

## 厚生労働科学研究費補助金

### 平成 24 年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業（アジア指定研究）

アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進と共同研究体制の強化に関する研究

Epidemiology and molecular characteristics of the hand, foot, and mouth disease in the North of Vietnam

北部ベトナムにおける手足口病の疫学とウイルス遺伝子解析

研究分担者： 清水博之

国立感染症研究所 ウイルス第二部

研究分担者： Nguyen Thi Hien Thanh

National Institute of Hygiene and Epidemiology

#### 研究要旨

ベトナムでは、近年、死亡例・重症例を含む手足口病あるいはエンテロウイルス 71 (EV71) 感染症の流行が報告されている。2011-2012 年には、ベトナム全土で多くの死亡例を含む大規模な手足口病流行が発生し、公衆衛生上の大きな問題となっている。2011 年の手足口病流行期における、北部ベトナムにおける手足口病患者由来検体から、エンテロウイルスの検出・同定を行った。エンテロウイルス陽性検体の半数弱からエンテロウイルス 71 が検出され、その他のエンテロウイルスの中ではコクサッキー A6 型およびクサッキー A16 型が比較的多く検出された。2011 年のエンテロウイルス 71 分離株の分子疫学的解析を行ったところ、遺伝子型 C4 が比較的多く検出されたが、遺伝子型 B5 と C5 も同時期に伝播していたことが明らかとなった。重症エンテロウイルス 71 感染症の流行が発生しているベトナムでは、手足口病関連エンテロウイルスの病原体サーベイランスは引き続き重要であり、エンテロウイルス 71 遺伝子型の推移と重症例を含む手足口病流行との関連について、今後も注視が必要である。

#### A. 研究目的

手足口病は、発疹を特徴とした発熱性疾患で、予後の良い一般的なエンテロウイルス感染症のうちの 1 つである。しかし、1990 年代後半以降、とくに東アジア地域で、エンテロウイルス 71 (EV71) による小児の急性死症例を含む重症エンテロウイルス感染症の大規模な流行が多発し、大きな社会問題となっている。1990 年代後半には、マレーシアおよび台湾で EV71 脳炎による多数の死亡例を伴う大規模な手足口病流行が発生し、2000 年代に入ってから、シンガポール、オーストラリア、香港、ベトナム、日本等アジア各国で、EV71 等による手足口病流行が報告されている。ベトナムでは近年、重症例・死亡例を含む手足口病流行が報告されている。南部を中心としたベトナムでは、2005 年以来、中枢神経系合併症を伴う手足口病流行が報告されており、2011-2012 年に発生した大規模な手足口病流行の際には、200 例以上の死亡例が報告されている。また、隣国カンボジアで 2012 年に発生した小児急性死症例流行の際には、死亡例から高頻度に EV71 が検出されており、他のベトナム同様、EV71 急性脳炎がカンボジアにおける小児急性死症例の流行に関与していた可能性が高い。

カプシド VP1 領域の塩基配列をもとにした分子系統解析によると、近年、東アジア地域で分離された EV71 は、すべての分離株が、2 種類の遺伝子型である genogroup B および genogroup C に大きく分かれ、さらに subgenogroup B1~B5 および C1~C5 に細分類される。1990 年代後半以降、おもに、B3 および B4、C1 および C2 が、東アジアの多くの地域で分離されており、1997 年のマレーシア、1998 年の台湾における EV71 脳炎をともなう大規模な手足口病流行では、それぞれ、B3 および C2 が主要な流行株であった。ベトナムでは、従来、地域固有の C5 が主要な遺伝子型であったが、2011-2012 年の手足口病流行の主要な原因ウイルスは遺伝子型 C4 であり、2012 年にカンボジアで死亡例から検出された EV71 も遺伝子型 C4 と報告されている。中国の EV71 分離株 C4 と分子疫学的関連性の高い C4 株は、台湾、日本、オーストラリア等でも報告されているが、いまのところ EV71 重症例の大規模流行には関与していない。ベトナム北部で伝播している EV71 の分子疫学的解析は、今のところほとんど報告されていない。

東アジアの多くの地域からは、多様な遺伝子型を有し、かつ、他の地域で分離されるウイルスと分子疫学的関連性の高い EV71 が多く分離されている。EV71 分離株の分子系

統解析によると、特定の EV71 遺伝子型と疾患の重篤化との明確な関連性は認められていないが、2011-2012 年に重症例・死亡例を伴う大規模な手足口病流行が発生したベトナムで分離された EV71 分離株の分子疫学的解析およびウイルス学的解析は重要である。本研究では、ベトナム National Institute of Hygiene and Epidemiology(NIHE)および感染研ウイルス第二部とのあいだの疫学および実験室診断技術に関する情報共有を基盤として、ベトナム北部における手足口病の疫学的解析および EV71 分離株の分子疫学的解析を行う。

## B. 研究方法

北部ベトナムでは、重症例を含む手足口病疾患サーベイランス体制は十分確立されていない。また、疾患サーベイランスも基づく実験室診断体制も完全には整備されていないが、NIHE では、北部ベトナムの手足口病症例に由来する臨床検体を用いたエンテロウイルス遺伝子検出およびシーケンス解析によるエンテロウイルス同定および分子疫学的解析を実施している。NIHE における手足口病実験室診断の概要を以下に示す(図 1. Dr Nguyen Thi Hien Thanh 提供資料)。

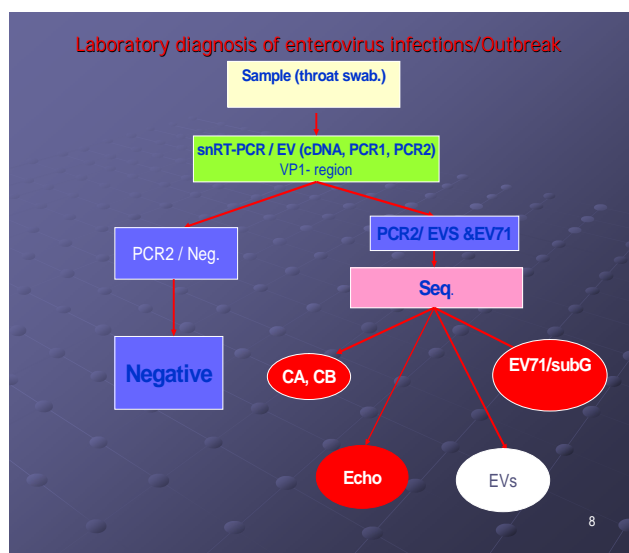


図 1

NIHE において、主として 2011 年の手足口病患者から検出されたエンテロウイルス VP1 領域の塩基配列解析によりウイルス型別を同定し、一部の EV71 株について分子系

統解析を行った。

ベトナムにおける手足口病流行およびエンテロウイルス病原体サーベイランスに関する最新情報は、ベトナム NIHE 側研究分担者である Dr Nguyen Thi Hien Thanh から情報提供を受けた。詳細な研究方法については、NIHE 側研究分担者による研究報告書(添付資料)に記載した。

本年度は、主として 2011 年に発症したベトナム北部の手足口病患者由来臨床検体(咽頭拭い液、発疹拭い液、糞便)を用いた解析を行った。検体は常法に従って調整し、遺伝子検査およびウイルス分離試験に供した。検体から抽出した RNA を鋳型にした semi-nested RT-PCR 法により VP1 部分領域を増幅し、電気泳動によるサイズを確認後ゲルから増幅 DNA を精製した。増幅 DNA を鋳型として塩基配列解析を行い、RNA 配列の相同性により、エンテロウイルス血清型(serotype)あるいは型(type)を同定した。EV71 分離株のうち、代表的な株について VP1 遺伝子をもとにした分子系統解析により、EV71 遺伝子型を判別した。

## C. 研究結果

- 1) エンテロウイルス遺伝子検出・遺伝子解析によるベトナム北部の手足口病患者由来臨床検体(2011 年)から検出されたエンテロウイルスの型別

ベトナム北部の手足口病患者に由来する 912 検体のうち、pan-enterovirus snRT-PCR による遺伝子検出により、603 検体(64%)がエンテロウイルス遺伝子陽性であり、エンテロウイルス陽性検体のうち、275 検体(エンテロウイルス陽性検体中 46%)が EV71 と同定された。塩基配列解析によりエンテロウイルス型別を行った EV71 以外の 328 検体のうち、177 検体(54%)がコクサッキーウイルス A6 型(CVA6)、102 検体(31%)がコクサッキーウイルス A16 型と同定された。その他、コクサッキーウイルス A 群および B 群ウイルス等、多様な型のエンテロウイルスが同定された。

- 2) ベトナム北部の手足口病患者検体(2011 年)から検出された EV71 の遺伝子型

検出された EV71 株のうち 49 株について VP1 領域の塩基配列解析を行い、分子系統解析を行った。2011 年の手足口病流行時に北部ベトナムの手足口病症例から検出された EV71 株では、異なる 3 種類の遺伝子型(EV71

subgenogroup B5, C4, C5)が認められた。2011年のEV71株で、もっとも高頻度で検出されたEV71遺伝子型は(EV71全体の74%)、中国で伝播しているEV71株と分子系統学的に近縁であるC4型であった。遺伝子型B5(20%)および2005～2009年にかけて北部ベトナムにおけるEV71分離株の主要な遺伝子型であった遺伝子型C5(6%)も少数例から検出された。遺伝子型C4は、2010年から高頻度に検出され、2011年の手足口病流行時には主要な原因ウイルスとなった。

感染研ウイルス第二部では、ベトナム固有の遺伝子型である遺伝子型C5株(209-VN株、2006年分離株)についてウイルスストックを作製し、分子系統解析およびウイルス学的性状を解析した。また、日本で分離されたC4株(75-Yamagata)は、ベトナムおよび中国本土で伝播しているC4株と分子系統学的に近縁であることから、遺伝子型C4株標準株としてウイルス学的性状の解析に用いている。

#### D. 考察および今後の研究方針

ベトナムでは、2005年以来、重症例・死亡例を含む手足口病流行が断続的に報告されている。北部ベトナムでは、重症例を含む手足口病病原体サーベイランス体制は十分確立されておらず、重症例を含む手足口病原因ウイルスは、これまで明らかにされていなかった。2011年のベトナム北部の手足口病患者由来臨床検体から検出されたエンテロウイルス型別により、始めて、この地域の手足口病原因ウイルスのトレンドが明らかとなった。手足口病原因ウイルスとして、EV71が高頻度に検出されたが、近年、日本を含めた東アジア地域でも広範な伝播が報告されているCVA6型も比較的高頻度に検出された。CVA6は、日本では従来、他のコクサッキーA群ウイルスとともに、ヘルパンギーナの主要な原因ウイルスであったが、2008年以降、手足口病症例からの検出頻度が増加し、2011年には大規模な手足口病の主要な原因ウイルスとなった。手足口病および爪甲脱落症の発症に関与する最近のCVA6と、従来、ヘルパンギーナ発症に関与していたCVA6は、異なる病原性を有することが示唆されることから、日本およびベトナムで分離されたCVA6の分子疫学的解析が、今後必要とされる。

ベトナムで近年伝播しているEV71分離株の分子疫学的解析を行ったところ、半数以上の2011年分離株が、中国で継続的に伝播している遺伝子型C4と同じ遺伝子型に属

することが明らかとなった。遺伝子型C4のEV71株と分子系統学的に近縁なEV71分離株は、中国本土以外、台湾、日本、ベトナム等でも近年報告されている。また、2012年にカンボジアで流行した重症エンテロウイルス感染症流行事例の多くから検出されたEV71も遺伝子型C4と報告されている。2005～2009年にかけて北部ベトナムにおけるEV71分離株の主要な遺伝子型はベトナム固有の遺伝子型C5だったが、2010年から遺伝子型C4が高頻度に検出され、2011年の手足口病流行時には主要な原因ウイルスとなった。ベトナムでは、近年、主要なEV71遺伝子型がC5からC4に入れ替わった可能性が示唆された。しかし、2011年には、遺伝子型B5および従来型のC5も検出されており、EV71遺伝子型の推移と重症例を含む手足口病流行との関連について、今後も注視が必要である。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表 (分担執筆した報告書等を含む)

- 1) Burns CC, Shaw J, Jorba J, Bukbuk D, Adu F, Gumedé N, Pate MA, Abanida EA, Gasasira A, Iber J, Chen Q, Vincent A, Chenoweth P, Henderson E, Wannemuehler K, Naeem A, Umami RN, Nishimura Y, Shimizu H, Baba M, Adeniji A, Williams AJ, Kilpatrick DR, Oberste MS, Wassilak SG, Tomori O, Pallansch MA, Kew O. Multiple Independent Emergences of Type 2 Vaccine-Derived Polioviruses during a Large Outbreak in northern Nigeria. *J Virol* (in press)
- 2) Fukuhara M, Iwami S, Sato K, Nishimura Y, Shimizu H, Aihara K, Koyanagi Y. Quantification of the dynamics of enterovirus 71 infection by experimental-mathematical investigation. *J Virol* 87: 701-705, 2012
- 3) Nishimura Y, Shimizu H. Cellular receptors for human enterovirus species a. *Front Microbiol* 3: 105, 2012
- 4) Nakajima N, Kitamori Y, Ohnaka S, Mitoma Y, Mizuta K, Wakita T, Shimizu H, Arita M. Development of a transcription-reverse transcription concerted reaction method for specific detection of human enterovirus 71 from clinical specimen. *J Clin Microbiol* 50: 1764-1768, 2012
- 5) Wong KT, Ng KY, Ong KC, Ng WF, Shankar SK, Mahadevan A, Radotra B, Su JI, Lau G, Ling AE, Chan KP, Macorelles P, Desai AS, Ravi V, Nagata N, Shimizu H, Takasaki T. Enterovirus 71 encephalomyelitis and Japanese encephalitis

can be distinguished by topographic distribution of inflammation and specific intraneuronal detection of viral antigen and RNA in the central nervous system. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 38: 443-453, 2012

- 6) Fujimoto T, Iizuka S, Enomoto M, Abe K, Yamashita K, Hanaoka N, Okabe N, Yoshida H, Yasui Y, Kobayashi M, Fujii Y, Tanaka H, Yamamoto M, Shimizu H: Hand, Foot, and Mouth Disease Caused by Coxsackievirus A6, Japan, 2011. *Emerg Infect Dis* 18: 337-339, 2012
- 7) 清水博之: 東アジア地域を中心とした手足口病流行の現状、感染症 2013 (印刷中)
- 8) 清水博之: 手足口病、特集「感染症動向 2013」、*メディカル朝日* 1、28-30, 2012
- 9) 清水博之: 手足口病の問題点. *小児科* 53: 751-758, 2012
- 10) 増本久人、南亮仁、野田日登美、江口正宏、古川義朗、鶴田清典、中田恵子、左近(田中)直美、山崎謙治、高尾信一、Tao Zexin, Xu Aiqiang, Zhang Yong, Xu Wenbo, 藤本嗣人、花岡希、小長谷昌未、吉田弘、清水博之. 国内外における手足口病流行に關与するコクサッキーウイルスA6型の遺伝子解析. *病原微生物検出情報* 33: 60-61, 2012
- 11) 藤本嗣人、花岡希、小長谷昌未、岡部信彦、榎本美貴、小林正明、吉田弘、清水博之. 2011年に手足口病患者から検出されたコクサッキーウイルスA6型の遺伝子配列. *病原微生物検出情報* 33: 61-62, 2012
- 12) 武知茉莉亜、乾未来、福島若葉、中野貴司、清水博之. 手足口病・ヘルパンギーナおよび関連合併症の入院症例に關する全国調査(2010年分) 中間集計結果. *病原微生物検出情報* 33: 63-64, 2012
- 13) 清水博之. 手足口病(エンテロウイルス71)ワクチン開発の現状. *病原微生物検出情報* 33: 65-66, 2012
- 14) A Guide to Clinical management and Public

Health Response for Hand Foot Mouth Disease (HFMD), WHO report, 2011 (分担執筆)

## 2. 学会発表等

- 1) 町田早苗、清水博之: 小児無菌性髄膜炎患者から検出されたエンテロウイルスの分子疫学的解析. 第60回 日本ウイルス学会学術集会. 大阪, 11月14日, 2012
- 2) Shimizu H. Hand, foot, and mouth disease and Enterovirus 71 infection. NIID-China CDC meeting on Collaborative Research meeting, 21 November, Tokyo, 2012
- 3) Shimizu H. Genetic and Phenotypic Diversity of Enterovirus 71. Current Progress in Enterovirus 71 Research in the Asia-Pacific Region, Tokyo, 30 August, 2012
- 4) Lee H, Cifuentes JO, Carnegie MS, Markoff A, Conway J, Shimizu H, Tano Y, Nishimura Y, Hafenstein S. The cryoEM structure of EV71 bound by fragments of neutralizing antibody predicts a mechanism of neutralization by crosslinking and competition with PSGL-1. EUROPIC 2012. Saint Raphaël, France, 3-7 June, 2012
- 5) Umami RN, Hosomi T, Nishimura Y, Shimizu H. Genetic analysis of PSGL-1-tropic enterovirus 71 isolates from clinical samples. EUROPIC 2012. Saint Raphaël, France, 3-7 June, 2012