

資料

成人麻疹様患者からのエコーウイルス5型の検出・分離

池田 周平, 谷澤 由枝, 島津 幸枝, 高尾 信一, 重本 直樹

Detection and isolation of echovirus 5 from adult measles-like patients

SYUHEI IKEDA, YUKIE TANIZAWA, YUKIE SHIMAZU, SHINICHI TAKAO and NAOKI SHIGEMOTO

(Received September 29, 2017)

2017年1月に成人麻疹が疑われる患者検体の検査を行った。麻疹及び風疹は陰性であったが、血液と咽頭ぬぐい液からエコーウイルス5型を検出・分離した。

広島県内におけるエコーウイルス5型の検出・分離は1992年から確認されておらず、国内では2008年36件をピークに、その後は年1件前後の検出しか確認されていない。

これまでのエコーウイルス5型の検出事例の多くは小児の発熱を伴う発疹症からの検出が報告されているが、今回、麻疹様の発疹症を呈した成人患者から本ウイルスを検出した。

Key words : エコーウイルス5型, 発疹症, 麻疹様疾患

諸 言

エンテロウイルス (EV) は、ピコルナウイルス科エンテロウイルス属に分類される一本鎖 (+) RNAをゲノムとして持つウイルスで、小児の無菌性髄膜炎、手足口病、ヘルパンギーナ、急性胃腸炎、呼吸器疾患、急性弛緩性麻痺等、幅広い疾患の原因ウイルスと考えられている [1]。エコーウイルス5型 (Echo 5) については小児の発熱を伴う発疹症での検出が報告されている [2-4] が、他のEVと比べてその発生頻度は低い。Echo 5は広島県では1992年から検出されておらず、全国的にも2008年以降は毎年1件前後の検出にとどまっている。

今回、成人麻疹様患者からEcho 5が検出されるといふ稀な症例を経験したので、その概要を報告する。

患者の概要及び方法

1 患者の概要と提供検体

患者は、19歳女性。39℃の発熱、頭痛、乾性の咳、鼻水及び結膜充血が見られた。発熱後3日目から全身に発疹が現れ、4日目に病院を受診し麻疹が疑われた。なお、受診時にはコプリック斑は認められなかった。患者には過去2回の麻疹ワクチンの接種歴があり、海外渡航歴はなかった。

ウイルス検査用の検体としては、麻疹検査に準じて血

液、咽頭ぬぐい液及び尿が採取され、その日のうちに当センターに搬入された。血液については遠心分離により、血しょうとバフィーコートを分画し、それぞれについて検査に供した。

2 方法

ウイルス分離

(1) ウイルス分離

ウイルス分離はBGM, RD-A, RD-18S, FL, HEp2及びF-Veroの48穴単層培養プレートを用い、各well検体30~100μlを接種後、34℃の炭酸ガスふ卵器で静置培養し、細胞変性効果 (CPE) の有無を7日間観察した。

(2) 分離ウイルスの同定

分離ウイルスの同定は特異的な中和抗血清を用いたマイクロ中和法により同定した。なお、Echo 5の同定は抗Echo 5単味血清 (デンカ生研製) を用いて実施した。

(3) リアルタイムRT-PCRによるEVの検出

各検体からQIAamp Viral RNA mini Kit (QIAGEN) を用いてウイルスRNAを抽出し、QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN) を用いてリアルタイムPCRを行った。プライマー及びプローブはDoらの報告 [5] を参考に作成し (表1)、50℃ 20分→95℃ 15分→95℃ 15秒、60℃ 1分 (45サイクル) →40℃ 30秒の条件でPCRを実施、EV遺伝子の有無を確認した。

表1 エンテロウイルス用リアルタイムRT-PCRのプライマー及びプローブ

プライマー及びプローブ名		配列 (5'-3')
Fowerd primer	Picorna_fw	TCCTCCGCCCCCTGAAT
Reverse primer	Picorna_rev	GAAACACGGACACCCAAAGTA
Probe	EnteroS_probe	FAM-TCTGCAGCGGAACCGACTA-MGB

表2 エンテロウイルス遺伝子型別PCRのプライマー

方法	プライマー名	配列 (5'-3')
1st-PCR	224	GCIATGYTIGGIACICAYRT
	222	CICCIGGIGGIAYRWACAT
2nd-PCR	AN89	CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG
	AN88	TACTGGACCACCTGNGGNAYRWACAT

(4) EV遺伝子増幅

リアルタイムRT-PCRでEVを確認した検体については、抽出RNAを用いPrimeScript™ RT reagent Kit Perfect Real Time (TaKaRa) を用いて37℃ 15分→85℃ 5秒の条件で逆転写を行い、cDNAを合成した。合成cDNAを鋳型としてGoTaq® Colorless Master Mix (Promega) を用い、94℃ 2分→94℃ 40秒、42℃ 40秒、72℃ 1分 (45サイクル) →72℃ 5分→4℃の条件で1st-PCRを行った。次に、1st-PCR産物を鋳型として、94℃ 2分→94℃ 40秒、60℃ 40秒、72℃ 1分 (45サイクル) →72℃ 5分→4℃の条件で2nd-PCRを行った。使用したプライマー [6] を表2に示した。

(5) EV遺伝子型の決定及び系統樹解析

2nd-PCRの増幅産物をダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定した後VP1領域の一部約350bpについてMEGA5でClustalWによるアライメント後、NJ法により分子系統樹を作成した。

結果および考察

EV検出のためのリアルタイムRT-PCR法の検査により、血しょう、バフィーコート及び咽頭ぬぐいからEVの遺伝子が検出された。血しょう及び咽頭ぬぐいの検体から検出されたEVを、遺伝子型別PCR増幅産物の塩基配列解読と系統樹解析の結果、Echo 5と同定された(図1)。加えて、培養細胞を用いたウイルス分離法では、咽頭ぬぐいを接種したRD-18Sにおいて、EV特徴的なCPEが確認され、分離ウイルスも、中和用抗血清を用いたマイクロ中和試験及び、PCR産物のダイレクトシーケンスと系統樹解析によりEcho 5であると同定された。

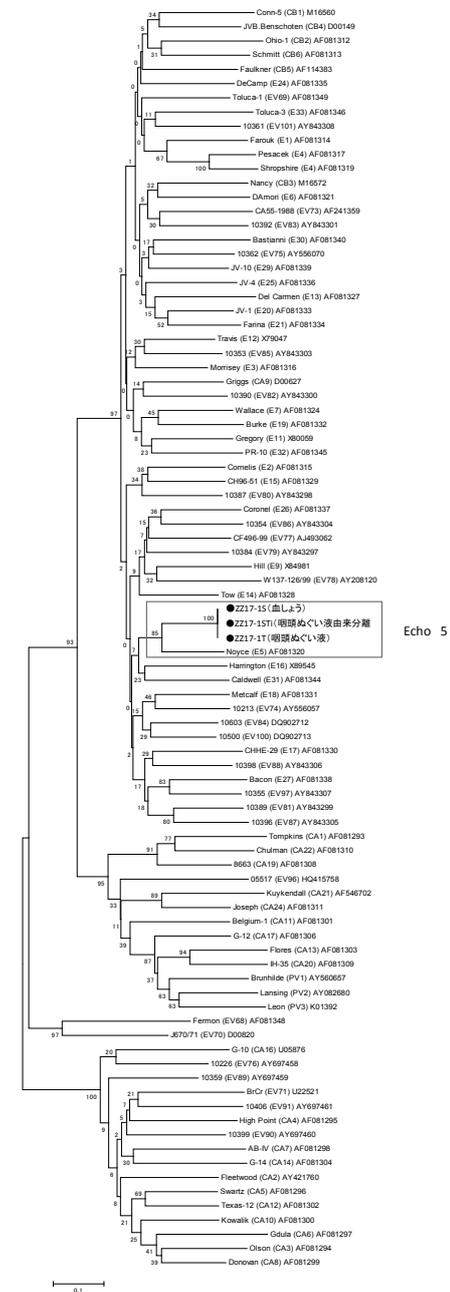


図1 EV VP1領域の一部(約350bp)を用いた系統樹解析 ●本事業検出株

当所では、麻疹や風疹が疑われる事例については年齢等を考慮しながら、他の発疹ウイルスも同時に検査を行うこととしている。今回の患者検体の検査についても麻疹及び風疹以外に、パルボウイルスB19、単純ヘルペス1型及びEVの検査を行っており(データ省略)、その結果、他のウイルスはいずれも陰性であったが、EVが検出され、検出されたウイルスはEcho 5であることが判明した。

Echo 5については、広島県では1992年から検出されておらず、全国的には2008年の36件を境にその後は毎年1件前後の検出にとどまっている [図2]。これまで広島県及び全国でEcho 5が検出された患者の一部についてその概要を表3及び表4にまとめた。広島県では1992

年に無菌性髄膜炎の患者10名から検出されており、全国では2008年に大阪府及び宮崎県において、小児の発熱を伴う発疹症の患者から検出されている。これらEcho 5が検出された患者の年齢は、広島県及び全国の検出例ともその多くが6歳未満の幼児であった。また、2008年宮崎県の事例では19例分離され、その年齢内訳は、0歳11例、1歳4例、2歳2例、4歳2例とすべてが4歳以下であったと報告されている [7-11]。このことからEcho 5は就学前の幼児を中心に感染が起これていたと思われる。しかし、今回Echo 5が検出された症例は、幼児の検出例と同様に発熱や麻疹様の発疹症状など見られたものの、年齢が19歳の成人であった。

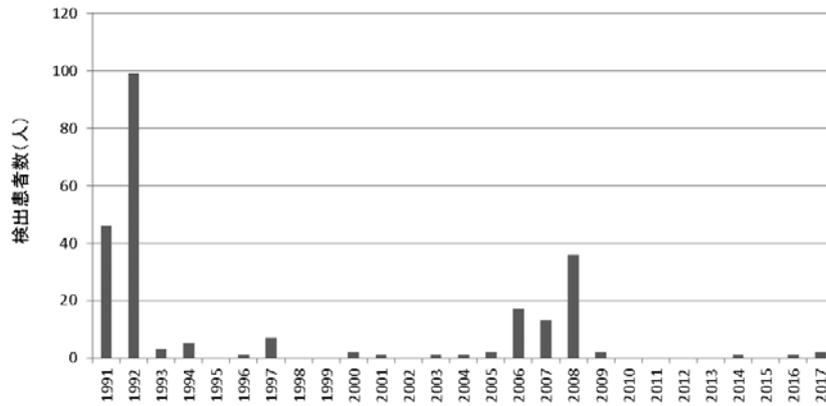


図2 Echo 5の年別検出患者数 (1991年～2017年9月)

表3 広島県内でEcho 5が検出された患者の概要

患者番号	検体採取日	年齢	性別	臨床診断名	症状・特記事項	検体種類	分離細胞
1	1992年4月	5歳	男	無菌性髄膜炎	発熱37.8℃, 髄膜炎	咽頭ぬぐい, 便, 髄液	RD-18S
2	1992年8月	不明	男	無菌性髄膜炎	髄膜炎	咽頭ぬぐい, 便	BGM
3	1992年8月	5歳	男	無菌性髄膜炎	発熱37.8℃, 髄膜炎, 上気道炎	髄液	RD-18S
4	1992年8月	3歳	男	無菌性髄膜炎	発熱37.5℃, 髄膜炎	便	RD-18S
5	1992年8月	4か月	女	不明発疹症	発熱, 上気道炎, 発疹, 下痢	便	RD-18S
6	1992年9月	11歳	女	無菌性髄膜炎	髄膜炎	咽頭ぬぐい	RD-18S
7	1992年9月	7歳	男	無菌性髄膜炎	髄膜炎	咽頭ぬぐい, 便	RD-18S
8	1992年9月	7歳	男	無菌性髄膜炎	髄膜炎	咽頭ぬぐい, 便	RD-18S
9	1992年10月	4歳	男	無菌性髄膜炎	髄膜炎	髄液	RD-18S
10	1992年10月	4歳	男	無菌性髄膜炎	発熱39℃, おう吐	咽頭ぬぐい, 便, 髄液	RD-18S

表4 全国でEcho 5が検出された患者の一部についての概要

患者番号	検体採取年	年齢	性別	臨床症状・特記事項	検体種類	報告自治体
1	2008年5月	1歳	女	痙攣	便	宮崎県
2	2008年5月	1歳	女	38.7℃, 発熱	咽頭ぬぐい液	宮崎県
3	2008年5月	1か月	女	38.8℃, 発疹症	咽頭ぬぐい液	宮崎県
4	2008年5月	1歳	女	37.5℃, 発疹(丘疹)	咽頭ぬぐい液	宮崎県
5	2008年5月	1歳	女	38.5℃, 発疹(丘疹)	咽頭ぬぐい液	宮崎県
6	2008年6月	10か月	男	エンテロウイルス感染症	咽頭ぬぐい液	宮崎県
7	2008年6月	1歳未満	-	発熱, 全身性発疹	咽頭ぬぐい液	大阪府
8	2008年6月	1歳未満	-	発熱, 全身性発疹	咽頭ぬぐい液	大阪府
13	2008年6月	2歳	女	38℃上気道炎(咽頭炎), 胃腸炎(嘔吐, 下痢)	便	宮崎県
14	2008年6月	2か月	女	39℃, 上気道炎, 発疹(丘疹, 紅斑), 口内炎	鼻水	宮崎県
17	2008年6月	2歳	女	39℃, 川崎病, 手足口病, 上気道炎, 水泡	鼻水	宮崎県
9	2008年6月	3か月	女	発疹(紅斑)	咽頭ぬぐい液	宮崎県
15	2008年6月	1か月	男	38.6℃不明熱	便	宮崎県
16	2008年6月	6か月	男	38.7℃, 発疹(紅斑)	咽頭ぬぐい液	宮崎県
10	2008年6月	10か月	女	38.7℃, 発疹(紅斑)	咽頭ぬぐい液	宮崎県
11	2008年7月	10か月	男	37.7℃, 不明の発疹症	咽頭ぬぐい液	宮崎県
12	2008年7月	1か月	男	38℃, 胃腸炎, 水泡	便	宮崎県
19	2008年7月	4歳	男	38.1℃, 夏風邪	咽頭ぬぐい液	宮崎県
18	2008年7月	7か月	女	38.8℃, 発疹	咽頭ぬぐい液	宮崎県
20	2016年6月	10歳代	男	ウイルス性髄膜炎		山形県

これまでEcho 5は6歳以下の幼児で発熱を伴う発疹症や無菌性髄膜炎などの原因と考えられてきたが、今回成人でもその感染が確認された。今回の症例はもともと成人麻疹疑いで検査依頼があり、麻疹ウイルスは陰性で他のウイルス検査を実施したことにより検出されたものである。このことから、Echo 5の成人への潜在的な感染が推察される。特に成人の発疹症で、麻疹・風疹陰性の場合は、EV等の他のウイルスの検査も視野に入れて検査を実施することで、成人におけるEcho 5を含めたEVの感染実態が把握できるものと考えられる。

文 献

[1] 横浜市衛生研究所. エンテロウイルスについて. [Internet]. 2001 Jan 23 [cited 2017 Sep 1]. Available from: <http://www.city.yokohama.lg.jp/kenko/eiken/idsc/disease/entero1.html>

[2] 山崎謙治, 左近直美, 中田恵子, 加瀬哲男. 大阪府におけるエンテロウイルス検出状況, 2008年4月~7月. 病原体検出情報. 2008;29:229-230

[3] Hamada Y, Kuriyama I, Miyao M. Exanthematous disease due to ECHO 5 virus. Tokushima J Exp Med. 1969;16(1):27-31.

[4] Park K, Song J, Baek K, Lee C, Kim D, Cho S, Park J, Choi Y, Kang B, Choi H, et al. Genetic diversity of a Korean echovirus 5 isolate and response of the strain to five antiviral drugs. Virology J. 2011;8:79.

[5] Do DH, Laus S, Leber A, Mario J, Marcon MJ, Jordan JA, Martin JM, Wadowsky Ito RM. A One-step, real-time PCR assay for rapid detection of

rhinovirus. J Mol Diagn. 2010;12(1):1102-108.

[6] 国立感染症研究所. 無菌性髄膜炎病原体検査マニュアル. [Internet]. [cited 2017 Sep 1]. Available from: <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/AsepticMening.pdf>

[7] 宮崎県感染症情報センター. 宮崎県感染症週報 第10巻 第28号. [Internet]. [cited 2017 Sep 1]. Available from: http://dl.ndl.go.jp/view/download/digidepo_9624915_po_200828.pdf?contentNo=1&alternativeNo=

[8] 宮崎県感染症情報センター. 宮崎県感染症週報 第10巻 第30号. [Internet]. [cited 2017 Sep 1]. Available from: http://dl.ndl.go.jp/view/download/digidepo_9624917_po_200830.pdf?contentNo=1&alternativeNo=

[9] 宮崎県感染症情報センター. 宮崎県感染症週報 第10巻 第32号. [Internet]. [cited 2017 Sep 1]. Available from: http://dl.ndl.go.jp/view/download/digidepo_9624919_po_200832.pdf?contentNo=1&alternativeNo=

[10] 宮崎県感染症情報センター. 宮崎県感染症週報 第10巻 第34号. [Internet]. [cited 2017 Sep 1]. Available from: http://dl.ndl.go.jp/view/download/digidepo_9624921_po_200834.pdf?contentNo=1&alternativeNo=

[11] 三浦美穂, 岩切章, 山本正悟, 塩山陽子. 宮崎県の感染症発生動向調査事業におけるウイルス検出報告(2008年). 宮崎県衛生環境研究所年報 2009;20:86-90