

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 (2012年度)

中田恵子* 山崎謙治* 左近直美* 加瀬哲男*

2012年度に無菌性髄膜炎、手足口病およびヘルパンギーナ疑いで大阪府公衆衛生研究所に病原体発生動向調査事業および医師からのウイルス同定依頼で搬入された188検体のうち、68検体(36%)からエンテロウイルスが検出された。それぞれの疾患で最も多く検出されたウイルス血清型は無菌性髄膜炎で Echovirus 7 (Echo7、13検体、32%)、手足口病で Enterovirus 71(EV71、4検体、36%)、ヘルパンギーナで Coxsackievirus A2(CA2、5検体、9%)であった。無菌性髄膜炎患者に由来する検体から分離培養した7株の Echo7、手足口病患者から得た1株の EV71、ヘルパンギーナ患者から得た4株の CA2 に対し、viral protein 1(VP1)領域の核酸配列を決定してそれぞれ分子系統樹解析を実施した。その結果、Echo7 と CA2 はそれぞれの株間で相同性が高く、全てが同じ遺伝的クラスターを形成した。2012年に流行した Echo7 と EV71 に最も近縁なウイルスは、それぞれ2005年にフランスで検出された株と、2009年に中国で検出された株であった。一方、CA2 は2010年度に当所で採取した株と最も近縁であった。Echo7 と EV71 は国内外で循環している可能性が、CA2 は国内を循環している可能性が考えられた。

キーワード: 無菌性髄膜炎、手足口病、ヘルパンギーナ、エコーウイルス7、コクサッキーA2、エンテロウイルス71

Key words: Aseptic meningitis, Hand, foot and mouth disease, Herpangina, Echovirus 7, Coxsackievirus A2, Enterovirus 71

エンテロウイルス感染症は夏季に主として小児で流行し、その臨床病型は多様性に富む。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の5類定点届出疾患に指定されているエンテロウイルス感染症は無菌性髄膜炎、手足口病およびヘルパンギーナである。いずれの疾患においても、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東アジアで流行した年には中枢神経系合併症の頻度が高くなると報告されている¹⁾。流行する血清型によって症状や重症度が異なるため、継続的なモニタリングが重要である。

大阪府立公衆衛生研究所では、病原体検索を目的に搬入された無菌性髄膜炎、手足口病あるいはヘルパンギーナ患者の検体が搬入される。本稿では2012年4月1日から2013年3月31日に搬入された検体の病原体検索結果を総括し、2012年度におけるエンテロウイルスの流行状況を概観するとともに、分子疫学的アプローチによる流行実態の解析結果を報告する。

実験方法

1. 検体および情報収集

2012年4月1日から2013年3月31日の期間、大阪府立公衆衛生研究所に搬入された無菌性髄膜炎、手足口病あるいはヘルパンギーナ疑い131名から採取された188検体を対象とした。検体種別の内訳は、髄液が65検体、呼吸器系検体(咽頭拭い液、うがい液、鼻汁等)が78検体、糞便(腸内容物含む)が43検体、尿

*大阪府立公衆衛生研究所感染症部ウイルス課

Epidemic and molecular epidemiological analysis of enterovirus infection in Osaka Prefecture (Fiscal 2012 Report)

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

が2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（患者の年齢、性別、診断名、体温、発症日）は調査票より収集した。それ以外の検体情報は医師から提供された書面より収集した。

2. 検体からのウイルス遺伝子検出

糞便は LE 溶液（0.5%ラクトアルブミン水解物、2μg/ml アンホテリシン B、200U/ml 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。さらに上清を LE 溶液で10倍希釈したのち、0.45μm ミニザルトシリンジフィルター（sartorius 社）でろ過し培養細胞用検体（糞便溶液）とした。10%懸濁液の上清およびそれ以外の検体（未処理）の200μl から Magstration®-MagaZorb® RNA Common Kit（PSS 社）を用いて、全自動核酸抽出装置 Magstration® 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 seminested RT-PCR²⁾を実施し、増幅産物の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。なお、ムンプスウイルスについては real-time PCR¹²⁾にて同定を行った。

3. 培養細胞および哺乳マウスによるウイルス分離

培養細胞によるウイルス分離には24ウェルプレートに播種した RD-18S 細胞および Vero 細胞を用いた。これらの細胞に糞便溶液および検体をそれぞれ200μl 接種し、37℃の CO₂ インキュベーターで1週間培養し、CPE(cytopathic effect)を観察した。CPE が出現した場合に培養上清を回収した。

VP4-2 領域に対する RT-PCR でエンテロウイルスが陽性だった検体のうち、培養細胞で分離が困難な血清型が検出された場合は、培養細胞による分離に加えて ICR 哺乳マウスによるウイルス分離を実施した。生後72時間までの哺乳マウスの頸部皮下に糞便溶液および検体を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は-80℃で保存した。

4. 培養上清およびマウスからのウイルス遺伝子検出

CPE が見られた RD-18S 細胞または Vero 細胞の培養上清からは、検体からの RNA 抽出と同法にて RNA を抽出した。

弛緩麻痺が見られた哺乳マウスについては、頭部、内臓、皮膚、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社）で約1分間振とうした。その後、15,000rpm で5分間遠心し、上清から同上の方法で 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った。また、7株の Echo7（709bp）、1株の EV71（581bp）および4株の CA2（643bp）に対して、ClustalW を用いた系統樹解析を実施した。

結 果

1. 患者情報およびウイルスの検出状況

無菌性髄膜炎患者は70名で、年齢の中央値は4歳1カ月（範囲：16日齢-64歳）、性別は男性53名（76%）、女性17名（24%）、体温の中央値は39.0℃（37.4-40.4℃）であった。手足口病患者は10名で、年齢の中央値が2歳2カ月（4カ月-8歳9カ月）、性別は男性7名（70%）、女性3名（30%）、体温の中央値は38.2℃（37.6-40.1℃）であった。ヘルパンギーナ患者は51名で、年齢の中央値は4歳（1カ月-40歳）、性別は男性38名（74%）、女性13名（26%）、体温の中央値は38.5℃（36.5-40.0℃）であった。

全患者131名中、51名（39%）の検体からエンテロウイルスが検出された。検出方法別では seminested RT-PCR での検出率が高く、188検体中60検体（32%）であった（表1）。seminested RT-PCR でエンテロウイルス陽性であったが、細胞培養で陰性だった12検体について哺乳マウスによるウイルス分離を試みたところ、CA8 および CA12 が各1株分離された。哺乳マウスによるウイルス分離率は12検体中2検体（17%）であった（表2）。

表 1.対象 3 疾患患者検体における検体種別検出法別ウイルス検出結果

	無菌性髄膜炎											
	髄液			呼吸器検体 (咽頭拭液、鼻汁、うがい液等)			糞便(腸内容物含む)			その他(尿、血液等)		
	N=63			N=15			N=40			N=2		
ウイルス血清型	PCR*	Vero細胞	RD細胞	PCR*	Vero	RD細胞	PCR*	Vero細胞	RD細胞	PCR*	Vero細胞	RD細胞
CA5	0	0	0	0	0	0	1	NT	NT	0	0	0
CA9	1	1	0	0	0	0	1	0		0	0	0
CB5	2	0	0	0	0	0	1	0		0	0	0
EV71	1	1	0	1	0	1	1	0		0	0	0
Echo6	2	2	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0
Echo7	3	4	3	1	1	1	6	3	5	0	0	0
Echo9	2	0	0	1	0	1	4	3	5	0	0	0
Echo20	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Rhino	1	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0
mumps	3	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0
合計	15	8	4	3	1	3	15	7	12	0	0	0
	手足口病											
	髄液			呼吸器検体 (咽頭拭液、鼻汁、うがい液等)			糞便(腸内容物含む)			その他(尿、血液等)		
	N=1			N=9			N=1			N=0		
ウイルス血清型	PCR*	Vero細胞	RD細胞	PCR*	Vero細胞	RD細胞	PCR*	Vero細胞	RD細胞	PCR*	Vero細胞	RD細胞
CA6	0	0	0	1	0	0	0	0	0	No data		
CA9	0	0	0	1	0	0	0	0	0			
CA16	0	0	0	1	0	0	0	0	0			
EV71	0	0	0	3	1	1	1	1	0			
合計	0	0	0	6	1	1	1	1	0			
	ヘルパンギーナ											
	髄液			呼吸器検体 (咽頭拭液、鼻汁、うがい液等)			糞便(腸内容物含む)			その他(尿、血液等)		
	N=1			N=51			N=2			N=0		
ウイルス血清型	PCR*	Vero細胞	RD細胞	PCR*	Vero細胞	RD細胞	PCR*	Vero細胞	RD細胞	PCR*	Vero細胞	RD細胞
CA2	0	0	0	5	0	4	0	0	0	No data		
CA4	0	0	0	4	0	3	0	0	0			
CA8	0	0	0	1	0	0	0	0	0			
CA9	0	0	0	2	2	2	0	0	0			
CA12	0	0	0	1	0	0	0	0	0			
CB2	0	0	0	1	1	0	0	0	0			
EV71	0	0	0	1	1	1	0	0	0			
Echo7	0	0	0	2	2	2	1	1	1			
Rhino	0	0	0	2	0	0	0	0	0			
HSV1	0	0	0	NT	1	1	0	0	0			
合計	0	0	0	19	7	13	1	1	1			
*seminestedRT-PCR、ただしmumpsについてはrealtimeRT-PCR												
NT:not tested												

*seminestedRT-PCR、ただしmumpsについてはrealtimeRT-PCR

NT: not tested

表 2.哺乳マウスによるウイルス分離

	*検体数	陽性
CA9	1	1
CA8	3	0
CA12	1	1
CA16	1	0
CB5	1	0
Echo7	2	0
Echo9	2	0
EV71	1	0

*検体数 (PCR陽性で細胞培養陰性の検体)

2. 疾患別患者割合および検出ウイルスタイプ

疾患別の患者の割合は無菌性髄膜炎が 53% (70/131 名) と最も多く、次いでヘルパンギーナが 39% (51/131 名)、手足口病が 8% (10/131 名) であった。各疾患でエンテロウイルスが検出された患者は無菌性髄膜炎で 37% (26/70 名)、そのうち Echo7 が 27%、次いで Echo9 が 15% を占めた (図 1)。ヘルパンギーナは 37% (19/51 名) からエンテロウイルスが検出され、そのうち CA2 が 27%、次いで CA4 が 21% であった (図 2)。手足口病は 60% (6/10 名) からエンテロウイルスが検出され、そのうち EV71 が 50% を占めた (図 3)。

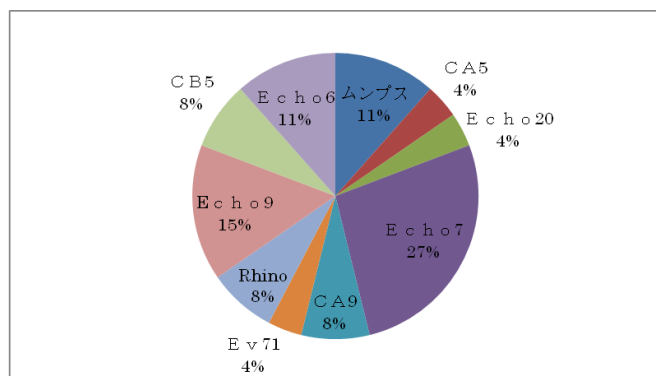


図 1.無菌性髄膜炎患者からの血清型別検出ウイルス割合 (n=26)

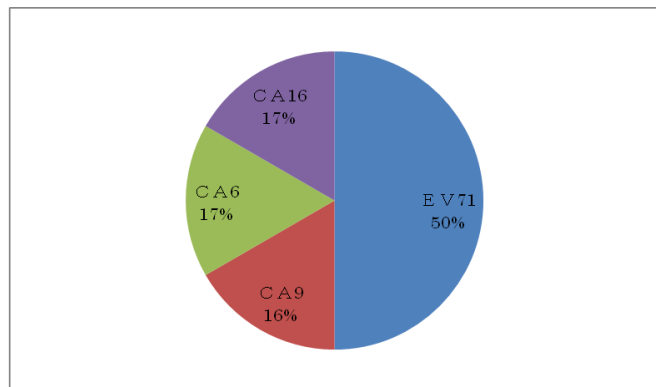


図 2.手足口病患者からの血清型別検出ウイルス割合 (n=6)

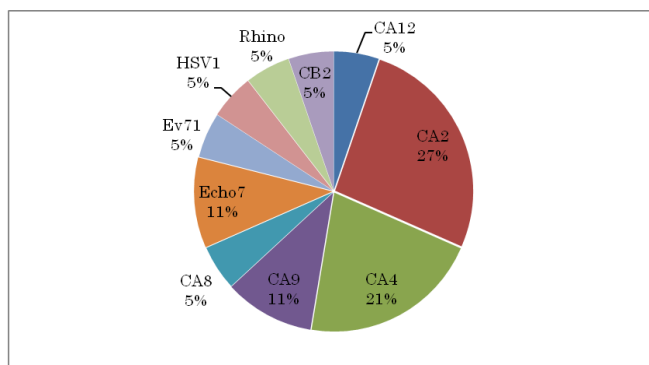


図 3.ヘルパンギーナ患者からの血清型別検出ウイルス割合(n=19)

3. 疾患別月別の検出エンテロウイルス血清型

2011年はCA6の検出割合が突出して高かったが、2012年度のエンテロウイルス検出では各疾患患者検体から様々な血清型のエンテロウイルスが検出された。無菌性髄膜炎患者検体でウイルス検出数が最も多かったのは7月と9月であった。検出頻度が最も高かったEcho7は8月にピークとなった (図4)。手足口病患者検体からのウイルス検出は10月が最も多く、全てEV71が検出された (図5)。ヘルパンギーナ患者検体からのウイルス検出数は7月が最も多く、検出頻度が高いCA2やCA4は7月のみに検出された (図6)。

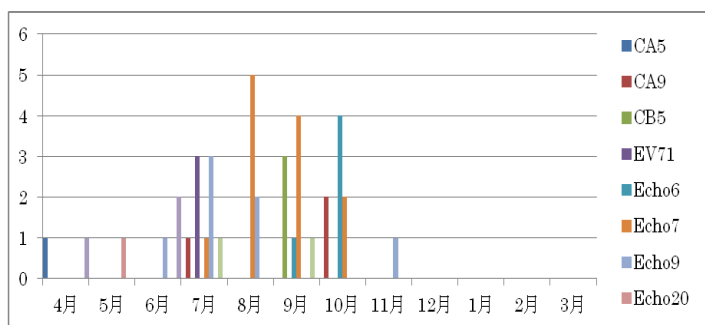


図4.無菌性髄膜炎患者検体からの月別検出ウイルス血清型

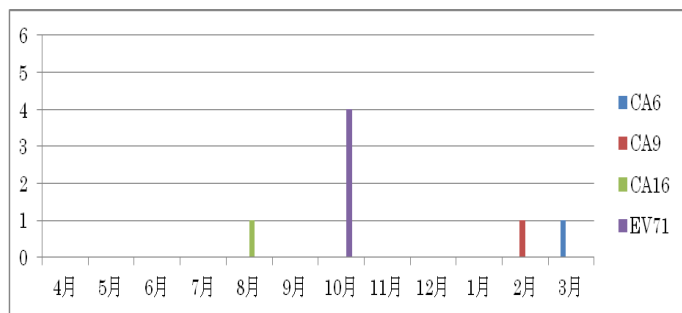


図5.手足口病患者検体からの月別検出ウイルス血清型

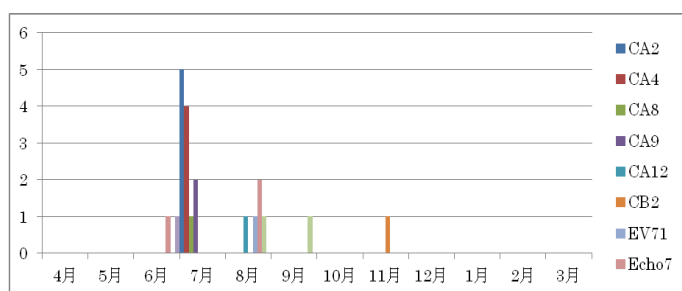


図6.ヘルパンギーナ患者検体からの月別検出ウイルス血清型

4. Echo7, EV71およびCA2の系統樹解析

7株のEcho7、1株のEV71および4株のCA2についてVP1領域（それぞれ、709bp、581bp、643bp）の系統樹解析を実施した。その結果、Echo7およびCA2については全てが同じクラスターを形成した（図7、9）。Echo7に最も近縁だったのはフランスで2005年に検出された株であり（図7）、EV71は2009年に中国で採取された株であった（図8）。CA2では2010年に当所で採取された株と同じクラスターを形成し、次に2003年に神奈川県で分離された株と近縁であった（図9）。

EV71の解析において2010年度に当所で採取された株（AB688662）は遺伝子型C2に属していたのに対し、今シーズンに採取された株（24037）は遺伝子型B型に属した（図8）。

考 察

2012年度、ヘルパンギーナおよび手足口病の流行は低レベルであったが、無菌性髄膜炎患者は例年並であった⁴⁾。CA6による手足口病が大流行した^{5) 6) 7)} 2011年度とは異なり、手足口病患者およびヘルパンギーナ患

者検体からはほとんどCA6が検出されなかった。

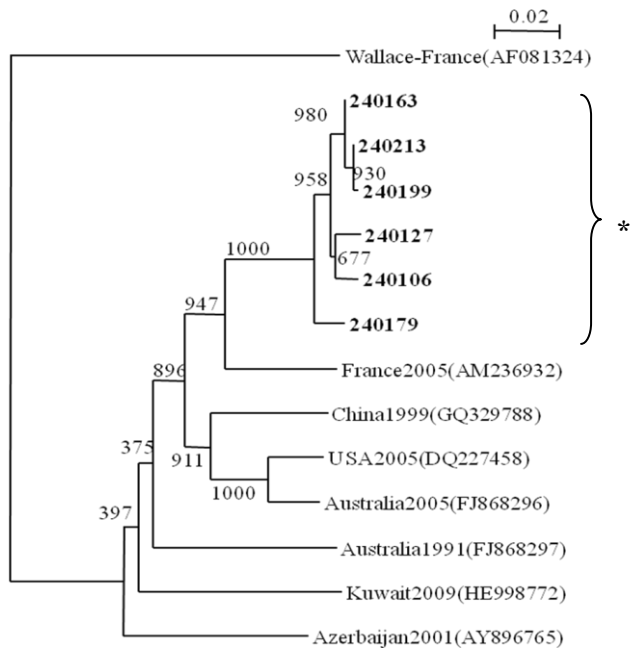
今シーズンの無菌性髄膜炎患者において最も多く検出されたウイルス血清型はEcho7であった。病原体検出情報(NESID)によると、2003/2004シーズンに全国で比較的多く検出された後、Echo7は今シーズンに至までほとんど報告されていない。Echoウイルスは一般的に流行サイクルが数年から数十年であるとされている^{8) 9) 10)}。今シーズンの流行は前回の流行から約10年間の間隔であり、既報とよく一致する。これから約10年後のEcho流行の動向に注目したい。Echo7の系統樹解析によると、今シーズンに流行したウイルス株は2005年にフランスで採取された株と最も近縁であった。中にはフランスの株と100%の相同性を持つものも存在した。これは、今シーズンのEcho7が国外から流入した可能性を示唆すると思われる。

今シーズンの手足口病で最も多く検出されたEV71は、国内で2010年に流行した。NESIDによると我が国のEV71による手足口病流行は2～3年毎である。今シーズンの検出も通常のサイクルに一致すると思われるが、流行は非常に小規模であった。特筆すべきことは2010年に当所で検出されたEV71は遺伝子型がC2型であったのに対し、今シーズンの株はB型だったことである。しかし、新しいタイプに属する可能性も残されているため、さらに他の分離株を解析する必要がある。

ヘルパンギーナではCA2およびCA4の検出が多かった。これは例年通りの傾向である。CAは培養細胞による分離培養が困難な場合が多く、今シーズン、遺伝子検索のみで検出があったCA8やCA12については哺乳マウスによる分離も実施した。その結果、培養細胞では出来なかったが、哺乳マウスでウイルス分離できた血清型があった。近年では生命倫理の観点から、動物によるウイルス分離を極力減らす方向にある。しかし、CAの分離においては代替法の開発が行われるまでは引き続き実施する必要があると思われる。CA2の系統樹解析においては2010年度に当所にて分離された株

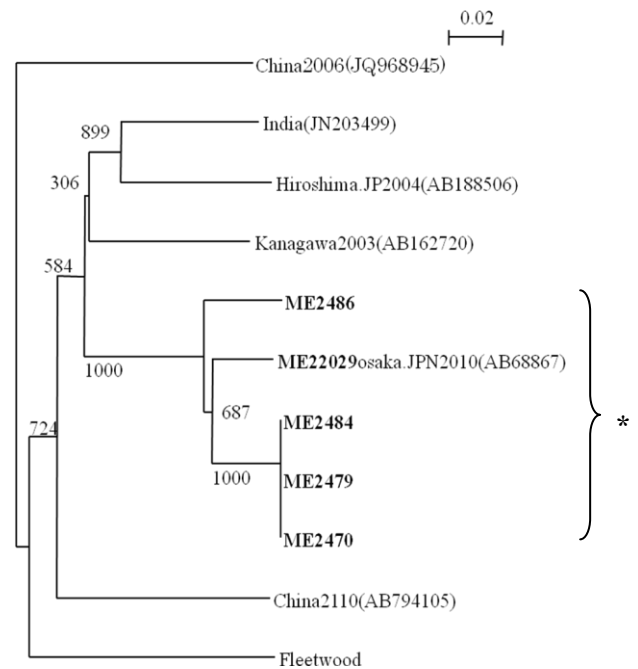
（ME22029osaka.JPN2010株）と同一のクラスターを形成し、次いで2003年に神奈川県で採取された株と近縁であった。このことから、CA2の遺伝的変化は比較的小さいと思われる。

Echo7およびEV71については国際的な伝播が、CA2については国内の伝播が大きな要因を占める可能性が示



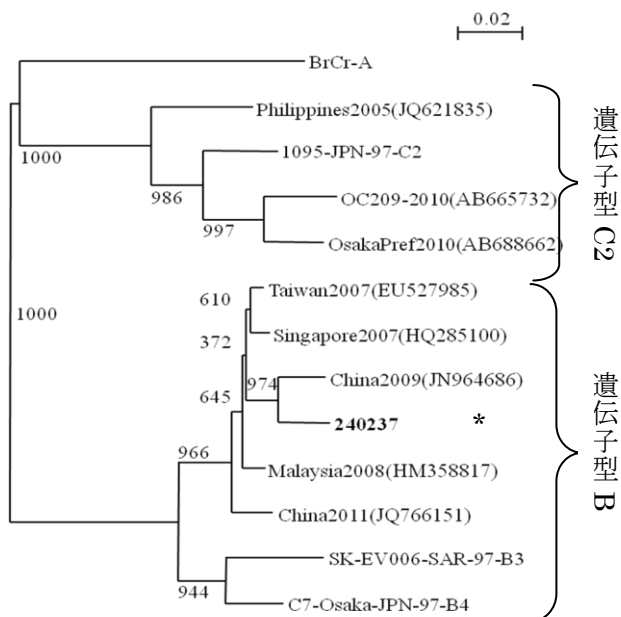
*太字:平成24年度大阪府分離株

図7. Echo7系統樹 (VP1領域, 709bp)



*太字:平成24年度大阪府分離株

図9. CA2系統樹 (VP1領域, 643bp)



*太字:平成24年度大阪府分離株

図8. EV71系統樹 (VP1領域, 581bp)

唆された。しかし、本報告は単年度に分離された少数のウイルス株からの知見であるため、この傾向を指示するデータを今後も蓄積したい。

エンテロウイルスは血清型が数多く存在し、年毎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。Echo ウイルスが流行した際は無菌性髄膜炎等の集団発生が報告¹⁰⁾されていることや、EV71 による手足口病流行の際には重症化症例への警戒が必要である。今後も流行規模の予測や予防啓発に資するため、流行するエンテロウイルスの血清型を継続的にモニタリングしていくことが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、興那覇麻理、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) 大阪府感染症発生動向調査事業報告書 第31報

5) 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).

6) 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)

7) 中田恵子、山崎謙治、左近直美、加瀬哲男；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）大阪府立公衆衛生研究所所報（平成24年度）P8-13.

8) 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)

9) 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）

10) 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）

11) 無菌性髄膜炎関連エンテロウイルスの動向 2008年12月現在.IASR30-1(347)

12) Boddicker JD, Rota PA, Kerman T, Wangeman A, Lowe L, Hummel KB, Thompson R, Bellini WJ, Pentella M, and DesJardin LE. Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay for Detection of Mumps Virus RNA in Clinical Specimens. Journal of Clinical Microbiology. 45(9):2902-2908,(2007).