

資料

## 広島県におけるヒトパレコウイルス 3 型の検出状況

池田 周平, 谷澤 由枝, 島津 幸枝, 高尾 信一, 重本 直樹

### Detection of Human Parechovirus 3 in Hiroshima Prefecture.

SYUHEI IKEDA, YUKIE TANIZAWA, YUKIE SHIMAZU, SHINICHI TAKAO and NAOKI SHIGEMOTO

(Received October 21, 2016)

2014年1月～2016年8月におけるヒトパレコウイルス 3 型の検出状況を調査したところ, 2014年は5名 (5検体), 2015年は0件, 2016年は14名 (21検体) から検出され, 2016年に流行が確認された。

ヒトパレコウイルス 3 型は乳児で多く検出されることが報告されており, 今回検出された患者の内, 約半数が生後3か月までの乳児であった。また, ヒトパレコウイルス 3 型は成人筋痛症の原因ウイルスであることも報告されており, 今回も同様に1名の成人筋痛症患者から検出された。

Key words : ヒトパレコウイルス 3 型, 乳児, 生後3か月, 筋痛症

### 諸 言

ヒトパレコウイルス (HPeV) は, ピコルナウイルス科パレコウイルス属に分類される1本鎖 (+) RNAをゲノムとして持つウイルスである。HPeV 1 型と2型については, 以前はエンテロウイルス属 (エコーウイルス22型および23型) に分類されていたが, 現在ではパレコウイルス属に再分類されている [1-2]。HPeVについては, 急性胃腸炎や呼吸器疾患の原因ウイルスと考えられているが, 2004年にItoらがHPeV3型 (HPeV3) の分離を報告した [3] のを契機に, 急性胃腸炎や呼吸器疾患以外にも, 多様な疾患の原因となっていることが明らかになっている [1-2]。特に, HPeV3については新生児や生後3か月以下の乳幼児に敗血症や髄膜脳炎などの重症感染症を引き起こす原因ウイルスの1つとして, 小児科領域で注目されているウイルスである [1-2, 4-8]。

HPeV3については広島県では2002年8月に初めて検出を確認しているが, 本年 (2016年) は小児を中心に多くの患者からHPeV3が検出されており, HPeV3の流行があったと考えられるので, その概要を報告する。

### 材料及び方法

#### 1 材料

2014年1月～2016年8月までに広島県感染症発生動向

調査事業において, 広島県内の医療機関 (主に小児科) において合計297名から採取された鼻咽頭拭い液, 便及び髄液等合計463検体を対象とした。それらの患者の臨床診断名の内訳は表1に示したとおりである。なお, それらの患者の年齢は生後11日齢～40歳, 中央値は1歳であった。

表1 広島県感染症発生動向調査事業においてパレコウイルスの検査を実施した患者及び検体

臨床診断名	患者数	検体数
無菌性髄膜炎	101	157
感染性胃腸炎	50	66
脳炎・脳症	20	42
不明熱	16	28
発疹	16	27
気管支炎	14	23
咽頭炎	13	19
手足口病	12	15
ヘルパンギーナ	10	13
上気道炎	8	11
川崎病	5	6
咽頭結膜熱	4	5
インフルエンザ	1	4
デング疑い	2	4
麻疹	1	3
けいれん	1	2
肝機能障害	1	1
その他の疾患	22	37
計	297	463

## 2 検査方法

### (1) ウイルス分離

ウイルス分離には、BGM, RD-A, RD-18S, FL, HEp2及びF-Veroの6種類の培養細胞を24穴組織培養プレートに単層培養したものに各検体30~100 $\mu$ lを接種後、34 $^{\circ}$ Cの炭酸ガスふ卵器で静置培養し、細胞変性効果(CPE)の有無を7日間観察した。

### (2) リアルタイムRT-PCRによるHPeVの遺伝子検査

各検体からQIAamp Viral RNA mini Kit (QIAGEN)を用いてウイルスRNA抽出し、QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN)を用いてNixらが報告した方法[9]を参考に、HPeVの各遺伝子型に共通のプライマー及びプローブを用いて50 $^{\circ}$ C 20分 $\rightarrow$ 95 $^{\circ}$ C 15分 $\rightarrow$ 95 $^{\circ}$ C 15秒, 60 $^{\circ}$ C 1分(50サイクル) $\rightarrow$ 40 $^{\circ}$ C 30秒でリアルタイムRT-PCRを行い、HPeV遺伝子の有無を確認した。使用したプライマー及びプローブは表2に示した。

### (3) Conventional RT-PCR及びNested-PCR

リアルタイムRT-PCRでHPeVを確認した検体については、抽出したRNAを用いてAccess RT-PCR system (Promega)を用いてItoらが報告した方法[3]を参考に、48 $^{\circ}$ C 45分 $\rightarrow$ 94 $^{\circ}$ C 2分 $\rightarrow$ 94 $^{\circ}$ C 10秒, 52 $^{\circ}$ C 10秒, 65 $^{\circ}$ C 1分(45サイクル) $\rightarrow$ 65 $^{\circ}$ C 5分 $\rightarrow$ 4 $^{\circ}$ CでConventional RT-PCRを行った。RT-PCR産物を鋳型にして、GoTaq $^{\circ}$  Colorless Master Mix (Promega)により、94 $^{\circ}$ C 2分 $\rightarrow$ 94 $^{\circ}$ C 40秒, 52 $^{\circ}$ C 40秒, 72 $^{\circ}$ C 1分(45サイクル) $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 5分 $\rightarrow$ 4 $^{\circ}$ CでNested-PCRを行った。使用したプライマー及びプローブは表3に示した。

### (4) HPeV遺伝子型の決定

増幅産物はダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定した後、日本DNAデータバンク(DDBJ)のBLASTソフトウェアによってデータベース(GenBank)に登録

されている遺伝子配列と比較し、パレコウイルスの遺伝子型を決定した。

## 結果および考察

2014年1月~2016年8月までに広島県感染症発生動向調査事業により当センターでウイルス検査を実施した297名(463検体)の内、19名(26検体)からウイルス分離と遺伝子検出の両方、あるいは遺伝子検出のみでHPeV3が検出された(表4)。過去3年間のHPeV3の検出状況をみると、2014年は5名(5検体)から検出されたが、2015年は1件も検出されなかった。ところが2016年は14名(21検体)から検出された(表4, 図1)。我が国においては、HPeV3は数年おきに流行を繰り返すことが知られているが[6-7], 2016年は全国的にも流行があったことが確認されており[10, 11], 広島県においても同様にHPeV3の流行があったことが推察される。

HPeV3が検出された19名、26検体については、いずれもHPeVに共通なリアルタイムRT-PCR法でウイルス特異的な遺伝子が検出され、それに引き続くConventional RT-PCR法とシーケンスによる遺伝子塩基配列の決定によりHPeV3と同定された。一方で、培養細胞を用いたウイルス分離法では、8検体からHPeV3が分離された。分離された培養細胞は、いずれもBGM細胞であり、細胞変性効果(CPE)は他のエンテロウイルスと同様のCPEを呈し、CPEを観察する限りでは、エンテロウイルスとHPeV3を区別することはできなかった。なお、他の培養細胞ではウイルス分離は確認できなかった。HPeV3のウイルス分離に関しては、Vero細胞やLLC-MK2細胞といったサル腎臓由来の細胞に感受性があることが報告されている[1, 4, 12]。今回、我々がHPeV3を分離したBGM細胞は、アフリカミドリザルの腎臓由来細胞であり、HPeV3は、こうしたサルの腎

表2 リアルタイム RT-PCRで使用したプライマー及びプローブ

	プライマー及びプローブ名称	配列 (5'-3')
Foward primer	AN345	GTAACASWWGCCTCTGGGCCAAAAG
Reverse primer	AN344	GGCCCCWGRTCAGATCCAYAGT
Probe	AN257	FAM-CCTRYGGGTACCTYCWGGGCATCCTTC-BHQ1

表3 RT-PCR法およびnested-PCR法で使用したプライマー

方法	プライマー名称	配列 (5'-3')
RT-PCR	E23-P1 (+)	CCGYAGGTAACAAGWGACACT
	HPV-N1 (-)	TAGGGGATACATARGTTCRCGYT
nested-PCR	HPV-UTR2 (+)	TTAAAAAACGTCTAGTGGGCC
	HPV-VP02 (-)	GAAADCCACAYCKWACWGCHGCA

表4 HPeV3が検出された患者の概要

患者番号	検体採取日	年齢	性	診断	症状・特記事項	検体種類	HPeV3検出状況	分離細胞	同時に検出されたウイルス
1	2014年6月	1歳8ヶ月	男	ヘルパンギーナ	発熱(39℃)	咽頭拭い 髄液	○ ×	BGM	
2	2014年7月	1歳5ヶ月	男	ヘルパンギーナ	発熱(38℃), 発疹(口腔内・臀部), 歩行困難	便	○	BGM	
3	2014年9月	2ヶ月	男	発疹	発熱(39℃), 発疹	便 咽頭拭い	○ ×		
4	2014年9月	1ヶ月	男	無菌性髄膜炎	発熱(40℃) 髄膜炎	便	○		
5	2014年10月	11日	男	不明熱	発熱(39.3℃), その他有意所見なし.	便 咽頭拭い 髄液	○ × ×		
6	2016年6月	8歳4ヶ月	男	筋炎	発熱(39), 関節痛, 筋肉痛	咽頭拭い 便	○ ×		
7	2016年6月	11ヶ月	女	発疹	発熱無し, 上気道炎, 紅斑(体幹~四肢)	咽頭拭い	○	BGM	エンテロウイルス, ライノウイルス
8	2016年7月	1歳2ヶ月	女	発疹	発熱無し, 上気道炎, 咳, 丘疹(体幹~四肢), 結膜炎	咽頭拭い	○		ライノウイルス
9	2016年7月	1歳7ヶ月	女	発疹	発熱無し, 上気道炎, 咳, 発疹・丘疹・紅斑(体 幹, 四肢), 風疹様の細かな発疹	咽頭拭い	○	BGM	ライノウイルス
10	2016年7月	1ヶ月	男	敗血症	発熱(40℃) 大泉門膨隆	便 髄液 尿 咽頭拭い	○ ○ × ×		
11	2016年7月	1ヶ月	男	気管支炎	発熱(39.4℃)	咽頭拭い 便 尿	○ ○ ×		
12	2016年7月	1ヶ月	男	無菌性髄膜炎, 敗血症疑い	発熱(39℃) 発疹, 水疱, 循環不全	便 鼻咽頭拭い 髄液 尿	○ ○ × ×		
13	2016年7月	2歳1ヶ月	男	手足口病	発熱(37.2℃) 発疹(丘疹:手掌, 足, 膝, 体幹)	咽頭拭い	○		
14	2016年7月	40歳5ヶ月	男	流行性筋痛症	発熱あり, 筋肉痛, 筋力低下	便 咽頭拭い	○ ×		
15	2016年7月	1ヶ月	男	パレコウイルス感染症	発熱(39℃) 循環不全(末梢)	鼻咽頭拭い 便 髄液	○ ○ ○		エンテロウイルス
16	2016年7月	1ヶ月	男	エンテロウイルス疑い	発熱(39℃), 兄弟から感染?	咽頭拭い 便 尿	○ ○ ×	BGM	ライノウイルス ライノウイルス
17	2016年7月	2ヶ月	女	エンテロウイルス感染症	発熱(39℃)	咽頭拭い 便 尿	○ ○ ×	BGM BGM	
18	2016年8月	2ヶ月	女	上気道炎	発熱(39.4℃), 鼻汁, 咳	咽頭拭い	○		
19	2016年8月	11日	女	気管支炎	発熱(39℃), 姉発熱有り	鼻腔拭い 便	○ ○	BGM	

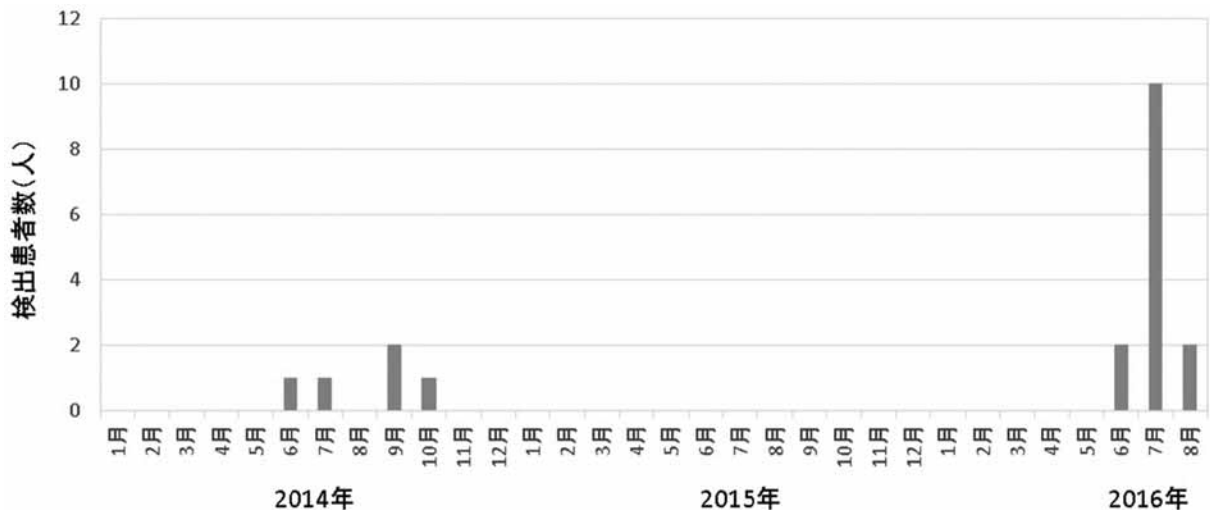


図1 HPeV3の月別検出患者状況 (2014年1月~2016年8月)

臓由来細胞に感受性が高いものと推察される. なお, 我々の施設で常用しているBGM細胞はHPeV以外にも, エンテロウイルスやアデノウイルスの一部, 単純ヘルペス1型およびムンプスウイルス等にも感受性があることを確認しており, サーベイランスを目的として使用する細胞の一つとして有用であると考えている.

今回, HPeV3が検出された19名の概要を表4に示した. HPeV3の感染については, 新生児や早期乳児に好発することが知られている [2, 4-6, 13]. 今回の我々

の示した結果でも, 患者の半数以上の11名が生後3か月以内の乳児で, 明らかに低年齢の児における感染が特徴的であった.

HPeV3の臨床症状については, 胃腸炎や呼吸器感染症, 発熱, 手足口病や発疹の他に無菌性髄膜炎などの中枢神経系の症状を示すことが知られている. 加えて, 敗血症様症候群にも関与していることが明らかになっている [2, 7]. 今回の我々が示した症例の中にも, 敗血症と診断された患者が2名認められた (患者No.10及び

12). このことから、特に新生児や乳幼児で敗血症を疑う場合には、HPeV3感染症の可能性を視野に入れてウイルス検査を実施する必要があると思われる。

HPeV3については、成人の流行性筋痛症の原因ウイルスの一つであることが明らかになっている [9, 14-16]. 今回の症例の中にも40歳成人(患者No.14)の筋痛症が確認され、小児のHPeV3の流行と成人筋痛症の発生の関係性が改めて確認できた。

HPeV3は新生児や乳幼児で重症化する恐れがあり、2～3年の周期流行している。流行の立ち上がりを把握することは感染症対策など公衆衛生的観点からも重要であることから、今後とも迅速かつ正確な把握に努めていきたい。

## 文 献

- [1] 伊藤 雅, 山下照夫, 皆川洋子. ヒトパレコウイルス (Human Parechovirus:HPeV) 感染症. モダンメディア 2007;53(12):329-336.
- [2] 相澤悠太, 齋藤昭彦. ヒトパレコウイルス. ウイルス 2015;65(1):17-25.
- [3] Ito M, Yamashita T, Tsuzuki H, Takeda N, Sakae K. Isolation and identification of a novel human parechovirus. J Gen Virol. 2004;85:391-398.
- [4] 山本美和子, 阿部勝彦, 国寄勝也, 国井悦子, 伊藤文明, 笠間良雄. 2008年6～7月のパレコウイルス3型の急増について－広島市. 病原体検出情報. 2008;29(9):p 255
- [5] 成相絵里, 児玉洋江, 崎川曜子, 杉下吉一. <速報>乳児における無菌性髄膜炎疑い患者等からのヒトパレコウイルス3型の検出－石川県. 病原体検出情報. 2014;35(9):p 200
- [6] 宮田一平, 宮入 烈. <速報>生後3か月未満の乳児におけるヒトパレコウイルス感染症の発生. 病原体検出情報. 2014;35(9):p 221
- [7] 相澤悠太, 鈴木優子, 大石智洋, 齋藤昭彦, 渡邊香奈子. <速報>新潟県におけるヒトパレコウイルス3型感染症の患者報告の急増. 病原体検出情報. 2014;35(9):p 220
- [8] 中田恵子, 山崎謙治, 駒野 淳, 加瀬哲男. <速報>エンテロウイルス感染症疑い患者からのパレコウイルス検出の増加－大阪府. 病原体検出情報. 2014;35(9):p 221-222
- [9] Nix WA, Maher K, Johansson ES, Niklasson B, Lindberg AM, Pallansch MA, Oberste MS. Detection of all known parechoviruses by real-time PCR. J Clin Microbiol. 2008;46(8):2519-2524
- [10] IASR Topics グラフ (Mumps virus/Hepatitis A virus/Enterovirus 68/Parechovirus/RSV). [Internet]. 2016 Sep 11. [cited 2016 Sep 26]. Available from: <http://www.nih.go.jp/niid/ja/allarticles/surveillance/510-iasr/graphs/4563-iasrgtopics.html>
- [11] 水田 克己. パレコウイルス3型による流行性筋痛症(筋炎)への関心の高まり. 衛研ニュース. 山形県: 山形衛生研究所; 2016. No.181: P. 2-3.
- [12] Watanabe K, Oie M, Higuchi M, Nishikawa K, Fujii M. Isolation and Characterization of Novel Human Parechovirus from Clinical Samples. Emerg Infect Dis. 2007;13(6):889-895
- [13] 小川英輝, 庄司健介, 宇田和宏, 木下典子, 小山(岩井)ちさと, 岩瀬徳康, 宮入 烈, 金子雅紀, 川村典子, 安藤 寿, 石井正浩, 豊田祥子, 小穴慎二. ヒトパレコウイルス3型が検出された新生児・早期乳児の10例－関東. 病原体検出情報. 2016;35(9):p 221-222
- [14] Mizuta K, Kuroda M, Kurimura M, Yahata Y, Sekizuka T, Aoki Y, Ikeda T, Abiko C, Noda M, Kimura H, Mizutani T, Kato T, Kawanami T, Ahiko T. Epidemic myalgia in adults associated with human parechovirus type 3 infection, Yamagata, Japan, 2008. Emerg Infect Dis. 2012;18(11):1787-1793.
- [15] Mizuta K, Yamakawa T, Nagasawa H, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, Shimizu Y, Ito S, Aoki Y, Ikeda T, Abiko C, Kuroda M, Noda M, Kimura H, Ahiko T. Epidemic myalgia associated with human parechovirus type 3 infection among adults occurs during an outbreak among children: findings from Yamagata, Japan, in 2011. journal of clinical virology. 2013; 58(1):188-193
- [16] Mizuta K, Yamakawa T, Kurokawa K, Chikaoka S, Shimizu Y, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, Ito S, Aoki Y, Matoba Y, Tanaka S, Yahagi K. Epidemic myalgia and myositis associated with human parechovirus type 3 infections occur not only in adults but also in children: findings in Yamagata, Japan, 2014. Epidemiol Infect. 2016;144(6):1286-1290.