

# 長崎県におけるエンテロウイルス感染症の分子疫学解析(2018)

松本 文昭、山下 綾香、小嶋 裕子、田栗 利紹

## Molecular Epidemiological Analysis of Enterovirus Infections in Nagasaki (2018)

Fumiaki MATSUMOTO, Ayaka YAMASHITA, Hiroko OJIMA and Toshitsugu TAGURI

キーワード: 手足口病、無菌性髄膜炎、エンテロウイルス、系統樹解析

Key word : Hand-Foot-and-Mouse Disease, Aseptic Meningitis, Enterovirus, Phylogenetic tree analysis

### はじめに

エンテロウイルス(EVs)は、ヒトに感染力を有するウイルスの中で最もよく知られているウイルスの一つである。たいていの感染は、手足口病やヘルパンギーナに代表されるとおり非定型熱性疾患や上気道炎を呈して、不顕性感染か軽症にとどまることが多い。しかしながら、EVsは中枢神経症状を示して無菌性髄膜炎、急性弛緩性麻痺、心筋炎や新生児敗血症様疾患などの重篤な臨床症状を引き起こすことも知られている<sup>1)</sup>。

EVs はピコルナウイルス科に属するエンベロープを持たない 1 本鎖 RNA ウイルスであり、Poliovirus、Coxsackievirus、Echovirus およびその他の Enterovirus で構成されるウイルス群の総称である。近年の分子遺伝学的研究により、これまで異なる種に分類されていた Rhinovirus も Enterovirus に再分類され、EVs は Enterovirus A~L および Rhinovirus A~C の 15 の species (種) に分類されている<sup>2)</sup>。

主に小児の間で流行する手足口病およびヘルパンギーナは、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」(以下、感染症法)において 5 類感染症定点把握疾患に指定され、患者発生状況は調査されているが、県内 EVs 株の流行状況は十分に把握されていない。また、同一型のウイルスに感染した場合でも、軽症者と重症者に分れることが報告されている。例えば、Coxsackievirus B 群はヘルパンギーナの原因ウイルスの一つだが、ウイルス血症を経て中枢神経に移行すると髄膜脳炎を呈し、稀ではあるが命に関わるような心筋炎を惹き起こすこともある<sup>3)</sup>。そこで、我々は、同一ウイルス型で症状が異なる事例における全塩基配列を比較解析し、有意な遺伝子変異や置換を見つけ出すことができれば、ウ

イルス側の要因の探索につながると考えた。

今回、県内の EVs 流行状況を明らかにするとともに、重症化にかかわるウイルス側因子の探索を目的として、2016 年度から 3 年間のエンテロウイルスの分子疫学解析手法による調査を開始した。ここでは、2018 年度に実施した流行動態調査の結果概要を報告する。

### 調査方法

#### 1 流行動態調査のための検体採取

2018 年 4 月から 2019 年 3 月まで、県立保健所管内(県央、西彼、県南、県北、五島、上五島、壱岐、および対馬)、長崎市および佐世保市の計 10 地点の協力医療機関において、エンテロウイルス感染症と診断された患者のうち、主治医から研究内容を説明のうえ、同意が得られた患者を対象とした。当該患者から採取された臨床検体を、48 時間以内に搬入可能な場合は 4°C で、それ以上の時間がかかる場合には -20°C 以下に一時保管し、医療機関から直接または郵送により搬入した。以上のとおり収集した咽頭拭い液 120 検体と便(直腸拭い液) 3 検体ならびに髄液 1 検体を検査・解析に供した。

#### 2 遺伝子検査方法

臨床検体のうち、尿、血清および髄液は未処理のまま RNA 抽出に供し、咽頭拭い液および便(直腸拭い液)は、ウイルス検体輸送保存液(ハックス液(日水)に最終濃度 0.5%となるようにゼラチンを添加したもの)に懸濁させたのち、12,000 rpm で 15 分間遠心分離したあとの上清を RNA 抽出用検体とした。臨床検体上清 140 μL から QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)を用いて 60 μL の RNA 抽出液を精製し、得られた RNA に対して、エンテロ

① Reverse Transcription						
< primer set > AN32 : GTYTGCCA, AN33 : GAYTGCCA, AN34 : CCRTCRTA, AN35 : RCTYTGCCA						
	volume	final conc.				
5 × First Strand Buffer	2.0 μL	1 ×	temp.	time	cycles	
RT primer Mix (10 μM each)	0.5 μL	0.5 μM	22°C	10 min.	1	
20 mM dNTPs	0.5 μL	1 mM	42°C	60 min.	1	
0.1 M DTT	1.0 μL		95°C	5 min.	1	
SuperScript III (200 U/μL)	0.5 μL	10 U/μL				
RNase Inhibitor (40 U/μL)	0.5 μL	2 U/μL				
Extract RNA	5.0 μL					
total	10 μL					
② First amplification						
< primer set > SO224 : GCIATGYTIGGIACICAYRT, SO222 : CICCIGGIGGIAYRWACAT						
	volume	final conc.				
10 × PCR reaction buffer	5.0 μL		temp.	time	cycles	
20 mM dNTPs	0.5 μL	0.2 mM each	95°C	30 sec.	} 40	
primer (SO224: 10 μM)	5.0 μL	1 μM	42°C	30 sec.		
primer (SO222: 10 μM)	5.0 μL	1 μM	60°C	45 sec.		
Taq Polymerase (1 U/μL)	2.5 μL	0.05 U/μL				
DW (DNase/RNase free)	22.0 μL					
cDNA	10.0 μL					
total	50 μL					
③ Second amplification						
< primer set > AN89 : CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG AN88 : TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT						
	volume	final conc.				
10 × PCR reaction buffer	5.0 μL		temp.	time	cycles	
20 mM dNTPs	0.5 μL	0.2 mM each	95°C	6 min.	1	
primer (AN89: 10 μM)	4.0 μL	0.8 μM	95°C	30 sec.	} 40	
primer (AN88: 10 μM)	4.0 μL	0.8 μM	60°C	20 sec.		
FastStart Taq (5 U/μL)	0.5 μL	0.05 U/μL	72°C	15 sec.		
DW (DNase/RNase free)	35.0 μL					
PCR1 product	1.0 μL					
total	50 μL					

Fig. 1. CODEHOP Protocol for Enterovirus VP1 using Reverse transcript-semi nested Polymerase Chain Reaction. Abbreviations for nucleotides following the International Union of Biochemistry nomenclature<sup>4)</sup>: I, inosine; N, adenine, cytosine, guanine, or thymine; R, adenine or guanine; Y, cytosine or thymine; W, adenine or thymine.

ウイルスを網羅的に検出可能な CODEHOP VP1 RT-semi-nested PCR を実施した (Fig. 1)<sup>1)</sup>。2 次増幅反応後に特異的増幅産物が得られた場合、AN89 および AN88 を Sequencing 用プライマーとしてダイレクトシーケンスを行い、塩基配列を決定した (Fig. 1)。塩基配列は、GENETYX ver.12 (ゼネティクス社) により解析し、決定した配列情報に基づき Enterovirus Genotyping Tool Version 0.1 により検出ウイルスを型別した<sup>5)</sup>。

### 3 ウイルス分離

遺伝子検査陽性となった場合は、24 ウェルマルチプレートに単層を形成させた RD-A (human rhabdomyosarcoma cells)、HeLa-4 (human cervical carcinoma cells)、Vero (African Green Monkey Kidney cells)、Caco2 (human epithelial colorectal adenocarcinoma cells) を準備し、検体 100  $\mu$ L を接種してウイルス分離を試みた。維持培地には、2%非働化牛胎児血清を含有した Eagle MEM (日水) を用いた。37°C、5%CO<sub>2</sub> の培養条件で 7 日間培養後、3 代継代して細胞変性効果 (cytopathic effect, CPE) が出現したものをウイルス分離陽性とした。

### 5 分子系統樹解析

ウイルス分離陽性となった培養上清から RNA を抽出し、EVs A 種の VP1 (Virus Particle 1) 領域を標的としたプライマーセット (Forward primers, 486: TGGTAICARACIAAITWYGTIGTNC, 487: ATGTWYGYICCCICGGI GCNCC, Reverse primers, 488: AYIGCICCSWITGYT GNCC, 489: AYIGCICCSWITGYTGNCC) を用いた RT-PCR<sup>9)</sup>を行い、増幅産物のダイレクトシーケンスにより VP1 領域の塩基配列 (891 nt) を決定した。そのようにして得られた EV-A71 24 株について GenBank データベースから入手可能な 19 の EV-A71 の塩基配列 (EV-A71/BrCr (U22521), EV-A71/26M/AUS/4/99 (EU376004), EV-A71/799/Yamagata/2013 (AB936556), EV-A71/933V/VNM/05 (AM490161), EV-A71/2007/08747 (EU527985), EV-A71/2027/SIN/01 (AF376111), EV-A71/8304/(AB524160), EV-A71/16068/(AB524176), EV-A71/H25/CHN/00 (AB115492), EV-A71/JP51/Sm/W/10 (HQ676230), EV-A71/KOR/EV71/01 (AY125966), EV-A71/Nagoya/(AB482183), EV-A71/S10862/SAR/98 (DQ341359), EV71/Fuyang.Anhui.P.R.C/17.08/2 (EU703813), EV-A71 SHZH98 (AF302996), EV-A71 USA/2016/19522 (KY888026), EV-A71/38474/BE/DE/2015 (KU641492), EV-A71/37507/TH/DE/2015 (KU641501), EV-A71/31170101 (LC321990)) と CV-A16 標準株 (CV-A16/G-10 (U05876)) の塩基配列を用いて Cl

astal W<sup>7)</sup>によりアライメントを作成し、遺伝子解析ソフト MEGA 6.0<sup>8)</sup>を用いて近隣結合法 (Neighbor Joining method: NJ 法)<sup>9)</sup> による分子系統樹解析を実施した。

## 調査結果及び考察

### 1 調査検体の診断名と流行状況

提供された 124 検体のうち、咽頭拭い液 90 検体および直腸拭い液 3 検体から EVs 属の遺伝子が検出され、50 検体からは同属ウイルスが分離された。検体の診断名は手足口病 (93 検体) が最も多く、次いでヘルパンギーナ (21 検体)、その他 (5 検体) の順であった。月別の検体提供数を見ると、2018 年度は例年の流行ピークよりも早い 5 月に最も多くの検体が搬入された。これは 2017 年 9 月から始まった EV-A71 による手足口病の流行が継続していたためと考えられた。5 月以降は 9 月と 11 月に検体提供数が一時的に微増したが、全体的に減少傾向を示した。(Fig. 2)。ヘルパンギーナは 5 月から 12 月にかけて検体提供があり、手足口病は 3 月を除き調査期間を通して検体提供が得られた。

### 2 EVs の型別

2018 年度に検出された EVs の上位 3 タイプは、Enterovirus A71 (以下、EV-A71)、Coxsackievirus (以下、CV) A6、CV-A4 であった (Fig. 3)。そのうち EV-A71 は 57 検体から検出され、EVs 検出総数全体の 6 割以上を占めた。CV-A6 は 12 検体、CV-A4 は 6 検体から検出された。その他 Rhinovirus が 6 検体、CV-A2 が 5 検体、CV-A16 が 1 検体、Echovirus 3 が 2 検体、CV-A9, A10, B5、および Echovirus 11 がそれぞれ 1 検体ずつ検出された。国立感染症研究所の病原微生物検出情報<sup>10)</sup>によると、2018 年の手足口病の原因ウイルスとして最も多く検出されたのは EV-A71 であり、本県においても全国と同様の傾向を示した。診断名別の検出ウイルスを Fig. 4 に示した。検出ウイルスの過半数を占めた EV-A71 は手足口病からのみ検出されていた。無菌性髄膜炎からの検出頻度が高い EVs B 種に属するウイルスのうち、Echovirus 3 を除く CV-A9, CV-B5, Echovirus 11 は、検出数は少ないもののヘルパンギーナやウイルス性発疹症から検出される傾向が見られた。これまでに本県で実施してきた手足口病やヘルパンギーナを対象とした病原体検索では、CV-A6 や EV-A71 を含む EVs A 種の検出率が高いものの、EVs B 種の検出頻度は低く、流行状況が十分に把握できていないと言え難い。EVs B 種の中でも CV-B 群は新生児敗血症様症候群等の重症例との関連が報告<sup>3)</sup>されており、それらのウイルスの流行を早期に捉えるためには、非定型的な熱性疾

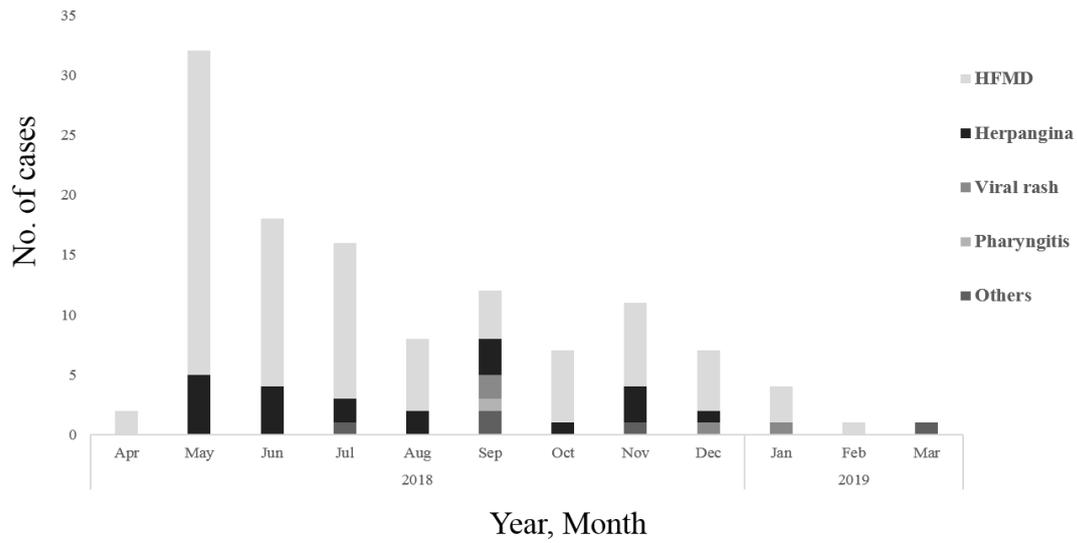


Fig. 2. Monthly number of clinical specimens of Enterovirus infections in this study (n=124).

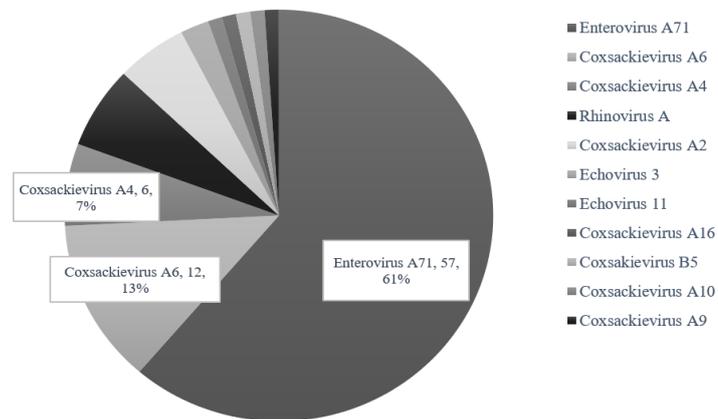


Fig. 3. The serotypes of detected Enteroviruses in this study (n=93).

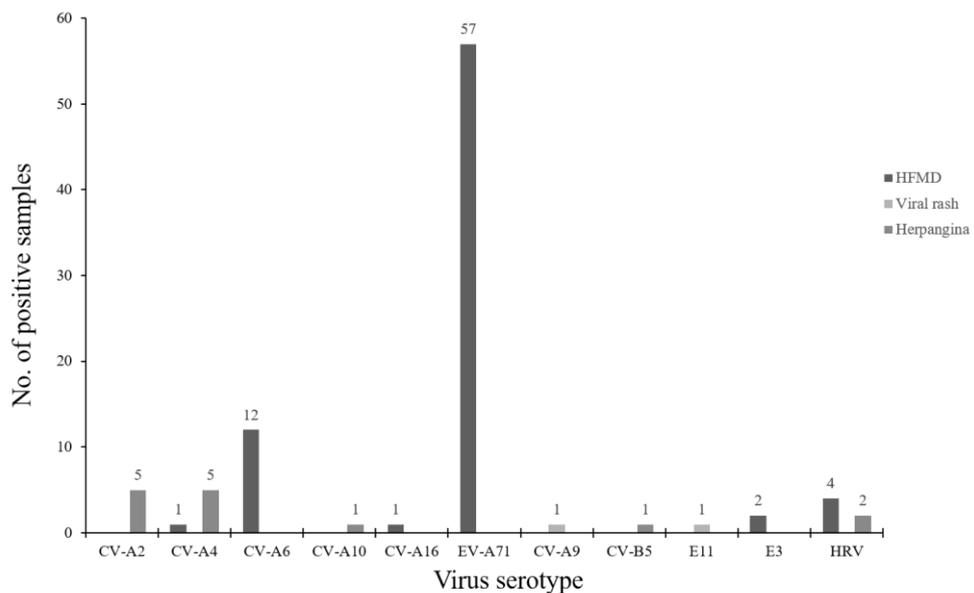


Fig. 4. The serotypes of detected Enterovirus from different clinical samples in diagnosis (n=93)

患等の検体収集が必要と考えられた。

### 3 EV-A71 の分子系統樹解析

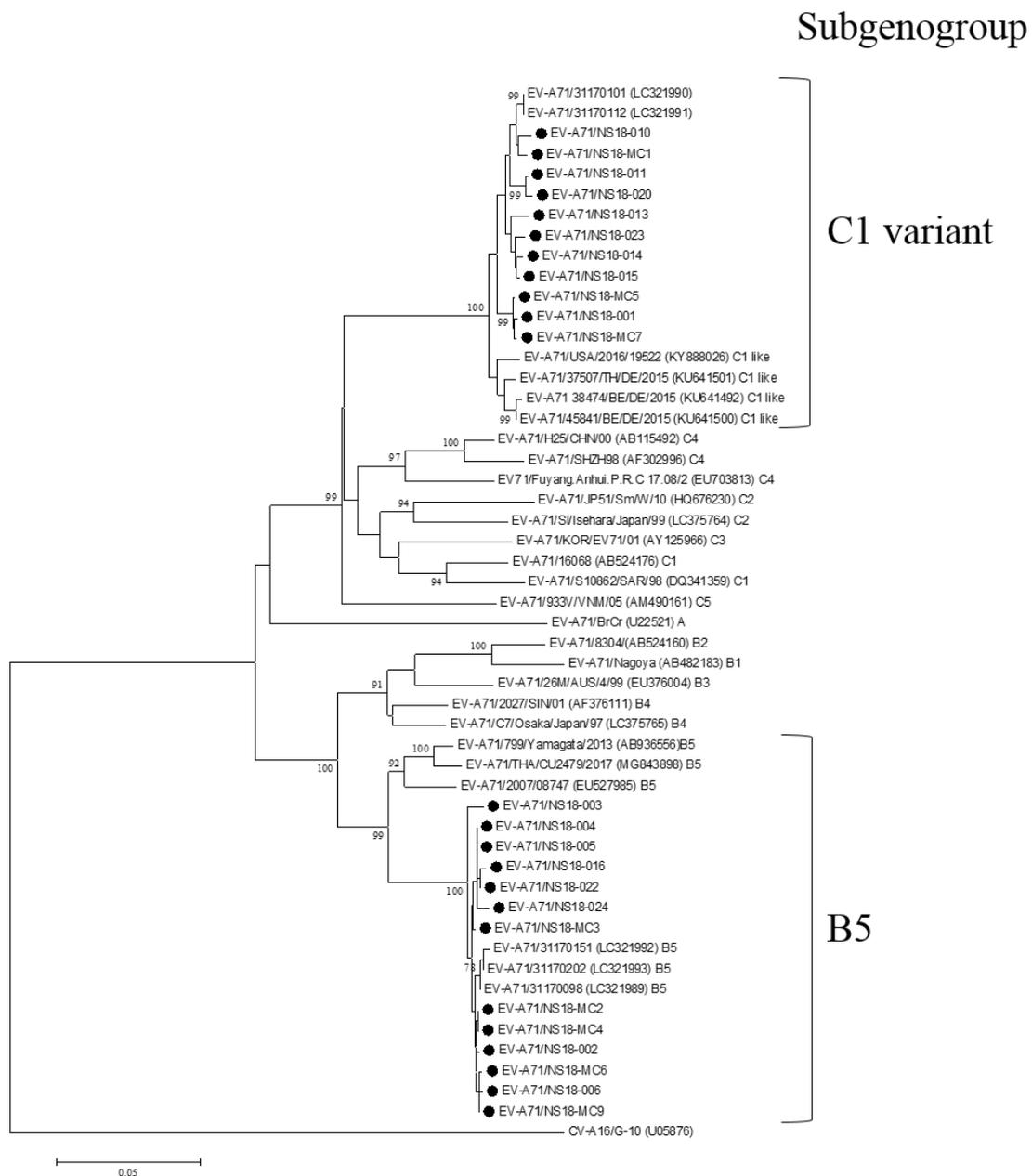
EV-A71 は VP1 領域の系統解析に基づき、A, B, C, および D の Genogroup に分類され<sup>11)</sup>、Genogroup B 及び C は、それぞれ B0~5, C1~5 の Subgenogroup に分類されている<sup>12, 13)</sup>。2018 年に県内で分離された 24 株の EV-A71 について VP1 領域全長配列 (891 nt) に基づく分子系統樹解析を行った (Fig. 5)。その結果、県内流行株は 2017 年の流行時と同様に 2 つの Subgenogroup (B5: 13 株, C1 variant<sup>14)</sup>: 11 株) に分類され、長崎県では異なる Subgenogroup に属する EV-A71 が 2017 年から継続して流行していたことが明らかになった。EV-A71 は中枢神経系の合併症を引き起こし、時には致命的な経過をたどる場合もある<sup>16-17)</sup>。長崎県内では、これまでのところ EV-A71 による髄膜脳炎等の重症感染例は確認されていないが、引き続き県内の流行状況を注視していく必要がある。

### 謝辞

本研究にご協力頂いた各協力医療機関および重症例提供医療機関の諸先生、検体の収集及び搬入にご協力頂きました各保健所の関係諸氏に深謝する。

### 参考文献

- 1) Pallansch, M. A. *et al*: Molecular Detection and Characterization of Human Enteroviruses. In: Akira M editors. *Cardiomyopathies and Heart Failure. Developments in Cardiovascular Medicine*, **248**, Springer, Boston, MA (2003).
- 2) International Committee on Taxonomy of Viruses: Genus Enterovirus (2017), [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/positive-sense-rna-viruses/picornavirales/w/picornaviridae/681/genus-enterovirus](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/picornavirales/w/picornaviridae/681/genus-enterovirus) (2019.6.26).
- 3) 吾郷昌信 他: 劇症型新生児心筋炎を惹起したコクサッキーウイルス B2 型の性状解析, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会要旨集, 2014.
- 4) Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB): Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences. Recommendations 1984, *Eur J Biochem*, **150**, pp1-5 (1985).
- 5) Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu: Enterovirus Genotyping Tool ver. 0.1 (2013) <http://www.rivm.nl/mpf/typingtool/enterovirus/> (2019.6.26).
- 6) 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**, pp119-128 (2006).
- 7) Thompson JD, *et al*: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, **22**, pp4673-80 (1994).
- 8) Tamura K, *et al*: MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0, *Mol Biol Evol*, **30**, pp2725-29(2013).
- 9) Saitou, N, *et al*: The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Mol Biol Evol*, **4**, pp406-425, (1987).
- 10) 国立感染症研究所: 手足口病から分離検出されたエンテロウイルス 2009 年~2018 年, <http://www.niid.go.jp/niid/ja/iasr/510-surveillance/iasr/graphs/4892-iasrgnatus.html> (2019.6.26).
- 11) Brown BA *et al*: Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998, *J Virol*, **73**, pp9969-75 (1999).
- 12) Hiroyuki S *et al*: Molecular epidemiology of enterovirus 71 infection in the Western Pacific Region, *Pediatr Int*, **46**, pp231-5 (2004).
- 13) Huang YP *et al*: The circulation of subgenogroups B5 and C5 of enterovirus 71 in Taiwan from 2006 to 2007, *Virus Res*, **137**, pp206-12 (2008).
- 14) Sindy Böttcher *et al*: Recombinant Enterovirus A71 Subgenogroup C1 Strains, Germany, 2015, *Emerg Infect dis*, **22**, (2016).
- 15) Chen, L *et al*: Full-Genome Sequences of Seven Fatal Enterovirus 71 Strains Isolated in Shenzhen, China, in 2014, *Genome Announc*, **4**, e00316-16 (2016).
- 16) Huang CC *et al*: Neurologic complications in children with enterovirus 71 infection, *N Engl J Med*, **341**, pp936-42 (1999).



**Fig. 6. Phylogenetic analysis of Enterovirus A71 VP1 region gene.**

Phylogenetic tree based on the VP1 genome sequences (891 nt) of the 51 EV-A71 strains and CV-A16/G-10 strain is conducted. The phylogenetic tree is generated using the neighbor-joining method (bootstrap analysis with 1,000 replicates) with MEGA version 6.0 software. The percentage bootstrap of supporting each branch no lower than 75 % is shown at the nodes. The scale bar indicates the number of nucleotide substitutions per site.

Black circle indicated EV-A71 clinical strains identifies in this study. Reference sequences are prefixed by the virus serotype, followed by the strain name, GenBank accession number and subgenogroup number of previously reported<sup>10,16,17</sup>.