

福岡市における Human Parechovirus の検出状況と遺伝子解析

若月紀代子・川本大輔・樋脇弘

福岡市保健環境研究所保健科学部門

Detection and Analysis of Human Parechoviruses in Fukuoka City

Kiyoko WAKATSUKI, Daisuke KAWAMOTO, and Hiroshi HIWAKI

Health Science Division, Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment

要約

2000年から2007年に福岡市感染症発生動向調査で採取された1,088検体から、VeroE6細胞を用いて Human Parechovirus (HPeV) の分離を行った。その結果、17検体から HPeV が分離され、VeroE6細胞は HPeV を検出するのに有効であることが明らかとなった。分離された17株は5'UTR-VP0領域の遺伝子解析から、7株は HPeV-1、8株は HPeV-3、2株は HPeV-4 と同定された。

Key Words : ヒトパレコウイルス Human Parechovirus, シーケンス sequence

1 はじめに

Human parechovirus (以下、HPeV) は、以前 *Picornavirus* 科 *Enterovirus* 属に属していた Echovirus 22 と Echovirus 23 が、1999年、同じ *Picornavirus* 科の *Parechovirus* 属に再分類され、それぞれ HPeV-1、HPeV-2 と改名されたウイルスである。HPeV は、小児の軽度な胃腸炎や呼吸器疾患の原因ウイルスであるが、一過性麻痺や新生児敗血症といった重度な症状を引き起こすことも報告されている^{1, 2)}。近年、遺伝子解析技術の発展により HPeV の型が追加され、HPeV は現在、6型まで知られている。しかしながら、HPeV の分離報告は少なく、その詳細は不明な点が多い。

福岡市の感染症発生動向調査 (以下、サーベイランス) においては、2000年に2件、2002年に1件、2006年に3件、計6件の HPeV-1 が検出されているが、それ以外の型は検出されていない³⁻⁵⁾。

そこで、これまでにサーベイランスで搬入された検体について HPeV に高い感受性を示す VeroE6 細胞を用いて再度、HPeV の検出を試みたので報告する。

2 材料および方法

2.1 材料

2000年から2007年にかけて、サーベイランスで採取された検体のうち、ウイルス分離陰性または同定不能であった1,082検体および、前述の既に HPeV-1 が検出された6検体の計1,088検体を供試した (表1)。検体内訳は、糞便、咽頭拭い液、咽頭うがい液、髄液などであった。

2.2 方法

ウイルスの分離は VeroE6 細胞を用い、培養上清液から QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) により RNA の抽出を行った。抽出 RNA を DNase 処理後 Super Script III で 50℃、1時間反応させ cDNA を作製し、5'UTR-VP0 領域を増幅する HPeV 特異的プライマー E23P1/HPV-N1 を用いて PCR を実施した¹⁾。

PCR 陽性となった場合、PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を使って精製し、BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (ABI) を用いてダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。

3 実験結果および考察

供試した1,088検体中17検体が PCR 陽性であった (表2)。これら増幅産物の塩基配列を BLAST 検索したところ、7検体は HPeV-1、8検体は HPeV-3、2検体は HPeV-4 と同定された。

表1 HPeVの検出を行った検体数および検体内訳

採取年	検体数	検体内訳				
		糞便	咽頭拭い液	咽頭うがい液	髄液	その他
2000	193	38	63	79	13	0
2001	195	27	63	97	7	1
2002	141	23	51	55	8	4
2003	105	39	21	34	8	3
2004	106	46	25	32	3	0
2005	91	47	14	24	3	3
2006	100	55	13	26	2	4
2007	157	75	48	44	3	20
計	1,088	350	298	358	47	35

表2 HPeVの検出結果

検体 No.	採取 年月	型別 結果	患者情報				ウイルス株	Accession number	備考
			臨床診断名	年齢	性別	材料			
1	2000.4	HPeV-1	脳脊髄炎（脳症）	1歳3ヶ月	女	糞便	Fuk2000-157	AB427205	
2	2000.6	HPeV-1	乳児嘔吐下痢症	0歳9ヶ月	女	糞便	Fuk2000-203	AB427206	*1
3	2000.6	HPeV-3	肝機能障害	0歳2ヶ月	男	糞便	Fuk2000-214	AB427212	
4	2000.7	HPeV-3	手足口病	0歳0ヶ月	女	糞便	Fuk2000-250	AB427213	
5	2000.7	HPeV-3	脳脊髄炎（脳炎）	0歳1ヶ月	男	糞便	Fuk2000-253	AB427214	
6	2001.9	HPeV-4	ヘルパンギーナ	1歳1ヶ月	女	糞便	Fuk2001-282	—	*2
7	2002.10	HPeV-1	肝炎	1歳0ヶ月	男	糞便	Fuk2002-227	AB427207	
8	2002.10	HPeV-3	ヘルパンギーナ	8歳4ヶ月	男	咽頭拭い液	Fuk2002-237	AB427215	
9	2003.6	HPeV-3	不明熱	0歳1ヶ月	男	糞便	Fuk2003-143	AB427216	
10	2004.8	HPeV-3	不明熱，急性上気道炎	0歳1ヶ月	女	糞便	Fuk2004-164	AB427217	
11	2005.8	HPeV-1	無菌性髄膜炎	0歳3ヶ月	男	糞便	Fuk2005-109	AB427208	
12	2005.11	HPeV-4	急性胃腸炎	3歳2ヶ月	男	糞便	Fuk2005-123	—	
13	2006.2	HPeV-3	感染性胃腸炎	0歳1ヶ月	男	糞便	Fuk2006-057	AB427218	
14	2006.2	HPeV-1	肝機能障害	0歳4ヶ月	女	糞便	Fuk2006-058	AB427209	
15	2006.5	HPeV-3	心筋炎疑い	0歳1ヶ月	女	糞便	Fuk2006-077	AB427219	
16	2006.10	HPeV-1	感染性胃腸炎	1歳2ヶ月	不明	糞便	Fuk2006-154	AB427210	*3
17	2006.11	HPeV-1	感染性胃腸炎	1歳3ヶ月	女	糞便	Fuk2006-163	AB427211	*3

*1：アデノウイルス41型を同時検出，*2：コクサッキーウイルスA2型を同時検出，*3 ノロウイルスを同時検出

HPeV-1 が検出された患者 7 名の臨床診断名は，脳脊髄炎，乳児嘔吐下痢症，肝炎，無菌性髄膜炎，肝機能障害，感染性胃腸炎と多岐にわたった。なお，感染性胃腸炎患者由来の 3 検体（検体 No.2, 16 および 17）では，下痢症ウイルスであるアデノウイルス 41 型，ノロウイルスの重複感染が認められた。

HPeV-3 が検出された患者 8 名の臨床診断名も HPeV-1 と同様に，肝機能障害，手足口病，脳脊髄炎，ヘルパンギーナ，不明熱，急性上気道炎，感染性胃腸炎，心筋炎疑いと多様であった。HPeV-3 感染の臨床症状は

HPeV-1 感染よりも，やや激しいことが指摘されている⁶⁾が，サーベイランスにおいては患者の詳細な臨床症状の情報を入手することが困難であり，HPeV-1 および HPeV-3 が検出された 15 名の患者についての臨床症状の程度の差は不明である。

HPeV-4 は，ヘルパンギーナ（検体 No.6）および急性胃腸炎（検体 No.12）の患者から検出され，検体 No.6 はコクサッキーウイルス A2 型の重複感染であった。HPeV-4 は，2006 年オランダやアメリカで報告され，新型 HPeV として登録されたウイルスであり，世界的にも

分離例が少ない^{7, 8)}。本サーベイランスにおいては、2 検体から HPeV-4 を検出したが、わが国では Watanabe らの報告に次ぐ二番目の事例となる^{9, 10)} (なお、今回の HPeV-4 の検出事例と遺伝子解析結果については、第 48 回日本臨床ウイルス学会で内容の一部を報告しており、全内容は *Journal of Clinical Microbiology* に投稿中である)。

HPeV は、エンテロウイルスと比較すると、低年齢者からの検出が多く、夏から冬にかけて流行することが指摘されている¹¹⁾。今回、HPeV が検出された 17 名の患者は、検体 No.8 の 1 名を除くと全て 1 歳以下であり、また、検体が採取された時期も No.1 と No.15 の検体を除くと、夏から冬の期間であった。

HPeV と同定された 17 株の 5'UTR-VP0 領域の塩基配列について、近隣結合法により系統樹解析を行った (図 1)。HPeV は型ごとに 6 つの大きなクラスターに分類された。

HPeV-1 では、分離された 7 株はリファレンス株である Harris 株とはやや離れたクラスターに位置し、分離年ごとにクラスターを作ることはなく、遺伝学的多様性がみられた。

HPeV-3 の場合、分離された 8 株のうち、3 株はリファレンス株である A308-99 株が属すクラスターに位置し、残りの 5 株は Can82853-01 リファレンス株が属すクラスターに位置し、リファレンス株を含むこれら HPeV-3 株は遺伝学的に相同性が高かった。

HPeV-4 では、リファレンス株である K251176-02 株と T75-4077 株は異なるクラスターに位置し、分離された 2 株はそれぞれのリファレンス株と近縁であった。

本市のサーベイランスにおいて検出されるウイルスは、エンテロウイルス、インフルエンザウイルス、ノロウイルス、アデノウイルスが大多数であり、HPeV の検出頻度は非常に低い³⁻⁵⁾。2000 年から 2006 年にかけてのサーベイランスでは、HPeV の検出はわずか 6 件であったが、今回の調査では、HPeV が新たに 11 件から検出され、計 17 株の HPeV が分離された。したがって、ウイルス分離に用いた VeroE6 細胞は HPeV を検出するのに非常に有効であることがわかった。

得られた 17 株のうち、HPeV-4 を除く 15 株の塩基配列は、GenBank に登録した (Accession number AB427205-427219)。

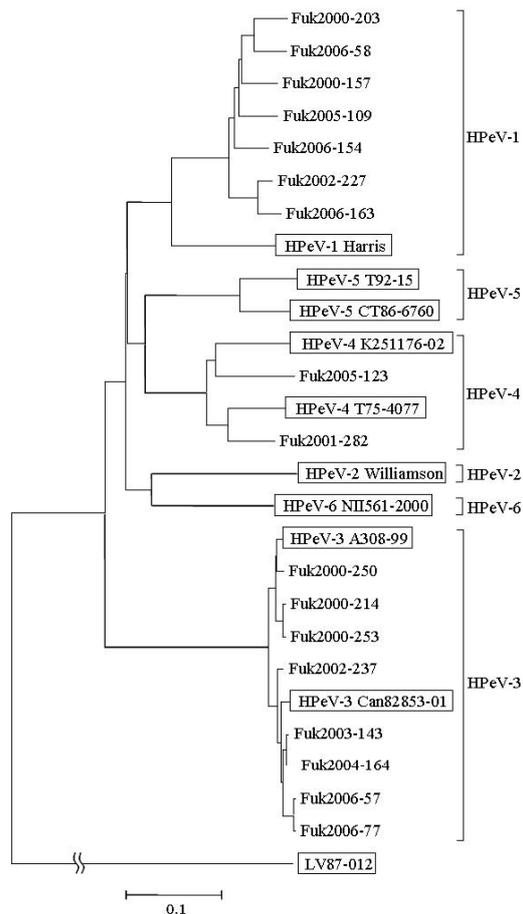


図 1 5'UTR - VP0 領域における系統樹解析結果
参照株は、GenBank より引用。

それぞれの Accession number は以下のとおり。

HPeV-1 Harris (L02971), HPeV-2 Williamson (AJ005695), HPeV-3 A308-99 (AB084913), HPeV-3 Can82853-01 (AJ889918), HPeV-4 K251176-02 (DQ315670), HPeV-4 T75-4077 (AM235750), HPeV-5 T92-15 (AM235749), HPeV-5 CT86-6760 (AF055846), HPeV-6 NII561-2000 (AB252582), Ljungan virus 87-012 (AF327920)。

文献

- 1) Ito, M., T. Yamashita, H. Tsuzuki, N. Takeda, and K. Sakae : Isolation and identification of a novel human parechovirus., *J. Gen. Virol.*, 85, 391-398, 2004.
- 2) Boivin Guy, Y. Abed, and F. D. Boucher : Human parechovirus 3 and neonatal infections., *Emerg. Infect. Dis.*, 11, 103-107, 2005.
- 3) 微生物課ウイルス担当：平成 12 年度感染症発生動向調査事業関連のウイルス検査結果，福岡市保健環境研究所報，26，220-221，2001.
- 4) 微生物部門ウイルス担当：平成 14 年度感染症発生動向調査事業関連のウイルス検査結果，福岡市保健環境研究所報，28，218-219，2003.
- 5) 保健科学部門ウイルス担当：平成 18 年度感染症発生動向調査事業関連のウイルス検査結果，福岡市保健環境研究所報，32，151-152，2007.
- 6) Benschop, K. S. M., J. Schinkel, R. P. Minnaar, D. Pajkrt, L. Spanjerberg, H. C. Kraakman, B. Berkhout, H. L. Zaaijer, M. G. H. M. Beld, and K. C. Wolthers : Human parechovirus infections in Dutch children and the association between serotype and disease severity., *Clin. Infect. Dis.*, 42, 204-210, 2006.
- 7) Benschop, K. S. M., J. Schinkel, M. E. Luken, P. J. M. van den Broek, M. F. C. Beersma, N. Menelik, H. W. M. van Eijk, H. L. Zaaijer, C. M. J. E. VandenBroucke-Grauls, M. G. H. M. Beld, and K. C. Wolthers : Fourth human parechovirus serotype., *Emerg. Infect. Dis.*, 12, 1572-1575, 2006.
- 8) Al-Sunaidi, M., Ç. H. Williams, P. J. Hughes, D. P. Schnurr, and G. Stanway : 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.
- 9) Watanabe, K., M. Oie, M. Higuchi, M. Nishikawa, and M. Fujii : Isolation and characterization of novel human parechovirus from clinical samples., *Emerg. Infect. Dis.*, 13, 889-895, 2007.
- 10) 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, 2007.
- 11) 伊藤雅, 山下照夫, 皆川洋子 : [話題の感染症] ヒトパレコウイルス (Human Parechovirus : HPeV) 感染症, *モダンメディア*, 53 巻, 12 号, 2007.