

## 手足口病病原ウイルスの多病原化傾向と 抗原変異について

佐藤 宏 康\*  
原 田 誠三郎\*

安 部 真理子\*  
森 田 盛 大\*

### I はじめに

手足口病が新しい独立した疾患として報告されてから30余年を経過した<sup>1)</sup>。我国で最初に病原として分離されたのはコクサッキーA群ウイルス(CAV)16型であった<sup>2)</sup>。次いで、エンテロウイルス71型(EV-71)であった<sup>3)</sup>。秋田県内でもこの両者が流行の主役になってきた<sup>4-6)</sup>。最近になりCAV-10型による手足病も報告された<sup>7)</sup>。

一方、秋田県内において、昭和62年度内に検出された手足口病の病原ウイルスは、前述のCAV-16型、EV-71型、CAV-10型さらに新顔としてCAV-4型も検出され、本疾患が多病原化する傾向が認められた。このようなことから、原因解明の一つとして病原ウイルスの検索を行ない、昭和62年度の分離ウイルスと過去の流行株との抗原の比較を行なったので、その成績について報告する。

### II 材料と方法

#### A. 材 料

##### 1. 組織培養細胞

HEAJ細胞とRD細胞を使用した。すなわち、当所で樹立したヒト由来細胞HEAJ細胞は10%牛血清を含むイーグルのMEMで培養した。また、青森衛研より分与を受けたRD細胞は牛胎児血清を5%を含むハンクスMEMで培養した。

##### 2. 哺乳マウス(SM)

当所で交配生産した生後72時間以内のdd系SMを用いた。

##### 3. ウイルス分離材料

昭和62年5月から63年2月までの間に、微生物感染症定点観測病原検出調査で採取された25名の咽頭ぬぐい液14検体、水疱内容18検体の合計32検体を用いた。

##### 4. 被検ウイルス株

CAV-4型は標準株High point, 昭和62年度分離

株23872, CAV-10型は標準株Kowalik, 昭和62年度分離株24081, 24113, CAV-16型は標準株G-10, 昭和55年度分離株9344, 昭和59年度分離株10918, 昭和62年度分離株24123, 24253, 24632, EV-71は標準株Nagoya, 62年度分離株24593, 24726を用いた。分離株はすべて水疱由来である。CAV-4と10型はSMで分離後、RD細胞に1~2代馴化継代させた。CAV-16型とEV-71はHEAJ細胞に継代した。

#### 5. 免疫血清

表2に示したとおりである。すなわち、抗CAV-4型はHigh point, 抗CAV-10型はKowalik, CAV-16型はG-10, 9344, 10918, 21915, 24123, EV-71はNagoya, 21958, 24593の免疫血清で9344はモルモット, 他はすべてウサギを用いて作製した。

### B. 方 法

#### 1. ウイルスの分離法

マイクロ分離法によった。すなわち、フラット型96穴マイクロプレートに単層培養したHEAJ細胞をPBSマイナスで1回洗浄し、抗生物質、牛胎児血清を0.5%に含むMEM0.1mlで液交換を行なった。各検体につき0.1mlずつ2穴に接種し、37°Cの炭酸ガス培養器で分離培養を行なった。一方、SMによる分離では腹腔内に0.05mlずつ接種し発症の有無を2週間観察した。

#### 2. 分離ウイルスの同定法

37°Cの回転培養法により行なった。すなわち、10倍希釈の抗9344モット血清及び抗Nagoyaウサギ血清の各々と100TCID<sub>50</sub>/0.1mlの分離ウイルス液を等量混合し37°Cで60分間反応させたのち、HEAJ細胞培養試験管に接種し、CPE陰性を示した型を当該するウイルス型とした。

一方、SMを用いた中和同定法は、100LD<sub>50</sub>/0.025mlのウイルス液と抗High pointウサギ血清、抗Kowalikウサギ各血清の100倍希釈液と等量混合し、37°Cで60分間

\* 秋田県衛生科学研究所

反応させたのち、SMの皮下に0.05mlずつ接種し、発症しなかった型を当該するウイルス型とした。

### 3. 免疫血清作製法

抗High point, 抗Kowalik血清は精製抗原を用いて作製した<sup>9)</sup>。抗G-10, 抗9344, 抗Nagoya血清は二層分配法<sup>9)</sup>にて濃縮した抗原を用いた。抗10918, 抗21915, 抗24123, 抗21958, 抗24593は8%ポリエチレングライコール6000とNaCl 2.1g/100mlにて濃縮<sup>10)</sup>したウイルス液を免疫抗原とした。いずれの場合もコンプリートアジュバントと等量混合し、皮下及び筋肉内に免疫した。1ヵ月後の追加免疫はウサギの場合は耳静脈内に4~5ml, モルモットの場合は腹腔内に5ml行なった。追加免疫7日後に全採血を行ない免疫血清を得た。

### 4. 交差中和試験法

マイクロ中和法により行なった。すなわち、各ウイル

スの100TCID<sub>50</sub>/0.025mlと40倍希釈から2倍階段希釈した血清とをトランスフアプレート上で等量混合し、37℃の炭酸ガス培養器中で3時間、4℃一夜反応させた。翌日、マイクロプレート上に組織培養しておいたRDあるいはHEAJ細胞を牛胎児血清0.5%を含むMEMで液交換し、接種した。HEAJ細胞は液交換前にPBSマイナスで1回洗浄した。培養は33℃の炭酸ガス培養器中で行ないCPEが30から300TCID<sub>50</sub>/0.025mlで判定した。

## III 成績

### A. サーベイランス情報からみた患者発生状況とウイルス分離成績

患者発生状況とウイルス分離数を月別に図1に示した。

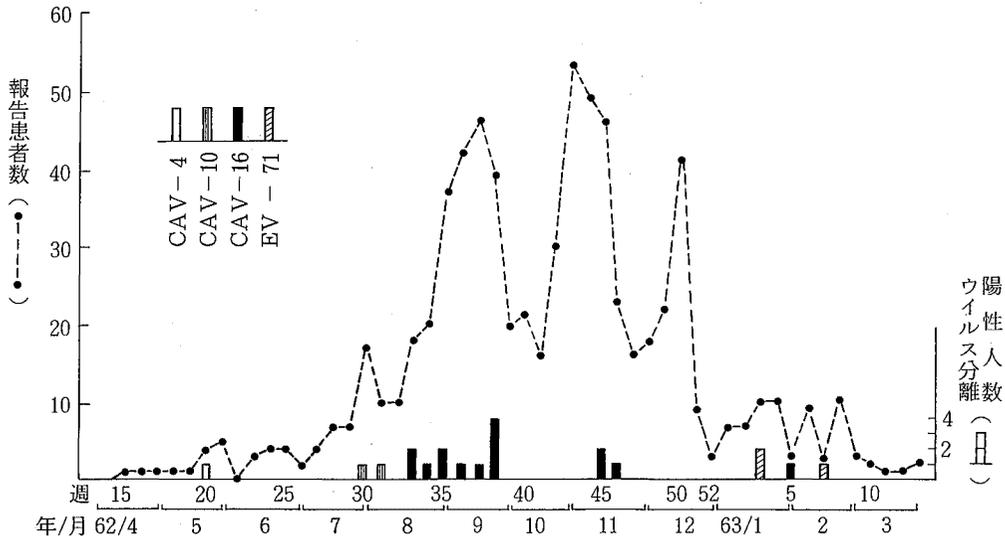


図1. 患者発生状況とウイルス分離数

患者発生は5月より散見され7月から増加し8~12月まで続いた。5月はCAV-4型が、7~8月にかけてはCAV-10型が病原ウイルスとして検出された。8月中旬以降11月まではCAV-16型のみが分離された。昭和63年1~2月にかけてはCAV-16型1株と新たにEV-71が3株分離された。一方、年齢別ウイルス検出数は図2に示した。すなわち、CAV-4, 10型は1才以下で分離され、CAV-16型は1~5才及び7才児からも分離され患者の年齢範囲が広く発生数も15名と多かった。また、EV-71は1才と3才児から分離された。

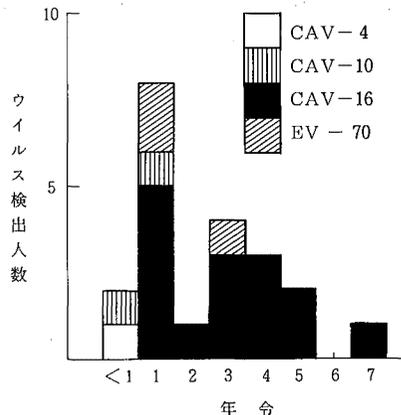


図2. 年齢別ウイルス検出数

### B. 分離培養宿主によるウイルス検出率の比較

EAJ細胞とSMの両宿主で同時にウイルス分離が実施できた咽頭液14検体、水疱18検体について両者の初代での検出成績を比較し表1に示した。CAV-4型とCAV-

10型はSMでのみ分離された。一方、CAV-16型はHE-AJ細胞で78.6% (22/28)であったのに対し、SMでは21.4% (4/28)であった。すなわち、昭和62年度流行のCAV-16型は細胞でよく分離されたが、SMを発症させ難い性状を有していた。

表1 分離培養系によるウイルス検出率の比較

分離ウイルス	ウイルス分離培養	分離材料		計 (%)
		咽頭液	水疱	
CAV-4 CAV-10	HEAJ	0/1	0/3	0/4 (0.0)
	SM	1/1	3/3	4/4 (100.0)
CAV-16	HEAJ	10/13	12/15	22/28 (78.6)
	SM	3/13	3/15	6/28 (21.4)

### C. 分離株の交差中和試験

昭和62年度分離株を主体に各免疫血清との反応を表2に示した。CAV-4型分離株23872は標準株High pointの抗血清でよく中和された。CAV-10型分離株24081, 24113は標準株Kowalikの抗血清に対し、ホモ価より2~3管低い抗体を示した。CAV-16標準株G-10はすべてのCAV-16型分離株抗血清により中和された。しかし、昭和55年以降の分離株は抗G-10血清で中和されなかった。昭和60年分離株で作製した抗21915血

表2 手足口病分離株交差中和試験

抗原		免疫血清									分離株由来	備考	
		抗CAV-4	抗CAV-10	抗CAV-16				抗Enterovirus-71					
				G-10	9344	10918	21915 <sup>2)</sup>	24123	Nagoya	21958 <sup>2)</sup>			24593
血清型	株名												
CAV-4	High Point	12,800	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	標準株
"	23872	12,800	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	S62年分離
CAV-10	Kowalik	—	2,560	—	—	—	—	—	—	—	—	—	標準株
"	24081	—	640	—	—	—	—	—	—	—	—	—	S62年分離
"	24113	—	320	—	—	—	—	—	—	—	—	—	"
CAV-16	G-10	—	—	2,560	2,560	320	320	160	—	—	—	—	標準株
"	9344	—	—	—	80	40	80	—	—	—	—	—	水疱
"	10918	—	—	—	—	—	40	—	—	—	—	—	"
"	24123	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	S59 "
"	24253	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	S62 "
"	24632	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	"
Enterovirus-71	Nagoya	—	—	—	—	—	—	—	2,560	640	1,280	—	標準株
"	24593	—	—	—	—	—	—	—	320	320	1,280	—	S62年分離
"	24726	—	—	—	—	—	—	—	640	1,280	2,560	—	"

1) 抗体価40倍未満 2) S60年手足口病水疱からのウイルス抗血清

清に対しては、昭和55, 59年の分離株は中和されるが昭和62年の分離株は中和されなかった。一方、EV-71分離株24593, 24726は抗Nagoya血清に対しホモ価より2~3管低い抗体価を示した。

なかった。さらに、抗24123血清が標準株G-10を中和することから24123株はCAV-16型と同定した。

### D. 昭和62CAV-16型代表株24123の性状

この株はHEAJ細胞で分離されたがSMでは分離されなかった。細胞を用いた同定では昭和55年の代表株9344の抗血清250単位で中和されるが、抗G-10血清では中和されなかった。一方、細胞2代継代株をSMに接種すると1週間で発症が認められた。SM2代継代した株を用いて抗G-10, 抗9344, 抗10918の40倍希釈血清と中和反応させると、いずれの血清とも中和が成立した。しかし、抗Nagoya, 抗21958血清の40倍希釈とは反応し

手足口病の病原ウイルスとして、水疱から検出されたウイルスはCAV-16型, EV-71, CAV-10そしてCAV-6型が報告されている<sup>12)</sup>。今回、我々は生後10カ月の乳児の足部水疱からCAV-4型を分離同定した。したがって、本邦においてもCAV-16, 10, EV-71以外の病原として今後CAV-4, 6型による手足口病に注目する必要がある。県内でも昭和53~54年の流行時に手足口病患者の咽頭からCAV-4と7型が分離されている<sup>6)</sup>。昭和62年度の流行では水疱よりCAV-4, 10,

16型そしてEV-71の4種類の病原ウイルスが検出され、本疾患が多病原化する傾向が観察された。

CAV-4型とCAV-10型はSMでのみ分離された。しかし、CAV-16型はHEAJ細胞での分離率が78.6%であるのに対し、SMのそれは21.4%と低かった。従来、CAV-16型の分離率は両者でほぼ同程度であった<sup>6)</sup>。昭和62年度のCAV-16型分離株は従来の流行株に比較し、SMでの病原性が著しく低いことが推定された。また、交差中和試験による成績から、昭和62年度のCAV-16型分離株は昭和55、59年度の実験株と抗原的に異なっていることが推定された。このような変異が患者の発症年齢が1~7才と比較的広範囲に及んだ一因ではないかと考えられた。

一方、CAV-10型分離株と標準株Kowalikとは多少抗原が変異していることが示唆された。釜洞<sup>13)</sup>は分子生物学的研究から、CAV-10型は短期間にウイルス変異が認められることを報告している。EV-71についてもNagoya株と分離株間に変異が起きていることが推定された。しかし、CAV-4型についてはそのような現象は認められなかった。

秋田県という限定された地域においても、手足口病の病原ウイルスの多病原化傾向と病原ウイルスの変異が観察されたことから、今後、ますます病原ウイルスの種類が増加とウイルスの変異現象が全国規模で観察されるのではないかと考えられた。

## V ま と め

昭和62年度に分離された手足口病の病原ウイルスを、ウイルス分離と抗原分析の両面から調査し、以下の成績を得た。

1. 病原ウイルスが多病原化する傾向が認められた。
2. CAV-16型以外にCAV-10型、EV-71においても変異が起きていることが示唆された。

稿を終るに当たり、標準株を分与していただいた予研腸内ウイルス部、検体採取にご協力をいただいた秋田組合総合病院小児科、由利組合総合病院小児科、市立秋

田総合病院小児科、大館市立総合病院小児科、仙北組合総合病院小児科の諸先生方に謝意を表します。

## 文 献

- 1) 渡辺悌吉：手足口病 (HFMD) の臨床像、臨床とウイルス、2 (1), 76-80 (1974)
- 2) 芦原義守：疫学的にみた手足口病、臨床とウイルス、2 (1), 81-84 (1974)
- 3) 萩原昭夫：エンテロウイルス71型、臨床とウイルス、7 (1), 20-24 (1979)
- 4) 須藤恒久たち：水疱よりVero細胞でウイルスが分離されたHand-Foot and Mouth Disease、秋田県衛生科学研究所報、14, 75-80 (1970)
- 5) 原田誠三郎たち：1978年、秋田県で流行した手足口病 (HFMD) の病原診断成績と血清疫学的研究、秋田県衛生科学研究所報、23, 65-69 (1979)
- 6) 佐藤宏康たち：昭和53、54年度流行した手足口病患者からのウイルス分離成績について、秋田県衛生科学研究所報、24, 85-89 (1980)
- 7) 板垣朝夫：Cox.A-10ウイルスによる手足口病の発生、病原微生物検出情報、28, 1~2 (1982)
- 8) 佐藤宏康たち：ELISA法によるCox.A群ウイルスの同定、秋田県衛生科学研究所報、30, 74-80 (1986)
- 9) 原田誠三郎たち：水性二層分配法 (ポリエチレングリコールとデキストランサルフェートナトリウム) を用いたエコー9ウイルスの分配組成系の比較検討について、秋田県衛生科学研究所報、24, 101-103 (1980)
- 10) 厚生省レファレンスシステム研究班、コクサッキーA群ウイルスの補体結合反応試験および免疫粘着赤血球凝集反応試験による同定法 (1984)
- 11) 厚生省公衆衛生局保健情報課、伝染病流行予測検査術式、16-23 (1975)
- 12) 病原微生物検出情報、手足口病1986-87, 91号, 24 (1987)
- 13) 釜洞俊雄たち：1981年8月から12月の間に松江市で手足口病患者から分離されたコクサッキーA10型ウイルスの分子疫学、第33回日本ウイルス学会総会抄録、183, (1985)