

令和元年9月3日現在

機関番号：84407

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10054

研究課題名(和文) 新生児死亡の原因となるエンテロウイルス感染症-CVBの危険性-

研究課題名(英文) Fatal neonatal infection with enterovirus -risk of coxsackie virus B infection-

研究代表者

中田 恵子 (Nakata, Keiko)

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・微生物部・主任研究員

研究者番号：50516747

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：軽症で知られるエンテロウイルス(EV)属のコクサッキーウイルスB(CV-B)群による感染症はまれに新生児での重症例が報告される。そこで、本研究は新生児にCV-B感染がもたらす危険性を疫学的に評価することを目的にした。解析対象となった87名の新生児のうち23名からEVが検出され、CV-B5(31%)が最も多かった。

EVが検出された児には兄弟がいることが有意に多く($P<0.01$)、家族内で何等かの感染症の流行があった($P=0.02$)。同じ解析期間で小児集団からCV-B5はほぼ検出されておらず、成人や小児では軽症で経過するCV-Bが免疫系の未熟な新生児でより顕性化しやすいと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EV感染症は手足口病やヘルパンギーナ、また近年では弛緩性麻痺の原因となる可能性が示唆されたEV-D68感染症等が知られているが、CV-B群が注目されることはなかった。しかし、本研究ではCV-B群が免疫系の未熟な新生児に感染し、高率に発症することが明らかとなった。幸い、本研究期間中に重症事例は発生しなかったが、少子高齢化時代において新生児の生命を守るための研究として社会的に重要な成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Coxsackie virus group B (CV-Bs) belongs to the genus enterovirus (EV), which usually causes mild or subclinical infection. However, there are reports describing severe neonatal cases with CV-Bs infection. Here we evaluated the risk of severe infection with CV-Bs among neonates. EV was detected from 23 of 87 enrolled neonates during the study period. The most frequent EV genotype was CV-B5 (31%).

EV-positive neonates had siblings more likely than EV-negative ones ($P<0.01$). Also, episodes of infection were reported more often in families with EV-detected neonates ($P=0.02$). CV-B5 was not prevalent among children during the study period, suggesting that it resulted in mild or subclinical infection among children and adults, but more likely resulted in symptomatic in neonates of naive immune system. These data clarify the risk of CV-B infections among neonates, which we believe is critical in the low birth era although severe cases were not reported during this study period.

研究分野：ウイルス学 小児感染症学 免疫学 公衆衛生学 分子生物学

キーワード：新生児エンテロウイルス感染症 エンテロウイルス コクサッキーウイルスB群 手足口病 ヘルパンギーナ 環境水調査 不顕性感染 家族内感染

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

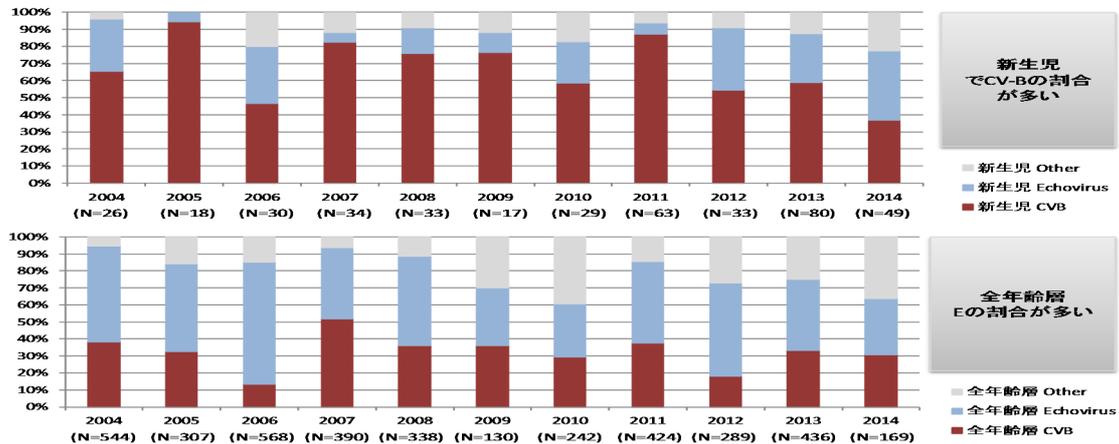
1. 研究開始当初の背景

EV 感染症は毎年夏期を中心に小児で流行を繰り返し、その病型は不顕性から死亡事例まで多岐に渡る。人に病原性を示すことが知られている EV 遺伝子型は 60 種類を越える。手足口病やヘルパンギーナはコクサッキーウイルス A2(CV-A2)、CV-A4、CV-A16、エンテロウイルス A71 (EV-A71) 等のエンテロウイルス A 種により引き起こされる。一方、無菌性髄膜炎(AM)はエコーウイルス (E) やコクサッキーウイルス B(CV-B)等のエンテロウイルス B 種が主な原因となる。EV 感染症は A・B 種に関わらず重症化する場合があることが知られているが、重症化リスク因子は解明されていない。

近年、新生児で脳炎、心筋炎、肝機能障害、死亡事例が報告された¹⁾。大阪府で収集した AM 患者のウイルス検査および感染症サーベイランスシステムから得た情報を解析した。2013 年度、大阪府では 7 人の新生児 AM または血球貪食症候群等の重症患者から EV が検出された。そのうち、86% (6 人) から CV-B が検出された。2014 年度は 2 人の新生児 AM 患者から共に CV-B が検出された。2015 年度は 1 人の新生児 EV 感染症患者から CV-B を検出した。この患者は、生後 6 日目に発症し、出血傾向、高フェリチン血症、血球貪食症候群を呈した後、心肺停止し死亡した。対照的に、その他の年齢層の AM 患者や他の EV 感染症患者からは、2013 年度は E の検出が優位で、2014、2015 年度では CV-B は全く検出されなかった。

全国から収集された感染症サーベイランスシステムからのデータでも同様の傾向が認められた。AM 患者から検出されたウイルスの割合を見ると、全年齢層では E が高いが、新生児では CV-B の割合が高い。この傾向は過去 10 年間ほぼ一貫している (図 1)。

図 1. 無菌性髄膜炎患者検出された EV の割合 (上段; 新生児、下段; 全年齢層)



また、大阪府で実施した環境水 (下水) のウイルスモニタリング結果によると、E は通年にわたり分離されるが、CV-B は冬季には分離されていなかった。CV-B 流行がより限定的あることが示唆されているにも関わらず、新生児 AM 患者で CV-B の検出割合が高い。

以上の知見は、新生児 EV 感染症において CV-B が重症化リスクである可能性を示している。しかし、この事実は過去に指摘されたことがない。上記の疫学解析はデータの質が“粗い”ため、科学的な知見としては説得力が弱いという問題点を包含していた。そのため、感染症法の下で集積される疫学データに加えて、医療機関と連携した前向き観察研究が必要であると着想した。

2. 研究の目的

AM、脳炎等を起こす EV 感染症は主に小児が罹患する。感染症法に基づく感染症発生動向調査によると、近年、AM の患者数は低調で推移している。しかし、新生児では増加しており、問題視されている。我々は独自の解析で AM の新生児から検出される EV が他の年齢層と異なることを見いだした。本研究では新生児を対象にした前向き観察研究を実施し、これまで未解明だった新生児における EV 感染症の重症化リスクを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 前向き観察研究

2015 年 8 月 1 日から 2018 年 7 月 31 日までの期間に大阪府内 5 か所の医療機関に通院あるいは入院 (分娩時入院含む) 中の EV 感染症を疑う生後 28 日齢未満の新生児から咽頭拭い液、便、髄液、血清、尿などを採取し、リアルタイム RT-PCR 法で EV のスクリーニング²⁾を実施した。陽性検体に対しては Seminedsted RT-PCR 法³⁾で EV の遺伝子型別を行った。検出された EV 遺伝子型と疫学情報から新生児における EV 感染症のリスク因子について統計学的に解析を行った (χ²検定および Mann-Whitney 検定)。

(2) 患者病原体サーベイランス

大阪府内の定点医療機関で採取された EV 感染症 (手足口病、ヘルパンギーナおよび AM) 疑

い患者由来検体からウイルス核酸を抽出し、EV 遺伝子の型別) を実施した。

(3)環境水（下水）サーベイランス

前向き観察研究と同期間に、大阪府内 3 か所の下水処理場より毎月各 500m l の流入下水を採取し、陰電荷膜吸着法を用いて 50 倍濃縮を行った。濃縮液から EV に感受性のある 4 種の株化細胞 (RD-A、VeroE6、FL、Caco-2) を用いてウイルス分離を実施した。分離されたウイルスの核酸を抽出し、EV 遺伝子の型別) を実施した。

4 . 研究成果

(1)前向き観察研究

研究期間中に 120 名の新生児から検体が得られた。EV 以外の病原体が検出された患者を除き、87 名を解析対象とした。23 名 (26.4%) より EV が検出され、EV 遺伝子型の内訳は多い順に CV-B5(31%)、E9(26%)、E3、E6、E18(各 9%)、CV-B1、E25、CV-A9、EV-A71(各 4%)であった。EV が検出された新生児では、発症の日齢が有意に高かった ($P<0.01$)。また、兄弟を有する割合が高く ($P<0.01$) 家族内で何等かの感染症の流行があった割合が高かった ($P=0.02$)。これらのことから、新生児への感染は兄弟を含む家族経由であることが示唆された。臨床症状は EV が検出された、されないに関わらず不明熱、急性上気道炎、発疹症などが多いことから、EV 感染患者とそうでない患者で臨床診断のみで区別することが困難であることが推測できる。また、EV が検出された新生児では夏から秋にかけての検出が多く、小児で手足口病やヘルパンギーナが流行する時期と同時期であった (図 2)。兄弟を含む家族からの感染が示唆されたにも関わらず、新生児と小児における EV 感染症のトレンドに乖離があったことから、不顕性感染 (軽症) 家族から免疫系の未発達な新生児に感染し、それが顕性化している可能性が示唆された。

図 2. 新生児の月別検体数および EV 陽性数 (上段) と各種サーベイランス検体からの検出 (下段) EV の比較



*色の濃い箇所は複数の患者から検出された (濃いほど多い)

(2)患者病原体サーベイランス

研究期間中、小児における手足口病やヘルパンギーナからは CV-A6 や EV-A71 等の EVA 種が主に検出されており、新生児で最も多く検出されていた CV-B5 の検出は 2016 年 7、8 月、2017 年 8 月にわずか 1 事例ずつであった。一方、AM では、新生児で検出されていた CV-B5 を含む EV-B 種（E も EV-B 種）が主に検出されていた（図 2）。これらのことから、新生児で検出される EV は小児で毎年夏季に流行が大きくなる手足口病やヘルパンギーナではなく、AM 患者から検出される EV と傾向が類似していた。

(3) 環境水（下水）サーベイランス

小児に限らず、広く人に感染した EV を反映する環境水（下水）では患者病原体サーベイランス結果とは対照的に、EV-B 種のみが分離された。新生児で CV-B5 が検出された 2015 年 10 月と 2016 年 7 月から 9 月の期間は下水より継続的に CV-B5 が分離されていた。また、新生児で検出された E についても種類・分離時期が環境水（下水）での分離状況と類似していた。

(4) まとめ

研究期間中、対象者において重症化事例が認められなかったため、新生児における EV 感染症の重症化リスク評価には至らなかった。しかし、新生児では小児における EV 感染症のトレンドとは大きく異なり、CV-B 感染が主要であることが判明した。そのため、小児における手足口病やヘルパンギーナの EV 感染症サーベイランスでは新生児における EV 感染症の発生動向を探知することが困難であると考えられた。新生児と AM 患者からの EV は類似傾向認められたが、AM の非流行シーズンでは患者数が少ないために流行探知の感度が低いことが推測できる。一方で、環境水（下水）サーベイランスでは、各種 EV が新生児で検出されるより早い時期からウイルス分離が始まっていたため、流行を予測するためのモニタリング法として適していると考えられた。CV-B には 6 種あり、その中で CV-B5 は重症化の報告が極端に少ない。本研究開始の契機となった新生児の死亡事例では CV-B3 が検出されたことや、2007 年にはアメリカで CV-B1 による新生児の重症化事例の多発¹⁾などの報告があることから、各種 CV-B の流行をいち早く察知し、リスク評価を実施する必要がある。本研究の成果により、少子高齢が進む我が国の「新生児の生命を守る」という重要な課題のためのより良い手法が提案されたと考えられる。

<引用文献>

- Pedrosa C, Lage MJ, Virella D. Congenital echovirus 21 infection causing fulminant hepatitis in a neonate. *BMJ Case Rep.* 9; 2013. pii: bcr2012008394. doi: 10.1136/bcr-2012-008394
- Jones G, Muriello M, Patel A, Logan L. Enteroviral Meningoencephalitis Complicated by Central Diabetes Insipidus in a Neonate: A Case Report and Review of the Literature. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 4(2), 2015:155-8
- Bissel SJ, Winkler CC, DeTondo J, Wang G, Williams K, Wiley CA. Coxsackievirus B4 myocarditis and meningoencephalitis in newborn twins. *Neuropathology.* 34(5), 2014, 429-437
- Tapparel C, Cordey S, Van Belle S, Turin L, Lee WM, Regamey N, Meylan P, Mühlemann K, Gobbini F, Kaiser L. New molecular detection tools adapted to emerging rhinoviruses and enteroviruses. *J Clin Microbiol.* 47(6), 2009, 1742-9
- 石古博昭 他. 遺伝子解析によるエンテロウイルスの同定, *臨床とウイルス* 27: 1999, 283-293
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Increased detections and severe neonatal disease associated with coxsackievirus B1 infection--United States, 2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 23;57(20), 2008, 553-6
- Wikswa ME, Khetsuriani N, Fowlkes AL, Zheng X, Peñaranda S, Verma N, Shulman ST, Sircar K, Robinson CC, Schmidt T, Schnurr D, Oberste MS. Increased activity of Coxsackievirus B1 strains associated with severe disease among young infants in the United States, 2007-2008. *Clin Infect Dis.* 49(5), 2009, e44-51

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

芦塚由紀、板持雅恵、伊藤 雅、大沼正行、小澤広規、梶原香代子、葛口 剛、熊田裕子、後藤明子、高橋雅輝、筒井理華、中田恵子、中野 守、西澤佳奈子、濱島洋介、堀田千恵美、

三好龍也、諸石早苗、吉田 弘、平成 29 年度ポリオ環境水サーベイランス（感染症流行予測調査事業および調査研究）にて検出されたエンテロウイルスについて、病原体検出情報（IASR）、2019、40、88-90

中田恵子、本村和嗣、生田和良、小林和夫、奥野良信、大阪府における急性弛緩性麻痺患者の検査状況と EV-D68 が検出された患者の症例報告、病原体検出情報（IASR）、2019、40、31-32

Azuma J, Yamamoto T, Sakurai M, Amou R, Yamada C, Hashimoto K, Kajita S, Yamamoto K, Kijima E, Mizoguchi Y, Nakata K, Shimotsuji T, Ozono K. Urinary β 2-microglobulin as an early marker of infantile enterovirus and human parechovirus infections. *Medicine (Baltimore)*. 97(43), 2018, e12930.

山田 知絵子、東 純史、石見 壮史、新田 統昭、天羽 竜子、櫻井 美帆子、木島衣理、中田 恵子、溝口 好美、下辻 常介、山本 威久。早期より尿中 2 microglobulin が高値を示したヒトパレコウイルス 3 型感染症の 4 例。小児感染免疫、2018、30（3）：223-229.

後藤明子、筒井理華、高橋雅輝、北川和寛、堀田千恵美、小澤広規、板持雅恵、大沼正行、西澤佳奈子、葛口 剛、伊藤 雅、中田恵子、三好龍也、中野 守、濱島洋介、磯田美穂子、吉富秀亮、諸石早苗、吉田 弘、平成 28 年度ポリオ環境水サーベイランス（感染症流行予測調査事業および調査研究）にて検出されたエンテロウイルスについて、病原体検出情報（IASR）、2018、39、67-69

中田恵子 上林大起 森川佐依子 大塚真紀、海外での感染が疑われた患者からの EV-D68 家族内感染事例、病原体検出情報（IASR）、2018、39、9-11

中田恵子、弓指孝博、大阪府におけるエンテロウイルス感染症の流行状況と分子疫学的解析（2017 年度）大阪健康安全基盤研究所研究年報 2018、2、1-9

Shinomoto M, Kawasaki T, Sugahara T, Nakata K, Kotani T, Yoshitake H, Yuasa K, Saeki M, Fujiwara Y. First report of human parechovirus type 3 infection in a pregnant woman. *Int J Infect Dis*. 2017, 59:22-24.

Nakata K, Takeda S, Tanaka A, Kwang J, Komano J. Antiviral activity of acid beta-glucosidase I on enterovirus 71, a causative agent of hand, foot and mouth disease. *J Gen Virol*. 98(4), 2017, 643-651

中田恵子、弓指孝博、久米田裕子、大阪府におけるエンテロウイルスおよびヒトパレコウイルス感染症の流行状況と分子疫学的解析（2016 年度）大阪健康安全基盤研究所研究年報、1、2017、1-9

中田恵子、左近直美、弓指孝博、加瀬哲男、大阪府におけるエンテロウイルス感染症の流行状況と分子疫学的解析（2015 年度）、大阪府立公衛研所報、第 54 号、2016、9-16

〔学会発表〕（計 2 件）

中田恵子、今村卓司、上田由香、西村章、橋村裕也、内山敬達、起塚庸、山本威久、木島衣理、榊原杏美、白石淳、野島昌俊、今西洋介、羽田敦子、伊藤由衣、高田利香、弓指孝博、加瀬哲男、駒野淳、新生児におけるコクサッキーウイルス B 群感染の危険性、第 50 回日本小児感染症学会、2018

中田恵子、駒野淳、加瀬哲男、コクサッキーウイルス A6 による手足口病-流行した 3 シーズンにおける臨床症状とウイルス学的特徴-、第 48 回日本小児感染症学会、2016

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。