

手足口病患者から検出されたエンテロウイルスの遺伝子解析 (2014年度～2016年度)

鈴木 愛^a, 長谷川 道弥^a, 岡崎 輝江^a, 栗田 さや子^a, 坂本 哲理^a, 新開 敬行^a, 貞升 健志^b

手足口病は、口腔粘膜および手や足に水疱性の発疹が現れる急性ウイルス性疾患であり、主に乳幼児を中心として毎年夏から秋にかけて流行が見られる。東京都における2014年度～2016年度感染症発生動向調査で、手足口病を疑う患者から採取された検体322件中245件がエンテロウイルス遺伝子陽性であった。さらに遺伝子型別検査を実施したところ、コクサッキーウイルスA6型、A16型、A4型などが検出された。また、検出されたウイルスの構成は各年度により差が認められた。

キーワード: エンテロウイルス, 手足口病, 発生動向調査, 2014年度～2016年度, CA6, CA16, CA4, EV71, 分子系統樹解析, CODEHOP

はじめに

感染症発生動向調査は感染症の発生状況を把握・分析し、情報提供することにより、感染症の発生およびまん延を防止することを目的として全国で実施されている。手足口病は感染症法において五類感染症に分類され、定点把握対象疾患として定点医療機関による患者の発生状況の届出が定められている¹⁾。東京都健康安全研究センター（以下当センター）では都内定点医療機関からの検体提供を受け、ウイルスの遺伝子検査と分離培養検査を行っている。

手足口病の原因となるウイルスは1種類ではないが、いずれもエンテロウイルス属に分類されている。従来、手足口病患者からはエンテロウイルス71型（以下EV71）とコクサッキーウイルスA16型（以下CA16）が多く検出されていたが、2009年以降はヘルパンギーナの主要な原因ウイルスであったコクサッキーウイルスA6型（以下CA6）の検出が増加し、手足口病の主要な原因ウイルスとなっている²⁾。症状としては口腔粘膜および手や足に水疱性の発疹が出現する。基本的に予後は良好な疾患であるが、急性髄膜炎の合併症が時に見られ、稀に急性脳炎を生ずることがある。なかでもEV71は中枢神経系合併症の発生率が他のウイルスより高いことが知られている³⁾。また、近年発生の多いCA6による手足口病では、CA16やEV71による症例より水疱が大きいことや、発症して数週間後に爪甲脱落症を呈す症例が報告されている⁴⁾。

都内における手足口病の発生は毎年確認されているが、特に2011年、2013年に大幅な患者数増加があり、ほぼ2年ごとに大流行を起こす傾向にある⁵⁾。今回、2014～2016年度における手足口病原因ウイルスの検出状況について検討を行ったので報告する。

方 法

1. 供試材料

2014年度～2016年度の間に、定点医療機関で手足口病と診断され、都の発生動向調査事業として搬入された検体322件（2014年度59件、2015年度188件、2016年度75件）を対象とした。検体種は咽頭ぬぐい液が314件、鼻汁および鼻腔ぬぐい液が7件、髄液が1件であった。検体提供者は主に小児であったが、20歳代～40歳代の成人も確認された。

2. 遺伝子検査方法

1) エンテロウイルス属のスクリーニング検査

Viral RNA mini Kit (QIAGEN) を用いて検体140 μlからRNAの抽出を行った後、エンテロウイルス各属のスクリーニング検査のために5'非コード領域を増幅するKuanの方法⁶⁾によりRT nested-PCRを実施した。得られたPCR産物は電気泳動を行い、約297bp付近にバンドが得られたものをエンテロウイルス属陽性として型別検査を実施した。

2) 型別検査

スクリーニング検査によりエンテロウイルス遺伝子陽性となった検体について、CODEHOP PCR⁷⁾によるエンテロウイルス型別検査を行った。反応後のPCR産物を用いて電気泳動を行い、目的部位である約370bp付近のバンドを切り出した後、QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN) を使用し精製した。続いて、BigDye[®] v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) にてシーケンス反応を行い、ABI PRISM3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した。

3) 血清型の決定と分子系統樹解析

エンテロウイルス属の血清型の決定は、エンテロウイルスのカプシド蛋白VP1コード領域を用いて行った。取得した塩基配列を公共の遺伝子データベースGeneBank

^a 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター微生物部

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) を利用したBLAST解析と、National Institute for Public Health and the Environmentが提供している型別分類ウェブサービス

(<http://www.rivm.nl/mpf/enterovirus/typingtool#/>) による解析により血清型分類を行った。検出割合の多かったCA6とCA16については遺伝子解析ソフトであるMEGA6による近隣結合法を用いてそれぞれ分子系統樹を作成した。樹形の信頼性に関してはブートストラップ法を用いて確認を行った。

結 果

1. 検体数の比較

2014年度～2016年度にかけて、国立感染症研究所集計の手足口病全国報告数と、当センターへの検体搬入数を比較した(図1)。いずれの年度も患者の発生は見られるが、2015年度は全国的に手足口病が大流行し、当センター検体搬入数も2015年度が顕著に増加していた。

2. 月別の搬入検体数

定点医療機関において手足口病と診断された検体は1年を通じて搬入されている。毎月のセンターへの検体搬入数の推移を年度ごとに比較した(図2)。検体搬入数は2014年度が9月、2015年度は7月、2016年度は10月に最多となっていた。

3. エンテロウイルスの検出と血清型

2014年度～2016年度に当センターに搬入された検体322件のうち、245件がエンテロウイルス属陽性であった。

1) 2014年度

2014年度には59件の検体が搬入され、35件がエンテロウイルス属陽性であった(陽性率59.3%)。陽性検体のうち26件(型別不明やシーケンス波形が不完全であったものを除く)が解析可能であった。検出された血清型はCA16が最も多く17件(65.4%)、続いてCA6が3件(11.5%)、CA4が2件(7.7%)、その他4件(15.4%)であった(図3)。その他の内訳はCA10、CA2、エコー7、エンテロウイルス71(以下EV71)がそれぞれ1件ずつであった。

2) 2015年度

2015年度には188件の検体が搬入され、157件がエンテロウイルス属陽性であった(陽性率83.5%)。陽性検体のうち138件が解析可能であった。検出された血清型はCA6が最多で91件(65.9%)、CA16が42件(30.4%)、その他が5件(3.6%)であった(図4)。その他の内訳はCA10が2件、CA9が2件、CA14が1件ずつであった。

3) 2016年度

2016年度には75件の検体が搬入され、57件がエンテロウイルス属陽性であった(陽性率76%)。陽性検体のうち51件が解析可能であった。検出された血清型はCA6が最も多く36件(70.6%)、CA16が7件(13.7%)、CA4が6件

(11.8%)、その他が2件(3.9%)であった(図5)。その他の内訳はCA5とCA10が1件ずつであった。

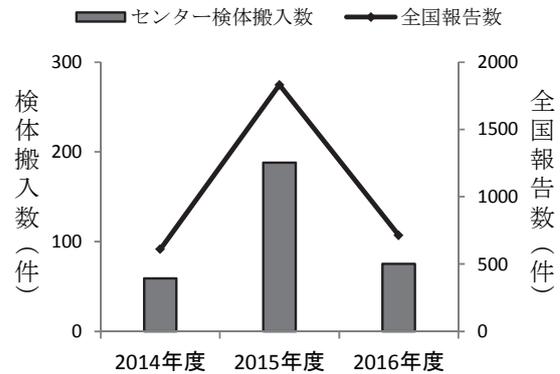


図1. 手足口病全国報告数と当センター検体搬入数の比較

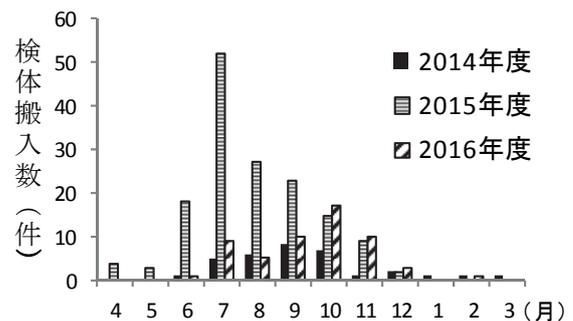


図2. 手足口病患者月別検体搬入数

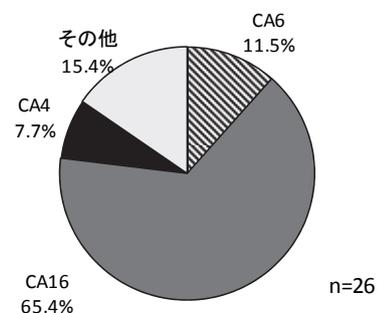


図3. 患者から検出されたエンテロウイルス (2014年度)

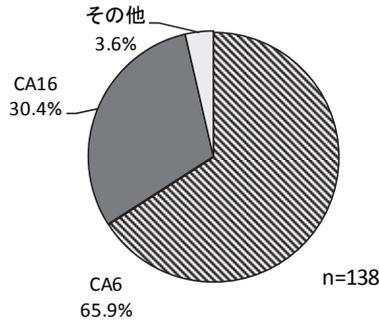


図4. 患者から検出されたエンテロウイルス (2015年度)

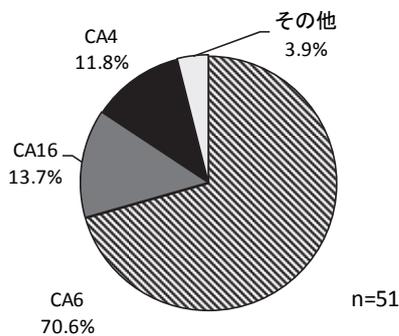


図5. 患者から検出されたエンテロウイルス (2016年度)

4. CA6およびCA16の分子系統樹解析

検出割合の多かったCA16とCA6に対し、分子系統樹を作成し解析を行った。

1) 近年都内で流行したCA6の比較

本調査で得られた各年度のCA6に、GenBankに登録された国内各地のCA6のデータ (1999~2015年) を加えて分子系統樹を作成した (図6)。2つのグループに大別され、グループ I には2009年以降に検出された株が、グループ II には2008年以前に検出された株が分類された。本調査で得られた2014~2016年度の株は全てグループ I に収束した。グループ I はさらにグループ I - Aと、I - Bに分けることができたが、検出年は混在していた。

2) 近年都内で流行したCA16の比較

本調査で得られた各年度のCA16に、GenBankに登録された国内各地のCA16のデータ (2002~2015年) を加えて分子系統樹を作成した (図7)。大きく2つのグループに分類されたが、検出年は混在していた。しかし、2016年度に本調査で検出された株は全てグループ I に帰属していた。

考 察

国立感染症研究所発表の統計によると、手足口病患者

から分離・検出されたエンテロウイルスは、2014年は主にCA16とEV71、2015年と2016年は主にCA6、CA16であった⁸⁾。この傾向は都で検出されたエンテロウイルスの構成ともほぼ一致している (図3, 4, 5)。手足口病は従来、CA16およびEV71が病因ウイルスであり、3~5日の潜伏期間ののち口腔粘膜や手掌、足などの四肢末端に水疱性発疹が出現、軽度の発熱が典型的な症状であると言われている。またEV71は無菌性髄膜炎、まれに麻痺や脳炎を引き起こし重症化することが知られている³⁾。日本国内では2000年に西日本を中心としたEV71による脳炎および中枢神経合併症 (死亡例含む) が複数報告され⁹⁾、2003年と2010年には全国的な流行が見られた。東アジア地域ではEV71の断続的な流行が発生、中国やベトナムでは多数の死亡例が報告されている^{3,10)}。1994年以降、EV71は3~4年周期で国内流行が見られているが¹¹⁾、2017年7月現在、都内手足口病患者検体からの検出が増加してきている。

2009年以降急激に増加してきたCA6による手足口病は、発疹が四肢末端に限局せず全身に広く分布し、39度以上の発熱、治癒後の爪甲脱落症を来す非典型的な経過を辿ることが特徴である⁴⁾。非典型的手足口病の流行は欧州やアジアでも確認されているほか^{12,13)}。都内においても本調査の3年間でCA6の検出割合は年々増加している (図3, 4, 5)。2009年前後のCA6に変化が生じているかどうかを検討するため、VP1領域におけるCA6の分子系統樹を作成したところ、2008年以前の株と2009年以降の株では異なるグループを形成していた。しかし、塩基配列をアミノ酸に変換し系統樹を作成したところ、2009年前後において明らかな差異は認められなかった。よって、CA6が手足口病の主要ウイルスとして急速に増加してきた理由として、VP1領域における抗原性の変化が存在していた可能性は低いと推察された。都内の手足口病におけるCA6の動向は、引き続き今後も把握していく必要がある。

エンテロウイルスには多様な型が存在しており、中には型別検査で得られた塩基配列の解析が難しい株も含まれる。例えば2014年度はEV71が5件検出されているが、型別のためのCODEHOP PCRを用いた際の検出感度が低く、解析可能であったのはそのうち1件のみであった。EV71をはじめ解析結果の芳しくないものについては論文等¹⁴⁾を参考に、専用プライマーの作成やプロトコルの再検討等、さらなる改良が必要と考えられる。

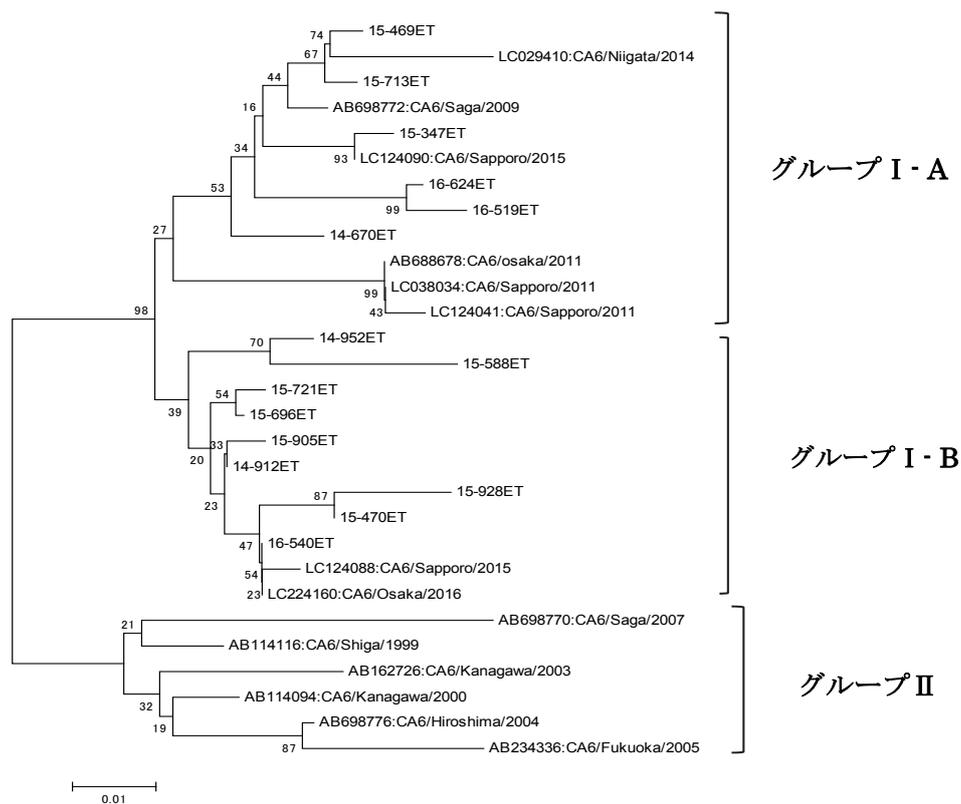


図6. 都内で検出されたCA6のVP1領域における分子系統樹解析（2014年度～2016年度）

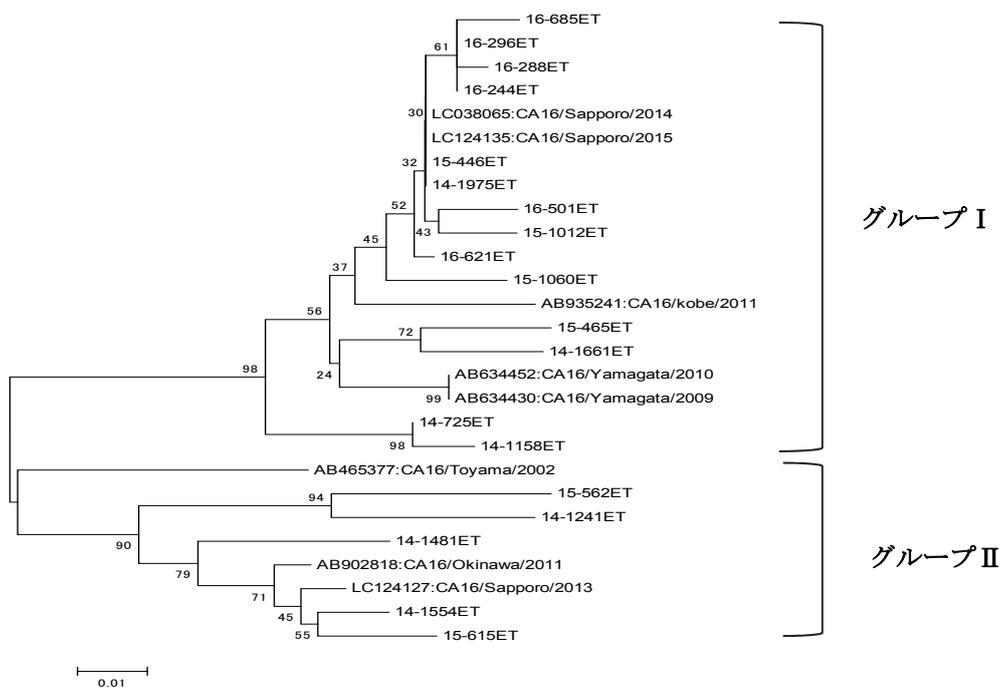


図7. 都内で検出されたCA16のVP1領域における分子系統樹解析（2014年度～2016年度）

文 献

- 1) 東京都感染症情報センター：感染症発生动向調査対象疾患.
<http://idsc.tokyo-eiken.go.jp/survey/> (2017年7月31日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 2) 病原微生物検出情報, **33**, 55-56, 2012.
- 3) 国立感染症研究所：手足口病とは.
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/441-hfmd.html> (2017年7月31日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 4) 感染症週報, **19**, 12-13, 2017.
- 5) 東京都感染症情報センター：手足口病の流行状況.
<http://idsc.tokyo-eiken.go.jp/diseases/handfootmouth/handfootmouth/>
(2017年7月31日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 6) Kuan, M.M.: *J Clin Microbiol.*, **35**(10), 2598-2601, 1997.
- 7) W, A.N.: *J Clin Microbiol.*, **44**(8), 2698-2704, 2006.
- 8) 病原微生物検出情報, 手足口病患者から分離・検出されたエンテロウイルス 2009-2017
https://www.niid.go.jp/niid/images/iasr/rapid/natsu/teashi/150903/teashien_170726.gif (2017年7月31日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 9) 吉田 茂, 藤本 嗣人：病原微生物検出情報, **28**, 342-344, 2007.
- 10) Wang, Y., Zou, G., Xia, A., *et al.*: *Virology Journal.*, 12:83, 2015.
<https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12985-015-0308-2>
- 11) 病原微生物検出情報, **25**, 224-225, 2004.
- 12) Chatproedprai, S., Tempark, T., Wanlapakorn, N., *et al.*: *SpringerPlus.*, 4:362, 2015.
- 13) Yan, X., Zhang, Z., Yang, Z., *et al.*: *BioMed research International.*, Volume 2015, Article **ID 802046**, 8 pages.
<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/802046/>
- 14) 安藤 克幸：佐賀県衛生薬業センター所報, **36**, 21-27, 2015.

**Genetic Analysis of Enteroviruses Detected in Patients with Hand, Foot, and Mouth Disease
(April 2014- March2017)**

Ai SUZUKI^a, Michiya HASEGAWA^a, Terue OKAZAKI^a, Sayako KURITA^a,
Tetsuyoshi SAKAMOTO^a, Takayuki SHINKAI^a and Kenji SADAMASU^a

Hand, foot, and mouth disease (HFMD) is an acute viral disease in which a bullous rash appears in the oral mucosa, hands, and feet. HFMD occurs from summer to autumn and mainly infects infants and young children. From April 2014 to March 2017, genetic testing was performed on 322 specimens collected from patients suspected of HFMD. Of these specimens, 245 were enterovirus-sequencing positive. Genotyping detected coxsackievirus types A6, A16, A4. Furthermore, the distribution of the type of enterovirus changed every year for 3 years.

Keywords: enterovirus, hand, foot, and mouth disease, A6, A16, A4, phylogenetic analysis, CODEHOP

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan