

[ノート]

兵庫県の手足口病患者から検出したエンテロウイルス 71 型の 分子疫学解析 (2008-2010)

榎本 美貴^{1*} 高井 伝仕¹ 藤本 嗣人² 岡藤 輝夫³
飯尾 潤⁴ 吉田 真策⁵ 近平 雅嗣¹

Genetic Analysis of Enterovirus 71(EV71) Detected from the Hand Foot and Mouth Disease Patients in Hyogo Prefecture (2008-2010)

Miki ENOMOTO^{1*}, Denshi TAKAI¹, Tsuguto FUJIMOTO²,
Teruo OKAFUJI³, Jyun IIO⁴, Shinsaku YOSHIDA⁵ and Masatsugu CHIKAHIRA¹

¹ *Infectious Disease Research Division, Public Health Science Research Center, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Consumer Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan,* ² *Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases,* ³ *Okafuji Pediatric Clinic,* ⁴ *Hyogo Prefectural Tsukaguchi Hospital and* ⁵ *Toyooka Public Hospital*

Hand, foot, and mouth disease (HFMD) caused by enterovirus is one of the common pediatric diseases. A lot of HFMD cases were reported under the epidemiological surveillance of infectious diseases of Hyogo prefecture in 2010. The cases younger than five years occupied 72.7% of the whole HFMD reported from 2008 to 2010. Thirty strains of enterovirus 71 (EV71) were detected from 1,097 patients under the infectious agents surveillance for those three years and all of the EV71 strains were detected in 2010. Fourteen of them were detected from the HFMD patients including five patients with complications of central nervous system such as aseptic meningitis and encephalitis.

According to the phylogenetic analysis of the VP4 region of the EV71 genome, the strains detected in Hyogo were similar to the C2 strain isolated in Netherlands in 2007, except for one strain which was similar to the C2-like strain isolated in Taiwan in 2008.

I はじめに

手足口病は、口腔粘膜や四肢末端に水疱性発疹が現れる発熱性疾患で、幼児を中心に夏季に流行する^{1,2)}。手足口病は主にコクサッキーウイルス A16 型 (CA16), A10

型 (CA10) やエンテロウイルス71型 (EV71) などのエンテロウイルス属が病原体となる急性ウイルス感染症である。通常、本疾病の予後は良好であるが、EV71が原因となると髄膜炎や脳症など中枢神経系の重篤な合併症を引き起こすことがある²⁾。

EV71 は 1990 年代後半にマレーシアや台湾で脳炎の流行を起こし、また 2008 年に中国で発生した大規模な手足口病流行時には小児の急性死症例が報告されている³⁾。兵庫県でも 2000 年に EV71 による脳炎等の重症例が多発した⁴⁾。

兵庫県の感染症発生動向調査では、2010年は例年に比

¹感染症部 ²国立感染症研究所感染症情報センター

³岡藤小児科医院 ⁴兵庫県立塚口病院 ⁵公立豊岡病院

*別刷請求先: 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町 2-1-29
兵庫県立健康生活科学研究所 健康科学研究センター
感染症部 榎本 美貴

べ手足口病患者が多く報告され、病原体定点医療機関で採取された同症の患者検体からは多くの EV71 が検出された。このため、2008～2010 年の手足口病患者の流行状況と、手足口病患者から検出されたエンテロウイルス属についてまとめた。さらに、2010 年に流行し、手足口病や無菌性髄膜炎等の重症例との関連性が示唆される EV71 について分子疫学的解析を行ったので、これらの結果について報告する。

II 材料と方法

1. 検査材料

2008 年 1 月から 2010 年 12 月の 3 年間に、感染症発生病動向調査の病原体定点医療機関で、咽頭結膜熱や手足口病、ヘルパンギーナ（インフルエンザは除く）等のウイルス感染を疑う患者 1,097 名から採取された咽頭ぬぐい液、鼻汁、髄液、糞便及び尿等の 1,319 検体を検査材料とした。

2. 検査方法

2.1 ウイルス分離

咽頭拭い液、鼻汁、髄液及び尿は攪拌後 3000rpm、20 分間遠心分離した。糞便は抗生物質（ペニシリン 500U/ml 及びストレプトマイシン 500 μg/ml）を含む D-MEM 培地（SIGMA）を加えた 10%乳剤を 3,000 rpm で 20 分間遠心分離した。これらの遠心分離後の上清 100 μl を A549, RD-18S, Vero-E6 または HeLa 細胞に接種し、35°C の 5% CO₂ インキュベーター中で培養した。7 日間培養後に培養細胞を 1 回凍結融解し、新しく単層培養した同一の細胞に 100 μl ずつ継代した。継代培養細胞をさらに 7 日間培養して、細胞変性効果（CPE）が観察された場合にウイルス分離陽性とした。

ウイルス分離陽性となった培養液は、エンテロウイルスプール抗血清（デンカ生研）、国立感染症研究所分与のエコーウイルス中和用プール抗血清及び CA16, EV71, CA10 の単抗血清を用いた中和試験によって血清型を同定した。

2.2 遺伝子検査

10%糞便乳剤、尿、咽頭拭い液、鼻汁あるいは髄液 140 μl から RNA を抽出（E.Z.N.A. RNA Isolation and Purification Kit, Omega Bio-tek）し、逆転写酵素（Prime-Script Reverse Transcriptase, TaKaRa）で cDNA を合成した。エンテロウイルスの 5'非翻訳領域～VP2 領域の約 650bp を、プライマー P-2, E31 及び E33⁵⁾ で 1st-PCR, 次いでプライマー EVP4 及び OL68-1⁶⁾ で

nested-PCR を行った。1st 及び nested-PCR 共に 94°C -15 秒, 58°C-30 秒, 72°C-45 秒の反応サイクルを 40 回繰り返した。

PCR 産物を GelRed (Biotium)を含む 1.5%アガロースゲルで電気泳動し、紫外線照射下で目的サイズの DNA を確認した。増幅 DNA を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) で精製した後、ダイレクトシーケンシング法 (Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing kit, Applied Biosystems)で塩基配列を決定した。

得られた塩基配列は DDBJ データベース上の、BLAST による相同性検索で型を同定した。また、得られた VP4 全領域 (207bp) の配列について、遺伝子解析ソフトウェア (MEGA5) を用いて近隣結合法で系統樹解析を行った。

III 結果および考察

1. 感染症発生病動向調査による手足口病患者の推移

2008 年～2010 年の兵庫県および全国の定点あたりの手足口病患者数の推移を Fig.1 に示した。兵庫県の手足口病患者は、2008 年は第 15 週、2009 年は第 24 週、そして 2010 年は第 6 週から増加した。2010 年は例年より患者数の増加は 9～18 週早く始まり、全国的にも同じ傾向が見られた。患者数のピークは、2008 年、2009 年及び 2010 年はそれぞれ第 29 週、第 32 週及び第 27 週であった。兵庫県の手足口病患者数は、過去 3 年で 2010 年が最も多く、ピーク時の報告数も 7.2 人と全国平均 (3.9 人) より多かった。

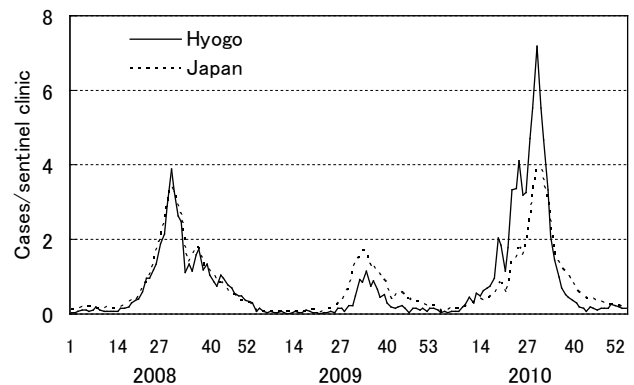


Fig.1 Weekly cases of hand, foot and mouth disease (2008-2010)

2. 手足口病患者の年齢分布

2008～2010 年に兵庫県で報告された手足口病患者の年齢分布を Fig.2 に示した。手足口病の患者報告数は 1 歳～2 歳が多く、3 歳以上では年齢と共に減少した。特に 2009 年は 1 歳児が全体の 29.8%を占め、2008 年の

19.9%, 2010年の17.6%より高かった。これは2009年の手足口病は流行が小規模で、患者の絶対数が少なく、1歳児に比べ感受性の低い3歳児以上に感染が拡大しなかったためと考えられる。2008~2010年の0~4歳の患者報告数の合計は、全報告数の72.7%を占めていた。

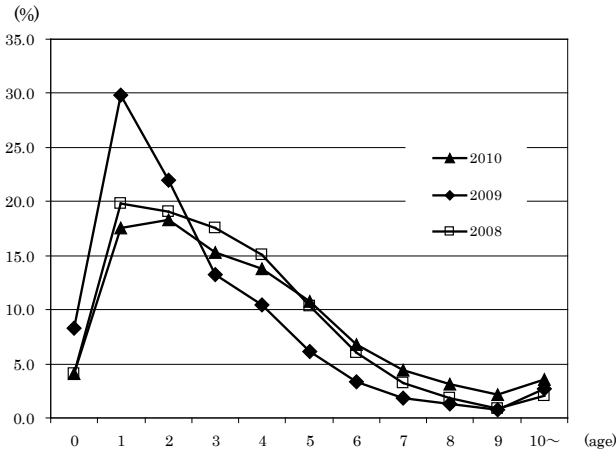


Fig.2 Age distribution of cases with hand, foot and mouth disease in Hyogo prefecture (2008-2010)

3. 手足口病患者からのエンテロウイルス検出

Table 1 に感染症発生動向調査において採取された手足口病患者から採取された検体からのエンテロウイルス属の検出結果を示した。2008年は20名の手足口病患者のうち15名からCA16が検出され、2009年は3名中2名からCA6が検出された。2010年は23名中20名からエンテロウイルス属が検出され、その内訳はEV71が14名(70.0%), CA4が1名(5.0%), CA6が3名(15.0%), CB1が2名(10.0%)であった。兵庫県では2008年の手足口病の主要病原体はCA16、2010年はEV71で、全国的にも同様の状況が報告されている⁷⁾。2009年の兵庫県は検体数が少なく検出ウイルスはCA6だけであったが、全国ではCA6(26.1%), EV71(23.3%)及びCA16(13.9%)が検出され、複数のウイルスが手足口病の原因となっていたと考えられる⁷⁾。

Table 1 Detection of enteroviruses from hand, foot and mouth disease patients

Year	Number of patients	Detected enteroviruses	Serotype of enterovirus				
			EV71 ^{*1}	CA16 ^{*2}	CA4 ^{*2}	CA6 ^{*2}	CB1 ^{*3}
2008	20	15	0	15	0	0	0
2009	3	2	0	0	0	2	0
2010	23	20	14	0	1	3	2

*1 EV71 : enterovirus 71

*2 CA : coxsackie A virus

*3 CB : coxsackie B virus

4. EV71の検出状況と遺伝子解析

Table 2 に2010年に兵庫県感染症発生動向調査に基づいて実施した病原体サーベイランスでの501名の臨床診断名とEV71検出状況を示した。EV71は、PCR検査により30名の患者から検出された。EV71を検出した患者の診断名は手足口病が14名(46.7%)と最も多く、次いで、呼吸器感染、胃腸炎、無菌性髄膜炎、熱性けいれん、咽頭結膜熱の順であった。EV71が検出された手足口病患者14名中5名は、無菌性髄膜炎や脳症、意識障害など中枢神経系の合併症を伴っており、EV71の中枢神経症状への関与が示唆された。

Table 2 Number of detection of enterovirus 71 by clinical diagnosis (2010)

Clinical diagnosis	Patients	EV71*-positive
Hand, foot and mouth disease	23	14 (46.7%)
Respiratory infection	273	5 (16.7%)
Gastroenteritis	27	3 (10.0%)
Aseptic meningitis	13	2 (6.7%)
Febrile convulsion	30	2 (6.7%)
Pharyngoconjunctival fever	27	1 (3.3%)
Herpangina	10	0 (0%)
Exanthema	19	0 (0%)
Mumps	2	0 (0%)
Others	77	3 (10.0%)
Total	501	30

* EV71 : enterovirus 71

PCR検査でEV71が検出された30名分の検体のうち、8名分から細胞培養でもEV71が分離された。PCR検査が陰性で細胞培養で分離された検体はなかった。

塩基配列を決定した27株のEV71について相同性検索を行った結果、2010年2月採取の1株は2008年に台湾で検出された株(07776-Taiwan-2008, HM622392)と98.4%一致した。また、4~8月採取の26株は2007年にオランダで検出された株(2485-Netherlands-2007, AB575941)と97.1~98.4%の相同性を有していた。

今回検出した27株とGenBankに登録されているEV71標準株および分離株⁸⁾のVP4領域(207bp)の塩基配列について系統樹解析を行った(Fig.3)。その結果、オランダ株と近縁の26株は遺伝子型C2に分類され、台湾株と近縁の4929-Hyogo-10はC2とは異なるクラスターとなった。

エンテロウイルス属の遺伝子構造はVP4, VP2, VP3とVP1領域を含む構造カプシド蛋白をコードするP1と、非構造蛋白をコードするP2とP3の3つの領域に分けられる。2月採取の検体から検出された4929-Hyogo-10株と相同性が高い台湾株は、P1領域の解析ではC2-likeに分類されているが、P3領域はB3と相同性が高いため、この株はC2とB3クラスター間での遺伝子組換えが生

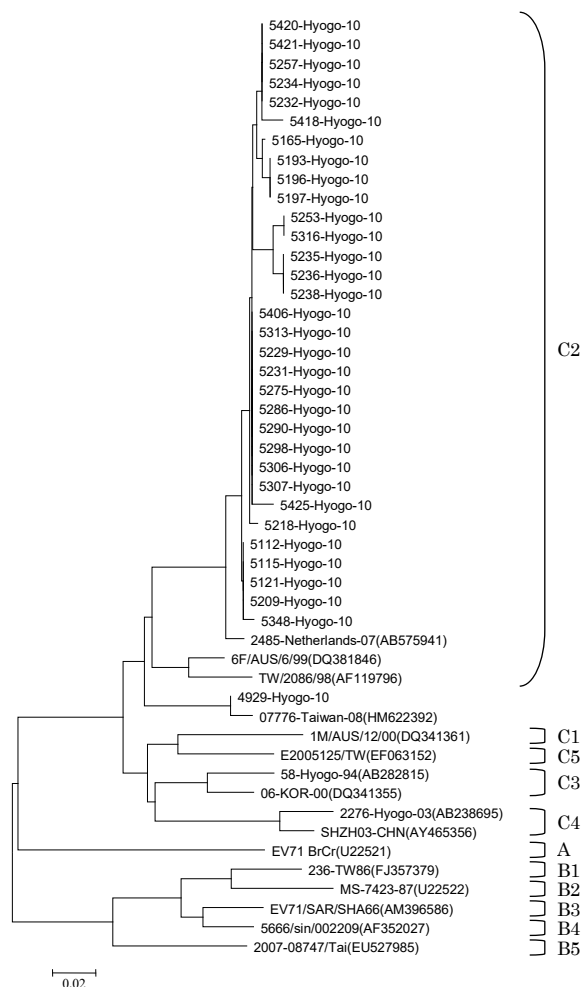


Fig.3 Phylogenetic tree of VP4 region of enterovirus 71 strains

じた可能性が論じられている⁸⁾。EV71は通常VP4あるいはVP1領域の解析によって遺伝子型別されるため⁹⁾、これに従って型別した当所の株は遺伝子型C2もしくはC2-likeに分類された。しかし、今回はP3領域について解析をしていないため、台湾株と同様に組換えを起こしているか明らかでない。EV71を詳細に分析するには、P3など解析領域を拡大する必要がある。

台湾株と相同性が高かった4929-Hyogo-10株を検出した手足口病患者に中枢神経系の合併症は見られなかった。また、オランダ株と近縁の株が検出された手足口病患者の中には、髄膜炎や意識障害を伴う症状を伴う患者も含まれていたが、遺伝子型とこれらの症状について関連性は見られなかった。

2010年の手足口病の患者報告数は2月ごろから増加し、病原体定点から手足口病を疑う患者検体が搬入されるようになった。感染症発生動向調査で患者数が多かった6～8月に採取された検体からは、CA4が検出された1検体を除いて、すべてEV71が検出された。2010年の手足口病はEV71が原因ウイルスとなって流行したと考

えられるが、10月になると同患者3名全員からCA6が検出されており、EV71による手足口病は秋期には終息したと思われる。

EV71は3～4年周期^{7,10)}で流行する傾向が認められており、今後も継続して病原体サーベイランスの病原体検索を行い、脳炎や髄膜炎など中枢神経系の合併症によって重症化傾向を示すEV71の動向に注意する必要がある。

IV 要旨

感染症発生動向調査において2010年の手足口病患者数は、兵庫県では過去3年で最も多かった。手足口病の患者数は4歳以下が7割以上を占めていた。2008～2010年の病原体サーベイランスで検体を採取された患者1,097名のうち30名(2.7%)からエンテロウイルス71(EV71)が検出されたが、同ウイルスが検出されたのは2010年のみであった。2010年にEV71を検出した手足口病患者14名中5名(36%)は脳炎や髄膜炎など中枢神経系の合併症を伴っていた。EV71のVP4領域の系統樹解析では、27株中26株は、遺伝子型C2のオランダの2007年分離株と相同性が高く、他の1株は遺伝子型C2-likeの台湾の2008年分離株と相同性が高かった。

謝辞

感染症発生動向調査にご協力いただいた兵庫県健康福祉部健康局疾病対策課、検体採取にご協力いただいた関係機関の皆様方に深謝いたします。

文献

- 1) 清水博之, 米山徹夫, 吉田弘, 山下照夫: 手足口病。病原体検査マニュアル(国立感染症研究所), 1-22(2003)
- 2) 国立感染症研究所: 手足口病 2000～2003. 病原体微生物検出情報(月報), 25(9), 224-225(2004)
- 3) 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. 病原体微生物検出情報(月報), 30(1), 9-10(2009)
- 4) Fujimoto, T., Chikahira, M., Yoshida, S., Ebara, H., Hasegawa, A., Totsuka, A. and Nishio, O.: Outbreak of central nervous system disease associated with hand, foot, and mouth disease in Japan during the summer of 2000: detection and molecular epidemiology of enterovirus 71. Microbiol Immunol, 46, 621-629(2002)

- 5) 篠原美千代, 内田和江, 島田慎一, 後藤惇: コクサッキーウイルス A16 型及びエンテロウイルス 71 型の検査法の検討. 感染症学雑誌, **73** (8), 749-757 (1999)
- 6) 石古博昭, 島田康司, 與那覇麻里: 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, **27**, 283-293 (1999)
- 7) 国立感染症研究所感染症情報センター: 手足口病患者から分離・検出されたウイルス 2007 年～2011 年. 病原体微生物検出情報 (IASR), <https://hasseidoko.mhlw.go.jp/Byogentai/Pdf/data/37j.pdf>
- 8) Huang, YP., Lin, TL., Hsu, LC., Chen, YJ., Tseng, YH., Hsu, CC., Fan, WB., Yang, JY., Chang, FY. and Wu, HS. : Genetic diversity and C2-like subgenogroup strains of enterovirus 71, Taiwan, 2008. *Virology Journal*, **7**: 277 (2010)
- 9) Cardoso, MJ., Pereta, D., Brown, BA., Cheon, D., Chan, HM., Chan, KP., Cho, H. and McMinn, P. : Molecular epidemiology of human enterovirus 71 strains and recent outbreaks in the Asia-Pacific region: comparative analysis of the VP1 and VP4 genes. *Emerg Infect Dis.*, **9**, 461-468 (2003)
- 10) 国立感染症研究所感染症情報センター: 手足口病患者から分離・検出されたウイルス 1997～2002 年, 2003～2007 年. 病原体微生物検出情報 (IASR), <http://idsc.nih.go.jp/iasr/prompt/circle-g/hfm/hfm9702j.html>, <http://idsc.nih.go.jp/iasr/prompt/circle-g/hfm/hfm0307j.html>