

TABLE 3: Epidemiological investigations in 21 food-borne outbreaks examined by SG-PCR and bacteriological cultures in Shimane Prefecture, Japan.

Case No.	Date occurred (day/mo/yr)	Days for examination after occurrence	Infected group	Source of infection (suspected source)	No. of patients/total	No. of examined patients	Causative pathogens	Stool samples (No. of positive/ examined samples)			Isolation			
								1st test	2nd test	3rd test		Final test	Total	
1	4-Oct-02	6	School excursion in a mountain area	Stream water <sup>a</sup>	23/33	22	*EPEC O:125, O:166, O:UT *astA-positive E. coli O:1, O:UT	1/7	—	—	4/22	7/22	5/22	
2	03-Sep-03	3	Protective care school	Catering box lunch	22/46	10	astA-positive E. coli O:18, O:20, O:114, O:159, O:UT	1/5	—	—	6/10	6/10	3/10	
3	01-Oct-03	2	Celebration in a company	Catering box lunch	437/1354	12	[Norovirus *C. perfringens O:13, O:16	5/5	—	—	—	7/12	7/12	10/12
4	11-Jun-04	6	Camping group of high school	Grilled meat (beef, bovine intestinal meat)	4/8	4	C. jejuni	1/4	—	—	—	1/8	1/8	5/8
5	12,13-Jun-04	6 ~ 7	9 citizen groups in Chophouse	Grilled meat (beef, bovine intestinal meat)	30/UN	12	C. jejuni	4/5	—	—	—	8/12	8/12	10/12
6	17-Jun-04	5	Cooking practise in a high school	Shelf-cooked lunch (salada mixed chicken)	31/41	20	*C. jejuni	4/5	—	—	—	12/14	12/14	17/20
7	07-Jul-04	1	Citizen in Chinese restaurant	Fried rice <sup>b</sup>	6/6	6	*B. cereus	1/1	—	—	—	2/6	2/6	2/6
8	11-Oct-04	3	Sport club in a high school	Shelf-cooked lunch	26/47	6	*C. perfringens O:16, O:UT	1/5	—	—	—	3/6	3/6	4/6
9	5~7-Nov-04	5 ~ 7	Restaurant	Unknown	5	5	C. jejuni	2/5	—	—	—	2/5	2/5	2/5
10	Unknown	Several days (19-Jun-05)	Nursery	Unknown	24/73	22	*EHEC O26	—	—	—	8/22	8/22	8/22	8/22
11	28~30-Sep-05	1 ~ 3	Prisoners in a prison	Shelf-cooked meal <sup>c</sup>	113/600	61	[Norovirus astA-positive E. coli C. perfringens (sporadic case)	—	—	14/14	—	14/14	41/46	41/46
								1/5				1/46	1/46	1/46

TABLE 3: Continued.

Case No.	Date occurred (day/mo/yr)	Days for examination after occurrence	Infected group	Source of infection (suspected source)	No. of patients/total	No. of examined patients	Causative pathogens	Stool samples (No. of positive/ examined samples)			Isolation			
								1st test	2nd test	3rd test		SG-PCR Final test	Total	
12	2~6-Oct-05	1~5	Elementary and high school children	Unknown (School lunch)	39/94	39	<i>astA</i> -positive <i>E. coli</i>	5/5	—	—	5/5	IM <sup>f</sup>		
13	28~30-May-06	0~2	Citizens at restaurant	Lunch (pilaf and scrambled egg <sup>d</sup> )	27/34	27	EPEC <i>A. hidrophila</i> <i>C. jejuni</i> (sporadic case) <i>* S. aureus</i> <i>astA</i> -positive <i>E. coli</i>	2/5 1/5 1/5 2/5 1/5	—	—	2/5	4/8 IM 1/16 IM		
14	4-Jul-06	0	Boarder of high school	Catering box lunch	34/51	34	<i>* C. perfringens</i>	5/5	—	—	8/8	8/8	19/50	
15	16-Aug-06	1	Citizens at restaurant	Fried rice	15/34	15	<i>* B. cereus</i>	1/4	—	—	1/4	2/4		
16	23~29-Aug-06	2~8	Boarder of training high school	Supper (contaminated sliced cabbage <sup>e</sup> )	19/43	18	<i>* C. jejuni</i>	3/5	—	—	6/9	8/9	9/14	
17	2-Sep-06	3	Citizens in Buddhist service	Catering box lunch	14/49	4	<i>astA</i> -positive <i>E. coli</i> <i>V. parahaemolyticus</i>	4/5	—	—	5/9	5/9	IM	
18	22-Dec-06	5	Citizens at restaurant	Supper (chiken)	12/12	8	<i>* C. jejuni</i>	3/5	—	—	4/9	4/9	4/10	
19	4-Jul-07	6	Citizens at restaurant	Supper (chiken)	7/11	7	<i>* C. jejuni</i>	1/2	—	—	1/2	2/3		
20	21-Oct-07	1	Citizens at restaurant	Supper	7/13	7	<i>* EPEC</i>	2/5	—	—	4/5	4/5	IM	
21	29-Nov-07	1	Citizens at restaurant	Supper (raw chiken liver)	8/8	7	<i>P. shigelloides</i> <i>* C. jejuni</i> <i>astA</i> -positive <i>E. coli</i>	3/5	—	2/5	4/7	5/7	4/7 2/5	
Total								54/93	58.1%		111/191	160/276	58.1%	58.0%

a: EPEC O:166, O:UT and *astA*-positive *E. coli* O:27, O:UT strains were isolated from stream water drunk by patients in case 1., b: *B. cereus* was isolated from cooked pork in case 7. c: *astA* genes were detected from 5 food samples in case 11., d: *S. aureus* was isolated from pilaf and scrambled egg in case 13., e: *C. jejuni* specific gene was detected from 5 food samples in case 17. f: Impossible isolation. \*: 14 cases examined by SG-qPCR and viable cell count.

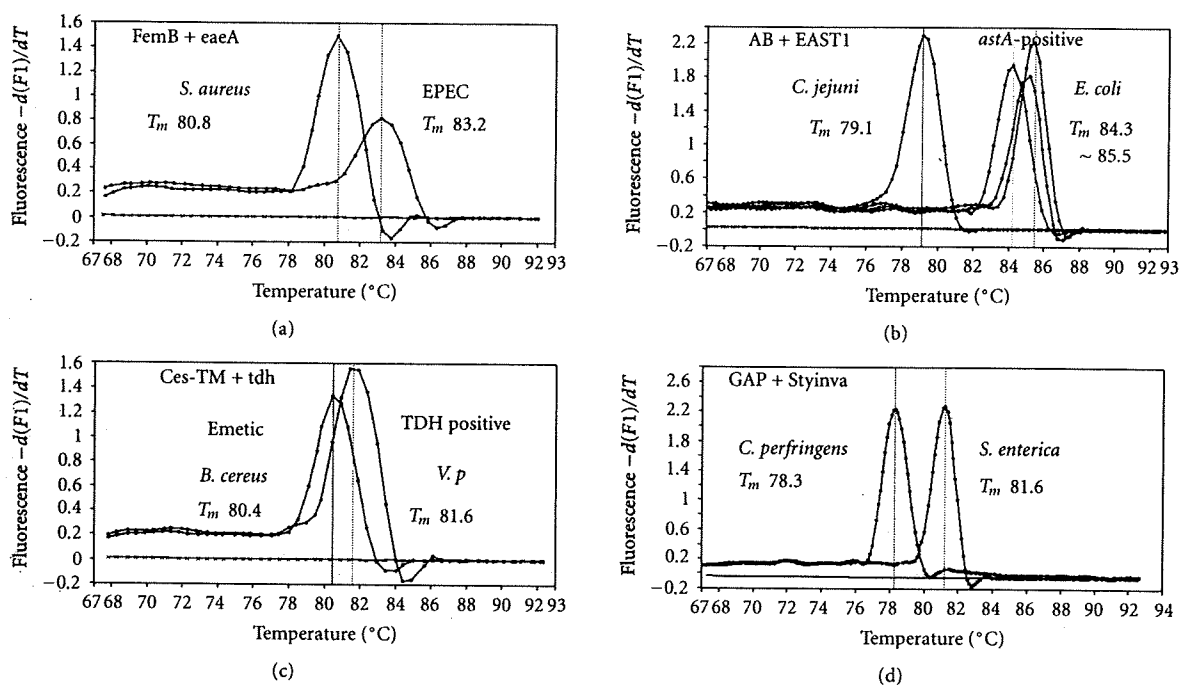


FIGURE 1: Melting curve analysis of duplex SYBR Green I PCR products in the first run using four primer sets: FemB plus eaeA, AB plus EAST1, ces plus tdh, and GAP plus Styinva.

Duplex SG-PCR rapidly and accurately demonstrated that 12 (57.1%) of 21 cases were caused with a single foodborne pathogen such as *C. jejuni* (6 cases), *C. perfringens* (3 cases), *B. cereus* (2 cases), and TDH-producing *V. parahaemolyticus* (one case). There were also 7 (33.3%) cases with plural foodborne bacterial pathogens (such as *astA*-positive *E. coli*, EPEC, *C. jejuni*, *C. perfringens*, *A. hydrophila*, and *P. shigelloides*) and 2 (9.5%) cases with foodborne bacterial pathogens (*astA*-positive *E. coli* or EHEC O:26) and norovirus. In cases 2 and 10, although detection of norovirus is out of the scope of our work, norovirus and foodborne bacterial pathogens were concomitantly detected by conventional PCR analysis in our virological laboratory. In case 2 in which norovirus was detected in 6 of 7 feces, the *astA* gene of EAEC was detected from 7 of 10 feces and then *astA*-positive *E. coli* strains were isolated from 6 samples. In case 10 in which norovirus was detected from 20 of 22 feces, the *eae* gene of EPEC or EHEC was detected from 8 of 22 feces and EHEC O26 strains were isolated from 8 of 22 feces. In 7 cases (cases 1, 11, 12, 13, 16, 20, and 21), the pathogenic *E. coli* strains belonging to *astA*-positive *E. coli* and/or EPEC were concomitantly detected with other foodborne bacterial pathogens. In case 1, the *eae* gene of EPEC or EHEC was detected from 4 of 22 feces and the *astA* gene of EAEC was detected in 3 other feces. However, duplex SG-PCR could not detect other virulent genes, including the *stx1* and *stx2* genes of EHEC. Then EPEC strains were later isolated from 5 feces and *astA*-positive *E. coli* from 4 other feces. In case 12, the *astA* gene of EAEC was detected in all 5 feces and the *eae* gene of EPEC or EHEC in 2 feces,

but duplex SG-PCR could not detect other *E. coli* virulent genes. The subsequent bacteriological examination could not isolate pathogenic *E. coli* among nonpathogenic *E. coli* flora. In case 16, the *C. jejuni* specific gene was detected in 6 of 9 feces and the *astA* gene of EAEC was detected in 5 feces (both genes from 3 feces). *C. jejuni* strains were then isolated from 9 of 14 feces, but we were not able to isolate the pathogenic *E. coli* strain among nonpathogenic *E. coli* flora. In cases 19 to 21 analyzed improved real-time PCR using 8 primers for the detection of 7 main foodborne bacteria and *astA*-positive *E. coli*, *C. jejuni*, EPEC, or *astA*-positive *E. coli* were detected from 1 to 3 fecal samples on the first run and the absence of the other main foodborne bacteria in the analyzed samples was readily confirmed. In case 20, the *eae* gene of EPEC or EHEC was detected from 2 of 5 fecal samples on the first run and the *gyrB* gene of *P. shigelloides* was detected separately from other 2 fecal samples on the second run. Then *P. shigelloides* strains were isolated from 2 feces, but isolation of the EPEC strain was very difficult due to the presence of large nonpathogenic *E. coli* flora in the feces.

In almost all cases, the duplex SG-PCR assay first run detected these causative agents from more than one of the five feces. Then, in almost all cases, the presence of a causative agent (presumed from duplex SG-PCR assay) was confirmed by the results of the final SG-PCR assay run and the bacteriological cultivation of additional feces. These findings confirmed that for foodborne outbreaks duplex SG-PCR is a useful tool for the rapid detection of both single and multiple pathogens.

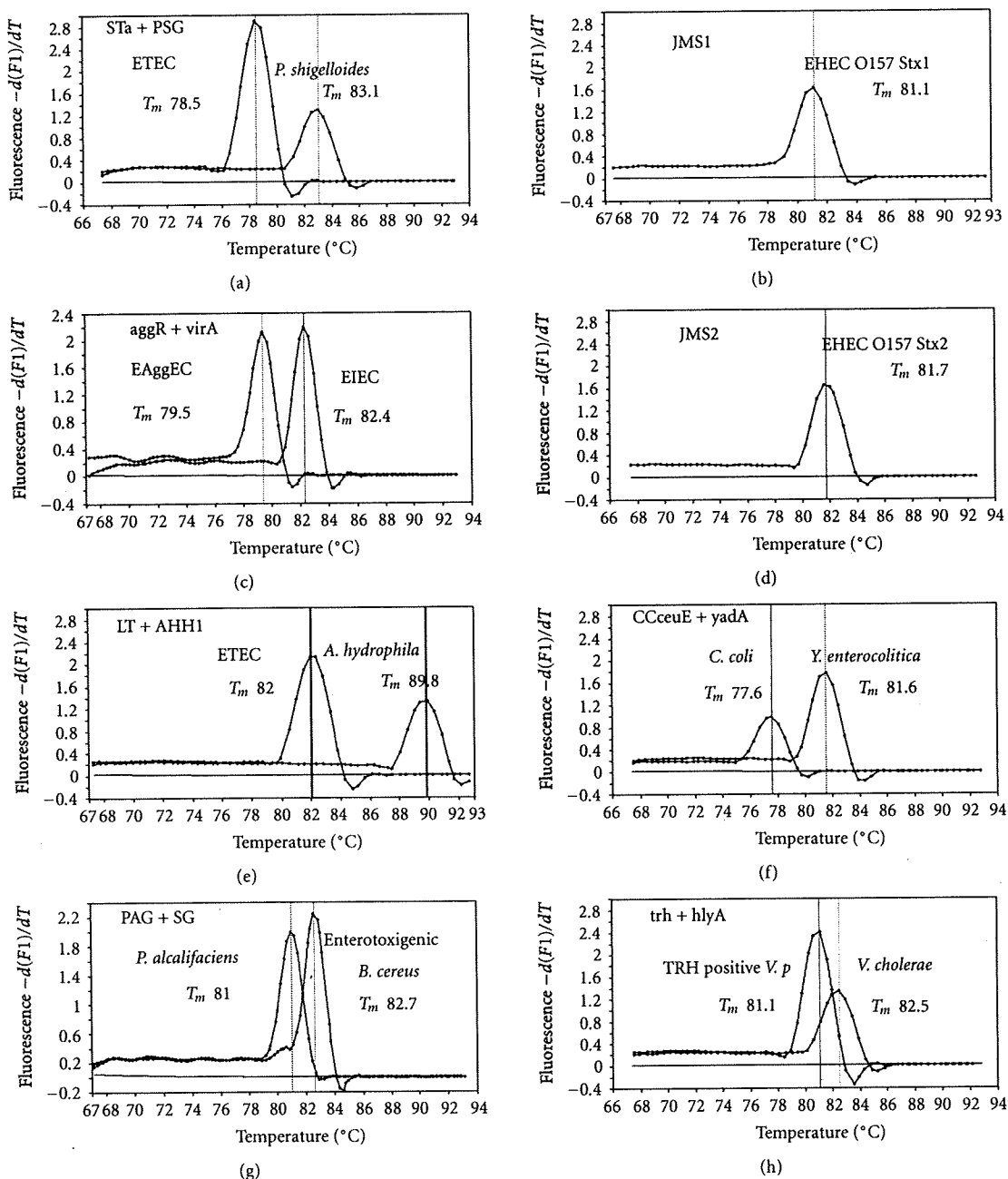


FIGURE 2: Melting curve analysis of duplex SYBR Green I PCR products in the second run using four primer sets: ST plus PSG, aggR plus virA, LT plus AHH1, and PAG plus SG; the third run using two primer sets: CCcesE plus yadA and trh plus hlyA; simple PCR with primers JMS 1 and JMS2.

3.3. Quantification of the Causative Agent in 14 Foodborne Outbreak Cases. Figure 2 shows the relationship between CFU and DNA copy of foodborne pathogens using SG-quantitative PCR (qPCR) assay in 71 feces from 14 cases examined by viable cell counting. There was no correlation ( $r^2 = 0.1183$ ) between CFU and DNA copy of foodborne pathogens in feces, although almost all pathogens were detected by SG-PCR from feces registering more than

$10^3$  CFU/g by viable cell counting. By using SG- qPCR assay combined with DNA extraction using the QIAamp DNA Stool Mini kit, Bibbal et al. [28] reported a significant correlation between CFU and DNA copy of ampicillin-resistant *Enterobacteriaceae* in swine feces. Fu et al. [29] reported a significant correlation between CFU and DNA copy of *Lactobacillus* and total anaerobic bacteria in dog feces but found no correlation between CFU and DNA copy of

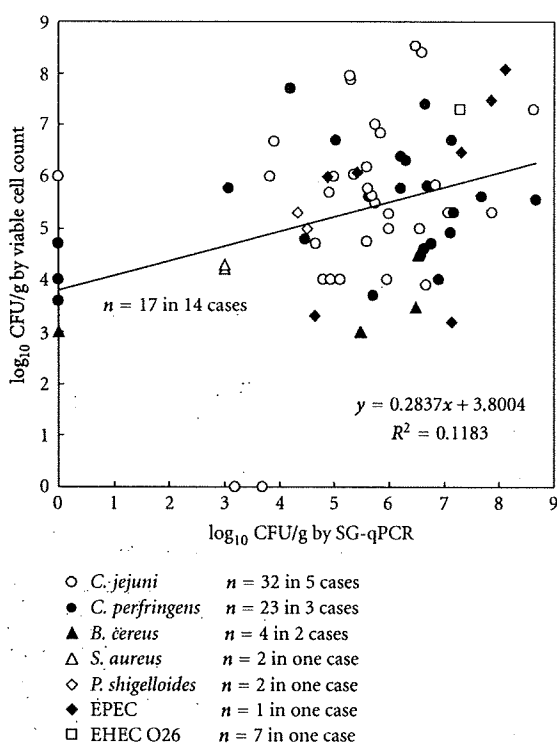


FIGURE 3: The relationship between CFU and DNA copy of foodborne pathogens in 71 foodborne pathogens-positive feces in 14 foodborne outbreak cases examined by viable cell counting.

*C. perfringens*. Although accurate quantifications of foodborne pathogens, including *C. jejuni* and *C. perfringens*, in feces were not completely performed by SG-qPCR in this study, the presence of any foodborne pathogens at more than  $10^3$  CFU/g feces was certainly confirmed by melting curve analysis. There are two major problems for these differences. One cause is different sample preparation that was used for CFU from the feces stored in the transport medium and for qPCR using the mass sample collected for virological inspection. Another cause is the approach used to construct the standard curves that were prepared from pure bacterial cultures. These curves do not relate with the "real" situation of a bacterial quantification in a faecal sample and can in part explain the absence of correlation between CFU and DNA copy of foodborne pathogens in faeces.

In our routine bacteriological diagnostic laboratory, we used duplex SYBR Green I PCR assay combined with DNA extraction via QIAamp DNA Stool Mini kit for the detection of foodborne bacteria from 21 foodborne outbreak cases. The causative bacteria were detected in almost all cases in 2 hours or less. The first run was for the detection of 8 main foodborne bacteria and the second run was for the detection of other unusual suspect bacteria. The results proved that for comprehensive and rapid molecular diagnosis in foodborne outbreaks, duplex SG-PCR assay is not only very useful, but is also economically viable for one-step differentiation of causative bacteria in fecal specimens obtained from

symptomatic patients. This then allows for effective diagnosis and management of foodborne outbreak.

## Acknowledgment

This work was supported in part by a grant-in-aid of the Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare (H19-Kenki-011).

## References

- [1] L. Fenicia, F. Anniballi, D. De Medici, E. Delibato, and P. Aureli, "SYBR green real-time PCR method to detect *Clostridium botulinum* type A," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 73, no. 9, pp. 2891–2896, 2007.
- [2] I. Abubakar, L. Irvine, C. F. Aldus, et al., "A systematic review of the clinical, public health and cost-effectiveness of rapid diagnostic tests for the detection and identification of bacterial intestinal pathogens in faeces and food," *Health Technology Assessment*, vol. 11, no. 36, pp. 1–216, 2007.
- [3] I. M. Mackay, "Real-time PCR in the microbiology laboratory," *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 10, no. 3, pp. 190–212, 2004.
- [4] M. Fricker, U. Messelhäuser, U. Busch, S. Scherer, and M. Ehling-Schulz, "Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent foodborne outbreaks," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 73, no. 6, pp. 1892–1898, 2007.
- [5] J. Hoorfar, P. Ahrens, and P. Radstrom, "Automated 5' nuclease PCR assay for identification of *Salmonella enterica*," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 38, no. 9, pp. 3429–3435, 2000.
- [6] Y. Iijima, N. T. Asako, M. Aihara, and K. Hayashi, "Improvement in the detection rate of diarrhoeagenic bacteria in human stool specimens by a rapid real-time PCR assay," *Journal of Medical Microbiology*, vol. 53, no. 7, pp. 617–622, 2004.
- [7] H. J. M. Aarts, R. G. Joosten, M. H. C. Henkens, H. Stegeman, and A. H. A. M. van Hoek, "Rapid duplex PCR assay for the detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains," *Journal of Microbiological Methods*, vol. 47, no. 2, pp. 209–217, 2001.
- [8] H. K. Nogva, A. Bergh, A. Holck, and K. Rudi, "Application of the 5'-Nuclease PCR assay in evaluation and development of methods for quantitative detection of *Campylobacter jejuni*," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, no. 9, pp. 4029–4036, 2000.
- [9] D. De Medici, L. Croci, E. Delibato, S. Di Pasquale, E. Filetici, and L. Toti, "Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with SYBR green I real-time PCR to detect *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in poultry," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 69, no. 6, pp. 3456–3461, 2003.
- [10] H. Fukushima, Y. Tsunomori, and R. Seki, "Duplex real-time SYBR green PCR assays for detection of 17 species of food- or waterborne pathogens in stools," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 41, no. 11, pp. 5134–5146, 2003.
- [11] H. Fukushima, K. Katsube, Y. Hata, R. Kishi, and S. Fujiwara, "Rapid separation and concentration of food-borne pathogens in food samples prior to quantification by viable-cell counting and real-time PCR," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 73, no. 1, pp. 92–100, 2007.

- [12] N. Jothikumar and M. W. Griffiths, "Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 with multiplex real-time PCR assays," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 68, no. 6, pp. 3169–3171, 2002.
- [13] H. Fukushima and Y. Tsunomori, "Study of real-time PCR assays for rapid detection of food-borne pathogens," *Kansenshogaku Zasshi*, vol. 79, no. 9, pp. 644–655, 2005.
- [14] E. M. Nielsen and M. T. Andersen, "Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 41, no. 7, pp. 2884–2893, 2003.
- [15] M. Klotz, S. Opper, K. Heeg, and S. Zimmermann, "Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A to D by real-time fluorescence PCR assay," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 41, no. 10, pp. 4683–4687, 2003.
- [16] J. Yatsuyanagi, S. Saito, H. Sato, Y. Miyajima, K.-I. Amano, and K. Enomoto, "Characterization of enteropathogenic and enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from diarrheal outbreaks," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 40, no. 1, pp. 294–297, 2002.
- [17] M. Nishibuchi, Y. Takeda, J. Tada, et al., "Methods to detect the thermostable direct hemolysin gene and a related hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus* by PCR," *Nippon Rinsho*, vol. 50, supplement, pp. 348–352, 1992 (Japanese).
- [18] N. Kato, S. M. Kim, H. Kato, et al., "Identification of enterotoxin-producing *Clostridium perfringens* by the polymerase chain reaction," *The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases*, vol. 67, no. 8, pp. 724–729, 1993.
- [19] S. M. Franck, B. T. Bosworth, and H. W. Moon, "Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 36, no. 6, pp. 1795–1797, 1998.
- [20] E. Villalobo and A. Torres, "PCR for detection of *Shigella* spp. in mayonnaise," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 64, no. 4, pp. 1242–1245, 1998.
- [21] G. Wang, C. G. Clark, C. Liu, et al., "Detection and characterization of the hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 41, no. 3, pp. 1048–1054, 2003.
- [22] F. Itoh, T. Ogino, K. Itoh, and H. Watanabe, "Differentiation and detection of pathogenic determinants among diarrheogenic *Escherichia coli* by polymerase chain reaction using mixed primers," *Nippon Rinsho*, vol. 50, supplement, pp. 343–347, 1992 (Japanese).
- [23] I.-C. Yang, D. Y.-C. Shih, J.-Y. Wang, and T.-M. Pan, "Development of rapid real-time PCR and most-probable-number real-time PCR assays to quantify enterotoxigenic strains of the species in the *Bacillus cereus* group," *Journal of Food Protection*, vol. 70, no. 12, pp. 2774–2781, 2007.
- [24] M. Skurnik and H. Wolf-Watz, "Analysis of the *yopA* gene encoding the Yop1 virulence determinants of *Yersinia* spp.," *Molecular Microbiology*, vol. 3, no. 4, pp. 517–529, 1989.
- [25] I. Gonzalez, K. A. Grant, P. T. Richardson, S. F. Park, and M. D. Collins, "Specific identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using a PCR test based on the *ceuE* gene encoding a putative virulence determinant," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 35, no. 3, pp. 759–763, 1997.
- [26] J. P. Nataro, D. Yikang, D. Yingkang, and K. Walker, "AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*," *Journal of Bacteriology*, vol. 176, no. 15, pp. 4691–4699, 1994.
- [27] Y. Nishikawa, J. Ogasawara, A. Helander, and K. Haruki, "An outbreak of gastroenteritis in Japan due to *Escherichia coli* O166," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 5, no. 2, p. 300, 1999.
- [28] D. Bibbal, V. Dupouy, J. P. Ferré, et al., "Impact of three ampicillin dosage regimens on selection of ampicillin resistance in *Enterobacteriaceae* and excretion of *bla*<sub>TEM</sub> genes in swine feces," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 73, no. 15, pp. 4785–4790, 2007.
- [29] C. J. Fu, J. N. Carter, Y. Li, J. H. Porter, and M. S. Kerley, "Comparison of agar plate and real-time PCR on enumeration of *Lactobacillus*, *Clostridium perfringens* and total anaerobic bacteria in dog faeces," *Letters in Applied Microbiology*, vol. 42, no. 5, pp. 490–494, 2006.

## 調 査 研 究

# Human parechovirus の検出ならびに同定方法の検討

伊藤 雅、山下照夫、都築秀明、椛島由佳、藤浦 明、  
長谷川晶子、長谷聡子、柴 賢司、皆川洋子

### 【要旨】

ピコルナウイルス科エンテロウイルス属から独立したヒトパレコウイルス (Human parechovirus: HPeV) には 2007 年現在、6 種類の血清型/遺伝子型が報告されているが、その病原性について明らかでない。平成 11~18 (1999~2006) 年度の愛知県感染症発生動向調査事業の一環として収集された患者糞便検体から細胞培養法及び RT-PCR 法を併用した HPeV の検出を試みたところ、4309 検体のうち細胞培養法により HPeV が検出されたのは 68 件 (1.6%)、5' UTR の一部を特異的に増幅する RT-PCR 法によると 104 件 (2.4%) が陽性であった。検出された HPeV 104 件の血清型/遺伝子型の内訳は HPeV-1 (58), HPeV-3 (44), HPeV-4 (1), HPeV-6 (1) であった。HPeV-1 は毎年度検出されており、HPeV-3 は 2000, 2005 年を除き各年度検出された。疾患別では HPeV-1 の 31 件 (53%) 及び HPeV-3 の 12 件 (27%) が感染性胃腸炎患者検体から、一方呼吸器感染症検体由来は HPeV-1 の 11 件 (19%)、HPeV-3 の 14 件 (32%) を占め、両疾患との関連が示唆された。

キーワード：ヒトパレコウイルス、系統樹解析、血清型/遺伝子型、胃腸炎、呼吸器感染症

### はじめに

ピコルナウイルス科エンテロウイルス属には、小児麻痺の原因として重要なポリオウイルスをはじめコクサッキー、エコー、エンテロウイルス 71 型などが知られている。このうちエコーウイルス 22 型及び 23 型は、1956 年に小児夏季下痢症の病原体として分離されたウイルス<sup>1)</sup>であるが、他のエンテロウイルス属とは生物学的及び遺伝子学的相違に基づき 1999 年にパレコウイルス属 (*Parechovirus*: para 「傍」+echo) として独立した<sup>2)</sup>。Human parechovirus 1 (HPeV-1; 旧エコーウイルス 22 型) は、小児の多様な疾患と関連した分離報告がなされている<sup>3)</sup>。

1999 年に愛知県内医療機関において一過性麻

痺症状を示した 1 歳小児の糞便検体より、当所において分離されたウイルスはパレコウイルス属の新しい型である HPeV-3<sup>4)</sup>として国際ウイルス命名委員会 (ICTV) に登録された。2007 年現在、ヒトパレコウイルスには 6 種類の血清型/遺伝子型が報告されている。HPeV は培養細胞を用いた分離が可能であるが、新たな血清型/遺伝子型は、既存の抗血清を用いた中和抗体法では同定型別が困難であり、現状では遺伝子断片の核酸配列から遺伝子型決定を試みる方が実際的である。そこで、逆転写 - ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription - polymerase chain reaction: RT-PCR) 法を用いた迅速かつ高感度の同定法を確立するために特異的プライマーの有用性を検

討した。

HPeV が、近年わが国の感染症発生动向調査において検出が報告されるウイルス全体に占める割合は1%以下と、エンテロウイルス属が例年30～50%程度であるのに比較して低く、疾患との関連についても不明な点が多く残されている。そこで、過去の本県における HPeV の侵淫状況を調査し、さらに血清型/遺伝子型と疾病との関わりを解析した。

### 材料と方法

本県において1999年～2006年に感染症発生动向調査検体として集められ凍結保存されていた患者糞便検体(約4,300件)を用い、①HeLa, Vero細胞を用いた細胞培養法及び②Joki-Korpelaら<sup>5)</sup>が設計したHPeV-1の非構造領域(5' UTR)の一部を増幅するプライマーev22+, ev22-を用いたRT-PCR法を用いて検出し、両者を比較・検討した。

また血清型/遺伝子型の同定に有用なPCRプライマーを設計するため、上記糞便検体から抽出したRNAを用い、③VP1遺伝子領域を増幅するプライマーHPeV-VP1-S(+:5' -GGD ARR MTK GGD VAW GAY GC -3')とHPeV-VP1-AS2(-:5' -TCY ARY TGR TAY ACA YKS TCT CC-3')及び nested-PCR 用 HPeV-VP1-AS(-:5' -CCA TAR TGY TTR TAR AAA CC -3')を併用したOne-step PCR法(RT反応50℃・30分→95℃・1分→94℃・1分+42℃・1分+72℃・90秒を35サイクル→72℃・10分)を行った。1.5%アガロースゲル電気泳動後、ethidium bromide染色下に検出したPCR産物をpGEM-T ベクターに組み込みクローニング後、塩基配列を決定した。検出されたHPeVについては、データベース上に登録されている HPeV1～6型各標準株 HPeV-1:Harris(L02971)<sup>6)</sup>, HPeV-2:Williamsos(AJ005695)<sup>7)</sup>, HPeV-3:A308-99(AB084913)<sup>4)</sup>, HPeV-4:K251176-02(DQ315670)<sup>8)</sup>, T75-4077(AM235750)<sup>9)</sup>, HPeV-5:86-6760 Connecticut/86 (AF055846)<sup>10)</sup>, T92-15(AM235749)<sup>9)</sup>, HPeV-6:NII561-2000(AB252582)<sup>11)</sup>及びVP1領域の登録されている分離株の遺伝子配列を基に塩基配列及び推定アミノ酸配列につい

てNJ (Neighbor-Joining) 法を用いた分子系統樹解析を行い、血清型/遺伝子型を同定した。また、患者情報に基づき性別、年齢、流行の状況や臨床症状等と血清型/遺伝子型の関連性を解析した。

### 結果

スクリーニング検査では、調査した4309検体のうち①細胞培養法による HPeV の検出は68件(1.6%)であったのに対して、②5' UTRの一部を特異的に増幅する RT-PCR 法による検出は、①細胞培養法陽性検体全てを含む104件(2.4%)であった。(表1)

表1 細胞培養法及びRT-PCR法を用いた糞便検体からの HPeV 検出数

年	検体数	陽性数 (陽性率)	
		細胞培養法	RT-PCR法
1999	1006	17 (1.7%)	31 (3.1%)
2000	574	4 (0.7%)	6 (1.0%)
2001	215	4 (1.9%)	6 (2.8%)
2002	275	8 (2.9%)	10 (3.6%)
2003	373	1 (0.3%)	10 (2.7%)
2004	506	10 (2.0%)	13 (2.6%)
2005	559	8 (1.4%)	12 (2.1%)
2006	801	16 (2.0%)	16 (2.0%)
全体	4309	68 (1.6%)	104 (2.4%)

スクリーニング検査に使用した②によるRT-PCR産物の塩基配列の分子系統樹解析では新たに登録された3～6型の HPeV 標準株を含め血清型/遺伝子型の同定が困難であることが判明した(図1)。そこで③構造蛋白質(VP1)領域のRT-PCRを行い、増幅産物が得られた66件についてPCR産物の塩基配列を決定し、HPeV標準株と比較する分子系統樹解析に供したところ、分離ウイルスの中和試験から決定した血清型と一致する遺伝子型別が可能であった(図2)。

以上の方法で検出された HPeV104件の血清型/遺伝子型の内訳は HPeV-1(58), HPeV-3(44), HPeV-4(1), HPeV-6(1)であった。



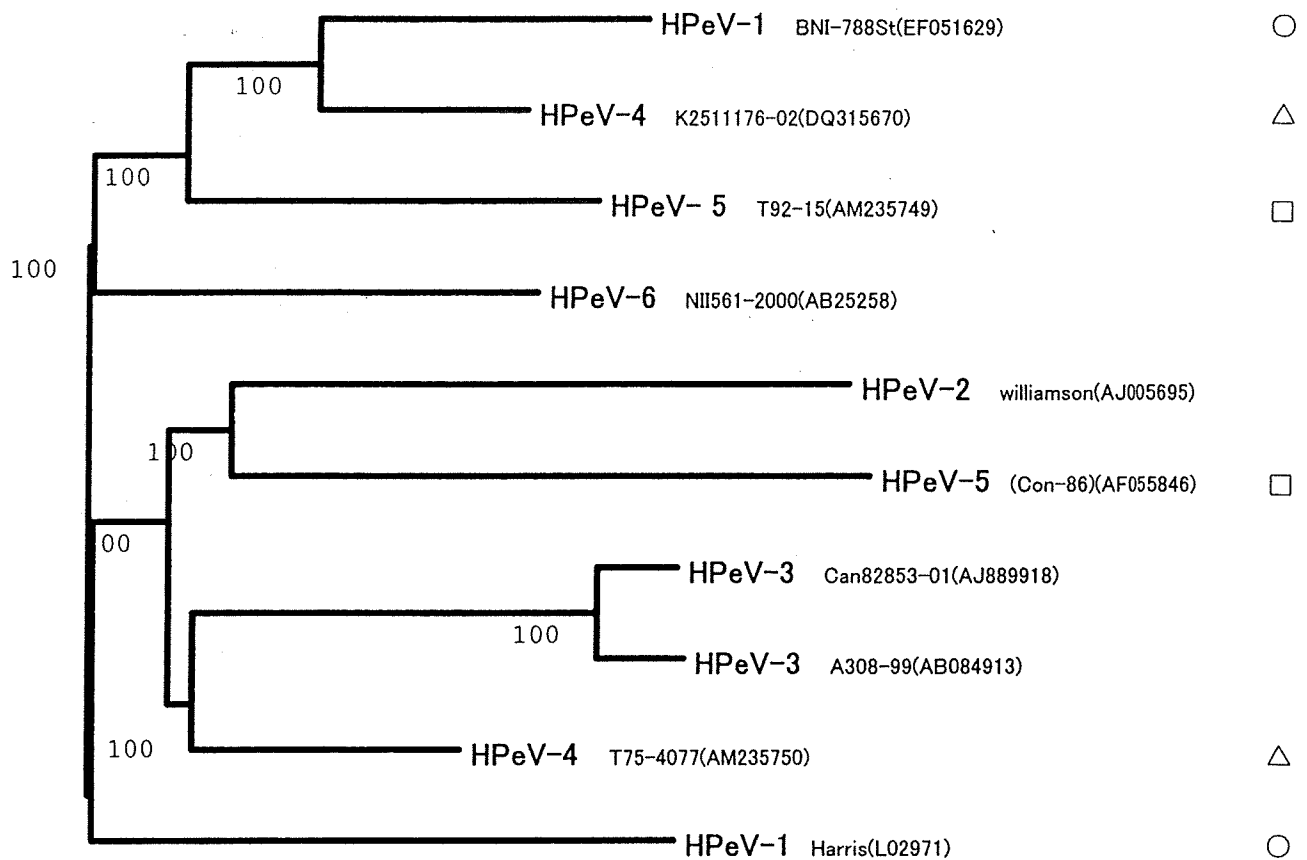


図1 5' UTRの一部を増幅するプライマーを用いた標準株の分子系統樹解析(NJ法)  
HPeV-1(O), HPeV-4(Δ), HPeV-5(□)は同一血清型でもクラスターを形成しない

HPeV-1 は毎年度検出されており、HPeV-3 は2000, 2005年を除き各年度で、HPeV-4 は2006年度に、HPeV-6は2001年度に各1件検出された。(表2)

HPeV-1 及び HPeV-3 は、いずれも1歳以下の乳幼児由来が約9割を占め、発症月は3月、4月を除き年間を通じて検出されていた。(表3、4)

HPeV-4は8月に2歳の感染性胃腸炎患者から検出された。また、HPeV-6は6月に11ヶ月齢のヘルパンギーナ患者から検出されたが同患者検体からは同時にコクサッキーウイルスA8 遺伝子も検出された。(表4、5)

HPeV 陽性検体が得られた患者の疾病は、感染性胃腸炎(44)、呼吸器感染症(25)、不明熱(14)、発疹症(9)、手足口病(7)、無菌性髄膜炎(4)、ヘルパンギーナ(1)であった。疾患別では HPeV-1 の31件(53%)及び HPeV-3 の12件(27%)が感染性胃腸炎患者検体から、一方呼吸器感染症検体由来は HPeV-1 の11件(19%)、HPeV-3 の14件(32%)を占

めた。(表5)

### 考 察

検出法の比較においては細胞培養法より5' UTRの一部を増幅する RT-PCR 法の方が感度の高いことが確認された。しかし、この HPeV-1 を元に設計されたプライマー<sup>5)</sup>による5' UTR領域増幅産物の分子系統樹解析では2004年以降に登録された3~6型標準株についての血清型/遺伝子型別同定が不可能であることが判明した。一方今回検討したVP1領域のプライマーは検出感度が66/104(63.5%)と上記5' UTR領域より低く、HPeVを迅速に検出同定するためには、感度と特異性を兼ね備えた新たなPCRプライマーの開発および反応条件の検討が必要である。

HPeV 陽性検体の患者情報解析からは以下の傾向が認められた。

- ①性別発症頻度: HPeV-1において男女比が2.6対1と男児に多い傾向がみられた。②発症年齢:



表2 検出されたヒトパレコウイルス  
血清型/遺伝子型内訳

年	HPeV 全 陽性数	内 訳			
		HPeV-1	HPeV-3	HPeV-4	HPeV-6
1999	31	15	16	0	0
2000	6	6	0	0	0
2001	6	3	2	0	1
2002	10	5	5	0	0
2003	10	6	4	0	0
2004	13	10	3	0	0
2005	12	12	0	0	0
2006	16	1	14	1	0
計	104	58	44	1	1

表3 パレコウイルス1及び3型の  
性別、年齢別検出状況

性別	HPeV-1(58件)		HPeV-3(44件)	
	男	42	25	
女	16		19	
男女比	2.6対1		1.32対1	
発症年齢	0ヶ月～4歳		0ヶ月～6歳	
年齢階層	<1	51	38	
	2～3	5	4	
	4<	1	2	
	不明	1	0	
1歳以下の検出割合 (不明1名をのぞく)	87.9%		86.4%	
発症患者の平均月齢	12.9ヶ月		12.1ヶ月	

HPeV-1あるいはHPeV-3陽性者101名の平均月齢  
: 12.6ヶ月  
3歳以下の占める割合 : 97%

表4 HPeV血清型/遺伝子型別・発症月別検出状況

	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	計
HPeV-1	7	1	0	0	2	3	3	8	9	5	12	8	58
HPeV-3	2	1	0	0	2	4	15	8	3	3	5	1	44
HPeV-4	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
HPeV-6	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1

表5 HPeV血清型/遺伝子型別・疾患別検出状況

臨床症状	HPeV 全 陽性数	内 訳				総検体 数
		HPeV-1	HPeV-3	HPeV-4	HPeV-6	
感染性胃腸炎	44	31	12	1	0	1790
呼吸器感染症	25	11	14	0	0	659
不明熱	14	8	6	0	0	167
発疹症	9	5	4	0	0	93
手足口病	7	2	5	0	0	239
無菌性髄膜炎	4	1	3	0	0	225
ヘルパンギーナ	1	0	0	0	1	152
その他	0	0	0	0	0	984
計	104	58	44	1	1	4309

## 参考文献

HPeV-1 および HPeV-3 は 1 歳以下の乳児からの検出が多く、特に HPeV-3 については、我々の調査した抗体保有状況<sup>4)</sup>の傾向と一致する結果であった。③発症月:HPeV-1 は秋から冬(9~2月)に発症した患者 42/57(73.7%)から、一方 HPeV-3 は夏(6~8月)に発症した患者 27/43(62.8%)から検出される傾向がみられ、血清型/遺伝子型により流行の季節性が異なっていた。④疾患別検出状況:HPeV-1 は主に感染性胃腸炎患者から、HPeV-3 は呼吸器疾患及び胃腸炎患者から同程度に検出されていた。HPeV-3 は、1999 年に当所で一過性麻痺症状を示した 1 歳小児の糞便検体より最初に分離同定されたものであるが<sup>4)</sup>、今回の調査では脳炎や脳症など中枢神経症状を呈した患者からの検出はなかった。胃腸炎、呼吸器症状以外の臨床症状を示す患者 18/44(40.9%) からも検出されており HPeV-3 と病原性の関係については更に検出例を増やして統計的に流行の状況を調査していく必要があると考えられた。

本研究において 2006 年に新たに登録された HPeV-4~6 のうち HPeV-4 及び HPeV-6 が各 1 件ずつ検出された。HPeV-4 は古くは 1973 年に分離報告された株を含めオランダ<sup>8)</sup>、イギリス<sup>9,12)</sup>、日本<sup>11,13)</sup> から少数例の報告があるのみで、病原性を含め詳細は不明である。HPeV-6 は 2006 年以降日本<sup>11)</sup>、オランダ<sup>14)</sup>、ドイツ<sup>15)</sup> から報告されている。我々が HPeV-6 を検出した検体はヘルパンギーナ患者由来であったが、この検体はコクサッキーウイルス A8 型も陽性であった。HPeV-4 及び HPeV-6 の病原性や疫学的特徴の解明には、今後も検出報告等のさらなる集積が必要である。

ヒトパレコウイルス感染症は、同じくピコルナウイルス科に属するエンテロウイルスによる感染症と同様に不顕性感染の割合が高いと推測されるが、乳幼児から検出されることが多く、中枢神経症状はじめ重篤な疾患の病原体となりうる可能性を含め注意が必要な感染症であると考えられる。

- 1) Wigand R, Sabin AB: Properties of ECHO types 22, 23 and 24 viruses, Arch Ges Virusforsch, 11:224-247, 1961
- 2) King AMQ, Brown F, Christian P, Hovi T, Hyypia T, Knowles NJ, Lemon SM, Minor PD, Palmenberg AC, Skern T, Stanway G: Picornaviridae In Virus taxonomy, Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, p.657-673, Edited by Regenmortel C, Fauquet MDH, Bishop CH, Calisher EB, Carsten MK, Estes SM, Lemon J, Maniloff MA, Mayo DJ, McGeoch CR, Pringle RBW Academic Press, New York, NY 1999
- 3) David MK, Peter MH: Fields Virology, Fifth edition, 1, p.839-894, 2007
- 4) Ito M, Yamashita T, Tsuzuki H, Takeda N, Sakae K: Isolation and identification of a novel human parechovirus, J Gen Virol, 85, 391-398, 2004
- 5) Joki-Korpela P, Hyypia T: Diagnosis and Epidemiology of echovirus 22 infections, Clin Infect Dis, 26, 129-136, 1998
- 6) Hyypia T, Horsnell C, Maaronen M, Khan M, Kalkkinen N, Auvinen P, Kinnunen L, Stanway G: A distinct picornavirus group identified by sequence analysis, PNAS, 89, 8847-8851, 1992
- 7) Ghazi F, Hughes P J, Hyypia T, Stanway G: Molecular analysis of human parechovirus type 2 (formerly echovirus 23), J Gen Virol, 79, 2641-2650, 1998
- 8) Benschop KS, Schinkel J, Luken ME, Broek PJM, Beersma MF, Menelik N, Eijk HW, Zaaijer HL, VandenBroucke-Grauls CM, Beld MG, Wolthers KC: Fourth human parechovirus serotype, Emerg Infect Dis, 12, 1572-1575, 2006
- 9) Al-Sunaidi M, Williams CH, Hughes PJ, Schnurr DP, Stanway G: Analysis of a new

- human parechovirus allows the definition of parechovirus types and the Identification of RNA structural domains, *J Virol*, 81, 1013-1021, 2007
- 10) Oberste MS, Maher K, Pallansch MA: Complete sequence of echovirus 23 and its relationship to echovirus 22 and other human enterovirus, *Virus Res*, 56, 217-223, 1998
  - 11) Watanabe K, Oie M, Higuchi M, Nishikawa M, Fujii M: Isolation and characterization of novel human parechovirus from clinical samples, *Emerg Infect Dis*, 13, 889-895, 2007
  - 12) Schnurr D, Dondero M, Holland M, Connor J: Characterization of echovirus 22 variants, *Arch Virol*, 141, 1749-1758, 1996
  - 13) 若月紀代子、渡邊香奈子、吉田弘: 福岡市における Human parechovirus 4 の分離事例第 48 回日本臨床ウイルス学会 抄録、p. 79, 2007
  - 14) de Vries M, Pyrc K, Berkhout R, Vermeulen-Oost W, Dijkman R, Jebbink MF, Bruisten S, Berkhout B, van der Hoek L: Human parechovirus type 1,3,4,5 and 6 detection in picornavirus cultures, *J Clin Microbiol* (in process) 2008
  - 15) Baumgarte S, de Souza Luna LK, Grywna K, Panning M, Drexler JF, Karsten C, Huppertz HI, Drosten C: Prevalence, types, and RNA concentrations of human parechoviruses, including a sixth parechovirus type, in stool samples from patients with acute enteritis, *J Clin Microbiol*, 46, 242-248, 2008

# Detection of Human parechovirus and examination of the identification method

Miyabi Ito, Teruo Yamashita, Hideaki Tsuzuki, Yuka Kabashima, Akira Fujiura,  
Akiko Hasegawa, Satoko Nagaya, Kenji Sakae, Hiroko Minagawa

Human parechovirus(HPeV) is a species of the genus *Parechovirus*, separated from the genus *Enterovirus* of the family *Picornaviridae*. By 2007, 6 HPeV serotype/genotypes were reported, but the pathogenicity of each virus type to the infected individuals has not been elucidated.

We detected HPeV by the methods of cell culture isolation and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) from the stool specimens collected through the infectious agent surveillance in Aichi Prefecture between 1999 and 2006. Of 4,309 specimens, 68(1.6%) were positive for HPeV by cell culture, and 104(2.4%) by RT-PCR amplification of the 5' untranslated (UTR) region. Of 104 HPeVs detected, 58 were typed as HPeV-1, 44 HPeV-3, one HPeV-4, and one HPeV-6. HPeV-1 was detected every year and HPeV-3 in each year except 2000 and 2005. Thirty-one (53%) of HPeV-1 and 12 (27%) of HPeV-3 were detected from the specimens related with gastroenteritis, while 11(19%) HPeV-1 and 14(32%) HPeV-3 were from those with respiratory illness.

Key word: human parechovirus, infectious agent surveillance, phylogenetic tree analysis, serotype/genotypes, gastroenteritis, respiratory illness

# ヒトパレコウイルス感染症

伊藤 雅<sup>1)</sup>/山下照夫<sup>2)</sup>/皆川洋子<sup>3)</sup>

**(KEYWORDS)** ヒトパレコウイルス, 胃腸炎, 呼吸器感染症, 遺伝子検査

## 1. はじめに

ヒトパレコウイルス (human parechovirus; HPeV) はピコルナウイルス科パレコウイルス属 (*Genus Parechovirus*: par(a) = 傍, echo = エコー) に分類される 1 本鎖の RNA ウイルスである。同ウイルス科には, 他に小児麻痺の原因となるポリオウイルスや無菌性髄膜炎, 手足口病, ヘルパンギーナの原因となるコクサッキー, エコーウイルス等が属するエンテロウイルス属, 呼吸器疾患の原因ウイルスが属するライノウイルス属, A 型肝炎の原因ウイルスが属するヘパトウイルス属, 胃腸炎患者から検出されたアイチウイルス<sup>1)</sup>が属するコブウイルス属のほか, カルチオウイルス属 (脳心筋炎ウイルス等), アフトウイルス属 (口蹄疫ウイルス), エルボウイルス属, テッショウイルス属等, 多数の重要な動物ウイルスが属している。

パレコウイルス属は, ヒトパレコウイルス (HPeV) とユンガンウイルス (*Ljungan virus*; LV) の二つの種から成る。HPeV は 1956 年に小児夏季下痢症の病原体として分離されたエコーウイルス 22 型およびエコーウイルス 23 型<sup>2)</sup>がウイルス学的特徴から 1999 年にパレコウイルス属として独立し, ヒトパレコウイルス 1 型 (HPeV-1) および 2 型 (HPeV-2) と改名された<sup>3-11)</sup>。主に小児の胃腸炎や呼吸器疾患患者から分離される。現

在のところ 6 種類の血清型/遺伝子型が存在し, 世界各国から検出報告がなされているが, わが国からは HPeV-1 と HPeV-3 の報告が多い。LV は, 1999 年に報告された野ネズミ bank vole (*Clethrionomys glareolus*) から検出されたウイルス<sup>12)</sup>で二つ以上の血清型が知られている。2007 年には子宮内死亡胎児 (intrauterine fetal death; IUFD) の脳と胎盤から免疫組織化学的に LV 抗原の存在が報告され, 人獣共通感染症の可能性も示唆されている<sup>13)</sup>。

## 2. 血清型/遺伝子型と病原性

表に HPeV に関する報告例を示す。

HPeV-1 (旧 Echovirus22・標準株 Harris 株) は世界各国で検出され HPeV の中では最も多く報告されている。その臨床症状は, 胃腸炎, 呼吸器疾患, 無菌性髄膜炎, 脳炎, 心筋炎, 中耳炎, 新生児敗血症様症候群 (neonatal sepsis-like syndrome) 等多彩である<sup>3,14-36)</sup>。エンテロウイルス感染症に比較すると中枢神経症状は目立たない印象がある。また, 健康成人や無症状幼児からの分離も報告されている<sup>16,45-47)</sup>。

HPeV-2 (旧 Echovirus23・Williamson 株) の分離報告は少なく, 1956 年のほかには, スウェーデンより胃腸炎および呼吸器疾患患者から<sup>37)</sup>, カナダより胃腸炎および敗血症患者から<sup>26)</sup>の報告がある。国立感染症研究所の病原体検出情報によると, わが国からは 1983 年に 1 例, 85 年に 1 例, 86 年に 1 例, 2000 年に 3 例, 01 年に 4 例, 03 年に 1 例の合計 11 例の分離報告がある。

1) ITO Miyabi 愛知県衛生研究所生物学部ウイルス研究室

2) YAMASHITA Teruo 同・室長

3) MINAGAWA Hiroko 愛知県衛生研究所・所長

表 ヒトパレコウイルスに関連する臨床症状の報告例

	国または機関	検出年 登録年	患者数	主な症状	標準株・分離株 (accession No.)	文献
HPeV-1	ドイツ	1961	4	胃腸炎		14)
	アメリカ	1964, 1965	18	呼吸器疾患		15)
	日本	1964, 1966, 1967	29	胃腸炎, 呼吸器疾患		16)
	スウェーデン	1966~1990	109	胃腸炎, 呼吸器疾患, リンパ節腫脹, 脳炎, 心筋炎		17)
	アメリカ	1967	1	心筋炎		18)
	WHO	1967~1974	581	胃腸炎, 呼吸器疾患, リンパ節腫脹, 脳炎, 心筋炎		19)
	アメリカ	1970	1	心筋炎		20)
	カナダ	1977~1978	8	尿毒症		21)
	ジャマイカ	1986	3	急性弛緩性麻痺(AFP), 無菌性髄膜炎		22)
	フィンランド	1989	1	脳炎		23)
	フィンランド	1991	4	胃腸炎, 呼吸器感染症		24)
	イスラエル	1992	19	胃腸炎, 壊死性腸炎		25)
	カナダ	1985~2004	20	胃腸炎, 呼吸器感染症		26)
	オランダ	2000~2005	27	胃腸炎, 呼吸器感染症, 敗血症, 中枢神経症状	(DQ172416-172441)	27)
	日本	1991~2005	14	胃腸炎, 呼吸器感染症, 手足口病		28)
	フィンランド	1992	1		Harris(L02971)	3)
	日本	1999, 2000	3	胃腸炎, 呼吸器感染症		29)
	日本	1999, 2000	14	呼吸器感染症		30)
	フランス	2002	1	脳脊髄炎		31)
	ドイツ	2006	1	下痢症	BNI-788St(EF051629)	32)
オランダ	2007	4			33)	
ドイツ	2008	7	急性胃腸炎	BNI-R90(EU024630)	34)	
フィンランド	2008		中耳炎, 呼吸器感染症(咳)		35)	
オランダ	2008	33	胃腸炎, 呼吸器感染症, 髄膜炎, 敗血症, 発熱		36)	
HPeV-2	スウェーデン	1953~1993	5	胃腸炎, 呼吸器感染症		2, 37)
	イギリス	1998	1		Williamson(AJ005695)	5)
	カナダ	2001	1		Can82047-01	26)
	オランダ	2008	2	無症状		36)
HPeV-3	日本	1999	3	胃腸炎, 麻痺, 発疹症, 呼吸器感染症	A308-99(AB084913)	29)
	カナダ	2001, 2004	5	胃腸炎, 敗血症, 新生児感染症(高熱, 発疹, 呼吸器症状)	Can82853-01(AJ889918)	26, 38, 39)
	アメリカ	2003, 2004	3	乳幼児突然死症候群		40)
	オランダ	2000~2005	10	胃腸炎, 呼吸器感染症, 敗血症, 中枢神経症状	K251181-02 (DQ172442-172451)	27)
	日本	1991~2005	16	胃腸炎, 呼吸器感染症, 発疹症, 無菌性髄膜炎, 不明熱, 筋炎		28)
	オランダ	2007	4		2000-759(EU077507)	33)
オランダ	2008	34	胃腸炎, 呼吸器感染症, 髄膜炎, 敗血症, 発熱		36)	
HPeV-4	オランダ	2002	1	発熱, 食欲不振	K251176-02(DQ315670)	41)
	アメリカ	1973, 1975, 1982	3		T75-4077(AM235750)	42, 43)
	日本	1993	1	リンパ節炎	NII370-93(AB434673)	28)
	日本	2005	2	ヘルパンギーナ, 急性胃腸炎	Fuk2001-282(AB433630)	44)
	オランダ	2007	1	胃腸炎(嘔吐)	2006-99(EU077521)	33)
	オランダ	2008	1	無症状		36)
HPeV-5	アメリカ	1998	1		86-6760 Connecticut/86 (AF055846)*	6)
	アメリカ	1982, 1983, 1992	4		T92-15(AM235749)	42, 43)
	カナダ	2003	2	ウイルス血症	Can95219-03, Can95224-03	26)
	オランダ	2007	1	発熱, 脱水, late onset sepsis neonatorum	2000-1108(EU077511)	33)
	オランダ	2008	3	胃腸炎, 発熱, 発疹	05-1475(AB443848)	36)
HPeV-6	日本	2000	1	ライ症候群	NII561-2000(AB252582)	28)
		2000, 2001	9	胃腸炎, 呼吸器感染症, 発疹症, 弛緩性麻痺		28)
	オランダ	2007	1	発熱, 脱水, 中耳炎, 貧血症	2005-823(EU077518)	33)
	ドイツ	2008	1	急性胃腸炎	BNI-67(EU022171)	34)
	ドイツ	2008	1		BNI-67/03(EU024629)	unpublished

\* 旧 Echo23(HPeV-2)



HPeV-3は2004年にわれわれが初めて報告したウイルス(A308-99株)で、発熱、胃腸炎症状、一過性下肢麻痺症状を示した1歳小児の糞便検体より分離された<sup>29)</sup>。この症例ではペア血清における有意な抗体価上昇から病原体診断が確定され、患者は後遺症なく回復している。分離ウイルスは血清学および遺伝子学的解析から HPeV3型と定められた。わが国では、他に胃腸炎、呼吸器疾患、発疹症、無菌性髄膜炎患者から<sup>28)</sup>、一方、ヨーロッパや北アメリカからは胃腸炎、呼吸器疾患患者に加え、新生児感染症<sup>26,39)</sup>、敗血症様疾患<sup>26,27,36,38)</sup>、無菌性髄膜炎<sup>28)</sup>、中枢神経症状<sup>27)</sup>、乳児突然死症候群(sudden infant death syndrome; SIDS)患者<sup>40)</sup>から検出されており、これら疾患との関連性が推測されている。また、HPeV-3は HPeV-1に比較して敗血症様症状や中枢神経症状を伴う重症例の割合が高いことも報告されている<sup>27)</sup>。

HPeV-4は2006年にオランダ(K251176-02株)<sup>41)</sup>とイギリス(T75-4077株)<sup>42)</sup>からそれぞれ報告された新しい血清型である。オランダ(K251176-02)株は発熱と哺乳不良を示した6日齢の新生児糞便検体から検出されている。血清学および遺伝子学的解析により4型と定められた。イギリス(T75-4077)株は HPeV-1(旧Echo22)の変異株として1996年に報告された分離株7例<sup>43)</sup>の詳細な解析により、新たに1株が4型と同定されたものである。わが国では、2007年以降にリンパ節炎<sup>28)</sup>、ヘルパンギーナ、急性胃腸炎各1名<sup>44)</sup>の患者報告がある。

HPeV-5は1986年に分離され HPeV-2(Echo23)とされた Connecticut/86株の全塩基配列解析の結果、イギリスで型別未同定とされていた株(T92-15株)とともに5型として2006年に再分類されたものである<sup>6,42)</sup>。カナダではウイルス血症の患者から<sup>26)</sup>、オランダでは発熱、胃腸炎、発疹症の患者から<sup>33,36)</sup>の検出が報告されている。

HPeV-6(NII561-2000株)は2007年に新潟県から報告された血清型で、Reye症候群で死亡した1歳小児の脳脊髄液から分離された。胃腸炎、発疹症、上気道炎、弛緩性麻痺等の症状を示した患者9例からの検出も同時に報告されている<sup>28)</sup>。オ

ランダでは発熱、脱水、中耳炎、貧血症<sup>33)</sup>、ドイツでは急性胃腸炎<sup>34)</sup>の患者から報告されている。

HPeV-4, 5, 6については、VP1領域アミノ酸配列の HPeV-1, 2, 3および相互の相同性が75%以下と同科のエンテロウイルスにおいて、異なる血清型に相当するレベルであることを根拠に遺伝子学的に新しい型と定められた。HPeV-1以外の血清型/遺伝子型については、分離例の報告は少なく病原性についての詳細はさらに分離株の情報を集め解析が必要である。HPeVの血清型/遺伝子型にかかわらず臨床症状のみからエンテロウイルス感染症と鑑別するのは困難と考えられる。特に新生児では敗血症様症状(発熱、けいれん、易興奮性、発疹、哺乳不良)を呈する症例<sup>48)</sup>が報告されており注意が必要である。

### 3. 疫学

比較的分離報告例の多い HPeV-1 および HPeV-3については、若干の疫学解析報告がなされている。

WHOは1967~74年の調査結果から HPeV-1(当時はEcho22)合計581分離例のうち1歳以下からの分離が61%を占め、エンテロウイルスに比較して低年齢からの検出が多いと報告している<sup>19)</sup>。また、スウェーデンにおける1966~90年の調査も、109例のうち1歳以下が72%であったと報告している<sup>17)</sup>。わが国からは HPeV-1が分離された呼吸器感染症患者14例は全例2歳以下であったとの報告がある<sup>30)</sup>。血清疫学解析をみると、わが国では1歳以上の高い抗体保有率が報告されており<sup>16,49,50)</sup>、フィンランドからは新生児の95%が移行抗体を持ち、2~12か月齢は20%、1歳以上は91%の抗体保有率が報告されている<sup>24)</sup>。日本や欧米において HPeV-1初感染の多くは乳児期に起こっていると推測される。

HPeV-3を分離した1999年に行った当所の調査では、HPeV-3に対する健康な愛知県民の中和抗体保有率は、6か月~1歳未満では15%、1~3歳では45%、4~9歳では77%、10~19歳では83%、20歳以上では73%であった<sup>29)</sup>。この結果は、健康者の多くが幼児期以前に HPeV-3の感染既往をもつことを示唆していた。

季節性について、HPeV-1はスウェーデンで晩夏から秋および冬から初春に多く<sup>17)</sup>、オランダで

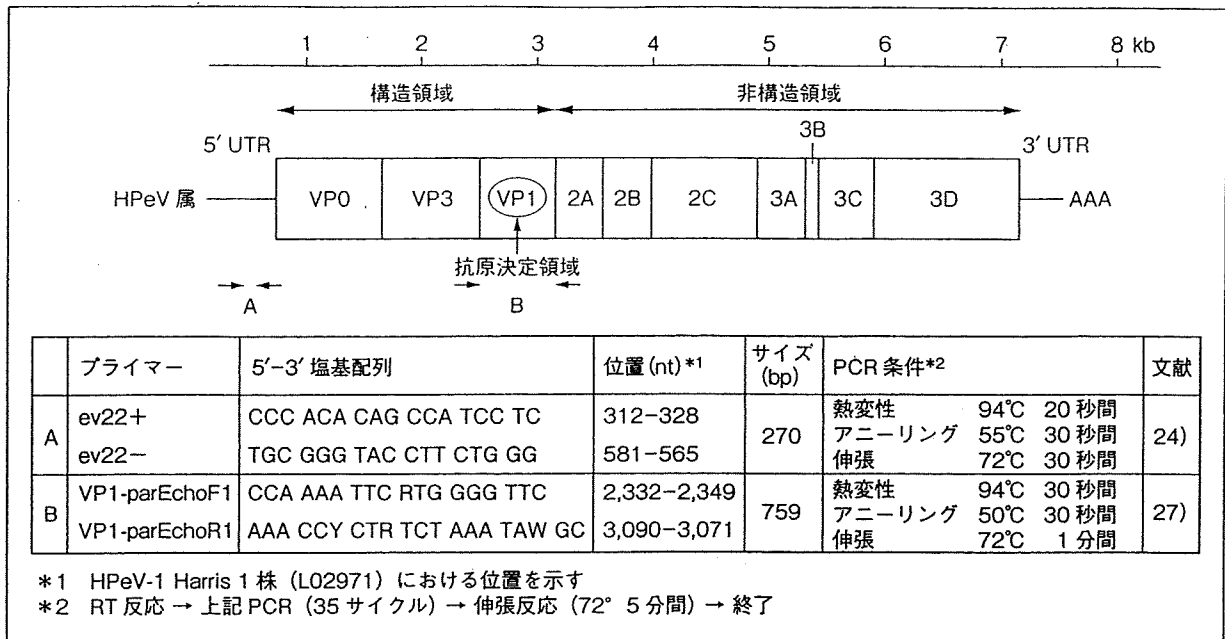


図 HPeV 遺伝子模式図とプライマー位置

は夏に少ないこと<sup>36)</sup>、HPeV-3 はカナダで秋から冬に<sup>26)</sup>、オランダでは 2 年ごとに流行を繰り返し<sup>36)</sup>春から初夏に発症した患者から<sup>27)</sup>の検出が多いことが報告されている。われわれの調査では HPeV-1 は秋から冬に、一方、HPeV-3 は夏から秋に多く検出されるという傾向を得ている。

#### 4. ウイルスの検出法

ウイルスの分離は、糞便、咽頭拭い液(あるいは鼻汁、鼻咽頭吸引液、気管内分泌液)、脳脊髄液検体からの細胞培養法による分離報告がある。感受性細胞には Vero, VeroE6, HeLa, RD-18S, CaCo2, BGM, HEp2, BSC-1, tMK, LLC-MK2,293, HT-29, A549 細胞等が報告されている。エンテロウイルス様の細胞変性効果(cytopathogenic effect; CPE)を示すが、エンテロウイルス抗血清で中和同定されない分離株あるいはエンテロウイルスに対する RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) 法では遺伝子の増幅がみられない検体には、HPeV の可能性を考慮すべきである。HPeV-1 に比べ HPeV-3 の CPE 出現が遅いと報告<sup>47)</sup>もあるが、われわれの Vero あるいは HeLa 細胞を用いた経験では、3~14 日でエンテロウイルス様の CPE が出現する。数回の盲継代後分離に成功した経験もある。型別同定は中和抗体法によるのが一般的

であるが、HPeV-3~6 型については抗血清の入手が難しく、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法も確立されていないため、検体あるいは培養上清から抽出したウイルス RNA を鋳型に用いた RT-PCR 法あるいはリアルタイム RT-PCR 法が推奨される。

われわれは通常 HPeV 分離には Vero 細胞、HeLa 細胞を用いている。CPE 出現がエンテロウイルスに比較して緩やかな印象がある。分離培養陰性であった検体からも、図に示した RT-PCR 法により直接 HPeV 遺伝子の検出を経験しており、RT-PCR 法は感度の良い検出系と思われる。増幅される領域が異なる多くの HPeV 検出用プライマーが報告されているが、ここでは高感度に HPeV を検出できるもの(A: 5' UTR 領域)<sup>24)</sup>、シークエンスによる型別同定に有用なもの(B: VP1 領域)<sup>27)</sup>を紹介する。A は患者検体から直接抽出した RNA などウイルス量が少ない場合でも高感度に HPeV 遺伝子増幅を確認できるが、1 型、4 型、5 型の型別同定には適していない。一方、B によって増幅される遺伝子断片は、標準株との塩基配列の比較により容易に型別同定が可能である。当施設では実施していないが最近では HPeV-1~6 型を検出可能なリアルタイム PCR 法の報告<sup>51-53)</sup>が相次いでおり血液や脳脊髄液から

の迅速診断が可能になりつつある。また、HPeVのVPO領域合成ペプチドを利用したELISA法など、血清診断法につながる研究開発もなされている<sup>54)</sup>。

#### 5. 治療および予防法

ウイルス特異的治療法は開発されておらず、多くのエンテロウイルス感染症と同様に対症療法が主体となる。胃腸炎、呼吸器症状の場合、予後は通常良好である。死亡例からのHPeV-3および6型の検出報告は、いずれも死因との因果関係は証明されていない。ただし、エンテロウイルスより低年齢、とりわけ1歳以下の乳幼児からの検出例が多く、免疫低下時の感染には注意が必要である。主な感染経路は経口感染であるため、感染予防には手洗いが有効である。

#### 6. おわりに

ヒトパレコウイルス感染症は同じくピコルナウイルス科に属するエンテロウイルスによる感染と同様に不顕性感染の多いことが推測される。小児においては胃腸炎、呼吸器感染症が一般的であるが、中枢神経症状はじめ多様な臨床症状が報告されている。HPeV-1およびHPeV-3以外の血清型に属するHPeVの検出報告はいまだ少ないが、国内にとどまらずヨーロッパ、カナダ、アメリカ等から報告があり、血清型により病原性が異なる可能性をはじめ、今後興味深い感染症である。

#### 文 献

- 1) Yamashita T, Sakae K, Tsuzuki H, et al : Complete nucleotide sequence and genetic organization of Aichi virus, a distinct member of *Picornaviridae* associated with acute gastroenteritis in human. *J Virol* 72 : 8408-8412, 1998
- 2) Wigand R, Sabin AB : Properties of ECHO types 22, 23 and 24 viruses. *Arch Ges Virusforsch* 11 : 224-247, 1961
- 3) Hyypia T, Horsnell C, Maaronen M, et al : A distinct picornavirus group identified by sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 8847-8851, 1992
- 4) Stanway G, Kalkkinen N, Roivainen M, et al : Molecular and biological characteristics of echovirus 22, a representative of a new picornavirus group. *J Virol* 68 : 8232-8238, 1994
- 5) Ghazi F, Hughes PJ, Hyypia T, et al : Molecular analysis of human parechovirus type 2 (formerly echovirus 23). *J Gen Virol* 79 : 2641-2650, 1998
- 6) Oberste MS, Maher K, Pallansch MA : Complete sequence of echovirus 23 and its relationship to echovirus 22 and other human enterovirus. *Virus Res* 56 : 217-223, 1998
- 7) Collier BAG, Chapman NM, Beck MA, et al : Echovirus 22 is an atypical enterovirus. *J Virol* 64 : 2692-2701, 1990
- 8) Stanway G, Hyypia T : Parechoviruses. *J Virol* 73 : 5249-5254, 1999
- 9) Stanway G, Joki-Korpela, Hyypia T : Human parechoviruses-biology and clinical significance. *Rev Med Virol* 10 : 57-69, 2000
- 10) Joki-Korpela P, Hyypia T : Parechoviruses, a novel group of human parechoviruses. *Ann Med* 33 : 466-471, 2001
- 11) King AMQ, Brown F, Christian P, et al : Picornaviridae in Virus taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (von Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, et al, eds), Academic Press, New York, pp 657-673, 1999
- 12) Niklasson B, Kinnunen L, Hornfeldt B, et al : A new picornavirus isolated from Bank Voles (*Clethrionomys glareolus*). *Virology* 255 : 86-93, 1999
- 13) Niklasson B, Samsioe AN, Papadogiannakis A, et al : Association of zoonotic Ljungan virus with intrauterine fetal deaths. *Birth Defects Res A* 79 : 488-493, 2007
- 14) Bauer H, Wigand R, Globig W, et al : Sauglings-Enteritis bei Infektion mit ECHO-Virus typ 22. *Arch Virusforsch* 12 : 702-705, 1962
- 15) Berchovich S, Pangan J : Recoveries of virus from premature infants during outbreaks of respiratory disease : The relation of echovirus type 22 to disease of the upper and lower respiratory tract in the premature infant. *Bull NYAC Med* 26 : 129-136, 1968
- 16) Nakao T, Miura R : ECHO virus type 22 infection in a premature infant. *Tohoku J Exp Med* 102 : 61-68, 1970
- 17) Ehrnst A, Eriksson M : Epidemiological features of type 22 Echovirus infection. *Scand J Infect Dis* 25 : 275-281, 1993
- 18) Maller HM, Powars DF, Horowitz RE, et al : Fetal myocarditis associated with ECHO virus type 22, infection in a child with apparent immunological deficiency. *J Pediatr* 71 : 204-210, 1967
- 19) Grist NR, Bell FJ, Assaad F : Enteroviruses in human disease. *Prog Med Virol* 24 : 114-157, 1978
- 20) Russell SJ, Bell EJ : Echoviruses and carditis. *Lancet* 295 : 784-785, 1970
- 21) O'Regan S, Robitaille P, Mongeau JG, et al : The hemolytic uremic syndrome associated with ECHO 22 infection. *Clin Pediatr* 19 : 125-127, 1980
- 22) Figueroa JP, Ashley D, King D, et al : An outbreak of acute flaccid paralysis in Jamaica associated with echovirus type 22. *J Med Virol* 29 : 315-319, 1989
- 23) Koskiniemi M, Paetau R, Linnavuori K : Severe encephalitis associated with disseminated echovirus 22 infection. *Scand J Infect Dis* 21 : 463-466, 1989

- 24) Joki-Korpela P, Hyypiä T : Diagnosis and Epidemiology of echovirus 22 infections. *Clin Infect Dis* 26 : 129-136, 1998
- 25) Birenbaum E, Handsher R, Kuint J, et al : Echovirus type 22 outbreak associated with gastro-intestinal disease in a neonatal intensive care unit. *Amer J Perinatol* 14 : 469-473, 1997
- 26) Abed Y, Boivin G : Human parechovirus infections in Canada. *Emerg Infect Dis* 12 : 969-975, 2006
- 27) Benschop KS, Schinkel J, Minnaar RP, et al : Human parechovirus infections in Dutch children and the association between serotype and disease severity. *Clin Infect Dis* 42 : 204-210, 2006
- 28) Watanabe K, Oie M, Higuchi M, et al : Isolation and characterization of novel human parechovirus from clinical samples. *Emerg Infect Dis* 13 : 889-895, 2007
- 29) Ito M, Yamashita T, Tsuzuki H, et al : Isolation and identification of a novel human parechovirus. *J Gen Virol* 85 : 391-398, 2004
- 30) Takao S, Fukuda S, Shimazu Y, et al : The isolation of human parechovirus 1 from cases of acute respiratory illness in children. *Jpn J Infect Dis* 54 : 36-38, 2001
- 31) Legay V, Chhomel JJ, Fernandez E, et al : Encephalomyelitis due to human parechovirus type 1. *J Clin Virol* 25 : 193-195, 2002
- 32) de Souza Luna LK, Baumgarte S, Grywna K, et al : Identification of a contemporary human parechovirus type 1 by VIDISCA and characterization of its full genome. *Virol J* 5 : 26, 2008
- 33) de Vries M, Pyrc K, Berkhout R, et al : Human parechovirus type 1, 3, 4, 5, and 6 detection in picornavirus cultures. *J Clin Microbiol* 46 : 759-762, 2008
- 34) Baumgarte S, de souza Luna LK, Grywna K, et al : Prevalence, type, and RNA concentrations of human parechoviruses, including a sixth parechovirus type, in stool samples from patients with acute enteritis. *J Clin Microbiol* 46 : 242-248, 2008
- 35) Tauriainen S, Oikarinen S, Taimen K, et al : Temporal relationship between human parechovirus 1 infection and otitis media in young children. *J Infect Dis* 198 : 35-40, 2008
- 36) van der Sanden S, de Bruin E, Vennema H, et al : Prevalence of human parechovirus in the Netherlands, in 2000 to 2007. *J Clin Microbiol* 46 : 2884-2889, 2008
- 37) Ehrnst A, Eriksson M : Echovirus type 23 observed as a nosocomial infection in infants. *Scand J Infect Dis* 28 : 205-206, 1996
- 38) Abed Y, Boivin G : Molecular characterization of a Canadian human parechovirus (HPeV)-3 isolate and its relationship to other HPeVs. *J Med Virol* 77 : 566-570, 2005
- 39) Boivin G : Human parechovirus 3 and neonatal infection. *Emerg Infect Dis* 11 : 103-105, 2005
- 40) Sedmak G, Jentzen J : Human parechovirus type 3 (HPeV-3) association with three infant deaths in Wisconsin from September 2003 through August 2004. Association of Public Health Laboratories-Infectious Disease Conference. Orlando, Florida. March 2-4, 2005. Abstract T-22, 2005
- 41) Benschop KS, Schinkel J, Luken ME, et al : Fourth human parechovirus serotype. *Emerg Infect Dis* 12 : 1572-1575, 2006
- 42) Al-Sunaidi M, Williams CH, Hughes PJ, et al : Analysis of a new human parechovirus allows the definition of parechovirus types and the identification of RNA structural domains. *J Virol* 81 : 1013-1021, 2007
- 43) Schnurr D, Dondero M, Holland D, et al : Characterization of echovirus 22 variants. *Arch Virol* 141 : 1749-1758, 1996
- 44) Wakatsuki K, Kawamoto D, Hiwaki H, et al : Identification and characterization of 2 strains of Human parechovirus 4 isolated from 2 clinical cases in Fukuoka city, Japan. *J Clin Microbiol* 46 : 3144-3136, 2008
- 45) Jenista JA, Powell KR, Menegus MA : Epidemiology of neonatal enterovirus infection. *J Pediatr* 104 : 685-690, 1984
- 46) Froeschle JE, Feorino PM, Gelfand HM : Continuing surveillance of enterovirus infection in healthy children in six United States cities. *Am J Epidemiol* 83 : 455-469, 1966
- 47) Galbraith NS : A survey of enteroviruses and adenoviruses in the faeces of normal children aged 0-4 years. *J Hyg* 63 : 441-455, 1965
- 48) Verboon-Macielek MA, Krediet TG, Gerards LJ, et al : Severe neonatal parechovirus infection and similarity with enterovirus infection. *Pediatr Infect Dis* 27 : 241-245, 2008
- 49) Sato N, Sato H, Kawana R, et al : Ecological behaviour of 6 coxsackie B and 29 echo serotypes as revealed by serologic survey of general population in Aomori, Japan. *Jap J Med Sci Biol* 25 : 355-368, 1972
- 50) Takao S, Shimazu Y, Fukuda S, et al : Seroepidemiological study of human parechovirus 1. *Jap J Infect Dis* 54 : 85-87, 2001
- 51) Nix WA, Maher K, Johansson ES, et al : Detection of all known parechovirus by real time-PCR. *J Clin Microbiol* 46 : 2519-24, 2008
- 52) Noordhoek GT, Weel JF, Poelstra E, et al : Clinical validation of a new real-time PCR assay for detection of enteroviruses and parechoviruses, and implications for diagnostic procedures. *J Clin Virol* 41 : 75-80, 2008
- 53) Benschop K, Molenkamp R, van der Ham A, et al : Rapid detection of human parechoviruses in clinical samples by real-time PCR. *J Clin Virol* 41 : 69-74, 2008
- 54) Abed Y, Wolf D, Dagan R, et al : Development of serological assay based on synthetic peptide selected from the VP0 capsid protein for detection of human parechovirus. *J Clin Microbiol* 45 : 2037-2039, 2007