

2011年に手足口病・ヘルパンギーナ患者から検出した エンテロウイルスの遺伝子解析と臨床的特徴

内山友里恵¹・中沢春幸¹

キーワード：手足口病，ヘルパンギーナ，エンテロウイルス，コクサッキーウイルスA群6型，系統樹解析

1. はじめに

手足口病(Hand, foot and mouth disease :HFMD)は、3～5日の潜伏期間の後、口の粘膜・手のひら・足の裏などに現れる2～3mmの水疱性の発しんを主症状とした急性ウイルス性感染症である。その他に発熱(38度以下)や食欲不振、のどの痛みなどが見られるが、一般的に軽症で、発疹は3～7日で消失する。

一方ヘルパンギーナ(Herpangina)は、典型的には2～4日の潜伏期間の後、突然38度以上の発熱を呈し、続けて口腔内に水疱が出現する急性ウイルス性感染症である。水疱が破れて痛みを伴うことがある。その後2～4日で解熱し、7日程度で治癒する。発熱による倦怠感や口腔内の痛みなどから、食事や水分を十分にとれず、脱水症状を呈することもある。

いずれも乳幼児を中心に夏季に流行する疾患であり、病原ウイルスはどちらもエンテロウイルス属によるものである。手足口病は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)及びコクサッキーウイルスA群10型(以下CA10)によるものが多く、ヘルパンギーナは、コクサッキーウイルスA群4型(以下CA4)、コクサッキーウイルスA群6型(以下CA6)及びCA10の感染によるものが多いと言われている。

このうちCA6とCA10は患者個体、感染時期によって、手足口病、ヘルパンギーナ様の多様な症状を示す。また手足口病、ヘルパンギーナを引き起こすウイルスは、年によって入れ替わり、流行規模にも変化がみられることが知られている^{1) 2)}。

2011年(H23年)は、長野県で手足口病が第31週(8月1～7日)に定点医療機関あたり9.04人と、過去5年間でもっとも多い状況となり、大規模な流行をみとめた。またヘルパンギーナも、定点あた

り8人を超える流行を示した³⁾。

そこで今回、2011年(1月～10月)の長野県における手足口病およびヘルパンギーナ患者からのPCR法によるエンテロウイルス検出状況と、遺伝子解析および臨床的特徴について報告する。

2. 検査対象と方法

2.1 検査対象

検査対象は、感染症発生動向調査事業において2011年1月～10月の間に長野県内の定点医療機関で、手足口病もしくはヘルパンギーナと臨床診断された患者から採取された咽頭ぬぐい液67検体(手足口病:46検体、ヘルパンギーナ:21検体)とした。また、過去の分離株と比較するために、2007年(H19年)に分離したCA6の5株と、2008年(H20年)に分離したCA10の5株を検査材料とした。

2.2 遺伝子学的検査方法

咽頭拭い液から、QIAampViral RNA Mini Kit(QIAGEN社)を用いてRNAを抽出した。抽出したウイルスRNAは、エンテロウイルス特異プライマー(AM11,12/AM31,32)を用いてワンステップRT-PCRによりVP2領域を増幅した。特異バンド(584bp)が検出されなかった検体については、セミネステットPCR(プライマー AM21,22/AM31,32)を実施した^{4) 5)}。得られたPCR増幅産物はQIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN社)を用いて精製後、ダイレクトシーケンシング法によりABI PRISM 3130 Genetic Analyzer(Applied Biosystems)を用い、VP2領域の塩基配列(512nt)を決定した。得られた塩基配列の成績は、GenBankに登録されている塩基配列情報との相同性をBLAST(<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>)より検索し、ウイルスを同定した。さらにClustal Wを用いて系統樹解析を行った。

1 長野県環境保全研究所 感染症部 〒380-0944 長野市安茂里米村1978

3. 結果および考察

3.1 長野県における手足口病患者およびヘルパンギーナ患者からのエンテロウイルス検出状況

手足口病患者およびヘルパンギーナ患者 67 検体のうち、CA6 が 45 株 (67%) と最も多く検出され、全体の 3 分の 2 を占めた。次いで CA10 が 18 株 (27%)、CA16 が 4 株 (6%) であった (図 1)。疾患別では、手足口病患者 46 株のうち CA6 が 35 株 (76%) と最も多く、次いで CA10 が 7 株 (15%)、CA16 が 4 株 (9%) であった (図 2)。

ヘルパンギーナ患者では、21 株のうち CA6 が 10 株 (48%)、CA10 が 11 株 (52%) 検出された (図 3)。このことから 2011 年 1 月～10 月は、手足口病、ヘルパンギーナ両疾患とも主な原因ウイルスは CA6 とと思われる。加えて病原性の相違によりヘルパンギーナ患者から CA10 が高頻度に検出された。

2004 年 (H16 年)～2010 年 (H22 年) の間、手足口病の流行中に最も多く検出されたウイルスは、全国と同様に CA16 と EV71 であり、この 2 つの血清型が、数年ごとに入れ替わっている (図 4)。CA6 は、少数の分離・検出はあったものの、これまで手足口病の主な原因ウイルスだったことはなかつ

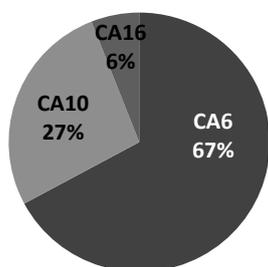


図 1 2011 年 (1 月～10 月) エンテロウイルス検出状況

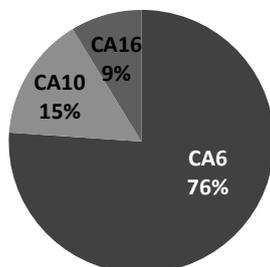


図 2 2011 年 (1 月～10 月) 手足口病患者からのエンテロウイルス検出状況

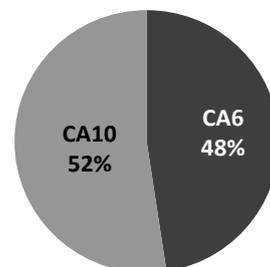


図 3 2011 年 (1 月～10 月) ヘルパンギーナ患者からのエンテロウイルス検出状況

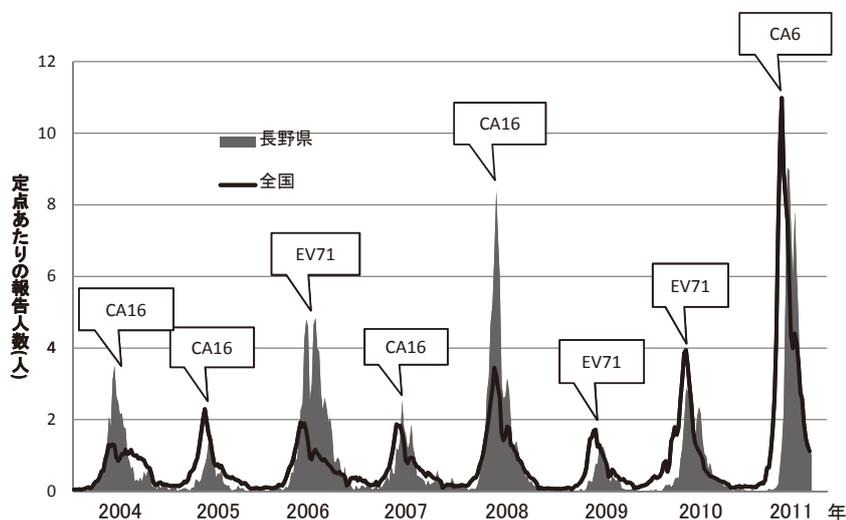


図 4 手足口病の主流原因エンテロウイルスと患者報告数の推移

表 1 長野県における手足口病患者からのウイルス分離・検出状況

	2004年	2005年	2006年	2007年	2008年	2009年	2010年	2011年*
CA 2	1 (9)				2 (6)			
CA 6		1 (13)		1 (6)			2 (14)	35 (76)
CA 9			1 (2)			1 (11)	2 (14)	
CA 10		1 (13)						7 (15)
CA 16	7 (64)	6 (75)	5 (12)	13 (76)	30 (94)	1 (11)		4 (9)
コクサッキーウイルスB群 3型	1 (9)			3 (18)				
EV71	2 (18)		34 (85)			6 (67)	10 (72)	
エコーウイルス9型						1 (11)		
合計検出数	11	8	40	17	32	9	14	46

()内%表示

た。

しかし2011年はCA6が手足口病患者から8割近く検出され、その傾向は、他年と相違していた(表1)。

また、ヘルパンギーナ患者からは、全国と同様に例年、コクサッキーウイルスA群2型(以下CA2)、CA4、CA5、CA6及びCA10と多くの血清型が検出されており、主に検出される血清型も年ごとに代わる傾向があった(図5)。これに対し、2011年に検出されたのは、CA6とCA10の2つの血清型のみで、他の血清型は検出されていない(表2)。

両疾患において、同年に同じ血清型が多く検出されたことも他年と相違していた。

3.2 CA6の遺伝子解析

過去の株と比較するために、CA6が比較的多くヘルパンギーナ患者から分離された2007年の5株と、

2011年に手足口病患者とヘルパンギーナ患者から検出されたもののうち、512ntが決定できた39株についてVP2領域による系統樹解析を実施した(図6)。

その結果、2007年に検出したCA6と2011年に検出したCA6は、異なるクラスターに分類された。

2011年に検出したCA6の39株は、同年に静岡県で検出されたCA6 Shizuoka/2011 (Accession No.AB663320)株と98%~100%相同の類似株であった。このことから、2011年にヘルパンギーナ患者と手足口病患者から検出したCA6は、診断名にかかわらず類似株であったといえる。さらに得られた塩基配列をアミノ酸配列に変換し、2011年検出株と2007年検出株とで比較すると、10ヶ所の違いが認められた(図7)。解析したエンテロウイルスVP2領域は、ウイルス粒子の内部に存在し比較的変異の少ないことが知られている⁵⁾。2011年検出

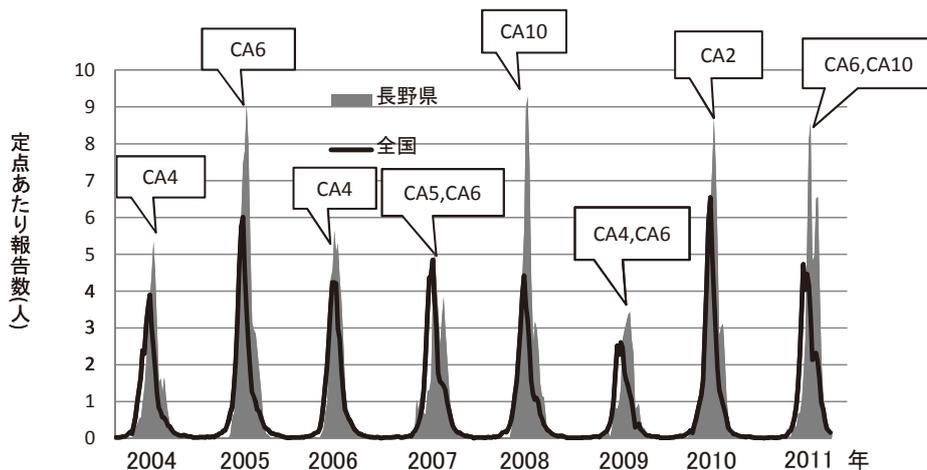


図5 ヘルパンギーナの主流原因エンテロウイルスと患者報告数の推移

表2 長野県におけるヘルパンギーナ患者からのウイルス分離・検出状況

	2004年	2005年	2006年	2007年	2008年	2009年	2010年	2011年 [*]
CA 2	7 (20)						7 (47)	
CA 4	14 (40)	5 (11)	18 (75)	1 (4)	3 (18)	6 (40)	3 (20)	
CA 5	1 (3)	10 (21)		11 (39)			2 (13)	
CA 6	6 (17)	24 (51)		11 (39)		5 (33)		10 (48)
CA 7							3 (20)	
CA 9		3 (6)				1 (7)		
CA 10		5 (11)		4 (14)	14 (82)			11 (52)
CA 16	1 (3)			1 (4)				
コクサッキーウイルスB群1型	3 (9)							
コクサッキーウイルスB群2型			2 (8)					
コクサッキーウイルスB群3型	3 (9)							
コクサッキーウイルスB群4型						3 (20)		
EV71			4 (17)					
総計	35	47	24	28	17	15	15	21

()内%表示

株と2007年検出株のVP2領域にコードされたアミノ酸配列に相違がみとめられたことは、感染性や病原性を司る領域にも変異が生じた可能性が考えられた。

3.3 CA10の系統樹解析

過去の株と比較するために、CA10が比較的多くヘルパンギーナ患者から分離された2008年5株と、2011年に手足口病患者とヘルパンギーナ患者から検出されたもののうち、512ntが決定できた13株についてVP2領域による系統樹解析を行った(図8)。2008年に検出したCA10と2011年検出のCA10は、異なるクラスターに分類された。さらに、今回解析した領域での塩基配列では、相違が認められるものの、アミノ酸変換で同義置換され、アミノ酸配列には相違を認めなかった(図9)。

3.4 臨床的特徴

従来、突然の高熱を伴い発疹が口腔内に限定した所見を認めればヘルパンギーナ、38℃以下の発熱で発疹が口腔内だけでなく手足にも出現が確認されれば手足口病と診断される場合が多い。しかし、松岡ら⁶⁾によれば、2011年は、高熱と口腔内発疹の所見からヘルパンギーナと診断しても、その後に皮疹が出現したことから手足口病と診断を訂正した事例を報告しており、その非典型事例からCA6が62%と、比較的多く検出されている。また、これまでより大きい扁平な水疱を伴う場合や、病後に爪甲が脱落する症例が国内外で報告されており、脱落した爪甲からCA6が検出されている⁷⁾。2011年は、非典型的な臨床所見が認められる傾向にあった。

4 まとめ

手足口病の原因ウイルスは、数年ごとにCA16とEV71の流行を繰り返していたが、2011年(1月～10月)はCA6が手足口病患者から8割近く検出され、その傾向は他年と相違していた。

ヘルパンギーナの原因ウイルスは、CA6とCA10の2種類がほぼ半々であった。

2007年に検出したCA6と2011年検出のCA6は系統樹解析において、異なるクラスターに分類され、アミノ酸配列においても10ヶ所の相違を認めた。

2008年の検出CA10の5株と、2011年の検出の

CA10は、系統樹解析で異なるクラスターに分類されたが、アミノ酸配列に変換すると、同義置換され相違は認めなかった。

2011年(1月～10月)に流行した手足口病、ヘルパンギーナは、臨床所見で非典型的な症状を認める傾向にあり、主な原因ウイルスはCA6によるものと推察された。

エンテロウイルス感染症は、多種・多様の症状を呈することで知られている。また、RNAウイルスの特徴としてウイルス変異が起りやすく、診断を下す臨床現場でも苦慮する事例も多いことが推察される。特に2011年に手足口病、ヘルパンギーナ患者から多く検出されたCA6は、遺伝子解析の結果から過去のCA6との相違が明らかになり、感染性や患者に症状を引き起こす病原性が、過去の同血清型から変化した可能性が推察された。

毎年の流行状況及び流行株の解析は、疾病の流行を監視する上で極めて重要である。今後も感染症発生動向調査を通じ、経年的な流行状況の把握に努め、臨床の現場にフィードバックしていきたい。

文 献

- 1) 国立感染症研究所 感染症情報センター：注目すべき感染症「手足口病」、感染症発生動向調査感染症週報、10(24)10-14(2008)
<http://idsc.nih.gov/idwr/kanja/idwr/idwr2008/idwr2008-24.pdf> (2011年11月確認)
- 2) 国立感染症研究所 感染症情報センター：注目すべき感染症「ヘルパンギーナ」、感染症発生動向調査感染症週報、12(26)7-9(2010)
<http://idsc.nih.gov/idwr/kanja/idwr/idwr2010/idwr2010-26.pdf> (2011年11月確認)
- 3) 長野県健康長寿課 長野県感染症情報2011年(H23年)第31週8月1日～7日
<http://www.pref.nagano.lg.jp/eisei/hokenyob/kansen/23-31w.pdf> (2011年11月確認)
- 4) 清水博之、米山徹夫、吉田弘、山下照夫：病原体検出マニュアル、手足口病、1～22(2003)
- 5) Nasri D, et al. (2007). Typing of Human Enterovirus by Partial Sequencing of VP2. J Clin

- Microbiol 45 (8) : 2370-2379
- 6) 松岡高史・松岡明子・松岡伊津夫 (2011) 今夏流行した手足口病とヘルパンギーナの臨床ウイルス学的特徴, 長野県小児科医会
- 7) 柏井健作 他 (2011) 手足口病後に脱落した爪からのコクサッキーウイルス A6 型の検出ー和歌山県, IASR, Vol. 32 (11) : 339-340

Genetic analysis of enterovirus and clinical characteristics were detected in patients with hand, foot and mouth disease and herpangina in 2011

Yurie UCHIYAMA¹, Haruyuki NAKAZAWA¹

¹ Nagano Environmental Conservation Research Institute, Infectious Disease Society Division, 1978 Komemura, Amori, Nagano 380-0944, Japan