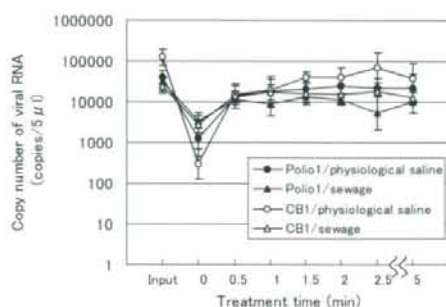


A. 超音波処理

(3%BeefExtract (溶媒:水))



B. ボルテックス

(3%BeefExtract (溶媒:水))

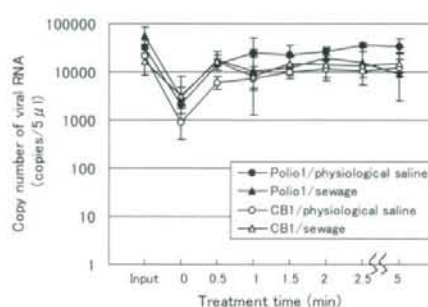


図2. リアルタイムPCR法によって定量した、溶出方法別のPolio1およびCB1の回収量。

A, 超音波処理; B, ボルテックスミキサーによる攪拌により、3% Beef Extract 水溶液 (溶媒:水) 中でウイルスを溶出させた。

海外旅行者から分離されたエンテロウイルスの遺伝子解析に関する研究

研究代表者 清水博之 国立感染症研究所

協力研究者 山下照夫、伊藤 雅、皆川洋子 愛知県衛生研究所

研究要旨

1989年～1998年に、主に東南アジア諸国を旅行し、帰国時に名古屋空港検疫所で胃腸炎症状を訴えた人3,115名中58名から分離されたウイルスのうち、既知のエンテロウイルス抗血清で中和された25種類の血清型のウイルス50株のVP1領域の配列を決定した。50株の配列は、各々の血清型の既知の塩基配列と75%以上の相同性を示す一方他の血清型との相同性は70%以下で、塩基配列情報に基づき血清型別が可能であることが確認された。25血清型のエンテロウイルスのうち17血清型は、愛知県の感染症発生动向調査では分離検出経験がないか希な血清型であった。分離例の多いエコーウイルス6型、11型、18型、及び25型について、愛知県の分離株と比較したところ、塩基配列や分離時期から海外から持ち込まれたものと推定された。毎年海外から県内へ、エンテロウイルスに限っても多様なウイルスがしばしば持ち込まれているものと推察される。

A. 研究目的

エンテロウイルスはピコルナウイルス科に属するウイルスで、各種の動物から分離される。ヒトエンテロウイルスは、中和反応を用いて66種の血清型に分類されていたが、近年これらの遺伝子解析が進み、同一の血清型であればVP1領域の塩基配列の相同性が75%（アミノ酸で88%）以上あり、他の血清型とは70%（同75%）以下の相同性である事が報告された。その結果に基づいて、多くの新型エンテロウイルスが同定されている。我々は、本方法の有用性を確認するために、海外旅行者から分離されたウイルスのうち血清型別分類が可能であった25血清型50ウイルス株のVP1領域遺伝

子解析を実施した。さらにウイルスが分離された時期に愛知県感染症発生动向調査において分離された同一血清型のウイルスの塩基配列も一部調べ、旅行者からのものと比較した。

B. 研究方法

研究対象としたウイルスとして、1989年～1998年に主に東南アジア諸国を旅行し、帰国時に名古屋空港検疫所で胃腸炎症状を訴えた人3,115名中58名から分離されたウイルスのうち、既知のエンテロウイルス抗血清で中和された25種類の血清型のウイルス50株を用いた。RD-18S細胞、或いはHeLa細胞にて分離した株の遠心上清からト

リゾールを用いてウイルス RNA を抽出した。VP1 領域の遺伝子増幅のため Oberste らのプライマー 187(+), 188(+), 及び 189(+), と 011(-) を用いて、one-step RT-PCR 法を行った。増幅した PCR 産物は精製後、pGEM-T ベクター (Promega) に組み込み、その配列を決定した。塩基配列の相同性および系統樹解析は Genetyx program で行った。また、同時期に愛知県感染症発生動向調査において分離されたエコーウイルス 6 型、11 型、18 型、及び 25 型についても VP1 領域の配列を同様に決定した。

C. 研究結果

VP1 領域の塩基配列を比較したところ、25 血清型のウイルス 50 株の VP1 領域の配列は、各々の血清型の既知のものと同様以上の相同性を示す一方他の血清型の配列との相同性は 70% 以下で、塩基配列のみから血清型別が可能であった。ただし、17 血清型 30 株はデータベースに登録された配列との相同性が 90% 未満 (75~89%) と同一血清型の中で今までに報告のない配列であった。表 1 に海外旅行者から分離された株の血清型と分離株数を示した。分離株は愛知県感染症発生動向調査において分離されたことのないウイルス 9 血清型 20 株 (分類 1)、分離例はあるが数が少ない 8 血清型 16 株 (分類 2)、分離例の多い 8 血清型 14 株 (分類 3) に分かれた。

分離例の多いウイルスの内、エコーウイルス 6 型、11 型、18 型、及び 25 型について旅行者からの分離時期と、愛知県感染症発生動向調査における患者からの分離時期及び分離株数を比較した (表 2)。エコーウイルス 6 型は、海外旅行者から 1989 年に 2

株、1993 年と 94 年に 1 株ずつ分離されたが、感染症発生動向調査では 1992 年に流行した他に 1998 年、90 年、91 年、94 年、及び 95 年にも分離されている。エコーウイルス 11 型は、海外旅行者から 1990 年に 1 株、95 年に 2 株分離されたが、愛知県では 1989 年、93 年、及び 98 年に流行があり、他にも 1992 年と 95 年に 1 株ずつ分離されている。エコーウイルス 18 型は、海外旅行者から 1995 年に 1 株分離されたが、愛知県では 1988 年と 98 年に流行し、1989 年から 97 年の間は分離されなかった。エコーウイルス 25 型は、海外旅行者から 1995 年に 1 株分離されたが、愛知県では大きな流行はみられなかったものの、1990 年、92 年、94 年、95 年、97 年、及び 98 年に 1 株~8 株のウイルスが分離された。

これらのウイルスの VP1 領域の塩基配列を系統樹解析した結果を図に示した。海外旅行者から分離されたエコーウイルス 6 型 4 株は、いずれも独立した配列であった。また、愛知県内の分離株も年により異なった配列を示し、今回の調査期間以外に分離された株も含め旅行者から分離された株とは異なるものであった。エコーウイルス 11 型は、旅行者から分離された 3 株中 1 株 (T90-0107) は 1980 年代に県内で分離した株と 95% の相同性を示し比較的近縁であった。愛知県内で分離された株は流行した年により 3 グループに分けられたが、海外旅行者から分離された他の 2 株は全く独立した配列であった。エコーウイルス 18 型の愛知県内で分離された株も流行した年で異なった配列を示したが、海外旅行者から分離された 1 株はそれらとはさらに異なっていた。エコーウイルス 25 型は、1995 年に海

外旅行者から分離されたが、同年に愛知県内で分離された同血清型ウイルス株とは塩基配列がかなり異なり、3年後の1998年に県内で分離された株と近縁のウイルスであった(相同性95%)。

D. 考察

海外旅行者から分離された25血清型50株のエンテロウイルスのVP1領域の配列は、既知の同一血清型の配列と75%以上の相同性を示しており、Obersteらが提唱した、塩基配列の相同性と血清型の相関を確認することができた。一方、25血清型50株中17血清型30株は、データベースに登録のある配列と90%未満の相同性を示しており、今までに報告のない配列であった。エンテロウイルスは同一血清型でも多くの遺伝子型が存在することが示唆された。

海外旅行者から分離された25血清型のエンテロウイルスのうち17血清型は、愛知県の感染症発生動向調査では分離されることがないか、分離が希な血清型のウイルスであった。これらは、旅行者により海外から持ち込まれた可能性が高いウイルスであると考えられる。また、愛知県内でも良く分離されるウイルス8血清型についても、4血清型9株を調べたところ7株は愛知県の流行株と配列が明らかに異なっていた。愛知県内流行株と95%の相同性を示し、近縁な株と思われた2株についても、分離された年が異なっていたことから、これらの株も海外から持ち込まれたものであると考える。我々の分離株は1989年から98年の10年間で約3,000名の旅行者を調べた結果得られたものである。毎年海外からかなりの数のウイルスが持ち込まれているものと推察さ

れる。

E. 結論

海外旅行者から分離された25血清型50株のエンテロウイルスを用いて、VP1領域の塩基配列の比較でも型別可能である事が確認された。愛知県感染症発生動向調査における検出頻度、検出時期、VP1領域の塩基配列等を比較した結果、これらのウイルスの殆どが新たに海外から持ち込まれたウイルスであると推察された。

G. 研究発表

1. 論文発表

山下照夫、伊藤 雅、川口まり子、田中正大、秦 真美、小林慎一、栄 賢司、皆川洋子：感染性胃腸炎および流行性角結膜炎からのアデノウイルス検出状況—愛知県、病原微生物検出情報29(4)：96-98, 2008

2. 学会発表

1)伊藤 雅、山下照夫、皆川洋子：愛知県におけるヒトパレコウイルス(HPeV)の検出状況、第49回日本臨床ウイルス学会、犬山、2008年6月

2)山下照夫：発生動向からみた胃腸炎の新知見—パレコウイルス、コブウイルス、ノロウイルス、第49回日本臨床ウイルス学会、犬山、2008年6月

3)Teruo Yamashita, Miyabi Ito, Hideaki Tsuzuki, Kenji Sakae, and Hiroko Minagawa: Molecular Identification of Enteroviruses Including Two New Types ('CV-A9r' and EV-98) Isolated from Japanese Travelers Returning from Southeast Asia. XIV. International Congress of Virology, Istanbul, August, 2008

4)山下照夫、伊藤 雅、皆川洋子：下水から検出された新型アイチウイルスと推定される遺伝子断片の解析、第56回日本ウイルス学会、岡山、2008年10月

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

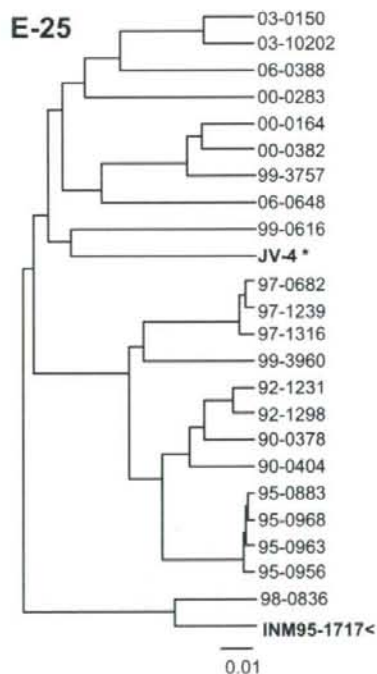
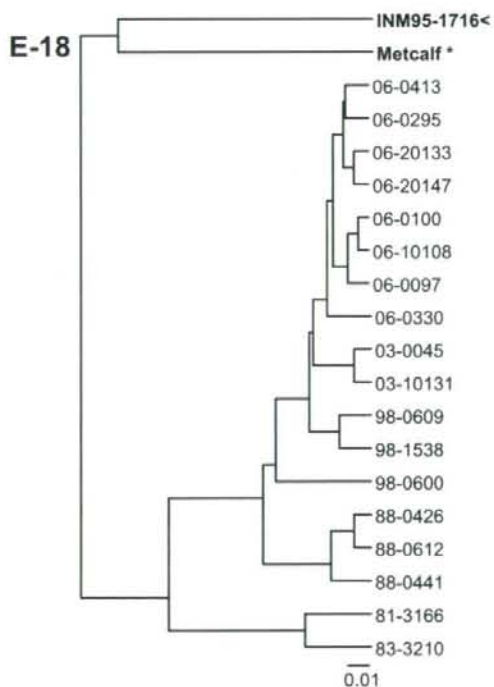
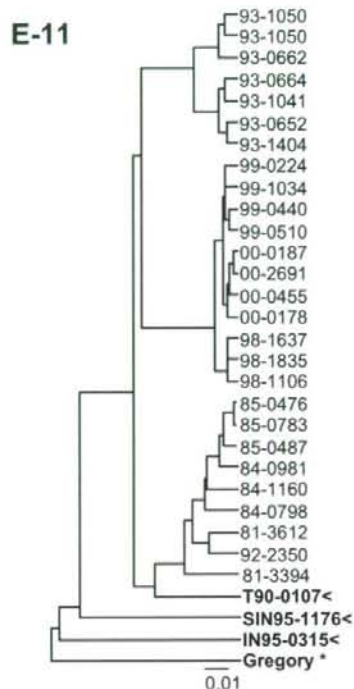
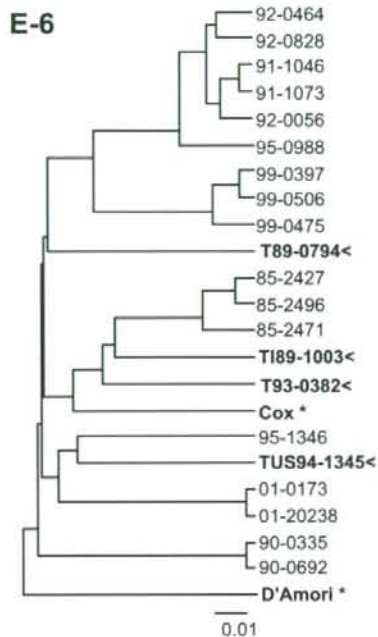


図 エコーウイルス 6 型 (E-6)、11 型 (E-11)、18 型 (E-18)、25 型 (E-25) の VP1 領域の系統樹解析 (UPGMA 法)

* : 標準株、< : 海外旅行者からの分離株、他は愛知県発生動向調査における分離株 (分離年・検体番号)

表1 海外旅行者から分離されたエンテロウイルスの血清型と愛知県
感染症発生動向調査における分離状況

分類*	ウイルス	海外旅行者 分離数	愛知県内 分離数
1	コクサッキーウイルス-A7型	1	0
	エコーウイルス 1型	5	0
	エコーウイルス 19型	2	0
	エコーウイルス 20型	2	0
	エコーウイルス 29型	2	0
	エコーウイルス 32型	1	0
	コクサッキーウイルス-A20型	1	0
	コクサッキーウイルス-A21型	4	0
	コクサッキーウイルス-A24型	2	0
	小計	20	0
2	エコーウイルス 2型	2	8
	エコーウイルス 5型	1	6
	エコーウイルス 14型	1	1
	エコーウイルス 15型	3	1
	エコーウイルス 17型	1	2
	エコーウイルス 21型	2	8
	エコーウイルス 24型	3	3
	エコーウイルス 27型	3	4
		小計	16
3	コクサッキーウイルス-B5型	1	31
	エコーウイルス 3型	1	29
	エコーウイルス 6型	4	50
	エコーウイルス 7型	2	43
	エコーウイルス 9型	1	90
	エコーウイルス 11型	3	49
	エコーウイルス 18型	1	150
	エコーウイルス 25型	1	20
		小計	14

*: 感染症発生動向調査において(1)分離されたことのないもの、(2)分離数が少ないもの、(3)良く分離されるもの。

表2 エコノミーウイルス6型、11型、18型、及び25型の愛知県発生動向調査と海外旅行者からの年別分離成績

ウイルス	対象	分離数	年別分離数															
			1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998					
エコノミーウイルス6型	愛知県	50	1		8	5	32		1	3								
	旅行者	4	2				1	1										
エコノミーウイルス11型	愛知県	49	12			1	16		1							19		
	旅行者	3	1							2								
エコノミーウイルス18型	愛知県	150	91													59		
	旅行者	1														1		
エコノミーウイルス25型	愛知県	39		4		1		2	8						4	1		
	旅行者	1														1		

厚生労働省科学研究費補助金
ウイルス感染症の効果的制御のための病原体サーベイランスシステムの検討研究事業
分担研究報告書

上気道炎患者由来検体からの高感度エンテロウイルス検出法に関する検討

吾郷昌信 長崎県環境保健研究センター

研究要旨

来院時、上気道炎症状を呈した患者の咽頭ぬぐい液 216 検体から Consensus-Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primers (CODEHOP) を用いてエンテロウイルス間で多様性のある VP1 領域を増幅する CODEHOP VP1 RT-snPCR 法によりヒトエンテロウイルス(HEVs)の検出、同定を行い、培養細胞を用いたウイルス分離同定法との比較検討を行った。使用した培養細胞では HEVs 49 株が分離され、49 株中 48 株は HEV B に属するウイルスで、HEV A に属するウイルスは CV-A3 の 1 株のみであった。本法による HEVs の分離率は、22.7%であった。これに対して、CODEHOP VP1 RT-snPCR 法による HEVs の検出、同定では、105 株が検出・同定され、陽性率は 48.6%と培養細胞法の 2 倍以上の高値を示した。同定された HEVs の 7 割以上は培養細胞で分離しにくい HEV A に属するウイルス(77 株)であった。したがって、本方法は従来のウイルス分離同定法に比較して多検体処理への応用も可能で、高感度かつ比較的短時間に同定まで行える上に、HEV A に属するウイルスでも問題なく型別同定でき、血清型を明らかにした後に使用する細胞を選択して目的のウイルス分離を行うこともできることなどから極めて有用な方法である。

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は、現在 10 の種に分類されている。このうち、ヒトに対して病原性を有するものは、ヒトエンテロウイルス A ~D およびヒトライノウイルス A ~C の 7 種に分類され、200 以上にも上る多数の血清型が存在する。

ヒトエンテロウイルス(HEVs)は、上気道炎、ヘルパンギーナ、手足口病等のように比較的軽微な症状を示す疾患から無菌性髄膜炎や脳炎などのような重篤な中

枢神経症状を呈する疾患まで、多彩な疾病の原因ウイルスである。一般に HEVs は、アデノウイルスと並んで夏期における普通感冒(夏かぜ)の代表的なウイルスとして知られているが、わが国における実態は明らかにされていない。

HEVs の分離同定は、培養細胞を用いた組織培養法でウイルスを分離し、中和試験によって血清学的に行われてきた。しかし、検査方法が煩雑な上に検査に長時間を要し、さらに、培養細胞で分離困難なウイルスや、型別困難なウイルスが出

Table 1. Primers used for cDNA synthesis, PCR1, snPCR2, and sequencing (Nix *et al.*, 2006)

Primers	5'-3' Sequences ^a	Amino acid motif	Location ^c
AN32	GTYTGCCA	WQT	3009-3002
AN33	GAYTGCCA	WQS	3009-3002
AN34	CCRTCRTA	YDG	3111-3104
AN35	RCTYTGCCA	WQS	3009-3002
SO224	GCIATGYTIGGIACICAYRT	AMLGTH(I/L/M)	1977-1996
SO222	CICIGGIGGIAYRWACAT	M(F/Y)(I/V)PPG(A/G)	2969-2951
AN89	<u>CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG</u> ^b	PALTA(A/V)E(I/T)G	2602-2627
AN88	<u>TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT</u> ^b	M(F/Y)(I/V)PPGGPV	2977-2951

^aAmbiguity codes based on Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB) are as follows: G, guanine; A, adenine; C, cytosine; T, thymine; R, A/G; Y, C/T; W, A/T; N, A/C/G/T; I, inosine.

^bThe nondegenerate clamp regions within AN88 and AN89 sequences are underlined.

^cThe locations of all primers are those relative to the genome of PV1 Mahoney strain (GenBank accession number J02281).

現するなどの問題点がある。培養細胞で分離困難なウイルス、特にコクサッキーウイルス A (CV-A) に属するウイルスは、乳呑みマウスを用いて分離同定が行われてきたが、培養細胞を用いた方法よりさらに煩雑である。近年、臨床検体から直接 RT-PCR 法でウイルス遺伝子を増幅し、VP4 領域の塩基配列を解読することにより迅速にウイルスの型別同定が行われるようになってきたが、比較的保存された領域のためエンテロウイルスであることは確認できるものの、型別同定が困難な場合も多い。最近、Nix らによって開発された Consensus-Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primers (CODEHOP) を用いてエンテロウイルス間で多様性のある VP1 領域を増幅する CODEHOP VP1 RT-snPCR 法が、より高率にエンテロウイルスの型別同定を可能にする方法として注目されている。CODEHOP とは、関連した遺伝子を増幅するための、効率的な混合塩基プライマー設計法である。この設計法は、目的とするタンパク質ファミリ

間で高度に保存されている 3~4 アミノ酸をもとに、3' 側に多くの混合塩基を有するプライマーをデザインすることが特徴である。

本研究では夏かぜにおけるエンテロウイルスの侵淫状況を明らかにするために、臨床検体から CODEHOP VP1 RT-snPCR 法を用いたエンテロウイルス高感度検出法の有効性を確認すると共に、培養細胞を用いたウイルス分離・同定との比較検討を行った。

B. 研究方法

2007 年 8 月から 10 月までの期間に長崎県下の小児科医院において、来院時、上気道炎症状を呈した患者より採取された咽頭ぬぐい液 216 検体を材料とした。

咽頭拭い液からのウイルス RNA の抽出は、High Pure Viral RNA Kit (Roche) および QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて行った。CODEHOP VP1 RT-snPCR は、Table 1 に示すプライマーを用いて、Nix らの方法に準じて行った。手順の概略

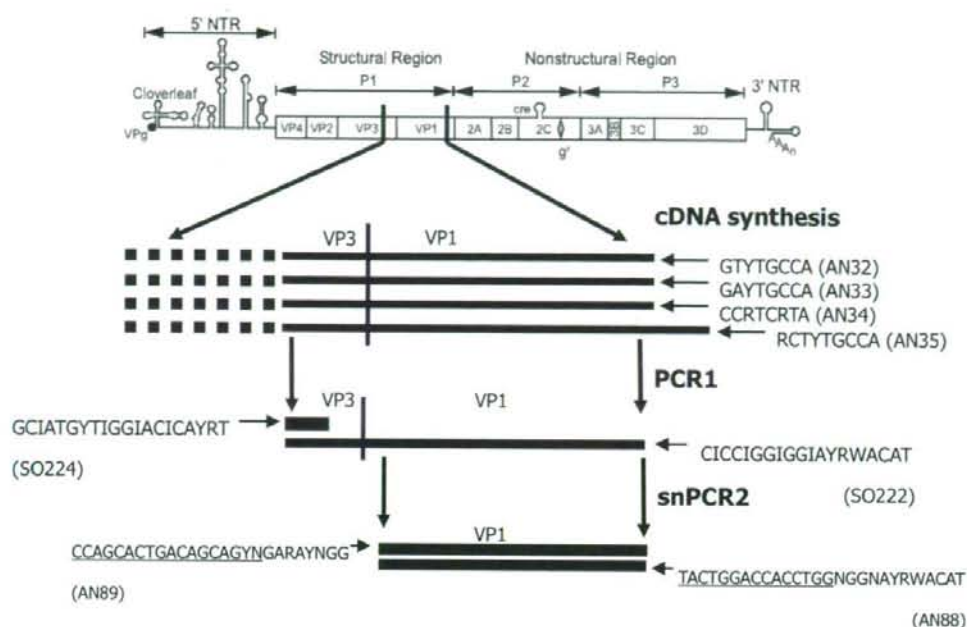


Figure 1. Schematic of the locations of the primers used and the representation of the steps in the partial VP1 amplification method

を Fig. 1 に示す。RT-PCR によって増幅された遺伝子産物は、塩基配列を決定した後、Blast により相同性の検索を行い、最も高いスコアを示したデータベースに基づいて型別同定した。

ウイルス分離には HEp-2、RD-18S、Caco-2、Vero 細胞を使用した。ウイルスの型別同定は、抗血清を用いた中和法により行った。

C. 研究結果

来院時、上気道炎症状を呈した患者より採取された咽頭ぬぐい液 216 検体からの CODEHOP VP1 RT-snPCR 陽性数は 105 で、陽性率は 48.6%であった。これらの遺伝子産物の塩基配列を決定し、Blast 検索を行って型別同定したところ、エコーウイルス 5 型 (E5)、E6、E9、E30、コク

サッキーウイルス A3 型(CV-A3)、CV-A5、CV-A6、CV-A16、CV-B4、CV-B5、およびポリオウイルス 1 型がそれぞれ 6 株、3 株、1 株、2 株、7 株、12 株、8 株、50 株、10 株、5 株、および 1 株の計 105 株であった。HEVs の種別にまとめると、HEV A に属するウイルスが 77 株と最も多く、全体の 7 割以上を占めた。HEV B および HEV C に属するウイルスは、それぞれ 27 株および 1 株が同定された。

一方、培養細胞によるウイルス分離では、67 株のウイルスが分離(分離率 31.0%)され、HEVs 49 株、ヒトパレコウイルス (HPeV)1 株、アデノウイルス (Ad) 4 株、未同定ウイルス 13 株であった。培養細胞による HEVs 分離率は 22.7%で、CODEHOP VP1 RT-snPCR 法と比較すると半分以下の確率であった。分離された 49

株の HEVs の内訳は、48 株が HEV B に分類される E-5、E-6、E-7、E-9、E-17、E-24、E-25、E-30、CV-B4 および CV-B5 であり、E-5 が 11 株、E-6 が 5 株、E-30 が 4 株、CV-B4 が 15 株、CV-B5 が 8 株で他はそれぞれ 1 株ずつであった。HEV A に属するウイルスは、上気道炎患者由来 CV-A3 の 1 株のみであった。

CODEHOP VP1 RT-snPCR 法により同定できた検体のうち、ウイルスが分離され、同定できた 54 検体について結果を比較すると、25 検体の結果が一致し、11 検体からは Ad-1、-6 型や HPeV-1 等の HEVs 以外のウイルスや E7、E24、CV-B4 および CV-B5 などが分離され、異なる結果が得られた。また、CODEHOP VP1 RT-snPCR 法では増幅できなかった検体のうち、18 検体から E5 が 8 株、CV-B4 が 5 株、E6 が 2 株、その他 E25、E30 および Ad-8 が 1 株ずつ分離同定された。

疾患別に見ると、無菌性髄膜炎患者由来の 6 検体のうち 4 検体は何れの方法でも CV-B4、CV-B5 および E30 といった HEV B に属し、無菌性髄膜炎を惹起する代表的なウイルスが同定され、両者の結果は完全に一致した。ヘルパンギーナの患者 9

D. 考察

今回、上気道炎症状を呈した患者からの咽頭ぬぐい液からの CODEHOP VP1 RT-snPCR 法による HEVs の検出率は従来法と比較して 2 倍以上高効率の 48.6% を示したが、検体を採取した期間が 8 月下旬から 10 月上旬までの約 2 ヶ月間と短期であったため、HEV による夏かぜの割合を真に反映する結果であるとは言い難い。今後、夏かぜの流行期間全体を通じて検出・同定を行う必要があるものと思われ

名の検体のうち、CODEHOP VP1 RT-snPCR 法では 7 検体から CV-A3 が 1 株、CV-A5 が 4 株、CV-A6 が 2 株同定された。このうち、CV-A3 が同定された検体からのみ HPeV-1 が分離された。また、手足口病(HFMD)の患者由来 55 検体のうち、41 検体から CV-A16 が 40 株、CV-A3 が 1 株、CODEHOP VP1 RT-snPCR 法により同定された。本法により CV-A16 の存在が確認された 4 検体から手足口病の原因とは考え難い CV-B4、CV-B5、E30 および Ad-1 が分離されたが、HEV A に属するウイルスは分離できなかった。未同定ウイルス 5 株が分離された以外はウイルス分離できなかった。上気道炎に加えて口内炎を併発した患者由来検体 9 検体のうち、7 検体から CV-A16 が 6 株、CV-A5 が 1 株同定され、CV-A16 が同定された 6 検体のうち 1 検体から Ad-1 が分離された。最終的に上気道炎と診断された患者からの検体からは、CODEHOP VP1 RT-snPCR 法では大半 HEV A に属するウイルスが同定されたのに対して、ウイルス分離では CV-A3 が 1 株分離された以外はすべて HEV B に属するウイルスであった。

る。

上気道炎患者から分離された HEVs は、CV-A3 の 1 株を除いて他の 48 株は全て HEV B に属するウイルスであり、今回用いた培養細胞による CV-A の分離率は極めて低率であった。また、HEV A に属する CV-A が原因ウイルスとなるヘルパンギーナや HFMD からは直接これらの疾患の原因とは考え難いウイルス 4 株以外分離することができなかった。これは、使用した培養細胞がこれらのウイルスに対して感受性が高く、CV-A に対して感受

性が低いことにより多重感染している患者の検体から選択的に増殖してきたものと考えられるが、現行の培養細胞では何れを使用しても高率に CV-A を分離することは難しい。従来、CV-A の分離、同定には乳呑みマウスが多用されてきたが、煩雑である上に判定まで長期間を要し、本法が使用できるのは飼育施設有する研究機関に限られる。今回、これらの方法に変わる高感度検出法として、CODEHOP VP1 RT-snPCR 法に基づいて増幅した VP1 領域の塩基配列を決め、同定を行った。その結果、咽頭ぬぐい液から 50% に近い検出率で HEVs を同定し、懸案の HEV A に属するウイルスも高率に検出された。また、HFMD の患者由来検体の大半からは CV-A16 が同定されるなど疾患別に本法により同定された HEVs をみても問題ないものと思われる。また、ウイルス分離に使用できる培養細胞に制限のある HEV A に属するウイルスの関与が疑われる疾患からの検体については、予め本法により原因ウイルスを特定した上で特異性の高い適切な細胞を選択して高効率にウイルス分離を行うこともできるものと考えられる。

本実験で使用したプライマーは、比較的安定した結果をもたらしてくれたが、E5 に関しては、培養細胞で分離できているにもかかわらず 8 株も増幅することができなかった。使用したプライマーでの増幅がかかり難い配列に変化している可能性もあるので、これら増幅できなかった検体の VP1 領域の塩基配列を全て明らかにして検討してみる必要があると思われる。

今回の研究により、CODEHOP VP1 RT-snPCR 法は、HEVs のうち、HEV A~C

に属するウイルスの高感度検出並びに同定に極めて有用な方法であることを示した。今後は、HEVs に属するウイルスのうち、冬期普通感冒の最大の原因ウイルスであり、HEV と同様 100 以上の血清型が存在するヒトライノウイルス A から C に属するウイルスについても本法の有用性について、検討を進める予定である。

E. 結論

CODEHOP VP1 RT-snPCR 法は、100 以上もの血清型が存在する HEV A から C に属するウイルスを煩雑なウイルス分離を行うことなく、迅速かつ高感度に検出・同定する方法として極めて有用な方法である。特に、これまで培養細胞によるウイルス分離が困難で、乳呑みマウスによるウイルス分離が多用されてきた HEV A に属するウイルスには有用性の高い方法である。

研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

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（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書（平成 20 年度）

ウイルス感染症の効果的制御のための病原体サーベイランスシステムの検討
～エンテロウイルスによる小児期中枢神経合併症サーベイランスについて～

研究協力者：中野貴司（国立病院機構三重病院 臨床研究部 国際保健医療研究室長）

共同研究者：浅田和豊、根来麻奈美、松野紋子、田中孝明、伊東宏明、一見良司、菅秀、
藤澤隆夫、庵原俊昭（国立病院機構三重病院）
赤地重宏、田沼正路、大熊和行（三重県保健環境研究所）

研究要旨

2008 年 7 月に三重病院へ無菌性髄膜炎疑いで入院した 12 例について、患者特性、臨床情報、ウイルス学的検査の結果を解析した。髄液 PCR にてエンテロウイルス (EV) 陽性が 8 例、うち 3 例で髄液細胞数増多を認めた。髄液 PCR 陽性例では発熱、頭痛、嘔吐、髄膜刺激症状の 4 症状を、陰性例では 2～4 症状を認めた。髄液 PCR 陽性例では、陰性例に比し炎症性サイトカインが有意に上昇していた。以上より、EV 感染症における中枢神経合併症は、髄液細胞増多を認めない例でも生じていることが推察され、病因診断は重要であると考えられた。PCR 法で EV が陽性であった検体の遺伝子配列解析を実施した結果、エコーウイルス 30 型の流行と考えられた。

A. 研究目的

エンテロウイルス属 (EV) は、手足口病やヘルパンギーナなど小児期によくみられる感染症の原因ウイルスとして頻度が高い。そしてまた、ポリオウイルスによる麻痺、エンテロウイルス 71 型による脳炎など重篤な中枢神経合併症を起こすことも知られている。また、予後は良好であるが無菌性髄膜炎の流行がしばしば認められる。今年度の研究では、小児期 EV 感染症における中枢神経合併症の病態を検討する目的で、髄膜炎様患者の多発に際して髄液所見を中心に解析し、効果的なサーベイランスの実施に役立てることを目的とした。

B. 研究方法

対象は、2008 年 7 月 9 日から 29 日の間に、髄膜炎疑いで入院した児 12 例。入院時に採取した髄液と血清を用いて、RT-PCR 法による EV 検出の有無（髄液・血清）を調べた。また、蛍光マイクロビーズアレイシステム Luminex®（日立ソフト、東京、日本）を用いて Immunoassay で各種サイトカイン/ケモカインの濃度を測定した。PCR 陽性であった検体については、ウイルス蛋白である VP4-VP2 部分領域の塩基配列について解析し、ウイルス同定を行うと共に、その相同性を調べた。髄液細胞数については、「 $30/3\mu\text{l}$ 以上」を細胞数増多と定義した。

統計学的解析は Mann-Whitney の U 検定を行い、p 値が 0.05 未満である場合を有意とした

(倫理面への配慮)

患者の個人情報特定されることのないように十分注意するとともに、解析に用いたデータについても個人の人権やプライバシーが侵害されることのないよう、取り扱いに配慮した。

C. 研究結果

1. 年齢・性別

年齢幅は 4~11 歳で、平均年齢・年齢中央値とも 7 歳、男児 5 例、女児 7 例であった (表 1)。

2. 症状

発熱と頭痛は 11 例 (92%)、嘔気/嘔吐と項部硬直は 10 例 (83%)、Kernig 徴候は 3 例 (25%) で認めた (表 1)。

3. 髄液所見

髄液細胞数は 1~154/3 μ l (中央値 14.0/3 μ l) であった (表 1)。髄液細胞数増多を 3 例 (25%) に認め、残りの 9 例 (75%) は髄液細胞数が正常であった。髄液細胞数増多を示した 3 例のうち、好中球優位は 1 例、他の 2 例はリンパ球優位であった。髄液蛋白量は 8~38mg/dl (中央値 21.5mg/dl) であった。

4. 髄液・血清の PCR 法による EV 検出

髄液 PCR は 8 例 (67%) で陽性、4 例 (33%) では陰性だった。一方、血清 PCR は 3 例 (25%) で陽性、9 例 (75%) は陰性であった (表 1)。血清 PCR が陽性であった 3 例は、発症当日 2 例、発症翌日 1 例と病初期に入院し検体を採取した例ばかりであり、いずれも髄液 PCR 陽性であった。

5. 髄液 PCR 結果および髄液細胞数と臨床症状

対象の 12 例を、髄液細胞数と髄液 PCR の結果によって、以下の 3 群に分類した。A

群: 髄液 PCR 陽性かつ髄液細胞数増多を認める群 (3 例, 25%)、B 群: 髄液 PCR 陽性で細胞数が正常な群 (5 例, 42%)、C 群: 髄液 PCR 陰性かつ細胞数が正常な群 (4 例, 33%) である。髄液 PCR 陽性の A・B 群では発熱、頭痛、嘔気/嘔吐、髄膜刺激症状 (項部硬直あるいは Kernig 徴候のいずれか) の 4 症状を全例で認め、PCR 陰性の C 群では 2~4 症状と総ての症状がそろわない症例も認めた (2 症状: 2 例, 3 症状: 1 例, 4 症状: 1 例) (図 1)。

6. ウイルス遺伝子配列の解析

髄液・血清 PCR が陽性であった症例はすべて、遺伝子配列解析の結果によりエコーウイルス 30 型と決定した。系統樹解析を行ったところ、今回の流行は類似のウイルスによるものであることを示唆する結果であった (図 2)。

7. 髄液中・血清中サイトカイン/ケモカイン

髄液 PCR 陽性群の髄液中 IL-6, IL-8, INF- γ , IP-10, MCP-1, MIP-1 β 濃度は、陰性群に比し有意に上昇していた (各々 $p < 0.01$, $p < 0.01$, $p < 0.01$, $p < 0.01$, $p < 0.05$, 図 3)。髄液 PCR 陽性群と陰性群の間で、血清中サイトカイン/ケモカイン濃度には差を認めなかった。

髄液細胞数正常群と増多群での比較も行ったが、髄液中・血清中サイトカイン/ケモカイン濃度に差は認めなかった。

髄液細胞数と髄液 PCR の結果で分類した図 1 の 3 群間における比較では、A 群では B 群に比して、髄液中 MIP-1 β 値が有意に上昇していた ($p < 0.05$)。その他の髄液中・血清中サイトカイン/ケモカイン濃度は、A・B・C 群間で有意差を認めなかった。

D. 考察

無菌性髄膜炎が地域流行する際、臨床症状からは髄膜炎が疑われても、髄液細胞数が増加していない症例にしばしば遭遇する。

成書では、無菌性髄膜炎と診断する際の条件に「髄液細胞数の増多」を挙げているものもあるが、そうでない記載も見られる。例えば、無菌性髄膜炎の定義として、①細菌培養が陰性、②培養、PCR法、抗原検出などの方法によりウイルスが検出・同定されること、としているものもある。近年PCR法が広くおこなわれるようになり、本定義による「髄液細胞数が正常な無菌性髄膜炎」もしばしば報告されている。

RT-PCR法による髄液中のEV検出は、培養細胞によるウイルス分離と比べると検出率が良いが、ウイルスがまだ増殖していない時期や急性期を過ぎた時期にはウイルスは検出されない可能性もある。今回の私たち症例では、髄液PCR陰性で髄液細胞数が増多した症例は1例も認めなかったが、さらに症例数を増やして検討することは必要であろう。

臨床症状については、髄液PCR陽性のA・B群では発熱、頭痛、嘔気/嘔吐、髄膜刺激症状(項部硬直あるいはKernig徴候のいずれか)の4症状を全例で認め、髄液PCR陰性のC群では2~4症状と症状がそろわない症例も認めた。4症状がすべてそろった場合は、髄膜炎である可能性が高いといえるであろう。髄液PCR陽性者の中で、髄液細胞数増多していた例と増加していなかった例の間で、主要症状の発現頻度に差異はなかった。

無菌性髄膜炎では、髄液細胞の軽度のNF- κ B活性化がみられ、急性期に髄液中炎症性サイトカイン(IL-6, IL-8, IFN- γ)が上昇することが多く、組織障害性の強いTNF- α の上昇はみられないという報告がある。初期免疫応答では単球/マクロファージが髄液中に動員され、CD4+Th1細胞およびCD8+T細胞がIFN- γ を産生し、抗ウイルス的に作用するとも考えられている。そしてウイルスが脳脊髄腔から消失する間

もしくは消失した後に、サイトカインネットワークによる免疫応答が切り替わり、髄液中炎症性サイトカイン(IL-10, TGF- β 1)の上昇が始まるとも言われる。今回の髄液PCR陽性群では、髄液中サイトカイン/ケモカインであるIL-6, IL-8, IFN- γ , IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β 濃度は、髄液PCR陰性群に比し有意に上昇していた。一方、IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1が高値を示した症例は、いずれも髄液PCR陽性であった。髄液中の炎症性サイトカイン濃度が高い症例で髄液PCR陰性例がないことから、今回の症例の中には髄液PCR陰性の無菌性髄膜炎はなかったと推察される。

髄液PCR陽性例(A群とB群)の中で、髄液細胞数増多を認めるA群は、髄液細胞数が正常なB群に比し、髄液中MIP-1 β 濃度が有意に上昇していた。MIP-1 β は、単球/マクロファージ、樹枝状細胞、リンパ球をはじめとする多くの細胞で産生されている。活性化されたCD8+T細胞のなかには、MIP-1 β を発現するものがある。今回の解析症例における髄液中MIP-1 β 濃度の上昇と髄液細胞の増多は、何らかの関連があるのかもしれない。

血清サイトカイン/ケモカイン濃度は、A・B・C群間で有意な差を認めず、髄液サイトカイン/ケモカイン濃度の上昇は、髄膜細胞や血管内皮細胞、単球/マクロファージなどによる局所での産生によるものが推察された。

E. 結論

エコー30型ウイルスの地域流行に際して、髄液PCR陽性例では髄液中炎症性サイトカイン濃度が上昇しており、EV感染症における中枢神経合併症は髄液細胞増多を認めない例でも生じていると考えられた。したがって、エンテロウイルス感染症の病因診断は大切である。

F. 研究発表

(論文発表)

1. 中野貴司：ポリオワクチン. チャイルドヘルス 11；161-163, 2008年3月.
2. 中野貴司(分担執筆). ポリオおよびポリオ様麻痺. 代表編集 岩田力；小児疾患診療のための病態生理(第4版). P1173-1177. 2008年11月. 東京医学社、東京.
3. 中野貴司(分担執筆). ポリオワクチン(生ポリオワクチンの接種法 P97-99, 生ポリオワクチンの副反応 P100-101, ポリオワクチン未接種者への対応 P102-103, ポリオ根絶計画とポリオの現状 P104-105, 不活化ポリオワクチン P106-107). 総編集 五十嵐隆、専門編集 渡辺博、小児科臨床ピクシス 4；予防接種. 2008年12月. 中山書店、東京.

(学会発表)

1. 浅田和豊、中野貴司、松野紋子、田中孝明、伊東宏明、一見良司、菅秀、藤澤隆夫、庵原俊昭、赤地重宏、田沼正路、大熊和行：第245回日本小児科学会東海地方会. 2008年夏に三重県津市周辺で流行したエンテロウイルス感染症について. 名古屋市、2009年2月22日.

G. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

表1. 対象患者の一覧

症例	年齢	性別	症状	髄液細胞数 (/3 μ l)	PCR(EV) (血清/髄液)	遺伝子 配列解析
1	4	F	発熱, 頭痛, 項部硬直	1	-/-	
2	7	F	発熱, 頭痛, 嘔気/嘔吐, 項部硬直, Kernig徴候	1	-/-	
3	8	F	発熱, 嘔気/嘔吐	1	-/-	
4	9	F	頭痛, 項部硬直, Kernig徴候	4	-/-	
5	8	M	発熱, 頭痛, 嘔気/嘔吐, 項部硬直	8	+/+	Echo30
6	8	M	発熱, 頭痛, 嘔気/嘔吐, 項部硬直	11	-/+	Echo30
7	11	F	発熱, 頭痛, 嘔気/嘔吐, 項部硬直	17	-/+	Echo30
8	6	F	発熱, 頭痛, 嘔気/嘔吐, Kernig徴候	18	-/+	Echo30
9	6	F	発熱, 頭痛, 嘔気/嘔吐, 項部硬直	20	+/+	Echo30
10	7	M	発熱, 頭痛, 嘔気/嘔吐, 項部硬直	38	+/+	Echo30
11	4	M	発熱, 頭痛, 嘔気/嘔吐, 項部硬直	42	-/+	Echo30
12	6	M	発熱, 頭痛, 嘔気/嘔吐, 項部硬直	154	-/+	Echo30

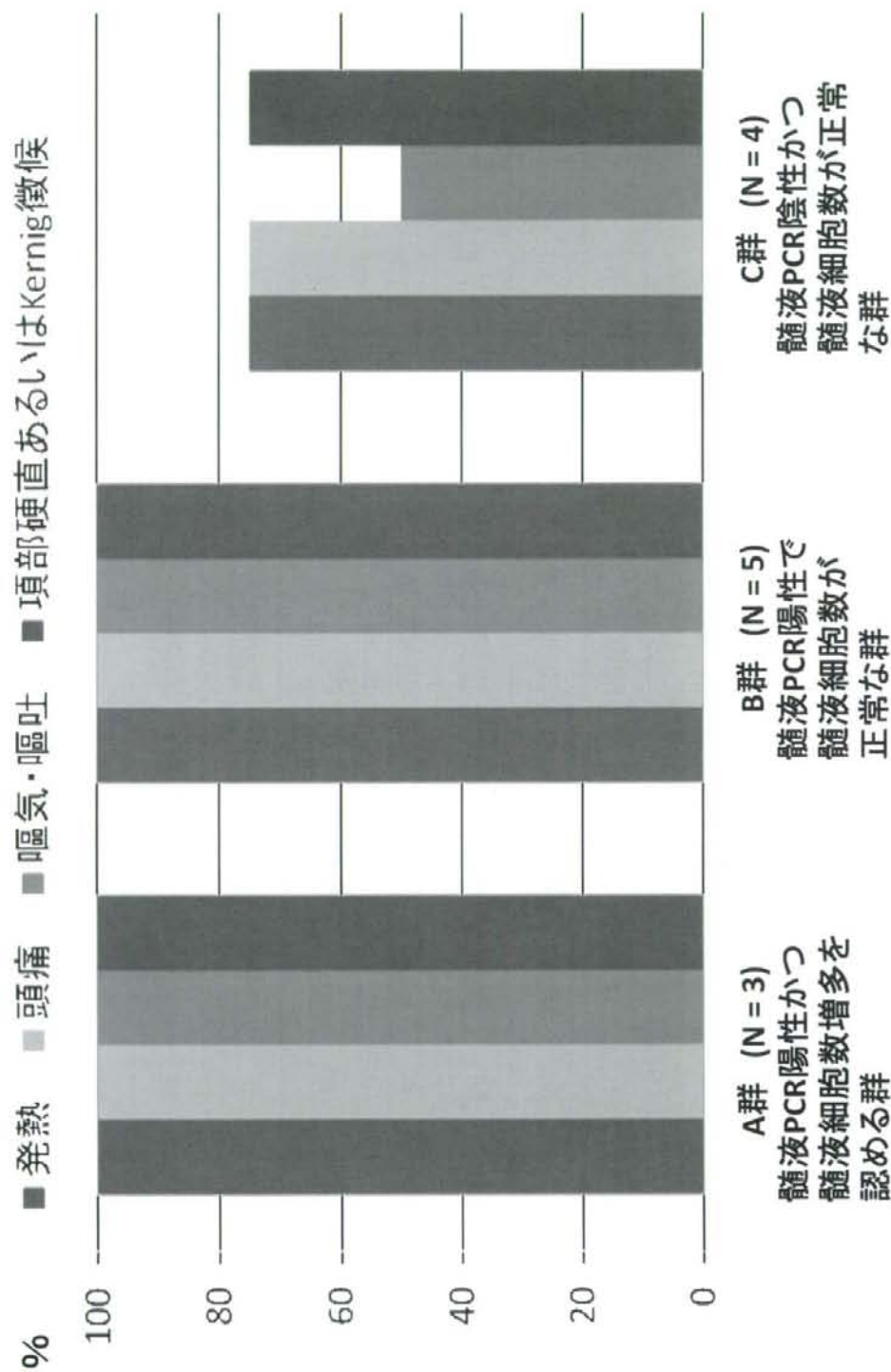


図1. 髄液PCRの結果および髄液細胞数により分類した各患者群における臨床症状

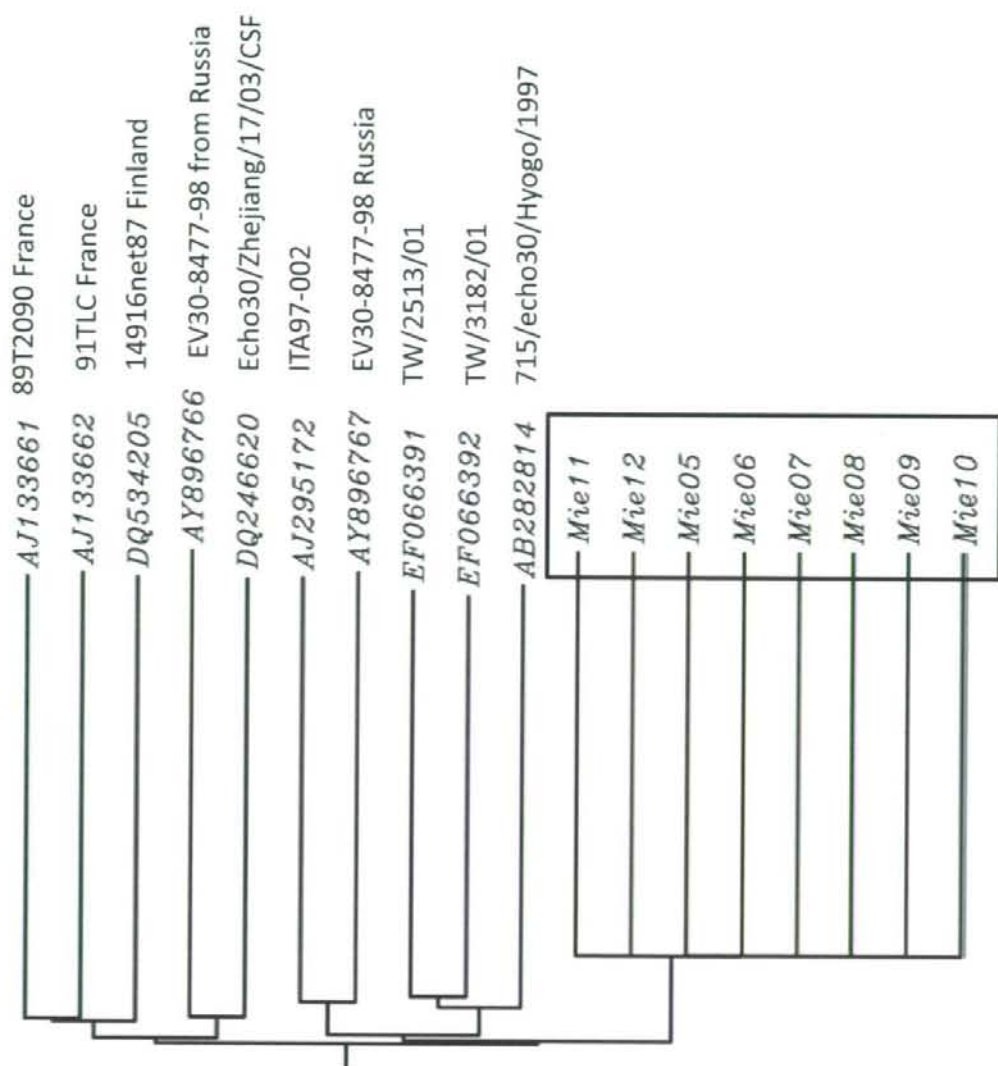


図2. 髄液PCR陽性例のウイルス系統樹解析

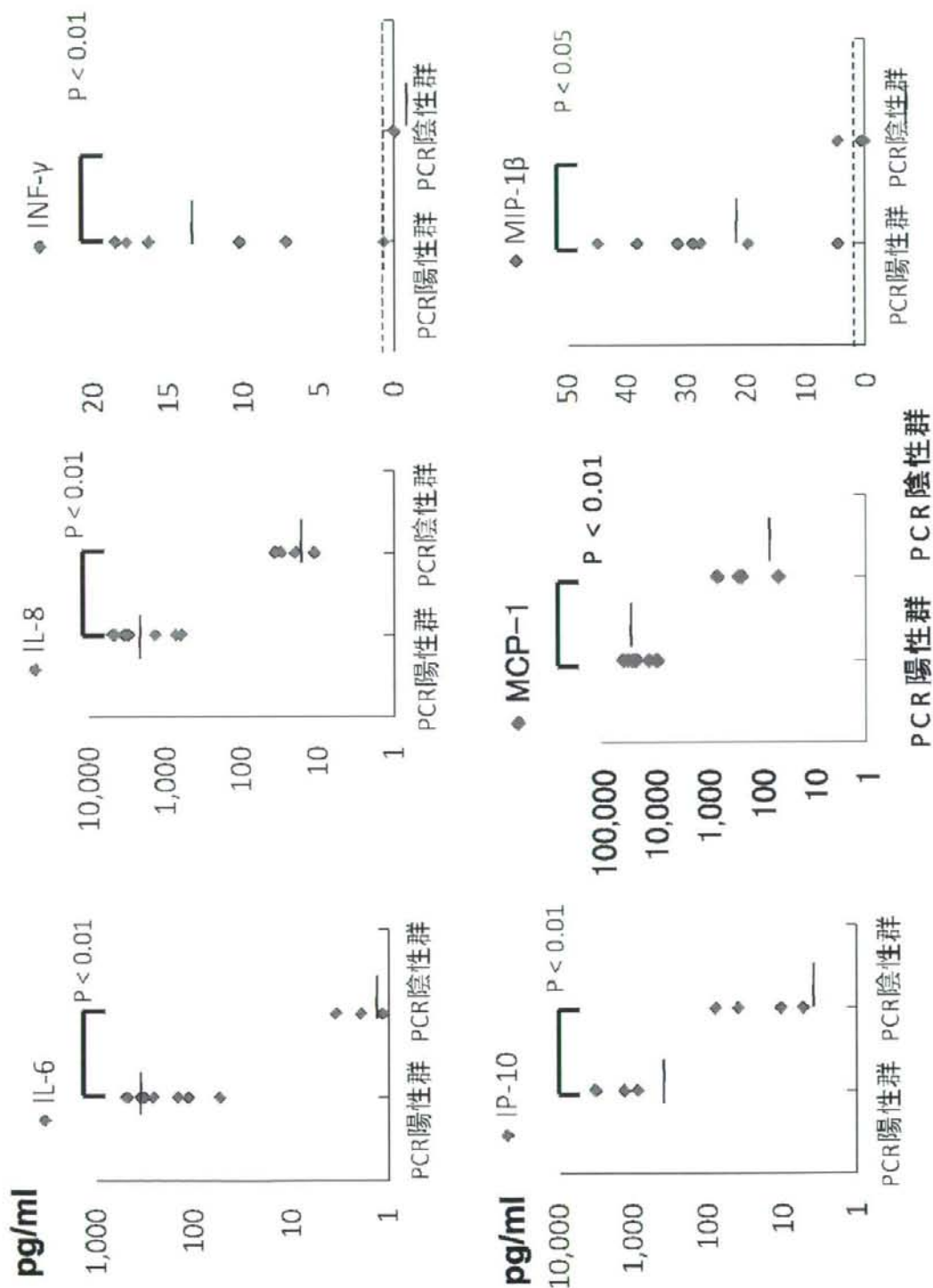


図3. 髄液PCR陽性群と陰性群における髄液中サイトカイン・ケモカイン濃度の比較