

短報

パレコウイルス3型による 無菌性髄膜炎の流行解析

伊達佳美*, 佐野貴子, 渡邊寿美,
近藤真規子, 黒木俊郎

Analysis of aseptic meningitis epidemic by human parechovirus3

Yoshimi DATE, Takako SANNO,
Sumi WATANABE, Makiko KONDO
and Toshiro KUROKI

はじめに

無菌性髄膜炎の主な原因はエンテロウイルス属であり、例年夏季に小児で流行がみられる。エンテロウイルスは無菌性髄膜炎のほか手足口病やヘルパンギーナなどの原因となるが、疾患ごとに検出されるウイルスの血清型には特徴があり、様々な型のエンテロウイルスが周期的に流行することが報告されている¹⁾。

パレコウイルス属はエンテロウイルス属と同じピコornaウイルス科であり、エンテロウイルス属のエコーウイルス22型、23型が他のエンテロウイルス属とのアミノ酸配列の違いから1999年にパレコウイルス (HPeV) 1型、2型に再分類された。その後、HPeV 3型が高熱、胃腸炎症状、一過性下肢麻痺症状を呈した1歳児の糞便から1999年に分離され、2004年に報告された²⁾。

本邦におけるHPeV 3型感染症の流行は2006年、2008年、2011年にみられ、2014年夏季には国立感染症研究所の微生物検出情報 (IASR) においてHPeV 3型感染症の入院症例の急増が報告された³⁾。当所においても複数の無菌性髄膜炎患者からHPeV 3型が検出された。そこで今回、HPeV 3型による無菌性髄膜炎の流行状況を解析するため、神奈川県のパレコウイルス定点医療機関から得られた無菌性髄膜炎患者検体からのウイルス検出状況を集約し、検出されたHPeV 3型の遺伝学的な解析や患者の疫学的特徴を解析したので報告する。

対象と方法

1. 対象

2013年1月～2014年12月に神奈川県のパレコウイルス定点医療機関から得られた無菌性髄膜炎患者54症例から採取された髄液43検体、咽頭ぬぐい液44検体、糞便40検体、尿1検体の計128検体を用いた。また、疫学的特徴の解析には患者の発生動向調査票のデータを使用した。

2. ウイルス分離・同定

1) 遺伝子増幅法 (RT-PCR法, PCR法)

無菌性髄膜炎の主な原因とされるエンテロウイルス (ライノウイルスを含む)、HPeV、ムンプスウイルス、ヘルペスウイルスを対象として各ウイルス遺伝子の検索を行った。すべての検体 (128検体) からQIAmp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)を用いて遺伝子を抽出し、RT-PCR法またはPCR法を実施した。RT-PCRはAccess™ RT-PCR System (Promega) を使用した。

各ウイルスの検出には、エンテロウイルスは5' NTR-VP 4部分領域⁵⁾とVP 4-VP 2部分領域⁶⁾を、HPeVはVP 3-VP 1部分領域⁴⁾を、ムンプスウイルスはSH gene部分領域⁷⁾を、ヘルペスウイルス (1～8型) はpolymerase gene領域⁸⁾を標的とした。

PCR実施後PCR産物の電気泳動を行い、増幅バンドの有無を確認した。増幅バンドがみられたPCR産物を精製後、ダイレクトシーケンス法 (BigDye® Terminator V3. 1Cycle Sequencing Kit : Applied Biosystems™) により塩基配列を決定し、塩基配列データベースに登録されている遺伝子配列との相同性検索により同定を行った。

2) 細胞培養法によるウイルス分離

すべての検体をそれぞれ200 μ lずつ4種類の細胞株 (RD-A, HEp-2, VeroE6, Vero) に接種し、37°Cで5%CO₂に1時間放置後、分離培養液 (1%FBS添加MEM培地) を1ml添加し、34°C、5%CO₂で培養を行い、3代まで継代した。分離されたウイルスの同定は、各種抗ウイルス血清を用いた中和試験のほか、細胞より遺伝子を抽出し上記の遺伝子増幅法を行った。

3. HPeV 3型の遺伝子解析

分離されたHPeV 3型の遺伝子情報に、GenBankに登録されているHPeV 1～6型の標準株 (HPeV 1型 (Accession No. L02971), HPeV 2型 (AJ005695), HPeV 3型 (AB084913), HPeV 4型 (AM235750), HPeV 5型 (AM235749), HPeV 6型 (AB252582)) の遺伝子情報を加え、MEGA6ソフトウェア⁹⁾を用い近隣接合法による分子系統樹を作成した。

4. 無菌性髄膜炎患者の疫学的解析

神奈川県衛生研究所 衛生部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1
*現 企画情報部

患者54症例の発生動向調査票の患者情報に基づき、性別、年齢および臨床症状について解析した。

結果

1. ウイルス検出状況

表1に無菌性髄膜炎患者の症例数とウイルス検出数および検出されたウイルスの内訳を示した。2013年は28症例中18例からウイルスが検出され、検出率は64.3%、2014年は26症例中17例、検出率は65.4%であった。2013年と2014年では症例数、検出率ともに大きな差は見られなかった。

検出されたウイルスの内訳は、2013年はエンテロウイルスが最も多く15株、ヘルペスウイルスが11株、アデノウイルスが1株であり、2014年はHPeV3型が最も多く11株、エンテロウイルスが6株、ヘルペスウイルスが2株であった。

月別の検出傾向を比較すると、2013年では流行の主流であったエンテロウイルスが6～11月に、ヘルペスウイルスが6月と9月を除き4月から11月まで検出された。2014年ではHPeV3型が6～10月にかけて、エンテロウイルスは7～9月と12月に検出された(図1)。

2. 検体・検査方法別検出状況

検体別のウイルス検出状況を表2に示した。エンテロウイルスとHPeV3型は髄液、咽頭ぬぐい液、糞便から検出され、HPeV3型は尿からも検出された。アデノウイルスとヘルペスウイルスのほとんどは咽頭ぬぐい液から検出された。

表1 無菌性髄膜炎患者からのウイルスの検出状況

症例数	検出数	
	2013年	2014年
検出症例数(検出率)	18(64.3%)	17(65.4%)
ヘルペスウイルス	HPeV3 CoxA4	11 ^{h)} 2 ^{h)}
	CoxA16	1
	CoxB1	2 ^{e)}
	CoxB3	4 ^{c)g)}
	CoxB5	1 ^{b)}
	EV68	1 ^{e)}
エンテロウイルス	EV71	1
	E7	1 ^{a)}
	E9	1 ^{b)}
	E16	1
	E18	1 ^{d)}
	E30	1
	ライノウイルス*	2 ^{f)}
小計	15	6
ヘルペスウイルス	HHV-4	1 ^{d)}
	HHV-5	1 ⁱ⁾
	HHV-6	3 ^{f)}
	HHV-7	7 ^{a)b)c)d)}
小計	11	2
アデノウイルス	Ad1	1 ^{e)}
検出株数	27	19

- a) E7 と HHV-7 の重複感染
 - b) CoxB5 と HHV-7 の重複感染
 - c) CoxB3 と HHV-7 の重複感染
 - d) E18 と HHV-4 および HHV-7 の重複感染
 - e) CoxB1 と EV68 および Ad1 の重複感染
 - f) ライノウイルス と HHV-6 の重複感染
 - g) CoxB3 と E9 の重複感染
 - h) HPeV3 と CoxA4 の重複感染
 - i) HPeV3 と HHV-5 の重複感染
- *ライノウイルスはエンテロウイルスと同一プライマーで検出されるため、エンテロウイルスにライノウイルスも含めて記載

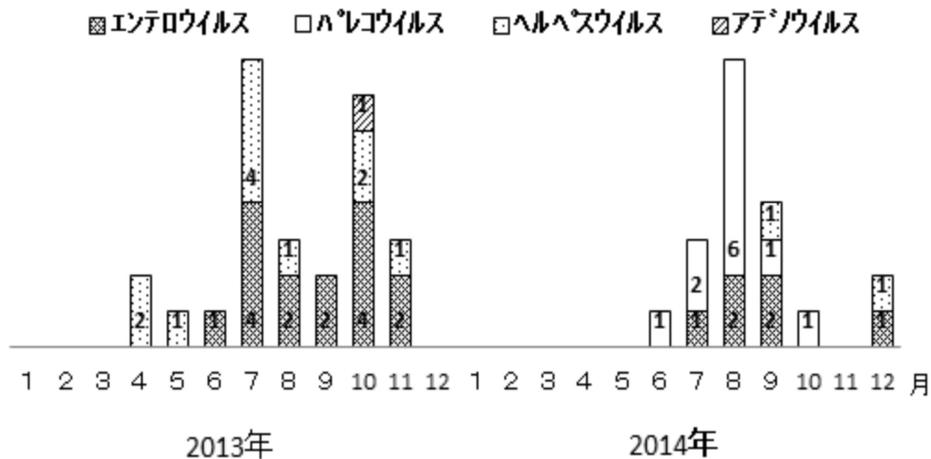


図1 無菌性髄膜炎患者からの月別ウイルス検出状況 (2013.1~2014.12)

表2 検体別ウイルス検出状況

	髄液 (43)	咽頭ぬぐい液 (44)	糞便 (40)	尿 (1)	計 (128)
HPeV3	7	8	9	1	25
エンテロウイルス	9	13	11	0	33
ヘルペスウイルス	0	13	1	0	14
アデノウイルス	0	1	0	0	1
ムンプスウイルス	0	0	0	0	0
計	16	35	21	1	73

() は検体数

表3 検出方法別ウイルス検出状況

	検出数	遺伝子増幅法 (分離率%)	細胞培養法 (分離率%)
HPeV3	11	11(100)	9(81.8)
エンテロウイルス	21	18(85.7)	13(61.9)
ヘルペスウイルス	13	13(100)	0(0)
アデノウイルス	1	NT	1(100)
ムンプスウイルス	0	0(0)	0(0)

検出方法別のウイルス検出数と分離率を表3に示した。HPeV3型と同定された11例のうち、遺伝子増幅法での検出率は100%、細胞培養法では81.8% (9例)であった。一方、エンテロウイルスは、遺伝子増幅法では21例中18例(85.7%)、細胞培養法では13例(61.9%)検出された。ヘルペスウイルスは13例とも遺伝子増幅法で検出され、細胞培養法では検出されなかった。

3. HPeV3型の系統樹解析

系統樹解析の結果を図2に示した。各種患者検体から検出された24株は標準株であるHPeV3型：A308-99 (AB084913)と同一のクラスターを形成し (Bootstrap値99%)、その中で2つのサブクラスターに分かれていた (Bootstrap値 \geq 95%)。HPeV3型が検出された11例のうち8例が藤沢市内、2例が平塚市内、1例が足柄市内の医療機関から得られた検体であるが、発生地域による遺伝学的な差はみられなかった。

4. 患者情報による疫学的解析

年代別のウイルス検出状況を表4に示した。HPeV3型はすべて生後3か月未満、エンテロウイルスは19例中9例の約半数が生後1年未満の乳児から検出された。ヘルペスウイルスは13例中1例が生後1年以降の患者から検出された。

無菌性髄膜炎患者54症例のうち、生後1年未満の乳児25症例の男女比と臨床症状を図3に示した。HPeV3型が検出された11例 (HPeV3検出群)とそれ以外の14例 (HPeV3非検出群)に分け解析した結果、男女比はHPeV3検出群が81.8%対18.2%であったが、HPeV3非検出群では同じ割合であった。臨床症状は、HPeV3検出群ではすべての症例で38℃以上の発熱がみられたが、呼吸器症状がみられた例はなかった。HPeV3非検出群では発熱が71.4%、呼吸器症状は28.6%にみられた。また、HPeV3検出群のその他の症状の内訳をみると、浮腫、白血球減少、チアノーゼ、代償性ショック等、重症の症状がみられた。

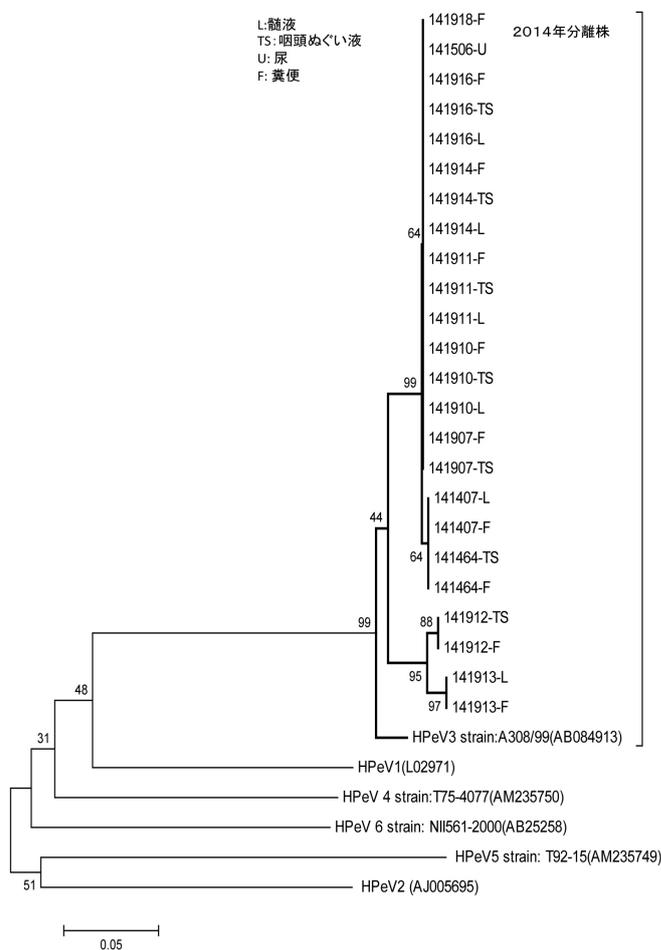


図2 HPeVのVP1-VP3部分領域 (261 b p) のNJ系統樹

表 4 年齢別ウイルス検出状況

	0-<3M	3-<12M	1-<3Y	3-<13Y	≥13Y	計
患者数	22	3	12	9	8	54
HPeV3	11					11
エンテロウイルス	8	1	2	6	2	19
ヘルペスウイルス	1	1	3	6	2	13
アデノウイルス			1			1
計	24	4	14	14	9	65

* 重複感染例はそれぞれ検出されたウイルス毎にカウント。ただし、同一属の場合は1とカウント

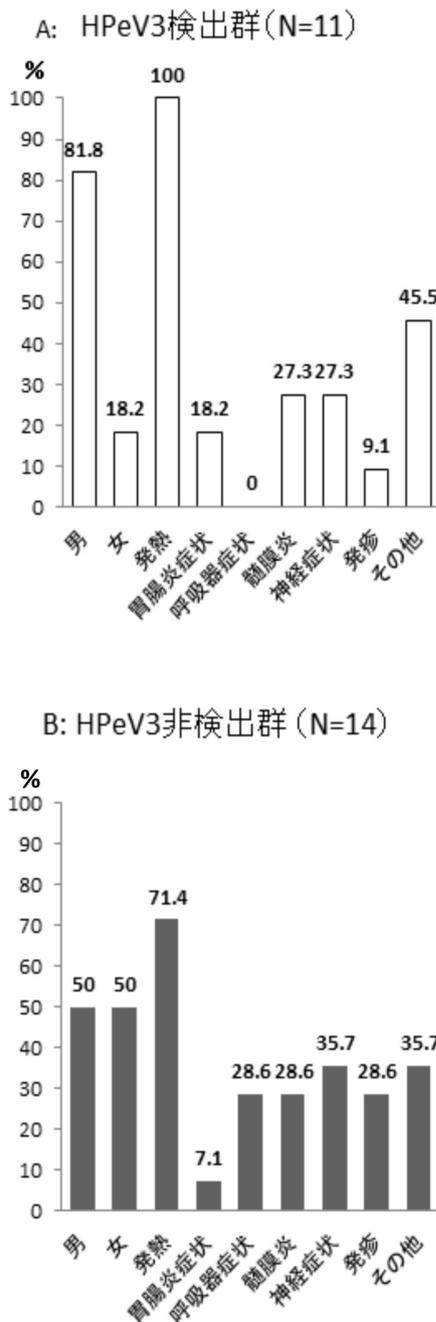


図 3 無菌性髄膜炎患者の男女比と臨床症状

考 察

神奈川県における無菌性髄膜炎患者からのウイルス検出状況をまとめたところ、最も多く検出されたウイルスは2013年ではエンテロウイルス、2014年はHPeV 3型であった。病原微生物検出情報 (IASR) によると、各都道府県市の地方衛生研究所からのHPeV 3型の分離/検出報告数は、2013年では3例であったが2014年は333例と急増し (2015年4月27日分報告数)、2014年30~31週をピークに22週から40週頃まで検出されている。今回の調査で、神奈川県域においても同時期にHPeV 3型が検出されたことから同様の流行があったと考えられた。しかし、IASRの診断名別のHPeV 3型分離/検出数をみると、その他・不明が256例と最も多く、以下無菌性髄膜炎38例、上気道炎21例、手足口病18例 (2015年4月27日分報告数) であった。神奈川県で検出されたHPeV 3型は、無菌性髄膜炎が11例と最も多く、その他手足口病、不明熱、咽頭結膜熱が各1例ずつであった。また、遺伝子解析の結果、今回検出された24株のHPeV 3型は、1999年に分離されたHPeV 3型の標準株と同一のクラスターを形成したことから、いずれの株も1999年に分離された株と遺伝学的に近縁であり、さらに発生地域における遺伝学的な差がみられないこと、HPeV 3型が2014年6月~10月の間に検出されたことから、神奈川県において2014年の夏季に遺伝学的に近縁のHPeV 3型による無菌性髄膜炎の流行があったと考えられた。

HPeV 3型が検出された無菌性髄膜炎患者はいずれも生後3か月未満で、エンテロウイルスなど他のウイルスが検出された患者よりも低月齢である傾向がみられた。また、男性から多く検出されたが、検出例が少なく男女の違いによる臨床症状の差は認められなかった。共通する臨床症状は高熱で、無菌性髄膜炎を発症していることから重症例であったと考えられるが、上気道炎など呼吸器症状はみられなかった。HPeV 3型は不顕性感染が多いとされるが、乳児に感染した場合は中枢神経系の関連が報告されている^{10), 11)}。オーストラリアではHPeV 3型感染乳児118例のほとんどが敗血症様の症状を呈し、高い確率で高熱、頻脈、循環障害、易刺激性が認められたことが報告されている¹²⁾。国内でも同様に発熱、頻呼吸、頻脈、網状チアノーゼ、白血球値減少、脳症等呈した敗血症ショック例など重症例が報告されている¹³⁾。今回データとして使用した発生動向調査票にもHPeV 3型検出群はこれらの症状が記載された例もみられ、重症化する理由として、母体からのHPeV 3型に対する移行抗体が少なく、出生直後の免疫能が未熟なためと推察されている¹⁴⁾。HPeV 3型の病原性や疫学的特徴から、罹患する年齢や性別が関与すると考えられたが、その解明には更

に検出例を増やして調査する必要がある。

無菌性髄膜炎の原因ウイルスを検索する際、髄液からの検出が重要であるが、検体として髄液のほか咽頭ぬぐい液、糞便などが検査対象となる。検体別のウイルス検出状況から、HPeV 3型は髄液以外の検体からも検出され、HPeV 3型はいずれの検体にも存在することが確認された。また、検出法の比較において、HPeV 3型の検出はVP 3-VP 1部分領域を標的としたRT-PCR法が高感度であったが、細胞培養でもVeroあるいはVeroE 6から高確率で分離されており、今後遺伝学的、ウイルス学的性状の解析を行うためには検体からの遺伝子増幅法(RT-PCR法、PCR法)と細胞培養の併用は重要であると考えられる。

2014年におけるHPeV 3型の流行は予測されていたが、エンテロウイルスと同様、今後周期的に流行する可能性がある。HPeV 3型感染症は臨床症状が多岐に渡っており、低月齢で罹患すると重症化する理由など不明な点も多く残されている。今後、HPeV 3型の実態を把握し、不明点を解明していくことは公衆衛生上重要であると考えられた。

謝 辞

本調査を実施するにあたり、多大なご協力を頂きました基幹および小児科病原体定点医療機関の先生方と藤沢市保健予防課の皆様には深謝いたします。

(平成27年8月1日受理)

文 献

- 1) Cherry, J.D. And Shields, W.D.: Aseptic meningitis and viral meningitis, In "Textbook of Pediatric infectious diseases 4th Ed", pp.457-467, Saunders, Philadelphia (1998)
- 2) Ito, M., Yamashita, T., Tsuzuki, H., Takeda, N. and Sakae, K.: Isolation and identification of a novel human parechovirus, *J. Gen. Virol.*, **85**, 391-398 (2004)
- 3) 相澤悠太, 鈴木優子, 大石智洋, 齋藤昭彦, 渡邊香奈子: 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, 国立感染症研究所 病原体微生物情報, **35**, 220 (2014)
- 4) Harvala, H., Robertson, I., McWilliam, Leitch.E.C., Benschop, K., Wolthers, K.C., et al.: Epidemiology and Clinical Associations of Human Parechovirus Respiratory Infections., *J. Clin. Microbiol.*, **46**, 10, 3446-3453 (2008)
- 5) 川俣 治: RT-PCR法によるエンテロウイルス及びライノウイルスの検出系, 新潟医学界雑誌, **111**, 633-646 (1997)
- 6) 宗村徹也, 藤本嗣人, 近平雅嗣, 木村博一, 西尾治, 吉田弘ほか: エンテロウイルス遺伝子診断法における市販RNA抽出キット選択の影響, 感染症学雑誌, **82**, 55-57 (2008)
- 7) 加藤篤, 竹内薫, 唐内良明, 木所稔, 青森県環境保健センター, 長崎県衛生公害研究所他: ムンプスウイルス病原体検査マニュアル, 国立感染症研究所 <<http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/Mumps2015.pdf>>
- 8) Johnson, G., Nelson, S., Petric, M. and Tellier, R.: Comprehensive PCR-based assay for detection and species identification of human herpesviruses., *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 3274-3279 (2000)
- 9) Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S.: MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0, *Molecular Biology and Evolution*, **30**, 2725-2729 (2013)
- 10) Wolthers, K.C., Benschop, K.S., Schinkel, J., Molenkamp, R., Rosemarijn, M., Bergevoet, R.M., et al.: Human parechoviruses as an important viral cause of sepsislike illness and meningitis in young children., *Clin. Infect. Dis.*, **47**, 358-63 (2008)
- 11) Harvala, H., Robertson, I., Chieochansin, T., McWilliam Leitch, E.C., Templeton, K. and Simmonds, P.: Specific Association of Human Parechovirus Type 3 with Sepsis and Fever in Young Infants, as Identified by Direct Typing of Cerebrospinal Fluid Samples, *J. Infect. Dis.*, **199**, 1753-1760 (2009)
- 12) Khatami, A., McMullan, B.J., Webber, M., Stewart, P., Francis, S., Timmers, K.J. et al.: Sepsis-like disease in infants due to human parechovirus type 3 during an outbreak in Australia, *Clin. Infect. Dis.*, **60**, 228-36 (2015)
- 13) 澤田奈実, 問田千晶, 六車崇, 宮入烈: 重篤化した乳児期ヒトパレコウイルス感染症の2例, 日集中治誌, **21**, 3, 258-262 (2014)
- 14) Abed, Y. and Boivin, G.: Human parechovirus types 1, 2 and 3 infections in Canada, *Emerg. Infect. Dis.*, **12**, 969-75 (2006)