

栃木県内で検出されたエンテロウイルスの分子疫学

微生物部

齋藤 明日美 水越 文徳¹ 関川 麻実 若林 勇輝
渡邊 裕子 根本 美香 永木 英徳

(¹前保健環境センター)

1 はじめに

エンテロウイルス感染症は小児を中心に毎年夏季に流行し、その血清型は年ごとに変動する。疾患名は臨床症状により手足口病、ヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎等と多岐にわたる。中枢神経症状を呈し、重症化する頻度の高い血清型もあることから、エンテロウイルスの検査において流行初期に血清型を把握することは、その後の流行への注意喚起のためにも重要である。

エンテロウイルスは、ピコルナウイルス科エンテロウイルス属に属するエンベロープのない1本鎖RNAウイルスである。ウイルス粒子は、一本鎖ゲノムRNAを中心として4種類のカプシド蛋白質(VP1~VP4)が規則正しく配置された正二十面体構造をとり、弱酸性条件下、有機溶媒存在下、凍結融解等、さまざまな物理的条件において比較的安定である。カプシド蛋白質のうちVP1、VP2、およびVP3はウイルス粒子上に位置しており、ウイルス抗原性および受容体との結合に関与している¹⁾。

エンテロウイルスの血清型の同定には遺伝子検査が広く使われており、VP4-VP2領域やVP1領域を増幅するRT-PCR法が多用されている。当センターではVP4-VP2領域を標的としたRT-PCRを行ってきたが、中和抗原性に関与するVP1領域の塩基配列を用いた解析は実施していなかった。

エンテロウイルスのVP1領域を高感度を増幅する方法としてConsensus-degenerate hybrid oligonucleotide primer VP1 RT-snPCR法(CODEHOP法)²⁾がある。この方法は、多様性が高く血清型との関連性の高いVP1領域を効率的に増幅するため塩基配列からの血清型類推が容易であること、semi-nested RT-PCRであるため検出感度が高いこと、などという長所がある。

この度、当センターにおいて、CODEHOP法を新たに立ち上げ、過去にVP4-VP2領域の解析でエンテロウイルスが検出されたサンプルについて解析を行った。また、得られたVP1領域の配列から分子疫学解析を行ったので報告する。

2 材料と方法

2.1 材料

2016年度~2019年度に栃木県感染症発生動向調査事業で搬入された143検体(診断名「手足口病」91検体、「ヘルパンギーナ」52検体)のうち、VP4-VP2領域の解析によりエンテロウイルスが検出された94検体(診断名「手足口病」72検体、「ヘルパンギーナ」22検体)を対象とした。その血清型の内訳は表1の「検体数」に示したとおりである。

2.2 CODEHOP法によるVP1遺伝子の増幅とダイレクトシーケンス法による血清型の類推

咽頭ぬぐい液などの検体からRNAを抽出し、手足口病病原体検査マニュアル(令和5年1月)³⁾に従ってCODEHOP法の原法を実施した。また、同法において2nd PCRが陽性となった検体をダイレクトシーケンス法により塩基配列を解読した。得られた塩基配列は、Enterovirus Genotyping Tool Version 1.0(<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/enterovirus/>)を用いて血清型を類推した。

2.2 分子疫学解析

検出されたウイルス株間の関係を解析するため、コクサッキーウイルス(CV)-A6、エンテロウイルス(EV)-A71、CV-A16について、解読した塩基配列をもとにMolecular Evolutionary Genetics Analysis version 7(MEGA7)を用いて最尤法(Maximum likelihood method; ML法)の系統樹を作成した。

3 結果

3.1 CODEHOP 法の原法

CODEHOP 法の原法における 1st PCR、2nd PCR の結果を表 1 に示した。1st PCR の陽性率は 5.3%、2nd PCR の陽性率は 95.7%であった。ダイレクトシーケンス法において血清型を類推できた検体は 94 検体中 81 検体であった。表 1 には示していないが、血清型が類推できた検体の血清型はすべて VP4-VP2 領域における結果と一致した。CV-A2、CV-A5、CV-A6、CV-A10、CV-A16 は、ほぼ全ての検体で血清型の類推が可能であったのに対し、CV-A4 および EV-A71 は 50%であった。

表 1 CODEHOP 法の原法の PCR 陽性率とダイレクトシーケンス法による血清型類推結果

| | 検体数 | 1st PCR 陽性 (%) | 2nd PCR 陽性 (%) | 血清型類推 (%) |
|--------|-----|----------------|----------------|-----------|
| CV-A2 | 2 | 0 (0) | 2(100) | 2(100) |
| CV-A4 | 8 | 4(50) | 8(100) | 4(50) |
| CV-A5 | 1 | 0 (0) | 1(100) | 1(100) |
| CV-A6 | 48 | 0 (0) | 48(100) | 46(95.8) |
| CV-A9 | 1 | 0 (0) | 1(100) | 0 (0) |
| CV-A10 | 13 | 1(7.7) | 13(100) | 13(100) |
| CV-A16 | 9 | 0 (0) | 9(100) | 9(100) |
| EV-A71 | 12 | 0 (0) | 8(66.7) | 6(50) |
| 計 | 94 | 5(5.3) | 90(95.7) | 81(86.2) |

3.2 分子疫学解析

CV-A6、CV-A16、EV-A71 の系統樹を図 1 に示した。CV-A6 では 2016、2017、2019 年度に検出された株は年度ごとに異なるクラスターを形成し、また、同じ検出年度内でもそれぞれ 2 つのパターンを示した。CV-A16 では、2016 年度、2018 年度は異なった場所にクラスターを形成し、CV-A6 と同様に、同一検出年度内においても異なる 2 パターンを示した。EV-A71 では、2017 年、2018 年度の検出株は異なったクラスターに位置した。

4 考察

CODEHOP 法の原法の RT-PCR とダイレクトシーケンス法による血清型類推の結果、CV-A4 および EV-A71 では血清型が類推できた検体が 50%であり、今後、PCR 試薬や反応条件、プライマー設計について検討する必要がある。令和 5 年 6 月に手足口病病原体検出マニュアルが更新された（以下「新マニュアル」という。）⁴⁾。新マニュアルによると、EV-A71 (Nagoya) 株を使用した CODEHOP 法の原法では感度が 2.2×10^5 copies であったのに対し、CODEHOP 法の変法では、 2.2×10^2 copies となり、感度が上がった。また、CODEHOP 法の原法であっても EV-A71 (SK-EV006) 株の場合、感度が 1×10^2 copies であり、EV-A71 (Nagoya) 株よりも感度が良かった。これらの結果から、EV-A71 の場合、株や試薬の違いにより感度が異なるため、CODEHOP 法の原法で陰性となっても、プライマーの変更や、試薬の変更で陽性となる可能性がある。

系統樹解析の結果、同じ血清型でも検出年度により異なった場所にクラスターを形成する場合があります、エンテロウイルスに感染してもその後、同じ血清型のウイルスに再度感染する可能性があることが示された。

今回、解析数の約半数を占めた CV-A6 は、48 検体中、47 検体が手足口病患者から検出されている。CV-A6 はヘルパンギーナ患者から主に検出されるウイルスであったが、2008 年以降、東南アジアで手足口病の患者から検出されるようになった⁵⁾。日本では 2009 年以降に検出され、2011 年に全国的大規模流行を引き起こした⁶⁾。そしてその後、2 年おきに発生した手足口病の大流行において主要な原因ウイルスとなった。CV-A6 の臨床的特徴は高熱、広範な発疹、爪甲脱落症等であり、一般的な手足口病とは異なっている⁷⁾。また、神奈川県における CV-A6 の系統樹解析では、2009 年以前のヘルパンギーナからの検出株と 2009 年～2017 年の手足

口病からの検出株は異なるクラスターを形成することが報告されている⁸⁾。このように、エンテロウイルスは同じ血清型であっても異なる症状を示すことがあるため、エンテロウイルスの検査には、血清型の類推だけでなく、系統樹解析も行うことが重要である。

手足口病は、新型コロナウイルス感染症の流行がはじまった2020年以降は報告数が減っていたものの、2022年は報告数が増加した。また、ヘルパンギーナの流行は、2020年～2022年では小規模な流行であったが、2023年第19週以降増加が続いており、過去5年間の同時期報告数と比較してかなり多くなっている⁹⁾。しかし、2020年度以降、新型コロナウイルス流行等の影響により、当センターには手足口病とヘルパンギーナの検体が搬入されておらず、流行しているエンテロウイルスの血清型を把握できていない。今後は、サーベランスの重要性を周知し、県内から広く検体を収集して、分子疫学解析により県内のエンテロウイルスの動向を詳細に監視する必要がある。

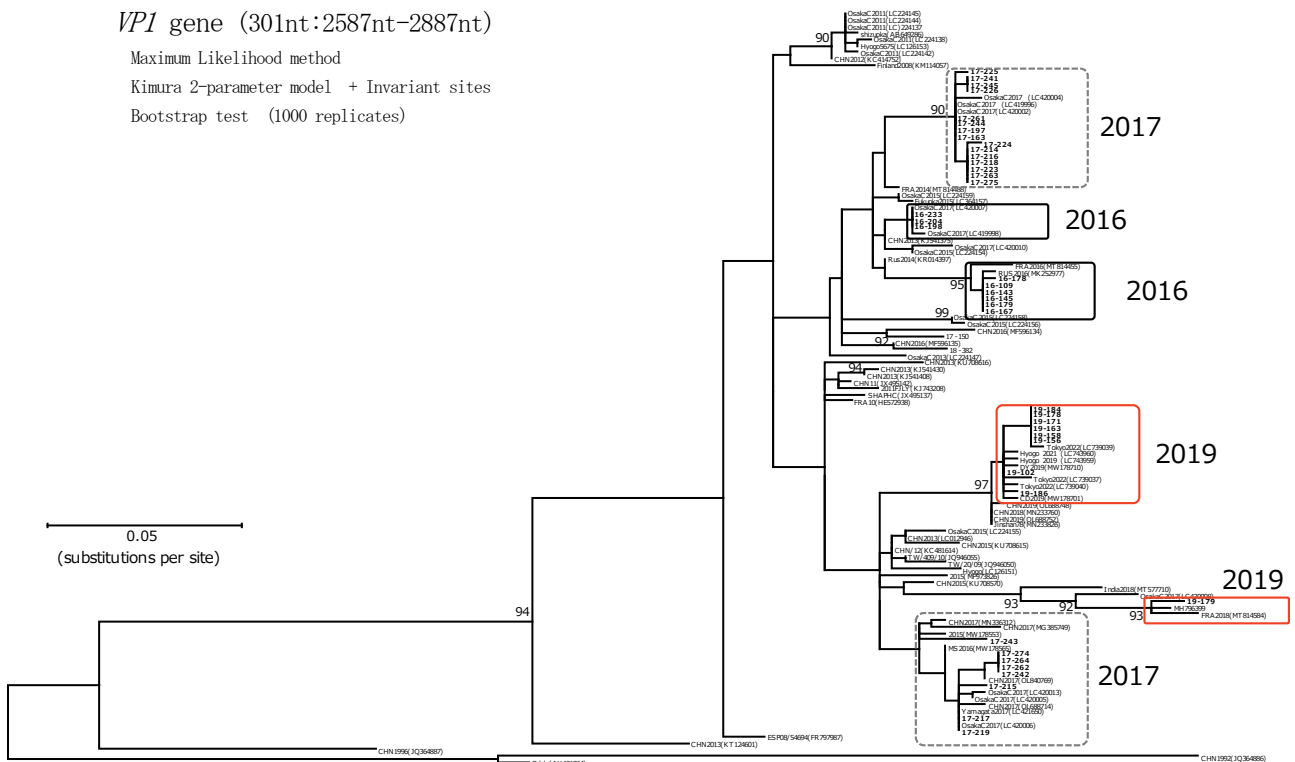
5 参考文献

- 1) Liu Y, *et al.*, Structure and inhibition of EV-D68, a virus that causes respiratory illness in children. *Science*. Jan 2;347(6217):71-4, 2015.
- 2) Oberste MS, *et al.*, Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J. Virol.* 73:1941-1948, 1999.
- 3) 手足口病 病原体検出マニュアル, 国立感染症研究所病原体検出マニュアル (令和5年1月)
- 4) 手足口病 病原体検出マニュアル, 国立感染症研究所病原体検出マニュアル (令和5年6月 ver. 2)
- 5) Österback R, *et al.*, Coxsackievirus A6 and Hand, Foot, and Mouth Disease, Finland. *Emerg Infect Dis.* 15:1485-1488, 2009.
- 6) Fujimoto T, *et al.* Hand, Foot, and Mouth Disease Caused by Coxsackievirus A6, Japan, 2011. *Emerg Infect Dis.* Vol. 18: 337-339, 2012.
- 7) 2013 および 2017 年におけるコクサッキーウイルス A6 型による手足口病患者の臨床的・疫学的観察, 国立感染症研究所 IASR Vol. 38p. 198-199:2017年10月号
- 8) 手足口病およびヘルパンギーナ患者の発生動向とエンテロウイルス検出状況-神奈川県, 国立感染症研究所 IASR Vol. 38p. 193-195:2017年10月
- 9) 国立感染症研究所 IDWR 感染症週報 2023 年第 25 週 (6 月 19 日～6 月 25 日): 通巻第 25 巻第 25 号

(1) CV-A6

VP1 gene (301nt:2587nt-2887nt)

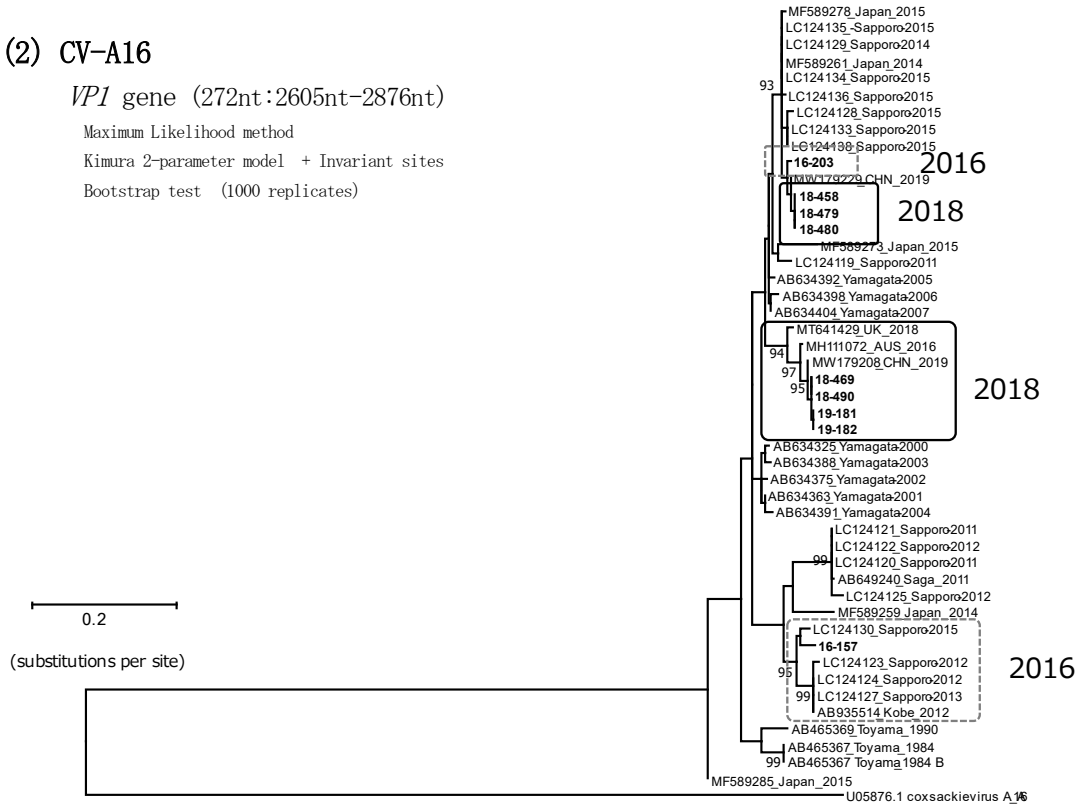
Maximum Likelihood method
 Kimura 2-parameter model + Invariant sites
 Bootstrap test (1000 replicates)



(2) CV-A16

VPI gene (272nt:2605nt-2876nt)

Maximum Likelihood method
 Kimura 2-parameter model + Invariant sites
 Bootstrap test (1000 replicates)



(3) EV-A71

VPI gene (249nt:2597nt-2845nt)

Maximum Likelihood method
 Kimura 2-parameter model + Invariant sites
 Bootstrap test (1000 replicates)

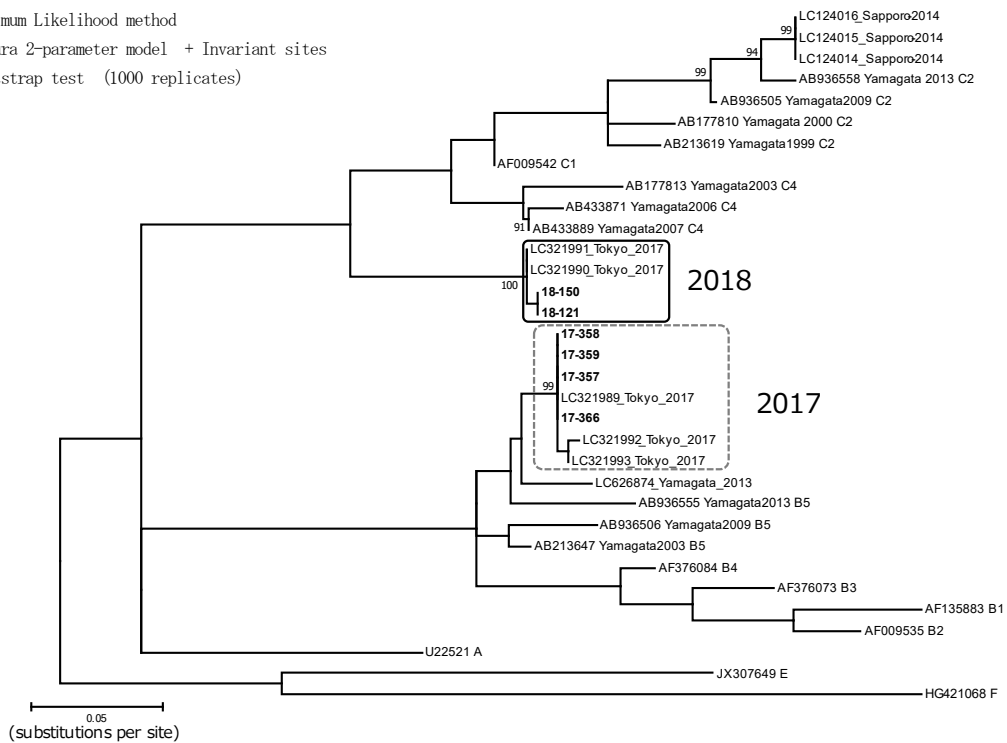


図1. CV-A6、CV-A16、EV-A71 のML法による系統樹解析 (太文字の検体が今回の解析検体)