

原因不明発疹性疾患のウイルス検索

微生物部

江原 栞 水越 文徳¹ 酒井 麻衣 中島 亜子 永木 英徳
(¹現生活衛生課)

要旨

平成30年度は関東を中心に風疹が流行し、当センターに麻疹、風疹が疑われる検体が71症例搬入されたが、検査の結果、陽性となった症例は麻疹ウイルスが2症例、風疹ウイルスが6症例のみだった。そこで、麻疹ウイルス及び風疹ウイルス陰性だった63症例について原因ウイルスを明らかにすることを目的とし、類似する症状を示すウイルスについて検索を行った。その結果、20症例から水疱・帯状疱疹ウイルス、ヒトヘルペスウイルス6、エプスタイン・バーウイルス、ヒトパルボウイルスB19、ヒトライノウイルス、パレコウイルスが検出された。

キーワード：風疹ウイルス、麻疹ウイルス、発疹性疾患

1 はじめに

皮疹、発疹を伴うウイルス性感染症は麻疹・風疹をはじめ数多く有り、また、その原因ウイルスも多岐にわたる。臨床の現場ではこれらの診断に病歴の聴取や所見の観察などが重要となるが、風疹や伝染性紅斑など一見では診断が難しい症例もある。また、平成30年度は関東地方を中心に風疹が流行し、当センターでも麻疹・風疹を疑われる検体が71症例搬入されたが、麻疹ウイルス又は風疹ウイルスが検出されたのは8症例のみだった。

本研究では感染症の拡大防止と診断の向上に資することを目的とし、麻疹ウイルス及び風疹ウイルスが検出されなかった症例について発疹性疾患の原因となる水疱・帯状疱疹ウイルス、単純ヘルペスウイルス1型/2型、ヒトヘルペスウイルス6/7、エプスタイン・バーウイルス、ヒトパルボウイルスB19、エンテロウイルス、ヒトライノウイルス、パレコウイルスについて検索を行った。

2 材料と方法

2.1 検体

2018年4月から2019年3月までに麻疹、風疹疑いで当センターに搬入された検体のうち、麻疹ウイルス又は風疹ウイルスが検出されなかった63症例、226検体（咽頭ぬぐい液57検体、血漿59検体、末梢血単球細胞（以下PBMCという。）58検体、尿52検体）を材料とした。

2.2 検査項目

水疱・帯状疱疹ウイルス（VZV）、単純ヘルペスウイルス1型（HSV-1）と2型（HSV-2）、ヒトヘルペスウイルス6（HHV-6）とヒトヘルペスウイルス7（HHV-7）、エプスタイン・バーウイルス（EBV）、ヒトパルボウイルスB19（B19）、エンテロウイルス（EV）、ヒトライノウイルス（HRV）、パレコウイルス（PeV）。

HHV-6/7については2歳以下の症例のみを対象とした。

2.2 検体の前処理

咽頭ぬぐい液は3000rpmで10分間遠心後、上清をフィルター濾過し、検体とした。

血液は1000rpmで20分間遠心し、上清を血漿とした。血漿分離後の残血をFicoll-Paqueを用い分画し、PBMCを分取した。

尿は3000rpmで10分間遠心後、上清をフィルター濾過し、検体とした。

2.3 遺伝子の抽出及びcDNAの合成

検体からのDNA、RNA抽出にはHigh Pure Viral Nucleic Acid Kit（Roche）を使用した。方法はキットの添付文書に従った。

RNAに関してはDNase処理後に逆転写反応を行いcDNAを合成した。DNase処理にはRecombinat DNase 1（TaKaRa）を使用した。抽出したRNA溶液12μL、5×PrimeScript Buffer 1.5μL、DNase1 1μL、DW 0.5μLを混和し、総量15μLにした後、まず37°C30分、次に75°C5分インキュベーションし、DNase処理を行った。逆転写反応はPrimeScript™ RT reagent Kit（Perfect Real Time）（TaKaRa）を使用した。DNase処理をしたRNA 15μLに5×PrimeScript Buffer 4.5μL、Random6mers 6μL、PrimeScript RT Enzyme Mix1 1.5μL、DW 3μLを添加しまず37°C15分、次に85°C5秒インキュベートしcDNAを合成した。

2.4 遺伝子検出及びシーケンス

遺伝子の検出はVZV、HSV-1/2、EBV、B19、EV、HRV、PeVについてはnested-PCR法、HHV-6/7についてはLAMP法で行った。

VZV、HSV-1/2、EBVについてはC. J. Melverらの方法¹⁾、EV、HRVについては病原体検出マニュアル²⁾、PeVについてはH. Harvalaらの方法³⁾を一部改変し、TaKaRa Ex Taq (TaKaRa) と10×Ex Taq Buffer (Mg²⁺ plus) を用いPCR反応をした。B19についてはTaKaRa Ex Taq (TaKaRa) を使用した。反応試薬及び反応条件は表2、3のとおりである。また、HHV-6/7についてはLoopamp DNA 増幅試薬キット (栄研化学) を使用し、方法はキットの添付文書に従った。

PCRにより遺伝子が検出された検体については、PCR産物をQIAquick PCR Purification (QIAEN) で精製後、GenomeLab DTCS-Quick Start Kit (BECKMAN COULTER) を用いダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。

表1 各プライマー

用途	名称	配列(5' to 3')	サイズ
VZV 1st PCR	VZV-0F	ACGGGTCTTGCCGAGCTGGT	272
	VZV-0R	AATGCCGTGACCACCAAGTATAAT	
VZV Nested PCR	VZV-1F	ACCTTAAACTCACTACCAGT	208
	VZV-1R	CTAATCCAAGCGGGTGCAT	
HSV-1/2 1st PCR	HSV-0F	ATCCGAACGCAGCCCCGCTG	382
	HSV-0R	TCCGSGGCAGCAGGGTGCT	
HSV-1/2 Nested PCR	HSV-1F	GCCCGCTCAGCGAGGATAAC	280
	HSV-1R	AGCTGTATASGGCGACGGTG	
EBV 1st PCR	EBVp23-10F	ATCAGAAATTTGCACITTTCTTTC	482
	EBVp23-20F	CAGCTCCACGCAAAGTCAGATTG	
EBV Nested PCR	EBVp23-3IF	TTGACATGAGCATGGAAGAC	363
	EBVp23-4IR	CTCGTGGTCGTGTTCCCTCAC	
EV/HRV 1st PCR	MD91	CCTCCGGCCCTGAATGCGGCTAAT	740
	0L68-B	GGRAAYTTCCACTACCANCC	
EV/HRV Nested PCR	EVP2	CCT CCG GCC CCT GAA TGC GGC TAA T	550 (EV:2nd)
	0L68-B	GGRAAYTTCCACTACCANCC	650 (HRV:2nd)
PeV 1st PCR	2090	GAYAATGCYATMTAYACWATYTGTA	433
	2523	ACWGTRAAARTRTCHACATTSATDG	
PeV Nested PCR	2159	TTYTCMACHTGGATGMGGAARAC	299
	2458	DGGYCCATCATCYTGWGCTGA	
B19 1st PCR	PVB19-1	CACTATGAAAACCTGGCAATAAAC	242
	PVB19-2	AATGATTCTCCTGAACCTGGTCC	
B19 Nested PCR	PVB19-3	ATAAACTACACTTTTGATTCCCTG	218
	PVB19-4	TCTCCTGAACCTGGTCCCG	
HHV-6 LAMP	H6U31BIP	ACGAAGAACGCATCACAGAGCTACTGCGTATTCTTTGGAGAGC	
	H6U31FIP	TCCGTAGACGGAGTGGCTGATAGTATCACGTTCCCTCACGAAAA	
	H6U31B3	GCATCTTGTGACGAGAGAAGA	
	H6U31F3	CAGAGATCGACCAAAATGCAAAA	
	H6U31LPB	GAGACGAACAAAATAAAAGAAC	
	H6U31LFP	TATATTTATTAGTGGAGGTAGC	
HHV-7 LAMP	H7U38BIP	TTCACGCCAAGACATGTGACAGGCAACACATAGCTTACTTCCA	
	H7U38FIP	ACAGCGCCATGTATTCCGACAAAATCACCGGTGTCAATCC	
	H7U38LPB	GAAGCTGCTATTGCCACACA	
	H7U38LFP	CTTTTTTCATTGAGAAATTT	
	H7U38B3	AGTCTACGGAGTCACCGG	
	H7U38F3	ACCTCTATTCCAAATGTCCCTG	

表2 B19の1検体当たりのPCR反応試薬

試薬	添加量(μL)
1st PCR	
DDW	13.25
10xExTaq Buffer	2.5
dNTP	2.0
Primer(Forward) 25mM	1.0
Primer(Reverse) 25mM	1.0
ExTaq (5unit/μℓ)	0.25
Nested PCR	
DDW	17.25
10xExTaq Buffer	2.5
dNTP	2.0
Primer(Forward) 25mM	1.0
Primer(Reverse) 25mM	1.0
ExTaq (5unit/μℓ)	0.25

表3 B19のPCR反応条件

温度	時間	Cycle
95℃	5分	1
95℃	30秒	} 38
55℃	30秒	
72℃	30秒	
72℃	10分	1
4℃	Hold	

表4 検出ウイルス

検出ウイルス	検出数	
	検体数	(症例数)
VZV	2	(1)
HSV-1	0	(0)
HSV-2	0	(0)
HHV-6	9	(5)
HHV-7	0	(0)
EBV	2	(2)
B19	32	(11)
EV	0	(0)
HRV	3	(2)
PeV	1	(1)
合計	49	20*

* : 2症例で同一の検体から2種類のウイルスを検出 (HHV-6とEBV、HHV-6とPeV)

3 結果

226検体中、49検体から発疹性疾患の原因となるウイルスが検出された。ウイルスの内訳は、VZVが2検体、HSV-6が9検体、EBVが2検体、B19が32検体、HRVが3検体、PeVが1検体であった。また、発疹性疾患の原因となるウイルスが検出された症例は63症例中20症例で、内訳はVZVが1症例、HHV-6が5症例、EBVが2症例、B19が11症例、HRVが2症例、PeVが1症例から検出された。なお、ウイルスが検出された20症例のうち2症例で、同一の検体から2種類のウイルス (HHV-6とEBV、HHV-6とPeV) が検出された (表4)。

本調査で患者が成人 (20歳以上) であった症例は33症例、青年 (15歳以上20歳未満) は4症例、乳幼児から小児 (4週間以上15歳未満) は26症例であった。各年齢層のウイルス検出状況は表5のとおりである。成人から検出されたウイルスは全てB19であった一方、乳幼児～小児ではHHV-6が最も検出頻度が高かったが、様々なウイルスが検出された。

表5 各年齢層のウイルス検出状況

	症例数	検出ウイルス						不検出
		VZV	HHV-6*	EBV	B19	HRV	PeV	
成人	33	0	-	0	8	0	0	25
青年	4	0	-	0	0	0	0	4
乳幼児～小児	26	1	5**	2**	3	2	1**	14
合計	63	1	5	2	11	2	1	43

* : 2歳以下の症例のみ検査を実施

** : 2症例で同一の検体から2種類のウイルスを検出 (HHV-6とEBV、HHV-6とPeV)

4 考察

ウイルスが検出された症例の約半数が伝染性紅斑の病因であるB19であった。伝染性紅斑は小児を中心にみられる流行性発疹性疾患であり、両頬がリンゴのように赤くなることからリンゴ病と呼ばれることもある。流行時期が風疹と重なること、成人では典型的な発疹が出にくいことから、風疹と誤診されることもあるとされている。今回の調査でも乳幼児～小児では様々なウイルスが検出された一方、成人の症例から検出されたウイルスは全てB19であったことから、成人の伝染性紅斑と麻疹及び風疹の鑑別が重要と思われた。乳幼児～小児の症例からは突発性発疹や手足口病等の主に小児で報告が多い発疹性疾患の原因となる様々なウイルスが検出された。小児では発熱を伴う発疹性疾患が多く、慎重な鑑別が重要と考えられる。

また、今回の調査では63症例の約3分の2にあたる43症例で原因ウイルスの検出ができなかった。これは発疹性疾患がウイルス性疾患のほかにも薬疹や細菌性疾患など多様な要因により引き起こされることに加え、検査に用いた検体が麻疹及び風疹の検査で搬入されたため水疱液がなく、VZV、HSV-1/2の遺伝子検出に適していなかったことが要因と考えられる。今後は抗体検査や今回の調査では検出しなかった病原体について検索を行い原因ウイルスの解明に努めたい。

5 参考文献

- 1) C. J. McIver, et al. , Development of Multiplex PCRs for Detection of Common Viral Pathogens and Agents of Congenital Infections, *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 5102-5110, 2005.
- 2) 国立感染症研究所 感染症疫学センター、ヘルパンギーナ病原体マニュアル、2018.
- 3) H. Harvala, et la. , Epidemiology and Clinival Association of Human Parechovirus Respiratory Infections, *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 3446-3453, 2008.