

Primers	5'-3' Sequences <sup>a</sup>	Amino acid motif	Location <sup>c</sup>
AN32	GTYTGCCA	WQT	3009--3002
AN33	GAYTGCCA	WQS	3009--3002
AN34	CCRTCRTA	YDG	3111--3104
AN35	RCTYTGCCA	WQS	3009--3002
SO224	GCIATGYTIGGIACICAYRT	AMLGTH(I/L/M)	1977--1996
SO222	CICIGGIGGIAYRWACAT	M(F/Y)(I/V)PPG(A/G)	2969--2951
AN89	<u>CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG</u> <sup>b</sup>	PALTA(A/V)E(I/T)G	2602--2627
AN88	<u>TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT</u> <sup>b</sup>	M(F/Y)(I/V)PPGGPV	2977--2951

<sup>a</sup>Ambiguity codes based on Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB) are as follows: G, guanine; A, adenine; C, cytosine; T, thymine; R, A/G; Y, C/T; W, A/T; N, A/C/G/T; I, inosine.

<sup>b</sup>The nondegenerate clamp regions within AN88 and AN89 sequences are underlined.

<sup>c</sup>The locations of all primers are those relative to the genome of PV1 Mahoney strain (GenBank accession number J02281).

Table 1. Primers used for cDNA synthesis, PCR1, snPCR2, and sequencing (Nix *et al.*, 2006)

の、型別同定が困難な場合も多い。最近、Nix らによって開発された Consensus Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primers (CODEHOP)を用いてエンテロウイルス間で多様性のある VP1 領域を増幅する CODEHOP VP1 RT-snPCR 法が、より高率に HEV の型別同定を可能にする方法として注目されているが、HRV における有効性についてはほとんど検証されていない。

これまでに我々は、夏かぜにおける HEV の侵淫状況を明らかにするために、感冒症状示した患者の臨床検体について培養細胞を用いたウイルス分離・同定との比較検討を行い、CODEHOP VP1 RT-snPCR 法を用いた HEV 高感度検出同定法の有効性を確認した。さらに、通常ウイルス分離に使用する培養細胞では分離し難い HEV-A が原因となるヘルパンギーナおよび手足口病患者の臨床検体で培養細胞ではウイルス分離されず VP1 RT-snPCR 法のみで原因ウイルス遺伝子が検出された検体について、同定されたウ

イルスに特異性の高い細胞を用いて再分離が可能になることを示し、細胞株を選択して確率の高いウイルス分離を行う上でも本法は有用であることを確認した。

本研究では、かぜにおける HRV の侵淫状況を明らかにするために、CODEHOP VP1 RT-snPCR 法を用いた高感度検出同定法の HRV 標準株に対する有効性を検証すると共に、本法を用いて臨床検体からの HRV の検出同定を行った。

## B. 研究方法

供試した HRV 標準株のうち、HRV 2 および 14 は川名林治博士より分与され、その他 46 株の HRV 標準株は ATCC より購入した。HRVs は、HeLa (Ohio)細胞で増殖させ、その培養上清を用いた。

臨床材料としては、来院時、かぜ症状を呈した患者より採取された咽頭ぬぐい液 238 検体を用いた。

ウイルス RNA の抽出は、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を用いて行った。

Serotype	Strain	Species	Receptor group	Matching ratio (%)	Serotype	Strain	Species	Receptor group	Matching ratio (%)
HRV1A	2060	A	Minor	97	HRV39	209	A	Major	98
HRV1B	B632	A	Minor	99	HRV41	56110	A	Major	96
HRV2	HGP	A	Minor	96	HRV44	71560	A	Minor	99
HRV3	FEB	B	Major	100	HRV47	Baylor 3	A	Minor	100
HRV5	Norman	B	Major	100	HRV49	8213	A	Minor	98
HRV8	MRH	A	Major	99	HRV50	A2 #58	A	Major	99
HRV9	211-CV13	A	Major	98	HRV54	F01-3774	A	Major	100
HRV10	204-CV14	A	Major	98	HRV56	CH82	A	Major	98
HRV12	181-CV16	A	Major	100	HRV58	21-CV20	A	Major	100
HRV13	353	A	Major	100	HRV61	6609-CV39	A	Major	99
HRV14	1059	B	Major	100	HRV67	1857-CV51	A	Major	98
HRV15	1734	A	Major	100	HRV68	F02-2317	A	Major	98
HRV16	11757	A	Major	100	HRV72	K2207	B	Major	98
HRV19	6072-CV18	A	Major	97	HRV75	328F	A	Major	100
HRV21	47	A	Major	98	HRV77	130-63	A	Major	100
HRV22	127-CV22	A	Major	100	HRV78	2030-65	A	Major	99
HRV25	5426-CV26	A	Minor	100	HRV81	483F	A	Major	100
HRV28	6101-CV29	A	Major	92	HRV86	121564-Johnson	B	Major	98
HRV29	5582	A	Minor	100	HRV88	CVD01-0165-	A	Major	97
HRV30	106F	A	Minor	100	HRV89	Dambranskas	A	Major	99
HRV31	140F	A	Minor	97	HRV92	41467 Gallo	B	Major	98
HRV32	363	A	Major	98	HRV95	SF-1622	A	Major	97
HRV33	1200	A	Major	98	HRV98	SF-998	A	Major	100
HRV36	342H	A	Major	98	HRV100	SF-4006	A	Major	100
						K6579	A	Major	100

Table 2. Human rhinovirus reference strains amplified by VP1 RT-snPCR

CODEHOP VP1 RT-snPCR は、Table 1 に示すプライマーを用いて、Nix らの方法に準じて行った。増幅された遺伝子産物は、BigDye Terminator v1.1 および ABI Prism 3130(何れも Applied Biosystems)を用いて塩基配列を決定した。Sequencing primer には AN89 および AN88 (Table 1)を使用した。決定した VP1 領域の塩基配列は、Blast により相同性の検索を行い、最も高いスコアを示したデータベースに基づいて型別同定した。

### C. 研究結果および考察

#### (1) VP1 RT-snPCR 法による HRV 標準株の検出同定。

HRVs 標準株 48 株を用いて VP1 RT-snPCR 法による検出同定の有効性について検討した。結果を Table 2 に示す。供試した標準株 48 株は、VP1 RT-snPCR で全て増幅され、VP1 領域の増幅産物は一致率 92~100%で同定可能であった。一部に増幅効率が低い HRV も存在したが、AN89 および AN88 を用いて再度増幅することにより、塩基配列を解析するために十分な量の増幅産物が得られた。これらの primer は、増幅産物の塩基配列解析に sequencing primer としても使用したが、(+)鎖の解析に使用した AN89 では一部に解析不十分な株が存在したのに対し、(-)鎖の解析に使用した AN88 では、供試した全ての HRV で解析が可能であった。今後、増幅産物における HRV(+)鎖の解析に使用する sequencing primer については、さらに検討する必要があるものと考えられる。

本実験の結果より、現在までに血清型分類されている HRV の 100 血清型のうち、約半数は、種 (species A または B)、あるいはレセプターグループに関係なく VP1

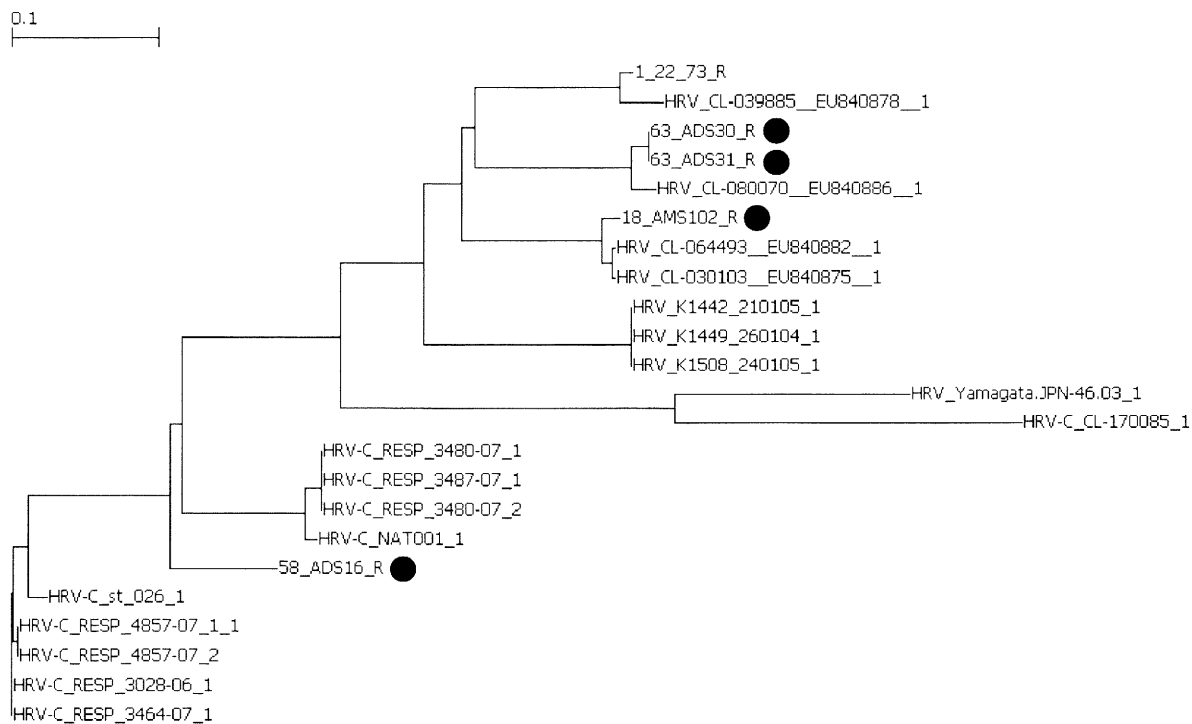
RT-snPCR 法により検出同定されたことから、HRV の検出同定における本法の有用性が示唆された。したがって、培養細胞を用いた分離同定が困難な HRV のうち、少なくとも HRV-A および B に属する大部分のウイルスについては HEV 同様、本法による検出同定が十分可能であるものと思われる。

#### (2) 臨床材料からの HRV の検出・同定

臨床材料 238 検体からのヒトのエンテロウイルス属の検出同定では 185 株が同定され、検出陽性率は 77.7%と高率であった。このうちの 9 割以上、181 株は HEV-A および HEV-B に属するウイルスであった。このうち、158 株は HEV-A に属するウイルスが占め、手足口病と診断された患者材料から検出同定された 52 株はいずれもコクサッキーウイルス A16 (CV-A16)であった。本結果より、2009 年に長崎県下で流行した手足口病の原因ウイルスは CV-A16 であることが示唆された。

一方、HRV は、上気道炎患者由来検体から 1 株、下気道炎症状を呈した患者由来検体から 3 株が検出同定され、いずれも HRV-C に属するウイルスであった。下気道炎(気管支炎)由来の 3 株は、これまでに下気道炎から分離された株と近縁 (Fig. 1)であったことから、HRV-C に属するウイルスの下気道炎との関係を考える上で極めて興味深い。

今回、臨床材料から本法により検出同定されたヒトのエンテロウイルス属に属するウイルス 185 株のうち HRV は僅か 4 株ではあったが、いずれも培養細胞では分離できない HRV-C に属するウイルスであり、HRV-A 及び B に加えて HRV-C に属するウイルスも本法により同様に検出できる可能性が示唆された。



**Fig. 1 VP1 phylogenies of HRV-Cs detected in this study**

今回検体を採取した時期が主として 4 月から 10 月であり、採取時期が冬期感冒の主要な原因ウイルスとされる HRV の検出率に影響している可能性が考えられることから初秋から春先までの期間に採取された検体についてもさらに検討が必要であると思われる。加えて、今回供試した臨床材料は、すべて咽頭拭い液であったことから、これに加えて鼻腔拭い液も併せて検討することにより HRV、特に HRV-A 及び B に属するウイルスの検出率の向上に繋がる可能性も十分に考えられる。したがって、かぜにおける HEV 及び HRV の侵淫状況を明らかにしていくためにはこれらを考慮して実施する必要があるものと思われる。

今後は、臨床検体より分離された HRV の型別同定および初冬から春先にかけて

採取された臨床検体からの HRV の検出同定を行い、本法の HRV の検出同定における有用性についてさらに検討する予定である。

#### D 結論

CODEHOP VP1 RT-snPCR 法は、冬期感冒の主要な原因で 100 以上もの血清型が存在する HRV のうち、少なくとも HRV-A 及び B に属するウイルスの迅速かつ高感度に検出・同定に極めて有用な方法である。また、培養細胞では分離できない HRV-C に属するウイルスも臨床検体から本法により検出同定できる可能性が示唆された。

研究発表

#### 1. 論文発表

なし.

2. 学会発表

(1) 吾郷昌信、山口顕徳、平野 学、吉川 亮、西村順裕、清水博之：ヒトライノウイルスの高感度検出同定法、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 (徳島)

知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
分担(協力)研究報告書

本邦における、手足口病、ヘルパンギーナ、および関連合併症の  
入院症例に関する全国調査

研究協力者 福島若葉、武知茉莉亜、熊谷桂子、乾未来  
大阪市立大学大学院医学研究科 公衆衛生学

研究協力者 中野 貴司  
川崎医科大学 小児科

主任研究者 清水 博之  
国立感染症研究所 ウイルス第二部

**研究要旨**

本邦における、手足口病、ヘルパンギーナ、および関連合併症による入院症例の臨床疫学像を把握するために全国調査を実施している。本調査は、一次調査と二次調査からなる。一次調査により、全国の入院症例数および死亡症例数を推計し、二次調査により、各症例の臨床症状、検査値、病原検索結果などの詳細情報を収集する。

一次調査では、小児科を標榜する全国の病院の小児科から、病床別に層化無作為抽出法で抽出した750診療科を対象とした。2010年4月1日~9月30日までの間に入院した15歳未満の日本人で、症例定義に一つでも合致する症例について、入院症例数および死亡症例数の報告を依頼した。なお、本調査では、諸外国と比較可能な形で情報を収集するために、世界保健機関(WHO)刊行のガイドライン[in press]で提唱された症例定義を採用した。

二次調査は、一次調査で「該当症例あり」と回答した診療科について実施する。2010年4月1日~9月30日までの間に入院した15歳未満の日本人で、症例定義に一つでも合致する症例について、診断名・臨床症状・基礎疾患・検査値・病原検索結果・転帰などの既存情報を収集する。

現在、一次調査を実施中である。2011年2月25日現在、392診療科(52.3%)から回答を得た。報告症例数は748症例で、うち死亡症例数は4例であった。一次調査の終了後、二次調査を行い、各症例の特性について情報を収集し、手足口病、ヘルパンギーナ、および関連合併症による入院症例の臨床疫学像を明らかにする。

**A. 研究目的**

1990年代後半より、西アジア太平洋地域で、手足口病、ヘルパンギーナ、およびエンテロウイルス71型(EV71)感染によ

るものと考えられる関連合併症の重症例が頻発しており、諸外国において当該重症例の疫学像を把握するための調査が行われている<sup>1-14)</sup>。

本邦では、感染症発生動向調査の一環として実施されている疾病サーベイランス、および病原体サーベイランスにより、手足口病やヘルパンギーナの国内における状況を知ることができる。重症例に関しては、散发例<sup>15-18)</sup>や、1998年に厚生省（当時）が実施したサーベイランスから数例の報告<sup>19)</sup>がある。また、2002~2004年の期間について、手足口病・ヘルパンギーナの臨床経過中に重症化した症例に関する報告を依頼したアンケート調査により、EV71流行年に重症例が増加する傾向が示唆されている<sup>20)</sup>。しかし、当該重症例に関して諸外国と比較可能な形で情報を収集した調査はない。

今般、世界保健機関(WHO)刊行の”A Guide to Clinical Management and Public Health Response for Hand Foot Mouth Disease (HFMD)[in press]”<sup>21)</sup>により、手足口病、ヘルパンギーナ、および関連合併症の症例定義が提唱された。本調査では、同症例定義を用いて入院症例に関する全国調査を行うことで、諸外国と比較可能な形で情報を収集し、わが国における重症例の臨床疫学像を明らかにする。

## B. 研究方法

厚生労働科学研究費補助金・難治性疾患克服研究事業「特定疾患の疫学に関する研究班」によって作成された「難病の患者数と臨床疫学像把握のための全国疫学調査マニュアル第2版」（以下、「全国疫学調査マニュアル」）<sup>22)</sup>に沿って実施した。当該マニュアルは、難病を対象疾患として作成されたものであるが、他疾患であっても、患者数が少なく受療が大規模施設に偏る傾向がある場合は応用可能と考える。調査は、

一次調査および二次調査からなる。一次調査により、全国の入院症例数および死亡症例数を推計し、二次調査により、各症例の臨床症状、検査値、病原検索結果などの詳細情報を収集する。

### 1. 一次調査

#### ① 対象

小児科を標榜する全国の病院の小児科から、層化無作為抽出法にて病床規模別に選定した。株式会社医事日報発行の「病院情報（最終版：2009、2010、または2011年）」<sup>23-28)</sup>を元に、小児科施設を有する全国の病院を「99床以下・100~199床・200~299床・300~399床・400~499床・500床以上・大学病院」に層化し、各層の抽出率は、「5%・10%・20%・40%・80%・100%・100%」とした。

#### ② 情報収集

以下すべての基準を満たす症例について、一次調査票（資料1）を用いて入院症例数と死亡症例数の情報を収集する。

- ・2010年4月1日~2010年9月30日までの間に対象小児科に入院
- ・15歳未満の日本人
- ・症例定義（資料2）に1つでも合致する

### 2. 二次調査

#### ① 対象

- 以下すべての基準を満たす者とする。
- ・一次調査で「手足口病、ヘルパンギーナ、および関連合併症の入院症例あり」と回答した診療科に、2010年4月1日~2010年9月30日までの間に入院
  - ・15歳未満の日本人

・症例定義（資料 2）に 1 つでも合致する

## ② 情報収集

調査個人票（資料 3）を用いて、対象の診断名・臨床症状・基礎疾患・検査値・病原検索結果・転帰などの既存情報を収集する。

## 3. 統計解析

「全国疫学調査マニュアル」の方法に従い、一次調査で報告された症例数をもとに、2010 年 4 月 1 日～9 月 30 日における全国の入院症例数、および死亡症例数を推計する。また、二次調査から得られた各症例の詳細情報をもとに、基礎疾患の保有割合、臨床症状の特性、各検査値の平均値および分布、病原検索結果、ICU 治療の割合、などを集計する。

### （倫理面への配慮）

一次調査では、入院症例数および死亡数のみの調査であるため、倫理面に問題はない。

二次調査では、診療録より既存情報を収集するため、個人情報保護の観点から倫理的な配慮を要する。二次調査で使用する調査個人票には、「性、生年月日、居住地（都道府県）」を記載するが、「患者氏名、住所（市町村以下）、電話番号」などの、すぐに個人を特定できる情報は記載しない。さらに、症例を識別するために調査票に記載する症例番号は、カルテ番号ではなく新たに設けた調査対象者番号とする。カルテ番号と調査対象者番号の対応表は対象診療科で施錠のうえ保管する。

**本調査は、疫学研究に関する倫理指針（2008 年 12 月 1 日改訂）の「第 3 インフ**

**ォームドコンセント等** 1 研究対象者からインフォームド・コンセントを受ける手続等」における、「(2) 観察研究を行う場合 [2] 人体から採取された試料を用いない場合 イ 既存資料等のみを用いる観察研究の場合」に該当するため、研究対象者からインフォームドコンセントを受けることを必ずしも要しない。なお、本研究実施についての情報を公開する必要上、「研究実施を知らせる媒体（A3 ポスター）」を対象診療科に送付し、待合室などでの掲示を依頼する。

本調査の実施については、大阪市立大学大学院医学研究科の倫理審査にて承認を受けた。

## C. 研究成果

一次調査を実施中であるため、2011 年 2 月 25 日現在の結果を報告する。表 1 に、一次調査の対象科数、返信科数、および報告症例数を示す。一次調査の対象として抽出した診療科の総数は 760 診療科であったが、うち 10 診療科については、廃院、小児科閉鎖中、小児入院設備が無い、等の連絡を受けた。最終的に一次調査の対象となったのは 750 診療科である。抽出率は、全体として 29.9%となった。

392 診療科（52.3%）から回答を得た。返信率は、各層で 40～60%となっている。報告症例数は 748 症例、うち死亡症例数は 4 例であった。このうち死亡症例 2 例を含む 267 症例については、300～399 床の層の一施設からの報告であった。

## D. 考察

2011 年 2 月 25 日現在、一次調査の調査



票返信率は全体で 52.3%であるが、一次調査における調査票返信の期日を 2 月末に設定しているため、今後も返信率、報告症例数ともに増えることが見込まれる。なお、2 月末を過ぎて回答のない診療科には、一次調査の再依頼を行う予定である。

2002~2004 年の期間について、手足口病・ヘルパンギーナの臨床経過中に重症化した症例に関する報告を依頼したアンケート調査によると、手足口病・ヘルパンギーナを呈さない脳炎・脳症、あるいは急性呼吸循環不全による死亡症例 442 例についても同時に調査されている。このうち、病原体が同定された 129 症例についてみると、インフルエンザが 56%と最も多く、次いでエンテロウイルスが 12%となっている<sup>29)</sup>。今回の調査では、エンテロウイルス以外の病原体が原因となった類似症例が多数混入することを出来る限り防ぐために、2010 年における手足口病の疾病サーベイランスの結果に基づき、調査期間を 2010 年 4 月 1 日~9 月 30 日に限定した (図 1.参照)。

それでもなお、一次調査で報告された症例には、他の病因を持つものが含まれていることは否定できない。これは、本調査で採用した WHO の症例定義が、手足口病やヘルパンギーナを呈さずともエンテロウイルス感染の可能性がある症例をすべて含むようなものとなっているためである。エンテロウイルス感染症例は、手足口病やヘルパンギーナに特有の皮膚症状を呈さずに合併症を起こして重症例となることがある<sup>9, 13)</sup>。手足口病流行期間における、エンテロウイルス感染による中枢神経障害の発生頻度、およびその重症度を把握するためにも、二次調査で報告症例の臨床経過や病原検索

結果等の情報を収集する必要がある。

感染症発生動向調査の病原体サーベイランス情報によると、2010 年における手足口病患者由来の検出ウイルスは EV71 が最多であった<sup>30)</sup>。EV71 流行年である 2010 年について、手足口病、ヘルパンギーナ、および関連合併症の臨床疫学像を明らかにすることは重要であると考えられる。

## E. 結論

本邦における、手足口病、ヘルパンギーナ、および関連合併症による入院症例の臨床疫学像を把握するために全国調査を実施している。本調査では、諸外国と比較可能な形で情報を収集するために、世界保健機関(WHO)刊行のガイドライン[in press]で提唱された症例定義を採用した。2011 年 2 月 25 日現在、一次調査で入院症例 748 例、うち死亡症例 4 例が報告されている。一次調査の終了後、二次調査を行い、各症例の特性について情報を収集し、手足口病、ヘルパンギーナ、および関連合併症による入院症例の臨床疫学像を明らかにする。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

なし

## H. 知的財産の出願・登録状況

なし

## 参考文献

- 1) McMinn P, Stratov I, Nagarajan L, Davis S: Neurological manifestations of

- enterovirus 71 infection in children during outbreak of hand, foot, and mouth disease in Western Australia. *Clin Infect Dis* 32: 236-242, 2001
- 2) AbuBakar S, Sam IC, Yusof J, Lim MK et al: Enterovirus 71 outbreak, Brunei. *Emerg Infect Dis* 15(1): 79-82, 2009
  - 3) Zhan Y Tan XJ, WangHY, Yan DM et al: An outbreak of hand, foot, and mouth disease associated with subgenotype C4 of human enterovirus 71 in Shandong, China. *J Clin Virol.* 44: 262-267, 2009
  - 4) Chen KT Chang HL, Wang ST, Cheng YT et al: Epidemiologic Features of Hand-Foot-Mouth Disease and Herpangina Caused by Enterovirus in Taiwan, 1998-2005. *Pediatrics* 120(2): e244-252, 2007
  - 5) Ho M Chen ER, Hsu KH, Twu SJ et al: An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. *N Engl J Med.* 341(13): 929-935, 1999
  - 6) Lin TY, Twu SJ, Ho MS, Chang LY et al: Enterovirus 71 outbreaks, Taiwan: Occurrence and recognition. *Emerg Infect Dis.* 9(3): 291-293, 2003
  - 7) Ma E and Chuang SK. Changing epidemiology of hand, foot, and mouth disease in Hong Kong, 2001-2009. *Jpn J Infect Dis.* 63: 422-426, 2010
  - 8) Ryu WS, Kang B, Hong J, Hwang S et al: Clinical and etiological characteristics of enterovirus 71-related disease during a recent 2-year period in Korea. *J Clin Microbiol.* 48(7): 2490-2494, 2010
  - 9) Chan LG, Parashar UD, Lye MS, Ong FG et al: Deaths of children during an outbreak of hand, foot, and mouth disease in Sarawak, Malaysia: clinical and pathological characteristics of the disease. For the Outbreak Study Group. *Clin Infect Dis.* 31(3): 678-83, 2000
  - 10)Cardosa MJ, Krishnan S, Tio PH, Perera D et al: Isolation of subgenus B adenovirus during a fatal outbreak of enterovirus 71-associated hand, foot, and mouth disease in Sibu, Sarawak. *Lancet* 354(9183): 987-991, 1999
  - 11)Podin Y, Gias EL, Ong F, Leong YW et al: Sentinel surveillance for human enterovirus 71 in Sarawak, Malaysia: lessons from the first 7 years. *BMC Public Health* 7(6): 180, 2006
  - 12)Ang LW, Koh BK, Chan KP, Chua LT et al: Epidemiology and control of hand, foot and mouth disease in Singapore, 2001-2007. *Ann Acad Med Singapore* 38:106-112, 2009
  - 13)Shah VA, Chong CY, Chan KP, Ng W et al: Clinical characteristics of an outbreak of hand, foot and mouth disease in Singapore. *Ann Acad Med Singapore* 32: 381-387, 2003
  - 14)Tu PV, Thao NT, Perera D, Huu TK et al: Epidemiologic and virologic investigation of hand foot and mouth disease, southern Vietnam. 2005. *Emerg Infect Dis.* 13(11): 1733-1741, 2007
  - 15)森田修行 : エンテロウイルス 71 型による手足口病の発生—富山県. 病原微生物

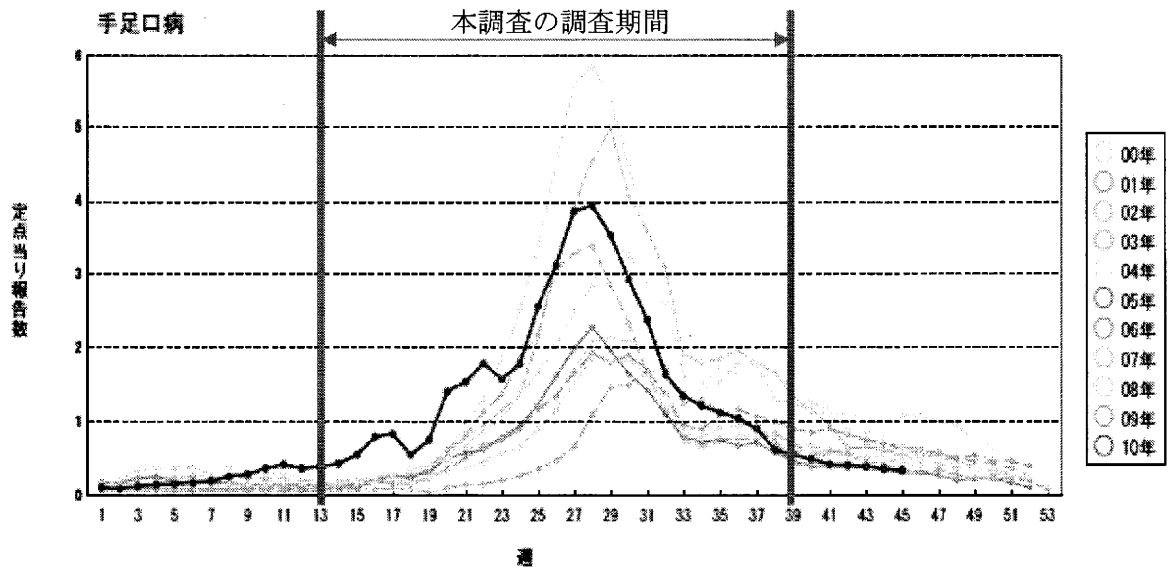
- 検出情報 11: 165, 1993.  
<http://idsc.nih.gov/iasr/CD-ROM/records/14/16502.htm> (2011年02月22日)
- 16) Komatsu H, Shimizu Y, Takeuchi Y, Ishiko H et al: Outbreak of severe neurologic involvement associated with Enterovirus 71 infection. *Pediatr Neurol* 20(1): 17-23, 1999
- 17) 塩見正司、外川正生、山崎謙治、奥野良信: エンテロウイルス71型感染が原因で急死したと考えられた3症例—大阪市。病原微生物情報 19: 55, 1998
- 18) Fujimoto T, Chikahira M, Yoshida S, Ebira H et al: Outbreak of central nervous system disease associated with hand, foot, and mouth disease in Japan during summer of 2000: Detection and molecular epidemiology of enterovirus 71. *Microbiol. Immunol.* 46(9): 621-627, 2002
- 19) 国立感染症研究所 感染症情報室: 手足口病 1998. 病原微生物情報 20: 141-142, 1999
- 20) Suzuki Y, Taya K, Nakashima K, Ohyama T et al: Risk factors for severe hand foot and mouth disease. *Pediatr International* 52: 203-207 2010
- 21) WHO Regional Office for the Western Pacific Region and the Regional Emerging Disease Intervention: A Guide to Clinical Management and Public Health Response to Hand Foot Mouth Disease (HFMD). in press
- 22) 川村孝 編: 難病の患者数と臨床疫学像把握のための全国疫学調査マニュアル 第2版. 厚生労働省難治性疾患克服研究事業 特定疾患の疫学に関する研究班、2006年
- 23) 2009年版北海道・東北病院情報. 医事日報. 2009
- 24) 2010年版関東病院情報. 医事日報. 2010
- 25) 2010年版中部病院情報. 医事日報. 2010
- 26) 2010年版近畿病院情報. 医事日報. 2010
- 27) 2010年版中国・四国病院情報. 医事日報. 2010
- 28) 2011年版九州・沖縄病院情報. 医事日報. 2010
- 29) 岡部信彦、多屋馨子、木村幹男、山下和予: 本邦におけるエンテロウイルス感染症の疫学および東南アジアにおける重症エンテロウイルス感染症の概要報告. 厚生労働科学研究費補助金(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14年度 総括・分担研究報告書: 11-21、2003年
- 30) 病原微生物検出情報: 手足口病患者から分離・検出されたウイルス、2007~2011年. 国立感染症研究所感染症情報センター. 2011年02月22日.  
<https://hasseidoko.mhlw.go.jp/Byogentai/Pdf/data37j.pdf> (2011年02月22日)

表 1. 一次調査の対象科数、返信科数、および報告症例数

病床規模	診療科数	対象科数	抽出率(%)	返信科数 および返信率(%)*	入院症例数 (うち死亡症例数) *
99床以下	821	41	5.0	18(43.9)	0
100~199床	538	48	8.9	25(52.1)	23(0)
200~299床	315	63	20.0	28(44.4)	41(0)
300~399床	320	125	39.1	67(53.6)	347(2)
400~499床	188	149	79.3	83(55.7)	121(0)
500~599床	204	203	99.5	98(48.3)	180(1)
大学病院	121	121	100	73(60.3)	36(1)
計	2507	750	29.9	392(52.3)	748(4)

\*2011年2月25日現在

図 1. 2010年の手足口病定点当り報告数 (引用：国立感染症研究所感染症情報センター)



手足口病、ヘルパンギーナ、および関連合併症の  
入院症例に関する全国調査  
一次調査 調査票

記載医師御氏名 \_\_\_\_\_

記載年月日 2011 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日

以下すべてに該当する症例についてお答えください		
・2010年4月1日～2010年9月30日の間に貴診療科に入院		
・15歳未満の日本人		
・同封の症例定義に一つでも当てはまる		
1. なし	2. あり →	_____例 (うち死亡 _____例)

記入上の注意事項

1. 該当症例のない場合でも「1. なし」に○をつけ、ご返信下さい。
2. 後日、各症例について二次調査を行いますのでご協力下さい。
3. 貴施設名、貴施設診療科、ご住所に誤りがございましたら、お手数ですがご訂正をお願いいたします。

2011年2月末日までにご返送いただければ幸いです。

## Proposed clinical case definitions for HFMD/herpangina and associated complications

\*Excerpted from "A Guide to Clinical management and Public Health Response for Hand Foot Mouth Disease (HFMD) [in press]."  
WHO Western Pacific Region and Regional Emerging Disease Intervention Center, 2010.

(日本語訳は裏面参照)

HFMD	Febrile illness with papulovesicular rash on palms and soles, with or without vesicles/ulcers in the mouth. Rash may occasionally be maculopapular without vesicular lesion, and may also involve the buttocks, knees or elbows, particularly in younger children and infants.
Herpangina	Febrile illness with multiple oral ulcers on the posterior parts of the oral cavity
Aseptic meningitis	Febrile illness with headache, vomiting and meningism associated with presence of more than 5 – 10 white cells per cubic millimeter in cerebrospinal (CSF) fluid, and negative results on CSF bacterial culture
Brainstem encephalitis	Myoclonus, ataxia, nystagmus, oculomotor palsies, and bulbar palsy in various combinations, with or without MRI. In resource-limited setting, the diagnosis of brainstem encephalitis can be made in children with frequent myoclonic jerks and CSF pleocytosis
Encephalitis	Impaired consciousness including lethargy, drowsiness or coma or seizures or myoclonus.
Encephalomyelitis	Acute onset of hyporeflexic flaccid muscle weakness with myoclonus, ataxia, nystagmus, oculomotor palsies, and bulbar palsy in various combinations
Acute flaccid paralysis	Acute onset of flaccid muscle weakness and lack of reflexes
Autonomic nervous system (ANS) dysregulation	Presence of cold sweating, mottled skin, tachycardia, tachypnea, and hypertension
Pulmonary oedema/haemorrhage	Respiratory distress with tachycardia, tachypnea, rales, and pink frothy secretion that develops after ANS dysregulation, together with a chest radiograph that shows bilateral pulmonary infiltrates without cardiomegaly.
Cardiorespiratory failure	Cardiopulmonary failure is defined by the presence of tachycardia, respiratory distress, pulmonary oedema, poor peripheral perfusion requiring inotropes, pulmonary congestion on chest radiography and reduced cardiac contractility on echocardiography.

## 手足口病、ヘルパンギーナ、および関連合併症例の疾病定義 (WHO 提唱原文は表面参考)

手足口病	手のひらと足裏の丘疹小水疱性皮疹を伴う熱性疾患で、口腔内の水疱または潰瘍は伴う場合も伴わない場合もある。 発疹は水疱ではなく斑状丘疹を形成することもある 特に若年小児や乳児では臀部やひざ、ひじに見られることもある。
ヘルパンギーナ	口腔後部にみられる複数の潰瘍を伴う熱性疾患
無菌性髄膜炎	頭痛、嘔吐、脳脊髄液中に $5-10/mm^3$ より多い白血球数増多を認める髄膜炎を伴う熱性疾患で、脳脊髄液の細菌培養は陰性
脳幹脳炎	ミオクローヌス、運動失調、眼振、眼球運動障害 (麻痺)、その他延髄麻痺 (球麻痺) MRI による画像診断はあってもなくてもよい *診断の特技や手段が限られている場合は、ミオクローヌスの頻発と髄液細胞増多による診断
脳炎	嗜眠・傾眠・昏睡などの意識障害、または、けいれん、またはミオクローヌス
脳脊髄炎	ミオクローヌス・運動失調・眼振・眼球運動障害 (麻痺)・その他の延髄麻痺 (球麻痺) を伴う、急性に発症する弛緩性の筋力低下で深部腱反射は低下
急性弛緩性麻痺	急性に発症する弛緩性の筋力低下で深部腱反射は低下
自律神経失調	冷汗、斑状皮膚、頻脈、頻呼吸、高血圧
肺水腫・肺出血	頻脈、頻呼吸、ラ音、自律神経失調症状後に排出されるピンクの泡状分泌物 (喀痰) を伴う呼吸窮迫で、胸部レントゲンで心肥大のない両肺浸潤
心肺機能不全	頻脈、呼吸窮迫、肺水腫、昇圧剤を要する末梢循環低下、胸部レントゲンで肺うっ血、心エコーで心収縮能の低下

資料 3

手足口病、ヘルパンギーナ、および関連合併症の入院症例に関する全国調査 二次調査 調査個人票

貴施設名: \_\_\_\_\_

厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業  
エンテロウイルス感染症制御のための診断・予防治療に関する国際連携研究

記入者氏名: \_\_\_\_\_

記入年月日: \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日

調査対象番号 +別紙対応表 参照	性別 1.男 2.女	生年月日		平成 _____ 年 _____ 月 _____ 日		身長・体重	居住地	部・道 府・県		
		月	日	年	月					
入院前に 今回の症状で 前院受診歴 がある場合	今回の症状による初診日		月	日	診断 1.手足口病 2.ヘルパンギーナ 3.その他( )					
	臨床症状 (複数選択可)	1. ≥37.5℃の発熱 _____℃ 2. 水疱 (部位に○:手・足・ひじ・ひざ・口腔・臀部) 3.丘疹 (部位に○:手・足・ひじ・ひざ・口腔・臀部) 4.口腔内の水疱・潰瘍 5.咳 6.下痢 7.食欲不振 8.頭痛 9.嘔吐 10.頸部硬直 11.けいれん 12.ミオクローム 13.運動失調 14.痙攣 15.意識障害 16.筋力低下 (部位に○:上肢・下肢) 17.呼吸障害 18.乏尿 19.その他 (詳細: )								
入院前に 今回の症状で 貴施設 外未受診歴 がある場合	今回の症状による初診日		月	日	診断 1.手足口病 2.ヘルパンギーナ 3.その他( )					
	臨床症状 (複数選択可)	1. ≥37.5℃の発熱 _____℃ 2. 水疱 (部位に○:手・足・ひじ・ひざ・口腔・臀部) 3.丘疹 (部位に○:手・足・ひじ・ひざ・口腔・臀部) 4.口腔内の水疱・潰瘍 5.咳 6.下痢 7.食欲不振 8.頭痛 9.嘔吐 10.頸部硬直 11.けいれん 12.ミオクローム 13.運動失調 14.痙攣 15.意識障害 16.筋力低下 (部位に○:上肢・下肢) 17.呼吸障害 18.乏尿 19.その他 (詳細: )								
貴施設 入院時	入院日	月	日	既往歴 1.なし 2.あり(詳細: )						
	基礎疾患 (複数選択可)	1.なし 2.あり → a.ぜんそく b.その他呼吸器疾患 c.心疾患 d.腎疾患 e.肝疾患 f.内分泌代謝疾患 g.血液疾患 h.てんかん i.その他の神経・筋疾患 j.アレルギー疾患 k.疾病・治療による免疫抑制状態 l.その他 (上記疾患名の詳細: )								
	診断 (症例定義参照) (複数選択可)	1.手足口病 2.ヘルパンギーナ 3.無菌性髄膜炎 4.脳幹脳炎 5.脳炎 6.脳脊髄炎 7.急性弛緩性麻痺 8.自律神経失調 9.肺水腫・肺出血 10.心臓機能不全 11.その他 (詳細に○は詳細を記載: 脱水・ )								
	臨床症状 (複数選択可)	1. ≥37.5℃の発熱 _____℃ 2. 水疱 (部位に○:手・足・ひじ・ひざ・口腔・臀部) 3.丘疹 (部位に○:手・足・ひじ・ひざ・口腔・臀部) 4.口腔内の水疱・潰瘍 5.咳 6.下痢 7.食欲不振 8.頭痛 9.嘔吐 10.頸部硬直 11.けいれん 12.ミオクローム 13.運動失調 14.痙攣 15.意識障害 16.筋力低下 (部位に○:上肢・下肢) 17.呼吸障害 18.乏尿 19.その他 (詳細: )								
	身体所見	脈拍	/分	呼吸数	/分	血圧	mmHg			
	血液検査	白血球	×10 <sup>9</sup> /L	総蛋白	g/dL	ヘモグロビン	g/dL	CRP	mg/dL	
		AST	U/L	ALT	U/L	血糖値	mg/dL	CK	U/L	
	髄液検査	1.なし 2.あり (月 日) →	蛋白	mg/dL	細胞数	/mm <sup>3</sup>	好酸球	%	リンパ球	%
	病原検索	部位・検体と採取日 (複数選択可)	検査結果		検査方法		検査実施施設			
		咽頭	1.陰性 2.陽性	エンテロウイルス[EV71・CA16・その他( )・型不明] 非エンテロ( )・不明	1.PCR 2.分離 3.その他( )	3.不明 2.分離 3.その他( )	1.貴施設 2.検査会社に外注 3.地衛研・感染症研			
鼻汁		1.陰性 2.陽性	エンテロウイルス[EV71・CA16・その他( )・型不明] 非エンテロ( )・不明	1.PCR 2.分離 3.その他( )	3.不明 2.分離 3.その他( )	1.貴施設 2.検査会社に外注 3.地衛研・感染症研				
便・直腸拭い液		1.陰性 2.陽性	エンテロウイルス[EV71・CA16・その他( )・型不明] 非エンテロ( )・不明	1.PCR 2.分離 3.その他( )	3.不明 2.分離 3.その他( )	1.貴施設 2.検査会社に外注 3.地衛研・感染症研				
髄液		1.陰性 2.陽性	エンテロウイルス[EV71・CA16・その他( )・型不明] 非エンテロ( )・不明	1.PCR 2.分離 3.その他( )	3.不明 2.分離 3.その他( )	1.貴施設 2.検査会社に外注 3.地衛研・感染症研				
その他( )	1.陰性 2.陽性	エンテロウイルス[EV71・CA16・その他( )・型不明] 非エンテロ( )・不明	1.PCR 2.分離 3.その他( )	3.不明 2.分離 3.その他( )	1.貴施設 2.検査会社に外注 3.地衛研・感染症研					
血清抗体検査	1.なし 2.あり →	1.単血清 2.ペア血清	測定方法及び結果 ( )		1.貴施設 2.検査会社に外注 3.地衛研・感染症研					
貴施設 入院後 経過	最高血糖値	mg/dL	1.免疫グロブリン製剤投与 2.ステロイド薬投与 3.抗ウイルス剤投与 4.抗けいれん薬投与							
	最高体温	℃	5.強心利尿剤投与 6.酸素投与 7.ICU治療 8.人工呼吸器 9.人工心臓							
	退院日	月	日	10.その他(詳細: )						
転帰	1.治癒・軽快 2.後遺症あり(詳細: ) 3.転院(理由: ) 4.死亡(原因: )									



厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
研究協力者報告書（平成 22 年度）

エンテロウイルス感染症制御のための診断・予防治療に関する国際連携研究  
～エンテロウイルス感染症の制御に関する臨床医学的研究

研究協力者：中野貴司（川崎医科大学 小児科）

共同研究者：加藤 敦、井上美佳、赤池洋人、尾内一信（川崎医科大学 小児科）

分担研究者：西村順裕、藤本嗣人（国立感染症研究所）

研究代表者：清水博之（国立感染症研究所）

**研究要旨**

手足口病様症状に下肢筋力低下を呈した 1 歳 8 か月男児を経験した。幸い、後遺症なく麻痺は回復した。画像検査や髄液所見に異常は認めなかった。糞便検体からアデノウイルスが分離されたが、咽頭ぬぐい液や脳脊髄液はウイルス分離陰性であった。臨床症状からはエンテロウイルスによる中枢神経障害を疑わせる経過であったが、ウイルス学的検討の大切さが再認識された。原因ウイルスと臨床症状、検査所見を詳細に検討した患者情報の集積により、エンテロウイルス感染症制御のための診断や予防治療に役立つ知見が得られると考える。

**A. 研究目的**

1990 年代後半よりアジア諸国を中心に、エンテロウイルス 71 型（EV71）感染症重症例の多発が報告されている。脳脊髄炎による意識障害や運動麻痺などの中枢神経症状、自律神経症状、肺水腫、心機能不全などが主な臨床像である。しかしわが国においては、諸外国と比較検討できる疫学調査は未だまとめられていない。したがって、国内症例に関するエビデンスの集積が必要であり、EV71 感染による臨床病型である手足口病やヘルパンギーナに伴い合併症を呈した症例については、詳細な検討が望まれる。その一助とすることが、本研究の目的である。

**B. 研究方法**

研究協力者らが診療した、手足口病様症状に一過性の下肢運動麻痺を合併した症例について報告する。

（倫理面への配慮）

患者の個人情報特定されることのないように十分注意し、個人の人権やプライバシーが侵害されることのないよう配慮した。

**C. 研究結果**

症例の概要

（年齢・性別）1 歳 8 か月 男児

（主訴）歩行困難

（既往歴・成長発達歴）特記事項なし

（予防接種歴）OPV は 2 回内服済み（4 か

月時と 10 か月時)

(現病歴) 2010 年 8 月 2 日に、歩行が出来ないことに気付かれた。座位やハイハイは可能であった。翌 8 月 3 日になり、両手掌・足底・臀部に発疹が出現し、口腔内にも丘疹とアフタを認めた。経過中、発熱は認めなかった。8 月 4 日、精査目的で入院となった。

(症状経過と検査所見) 入院時、徒手筋力テストで腸腰筋・大腿四頭筋・ハムストリングス・腓腹筋に筋力低下を認めたが、数日で正常筋力に回復し、その後歩行も通常に可能となった。血算や生化学検査に異常なく、脳脊髄液検査では細胞数  $1/\mu\text{L}$  (単核球) で蛋白  $11\text{mg/dl}$  であった。脳脊髄の MRI 検査では、造影検査を含めて異常信号は認めなかった。

(ウイルス学的検査) 咽頭ぬぐい液、脳脊髄液、血清検体ではウイルス分離陰性であった。糞便検体では、RD 細胞, HEp-2 細胞で CPE を確認した。CPE 陽性サンプルからウイルス RNA を回収し、EV71 VP1 RT-PCR および enterovirus VP1 CODEHOP-PCR を行った結果、ウイルス遺伝子は検出されなかった。CPE 陽性 HEp-2 細胞培養上清では、石古法 (Miura-Ochiai R, Ishiko H, et al: Quantitative detection and rapid identification of human adenoviruses. J Clin Microbiol 45, 958-967, 2007) でアデノウイルスが陽性であった。CPE 陽性 RD 細胞培養上清では、アデノウイルスは陰性であった。

#### D. 考察

今回経験した 1 歳 8 か月男児は、両手掌・足底・臀部の発疹、口腔内の丘疹とアフタを認め、手足口病様症状を呈した。歩行困難の症状は、発疹に一日先んじて気付かれていたが、手足口病様症状に一過性の運動

麻痺を合併した例である。しかしウイルス学的検査では、EV71 を含めエンテロウイルス属は分離されず、糞便検体でアデノウイルスが陽性であった。筋力低下は後遺症なく回復した。本症例の経験より、問題となる症例に対してはウイルス学的検討を実施することが不可欠であることが示された。

研究協力者らは、平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金 (新興・再興感染症研究事業) 「ウイルス感染症の効果的制御のための病原体サーベイランスシステムの検討」において、エンテロウイルスが原因と考えられる中枢神経合併症を呈した患者の病像を報告した。その内容を抜粋すると、以下のようなになる (症例番号は、平成 19 年度研究報告書記載のものを用いた)。

【症例 4】2 歳 6 か月男児。脊髄炎の患者で、ポリオ様麻痺を呈した。発症は冬季 2 月で、発熱に引き続いて両下肢の筋力低下を来したが、後遺症無く回復した。髄液細胞数  $26/\mu\text{L}$ 、蛋白  $63\text{mg/dl}$  で、急性期の脊髄 MRI 検査、神経生理検査で異常所見があった。糞便からエンテロウイルス 71 型が分離された。咽頭ぬぐい液と髄液検体では分離 & PCR ともエンテロウイルス陰性であった。エンテロウイルス 71 型に対する血清中和抗体価は、麻痺急性期と 2 週間後ともに 256 倍であった。

【症例 7】5 歳 4 か月男児。急性小脳失調の患者で、ヘルパンギーナ罹患時に一過性の神経症状を呈した。髄液細胞数  $4/\mu\text{L}$ 、蛋白  $45\text{mg/dl}$  であった。糞便と咽頭ぬぐい液の PCR 検査でコクサッキー A6 型陽性で、髄液検体は陰性であった。

【症例 9】6 歳 3 か月男児。手足口病罹患時にけいれんと意識変容を来し、髄膜脳炎と診断した。髄液細胞数  $68/\mu\text{L}$ 、蛋白  $42\text{mg/dl}$  であった。糞便と咽頭ぬぐい液の PCR 検査でエンテロウイルス 71 型陽性であったが、髄液は陰性であった。後遺症無

く回復した。

これらと今回報告した症例の差異は、ウイルス分離の結果以外に、エンテロウイルス感染により中枢神経症状を呈した症例では、髄液細胞数や髄液蛋白の増多、画像検査での異常所見が認められたことであった。また、平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）「ウイルス感染症の効果的制御のための病原体サーベイランスシステムの検討」における研究協力者らの研究では、エンテロウイルス感染症では髄液細胞増多を認めない例でも中枢神経へのウイルスの侵入が考えられた。これらの事実は、エンテロウイルスは、より強度に中枢神経に侵入し組織障害性を有することを示唆する所見かも知れないが、今後さらに多くの症例を対象として調査を行うことが必要である。

含む)

なし

## E. 結論

臨床症状からエンテロウイルスによる重症化や合併症を疑う症例においては、当然であるがウイルス学的検討を確実に実施することが大切である。原因ウイルスと臨床症状、検査所見を詳細に検討した患者情報の集積により、エンテロウイルス感染症制御のための診断や予防治療に役立つ知見が得られると考える。

## F. 研究発表

(論文発表)

1. 浅田和豊、中野貴司、松野紋子、田中孝明、伊東宏明、一見良司、菅秀、藤澤隆夫、庵原俊昭. エコーウイルス 30 型髄膜炎における髄液および血清中サイトカイン/ケモカイン解析. 日本小児科学会雑誌 114 巻 3 号, P479-484, 2010 年 3 月.

## G. 知的所有権の出願・登録状況（予定を

厚生労働科学研究費補助金  
平成 22 年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業  
研究報告書

エンテロウイルス感染症制御のための診断・予防治療に関する国際連携研究  
(主任研究者：清水博之)

無菌性髄膜炎を疑う熱性痙攣小児患者からのエンテロウイルスの検出

分担研究者： 清水博之 国立感染症研究所 ウイルス第二部  
研究協力者： 町田早苗 埼玉医科大学 医学研究センター  
西村順裕 国立感染症研究所 ウイルス第二部

**研究要旨**

無菌性髄膜炎患者からはエンテロウイルスが検出される例が多い。エンテロウイルスは、年によって流行する血清型が入れ替わり、地域によっても流行型に差が見られる。無菌性髄膜炎患者の髄液中から B 群エンテロウイルスが高頻度に検出され、その起因ウイルスと考えられているが、他群のエンテロウイルスが検出されることもある。

今回、2008年4月～2010年10月迄の無菌性髄膜炎を疑う熱性痙攣小児患者を対象として患者の髄液、咽頭ぬぐい液、便からエンテロウイルスCODEHOP PCR法を用いてウイルス検出を試みた。エンテロウイルスCODEHOP PCR法で164検体から33検体陽性(20.1%)となり、陽性となった髄液検体からコクサッキーA9検出された。他の陽性検体では咽頭ぬぐい液と便から主にA群エンテロウイルスが検出された。

**A. 研究目的**

無菌性髄膜炎患者からはエンテロウイルスが検出される例が多い。エンテロウイルスは、年によって流行する血清型が入れ替わり、地域によっても流行型に差が見られる。

無菌性髄膜炎患者の髄液中から B 群エンテロウイルスが高頻度に検出され、その起因ウイルスと考えられているが、他群のエンテロウイルスが検出されることもある。

エンテロウイルス髄膜炎は基本的に予後良好であるが、手足口病流行時にエンテロウイルス 71 型が原因となる中枢神経合併症による死亡例も多く報告されている。

今回、我々は無菌性髄膜炎を疑う小児患者の髄液、咽頭ぬぐい液を用いて、エンテロウイルス CODEHOP PCR 法によるウイルス遺伝子検出と遺伝子陽性サンプルの細胞培養によるウイルス分離について報告する。

**B. 研究方法**

**1. 対象と検体**

2008年4月から2010年10月までの期間に埼玉医科大学 小児科を受診した小児患者 77 名を対象とした。対象の条件として細菌性髄膜炎を否定、インフルエンザウイルス簡易キット陰性、後部硬直など無菌性髄膜炎の疑いがある熱性痙攣患者とした。対象患者の年齢は生後 24 日から 14 歳であった。患者から提出された検体は、髄液 28 検体、咽頭ぬぐい液 71 検体、便 65 検体、計 164 検体であった。年別のサンプルは 2008 年 97 検体 (髄液 11 検体、咽頭ぬぐい液 46 検体、便 40 検体)、2009 年 46 検体 (髄液 12 検体、咽頭ぬぐい液 17 検体、便 17 検体)、2010 年 21 検体 (髄液 5 検体、咽頭ぬぐい液 8 検体、便 8 検体) であった。

**2. RNA の抽出および cDNA の合成**

検体から High Pure Viral RNA Kit (Roche) を用いて RNA を抽出した。

**3. cDNA の合成と CODEHOP PCR 法**