

大阪府における手足口病の疫学・血清疫学・分子疫学

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、左近直美 (大阪府立公衆衛生研究所)

**研究要旨** エンテロウイルス 71 (EV71) 流行前後に採取された成人血清 251 例の EV71 に対する中和抗体測定の結果、1966, 67, 69 および 72 年の抗体保有率は 22~48%であったことから、EV71 は初めて流行が確認された 7 年以上前から、既に国内に存在していたことが示唆された。

2000 年に大阪府で流行した手足口病の患者 122 名についてウイルス分離および RT-PCR 法による迅速な遺伝子診断を行なったところ、ウイルス陽性者 90 名中 72 名からウイルスが分離された。塩基配列の解析から、22 株のコクサッキーウイルス A16 (CA16)はすべて同一の遺伝子型に、また 33 株の EV71 は異なる 2 つの遺伝子型に分類され、今回の手足口病の流行がこれら 3 つの異なる遺伝子型ウイルスの同時流行によるものであることが明らかとなった。

感染症サーベイランスデータを基に、エンテロウイルスを原因ウイルスとした疾患の患者発生動向および気象条件 (月別平均気温、湿度、降水量) との相関関係を調査した結果、患者発生動向は「気温」・「湿度」と高い相関係数が得られ、さらにその分布も右上がりの直線を示しており、その有意性が示された。

## 1. エンテロウイルス 71 の血清疫学

### A. 研究目的

1969 年にカリフォルニアで無菌性髄膜炎から新しいエンテロウイルス (BrCr 株) が分離され、EV71 と命名されたが、1972~73 年には EV71 による手足口病が日本で大流行した。本研究では EV71 がいつ頃日本に侵入してきたのか、また同時期に流行した遺伝子型の異なる EV71 に対する免疫状態がいかであるのかを、血清学的に明らかにすることを目的として調査を行った。

### B. 研究方法

1)ウイルス：1997 年 9 月に大阪府で急性脳症と診断され、呼吸循環不全により急死した 5

カ月男児の糞便から分離された EV71 (C7/大阪/97; genotype A2)、および同年に手足口病患者から分離された EV71 (1095/滋賀/97; genotype B2) を用いた。

2)中和抗体測定：血清材料として EV71 流行前後の 1966, 67, 69, 72 および 89 年に採取された 251 名の成人血清を用いた。血清はいずれも手足口病に関係しない疾患患者から得られたものである。細胞は RD18s を用い、 $10^3$ TCID<sub>50</sub> のウイルス (C7/大阪/97 および 1095/滋賀/97) を抗原として、マイクロプレート法により中和抗体を測定し、4 倍以上を抗体陽性とした。

### C. 研究結果

表 1 に C7/大阪/97 に対する年度別抗体保有

状況を示した。各年度の成人の抗体陽性率は流行前が 30.8% (1966 年)、45.2%(67 年)、47.8% (69 年)、35.1%(72 年)であり、64 倍以上の高い抗体保有者も 3 名認められた。また流行後では 67.2%(89 年)、60.0%(92 年)であった。1095/滋賀/97 に対しては流行前が 21.5% (1966 年)、41.9%(67 年)、43.5% (69 年)、32.4%(72 年)、流行後では 64.1%(89 年)、48.9%(92 年)であり (表 2)、全年度において C7/大阪/97 よりも 3 ~11%低い陽性率を示した。

#### D. 考察

国内で EV71 による手足口病が初めて確認されたのは 1972 年であったが、今回の調査により、その 7 年前の 1966 年には EV71 が浸潤していたことが血清学的に示された。これは EV71 流行前の健康児の抗体保有率が 7~40%(1966~73 年)であったという成績(萩原昭夫：日本臨床 35, 91-94, 1977)ともよく一致していた。また、1968 年に健康乳児の糞便から分離されたウイルスが EV71 であったこと(須藤恒久：第 23 回日本ウイルス学会総会抄録集, 1975)や、1968 年に住民の EV71 抗体保有率が高かったとする報告(高見俊才：愛媛衛研年報 38, 13-16, 1977)からも流行期より数年以前の侵入が推定された。

#### E. 結論

1966 年に採取された血清の 20~30%に EV71 抗体が検出されたことから、EV71 は日本での流行期よりさらに数年以前に日本に侵入していたことが推定された。

## 2. 2000 年大阪府で流行した手足口病の分子疫学的解析

#### A. 研究目的

1982 年に始まった大阪府感染症サーベイランス事業における手足口病の発生動向調査では 5 年ごとに大流行が発生しており、2000 年は大流行にあたった年であった。そこで手足口病患者からウイルス分離を試み、ウイルスの動向を明らかにすると共に、EV71 には異なる遺伝子型があることが明らかになってきたのでこれら

ウイルスの分子疫学についても検討を加えることを目的とした。

#### B. 研究方法

1)ウイルス分離：2000 年 1 月から 11 月までに大阪府感染症発生動向調査定点の医療機関から得られた 122 名の手足口病患者(10 名は無菌性髄膜炎を併発)の検査材料(咽頭拭い液 104、髄液 20、糞便 12 検体)を MRC-5, RD18s, LLCMK2, GMK 細胞および一部は乳マウスに接種した。分離されたウイルスの同定は中和用プール血清(EP95)、単味血清および免疫腹水を用いて中和反応または補体結合反応により行った。一部はダイレクトシークエンスを行わない NCBI BLAST を用いた相同性検索により同定を行った。

2)塩基配列の決定および分子系統樹の作成：エンテロウイルス共通プライマーペア(EVP4, OL68-1)を用いて増幅した PCR 産物をシークエンス反応に用いた。解読された CA16 および EV71 の塩基配列のうち、VP4 全領域(207b)について Clustal W version 1.6.1 を用いて解析を行い、近隣結合 (N-J) 法により分子系統樹の作成をした。

#### C. 研究結果

1)ウイルス検出：手足口病患者 122 名中 67 名(55%)からウイルスが分離された。さらに分離陰性の 13 名から RT-PCR によりウイルスが検出された(合計検出率 66%)。細胞別では MRC-5 が最も高い分離率を示した (表 3)。また検出されたウイルス中 EV71(38 株)および CA16(23 株)で全体の 76%を占めた (表 4)。

週別のウイルス検出数は手足口病患者発生のピーク(27 週、6 月 30 日~7 月 7 日)と同じ週に最大となり、11 株分離された。また EV71 は遺伝子型の異なる株が大阪府内のみならず(図 1A)、一医療機関内においても同時期に混在して流行した(図 1B)ことが示された。

2) CA16 および EV71 の遺伝子解析：CA16 標準株(G-10)および 1967 年以降に大阪府で分離された CA16 27 株の塩基配列を解析した結

果、2000年の分離株はすべて96%以上のホモロジーを示した。過去の分離株とは90%以上のホモロジーであったが、G-10とは80%と低いホモロジーであった(図2)。またBrCrおよび1968年以降に分離されたEV71 38株の塩基配列の解析では、2000年の分離株はブートストラップ値99%の確率で2つのクラスターに分かれ、そのうち24株はC7/97と同じgenotype A2に、また9株が1095/97と同じgenotype B2に属していた(図3)。髄膜炎を併発した4例から検出されたEV71のうち3例(12-324、12-238、12-352)はgenotype A2に、1例(12-232)はgenotype B2に属していた。genotype A内では94%以上、またgenotype B内では91%以上のホモロジーであったが、A-B間では82%と低いホモロジーを示した。CA16およびEV71間では平均して66%のホモロジーであった。しかしVP4領域のアミノ酸配列はCA16、EV71いずれも標準株を含めて、同一血清型内では98.5~100%と高い相同性を示した。CA16およびEV71間では平均して75%の相同性であった。

#### D. 考察

最近10年間、大阪府ではほぼ5年毎に手足口病の大流行がくり返されており、2000年はその大流行年で、流行のピーク時には定点当たり患者数が8.9人となり、1982年に感染症サーベイランス事業が始まって以来最大であった。1998~2000年に国内で手足口病から分離されたウイルスのうち、CA16とEV71の構成比率に年度差はあるものの、いずれの年度でも両ウイルスで全体の75%前後を占めており、2000年大阪府においても同様に両ウイルスで76%を占めていた。

CA16とEV71が共に流行した同一年度に、手足口病に再感染した12事例(1978~83年)が報告されている(飯塚節子:臨床とウイルス16, 54-58, 1988)が、本流行時には再感染例は認めなかった。ウイルス分離を行った患者の男女比は1:1であり、髄膜炎を併発した10名にも性差はなかった。組織培養法およびRT-PCR法によるウイルス検出数はそれぞれ67例、68例で

あり、ほぼ同等の検出率であったが、80陽性事例のうち25事例はいずれかの方法でのみ検出された。このことから、RT-PCR法は検出感度はすぐれているが、RNaseなどの影響を受けやすいことが想像された。従って両者を併用することが望ましいと考えられた。

分離株の遺伝子解析からEV71は異なる2つのgenotypeがあり、これら異なるウイルスが大阪府内のみならず、1つの診療所近辺で同時に流行したというのはこれまで報告されていなかった知見である。CA16、EV71共にVP4領域では標準株をも含めて、同一血清型内では非常に高いアミノ酸配列の相同性を保有していた。これは多くの研究者がCA16、EV71のphenotypeの変異について報告していることと矛盾している。しかしこれはVP4がinner capsidを構成していることと関係がある可能性があり、outer capsidの1つであるVP1領域ではBrCrと他のEV71のアミノ酸配列の相同性は94~96%であると報告されている(Brown BA: J. Virol 73, 9969-9975, 1999)。従ってさらに他領域の遺伝子配列を比較することにより、抗原性の解析が可能になることも予想される。

#### E. 結論

2000年大阪府では5年ぶりに手足口病が大流行したが、ウイルス分離成績および遺伝子解析から、本流行はCA16および2つの遺伝子型のEV71の同時流行によるものであることが明らかになった。

### 3. 手足口病の患者発生動向と気象因子との因果関係

#### A. 研究目的

現在サーベイランスデータ集計や病原体探索は地方衛生研究所の重要な仕事の1つとなっているが、集計後のデータ解析が充分に行われていないのが現状であると思われるので、本研究ではエンテロウイルスによる疾患と気象データとの相関について調査を行い、我が国におけるエンテロウイルスが原因として疑われる疾患の

より一層の疫学的理解につなげることを目的とした。

## B. 研究方法

気象庁発表の各都道府県庁所在地における、過去 10 年間の月別平均気温(°C)、月別平均湿度(%）、月別平均降水量(mm) (以下「気温」・「湿度」・「降水量」と呼ぶ) の各種気象因子を独立関数として考え、月別の定点あたり患者発生数を従属変数とした。また対象とした地域は、これらの疾患の伝播様式が飛沫糞口感染であることから、一定の人口密集地帯を持つ地域を選び、さらに気象の相違を考慮して北海道、宮城、東京、新潟、愛知、大阪、広島、福岡、沖縄の 9 都道府県を選択し、手足口病との相関を調べた。

## C. 研究結果

患者発生数と「気温」の上昇は福岡、沖縄を除く 7 都道府県で相関計数(0.416~0.466)と高い相関を示した(表 5A)。しかし患者発生数のピークと「気温」のピークとは必ずしも一致せず、患者のピークが前にくる傾向が見られた(図 4)。「湿度」も比較的高い相関が認められた(図 5)が、「降水量」はいずれの地域でも高い相関は見られなかった(図 6)。福岡、沖縄は「気温」と同様に「湿度」、「降水量」も低い相関でしかなかった。

3 種の独立変数間に相関がある可能性を排除するために、他の独立変数の影響を受けない時の相関(偏相関関数)を求めた(表 5B)。「気温」については p 値 0.05 以下が 5/7 (福岡、沖縄を除く)と相関性があるという結果が得られたが、「湿度」、「降水量」共に 2/7 でばらつきがみられ有意性があるとは言えなかった。

## D. 考察

患者発生数と「気温」が強く相関するのは、手足口病の原因ウイルスの活動性が高温時に増すためと推測出来る。患者発生数が増えるのは北海道・宮城で 10°C 前後、新潟で 16°C、他地域で 20°C 前後である。このことから手足口病の患者発生数が増える「気温」にお

いて日本は北海道・東北・北陸地方と太平洋側地域・沖縄の二つに分類して考える事が出来る。しかしこの両地域においてウイルスの性質が異なるとは考えにくいので、「気温」そのものと共に、その上昇がウイルスの活動を活性化するという可能性や、他地域において患者発生数が増加し、それが宿主である人を介して北海道・東北・北陸地方に伝播したという可能性もある。また、最高「気温」と患者発生数のピークが一致しないという事実もみられた。これは多くの場合において患者発生数のピークは通常 7 月に現れるのに対し、「気温」のピークは通常 8 月に生じる。両者のピークは必ずしも一致しないとは言えないものの、患者発生数増加に「気温」が深く関わっていることを考慮すると非常に不可解な現象であると言えよう。この要因としては、手足口病の原因ウイルスの活動性が 8 月の気温程度で急激に低下するとは考えられないため、最も暑さが厳しい 8 月において人間の活動性の方が低下し、人間同士が接触する機会が減少するためウイルス感染が成立しにくくなることが推測される。

次に「湿度」との関係であるが、高い「湿度」がウイルスの飛沫感染を容易にすることから、患者発生数と「湿度」には相関性があると考えられる。「湿度」があまりに高いと患者発生数が逆に減少を始めるという傾向も読みとれる。また「湿度」のピークと患者発生数のピークが必ずしも一致しないことについて、高い「湿度」はウイルスの飛沫感染を容易にすることは明らかであり、このことは非常に不可解な結果である。この現象の原因を新潟とそれ以外の地域に分けて考察する。まず新潟では雪の影響であろうか患者発生数が少ない 4、5、12 月に著名な「湿度」のピークを生じることが頻繁にあり、高すぎる「湿度」が患者発生数を抑制しているように見えるのである。一方、新潟以外の地域では年間の平均湿度のピークが 6、7、8 月に平均気温とは異なり非常に緩やかなピークを描くことが多い。そしてピークは患者発生数が増える 7 月に生じるとは必ずしも言えず、6、

8月に生じることの方が多い。また台風の影響で9月に平均湿度が最高値をとることも多い。このことが原因で上記のような不可解な現象が生じるのであろう。

手足口病において福岡県・沖縄県のみがこれほど「気温」との相関性が薄い結果になったのはなぜであろうか。福岡県・沖縄県は他県に比べて緯度が低く、他地域とは気候が異なるためにウイルスそのものの活動性が変化するのではないかという考察が出来よう。しかしそのような事実は見受けられなかった。そこで経口感染であることに着目して人間の住環境による影響も考察した。まず人口密度についてであるが、北海道や新潟県のように人口密度の低い地域でも、東京都・大阪府のように高い地域でも同様に「気温」・「湿度」との相関性が実証されており、福岡県・沖縄県をのみ相関性が薄いことの説明には成り難い様に思われる。手足口病は0～4歳に好発することが知られているので、4歳以下人口密度による影響も考えられたが、これも他地域において同様に「気温」・「湿度」との相関性が見られるため関係は無いと推測できる。また、都市部・郡部の人口分布の差異による影響があるのかとも考えられたが、福岡県と沖縄県の条件には大きく隔たりがあるため、これも可能性が否定されると思われる。

結局、理由としては人間に感染する以上、気候の変化によって宿主である人間自身の免疫能の変化による影響があると考えるのが自然であろう。よって「気温」・「湿度」の上昇に伴って人間の活動が低下し、同一の場所（例えば空調の整った場所など）に集まる様になり、この条件下における人間の体力の低下に伴うウイルスに対する抵抗力の低下によって易感染傾向となる。しかしこの時、通常より気温の高い地方（ここでは福岡、沖縄の二都市）の人々は高温条件下に慣れているために、夏に生じるウイルスに対する抵抗力の低下が少ないため、「気温」・「湿度」の上昇による影響は少ない。沖縄県では物理的に他県から隔てられているため、一層接触

の機会は少なくなるであろう。これにより他の都道府県と比べて“蒸し暑い”福岡県や沖縄県は患者発生が少なく、そうではない所は多いという結果を招くのではないかとする仮説を立てることができる。しかし、人間の活動性やウイルスへの抵抗性、免疫力を評価する適当な指標が見当たらず、これらを実証することは出来なかった。

## E. 結論

手足口病の患者発生数の増加に関与するものとして気象条件、ウイルスの感染性の強弱、宿主の免疫状態など様々な因子があると想像されるが、「気温」・「湿度」の上昇は十分条件ではないにしろ、必要条件であることが推定された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

大石 功、山崎謙治：ウイルス感染よりみた免疫応答ーポリオウイルス、臨床と微生物、27、67-72 (2000)

山崎謙治、奥野良信：2000年大阪府で流行した手足口病の遺伝子診断および分子疫学的解析、感染症学雑誌、75、909-915 (2001)

### 2. 学会発表

山崎謙治、奥野良信：2000年大阪府で流行した手足口病のウイルス学的検討、第75回日本感染症学会総会、奈良 (2001)

山崎謙治、左近直美、奥野良信：2000年大阪府で流行した手足口病の遺伝子診断および分子疫学、第42回日本臨床ウイルス学会、名古屋 (2001)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

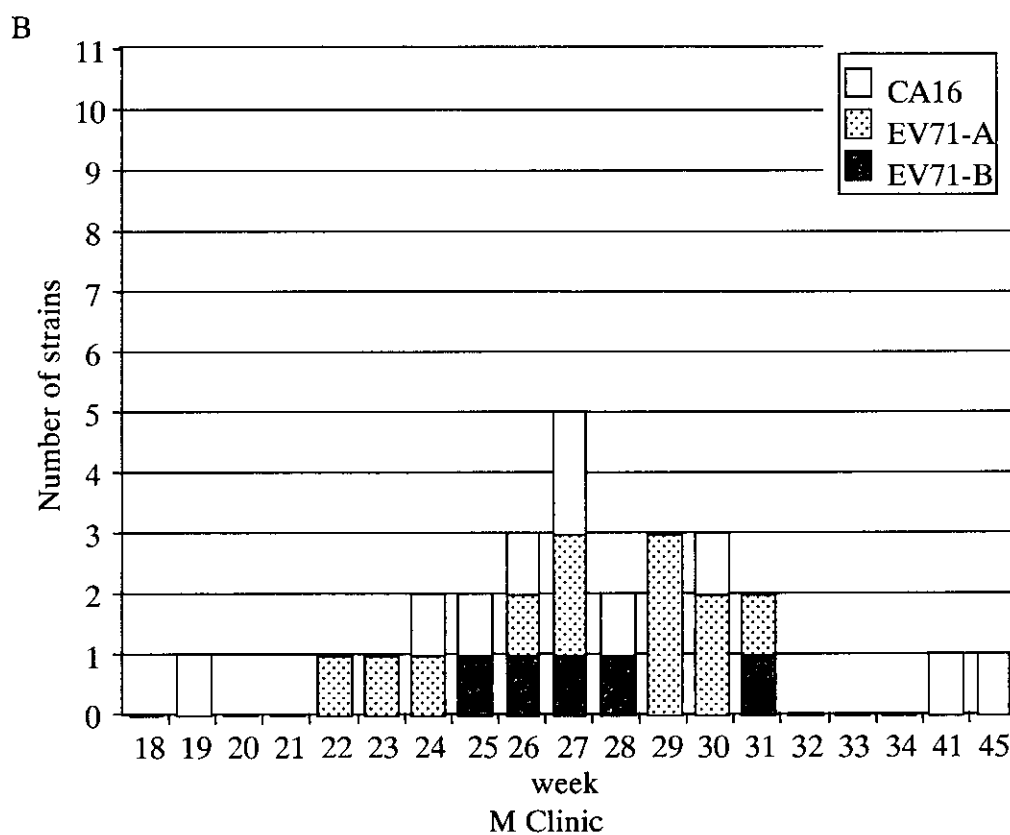
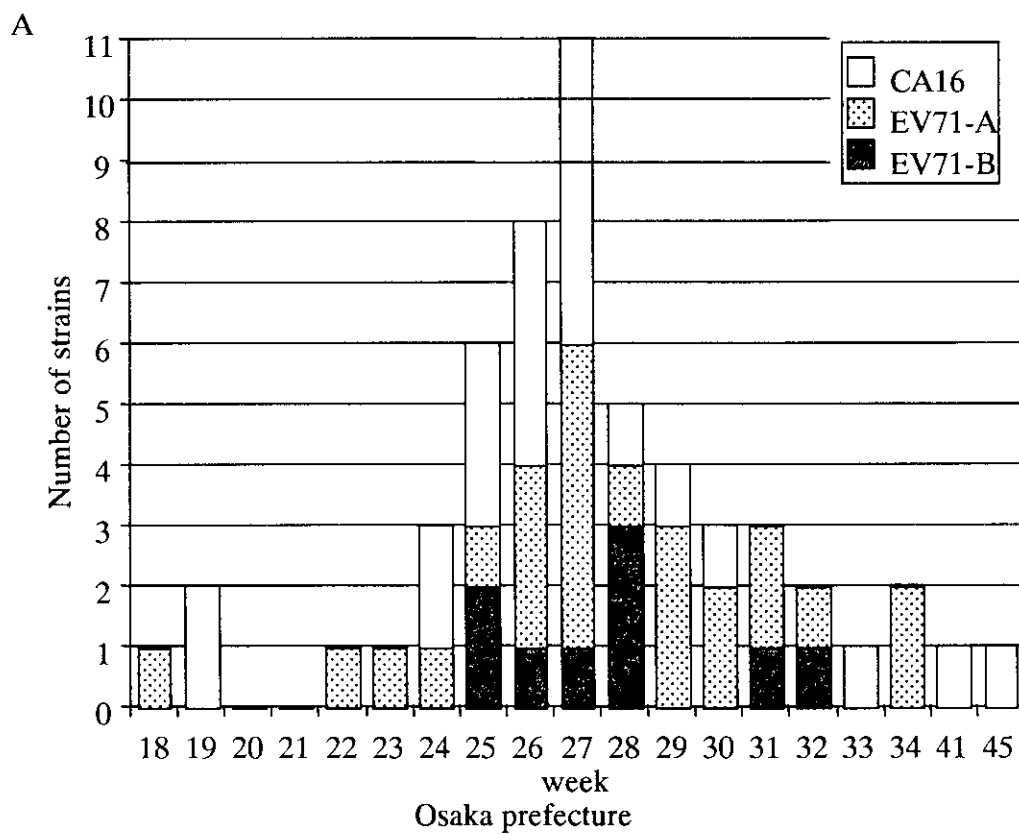


図1 2000年大阪府で流行した手足口病から分離されたCA16およびEV71

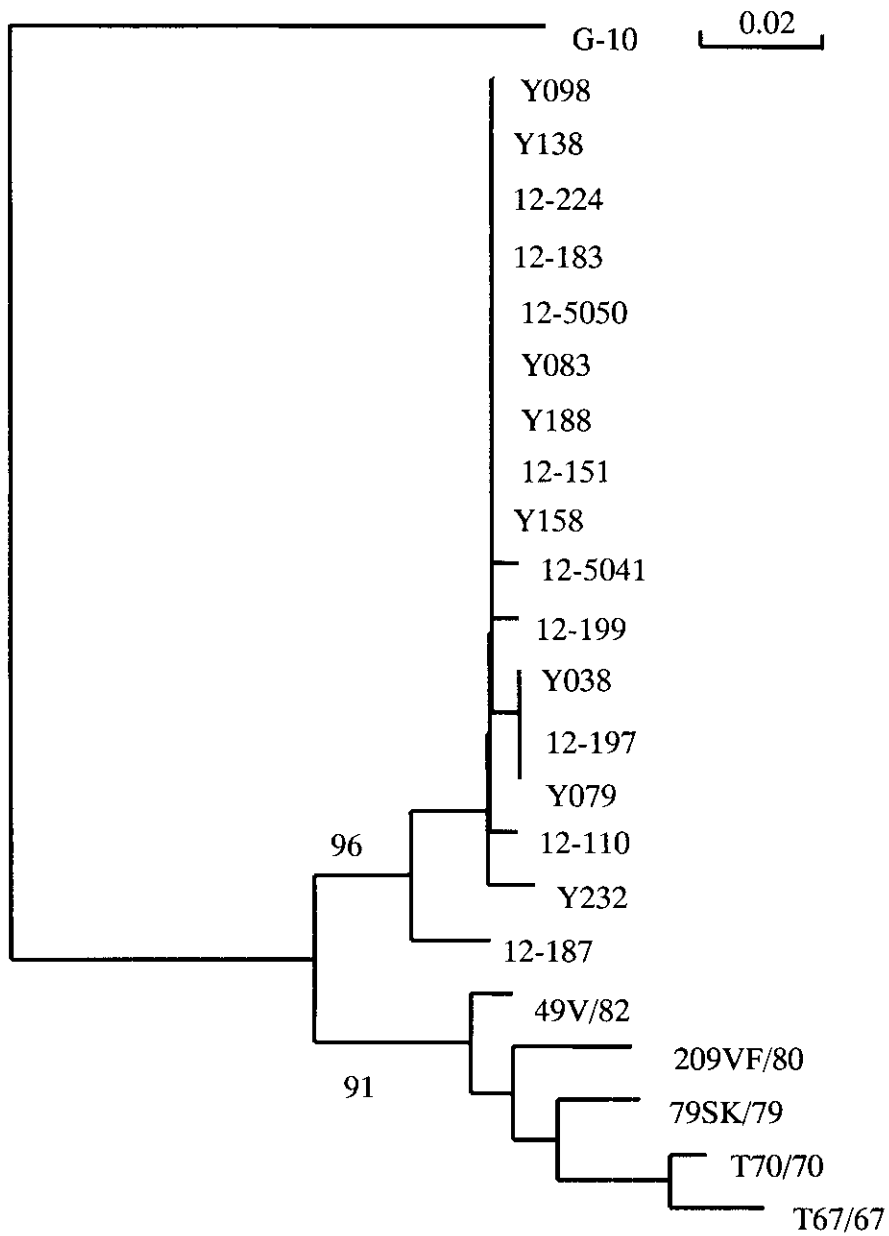


図2 大阪府で分離されたCA16の分子系統樹  
 The numbers at the node of the tree indicate the bootstrap values (shown by percentage).

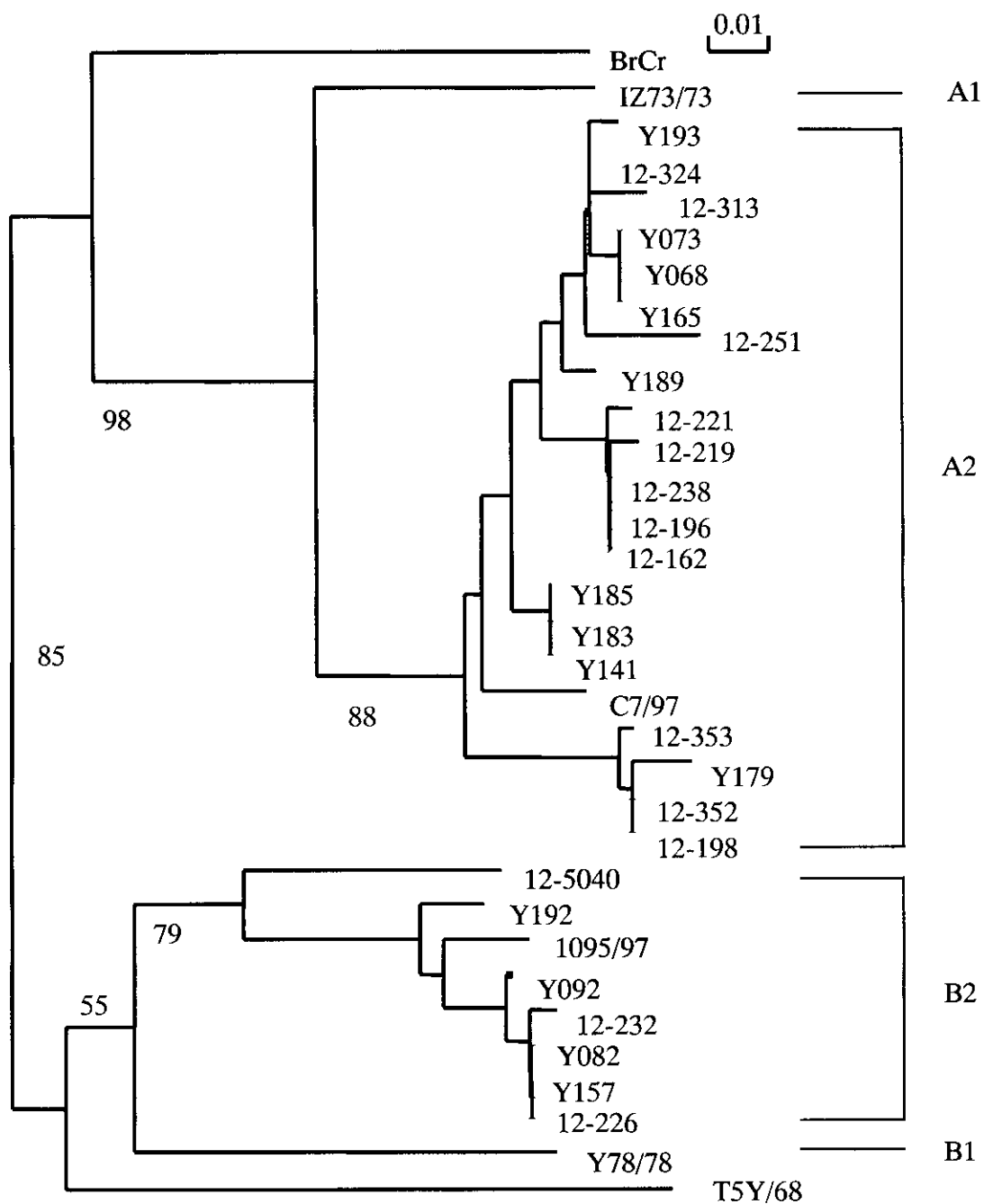


図3 大阪府で分離されたEV71の分子系統樹  
 The numbers at the node of the tree indicate the bootstrap values (shown by percentage).



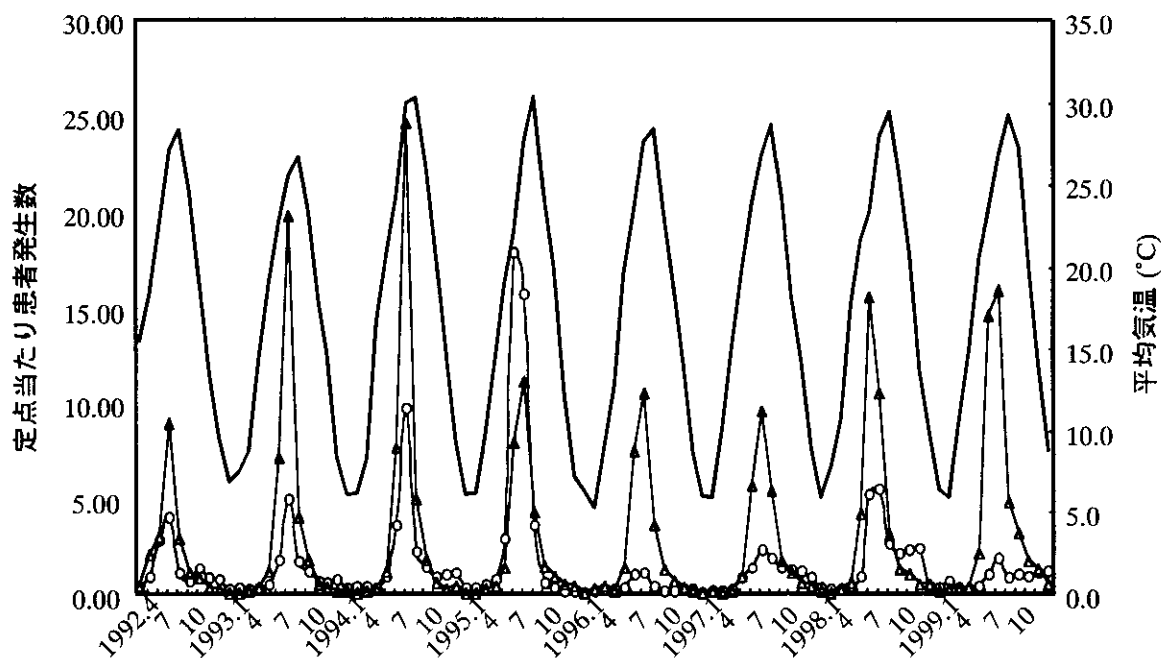


図4 定点別患者発生数と気温の相関関係（大阪府）

○ 定点当たり患者発生数手足口病    △ 定点当たり患者発生数ヘルパンギーナ  
 — 平均気温(°C)

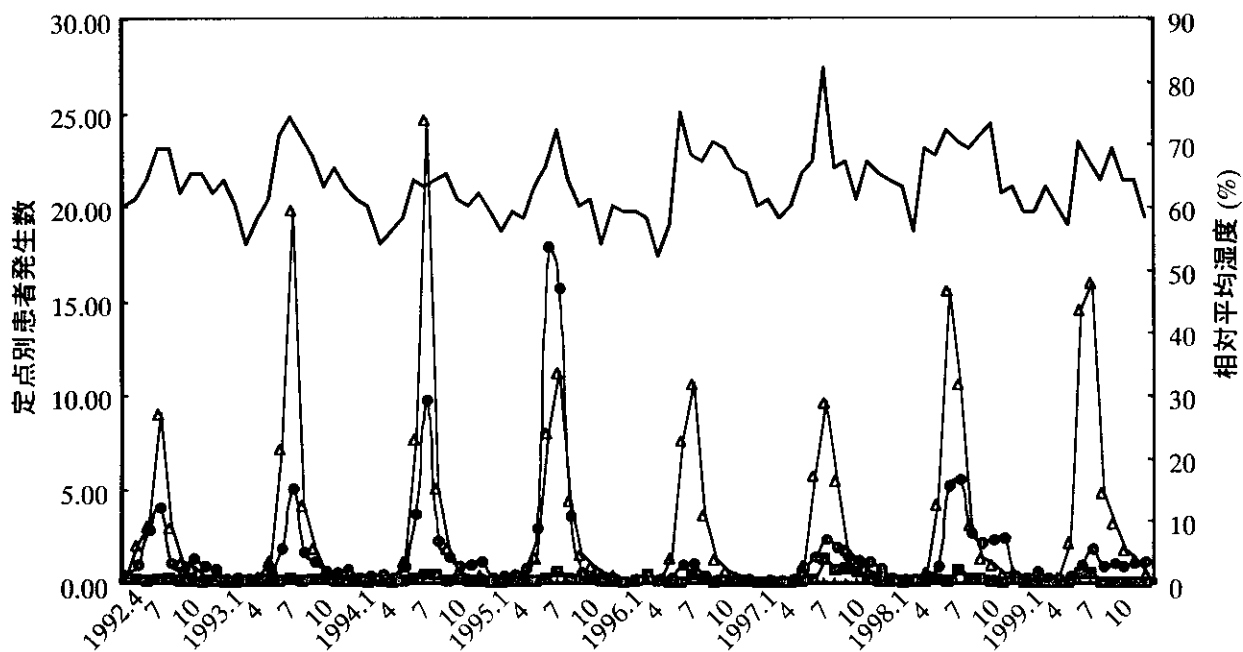


図5 定点別患者発生数と湿度の相関関係（大阪府）

● 定点当たり患者発生数手足口病    ▲ 定点当たり患者発生数ヘルパンギーナ  
 ■ 定点当たり患者発生数無菌性髄膜炎    — 平均相対湿度(%)

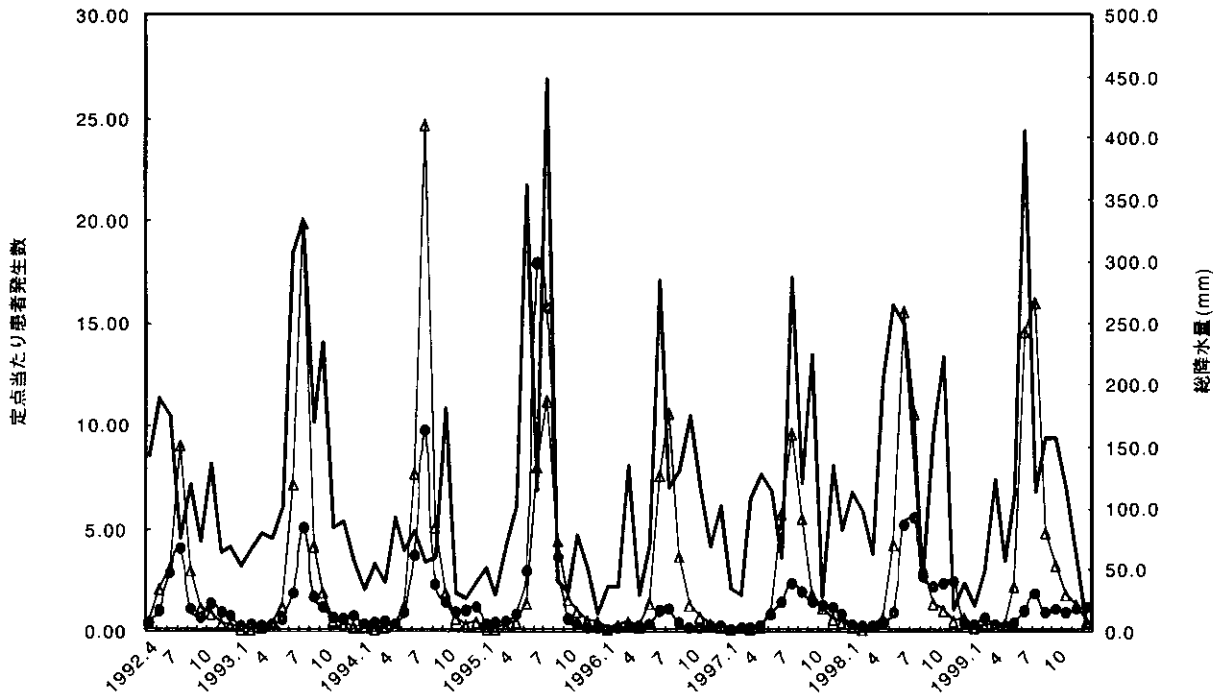


図6 定点別患者発生数と降水量の相関関係（大阪府）

● 定点当たり患者発生数 手足口病      ▲ 定点当たり患者発生数 ヘルパンギーナ      — 総降水量 (mm)

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

手足口病及び重篤エンテロウイルス感染症のウイルス疫学的研究

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（同上）

山西重機、亀山妙子、三木一男（香川県衛生研究所）

板垣朝夫、飯塚節子（島根県保健環境科学研究所）

**研究要旨** 手足口病（HFMD）に重篤な脳炎を併発して、多数の死亡例が発生し、その原因としてエンテロウイルス 71 型（EV71）の関連が指摘されている。そこで、我々は中国四国 3 県（愛媛県、香川県、島根県）の HFMD 及び重篤エンテロウイルス感染症の発生状況を把握するため、ウイルス学的調査を行った。その結果、2000 年には EV71、2001 年はコクサッキー A16 型（CA16）による HFMD の流行が認められた。また、エンテロウイルス流行状況を解析したところ、それぞれの県における流行ウイルス型が異なり、平常時のウイルス検査体制の維持・強化が必要と考えられた。

A. 研究目的

エンテロウイルスは 64 の血清型に分類されており、わが国においても顕性あるいは不顕性に流行を繰り返している。エンテロウイルスはポリオウイルスの急性灰白髄炎に代表されるように、重篤な中枢神経症状をおこす重要なウイルスである。ポリオウイルス以外にも、1969 年に突然現れたエンテロウイルス 70 型は、急性出血性結膜炎の世界的大流行を起こし、一部にポリオ様運動麻痺の併発が報告された。また、古くから心筋炎や筋痛症とコクサッキー B（CB）群との関連が注目されていたが、近年の遺伝子学的手法の開発に伴い、両者の関連性がさらに深まってきている。1997 年にはマレーシアのサラワク地方で HFMD が発生し、その経過中に小児の急死例が多発した。さらに、1998 年には台湾において HFMD の大きな流行が発生し、HFMD に併発した脳炎、急性弛緩性麻痺により 70 名以上の死亡が報告されており、EV71 が、HFMD に併発した中枢神経症状の原因として考えられている。

このような例は、今後も発生する可能性があり、健康危機管理上においても、日常的にエンテロウイルスの流行状況を監視しておくことが重要である。

今回は、全国感染症サーベイランス事業が開始された 1982 年以降の愛媛県における HFMD の流行について疫学的、ウイルス学的解析を加え、さらに 2000 年、2001 年については、中国四国地方の 3 県、愛媛県、香川県、島根県における、HFMD およびその他のエンテロウイルス感染症の発生状況についてウイルス疫学的調査を行った。

B. 研究方法

患者発生状況：愛媛県、香川県、島根県における感染症発生動向調査の患者発生報告数を用いた。愛媛県と香川県は隣接しており、高速道路高松－松山線、国道 11 号線や JR 予讃線等で人や物の交流が多いが、愛媛県と島根県は瀬戸内海と中国山地を隔て、中国四国地方の中でも互いに交流が希薄という地理的

関係がある。

ウイルス分離：ウイルス分離材料は、感染症発生動向調査検査定点等を受診した手足口病および無菌性髄膜炎等ウイルス性疾患患者の咽頭ぬぐい液、髄液、糞便等を採取し、常法による細胞培養法でウイルス分離を行い、中和試験で血清型の同定を行った。愛媛県と香川県では FL 細胞、RD-18 s 細胞、Vero 細胞を用い、島根県では AG-1、FL、HEL、RD-18s、Vero の各細胞を用いた。また、ヘルパンギーナ等コクサッキー A(CA)群が疑われた検体については、その一部を哺乳マウスに接種してウイルス分離を実施した。

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、遺伝子解析を行った。PCR 産物からのダイレクトシークエンスは三菱油化ビーシーエルの石古博昭博士に依頼し、Genebank に登録されているマレーシアや台湾の分離株とともに NJ 法による系統樹解析を行った。

EV71 分離株の中和試験による抗原性分析：EV71 分離株は、精製ウイルス粒子をウサギに免疫し、抗血清を作製し、80%ブラック減少法による交差中和試験を行った。BrCr 株(標準株、1970 年分離)、C7 株(1997 年脳炎患者から分離)の抗血清は、国立感染症研究所から分与された。

## C. 研究結果

### 1. 愛媛県における HFMD 流行の長期観察

感染症サーベイランス事業が始まった 1982 年以降の HFMD 患者報告数の消長と継続して実施している HFMD の病原体検索の結果を図 1 に示した。愛媛県においては HFMD は 1970 年に初めて流行がみられ、それ以降 1973 年、1975 年、1978 年、1979-80 年に流行している。原因ウイルスの検索により、1970 年、1975 年、1979-80 年の流行は CA16 によるものであり、1973 年、1978 年の流行は EV71 によるものであったことが明らかにされている。感染症サーベイランス開始後は 1982 年、1985 年、1987

年、1994-95 年、1999 年の流行時に CA16 が分離され、1983 年、1986 年、1990 年、1993 年、1997 年、2000 年の流行時には EV71 が分離された。このように HFMD の長期観察により、1970 年代は CA16 と EV71 がそれぞれ 4-5 年の周期を守って流行していたが、1980 年代以降は周期性が崩れ、ほぼ 3-4 年毎に流行するようになったことが示された。

1993 年と 2000 年の分離株を用いた、ブラック減少法による交差中和試験の結果を表 1 に示した。1993 年分離 1 株及び 2000 年分離の 2 株は、互いにほぼ同一の抗原性を示し、EV71 標準株 BrCr 株比でも抗原性の差異はほとんどみられなかった。C7 株は株特異的な反応を示していたが、一般に EV71 は、最近の分離株においても標準株から大きな抗原性の変異をしていないことが示唆された。

EV71 分離株の遺伝子解析の結果を図 2 に遺伝子系統樹として示した。愛媛県内においても genotype A と genotype B の両遺伝子型が流行していたことがわかった。1973 年、1990 年、1993 年の県内分離株は genotype A に、1997 年分離株は genotype B のクラスターに属していた。2000 年分離株は A、B 双方の genotype に分かれた。すなわち髄膜炎を併発した手足口病由来株 2K-1213 を含む 4 株が genotype A に、他の 2 株が genotype B に属していた。

### 2. 中国四国地方 3 県における HFMD 患者発生状況 (2000 年～2001 年)

愛媛県、香川県、島根県における HFMD 患者発生の時系列的消長を図 3 に示した。2000 年には、3 県とも HFMD の中規模流行がみられた。HFMD の流行は、愛媛県では第 21 週(5 月下旬)から始まり、第 27 週をピーク(7 人/定点/週)に、第 35 週まで続いた。患者発生は地域的に差異がみられ、特に患者が多発した今治地区を含む県東部に多く、次いで県南部に多かった。人口の多い松山市を中心とする県中部で患者発生が最も低率であった。2001 年は 6 月半ばから 9 月初めにかけて定点あたり患者数が 1 人/週を超えたが、全般的

に小規模な患者発生であった。年間の届出患者数は2000年が2891人(74.1人/定点/年)に対し、2001年は1091人(28.0人)であった。

香川県では、2000年の流行は第25週から始まり、第29～30週にピークを迎え、その後も散発的な発生がみられた。年間患者数は定点あたり61.5人で、全国と比較してほぼ同程度の流行であった。患者発生の地域性については、県西部で多発する傾向がみられた。2001年のHFMD流行状況は、第26週から始まり、第38週、第45～46週をピークとする2峰性のパターンがみられた。2000年に比べると定点あたり患者数は少なく、40.3人/年であった。また地域性では県中央部に多くみられた。

島根県では2000年に中規模の流行がみられたが、患者発生状況は地区により異なり、東部では9、10月をピークとした1峰性の流行であったのに対し、中部では8月と10月、西部では9月と11月をピークとする2峰性の流行となった。年間の届出患者数は1,267人(55.1人/定点/年)であった。2001年は、6月下旬から患者数の増加が認められ12月まで患者発生が続いた。しかし、定点当たり週別患者数が1.0人を上回ったのは第41、42週のみであり、小規模な流行であった。

2000年の流行は、愛媛県と香川県では、6月、7月であったが、島根県では8～9月と9～11月に2峰性の流行がみられ、流行の時期も前2県とは明らかに異なっていた。2001年は、3県ともHFMDの患者発生は小規模にとどまり、患者報告数はそれぞれ前年の約1/3から2/3に減少した。

### 3. 2000年～2001年のHFMD患者からのウイルス分離

愛媛県では2000年に検査された41名のHFMD患者のうち32名からEV71が、2名からCB5が分離された。3名は無菌性髄膜炎を併発していたが、そのうち2名からはEV71(髄液1、糞便1)が分離された。2001年にはウイルス分離試験を行った21名から

CA16が11例、EV71が4例、CA6が1例分離された。無菌性髄膜炎を併発した1名からはEV71が分離されている。

香川県では2000年に採取されたHFMD由来材料23件からEV71が6例分離された。EV71はHFMD以外にも無菌性髄膜炎から1例と口内炎から1例分離された。2001年は、HFMD由来材料19件が採取されCA16が7例、CA4が6例、CA8が2例分離された。

島根県では2000年に、154名209検体から、EV71が49例、CA10が17例、CA16が2例分離された。その他のウイルスはCA4、CA6、エコーウイルス3型(ECHO3)が各2例、CA5、HSV1が各1例分離された。流行の主要原因ウイルスはEV71であったが、流行前期の6～8月は、CA10が主要な原因であったことが示唆された。2001年はCA16が14例、CA6が7例、EV71が3例分離され、その他にもCA群ウイルスが少数例分離されている。なお、両年ともHFMDに無菌性髄膜炎を併発した症例はみられなかったが、咽頭炎(1ヶ月児)の咽頭拭い液と髄液、脳脊髄炎(14歳児)の咽頭拭い液からEV71が分離されている。

2000年と2001年の3県におけるHFMDの主要原因ウイルスは、それぞれEV71とCA16で、ほぼ同じウイルスが広範囲に流行していた。しかし、2000年のEV71は、愛媛県と香川県においてはそれぞれ7月、8月に流行ピークを迎えたのに比べ、地理的な隔たりが大きい島根県では大幅に遅れて9月、10月に流行最盛期がみられた。また、CA10は島根県でHFMDから比較的多く分離されたにもかかわらず、四国の2県では全く分離されなかった。これらのことから、HFMDが初夏の比較的短期間に全国的一斉流行するパターンではなく、最近の流行は比較的小地域での流行が次々に移動して広範囲の流行を形成するパターンに変わってきたことが伺われた。

### 4. 無菌性髄膜炎等の中枢神経系疾患及び筋肉炎症状からのウイルス分離状況(2001年)

無菌性髄膜炎等中枢神経系疾患からのウイルス分離結果を表3に示した。

愛媛県では脳炎・脳症患者6名、無菌性髄膜炎患者26名のウイルス分離を行ったが、エンテロウイルスは無菌性髄膜炎からCB2が1例、CB3が2例分離されたのみで、そのうち髄液からの分離はCB3が1例であった。

香川県では脳炎・脳症患者19名、無菌性髄膜炎患者98名の分離検査の結果、無菌性髄膜炎患者からECHO11が2例分離された。

島根県では脳炎・脳症8名、無菌性髄膜炎61名、麻痺患者1名のウイルス分離を行い、無菌性髄膜炎からECHO11が6例、CB4が5例、ECHO18が4例分離され、麻痺患者からもCB4が分離された。無菌性髄膜炎からの分離例のうち髄液からの分離陽性例は、ECHO11が5例、CB4が4例、ECHO18が3例であった。脳炎・脳症からはエンテロウイルスは分離されなかったが、インフルエンザB型が咽頭拭い液から1例分離された。

次に、心筋炎、筋痛症からのウイルス分離状況を表4に示した。これらの症例の検査数は少なく、愛媛県と香川県を合わせても、心筋炎患者3名、筋痛症患者7名であった。そのうち、心筋炎からCB3が1例、筋痛症からCB5が1例分離された。

#### 5. 中国四国地方3県における月別ウイルス分離状況(2000年~2001年)

愛媛県、香川県、島根県における2000年から2001年の月別エンテロウイルス分離数を表5に示した。CB群、ECHO群ウイルスについては、用いている培養細胞系から3県ともほぼ同程度の分離感度を維持していると考えられるが、CA群に関しては、島根県では哺乳マウスを用いた分離検査件数が多いため、他の県と一様な比較はできない。

CA群、CB群ともに、2000年に多く分離された型は2001年には少なくなり、代わって別の型が多発する傾向がみられた。また、地域的には2000年にCA4、CA10、CB5がほぼ共通して多かったが、特に香川県ではCB5の

地域的流行がみられた。その流行は、2月と8月をピークとする2峰性の流行を示し、疾患別では呼吸器系疾患121株(73.8%)、無菌性髄膜炎18株(11%)、その他の疾患25株(15.2%)であった。2月のピークはインフルエンザの流行期と一致しており、冬季期間中の分離株は全て呼吸器疾患由来であった。また、インフルエンザウイルスとの同時分離が17例にみられている。今季のCB5の流行は全国の分離者総数294名中、香川県が134名と45.6%を占めており、香川県域に限局した流行と考えられた。

2001年は愛媛県でCA5、CB3が最も多かったのに対し、香川県ではCA4、島根県ではCA8、CA4、CA6、CB4が多かった。CA群やCB群は年により地域により主流ウイルス型が異なるという流行形態を示した。ECHO群は、CA群、CB群に比べ非常な型の流行をするが、調査期間中にはECHO11とECHO18が比較的多く、流行時期は通常のエンテロウイルス好発期とは異なり、秋から冬にかけて多発する傾向がみられた。

#### D. 考察

愛媛県におけるHFMDの流行の長期観察により、EV71による流行も、CA16による流行も、1970年代には4~5年周期で流行を繰り返してきたが、最近、その周期性がやや崩れ、2~3年周期の流行に変わってきたことが示された。また、EV71の交差中和試験での抗原性の解析では、2000年分離株には標準株BrCr株や過去の分離株からの大きな変異は認められず、EV71の流行が新たに誕生した感受性者の蓄積を待って周期的に起こるという考えが支持された。

VP4遺伝子の塩基配列を解析した結果、愛媛県においても国内や台湾等を同じように、genotype Aとgenotype Bの2つの遺伝子型株が流行していたことが示された。また、抗原性や症状と遺伝子型には関連性がみられなかった。サラワクや台湾で発生した脳炎・脳症等重篤な症状の原因がウイルス側にあるなら、VP4領域以外の部分のより詳細な解

析が必要である。

中国四国地方の3県（愛媛県、香川県、島根県）における HFMD 患者発生状況は、2000 年は EV71 を主原因とする中規模流行であり、2001 年は CA16 を主とする小規模な流行であった。2000 年 EV71 の流行時期は、愛媛県、香川県が夏季であったのに比べ、島根県では秋季に流行した。また、同じ県内でも小地域単位の流行が次々と移動している傾向がみられ、流行周期性の崩れとともに HFMD の流行を把握するのが難しくなると思われる。

HFMD の原因として EV71、CA16 が主要ウイルスとされているが、島根県では CA10 が比較的多く分離され、CA10 が HFMD を発生させる頻度の高いウイルスと考えられている。今回、その他にも CA4、CA6 が少数例分離されたが、これらのウイルスの HFMD 病原性についての検討は今後の課題である。

EV71 の流行時期には HFMD 症状を呈していない無菌性髄膜炎患者から EV71 が少数例分離されている。髄液検体からの EV71 分離頻度は非常に低いので、EV71 による HFMD 流行時には、その周辺に EV71 による無菌性髄膜炎が多数発生している可能性がある。無菌性髄膜炎のウイルス分離試験による診断確定率が非常に低いため、髄液からエンテロウイルス等遺伝子を検出する高感度 PCR 法を開発する必要がある。

エンテロウイルスは年により地域により主流ウイルス型が次々に変わる。重篤な症状を呈するエンテロウイルス感染症の発生を早期に見出すためには、各県で平常時のエンテロウイルスの流行状況を把握しておくことが必要である。

次年度も愛媛県、香川県、島根県における手足口病及び重篤エンテロウイルス感染症の発生状況の把握を推進する。また、無菌性髄膜炎や脳炎の検体から直接エンテロウイルス遺伝子を検出する PCR 法の導入、開発を試み、保存している髄液や咽頭ぬぐい液を用いてその有効性を評価したい。

## E. まとめ

1. 近年、HFMD の流行周期性が崩れてきているが、愛媛県においては EV71、CA16 ともにほぼ 3~4 年の周期で流行がみられた。
2. EV71 の抗原性は標準株 BrCr 株や過去の分離株からの大きな変異は認められなかった。また、VP4 遺伝子領域の遺伝子型と抗原性、症状との関連性はみられなかった。
3. 中国四国地方の3県（愛媛県、香川県、島根県）で、2000 年には EV71 による HFMD の中規模流行があり、HFMD に無菌性髄膜炎を併発した例から少数例 EV71 が分離された。2001 年は CA16 の小流行があった。
4. エンテロウイルス特に CA 群、CB 群は、年次、地域により主流ウイルス型が異なっており、健康危機管理のために平常時のウイルス検査体制の強化、維持が必要であると考えられた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1.論文発表

- 1)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
- 2)飯塚節子、武田積代、板垣朝夫：島根県における 2000 年の手足口病の流行状況。病原微生物検出情報、22：170-171、2001

### 2.学会発表

吉田紀美、近藤玲子、山下育孝、大瀬戸光明、浅井忠男、井上博雄：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流行。第 17 回中国四国ウイルス研究会、米子市、2001

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

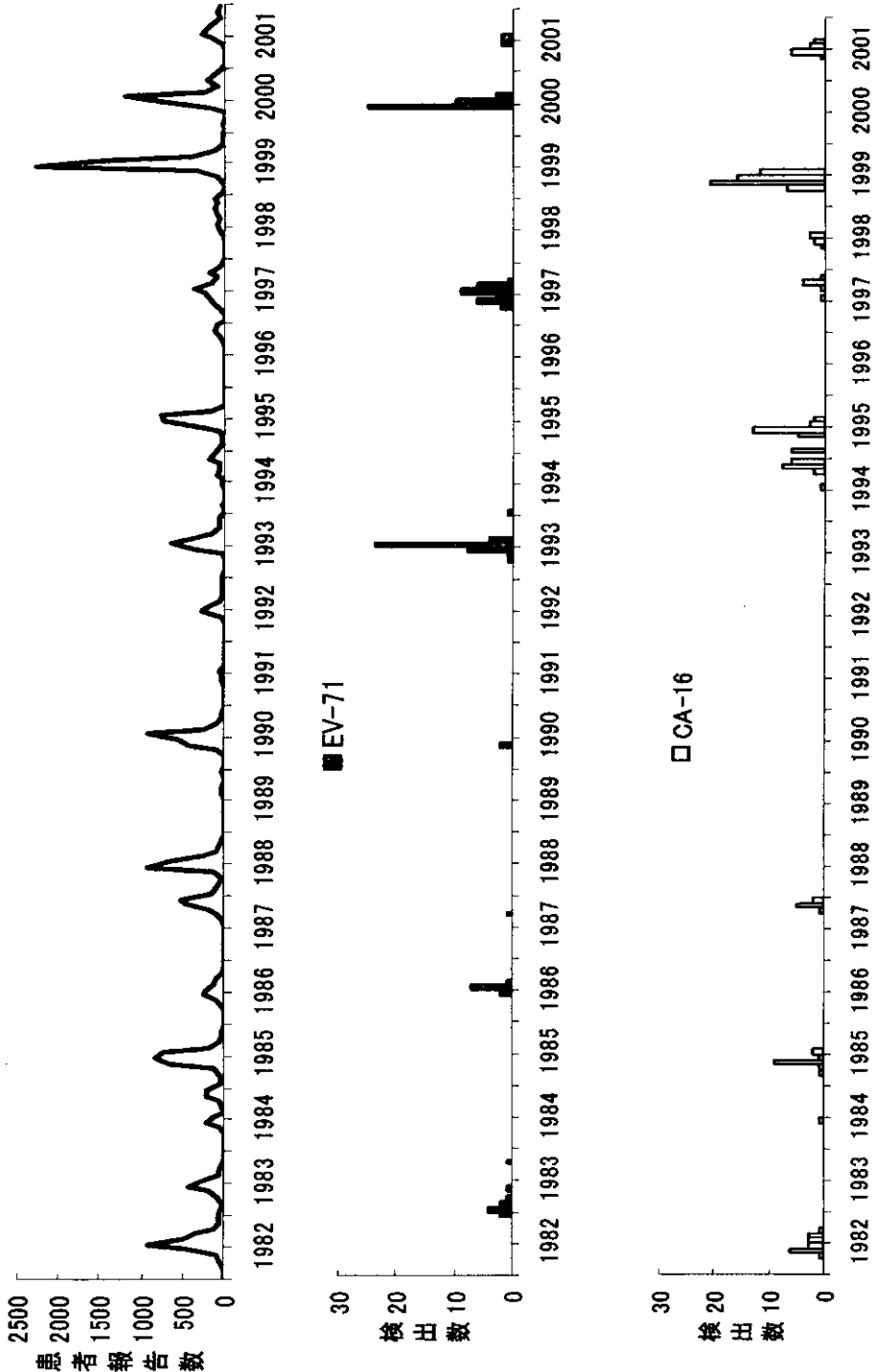


図1 手足口病患者報告数とEV71,CA16の月別検出状況



表1 EV71分離株の交差中和試験結果

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

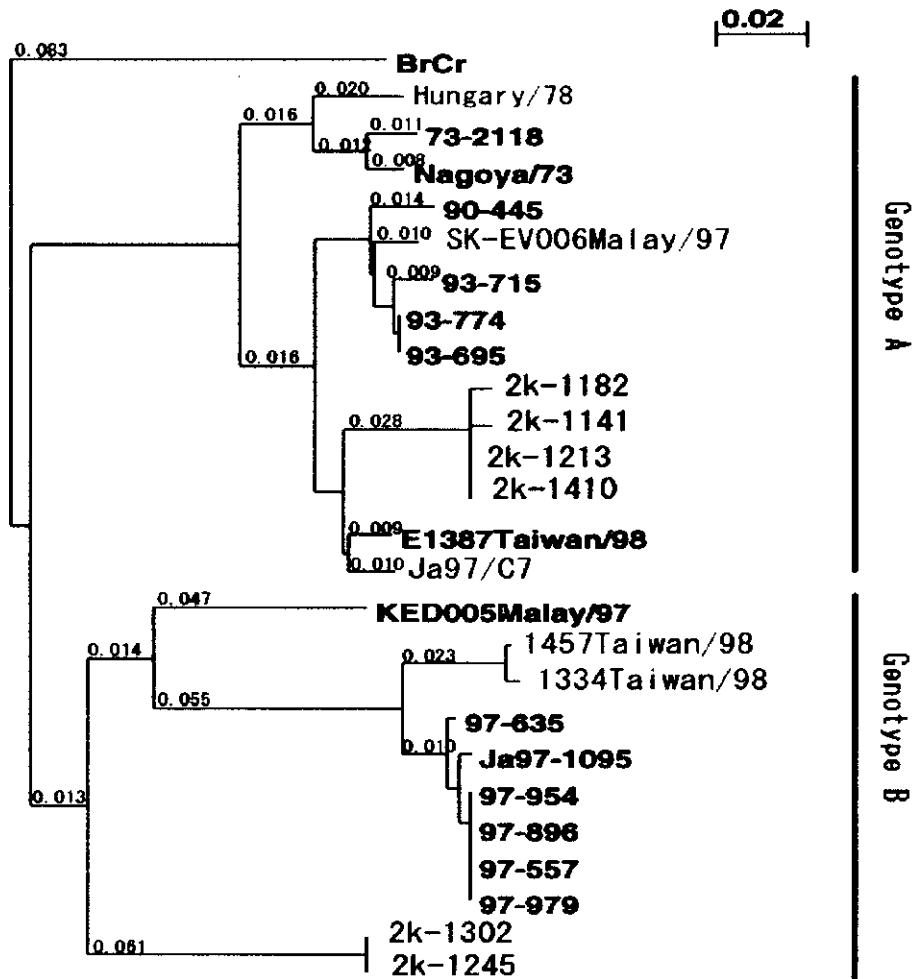


図2 EV71の遺伝子解析(NJ法)

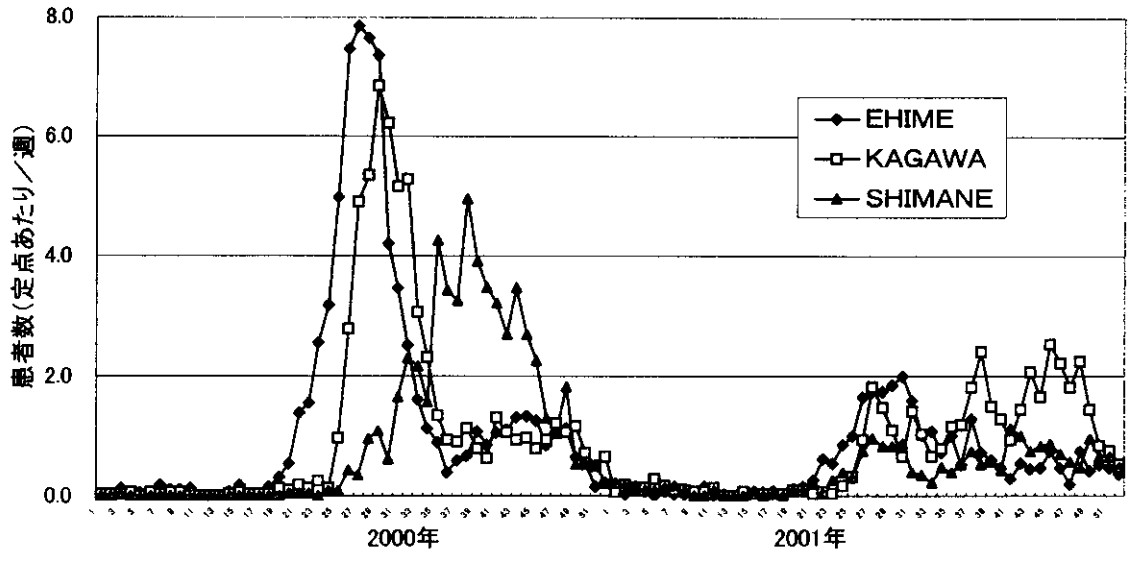


図3 HFMD患者報告数の週別消長(感染症発生動向調査データ)

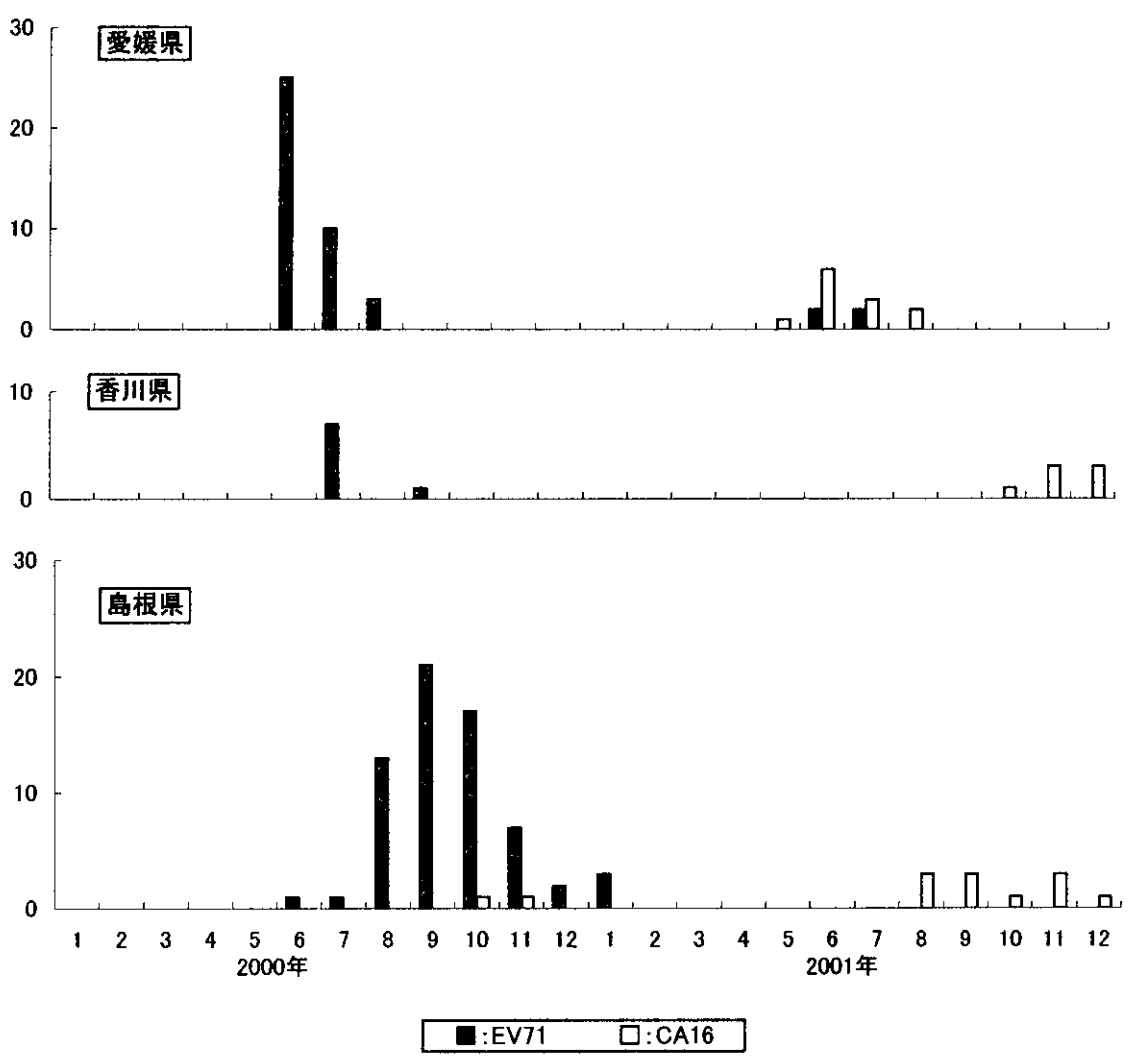


図4 EV71とCA16の月別分離状況(2000年～2001年)

表2 HFMD患者からのウイルス分離状況

	年次	症状	患者数	EV71	CA16	CA2	CA4	CA5	CA6	CA8	CA10	CB5	ECHO3
愛媛県	2000年	HFMD	38	30								2	
		HFMD+AM	3	2									
	2001年	HFMD	20	3	11				1				
		HFMD+AM	1	1									
香川県	2000年	HFMD	17	5									
		HFMD+AM	19	2									
	2001年	HFMD	21		7		6				2		
		HFMD+脳炎	1										
島根県	2000年	HFMD	154	49	2		2	1	2		17		2
	2001年	HFMD	49	3	14	1	1		7		2		
		HFMD+AM	0										

表3 髄膜炎、脳炎等中枢神経系疾患が疑われる症状からのウイルス分離(2001年)

県別	診断名	患者数	CB2	CB4	CB3	ECHO11	ECHO18	INF.B	Mumps	Adeno
愛媛県	脳炎・脳症	6								
	髄膜炎	26	1		2					2
	片麻痺	1								
	顔面神経麻痺	1								
香川県	脳炎・脳症	19								
	髄膜炎	98				2				
島根県	脳炎・脳症	8						1		
	髄膜炎	61		5		6	4			3
	麻痺	1		1						

表4 心筋炎・筋肉痛等からのウイルス分離  
(2001年)

県別	症状	患者数	CB3	CB5
愛媛県	心筋炎	1	1	
	筋炎・筋肉痛	4		
香川県	心筋炎	2		
	筋炎・筋肉痛	3		1

表5 月別ウイルス検出状況(2000年～2001年)

県別	ウイルス型	2000年												2001年														
		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	計	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	計	
愛媛県	COXSAA2													0												1		
	COXSAA4	1				1	9	8	3					22						1	4		1	1		7		
	COXSAA5													0					2	8	9	1				20		
	COXSAA6											1	3	4						1		2				3		
	COXSAA8													0					1	4	2				1	8		
	COXSAA9								1	2	1			4												0		
	COXSAA10								1	1		3	7	2	14									1			1	
	COXSAA16														0					1	6	3	2				12	
	COXSAB1							7	10	2					19	1											1	
	COXSAB2														0									1	3	2	6	
	COXSAB3							2	4						6						5	4	1	5			15	
	COXSAB4					2				2					4												0	
	COXSAB5							2	4				1		7			1	1								2	
	ECHO 11								1				7	3	11	3	1	1									5	
	ECHO 16				1										1									1			1	
	ECHO 18	1													1												0	
ECHO 25									1			2		3												0		
ENTERO71							25	10	3					38						2	2					4		
香川県	COXSAA2													1					1	10	3				14			
	COXSAA4							1	1					2												4		
	COXSAA5													0												0		
	COXSAA8													0						2	2					4		
	COXSAA16													0										1	3	3	7	
	COXSAB1						1	1	1					3												4		
	COXSAB2													0			4									4		
	COXSAB3	2												2			5						1			6		
	COXSAB4													0										1		1		
	COXSAB5	6	35	1	5	3	13	26	42	20	11	1	1	164			3								1	4		
	ECHO 3													0										1		1		
	ECHO 6				4									4										1		1		
	ECHO 11										1	2		3							1			1	13	15		
	ENTERO71							7		1				8												0		
	島根県	COXSAA2							2	1					3					1	5	13	3	1	1	24		
		COXSAA4			3	1	4	1	13	8	3				33					3	10	21	2		3	39		
COXSAA5								1	1	1	1			4											0			
COXSAA6								2	3		2	2		9			2	1	2	11	16	2	3	1	38			
COXSAA8									2	3				5						12	41	11	2		66			
COXSAA10							6	22	27	11	4	2		72	1				5	8					14			
COXSAA16											1	1		2									3	3	1	4	5	16
COXSAB2							2							2												0		
COXSAB3		1								1	1		4	7	1	1					1	5	6			14		
COXSAB4														0					1		3	3	3	7	4	21		
COXSAB5				1	5	18	24	19	3					70													0	
ECHO 3					3		6	9	2	1		2		23	1											1		
ECHO 6							1		1					2												0		
ECHO 9														0						1						1		
ECHO 11														0							3	7	5	10	9	11	45	
ECHO 16														0									1	3	1	3	8	
ECHO 18								2	1	3	5	1	12	2	1	2	2	1		1	1	3		1	14			
ECHO 25			1	1	2	5	2						11			1	4								5			
ENTERO71						1	1	13	21	17	7	2	62	3											3			