

## 愛媛県において手足口病患者検体より検出された コクサッキーウイルスA6型の遺伝子解析

越智晶絵 溝田文美\*<sup>1</sup> 山下育孝\*<sup>2</sup> 木村俊也\*<sup>3</sup> 井上智 四宮博人

### Detection and genetic analysis of Coxsackievirus A6 from patients with hand, foot and mouth disease in Ehime

Akie OCHI, Fumi MIZOTA, Yasutaka YAMASHITA, Toshiya KIMURA,  
Satoshi INOUE, Hiroto SHINOMIYA

Hand-foot and mouth disease (HFMD) - a mild contagious viral infection common in young children- is characterized by vesicular rash on the hands, feet, and oral mucosa. Common symptoms of HFMD include vesicular rash on the hands, feet, and oral mucosa. In the past, the main pathogen of HFMD was recognized as coxsackievirus A16 (CV-A16) or enterovirus 71 (EV-A71). Recently, coxsackievirus A6 (CV-A6) has been dominant in HFMD cases. In this study, we analyzed the epidemiology of HFMD and the molecular epidemiology of CV-A6 associated with HFMD in Ehime. The CV-A6 strains detected in Ehime in 2013, 2015, and 2016 were included in one group that were further divided into three subgroups. The nucleotide identities of these strains ranged 93.4%-100% (VP4-VP2) and 94.6%-100% (VP1) respectively. Annual changes in HFMD patients with CV-A6 by age suggested not exposed to CV-A6 in the past are more likely to be infected with CV-A6. Because CV-A6 epidemics may occur in future, continuous monitoring of CV-A6 infections will be necessary.

Keywords : coxsackievirus A6, hand, foot and mouth disease

#### はじめに

手足口病とは、口腔粘膜や四肢末端に水疱性の発疹が現れるウイルス性発疹症であり、感染症法上の五類感染症定点把握疾患である。乳幼児を中心に夏季に流行するが、ほとんどの患者は数日のうちに治癒する。従来、手足口病患者からは、コクサッキーウイルスA16型 (CV-A16) やエンテロウイルス71型 (EV-A71) が主に分離されてきた<sup>1)</sup>。しかし、近年になって、より広範囲に発疹が現れる<sup>2)</sup>、回復後に爪甲が脱落する<sup>3)</sup>といった、非定型的な症状を示す手足口病例が報告されるようになり、こうした症状を示す手足口病は、コクサッキーウイルスA6型 (CV-A6)

によって引き起こされていることが明らかになってきた<sup>4)</sup>。

CV-A6はピコルナウイルス科エンテロウイルス属に属する一本鎖RNA (プラス鎖) ウイルスであり、元来、ヘルパンギーナの主要な原因ウイルスとして知られていた。しかし、近年になって、CV-A6による手足口病が多く報告されるようになった。CV-A6による手足口病は、2008年のフィンランド<sup>5)</sup>やスペイン<sup>6)</sup>での発生が報告されて以来、世界各地に広がっている。

本研究では、愛媛県内における手足口病の発生状況について調査するとともに、その流行要因を検討するために、手足口病患者検体から検出されたCV-A6について遺伝子解析を行ったので報告する。

#### 材料と方法

##### 1 愛媛県における手足口病の発生状況

愛媛県立衛生環境研究所 松山市三番町8丁目234番地

\*1 食肉衛生検査センター \*2 宇和島保健所

\*3 八幡浜保健所

感染症発生動向調査によって、2006年から2016年の11年間に報告・収集された、愛媛県内の手足口病の発生状況およびウイルス検出状況に関するデータを解析した。

## 2 検体

感染症発生動向調査として2013年、2015年、2016年に定点医療機関から手足口病患者検体として当所に搬入された咽頭ぬぐい液、水泡液等合計157検体(149症例)を対象とした。

## 3 CV-A6検出患者の年齢別集計

2006年から2016年の間に、感染症発生動向調査により当所に搬入された手足口病患者検体からCV-A6が検出された患者数を年齢別に集計した。

## 4 CV-A6の検出及び遺伝子解析

遺伝子の検出および解析は、国立感染症研究所が公表している「手足口病 病原体検査マニュアル」に従い実施した。すなわち、対象検体からHigh Pure Viral RNA kit (Roche)を用いてウイルスRNAの抽出を行い、RT-semi-nested PCR法(プライマー:EVP4/OL68-1)<sup>7)</sup>によってVP4-VP2部分領域を、CODEHOP VP1 RT-semi-nested PCR法(プライマー:AN89/AN88)<sup>8)</sup>によってVP1部分領域をそれぞれ増幅し、ウイルス遺伝子を検出した。陽性検体については、PCR増幅産物を用いたダイレクトシーケンシング法により塩基配列を決定し、遺伝子型別を行った。さらに、CV-A6型別株の一部について、ML法により分子系統樹を作成した。

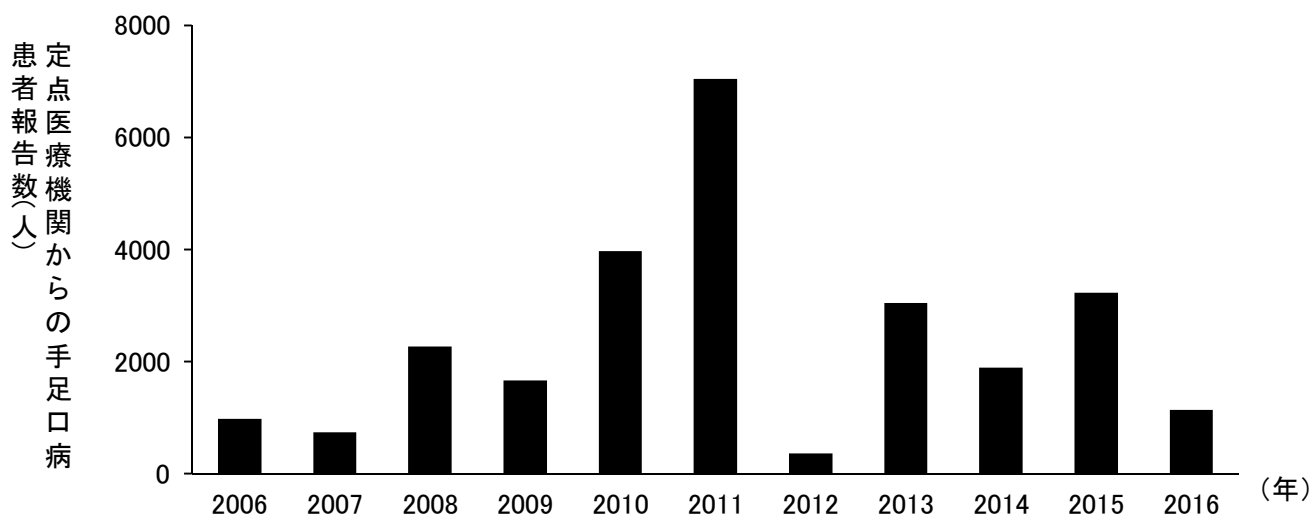


図1 定点医療機関からの手足口病患者報告数の推移(2006年～2016年)

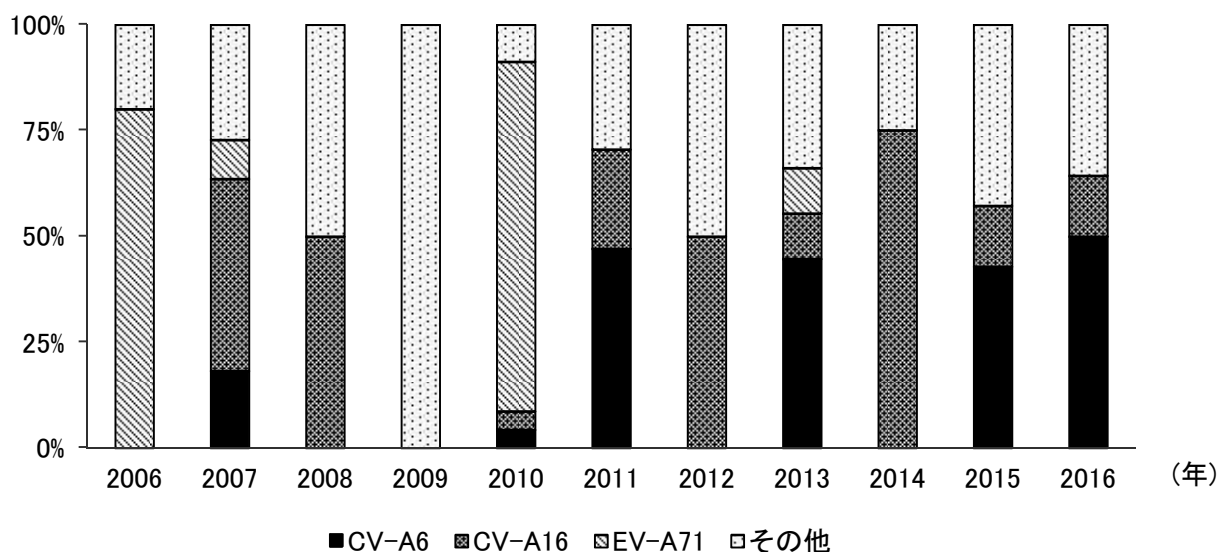


図2 手足口病患者検体から検出された病原体の割合(2006年～2016年)

## 結果

### 1 愛媛県における手足口病患者の発生状況

愛媛県では、2011年に、定点医療機関からの患者報告数が全体で7000人以上となる大規模な手足口病の流行があった。また、2011年と比較すると規模は小さいものの、2010年、2013年、2015年にも流行がみられた(図1)。手足口病患者検体からの検出病原体割合を集計した結果、2010年以前はCV-A16やEV-A71が大きな割合を占めた。一方、2011年以降はCV-A6の割合が増加していた(図2)。

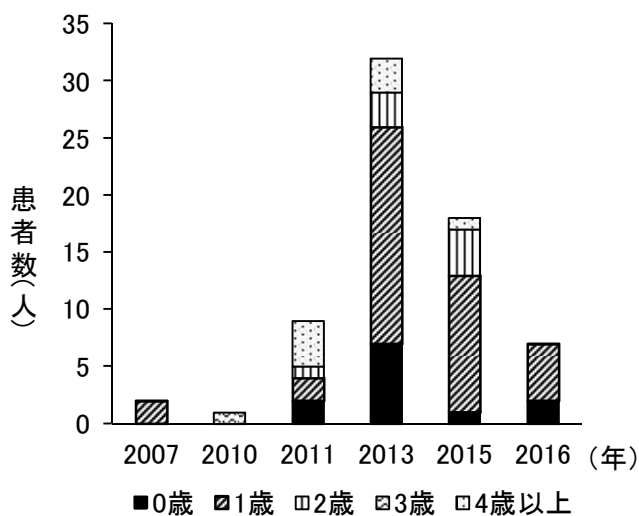


図3 年齢別 CV-A6 陽性患者数

### 2 CV-A6 検出例の年齢分布

2006年から2016年の間にCV-A6が検出された手足口病患者数の年齢別集計結果を図3に示した。2011年は、4歳以上の割合が高く、検出された患者の年齢は多様性に富んでいた。2013年と2015年は、0歳～2歳が大部分を占めていた。2016年は、0歳～1歳のみで検出されていた。

### 3 CV-A6 株の遺伝子解析

対象とした157検体(149症例)のうち、57検体(54症例)からCV-A6が検出された。そのうちの一部の株について分子系統樹解析を行った結果、解析に用いた株は、VP4-VP2部分領域(519nt)、VP1部分領域(273nt)ともに、2008年以前に国内でヘルパンギーナ患者検体等から検出されたCV-A6株とは異なり、2008年にフィンランドで手足口病患者検体より検出されたCV-A6株と同一のグループに属し、株間の塩基配列の相同性はそれぞれ93.4%～100%(VP4-VP2部分領域)、94.6%～100%(VP1部分領域)と非常に高かった。また、これらの株は、年ごとに別々のサブグループを形成し、それぞれのサブグループには、同じ年に国内の別の地域で検出された株が含まれていた(図4、5)。しかし、アミノ酸配列の比較を行ったところ、アミノ酸変異はほとんど起きていなかった(データは示していない)。

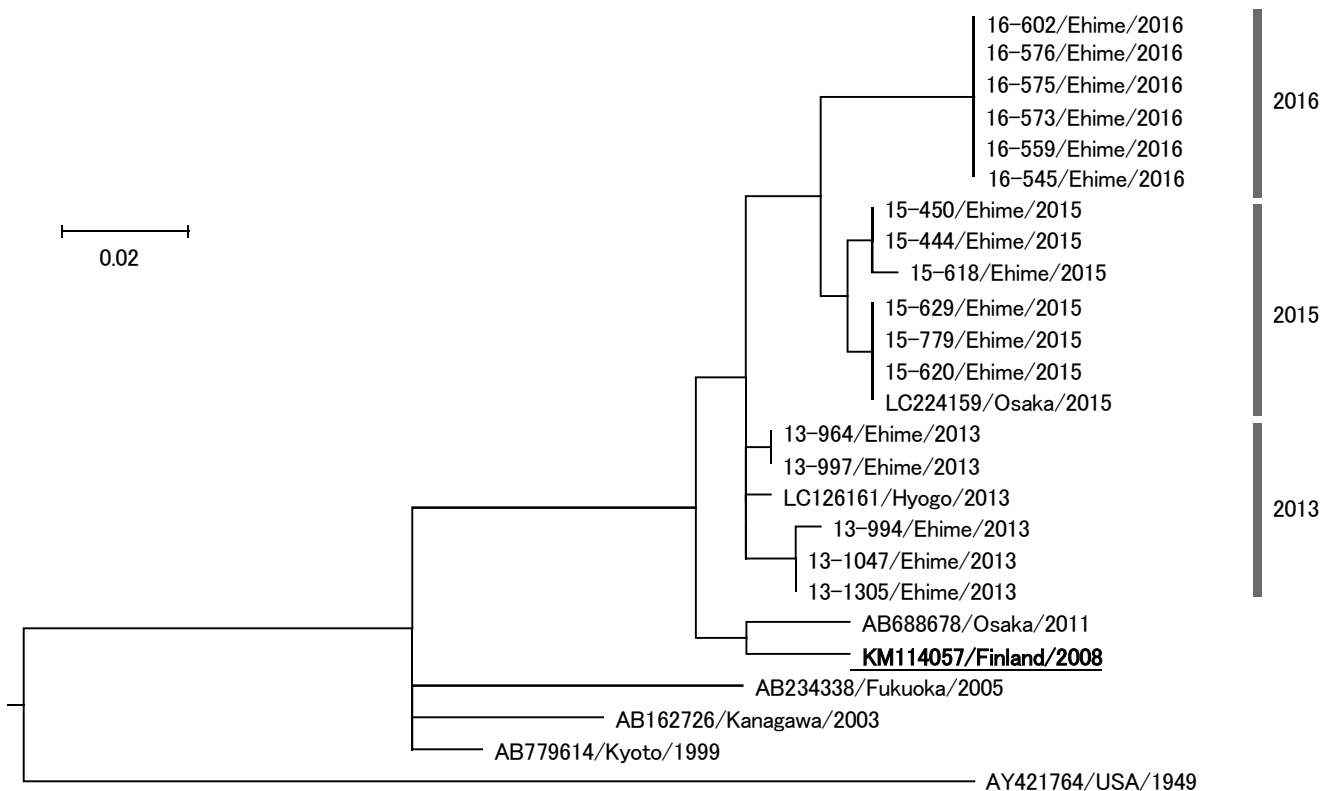


図4 CV-A6のVP4-VP2領域塩基配列(519nt)の分子系統樹

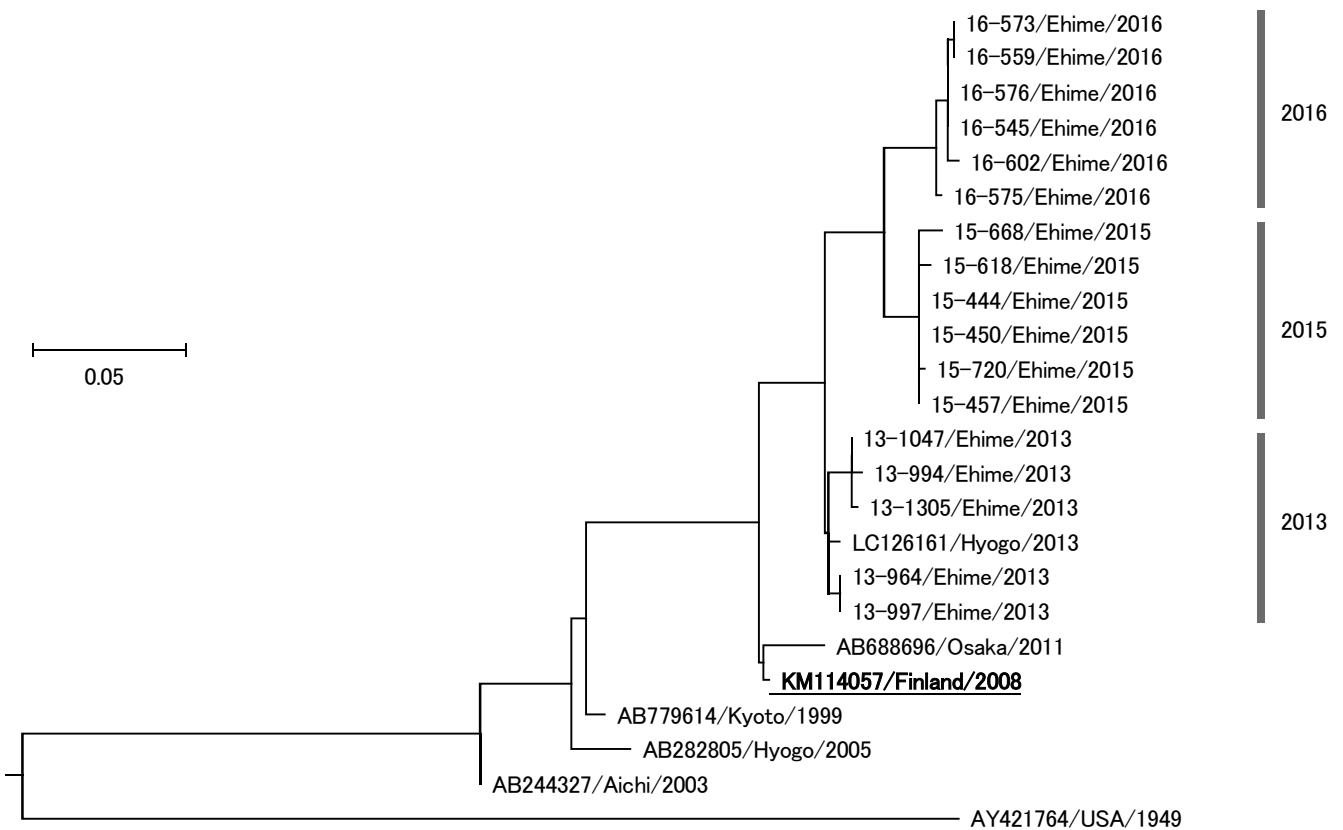


図5 CV-A6のVP1領域塩基配列(273nt)の分子系統樹

## 考察

図1, 2に示すとおり, 愛媛県では, ほぼ2年毎に手足口病が流行していた. また, 大規模流行が発生した年は比較的CV-A6の検出率が高いということが判明した. このことから, 近年の手足口病の流行はCV-A6の変異に起因する可能性が示唆された. そこで, 対象検体より検出されたCV-A6株のVP4-VP2部分領域およびVP1部分領域について分子系統樹解析を行ったところ, 調査期間中に検出されたCV-A6株は, 2008年以前に日本でヘルパンギーナ患者検体等から検出されたCV-A6株とは異なるグループに分類された. さらに, これらの株は, 年ごとに別々のサブグループを形成する傾向にあった(図4, 5). しかし, アミノ酸配列を確認したところ, アミノ酸レベルでの変異はほとんど認められなかった. しかしながら, 今回の解析では, VP4-VP2領域, VP1領域ともに領域の一部分のみしか解析していないため, 解析範囲の拡大, 今回解析できなかった領域におけるアミノ酸変異の確認が必要と思われる.

年齢別CV-A6陽性患者の解析により, 1年前にCV-A6による地域流行が起こっている2016年は, 0歳~1歳のみでCV-A6が検出されていること, また, 2年前に地域流行の起こっている2013年と2015年は, 0歳~2歳で多く検出されていることが判明した. また, 過去にCV-A6による地

域流行の起きていない2011年には, 4歳以上の患者数も多く, 検出された年齢が多様性に富んでいた(図3). このことから, 前回のCV-A6の地域流行時にまだ出生していない等の理由で, CV-A6による曝露をうけていない人が, 選択的にCV-A6に感染している可能性が示唆された. すなわち, CV-A6感受性者の蓄積が, CV-A6による手足口病の流行要因の一つとなっている可能性が考えられる. しかし, 近年他のエンテロウイルス属よりもCV-A6が優位となってきている原因は不明である. その解明には, CV-A6以外の手足口病の原因ウイルスの解析やCV-A6の全長解析を行う等, より詳細な解析が必要である.

CV-A6による手足口病は, 今後も数年おきに流行を繰り返す可能性がある. CV-A6は脳炎, 髄膜炎, けいれん患者からも検出されており<sup>9)</sup>, また, 同じA群エンテロウイルス属に属するEV-A71が重篤な中枢神経症状の原因となりうる<sup>10)</sup>ことから, CV-A6に関しても同様の注意が必要となる可能性がある. このため, 今後もCV-A6の発生動向に注意する必要がある.

## まとめ

1 2011年以降に愛媛県内で発生した手足口病の流行の主な原因ウイルスはCV-A6であった.

2 手足口病の流行が発生した2013年, 2015年, 2016年に手足口病患者検体より検出されたCV-A6について, VP4-VP2部分領域とVP1部分領域の塩基配列を決定し遺伝子解析を行った結果, どちらも高い相同性を示した.

3 CV-A6が検出された患者について, 年齢別に集計した結果, CV-A6による暴露をうけていない年齢層が, 選択的にCV-A6に感染している可能性が示唆された.

## 文 献

- 1) 病原微生物検出情報月報, 25(9), 224-225(2004)
- 2) 病原微生物検出情報月報, 32(8), 230-231(2011)
- 3) 病原微生物検出情報月報, 32(11), 339-340(2011)
- 4) Fujimoto T. et al: Emerg Infect Dis, 18(2), 337-339(2012)
- 5) Österback R. et al: Emerg Infect Dis, 15(9), 1485-1488(2009)
- 6) Bracho MA. et al: Emerg Infect Dis, 17(12), 2223-2231(2011)
- 7) Ishiko H. et al: J Infect Dis, 185(6), 744-754(2002)
- 8) Nix WA. et al: J Clin Microbiol, 44(8), 2698-2704(2006)
- 9) 病原微生物検出情報月報, 32(8), 228-229(2011)
- 10) 病原微生物検出情報月報, 25(9), 228-229(2004)