1969-70年に流行した手足口病 (HFMD) 症例より 分離されたウイルスの性状について

杉 山 一 夫 須 藤 恒 久*
天 野 保 二** 森 田 盛 大***

PROPERTIES OF THE VIRUS ISOLATED FROM HAND-FOOT AND MOUTH DISEASE PATIENTS IN 1969-1970

Kazuo SUGIYAMA, Tsunehisa SUTO, Yashuji AMANO
and Morihiro MORITA

Department of Microbiology, Akita University, School of Medicine
Laboratory Center, Akita University, School of Medicine
Akita Institute of Public Health

〔受付：7月29日，1976年〕

総 括

1969年から1970年にかけてわが国では史上はじめての大流行を起こした Hand-Foot and Mouth Disease (HFMD) 流行の要因を追求するため、HFMD 患者水疱から細胞培養によって分離した株 (69-70株) と Cox. A-16 標準株の生物学的性状を比較検討し以下の結果を得たので報告する。

1. 69-70株は抗 Cox. A-16 および抗69-70血清によつて中和されがたいが、抗69-70血清は標準株をよく中和する。この性質は分離、継代に用いた細胞を変えても同様である。

2. 69-70株は標準株よりも感染性ウイルスの産生量が低い。この理由の1つは69-70株では標準株に比べ不完全粒子の産生頻度が高いためと思われる。

3. 低濃度の重炭酸を含む寒天培地によるブラック形成は標準株では極度に抑制されるが、69-70株ではその影響が少ない。

4. 50°C 加熱処理に対する耐熱性の保持のためにアルミニウムイオンの添加を試みたところ、標準株では有効であるが、69-70株では効果が少ない。

5. 40°C, 37°C および30°C における両株の感染価を比較したところ、標準株では温度による差は少ない。

が、69-70株では30°C, 40°C のいずれの温度でも37°C よりは著しく抑制された。

序 文

われわれは先に、1969年から1970年にかけてわが国で史上初の大流行を起こした Hand-Foot and Mouth Disease (HFMD) 患者水疱液より培養細胞を用いて容易に病原ウイルスを分離しうることを報告した (須藤ほか, 1970a¹⁾, b²⁾, 須藤ほか1971³⁾, 須藤ほか1972⁴⁾)。また、血清疫学的調査から、この大流行の原因は従来からわが国に存在していた Cox. A-16とは異なった性状を有するウイルス株の浸淫によるものであることを推測した。すなわち、これらの分離株は、いずれも顕著な難中和性を示し、抗 Cox. A-16 標準株血清ではまったく中和されず、また、標準株に対し高い中和抗体価を有する分離株免疫血清によつてさえもほとんど中和されなかったのである。しかしながら、モルモットおよび家兎を免疫して得た抗分離株血清はいずれも Cox. A-16 標準株に対して高い中和抗体価を示したことにより Cox. A-16 と同定しえたものである (須藤ほか1971³⁾, Fujimiya et al. 1974a⁵⁾, b⁶⁾)。

Cox. A-16型ウイルスそのものとしては、HFMD 流行以前からわが国に存在していたことが明らかであるにもかかわらず、1969-70年にはじめて HFMD が大流行を起こした原因をウイルス側に求めて、それを解明する一手段として、われわれは HFMD 由来の Cox. A-16

* 秋田大学医学部微生物学教室

** 秋田大学医学部中央研究センター

*** 秋田県衛生科学研究所

と Cox. A-16 標準株の性状を種々比較検討してきたのであったが、本稿では1969~70年流行株の難中和性の再検討、37°Cでの増殖の経過、40°Cおよび30°Cでの感染価、ブラック形成に及ぼす重炭酸濃度の影響、ならびにアルミニウムイオン存在下の熱抵抗性等について比較検討した結果について報告する。

材料と方法

1. ウイルスおよび細胞

本実験には大阪府公衛研より分与された継代アフリカミドリザル腎細胞 (GMK 細胞) を使用した。細胞増殖液としては5%牛血清添加の Eagle の MEM を、また、細胞維持液は2%仔牛血清添加の MEM を使用した。

使用した標準株は予研腸内ウイルス部より分与された Cox. A-16標準株 (G10) の哺乳マウス継代株を、改めて GMK 細胞で継代したものである。また1969~70年流行時の分離代表株としては、HFMD 患者水疱材料から GMK 細胞を用いて直接ブラック法により分離した後、さらに GMK 細胞で継代した AK-1577 GP 株を使用し、本稿ではこれを69-70株と称した。

2. ブラック観察

ブラック用重層培地は YLE と Eagle の MEM の等量混合液に Noble agar および仔牛血清をそれぞれ1.5%および2.0%の割合に添加したものを用い、ブラック形成実験は密栓ボトル法によった。すなわち、ウイルス接種後、37°Cで60分間吸着させ、中性紅を含まない重層培地を加え、接種後3日めに0.006%中性紅添加の培地を重層し翌日計測した。

3. 抗血清の作製

抗血清の作製にはモルモットを使用した。すなわち、ウイルス培養液を数回凍結融解後、2,500rpm 10分の遠心を行ない、その遠心上清を3回フロロカーボン処理後、complete adjuvant と等量混合し、モルモットの皮下に注射した。免疫は2~3日ごとに5ml ずつ5回行ない、採血は初めの免疫から約1か月後の血清を免疫血清とした。

4. Neutralization Kinetics

標準株に対して4,096倍の90%ブラック減少価を示した抗69-70株血清を Hanks 液で40倍および160倍に希釈し、標準株あるいは69-70株と等量混合して室温で中和させた。その混合液より経時的に一定量を採取し、ただちに2%仔牛血清加 MEM で50倍に希釈し、その PFU 価を測定した。

5. アルミニウムイオンの添加および耐熱性試験

塩化アルミニウム ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) を蒸留水に溶解し

2モル溶液とし適宜希釈して用いた。塩化アルミニウムの濃度はすべてウイルス液と混合した後の最終濃度で表わした。ウイルス-アルミニウム塩混合液の加熱は試料を100×130mmの試験管に入れゴム栓をした後、50°C恒温槽で行ない、経時的にとりあげ、ただちに氷水中に冷却した。感染価の測定は加熱処理後ただちに行ない、ウイルス-アルミニウム塩混合液の段階希釈は生理的食塩水により行なつた。

成 績

1. 血清学的性状について

さきに判明していた HFMD 由来分離株の難中和性は (須藤ほか1970a¹¹⁾, b¹²⁾, 須藤ほか1971¹³⁾、分離および継代に用いた VERO 細胞由来の因子による宿主依存性のものであるとする考えかたもあるので (名取1974⁷⁾)、この点を明らかにするため標準株の継代および流行株の分離・継代などの実験系をすべて GMK 細胞に変え、チューブ法による50%中和抗体価、90%ブラック減少価による交差中和試験を行なったわけである。その結果は表1に示すごとく、標準株はチューブ法、ブラック法のいずれにおいても、Homo および Hetero の抗血清によりよく中和されたが、69-70株は標準株抗血清によつてはまったく中和されず、また、Homo の抗69-70血清によつてもほとんど中和されがたく、この難中和性は宿主細胞を変えても変わらないことが明らかにされ、やはりウイルス株の特質と考えられた。

表1 Cox. A-16標準株と69-70株の交差中和試験

Anti-serum \	50% tube neutralization titer		90% plaque reduction titer	
	Virus			
	Prototype	69-70 strain	Prototype	69-70 strain
Prototype	452	<10	640	<5
69-70 strain	3,200	7	4,096	4

つぎに、両株の被中和能の差異を中和反応速度で比較した。結果は図1に示したとおりである。すなわち、標準株は抗69-70血清の40倍および160倍希釈血清のいずれによつても2~5分以内にほぼ100%の中和が進行した。いつぼう、69-70株では40倍希釈抗血清の中和において75~80%まで中和が進行したが、以後平衡に達した。また、160倍希釈血清では2~5分以内にほぼ60%まで中和が進行したが120分後においてもまだ約40%の未中和ウイルスの残存が認められた。すなわち、標準株および69-70株ともに中和開始後ほぼ2~5分間に中和反応は終了するが、69-70株の中和は標準株に比べ不完全のままで停止し、未中和ウイルスが高率に残ることが知られ

図1 Cox. A-16標準株および69-70株の抗69-70株血清による Kinetic neutralization

た。

2. GMK 細胞での増殖の比較検討結果

1) 吸着

標準株と69-70株の GMK 細胞への吸着を比較した。両株とも、約100 PFU のウイルスを接種し、吸着後経時的に Hanks 液で3回洗浄後ブラック用培地を重層した。図2に示したように両株の吸着の程度に差は認められず、吸着開始後30分ではほぼ60%のウイルスが吸着し、180分では100%が吸着した。

2) 感染価の相異と CPE Score の経日の進行比較

継代 GMK 細胞で得られた標準株ウイルス液の感染価はチューブ法およびブラック法でそれぞれ $10^{8.5}$ TCD₅₀/ml, $10^{8.0}$ PFU/ml であったが、69-70株では $10^{6.5}$ TCD₅₀/ml, $10^{6.0}$ PFU/ml であり標準株は約100倍高い感染価を示した。また両株について63 TCD₅₀/0.1 ml 接種時の CPE の進行を CPE Score (Barron, A. L. et al. 1957)¹⁾ で表示すると、図3のごとく標準株では約48時間で100%に達したが、69-70株では3~4日を要し、CPE の進行はあきらかに標準株よりゆるやかであった。

3) 増殖曲線における相異

図2 Cox. A-16標準株および69-70株の GMK 細胞への吸着

図3 Cox. A-16標準株および69-70株の CPE score

チューブに培養した GMK 細胞に両ウイルス株を MOI=1.1で接種し4℃, 90分吸着後 Hanks 液で洗い、さらに維持液におきかえ36℃で回転培養を行ない、経時的に採取した細胞および培養液について、その感染価の測定を行なった。図4に示したように標準株の細胞内ウイルスの感染価の上昇は接種後約4.5時間ごろから観察され、7時間でほぼ定常に達した。いつぼう、69-70株は接種後4.5時間ごろに最初の感染価の上昇が見られるが、その後ゆるやかな上昇が見られ約10時間で定常に

図 4 Cox. A-16標準株と69-70株の増殖曲線

達した。また培養液中に遊離したウイルスの感染価をみると、標準株では接種後約9時間で2.5 log unitsの急な上昇を示したが、69-70株では非常に遅々とした上昇を示した。以上のようにGMK細胞におけるウイルスの増殖には両株間に明らかな差異が認められた。

4) 電顕観察による両株の比較

両ウイルス株をそれぞれ分画遠心により濃縮し、電顕によるNegative Staining法で観察した結果が図5の写真である。すなわち、標準株はほとんどが完全粒子であったが、69-70株では大部分の粒子が粒子内物質を欠除し、空胞状を呈した不完全粒子であった。これが両者における感染価の相異をもたらす有力な一因と考えられた。

3. 培地中の重炭酸濃度のブラック形成に及ぼす影響

Vogt, M. ら (1957)¹⁹⁾ はポリオウイルス弱毒株は低濃度の重炭酸培地では増殖しないのに対し、強毒株は低い重炭酸濃度でもよく増殖することを指摘し、低い重炭酸濃度でのブラック形成能から逆にその株の毒力を判定するいわゆるd-マーカーを提唱している。また、Soda (1971)²⁰⁾ はCox. A-ウイルスにおいて、ブラック形成は培地中の重炭酸濃度により影響を受け、0.22~0.33%の濃度でもつとも効率良くブラック形成され、また、ブラックサイズに関しても重炭酸により調整された培地は、

A : 標準株, B : 69-70株

図 5 Cox. A-16標準株と69-70株の電顕像
ウイルス液を低速遠心後、濃縮し、Sucrose 勾配 (35,000rpm 2時間) 遠心により採取した。
電顕観察はリンタングステン酸ネガティブ染色により行なった。

ほかの緩衝液で調整された重層寒天培地よりも優れていることを示している。われわれはCox. A-16標準株と69-70株について、ブラック形成に及ぼす重炭酸濃度の影響を比較検討した。

寒天培地中の重炭酸濃度はそれぞれ0.03, 0.075, 0.15, 0.30, 0.60%とし、ウイルス接種後5日めと6日めにブラック数とサイズを測定した。接種後5日めに各濃度でのPFUの比をとると両株ともに0.15%, 0.30%の濃度ではPFU価は高くなる傾向を示した。いつばう、低濃度の0.03%では標準株が3.0 log unitsもの大幅なPFUの低下を示したのに対して、69-70株では0.8 log units低下したにすぎなかった。接種後6日めになると、5日めでは低濃度域で極度にブラック出現が遅れていた標準株は大幅な上昇を示したものの69-70株に比べ低い値のままであった(図6a)。両株のブラック・サイズに及ぼす重炭酸濃度の影響については図6bに示したとおりであり、0.03%, 0.075%の低濃度域においても69-70株では影響が少なく標準株では低濃度になるほどサイズが縮小した。

4. 両ウイルス株の加熱処理におけるアルミニウムイオンの効果

a. 0.3%時のブラック数に対する各濃度でのブラック数の比.

b. 0.3%時のブラックサイズに対する各濃度でのブラックサイズの比.

図6 ブラック形成に及ぼす重曹濃度の影響

Wallis C. ら (1962)¹⁰⁾ はポリオウイルスの毒性に関するマーカー試験の1つとして、アルミニウムイオン存在下の熱抵抗性の相異について述べており、アルミニウムイオンの添加により熱抵抗性を示した株を A-マーカー (-) : (A⁻), 熱抵抗性を示さない株を A-マーカー (+) : (A⁺) としている. そこでわれわれは Cox. A-16 標準株と69-70株について各種の塩化アルミニウム濃度下における50°C, 5分間の加熱処理に対する各株の熱抵抗性の変化を検討した. ウイルス液を加熱処理後, ただちに氷水中で冷却し, チューブ法による感染価の測定を行なった. 図7 a. に示したように, 両株とも15.0mM以下の濃度では大幅な感染価の低下を示したが, 15mM以上の濃度では両株とも感染価の低下はなく熱処理に対するアルミニウムイオンの効果がみられた.

そこで, つぎに, ほぼ同一の感染価($10^{6.5}$ TCD₅₀/ml)の両株について, 塩化アルミニウム濃度15.6mMにおける50°Cの加熱処理を行ない, 経時的に試料を採取後, ただちにチューブ法による感染価を測定した. 図7 b. に示したように標準株では加熱処理による感染価の失活は処理後30分まではほとんど認められず, 60分後で

も1.0 log units に達しなかった. いっぽう, 69-70株ではあきらかに経時的な感染価の失活が認められ, 処理後5~15分でほぼ1.0 log units 低下し, 60分後では約2.5 log units の低下を示した. 対照の塩化アルミニウム非添加ウイルス液における感染価の失活は両株とも短時間に進行し60分後には4~5 log units の低下を示した. 以上のように塩化アルミニウム存在下での熱抵抗性は標準株において大きく, 69-70株では小さいことが明らかになった.

5. 40°C および30°C におけるウイルス感染価の比較

Lwoff, A. (1959)¹¹⁾ によると, ポリオウイルスの強毒株は40°C でもよく増殖するが, 弱毒株では増殖が極度に抑えられると述べている. そして40°C でのウイルス感染価が35°C でのそれに比べ 10^5 以下になったときは, これを T-マーカー (-) : (T⁻), 10^2 以内の差のとき T-マーカー (+) : (T⁺) とし, このマーカーはポリオウイルスの神経毒力と並行するものと考えられている. われわれは Cox. A-16標準株と69-70株についてこの試験を適用してみた.

図7 アルミニウムイオン存在下のCoxsackievirus A-16標準株および69-70株の耐熱性の比較

表2 Coxsackievirus A-16標準株と69-70株の感染価に及ぼす培養温度の影響

Temperature(°C)	Coxsackievirus A-16 prototype	69-70strain
40	5.5*	<0.5
40→37**	7.5	<0.5
37	8.5	5.3
38.5	8.5	5.3
38.5→37	8.5	5.3
37	8.5	7.3
30	7.5	2.5
30→37	7.8	6.3
37	7.8	6.3

* Infectivity was expressed as -log TCD₅₀/ml.

** Culture-temperature was shifted to 37°C from indicated, at 4 days post infection.

それぞれの株のウイルス液を10倍段階希釈し、チューブ培養した細胞に接種後ただちに40°Cのふ卵器中で静

置培養した。接種後4日目に両株の感染価を判定しTCD₅₀/mlで表わした(表2)。37°Cで10^{8.5} TCD₅₀/mlの感染価をもった標準株は、40°Cでは10^{5.5} TCD₅₀/mlの感染価を示した。したがってT⁺に近い。いつぼう、37°Cで10^{5.8} TCD₅₀/mlの感染価を示した69-70株では40°CにおいてCPEはまったくみられず10^{5.0}以上の低下を来した。したがってT⁻と考えられる。なお、40°Cに保持した対照のGMK細胞は良好な状態に維持されていたので、40°Cでの感染価を判定後、細胞維持液を交換し37°Cで培養を継続したところ、標準株はさらに2.0 log unitsの感染価の上昇を示したが69-70株ではCPEの出現をみなかった。

つぎに、30°Cでの感染価を比較した。この実験に用いたウイルスの37°Cでの感染価は標準株で10^{7.8} TCD₅₀/ml、69-70株で10^{6.8} TCD₅₀/mlであったが、接種後4日めにおける30°Cでのウイルスの感染価は、標準株では10^{7.5} TCD₅₀/mlであり37°Cでのそれと大差はなかった。しかしながら、69-70株は10^{2.5} TCD₅₀/mlの値を

示したにすぎず低温での CPE の出現の遅延が示された。しかし、判定後これらを 37°C に移して培養を継続したところ、標準株、69-70株ともに対照である 37°C 時の値まで感染価は上昇した (表 2)。

以上の結果は 40°C および 30°C のいずれの温度についても、標準株では培養温度の感染価への影響が少ないことが知られ、69-70 株では増殖の至適温度の幅が狭いことを示唆するものである。

考 察

1969~70年の HFMD 流行中に患者の水疱から分離された株は、抗標準株血清および抗 Homo 血清に対して難中和性を有することはきわめて特異なことであるが、この原因について、ウイルスの継代に用いた宿主細胞に由来する中和抑制物質の影響を受ける結果であるとする説 (名取 1974)⁷⁾ がある。しかし、宿主細胞として VERO 細胞、あるいは GMK 細胞のいずれを用いても、69-70株の被中和能の上昇は認められなかったことから、この株の難中和性の原因が宿主細胞に由来するものであるとは考えがたい。

チューブ法、あるいはブラック法でみた中和反応では、69-70 株は標準株に比べて、著しい難中和性を示しているが、高力価の抗 69-70 株血清によつては中和されることが、さらに 40 倍の抗 69-70 株血清による中和 Kinetics 試験により、標準株、69-70 株ともにほぼ 2~5 分以内に中和が完了することなどから、両株の中和程度の難易はウイルス粒子そのものの被中和能の差よりもほかの要因による可能性が示唆される。両株の被中和能の差をみる場合、まず、考慮すべきことは不完全粒子 (非感染性粒子) の存在である。かりに不完全粒子が完全粒子 (感染性粒子) と同様な抗原性を有するならば、中和反応における抗体の消費はかならずしも各株における完全粒子のみの数に並行するとは限らないからである。つぎに考慮すべきことは、粒子自体の抗体との結合能力の差である。すなわち、両株がともに質的に同様の抗原性を有しているとしても、一粒子当たりの抗体結合能力が異なっていれば、抗体の消費は各株における完全粒子の数に並行しないと考えられるからである。

Choppin, P. W. ら (1962)²⁾ は Cox. B-4 ウイルスのある株が抗体に対して難中和性を示し、この性質が継代によつて変化するのは特異抗体に対する感受性の異なる粒子が種々の比率で混在しているからであり、継代により生物学的特性の異なる 2 種の粒子を分離しうることが報告している。そこでわれわれは 69-70 株の難中和性について次のように推論してみた。まず、細胞当たりのウイルス産生量は感染価でみると、69-70 株は標準株に

比べて約 100 倍低く、その CPE の進行も著しく遅い。さらに、電顕での観察によると、69-70 株では圧倒的に不完全粒子が多くみられ完全粒子の数が極度に少ない。ところが標準株ではほとんどが完全粒子で占められている。この事実は、69-70 株は非感染性粒子を多量に産生するのに反し、標準株では産生された粒子のほとんどが感染性粒子であることを示しており、GMK 細胞における両ウイルス株の感染価でみた産生量の差を示唆している。さらにこの事実は、69-70 株の中和に際し、多量の不完全粒子がそれ自身の抗原性のために多量の抗体を消費してしまう可能性も示唆しており、かりに感染性粒子と非感染性粒子の比が、標準株で 100:1、69-70 株で 1:100 とすれば、同一感染価の条件で中和反応を行なつた場合、69-70 株は標準株に比し 10,000 倍もの抗体を必要とすることになる。しかしながら、この説明を満足させるためには、両株が産生する非感染性粒子の抗原性について、質的、量的検討を行なう必要があるし、また、GMK 細胞または VERO 細胞以外の細胞についても各株の増殖能・産生される粒子の性質等確かめる必要がある。たとえば、ECHO-6 のブラック変異株においては、ウイルスの増殖能力は細胞により差異があることが知られている (Suto et al. 1965 a. b.)⁹⁻¹⁰⁾。

ポリオウイルスの病原性を表わすマーカーとしては、T-マーカー、d-マーカー、A-マーカー、PG-マーカーなど種々のマーカーが知られている (Vogt, M., et al. 1957¹⁵⁾, Lwoff, A. 1959⁶⁾, Wallis, C., et al. 1962¹⁶⁾, Lokteva, V. F., et al. 1973³⁾)。Wallis, C. らはアルミニウムイオン存在下の多くのウイルスの熱抵抗性の相異について述べ、アルミニウムイオンの添加により熱抵抗性を示した株を A⁻、熱抵抗性を示さない株を A⁺ とした。さらにポリオウイルスでは、d-マーカーと A-マーカーは互いに関連性があるが、T-マーカーとは関連性がないとしている。ポリオウイルスによる病原性の発現と HFMD 発症とは直接的関連性はないと考えられるが、Cox. A-16 標準株、および 69-70 株で得られた結果にポリオウイルスでのマーカーを適用してみると、標準株は d⁻A⁻T⁺、69-70 株は d⁺A⁺T⁻ の性質を示した。ポリオウイルスの強毒株が d⁺A⁺ であり、HFMD 由来株がやはり d⁺A⁺ であることは、ともに腸管ウイルスであり病原性においてなんらかの類似性を示唆するように思われる。しかし、これらの生物学的特性の差異と病原性との関連の解明は、今後に課せられた問題である。

Summary

Green monkey kidney cell (GMK) cultures

were used to compare some biological properties between the prototype strain Cox. A-16 and strain 69-70, a representative strain which had been isolated from vesicular fluids of patients with hand-foot and mouth disease (HFMD). Some marker-tests of poliovirus were also applied tentatively to both strains. The results obtained are summarized as follows.

Strain 69-70 showed a resistance to anti-69-70 and anti-Cox. A-16 serum, but the prototype strain was readily neutralized by both sera. This character was not altered by cells used in experiments for virus isolation, multiplication, and neutralization.

The infectivity of the prototype strain was 2 log units higher than that of strain 69-70. Electron microscopic observation suggested that many empty virions of strain 69-70 might have been produced.

There was a marked reduction in the plaque size and the efficiency of plating of the prototype strain under an acidic agar-overlay, whereas strain 69-70 was not affected with a wide range of bicarbonate concentration.

Heating at 50°C in the presence of $AlCl_3$ was effective for stabilizing the infectivity of the prototype strain, but had no such significant effect on that of strain 69-70.

The effect of temperature on viral growth of both strains was examined in titration of infective virus at 40, 37, and 30°C. The prototype strain grew readily at these temperatures, but the growth of strain 69-70 was repressed under the same experimental conditions.

From the results obtained, it was suggested that the epidemic of HFMD occurring in Japan over a period from 1969 to 1970 might have been induced by the invasion of a new variant strain of Cox. A-16 virus.

文 献

- 1) Barron, A. L. and Karzon, D. T. (1957) : Effect of PH on cytopathogenicity of orphan viruses. *Proc. Soc. for Exp. Biol. and Med.*, **94**, 393-399.
- 2) Choppin, P. W. and Eggers, H. J. (1962) : Heterogeneity of Cox. B 4 virus; Two kinds of particles which differ in antibody sensitivity, growth rate and plaque size. *Virol.*, **18**, 470-476.
- 3) Fujimiya, Y., Oyama, S., Numazaki, Y. and Ishida, N. (1974 a) : Serologic relationship of Coxsackie A16 viruses from the epidemic of Hand-Foot-and-Mouth Disease in Japan, 1970, to the prototype strain. *Jap. J. Micro. Biol.*, **18**, 379-384.
- 4) Fujimiya, Y., Suto, T., Morita, M. and Ishida, N. (1974b) : Antigenic analysis of sequential isolates of Coxsackie A16 virus from 1964 to 1970 in Japan. *Jap. J. Micro. Biol.*, **18**, 463-467.
- 5) Lokteva, V. F. (1973) : Differential sensitivity of virulent and attenuated strains of type 1 poliovirus to polyethylene glycol as a possible new genetic marker. *Arch. für die gesamte Virusforschung*, **41**, 155-159.
- 6) Lwoff, A. (1959) : Factors influencing the evolution of viral diseases at the cellular level and in the organism. *Bact. Review*, **23**, 109-124.
- 7) 名取克郎 (1974) : 1969-70年に流行した Hand Foot and Mouth Disease におけるウイルス学的検討. *臨床とウイルス*, **2**, 85-90.
- 8) Soda, K. (1971) : Plaque characteristics of Coxsackie A 7 virus. *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, **24**, 295-311.
- 9) Suto, T., Karzon, D. T., Bussell, R. H. and Barron, A. L. (1965 a) : Studies of mutants of ECHO virus 6 ; 2. Isolation from human alimentary tract. *Amer. J. Epid.*, **81**, 333-340.
- 10) Suto, T., Karzon, D. T. and Bussell, R. H. (1965 b) : Studies of mutants of ECHO virus 6 ; 3. Behavior in monkey and human cell culture. *Amer. J. Epid.*, **81**, 341-349.
- 11) 須藤恒久, 森田盛大, 藤原登美子, 坂本昭男, 原田誠三郎, 日沼頼夫, 石田名香雄 (1970 a) : Hand-Foot and Mouth Disease に関する研究——特に VERO 細胞によるウイルス分離について. *ウイルス*, **20**, 157.
- 12) 須藤恒久, 森田盛大, 坂本昭男, 原田誠三郎 (1970 b) : 昭和 44-45 年, 秋田県内に於ける Hand-Foot and Mouth Disease (HFMD) の流行状況と Coxsackie A16 に関する疫学的観察. *秋田県衛研報*, **15**, 97-106.
- 13) 須藤恒久, 森田盛大 (1971) : Hand Foot and Mouth Disease. *日本臨床*, **29**, 1137-1142.
- 14) 須藤恒久, 杉山一夫, 森田盛大, 原田誠三郎 (1972) : エンテロウイルスの感染と発症との関係——HFMD 流行の要因に関する考察——. *小児科臨床*, **25**, 1248-1252.
- 15) Vogt, M., Dulbecco, R. and Wenner, H. A. (1957) : Mutants of poliomyelitis virus with reduced efficiency of plating in acid medium and reduced neurophathogenicity. *Virol.*, **4**, 141-155.
- 16) Wallis, C., Melnick, J. L., Ferry, G. D. and Wimberly, I. L. (1962) : An aluminium marker for the differentiation and separation of virulent and attenuated polioviruses. *J. Exp. Med.*, **115**, 763-775.