

小児の急性散在性脳脊髄炎と多発性硬化症における脳幹病変と呼吸障害について

研究協力者 岡崎 伸、富和清隆、川脇 壽、塩見正司、外川正生、望月邦三、赤土みゆき
(大阪市立総合医療センター 小児神経内科 小児感染症科 放射線科)

要旨 エンテロウイルス 71 の脳幹脳炎では神経性肺水腫、心原性ショックを伴い、剖検所見・画像所見では延髄病変が特徴的であり、enterovirus brainstem cardio-pulmonary syndrome ととらえられる。小児期に脳幹病変を伴う急性神経疾患としては急性散在性脳脊髄炎(ADEM)/多発性硬化症(MS)がある。成人の MS 例で延髄背側部(網様体部)に病変が局在することが推定された例で神経性肺水腫を併発した報告があることから、小児 ADEM/MS の症例について解析することとした。当院小児神経科、小児内科で経験した ADEM8 例、MS4 例について検討した。MS については再発時を各々別個に、計 12 エピソードについて検討した。

結果: 入院経過中に脳幹症状を認めたものは、ADEM 8 例中 6 例に、MS 12 例中 8 例と高頻度にみられた。MRI による検索においても入院経過中の脳幹部所見陽性例は ADEM 中 6 例、MS 6 例と同様に高頻度に見られた。しかし、呼吸器症状を呈したのは 1 例のみであり、この症例においても肺水腫はみられなかった。全例ステロイド治療により治癒または寛解を得ている。

結論: 小児期の急性脳幹病変を伴う疾患として代表的な疾患は ADEM/MS である。しかし、EV71 脳幹脳炎にみられる肺水腫や末梢循環不全を伴う例は当院入院例ではみられなかった。

I. 目的

エンテロウイルス 71 は手足口病の原因として知られているが、近年、脳幹脳炎を合併し、心原性ショックと神経原性肺水腫と伴い急死する例が多発するようになった¹⁾。成人領域の急性脳幹病変としては出血、梗塞、炎症などがあるが、小児では急性散在性脳脊髄炎と多発性硬化症が代表的な疾患である。また、多発性硬化症ではまれではあるが神経原性肺水腫をきたす報告がある²⁾。小児における脳幹病変と神経性肺水腫の関連を調べるため、当院にて入院加療を受けた急性散在性脳脊髄炎(以下 ADEM)と多発性硬化症(以下 MS)

における MRI 上の脳幹部所見および脳幹症状について後方視的に検討し、脳幹病変と呼吸障害の関連について検討した。

II. 対象

1993~2001 に当院小児内科・小児神経内科を受診した症例のうち、初発時から当院フォロー中の症例で、かつ入院で精査から確定診断し治療を行った症例を選んで対象と定めた。

ただし、症例①は、当初脊髄腫瘍疑いと診断され脳外科的に対応されていたので 3 回目の再発データを対象とした。

III. 方法

過去の入院カルテと MRI を用い、臨床症状とくに脳幹症状と MRI 上の所見について整理し対比検討した。MS については各再発時を 1 例として検討した。

ADEM/MS の診断は厚生省班会議の基準に従った。神経症状の責任病巣は、二名以上の小児神経内科医による総合的な所見にもとづき臨床的に判定した。特に構音障害については、球症状以外にも核上もしくは小脳性の症状として生じることがあり、その鑑別が小児では困難であるが、他の神経症状を参考にして判定した。また MRI の脳幹部所見については放射線科医が読影した。

IV. 結果

対象は ADEM 症例 8 例 (1-12 歳) MS 症例 4 例 (6-13 歳) で、計 12 人、再発を含め、のべ 20 例であった (表 1)。男女比は ADEM では 5 例 : 3 例、MS では 0 例 : 4 例で女児が多かった。年齢は ADEM の方が低年齢の症例がみられた。なお、入院経路はすべて開業医および総合病院からの紹介であった。うち症例③、⑦の 2 症例は治療が開始されていたが、反応が乏しいため転院している。

画像所見は症例⑧のみみられなかったが、この症例は小脳症状と脊髄症状を有し、髄液蛋白と細胞数の増加があり、メチルプレドニゾロンパルス療法で早やかに著明に改善したため、臨床的に ADEM と判断した。

髄液所見では、蛋白 30mg/dl 以上の上昇は 7 例/12 例、MBP 陽性例 (1.0ng/ml 以上の増加) は 5 例/9 例 (症例⑧、⑨、⑩は計測せず) であった。

本検討における ADEM/MS の脳神経症状についての結果を (表 2-1) にあらわす。入院経過中に脳幹症状を認めたものは、ADEM 6 例/8 例、MS 8 例/12 例であり高頻度でみられた。脳幹症状としては脳神経 III、V、VI、VII、VIII、X、XII の障害が想定される非常に様々な症状を認めた。ADEM では、外眼筋の麻痺 (脳幹症状を表した ADEM6 例のうち 4

例) と構音障害 (脳幹症状を表した ADEM6 例のうち 4 例) が非常に高率にみられた。MS では、発症時々により症状は異なり、外眼筋の麻痺や構音障害は 1 例ずつで、多様な知覚異常が認められた。脳神経 VIII の障害は ADEM/MS ともに認められなかった。神経症状の責任病巣と考えられる部位を表に示した (表 2-2)。

ADEM では痙性四肢麻痺 (ADEM8 例のうち 4 例)、不随意運動 (ADEM8 例のうち 6 例) が多くみられた。MS では、不随意運動は無く痙性四肢麻痺は 1 例であり脊髄横断症状や視力障害が多くみられた。ADEM では運動障害が多く、MS では知覚障害が多い傾向は脳神経症状と同一であった。

入院時初回の MRI における脳幹部の所見を表に示した (表 3-1)。入院経過中の脳幹部所見陽性例は ADEM 6 例/8 例、MS 6 例/12 例と高頻度に見られた。ADEM 症例の方が脳幹の所見は多く、中脳/脳幹/延髄全てにわたる所見が 2 例、中脳/脳幹にわたる病変が 4 例、脳幹/延髄にわたる病変が 4 例と多くみられた。陽性例に明らかな脳幹症状が見られた。また、画像上認めない例でも脳幹症状があった。

MRI におけるその他の中枢神経所見を表に示した (表 3-2)。大脳白質病変が ADEM6 例、MS10 例と非常に多くみられ、脳幹病変は次に頻度が高かった。ADEM では、大脳基底核病変が 4 例 (8 例中) と半数に見られた。また、MS では脊髄病変が 4 例 (12 例中) と比較的多くみられた。

呼吸障害をきたした症例は症例⑩であった。以下に症例提示し、神経原性肺水腫の合併の有無について検討する。症例⑩は 13 歳女児で主訴は呼吸困難。現病歴としては平成 6 年 11 月 15 日から、鼻汁を認めたが、発熱は見られなかった。同日頃から左上下肢にしびれ感を認めたがそのまま登校していた。同 18 日朝から急に呼吸苦を訴え徐々に努力性呼吸となった。同 19 日になり、努力性呼吸が増強し立位・

座位も不能となった。某総合病院を受診。過呼吸の診断で入院した。尿失禁・右優位の片麻痺が続き、過呼吸の治療で努力性呼吸が改善しないことから、器質的な神経疾患を疑われ当院へ紹介となった。家族歴は特記すべきことなく、既往歴はアトピー性皮膚炎、卵・牛乳アレルギーがあった。

当院転院時は意識はほぼ清明であった。現症をに示す(図1)。脈拍は1分間88回で整。呼吸数は1分間18回であったが著明な努力性呼吸(肩呼吸・下顎呼吸)であり不整であった。肺雑音はあまり認めなかった。腹部の所見は特に無かった。深呼吸させると胸式で可能であるが腹式呼吸は全くできなかった。口蓋垂がやや左側へ変位しており、常に開口していた。会話は可能であるが、発語に不明瞭さが認められた。四肢及び体幹の筋力低下著明(右2/5、左5/5)で腱反射は膝蓋腱反射のみ右がやや低下。していたが病的反射を認めなかった。右頸部から上腕部、腹部に感覚の低下を認めた。尿意は訴えられるが、尿閉であった。

血液/髄液の検査結果を示す(図2)。髄液蛋白の上昇は著明ではなかったが、ミエリンベースックプロテインは著明な高値であった。MRI所見(図3)は白質優位に病変が空間的に多発しており、ADEM/MSと考えられた。(後に再発を認めMSと考えた)

臨床経過を示す(図4)。入院後、2回のステロイドパルス療法で症状軽減が見られたが、入院中に神経症状が再発した。上下肢の知覚症状が続いていたが、四肢麻痺や膀胱直腸障害が軽減し消失したため経過観察していたが、平成7年1月中旬から下肢のしびれ感が増強し、さらに企図振戦/視力障害を表したためさらに2回のステロイドパルス療法を行った。症状軽減し消失が見られたため退院とした。

努力性呼吸の症状に注目してみると、他の神経障害と同時期に症状が出現しており、ステロイド大量療法で比較的早やかにまた完全に回復しており、レントゲン上肺炎や無気肺

などの所見が認められず、呼吸筋麻痺による低換気と思われ、肺水腫は否定的であった。

V. 考察

エンテロウイルス71の脳幹脳炎が神経原性肺水腫を引き起こすことは、肺水腫を伴った剖検例で心臓や肺からはウイルスは分離されず、中枢神経系のみから分離され、脳幹の神経細胞への感染が最も著明であった報告から明らかである³⁾⁴⁾。また、死亡例では左心機能の低下が著しく、Enterovirus Brainstem Cardio-pulmonary Syndrome(EBPCS)とするのが適切な病態を呈している。

MSにおいても肺水腫は認められ、延髄背側の病変が責任部位であるとの報告²⁾がある。また、左心室収縮能の著しい低下を伴う神経原性肺水腫の報告⁴⁾⁵⁾、心合併症を伴わない神経原性肺水腫の報告⁶⁾などがあり、責任病巣は延髄であると考察されることが多い。EBPCS同様にMSの脳幹病変に肺水腫と心原性ショックが合併することは興味深い。

今回の我々の症例では、脳幹病変がADEM6例/8例、MS8例/12例と多く、MRI所見陽性例もADEM6/8、MS6/12と高頻度であったにもかかわらず、呼吸状態は全く変化の無い症例がほとんどであり、呼吸障害をきたしたのは症例⑩1例であった。症例⑩の呼吸障害を検証すると、腹式呼吸が不可能であったこと、レントゲン上無気肺や気胸または肺炎所見などはなく空気の入りも良く、肺水腫のような障害よりも中枢性の呼吸運動障害による低喚起吸が疑われた。状態が悪く鎮静が不十分のため急性期MRI所見の断定は不能であるが、その後のMRIでは延髄背側に明らかな病変を持っていた。MSの肺水腫合併例は延髄背側の迷走神経運動核や網様体部の病変が疑われているが、症例⑩では外側部の白質部の病変であったことが肺水腫を合併しなかった理由とも考えられる。

今回、小児の急性脳幹病変としてMS/ADEMを取り上げ、神経原性肺水腫の合併について検

討したが、当院入院例では神経性肺水腫合併例は見いだせなかった。文献的にも小児の ADEM/MS の肺水腫合併例は検索した限りではなかったし、成人例も少ない。そもそも小児の急性脳幹病変はまれであり、この点からもエンテロウイルス 71 脳幹脳炎とくに EBCPS はユニークであり、臨床の現場で広く認識される必要がある。

神経原性肺水腫の責任部位とする報告の多い延髄に注目してみると、今回の報告でも多くの症例で症状的にも認め、MRI 所見でも認めた。また、脳幹/延髄にわたる病変が 5 例と広範囲の病変も多くみられたにもかかわらず、神経原性肺水腫は生じておらず、神経原性肺水腫の責任病変は、かなり限局された部位であるか、灰白質の病変を含むことが推測された。脳幹病変の他の症状は強く出ており、同じ脳幹病変であっても限局性脳幹脳炎よりも ADEM/MS では神経原性肺水腫が生じにくいのではないかと考えられた。

理由としては、ADEM/MS は病変好発部位として白質病変が多いことが関係するのではないかと考えた。

VI. 結果

1. 当院小児内科系で治療を行った ADEM/MS 症例 20 例（12 名）について脳幹病変の検討を行った。
2. 脳幹症状陽性例は ADEM 6 例/8 例、MS 10 例/12 例と高頻度に見られた。
3. MRI で脳幹所見が陽性であった例は ADEM 6 例/8 例、MS 6 例/12 例と高頻度で

あった。

4. 今回の検討では脳幹病変を示す例は多く、広範囲に病変と思われる MRI 所見を認めたが、神経原性肺水腫を生じた症例は無く、神経原性肺水腫の責任病変はかなり限局された部位であることが予測された。
5. 今後前方視的にも ADEM/MS 症例における呼吸障害の検討を続けて、症例を積み重ね ADEM/MS 症例と神経原性肺水腫との関連を追及すべきである。

参考文献

- 1) 塩見正司: エンテロウイルス 71 感染または手足口病に合併した脳幹部脳炎・肺水腫の 4 例の臨床解析 厚生科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業、重症エンテロウイルス脳炎の疫学的及びウイルス学的研究並びに臨床的対策に関する研究。平成 12 年度総括・分担研究報告書 41-46, 2001
- 2) Simon RP, Grean-Marton AD, Sander JE: Medullary lesion inducing pulmonary edema: a magnetic resonance imaging study. *Ann Neurol* 1991; 30: 727-30
- 3) Lum LCS et al: Fatal enterovirus 71 encephalomyelitis. *J Pediatr* 1998; 133: 795-8
- 4) Crawly F et al: Acute pulmonary oedema: presenting symptom of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2001;7(1):71-2
- 5) Gentiloni N et al: Neurogenic pulmonary edema: presenting symptom of multiple sclerosis. *Ital J Neurol Sci* 1992; 13 (5): 435-8
- 6) Melin J, Usenius JP, Fogelholm R: Left ventricular failure and pulmonary edema in acute multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 1996; 93: 315-317

症例	性別	初発年齢	診断	入院日の病日	主訴	再発回数	MRI所見	髄液		
								細胞数 (個/3視野)	蛋白 (mg/dl)	MBP* (ng/ml)
1	男	1	ADEM	4	四肢不全麻痺	0	あり	137	54	1.7
2	女	1	ADEM	17	不随意運動/不機嫌	0	あり	31	18	1未満
3	男	4	ADEM	33	右下肢不随意運動	0	あり	5	12	0.5未満
4	男	5	ADEM	2	意識障害	0	あり	162	33	13.4
5	女	5	ADEM	4	複視	0	あり	5	9	2.7
6	男	8	ADEM	4	眼瞼下垂/複視	0	あり	26	29	0.5未満
7	女	11	ADEM	22	顔面のしびれ/構音障害	0	あり	22	30	0.5
8	男	12	ADEM	5	四肢筋力低下	0	なし	368	135	
9	女	6	MS	8	複視	1	あり	45	33	
10	女	11	MS	2	四肢筋力低下	2	あり	154	35	
11	女	13	MS	5	呼吸不全	2	あり	3	12	23.3
12	女	13	MS	20	右半身の感覚異常	12	あり	21	31	1.3

表 1. ADEM/MS患者背景と画像・髄液所見 (大阪市立総合医療センター、1994-2001)

* MBP: Myelin Basic Protein

症例	初・再発	II	III,IV,VI	VII	V,VIII	IX,X,XI,XII
1	初発					
2	初発					
3	初発					構音障害・嚥下障害 舌の攣縮
4	初発		眼瞼下垂	左顔面神経麻痺		構音障害・嚥下障害・嘔声
5	初発	視力障害	右外転神経麻痺			嚥下障害
6	初発		眼瞼下垂下垂・両眼内転障害			
7	初発		固視(追視不能)	両顔面神経麻痺		構音障害
8	初発					構音障害
9	初発		左眼内転障害			構音障害
	再発1回目	視力障害				
10	再発3回目					
11	初発	視力障害				構音障害、努力性呼吸
	再発1回目			味覚障害	顔面のしびれ、感覚消失	舌のしびれ・知覚消失
	再発2回目				回転性めまい	
12	初発	左視力障害				
	再発1回目	左視力障害		味覚異常	左顔面知覚障害	口腔内左半の知覚消失
	再発2回目				回転性めまい、眼振	
	再発3回目	目のかすみ			左前額部異常知覚	
	再発4回目	左視野狭窄	複視			
	再発5回目					

表 2-1 本検討におけるADEM・MSの脳神経症状

症例	初・再発	脳幹	大脳基底核	小脳	脊髄	大脳白質 / その他
1	初発	なし				急性四肢麻痺(下肢優位)
2	初発	なし	方トビ			急性四肢麻痺
3	初発	あり	方トビ			
4	初発	あり		失調歩行		急性四肢麻痺
5	初発	あり		企図振戦		急性四肢麻痺、両下肢拘縮、視力障害
6	初発	あり	四肢不随意運動			けいれん
7	初発	あり	手の不随意運動			急性四肢麻痺、けいれん
8	初発	あり		企図振戦、眼振	膀胱直腸障害	急性四肢麻痺、睡眠
9	初発	なし		失調歩行		
	再発1回目	あり				視力障害
10	再発3回目	なし			頸髄5以下筋力・温痛覚低下 膀胱直腸障害	眼前閃輝
11	初発	あり		眼振、企図振戦 左上肢失調	右頭部～上腕感覚障害(しびれ感) 膀胱直腸障害	急性四肢麻痺、握力低下著明 視力障害
	再発1回目	あり				
	再発2回目	あり				
12	初発	なし			首から下の感覚低下	歩行障害、左視力障害
	再発1回目	あり			左足筋力低下、四肢の感覚低下	左視力障害
	再発2回目	あり				
	再発3回目	あり			左胸部～左上肢、異常知覚と感覚低下	頭痛、目のかすみ
	再発4回目	あり			左足筋力低下	頭痛、左視野狭窄
	再発5回目	なし			左頸髄2以下の異常知覚と感覚低下	頭痛

表 2-2 神経症状の責任病巣と考えられる部位

症例	初・再発	中脳	橋	延髄
1	初発	両側大脳脚	両側中小脳脚	下小脳脚
2	初発			
3	初発	左大脳脚内側部		
4	初発	右大脳脚	上小脳脚 (右>左) 右中小脳脚 (広範囲) 両側橋被蓋部 (左>右)	下小脳脚
5	初発		右橋・延髄接合部 (脳神経V I 繊維を含むと考えられる)	右橋・延髄接合部 (脳神経V I 繊維を含むと考えられる)
6	初発	中脳正中	右中小脳脚	
7	初発		特定できず	特定できず
8	初発			
9	初発	左大脳脚	橋左腹側やや上部 (離体路を含むと考えられる)	
	再発1回目			
10	再発3回目			
11	初発		左中小脳脚	
	再発1回目			
	再発2回目			
12	初発			延髄左側線
	再発1回目		左中小脳脚、左橋外側 (III核付近)、橋右線	
	再発2回目		橋・延髄接合部左側線	橋・延髄接合部左側線
	再発3回目			
	再発4回目			
	再発5回目		両中小脳脚 (広範囲)、左橋腹側の一部、左橋背側	

表 3-1 MRIにおける脳幹部の所見

症例	初・再発	脳幹	大脳基底核	小脳	脊髄	視床	大脳白質 / その他
Y.U.	初発	中脳・橋・延髄	右被殻・尾状核	両小脳半球	頸髄・胸髄10/11		両側前頭葉白質
S.Y.	初発		両被殻・尾状核				両側側脳室周囲白質 (前頭～頭頂葉)
N.D.	初発	中脳	両被殻・尾状核			両視床	
Y.F.	初発	中脳・橋・延髄				両視床	右後頭葉白質
Ma.N.	初発	橋	両淡蒼球・被殻	小脳虫部		両視床	左後頭葉斑状
K.M.	初発	中脳・橋					左後頭葉白質 (斑状)
S.S.	初発	橋・延髄			頸髄1-7		両側側脳室周囲白質 (広範囲)・全脳梁
H.M.	初発						
F.U.	初発	中脳・橋					両側前頭葉白質
	再発1回目	中脳					右視神経
Mi.N.	再発3回目		右尾状核	左小脳半球	頸髄2-4		左頭頂葉白質
M.M.	初発	中脳・橋			頸髄		両後頭葉白質・全脳梁
	再発1回目	橋					右後頭葉
	再発2回目						左後頭葉
Y.N.	初発	中脳	右被殻		頸髄4-5背側	左視床	前頭葉～後頭葉白質に斑状に散在 左視神経、視交叉
	再発1回目	橋					右放線冠
	再発2回目	橋・延髄					右側頭葉、左放線冠
	再発3回目						右内包後脚
	再発4回目						
	再発5回目				頸髄1背側下線		

表 3-2 MRIにおけるその他の中脳神経所見

意識 ほぼ清明

体重 37kg、体温 36.9℃、脈拍 88回/分 整

呼吸数 18回/分 不整 著明な努力性呼吸 (肩呼吸・下顎呼吸)

深呼吸は胸式で可能であるが腹式呼吸は不可

口蓋垂やや左側へ変位 常に開口

胸部 心音 心雑音 なし 胸部 ラ音 なし

腹部 異常所見なし

会話は可能であるが、言語不明瞭

四肢及び体幹の筋力低下著明 (右2/5、左5/5)

右頸部から上腕部、腹部に感覚の低下を認める

尿意は訴えられるが、尿閉である

腱反射は膝蓋腱反射のみ右がやや低下。病的反射を認めず

図 1 入院時現症

WBC	8220	/ μ l	Na	131	mEq/l	動脈血ガス分析 (入院直後)	
Seg	70.0	%	K	4.3	mg/dl	PH	7.392
Lym	20.0	%	Cl	93	mEq/l	PCO2	48.4 mmHg
Mo	10.0	%	Ca	9.4	mg/dl	PO2	99.6 mmHg
RBC	4.90×10^4	/ μ l	P	3.7	mg/dl	HCO3	29.1 mmol/l
Hb	14.5	g/dl	Mg	2.6	mg/dl	ABE	3.5 mmol/l
Hct	43.0	%	IgG	1995	mg/dl	SAT	97.5 %
PLT	269×10^3	/ μ l	IgM	212.4	mg/dl		
Ret	16.6	%	IgA	405.9	mg/dl		
			C3	66.5	mg/dl		
AST	14	IU/l	C4	11.7	mg/dl	自己抗体検査 (11/30)	
ALT	8	IU/l	CH50	76.2	ng/ml	抗核抗体	20 倍
LDH	132	IU/l	NH3	90	μ g/dl	抗DNA抗体	4 IU/ml
ALP	347	IU/l	乳酸	10.9	mg/dl		
CK	67	IU/l	ビリルビン	0.7	mg/dl	髄液検査 (無色透明) (12/1)	
TP	7.9	g/dl	血糖	132	mg/dl	細胞数	7 /3H P F
Alb	4.6	g/dl	CRP	0.01	mg/dl	(単核球 86% 多核球 14%)	
BUN	11.9	mg/dl	浸透圧	288	mOs/l	蛋白	24 mg/dl
Cre	0.3	mg/dl	LE test	(+)		糖	63 mg/dl
T-Bil	1.0	mg/dl				MBP	23.3 ng/ml
						オリゴクローナルIgG	(-)

図 2 入院時検査所見 (H6/11/24)

- MRI①** (H6/12/9 : 努力性呼吸の静止でPoor Image)
 散在性のT₂延長病変 (病変は造影による増強効果なし)
1. 右帯状回
 2. 脳梁上面
 3. 右大脳脚
 4. 橋腹側表面、延髄背外側
 5. 脊髄 C₂₋₄、病変部は明らかな腫脹も認める

- MRI②** (H6/12/22)
 MRI①病変部位と変わらず

- MRI③** (H7/2/2)
 1. MRI①での1.病変のみ減少
 2. 左前頭葉白質に新たな病変を認め造影による増強効果を認めた

図 3 MRI所見

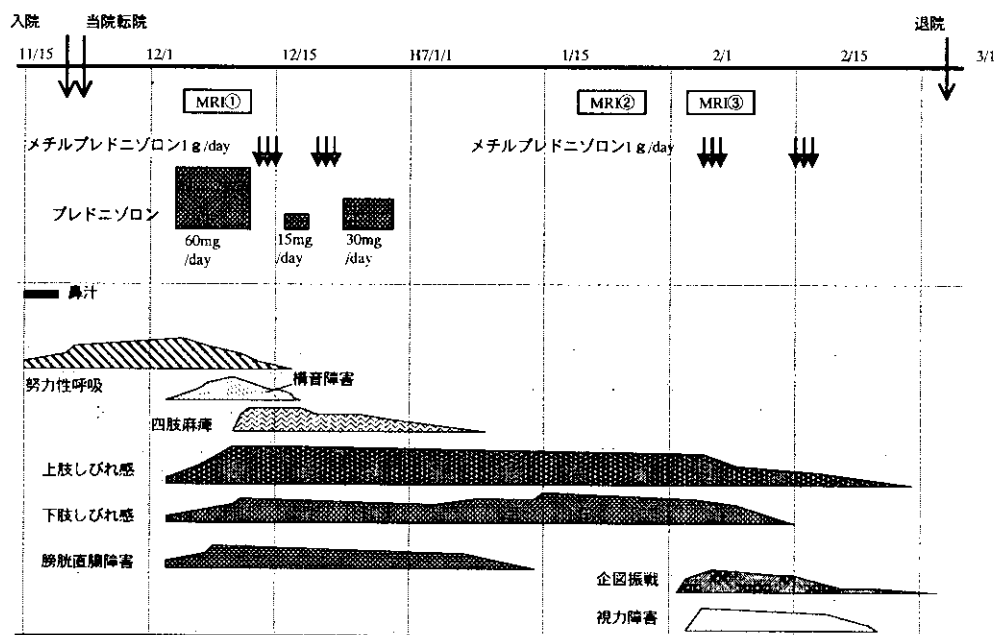


図 4 臨床経過

西太平洋地域のエンテロウイルス 71 流行株の分布と変遷

分担研究者 清水 博之 (国立感染症研究所ウイルス第 2 部)
協力研究者 永田 典代 (国立感染症研究所安全性研究部)
岩崎 琢也 (長崎大学熱帯医学研究所)
大瀬戸光明 (愛媛県立衛生環境研究所)

研究要旨 西太平洋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 (EV71)について分子疫学的解析を行なった。日本で 1970 年代から流行している手足口病由来の EV71 についても、併せて比較解析を行なった。我々は従来、VP4/VP2 領域の分子系統解析をもとに、マレーシア、台湾、日本では 2 種類の遺伝子型の EV71 が伝播していることを示してきたが、他の遺伝子領域(5'-NTR 及び VP1)の塩基配列に基づく分子系統解析でも、大きく 2 種類の遺伝子型の EV71 が伝播していることが確認された。最近報告されているオーストラリア、台湾等で分離された EV71 との比較のため、VP1 領域の分子系統解析を行ない、日本の EV71 との関連を調べた。日本の EV71 も、西太平洋地域の他の国々と同様、少なくとも 2 種類の VP1 genogroup が認められたが、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。

A. 研究目的

WHO を中心として進められている世界ポリオ根絶計画は、現在、根絶の最終段階にさしかかっている。南北アメリカに続き、2000 年 10 月には、日本・中国等を含む西太平洋地域においても、ポリオ野生株の伝播の終息、いわゆるポリオフリーが宣言された。しかし、皮肉なことに、この地域では近年、ポリオウイルス流行と入れ替わるように、非ポリオエンテロウイルスによる重症エンテロウイルス感染症の流行が報告されている。中でも、1997 年マレーシアおよび 1998 年台湾での大規模な手足口病の流行と平行したエンテロウイルス 71(EV71)脳炎の流行は、多数の小児の急性死症例を伴っていたことから、大きな社会問題となった。その後も散発例ではあるが、非ポリオエンテロウイルス感染に起因すると考えられる重症エンテロウイルス感染症が、オーストラリア、シンガポール、マレーシア、日本等で報告されている。これらの重症エンテロウイルス感染症の多くは、EV71 感染に起因すると考えられているが、他のエンテロウイルスの関与する重症エンテロウイルス感染症の報告もある。

EV71 感染症の重篤化の原因は、いまのところほとんど明らかなされていないが、重篤化の原因をウイルス側に求める観点から、マレーシア、台湾、オーストラリア等で重症例を含む手足口病患者から分離されたウイルスの分子疫学的データが報告されている。我々は以前、マレーシア、台湾、日本等で分離された EV71 の分子系統解析を行い、この地域では、genotype が異なる少なくとも 2 種類の EV71 が、同時に伝播している事を明らかにしたが、その後も他のグループにより、多くの分子疫学的解析が報告されている。しかし、分子系統解析に用いられる遺伝子領域が報告者により異なるため、直接的な比較解析は困難であった。そこで今回、我々がこれまで報告してきた VP4/VP2 領域の解析に加えて、他の遺伝子領域、特に VP1 領域の塩基配列をもとにして EV71 の分子系統解析を行い、近年の西太平洋地域の EV71 の遺伝子型の分布について解析した。

B. 研究方法

日本を含む西太平洋地域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行なった。分離したエンテロウイルスは EV71 特異的中和抗血清で同定後、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。おもに 5'-NCR および VP4/VP2 領域を含む約 1000bp を増幅した。いくつかの分離株については、VP1 全長を含む領域を RT-PCR により増幅し VP1 領域の塩基配列を決定した。世界各地の EV71 の塩基配列は GenBank に登録された塩基配列を用いたが、特にアメリカの EV71 の VP1 配列の多くは Brown らの、近年のオーストラリア、マレーシア、シンガポール等の EV71 の VP1 配列の多くは MacMinn らの報告をもとにして解析を行なった。分子系統解析は、近接結合法を用いて行い、系統樹の信頼度は bootstrap 解析により検定した。

C. 研究結果

1. 異なる遺伝子領域を用いた EV71 の分子系統解析の比較

日本および世界各地で分離された EV71 の分子系統解析を、5'-NTR の一部(617bp)、VP4/VP2 の一部(420bp)および VP1 全長(891bp)の塩基配列をもとに行なった。図 1 に示したように、5'-NTR と VP4/VP2 を用いた系統樹における genotype は、ほとんど一致しており、プロトタイプの BrCr を除く EV71 は、大きく 2 種類の genotype (A 及び B)に分けられた。VP1 を用いた系統樹における 2 種類の genogroup (B および C、Brown らによる)は、5'-NTR あるいは VP4/VP2 による分子系統樹と、ほぼ対応する grouping を示した。これらの結果から、どの領域の塩基配列を用いても、2 種類の genotype の判別には問題がないことが示唆された。

2. 近年の西太平洋地域の EV71 の分布

マレーシア、台湾での大規模な手足口病流行を受けて、西太平洋地域の EV71 の分子疫学的解析が、現在積極的に進められている。EV71 の大まかな遺伝子型に関しては、前述のように 5'-NTR、VP4/VP2、VP1 のどの遺伝子領域の解析においても、ほとんど同様の結果が得られるが、より詳細な解析のためには、出来るだけ長い同一の遺伝子領域の塩基配列を集積し比較する必要がある。そのような観点で現在最も多くの利用可能なデータが集められつつあるのは、VP1 領域全長の塩基配列であることから、日本の EV71 分離株の一部についても、VP1 領域を用いた分子疫学的解析を試みた。マレーシア、オーストラリア、シンガポール等西太平洋地域の EV71 の VP1 領域の分子系統解析を報告した McMinn らに準じて、より詳細に VP1 領域の sub-genogroup

を解析したところ、日本では現在、VP1 genogroup B-4 および VP1 Genogroup C-2 が伝播していることが示唆された(図 3)。genogroup B-3 および C-1 等、近年西太平洋地域の他の国々で分離されている sub-genogroup が日本にも存在しているかについては、さらに多くの EV71 分離株を解析する必要がある。

3. 日本の EV71 遺伝子型の変遷

近年の西太平洋地域における脳炎を伴う手足口病流行および流行時に分離された EV71 の分子系統解析については、すでに多くの報告がなされているが、この地域での 1997 年以前の EV71 分離株についての報告は、ほとんどない。そこで、日本の EV71 分離株の遺伝子型の変遷を VP4 genotype を用い、分子疫学的に解析した。図 2 に簡略化した分子系統樹で示したように、日本では 1970 年代から、明らかに異なる 2 種類の VP4 genotype の EV71 が伝播していたことが示された。1970 年代の大きな手足口病流行(1973 年および 1978 年)に関与していたと考えられる VP4 genotype A-1 ウイルスは、その時期アメリカで分離されていた genotype と近いと考えられ、また、分離数が少ないため確実ではないが、ハンガリーおよびブルガリアで流行した EV71 脳炎流行時の分離株と同一の genotype に属すると考えられた。VP4 genotype A は、1990 年代後半になると再び増加して(genotype A-2)、1997 年の手足口病流行時には、VP4 genotype B と同時期同地域での伝播が確認されている。VP4 genotype B ウイルスは、1970 年代後半から散見され 80-90 年代を通じて、少しずつ変異しながら手足口病患者から継続的に分離されている。

D. 考察

現在日本で同時に伝播している VP4 genotype A および B は、それぞれ、1997 年にマレーシアで流行した genotype および 1998 年に台湾で流行した多数の死亡例を伴った手足口病流行から分離された EV71 の genotype に対応している。しかし、マレーシア・台湾いずれの手足口病流行でも、dominant genotype の他に minor genotype の存在が認められており、西太平洋地域全般において、この 2 種類の genotype の EV71 がこの時期同時に伝播していたことが示唆された。VP1 領域を用いた分子系統解析によると、台湾における 1998 年の大規模な手足口病流行時の dominant VP1 genogroup は C-2 であったが、2000 年の手足口病流行からの分離株の多くは genogroup B-4 であったとされる。台湾の場合、ここ数年のこのような dominant genogroup の大きな変化にも関わらず、手足口病流行に伴う重症例の存在に関しては顕著な違いは無く、2000 年の手足口病流行時も 40 名以上の死亡例が報告されている。日本の VP4 genotype B ウイルスは、1998 年の台湾の手足口病流行における major

genotype のウイルスと分子系統解析上同一のグループに属すると考えられるが、日本の場合、重篤な中枢神経疾患の流行と EV71 感染との明瞭な関連性は報告されていない。現在、比較的古いウイルスも含めた日本の EV71 の VP1 領域の塩基配列の解析を検討しており、西太平洋地域を中心とした世界各地のウイルス伝播の実態といままでの変遷についての、より詳細な調査を行なう予定である。

E. 結論

日本を含む西太平洋地域で近年流行している EV71 について、いくつかの異なる遺伝子領域を用いて、分子疫学的解析を行なった。どの遺伝子領域の塩基配列に基づく分子系統解析でも、この地域では、大きく 2 種類の遺伝子型の EV71 が伝播していることが確認された。最近報告されているオーストラリア、台湾等で分離された EV71 との比較のため、VP1 領域の分子系統解析を行ない、日本の EV71 との関連を調べた。日本の EV71 も、西太平洋地域の他の国々と同様、少なくとも 2 種類の VP1 genogroup が認められたが、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

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kew O, Morris-Glasgow V, Landaverde M, Burns C, Shaw J, Garib Z, André J, Blackman E, C Freeman J, Jorba J, Sutter R, Tambini G, Venczel L, Pedreira C, Laender F, Shimizu H, Yoneyama T, Miyamura T, van der Avoort H, Oberste S, Kilpatrick D, Cochi S, Pallansch M, and de Quadro C.: Outbreak of Poliomyelitis in Hispaniola Associated with Circulating Type 1 Vaccine-Derived Poliovirus. *Science*. (in press)

Nagata, N., Shimizu, H., Ami, Y., Tano Y., Harashima, A., Suzuki, Y., Sato, Y., Miyamura, T., Sata, T., and Iwasaki, T. Pyramidal and extrapyramidal involvement in experimental infection of enterovirus 71 in cynomolgus monkeys *J. Med. Virol* (in press)

Yoneyama T, Yoshida H, Yoshii K, Shimizu H, Miyamura T (2001) Necessity of two-stool sample test for sensitive detection of poliovirus. *Jpn J Infect Dis* 54: 250-1.

Yoneyama T, Yoshida H, Shimizu H, Yoshii K,

Nagata N, Kew O, Miyamura T (2001) Neurovirulence of Sabin 1-derived polioviruses isolated from an immunodeficient patient with prolonged viral excretion. *Dev Biol (Basel)* 105: 93-8.

Chiba Y, Murakami H, Kobayashi M, Shimizu H, Yoshida H, Yoneyama T, Miyamura T, Jingjin Y, Libi Z (2000) A case of poliomyelitis associated with infection of wild poliovirus in Qinghai Province, China, in October 1999. *Jpn J Infect Dis* 53: 135-6.

Shimizu H, Agoh M, Agoh Y, Yoshida H, Yoshii K, Yoneyama T, Hagiwara A, Miyamura T (2000) Mutations in the 2C region of poliovirus responsible for altered sensitivity to benzimidazole derivatives. *J Virol* 74: 4146-54.

Utama A, Shimizu H, Hasebe F, Morita K, Igarashi A, Shoji I, Matsuura Y, Hatsu M, Takamizawa K, Hagiwara A, Miyamura T (2000) Role of the DExH motif of the Japanese encephalitis virus and hepatitis C virus NS3 proteins in the ATPase and RNA helicase activities. *Virology* 273: 316-24.

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 16, 46 - 50, 2000

鎌塚 眞、上田竜生、右田雄二、野口英太郎、米山徹夫、清水博之、吉田 弘、吉井久美子、萩原昭夫：ポリオワクチン被投与及びその母親からのウイルス分離。臨床とウイルス 28, 143 - 150, 2000

千葉靖男、村上 仁、小林 誠、清水博之、吉田 弘、米山徹夫、宮村達男：中国青海省で 1999 年 10 月発生した野生ポリオの 1 症例。臨床とウイルス 28, 138 - 142, 2000

2. 学会発表

永田典代、岩崎琢也、佐多徹太郎、長谷川秀樹、倉田毅、原嶋綾子、佐藤由子、網康至、清水博之：エンテロウイルス 71 とポリオウイルスの神経病原性：カニクイザルでの解析、第 90 回日本病理学会総会、2001 年

木添和博、山本正悟、吉野修司、矢野隆郎、米山徹夫、清水博之、吉田 弘、宮村達男：ワクチン接種児からの接触感染が確認された成人のポリオ麻痺事例：第 42 回臨床ウイルス学会総会、2001 年

小池智、李継芬、細沼美樹、清水博之、岩崎琢也、永田典代：エンテロウイルス 71 の感染性 cDNA の構築、第 49 回ウイルス学会総会、2001 年

永田典代、清水博之、網 康至、田野良夫、
須崎百合子、原嶋綾子、佐藤由子、長谷川秀
樹、佐多徹太郎、岩崎琢也、： カニクイザ
ルを用いたエンテロウイルス 71 の病態解析、
第 49 回ウイルス学会総会、2001 年

清水博之、宮村達男、E. Rieder, E.Wimmer :
C 群エンテロウイルス- ポリオウイルスと最
も近縁なエンテロウイルスの解析、第 49 回ウ
イルス学会総会、2001 年

E. Rieder, H.Shimizu, A. Gorbalenya, and
E.Wimmer : Genetic and phylogenetic analysis of
C-cluster enteroviruses, 6th International
Symposium on positive strand RNA viruses ,2001
年

Shimizu H.: MOLECULAR EPIDEMIOLOGY
OF ENTEROVIRUS 71 IN EAST ASIA , APEC
Symposium on Enterovirus Watch Program for
Children , 2000 年

Hiroyuki Shimizu, Noriyo Nagata, Takuya Iwasaki,
Yasushi Ami and Tatsuo Miyamura : Phylogenetic
analysis of enterovirus 71 from fatal and non-fatal
hand-foot-and-mouth disease cases in East Asia,
Molecular Biology of Picornaviruses (EUROPIC
2000), 2000 年

永田典代、清水博之、岩崎琢也、他 : エンテ
ロウイルス 71 の神経病原性についてのカニク
イザル感染実験による解析、第 48 回ウイル
ス学会総会、 2000 年

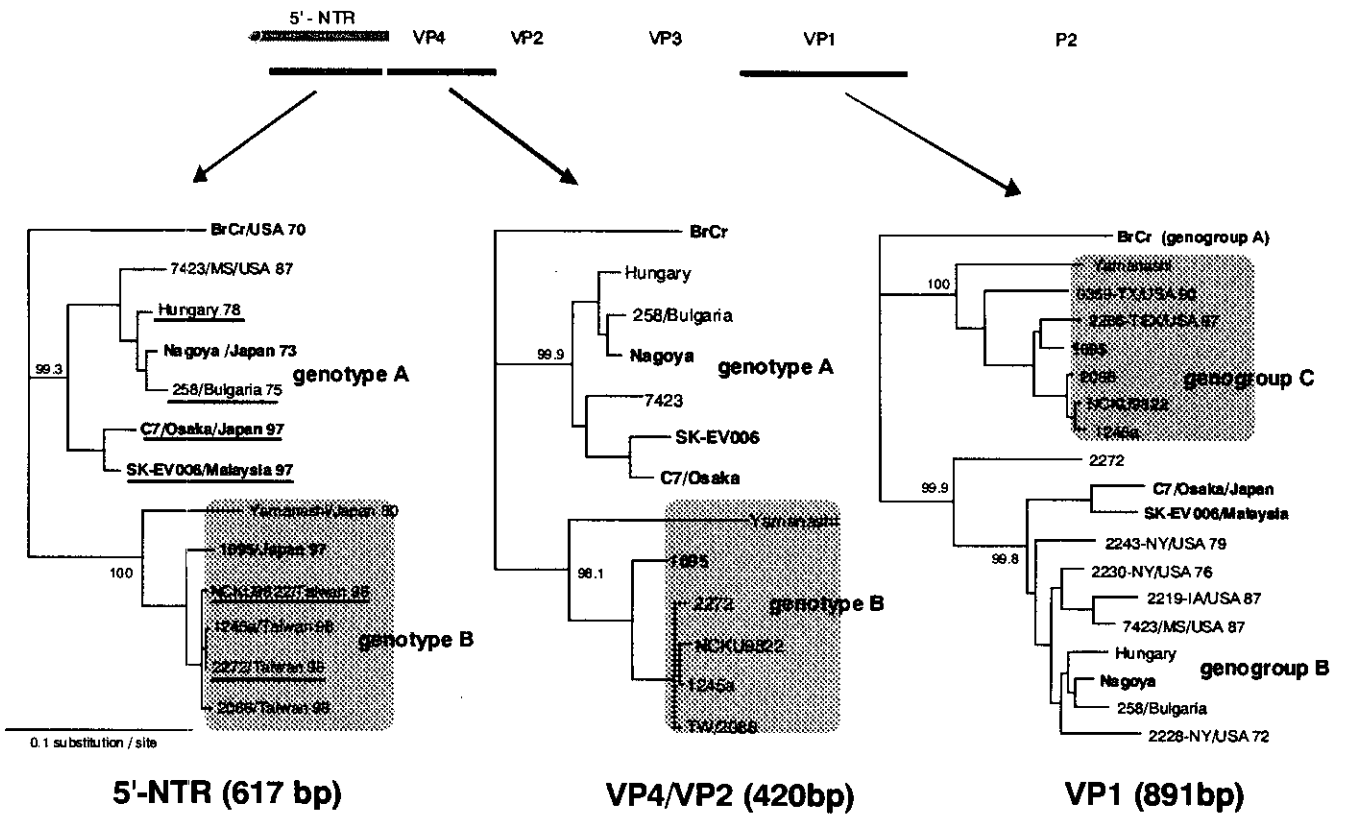


図 1 5'-NTR, VP4/VP2 及び VP1 領域の塩基配列をもとにした EV71 の分子系統解析
 VP4/VP2 の遺伝子型(genotype, A, B, BrCr)は、我々の以前の報告に準じた。VP1 の遺伝子型(Genogroup A, B, C) は、Brown らの報告に準じた。死亡例由来の分離株を下線で示した。

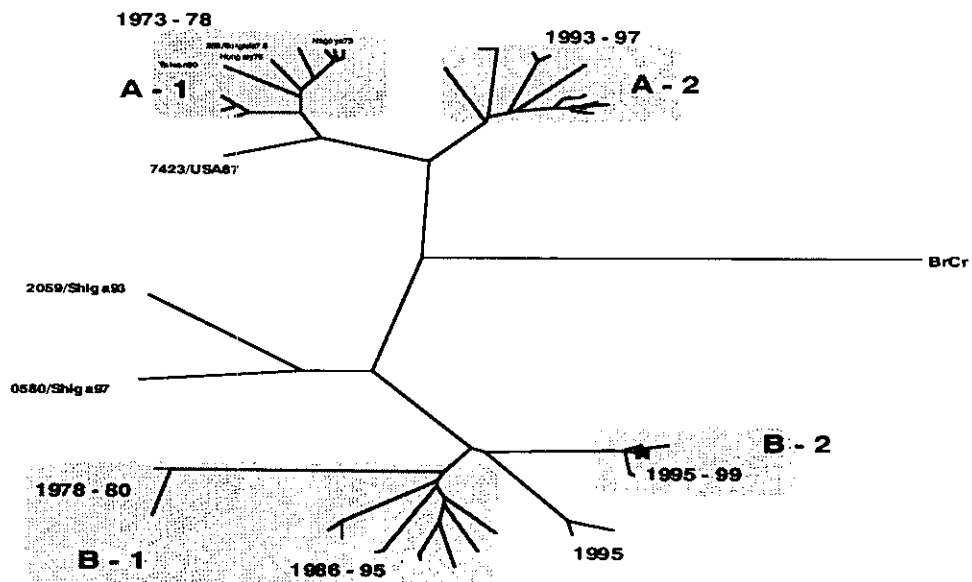


図 2 日本で分離された EV71 の遺伝子型

日本で、おもに手足口病患者から分離された EV71 の VP4 遺伝子型を示した。

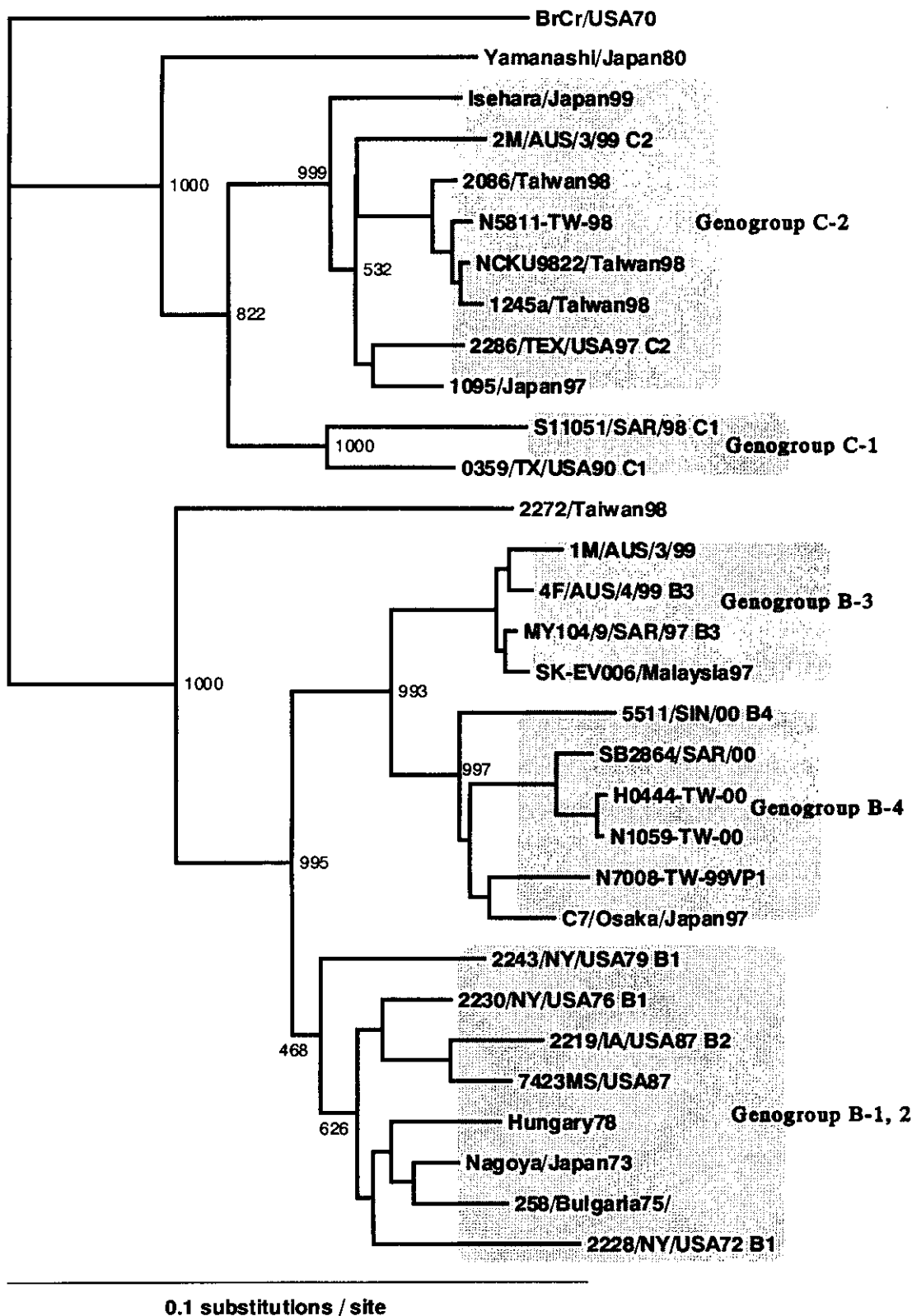


図3 世界各地で分離されたEV71のVP1領域の分子系統樹

日本のEV71分離株と世界各地のEV71分離株とのVP1領域の分子系統解析による比較。VP1領域のGenogroup (A, B, C)はBrownら、sub-genogroupはMcMinnらに準じた。

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
—熱性痙攣の原因診断への応用—

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
石古 博昭 三菱化学ビーシーエル

研究要旨 エンテロウイルス遺伝子を高感度に検出する PCR 法と、検出感度はやや劣るが増幅産物の系統解析によりウイルスの遺伝子型別が行える PCR 法を組み合わせることにより、熱性痙攣に関与するエンテロウイルスを検出・同定した。その結果、夏期の熱性痙攣の多くにエンテロウイルスが関与すること、その多くが、組織培養によるウイルス分離法では検出困難なコクサッキーウイルス A 群であることが証明された。すなわち、2 つの PCR 法を組み合わせることにより、エンテロウイルスを高感度に検出し、同定できることが証明された。

A. 研究目的

熱性痙攣の月別発生数を観察すると、夏期と冬期に二峰性のピークが存在する。この季節性は、熱性痙攣の発症の多くにウイルス感染が関与することを示唆している。これまでの報告は、冬期のピークにインフルエンザウイルスと RS ウイルスが関与することを証明している。一方、夏期のピークの原因としては、エンテロウイルスが疑われていたが、通常の組織培養法によるウイルス分離では、その関与は証明されなかった。そこで、熱性痙攣患者より各種の検体を採取し、従来のウイルス分離法、血清学的診断法に加え、PCR 法によるエンテロウイルスの検出・同定法を行うことにより、熱性痙攣の発熱の原因となったウイルス感染症を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1 検体採取 1997 年 7 月より 1998 年 3 月までの 1 年間に、発熱に伴い痙攣をきたした 57 例の患者より、その急性期に咽頭拭い液、直腸拭い液、血清、および髄液を採取した。

また、一部の症例では回復期の血清を採取した。検体は、ウイルス学的検査、あるいは血清学的検査まで、 -80°C に保存した。このうち、最終的に熱性痙攣と診断したのは 41 例であった。熱性痙攣の診断基準は、「乳幼児期の 38°C 以上の発熱に伴ってみられた痙攣で、明かな発作原因疾患のないもの」とした。20 分以上痙攣発作が持続し複合型熱性痙攣と診断したのが 4 例で、他の 37 例は単純型熱性痙攣であった。

2 ウイルス分離 咽頭拭い液と直腸拭い液を検体とし、福島県衛生研究所において行った。Vero、HEp-2、RD18-S、HMV-II、および MDCK の各細胞を用いて、マイクロプレート法によるウイルス分離を行った。すなわち、96 穴のマイクロプレート上に各細胞の単層培養を作成し、 $100\mu\text{l}$ の維持培地と $50\mu\text{l}$ の検体を接種し、細胞変性効果 (CPE) の出現を 7 日間観察した。CPE が観察されなかった場合は一度盲継代した。分離されたウイルスは、中和試験あるいは赤血球凝集抑制試験により同定した。

3 血清学的診断 臨床症状より、突発性発疹、水痘、インフルエンザなど、特定の感染症が推定された場合は、急性期と回復期のペア血清を用いてウイルス抗体価を測定し、抗体価の4倍以上の上昇により感染を確認した。

4 PCR法によるウイルスの検出 咽頭拭い液、直腸拭い液、血清および髄液を検体とし、福島県立医科大学小児科において行った(PCR-FMU)。ウイルス分離陰性検体について、エンテロウイルスに対するPCR法によりウイルス遺伝子の有無を検討した。検体250 μ lよりRNAを抽出し、5末端の非翻訳領域に設定したプライマーを用いて逆転写反応によりcDNAとし、nested-PCRによりウイルス遺伝子を増幅した。増幅産物を2%アガロースを用いて電気泳動し、目的とする155塩基対のバンドが確認された場合を陽性とした。本法は、ウイルス分離の約1000の検出感度を有した。

5 系統解析によるウイルスの同定 PCR-FMUにより陽性となった検体については、三菱化学ピーシーエルに送付し、別個にPCR法(PCR-BCL)を行い、ウイルス遺伝子型を同定した。すなわち、5末端の非翻訳領域とVP2領域にプライマーを設定し、nested-PCRにより遺伝子を増幅させた。増幅産物に含まれるVP4領域の塩基配列を決定し、64種のエンテロウイルス標準株のVP4領域の塩基配列とともに系統解析し、ウイルスの遺伝子型別を行った。

C. 研究結果

41例の熱性痙攣患者の月別発生をみると、夏期と冬期に二峰性のピークを示した。咽頭拭い液および直腸拭い液を用いてウイルス分離を行うと、インフルエンザウイルスが11例(A型10例、B型1例)、アデノウイルスが3例(1型2例、5型1例)、エンテロウイルスが1例(エコー30型)より分離された。(図1)。

臨床症状から特定の疾患が推定され、ウイルス抗体検索により感染が証明されたのは、

インフルエンザウイルスが2例、水痘帯状疱疹ウイルスが3例、ヒトヘルペスウイルス6型が1例であった。

エンテロウイルスに対するPCR法によりウイルス遺伝子が検出されたのは、咽頭拭い液8検体、直腸拭い液8検体、血清5検体、髄液10検体で、いずれかより検出されたのは11例であった(表1)。

以上の方法により、インフルエンザウイルスが13例、エンテロウイルスが12例、アデノウイルスが3例、水痘帯状疱疹ウイルスが3例、ヒトヘルペスウイルス6型が1例の、計32例(78.0%)において、熱性痙攣の原因となったウイルス感染症が推定された(図2)。ウイルス感染症の季節性をみると、エンテロウイルス感染症は6~8月を中心に、インフルエンザは2~3月を中心にみられ、他のアデノウイルス感染症、水痘には季節性はみられなかった(図2)。

PCR増幅産物の遺伝子系統解析により、熱性痙攣に関与したエンテロウイルスの遺伝子型別を行うと、同定された8株の内5株は、組織培養によるウイルス分離の困難な、コクサッキーウイルスA群に属することが証明された(表1)。熱性痙攣患者より検出されたコクサッキーウイルスA群は、同時期に流行したヘルパンギーナより検出されたコクサッキーウイルスA群と同じクラスターを形成した(図3)。

D. 考案

熱性痙攣の月別発症数を観察すると、夏期と冬期に二峰性のピークが存在する。冬期のピークがインフルエンザやRSウイルス感染症に関連することはすでに報告されている。われわれの今回の結果も、冬期の熱性痙攣の多くにインフルエンザが関与することを示した。一方、夏期の熱性痙攣の原因については、ウイルス感染症の季節性から、エンテロウイルスの関与が推定されていたが、通常の組織

培養によるウイルス分離では証明されていなかった。われわれは、ウイルス分離法に加え、PCR 法によるウイルス検出を試み、41 例中 12 例 (29.3%) に、特に夏期 (6~8 月) に限ると 14 例中 10 例 (71.4%) に、エンテロウイルスの関与を証明した。遺伝子系統解析の結果は、同定されたエンテロウイルスの多くが、通常の組織培養法では分離の困難な、コクサッキーウイルス A 群であることを示した。すなわち、エンテロウイルス属の中でもコクサッキーウイルス A 群が特に熱性痙攣への関与が強く、これらは通常の組織培養法では分離されにくいいため、これまでエンテロウイルスと熱性痙攣の関連が証明されなかったものと思われた。

熱性痙攣を合併する頻度の高いウイルス感染症としては、インフルエンザウイルスやヒトヘルペスウイルス 6 型などが知られている。われわれは、インフルエンザにおける熱性痙攣の合併率を約 6%と推定している。ヒトヘルペスウイルス 6 型感染症 (突発性発疹) における合併率は約 10%とされている。本研究が示すように、コクサッキーウイルス A 群感染症も熱性痙攣を合併する頻度が高い。これらはいずれも高熱を来す疾患であり、一般にはそれが痙攣の原因と考えられている。しかし、他の血清型のエンテロウイルスは、コクサッキーウイルス A 群と同様に高熱を呈しながらも、痙攣の合併率は低い。突発性発疹において熱性痙攣をきたした際に、髄液中にしばしばヒトヘルペスウイルス 6 型遺伝子が証明される。また、夏期の熱性痙攣の患者髄液中にもコクサッキーウイルス A 群遺伝子が高率に証明される。これらのことは、熱性痙攣の原因となるウイルスは、単に高熱をきたすだけでなく、中枢神経系への親和性が高いことを示唆しており、熱性痙攣の発症機序を考える上で大変興味深い。

E. 結論

PCR 法を基にしたエンテロウイルスの検出・同定法を、熱性痙攣の病原診断に応用した。その結果、夏期の熱性痙攣の多くにエンテロウイルス、特にコクサッキーウイルス A 群が関与することが証明された。これまでエンテロウイルスと熱性痙攣の関連は証明されていなかったが、これはコクサッキーウイルス A 群が通常の組織培養では分離が困難なことによると思われる。PCR 法を用いたエンテロウイルスの検出・同定法は、ウイルス分離を必要としないため、特にコクサッキーウイルス A 群の病原診断に有効である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

細矢光亮. 日常臨床に役立つ感染症の診断治療. 小児感染免疫 2000;12:134-137.

Hosoya M, Ishiko H, et al. Association of nonpolio enteroviral infection in the central nervous system of children with febrile seizures. Pediatrics 2001;107:e12.

細矢光亮, 石古博昭, 他. 熱性痙攣の原因に関するウイルス学的検討. 小児感染免疫 2001;13:149-153.

川崎幸彦, 細矢光亮, 他. 福島県下における小児期発症急性脳炎/脳症 105 例の疫学的臨床的検討. 日児誌 2001;105:695-702.

細矢光亮. ポリオ以外のエンテロウイルス感染症. 小児内科 2001;33:324-325.

H. 知的財産検の出願・登録状況

なし

表1 エンテロウイルス検出症例

症例	発症日	性別	臨床診断	ウイルス分離		PCR-FMU				PCR-BCL			
				咽頭	直腸	咽頭	直腸	血清	髄液	咽頭	直腸	血清	髄液
1	97. 6	M	ARI, FS	-	-	-	-	-	+	NT	NT	NT	-
2	6	M	ARI, FS	-	-	+	+	+	+	CA6	CA6	CA6	CA6
3	7	M	ARI, FS	-	-	+	+	-	+	E30	-	NT	-
4	7	M	ARI, FS, SE	-	-	+	+	+	+	CA4	CA4	CA4	CA4
5	7	M	ARI, FS	-	-	+	+	+	+	CA4	CA4	CA4	CA4
6	7	M	Hr, FS	-	-	+	+	+	+	CA4	CA4	CA4	CA4
7	8	F	ARI, FS	-	-	-	-	-	+	NT	NT	NT	-
8	8	M	ARI, FS	-	-	+	-	-	-	-	NT	NT	NT
9	8	M	ARI, FS	-	-	+	+	+	+	E8	E8	E8	E8
10	8	M	ARI, FS	-	-	+	+	-	+	CA4	CA4	NT	CA4
11	11	M	ARI, FS	-	E30	-	NT	-	-	NT	NT	NT	NT
12	98. 3	M	ARI, FS	-	-	-	+	-	+	NT	E18	NT	NT

ARI : acute respiratory infection, FS : febrile seizures, SE : status epilepticus, Hr : herpangina, AM : aseptic meningitis, NT : not tested, CA : coxsackievirus A, E : echovirus

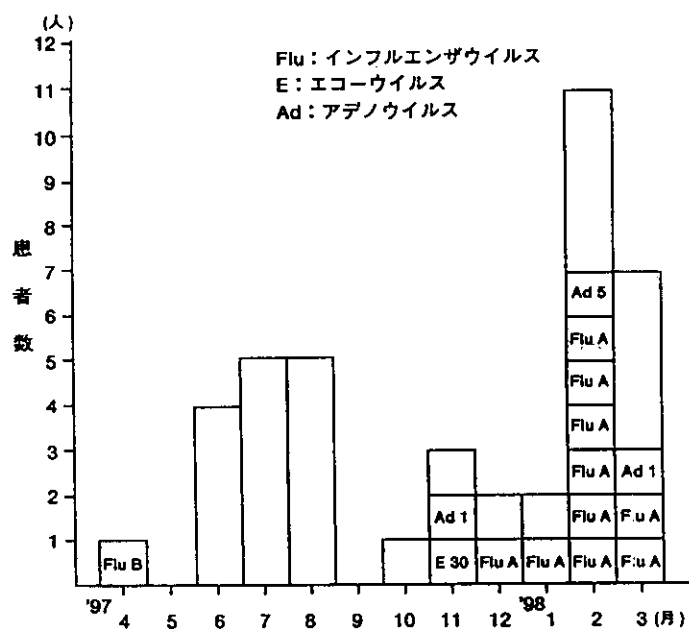


図1 1年間の月別熱性けいれん患者数とウイルス分離成績

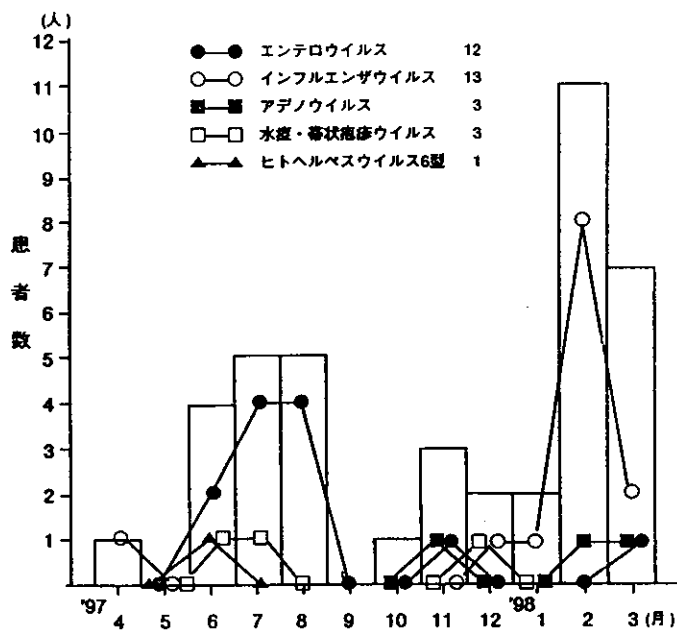


図2 発熱の原因となったウイルス感染症

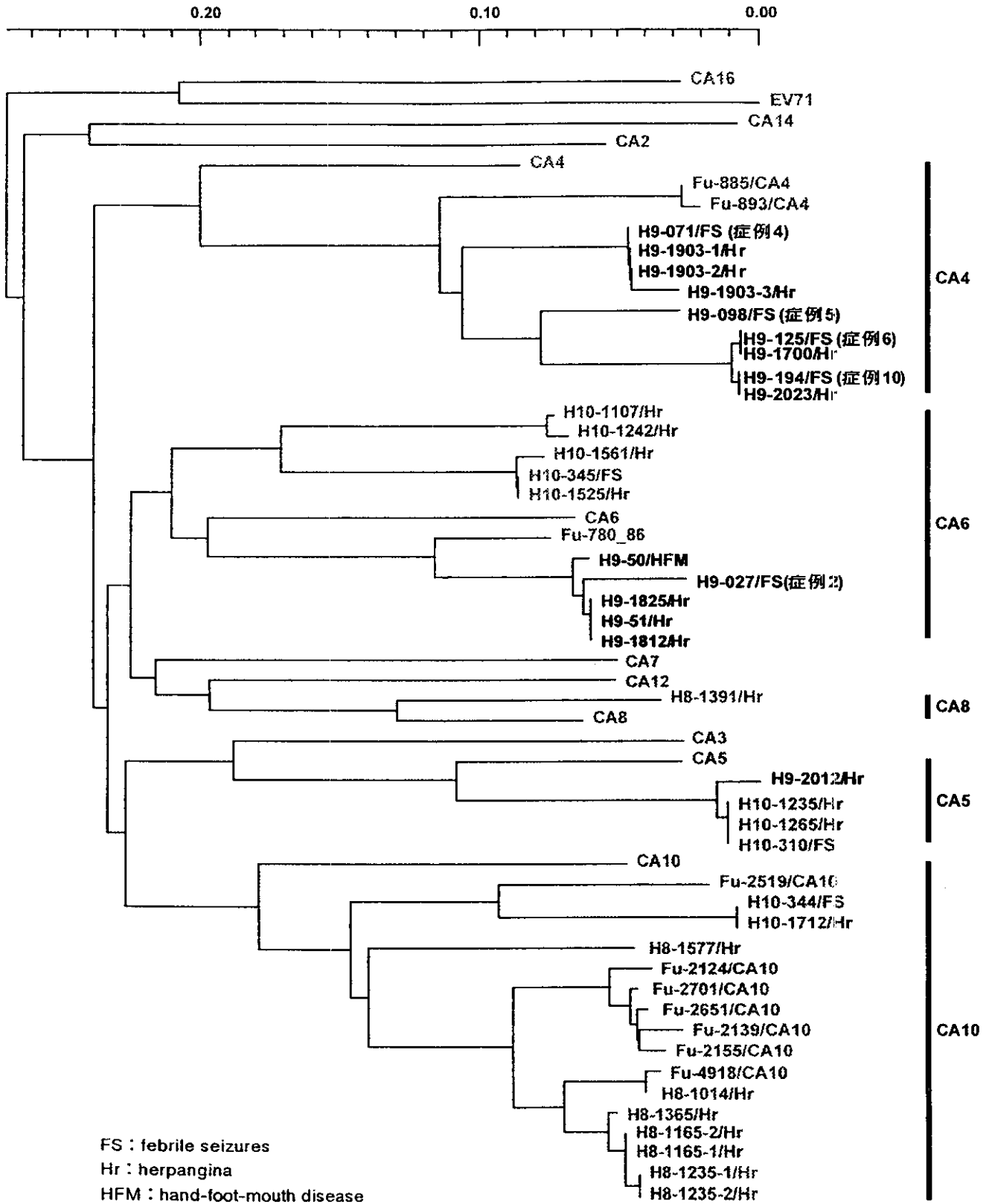


図3 コクサッキーウイルスA群の遺伝子系統解析

エンテロウイルス感染症迅速診断法の研究

分担研究者 石古 博昭 (株)三菱化学ピーシーエル 研究開発部長

研究要旨 手足口病ウイルスをはじめとするヒトエンテロウイルスの迅速診断に遺伝子系統解析を応用するため、臨床材料からウイルス遺伝子を RT-PCR で増幅し、増幅 DNA の塩基配列を解読し、標準株のデータベースとともに遺伝子系統解析を行い、起因ウイルスの迅速な型同定を試みた。

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、2001 年のヘルパンギーナ 17 例、手足口病 6 例、急性咽頭(扁桃)炎 21 例、感冒 32 例の患者の起因ウイルスを同定するため、患者から採取された咽頭拭い液から、RT-PCR にてエンテロウイルスの検出を行なった。ウイルス遺伝子の増幅が確認されたサンプルは、その VP4 塩基配列を解読、標準株のデータベースとともに遺伝子系統解析を行ない、起因ウイルスの型同定を試みた。

B.研究方法

ウイルス分離培養をすることなく、臨床材料より RNA を直接抽出、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

2001 年のヘルパンギーナ、手足口病などの流行より採取された咽頭拭い液を用い、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、ヘルパンギーナ 15 例、手足口病 6 例、急性咽頭炎 8 例、感冒 5 例から、ウイルス遺伝子の増幅がアガロース電気泳動とエチジウムブロマイド染色によって確認された。それぞれの増幅産物の VP4 塩基配列を解読し、HuEV 標準株とともに遺伝子系統解析を行った結果、ヘルパンギーナの 15 例中 12 例の塩基配列は、CV-A2-A8、CV-A10、CV-A16、EV71 の HuEV A 標準株とともに HuEV A に群別された。それらのうちの 5 例は CV-A2 標準株、3 例は CV-A6 の国内分離株とのみブートストラップ値 70%以上の確率で単一クラスターを形成し、各血清型に同定された。4 例はそれぞれ CV-A8、

CV-A10、CV-A12 または CA-V16 の標準株または血清型が明らかな国内の分離株とのみブートストラップ値 70%以上の確率で単一クラスターを形成し、各血清型に同定された。また、3 例は CV-B およびエコーウイルスの標準株とともに HuEV B に群別され、1 例が E11、2 例は CV-B4 に同定された。以下同様に、手足口病からは、CV-A2 (1 例)、CV-A 6 (1 例)、CV-A 16 (4 例) が同定された。急性咽頭 (扁桃) 炎からは、CV-A6 (5 例)、CV-A2 (1 例)、CV-B4(2 例)が同定された。感冒からは、CV-A2 (1 例)、CV-A4 (1 例)、CV-A6 (1 例)、CV-B4 (1 例)、E-11 (1 例) が同定された。

D. 考察

今回、ウイルス分離することなく臨床材料より直接ウイルス遺伝子を増幅し、その塩基配列の遺伝子系統解析によって HuEV の型同定が可能なことが明らかとなった。これまでの研究結果から、分離ウイルスを用いた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エンテロウイルスの型同定の有用性を明らかにしてきた。本法は 1 セットの semi-nested PCR によって全血清型のウイルス

を増幅できることから、手足口病のみならず多彩な疾患を引き起こすヒトエンテロウイルスの迅速診断に極めて有力な方法と思われる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文

Ishiko, H., Y. Shimada, M. Yonaha, O. Hashimoto, A. Hayashi, K. Sakae, and N. Takeda. 2002. Molecular diagnosis of human enteroviruses by phylogeny-based classification using the VP4 sequence. *J infectious diseases*. In Press.

Lin, K. H., C. L. Chern, P. Y. Chu, C. H. Chang, H. L. Wang, M. M. Sheu, W. L. Huang, Y. Pongsuwanna, S. Yamamoto, S. Yoshino, H. Ishiko, and N. Takeda. 2001. Genetic analysis of recent Taiwanese isolates of a variant of coxsackievirus A24. *J Med Virol* 64:269-74.

Hosoya M, Sato M, Honzumi K, et al. Association of nonpolio enteroviral infection in the central nervous system of children with febrile seizures. *Pediatrics* 2001; 107:E12

2. 学会発表

ヒトライノウイルスの系統解析による迅速同定 2001 年 第 49 回日本ウイルス学会