

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(2017)

松本 文昭、三浦 佳奈、山下 綾香、田栗 利紹

Molecular Epidemiological Analysis of Enterovirus Infections in Nagasaki (2017)

Fumiaki MATSUMOTO, Kana MIURA, Ayaka YAMASHITA 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、このウイルスは無菌性髄膜炎、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¹⁾。

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²⁾。

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ても、軽症と重症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³⁾。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ゲノム遺伝子配列を比較解析し、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ことを目的として、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、2017 年度に実施した調査の解析結果の概要を報告する。

調査方法

1 流行動態調査のための検体採取

2017 年 4 月から 2018 年 3 月まで、長崎県立保健所管内(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咽頭拭い液または便(直腸拭い液)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 135 検体、便(直腸拭い液)4 検体を検査・解析に供した。

2 遺伝子検査方法

提供された臨床検体のうち、血清および髄液はそのまま RNA 抽出に供した。咽頭拭い液および便(直腸拭い液)は、ウイルス保存輸送液 ハンクス液(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。QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出した RNA に対して、エンテロウイルスを網羅的に検出可能な CODEHOP VP1 RT-semi-nested (sn) PCR を実施した (Fig.1)⁴⁾。2 次増幅反応

① 逆転写反応 (RT reaction)						
< primer set > AN32 : GTYTGCCA, AN33 : GAYTGCCA, AN34 : CCRTCRIA, AN35 : RCTYTGCCA						
	volume	final conc.	temp.	time	cycles	
5 × First Strand Buffer	2.0 μL	1 ×	22°C	10 min.	1	
RT primer Mix (10 μM each)	0.5 μL	0.5 μM	42°C	60 min.	1	
20 mM dNTPs	0.5 μL	1 mM	95°C	5 min.	1	
0.1 M DTT	1.0 μL					
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 (PCR1)						
< primer set > SO224 : GCIATGYTIGGIACICAYRT, SO222 : CICCIGGIGGIAYRWACAT						
	volume	final conc.	temp.	time	cycles	
10 × PCR reaction buffer	5.0 μL		95°C	30 sec.	} 40	
20 mM dNTPs	0.5 μL	0.2 mM each	42°C	30 sec.		
primer (SO224: 10 μM)	5.0 μL	1 μM	60°C	45 sec.		
primer (SO222: 10 μM)	5.0 μL	1 μM				
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 (snPCR)						
< primer set > AN89 : CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG AN88 : TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT						
	volume	final conc.	temp.	time	cycles	
10 × PCR reaction buffer	5.0 μL		95°C	6 min.	1	
20 mM dNTPs	0.5 μL	0.2 mM each	95°C	30 sec.	} 40	
primer (AN89: 10 μM)	4.0 μL	0.8 μM	60°C	20 sec.		
primer (AN88: 10 μM)	4.0 μL	0.8 μM	72°C	15 sec.		
FastStart Taq (5 U/μL)	0.5 μL	0.05 U/μL				
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 (sn) Polymerase Chain Reaction
Abbreviations for nucleotides follow the International Union of Biochemistry nomenclature¹⁵: I, inosine; N, adenine, cytosine, guanine, or thymine; R, adenine or guanine; Y, cytosine or thymine; W, adenine or thymine.

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。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⁴⁾。

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 および RD-18S (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 µL 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%CO₂ 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。

4 分子系統樹解析

流行動態調査の結果、県内では 2013 年以降の検出となったエンテロウイルス A71 型 (以下、EV-A71) については遺伝子型別のため、ウイルス分離試験で得られた分離株の上清から RNA を抽出し、EVs A 種の VP1 領域を標的としたプライマーセット (Forward or Reverse, primer name: sequence; Forward, 486: TGGTAICARACIAAI TWYGTIGTNCC, 487: ATGTWYGYICCCICGIGCN CC, Reverse 488: AYIGCICCSWITGYTGNCC, 489: AY IGCICCSWITGYTGNCC) を用いた RT-PCR⁵⁾を行い、増幅産物のダイレクトシーケンスにより VP1 領域の配列 (891 nt) を決定した。GenBank データベースから入手可能な 19 株の EV-A71 の配列 (EV-A71/strain name (accession number) ; EV-A71/BrCr (U22521), EV-A71/26M/A US/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 CVA16 標準株 (CVA16/G-10

(U05876)) の配列を用いて Clustal W によりアライメントを作成し、遺伝子解析ソフト MEGA 6.0⁶⁾ を用いて近隣結合法 (Neighbor Joining method: NJ 法) による分子系統樹解析を実施した⁷⁾。

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 139 検体のうち、咽頭拭い液 123 検体および直腸拭い液 4 検体から EVs 属の遺伝子が検出され、64 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 (114 検体) が最も多く、次いでヘルパンギーナ (21 検体)、無菌性髄膜炎 (2 検体) およびその他 (2 検体) の順であった。月別の発生状況を見ると、2017 年は EVs の流行期である夏季の流行に加え、小規模ながら 10 月から 12 月にかけて手足口病の流行があり、緩やかな二峰性ピークを示した (Fig.2)。ヘルパンギーナは 4 月から 11 月にかけて発生が認められ、手足口病は年間を通して発生していた。無菌性髄膜炎は 7 月に起こっていた。

2 EVs の同定結果

Fig. 3 に検出されたウイルス型を示した。2017 年度に最も多く検出されたウイルス型は Coxsackievirus A6 型 (以下、CVA6) であり、58 検体であった。CVA6 は、全国的にも 2017 年に手足口病の原因ウイルスとして最も検出された株であり⁸⁾、本県においても同様の傾向を示した。次に多く検出されたウイルス型は EV-A71 で 31 検体から検出された。Coxsackievirus A16 型 (以下、CVA16) と Coxsackievirus A10 型がそれぞれ 14 検体から検出され、それらのウイルス型が検出ウイルス全体の 80% 以上を占めた。その他は Rhinovirus が 6 検体、Coxsackievirus B2 と B4 が各 1 検体、Echovirus 6 と CVA6 同時検出が 1 検体、Echovirus 6 が 1 検体であった。

3 ウイルス型の流行状況

Fig. 4 に診断名別ウイルス型の検出結果を示した。手足口病と診断された症例からは CV-A6 の検出数が最も多く、EV-A71 と CV-A16 がそれに続いた。ヘルパンギーナからは CV-A6 と CV-A10 といった EVs の A 種に属するウイルスが多かったが、一部の検体からは CV-B2 や Echo 6 といった B 種に属する EVs が検出された。検出数上位 3 ウイルス型の月別検出数の推移を Fig.5 に示した。4 月のみ CV-A16 が優勢であったが 5 月から 8 月にかけて CV-A6 が流行し、9 月以降は EV-A71 が検出され始め、県内流行の主流となった。2014 年以降、本邦において EV-A71 の大きな流行は確認されていなかったが、この 9 月以降の

流行は全国的にも確認されている⁹⁾。EV-A71 は重篤な合併症との関連が報告されているため、本県でも同株の動向を注視する必要がある。

4 EV-A71 の系統樹解析

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⁹⁾、Genogroup B 及び C は、それぞれ B0~5 と C1~5 の Subgenogroup に分類されている^{13, 14)}。2017 年に県内で分離された EV-A71 16 株について VP1 領域全長配列に基づく分子系統樹解析を行った (Fig. 6)。その結果、県内流行株は 2 つの Subgenogroup (B5: 8 株, C1: 8 株) に分類された。そのうち、C1 に属する EV-A71 は、2015 年にドイツで Sindy ら¹⁰⁾によって報告された C1 variant と同一のクラスターに分類され、2017 年の長崎県では 2 つの Subgenogroup の EV-A71 が同時期に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¹¹⁻¹²⁾。長崎県内では、これまでのところ EV-A71 による重症例発生はみられていないが、県内流行株の詳細解析のため、分離株の全塩基配列の解読を進めていく。

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) Nix, W A *et al*: Sensitive, Semi-nested PCR Amplification of VP1 Sequences for Direct Identification of All Enterovirus Serotypes from Original Clinical Specimens, *J Clin Microbiol*, **44**, 2698–2704 (2006).
- 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 (2018.7.17 アクセス)
- 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発表抄録, (2014).
- 4) Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu : Enterovirus Genotyping Tool ver. 0.1 (2013) <http://www.rivm.nl/mpf/typingtool/enterovirus/> (2018.7.17)

- 5) 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).
- 6) Tamura K, *et al*: MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0, *Mol Biol Evol.*, **30**, 2725–2729 (2013).
- 7) Saitou, N and Nei, M: The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Mol Biol Evol*, **4**, 406–425 (1987).
- 8) 国立感染症研究所: 手足口病・ヘルパンギーナ 2007 年～2017 年 9 月: *IASR* **38**, 191-193 (2017).
- 9) Brown BA *et al*: Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998, *J Virol* **73**, 9969–9975 (1999).
- 10) Sindy Böttcher *et al*: Recombinant Enterovirus A71 Subgenogroup C1 Strains, Germany, 2015, *Emerg Infect dis* Vol. 22, No. 10, October (2016).
- 11) 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).
- 12) Huang CC *et al*: Neurologic complications in children with enterovirus 71 infection, *N Engl J Med*. **341**, 936-42 (1999).
- 13) Hiroyuki S *et al*: Molecular epidemiology of enterovirus 71 infection in the Western Pacific Region, *Pediatr Int*. **46**, 231-235 (2004).
- 14) Huang YP *et al*: The circulation of subgenogroups B5 and C5 of enterovirus 71 in Taiwan from 2006 to 2007, *Virus Res.*, **137**, 206-12(2008).
- 15) 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**, 1-5 (1985)

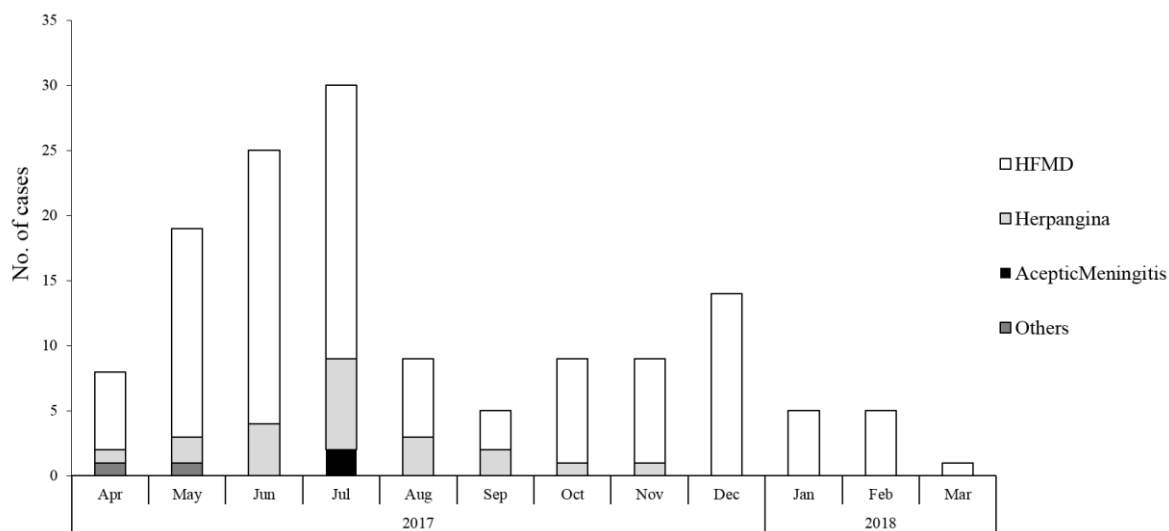


Fig. 2. Monthly number of clinical specimens of Enterovirus infections in this study (n=139)

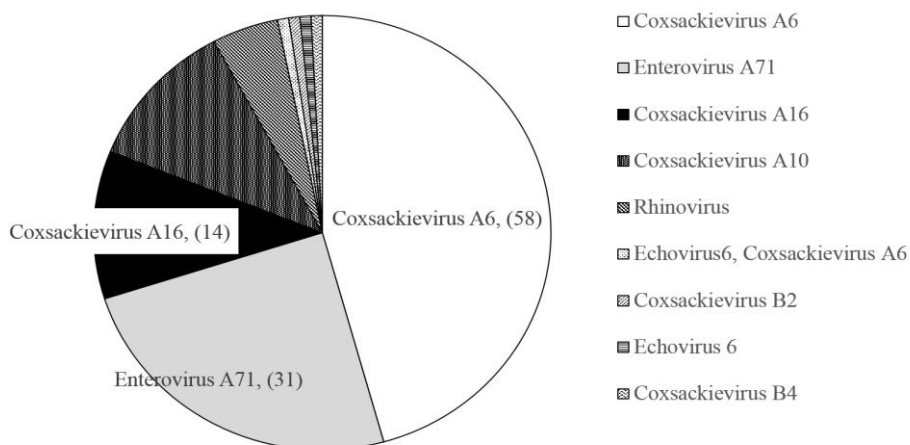


Fig. 3. The serotypes of detected Enteroviruses in this study (n=127)

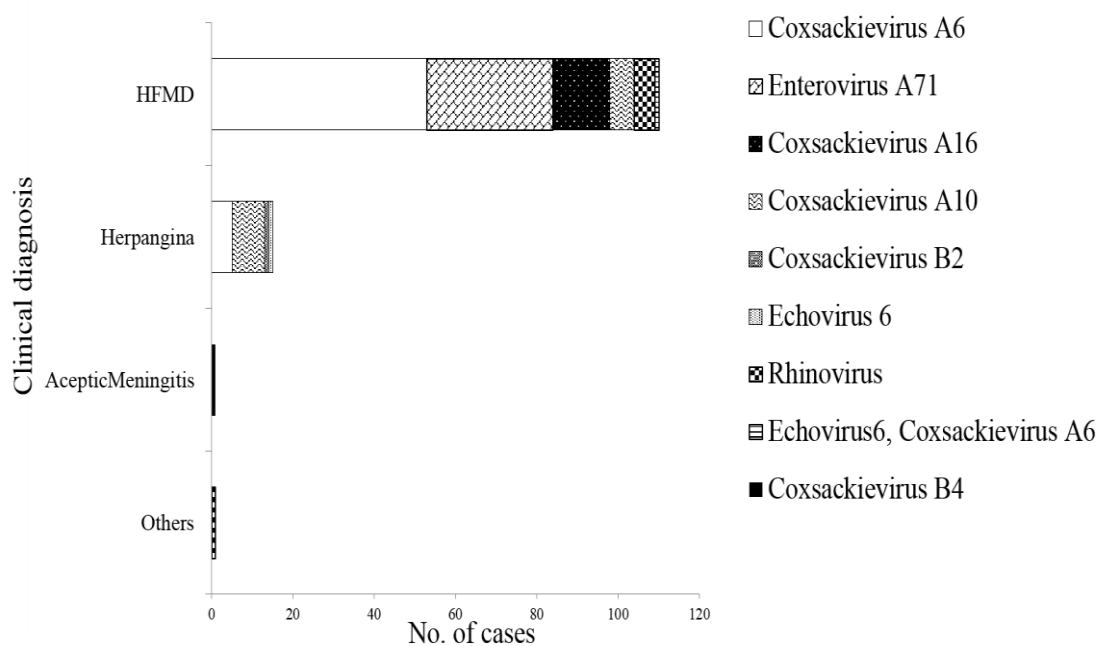


Fig. 4. The serotypes of detected Enterovirus from different clinical samples in diagnosis (n=127)

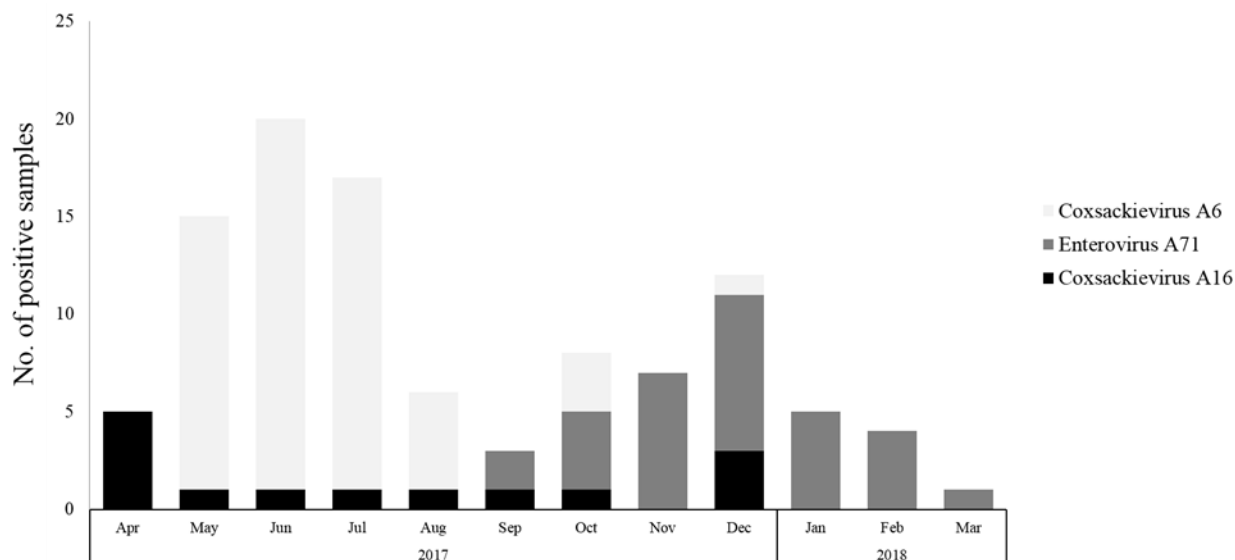


Fig. 5. Monthly surveillance results of three major Enterovirus serotypes (CV-A6, EV-A71, CV-A16) in this study (n=103)

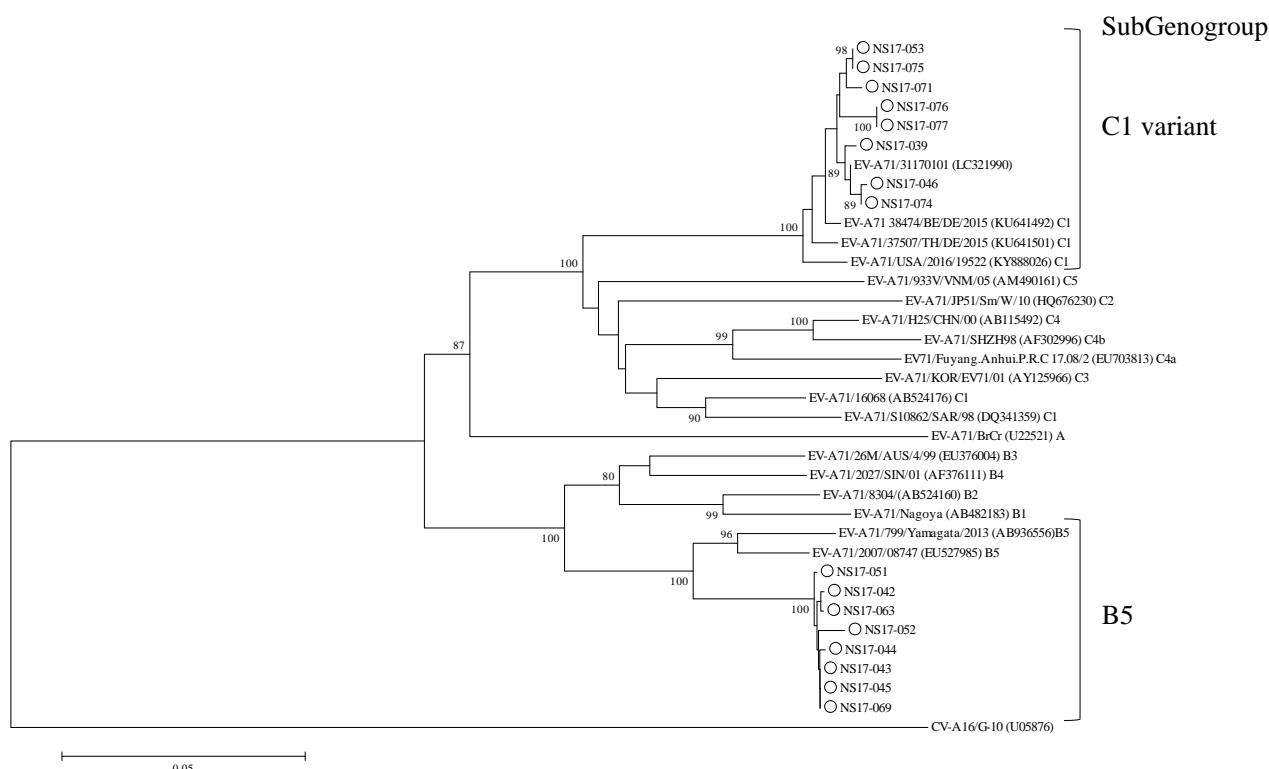


Fig. 6. Phylogenetic analysis of Enterovirus A71 VP1 region gene.

Phylogenetic tree based on the VP1 genome sequences (891 nt) of the 36 EV-A71 strains and CV-A16/ G-10 strain was conducted. The phylogenetic tree was 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 80 % is shown at the nodes. The scale bar indicates the number of nucleotide substitutions per site.

Circle indicated EV-A71 clinical strains identified in this study. Reference sequences were prefixed by the virus serotype, followed by the strain name, GenBank accession number and Subgenogroup number of previously reported^{9, 13, 14}.