

2000年大阪府で流行した手足口病の 遺伝子診断および分子疫学的解析

大阪府立公衆衛生研究所

山 崎 謙 治 奥 野 良 信

(平成13年4月20日受付)

(平成13年7月12日受理)

Key words : hand, foot and mouth disease, coxsackievirus type A16, enterovirus 71, genetic diagnosis, molecular epidemiology

要 旨

2000年に大阪府で流行した手足口病の患者122名についてウイルス分離およびRT-PCR法による迅速な遺伝子診断を行い、分離したウイルスの分子疫学的検討を行った。ウイルス分離にはMRC-5細胞が最も高い感受性を示し、ウイルス陽性者80名中59名からウイルスが分離された。VP4からVP2にかけての領域に設定したコクサッキーウイルスA16(CA16)またはエンテロウイルス71(EV71)特異的プライマーを用いたRT-PCRでは、分離されたCA16およびEV71はそれぞれの特異プライマーのみで増幅され、他の49血清型のエンテロウイルス標準株は全く増幅されなかった。塩基配列の解析から、22株のCA16はすべて同一の遺伝子型に、また33株のEV71は異なる2つの遺伝子型に分類され、今回の手足口病の流行がこれら3つの異なる遺伝子型ウイルスの同時流行によるものであることが明らかとなった。

[感染症誌 75: 909~915, 2001]

序 文

手足口病は主にコクサッキーウイルスA16(CA16)またはエンテロウイルス71(EV71)を原因とし、手足や口腔内に水疱、発疹を生じる小児の疾患であり、臨床診断は比較的容易であるが、症状から原因ウイルスを特定することは困難とされている^{1,2)}。また最近になってEV71感染に関連した重症脳症の発生が報告されており³⁾、ウイルス診断を確実にすることが重要である。一方でエンテロウイルスの変異株の出現^{4,5)}や宿主細胞のウイルス感受性の変化^{6,7)}によってCA16やEV71の

同定が必ずしも容易ではなくなっている。

1982年に始まった大阪府感染症サーベイランス事業における手足口病の発生動向調査では5年ごとに大流行が発生しており、2000年は大流行にあたった年であった。さらにウイルス分離成績からはCA16およびEV71が混在して流行したことが明らかになった。こうした背景をふまえてわれわれはCA16およびEV71の迅速な遺伝子診断法の開発を試みた。またEV71には異なる遺伝子型があることが明らかになってきた^{8,9)}のでこれらウイルスの分子疫学についても検討を加えた。

材料と方法

1. ウイルス

別刷請求先: (〒537 0025) 大阪市東成区中道1 3 69
大阪府立公衆衛生研究所 山崎 謙治

平成13年11月20日

CA16の遺伝子解析にはCA16標準株(G-10)および分離株(1967,1970,1980,1982,2000年大阪)を用いた。またEV71の解析にはEV71標準株(BrCr)および分離株(1968年秋田,1973,1978年大阪,1997年大阪,滋賀,2000年大阪)を用いた。CA16またはEV71特異プライマーの特異性確認にはポリオウイルス1~3,エコーウイルス(Echo)1~7,9,11~21,24~27,29~33,CA1~10,24,コクサッキーウイルスB(CB)1~6およびエンテロウイルス70の標準株を用いた。

2. ウイルス分離

2000年1月から11月までに大阪府感染症発生動向調査定点の医療機関から得られた122名の手足口病患者(10名は無菌性髄膜炎を併発)の検査材料(咽頭拭い液104,髄液20,糞便12検体)をMRC-5, RD18s, LLCMK₂, GMK細胞および一部は乳マウスに接種した。分離されたウイルスの同定は中和用プール血清(EP95),単味血清および免疫腹水を用いて中和反応または補体結合反応により行った。一部はダイレクトシーケンスを行いNCBI BLASTを用いた相同性検索により同定を行った。

3. ウイルス RNA 抽出

患者材料および分離ウイルス培養上清250μlからISOGEN-LS(和光純薬)750μlを用いてRNAの抽出を行った。乾固後のRNAは20μlのDEPC処理水に溶解して用いた。

4. cDNA 合成および PCR

cDNA合成は100pmol/μlの下流プライマー(OL68 1¹⁰⁾; 5'-GGTAA[C,T]TCCACCACCA[A,C,G,T]CC-3')1μl, 10×Ex Taq緩衝液2μl, 2.5 mM dNTP mixture 4μl, MuLV逆転写酵素(PERKIN ELMER) 5U, Ribonuclease Inhibitor(TaKaRa) 50Uを含む反応液16μlにRNA 4μlを加え, ミネラルオイル(SIGMA)を重層した後42 30分間反応させて作成した。99 5分, 4 3分反応させた後PCR反応液を加えた。

1st PCRは10×Ex Taq緩衝液8μl, 100pmol/μlの上流プライマー1μl, 5U/μlのEx Taq 0.5μlを含む反応液80μlをcDNA液20μlに加え, 遠心した後94 30秒, 51 1分, 72 1分の条件を35サイ

クル行った。

nested PCRは10×Ex Taq緩衝液10μl, 2.5mM dNTP mixture 4μl, 100pmol/μlの上流および下流プライマー各1μl, 5U/μlのEx Taq 0.5μlを含む反応液99μlに1st PCR産物1μlを加え, ミネラルオイルを重層し, 94 30秒, 51 1分, 72 1分の条件を30サイクル行った。

患者材料からのエンテロウイルス検出には, 5' NCRからVP2領域の約740bpを増幅するプライマーペア(E2¹¹⁾; 5'-TCCGGCCCCCTGAATG-3', OL68 1)を用いた1st PCRを行った後, 5' NCRからVP2領域の約650bpを増幅するプライマーペア(EVP4¹²⁾; 5'-CTACTTTGGGTGTCCGTGTT-3', OL68 1)を用いたsemi nested PCRを行った。分離ウイルスについてはプライマーペア(EVP4, OL68 1)を用いたsingle step PCRを行った。

5. CA16 および EV71 鑑別診断

1998年に台湾で分離されたCA16およびEV71の塩基配列をもとにVP4からVP2領域の208bpを増幅する特異的プライマーペアA16F(5'-GTGCGGGCGCCAGGATATGTC-3'), A16R(5'-TCAGGCCACTCCCCATAGGCTAT)およびE71F(5'-CAGCAGGTAAGCAGAGCCTTAA-3'), E71R(5'-GAAGGCCACTCACCATAGCCAAC-3')を作成した。患者材料または分離ウイルスについて行った1st PCR産物を用いてA16F, RまたはE71F, Rプライマーペアを含む反応液でnested PCRを行った。PCR産物は0.5μg/mlのエチジウムブロマイドを含む2%アガロースゲルで電気泳動をし, 紫外線照射で検出した。

6. 塩基配列の決定および分子系統樹の作成

患者材料からのnested PCR産物および分離ウイルスからの1st PCR産物50μlを電気泳動し, DNA断片をアガロースゲルから切り出し, -80で10分間凍結した後の遠心上清を取り, およそ10ngのDNAをシーケンス反応に用いた。EVP4またはOL68 1プライマーを用いてBig Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(ABI PRISM)によるシーケンス反応を行い, 配列をABI PRISM 310 Genetic Analyzer

Table 1 Efficiency of virus isolation from HFMD patients compared with RT-PCR

Host for isolation	Number of strains
Tissue culture MRC-5	59
RD18s	20
LLCMK ₂	8
GMK	1
Suckling mouse	2
RT-PCR	68

Table 2 Viruses isolated or detected from HFMD patients

virus	isolated/detected strains*
CA16	23
EV71	38
Echo9	2
Echo14	2
Echo18	2
Echo22	1
Echo25	6
CA6	1
CA10	1
CB3	1
Rhino-v	1
untyped	2

*; Total number of viruses isolated using tissue cultures or suckling mouse and detected with RT-PCR

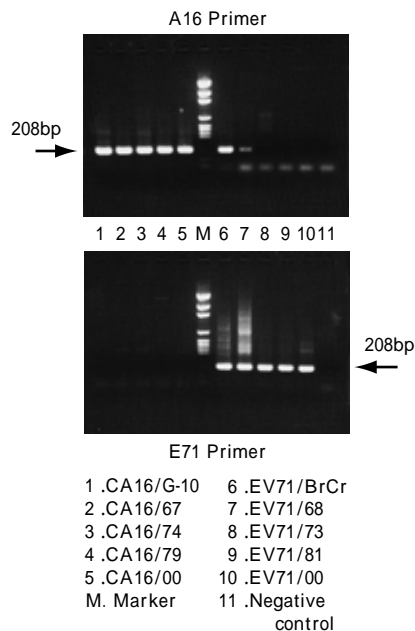
で解読した。解読された CA16 および EV71 の塩基配列のうち、VP4 全領域(207b)について Clustal W version 1.6.1¹³⁾を用いて解析を行い、近隣結合法(N-J)により分子系統樹の作成をした。系統解析の確かさは1,000回繰り返しのブートストラップ法により確認した。

成 績

1. ウイルス検出

手足口病患者 122 名中 67 名(55%)からウイルスが分離された。さらに分離陰性の 13 名から RT-PCR によりウイルスが検出された(合計検出率 66%)。Table 1 に示したように細胞別では MRC-5 が最も高い分離率を示した。また Table 2 に示したように検出されたウイルス中 EV71(38 株)および CA16(23 株)で全体の 76% を占めた。

Fig. 1 Detection of CA16 and EV71 by RT-PCR using specific primers



2. 特異プライマーによる CA16 および EV71 の鑑別

CA16 および EV71 の標準株と 1967 年以降の分離株を用いて A16 および E71 プライマーペアの特異性を検討したところ、CA16 は 5 株すべて A16 プライマーのみで検出された(Fig. 1)。一方、EV71 は 5 株すべて E71 プライマーで検出されたが、BrCr および 1968 年分離株は A16 プライマーとも反応した(Fig. 1)。CA16、EV71 を除くエンテロウイルス 49 血清型標準株はすべて両プライマーとは反応しなかった。

2000 年に発生した手足口病患者から分離されたウイルスについて特異プライマーによる型別を行った結果、CA16 はすべて A16 プライマーのみ増幅され、EV71 は genotype A および B 共にすべて E71 プライマーとのみ反応した。また Echo9、14、18、25、CA10、CB3、ライノウイルスはいずれとも反応しなかった(Table 3)。

3. CA16、EV71 の遺伝子解析

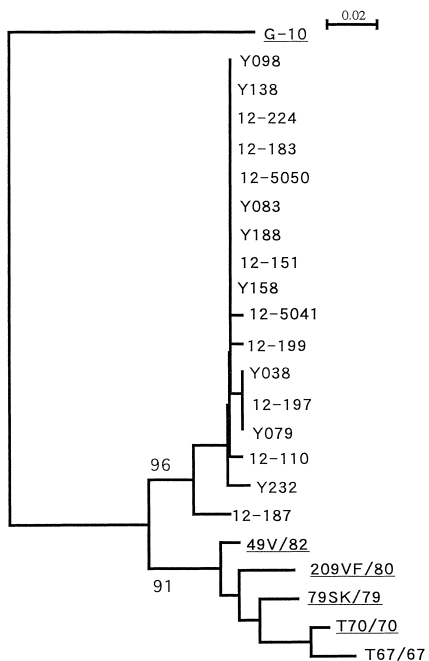
G-10 および 1967 年以降に大阪府で分離された CA16 27 株の塩基配列を解析した結果、2000 年の

Table 3 Detection of enteroviruses using new primer pairs

Epidemic strains	RT-PCR		
	A16 + E71 -	A16 - E71 +	A16 - E71 -
CA16	19	0	0
EV71	0	23	0
Echo9	0	0	2
Echo14	0	0	2
Echo18	0	0	2
Echo25	0	0	6
CA10	0	0	1
CB3	0	0	1
Rhino-v	0	0	1
Total	19	23	15

Fig. 2 Phylogenetic tree of CA16 strains prevailed in Osaka in the year 2000.

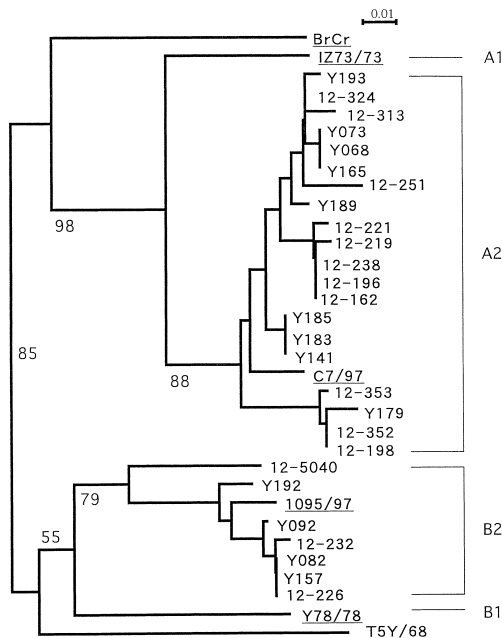
The bootstrap values are shown at the node of the tree. Previously isolated strains and prototype strain are underlined.



分離株はすべて96%以上のホモロジーを示した。過去の分離株とは90%以上のホモロジーであったが、G-10とは80%と低いホモロジーであった (Fig. 2)。また BrCr および 1968 年以降に分離された EV71 38 株の塩基配列の解析では、2000 年の

Fig. 3 Phylogenetic tree of EV71 strains prevailed in Osaka in the year 2000.

The bootstrap values are shown at the node of the tree. Previously isolated strains and prototype strain are underlined.



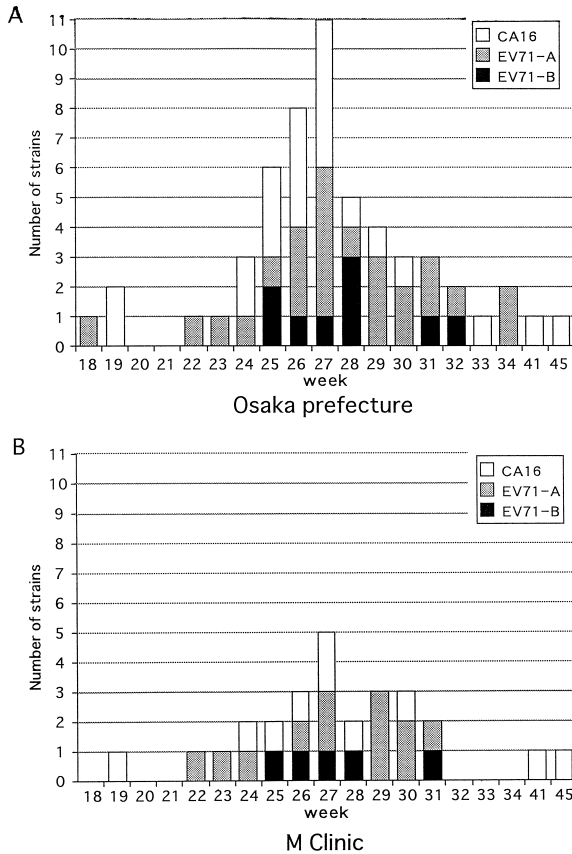
分離株はブートストラップ値99%の確率で2つのクラスターに分かれ、そのうち24株はC7/97と同じ genotype A2¹⁴に、また9株が1095/97と同じ genotype B2¹⁴に属することが示された (Fig. 3)。髄膜炎を併発した4例から検出されたEV71のうち3例(12 324, 12 238, 12 352)は genotype A2 に、1例(12 232)は genotype B2 に属していた。 genotype A 内では94%以上、また genotype B 内では91%以上のホモロジーであったが、A B 間では82%と低いホモロジーを示した。CA16 および EV71 間では平均して66%のホモロジーであった。

しかし VP4 領域のアミノ酸配列は CA16, EV71 いずれも標準株を含めて、同一血清型内では98.5~100%と高い相同性を示した。CA16 および EV71 間では平均して75%の相同性であった。

4. CA16 および EV71 分離成績

週別のウイルス検出数は手足口病患者発生の

Fig. 4 Isolation of CA16 and EV71 during the epidemics of HFMD in Osaka in the year 2000



ピーク(27週, 6月30日~7月7日)と同じ週に最大となり, 11株分離された。またEV71は遺伝子型の異なる株が大阪府内のみならず(Fig. 4A), 一医療機関内においても同時期に混在して流行した(Fig. 4B)ことが示された。

考 察

最近10年間, 大阪府ではほぼ5年毎に手足口病の大流行がくり返されており, 2000年はその大流行年で, 流行のピーク時には定点当たり患者数が8.9人となり, 1982年に感染症サーベイランス事業が始まって以来最大であった。病原微生物検出情報¹⁵⁾によれば西日本(熊本, 福岡市, 北九州市, 愛媛, 兵庫)ではEV71が, また東日本(岩手, 山形, 栃木)ではCA16が主に流行したが, 大阪府においては両ウイルスが同時に流行した。1998~

2000年に国内で手足口病から分離されたウイルスのうち, CA16とEV71の構成比率に年度差はあるものの, いずれの年度でも両ウイルスで全体の75%前後を占めており¹⁵⁾, 2000年大阪府においても同様に両ウイルスで76%を占めていた。

飯塚ら¹⁶⁾はCA16とEV71が共に流行した同一年度に, 手足口病に再感染した12事例(1978~83年)を報告しているが, 本流行時には再感染例は認めなかった。ウイルス分離を行った患者の男女比は1:1であり, 髄膜炎を併発した10名にも性差はなかった。EV71による手足口病に髄膜炎を併発する割合は0.3~12%と報告されている¹⁴⁾¹⁷⁾。

先に述べたようにウイルスの変異, 細胞の感受性の低下などの理由により, われわれの所では手足口病からのウイルス検出率が年々低下してきていたが, MRC-5, CaCO2細胞に対する高感受性が報告された⁷⁾ことから, われわれもMRC-5を含めた5種類の細胞を用いた。手足口病患者の咽頭拭い液からの長期間にわたるウイルス分離成績では分離率が34%であったとされている¹⁶⁾ので, 今回の結果からMRC-5はやや感受性が高く, われわれの他の細胞は低いということが示唆された。組織培養法およびRT-PCR法によるウイルス検出数はそれぞれ67例, 68例であり, ほぼ同等の検出率であったが, 80陽性事例のうち25事例はいずれかの方法でのみ検出された。このことから, RT-PCR法は検出感度はすぐれているが, RNaseなどの影響を受けやすいことが想像された。従って両者を併用することが望ましいと考えられた。

遺伝学的手法を応用したエンテロウイルスの検出法として, 型特異的標識プローブを用いたザンプロットハイブリダイゼーション法¹⁸⁾, 標識PCR産物をプローブとしたstringent reverse microplate hybridization法¹²⁾, PCR-SSCP法¹⁹⁾, PCR-RFLP法⁷⁾, EV71特異プライマーによるPCR法²⁰⁾²¹⁾などが考案されているが, SSCP法, RFLP法は標的ウイルスに1塩基置換が生じるだけで対応できなくなる可能性がある。

今回考案したCA16, EV71鑑別用プライマーの特異性について検討した結果, BrCrと1968年分

離 EV71 が A16 プライマーとも反応した。この理由として CA16 および EV71 はエンテロウイルス内で最も近縁であり⁹⁾、塩基配列が類似していることに加えて、BrCr 株は上流プライマー結合部内に、A16F プライマーの 3' 末端 3 塩基 GTC 配列と同配列を保有するために増幅が開始され、ほぼ同サイズのバンドが形成されたと考えられた。しかし A16 および E71 プライマーによって、過去 30 年間における CA16 および EV71 分離株が特異的に検出できたことから、このプライマーは近い将来に渡っても使用できるものと考えられる。

分離株の遺伝子解析から EV71 は異なる 2 つの genotype があり、これら異なるウイルスが大阪府内のみならず、1 つの診療所近辺で同時に流行したというのはこれまで報告されていなかった知見である。石古ら⁹⁾も示しているように CA16, EV71 共に VP4 領域では標準株をも含めて、同一血清型内では非常に高いアミノ酸配列の相同性を保有していた。これは多くの研究者が CA16, EV71 の phenotype の変異について報告していることと矛盾している。しかしこれは VP4 が inner capsid を構成していることと関係がある可能性があり、outer capsid の 1 つである VP1 領域では BrCr と他の EV71 のアミノ酸配列の相同性は 94~96% であると報告されている²²⁾。従ってさらに他領域の遺伝子配列を比較することにより、抗原性の解析が可能になることも予想される。

以上の成績から、手足口病からのウイルス分離においては感受性の高い細胞を選択することが重要であり、さらに PCR 法を併用することによってウイルス検出感度が上昇することが明らかになった。また新たに作成した CA16 および EV71 鑑別プライマーを用いることにより、手足口病病因の迅速診断が可能になると考えられる。

この研究の一部は平成 12 年度厚生省新興・再興感染症研究事業（岩崎琢也 班）の支援を受けて行ったものである。

文 献

1) 西野泰生, 板垣朝夫, 飯塚節子: 松江市における手足口病の現況 1987~1988 年の流行を中心に. 臨床とウイルス 1989; 17: 183-8.

- 2) 金兼弘和, 森田修行: 手足口病の臨床的・ウイルス学的検討. 臨床とウイルス 1993; 21: 163-6.
- 3) 塩見正司, 外川正生, 山崎謙治, 奥野良信: エンテロウイルス 71 型感染が原因で急死したと考えられた 3 症例 大阪市・病原微生物検出情報 (IASR) 1998; 19: 55.
- 4) 濱崎光宏, 梶原淳睦, 石橋哲也, 千々和勝巳, 福吉成典: 福岡県におけるコクサッキーウイルス A16 変異株による手足口病の流行. 臨床とウイルス 1996; 24: 371-4.
- 5) 萩原昭夫: ポリオ, エンテロウイルス感染症, 手足口病, ヘルパンギーナ, 無菌性髄膜炎. 臨床とウイルス 1995; 23 増刊号: 156-63.
- 6) 原 稔, 萩原昭夫, 斉藤芳子: エコー 7 型分離株の感受性 アンケート調査のまとめ. 臨床とウイルス 1988; 16: 341-7.
- 7) 篠原美千代, 内田和江, 島田慎一, 後藤 敦: コクサッキーウイルス A16 型およびエンテロウイルス 71 型の検査法の検討. 感染症誌 1999; 73: 749-57.
- 8) Shimizu H, Utama A, Yoshii K, Yoshida H, Yoneyama T, Sinniah M, *et al.*: Enterovirus 71 from fatal and nonfatal cases of hand, foot and mouth disease epidemics in Malaysia, Japan and Taiwan in 1997-1998. Jpn J Infect Dis 1999; 52: 12-5.
- 9) 石古博昭, 島田康司, 奥那覇麻理, 栄 賢司: 遺伝子系統解析によるエンテロウイルスの同定. 臨床とウイルス 1999; 17: 283-93.
- 10) Olive DM, Al-Mufti S, Al-Mulla W, Khan MA, Pasca A, Stanway G, *et al.*: Detection and differentiation of picornaviruses in clinical samples following genomic amplification. J Gen Virol 1990; 71: 2141-7.
- 11) Chapman HN, Tracy S, Gaunt CJ, Fortmueller U: Molecular detection and identification of enteroviruses using enzymatic amplification and nucleic acid hybridization. J Clin Microbiol 1990; 28: 843-50.
- 12) 石古博昭, 成沢 忠, 北村明子, 栄 賢司, 石原佑式, 飯塚節子, 他: PCR 増幅 DNA のストリンジェント・リバース固相ハイブリダイゼーションによるエンテロウイルスの型鑑別. 臨床とウイルス 1994; 22: 199-207.
- 13) Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 1994; 22: 4673-80.
- 14) 山崎謙治, 左近直美, 奥野良信: エンテロウイルス 71 の血清疫学. 臨床とウイルス 2000; 28: 151-4.

- 15) 病原微生物検出情報 (IASR) 2000 ; 2.
- 16) 飯塚節子, 板垣朝夫: 1978年から1985年の間に流行した手足口病について ウイルス学的検索を中心に . 臨床とウイルス 1988 ; 16 : 54-8.
- 17) 出口雅経, 水田舜助, 新宮正久: 手足口病の臨床 . 臨床とウイルス 1990 ; 18 : 259-62.
- 18) 北村明子, 成澤 忠, 林 明男, 芦原義久, 石古博昭, 箕原 豊, 他: 手足口病病因ウイルスの型同定 RT-PCR と特異プローブによる臨床検体からの遺伝子検出と同定 . 感染症誌 1997 ; 71 : 715-22.
- 19) Fujioka S, Koide H, Kitaura Y, Deguchi H, Kawamura K : Analysis of enterovirus genotypes using single-strand conformation polymorphism of polymerase chain reaction products. J Virol Meth 1995 ; 51 : 253-8.
- 20) Brown AB, Kilpatrick DR, Oberste MS, Pallansch MA : Serotype-specific identification of enterovirus 71 by PCR. J Clin Virol 2000 ; 16 : 107-12.
- 21) Singh S, Chow VT, Chan KP, Ling AE, Poh CL : RT-PCR, nucleotide, amino acid and phylogenetic analyses of enterovirus type 71 strains from Asia. J Virol Methods 2000 ; 88 : 193-204.
- 22) Brown BA, Oberste MS, Alexander JP, Kennett ML, Pallansch MA : Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998. J Virol 1999 ; 73 : 9969-75.

Genetic Diagnosis and Molecular Epidemiological Analyses of Hand, Foot and Mouth Disease Which Prevalled in Osaka Prefecture in 2000

Kenji YAMAZAKI & Yoshinobu OKUNO
Osaka Prefectural Institute of Public Health

Direct rapid genetic diagnosis by RT-PCR as well as virus isolation was performed on the 122 patients with hand, foot and mouth disease (HFMD) in Osaka Prefecture in 2000, followed by molecular epidemiological analyses of the isolated viruses. MRC-5 cells showed the highest sensitivity for virus isolation, recovering 59 strains of viruses from 80 virus-positive patients. By RT-PCR using newly designed primers spanning VP4 and VP2, corresponding genome regions of coxsackievirus type A16 (CA16) and enterovirus 71 (EV71) isolates were amplified only with primers specific to respective viruses. On the other hand, none of the genomes of prototype enteroviruses of other 49 serotypes were detected with these primers. From the sequence analyses, all of the 22 isolates of CA16 belonged to the same genotype and 33 isolates of EV71 were classified into two genetic groups. The results showed that 3 different genotypes of viruses were prevailing in the epidemic of HFMD in Osaka Prefecture in 2000.