

平成 10 年度(1998 年度)

厚生科学研究費 (新興再興感染症研究事業)

研究課題番号 H10 - 新興 - 52

東アジア地域で流行している小児の急性死を
伴う手足口病のウイルス学的研究

研究報告書

代表研究者 萩原昭夫

東アジア地域で流行している小児の急性死を伴う手足口病のウイルス学的研究

1	総括報告	萩原 昭夫	…	1
2	東アジア地域で流行しているエンテロウイルス71の分子疫学的解析	清水 博之	…	4
3	エンテロウイルス71型による手足口病の流行の長期継続的解析	大瀬戸光明	…	12
4	手足口病の臨床およびウイルス学的研究	奥野 良信	…	17
5	東アジア地域で流行している小児の急性死を伴う手足口病の研究 病理学的研究	岩崎 琢也	…	21
6	エンテロウイルス71温度感受性株の中枢神経病原性の検討	網 康至	…	27
7	本研究に関連した発表論文	……………		31

東アジア地域で流行している小児の急性死を伴う手足口病のウイルス学的研究（総括報告）

代表研究者： 萩原昭夫

【要旨】 東アジア地域で最近(1997～1998年)流行した小児の急性死を伴うエンテロウイルス 71 感染症について分子疫学的、血清疫学および病理学的研究を行なった。分子系統解析により、近年、東アジア地域(マレーシア、台湾、日本)で伝播したエンテロウイルス 71 は、大きく2種類の遺伝子型に分けられることが明らかになったが、手足口病の重篤化と EV71 の遺伝子型との間に関連性は認められなかった。日本では、エンテロウイルス 71 感染症による手足口病流行が周期的に起きており、散発的にはあるが重篤な中枢神経合併症例があることを確認した。カニクイザル感染モデルによりエンテロウイルス 71 の神経毒性を評価する系を用いて、エンテロウイルス 71 分離株の病原性についての比較検討を行なった。本研究において、東アジア地域のエンテロウイルス 71 感染症の実態についての基礎的データが得られた。さらに、今後、エンテロウイルス 71 による中枢神経症状発現のメカニズムを解析していく上で必要な実験系の開発を行うことが出来た。

【研究目的】

エンテロウイルス 71 (EV71) は、手足口病の主要な原因ウイルスであるが、非ポリオエンテロウイルスの中では、中枢神経症状を起こしやすいウイルスとして知られている。マレーシアでは 1997 年 6 月、台湾では翌年 1998 年 6 月を中心に、EV71 感染による大規模な手足口病流行と平行して、それぞれ 30 名および 70 名以上の小児の急性死症例が報告された。マレーシア・台湾における急性死症例は、臨床経過および死亡例の剖検材料の一部から EV71 が分離されていることから、EV71 感染による急性中枢神経疾患(EV71 脳炎)によるものである可能性が強い。一方、日本では規模の大小はあるものの手足口病の流行は毎年夏期を中心として認められており、EV71 は、コクサッキー A16 (CA16)、コクサッキー A10 とともに数年ごとに流行を繰り返している。今のところ日本では、マレーシアおよび台湾で起きたような重篤な症例の集中的な流行はないが、少数ではあるが EV71 の関与が疑われる小児の中枢神経疾患が認められており、死亡例も報告されている。そのため、将来的な手足口病重症例の流行の可能性を念頭におき、EV71 感染症の実態を把握し中枢神経症状発現のメカニズムを解明することは、きわめて重要であると考えられる。

これまで、EV71 感染症についての研究及び EV71 のウイルス学的研究は世界的に見てもあまり進められておらず、特に病原性に関する情報は限られたものである。本研究班では、日本を含めた東アジア地域で流行した EV71 感染症の実態を把握することを第一の研究目的とする。同地域において近年伝播した EV71 を手足口病患者あるいは重症例から分離し、ウイルス学的・分子疫学および血清疫学的解析を行なう。EV71 感染症診断に必要な検査方法についても検討する。さらに、EV71 感染による中枢神経症状発現およびその重篤化のメカニズムを明らかにするため、動物実験モデルを用い、EV71 の中枢神経病原性を病理学およびウイルス学的に検討する。

今後、日本あるいは東アジア地域に EV71 による手足口病重症例の流行が再度おきた場合、本研究により得られた研究成果が有用な情報を提供する事が期待される。

【研究組織】

主任研究者： 萩原昭夫 (国立感染症研究所)

分担研究者：

清水博之(国立感染症研究所)

網 康至(国立感染症研究所)

岩崎琢也(国立感染症研究所)

奥野良信(大阪府公衆衛生研究所)

大瀬戸光明 (愛媛県立衛生環境研究所)

牛島廣治 (東京大学医学部)

【研究方法】

近年東アジア地域で流行した EV71 について分子疫学的比較を行なった。マレーシア・台湾の重症例を含む手足口病患者から分離した EV71 の部分的な塩基配列を解析し、分子系統樹を作製し分子疫学的解析を行なった。患者の重症度と遺伝子型に関連性があるか疫学的に検討した。日本で流行している EV71 についての分子疫学的解析を行なった。おもに 1995 年以降、日本各地で分離されたウイルスを中心に比較した。日本・マレーシア・台湾の EV71 の関連を調べ、世界各地で以前流行した EV71 についても、併せて比較解析を行なった。1997 年に大阪で流行した手足口病について、死亡例を含む重症例の臨床症状について解析した。また、近年近畿地区で手足口病症例から分離されているエンテロウイルスについての解析を行い、血清疫学的調査を行なった。日本における手足口病の流行と EV71 伝播の傾向を明らかにするため、愛媛県を中心として 1973 年以降継続して行ってきた手足口病流行調査についてまとめた。EV71 流行のサイクルについての血清疫学的データを得るため、EV71 中和抗体保有状況についての調査を行なった。EV71 の病原性、特に神経毒性を検討するため、カニクイザル感染実験の条件検討を行なった。遺伝子型の異なる EV71 分離株をカニクイザル脊髄内に接種し、麻痺・運動失調等症状の発現を経時的に観察した。中枢神経組織の組織標本を作製し、病理学的な比較解析を行なうと同時に組織中のウイルス量を測定した。EV71 同定に必要な抗 EV71 中和抗体を作製し評価を行なった。また、病理組織中の EV71 抗原の特異的免疫染色に適した EV71 抗体を作製し有用性を評価した。

【結果と考察】

1. マレーシア及び台湾で分離された EV71 の分子疫学的解析

近年東アジア地域で分離された EV71 について分子疫学的比較解析を行なった結果、マレーシア、台湾、日本では大きく分けて 2 種類の遺伝子型(A-2 型および B 型)の EV71 が伝播していることが明らかになった。マレーシアからは A-2 型、台湾からは B 型が多く分離された。EV71 標準株である BrCr 株、1985 年以前に世界各地で分離された EV71 株、近年の東アジアの EV71 流行株は、分子系統樹上でそれぞれ異なるグループを形成した。マレーシアの死亡例由来の EV71 はすべて A-2 型、台湾の死亡例からは B 型が分離されており、EV71 の遺伝子型と手足口病の重篤化に直接的関連は認められなかった(清水)。

2. 日本で分離された EV71 の分子疫学的解析

近年日本で分離された EV71 の分子系統解析によると、マレーシアで多く分離された A-2 型および台湾で多く分離された B 型に類似した塩基配列を持つ異なる 2 種類の EV71 が同時に伝播していることが明らかとなった。1997 年の EV71 脳炎が疑われる小児の死亡例(大阪)から分離された EV71 は A-2 型であり、マレーシア(サラワク)で多く分離されたウイルスと相同性が高かった。日本では、同じ時期、同じ地域に異なる 2 種類の遺伝子型の EV71 が流行していることが示された。日本で分離された EV71 は、ほとんど手足口病症例由来ウイルスであり、遺伝子型と症状の重篤化の関連は明らかではなかった(清水)。

3. 日本の手足口病の疫学的解析

1997 年に大阪で流行した手足口病流行時に 3 例の急性死症例が報告され、臨床経過はマレーシア・台湾の急性死症例(EV71 脳炎)との類似が認められた。3 例のうち 1 例から EV71 が分離され(C7/Osaka 株)遺伝子型は A-2 型であった(奥野)。

愛媛県における手足口病の定点追跡調査により、3～5年ごとにEV71が流行していたことが示された。1973年の手足口病流行時には比較的高い割合で中枢神経合併症状が報告されているが、その後の手足口病流行では、中枢神経合併症例は低い割合で推移している。愛媛県および大阪府における血清疫学的調査から、中和抗体を保有しない小児の増加がEV71による手足口病の流行を規定していることが示唆された(大瀬戸、奥野)。

4. EV71の中枢神経病原性の研究

5.

EV71の神経毒性をカニクイザル感染モデルで比較した。遺伝子型の異なるEV71分離株をカニクイザル腰髄内に接種し症状の発現を経時的に観察した。接種ウイルス株により、接種後比較的早い時期(4～6日目)に麻痺を伴う重篤な神経症状を呈した群と、接種後7日目以降に振戦・運動失調等の中枢神経症状を示した群に分けることが出来た。剖検によると、多くの個体で神経病理学的変化が認められたが、早期に強い中枢神経症状を呈した群においては、脳幹部を中心にEV71特異的ウイルス抗原が検出され、組織からのウイルス分離も可能であった(岩崎)。

精製EV71ウイルスを抗原としてウサギに免疫を行い、高力価の抗EV71中和抗体を作製した。精製EV71ウイルスをSDS処理した抗原を免疫することにより抗血清を作製し、免疫組織染色における有用性を確認した(岩崎)。

EV71標準株であるBrCr株から分離した温度感受性株を神経毒性をカニクイザル感染系を用いて評価した。温度感受性株(ts株)は、非感受性株(tr株)と比較して弱い神経毒性を示すことを中枢神経症状の発現、病理学的解析およびウイルス学的解析により評価可能であることを示した(網)。

【まとめ】

東アジア地域で最近流行した小児の急性死を伴うエンテロウイルス71感染症について分子疫学的、血清疫学的および病理学的に解析した。近年、日本を含む東アジア地域で伝播しているエンテロウイルス71の分子疫学的特徴を明らかにした。日本の手足口病流行について疫学的な

解析を行なった。EV71の中枢神経病原性を評価可能な感染動物実験系を構築しEV71分離株の病原性の解析を行なった。以上の結果は、今後のEV71感染症の研究の基盤となりうるものである。

【研究発表】

論文発表

- (1) Shimizu, H., Agoh, M., Agoh, Y., et al.: Mutations in the 2C region of poliovirus responsible for altered sensitivity to benzimidazole derivatives. *J. Virol.* (in press)
- (2) Shimizu, H., Utama, A., Yoshii, K., 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, 12-15
- (3) Yoshida H, Hong Z, Yoneyama T, Yoshii K, Shimizu H, et al. Phylogenetic analysis of echovirus type 30 isolated from a large epidemic of aseptic meningitis in Japan during 1997-1998. *Jpn J Infect Dis* (1999) 52, 60-63
- (4) 清水博之: 非ポリオエンテロウイルス感染症の実験室診断、*日本臨床*(1999) 57, 336-339
- (5) 清水博之: 手足口病、*感染炎症免疫*(1999)、29, 40-41
- (6) 清水博之: エンテロウイルス71による脳炎、*化学療法の領域* (印刷中)
- (7) 塩見正司、外川正生、山崎謙治、奥野良信ほか: エンテロウイルス71型感染症が原因で急死したと考えられた3症例、*IARS* (1998), 19

学会発表

- (1) 塩見正司、外川正生、奥野良信: 手足口病またはEnterovirus 71にともなって急死した乳幼児の3症例、第72回日本感染症学会総会(1998)大阪
- (2) 清水博之、萩原昭夫、他: マレーシアで流行した小児の致死的疾患患者から分離されたエンテロウイルスの研究、第39回臨床ウイルス学会総会(1998)
- (3) 清水博之、奥野良信、萩原昭夫、他: 日本のエンテロウイルス71感染症の分子疫学、第39回臨床ウイルス学会総会(1998)
- (4) 清水博之、萩原昭夫、奥野良信、他: 死亡例および手足口病患者から分離したエンテロウイルス71の分子疫学的解析、ウイルス学会総会(1998)
- (5) 清水博之、萩原昭夫、他: エンテロウイルス71温度感受性株の塩基配列の解析、第40回臨床ウイルス学会総会(1999)
- (6) 清水博之: エンテロウイルス71の分子疫学、衛生微生物技術協議会第20回研究会(1999)

東アジア地域で流行しているエンテロウイルス 71 の 分子疫学的解析

分担研究者： 清水博之

協力研究者： Andi Utama、田炳均、吉井久美子、吉田弘、米山徹夫、
萩原昭夫、岡部信彦、宮村達男（国立感染症研究所）

Shin-Ru SHIH, Kenneth Sheuh-Shen CHANG(長庚大学)

Hour-Young CHEN, Gong-Ren WANG(国立予防医学研究所) Chuan-Liang KAO(国立台湾大学)

Mangalam SINNI AH, Mohd Apandi Bin YUSOF(マレーシア医学研究所)

【要旨】東アジア地域で近年流行している小児の急性死を伴うエンテロウイルス 71 感染症について分子疫学的比較解析を行なった。分子疫学的解析により、現在、東アジア地域(マレーシア、台湾、日本)で伝播しているエンテロウイルス 71 は、大きく 2 種類の遺伝子型(A-2 型及び B 型)に分けられることが明らかになった。マレーシアからは A-2 型、台湾からは B 型が多く分離された。日本では、A-2 型及び B 型が同時期に同じ地域で伝播していた。EV71 標準株である BrCr 株、1985 年以前に世界各地で分離された EV71 株(A-1 型)、近年の東アジアの EV71 流行株(A-2 型及び B 型)は、分子系統樹上でそれぞれ異なるグループを形成した。マレーシアの死亡例由来の EV71 はすべて A-2 型、台湾の死亡例からは B 型の EV71 が多く分離された。重症例でない手足口病患者からも、マレーシアでは A-2 型、台湾では B 型が高頻度に分離された。このように、EV71 の遺伝子型と手足口病の重篤化に直接的関連性は認められなかった。

【研究目的】

エンテロウイルス 71(EV71)は、日本では数年ごとに手足口病の流行を起こす常在ウイルスである。手足口病は、口唇粘膜および四肢末端の発疹を特徴とする疾患で、発熱・無菌性髄膜炎等の症状を伴うことがあるが、一般に予後は良好である。EV71 は、主に手足口病患者の咽頭・発疹拭い液・糞便から分離される。一方、EV71 は非ポリオエンテロウイルスのなかでは中枢神経親和性の強いウイルスとしても知られており、ポリオ様麻痺・脳炎・無菌性髄膜炎等中枢神経症状を呈した患者からの分離も報告されている。EV71 は、1970 年代に新たなエンテロウイルスとして同定された当初から、中枢神経合併症との関連が指摘されていたが症例は散発例であった。しかし、1975 年のブルガリア、1978 年のハンガリーにおける EV71 の流行では、いずれも 40 名以上の死亡例が報告されている(表 1)。その後、1990 年代後半まで、重篤な中枢神経合併症を示す EV71 感染の大規模な流行は報告されていないが、散発例は世界各地で報告されている。

しかし、近年、東アジア地域のマレーシア及び台湾で、大規模な手足口病流行と同時期に小児の急性死症例が多発し、EV71 感染による急性脳炎が死亡原因である事が明らかとなってきた。マレーシアでは 1997 年 6 月、台湾では翌年 1998 年 6 月を中心に、EV71 感染による大規模な手足口病流行と平行して、それぞれ 30 名および 70 名以上の小児の急性死症例が報告された。マレーシア・台湾における急性死症例は、臨床経過および死亡例の剖検材料の一部から EV71 が分離されていることから、EV71 感染による急性中枢神経疾患(EV71 脳炎)によるものである可能性が高い。今のところ日本では、マレーシア及び台湾で起きたような重篤な症例の集中的な流行は報告されていないが、将来的な手足口病重症例の流行の可能性を念頭におき、東アジア地域で伝播している EV71 の関連性を明らかにするため、分子疫学的手法によりマレーシア・台湾・日本の EV71 分離株を解析した。

【研究方法】

1997年にマレーシアで発生した重症例を含む手足口病流行時に採取された、死亡例、手足口病患者および接触者由来の検体(糞便、髄液、血液、咽頭拭い液、剖検材料等)から、細胞培養によりウイルス分離を試みた。同時期に手足口病が多発しており、散発的な重症例が報告されているマレー半島の患者由来検体からも同様にウイルスを分離した。分離したエンテロウイルスは抗血清で同定後、ゲノムRNAを鋳型にRT-PCR法によりcDNAを増幅し塩基配列を決定した。増幅領域は、5'-NCRおよびVP4/VP2領域を含む約1000bpである。これまで日本および世界各地で分離され、当研究室に保存されていたEV71野生株についても塩基配列を決定し、マレーシア分離株との比較を行った。分子系統樹は、近接結合法を用いて作成した。サラワクの死亡例から分離されたSK/EV006株については、全塩基配列を決定した。全塩基配列が登録されているEV71計6株(アメリカ分離株2株、台湾分離株4株)については、GenBankから塩基配列を入手して、比較解析に用いた。

1998年に台湾で発生した手足口病重症例流行時に分離されたEV71についても、同様の方法で解析を行なった。日本のEV71については、1990年から1997年まで、特に1995年以降手足口病患者から分離されたEV71を解析した。EV71分離株の多くは地方衛生研究所から分与されたものを用いた。C7株は1997年の大阪における小児の死亡例から分離されたEV71である。

【結果および考察】

1. マレーシアで分離されたEV71の分子疫学的解析

1997年、サラワク地方を中心としたマレーシアで小児の急性死症例が多数報告された。サラワク地方だけで死亡例は30名以上にのぼり、その後、類似症例がマレー半島でも散発的に認められた。手足口病患者および重症例の一部の臨床検体からEV71を含むエンテロウイルスが多数分離されたが、EV71の分離頻度は他のエンテロウイルスと比較して高かった。マレー半島の肺水腫を伴う脳幹脳炎症例数例に的中枢神経組織からEV71が分離され、同時に中枢神経組織においてEV71抗原が同定され、EV71の急性中枢神経感染が直接の死亡原因である可能性が強くなった。

図1にマレーシアで分離されたEV71の分子系統樹を示した。マレーシアで分離されたEV71は、大きく2種類のgenotype(A-2型とB型)に分けられた。EV71標準株であるBrCrは他のEV71分離株と相同性が低く、1970~1980年代に世界各地で分離されたEV71は別のグループ(A-1型)を形成していた。マレーシアの

EV71の多く(12株/15株)は、A-2型に属していた。死亡例由来株(6株)およびサラワク分離株(6株)は、すべて、A-2型に属していた。マレーシアで分離されたA-2型のEV71は、日本の死亡例由来のC7/Osaka株と高い相同性を示した。マレー半島の手足口病患者由来株(TRG5, KED005)は、台湾で1998年に流行したEV71と同じB型に属していた(図1)。

2. 台湾で分離されたEV71の分子疫学的解析

マレーシアでの手足口病の流行のほぼ一年後の1998年4月から7月にかけて、今度は台湾全土において大規模な手足口病の流行と平行して乳幼児の急性死症例が多発し、入院を必要とした重症例は400例以上、死亡数は78例に上った。死亡例及び重症例の多くからEV71が分離された。また、手足口病あるいはヘルパンギーナ患者からも多数のEV71が得られている。

分子系統解析によると、台湾で分離されたEV71の多くは、マレーシアと異なりB型に属していた(図2)。解析した12株のうち、死亡例由来株3株を含む9株がB型に属しており、他の3株は、マレーシアで多く分離されたA-2型に属していた。

3. 日本のEV71の分子疫学的解析

病原微生物検出情報によると、EV71による手足口病の比較的大きな流行は、1973, 1975, 1978, 1983, 1990, 1993および1997年に起きている。マレーシア・台湾の様な重篤なEV71脳炎の流行は、日本では発生していないが、EV71感染が疑われる中枢神経合併症例の散発例が報告されている(表2)。最も最近EV71の大きな流行があった1997年には、大阪でEV71脳炎が疑われる死亡例が3例報告されており、そのうち1例からはEV71が分離されている(C7/Osaka株)。

近年の日本のEV71分離株の分子系統解析によると、日本でも、2種類の異なるタイプのEV71(A-2型及びB型)が同時に伝播していたことが明らかとなった(図3)。解析した1990年代の分離株46株のうち、マレーシアの分離株の多くが属するA-2型には19株、台湾の分離株の多くが属するB型には24株が属していた。大阪の死亡例由来株C7/Osakaは、A-2型であったが、C7/Osaka株と高い相同性を持つA-2型のEV71分離株の多くは、通常の手足口病患者からも分離されている。1997年の手足口病流行時には、同じ時期、同じ地域(滋賀、横浜等)で異なるgenotypeのEV71が同時に伝播していたことが明らかとなった。

4. EV71 全塩基配列の比較

マレーシアの死亡例から分離された SK/EV-006 株 (VP4/VP2 領域, A-2 型) の全塩基配列を決定し、全塩基配列が報告されている他の EV71 分離株との比較を行なった。異なる遺伝子領域ごとに分子系統樹を作成し比較したところ、1998 年に台湾で分離された EV71 株 4 株 (VP4/VP2 領域, いずれも B 型) は、5'-NCR, P1, P2, P3 いずれの領域においても、単一のグループを形成し、高い相同性を示す事が明らかとなった。他の 3 株、BrCr, 7423MS および SK/EV-006 株は、いずれの領域の塩基配列を用いた分子系統樹においても、台湾で分離された EV71 と同一のグループに属していなかった。以上の結果より、台湾で多く分離された B 型とマレーシアで多く分離された A-2 型は、我々が分子系統解析に用いた P1 領域 (VP4/VP2) 以外の遺伝子領域においても、異なるグループに属する事が示唆された。今後、より多くの分離株についての比較を行い、この点を検証していく必要がある。

5. EV71 の遺伝子型と病原性の関係

日本では、EV71 は手足口病の原因ウイルスと考えられているが、欧米では EV71 は中枢神経症状を起こしやすい非ポリオエンテロウイルスとして認識されている。このため、以前から中枢神経病原性の異なる EV71 が、それぞれの地域で伝播している可能性が指摘されていた。しかし、ウイルス遺伝子型と病原性の関係についての研究は、これまで、ほとんど行われてこなかった。

マレーシア、台湾および日本で近年分離された EV71 の分子系統解析によると、多くの分離株は明らかに異なる二種類の遺伝子型 (A-2 型および B 型) に分けられた (図 1, 2, 3)。死亡例から分離された株も含めてマレーシアの EV71 の多くは A-2 型、重症例由来株を含めた台湾の分離株の多くが B 型であった。日本では近年、A 型および B 型の EV71 が同時に伝播しており、マレーシア、台湾の死亡例由来の分離株と高い相同性を持つ EV71 が、通常の手足口病患者から分離されている。また、1970 年代に多数の死亡例を含む EV71 の大きな流行を起こしたブルガリア (1975 年)、ハンガリー (1978 年) の分離株は、A-1 型に属していたが、日本の手足口病患者から同一の genotype に属するウイルス (Nagoya 株) が分離されている。この Nagoya 株は、カニクイザルに対して、比較的強い病原性を示すことが報告されている。このように、いずれの genotype のウイルスも通常の手足口病患者及び重症例から分離されており、遺伝子型と病原性に強い関連性は認められなかった。以上の結

果から、ウイルスの遺伝子型の違いのみからは、重症 EV71 感染症の流行の原因を説明できない。EV71 の中枢神経親和性は、このウイルスの一般的な性質であると考えられるが、宿主側要因やアデノウイルス等の他の感染症が EV71 感染の重篤化に関与している可能性も指摘されている。EV71 感染症の重篤化の原因について、ウイルス側、宿主側両面から、今後も研究を進めていく必要がある。

【謝辞】

本研究で用いた日本の EV71 分離株の多くは、地方衛生研究所で分離同定されたものを用いた。分与下さった先生方に深謝いたします。

【研究発表】

論文発表

- (1) Shimizu, H., Utama, A., Yoshii, K., 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 - 15
- (2) 清水博之: 非ポリオエンテロウイルス感染症の実験室診断、*日本臨床*(1999) 57, 336-339
- (3) 清水博之: 手足口病、*感染症免疫*(1999)、29, 40-41
- (4) 清水博之: エンテロウイルス 71 による脳炎、*化学療法の領域* (印刷中)

学会発表

- (1) 清水博之、萩原昭夫、他: マレーシアで流行した小児の致死性疾患患者から分離されたエンテロウイルスの研究、第 39 回臨床ウイルス学会総会 (1998)
- (2) 清水博之、奥野良信、萩原昭夫、他: 日本のエンテロウイルス 71 感染症の分子疫学、第 39 回臨床ウイルス学会総会 (1998)
- (3) 清水博之、萩原昭夫、奥野良信、他: 死亡例および手足口病患者から分離したエンテロウイルス 71 の分子疫学的解析、ウイルス学会総会 (1998)
- (4) 清水博之: エンテロウイルス 71 の分子疫学、*衛生微生物技術協議会第 20 回研究会*(1999)

表1. 世界各地におけるEV71による中枢神経疾患の流行

地域	流行年	患者数*	死亡者数*	おもな症状
アメリカ	1969～1973	20	1	髄膜炎・脳炎
日本(愛媛)	1973	81	0	髄膜炎・脳炎・手足口病
ブルガリア	1975	705	44	脳炎・ポリオ様麻痺
ハンガリー	1978	1550	45	脳炎・ポリオ様麻痺
オーストラリア	1986	34	0	脳髄膜炎
香港	1986	5	0	麻痺
マレーシア	1997	不明	31以上	脳炎・肺水腫・手足口病
日本(大阪)	1997	3	3	脳炎・手足口病
台湾	1998	407	78	脳炎・肺水腫・手足口病
香港	1999	2	1	脳炎・運動失調
オーストラリア	1999	6	0	麻痺

* EV71感染との関連が未確定な症例も含む

表2. 近年日本で報告されたEV71感染の関与が疑われる中枢神経合併症例

発生年	地域	患者数	症状	EV71分離数	報告
1994	神奈川	10	限局性脳炎・髄膜炎・手足口病	2	1
1995	岡山	1	意識障害・手足口病	0	2
1997	大阪	3	脳炎(死亡例3)、手足口病	1	3
1997	大津	12	脳炎・髄膜炎・手足口病	0	4
1997	京都	15	小脳失調を伴う脳髄膜炎	0	5

1: 三浦ら(日本小児科学会誌 102, 581～586, 1998)

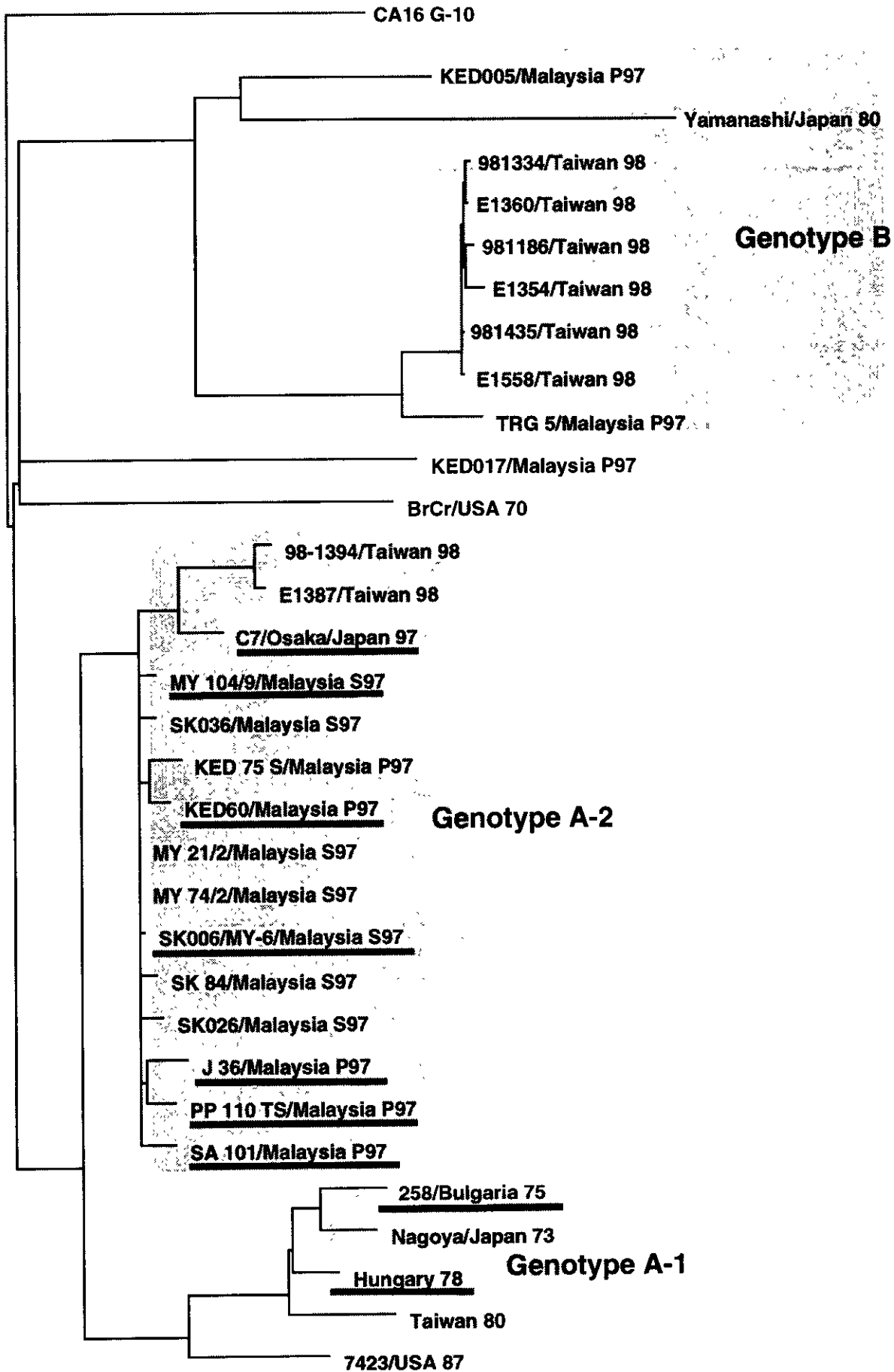
2: 横山(小児感染免疫 10, 19～22, 1998)

3: 塩見ら(感染症学会総会, 1998)

4: 小松ら(Pediatr. Neurol. 20, 17 - 23, 1999)

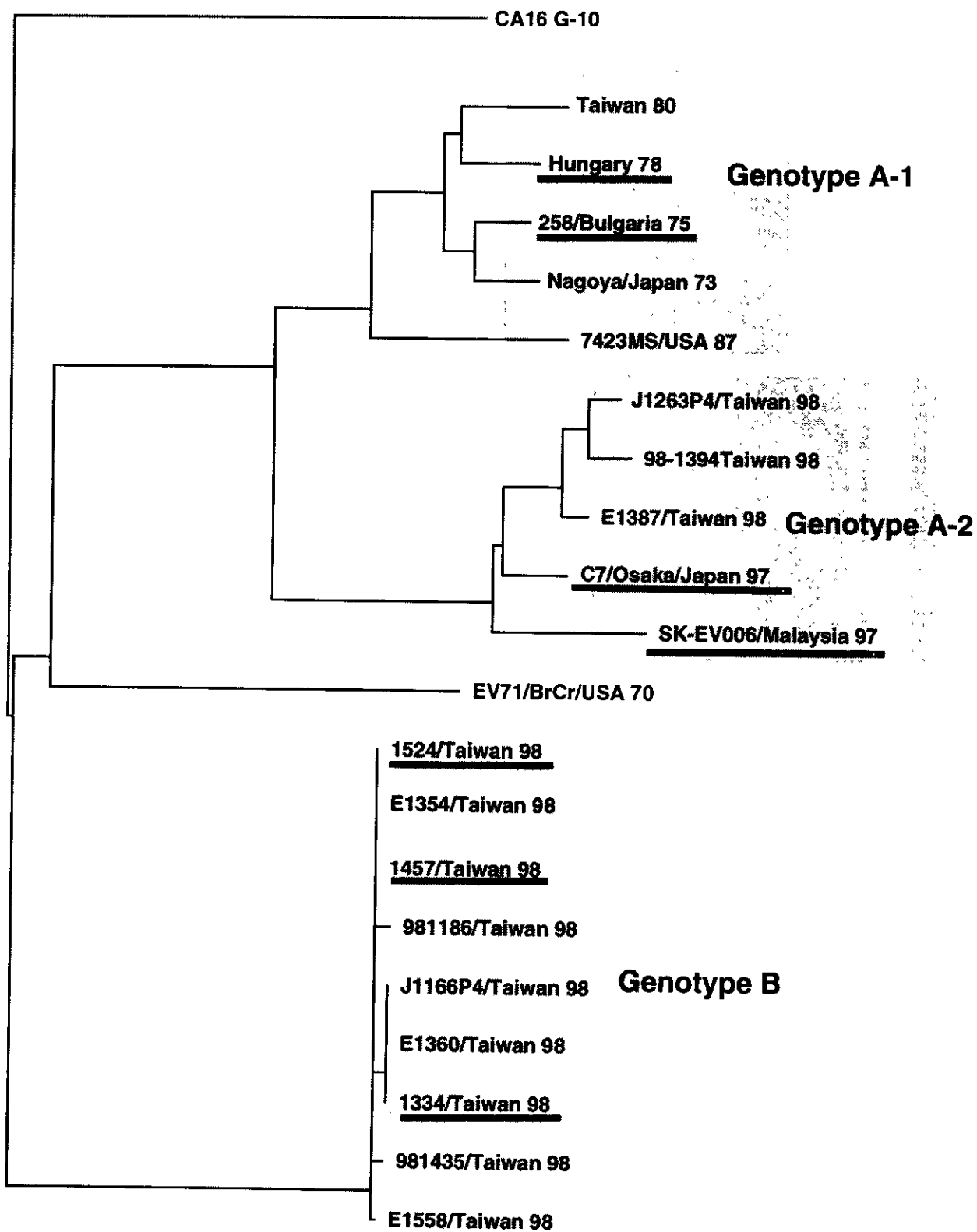
5: 禹ら(小児神経学会総会, 1998)

図1 マレーシアで分離されたEV71の分子系統樹
(5'-NCR/VP4/VP2, 1037 bp)



下線は、死亡例由来の分離株、Malaysia S97は Sarawak分離株、P97は、マレー半島分離株を示す。

図2 台湾で分離されたEV71の分子系統樹 (VP4/VP2, 420bp)



下線は、死亡例由来の分離株

図3 日本で分離されたEV71の分子系統樹
(5'-NCR/VP4/VP2, 1037bp)

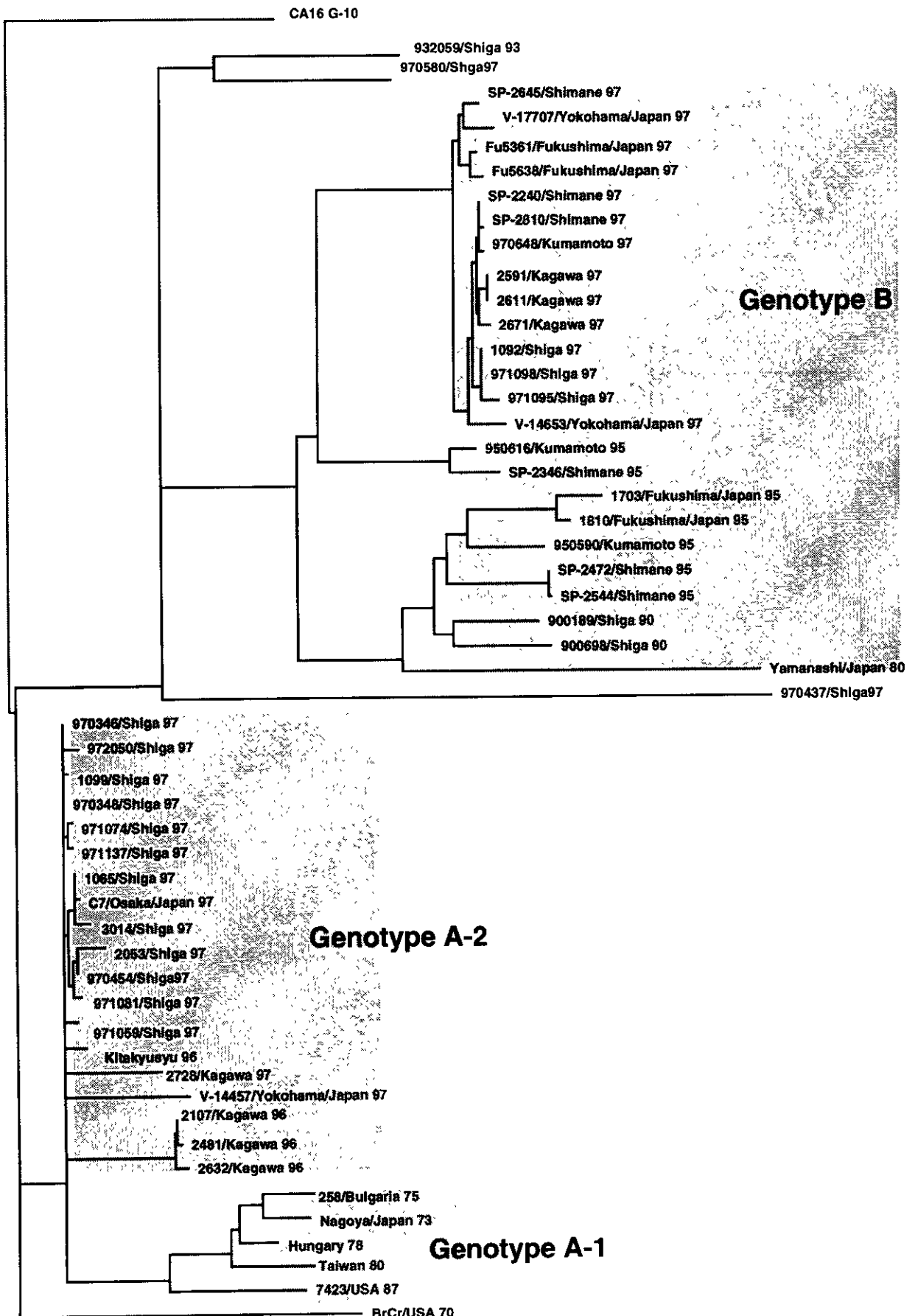
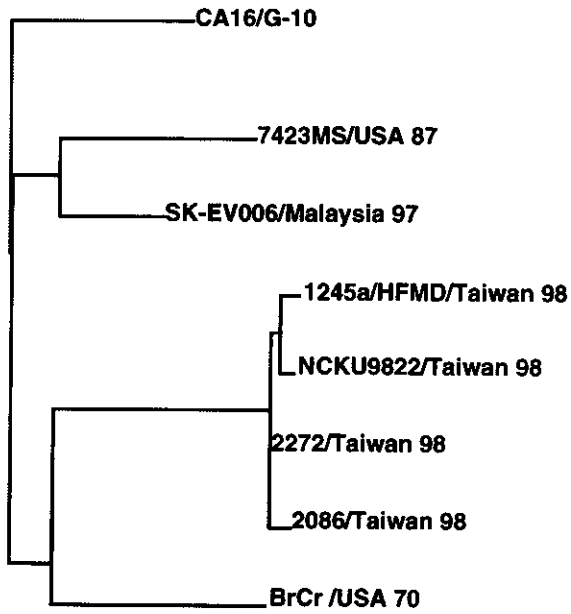
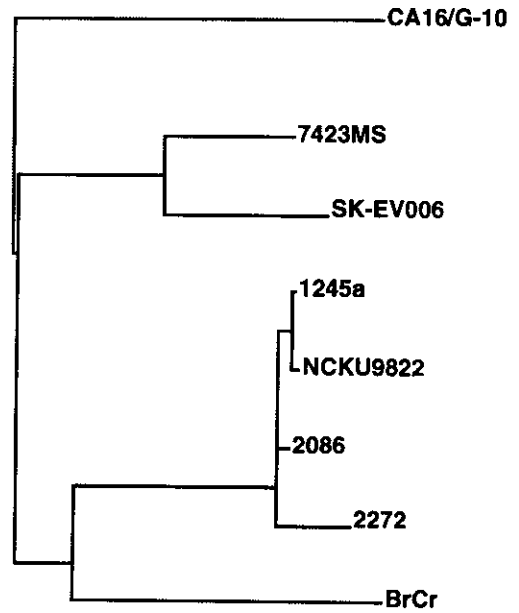


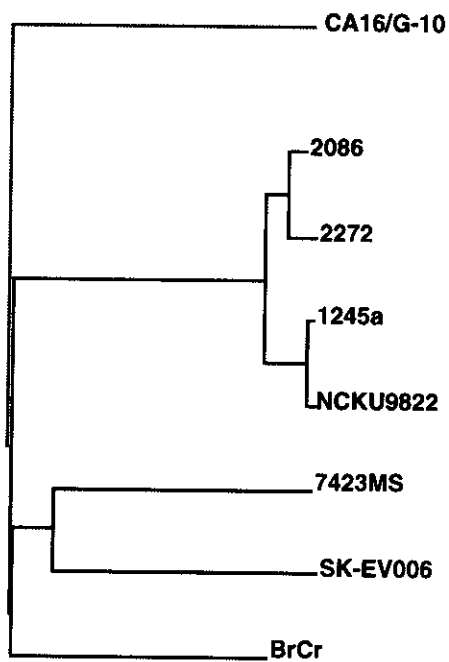
図4 全塩基配列が解析されたEV71の分子系統解析



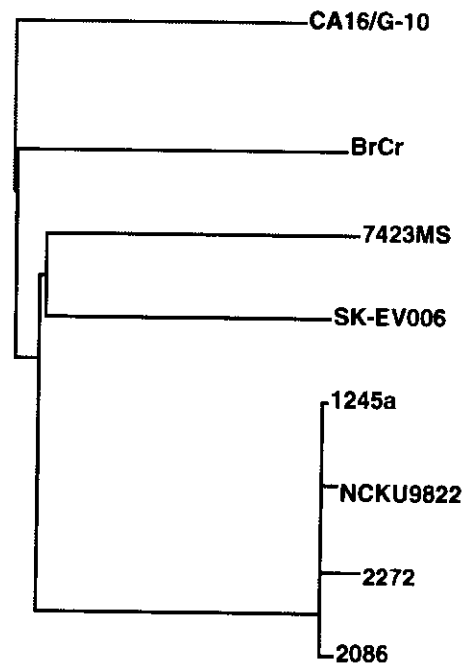
5' - NCR



P1



P2



P3

エンテロウイルス 71 型による手足口病の流行の長期継続的解析

分担研究者 大瀬戸光明

研究協力者 吉田紀美

研究要旨：マレーシアや台湾において手足口病の経過中に小児が中枢神経合併症により死亡する例が多発し、原因としてエンテロウイルス 71 型 (EV71) が注目されている。将来病原性が著しく強い EV71 が国内に侵入したとき、EV71 の流行規模等を予測するための資料とするため、愛媛県における過去の手足口病流行の実態をまとめた。その結果、手足口病は毎年のように発生しているが、地域内では EV71 は 1973 年以降現在まで、ほぼ 4.5 年ごとに流行を繰り返していることがわかった。また、流行の前には 4 歳未満の年齢層がほとんど感受性者群になっており、その 40-50% が一度の流行で感染していたことが示された。EV71 流行株中には種々の抗原性を示す株が混在しており、抗原性の評価は慎重にする必要があると考えられた。

はじめに

我が国における手足口病の本格的な流行は、1970 年のコクサッキーウイルス A16 型 (CA16) によるものが最初で、次いで 1973 年に流行した手足口病はエンテロウイルス 71 型 (EV71) によるもので、髄膜炎等中枢神経症状を合併する割合が高く注目された。以後、CA16 と EV71 が交互に数年毎の間隔をおいて流行を繰り返してきた。EV71 はその発見当初は欧米において中枢神経症状が強く多くの死亡例が報告されていたことから、手足口病の流行に際しては病原体の分離同定が重要視されてきた。そのため、当所では従来から手足口病の流行疫学を継続して実施してきた。

最近、マレーシアや台湾において手足口病の経過中に小児が中枢神経合併症により死亡する例がそれぞれ数十例報告され、その原因としてエンテロウイルス 71 型 (EV71) が注目されている。しかも、EV71 分離株の遺伝子塩基配列解析の結果、国内にもすでにマレーシアや台湾で死亡例を出したサラワク株と類似の遺伝子型株が流行しており、手足口病の経過中に脳炎を合併して死亡した小児例や EV71 によると考えられる脳炎例が報告されている。すでに国内での分離株の遺伝子学的解析は少なからず進んでいるが、病原性や抗原性の解析はまだ十分にはなされていない。そこで、我々は 1973 年以降の流

行状況、ウイルスの抗原性、流行前後の中和抗体保有状況等について、今までの流行をまとめ、その結果から EV71 の流行対策に有用な資料を得ることを目的とした。

材料と方法

ウイルス分離：松山市内のウイルス性感染症の定点観測医院外来で手足口病患者から採取した咽頭拭い液、水疱内容物、髄液、糞便から培養細胞法でウイルスを分離した。細胞は GMK, Vero, FL 等を主に用いた。

ウイルス中和試験：住民の EV71 抗体保有状況の測定、分離株の抗原性の解析には、GMK 細胞を用いた 80% プラーク減少法で行い、一次重層培地には 2% メチルセルロース含有 MEM 培地を用い、培養 5 日目に 0.005% ニュートラルレッド含有寒天 MEM 培地を二次重層した。

手足口病患者の発生状況：愛媛県感染症サーベイランス事業における患者定点 29 ヶ所からの手足口病患者報告数を月別に集計した。

結果および考察

手足口病患者の発生状況及びウイルス分離状況：愛媛県においては手足口病は 1970 年以降数年ごとに流行がみられた。1981 年以前には 1970 年、1973 年、1975 年、1978 年、1979-80 年、に手足口病が流行しており、1970 年、1975 年、

1979-80年の流行からはCA16が分離され、1973年、1978年はEV71が分離された。感染症サーベイランス事業が開始された1982年以降の患者数の月別動向は図1に、手足口病患者からのCA16とEV71の分離状況を図2に示した。1982年、1985年、1987年、1994-95年の流行期にはCA16が分離され、また、1973年、1978年、1983年、1986年、1990年、1993年、1997年にはEV71が分離され、CA16とEV71はそれぞれほぼ4-5年の周期で流行してきたことが示された。

EV71による手足口病では無菌性髄膜炎の合併例が報告されたが、CA16による手足口病の流行時にはほとんど中枢神経症状の併発例はみられなかった。また、同じEV71による手足口病においても流行毎に臨床症状に差異がみられ、1973年の流行では24.1% (81/335)の中枢神経症状合併率であったが、1978年のそれは7.2% (54/746)、1993年は8.7% (20/229)で著しく減少していた。この傾向は現在も持続しており、1997年の流行でも中枢神経親和性を増しているという証拠は認められていない。

流行前後の中和抗体保有率の変動：1973年、1978年及び1993年のEV71による手足口病の流行前後に採血した住民血清を用い、EV71標準株BrCrに対する中和抗体保有率を測定した結果を図3に示した。1973年、1978年の流行前には4歳未満の年齢層では全く抗体を保有してなく、流行と流行の間にはほとんどEV71が浸淫していなかったことが示された。1993年の流行前住民血清は2-3歳層で25%の抗体保有率を示した。これは1990年のEV71流行を反映しており、EV71の流行周期としては比較的短い間隔であった。流行後の抗体保有率は4-6歳層以下の年齢層で約40%から50%の抗体保有率の上昇を示しており、EV71の強い感染力が伺われた。中和抗体保有率曲線は各流行の分離株を用いて測定しても、標準株BrCrとほぼ同じ結果が得られている。これらのことは4歳未満の乳幼児に感

受性者が蓄積することがEV71の重要な流行要因であることを示唆している。

EV71の抗原性の変異：EV71標準株BrCr及び各流行の代表株に対する自家製ウサギ免疫血清を用い、80%プラーク減少法による交差中和試験を行い、結果を表1に示した。1973年(73-2118)、1978年(78-034)、1990年(90-445)の代表株は、BrCrとほとんど同じ反応を示し抗原性の変異は認められなかった。1993年流行株(93-774、93-695、93-715)はBrCr及び73-2118、78-034の免疫血清に対してホモ抗体価より2倍または4倍高い抗体価を示した。このように通常のエンテロウイルスの変異とは異なる特異な抗原性の変異が示されたので、一部の株について3回のプラーククローニングを行い、得られた直径2-3mmの大プラーク(Lp)、1mmの中プラーク(Mp)のクローンを用いて中和試験を行った。結果は表2に示したが、プラークサイズに関係なく多様な反応がみられ、分離株中に複数の抗原性を持つ株が混在していたことが示唆された。なお、ピンポイントの小プラーク株はクローニングができず、中和試験の成績が得られていないため、EV71の抗原性の変異に関する評価は慎重にする必要がある。今後クローニングを継続し、抗原性と遺伝子型との関連について解明を試みる必要がある。

結論

- 1) EV71による手足口病は1973年の最初の流行以来、4-5年の周期を保って流行を繰り返してきた。
- 2) 各流行期の前には、4歳未満の年齢層ではほとんどEV71に対する中和抗体を保有していない状態であった。
- 3) 分離株中には複数の抗原性を示す株が混在しており、抗原性の評価は慎重にする必要があることを示唆された。

図1 感染症サーベイランスにおける手足口病患者の月別発生動向

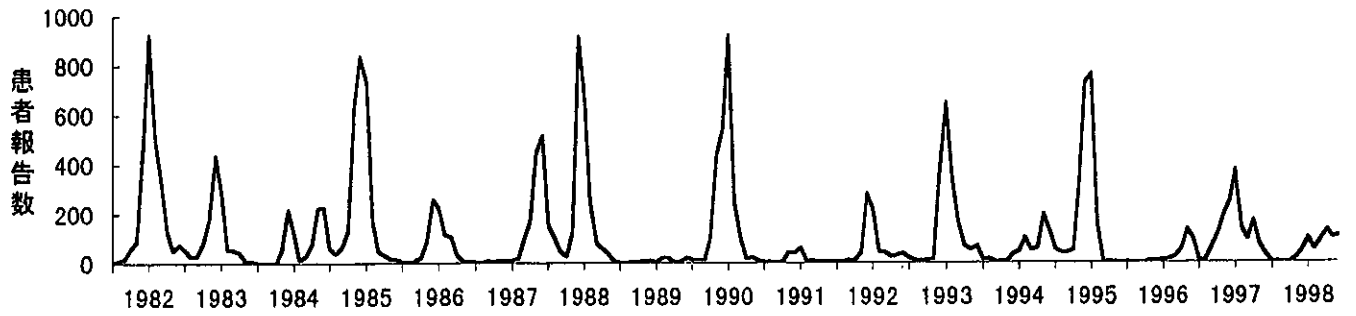
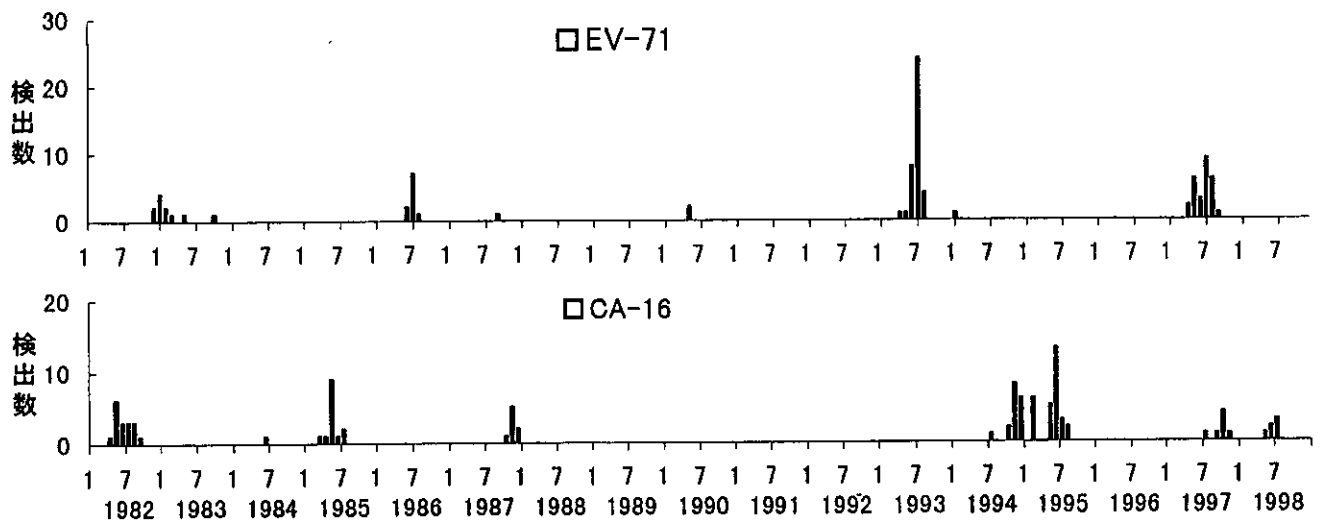


図2 EV71、CA16の月別検出状況



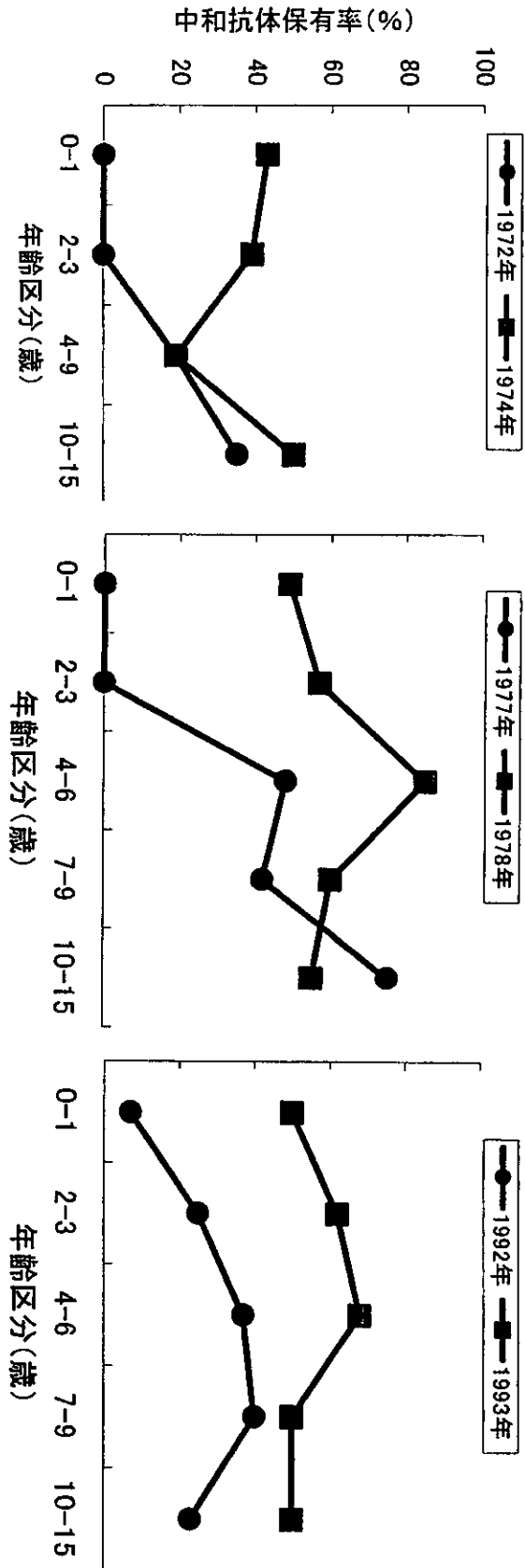


図3 流行前後の住民のEV71(BrCr株)中和抗体保有率の推移

表1 EV71分離株の交差中和試験

ウイルス株	ウサギ免疫血清			
	抗BrCr	抗73-2118	抗78-034	抗93-774
BrCr	800	400	3200	200
73-2118	800	400	6400	200
78-034	400	200	6400	200
90-445	800	200	25600	<800
93-774	3200	800	25600	3200
93-695	3200	800	51200	6400
93-715	3200	800	51200	3200

表2 EV71プラークローニング株の中和試験

ウイルス株	ウサギ免疫血清		
	抗BrCr (800)*	抗78-034 (6400)*	抗93-774 (1600)*
73-2118(Lp)	400	25600	400
78-034(Lp)	200	12800	<200
93-774(Lp)	1600	12800	400
93-774(Mp)	<200	25600	1600
93-695(Lp)	800	3200	400
93-715(Lp)	1600	12800	1600

* : ホモ抗体価

Lp:大プラーク

Mp:中プラーク

手足口病の臨床およびウイルス学的研究

分担研究者 奥野良信 大阪府立公衆衛生研究所
協力研究者 山崎謙治 大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨 1997年に大阪市で手足口病によると思われる3例の死亡例が発生し、患者からEV71が分離された。これらの症例は臨床的・ウイルス学的に、同年マレーシアで流行した多くの死亡例と共通していた。

A. 目的

手足口病(HFMD)が初めて発生したのは1957年(カナダ)、日本では1963年であり、Coxsackievirus A16 (CA16)が病因ウイルスとして報告された。それ以後世界各国で発生が認められ、さまざまなウイルス(CA5,6,9,10, CB2,4,5, Echo9,11)が患者から分離された。その分離数からCA16および、1969年からカリフォルニアで、日本では1973年から流行したEnterovirus 71 (EV71)が主な原因ウイルスであるとされる。EV71は髄膜炎・ポリオ様麻痺などの中枢神経疾患が知られ、流行によって手足口病を伴う場合と伴わない場合がある。EV71による大きな流行が起こり、多数の重症例と急性死亡例の出たことが今までに世界中で報告されている。最近では1997年にマレーシアにおいてEV71感染により30名以上の死亡例が認められ、同年、大阪市でも死亡例からサラワク型のEV71が分離されたが、Genotypeの異なるウイルスの流行も認められた。本研究では、死亡例についての臨床的検討およびGenotypeの異なるEV71に対する抗体保有率が異なるかどうかを調査することを目的とした。

B. 方法

臨床的検討；1997年に大阪市で手足口病に併発して発生したと思われる3名の死亡事例についての臨床的特徴を検討し、合わせてウイルス分離も行った。

血清疫学的調査；1992年に採取した0

～80歳のヒト血清82例を用いて中和抗体を測定した。ウイルスはEV71 C7/97/Osaka株(Genotype S)および1095/97/Shiga株(Genotype J)をRD18s細胞で増殖させ、中和用抗原として用いた。

C. 結果

症例1：9カ月女児。兄と姉が手足口病に罹患し、自身も7月11日から発熱と発疹が出現したが、一般状態は良好であった。14日午後からぐったりし、近医を受診した。呼吸困難がみられたためY病院へ入院し、気管内挿管と人工呼吸を受けたがショック状態を脱しないため当院救急救命センターへ転送された。入院6時間後に死亡した。胸部レ線で肺水腫がみられたが心拡大はなく、心臓超音波検査では心筋の収縮不全がみられた。胸部のみの剖検が許可されたが、明らかな心筋炎は認められなかった。

症例2：15カ月男児。8月17日手足口病に罹患したが、元気にしていた。21日未明から元気がなかったが、意識は清明であった。21日朝、近医を受診したが、医院の前で嘔吐後、心肺停止となった。当院へ搬送され蘇生されたが、入院4時間後に死亡した。髄液細胞増多(106/3, 単核球優位)がみられた。

症例3：5カ月男児。9月25日から発熱したが、元気にしていた。28日朝から多呼吸・頻脈で視線が合わず、急病診療所を受診、二次後送病院で気管内挿管を受け、

当院へ転送された。治療に反応せず12時間後に死亡した。髄液細胞増(1220/3)、肺水腫が認められた。また、入院後肝機能異常、播種性血管内凝固症候群(DIC)などの多臓器不全の所見がみられたが、二次的な事象であろうと考えられた。

症例1、2からのウイルス分離は陰性であったが、症例3からはEV71が分離された。

82名について中和抗体測定を行った結果、抗体保有率はC7/97に対して41/82(50%)、1095/97に対して40/82(49%)とほぼ同率であった。また抗体陽性者の平均抗体価は両者共に $2^{4.8}$ と同じ価であった(図1, 2)。

D. 考察

1997年4月～7月にかけてマレーシアのカリマンタン(旧ボルネオ)島サラワク州にて手足口病の流行があり、31人の乳幼児が死亡した。手足口病様の発疹と2～3日の発熱後に急に呼吸循環不全となり、入院後24時間以内に死亡したと報告されている。一方、マレー半島では4例の乳幼児の急死例(うち手足口病1例、口内炎1例)があり、剖検にて延髄を中心とした脳幹脳炎と診断され、全例EV71が神経組織から分離されている。サラワクとマレー半島の死亡例はいずれも肺水腫があったという。我々の例も含め、これらの報告に共通しているのは、ポリオに比し、EV71ではポリオ様麻痺よりも延髄型(bulbar form)が多く、肺水腫を伴い急激な経過で死亡するという臨床像である

う。

今回の3例中、1例はウイルス学的にEV71が証明された。手足口病に併発した2例からはウイルスが分離されなかったが、1997年度は全国的にEV71が優勢的に流行し、近畿地方においても同様であった(図3)ことから、この2例についてもEV71が関与したものと推察された。症例3から分離されたEV71は国立感染症研究所でシーケンシングされ、サラワクの死亡例より分離されたEV71にきわめて近い塩基配列であることが明らかになった。サラワク型を含めた異なるGenotypeのEV71を用いた血清疫学の結果から、Genotype SおよびJ間には抗原性の差異はほとんどないと推察されたが、さらに病原性の解析をすすめる必要があると思われる。

E. 発表

塩見正司、外川正生、奥野良信；手足口病またはEnterovirus 71にともなって急死した乳幼児の3症例、第72回日本感染症学会総会、1998.4 (大阪市)

清水博之、萩原昭夫、山崎謙治、奥野良信ほか；日本のエンテロウイルス71感染症の分子疫学、第39回日本臨床ウイルス学会、1998.6 (札幌市)

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、IASR, 19(3), 1998