

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D68のウイルス学的解析に関する研究

研究分担者 清水博之 国立感染症研究所 ウイルス第二部

研究協力者 吉田和央 国立研究開発法人 国立循環器病研究センター

研究協力者 水田克巳 山形県衛生研究所

研究要旨

エンテロウイルス D68(EV-D68)感染症予防治療への応用の可能性を検討するため、日本で使用されている免疫グロブリン製剤 9 種類を入手し、2010 年～2015 年に日本で分離された EV-D68 分離株 6 株に対する中和抗体価を測定した。9 製剤とも、256 倍より高い希釈倍率で、EV-D68 中和活性を示したことから、高力価の EV-D68 中和抗体を含むことが明らかとなった。海外および国内の血液に由来する免疫グロブリン製剤間で、EV-D68 株に対する中和活性の傾向に顕著な違いは認められなかった。

2018 年 5 月に、急性弛緩性麻痺(AFP)が、感染症法の五類感染症全数把握疾患に追加されたが、AFP 症例からの検体採取や実験室診断については依然多くの課題が残されている。国立感染症研究所および地方衛生研究所の検査担当者等により、AFP 検体からの検査フローの検討を進め、検体採取を含む検査フロー、役割分担、具体的な検査方法を記載した「急性弛緩性麻痺病原体検査マニュアル」作成を進めた。世界各地で発生・拡大しているワクチン由来ポリオウイルスによるポリオ流行のリスクを考慮し、AFP 症例のポリオウイルス検査を国立感染症研究所で実施する体制の整備を進めた。

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年の米国、2015年の日本におけるEV-D68感染症流行時に発生した急性弛緩性麻痺・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。

EV-D68感染症予防治療への応用の可能性を検討するため、日本で使用されている免疫グロブリン製剤中の、国内EV-D68分離株に対する中和抗体価の測定・評価を継続した。日本では、2018年5月に、急性弛緩性麻痺 (acute flaccid paralysis; AFP) が、感染症法の五類感染症全数把握疾患に追加され、今後より正確かつタイムリーなAFP発生動向の把握が期待できる。その一方、AFP症例からの検体採取や実験室診断については依然多くの課題が残さ

れており、AFP病原体サーベイランス体制の整備が求められている。

B . 研究方法

日本で使用されている免疫グロブリン製剤9種類を購入し、2010年～2015年に日本で分離されたEV-D68分離株6株に対する中和抗体価を測定した。9製剤のうち、7製剤は日本国内の献血由来、1製剤はドイツの献血由来、1製剤は米国の非献血由来であった。使用したEV-D68分離株は、2010年から2015年にかけて国内で分離された6株で、異なる3種類のEV-D68遺伝型 (Lineage1/CladeC、Lineage2/CladeB、Lineage3/CladeA)、それぞれ2株を含む。RD細胞におけるEV-D68によるCPE発現を抑制するのに必要な免疫グロブリン製剤の希釈倍率により、各製剤の抗EV-D68中和活性を評価した。

2018年5月より、AFPが五類感染症全数報告対象疾患となり、内外の現状を踏まえた検査体制の整備が進められている。「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」では、糞便検体からのポリオウイルス検査は必

須であり、エンテロウイルスA71やAFP発症への関与が強く疑われているEV-D68を含む非ポリオエンテロウイルス (NPEV) についても、可能な限り検査を実施することが推奨されている。しかし、AFP症例に由来する検体の検査を担当している地方衛生研究所から、「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」のみでは、どのような検体を用いて、どこまで検査を行うのが不明瞭であるとの声が多く寄せられている。そのため、国立感染症研究所 (感染研) のAFP検査担当者および地方衛生研究所 (地衛研) の代表により、AFP由来検体のポリオウイルスおよびNPEV検査に関する現状と問題点を整理し、今後の検査の方向性について検討を行った。

(倫理面への配慮)

人体から分離した微生物の分析等を行う研究であり、「人を対象とする」研究には該当しない。
本研究で使用する病原体は、感染研病原体等完全管理規定等に基づき、適切なバイオリスク管理の下で取り扱った。

C . 研究結果

国内で入手可能な9種類の免疫グロブリン製剤は、いずれも、日本のEV-D68分離株6株に対する中和抗体を有していた。すべての製剤は、256倍より高い希釈倍率で、EV-D68中和活性を示したことから、高力価のEV-D68中和抗体を含むことが明らかとなった。EV-D68遺伝子型と中和活性に顕著な関連性は認められなかったが、同一遺伝子型に属するEV-D68株に対して、中和抗体価が明らかに異なる免疫グロブリン製剤が認められた。また、海外 (米国非献血、ドイツ献血)、あるいは、国内 (献血) で採血した血液に由来する免疫グロブリン製剤間で、製剤中の中和抗体価およびEV-D68株間の中和活性の傾向に顕著な違いは認められなかった。

2019年7月に開催された衛生微生物技術協議会第40回研究会の際、シンポジウムにおいて、国内AFPサーベイランスの背景と現状について説明を行うとともに、感染研のAFP検査担当者および地衛研の代表により、AFP由来検体のポリオウイルスおよびNPEV検査に関する現状と問題点を整理し、今後の検査の方向性について検討した。糞便検体からのポリオウイルス分離・同定検査を必須とし、糞便、咽頭拭い液等の検体からのエンテロウイルス遺伝子検査を推奨検査とする方向で、会議参加者の一定の合意が得られたことから、感染研および地衛研の

担当者により、検体採取を含む検査フローおよび具体的な検査方法を記載した「急性弛緩性麻痺病原体検査マニュアル」作成を進めることとした。

2019年7月の打合せ時点では、糞便検体からのポリオウイルス分離・同定検査は、可能な範囲でWHOによる標準的検査法に準拠して、地衛研で実施することを想定していた。しかし、パプアニューギニア、フィリピン等WHO西太平洋地域を含む世界各地において、ワクチン由来ポリオウイルスによるポリオ流行が頻発し、日本へのポリオウイルス伝播リスクの増加が懸念される状況が生じた。そのため、厚労省結核感染症課から、国内AFPサーベイランス導入後のウイルス検査のうちWHO標準法によるポリオウイルス検査については、国内唯一のWHO認定ポリオウイルス実験施設である感染研ウイルス第二部で実施する可能性について打診があり、現在、すべてのAFP症例のポリオウイルス検査を感染研で実施する体制の整備を進めている。

D . 考察

海外の免疫グロブリン製剤については、EV-D68に対する中和抗体を含むとの報告があるが、今回使用した国内で入手可能な免疫グロブリン製剤すべてが、EV-D68中和抗体を含むことが、本研究により明らかとなった。EV-D68感染症における抗EV-D68中和抗体投与の有効性は、動物実験レベルでの報告はあるが、ヒトにおける治療効果は明らかではなく、治療効果が認められなかったという臨床研究事例の報告もある。EV-D68流行時におけるAFP症例でも、EV-D68陽性例の頻度は、それほど高くない、他の要因によるAFP発症の可能性もある。そのため、AFP等重篤な中枢神経疾患に対するEV-D68中和抗体の治療効果については、慎重な解析・評価が必要とされる。

2018年5月より、AFPが五類感染症全数報告対象疾患となり、検査体制の整備が進められているが、AFP症例からの検体採取や実験室診断については依然多くの課題が残されている。感染研および地衛研の検査担当者による検討の結果、糞便検体からのポリオウイルス分離・同定検査を必須とし、糞便、咽頭拭い液等の検体からのエンテロウイルス遺伝子検査を推奨検査とする検査フロー概要について合意が得られ、具体的な検査方法を記載した「急性弛緩性麻痺病原体検査マニュアル」作成を開始した。その後、世界各地で発生・拡大しているワクチン由来ポリオウイルスによるポリオ流行による、日本へのポリオウイルス伝播リスク増加に対応するため、すべてのAFP症例のポリオウイルス検査をWHO認

定ポリオウイルス検査施設である感染研ウイルス第二部で実施する体制の整備を進めている。EV-D68検出を含むNPEV検査については、地衛研で検査を実施することが想定されていることから、「AFP病原体検査マニュアル」では、検体採取、検体の輸送、結果の報告等を含めた、地衛研と感染研の役割分担を明確にする必要がある。

E. 結論

- (1) 国内で使用されている免疫グロブリン製剤 9 製剤中の EV-D68 中和抗体価を測定した。いずれの製剤も高い EV-D68 中和抗体を含有することが明らかとなった。
- (2) 「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」の内容を感染研および地衛研の検査担当者等により検討し、検体採取を含む検査フロー、役割分担、具体的な検査方法を記載した「AFP 病原体検査マニュアル」作成を開始した。

F. 研究発表

1. 論文発表
 - (1) Hoa-Tran TN, Nguyen AT, Dao ATH, Kataoka C, Ta HTT, Nguyen HTV, Takemura T, Nguyen TTT, Vu HM, Nguyen TTH, Shimizu H. Genetic characterization of VP1 of coxsackieviruses A2, A4, and A10 associated with hand, foot, and mouth disease in Vietnam in 2012–2017: endemic circulation and emergence of new HFMD-causing lineages. Arch Virol 165: 823-834, 2020
 - (2) Ushioda W, Kotani O, Kawachi K, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Hasegawa H, Shimizu H, Takahashi K, Nagata N. Neuropathology in Neonatal Mice After Experimental Coxsackievirus B2 Infection Using a Prototype Strain, Ohio-1. J Neuropathol Exp Neurol 79: 209-225, 2020
 - (3) Takechi M, Fukushima W, Nakano T, Inui M, Ohfuji S, Kase T, Ito K, Kondo K, Maeda A, Shimizu H, Hirota Y. Nationwide Survey on Pediatric Inpatients of Hand, Foot and Mouth Disease, Herpangina, and Associated Complications during Epidemic Period in Japan: Estimated Number of Patients and Factors Associated with Severe Cases. J Epidemiol 29: 354-362, 2019
 - (4) Funakoshi Y, Ito K, Morino S, Kinoshita K, Morikawa Y, Kono T, Doan HY, Shimizu H, Hanaoka N, Konagaya M, Fujimoto T, Suzuki A, Chiba T, Akiba T, Tomaru Y, Watanabe K, Shimizu N. Enterovirus D68 respiratory infection in a children's hospital in Japan in 2015, Pediatr Int 61:768-776, 2019
 - (5) Okumura A, Mori H, Fee Chong P, Kira R, Torisu H, Yasumoto S, Shimizu H, Fujimoto T, Tanaka-Taya K. Acute Flaccid Myelitis Collaborative Study I. Serial MRI findings of acute flaccid myelitis during an outbreak of enterovirus D68 infection in Japan. Brain Dev, 2019
 - (6) Apostol LN, Shimizu H, Suzuki A, Umami RN, Jiao MMA, Tandoc A 3rd, Saito M, Lupisan S, Oshitani H. Molecular characterization of enterovirus-A71 in children with acute flaccid paralysis in the Philippines. BMC Infect Dis 19: 370, 2019
 - (7) 清水博之. 世界ポリオ根絶計画の現状と病原体サーベイランス. 病原微生物検出情報 41: 21-23, 2020
 - (8) 永田典代、長谷川秀樹、清水博之、斎藤博之. エンテロウイルス感染による急性弛緩性麻痺の病理. 病原微生物検出情報 41: 25-27, 2020
 - (9) 藤本嗣人、花岡 希、多屋馨子、清水博之. 急性弛緩性麻痺(AFP)を認める症例からの EV-D68、EV-A71の検出方法を含めた非ポリオエンテロウイルス検査. 病原微生物検出情報 41: 28-29, 2020
 - (10) 崎山 弘、城 青衣、梅本 哲、清水博之、大石和徳. 全国調査による定期予防接種の累積接種率調査: 2017年・2018年調査. 外来小児科 22: 462-470, 2019
 - (11) 清水博之. 「エンテロウイルス」の項を担当、大曲貴夫監修. 【今日の疾患辞典】 デジタル版 Current Decision Support (CDS), 2019
 - (12) 清水博之、「ポリオ」の項を担当、西條政幸編、グローバル時代のウイルス感染症、204-208、日本医事新報社、2019
 - (13) 清水博之. エンテロウイルスD68感染症と中枢神経疾患. 臨床とウイルス 47: 210-217, 2019
 - (14) 藤本嗣人、花岡 希、小長谷昌未、高橋健一郎、多屋馨子、清水博之. エンテロウイルス脳炎と

検体採取について. 病原微生物検出情報 40:
107-108, 2019

- (15) 清水博之. 手足口病の流行周期と原因エンテロウイルス. チャイルドヘルス 22: 40-43, 2019
- (16) 清水博之. エンテロウイルスD68感染症. 小児科診療「小児感染症のいまを読み解く」 82,769-774, 2019
- (17) 清水博之. 感染症予防規則の一部改正 急性弛緩性麻痺 (AFP; ポリオを除く) が五類感染症に追加. ファルマシア 55, 341, 2019

2. 学会発表

- (1) Shimizu H. A Turning Point in Global Polio Eradication -Residual risk and vaccine strategies- The annual conference of pathogenic microbiology and biosafety. Shantou, Guangdong, China, 16 October 2019
- (2) 清水博之. ポリオ根絶計画の現状と実験室診断. 2019年度 希少感染症診断技術研修会 2020年1月29日、東京
- (3) 清水博之. 世界ポリオ根絶計画最終段階におけるワクチン戦略. 第23回日本ワクチン学会学術集会シンポジウム3: 国際化とワクチン, 2019年12月1日、東京
- (4) 清水博之. ポリオウイルス感染性を有する可能性のある検体のバイオリスク管理 —現実的な対策に向けて— 第19回日本バイオセーフティ学会総会・学術集会. ワークショップ1 ポリオ根絶の最終段階戦略とその実施計画, 2019年11月19日、東京
- (5) 斎藤博之、秋野和華子、佐藤寛子、藤谷陽子、柴田ちひろ、田中貴子、佐藤了悦、佐藤進、清水博之. 乳飲みマウスを用いたガンマグロブリン製剤のエンテロウイルス D68 型に対する

中和能の検討. 第67回日本ウイルス学会学術集会, 2019年10月29日-31日、東京

- (6) 吉田和央、村松正道、水田克巳、清水博之. 日本で分離されたエンテロウイルス D68 株に対する IVIG 製剤の中和活性の測定 (ポスター). 第67回日本ウイルス学会学術集会, 2019年10月29日-31日、東京
- (7) 永田典代、宮崎誠、斎藤博之、柴田ちひろ、ドゥアンイェンハイ、荒尾雄二郎、岩田(吉河)奈織子、清水博之、長谷川秀樹. マウスモデルにおけるエンテロウイルス D68 の神経病原性. 第67回日本ウイルス学会学術集会, 2019年10月29日-31日、東京
- (8) 清水博之. 急性弛緩性麻痺症例から検出されるエンテロウイルスとその検査. 衛生微生物技術協議会 第40回研究会 シンポジウム II 2019年7月11日熊本市民会館
- (9) 清水博之. エンテロウイルス D68 感染症と中枢神経疾患. 第60回臨床ウイルス学会. シンポジウム1 「未知・既知のウイルス感染症の病態を解く」, 2019年5月25日、ウインクあいち、名古屋
- (10) 斎藤博之、柴田ちひろ、佐藤寛子、清水博之. ガンマグロブリン製剤のエンテロウイルス D68 型に対する中和能. 第60回臨床ウイルス学会. 2019年5月25日、ウインクあいち、名古屋

G . 知的財産権の出願・登録状況

特に無し