

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)

資料 2

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膚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 *診断の手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

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 新型コロナウイルス感染症等新興・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 _____ cm _____ kg	居住地 _____ 都・道 _____ 府・県
入院前に 今回の症状で 前医受診歴 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.オクロース 13.運動失調 14.眼振 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 外来受診歴 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.オクロース 13.運動失調 14.眼振 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 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 2.あり→ 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.心肺機能不全 11.その他(部位に○もしくは詳細を記述: 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.オクロース 13.運動失調 14.眼振 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 /μL	総蛋白 mg/dL	ヘモグロビン g/dL
		AST IU/L	ALT IU/L	血糖値 mg/dL
	髄液検査	1.なし	2.あり(月 日)→	糖 mg/dL
		蛋白 mg/dL	細胞数 mm ³ /μL	好酸球 %
				リンパ球 %
病原検査	部位・検体と採取日 (複数して可)	検査結果		検査方法
	咽頭	EV71:エンテロウイルス71, CA16:コクサッキーウイルスA16		検査実施施設
	月 日	1.陰性 2.陽性	エンテロウイルス[EV71・CA16・その他()・型不明] 3.不明 非エンテロ[()・不明]	1.PCR 2.分離 3.その他()
	鼻汁	1.陰性 2.陽性	エンテロウイルス[EV71・CA16・その他()・型不明] 3.不明 非エンテロ[()・不明]	1.PCR 2.分離 3.その他()
	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] 3.不明 非エンテロ[()・不明]	1.PCR 2.分離 3.その他()
	髄液	1.陰性 2.陽性	エンテロウイルス[EV71・CA16・その他()・型不明] 3.不明 非エンテロ[()・不明]	1.PCR 2.分離 3.その他()
その他()	月 日	1.陰性 2.陽性	エンテロウイルス[EV71・CA16・その他()・型不明] 3.不明 非エンテロ[()・不明]	1.PCR 2.分離 3.その他()
血清抗体検査	1.なし	1.単血清	測定方法	
	2.あり→	2.ペア血清	及び結果	
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.ステロイドホルモン投与 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.人工心肺	
	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(死因:)		

下記症状 初発日	月 日
水疱・丘疹 発疹・潰瘍	月 日
不明 発現なし	月 日
発熱(≥37.5℃)	月 日
不明 発現なし	月 日
神経症状	月 日
不明 発現なし	月 日

二次調査用 調査個人票ご記入にあたって

「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に関する全国調査（一次調査）」にて、貴診療科より、枠内に該当する症例について下記の通りご報告いただきました。

- ・ 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

記入者御氏名： _____ 報告症例数： _____ 例（うち死亡 _____ 例）

二次調査個人票には、一次調査でご報告いただいた症例のうち、下記以外の症例について、ご記入いただきますようお願い申し上げます。

- ・ 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

例 ムンプス、単純ヘルペス等による髄膜炎
 インフルエンザ、単純ヘルペス等による脳炎
 ポリオ（弱毒ワクチン株を含む）による急性弛緩性麻痺

- ・ 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

例 慢性的に症状を呈する自律神経失調症
 川崎病、外傷、先天性心疾患等による心肺機能不全

計 _____ 例（うち死亡例 _____ 例）

※二次調査では、「手足口病やヘルパンギーナ特有の症状を呈しておらず、病原体も不明であった（あるいは病原検査を実施しなかった）が、エンテロウイルス感染を完全に否定することができない症例」についても、もれなく把握したいと考えております。

～この用紙は、「二次調査用 調査個人票」とともにご返送下さい～

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 23 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）
研究協力者：福島慎二（東京医科大学病院 渡航者医療センター）
共同研究者：濱田篤郎（東京医科大学病院 渡航者医療センター）
共同研究者：水野泰孝（東京医科大学病院 感染制御部）
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

わが国においても不活化ポリオワクチン（inactivated polio vaccine, IPV）の導入が間近となった。まずは、乳児期の定期接種が経口生ポリオワクチン（oral polio vaccine, OPV）から IPV に移行されるであろうが、近い将来の方向性として OPV から IPV への転換は年齢対象を限定したものではないことが予想される。したがって、わが国でも成人に対して IPV の追加接種を行う機会がまもなく訪れると考えられ、それに備えて免疫原性と安全性の検討を行う分担研究を開始した。

A. 研究目的

わが国においても 2012 年の秋頃を目途に不活化ポリオワクチン（inactivated polio vaccine, IPV）が導入される見込みである。本研究では、成人に対して IPV の追加接種を行い、免疫原性と安全性の検討を行うことを目的とした。

B. 研究方法

研究概略：

(1) 研究期間：

IPV 接種臨床研究は、東京医科大学倫理委員会承認日（2011 年 6 月 1 日）から 2013 年 5 月末まで実施される予定であるが、本分担研究では平成 23 年度中の研究成果について報告する。

(2) 対象：20 歳以上の成人。

(3) 除外基準：被接種者が次のいずれかに該当すると認められる場合には、除外する。

- ・明らかな発熱を呈している者
- ・重篤な急性疾患にかかっていることが明らかな者
- ・本研究で用いる IPV の成分に対して過敏症を呈したことがある者
- ・上記に掲げる者のほか、予防接種を行うことが不適当な状態にある者

(4) 接種方法：不活化ワクチンを 4 週間間隔で 2 回接種する。

(5) 抗体価測定：1, 2, 3 型のポリオウイルスに対する血清中和抗体価を計 3 回測定する。1 回目のワクチン接種前、2 回目のワクチン接種前（1 回目接種の 4 週間後に相当）、

2回目接種の4週間後である。

実施手順：

下記の手順で実施する。なお、IPVの輸入手続きと接種、採血については東京医科大学病院渡航者医療センターで、血清中和抗体価の測定は国立感染症研究所ウイルス第二部で行う。

- (1) 不活化ワクチンを手続きに従って海外から輸入。
- (2) 不活化ワクチンの追加接種を希望する成人を募集。
- (3) 対象者の過去の接種歴を母子手帳で確認。
- (4) IPV接種前に約5ml採血（第1回目採血）し、その後ワクチン1回目を接種。
- (5) 4週間後に、IPV接種前に約5ml採血（第2回目採血）し、ワクチン2回目を接種。
- (6) 2回目接種4週間後に約5ml採血（第3回目採血）。
- (7) 安全性の検討として、IPV接種後の健康状態について、全身症状や局所症状（接種部位の変化）を調査。
- (8) 1, 2, 3型のポリオウイルスに対する血清中和抗体価を測定。
- (9) データの解析。

使用する IPV:

Sanofi Pasteur社のImovax Polio®を、手続きに従って海外から輸入して使用する。本IPVは1982年に発売され、現在は92カ国で承認を受けている。また、近々国内で承認・使用される予定の単独(stand-alone)IPVは本ワクチンとなる見込みである。

Imovax Polio®の治験における副反応調査では、全身性の副反応は稀であり、局所反応は発赤(0.7~2.4%)、疼痛(0.7~34%)、腫脹(0.4%)などが報告されている。海外市販後の調査でも、副反応は稀であると報告されている。

IPVの輸入手続き：

ワクチンの輸入手続きについては、下記

の手順を医薬品輸入取扱商社に依頼した。

- (1) 医薬品輸入取扱商社へ発注
- (2) 厚生労働省・経済産業省へ輸入承認申請書を提出
- (3) 厚生労働省へ輸入申請の書類を提出し、薬監証明書を取得
- (4) 通関
- (5) 納品

倫理面への配慮：

研究の参加は、受診者の自由意思によるものであり、受診者は研究への参加を随時拒否または撤回することができる。また拒否・撤回によって受診者が不利な扱いを受けることはない。なお、本研究は東京医科大学倫理委員会において承認済みである。また血清中和抗体価の測定に関して、国立感染症研究所の倫理委員会においても承認済みである。

C. 研究結果

成人に対するIPV接種に関する臨床研究プロトコルを作成し、倫理委員会での承認を経て、海外からIPVを輸入し、被験者を募集し接種を開始した。本報告書作成時点で、20名が登録され、研究を継続中である。現在のところ、研究継続に問題となるような接種後有害事象の報告は無い。

D. 考察

ポリオウイルス感染症を予防するためのワクチンには、経口生ポリオワクチン(oral polio vaccine, OPV)と不活化ポリオワクチン(inactivated polio vaccine, IPV)の2種類が存在する。1960年代以降、世界でポリオ制御の主役を担ってきたのはOPVであった。血清中和抗体の上昇とともに腸管粘膜局所免疫を付与することもでき、被接種者への優れた免疫原性とともに集団免疫効果(herd immunity)を併せ持つ優れたワクチンである。しかし、OPVは弱毒生ワ

クチンであるがゆえに、元々の病原体であるポリオウイルスが有する神経病原性を完全には無くすることができずに、頻度は低いながらもワクチン関連性麻痺（vaccine-associated paralytic poliomyelitis, VAPP）という副反応の懸念がある。すでに海外の先進諸国では、VAPP のリスクに鑑み定期接種の OPV を IPV に移行した国が 10 数年前から増えている。わが国はそれら国々に比べるとかなり遅れてしまったが、2012 年の秋頃には IPV の導入が見込まれる状況である。まず変更が行われるのは乳児期の定期接種であろうが、OPV から IPV への転換は対象を限定したものではないことが予想される。海外諸国においても、移行後は国内では主に IPV のみを用いる国が多い。

米国では、乳児期に接種をすませた成人は、通常はポリオワクチンの追加接種は不要とされている。しかし、感染リスクのある一部の対象（流行地への渡航者、実験室で野生株ポリオウイルスを扱う者、野生株ポリオウイルスと濃厚接触する医療従事者）については IPV を用いて追加接種を行うことが推奨されている。

わが国においては、国の感染症サーベイランス事業である血清疫学調査の結果より、1975-77 年生まれの世代はポリオウイルス 1 型に対する血清中和抗体保持率が他の世代より低いことが判明している。厚生労働省からの通達（平成 8 年）によれば、これらの者において「ポリオ感染のリスクが高いことが予想される場合」は OPV の追加接種を勧奨する機会であるとされている。1975-77 年生まれの者がポリオ流行地へ渡航する場合などがこれに該当するのであるが、VAPP のリスクが議論される昨今においては、彼らの子どもが OPV を内服する際への対処もしばしば議論されている。さらには、過去の接種歴が無い者、あるいは

不明な者に対する IPV の接種についても出生年にかかわらず検討しておく必要がある。本研究の成果を、それら成人に IPV を接種する際に役立てたい。

E. 結論

成人に対する IPV 追加接種の臨床研究計画を策定し、接種を開始した。今後のわが国の予防接種施策に活用できるような成果につなげたい。

F. 研究発表

（論文発表）

1. Nakano T : Japanese vaccinations and practices, with particular attention to polio and pertussis. *Travel Med Infect Dis* 9, 169-175, 2011.

G. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

平成 23 年度 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」

研究報告書

無菌性髄膜炎を疑う小児患者からのエンテロウイルスの検出

研究協力者 町田早苗 埼玉医科大学 医学部 医学研究センター
主任研究者 清水博之 国立感染症研究所 ウイルス二部

研究要旨

日本では毎年夏季に無菌性髄膜炎患者の報告が多く、その原因の 80%~90%がエンテロウイルスによるものである。年によって流行する血清型/遺伝子型が入れ替わり、地域によっても流行型に差がみられる。我々は、無菌性髄膜炎を疑う小児患者の髄液、咽頭拭い液、便から CODEHOP PCR 法によりダイレクトシークエンシングを行い、塩基配列と遺伝子型を決定し、CODEHOP PCR 法陽性検体のウイルス分離を試みた。2011 年に提出された検体から CODEHOP PCR 法で高率にエコー 6 型が検出され、そのうち 2 検体の髄液からエコー 6 型が分離された。検出されたエコー 6 型の VP1 領域 300bp の系統樹解析では中国の下水から 2010 年分離された株と近縁であることが判明した。

A. 研究目的

無菌性髄膜炎は本邦では夏季に流行がみられ、エンテロウイルスがその大半を示している。無菌性髄膜炎の起因ウイルスは主に B 群エンテロウイルス、A 群エンテロウイルスであるが、年によって起因ウイルスが入れ替わり、地域によっても流行型に差がみられる。

B. 研究方法

1. 対象と検体

2011 年 2 月~10 月末までの期間に埼玉医科大学小児科を受診した小児患者を対象とした。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、無菌性髄膜炎、ウイルス性脳炎の疑い患者とした。対象は、18 名、年齢は 0 歳~14 歳であった。患者から提出された検体

は、髄液 17 検体、咽頭拭い液 15 検体、14 便検体、計 46 検体であった。

2. CODEHOP PCR 法

(1) RNA 抽出

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

(2) cDNA 合成と CODEHOP PCR 法

Nix W A の方法に従い、cDNA 合成、エンテロウイルス VP1 領域検出のための COODEHOP PCR 法を施行した。Nested PCR を行い、350~400bp のバンドが検出された検体を陽性とした。PCR 増幅産物を精製し、ダイレクトシークエンシングを行い、塩基配列を確認した。塩基配列の同定には Blast 検索を行い、genotype を推定した。ダイレクトシークエンシングで塩基配列を解読できなかった検体については pGEM-T Easy Vector System I(Promega)

を用いたクローニングを施行し、塩基配列を同定した。

3. ウイルス分離

Vero 細胞、RD-A 細胞、HEp-2 細胞を用いて CODEHOP PCR 法陽性検体のみをウイルス分離を試みた。細胞変性効果 (CPE) を示した細胞上清を用いて CODEHOP PCR 法を施行し genotype を推定した。

(倫理面の配慮)

本研究を遂行するのに当たり埼玉医科大学病院 IRB で継続承認を受けた (承認 No.08-011)。臨床材料採取については「疫学研究における倫理指針」に基づき、材料提供者及び家族や個人の尊厳及び人権の尊重、個人情報保護に配慮した。検体提供に関してはインフォームドコンセントを行い、患者家族からの同意書が提出されている。

クローニングを施行するのに当たり、埼玉医科大学 組み換え DNA 実験安全委員会の承認を受けている (承認番号 993 号)。

C. 研究結果

CODEHOP PCR 法での陽性率は、髄液 17 検体中 7 検体 (41.2%)、咽頭拭い液 15 検体中 12 検体 (80.0%)、便 12 検体中 7 検体 (58.3%) であった。塩基配列が同定された検体は、髄液 7 件中 5 件、咽頭拭い液 12 件中 10 件、便については 7 件中 7 件であり、全てエコー 6 型 (E6) と同定された。

提出された検体のいずれかで E6 が検出された患者は 18 名中 13 名であり、その年齢は、0～5 歳 5 名、5 歳～10 歳 4 名、10 歳～14 歳 4 名であった。症状でみると 10 歳以下では発熱、項部硬直の所見が多く見られたが、10 歳以上では頭痛、発熱の所見であった。

CODEHOP PCR 法で陽性となった検体の髄液、咽頭拭い液からウイルス分離を施行したが、髄液 2 件から RD-A 細胞でウイルスが分離され、内 1 検体では HEp 細胞でもウイルス分離された。分離ウイルス上清を CODEHOP PCR 法で塩基配列を同定したが、2 検体とも E6 と同定された。

今回 塩基配列を同定した患者の咽頭拭い液または分離ウイルスの塩基配列 300bp について系統樹解析をすると 2010 年中国山東省下水から分離されたウイルスに近縁であることが判明した (図)。

D. 考察

感染症発生動向調査での無菌性髄膜炎の患者報告数をエンテロウイルスに限定して 2000 年から 2011 年を見ると 2002 年にエコー (E) 13 による大流行がみられたが、その年以外は小規模な流行に留まっている。また、病原体検出情報によるとエコーウイルスの各型は毎年検出される型と数年～数十年の間隔を空けて流行する型がある。

今回の解析で 2011 年埼玉の無菌性髄膜炎の起因ウイルスと同定された E6 は、中国山東省の下水から分離された E6 と近縁であった。E6 は、病原体検出情報の無菌性髄膜炎患者からのウイルス分離・検出報告状況によると毎年検出されているが、2010 年～2011 年に無菌性髄膜炎の起因ウイルスの首位に報告されている。都道府県別でみると 2011 年に東京都と埼玉県で E6 が多数検出されており、小規模の流行があったことが分かり、その流行起因ウイルスは中国山東省からの輸入ウイルスの可能性が示唆された。

系統樹から推測すると 2011 年大阪で分

平成 23 年度 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）

Saffold virus に関する研究（ヒト・動物の SAFV 調査、SAFV2 と SAFV3 間の免疫交差反応性検討、アンホテリシン B 添加による SAFV の分離高感度化検討）

研究協力者：細見卓司（高知県衛生研究所）

研究要旨

- ① 2010 年 3 月～2012 年 2 月の高知県における患者検体からの SAFV 検出は 17 検体（1.3%）で、うち、カプシド VP1 領域解析に成功した 11 株総てが SAFV2 であった。また、SAFV 陽性検体のうち、13 検体（70.6%）で他のウイルスの共感染が認められた。
- ② イヌ、ネコ、ウシ血清の SAFV3 に対する中和抗体を測定したところ、各動物種で中和抗体陽性検体が認められ、特にイヌ、ネコで、比較的高い力価の中和抗体が認められた。しかし、イヌ、ネコのふん便等から SAFV 遺伝子は検出されなかった。
- ③ マウス、ウサギ抗血清を用いて SAFV2 と SAFV3 の中和抗体の免疫交差反応を調査したところ、比較的高い交差反応が認められるものがあった。
- ④ アンホテリシン B の添加により、SAFV2 及び SAFV3 のウイルス力価の増強が認められ、アンホテリシン B が SAFV 分離の際、有効であると考えられた。

A. 研究目的

Saffold virus (SAFV) はピコルナウイルス科カルジオウイルス属に属するウイルスであり、1981 年に採取された不明熱患者のふん便検体から初めて検出された。以降、世界各地で検出されており、遺伝子型 1～9 型まで報告されている。しかし、その病原性、性状等について未知な点も多い。

1. ヒト検体からの SAFV 検出調査

平成 22 年度調査で、高知県在住者の血清中 SAFV 中和抗体保有状況を調査したところ、SAFV2 71.9%、SAFV3 67.4%の

陽性者が認められた。そこで、平成 22 度から引き続き高知県感染症発生動向調査の患者検体からの SAFV 検出を試み、SAFV の感染状況を調査した。

2. 動物の SAFV 調査

SAFV はヒトからのみ検出報告があるウイルスであるが、宿主動物がヒトのみであるか否かは不明である。そこでこの点を明らかにするため、動物の血清中の SAFV 中和抗体保有状況及び動物検体からの SAFV 検出について調査した。

3. SAFV2、SAFV3 間の免疫交差反応

性調査

ヒトの SAFV2、及び SAFV3 の中和抗体価の分布は非常に類似しており、これらの遺伝子型間では免疫交差反応がある可能性がある。そこで、SAFV2 及び SAFV3 に対する抗血清を作成し、免疫交差反応性を調査した。

4. アンホテリシン B 添加による SAFV 分離高感度化の検討

ウイルスの性状等の研究を行ううえで、ウイルス株の分離は重要であるが、SAFV 株の分離は困難である。そこで、SAFV 分離の高感度化を目指して、アンホテリシン B 添加の SAFV 分離への影響を検討した。

B. 研究方法

1. ヒト検体からの SAFV 検出調査

2010 年 3 月～2012 年 2 月の感染症発生动向調査の検体 1,287 検体（ふん便 331、咽頭ぬぐい液 858、髄液 63、その他 35）について調査した。

検体から RNA を抽出し、Drexler らの 5' UTR 領域に設計したプライマー（CF723, CR888）（Drexler JF, et al., *Emerg Infect Dis.*, 2008,14,1398–405, DOI: 10.3201/eid1409.080570）で PCR を行い、目的サイズのバンドを確認した。目的のバンドが得られた場合、カプシドの VP1 領域に設計された Itagaki らのプライマー（1st primer 315F, primer738R、2nd primer316F, primer621R）（Itagaki T, et al., *Scand J Infect Dis.*, 2010,42,950-2）又は Chiu らのプライマー（CardioVP1-1F, CardioVP1-2F, CardioVP1-3R, CardioVP1-4R）（Chiu CY, et al., *Proc Natl Acad Sci USA.*, 2008,105,14124–9, DOI: 10.1073/pnas.0805968105）でターゲットのゲノムを増幅し、ダイ

レクトシーケンスにより塩基配列を解読した。解析ソフトは MEGA5（Tamura K, et al., *Mol Biol Evol.*, 2011,28,2731-9）を使用し、既に報告された SAFV1～8 型のゲノムを参照株として近隣接合法で分子系統樹解析を行った。

VP1 領域の PCR が不成功の場合、5'UTR 領域の塩基配列を解読し、Blast 解析により GenBank に登録された SAFV のゲノムとの相同性を解析し、SAFV であることを同定した。

併せて、Vero, LLC-MK2, FL, RD-18s 細胞により、ウイルス分離を行った。

また、臨床症状に応じて PCR、Real time PCR 法（TaqMan Probe 法）、イムノクロマト法、EIA 法、細胞培養法でエンテロウイルス、パレコウイルス、アデノウイルス、ロタウイルス（A 群、C 群）、アストロウイルス、ノロウイルス、サポウイルス、インフルエンザウイルス、RS ウイルス、ヒトメタニューモウイルス、パラインフルエンザウイルス（1,2,3 型）について検出を行った。

2. 動物の SAFV 調査

1) 動物血清中の SAFV3 中和抗体保有状況

イヌ血清 54 検体、ネコ血清 22 検体、ウシ血清 20 検体を調査した。

ウイルス株は、SAFV3（JPN08-404 株（HQ902242））を用い、細胞は LLC-MK2 細胞を用いた。

血清検体はウシ胎児血清を 2%含有した MEM 培地（2%FBS 含 MEM）で 1:8 に希釈した後、56°C30 分間非働化した。この非働化検体を 2%FBS 含 MEM で 2 倍段階希釈により 1:2048 まで希釈した。各希釈段階について 2 穴用意し、各希釈

段階の検体 50ul に対して、100TCID₅₀/50ul に調整したウイルス液 50ul を加え、5%CO₂ で 37 度 3 時間感作した。感作後、5%FBS 含 MEM で 1-2 × 10⁵cell/ml に調整した細胞浮遊液を 100ul 加え、14 日間、5%CO₂ で 37°C 培養し、CPE の出現を観察した。

接種ウイルスを 50%以上中和した検体の最高希釈倍率をもって中和抗体価とした。また、1:8 以上の中和抗体価を有する検体については中和抗体陽性、1:8 未満については陰性と判定した。

2. 動物検体からの SAFV 検出調査

2010 年 9 月～2011 年 9 月に採取されたイヌ 666 頭 (ふん便 666 検体、咽頭ぬぐい液 76 検体)、ネコ 158 頭 (ふん便 158 検体) について調査した。

各検体個別に、又は 2～4 検体分をひとまとめにして、検体から RNA を抽出し、5'UTR 領域のプライマー (CF723,CR888) で PCR を行い、目的サイズのバンドを確認した。陽性となった場合は、個別の検体で検索を行い、ダイレクトシーケンスによる SAFV の同定、VP1 領域の塩基配列解析による遺伝子型の解析を行うこととした。

3. SAFV 2、SAFV 3 間の免疫交差反応性調査

抗原ウイルス株は、SAFV2 (高知 10-534 株)、SAFV3 (JPN08-404 株) を用いた。

抗 SAFV2 血清はマウス 8 頭、抗 SAFV3 血清はマウス 7 頭、ウサギ 2 頭を用いて作成し、各個体別に血清を採取、各抗血清の SAFV2 及び SAFV3 株に対する中和抗体価を測定した。CPE 発現の観察期間は SAFV2 は 17 日間、SAFV3 は 14 日間とした。陰

性コントロールとして、マウス抗 SAFV 血清作成と同時期同施設で飼育された正常マウス血清を用いた。

4. SAFV 分離高感度化の検討

ウイルスは SAFV2 (高知 10-534 株)、SAFV3 (JPN08-404 株) を、細胞は LLC-MK2 細胞を用いた。

各ウイルス株について概ね 100TCID₅₀/50ul に調整したウイルス液を原液として、2%FBS 含 MEM を用いて 10 倍段階希釈で 1:10⁰～1:10⁴ の希釈系列のウイルス液を作成し、各希釈系列のウイルス液を 50ul ずつ、96 穴マイクロプレート 8 穴に接種した。これらのウェルに、アンホテリシン B の最終濃度 0.3～2.5ug/ml となるようにファンギゾン (GIBCO) を添加した 2%FBS 含 MEM50ul を加えて、5%FBS 含 MEM で 1-2 × 10⁵cell/ml に調整した細胞浮遊液を 100ul 注入し、SAFV2 は 17 日間、SAFV3 は 14 日間、5%CO₂ で 37°C 培養した。対照として、アンホテリシン B 無添加系列を作成し、同様に試験した。CPE の出現を観察し、アンホテリシン B の添加濃度別に TCID₅₀/50ul を測定し、アンホテリシン B 無添加系列の TCID₅₀/50ul に対する比を求めた。

この試験を 3 回繰り返し実施した。

C. 研究結果

1. ヒト検体からの SAFV 検出調査

SAFV は 1287 検体中 17 検体から検出された。うち、ウイルス分離は 2010 年の 1 検体 (高知 10-534 株) からのみ成功した。(表 1、表 2)

SAFV が検出された時期は 2010 年 8 月

から 2011 年 3 月まで、及び 2011 年 8、9 月であった。

臨床症状は、概ね気道炎と胃腸炎であったが、17 検体中ウイルスの共感染が認められたものが 13 検体 (70.6%) であった。

VP1 領域が解析できた 11 株について、塩基配列 247bp をもとに分子系統樹解析を行った結果、総て SAFV2 に分類され、FI N08-13B (FJ374267)類似株 9 株と、Can1 12051-06 (AM922293)類似株 2 株に分けられた。(図 1)

その他、VP1 領域を解析できず、遺伝子型を分類できていない株 (SAFV NT) が 6 株あったが、解析に向けて検討中である。

2. 動物の SAFV 調査

1) 動物血清中の SAFV3 中和抗体保有状況調査

イヌ、ネコ、ウシの SAFV3 に対する中和抗体保有状況は、イヌ 68.5%、ネコ 55.0%、ウシ 27.3%であったが、1:16 以上の抗体価を保有していたものは、イヌとネコであり、最高値はイヌ 1:128、ネコ 1:256 であった。(図 2)

2) 動物検体からの SAFV 検出調査

イヌ、ネコ 824 頭のふん便、咽頭ぬぐい液、合計 900 検体から SAFV 遺伝子の検出を試みたが、SAFV 遺伝子は検出されなかった。

3. SAFV2、SAFV3 間の免疫交差反応性調査

マウス抗 SAFV2 血清 8 検体における、SAFV2 中和抗体価 ÷ SAFV3 中和抗体価は、8~1024 (中央値 128.0 幾何平均値 117.3) であり、マウス抗 SAFV3 血清 7 検体及びウサギ抗 SAFV3 血清 2 検体の抗 SAFV3

中和抗体 ÷ SAFV2 中和抗体価は、2~512 (中央値 16.0 幾何平均値 17.3) であった。

陰性コントロールでは、SAFV2 及び SAFV3 に対する中和抗体は認められなかった。(表 3)

4. アンホテリシン B 添加による SAFV 分離高感度化の検討

アンホテリシン B 添加系列の TCID₅₀/50ul のアンホテリシン B 無添加系列との比の平均値は、SAFV2 では、2.8~4.3、SAFV3 では、3.5~5.8 であり、添加系列は無添加系列に比べ、力価の増加が認められた。(図 3)

D. 考察

SAFV は気道炎や胃腸炎の原因ウイルスの一つであると考えられているが、疫学的特性や病原性等について不明な点が多い。

今回、2010 年 3 月から 2012 年 2 月までに SAFV 検出を試みたところ、17 例 (1.3%) の陽性例が確認され、うち、遺伝子型の解析ができたものは総て SAFV2 であった。調査期間のうち、2010 年 8 月~2011 年 1 月に流行していた SAFV は SAFV2 であると考えられた。

SAFV 陽性検体の臨床症状は主に気道炎と胃腸炎であったが、70.6%でウイルスの共感染が認められており、病原性の解析についてさらなる検討が必要であると考えられた。

SAFV は現在のところヒトからしか検出されておらず、ヒトのみを宿主としたウイルスであると考えられているが、今回、イヌ、ネコ、ウシにも中和抗体が確認された。特にイヌ、ネコでは、イヌ 1:128、ネコ 1:256

といった比較的高い中和抗体価が確認されており、SAFV の動物への感染も検討する必要がある。今回の調査では、イヌ、ネコのふん便等から SAFV は検出されなかったが、更なる調査が必要であると考えられる。

平成 22 年度のヒトの中和抗体保有状況の調査において、SAFV2 と SAFV3 の分布状況が非常に類似していることが確認され、SAFV2 と SAFV3 の間に交差反応性がある可能性を指摘した。このことは、Galama とも言及している (Galama J, et al., Emerg Infect Dis., 2011, 17, 1572-3)。今回、マウス及びウサギ抗血清を用いて試験したところ、SAFV2, SAFV3 間で比較的高い免疫交差反応を示すものが確認できた。これらの遺伝子型間で免疫交差反応性がある可能性が高いと考えられる。しかし、交差反応性は、免疫動物により個体差が大きく、今後、より厳密な検討を必要としていると思われる。

SAFV 研究の進展において、SAFV のウイルス株の分離は重要なポイントであるが、今回の調査においても、分離できた株は 17 例中 1 例のみであり、SAFV 分離は比較的困難であると思われる。今回、アンホテリシン B の細胞維持液への添加で、SAFV のウイル

ス力価が増強することが確認された。このことは SAFV 分離の一助になると思われる。本方法を用いて臨床検体からの検出試験を行う必要がある。また、力価の向上は 2.8 ~5.8 倍であり、十分な効果を上げるためには更なる力価を上げる方法を検討する必要があるだろう。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Takushi Hosomi, et al., Prevalence of neutralizing antibody against Saffold virus genotypes 2 and 3 in Kochi, Japan, International Congress of Virology, 2011, 札幌市, 2011 年 9 月

H. 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

	2010年 3月～12月	2011年 1月～12月	2012年 1月～2月	合計
ふん便	7/190(3.7%)	0/130	0/11	7/331(2.1%)
咽頭ぬぐい液	5/327(1.5%)	5/473(1.1%)	0/58	10/858(1.2%)
髄液	0/21	0/37	0/5	0/63
その他	0/11	0/24	0/0	0/35
合計	12/549(2.2%)	5/664(0.8%)	0/74(0%)	17/1,287(1.3%)

表1 SAFV 検出数の推移

各欄の数字はSAFV 陽性検体数/検査検体数であり、()内は%を示す。

検体番号	患者 年齢	性 別	採取日	臨床診断名	検体	検出 SAFV	検出状況	共感染 ウイルス
1 高知 10-534	1才	男	2010. 8. 16	ヘルパンギーナ	咽頭ぬぐい液	SAFV2	ウイルス分離	
2 高知 10-551	1才	男	2010. 8. 27	喉頭気管支炎	咽頭ぬぐい液	SAFV2	遺伝子検出	
3 高知 10-586	3才	男	2010. 9. 22	咽頭結膜熱	咽頭ぬぐい液	SAFV2	遺伝子検出	AdV-2
4 高知 10-593	1才	男	2010. 9. 30	川崎病	便	SAFV2	遺伝子検出	HPeV
5 高知 10-611	5才	男	2010. 11. 1	感染性胃腸炎	便	SAFV2	遺伝子検出	SaV
6 高知 10-617	1才	男	2010. 10. 29	感染性胃腸炎	便	SAFV2	遺伝子検出	SaV , Polio-2
7 高知 10-621	6才	女	2010. 11. 1	流行性耳下腺炎	咽頭ぬぐい液	SAFV2	遺伝子検出	
8 高知 10-633	1才	女	2010. 11. 12	感染性胃腸炎	便	SAFV2	遺伝子検出	AdV-40/41, HPeV
9 高知 10-665	8ヶ月	女	2010. 12. 03	咽頭結膜熱	咽頭ぬぐい液	SAFV NT	遺伝子検出	AdV-2
10 高知 10-669	5ヶ月	不明	2010. 12. 06	感染性胃腸炎	便	SAFV2	遺伝子検出	NoV G II
11 高知 10-692	11ヶ月	男	2010. 12. 11	感染性胃腸炎	便	SAFV2	遺伝子検出	NoV G II
12 高知 10-707	2才	男	2010. 12. 17	感染性胃腸炎	便	SAFV NT	遺伝子検出	NoV G II
13 高知 11-74	8才	女	2011. 1. 24	インフルエンザ	咽頭ぬぐい液	SAFV NT	遺伝子検出	Flu AH1pdm09
14 高知 11-86	8才	男	2011. 1. 31	インフルエンザ	咽頭ぬぐい液	SAFV2	遺伝子検出	Flu AH1pdm09
15 高知 11-230	2才	女	2011. 3. 25	咽頭結膜熱	咽頭ぬぐい液	SAFV NT	遺伝子検出	
16 高知 11-473	3才	男	2011. 8. 29	手足口病	咽頭ぬぐい液	SAFV NT	遺伝子検出	CA-16
17 高知 11-488	2才	女	2011. 9. 2	流行性角結膜炎	咽頭ぬぐい液	SAFV NT	遺伝子検出	Ad-3

表2 SAFV 検出状況

感染症発生動向調査検体からのSAFV 検出状況 EV:Enterovirus RV:Rhinovirus AdV:Adenovirus

PeV:Parechovirus SaV:Sapovirus Polio:Poliovirus Flu :Influenza virus CA:Coxsackivirus

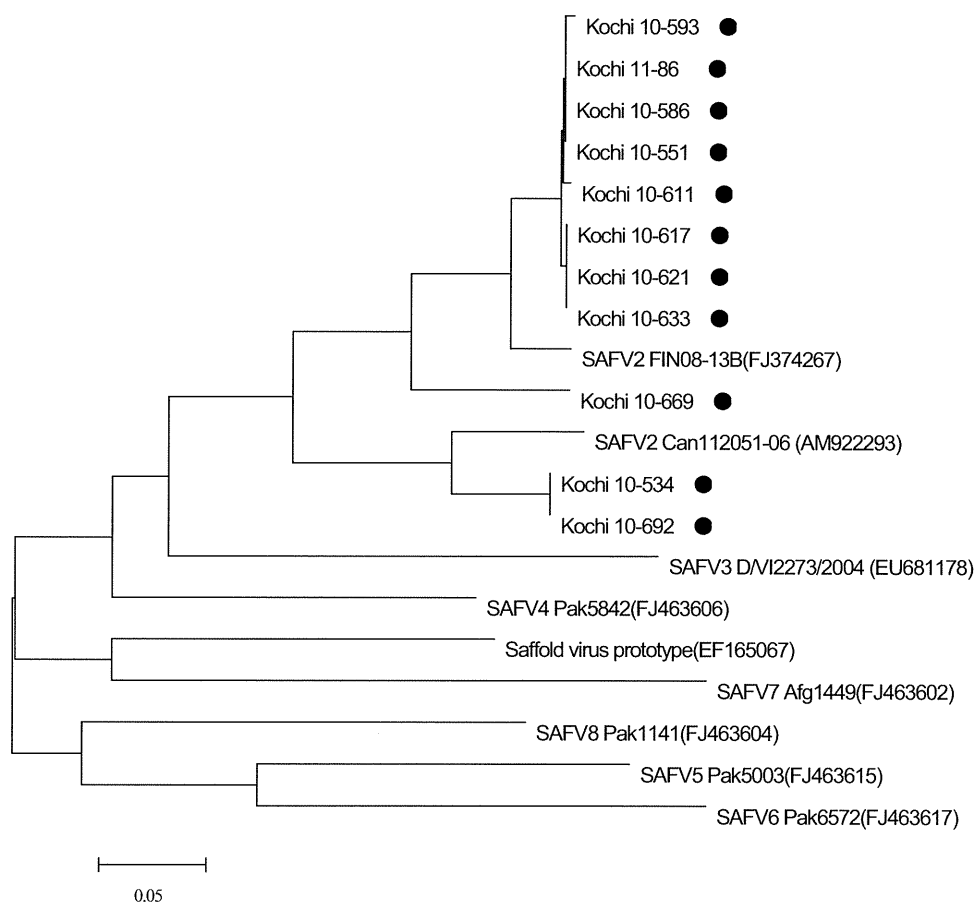
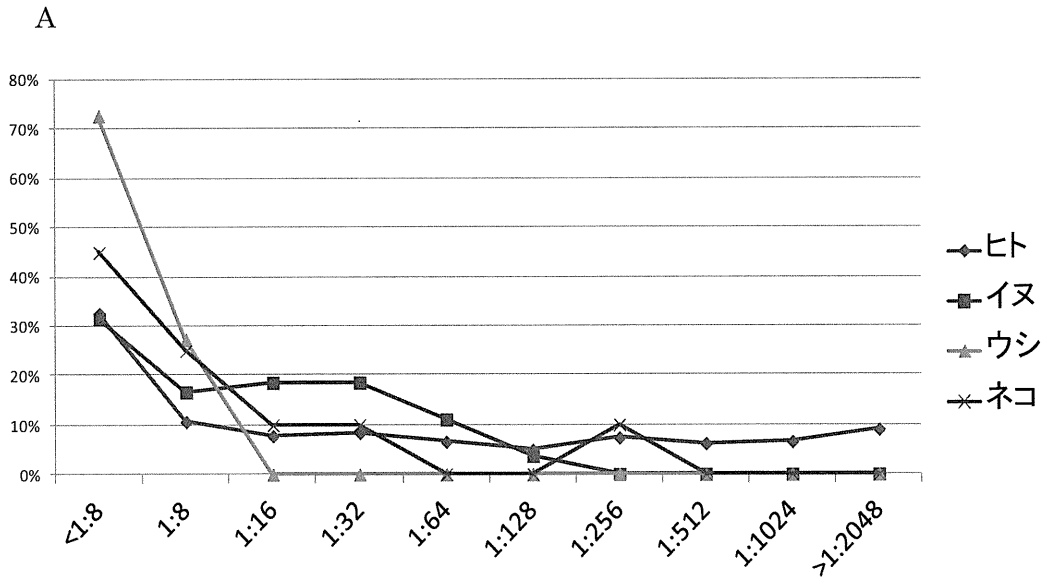


図1 検出された SAFV の分子系統樹

●は、今回の調査で検出された SAFV 株で、総て SAFV2 に分類された。また、検出株は FIN08-13B(FJ374267) 類似株 9 株と Can112051-06(AM922293)類似株 2 株に分類された。



B

	陰性(<math><1:8</math>)	陽性(>math>\geq 1:8</math>)	陽性検体の力価の幾何平均値
イヌ	17/488(31.5%)	37/488(68.5%)	22.8
ネコ	9/20(45.0%)	11/20(55.0%)	21.9
ウシ	16/22(72.7%)	6/22(27.3%)	8.0
ヒト	159/488(32.6%)	329/488(67.4%)	95.7

図2 動物の SAFV3 中和抗体保有状況

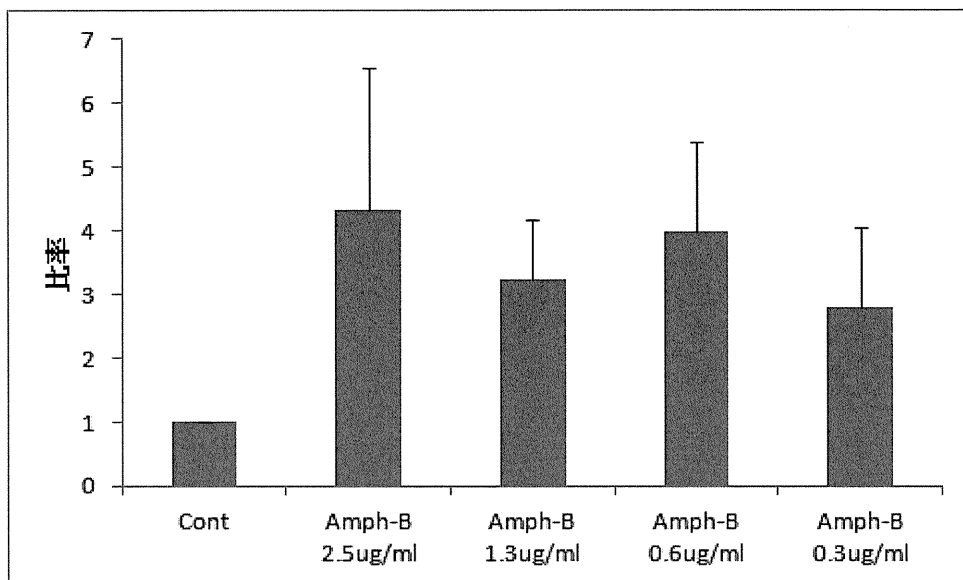
- A) 各動物における SAFV3 に対する中和抗体価の分布状況
 B) 各動物の SAFV3 中和抗体保有率及び陽性検体の力価の幾何平均値

		Sample	SAFV2 中和抗体価	SAFV3 中和抗体価	SAFV3 中和抗体価 ÷ SAFV2 中和抗体価	SAFV2 中和抗体価 ÷ SAFV3 中和抗体価
抗 SAFV2 血清	マウス	No. 1	4,069	8	-	509
		No. 2	16,384	64	-	256
		No. 3	8,192	64	-	128
		No. 4	8,192	8	-	1024
		No. 5	8,192	256	-	32
		No. 6	8,192	64	-	128
		No. 7	16,384	2,048	-	8
		No. 8	4,096	64	-	64
	幾何平均値		8185.2	69.8	-	117.3
	中央値		8,192.0	64.0	-	128.0
抗 SAFV3 血清	マウス	No. 1	256	4,096	16	-
		No. 2	512	4,096	8	-
		No. 3	512	8,192	16	-
		No. 4	16	8,192	512	-
		No. 5	64	4,096	64	-
		No. 6	256	2,048	8	-
		No. 7	128	8,192	64	-
	ウサギ	No. 1	32,768	65,566	2	-
		No. 2	16,384	32,768	2	-
	幾何平均値		474.0	8,192.4	17.3	474.0
	中央値		256.0	8,192.0	16.0	256.0
Normal	マウス	No. 1	<8	<8	-	-
		No. 2	<8	<8	-	-
		No. 3	<8	<8	-	-
		No. 4	<8	<8	-	-

表3 SAFV2 と SAFV3 間の免疫交差反応性

抗 SAFV2、抗 SAFV3 血清の SAFV2、SAFV3 に対する中和抗体価 及び 各中和抗体価の比を示す。

A



B

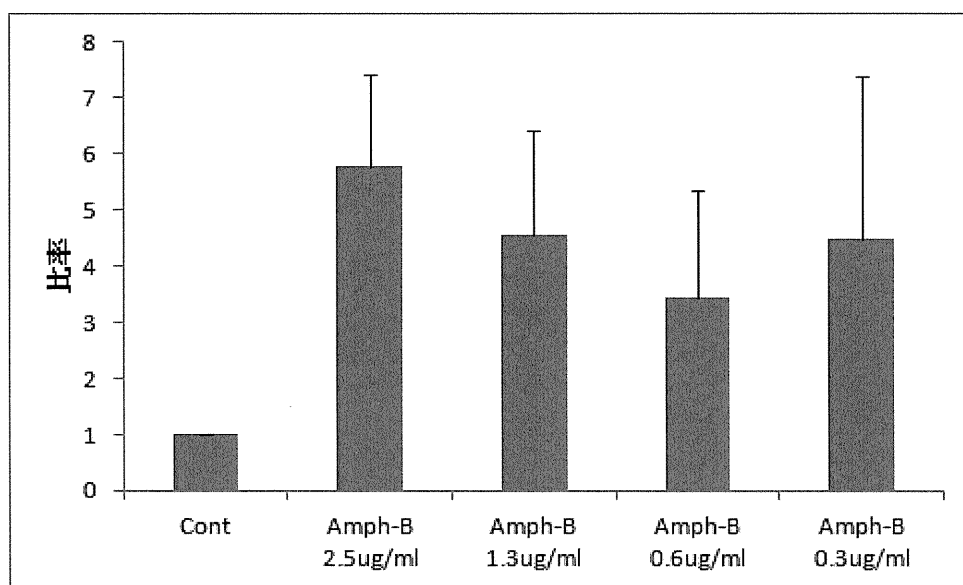


図3 アンホテリシン B(amph-B)を添加した場合の SAFV 力価の変化
 コントロール (アンホテリシンB無添加) の力価 (TCID₅₀/50ul) を1とした場合の各アンホテリ
 シンB添加群の力価の比 (各アンホテリシン添加群力価÷コントロール力価) (n=3)
 A)SAFV2の試験結果 B)SAFV3の試験結果

ヒトカルジオウイルス（Saffold ウイルス）の病原性解析〈第二報〉

協力研究者 大原義朗 金沢医科大学医学部 微生物学部門 教授
姫田敏樹 金沢医科大学医学部 微生物学部門 講師

研究要旨

ヒトカルジオウイルス (Saffold ウイルス, SAFV) は、2007 年の発見以来、世界各国において、呼吸器疾患、胃腸炎、手足口病様疾患、および、無菌性髄膜炎など、様々な臨床検体から検出されているが、その病原性は依然不明である。近年、動物実験により SAFV は神経向性を持つことが示され、神経疾患との関係が強く疑われている。

本研究では、SAFV の病原性を分子ウイルス学的に解析することを最終目的とし、昨年度作製した SAFV 感染性 cDNA クローンを利用し、リコンビネーションの検討および SAFV leader 蛋白の機能解析を行った。その結果、SAFV とマウスカルジオウイルスであるタイラーウイルス (TMEV) との間で、カプシド蛋白の組換えが起こる可能性は極めて低いことが示された。また、SAFV leader 蛋白は、TMEV leader 蛋白と同様、IFN 産生抑制能を有しており、ウイルスの増殖に重要な役割を担っていることが示唆された。

A. 研究目的

Saffold ウイルス (SAFV) は、ヒトを自然宿主とするカルジオウイルスとして 2007 年に原因不明の発熱患者の便から初めて分離され、その後、欧米およびアジア諸国において、呼吸器疾患、胃腸炎、手足口病様疾患、および、無菌性髄膜炎など、様々な臨床検体から検出されており、ヒトの間で広く伝播していることが示されている。SAFV は、マウスカルジオウイルスの代表であるタイラーウイルス (Theiler's murine encephalomyelitis virus, TMEV) と高い相同性を保持しており、TMEV がマウスに脱髄を起こすことから、SAFV と脱髄を含む神経疾患との関係が疑われていた。2008 年、高知県衛生研究所の細見らによる髄液から

の SAFV の分離は、SAFV の神経疾患への関与を示唆する貴重なデータのひとつとして注目された。さらに 2010 年、ベルギーの Michiels らが SAFV をマウス腹腔内に接種すると、ウイルス抗原が、中枢神経、心臓、脾臓において検出されることを報告したことから、SAFV の神経疾患への関与がより注目されるようになった。しかし、SAFV のヒトに対する神経病原性は依然不明である。

そこで本研究では、昨年度作製し報告した SAFV 感染性 cDNA クローンを基に、各ウイルス蛋白の変異体を作製することから、SAFV の病原性を分子ウイルス学的に解析することを目的とする。