

表 1. ベトナムの急性呼吸器感染症で入院した小児におけるウイルスの検出

| | 人数 | % |
|---------------------|---------------|-------------|
| 総患者数 | 1082 | 100 |
| ウイルス陽性 | 690 | 63.8 |
| ライノウイルス | 325 | 30.0 |
| RS ウイルス | 257 | 23.8 |
| パラインフルエンザウイルス 3 | 57 | 5.3 |
| パラインフルエンザウイルス 1 | 36 | 3.3 |
| インフルエンザウイルス A 型 | 35 | 3.2 |
| ボカウイルス | 34 | 3.1 |
| 他のウイルス* | 7~13 | 0.6~1.2 |
| 混合感染 | 98 | 9.1 |
| ライノウイルスと他のウイルスとの共感染 | 82/325 | 25 |
| ライノウイルスと RS ウイルス共感染 | 51 | |

* : 他のウイルスとはインフルエンザウイルス B 型、パラインフルエンザウイルス 2 と 4 型、ヒトメタヒューモウイルス、コロナウイルス 229E と OC43、アデノウイルスでの結果を示す。

雨季

乾季

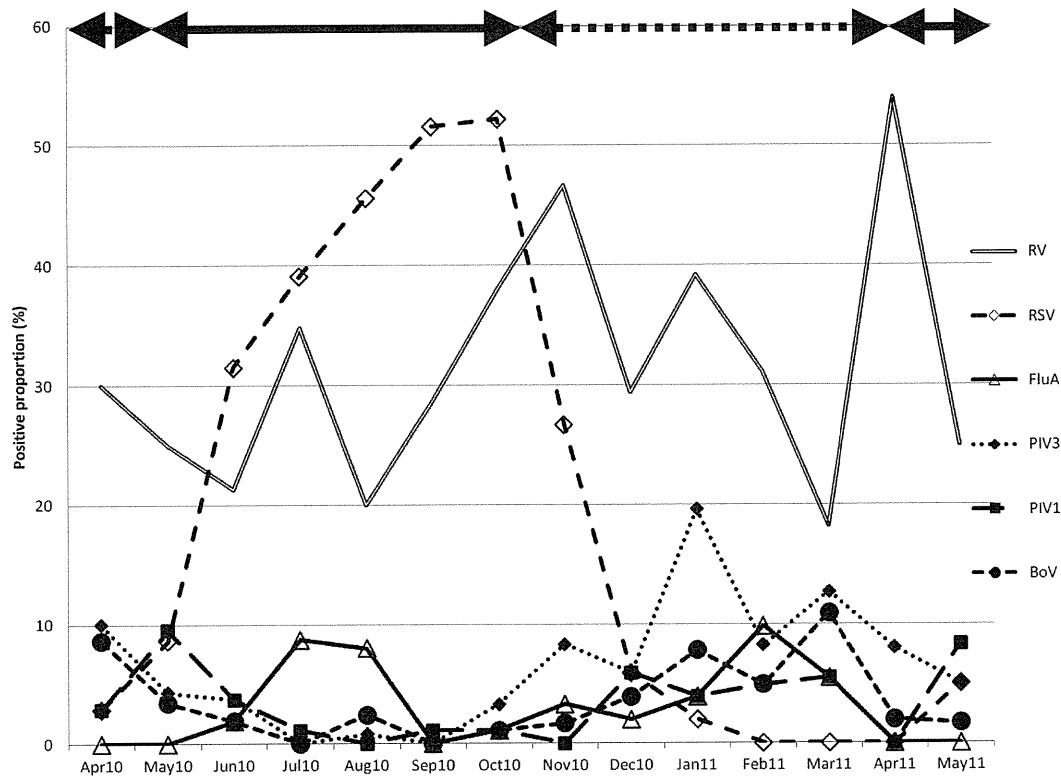


図1. 研究期間におけるヒトライノウイルス及び他の一般的な呼吸器感染ウイルス検出の季節性

表2. ヒトライノウイルスと他の病原体の臨床的特徴の比較

| Features (%) | RV n=243 | RSV n=198 | Flu A n=28 | PIV1 n=30 | PIV3 n=40 | BoV n=17 | p |
|-----------------------|-------------|--------------|---------------|--------------|--------------|-------------|-------|
| Fever | 50.6 | 74.7 | 92.9 | 90 | 72.5 | 64.7 | <0.05 |
| SpO2≤92% | 11.9 | 4.5 | 7.1 | 3.3 | 0 | 17.6 | <0.05 |
| Tachypnea | 42 | 42.9 | 60.7 | 56.7 | 32.5 | 47.1 | NS |
| LCI | 58 | 69.2 | 50 | 33.3 | 50 | 52.9 | <0.05 |
| Wheezing | 63.8 | 59.6 | 42.9 | 53.3 | 70 | 76.5 | <0.05 |
| Days bf. hos. (d)* | 3(1-5) | 2(2-4) | 3(2-4.5) | 2(2-6) | 2.5(1-3) | 3(1-3) | NS |
| URIs | 28 | 17.7 | 25 | 16.7 | 12.5 | 23.5 | <0.05 |
| Croup | 2.9 | 1 | 10.7 | 40 | 7.5 | 11.8 | <0.05 |
| Bronchiolitis | 34.2 | 44.9 | 14.3 | 13.3 | 45 | 17.6 | <0.05 |
| Pneumonia | 35 | 36.4 | 50 | 30 | 35 | 47.1 | NS |
| Hos. Duration (d)* | 5(3-8) | 6(4-8) | 5(4-10) | 5(4-7) | 5.5(4-7) | 7(4-9) | NS |

表3. 肺炎、細気管支炎患者から検出したライノウイルスとRSウイルスの割合

| | 乾季 | | | | 雨季 | | | |
|-------|------|-----|--------|------|------|------|--------|------|
| | RV | RSV | 他のウイルス | なし | RV | RSV | 他のウイルス | なし |
| 細気管支炎 | 31.5 | 5.4 | 28.9 | 34.2 | 19.4 | 33.5 | 18.5 | 28.6 |
| 肺炎 | 23.0 | 3.4 | 27.6 | 46.0 | 18.1 | 26.5 | 20.9 | 34.5 |

(%)

「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

1,2-diphenyl-6-isopropyl-3-methyl-1,4-dihydro-4-oxoquinoline (MRL-2471)
の抗ライノウイルス作用に関する分子解析

吾郷昌信 長崎県環境保健研究センター 保健科長
北川由美香、吉川 亮 長崎県環境保健研究センター

新規抗 HRV 剤 MRL-2471 の薬剤耐性ウイルスに見出されたアミノ酸置換を伴う変異を導入した cDNA クローンを作製し、作用部位の解析を行った。2B に Ser57Phe あるいは 3A に Cys73Ser の単独変異を導入したウイルスは何れも MRL-2471 に対して耐性を示したことから、これらの部位のアミノ酸が本薬剤の主要な作用部位であることが明らかとなった。変異導入ウイルスには、3A を主要な標的タンパク質とする enviroxime に対する交叉耐性は認められなかった。MRL-2471 に対する主要な薬剤感受性決定部位と考えられる HRV89 2B の 57 番目、3A の 73 番目に相当するアミノ酸が MRL-2471 の抗ピコルナウイルススペクトルを決定しているものと考えられる。以上の結果より、MRL-2471 の抗 HRV 効果における主要な標的タンパク質は 2B および 3A であり、2B の viroporine や 3A が関与すると考えられる replication complex の形成等を阻害することによりウイルス RNA 複製を特異的に阻害する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、ヒトライノウイルス (HRV) は、HRV-A~C の 3 つのグループに分類され、100 以上にも上る多数の血清型が存在する。HRV は冬期普通感冒の代表的な原因ウイルスとして知られ、その 50% が本ウイルスに因るものと考えられ、最近では喘息発作の要因としての重要性が指摘されている。中でも最近新たに分類された HRV-C に属するウイルスは、培養細胞での増殖、分離は困難と

され、重症性下気道炎との関連が示唆されている。

HRV には多数の血清型が存在することからワクチンによる予防は現実的に不可能であり、化学療法剤の開発が古くからおこなわれてきたが、有効な薬剤は未だ開発されていない。

1,2-diphenyl-6-isopropyl-3-methyl-1,4-dihydro-4-oxoquinoline (MRL-2471) は、丸石製薬(株)において多数合成したキノリン誘導体の中から見出された極めて選択性

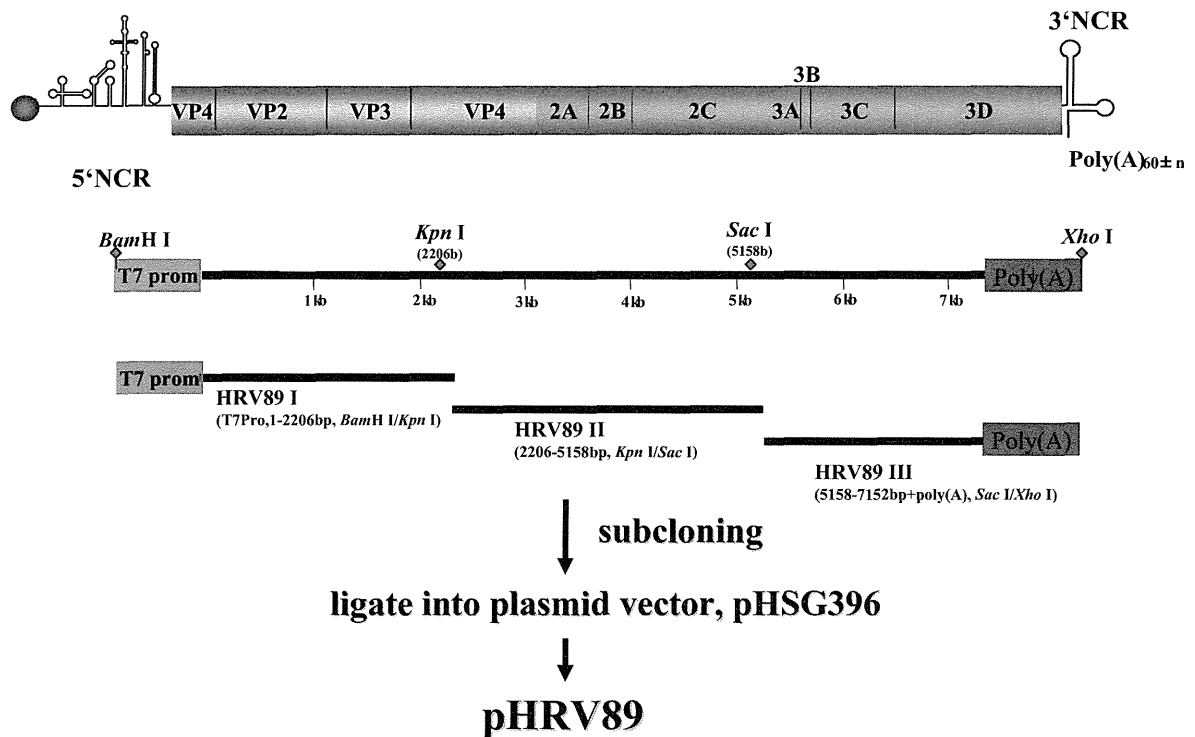


Fig. 1. Construction of HRV89 cDNA clone

の高い抗 HRV 活性を有する新規抗 HRV 剤である。本薬剤には吸着侵入過程の阻害作用はなく、主としてウイルス複製の

また、HRV89 を本薬剤存在下で継代することにより得られた耐性ウイルスのうち、非構造タンパク質 2B (S57F) あるいは 3A (C73S) に単独の変異を有するウイルスが多数見出されたほか、2B (S57F9)、3A (M50L) および 3D (N113D) の 3 か所に変異を併せ持つものが見出されたことから本薬剤はこれらの非構造タンパク質に作用していることが推定された。

今回、MRL-2471 の薬剤耐性ウイルスに見出されたアミノ酸置換を伴う変異を導入した cDNA クローンを作製して reverse genetics を行うことにより作用部位の解析及び検証を行った。

初期過程、なかでもウイルス RNA 複製を顕著に阻害することが明らかにされている。

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-2471、2-amino-1-(isopropylsulfonyl)-6-benzimidazole phenyl ketone oxime (Enviroxime) および WIN54954 を使用した。MRL-2471 は 5 mg/ml になるようにメタノールに溶解させ、ストック液として使用するまで -20 °C で保存した。また、Enviroxime 及び WIN54954 は、それぞれ DMSO に 10 mg/ml になるように溶解させ、ストック液として使用するまで -20 °C で保存した。何れも用時メディアウムで所定濃度に希釈して使用した。

細胞とウイルス

宿主細胞には HeLa (Ohio)細胞を使用

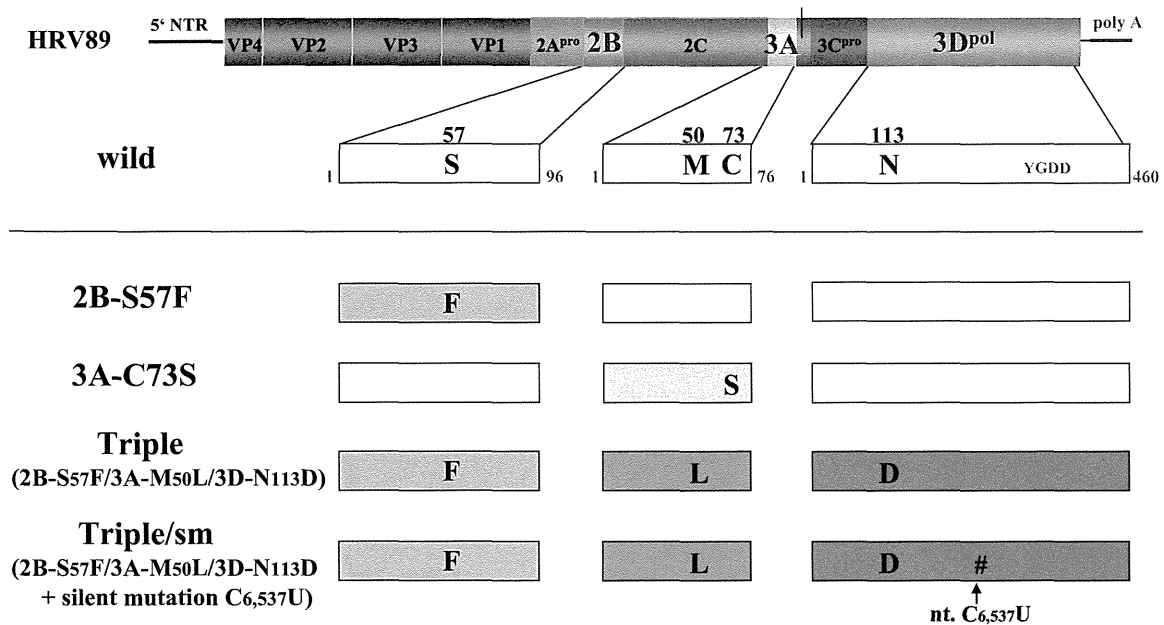


Fig. 2. Schematic diagram illustrating the locations of mutations introduce into cDNA clone of HRV89.

した。
HRV はプラーク純化した HRV89 標準株 (41467 Gallo) ならびにこれを薬剤存在下で継代し、増殖してきたウイルスをプラーク純化して得られた MRL-2471 耐性ウイルス R05206 (2B-S27F)、R05302 (3A-C73S) 及び R1209 (Triple/sm) を使用した。これらのウイルスはそれぞれ HeLa (Ohio) 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、プラーク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

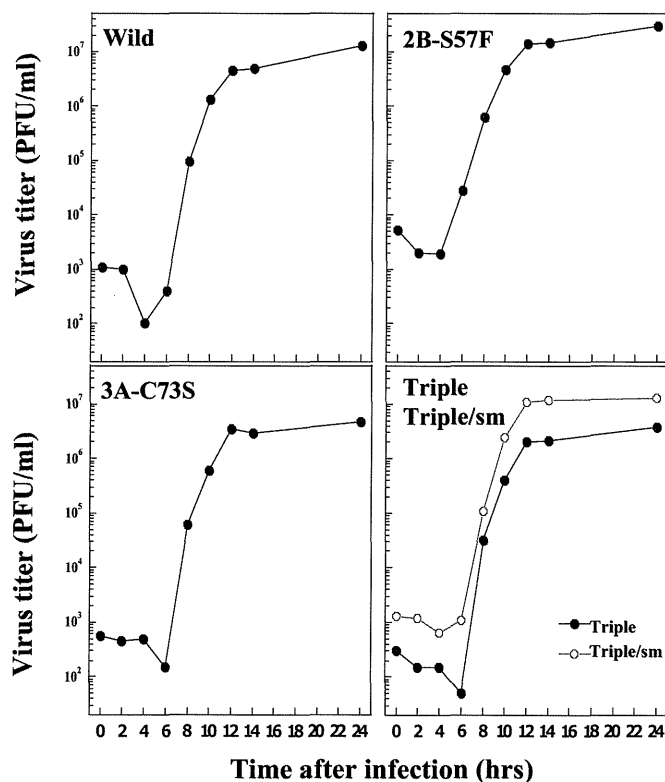
用メディウム (10%FCS 加 Eagle MEM) を除去し、段階希釈した MRL-1237 を含む維持メディウム (非働化 2%FCS 加 Eagle MEM)、あるいは含まない維持メディウムを 50 μ l/well 添加後、維持メディウムで希釈して 2×10^4 PFU/ml に調整したウイルス液を 50 μ l/well (10^3 PFU/well) 接種して攪拌後 37°C で培養した。MRL-2471 を含まないメディウムを加えたウェルの細胞が 90% 以上 CPE を示した時点 (感染後 4 日) で、薬剤によるウイルス増殖 (細胞死) の阻害を MTT 法により測定し、ウ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_{50} 値) を求めた。同時に MRL-1237 の宿主細胞に対する毒性 (CC_{50} 値) を同様の方法で算出した。

| Virus | Virus titer (PFU/ml) | | (B)/(A) |
|----------------------------|-------------------------|----------------------------|---------|
| | (A) without MRL-2471 | (B) MRL-2471(0.5 mg/ml) | |
| HRV89 | 1.1×10^8 | 4.6×10^4 | 0.00042 |
| Wild | 1.8×10^7 | 2.0×10^3 | 0.00011 |
| HRV89 R05206 (2B-S57F) | 5.1×10^4 | 3.8×10^4 | 0.75 |
| 2B-S57F | 1.6×10^7 | 1.2×10^7 | 0.75 |
| HRV89 R05302 3A(C73S) | 5.0×10^3 | 4.3×10^3 | 0.86 |
| 3A-C73S | 1.9×10^7 | 1.4×10^7 | 0.74 |
| HRV89 R1209 (Triple/sm) | 2.1×10^3 | 1.9×10^3 | 0.90 |
| Triple/sm | 2.1×10^7 | 1.9×10^7 | 1.0 |
| Triple | 4.8×10^7 | 3.4×10^7 | 0.71 |

遺伝子解析

Isogen-LS (ニッポンジーン) を用いてウ

Table 1. Confirmation of mutations in HRV89.



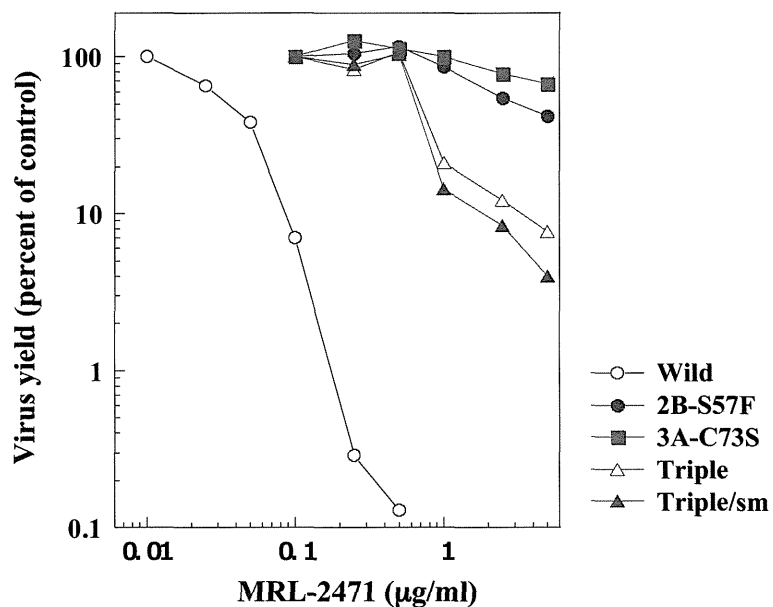
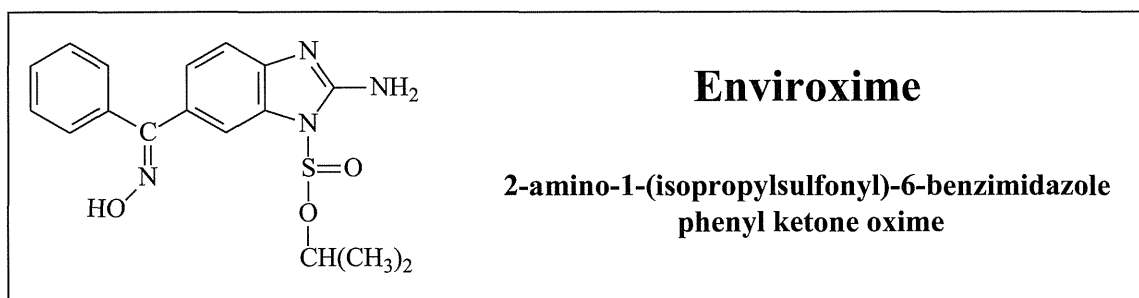


Fig. 4. Drug susceptibility of HRV89 mutant clones (Yield reduction assay)



| Mutant | IC50 (mg /ml) | |
|-----------|---------------|-----------|
| | Enviroxime | WIN-54954 |
| Wild | 0.054 | 0.0089 |
| 2B-S57F | 0.055 | 0.0087 |
| 3A-C73S | 0.099 | 0.0092 |
| Triple | 0.054 | 0.0068 |
| Triple/sm | 0.062 | 0.0078 |

Table 3. Effect of Enviroxime on the replication of HRV89 mutant clones

イルスストック液 0.25 ml から genomic RNA を抽出し、RT-PCR で増幅した後、PCR産物を ABI 3130 genetic analyser で解析し、全塩基配列を決定した。

HRV89 感染性 cDNA クローンおよび部位突然変異

HRV89 (41467 Gallo) 感染性 cDNA クローンを Fig.1 に示すように構築し、使用した。感染性 cDNA クローンを鋳型と

C. 研究結果および考察

cDNA クローンに由来する Wild 及び耐性変異導入ウイルスの MRL-1237 に対する薬剤感受性をそれぞれの親株と比較した (Table 1)。その結果、何れも親株と同等の感受性を示すことが明らかとなった。さらに、2B (S57F)、3A (M50L) および 3D (N113D) の 3 か所に変異を併せ持つ R1209 (Triple/sm) は、6,537 番目の C が U に置換した同義置換が存在したため、これを除去した 3 箇所のアミノ酸変異のみを有する変異導入ウイルス Triple も作製したが、Triple/sm とほぼ同程度の感受性を示したことから、この同義置換は、耐性獲得には無関係であるものと推定された。また、cDNA クローンから作製した HRV89 及び薬剤耐性株の増殖性状を一段増殖曲線で比較したところ、何れも一段増殖に要する時間は野生株と同じ 12-14 時間であり、増殖性には大差は認められなかった (Fig. 3)。

さらに、これらの変異導入ウイルスの MRL-2471 に対する耐性程度を yield reduction 法により詳細に比較した。すなわち、各ウイルスを m.o.i.=5-10 PFU/cell で感染させ、種々の濃度の薬剤存在下で 14 時間増殖させた後、harvest してウイルスの増殖量をプラーク法により測定した。

して *in vitro* transcription により RNA を合成し、HeLa (Ohio) 細胞にトランスフェクションしてウイルス (Wild) を回収した。さらに、この感染性 cDNA クローンを基に、PCR を用いた部位突然変異法により所定の変異を導入して得られた変異体 cDNA クローンを作製し (Fig. 2)、Wild と同様の方法で変異導入ウイルスを回収した。

薬剤非存在下におけるウイルス収量を 100 として各濃度における収量の減少曲線を描き MRL-2471 に対する耐性程度を比較した (Fig. 4) ところ、Wild の IC₅₀ 値が約 0.04 µg/ml であったのに対し、2B あるいは 3A に単独変異を有する 2B-S57F あるいは 3A-C73S が最も耐性を示し、供試最高濃度の 5.0 µg/ml でも 50% 未満の増殖阻害しか受けなかった。一方、2B、3A および 3D の 3 か所の変異と C6,537U の同義置換を導入した Triple/sm 及びこれらから C6,537U の同義置換を除いた Triple は、Wild と比較すると明らかな耐性を示したが、2B-S57F あるいは 3A-C73S より耐性程度は明らかに減弱していた。Triple/sm 及び Triple には 2B-S57F と同じ 2B の位置に変異を有するものの、3A 内の変異は 3A-C73S とは異なる部位の M50L の変異であり、3D ポリメラーゼ内にも N113D の変異も併せ持つことから 2B の強力な耐性変異を 3A 及び 3D の変異が打ち消している可能性が示唆された。これらの変異は、MRL-2471 存在下でウイルスが安定に複製するために必要な変異であると思われるが、その意味に関しては、今のところ不明である。

非構造タンパク質 3A に作用する薬剤として enviroxime が知られている。本薬

剤は、ウイルス非構造タンパク質と宿主 因子によって形成される replication

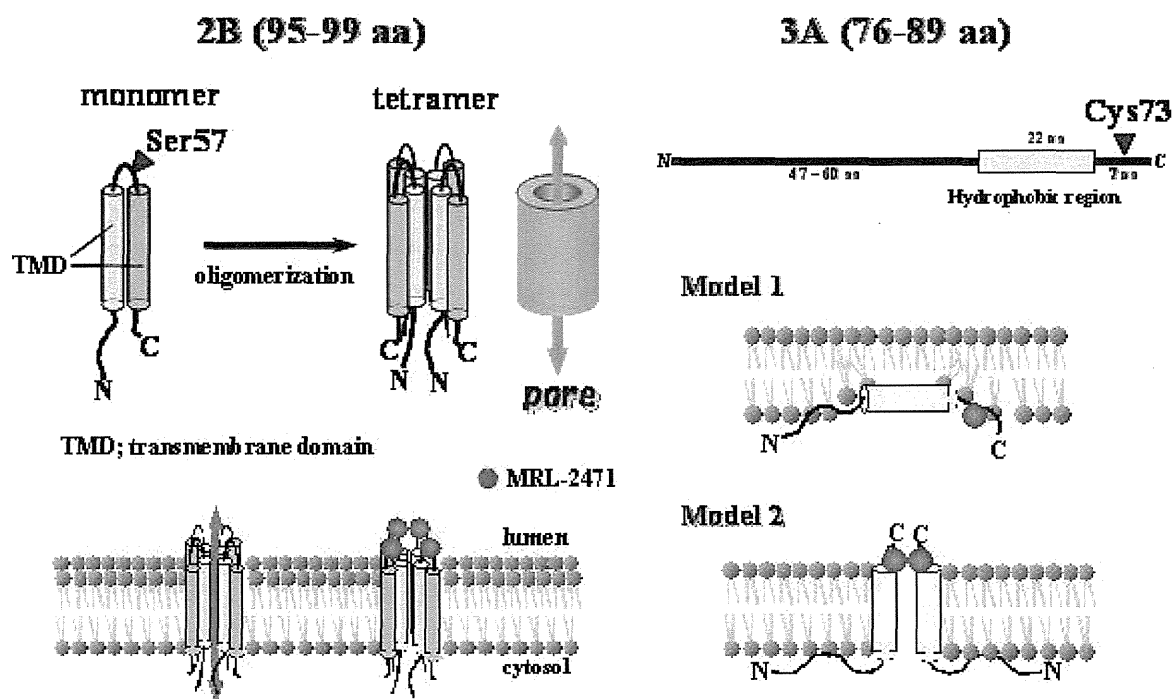


Fig. 5. Structural model of picornavirus 2B and 3A.

| | 2B (95-99 aa) | | | IC ₅₀ (μg/ml) | 3A (76-89 aa) | |
|------------|---------------|----------|-------|--------------------------|---------------|---------|
| | 30-31 aa | 23-26 aa | 5 aa | | 47-60 aa | 22 aa |
| Polio | LVIIIT | RNYED | TTTVI | >5 | VVYVMY | KLFAGHQ |
| CVBs | LVIVV | RNHDD | LITVT | >5 | IIYIIY | KLFAGFQ |
| ECHO 6, 11 | LVIVV | RNHDD | LITVT | >5 | IIYIIY | KLFAGFQ |
| CVA 9 | LVIVV | RNHDD | LITVT | >5 | IIYIIY | KLFAGFQ |
| CVA 21 | LVIVV | RNYED | TTTII | >5 | VVYVMY | KLFAGQQ |
| EV 70 | MVIVI | RNSED | IVTVT | >5 | VVYVIY | KLFAGIQ |
| HRV 14 | LVIIC | RNHDD | LITVT | >5 | IVYVIY | KLFAQTG |
| HRV 1A | MVIII | RNSSD | PQTII | 0.32 | IIFVIY | KLFCSLQ |
| HRV 1B | MVIII | RNSSD | PQTII | 0.21 | IIFVIY | KLFCTLQ |
| HRV 2 | MVIII | RNSSD | PQTIL | 0.029 | IIYVIY | KLFCTLQ |
| HRV 16 | MVIII | RNSSD | PQTII | 0.083 | IIYIIY | KLFCSLQ |
| HRV 49 | MVIII | RNSSD | PQTII | 0.062 | VIYIIY | KLFCTLQ |
| HRV 89 | MIIMV | RNSSD | PQTVI | 0.046 | VIYIIY | KLFCTLQ |

Fig. 6. Sequence alignment of human enteroviruses 2B and 3A protein sequence.

complex において構成タンパク質の一つである 3A と宿主因子である PI4KIII B との結合を妨げることによりウイルス複製を阻害しているものと推定されている。また、HRV に対する enviroxime の主要な作用部位は、30 番目のアミノ酸であると考えられている。そこで、3A-C73S が enviroxime に対しても交叉耐性を示すか否かについて検討したところ、ウイルス粒子に結合して粒子を安定化して脱殻を阻害する WIN64954 と同様、enviroxime に対しても Wild 及び 2B-S57F、Triple/sm、Triple と同程度の感受性を示した (Table 2.)。以上の結果は、MRL-2471 は、enviroxime とは明らかに 3A の異なる部位に作用し、異なる機序で replication complex の形成等を阻害していることを示唆する (Fig. 5)。詳細を明らかにするためには、さらなる検討が必要である。

MRL-2471 の主要な標的タンパク質と考えられる非構造タンパク質 2B は、4 量体を形成して小胞体膜に貫通し、viroporine と呼ばれる pore 構造を形成し、Ca²⁺イオンチャンネルとして機能することが Kuppeveld ら及び Carrasco らによって明らかにされた。Fig. 5、6 に示すように 2B は中央部の約 5 残基からなるヒンジ部を挟んで N 末端側、C 末端側に 21-26 残基の疎水性アミノ酸からなるドメイン構造が膜貫通ドメインと考えられ 4 量体を形成することで pore になるものと思われる。この推定構造モデルにおいて、2B 上に明らかにされた S57F の耐性変異は驚くべきことにヒンジ部に位置する可能性が強く示唆された。すなわち、MRL-2471 は、Ca²⁺イオンチャンネルとして機能する 2B viroporine のルーメン側に位置するヒンジ部の S 残基と強く結合

することにより Ca²⁺イオンの流れを妨げることにより抗 HRV 効果を発揮しているものと考えられる。これまで見出された抗 HRV 剤とは全く異なる 2B を標的とする新規抗 HRV 剤 MRL-2471 の今回提唱した極めて興味深い作用機序の仮説を証明するためにはさらなる研究が必要である。

今回証明した耐性獲得に関与する HRV89 の 2B 及び 3A の部位は、それぞれ 57 番目及び 73 番目のアミノ酸残基であった。これらのアミノ酸周辺の配列を MRL-2471 が全く増殖阻害効果を示さないヒトエンテロウイルス (HEV) と強い感受性を示す HRV について、alignment してみたところ、HEV 及び HRV の中でも数少ない非感受性の HRV14 における 2B の S57 に該当する部位はすべて E か D であった。さらに、3A でも 73 番目の残基は、感受性を示す HRVs ではすべて C、非感受性グループは、すべて A であった (Fig. 6) ことから、これらの部位に位置するアミノ酸残基は、本薬剤の抗ウイルススペクトルを決定する最も重要な部位であると考えられる。因みに、最近新たに分類された重症性下気道炎との関連が示唆されている HRV-C に属するウイルスにおける、それぞれの部位に位置するアミノ酸残基の大部分はそれぞれ S、C であったことから、培養細胞での培養が困難であることから実際の評価はできないが、おそらく HRV-C の大半にも有効であると推定される。

D 結論

新規抗 HRV 剤 MRL-2471 の HRV における主要な作用部位は非構造タンパク質 2B の S57 あるいは 3A の C73 に相当する

アミノ酸残基である。

研究発表

1. 論文発表
なし.
 2. 学会発表
- (1) 久保 亨、吾郷昌信、森内浩幸、森田公一：エンテロウイルス 71 に対する RT-LAMP 法を用いた迅速診断系の開発とその臨床応用に関する研究. 第 86 回日本感染症学会総会. 長崎、2012 年 4 月
 - (2) 吉川 亮、徳田昌紘、池田秀樹、山口顕徳、北川由美香、鍋島武、井上信吾、森田公一、吾郷昌信：2010、2011 年に長崎県で発生した日本脳炎に関

する疫学解析. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪、2012 年 11 月

- (3) 久保 亨、吾郷昌信、森内浩幸、西村秀一、森田公一：エンテロウイルス 71 に対する RT-LAMP 法を用いた迅速診断系の開発とその臨床応用に関する研究. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪、2012 年 11 月

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
小児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)、および各疾病に関連する中枢神経系 (CNS) 合併症による小児入院症例について臨床疫学特性を把握するため、全国調査 (2010 年分) を実施した。

一次調査結果から患者数の推計を行った。また、二次調査で詳細情報を得た症例については、以下の 3 群に分類して、CNS 合併症の関連因子を検討した; No complication 群 (HFMD あるいは HA のみの診断) 145 例、Complication 群 (HFMD/HA の有無に拘わらず、CNS 合併症あり) 161 例、Severe complication 群 (HFMD/HA の有無に拘わらず、無菌性髄膜炎以外の CNS 合併症あり) 27 例。Complication 群と Severe complication 群の臨床疫学特性を No complication 群と比較した。また logistic regression model を用いて、「Complication あり」、「Severe complication あり」に対する各特性のオッズ比 (OR) および 95%信頼区間 (CI) を算出した。

2010 年の HFMD 流行期であった、4 月 1 日～9 月 30 日の入院患者数は、3,500 人 (95%信頼区間: 1,350 - 7,200) と推計された。CNS 合併症の関連因子を検討した結果、「Complication あり」に対する「入院時の発熱 $\geq 39^{\circ}\text{C}$ 」の OR (95%CI) は 2.07 (1.00-4.28)、「Severe complication あり」に対する「高血糖」の OR (95%CI) は 10.6 (1.63 - 68.5)、「白血球増多」の OR (95%CI) は 2.36 (0.61 - 9.17) であった。また、「CRP 高値」と CNS 合併症の負の関連が示され、OR (95%CI) は「Complication あり」に対して 0.25 (0.13-0.47)、「Severe complication あり」に対して 0.23 (0.07-0.69) であった。

A. 研究目的

1990 年代後半より、西太平洋地域で、手足口病 (HFMD)、ヘルパンギーナ (HA)、およびエンテロウイルス (EV) のうち特に 71 型 (EV71) 感染によると考えられる中枢神経系 (CNS) 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¹⁻¹⁶⁾。しかし、過去の研究で使用されている症例定義は統一されたものではない。今般、世界保

健機関西太平洋地域事務局 (WPRO) 刊行の "A Guide to Clinical Management and Public Health Response for Hand Foot Mouth Disease (HFMD)"¹⁷⁾により、HFMD、HA、および各疾病に関連する合併症として CNS 合併症の症例定義 (以後、WPRO 定義) が提唱された。

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、散発的な発生例¹⁸⁻²¹⁾や、1998年に旧厚生省が実施したサーベイランスに基づく症例²²⁾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²³⁻²⁴⁾。しかし、EV感染の重症例では、必ずしもHFMD・HA特有の発疹や水疱といった症状が発現するわけではない¹⁹⁾。また、これまでに当該重症例について諸外国と比較可能な形で情報を収集した調査はない。

今回、我々は、症例の適格基準として、WPRO定義を用いて、HFMD・HA、および関連CNS合併症の小児入院症例に関する全国調査を行った。一次調査結果から流行期の入院患者数を推定した。また、二次調査結果からは、臨床疫学像を把握し、さらにCNS合併症に関連する因子を検討した。

B. 研究方法

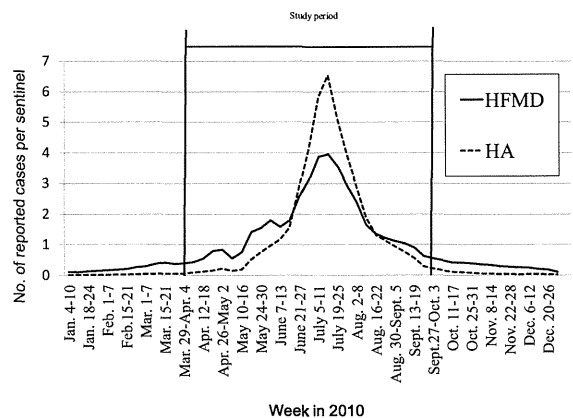
厚生労働科学研究費補助金・難治性疾患克服研究事業「特定疾患の疫学に関する研究班」が作成した「難病の患者数と臨床疫学像把握のための全国疫学調査マニュアル第2版」²⁵⁾に沿って実施した。当該マニュアルは、難病を対象疾患として作成されたものであるが、他疾患であっても、患者数が少なく受療が大規模施設に偏る傾向がある場合は応用可能な手法である。調査は、一次調査および二次調査からなる。

1. 対象 適格基準

以下の基準を全て満たす者：①2010年4月1日～9月30日の間に入院、②入院時15歳未満の日本人、③WPRO定義(資料1)、に1つでも合致。①に示す期間は2010年におけるHFMD・HAの流行期であり、「EV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・HAの疾病サーベイランス結果を基に決定

した(図1)。

図1. 対象期間の設定 (引用:国立感染症情報センター)



調査対象診療科

全国の病院小児科から病床規模別に層化無作為抽出法で選定した。全国の病院小児科の名簿は、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)」²⁶⁻³¹⁾を使用した。抽出率は、100床未満: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%である。

2. 情報収集

一次調査

2011年1月、ハガキ調査票およびWPRO定義を対象診療科に送付し、適格基準に合致する対象症例の有無を調査した。「対象症例あり」の場合は症例数・死亡数の情報を収集した。返信が確認できなかった診療科については、2011年3月に再依頼を行った。

二次調査

一次調査で「症例あり」の回答を得た診療科に対して、2011年6月、WPRO定義および調査個人票を送付した。担当医に、症例に関する情報を診療録から調査個人票に転記する作業を依頼した。なお、以下の基準を満たす者については報告症例に含めないよう依頼した：①「EV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」、②「病原体は明らかではないが、EV感染以外の病因であると担当医が判断した症例」。収集した情報は以下の通りである：性、年齢、基

礎疾患、入院時情報(診断名、症状、血液検査結果)、症状初発日($\geq 37.5^{\circ}\text{C}$ の発熱、発疹・水疱、中枢神経症状)、髄液検査結果、病原検索結果、治療内容、転帰、など。返信が確認できなかった診療科については、2011年8月に再依頼を行った。

3. 解析

一次調査結果による患者数推計

患者数の推計式に関する詳細は、難病マニュアルに掲載されている。さらに、二次調査で除外された症例の割合を加味するために、推計数の追加修正を行った。

二次調査結果による臨床疫学特性の把握、および CNS 合併症関連因子の検討

二次調査で情報を得た症例を、以下の3群に分類した：No complication 群 (HFMD あるいは HA のみの診断)、Complication 群 (HFMD/HA の有無に拘わらず、CNS 合併症あり)、Severe complication 群 (HFMD/HA の有無に拘わらず、無菌性髄膜炎 (AM : Aseptic Meningitis) 以外の CNS 合併症あり)。臨床疫学特性、および CNS 合併症関連因子の検討ともに、Complication 群、Severe complication 群の各々を No complication 群と比較した。

臨床疫学特性の比較には、 χ^2 検定、Fisher の直接確率検定、Wilcoxon の順位和検定を使用した。CNS 合併症関連因子の検討には、logistic regression model を用いて、「Complication あり」あるいは「Severe complication あり」に対する各特性のオッズ比 (OR) および 95%CI を算出した。多変量解析では、単変量解析で P 値が 0.1 未満であった因子、および CNS 合併症との関連が考えられる因子をモデルに含めた。多変量モデルに含めた因子は以下の通りである：性、年齢 (<1.0、1.0 - 4.9、 ≥ 5.0 歳)、基礎疾患、入院時の発熱 $\geq 39.0^{\circ}\text{C}$ 、白血球増多 (白血球数 $\geq 15,000/\text{mm}^3$)、高血糖 (血糖値 $\geq 8.3\text{mmol/L}$)、CRP 高値 (CRP 値 $\geq 0.30\text{mg/dL}$)。

検定は両側検定で行い、有意水準は 5%とした。

解析には SAS Ver. 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いた。

(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本研究用に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え 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. 推計入院患者数

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 (回答率 68.6%) から回答を得た。「症例あり」と回答した 125 科より 1,094 例 (うち死亡 5 例) の入院症例数が報告された。二次調査では、85 診療科から 365 例について情報を得た (回答率 68%)。

二次調査にも回答した 85 科からは、一次調査で

526 例の報告を得ているため、担当医が二次調査回答時に除外した症例は 161 例と考えられる。さらに二次調査票の回答内容を検討した結果、適格基準に合致しないと考えられた 13 例をあわせると、除外症例は 174 例となった。除外割合 (174/526、33%) を考慮した結果、調査対象期間である 2010 年 4 月 1 日～9 月 30 日の入院患者数は、3,500 人 (95%CI : 1,350-7,200) と推定された (表 1)。

表1. 推計入院患者数

| 病床規模 | 推計患者数 | 95%信頼区間 |
|---------|-------|-------------|
| 99以下 | 1197 | 251 ~ 2143 |
| 100~199 | 307 | 96 ~ 518 |
| 200~299 | 248 | 120 ~ 378 |
| 300~399 | 1129 | -710 ~ 2969 |
| 400~499 | 270 | 121 ~ 417 |
| 500~599 | 280 | 46 ~ 514 |
| 大学病院 | 64 | 22 ~ 106 |
| 計 | 3496 | 1345 ~ 7201 |
| 計 (丸め値) | 3500 | 1350 ~ 7200 |

2. 臨床疫学特性、および CNS 合併症関連因子の検討

二次調査で報告され、回答内容から適格基準を満たすと考えられた 352 症例のうち、46 症例が、「HFMD あるいは HA に加えて、WPRO 定義に合致しない非特異的な診断」を有していた。これら 46 症例を除外し、306 例を解析対象とした。各群の内訳は、No complication 群 145 例、Complication 群 161 例、Severe complication 群 27 例である (図 2)。Severe complication 群の内訳は、脳幹脳炎 3 例、脳炎 12 例 (含：急性散在性脳炎 1 例)、急性弛緩性麻痺 2 例、心肺機能不全 2 例、小脳失調 7 例、意識障害を伴うけいれん重積・1 例であった。このうち、小脳失調 (7 例)、および意識障害を伴うけいれん重積 (1 例) は WPRO 定義に記載のない合併症である。解析対象に含めた理由は以下の通りである。小脳失調に関しては、EV71 感染による脳幹脳炎症例を検討した過去の研究で、これら症例が前駆症状として Cerebellar sign を呈していた

と報告されている³³⁾。意識障害を伴うけいれん重積の 1 例については、鼻腔スワブ検体から EV71 が検出された。

図2. 解析対象

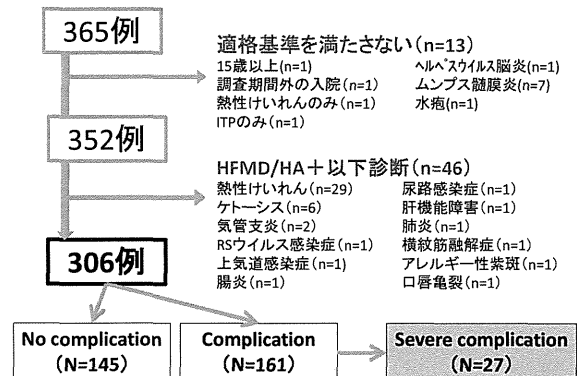


図 3 に、年齢分布を示す。5 歳未満の割合は、No complication 群 : 84%、Complication 群 : 59%、Severe complication 群 : 85%であった。

図3. 年齢分布

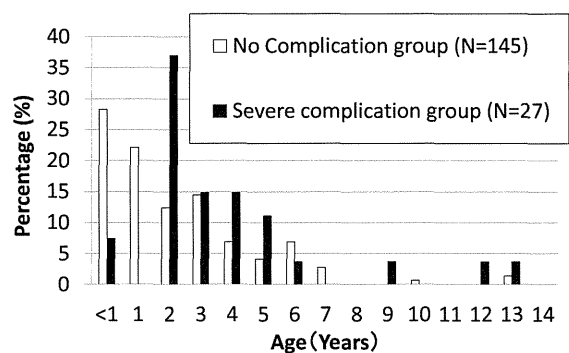
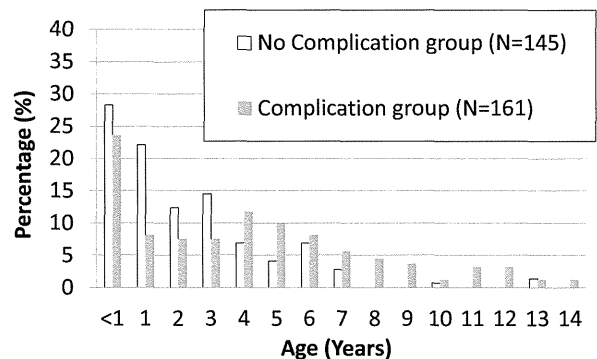


表 2 に、基本特性、および転帰を示す。男児の割合は、Complication 群 : 67%、Severe complication

群：69%であり、No complication 群（48%）と比較して高かった。Complication 群と Severe complication 群では、入院時に HA の診断を有する症例が少なかった。後遺症ありの症例、および死亡例は、No complication 群で認めなかった。

表2. 基本特性・転帰

| 項目 | No complication (N=145) | Complication (N=161) | P値 ^a | Severe complication (N=27) | P値 ^a |
|-----------|-------------------------|----------------------|-----------------|----------------------------|-----------------|
| 男児 | 70 (48) | 108 (67) | <.001 | 18 (69) | .05 |
| 年齢(歳) | 2 (0 - 14) | 4 (0 - 15) | <.001 | 2 (0 - 14) | .30 |
| 基礎疾患あり | 31 (22) | 27 (17) | .30 | 5 (19) | .72 |
| 入院時診断 | | | | | |
| HFMD | 77 (52) | 60 (37) | <.001 | 12 (44) | <.001 |
| HA | 68 (48) | 4 (3) | | 0 | |
| HFMD/HAなし | 0 | 97 (60) | | 15 (56) | |
| 発熱～入院(日) | 1 (-1-11) | 1 (-1-30) | .64 | 2 (0-30) | .17 |
| 入院期間(日) | 3 (1-11) | 5 (0-91) | <.001 | 7 (2-91) | <.001 |
| 転帰 | | | | | |
| 転院 | 1 (1) | 3 (2) | .30 | 2 (7) | <.001 |
| 後遺症あり | 0 | 1 (1) | | 1 (4) | |
| 死亡 | 0 | 2 (1) | | 2 (7) | |

表中の数値はn (%) または中央値 (範囲)

^a No complication群とComplication群の比較

^b No complication群とSevere complication群の比較

^c 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 3 に、入院時の血液検査結果を示す。No complication 群と比較すると、Complication 群と Severe complication 群における血糖値は有意に高く、Severe complication 群に関してはクレアチンキナーゼ (CK) の値も高かった。一方、C-reactive protein (CRP) の値は、Complication 群と Severe complication 群で有意に低かった。さらに、Complication 群における白血球数は有意に低いという結果を得た。

表3. 入院時の血液検査結果

| 項目 | No complication (N=145) | Complication (N=161) | P値 ^a | Severe complication (N=27) | P値 ^a |
|-------------------------|-------------------------|----------------------|-----------------|----------------------------|-----------------|
| 白血球数(/mm ³) | 11200 (2600-31100) | 9700 (2700-22780) | .03 | 10440 (4100-22780) | .73 |
| 血糖値(mmol/L) | 5.1 (1.8-11) | 5.5 (3.2-24.3) | .01 | 6.1 (3.2-24.3) | .003 |
| 総たんぱく(g/dL) | 7.0 (5.6-7.9) | 7.1 (4.7-8.6) | .18 | 6.8 (8.7-16.1) | .26 |
| AST (U/L) | 12.1 (9.1-18.3) | 12.7 (8.7-20.2) | <.001 | 12.3 (8.7-16.1) | .13 |
| ALT (IU/L) | 16 (6-201) | 14 (2-478) | <.001 | 14 (6-75) | .32 |
| CRP(mg/dL) | 0.8 (0.0-14.9) | 0.2 (0.0-11.5) | <.001 | 0.3 (0.0-5.4) | <.001 |
| CK(IU/L) | 79 (10-316) | 71 (15-968) | .44 | 116 (80-877) | .004 |

表中の数値は中央値 (範囲)

^a No complication群とComplication群の比較

^b No complication群とSevere complication群の比較

表 4 に、病原検索の結果を示す。検索実施の割合は No complication 群で顕著に低かった (7%)。

表4. 病原検索結果

| | No complication (N=145) | Complication (N=161) | Severe complication (N=27) |
|----------|-------------------------|----------------------|----------------------------|
| 検索あり | 10 (7) | 87 (54) | 16 (75) |
| うち結果陽性 | 8 | 47 | 12 |
| うちEV71陽性 | 5 | 11 | 5 |

表中の数値はn(%)

表 5 に、「Complication あり」に対する各因子の OR および 95%CI を示す。正の関連を認めた因子は、「男児」、「年齢：≥5 歳 (Reference:<1 歳)」、「入院時の発熱≥39°C」であった。また、「CRP 高値」は負の関連を示した。

表5. 「Complication あり」に対する各因子のOR (95%CI) (Complication群をNo complication 群と比較)

| 因子 | Crude | Multivariate* |
|------------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 男児 | 2.18 (1.37-3.47) | 2.55 (1.39-4.68) |
| 年齢[歳] (Ref.: <1.0) | | |
| 1.0-4.9 | 0.76 (0.44-1.32) | 0.63 (0.30-1.29) |
| ≥5.0 | 3.14 (1.65-6.01) | 2.80 (1.23-6.42) |
| 基礎疾患 | 0.76 (0.41-1.30) | 0.77 (0.35-1.69) |
| 入院時の発熱 ≥39°C | 1.34 (0.79-2.29) | 2.07 (1.00-4.28) |
| 白血球増多(白血球≥15,000/mm ³) | 0.90 (0.48-1.68) | 1.38 (0.60-3.16) |
| 高血糖(血糖値≥8.3mmol/L) | 2.36 (0.63-8.79) | 2.10 (0.50-8.81) |
| CRP高値 (CRP≥0.30mg/dL) | 0.24 (0.51-0.40) | 0.25 (0.13-0.47) |

*表中のすべての変数を含むモデル

表 6 に、「Severe complication あり」に対する各因子の OR および 95%CI を示す。Crude model において正の関連を認めた項目は、「年齢：1.0-4.9 歳 (Reference:<1 歳)」、「白血球増多」、「高血糖」であった。このうち、「白血球増多」との関連は、multivariate model において有意性が消失した。また、「CRP 高値」について負の関連を認めた。

表6. 「Severe complication あり」に対する各因子のOR (95%CI) (Severe complication群をNo complication群と比較)

| 因子 | Crude | Multivariate* |
|------------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 男児 | 2.41 (0.99-5.90) | 3.14 (0.99-9.94) |
| 年齢[歳] (Ref.: <1.0) | | |
| 1.0-4.9 | 5.74 (1.23-26.7) | 8.56 (1.26-58.0) |
| ≥5.0 | 4.18 (0.88-19.9) | 4.92 (0.50-48.2) |
| 基礎疾患 | 0.83 (0.29-2.37) | 0.50 (0.12-2.06) |
| 入院時の発熱 ≥39°C | 1.61 (0.64-4.04) | 1.06 (0.27-4.09) |
| 白血球増多(白血球≥15,000/mm ³) | 2.57 (1.03-6.41) | 2.36 (0.61-9.17) |
| 高血糖(血糖値≥8.3mmol/L) | 12.2 (2.88-51.6) | 10.6 (1.63-68.5) |
| CRP高値 (CRP≥0.30mg/dL) | 0.24 (0.10-0.57) | 0.23 (0.07-0.69) |

*表中のすべての変数を含むモデル

D. 考察

今回の調査により、2010年4月1日から9月30日の間に、HFMD、HA、および関連 CNS 合併症で入院した15歳未満の患者数は、全国で約3,500人と推計された。なお、二次調査の解析対象のうち、Complication 群および Severe complication 群の割合は、それぞれ46% (161/352) と7.6% (27/352) であった。研究期間中、全国における重症例が同様の割合で発生したと仮定すると、各群の入院患者数は、それぞれ、約1,700人および100人と推計される。さらに、2010年の15歳未満児の人口(約1,680万人)から、研究期間中の累積罹患率 (incidence proportion) は、Complication 群: 10.3、Severe complication 群: 0.65 (人口10万あたり) と計算することができる。

本調査における severe case-fatality proportion は1.2% (2/161) であり、台湾における1998年のHFMD流行時の19.3%⁶⁾と比較して、非常に低い値であった。この理由としては、医療へのアクセスの違い、ウイルスの遺伝子型による病原性の違い^{36, 37)}、何らかの宿主側因子が考えられる。

二次調査で情報を得た症例のうち306症例についてみると、No complication 群と比較して、Complication 群・Severe complication 群で男児が多かった。5歳未満児の割合は、No complication 群・Severe complication 群で約85%であった。これらの結果は、過去の報告と同様であった^{14, 37-39)}。一方、Complication 群における5歳未満児の割合は約60%であり、他2群と比較して低かった。さらに、多変量解析の結果、Complication 群に対する5歳以上のOR (Reference: 1歳未満) が2.80 (95%CI, 1.23 - 6.42) と有意に上昇した。CNS 合併症を伴うEV感染症例に関する報告で、対象の85%がAM症例であった研究では、年齢分布が幅広かったことを報告している⁴⁰⁾。今回の調査でComplication 群に認めた年齢層の広さも、AM症例を検討対象に含めたことを反映しているかもしれない。

「入院時の発熱 $\geq 39^{\circ}\text{C}$ 」は「Complication あり」と関連したものの、「Severe complication あり」との関連はみられなかった。HFMDにAM以外の

CNS 合併症を伴う症例を対象とした研究でも、高熱とCNS 合併症の関連は認められていない⁴¹⁾。一方、HFMD症例を対象とした過去の研究で、 $\geq 38.5^{\circ}\text{C}$ の高熱が髄液細胞増加と有意に関連していたことが示されている⁴²⁾。年齢分布についての考察と同様に、本調査におけるCNS 合併症と高熱との関連は、研究対象にAM症例を含めることによって導かれたと考えられる。

「Severe complication あり」をアウトカム変数として関連因子を検討した多変量解析では、「高血糖」のオッズ比が有意に上昇した。中国 Shandong 省における2009年のHFMDアウトブレイク時にHFMD症例を対象として実施された研究で、CNS 合併症・呼吸困難・心肺機能不全を伴う重症例では、空腹時血糖値の高値が、軽症例と比較して顕著であったことが示されている⁴³⁾。また、台湾における1998年のHFMD流行時に採取したEV71感染症例の血液サンプルを分析した研究では、脳炎症例・脳炎に肺水腫を伴った症例の血糖値が、合併症を伴わない症例と比較して高値であったことが示されている⁴⁴⁾。メカニズムとしては、ウイルス感染によって全身性炎症反応が起こり、肝代謝異常とインスリン抵抗性が高まった結果、高血糖の状態をもたらすと考えられている^{6, 14, 45)}。

CNS 合併症と負の関連を示す因子として、今回、「Complication あり」・「Severe complication あり」のアウトカム変数に対して、「CRP 高値」のオッズ比が有意に低下した。過去の研究で、EV71感染の重症例でCRP値の上昇はみられなかったとの報告がある⁴⁴⁾。また、台湾での1998年のHFMDアウトブレイク時、EV71感染症例のうち、髄膜脳炎を発症している群では、発症していない群と比較して、CRP値に差はなかった⁴⁶⁾。この結果については、重症EV71感染症例において、顆粒球の活性化が起こっていないことを示す、と考察されている。しかし、今回我々の調査で得られた、「CRP 高値」とCNS 合併症との「負の関連」は、今後の調査によりさらに検討する必要がある。

本研究には、以下の限界点がある。まず、後ろ向き研究のデザインであったため、No

complication 群で髄液検査や病原検索の実施割合が低く、これら検査結果を統計学的に検討できなかった。また、過去の研究では「高熱の持続」が重症例の関連因子として報告されている⁴⁾。今回の調査では、発熱症状の初発日に関する情報を収集しているものの、当該症状が入院時まで持続していたかを把握していなかった。

過去の研究によると、EV71 主流行中であっても他ウイルスと同時感染している症例^{11, 12)}、発疹や水疱といった HFMD・HA に特有の症状を伴わない EV71 感染症例^{19, 47)}の報告や、EV71 流行中でも HFMD・HA 症例から様々な EV の血清型が同定された報告^{6, 48)}などがある。今回、「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の工夫として、調査対象期間を HFMD・HA の流行期に限定した。さらに、EV71 が主流行した 2010 年について調査を実施したが、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。

E. 結語

2010 年に、HFMD、HA、および関連 CNS 合併症の小児入院症例に関する全国調査を行い、全国で HFMD・HA 流行期に当該症例によって入院した 15 未満の患者数を推計した。EV71 は EV の他血清型と比較し、より重症な中枢神経系の合併症を引き起こすと示されてきていることから、日本で EV71 が主流行していた 2010 年に当該重症例について調査を行い、WPRO 定義を使用して他の研究結果と国際的に比較可能な情報を得たことは、非常に重要であると考えられる。また、今回の調査では、CNS 合併症を呈した症例を AM の有無によって 2 群に分類し、CNS 合併症の重篤度によって関連する因子が異なることを示すことができた。将来的に、前向き研究の手法により、病原検索の結果も含めて情報を収集し、検討していく必要がある。

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。

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, Wang HY, 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 Sibu, 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.go.jp/iasr/CD-ROM/records/14/16502.htm> (2013 年 02 月 20 日)
- 18) 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) 2011
- 19) 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
- 20) 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
- 21) 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
- 22) 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
- 23) 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
- 24) 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
- 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