神奈川県衛生研究所研究報告　No. 46 (2016)
Bull. Kanagawa Ins. of P.H.

短報

手足口病，ヘルパンギーナ患者の発生動向およびウイルスの検出動向に関する解析

佐野貴子[1]，篠崎聡子[2*]，嘉手苅将[1]，伊達佳美[1]，
渡邉寿美[1]，近藤真規子[1]，黒木俊郎[1]

Sentinel surveillance and virus detection trends of hand, foot and mouth disease and herpangina cases in Kanagawa Prefecture

Takako SANO, Satoko SHINOZAKI,
Sho KADEKARU, Yoshimi DATE,
Sumi WATANABE, Makiko KONDO
and Toshiro KUROKI

はじめに

手足口病およびヘルパンギーナは，乳幼児を中心に夏季に流行するウイルス性疾患である．手足口病，ヘルパンギーナともに，年によって流行するウイルスが入れ替わり，流行規模にも違いが見られることが分かっている．手足口病は口腔粘膜および手や足などに現れる水疱性発疹を主症状とし，コクサッキーウイルスA16型（CV-A16）またはエンテロウイルス71型（EV-A71）が主な原因ウイルスとされてきたが，2011年にはこれまでヘルパンギーナの原因ウイルスの一つとされてきたコクサッキーウイルスA6型（CV-A6）による手足口病の大流行が発生した[1−3)]．ヘルパンギーナは口腔粘膜に現れる水疱性発疹と発熱を特徴とする急性ウイルス性咽頭炎であり，コクサッキーウイルスA2型（CV-A2），A4型（CV-A4），A5型（CV-A5），CV-A6，A10型（CV-A10）等の感染によるものが多い[4)]．

今回，神奈川県域（横浜市，川崎市，相模原市，横須賀市および藤沢市を除く：以下，県域と略）における2012〜2015年の４年間の手足口病およびヘルパンギーナ患者の発生動向と患者検体から検出されたウイルス株について解析を行ったので報告する．

方　法

１　患者発生動向調査

神奈川県感染症情報センターにおいて「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」に基づいて行われている感染症発生動向調査のうち，五類定点把握疾患として定点医療機関から報告された手足口病およびヘルパンギーナ患者数を「定点当たり患者報告数」として週別に集計したデータを用いた．それらのデータから2012〜2015年の流行状況の解析を行った．

２　ウイルス分離・同定

県域の小児科病原体定点医療機関から得られた手足口病およびヘルパンギーナ患者の咽頭ぬぐい液について，2012〜2014年はRD-A，HEp-2，VeroおよびVeroE6，2015年はRD-A，A549，VeroおよびVeroE6の各４種類の培養細胞を用いて３代継代培養を行い，細胞変性効果を示したものについて同定を行った．同定法としては各ウイルスに対する中和用抗血清を用いた中和反応あるいは直接蛍光抗体法を実施した．A群コクサッキーウイルスは培養細胞での分離困難例が多いことから，一部の検体については哺乳マウスを用いたウイルス分離を実施し，免疫腹水を用いた補体結合反応による同定を行った．また，咽頭ぬぐい液から遺伝子増幅法（PCR）を用いて，直接ウイルスゲノムの検出を行った．エンテロウイルス属，ライノウイルス属の同定については，5′NTR-VP4部分領域を標的としたP3（1st），P4（2nd）/P5[5)]あるいはVP4-VP2部分領域を標的とした60-80F（1st），EVP4（2nd）/OL68-71R[6)]のプライマーセットを用いてRT-seminested PCRを行った．また，VP4領域において同定不能であった検体については，VP1部分領域を標的とした187，188，189/011[7)]のプライマーセットを用いたRT-PCR法あるいはCODEHOP VP1 RT-snPCR法[8)]を用いて同定を行った．細胞分離株において中和試験で同定不能となったパレコウイルス属株については，VP3/VP1部分領域を標的としたRT-nested PCR法を実施した[9)]．PCR産物は1.5％アガロースゲルを用いて電気泳動し，エチジウムブロマイドで染色後，紫外線下で増幅バンドの有無を確認した．増幅バンドが見られたPCR産物については，ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し，米国生物工学情報センター（NCBI）が提供する塩基配列データベース（GenBank）に登録されている遺伝子配列との相同性検索を行い，塩基，アミノ酸配列とも最も高い一致度を示す標準株の血清型に

１神奈川県衛生研究所　微生物部
〒253-0087　茅ヶ崎市下町屋1-3-1
sano.ipn@pref.kanagawa.jp
２神奈川県衛生研究所　企画情報部
神奈川県感染症情報センター
＊　現　精神保健福祉センター

基づき同定を行った．また，CV-A6で遺伝子解析が可能であった株については， VP1部分領域の369bpを用いて，2007～2011年に検出されたCV-A6株とともに系統解析を行った。遺伝距離はkimura-2-parameter法を用いて推定し，ブートストラップサンプリングを1,000回行い， 近隣結合法にて系統樹を作成した.解析にはMEGA version 6 ソフトウェア[10]を使用した.

結果および考察

1　手足口病，ヘルパンギーナ患者の発生動向

2012～2015年の県域における手足口病患者の定点当たり患者報告数（以下，定点当たり報告数と略）の週別推移を図１に，ヘルパンギーナ患者の定点当たり報告数の週別推移を図２に示した.

手足口病では，警報レベルの開始基準値である定点当たり報告数５を超えていた年は，2013年と2015年の２年で，定点あたり報告数のピーク値は，2013年は10.65（第30週），2015年は12.74（第31週）であった．これらは，2003～2011年のピーク値（1.51-9.10）[3]と比較しても過去最高値となった．CV-A6による流行が起きた2011年のピーク値は7.57（第31週）であり[3]，2011年から１年おきに流行が発生しており，且つ流行規模が拡大傾向にあることから，今後の動向には注意が必要である．ヘルパンギーナでは，警報レベルである定点当たり

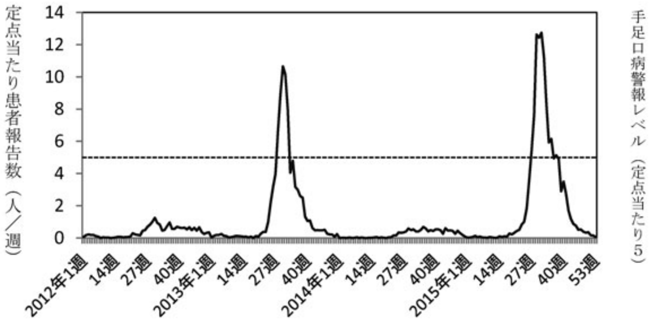

図１　手足口病患者の定点あたり報告数の週別推移（2012－2015年）

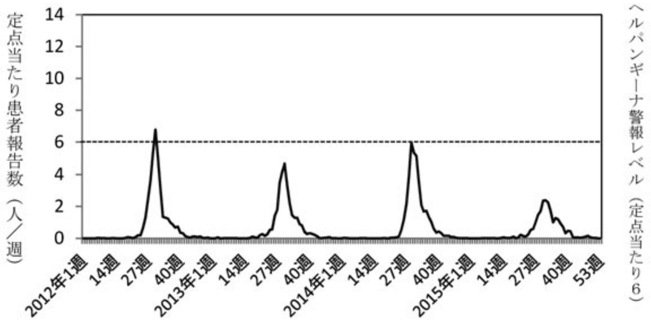

図２　ヘルパンギーナ患者の定点あたり報告数の週別推移（2012－2015年）

表１　手足口病患者検体からのウィルス検出状況

検出ウイルス*	2012年	2013年	2014年	2015年	合計
CV-A2				1	1
CV-A4			5		5
CV-A5	1	1		2	4
CV-A6	8	70	2	59	139
CV-A9	1			2	3
CV-A10			1	7	8
CV-A14				2	2
CV-A16	21	15	9	61	106
CV-B4		2			2
CV-B5				1	1
EV-D68				2	2
EV-A71	7	24			31
E-7	1	2			3
HRV	4	6		4	14
HPeV-3			1		1
HPeV-6				1	1
AdV-1	1				1
AdV-2				1	1
AdV-5		2			2
HSV-1		2		2	4
検出株数	42 (2)**	120 (4)	17 (1)	140 (5)	319 (12)
陰性数	19	44	23	53	139
検体数	61	164	40	193	458
検出率(%)	69	73	43	73	70

*検出ウイルス名
CV：コクサッキーウイルス、EV：エンテロウイルス、E：エコーウイルス、HPV：ヒトライノウイルス、HPeV：ヒトパレコウイルス、AdV：アデノウイルス、HSV：単純ヘルペスウイルス
** カッコ内数字は重複検出数

表２　ヘルパンギーナ患者検体からのウイルス検出状況

検出ウイルス*	2012年	2013年	2014年	2015年	合計
CV-A2	5	1	1	2	9
CV-A4	34	1	29	1	65
CV-A5	19	2	3		24
CV-A6	4	12	1	8	25
CV-A8	1		1		2
CV-A9	1				1
CV-A10		1	6	3	10
CV-A12		1			1
CV-A16				4	4
CV-B2	1				1
CV-B4		2	1	1	4
CV-B5		1			1
EV-A71		1			1
E-6	2				2
PV-1	1				1
HRV	2		1	1	4
AdV-2		1			1
AdV-5		2			2
HSV-1	1	1			2
検出株数	70 (1)**	23 (3)	42 (1)	20	155 (5)
陰性数	10	11	8	3	32
検体数	80	34	50	23	187
検出率(%)	88	68	84	87	83

*検出ウイルス名
CV：コクサッキーウイルス、EV：エンテロウイルス、E：エコーウイルス、PV：ポリオウイルス、HPV：ヒトライノウイルス、AdV：アデノウイルス、HSV：単純ヘルペスウイルス
** カッコ内数字は重複検出数

報告数６を超えた年は2012年の１年で，定点あたり報告数のピーク値は，2012年の6.78（第30週）であった．2014年は5.97（第29週）と若干下回っていたが，手足口病の流行が見られない年にヘルパンギーナの流行が見られる傾向にあることから，継続した監視が必要と考える．

２　手足口病，ヘルパンギーナ患者のウイルス検出状況および検出ウイルス株の解析

県域における手足口病患者検体からのウイルス検出状況を表１に，ヘルパンギーナ患者検体からのウイルス検出状況を表２に示した．手足口病では，全検体の70％からウイルスを検出しており，検出したウイルス株は，主因ウイルスとされるCV-A6，CV-A16，EV-A71で87％を占めていた．その他，CV-A6,CV-A16以外のＡ群コクサッキーウイルス，ヒトライノウイルス，Ｂ群コクサッキーウイルス，エコーウイルス，ヒトパレコウイルス，アデノウイルス，単純ヘルペスウイルスが検出された．また，2015年には急性弛緩性麻痺との関連が疑われるエンテロウイルス68型（EV-D68）[11]が２株検出された．主因ウイルスのCV-A6，CV-A16，EV-A71について検出数および検出率を年別で比較したところ，流行が大きかった2013年と2015年では，CV-A6の検出数が多く，且つ検出率が高かった（図３）．このことから，近年の手足口病の流行にはCV-A6が係わっていることが示唆された．さらに2015年では，CV-A16の検出数はCV-A6とほぼ同程度であったことから，CV-A6とCV-A16の混合流行により，過去最大の流行に繋がったと推察された．

ヘルパンギーナでは，検体数の83％からウイルスを検出し，検出株数のうち，主因とされるＡ群コクサッキーウイルスの検出が91％を占めた．その他，Ｂ群コクサッキーウイルス，ヒトライノウイルス，エコーウイルス，EV-A71，ポリオウイルス（ワクチン由来株），アデノウイルス，単純ヘルペスウイルスが検出された．Ａ群コクサッキーウイルスのうち検出数の多かったCV-A2，CV-A4，CV-A5，CV-A6，CV-A10について検出数と検出率を年別で比較したところ，流行の大きかった2012年と，比較的流行が大きかった2014年ではCV-A4の検出率が高くなっていた（図４）．一方，ヘルパンギーナの流行が比較的小規模であった2013年と2015年では，CV-A6の検出率が高くなっていた．

我々はこれまでに，従来ヘルパンギーナの主因ウイルスであったCV-A6による手足口病の大規模な流行が2011年に起き，その流行株が2009年以前の主流株とは異なるバリアントであったことを報告している[3]．今回，2011年以降の手足口病流行の起因となっているCV-A6の遺伝子的動向を継続して把握するため，2007～2015年に手足口病およびヘルパンギーナ患者検体から検出されたCV-A6株のうち，遺伝子解析が可能であった87株（2007年２株，2008年12株，2009年15株，2010年19株，2011年12株，2012年４株，2013年８株，2014年３株，2015年12株）について，VP1部分領域369bpを用いた系統解析を行った（図５）．その結果，2012年以降に検出された株は，2011年流行株と同じクラスターのGroup A（ブートストラップ値：90％）に分類され，2009年以前の主流株であるGroup B（ブートストラップ値：99％）とは異なっていた．また，Group Aの中では，年別にサブクラスターを形成する傾向が見られた．これらのことから，2011年以降，近縁のバリアントが手足口病の主因ウイルスとなっていることが分かった．

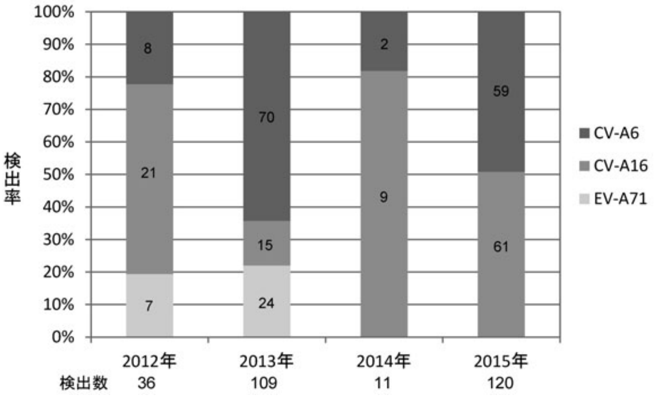

図３　手足口病患者検体からのCV-A6, CV-A16, EV-A71検出数と検出率（2012-2015年）

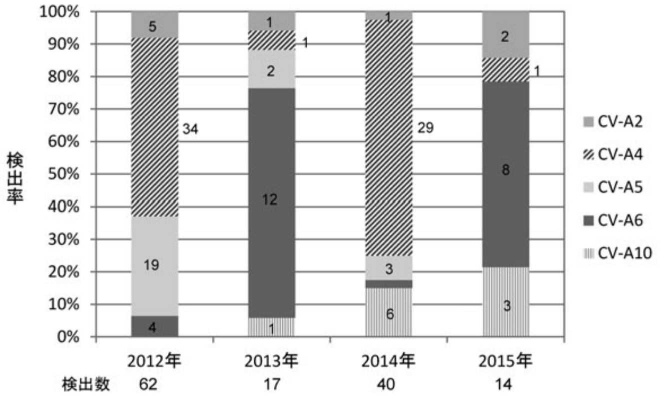

図４　ヘルパンギーナ患者検体からのCV-A2, CV-A4, CV-A5, CV-A6, CV-A10検出数と検出率（2012-2015年）

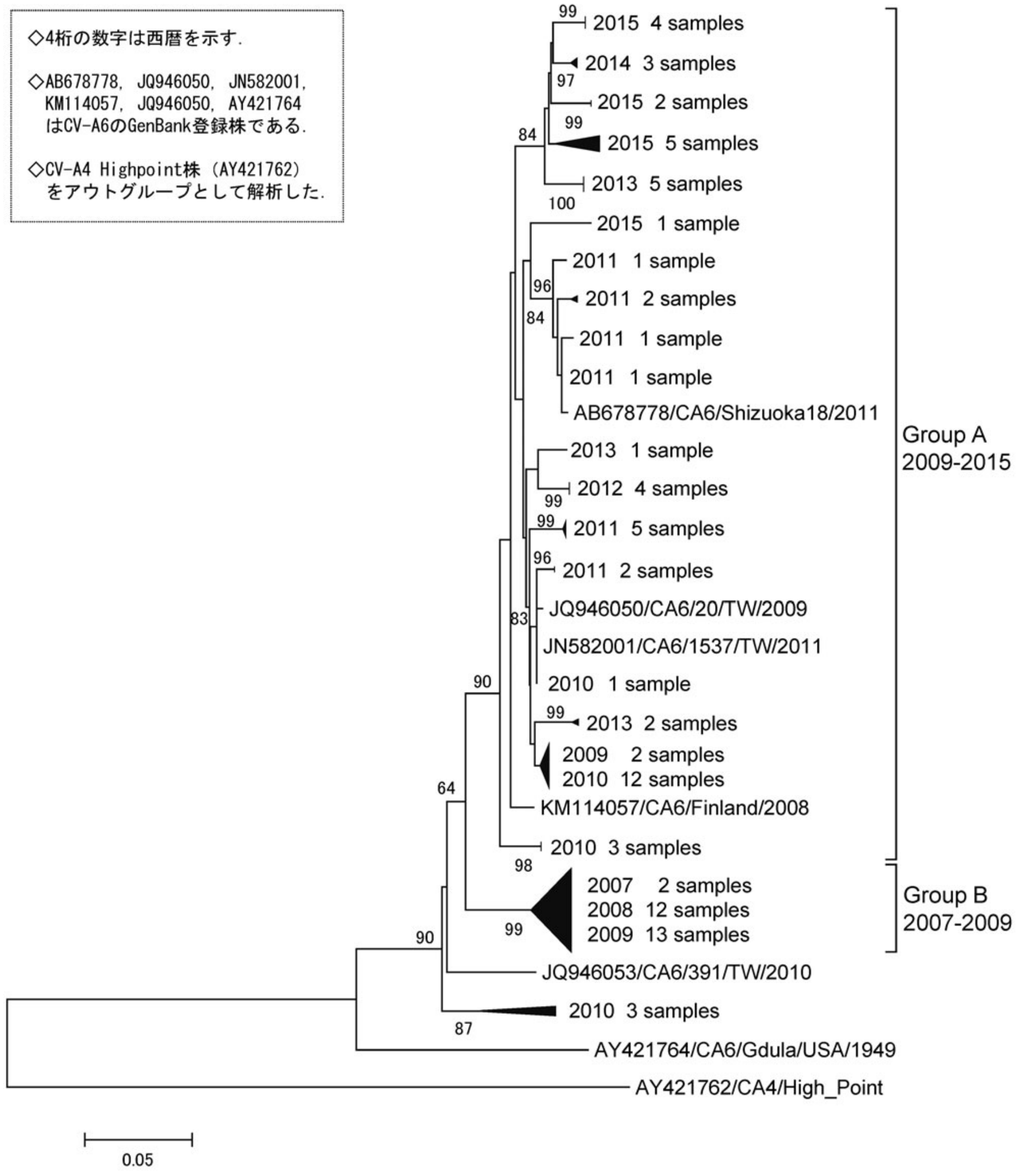

図5 CV-A6のVP1部分領域（369bp）を用いた系統樹

まとめ

手足口病は近年１年おきに流行が発生しており，流行規模が拡大傾向にあることから，今後も監視が必要である．ヘルパンギーナは手足口病の流行が小さい年に流行が起きており，どちらかの疾患が毎年流行している状況にある．近年，手足口病の流行株はCV-A6が主流となっているが，2015年にはCV-A6とCV-A16による混合流行が見られ，大規模な流行が発生した．手足口病とヘルパンギーナは基本的には予後が良好な疾患であるが，手足口病の原因ウイルスの１つであるEV-A71は無菌性髄膜炎を併発することもあり，死亡例も報告されている[12)]．近年，県域ではEV-A71の流行は見られていないが，今後の発生動向には注意が必要である．また，急性弛緩性麻痺との関連が疑われるEV-D68の検出動向も注視すべきである．毎年の流行状況および原因ウイルスの解析は，疾病の流行を監視する上で極めて重要と考える．今後も感染症発生動向調査を継続していく中で，経年的な流行状況の把握と迅速な情報還元に努めていきたい．

謝　辞

本調査を実施するにあたり，多大なご協力を頂きました小児科病原体定点医療機関の先生方および県健康危機

管理課の皆様に深謝いたします.

文　献

1）Fujimoto, T., Iizuka, S., Enomoto, M., Abe, K., Yamashita, K., Hanaoka, N., et al.: Hand, foot, and mouth disease caused by coxsackievirus A6, Japan, 2011, Emerg. Infect. Dis., 18, 337-339（2012）

2）国立感染症研究所感染症情報センター：<特集>手足口病2002～2011年，病原微生物検出情報，33, 55-56（2012）

3）佐野貴子，近内美乃里，近藤真規子，渡邉寿美，齋藤隆行：神奈川県域における手足口病，ヘルパンギーナ患者の発生動向および検出ウイルス株の解析，神奈川県衛生研究所研究報告，42，11-16（2012）

4）国立感染症研究所感染症情報センター：感染症の話「ヘルパンギーナ」，国立感染症研究所感染症発生動向調査週報，2003年第８号，10-11（2003）

5）川俣　治：RT-PCR法によるエンテロウイルス及びライノウイルスの検出系，新潟医学会雑誌，111, 633-646（1997）

6）宗村徹也，藤本嗣人，近平雅嗣，木村博一，西尾治，吉田　弘ほか：エンテロウイルス遺伝子診断法における市販RNA抽出キット選択の影響，感染症学雑誌，82，55-57（2008）

7）Oberste, M.S., Maher K., Flemister M.R., Marchetti G., Kilpatrick D.R., Pallansch M.A.: Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses, J Clin Microbiol, 38, 1170-4（2000）

8）Nix, W.A., Oberste, M.S., Pallansch, M.A.: Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens, J Clin Microbiol, 44, 2698-2704(2006)

9）Harvala, H., Robertson, I., McWilliam Leitch, E.C., Benschop, K., Wolthers, K.C., Templeton, K., et al.: Epidemiology and clinical associations of human parechovirus respiratory infections, J Clin Microbiol, 46, 3446-53(2008)

10）Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S.: MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30, 2725-2729（2013）

11）国立感染症研究所感染症情報センター：エンテロウイルスD68 型（EV-D68）に関する国内の疫学状況のまとめ（更新）（2016年１月20日現在）病原微生物検出情報，37，33-35（2016）

12）篠原美千代，内田和江，島田慎一，瀬川由加里，星野庸二：埼玉県における2002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，75，490-494（2001）