

手足口病患者からのコクサッキーウイルスA6型の検出

改田 厚、関口純一朗、久保英幸、入谷展弘、後藤 薫、長谷 篤

Detection of Coxsackievirus A6 from Patients with Hand, Foot and Mouth Disease

Atsushi KAIDA, Jun-ichiro SEKIGUCHI, Hideyuki KUBO, Nobuhiro IRITANI, Kaoru GOTO and Atsushi HASE

Abstract

Hand, foot and mouth disease (HFMD) is a common childhood illness characterized by vesicular eruptions on the hands, feet, and mouth. Most HFMD are caused by coxsackievirus A (CA) 16, CA10, or human enterovirus 71. In Japan, HFMD patients increase annually during summer. Gene amplification tests for enteroviruses were performed for 58 clinical specimens collected from 30 HFMD, 15 rash, and 4 herpangina patients during May 2011 and August 2011 in Osaka City. Results revealed that 14 specimens (HFMD, 12; rash, 2) were enterovirus-positive. For genotyping, those strains were analyzed using partial viral protein (VP1) gene: the 14 specimens were all CA6. Phylogenetic analysis using partial VP1 sequences showed that CA6 strains detected in HFMD patients in Japan 2011 were genetically close, and that they differed from CA6 strains detected in Japan during 1994–2004. CA6 has rarely been detected in HFMD. Further analyses are necessary to clarify the recent CA6 outbreak in HFMD.

Key words: hand, foot and mouse disease; coxsackievirus A6; enterovirus; molecular epidemiology

I 緒言

手足口病は、ウイルス感染が原因で発症する発疹性疾患であり、日本では例年、夏季に流行が認められる。口腔粘膜、手のひら、足底や足背などに2~3 mmの水疱性の発疹が出現することが多いが、肘、膝、臀部などにも出現することもある。発熱は、約1/3に認められるが、通常、軽度であり、38℃以下のことがほとんどである[1]。本症は4歳位までの幼児を中心とした疾患であり、2歳以下が半数を占めるが、免疫をもたない場合は成人でも発症する[2]。多くの場合、軽快するが無菌性髄膜炎あるいは脳炎となり、入院加療が必要となる場合がある。集団生活の中では、特に感染が拡大しやすく、保育所や幼稚園を中心に、例年、多くの患者発生がある。手足口病は、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」において、五類感染症に定められている。小児科定点把握疾患であり、全国約3,000の小児科定点医療機関で患者発生が毎週報告されている。

原因ウイルスは、ピコルナウイルス科エンテロウイルス属に属するコクサッキーウイルス A16 型 (CA16)、CA10、エンテロウイルス 71 型 (EV71) が主であり、年によって検出傾向が異なる。EV71 は、中枢神経系合併症の発生率が他のウイルスより高いことが知られており、重症の場合は、死亡することもある(1997年 マレーシア、1997年 大阪、1998年 台湾、2000年 兵庫)[2]。

手足口病の原因ウイルスの潜伏期は、3~5日程度とされる。感染経路は、鼻汁、くしゃみ等の飛沫感染や接触感染、便中のウイルスの経口感染が主である。一般に、症状は3~7日間で自然治癒する。ワクチンはないため、対症療法が基本である。主症状からの回復後もウイルスは長期にわたって排泄されることがあるので、急性期のみの登校登園停止による学校・幼稚園・保育園などでの流行阻止効果はあまり期待ができない [2]。

大阪市において、2011年夏季は、手足口病の原因ウイルスとして、CA6が多数検出された。CA6は主にヘルパンギーナの原因ウイルスの1つとして知られているが、手足口病におけるCA6の流行は、極めて稀であ

大阪市立環境科学研究所

〒543-0026 大阪市天王寺区東上町 8-34

Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences

8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan

る。本研究は、2011年に大阪市内で流行した手足口病におけるCA6の検出状況の解析、陽性株の分子疫学的解析を目的とした。

II 材料と方法

1) 臨床検体

検査した臨床検体は、2011年5月～8月の期間に大阪市感染症発生動向調査事業に供与され、臨床的に手足口病が疑われた30症例、発疹が認められた15症例、ヘルパンギーナ4症例の合計49症例由来58検体を対象とした。検体の内訳は、咽頭ぬぐい液24検体、糞便16検体、鼻汁14検体、髄液2検体、血清1検体、皮膚病巣ぬぐい液1検体であった。

2) 培養細胞株を用いたウイルス分離検査

ウイルス分離検査では、VeroおよびRD-18S細胞を用いた。咽頭ぬぐい液、鼻汁、髄液、血清、皮膚病巣ぬぐい液については、臨床検体を直接細胞に接種した。糞便検体については、10%乳剤を作製し、遠心後、0.45 μm フィルターを通したものを接種した。

培養開始後、約7日間経過した培養上清の一部を新しい細胞に接種し、更に7日間培養後、細胞変性作用(CPE)が観察された場合、CPE陽性と判定した。

3) エンテロウイルス遺伝子検出および型別

各臨床検体、および糞便乳剤140 μLについて、QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN) およびQIAcube (QIAGEN) を用いて、ウイルスRNAを抽出した。その後、AMV Reverse Transcriptase XL (タカラバイオ) によりcDNAを合成した。エンテロウイルス遺伝子検出方法は、Caroらの方法[3]に従い、viral protein (VP) 1-2C領域を標的としてTakara *Ex Taq* Hot start version (タカラバイオ) を用いて、PCRをおこなった。プライマーペアは、EUG3a: 5'-TGGCAAACCTCCWCCAACCC-3' (3002-3021, 塩

基の位置は、ポリオウイルス1型 Mahoney 株に相当)、EUG3b: 5'-TGGCAAACATCTTCMAATCC-3' (3002-3021)、EUG3c: 5'-TGGCAGACTTCAACHAACCC-3' (3002-3021)、EUC2: 5'-TTTGCACTTGAAGTGTATGTA-3' (4474-4454) を混合して用いた。PCR条件は、95°C 1分の反応後、95°C 20秒、45°C 1分、72°C 1分の反応を30サイクルおこない、最後に72°C 10分の伸長反応をおこなった。特異的増幅産物の塩基配列は、Genetic analyzer 3130 (Applied Biosystems) を用いて解読した。エンテロウイルスの型別は、解読塩基配列を用いて Enterovirus Genotyping Tool Version 0.1 (<http://www.rivm.nl/mpf/enterovirus/typingtool#/>) により決定した。

4) 分子系統樹解析

CA6陽性株のVP1遺伝子領域[3042～3322(281塩基、CA6 Gdula株(prototype)に換算)]について、BioEdit (version 7.0.5.3, <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) [4] または Clustal X (version 2.0, <http://www.clustal.org/>) [5]によりアライメント後、Kimura 2パラメータ法により遺伝的距離を計算し[6]、近隣結合法(Neighbor-joining法)により分子系統樹を作成した。樹型については、ブートストラップを1,000回おこない、検定した[7]。

III 結果

手足口病、発疹、およびヘルパンギーナ由来検体は、7月26検体と最多であり、次いで、6月15検体、8月14検体、5月3検体であった。ウイルス分離検査(VeroおよびRD-18S細胞)の結果は、すべて陰性であった。そこで、原因ウイルスとして可能性が高いと考えられたエンテロウイルスの遺伝子検査を実施した結果、13名由来14検体(手足口病12検体、発疹2検体)が陽性であり、すべてCA6と判明した(表1)。CA6陽性例はすべて散発例であり、疫学的な関連は認められなかった。手足口病、発疹症におけるCA6の月別検

表1 CA6陽性患者の情報

症例 No.	検体 No.	検体	臨床診断名	症状	年齢	性別	検体採取日
1	11-287	咽頭ぬぐい液	カボジ水痘様発疹症疑い	39°C、水疱	0y 7m	女	2011/6/3
	11-288	皮膚病巣					
2	11-328	咽頭ぬぐい液	手足口病	39°C、水疱、丘疹、紅斑、リンパ節腫脹(頸部)	2y 4m	男	2011/6/14
3	11-397	咽頭ぬぐい液	手足口病疑い	39°C、発疹	4y 8m	男	2011/6/28
4	11-400	鼻汁	手足口病	丘疹	1y 4m	男	2011/6/27
5	11-408	咽頭ぬぐい液	手足口病疑い	40°C、口内炎、上下肢に発疹(丘疹、水疱)多数	1y 9m	女	2011/6/29
6	11-424	咽頭ぬぐい液	手足口病	発熱、発疹	1y 7m	女	2011/7/4
7	11-425	糞便	手足口病	37.5°C、丘疹、水疱	1y 0m	男	2011/7/4
8	11-427	鼻汁	手足口病	39°C、水疱、紅斑	0y 7m	男	2011/7/1
9	11-432	鼻汁	手足口病、気管支炎	39°C、気管支炎	1y 0m	男	2011/7/4
10	11-461	糞便	手足口病	40°C、熱性痙攣、丘疹	3y	男	2011/7/11
11	11-472	咽頭ぬぐい液	手足口病	39.1°C、口内炎、水疱、丘疹、施設集団発生	2y 3m	男	2011/7/11
12	11-475	咽頭ぬぐい液	手足口病	39°C、咽頭炎	3y 2m	男	2011/7/11
13	11-514	糞便	手足口病	39°C、口内炎、丘疹	1y 7m	男	2011/7/15

出状況を図に示した(図1)。調査期間中、CA6 が検出されたのは6月および7月のみであった。

大阪市で検出した CA6 株のうち、VP1 遺伝子領域 [3042~3322 (281 塩基、CA6 Gdula 株 (prototype) に換算)] の解読が可能であった 8 株と日本国内あるいは世界各地での検出株を用いて分子系統樹を作成した。

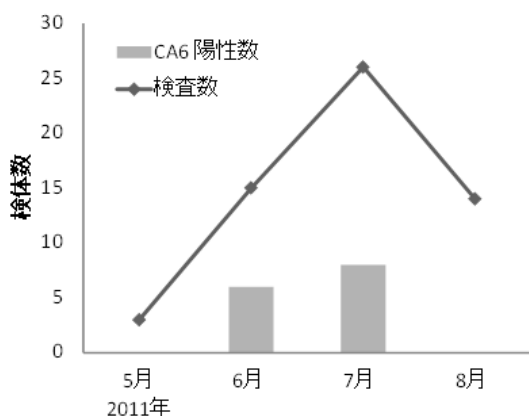


図1 月別 CA6 検出状況 (2011年5月～8月)

その結果、大阪市検出株は、同時期に国内他地域で検出された CA6 株 (静岡県、大阪府) と非常に近縁であった。また、2009 年インド検出株、および 2009 年中国検出株と 2010 年フランス検出株の一部は、それぞれ 2011 年日本検出株と同一のクラスター (2009-2011) を形成した。一方、1999-2005 年に国内各地で検出された CA6 株は、2009-2011 年検出 CA6 株とは、異なるクラスターを形成した。また、1994-2004 年に国内で検出された CA6 株は 2009-2011 年手足口病由来 CA6 株とは遺伝的に大きく異なっていた(図2)。

IV 考察

2011 年度は、全国的に手足口病患者からの CA6 検出報告が多く認められた[8-11]。また、ヘルパンギーナ患者からの CA6 検出も報告されている[11]。その後の解析から、2011 年は、感染症発生動向調査開始 (1981 年 7 月) 以来最大の手足口病流行が起こり、今までヘルパンギーナの主要な原因ウイルスの 1 つであった CA6 が最も多く検出されたことが明らかとなった[12]。

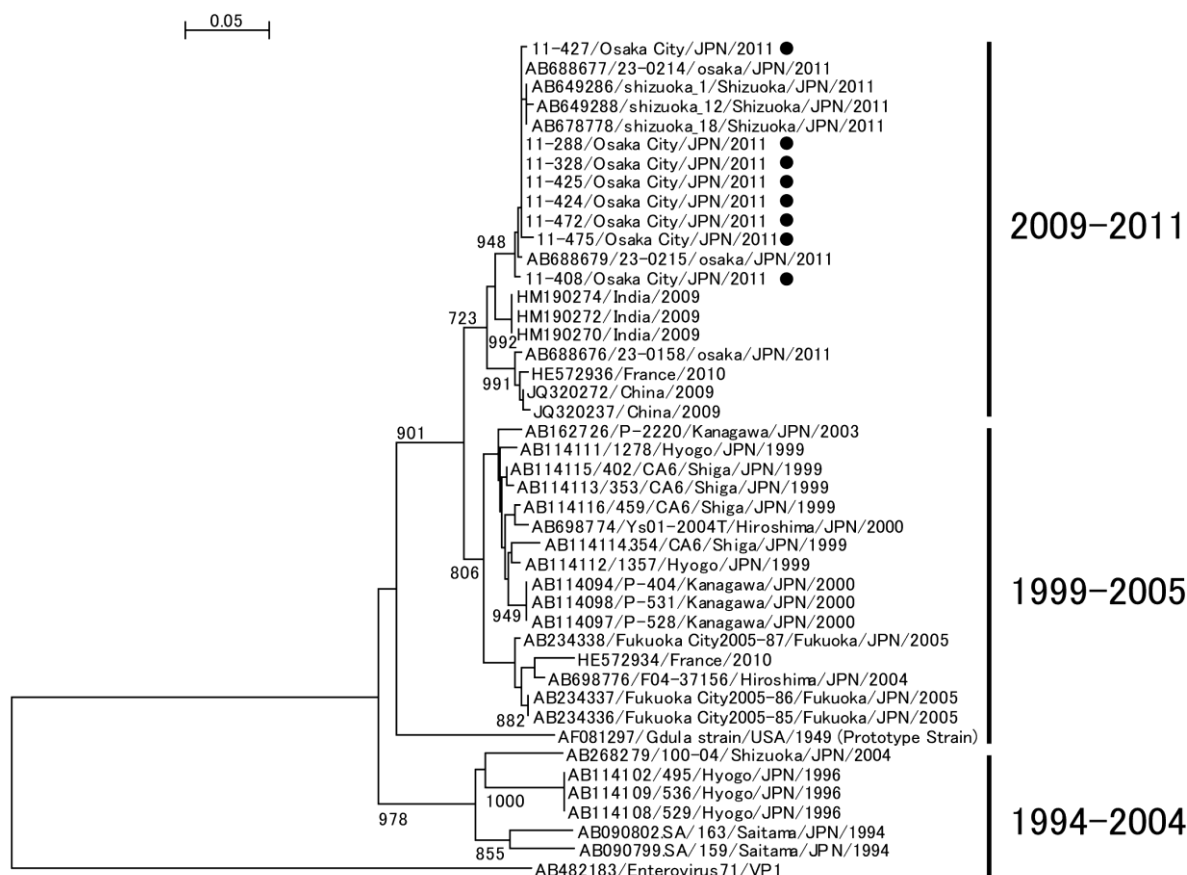


図2 大阪市で検出された CA6 株の分子系統樹

分子系統樹は VP1 遺伝子領域 (281 塩基) を用いて、NJ 法により作成した。ブートストラップ値は、クラスターを支持する枝にそれぞれ数字で示した。大阪市で2011年に検出されたCA6株は、●を付記した。株の名前は、(GenBank アクセッション番号)/株名/地域/検出年とした。アウトグループとして、エンテロウイルス71型のVP1遺伝子領域を用いた。

世界では、2008年のフィンランドでの報告を最初に、2008年シンガポール、2008年スペイン、2010年台湾、2010年フランスと手足口病におけるCA6 検出増加が報告されている[13-17]。2009年の中国では、手足口病におけるCA6の検出割合は、非常に低いことから、2009年の段階では、中国国内へのCA6の侵入は少ないと考えられた[18]。地域差はあるが、遺伝的に近縁なCA6が数年を経て世界中に拡がり、手足口病の流行に關与している可能性が高いと考えられた。

しかしながら、従来の手足口病の主病原体であるEV71やCA16と異なり、なぜ、CA6が流行したのか、その原因は不明である。今回のCA6による手足口病は、従来のウイルスによる手足口病とは症状に違いが認められた。CA6による手足口病の発疹は、臀部など手足口以外の部位にも発生した。水疱は従来の手足口病と比較してやや大きい印象で10mm以上のものもあり、扁平で臍窩を認めた[19]。また、CA6感染にともない、その数週間後に爪甲の脱落が報告されている[15, 20-22]。また、脱落した爪甲からCA6遺伝子が検出されていることから、爪甲脱落とCA6感染との関連が示唆されている[22]。一方、CA10においても、爪甲脱落との関連を示唆する報告がある[21]。また、手足口病関連ウイルス(CA10あるいはCA6)とコクサッキーウイルスB1との重複感染が爪甲脱落に關与するとする報告もあり、因果関係は明らかでない[20]。

系統樹解析の結果、日本国内での2011年の手足口病由来CA6株は、1999-2005年に検出されたCA6株とは異なるクラスターを形成した。他研究グループも2008年~2011年にかけて欧州、日本で手足口病およびヘルパンギーナから検出された主なCA6株のVP1遺伝子領域の一部を用いた解析の結果、1つのクラスターを形成すること、過去のCA6株とは遺伝的に異なることを報告しており、我々の結果と同様であった[23]。今回、我々は、VP1遺伝子領域の一部を用いたが、VP1全長領域を用いた解析をおこなうことで、より詳細な結果が得られると考えられた。

CA6は、VeroおよびRD-18S細胞を用いた分離検査では陰性であったが、RD-A細胞を用いたウイルス分離検査、あるいは、乳のみマウスでは効率よく分離されることが報告されている[24, 25]。今回の手足口病におけるCA6流行のように、特定の培養細胞、あるいは乳のみマウスを用いる場合以外は、ウイルス分離は陰性の場合が多い。そのため、PCR法は、手足口病の原因ウイルスの検出、解析に有効な手法の1つであると考えられた。エンテロウイルスは、100種以上の血清型が報告されており、ウイルスによって多彩な性状をもつ。エンテロウイルスの分離・検出については、標的ウイルスの性状を考慮しながら、様々な方法を試みるのが重要であると考えられた。

EV71と異なり、CA6感染による手足口病は、現在ま

でのところ、一般に予後良好である。しかしながら、幼児死亡例からのCA6検出が1例報告されている[26]。また、国内において、子供から成人へのCA6による手足口病の感染例が報告されている[22, 27]。幼児死亡例とCA6との因果関係は不明であるが、EV71のように重症化に關与する可能性もあることから、今後の詳細な解析が必要であると考えられた。CA6を原因とする手足口病については、検出が稀であったため、不明な点が多い。CA6流行の原因究明、症状との関連解析において今後の疫学情報の蓄積、分子疫学的解析が重要であると考えられる。

手足口病は、原因ウイルスが複数あり、年によって流行する型が異なる。また、手足口病は、重症化や死亡例があるため、ウイルスを検出、型別、解析することは公衆衛生上、きわめて重要である。感染症発生動向調査事業を通して得られた検出ウイルスの情報は、国内での疫学解析のみならず、海外で進められているワクチン開発にも貴重な情報になると思われる。

V 結論

大阪市における2011年夏の手足口病は、CA6が主な病原体であり、国内の他地域と同様の傾向であった。従来、手足口病の主病原体は、EV71やCA16、CA10が主流であり、CA6の検出はほとんどなかった。2011年に手足口病から検出されたCA6株は、同時期に国内および海外で検出されたCA6株と遺伝的に非常に近縁であり、過去に国内で検出されたCA6株とは異なっていた。

謝辞 大阪市感染症発生動向調査事業にご尽力頂いております市内医療機関の皆様へ深謝いたします。

参考文献

- 1) 田代真人、牛島廣治. ウイルス感染症の検査・診断スタンダード. 羊土社 2011: 110-113.
- 2) 国立感染症研究所感染症情報センター. 手足口病、感染症発生動向調査週報 2001; 第27週.
- 3) Caro T, Guillot S, Delpeyroux F, Crainic R. Molecular strategy for 'serotyping' of human enteroviruses. J Gen Virol 2001; 82: 79-91.
- 4) Hall T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl Acids Symp Ser 1999; 41: 95-98.
- 5) Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res 1997; 25: 4876-4882.
- 6) Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative

- studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980; 16: 111-120.
- 7) Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985; 39: 783-791.
 - 8) 飯塚節子, 糸川浩司, 木内郁代, 日野英輝. コクサッキーウイルス A6型(CA6)による手足口病の流行—島根県. *病原微生物検出情報* 2011; 32: 195-196.
 - 9) 松本一繁, 谷脇 妙, 藤戸亜紀, 鍋島 民, 細見卓司, 松本道明, 他. コクサッキーウイルスA6型による手足口病の流行—高知県. *病原微生物検出情報* 2011; 32: 268.
 - 10) 榎本美貴, 高井伝仕, 近平雅嗣, 花岡 希, 岡部信彦, 谷口清州, 他. 2010~2011年の手足口病患者からのコクサッキーウイルスA6型の検出状況—兵庫県. *病原微生物検出情報* 2011; 32.
 - 11) 阿部勝彦, 山本美和子, 藤井慶樹, 田中寛子, 橋本和久, 笠間良雄, 他. 手足口病、ヘルパンギーナ、髄膜炎等からのコクサッキーウイルス A6 型の検出—広島市. *病原微生物検出情報* 2011; 32: 228-230.
 - 12) 国立感染症研究所. 手足口病 2002 ~2011 年. *病原微生物検出情報* 2012; 33: 55-56.
 - 13) Blomqvist S, Klemola P, Kaijalainen S, Paananen A, Simonen ML, Vuorinen T, et al. Co-circulation of coxsackieviruses A6 and A10 in hand, foot and mouth disease outbreak in Finland. *J Clin Virol* 2010; 48: 49-54.
 - 14) Mirand A, Henquell C, Archimbaud C, Ughetto S, Antona D, Bailly JL, et al. Outbreak of hand, foot and mouth disease/herpangina associated with coxsackievirus A6 and A10 infections in 2010, France: a large citywide, prospective observational study. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: E110-118.
 - 15) Osterback R, Vuorinen T, Linna M, Susi P, Hyypia T, Waris M. Coxsackievirus A6 and hand, foot, and mouth disease, Finland. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 1485-1488.
 - 16) Wei SH, Huang YP, Liu MC, Tsou TP, Lin HC, Lin TL, et al. An outbreak of coxsackievirus A6 hand, foot, and mouth disease associated with onychomadesis in Taiwan, 2010. *BMC Infect Dis* 2011; 11: 346.
 - 17) Wu Y, Yeo A, Phoon MC, Tan EL, Poh CL, Quak SH, et al. The largest outbreak of hand; foot and mouth disease in Singapore in 2008: the role of enterovirus 71 and coxsackievirus A strains. *Int J Infect Dis* 2010; 14: e1076-1081.
 - 18) Yang F, Zhang T, Hu Y, Wang X, Du J, Li Y, et al. Survey of enterovirus infections from hand, foot and mouth disease outbreak in China, 2009. *Virol J* 2011; 8: 508
 - 19) 小林正明, 藤本嗣人, 花岡 希, 小長谷昌未, 安井良則, 谷口清州, 他. 2011年のコクサッキーウイルス A6 型感染による手足口病の臨床的特徴—静岡県. *病原微生物検出情報* 2011: 230-231.
 - 20) Bracho MA, Gonzalez-Candelas F, Valero A, Cordoba J, Salazar A. Enterovirus co-infections and onychomadesis after hand, foot, and mouth disease, Spain, 2008. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 2223-2231.
 - 21) Davia JL, Bel PH, Ninet VZ, Bracho MA, Gonzalez-Candelas F, Salazar A, et al. Onychomadesis outbreak in Valencia, Spain associated with hand, foot, and mouth disease caused by enteroviruses. *Pediatr Dermatol* 2011; 28: 1-5.
 - 22) 柏井健作, 仲 浩臣, 寺杣文男, 青木一人, 玉置三朗, 島田美昭. 手足口病後に脱落した爪からのコクサッキーウイルスA6型の検出—和歌山県. *病原微生物検出情報* 2011; 32: 339-340.
 - 23) 増本久人, 南 亮仁, 野田日登美, 江口正宏, 古川義朗, 鶴田清典, 他. 国内外における手足口病流行に関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* 2012; 33: 60-61.
 - 24) 近野真由美, 吉岡政純, 杉江真理子, 馬口敏和, 中村 剛, 木澤正人, 他. 14年間(1996~2009年)におけるコクサッキーA群ウイルスの乳のみマウス、RD-18S および Vero 細胞による分離状況—京都市. *病原微生物検出情報* 2011; 32: 20-21.
 - 25) 飯塚節子, 木内郁代, 日野英輝. 2011年に流行した手足口病およびヘルパンギーナからのウイルス検出—島根県. *病原微生物検出情報* 2012; 33: 58-59.
 - 26) 白井僚一, 山本香織, 浅野康子, 横山浩己, 近藤章子. 心肺停止患者の咽頭ぬぐい液からのコクサッキーウイルスA6型(CA6)の検出と県内CA6の検出状況—鳥取県. *病原微生物検出情報* 2011; 32: 270.
 - 27) 中田恵子, 山崎謙治, 加瀬哲男. コクサッキーウイルスA6 型による手足口病の成人例—大阪府. *病原微生物検出情報* 2011; 32: 231.