

- International Congress of Virology.  
2011.9.15 Sapporo
3. Okitsu S, Khamrin P, Thongprachum A, Hayakawa S, Maneekarn N, Ushijima H. Molecular characterization of VP1 region of porcine kobuviuse. International Union of Microbiology Society International Congress of Virology. 2011.9.15 Sapporo
4. 牛島廣治: ウイルス性下痢症の最近の動向 第49回埼玉県小児感染免疫懇話会  
平成23年7月30日 大宮ソニックシティ906 (代表 高見澤勝)
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

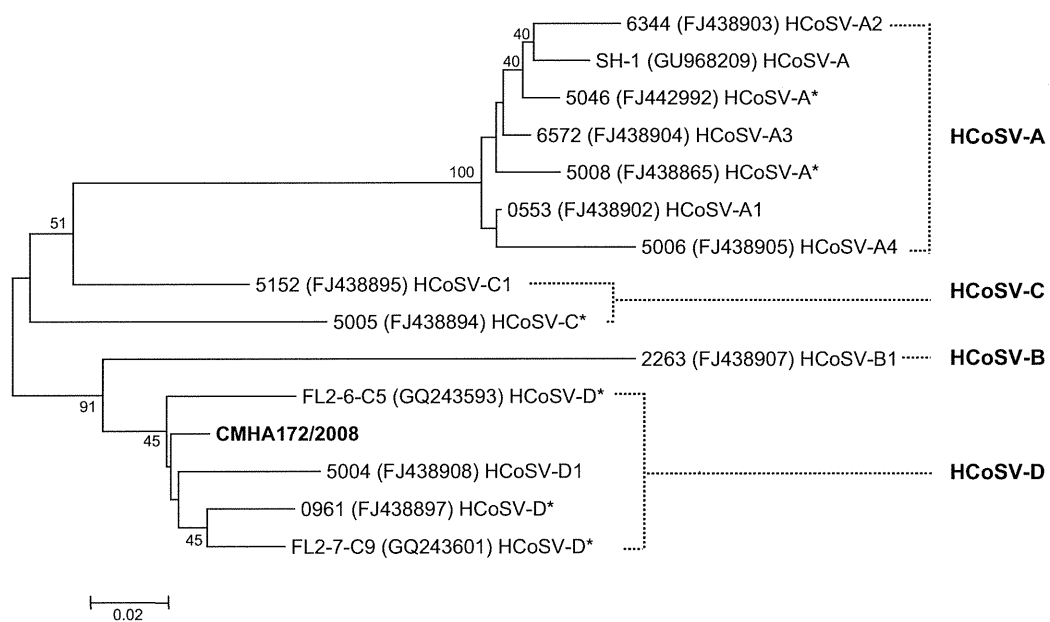
表 1

Partial 5' UTR nucleotide sequence identities between the sequence of HCoV found in this study and HCoV reference strains

HCoV strains	Nucleotide sequence identity (%)				
	CMHA172/08	0553 HCoV-SV-A1	2263 HCoV-SV-B1	5152 HCoV-SV-C1	5004 HCoV-SV-D1
CMHA172/08	100.0				
0553 HCoV-SV-A1	83.1	100.0			
2263 HCoV-SV-B1	82.3	76.4	100.0		
5152 HCoV-SV-C1	87.7	84.0	80.0	100.0	
5004 HCoV-SV-D1	<b>95.4</b>	81.3	83.7	85.0	100.0

図 1

HCovS の 5' UTR 領域の系統樹



厚生労働科学研究費補助金 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  
分担研究報告書

研究分担課題名： タイ国の健康なブタ血清中のブタコブウイルス

研究分担者： 牛島廣治 日本大学医学部病態病理学系微生物学分野・客員教授

研究協力者： 沖津祥子 東京大学大学院医学系研究科・客員研究員

Khamrin Pattara チェンマイ大学医学部微生物学・講師

清水博之 国立感染症研究所ウイルス II 部室長

#### A. 研究目的

ピコルナウイルス科のコブウイルス属には現在のところ2つの種、ヒトに感染するアイチウイルスとウシに感染する bovine kobuvirus が存在する。ブタコブウイルスは candidate speices であり、この属にはその他に canine kobuvirus、murine kobuvirus が最近報告されている。糞便中のブタコブウイルスの検出は 2009 年にハンガリー、中国で始まり、その後アジア、ヨーロッパ、南米で検出され、世界中に分布していると考えられる。健康なブタの便からも検出されるが、下痢症のブタでは検出率が高く、下痢と関わりがあると考えられている。タイでは下痢症の仔ブタの便から 99% の高率で検出されているが、今回は健康なブタの血清中から検出し、その遺伝子配列を比較した。

#### B. 研究方法

タイ国チェンマイ地方の 14 の農場で 2003-2008 年に採取した各月齢の健康なブタ 376 例から得た血清を対象とした。RNA を抽出し、RT 後、コブウイルスの 3D 領域に設定したコンプライマーで増幅し、陰性検体には hemi-nested PCR を行った。陽性

検体の一部についてその遺伝子配列を比較した。

#### C. 結果

各月齢の検体の陽性率を示す (表 1)。1 カ月齢ではすべて陰性であったが、2 カ月から陽性率は上昇し、4 カ月でピークとなった。一旦 5 カ月で陽性率は下がったあと、6 カ月で最高となり、7-8 カ月齢の成熟ブタでも 24% がウイルスを保有していた。

陽性 72 検体中、26 検体について配列決定を行った。今回の研究で検出された株をブロック体で示す。図 1 のようにすべてブタコブウイルスのプロトタイプである S-1 と同じ枝に位置していた。また特に図中 A と B で示したようにタイで検出された株は非常に類似した配列に集積していることがわかった。特に A に含まれる 12 株はその検体採取が 2003-2008 年と 6 年間に亘っているにも関わらず、その類似性は 98.3-100% であった。

#### D. 考察

健康なブタの血清中にブタコブウイルスの核酸が検出された。これは今までにもハンガリーやブラジルからも検出されているが、これらの報告では検体数が少ない。今

回 376 検体を測定したところ、同様な結果が得られた。また、月齢に伴い、検出率が変化したが、6 カ月以降ではすべての月齢で検出された。また、2003-2008 年にわたって類似の株が蔓延していることがわかった。この結果はブラジルでの研究で、ブタコブウイルスは持続感染せず、再感染を繰り返すという報告と一致すると考えられる。

#### E. 結論

タイの健康なブタから 2003-2008 年に採取した血清からブタコブウイルスの RNA を検出した。検出率は 19% で、4 カ月齢と 6 カ月齢で検出率が高かった。この結果はこのウイルスが持続感染ではなく、再感染を繰り返すという報告と一致する。また、ウイルスの 3D 領域の解析結果は、2003-2008 年にわたり、類似の株が流行していたことを示している。

謝辞：この研究はチェンマイ大学の S. Kongkaew, A. Kongkaew, N. Maneekarn 先生との共同研究である。

#### F. 健康危機情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Khamrin P, Chaimongkol N, Malasao R, Suantai B, Saikhruang W, Kongsricharoern T, Ukorapol N, Okitsu S, Shimizu H, Hayakawa S, Ushijima H, Maneekarn N. Detection and molecular characterization of cosavirus in adults with diarrhea, Thailand. *Virus Gene* 2001, 1, Dec 16 (E pub)
- 2) Okitsu S, Khamrin P, Thongprachum A, Hidaka S, Kongkaew S, Kongkaew A, Maneekarn N, Mizuguchi M, Hayakawa S, Ushijima H. Sequence analysis of porcine

kobuvirus VP1 region detected in pigs in

Japan and Thailand. *Virus Gene* 2011 Epub

3) Khamrin P, Okitsu S, Ushijima H. A single-tube multiplex PCR for rapid detection of 10 diarrheal viruses in stool samples collected from children with diarrhea. *J Virol Methods*; 173:380-393, 2011.

4) Khamrin P, Okitsu S, Ushijima H. Saffold cardioviruses in children with diarrhea, Thailand. *Emerg Infect Dis* 17:1150-1152, 2011.

#### 2. 学会発表

1. Ushijima H, Khamrin P, Pham TK, Thongprachum A, Okitsu S, Hayakawa S, Maneekarn N. RT-multiplex PCR for detection of diarrheal viruses. International Union of Microbiology Society International Congress of Virology. 2011.9. 15 Sapporo

2. Khamrin P, Chaimongkol N, Nantachit N, Okitsu S, Ushijima H, Maneekarn N. Saffold cardioviruses in pediatric patients with diarrhea, Thailand. International Union of Microbiology Society International Congress of Virology. 2011.9. 15 Sapporo

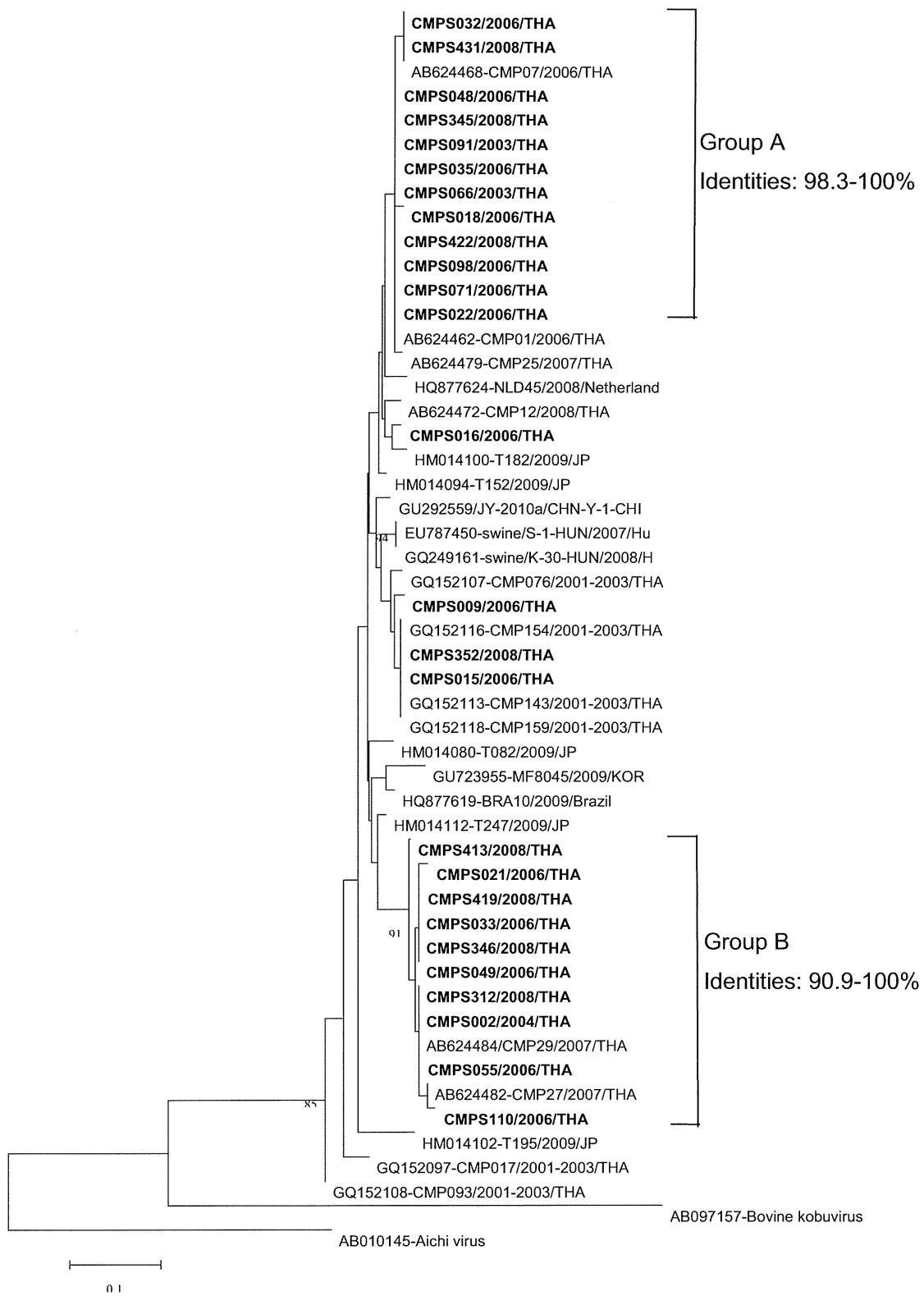
3. Okitsu S, Khamrin P, Thongprachum A, Hayakawa S, Maneekarn N, Ushijima H. Molecular characterization of VP1 region of porcine kobuviuse. International Union of Microbiology Society International Congress of Virology. 2011.9. 15 Sapporo

4. 牛島廣治：ウイルス性下痢症の最近の動向 第 49 回埼玉県小児感染免疫懇話会。平成 23 年 7 月 30 日 大宮ソニックシティ 906 (代表 高見澤勝)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

**表 1** Incidence of porcine kobuvirus RNA in serum samples  
from healthy pigs in Thailand, 2003-2008

<b>Age</b>	<b>Number of tested samples</b>	<b>Positive number</b>	<b>Prevalence</b>
<b>1M</b>	<b>32</b>	<b>0</b>	<b>0%</b>
<b>2M</b>	<b>100</b>	<b>11</b>	<b>11%</b>
<b>3M</b>	<b>45</b>	<b>6</b>	<b>13%</b>
<b>4M</b>	<b>30</b>	<b>13</b>	<b>43%</b>
<b>5M</b>	<b>18</b>	<b>2</b>	<b>11%</b>
<b>6M</b>	<b>15</b>	<b>7</b>	<b>47%</b>
<b>7-8M</b>	<b>136</b>	<b>33</b>	<b>24%</b>
<b>total</b>	<b>376</b>	<b>72</b>	<b>19%</b>



☒ 1. Phylogenetic trees of partial nucleotide sequences of porcine kobuvirus 3D region

「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」  
分担研究報告書

エンテロウイルス 71 型およびコクサッキーウイルス A6 型に対する  
新規抗エンテロウイルス剤 MRL-1237 の抗ウイルス作用

吾郷昌信 長崎県環境保健研究センター 保健科長  
小池 智 東京都医学総合研究所 神経ウイルスプロジェクトリーダー

手足口病 (HFMD) の主要な原因ウイルスの 1 つであり、重症化しやすいエンテロウイルス 71 型 (EV71) および 2011 年に HFMD の全国的な流行を惹き起した CVA6 に対する新規抗エンテロウイルス剤 MRL-1237 の *in vitro* における抗ウイルス効果について CPE inhibition assay により検討した。供試した 31 株の EV71 および CVA6 すべての増殖を阻害し、MRL-1237 の供試ウイルスに対する IC<sub>50</sub> 値は 0.086 – 0.75 µg/ml であった。また、RD-A 細胞に対する CC<sub>50</sub> 値は 305 µg/ml であったことから EV71 SK-EV006 株を除く他の 30 株に対して 1,000 倍以上の高選択性を示した。したがって、MRL-1237 は、EV71 および CVA6 による感染症の治療薬としての可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

ピコルナウイルス科に属するエンテロウイルス属のうち、ヒトに対して病原性を有するものは、ヒトエンテロウイルス (HEV) A~D およびヒトライノウイルス (HRV) A~C の 7 種に分類され、200 以上にも上る多数の血清型が存在する。HEV 感染により上気道炎、ヘルパンギーナ、手足口病、下痢、急性出血性結膜炎など比較的軽微なものから重篤な新生児心筋炎、若年型糖尿病、無菌性髄膜炎、脳炎、麻痺、急性灰白髄炎等多彩な病状を呈する。

これらのうち、手足口病 (HFMD) の原因ウイルスの一つであるエンテロウイルス 71 (EV71) は中枢神経親和性を示

し、脳炎や急性弛緩性麻痺を引き起こすこともある。2008~2010 年には中国、2011 年にはベトナムにおいて本ウイルスによる HFMD が大流行し、重症例および死亡例が多数報告された。我が国でも EV71 による手足口病流行時には重症感染例が多発している。

一方、コクサッキーウイルス A6 型 (CVA6) は、ヘルパンギーナの原因ウイルスとして知られていたが、2011 年には HFMD の原因ウイルスとして全国に大流行を惹き起した。本流行では通常の HFMD の臨床症状より高熱を発し、水痘様の発疹が出現し、発疹が体幹部にまで及ぶなど、特徴的な症状を呈したが、EV71 による流行時とは異なり昏神経症

状を伴う重傷例はほとんど報告されなかった。

MRL-1237 は、丸石製薬(株)において多数合成したベンズイミダゾール誘導体の中から見出された極めて選択性の高い抗 EV 活性と *in vivo* で予防効果のみならず治療効果も発揮する新規抗 EV 剤である。本薬剤は EV の非構造タンパク質で helicase motif を有する 2C に特異的に作用してその ATPase 活性を強力に阻害し、結果的にウイルス RNA 複製阻害に導く。すなわち、MRL-1237 は 2C<sup>ATPase</sup> の特異的阻害剤である。本薬剤は、2C の ATP 結合ポケットに可逆的に結合して 2C<sup>ATPase</sup> 活性を阻害するものと考えられるが、2C との結合には ATP 結合ポケットの C 末端側、すなわち helicase domain の motif-C 近傍の 220 - 230 番目までのアミノ酸が深く関与しており、中でも 227 番目と 229 番目のアミノ酸が薬剤感受性の主要決定基である。したがって、MRL-1237 の抗ピコルナウイルススペクトルは 227 番目、229 番目およびその近接するアミノ酸によって決定されるものと推定されている。

今回、*in vitro* における EV71 の種々の臨床分離株および 2012 年に HFMD の流行時に分離された CVA6 に対する MRL-1237 の抗ウイルス作用について検討した。

## B. 研究方法

### 供試化合物

丸石製薬株式会社中央研究所において合成された MRL-1237 を使用した。MRL-1237 は 1 mg/ml になるように Eagle MEM に溶解させ、ストック液として使用するまで 4°C で保存した。

### 細胞とウイルス

宿主細胞には RD-A 細胞を使用した。

EV71 は標準株 (BrCr) ならびに HFMD、無菌性髄膜炎、脳炎等を発症した患者から分離された臨床分離株および 2011 年の HFMD 流行時にヘルパンギーナ、HFMD 患者から分離された CVA6 臨床分離株を使用した。これらのウイルスはそれぞれ RD-A 細胞で増殖させ、CPE が細胞全体に広がった時点で harvest して凍結融解を 3 回行った後の遠心上清をウイルスストック液として、使用するまで -80°C で保存した。これらのストックウイルスは、TCID<sub>50</sub> 法により感染価を測定し、薬剤の抗ウイルス活性測定に用いた。

### 抗ウイルス活性の測定

抗ウイルス活性は CPE inhibition assay により測定した。96 ウェルマイクロプレートに細胞の単層を形成させた後、増殖用メディウム (10%FCS 加 Eagle MEM) を除去し、段階希釈した MRL-1237 を含む維持メディウム (非働化 2%FCS 加 Eagle MEM)、あるいは含まない維持メディウムを 50  $\mu$ l/well 添加後、維持メディウムで希釈して  $2 \times 10^4$  PFU/ml に調整したウイルス液を 50  $\mu$ l/well ( $10^3$  PFU/well) 接種して攪拌後 37°C で培養した。MRL-2471 を含まないメディウムを加えたウェルの細胞が 90%以上 CPE を示した時点 (感染後 3 - 5 日) で、薬剤によるウイルス増殖 (細胞死) の阻害を MTT 法により測定し、ウイルス非感染細胞の吸光度 ( $A_{600}$ ) を阻害 100%、薬剤非存在下のウイルス感染細胞の吸光度を阻害 0% として、50% 増殖阻害濃度 (IC<sub>50</sub> 値) を求めた。同時に MRL-1237 の宿主細胞に対する毒性 (CC<sub>50</sub> 値) を同様の方法で算出した。

### 遺伝子解析

Isogen-LS (ニッポンジーン) を用いて



<b>Strain</b>	<b>Origin</b>	<b>IC50 (µg/ml)</b>
<b>NS10-001</b>	<b>Aseptic meningitis</b>	<b>0.15</b>
<b>MZ06330</b>	<b>HFMD</b>	<b>0.26</b>
<b>MZ06354</b>	<b>HFMD</b>	<b>0.26</b>
<b>MZ06357</b>	<b>HFMD</b>	<b>0.24</b>
<b>MZ06360</b>	<b>HFMD</b>	<b>0.28</b>
<b>MZ06373</b>	<b>HFMD</b>	<b>0.28</b>
<b>MZ07048</b>	<b>HFMD</b>	<b>0.26</b>
<b>MZ07060</b>	<b>HFMD</b>	<b>0.28</b>
<b>MZ07072</b>	<b>Herpangina</b>	<b>0.21</b>
<b>MZ07091</b>	<b>Aseptic meningitis</b>	<b>0.28</b>
<b>MZ07141</b>	<b>HFMD</b>	<b>0.17</b>
<b>MZ10065</b>	<b>HFMD</b>	<b>0.12</b>
<b>258 Bulgaria</b>	<b>fatal encephalitis</b>	<b>0.25</b>
<b>SK-EV006</b>	<b>fatal encephalitis</b>	<b>0.75</b>
<b>C7/Osaka</b>	<b>fatal encephalitis</b>	<b>0.25</b>
<b>Hungary</b>	<b>fatal encephalitis</b>	<b>0.18</b>
<b>1095/Shiga</b>	<b>HFMD</b>	<b>0.23</b>
<b>SI/Isehara</b>	<b>HFMD</b>	<b>0.15</b>
<b>Nagoya</b>	<b>HFMD</b>	<b>0.15</b>
<b>BrCr (M)</b>	<b>Aseptic meningitis</b>	<b>0.11</b>
<b>BrCr/tr</b>	<b>Aseptic meningitis</b>	<b>0.10</b>
<b>BrCr/ts</b>	<b>Aseptic meningitis</b>	<b>0.086</b>

Table 1. Antiviral Effect of MRL-1237 on the replication of EV71

ウイルスストック液 0.25 ml から genomic RNA を抽出し、2C 領域を含む約 1,000 塩基を RT-PCR で増幅した。PCR 産物を ABI 310 genetic analyser で解析し、2C 領域の全塩基配列を決定した。

EV71 感染性 cDNA クローンおよび部位突然変異

EV71 SK-EV006 の感染性 cDNA クローンを使用した。この感染性 cDNA クローンの 4,748 番目の T から G への変異を PCR 法により導入し、得られた変異体 cDNA から in vitro transcription により RNA を合成し、RD-A 細胞にトランスフェクションしてウイルスを回収した。

Strain	Origin	IC50 ( $\mu\text{g/ml}$ )
NS11-001	HFMD	0.12
NS11-002	Herpangina	0.24
NS11-003	Herpangina	0.24
NS11-004	Herpangina	0.22
NS11-005	Herpangina	0.22
NS11-006	HFMD	0.25
NS11-007	HFMD	0.25
NS11-008	HFMD	0.24
NS11-009	HFMD	0.25

Table 2. Antiviral Effect of MRL-1237 on the replication of CVA6 clinical isolates

### C. 研究結果および考察

22株のEV71に対するMRL-1237の抗ウイルス活性について、RD-A細胞を使用してCPE inhibition assayにより検討した (Table 1)。その結果、標準株並びに国内外で分離された株、何れに対しても明らかな抗ウイルス作用が認められ、 $IC_{50}$ 値は0.086–0.28  $\mu\text{g/ml}$ であった。供試した22株のEV71のうち、SK-EV006株を除く21株については $IC_{50}$ 値が0.086–0.28  $\mu\text{g/ml}$ で感受性に大差は認められなかった。しかしながら、SK-EV006株に対する $IC_{50}$ 値は0.75  $\mu\text{g/ml}$ で、この株は他の21株と比較して明らかにMRL-1237に低感受性を示した。

2011年のHFMD流行時に患者材料より分離したCVA6臨床分離株9株に対するMRL-1237の $IC_{50}$ 値は0.12–0.25  $\mu\text{g/ml}$ でCVA6は何れの株もほぼ同程度の感受性を示した (Table 2)。また、MRL-1237

に対する感受性をEV71と比較してもSK-EV006株を除く21株とほぼ同等であった。

MRL-1237の作用部位についてコクサッキーウイルスB4型(CVB4)を用いて詳細に検討したこれまでの結果から、本薬剤に対するウイルスの感受性は標的タンパク質であるhelicase様タンパク質2Cのmotif CのC末端側近傍に存在する220-230番目までに存在するアミノ酸によって決定され、特に227番目および229番目に位置するアミノ酸が最も重要な薬剤感受性決定基であることが明らかになっている。したがって、SK-EV006株と他の株の薬剤感受性差がこの領域のアミノ酸配列に反映している可能性を確認するために、EV71およびCVA6の2C領域の全塩基配列を決定し、アミノ酸配列の比較を行った。その結果、ウイルス間のheterogeneityが最も多く認められたのは、

N 末端側 70 残基と C 末端側 20 残基の領域であったが、薬剤感受性に関与すると

考えられる helicase domain 内に存在し、SK-EV006 株のみに見出されるアミノ酸

Virus	Amino acid #								
	222	223	224	225	226	227	228	229	230
<b>EV71</b>									
258Bulgaria	T	N	A	S	N	I	I	V	P
SK-EV006	T	N	S	S	N	I	I	V	P
C7/Osaka	T	N	A	S	N	I	I	V	P
Hungary	T	N	A	S	N	I	I	V	P
1095/Shiga	T	N	A	S	N	I	I	V	P
SI/Isehara	T	N	A	S	N	I	I	V	P
Nagoya	T	N	A	S	N	I	I	V	P
BrCr (M)	T	N	A	S	N	I	I	V	P
BrCr/tr	T	N	A	S	N	I	I	V	P
BrCr/ts	T	N	A	S	N	I	I	V	P
NS10-001	T	N	A	S	N	I	I	V	P
<b>CVA6</b>									
NS11-008	T	N	A	S	N	I	I	V	P

Table 3. Amino acid sequence alignment of 2C of EV71 and CVA6

Strain	Origin	IC50 ( $\mu\text{g/ml}$ )
SK-EV006	fatal encephalitis	0.73
T4748G	SK-EV006	0.18
Hungary	fatal encephalitis	0.13
Nagoya	HFMD	0.13

Table 4. Effect of 224 amino acid substitution of EV71 (SK-EV006) on sensitivity against MRL-1237

置換は唯一 motif C 直後の 224 番目のアミノ酸であった (Table 3.)。224 番目のアミノ酸は、他の株では全て Ala であったのに対して、SK-EV006 株では Ser であった。また、EV71 と同等の感受性を示し分離株間でも薬剤感受性差がほとんど変わらなかった CVA6 も SK-EV006 株以外の EV71 と同一のアミノ酸配列であった。以上の結果より、224 番目のアミノ酸の違いが MRL-1237 に対する感受性差を反映していることが強く示唆された。

そこで、SK-EV006 株感染性 cDNA クローンに部位突然変異 (T4,748G; 2C/Ser224 Ala) を導入した変異ウイルスを作製し、薬剤感受性の変化を検証したところ、Hungary 株および Nagoya 株と同程度の IC<sub>50</sub> 値 (0.18 µg/ml) であった (Table 4)。したがって、SK-EV006 株の MRL-1237 に対する低感受性は Ala224Ser に起因することが明らかとなった。

また、今回使用した RD 細胞の内、RD18S 細胞で増殖が認められたのは BrCr(M)株のみであった。この RD-18S 細胞を用いて BrCr(M)株に対する MRL-1237 の IC<sub>50</sub> 値を測定したところ、BrCr(M)株は RD-A 細胞を用いた時より約 4 倍高感受性を示し、MRL-1237 の BrCr(M)株に対する IC<sub>50</sub> 値は 0.24 µg/ml であった (Table 2)。以上の結果より、今回供試した 10 株の EV71 の本薬剤に対する感受性は、これまでに RD-18S 細胞を宿主細胞として用いて測定したコクサッキーウイルス A 群(CA) の IC<sub>50</sub> 値と相対的に比較して (0.16 – 0.94 µg/ml) と同程度と推定される。

今回、MRL-1237 の EV71 に対する効果の検討において 3 種類の細胞株を使用

し、それぞれの細胞で測定した IC<sub>50</sub> 値には同じウイルスでも著しい差が認められた。RD-18S 細胞と RD-A 細胞は同じ RD 細胞に由来するものの、EV71 株間の増殖許容性の違いだけでなく本薬剤の膜透過性にも差があり、細胞内薬剤濃度の差が IC<sub>50</sub> 値に違いになって表れたものと思われる。抗ヘルペス作用を有するヌクレオチドアナログでは今回の場合のようにヒト由来の細胞を宿主細胞として使用した場合には強力な抗ウイルス作用が認められてもサル由来の細胞では全く効果が認められないことが以前から報告されている。エンテロウイルスのように多数の血清型が存在し、細胞への感染の足掛かりとして使用するレセプターが多様なウイルスの *in vitro* における抗ウイルス活性を 1 種類の細胞を使って相対的に評価することは極めて困難であり、また、そのような細胞があったとしても前述した細胞内薬剤濃度の問題を考えなければならない。

今回、HFMD の原因となる EV71 および CVA6 に対する MRL-1237 の抗ウイルス効果について、RD-A 細胞を用いて検討したところ、有効性が確認されるとともに RD-18S 細胞に対する CC<sub>50</sub> 値は 305 µg/ml と極めて低毒性で 1,000 倍以上の選択性を示したことから、本薬剤はこれらのウイルスによる感染症の治療薬として十分期待できる可能性が示唆された。

#### D 結論

新規抗エンテロウイルス剤 MRL-1237 は EV71 および CVA6 による感染症の治療に有効性を発揮す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

なし

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 武知茉莉亜、乾未来、福島若葉  
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

研究代表者 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（HFMD）、ヘルパンギーナ（HA）、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（2010年分）を実施した。

一次調査の結果、2010年のHFMD流行期である、4月1日～9月30日の入院患者数は、4,273人（95%信頼区間：1,804～6,741）と推計された。

二次調査では、290例について臨床疫学特性に関する情報を収集し、以下の3群に分けて集計を行った；①NC（No Complications）群（144例）：HFMDあるいはHAのみで関連合併症なし、②AM（Aseptic Meningitis）群（130例）：HFMD/HAの有無に拘わらず無菌性髄膜炎あり、③Other群（16例）：HFMD/HAの有無に拘わらず無菌性髄膜炎以外の合併症あり。男児の割合は、NC群：49%、AM群：68%、Other群：63%であった。各群における5歳以下の割合は、NC群：83%、AM群：52%、Other群：94%であった。基礎疾患の保有割合は、NC群20%、AM群15%、Other群6%であり、Other群で顕著に低かった。病原検索の実施割合は、Other群で75%と高い一方、NC群においては7%と低かった。

今回、二次調査への協力依頼にあたって、「エンテロウイルス以外の病原体が、病因として明らかであった（あるいは強く疑われた）症例」「病原体は明らかではないが、エンテロウイルス感染以外の病因であると担当医が判断した症例」についての報告を不要としたところ、一次調査で報告された症例のうち、二次調査で報告された症例は32%減少した。このことから、一次調査から推計された入院患者数は過大評価されていると考えられる。今後、これら適格でないと考えられる症例の割合を考慮した補正を行う。

A. 研究目的

1990年代後半より、西太平洋地域で、手足口

病（HFMD：Hand, Foot and Mouth Disease）、ヘルパンギーナ（HA：Herpangina）、およびエン

テロウイルス 71 型 (EV71) 感染による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>1-16)</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、HFMD や HA 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、散發的な発生例<sup>17-20)</sup>や、1998 年に厚生省 (当時) が実施したサーベイランスに基づく症例<sup>21)</sup>についての報告がある。また、2000~2002 年の期間について、HFMD・HA 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>22-23)</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)西太平洋地域事務局刊行の「A Guide to Clinical Management and Public Health Response for Hand Foot Mouth Disease (HFMD)」<sup>24)</sup>により、HFMD、HA、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」が作成した「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」<sup>25)</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。

一次調査の調査対象は、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>26-31)</sup>をもとに、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。抽出率は、99 床以下: 5%、100~199 床: 10%、200~299 床: 20%、300~399 床: 40%、400~499 床: 80%、500 床以上: 100%、大学病院: 100%とした。以下 1)~3)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し、患者数を推定した。

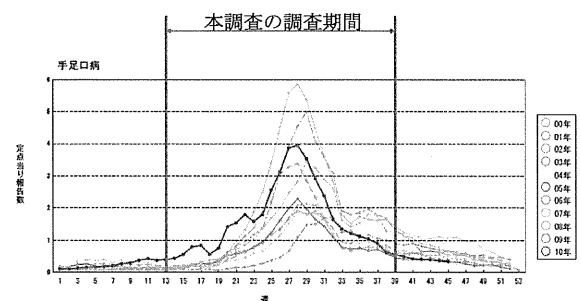
1) 15 歳未満の日本人

2) 2010 年 4 月 1 日~9 月 30 日の間に対象科に入院

3) 症例定義(資料 2) に 1 つでも合致する

本調査の対象期間は、2)に示す通り、2010 年の HFMD 流行期である 4 月 1 日~9 月 30 日に設定した。調査の対象期間を流行期に限定することで、「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ことを目的とした。流行期は、2010 年における HFMD の疾病サーベイランス結果を基に決定した (図 1)。

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)



二次調査の調査対象は、一次調査で「症例あり」と回答した小児科とし、調査個人票 (資料 3) を用いて、症例の臨床疫学特性に関する情報を収集した。なお、二次調査への協力依頼にあたり、「エンテロウイルス以外の病原体が、病因として明らかであった (あるいは強く疑われた) 症例」「病原体は明らかではないが、エンテロウイルス感染以外の病因であると担当医が判断した症例」については、調査個人票への記入が不要であることを明記した (資料 4)。

(倫理面への配慮)

一次調査は、入院症例数および死亡数のみの調査であるが、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ていない。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した。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ち 2011 年 12 月末日まで保管し、以後はシュレッダー等で破棄するよう依頼した。

本調査は、疫学研究に関する倫理指針（2008 年 12 月 1 日一部改正）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した。

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

### 1. 一次調査

2011 年 1 月に調査を開始し、未回答の小児科については、3 月に再依頼状を送付した。全国の小児科 2507 科から 760 科を抽出して調査を実施し、521 科（68.6%）から回答を得た。「症例あり」と回答した 126 科より 1094 例（うち死亡 5 例）の入院症例数が報告された。このうち、267 例（うち死亡 2 例）については、300~399 床の層の 1 施設からの報告であった。

調査対象期間である 2010 年 4 月 1 日~9 月 30

日の間の入院患者数は、4,273 人（95%信頼区間：1,804~6,741）と推定された（表 1）。

表1. 推計入院患者数

病床規模(床)	推計患者数	95%信頼区間
99以下	1231	285~2178
100~199	399	124~674
200~299	323	155~492
300~399	1351	853~3554
400~499	316	142~489
500以上	540	88~992
大学病院	112	39~185
計	4273	1804~6741

### 2. 二次調査

2011 年 6 月に調査を開始し、7 月 15 日時点で 62 科（49.2%）より 233 例の情報を収集した。未回答の小児科については、9 月 15 日を回答期限として再依頼状を送付した。すでに回答を得た小児科に対しても、記入漏れや整合性のない回答がある場合に再確認・再記入の依頼を行った。

最終的に、86 科（68.3%）より 365 例（うち死亡 2 例）の情報を収集した。このうち、二次調査で収集した情報から、本調査の症例として厳密には適格でないと考えられる 75 例を除いた 290 例を解析対象とし、以下 3 群に分類し集計を行った。

- ① NC（No Complications）群（144 例）：  
HFMD あるいは HA のみで関連合併症なしの者
- ② AM（Aseptic Meningitis）群（130 例）：  
HFMD/HA の有無に拘わらず無菌性髄膜炎を呈した者
- ③ Other 群（16 例）：HFMD/HA の有無に拘わらず無菌性髄膜炎以外の合併症を呈した者

なお、Other 群の内訳は、脳炎 9 例、脳幹脳炎 3 例、急性弛緩性麻痺 2 例、心肺機能不全 2 例であった。

表 2 に、性別の内訳を示す。男児の割合は、NC 群：49%、AM 群：68%、Other 群：63%であり、AM 群および Other 群で多かった。



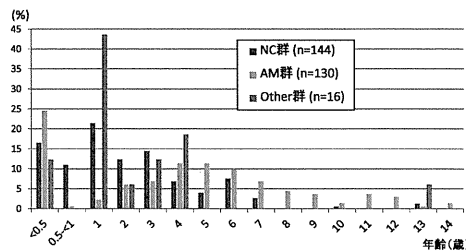
表2. 性別

	NC群		AM群		Other群	
	n	(%)	n	%	n	%
男	70	(49)	88	(68)	10	(63)
女	74	(51)	42	(32)	6	(37)
計	144	(100)	133	(100)	16	(100)

NC(No Complications)群:HFMDあるいはHAのみで関連合併症なしの者  
 AM(Aseptic Meningitis)群:HFMD/HAの有無に拘わらず無菌性髄膜炎を呈した者  
 Other群:HFMD/HAの有無に拘わらず無菌性髄膜炎以外の関連合併症を呈した者

図2に、入院時年齢分布を示す。若年小児の割合が高く、特にNC群、およびOther群における5歳以下の割合が、それぞれ83%、94%と高かった。Other群では、1歳児が約半数を占めていた。

図2. 入院時の年齢分布



NC(No Complications)群:HFMDあるいはHAのみで関連合併症なしの者  
 AM(Aseptic Meningitis)群:HFMD/HAの有無に拘わらず無菌性髄膜炎を呈した者  
 Other群:HFMD/HAの有無に拘わらず無菌性髄膜炎以外の関連合併症を呈した者

表3に、基礎疾患の保有割合を示す。「基礎疾患あり」の割合は、NC群:20%、AM群:15%、Other群:6%であり、Other群では1例のみであった。

表3. 基礎疾患の保有割合

	NC群		AM群		Other群	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
基礎疾患*						
なし	114	(80)	110	(85)	15	(94)
あり	29	(20)	19	(15)	1	(6)
欠損・不明	1		1		0	
計	144	(100)	133	(100)	16	(100)

NC(No Complications)群:HFMDあるいはHAのみで関連合併症なしの者  
 AM(Aseptic Meningitis)群:HFMD/HAの有無に拘わらず無菌性髄膜炎を呈した者  
 Other群:HFMD/HAの有無に拘わらず無菌性髄膜炎以外の関連合併症を呈した者  
 \*喘息、その他の呼吸器疾患、心疾患、腎疾患、肝疾患、内分泌疾患、血液疾患、てんかん、その他の神経・筋疾患、アレルギー疾患、疾病・治療による免疫抑制状態、など

表4に、入院時の各臨床症状の保有割合を示す。Other群では、HFMD/HAに特有の症状である「水疱」、「丘疹」の保有割合が低く、それぞれ13%、19%であった。また、Other群における「神経症状あり」は81%であり、顕著に高かった。

表4. 入院時の臨床症状

臨床症状	NC群(N=144)		AM群(N=130)		Other群(N=16)	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
入院時体温:平均(中央)値	38.6	(38.6)	38.6	(38.5)	38.7	(39.0)
発熱 $\geq$ 39°C	38	(26)	62	(48)	7	(44)
水疱	53	(37)	25	(19)	2	(13)
丘疹	52	(36)	32	(25)	3	(19)
口腔内水疱・潰瘍	104	(72)	30	(23)	0	(0)
頭痛	9	(6)	62	(48)	0	(0)
嘔吐	15	(10)	42	(32)	3	(19)
頸部硬直	3	(2)	65	(50)	3	(19)
けいれん	4	(3)	5	(4)	4	(25)
ミオクローヌス	0	(0)	6	(5)	1	(6)
運動失調	0	(0)	1	(1)	2	(13)
眼振	0	(0)	0	(0)	1	(6)
意識障害	4	(3)	4	(3)	7	(44)
筋力低下	1	(1)	0	(0)	2	(13)
神経症状	9	(6)	49/129*	(38)	13	(81)

NC(No Complications)群:HFMDあるいはHAのみで関連合併症のなかった者  
 AM(Aseptic Meningitis)群:HFMD/HAの有無に拘わらず無菌性髄膜炎を呈した者  
 Other群:HFMD/HAの有無に拘わらず無菌性髄膜炎以外の関連合併症を呈した者  
 \*:1人については欠損値

表5に、病原検索結果を示す。病原検索の実施割合は、NC群:7%、AM群:53%、Other群:75%であり、NC群において顕著に低かった。

表5. 病原検索結果

病原検索あり	NC群(N=144)		AM群(N=130)		Other群(N=16)	
	10(7)	69(53)	12(75)			
部位 (複数回答)	検体数	EV 陽性	EV71 陽性	検体数	EV 陽性	EV71 陽性
咽頭	7	3	3	20	7	5
鼻汁	3	0	0	2	0	0
便・直腸	4	3	2	24	15	8
髄液	7	0	0	60	16	2
その他	1	0	0	2	1	1

NC(No Complications)群:HFMDあるいはHAのみで関連合併症のなかった者  
 AM(Aseptic Meningitis)群:HFMD/HAの有無に拘わらず無菌性髄膜炎を呈した者  
 Other群:HFMD/HAの有無に拘わらず無菌性髄膜炎以外の関連合併症を呈した者  
 EV: Enterovirus

表6に、転帰を示す。治癒・軽快例の割合は、NC群、およびAM群で99%と高い一方、Other群では69%であった。また、Other群では死亡2例(13%)が報告された。

表6. 転帰

	NC群		AM群		Other群	
	n	(%)	n	%	n	%
治癒・軽快	143	(99)	127	(99)	11	(69)
後遺症	0	(0)	0	(0)	1	(6)
転院	1	(1)	1	(1)	2	(13)
死亡	0	(0)	0	(0)	2	(13)
欠損	0		2			
計	144	(100)	133	(100)	16	(100)

NC(No Complications)群:HFMDあるいはHAのみで関連合併症なしの者  
 AM(Aseptic Meningitis)群:HFMD/HAの有無に拘わらず無菌性髄膜炎を呈した者  
 Other群:HFMD/HAの有無に拘わらず無菌性髄膜炎以外の関連合併症を呈した者

#### D. 考察および結論

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HFMD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。

それでもなお、一次調査で報告された症例に、他の病因を有する者が含まれている可能性は否定できない。これは、本調査で採用した症例定義が、HFMDやHAを呈さずともエンテロウイルス感染の可能性のある症例をすべて含めるようなものとなっているためである。二次調査に回答した86科についてみると、一次調査の時点で報告された症例は537例であった。ところが、二次調査で「エンテロウイルス以外の病原体が、病因として明らかであった（あるいは強く疑われた）症例」「病原体は明らかではないが、エンテロウイルス感染以外の病因であると担当医が判断した症例」については報告不要であることを明記したところ、同86科から報告された症例は365例と32%減少した。さらに、二次調査の個人票の内容に基づき、このうち75例(21%)が本調査の症例として厳密には適格でないと判断されたことから、一次調査結果から推計された入院患者数は、過大評価されていると考えられる。今後、不適格例の割合を考慮した補正を行う。

二次調査では、NC群と比較して重症と考えられるAM群・Other群で「男児の割合が高い」、Other群で「若年小児の割合が高い」、「基礎疾患の保有割合が低い」という結果を得た。これらは、台湾、マレーシア、シンガポールからの過去の報告と同様の結果であった<sup>4,6),10)</sup>。

さらに、HFMD・HAに特有の症状である水疱・丘疹の各症状について、入院時の保有割合がOther群で低いという結果を得た。この点も、HFMD流行時の死亡例や重症例において、当該症状を常に認めるわけではないという過去の報告<sup>10,11)</sup>と一致している。

なお、二次調査の報告症例で病原検索の実施割合が100%でないため、今回の調査結果から、各群におけるEV71感染割合を把握することは困難である。しかし、本邦では2010年のHFMD流行時にEV71が主に検出されていることから<sup>32)</sup>、EV71流行年における当該疾患の臨床疫学像を把握することは、諸外国における研究結果との比較可能性を高めるためにも非常に重要であると考え

られる。今後、さらに詳細な解析を行う予定である。

謝辞

日頃の診療、教育、研究にご多忙な中、貴重な時間を割いて調査にご協力くださいました全国の諸先生方に深く感謝いたします。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

なし

#### G. 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) Chong CY et al. *Acta Paediatr*. 92: 1163-1169, 2003
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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
- 10) Shekhar K, Lye MS, Norlijah O et al. Deaths in children during an outbreak of hand, foot and mouth disease in Peninsular Malaysia – Clinical and pathological characteristics. *Med J Malaysia.* 60(3):297-304, 2005.
- 11) 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
- 12) Cardoso 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 Sibul, Sarawak. *Lancet* 354(9183): 987-991, 1999
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 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
- 17) 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.jp/iasr/CD-ROM/records/14/16502.htm> (2011 年 02 月 22 日)
- 18) 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
- 19) 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
- 20) Fujimoto T, Chikahira M, Yoshida S, Ebara 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
- 21) 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
- 22) 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
- 23) 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

24)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

25)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

26)2009年版北海道・東北病院情報. 医事日報. 2009

27)2010年版関東病院情報. 医事日報. 2010

28)2010年版中部病院情報. 医事日報. 2010

29)2010年版近畿病院情報. 医事日報. 2010

30)2010年版中国・四国病院情報. 医事日報. 2010

31)2011年版九州・沖縄病院情報. 医事日報. 2010

32)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. 2012年3月1日.

[https://hasseidoko.mhlw.go.jp/Byogentai/Pdf/d\\_ata37j.pdf](https://hasseidoko.mhlw.go.jp/Byogentai/Pdf/d_ata37j.pdf) (2012年03月1日)

資料 1

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。