

# エンテロウイルスの検出状況(2016年度)

松本 文昭、三浦 佳奈、山下 綾香、田栗 利紹

## Surveillance Report of Enteroviruses in Nagasaki (2016)

Fumiaki MATSUMOTO, Kana MIURA, Ayaka YAMASHITA and Toshitsugu TAGURI

Key word : Hand-Foot-and-Mouse Disease, Enterovirus, Phylogenetic analysis

キーワード: 手足口病、エンテロウイルス、系統樹解析

### はじめに

Enteroviruses (以下、EVs) は、ヒトに感染力を有するウイルスの中で最も発生頻度の高いウイルスの一つである。たいていの感染は、手足口病やヘルパンギーナに代表されるとおり非定型熱性疾患や上気道炎を呈し、不顕性感染か軽症にとどまることが多い。しかしながら、EVs は急性出血性結膜炎、無菌性髄膜炎、急性弛緩性麻痺、心筋炎や新生児敗血症様疾患などの重篤な臨床症状を引き起こすことも知られている<sup>1)</sup>。

EVs はピコルナウイルス科に属するエンベロープを持たない 1 本鎖 RNA ウイルスであり、Poliovirus、Coxsackievirus、Echovirus およびその他の EVs で構成されるウイルス群を総称しているが、近年の分子遺伝子学的研究により 4 つの遺伝子型に大別される<sup>2)</sup>。

主に小児の間で流行する手足口病およびヘルパンギーナは「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」(以下、感染症法)において 5 類感染症の定点把握疾患に指定され、患者の発生状況は例年調査されているが、全ての症例において EVs の実験室内診断をしているわけではなく、県内の EVs 株の流行状況は十分に把握されていない。また、同一型のウイルスに感染しても、軽症と重症に分れることが報告されている。例えば、Coxsackievirus B 群はヘルパンギーナの原因ウイルスの一つだが、ウイルス血症を経て中枢神経に移行すると髄膜炎を呈し、稀ではあるが命に関わるような心筋炎を惹き起こすこともある<sup>3)</sup>。

ここでは、今年度の県内の EVs 流行状況を明らかにするために実施した調査の概要を報告する。

### 調査方法

#### 1) 流行状況の把握のための検体採取

2016 年 6 月から 2017 年 3 月まで、全県立保健所管内(県央、西彼、県南、県北、五島、上五島、壱岐、対馬)および長崎市、佐世保市の計 10 地点の協力医療機関において、エンテロウイルス感染症と診断された患者のうち、主治医から研究内容を説明のうえ、同意が得られた患者を対象とした。

当該患者から採取された咽頭拭い液または便(直腸拭い液)を 48 時間以内に搬入可能な場合は 4°C で、それ以上の時間がかかる場合には -20°C 以下に一時保管した。検体は医療機関から直接または郵送により搬入された。以上のとおり収集された咽頭拭い液 105 検体および直腸拭い液 2 検体の計 107 検体を検査・解析に供した。

#### 2) 遺伝子検査方法

提供された臨床検体は、ウイルス保存輸送液(ハンクス液(日水))に最終濃度 0.5%となるようにゼラチンを添加したものに懸濁させたのち、12,000 rpm で 15 分間遠心分離したあとの上清を RNA 抽出用検体とした。QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を用いて抽出した RNA に対して、エンテロウイルスを網羅的に検出可能な CODEHOP VP1 reverse transcription-seminested PCR<sup>1)</sup>を実施した(図 1)。特異的増幅産物が得られた場合、AN89 および AN88 をシーケンス用プライマーとしてダイレクトシーケンスを行い、塩基配列を決定した。決定した配列情報に基づき Enterovirus Genotyping Tool Version 0.1<sup>4)</sup>により検出ウイルスを型別した。塩基配列は、GENETYX ver.12(ゼネティクス社)により解析した。また、Coxsackievirus

A6(以下、CVA6)については、2011年以降、手足口病の原因ウイルスとして全国的な流行が報告されているため<sup>5)</sup>、VP1領域の一部(485塩基対)を標的としたプライマーセット(Forward 487: ATGTWYGYICCCICGIGCNCC, Reverse 489: AYIGCICISWITGYTGNC)を用いたRT-PCR<sup>6)</sup>を行い、近隣結合法(NJ法)<sup>7)</sup>による分子系統解析を実施した。

### 3) ウイルス分離

遺伝子検査陽性となった場合は、24ウェルマルチプレートに単層を形成させたRD-A, RD-18S, HeLa-4, Vero, Caco2細胞を準備し、検体100 $\mu$ Lを接種してウイルス分離を試みた。維持培地には、2%非働化牛胎児血清を含有したEagle MEM(日水)を用いた。37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>の培養条件で7日間培養後、3代継代して細胞変性効果(CPE)が出現したものをウイルス分離陽性とした。

## 調査結果及び考察

### 1) 調査検体の診断名と流行状況

本研究で2016年度は107検体提供された。検体の診断名は手足口病(43検体)が最も多く、次いで発疹症(28検体)、ヘルパンギーナ(23検体)の順であり、これら3疾病で全体の87.9%を占めた。月別の発生状況はEVsの流行期である夏季に比較的多く認められたものの、調査期間中は毎月検体が得られていた(図2)。発疹症は6月に始まり11月に流行が終息していたが、ヘルパンギーナは6月から2月まで断続的に発生し、手足口病は7月以降毎月発生していた(図2)。

### 2) EVsの検出状況

提供された107検体のうち、咽頭拭い液82検体および直腸拭い液1検体からEVs属の遺伝子が検出され、35検体からは同属ウイルスが分離された。図3に検出されたEVsの同定結果を示した。2016年度に最も多く検出されたウイルスは、CVA6であり、26検体であった。CVA6は、2016年に手足口病の原因ウイルスとして最も報告されている種であり<sup>5)</sup>、本県においても同様の傾向であったことが示された(図3)。次に多く検出されたウイルス型はEchovirus 9型(以下、ECV9)とCoxsackievirus A16型(以下、CVA16)であり、それぞれ20検体と15検体から検出され、以上3種で全体の約73.5%を占めた(図3)。その他はCoxsackievirus

A2が1検体、Coxsackievirus A4が6検体、Coxsackievirus A4とB1が各1検体、Coxsackievirus A5が3検体、Coxsackievirus A10が3検体、Coxsackievirus B2が1検体、Echovirus 6が1検体、Echovirus 25が1検体、Rhinovirus A、BおよびCがそれぞれ3、1および1検体であった。

### 3) 主要ウイルス型の診断名と流行状況

検出数の多かったウイルス型のうちCVA6とCVA16は「手足口病」と診断された検体から検出されることが多く、ECV9は「発疹症」から多く検出される傾向にあった(図4)。

主要ウイルス型の月別推移を図5に示した。CVA6は7月から翌年3月までほぼ一年を通して検出され、10月から1月にかけて多く検出される傾向にあった。ECV9は6月から11月にかけて検出され、7、9、10月が多い傾向にあった。CVA16は8月から3月まで断続的に検出された。

### 4) CVA6の系統樹解析

今年度、全国的な流行を示しているCVA6<sup>5)</sup>については、解析可能であった16検体について系統樹解析を行った。その結果、県内検出CVA6株は2つのクラスターに分類され、2016年の長崎県内では、少なくとも遺伝学的に異なる2種類のCVA6による手足口病が流行していたことが明らかとなった(図6)。

以上のとおり、今年度のEVsの流行状況を取りまとめたが、今後も引き続きEVs感染症例を収集・解析してEVsの流行状況をより詳細に明らかにするとともに、その重症化にかかわるウイルス側因子の探索を実施していく予定である。

## 謝辞

本研究は、2016年度から3年間の計画で実施している長崎県経常研究事業で行われた。研究にご協力頂いた各協力医療機関の諸先生、検体の収集及び搬入にご協力頂きました各保健所の関係諸氏に深謝する。

## 参考文献

- 1) Nix *et al.*: Sensitive, Seminested PCR Amplification of VP1 Sequences for Direct Identification of All Enterovirus Serotypes from Original C

- linical Specimens. *J Clin Microbiol*, 44, 2698-2704, 2006.
- 2) 斎藤昭彦: エンテロウイルス・パレコウイルス、医学と薬学、第 73 巻、2016.
  - 3) 吾郷昌信 他: 劇症型新生児心筋炎を惹起したコクサッキーウイルス B2 型の性状解析、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014.
  - 4) Enterovirus Genotyping Tool ver. 0.1 (<http://www.rivm.nl/mpf/typingtool/enterovirus/>)
  - 5) IDWR、注目すべき感染症 手足口病、23、2017.
  - 6) Obsert *et al.*: Species-specific RT-PCR amplification of human enteroviruses: a tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses. *J Gen Virol.* 87, 119-128, 2006.
  - 7) N. Saitou, M Nei: The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4, 406-425, 1987.

① 逆転写反応 (RT reaction)						
< primer set > AN32 : GTYTGCCA, AN33 : GAYTGCCA, AN34 : CCRTCRTA, AN35 : RCTYTGCCA						
	volume	final conc.	temp.	time	cycles	
5 × First Strand Buffer	2.0 μL	1 ×	22°C	10 min.	1	
RT primer Mix (10 μM each)	0.5 μL	0.5 μM	42°C	60 min.	1	
20 mM dNTPs	0.5 μL	1 mM	95°C	5 min.	1	
0.1 M DTT	1.0 μL					
SuperScript III (200 U/μL)	0.5 μL	10 U/μL				
RNase Inhibitor (40 U/μL)	0.5 μL	2 U/μL				
Extract RNA	5.0 μL					
total	10 μL					
② 1次増幅反応 (PCR1)						
< primer set > SO224 : GCIATGYTIGGIACICAYRT SO222 : CICCIGGIGGIAYRWACAT						
	volume	final conc.	temp.	time	cycles	
10 × PCR reaction buffer	5.0 μL		95°C	30 sec.	40	
20 mM dNTPs	0.5 μL	0.2 mM each	42°C	30 sec.		
primer (SO224: 10 μM)	5.0 μL	1 μM	60°C	45 sec.		
primer (SO222: 10 μM)	5.0 μL	1 μM				
Taq Polymerase (1 U/μL)	2.5 μL	0.05 U/μL				
DW (DNase/RNase free)	22.0 μL					
cDNA	10.0 μL					
total	50 μL					
③ 2次増幅反応 (snPCR)						
< primer set > AN89 : CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG AN88 : TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT						
	volume	final conc.	temp.	time	cycles	
10 × PCR reaction buffer	5.0 μL		95°C	6 min.	1	
20 mM dNTPs	0.5 μL	0.2 mM each	95°C	30 sec.	40	
primer (AN89: 10 μM)	4.0 μL	0.8 μM	60°C	20 sec.		
primer (AN88: 10 μM)	4.0 μL	0.8 μM	72°C	15 sec.		
FastStart Taq (5 U/μL)	0.5 μL	0.05 U/μL				
DW (DNase/RNase free)	35.0 μL					
PCR1 product	1.0 μL					
total	50 μL					

図1 CODEHOP VP1 RT- seminested PCR 反応条件

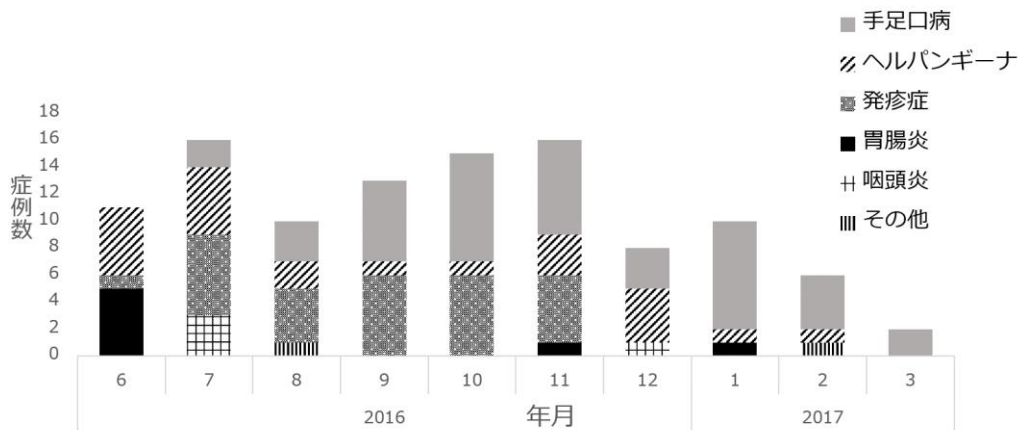


図2: 供試検体(症例別)の月別搬入状況

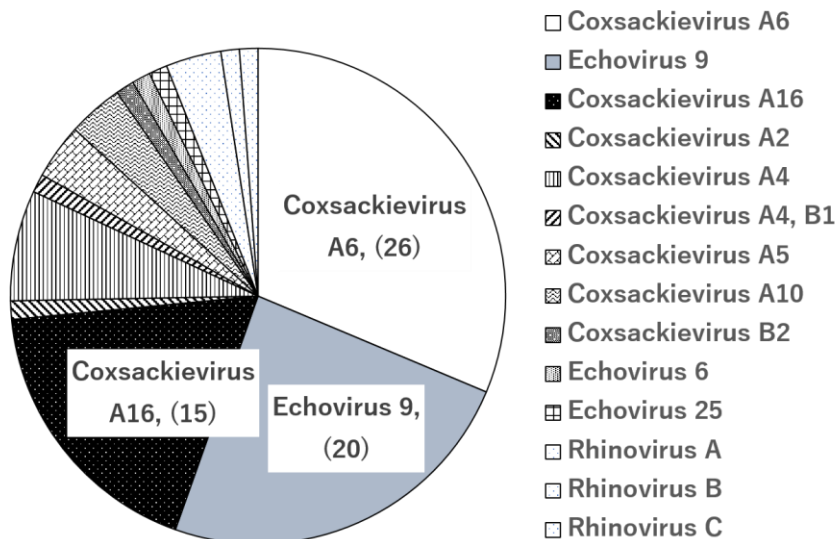


図3: 2016年度に検出されたEVsのウイルス型(n=83)

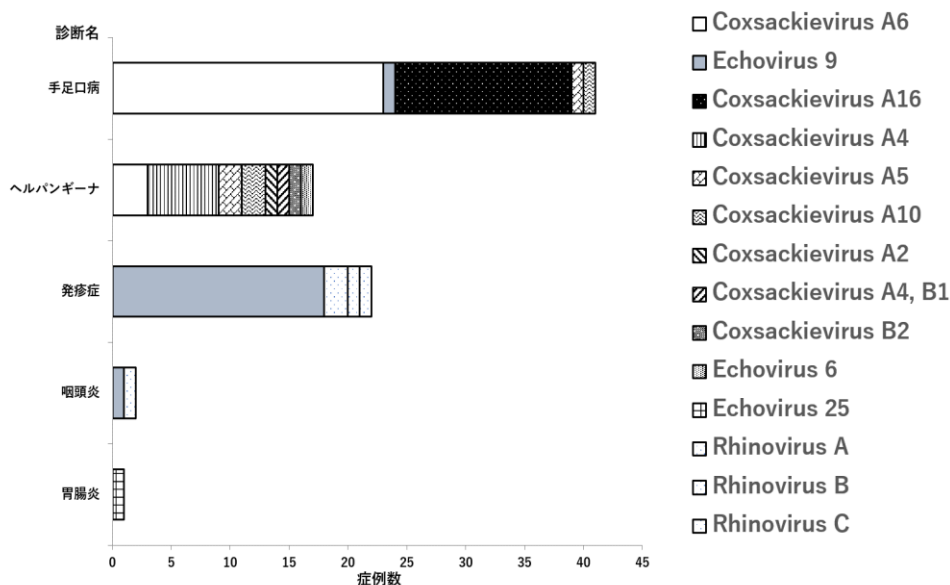


図4: 診断名別のEVsウイルス型(n=83)

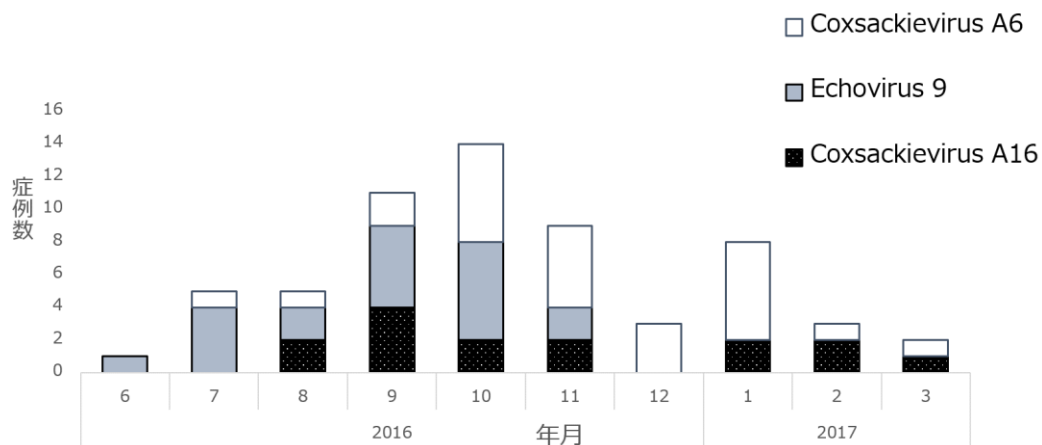


図 5: 三大検出ウイルス型(CA6, E9, CA16)の月別検出状況(n=61)

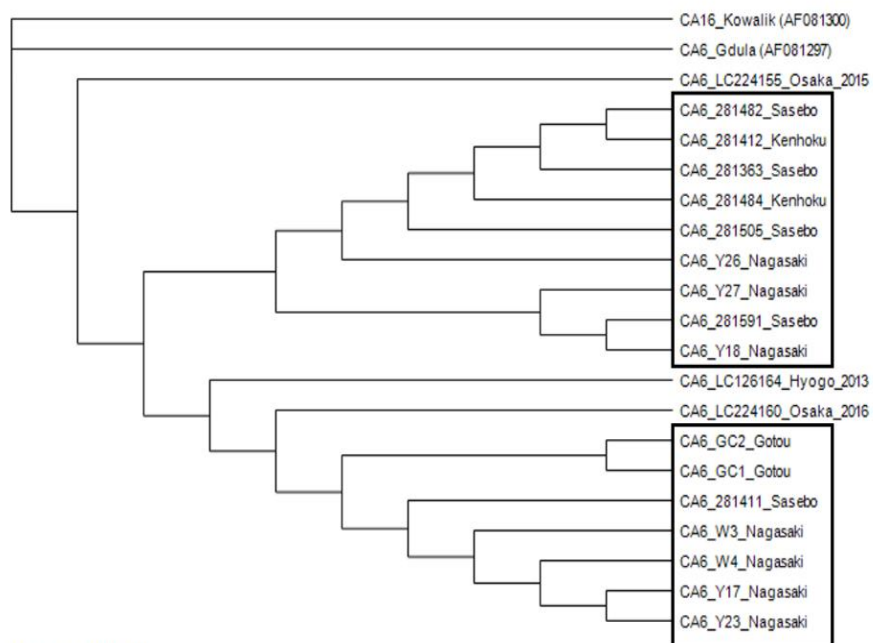


図 6: Coxsackievirus A6 の 系統樹解析

Rectangle: Clinical isolates identified in this study