ノート

福井県におけるエンテロウイルス系疾患からの病原体検出（平成 22～25 年度）

小和田和誠・平野映子・野田希・大村勝彦

Detection of Enteroviruses in Fukui Prefecture, 2010-2013

Kazuaki KOWADA, Eiko HIRANO, Nozomi NODA, Katsuhiko OMURA

１．はじめに

エンテロウイルス（以下 EV）は、ピコルナウイルス科エンテロウイルス属に分類されるエンベロープを持たない一本鎖 RNA ウイルスである。EV は、主に糞口感染により腸管内で増殖し、不顕性感染や、熱性疾患、発疹性疾患および中枢神経疾患など、多種多様な疾患の発症に関与することが知られている [1)]。

EV は A～J の種があり、ヒトに感染するものは A～D に分類される。さらに、EV は 100 を超える血清型が報告されており [2)]、血清型の違いによって誘発される疾患に特徴があることが知られている。例えば、急性灰白髄炎（ポリオ）を誘発する EV は、ポリオウイルス 1～3 型が多く、手足口病を誘発する EV は、A 群コクサッキーウイルス（CoxA）16 型およびエンテロウイルス 71 型（EV71）が多い [1),3)]。多くの疾患に関与する EV の流行動態の把握は、保健衛生上重要である。

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（感染症法）では、EV が主な原因となるポリオ、無菌性髄膜炎、手足口病、ヘルパンギーナ、急性出血性結膜炎が届出対象疾患とされており、福井県においても上記疾患の患者検体から病原体検出を実施してきた。

本報では、平成 22～25 年度に県内で採取された EV 関連疾患疑い患者から検出された EV について報告する。

２．方法

２．１　検査材料

当センターに検査依頼があった県内在住の EV 関連疾患疑い患者で、平成 22～25 年度（平成 22 年 4 月～26 年 3 月）に採取された検体を対象とした。

検査対象の患者数は計 165 名､検体数は計 228 検体で、検体の内訳は、糞便 64 検体、髄液 57 検体および咽頭拭い液 107 検体であった。1 名の患者につき 3 種類の検体（糞便・髄液・咽頭拭い液）全てが揃ったのは、18 名（10.9%）であった。

臨床診断名別では、無菌性髄膜炎 40 名、手足口病 30 名、ヘルパンギーナ 11 名およびその他の EV 関連疾患疑い疾患（発疹症、脳炎、不明熱など）84 名であった。ポリオおよび急性出血性結膜熱の検体はなかった。

２．２　検査方法

糞便は滅菌水で 10%乳剤とし、8,500×g、10 分間冷却遠心後の上清を試料とした。髄液は、0.22μm 滅菌フィルターで濾過し、濾液を試料とした。咽頭拭い液は、粗遠心後の上清を、0.22μm 滅菌フィルターで濾過し、濾液を試料とした。試料 140μL から、QIAamp Viral RNA mini kit(Qiagen)を用いて Total RNA を 60μL 抽出した。抽出 RNA 10μL をテンプレートとして、Nix らの CODEHOP VP1 RT-seminested PCR [4)] により VP1 領域の増幅産物を得て、ダイレクトシークエンス法により塩基配列を決定した。シークエンス装置は Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Life Technologies) を使用し、Sequencher software version 4.9 (Life Technologies)を用いて解析した。決定した塩基配列は BLAST 検索 [5)] を実施し、相同性の最も高い塩基配列からウイルスの遺伝子型を決定した。また、EV71 については、決定した塩基配列からプライマー配列を除いた領域（324bp）の系統樹解析を実施した。解析ソフトは MEGA5 [6),7)] を使用し、近隣結合法（NJ 法）により系統樹を作製した。系統樹評価のため 1000 回のブートストラップを実施した。

３．結果および考察

検査対象とした EV 関連疾患疑い患者 165 名 228 検体のうち、EV が検出されたのは 75 名 94 検体であった。検体別の陽性例の内訳（陽性率）は、糞便 24 検体（37.5%）、髄液 17 検体（29.8%）、咽頭拭い液 53 検体（49.5%）であった。3 種類の検体全てから EV が検出された患者は 7 名であった（表 1）。髄液は、糞便および咽頭拭い液に比

表１　3 種類の検体が揃った患者の検査結果

No	患者ID	診断名	糞便	髄液	咽頭拭い
1	222065	無菌性髄膜炎	CoxB2	CoxB2	CoxB2
2	222069	無菌性髄膜炎	CoxB2	CoxB2	CoxB2
3	222079	無菌性髄膜炎	Echo6	Echo6	Echo6
4	222113	無菌性髄膜炎	CoxB2	CoxB2	CoxB2
5	222125	無菌性髄膜炎	-	-	CoxB2
6	222126	無菌性髄膜炎	Echo6	Echo6	Echo6
7	222198	エンテロウイルス感染症	-	-	-
8	224023	無菌性髄膜炎	-	-	-
9	224024	無菌性髄膜炎	-	-	-
10	224038	無菌性髄膜炎	CoxA9	CoxA9	CoxA9
11	224073	無菌性髄膜炎	Echo7	Echo7	Echo7
12	224083	脳炎・脳症	-	-	RhV
13	224113	無菌性髄膜炎	Echo7	-	-
14	225032	無菌性髄膜炎	CoxB3	-	-
15	225054	脳炎・脳症	-	-	-
16	225055	脳炎・脳症	-	-	-
17	225059	無菌性髄膜炎	-	-	-
18	225326	無菌性髄膜炎	-	-	-

表 2　福井県の EV 感染疑い患者からの発病月別の病原体検出状況

診断名	年度	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	計
無菌性髄膜炎	H22				CoxB2 (3) Echo6 (1)	EV71 (1) CoxB1 (1) CoxB2 (1) Echo6 (1)								8
	H23						CoxB1 (1)		CoxB5 (1)	Echo6 (1)				3
	H24		CoxA9 (1)		Echo7 (1)	EV71 (1)	CoxB3 (1) Echo6 (1)		Echo7 (1)					6
	H25		CoxB3 (1)				CoxB3 (2)							3
手足口病	H22				EV71 (1) CoxA16 (1)									2
	H23			CoxA6 (3)	CoxA6 (5)		CoxA10 (2)							10
	H24	CoxA16 (1)				EV71 (1)								2
	H25			CoxA6 (1)	CoxA6 (5)	CoxA6 (2) EV71 (1)	EV71 (1)		EV71 (1)					11
ヘルパンギーナ	H22			CoxA4 (1)	CoxA6 (1)									2
	H23						CoxA10 (1)							1
	H24													0
	H25				CoxA6 (2) CoxA8 (1)		CoxA6 (1)		CoxA5 (1)					5
その他の EV 疾患	H22	RhV (1)			CoxA4 (3) Echo6 (2) Echo25 (1)	Echo6 (1) EV68 (1)	EV71 (1)							10
	H23				RhV (1)	CoxB5 (1)	CoxA9 (1) CoxA10 (1)							4
	H24				CoxA9 (1)	RhV (1)				EV71 (1)				3
	H25			CoxB3 (1)	CoxA2 (1) CoxA6 (1)	CoxB3 (1)	CoxB3 (1)							5

※（内数）・・・陽性患者数

べて検出率が低かった。

無菌性髄膜炎の患者 40 名のうち、計 20 名から EV が検出され、内訳は、B 群コクサッキーウイルス(CoxB)2、CoxB3 およびエコーウイルス(Echo)6 が各 4 名、CoxB1、Echo7 および EV71 が各 2 名、CoxA9 および CoxB5 が各 1 名であった（表 2）。

日本国内の無菌性髄膜炎患者からは Echo および CoxB の検出が多く [8]、本調査でも検出された EV の 85%（17 検体）が該当した。血清型を比較すると、平成 18 年度に県内の無菌性髄膜炎患者の間で CoxB5 が流行した [9] が、本調査では平成 23 年度に 1 名検出されただけであり、各年度によって主流となるものが異なっていた。

手足口病の患者 30 名のうち、計 25 名から EV が検出され、内訳は CoxA6 が 16 名、EV71 が 5 名、CoxA10 および CoxA16 が各 2 名であった（表 2）。手足口病は例年 6 月～9 月に流行があり、同時期の検体搬入が多かった。また、平成 23 年度および 25 年度の検体搬入が多くあり、感染症発生動向調査事業における小児科定点医療機関あたり患者数調査においても平成 23 年度および 25 年度は、平成 22 年度および 24 年度に比べて流行最大ピーク値および

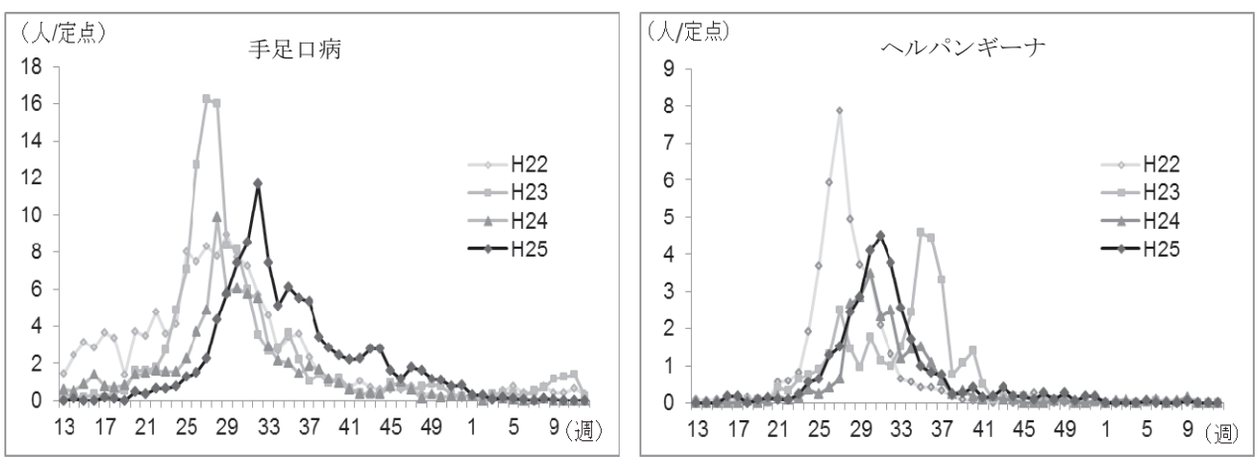
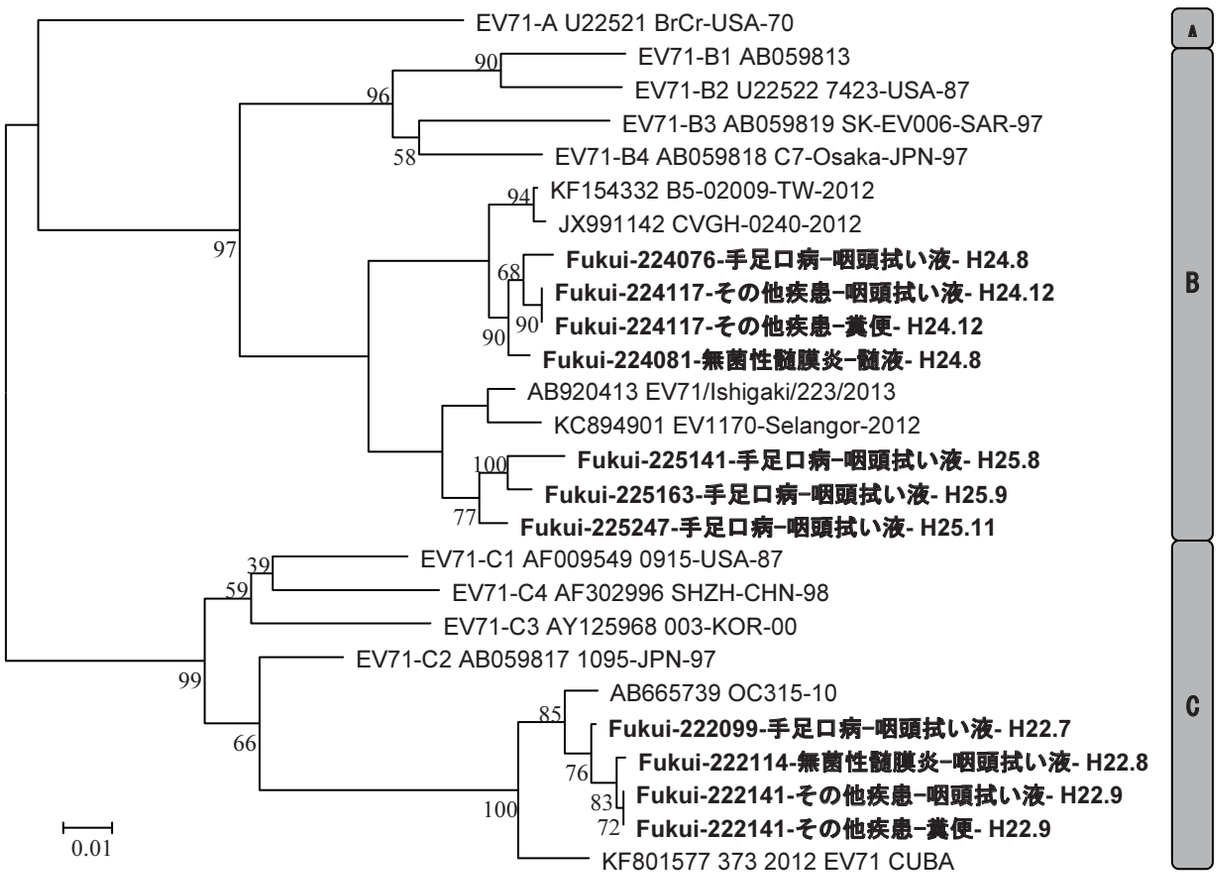


図 1　週別の小児科定点医療機関あたり患者数



福井県内検出株・・【Fukui−患者 ID−診断名−検体種類−検体採取年・月】で表記

図 2　EV71 の系統樹解析

患者数が多い結果となった（図 1）。流行年に検出される EV は、流行初期からピーク時には主に CoxA6 が検出され、流行ピークを超えた後は CoxA10 および EV71 が検出されるという傾向が見られた。手足口病は、CoxA10 、CoxA16 および EV71 が主な原因とされてきた[10]が、ヘルパンギーナの主な原因であった CoxA6 の検出が近年は多いという報告が全国各地で相次いでおり[11]、福井県においても同様の傾向が見られる結果となった。CoxA6 による手足口病患者の中には上腕、大腿部および臀部の発疹[12]や回復後の爪甲脱落症[13]等の従来の病態と異なる報告もあり、今後の動向が注目される。

ヘルパンギーナの患者 11 名のうち、計 8 名から EV が検出され、内訳は CoxA6 が 4 名、CoxA4、CoxA5、CoxA8 および CoxA10 が各 1 名であった（表 2）。ヘルパンギーナからは CoxA4、CoxA6、CoxA10 等の CoxA が多く検出されることが知られており[14]、福井県においても検出された EV は全て CoxA という従来と同様の結果となった。

平成 22 年度以降、福井県では手足口病は流行開始基準値（5 人/定点）を夏期に大きく超過している。一方で、ヘルパンギーナは平成 22 年第 27 週に流行開始基準値（6 人/定点）を超過した以外は、平成 22 年度以降に基準値の超過はみられなかった（図 1）。手足口病に比べるとヘルパンギーナの流行は小さかったため、搬入されるヘルパンギーナの検体の量も少なかったと考えられた。

その他の EV 関連疾患疑い疾患の患者 84 名のうち、計 22 件の EV が検出され、内訳は CoxA4、CoxB3、Echo6 およびライノウイルス（HRV）が各 3 名、CoxA9 および EV71 が各 2 名、CoxA2、CoxA6、CoxA10、CoxB5、Echo25 および EV68 が各 1 名であった（表 2）。病原体が検出された検体は、発病月が 7〜9 月に集中していた（19 件：86%）。この時期は、手足口病やヘルパンギーナの流行時期と重なっており、発疹症などの一部の患者については関連性があると考えられた。

EV71 は、1990 年代後半以降に東アジアで小児の死亡例を含む重症患者が多発し、問題となっている[15]。治療薬は無く、国内ではワクチンの開発も遅れている[16]ことから、EV71 の流行動態の正確な把握は重要である。

そこで、本調査で 9 名 11 検体から検出された EV71 について、VP1 領域（324bp）の系統樹解析を実施した。系統樹解析には、本調査で検出した福井県内検出株、各検出株を BLAST 検索実施時に最も相同性の高かった株、そして清水らの報告による各 Subgroup の標準株[17]を使用した。解析の結果、平成 22 年度検出株は Subgroup C、平成 24 年度および平成 25 年度検出株は Subgroup B に分類され、さらに平成 24 年度検出株と平成 25 年度検出株では異なるクラスターを形成した（図 2）。BLAST 検索で最も相同性が高い検出株の検体採取年は、いずれも対応する福井県内検出株の検体採取年と近く、その年に流行していたクラスターに分類されたと考えられた。疾患の違いよりも検出年の違いによる影響が大きい結果となっており、

EV71は､年々変化して流行している可能性が示唆された。今後も、年が変わるごとに変異を繰り返し、流行を拡大させていく恐れがあるため、調査を継続し、実態を把握し続けることが必要と考えられた。

４．まとめ

平成 22～25 年度に福井県内で採取された EV 関連疾患疑い患者 165 名 228 検体について、CODEHOP VP1 RT-seminested PCR 法を用いて、病原体の検索を実施した結果、75 名 94 検体から EV を検出した。

EV 陽性検体における血清型調査の結果、無菌髄膜炎からは Echo (30%) および CoxB (55%) が多く検出され、ヘルパンギーナから検出されたのは全て CoxA であった。手足口病からは CoxA6 (64%) が多く検出され、近年の流行の主流と推定された。

EV71 の系統樹解析の結果、県内で流行する EV71 は年々変異している可能性が示唆された。

謝辞

検体の採取、搬入および疫学等の情報収集を担当された健康福祉センター、医療機関、福井県健康福祉部健康増進課の関係各位に深謝いたします。

参考文献

1) ウイルス感染症の検査･診断スタンダード,羊土社 (2011)
2) Picornaviridae.com HP [Enterovirus] http://www.picornaviridae.com/enterovirus/enterovirus.htm)
3) 国立感染症研究所；手足口病 2002 ～2011 年, IASR Vol. 33(3):55-56 (2012)
4) Nix WA, et al. Sensitive, Seminested PCR Amplification of VP1 Sequences for Direct Identification of All Enterovirus Serotypes from Original Clinical Specimens , J Clin Microbiol 44: 2698-2704, (2006)
5) NCBI HP [BLAST] http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome
6) Tamra K, et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Mol. Biol. Evol. 28: 2731-2739 (2011)
7) MEGA HP http://www.megasoftware.net/
8) 谷口清州；感染症の話「無菌性髄膜炎」,IDWR 2003 年第 12 週号
9) 東方美保他；無菌性髄膜炎患者からの B 群コクサッキーウイルス 5 型分離状況－福井県, IASR Vol.27(10) 271 (2006)
10) 国立感染症研究所；感染症の話「手足口病」,IDWR 2011 年第 27 週
11) 国立感染症研究所；手足口病 2002 ～2011 年, IASR Vol. 33(3) 55-56 (2012)
12) 小林正明他；2011 年のコクサッキーウイルス A6 型感染による手足口病の臨床的特徴―静岡県, IASR Vol. 32(8) 230-231(2011)
13) 柏井健作他；手足口病後に脱落した爪からのコクサッキーウイルス A6 型の検出―和歌山県, IASR Vol.32(11) 339-340 (2011)
14) 国立感染症研究所；ヘルパンギーナ 2005 年 7 月現在, IASR Vol. 26(9) 235-236 (2005)
15) 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, IASR Vol. 30(1) 9-10 (2009)
16) 清水博之；手足口病（エンテロウイルス 71）ワクチン開発の現状, IASR Vol. 33(3) 65-66 (2012)
17) 清水博之；東アジア地域で分離されるエンテロウイルス 71 型の分子疫学, IASR Vol.25(9) 228-229 (2004)