

3) 熊本県におけるエンテロウイルス (EV) の検出状況と 無菌性髄膜炎由来 EV の系統樹解析

清田 直子 西村 浩一* 吉岡 健太 原田 誠也

要 旨

手足口病や無菌性髄膜炎の原因となるエンテロウイルス (EV) の分離と遺伝子検出及び系統樹解析を行った。2011 年は全国規模で手足口病の大流行が起こり、患者からは Enterovirus 71 型や Coxsackievirus A(CA) 6 型, CA16 型が検出された。無菌性髄膜炎患者からは主に Coxsackievirus B(CB) 1 型と CB5 型が検出され、それらの系統樹解析を行ったところ、検出された株の相同性は高く、調査期間内において遺伝的に近い株が流行していたと考えられた。

キーワード：エンテロウイルス，手足口病，無菌性髄膜炎，系統樹解析

はじめに

エンテロウイルス (EV) 感染症は、主に夏季に小児の間で流行する感染症である。EV が引き起こす疾患は、手足口病、ヘルパンギーナ、感冒、無菌性髄膜炎、感染性胃腸炎等と多岐にわたり、2011 年には全国的な手足口病の大流行が起こった¹⁾。流行する EV の血清型は年によって異なり、地域によっても差が見られる。一般的に EV による無菌性髄膜炎の予後は良好とされるが、重症化する例もあり、特にエンテロウイルス 71 型 (EV71) による手足口病流行時は中枢神経合併症の頻度が高くなるという報告がある²⁾。このことから、流行している血清型の調査を行うことは重要である。

そこで今回、2011 年 4 月から 2013 年 3 月までの当所における EV 検出状況及び無菌性髄膜炎由来 EV の系統樹解析結果について報告する。

実験方法

2011 年 4 月から 2013 年 3 月に、本県の病原体定点医療機関を受診した手足口病、ヘルパンギーナ、発疹症、無菌性髄膜炎及び脳炎・脳症疑いの患者 451 名 (手足口病：168 名、ヘルパンギーナ：101 名、発疹症：106 名、無菌性髄膜炎：50 名、脳炎・脳症：26 名) から採

取された 518 検体 (咽頭ぬぐい液：419 検体、髄液：71 検体、便：19 検体、その他：9 検体) を試験に供した (表 1)。EV の遺伝子検査は、VP4/VP2 領域を標的とした semi-nested PCR 法³⁾により行った。エンテロウイルス陽性と判定された場合、VP1 領域を標的とした nested PCR 法⁴⁾及びダイレクトシーケンスで塩基配列を決定し、BLAST による相同性検索で型別同定を行った。また、無菌性髄膜炎及び脳炎・脳症由来 EV の一部については、得られた VP1 領域の塩基配列 (約 270bp) を用いて、近隣結合法による系統樹解析を行った。

表 1 診断名別患者検体数

検体種別 診断名	咽頭 ぬぐい液	髄液	便	その他	総計
手足口病	167	1	1	2	171
ヘルパンギーナ	96		5		101
発疹症	105	3		2	110
無菌性髄膜炎	32	44	8		84
脳炎・脳症	19	23	5	5	52
総計	419	71	19	9	518

* 現熊本県健康福祉部薬務衛生課

ウイルス分離は、4細胞（2011年：RD-18S, VeroE6, MRC-5, A549, 2012年：RD-A, VeroE6, MRC-5, HEp-2）を使用し、3代目まで継代及び観察を行った。分離できた株は、中和試験を行った。

結果

1. 疾患別患者報告数の推移とEV検出状況

(1) 手足口病

2011年は、全国的に手足口病の大流行が起こった年であった。本県においても同様に、2011年第21週（5/23～29）頃から増加傾向が見られ、第24週（6/13～19）に定点当たりの患者報告数が7.04で警報基準値（5.00以上）を超えた。第27週（7/4～10）にピークを迎えた後は減少し続け、第36週（9/5～11）には警報基準値を下回った。一方、2012年度は手足口病の流行はほとんど起こらなかった。

EVは手足口病患者168名中134名から検出された。型の内訳は、EV71が25名、Coxsackievirus A6型（CA6）が39名、Coxsackievirus A10型（CA10）が1名、Coxsackievirus A14型（CA14）が1名、Coxsackievirus A16型（CA16）が59名、Echovirus 7型（Echo7）が2名、Enterovirus 型不明（EV NT）が7名であった（表2）。時期によって流行型に違いが見られ、2011年4月はEV71、6月はCA6、7月はCA6とCA16、8～10月はCA16が主な流行型であった。2012年度は、CA6、CA14、CA16が散発的に検出されたのみであった（図1-A）。

(2) ヘルパンギーナ

ヘルパンギーナは、2011年は第22週（5/30～6/5）頃から増加傾向となり、第28週（7/11～17）にピークを迎えた後は減少した。2012年も2011年と同様の傾向が見られ、第22週（5/28～6/3）頃から増加傾向となり、第27週（7/2～8）にピークを迎えた後に減少するという経過であった。

EVはヘルパンギーナ患者101名中50名から検出された。型の内訳は、EV71が1名、Coxsackievirus A2型（CA2）が4名、Coxsackievirus A4型（CA4）が8名、Coxsackievirus A5型（CA5）が4名、CA6が10名、CA10が4名、CA16が3名、Coxsackievirus B1型（CB1）が2名、Coxsackievirus B3型（CB3）が1名、Echo7が2名、Echovirus 9型（Echo9）が1名、Poliovirus 2型（Polio2）が1名、EV NTが9名であった（表2）。2011年はCA6が、2012年はCA4が、他と比較して多く検出されたが、CAを中心とした多様な型が検出された（図1-B）。

(3) 発疹症

発疹症は定点把握疾患としての患者報告がなされていないため、EV検出状況のみ以下に記載する。

EVは発疹症患者106名中31名から検出された。型の内訳は、CA6が4名、Coxsackievirus A9型（CA9）は1名、Echo9が13名、Echovirus 18型（Echo18）が8名、Poliovirus 1型（Polio1）は1名、EV NTが4名であった（表2）。2011年と2012年の6、7月はEcho9が、2012年の10月はEcho18が多く検出された。（図1-C）。

(4) 無菌性髄膜炎

無菌性髄膜炎は、近年では流行は見られず、本県においても同様に低い水準で推移している。2011年、2012年も例年と同じように大きな流行は見られなかった。

EVは無菌性髄膜炎、脳炎・脳症患者76名中32名から検出された。型の内訳は、CB1が9名、Coxsackievirus B4型（CB4）が1名、Coxsackievirus B5型（CB5）が12名、Echovirus 6型（Echo6）が3名、Echo7が4名、Echo18が1名、EV NTが2名であった。（表2、図1-D）。

表2 診断名別EV検出状況

診断名 (検査 患者数)	手足口病 (168)	ヘルパン ギーナ (101)	発疹症 (106)	無菌性髄膜炎 脳炎・脳症 (76)
EV71	25	1		
CA2		4		
CA4		8		
CA5		4		
CA6	39	10	4	
CA9			1	
CA10	1	4		
CA14	1			
CA16	59	3		
CB1		2		9
CB3		1		
CB4				1
CB5				12
Echo6				3
Echo7	2	2		4
Echo9		1	13	
Echo18			8	1
Polio1			1	
Polio2		1		
EV NT	7	9	4	2
計	134	50	31	32

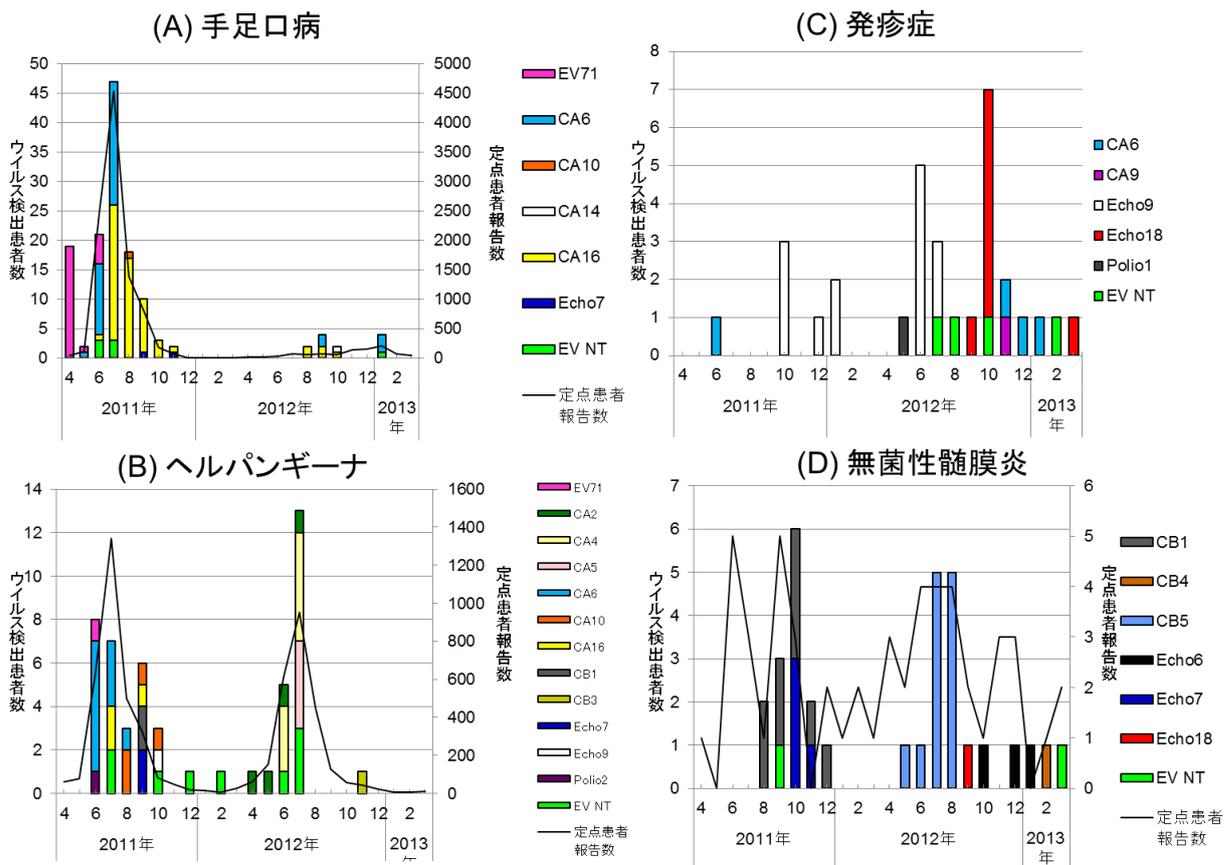


図1 診断名別ウイルス検出状況および定点患者報告数

2. 細胞培養によるEV分離

2年間で数多くのEVが分離され、RD-AとVeroE6はCA, CB, Echo, Polio, RD-18SはCAとEcho, MRC-5はCAとEchoとPolio, A549はCBとEchoに感受性を示した。特に、RD-AはCA2やCA6にも感受性を示した(表3)。

3. 無菌性髄膜炎由来EVの系統樹解析

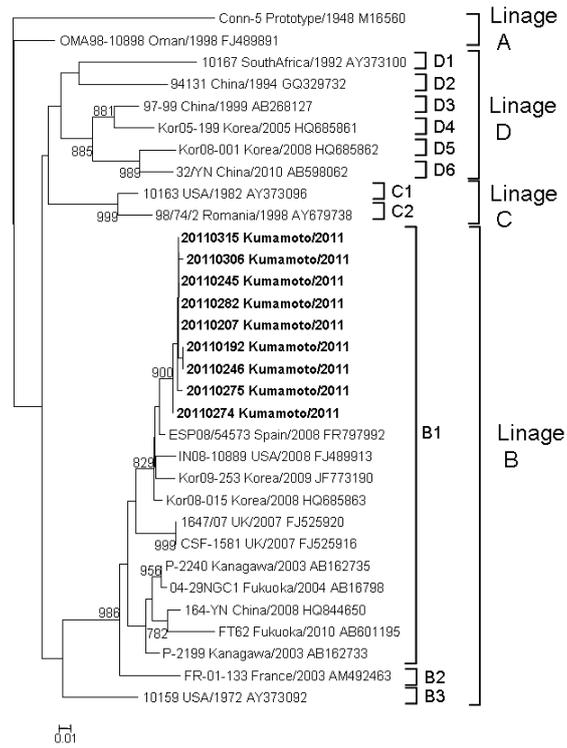
無菌性髄膜炎、脳炎・脳症の患者から主に検出されたCB1とCB5の検出株について、VP1領域の系統樹解析を行った(図2)。CB1はA~Dに、CB5はA~Eのグループに分かれることが知られている^{5,6)}。今回得られたCB1株の相同性は99%以上と高く、いずれもLinage Bの中のsublinage B1に属していた。また、スペインで2008年に検出された株と最も高い相同性を示した。CB5については、今回得られた株の相同性は95%以上と高く、全てLinage Eに分類された。得られたCB5株は、さらに2つのサブグループ(Kumamoto2012-1, -2)に分けられた。CB5が検出された患者の中には髄膜炎症状だけでなく、脳炎症状を呈する患者もいた。

表3 細胞別EV分離株数*

EV 型名	RD-A	RD-18S	VeroE6	MRC-5	HEp-2	A549
EV71		5				
CA2	3					
CA6	6					
CA9					1	
CA10		4				
CA14	1		1	1		
CA16	5	2	7	3		
CB1			4		1	4
CB3	1		1			
CB4	1		1			
CB5	3		3		10	
Echo6	3			1		
Echo7		7	3			2
Echo9	3	2	9	5		3
Echo18	1			5		
Polio1	1		1	1	1	

* RD-Aは2012年, RD-18Sは2011年, HEp-2は2012年, A549は2011年のみ使用。

(A) CB1



(B) CB5

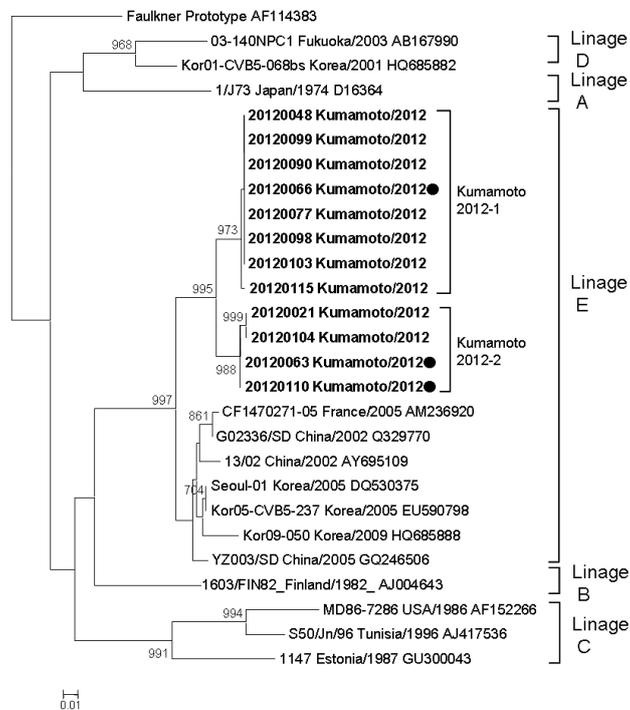


図2 無菌性髄膜炎由来 EV の VP1 領域分子系統樹

(今回の検出株を太字で示し、脳炎患者由来の検出株を●で示した。ブートストラップ値は、70%以上のみを示した。)

考察とまとめ

2011 は全国的に手足口病の大流行が起こったことから、本県でも多数の EV が分離・検出された。EV71 による流行の後に、CA6 と CA16 の流行が続いて起こり、これは全国の手足口病由来 EV の血清型とも同様の流れであった。2012 年は手足口病の大きな流行は見られなかったが、2011 年に起こった大流行の際に、抗体を獲得した小児が数多くいたためと考えられた。

手足口病患者からは、主に CA もしくは EV71 が分離・検出されることが多いが、2011 年の CA6 流行時には RD-A ではなく RD-18S を使用しており、CA6 が分離できていない。分離率の向上を目的に 2012 年は RD-A を使用したことで、CA6 の分離ができたことから、RD-A は CA6 の分離に非常に有用であると考えられた。

ヘルパンギーナ及び発疹症は大きな流行ではなかったが、CA を中心とした多種類の EV が検出され、発疹症では Echo9, 18 型を中心とした流行が確認された。

無菌性髄膜炎は、2002 年に Echovirus 13 型による流行⁷⁾が起きて以来、近年は落ち着いた動向を見せている。EV の検出状況を見ると、2011 年は CB1 が、2012 年は CB5 が主な流行の型であったことが明らかとなった。CB1, CB5 ともに検出株の相同性は高く、調査期間内の本県では遺伝的に近い株が流行していたと考えられた。検出された CB5 はサブグループ間の相同性は高いものの、2つの系統の CB5 が同時に流行していたことが推定された。また、EV による脳炎は比較的少ないが、今回検出された CB5 の中には脳炎症状を呈した患者もおり、EV による脳炎の発生にも注意が必

要と考えられた。

EV は血清型が数多く存在し、年や時期によって流行の型が入れ替わり、規模も大きく変化する。今後とも EV サーベイランスを継続し、データを蓄積するとともに、流行を早期に探知することが重要であると思われる。

謝 辞

感染症発生動向調査に御協力いただいた病原体定点医療機関、関係機関の皆様方に深謝いたします。

文 献

- 1) 国立感染症情報センター：病原微生物検出情報, **33**, 55-56 (2012).
- 2) 国立感染症情報センター：病原微生物検出情報, **30**, 9-10 (2009).
- 3) H. Ishiko, Y. Shimada, M. Yonaha, O. Hashimoto, A. Hayashi, K. Sakae, N. Takeda: *J. Infect. Dis.* **185**, 744-754 (2002).
- 4) W.A. Nix, M.S. Oberste, M.A. Pallansch: *J. Clin. Microbiol.* **44**, 2698-2704 (2006).
- 5) T. Zhang, J. Du, Y. Xue, H. Su, F. Yang, Q. Jin.: *PLoS One.* **8**, e67157 (2013).
- 6) K. Baek, S. Yeo, B. Lee, K. Park, J. Song, J. Yu, I. Rheem, J. Kim, S. Hwang, Y. Choi, D. Cheon, J. Park: *Virology*, **8**, 297 (2011).
- 7) 国立感染症情報センター：病原微生物検出情報, **30**, 1-3 (2009).