

大阪府におけるエンテロウイルス感染症の流行状況と分子疫学的解析 (2013 年度)

中田恵子*1 山崎謙治*1 左近直美*1 駒野淳*2 加瀬哲男*1

感染症発生動向調査事業に基づいて、五類定点把握感染症の病原体定点から大阪府立公衆衛生研究所には検体が搬入される。本稿では、2013 年度に搬入された無菌性髄膜炎、手足口病およびヘルパンギーナと診断された患者から採取された検体を対象に実施したエンテロウイルスに関する検査結果を総括する。全 156 検体のうち、90 検体 (58%) からエンテロウイルスが検出された。各疾患における主要なウイルス血清型の検出割合は以下の通りである：無菌性髄膜炎では、Coxsackievirus B5 (CB5、5/25 症例、20%)、手足口病では、Coxsackievirus A6 (CA6、19/38 症例、50%) および Enterovirus 71 (EV71、11/38 症例、29%)、ヘルパンギーナでは、Coxsackievirus A5 (CA5、4/15 症例、27%) および Coxsackievirus A8 (CA8、4/15 症例、27%)。無菌性髄膜炎患者で CB5 が検出された 5 症例中、4 例が生後 1 カ月齢以下の患者であった。このうち 2 例は生後 1 週間以内の発症であったことから垂直感染が疑われた。手足口病は CA6 および EV71 がシーズンの初めから最後まで検出される混合流行であった。CA6 と EV71 の分離株について viral protein 1 (VP1) 領域に対する系統樹解析を実施した。その結果、分離された CA6 の 3 株全て、CA6 による手足口病が大流行した 2011 シーズンの株よりも 2012 年に中国で検出された株や 2013 年にマレーシアで検出された株と近縁であった。また、分離された EV71 のうち、遺伝子解析が実施できた 5 株中 4 株が大阪市、広島県、台湾で近年検出された株と近縁であった。2011 年シーズン以降、手足口病の原因ウイルスとして CA6 が主要な血清型の一つとなりつつあるが、EV71 と同様に CA6 も国内だけでなく近隣諸国との間で流行を形成す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、コクサッキーウイルス B5、コクサッキーウイルス A6、エンテロウイルス 71

Key words: Aseptic meningitis, Hand, foot and mouth disease, Herpangina, Coxsackievirus B5, Coxsackievirus A6, Enterovirus 71

エンテロウイルス感染症は夏季に小児で流行するが、その血清型は年ごとに変動する。臨床病型は多様性に富み、中でも無菌性髄膜炎、手足口病およびヘルパンギーナは「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」の 5 類感染症定点把握疾患に指定されている。疾患ごとに患者から検出されるウイルス血清型に特徴があり、血清型によって症状や重症度が異

なる。例えば、無菌性髄膜炎において Echovirus 13 や Echovirus 30 が検出されるシーズンは、その流行が大きくなる傾向にある¹⁾。また、手足口病では EV71 が検出される場合、中枢神経系症状が合併する頻度が高くなると報告されている²⁾。従って、ウイルス血清型を継続的にモニタリングすることは、流行予測および重症化に対する注意喚起のために重要である。本稿では、2013 年 4 月 1 日から 2014 年 3 月 31 日の間に感染症発生動向調査事業に基づいて当所に搬入された無菌性髄膜炎、手足口病およびヘルパンギーナと診断された患者検体からの病原体検出情報を集約し、2013 年シーズンに流行したウイルス血清型および分離ウイルスの分子疫学的解析を実施したので報告する。

*1 大阪府立公衆衛生研究所感染症部ウイルス課

*2 国立病院機構名古屋医療センター統括診療部

Epidemic and molecular epidemiological analysis of enterovirus infection
in Osaka Prefecture (Fiscal 2013 Report)

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

調 査 方 法

1.検体および情報収集

2013年4月1日から2014年3月31日の期間、大阪府内の定点医療機関から当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と診断された114名から採取された156検体を対象とした（ただし、大阪市、東大阪市および堺市を除く）。検体種別の内訳は、髄液が41検体、呼吸器由来検体（咽頭拭い液、うがい液、鼻汁等）が83検体、消化器由来検体（糞便、腸内容物等）が26検体、血液が4検体、皮膚病巣由来検体が1検体、尿検体が1検体であった。感染症法に基づく感染症発生動向調査事業によって得られた検体情報（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。

2.検体からのウイルス遺伝子検出

咽頭拭い液等の呼吸器由来拭い検体は、綿棒で咽頭等の病巣を擦過後、1mlの検体輸送用培地に浸漬したものから200 μ lを、髄液は無処理のまま200 μ l採取し、RNA抽出用検体とした。糞便は、緩衝液で10%懸濁液を作製し、15,000rpmで5分間遠心分離し、上清から200 μ l採取し、RNA抽出用検体とした。また、上清を10倍希釈したのち、0.45 μ m ミニザルトシリンジフィルター（sartorius社）でろ過し、培養細胞によるウイルス分離用検体（糞便溶液）とした。RNA抽出は、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）で行った。エンテロウイルス VP4-2 領域に対する seminested RT-PCR³を実施し、増幅産物のダイレクトシーケンスを行ない、BLAST 相溶性検索にて血清型を決定した。

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 RDA、VeroE6、FL、LLCMK2、Caco-2 細胞を用いた。これらの細胞に上記のように処理した検体をそれぞれ200 μ l接種し、37°C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。なお、3代盲継代を繰り返し、CPEが出現しなかった場合を

陰性と判定した。

VP4-2 領域に対する seminested RT-PCR でエンテロウイルスが陽性だった検体のうち、培養細胞での分離が陰性でかつ、哺乳マウスに感受性を示す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または、それ以外の検体を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°C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が認められた培養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。弛緩麻痺が認め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緩衝液を加えて、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-PCR⁴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、CA6(651bp)およびEV71(711bp)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

検体が採取された患者のうち、無菌性髄膜炎と診断されたのは49名で、年齢の中央値は1歳6か月（範囲：1日-72歳4ヶ月齢）、性別は男性29名（59%）、女性20名（41%）であった。手足口病と診断された患者は42名で、年齢の中央値が1歳9か月（10か月-14歳1ヶ月齢）、性別は男性28名（67%）、女性12名（29%）、不明2名（4%）名であった。ヘルパンギーナと診断された患者は23名で、年齢の中央値は2歳6ヶ月（11ヶ月-40歳齢）、性別は男性16名（70%）、女性7名（30%）であった。

対象3疾患と診断された患者114名中、80名（70%）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 での検出割合が高く、156 検体中 88 検体(56%)が陽性であった (表 1~3)。細胞培養で陰性だったが、seminested RT-PCR で CA6 が陽性であった 19 検体または、CA10 が陽性であった 1 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、CA6 および CA10 がそれぞれ 12 株および 1 株分離された。

2.疾患別ウイルス検出割合および検出ウイルスタイプ

無菌性髄膜炎患者由来の 51% (25/49 名) の検体からエンテロウイルスが検出され、そのうち CB5 が 20%、次いで Echo6 が 16%、Echo11 が 16%を占めた (図 1)。検出検体別にみると、髄液からエンテロウイルス遺伝子が検出された検体が 27% (11/41 検体) で、同定されたウイルスは頻度順に Echo6 が 4 検体 (36%)、CB5 が 3 検体 (27%) であった。また、培養細胞試験では 17% (7/41 検体) の検体からエンテロウイルスが分離され、CB5 が 43% (3 検体)、Echo6 が 29% (2 検体) を占めた。また、同一患者から髄液とともに呼吸器由来検体および消化器由来検体が同時に搬入された患者で、髄液からエンテロウイルスが検出された患者 (5 名) において呼吸器および消化器由来検体の両方から同一血清型のウイルスが検出された。手足口病では 90% (38/42 名) の患者からエンテロウイルスが検出され、そのうち CA6 が 47%、次いで EV71 が 26%を占めた (図 2)。同様に、ヘルパンギーナでは 65% (15/23 名) の患者検体からエンテロウイルスが検出され、そのうち CA8 および CA5 がそれぞれ 27%を占めた (図 3)。

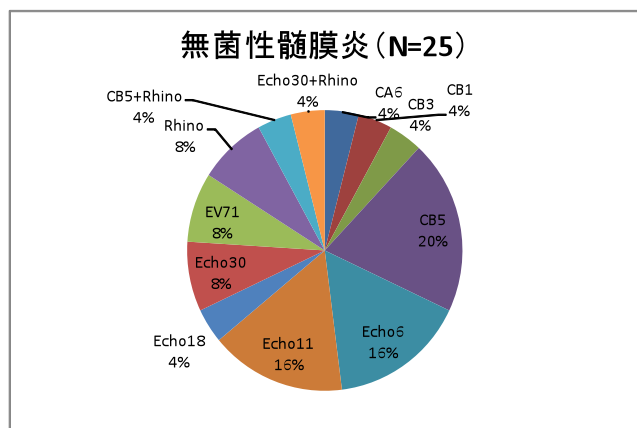


図 1.無菌性髄膜炎患者からの血清型別検出ウイルス割合

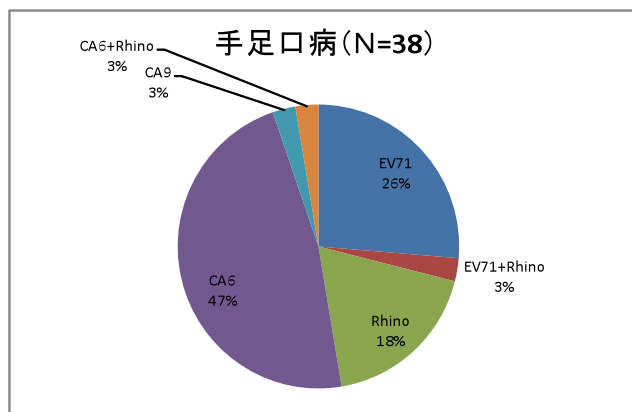


図 2.手足口病患者からの血清型別検出ウイルス割合

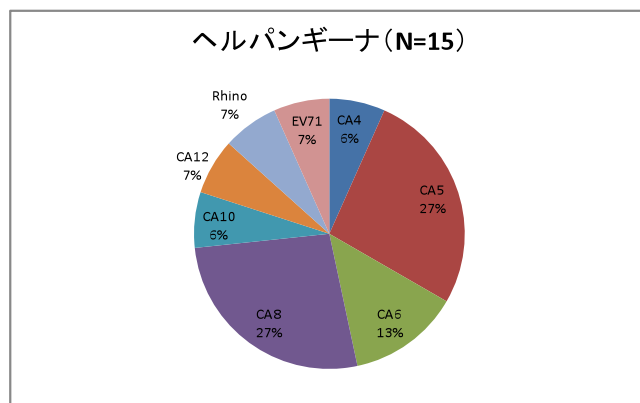


図 3.ヘルパンギーナ患者からの血清型別検出ウイルス割合

3.疾患別月別の検出エンテロウイルス血清型

無菌性髄膜炎患者由来検体から検出割合が高かった CB5 は全て 10 月に検出された。一方、同様に検出割合が高かった Echo6 は 7~9 月にかけて検出された (図 4)。手足口病患者由来検体で最も検出割合が高かった CA6 は 6~7 月に集中して検出され、次いで検出割合が高かった EV71 は 11 月に多く検出されたが、両血清型ともに、シーズンを通じて検出された (図 5)。ヘルパンギーナ患者由来検体からエンテロウイルスが検出された 80%の事例は 6~8 月に集中しており、今シーズンの主要な血清型である CA8 は 6 月と 7 月のみに検出された (図 6)。

4.手足口病患者から検出された CA6 および EV71 の系統樹解析

患者検体から分離された株のうちウイルス抗原決定領域である viral protein 1(VP1)領域の遺伝子解析が実施可能であった CA6、3 株および EV71、5 株についてそれぞれ 651bp および 711bp の系統樹解析を実施した。その結果、CA6 の 3 株は全てが同じクラスターを形成した。また、今年度検出された CA6 の 3 株は、CA6 による手足口病が大流行した 2011 年シーズンに大阪府で分離された株 (230325) よりも 2012 年に中国で検出された株 (KF836581) や 2013 年にマレーシアで検出された株 (KF772909) と近縁であった (図 7)。一方、EV71 は、5 株中 4 株が遺伝子型 C2 型で、近年大阪市 (AB665746)、広島県 (AB560881)、台湾 (KF306101) で検出された株と近縁であった。残りの 1 株は遺伝子型 B 型であった (図 8)。

考 察

本事業の対象である 3 疾患を比較した場合、手足口病と診断された患者からのウイルス検出割合が最も高く、無菌性髄膜炎と診断された患者からのウイルスの検出割合が最も低かった。これは、手足口病では、手、足、口にエンテロウイルス感染症に特徴的な発疹が発現するのに対し、無菌性髄膜炎は症候群として診断されるため、エンテロウイルス以外のウイルスやその他の原因でも引き起こされるためであると考えられる。

2013 年シーズンの手足口病およびヘルパンギーナの流行は過去 5 年間の中で 2 番目に大きかったが、無菌性髄膜炎は例年並みであった⁵⁾。また、3 疾患全てで、ウイルス血清型の流行傾向が 2012 年シーズンと異なっていた⁶⁾。

手足口病に関しては、2013 年シーズンは 2011 年シーズンに大流行した CA6^{7) 8) 9)} が最も多く検出されたほか、周期的に流行を繰り返す EV71 もシーズンを通じて検出された。これら 2 種類の血清型が存在したために流行が大きくなったと考えられる。系統樹解析の結果、2013 年シーズンに流行した CA6 は手足口病が大流行した 2011 年シーズンに大阪府で検出された株ではなく、2011 年以降に中国やマレーシアで検出された株により近縁であった。これは、CA6 がアジア地域で

広く循環している可能性を示唆する。また、今シーズン検出された EV71 は、遺伝子型 B 型と C2 型にクラスターを形成した。大阪府では 2011 年シーズンは C2 型が主流で、2012 年シーズンに B 型が検出された。従って、2013 年シーズンは遺伝子型 B とともに、国内外で循環していた C 型と混合して EV71 の流行を形成したと考えられた。

CA6 は 2011 年シーズン以前、ヘルパンギーナの主要な原因ウイルスの一つとして知られていた。しかし、2013 年シーズンは手足口病患者で最も多く検出された。2011 年以降、手足口病患者からの CA6 検出割合が増加していることから、口腔内の水疱性発疹が特徴的な症状であるヘルパンギーナから、手、足、口に広汎に水疱性発疹が発生する手足口病へと CA6 の病原性が変化してきた可能性が考えられる。

無菌性髄膜炎の流行は例年並みで小規模であった⁵⁾。患者年齢の中央値は 2012 年シーズンでは 4 歳 1 ヶ月齢であったが、2013 年シーズンでは 1 歳 6 カ月と低かった。これは、1 ヶ月齢未満の患者が 10 人と多かったことに由来すると考えられる。また、この 10 人中 6 人からエンテロウイルスが検出され、このうち 4 人が生後 1 週間以内に発症していた。国立感染症研究所感染症サーベイランスシステムから収集した情報によると、全国的にも 2013 年シーズンは、過去 10 年間で最も多く 1 カ月齢未満の無菌性髄膜炎患者からエンテロウイルスが検出されている。その半数以上から CB が検出された (データ未掲載)。発症が生後 1 週間未満の場合、感染経路としては院内での水平感染と垂直感染が考えられる。CB が原因となる新生児重症ウイルス感染症事例が複数報告¹⁰⁾¹¹⁾されていることから、新生児からの病原体検出だけでなく、胎盤からの病原体検出および母親の抗体保有状況など、CB による新生児の無菌性髄膜炎における垂直感染の論拠となる系統的なデータの集積が重要であると思われた。

エンテロウイルスは血清型が多数存在し、年毎に流行血清型が入れ替わり、流行の規模も毎年変化する。近年、手足口病においては主な原因ウイルスとして知られていた EV71 や CA16 に加えて CA6 が流行するようになった。中枢神経系の合併症の頻度が高いとされている EV71²⁾ だけではなく、皮膚症状が重症化する CA6¹²⁾の今後の流行状況にも注目する必要がある。

また、無菌性髄膜炎では今シーズンは新生児の患者

表 1. 無菌性髄膜炎患者由来検体における検体種別検出法別ウイルス検出結果

血清型	髄液		呼吸器由来検体 (咽頭拭い液・鼻汁・うがい液)		消化器由来検体 (糞便・直腸内容物)		その他 (血清・尿)	
	N=41		N=19		N=24		N=3	
	PCR	培養細胞	PCR	培養細胞	PCR	培養細胞	PCR	培養細胞
CA6			1	0				
CB1			1	0				
CB3	1	1	1	1	1	1		
CB5	3	3	1	1	2	2	2	1
Echo6	4	2						
Echo11			2	0	2	1		
Echo18	1	0						
Echo30	2	1	1	0	1	0		
EV71			1	1	1	1		
Rhino			3	0	1	0		
合計(%)	11(27)	7(17)	11(85)	3(16)	8(33)	5(21)	2(67)	1(33)

表 2. 手足口病患者由来検体における検体種別検出法別ウイルス検出結果

血清型	呼吸器由来検体 (咽頭拭い液・鼻汁・うがい液)		消化器由来検体 (糞便・直腸内容物)		その他 (血清・皮膚病層拭い)	
	N=41		N=2		N=2	
	PCR	培養細胞	PCR	培養細胞	PCR	培養細胞
CA6	17	3	1	1	1	0
CA9	1	1			1	1
EV71	11	9				
Rhino	9	0				
合計(%)	38(93)	13(32)	1(50)	1(50)	2(100)	1(50)

表 3. ヘルパンギーナ患者由来検体における検体種別検出法別ウイルス検出結果

血清型	呼吸器由来検体 (咽頭拭い液・鼻汁・うがい液)	
	N=23	
	PCR	培養細胞
CA4	1	1
CA5	4	3
CA6	2	1
CA8	4	3
CA10	1	1
CA12	1	0
Rhino	1	0
EV71	1	1
合計(%)	15(65)	10(43)

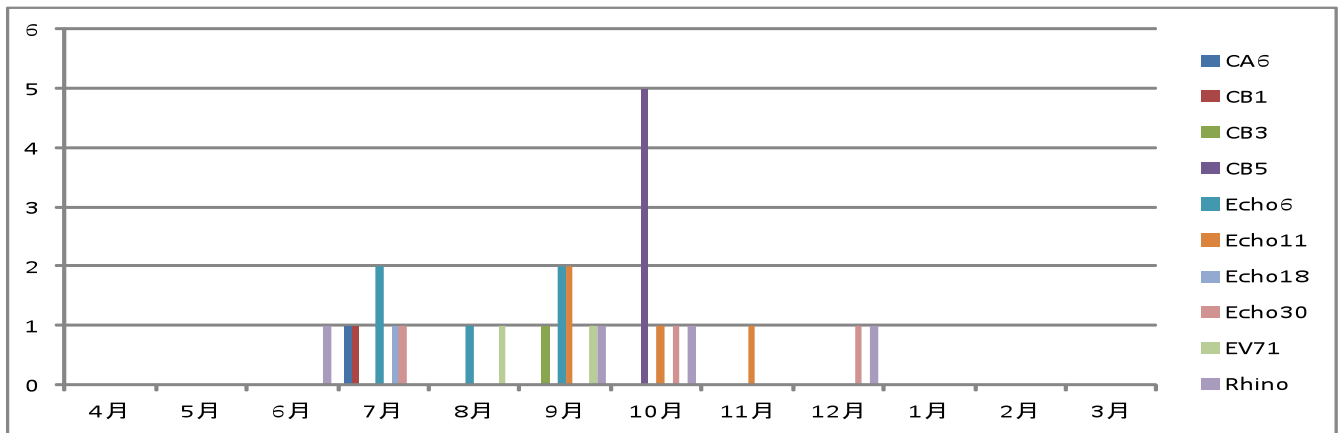


図 4. 無菌性髄膜炎患者検体からの月別検出ウイルス血清型

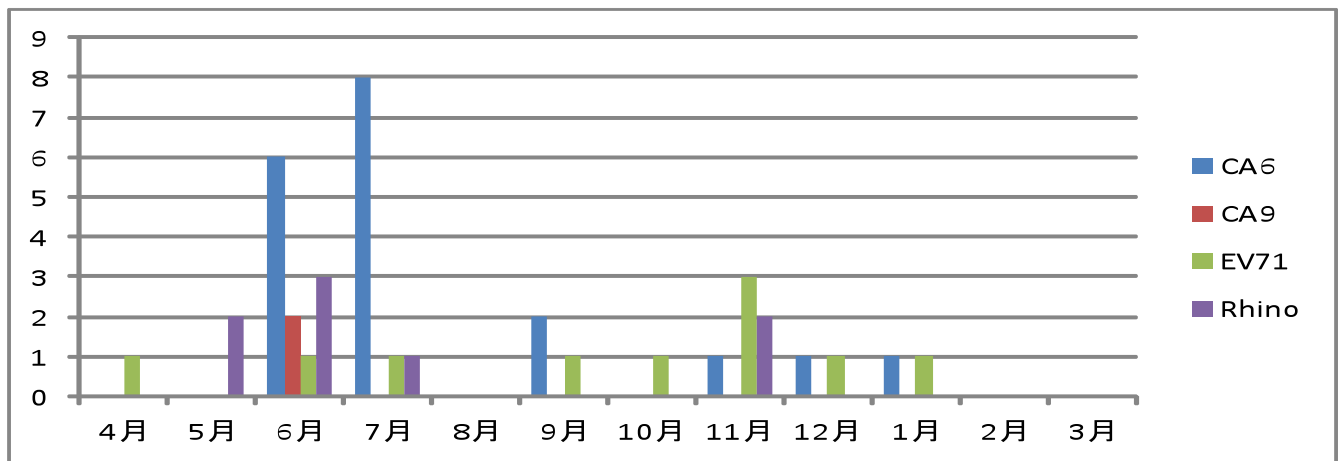


図 5. 手足口病患者検体からの月別検出ウイルス血清型

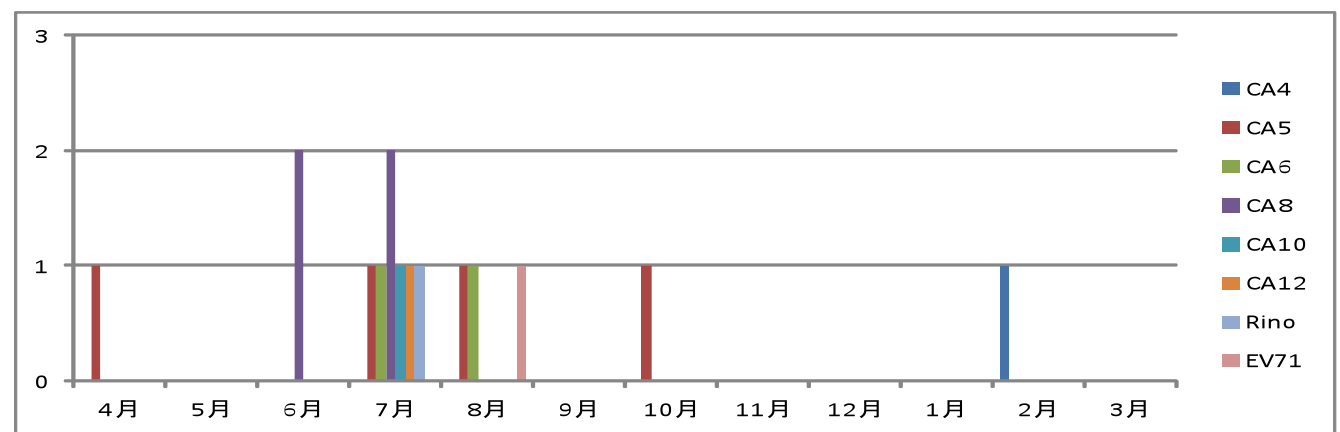


図 6. ヘルパンギーナ患者検体からの月別検出ウイルス血清型

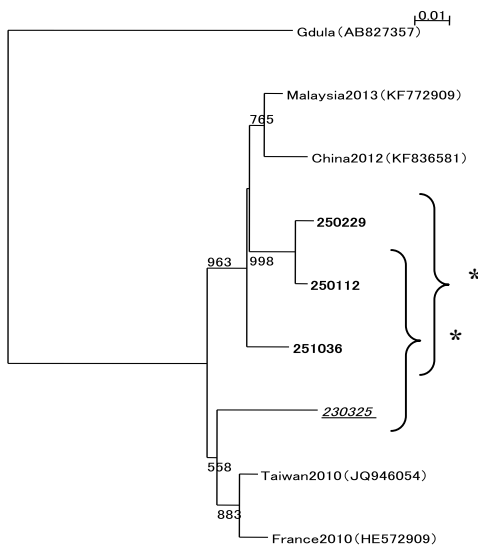


図 7. CA6 系統樹 (VP1 領域,651bp)

*太字:平成 25 年度大阪府分離株、斜字下線:
平成 23 年度大阪府分離株

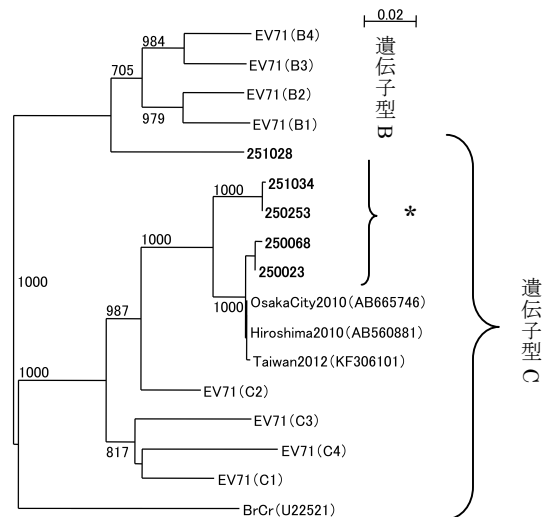


図 8. EV71 系統樹 (VP1 領域,711bp)

*太字:平成 25 年度大阪府分離

の頻度が高く、ウイルスが検出された 6 人中、4 人から CB が検出された。垂直感染の事実確認および CB が新生児に及ぼす影響等を解明するためには、感染症発生动向調査事業に基づいた継続的な病原体モニタリングだけでなく積極的な疫学調査も必要である。

文 献

- 1) 国立感染症研究所感染症情報センターホームページ、病原微生物検出情報；エンテロウイルスグラフ（参照 2014-5-30）
- 2) 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)
- 3) 石古博昭、島田康司、輿那覇麻理、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)
- 4) 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)

- 5) 大阪府立公衆衛生研究所ホームページ；エンテロウイルス関連情報(参照 2014-5-30)
- 6) 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（2012 年度）大阪府立公衆衛生研究所所報 51: 7-13 (2013)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 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 50: 8-13 (2012)

10) Romero JR. Pediatric group B coxsackievirus infections. *CurrTop Microbiol Immunol.* 323: 223-39 (2008)

11) Cheng LL, Ng PC, Chan PK, Wong HL, Cheng FW, Tang JW. Probable intrafamilial transmission of

coxsackievirus b3 with vertical transmission, severe early-onset neonatal hepatitis, and prolonged viral RNA shedding. *Pediatrics.* 118(3): e929-33 (2006)

12) 渡部裕子 ; 手足口病後の爪変形・爪甲脱落症、病原微生物検出情報月報 (IASR) 33: 62-63 (2012)