

図1 EV71 中和抗体保有率 (累積)

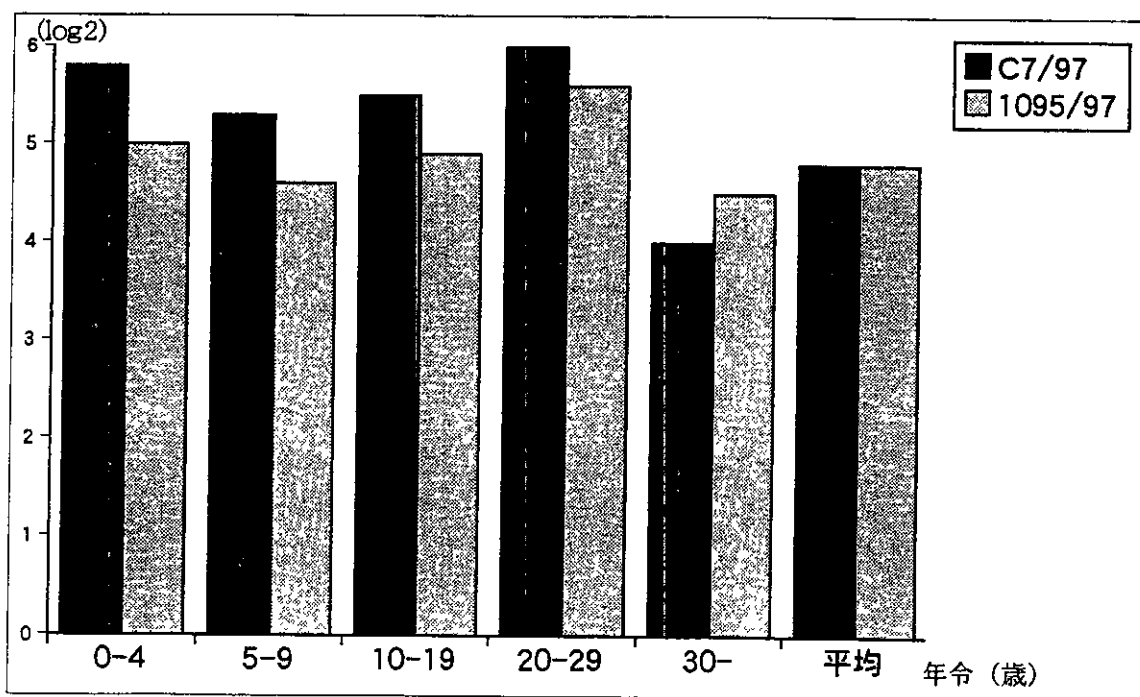


図2 抗体陽性者の中和抗体価

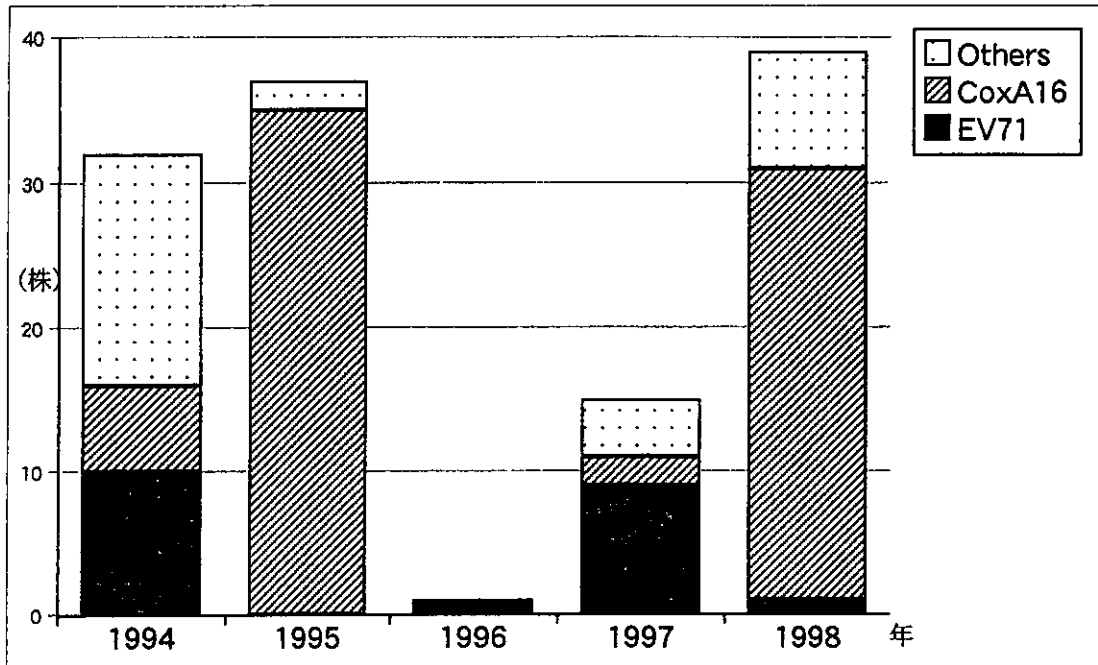


図3 手足口病からの分離ウイルス（近畿）

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

(代表研究者：萩原昭夫)

病理学的研究

分担研究者	岩崎琢也	国立感染症研究所	感染病理部室長
研究協力者	永田典代、長谷川秀樹	国立感染症研究所	感染病理部
	波多野いく持、原嶋綾子	国立感染症研究所	安全性研究部
	清水博之	国立感染症研究所	ウイルス二部
	網 康至	国立感染症研究所	動物管理室
	倉田 毅	国立感染症研究所	感染病理部部長

研究要旨 1997年と1998年にマレーシアと台湾で重篤な臨床症状を示して急死する小児例が相次いで報告され、エンテロウイルス71が分離された。この分離されたエンテロウイルス71の病原性の解明と人体例でのウイルス感染のウイルス病理学的同定方法開発の目的で研究を行った。具体的にはカニクイサルにエンテロウイルス71の種々の株を腰髄内接種し、経時的に観察し、屠殺し、神経組織を含めた全身の諸臓器を病理学的に解析した。さらに、この剖検組織内でのウイルス局在を明らかにするための抗体の作製を試み、ホルマリン固定パラフィン包埋組織上でウイルス感染細胞を免疫組織化学的に同定することができた。このことにより、人体感染例での病理学的診断もレトロスペクティブに可能になった。

A 研究目的

1997年と1998年にマレーシアと台湾で重篤な臨床症状を示して急死する小児例が相次いで報告され、エンテロウイルス71が分離された。エンテロウイルス71は米国カリフォルニア州において重篤な神経症状を伴う感染の流行(1974年)に初めて分離され、このうちChDa株は脳炎を来した死亡例の脳より分離され、BrCr株は無菌性髄膜炎症例の便より分離された(Schmidt et al. J Infect Dis 129: 304-309, 1974)。

エンテロウイルスはポリオウイルスとともにピコルナウイルス科エンテロウイルス属に分類され、この感染は通常手足口病、上気道炎等の軽微で自然治癒に至る臨床症状を示すが、ときにこのような致死感染を伴う小流行を引き起こしている。

エンテロウイルス71の神経病原性は十分に解明されておらず、文献的にはBrCr株の脊髄(腰髄)内接種に伴う神経症状ならびに神経組織の病理像を解析した本研究の萩原・橋本らの研究(Hashimoto et al. Arch Virol 56: 257-261, 1978; Hashimoto & Hagiwara. Acta

Neuropathol 60: 266-270, 1983)があるのみで、新たに分離されたエンテロウイルス71株との相関性ならびに個々の野生株の神経病原性は現時点では不明である。種々のエンテロウイルス71株の神経病原性を明らかにするため、BrCr株を含め、5株のエンテロウイルス71をカニクイサル腰髄に接種し、神経組織を中心に、全身の諸臓器を病理学的に解析した。さらに、この剖検組織内でのウイルス局在を明らかにするための抗体の作製を試みた。

B 材料と方法

動物：育成カニクイサル(筑波霊長類センター)(7-14年齢、雌)を使用した。

ウイルス：エンテロウイルス71の5種類の株 BrCr, SK/EV006, C7/Osaka, Shiga 1095, Nagoya を使用した。これらの株はVero細胞で継代し、ウイルス定量を行った。BrCr株はSchmidtらにより分離された株で10代以上の継代が行われている。SK/EV006株とC7/Osaka株は死亡例より分離された野生株、Shiga 1095

株と Nagoya 株は手足口病患者から分離された株であり、前者は野生株、後者は 10 代以上の継代が行われている。

接種：エンテロウイルス 71 を Vero 細胞で定量後、 $10^{6.5}$ TCID₅₀/100 μl となるように調整し、ケタラール・キシラジン混合液の麻酔下で、それぞれの株について、3 頭のカニクイサルの腰髄に接種した。

病理学的解析：深麻酔下で、脱血を行い、脳ならびに脊髄組織、心、肺、肝、腎、脾、胸腺、リンパ節等の種々の組織を採取した。一部を凍結保存し、残りの組織は 4%ホルマリン/磷酸緩衝液 (pH7.4) に 2 昼夜浸漬した後パラフィン包埋を行った。2.5 μm のパラフィン切片を作成後、hematoxylin-eosin 染色を行い、さらに神経組織は Klüver-Barrera 染色も行った。

抗体作製：国立感染症研究所ウイルス 2 部清水博之博士より提供を受けたエンテロウイルス 71 精製ウイルス粒子を、ドデシル硫酸ナトリウム中で変性を加え、その後、PBS にて 1 倍に希釈し、Freund complete アジュバンドもしくはアルミニウムアジュバンドと一緒に New Zealand 白ウサギの皮下に免疫した。免疫は計 7 回行った。初回免疫後 76 日目に全採血を行った。

感染細胞セルブロック作製：Vero 細胞に MOI (multiplicity of infection) 10 で Shiga1095 株と C7/Osaka 株を感染させ、感染後 Shiga1095 株は 72 時間、C7/Osaka 株は 48 時間に 4%ホルマリン/磷酸緩衝液 (pH7.4) で固定し、セルスクレーパーで回収し、パラフィンに包埋し、2.5 μm のパラフィン切片を作製した。

免疫組織化学：パラフィン切片を脱パラフィン後、親水化し、0.3% H_2O_2 /メタノール溶液中で内因性ペルオキシダーゼ活性を不活化し、正常山羊血清と反応後、一定濃度に希釈した抗エンテロウイルス 71 ウサギ血清と、1 晩 4°C にて反応させ、洗浄後、ビオチン標識抗ウサギ免疫グロブリン抗体と反応、更に洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンと反応させた。結合した抗体の局在は DAB を基質として酵素反応を行うことにより検出した。さらに、ヘマトキシリンで核染色した。

C 結果

神経症状：BrCr 株ならびに Nagoya 株の 2 種の laboratory strains が接種されたカニクイサル (4183, 3984, 4185 ならびに 4195, 4196, 4184) は接種後早期に重篤な神経症状 (下肢の麻痺) が出現し、4-6 日目に屠殺した。一方、野生株の SK/EV006, C7/Osaka, Shiga 1095 株を接種したカニクイサル (4186, 4187, 4188; 4189, 4190, 4191; 4192, 4193, 4194) では早期に下肢の麻痺が出現するサルもいたが、錐体路症状は軽度であった。しかし、接種後 7-9 日に振戦、失調症を認める頻度が高かった (8/9)。

神経病理学的変化：解剖は、接種後 4 日目に降、臨床症状が重篤なものから行った。最終的にはウイルス接種後 10 日目に全頭の解剖を行った。全例の脳もしくは脳幹部、脊髄の灰白質に神経細胞の空胞変性と好酸性変化、好中球や単核系細胞による神経貪食像 neuronophagia が生じ、さらに好中球を主体とする vascular cuffing が認められた (図 1, 2, 3a)。また、くも膜下にリンパ球を主体とする細胞浸潤がみられた。これらの病変は接種後早期に解剖したものでは炎症性反応が比較的弱く、接種後 10 日目前後に解剖した例では炎症性反応が比較的広範で強かった。

抗エンテロウイルス 71 抗体：2 種のエンテロウイルス株をそれぞれ感染させた Vero 細胞のセルブロックの薄切切片上において、変性ウイルス粒子で免疫したウサギ血清の抗体価について免疫組織化学的に検討した。この解析において、比較のため、熱変性処理ウイルス粒子の免疫で作製した中和活性のある抗エンテロウイルス 71 ウサギ血清についても検討した (表)。

ウイルス抗原の免疫組織学的検出：前項で至適濃度が決定した抗変性エンテロウイルス 71 (Shiga1095) ウサギ血清を使用して、パラフィン切片上でウイルス構成蛋白の局在について検討を行った。その結果、病変部に一致して一部の神経細胞の細胞質が陽性となり (図 3b)、比較においた、正常サル脳組織は陰性であった。抗原陽性細胞はほとんどが変性、壊死に陥った神経細胞であったが、HE 上で病変がみとめられた細胞でもウイルス抗原が陰性のものもあった。しかし、その区別は

HE 上では困難であった。また、ウイルス抗原陽性細胞は脳幹部を中心に認められた。血管内皮細胞、膠細胞ならびにリンパ系細胞の陽性細胞は認められなかった。ウイルス抗原が陽性であったものは接種後 4-5 日で死亡した例のみであり、接種後 7 日以上の場合では陰性であった。

D 考察

エンテロウイルス 71 は通常は軽微な感染症を来すが、ときに無菌性髄膜炎もしくは脳炎、脳幹部脳炎をきたし、宿主、特に幼児に、致死的感染を引き起こす。この病原性の違いが、ウイルスの株の違いによるものか、宿主の免疫あるいは他の要因によるものかは現時点では不明である。

今回の解析は一度培養細胞で増殖させたウイルス粒子を脊髄内に直接接種している点で、自然感染とは異なっている。しかし、現時点で、ウイルスの経口感染で神経病変をサルにおいてコンスタントに引き起こすエンテロウイルス 71 の感染実験モデルが成立していないため、ポリオウイルスの感染実験同様、神経組織内の直接接種による解析により、エンテロウイルスの神経病原性を明らかにすることができる。

今回のカニクイサル実験でもっとも注目すべき結果は、①脳炎症例と手足口病症例それぞれから分離されたウイルスの神経病原性がほぼ同様であったこと、②実験室株として長く培養細胞で継代していたウイルス株が野生株よりも強毒であった点である。前者の結果は神経病原性が宿主側因子によっている可能性を強く示唆している。

一方、今回作製した抗エンテロウイルス 71 ウサギ血清を用いることにより、ホルマリン固定組織のパラフィン切片上でウイルス抗原の検出が可能となった。この抗体を使用することにより、日常診療で遭遇する致死的感染例の診断も可能と考える。しかし、接種後 4-5 日で死亡した例においてはウイルス抗原の免疫組織学的検出が可能であり、接種後 7 日以上の場合では不可能であったことからして、時間が経過した例でのウイルス抗原の検出が困難と考える。

E. 結論

脳炎症例と手足口病症例それぞれから分離されたウ

イルス株および実験室株いずれのエンテロウイルス 71 もカニクイサル腰髄内接種により神経病原性を示すことが明らかになった。また、人体剖検例でのウイルス局在を明らかにするための抗体を作製し、ホルマリン固定パラフィン包埋組織上でウイルス感染細胞を検出することにより人体感染例での病理学的診断もレトロスペクティブに可能となった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Chen Z, Sahashi Y, Matsuo K, Asanuma H, Takahashi H, Iwasaki T, Suzuki Y, Aizawa C, Kurata T, Tamura S: Comparison of the ability of viral protein-expressing plasmid DNAs to protect against influenza. *Vaccine* 16: 1544-1549, 1998

Mitsuishi T, Sata T, Iwasaki T, Matsukura T, Manaka I, Nogita T, Ohara K, Kawashima M: The detection of human papillomavirus 16 DNA in erythroplasia of Queyrat invading the urethra. *Br J Dermatol* 138: 188-203, 1998

Yoshikawa T, Suzuki K, Ihira M, Furukawa H, Suga S, Iwasaki T, Kurata T, Asanuma K, Tanaka K, Asano Y: Human herpesvirus 6 latently infects mononuclear cells but not liver tissue. *J Clin Pathol* 52: 65-67, 1999

Iwasaki T, Tamura S, Kumasaka T, Sato Y, Hasegawa H, Asanuma H, Aizawa S, Yanagihara R, Kurata T: Exacerbation of influenzavirus pneumonia by intranasal administration of surfactant in a mouse model. *Arch Virol* (in press)

Chiba N, Iwasaki T, Mizutani T, Kariwa H, Kurata T, Takashima I: Pathogenicity of tick-borne encephalitis isolated in Hokkaido, Japan in mouse model. *Vaccine* (in press)

Chen Z, Matsuo K, Asanuma H, Takahashi H, Iwasaki T, Suzuki Y, Aizawa C, Kurata T, Tamura S: Enhanced protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with both hemagglutinin- and neuraminidase-expressing DNAs. *Vaccine* 17: 653-659, 1999

2. 学会発表

熊坂利夫、佐多徹太郎、岩崎琢也、植草俊公、須田耕一、倉田毅: 膠原病肺における KHSV (HHV8) の検出。第 87 回日本病理学会総会 1998, 4, 東京
岩崎琢也、笠原健弘、佐藤由子、佐多徹太郎、倉田毅: VZV 感染における前初期蛋白 ORF63 産物の発現。第 87 回日本病理学会総会 1998, 4, 東京
千葉暢行、岩崎琢也、水谷哲也、刈和宏明、倉田毅、高島郁夫: ダニ脳炎ウイルス北海道分離株のマウスに対する病原性。第 46 回日本ウイルス学会総会

1998,10, 東京

永田典代、網康至、吉井久美子、須崎百合子、原島綾子、岩崎琢也、倉田毅: ポリオウイルスレセプター遺伝子導入トランスジェニックマウス PVR-Tg21) とカニクイサルにおけるポリオウイルス病原性の比較。第 46 回日本ウイルス学会総会 1998,10, 東京

荒尾雄二郎、岩崎琢也、山田雅夫、倉田毅: Human herpesvirus 6 variant B (HHV-6B) によるヒト単球系 U937 細胞の増殖抑制は HHV-6B 複製によらず、連鎖反動的に拡大する。第 46 回日本ウイルス学会総会 1998,10, 東京

岩崎琢也、佐藤由子、谷口貴代美、熊坂利夫、田村慎一、倉田毅: インフルエンザウイルス気道感染に及ぼすサーファクタントの影響。第 46 回日本ウイルス学会総会 1998,10, 東京

陳則、松尾和俊、浅沼秀樹、高橋秀宗、岩崎琢也、倉田毅、田村慎一、鈴木雄二郎、相沢主税: インフルエンザウイルスの主要な蛋白質を発現するプラスミド DNA の感染防御能力の比較。第 46 回日本ウイルス学会総会 1998,10, 東京

松尾和俊、陳則、浅沼秀樹、岩崎琢也、倉田毅、田村慎一、鈴木雄二郎、相沢主税: インフルエンザウイルス経鼻感染および経鼻ワクチン接種時のマウス NALT 領域でのサイトカイン mRNA の比較。第 46 回日本ウイルス学会総会 1998,10, 東京

表 感染細胞セルブロックを用いた抗エンテロウイルス71抗体の抗体価の検討

ウサギ血清	抗原	変性	C7/Osaka感染細胞	Shiga1095感染細胞
1	C7/Osaka	SDS処理	X8000	X4000
2		熱処理	X4000	X1000
3	Shiga1095	SDS処理	X8000	X4000
4		熱処理	X8000	X4000

図 EV71 脊髄内接種カニクイザルの小脳病理組織所見 (接種後4日目)

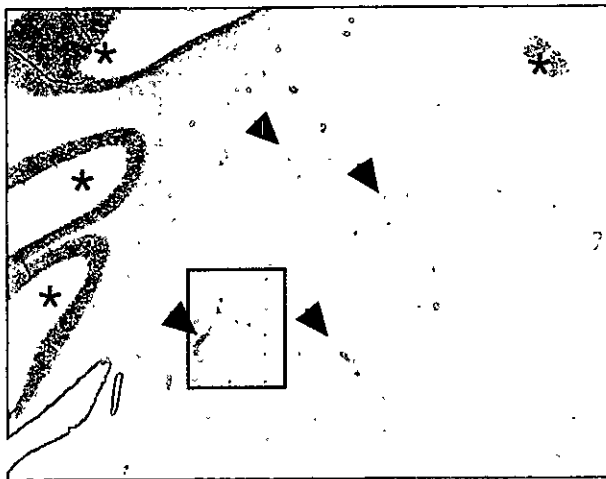


図1：小脳歯状核 (X5)
*：小脳皮質と顆粒層
▲：血管周囲性細胞浸潤

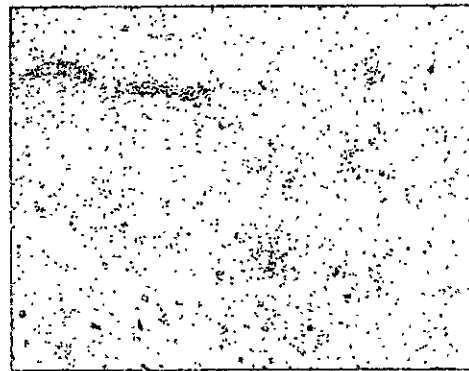


図2：同部位 (X25)

神経細胞の変性、萎縮、壊死とそれに伴う好中球および単核系細胞を主体とする神経食現象がみられた。また、好中球、単核系細胞を主体とする血管周囲性細胞浸潤が認められた。



図3a: 同部位 (X100)

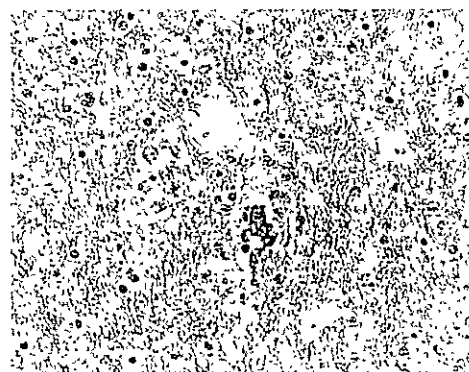


図3b: 同部位、ABC法 (X100)

核の濃縮もしくは消失がみられる、好酸性萎縮した神経細胞の細胞質内において、ウイルス抗原は陽性であった。

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

分担研究者： 網 康至

協力研究者： 永田典代、岩崎琢也、須崎百合子、清水博之、萩原昭夫（国立感染症研究所）

【要旨】近年、マレーシア及び台湾において、大規模な手足口病流行に伴い小児の急性死症例が多発した。重症例を含む手足口病患者からエンテロウイルス 71 が分離され、死亡例の中枢神経組織から感染性ウイルス及びウイルス抗原が検出されたことから、EV71 感染による急性脳炎(エンテロウイルス 71 脳炎)が直接の死亡原因であると考えられている。エンテロウイルス 71 は非ポリオエンテロウイルスの中では中枢親和性が強く、時として麻痺・脳炎等重篤な疾患の原因となることが知られている。今回流行したエンテロウイルス 71 の中枢神経病原性を評価し、EV71 感染症の重篤化の原因を検討するため、カニクイザル感染モデルにより、エンテロウイルス 71 標準株由来の温度感受性変異株の病原性を検討した。温度感受性株は、温度非感受性株と比較してカニクイザル感染モデルにおける中枢神経病原性が顕著に低下している事を中枢神経症状の発現から確認した。カニクイザル感染モデルは、エンテロウイルス 71 脳炎モデルとして有用であることが示された。

【研究目的】

エンテロウイルス 71(EV71)は、手足口病の原因ウイルスとして、日本に常在している。その一方、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合併症の発症にも関与している。1970 年代には、ブルガリア及びハンガリーにおいてポリオ様麻痺を主徴とする EV71 による中枢神経合併症の流行により、いずれも 40 名以上の死亡例が報告されている。その後も、EV71 感染の関与が疑われる重篤な中枢神経合併症の散発例が世界各地で報告されている。

マレーシアでは 1997 年 6 月、台湾では翌年 6 月を中心に、EV71 感染による大規模な手足口病流行が発生し、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。直接的な死亡原因の多くは激症型肺水腫であり、激症型肺水腫の発現は中枢神経症状と密接に関連していた。重症例で多く認められた中枢神経症状は、脳幹脳炎あるいは菱脳炎であり、発熱、ミオクローヌス、振戦、運動失調、頭痛、嗜眠、嘔吐等の症状が認められた。肺を含む中枢神経組織以外の組織からは EV71 は分離されておらず、直接の死亡原因は EV71 感染による中枢神経障害による可能性が高いが、EV71 脳炎の発現機序には、まだ不明な点が多い。

EV71 の病原性及び EV71 脳炎発症機構を解析するためには、適切な動物実験モデルの開発が必要とされる。一般に、ヒトエンテロウイルスは自然宿主域が狭く、小動物を用いた感染実験系は限られている。ポリオウイルスの場合は宿主レセプター分子が遺伝子クローニングされており、レセプター発現トランスジェニックマウスを開発することにより、ヒトの病態を反映した小動物実験系が可能となったが、EV71 のレセプターは同定されておらず、小動物を用いた感染実験の報告はほとんど無い。

本研究所では以前より、カニクイザル感染系において、EV71 が中枢神経病原性を示すことを報告してきた(表 1)。今回、このカニクイザル感染系がヒトにおける EV71 脳炎の臨床症状を反映したモデルであることを確認するとともに、EV71 の弱毒化に関するウイルス遺伝子領域解析への応用の可能性についての検討を行なった。

【研究方法】

使用動物：カニクイザル(筑波霊長類センター、12~18 年齢、♀)を使用した。各群 3 頭のサルを使用した。

ウイルス：EV71 標準株である BrCr 株から、F-Vero 細胞でブラッククローニングすることにより、温度感受性株を分離した。39.5/35℃における感染価(TCID₅₀)の比が 10⁴ 以上のクローンを ts クローンとした。39.5/35℃の比が 10⁴ 以下のクローンを tr クローンとした。

ウイルス接種： $10^{5.5}$ TCID₅₀/0.1ml に調整したウイルス希釈液を、ケタラル麻酔下のカニクイザルに脊髄内接種した。

病理学的解析：深麻酔下脱血による安楽死後、中枢神経組織および主要臓器を採取した。ウイルス分離用に一部の組織は凍結保存し、残りは4%ホルマリン/リン酸緩衝液に浸漬後、パラフィン包埋した。パラフィン切片を作成後、hematoxylin-eosin 染色及び Klüver-Barrera 染色を行なった。

ウイルス抗原の検出及びウイルス分離：組織中のウイルス抗原検出には、SDS 変性 EV71 ウイルス粒子を抗原として免疫したウサギから採取したポリクローナル抗体を用いた。EV71 抗原の免疫組織染色は、ビオチン/ストレプトアビジン染色により行なった。

組織中感染性ウイルス量の測定のため、凍結した神経組織を融解して、9 倍量(w/w)の PBS(+)添加後、ミニベッセルを用いて神経組織を破碎した。組織懸濁液を 10000rpm, 5 分, 4°C で遠心分離した後、上清を段階希釈して、F-Vero 細胞によりウイルス感染価を測定した。

【結果】

温度感受性株の分離

萩原等が以前作製した温度感受性株 BrCr/ts 株を種ウイルスとし、F-Vero 細胞で再増殖させ、このウイルスをカニクイザルに脊髄内接種したところ、麻痺の発現等比較的強い神経毒性を示した(データ未提出)。種ウイルス(BrCr/ts/original)の温度感受性を再度検討したところ、39.5°C で増殖可能なブラック・クロンが混在していた。そこで、再度 3 回ブラッククロニングを行うことにより、新たな温度感受性種ウイルス(35C-1~C-3、表 2)をクロニングした。BrCr/ts/original からブラッククロニングし、温度非感受性であったクロンを 39C-1~C-3 とした(表 2)。

中枢神経症状の観察

これまでの感染実験の結果から、EV71 標準株である BrCr 株(親株)は、カニクイザル脊髄内接種によって、麻痺等重篤な中枢神経症状を呈するこちが明らかとなっている(表 1)。今回再クロニングしたウイルスのうち、温度非感受性であった BrCr/39C-1 株は、強い神経病原性を示した。BrCr/39C-1 株を接種した 3 頭のカニクイザルは、いずれも感染後 3 日以内に顕著な下肢の麻痺が認められた(図 1)。そのうちの 1 頭(4334)では、運動失調・振戦等の神経症状の発現も認められた。

温度感受性であった BrCr/35C-1 株を接種し

た群は、BrCr/39C-1 株接種群と比較して、神経症状の発現が明らかに低下していた(図 1)。3 頭の 1 頭では、軽度の麻痺が認められたが、他の 2 頭では、中枢神経症状の発現は観察されなかった。

温度感受性株の分離

組織内感染性ウイルス量の測定および病理学的解析については、現在実施中である。

【考察】

臨床知見から示されているように、EV71 は中枢神経親和性の比較的強い非ポリオエンテロウイルスである。マレーシア・台湾における EV71 脳炎の流行により、非ポリオエンテロウイルスによる再興感染症として、EV71 感染症に対する注意が必要となっている。しかし、EV71 脳炎の発症に関与するウイルス側・宿主側要因については、今のところ、ほとんど分かっていない。

本実験により、カニクイザル感染モデルが EV71 脳炎のモデルとして有用であることが確認された。カニクイザルは EV71 脊髄内感染により、重篤な中枢神経症状を呈し、麻痺の発現だけでなく運動失調・振戦等、EV71 脳炎症例に特徴的な臨床症状も認められた。また、温度感受性株と非感受性株の神経症状が明らかに異なることから、ウイルス神経毒性の評価に、この感染系が応用可能であることが示された。現在、EV71 の弱毒化に関する遺伝子領域の解析を行っており、その評価系として、カニクイザル感染系は有用である。また、将来的な弱毒化ワクチンの評価系としての応用も可能である。

【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: 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、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 回日本臨床ウイルス学会, 1999 年 6 月, 大阪

表 1. カニクイザルにおけるEV71の病原性の検討
(これまでの報告)

EV71株	接種経路	おもな症状	Reference
Nagoya	皮下	麻痺 (3/6)	Hashimoto, I. <i>et al.</i> Arch. Virol. 56 (1978)
Nagoya	経口	麻痺 (1/10)	Hashimoto, I. <i>et al.</i> Neuropathol Appl Neurobiol. 8 (1982)
Nagoya	脊髄内	麻痺 (3/5)	Hashimoto, I. <i>et al.</i> Acta Neuropathol. 58 (1982)
BrCr (tr/ts)	脊髄内	麻痺 (ts 0/6, tr 3/4)	Hashimoto, I. <i>et al.</i> Acta Neuropathol. 60 (1983)
Nagoya, Ehime Yamanashi Bulgaria, Hungary等	脊髄内	麻痺 (Nagoya, Bulgaria, Hungaryが強い病原性)	Hagiwara, A. <i>et al.</i> Arch. Virol. 79 (1984)

表 2. 温度感受性株のクローニング

Clone	log [TCID ₅₀ /0.05 ml]		Δ TCID ₅₀ (35 - 39.5)
	at 35°C	at 39.5 °C	
35C-1 (ts)	5.75	1.0	4.75
35C-2 (ts)	5.50	1.25	4.25
35C-3 (ts)	5.25	0.75	4.50
39C-1 (tr)	6.25	5.25	1.0
39C-2 (tr)	5.50	5.0	0.5
39C-3 (tr)	5.75	5.50	0.25

感染価 (TCID₅₀) の測定は、F-Ver o細胞を用いて行なった

図1 EV71温度感受性/非感受性株接種カニクイザルの臨床症状

Virus	No.	Symptom	Days after infection						
			0	1	2	3	4	5	
39C-1 (tr)	4334	Paralysis			+	++	+++	++++	
		Ataxia					+		
		Tremor					+	++	
		Weakness						+	
	4335	Paralysis		+	++	+++	sacrificed		
		Ataxia							
		Tremor							
		Weakness				+			
	4337	Paralysis			+	++	sacrificed		
		Ataxia							
		Tremor							
		Weakness							
35C-1 (ts)	4338	Paralysis							
		Ataxia							
		Tremor							
		Weakness							
	4339	Paralysis		+	++	+++	++++	++++	
		Ataxia							
		Tremor							
		Weakness							
	4340	Paralysis							
		Ataxia							
		Tremor							
		Weakness							



19980505

これ以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
下記の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

研究成果の刊行に関する一覧表

Enterovirus 71 from fatal and nonfatal cases of hand, foot and mouth disease epidemics in Malaysia, Japan and Taiwan in 1997-1998.

Shimizu H, Utama A, Yoshii K, Yoshida H, Yoneyama T, Sinniah M, Yusof MA, Okuno Y, Okabe N, Shih SR, Chen HY, Wang GR, Kao CL, Chang KS, Miyamura T, Hagiwara A.

Jpn J Infect Dis. 1999 Feb;52(1):12-5.

手足口病

清水博之

感染炎症免疫 29 P.40-41 1999

非ポリオエンテロウイルス感染症の実験室診断

清水博之

日本臨床 57 P.336-339 1999