collected throughout the study for assessment of safety. Immunogenicity was assessed by measuring EV71 neutralizing antibodies in sera from all subjects throughout the study.

C. Research results

Immunogenicity of Takeda’s EV71 vaccine candidate in animals

All animals seroconverted at day 56 after 2 doses in all groups that received vaccine. Higher GMT neutralizing titers were observed in the groups of animals that received the vaccine candidate formulated with alum, with GMTs ranging from 11- to 23-fold higher than groups without alum at Day 28 (after 1 dose), 4- to 6-fold higher at Day 42 (after 2 doses) and 2.4- to 9-fold higher at Day 56 (after 2 doses).



Cross-neutralization of EV71 antiserum against other EV71 sub-genogroups

Antiserum	Sub-genogroup			
	B2	B4	B5	C4
Rat	724	181	128	2048
Rabbit	32768	32768	32768	46341

Anti-sera raised against Takeda’s EV71 vaccine candidate in rats and rabbits were capable of neutralizing other sub-genogroups of EV71, namely B4, B5 and C4 genogroups.

Repeated-dose toxicology study in rabbits

No morbidity or mortality occurred in any animals, and no skin reactions (i.e. no erythema or edema) at the site of injection were found in any animals. There were no treatment related changes in hematology and clinical chemistry parameters. Animals in the EV71 vaccine-treated groups exhibited no differences from the control groups in group averages of body mass, body mass change during the study period, or food consumption. In addition, there was no treatment related neurotoxicity, renal or hematological adverse effects. There was no treatment related effects upon gross pathological examination or on absolute and relative organ weights.

Muscular degeneration at the site of injection, with or without mononuclear cell/eosinophil infiltration, were observed in a sub-population of animals in all groups receiving formulations containing aluminum hydroxide including the Alhydrogel placebo group, but not in animals which received the saline placebo. The lesions had healed or were markedly reduced by day 56, i.e. 28 days after the last immunization for the Alhydrogel placebo and low dose groups, and 14 days after the last immunization for the high dose group. These lesions are usually observed following an injection of an Alum containing vaccine.

Safety and immunogenicity of Takeda's EV71 vaccine candidate in healthy adults

Of 36 subjects, one subject discontinued due to administrative reasons and 35 completed the study. Injections with either placebo or Takeda's EV71 vaccine candidate were generally well tolerated; there were no serious

adverse events (SAE) or withdrawals due to adverse events during the study.

All vaccine-related AEs were considered to be mild in severity, and there were no vaccine-related unsolicited AEs. Blood chemistry tests did not indicate any clinically significant changes after either vaccine or placebo administration.

The candidate vaccine was immunogenic, and all vaccinees seroconverted, i.e. displayed a four-fold or greater increase in EV71 neutralizing titer compared with Day 0, while titers in the placebo group did not change significantly over the duration of the study. Increased tiers were observed in both low dose and high dose vaccine groups by Day 14, with a further increase after a second dose. Although levels declined over the following weeks, geometric mean titers remained higher than baseline at 28 weeks. There was a trend for titers to be higher in the high dose group, particularly after the second dose.

D. Discussion

Enterovirus 71, one of the major causes of severe HFMD, is a major public health concern in the Asia-Pacific region, affecting mainly infants and young children. Although most cases are asymptomatic or sub-clinical, some patients develop serious conditions including flaccid paralysis, aseptic meningitis and/or encephalitis leading to complications affecting the CNS, lungs and heart and ultimately death. Currently, there is no treatment or vaccine available to prevent disease. Takeda is developing an inactivated vaccine for the prophylaxis of HFMD caused by EV71.

Takeda's EV71 vaccine candidate has been

shown to induce neutralizing antibodies in animals, which were demonstrated to cross-neutralize other EV71 sub-genogroups in vitro. Data from Phase 1 clinical study demonstrated that the vaccine candidate was generally well tolerated at two dose levels and after two injections in a group of healthy adults. In the same study, the vaccine candidate was shown to be immunogenic with all subjects seroconverting after two doses of either the low dose or the high dose formulation. In addition to the induced neutralizing antibody responses, the vaccine candidate induced antibodies with broad cross reactivity against other EV71 sub-genogroups.

E. Conclusion

Takeda's EV71 vaccine candidate has been shown to be generally well tolerated following administration of two doses in healthy adults. Development of a vaccine to protect children against the severe form of HFMD caused by EV71 is an important progress in the prevention of enterovirus related diseases.

F. Health risk information

None

G. Research publications

None

H. Intellectual property applications/registrations

Unpublished application filed.

Reference

1. Solomon T, Lewthwaite P, Perera D, Cardosa MJ, McMinn P, Ooi MH. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. *Lancet Infect Dis.* 2010; 10: 778–790.
2. Wang Y-R, Sun L-L, Xiao W-L, Chen L-Y, Wang X-F, Pan D-M. Epidemiology and clinical characteristics of hand foot, and mouth disease in a Shenzhen sentinel hospital from 2009 to 2011. *BMC Infect Dis.* 2013; 13:539.
3. Huang CC, Liu CC, Chang YC, Chen CY, Wang ST, et al. Neurologic complications in children with enterovirus 71 infection. *N Engl J Med* 1999; 341: 936–942.
4. Chang LY, Huang YC, Lin TY. Fulminant neurogenic pulmonary oedema with hand, foot, and mouth disease. *Lancet* 1998; 352: 367–368.
5. Saraswathy S, Tan LV, Thwaites L, Wills B, Qui PT, van Doorn HR. Enterovirus 71 related severe hand, foot and mouth disease outbreaks in South-East Asia: current situation and ongoing challenges. *J Epidemiol Community Health* 2014; 68:500-502.
6. Hwa SH, Lee YA, Brewoo J, Partidos CD, Osorio JE, Santangelo JD. Preclinical evaluation of the immunogenicity and safety of an inactivated enterovirus 71 candidate vaccine. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013 Nov; 7(11): e2538.
7. Tambyah P, Oon J, Asli R, Kristanto W, Gordon G, Santangelo J, Stinchcomb D, Thomson C. Safety and immunogenicity of INV21, an inactivated vaccine candidate for the prevention of hand, foot.

and mouth disease caused by enterovirus

71. 15th ICID, June 13-16, 2012.

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

協力研究者 片岡 周子 国立感染症研究所 ウイルス第二部第二室 研究員

研究要旨：近年、東アジア地域の小児において死亡例を伴うエンテロウイルス 71 (EV71) 感染症流行が問題になっている。しかし、EV71 感染症における詳細な病原性発現機構はまだ分かっていない。我々は EV71 特異的受容体として PSGL-1 を同定し (Nishimura et al. 2009)、EV71-PSGL-1 結合の分子的基盤の研究を進めている。本研究では、in vivo での PSGL-1 依存的 EV71 感染増殖・病原性発現機構を明らかにすることを目的とし、PSGL-1 結合 (PB) および PSGL-1 非結合 (non-PB) EV71 とカニクイザルを用いた感染実験を行った。

A. 研究目的

エンテロウイルス 71 (EV71) は糞口感染や経口飛沫感染で、感染しても不顕性もしくは軽度な症状で完治することが多いが、近年では無菌性髄膜炎や急性脳炎、神経原性肺水腫などの中枢神経合併症を引き起こし特に東アジア地域の小児において死亡例を伴う EV71 感染症の流行が大きな問題になっている。しかし、EV71 感染重症化の詳細な病原性発現機構はまだ分かっていない。我々は EV71 特異的受容体として PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) を同定し (Nishimura et al. 2009) EV71-PSGL-1 結合の分子的基盤の研究を進めている。本研究では、PSGL-1 結合 (PB) および PSGL-1 非結合 (non-PB) EV71 とカニクイザルを用いた感染実験を行うことで in vivo での PSGL-1 依存的 EV71 感染増殖・病原性発現機構を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

EV71-02363 株感染性クローン (non-PB 型; 02363-KE)、および、PSGL-1 結合性を規定する VP1 アミノ酸 (VP1-98 および VP1-145) に変異を導入した感染性クローン (PB 型; 02363-EG) をそれぞれ $10^{6.3}$ CCID₅₀ ずつ、8 頭のカニクイザル (non-PB、PB それぞれ 4 頭ずつ) に静脈内接種し、中枢神経症状を含む臨床症状の発現を観察した。感染後 0・3・7・10 日目に臨床検体 (末梢血、直腸拭い液、咽頭拭い液、髄液) を採取した。両群とも重篤な神経症状は認められず、感染 10 日目に解剖し、心臓・肝臓・脾臓などの主要臓器や脳・脊髄などの中枢神経系組織を採取した。

(倫理面への配慮)

動物実験は国立感染症研究所の動物実験委員会の承認を経て、動物実験指針に基づいて行なった。「動物の愛護及び保管に関する法律」「実験動物

の飼養及び保管に関する基準」、霊長類学会「サル類を用いる実験遂行のための基本原則」を遵守し実験動物の使用を最小限にするとともに、取扱や処理には動物愛護の精神をもって臨んだ。

C. 研究結果

non-PB 接種群は振戦などの神経症状を示し、直腸拭い液、咽頭拭い液及び血清から高頻度にウイルス及びウイルス遺伝子が検出された。PB 接種群では明らかな神経症状を示さなかったが、感染後期の血清や末梢血単核球 (PBMC)、剖検時の中枢神経系組織からウイルス及びウイルス遺伝子が検出された。どちらの接種群においても、拭い液や血清および中枢神経系を含む各種組織から検出されたウイルスの多くは VP1-98 あるいは VP1-145 にアミノ酸変異を有しており、non-PB 型 (02363-EE) が高頻度に検出された。(前年度報告) 両感染群サルの血清中のサイトカイン濃度を測定したところ、non-PB 接種群は感染前より高い傾向がみられたが、PB 接種群では変動が見られなかった。また中枢神経組織の病理学的解析では non-PB 接種群全頭と PB 接種群のうち中枢神経組織から高頻度にウイルスが検出されたサルにおいて神経細胞の変性・壊死と炎症所見が観察され、その組織病変の程度に明らかな差は見られなかった。

D. 考察

PSGL-1 結合性の異なる 2 種類の感染性クローン由来 EV71 を感染動物モデルであるカニクイザルに感染させ、ウイルスの in vivo における病原性や増殖性などの違いを比較した。その結果、EV71 感染動物モデルであるカニクイザルにおいて EV71 は、VP1-145 のアミノ酸の変異/選択のメカニズムは未解明であるが、VP1-145 に強い選択を受けつつ PSGL-1 非依存的に増殖し、in vivo に

において変異適応した non-PB が効率良く増殖し、中枢神経系におけるウイルス増殖と病原性発現に関与することが示唆された。

H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

E. 結論

- 1 Non-PB 接種カニクイザルは、感染初期にリンパ球減少症が見られ、髄膜炎を発症し、また振戦などの神経症状を示した。
- 2 Non-PB 接種カニクイザルから採取した咽頭拭い液、直腸拭い液及び血清から高頻度にウイルスが検出され、その検出されたウイルスは全て 98 番目のアミノ酸が E に変異した non-PB 型 (EE) であった。
- 3 PB 接種カニクイザルは明らかな臨床症状は示さなかった。
- 4 PB 接種カニクイザルから感染後期に採取した血清や PBMC、また剖検時の中枢神経組織からウイルスが検出された。そのウイルスも non-PB 接種サルから検出されたのと同じ VP1 配列を持ち 145 番目のアミノ酸が E に変異した non-PB 型 (EE) であった。
- 5 両感染群から検出できたウイルスの VP1 配列内で 98 番目と 145 番目のアミノ酸以外に共通して変異を起こしている箇所は無かった。
- 6 血清中のサイトカイン 28 種類について測定した。IL-1 β は両感染群において上昇していたが、その他、ヒトの EV71 感染重症患者で高いと報告されている IL-1RA、IL-6、TNF- α 、IFN- γ 、G-CSF はすべて non-PB 接種群においてのみ上昇していた。
- 7 神経症状の見られた non-PB 接種群の全てのサル 4 頭の中枢神経組織において、炎症や中枢神経細胞変性が見られた。
- 8 神経症状がみられなかった PB 接種群のサルは 4 頭中 2 頭において炎症や神経細胞変性が見られた。これらのサルは中枢神経においてウイルスが検出できたサルであった。
- 9 中枢神経組織で炎症が見られた non-PB 接種又は PB 接種サルの病変はどちらも同じ程度であった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

- 1 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免疫学的解析：第 62 回日本ウイルス学会総会、横浜、11 月 10 日-12 日、2014.

平成 26 年度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
不活化ポリオワクチンの有効性・安全性の検証及び国内外で進められている新規腸管ウ
イルスワクチン開発に関する研究 (H26-新興-一般-012)
分担研究報告書

hSCARB2-Tg マウスを用いた EV71 感染モデル系の構築

研究分担者

小池智 (公財) 東京都医学総合研究所・副参事研究員

研究協力者

藤井健 (公財) 東京都医学総合研究所・主任研究員

研究要旨

ポリオウイルスと近縁のエンテロウイルス 71 (EV71) は、手足口病の原因ウイルスであるが、近年、アジア太平洋地域で大規模な流行が起こっており、稀に中枢神経合併症による死亡例が報告されている。そのため日本においても重篤な神経症状を伴う EV71 の流行が危惧されている。しかしながら、EV71 の神経病原性発症機構を解析するための適した動物モデルが確立されておらず、ワクチンおよび抗ウイルス薬開発に影響をおよぼしている。我々はこれまでに EV71 の受容体であるヒト SCARB2 (hSCARB2) をマウスに発現させたトランスジェニックマウス (hSCARB2-Tg マウス) を作製し、EV71 に対して感受性を示し、ヒトと同様、急性神経症状を呈することを報告してきた。本研究課題では、hSCARB2-Tg マウスを用いて EV71 感染モデル系の構築を目的とする。hSCARB2-Tg マウスが適切な感染動物モデルであると結論するためには 1) 毒力判定能を有する、2) ヒト感染に近いサルモデルと相関性がある、という 2 点が重要である。本年度は hSCARB2-Tg マウスで毒力判定能について焦点をあて、1) EV71 13 株の毒力比較、2) 毒力に関与すると報告されている VP1-145 アミノ酸との相関性、3) ポリオウイルスで検証されたウイルス温度抵抗性との相関性について検証を行った。EV71 13 株の毒力試験の結果、ウイルス株間で毒力が異なることから、Tg-10 マウスにより毒力判定が可能であると考えられた。VP1-145 アミノ酸もしくは温度抵抗性と毒力との相関性比較から EV71 の毒力は 1 つの因子ではなく幾つかの因子により規定されていることが示唆された。従って、今後はウイルスの遺伝的バックグラウンドを揃え、各因子についてそれぞれ毒力

との相関性を比較する必要がある。

A. 研究背景と目的

これまでにEV71感染に必要な受容体であるhSCARB2をマウスに発現させたトランスジェニックマウス(hSCARB2-Tgマウス)を作製し、成獣マウスではEV71に対して感受性を示し、ヒトと同様、急性神経症状を呈することを報告した。昨年度はEV71ウイルス株間での毒力の違いを比較するため、3週齢のTg-10マウスにBrCr/USA/70、SK-EV006/Malaysia/97株、C7/Japan/97株ならびにEV71/Isehara/Japan/99株を 1×10^6 TCID₅₀脳内接種し、病態を観察したところ、試験した全てのウイルス株の感染により、神経症状を示すが、毒力に違いがみられていた。本年度はTg-10マウスの毒力判定能を確認するためにウイルス株を13株に増やし毒力比較を行った。またVP1-145番目のアミノ酸にグルタミン酸(E)を持つ株は高い毒力を示すことが示唆されている。更にポリオウイルスでは温度抵抗性と毒力の相関性が解析されている。そこでVP1-145アミノ酸もしくは温度抵抗性と毒力の相関性を調べるため、毒力比較を行った13株の毒力とを比較解析した。

B. 研究方法

EV71 13株(表3)を6-7週令のTg-10マウスに 1×10^5 TCID₅₀もしくは 1×10^6 TCID₅₀脳内接種後、病態スコア、神経症状発現率、死亡率で毒力を比較した。

VP1-145アミノ酸と毒力の相関性を調べるため、CODEHOP PCR法によりVP1領域の一部の塩基配列を決定後、アミノ酸と毒力とを比較した。

温度抵抗性を調べるため、EV71 13株の37°Cと39°Cにおけるウイルス力価をマイクロタイトレーション法により決定した。ウイルス力価の比($\Delta 37^\circ\text{C}/39^\circ\text{C}$)を算出後、 $\Delta 37^\circ\text{C}/39^\circ\text{C}$ が2未満と温度抵抗性、2以上を温度感受性株とし、毒力と比較した。

C. 研究結果

EV71 13株の毒力比較の結果、それぞれのウイルスで病態スコア、神経症状発現率、死亡率が異なっていた。Isehara、Nagoya、KOR株が病態スコア、神経症状発現率(図1A)、死亡率が高かった(図1B)。一方、NETH、KED005、THAI、VN株は病態スコア(図1A)、神経症状発現率、死亡率が低かった(図1B)。

VP1-145番目のアミノ酸を比較したところ、Isehara、Nagoya、BrCr、Hungary、THAI、VN株はグルタミン酸(E)であった。SK、C7、1095株はグリシン(G)、KOR、NETH、KED005株はグルタミン(Q)であった。BulgariaとCAV16株ではそれぞれアラニン(A)とバリン(V)であった(表2)。

温度抵抗性を比較した結果、BrCr、Nagoya、Bulgaria、SK、C7、Isehara、VN株は $\Delta 37^\circ\text{C}/39^\circ\text{C}$ が2未満であった。一方、

Hungary、NETH、THAI、KED、1095、KOR、CVA16 G10 株は $\Delta 37^{\circ}\text{C}/39^{\circ}\text{C}$ が2以上であった(図2)。毒力との相関性を調べたところ、VP1-145 アミノ酸にEを持つ株でも毒力の低い株が、それ以外のアミノ酸を持つ株でも毒力の高い株が存在した。VP1-145 アミノ酸がEの場合でもそれ以外のアミノ酸の場合でも温度抵抗性株の方が高い毒力を示す傾向が見られた(表2)。

D. 考察

Tg-10 マウスのEV71接種により、病態スコア、神経症状発現率、死亡率が異なるウイルス株が存在することが明らかとなったことから、Tg-10 マウスにより毒力判定可能であると考えられる。VP1-145 アミノ酸比較からは必ずしも毒力の違いがVP1-145 アミノ酸に起因するか否かは結論できなかった。温度抵抗性株は比較的毒力が強い傾向にある可能性が考えられる。

E. 結論

Tg-10 マウスを用いることで毒力判定が可能であることが示された。VP1-145 アミノ酸もしくは温度抵抗性と毒力との相関性比較からEV71の毒力は幾つかの因子により規定されていることが示唆された。従って、今後はウイルスの遺伝的バックグラウンドを揃え、各因子についてそれぞれ毒力との相関性を比較する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamayoshi S, Fujii K, Koike S: Receptors for enterovirus 71. *Emerging Microbes & Infection* 3: e53, 2014
2. Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Sato Y, Nakajima N, Koike S, Iwasaki T, Sata T, Yamashita T, Minagawa H, Taguchi F, Hasegawa H, Shimizu H, Nagata N: Establishment of a panel of in-house polyclonal antibodies for the diagnosis of enterovirus infections. *Neuropathology*: Epub ahead of print, 2014
3. Koike S: A pH-dependent molecular switch for virion uncoating. *Protein Cell*, 5: 653-654, 2014
4. 小池 智: ポリオウイルスの神経指向性のメカニズム *NEUROINFECTION*, 19:7-12, 2014

2. 学会発表

1. Koike S: Enterovirus 71 - an emerging enterovirus-. The XVIII th Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses (EUROPIC 2014). Blankenberge, Belgium, 2014年3