

大阪府におけるエンテロウイルスの検出状況と分子疫学的解析 (2011 年度)

中田恵子* 山崎謙治* 左近直美* 加瀬哲男*

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ける 5 類定点届出疾患である手足口病、ヘルパンギーナおよび無菌性髄膜炎の原因は、主にエンテロウイルス感染が疑われる。2011 年度、大阪府に搬入されたこれらの疾患疑い検体、376 検体のうち 166 検体（44.1%）からエンテロウイルスが検出され、coxsackievirus A6(CA6)陽性が 91 検体（54.8%）、CA16 陽性が 21 検体（12.7%）と上位 2 位を占めた。分離培養ができた CA6 および CA16 からそれぞれ 12 株および 8 株を抽出し、得られた viral protein 1(VP1)領域の配列 310bp を用いて分子系統樹解析を実施した結果、CA6 は全てが同じクラスター（相同性 95%以上）に分類され、CA16 については 12 月に検出された 5 株が全て一つのクラスター（相同性 100%）に分類された。

キーワード: エンテロウイルス、手足口病、コクサッキーA6、コクサッキーA16

Key words : Enterovirus, Hand,foot and mouth disease, CoxsackievirusA6, CoxsackievirusA16

実 験 方 法

エンテロウイルス感染症は夏季に主に小児で流行する疾患である。その症状は、夏風邪様、手足口病、ヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎、感染性胃腸炎、中枢神経系合併症からの死亡等と多様性を示す。また、年によって流行する血清型が入れ替わり、地域によっても流行型に差がある。EV71 が原因となる手足口病が流行した年には中枢神経系合併症の頻度が高くなるという報告¹⁾があり、流行型によって症状や重症度が異なる場合があるため、流行型のモニタリングが必要である。

そこで、2011 年 4 月 1 日から 2012 年 3 月 31 日に手足口病、ヘルパンギーナあるいは無菌性髄膜炎疑いと診断されて大阪府立公衆衛生研究所に搬入された検体からのエンテロウイルス検出状況およびウイルスの分子疫学的解析を実施したので報告する。

1. 検体および情報収集

2011 年 4 月 1 日から 2012 年 3 月 31 日の期間、大阪府立公衆衛生研究所に手足口病、ヘルパンギーナあるいは無菌性髄膜炎疑いで搬入された 286 名から採取された 376 検体を対象とした。検体種別の内訳は、髄液が 71 検体、呼吸器系検体（咽頭拭い液、うがい液、鼻汁等）が 224 検体、糞便（腸内容物含む）が 70 検体、その他（尿、血清、水疱液等）が 11 検体であった。感染症法に基づく病原体発生動向調査事業によって得られた検体の情報は調査票より、それ以外から得られた検体の情報は医師から提供された書面より患者の年齢、性別、診断名、体温、発症日などの情報を収集した。

2. 検体からのウイルス遺伝子検出

糞便は LE 溶液（0.5%のラクトアルブミン水解物、2μg/mL のアンホテリシン B、200U/mL のペニシリンおよび 200μg/mL のストレプトマイシンを含む緩衝液）で 10%懸濁液を作製し、15,000rpm で 5 分間遠心分離した。上清をさらに LE 溶液で 10 倍希釈したのち、

*大阪府立公衆衛生研究所感染症部ウイルス課

Prevalence and molecular epidemiological analysis of enterovirus infection in Osaka Prefecture (Fiscal 2011 Report)

by Keiko NAKATA, Kenji YAMAZAKI, Naomi SAKON and Tetsuo KASE

結 果

0.45μm ミニザルトシリンジフィルター (sartorius) でろ過したものを材料 (糞便溶液) とした。糞便溶液及びそれ以外の検体 200μL から Magtration®-MagaZorb® RNA Common Kit (PSS 社) を用いて、全自動核酸抽出装置 Magtration® System 6GC および 12GC (PSS 社) にて RNA を抽出した。エンテロウイルス VP4-2 領域に対する seminestedRT-PCR²⁾を実施したのち、増幅産物に対してダイレクトシーケンスを行ない、BLAST 相同性検索にて血清型を決定した。

3. 培養細胞によるウイルス分離

ウイルス分離には 24 ウェルマイクロプレートに播種した RD-18S 細胞、Vero 細胞を用いた。RD-18S 細胞および Vero 細胞には糞便溶液およびそれ以外の検体をそれぞれ 200μL 接種し、1 週間、CPE(cytopathic effect) を観察し、CPE が出現したウェルの培養上清を回収した。

4. マウスによる CA6 の分離

VP4-2 領域に対する RT-PCR で CA6 が陽性であった検体について糞便溶液あるいは検体を ICR 哺乳マウス頸部皮下に 0.05mL 接種し、1 週間観察した。観察期間内に弛緩麻痺を呈した哺乳マウスを回収し、-80℃で保存した。

5. 培養上清およびマウスからのウイルス遺伝子検出

RD-18S 細胞、Vero 細胞で CPE が見られた培養上清からは、検体からのウイルス遺伝子検出と同様に RNA 抽出を実施した。

弛緩麻痺が見られた哺乳マウスは、頭部、内臓、皮、四肢を取り除いた部分にLE溶液を加えて多検体細胞破碎装置 (シェイクマスターVer1.2 システム、バイオメディカルサイエンス) で約1分振とうしたのちクラッシュャーを取り除いて15,000rpmで5分間遠心し、その上清から同上的方法でRNAを抽出した。

培養上清およびマウスから抽出したRNAを用いてエンテロウイルスのVP1領域に対するRT-PCR³⁾を実施し、得られた増幅産物に対してダイレクトシーケンスを行ない、BLAST相同性検索にて血清型を決定した。また、CA6の12株およびCA16の8株 (310bp) に対して、得られた塩基配列を用いて系統樹解析を実施した。

1. 患者情報およびウイルスの検出状況

対象3疾患全体の患者年齢の中央値は3.75歳 (範囲: 0-77歳)、男性170名 (59.6%)、女性113名 (39.6%)、不明2名 (0.7%) であり、体温の中央値は38.8℃ (36.0-41.3) であった。疾患別患者年齢中央値は、手足口病患者では2.58歳 (0-54.6歳)、ヘルパンギーナ患者では5.0歳 (0-12.9歳)、無菌性髄膜炎患者では4.0歳 (0-77歳) であった。全患者286名中、131名 (45.8%) からエンテロウイルスが検出された。呼吸器系検体 (咽頭拭い液、うがい液、鼻汁等)、糞便 (腸内容物含む)、ではそれぞれ33.5%、20.0%とCA6の検出割合が最も多かった。検出方法別ではseminestedRT-PCRでの検出頻度が高く、159検体(42.3%)であった。CA6ではseminested RT-PCRで検出された91検体中、細胞培養で分離できた検体は1検体のみであり、ICR哺乳マウスで分離できた検体は85検体 (93.4%) であった (表.1)。

2. 疾患別患者割合および検出ウイルスタイプ

対象3疾患患者286名中、手足口病と診断された患者は117名 (40.9%) と最も多く、次いでヘルパンギーナが90名 (31.5%)、無菌性髄膜炎が79名 (27.6%) であった。各疾患においてエンテロウイルスが検出された患者は手足口病では76名 (65.0%) であり、そのうちCA6が67%、次いでCA16が28%であった。ヘルパンギーナでは38名 (13.3%) からエンテロウイルスが検出され、そのうちCA6が74%と最も高い頻度で検出された。無菌性髄膜炎では14名 (4.9%) からエンテロウイルスが検出され、そのうちCB4およびCB5が29%であった。(図1,2,3)。

3. 月別エンテロウイルス検出数

平成23年度は突出してCA6の検出割合が高く、次いでCA16が高かった。CA6は主に6月、7月、8月に検出されていたが、9月以降は検出されていない。一方、CA16は7月から検出され始め、12月に最も多く検出された。その他のウイルスの検出には目立った特徴はなく、そのほとんどが通常のエンテロウイルスの流行期である夏季 (6月から10月) の期間に検出された (図4)。

表1.検体種・検出方法別の血清型別ウイルス検出数

検出 ウイルス	髄液					呼吸器系検体 (咽頭拭い液、うがい液、鼻汁)					糞便(腸内容物含む)					その他(尿、血液、水泡液等)					検体数合計				
	71					224					70					11					376				
	RT-PCR	Vero細胞	RD細胞	哺乳マウス	哺乳マウス	RT-PCR	Vero細胞	RD細胞	哺乳マウス	RT-PCR	Vero細胞	RD細胞	哺乳マウス	RT-PCR	Vero細胞	RD細胞	哺乳マウス	RT-PCR	Vero細胞	RD細胞	哺乳マウス				
CA6	1	0	0	0	0	75	0	1	74	14	0	0	10	1	0	0	1	91	0	1	85				
CA9	1	0	0	ND	0	0	0	0	ND	0	0	0	ND	0	0	0	ND	1	0	0	ND				
CA10	0	0	0	ND	4	0	1	1	ND	1	0	0	ND	0	0	0	ND	5	0	1	ND				
CA16	0	0	0	ND	17	0	11	0	ND	3	0	0	ND	0	0	0	ND	20	0	11	ND				
CB1	1	1	0	ND	0	0	0	0	ND	1	1	0	ND	0	0	0	ND	2	2	0	ND				
CB3	0	0	0	ND	1	2	0	0	ND	1	1	0	ND	1	0	0	ND	3	3	0	ND				
CB4	3	2	1	ND	4	3	0	0	ND	4	2	0	ND	0	0	0	ND	11	7	1	ND				
CB5	2	1	0	ND	4	4	0	0	ND	2	1	0	ND	1	1	0	ND	9	7	0	ND				
Echo6	2	0	1	ND	2	0	1	1	ND	3	0	3	ND	0	0	0	ND	7	0	5	ND				
Echo7	1	0	0	ND	0	0	1	1	ND	0	0	0	ND	0	0	0	ND	1	0	1	ND				
Echo9	0	0	0	ND	0	0	1	1	ND	2	0	2	ND	0	0	0	ND	2	0	3	ND				
Echo25	1	0	1	ND	1	1	0	0	ND	3	0	0	ND	2	0	0	ND	7	1	1	ND				
検出数合計	12	4	3	ND	108	10	16	74	34	5	5	5	10	5	1	0	1	159	20	24	85				

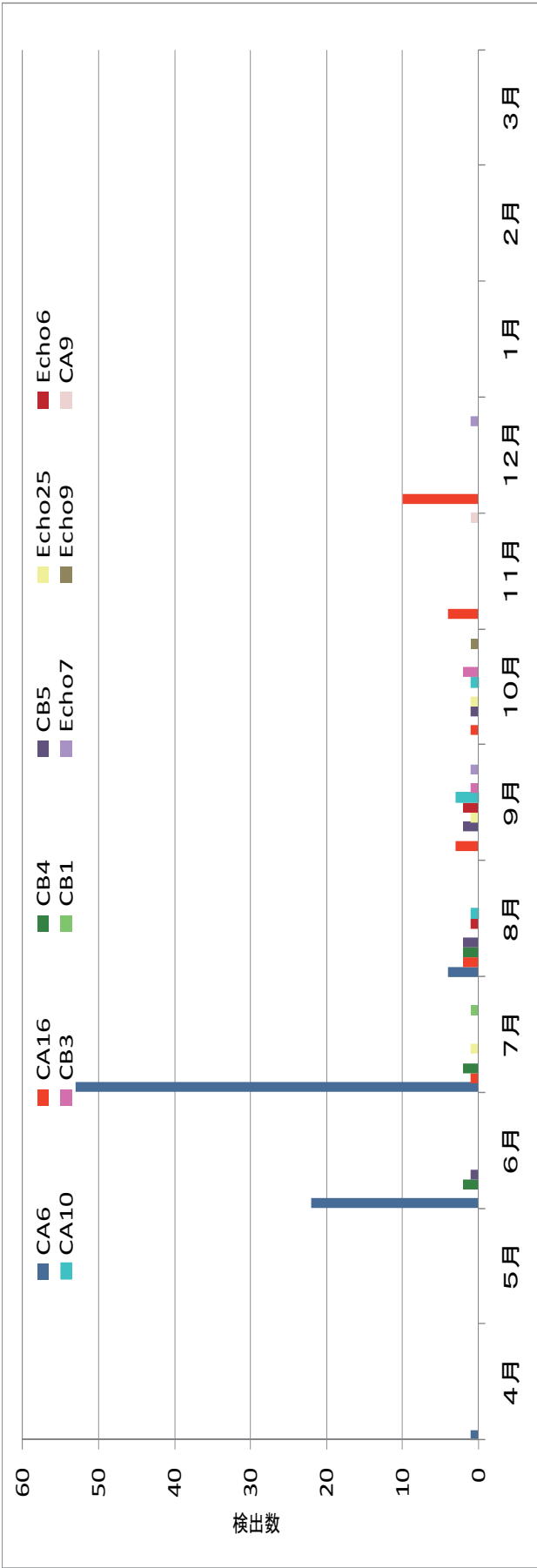


図4.月別検出ウイルス (血清型別)

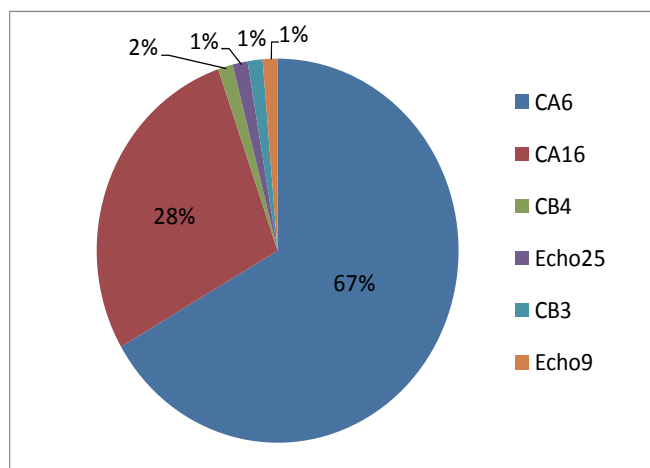


図 1.手足口病患者からの血清型別検出ウイルス割合 (n=76)

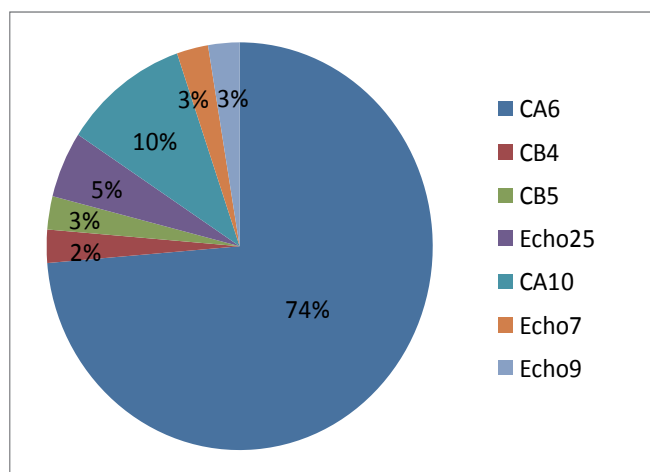


図 2.ヘルパンギーナ患者からの血清型別検出ウイルス割合 (n=38)

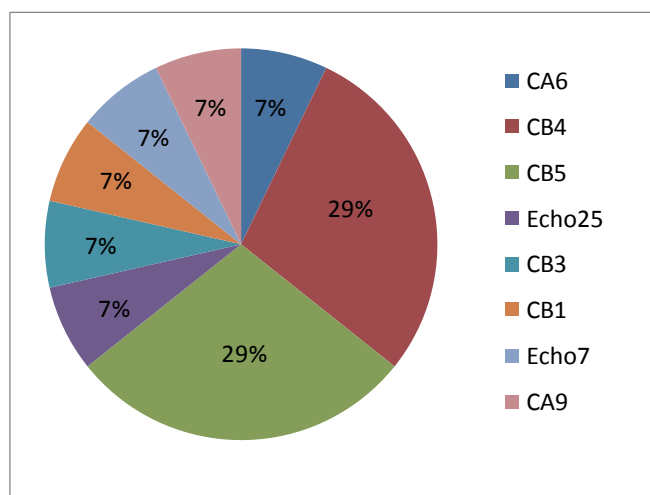


図 3.無菌性髄膜炎患者からの血清型別検出ウイルス割合 (n=14)

4. CA6およびCA16の系統樹解析

分離したCA6、12株およびCA16、8株についてVP1領域（310bp）の系統樹解析を実施した結果、CA6は6月、7月、8月に採取された株全てが同じクラスター（相同性95%以上）に分類され、同年に登録された静岡の株、2008年のフィンランドの株および2010年の中国の株とも同じクラスターであった。一方、CA16のうち、12月に採取された5株は同じクラスター（相同性100%）に分類されたが、その他の3株（230436:8月採取、230592:11月採取、230612:11月採取）は異なるクラスターに分類された（図5,6）。

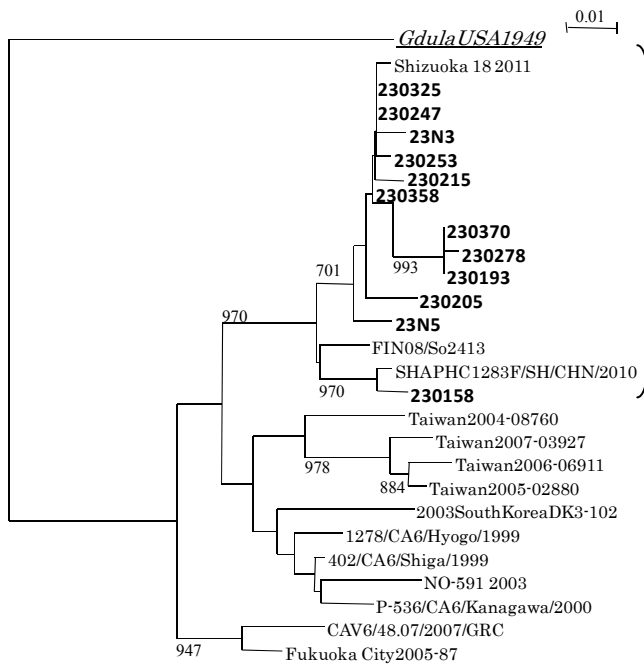
考 察

平成23年度、日本では全国的にCA6による手足口病の大きな流行があり、非定形的な皮膚症状や爪甲脱落症がみられるケースの報告があった⁴⁾⁵⁾⁶⁾。これらの症状は、EV71やCA16が原因となる通常の手足口病とは異なる様相を呈した。近年、諸外国においても我が国と同様のCA6による手足口病の流行が報告されている⁷⁾⁸⁾⁹⁾。大阪府においても平成23年度におけるエンテロウイルス感染症の特徴は、手足口病およびヘルパンギーナ患者から高率にCA6が検出されたことである。これに対し、無菌性髄膜炎ではCA6の検出は1検体のみであり、CA6が無菌性髄膜炎の原因になる可能性が低いことが示唆された。

通常、手足口病およびヘルパンギーナの患者は0歳から4歳未満の小児に多く、無菌性髄膜炎の患者はそれよりも年長の小児に多いとされている^{10) 11) 12)}。本研究の対象者ではヘルパンギーナ患者の中央値が5.0歳と高かったが、無菌性髄膜炎および手足口病では通常と大きな違いはなかった。

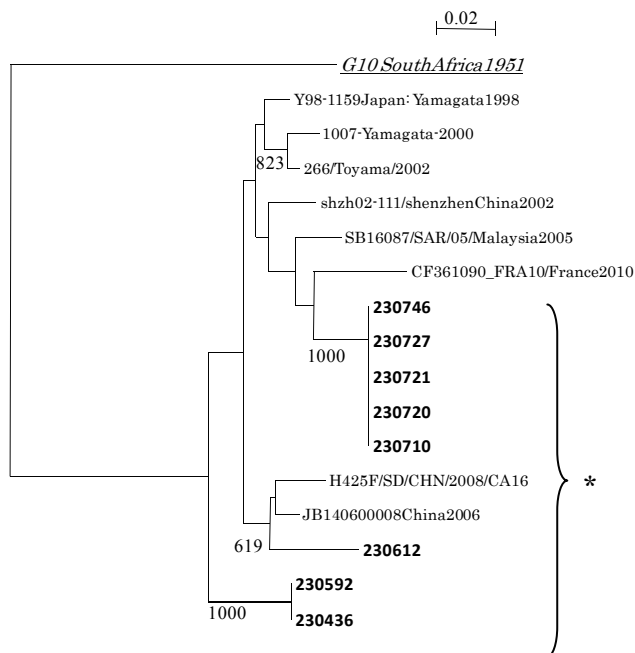
検出の最も多かったCA6はRD18S細胞で分離が可能であると言われているが、今回は細胞培養での分離は困難であった。この原因についてはさらにウイルス学的性状の解析を進め、追求する予定である。

哺乳マウスおよび培養細胞で分離ができたCA6およびCA16のうち、それぞれ12株および8株に対して行なった系統樹解析において、CA6では12株全てが同じクラスター（相同性95%以上）に分類された。また、



*太字:平成23年度大阪府分離株

図5. CA6系統樹 (VP1領域,310bp)



*太字:平成23年度大阪府分離株

図6. CA16系統樹 (VP1領域,310bp)

同年に登録された静岡の株が同じクラスターに分類されていることから、大阪府で検出された株は平成 23 年度に日本国内で流行していた株と近縁である可能性が示唆された。また、2008 年に CA6 による手足口病の

流行が報告されているフィンランド⁸⁾の株、2010 年の中国株とも同じクラスターであることから、近年、諸外国で流行を引き起こしているウイルスとも近縁であると考えられた。

国立感染症研究所の病原微生物検出情報によると、平成 23 年度は全国的に手足口病の患者において CA16 の検出が冬季まで続いており、大阪府においては 12 月に最も多く検出された。大阪府で検出された CA16 では 12 月の 5 株 (相同性 100%) は他の 3 株 (8 月、11 月検出株) と異なるクラスターに分類されたが、これは 12 月の 5 株が全て同一医療機関の手足口病患者検体から検出された株であるため、当該医療機関近郊での地域的流行を反映したものであると考えられる。

エンテロウイルスは血清型が数多く存在し、年ごとに流行のタイプが入れ替わり、流行の規模も大きく変化する。CA6 は通常、手足口病の主要原因になることは少ないが、平成 23 年度は大きな流行を引き起こした。手足口病のみならず、ヘルパンギーナ患者からも高率に検出されたことや、爪甲脱落症等の血清型特異的であると思われる症状の報告も相次いだことより、症状からの診断が容易ではなかったことが考えられる。エンテロウイルス感染症の流行規模の予測や予防啓発の観点からも、流行ウイルスタイプをモニタリングすることが今後も重要であると思われる。

文 献

- 1) 清水博之：東アジアにおけるエンテロウイルス 71 型感染症の流行,病原微生物検出情報月報 (IASR) 30, 9-10 (2009)
- 2) 石古博昭, 島田康司, 奥那覇麻理, 栄賢司：遺伝子系統解析によるエンテロウイルスの同定,臨床とウイルス,17,283-93 (1999).
- 3) Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Pallansch MA Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification., J Virol 73, 1941-1948 (1990).
- 4) 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(2),337-9 (2012).

- 5) 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月報 (IASR) 33 ,58-59 (2012)
- 6) 渡部裕子; 手足口病後の爪変形・爪甲脱落症 (IASR) 33 ,62-63(2012)
- 7) Wei SH, Huang YP, Liu MC, Tsou TP, Lin HC, Lin TL, Tsai CY, Chao YN, Chang LY, Hsu CM; An outbreak of coxsackievirus A6 hand, foot, and mouth disease associated with onychomadesis in Taiwan, 2010. BMC Infect Dis. 14;11:346,(2011).
- 8) Blomqvist S, Klemola P, Kaijalainen S, Paananen A, Simonen ML, Vuorinen T, Roivainen M. Co-circulation of coxsackieviruses A6 and A10 in hand, foot and mouth disease outbreak in Finland. J Clin Virol.; 48(1):49-54 (2010).
- 9) Bracho MA, González-Candelas F, Valero A, Córdoba J, Salazar A Enterovirus co-infections and onychomadesis after hand, foot, and mouth disease, Spain, 2008. Emerg Infect Dis. 17(12):2223-31(2011).
- 10) 感染症発生動向週報 (IDWR) 感染症の話 ヘルパンギーナ 2003 年第 8 週号(2003 年 2 月 17 日～23 日)
- 11) 感染症発生動向週報 (IDWR) 感染症の話 手足口病 2001 年第 27 週 (7 月 2 日～7 月 8 日)
- 12) 感染症発生動向週報 (IDWR) 感染症の話 無菌性髄膜炎 2003 年第 12 週号 (2003 年 3 月 17 日～23 日)