

資料

広島県におけるエコーウイルス13型の流行について

高尾 信一, 島津 幸枝, 福田 伸治, 桑山 勝, 宮崎 佳都夫

An Epidemiological Study of Echovirus type 13 Prevailed in Hiroshima Prefecture in 2002

SHINICHI TAKAO, YUKIE SHIMAZU, SHINJI FUKUDA,
MASARU KUWAYAMA and KAZUO MIYAZAKI

(Received Sep. 30, 2002)

2002年4月から8月の間に、広島県内ではこれまで分離されたことのなかったエコーウイルス13型(E13)が、196名の患者から分離された。患者の臨床症状(診断名)は無菌性髄膜炎が主(78.6%)であったが、一部には不明発熱(6.6%)あるいは発疹性疾患(5.6%)と診断された患者も認められた。これらの患者の地域分布には片寄りがみられ、広島市南部および安芸郡を中心とした地域、県西部の廿日市市とその周辺地域、および県東部の福山市を中心とした地域で患者が多く認められたが、県北部地域での患者発生は少なかった。E13が分離された患者の年齢は、いずれも16歳以下(平均5.8歳)で、3歳から9歳の年齢層が最多であった。今回のE13の流行が始まる以前の2001年10月に採取した住民血清を用いて、E13に対する中和抗体保有状況を調査した結果、14歳以下では抗体保有者が認められず、それ以上の年齢層では概ね加齢に伴って抗体保有率が上昇する傾向にあった。E13分離株について遺伝子学的解析を実施した結果、今回広島県内で分離されたE13株は、2001年に福島県で分離されたE13株と近縁であることが判明した。このことは、2001年から始まったE13の全国的な流行が、2002年4月以降、広島県にも波及してきたことを推察させる成績であった。

キーワード：エコーウイルス13型, echovirus type 13, epidemiology, Hiroshima

はじめに

広島県では、1972年から県内の医療機関(主に小児科)の協力を得て、県内で発生したウイルス性疾患の患者を対象として起因ウイルスのサーベイランスを開始した。1981年には広島県感染症サーベイランス事業として対象疾病や定点医療機関の拡充を図り、さらに1998年からは広島県感染症発生動向調査事業へと、若干の改正を経て現在に至っている。この間、我々は多種多様なウイルスの分離と同定(ウイルス抗原の検出等を含む)を行ってきた。その中でも、エンテロウイルスは小児のウイルス性疾患の主たる原因ウイルスであることから、最も多く分離されている。そのような状況の中で、本年(2002年)4月には、これまで広島県内では分離されたことのないエコーウイルス13型(E13)が分離された。今回、我々は2002年4月から8月にかけて広島県内で流行を認めたE13について、その疫学的・ウイルス学的特徴についてまとめたので報告する。

材料と方法

1. ウイルス分離・同定

(1) 検査対象

2002年4月から8月末までの間に、広島県結核感染症発生動向調査事業(感染症発生動向調査)で県内の定点病院およびその他の協力病院において、患者710名から採取された検体、合計742件を対象としてウイルス検査を実施した。その内訳は、咽頭拭い液(鼻汁を含む)286件、髄液284件、糞便158件、その他14件である。

(2) ウイルス分離

分離用の培養細胞としては、基本的にBGM, HEp 2, RD-18S, F-Vero, FLの5種類を用いた。各培養細胞を24穴プレートに単層培養し、1検体あたり2穴を供して処理検体を0.2ml/穴ずつ接種した。34の炭酸ガスふ卵器中で静置培養し、細胞変性効果(CPE)を指標として6~7日間観察し、3代の盲継代後もCPEが出現しなかった検体は分離陰性と判定した。なお、臨床診断で感染性

胃腸炎およびその関連疾患が疑われる糞便検体については、ウイルス特異的ELISA法、RT-PCR法、電子顕微鏡によるウイルス粒子の観察を併用してウイルスの検出・同定を行った。

(3) 分離ウイルスの同定

分離ウイルスの同定は、特異的な中和用抗血清を用いたマイクロ中和法により同定した。なお、E13の同定は抗E13単味血清（デンカ生研製）を用いて実施した。

2. 広島県内住民のE13に対する中和抗体価測定

(1) 対象

今回のE13の流行が確認される以前の2001年10月に、広島県内の住民171名から採取していた血清を供試してE13に対する中和抗体価を測定した。

(2) 中和抗体測定方法

広島県内で発生した無菌性髄膜炎患者のうち、2002年5月21日に採取された髄液に由来する分離株（ON02-2R株）を中和試験のウイルス抗原とした。各被検血清は56℃、30分間非働化処理した後、4倍から128倍まで2倍階段希釈した後、100TCID₅₀/0.025mlに希釈したウイルス抗原を等量加え、37℃で90分間中和した。その後、96穴マイクロプレートに培養したHEp2細胞に血清とウイルス抗原の混和液を0.05mlずつ接種し、34℃の炭酸ガスふ卵器中で培養を行った。培養3日目に50%のCPEを示した血清の最高希釈倍数の逆数を中和抗体価とし、4倍以上を示す血清を中和抗体陽性と判定した。

3. E13分離株の遺伝子塩基配列の決定および相同性検索

5月21日に採取された無菌性髄膜炎患者の髄液に由来するON02-2R株、および5月20日に採取された発疹症患者の糞便に由来するCR02-10F株の2種類のE13株を解析の対象とした。これらのウイルス株からRNAを抽出した後、エンテロウイルスのVP1領域を増幅する汎エンテロウイルス用プライマーセット（188と011）を用いてRT-PCRを実施し[1]、その増幅遺伝子産物についてダイレクトシークエンシング法で塩基配列を決定した。得られた塩基配列の成績は、GenBankに登録されている塩基配列情報との相同性をBLAST(<http://www.ddbj.nig.ac.jp/E-mail/homology-j.html>)により検索した。

結 果

1. 対象患者からのウイルス検出成績

2002年4月から8月までに、感染症発生動向調査事業の対象となった患者710名から検出されたウイルスを表

1にまとめた。対象患者からは合計348株のウイルスが検出されたが、そのなかでE13が226株（64.9%）と過半数を占めており、広島県内においてE13の大きな流行があったことが明らかとなった。

表1 広島県結核感染症発生動向調査事業により分離・検出されたウイルス（2002年4月～8月）

| ウイルス種(血清型) | 分離・検出ウイルス数 |
|------------------------|------------|
| アデノウイルス(1,2,3,5,40/41) | 25 |
| ポリオウイルス(2,3) | 3 |
| コクサッキー A 群ウイルス(3,4,16) | 16 |
| コクサッキー B 群ウイルス(2,4,5) | 6 |
| エコーウイルス(13) | 226 |
| (22) | 1 |
| (25) | 1 |
| (30) | 11 |
| インフルエンザウイルス(H1,H3,B) | 15 |
| 単純ヘルペスウイルス(1) | 5 |
| ムンプスウイルス | 19 |
| 小型球形ウイルス(サッポロ,ノーウオーク) | 9 |
| アストロウイルス | 2 |
| ロタウイルス | 9 |
| 合 計 | 348 |

2. E13分離陽性患者の特徴

今回の検査対象者710名のうち、E13が分離された患者は196名であった。図1に示すように、E13分離陽性患者は全て16歳以下（平均5.8歳）であり、なかでも3歳から9歳の幼児と学童に患者が多いのが特徴であった。また、患者の性別では、男性135名、女性61名となり男性の方が約2倍多かった。

E13が分離された患者の臨床症状（診断名）を表2に示した。その結果、無菌性髄膜炎が最も多く154名（78.6%：154/196）、次いで不明発熱が13名（6.6%）、発疹性疾患が11名（5.6%）であった。この他には上・下気道疾患や胃腸炎の症状を呈した患者も少数例ながら認められた。

E13が分離された患者の県内における地域分布を図2に示した。それによると、今回のE13の流行では、特に広島市南部および安芸郡を中心とした地域、県西部の廿日市市とその周辺地域、および県東部の福山市とその周辺地域において患者の発生が多く、県北部地域では比較的患者の発生が少なかった。

表2 E13分離陽性患者の臨床症状

| 診断・臨床症状 | 患者数 |
|---------|-----|
| 無菌性髄膜炎 | 154 |
| 不明発熱 | 13 |
| 発疹性 | 11 |
| 上気道炎 | 8 |
| 感染性胃腸炎 | 4 |
| 下気道炎 | 2 |
| その他の疾患 | 4 |

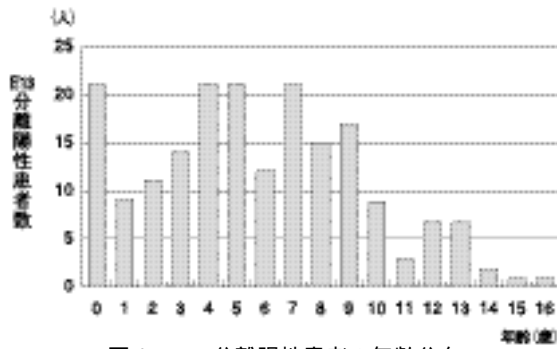


図1 E13分離陽性患者の年齢分布

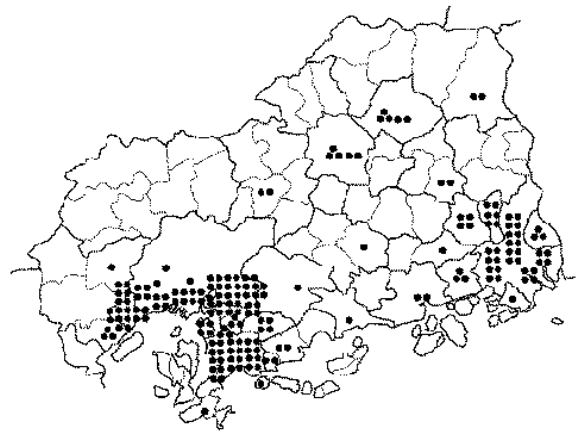


図2 E13分離陽性患者の広島県内における地域的分布 (2002年4月～8月)

表3 広島県内住民の年齢群別抗E13中和抗体保有状況

| 年齢区分 (歳) | 検体数 | 陽性数 | 陽性率* (%) | 中和抗体価 | | | | | | |
|-------------|-----|-----|-------------|-------|-----|-----|------|------|------|-------|
| | | | | <1:4 | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:128 |
| 0~4 | 20 | 0 | 0 | 20 | | | | | | |
| 5~9 | 11 | 0 | 0 | 11 | | | | | | |
| 10~14 | 6 | 0 | 0 | 6 | | | | | | |
| 15~19 | 9 | 1 | 11 | 8 | | | 1 | | | |
| 20~29 | 25 | 1 | 4 | 24 | 1 | | | | | |
| 30~39 | 20 | 0 | 0 | 20 | | | | | | |
| 40~49 | 20 | 4 | 20 | 16 | 4 | | | | | |
| 50~59 | 20 | 9 | 45 | 11 | 6 | 1 | | 2 | | |
| 60~69 | 20 | 12 | 60 | 8 | 4 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 70~ | 20 | 13 | 65 | 7 | 7 | 2 | 4 | | | |

*：中和抗体価1:4以上を陽性と判定

3. 広島県内住民のE13に対する中和抗体保有状況

今回のE13の流行以前である2001年10月に採取していた住民血清171検体について、E13分離株(ON02-2R株)に対する中和抗体価を測定し、年齢層別の抗体保有率および保有抗体価を表3に示した。その結果、14歳以下の年齢層では抗体保有者を認めなかったが、それ以上の年齢層では、30歳代を除くいずれの年齢層においても抗体を保有し、特に60歳代以上では60%以上の高い抗体保有率を示した。

4. E13分離株の塩基配列と他の株との相同性

広島県で分離されたE13株のうち、ON02-2R株とCR02-10F株の2株についてウイルスVP1領域の塩基配列を決定した。そこで得られた塩基配列情報のうちの706塩基について、他との相同性をGenBankのBLASTにより検索した。

図3には、ON02-2R株とCR02-10F株の塩基配列および、検索によりON02-2R株と最も高い相同性を認めた株の塩基配列を示した。ON02-2R株の塩基配列を基準にすると、CR02-10F株は317番目の塩基の1ヶ所(T→C)

のみに違いがあるだけで、99.9%の相同性が確認された。また、GenBankに登録されているE13の塩基配列のうち、CR02-2R株と最も高い相同性を示したE13株は、2001年に福島県で分離された株(19/Fukushima/01株, GenBank Accession No: AB086858)で、98.9%(698bp/706bp)の相同性を示した。また2000年にドイツで分離された株(Weissenfels/2000/DEU株, GenBank Accession No.: AY007223)に対しても98.9%(284bp/289bp)の相同性を示した。

考 察

E13はLannetteら[2]が1955年に中枢神経系疾患の患者から分離した事例が最初であるが、その後は大きな流行の報告例もなかったことから、エコーウイルスの中では分離されることが稀な血清型であると考えられていた[3]。しかし2000年にはアメリカやヨーロッパ各国で、主に無菌性髄膜炎患者を中心に多数のE13が分離されるようになった[4-6]ことから、本ウイルスの我が国への侵入が危惧されていた。

| E13分離株名 | 塩基配列 |
|----------------------|---|
| ON02-2R | 1 AGGTGTGTGTTGAACCGACACAAGCGTTTCAGAATCATCCATAGAAAACTTCTTGTGTCGCTCGGCTTGTGT |
| CR02-10F | * |
| 19/Fukushima/01 | |
| Weissenfels/2000/DEU | |
| | 72 GTACTACACAACATACGACACACACGGGGACGCCCGCAGACGCTAAGTATGCTAGTTGGACCATCACAAACGC |
| |T..... |
| |C..... |
| | 143 GCAAGGTTGCTCAGTTGAGGAGAAAAGCTGBAAATGTTACATACTTAAGATTTGATTTGGAAGTGACGTTT |
| | |
| | |
| | 213 GTTATTACAAGTGCCCAAGTCACCTCTACAAAACCAAAGTCAAGATGCACCTGTCCCTCACTCATCAGGTGAT |
| | |
| |G.....G..... |
| | 284 GTACGTACCACCAGGGGGAGCAGTGCCTGCCAGTGTGGACGATTACGCATGGCAGACGCTACGAACCCGA |
| |C..... |
| | |
| | 355 GTATATTCTGGACTGAGGGAAAACGCACCAGCGCCCATGTCCATCCCATTCAATAGTGTGGGTAACGGGTAC |
| | |
| |A..... |
| | 436 AGCAGCTTTTATGACGGGTGGTCCAATTTACACAGAATGGCGTATATGGTTTCAACACTCTGAATAACAT |
| | |
| |C.....C..... |
| | 497 GGGCAAGCTATATGTTAGACATGTTAACGGGGCAAGCCAGGGCGTGTGAAGAGCACGATCCGGATCTACA |
| | |
| |T..... |
| | 568 TGA AACCGAAACACGTC AAAGCATGGATCCCAAGGCCGCCGACTCTCCGAATATGAGAAATCAGGGAAT |
| | |
| |A.....G..... |
| | 639 GTAAATTTCAAMCCTAAGGGAGTCACTGAGGCTCGACCATCCATCAAGTTGGAGAAACCAAGCACTG 706 |
| | |
| |C..... |

図3 . E13分離株の塩基配列と株間の比較

一方、我が国では、これまでE13の流行報告例はなく、唯一の分離報告例としては1980年の岐阜県での1例[7]が有るのみであった。しかし2001年9月の福島県における無菌性髄膜炎の流行事例からE13が分離されて以降[7]、大阪市や福井県などから、相次いでE13の分離例が報告された[8,9]。

広島県においても、過去にE13を分離した事例は無かったが、2002年4月に採取された無菌性髄膜炎患者の髄液からE13が初めて分離されてから、同年8月までの間に、合計196名の患者からE13が分離された。E13が分離された患者の主な臨床症状(診断名)は、無菌性髄膜炎であったが、一部には不明発熱や発疹症、あるいは感染性胃腸炎と診断された患者も少数例ながら認められた。このことから、今回流行したE13は、無菌性髄膜炎のみ

ならず、患者に多様な症状を引き起こしていたものと考えられる。

E13が分離された患者の年齢をみると、いずれの患者も16歳以下で、17歳以上の成人層では患者を認めなかった(図1)。この事実と、広島県内住民を対象としたE13に対する中和抗体保有状況の成績(表3)とを考慮併せると、少なくとも最近の10年~15年間に広島県内ではE13の流行がなく、そのために小児を中心とする感受性が蓄積していたものと推察される。一方、15歳以上の年齢層、特に50歳代以上の年齢層で高率に抗体保有者が存在していたことから、広島県では、これまでE13による流行がウイルス分離によって確認されていないものの、過去において本型ウイルスによる大きな流行があったものと推察される。

今回の広島県内でのE13の流行に関して、ウイルスが分離された患者の発生地域をみると、患者は広島市とその周辺地域、県西部地域および県東部の福山市とその周辺地域に集中していた。このことは患者から検査材料を採取した医療機関（感染症発生動向調査検査定点病院）が必ずしも県内に均等配置されていない状況を考慮しても、前述の地域における患者多発の背景を明示するものではない。1999年に発生したエコーウイルス30型（E30）の流行では、同様の検査体制の中で県北部の三次・庄原地域の患者を中心にE30が分離された[10]ことから流行地域の偏りには他の要因が考えられる。

今回広島県内で分離されたON02-2R株と2001年に福島県で分離された19/Fukushima/01株[11]の相同性が98.9%と高かったことは、昨年（2001年）我が国で流行した株の系統を受け継ぐE13が、2002年になって広島県内にも侵入し、大きな流行を引き起こした可能性を推察させる。

今回初めて、広島県内におけるE13の流行が確認されたが、エコーウイルスを含めてエンテロウイルスは、一度大きな流行を起こすと、時として複数年にわたり同一県内で流行が継続する場合が多い[12]。今回のE13の流行は、県北部地域での患者発生が比較的少数であったことから、来年以降もその地域で流行が生じる可能性を否定し得ない。従って本型ウイルスの動向については、今後も注意深く監視を続けて行く必要があると思われる。

文 献

- [1] Oberste, M.S., Maher, K., Flemister, M.R., Marchetti, G., Kilpatrick, D.R., and Pallansch, M.A. (2000) : Comparison of Classic and Molecular Approaches for the Identification of Untypeable Enteroviruses. *J.Clin.Microbiol.*, 38(3) 1170-1174.
- [2] Lannette, E.H., Schmidt, N.J., Magoffin, R.L. and Wiener, A.(1962) : Recovery of a newly recognized enterovirus from patients with aseptic meningitis. *New Engl. J. Med.*, 266, 1358.
- [3] 中尾 亨 著 (1977) : 小児科学選書 4 無菌性髄膜炎, 106, 東京, 東京医学社
- [4] 国立感染症研究所, 厚生省保健医療局結核感染症課 (2000) : エコーウイルス13型によるウイルス性髄膜炎の集団発生, 2000年 ドイツ. 病原微生物検出情報月報, 21(11) 7.
- [5] 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局結核感染症課 (2002) : 欧州を中心とする最近のエコーウイルス13型および30型の流行. 病原微生物検出情報月報, 23(3) 15-16 .
- [6] Centers for Disease control and Prevention (2001) : Echovirus type 13 - United States, 2001. *Morbil. Mortal. Wkly. Rep.*, 50, 777-780.
- [7] 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局結核感染症課(2002): 速報 髄膜炎患者からエコーウイルス13型の分離 福島県. 病原微生物検出報月報, 22(12), 9-10 .
- [8] 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局結核感染症課(2002): 情報 エコーウイルス13型の分離状況 大阪市. 病原微生物検出報月報, 23(5), 13 .
- [9] 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局結核感染症課(2002): 速報 エコーウイルス13型による無菌性髄膜炎の流行および県内住民抗体保有状況 福井県. 病原微生物検出報月報, 23(7), 10-11 .
- [10] 高尾信一, 駒澤克孝, 福田伸治, 豊田安基江, 野田雅博, 徳本静代 (1999) : 広島県備北地域におけるエコーウイルス30型を原因とする無菌性髄膜炎の流行と患者からのウイルス排泄期間の検討. 広島県保健環境センター研究報告, 7, 1-4 .
- [11] Keino, M., Kanno, M., Hirasawa, K., Watari, K., Mikawa, M., Saito, K., Kato, K., Katayose, M. and Yoshida, H. : Isolation of Echovirus Type 13 from Patients of Aseptic Meningitis. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 54, 249-250.
- [12] 高尾信一, 妹尾正登, 徳本静代 (1992) : 広島県におけるエコーウイルス30型による無菌性髄膜炎の流行(1989-1991). 広島県衛生研究所研究報告, 39, 37-42 .