

東京都における小児肝炎疑い事例の検査結果について (2022年4-7月)

藤原 卓士^a, 浅倉 弘幸^a, 永野 美由紀^a, 鈴木 愛^a, 矢尾板 優^a, 磯貝 まや^a, 根岸 あかね^a,
河上 麻美代^a, 伊藤 仁^a, 黒木 絢士郎^a, 横田 翔太^a, 北村 有里恵^a, 林 志直^a,
三宅 啓文^b, 長島 真美^a, 貞升 健志^b

2022年4月以降, 小児における原因不明の急性肝炎が欧米やアフリカ地域で多数報告されている。現在アデノウイルス F41 の関与が疑われているが, 原因の特定には至っていない。また, アデノウイルスが検出された幾つかのケースの中には SARS-CoV-2 が検出された場合もあり, SARS-CoV-2 と肝炎との関連性が懸念されている。2022年4-7月の間に東京都健康安全研究センターに原因不明の小児肝炎疑いで積極的疫学調査として搬入された 18 事例 73 検体について病原体核酸多項目同時測定試薬 (2 種類) を用いて病原微生物のスクリーニング検査を行った。陽性となった病原体については別途 nested PCR を実施後, ダイレクトシーケンス法による塩基配列の決定を行った。血清 17 検体については新型コロナウイルス感染症の抗 S 抗体及び抗 N 抗体の抗体価を測定した。4 事例がスクリーニング検査の結果陽性となり, アデノウイルス F41 が 1 件, パラインフルエンザウイルス 1 が 1 件, ライノウイルス A34 と B3 が検出された。SARS-CoV-2 の抗 N 抗体は 2 事例 (11.8%), 抗 S 抗体は 9 事例 (52.9%) で検出された。少数ではあるが肝炎疑いで搬入された検体の中に, アデノウイルス F41 と同様に SARS-CoV-2 感染が疑われる事例が確認された。

キーワード: 小児肝炎, アデノウイルス, 病原体核酸多項目同時測定試薬, FilmArray消化管パネル, FilmArray呼吸器パネル2.1

はじめに

肝炎とは, 何らかの原因によって肝細胞が炎症を起し, 破壊されている症状である。肝炎の原因は, 薬品, 飲酒からくるエタノール, 自己免疫によるものなど様々なものがあるが, 最も多いのはウイルス感染によるものである。国の調査¹⁾によると, 肝炎 (ウイルス性肝炎) の持続感染者は, B型が110~120万人, C型が90~130万人存在すると推定されており, 国内最大級の感染症と言われている。

小児における原因不明の急性肝炎は, 2022年4月5日から7月8日までの約3ヶ月の間にWHOに35ヶ国から1,010例報告された²⁾。WHOによると, 症例の約半数はヨーロッパから報告されており, 英国からの272例を合わせて21カ国から484例の可能性例であった。また2番目に多い可能性例は, アメリカ地域からアメリカ合衆国の334例を含む435例であった。海外ではアデノウイルスF41型の関与が疑われており, ヨーロッパでは30名, アメリカでは1名から検出されている²⁾。

国内では 2022 年 8 月 15 日現在, 2021 年 10 月以降に小児の原因不明の急性肝炎の入院症例が 67 件発生しており, アデノウイルスの PCR 検査での陽性例が 5 件, SARS-CoV-2 の PCR 検査での陽性例が 5 件報告されている³⁾。ただし, このアデノウイルス陽性例については 2 件について型

別が行われ 1 型及び 2 型と判明しており, 原因不明の小児肝炎の原因²⁾と疑われているアデノウイルス F41 型ではなかった。

東京都でも積極的疫学調査の一環として, 小児の原因不明の急性肝炎に関する調査を行っている⁴⁾。世界の複数の国でアデノウイルスF41型の関与が疑われているが, 原因が特定できていないことから, アデノウイルスを含み, 一度に複数の病原体検出が可能な病原体核酸多項目同時測定試薬 (2種類) を用いて病原体の検出を試みた。また, アデノウイルスを検出した小児の検体から新型コロナウイルスが検出された事例もある⁵⁾ことから, SARS-CoV-2 の抗体価の測定も行ったのであわせて報告する。

実験方法

1. 供試材料

2022年4-7月の期間に積極的疫学調査事業で東京都健康安全研究センターに搬入された小児の肝炎疑いの18事例, 73検体を対象とした。

検体の内訳は, 血液14件, 血清20件, 糞便15件, 尿10件, 咽頭拭い液13件及び鼻腔拭い液1件である。糞便は PBS (日水製薬) を加えて10%乳剤を作製し供試材料とした。

^a 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター微生物部

表 1. FilmArray 呼吸器パネル 2.1 の検出対象微生物

Adenovirus	Coronavirus 229E	Coronavirus HKU1
Coronavirus NL63		Coronavirus OC43
Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2(SARS-CoV-2)		
Human Metapneumovirus		Human Rhinovirus/Enterovirus
Influenza A	Influenza B	Parainfluenza Virus 1
Parainfluenza Virus 2		
Parainfluenza Virus 4		Respiratory Syncytial Virus
Bordetella parapertussis(IS 1001)		Bordetella pertussis(PTXp)
Chlamydia pneumonia		Mycoplasma pneumonia

表 2. FilmArray 消化管パネルの検出対象微生物

Campylobacter	Clostridium difficile toxin A/B	
Plesiomonas shigelloides	Salmonella	
Vibrio	Vibrio cholera	Yersinia enterocolitica
Enterococci (EAEC)	Enteropathogenic E. coli(EPEC)	
Enterotoxigenic E. coli(ETEC) lt/st	Shiga-like toxin-producing E. coli(STEC) stx1/stx2	
E. coli O157	Shigella/Enteroinvasive E. coli(EIEC)	
Cryptosporidium	Cyclospora cayentanensis	Giardia lamblia
Adenovirus F 40/41	Astrovirus	Norovirus GI/GII
Rotavirus A	Sapovirus	

2. 病原体核酸多項目同時測定試薬を用いたスクリーニング検査

呼吸器疾患の病原体検査にはバイオメリュー社製 FilmArray呼吸器パネル2.1 (以下, 呼吸器パネル) (表1) を, 腸管系疾患の病原体検査にはバイオメリュー社製 FilmArray消化管パネル (以下, 消化管パネル) (表2) を用いた. 呼吸器パネルでは供試材料300 μ Lを, 消化管パネルについて供試材料200 μ Lを用いてそれぞれの添付文書^{6,7)}に従い, 測定を行った.

3. ダイレクトシーケンス法による塩基配列の決定

呼吸器パネル及び消化管パネル検査により陽性を示した検体について, ウイルスの型別を目的に塩基配列の解析を行った. 供試材料から QIAmp Viral RNA mini Kit

(QIAGEN) を用いて核酸を抽出し, 抽出した核酸について既報^{8,9)} による nested PCR を行った後, 電気泳動により PCR の増幅を確認した. ゲルより目的のバンドを切り出した後, QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN) で精製した. 精製した PCR 産物について BigDye v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) でシーケンス反応を行い, ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で塩基配列を決定した.

4. 血清における新型コロナウイルスの抗体検査

血清で搬入された20件について, SARS-CoV-2 IgG試薬 (Abbott社) を用いて血清中の抗N抗体を, SARS-CoV-2 IgGII試薬 (Abbott社) を用いて血清中の抗S抗体を測定した (倫理的配慮: 東京都健康安全研究センター倫理委

表 3. 呼吸器パネル及び消化管パネル測定の結果

No.	搬入日	性別	年齢	全血	血清	糞便	咽頭	尿	鼻腔液
1	4月27日	男 ^{*1}	8		(-)				
	5月9日	同上 ^{*1}	同上	(-)		(-)	(-)	(-)	
2	4月28日	女	11		(-)	(-)	(-)		
3	4月28日	女	15	(-)		(-)	(-)		
4	5月9日	男	5		(-)				
5	5月19日	女	5	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
6	5月25日	女	4	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
7	5月25日	女	5	(-)	(-)	(-)		(-)	(-)
8	6月3日	女	3	(-)	(-)	(-)			
9	6月6日	女	2M	(-)	(-)	(+) ^{*4}	(+) ^{*4}	(-)	
10	6月8日	女	13		(-)	(-)	(-)	(-)	
11	6月13日	女	9	(-)	(-)	(-)	(-)		
12	6月16日	男	1	(-)	(-)	(-)	(+) ^{*4}		
13	6月17日	男 ^{*2}	4M		(-)				
		同上 ^{*2}	同上		(-)				
		同上 ^{*2}	同上		(-)				
14	7月4日	不明	9	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
15	7月6日	男	5	(-)	(-)		(-)	(-)	
16	7月22日	女 ^{*3}	2M	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
		同上 ^{*3}	同上		(-)				
17	7月22日	男	4	(-)	(-)	(-)	(+) ^{*5}	(-)	
18	7月27日	女	2	(+) ^{*6}	(+) ^{*6}	(+) ^{*6}			

*1, *2, *3 についてはそれぞれ同一人物

*4 Human Rhinovirus/Enterovirus, *5 Parainfluenza Virus 1, *6 Adenovirus

(消化管パネルについては*6 以外全て(-), *6 は Adenovirus F40/41)

表 4. 小児肝炎疑いの血清検体中の新型コロナウイルスに対する抗体価

No.	性別	年齢	抗 N 抗体価	抗 S 抗体価
			IgG (Index) cutoff 1.4Index	IgGII (AU/mL) cutoff 50.0AU/mL
1	男	8	0.48	<u>55.2</u>
2	女	11	0.08	<u>3101.4</u>
4	男	5	0.10	0.0
5	女	5	0.02	<u>5856.6</u>
6	女	4	0.02	0.0
7	女	5	<u>3.88</u>	<u>521.8</u>
8	女	3	0.12	16.6
9	女	2M	0.02	0.0
10	女	13	0.68	<u>4727.8</u>
11	女	9	0.02	<u>187.0</u>
12	男	1	0.06	0.0
13	男	4M	0.16	<u>53.6</u>
			0.16	48.8
			0.16	46.4
14	不明	9	0.32	<u>199.0</u>
15	男	5	0.06	0.0
16	女	2M	0.00	0.0
			0.04	0.0
17	男	4	0.04	0.0
18	女	2	<u>5.28</u>	<u>190.0</u>

注) 下線は陽性を示す

員会に承認されている, 3健研健第381号)。

結果及び考察

1. 呼吸器パネル及び消化管パネルによる病原微生物の検出

搬入された18事例, 73検体について, 呼吸器パネル及び消化管パネルによる検査を行った(表3)。呼吸器パネルによる検査の結果, No. 9の糞便及び咽頭拭い液, 及びNo. 12の咽頭拭い液からライノウイルス/エンテロウイルスが, No. 17の咽頭拭い液からパラインフルエンザウイルス1が, No. 18の全血, 血清及び糞便の3検体から アデノウイルスが検出された。No.18の3検体については, 消化管パネルによる検査の結果, アデノウイルスF 40/41が検出された。なお, SARS-CoV-2を含むそれ以外の病原体は検出されなかった。

2. ダイレクトシーケンス法による塩基配列の決定

病原体核酸多項目同時測定試薬では検出されたウイルスの型までは判別できないため, 別途 nested PCR を実施した後, 塩基配列解析によりウイルス型別を行った。

パラインフルエンザウイルス1が検出された1検体を除く陽性6 検体に対し, 検査を実施したところ, ライノウイルス/エンテロウイルスが検出された検体についてはライノウイルスB3とA34に, アデノウイルスが検出された検体についてはアデノウイルスF41に決定された。ライノウイルス B3及びA34についてはライノウイルスにおいて一般的にみられる型であり, アデノウイルスについては英国等で小児の肝炎の原因とされているF41型であった。

3. 小児急性肝炎疑い例における新型コロナウイルスの抗体保有状況

搬入された血清17事例20検体について抗体価を測定した結果(表4), 2検体が抗N抗体, 抗S抗体ともに陽性となり, 7検体が抗S抗体のみ陽性となった。抗N抗体, 抗S抗体ともに陽性を示した2検体のうち, 1例 (No. 18) は血清と一緒に搬入された全血, 糞便を加えた3 検体全てからアデノウイルスF41が検出されていた。もう1例 (No. 7) は, 今回行った2種類のパネル検査の全ての項目で陰性であった。また, 抗S抗体のみ陽性となった7検体も同様に2種類のパネル検査で全て陰性であった。

一般的に, 抗N抗体が検出されず抗S抗体のみが検出された場合, 新型コロナウイルスのワクチンを接種した可能性が高いと言われている。我が国では, 2022年3月から(自治体の準備状況によっては同2月末から), 小児(5-11歳)に対して全国の自治体はワクチン接種の機会を提供している¹⁰⁾が, 抗S抗体のみ陽性を示した7名のうち2名は5歳未満でありワクチン接種の可能性は低いとも考えられた。全国の5-11歳の小児のワクチン接種率は, 2022年8月15日現在で1回以上接種者が19.10%, 2回接種完了者が

17.10%であり⁹⁾, それほど小児の接種は進んでいない状況がある。また小児肝炎が報告される国ではオミクロン株感染者が多いとの報告¹¹⁾もあり, その中では「予防接種の対象者ではない小児で, 英米規模のように自然感染すると, 小児急性肝炎に罹患するリスクを伴うと考えられる」とも報告されている。このことから, 今後小児肝炎とCOVID-19との関係性把握のためにも新型コロナウイルスの抗体価を継続して測定していく必要があると考えられた。

ま と め

2022年4-7月の間に当センターに小児肝炎疑いで積極的疫学調査として搬入された18事例73検体について呼吸器及び消化管パネルを用いて病原性ウイルスのスクリーニング検査を行った。陽性になった検体についてはダイレクトシーケンス法による塩基配列の決定を行った。その結果, 1例のみアデノウイルスF41が検出された。血清については, 新型コロナウイルス感染症の抗S及び抗N抗体の抗体価を測定し, アデノウイルスF41が検出された小児の血清からCOVID-19への感染履歴を推察させる抗N抗体が検出された。また, 両検査パネルで病原体が検出されなかった9事例からSARS-CoV-2の抗体が検出された。

文 献

- 厚生労働省: 肝炎総合対策の推進, https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou09/hepatitis_about.html (2022年8月15日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- WHO: Severe acute hepatitis of unknown aetiology in children-Multi-country, <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2022-DON400> (2022年8月15日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 厚生労働省: プレスリリース小児の原因不明の急性肝炎について(令和4年7月1日), https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage_26578.html (2022年8月15日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 東京都福祉保健局感染症対策部長: 欧州及び米国における小児の原因不明の急性肝炎の発生について(協力依頼) 令和4年5月17日
- Gao, S.H., Gong, M.C., Song, H.M.: *World J. Pediatr.*, **18**, 529-532, 2022.
- FilmArray呼吸器パネル2.1添付文書, https://www.info.pmda.go.jp/tgo/pack/30200EZX0003200_A_04_01/ (2022年8月15日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性はある)

- 7) FilmArray消化管パネル添付文書,
https://www.info.pmda.go.jp/tgo/pack/30300EZX00032000_A_02_01/
(2022年8月15日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 8) Nix, W.A., Aoberste, M.S., Pallansch, M.A.: *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 2698–2704, 2006.
- 9) 国立感染症研究所：咽頭結膜熱・流行性角結膜炎検査, 診断マニュアル (第3版)
- 10) 首相官邸HP：新型コロナワクチンについて,
<https://www.kantei.go.jp/jp/headline/kansensho/vaccine.html>
(2022年8月15日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 11) 厚生労働省：全第83回新型コロナウイルス感染症対策アドバイザリーボード (令和4年5月11日),
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000121431_00348.html
(2022年8月15日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)

Inspection Results of Suspected Childhood Hepatitis Cases in Tokyo (April 2022 to June 2022)

Takushi FUJIWARA^a, Hiroyuki ASAKURA^a, Miyuki NAGANO^a, Ai SUZUKI^a, Yu YAOITA^a, Maya ISOGAI^a, Akane NEGISHI^a, Mamiyo KAWAKAMI^a, Hitoshi ITO^a, Kenshiro KUROKI^a, Shota YOKOTA^a, Yurie KITAMURA^a, Yukinao HAYASHI^a, Hirofumi MIYAKE^a, Mami NAGASHIMA^a, and Kenji SADAMASU^a

From April to July 2022, the FilmArray Respiratory 2.1 and Gastrointestinal Panels were used to screen 73 specimens from 18 cases of suspected pediatric hepatitis brought to the Tokyo Metropolitan Institute of Public Health as part of active epidemiological surveillance. The positive samples were sequenced using nested polymerase chain reaction (PCR), RT-nested PCR, and direct sequencing methods, and the antibody titers of anti-S and anti-N antibody titers for the SARS-CoV-2 were measured in the 18 samples. The screening revealed four positive cases, and typing by sequencing revealed one case of adenovirus F41, one case of parainfluenza virus 1, and two cases of rhinoviruses A34 and B3. SARS-CoV-2 anti-N antibodies were found in two samples, and anti-S antibodies were found in nine samples. A case of suspected SARS-CoV-2 infection was confirmed in samples from children with hepatitis.

Keywords: childhood hepatitis, adenovirus , FilmArray gastrointestinal panel, FilmArray respiratory 2.1 panel

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan