

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K09080

研究課題名(和文) エンテロウイルスD68型の抗体保有状況の推移と流行の関連

研究課題名(英文) Changes in Enterovirus D68 Antibody Prevalence and Association with Epidemics

研究代表者

岡本 道子 (Okamoto, Michiko)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10593981

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：EV-D68はClade A - Dの遺伝子型に分類される。フィリピンではClade Bの流行が数年おきに見られ、2017年以降Clade Dの検出が増加している。2014年から2017年に急性呼吸器感染症小児から検出されたClade BとClade Dの分離ウイルスを抗原として同研究の血清の抗体価を測定した。期間全体での抗体価は繰り返し流行するClade Bが高値を示したが、Clade Dの流行後にはClade Dの抗体価がClade Bを上回っていた。しかし、Cladeに関わらず流行前には抗体価が低下することから、地域における小児の抗体の減少が流行に關与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EV-D68の2つの遺伝子型のウイルスを用いて、地域における小児の抗体保有状況の推移を継続的に測定した研究である。2つのウイルス抗原は同じ血清型でありながら異なる推移を示したことから、遺伝子型間の抗原性が同一ではないことが示唆された。EV-D68は呼吸器疾患のみならずClade Bによる急性弛緩性麻痺との関連も重要視されているが、近年増加しているClade Dも注視する必要がある。

研究成果の概要(英文)：EV-D68 has been divided into four clades, A, B, C, and D. In the Philippines, outbreaks of Clade B have occurred every few years, and detections of Clade D have increased since 2017. Serum antibody titers were measured using Clade B and Clade D viruses isolated from children with acute respiratory infections from 2014 to 2017 as antigens. The antibody titer against Clade B, which frequently detected, was high throughout the study period, but Clade D antibody titers exceeded Clade B after the Clade D epidemic. However, regardless of the clade, the antibody titers decreased before the epidemic, suggesting that the decrease in antibody levels among children in the community may be related to the epidemic.

研究分野：ウイルス疫学

キーワード：エンテロウイルスD68型 血清抗体

## 1. 研究開始当初の背景

1962 年米国で急性下気道感染症の小児から初めて検出されたエンテロウイルス D68 (EV-D68) は、1970 年から 2005 年まで米国での数十例の報告のみで、2013 年まで北米、アジア、ヨーロッパなどの報告を合わせても 1,000 例以下にとどまっていた。その後 2014 年に米国・カナダで大流行が起こり、続いてヨーロッパやアジアを含む世界各国で多数の報告があった (Hansen, et al. Lancet Infect Dis, 2016)。日本国内では 2010 年と 2013 年に報告数が増加したが、2014 年はほとんどなく 2015 年 8 月以降、これまでにない規模の流行となった。我々はフィリピンで重症例を含む小児の急性呼吸器感染症例から EV-D68 を検出し、数年毎に流行を起こしていることを報告しており (Imamura et al., Emerg Infect Dis, 2011, Furuse et al., J Clin Microbiol, 2015)、これまでに 6 例の死亡を経験している。

EV-D68 は遺伝的に 3 種(現在は 4 種)の Clade が存在し、我々はそれらの免疫血清の反応から抗原性が異なることを報告した (Imamura, et al., J virol, 2014)。検出される Clade は年によって異なる場合や複数混在する場合があります、流行の時期は必ずしも他の国々と一致しない。2014 年以降各国で検出されている EV-D68 は Clade 2 で、2011 年以前に検出された Clade 2 に比し若干のアミノ酸変異がある (Furuse et al., J Clin Microbiol, 2015)。2014 年北米における Clade 2 の大流行時には急性弛緩性麻痺等との関連が示唆され (Messacar et al., Lancet 385, 2015)、日本でも 2015 年には同様の報告があったが、髄液等の中枢神経系からのウイルス検出や病原性の変化の証明には至っていない。また 2015 年の国内での流行時に行った我々の研究では、EV-D68 陽性例の多くは初診時に気管支喘息発作を主訴としており、小児に多い RS ウイルスよりも喘息発作の有力な誘因となることを報告した。(2015 年 日本感染症学会)。また我々は 2015 年の流行時に分離した EV-D68 を抗原に用いて、EV-D68 陽性患者 9 名の急性期血清の中和抗体を測定したところいずれも抗体価は 8 倍以下で、ペア血清が得られた症例では回復期の抗体価が有意に上昇していた。また保存血清で流行前と流行後の抗体価を比較すると、流行後期になるに従って高い値を示す例が増加した。EV-D68 の分子疫学情報が蓄積される中で、異なる clade の EV-D68 を用いた血清疫学に関する報告はまだないことから、国内での 2015 年の EV-D68 の流行の原因、感染による喘息発作等の重症例の増加が流行の規模に起因するのか、ウイルスの抗原性の変化に起因するのかを検討するひとつの手段として本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

5 歳未満の各年齢層における EV-D68 の抗体保有状況および流行前後の抗体価の推移を観察することにより、流行規模と集団免疫の関連や抗体の持続期間を明らかにする。

異なる Clade のウイルスに対する血清抗体の差の有無を検討する。

## 3. 研究の方法

ウイルス抗原ウイルスおよび ELISA 法にて、フィリピンで採取された 0~5 歳未満の小児の保存血清の抗体を測定し、年齢毎の抗体価および保有状況を明らかにする。また、フィリピンでの EV-D68 の検出状況を踏まえ、流行から次の流行までの間に各年齢層の抗体価がどのように推移するのかを解析する。

### ・保存血清

フィリピンで 2012 年から 2017 年におこなわれた 0 歳 5 歳未満の小児急性呼吸器感染症の研究で採取し保存された血清。

### ・ウイルス抗原

RD-A 細胞にてフィリピンでこれまでに分離された EV-D68。

### ・中和法

RD-A 細胞を 96well plate に播種し培養する。被験血清を 10 倍希釈から 2 倍階段希釈で 1280 倍まで希釈し、各々の希釈血清と 100 Tissue culture dose (TCID) / 25uL に調整したウイルス抗原と等量混和する。コントロールとして、5% に調整した細胞培養用 5% ウシ血清と 100TCID のウイルス抗原も等量混和する。血清とウイルス抗原、5% ウシ血清とウイルス抗原の混和液を 37 1 時間反応後、50uL ずつ 2well の RD-A 細胞に接種する。接種後の Plate を 2000rpm 室温にて 30 分遠心後、34 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養し、翌日から細胞変性効果 (CPE) を観察する。48 時間後、コントロールの CPE と比較してあきらかに抑制されている血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

### ・ELISA 法

RD-A 細胞で増やしたウイルス培養液を 3000rpm 15 分遠心後、上清を 35000rpm で 90 分超遠

心し pellet を回収する。ウイルスタンパク量を測定し、15ug/mL に調整した抗原を 50uL ずつ ELISA plate にコーティング後、ブロッキングする。100 倍希釈から 3200 倍まで 2 倍階段希釈した血清および陰性コントロール血清を ELISA plate に 50uL 入れ 37 1 時間反応させる。Plate を洗浄後、20000 倍希釈ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 抗体を 50uL 入れて 37 1 時間反応後 plate を洗浄し、基質液を加えて 37 15 分反応後、405nm で吸光度を測定する。100 倍希釈陰性コントロール血清の吸光度  $\times 1.5$  をカットオフ値とした。

#### 4 . 研究成果

月齢別の抗体陽性率は生後 1 ヶ月未満では ELISA 抗体は約 70%、中和抗体は約 90% を示し、母体由来の移行抗体を反映していると考えられた。抗体陽性率はその後徐々に減少し、最も低くなる月齢は ELISA 抗体は生後 2 - 3 ヶ月 (30% 未満) 中和抗体は 6 ヶ月 (約 50%) であった。測定法による抗体陽性率の推移の違いは、ELISA は Whole virion に対する抗体を検出するのに対し、中和抗体はウイルスのカプシドタンパク VP1 に対する抗体を検出していることに起因していると考えられた。

フィリピンでは Clade B の流行に加え、2017 年以降 Clade D の検出が増加したことから、Clade B と Clade D のウイルス抗原に対する抗体を測定した。研究期間全体で見た Clade 別の抗体価は ELISA と中和のいずれも Clade B が高値を示したが、2013 年や 2017 年の Clade D 流行後には Clade D の抗体価が Clade B を上回っていた。しかし、Clade に関わらず流行前には全年齢群で抗体価の低下が見られたことから、コミュニティにおける小児の抗体の減少が EV-D68 の流行に関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Okamoto M, Sakamoto M, Dapat C, Saito M, Saito-Obata M, Tamaki R, Lupisan SP, Quiambao BP, Oshitani H.	4. 巻 10(39)
2. 論文標題 Complete Genome Sequences of Enterovirus D68 Clade A and D Strains in the Philippines.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiol Resour Announc.	6. 最初と最後の頁 e0070921
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00709-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kadji FMN, Nishimura H, Okamoto M, Sato K, Ohmiya S, Ito H, Suzuki A, Nagai Y, Oshitani H.	4. 巻 73
2. 論文標題 Fluctuations in antibody titers against enterovirus D68 in pediatric sera collected in a community before, during, and after a possible outbreak.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 55 - 57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7883/yoken.JJID.2019.056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Metoki T, Okamoto M, Suzuki A, Kitaoka S, Miyabayashi H, Rokugo Y, Onuma R, Noguchi R, Sato T, Watanabe Y, Ohmiya S, Sato K, Nishimura H, Oshitani H, Kumaki S.	4. 巻 37
2. 論文標題 Concurrent Community Transmission of Enterovirus D68 with Human Rhinoviruses and Respiratory Syncytial Virus among Children in Sendai, Japan.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Pediatric Infectious Disease Journal	6. 最初と最後の頁 394-400
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/INF.0000000000001768,	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	D a p a t C l y d e  (Dapat Clyde)  (10733826)	東北大学・医学系研究科・講師    (11301)	2023.2.28退職

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	斉藤 繭子  (Saito Mayuko)  (20598031)	東北大学・医学系研究科・准教授    (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
フィリピン	Research Institute of Tropical Medicine			