

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
分担研究報告書

エンテロウイルスに関連した急性弛緩性麻痺、急性脳炎・脳症に関する研究

研究分担者 清水博之

国立感染症研究所 ウイルス第二部 第二室 室長

研究協力者 花岡 希、藤本嗣人

国立感染症研究所 感染症疫学センター

研究要旨

- (1) 2015年に発症した、急性弛緩性麻痺・急性弛緩性脊髄炎症例の一部に由来する臨床検体から、エンテロウイルス D68 特異的リアルタイム RT-PCR 法等により、エンテロウイルス D68 を検出した。咽頭拭い液からの検出頻度が比較的高かったが、髄液や血液からの検出事例も認められた。
- (2) エンテロウイルス D68 遺伝子の検出・同定法としては、エンテロウイルス D68 特異的リアルタイム RT-PCR 法の検出感度が高かった。
- (3) 急性弛緩性麻痺・急性弛緩性脊髄炎の流行が発生した場合、発症後できるだけ速やかに、咽頭拭い液を含めた、適切かつ質の高い検体を採取する必要があることが示唆された。
- (4) 2015年のエンテロウイルス D68 流行時に、急性弛緩性麻痺を含む症例から分離されたエンテロウイルス D68 株 3 株について、ウイルス学のおよび遺伝子解析を進めた。次世代シーケンス解析により、分離株は遺伝子型 Clade B に分類された。

A．研究目的

エンテロウイルスD68 (Enterovirus D68; EV-D68) は、ライノウイルスに類似したウイルス学的性状を有するエンテロウイルスとして、一般的な呼吸器感染症の原因ウイルスと考えられてきた。しかし、近年の調査・研究により、EV-D68は、より重篤な呼吸器感染症にも関与する可能性が高く、また、2014年の米国、2015年の日本におけるEV-D68感染症流行時の急性弛緩性麻痺・急性弛緩性脊髄炎症例の多発により、EV-D68感染と中枢神経疾患との関連について注目が集まっている。本研究では、急性弛緩性麻痺・急性弛緩性脊髄炎を含む中枢神経疾患症例に由来する臨床検体からのEV-D68検出・同定法について検討した。

B．研究方法

急性弛緩性麻痺・急性弛緩性脊髄炎を含む中枢神経疾患症例に由来する咽頭拭い液、糞便、髄液等を含む様々な臨床検体から、異なる手法を用いたエンテロウイルス遺伝子検出を試み、一部のエンテロウイルス遺伝子陽性検体については、塩基配列解析を行った。島根県保健環境科学研究所で、2015年のEV-D68流行時に、RD-SCARB2細胞を用いて分離された3株のEV-D68分離株について、ウイル

ス学的性状の解析および次世代シーケンスによる遺伝子解析を行った。EV-D68分離株 SP-658-15株は、気管支喘息による入院後に、弛緩性麻痺を発症した症例の麻痺発症前の気管吸入液から分離されたユニークなEV-D68分離株である。

（倫理面への配慮）

急性弛緩性麻痺症例に由来する臨床検体の検査は、2015年10月21日付の厚労省健康局結核感染症課・協力依頼「急性弛緩性麻痺(AFP)を認める症例の実態把握について」に基づく、積極的疫学調査の一環として、地方衛生研究所、あるいは感染研において実施された。

C．研究結果

米国CDC、および、ワシントン大学のグループから報告されているEV-D68特異的リアルタイムRT-PCR法、および、すべての型のエンテロウイルスを検出できるPan-enterovirus real-time PCR法を用いて、CDCから分与されコピー数が分かっているEV-D68由来ゲノムRNAを用いて検出感度を比較したところ、EV-D68特異的RT-PCR（ワシントン大法）> EV-D68特異的RT-PCR（CDC法）> Pan-enter

ovirus PCRの順に検出感度が高かった。実際の臨床検体を用いた検査でも、EV-D68特異的RT-PCR（ワシントン大法）により、もっとも多くの陽性例が認められ、EV-D68特異的RT-PCR（ワシントン大法）の検出感度が高いことが示唆された。しかし、急性弛緩性麻痺症例に由来する臨床検体の多くは、EV-D68特異的RT-PCR（ワシントン大法）を含む、すべての方法で、EV-D68およびエンテロウイルス遺伝子検出陰性であった。EV-D68遺伝子陽性検体の多くは、咽頭拭い液検体であったが、血液あるいは髄液検体からのEV-D68遺伝子検出事例も認められた。

島根県で、2015年のEV-D68流行時に分離された3株のEV-D68分離株は、RD-A細胞においてCPEを誘導し、多くのエンテロウイルスの増殖最適温度である37より低い、33において、より効率良く増殖する傾向が認められた。3株のEV-D68分離株は、エンテロウイルス特異的プライマーを用いた遺伝子増幅を経ることなく、ウイルスゲノムRNAを鋳型とした次世代シーケンスにより、ウイルスゲノム全長に近い配列の解析が可能であった。データベースに登録されているEV-D68株との分子系統解析により、島根県で2015年に分離されたEV-D68分離株3株は、いずれもEV-D68遺伝子型Clade Bに属することが明らかとなった。2014年米国のEV-D68株の多くも、遺伝子型Clade Bに分類されるが、2015年島根株は、2014年に中国、台湾等、アジア地域で高頻度に検出されたEV-D68株と分子系統学的関連性が高いことが示唆された。

D．考察

2014年の米国、2015年の日本における急性弛緩性麻痺・急性弛緩性脊髄炎を含む中枢神経疾患症例からのEV-D68を含むエンテロウイルス検出率は必ずしも高くなく、髄液検体からのEV-D68検出事例は稀であった。2015年の日本における急性弛緩性麻痺症例の病原体サーベイランスの結果を解析すると、検体の種類および検体量が不十分な症例が多く、また、発症後、時間を経てからの検体が多く認められた。呼吸器症状を呈する際、ウイルス検出頻度が高く、その後の麻痺発症後はウイルス検出頻度が低下する可能性が示唆される。一部検体については、検体の採取・保存法が不適切であった可能性が高い。EV-D68を含むエンテロウイルス検出のためには、明確な症例定義による急性弛緩性麻痺・急性弛緩性脊髄炎の報告とともに、呼吸器、糞便、髄液検体を含む、速やか、かつ適切な検体採取が重要となる。

EV-D68は、一部のヒト培養細胞において増殖することが報告されている。しかし現在、EV-D68を含むエンテロウイルス遺伝子検出・同定が一般的検査法として広く用いられており、本研究で用いた急性弛緩性麻痺症例に由来するEV-D68株は、ユニークかつ貴重である。今後、より詳細なウイルス学的解析に供すると共に、感染動物実験による病原性解析等、EV-D68分離株を用いることが必須とさ

れる研究への利用が期待できる。今回用いたEV-D68分離株は、ウイルスゲノムRNAを鋳型とした、非特異的手法による次世代シーケンス解析が可能であったが、臨床検体等から高感度かつ網羅的にEV-D68遺伝子を解析する方法について、現在評価検討を進めている。

E．結論

急性弛緩性麻痺・急性弛緩性脊髄炎症例の一部に由来する咽頭拭い液等の臨床検体から、EV-D68特異的リアルタイムRT-PCR法により、EV-D68遺伝子を検出した。2015年に発生した急性弛緩性麻痺・急性弛緩性脊髄炎の流行時、EV-D68検出率は必ずしも高くなく、咽頭拭い液を含めた適切かつ質の高い検体を採取する必要があることが示唆された。2015年の流行時に急性弛緩性麻痺を含む症例から分離されたEV-D68株3株について、ウイルス学および遺伝子解析を進めた。

F．研究発表

1. Kimura K, Fukushima T, Katada N, Shimizu H, Nakamura T, Fujimoto T, Hanaoka N, Tanaka-Taya K, Makino K. Adult Case of Acute Flaccid Paralysis with Enterovirus D68 Detected in the CSF. *Neurology: Clinical Practice* Published online before print November 4, 2016
2. Kotani O, Suzuki T, Yokoyama M, Iwata-Yoshikawa N, Nakajima N, Sato H, Hasegawa H, Taguchi F, Shimizu H, Nagata N. Intracerebral inoculation of mouse-passaged Saffold virus type 3 affects cerebellar development in neonatal mice. *J Virol* (in press)
3. 国立感染症研究所 感染症疫学センター、ウイルス第二部：エンテロウイルスD68型（EV-D68）に関する国内の疫学情報のまとめ（更新）（2016年1月20日現在）病原微生物検出情報 37: 33-35, 2016
4. 中村朋史、清水博之：エンテロウイルスD68と関連疾患 エンテロウイルスD68のウイルス学的特徴．臨床とウイルス 44：72-78, 2016
5. 藤本嗣人、花岡 希、多屋馨子、清水博之：エンテロウイルスD68と関連疾患 エンテロウイルス(D68を含む)の検査方法．臨床とウイルス 44：84-89, 2016
6. 清水博之：エンテロウイルスD68型．感染と消毒 23：133-137, 2016
7. 清水博之：【話題の疾患と治療】エンテロウイルスD68．感染炎症免疫 46：51-54, 2016
8. 清水博之：エンテロウイルス感染症．医師会雑誌，（印刷中）2017

2. 学会発表

1. Kinoshita H, Arima Y, Sunagawa T, Tanaka-Taya K, Hanaoka N, Fujimoto T, Oishi K, Shimizu H. Detections of enterovirus D68 based on the National Epidemiological Surveillance of Infectious Diseases system in Japan, 2005-2015 Meetings of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses (EUROPIC 2016), Les Diablerets, 3-10 September, 2016
2. 木下一美、有馬雄三、砂川富正、多屋馨子、大石和徳、清水博之、我が国のサーベイランスデータからみるエンテロウイルスD68型検出症例. 感染症学会 2016年4月

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

とくに無し

H. 謝辞

EV-D68分離株を分与いただいた島根県保健環境科学研究所の飯塚節子先生、藤澤直輝先生に深謝いたします。