

[調査研究]

In 2016 , Multiple outbreaks of fulminant myocarditis were caused by Cocksackie B viruses in Saga prefecture.

ウイルス課 安藤 克幸 島 あかり 堤 陽子 諸石 早苗

1 はじめに

劇症型心筋炎起因ウイルスとしては Cocksackie virus 、 Adenovirus、 parvovirus B19、 hepatitis C 及び herpes virus 6 等がある。

これらの感染症では、罹患後に cardiomyopathy を合併することが世界的に知られている。

このうちエンテロウイルスには以下のように多くの遺伝子型が含まれるが、特定の遺伝子型が発症に関与していると考えられている。

・Cocksackieviruses A1 to A21、 A24、 and B1 to 6 ・Echoviruses (enteric cytopathic human orphan viruses) 1 to 7、 9、 11 to 21、 24 to 27、 and 29 to 33 ・Enteroviruses 68 to 71、 73 to 91、 and 100 to 101 ・ Polioviruses types 1 to 3

この劇症型心筋炎の問題点として、発症時に、重篤な場合は ICU での体外循環装置による救命措置が必要となる点である。

今回、県内において劇症型心筋炎の患者が多発したため、その起因ウイルスについて調査することとした。

2 材料および方法

発症者の詳細については、以下のとおりである。

表 1(発症者の詳細)

発病月日等	居住市町	年齢・性別	症状	検体
5 月 14 日(土)	唐津市	59 歳 女性	劇症型心筋炎 (体外式心臓) 意識不明	咽頭拭い液、血液、尿、便
6 月 16 日(木)	唐津市	69 歳 男性	劇症型心筋炎 意識不明	咽頭拭い液、血液、便
5 月 27 日(金)	小城市	35 歳 男性	劇症型心筋炎 (体外式心臓) 意識不明	咽頭拭い液、血液、尿、便
6 月 4 日(土)	神崎市	42 歳 男性	急性心筋炎発症 (体外式心臓) 意識不明	咽頭拭い液、血液、尿、便
6 月 23 日(木)	小城市	60 歳 女性	劇症型心筋炎 (体外式心臓) 意識不明	咽頭拭い液、血液、尿、便
7 月 22 日(金)	佐賀市	84 歳 女性	劇症型心筋炎 体外式ペースメーカーと補助人工心臓	咽頭拭い液、血液、尿、便

[調査研究]

2-1 細胞培養によるウイルス分離

培養細胞によるウイルス分離には、24 ウェルプレートに播種した RD-A、VeroE6 および Hep-2 を用いた。咽頭拭い液等の呼吸器検体は、採取した綿棒を 1ml の検体輸送用培地に浸漬した。糞便は、PBS で 10%懸濁液を作製し、10、000rpm で 10 分間遠心分離し、上清を得た。

それぞれの検体を 0.45 μ m フィルター(ミリポア 社)でろ過し、各 100 μ lを培養細胞によるウイルス分離用検体とした。検体を接種した細胞は、36.5°Cの CO₂ インキュベーターで 1 週間培養し、CPE(cytopathiceffect)を観察した。CPE が出現した場合に培養上清を回収した。3代盲継代を行い、CPE が出現しなかった場合を陰性と判定した。

2-2 RT-PCR および PCR による遺伝子検出と塩基配列の解析

呼吸器由来拭い検体等は、綿棒を 1ml の検体輸送用培地に浸漬したものから 400 μ l を、糞便は、PBS で 10%懸濁液を作製し、10,000rpm で 10 分間遠心分離した上清から 200 μ l 採取し、RNA および DNA 抽出用検体とした。

CPE が認められた細胞の培養上清からは、輸送培地検体からの抽出と同様の方法で RNA を抽出した。

プライマー;通常の方法で作成したオリゴヌクレオチドを合成後、HPLC 精製した。

DNA polymerases;AmpliTaq Gold® DNA Polymerase with Buffer II and MgCl₂

ゲル抽出;FastGene Gel/PCR Extraction Kit

Cycle sequence kits ; BigDye® Terminator v3. 1 Cycle Sequencing Kit

Dye Terminator Removal ;FastGene Dye Terminator Removal Kit

ポリマー:POP7

遺伝子増幅:GeneAmp® PCR System9700

シーケンサー;ABI XL3130

○Enterovirus については以下の primers、条件で cDNA 合成、PCR を実施した。13)

Oligonucleotide primers**cDNA (RT) primers**

AN32 5' GTY TGC CA 3' AN33 5' GAY TGC CA 3'

AN34 5' CCR TCR TA 3' AN35 5' RCT YTG CCA 3'

PCR 1 primers

SO224 5' GCI ATG YTI GGI ACI CAY RT 3' FORWARD

SO222 5' C ICC IGG IGG IAY RWA CAT 3' REVERSE

snPCR 2 primers

AN89 5' CCA GCA CTG ACA GCA GYN GAR AYN GG 3' FORWARD

AN88 5' TAC TGG ACC ACC TGG NGG NAY RWA CAT 3' REVERSE

[調査研究]

Thermocycler programmes for cDNA、PCR 1 and snPCR 2

1-1 DNase DNase 42° C 2 minutes Hold 4° C Forever	1-2 cDNA cDNA 40° C 15 minutes RT inactivation 85° C 5 seconds Hold 4° C Forever
2 PCR 1 35-40 cycles Denature 95° C 30 seconds Annealing 42° C 30 seconds Ramp 60° C 0.4 °C/second Elongation 60° C 45 seconds Hold 4° C Forever	3 snPCR 2 Hold (Hot start) 95° C Hold 6 minutes to activate FS Taq. 35-40 cycles Denature 95° C 30 seconds Annealing 60° C 20 seconds Elongation 72° C 15 seconds Hold 4° C Foreve

○Parecho virus については以下の primers、条件で cDNA 合成、PCR を実施した。12)

Oligonucleotide primers

cDNA primers

AN273 5' AAR TAG TC 3' AN274 5' AAR TAA TC 3'
 AN275 5' TCR CAG TT 3' AN276 5' TCR CAA TT 3'
 AN277 5' ATR AAT TT 3' AN278 5' ATR AAC TT 3'

Contents

PCR 1 primers

AN353 5' GAC AAT AGT TTT GAA ATN ACN ATH CCN TA 3' FORWARD
 AN355 5' C TCC AAC TAT AAT GCC ATA RTG YTT RTA RAA NCC 3' REVERSE

snPCR 2A and 2B primers

snPCR 2A

AN353 5' GAC AAT AGT TTT GAA ATN ACN ATH CCN TA 3' FORWARD
 AN357 5' GA ATA AAA TGG TAC TGA NAR NGT CAT YTG YTC 3' REVERSE

secondPCR 2B

AN369 5' ACC AAG GTT GAC AAC ATT TTY GGN MGN GC 3' FORWARD
 AN358 5' AAC TAT AAT GCC ATA RTG YTT RTA RAA NCC 3' REVERSE

secondPCR 2C

AN369 5' ACC AAG GTT GAC AAC ATT TTY GGN MGN GC 3' FORWARD
 AN357 5' GA ATA AAA TGG TAC TGA NAR NGT CAT YTG YTC 3' REVERSE

Thermocycler programmes for cDNA、PCR 1、snPCR 2A and 2B and 2C

[調査研究]

<p>1-1 DNase</p> <p>DNase 42° C 2 minutes Hold 4° C Forever</p>	<p>1-2 cDNA</p> <p>cDNA 40° C 30 minutes RT inactivation 85° C 5 seconds Hold 4° C Forever</p>
<p>PCR 1</p> <p>35 cycles</p> <p>Denature 95° C 30 seconds Annealing 42° C 40 seconds Ramp 72 °C 0.4 °C/second Elongation 72° C 60 seconds Hold 72° C 3 minutes Hold 4° C Forever</p>	
<p>snPCR 2A</p> <p><i>(programme on MJ Research thermocyclers = PAR2A)</i></p> <p>Hold (Hot start) 95° C Hold 6 minutes to activate FS Taq_o.</p> <p>40 cycles</p> <p>Denature 95° C 30 seconds Annealing 58° C 40 seconds Elongation 72° C 60 seconds Hold 72° C 3 minutes Hold 4° C Forever</p>	<p>second PCR 2B</p> <p><i>(programme on MJ Research thermocyclers = PAR2B)</i></p> <p>Hold (Hot start) 95° C Hold 6 minutes to activate FS Taq_o.</p> <p>40 cycles</p> <p>Denature 95° C 30 seconds Annealing 44° C 40 seconds Elongation 72° C 60 seconds Hold 72° C 3 minutes Hold 4° C Forever</p>
<p>second PCR 2C</p> <p><i>(programme on MJ Research thermocyclers = PAR-3N)</i></p> <p>Hold (Hot start) 95° C Hold 6 minutes to activate FS Taq_o.</p> <p>40 cycles</p> <p>Denature 95° C 30 seconds Annealing 58° C 20 seconds Elongation 72° C 30 seconds Hold 4° C Forever</p>	

[調査研究]

○Adeno virus は、以下の primers、条件で PCR を実施した。10)

Oligonucleotide primers

(Hexon C4)

AdnU-S' 2 TTC CCC ATG GCN CAC AAY AC

AdnU-A2 TGC CKR CTC ATR GGC TGR AAG TT

Thermocycler programmes for PCR

94°C 3min [94°C 30sec, 50°C 1min, 72°C 2min] × 40cycles , 72°C 5min

○Parvo virus は、以下の primers、条件で PCR を実施した。14)

Oligonucleotide primers

B19-1a CAC TAT GAA AAC TGG GCA ATA AAC

B19-2b AAT GAT TCT CCT GAA CTG GTC C

B19-3c ATA AAC TAC ACT TTT GAT TTC CCT G

B19-4d TCT CCT GAA CTG GTC CCG

Thermocycler programmes for PCR (1st,2nd)

95°C 5min [95°C 30sec, 55°C 1min, 72°C 30sec] × 38cycles , 72°C 10min

○Herpes virus は、以下の primers、条件で PCR を実施した。15)

Oligonucleotide primers

HSV-P1 (5'-GTGGTGGACTTTGCCAGCCTGTACCC-3')

HSV-P2 (5'-TAAACATGGAGTCCGTGTCGCCGTAGATGA-3')

VZV-P1 (5'-GTCGTGTTTGATTTTCAAAGTTTATATCC-3')

VZV-P2 (5'-ATAAACACACAATCCGTATCACCATAAATAACCT-3')

HSV-P1 and HSV-P2 primer pair the cycling parameters

95°C 12 min; then 3 cycles consisting of 95°C 1 min, 60°C 1 min, and 72°C for 1 min; then 37 cycles of 95°C 1 min, 55°C 45 sec, and 72°C for 1 min; final incubation at 72°C for 3 min.

VZV-P1 and VZV-P2 primer pair the cycling parameters

95°C for 10 min and then 40 cycles consisting of 95°C 1 min, 47°C 1 min, and 72°C for 1 min, final incubation at 72°C for 3 min.

2-3 中和抗体価の測定

エンテロウイルスの血清学的診断に最もよく利用されるのは中和法であり、マイクロプレートにより血清中の中和抗体価を測定する。中和試験に使用するウイルスは通常標準株を用いるが、今回は、特異性の向上を目的として当該シーズンに県内で分離された株を使用して測定した。

1) 血清希釈

① 血清は維持培養液で1:4に希釈(血清0.1mlに希釈液0.3ml)し、56°C30分間非働化した。

② 96穴マイクロプレートの第1列、3～10列目の各穴に、維持培養液を50 μlずつ、滅菌チップ(以下チップ)で滴下、分注した。

③ 1希釈の第1列目、2列目及び3列目の穴に1:4に希釈した血清の50 μlを分注した。

[調査研究]

④ 各型とも血清の1希釈につき2穴ずつを使用し、チップによる血清の倍数希釈を行った。

2) 中和

① 細胞コントロール列には100 μ l/wellの維持培養液を加えた。

② 100 TCID₅₀/50 μ l のウイルス液を細胞コントロール列およびBack-titration以外のwellに加えた。

③ Back-titrationを並行して行い、攻撃ウイルス量が100 TCID₅₀(許容範囲32~320 TCID₅₀ /50 μ l)で行われたことを確認した。

④ マイクロミキサーで混和後、蓋をかぶせて炭酸ガス培養器に入れ、35~37°Cで3時間中和した。

⑤ 中和を終えたマイクロプレートに別に準備した細胞浮遊液(1~2×10⁵個/ml)を100 μ lずつ加え35~37°Cで培養した。

⑥ 接種後1週間、CPEの出現の有無を観察した。

3) 判定

① ウイルス対照の成績が32~320TCID₅₀/50 μ lからはずれているときは再検査を行った。抗体価は接種ウイルスによるCPEの発現を抑制した血清の最高希釈倍数とした。

3 結果

3-1 培養結果

表 2(培養の結果)

患者番号(発症日)	咽頭ぬぐい液	尿	便
患者①(H28/5/14)	陰性	陰性	陰性
患者②(不明)	VeroE6 陽性	陰性	Hep2 陽性
患者③(H28/5/27)	VeroE6 陽性	陰性	陰性
患者④(H28/6/4)	陰性	陰性	陰性
患者⑤(H28/6/23)	陰性	陰性	陰性
患者⑥(H28/7/22)	陰性	陰性	R-DA 陽性

RD-A、VeroE6 および Hep2 の細胞培養によるウイルス分離では、患者②VeroE6 から HHV1 が、Hep2 から CoxB5 が、患者③VeroE6 からパレコウイルス 3 型が、患者⑥RD-A から CoxB5 がそれぞれ検出された。

3-2 RT-PCR、PCR 結果

表 3(Enterovirus の RT-PCR 結果)

患者番号(発症日)	咽頭ぬぐい液	尿	便
患者①(H28/5/14)	陰性	陰性	陰性

[調査研究]

患者②(不明)	陰性	陰性	陽性
患者③(H28/5/27)	陰性	陰性	陰性
患者④(H28/6/4)	陰性	陰性	陰性
患者⑤(H28/6/23)	陰性	陰性	陰性
患者⑥(H28/7/22)	陰性	陰性	陽性

表 4(Parecho virus の RT-PCR 結果)

患者番号(発症日)	咽頭ぬぐい液	尿	便
患者①(H28/5/14)	陰性	未実施	陰性
患者②(不明)	陰性	未実施	陰性
患者③(H28/5/27)	陰性	未実施	陰性
患者④(H28/6/4)	陽性	未実施	陰性
患者⑤(H28/6/23)	陰性	未実施	陰性
患者⑥(H28/7/22)	陰性	未実施	陰性

表 5(Adeno virus の PCR 結果)

患者番号(発症日)	咽頭ぬぐい液	尿	便
患者①(H28/5/14)	陰性	陰性	陰性
患者②(不明)	陰性	陰性	陰性
患者③(H28/5/27)	陰性	陰性	陰性
患者④(H28/6/4)	陰性	陰性	陰性
患者⑤(H28/6/23)	陰性	陰性	陰性
患者⑥(H28/7/22)	陰性	陰性	陰性

表 6(Parvo virus の PCR 結果)

患者番号(発症日)	咽頭ぬぐい液	尿	血液
患者①(H28/5/14)	陰性	未実施	陰性

[調査研究]

患者②(不明)	未実施	未実施	未実施
患者③(H28/5/27)	陰性	未実施	陰性
患者④(H28/6/4)	陰性	未実施	陰性
患者⑤(H28/6/23)	陰性	未実施	陰性
患者⑥(H28/7/22)	未実施	未実施	未実施

表 7(Herpes virus の PCR 結果)

患者番号(発症日)	咽頭ぬぐい液	尿
患者①(H28/5/14)	未実施	未実施
患者②(不明)	陽性	未実施
患者③(H28/5/27)	陰性	未実施
患者④(H28/6/4)	陽性	未実施
患者⑤(H28/6/23)	陰性	未実施
患者⑥(H28/7/22)	未実施	未実施

RT-PCR および PCR による遺伝子検出により Enterovirus 2 検体、Herpes virus 2 検体、Parvovirus 1 検体が検出された。また、Adenovirus 及び Parvovirus は検出されなかった。

○シーケンス結果

RT-PCR および PCR で陽性だった 5 検体について、PCR 産物をダイレクトシーケンス法により塩基配列の解析を行った結果、コクサッキーB5 が 2 検体、単純ヘルペスウイルス(HHV1)、ヒトヘルペスウイルス(HHV4)およびヒトパレコウイルス 3 型がそれぞれ 1 検体検出された。

このうちコクサッキーB5 が検出された 2 検体については、AN89、AN88 の primers を用いた解析で同一株であった。

3-3 血清中和抗体価

エンテロウイルス(Enterovirus)は血清型の違いにより 67 種類に分けられる。集団発生を起こした Enterovirus はコクサッキーB5 ウイルス(Coxsackievirus B5)と考えられ、感染後に得られる免疫は感染した Coxsackievirus B5 に特異的なものではないが、血清中のウイルスに対する中和抗体価を測定することで、特異的に過去にどの血清型のウイルスに感染したかを推定することができる。

このため、今回使用した株は、平成 28 年 5 月と 6 月に発生動向調査で分離した佐賀分離株 2 株

[調査研究]

(coxsackievirusB5/16s89/saga/2016, coxsackievirusB5/16s121/saga/2016)である。

16s89と16s121の2株についてはAN89とAN88 primerによる解析範囲では、配列が同じであったが、224と222による1,120ntの解析では異なる塩基配列であった。

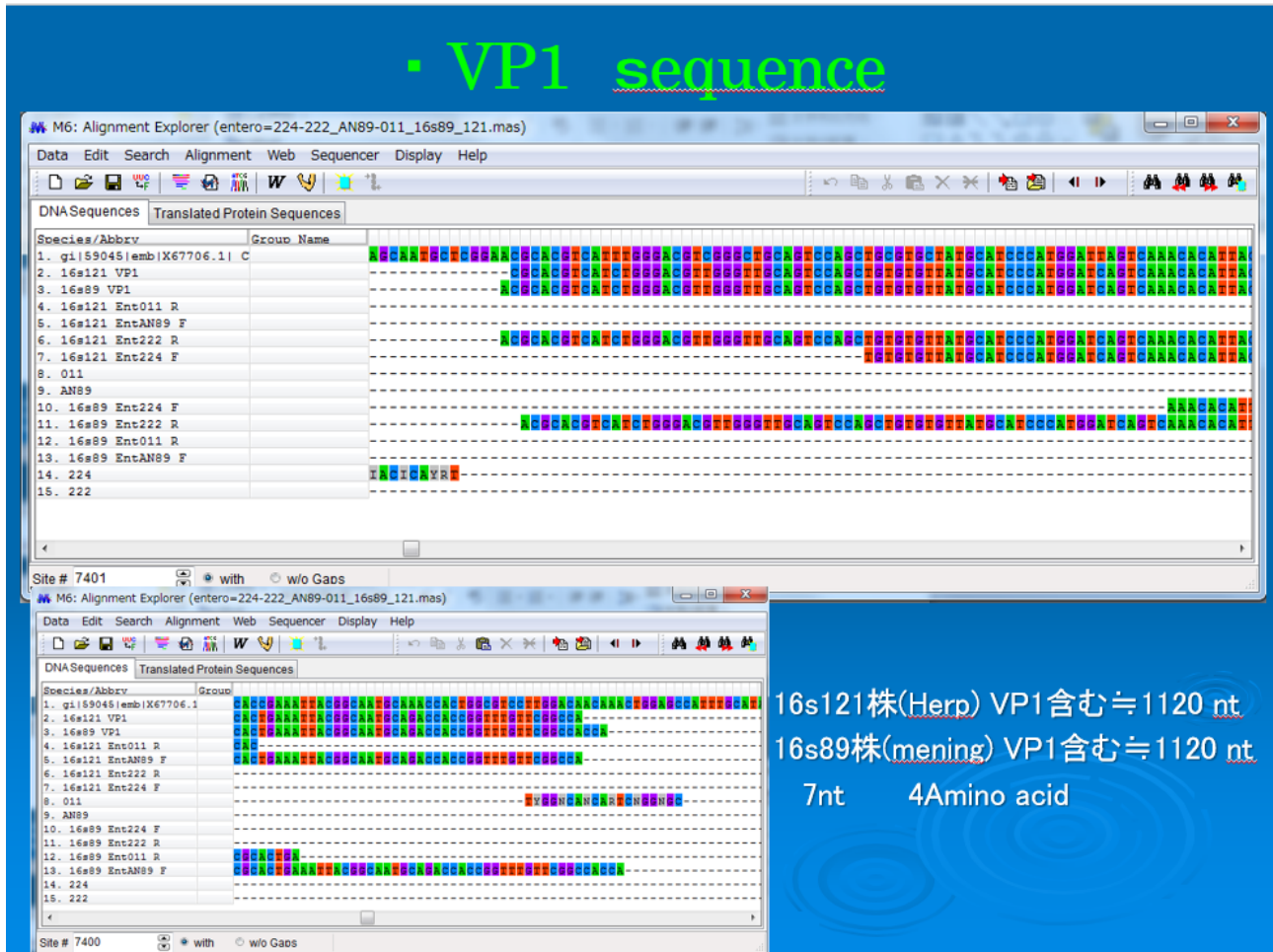


図1 抗原株16s89と16s121のVP1領域1,120ntの遺伝子解析

表8(CoxB5 2株に対する中和抗体価)

患者番号 (発症日)	検体採取日	検体種別	16s89(抗原株)	16s121(抗原株)
患者① (H28/5/14)	H28.6.11 (第29病日)	急性期	1:128	1:128
	H28.6.27 (第45病日)	回復期	1:64	1:8
患者② (不明)	H28.6.16	急性期	1:256	1:16
	H28.8.24	回復期	1:256	1:< 4

[調査研究]

患者③ (H28/5/27)	H28.6.11 (第 16 病日)	急性期	1:16	1:512
	H28.6.27 (第 32 病日)	回復期	1:16	1:4
患者④ (H28/6/4)	H28.6.11 (第 8 病日)	急性期	1:< 4	1:4
	H28.6.27 (第 24 病日)	回復期	1:16	1:< 4
患者⑤ (H28/6/23)	H28.6.27 (第 5 病日)	急性期	1:128	1:4
	H28.7.11 (第 19 病日)	回復期	1:128	8 倍
患者⑥ (H28/7/22)	H28.7.26 (第 5 病日)	急性期	1:128	1:4
	H28.8.5 (第 15 病日)	回復期	1:256	1:32

4 考察

今回、県内において 2016 年 5 月から 7 月にかけて、劇症型心筋炎と診断され検体採取された 6 名の年齢の平均は 58.2 歳(35 歳～84 歳)、性別は男性 3 名、女性 3 名であった。また、発症地域や時期に集積性はなかった。

米国疾病管理・予防センター(CDC)によって 1970-2005 年に報告されたエンテロウイルス検出情報 6)では、20 歳未満においてエンテロウイルス感染症の感染者は男性が多いとされている。しかし、20 歳以上では性別の差がみられなくなる。その理由の一つとして、成人女性は乳幼児との接触機会が多いためであると考えられている。

今回の症例数は男女が 3 名ずつであり、CDC の報告にも合致する。

すべての患者が感冒様症状を発病後、患者①は 3 日後に、患者②は不明、患者③は 12 日後に、患者④は 7 日後に、患者⑤は 4 日後に、患者⑥は 1 日後にそれぞれ劇症型心筋炎を発症している。

この心筋炎の病原体としては、ウイルス、細菌、リケッチア、クラミジア、スピロヘータ、マイコプラズマ、真菌、原虫、寄生虫などが知られている。

これまで、急性心筋炎の原因ウイルスとしてエンテロウイルス、なかでもコクサッキー B 群ウイルスが報告されてきた 3)が、新たな調査・解析ではアデノウイルスやパルボウイルス B19 も多く検出されたとの報告 4)がある。また、HIV 感染症(AIDS)5)や C 型肝炎ウイルスも心筋炎を発症する要因となる 9)。

そして、ウイルス感染は確認できるが心筋炎を発症しない人が存在することも多くの調査で明らかである。

また、組織学的分類から、心筋炎はリンパ球性心筋炎、巨細胞性心筋炎、好酸球性心筋炎、肉芽腫性心筋炎に分類される。リンパ球性心筋炎はウイルス感染によるものが多く、巨細胞性心筋炎、好酸球性心筋炎、肉芽腫性心筋炎は心毒性物質・薬物アレルギー・自己免疫・全身性疾患などの合併症と考えられている。

[調査研究]

早期の診断を行うためには、発病初期に心筋生検を行えば組織診断に基づいた治療計画を立てることが可能であるが、初期には心筋生検が困難である症例や正確な組織診断が難しい症例もある。

心筋炎は、発症様式により、急性心筋炎と慢性心筋炎に分けられる。この急性心筋炎の中で発病初期に心肺危機に陥るものが劇症型心筋炎 (fulminant myocarditis) となる 2)。

ウイルス検査結果の表 3 から表 7 と中和抗体価検査結果の表 8 について、以下のとおりまとめた。

表 9(ウイルス検査結果表 3～表 7 と中和抗体価表 8 のまとめ)

患者番号	抗原検査(RT-PCR および PCR)	抗体検査
患者①	ウイルス検出せず	急性期、回復期検体の採取日が通常の日数を超過している。また、抗体価が高値で推移している。
患者②	CoxB5(便) 単純ヘルペスウイルス 1 型 (咽頭ぬぐい液)	発病日数が不明であるが、抗体価が高値で推移している。
患者③	ヒトパレコウイルス 3 型 (咽頭ぬぐい液)	急性期、回復期検体の採取日が通常の日数を超過している。抗体価が高値である。
患者④	ヒトヘルペスウイルス 4 型 (咽頭ぬぐい液)	抗体価が最大値で 16 である。
患者⑤	ウイルス検出せず	急性期、回復期検体の採取日が通常の日数を超過している。抗体価が高値で推移している。
患者⑥	CoxB5(便)	急性期、回復期検体の採取日が通常の日数を超過している。抗体価が高値で推移している。

エンテロウイルス感染症の間接的診断法として、血清中の抗エンテロウイルス抗体の測定が行なわれる。通常、急性期と回復期の血清を比較して 4～8 倍の抗体価の上昇があれば、ウイルス感染の証明とされるが、エンテロウイルス感染には不顕性感染も多いので、検査結果の評価には注意が必要である。

患者①の CoxB4 抗体価が高いとのデータが入院中の病院から報告されているが、CoxB4 については、フィールドでの高抗体価が報告 7, 10) されており、過去の感染の可能性も考えられた。

急性期と回復期のペア血清での抗体陽転は感染が最近起こった事を意味している。また、表 9 に示したように抗原株によって抗体価が 4 倍未満であったことと、これまでの報告 8) から抗体価 32 倍を超える患者については、過去を含めて CoxB5 に感染した可能性が高いと考えられた。

さらに、抗体価 128 倍以上の患者については、今回の劇症型心筋炎の発症時期と近い時期に感染した 8) ものと考えられた。

劇症型心筋炎の直接的調査として、アメリカのオハイオ州立大学病院で心筋炎の発症後、突然死をした 2～67 歳の患者 13 人 (Male 8, Female 5) の心筋組織標本で、adenovirus、cytomegalovirus、Epstein Barr virus、herpes simplex virus 1 and 2、human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)、influenza A、influenza B、parvovirus、rotavirus、picornavirus (including separate primers for enterovirus and Coxsackie virus A and B)、varicella zoster virus、および respiratory syncytial virus について遺伝子分析した結果では Coxsackie virus B (5 cases)、

[調査研究]

rotavirus (4 cases)、HIV-1 (2 cases)、influenza A (1 case)、influenza B (1 case)となっており、コクサッキーウイルス B 群の検出結果が最多となっている。1)

これらの結果から、患者①は急性期、回復期検体の採取日が通常発病日数を超過しているが、抗体価が 128 から 64 の高値で推移していることから CoxB5 への感染が強く疑われた。

患者②については、発病日が不明であるが抗体価が 256 の高値で推移していること、遺伝子が検出されていることから CoxB5 への感染が考えられた。

患者③は急性期、回復期検体の採取日が通常発病日数を超過しているが、抗体価が 512 の高値であることから CoxB5 への感染が強く疑われた。

患者④については、抗体価の最大値が 16 であることから CoxB5 への感染は低いものと考えられた。

患者⑤は急性期、回復期検体の採取日が通常発病日数を超過しているが、不顕性感染で測定されることがある 8)抗体価 32 より大きい 128 で推移していることから CoxB5 への感染が強く疑われた。

患者⑥については、急性期、回復期検体の採取日が通常発病日数を超過しているが、抗体価が 128 から 256 の高値で推移していること、遺伝子が検出されていることから CoxB5 へ感染したものと考えられた。

文献

- 1) Cioc M. Adina, M.D., Nuovo J. Gerard, M.D. Histologic and In Situ Viral Findings in the Myocardium in Cases of Sudden, Unexpected Death. *Mod Pathol* 2001;15(9):914-922
- 2) Aoyama N, Izumi T, Hiramori K, et al Japanese Investigators of Fulminant Myocarditis: National survey of fulminant myocarditis in Japan: therapeutic guidelines and long-term prognosis of using percutaneous cardiopulmonary support for fulminant myocarditis (special report from a scientific committee) *Circ J* 2002; 66: 133-144
- 3) Banatvala JE, Clements GB. Characteristics of viruses inducing cardiac disease In *Viral infections of the heart* 1993:1-21
- 4) Bowles NE, Ni J, Kearney DL, et al. Detection of viruses in myocardial tissues by polymerase chain reaction Evidence of adenovirus as a common cause of myocarditis in children and adults. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 466-472
- 5) Barbaro G, Di Lorenzo G, Grisorio B, et al Incidence of dilated cardiomyopathy and detection of HIV in myocardial cells of HIV-positive patients. Gruppo Italiano per lo Studio Cardiologico dei Pazienti Affetti da AIDS. *N Engl J Med* 1998; 339: 1093-1099
- 6) Centers for Disease Control and Prevention. Enterovirus Surveillance - United States, 1970-2005. *Surveillance Summaries*, September 15, 2006. *MMWR* 2006;55(No. SS-8), p1-20.
- 7) Fujimoto Tsuguto et al. Seroepidemiological Study on Neutralizing Antibody against Coxsackie B Viruses of Pregnant Women and Children Age 0-9 in Hanshin-area, Hyogo Prefecture. Annual report of Hyogo prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences 2(103-106)2003
- 8) Kitamura Yasushi: VIROLOGICAL STUDY OF IDIOPATHIC CARDIOMYOPATHY: Serological study of virus antibodies and immunofluorescent study of myocardial biopsies. *Jpn Circul J* 45 4:279, 1981
- 9) Matsumori A, Yutani C, Ikeda Y, et al. Hepatitis C virus from the hearts of patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Lab Invest* 2000; 80:1137-1142
- 10) Miura-Ochiai R(1), Shimada Y, Konno T, Yamazaki S, Aoki K, Ohno S, Suzuki E, Ishiko H. Quantitative

[調査研究]

detection and rapid identification of human adenoviruses. J Clin Microbiol. 2007 Mar;45(3):958-67. Epub 2007 Jan 17.

11)渡辺 実 他:コクサッキーウイルス B 群の血清疫学的研究 岐阜県における抗体保有率の推移. 感染症学雑誌, 56, P979-981 (1982)

12)W. Allan Nix, Kaija Maher, Mark A. Pallansch, M. Steven Oberste
Parechovirus typing in clinical specimens by nested or semi-nested PCR coupled with sequencing
Journal of Clinical Virology Volume 48, Issue 3, July 2010, Pages 202-207

13)W. Allan Nix, M. Steven Oberste, and Mark A. Pallansch
Sensitive, Seminested PCR Amplification of VP1 Sequences for Direct Identification of All Enterovirus Serotypes from Original Clinical Specimens.

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Aug. 2006, p2698-2704 Vol. 44, No. 8

14)Yoto Y, et al, Br J Haematol 91: 1017-1018, 1995

15)JOHNSON GRANT, NELSON SUSAN, PETRIC MARTIN, AND TELLIER RAYMOND Comprehensive PCR-Based Assay for Detection and Species Identification of Human Herpesviruses JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Sept. 2000, p.3274-3279

SUMMARY

Myocarditis is clinically and pathologically defined as an inflammation of the heart muscle. The term myocarditis was first used in the 19th century to describe myocardial diseases not associated with valvular abnormalities.

Numerous agents are known to cause these heart infections and viruses are considered to be the most important causative agent. Coxsackieviruses B (CV B) have been involved in 25-40% cases of acute myocarditis and dilated cardiomyopathy in infants and young adolescents.

In the present study, the number of 6 fulminant myocarditis cases suspected clinically, blood, nasopharyngeal swab, urine and feces samples were used according to a protocol.

It was studied prospectively the RD-A, Vero-E6, and Hep-2 cell lines in the isolation of the virus from clinical samples by means of the dish method.

Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) complemented with sequencing and measuring neutralizing antibody titers against the CV-B that could be performed to detect the infectious agents.

In each case, RT-PCR (PCR) amplified viral RNA and DNA was detected: Coxsackie B5 virus (2 cases), Parechovirus (1 case), HHV-1 (1 case), and HHV-4 (1 case).

The patient① sera tested with the CV-B5(16s121,16s89) virus, showed a rise in titer from 1:128 during the 29 days to 1:64 at 45 days after onset.

In each titers show as follows: patients② 1:256 (UNK) to 1:256 (UNK),

patients③ 1:512(16 days) to 1:4(32 days), patients④ <1:4 (8 days) to 1:16(24 days), patients⑤ 1:28(5 days) to 1:128(19 days) and patients⑥ 1:128 (5 days) to 1:256(15 days).

These results suggest a relationship CV-B5 infection of the fulminant myocarditis.