

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い。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際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ため、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た(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受け、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

##### 1. 論文発表

- 1) Shimizu H, Nakashima K. Surveillance of hand, foot, and mouth disease for a vaccine. *Lancet Infect Dis.*

- (in press) 2014
- 2) Yasui Y, Makino T, Hanaoka N, Shimizu H, Kanou K, Kobayashi M, Konagaya M, Fujimoto T. A Case of Atypical Hand-Foot-and-Mouth Disease Caused by Coxsackievirus A6: Differential Diagnosis from Varicella in a Pediatric Intensive Care Unit, *Jpn J Infect Dis* 66, 564-566, 2013
  - 3) Lee H, Cifuentes JO, Ashley RE, Conway JF, Makhov AM, Tano Y, Shimizu H, Nishimura Y, Hafenstein S. A Strain-Specific Epitope of Enterovirus 71 Identified by Cryo-Electron Microscopy of the Complex with Fab from Neutralizing Antibody. *J Virol*; 87(21): 11363-11370. 2013
  - 4) Nishimura Y, Lee H, Hafenstein S, Kataoka C, Wakita T, Bergelson JM, Shimizu H. Enterovirus 71 Binding to PSGL-1 on Leukocytes: VP1-145 Acts as a Molecular Switch to Control Receptor Interaction. *PLoS Pathog*;9(7):e1003511. 2013
  - 5) Kobayashi, M., Makino, T., Hanaoka, N., Shimizu, H., Enomoto, M., Okabe, N., Kanou, K., Konagaya, M., Oishi, K., Fujimoto, T. Clinical manifestations of coxsackievirus a6 infection associated with a major outbreak of hand, foot, and mouth disease in Japan. *Jpn J Infect Dis* 66, 260-261, 2013
  - 6) Arita M, Kojima H, Nagano T, Okabe T, Wakita T, Shimizu H. Oxysterol-binding protein (OSBP) family I is the target of minor enviroxime-like compounds. *J Virol* 87: 4252-4260, 2013
  - 7) Khamrin P, Thongprachum A, Kikuta H, Yamamoto A, Nishimura S, Sugita K, Baba T, Kobayashi M, Okitsu S, Hayakawa S, Shimizu H, Maneekarn N, Ushijima H. Three clusters of Saffold viruses circulating in children with diarrhea in Japan. *Infect Genet Evol* 13: 339-343, 2013
  - 8) 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, 2013
  - 9) 清水博之: 手足口病の大規模流行と原因ウイルス. *日本医事新報* 4673, 56-57, 2013
  - 10) 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* 43, 50-51, 54-59, 2013
  - 11) Nishimura Y, Shimizu H. Cellular receptors for human enterovirus species a. *Front Microbiol* 3: 105, 2012
  - 12) 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
  - 13) 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
  - 14) 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
  - 15) 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
  - 16) 清水博之: 手足口病の問題点. *小児科* 53: 751-758, 2012
  - 17) 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
  - 18) 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
  - 19) 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關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
  - 20) 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
  - 21) Konno M, Yoshioka M, Sugie M, Maguchi T, Nakamura T, Kizawa M, Umegaki Y, Yasutake H, Ishikawa Y, Hanaoka N, Okabe N, Taniguchi T, Shimizu H, Fujimoto T: Fourteen years' surveillance of coxsackievirus group A in Kyoto 1996-2009 using mouse, RD-18S, and Vero Cells. *Jpn J Infect Dis* 64:167-168, 2011
  - 22) Miyamura K, Nishimura Y, Abo M, Wakita T, and Shimizu H: Adaptive mutations in the genomes of enterovirus 71 strains following infection of mouse cells expressing human P-selectin glycoprotein ligand-1. *J Gen Virol* 92: 287-291, 2011
  - 23) 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) Shimizu H. Hand, Foot, and Mouth Disease and infectious agent surveillance in Japan. International Workshop on Hand, Foot and Mouth Disease. Hanoi, Vietnam, 4-5 April, 2013
- 2) Shimizu H. Molecular Epidemiology and Virulence (viral) factors of EV71. International Workshop on Hand, Foot and Mouth Disease. Hanoi, Vietnam, 4-5 April, 2013
- 3) Shimizu H. Current status of hand, foot, and mouth disease outbreaks and EV71 infection in Japan and Asian countries, The 7th China-Korea-Japan Forum on Communicable Disease Control and Prevention, Beijing, China, 25 November, 2013
- 4) 有田峰太郎、小島宏建、長野哲雄、岡部隆義、脇田隆字、清水博之: OSBP ファミリーI は minor enviroxime 様化合物の標的である。第61回日本ウイルス学会学術集会。神戸市、11月10~12日、2013
- 5) 西村順裕、Hyunwook Lee、Susan Hafenstein、片岡周子、脇田隆字、Jeffrey M. Bergelson、清水博之: エンテロウイルス71と受容体PSGL-1との結合: VP1-145は受容体特異性を制御する分子スイッチである。第61回日本ウイルス学会学術集会。神戸市、11月10~12日、2013
- 6) 飯塚節子、清水博之: RD-A細胞を用いた Human enterovirus A の分離。第61回日本ウイルス学会学術集会。神戸市、11月10~12日、2013
- 7) 片岡周子 西村順裕 鈴木忠樹 小谷治 岩田奈織子 永田典代 網康至 清水博之: エンテロウイルス71のカニクイザリにおける病原性の解析。第61回日本ウイルス学会学術集会。神戸市、11月10~12日、2013
- 8) 清水博之: アジアにおける手足口病とエンテロウイルス感染症流行の現状。第87回日本感染症学会学術講演会・第61回日本化学療法学会総会合同学会、シンポジウム「世界的視野でみる感染症疫学とその対策」。横浜市、6月5日、2013
- 9) 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
- 10) Shimizu H. Hand, foot, and mouth disease and Enterovirus 71 infection. NIID-China CDC meeting on Collaborative Research meeting, 21 November, Tokyo, 2012
- 11) Shimizu H. Genetic and Phenotypic Diversity of Enterovirus 71. Current Progress in Enterovirus 71 Research in the Asia-Pacific Region, Tokyo, 30 August, 2012
- 12) 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
- 13) Urami 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