

学内グラント 終了時報告書

平成18年度 学内グラント報告書

原因不明の脳炎・髄膜炎でのパレコウイルス検出と その臨床症状の解析

研究代表者 野村 恭一(埼玉医科大学 神経内科)

研究分担者 佐々木 望¹⁾, 富岳 亮²⁾, 名和 優³⁾, 高濱 美里²⁾,

町田 早苗⁴⁾, 清水 博之⁵⁾

緒 言

ヒトパレコウイルス(Human Parechovirus; HPeV)は、ヒトの脳炎・髄膜炎などの中枢神経感染性疾患の原因となる関連性が示唆されているが、その臨床症状は多彩で十分には解明されていない。

HPeV1型と2型は、かつてはEnterovirus属(エコーウィルス22型および23型)に分類されていたが、Stanwayらによりピコルナウイルス科の中の独立した属であるParechovirus属に再分類された¹⁾。HPeVは現在、1型～6型まで同定されている。最近の報告では、我が国でHpeV1型、3型、4型、6型が分離され²⁾、HpeV2型はかつては分離されていたが、1986年以降分離報告はない^{2,3)}。従来、HPeVは急性胃腸炎や呼吸器症状患者から比較的多く分離されているが、脳炎や髄膜炎患者からの分離も報告されている。HpeV6型は、我が国のReye症候群の小児患者の髄液から分離され、新規血清型の報告となった。我が国における各HPeV血清型の伝播状況および特定疾患と関連性については明らかにされておらず、臨床および基礎的な解析が必要となる。そこで第1に、感染源などを解析する上で血清疫学解析、脳炎や髄膜炎の髄液サンプルの収集を行い、HPeVの検出を行った。血清疫学解析では、中和抗体法で年齢別健康人血清を用いてHPeV1～3型の抗体保有状況を解析した。ELISA法を確立した段階でELISA法と中和抗体法での抗体検出率を解析する予定である。

材料と方法

1. HPeV1～3型中和抗体法

1歳から59歳までの健康人血清計235検体を

1) 埼玉医科大学 小児科, 2) 埼玉医科大学 神経内科

3) 埼玉医科大学 微生物, 4) 埼玉医科大学 医学研究センター

5) 埼玉医科大学 国立感染症研究所 ウィルス2部

用いた。被験血清検体を1:8から1:2048まで2倍階段希釈し、Vero細胞で発現するCPE抑制を指標とした血清中和抗体法で抗体価を測定した。血清抗体価8倍以上を陽性とした。中和抗体法に使用したウイルス株は、HPeV1型はHarris strain、HPeV2型はWilliamson strain、HPeV3型はA308/99 strainを用いた。

2. HPeV ELISA法の確立

HPeV1型:Harris strain, HPeV2型:Williamson strain, HPeV3型:A308/99 strain HPeV4型:サ2005-123FC strain, HPeV5型:tc HLF 07-18-95 strain (CDC), HPeV6型:NII561-2000 strainを用い、RT-PCR法にてELISA抗原となる各血清型のVP-1領域を増幅した。塩基配列を確認後、各VP-1遺伝子をpET-15b vectorに挿入した。Ni-NTA Fast kit (QAIKEN)を用いて発現蛋白を簡易精製した。発現蛋白の確認は、Western Blot(WB)法にて抗Hisモノクローナル抗体を用いて行った。

3. 髄液からのHPeV遺伝子の検出

髄液から、High Pure viral RNA kit (Roche) を用いてRNAを抽出した。RNAは、PrimeScript®1st strand cDNA Synthesis(TAKARA)のrandom 6mer primerを用いてcDNAを合成した。HPeV 5'UTR領域に設定したprimer pairにてPCRを施行し、約140 bpバンド検出した場合に陽性とした。陽性の場合には、更にVP-1領域のPCRを行い、塩基配列を確認した。

結 果

1. HPeV 血清診断

1) HPeV1～3型の血清疫学

年齢別健康人血清を用いて中和抗体法にてHPeV1～3型の抗体保有状況を解析した。HPeV1型の抗体保有率

を見ると3歳以下では54.5%, 4歳～5歳では78.8%, 6歳から10歳未満では94.5%, 20歳以上では95%以上であった(図1)。

HPeV2型は、全体的に抗体保有率(平均21%)が低く、特に5歳以下と16歳から50歳未満で平均10%と低かった。しかし、6歳から15歳までの抗体保有率は36.5%であった(図2)。

HPeV3型抗体保有率は平均72%であり、年代別に見ると3歳以下では45.5%, 4歳～5歳では78.8%となった。6歳から10歳未満では88.9%, 10歳から20歳未満では70.0%, 20歳から30歳未満では87.5%, 30歳～40歳未満では77.5%, 40歳～50歳未満55.0%そして50歳～60歳未満75.7%であった(図3)。

HPeV1型とHPeV3型の抗体保有を3歳以下の子供でみると両型の陰性者より片方のみの陰性が多かった(表1)。

2) 血清解析のためのELISA法の確立

HPeV1～3型は、各VP-1遺伝子をpET-15b vectorに挿入し、その発現を確認した。HPeV1～3型の発現蛋白30.5 kDaをWB法で確認した。現在、HPeV4～6型標準株から、RT-PCRでVP-1遺伝子を増幅、その塩基配列を確認し、pET-15b vectorに導入し、発現蛋白の解析中である。

2. 髄液からのウイルス遺伝子の検出およびウイルス分離

平成19年度は、成人の脳炎や髄膜炎の患者が少なく、小児脳炎2患者の髄液を用いてHPeVの遺伝子検出を行ったが、HPeVは検出されなかった。Vero細胞に髄液を接種し、その細胞上清液と細胞からのHPeVの遺伝子検出を行ったが、HPeVはいずれも陰性であった。

考 察

HPeV1～3型の血清解析から、HPeV1型は6歳以上における抗体保有率が90%以上で広く国内に蔓延していることが推測された。HPeV2型は全体的に抗体保有率(平均21%)が低く、特に5歳以下と16歳から50歳未満で低かった。学童期に一旦保有率が高くなり、その後低くなるパターンとなり、流行期・非流行期の存在が示唆された。病原体微生物検出情報によると、1986年以来HPeV2型の分離報告はないが、HPeV2型の不顕性伝播の可能性が明らかになった。今後、ウイルス遺伝子検出等を用いた病原体検出によるHPeV-2伝播の確認が必要とされる。HPeV3型に対する抗体保有率は平均72%とHPeV1型より低く、各年齢群で抗体保有率の多少のバラツキが認められた。HPeV1型とHPeV3型共に乳幼児期に不顕性感染することが示唆された。5歳以下のHPeV1～3型の抗体保有状況を見ると両方の血清型のHPeVに対する抗体を保有している児は4/20例と感染様態の違いが示唆された(表1)。今後、HPeV4～6型についても同様の血清疫学解析を行

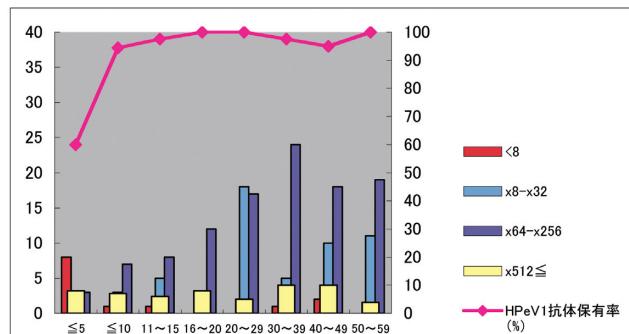


図1. HPeV1型の抗体保有率(%)と抗体価の分布。

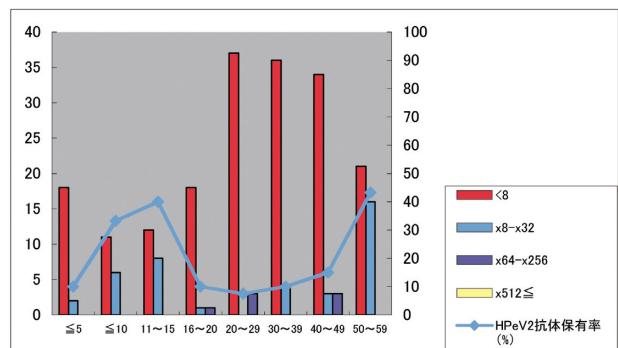


図2. HPeV2型の抗体保有率(%)と抗体価の分布。

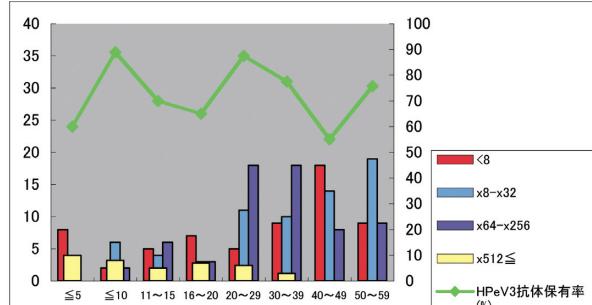


図3. HPeV3型の抗体保有率(%)と抗体価の分布。

表1. HPeV1,2,3型抗体保有状況

	年齢	HPeV1型	HPeV2型	HPeV3型
1	1歳	512	<8	8
2	1歳	512	8	<8
3	1歳	8	<8	<8
4	1歳	<8	<8	2048
5	2歳	2048	<8	2048
6	2歳	512	<8	<8
7	2歳	2048	<8	<8
8	2歳	<8	<8	<8
9	3歳	<8	<8	1024
10	3歳	<8	<8	2048
11	3歳	<8	<8	<8
12	4歳	<8	<8	<8
13	4歳	64	<8	1024
14	4歳	2048	8	512
15	4歳	1024	<8	8
16	4歳	<8	<8	1024
17	5歳	256	<8	1024
18	5歳	128	<8	<8
19	5歳	1024	<8	512
20	5歳	<8	<8	1024

うことにより、各血清型 HPeV の伝播状況についての解析を行う。ELISA での IgG 抗体検出法も確立できるので ELISA 法と今回検出した抗体価と比較検討する予定である。

脳炎・髄膜炎は、季節性や年によって発生にばらつきが認められる。その原因としてウイルス感染が考えられ、小児の解析ではエンテロウイルスの関与が示唆されている⁴⁾。かつてはエンテロウイルスに分類されていた HPeV を原因と考え、その解析をする意義は大きい。今回解析した 2 例では HPeV を検出できなかったが、継続してサンプルを収集しているのでその解析を進めていく。

引用論文

- Stanway G, Kalkkinen N, Roivainen M, Ghazi F, Khan M, Smyth M, et al. molecular and biological characteristics of echovirus 22, a representative of a

new picornavirus group. *J Virol* 1994;68:8232-8.

- Watanabe K, Oie M, Higuchi M, Nishikawa M, Fujii M. Isolation and characterization of novel human parechovirus from clinical samples. *Emerging Infectious Diseases* 2007;13:889-95.
- 国立感染症研究所 病原微生物検出情報
- 松永健司, 小児ウイルス性髄膜炎-エンテロウイルス性髄膜炎とムンプス髄膜炎との比較検討-小児感染免疫 2007;19:157-62.

研究成果リスト

学会発表

- 町田早苗, 西村順裕, 名和優, 伊藤雅, 清水博之.
Human Parechovirus (HPeV) 抗体保有状況の解析,
第 55 回日本ウイルス学会学術集会, 平成 19 年 10 月
21 日～23 日, 札幌