

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 (2015年度)

中田恵子*1 左近直美*1 弓指孝博*1 加瀬哲男*2

2015年度に感染症発生動向調査事業に基づいて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(ライノウイルスおよびムンプスウイルスの検査結果を含む)。163症例(211検体)のうち、108症例(119検体)(66.3%)からウイルスが検出された。手足口病から検出されたエンテロウイルスは、Coxsackievirus A6 (CVA6、57% : 42/74 ; 重複検出含む) および Coxsackievirus A16 (CVA16、27% : 20/74)、ヘルパンギーナでは、Coxsackievirus A10 (CVA10、39% : 9/23) および CVA6 (26% : 6/23) が主要な血清型であった。分離株の viral protein 1 領域に対する系統樹解析では、CVA6は、2011年シーズンの分離株よりも2013年にマレーシア、中国、兵庫県および大阪府で検出された株と近縁であったことから、経年で遺伝子変化が生じていると思われた。一方で、分離されたCVA16は、2005年富山県、2008年中国、2014年タイでそれぞれ検出された株と近縁であったことから経年変化が比較的少ないと考えられた。

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 A6、コクサッキーウイルス A16
Key words: Aseptic meningitis, Hand, foot and mouth disease, Herpangina, Coxsackievirus A6, Coxsackievirus A16

エンテロウイルス感染症は夏季(流行シーズンは春から秋:4月から11月)に小児で流行するが、流行株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」(以下、感染症法)の5類感染症定点把握疾患に指定されている(ただし、無菌性髄膜炎については原因としてエンテロウイルスの他に、ムンプスウイルス、その他のウイルスや病原体によって引き起こされる場合がある)。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、血清型の違いによって症状や重症度が異なる¹⁾。2011年シーズンにCVA6による手足口病がサーベイランス開始以来最大の流行となった²⁾。CVA6による手足口病では、手足の水疱と口内炎といった典型的な症状ではなく、体幹

にまでおよぶ水痘様の激しい皮膚症状や手指の爪の脱落が報告された³⁾。一方、EV71が原因となる手足口病が流行するシーズンでは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⁴⁾。

従って、エンテロウイルス感染症において、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、2015年4月1日から2016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、2015年シーズンに流行したエンテロウイルス血清型(無菌性髄膜炎患者からのムンプスウイルスの検出情報を情報を含む)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 元大阪府立公衆衛生研究所感染症部

Epidemic and Molecular Epidemiological Analysis of Enterovirus Infection
in Osaka Prefecture (Fiscal 2015 Report)
by Keiko NAKATA, Naomi SAKON, Takahiro YUMISASHI and Tetsuo KASE

調 査 方 法

1. 検体および情報収集

2015年4月1日から2016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163名から採取された211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36検体、呼吸器由来検体（咽頭拭い液、うがい液、鼻汁、唾液）が143検体、消化器由来検体（糞便、腸内容物）が29検体、皮膚病巣由来検体が2検体、尿検体が1検体であった。検体情報（患者の年齢、性別、診断名、体温、発症日）は、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調査票より収集した。

2. 検体処理およびウイルス遺伝子検出

咽頭拭い液は、綿棒で咽頭等の病巣を擦過後、1 ml の検体輸送用培地に浸漬したもの、うがい液、唾液、鼻汁、髄液は無処理のもの、それぞれから200 µl を採取しRNA抽出用検体とした。糞便は、緩衝液で10%懸濁液を作製し、15,000 rpm で5分間遠心分離した後、上清の200 µl をRNA抽出用検体とした。また、上清を10倍希釈したのち、0.45 µm ミニザルトシリンジフィルター（sartorius 社）でろ過したものを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。抽出したRNAを用い、エンテロウイルス VP4-2 領域に対する seminested RT-PCR⁵⁾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同定した。ムンプスウイルスについては SH 遺伝子に対する nested RT-PCR⁶⁾を実施し、エンテロウイルスと同様の方法で同定を行った。

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48ウェルプレートに播種した RDA、VeroE6、FL、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100 µl 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 が出現した場合は培養上清を回収した。なお、3代盲継代を繰り返す、CPE が出現しなかった場合は陰性と判定した。

検体から抽出した RNA に対して実施したエンテロ

ウイルス VP4-2 領域に対する seminested RT-PCR で CVA6 が陽性だったもののうち、培養細胞でのウイルス分離が陰性でかつ、哺乳マウスによる検査のために十分な検体量が残っていたものについては、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0.05 ml 接種した。1週間観察し、弛緩麻痺を呈した哺乳マウスは同定するまで-80°Cで保存した。

4. 遺伝子解析による培養上清およびマウスからのウイルス同定

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、15,000 rpm で5分間遠心し、上清から同様の方法で RNA を抽出した。

培養上清および哺乳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-PCR⁷⁾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、CVA6、CVA10 および CVA16 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36名で、年齢の中央値は5カ月（範囲：15日-15歳3ヶ月齢）、性別は男性20名（56%）、女性16名（44%）であった。手足口病と診断された患者は81名で、年齢の中央値は1歳6カ月（15日-8歳1ヶ月齢）、性別は男性53名（65%）、女性28名（35%）であった。ヘルパンギーナと診断された患者は46名で、年齢の中央値は3歳7ヶ月（6ヶ月-47歳）、性別は男性19名（42%）、女性27名（59%）であった。

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163名中、108名（66%）から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、211検体中129検体（61%）が陽性であった（表1,2,3）。細胞培養で陰性だったが、seminested RT-

PCR で CVA6 が陽性であった 30 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、21 検体からウイルスが分離された。ウイルス分離ができた 21 検体の検体種別の内訳は呼吸器由来検体が 19/28 (67.9%)、消化器由来検体が 1/1 (100%)、髄液が 1/1 (100%) 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 30% (11/36 名) からウイルスが検出されたが、エンテロウイルスは Echo16、Echo18 および CVB5 が各 1 症例ずつであった。一方でムンプスウイルスが 36.5% (4/11 名) と高い割合で検出された (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のは 33 検体中 3 検体 (0.09%) のみで、うち 2 検体はムンプスウイルス (mumps)、残りの 1 検体は Echo18 と同定された。呼吸器由来検体では 17 検体中 10 検体 (58.8%) でウイルスが検出され、呼吸器由来検体においてもムンプスウイルスの検出が高い割合であった (3/17 検体) (表 1)。

手足口病では 91% (74/81 名) の患者からウイルスが検出され、そのうち CVA6 が 57% (重複検出含む)、次いで CVA16 が 27% (重複検出含む) を占めた (図 2)。なお、手足口病では皮膚病巣 (その他) 検体からのウイルス遺伝子検出が 100% (2/2 検体)、次いで呼吸器由来検体で 92.4% (73/79 検体) と検出割合が高かった (表 2)。一方、ヘルパンギーナでは 50% (23/46 名) の患者検体からウイルスが検出され、そのうち CVA10 が 39%、CVA6 が 26% を占めた (図 3)。ヘルパンギーナ患者由来の検体は全て呼吸器由来検体で、ウイルス遺伝子検出割合は 52.2% であった (表 3)。

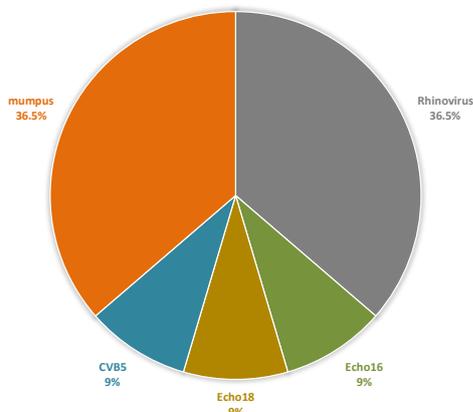


図 1. ウイルスが検出された無菌性髄膜炎患者 (n=11) におけるウイルス血清型割合

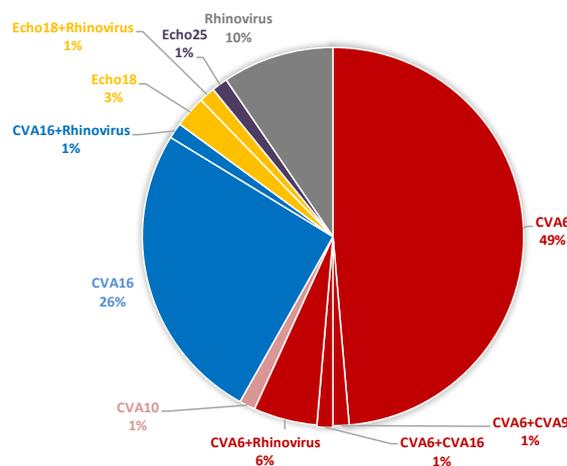


図 2. ウイルスが検出された手足口病患者 (n=74) におけるウイルス血清型割合

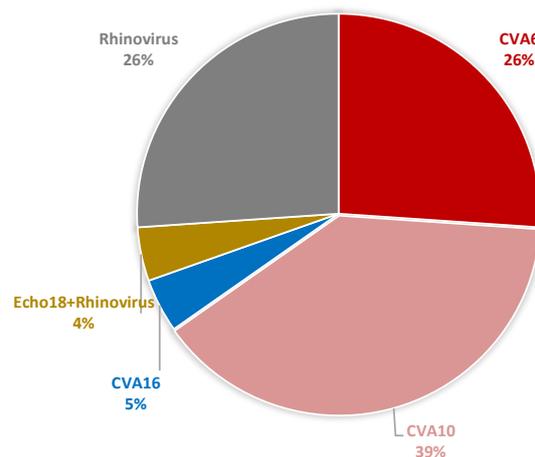


図 3. ウイルスが検出されたヘルパンギーナ患者 (n=23) におけるウイルス血清型割合

3. 疾患別月別の検出エンテロウイルス血清型

無菌性髄膜炎患者ではエンテロウイルスの検出は 7 月および 8 月であったが、ムンプスウイルスは 10 月にも検出された (図 4)。手足口病患者で最も検出割合が高かった CVA6 は 6 から 9 月に集中して検出され、次いで検出割合が高かった CVA16 は 4 から 7 月に多く検出された (図 5)。ヘルパンギーナ患者で最も多く検出された CV10 は 5 から 9 月にかけて検出された (図 6)。次いで検出割合が高かった CVA6 は、手足口病の

患者から CVA6 が検出された時期と同時期（6 から 8 月）に検出された（図 5, 6）。

4. CVA6、CVA10 および CVA16 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 CVA6、11 株、CVA10、7 株および CVA16、10 株についてそれぞれ増幅長の領域が 686bp、656bp および 663bp の系統樹解析を実施した。その結果、今シーズン検出された CVA6 のクラスター内に、2013 年にマレーシア、中国、兵庫県で検出された株が含まれており、2010 年に台湾で検出された株や大阪府の株とも近縁であった。しかし、CVA6 による手足口病が大流行した 2011 年シーズンの株とは異なるクラスターを形成した（図 7）。CVA10 では、2013 年に大阪府で検出された株とは異なるクラスターを形成した一方で、今シーズン検出された一部のウイルスが 2013 年にロシアや中国で検出された株と同じクラスターを形成した（図 8）。CVA16 では今シーズン検出された株と同じクラスターに 2005 年に富山県や山形県で検出された株や 2008 年の中国株、2014 年のタイ株が含まれていた（図 9）。

考 察

無菌性髄膜炎、手足口病およびヘルパンギーナを比較した場合、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。例年同様の傾向が認められており^{8),9),10),11)}、これは、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。

無菌性髄膜炎は流行規模が小さく¹²⁾、エンテロウイルスの検出も 3 症例からのみと非常に少なかった。一方で、ムンプスウイルスが検出された事例においては、流行性耳下腺炎の流行時期とも重なったため、流行性耳下腺炎¹²⁾の合併症として無菌性髄膜炎を発症したと考えられる。

手足口病に関しては、2014 年シーズンは通常の流行期とは異なる冬期にも CVA16 が検出されていた¹¹⁾。したがって、2015 年シーズンの 7 月頃までの CVA16 の検出は前シーズンから継続していたと考えられる。夏

期は CVA6²¹⁾が最も多く検出された。したがって、2015 年シーズンの手足口病の流行規模は、サーベイランス開始以来 2 番目に大きかったが¹²⁾、CVA16 と CVA6 の 2 種類のウイルスが流行に関与したためであると考えられる。2011 年シーズンには、これまでヘルパンギーナの主な原因ウイルスとして知られていた CVA6 による手足口病の大流行が記録された。以降、CVA6 は手足口病の主要な原因ウイルスとなった。その後、2013 年シーズン、2015 年シーズンに手足口病の大きな流行を記録したが、その全てに CVA6 が寄与していた¹⁴⁾。系統樹解析の結果、2015 年シーズンに流行した CVA6 は、2011 年シーズンに大阪府で検出された株よりも 2013 年に大阪府で検出された株に近縁であった。さらに、同年にマレーシアや中国で検出された株とも同じクラスターを形成したことから、経年的にウイルス遺伝子が増変し、アジア諸国でウイルスが循環していることが示唆された。一方、CVA16 では 2015 年シーズンに検出された株と同じクラスターに 2005 年に富山県や山形県で検出された株や 2008 年の中国株、2014 年のタイ株が含まれていた。このことにより、CVA16 は、経年によるウイルス遺伝子の変化が大きくないと考えられた。

2015 年シーズンにおいてヘルパンギーナで主な検出ウイルスであった CVA10 は、2013 年に大阪府で検出された株とは異なるクラスターを形成した。このことにより、CVA6 と同様、経年的にウイルス遺伝子が増変し、世界的にウイルスが循環している可能性が示された。

無菌性髄膜炎、手足口病およびヘルパンギーナの全ての患者からライノウイルスが検出されているが、ライノウイルスは不顕性感染が多いウイルスとして知られている¹⁵⁾。本報告で用いたウイルス遺伝子検出法ではエンテロウイルスと共通遺伝子領域を増幅させる系を用いている。そのため、検出事例として挙げているが、疾患との因果関係は明確であるとは言えない。しかし、無菌性髄膜炎およびヘルパンギーナ患者で高い割合でライノウイルスが検出されていることから、何等かの症状を起こす可能性は否定できない。

エンテロウイルスは血清型が多数存在し年毎に流行する血清型が入れ替わる。また、流行の規模も毎年変化する。近年、エンテロウイルスによる無菌性髄膜炎

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

	呼吸器由来検体 n=17		消化器由来検体 n=19		髄液 n=33		その他 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
Echo16	1	0	1	0	0	0	0	0
Echo18	2	0	1	0	1	0	0	0
CVB5	1	1	1	0	0	0	1	0
Rhinovirus	3	0	3	0	0	0	0	0
mumpus	3	1	1	0	2	0	0	0
合計(%)	10(58.8)	2(11.8)	7(36.8)	0(0)	3(0.9)	0(0)	1(100)	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 n=79		消化器由来検体 n=11		髄液 n=3		その他 n=2	
	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
CVA6	48	13	4	0	1	0	2	1
CVA9	0	1	0	0	0	0	0	0
CVA10	1	0	0	0	0	0	0	0
CVA16	20	16	2	1	0	0	0	0
Echo18	2	2	1	0	0	0	0	0
Echo25	3	0	1	0	0	0	0	0
Rhinovirus	7	0	0	0	0	0	0	0
合計(%)	73(92.4)	32(40.5)	8(72.7)	1(9.0)	1(33.3)	0(0)	2(100)	1(50)

重複検出含む

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 n=46	
	遺伝子検出	分離培養
CVA6	6	2
CVA10	9	7
CVA16	1	0
Echo18	1	0
Rhinovirus	7	0
合計(%)	24(52.2)	9(19.6)

重複検出含む

呼吸器由来検体：咽頭ぬぐい液、鼻汁、うがい液、唾液

消化器由来検体：糞便、直腸ぬぐい液

その他：皮膚病巣（水疱内容物）、尿

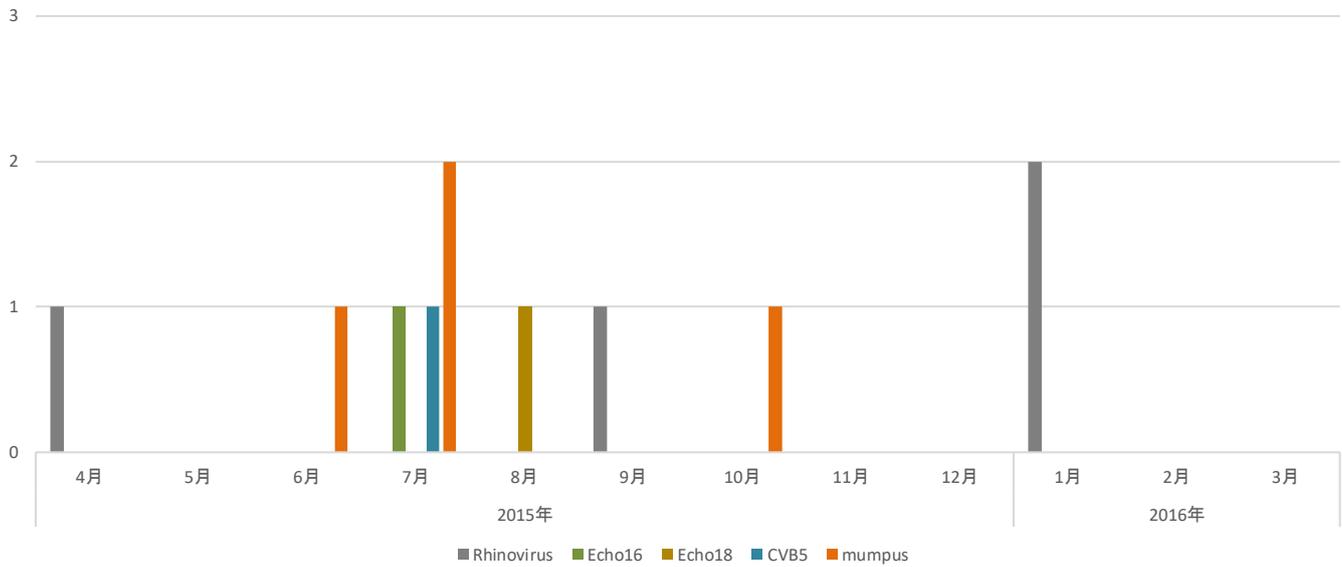


図 4. 無菌性髄膜炎患者から検出された月別検出ウイルス遺伝子型

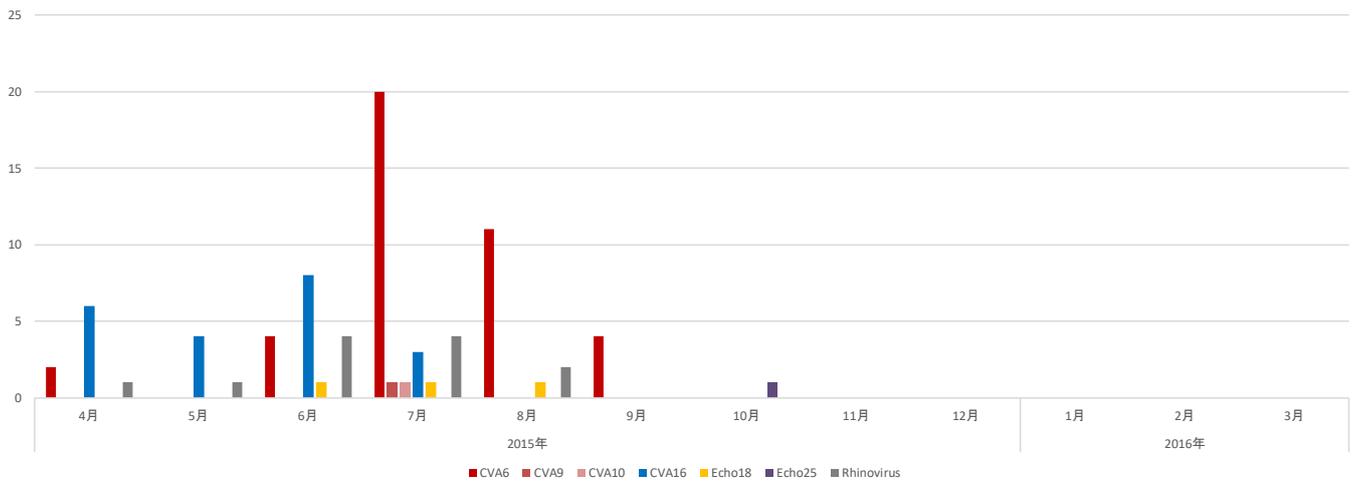


図 5. 手足口病患者から検出された月別検出ウイルス遺伝子型

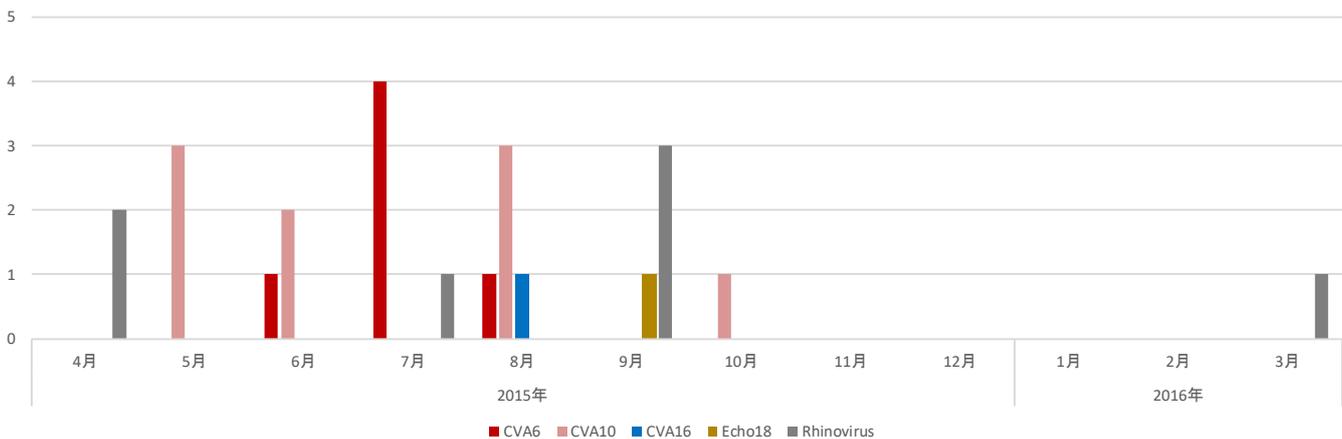


図 6. ヘルパンギーナ患者から検出された月別検出ウイルス遺伝子型

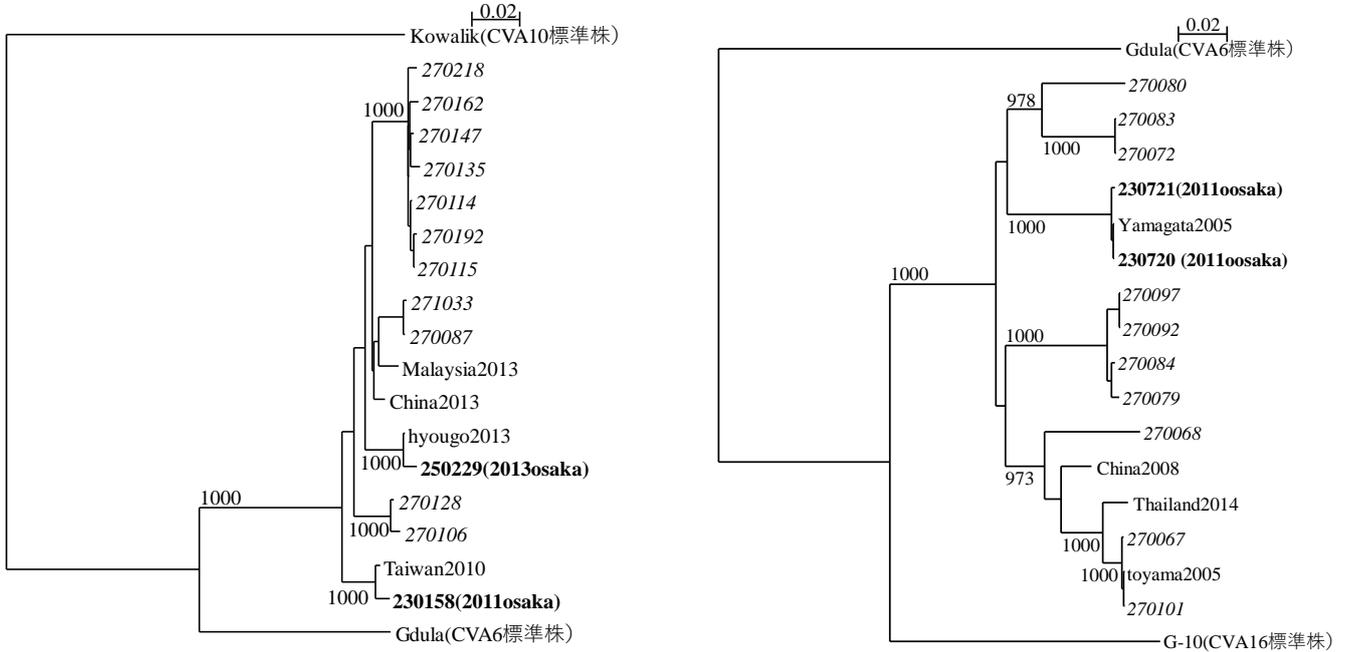


図 7. CVA6 系統樹 (VP1 領域,686bp)

太字は 2011 年 2013 年、斜体は 2015 年シーズン大阪分離株

図 8. CVA10 系統樹 (VP1 領域,656bp)

太字は 2013 年、斜体は 2015 年シーズン大阪分離株

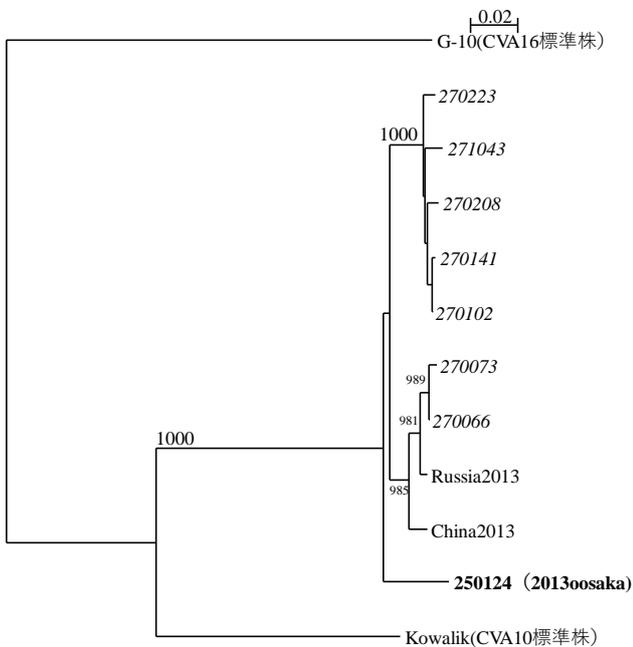


図 9. CVA16 系統樹 (VP1 領域, 663bp)

太字は 2011 年、斜体は 2015 年シーズン大阪分離株

の流行は報告されていないが、過去には Echo13、30 による大規模な流行が報告された¹⁶⁾。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 CVA16 に加えて CVA6 が流行するようになった。したがって、中枢神経系の合併症の頻度が高いとされている EV71¹⁴⁾だけではなく、皮膚症状が重症化する CVA6¹⁷⁾の今後の流行状況にも注目する必要がある。

文 献

- 1) Heinz, Z. and Hans-Peter, G. : Clinical virology manual third edition-Enteroviruses, p252-269, American society for microbiology, Wasington, D. C (2000).
- 2) 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), 337-339 (2012)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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, 283-293 (1999)
- 6) 国立感染症研究所監修, ムンプスウイルス病原体検出マニュアル
- 7) Oberste, MS., Maher, K., Kilpatrick, D. R. and 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)
- 8) 中田恵子, 左近直美, 駒野淳, 加瀬哲男 : 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), 大阪府立公衆衛生研究所所報, P7-14 (2015).
- 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 (2013 年度), 大阪府立公衆衛生研究所所報, P7-13 (2014)
- 10) 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, P7-13 (2013)
- 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 (2011 年度), 大阪府立公衆衛生研究所所報, P8-13 (2012)
- 12) 大阪府感染症発生動向調査事業報告書, 第 34 報
- 13) 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)
- 14) 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 2016-5-31)
- 15) Hasegawa, K., Linnemann, RW., Avadhanula, V., Mansbach, JM., Piedra, PA., Gern, JE and Camargo, CA, Jr. : Detection of respiratory syncytial virus and rhinovirus in healthy infants, BMC Res Notes. 8: 718 doi: 10.1186/s13104-015-1695-6 (2015)
- 16) 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 (無菌性髄膜炎由来ウイルス) : 無菌性髄膜炎患者から検出されたウイルス. 2010 ~2014 年
- 17) 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)