有無を知ることを目的とした。

B.研究方法

1993 年、1997 年、および 1998 年に愛知県内 6 地域の医療機関から集められた手足口病（32 名）、脳・脊髄炎（1名）、無菌性髄膜炎（4名）、不明熱性疾患（2名）、ヘルパンギーナ（1名）、筋痛症（1名）、川崎病（1名）の合計 42 名の患者から分離された EV71 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。

分離ウイルスから TRIzol LS Reagent (Gibco BRL)を用いててRNAを抽出しOligo dT とランダムプライマーをもちいて cDNA を作成した。PCR 法は石古らが使用している Olive らの VP4 領域の前後を増幅するプライマーをおよび Oberste らの報告による VP1 領域を増幅するプライマー用い、その配列（前者のプライマーによる PCR 産物の場合は翻訳開始部位から 400 塩基: 以後 VP0 領域と呼ぶ）を決定した。その他の分離株や標準株の塩基配列は公的データベース（GenBank, EMBL, DDBJ）から得た。各塩基配列は市販の遺伝子解析ソフト（GENETYX）にて解析した。

C.研究結果

42 株はいずれも Olive および Oberst らのプライマーと良く反応した。PCR 産物の遺伝子解析を行ったところこれらは VP0 および VP1 の両領域の解析でも同じグループに分けられた。3 株は遺伝子型 A-2/B(VP0/VP1)、39 株は遺伝子型 B/C であった（表1）。2グループに分けられた分離株の塩基配列の相同性は VP0 で 85%、VP1 で 78%であった。年代別では、1993 年の分離 29 株は全て B/C 型で、1997～98 年の分離株は3株が A-2/B 型、10 株が B/C 型であった。系統樹解析によると、これらの株のうち、A-2/B 型3株はシンガポールで流行した B4 型に近いウイルス2株と B3 型に近い1株に分かれた。B/C 型ウイルスは最近報告された東南アジアや西オーストラリアにおける分離株の遺伝子型 C2 型に属するもの（11 株）と、C1 および C2 とは独立したウイルス 28 株に分かれた（図1）。B/C 型は県内各地（6地区）から検出されたのに対し、A-2/B 型は 1 地区で、検出されたのみであった。月別に分離状況を比べてみると、ウイルスは4月から 11 月にかけて分離されており、特定の遺伝子型が特定の時期に集中することはなかった。

D.考察

1997 年からシンガポールや台湾で流行が確認されている EV-71 は、死亡例が多く報告されその病原性が注目されている。またそのウイルスの VP1 領域の遺伝子型はシンガポールが B 型、台湾が C 型とされている。今回の調査結果により 1997 年には愛知県下でも遺伝子型の類似した株（B型）が分離されていたことが判明した。しかしながら、分離数は3株と少なく大きな流行には至らなかったと思われた。2000 年の愛知県における手足口病流行時には中枢神経症状を伴った比較的重篤な症例が報告されたが、これらの原因ウイルスはシンガポールで流行した EV-71 の遺伝子型 B 型に近縁のウイルスよるものと昨年報告したところである。

一方 1993 年に愛知県で流行した株は全て遺伝子型Cで、その5年後の 1998 年に台湾で流行した株に近いものも含まれていた。台湾におけるの流行においても死亡者が多数報告されており、その流行株の病原性の強さが想像されている。1993 年の愛知県の流行株は、手足口病患者のみならず

脳・脊髄炎、無菌性髄膜炎、不明熱性疾患患者からも多数分離されてることから、病原性の強い株であった事が想像された。

系統樹解析によると、C 型の EV-71 は C1 および C2 型以外のウイルスが存在し、その多様性は B 型ウイルスと同じであると思われた。反対に標準株である BrCr 株の遺伝子型である A 型は 1993 年以降分離されていない。アジア地区には存在しない遺伝子型であるか、あるいは近年流行していない可能性が高い。

E.結論

1993、97、および 98 年に手足口病患者など 42 名から分離された EV-71 の VP0 および VP1 領域の遺伝子解析を行った。どちらの領域の解析でも分離株は同じ 2 グループに分けられた。3 株は遺伝子型 A-2/B(VP0/VP1)、39 株は遺伝子型 B/C であった。B/C 型ウイルスは 1993 年に愛知県下で流行し、手足口病患者のみならず脳・脊髄炎、無菌性髄膜炎、不明熱性疾患患者からも分離されている。その遺伝子型の多く（11 株）は最近報告された東南アジアや西オーストラリアにおける分離株の遺伝子型 C2 型に属するものであり、病原性の強い株であったと想像された。

F.健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamashita, T., K. Sakae: Molecular biology and epidemiology of Aichi virus and other diarrhoeogenic enteroviruses. In Perspective in Medical Virology (A.Z. Zuckerman and L.K. Mushahwar eds) Elsevier Science (in press).

2. 学会発表

山下照夫、椛島由佳、伊藤　雅、栄　賢司：コクサッキー A 群ウイルスの遺伝子解析による同定。第 49 回臨床ウイルス学会 秋田　2002.6.18-20.

H.知的財産権の出願・登録状況

なし

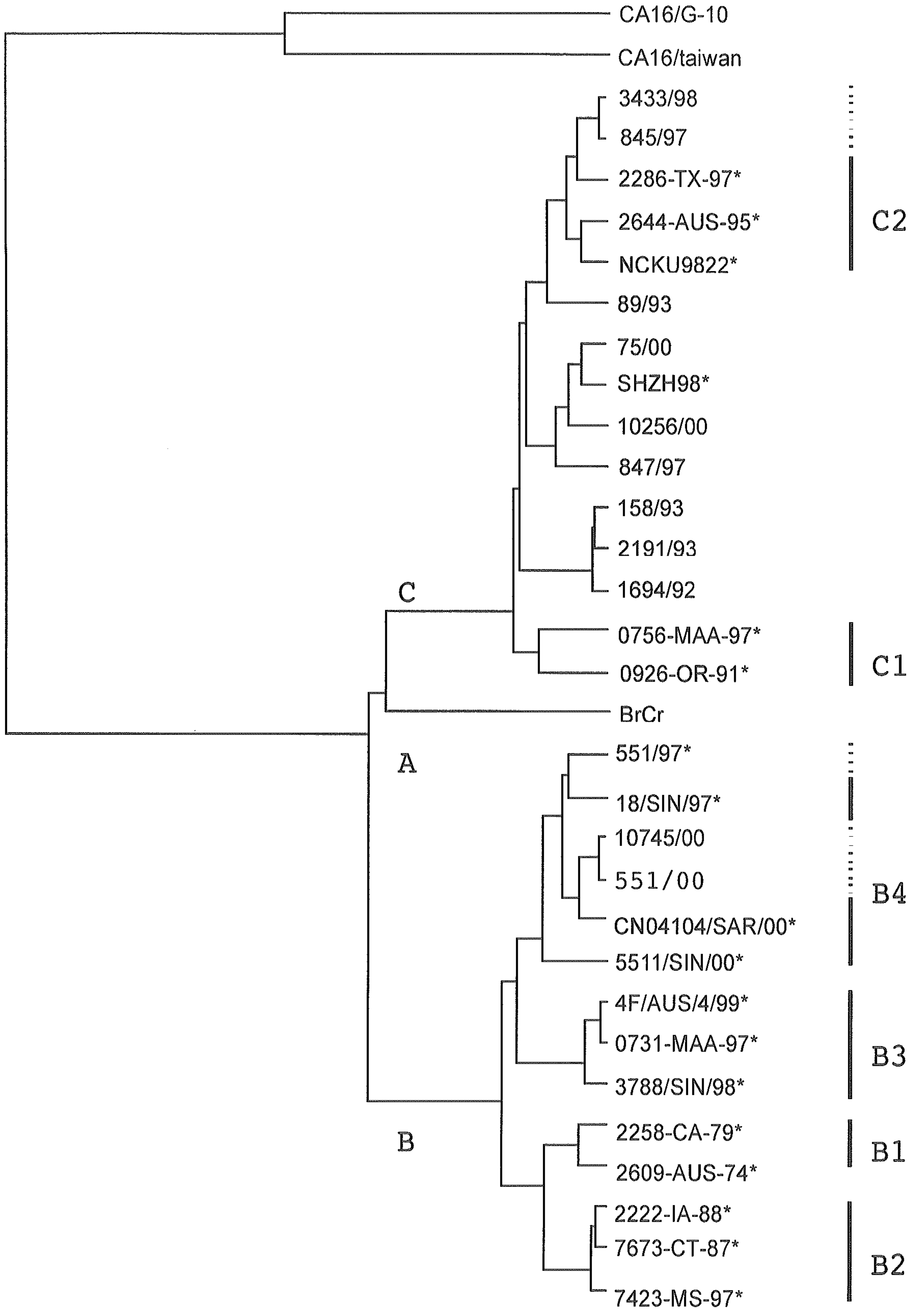

図 1. EV71 分離株と海外流行株*の分子系統樹による比較 (VP1 領域 UPGMA 法)

表１、EV71の各遺伝子型別分離株数（1993年～98年）

遺伝子型	分離年			
VP4/VP1	1993	1997	1998	合計
A-1/A	0	0	0	0
A-2/B	0	3	0	3
B/C	29	7	3	39
合計	29	10	3	42

平成１４年度
厚生労働省科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担　研究報告書

日本のエンテロウイルス 71 流行株の VP4 遺伝子領域の分子系統解析

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
宗村徹也
横浜市衛生研究所

【要旨】
日本で 1970 年代から 2000 年にかけて分離された、エンテロウイルス 71(EV71) 分離株の分子的多様性の変遷を解析するため、VP4 領域の塩基配列による分子系統解析を行った。日本の過去の分離株の多くは愛媛、横浜市において主として手足口病患者から分離された EV71 を用いた。台湾、マレーシア等の東アジア地域で近年、中枢神経合併症重症例を含む手足口病患者から分離された EV71 の塩基配列もあわせて解析を行い、日本で分離されている EV71 との比較を行った。VP4-genotype A-1 の EV71 は、日本では、1970 年代から 1980 年代にかけて分離されており、ブルガリアおよびハンガリーで 1970 年代に分離された EV71 と高い相同性を示した。VP4-genotype A-1 は、1990 年代以降は分離されておらず、1980 年代から日本で分離されている VP4-genotype A-2 は、近年、台湾、マレーシアでも分離されている。1980 年代に分離が認められている VP4-genotype B-1 の EV71 は、1990 年代を通して日本で分離されており、1990 年代後半に台湾で多く分離された VP4-genotype B-1 と高い相同性を示した。以上の結果から、日本では、1980 年代以降、大きく２種類(A および B)の genotype の EV71 が伝播しており、手足口病流行に関与していたことが示唆された。 少なくとも日本の分離株を見る限り、EV71 の genotype と手足口病の重篤化に直接的な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 年には西太平洋地域、2002 年にはヨーロッパ地域で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、西太平洋地域では近年、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。なかでも、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ともなっていたことから、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。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。過去の EV71 流行は多様な臨床症状の発現をともない、また、流行時期・流行地域により重篤な中枢神経疾患の発生頻度が大きく異なるため、病原性の異なる EV71 の genotype/ variant が存在する可能性が指摘されている。そのため、病原性と genotype の関連性を調べるため、この地域の EV71 分離株の分子系統解析結果が、多数報告されている。

日本では EV71 は手足口病の原因ウイルスとして常在化しているため、これまであまり注意がなされていなかったが、散発例ではあるが EV71 感染によると考えられる中枢神経合併症例が認められている。我々は昨年度までの本研究班報告において、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。しかし、解析に用いた東アジア地域の EV71 の多くは、1990 年代後半の分離株であり、それ以前のこの地域の EV71 については、ほとんど解析されていない。日本では、1980 年代から優れた手足口病サーベイランスシステムが存在するため、手足口病由来の過去の EV71 分離株の解析が可能である。そこで、本年度は、過去の多くの EV71 分離株が保管されている横浜市衛生研究所と愛媛県衛生環境研究所との共同研究として、過去の EV71 の分子系統解析を行い、EV71 の VP4-genotype の変遷および海外の EV71 との比較を行った。

B. 研究方法

日本の EV71 は、おも手足口病患者由来の臨床検体(糞便、咽頭拭い液等)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 DNA を増幅し塩基配列を決定した。5'-NTR/VP4/VP2 領域を含む約 1000bp を増幅し、VP4 領域の塩基配列を決定した。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。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 横浜市で分離された EV71 の VP4-genotype の変遷

昨年度までの本研究班報告で、EV71 の分子系統解析を、5'-NTR の一部, VP4/VP2 の一部および VP1 全域を用いて行った場合、どの領域を用いた場合でも EV71 分離株の分子系統的関連性に大きな差はないことが明らかとなっている。どの領域の塩基配列を用いても、近年の EV71 分離株は、大きく 2 種類の genotype に分けることが可能であった。そこで今回は、VP4 領域の配列をもとに分子系統解析を行った。図 1 に示したように、1970 年代から 2000 年までの EV71 分離株は、日本の分離株、海外の分離株を含めて、標準株である BrCr 株以

外は全て2種類の genotype (A および B)に分類可能であることが再確認された。1970 年代から 1980 年代にかけて分離された VP4-genotype A-1 ウイルスは 1970 年代の日本で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 は、1990 年代以降は分離されていない。日本では 1980 年代から分離されている VP4-genotype A-2 は、1990 年代後半になると分離数が増加しており、1997 年の手足口病流行時には、VP4-genotype B-1 と同時期・同地域での伝播が確認されている。VP4 genotype B-1 ウイルスは、1980 年代から散見され 80-90 年代を通じて、少しずつ変異しながら日本の手足口病患者から継続的に分離されている。

2. 海外の EV71 と日本の EV71 の分子系統解析

VP1 領域を用いた分子系統解析でも明らかにされたように、1970 年代から 1980 年代にかけて日本の手足口病患者から分離された VP4-genotype A-1 ウイルスは、ハンガリーおよびブルガリアで流行した EV71 脳炎患者由来の分離株と相同性が高く、同一の genotype に属すると考えられた。その後 1980 年代に出現した VP4-genotype A-2 ウイルスは、1990 年台後半には、台湾およびマレーシアで分離されている。とくに、1997 年、マレーシアの重篤な中枢神経疾患をともなう手足口病流行由来の EV71 の多くは、VP4-genotype A-2 に属していた。一方、VP4-genotype B-1 の EV71 は、1990 年代を通して日本で多数分離されており、1998 年に台湾で多く分離された VP4-genotype B-1 の EV71 と高い相同性を示した。

D. 考察

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。これまでの EV71 の分子系統解析により、5'-NTR, VP4/VP2、VP1 どの領域を用いた場合でも近年の EV71 分離株は、大きく 2 種類の genotype に分けられることが示されていたが、今回の解析により、日本で 1970 年代から 1980 年代に分離された過去の EV71 も、これら2種類の genotype に分類可能であることが示された。今回解析した日本の EV71 のほとんどは、通常の手足口病患者由来の分離株であり、重症例からの分離株はほとんど含まれていない。しかし、近年の東アジアでの重症エンテロウイルス感染症流行時に分離された genotype は単一ではなく、重症例由来の EV71 と相同性が高いウイルスが日本では手足口病患者から分離されている。1970 年代の VP4-genotype A-1 ウイルスは、ヨーロッパで流行した EV71 脳炎由来の分離株と相同性が高く、1997 年のマレーシアの VP4-genotype A-1 と相同性の高い EV71 が、日本ではほぼ同時期に手足口病患者から分離されている。また、近年の日本の VP4 genotype B-1 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。

以上の結果は、中枢神経疾患発生の頻度が高い EV71 流行が特定の genotype と関連するものではないことを確認するものであり、すべての genotype の EV71 が潜在的に中枢神経親和性を有することを示唆している。幸い日本では、大規模な中枢神経疾患の流行は認められていないものの、他の東アジアで分離されている EV71 と相同性の高い EV71 が日本でも分離されていることから、手足口病流行と EV71 の分離動向を、今後も監視していく必要がある。

E. 結論

日本の EV71 について、1970 年代から 2000 年にわたる EV71 分離株を用いて分子系統解析を行った。どの遺伝子領域の塩基配列に基づく分子系統解析でも、日本では、過去 20 年以上にわたり、大きく 2 種類の genotype の EV71 が伝播していたことが確認された。海外で分離された EV71 と日本の分離株の関連を調べたところ、2種類の genotype の EV71 は、西太平洋地域の他の

国々で伝播している EV71 の一部と高い相同性が認められた。しかし、日本の EV71 はほとんどが手足口病口患者から分離されており、EV71 の genotype 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

論文発表

1. Munemura, T., M. Saikusa, C. Kawakami, H. Shimizu, M. Oseto, A. Hagiwara, H. Kimura, and T. Miyamura. Genetic diversity of enterovirus 71 isolated from cases of hand, foot and mouth disease in Yokohama City between 1982 and 2000. Arch Virol 148:253-63. 2003.
2. 清水博之: 手足口病、総合臨床 (印刷中)
3. 清水博之: ワクチン由来ウイルスによるポリオ流行、臨床とウイルス 30, 329 – 335, 2002
4. Tano, Y., H. Shimizu, M. Shiomi, T. Nakano, and T. Miyamura. Rapid Serological Diagnosis of Enterovirus 71 Infection by IgM ELISA. Jpn J Infect Dis 55:133-5. 2002.
5. Nagata, N., H. Shimizu, Y. Ami, Y. Tano, A. Harashima, Y. Suzaki, Y. Sato, T. Miyamura, T. Sata, and T. Iwasaki. Pyramidal and extrapyramidal involvement in experimental infection of cynomolgus monkeys with enterovirus 71. J Med Virol 67:207-216. 2002.
6. Hatsu, M., M. Tanaka, A. Utama, H. Shimizu, and K. Takamizawa. A Japanese Encephalitis Virus NS3 Inhibitor Produced by *Streptomyces sp.* Actinomycetologica 16:6-8. 2002.
7. Kew, O., V. Morris-Glasgow, M. Landaverde, C. Burns, J. Shaw, Z. Garib, J. Andre, E. Blackman, C. J. Freeman, J. Jorba, R. Sutter, G. Tambini, L. Venczel, C. Pedreira, F. Laender, H. Shimizu, T. Yoneyama, T. Miyamura, H. van Der Avoort, M. S. Oberste, D. Kilpatrick, S. Cochi, M. Pallansch, and C. de Quadros. Outbreak of Poliomyelitis in Hispaniola Associated with Circulating Type 1 Vaccine-Derived Poliovirus. Science 14:14. 2002.

学会発表

1. Shimizu,H. Enterovirus Surveillance and Laboratory Diagnosis - Before and After the Eradication of Poliomyelitis -Vietnamese-Japanese Seminar on Tropical Infectious Diseases, Hanoi, November, 2002
2. Thorley B. Shimizu H., Tano Y., Yoneyama Y., Miyamura T., Paladin F. J., Brussen K.A., Stambos V., Yuen L. : Poliomyelitis due to vaccine-derived polioviruses in the Philippines. International Conference on Virology, Paris, July 2002
3. Iwasaki T., Nagata N., Shimizu H., Ami Y., Miyamura T., Sata T., Kurata T. : Pathology of experimental infection of enterovirus 71 in cynomolgus monkeys in comparison with that of poliovirus. 39th Joint Working Conference on Viral Diseases, Matsumoto, July 2002
4. Hasebe F., Limkittikul K., Hong T.C.T., Utama A., Shimizu H., Miyamura T., Morita K. Significance of mutant helicase motif II for Japanese encephalitis virus infectivity. 39th Joint Working Conference on Viral Diseases, Matsumoto, July 2002
5. Shimizu H., Tano Y., Yoneyama Y., Yoshida H., Miyamura T., Paladin F. J., Thorley B.:Circulation of Vaccine-Derived Polioviruses in the Philippines. EOROPIC 2002, Boston, April 2002
6. 清水博之 ：ワクチン由来ポリオウイルスによるポリオ流行、第43回日本臨床ウイルス学会、2002年、秋田
7. 有田峰太郎、清水博之、宮村達男 ：ポリオウイルスの神経毒性発現におけるウ

イルス蛋白質合成の役割、第50回日本ウイルス学会、2002年、札幌
8. 永田典代、清水博之、網　康至、波多野いく持、原嶋綾子、佐藤由子、須崎百合子、佐多徹太郎、倉田　毅、野本明男、岩崎琢也 ：ポリオウイルスレセプター導入トランスジェニックマウスTgPVR21の粘膜感染モデル、第50回日本ウイルス学会、2002年、札幌

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1　エンテロウイルス 71 分離株の VP4-genotype ごとの分離数の推移

ウイルス分離時期	Genotype (日本の分離株)				Genotype (日本以外の分離株)			
	A-1	A-2	B-1	B-2	A-1	A-2	B-1	B-2
1970 – 1979	8	0	0	0	2	0	0	0
1980 – 1989	5	2	18	0	1	1	0	0
1990 – 1995	0	1	4	2	0	0	0	0
1996 – 2000	0	13	8	0	0	6	17	1

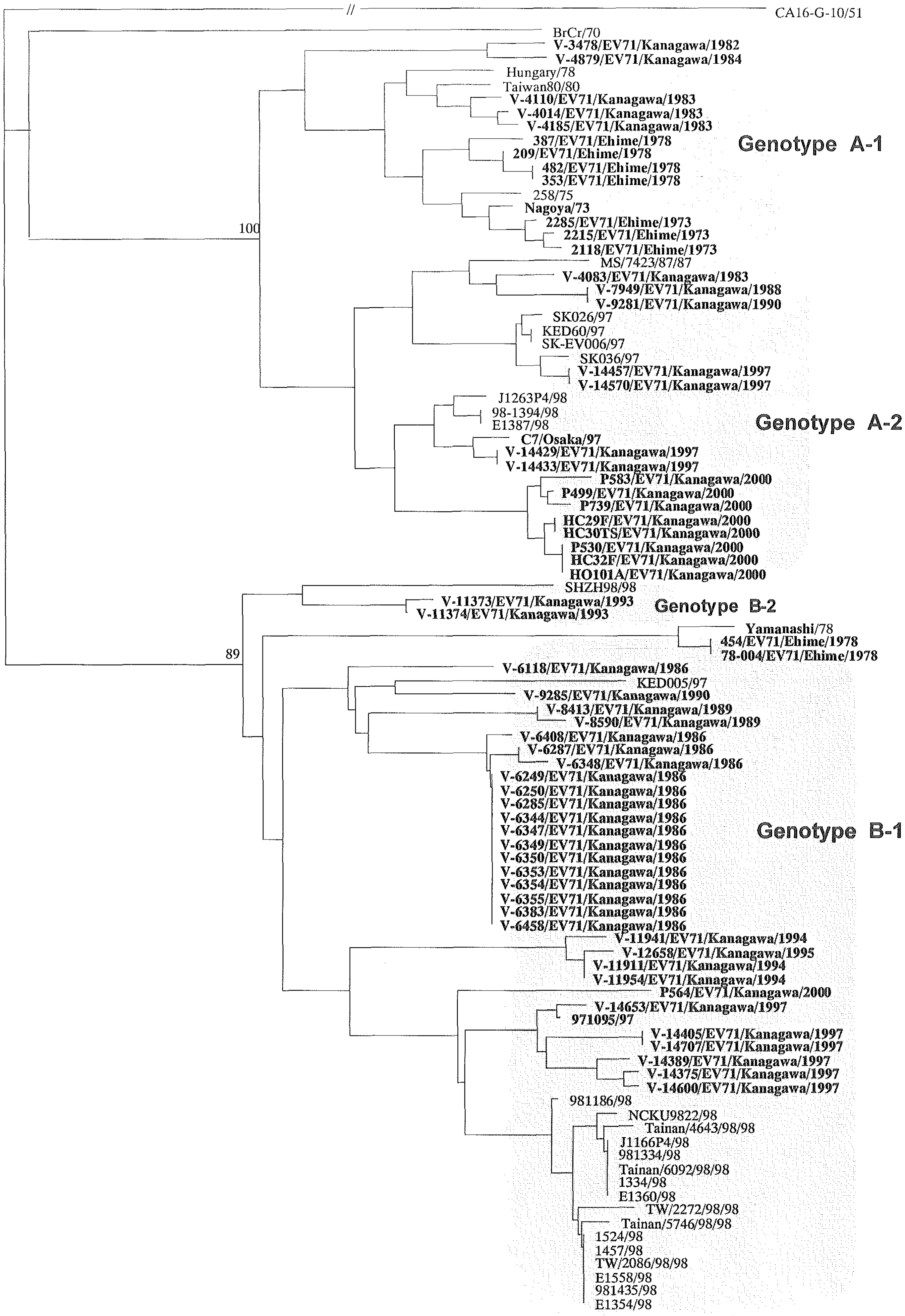

図1　VP4領域の塩基配列よるエンテロウイルス71分離株の分子系統解析

太字は日本の分離株を示す

平成１４年度
厚生労働省科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担　研究報告書

エンテロウイルス感染症診断へのPCR法の応用に関する研究
－夏季熱性疾患における病因診断への応用－

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・講師

共同研究者　石古　博昭　三菱化学ビーシーエル

研究要旨　夏季に38.5℃以上の発熱を呈した患者255例より咽頭拭い液を採取し、ウイルス分離法とPCR法によりエンテロウイルスの検出を試みた。ヘルパンギーナ24例中18例よりエンテロウイルスを検出し、同定されたウイルスはすべてコクサッキーウイルスA群であった。ヘルパンギーナを除く熱性疾患231例中97例よりウイルスを検出し、その約60%がエンテロウイルスであり、またその1/3がコクサッキーウイルスA群であった。

A．研究目的

エンテロウイルスの分離には、株化細胞による組織培養法が一般に用いられる。この方法により、エコーウイルス、コクサッキーウイルスB群、一部のコクサッキーウイルスA群は、良く分離される。しかし、多くのコクサッキーウイルスA群の分離は困難である[1)]。PCR法は、エンテロウイルス属に保存された部位にプライマーを設定することで、コクサッキーウイルスA群を含むほとんどのエンテロウイルスを検出できると考えられる。そこで、ウイルス分離法に加え、エンテロウイルスを高感度に検出するPCR法（PCR-FMU）と、増幅された遺伝子配列を系統解析することによりエンテロウイルスの遺伝子型を同定できるPCR法（PCR-MBCL）の2つを用いることにより、夏季の熱性疾患におけるエンテロウイルス、特にコクサッキーウイルスA群の関与について検討した。

B．研究方法

1　検体採取　1997年と1998年の6～8月に、38.5℃以上の発熱を呈した患者255例より咽頭拭い液を採取し、これを検体とした。検体は、ウイルス学的検査まで-80℃に保存した。

2　ウイルス分離　福島県衛生研究所において、Hep-2、Vero、RD-18S、HMV-II、MDCKの各細胞を用いたマイクロプレート法により、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、100μlの維持培地と50μl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　PCR 法によるエンテロウイルスの検出　ウイルス分離陰性の咽頭拭い液については、福島県立医科大学小児科において、PCR 法（PCR－FMU）によりエンテロウイルス遺伝子の有無を検索した。検体 250 μl より RNA を抽出し、エンテロウイルス属によく保存されている 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 とした。Nested-PCR 法によりウイルス遺伝子を増幅し、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、ウイルス分離法の約 1,000 倍の検出感度を有した。

4　系統解析によるエンテロウイルスの同定　PCR-FMU により陽性となった検体については三菱化学ビーシーエルに送付し、別個に PCR 法（PCR－MBCL）を行い、検出したエンテロウイルスを遺伝子型別した。すなわち、5'末端と VP 2 領域にプライマーを設定し、nested-PCR 法により遺伝子を増幅した。検出感度は、ウイルス分離法の 10～100 倍であった。増幅産物に含まれる VP 4 の全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 VP 4 領域の塩基配列とともに系統解析し、エンテロウイルスの遺伝子型別を行った。

5　患者背景の比較　ヘルパンギーナおよびその他の熱性疾患において、コクサッキーウイルス A 群、その他のエンテロウイルス、アデノウイルスが検出された症例の年齢や発熱の程度などを調べ、各群の背景を比較した。

結果は平均値±標準偏差で表わし、2 群間の差の検定にはノンパラメトリック検定の Mann-Whitney の U 検定を用いた。

C．研究結果

夏季の熱性疾患患者 255 例中 24 例は特徴的な口腔粘膜所見よりヘルパンギーナと診断した。他の 231 例はヘルパンギーナ以外の急性熱性疾患であった。

組織培養法により、255 検体中 73 検体からウイルスが分離された。分離ウイルスは、エンテロウイルスが 33 株、アデノウイルスが 36 株、パラインフルエンザウイルスが 2 株、単純ヘルペスウイルスが 2 株であった。ヘルパンギーナからは、コクサッキーウイルス A16 が 1 株分離された。その他の急性熱性疾患から分離されたエンテロウイルス 32 株は、いずれもコクサッキーウイルス A 群以外であった（表 1）。

ウイルスの分離されなかった 182 検体は、PCR-FMU によりエンテロウイルスの有無を検索した。ヘルパンギーナ 22 検体中 17 検体(77.3%)、その他の熱性疾患 160 検体中 26 検体(16.3%)、合計 43 検体で陽性であった（表 2）。

PCR-FMU によりエンテロウイルス遺伝子が検出された 43 検体について、PCR-MBCL によりエンテロウイルスの同定を試みた。ヘルパンギーナ 17 検体中 14 検体(82.4%)、その他の熱性疾患 26 検体中 16 検体(61.5%)、合計 30 検体で遺伝子型が同定された。同定されたエンテロウイルスはすべて、通常の組織培養では分離の困難なコクサッキーウイルス A 群であった（表 2）。

すなわち、ウイルス分離法と PCR 法により、ヘルパンギーナ 24 例中 18 例よりエンテロウイルスを検出し、同定した 15 株は全てコクサッキーウイルス A 群であった。ヘルパンギーナを除く急性熱性疾患 231 例中 97 例で病原診断ができ、その約 60%がエンテロウイルスであり、同定されたエンテロウイルスの 1/3 がコクサッキーウイルス A 群であった（表 3）。

検出されたコクサッキーウイルス A 群を系統解析した（図）。コクサッキーウイルス A5 をみると、2 つのクラスターを形成しており、1 つは 1997 年、他の 1 つは 1998 年に検出したウイルス群であった。すなわち、検出されたウイルスは、疾患ごとにでは無く、検出された年ごとにクラスターを形成していた。

コクサッキーウイルス A 群が検出されたヘルパンギーナとその他の熱性疾患を比較すると、ヘルパンギーナを呈した症例の年齢が有意に低かった。コクサッキーウイルス A 群、その他のエンテロウイルス、アデノウイルスが検出されたヘルパンギーナ以外の熱性疾患症例を比較すると、年齢、発熱の程度などに差はみられなかった（表 4）。

D．考案

エンテロウイルスには、ポリオウイルス、エコーウイルス、コクサッキーウイルス A 群、コクサッキーウイルス B 群、エンテロウイルスがあり、64 の血清型に分類される。これらの中で、エコーウイルス、コクサッキーウイルス B 群、一部のコクサッキーウイルス A 群は、通常のウイルス分離法により比較的良く分離される。しかし、多くのコクサッキーウイルス A 群は組織培養による分離は困難で、その目的に乳飲みマウスを用いて分離が行われてきた。1950 年代に、この方法によりヘルパンギーナとコクサッキーウイルス A 群の関連が明らかにされたが、ヘルパンギーナ以外の病態とコクサッキーウイルス A 群の関連については、まだ不明な点が多い。近年、乳飲みマウスを用いたウイルス分離は、世界的に行われなくなってきている。

PCR 法は、エンテロウイルス属に良く保存された 5'末端の非翻訳領域や VP 2 領域にプライマーを設定することにより、エンテロウイルス属を広く検出することができる。この方法は、ウイルス分離を必要としないため、特に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 群の検出に有効であろうと考えられる。そこで、通常のウイルス分離法に加え、エンテロウイルスを高感度に検出する PCR－FMU と、検出感度はやや劣るが、エンテロウイルスの遺伝子型別の可能な PCR-MBCL の、2 つの PCR 法を用いることにより、夏期の熱性疾患におけるエンテロウイルスの関与を検討した。その結果、組織培養法によりウイルスの分離されなかった 182 検体中 43 検体にエンテロウイルスを検出し、遺伝子型が同定された 30 株はすべてコクサッキーウイルス A 群であった。すなわち、予測されたように、PCR 法を応用したエンテロウイルスの検出、同定法は、特にコクサッキーウイルス A 群の診断に有効であることが証明された。

ヘルパンギーナ 24 例中 18 例よりエンテロウイルスが検出され、同定されたエンテロウイルスがすべてコクサッキーウイルス A 群であったことは、従来の報告に一致する。ヘルパンギーナを除く急性熱性疾患 231 例中 58 例よりエンテロウイルスが検出され、同定されたエンテロウイルスの 1/3 がコクサッキーウイルス A 群であった。コクサッキーウイルス A 群、その他のエンテロウイルス、アデノウイルスが検出された症例の背景を比較すると、年齢、発熱の程度などに差はみられず、臨床症状からコクサッキーウイルス A 群感染症を予測することは困難と思われた。同じくコクサッキーウイルス A 群が分離されても、ヘルパンギーナを呈した症例の年齢はその他の急性熱性疾患に比較して低く、低年齢層におけるコクサッキーウイルス A 群感染がヘルパンギーナに関与すると考えられた。

検出されたコクサッキーウイルス A 群を系統解析すると、各遺伝子型において、疾患ごとでは無く、検出された年ごとにクラスターを形成した。すなわち、その年に流行したコクサッキーウイルス A 群は、ヘルパンギーナとその他の熱性疾患の両者に関与することが証明された。

E．結論

PCR 法がコクサッキーウイルス A 群感染症の診断に有効であること、コクサッキーウイルス A 群は、ヘルパンギーナの主な原因であり、夏季の熱性疾患に関与するエンテロウイルスのおおよそ 1/3 を占めること、ある年に流行したコクサッキーウイルス A 群はヘルパンギーナとその他の熱性疾患の両者に関与し、特に低年齢層ではヘルパンギーナを発症すること、が示された。

F．健康危険情報

なし

G．研究発表

1．論文発表

Hosoya M, Ishiko H, Shimada Y, Honzumi K, Suzuki S, Kato K, Suzuki H : Diagnosis of group A coxsackieviral infection using polymerase chain reaction. Arch Dis Child 84 : 316-319, 2002.

細矢光亮，佐藤晶論，本泉　健，加藤一夫，島田康司，石古博昭，鈴木　仁．夏季の熱性疾患におけるエンテロウイルス，特にコクサッキーウイルス A 群感染症の関与．小児感染免疫，14(4) : 331-336，2002.

H．知的財産権の出願・登録状況

なし

表１　組織培養法によるウイルスの分離

		ヘルパンギーナ (n=24)	その他の急性熱性疾患 (n=231)	計 (n=255)
ウイルス分離陽性		2	71	73
エンテロウイルス		1	32	33
Cox	A16	1	0	1
	B1	0	2	2
	B2	0	3	3
	B5	0	3	3
Echo	9	0	8	8
	18	0	13	13
	30	0	2	2
Entero	71	0	1	1
アデノウイルス		0	36	36
Adeno	1	0	5	5
	2	0	10	10
	3	0	16	16
	5	0	4	4
	7	0	1	1
その他		1	3	4
Para	1	0	1	1
	3	0	1	1
HSV	1	1	1	2
ウイルス分離陰性		22	160	182

表２　PCR法によるエンテロウイルスの検出と同定

		ヘルパンギーナ (n=22)	その他の急性熱性疾患 (n=160)	計 (n=182)
PCR-FMU陽性		17	26	43
PCR-MBCL陽性		14	16	30
エンテロウイルス				
Cox	A2	0	4	4
	A4	3	2	5
	A5	3	7	10
	A6	4	1	5
	A8	1	0	1
	A10	3	2	5
PCR陰性		5	134	139

表3　熱性疾患患児咽頭拭い液からのウイルスの検出

	ヘルパンギーナ (n=24)	その他の急性熱性疾患 (n=231)
ウイルス検出	19	97
エンテロウイルス	18	58
コクサッキーA型	15 (100%)	16 (33.3%)
その他	0	32
アデノウイルス	0	36
その他	1	3
ウイルス検出せず	5	134

表4　ウイルスが検出された熱性疾患患者の特徴

	ヘルパンギーナ	その他の熱性疾患		
	コクサッキーA群 (n=15)	コクサッキーA群 (n=16)	他のエンテロウイルス (n=32)	アデノウイルス (n=31)
年　齢（歳）	2.34±1.45*	4.39±3.38*	4.20±2.85	4.13±3.70
検体採取までの最高体温（℃）	39.0±0.5	39.4±0.5	39.2±0.5	39.5±0.5
検体採取までの発症後日数	2.50±1.03	2.88±1.33	2.38±0.99	3.17±1.89

* $P<0.05$

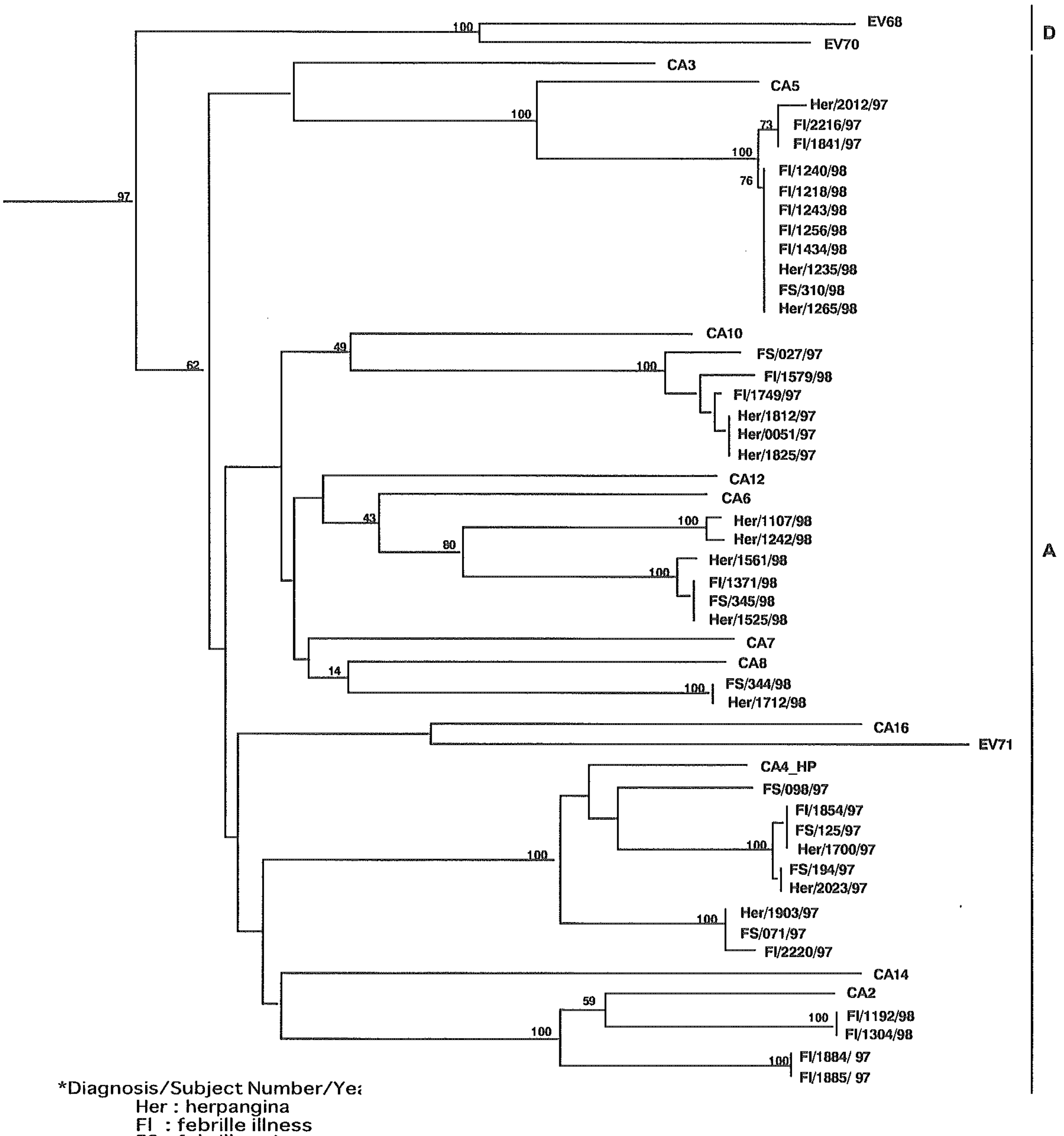

図　PCR法により検出されたエンテロウイルスの系統解析

平成１４年度

厚生労働省科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担　研究報告書

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）三菱化学ビーシーエル

研究要旨　手足口病ウイルス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、2002 年の小児のヘルパンギーナ 22 例、無菌性髄膜炎 11 例、ウイルス性発疹 12 例、感冒 70 例、急性咽頭（扁桃）炎 51 例、急性上気道炎 42 件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

ウイルス分離培養をすることなく、臨床材料より RNA を直接抽出し、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

2002 年のヘルパンギーナ、急性上気道炎などの患者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 塩基配列を解読し、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 20 例、無菌性髄膜炎 10 例、ウイルス性発疹 6 例、感冒 26 例、急性咽頭（扁桃）炎 20 例、急性上気道炎 13 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 20 例中 18 例の塩基配列は、CV-A4—6、CV-A12 の HuEV A 標準株とともに HuEV A に群別された。それらのうち 14 例は CV-A4 標準株、2 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、それぞれの血清型に同定された。また他の 2 例はそれぞれ CV-A5 または CA-V12 の各標準株または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。残りの 2 例は CV-B3 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、それぞれの血清型に同定された。残りの以下同様に、ウイルス性発疹からは、E-9（3 例）、E-13（3 例）が同定された。無菌性髄膜炎からは E-9（7 例）、E-13（3 例）が同定された。急性咽頭（扁桃）炎からは、CV-A2（3 例）、CV-A4（4 例）、CV-A12（3 例）、CV-B3（2 例）、E-9（4 例）、E-13（4 例）が同定された。感冒からは、CV-A9（1 例）、CV-B2（2 例）、CV-B3（3 例）、E-9（13 例）、E-13（1 例）が同定された。急性上気道炎からは、CV-A4（2 例）、CV-B2（1 例）、CV-B3（2 例）、E-9（7 例）、E-13（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.研究発表

1.論文発表

Ishiko H, Shimada Y, Yonaha M, Hashimoto O, Hayashi A, Sakae K, Takeda N. Molecular diagnosis of human enteroviruses by phylogeny-based classification by use of the VP4 sequence. J Infect Dis. 2002 185(6):744-54.

Ishiko H, Miura R, Shimada Y, Hayashi A, Nakajima H, Yamazaki S, Takeda N
Human rhinovirus 87 identified as human enterovirus 68 by VP4-based molecular diagnosis. Intervirology. 2002;45(3):136-41

2.学会発表

石古博明、三浦里香、山崎修道、武田直和：ＶＰ4 塩基配列に基づく系統解析によって、ヒトライノウイルス 87 型はヒトエンテロウイルス 68 型に同定された。第 50 回日本ウイルス学会, 2002, 札幌

平成１４年度
厚生労働省科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担　研究報告書

エンテロウイルスの分子ウイルス学的研究

分担研究者　　小池智

（財）東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・
微生物研究部門・副参事研究員

研究協力者　細沼美樹
東京都神経科学総合研究所・微生物研究部門
吾郷昌信
丸石製薬中央研究所

研究要旨
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知られていたが、近年重篤な脳炎の原因ともなりうることが明らかにされてきた。ポリオウイルスをはじめとするエンテロウイルス属のウイルスは感染性 cDNA クローンを用いた分子遺伝学的な手法によって大きく進展し、病原性の強弱などがどのように支配されているか分子レベルで明らかになってきている。ところが EV71 に関してはいくつかの分離株について塩基配列が報告されているに留まっていた。一昨年度我々は EV71 に感染し脳炎を発症した死亡例からの分離株 SK/EV006/Malaysia 株をもとに感染性 cDNA クローンの構築を行った。本年度は昨年度に引き続きこの感染性 cDNA クローンをもとに弱毒候補株の作成、ならびその性状解析、あるいは SK/EV006/Malaysia 株の抗ウイルス剤 MRL-1237 の有効性に関与するアミノ酸の検索を行った。

A.　研究目的

1.　EV71 の分子遺伝学的な解析を可能とするために感染性 cDNA クローンを構築し、これに変異を加えた弱毒候補株を作成する。ポリオウイルスにおいては５’noncoding region の配列の違いがウイルスの毒力に大きな影響を与えることが知られている。そこで EV71 においても同様のメカニズムが存在していると考えられるので EV71 の 5' noncoding region に変異を加えて弱毒化したウイルスの作成を試みた。昨年度にこの領域をポリオウイルス Mahoney 株、あるいは Sabin 1 株に置換したウイルスを作成したのでその性状を解析した。