

表1 手足口病患者から分離されたウイルス(滋賀県)

ウイルス型	年次				計
	1997	1998	1999	2000	
エンテロウイルス71型	10			10	20
コクサッキーウイルスA16型		8	3	6	17
コクサッキーウイルスA6型		1	5		6
コクサッキーウイルスA4型		2			2
エコーウイルス25型				1	1
未同定	2	1		1	4
計	12	12	8	18	50

数字は分離株数

表2 年次別、保健所管内別、手足口病年間患者数(滋賀県・1997-2000)

年次	1997	1998	1999	2000
保健所管内別				
大津	29.5	88.1	21.4	37.4
草津	44.0	50.5	6.9	77.1
水口	8.5	167.5	9.3	47.5
八日市	52.5	29.5	16.6	10.4
彦根	65.0	49.3	9.1	29.8
長浜	100.0	73.8	8.5	70.8
今津	146.0	22.0	23.0	47.0
県全体	57.43	52.20	13.75	52.37

数字は1定点当たり

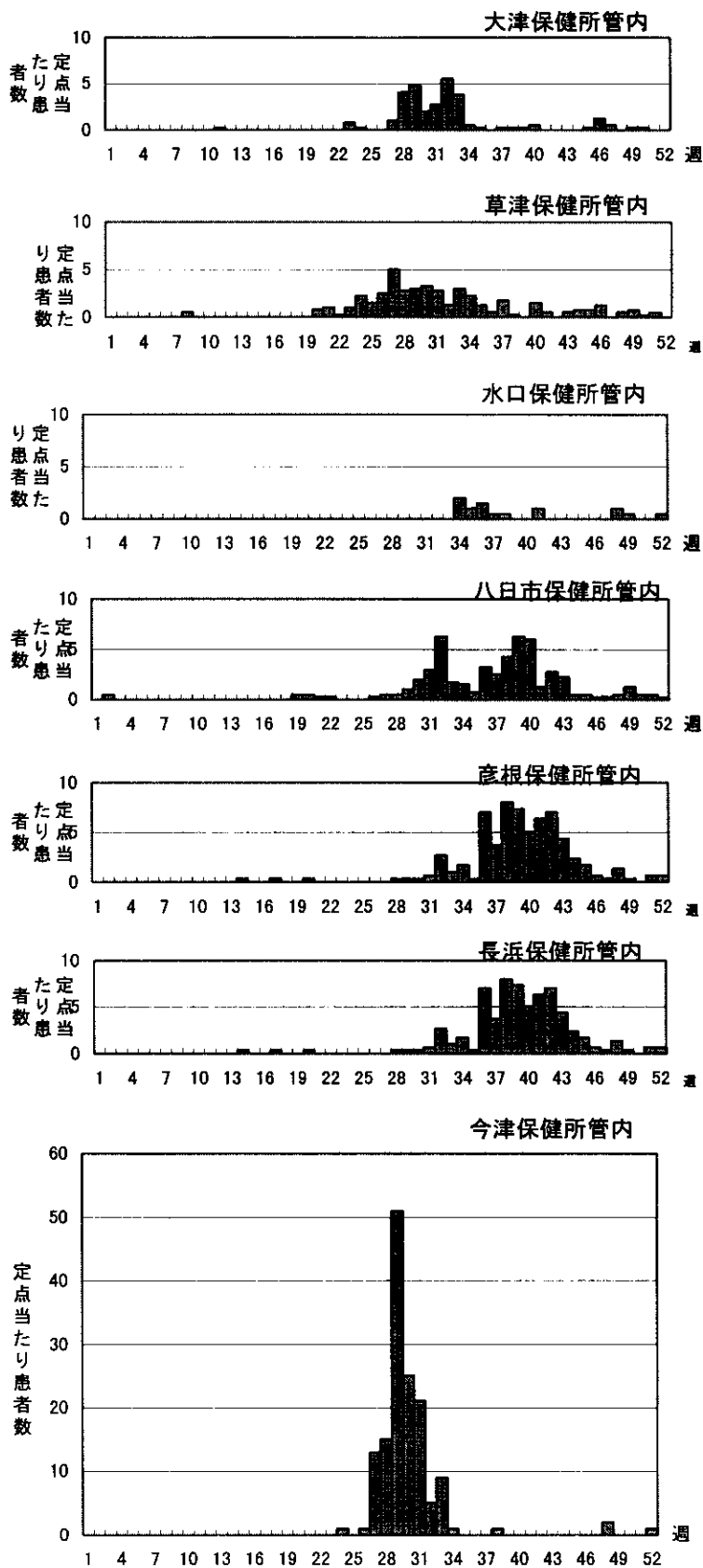


図1 手足口病の保健所別、週別定点当たり患者数（滋賀県・1997年）

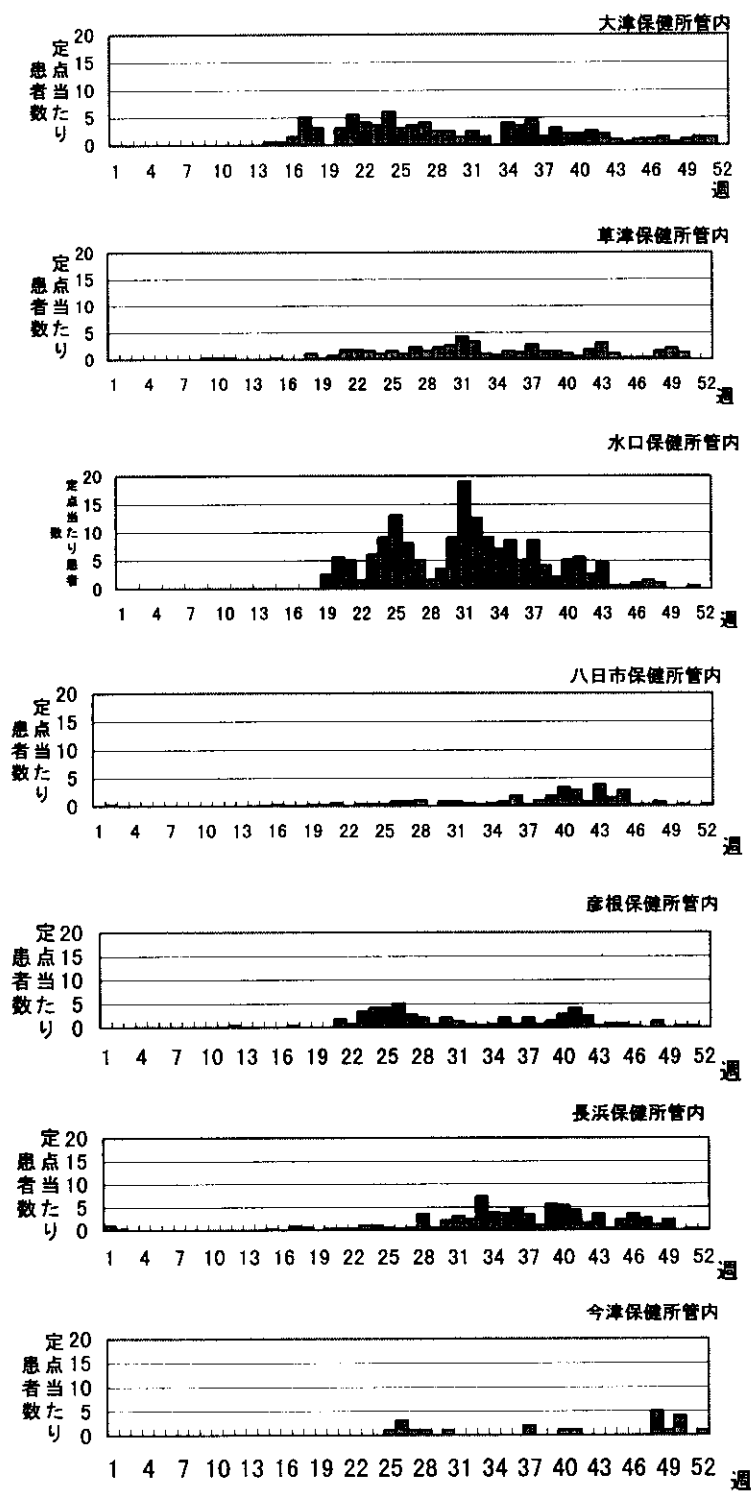


図2 手足口病の保健所別、週別定点当たり患者数（滋賀県・1998年）

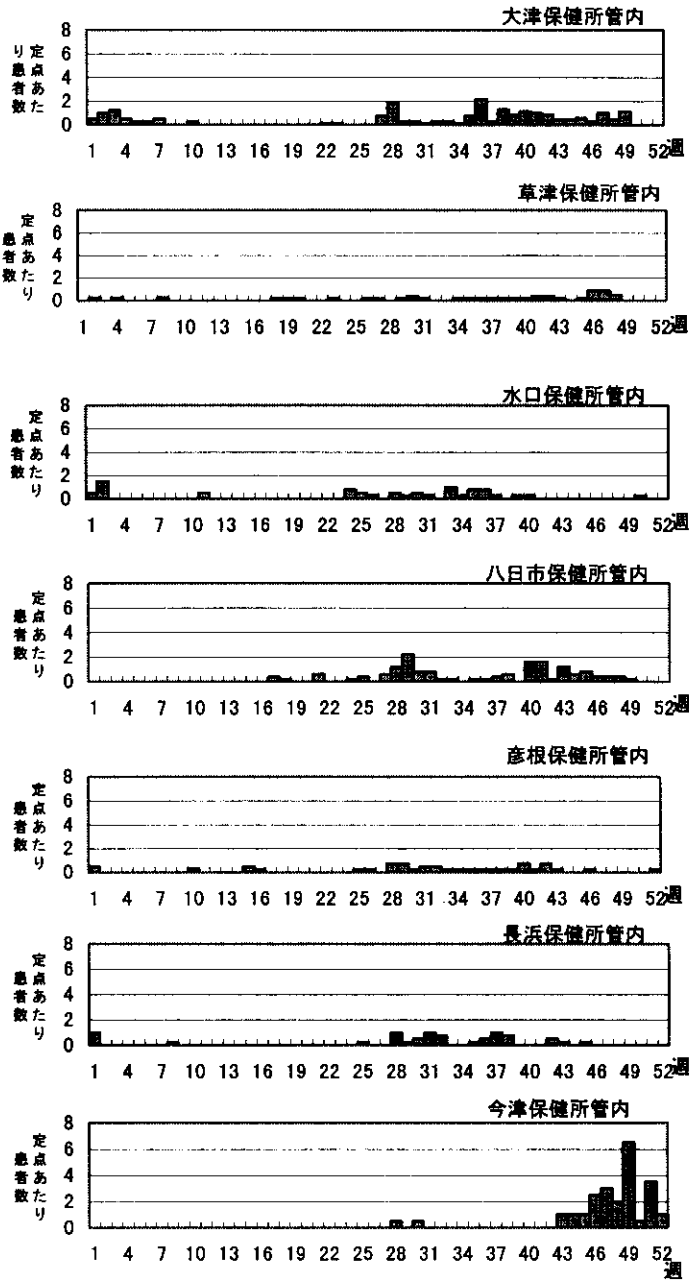


図3 手足口病の保健所別、週別定点当たり患者数（滋賀県・1999年）

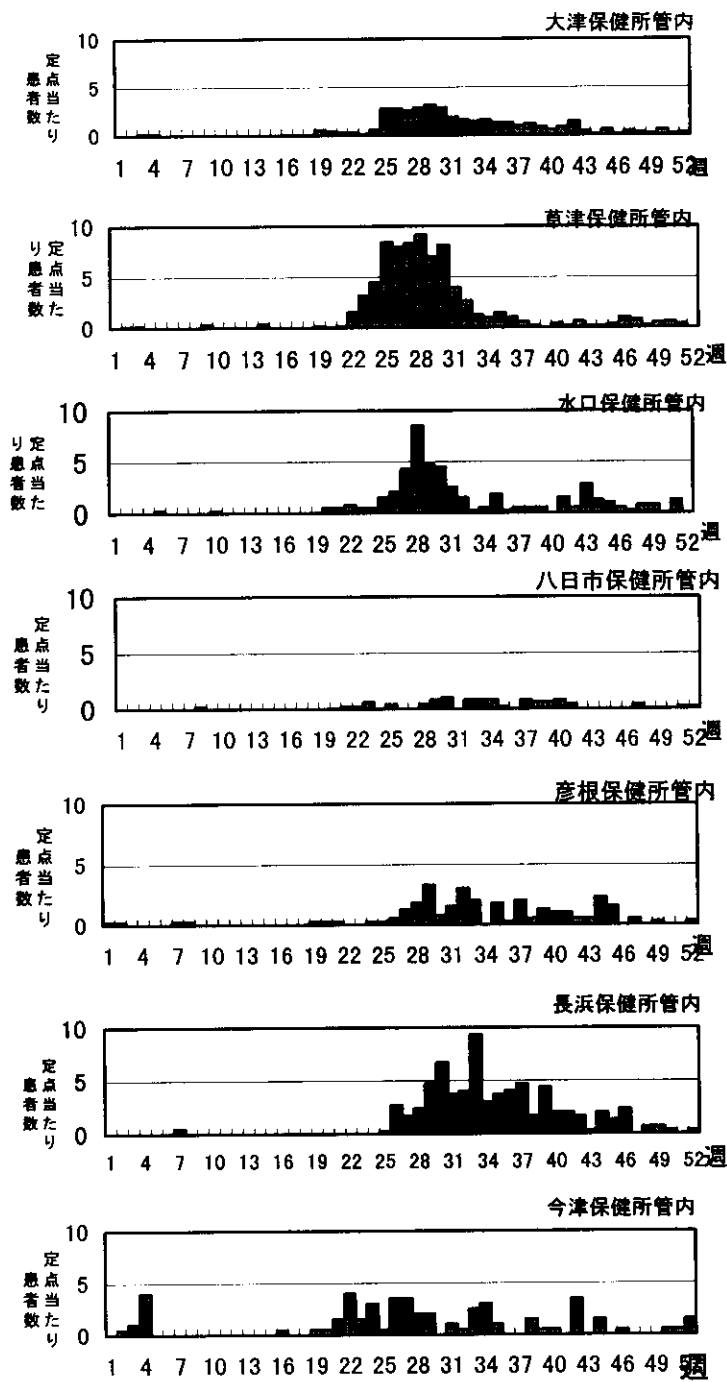


図4 手足口病の保健所別、週別定点当たり患者数（滋賀県・2000年）

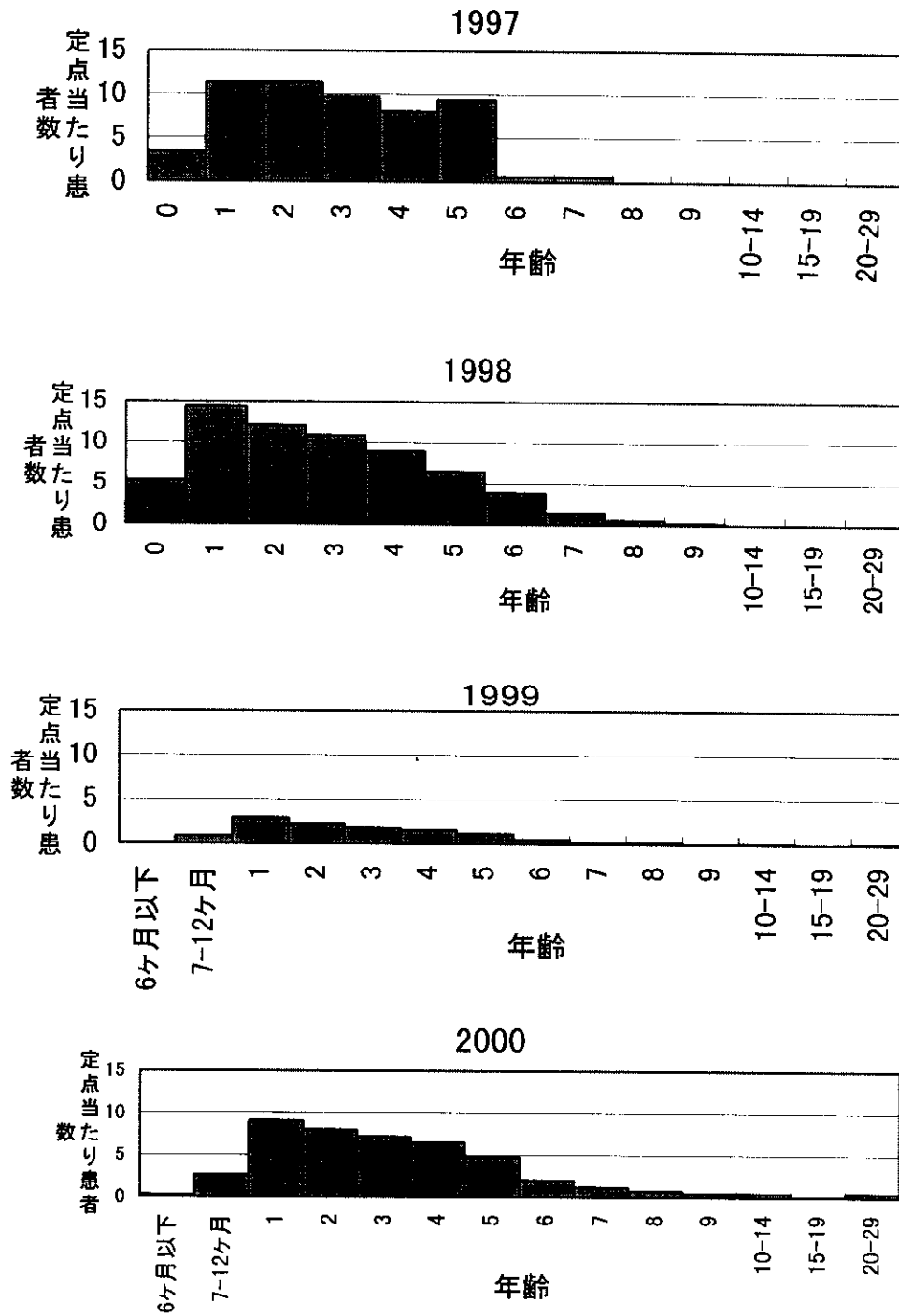


図5 手足口病患者の年齢分布(滋賀県・1997-2000)

していないので断定できないが、県全体では1997年に流行したEV71が、水口では1年後の1998年に流行したことも考えられる。また、1997年の今津の流行では7週間程度で収束したが、患者発生のパターンおよびその定点あたり患者数から、このときの流行の激しさを窺うことができる。

このような局地的な大流行あるいは他の地域とは時期のずれた流行など、地域的に偏った流行がおこる理由として、その流行地域が他の地域との交流が少ないという地域特性が考えられる。今津は県西部に位置しているが、他の地域に比べると県内他地域との交流頻度が低い。このため、他の地域とは異なる発生状況を示したものと考えられる。

1999年の第1週から第10週までとくに大津でHFMDの小流行が観察され、その病因としてCA6が分離されている。HFMD患者からよく分離されるウイルスとは異なった型のウイルスによる、季節外れの小流行である。また、当該地域におけるウイルス分離は実施できなかったが、1999年の第43週から2000年の第4週にかけて、今津で第49週をピークとするHFMDのまとまった流行が観察された。1999年の大津での冬季の流行も考えあわせると、HFMDは通常春から秋にかけて流行するが、状況によっては冬季にも流行すると考えられる。

HFMDの患者の年齢はほとんど5歳以下に分布し、とくに1歳が最も多い。しかし年齢の構成比率は年次によって異なり、1997年は1歳から5歳までほぼ同率である。この年の病因ウイルスはEV71であった。滋賀県内において確認された前回のEV71の流行は、1990年である。1990年から1997年までは、1992年および1995年において2回のHFMDのまとまった流行が観察されているが、このときの病因ウイルスはCA16であった。1997年のEV71の流行は、6年ぶりの流行であり、1990年の流行後生まれた年齢層が、一様にHFMDを発病したと考えられる。HFMDの患者は5歳以下に多いが、その構成年齢は流行年によって比率が異なり、病因

となったウイルスの以前の流行如何によって、変動すると考えられる。

HFMDは通常子供の病気とされるが、2000年の年齢別患者数で20-29歳層に若干患者発生があり、成人も発病していることを示している。さらにそれが女に多かったことは、HFMD患者の子供を持つ年齢層である母親が、子供とともにHFMDを発病していることが推測される。HFMD患者の性別は、2000年の1-5歳の年齢層で、男が女の1.4倍あり男に多かったが、成人では逆の現象が起きており、子供との接触機会の多い母親が子供から感染していることも考えられる。

#### E. 結論

HFMDの流行は年次により大小があり、同一年次でも地域ごとに流行規模および流行時期は異なる。とくに孤立した地域的では、他と大きく異なる流行を示すことがある。

子供の疾患とされるHFMDであるが、20-29歳の成人女性も発病している。

病因ウイルスは年次により異なり、主にEV71、CA16およびCA6が分離された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

横田陽子、大内好美、吉田智子、林賢一：エンテロウイルスを中心とした滋賀県のウイルス分離状況（1996年～1997年）。滋賀県立衛生環境センター所報、第33集、71-77,1998

横田陽子、大内好美、吉田智子、林賢一：エンテロウイルスを中心とした滋賀県のウイルス分離状況（1998～1999年）。滋賀県立衛生環境センター所報、第35集、51-57,2000

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 愛媛県におけるエンテロウイルス 71 型による手足口病の疫学

分担研究者 大瀬戸光明 (愛媛県立衛生環境研究所)

協力研究者 吉田紀美、近藤玲子、山下育孝 (愛媛県立衛生環境研究所)

### 研究要旨

最近、マレーシアや台湾で手足口病の流行時に小児の急性死が多発し、その原因としてエンテロウイルス 71 型(EV71)が重要視されている。2000 年夏には 3 年ぶりに EV71 による手足口病の流行がみられたので、地域的流行状況、ウイルスの抗原性、遺伝子型の分布、地域住民の血清疫学等を調査解析した。本年の EV71 分離株には、Genotype A と Genotype B がみられ、両遺伝子型が混合して流行していたことがわかった。しかし、両遺伝子型株の免疫血清を用いた交差中和試験では、両株間に抗原性の差異はみられなかった。

### A.研究目的

手足口病は、主に幼児を中心として夏期に流行する急性ウイルス性感染症である。病原ウイルスは、EV71 とコクサッキーウイルス A 群 16 型 (CA16) がその大半を占め、両者が交互に数年毎の間隔をおいて流行を繰り返している。我々は EV71 が中枢神経親和性を示し、無菌性髄膜炎等を併発する頻度が高いことから、従来から手足口病の流行実態の把握に努めてきた。2000 年 5 月から 7 月にかけて愛媛県において、1997 年以來 3 年ぶりに EV71 による手足口病の流行がみられた。そこで、手足口病の地域における流行状況、ウイルスの抗原性の変異、遺伝子型の分布等を把握するため、ウイルス学的、血清疫学的調査を行った。

### B.研究方法

#### 1) 手足口病患者の発生状況

愛媛県感染症発生動向調査事業における患者定点からの手足口病患者報告数を週別に集計した。

#### 2) ウイルス分離

県内の小児科定点等から手足口病患者の咽頭ぬぐい液、髄液、水疱内容物、糞便を採取し、培養細胞法によりウイルス分離を実施した。細胞は FL、RD18S、Vero 細胞を使用した。

#### 3) EV71 の遺伝子解析

1973 年、90 年、93 年、97 年、2000 年に分離された計 16 株の EV71 を用いて、VP4 領域の塩基配列(207bp)を決定し、遺伝子解析を試みた。ウイルス RNA は培養上清 200  $\mu$ l から High Pure Viral RNA Kit を用いて抽出した。MMLV-RT により cDNA を合成し、エンテロウイルス共通のプライマーセット (OL68-1、EVP4) を用いた PCR 法で約 650bp の DNA を増幅した。PCR 産物からのダイレクトシーケンスは三菱油化ビーシーエルの石古博昭博士に依頼して行った。

#### 4) 中和抗体価測定

松山市とその周辺部の住民血清を対象に中和試験を行った。1998 年血清は 0 歳から 50 歳代までの 90 検体、2000 年の流行期後に採取した血清は 0 歳から 30 歳代までの 65 検体を供試し



た。中和抗体価測定は Vero 細胞を用いた 80% ブラック減少法で実施した。被検血清の 4 倍階段希釈系列に、等量の 100pfu/0.1ml のウイルス液を混合、37°C 2 時間中和後、6 ウェルプレートの Vero 細胞に 0.2ml 接種した。一次重層培地には 0.5%アガロース含有 Eagles' MEM 培地を用い、培養 4 日目に 0.005%ニュートラルレッド添加・アガロース含有 MEM 培地を二次重層した。攻撃ウイルスには国立感染症研究所から分与された遺伝子型の異なる 3 種類のウイルス株、BrCr(Genotype BrCr)、C7/Osaka97 株(Genotype A-2)、1095/Shiga97 株(Genotype B)及び愛媛県の 1993 年分離株 93-774 株、2000 年分離株 2K-1213 株、2K-1245 株を用いた。

### C.結果

#### 1) 2000 年の EV71 による手足口病の流行

愛媛県における本年の手足口病の流行は、感染症発生動向調査によれば第 18 週頃から始まり、第 27 週をピーク(7 人/定点/週)に、第 30 週以降は減少に転じ第 36 週には一応の終息をみた。医療圏域別患者届出状況は図 1 に示すとおり、特に今治圏域が、流行時期、規模共に他圏域に比べ突出しており、第 25 週には 19 人/定点/週の患者届出がなされ、地域的大流行の様相を呈した。次いで宇摩圏域、宇和島圏域が多く、ピーク時には 15 人/定点/週の届出があった。管内人口が多い松山圏域では小規模の流行にとどまった。

今治圏域および松山圏域の検査定点からの検体について、病原ウイルスの検索を行った結果を表 1 に示す。手足口病患者 41 名中 32 名(78.0%)から EV71 が、2 名からコクサッキーウイルス B5 型が分離され、本年の手足口病の主原因は、EV71 であることが示された。また、髄膜炎を併発した 3 症例のうち、2 例(1 例は糞便、他の 1 例は髄液と糞便)から EV71 が分離され、EV71 による髄膜炎が示唆された。

臨床材料別のウイルス分離状況を表 2 に示す。手足口病患者 41 名から採取した 50 件の臨床材料のうち 35 件(70.0%)から EV71 を分離した。

材料別では、咽頭拭い液から 67.5%、水疱内容物・糞便から 100%、髄液から 33.3%で、全体的に分離率は高率であった。また、ウイルス分離に用いた FL、RD18S、Vero の各細胞のうち、Vero 細胞(64%)、FL 細胞(52%)、RD18S 細胞(36%)の順に高い感受性を示した。

#### 2) EV71 分離株の遺伝子解析

今回分離された EV71 とともに過去の手足口病の流行時に分離された EV71 を用いて VP4 領域の塩基配列を解析した(図 2)。その結果、16 株の EV71 は、大きく 2 つのグループに分かれた。清水らの EV71 国内分離株の系統樹解析によると、愛媛県の 97 年分離株は Genotype B-2 に属し、93 年分離株は Genotype A-2 に分類されていることから、2000 年流行株は Genotype A と Genotype B の 2 つの遺伝子型に分かれることがわかった。すなわち 2K-1141 株、2K-1182 株、2K-1213 株、2K-1410 株は Genotype A に属し、2K-1245 株、2K-1302 株は Genotype B に属していた。従って、今回の手足口病の流行においては 2 つの異なる遺伝子型の EV71 が混在して流行したことが推察された。地域毎の遺伝子型別の流行状況は、今後さらに詳細に検討する予定である。

#### 3) EV71 分離株の抗原性の検討

ブラック減少法による交差中和試験の結果を表 3 に示した。抗 C7 抗血清のみが株特異性の高い反応を示したが、2000 年分離株である 2K-1213 株及び 2K-1245 株は BrCr 株、93-774 株らとの間にほとんど抗原性に差異が認められなかった。2K-1213 株は Genotype A で、2K-1245 株は Genotype B であるが、両株はほとんど同じ抗原性を示し、Genotype と抗原性との関連性はみられなかった。

#### 4) EV71 中和抗体保有状況

1998 年住民血清の 3 株の EV71 (BrCr 標準株、脳炎由来の C7/Osaka97 株、手足口病由来の 1095/Shiga97 株)に対する中和抗体保有率は、それぞれ 51.1%、52.2%、51.1%でほとんど同じであった。また、各年齢層別の中和抗体保有状況(図 3)もほぼ一致していることから、3 株

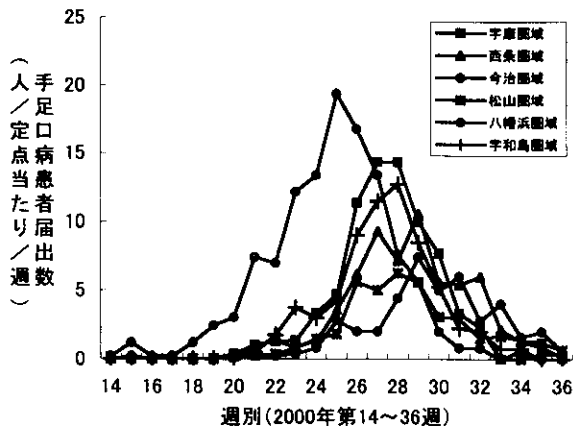


図1 愛媛県における医療圏域別手足口病患者届出状況

表1 臨床症状別ウイルス分離状況

	患者数	EV-71	CB-5
手足口病	38	30	2
手足口病+髄膜炎	3	2	0
計	41	32	2

EV-71、CB-5の混合感染1例を含む

表2 臨床材料別ウイルス分離状況

	検査数	EV-71 (%)	CB-5
咽頭拭い液	40	27 (67.5)	2
水泡内容物	5	5 (100)	0
髄液	3	1 (33.3)	0
糞便	2	2 (100)	0
計	50	35 (70.0)	2

EV-71、CB-5の混合感染1例を含む

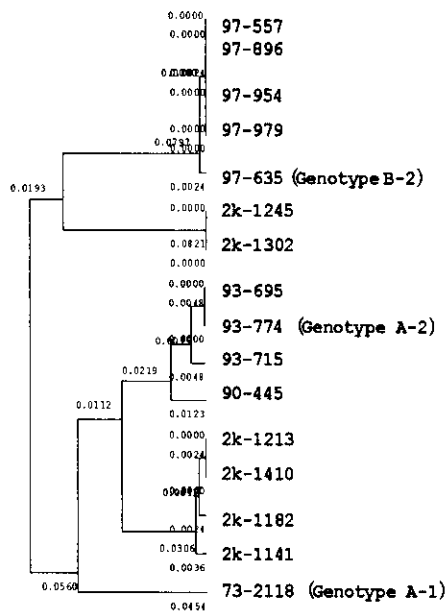


図2 愛媛県で分離されたEV71の遺伝子解析

表3 EV71分離株の交差中和試験

接種ウイルス	免疫血清				
	抗BrCr	抗C7	抗93-774	抗2K-1213	抗2K-1245
BrCr	160	<10	640	10240	2560
C7	40	80	80	2560	2560
93-774	160	<10	160	2560	640
2K-1213	80	<10	160	2560	2560
2K-1245	160	<10	160	2560	2560

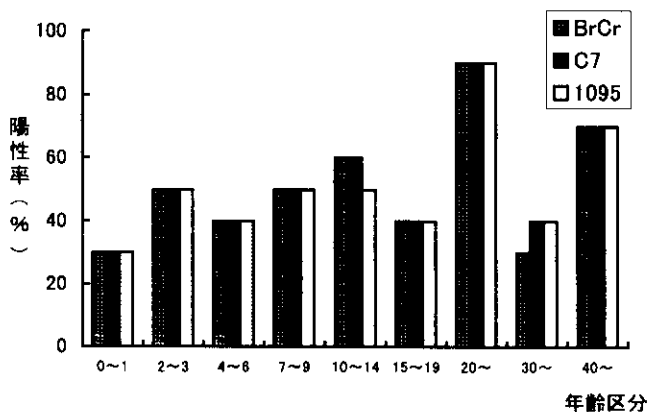


図3 EV71抗体保有状況(8倍以上)

表4 EV71(BrCr株)血清中和抗体保有状況

年齢層	合計	血清中和抗体価				8倍以上 陽性率(%)
		<8	8	32	>128	
0~1	7	4	0	1	2	42.9
2~3	10	5	0	2	3	50.0
4~6	8	4	1	1	1	37.5
7~9	10	3	2	2	2	60.0
10~	10	5	1	4	0	50.0
20~	10	4	3	3	1	70.0
30~	10	4	4	2	0	60.0
計	65	29	11	15	9	53.8

間で中和の抗原性には差異がなかったことが推察された。

次に、2000年住民血清について BrCr 株に対する中和抗体価を測定し、年齢区分別の中和抗体価分布状況を表4に示した。小児の血清は本年の手足口病流行後に採取されたもので、その抗体保有度から松山圏域での手足口病の流行は比較的小規模であったことが推測された。

#### D. 考察

EV71は従来から中枢神経親和性が強く、無菌性髄膜炎や希に脳炎をおこすことで注目されてきた。特に1997年マレーシア及び1998年台湾において、重篤な中枢神経合併症で急死する小児が多発し、その原因としてEV71が重要視されている。この重篤な臨床症状をきたす要因が、ウイルス側の病原性にあるか、宿主側にあるのか不明である。EV71は遺伝子の系統樹解析から Genotype-A 型と Genotype-B 型に分けられている。マレーシアでは重篤例も含めて A-2 型が多く、台湾では B 型が多く分離されており、遺伝子型と臨床症状の重篤度には関連がみいだせないとされている。今回愛媛県では A 型と B 型の遺伝子型の株が同時に流行していることが示されたが、臨床症状に明らかな差異はみられなかった。さらに、A 型と B 型の分離株の間に抗原性の変異も見いだせなかった。

また、C7/Osaka97 株は免疫血清を用いた交差中和試験では抗原性の違いがみられたが、住民の血清に対する中和試験では BrCr 株や 1905/Shiga97 株とほとんど同じ反応を示した。このことは、EV71の血清疫学には BrCr 株を用いて行いうることを示している。

愛媛県においては1973年のEV71の国内侵入以来、3～5年周期で流行を繰り返してきた。特に、近年は周期が短くなり3～4年毎に流行がみられた。血清疫学では流行前には3、4歳以下の年齢層でほとんど抗体陽性者がみられず、

この年齢層を中心にした感受性者の蓄積がEV71の流行要因の一つと考えられている。今回の流行の患者届出数は今治圏域に比べ松山圏域は明らかに少なかった。松山圏域を対象にした住民の抗体価測定により、1998年には前年のEV71流行を反映して比較的高い抗体保有レベルを示しており、また、2000年の流行後に大きな抗体陽性率の上昇はみられなかったことが示され、血清疫学的にも松山圏域の流行は小規模であったことが伺われた。

また、今回の流行期中には無菌性髄膜炎の発生頻度が若干増加している傾向はみられたが、手足口病に併発した特に重篤な症例は把握できなかった。今後、地域の小児科医院と連携してEV71による重篤症例の監視を続ける必要がある。

#### E. 結論

1. 2000年5月から8月に愛媛県において手足口病の流行がみられ、主要原因はEV71であったことが示された。本流行中には手足口病に併発した特に重篤な症例は把握できなかった。
2. EV71流行株の遺伝子系統樹解析により、Genotype A と Genotype B が混合して流行していたことが明らかとなった。
3. 交差中和試験では、2000年流行株は遺伝子型の相違に関わらず、抗原性に明瞭な変異を見出すことができなかった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

吉田紀美、近藤玲子、山下育孝、大瀬戸光明：手足口病患者からのエンテロウイルス 71 型の分離、愛媛県。病原微生物検出情報、21:11,2000

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## コクサッキー B 群ウイルスの分離状況と血清疫学に関する研究

分担研究者 栄 賢司 愛知県衛生研究所

協力研究者 杉山 雅、都築秀明、山下照夫 愛知県衛生研究所

### 研究要旨

過去 13 年間の急性脳炎患者 170 名中 7 名（4.1%）からコクサッキー B 群ウイルス（CB）が分離された。分離された CB は 2 型が 4 名、3、4、6 型が各 1 名であった。他のウイルスとして、エコーウイルスが 10 名、コクサッキー A 群ウイルスが 3 名、エンテロ 71 型ウイルスが 2 名、エンテロウイルス以外が 7 名から分離された。急性脳炎からのウイルス分離率は 17% であり、その 24% が CB ということは本ウイルスと急性脳炎との関連の高さが伺えた。13 年間で CB は小児患者 17,251 名中 368 名（2.1%）から分離された。各 CB の抗体保有状況を調べ、分離成績とあわせ血清型別のウイルス流行状況を比較した。

#### A. 研究目的

エンテロウイルスは口から感染し、腸管で増殖したウイルスは数週間便中に排せつされ、感染源となる。エンテロウイルス感染症の大部分は無症状に終わるため、あまり重要視されて来なかったが、肺炎・下気道炎、中枢神経疾患などの重篤な疾患を引き起こす。

人由来のエンテロウイルスのうちでコクサッキー B 群ウイルス（CB）は哺乳マウスに筋肉けいれんなどの強直性麻痺を引き起こすが、人では急性脳炎、無菌性髄膜炎、心筋炎、真正糖尿病、ボルンホルム病（流行性筋痛症）などの病因として知られておりエンテロウイルスのなかでも重症例の比較的多いウイルスである。本ウイルスは HeLa などの株化細胞で良く増殖するため心筋炎、真正糖尿病以外の病因の把握は比較的容易である。そこで、本ウイルスの愛知県における過去の分離状況と抗体保有率をまとめてみた。

#### B. 研究方法

1987 年から 1999 年の 13 年間に急性脳炎、無菌性髄膜炎、肺炎・下気道炎、不明熱性疾患、ヘルパンギーナ、ボルンホルム病などと診断された患者 17,251 名のふん便、咽頭ぬぐい液、随液を材料とした。ウイルス分離には HeLa 細胞を用いた。ウイルスの同定は、国立感染症研究所から分与された抗血清を用いて、中和法で行った。

血清は 1999 年から 2000 年に、0 才から 60 才までの年齢階層別に愛知県内で集められた 400 件を用いた。ウイルスは国立感染症研究所から分与された、CB1 から CB6 標準株を用い、マイクロプレートによる中和法で測定し抗体価 8 倍以上を陽性とした。

#### C. 研究結果

17,251 名中 368 名（2.1%）から CB が分離された。その内訳は CB1 が 20 名、CB2 が 59 名、CB3 が 154 名、CB4 が 61 名、CB5 が 67 名、CB6

が7名であった。ウイルス別の流行状況をみると、CB1は1992年に8名、1997年に10名から分離された。CB2は1990年に8名、1997年に9名、1999年に26名から分離された。CB3は1987年に57名、1994年に53名、1998年に34名から分離された。CB4は1987年に7名、1989年に11名、1992年に9名、1996年に17名から分離された。CB5は1987年に18名、1989年に9名、1994年に7名、1999年に18名から分離された。CB6は1995年から1997年の3年間で7名から分離されたのみであった。CB1は13年間で4年分離されたのみであったが、CB2とCB5は10年、CB4が9年、CB3が8年と比較的多くの年で分離された。疾患別では急性脳炎患者170名中7名(4.1%)、無菌性髄膜炎患者1,440名中150名(10.4%)、不明熱性疾患1,541名中44名(2.8%)、肺炎・下気道炎3,393名中32名(0.9%)、上気道炎1,253名中25名(2.0%)、感染性胃腸炎2,236名中25名(1.1%)、ボルンホルム病の51.1%(47名中24名)などから分離された。また、分離数は少ないもののヘルパンギーナの5.4%(203名中11名)、咽頭結膜熱の3.3%(329名中11名)からも分離された。急性脳炎患者7名から分離されたCBは2型が4名、3、4、6型が各1名であった。

抗体保有率は、CB1に対して2才未満は0%で、2才から14才までが20%台、15才から30才代で30%で、40才以上では60%以上の保有率であった。CB2に対しては、各年齢階層とも50%以上の高い抗体保有率を示し、40才以上では100%であった。CB3に対しては1才未満が5%、2から3才が16%と比較的低いが、4才以上から50%以上の保有率となり、40才代で75%、50才以上で90%であった。CB4に対しては、6才以下が15から30%、7から9才で55%となり、10才代が75から87%と高く、20から24才は52%と低くなり、25才以上では80%以上の保有率を示し、50才以上は100%であった。CB5に対しては、1才未満は0%、2才から6才が20%、7才から9才で40%、10才から24才で50%、25才から29才で57%、30才

代が70%と比較的高く、40才代が50%、50才代が60%であった。CB6に対しては、1才未満と20才から24才の年齢層で各1名が陽性とそその殆どが抗体を保有しておらず、50才代で30%の保有率を示したのみであった。

#### D. 考察

急性脳炎患者の7名がCBによるものと考えられた。他のウイルスとして、エコーウイルスが10名、コクサッキーA群ウイルスが3名、エンテロ71型ウイルスが2名、エンテロウイルス以外が7名から分離された。急性脳炎からのウイルス分離率は17%であり、そのうち24%がCBということは本ウイルスと急性脳炎との関連の高さが伺えた。その他では無菌性髄膜炎、ボルンホルム病、ヘルパンギーナ、咽頭結膜熱や不明熱性疾患と本ウイルスとの関連性が高いとおもわれた。

ウイルスの分離状況から推察すると、CB3が最も患者数が多く、次いでCB2、CB4およびCB5が同程度で、CB1はやや少なく、CB6は非常に少ないと思われた。一方、抗体保有状況を比較すると、CB2が最も高く、次いでCB4、CB3の順で、CB1とCB5が同程度で続き、CB6は殆ど抗体保有者がいなかった。抗体保有状況とウイルス分離成績を比較すると、CB2やCB4は流行しやすいが不顕性感染も多いウイルスであると思われた。これに対しCB5は比較的不顕性感染の少ないウイルスであると思われた。CB3は過去3回の流行した年の分離者数が多かったため、分離数の割に抗体保有者が少ない。一旦流行すると、規模は大きい傾向が伺えるとともに、CB5と同様に不顕性感染が比較的少ないウイルスと考えられた。CB1の分離数は少ないが、抗体保有状況はCB5と同じくらいであるため不顕性感染も多いと思われた。CB6は全国規模では毎年報告されてはいるが、散発的な発生に留まっている模様である。我々が分離した患者7名は、急性脳炎、無菌性髄膜炎、肺炎・下気道炎が各1名、発疹症2名、胃腸炎4名であった。抗体保有者が殆どいないことから、新生児に感

染した場合に重篤な疾患につながるものが危惧される。

同じ CB でありながら、その流行状況が異なることが分かった。殆ど毎年のように分離されるウイルスとそうでないウイルスの違いおよび急性脳炎を含む各疾患との因果関係について、分子疫学的手法を用いて今後検討してゆきたい。

#### E. 結論

CB と急性脳炎との関連は高く、病因の判明した 24% が本ウイルスによると推察された。また血清型により流行状況に違いがみられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Yamashita T, M. Sugiyama, H. Tsuzuki, K. Sakae, Y. Suzuki, and Y. Miyazaki. Application of a RT-PCR for identification and differentiation of Aichi virus, a new member of the picornavirus family associated with gastroenteritis in humans. *J. Clin.*

*Microbiol.* 38: 2955-2961, 2000.

山下照夫: ピコルナウイルス科コブウイルス属に分類されたアイチウイルス。臨床とウイルス 28: 209-218, 2000

##### 2. 学会発表

栄賢司、山下 照夫、都築 秀明、杉山雅、鈴木康本、志水哲也: 流行性筋痛症（ボルンホルム病）からのウイルス分離。第 41 回日本臨床ウイルス学会 広島 2000. 5.25-26

山下照夫、杉山雅、都築秀明、栄賢司: 新型コブウイルス（U-1 株）の全塩基配列。第 48 回日本ウイルス学会学術総会 三重 2000.10.12-14

杉山雅、山下照夫、都築秀明、栄賢司: 麻痺患者から分離された Parechovirus 類似株について。第 48 回日本ウイルス学会学術総会 三重 2000.10.12-14

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 神経系エンテロウイルス感染症の診断への PCR 法の応用に関する研究

分担研究者 細矢光亮 福島県立医科大学医学部小児科学講座

**研究要旨** 神経系エンテロウイルス感染症の高感度で迅速な診断法の確立を目的として、PCR 法の応用を試みた。我々の確立した PCR 法は、ウイルス分離法の約 1000 倍の検出感度を有した。この方法により、ウイルス分離法では感染が証明できなかった無菌性髄膜炎、および急性脳炎／脳症の患者髄液中に、エンテロウイルス遺伝子が検出され、エンテロウイルスが病因と確定できた。すなわち、本法が神経系エンテロウイルス感染症の診断に極めて有効であることが証明された。

### A. 研究目的

近年、手足口病などのエンテロウイルス感染症に伴い、重篤な脳炎の発症が認められている。その実態を的確に把握し、有効な予防治療手段を講ずるには、高感度で迅速な診断法の確立が不可欠である。

PCR 法は、遺伝子検出感度が高く、迅速性も有しており、ウイルス感染症の診断法として期待される。そこで、エンテロウイルスの 5'末端の非翻訳領域に存在するウイルス血清型間で良く保存された部位にプライマーを設定し、ほとんどすべてのエンテロウイルスの検出を可能にする PCR 法を確立した(文献 1)。この方法を応用し、神経系エンテロウイルス感染症の病因診断を試みた。

### B. 研究方法

#### (1) 検体

1997 年 6 月から 12 月の間に、無菌性髄膜炎と診断した患児 126 名より、咽頭拭い液 124 検体、肛門拭い液 122 検体、髄液 125 検体を採取し、これを検体として用いた。

また、1996 年 6 月から 1999 年 12 月の間に、急性脳炎／脳症と診断した患者で、臨床経過、ウイルス分離、ヘルペスウイルスに対する PCR

法などにより病因が特定できなかった 16 例の患者より採取した髄液を検体として用いた。

#### (2) ウイルス分離法

無菌性髄膜炎と診断した患児 126 名より採取した、咽頭拭い液 124 検体、肛門拭い液 122 検体、髄液 125 検体を用いた。ウイルス分離は、RD-18S、HEp-2、Vero、HMV-II、および MDCK 細胞を用いて、マイクロプレートによる組織培養法により行なった。検体を接種後、細胞変性効果の出現を 7 日間観察した。初代で分離陰性のもは 2 代目まで盲継代した。分離ウイルスは中和試験により同定した。

#### (3) PCR 法

無菌性髄膜炎、および急性脳炎／脳症の患者より採取した髄液を検体とした。多くのエンテロウイルスで共通に保存されている 5'末端の一部を増幅するように設定したプライマー (5'-CAAGCACTTCTGTTTCCCGG と 5'-ATTGTCACCATAAGCAGCCA を第一 PCR プライマー対とし、5'-TCC TCCGGCCCCTGAATGCG と 5'-ATTGTCACCATAAGCAGCCA を第二 PCR プライマー対とした) を用いた。髄液 250 $\mu$ l より RNA を抽出し、第一 PCR プライマ

ーを用いて cDNA を作成した。第一 PCR は、93°C 1 分、45°C 1 分、72°C 2 分を 1 サイクルとして、30 サイクル行なった。第二 PCR は、第一 PCR 産物の 2μl を用いて、93°C 1 分、65°C 1 分、72°C 2 分を 1 サイクルとして、30 サイクル行なった。無菌性髄膜炎については、2%アガロースゲルを用いた電気泳動により、目的とする大きさの遺伝子が増幅された場合に、エンテロウイルス陽性とした。脳炎/脳症から増幅された PCR 産物については、その塩基配列を決定し、既報のエンテロウイルス遺伝子と比較することにより、エンテロウイルス遺伝子であることを確認した。

#### 倫理面への配慮

患者および家族に対しては、ウイルス分離法と併に、PCR 法による病因診断を試みることを説明し、十分な理解と同意を得た。

#### C. 研究結果

##### (1) 無菌性髄膜炎 (表 1)

ウイルス分離法により、髄液 125 検体中 66 検体、咽頭拭い液 124 検体中 77 検体、肛門拭い液 122 検体中 92 検体より、エンテロウイルスが分離された。PCR 法により、髄液 126 検体中 118 検体 (93.7%) より、エンテロウイルス遺伝子を検出した。髄液、咽頭拭い液、肛門拭い液のいずれかよりエンテロウイルスが分離された 102 例から採取した髄液 102 検体すべてにおいて、エンテロウイルス遺伝子を検出した。(文献 2)

##### (2) 急性脳炎/脳症 (図 1)

単純ヘルペスウイルス、水痘/帯状疱疹ウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、インフルエンザウイルス、ヒトヘルペスウイルス 6 型の感染が否定された急性脳炎/脳症 16 例の髄液検体中、2 検体より、PCR 法にてエンテロウイルス遺伝子を検出した。この 2 例の臨床経過は文献 3 に記した。

#### D. 考察

ウイルス性髄膜炎の確定診断は、髄液中にウイルスの存在を証明することによってなされる

が、髄液からのウイルス分離率は一般に 50%程度であり、咽頭拭い液や肛門拭い液からの分離率よりも低い。これは、髄液中の感染力価が、咽頭拭い液や肛門拭い液のそれらに比較して低いためと考えられている。エコー 7 型ウイルス希釈液を用いて、ウイルス分離法と PCR 法のエンテロウイルス検出感度を比較すると、PCR 法はウイルス分離法の約 1000 倍の感度である (文献 1)。この PCR 法を用いることにより、無菌性髄膜炎の髄液 126 検体中、118 検体にエンテロウイルス遺伝子を検出した。特に、咽頭拭い液、あるいは肛門拭い液からウイルスが分離され、エンテロウイルス髄膜炎が疑われたが、髄液からは分離されなかった 36 例の髄液中のすべてに、エンテロウイルス遺伝子を検出できたことは、PCR 法が無菌性髄膜炎の病因診断に極めて有効であることを示していた (文献 2)。

臨床症状やウイルス分離法、あるいはヘルペスウイルスに対する PCR 法を用いても病原が推定できなかった脳炎/脳症症例の髄液検体を用いて、エンテロウイルスに対する PCR 法を行なったところ、2 検体中にウイルス遺伝子を検出した。一般に、急性脳炎/脳症のうち、通常のウイルス学的検索法でエンテロウイルスが病因と特定されるのは約 2%である。しかし、患者発生の季節性から判断すると、脳炎/脳症全体の 20~40%はエンテロウイルスが原因であろうと推定されている。PCR 法は、通常のウイルス学的検索法で病原が特定できない場合、特に発症が夏期の場合には試みるべきと考える。エンテロウイルスが検出された 2 例の臨床経過は神経症状が二相性を呈した (文献 3)。このように、非定型的臨床経過を呈した場合にも検索する必要がある。

#### E. 結論

エンテロウイルスの検出感度を比較すると、PCR 法はウイルス分離法の約 1000 倍であった。この方法を用いて、無菌性髄膜炎、および急性脳炎/脳症の患者髄液を検体としてウイルス遺伝子の検索を行なうことにより、ウイルス分離



表1 ウイルス分離法とPCR法による無菌性髄膜炎患者検体からのエンテロウイルスの検出

	髄液	咽頭拭い液	肛門拭い液	全体
	陽性数/検体数 (陽性率)	陽性数/検体数 (陽性率)	陽性数/検体数 (陽性率)	陽性数/検体数 (陽性率)
ウイルス分離	66/125 52.8%	77/124 62.1%	92/122 75.4%	102/126 81.0%
PCR法	118/126 93.7%		118/126 93.7%	

Cox B1	gct aatcc t aac t gc gga gcaca taccctcaaa cca gggggca gtg tgtcgta a cgggcaact ctgca gcgga accg c
B3	gct aatcc t aac t gc gga gcaga caccctcaaa cca gagggca gtg tgtcgta a cgggcaact ctgca gcgga accg c
B4	gct aatcc t aac t gc gga gcaca cgttcgcaag cca gcgagtgt gtg tgtcgta a cgggcaact ctgca gcgga accg g
B5	gct aatcc t aac t gc gga gcaca taccctcaac cca gggggca gtg tgtcgta a cgggtaact ctgca gcgga accg c
B6	gct aatcc t aac t gc gga gcagg cactcgcaga cca gcgagca gct tgtcgta a tgggtaact ccgca gcgga accg c
Echo 1	gct aatcc t aac t gc gga gcaca tactccaat cca gggagca gtg tgtcgta a tgggtaact ctgca gcgga accg c
6	gct aatcc c aac c gc gga gcagg taccacaaa cca gtgggga gcc tgtcgta a tgggcaact ctgca gcgga accg c
7	gct aatcc t aac t gc gga gcaga taccacang cca gtgggca gtc tgtcgta a cgggcaact ctgca gcgga accg c
9	gct aatcc t aac t gt gga gcaca tgcccctaata cca aggggta gtg tgtcgta a cgggcaact ccgca gcgga accg c
27	gct aatcc t aac t gc gga gcaca tgcccacmaa ccn gtggrtr gtg tgtcgta a cgggcaact ctgca gcgga accg c
30	gct aatcc t aac c gc gga gcaga taccacatg cca gtgggaa gtc tgtcgta a tgggcaact ctgca gcgga accg c
Entero 70	gct aatcc c aac c ac gga gcaaa tgctcacaat cca gtgagtgt gtt tgtcgta a tggcgaagt ctgtg gcgga accg c
Cox A24	gct aatcc t aac c at gga gcagg tagttgcaat cca gcagcca gcc tgtcgta a cgcgcaagt ccgtg gcgga accg c
A9	gct aatcc c aac t gc gga gcacg caccctcaaa cca gggggca gcg tgtcgta a cgggcaact ctgca gcgga accg c
症例 1	gct aatcc t aac t gc gga gcagg caatcacaat cca gtggatg gcc tgtcgta a cgggcaact ccgca gcgga accg c
症例 2	gct aatcc t aac t gc gga gcagg caatcacaat cca gtgggtg gcc tgtcgta a cgggcaact ccgca gcgga accg c

図1 PCR増幅遺伝子とエンテロウイルス遺伝子の塩基配列の比較

法では感染が証明できなかった症例で、エンテロウイルスが病因と確定できた。すなわち、本法が神経系エンテロウイルス感染症の診断に極めて有効であることが証明された。

今後は、PCR 法を応用して検出したエンテロウイルスを型別することと、重症なエンテロウイルス感染症を迅速に診断するためのシステムを構築することが必要である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. Hosoya M, Suzuki H, et al. Application of PCR for various neurotropic viruses on the diagnosis of viral meningitis. J Clin Virol 1998; 11:117-124.
2. 佐藤晶論, 細矢光亮, 他. 1997 年に福島県中地方で流行した無菌性髄膜炎の病原診断. 日児誌 1998;102:1277-1283.
3. 細矢光亮, 鈴木 仁, 他. PCR 法により診断した非定型的経過をとったエンテロウイルス脳炎の 2 症例. 日児誌 2000;104:856-861.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## エンテロウイルス感染症迅速診断法の研究

分担研究者 石子博昭 (株)三菱化学ビーシーエル

### 研究要旨

遺伝子系統解析によるエンテロウイルスの迅速同定は『ウイルス遺伝子の増殖』、『VP4 領域の塩基配列の解読』、『遺伝子系統解析』のステップで行われる。手足口病ウイルスの迅速診断に遺伝子系統解析を応用するため、分離ウイルスから RT-PCR でウイルス遺伝子を増幅し、エンテロウイルスを検出する。そして、増幅 DNA 断片の VP4 塩基配列を解読し、標準株のデータベースとともに遺伝子系統解析を行い、分離ウイルスの型同定を試みた。

#### A. 研究目的

ヒトエンテロウイルス(HuEV)は 64 種類の血清型に分類され、各血清型のウイルスは多彩な臨床症状を引き起こす。そのため、原因ウイルスの特定は、病巣から培養細胞を用いた組織培養法によってウイルスを分離し、中和試験によって血清学的に同定される。しかし、検査方法が煩雑で、検査に時間がかかり、さらに、培養細胞で分離困難なウイルスや、型別困難なウイルスが出現するなどの問題点がある。これらを解決するため、HuEV 標準株の VP4 塩基配列を解読、標準株のデータベースを構築し、遺伝子系統解析に基づく迅速同定法を試みている。本研究では、手足口病患者より培養細胞で分離された型特異抗血清を用いた中和試験で型同定された分離ウイルスの遺伝子を RT-PCR 法で増幅、その VP4 塩基配列を解読、標準株のデータベースとともに解析し、遺伝子系統解析による分離ウイルスの型同定を試みた。

#### B. 研究方法

分離ウイルスより RNA を抽出、HuEV に共通なプライマーセットを用いて、5'非翻訳領域の一部、VP4 全領域、VP2 領域の一部を含む約 650 塩基を RT-PCR で増幅した。PCR 産物の塩基配

列を解析し、VP4 領域の全塩基配列を決定した。HuEV 標準株の VP4 塩基配列データベースを用い、遺伝子系統解析を行い、型同定を試みた。

#### C. 研究結果

1970~1997 年の手足口病の流行より分離された CA16 の 20 株と EV71 の 20 株の HuEV 遺伝子を RT-PCR で増幅し、増幅 DNA の VP4 塩基配列を解読、VP4 塩基配列に基づく遺伝子系統解析を行った。その結果、CA16 と EV71 の分離株は CA2~8、CA10、CA16、EV71 の HuEVA 標準株とともに HuEVA に群別された。さらに、CA16 の分離株は群内で EV71 および、他の標準株と交差することなく、標準株の CA16/G-10 とのみブートストラップ値 99%の確率で単一のクラスターを形成し、CA16 に同定された。また、EV71 分離株は CA16、他の標準株と交差することなく、標準株の EV71/BrCr とのみブートストラップ値 100%の確率で単一のクラスターを形成し、EV71 に型同定された。さらに、EV71 分離株はブートストラップ値 93~100%の確率で2つのクラスターに群別された。

#### D. 考察

遺伝子系統解析の型同定結果は特異抗血清を用いた中和試験の同定結果と一致し、遺伝子系

統解析による手足口病分離ウイルスの型同定の有用性が示された。さらに、遺伝子系統解析によって同一血清型のウイルスが遺伝子型に分類されることが明らかとなった。本法は1セットの semi-nested PCR によって全血清型のウイルスを増幅できることが分っている。さらに、1回の塩基配列解析によって VP4 全域の塩基配列が解析可能である。

#### E. 結論

VP4 塩基配列に基づく遺伝子系統解析は手足口病ウイルスの迅速診断に有力な方法と思われた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 学会発表

Ishiko H, Yasushi S, Takeda N: Typing and molecular phylogeny of human enteroviruses based on VP4 sequence. 5th Asia Pacific Conference of Medical Virology

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし