

F. 研究発表

1 論文発表

- (1) Takahara Y, Matsuoka S, Kuwano T, Tsukamoto T, Yamamoto H, Ishii H, Nakasone T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Sakawaki H, Horiike M, Miura T, Igarashi T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Dominant induction of vaccine antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses after simian immunodeficiency virus challenge. *Biochem Biophys Res Commun* 408:615-619, 2011.
- (2) Ishii H, Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Matsuoka S, Shiino T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Naruse TK, Kimura A, Takiguchi M, Matano T. Impact of vaccination on cytotoxic T lymphocyte immunodominance and cooperation against simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques. *J Virol* 86:738-745, 2012.
- (3) Seki S, Matano T. CTL escape and viral fitness in HIV/SIV infection. *Front Microbiol* 2:267, 2012.
- (4) Nomura T, Yamamoto H, Shiino T, Takahashi N, Nakane T, Iwamoto N, Ishii H, Tsukamoto T, Kawada M, Matsuoka S, Takeda A, Terahara K, Tsunetsugu-Yokota Y, Iwata-Yoshikawa N, Hasegawa H, Sata T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Association of major histocompatibility complex class I haplotypes with disease progression after simian immunodeficiency virus challenge in Burmese rhesus macaques. *J Virol* 86:6481-6490, 2012.
- (5) Nomura T, Matano T. Association of MHC-I genotypes with disease progression in HIV/SIV infections. *Front Microbio* 3:234, 2012.
- (6) Takahashi N, Nomura T, Takahara Y, Yamamoto H, Shiino T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Sakawaki H, Miura T, Igarashi T, Koyanagi Y, Naruse TK, Kimura A, Matano T. A novel protective MHC-I haplotype not associated with dominant Gag-specific CD8+ T-cell responses in SIVmac239 infection of Burmese rhesus macaques. *PLoS ONE* 8:e54300, 2013.
- (7) Nakane T, Nomura T, Shi S, Nakamura M, Naruse TK, Kimura A, Matano T, Yamamoto H. Limited impact of passive non-neutralizing antibody immunization in acute SIV infection on viremia control in rhesus macaques. *PLoS ONE* 8:e73453, 2013.
- (8) Iwamoto N, Takahashi N, Seki S, Nomura T, Yamamoto H, Inoue M, Shu T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Control of SIV replication by vaccine-induced Gag- and Vif-specific CD8+ T cells. *J Virol* 88:425-433, 2013.

2 学会発表

- (1) Nomura T, Iwamoto N, Inagaki N, Matsuoka S, Yamamoto H, Matano T. Dynamics of viral CTL escape mutations toward higher viral replicative ability in vivo. The 6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention, Rome, Italy, 7/18/2011.
- (2) Nomura T, Yamamoto H, Shi S, Iwamoto N, Matano T. Analysis of viral genome sequences in SIV controllers. The XVth International Congress of Virology, Sapporo, Japan, 9/13/2011.

- (3) Matano T. Impact of prophylactic vaccination on post-exposure CTL cooperation against SIV replication in rhesus macaques. 12th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 10/20/2011.
- (4) 中村碧、高原悠佑、阪脇廣美、堀池麻里子、三浦智行、五十嵐樹彦、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗、松岡佐織. サルエイズモデル感染初期におけるMHCクラスIハプロタイプ別のCTL反応優位パターンの解析. 第25回日本エイズ学会学術集会、東京、11/30/2011.
- (5) Takahara Y, Nakamura M, Matsuoka S, Sakawaki H, Miura T, Igarashi T, Koyanagi Y, Naruse T, Kimura A, Matano T. Impact of therapeutic vaccination on CTL immunodominance and viral suppression in SIV-infected rhesus macaques under HAART. The XIXth International AIDS Conference, Washington, DC, USA, 7/26/2012.
- (6) Matano T. Stable viral control in the presence of silent proviruses in a macaque AIDS model. The 13th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 10/24/2012.
- (7) 野村拓志、山本浩之、明里宏文、俣野哲朗. SIV複製抑制マカクサルにおけるCTL逃避変異体の選択による複製抑制破綻機構の解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、11/14/2012.
- (8) 高橋尚史、山本浩之、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗. サルエイズモデルにおけるNef抗原特異的細胞傷害性Tリンパ球反応が関与するウイルス複製制御機序に関する研究. 第26回日本エイズ学会学術集会、東京、11/24/2012.
- (9) Matano T. Vif can be a promising CD8 T cell target for HIV/SIV control. The 14th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 10/29/2013.
- (10) 野村拓志、俣野哲朗. SIV感染制御群における制御維持へのVifおよびNef特異的細胞傷害性Tリンパ球反応の関与に関する研究. 第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、11/12/2013.

G. 知的財産権の出願・登録状況  
無し。

表 1. インド人 HIV 感染者検体の解析で見出された HLA アレル

HLA-A	頻度
A*01:01	11 %
A*11:01/02	25 %
A*24:02	11 %
A*31:01	11 %
A*33:03	18 %
A*68:01	14 %

HLA-B	頻度
B*07:02	11 %
B*40:06	14 %
B*44:03	21 %
B*52:01	11 %
B*57:01	8 %
B*58:01	8 %

HLA-C	頻度
C*03:02	8 %
C*06:02	11 %
C*07:01	25 %
C*07:02	14 %
C*12:03	8 %
C*15:02	17 %

# プロジェクト4：ベトナム

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

平成 23-25 年度 総合分担研究報告書

研究課題名：「腸内細菌の molecular typing に関する研究－ベトナム」

研究分担者 泉谷秀昌

国立感染症研究所 細菌第一部

研究要旨 本研究は、わが国をはじめアジア各国で発生する種々の細菌感染症に対応するため、主として食水系由来腸管感染症を対象に遺伝子解析をベースとした疫学指標、診断法の開発、ならびにそれらの有用性についての検討を主眼としている。本研究ではベトナム国立衛生疫学研究所（National Institute of Hygiene and Epidemiology, NIHE）の腸内細菌部門と共同して *Vibrio cholerae* を中心に分離菌株の解析および環境調査などを行った。

Molecular typing of enteric pathogens

Hidemasa Izumiya

Molecular epidemiological analyses were performed for *Vibrio cholerae* isolates of 2007-2010 from Vietnam in collaboration with National Institute of Hygiene and Epidemiology, Vietnam. The resulting data revealed the relatedness among isolates. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis identified 24 types which were linked with each other by single locus variations. The analysis suggests that 2010 isolates were more similar to 2007 isolates than to 2009 isolates.

Environmental research was performed for water samples collected from environments in Hanoi and neighboring provinces. Most probable number combined with PCR method (MPN-PCR) was applied to estimate the distribution of *V. cholerae*. Some seasonal variations were suggested though more successive research would be required.

#### A. 研究目的

コレラ菌、赤痢菌、サルモネラといった、食水系腸管感染症起因菌を中心に研究を行う。当該感染症の流行地域であるアジア各国において、流行菌種あるいは菌型を把握するための分子タイピング法の検討を行う。また、必要に応じて、当該国の能力向上を図ることを目的とする。

#### B. 研究方法

分子タイピング法としてパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) および multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA) を主として活用する。

本研究における地理的な分布図作成については、地理情報分析支援システム (MANDARA) を使用した。

環境調査においては、生活水路等から採水

し供試検体とする。検体を MPN (最確数) -PCR 法により試験し、検体中の *Vibrio cholerae* の菌数を推定する。

### C. 研究結果および考察

コレラはコレラ菌 (コレラ毒素産生性 *Vibrio cholerae* 01/0139) によって発生する経口感染症である。上下水道等、いわゆるインフラ整備が不十分な途上国では、コレラの流行は公衆衛生上の脅威である。本研究のカウンターパートであるベトナムでは、しばらくの休眠期間の後、2007 年から 2010 年にかけてコレラの流行が発生した。コレラの流行は当該国において非常な脅威であり、当該国の感染症対策において上位に位置づけられている。また、ベトナムは現在、我が国との交易も盛んな国であることから、当該国でのコレラの流行はわが国にとってもリスクとなりえる。こうした背景から、本研究においてはベトナムにおけるコレラ流行の把握と制御に向けた共同研究を遂行している。

具体的にはベトナム国立衛生疫学研究所 (National Institute of Hygiene and Epidemiology; NIHE) の腸内細菌部門・コレラセンターと共同して、コレラ菌のサーベイランスシステムの構築を検討している。

本研究においては 2 つの活動を基点とする。一つは NIHE の能力向上であり、今一つは感染研との共同研究である。ベトナムで流行した、もしくは流行しているコレラ菌の特徴づけを行うべく、感染研と NIHE とで材料および技術をやり取りすることによって 2 つの活動が回っていくことを期待している。

本研究では上記 2007 年から 2010 年に関

して発生したコレラ流行に関連する分離菌株を供試菌株とした。当該菌株に関して分子疫学解析を行い、時系列別の比較を行った。2009 年分離株に関しては、分離地の情報と組み合わせてより詳細な解析を行った。

供試菌株 (約 190 株) は 24 の型に分類された。それぞれの型は 1 遺伝子座の違い (single locus variant, SLV) によってつなげることができ、流行時の菌の伝播とともにバリエーションが派生していることが窺えた。

なお、PFGE についても比較的マイナーなバリエーションが見られ、年によって大きなクラスターが形成された (図 2、A1, B1, D)。

2010 年分離株は、MST からすると 2007 年株より派生していることが窺えた (図 1)。MLVA で使用している 7 つの遺伝子座のうち 2 遺伝子座は *V. cholerae* が保有する大小 2 つの染色体のうち、小染色体にあり、これらはより不安定でバリエーションが出やすい (表 1) ことから、大染色体の 5 遺伝子座のみを使って MST を描いたところ、2010 年株は 2007 年株と同じクラスターに分類された。このことは、2010 年株が 2009 年株よりも 2007 年株に近いことを示唆しており、2010 年株が 2007 年株から派生してきた可能性が示唆された。

実際、2007-2009 年はベトナム北部を中心に流行があり、2010 年は南部から始まって北部に至ったとされており、2010 年が 2009 年の続きにあるというよりは、近縁だが別の新たな流行波で 2010 年の流行が生じた可能性が考えられた。

2009 年分離株は全体の半数を占め、大きな流行があったことが窺えた。これらの菌株に関する疫学情報を入手し (発症日、発生地)

を入手し、時間—空間推移を検討した。ちなみに 2009 年に多数を占めた MLVA 型は 2007 年流行株のそれとは 2 遺伝子座以上異なっていた (図 1)。

2009 年 4 月 15 日に初発例が出たものの 2 週間は陽性例がなかった。2 週間後の 5 月 2 日から最初のピークが発生した (第一波)。患者の多くはハノイ周辺およびタンホア省であった。5 月 17 日時点の菌陽性例は 36 であった。5 月 18 日より 2 回目のさらに大きなピークが発生した (第二波)。これ以後に発生した菌陽性例は 56 であり、うち 49 例 (88%) がバクニン省で発生した。バクニン省は第一波では 36 例中 17 例 (47%) を占めていた (図 3)。バクニン省はハノイに隣接しており、コレラの流行が起きやすいと言われているハイフォン省への中間にある (図 4)。

上記解析は、ほぼ同一の MLVA 型を示す株の分離状況によるものではあるが、2009 年初夏のコレラ流行が小さな第一波と大きな第二波からなることが示唆された。各症例間のつながりなどを示す情報がないため、第一波と第二波を直接つなげる要素はないが、第二波が第一波から派生した汚染源、たとえば、ある地域の共通の飲料水あるいは食材が原因となって発生した可能性も十分に考えられる。全体的には、図 1 に示すように 2007-2009 年にかけて流行伝播を繰り返しながら、互いに近縁の菌株が派生している状況が窺える。上記 2009 年の解析からも、大小の流行から成り、流行制御が不十分であることが、コレラ菌の伝播、そしてバリエーションの派生につながっていることが推測された。

コレラの流行に対応するために環境中の *V.*

*cholerae* の動向を調査することは重要である。流行期間でない時期にはいわゆるコレラ菌ではなく、毒素産生のない *V. cholerae* がほとんど大勢を占めるが、環境調査を行うことで、環境中のリスク要因あるいはポイントの検討および流行発生時の調査を円滑に実施できる体制整備につながる。

本調査は NIHE 腸内細菌部門で継続的に実施されていたが、定量性を加味するために MPN-PCR 法の導入を行った。2013 年 3-8 月の間に、約 100 検体を試験し、20 検体が陽性であった。それらの MPN 値の最低および最高値を図 5 に示す。5-7 月にかけては菌数が低く、3, 4 月および 8 月には菌数が高かったことから、*V. cholerae* 分布に関する季節変動の可能性が示唆された。本結果については、ポイントの整理などを行い、また継続して調査を行うことで *V. cholerae* の消長が定期的に発生するかどうかを見ていく必要がある。

#### D. 結論

2007 年から 2010 年にかけてベトナムで発生したコレラの流行に関し、関連菌株を用いた分子疫学解析を通じて互いの関連性および近縁性を明らかにすることができた。

環境調査を定量的に実施することで、環境中の *V. cholerae* の分布および消長をより高い精度で把握することが可能である。

#### E. 健康危機情報

特になし

#### F. 研究発表

Yamamoto S, Mitobe J, Ishikawa T, Wai SN,

Ohnishi M, Watanabe H, Izumiya H. transmembrane regulator in *Vibrio*  
Regulation of natural competence by the *cholerae*. Mol Microbiol. 2014  
orphan two-component system sensor kinase Jan;91(2):326-47.  
ChiS involves a non-canonical



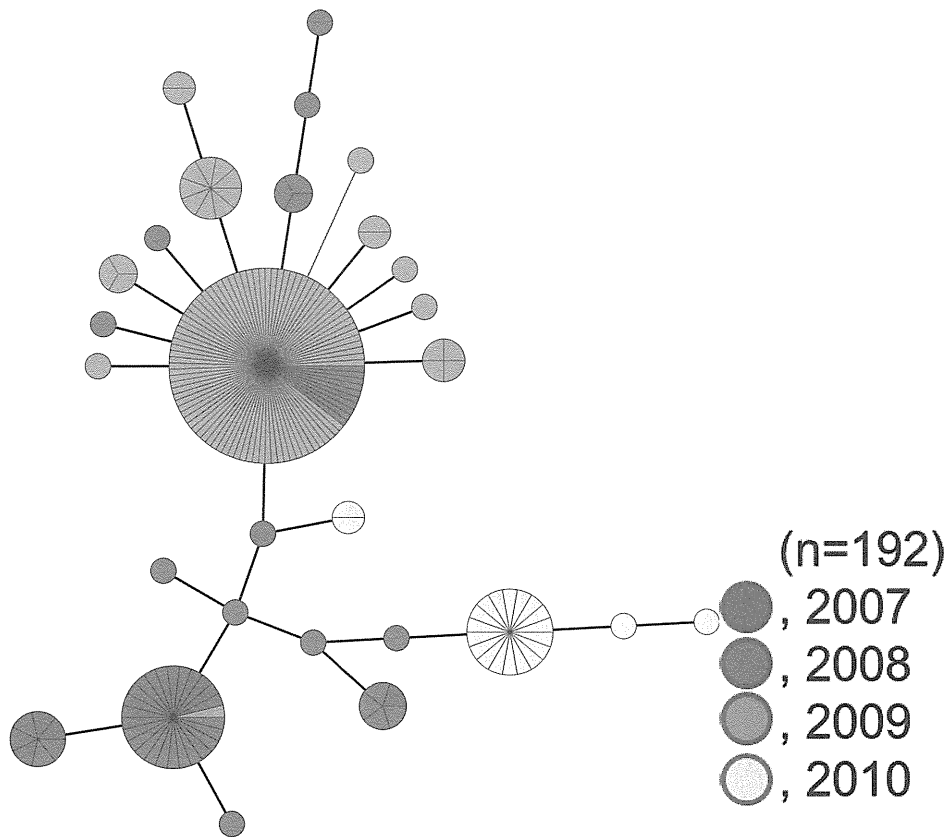


図1. 2007-2010年コレラ流行株のMLVAによるMST解析

PFGE-VC

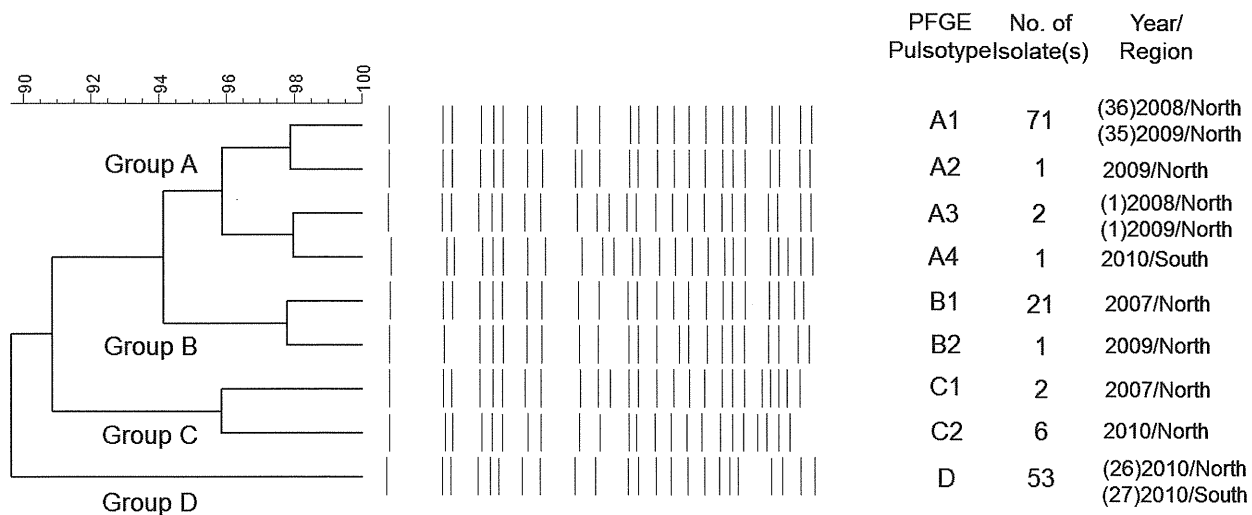


図2. 2007-2010年コレラ流行株のPFGEによるクラスター解析

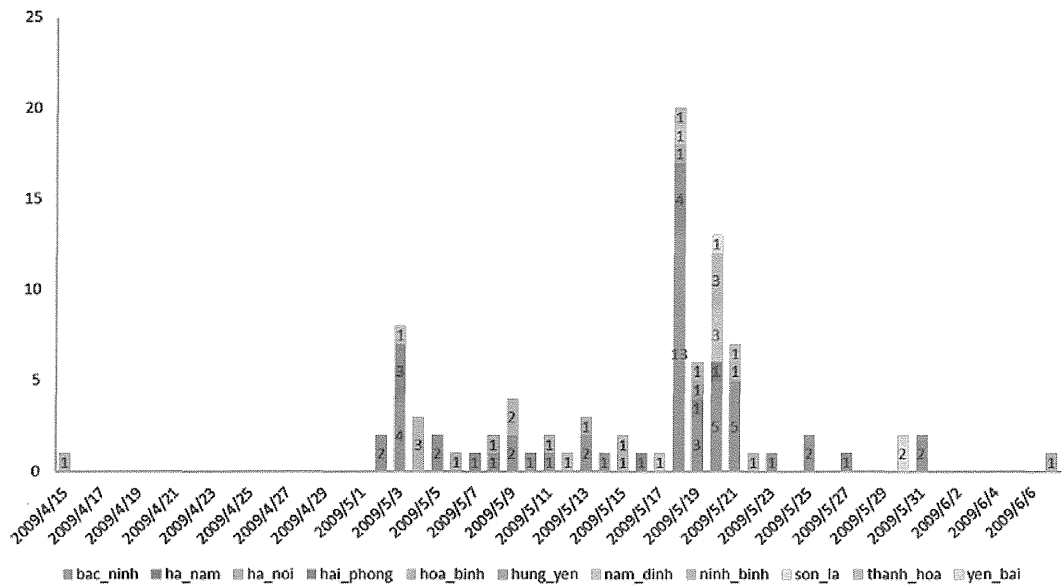


図3. 2009年4-6月コレラ菌の分離菌株数の推移

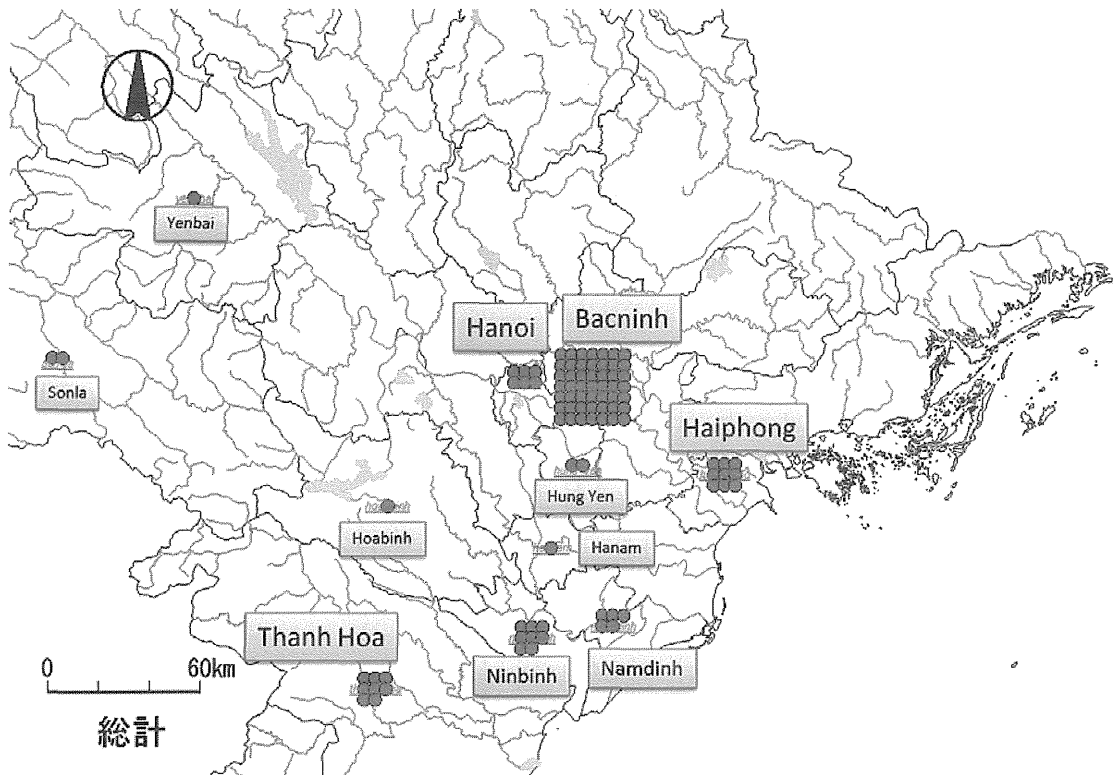


図4. 2009年4-6月コレラ菌分離株数の地図（ベトナム北部拡大図）

Chromosome	locus	# allele	Diversity
Large	VC-1	3	5.1
	VC-2	1	0
	VC-3	1	0
	VC-5	3	47
	VC-6	1	0
Small	VC-7	7	56.1
	VC-8	8	64.1

表1. MLVA の各遺伝子座において観察されたアリル数および分解能 (Diversity)

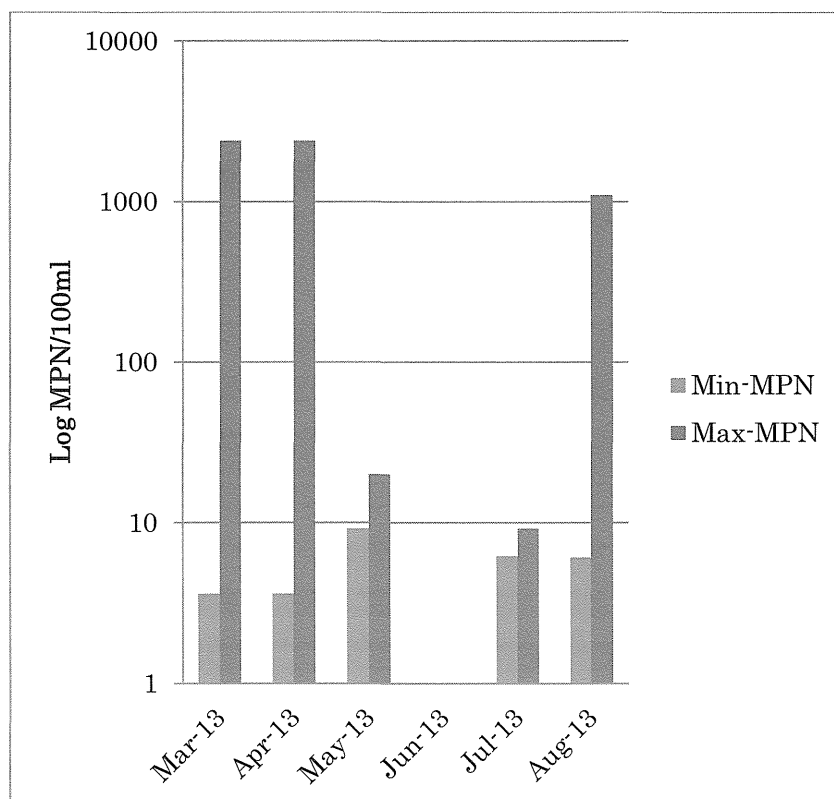


図5. ハノイおよび周辺の province における環境調査。検出された MPN 値の最低値および最高値を表す。

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
総合分担研究報告書（平成 23～25 年度）

アジアの感染症担当研究機関とのレプトスピラ症に関する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

Collaborative study on leptospirosis with Taiwan CDC and Vietnam NIHE

研究分担者 小泉信夫 国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官

Nobuo Koizumi: Senior Researcher, Department of Bacteriology I, NIID

Jung-Jung Mu: Chief, Bacterial Enteric and Emerging Diseases Laboratory,  
Center for Research, Diagnostics and Vaccine Development, Taiwan CDC

Hoang Thi Thu Ha: Chief, Bacteriology Department, National Institute of  
Hygiene and Epidemiology, Vietnam

研究要旨

1. 日本，台湾，フィリピンおよびベトナムで分離された *Leptospira interrogans* および各血清型基準株の分子タイピングを multiple locus variable-number tandem repeats analysis (MLVA) により行った。MLVA により，他の分子タイピング法で同じ分子タイプと分類された異なる血清群を識別できること，また同じ血清群内の遺伝的多様性が明らかとなった。またこれらの国に分布する *L. interrogans* と保有動物の多様性および普遍性，動物種特異的な血清群の存在が明らかになった。

We performed molecular typing of *Leptospira interrogans* isolated in Japan, Taiwan, Philippines and Vietnam by multiple locus variable-number tandem repeats analysis (MLVA). MLVA revealed the genetic diversity of strains which belong to the same serogroup and turned out to have more discriminatory power than that of *flaB* sequence typing or multilocus sequence typing. MLVA also revealed the diversity and the universality of the relation between *L. interrogans* and host animals in/across these countries.

2. ベトナム北部のレプトスピラ症の現状を明らかにするために，ベトナム国立衛生疫学研究所 (NIHE) にレプトスピラ症実験室診断法の技術移転を行った。これらの診断法を用いてタインホア地域の熱源が不明の発熱患者および一般健康人の血清疫学，ネズミ，ブタおよび土壌からのレプトスピラ検出を行った。熱源不明の発熱患者の 20% からレプトスピラ特異的 IgM が検出され，9% の患者血液からレプトスピラ DNA が検出された。また同地域の健康人の 49% からレプトスピラ特異的 IgG が検出され，農業従事者におけるレプトスピラ感染の蔓延が明らかとなった。

To elucidate the current situation of leptospirosis in the northern part of Vietnam, the technical transfer of diagnostic methods of leptospirosis was implemented, and then the seroprevalence study of patients with undifferentiated fever and healthy people and the detection of leptospiral DNA from patients, rats and soil were conducted in Thanh Hoa area. *Leptospira* specific IgM and DNA was detected in 20% and 9% of the patients with

undifferentiated fever, respectively. *Leptospira*-specific IgG was detected in 49% of healthy people whose occupations were agriculture-related, indicating the epidemicity of leptospirosis among agricultural workers in Thanh Hoa area.

## 研究目的

レプトスピラ症は、病原性レプトスピラの感染によっておこる人獣共通感染症である。レプトスピラは、交差凝集素吸収試験により250以上の血清型に分類されるが、本試験法は非常に煩雑で実施できる機関は限られている。近年、血清学的分類に替わる多くの分子タイピング法が開発されてきた。我々はこれまで国内のレプトスピラ分離株について、*flaB* シーケンスタイピング(*flaB*-ST)および multi locus sequencing typing (MLST)を行ってきたが、異なる血清群に属するレプトスピラが同じタイプに分類されるといった問題点が明らかとなってきた。そこで本研究では、日本、台湾、フィリピンおよびベトナムで分離された *L. interrogans* の解析を multiple locus variable-number tandem repeats analysis (MLVA) により行った。

レプトスピラ症はアジアの多くの国で流行しているが、ベトナムでは南部メコンデルタ地域での患者報告があるものの、国レベルでの実態は明らかになっていない。そこで本研究では、ベトナム北部におけるレプトスピラ症の実態を明らかにするために、ベトナム国立衛生疫学研究所(NIHE)にレプトスピラ症実験室診断法の技術移転を行い、タインホア地域のレプトスピラ症の実態を調査した。

## 方法、結果および考察

1. 日本、台湾、フィリピンおよびベトナムで分離された *L. interrogans* の MLVA  
各国で分離されたレプトスピラ *L. interrogans* 263株の血清群同定を行い(表1),

11種類の VNTR のリピート数をアガロース電気泳動および DNA シーケンシングにより算定した (MLVA)。また *L. interrogans* 各血清型標準株 51 株の MLVA も行った。各分離株のクラスター解析は、各 VNTR のリピート数をもとに Bionumerics を用いて行い、系統樹は UPGMA 法により作成した。

本 MLVA により、*flaB*-ST および MLST で同じシーケンスタイプだった血清群の異なる分離株を、血清群ごとにタイピングすることができた (図1)。また血清型基準株との比較により、血清群 *Bataviae*, *Canicola*, *Pyrogenes* 分離株の血清型をそれぞれ *Bataviae*, *Canicola*, *Manilae* と、また *Icterohaemorrhagiae* 分離株の血清型を *Icterohaemorrhagiae* および *Naam* と同定することができた。したがって、MLVA はこれまでの分子タイピング法よりも解像度が高いことが明らかとなり、血清型推定にも有用である可能性が示された。しかしながら、その他の血清群分離株と同一あるいは近縁の MLVA タイプは今回タイピングを行った基準株から見いだされなかった。このことはこれら分離株の血清型が新規の血清型であることを示唆しているのかもしれない。あるいは同じ血清型が異なる分子タイプ群から構成されている可能性も考えられる。今後、他の地域の分離株の解析を通して血清学的分類と分子タイピングの関連性 (普遍性あるいは多様性) をさらに明らかにしていく必要がある。

ドブネズミは世界中に分布しているが、地域により保有している血清群が異なることが明らかとなった (表1)。また他の動物が保有するレプトスピラに比べて、ドブネズミが保有するレプトスピラの血清群間のゲノムは高度に保存されていた。このことから、保有す

るレプトスピラ血清群・分子タイプを決定することで、ドブネズミの拡散経路に関する新たな知見が得られる可能性が示唆された。一方で、地域により保有血清群が異なることは、特定の血清群を保有したドブネズミが拡散したのではなく、その地域ごとに新たなドブネズミ-レプトスピラの保有関係が成立したことを示唆しているのかもしれない。今後他の地域のドブネズミ分離株の解析を行い、これら仮説の検証を行っていく。

MLVA により、ヒトへの感染源となっている保有動物の推定に有用なことが明らかとなった。国内の血清群 *Autumnalis* はアカネズミおよびイヌに特異的なクラスターを形成するが、ヒト患者分離株はイヌと同じクラスターに分類されることが明らかとなり、イヌがこの血清群の維持宿主となり、ヒトへの感染源となっている可能性が示唆された。また沖縄県の患者分離株は台湾のネズミ分離株と同一のクラスターを形成し、本州のイヌおよびアカネズミから分離された血清群 *Australis* とは異なるクラスターであった。これまで沖縄県における本血清群の保有動物は明らかになっていないが、沖縄県に広く存在するジャコウネズミが保有動物の可能性が示唆された。

## 2. ベトナム北部におけるレプトスピラ症疫学研究

ベトナムでは、南部メコンデルタ地帯でレプトスピラ症の蔓延が報告されているが、北部におけるレプトスピラ症の発生実態はほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、ベトナム NIHE にレプトスピラ症実験室診断法の技術移転を行い、これらの診断法を用いてタインホア省のレプトスピラ症疫学研究を行った。

熱源不明の発熱患者の 20% からレプトスピラ特異的 IgM (LigA IgM) が検出され、9% の患者血液から *flaB*-nested PCR によりレプトスピラ DNA が検出された。また同地域の健康人の 49% からレプトスピラ特異的 IgG

(LigA IgG) が検出された。抗体陽性者の職業は農作業従事者 62%、畜産従事者 17%、屠畜従事者 6% であり、農業従事者におけるレプトスピラ感染の蔓延が明らかとなった。またネズミの 10% の腎臓あるいは尿からレプトスピラ DNA が検出された。一方、土壌 70 検体からレプトスピラ DNA は検出されなかった。今後ネズミ以外のウシやブタなどの家畜からのレプトスピラ検出を行うとともに、環境からの検出法の改善を行い、同地域におけるレプトスピラ症の伝播経路の解明を目指す。

loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法による血漿からの DNA 検出のための、DNA 精製を必要としない簡便な DNA テンプレートの調整法を以下のように確立した。

## Lepto-*rrs* LAMP のための血漿からの DNA 調整法

血漿

↓ 遠心分離(16,000×g, 10 分間)

遠心沈渣

↓ 5% Chelex 100 を含む TE 20 μl に懸濁

↓ 熱処理 (100°C, 10 分間)

↓ 急冷

↓ 遠心分離(16,000×g, 1 分間)

上清を DNA 検体として使用

レプトスピラを分与いただいた岡野祥 (沖縄県衛生環境研究所)、吉松組子 (北海道大学大学院)、また MLVA を行うにあたってご協力いただいた泉谷秀昌 (国立感染症研究所) 各氏に深謝いたします。

## 論文発表

1. 小泉信夫, 大西真. レプトスピラ症. 小児科. 54:43-48, 2013.

2. 小泉信夫, 岡野祥, 大西真. レプトスピラ症. 化学療法の領域. 29:670-678, 2013.
3. 小泉信夫, 大西真. レプトスピラ感染症(レプトスピラ症, ワイル病). 別冊 日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No. 24 感染症症候群 (第2版) (上) 病原体別感染症編. 257-260, 2013.
4. Koizumi N, Nakajima C, Harunari T, Tanikawa T, Tokiwa T, Uchimura E, Furuya T, Mingala CN, Villanueva MA, Ohnishi M, Suzuki Y. A new loop-mediated isothermal amplification method for rapid, simple, and sensitive detection of *Leptospira* spp. in urine. J Clin Microbiol 50:2072-2074, 2012.

学会発表

1. 小泉信夫. スリランカ・フィリピンにおけるレプトスピラ症の現状. 第87回日本細菌学会総会. 2014年3月.
2. 小泉信夫. レプトスピラ症の現状. 第12回人と動物の共通感染症研究会学術集会. 2012年11月.

表 1. 本研究で解析を行った *L. interrogans* の分離国，血清群および分離動物

国	レプトスピラ血清群	分離動物
日本	Australis	アカネズミ， イヌ， ヒト
	Autumnalis	アカネズミ， イヌ， ヒト
	Canicola	イヌ， ネコ， ヒト
	Grippotyphosa	ヒト
	Hebdomadis	アカネズミ， アライグマ， イヌ， オキナワハツカネズミ， ヒト， マングース
	Icterohaemorrhagiae	アライグマ， イヌ， ドブネズミ， ヒト
	Pomona	ドブネズミ
	Pyrogenes	ヒト
台湾	Australis	コキバラネズミ， ジャコウネズミ
	Bataviae	ドブネズミ
ベトナム	Bataviae	ドブネズミ
フィリピン	Bataviae	ドブネズミ， ヒト
	Grippotyphosa	ドブネズミ， ヒト
	Pyrogenes	ドブネズミ， ヒト



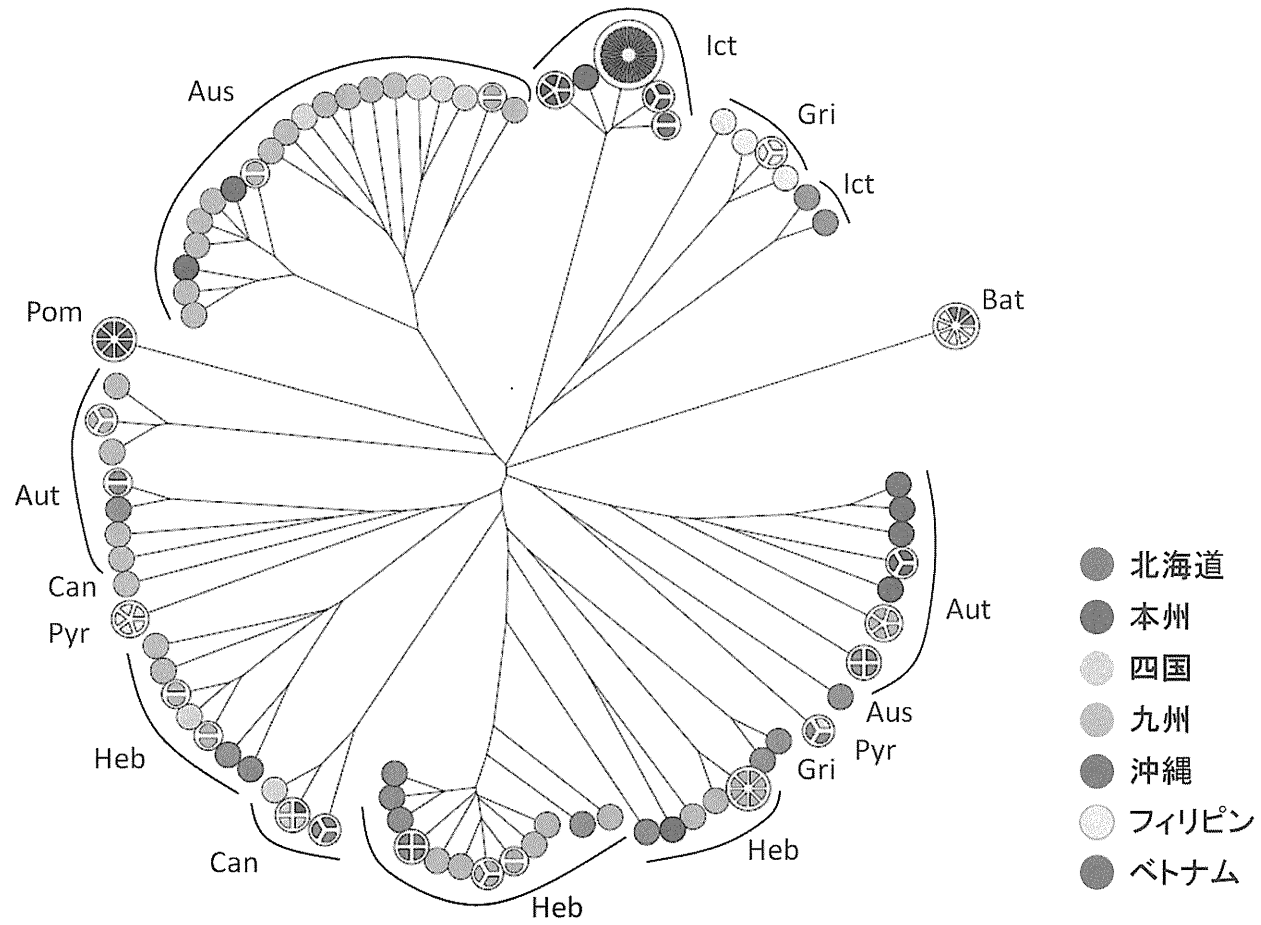


図1. MLVAによる日本、フィリピン、ベトナムで分離された *L. interrogans* の系統樹  
各アルファベットは血清群を表す: Aus; Australis, Aut; Autumnalis, Bat; Bataviae, Can; Canicola, Gri; Grippotyphosa, Heb; Hebdomadis, Pom; Pomona, Pyr; Pyrogenes.

厚生労働科学研究費補助金

平成 23～25 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  
総合研究報告書

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
研究協力者：	片岡周子	国立感染症研究所 ウイルス第二部
研究協力者：	中島一敏	国立感染症研究所 感染症疫学センター

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、死亡例を含む多くの重症例を伴う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。主として 2011-2012 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・同定を行い以下の結果を得た。

- 1) ベトナムでは、2011 年から手足口病が全国サーベイランスによる届出対象疾患となった。2011～2012 年にかけて、約 28 万人の手足口病症例および 223 名の死亡例が報告された。
- 2) NIHE における実験室診断体制を整備し、手足口病由来検体の実験室診断を実施した。2011～2012 年の検体では、エンテロウイルス陽性検体のうち、半数以上が EV71 であった。
- 3) 2011～2012 年の手足口病検体から EV71 に次いで高頻度にコクサッキー A6 型(CVA6)が検出された。日本やアジア諸国同様、ベトナムでも、CVA6 による手足口病症例の増加傾向が認められた。
- 4) 2011～2012 年にかけて、ベトナムの手足口病症例から検出された EV71 の遺伝子型は C4 型の頻度が高かったが、2012 年は B5 型が増加した。ベトナム固有の遺伝子型 C5 型も少数検出された。
- 5) WHO 西太平洋地域事務局、感染研、NIHE を含む専門家の協力の下、WHO 手足口病ガイドライン”A Guide to Clinical Management and Public Health Response for Hand Foot Mouth Disease (HFMD)”を作成・公開した。

重症 EV71 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、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、今後も解析が必要である。

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、広範な東アジア地域で、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。

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。

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。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、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。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手足口病由来エンテロウイルス同定および EV71 分離株の分子疫学的解析を行った。

## B. 研究方法

主として 2011-2012 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、糞便等) 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。エンテロウイルススクリーニングのため、咽頭拭い液検体から抽出した RNA を鋳型にした semi-nested RT-PCR (CODEHOP RT-PCR) 法により VP1 部分領域を増幅し、エンテロウイルス特異的フラグメントの増幅を確認した。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、エンテロウイルス型(type)を同定した。エンテロウイルス遺伝子陽性検体のうち、一部検体について、RD 細胞を用いたウイルス分離を実施した。EV71 分離株のうち、代表的な EV71 株について VP1 全領域遺伝子をもとにした分子系統解析により、EV71 遺伝子型を解析した。

臨床検体の種類、患者の年齢、異なる検体からのウイルス検出陽性率等、NIHE で入手可能な患者情報と疫学情報・実験室診断の結果を整理した。ベトナムにおける手足口病サーベイランスシステムおよび手足口病実験室診断体制の実態を把握するため、Hien 所長、サーベイランス担当者、実験室担当者とのミーティングを実施するとともに、症例報告システムや検体送付票・症例報告票等を調査

した。

## C. 研究結果

### 1) ベトナムにおける手足口病サーベイランス

ベトナムでは、近年の大規模手足口病流行と重症例の多発を受けて、2011 年から手足口病が全国サーベイランスによる届出対象疾患となった。全国的な手足口病サーベイランスの結果、2011~2012 年の期間で、約 28 万人の手足口病症例、および、223 名の死亡例が報告されている。

### 2) 手足口病サーベイランス由来検体の実験室診断

手足口病サーベイランスに由来する一部の検体について、NIHE での実験室診断が実施されている。手足口病由来検体は、患者情報・疫学情報とともに NIHE に送付されるシステムとなっているが、検査情報と患者情報・疫学情報の統合は十分なされていなかった。また、重症例を含む手足口病症例報告、また、どのような背景の検体について NIHE で実験室診断を実施しているのか等について、疫学情報・検査診断結果の報告バイアスが存在することが示唆された。サーベイランスおよび実験室診断の結果を解釈するには留意が必要となる。

### 3) 手足口病サーベイランス由来検体の実験室診断

NIHE エンテロウイルス実験室で入手可能なデータを再度確認し整理したところ、2011 年の手足口病患者 912 症例中 594 症例(65%)がエンテロエンテロウイルス陽性と判定された。ひとりの手足口病症例に由来する複数の臨床検体からエンテロウイルスが検出される場合も多いことから、検体ごとのエンテロウイルスおよび EV71 検出率を整理した。糞便検体からは EV71 が比較的高頻度に検出され(62%)、咽頭拭い液(37%)および水疱検体(13/46; 28%)からの EV71 検出率は糞便と比較すると低かった。EV71 分離株の一部について、VP1 領域の塩基配列解析により EV71 遺伝子型を解析したところ、C4 型が高頻度に検出され(83%)、B5 型(12%)および C5 型(5%)が低い頻度で検出された。

2012 年の手足口病症例 730 人中 444 症例(68%)がエンテロウイルス陽性と判定された。2012 年の手足口病患者糞便検体からの EV71 検出率(41%)は、2011 年(62%)と比

較すると低く、咽頭拭い液 (56%)との比較でも EV71 検出率が低い傾向が認められた。EV71 分離株の一部について、VP1 領域の塩基配列解析により EV71 遺伝子型を解析したところ、2011 年同様、C4 型が高頻度に検出されたが(54%)、B5 型(38%)の検出頻度が増加した。C5 型(4%)は、引き続き低い頻度で検出された。

#### 4) WHO 手足口病ガイドラインの作成・公開

WHO/WPRO 地域では、手足口病および EV71 感染によるものと考えられる中枢神経合併症重症例が頻発しているが、手足口病および重症例の症例定義、および、症例定義に基づく疾患および病原体サーベイランスが、かならずしも標準化されておらず、各国の疫学情報の比較は困難であった。そのため、WHO/WPRO 事務局、感染研、中国 CDC、台湾 CDC、ベトナムパスツール研、NIHE 等からの専門家の協力の下、手足口病ガイドライン”A Guide to Clinical Management and Public Health Response for Hand Foot Mouth Disease (HFMD)”を作成した。本ガイドラインは、2011 年に公開され、手足口病関連合併症の症例定義や標準的な実験室診断手法に関する基盤情報の共有化に寄与した。

#### D. 考察および今後の研究方針

北部ベトナムでは、これまで、手足口病サーベイランス体制は十分整備されておらず、重症例を含む手足口病流行の実態は必ずしも明らかではなかった。また、重症例を含む手足口病原因ウイルスの実験室診断体制も未整備であった。近年の大規模手足口病流行と重症例の多発を受けて、ベトナムでは、2011 年から手足口病が全国サーベイランスによる届出対象疾患となった。それに伴い、手足口病由来の一部検体について、NIHE においてエンテロウイルス検出・同定が実施された。その結果、2011～2012 年に手後口病症例から検出されたエンテロウイルスの半数以上が EV71 であることが明らかとなった。この時期、死亡例を含む重症例が多発したのは、他のアジア諸国同様、EV71 による手足口病流行の発生によることが示唆された。

一方、2011～2012 年、北部ベトナムの手足口病症例から 2 番目に高頻度で検出されたエンテロウイルスは CVA6 であり、ベトナムでも他のアジア諸国同様、CVA6 が手足口病の主要な原因ウイルスのひとつとして定着し

つつあることが示唆された。CVA6 は、日本では従来、他のコクサッキー A 群ウイルス(HEV-A)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、「非典型手足口病」(Atypical HFMD) 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。

1990 年代後半以降、おもに、EV71 遺伝子型 B3 および B4, B5, 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、2000 年代は、地域固有の C5 型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、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。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、2011～2012 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る。EV71 遺伝子型 C4 は、2008 年から中国で断続的に発生している多くの重症例を伴う大規模手足口病流行に関与しており、多数の死亡例が報告された 2012 年のカンボジアにおける重症 EV71 感染症症例から検出された EV71 も C4 型と報告されている。ベトナムにおける 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は、今後も継続した解析が必要とされる。

ベトナムでは、2011 年から手足口病が全国サーベイランスによる届出対象疾患となり、一部検体については NIHE で実験室診断が行われている。近年の手足口病重症例の多発をうけ、NIHE を中心として、サーベイランスおよび実験室診断体制の整備が進められているが、全国的なサーベイランスおよび報告システムは質的に不十分な点が認められ、改善の余地がある。また、実験室診断結果を含め、得られた情報の疫学的・ウイルス学解析は、今後の課題である。重症 EV71 感染症の流行が発生しているベトナムにおける、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の質的強化は、EV71 感染症重症化のリスクを解析するため、引き続き重要である。

#### E. 研究発表