

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

研究分担者：	清水博之	国立感染症研究所 ウイルス第二部
研究分担者：	Xu Wenbo	Chinese Center for Disease Control and Prevention
研究協力者：	Zhang Yong	Chinese Center for Disease Control and Prevention

研究要旨

中国本土では、2008 年以来、多数の死亡例を含む手足口病あるいはエンテロウイルス 71 (EV71) 感染症の流行が報告されている。2010 年には、中国全土で 900 例以上の手足口病死亡例が発生し、公衆衛生上の大きな問題となった。中国 CDC および感染研ウイルス第二部とのあいだの疫学および実験室診断技術に関する情報共有体制を基盤として、中国で伝播している EV71 分離株の分子疫学的解析を行ったところ、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。

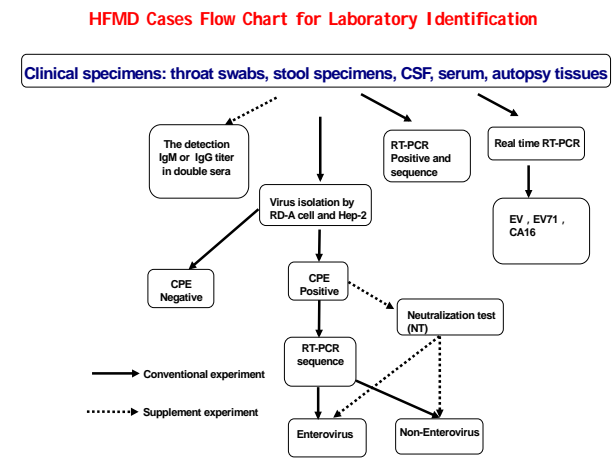
1990 年代後半以降、とくに東アジアの広範な地域で、EV71 感染症による小児の急性死症例を含む重症エンテロウイルス感染症の大規模な流行が多発し、1990 年代後半には、マレーシアおよび台湾で、EV71 脳炎による多数の死亡例を伴う大規模な手足口病流行が発生し、2000 年代

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



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	
Sentinext Therapeutics	Malaysia	VLP		Preclinical	http://www.sentinext.com/

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、高い有効性及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。

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

- 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