

## 9. 静岡県の手足口病患者の咽頭・糞便・皮膚検体からのウイルス検出・定量

○藤本 嗣人 (国立感染症研究所 室長)

### 【研究目的】

手足口病患者の咽頭、糞便、皮膚検体からエンテロウイルスを検出・型別・定量する。

### 【研究の必要性】

2011 年から流行し始め、流行周期から 2018 年も流行が懸念されるコクサッキーウイルス A6 型 (CV-A6) の大規模流行が繰り返される理由は不明であり、解明が対策につながる。

### 【研究計画】

国立感染症研究所の倫理審査委員会において承認番号 832、877 で承認された研究の一部として実施した。静岡県において 2017 年に 88 例の手足口病患者から採取された咽頭、糞便、皮膚検体 (合計 107 件) についてエンテロウイルスの検出・型別、ウイルスの定量を行なう。

### 【実施内容・結果】

#### 研究の方法

**検体：**患者および臨床検体：2017 年 6 月 5 日～2017 年 11 月 8 日手足口病患者 88 例 (男 57 例、女 30 例および不明 1 例) から採取された 107 検体を用いた。検体は静岡県の小林小児科においてインフォームドコンセントを得て採取された。

**検査法：**ウイルスの型別は CODEHOP VP1 RT-snPCR (1)、ウイルスの定量はリアルタイム PCR (2) でそれぞれ論文報告された手法に準じて実施した。CODEHOP VP1 RT-snPCR により 88 例中 85 例 (97%) の患者からエンテロウイルスが検出された。サンガー法により決定された VP1 領域の配列の BLAST 解析により検出されたエンテロウイルスを型別した。

#### 研究の結果

85 例から CV-A6 (68 例)、エンテロウイルス A71 型 (EV-A71 ; 9 例)、エコーウイルス 9 型 (Echo-9 ; 5 例)、CV-A10 (2 例) および Echo-16 (1 例) の 5 種類の型が検出された。

85 例から採取された 107 検体の内訳は表 1 のとおりであり、皮膚由来検体から検体が採取され、さらにウイルスが検出されたのは全て CV-A6 であった。様々な皮膚検体から CV-A6 が検出された：痂<sup>か</sup>痂<sup>ひ</sup> (14/14 例、陽性率 100%)、落<sup>らく</sup>屑<sup>せつ</sup> (6/7 例、86%)、上<sup>じやう</sup>肢<sup>し</sup>擦<sup>さつ</sup>過<sup>か</sup>物<sup>ぶつ</sup> (6/7 例、86%)、下<sup>げ</sup>肢<sup>し</sup>擦<sup>さつ</sup>過<sup>か</sup> (4/5 例、80%)、皮膚 (部位記載なし) (3/3 例、100%)、足<sup>あし</sup>裏<sup>うら</sup>皮膚 (1/1 例、100%)、および水<sup>すい</sup>疱<sup>ぽう</sup>擦<sup>さつ</sup>過<sup>か</sup> (1/1 例、100%) であり、陽性率はいずれの検体でも 80% 以上であ

った。エンテロウイルスが検出されなかった検体は表2のとおりであった。

107 検体のリアルタイム PCR による定量の結果、ウイルスコピー数が 81 件 (76%) で得られた。CODEHOP VP1 RT-snpPCR により 102 件 (95%) で型別できたが、それらのうち 21 件 (21%) が検出限界以下と判定された。これら 21 検体の型は CV-A6 (14 件)、EV-A71 (4 件)、Echo-9 (2 件)、CV-A10 (1 件) と同定された。

### 1. ウイルス検出・型別結果

検体の種類	件数	CV-A6	EV-A71	Echo-9	CV-A10	Echo-16	陰性
咽頭ぬぐい液	67	48	9	5	2	1	2
痂皮	14	14					
落屑	7	6					1
上肢擦過	7	6					1
下肢擦過	5	4					1
皮膚	3	3					
血清	2	2					
足裏皮膚	1	1					
水疱擦過	1	1					
	107	85	9	5	2	1	5

\*CV-A6 以外のエンテロウイルスはすべて咽頭ぬぐい液のみから検出された。

表 2. エンテロウイルスが検出されなかった 5 検体

検体の種類	発症日	検体採取日	備考
咽頭ぬぐい液	2017/7/21	記載なし	他の検体なし。
擦過/手掌	2017/8/25	2017/8/24	同日(発症後 2 日目)に採取した咽頭ぬぐい液から EV-A71 検出
下肢落屑	2017/8/9	2017/8/27	発症後 20 日に採取。他の検体なし。
下肢擦過	2017/9/15	2017/9/11	同日(発症後 5 日目)に採取された咽頭ぬぐい液から CV-A6 検出
咽頭ぬぐい液	2017/11/8	2017/11/4	発症 5 日後に採取。他の検体なし。

### 【考察と今後の課題】

我が国において 2011 年～2019 年に CV-A6 が 1 年おきに大規模な手足口病 (HFMD) の流行を引き起こした。しかし、CV-A6 がこのように大規模流行する理由は不明である。CV-A6 は他の HFMD 起因病原体である EV71 や CV-A16 と比較して、痂皮が残りことが多く爪がはがれ

ることがあるなど独特の症状がみられる。その検査に関して皮膚（大きな水疱や、表層が大小の角質片となつてあるなど独特の症状がみられる。その検査に関して皮膚（大きな水疱や、表層が大小の角質片となつてはがれ落ちた皮膚など）が使用できるか不明であったので、皮膚からウイルスが検出されるか検証した結果、検出されることが明らかになった。

今回、2017年に発症した手足口病患者のほとんど(97%)の咽頭、糞便、皮膚検体からエンテロウイルスが検出・型別された。皮膚検体38件のうち35件(92%)からCV-A6が検出・同定された。2017年はCV-A6による大規模な手足口病の流行があったことが全国のデータから明らかになっているが、我々の結果はそれを裏付ける結果であった。また、皮膚由来検体からも高率にCV-A6が検出され、CV-A6による手足口病の検査に皮膚由来検体が使用できると考えられた。また、皮膚検体から高頻度にCV-A6が検出された結果は皮膚がCV-A6の感染源となることを示唆している。

今後の課題として、PCRによる臨床検体からの直接のウイルス検出・定量を実施したが、ウイルス分離は実施していない。そのため、皮膚由来検体から検出されたCV-A6に感染力があるか否かは不明であり、今後の検討が必要である。また、皮膚由来検体の採取法に関して標準的な方法がないため、皮膚検体採取法の標準化が必要である。

#### 【参考文献】

- 1) 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.
- 2) Fujimoto T et al. Usefulness of real-time reverse transcription-polymerase chain reaction for the diagnosis of echovirus aseptic meningitis using cerebrospinal fluid. Jpn J Infect Dis. 2009 Nov; 62(6):455-7.

#### 【経費使途明細】

使 途	金 額
消耗品費（試薬、実験用器具、パソコン消耗品、ソフトウェア、書籍）	155,965 円
交通費（研究に関する情報交換・講演会聴講 金沢・船堀・京都）	56,224 円
会場費（会場費3回分）	55,900 円
会議費（7名参加の会議×2回、役員会 2回）	37,775 円
合 計	305,864 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円