

## 平成28年度医療研究開発推進事業費補助金

### (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) 成果報告書

#### I. 基本情報

事業名： (日本語) 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  
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

補助事業課題名： (日本語) 新興・再興エンテロウイルス感染症の検査・診断・治療・予防法の開発に向けた研究

(英語) Studies toward the development of surveillance, diagnosis, prevention, and therapy of emerging and re-emerging enterovirus infections

補助事業担当者 (日本語) 国立感染症研究所ウイルス第二部・室長・清水博之

所属 役職 氏名： (英語) Chief, Laboratory of Enteroviruses, Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究課題名： (日本語)  
(英語)

補助事業分担者 (日本語)  
所属 役職 氏名： (英語)

#### II. 成果の概要 (総括研究報告)

(和文)

不活化ポリオワクチン(IPV)含有ワクチンの有効性および品質管理に関する調査研究を継続した。国立感染症研究所(感染研)感染症疫学センター多屋馨子室長らは、幼児のポリオ含有ワクチン接種率ならびに抗体保有状況について解析した。2016年度の調査では、5歳未満の乳幼児(n=298)でポリオワクチンの1回以上の接種歴があった者は94.9~100%(接種歴不明者を除く)であり、3つの型すべてに対して概ね95%以上の抗体保有率を有していた。IPV含有4種混合ワクチンの累積接種率調査(感染研ウイルス第二部清水博之室長ら)では、1回目の累積接種率は生後12ヶ月で97.4%、生後24ヶ月で99.1%に達した。追加接種(4回目)の累積接種率は、生後24ヶ月で85.0%であった。感染研ウイルス第二部染谷雄一主任研究官らは、IPV力価試験に用いるラットの系統について検討し、セービン株由来IPV国内参照品の免疫原性力価単位は、Cr1j:WIラットでもほぼ再現され、力価単位はラット

の系統に因らないことを明らかにした。一般財団法人阪大微生物病研究会落合晋課長(研究開発協力者)らは、セービン株由来 IPV の D 抗原量測定系において、現在標準ウイルスとして使用している生ポリオウイルスを、不活化ポリオウイルスへ変更するための検討を行った。WHO ポリオウイルス病原体管理に関する世界行動計画(GAPIII)に対応した IPV 品質管理について、sIPV ワーキンググループ(清水博之室長ら)による技術的検討を進めた。

新興・再興腸管ウイルス感染症流行を迅速かつ正確に把握するため、国内外における腸管ウイルス病原体サーベイランスに関する研究を進めた。押谷仁教授(東北大学大学院医学系研究科)らは、近年フィリピンで検出されたエンテロウイルス D68(EV-D68)の Lineage2 (Clade B) は、北米やヨーロッパとは異なるアジア諸国の株と同一のクラスターを形成しており、各国の Lineage2 は Lineage3(Clade A)に比べてより強い地域性を有することを明らかにした。我が国では、2015 年に過去最大規模の EV-D68 流行が発生したことから、EV-D68 病原体サーベイランスシステムを検討するとともに、2015 年の EV-D68 分離株の遺伝子解析およびウイルス学的解析を実施した(感染研ウイルス第二部清水博之室長ら)。牛島廣治上級研究員(日本大学医学部)らは、2015-2016 年の下痢症由来検体からピコルナウイルスの検出を行い、エンテロウイルス(6.3%)、パレコウイルス(10.6%)、アイチウイルス(0.6%)を検出するとともに、糞便からの検出頻度が低い EV-D68 検出について報告した。片岡周子特任助教(北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター)は、北部ベトナムの手足口病患者に由来するエンテロウイルス 71(EV71)の遺伝子型を解析し、およそ 8 割が遺伝子型 B5 であり、残りは C4 であることを明らかにした。感染研感染症疫学センターの藤本嗣人室長らは、近年、日本の手足口病症例からの検出が増加している CVA6 株の全遺伝子解析を行った。1999~2009 年の株はクラスター I に、2011~2013 年の株はクラスター II に分類され、ヘルパンギーナおよび手足口病に関与していた。

新規腸管感染ウイルスの予防治療法開発のための研究基盤整備のため、以下の研究を実施した。感染研ウイルス第二部の有田峰太郎主任研究官は、EV-D68 Fermon 株ゲノムの一部(5' 非翻訳領域および非構造タンパク質領域および 3' 非翻訳領域)をプラスミドに導入し、ルシフェラーゼ遺伝子を導入したレプリコンを作製した。感染研感染病理部の永田典代室長らは、免疫組織化学法に必要な EV-D68 に対するポリクローナル抗体の作製を開始した。また、市販抗体の抗 EV-D68 VP1 ポリクローナル抗体が、ホルマリン固定パラフィン包埋 EV-D68 プロトタイプ株検出に有用であることを示した。感染研ウイルス第二部の相崎英樹室長らは、宿主特異性や病原性発現に関与する宿主因子探索のため、EV-D68 標準株、臨床分離株の呼吸器細胞および神経細胞への感染性を解析した。Fermon 株は全ての細胞に感染し強い CPE を誘導したが、2015 年臨床分離株は細胞種により CPE 発現の違いが認められた。2015 年 EV-D68 分離株の一部は乳呑みマウスで分離され麻痺を誘導することから、マウス感染実験への応用を進めている(清水博之室長ら)。感染研ウイルス第二部の西村順裕主任研究官は、EV71 受容体の一つである SCARB2 を効率よく検出するためのポリクローナル抗体を作製した。SCARB2 の細胞外領域と抗体定常領域の融合蛋白質を 293T 細胞で発現精製しウサギを免疫し、ELISA により十分な抗体価の上昇を確認した。東京都医学総合研究所小池智プロジェクトリーダーら(ゲノム医科学研究分野)は、宮城県、山形県で手足口病患者から分離された EV71 株 27 株を SCARB2 トランスジェニックマウスに接種し毒力を判定した。同一地域、同一流行において、毒力の異なった EV71 株が伝播している可能性が考えられた。EV71 を精製、不活化した抗原を SCARB2tg マウスに投与し、その後強毒株の攻撃感染を行うことで、SCARB2tg マウスを用いたワクチン検定の可能性を示した。ヒトおよび感染動物モデルに由来する臨床検体や感染組織におけるエンテロウイルス遺伝子変異およびウイルス準種(quasi-species)出現を解析するため、各種ウイルス RNA 抽出、遺伝子増幅、NGS 解析に関する至適化条件検討を行った(清水博之室長ら)。藤田保健衛生大学の佐々木潤講師らは、アイチウイルスゲノム複製には、複製部位にコレステロールが蓄積することが必要であり、コレステロール輸送に関与するタンパク質が、ウイルスタンパク質との結合能を有し、ゲノム複製部位にも存在することを明らかにした。金沢医科大学姫田敏樹准教授(微生物学講座)らは、サフォードウイルス(SAFV)構造蛋白 VP1 の

不安定性に関わる責任領域は PEST 配列であることが明らかとした。カプシド形成に伴い PEST 領域がマスクされ VP1 の分解が抑制されることが示唆された。感染研病原体ゲノム解析研究センター佐藤裕徳室長らは、*in silico* 技術を取り入れて新興・再興ピコルナウイルスの分子構造とリスク変異を調べる新しい研究基盤を構築した。SAFV は、カプシド相互作用表面の柔軟性を変える特定の変異により、新生仔マウス小脳での神経病原性を発現することを見出した。新潟大学齋藤昭彦教授のグループ(医歯学総合研究科小児科学分野)は、小児科領域の重要な新興感染症であるヒトパレコウイルス 3 型について、免疫グロブリン製剤 (Intravenous immunoglobulin, IVIG) の抗ウイルス効果を *in vitro* の実験系で評価した。その結果、IVIG は、細胞内外のウイルス量を著明に減少させることを確認した。

(英文)

We continued to survey the effectiveness of inactivated poliovirus vaccine (IPV) in Japan and improved the quality control of the IPV products. In 2016, a coverage of  $\geq 1$  doses of the IPV-containing vaccines among children aged under 5 years was 94.9-100%, except individuals with unknown vaccination status (Taya *et al.* Infectious Disease Surveillance Center, NIID). Seropositivity rates (neutralizing antibody titers  $\geq 1:8$ ) for all 3 types of poliovirus were high (type 1: 94.9-100%, type 2: 95.5-100%, and type 3: 92.3-100%). According to the cumulative vaccination coverage (CVC) of DPT-IPV in 2016, the CVC rate of the 1<sup>st</sup> IPV dose at 12 months was 97.4% and that at 24 months was 99.1%. The CVC rate of the fourth DPT-IPV dose (booster DPT-IPV immunization) was 85.0% at 24 months (Shimizu *et al.* Department of Virology II, NIID). Dr Someya *et al.* (Department of Virology II, NIID) investigated rat strains to be used for a potency test for the quality control of the sIPV products. The immunogenicity of sIPV was reasonably determined even in the Crlj:WI rats without apparent rat strain differences. An alternative method of the D antigen ELISA using inactivated poliovirus antigens is under development by a research group of the Research Foundation for Microbial Diseases of Osaka University (Dr Ochiai *et al.*). Based on a sIPV working group (Shimizu *et al.*), we reviewed and investigated the reliable sIPV quality control systems under the requirements of WHO poliovirus containment action plan (GAPIII).

To monitor emerging and re-emerging enteric virus infections in a timely manner, we attempted to improve infectious agent surveillance activities for some critical enterovirus infections. Prof. Oshitani's group (Tohoku University Graduate School of Medicine) demonstrated that enterovirus D68 (EV-D68) lineage 2 (Clade B) viruses identified in the Philippines from 2012-2015 were genetically clustered with strains from other countries in Asia, but distinct from those from North America and Europe. The evolutionary dynamics of EV-D68 circulating in Asia showed that lineage 2 had a fluctuating pattern in genetic diversity while lineage 3 maintained its high diversity. During the largest EV-D68 outbreak during autumn 2015 in Japan, we investigated laboratory diagnosis methods for EV-D68 infection and some of the EV-D68 isolates in 2015 were genetically and virologically analyzed (Shimizu *et al.*). Dr Ushijima *et al.* (Nihon University School of Medicine) identified picornaviruses (enteroviruses; 6.3%, parechoviruses; 10.6%, and aichiviruses; 0.6%) from diarrhea patients and identified EV-D68 from a stool sample. Dr Kataoka and colleagues (Hokkaido University Research Center for Zoonosis Control) analyzed the genogroups of enterovirus 71 (EV71) isolates from HFMD cases in northern Vietnam and identified B5 (almost 80%) and C4 (about 20%) subgenogroups. Dr Fujimoto and colleagues (Infectious Disease Surveillance Center, NIID) conducted full-genome sequence analysis of coxsackievirus A6 (CVA6) strains, which became one of the major causative agents of herpangina and/or HFMD in Japan. The CVA6 strains in 1999-2009 and those in 2011-2013 were genetically classified into Cluster I and Cluster II, respectively.

To establish a research basis of the development of preventive and therapeutic approaches for enteric virus infections, we conducted the following research activities. Dr Arita (Department of Virology II, NIID) established a replicon carrying a part of the EV-D68/Fermon genome (5' NTR, non-capsid, and 3' NTR) with a luciferase gene. To establish the pathological diagnostics for EV-D68 infection, a polyclonal antibody against EV-D68 is currently producing (Dr Nagata *et al.* Department of Pathology, NIID). A commercial antibody against EV-D68-VP1 was available for the immunohistochemistry using paraffin embedding tissues infected with the prototype strain. Dr Aizaki's group (Department of Virology II, NIID) analyzed the infectivity of the prototype and clinical EV-D68 strains with the respiratory and neuronal cell lines. The prototype Fermon strain infected all cell lines and induced a strong cytopathic effect. Recent EV-D68 isolates did not induce any cytopathic effect on neural cells. Some of the EV-D68 strains in Japan in 2015 were isolated in suckling mice with paralysis expected to be used for a mouse model (Shimizu, *et al.*). Dr Nishimura (Department of Virology II, NIID) generated anti-SCARB2 polyclonal antibody. Soluble SCARB2 recombinant protein fused to the Fc region of mouse IgG was produced and purified to be used to immunize rabbits. ELISA analysis confirmed a significant increase of the anti-SCARB2 titer in the rabbit serum. Dr Koike's group (Neurovirology Project, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science) compared neurovirulence of 27 clinical EV71 isolates from HFMD cases in Miyagi and Yamagata prefectures in SCARB2-transgenic mice and demonstrated different levels of neurovirulence among the clinical strains. The SCARB2-transgenic mouse system can be used for the efficacy test of EV71 vaccine candidates, by immunization with the EV71 antigens and challenges of the virulent EV71 strains. We attempted to optimize the NGS methods (RNA extraction, specific and non-specific amplification, etc.) of enteroviruses directly from clinical and tissue samples to investigate the *in vivo* viral mutation and quasi-species (Shimizu *et al.*). Dr Sasaki *et al.* (Fujita Health University School of Medicine) revealed that the involvement of cholesterol accumulation in Aichivirus replication and also demonstrated the role of cholesterol transport proteins in the binding and co-localization with viral proteins. Dr Himeda and colleagues (Kanazawa Medical University School of Medicine) found that the PEST sequence in SAFV VP1 is a responsible element for its instability, and suggesting that the PEST sequence is masked and stabilized during capsid formation. Dr Sato's group (Pathogen Genomics Center, NIID) created a new research platform for studying molecular structures and risk mutations of emerging and re-emerging picornaviruses with computational science. We found that SAFV gains neuropathogenicity in the cerebella of neonatal mice by specific mutations affecting flexibility of capsid protein interaction surface. Prof. Saito and colleagues (Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences) evaluated the anti-viral effects of intravenous immunoglobulin (IVIG) for human parechovirus type 3 (HPeV3), which is known as an emerging infection in pediatric field, using an *in vitro* assay. We showed IVIG suppressed intracellular and extracellular viral loads of HPeV3 significantly.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 8件、国際誌 5件)

1. 清水博之: ポリオウイルス病原体バイオリスク管理に関するWHO行動計画(GAP III)と今後の課題. JBSA Newsletter, 2017, 6 (印刷中)
2. 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. 2016, 46, 51-54.
3. 清水博之. エンテロウイルスD68型. 感染と消毒. 2016, 23, 133-137
4. 清水博之. エンテロウイルス71ワクチン開発の現状. 2016 小児科. 57, 929-936.

5. 中村朋史、清水博之. 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. 2016, 44, 72-78.
6. 藤本嗣人、花岡 希、多屋馨子、清水博之. エンテロウイルス (D68を含む) の検査方法. 臨床とウイルス. 2016, 44, 84-89.
7. 清水博之. エンテロウイルス感染症. ドクターサロン. 2016, 60, 343-346.
8. 清水博之. エンテロウイルス感染症(エンテロウイルス71、68型感染症等). ドクターサロン. 2016, 60, 40-43.
9. 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. 2017 (in press)
10. 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. 2017 (in press)
11. 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. <http://cp.neurology.org/content/early/2016/11/04/CPJ.0000000000000311.short>, 2016
12. 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. 2017 89: 818-824.
13. Kotani O, Naeem A, Suzuki T, Iwata-Yoshikawa N, Sato Y, Nakajima N, Hosomi T, Tsukagoshi H, Kozawa K, Hasegawa H, Taguchi F, Shimizu H, Nagata N. Neuropathogenicity of Two Saffold Virus Type 3 Isolates in Mouse Models. PLoS One. 2016, 11, e0148184.  
Shimizu H. Development and introduction of inactivated poliovirus vaccines derived from Sabin strains in Japan. Vaccine. 2016, 34, 1975-1985.

(研究開発協力者、水田克己)

1. 水田克己、古瀬祐気、ナタワンチャイモンコン、押谷仁：エンテロウイルス D68感染症に関する海外情報、臨床とウイルス、2016. 44:112-120.
2. Tanaka S., Aoki Y., Matoba Y., Yahagi K., Itgaki T., Matsuzaki Y., Mizuta K. : Seroepidemiology of human parechovirus types 1, 3, and 6 in Yamagata, Japan, in 2014. Microbiol. Immunol. 2016. 60:854-858.
3. 栗村正之、水田克己、山川達志、加藤丈夫：ヒトパレコウイルス 3 型関連筋痛症/筋炎：新興感染症としての流行性筋痛症、神経内科、2017. 86:307-314.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 不活化ワクチン導入前後のポリオの予防接種状況・抗体保有状況について (2011~2015 年度感染症流行予測調査より)、口頭、佐藤 弘、多屋馨子、大石和徳、清水博之、第 20 回日本ワクチン学会学術集会、2016 年 10 月 22~23 日、国内
2. エンテロウイルス D68 感染症の流行とウイルス学的特徴、口頭、清水博之、大阪小児感染症研究会第 23 回講演会、2016 年 10 月 15 日、国内
3. ポリオウイルスのバイオリスク管理. エンテロウイルス D68 感染症、口頭、清水博之、平成 28 年度感染症危機管理研修会. 2016 年 10 月 13 日、国内
4. ポリオ根絶に向けた検査と病原体管理、清水博之、口頭、平成 28 年度希少感染症診断技術研修会、

東京、2017年2月21日、国内

5. Outbreak of type 1 vaccine-derived poliovirus in Laos in 2015–2016. 口頭、Shimizu H, Nakamura T, Nishimura Y, Arita M, Yoshida H. 第64回日本ウイルス学会学術集会, 2016. 10月23日～25日、国内
6. Prediction of enterovirus A71 functional region for the viral encapsidation. ポスター、Kotani O, Yokoyama M, Nishimura Y, Nagata N, Shimizu H, Sato H, 第64回日本ウイルス学会学術集会, 2016. 10月23日～25日、国内
7. Molecular characterization of the hepatitis E virus receptor candidate. 口頭、Shiota T, Li T-C, Yoshizaki S, Nishimura Y, Shimizu H, Shimojima H, Saijo M, Wakita T, Ishii K. 第64回日本ウイルス学会学術集会, 2016. 10月23日～25日、国内
8. Pathogenicity of recent Coxsackievirus B2 isolates in adult mice inoculated via the mucosal route. 口頭、Nagata N, Iwata-Yoshikawa N, Iizuka S, Agoh M, Shimizu H, Hasegawa H, 第64回日本ウイルス学会学術集会, 2016. 10月23日～25日、国内
9. The VP1 amino acid residue 145 of EV71 is a virulence determinant in a cynomolgus monkey model. 口頭、Fujii K, Sudaka Y, Kataoka C, Suzuki T, Iwata-Yoshikawa N, Kotani O, Ami Y, Shimizu H, Nagata N, Koike K. 第64回日本ウイルス学会学術集会, 2016. 10月23日～25日、国内
10. WHO ポリオウイルス病原体バイオリスク管理行動計画(GAPIII)について. 口頭、清水博之、衛生微生物技術協議会第37回研究会. 2016. 7月22日、国内
11. 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、口頭、木下一美、有馬雄三、砂川富正、多屋馨子、大石和徳、清水博之、第90回日本感染症学会学術集会 4月15日～16日、2016、国内
12. NPV surveillance in Japan, 2015–2016, EV-D68 outbreak in Japan, 2015. 口頭 Shimizu H. The 6<sup>rd</sup> Meeting on Vaccine-preventable Diseases Laboratory Networks in the Western Pacific Region. WHO/WPRO, 12–13 September, 2016, Manila, the Philippines、海外
13. Outbreak of type 1 vaccine-derived poliovirus in Lao People’s Democratic Republic in 2015–2016. 口頭 Shimizu H. The 6<sup>rd</sup> Meeting on Vaccine-preventable Diseases Laboratory Networks in the Western Pacific Region. WHO/WPRO, 12–13 September, 2016, Manila, the Philippines、海外
14. Poliovirus surveillance after the IPV introduction in Japan 2013–2016. 口頭 Shimizu H. The 6<sup>rd</sup> Meeting on Vaccine-preventable Diseases Laboratory Networks in the Western Pacific Region. WHO/WPRO, 12–13 September, 2016, Manila, the Philippines、海外
15. NIID Polio GSL activity. 口頭 Shimizu H. The 6<sup>rd</sup> Meeting on Vaccine-preventable Diseases Laboratory Networks in the Western Pacific Region. WHO/WPRO, 12–13 September, 2016, Manila, the Philippines、海外
16. The VP1 amino acid residue 145 of EV71 is a virulence determinant in SCARB2-dependent infection. 口頭. Fujii K, Sudaka Y, Ayumi Imura, Takashino A, Kataoka C, Suzuki T, Iwata-Yoshikawa N, Kotani O, Ami Y, Shimizu H, Nagata N, Koike K. Europic 2016, 4–8 September, 2016, Switzerland、海外
17. Detection of Enterovirus D68 Based on the National Epidemiological Surveillance of Infectious Diseases System in Japan from 2005 to 2015. 口頭 Kinoshita H, Arima Y, Sunagawa T, Tanaka-Taya K, Hanaoka N, Fujimoto T, Oishi K, Shimizu H. Europic 2016, 4–8 September, 2016, Switzerland、海外
18. Scaffold virus *in vivo* passages drive the structural evolution of the capsid protein for

- enhancing replication fitness in neural cells. ポスター、Kotani O, Yokoyama M, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Hasegawa H, Shimizu H, Sato H, Nagata N. Europic 2016, 4-8 September, 2016, Switzerland、海外
19. Virulence of Recent Coxsackievirus B2 Isolates in A Neonatal Mouse Model. ポスター、Nagata N, Ushioda W, Nakamura T, Agoh M, Iizuka S, Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Shimizu H, Hasegawa H. Europic 2016, 4-8 September, 2016, Switzerland、海外
20. Outbreak of type 1 vaccine-derived poliovirus in Lao People's Democratic Republic in 2015-2016. 口頭、Shimizu H, Vongphrachanh P, Khamphongphane B, Sengkeopraseuth B, Nakamura T, Nishimura Y, Arita M, Wada J, Yoshida H, Schluter WW, Datta SS, Europic 2016, 4-8 September, 2016、海外
21. Molecular assays for the detection and characterization of poliovirus isolates and antibodies. 口頭、Arita M, Nakamura T, Shimizu H. Scientific consultation on the safety and containment of new poliovirus strains for vaccine production, clinical/regulatory testing and research. 7 July, 2016, NIBSC, Potters Bar, United Kingdom、海外

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 世界ポリオ根絶計画の進捗と残された課題、清水博之、第 26 回感染研シンポジウム WHO the expanded program on immunization (EPI) と麻疹・ポリオの排除・根絶、2016 年 5 月 23 日、国内
2. 世界ポリオ根絶計画と日本の貢献、清水博之、聖路加国際大学 WHO プライマリヘルスケア看護開発研究センターPeople Centered Care セミナー、疾病の根絶・制圧と日本の貢献 2017 年 1 月 7 日、国内

(4) 特許出願

特に無し

## 平成28年度医療研究開発推進事業費補助金

### (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) 成果報告書

#### I. 基本情報

事業名： (日本語) 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  
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

補助事業課題名： (日本語) 新興・再興エンテロウイルス感染症の検査・診断・治療・予防法の開発に向けた研究  
(英語) Studies toward the development of surveillance, diagnosis, prevention, and therapy of emerging and re-emerging enterovirus infections

補助事業担当者 (日本語) 国立感染症研究所 感染症疫学センター 室長 多屋 馨子  
所属 役職 氏名： (英語) Chief of Immunization Program, Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases, Keiko Tanaka-Taya

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究課題名： (日本語)  
(英語)

補助事業分担者 (日本語)  
所属 役職 氏名： (英語)

#### II. 成果の概要 (総括研究報告)

補助事業代表者： 国立感染症研究所・ウイルス第二部・清水博之 総括研究報告を参照。

#### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 件、国際誌 件)  
なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 不活化ワクチン導入前後のポリオの予防接種状況・抗体保有状況について、口頭、佐藤 弘、多屋馨子、清水博之、大石和徳、第20回日本ワクチン学会学術集会、2016/10/23、国内。



(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
なし

(4) 特許出願  
なし

## 平成28年度医療研究開発推進事業費補助金

### (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) 成果報告書

#### I. 基本情報

事業名：(日本語) 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  
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

補助事業課題名：(日本語) 新興・再興エンテロウイルス感染症の検査・診断・治療・予防法の開発に向けた研究  
(英語) Studies toward the development of surveillance, diagnosis, prevention, and therapy of emerging and re-emerging enterovirus infections

補助事業担当者 (日本語) 国立感染症研究所 感染症疫学センター・室長・藤本嗣人  
所属 役職 氏名：(英語) National Institute of Infectious Diseases, Chief, Tsuguto Fujimoto

実施期間：平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究課題名：(日本語)  
(英語)

補助事業分担者 (日本語)  
所属 役職 氏名：(英語)

#### II. 成果の概要 (総括研究報告)

補助事業代表者：国立感染症研究所・感染症疫学センター・藤本 嗣人  
総括研究報告を参照。

#### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 1件、国際誌 2件)

1. Miki Ogi, Yoshihiko Yano, Masatsugu Chikahira, Denshi Takai, Tomohiro Oshibe, Takeshi Arashiro, Nozomu Hanaoka, Tsuguto Fujimoto, Yoshitake Hayashi: *Characterization of genome sequences and clinical features of coxsackievirus A6 strains collected in Hyogo, Japan in 1999-2013*. Journal of Medical Virology, 2017, DOI:10.1002/jmv.24798
2. Keishi Kimura, Takao Fukushima, Naoko Katada, Hiroyuki Shimizu, Tomofumi Nakamura, Tsuguto Fujimoto, Nozomu Hanaoka, Keiko Tanaka-Taya, Kunihiro Makino: *Adult case of acute flaccid paralysis with enterovirus D68 detected in the CSF*. Neurology: Clinical Practice (Online) 11/2016; DOI:10.1212/CPJ.

3. Tsuguto Fujimoto, Nozomu Hanaoka, Keiko Taya, Hiroyuki Shimizu: *Laboratory diagnosis of enteroviruses including Enterovirus D68* (エンテロウイルス(D68を含む)の検査方法)、臨床とウイルス、2016、44(3)、84-89 (和文).

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Detections of enterovirus D68 based on the National Epidemiological Surveillance of Infectious Diseases system in Japan, 2005-2015、口頭、Hitomi Kinoshita, Yuzo Arima, Tomimasa Sunagawa, Keiko Tanaka-Taya, Nozomu Hanaoka, Tsuguto Fujimoto, Kazunori Oishi, Hiroyuki Shimizu、Les Diablerets / Switzerland, 2016/9/7, 海外
2. A variety of virus commonly causing diarrhea detected in untreated sewage、口頭、Aksara Thongprachum, Tsuguto Fujimoto, Sayaka Takanashi, Shoko Okitsu, Satoshi Hayakawa, Hiroshi Ushijima、the 64<sup>th</sup> annual meeting of the Japanese Society for Virology, Sapporo, 2016/10/25, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 手足口病について：検査法の視点から、近平雅嗣、藤本嗣人、荻美貴、衛生微生物協議会第37回研究会シンポジウム, 2016/7/22, 国内.

(4) 特許出願

なし

## 平成28年度医療研究開発推進事業費補助金

### (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) 成果報告書

#### I. 基本情報

事業名： (日本語) 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  
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

補助事業課題名： (日本語) 新興・再興エンテロウイルス感染症の検査・診断・治療・予防法の開発に向けた研究  
(英語) Studies toward the development of surveillance, diagnosis, prevention, and therapy of emerging and re-emerging enterovirus infections

補助事業担当者 (日本語) 佐藤 裕徳

所属 役職 氏名： (英語) Center for Pathogen Genomics, National Institute of Infectious Diseases/Chief/ Hironori Sato

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究課題名： (日本語)  
(英語)

補助事業分担者 (日本語)

所属 役職 氏名： (英語)

#### II. 成果の概要 (総括研究報告)

補助事業代表者： 国立感染症研究所・ウイルス第二部・清水博之 総括研究報告を参照。

#### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 1件、国際誌 1件)

1. 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. *Journal of Virology*. 2016 pii: JVI.00864-16.
2. 佐藤裕徳. 計算・情報科学の利活用による論理的創薬の基盤開発. *IASR*. 2016. 37(9):10(176)-11(177).

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 「ウイルス感染症と計算科学」、口頭、佐藤裕徳、第374回 CBI 学会研究講演会、感染症研究の将来 ～グローバルヘルスに貢献する創薬～、2016年7月22日(金)、東京(東京大学山上会館)

2. 「ウイルス感染症研究への計算科学の利活用」口頭、佐藤裕徳、大塚製薬先端創薬研究所 招待講演、2016年10月7日（金）、徳島（先端創薬研究所）
3. 「Saffold virus *in vivo* passages drive the structural evolution of the capsid protein for enhancing replication fitness in neural cells」、ポスター、Kotani O, Yokoyama M, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Hasegawa H, Shimizu H, Sato H, Nagata N. EUROPIC 2016. September 4-8, 2016, Les Diablerets, Switzerland.
4. 「エンテロウイルス A71 粒子形成を制御するカプシド蛋白質機能領域の予測」、小谷治、横山勝、西村順裕、永田典代、清水博之、佐藤裕徳、第64回日本ウイルス学会学術集会、2016年10月23日（日）～25日（火）、北海道（札幌コンベンションセンター）

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. H28.7.22に専門家と一般人を対象に開催された「CBI 学会研究講演会」において講演し、コンピュータ科学を感染症対策に活用した事例（エンテロウイルスを含む）を説明した。佐藤裕徳 「ウイルス感染症と計算科学」、第374回CBI学会研究講演会、感染症研究の将来～グローバルヘルスに貢献する創薬～、2016年7月22日（金）、東京（東京大学山上会館）。
2. H28.7.31に一般人を対象に開催された「国立感染症研究所村山庁舎一般公開」において、ポスターと分子模型を展示した。新興・再興感染症問題、並びにその解決に向けた取り組みの一つとして、コンピュータ科学の活用を説明した。国立感染症研究所村山庁舎一般公開（小谷治、横山勝、佐藤裕徳、山本浩之）

(4) 特許出願

該当なし

## 平成28年度医療研究開発推進事業費補助金

### (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) 成果報告書

#### I. 基本情報

事業名：(日本語) 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  
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

補助事業課題名：(日本語) 新興・再興エンテロウイルス感染症の検査・診断・治療・予防法の開発に向けた研究  
(英語) Studies toward the development of surveillance, diagnosis, prevention, and therapy of emerging and re-emerging enterovirus infections

補助事業担当者 (日本語) ウイルス第二部 室長 清水 博之  
所属 役職 氏名：(英語) Department of Virology II, Chief, Hiroyuki Shimizu

実施期間：平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究課題名：(日本語) セービン株由来不活化ポリオワクチンの国際標準品制定および力価試験標準化に向けた研究  
(英語) Studies on the establishment of the Sabin IPV's international standard and the standardization of potency assay for sIPV

補助事業分担者 (日本語) ウイルス第二部 主任研究官 染谷 雄一  
所属 役職 氏名：(英語) Department of Virology II, Senior Researcher, Yuichi Someya

#### II. 成果の概要 (総括研究報告)

補助事業代表者：国立感染症研究所・ウイルス第二部・清水博之 総括研究報告を参照。

#### III. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 0 件)
- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
- (4) 特許出願

## 平成 28 年度医療研究開発推進事業費補助金

### (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) 成果報告書

#### I. 基本情報

事業名： (日本語) 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  
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

補助事業課題名： (日本語) 新興・再興エンテロウイルス感染症の検査・診断・治療・予防法の開発に向けた研究

(英語) Studies toward the development of surveillance, diagnosis, prevention, and therapy of emerging and re-emerging enterovirus infections

補助事業担当者 (日本語) 感染病理部 室長 永田典代

所属 役職 氏名： (英語) Department of Pathology, Chief, Noriyo Nagata, DVM, PhD

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究課題名： (日本語)  
(英語)

補助事業分担者 (日本語)  
所属 役職 氏名： (英語)

#### II. 成果の概要 (総括研究報告)

補助事業代表者： 国立感染症研究所・感染病理部・永田典代 総括研究報告を参照。

#### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 1 件)

1. 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. *Journal of Virology*. 2016. 90 (21) 10007-10021

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Virulence of recent coxsackievirus B2 isolates in a neonatal mouse model. ポスター、Nagata N, Ushioda W, Nakamura T, Agoh M, Iizuka S, Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Shimizu H, Hasegawa H. 19th International Picornavirus meeting, 2016.9. 国外

2. Pathogenicity of recent Coxsackievirus B2 isolates in adult mice inoculated via the mucosal route. 口頭、Nagata N, Iwata-Yoshikawa N, Iizuka S, Agoh M, Shimizu H, Hasegawa H. 第64回日本ウイルス学会、2016年10月、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
該当無し

(4) 特許出願  
該当無し



## 平成28年度医療研究開発推進事業費補助金

### (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) 成果報告書

#### I. 基本情報

事業名： (日本語) 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  
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

補助事業課題名： (日本語) 新興・再興エンテロウイルス感染症の検査・診断・治療・予防法の開発に向けた研究  
(英語) Studies toward the development of surveillance, diagnosis, prevention, and therapy of emerging and re-emerging enterovirus infections

補助事業担当者 (日本語) 相崎英樹  
所属 役職 氏名： (英語) National Institute of Infectious Diseases、Chief、Hideki Aizaki

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究課題名： (日本語) エンテロ68の感染・増殖における宿主因子の解析  
(英語) Identification of host factors in infection and replication of enterovirus 68

補助事業分担者 (日本語)  
所属 役職 氏名： (英語)

#### II. 成果の概要 (総括研究報告)

補助事業代表者： 国立感染症研究所・ウイルス第二部・清水博之 総括研究報告を参照。

#### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0件、国際誌 0件)

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願  
なし

## 平成 28 年度医療研究開発推進事業費補助金

### (感染症実用化研究事業) 成果報告書

#### I. 基本情報

事業名：(日本語) 感染症実用化研究事業新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業

(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

補助事業課題名：(日本語) 新興・再興エンテロウイルス感染症の検査・診断・治療・予防法の開発に向けた研究

(英語) Studies toward the development of surveillance, diagnosis, prevention, and therapy of emerging and re-emerging enterovirus infections

補助事業担当者 (日本語) 清水 博之

所属 役職 氏名：(英語) Department of Virology II, Chief, Hiroyuki Shimizu

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究課題名：(日本語) 抗エンテロウイルス化合物の同定および解析

(英語) Identification and analysis of anti-enterovirus compounds

補助事業分担者 (日本語) 有田 峰太郎

所属 役職 氏名：(英語) Department of Virology II, Senior research scientist, Minetaro Arita

#### II. 成果の概要 (総括研究報告)

補助事業代表者：国立感染症研究所・ウイルス第二部・清水博之 総括研究報告を参照。

#### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 0 件)

なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

なし

(4) 特許出願

なし

## 平成28年度医療研究開発推進事業費補助金

### (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) 成果報告書

#### I. 基本情報

事業名：(日本語) 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  
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

補助事業課題名：(日本語) 新興・再興エンテロウイルス感染症の検査・診断・治療・予防法の開発に向けた研究  
(英語) Studies toward the development of surveillance, diagnosis, prevention, and therapy of emerging and re-emerging enterovirus infections

補助事業担当者 (日本語) 国立感染症研究所 ウイルス第二部 主任研究官 西村順裕  
所属 役職 氏名：(英語) National Institute of Infectious Diseases, Department of Virology II, Senior Research Scientist, Yorihiro Nishimura

実施期間：平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究課題名：(日本語)  
(英語)

補助事業分担者 (日本語)  
所属 役職 氏名：(英語)

#### II. 成果の概要 (総括研究報告)

補助事業代表者：国立感染症研究所 ウイルス第二部 清水博之 総括研究報告を参照。

#### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 1件、国際誌 0件)

1. 西村順裕. エンテロウイルスと受容体についての最新の理解. 医学の歩み. 2017, 260, 509-12

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. エンテロウイルス71と受容体PSGL-1の結合とその制御. 口頭, 西村順裕. 平成28年度 東京大学医科学研究所 若手研究者シンポジウム「若手研究者が切り拓く次世代ウイルス学」, 2017/2/17, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み：なし

(4) 特許出願：なし

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 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  
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

研究開発課題名：(日本語) 新興・再興エンテロウイルス感染症の検査・診断・治療・予防法の開発に向けた研究

(英語) Studies toward the development of surveillance, diagnosis, prevention, and therapy of emerging and re-emerging enterovirus infections

研究開発担当者 (日本語) 小池 智

所属 役職 氏名：(英語) Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Project Leader, Satoshi Koike

実施期間：平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語) 腸管ウイルス感染・病原性発現モデルの開発研究

開発課題名：(英語) Development of an animal model for enterovirus pathogenesis

研究開発分担者 (日本語)

所属 役職 氏名：(英語)

II. 成果の概要(総括研究報告)

研究開発代表者：公益財団法人東京都医学総合研究所 ゲノム医科学研究分野 小池智

和文

**SCARB2 tg マウスによる EV71 株の毒力の判定系の確立**

仙台ウイルスセンター並びに山形県衛生研究所によって宮城県、山形県内で手足口病患者から分離された EV71 株 27 株を得た。これらの株を SCARB2 トランスジェニックマウスに  $10^6$  TCID<sub>50</sub> 接種し生死、麻痺発症、体重変化を観察して毒力を判定した。その結果、同一地域、同一年に流行した株においても株毎に毒力に大きな違いが見られた。最も毒力の強い株では接種後 5 日以内に全て死亡し、最も毒力の弱い株では全く発症せず、体重変化も見られなかった。これらの事から、流行しているウイルス株は均一ではなく、病原性の異なった株の集団であり、幾つかの変異により毒力の強い株が出現するのではないかという我々の仮説を支持する結果が得られた。現在これらの株の塩基配列を解析中で、どのような変異が毒力に影響を与えるかを決定する。

## **SCARB2tg マウスのワクチン検定系への応用可能性の検討**

我々は2種類のワクチン候補を作成した。EV71 SK-EV006 株は tg マウスにおいて毒力が低く発症することがないため、弱毒ワクチンとしてマウスモデルにおいては弱毒生ワクチンとして利用した。また、同ウイルス株を精製、ホルマリンで不活化し、不活化ワクチンとした。これらワクチンを SCARB2tg マウスに投与し、その後強毒株の攻撃感染を行った。

生ワクチン  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ TCID<sub>50</sub> をもしくは、不活化ワクチン 0.003, 0.03, 0.3  $\mu$ g を4週令、8週令で免疫し、10週令において約10倍 LD<sub>50</sub> の Isehara 株で攻撃感染を行った。ワクチン投与群でワクチン投与量に依存して、抗体価、マウスの生存率が顕著な上昇が見られた。コントロール群では抗体価の上昇は見られず、マウスの生存率も極めて低かった。これらのことから SCARB2tg マウスを用いたワクチンの有効性試験は可能であると考えられた。

## **英文**

### **Assessment of virulence level of EV71 strains using SCARB2 tg mice.**

We obtained a total of 27 EV71 strains, which were isolated in Miyagi Prefecture and Yamagata Prefecture by Sendai Virus Center and Yamagata Prefectural Health Institute, respectively. We assessed the virulence level of these strains by inoculating  $10^6$  TCID<sub>50</sub> of these viruses to SCARB2 tg mice and observed survival, paralysis and body weight loss. We observed a wide variety in virulence among the strains that circulated in the same area and the same period. The most virulent strains can kill all the inoculated mice within 5 days, while some other strains did not cause disease and body weight loss at all in mice. These results support the idea that circulating viruses are not homogeneous but are a group that contain a variety of different virulence level and that the virulent strains may emerge by accumulating certain mutations. We are currently determining the nucleotide sequence of these strains in order to identify key nucleotides that influence the virulence of EV71.

### **Application of SCARB2 tg mice for efficacy test of EV71 vaccines.**

We prepared two vaccine candidates. An EV71 strain, SK-EV006 does not cause disease in SCARB2 tg mice. We used this strain as a live attenuated vaccine. We also purified this strain and inactivated by formalin. We inoculated these vaccine candidates to SCARB2 tg mice and then challenged by lethal infection of virulent strains.

We inoculated  $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^6$  TCID<sub>50</sub> of live SK-EV006 or 0.003, 0.03 or 0.3mg of inactivated vaccine to SCARB2 tg mice at 4-week-old and 8-week-old of age. The immunized mice were challenged by approximately 10 LD<sub>50</sub> dose of virulent strain. We observed significant increase in neutralizing antibody titer in the serum of immunized mice in a dose-dependent manner, but not in the control mice. The immunized mice were protected from the lethal infection. The results suggest that it is possible to evaluate the efficacy of the vaccines using SCARB2tg mice.

### III. 成果の外部への発表

#### (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌1件、国際誌0件）

1. 小池智 エンテロウイルス71研究の進展 医学のあゆみ 2016, 258:1149-1154,

#### (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Neurovirulence of enterovirus 71 assessed by transgenic mouse model expressing human scavenger receptor B2. Koike S. 口頭 *Hand, Foot and Mouth Disease International Conference 2016 (HFMDIC2016)* Biopolis, Singapore 2016/7/25. 国外
2. The VP1 amino acid residue 145 of EV71 is a virulence determinant in SCARB2-dependent infection. 口頭、Fujii K, Sudaka Y, Imura A, Takashino A, Kataoka C, Suzuki T, Iwata-Yoshikawa N, Kotani O, Ami Y, Shimizu H, Nagata N, Koike S. E *The XVIII Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses (EUROPIC 2016)* Les Diablerets, Switzerland 2016/9/8 国外
3. The VP1 amino acid residue 145 of EV71 is a virulence determinant in a cynomolgous monkey model. 口頭、Fujii K, Sudaka Y, Kataoka C, Suzuki T, Iwata-Yoshikawa N, Kotani O, Amin Y, Shimizu H, Nagata N, Koike S. *The 64<sup>th</sup> Annual Meeting of The Japanese Society for Virology* 札幌コンベンションセンター（札幌市）2016/10/22 国内
4. Variation in virulence of clinical isolates of enterovirus 71, ポスター Takashino A, Sudaka Y, Imura A, Fujii K, Kobayashi K, Nishimura H, Mizuta K, Koike S. *The 64<sup>th</sup> Annual Meeting of The Japanese Society for Virology* 札幌コンベンションセンター（札幌市）2016/10/22 国内
5. Changes in EV71 virulence by substitution of amino acid 145 of capsid protein VP1, ポスター, Sudaka Y, Imura A, Takashino A, Fujii K, Koike S. *The 64<sup>th</sup> Annual Meeting of The Japanese Society for Virology* 札幌コンベンションセンター（札幌市）2016/10/22 国内
6. Application of SCARB2tg mice to an efficacy test of EV71 vaccine. ポスター Imura A, Sudaka Y, Takashino A, Fujii K, Kobayashi K, Koike S. *The 64<sup>th</sup> Annual Meeting of The Japanese Society for Virology* 札幌コンベンションセンター（札幌市）2016/10/22 国内

#### (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

#### (4) 特許出願

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 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  
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

研究開発課題名：(日本語) 新興・再興エンテロウイルス感染症の検査・診断・治療・予防法の開発に向けた研究  
(英語) Studies toward the development of surveillance, diagnosis, prevention, and therapy of emerging and re-emerging enterovirus infections

研究開発担当者：(日本語) 国立感染症研究所 ウイルス第二部 清水 博之  
所属 役職 氏名 (英語) National Institute of Infectious diseases, Department of Virology II, Head, Hiroyuki Shimizu

実施期間：平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 開発課題名：

(日本語) エンテロウイルス D68 の治療・予防法の開発と基盤となるウイルス学的解析  
(英語) Virological analysis of enterovirus D68 for the basis of development for the treatment and prevention

研究開発分担者 所属 役職 氏名：

(日本語) 国立大学法人東北大学大学院医学系研究科 教授 押谷 仁  
(英語) Tohoku University Graduate School of Medicine, Professor, Hitoshi Oshitani

II. 成果の概要(総括研究報告)

研究開発代表者：国立感染症研究所・ウイルス第二部・清水 博之 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧(国内誌 0件、国際誌 0件)

1. 該当なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Evolutional patterns and genetic variability of human enterovirus D68. 口頭.  
Natthawan Chaimongkol, Michiko Okamoto, Hitoshi Oshitani. 第64回日本ウイルス学会学

術集会. 2016/10/24. 国内.

2. 2015年の仙台市におけるエンテロウイルス D68 型の流行と血清中和抗体の測定. 口頭.  
岡本道子, 押谷 仁. 第 48 回日本小児感染症学会. 2016/11/19. 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 該当なし

(4) 特許出願

- 該当なし



平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 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  
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

研究開発課題名：(日本語) 新興・再興エンテロウイルス感染症の検査・診断・治療・予防法の開発に向けた研究

(英語) Studies toward the development of surveillance, diagnosis, prevention, and therapy of emerging and re-emerging enterovirus infections

研究開発担当者 (日本語) 大学院医歯学総合研究科 教授 齋藤昭彦

所属 役職 氏名：(英語) Graduate School of Medical and Dental Sciences, Professor, Akihiko Saitoh

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) ヒトパレコウイルス 3 型感染症の病態生理の解明と新しい治療法の検討

開発課題名：(英語) Investigations for the pathogenesis and new therapies for human parechovirus type 3 infection

研究開発分担者 (日本語) 大学院医歯学総合研究科 教授 齋藤昭彦

所属 役職 氏名：(英語) Graduate School of Medical and Dental Sciences, Professor, Akihiko Saitoh

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者： 新潟大学 医歯学系 齋藤昭彦 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 件、国際誌 件)

1. Aizawa Y, Koyama A, Ishihara T, Onodera O, Saitoh A. Performance of a real-time PCR-based approach and droplet digital PCR in detecting human parechovirus type 3 RNA. J Clin Virol. 2016;84:27-31.
2. Saitoh A. Re: Severe Human Parechovirus Infections in Infants and the Role of Older Siblings (Letter). Am J Epidemiol. 2016;184:603-604

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Izumita R, Aizawa Y, Watanabe K, Saitoh A. A Role of Intravenous Immunoglobulin in Human Parechovirus Type 3 Infection in an in vitro Model. Infectious Disease Society of America, 54th Annual Meeting, New Orleans, LA, October, 2016.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 感染症実用化研究事業  
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  
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

研究開発課題名：(日本語) 新興・再興エンテロウイルス感染症の検査・診断・治療・予防法の開発に向けた研究

(英語) Studies toward the development of surveillance, diagnosis, prevention, and therapy of emerging and re-emerging enterovirus infections

研究開発担当者 (日本語) 国立感染症研究所・ウイルス第2部・第二室室長・清水博之

所属 役職 氏名：(英語) Virus II, National Institute of Infectious Diseases, Chief, Hiroyuki SHIMIZU

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) わが国およびアジアにおけるエンテロウイルス感染症の臨床と分子疫学の研究

開発課題名：(英語) Clinical and molecular epidemiological studies of enterovirus infection in Japan and Asia

研究開発分担者 (日本語) 日本大学医学部・上席研究員・牛島廣治

所属 役職 氏名：(英語) Nihon University School of Medicine, Senior Researcher, Hiroshi USHIJIMA

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者：国立感染症研究所・ウイルス第2部・第二室室長・清水博之  
総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 7 件)

1. 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. 2017, 89, 818-24.
2. Pham NT, Ushijima H, Thongprachum A, Trinh QD, Khamrin P, Arakawa C, Ishii W, Okitsu S, Komine-Aizawa S, Hayakawa S Multiplex PCR for the detection of 10

viruses causing encephalitis/encephalopathy and its application to clinical samples collected from Japanese children with suspected viral encephalitis/encephalopathy. Clin Lab. 2017, 63, 91-100.

3. Chuchaona W, Khamrin P, Yodmeeklin A, Kumthip K, Saikruang W, Thongprachum A, Okitsu S, Ushijima H, Maneekarn N. Detection and characterization of Aichi virus 1 in pediatric patients with diarrhea in Thailand. J Med Virol. 2016, 89, 234-8.
4. Tran DN, Trinh QD, Pham NT, Vu MP, Ha MT, Nguyen TQ, Okitsu S, Hayakawa S, Mizuguchi M, Ushijima H. Clinical and epidemiological characteristics of acute respiratory virus infections in Vietnamese children. Epidemiol Infect. 2016,144,527-36.
5. Tran DN, Trinh QD, Pham NT, Pham TM, Ha MT, Nguyen TQ, Okitsu S, Shimizu H, Hayakawa S, Mizuguchi M, Ushijima H. Human rhinovirus infections in hospitalized children: clinical, epidemiological and virological features. Epidemiol Infect. 2016,144, 346-54.
6. Thongprachum A, Khamrin P, Maneekarn N, Hayakawa S, Ushijima H. Epidemiology of gastroenteritis viruses in Japan: Prevalence, seasonality, and outbreak. J Med Virol. 2016: 88:551-70.
7. Khamrin P, Maneekarn N, Okitsu S, Ushijima H: Chapter 11. Emerging foodborne pathogenic kobuvirus, picobirnavirus, and torovirus. (pp219-235) Foodborne Viral Pathogens CRC press, London, pp.280 (Ed: White PA, Netzler NE, Hansman GS) Dec, 2016, ISBN 9781466579507

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 三浦 航、桃木恵美子、春日悠岐、川口忠恭、不破一将、木村かおり、河村由生、石井和嘉子、福田あゆみ、淵上達夫、藤田之彦、牛島廣治、高橋昌里 ヒトパレコウイルス関連脳炎と診断した一乳児例 第 633 回 日本小児科学会東京都地方会談話会, 2017/1/21, 国内
2. Thongprachum A, 沖津祥子、早川智、牛島廣治. Epidemiology of gastroenteritis viruses circulating in Japanese pediatric patients. 第 91 回日本感染症学会・学術集会 2017/4/7,国内.
3. Thongprachum A, Pham TKN, Takanashi S, Kikuta H, Yamamoto A, Kobayashi M, Sugita K, Nishimura S, Baba T, Nakayama E, Okitsu S, Hayakawa S, Ushijima H. First report of salivirus (family of Picornaviridae) in gastroenteritis children in Japan. 第 48 回日本小児感染症学会・学術集会 2016/11/19, 国内.
4. 沖津祥子、疋田敏之、Aksara Thongprachum、高梨さやか、早川智、牛島廣治.2014 年から 2015 年の一小児科外来における急性胃腸炎原因ウイルスの検索 第 48 回日本小児感染症学会・学術集会 2016/11/19, 国内
5. Thongprachum A, Fujimoto T, Takanashi S, OKitsu S, Hayakawa S, Ushijima H. A variety of virus commonly causing diarrhea detected in untreated sewage. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 2016/10/25, 国内.
6. Ushijima H, Thongprachum A, Khamrin P, Okitsu S, Takanashi S, Maneekarn N,

Hayakawa S. The gastroenteritis viruses circulating in Japanese pediatric patients. The 11th Japan-China International Conference of Virology. 2016/7/1, 国外.

7. 牛島廣治、Aksara Thongprachum、Pham Thi Kim Ngan、沖津祥子、早川智、清水博之 ピコルナウイルスと胃腸炎、脳炎・脳症についてー最近経験した臨床例の分子疫学を中心にー 第57回日本臨床ウイルス学会 2016/6/18, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 牛島廣治、早川智 ウイルス性下痢症への挑戦 「N.レスキュー」～日本大学の総合力は松花堂弁当の如く～ 平成 28 年度 日本大学学部連携研究推進シンポジウム, 日本大学理工学部 駿河台校舎 2017/1/21, 国内.
2. 牛島廣治 最近のウイルス性胃腸炎の話題と経口補水療法 横浜内科学会・消化器の知識を増やす会 横浜市健康福祉総合センター 8F 2016/11/1, 国内.

(4) 特許出願

特になし。

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

**I. 基本情報**

- 事業名：(日本語) 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  
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases
- 研究開発課題名：(日本語) 新興・再興エンテロウイルス感染症の検査・診断・治療・予防法の開発に向けた研究  
(英語) Studies toward the development of surveillance, diagnosis, prevention, and therapy of emerging and re-emerging enterovirus infections
- 研究開発担当者 (日本語) 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター 特任助教 片岡 周子  
所属 役職 氏名：(英語) Research Center for Zoonosis Control, Hokkaido University, assistant professor, Chikako Kataoka
- 実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語)  
開発課題名：(英語)
- 研究開発分担者 (日本語)  
所属 役職 氏名：(英語)

**II. 成果の概要 (総括研究報告)**

研究開発代表者：国立感染症研究所 ウイルス第二部 清水博之 総括研究報告を参照。

**III. 成果の外部への発表**

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 0 件)
- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
- (4) 特許出願

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 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  
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

研究開発課題名： (日本語) 新興・再興エンテロウイルス感染症の検査・診断・治療・予防法の開発に向けた研究

(英語) Studies toward the development of surveillance, diagnosis, prevention, and therapy of emerging and re-emerging enterovirus infections

研究開発担当者 (日本語) 清水 博之

所属 役職 氏名： (英語) Shimizu Hiroyuki

実施期間： 平成28年 4月 1日 ~ 平成29年 3月 31日

分担研究 (日本語) 胃腸炎関連ピコルナウイルスであるアイチウイルスの複製機構の解析

開発課題名： (英語) Analysis of replication mechanism of Aichi virus, a picornavirus associated with acute gastroenteritis

研究開発分担者 (日本語) 佐々木 潤

所属 役職 氏名： (英語) Sasaki Jun

成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者： 国立感染症研究所 ウイルス第2部 清水 博之

総括研究報告を参照。

我々は胃腸炎関連のピコルナウイルス、アイチウイルス(AiV)のウイルスゲノム複製機構の解明を目的とした研究を行ってきた。ピコルナウイルスを含むプラス鎖RNAウイルスのゲノム複製は、細胞オルガネラ膜を再編して形成される複製複合体で起こる。細胞の膜輸送や脂質輸送・代謝システムをウイルスが利用して、複製複合体形成が形成されると考えられている。これまでも我々は AiV 複製の宿主因子を同定してきた。本研究では、AiV 感染に関与する新たな宿主因子を同定し、機能解析を行った。ゲノム複製部位でのコレステロール蓄積が AiV のゲノム複製に必要であり、OSBP などの宿主タンパク質が必須であることをすでに示したが、このコレステロール輸送には他にも複数の宿主タンパク質がかかわっており、今年度は、未解析のものについて解析を行った。siRNA を用いた発現ノックダウンがウイルス複製を阻害すること、ウイルスタンパク質との結合能を有する

こと、ウイルス複製細胞の免疫染色により、ウイルスゲノム複製部位に局在することを明らかにし、以上の結果からコレステロール輸送にかかわる宿主タンパク質が AiV ゲノム複製に必要であることを示した。つまり、AiV はゲノム複製に、細胞のコレステロール輸送システムを利用していることが示唆された。ウイルス複製に必要な宿主タンパク質は、ウイルス増殖の阻害剤の標的分子となる可能性が考えられる。

We have analyzed a molecular mechanism genome replication of Aichi virus (AiV), a picornavirus associated with acute gastroenteritis. Positive-strand RNA viruses including picornaviruses rearrange cellular membranes for their genome replication, resulting in formation of replication complexes. For its formation, viruses use the cellular system for intracellular membrane traffic and lipid transport. The purpose of this study is to identify the new host factor required for AiV replication and to understand AiV. We previously showed that accumulation of cholesterol by OSBP at the AiV replication site is important for AiV replication, but it is known that various host proteins other than OSBP are involved in cholesterol transport. In this year, we analyzed whether the component proteins of the cholesterol transport system are required for AiV replication. We revealed that knockdown using siRNA of these genes inhibit AiV replication, that these component proteins interact with the AiV proteins, and that the component proteins colocalized with the viral proteins at the replication sites. These results suggest that AiV utilizes the intracellular transport system for its genome replication. The host proteins required for virus replication are expected to be targets of inhibitors of virus replication.

## II. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 0 件)

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表  
該当なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
該当なし

(4) 特許出願  
該当なし



平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

**I. 基本情報**

事業名：(日本語) 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  
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

研究開発課題名：(日本語) 新興・再興エンテロウイルス感染症の検査・診断・治療・予防法の開発に向けた研究  
(英語) Studies toward the development of surveillance, diagnosis, prevention, and therapy of emerging and re-emerging enterovirus infections

研究開発担当者 (日本語) 金沢医科大学 医学部 微生物学講座・准教授・姫田敏樹  
所属 役職 氏名：(英語) Department of Microbiology, Kanazawa Medical University School of Medicine, Associate Professor, Toshiki Himeda

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) Saffold ウイルスの病原性を規定するウイルス側および宿主側因子の探索  
開発課題名：(英語) Studies of viral and host factors associated with the pathogenesis of SAFV.

研究開発分担者 (日本語)  
所属 役職 氏名：(英語)

**II. 成果の概要 (総括研究報告)**

研究開発代表者：国立感染症研究所・ウイルス第二部・清水博之 総括研究報告を参照。

**III. 成果の外部への発表**

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 2 件)

1. Ito H, Miyagaki S, Sakaue S, Matsui F, Katsumi Y, Otabe O, Torii J, Itagaki T, Himeda T, Okuwa T, Ohara Y: Saffold cardiovirus infection in a 2-year-old boy with acute pancreatitis. *Jpn J Infect Dis.* 2017, 70, 105-7.
2. Okuwa T, Sasaki Y, Matsuzaki Y, Himeda T, Yoshino N, Hongo S, Ohara Y, Muraki Y. The epitope sequence of S16, a monoclonal antibody against influenza C virus hemagglutinin-esterase fusion glycoprotein. *Future Virol.* 2017, 12, 93-101.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Scaffold ウイルス Leader 蛋白の機能解析、ポスター、姫田敏樹、大桑孝子、樋口雅也、日本ウイルス学会学術集会（札幌）2016/10/24、国内
2. タイラーマウス脳脊髄炎ウイルスは形質細胞様樹状細胞を刺激しない、ポスター、武田和也、姫田敏樹、大原義朗、中村晃、日本ウイルス学会学術集会（札幌）2016/10/24、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
なし。

(4) 特許出願  
なし