

埼玉県におけるエンテロウイルス検出状況について(2016-2017年度)

中川佳子 篠原美千代 富岡恭子 鈴木典子 峯岸俊貴 小川泰卓 青沼えり 内田和江 岸本剛

Enterovirus Isolated in Saitama Prefecture (April 2016-March 2018)

Keiko Nakagawa, Michiyo Shinohara, Kyoko Tomioka, Noriko Suzuki, Toshitaka Minegishi,
Yasutaka Ogawa, Eri Aonuma, Kazue Uchida, Tsuyoshi Kishimoto

はじめに

エンテロウイルス (EV) は、腸管で増殖するウイルスの総称である。夏季に小児で流行し、手足口病やヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎等の起因となる。流行株の血清型は年ごとに変動し、血清型の違いによって症状や重症度が異なることが報告されている¹⁾。今回は、2016~2017年度に埼玉県感染症発生動向調査において採取された手足口病、ヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎のEV検出状況について報告する。

対象及び方法

1 対象

2016年4月から2018年3月の間に、さいたま市を除く県内(県域)における感染症発生動向調査の病原体検査定点を含む小児科定点等で採取された検体のうち、手足口病、ヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎と診断された361検体を調査の対象とした。また、埼玉県感染症情報センターで集計している手足口病、ヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎の週ごとの定点あたり患者報告数も資料とした。

2 方法

(1) RNA抽出

QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)を用いて検体140μlからキットの説明書に従いウイルスRNAを抽出し、60μlのジエチルピロカーボネート (DEPC) 処理水に溶出した。また、一部の検体ではEZ1 Virus Mini Kit v2.0(QIAGEN)を用いて検体200μlからウイルスRNAを抽出し、キット添付の溶出液60μlに溶出した。

(2) 逆転写反応

SuperScript II Reverse Transcriptase(Invitrogen) またはPrimeScript RT reagent Kit(Perfect Real Time, Takara)を使用した。後述するCODEHOP VP1 RT-snPCR法によってPCRを行う場合は、病原体検出マニュアル^{2)~4)}記載の方法に従い、4種のプライマーを用いた逆転写反応を行った。

(3) リアルタイムPCR (TaqMan Probe) 法

手足口病とヘルパンギーナの検体については、EVの5' UTR領域の遺伝子を、リアルタイムRT-PCR法により増幅した。無菌性髄膜炎については、FTD Neuro9 (Fast-Track

Diagnostics)を用いて、EVを含む髄膜炎起因ウイルス9種のマルチプレックスリアルタイムRT-PCRを実施した。

EV5' UTR領域のリアルタイムPCR法は、TaqMan Universal PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific) 25μl, Fプライマー (100μM) 0.45μl, Rプライマー1及び2 (100μM) 各 0.15μl, プローブ (10μM) 1μl, cDNA5μlを加え、DEPC処理水で50μlになるよう調製し、50°C2分, 95°C10分反応させた後、95°C15秒, 60°C1分のサイクルを45回繰り返した。マルチプレックスリアルタイムRT-PCR法は、FTD Neuro9キット添付の2×RT-PCR Buffer12.5μl, プライマープローブMix1.5μl, 25×RT-PCR Enzyme Mix1.0μlにRNA抽出液10μlを加え、42°C15分, 94°C3分反応後, 94°C8秒, 60°C34秒のサイクルを40回繰り返した。解析にはVii7リアルタイムPCRシステムまたはQuantStudio5リアルタイムPCRシステム(共にThermo Fisher Scientific)を用い、Ct値が40以下でシグモイドカーブが正常である場合に「陽性」、不検出である場合に「陰性」とした。

(4) conventional RT-PCR

リアルタイムPCRでEVが検出されたものについて、病原体検出マニュアル^{2)~4)}記載のCODEHOP VP1 RT-snPCR法を用いてEVのVP1領域を増幅した。必要に応じて、同マニュアル記載の、CODEHOP以外のRT-PCR法を用いてVP1領域またはVP4-VP2領域を増幅した。得られたPCR増幅産物は2%アガロースゲルにて電気泳動を行い、目的サイズ (CODEHOP1stPCR:760bp, CODEHOP2ndPCR:354bp, VP1 RT-snPCR: 776bp, VP4-VP2 RT-snPCR:750bp, VP4-VP2 2ndPCR:653bp)のバンドが検出されない場合は「未定型エンテロウイルス (EV-NT)」, 検出された場合はダイレクトシーケンス法により血清型を決定した。

(5) ダイレクトシーケンス法による血清型決定

PCR増幅産物の精製にはQIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN)もしくはillustra ExoProStar (GE Healthcare Life Sciences)を用いた。また、非特異バンドが確認された場合には、2%アガロースゲルにて電気泳動を行い、目的とするバンドを切り出し後、QIAquick Gel Extraction Kit(QIAGEN)を用いて精製した。

シーケンス反応には、Conventional RT-PCR と同じプライマーと Big Dye Terminator V1.1 Cycle Sequencing

Kit (ThermoFisher Scientific) を用いた。

シーケンス反応後の精製には, Centri-SEP Spin Columns (ThermoFisher Scientific) もしくは BigDye X Terminator Purification Kit (ライフテクノロジーズ) を用いて実施した。Applied Biosystems 3500 ジェネティックアナライザ (ThermoFisher Scientific) で泳動後, SEQUENCHER5.0 (日立) で塩基配列を決定し, BLAST 解析により得られた塩基配列の相同性を比較して血清型を決定した。VP1 領域については, オランダ National Institute for Public Health and the Environment が提供する遺伝子配列による型別分類ウェブサービスも利用した。

結果と考察

1 定点あたり患者報告数及び検体数

手足口病の定点あたり患者報告数は, 2016 年は 6 月末から増加し始め, 7 月から 10 月にかけて穏やかに上昇し, 10 月上旬 (第 40 週) に 2.03 とピークに達した後, 12 月に 0.09 となるまで緩やかに減少した。2017 年は 6 月末から患者報告数が急上昇し, 7 月 (第 28 週) に国が定める流行警報開始基準値 (手足口病では定点あたり患者報告数 5) を超えた。8 月 (第 31 週) に 11.75 とピークに達し, 9 月 (第 39 週) に 5 を下回るまで大きな流行が続いた。埼玉県衛生研究所へ搬入された手足口病検体数は, 両年とも患者報告数が上昇した 6 月から 10 月に多くなっていた (図 1-1)。感染症発生動向調査週報⁵⁾による全国の情報では, 手足口病は 2011 年以降 2 年ごとに大きな流行が起きており, 2016 年は低流行, 2017 年は患者報告数の大きな上昇が見られ, 県域の傾向と一致していた。

ヘルパンギーナの定点あたり患者報告数は, 2016 年は 6 月に増加し始め, 7 月 (第 29, 30 週) に流行警報開始基準値である 6 を超える大きな流行が見られた。2017 年は 6 月から患者報告数が上昇し, 8 月 (第 31 週) に 2.92 とピークに達した後, 12 月に 0.03 となるまで緩やかに減少した。2017 年は 2016 年と比較して低流行であった。衛生研究所へ搬入された検体数は, 患者報告数と一致するような推移が見られた (図 1-2)。ヘルパンギーナは手足口病と比較して流行の規模が小さい傾向にあるが, 手足口病と同じくここ数年は 2 年ごとに比較的大きな流行が見られている。2016 年は全国的にも大きな流行が見られ, 2017 年は比較的低流行であり, 県域の傾向と一致していた⁵⁾。

無菌性髄膜炎は, 1 症例につき咽頭ぬぐい液, 髄液, 糞便等複数検体を採取する機会が多い。図 1-3 には定点あたり患者報告数と症例数の推移を示した。年度を通して患者報告数が少なく, 流行の規模が小さかった。衛生研究所に搬入された無菌性髄膜炎検体は, 年度を通して検体の搬入があったが, 夏から秋にかけて検体数が増える傾向が見られた。

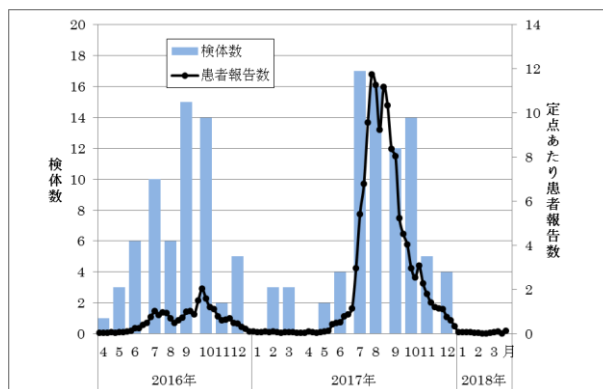


図 1-1 手足口病の定点あたり患者報告数と搬入検体数

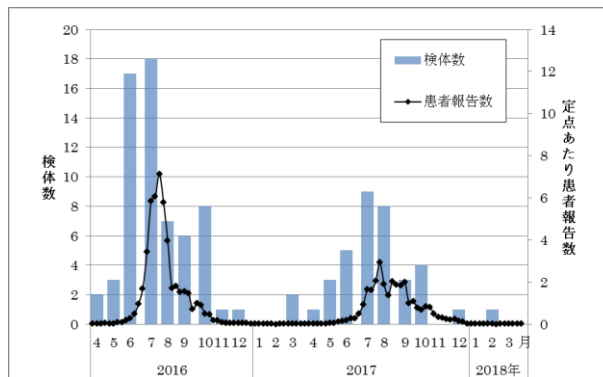


図 1-2 ヘルパンギーナの定点あたり患者報告数と搬入検体数

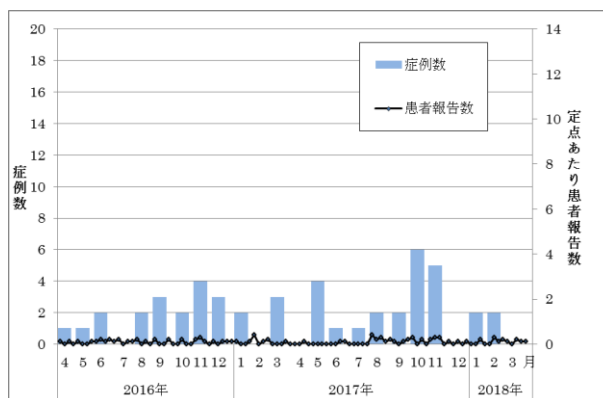


図 1-3 無菌性髄膜炎の定点あたり患者報告数と搬入検体数

2 疾患別ウイルス検出割合

手足口病は, 2016 年度に 68 検体が採取され, 52 検体 (76.5%) から 53 株のウイルスが検出された。その内 EV が検出されたのは 46 検体 (88.5%) であった。検出された EV の血清型は, コクサッキーウイルス A6 型 (CA6) が 33 株 (62.3%), CA4 と CA16 が 3 株 (5.7%) ずつ, CA10 が 2 株 (3.8%), エコーウイルス 18 型 (E18) が 1 株 (1.9%), EV-NT が 4 株 (7.5%) であった (図 2-1 左)。2017 年度は, 74 検体が採取され, 69 検体 (93.2%) から 71 株のウイルスが検出された。その内 EV が検出されたのは 63 検体 (91.3%) からであった。EV の内訳は, CA6 が 38 株 (53.5%), EVA71 型 (EVA71) が 13 株 (18.3%), CA10 が 4 株 (5.6%), CA16 が 3 株 (4.2%), CB4 が 2 株 (2.8%), E3, E9, EV-NT が 1 株 (1.4%)

ずつであった(図2-1右)。EVA71は、埼玉県では2013年以降4年ぶりの検出となった。病原微生物検出情報⁶⁾による全国の情報でも、2016年、2017年ともにCA6が最も多く検出され、2017年ではCA6についてEVA71が多く検出されたとの報告があった。

ヘルパンギーナは、2016年度に65検体が採取された。56検体(86.2%)から60株のウイルスが検出され、内EVが検出されたのは48検体(85.7%)からであった。EVの内訳は、CA4が16株(26.7%)、CA5が10株(16.7%)、CA6が9株(15.0%)、CA10が4株(6.7%)、CA2とCB4が2株(3.3%)ずつ、CB3とCB5が1株(1.7%)ずつ、EV-NTが3株(5.0%)であった(図2-2左)。2017年度は、35検体が搬入され、31検体(88.6%)から35株のウイルスが検出された。その内EVは20検体(64.5%)から検出された。EVの内訳は、CA10が9株(25.7%)、CA6が6株(17.1%)、CA2が3株(8.6%)、CA4とEV-NTが1株(2.9%)ずつであった(図2-2右)。病原微生物検出情報⁶⁾による全国の情報では、2016年はCA4が、2017年はCA6とCA10が多く検出されたとの報告があり、県

域でも全国と同様の傾向であった。

無菌性髄膜炎では、2016年度は、23症例64検体が採取され、13症例20検体(56.5%)から24株のウイルスが検出された。EVが検出されたのは8症例14検体(61.5%)で、内訳は、E6が5症例9株(37.5%)、CB3及びCB5がそれぞれ1症例2株(8.3%)、EV-NTが1症例1株(4.2%)であった(図2-3左)。2017年度は、25症例55検体が採取され、15症例21検体(60.0%)から22株のウイルスが検出された。EVが検出されたのは、6症例12検体(40.0%)であった。内訳は、EVA71が3症例4株(19.2%)、CB2が2症例5株(15.4%)、E3が1症例3株(11.5%)であった(図2-3右)。病原微生物検出情報⁶⁾による全国の情報では2016年ではCB3次いでE6が、2017年ではE6次いでCB2が多く検出されたとの報告がある。2016年は県域でもE6とCB3が検出されたが、2017年は県域ではCB2は検出されたがE6は検出されなかった。

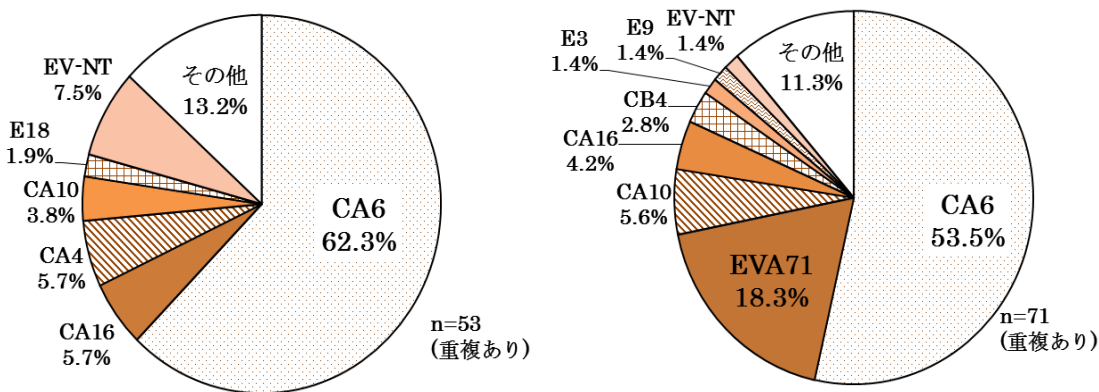


図2-1 手足口病患者における検出ウイルス (左図が2016年度, 右図が2017年度)

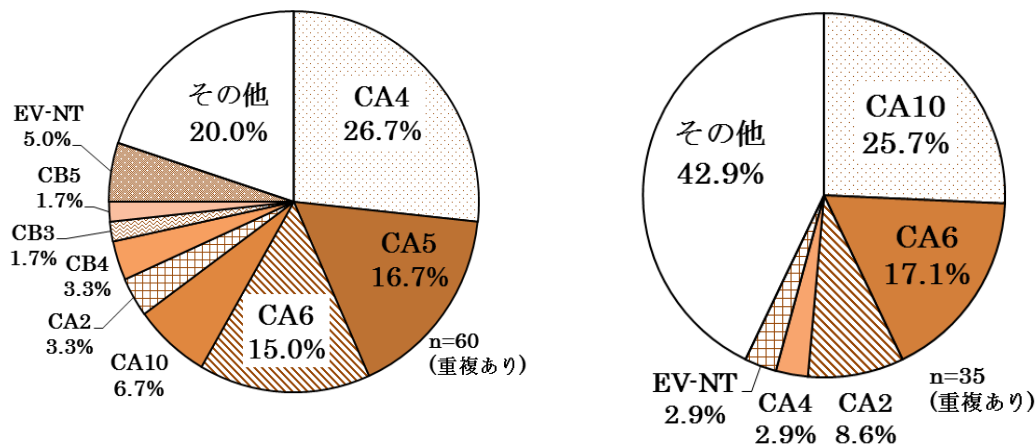


図2-2 ヘルパンギーナ患者における検出ウイルス (左図が2016年度, 右図が2017年度)

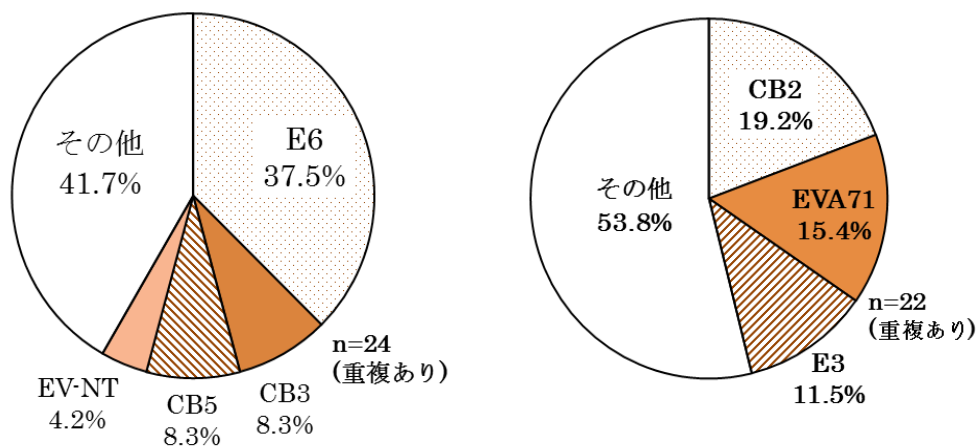


図 2-3 無菌性髄膜炎患者における検出ウイルス (左図が 2016 年度, 右図が 2017 年度)

3 疾患別年齢分布

2016 年 4 月から 2018 年 3 月までの間に感染症発生动向調査で採取された手足口病, ヘルパンギーナ, 無菌性髄膜炎患者検体の, 疾患ごとの年齢分布を図 3 に示した.

おもに小児科病原体定点から提出される手足口病とヘルパンギーナ患者検体は, 5 歳以下が全体の 8 割を占めており, 1 歳が最も多かった. 年齢中央値は手足口病が 2 歳 6 ヶ月, ヘルパンギーナが 1 歳 10 ヶ月であった. ヘルパンギーナ患者の最年長は 12 歳であったが, 手足口病は 20 代, 30 代の患者からの検体もあった. 無菌性髄膜炎の年齢中央値は 5 歳 6 ヶ月で, 0 歳が最も多くなっていた. 30 代と 70 代の患者検体も搬入されているが, EV は検出されなかった.

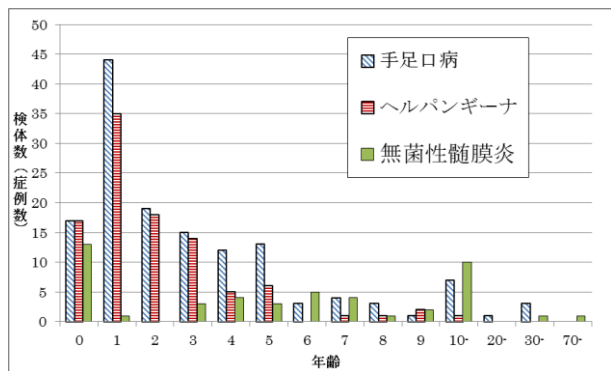


図 3 疾患別年齢分布 (2016-2017 年度)

4 疾患別月別 EV 検出状況

手足口病で最も検出割合が高かった CA6 は, 2016 年度は 9 月から 10 月, 2017 年度は 7 月から 9 月に集中して検出された. 次いで検出割合が高かった EVA71 は 2017 年 8 月以降に検出され, 特に 10 月の検出数が多くなっていた (図 4-1).

ヘルパンギーナで最も検出割合が高かった CA4 は, 2016 年 6 月と 7 月に集中して検出され, 2017 年度は 10 月に 1 検体から検出されたのみであった. 次いで検出数の多かった CA6 は, 2016 年 10 月に最も検出数が多くなっていた. 2017 年度は, CA10 の検出割合が多く, 8 月と 9 月が特に検出数が多かった (図 4-2).

2016 年度の無菌性髄膜炎患者では, 7 月以外の 5 月から 11

月に EV が検出され, その内 5, 6, 8, 9, 11 月に E6 が検出された. 2017 年度は 8 月から 11 月に EV が検出され, 8, 9, 11 月に EVA71 が検出された (図 4-3).

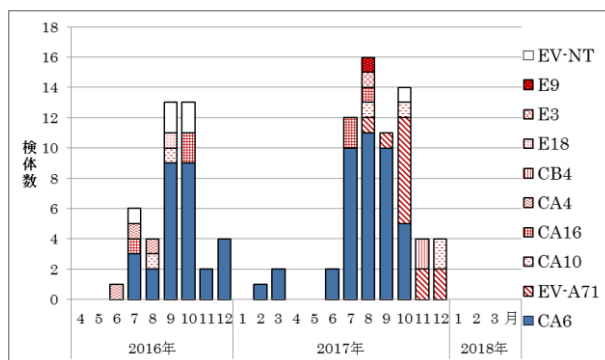


図 4-1 手足口病の月別 EV 検出状況

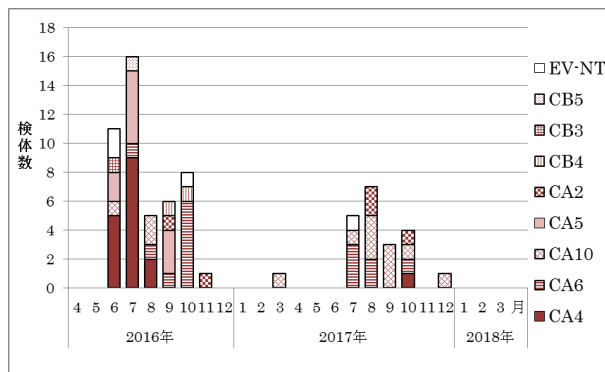


図 4-2 ヘルパンギーナの採取月別 EV 検出状況

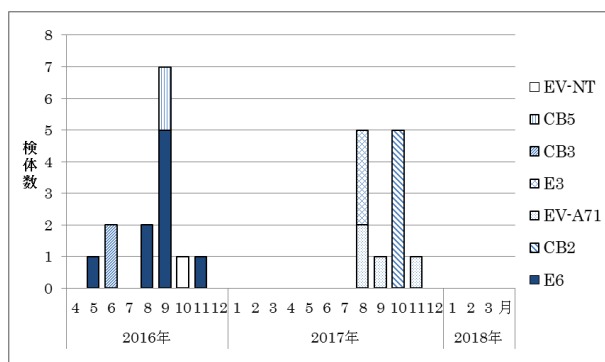


図 4-3 無菌性髄膜炎の採取月別 EV 検出状況

まとめ

検出ウイルスに占めるEVの割合が最も高かったのは手足口病で、2016年度が88.5%、2017年度が91.3%であった。手足口病とヘルパンギーナについては、患者報告数が多い年にEV検出割合が高い傾向が見られた。無菌性髄膜炎のEV検出割合は、2016年度61.5%、2017年度40%と他疾患と比較して低かった。手足口病やヘルパンギーナと異なり、EV以外のウイルスやその他の原因でも無菌性髄膜炎が引き起こされるため、このような結果になったと考えられる⁷⁾。

手足口病は、2016年、2017年ともにCA6が最も多く検出された型であった。手足口病の流行期は夏季だが、2016年度は冬季にもCA6が検出された。2017年8月からEVA71が2013年以降4年ぶりに検出され、2017年12月まで検出が続いた。CA6による手足口病では、発病数週間後に爪の脱落が起きる症例が報告され⁸⁾、EVA71は中枢神経系の合併症を起こす割合が他のEVよりも高いことが報告されている⁹⁾ことから、今後ともこれらの血清型の動向に注視していく必要がある。

ヘルパンギーナは2016年と2017年で主要な血清型に違いが見られた。2016年はCA4が多く検出され、2017年ではCA10とCA6の割合が高くなっていた。2016年7月と8月には、当所に検体が搬入された急性脳炎2症例からもCA4が検出されている。近年患者報告数が多い年でCA4の検出割合が高い傾向があることも合わせて、CA4の検出が多い年では注意が必要である。

EVは多くの血清型が存在し、血清型の違いによって臨床症状に違いが見られる。年毎に流行する血清型、流行の規模が変化するため、継続的にウイルス検出状況及び検出ウイルスの血清型を調査し、情報収集していくことが必要である。

文献

- 1) Mark A. Pallansch, M. Steven Oberste, and J. Lindsay Whitton : Enteroviruses : polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. David M. Knipe and Peter M. Howley eds, Fields Virology 6th Edition. Volume1, 490-530, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2013
- 2) 国立感染症研究所及び地方衛生研究所全国協議会病原体検出マニュアル 手足口病
- 3) 国立感染症研究所及び地方衛生研究所全国協議会病原体検出マニュアル ヘルパンギーナ
- 4) 国立感染症研究所及び地方衛生研究所全国協議会病原体検出マニュアル 無菌性髄膜炎
- 5) 国立感染症研究所, 感染症疫学センター, 厚生労働省健康局結核感染症課 : 感染症発生動向調査 週報 <https://www.niid.go.jp/niid/ja/idwr.html>

- 6) 国立感染症研究所, 感染症疫学センター, 厚生労働省健康局結核感染症課 : 病原微生物検出情報 <https://www.niid.go.jp/niid/ja/iasr.html>
- 7) 国立感染症研究所, 感染症疫学センター : 無菌性髄膜炎とは. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/520-viral-meningitis.html>
- 8) 渡辺裕子 : 手足口病後の爪変形・爪甲脱落症. 病原微生物検出情報, 33, 62-63, 2012
- 9) 吉田茂, 藤本嗣人 : エンテロウイルス 71 による脳炎および中枢神経合併症について. 病原微生物検出情報, 28, 342-344, 2007