

宮城県におけるヒトパレコウイルス浸淫状況調査

Epidemiological Study of Human Parecho Virus in Miyagi, Japan

阿部美和 木村俊介 鈴木優子 川端淑子*1 植木 洋 佐藤俊郎*2
 Miwa ABE Shunsuke KIMURA Yuko SUZUKI Yoshiko KAWABATA
 Yo UEKI Toshiro SATO

宮城県におけるヒトパレコウイルス (Human parechovirus:HPeV) の浸淫状況を把握するため、宮城県結核感染症発生動向調査事業病原体調査 (発生動向調査検体) と下水処理場流入水及び処理水について RT-PCR 法を用い HPeV 遺伝子の検出を試みた。発生動向調査検体 1,553 件中 18 件, 流入下水検体 79 件中 14 件から HPeV 遺伝子を検出した。HPeV 遺伝子陽性検体 32 件中遺伝子型を決定できた検体は 24 件で HPeV1 が 23 件, HPeV6 が 1 件であった。

キーワード: ヒトパレコウイルス; 発生動向調査; 流入下水

Key words: Human parechovirus; surveillance; wastewater influent

1 はじめに

ヒトパレコウイルス (HPeV) は主に小児の胃腸炎疾患や呼吸器疾患患者から検出され、これらの疾患との関連性が示唆されている。健常者や無症状幼児からの検出例も確認されている一方、無菌性髄膜炎、脳炎、心筋炎等との関連も指摘されている。HPeV は VP1 領域の遺伝子配列によって現在のところ 16 の遺伝子型 (分離ウイルスによる血清型は 8 型) に分類されている。今回、宮城県 (仙台市を除く) での浸淫状況を把握するため発生動向調査検体を対象に RT-PCR 法で HPeV 遺伝子の検出を試みた。また地域内での流行の把握を目的として、下水処理施設の流入下水、処理水についても調査を行ったので併せて報告する。

2 対象及び検査方法

2.1 対象

2008 年 4 月から 2014 年 3 月までに発生動向調査で採取した糞便 748 件、鼻咽頭拭い液 805 件、計 1,553 件 (2008 年 4 月から 2009 年 3 月インフルエンザ対象検体を除く) と、2012 年 7 月から 2014 年 2 月までに 3 カ所の下水処理場より採取された流入下水検体 79 件、処理水検体 39 件を対象とした。(表 1, 2)

表 1 発生動向調査検体数

搬入期間	検体数	検体内訳	
		糞便	鼻咽頭拭い液
2008/4~09/3	91	70	21
2009/4~10/3	398	126	272
2010/4~11/3	323	172	151
2011/4~12/3	195	99	96
2012/4~13/3	278	126	152
2013/4~14/3	268	134	134
計	1,553	727	826

*1 現 環境対策課 *2 現 食肉衛生検査所

表 2 下水検体調査検体数

下水処理場	採取期間	流入下水	処理水
M下水処理場	2012/7~14/2	40	0
I下水処理場	2012/7~13/3	18	18
T下水処理場	2013/4~14/2	21	21
計		79	39

2.2 方法

2.2.1 検体処理

糞便は 10% 乳剤もしくはシードスワブの滅菌蒸留水洗浄液を 10,000rpm 10 分遠心分離した上清をウイルス遺伝子抽出材料とした。また鼻咽頭拭い液は、鼻腔もしくは咽頭を拭った綿棒を入れて攪拌した細胞接種用液をウイルス抽出液とした。流入下水及び処理水はポリエチレングリコール沈殿法で処理したものをウイルス濃縮液とした。

2.2.2 RNA 抽出

QIAamp®Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いキット添付の説明書に従い RNA の抽出を行った。

2.2.3 RT-PCR

1) 逆転写反応

Superscript® II Reverse Transcriptase (200U/µl) 5×First Strand Buffer, 0.1M DTT, RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40U/µl), 2.5mM dNTP, random primer (100µmol/100µl), Distilled Water を用い、cDNA を作成した。

2) PCR (polymerase chain reaction)

5' UTR 領域を対象とした PCR はプライマー ev22(+)/ev22(-) を使用する Joki-Korpela and Hyypia の方法¹⁾を用いた。5' UTR 領域を対象とした PCR において陽性であった検体は、遺伝子型を決定するために VP1 領域を対象とした PCR を行った。1st PCR にプライマー Cap-parECHO-F/ Cap-parECHO-R を、nest PCR に VP1-parECHO-F1/ VP1-parECHO-R1 を用いる Pham らの方法²⁾によって行った。ただし 2013 年 4 月以降の

下水検体については5' UTR領域を対象としたPCRで明らかな陽性例を検出することができなかつたため、VP1領域を対象としたPCRを併用して行った。

2.2.4 遺伝子解析

VP1領域を対象としたPCRにおいて陽性であった検体については、BigDye@Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, ABI 3130 Genetic Analyzerを用いてダイレクトシーケンスを行った。その後MEGA5 (molecular evolutionary genetics analysis, URL: <http://evolgen.bio.l.se.tmu.ac.jp/MEGA/>)で塩基配列を決定しアライメントを行った。さらにDDBJ (DNA Data Bank of Japan, URL: <http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-j.html>)のclustalWを用い近隣接合法 (NJ法) で系統解析を行い、TreeExplorで系統樹を作成して遺伝子型を決定した。VP1領域を対象としたPCRで遺伝子型を決定できなかった発生動向調査検体については、5' UTR領域のPCR産物について塩基配列を決定後、DDBJ BLASTにより相同性を検索し、HPeVであることを確認した。

2.2.5 PCR産物のクローニング

VP1領域を対象としたPCR産物からダイレクトシーケンスで遺伝子型を決定できなかった流入下水検体についてはTOPO TA Cloning kits (invitrogen)を用いてクローニングを行い、得られた産物より遺伝子型別を行った。

3 結果

発生動向調査検体では糞便検体748件中13件(検出率1.7%)からHPeV遺伝子が検出され、そのうち遺伝子型を決定することができた10件はHPeV1であった。一方鼻咽頭拭い液805件から5件のHPeV遺伝子が検出され、遺伝子型を決定することができた3件のうち2件はHPeV1、1件がHPeV6であった(表3)。18件の陽性例の年齢割合は0歳が38.9%(7/18)、1歳が27.8%(5/18)であり、3歳以下が94.4%(17/18)を占めた。また男女比に差はなかつた。検出時期は3月4月以外の通年であり、他の病原体を検出しなかつた症例のうち最も多い症状は下痢で、次いで発熱、上気道炎であった。一方下水処理場流入下水検体79件中14件(検出率17.7%)よりHPeV遺伝子が検出され、遺伝子型はすべてHPeV1であり(表4)、検出時期は8月~12月であった。しかし、処理水39件からHPeV遺伝子は検出されなかつた。発生動向調査検体及び流入下水検体から検出されたHPeV遺伝子のうちVP1領域の塩基配列を決定できた27例について系統樹を作成した(図1)。系統樹解析により2012年に検出された発生動向検体と流入下水検体の一部が同じクラスターを、また、2013年に検出された検体も同様に2つクラスターを形成した。

表3 発生動向調査HPeV遺伝子陽性検体

年齢(歳)	性別	検査材料	採取月日	臨床診断	症状	遺伝子型	その他検出病原体	
08-S10	2	M	鼻咽頭拭い	2008年 5月20日	手足口病	記載なし	型不明	無
08-S17	2	F	鼻咽頭拭い	2008年 6月28日	ヘルパンギーナ	発熱・下痢	型不明	無
08-S115	1	M	糞便	2009年 1月 8日	感染性胃腸炎	嘔吐・嘔気	HPeV1	NoVG II
09-S81	1	F	鼻咽頭拭い	2009年 7月22日	ヘルパンギーナ	発熱	HPeV1	無
09-S95	0(11ヶ月)	M	糞便	2009年 8月 6日	感染性胃腸炎	下痢	HPeV1	無
09-S183	0(8ヶ月)	F	糞便	2009年10月 4日	感染性胃腸炎	下痢	HPeV1	無
09-S242	3	F	鼻咽頭拭い	2009年10月27日	インフルエンザ	発熱・上気道炎	HPeV1	インフルエンザAH1N1
09-S345	19	F	糞便	2010年 2月 9日	感染性胃腸炎	下痢・嘔吐・腹痛・嘔気	HPeV1	NoVG II
10-S173	3	F	糞便	2010年12月14日	感染性胃腸炎	下痢・嘔吐・腹痛	HPeV1	NoVG II
10-S297	1	F	糞便	2011年 2月16日	感染性胃腸炎	発熱・下痢	HPeV1	NoVG II EAEC
12-S98	1	M	糞便	2012年 9月24日	感染性胃腸炎	下痢	HPeV1	無
12-S103	0(11ヶ月)	F	糞便	2012年 9月26日	感染性胃腸炎	下痢	型不明	無
13-S44	0(11ヶ月)	M	糞便	2013年 7月25日	感染性胃腸炎	下痢	HPeV1	無
13-S51	0(8ヶ月)	M	鼻咽頭拭い	2013年 8月26日	手足口病	口内炎・水疱 (丘疹)・下痢	HPeV6	CA6
13-S75	1	M	糞便	2013年10月21日	感染性胃腸炎	発熱・上気道炎・下痢	型不明	無
13-S78	0(7ヶ月)	M	糞便	2013年10月23日	感染性胃腸炎	発熱・上気道炎・下痢	型不明	無
13-S87	2	M	糞便	2013年11月20日	感染性胃腸炎	下痢	HPeV1	無
13-S127	0(9ヶ月)	F	糞便	2013年12月12日	感染性胃腸炎	下痢・嘔吐	HPeV1	無

表 4 流入下水 HPeV 遺伝子陽性検体

採取日	下水処理場	遺伝子型
2012年 8月 8日	M	HPeV1
2012年 8月 22日	I	HPeV1
2012年 9月 5日	I	HPeV1
2012年 9月 19日	I	HPeV1
2012年 9月 19日	M	HPeV1
2012年 10月 3日	I	HPeV1
2012年 10月 17日	I	HPeV1
2012年 11月 7日	I	HPeV1
2013年 8月 21日	M	HPeV1
2013年 9月 18日	T	HPeV1
2013年 10月 9日	M	HPeV1
2013年 10月 23日	M	HPeV1
2013年 11月 6日	M	HPeV1
2013年 12月 4日	T	HPeV1

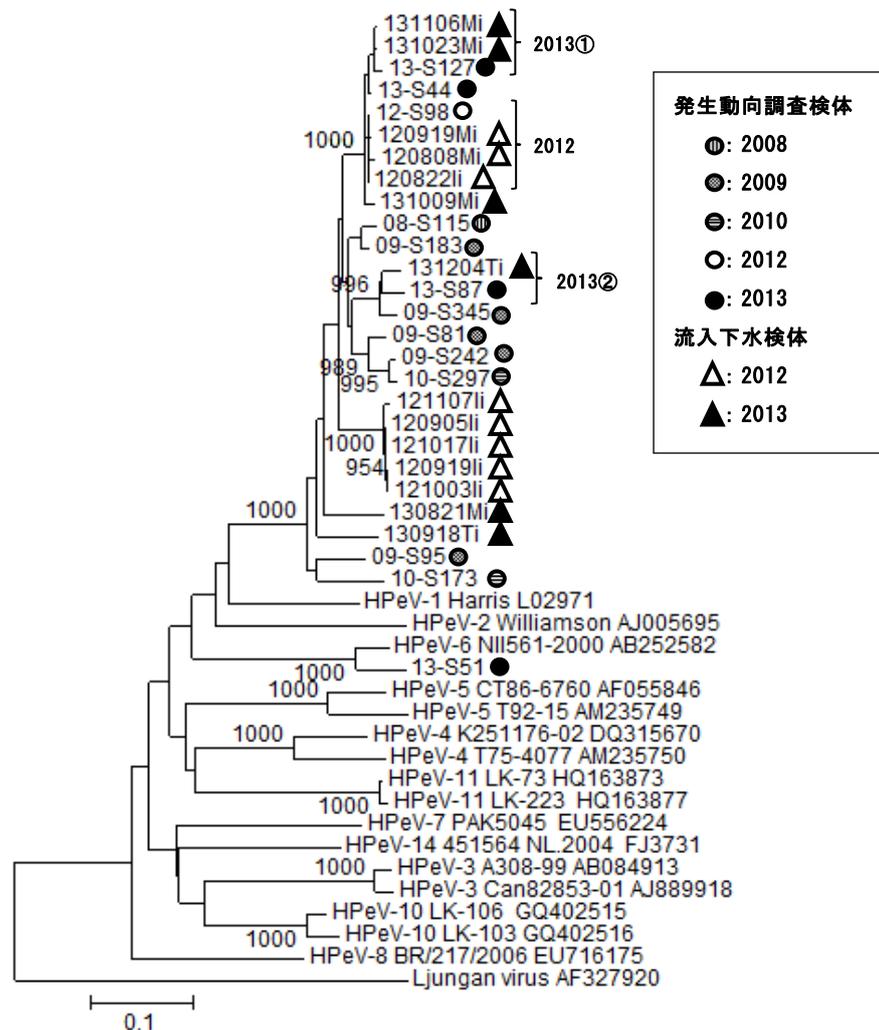


図 1. HPeV VP1 領域塩基配列に基づく系統樹 (N J 法)

4 考 察

今回の調査では発生動向調査検体 1,553 件中 18 件 (検出率 1.2%) から HPeV 遺伝子を検出し、そのうちの 12 件は HPeV1, 1 件が HPeV6 であった。HPeV のうち臨床検体から検出される遺伝子型の多くは HPeV1 と HPeV3 であるが、今回の調査で HPeV3 は確認されなかった。国立感染症研究所病原微生物検出情報 (IASR, <http://www.nih.go.jp/niid/ja/typhi-m/iasr-reference/230-iasr-data/2968-iasr-table-v-p.htm>)

によれば 2008 年と 2011 年には全国的に HPeV3 の検出が多く報告されているものの、本調査では 2011 年採取検体から HPeV 遺伝子が検出されず、宮城県内での流行を確認することはできなかった。また 2008 年採取検体 (インフルエンザ対象検体を除く) から検出した HPeV 遺伝子のうち 2 件は VP1 領域による遺伝子型別ができなかった。この 2 件が HPeV3 であ

る可能性は否定できないが、宮城県内では HPeV3 の伝播がなかったか、その頻度が少なかったことが考えられた。IASR での遺伝子型別集計は HPeV1, 2, 3 のみのため全国での HPeV6 の報告数は不明であるが、HPeV6 は新潟県で発見された遺伝子型³⁾であり、愛知県⁴⁾、愛媛県⁵⁾で検出報告があったことから報告例は少ないものの広域で検出される遺伝子型であると考えられる。遺伝子型不明を含めた HPeV 遺伝子陽性患者の年齢は 0~19 歳で 1 歳以下が半数を占めており、既報と同様に乳幼児での感染が多いことを示した。今回の調査では 18 件中 13 件が感染性胃腸炎の臨床診断であった。一般に感染性胃腸炎の流行時期は冬~春で起病病原体として主にノロウイルス、A 群ロタウイルス、サポウイルスなどが検出され、報告数が減少する夏~秋の胃腸炎では病原性大腸菌などの細菌やアデノウイルス 40/41 型が検出されることが多い。今回の調査では流入下水検体から HPeV 遺伝子が 8~12 月まで継続的、断続的に検出され、発生動向調査検体も 8~12 月までの期間に 61.1% (11/18) が検出されている。そのため夏~秋の、特に 1 歳以下の乳幼児については HPeV による胃腸炎も注意する必要がある。HPeV 遺伝子の系統樹解析により発生動向調査検体と流入下水検体の

一部が同じクラスター形成していることから流入下水検体はヒト-ヒト間の伝播を反映しているものと考えられた。流入下水検体の検出率は発生動向調査と比較して高く、市中での流行状況の指標として非常に有効であると考えられた。

参考文献

- 1) Joki-Korpela.P and T.Hyypia: *Clinical Infectious Diseases*,26,p.129(1998)
- 2) Pham.N.T, Q.DTrinh, N.Maneekarn, H.Shimizu, S.Okitsu,M.Mizuguchi,andH.Ushijima: *Journal of Clinical Microbiology*, 48,p.115(2010)
- 3) K.Watanabe, M. Oie, M.Higuchi, M. Nishikawa, and M. Fujii: *Emerging Infectious Diseases* , 13, p.889,(2007)
- 4) M.Ito, T.Yamashita, H.Tsuzuki, Y. Kabashima, A. Hasegawa, S.Nagaya, M.Kawaguchi, S.Kobayashi, A.Fujiura, K.Sakae, and H. Minagawa: *Journal of Clinical Microbiology* ,48,p. 2683(2010)
- 5) 青木里美, 山下育孝, :第53回日本臨床ウイルス学会プログラム抄録集,p.S89(2012)