

厚生労働科学研究費委託費

平成26年度 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

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
研究協力者：	Tran Thi Nguyen Hoa	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：	中村朋史	国立感染症研究所 ウイルス第二部

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。本研究では、主として、2011 年と 2012 年の北部ベトナムにおける手足口病流行について、手足口病患者検体と疫学情報を用いて EV71 の分子疫学解析を行った。

エンテロウイルス陽性症例の約半数から EV71 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ウイルス A6 型 (CVA6) およびコクサッキーウイルス A16 型 (CVA16) が比較的多く検出された。2011～2012 年の EV71 株の分子疫学的解析を行ったところ、EV71 サブジェノグループは B5、C4、C5 であり、主な流行株は C4 であった。2012 年には B5 の検出率が上昇した。重症 EV71 感染症の流行が断続的に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、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ひとつである。手足口病の主要な原因ウイルスは、従来、コクサッキーウイルス A16 型 (CVA16)、および、エンテロウイルス 71 (EV71) であったが、近年、コクサッキーウイルス A6 型 (CVA6) による手足口病流行が、日本やアジア地域を含めた世界各地で報告されている。EV71 による手足口病流行時には、無菌性髄膜炎や急性脳炎、神経原性肺水腫などの中枢神経合併症の発生頻度が高くなる。とくに東アジア地域では、重症例・死亡例をとまなう大規模な EV71 感染症流行が大きな問題になっているが、EV71 感染症重症化を規定するウイルス側・宿主側要因は、まだ分かっていない。

1990 年代後半以降、とくに東アジアの広範な地域で、EV71 感染症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、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。ベトナムでも、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 が検出された。

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う。本年度は、手足口病の大きな流行のあった2011年と2012年の北部ベトナムにおける手足口病流行の原因ウイルスを把握するとともにEV71の分子疫学解析を行うことを目的とした。

## B. 研究方法

2011年と2012年にNIHEに集められた手足口病患者情報とその臨床検体を用いた。NIHEには北部ベトナム28省から2011年は1052人(患者への接触者121人も含む)、2012年は742人分の臨床サンプル(主に便・咽拭い液・水疱拭い液)が送られており、実験室診断を実施している。入手可能な患者情報とNIHEにおける診断結果を照合し、流行時期や伝播ウイルス株に関わる情報を解析した。

一部のEV71陽性検体(44株)については、RD-A細胞を用いてウイルスを分離しRNAを抽出したのち、VP1全領域の塩基配列を決定した。VP1塩基配列の系統樹解析にはMEGA version 6を使用し、Neighbor-joining法にて解析を行った。

(倫理面への配慮)提供された臨床疫学情報は、整理番号が付与され、研究実施者は匿名化された臨床情報のみを受け取るため、患者を特定することはできない。また、いかなる研究成果の公表においても個人名および関連情報を想起させることのないように留意する。

## C. 研究結果

本年度は、JICAプロジェクト「高危険度病原体に係るバイオセーフティ並びに実験室診断能力の向上と連携強化」の一環として、2014年7月13日～7月23日にかけて、NIHEにおいて開催されたバイオセーフティワークショップおよび手足口病実験室診断技術研修会に参加する機会を得たため、NIHEを含む四カ所の基幹国立研究所からの研修参加者に対して、手足口病および関連ウイルス実験室診断に関する講義および技術指導を実施した(清水、片岡、中村)。JICA手足口病実験室診断技術研修会終了後、NIHE担当者と、本研究課題に関する研究打合せを行うとともに(清水、片岡、中村、Thanh、Hoa、他)、2011-2012年の手足口病流行時の疫学およびウイルス学的解析データの確認・整理を行った(片岡、中村、Hoa、他)。

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。北部ベトナムの手足口病症例の解析結果においても、これまでの報告と同様、手足口病患者は5歳以下が9割以上を占めた。本研究で使用した北部ベトナムにおける手足口病症例の疫学情報からは重症患者は見いだされなかった。

手足口病と診断された患者のうちエンテロウイルス陽性症例は2011年と2012年でそれぞれ64.2%と60.0%、陰性であった患者は34.4%と38.4%であった。エンテロウイルス陽性患者のうちEV71陽性症例は2011年と2012年でそれぞれ、44.1%と58.2%、CVA16陽性は17.2%と12.1%、CVA6陽性は29.1%と17.1%であった。その他のエンテロウイルスは6.4%と7.9%の割合で検出され、両年共にEV71が主な手足口病の原因ウイルスであることが明らかとなった。さらにEV71のサブジェノグループを解析したところ、EV71陽性検体のうち、2011年および2012年では、それぞれ84.2%と61.7%でサブジェノグループC4が検出され、7.4%と5.2%でサブジェノグループC5、8.5%と33.1%でサブジェノグループB5が検出された。それぞれのサブジェノグループ内での塩基配列は、B5(18株)では98.5-99.9%、C4(22株)は96.2-99.9%、C5(4株)は92.6-100.0%の相同性があった。またアミノ酸配列ではB5では99.0-100.0%、C4は98.6-100.0%、C5は99.3-100.0%の相同性があった。2011-2012年にかけて北部ベトナムの手足口病患者から分離されたEV71株は、重症例が多く報告されている南部ベトナムやカンボジアで分離されたEV71株の一部と相同性が高かった。

## 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、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く、原因ウイルスの解析結果も報告されていない。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り、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。

本研究では、2011年と2012年に北部ベトナムにおいて流行した手足口病の疫学情報をもとに流行状況を明らかにすることを目的とした。1990年代後半以降、おもに、EV71 サブジェノグループ 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。

2011～2012年に北部ベトナムの手足口病症例から検出された EV71 サブジェノグループは、以前ベトナムにおいて主流であったジェノグループ C5 からサブジェノグループ C4 に置き換わっていた事が明らかとなった。また2012年にはジェノグループ B5 の検出頻度が2011年に比べて増加していた。VP1 の遺伝子配列解析から北部ベトナムにおいて流行している EV71 は南部で流行している株と相同性が高い事から、ベトナム国内においては地域固有の EV71 サブジェノグループの伝播はないと考えられた。南部および北部ベトナムでは、重症 EV71 症例の発生頻度が異なるという報告もあるが、EV71 サブジェノグループのみでその病原性を比較する事は難しく、更なる検討が必要であると考えられる。

EV71 感染による小児急性死症例が多く報告されている東アジア地域では、EV71 感染症の流行が大きな公衆衛生上の問題となっている。このような背景からベトナムにおいても2011年から手足口病が届出疾患に指定され、現在 JICA プロジェクトによる支援のもと、手足口病実験室診断の国内ラボネットワークを整備しつつあり、2014年7月にはベトナム・ハノイにおいて、JICA 手足口病実験室診断ワークショップが開催された。その結果、四カ所の基幹研究所における手足口病検査手法は統一されておらず、また、サーベイランスおよび検査体制の整備状況は地域・施設ごとに異なることが明らかとなった。さらに、どのような手足口病症例(通常の手足口病症例、中枢神経合併症例、EV71 脳炎重症例・死亡例等)由来の臨床検体について検査を実施するのかについて、国内手足口病実験室ネットワークとしてのコンセンサスが必要と思われる。

## E. 結論

- 1 2011-2012年の北部ベトナムにおける手足口病患者は主に5歳以下の小児であった。
- 2 手足口病の流行時期は、2011年は後半に、2012年は前半であった。
- 3 手足口病の原因ウイルスは EV71 が主流であり、次いで

CVA6、CVA16であった。

- 4 EV71 の流行サブジェノグループは B5、C4、C5 であり、主な流行株は C4 であった。2012年には B5 の検出率が上昇した。
- 5 今回分離したウイルス株の同サブジェノグループ内での塩基配列は、B5 では 98.5-99.9%、C4 は 96.2-99.9%、C5 は 92.6-100.0%の相同性であった。
- 6 今回分離したウイルス株の同サブジェノグループ内でのアミノ酸配列では B5 では 99.0-100.0%、C4 は 98.6-100.0%、C5 は 99.3-100.0%の相同性であった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Shimizu H. Development and introduction of inactivated poliovirus vaccines derived from Sabin strains in Japan. Vaccine (in press)
- 2) Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Sato Y, Nakajima N, Koike S, et al. Establishment of a panel of in-house polyclonal antibodies for the diagnosis of enterovirus infections. Neuropathology (in press)
- 3) Shimizu H, Nakashima K. Surveillance of hand, foot, and mouth disease for a vaccine. Lancet Infect Dis 14(4), 262-3, 2014
- 4) Arita M, Kilpatrick DR, Nakamura T, Burns CC, Bukbuk D, Oderinde SB, Oberste MS, Kew OM, Pallansch MA, Shimizu H. Development of an efficient entire-capsid-coding-region amplification method for direct detection of poliovirus from stool extracts. J Clin Microbiol 53: 73-78, 2015
- 5) Naem A, Hosomi T, Nishimura Y, Alam MM, Oka T, Zaidi SS, Shimizu H. Genetic diversity of circulating Saffold viruses in Pakistan and Afghanistan. J Gen Virol 95: 1945-1957, 2014
- 6) Shirato H, Someya Y, Ochiai M, Horiuchi Y, Takahashi M, Takeda N, Wakabayashi K, Ouchi Y, Ota Y, Tano Y, Abe S, Yamazaki S, Wakita T, sIPV Evaluation Group of NIID Virology II. A national reference for inactivated polio vaccine derived from Sabin strains in Japan. Vaccine 32: 5163-5169, 2014

- 7) 清水博之. ライノウイルスの分類と疾患への関与. 日本医事新報 4689: 53-55, 2014
- 8) 清水博之: 急増した手足口病 感染・炎症・免疫 44,94-96, 2014
- 9) 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, 2014
- 10) 清水博之, 「消化器ウイルス篇 エンテロウイルス-ポリオウイルスおよび非ポリオエンテロウイルス」の項を担当, 臨床医のための呼吸器・消化管ウイルス感染症 (堤裕幸, 中野貴司, 寺田喜平, 編), 103-109, 診断と治療社, 東京, 2014

## 2. 学会発表等

- 1) Shimizu H. WHO Collaborating Centre for Virus Reference and Research (Enteroviruses). (Poster). The First Regional Forum of WHO Collaborating Centres in the Western Pacific, Manila, the Philippines, 13-14 November, 2014
- 2) Shimizu H. Molecular basis of virus-host interaction and pathogenesis of enterovirus 71 infection. Monto Ho Memorial Lectures on Enterovirus 71, 2014 International Symposium on Infectious Disease and Signal Transduction, Tainan, Taiwan, 2 November, 2014
- 3) Shimizu H. The molecular basis of the interaction between EV71 and PSGL-1 from structural and functional standpoints. TLL Seminar, Temasek Life Science Laboratory, Singapore, 25 September, 2014
- 4) Shimizu H. Structural and functional basis of the interaction between enterovirus 71 and a cellular receptor, PSGL-1. Protein Island Matsuyama International Symposium, Matsuyama, Ehime, 17 September, 2014
- 5) Shimizu H. Virology of Enterovirus 71. JICA Training Workshop on Biosafety and HFMD

Laboratory Diagnosis, Hanoi, Viet Nam, 14-18 July 2014

- 6) Shimizu H. Overview of hand, foot, and mouth disease and enterovirus infections. JICA Training Workshop on Biosafety and HFMD Laboratory Diagnosis, Hanoi, Viet Nam, 14-18 July 2014
- 7) 吾郷昌信, 北川由美香, 松本文昭, 吉川亮, 陣内久美子, 森内浩幸, 永田典代, 清水博之, 森田交一. 新生児重症感染を惹起したコクサッキーウイルス B2 型の性状解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜市, 11 月 10~12 日, 2014
- 8) 町田早苗, 清水 博之. ヒトパレコウイルス (HPeV)3 型の増殖機構の解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜市, 11 月 10~12 日, 2014
- 9) 中村 朋史, 有田 峰太郎, 清水 博之. ウイルス受容体特異性を応用したポリオウイルス直接検出法の開発. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜市, 11 月 10~12 日, 2014
- 10) 小谷治, 藤井健, 鈴木忠樹, 岩田奈織子, 網康至, 須崎百合子, 長谷川秀樹, 田口文広, 清水博之, 永田典代. カニクイザルを用いた Saffold virus の神経病原性の病理学的解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜市, 11 月 10~12 日, 2014
- 11) 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 のカニクイザルにおける病原性の解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜市, 11 月 10~12 日, 2014
- 12) 吾郷昌信, 陣内久美子, 高柳俊光, 森内浩幸, 清水博之: コクサッキーウイルス B2 型垂直感染による新生児重症感染例. 第 55 回日本臨床ウイルス学会. 札幌市, 6 月 14 日~6 月 15 日, 2014
- 13) 藤本嗣人, 花岡希, 藤巻明日香, 萩美貴, 清水博之: 兵庫県で脳炎を引き起こしたエンテロウイルス 71 (EV71) の分子疫学. 第 55 回日本臨床ウイルス学会. 札幌市, 6 月 14 日~6 月 15 日, 2014