

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 室長
研究協力者 花岡 希 国立感染症研究所感染症疫学センター主任研究官
研究協力者 藤本嗣人 国立感染症研究所感染症疫学センター 室長

研究要旨

2015年に発症した、急性弛緩性麻痺、呼吸器感染症症例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、EV-D68 陽性検体の一部から培養細胞により EV-D68 株を分離した。

2015年のエンテロウイルス D68 国内分離株は、次世代シーケンス解析・分子系統解析により遺伝子型 Clade B に分類された。

2015年の呼吸器感染症症例に由来する咽頭拭い液検体を乳のみマウスに接種することにより、高頻度に EV-D68 が検出され、EV-D68 は乳のみマウスに特徴的な弛緩性麻痺を誘導した。

AFP全数報告国内体制を整備するため、ポリオウイルス検査も含めた世界的ポリオAFPサーベイランスについて整理し、「急性弛緩性麻痺を認める疾患のサーベイランス・診断・検査・治療に関する手引き」に反映した。

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 (*Enterovirus D*)として、これまで、一般的な呼吸器感染症の原因ウイルスのひとつと考えられてきた。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年の北米、2015年の日本におけるEV-D68感染症大規模流行時の急性弛緩性麻痺(acute flaccid paralysis; AFP)および急性弛緩性脊髄炎(acute flaccid myelitis; AFM)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。そのため、2015年に日本国内で分離されたEV-D68株のウイルス学的性状解析を行った。

2015年に発生したAFP症例の多発を受け、

AFPおよびAFM症例の実態把握、病原体検索、将来的な予防治療法の開発等を目的として、AFP症例を感染症法による届出疾患として全数報告とするための準備を進めた。そのため、

「急性弛緩性麻痺を認める疾患のサーベイランス・診断・検査・治療に関する手引き」(以下、「手引き」と表記)作成に協力し、急性弛緩性麻痺サーベイランスと実験室診断に関する項目について分担執筆を担当した。

B．研究方法

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。また、秋田県健康環境センターで、2015年に発症した喘息等呼吸器感染症症例に由来する咽頭拭い液を乳のみマウスに接種することにより分離したEV-D68株についても、遺伝子解析およびウイルス学的性状の解析を行った。

AFPは急性灰白髄炎(ポリオ)の典型的臨床

症状であり、AFP症例に由来する便検体の病原体検査は、WHOを中心として進められている世界ポリオ根絶計画における標準的サーベイランスとして世界的に確立した手法である。そのため、ポリオウイルス検査体制も含め国内外のAFPサーベイランスの異同について整理した。

(倫理面への配慮)

2015年に発生した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

島根県で、2015年のEV-D68流行時に分離されたEV-D68分離株は、RD-A細胞においてCPEを誘導し、一般的なエンテロウイルスの増殖至適温度である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。秋田県の呼吸器感染症症例に由来する咽頭拭い液検体を乳のみマウスに接種することにより、2015年9月に採取した検体を中心にEV-D68が高頻度に検出された。乳のみマウスで分離されたEV-D68株は、特徴的な弛緩性麻痺を誘導し、抗EV-D68抗血清で中和された。乳のみマウス分離EV-D68株(Aki ta/150455)は、マウス組織懸濁液をRD-A細胞に接種した際のウイルス感染価は低かったが、同細胞で継代することにより、RD-A細胞において増殖可能なウイルス・ストックが得られた。

2015年のEV-D68国内分離株は、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シングにより、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、島根県および秋田県で2015年に分離されたEV-D68分離株は、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年国内分離株は、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。

AFP症例に由来する便検体の病原体検査は、WHOを中心として進められている世界ポリオ根絶計画における標準的サーベイランスとして世界的に確立した手法である。ポリオウイルス検査体制も含めた世界的ポリオAFPサーベイランスについて整理し、国内外のAFPサーベイランスに大きな齟齬が無いよう、「手引き」に反映させた。一方、今後導入される国内AFPサーベイランスでは、EV-D68を含むエンテロウイルスや他の病原体検査についても考慮し、糞便検体以外の臨床検体の採取と非ポリオエンテロウイルス検査について、「手引き」により解説した。

D. 考察

2014年の米国、2015年の日本におけるAFP・AFM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AFP/AFM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。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AFP/AFM症例の報告とともに、呼吸器、糞便、髄液検体を含む、発症後できるだけ速やか、かつ適切な検体採取が重要となる。現在、整備が進められている、感染症法による届出疾患としてのAFP全数報告は、わが国におけるAFP症例の発生動向、および、EV-D68を含む病原因子の関与を明らかにするための重要な基盤情報となることが期待できる。AFP全数報告体制の運用にあたっては、「急性弛緩性麻痺を認める疾患のサーベイランス・診断・検査・治療に関する手引き」等を介した継続的な情報提供が重要となる。

EV-D68は、一部のヒト培養細胞において効率良く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AFPあるいは呼吸器感染症に由来するEV-D68分離株は貴重

である。とくに、臨床検体から直接、培養細胞による分離を経ず、乳のみマウスで分離されたEV-D68株は、乳のみマウスにおいて特徴的な弛緩性麻痺を誘導することから、感染動物実験による病原性解析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、現在検討を進めている。

E . 結論

2015年のEV-D68流行時に、日本国内で分離されたEV-D68株の遺伝子解析およびウイルス学的性状解析を行った。島根県および秋田県で2015年に分離されたEV-D68分離株は、いずれもEV-D68遺伝子型Clade Bに属していた。秋田県の呼吸器感染症症例に由来する咽頭拭い液検体を乳のみマウスに接種することにより高頻度にEV-D68が検出された。乳のみマウスEV-D68分離株は、特徴的な弛緩性麻痺を誘導し、抗EV-D68抗血清で中和された。

2015年に発生したAFP症例の多発を受け、AFPおよびAFM症例の実態把握、病原体検索、将来的な予防治療法の開発等を目的として、感染症法による届出疾患としてAFP全数報告とするための準備を進めた。ポリオウイルス検査体制も含めた世界的ポリオAFPサーベイランスについて整理し、国内外のAFPサーベイランスに大きな齟齬が無いよう、「急性弛緩性麻痺を認める疾患のサーベイランス・診断・検査・治療に関する手引き」に反映させた。

F . 研究発表

1. 論文発表

1. Chong PF, Kira R, Mori H, Okumura A, Torisu H, Yasumoto S, Shimizu H, Fujimoto T, Hanaoka N, Kusunoki S, Takahashi T, Oishi K, Tanaka-Taya K. Clinical Features of Acute Flaccid Myelitis Temporally Associated With an Enterovirus D68 Outbreak: Results of a Nationwide Survey of Acute Flaccid Paralysis in Japan, August-December 2015. *Clin Infect Dis* 66: 653-664, 2018

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) 2017
3. Pham NTK, Thongprachum A, Baba T, Okitsu S, Trinh QD, Komine-Aizawa S, Shimizu H, Hayakawa S, Ushijima H. A 3-month-old child of acute gastroenteritis with enterovirus D68 detected from stool specimen. *Clin. Lab* 63: 1269-1272, 2017
4. Thongprachum A, Khamrin P, Thi Kim Pham N, Takanashi S, Okitsu S, Shimizu H, Maneekarn N, Hayakawa S, Ushijima H. Multiplex RT-PCR for rapid detection of viruses commonly causing diarrhea in pediatric patients. *J Med Virol* 89: 818-824, 2017
5. 斎藤博之、秋野和華子、佐藤寛子、藤谷陽子、柴田ちひろ、佐藤了悦、清水博之: 乳飲みマウスによるエンテロウイルス D68 型の分離-秋田県. *病原微生物検出情報* 38: 10-11, 2017
6. 清水博之: エンテロウイルスD68のウイルス学的性状. *神経感染症学雑誌*, 2017 (in press)
7. 清水博之: エンテロウイルスD68感染症の大規模流行、その後. *臨床とウイルス* 45: 256-263, 2017
8. 清水博之: エンテロウイルスと子どもの麻痺. *小児保健研究* 76, 208-217, 2017
9. 清水博之: エンテロウイルス感染症. *医師会雑誌* 146, 259-263, 2017

2. 学会発表

1. Shimizu H. Nationwide survey of acute flaccid paralysis in August–December 2015 during an enterovirus D68 outbreak in Japan. U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program Viral Diseases Panel Meeting, Shenzhen, China, 8 January, 2018
2. Shimizu H. Understanding of the pathogenesis of enterovirus 71 infection based on the identification of the receptors. The 20nd International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim,

- Shenzhen, China, 8 January, 2018
3. Shimizu H. Surveillance and Laboratory Diagnosis of Enterovirus Infections in Vietnam and Japan. A Joint Meeting on Collaborative Research between NIID and NIHE, Tokyo, 22 August, 2017
 4. Shimizu H. Enterovirus D68 outbreak in Japan during autumn 2015, The 3rd Symposium on Research and Quality Control of Vaccines. Beijing, China, 8 May, 2017
 5. 宮崎誠、斎藤博之、柴田ちひろ、YEN HAI DOAN、荒尾雄二郎、岩田奈織子、長谷川秀樹、清水博之、永田典代. エンテロウイルス D68 型感染後の弛緩性麻痺発現マウスモデルの構築. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2017 年 10 月 24 日～26 日
 6. 清水博之. エンテロウイルス D68 のウイルス学的性状, シンポジウム 2 急性弛緩性脊髄炎. 第 22 回日本神経感染症学会学術大会, 北九州, 2017 年 10 月 14 日
- 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、秋田県健康環境センターの斎藤博之先生に深謝いたします。