

表 題 小児におけるサフォードウイルス感染症の臨床的特徴

論文の区分 博士課程（乙種）

著 者 名 鵜飼 智子

担当指導教員氏名 教授 畠山 修司

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
地域医療学系 専攻 地域医療学

2019年4月11日申請の学位論文

目次

1. 研究の動機	2
2. サフォードウイルスの一般論	3
2.1 サフォードウイルスの発見	3
2.2 サフォードウイルスによる疾患	3
2.3 サフォードウイルスの疫学	4
2.4 サフォードウイルスの検査・診断	6
2.5 サフォードウイルスの治療	6
3. 目的	7
4. 対象と方法 サフォードウイルスの同定	7
4.1 対象	7
4.2 方法	8
4.2.1 ウイルス分離	8
4.2.2 PCRと遺伝子解析による同定	9
5. 結果	10
5.1 遺伝子型の特徴	10
5.2 サフォードウイルス感染症の臨床像	13
5.3 無菌性髄膜炎の臨床像	17
6. 考察	19
6.1 SAFV感染症の臨床診断	19
6.2 SAFV上気道感染症の臨床像	20
6.3 SAFV中枢神経感染症の臨床像	22
7. この研究の限界	24
8. 終わりに	24
9. 謝辞	26
10. 参考文献	27

1. 研究の動機

新潟県西部に位置する佐渡島全域を市域とする佐渡市は、人口約 5,7000 人、うち小児人口約 6,000 人である。佐渡市立両津病院は病床数 99 床、診療科は内科、小児科、歯科口腔外科があり、常勤医師は 7 名、年間新規入院患者数約 1000 名、1 日の外来患者数約 280 名の、規模は小さいが佐渡東部の医療の中核を担う病院である。私は 2012 年から 2014 年まで佐渡市立両津病院に小児科医として勤務していた。

2013 年の夏季に、新潟県佐渡島において園児から高校生にわたり、原因不明の発熱の症例が 40 例ほどみられた。いずれも 39℃を越える高熱があり、頭痛、全身倦怠、食欲低下といった全身症状を認め、入院を要した症例もあった。多くの症例は咽頭痛や頸部痛を訴える一方、咳や鼻水などの上気道症状は乏しかった。咽頭の細菌培養、アデノウイルスや溶連菌の迅速検査はいずれも陰性であり、特殊なウイルス感染症が疑われた。原因検索のため、新潟県保健環境科学研究所にウイルス分離を依頼したところ、サフォードウイルス(Saffold virus : SAFV)が同定された。

早速 SAFV の臨床像について Pubmed などを用いて文献検索を行ったが、SAFV は新興感染症でありその臨床像は未だ明らかでないことが判明した。そこで、小児領域における新興感染症である SAFV の分離、培養、同定を行い、

その臨床像を明らかにするため、本研究を開始した。

2. サフォードウイルスの一般論

2.1 サフォードウイルスの発見

サフォードウイルス (Saffold virus : SAFV) は、2007 年に初めて分離・同定されたピコルナウイルス科カルジオウイルス属に分類される一本鎖の RNA ウイルスである。カルジオウイルス属には、小型げっ歯類に心筋炎、脳炎や脾炎を引き起こす脳心筋炎ウイルス (encephalomyocarditis virus : EMCV) やタイロウイルス (Theilovirus) が含まれる¹⁻⁵。このうち、EMCV はヒトにもインフルエンザ様症状を引き起こす人獣共通感染症ウイルスである⁶⁻¹¹。

カルジオウイルス属は臨床現場では馴染みの薄いウイルスであったが、1981 年に不明熱の生後 8 カ月の女児の便から分離されたウイルスが、2007 年にカルジオウイルス属に分類されたことをきっかけに、注目を集めることとなった¹²。その後、日本を含めた世界各国で乳幼児の気道炎、胃腸炎、手足口病様疾患、無菌性髄膜炎、脳炎、脾炎など検体から、SAFV の分離・検出が相次いで報告され、近縁のエンテロウイルスと同様に多様な疾患の病原体となり得ると考えられている。そのため、SAFV は、ヒトを自然宿主とする新たなカルジオウイルス属のウイルスとして注目されている。

2.2 サフォードウイルスによる疾患

SAFVは主に胃腸炎や咽頭扁桃炎、上気道炎の患者検体から検出されている。

しかしながら、少数ではあるが、弛緩性麻痺、無菌性髄膜炎、脳炎、心筋炎、腓炎、突然死の患者検体からも検出されている。

疾患の中での同定率に関しては、胃腸炎の便検体の0.2～3.0%、上気道炎の上咽頭ぬぐい液の0.2～24%と頻度は低く¹³、その大部分に他のウイルスとの共感染がみられており、未だ各疾患とSAFVの病原性の因果関係、およびどのような疾患を引き起こすのかについては明らかでない。

SAFV感染症の詳細な臨床像については、その多くが不明である。また、弛緩性麻痺や無菌性髄膜炎などの重症感染症については、世界的にも数例の症例報告を認めるのみであり、詳細な臨床像を記述した報告はほとんどない。

2.3 サフォードウイルスの疫学

2019年現在、SAFVはVP1(viral structural protein 1)領域のシーケンスによって、11の遺伝子型が報告されている。なかでもSAFV1～3型が多くを占めており、1型は世界中で、生後早期に呼吸器、消化器感染症を引き起こすといわれている。2、3型は北・南アメリカ、ヨーロッパ、アジアで、4～8型は南ア

ジアで報告されている。遺伝子型と病原性の関連については未だ解明されていない。

日本国内での SAFV3 型の血清中和抗体保有率を示す(表 1)¹⁴。

表 1: SAFV3 の中和抗体保有率

年齢 (歳)	保有率 (%)	合計	幾何平均抗体価
0-1	76.9(10/13)	13	30.7
2-4	84.6(11/13)	13	36.3
5-9	100 (14/14)	14	72.9
10-19	100 (15/15)	15	80.6
20-	100 (59/59)	59	79.1
合計	95.6(109/114)	114	66.1

この保有率検査の対象者は、5 歳未満の感染徴候のない、基礎疾患に心疾患、鼠径ヘルニアを持つ児と、それ以外の年齢の健常人 (20 歳～66 歳) である。全体の 95.6%、特に 5 歳以上の 100%は中和抗体を保有していた¹⁴。同様の傾向が SAFV2 型でも報告されている¹⁵。これらのことから、ヒトは幼少期に SAFV の初感染を受け、そのほとんどが不顕性感染や、自然軽快する上気道炎や胃腸炎を起こすと考えられている。しかし、近年 SAFV による重症感染症が報告されるようになり、これまで原因不明とされていた重症な経過をたどるウイルス感

感染症の一部は SAFV が関与している可能性が考えられている。

2.4 サフォードウイルスの検査・診断

ウイルスの検出には、検体を細胞に接種して、感染性のあるウイルスを検出するウイルス分離と、検体中のウイルス核酸を検出する RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction:逆転写ポリメラーゼ連鎖反応)があげられる。ウイルス分離は感染性のあるウイルスのみを検出するため特異度は高いが、感度と迅速性は RT-PCR 法に比べ劣る。SAFV を分離培地で増殖させることは困難であり、世界的にも、培養で SAFV を同定している機関はごくわずかである。そのため、SAFV の一般的な診断法は RT-PCR 法により行われている。しかしながら RT-PCR 法は感度、陰性的中率、迅速性に優れるが、特異度はウイルス分離に劣る上、全例に RT-PCR 法を施行することはコストの面で難しい。これらの理由から、SAFV を同定できる国内の機関は少なく、また認知度も低いため、多くの SAFV 感染症は正しく診断できていない可能性が高い。

今回、新潟県保健環境科学研究所の所有する RD 細胞-18S-Niigata 細胞にて SAFV が分離、同定されたため、そこから臨床像の解明に繋がった。

2.5 治療

SAFV に対して有効性の示された抗ウイルス薬は現時点では存在しない。弛緩性麻痺、脳炎、心筋炎、膵炎、突然死の症例からも検出され、後遺症や死亡の原因となる病原性も疑われるため、早期の治療開発が望まれる。現状では、早期に SAFV 感染症と診断し、支持療法を行うことが唯一の治療法となる。

3. 目的

小児領域における新興感染症である SAFV の分離、培養、同定を行い、その臨床像を明らかにする。

4. 対象と方法 サフォードウイルスの同定

4.1 対象

「感染症の予防及び感染症の患者の医療に関する法律(感染症法)」に基づいた感染症発生動向調査の病原体サーベイランスの一環として、新潟県では感染症の発生状況および動向の把握、そしてその原因の調査として医師の届け出に基づくサーベイランスシステムが構築されている。本研究の対象は、新潟県の病原体サーベイランスに検体が提出された、ウイルス感染症が疑われ 2006 年 1 月から 2013 年 12 月に病原体定点医療機関で採取された 5412 検体(咽頭ぬぐい液、鼻汁、便、髄液)である。さらに、5412 検体の中からウイルス分離および RT-PCR 法により SAFV が同定された症例を対象とし、その診療録を後方視的に検討し

た。

厚生労働省の感染症発生動向調査事業実施要綱に基づき、主治医により患者の保護者から検体の提供に関する同意、ならびに診療情報の提供に対する同意を書面にて得た。

4.2 方法

SAFV の同定にはウイルス分離を用い、ウイルス増殖が確認されたものについては RT-PCR 法で同定検査を実施した。ウイルスの分離培養、遺伝子解析については新潟県保健環境科学研究所において実施した。

4.2.1 ウイルス分離

ウイルス分離培養にはイヌ腎尿細管上皮細胞由来細胞 (Madin-Darby canine kidney、MDCK 細胞)、ヒト結腸癌由来細胞 (Caco-2 細胞)、アカゲザル腎由来細胞 (Rhesus monkey kidney epithelial cells、LLC-MK2 細胞)、Vero9013 細胞、ヒト横紋筋肉腫由来細胞 [Rhabdomyosarcoma cells、RD 細胞-18S-Niigata (RD-18S-N)]、ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞(A549)またはヒト喉頭癌由来細胞(HEp-2 細胞)を使用した。保存された検体を培養細胞に接種し、33°C5%CO₂ ふ卵器で培養した。接種後 3 日間顕微鏡で観察し、細胞変性効果 (cytopathic

effect、CPE) が観察された時点で-80℃に保存した。RD-18S-N 細胞は、イーグル最小必須培地 (Eagle's minimum essential medium, MEM、 Nissui Pharmaceutical、日本)、10%牛胎仔血清 (fetal bovine serum、FBS)、7.5% sodium bicarbonate、ファンギゾン、ゲンタマイシン、L-glutamine を用いて単層培養した。

4.2.2 PCR と遺伝子解析による同定

RD-18S-N 細胞においてピコルナウイルス様の細胞変性効果を認めた検体に対し、通常この細胞で分離されるエンテロウイルス、パレコウイルスの RT-PCR が陰性だった検体に対して SAFV の RT-PCR を実施した。さらに SAFV が分離された検体に対して、パラインフルエンザウイルス、ライノウイルス、RS ウイルス、ヒトメタニューモウイルス、ヒトコロナウイルスの RT-PCR を施行し、SAFV 以外の呼吸器ウイルスが検出されないかを確認した。SAFV の RT-PCR は、検体または細胞培養上清液を用いて、SAFV の VP1 領域を増幅する primer 315F/primer 738R および primer 316F/primer 621R を用いて施行した。RT-PCR 法にて目的とする 327 塩基のバンドが認められた検体に対し、その PCR 産物をシーケンスによる系統樹解析に用いた。相同性解析は、得られたシーケンスを Basic Local Alignment Search Tool を用いて National Center for

Biotechnology Information GenBank から検索し、既報の株との相同性を比較した。系統樹は MEGA5.2 を用いた近接結合法により作成した¹⁶。

5. 結果

5.1 遺伝子型の特徴

新潟県では 2013 年に初めて RD-18S-N 細胞から 6 株の SAFV が分離され、遺伝子解析の結果 SAFV2 と同定された。そこで、2006 年から 2012 年の間に、ウイルス分離により RD-18S-N 細胞に CPE(図 1)が確認されたが、その後の遺伝子検査においてウイルスが同定されなかった 6 つの分離株についても SAFV の遺伝子解析を行ったところ、新たに 3 例が SAFV と同定された(図 2)。合計 9 症例から 9 株の SAFV が分離され、他のウイルスは分離されなかった。

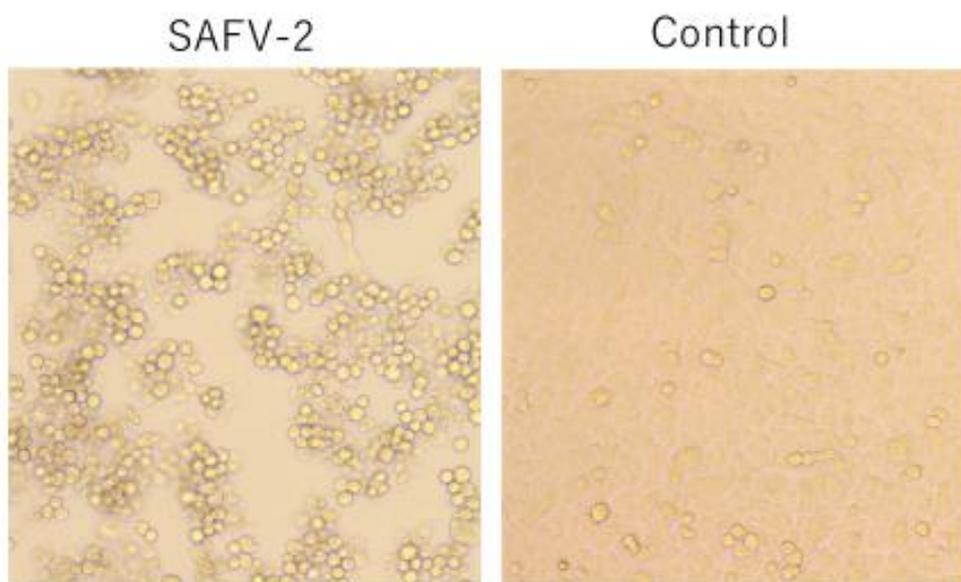


図1 接種後3日後に観察された細胞変性効果 (CPE)

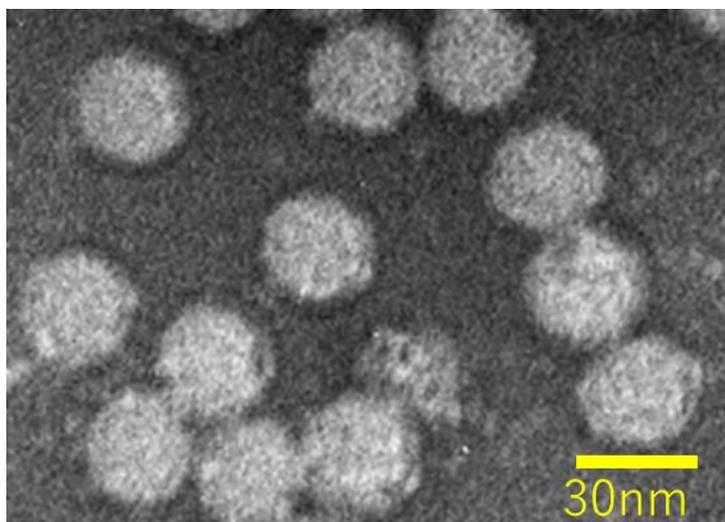


図2 SAFVの電顕像

9株すべてでSAFVの遺伝子型が同定された。症例9 (2013年8月、遺伝子型2) はシーケンスで得られた塩基配列が十分でなかったため、系統樹解析(図3)からは除外した。系統樹解析を行った8株は、SAFV2とSAFV3の2つの遺伝子型に分類された。5株 (Niigata965/2013, Niigata969/2013, Niigata959/2013, Niigata930/2013, Niigata887/2013)はSAFV2と同定され、それぞれ100%の相同性が示された。これらの結果から、症例4-8は、それぞれ発症した2013年7月から8月の2か月間にSAFV感染症の地域流行がみられたことを示唆していた。また、3株 (Niigata987/2007, Niigata165/2008, Niigata166/2008)はSAFV3と同定され、それらは国内で既報のSAFV3の株 [245/Yamagata/2008SAFV-3, 911/Niigata/2007, Aichi10247/2007, JPN08-404(HQ902242)] と99-100%の相

同性を示していた。

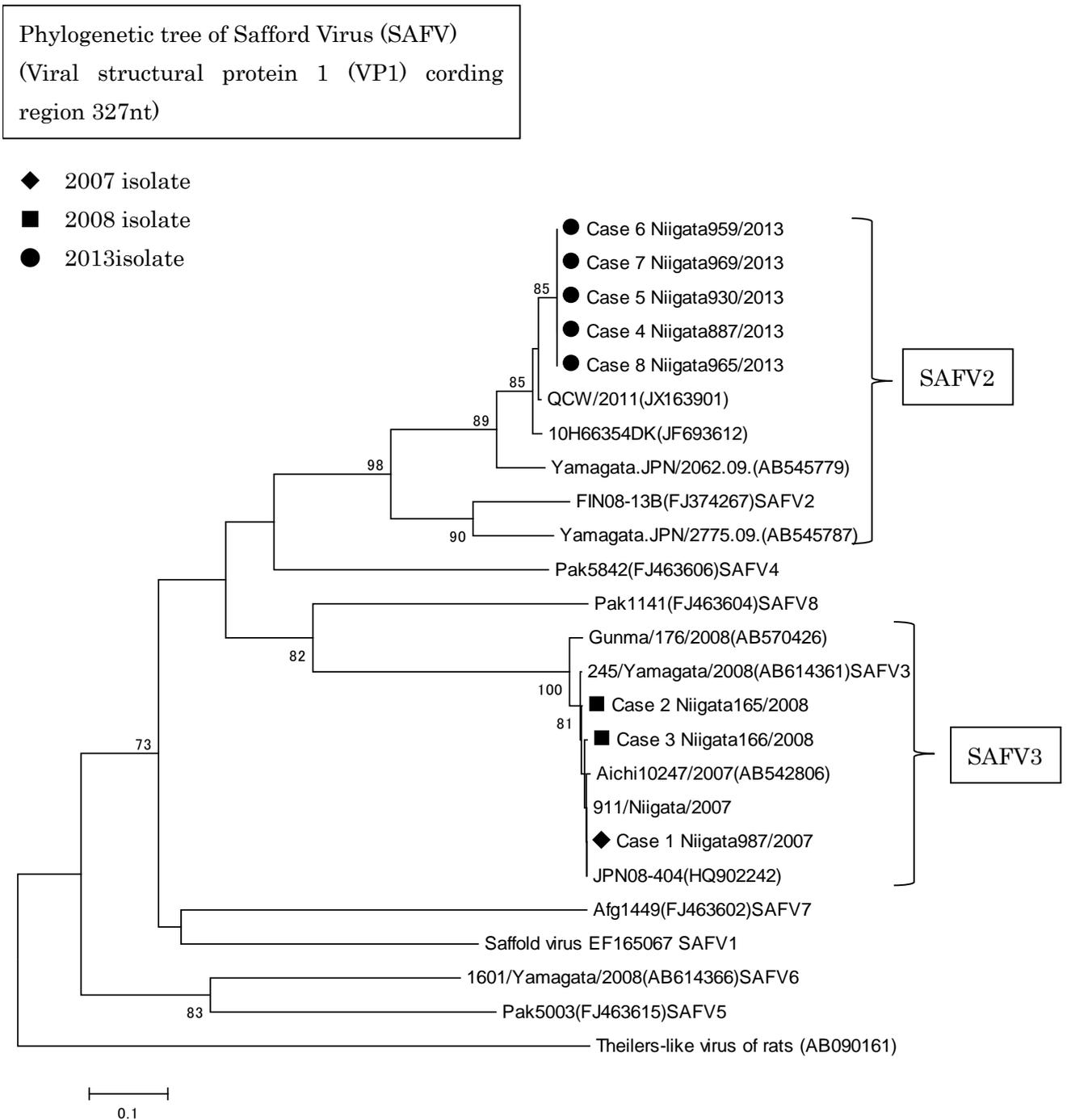


図3 サフォードウイルスの系統樹

5.2 サフォードウイルス感染症の臨床像

対象となる SAFV 陽性 9 症例の臨床的特徴と遺伝子型を示す(表 2)。年齢の中央値は 5 歳 (2-16 歳)であり、6 人(67%)は男児であった。診断は咽頭扁桃炎 7 例、無菌性髄膜炎 1 例、熱源不明の発熱 1 例であり、咽頭扁桃炎の 7 例の上咽頭拭い液から 7 株、無菌性髄膜炎の 1 例の髄液から 1 株、熱源不明の発熱の 1 例の糞便から 1 株 SAFV が同定された。他のウイルスは同定されなかった。全ての症例で 38 度以上の発熱がみられ、そのうち 8 例(89%)は 38.5 度以上の高熱であった。有熱期間の中央値(幅)は 2 日間(1-5 日)であった。食思不振、咽頭痛、頭痛がそれぞれ 6 例(67%)、4 例(44%)、3 例(33%)でみられた。他の症状は嘔気(2 例、22%)、鼻汁(2 例、22%)、倦怠感(2 例、22%)であった。遺伝子型は SAFV2 が 6 例(咽頭扁桃炎 5 例、熱源不明の発熱 1 例)、SAFV3 が 3 例(咽頭扁桃炎 2 例、無菌性髄膜炎 1 例)であった。身体所見では、主に咽頭発赤(6 例、67%)、扁桃腫大(6 例、67%)、頸部リンパ節腫脹(3 例、33%)がみられた。血液検査は 5 例で施行した。症例 1、9 は第 3 病日、症例 4、7 は第 2 病日、症例 6 は第 1 病日で採血した。その結果、白血球数の中央値(幅)は 11,080/ μ L (9,690-15,580/ μ L) であり、好中球の割合の中央値(幅)は 75%(71-86%)であった。C-reactive protein (CRP)の中央値(幅)は 2.94 mg/dL (0.01-5.52 mg/dL)であった。

全 9 症例のうち 6 症例 (症例 4~9) では SAFV2 が、3 症例 (症例 1~3)では

SAFV3 が同定された。症例 4～9 は 2013 年 7 月から 8 月の 2 か月間に発症していた。3 症例（症例 1, 6, 7）は入院を要し、他の 6 症例は外来治療であった。全例が対症療法のみで全身状態は速やかに改善し、後遺症はみられなかった。

表2 サフォードウイルス感染症の臨床像

症例	性別	年齢 (歳)	発病日	診断	RT-PCR			遺伝子 型	体温 (℃)	有熱期 間(日)	症状	身体所見	血液検査	
					髄液	上咽頭 拭い液	便						白血球数 (μL) (好中球, %)	CRP (mg/dL)
1	男	5	2007/9/8	無菌性髄膜炎	+	N/A	-	3	38.9	5	食欲低下 頭痛 嘔気 嘔吐	項部硬直	13,200 (75%)	0.01
2	女	2	2008/1/22	咽頭扁桃炎	N/A	+	N/A	3	38.2	3	咳 鼻汁	N/A	N/A	N/A
3	女	4	2008/1/25	咽頭扁桃炎	N/A	+	N/A	3	39.1	1	食欲低下 鼻汁 嘔気	扁桃腫脹	N/A	N/A
4	男	16	2013/7/9	咽頭扁桃炎	N/A	+	N/A	2	39.7	2	食欲低下 頭痛 倦怠感	咽頭発赤 扁桃腫脹 頸部リンパ節腫脹	9,690 (71%)	4.16
5	男	6	2013/7/28	咽頭扁桃炎	N/A	+	N/A	2	39.6	2	食欲低下 咽頭痛	咽頭発赤 扁桃腫脹	N/A	N/A
6	女	8	2013/8/1	咽頭扁桃炎	N/A	+	N/A	2	39.1	2	咽頭痛 頭痛 倦怠感	咽頭発赤 扁桃腫大 頸部リンパ節腫脹	11,080 (86%)	2.94

表2 サフォードウイルス感染症の臨床像 (続き)

症例	性別	年齢 (歳)	採取日	診断	RT-PCR			遺伝子 型	体温 (°C)	有熱期 間 (日)	症状	身体所見	血液検査	
					髄液	上咽頭 拭い液	便						白血球数 (μL) (好中球%)	CRP (mg/dL)
7	男	5	2013/8/2	熱源不明 の発熱	N/A	N/A	+	2	39.0	2	食欲低下 腹痛	咽頭発赤	15,580 (81%)	5.52
8	男	4	2013/8/14	咽頭扁桃 炎	N/A	+	N/A	2	40.0	1	頭痛	咽頭発赤 扁桃腫脹	N/A	N/A
9	男	5	2013/8/30	咽頭扁桃 炎	N/A	+	N/A	2	39.2	3	食欲不振 咽頭痛 頸部痛 腰痛	咽頭発赤 扁桃腫脹 頸部リンパ節腫大	10,980 (73%)	0.41

RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; CRP, C-reactive protein; N/A, not available

5.3 無菌性髄膜炎の臨床像

【症例】 5歳男児

【既往歴】 特記事項なし、頭部外傷の既往なし

【周囲での流行疾患】 なし

【主訴】 発熱、頭痛、嘔吐

【現病歴】

入院3日前から38.9℃の発熱、強い頭痛、入院前日から1日1回の嘔吐を認めたため、総合病院を受診した。胃腸炎と診断され、対症療法のみで対応していたが、その後も発熱と頭痛、嘔気、嘔吐が持続し、入院当日に総合病院を再診した。

【身体所見】

体温39.5℃、頭痛を訴え、機嫌が悪く啼泣、嘔吐3回あり

頸部：項部硬直あり、咽頭：発赤なし、胸部：呼吸音清、心雑音なし、腹部：平坦、軟、腸蠕動音亢進減弱なし

【血液検査】

白血球数13,200/ μ L、(顆粒球75%、リンパ球19%、単球5%)、CRP0.01 mg/dL、ヘモグロビン12.9 g/dL、血小板 31.7×10^4 / μ L、随時血糖109 mg/dL

【尿検査】

蛋白定性(-)、糖定性(-)、白血球 1-4/HPF

【髄液検査】

細胞数 1,621/ μ L (単核球 58%、多核球 42%)、蛋白 49 mg/dL、糖 60 mg/dL

【血液培養 (細菌)】

陰性

【尿培養 (細菌)】

陰性

【髄液培養 (細菌)】

陰性

【ウイルス培養】

RD-18S-N 細胞において CPE を認め、RT-PCR により SAFV と同定された

【臨床経過】

頭痛、嘔気・嘔吐の症状、項部硬直に加え、髄液検査で単核球優位の細胞増多を認めたため、無菌性髄膜炎と診断し、入院し、補液のみで経過観察した。入院 2 日目には解熱傾向となり、嘔気・嘔吐は消失した。入院 3 日目に解熱し、頭痛と項部硬直も軽快、神経学的症状を残さず入院 4 日目に退院した。最高体温は 40.0°C、有熱期間は 5 日間であった。退院後 1 か月間経過をみたが、神経学的症状はみられなかった。その後、髄液培養 (細菌) は陰性であったが、髄液ウイ

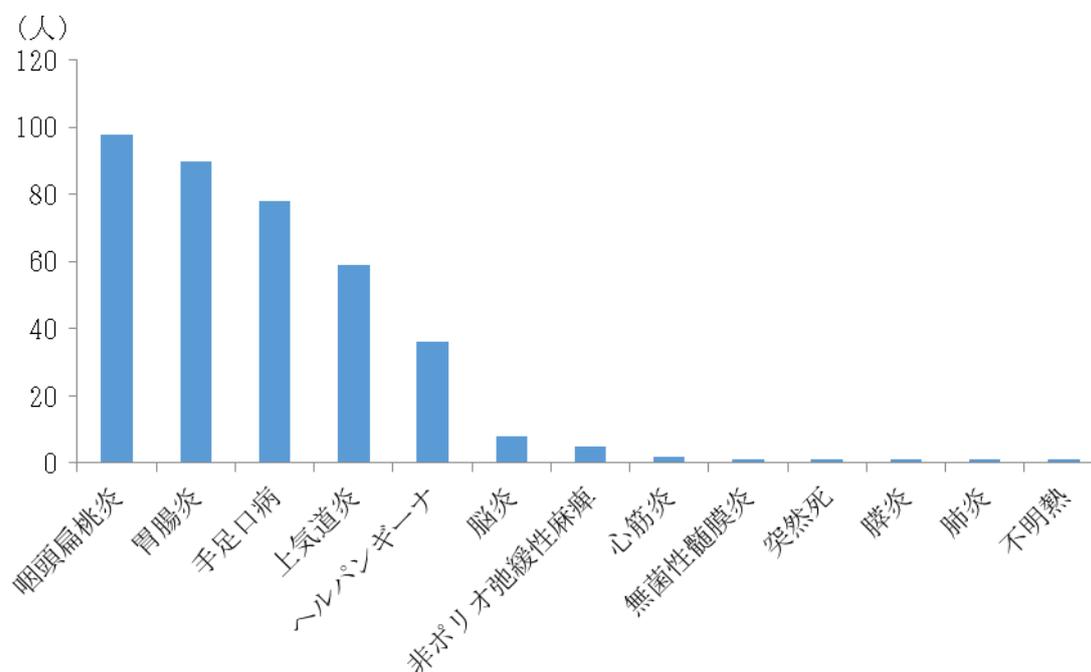
ルス培養で CPE を認め、RT-PCR 検査で SAFV (VP1 塩基配列から SAFV3) と同定され、SAFV による無菌性髄膜炎と診断された。

6. 考察

6.1 SAFV 感染症の臨床診断

SAFV 感染症について、2007 年から 2018 年 1 月までに報告された 28 の症例報告と記述研究を集積したところ、全症例数は 372 例であった^{12,17-41}。その内訳は以下の通りである (表 3)。

表 3 SAFV 感染症の過去の報告の臨床診断



咽頭扁桃炎が 98 例、胃腸炎が 90 例、手足口病が 78 例、上気道炎が 59 例と報告数が多く、脳炎、非ポリオ弛緩性麻痺、無菌性髄膜炎といった中枢神経感染症報告も散見されている。心筋炎は 2 例、突然死、膵炎、肺炎、不明熱はそれぞれ 1 例ずつ報告されている。

6.2 SAFV 上気道感染症の臨床像

SAFV による咽頭扁桃炎、上気道感染症の症例集積を提示する（表 4）

表 4. サフォードウイルスによる咽頭扁桃炎、上気道感染症の症例報告

国	症例数	遺伝子型	年齢(中央値、範囲)	時期	症状	身体所見	文献
中国	7	1 (2 症例) 2 (2 症例) 3 (3 症例)	2.7 (0.4-9)	6-12 月	発熱 (5/7, 71%) 咳嗽 (7/7, 100%)	NA	[30]
日本	9	2	3.8 (2-7)	8-12 月	発熱 (9/9, 100%)	咽頭滲出 (9/9, 100%)	[23]
日本	2	3	5.5 (5-6)	6 月	発熱 (2/2, 100%) 咽頭痛 (2/2, 100%)	口腔潰瘍 (2/2, 100%)	[31]
日本	35	2	4 (0.6-16)	6-12 月	発熱 (33/35, 94%) 下痢 (7/35, 20%) 咳嗽 (14/35, 40%) 鼻汁 (11/35, 31%)	NA	[23]
マレーシア	1	3	5	11 月	発熱, 咽頭痛, 咳嗽 嘔吐, 腹痛	NA	[17]
台湾	22	3	<6	NA	咳嗽 (11/22, 50%) 咽頭痛 (8/22, 36%) 鼻汁 (6/22, 27%)	咽頭小水疱また は口腔潰瘍 (3/22, 14%)	[36]
日本	91	2 (63 症例) 3 (28 症例)	4 (0-17)	8-12 月	発熱 (82/91, 90%)	NA	[41]

好発年齢は1～6歳の幼児期であり、流行時期は7～11月という報告が多い。本研究においても2013年7-8月に症例が集積しており、SAFV感染症の地域流行が考えられる。SAFVによる上気道感染症の症状は、2-3日間持続する高熱と、咳嗽、咽頭痛、鼻汁であり、身体所見では咽頭発赤と扁桃腫大がみられた。本研究においても同様の特徴がみられた。更に、今回の検討により、血液検査では好中球優位の白血球増多とCRPの上昇が特徴的であることが示された。

SAFV感染症による咽頭扁桃炎は、幼児期に39℃以上の高熱と咽頭発赤、扁桃腫脹がみられ、血液検査では好中球優位の白血球増多とCRPの上昇を示すことから、アデノウイルスや溶連菌による咽頭扁桃炎との鑑別を要する。SAFV感染症は、アデノウイルスや溶連菌と比較し有熱期間は短い。溶連菌による咽頭炎に対し抗菌薬が投与されて早期に解熱した場合は両者の臨床像を区別することは困難である。不要な抗菌薬の使用を防止し、自然経過の予測をするために、SAFVの咽頭扁桃炎について更なる血清疫学的な研究や流行周期を検討する必要がある。

6.3 SAFV 中枢神経感染症の臨床像

SAFVは近年、無菌性髄膜炎や脳炎などの中枢神経感染症の原因微生物としても注目されている。中枢神経感染症の報告は過去に15例報告されている

19,22,26,35。1-5 例目は、2007 年にアメリカで、非ポリオ弛緩性麻痺の 7 か月、2 歳 6 か月、2 歳 9 か月、4 歳、13 歳の患児の糞便から SAFV3, 4, 7 が 1 株、SAFV5 が 2 株同定された。全ての症例で発熱を認め、2 例には非対称性の麻痺がみられた¹⁹。6 例目は、2008 年に日本で無菌性髄膜炎の 9 歳男児の髄液から SAFV3 が単独で同定された。臨床経過の詳細は不明である²²。7 例目は、2009 年 3 月にデンマークで失調症状を呈した 16 か月の男児の髄液と便から SAFV2 が同定された。臨床経過は、6 日間の先行する発熱の後に解熱し、突然の上下肢の失調症状が出現した。精神症状や意識障害はみられなかった。症状は 2 か月で消失し、神経学的後遺症は残さなかった。また、糞便からはパレコウイルス 3 型が検出された²⁶。8 例目は、2009 年 8 月にデンマークで突然死の 27 か月の女児の髄液、血液、心筋から SAFV2 が同定された。剖検の結果死因は脳ヘルニアと考えられた。同時に検出された微生物としては、コアグラージェ陰性ブドウ球菌が髄液から、非溶血性連鎖球菌が肺組織と胸水から、表皮ブドウ球菌が胸水から、ペロ毒素産生大腸菌が糞便の培養からそれぞれ同定された²⁶。9-15 例目は、2009 年から 2012 年までに中国で採取された手足口病を伴う脳炎患者の血清および髄液から 7 例で SAFV が同定された。詳細な臨床経過は不明である³⁵。

中枢神経感染症に対する SAFV の病原性についてはいまだに明らかになっていない。本研究では、SAFV3 による無菌性髄膜炎の詳細な臨床経過を報告した。

症状、身体所見、血液検査、髄液検査は、他のウイルス感染症による無菌性髄膜炎と類似していた。本症例は後遺症なく経過したが、過去には脳炎や突然死、心筋炎など深刻な経過をたどる症例も報告されており、中枢神経感染症の臨床像の解明には更なる症例の蓄積が必要である。

7. この研究の限界

本研究で用いたウイルス培養細胞（RD-18S-N 細胞）は SAFV2,3 を分離できることは確認しているが、他の遺伝子型については不明であり、別のアプローチにより他の遺伝子型が検出される可能性はある。また、ウイルス分離によるウイルスの検出は PCR 法に比べると感度が劣るため、PCR 法による検出を行えばより多くの SAFV を同定できた可能性がある。

8. 終わりに

SAFV は、2007 年に同定された新しいヒトカルジオウイルスである。SAFV は幼児期の咽頭扁桃炎や胃腸炎の原因微生物の鑑別の 1 つにあげられる。SAFV の咽頭炎、上気道炎の症例では 39 度以上の高熱と咽頭発赤、扁桃腫脹が見られ、血液検査では好中球優位の白血球増多と CRP の上昇を示すことから、アデノウイルスや溶連菌による咽頭炎との鑑別を要する。中枢神経感染症の原因微生物

としても注目されるが、その病原性については今後の症例の蓄積が必要である。

9. 謝辞

本研究を進めるに当たり、新潟大学小児科齋藤昭彦教授、および自治医科大学総合診療部門畠山修司教授より、指導教官として多大なご指導、ご助言を賜りました。また、新潟県保健環境科学研究所調査研究室ウイルス科広川智香さん、田村務先生には SAFV の分離、同定についてご指導、ご協力を賜りました。佐渡市立両津病院小児科岩谷淳先生、富山大学医学部小児科種市尋宙先生には、指導医として担当症例のご指導を頂きました。新潟大学小児科相澤悠太先生には、論文化にあたり、貴重なご意見を賜りました。厚く感謝を申し上げます。また、本研究に参加することを同意して下さった患者様もしくはそのご家族に厚く御礼申し上げます。産休、育休中にも関わらず、本論文を完成させるために積極的に家事を引き受けてくれた夫、いつも私を癒してくれる最愛の娘に感謝します。

10. 参考文献

1. Dickinson, L. & Griffiths, A.J. The pathogenesis of experimental infections with encephalomyocarditis (EMC) virus. *Br J Exp Pathol* **47**, 35-44 (1966).
2. Craighead, J.E. & McLane, M.F. Diabetes mellitus: induction in mice by encephalomyocarditis virus. *Science* **162**, 913-4 (1968).
3. Dal Canto, M.C. & Lipton, H.L. Multiple sclerosis. Animal model: Theiler's virus infection in mice. *Am J Pathol* **88**, 497-500 (1977).
4. Rodriguez, M., Oleszak, E. & Leibowitz, J. Theiler's murine encephalomyelitis: a model of demyelination and persistence of virus. *Crit Rev Immunol* **7**, 325-65 (1987).
5. Yoon, J.W., McClintock, P.R., Onodera, T. & Notkins, A.L. Virus-induced diabetes mellitus. XVIII. Inhibition by a nondiabetogenic variant of encephalomyocarditis virus. *J Exp Med* **152**, 878-92 (1980).
6. Canelli, E. *et al.* Encephalomyocarditis virus infection in an Italian zoo. *Virology* **7**, 64 (2010).
7. Czechowicz, J. *et al.* Prevalence and risk factors for encephalomyocarditis virus infection in Peru. *Vector Borne Zoonotic Dis* **11**, 367-74 (2011).
8. Hubbard, G.B. *et al.* An encephalomyocarditis virus epizootic in a baboon colony. *Lab Anim Sci* **42**, 233-9 (1992).
9. Masek-Hammerman, K. *et al.* Epizootic myocarditis associated with encephalomyocarditis virus in a group of rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Vet Pathol* **49**, 386-92 (2012).

10. Oberste, M.S. *et al.* Human febrile illness caused by encephalomyocarditis virus infection, Peru. *Emerg Infect Dis* **15**, 640-6 (2009).
11. Reddacliff, L.A., Kirkland, P.D., Hartley, W.J. & Reece, R.L. Encephalomyocarditis virus infections in an Australian zoo. *J Zoo Wildl Med* **28**, 153-7 (1997).
12. Jones, M.S., Lukashov, V.V., Ganac, R.D. & Schnurr, D.P. Discovery of a novel human picornavirus in a stool sample from a pediatric patient presenting with fever of unknown origin. *J Clin Microbiol* **45**, 2144-50 (2007).
13. Tan, S.Z., Tan, M.Z. & Prabakaran, M. Saffold virus, an emerging human cardiovirus. *Rev Med Virol* **27**(2017).
14. Kobayashi, M. *et al.* Seroepidemiology of Saffold cardiovirus (SAFV) genotype 3 in Japan. *J Infect* **66**, 191-3 (2013).
15. Galama, J., Lanke, K., Zoll, J., Roivainen, M. & van Kuppeveld, F. Seroepidemiology of Saffold cardiovirus type 2. *Emerg Infect Dis* **17**, 1572-3 (2011).
16. Tamura, K. *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**, 2731-9 (2011).
17. Chua, K.B. *et al.* Saffold virus infection in children, Malaysia, 2009. *Emerg Infect Dis* **17**, 1562-4 (2011).
18. Abed, Y. & Boivin, G. New Saffold cardioviruses in 3 children, Canada. *Emerg Infect Dis* **14**, 834-6 (2008).

19. Blinkova, O. *et al.* Cardioviruses are genetically diverse and cause common enteric infections in South Asian children. *J Virol* **83**, 4631-41 (2009).
20. Chiu, C.Y. *et al.* Identification of cardioviruses related to Theiler's murine encephalomyelitis virus in human infections. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 14124-9 (2008).
21. Drexler, J.F. *et al.* Circulation of 3 lineages of a novel Saffold cardiovirus in humans. *Emerg Infect Dis* **14**, 1398-405 (2008).
22. Himeda, T. *et al.* The preparation of an infectious full-length cDNA clone of Saffold virus. *Virology* **438**, 110 (2011).
23. Itagaki, T. *et al.* Saffold cardiovirus infection in children associated with respiratory disease and its similarity to coxsackievirus infection. *Pediatr Infect Dis J* **30**, 680-3 (2011).
24. Itagaki, T. *et al.* Sequence and phylogenetic analyses of Saffold cardiovirus from children with exudative tonsillitis in Yamagata, Japan. *Scand J Infect Dis* **42**, 950-2 (2010).
25. Khamrin, P. *et al.* Three clusters of Saffold viruses circulating in children with diarrhea in Japan. *Infect Genet Evol* **13**, 339-43 (2013).
26. Nielsen, A.C., Bottiger, B., Banner, J., Hoffmann, T. & Nielsen, L.P. Serious invasive Saffold virus infections in children, 2009. *Emerg Infect Dis* **18**, 7-12 (2012).
27. Nielsen, A.C., Gyhrs, M.L., Holmes, E.C. & Cui, J. Co-circulation and persistence of genetically distinct saffold viruses, Denmark. *Emerg Infect Dis* **18**, 1694-6 (2012).

28. Nielsen, A.C., Gyhrs, M.L., Nielsen, L.P., Pedersen, C. & Bottiger, B. Gastroenteritis and the novel picornaviruses aichi virus, cosavirus, saffold virus, and salivirus in young children. *J Clin Virol* **57**, 239-42 (2013).
29. Ren, L. *et al.* Saffold cardiovirus in children with acute gastroenteritis, Beijing, China. *Emerg Infect Dis* **15**, 1509-11 (2009).
30. Ren, L. *et al.* Saffold cardioviruses of 3 lineages in children with respiratory tract infections, Beijing, China. *Emerg Infect Dis* **16**, 1158-61 (2010).
31. Tsukagoshi, H. *et al.* Sequencing and phylogenetic analyses of Saffold cardiovirus (SAFV) genotype 3 isolates from children with upper respiratory infection in Gunma, Japan. *Jpn J Infect Dis* **63**, 378-80 (2010).
32. Tsukagoshi, H. *et al.* The impact of Saffold cardiovirus in patients with acute respiratory infections in Yamagata, Japan. *Scand J Infect Dis* **43**, 669-71 (2011).
33. Xu, Z.Q. *et al.* New Saffold cardiovirus in children, China. *Emerg Infect Dis* **15**, 993-4 (2009).
34. Yodmeeklin, A. *et al.* Saffold viruses in pediatric patients with diarrhea in Thailand. *J Med Virol* **87**, 702-7 (2015).
35. Zhang, X.A. *et al.* Prevalence and genetic characteristics of Saffold cardiovirus in China from 2009 to 2012. *Sci Rep* **5**, 7704 (2015).
36. Lin, T.L. *et al.* Molecular epidemiological analysis of Saffold cardiovirus genotype 3 from upper respiratory infection patients in

- Taiwan. *J Clin Virol* **70**, 7-13 (2015).
37. Nielsen, T.S. *et al.* Saffold virus infection associated with human myocarditis. *J Clin Virol* **74**, 78-81 (2016).
 38. Ito, H. *et al.* Saffold Cardiovirus Infection in a 2-Year-Old Boy with Acute Pancreatitis. *Jpn J Infect Dis* **70**, 105-107 (2017).
 39. Li, L.L. *et al.* Analysis of Aichi virus and Saffold virus association with pediatric acute gastroenteritis. *J Clin Virol* **87**, 37-42 (2017).
 40. Menage, L., Yodmeeklin, A., Khamrin, P., Kumthip, K. & Maneekarn, N. Prevalence of human cosavirus and saffold virus with an emergence of saffold virus genotype 6 in patients hospitalized with acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand, 2014-2016. *Infect Genet Evol* **53**, 1-6 (2017).
 41. Itagaki, T. *et al.* Detection of Saffold viruses from children with acute respiratory infections in Yamagata, Japan, between 2008 and 2015. *J Med Virol* **90**, 34-40 (2018).