

# 大阪府におけるエンテロウイルスおよびヒトパレコウイルス感染症の流行状況 と分子疫学的解析 (2014 年度)

中田恵子\*<sup>1</sup> 山崎謙治\*<sup>1</sup> 左近直美\*<sup>1</sup> 駒野淳\*<sup>2</sup> 加瀬哲男\*<sup>1</sup>

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、2014 年度に搬入された無菌性髄膜炎、手足口病または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およびヒトパレコウイルスに関する検査結果を総括する。全 190 症例のうち、142 症例 (74%) からエンテロウイルスまたはヒトパレコウイルスが検出された。142 症例中、32 症例(23%)からヒトパレコ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、Human parechovirus 3 (HPeV3) ; 40% (8/20 症例)、Coxsackievirus A9 (CVA9) ; 10% (2/20)、Coxsackievirus B4 (CVB4) ; 10% (2/20)、Echovirus18 (E18) ; 10% (2/20)および Echovirus30 (E30) ; 10% (2/20)、手足口病では、Coxsackievirus A16 (CVA16) ; 41% (18/44)および HPeV3 ; 23% (10/44)、ヘルパンギーナでは、Coxsackievirus A2 (CVA2) ; 27% (21/78)、Coxsackievirus A4 (CVA4) ; 25% (20/78)および HPeV3 ; 18% (14/78)。無菌性髄膜炎患者で HPeV3 が検出された 8 症例中 7 例が生後 1 カ月齢以下の患者であった。一方で、手足口病およびヘルパンギーナ患者で HPeV3 が検出された患者 (各 10 症例および 14 症例) の年齢の中央値はともに 1 歳 7 カ月であった。手足口病では、6 月から 8 月には HPeV3 の検出が優位で、9 月以降は、CVA16 が主要となった。このように手足口病における主要な原因ウイルスの入れ替わりを伴う流行パターンは、2014 年度に特徴的であった。3 疾患患者それぞれから検出され、viral protein 1 (VP1)領域が増幅できた HPeV3 に対し系統樹解析を実施したところ、各ウイルス株は、疾患とは関係なく 2 つのクラスターに分類され、2011 年に山形県で検出された株と最も近縁であった。HPeV3 の感染による症状は、エンテロウイルス感染症と区別が困難であり、3 疾患のそれぞれから検出されたウイルス株においても疾患特有の遺伝的特徴は認められなかった。そのため、これら 3 疾患の原因として HPeV3 を考慮し、エンテロウイルスと同様に流行状況を把握する必要があると考えられる。

**キーワード:** 無菌性髄膜炎、手足口病、ヘルパンギーナ、ヒトパレコウイルス 3 型、コクサッキーウイルス A16  
**Key words:** Aseptic meningitis, Hand, foot and mouth disease, Herpangina, Human parechovirus 3, Coxsackievirus A16

エンテロウイルス感染症は夏季に小児で流行するが、原因ウイルス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。

\*<sup>1</sup> 大阪府立公衆衛生研究所感染症部ウイルス課

\*<sup>2</sup> 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 and human parechovirus infection in Osaka Prefecture (Fiscal 2014 Report)  
by Keiko NAKATA, Kenji YAMAZAKI, Naomi SAKON, Atsushi KOMANO and Tetsuo KASE

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<sup>1)</sup>。一方、ヒトパレコウイルスはエンテロウイルスに属していたが、ウイルス学的性状の違いから 1999 年にヒトパレコウイルス属として独立した。ヒトパレコウイルス (Human prechovirus: HPeV) の中でも 3 型による感染症は、エンテロウイルス感染症と同様に夏から秋に流行すると言われている<sup>2)</sup>。さらに、国内では主に呼吸器症状や胃腸炎症状患者から検出されることもエンテロウイルス感染症と類似している。また、HPeV3 は、呼吸器症状や胃腸炎症状患者の他、新生児感染症<sup>3,4,5)</sup>、敗血症様症状<sup>3,4,6)</sup>、乳幼児突然死症候群患者<sup>6)</sup>からも検出されており、関連性が推測されている。従って、エ

ンテロウイルスの血清型のみならず、HPeV の発生動向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、2014年4月1日から2015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、手足口病または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、2014年シーズンに流行したエンテロウイルス血清型およびHPeV の流行状況を解析するとともに、HPeV3 の分子疫学的解析を実施したので報告する。

## 調 査 方 法

### 1. 検体・情報収集および統計解析

2014年4月1日から2015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、手足口病またはヘルパンギーナと診断された190名から採取された216検体を対象とした（ただし大阪市、東大阪市および堺市除く）。検体種別の内訳は、髄液が39検体、呼吸器由来検体（咽頭拭い液、うがい液、鼻汁等）が156検体、消化器由来検体（糞便、腸内容物等）が20検体、尿が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。また、各疾患における患者とHPeV 検出患者の年齢分布の比較には Mann-Whitney 検定を用いた。

### 2. 培養細胞によるウイルス分離

培養細胞によるウイルス分離には48ウェルプレートに播種した RDA、VeroE6、FL、Caco-2 細胞を用いた。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、検体輸送用培地に浸漬した溶液（呼吸器検体溶液）を、髄液は無処理でそれぞれ100 $\mu$ l ずつを各細胞に接種した。糞便は、緩衝液で10%懸濁液（糞便乳剤）を作製し、15,000rpm で5分間遠心分離後、その上清を10倍希釈し、0.45 $\mu$ m ミニザルトシリンジフィルター（sartorius 社）でろ過した溶液から100 $\mu$ l を各細胞に接種した。各細胞への検体接種後、37 $^{\circ}$ C のCO<sub>2</sub> インキュベーターで1週間培養し、細胞変性効果（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。

### 3. 検体および培養上清からのウイルス遺伝子検出

呼吸器検体溶液、髄液および糞便乳剤の遠心上清からそれぞれ200 $\mu$ l を採取し、RNA 抽出用検体とした。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-PCR<sup>7)</sup> 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。また同時に、ヒトパレコウイルスに対する RT-realtimePCR<sup>8)</sup> をスクリーニング検査として実施し、陽性検体については VP1 領域に対する RT-nestedPCR<sup>9)</sup> を実施した後、エンテロウイルスと同様に血清型を同定した。また、VP1 領域（783nt）を増幅できた HPeV については、ダイレクトシーケンスで得られた塩基配列に対し、ClustalW を用いた系統樹解析を実施した。

また、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。

培養上清から抽出した RNA を用いてエンテロウイルス<sup>10)</sup> およびヒトパレコウイルスの VP1 領域に対する RT-PCR を実施した。得られた増幅産物に対し、ダイレクトシーケンスを行ない、BLAST 解析によりウイルスを同定した。

## 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45名で、年齢の中央値は1カ月（範囲：2日-13歳5ヶ月）、性別は男性29名（64%）、女性16名（36%）であった。手足口病と診断された患者は47名で、年齢の中央値が2歳6カ月（3カ月-33歳）、性別は男性27名（57%）、女性20名（43%）、であった。8月までに手足口病と診断され、搬入された患者の約半数で発疹が不明瞭、掌に発疹がない等、通常の手足口病とは異なる病型であるとの報告があった。ヘルパンギーナと診断された患者は98名で、年齢の中央値は3歳5ヶ月（1ヶ月-48歳）、性別は男性57名（58%）、女性41名（42%）であった。

無菌性髄膜炎、手足口病あるいはヘルパンギーナと

診断された合計 190 名中、142 名 (74%) の患者からエンテロウイルスまたは HPeV が検出された。検出方法別では遺伝子検出の割合が高く、216 検体中 153 検体 (71%) が陽性であった。一方で細胞培養による分離で陽性であったのは、216 検体中 53 検体 (25%) に留まった (表 1~3)。各疾患で HPeV が検出された患者の年齢の中央値は無菌性髄膜炎で 1 カ月、手足口病で 1 歳 7 カ月、ヘルパンギーナで 1 歳 7 カ月であった。

## 2. 疾患別ウイルス検出割合および検出ウイルスタイプ

無菌性髄膜炎患者の 44% (20/45 名) からエンテロウイルスまたは HPeV が検出され、検出内訳は、HPeV が 40%、次いで CVA9、CVB4、E18 および E30 が 10% を占めた (図 1)。検出検体別にみると、髄液からウイルス遺伝子が検出された検体が 36% (14/39 検体) で、HPeV の検出が 43% (6/14 検体) と最も多かったが、HPeV は培養細胞では分離されなかった。手足口病では、94% (44/47 名) の患者検体からエンテロウイルスまたは HPeV が検出され、そのうち CVA16 が 41%、次いで HPeV が 23% を占めた (図 2)。同様に、ヘルパンギーナでは 80% (78/98 名) の患者検体からエンテロウイルスまたは HPeV が検出され、そのうち CVA2 が 27%、CVA4 が 25%、HPeV が 18% を占めた (図 3)。

無菌性髄膜炎 (n=20)

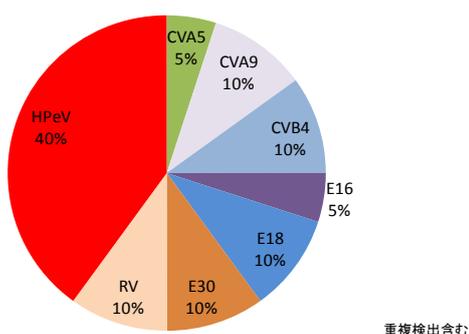


図 1. 無菌性髄膜炎患者からの血清型別検出ウイルス割合

手足口病 (n=44)

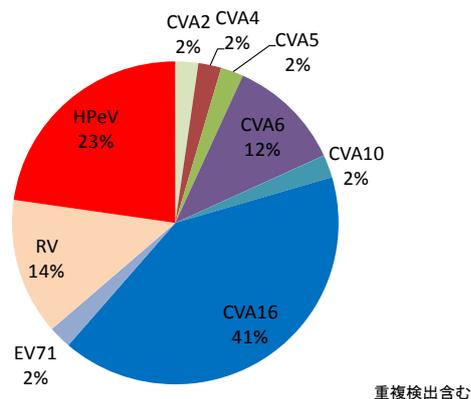


図 2. 手足口病患者からの血清型別検出ウイルス割合

ヘルパンギーナ (n=78)

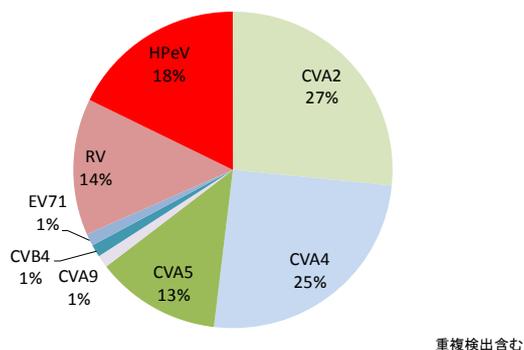


図 3. ヘルパンギーナ患者からの血清型別検出ウイルス割合

## 3. 疾患別月別の検出エンテロウイルス血清型および HPeV

HPeV は、無菌性髄膜炎患者由来検体で 4 月から検出され始めた (図 4)。手足口病患者からは 6 月、ヘルパンギーナ患者から 5 月より検出され始めたが、検出のピークはそれぞれ 7 および 9 月、7 月、7 月であった。手足口病で最も検出割合が高かった CVA16 は、8 月から翌年 3 月まで検出され続けた (図 5)。ヘルパンギーナでは、検出割合が高かった CVA2 および CVA4 は、5 月から 9 月までに集中して検出され、そのピークは 6、7 月であった (図 6)。

### 4.3 疾患患者から検出された HPeV の系統樹解析

患者検体から検出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 HPeV3、16 株について 783nt の系統樹解析を実施した。その結果、16 株のうち 2 株を除く全ての株が同じクラスターを形成し、同クラスターには 2011 年に山形県で検出された株も含まれた。残りの 2 株についても 2011 年に山形県で検出された株と 96% の相同性を有し、解析した株の全てが非常に近縁なウイルスであることが明らかになった (図 7)。

## 考 察

無菌性髄膜炎、手足口病またはヘルパンギーナ患者を比較した場合、手足口病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、例年の検出傾向と同様<sup>11,12,13)</sup>であるが、通常は手足口病では、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ことから、エンテロウイルス以外のウイルスやその他の原因で引き起こされることがあるためと考えられる。2014 年シーズンは、HPeV3 が無菌性髄膜炎、手足口病およびヘルパンギーナ患者のそれぞれから検出された。手足口病では、重複して CA4 が検出された 1 検体を除き、7 月末までに搬入された 11 検体中、5 検体で HPeV3 が検出された以外はエンテロウイルスの検出はなかった。このことにより、エンテロウイルス感染症と HPeV 感染症を明確に区別することが困難であることが分かる。

2014 年度、大阪府では無菌性髄膜炎の患者数は前年比で 26.7%減であり、近年大きな流行は見られていない<sup>14)</sup>。患者数が少ない中、病原体検索結果で最も高い検出割合であったのは HPeV3 であった。従って、HPeV3 の流行年においては無菌性髄膜炎の原因として HPeV のサーベイランスの強化が必要であると考えられる。手足口病についても患者数は前年と比較して少なく、流行は非常に小さかった<sup>14)</sup>。検出されたウイルスは、夏季では HPeV3 が、冬季では CVA16 が主要という流行パターンが認められた。これは通常はエンテロウイルスのみの検査を実施しているところを、HPeV の検査を全ての検体に対し実施したことにより明らかになったと考えられる。一方で、ヘルパンギーナ患者は前年より増加し、定点あたりの患者数が全国で 4 位であった<sup>14)</sup>。5 月から 8 月に患者数がピークとなり、病原

体検出においても 6、7 月に検出数がピークとなった。ウイルスの検出は、CVA2 および CVA4 が全体の半数以上を占め、HPeV3 を含めて夏季に検出が集中していた。そのため、夏季に単峰性のピークを示す比較的典型的な流行パターンを示したと考えられる。

各疾患患者から検出された HPeV3 の系統樹解析では、それぞれの株は疾患とは関係なく 2 つのクラスターに分類された。しかし、いずれのクラスターも 2011 年に山形県で検出された株と高い相同性を有することから、解析を実施した株の全てが非常に近縁なウイルスであることが明らかになった。このことは、遺伝的に大きな変化がなくても HPeV3 が多様な症状を引き起こすことを裏付けていると思われる。また、疾患ごとに HPeV3 感染者と患者全体の年齢分布を比較すると、無菌性髄膜炎では患者全体と HPeV3 感染者の年齢中央値はともに 1 カ月であるのに対し、手足口病では患者全体では 2 歳 6 カ月、HPeV3 感染者では 1 歳 7 カ月、ヘルパンギーナでは各、3 歳 5 カ月と 1 歳 7 カ月であった。無菌性髄膜炎を除き、HPeV3 感染者で年齢が低い傾向が認められた (無菌性髄膜炎：P=0.24、手足口病：P=0.08、ヘルパンギーナ：P<0.05)。HPeV はエンテロウイルスよりも低年齢層からの検出が多いとの報告<sup>1,6)</sup>があり、本報告の結果とも一致している。また、本邦で比較的良好に検出される HPeV1 と比較して HPeV3 が検出された症例では中枢神経症状を伴う割合が高いと報告されている<sup>6)</sup>。本報告においても無菌性髄膜炎の患者で HPeV3 の検出割合が最も高く、HPeV3 の感染で中枢神経症状を惹起する可能性が示唆された。また、手足口病およびヘルパンギーナ患者の HPeV3 感染者の患者年齢よりも無菌性髄膜炎患者における HPeV3 感染者の患者年齢が非常に小さくなっている (1 歳 7 カ月対 1 カ月)。また、手足口病、ヘルパンギーナで HPeV3 が検出された患者のうち、それぞれ 60% および 43% の患者からエンテロウイルスまたはライノウイルスが重複して検出されているが、無菌性髄膜炎患者では重複検出は認められなかった (データは示していない)。これらの結果より、HPeV3 は乳幼児では単独感染で中枢神経症状を伴う症状を引き起こす可能性が考えられた。

エンテロウイルス感染症を疑う疾患検体が搬入された場合、これまで HPeV の検査を全ての検体に対し実

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

|       | 髄液<br>n=39 |       | 呼吸器由来検体<br>(咽頭拭い液、鼻汁、うがい液、唾液)<br>n=11 |       | 消化器由来検体<br>(糞便)<br>n=18 |       | その他<br>(尿)<br>n=1 |      |
|-------|------------|-------|---------------------------------------|-------|-------------------------|-------|-------------------|------|
|       | 遺伝子検出      | 分離培養  | 遺伝子検出                                 | 分離培養  | 遺伝子検出                   | 分離培養  | 遺伝子検出             | 分離培養 |
| CVA5  | 0          | 0     | 0                                     | 0     | 1                       | 0     | 0                 | 0    |
| CVA9  | 2          | 1     | 0                                     | 0     | 1                       | 0     | 0                 | 0    |
| CVB4  | 2          | 2     | 1                                     | 1     | 1                       | 1     | 0                 | 0    |
| E16   | 1          | 0     | 0                                     | 0     | 0                       | 0     | 0                 | 0    |
| E18   | 1          | 0     | 1                                     | 1     | 2                       | 1     | 0                 | 0    |
| E30   | 2          | 1     | 0                                     | 0     | 1                       | 1     | 0                 | 0    |
| RV    | 0          | 0     | 1                                     | 0     | 1                       | 0     | 0                 | 0    |
| HPeV  | 6          | 0     | 1                                     | 0     | 4                       | 1     | 0                 | 0    |
| 合計(%) | 14(36)     | 4(10) | 5(45)                                 | 2(18) | 11(61)                  | 4(22) | 0                 | 0    |

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

|       | 呼吸器由来検体<br>(咽頭拭い液、鼻汁、うがい液、唾液)<br>n=47 |        | 消化器由来検体<br>(糞便)<br>n=2 |       |
|-------|---------------------------------------|--------|------------------------|-------|
|       | 遺伝子検出                                 | 分離培養   | 遺伝子検出                  | 分離培養  |
| CVA2  | 1                                     | 0      | 0                      | 0     |
| CVA4  | 1                                     | 0      | 0                      | 0     |
| CVA5  | 1                                     | 1      | 0                      | 0     |
| CVA6  | 5                                     | 3      | 0                      | 0     |
| CVA10 | 1                                     | 1      | 0                      | 0     |
| CVA16 | 19                                    | 9      | 0                      | 0     |
| EV71  | 1                                     | 0      | 0                      | 0     |
| RV    | 6                                     | 0      | 0                      | 0     |
| HPeV  | 9                                     | 1      | 1                      | 1     |
| 合計(%) | 44(94)                                | 15(32) | 1(50)                  | 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

|       | 呼吸器由来検体<br>(咽頭拭い液、鼻汁、うがい液、唾液)<br>n=98 |        |
|-------|---------------------------------------|--------|
|       | 遺伝子検出                                 | 分離培養   |
| CVA2  | 21                                    | 6      |
| CVA4  | 19                                    | 13     |
| CVA5  | 10                                    | 5      |
| CVA9  | 1                                     | 1      |
| CVB4  | 1                                     | 1      |
| EV71  | 1                                     | 0      |
| RV    | 11                                    | 0      |
| HPeV  | 14                                    | 1      |
| 合計(%) | 78(80)                                | 27(28) |

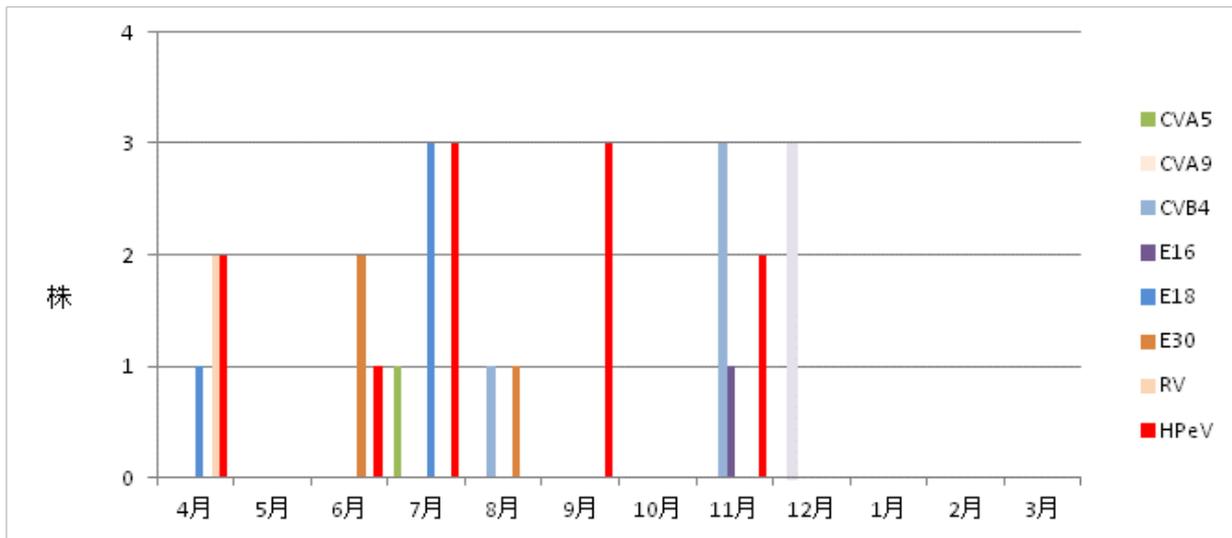


図 4. 無菌性髄膜炎患者検体からの月別検出ウイルス血清型

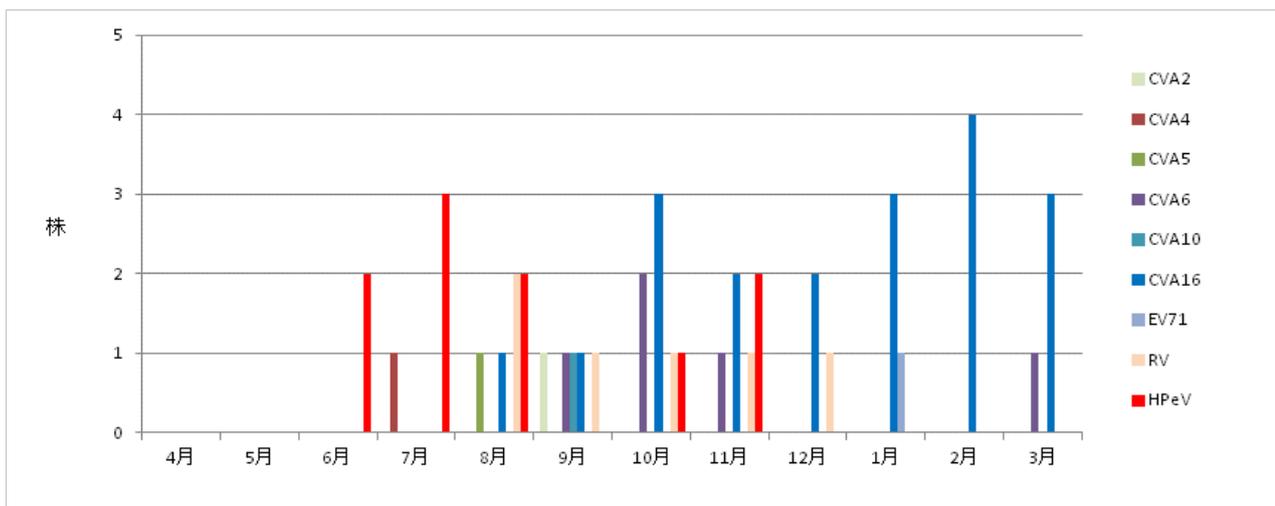


図 5. 手足口病患者検体からの月別検出ウイルス血清型

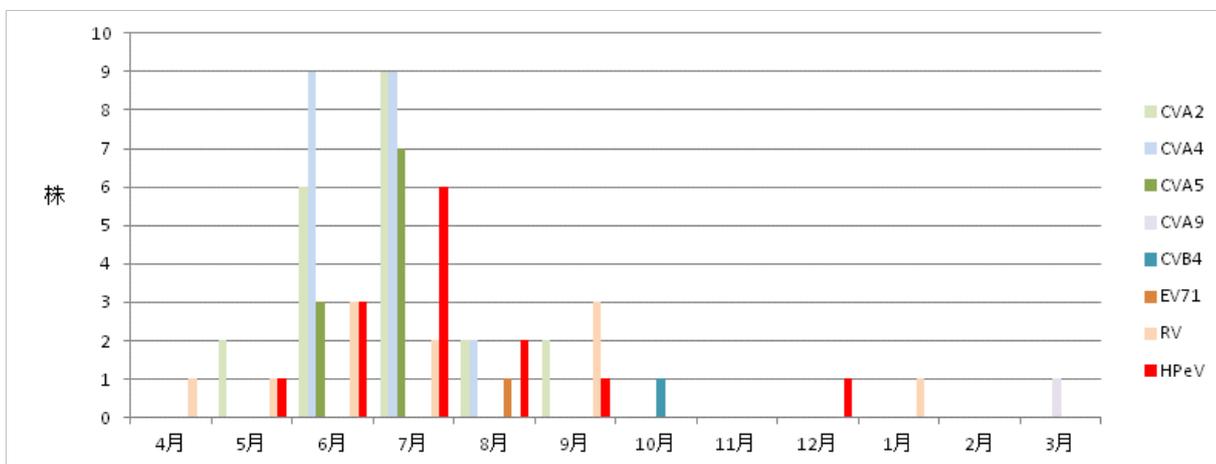


図 6. ヘルパンギーナ患者検体からの月別検出ウイルス血清型

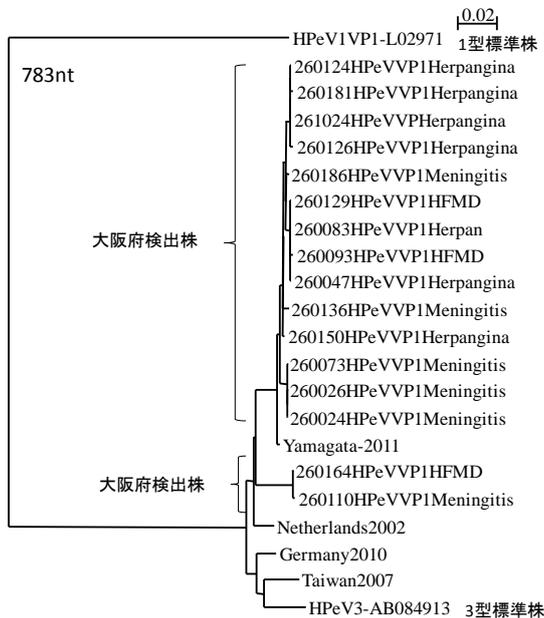


図 7. HPeV 系統樹 (VP1 領域,783nt)

## 文 献

- 1) Heinz Z and Hans-Peter G. : Clinical virology manual third edition-Enteroviruses, :252-269, American society for microbiology, Wasington, D. C (2000).
- 2) Ito M, Yamashita T, Tsuzuki H, Kabashima Y, Hasegawa A, Nagaya S, Kawaguchi M, Kobayashi S, Fujiura A, Sakae K, Minagawa H. : Detection of human parechoviruses from clinical stool samples in Aichi, Japan. J Clin Microbiol. Aug ; 48 (8):2683-8 (2010).
- 3) Abed Y, Boivin G. : Human parechovirus types 1, 2 and 3 infections in Canada. Emerg Infect Dis. Jun; 12 (6):969-75 (2006).
- 4) Abed Y, Boivin G. : Molecular characterization of a Canadian human parechovirus (HPeV)-3 isolate and its relationship to other HPeVs. J Med Virol. Dec; 77(4):566-70 (2005).
- 5) Boivin G, Abed Y, Boucher FD. : Human parechovirus 3 and neonatal infections. Emerg Infect Dis. Jan;11 (1):103-5 (2005).
- 6) Benschop KS, Schinkel J, Minnaar RP, Pajkrt D, Spanjerberg L, Kraakman HC, Berkhout B, Zaaijer HL, Beld MG, Wolthers KC. : Human parechovirus infections in Dutch children and the association between serotype and disease severity. Clin Infect Dis. 2006 Jan 15; 42(2):204-10. Epub Dec 12 (2005).
- 7) 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.
- 8) Nix WA, Maher K, Johansson ES, Niklasson B, Lindberg AM, Pallansch MA, Oberste MS. : Detection of all known parechoviruses by real-time PCR. J Clin Microbiol. Aug;46(8):2519-24 (2008).
- 9) Nix WA<sup>1</sup>, Maher K, Pallansch MA, Oberste MS. : Parechovirus typing in clinical specimens by nested or semi-nested PCR coupled with sequencing.J Clin Virol. Jul;48(3):202-7(2010).
- 10) 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).

11) 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（2013年度）大阪府立公衆衛生研究所所報（平成26年度）P7-14.

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.

12) 中田恵子、山崎謙治、左近直美、加瀬哲男：大阪

13) 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（平成25年度）P7-13.

14) 大阪府感染症発生動向調査事業報告書 第33報