

2006年の長野県におけるエンテロウイルス71型分離状況

高橋夕子¹・畔上由佳・粕尾しず子・中沢春幸・小林正人・和田啓子

キーワード：発生動向調査事業，手足口病，エンテロウイルス71型

1. はじめに

手足口病は，手足ならびに口腔粘膜に水疱性発疹をきたす疾患で，毎年夏季に小児を中心に流行するエンテロウイルス感染症である^{1) 2)}．主な起因ウイルスとしてコクサッキーウイルスA群10型やコクサッキーウイルスA群16型（以下CA16），エンテロウイルス71型（以下EV71）が知られている²⁾．一般的に予後良好な疾患とされているが³⁾，EV71による感染時は中枢神経合併症の併発頻度が高く，1977年以降，日本を含む東アジア地域では死亡例も報告されており^{2) 4)}，EV71を主体とする手足口病の流行に大きな関心が寄せられている．

このような現状の中で，2006年感染症発生動向調査事業において長野県の手足口病患者報告数は全国平均を大きく上回り，当所に搬入された手足口病をはじめとする患者検体からEV71が例年になく高率に分離されたので，その概要を報告する．

2. 検査対象と方法

2.1 検査対象

感染症発生動向調査事業において2006年第1週(1/2～1/8)から第43週(10/23～10/29)までに長野県内の定点医療機関で採取され，当所に搬入された295検体を検査対象とした．検査材料の内訳は咽頭ぬぐい液270検体，髄液21検体，糞便4検体であった．

2.2 ウイルス分離方法

咽頭ぬぐい液および髄液は攪拌後，3000rpm，20分間遠心分離した．糞便は試料1gに高濃度抗生物質（Penicillin 500u/mlおよびStreptomycin 500 γ /ml）を含むPBS（phosphate-buffered saline）8.5ml，クロロホルム1.5mlを加え，激しく攪拌後，

3000rpm，20分間遠心分離した．遠心分離後上清液100 μ lをVero，Hep-2，Vero9013，RD-18s細胞に接種し，35 $^{\circ}$ C，5%CO₂下で一週間培養した．判定は細胞変性効果（cytopathic effect：以下CPE）の出現をもってウイルス分離陽性とし，CPEが認められなかったものはさらに3代まで継代培養を行った後，判定した．

細胞培養法で陽性と判定されたものは，CPEの出現程度によってウイルス液を細胞維持液で4～10倍に希釈した後，国立感染症研究所より分与された抗血清でトランスファーを使用した方法²⁾により中和試験を実施し同定を行った．

2.3 遺伝子学的検査方法

中和試験でEV71と同定された細胞培養上清液を用いて，エンテロウイルスのVP4-VP2領域を増幅するEVP4およびOL68-1プライマーを用いたReverse Transcription-Polymerase Chain Reaction法（以下RT-PCR法）²⁾を試みた．エンテロウイルスと確認されたものは，EV71F/Rを用いた山崎ら⁵⁾の方法によりNested Polymerase Chain Reaction法（以下Nested-PCR法）を実施し，EV71の確認を行った．さらにEV71と確認された株はシーケンスによる系統解析を国立感染症研究所に依頼した．

3 結果および考察

3.1 全国および長野県における手足口病患者発生状況

全国および長野県における手足口病患者定点あたり報告数を図1に示す．

全国における手足口病患者発生状況：全国における手足口病患者の定点あたり報告数は第19週(0.2)以降増加しており，第28週(1.9)～第30週(1.9)にかけてピークが認められ，それ以後，減少傾向を

1 長野県環境保全研究所 保健衛生部 〒380-0944 長野県長野市安茂里米村1978

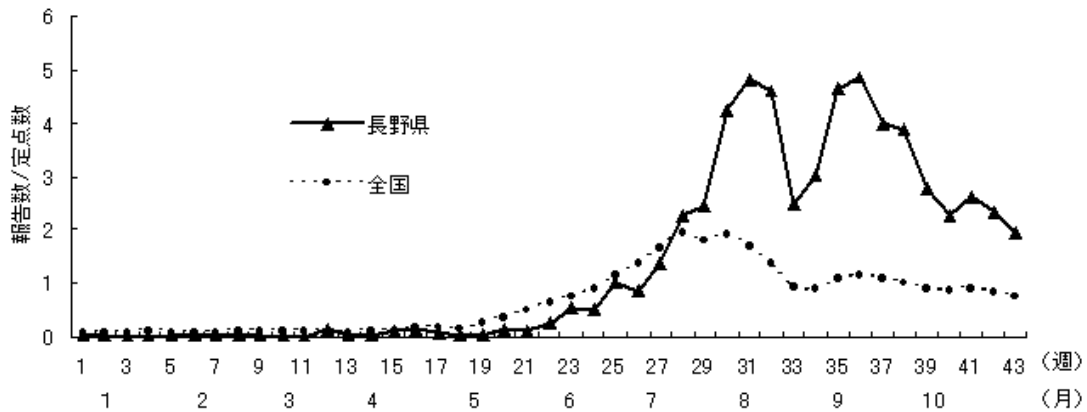


図1 全国および長野県における手足口病患者定点あたり報告数

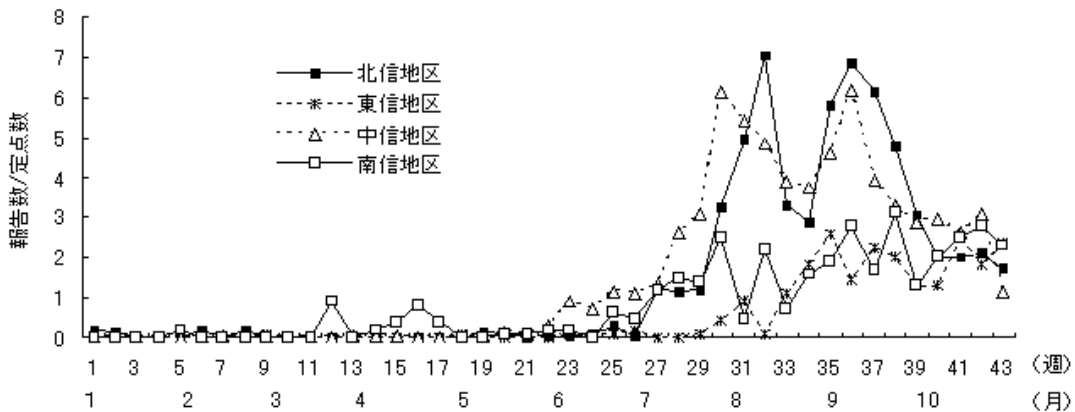


図2 長野県内地区別手足口病患者定点あたり報告数

示した。

長野県における手足口病患者発生状況：長野県における報告数は全国より遅れて第22週(0.3)から増加し、全国でピークが認められた第28週(2.3)および第30週(4.3)には全国の報告数を上回り、第31週(4.8)に第1ピークが認められた。第32週(4.6)からは一時減少したが、その後、第35週(4.7)～第36週(4.8)にかけて再び高値となり、第37週(4.0)から減少傾向を示していた。長野県では第30週～第32週にかけて、手足口病患者数が最も多い年齢層の乳幼児が通う幼稚園、保育園が夏休みにより相次いで休園となったため、集団暴露の機会が低下し、潜伏期間を経た第32週から第33週、第34週の一時的な減少につながったものと推察された。また、第33週はお盆にあたり、休診した医療機関があったことから、それに伴う報告数の減少も考えられた。このため、逆に第34週から再開された集

団生活により再び伝搬が広がり、患者数が増加したものとされる。2006年における長野県の流行が全国平均に比べて大きく、また、これらの影響が流行のピークと重なっていたため、報告数の増減が顕著に表れたものと推察された。

3.2 長野県内地区別手足口病患者発生状況

長野県内4地区(東中南北)における手足口病患者定点あたり報告数を図2に示す。

第1週から第24週までの定点あたり報告数は、どの地区においても1.0以下で推移していた。その後、中信地区では他の地区に先駆けて第25週(1.2)から増加傾向となり、第30週(6.1)および第36週(6.2)には二峰性のピークを示した。また、北信地区においては第32週(7.0)および第36週(6.9)にかけて二峰性のピークを示した。両地区は共に第37週から減少した。

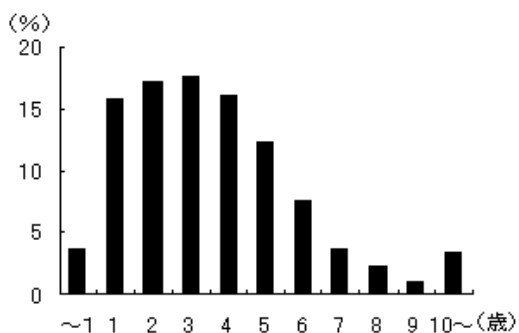


図3 長野県における手足口病患者の年齢分布

南信、東信地区ではそれぞれ第25週、第30週から増加傾向を示していたが、調査期間において0.0～3.1の範囲で増減を繰り返しており、調査期間終了週（43週）においても減少傾向は認められなかった。

患者発生状況に地域差が認められた要因は不明であった。

3.3 長野県における手足口病患者の年齢分布

長野県において報告された手足口病患者の年齢分布を図3に示す。

報告された患者総数は3207人であった。患者数の最も多い年齢は3歳で全体の17.6%（566人）、次いで2歳が17.1%（550人）、4歳が16.0%（514人）、1歳が15.8%（507人）、5歳が12.3%（393人）で、患者の80%以上（2646/3,207人）が5歳以下の小児であった。本疾患の好発年齢は乳幼児とされており⁶⁾、今回の調査においても同様の傾向が認められた。

3.4 エンテロウイルス分離状況と遺伝子学的検査

Vero9013細胞およびRD-18s細胞におけるCPE

の出現パターンを図4に示す。

細胞培養法により分離されたEV71の総数は45株であった。そのうち、Vero9013細胞およびRD-18s細胞ともに感受性を示したものは34株、Vero9013細胞のみ感受性を示したものが8株、RD-18s細胞のみ感受性を示したものは3株であった。両細胞共に1代で分離された株が最も多かったが、継代後にCPEが認められた株では、Vero9013細胞はRD-18s細胞に比べて早い継代数でCPEが認められる傾向にあった。

EV71分離株がVero細胞で高い感受性を示したと報告されているが⁷⁾、今回、Vero細胞及びHep-2細胞では、いずれの分離株も感受性は認められなかった。

EV71以外のエンテロウイルスはVero9013細胞よりもRD-18s細胞で良好に分離される傾向にあった。

分離株の同定は中和試験により行った。エンテロウイルスは伝搬の過程で抗原性の変化により、中和試験による同定が困難な場合がある²⁾との報告もあるが、今回分離された株は全て既存の抗血清により良好に中和された。

確認試験として、中和試験でEV71と同定された45株の中から無作為に抽出した33検体の細胞培養上清液を用いてRT-PCRを行った結果、全て650bpの特異的バンドが認められ、エンテロウイルスであることが確認された。さらに、Nested-PCRを行ったところ全て208bpの特異的バンドが認められ、EV71であることが確認された。

Nested-PCRによりEV71と確認された33株の中から無作為に抽出した17株のRT-PCR産物を用いてシーケンスによる系統解析を依頼した結果（図5）、当所における分離株はいずれも99%以上の相同性を

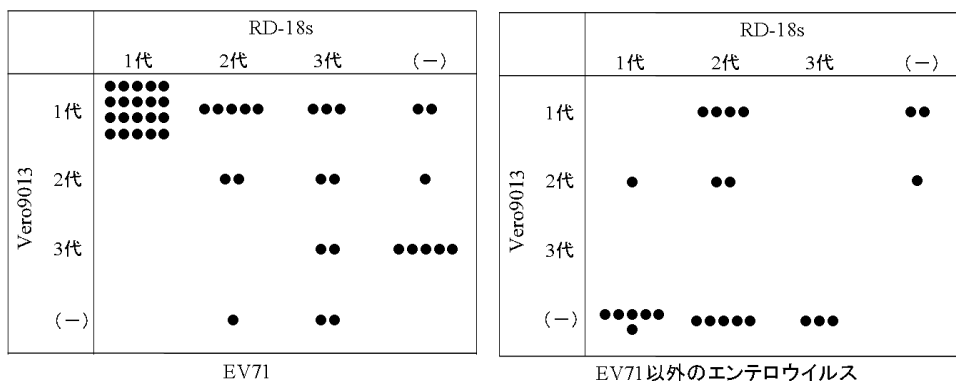


図4 Vero9013細胞およびRD-18s細胞におけるCPEの出現パターン
●：分離1株を示す

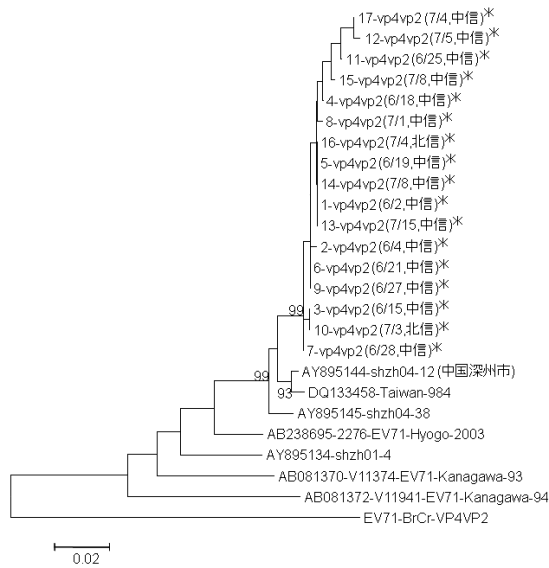


図5 シークエンスによるEV71分離株の系統解析
* : 当所で分離された株 () : 発病日, 発生地区

表1 診断名別検査件数および分離ウイルス内訳

診断名	検査 件数	EV71 分離数	EV71以外のエンテロウイルス	
			分離数	内訳
手足口病	46	33	5	CA16 (4) CA9* ¹ (1)
無菌性髄膜炎	20	4		
不明発疹症	18	4	7	CA4 (1) CA9 (6)
ヘルパンギーナ	25	4	10	CA4* ² (8) CB2* ³ (2)
咽頭結膜熱	29		2	CB3* ⁴ (1) CA9 (1)
インフルエンザ	144			
急性上気道炎	3			
結膜炎	1			
アデノウイルス感染症	6			
流行性耳下腺炎	2			
流行性角結膜炎	1			
計	295	45	24	

* 1 : コクサッキーウイルスA群9型
* 2 : コクサッキーウイルスA群4型
* 3 : コクサッキーウイルスB群2型
* 4 : コクサッキーウイルスB群3型

示していた。また、2004年に中国の深州市(広東省)で分離された株と近縁にあることが判明した。

3.5 診断名別検査件数およびウイルス分離状況

診断名別検査件数およびウイルス分離状況を表1に示す。

手足口病患者検体からはEV71が71.7% (33/46検体), CA16が8.7% (4/46検体), CA9が2.2% (1/46検体)分離された。さらに、当所では複合感染の可能性を考慮し、定点医療機関の報告診断名が手足口病でなかった患者検体からもウイルス分離を行った結果、今回、EV71はヘルパンギーナ患者検体8.9% (4/45株)や不明発疹症患者検体8.9% (4/45株)からも分離された。また、EV71以外ではコクサッキーウイルスが24株分離された。

EV71は従来から無菌性髄膜炎をはじめとする中枢神経疾患の起因ウイルスとして注目されているが¹⁾、今回、無菌性髄膜炎4症例中3症例の髄液および1症例の糞便からEV71が分離され、EV71感染による中枢神経合併症の可能性が推察された。

3.6 長野県における手足口病患者検体からの年別ウイルス分離状況

2000年から2006年の間に当所に搬入された手足口病患者検体からのウイルス分離状況を表2に示す。

全国的にはCA16とEV71が周期的に流行を繰り返しており、EV71を主体とする流行は、2000年、

2003年、2006年と2年おきに認められている⁸⁾。EV71の流行年における全国の分離率は2000年40.5% (143/353株)、2003年72.2% (314/435株)、2006年59.9% (175/292株)であった。一方、同年の長野県における分離率は、2000年が47.4% (9/19株)、2003年が33.3% (4/12株)で全国に比較して同等かそれ以下であったが、2006年は86.8% (33/38株)と顕著に高率(p < 0.005)で、2000年以降、最も高かった。

2006年の全国における手足口病の流行は、分離されたウイルスの内訳のうちEV71が59.9%を占めていることから、EV71を主体としたものにみえる。しかし、他疾患名患者由来株を含むEV71分離株の総数を報告機関別にみると、愛知県(56/255株)、山形県(45/255株)および長野県(45/255株)の3県のみで57.3% (146/255株)を占めており⁹⁾さらにEV71がCA16に比べ高率に分離されているのは全国60機関中16機関のみであることから、2006年の長野県におけるEV71を主体とする手足口病の流行は地域限定的なものと推察された。流行地域が限定的であった理由は不明だが、今後、エンテロウイルス感染症を予防する上にも、その要因を検討していくことが必要と思われる。

4 まとめ

2006年感染症発生動向調査における長野県の手

表2 当所における手足口病患者検体からの年別ウイルス分離状況

	総検体数	ウイルス 分離数	EV71		EV71 以外の分離ウイルスの内訳と分離数						
			分離数	分離率 (%)	CA16	CA10 ^{*1}	その他 Cox ^{*2}	Echo ^{*3}	AD ^{*4}	HSV ^{*5}	INF ^{*6}
2000年	43	19	9	47.4			3	5	1	1	
2001年	50	25	2	8.0	18		1	1	1	1	1
2002年	25	11	4	36.4	5	1					1
2003年	33	12	4	33.3	4		1		3		
2004年	15	11	2	18.2	7		2				
2005年	11	9		0.0	6		1		2		
2006年	46	38	33	86.8	4		1				

*1: コクサッキーウイルス A 群 10 型

*2: コクサッキーウイルス

*3: エコーウイルス

*4: アデノウイルス

*5: ヒトヘルペスウイルス

*6: インフルエンザウイルス

手足口病患者報告数は全国平均を大きく上回っており、患者検体からは EV71 が高率に分離された。また、無菌性髄膜炎をはじめとする他診断名患者からも分離された。

EV71 分離株は Vero 細胞および Hep-2 細胞からは分離できなかったが、Vero9013 細胞および RD-18s 細胞に感受性を示した。中和試験では良好に同定され、PCR 検査においても同様の同定結果が得られた。また、分離株はいずれも近縁にあった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、シーケンス等、御協力を賜りました国立感染症研究所ウイルス第2部吉田弘先生に深謝いたします。

文 献

- 1) 畑中正 (1997) ウイルス学. 134-141
- 2) 清水博之・米山徹夫, 吉田弘・山下照夫 (2003)

病原体検査マニュアル. 手足口病, 1-22

- 3) 吉田弘 (2003) ヒトエンテロウイルス. 日本臨床, 61 巻, 増刊号 3, 463-467
- 4) 岡部信彦・清水博之・吉田弘 (1998) 国立感染症研究所感染症情報センター病原微生物検出情報, 19, 75
- 5) 山崎謙治, ・奥野良信 (2000) 2000 年大阪府で流行した手足口病の遺伝子診断および分子疫学的解析. 感染症学雑誌, 75, 11
- 6) 田口文章 (2006) ウイルス感染症がわかる本, 128-129
- 7) 吉田紀美・山下育孝・近藤玲子・大瀬戸光明・浅井忠男・井上博雄 (2000) 愛媛県におけるエンテロウイルス 71 型による手足口病の疫学的考察. 平成 12 年度愛媛衛環研年報, 23-29
- 8) 国立感染症感染症情報センターホームページ
<http://idsc.nih.go.jp/iasr/index-j.html>
- 9) 国立感染症感染症情報センター (2006) 病原微生物検出情報, Vol27, No11

Survey of Enterovirus 71 at 2006 in Nagano Prefecture

Yuko TAKAHASHI, Yuka AZEGAMI, Shizuko KASUO, Haruyuki NAKAZAWA, Masato KOBAYASHI and Keiko WADA

*Nagano Environmental Conservation Research Institute, Public Health Division,
1978 Komemura, Amori, Nagano 380-0944, Japan.*