

## 35. 奈良県で検出したヒトパレコウイルス 3 型の 遺伝子解析に基づく疫学的研究

○稲田眞知(奈良県保健研究センター)

### 【研究目的】

ヒトパレコウイルス(human parechovirus : HPeV)は、主に小児の胃腸炎や呼吸器疾患患者から検出されるウイルスで、我が国では 1 型(HPeV-1)と 3 型(HPeV-3)の感染例が多く報告されている。特に 2004 年に愛知県から報告<sup>1)</sup>された HPeV-3 は、一過性下肢麻痺の 1 歳児から検出されており、また近年では、新生児や 3 ヶ月未満の早期乳児において敗血症、脳炎等を引き起こすとされ、さらに、後遺症を残す事例が報告<sup>2)</sup>されるなど、小児科領域で非常に注目されているウイルスとなっている。

当センターでは、奈良県感染症発生動向調査事業として、県内の病原体定点で採取された検体について病原体(ウイルス)検索を実施している。HPeV の検出は 2014 年から開始しており、同年夏には他府県から HPeV-3 の検出が増加しているとの報告が相次ぎ<sup>3-5)</sup>、本県でも同様に HPeV-3 を多く検出した。そこで、今後の流行監視に生かすため、2014 年までの県内での浸淫状況を把握するため、過去にさかのぼって HPeV-3 の検索を実施し、ウイルス解析に基づく奈良県での流行疫学の解明を目的としている。

### 【材料と方法】

全国で HPeV-3 が検出されている<sup>6)</sup>2011 年(平成 23 年)および 2013 年(平成 25 年)に、奈良県感染症発生動向調査で搬入された検体のうち、これまでの検査で病原ウイルスを分離・検出できなかった検体(平成 23 年度 357 検体、平成 25 年度 271 検体)を検査材料とした。検体は、糞便、咽頭ぬぐい液、髄液、血清及び尿などであった。

HPeV 遺伝子の検出は、検査材料からウイルス RNA を抽出後、ウイルス VP3/VP1 部分領域を増殖するプライマーセット<sup>7)</sup>を用いて RT-PCR を実施し、ethidium bromide 含有アガロースゲル電気泳動で増幅を確認した。得られた増幅産物を精製し、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、得られた塩基配列と塩基配列データベース(DDBJ)での BLAST 検索によりウイルス亜型を同定した。また、GenBANK から入手した HPeV-1 から HPeV-6 の標準株や類似株及び同じパレコウイルス属の *Ljungan virus* を用いて、MEGA6.06 の Neighbor-Joining 法により系統樹解析を行った。

また、患者情報については、奈良県感染症発生動向調査病原体検査票より収集した。

### 【結果】

#### 1. 検出状況

平成 23 年度 357 検体(318 症例)のうち、HPeV を検出したのは、23 検体(20 症例)で、検出した亜型は HPeV-1 が 12 検体(12 症例:3.8%)、HPeV-3 が 10 検体(7 症例:2.2%)、HPeV-6 が 1 検体(1 症例:0.3%)であった。平成 25 年度 271 検体(235 症例)のうち、HPeV を検出したのは 6 検体(6 症例)で、亜型は、HPeV-1 が 5 検体(5 症例:2.1%)、HPeV-6 が 1 検体(1 症例:0.4%)で、HPeV-3 は検出しなかった。なお、平成 26 年度には、検査した 157 検体(139 症例)のうち、3 検体(3 症例:2.2%)から HPeV-1 を、21 検体(16 症例:11.5%)から HPeV-3 を検出している。

平成 23 年度、平成 25 年度及び平成 26 年度の発症月別に HPeV-3 の検出状況を図1に示す。

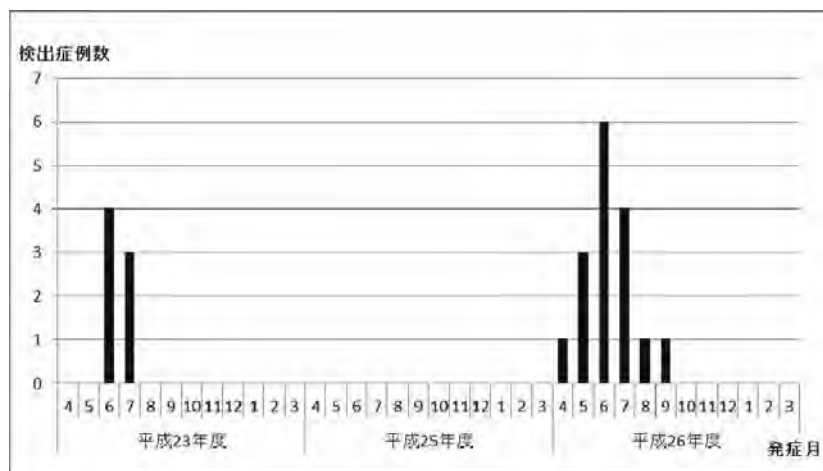


図1 発症月別検出状況

## 2. 患者情報

これまでに HPeV-3 を検出した患者の診断名は、発疹を主とする疾患(パルボウイルス感染症疑い、手足口病、発疹症)11 例、ヘルパンギーナ 3 例(1 例は手足口病と重複)、感染性胃腸炎 2 例、扁桃炎 3 例、インフルエンザ様疾患(下気道炎症状)2 例、咳嗽症状 1 例、流行性筋痛症 1 例及び新生児無呼吸症候群 1 例であった。平成 26 年度には、エンテロウイルス感染症(手足口病、ヘルパンギーナ、発疹症)の記載が多かった。また発疹について小丘疹、紅疹等の記載が多く、発疹の部位として「全身」や「四肢優位で全身に広がる」等の記載があった。一方、平成 23 年度には、発疹に関する記載があったのは 2 例(パルボウイルス感染症疑い、ウイルス性発疹症:ともに紅疹と記載あり)で、その他は、感染性胃腸炎、咳嗽症状、扁桃炎等であった。

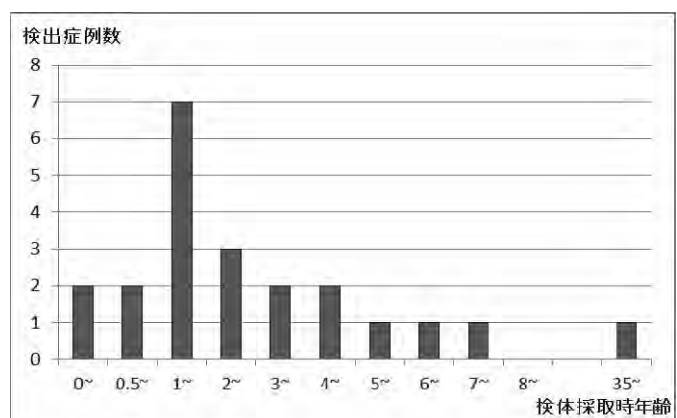


図2 年齢別検出状況

また患者年齢は幅広く、生後1ヶ月に満たない新生児や35歳の成人男性からも検出しており、1歳代が最も多かった(7症例/23症例:30%) (図2) (1例年齢不明)。

### 3. 検出したウイルスの解析

検出したウイルスの VP3/VP1 部分領域遺伝子(256bp)の分子系統樹解析の結果を図3に示す。大きく2つの標準株のクラスター(A308-99及びCan82853)に分類され、さらにA308-99のクラスターの中でも2つのクラスター(図3中 a, b)に細分類され、Can82853の中でも2つのクラスター(同 c, d)に細分類された。2011年の全株が a に分類され、2014年は b に分類された1株が Niigata851/14-JPNと近縁で、その他の株は c, d に二分された。c のクラスターに分類された6株は、全て手足口病、ヘルパンギーナや発疹症と診断されていた。なお、性別、発症月、地域、発熱状況については、各クラスターに偏りはなかった。

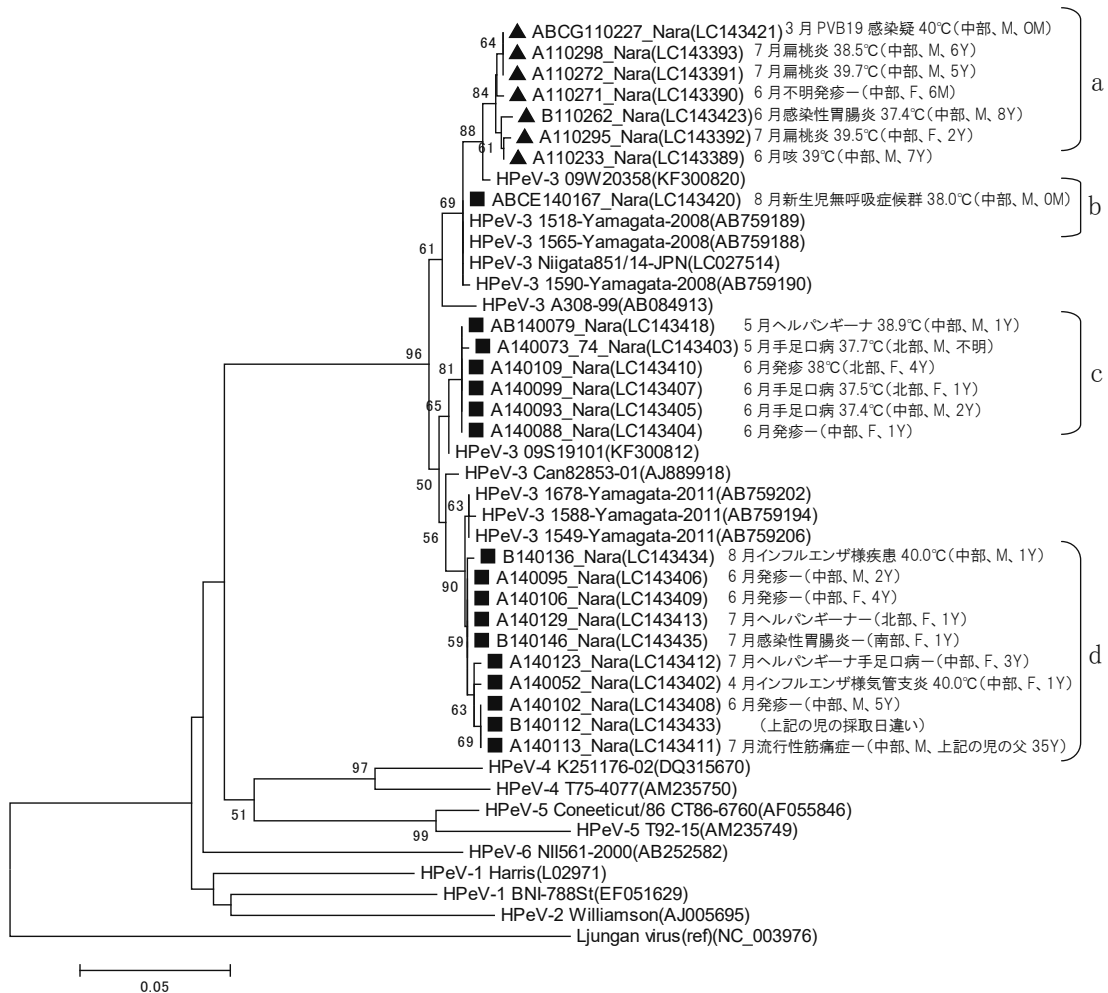


図3 VP3/VP1 部分領域遺伝子の分子系統樹解析

HPeV-1 から HPeV-6 の標準株、類似株及び *Ljungan virus* は GenBank から入手したものをそれぞれ株名の後に accession number を記載した  
 検出した各株に、発病月:診断名、発熱の状況(患者住所県内地域、性別、年年齢)を記載した

## 【考察】

これまで検査した平成 23 年度、平成 25 年度及び平成 26 年度の検体のうち、平成 23 年度(2011 年)及び平成 26 年度(2014 年)の検体から HPeV-3 を検出した。2011 年及び 2014 年には、全国<sup>6)</sup>でも HPeV-3 が多く検出されており、本県でも同様であった。平成 25 年度(2013 年)は HPeV-3 の検出は全国でも少なく、また検出されている自治体も 3 自治体(埼玉県、神奈川県および広島県)で、近府県内では検出されておらず、奈良県でも同様に検出がなかったことから、2013 年には県内で HPeV-3 の流行はみられなかったと考えられた。

また、検出が多い時期は 6~7 月を中心とした夏期で、HPeV-1 の検出時期(9 月を中心とした秋期)とは少しずれがあるが、エンテロウイルスの検出時期と重なっていた。年別に見ると、2011 年は 6 月から 7 月の短期間の検出であったが、2014 年は 4 月から 9 月まで長期間検出した。検出事例数も 2014 年が多いことから、2014 年の奈良県における HPeV-3 は、2011 年よりも大きな流行があったと考えられる。

また検出年齢では、1 歳代が最も多い(29.1%)が、広い年齢で検出があった。我が国の感染症発生動向調査<sup>6)</sup>では、HPeV-3 は 0 歳児、特に生後 2 ヶ月までの新生児、早期乳児からの検出が多く、本県は異なる結果となった。本県での新生児からの HPeV-3 検出事例は、2011 年のパルボウイルス感染症疑いと診断された生後 15 日の男児と 2014 年の新生児無呼吸症候群の生後 24 日の男児の 2 例で、特に 2014 年の事例は、緊急搬送された重篤例であった。なお、HPeV-3 の年齢別の中和抗体保有率が、4~9 歳で 77%、10~19 歳で 83%、20 歳以上でも 73%<sup>1)</sup>と成人でもそれほど上昇しないことから、全国の検出状況のように新生児に限定した病原体ではないと考えられる。今回の成人男性(35 歳)は、別に HPeV-3 を検出している 5 歳男児の父親で、男児の 8 日後に発症し、流行性筋痛症と診断されていた。これは、HPeV-3 が流行する時期に、成人の流行性筋痛症が増加するという Mizuta ら<sup>8,9)</sup>の報告と同様であった。

また、奈良県感染症発生動向調査病原体検査票に記載されている症状は、発疹に関する記載が多かった。なお、発疹症状を呈するという点も、エンテロウイルスと共通している。

検出したウイルスの VP3/VP1 部分領域遺伝子の分子系統樹解析では、2011 年の株はひとつのクラスター a となり、2014 年には 3 つのクラスター b、c、d を形成した。これは、2014 年に県内で流行していた HPeV-3 が、少なくとも 3 系統あったことが示唆される。また c のクラスターに分類された 6 株が、手足口病、ヘルパンギーナや発疹症と診断された患者から検出していることについては、隣接する大阪府でエンテロウイルス感染症疑い患者からパレコウイルスの検出が増加した<sup>5)</sup>こととも一致するものだった。

## 【まとめ】

本県では平成 26 年度に検索を開始した HPeV-3 について遡り調査を実施し、本県でも全国と同様に HPeV-3 を検出する事がわかった。検出した中には新生児の重症例も見られた。検出する時期は夏期が多く、エンテロウイルスと検出時期や症状が似ていることから、臨床症状だけでは鑑別は難しいと思われる。新生児では網状チアノーゼや掌蹠の紅斑が特徴的な症状<sup>10)</sup>とされており、病原体検査票にも発疹に関して特記されていることが多かったことから、発疹症状のあるも

のについて、エンテロウイルスとの鑑別検索は重要と思われた。2014年に検出が多かったことについては、少なくとも3系統のウイルスが混合流行していたためとも考えられ、今後もウイルス解析が流行予測に役立つと思われた。全国では2～3年おきに検出が増加していることから、平成29年(2017年)頃までには県内でも増加するとみられる。今回収集した患者情報やウイルス検出・解析情報から、積極的な検索と迅速な情報提供を心がけたい。

#### 【引用文献】

- 1) M. Ito, T. Yamashita, H. Tsuzuki, *et al.*: *J Gen Virol.*, **85**, 391-398 (2004)
- 2) MA. Verboon-Maciolek, F. Groenendaal, CD. Hahn, *et al.*: *Ann Neurol.*, **64**, 266-273 (2008)
- 3) 相澤悠太、鈴木優子、渡邊加奈子、他:IASR、**35**、220 (2014)
- 4) 宮田一平、宮入烈: IASR、**35**、221 (2014)
- 5) 中田恵子、山崎謙治、駒野淳、他: IASR、**35**、221-222 (2014)
- 6) IASR Topics グラフ  
<http://www.nih.go.jp/niid/ja/allarticles/surveillance/510-iasr/graphs/4563-iasrgtopics.html>
- 7) H. Harvala, I. Robertson, EC. McWilliam Leitch, *et al.*: *J Clin Microbiol.*, **46**, 3446-3453 (2008)
- 8) K. Mizuta, M. Kuroda, M.Kuriyama, *et al.*: *Emerg Infect Dis.*, **18**, 1787-1793 (2012)
- 9) K. Mizuta, T. Yamakawa, H. Nagasawa, *et al.*: *J Clin Virol.*, **58**, 188-19 (2013)
- 10) 相澤悠太、齋藤昭彦:ウイルス、**65**、17-26 (2015)

#### 【謝辞】

本研究を実施するにあたり、検体の提供をいただきました奈良県感染症発生動向調査病原体定点医療機関の先生方、また研究助成をいただきました公益財団法人大同生命厚生事業団に心から深謝いたします。

#### 【経費使途明細】

使途	金額
QIAamp Viral RNA Mini Kit 250回分 52906	121,176円
PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2 50回分 RR055A ×2	54,324円
PerfectShot Ex Taq (Loading dye mix)25μL×48本 RR0005A×2	20,196円
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit 24回分 4337449 ×2	90,698円
10μL ロングフィルターチップシステムラック 96本×10ラック 1252-207CS	10,125円
アズラボフリーズボックス 25本入×10箱 AFB-25	3,488円
合計	300,007円
大同生命厚生事業団助成金	300,000円