

厚生労働科学研究費委託費

平成26年度 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進 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

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

担当責任者：	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、中国本土で検出される EV71 分離株のほとんどが、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ている。そのため、中国国内では現在、遺伝子型 C4 ベース不活化 EV71 ワクチンの開発が進められ、近い将来に承認されるものと考えられている。中国で開発中の不活化 EV71 ワクチンは、世界初の EV71 ワクチンとして重症 EV71 感染症の予防効果が期待されるが、日本を含む中国以外のアジア地域における EV71 ワクチンの有用性・必要性については、各国における手足口病流行の疫学的・ウイルス学的・分子疫学的状況を踏まえた検討が必要とされる。

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ひとつである。手足口病の主要な原因ウイルスは、従来、コクサッキーウイルス A16 型 (CVA16)、および、エンテロウイルス 71 (EV71) であったが、近年、コクサッキーウイルス A6 型 (CVA6) による手足口病流行が、日本やアジア地域を含めた世界各地で報告されている。EV71 による手足口病流行時には、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の発生頻度が高くなる。とくに東アジア地域では、重症例・死亡例をともなう大規模な EV71 感染症流行が大きな問題になっているが、EV71 感染症重症化を規定するウイルス側・宿主側要因は、まだ分かっていない。

1990 年代後半以降、とくに東アジアの広範な地域で、EV71 感染症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、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

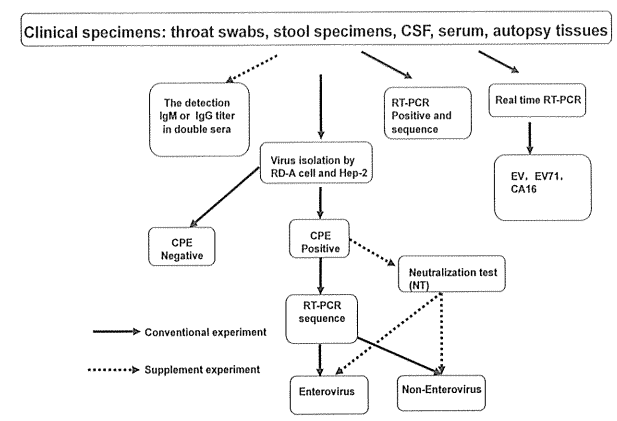
に入ってから、シンガポール、オーストラリア、香港、ベトナム、日本等アジア各国で、EV71 等による手足口病流行が報告されている。中国本土では、2008 年に手足口病の大流行が発生し、126 例の死亡例が報告された。重症例・死亡例の多くで EV71 が検出されており、重症例の臨床像は、台湾等における EV71 急性脳炎症例と類似していた。中国本土では、その後も、重症例を伴う手足口病流行が継続し、2009 年および 2010 年には、それぞれ、353 例および 905 例の死亡例が報告されており、公衆衛生上の大きな問題となっている。そのため、中国国内では、EV71 ワクチン研究開発が積極的に進められ、3 社が開発した不活化 EV71 ワクチンの有効性・安全性に関する大規模臨床研究の結果が報告されている。中国で開発中の不活化 EV71 ワクチンは、近い将来、中国で承認・導入されるものと考えられる。中国で開発中の遺伝子型 C4 ベース不活化 EV71 ワクチンは、世界初の EV71 ワクチンとして期待されるが、日本を含む中国以外のアジア地域における EV71 ワクチンの有用性・必要性については、さらなる検討が必要とされる。

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。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。

図 1

HFMD Cases Flow Chart for Laboratory Identification



C. 研究結果

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 7,200,000 例の手足口病疑い症例が報告された。この間、2,457 例の死亡例、および、82,486 例の重症例(中枢・心肺機能障害)が報告され、手足口病疑い症例中の重症化率および死亡率は、それぞれ、約 1.1% および 0.03%であった。手足口病疑い例のうち、約 3.7%

について実験室診断が行われ、実験室診断確定死亡例の多く(93%)は、EV71 感染によるものであった。手足口病実験室診断は、中国 CDC を中心とした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)。

中国全土の手足口病サーベイランスにより得られた EV71 分離株の分子疫学的解析により、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 C4a 株は、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。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、EV71 感染症重症例の流行に関与している。

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。そのため、2008 年 5 月より、手足口病は、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、また、中国 CDC を中心とした中国国内エンテロウイルス実験室ネットワークにより、重症例を中心とした手足口病口症例の実験室診断が行われている。2008～2012 年にかけての手足口病サーベイランスおよび実験室診断の結果のサマリーは、中国 CDC のグループにより報告されており、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。

表 1 現在開発中の EV71 ワクチン

Institute	Country	Vaccine			Reference
		Antigen	Production	Status	
National Health Research Institute	Taiwan	Inactivated EV71 particles (genotype B4)	Vero cell	Phase II	http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01268787 Cheng et al. Vaccine 2013 [Phase I]
Adimmune Corporation	Taiwan	Inactivated EV71 particles	Cell culture	Preclinical	http://www.adimmune.com.tw/eng/index.php
Sinovac	China	Inactivated EV71 particles (genotype C4)	Vero cell	Phase III reported	http://www.sinovac.com/ Li et al. Vaccine 2012 [Phase I] Li et al. J Infect Dis 2014 [Phase II] Zhu et al. N Engl J Med 2014 [Phase III]
Beijing Vigoo Biological	China	Inactivated EV71 particles (genotype C4)	Vero cell	Phase III reported	http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01399853 Zhu et. al. Lancet 2013 [Phase II] Zhu et. al. Lancet 2013 [Phase III]
Institute of Medical Biology Chinese, Academy of Medical Sciences	China	Inactivated EV71 particles (genotype C4)	KMB-17 cell	Phase III reported	http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01512706 Li et al. N Engl J Med 2014 [Phase III]
Takeda (Inviragen)	USA/Singapore/Japan	Inactivated EV71 particles	Vero cell	Phase I	http://www.inviragen.com/
EV71 Vaccine Project 2009-2020 (Korea CDC)	Korea	Inactivated EV71 particles or VLP		Preclinical	
VABIOTEC	Vietnam	Inactivated EV71 particles (genotype C5?)		Preclinical	
Sentinx Therapeutics	Malaysia	VLP		Preclinical	http://www.sentinx.com/

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimizu H. Development and introduction of inactivated poliovirus vaccines derived from Sabin strains in Japan. Vaccine (in press)
- 2) Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Sato Y, Nakajima N, Koike S, et al. Establishment of a panel of in-house polyclonal antibodies for the diagnosis of enterovirus infections. Neuropathology (in press)
- 3) Shimizu H, Nakashima K. Surveillance of hand, foot, and mouth disease for a vaccine. Lancet Infect Dis 14(4), 262-3, 2014
- 4) Arita M, Kilpatrick DR, Nakamura T, Burns CC, Bukbuk D, Oderinde SB, Oberste MS, Kew OM, Pallansch MA, Shimizu H. Development of an efficient entire-capsid-coding-region amplification method for direct detection of poliovirus from stool extracts. J Clin Microbiol 53: 73-78, 2015

そのため、現在中国で 3 社(Sinovac, Beijing Vigoo Biological, Institute of Medical Biology Chinese/Academy of Medical Sciences)により開発が進められている不活化 EV71 ワクチンは、すべて中国で分離された遺伝子型 C4 株をホルマリン処理した不活化 EV71 抗原が用いられている(表 1)。いずれの不活化 EV71 ワクチンについても、大規模第三相臨床試験により、高い有効性および安全性が確認されたとする内容の臨床研究論文が発表されており、近い将来の承認・導入が期待されている(表 1)。しかし、中国で開発された不活化 EV71 ワクチンは、いずれも、中国における、ほとんど唯一の流行株である遺伝子型 C4 株をホルマリン処理した不活化 EV71 抗原が用いられており、より多様な遺伝子型・抗原性を有する EV71 の伝播・流行が報告されているアジアの他の地域(台湾、マレーシア、オーストラリア、ベトナム、日本等)における C4 ベース不活化 EV71 ワクチンの交叉抗原性・有効性について、今後さらなる検討が必要とされる。不活化 EV71 ワクチンには、EV71 感染症重症例発症予防効果が期待できるものの、CVA16 や CVA6 等、他の血清型のエンテロウイルスによる手足口病にも発症予防効果を有する次世代手足口病ワクチン開発の必要性についての議論がなされている。

- 5) Naeem A, Hosomi T, Nishimura Y, Alam MM, Oka T, Zaidi SS, Shimizu H. Genetic diversity of circulating Saffold viruses in Pakistan and Afghanistan. *J Gen Virol* 95: 1945-1957, 2014
- 6) Shirato H, Someya Y, Ochiai M, Horiuchi Y, Takahashi M, Takeda N, Wakabayashi K, Ouchi Y, Ota Y, Tano Y, Abe S, Yamazaki S, Wakita T, sIPV Evaluation Group of NIID Virology II. A national reference for inactivated polio vaccine derived from Sabin strains in Japan. *Vaccine* 32: 5163-5169, 2014
- 7) 清水博之. ライノウイルスの分類と疾患への関与. *日本医事新報* 4689: 53-55, 2014
- 8) 清水博之: 急増した手足口病 感染・炎症・免疫 44, 94-96, 2014
- 9) 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, 2014
- 10) 清水博之、「消化器ウイルス篇 エンテロウイルス-ポリオウイルスおよび非ポリオエンテロウイルス」の項を担当、臨床医のための呼吸器・消化管ウイルス感染症 (堤裕幸、中野貴司、寺田喜平、編)、103-109, 診断と治療社、東京、2014
- the interaction between enterovirus 71 and a cellular receptor, PSGL-1. Protein Island Matsuyama International Symposium, Matsuyama, Ehime, 17 September, 2014
- 5) Shimizu H. Virology of Enterovirus 71. JICA Training Workshop on Biosafety and HFMD Laboratory Diagnosis, Hanoi, Viet Nam, 14-18 July 2014
- 6) Shimizu H. Overview of hand, foot, and mouth disease and enterovirus infections. JICA Training Workshop on Biosafety and HFMD Laboratory Diagnosis, Hanoi, Viet Nam, 14-18 July 2014
- 7) 吾郷昌信、北川由美香、松本文昭、吉川亮、陣内久美子、森内浩幸、永田典代、清水博之、森田交一. 新生児重症感染を惹起したコクサッキーウイルス B2 型の性状解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜市, 11 月 10~12 日, 2014
- 8) 町田早苗、清水 博之. ヒトパレコウイルス (HPeV) 3 型の増殖機構の解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜市, 11 月 10~12 日, 2014
- 9) 中村 朋史、有田 峰太郎、清水 博之. ウイルス受容体特異性を応用したポリオウイルス直接検出法の開発. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜市, 11 月 10~12 日, 2014

2. 学会発表等

- 1) Shimizu H. WHO Collaborating Centre for Virus Reference and Research (Enteroviruses). (Poster). The First Regional Forum of WHO Collaborating Centres in the Western Pacific, Manila, the Philippines, 13-14 November, 2014
- 2) Shimizu H. Molecular basis of virus-host interaction and pathogenesis of enterovirus 71 infection. Monto Ho Memorial Lectures on Enterovirus 71, 2014 International Symposium on Infectious Disease and Signal Transduction, Tainan, Taiwan, 2 November, 2014
- 3) Shimizu H. The molecular basis of the interaction between EV71 and PSGL-1 from structural and functional standpoints. TLL Seminar, Temasek Life Science Laboratory, Singapore, 25 September, 2014
- 4) Shimizu H. Structural and functional basis of
- 10) 小谷治、藤井健、鈴木忠樹、岩田奈織子、網康至、須崎百合子、長谷川秀樹、田口文広、清水博之、永田典代. カニクイザルを用いた Saffold virus の神経病原性の病理学的解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜市, 11月10~12日, 2014
- 11) 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 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜市, 11 月 10~12 日, 2014
- 12) 吾郷昌信、陣内久美子、高柳俊光、森内浩幸、清水博之: コクサッキーウイルス B2 型垂直感染による新生児重症感染例. 第 55 回日本臨床ウイルス学会. 札幌市, 6 月 14 日~6 月 15 日, 2014
- 13) 藤本嗣人、花岡希、藤巻明日香、萩美貴、清水博之: 兵庫県で脳炎を引き起こしたエンテロウイルス 71 (EV71) の分子疫学. 第 55 回日本臨床ウイル

ス学会. 札幌市、6月14日～6月15日, 2014

厚生労働科学研究委託費

(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)

委託業務成果報告書

日本国内小児侵襲性肺炎球菌感染症由来血清型 19A 型の遺伝子型別に関する研究

担当責任者 常 彬 国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官
前川純子 国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官

研究要旨

2007年から2013年10月まで、日本国内の15歳未満小児で発症した180例の侵襲性肺炎球菌感染症例 (invasive pneumococcal disease; IPD) から分離された血清型 19A 型肺炎球菌の遺伝子型別 (マルチローカスシーケンスタイピング; MLST) 解析および薬剤感受性試験を行った。180株の中、177株 (98.3%) は3つのグループに分けることができた。そのうち、133株 (73.9%) は clonal complex (CC) 3111 に属し、もっとも多かった。2番目に多く分離されたのは ST320 型で、分離率は 15.0% (27株) であった。17株 (9.4%) は CC2331 型を示した。残った3株はそれぞれ ST63、ST667、ST5242 であった。ST320 型肺炎球菌のペニシリン G (PCG)、セフトキシム (CTX) およびメロペネム (MEPM) に対する MIC₉₀ および幾何平均 MIC は他の ST タイプより有意に高かった。7価肺炎球菌コンジュゲートワクチン (PCV7) 導入後、米国においては、PCV7 に含まれない ST320 19A 型肺炎球菌による IPD の罹患率の上昇が見られていた。わが国においても、PCV7 接種率の上昇に伴い、同様な現象が起こることが明らかになった。

A. 研究目的

日本では、侵襲性肺炎球菌感染症 (IPD) は 2013 年 4 月 1 日から 5 類感染症に追加され、全数把握疾患に指定された。また、同時期から PCV7 は定期接種の対象となり、11 月 1 日からは 13 価肺炎球菌コンジュゲートワクチン (PCV13) に変更された。

米国において 2000 年から PCV7 が導

入された以後、ワクチンに含まれる血清型による侵襲性感染が減少する一方、ワクチンに含まれない血清型、特に 19A 型肺炎球菌による IPD の罹患率の増加が見られた。その中でも、抗菌薬に耐性を示す ST320 19A 肺炎球菌による IPD 症例の増加が問題になっていた。日本においても、2010 年 2 月に PCV7 が導入された後の 19A 型に

よる IPD の増加がみられた (IASR 35: 234-236, 2014)。本担当研究は日本国内の 15 歳未満小児 IPD 由来 19A 型肺炎球菌の遺伝子型別と薬剤感受性試験を行い、その特徴などの疫学データの提供を目的とした。

B. 研究方法

1: 小児 IPD 症例由来肺炎球菌

2007 年から 2013 年 10 月まで、日本国内 15 歳未満小児 IPD 症例 180 例由来 19A 肺炎球菌を対象とした。血液寒天培地にて 37°C、5% CO₂ の条件下で一晩培養した肺炎球菌を用いて解析を行った。

2: 血清型別

肺炎球菌の血清型は Statens Serum Institut 製血清を用いて、莢膜膨潤法により確認した。

3: 遺伝子型別 (MLST)

MLST では、分離株のゲノム DNA を精製し、肺炎球菌のゲノム上にある 7 つのハウスキーピング遺伝子 (*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、ST 型を決定した。7 つの遺伝子のうち、5 つ以上は同じ塩基配列を有する ST 型は同一 clonal complex (CC) にまとめている。得られた ST 型のクラスター解析は BioNumerics を用いて行った。

4: 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は PCG、CTX および MEPM を用いて、微量液体希釈法によって行った。

(倫理面への配慮)

該当しない。

C. 研究結果

すべての集計は症例数をもとに行っている。

1: 小児 IPD 由来 19A 型肺炎球菌の遺伝子型

2007 年から 2013 年 10 月まで、日本国内 15 歳未満小児における IPD 症例由来肺炎球菌の収集を行った。そのうち、血清型 19A 型肺炎球菌は 34 県の 180 症例 (そのうち髄膜炎症例は 15 例) から分離された。これらの 19A 型肺炎球菌の遺伝子型別およびクラスター解析を行った

本研究で収集した 19A 型肺炎球菌は全部で 14 の ST 型がみられた (表 1)。ST7790、ST8736、ST9016、ST9045 および ST9334 は ST3111 の近縁 ST 型で、ST5842、ST7495 および ST7500 は ST2331 の近縁 ST 型であり、それぞれは CC3111 および CC2331 に属する。クラスター解析では (図 1)、これらの 180 株は大きく 4 つのグループ (CC3111、ST320、CC2331、その他) に分けられる。133 株 (73.9%)、27 株 (15.0%) と 17 株 (9.4%) はそれぞれ CC3111、ST320 および CC2331 に属する。全株の 98.3% がこの 3 つのクラスターを形成した。残った 3 株 (1.7%) は

CC3111、ST320、CC2331 と異なる ST63、ST667 と ST5242 を示した(図 1)。

CC3111 および CC2331 19A 型肺炎球菌は日本国内各地域から分離されたタイプであった。2015 年 2 月現在、肺炎球菌の MLST 登録サイトには日本以外の分離株は CC3111 は 1 株のみの登録であった。CC2331 19A 型株はすべて日本国内の分離株の登録であった。その一方、ST320 は日本では特定の地域からしか分離されなかったタイプで、アメリカはじめ、アジアやヨーロッパの各国から分離されたことが報告されていた。以上のことから、CC3111 および CC2331 19A 型肺炎球菌は日本に固有のクローンである可能性が考えられた。

2: 19A 型肺炎球菌の ST 型と薬剤感受性の相関性

180 株血清型 19A 型肺炎球菌のうち、179 症例由来株の薬剤感受性試験を行い、PCG、CTX および MEPM に対する MIC を決定した(表 2)。菌血症患者から分離された ST2331 の 1 株は MIC 測定用液体培地に増殖できず、MIC を決めることができなかった。10 株以上に分離された CC3111、S320 および CC2331 の MIC 分布、MIC₉₀ および幾何平均 MIC を表 2 にまとめている。括弧の中の数字は髄膜炎症例数を示している。

CC3111 肺炎球菌の PCG、CTX および MEPM に対する MIC は ST320 および CC2331 に比べて幅が広く、バラツキが多

かった。一方、ST320 肺炎球菌の PCG、CTX および MEPM に対する MIC₉₀ および幾何平均 MIC は CC3111 および CC2331 より有意に高かった。

D. 考察

米国では、PCV7 導入後で血清型 19A による小児 IPD の罹患率の上昇およびペニシリンに対する耐性率の上昇がみられた(J. Infect. Dis. 1988-1995, 2005)。特に、19F ST320 の莢膜型変換により現れた 19A ST320 型肺炎球菌の広がりが問題視されていた。日本国内でも、PCV7 導入による 19A 型肺炎球菌による IPD の罹患率の増加がみられたとともに、抗菌薬に対する感受性の悪い ST320 型が小児 IPD 由来 19A 型肺炎球菌の 15.0% を占めたことが本研究で明らかになった。2013 年 11 月より、日本国内の小児用肺炎球菌コンジュゲートワクチンは PCV7 から PCV13 に切り替えられ、19A 型肺炎球菌による罹患率の低下が期待されている。さらに、PCV13 の接種率の増加によって、ST320 19A 型肺炎球菌による IPD は特定な地域での発症が減少し、他の地域への伝播防止効果もみられると思われる。一方、PCV13 に含まれない血清型肺炎球菌による IPD の増加の有無を継続して観測することも非須である。

E. 結論

日本国内の 15 歳未満小児 IPD より分離された 19A 型肺炎球菌は主に 3 つのク

ラスターに分けられた。日本固有の ST 型 (ST3111 と ST2331) およびの莢膜型変換により出現した新たな ST 型 (ST320) がみられた。PCV13 の導入効果が期待されるとともに、PCV13 の接種を受けていない年長幼児の 19A 型肺炎球菌による IPD の観測が必要である。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし。

2. 学会発表

小児用肺炎球菌結合型ワクチン PCV7 導入が小児侵襲性肺炎球菌感染症へ及ぼす影響の細菌学的解析。常彬。第 88 回日本感染症学会学術講演会、第 62 回日本化学療法学会総会合同学会、2014 年 6 月。国内。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

表 1. 小児侵襲性肺炎球菌感染症由来 19A 型の遺伝子型

ST	<i>aroE</i>	<i>gdh</i>	<i>gki</i>	<i>recP</i>	<i>spi</i>	<i>xpt</i>	<i>ddl</i>
63	2	5	36	12	17	21	14
320	4	16	19	15	6	20	1
667	8	13	14	4	14	4	14
2331	10	16	150	1	17	1	29
5842	10	16	150	1	13	1	29
7495	10	16	150	1	321	1	270
7500	10	16	150	201	17	1	29
3111	61	60	67	16	10	104	14
7790	61	60	67	16	10	466	14
8736	61	5	67	16	10	104	14
9016	61	60	67	16	10	104	26
9045	7	60	67	16	10	104	14
9334	61	60	67	16	10	104	591
5242	7	13	8	6	1	337	8

表 2. 19A 型肺炎球菌の PCG, CTX, MEPM に対する MIC (n=176)

ST または CC	抗菌薬	≤0.06 μg/mL	0.12 μg/mL	0.25 μg/mL	0.5 μg/mL	1 μg/mL	2 μg/mL	4 μg/mL	≥8 μg/mL	MIC ₉₀ (μg/mL)	幾何平均 MIC
CC3111 (11)	PCG	68 (4)	12	6 (1)	22 (4)	23 (2)	2	0	0	1	0.16
	CTX	1	3	38 (4)	64 (7)	27	0	0	0	1	0.43
	MEPM	83 (4)	21 (3)	24 (3)	5 (1)	0	0	0	0	0.25	0.05
ST320 (1)	PCG	0	0	0	0	0	15 (1)	12	0	4	2.72
	CTX	0	0	0	1	22 (1)	3	0	1	2	1.14
	MEPM	0	0	1	22 (1)	4	0	0	0	1	0.54
CC2331 (3)	PCG	16 (3)	0	0	0	0	0	0	0	≤0.06	0.14
	CTX	2	2	5 (2)	7 (1)	0	0	0	0	0.5	0.42
	MEPM	16 (3)	0	0	0	0	0	0	0	≤0.06	0.04

括弧の中の数字は髄膜炎症例数を示している。

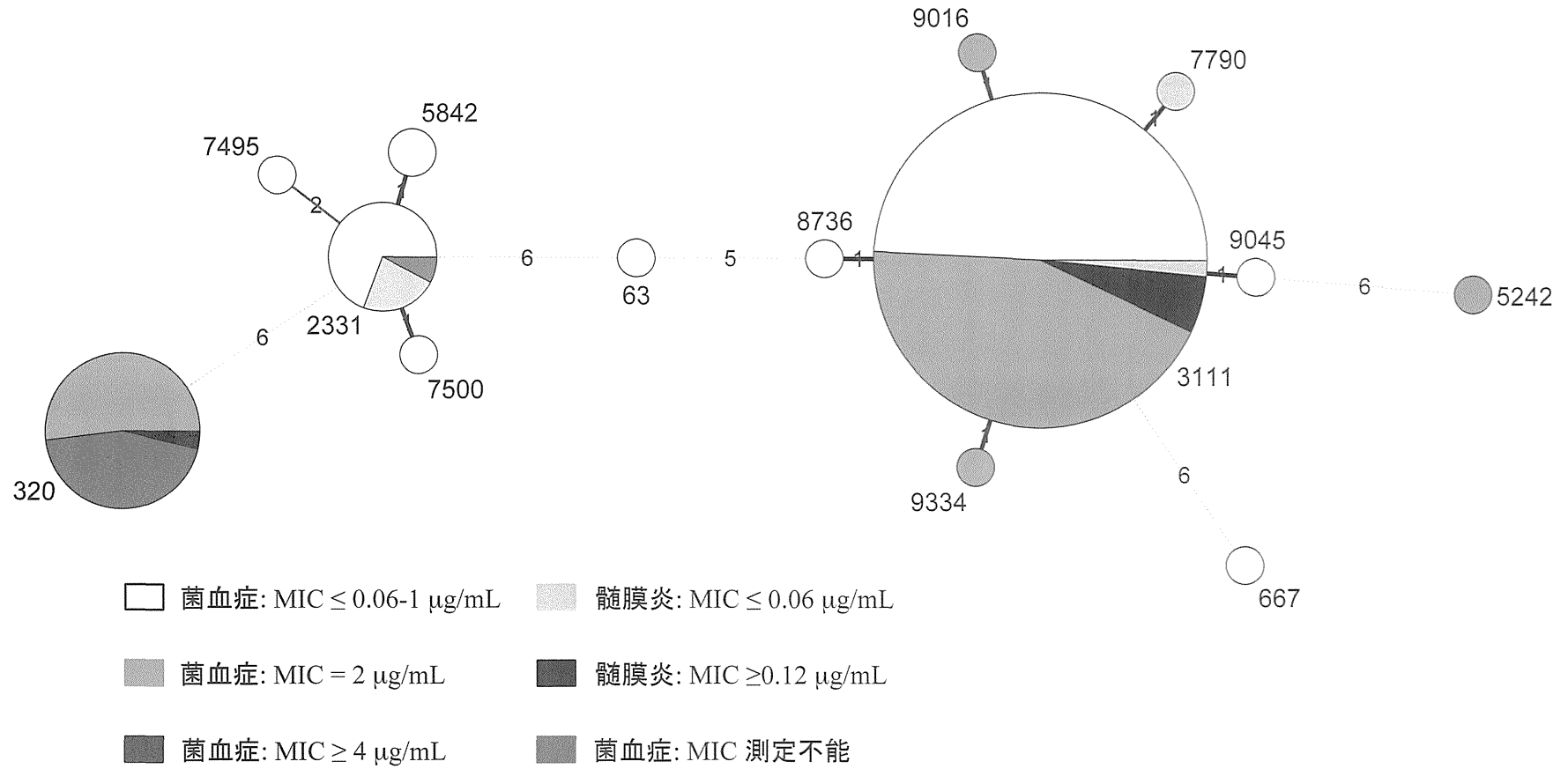


図1:小児 IPD 由来 19A 型肺炎球菌の ST 型分布

厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

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（H26－新興実用化—一般—011）

業務項目：「出血熱の解析：SFTS」

担当責任者 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)は、2011年にブニヤウイルス科フレボウイルス属の SFTS ウイルスによる急性感染症であることが判明した新興ウイルス感染症である。その後、日本、韓国でも SFTS 患者が発生している。中国では20省で患者が報告されており、日本では15自治体で患者が発生している。SFTS ウイルスはマダニ媒介性ウイルスであることから、野生動物や家畜とマダニの間でウイルスの感染環が形成されていると考えられる。このため、SFTS ウイルスの分布を調べるためには動物の血清疫学調査を行うのが重要となる。これまでに、組換え SFTS ウイルス抗原を用いた抗体検出法を作製したが動物検体からの抗体検出には感度が低いことが判明した。そこで、SFTS ウイルス感染細胞由来抗原を用いた ELISA 及び SFTS ウイルス感染細胞を抗原とする間接蛍光抗体法を動物血清に適用したところ、十分な感度で抗体が検出された。また、比較的近縁な Bhanja virus との交差反応の有無は血清疫学上大きな問題となるため、両ウイルスの抗原性の交差についても検討した結果、非常に弱い交差反応性はあるものの疫学上問題とならないことが判明した。本試験法により、国内外の動物の SFTS ウイルスの血清疫学が可能となった。

業務項目の担当責任者氏名・所属研究機関名
及び所属研究機関における職名：森川茂・国立感染症研究所・獣医科学部・部長

業務項目の担当協力者：宇田晶彦、木村昌伸、朴ウンシル、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）

A. 研究目的

重症発熱性血小板減少症(SFTS)ウイルスは2009年に新興した感染症で、2011年

に中国で原因ウイルスが同定された新規ブニヤウイルスである。SFTS患者の症状は、発熱、消化器症状、血小板減少、白血球数減少等の特徴とし、高齢者で重症例と死亡率が高い傾向がある。これまでに、中国では20省で患者が報告されており、日本では15自治体で患者が発生している。韓国でも数十人の患者が報告されている。国内のこれまでの確定患者数は100症例以上となり致死率は30%と極めて高い。

SFTS ウイルスはマダニ媒介性ウイルスであることから、野生動物や家畜とマダニ

の間でウイルスの感染環が形成されていると考えられる。中国では流行地において反芻獣である山羊、羊、牛が特にウイルスの感染環において重要な役割を果たしていると考えられている。国内の流行地では、これらの家畜がそれほど多く飼育されていないことから野生動物がウイルスの感染環において重要な役割を果たしていると考えられる。このため、SFTS ウイルスの分布を調べるためには野生動物等の血清疫学調査を行うのが重要である。

中国では、各種動物の血清疫学には、ELISA プレートに固相化したウイルス抗原と反応した被験血清中の抗体を、標識ウイルス抗原で検出するサンドイッチ ELISA を用いている。これまでに、同様の ELISA を試みたが十分な感度、特異度が得られなかった。また、組換え SFTS ウイルス抗原を用いた抗体検出法を作製したが動物検体からの抗体検出には感度が低いことが判明した。そこで、SFTS ウイルス感染細胞を用いた抗体検出法を検討し、動物の血清疫学を可能とする必要がある。これまでに、シカ、イヌ、イノシシからの抗体検出が可能であることが明らかになっている。これら以外の動物からの抗体検出の可能性を検討した。さらに、遺伝的に比較的近縁な Bhanja ウイルスとの血清学的な交差性の程度を明らかにし、血清疫学上問題となる交差があるかを明らかにする必要がある。本研究では、これらにより正確な血清疫学を行う体制を整備することを目的とした。

B. 研究方法

これまで、組換え SFTS ウイルス蛋白を用いた血清診断系を開発したが、動物の血

清疫学に用いるには十分な感度が得られなかった。そこで、ELISA 抗原には SFTS ウイルス感染 Huh7 細胞ライセート及び非感染細胞ライセートを用いた。Huh7 細胞に SFTS ウイルスを感染後3日目に細胞を PBS で洗浄し、1% NP40/PBS で 10 分間可溶化したライセートを、短波長 UV トランスイルミネータ上で 10 分間 UV 照射してウイルス抗原を可溶化し不活化した。その後 12,000rpm, 10 分間遠心した上清を ELISA 抗原とした。ELISA 抗原は、抗 SFTS ウイルス NP ウサギ血清を用いた ELISA で最大抗原価を示す最大希釈の 4 倍低い希釈である 800 倍希釈して ELISA プレートに固相化した。二次血清には protein A/G-HRPD を用い、基質には ABTS を用いた。間接蛍光抗体法 (IF 法)は、SFTS ウイルス感染 HeLa W229 細胞を用いた。SFTS ウイルス持続感染 HeLa 細胞を作製し、トリプシン処理、PBS 洗浄により浮遊化させた SFTS ウイルス感染 HeLa W229 細胞と非感染 HeLa W229 細胞を 1:2 の比率で混合し、IF スライドグラスに塗抹し、UV 照射下で乾燥しアセトン固定して IF 法の抗原とした。

Bhanja ウイルス血清群の Forecariah と Palma ウイルスを米国から入手し、SFTS 抗原と同様に ELISA 抗原と IF 抗原を作製した。また、Bhanja ウイルス血清群の Forecariah と Palma ウイルスをウサギに実験感染させて特異抗体を作製し、SFTS ウイルスとの交差性を調べた。また、SFTS ウイルス抗体陽性シカ血清を用いて、Forecariah と Palma ウイルス抗原との交差性を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究では、人に由来する材料は用いていない。また、野生動物等の材料は、害獣駆除あるいは狩猟期に捕獲された動物に由来するため、国立感染症研究所の動物実験委員会の定める動物実験に該当しない。

Forecariah ウイルスと Palma ウイルスのウサギ感染実験は、国立感染症研究所の動物実験委員会の承認を得て ABSL2 レベルで実施された。

C. 研究結果

1) 動物からの SFTS ウイルス抗体検出法:

これまでにシカ、イノシシ、イヌなどから SFTS ウイルス抗体を検出している。より多くの動物種に対応可能とするため ELISA の二次血清には Protein A/G-HRPD (Invitrogen) を用いた。ウサギ免疫血清、シカ、イノシシ、イヌの陽性血清を用いて検討した結果、Protein A/G-HRPD を 20,000 倍希釈するのが指摘であった。この条件で、シカ、イヌはそれぞれに特異的な二次血清と同等以上の感度で抗体が検出された。この条件で他の動物の血清中の SFTS 特異抗体を検出すると、ニホンザル、タヌキ、アライグマ、ハクビシン、ウサギ、アナグマから抗体陽性動物が見いだされることがわかった。これらの一部の血清は IF でも陽性が確認されていることから、本 ELISA は、各種動物からの SFTS ウイルス抗体を検出することが出来ると判断された。

2) Bhanja ウイルス血清群の Forecariah と Palma ウイルス抗体検出系の開発と SFTS ウイルスとの血清学的交差性:

Forecariah ウイルスと Palma ウイルス

は、Dr. Robert B. Tesh, M.D. (University of Texas Medical Branch, USA) から供与された。国立感染症研究所のバイオリスク管理委員会で両ウイルスのバイオセーフティレベルの申請を行った結果、BSL2 の承認を受けた。このため、両ウイルスの培養、動物感染実験は BSL2 で実施された。ウイルスの N 蛋白質のアミノ酸配列に基づく分子系統樹 (図 1) から、フレボウイルス属のウイルスの中で Forecariah ウイルスと Palma ウイルスは、SFTS ウイルスにより近縁である。なお、リフトベレー熱ウイルスは、遺伝的に距離があり血清学的にも交差しないことを既に確認している。

Forecariah ウイルスと Palma ウイルスを Vero 細胞、Vero E6 細胞、Huh7 細胞に感染するといずれの細胞でも増殖したが、Huh7 細胞で最も増殖効率が高く、感染力価はそれぞれ 2×10^7 TCID₅₀/mL, 6.3×10^5 TCID₅₀/mL であった。Forecariah ウイルスと Palma ウイルス (10^6 TCID₅₀) をウサギ (日本白色種) 2 羽ずつに皮下接種した。感染後 6 週間観察したが、臨床的には全く症状を示さず両ウイルスともウサギには病原性がないと考えられた。感染後 1 週で非常に低力価の抗体が検出され、抗体価は上昇し 6 週でピークに達した。これらの血清及び SFTS ウイルスの N 蛋白質特異的抗血清を用いて ELISA と IF で交差反応性を検討した。その結果、ELISA では Forecariah ウイルス感染ウサギ#2 が SFTS ウイルスに弱い交差反応性を示したが、他の血清は交差反応性を示さなかった (図 2)。また、IF ではいずれの血清も交差反応性を示さなかった (図 3)。

D. 考察

SFTS は、その高い致死率と患者からの二次感染を起こすこともあることから、公衆衛生上極めて重要な新興ウイルス感染症である。国内では SFTS ウイルスを媒介するのはフタトゲチマダニとタカサゴキラマダニとかんがえられるが、これらは多くの野外動物、家畜を宿主とすることから、ウイルスの感染感はマダニと動物で維持されていると考えられる。SFTS 患者の発生地域は近畿以西に限局しているが、その原因は不明である。中国、日本でウイルス感染間に重要な動物を明らかにし、それらのモニタリングを継続することは患者発生リスクを評価するためにも重要である。

本研究では、各種動物からの血清抗体を効率よく検出する系を確立した。また、遺伝的に近縁な Bhanja ウイルスとの血清学的交差性に関してウイルス感染ウサギ血清等を用いて解析した結果、非常に弱い交差性はあるものの、容易に鑑別可能で血清疫学上問題ないことが明らかになった。なお、SFTS ウイルスとより近縁なウイルスがアジア、北米で見つかっていることから（図 4）、近隣アジア諸国での SFTS 近縁ウイルスの調査も検討する必要がある。また、Bhanja ウイルスの国内浸淫度を動物血清を用いて調査することも必要と考えている。

中国 CDC の Porf. Mifang Liang、Porf. Li-Dexin らとの協議から、中国では主に反芻獣家畜が SFTS ウイルス感染環に重要な役割を果たしているとのことであるが、国内ではむしろ野生動物が重要かもしれない。

E. 結論

種々の動物血清から SFTS ウイル斯特異抗体を検出する方法が確立された。この方法により、多くの動物種の血清疫学調査を行うことが可能となった。また、本法により SFTS ウイル斯特異抗体と遺伝的に近縁な Bhanja ウイルス血清群に対する抗体とを容易に鑑別できることが明らかになった。

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、2005 年から患者発生が国内で確認されている。2013 年 1 月 1 日以降に発症した SFTS 症例は 110 名（本年 2 月 4 日時点）で、致死率 30% である。患者は近畿、中国、四国、九州地方で発生しているが、SFTS ウイルスの分布はより広範囲に亘る。

1. 論文発表

- 1) Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Fukuma A, Taniguchi S, Suda Y, Maeda K, Takahashi T, Morikawa S, Saijo M. Effects of ribavirin on severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in vitro. *Jpn J Infect Dis.* 2014;67(6):423-7.
- 2) Tomoki Yoshikawa, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Aiko Fukuma, Satoshi Taniguchi, Shoichi Toda, Yukie Shimazu, Koji Yano, Toshiharu Morimitsu, Katsuyuki Ando, Akira Yoshikawa, Miki Kan, Nobuyuki Kato, Takumi Motoya, Tsuyoshi Kuzuguchi, Yasuhiro

- Nishino, Hideo Osako, Takahiro Yumisashi, Kouji Kida, Fumie Suzuki, Hirokazu Takimoto, Hiroaki Kitamoto, Ken Maeda, Toru Takahashi, Takuya Yamagishi, Kazunori Oishi, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo, and Masayuki Shimojima. Sensitive and specific PCR systems for the detection of both Chinese and Japanese severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strains, and the prediction of the patient survival based on the viral load. *J. Clin. Microbiol.*, 2014 Sep;52(9):3325-33.
- 3) Toru Takahashi, Ken Maeda, Tadaki Suzuki, Aki Ishido, et al. , Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. The First Identification and Retrospective Study of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Japan. *J Inf Dis.*, 2014 ;209(6):816-27.
2. 学会発表
1. 堀田明豊,木村昌伸,中村幸子,片山敦司,中下留美子,坪田敏男,猪島康雄,鈴木道雄,今岡浩一,棚林清,藤田修,山本美江,宇田晶彦,森川茂. 2007年以前の国内野生動物における重症熱性血小板減少症候群ウイルス (SFTSV) に対する抗体調査. 第157回日本獣医学会学術集会, 北海道, 2014年9月.
2. 堀田明豊、木村昌伸、坪田敏男、中村幸子、片山敦司、中下留美子、猪島康雄、鈴木道雄、今岡浩一、棚林清、藤田修、山本美江、宇田晶彦、森川茂. 「2007年以前の国内野生動物における重症熱性血小板減少症候群ウイルス (SFTSV) に対する抗体調査」 第157回日本獣医学会学術集会、北海道、2014年9月9日・12日
3. 藤田修、宇田晶彦、木村昌伸、藤田博己、今岡浩一、森川茂. 「ニホンジカから採取したマダニ類のウイルス遺伝子保有状況からみた自然界における SFTS ウイルス維持様式の検討」 第157回日本獣医学会学術集会、北海道、2014年9月9日・12日
4. 森川茂、木村昌伸、堀田明豊、加来義浩、朴ウンシル、鈴木道雄、野口章、井上智、今岡浩一、前田健. 「野生のシカにおける SFTS ウイルス抗体調査」 第157回日本獣医学会学術集会、北海道、2014年9月9日・12日
5. 浜崎千菜美、鋤田龍星、野口慧多、寺田豊、下田宙、高野愛、鈴木和男、森川茂、前田健. 「野生動物における SFTS ウイルス感染の疫学調査」 第157回日本獣医学会学術集会、北海道、2014年9月9日・12日
6. 森川茂、朴ウンシル、今岡浩一、前田健、宇田晶彦. 「SFTS ウイルスの生活環における野生のシカの役割」 第62回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014年11月10-12日
7. 西條政幸、吉河智城、福士秀悦、谷英樹、福間藍子、谷口怜、須田遊人、Harpal Singh、前田健、高橋徹、森川茂、下島昌幸. 「重症熱性血小板減少症候群ウイルスの分子系統学的特徴とその地理的分布」 第62回日本ウイルス学会学

- 術集会、神奈川、2014年11月10-12日
8. 前田健、濱崎千菜美、下田宙、鎌田龍星、野口慧多、米満研三、高野愛、鈴木和男、森川茂. 「SFTS ウイルスの生活環における動物の重要性」 第62回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014年11月10-12日
 9. 谷英樹、谷口怜、福岡藍子、福士秀悦、森川茂、下島昌幸、西條政幸. 「重症熱性血小板減少症候群ウイルス GP の細胞融合能と 25-hydroxycholesterol による感染阻害効果」 第62回日本ウイルス学会学術集会、神奈川、2014年11月10-12日
 10. Shigeru Morikawa, Masanobu Kimura, Shuetsu Fukushi, Aiko Fukuma¹ Yoshihiro Kaku, Unsil Paku, Hideki Tani¹ Tomoyuki Yoshikawa, Koichi Imaoka, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Ken Maeda. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in domestic and wild animals in Japan. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014
 11. Aiko Fukuma, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Satoshi Taniguchi, Momoko Ogata, Masayuki Shimojima¹, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. Development of IFA and ELISA to detect antibodies against SFTSV. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014
 12. Hideki Tani, Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushi, Tomoki Yoshikawa, Aiko Fukuma, Satoshi Taniguchi, Momoko Ogata, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. Analyses of cell entry of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus using pseudotype vesicular stomatitis virus system. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014.
 13. Akihiko Uda, Hiroki Kawabata, Shuetsu Fukushi, Yoshiharu Kaku, Masayuki Shimojima, Shuji Ando, Ken Maeda, Hiromi Fujita, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa, Tomoyuki Yoshikawa, Aya Niikura, Sawabe Kyoko. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in ticks in Japan. XVIth International Congress of Virology, Montreal (Canada), 27July- 1Aug 2014.
 14. Shigeru Morikawa, Akihiko Uda, Masanobu Kimura, Kawabata, Hiroki, Shuetsu Fukushi, Aiko Fukuma, Yoshihiro Kaku, Unsil Paku, Hideki Tani, Tomoyuki Yoshikawa, Aya Niikura, Shuji Ando, Sawabe Kyoko, Hiromi Fujita, Koichi Imaoka, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Ken Maeda. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in animals and ticks in Japan. The 10th China-Japan International Conference of Virology, Changchun,

China, Aug25-28 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし.

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図 1. NP のアミノ酸配列に基づくフレボウイルスの分子系統樹

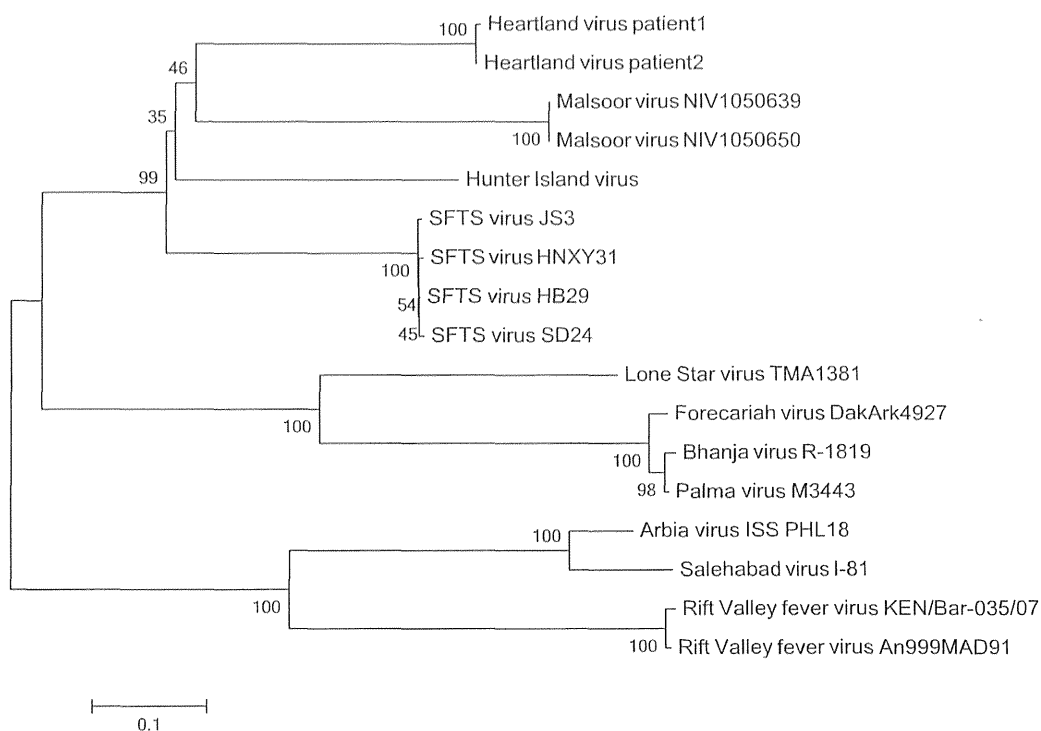


図2. SFTS ウイルスと Bhanja ウイルスとの ELISA による交差反応性

IgG-ELISA

Titers to	Forecariah	SFTS	Homo/hetero
Forecariah #1-6wpi	204,800	800	256
Forecariah #1-4wpi	3,200	<100	>32
Forecariah #1-2wpi	1,600	<100	>16
Forecariah #1-1wpi	100	<100	>1
Forecariah #2-6wpi	51,200	6,400	8
Palma #3-6wpi	204,800	<100	>2048
Palma #4-6wpi	25,600	<100	>256
anti-SFTSV	<100	512,000	>5120

weak cross reaction, if any, was observed in Forecariah #2 rabbit serum