

エンテロウイルス 71 型 (EV71) の遺伝子解析 (2006～2010 年)

桜井涼子・北野智一・三浦美穂・山本正悟*¹

Gene analysis of Enterovirus 71(EV71)

Ryoko SAKURAI, Tomokazu KITANO, Miho MIURA, Seigo YAMAMOTO

Abstract

Hand-foot and mouth disease(HFMD) is a febrile illness characterized by eruptions on hands, feet and oral mucosa, and generally the patient's prognosis is good. However, HFMD by enterovirus 71 develops into a central nerve symptom uncommonly and it drives a patient into serious condition.

Currently, EV71s is classified into 11 genotypes by the sequences of VP4 gene, and into 3 genotypes by the sequences of VP4-VP2 gene. A few reports concerning the relationship between these genotypes and pathogenicity have been showed, but the detailed relationship is not yet clarified. Further, there is no report that investigated the genotypes of patient origin isolates in Miyazaki prefecture. In this study, we report the results of isolating EV71 and the genotypes of the isolates from 2006 to 2010 in Miyazaki.

Key words: Enterovirus 71, Hand-foot and mouth disease, VP4-VP2 gene, VP4 gene

はじめに

手足口病は口腔粘膜や手足の発疹を特徴とする発熱性疾患であり、一般的に予後は良好である。日本では毎年夏季を中心として主に小児で流行を起こしており、その主な原因は、エンテロウイルス 71 型(EV71)及びコクサッキーウイルス A16 型(CA16)や CA10 型等であるが、EV71 による感染では、まれに中枢神経症状を引き起こし、重篤化することが知られている。1997 年以降には我が国においても EV71 感染による急性脳炎等での死亡例が発生している。また近年では東アジア地域で、EV71 による大規模な手足口病の流行が発生し、多くの小児の急性死亡例が報告²⁾⁴⁾された。EV71 は、VP4 遺伝子の配列から 11 の遺伝子型、VP4-VP2 領域で 3 種類の遺伝子型に分類され、遺伝子型と病原性の関係については一部報告されているが現在までに明らかとなっていない。

これまで県内の患者由来株について、遺伝子

型を調査した報告はなく、今回、宮崎県における EV71 の流行の特徴を明らかにするため、2006 年～2010 年の県内における EV71 の分離状況と分離株の遺伝子型について検討したので報告する。

材料及び方法

1. 検査対象

感染症発生動向調査事業において、2006 年～2010 年の 5 年間に宮崎県の各定点医療機関で採取された便・咽頭拭い液及び水疱内容を検査材料として下記の方法で分離された 27 株を対象とした。

2. ウイルス分離

検体を細胞培養用維持培地〔1%牛胎児血清加 Eagle' sMEM(日水製薬にペニシリン、ストレプトマイシンをそれぞれ 100 単位、100u/mL の割合で加えたもの)〕に浮遊させた後、3000rpm×10 分間遠心した RD-18s, HEp-2, Vero, Caco-2 細

* 1 平成 23 年 3 月 退職

胞に検体を 30 μ L ずつ接種し、36°C30 分間吸着後、維持培地 100 μ L ずつ加え、CO₂ インキュベーターで培養し、細胞変性効果(CPE)の出現したものをウイルス分離陽性とした。

3. 中和試験

抗 EV プール血清(国立感染研より分与)と抗 EV71 単味血清(国立感染研より分与)を使用し、病原体検出マニュアルに準じて実施した。

4. 遺伝子検査

ウイルス分離株の培養上清から、QIAamp

Viral RNA Mini キットを用いて RNA を抽出し、篠原らの報告¹⁾に基づき 5' -非翻訳領域~VP2 領域をターゲットとして RT-PCR を実施した。得られた増幅産物を用いて、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、BLAST で相同性検索を行った。また、近隣接合法(N-J 法)により VP4 領域-VP2 領域の 969bp 及び、VP4 領域の 207bp について 1000 回の Bootstrap 検定を行い分子系統樹を作成した。

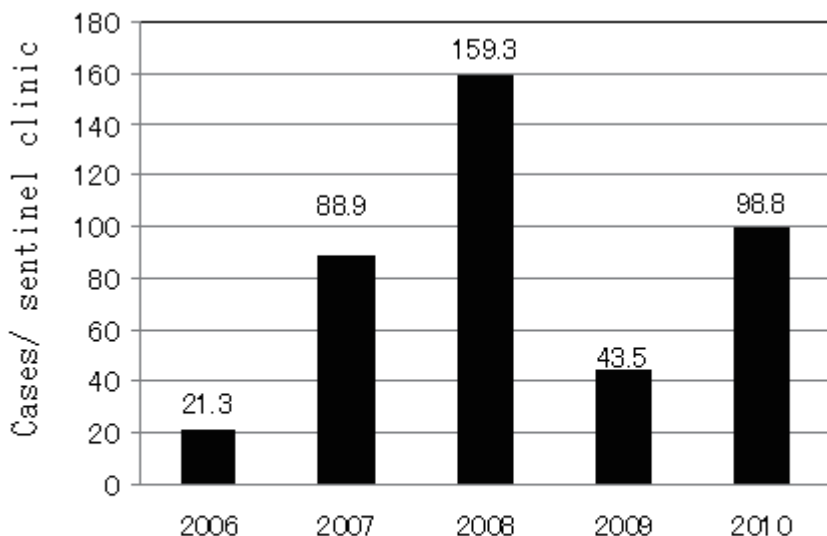


Fig.1. Incidence of hand-foot and mouth disease(HFMD) per reporting hospital, Miyazaki prifecture, 2006-2010

結果

1. 手足口病報告数とウイルス分離状況の概要

1) 報告数の推移

2006 年~2010 年の県内における定点医療機関あたりの手足口病報告数を Fig. 1 に示した。2008 年の報告数が最も多く、159.3 件であり、次いで 2010 年の 98.8 件であった。

2) ウイルス分離状況

EV71 と CA16 の分離状況について、県内の状況を Fig. 2 に、全国の状況を Fig. 3 に示した。2006~2007 年は本県で EV71 のみ分離されたが、全国的には CA16 も分離された。2008 年は全国的に EV71 の分離は少数なく、CA16 の分離が多かった。本県でも CA16 が主に分離され、EV71

の分離はなかった。2009 年は、全国的に手足口病由来のウイルス分離が少なく、2010 年では、全国的にも本県でも、主に EV71 が分離された。

3) EV71 分離状況

a) 月別分離状況

本県での月別分離状況は、2006 年では 8 月下旬~11 月初旬にかけて、2007 年では 2 月初旬~6 月下旬、2010 年は 3 月初旬~9 月中旬にかけて分離された。全国的には、2006 年は 7~12 月にかけて、2007 年は 1~2 月と 5~12 月に検出され、2010 年では 5~8 月をピークに年間通して検出された。

b) 臨床診断名別分離状況

主な臨床診断名は、手足口病が 77% を占め、無菌性髄膜炎は 7% であり、全国の状況と同様

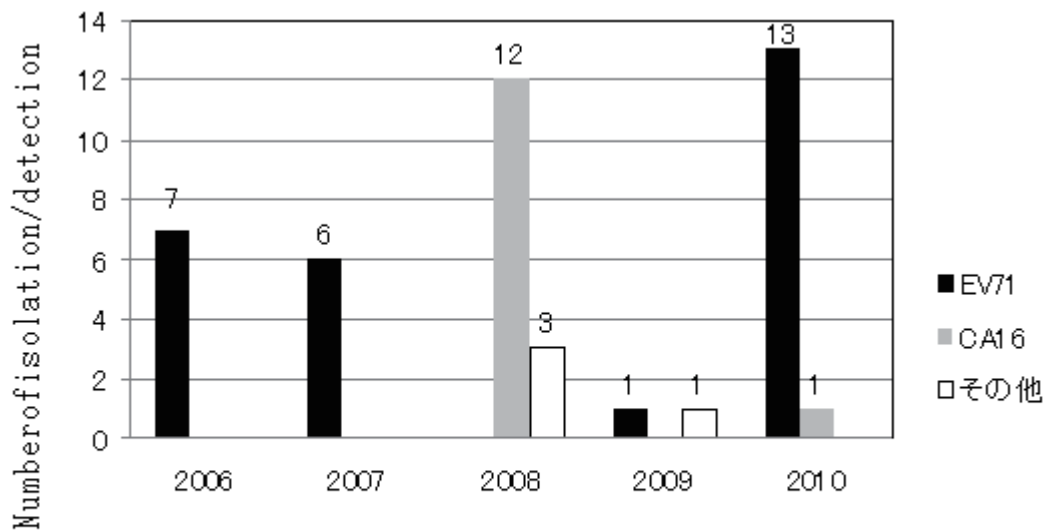


Fig.2. Number of isolation /detection of viruses from HFMD patients, Miyazaki prefecture, 2006-2010

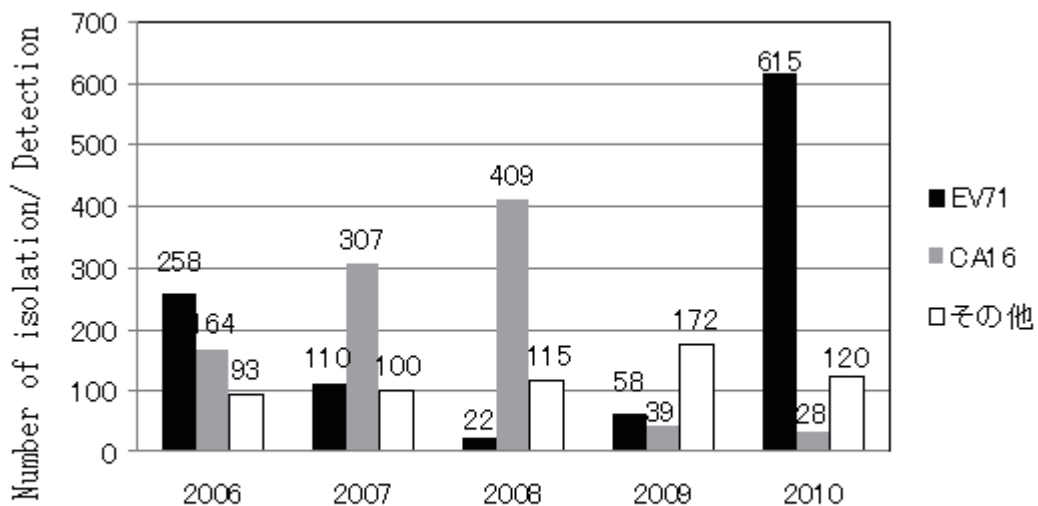


Fig.3. Number of isolation/detection of viruses from HFMD patients, Japan, 2006-2010

の傾向であった。

c) 患者の年齢別分離状況

本県では、全て8歳以下の小児から分離された。特に1～3歳未満が最も多く全体の63%を占め、全国と同様の傾向であった。症状と年齢の関係は、特徴的な傾向はみられなかった。

2. EV71 同定及び遺伝子型別

1) 中和試験

2006年～2007年に分離された13株については、一部が難中和性で、2009年～2010年に分離

された14株は全て難中和性であった。

2) VP4領域(207bp)およびVP4-VP2領域(969bp)の遺伝子解析

VP4領域の系統樹を Fig. 4に、VP4-VP2領域の系統樹を Fig. 5に示す。いずれの領域でも2009～2010年分離株と2006～2007年分離株で大きく2つのクラスターに分かれ、2007年の分離株のうち1株のみ2009～2010のクラスターに含まれた。清水らによるEV71の遺伝子型は、VP4領域で11種類(A, B1～5, C1～5)、VP4-VP2

領域で3種類(A1, A2, B)に分類される。²⁾³⁾県内で2006年～2010年にかけて分離された27株は、VP4領域では全て遺伝子型C2, VP4-VP2領域では全てB型に分類された。BLASTによる相同性検索の結果、2006年の分離株7株は、2004年に台湾で分離された株(DQ133458, DQ133459)に97～98%一致した。2007年の分離株6株のうち5株は、2004年に台湾で分離された株(DQ133458, FJ357373)に97～98%一致し、残りの1株は、2008年にシンガポールで分離された株(FJ172159)に97～98%一致した。2009年の分離株1株は、2008年に台湾で分離された株(HM622392)に98%一致し、2010年の13株は、2008年にシンガポールで分離された株(FJ172159)に97～98%一致した。

分離株間の相同性では、5'非翻訳領域からVP2領域の塩基配列を比較した結果、2006年の分離株7株の塩基配列(614bp)の一致率は約99%で、2010年の分離株13株(606bp)の一致率は約95%であった。また、無菌性髄膜炎を呈した患者から分離された2株とその他の分離株では、塩基配列及びアミノ酸配列を比較した結果、それぞれに特異的な変異は認めなかった。

まとめと考察

2006年～2010年の県内における手足口病の報告数は2008年が最も多く、次いで2010年であった。主な原因ウイルスは、2008年ではCA16, その他の年ではEV71と考えられた。EV71は、夏期を中心にほぼ年間通して分離された。全て8歳以下からの分離であり、小児間の流行であったことが示唆された。また、EV71は数年の周期で流行するが、2010年は分離数が多く、全国

的な流行の年であったと考えられる。

遺伝子型では、本県で2006～2010年に分離された27株では、全てC2型であったが、2006/2007年の分離株と2009/2010年の分離株では異なるクラスターを形成し、流行ごとに単一な型のEV71が主流となる傾向が示された。また、臨床症状は、手足口病、無菌性髄膜炎、発疹と多彩であったが、例数が限られており、遺伝子型と臨床症状についての情報は得られなかった。特に、無菌性髄膜炎を呈した患者から分離されたEV71に特徴的な遺伝子変異は認めなかった。

これまでのところ特定のEV71遺伝子型と疾患の重篤化との明確な関連性は認められていないとされている⁴⁾。しかし、EV71による手足口病流行時には、無菌性髄膜炎や脳炎等の中枢神経合併症の頻度が高くなることがわが国の調査でも明らかになっており⁴⁾、今後もウイルスの型に加え、遺伝子型についてのモニタリングが必要と思われる。

参考文献

- 1) 篠原美千代 他：コクサッキーウイルスA16型及びエンテロウイルス71型の検査法の検討，感染症学雑誌，73(8)，749-756，(1999)
- 2) 清水博之：東アジアにおけるエンテロウイルス71型感染症の流行 病原微生物検出情報，Vol.30. 9-10，(2009)
- 3) 篠原美千代 他：埼玉県における2000年のエンテロウイルス71型分離株について，感染症学雑誌，75(6)，490-494，(2002)
- 4) 清水博之：東アジア地域で分離されるエンテロウイルス71型の分子疫学 病原微生物検出情報，Vol.25, 228-229，(2004)

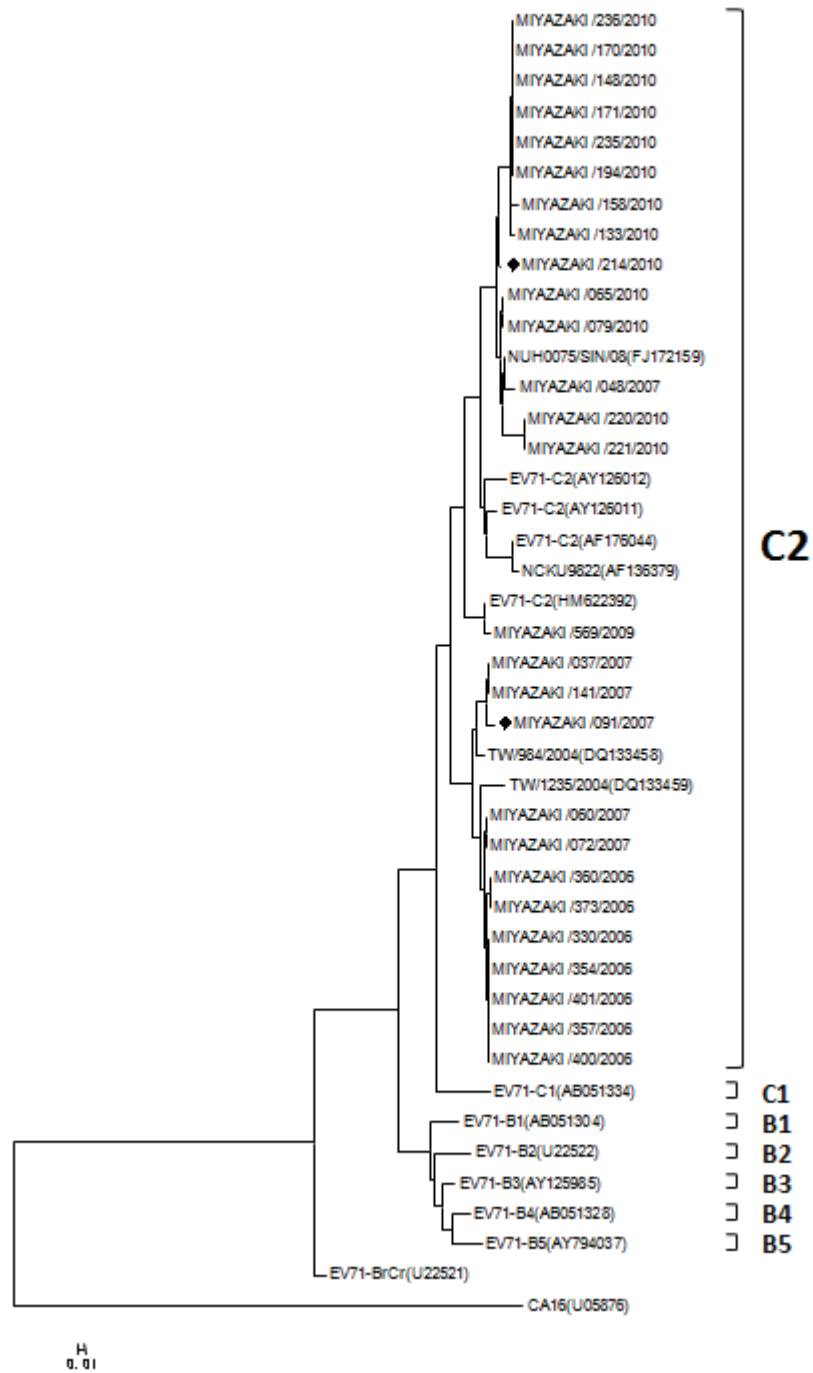


Fig.4. Phylogenetic analysis of Enterovirus71 VP4 genes(207bp)

◆ Isolated that caused aseptic meningitis

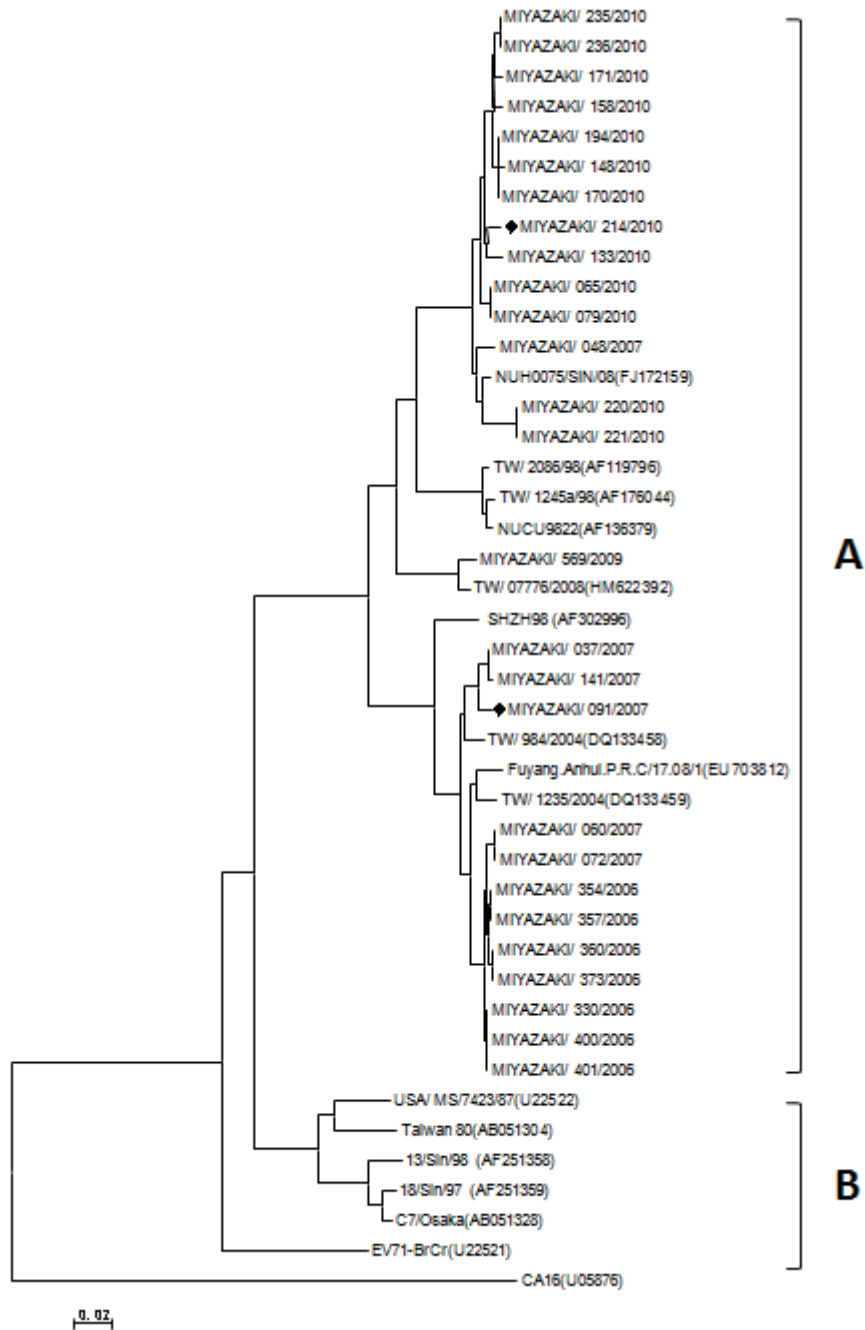


Fig. 5. Phylogenetic analysis of Enterovirus71 VP4—VP2 genes(969bp)

◆ Isolated that caused aseptic meningitis