

愛媛県におけるエコーウイルス9型による発疹症

青木里美 川口利花 菅 美樹 山下育孝 服部昌志 大倉敏裕 四宮博人

Detection of echovirus 9 in patients with skin rash in Ehime in 2012

Satomi AOKI, Rika KAWAGUCHI, Miki KAN, Yasutaka YAMASHITA
Masashi HATTORI, Toshihiro OHKURA, Hiroto SHINOMIYA

Echoviruses can cause a variety of clinical syndromes such as aseptic meningitis, respiratory infections, skin rash, and diarrhea. Among many serotypes of echovirus, echovirus 9 (E9), as well as E30, is most often detected in Japan. E9 was detected in patients with viral or mysterious rashes that were prevalent in Ehime in 2012. The ages of the patients were 6 months to 10 (the average, 2.0), and the infants aged 1-3 years accounted for 83.3% of the entire patients. The homology of the nucleotide sequences in VP4-VP2 region among the detected E9 strains was 99.1-100%, while the homology was not so high when compared to those of E9 strains detected in 1995, 2002 and 2005 in Ehime, suggesting that the E9 strains detected in 2012 were different from those detected in the past.

Keywords : Echovirus 9, skin rash, molecular epidemiology

はじめに

エコーウイルスは、無菌性髄膜炎、夏かぜや咽頭炎等の気道感染症、発疹症、下痢症など多様な疾患から検出され、血清型も毎年あるいは数年周期で入れ替り、散发または地域流行を起こす。エコーウイルス9型 (E9)は、米国におけるエンテロウイルスサーベイランスにおいて¹⁾ 検出数の多い血清型の1つで、他の血清型に比べ致死率は低く、無菌性髄膜炎患者からの報告が多い。我が国においては、1982年から1999年の間に髄膜炎患者からE30に次いで多く検出され²⁾、また、2000年、2002年、2005年にも無菌性髄膜炎の主要な病因となっていた³⁻⁴⁾。無菌性髄膜炎以外では、E9の検出数が多かった1994年、1997年、2000年、2002年に発疹症患者から検出されている^{3,5-7)}。近年は検出数が減っていたが、2011年9月以降E9が散発的に検出され、2012年には西日本を中心にE9が不明発疹症、上気道炎、無菌性髄膜炎等の患者から多く検出された⁸⁾。愛媛県では、E9は、2005年の不明

発疹症患者からの検出を最後に2011年まで検出されていなかったが、2012年6月から7月に発疹症患者から多数検出された。

そこで、本県におけるE9の流行状況を把握するとともに、流行実態を明らかにするため、検出ウイルスの分子疫学的解析を行ったので報告する。

材料と方法

1 検査材料

感染症発生動向調査事業において2012年6月から7月に定点医療機関から発疹症、手足口病、無菌性髄膜炎等が疑われ当所に搬入された103名の患者検体(咽頭ぬぐい液、髄液および直腸ぬぐい液)を材料とした。

2 ウイルス分離検査

検体の前処理および保存は既報⁹⁾に準じて行った。ウイルス分離には、FL、RD-18s、Vero細胞を用いて2代まで継代培養を行った。分離されたエンテロ様ウイルスの同定は、国立感染症研究所から分与されたエコーウイルスプール抗血清および単味抗血清を用いた中和試験によ

って行った。また、アデノ様ウイルスの同定には、デンカ生研の抗血清を用いた。

3 遺伝子検査

検体(咽頭拭い液, 細胞培養上清)からのRNAの抽出はHigh Pure Viral RNA kit (ロシュ)を用い, SuperScript II 逆転写酵素 (ライフテクノロジー)でcDNAを作成後, VP4-VP2領域の増幅を目的としたPCR法を行った。プライマーは, 1st-PCRでは EVP2¹⁰⁾およびOL68-1¹¹⁾, nested-PCRではEVP4¹²⁾およびOL68-1を使用した。条件は, 94°C4分の反応後, 94°C30秒, 55°C30秒, 72°C1分の反応サイクルを40回繰り返し, 最後に72°C7分の伸長反応を行った。nested-PCRは1st-PCRと同じ反応条件で35サイクル行った。増幅産物は, MinElute PCR Purification Kit (キアゲン)で精製後, ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し, BLASTによる相同性検索を行った。また, 得られたVP4-VP2領域の塩基配列について, ClustalXでアライメントを行い, 近隣接合法(NJ法)により系統樹を作成した。

4 過去に検出された株との比較

愛媛県で過去に検出されたE9 (Ehime97-1267-2[1997

年に不明発疹症から検出], Ehime02-748-2[2002年に不明発疹症から検出], Ehime05-1367[2005年に無菌性髄膜炎から検出])3株と今回検出されたE9のVP4-VP2領域(432bp)の塩基配列を比較した。

結果および考察

103名中34名からウイルスが36例検出された。内訳はE9が26例で最も多く, 次いでコクサッキーウイルスA(CA)4が4例, CA16が3例, アデノウイルス1型(Ad-1)が2例, E7が1例であった。

E9が検出された26症例について表1に示した。ウイルス分離陽性であった24症例は, すべて培養を開始して6日以内(大部分は3~4日)にRD-18S細胞にのみCPEが認められたため, 抗血清を用いた中和試験により同定し, ウイルス分離陰性であった症例18, 19はRT-PCR法により同定した。また, Ad-1との重複感染が2症例に見られた。調査期間中に E9が検出された患者の臨床診断名は, ウイルス性発疹症・不明発疹症(以下, 発疹症)が約81%(21/26)を占めていたことから, 2012年6月から7月に本県においてE9による本疾患の地域流行があったと考え

表1 本研究で対象としたE9陽性患者の情報

症例No	検体	診断名	症状	年齢	性別	検体採取日	その他の検出ウイルス
1	咽頭ぬぐい液	ウイルス性発疹症	発疹	4歳	男	2012/6/13	
2	咽頭ぬぐい液	ウイルス性発疹症	発疹	11か月	女	2012/6/13	Ad-1
3	咽頭ぬぐい液	ウイルス性発疹症	発熱(39°C)、発疹(紅斑)	1歳	女	2012/6/13	
4	咽頭ぬぐい液	ウイルス性発疹症	発熱(38.5°C)、発疹	1歳	男	2012/6/13	
5	咽頭ぬぐい液	ウイルス性発疹症	発疹	4歳	男	2012/6/13	
6	咽頭ぬぐい液	不明発疹症	発熱(38.4°C)、発疹(紅斑性丘疹)	1歳	男	2012/6/14	
7	咽頭ぬぐい液	不明発疹症	発熱(39°C)、頭痛、発疹	3歳	男	2012/6/14	
8	咽頭ぬぐい液	不明発疹症	発疹(紅斑性丘疹)	2歳	男	2012/6/14	
9	咽頭ぬぐい液	不明発疹症	発疹(紅斑性丘疹)	1歳	男	2012/6/19	
10	咽頭ぬぐい液	不明発疹症	発熱(39°C)、発疹(紅斑性丘疹)	1歳	男	2012/6/19	
11	咽頭ぬぐい液	ウイルス性発疹症	発疹(小発赤疹)	1歳	男	2012/6/19	
12	咽頭ぬぐい液	不明発疹症	発熱(39°C)、発疹(紅斑性丘疹)	1歳	女	2012/6/19	Ad-1
13	咽頭ぬぐい液	不明発疹症	発熱(39°C)、発疹(紅斑性丘疹)	1歳	女	2012/6/19	
14	咽頭ぬぐい液(鼻汁)	不明発疹症	発熱(39°C)、発疹(紅斑)	10歳	女	2012/6/25	
15	咽頭ぬぐい液	ウイルス性発疹症	発疹(丘疹)	1歳	男	2012/6/26	
16	咽頭ぬぐい液	ウイルス性発疹症	発疹(丘疹)	1歳	男	2012/6/26	
17	咽頭ぬぐい液	ウイルス性発疹症	発熱(39°C)、発疹(紅斑)、胃腸炎(嘔吐)	2歳	男	2012/6/27	
18*	咽頭ぬぐい液	不明発疹症	発熱(39°C)、発疹(丘疹、紅斑)、胃腸炎(嘔吐)、肝機能障害	9か月	女	2012/6/27	
19*	咽頭ぬぐい液	不明発疹症	発熱(39°C)、発疹	6か月	女	2012/7/5	
20	咽頭ぬぐい液	不明熱	発熱(38.1°C)	1歳	男	2012/7/11	
21	咽頭ぬぐい液	手足口病	発熱(38.1°C)、発疹	1歳	男	2012/7/18	
22	咽頭ぬぐい液	ウイルス性発疹症	発熱(39.4°C)、発疹(バラ疹)、上気道炎	7歳	男	2012/7/18	
23	咽頭ぬぐい液	下気道炎	発熱(38.9°C)、気管支炎	3歳	女	2012/7/23	
24	咽頭ぬぐい液	不明発疹症	発熱(38.3°C)、発疹	2歳	女	2012/7/24	
25	直腸拭い液	無菌性髄膜炎	髄膜炎	6歳	女	2012/7/25	
26	咽頭ぬぐい液	無菌性髄膜炎	発熱(38°C)、髄膜炎	7歳	男	2012/7/28	

*遺伝子により判定

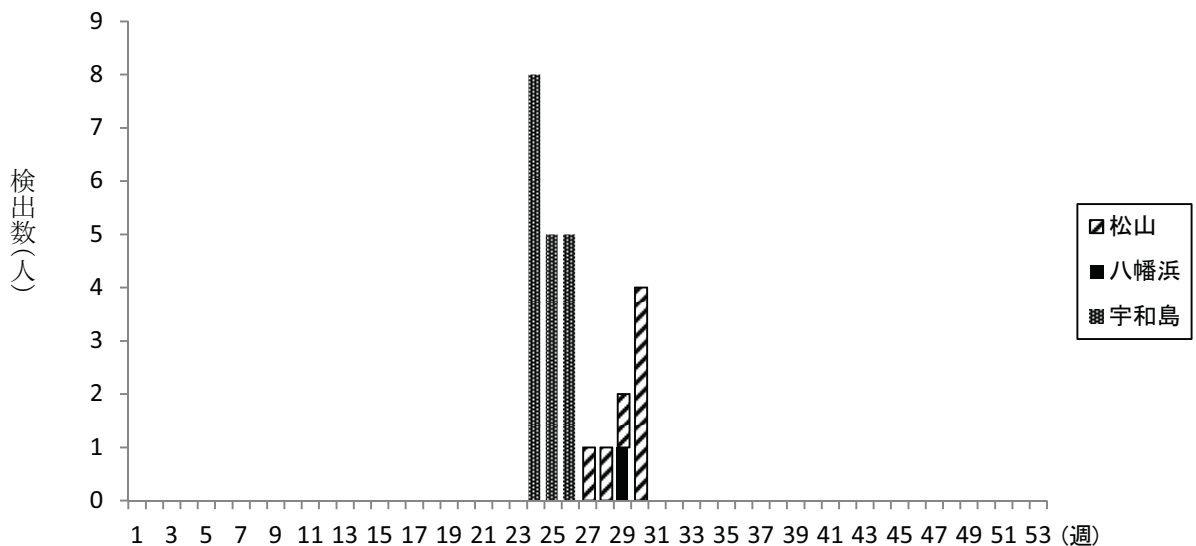


図1 E9 週別検出状況

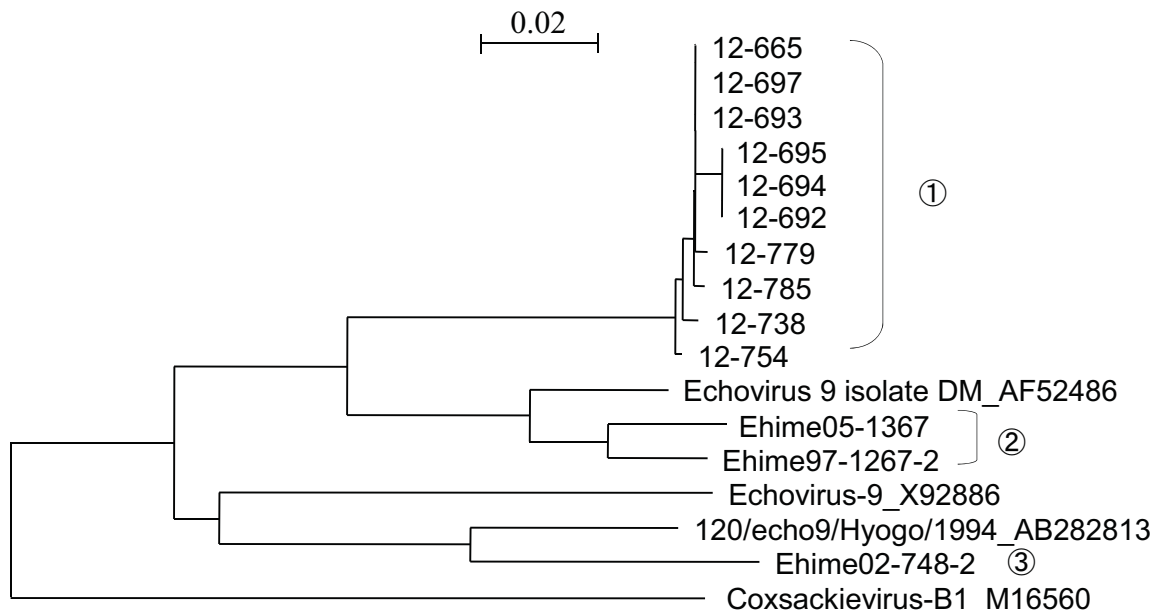


図2 E9 系統樹(VP4-VP2 領域 432bp)

られた。感染症発生動向調査によると^{8,13)}、E9は2012年6月に発疹症から多く検出され、しかも中国・四国および九州地区での検出数が多い。これらのことから、E9による発疹症が、この時期に、本県だけでなく、これらの地域においても発生していたことが示唆された。E9が検出された発疹症患者の年齢は6カ月から10歳(平均2.0歳)で、1歳児が50%と最も多く、1から3歳の乳幼児で全体の83.3%を占めていた。一方、E9が検出された無菌性髄膜炎患者は6歳と7歳(平均6.5歳)で、発疹症患者の年齢の方が低い傾向が見られた。これは、藤本ら⁵⁾、吉野ら⁷⁾の報告と同様であった。

E9は、第24週から第26週(6月中旬から下旬)に宇和島地区で発疹症から18例検出された。一方、松山地区ではCA4が不明熱および上気道炎から4例検出されていたが、7月に入ってから発疹症、手足口病、不明熱、下気道炎及び無菌性髄膜炎患者からE9が7例検出されている。また、八幡浜地区では第28週に発疹症患者から1例検出された(図1)。E9は6月に宇和島地区で初めて検出され、局所的に流行し、その後八幡浜、松山地区へと流行が広がったと考えられた。

各地区で検出されたE9の10株と愛媛県で過去に検出された株および国内外の検出株を用いて系統樹解析を

行った(図2).その結果,2012年に愛媛県で検出された10株は,同一のクラスターを形成し,VP4-VP2領域の塩基配列の相同性は99.1~100%であり,非常に近縁であった(図2-①).一方,1997年および2005年の検出株とは異なるクラスター(塩基配列の相同性86.5~88.4%)を形成した(図2-②).2002年に検出された株とは80.1~81.0%の相同性を示し,これらとも異なるクラスターに分類された(図2-③).以上より,愛媛県で過去に検出された株とは遺伝子学的に異なるE9が2012年に地域流行していたことが示唆された.今回,我々はVP4-VP2領域の塩基配列を比較したがVP1領域全長あるいは全構造領域を解析に用いることで,より詳細な流行要因の解析が可能になると考えられ,今後の検討課題である.

なお,本研究の一部は愛媛県立衛生環境研究所特別研究調査事業により行われたものである.

まとめ

- 1 2012年,県内でE9を主病因とする発疹症の流行が認められた.
- 2 E9は,当初南予地区で流行していたが,その後中予地区にも広がりを見せた.
- 3 E9が検出された発疹症患者の年齢は6カ月から10歳(平均2.0歳)で,1から3歳の乳幼児が全体の83.3%を占めていた.
- 4 2012年に検出されたE9のVP4-VP2領域の塩基配列の相同性は99.1~100%で,非常に近縁であり,過去に検出された株とは異なるクラスターに分類された.

文献

- 1) Centers for Disease Control and Prevention : Enterovirus Surveillance - United States, 1970-2005. surveillance Summaries , September 15, 2006. MMWR, 55, 1-20(2006)
- 2) 病原微生物検出情報月報, 21(10), 1-2(2000)
- 3) 病原微生物検出情報月報, 23(8), 1-2(2002)
- 4) 病原微生物検出情報月報, 30(1), 1-3(2009)
- 5) 藤本嗣人他:病原微生物検出情報月報, 15(10), 6(2009)
- 6) 玉田清治他:病原微生物検出情報月報, 18(8), 19-20(2009)
- 7) 吉野周司他:病原微生物検出情報月報, 21(8), 7-8(2009)
- 8) 病原微生物検出情報IASR : <http://www.nih.go.jp/niid/images/iasr/arc/ot/2012/data2012.106j.pdf>
- 9) 近藤玲子ほか:愛媛衛環研年報, 3, 10-16(2000)
- 10) Rotbart HA. et al: J Clin Microbiol, 28 (3), 438-442(1990)
- 11) Olive DM. et al: J Gen Virol, 71, 2141-7 (1990)
- 12) Ishiko H. et al: J Inf Dis, 185, 744-754 (2002)
- 13) 病原微生物検出情報 IASR : <http://www.nih.go.jp/niid/images/iasr/arc/ot/2012/data2012.105j.pdf>