

51. 手足口病患者からのウイルス分離及び遺伝子解析について

○仲 浩臣、寺杣文男（和歌山県環境衛生研究センター）

青木一人（旧所属 和歌山県環境衛生研究センター 現所属 和歌山県福祉保健部薬務課）

【はじめに】

手足口病は、手掌、足底、口腔内等に生じる水疱性発疹を主症状とし、夏季に乳幼児を中心とした流行を起こす急性のウイルス感染症で、主要原因はコクサッキーウイルス A16 型（以下 CA16）、エンテロウイルス 71 型等の A 群エンテロウイルスである¹⁾。手足口病の多くは予後良好な疾病であるが、時に無菌性髄膜炎や急性脳炎等を併発することがあり、これら中枢神経系合併症による数十人規模の死亡例が中国やマレーシア等のアジア地域から報告されている。今回、手足口病の予防・啓発を目的として、和歌山県の患者発生状況及び原因ウイルスと臨床所見等との関連性について調査を行ったので報告する。

【材料と方法】

1. 手足口病患者発生状況

感染症発生動向調査事業により、県内 31 箇所の小児科定点医療機関から報告される患者数により把握した。

2. ウイルス検査と遺伝子解析

（1）材料

2011 年 5 月から 8 月にかけて県内の医療機関で採取された手足口病 76 症例由来の咽頭拭い液 72 検体及び糞便 4 検体と、手足口病罹患後にみられた爪甲脱落症 3 症例由来の爪 3 検体を検査材料とした。

（2）方法

ウイルス遺伝子の検出は材料から RNA を抽出した後、Oberste 等の 486/488 プライマー²⁾を用い、RT-PCR により行った。この内、陰性例については Ishiko 等の EVP4/OL68-1 プライマー³⁾を用いた RT-PCR を併せて実施した。

ウイルス分離は RD-18s、Vero、VeroE6、HEp2、A549 細胞を用いた細胞培養法により実施した。細胞変性効果（以下 CPE）が確認されたものについて、EVP4/OL68-1 プライマー、或いは Benschop 等の VP1-ParEchoF1/ VP1-ParEchoR1 プライマー^{4, 5)}を用いた RT-PCR を行い、増幅産物の塩基配列をダイレクトシーケンス法により決定した後、DDBJ の BLAST 検索によりウイルスを同定した。

系統樹解析は当センター検出株と標準株（CA6 Gdula/AY421764）のVP3-VP1領域の部分塩基配列（204bp）を用いてDBJのClustalWで解析後、近隣結合法を用いて行った。

3. 倫理面への配慮

本研究は和歌山県環境衛生研究センター倫理審査委員会の承認を得て実施した。

【結 果】

2011年は全国的に手足口病の大きな流行がみられ、1981年に感染症発生動向調査が開始されて以来、最大規模の流行となった¹⁾。当県においても、患者報告数は第20週から増加し始め、第28週には定点当たり報告数が9.97人で最大となり、その後急速に減少したが、2000年から2010年までの平均を上回る流行が年末まで続いた(図1)。2000年以降では、流行ピーク時の定点当たり報告数は、2000年、2007年に次いで多く、また累積報告数では2000年に次ぐ流行規模であった。

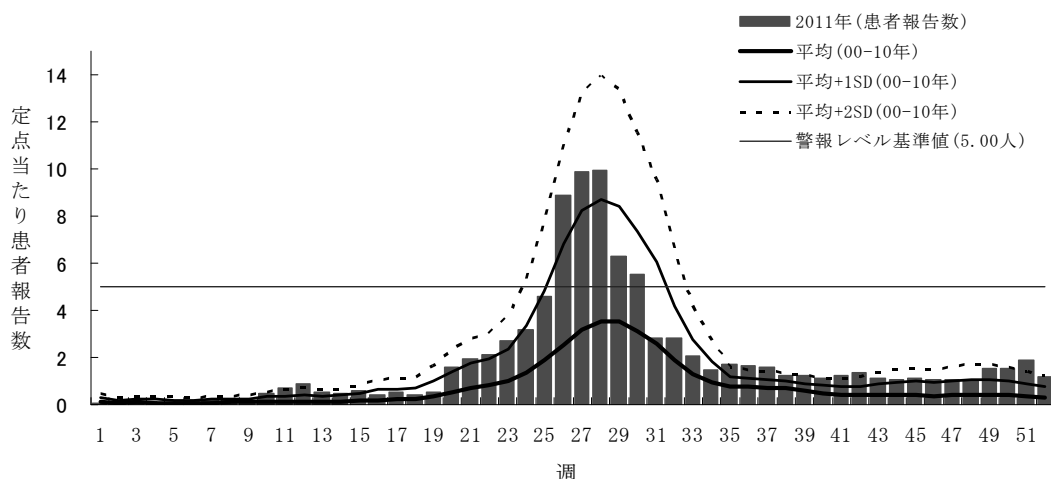


図1. 手足口病患者報告数の推移（和歌山県）

ウイルスは79症例中61例（77.2%）から検出された。この内コクサッキーウイルスA6型（以下CA6）は56例で検出され、内訳は第20週から第31週にかけてみられた手足口病54例、及び第32、33週の爪甲脱落症2例であった。CA6の検出はすべてRT-PCR法によるもので、細胞培養法ではいずれの細胞でもCPEは確認されなかった。

CA6以外のウイルスはすべて手足口病由来で、細胞培養法により、第28週にエコーウイルス25型が1例とパレコウイルス3型が2例、RT-PCR法により、第31週にCA16が2例検出された。

手足口病から検出されたウイルスは、第27週まではすべてCA6であったが、第28週以降はCA6、7例（58.3%）に対し、CA6以外のウイルスが5例（41.7%）であった。

CA6 が検出された手足口病患者 54 症例の年齢分布は、全国の状況¹⁾と同様に 1 歳児からの検出例が最も多く、5 歳以下が全体の 88.9% (48 例) を占めていた (図 2)。発熱患者は 54 症例中 45 例 (83.3%) で、38℃以上の患者が全症例の 70.4% (38 例) を占め、発熱の平均値は 38.6℃、中央値は 38.7℃であった。また、CA6 が検出された爪甲脱落症例では、それぞれ手足口病発病後、約 1 ヶ月或いは 1 ヶ月半経過後に爪の脱落が確認された (表 1)。

系統樹解析を行った CA6、56 株は臨床材料の採取時期や地域に拘らず、100%の相同性を有した株が多く、系統樹上に発熱や爪甲脱落の有無を示唆する変異も確認されなかった。全検出株間での塩基配列、アミノ酸配列の相同性は共に 97-100%であった (図 3)。

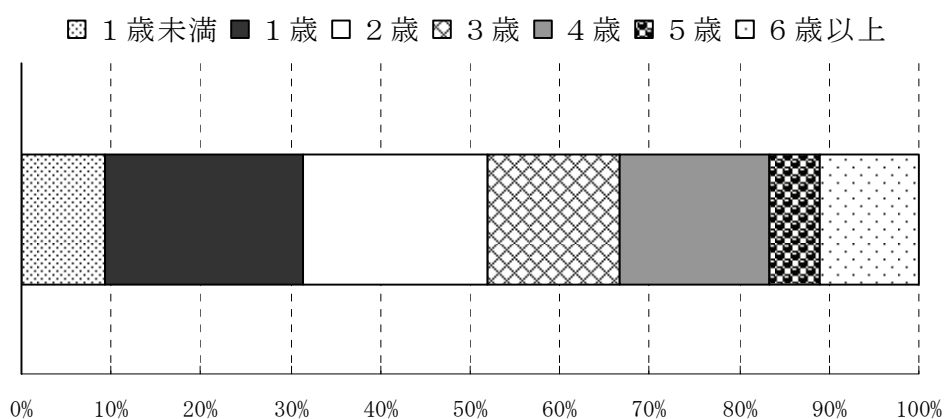


図 2. 2011年のCA6による手足口病患者の年齢分布 (N=54)

表 1. CA6 が検出された爪甲脱落症患者の臨床所見

	症例 1	症例 2
年齢・性別	6 歳男性	13 歳男性
手足口病発症日	2011 年 6 月 23 日	2011 年 7 月 11 日
診断時の臨床症状	発熱 (38℃台)	発熱 (39.9℃)
	咽頭炎	咽頭炎
	紅色発疹 (口周囲、膝、手、足)	全身に粟粒大の発疹、痒み
	口腔内のアフタ無し	口腔内のアフタ無し
爪の異常	ヘルパンギーナ様発疹 (咽頭)	爪全体の紅潮及び痛み
爪の異常	8 月 11 日に脱落確認	発病後、14 日後に爪の変化を認め、 8 月 12 日に脱落確認
検体採取日 (種別)	2011 年 8 月 18 日 (爪)	2011 年 8 月 12 日 (爪)

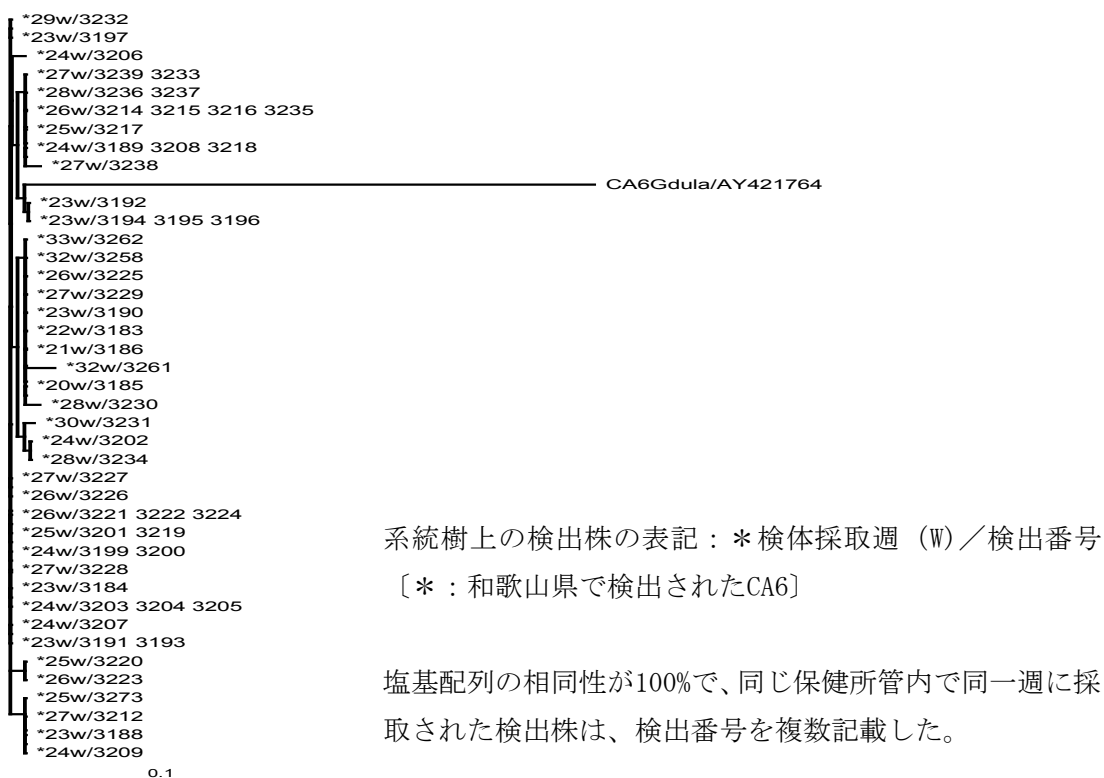


図3. VP3-VP1 領域の部分塩基配列に基づく分子系統樹

【考 察】

2011年の手足口病患者発生状況及びウイルス解析結果から、和歌山県内の流行は近年では2000年に次いで規模が大きく、その主要原因が相同性の高いCA6であったことが判明した。また、流行ピーク時以降はCA6に代わってCA16等の検出率が増加しており、全国的にも同様の状況⁶⁾が認められていることから、複数種のウイルスを原因とした混合流行が年末まで継続していたと考えられた。

一般的に手足口病の発熱症状は軽度とされている⁷⁾が、昨年のCA6による手足口病では発熱を呈した患者が多く、38℃以上の症例も約7割に認められていることから、高頻度の発熱が臨床的特徴の一つとして挙げられる。また、CA6による手足口病では回復後に爪甲の脱落や変形を来す症例が国内外で報告されており⁸⁻¹⁰⁾、県内でも同様の症例が確認されている。今回、脱落した爪から手足口病由来のCA6と相同性の高いウイルスが検出されたことから、爪甲脱落症はCA6による手足口病に起因した特徴的所見であると考えられた。

2011年の調査では、無菌性髄膜炎等の重症化症例は確認されなかったが、手足口病はその原因により、中枢神経系合併症の発生頻度が異なる疾病であるため、今後も感染症発生動向調査事業等を通じ、病原体の流行状況を調査していくことが重要と考える。

【参考文献】

- 1) 国立感染症研究所感染症情報センター：IASR 病原体微生物検出情報（月報），33(3)，55～56，2012.
- 2) Oberste M. S, 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
- 3) Ishiko H, et al. : Molecular diagnosis of human enteroviruses by phylogeny-based classification by use of the VP4 sequence. J Infect Dis 185:744-754, 2002
- 4) Benschop KS, et al. : Human Parechovirus Infections in Dutch Children and the Association between Serotype and Disease Severity. Clin Infect Dis 42:204-210, 2006
- 5) 伊藤雅, 他 : ヒトパレコウイルス感染症, 臨床検査, 53(1), 105-110, 2009
- 6) 国立感染症研究所感染症情報センター：週別手足口病患者からのウイルス分離・検出報告数, 2008～2012年, <https://nesid3g.mhlw.go.jp/Byogentai/Csv/data24j.csv>
- 7) 国立感染症研究所感染症情報センター：感染症発生動向調査週報 感染症の話「手足口病」, 2001年第27週（7月2日～7月8日）
- 8) Riikka Österback, et al. : Coxsackievirus A6 and Hand, Foot, and Mouth Disease, Finland. Emerg Infect Dis 15(9):1485-1488, 2009
- 9) Fujimoto T, et al. : Hand, Foot, and Mouth Disease Caused by Coxsackievirus A6, Japan, 2011 Emerg Infect Dis 18: 337-339, 2012
- 10) 国立感染症研究所感染症情報センター：IASR 病原体微生物検出情報（月報），32(11)，339～340，2011

〔謝辞〕

本研究を実施するにあたり、研究助成を頂きました公益財団法人大同生命厚生事業団に深謝致します。

（経費使途明細）

Qiagen viral RNA Mini kit(250 検体用) No:52906	114,000 円
BigDye® Terminators v1.1 Cycle Sequencing Kit(100 反応) No:4337450	112,100 円
ABI 310POP6 (3ml) No:402837	24,400 円
ABI EDTA バッファー No:402824	11,200 円
Wako 牛胎児血清 500ml No:531-69541	10,415 円
Wako MEM ノンエッセンシャルアミノ酸 100ml No:539-10251	6,600 円
Sarstedt 1.5ml サンプルングチューブ 1000 本入り	7,000 円
消費税	14,285 円
合計	300,000 円