

[ノート]

兵庫県の感染症発生動向調査において検出されたエンテロウイルス (2008～2012年)

榎本 美貴^{1*} 高井 伝仕¹ 押部 智宏¹
藤本 嗣人² 近平 雅嗣¹ 吉田 昌史¹

Detection of Enteroviruses in Hyogo Prefecture during the 5-year Period between 2008 and 2012

Miki ENOMOTO^{1*}, Denshi TAKAI¹, Tomohiro OSHIBE¹,
Tsuguto FUJIMOTO², Masatsugu CHIKAHIRA¹ and Masashi YOSHIDA¹

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*

Enteroviruses were detected from 431 of 3,028 cases under the infectious agents surveillance for 5 years from 2008 to 2012. Detected enteroviruses were classified into 25 different serotypes. Children under 3 years old occupied 65.5% of enterovirus positive cases.

Coxsackie A virus (CA) 16, CA10, enterovirus (EV) 71, CA6 and CA9 were among the most common serotypes in 2008, 2009, 2010, 2011 and 2012, respectively. CA16, EV71 and CA6 were primary etiologic agents of hand, foot and mouth disease (HFMD). CA6 caused the largest HFMD epidemic since the start of infectious disease surveillance in Japan. HFMD caused by CA6 in 2011 were characterized by a fused large rash spreading to leg and breech and dropout of the nails after recovery. According to the phylogenetic analysis of the VP1 region of CA6, our detected strains in 2009～2011 were similar to that detected in Finland in 2008 from HFMD patients with the same symptom. It was assumed, therefore, that the CA6 strain had probably been imported from abroad by 2009.

While HFMD was mainly caused by a single serotype of virus at every enteroviral epidemic season, the herpangina and aseptic meningitis tended to be caused by plural serotypes of enteroviruses.

I はじめに

エンテロウイルス属はピコルナウイルス科に属するウイルスで、夏季における乳幼児のウイルス感染症の主要

な病原体である。不顕性感染が多いが、発症した時には極めて多彩な臨床症状を示す。多くは発熱や上気道炎を主症状とするいわゆる「夏かぜ」や発疹症で、通常は予後良好であるが、まれに脳炎や心筋炎など重篤な症状を引き起こすことがある¹⁾。

エンテロウイルス属には60を超える血清型があり、これらは分子系統解析に基づいてA～D群の4種に分類される²⁾。A群はコクサッキーウイルスA群(CA)2～8, 10, 12, 14, 16, エンテロウイルス(EV)71, B群はエコー

¹感染症部 ²国立感染症研究所

*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

ウイルス(Echo)1~7, 9, 11~21, 24~27, 29~33, コクサッキーウイルスB群(CB)1~6, CA9, EV69, C群はCA1, 11, 13, 15, 17~22, 24, ポリオウイルス1~3, D群はEV68及び70で構成されている。

感染症発生動向調査事業では、エンテロウイルスは手足口病、ヘルパンギーナや無菌性髄膜炎などの患者から検出と型同定が行われ、全国レベルでその動向が調査されている。小児のエンテロウイルス感染症の代表的な疾患である手足口病の病原ウイルスはCA16, EV71などであるが³⁾、特にEV71は髄膜炎や脳炎など中枢神経系の重篤な合併症を引き起こすことが報告されている⁴⁾。ヘルパンギーナの主要な病原ウイルスはコクサッキーウイルスA群である⁵⁾。無菌性髄膜炎は様々な病原体が原因となるが、全体の約85%はエンテロウイルス属によるもので、その中でもエコーウイルスとコクサッキーウイルスB群によることが多いとされる⁶⁾。このようにエンテロウイルスは同じ疾患でも病因となる血清型は複数あり、型により重症化する症例もあることから、流行状況の把握が重要になっている。

本論文では①当所における2008年から2012年までの5年間の感染症発生動向調査におけるエンテロウイルス属の型別検出状況、②手足口病、ヘルパンギーナ及び無菌性髄膜炎から検出されたウイルス型の推移、③5年間で検出数が最も多かったCA6の系統樹解析について報告する。

II 材料と方法

1. 検査材料

2008年1月~2012年12月に感染症発生動向調査の病原体定点医療機関の小児科で3,028名の患者（インフルエンザ患者は除く）から採取された咽頭ぬぐい液や鼻汁等の呼吸器検体、髄液、糞便、尿、血漿等3,810検体を検査材料とした（Table 1）。

2. 検査方法

2.1 エンテロウイルス遺伝子の検出と型同定

呼吸器検体は患者の咽頭や鼻腔等を拭った綿棒をゲンタマイシン(50 µg/ml)を含む Veal Infusion Broth に浸して綿棒を除いた抽出液を用いた。糞便は同様の Veal Infusion Broth で作製した10%乳剤の遠心上清を用いた。髄液、尿及び血漿は無処理で検査に用いた。

検体 140 µl から E.Z.N.A. Viral RNA Kit (Omega Bio-tek) で抽出した RNA を逆転写酵素(Prime-Script Reverse Transcriptase, TaKaRa)で cDNA に転換した。エンテロウイルス遺伝子の検出は5'非翻訳領域~VP2領域(約 650bp)に対する nested PCR で行った。1stPCR にプライマー-E2, E31, E33 を⁷⁾、nested PCR にプライマー-EVP4, OL68-1 を用い⁸⁾、増幅は 1st, nested 共に 94°C - 15 秒, 58°C - 30 秒, 72°C - 45 秒の反応を 40 サイクル行った。PCR 産物は GelRed (Biotium) を添加した 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、Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) によるダイレクトシーケンシング反応によって、塩基配列を決定し、DDBJ データベース上の BLAST による相同性検索でウイルス型を同定した。

2.2 ウイルス分離

呼吸器検体、髄液、10%糞便乳剤及びその他検体(尿、血漿等)を攪拌後、3,000rpm で 20 分間遠心した。上清 100 µl を HeLa, RD-18S, Vero-E6 または A549 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凍結融解し、新しく単層培養した同一細胞に 100 µl ずつ接種して、7 日間培養後に細胞変性効果(CPE)が観察された検体をウイルス分離陽性とした。

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)と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を用いた中和試験によって血清型を同定した。

Table 1 Number of cases and clinical specimens from 2008 to 2012 in Hyogo Pref.

	2008	2009	2010	2011	2012	Total
Cases	270	360	547	933	918	3028
male	175	189	296	526	524	1710
female	95	171	251	407	394	1318
Clinical specimens	313	439	677	1189	1192	3810
Nasopharygeal swabs	207	317	507	844	816	2691
Cerebrospinal fluid	48	68	71	94	105	386
Feces	48	35	87	214	245	629
Others(urine, plasma, blister)	10	19	12	37	26	104

2.3 マウスによる CA6 の分離と系統樹解析

上記の 5'非翻訳領域から VP2 領域の PCR とシーケンス反応により CA6 陽性となった検体を哺乳マウスの皮下に接種し 1 週間観察した。麻痺が出現した哺乳マウスから後頭部、内臓、皮膚及び四肢を取り除いた胴体に PBS(-)を加え、Beads shocker で 3,000rpm、5 秒間粉碎した。この乳剤を 10,000rpm、20 分間の遠心上清から抽出したウイルスの VP1 領域に対する CODEHOP PCR⁹⁾を実施した。得られた PCR 産物の塩基配列を決定し、系統樹解析を行った。解析は GenBank に登録されている標準株と分離株のデータと合わせて、解析ソフト MEGA5 を用いて近隣結合法により行った。

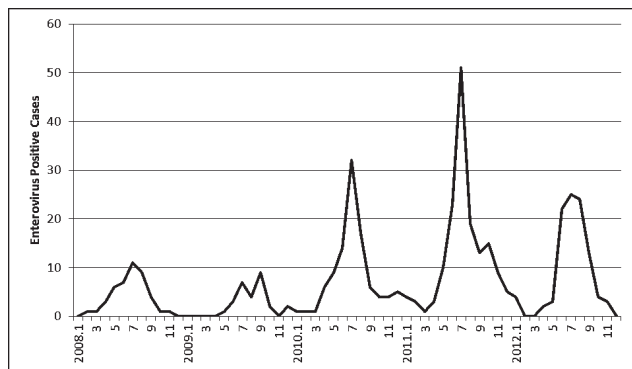


Fig. 1 Monthly enterovirus detected cases from 2008 to 2012 in Hyogo Pref.

Table 2 Enterovirus serotypes from 2008 to 2012 in Hyogo Pref.

Serotype ^{a)}	2008	2009	2010	2011	2012	Total
CA2	3	0	6	0	5	14
CA4	7	0	15	0	17	39
CA5	0	0	3	0	0	3
CA6	0	8	4	79	0	91
CA9	0	2	0	0	23	25
CA10	1	11	0	17	3	32
CA12	0	0	1	0	13	14
CA16	16	0	0	19	2	37
CB1	0	2	13	3	0	18
CB2	0	0	0	3	0	3
CB3	0	0	1	0	1	2
CB4	2	0	0	18	0	20
CB5	3	0	0	2	3	8
Echo3	0	0	0	1	1	2
Echo6	2	0	3	2	3	10
Echo7	0	0	0	3	13	16
Echo9	0	0	0	0	9	9
Echo18	0	0	0	0	3	3
Echo25	0	0	3	0	1	4
Echo30	1	0	0	0	0	1
EV68	0	2	13	0	0	15
EV71	0	0	31	1	0	32
Polio1	0	1	1	4	0	6
Polio2	1	1	2	2	2	8
Polio3	0	1	6	2	1	10
Enterovirus NT	9	0	0	0	0	9
Total	45	28	102	156	100	431

a) Abbreviations CA : Coxsackievirus A, CB : Coxsackievirus B, NT : not typed

III 結果および考察

1. エンテロウイルス検出状況

5年間に 3,028 名中 431 名の患者 474 検体からエンテロウイルスを検出した。患者は 1 歳児が最も多く 19.2%、次いで 0 歳が 18.7%、2 歳が 15.7%、3 歳が 11.9%、4～6 歳は 23.0%、7～10 歳は 6.6%、10 歳以上は 4.9%で、0～3 歳の乳幼児が全体の 65.5%を占めていた。

エンテロウイルスが検出された患者数を検体の採取月別に Fig. 1 に示した。検出は同ウイルス流行期の夏季に集中しており、陽性患者の 73%は 6～9 月に検体が採取されていた。2011 年は秋以降も流行が続き、10 月の患者数は 9 月よりも多かった。この時検出されたウイルスは 9 月までは CA6 や CB4 が多かったが、10 月は CA10 が主体となり、流行ウイルスの遷移が認められた。

検出ウイルスの型別患者数を Table. 2 に示した。5年間に 25 種類の型のエンテロウイルスが検出された。最も検出数の多かった型は CA6 で、次いで CA4, CA16, EV71 の順であった。年別の主要な検出ウイルスは、2008 年は CA16, 2009 年は CA10, 2010 年は EV71, 2011 年は CA6, 2012 年は CA9 と毎年入れ替わっていた。2008 年の CA16, 2010 年の EV71 及び 2011 年の CA6 は手足口病患者から、2009 年の CA10 はヘルパンギーナ患者から、2012 年の CA9 はウイルス性発疹症患者から主に検出された。CA9 の検出は 2008～2011 年の 4 年間では 2009 年の 2 名のみであったが、2012 年は 23 名へと増加した。その検出地域は様々で県下全域への分布が考えられた。

Echo7 も CA9 と同様に、2011 年 8 月までは全く検出されなかったが、同年 9 月に 3 名から、2012 年は 5～11 月に 13 名から検出された。Echo7 は全国的にも 2011 年の 9 月ごろより検出数が増加している¹⁰⁾。症状は上気道炎等軽症の患者が多かったが、中には無菌性髄膜炎患者も含まれており、その流行に注意する必要がある。

ポリオウイルスは毎年分離されたが、すべてワクチン株であった。これらは不活化ワクチンの導入に伴って検出されなくなることが予想されるが、野生ポリオウイルスの根絶を証明するためにも、引き続きウイルス分離による監視を続けていくことが必要である。

2. 手足口病、ヘルパンギーナおよび無菌性髄膜炎患者からのエンテロウイルス検出状況

2008～2012 年の 5 年間に手足口病患者 112 名、ヘルパンギーナ患者 68 名、無菌性髄膜炎患者 37 名からエンテロウイルスが検出された (Table 3)。

手足口病患者からは主に CA6 (47 名)、CA16 (30 名)

Table 3 Enterovirus serotypes detected from hand, foot and mouth disease, herpangina and aseptic meningitis by clinical specimens from 2008 to 2012 in Hyogo Pref.

Serotype ^{a)}	Hand, foot and mouth disease					Herpangina					Aseptic meningitis				
	Naso-pharyngeal swabs	Cerebro-spinal fluid	Feces	Others ^{b)}	Total	Naso-pharyngeal swabs	Cerebro-spinal fluid	Feces	Others ^{b)}	Total	Naso-pharyngeal swabs	Cerebro-spinal fluid	Feces	Others ^{b)}	Total
CA2						7				7			1		1
CA4	1				1	12				12					
CA5						2				2					
CA6	38		6	3	47	18		2		20	1				1
CA9											1				1
CA10	6				6	15				15					
CA12	1				1	5				5					
CA16	27		1	2	30										
CB1	2				2	1				1					
CB2											1				1
CB4	3				3	3				3	1		1		2
CB5						1				1	3	5	3		11
Echo6											3	4	3		10
Echo7						1		1		2	2	1	1		4
Echo9											1				1
Echo25											1				1
Echo30													1		1
EV71	14	1	5	2	22						1		2		3
Total	92	1	12	7	112	65	0	3	0	68	13	12	12	0	37

a) Abbreviations are shown in the footnote of Table 2.
b) Others: urine, plasma, blister

Table 4 Enterovirus serotypes detected from hand, foot and mouth disease

	2008	2009	2010	2011	2012	Total
CA4	0	0	1	0	0	1
CA6	0	2	3	42	0	47
CA10	0	0	0	5	1	6
CA12	0	0	0	0	1	1
CA16	16	0	0	13	1	30
CB1	0	0	2	0	0	2
CB4	0	0	0	3	0	3
EV71	0	0	20	2	0	22
Total	16	2	26	65	3	112

及び EV71 (22 名) が検出され、呼吸器系検体が陽性検体の 82.1% を占めた。CA6 と CA16 は水疱や発疹からも検出された。手足口病患者から検出したエンテロウイルスの型の年次推移を Table 4 に示した。2008 年と 2010 年の手足口病の原因ウイルスは、それぞれ CA16 と EV71 だった。EV71 は周期的に流行を繰り返しており¹¹⁾、今後の流行に注意する必要がある。2009 年と 2012 年は手足口病の患者数が少なくエンテロウイルスの検出数も少なかったが、2011 年は定点観測開始以降最大規模の手足口病の流行となり¹²⁾、その病原体は CA6 であった。この時の CA6 による手足口病の臨床像は例年と異なり、従来より大きい水疱が臀部や大腿部など広範囲に及び、回復後に爪甲脱落症を続発するのが特徴的で¹²⁾、当所でもこのような症例が確認された。CA6 の検出数は 2011 年の 5 月から増え始め、7 月にピークに達した。8 月以降は検出されるウイルスが入れ替わり、8~11 月は CA16、10 月~2012 年 1 月は CA10 となり、CA6 は 9 月以降検出されなくなった。

Table 5 Enterovirus serotypes detected from herpangina

	2008	2009	2010	2011	2012	Total
CA2	2	0	1	0	4	7
CA4	5	0	1	0	6	12
CA5	0	0	2	0	0	2
CA6	0	4	0	16	0	20
CA10	1	7	0	6	1	15
CA12	0	0	1	0	4	5
CB1	0	0	1	0	0	1
CB4	0	0	0	3	0	3
CB5	0	0	0	0	1	1
Echo7	0	0	0	0	2	2
Total	8	11	6	25	18	68

ヘルパンギーナ患者から検出されたウイルスは CA6 (20 名)、CA10 (15 名)、CA4 (12 名) の順に多く、コクサッキーウイルス A 群が全体の 90.0% を占めており、大部分が呼吸器検体からの検出であった (Table 3)。ヘルパンギーナからのエンテロウイルスの年別検出状況を Table 5 に示した。2011 年はヘルパンギーナの主要病原体は CA6 であったが、それ以外の年では特定の型に限定されることなく、複数の型のウイルスが検出された。CA2 と CA4 は 2008 年、2010 年、2012 年に、CA6 は 2009 年と 2011 年に検出されており、隔年で病原体が入れ替わる傾向が見られた。

無菌性髄膜炎患者からは CB5 (11 名)、Echo6 (10 名)、Echo7 (4 名) の順に多く検出され、呼吸器検体、髄液及び便からのエンテロウイルスの検出数はほぼ同数であった (Table 3)。無菌性髄膜炎患者から検出されたエンテロウイルスの年別検出状況を Table 6 に示した。無菌性髄膜炎からもヘルパンギーナと同様に複数の型が検出さ

Table 6 Enterovirus serotypes detected from aseptic meningitis

	2008	2009	2010	2011	2012	Total
CA2	0	0	1	0	0	1
CA6	0	0	0	1	0	1
CA9	0	0	0	0	1	1
CB2	0	0	0	1	0	1
CB4	2	0	0	0	0	2
CB5	4	0	0	6	1	11
Echo6	2	0	3	1	4	10
Echo7	0	0	0	0	4	4
Echo9	0	0	0	0	1	1
Echo25	0	0	1	0	0	1
Echo30	1	0	0	0	0	1
EV71	0	0	3	0	0	3
Total	9	0	8	9	11	37

れた。Echo30は今回の調査では2008年に1名から検出されたのみであったが、1983年、1989～1991年、1997～1998年に全国的な大流行を起こし¹³⁾、兵庫県でも1997～1998年に成人を含む81名から同ウイルスが検出された¹⁴⁾。その流行周期から2005～2006年に再流行する可能性が高いとの予測がたてられたが、2005～2006年の兵庫県の感染症発生動向調査では検出されず、2012年まで流行は見られなかった。EV71は2010年に3名の無菌性髄膜炎患者から検出された。EV71による手足口病が流行した時は無菌性髄膜炎や脳炎等中枢神経合併症の頻度が高くなることが報告されており²⁾、今後も流行状況のモニタリングが重要である。

3. CA6の遺伝子解析

CA6は当所で通常用いているA549細胞やRD-18S細胞では分離できず、哺乳マウスで分離された。

2009～2011年に検出されたCA6のVP1領域の系統樹解析の結果をFig. 2に示した。2009～2011年に検出されたCA6は2つのクラスターに分類された。2009年に検出された3株と2010年、2011年に検出されたすべての株は、2008年にフィンランドで検出された株FIN08/So244(GU248469)と96～98%の高い相同性を示した。FIN08/So244(GU248469)は2008年にフィンランドで流行した手足口病患者から検出され、回復後に爪が脱落するなど2011年に日本で流行した手足口病と同様の症状が報告されている¹⁵⁾。もう一方のクラスターに分類された2009年の株は、1999年に兵庫県で検出された株1278/CA6/Hyogo/1999(AB114111)と93%の相同性を示した。

2009年にFIN08/So244(GU248469)に近縁の株が検出されていたことから、特徴的な症状を引き起こすCA6は2009年には海外から県内に侵入していた可能性が示唆された。今回の解析はVP1領域について行ったが、このような臨床像について検討するには解析領域をさら

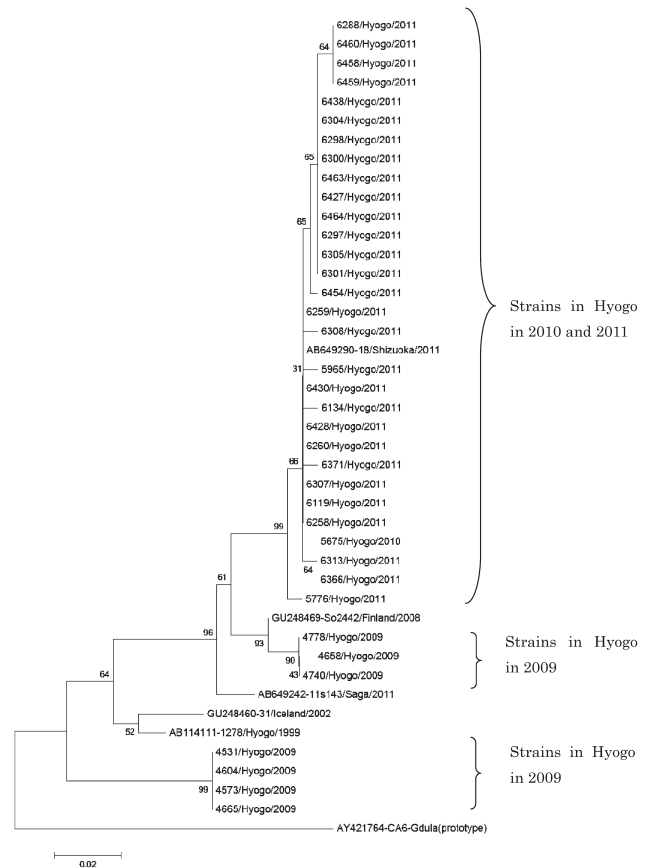


Fig. 2 Phylogenetic tree based on the VP1 region of Coxsackievirus A6

に拡大する必要がある。

エンテロウイルスには多数の血清型が存在し引き起こされる症状も様々である。今後もデータを集積していくことで流行の端緒や周期性を把握することが可能になると思われる。

IV 要旨

2008年～2012年の感染症発生動向調査で検体を採取された3028名の患者のうち431名から25種類の型のエンテロウイルスを検出し、0～3歳が陽性患者の65.5%を占めた。

2008年はCA16、2009年はCA10、2010年はEV71、2011年はCA6、2012年はCA9が最も多く検出され、CA16、EV71及びCA6はその年の手足口病の主要病原体となっていた。2011年のCA6による手足口病の流行は定点観測を始めてから最大規模となり、広範囲に出現する水疱や罹患後の爪甲脱落症など特徴的な臨床像を示した。CA6のVP1領域の系統樹解析では、2009～2011年に兵庫県で検出されたCA6は、2008年にフィンランドで検出され同様の症状を引き起こした株に近縁であったことから、このCA6株は2009年には海外から県内に

侵入していた可能性が示唆された。手足口病の原因となるウイルスは流行年により異なるもののほぼ単一であったが、ヘルパンギーナと無菌性髄膜炎からは複数の型が検出されることが多く、複数のウイルスが同時期に関与する傾向が認められた。

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) 多屋馨子, 早川丘芳, 北本理恵, 逸見佳美, 新井智, 大山卓昭, 岡部信彦, 岩崎琢也: 本邦におけるエンテロウイルス感染症の疫学, 重症化例の発生動向調査. IASR 病原体微生物検出情報(月報), 25(9), 226-227 (2004)
- 2) Oberste, MS., Maher, K., Kilpatrick, DR. 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 (1999)
- 3) 国立感染症研究所 : 注目すべき感染症「手足口病」. IDWR (感染症発生動向調査 感染症週報), 14(26), 7-9 (2012)
- 4) McMinn, P., Lindsay, K., Perera, D., Chan, HM., Chan, KP. and Cardoso, MJ. : Phylogenetic analysis of enterovirus. 71 strains isolated during linked epidemics in. Malaysia, Singapore, and Western Australia. *J. Virol.*, 75, 7732-7738, (2001)
- 5) 国立感染症研究所 : 注目すべき感染症「ヘルパンギーナ」. IDWR (感染症発生動向調査 感染症週報), 12(26), 7-9 (2010)
- 6) 国立感染症研究所 : 感染症の話「無菌性髄膜炎」. IDWR (感染症発生動向調査 感染症週報), 5(12), 10-13 (2003)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) W. Allan N., M. Steven O. and Mark A. P. : Sensitive, Seminested PCR Amplification of VP1 Sequences for Direct Identification of All Enterovirus Serotypes from Original Clinical Specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 44(8), 2698-2704 (2006)
- 10) 国立感染症研究所 感染症情報センター: 過去のウイルス検出状況・集計表 (地研からの報告), 月別 2000~2011 年, エンテロウイルス(2). 病原体微生物検出情報(IASR), <http://www.nih.go.jp/niid/ja/typhi-m/iasr-reference/230-iasr-data/2968-iasr-table-v-p.html>
- 11) 国立感染症研究所感染症情報センター : 手足口病 2000~2003. IASR 病原体微生物検出情報(月報), 25(9), 224-225 (2004)
- 12) 国立感染症研究所 感染症情報センター : 手足口病 2002~2011 年. IASR 病原体微生物検出情報(月報), 33(3), 55-56 (2012)
- 13) 国立感染症研究所感染症情報センター: 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. IASR 病原体微生物検出情報(月報), 30(1), 1-3 (2009)
- 14) 藤本嗣人, 近平雅嗣, 増田義邦, 楠田均, 岡藤輝夫, 芥川宏, 吉田真策, 河合徹, 吉田茂, 長谷川斐子, 吉田弘, 西尾治 : 兵庫県における過去 8 年間 (1993~2000 年)のエンテロウイルス検出・同定状況. 兵庫県立衛生研究所年報, 36, 75-81 (2001)
- 15) Blomqvist, S., Klemola, P., Kaijalainen, S., Paananen, A., Simonen, M. L., Vuorinen, T. and Roivainen, M. : Co-circulation of coxsackieviruses A6 and A10 in hand, foot and mouth disease outbreak in Finland. *J. Clin. Virol.*, 48 (1), 49-54 (2010)

[平成 25 年 3 月 27 日受理]