

呼吸器ウイルス感染症患者検体からのウイルス検出状況

和田美江子・飯塚節子

キーワード：呼吸器ウイルス

Detection of Various Respiratory Viruses from Acute Respiratory Infections in Shimane

Mieko WADA, Setsuko IIZUKA

Key word: Respiratory Virus

1. はじめに

当所で、2009 年及び 2010 年に行った調査研究事業「重症呼吸器ウイルス感染症のサーベイランス・病態解明及び制御に関する研究（厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）」を実施するにあたり、呼吸器系ウイルス感染症の原因ウイルスとして RS ウイルス(以下、「RSV」)、ヒトメタニューモウイルス(以下、「hMPV」)、ヒトライノウイルス(以下、「HRV」)、パラインフルエンザウイルス(以下、「PIV」)、ボカウイルス(以下、「HBoV」)、サフォードカルジオウイルス(以下、「SAFV」)]について検査体制が整えられた。

RSV は、乳幼児の下気道炎の主因ウイルスであり、感染症発生動向調査では、RS ウイルス感染症として小児科定点把握疾患となっている。また、hMPV は RSV に次ぐ、乳幼児の下気道炎の原因ウイルスとされ、臨床現場で注目されてきている。さらに、軽症の上気道炎の原因とされていた HRV は、喘息との関連が注目されるなど、呼吸器ウイルス感染症の原因ウイルスの検索の重要性が増してきていることから、引き続き、感染症発生動向調査事業の病原体サーベイランスの一環として、検査を実施している。今回、2007 年 2008 年検体の検査を遡り実施し、7 年間の検出状況として把握した。

2. 材料と方法

2. 1 対象検体

・2007 年 2008 年の検体については、2012 年から 2013 年にかけて自主研究として検査を実施した。病原体サーベイランスで呼吸器ウイルス感染症と診断され、原因ウイルスが特定されていない検体から抽出した各々、95 件、109 件の鼻腔/咽頭拭い液。

・2009 年 2010 年の検体は、病原体サーベイランスで

呼吸器ウイルス感染症と診断された鼻腔/咽頭拭い液、それぞれ 272 件、188 件と、2009 年に 2 つの高齢者福祉施設における集団発生事例（後に hMPV によるものと判明）の患者から採取された鼻腔拭い液 12 件。

・2011 年から 2014 年 5 月までのサーベイランスで呼吸器ウイルス感染症と診断された患者検体（咽頭/鼻腔拭い液及び便）各年、137 件、301 件、272 件、146 件（～5 月末まで）。RSV、hMPV、PIV については、咽頭/鼻腔拭い液のみを検査対象とし、HBoV は、4 歳以下を対象とした。

表 1、当所で使用しているPrimer

Virus	Primer	Sequence(5'→3')	Target gene
RSV ¹⁾	22K1	ATGTCACGAAGGAATCCTTGC	M2
	22k2	TAGCTCTTCATTGTCCCTCAGC	
	22k3	GAGGTCATTGCTTAAATGG	
	22k4	GCAACACATGCTGATTGT	
(注) ²⁾	ABG490	ATGATTWYCAITTTGAAGTGTTTC	G
	F164	GTTATGACACTGGTATACCAACC	
	AG655	GATCYCAAACCTCAAACCCAC	
	BG517	TTYGTTCCCTGTAGTATATGTG	
hMPV ³⁾	hMPV-1f	CTTTGGACTTAATGACAGATG	F
	hMPV-1r	GTCTTCCTGTGCTAACTTTG	
	hMPV-2f	CATGCCGACCTCTGCAGGAC	
	hMPV-2r	ATGTTGCAITCYTTTGATTG	
HRV ⁴⁾	HRV 9895-F	GGGACCAACTACTTTGGGTGTCGGTGT	VP4-2
	HRV 9565-R	GCATCIGGYARYTTCCACCACCANCC	
PIV1 ⁵⁾ PIV2 PIV3	PIV1-1F	CCTTAAATTCAGATATGTAT	N
	PIV1-1R	GATAAATAATTATTGATACG	
	PIV1-2F	CCGGTAATTTCTCATACCTATG	
	PIV1-2R	CTTTGGAGCGGAGTTGTTAAG	
	PIV2-1F	AACAATCTGCTGCAGCATT	
	PIV2-1R	ATGTCAGACAAATGGGCAAAT	
	PIV2-2F	CCATTTACCTAAGTGATGGAAT	
	PIV2-2R	GCCCTGTTGTATTTGGAAGAGA	
	PIV3-1F	CTGTAAACTCAGACTTGTA	
	PIV3-1R	TTTAAGCCCTTGCAACAAC	
	PIV3-2F	ACTCCCAAAGTTGATGAAAGAT	
	PIV3-2R	TAAATCTTGTGTTGAGATTG	
	PIV4-1F	CTGAACGGTTGCATTCAGGT	
	PIV4-1R	AGGACTCATTCTTGATGCAA	
PIV4-2F	AAAGAATTAGGTGCAACCAGTC		
PIV4-2R	GCTGCTTATGGGATCAGACAC		
HBoV ⁷⁾	HBoV 188F	GACCTCTGTAAGTACTATTAC	NP1
	HBoV 542R	CTCTGTGTTGACTGAATACAG	
SAFV ⁸⁾	315F	HAARCARGRYTGGARYTTYNTNATGTT	VP1
	738R	DGGBCKDGGRCARWAVACYCTCAT	

(注)2011年にG-geneをターゲットとしたPrimerに変更

2. 2 遺伝子検査方法

検体から QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いて核酸を抽出し、HBoV についてはそのまま試料とし、AmpliTaq Gold 360 Master Mix (Applied biosystems 社製) を用いて PCR を実施した。抽出した RNA は、DNase 処理を行った後、HRV 及び SAFV については OneStep RT-PCR キット (QIAGEN 社製)、RSV、hMPV、PIV については、High-Capacity cDNA Reverse Transcription キット (Applied biosystems 社製) により cDNA の合成を行い、AmpliTaq Gold 360 Master Mix を用いて nested PCR 法を実施した。得られた増幅産物を用いてダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し同定した。

使用したプライマーは表 1 のとおりである。

2. 3 分離培養

検体を、呼吸器系ウイルスの分離を目的に、Hep2、VeroE6、HeLa(ohio)の細胞に接種するとともに、FL、MDCK、A549、RD-A に接種した。

3. 結果と考察

3. 1 経年の検出状況

・RSV：114 件検出。例年冬季に検出数が多いが、2012/13 シーズンには、秋季に 19 件、2013/14 シーズンは、夏季 10 件、秋季 10 件と流行のピークが早くなってきている (図 1-1)。今後も、この傾向が続くのか注視が必要である。

・hMPV：65 件検出。一般に言われる春季に多いとされる季節性はみられなかった。2009 年夏季と 2011 年秋季を中心に検出数が多かった (図 1-1)。hMPV は、一旦流行が始まると、比較的長期間流行が続く傾向がうかがえた。

・HRV：87 件検出。季節性はみられない。2012 年春季からの検出数が増加している (図 1-2)。

・PIV：PIV1 は 19 件、PIV2 は 27 件、PIV3 は 14 件検出した。当所では、PIV4 の検出はなかった。全国的に PIV の中で PIV3 が 6 割程度占めるとされているが、当所では PIV3 の検出数は少ない傾向にある。2012 年夏季から冬季まで PIV2 の検出数が多く、秋季をピークとした流行があったのではないかと考えられた。検出数は少ないが、PIV3 は、夏季に検出される季節性がみられるが、PIV1、PIV2 は季節性は認められない (図 1-3)。

・HBoV：27 件検出。2012 年の冬季までの 5 年間、殆ど検出されていなかったが、2012 年春季から検出が続いており、同時期から HRV の検出数も増加していることから、関連があるのではないかと推察される。今

後の HRV と HBoV の動向について注視したい (図 1-2)。

・SAFV：5 件検出。年 1 件程度と、殆ど検出されていない (図 1-2)。

3. 2 呼吸器系ウイルス検出者の年齢区分 (図 2)

・RSV：2 歳以下が 7 割を占めている。

・hMPV：2 歳以下が 4 割で、50 歳以上が 3 割を占めている。調査期間中、福祉施設での集団発生事例が発生し、50 歳以上の半数を占め、結果に大きく影響した。

・HRV：2 歳以下が 6 割を占めていた。

・PIV：PIV1 は、3 歳から 4 歳が 4 割近くを占め、RSV に比して年齢が高い層の割合が高かった。PIV2 は、5 歳以上 14 歳が 1/4 を占め PIV1 に比して更に年齢が高い層の割合が高かった。PIV3 は、1 歳以下が 8 割を占めていた。

・HBoV：5 歳以下で 100%罹患するとされ、当所でも 4 歳以下を対象に検査を実施した。0 歳に比して 1 歳の割合が高く、1 歳以下が 8 割以上を占めていた。

3. 3 各細胞での呼吸器系ウイルスの分離状況

・2012 年 7 月から 2014 年 5 月末までの検体からのウイルス分離状況をまとめた (表 2)。

表 2 各細胞ごとのウイルス分離状況

ウイルス 細胞	RSV		hMPV		HRV		PIV2	
	分離数	率	分離数	率	分離数	率	分離数	率
VeroE6	3	5.4	4	36.4			3	13.6
Hep2	7	12.5						
HeLa(ohio)	4	7.1			6	12.0		
RD-A					3	6.0		
分離数(注)	7	12.5	4	36.4	9	18.0	3	13.6
陽性検体数	56		11		50		22	

注：複数の細胞で分離できた株は、1 株として計上した

・RSV：陽性検体 56 件の内、Hep2 で 7 件 (12.5%)、VeroE6 で 3 件 (5.4%)、HeLa(ohio) で 4 件 (7.1%) 分離した。VeroE6、HeLa(ohio) で分離できたものは、全て Hep2 でも分離している。

・hMPV：陽性検体 11 件の内、VeroE6 で 4 件 (36.4%)、分離した。1 件は、インフルエンザウイルス (以下、「Inf」) が MDCK で分離された検体から、また、検体からの遺伝子検査で陰性であったものからの分離陽性例も 1 件みられた。

・HRV：陽性検体 50 件の内、HeLa(ohio) で 6 件 (12.0%)、RD-A で 3 件 (6.0%) 分離、計 9 件 (18.0%) 分離された。

・PIV：PIV の内、VeroE6 で明らかな CPE が確認できたのは PIV2 のみで、陽性検体 22 件の内、VeroE6 で 3 件 (13.6%) 分離した。

・SAFV：分離していない。

3.4 同一検体からの複数ウイルスの検出状況

同一検体から、遺伝子検査や分離培養により、呼吸器ウイルスが複数検出されたり、対象となる呼吸器ウイルス以外の、Inf、アデノウイルス（以下、「Adeno」）やコクサッキーウイルス A、コクサッキーウイルス B、エコーウイルス、パレコウイルス（以下、「Entro」にまとめた）の複数のウイルスが検出された（表3）。いずれかの呼吸器ウイルスが検出された検体数は330件で、このうち2種検出されたのは47件、3種検出されたのは4件であった。呼吸器ウイルスの中では、HBoVが複数で検出される場合が1/3と高率で、HRVが3件、Entroが2件検出された（表3）。

4. まとめ

呼吸器ウイルス感染の原因ウイルスとして、RSV、hMPV、HRV、PIV1-4、HBoV、SAFVの検出を試みた。RSVは、冬季に流行する傾向が近年早くなっていること、hMPVは、季節性がなく一旦流行が始まると比較的長期間流行が持続することがわかってきたが、今後の動向についても注目していくべきだと思われる。HBoVは、殆ど検出されなかったが、2012年春季から

時期に検出数の増えたHRVとの関連があるのか等、今後の検出状況が期待される。検出例が少ないウイルスについては、更に、長期にわたる調査を実施すべきだと思われた。

ウイルスの分離は、最長3週間培養を3代継代するウイルスもあり、細胞の取り扱いや、CPEの観察方法を習熟する必要がある。また、CPEが確認しにくいウイルスや、検体からの遺伝子検査で既に陽性結果が判明している場合の分離ウイルスの簡易な確認方法について、検討する必要がある。

参考

- 1) O'Donnell DR. et al: J Pediatr 133,272(1998)
- 2) Kazuko G-Sugai, et al: Jpn.J.Infect.Dis 63,393(2010)
- 3) 高尾 信一ら: 感染症学雑誌 78,2,129(2004)
- 4) Savolainen C., et al: J Gen Virol.83,333(2002)
- 5) Echevarria J.E., et al: J.Clin.Microbiol.36,1388(1998)
- 6) Jose C.A, et al: J,Clin, Microbiol 38,1191(2000)
- 7) Allander T, et al: Proc Natl Acad 102,12891(2005)
- 8) Hiroyuki T, et al: Lab Epi Com, 378(2010)

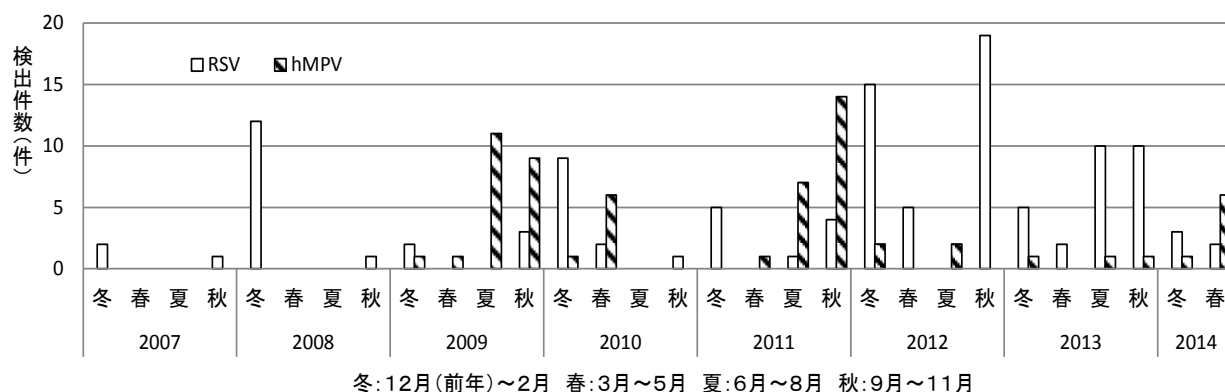


図1-1 経年の検出数の推移(RSV、hMPV)

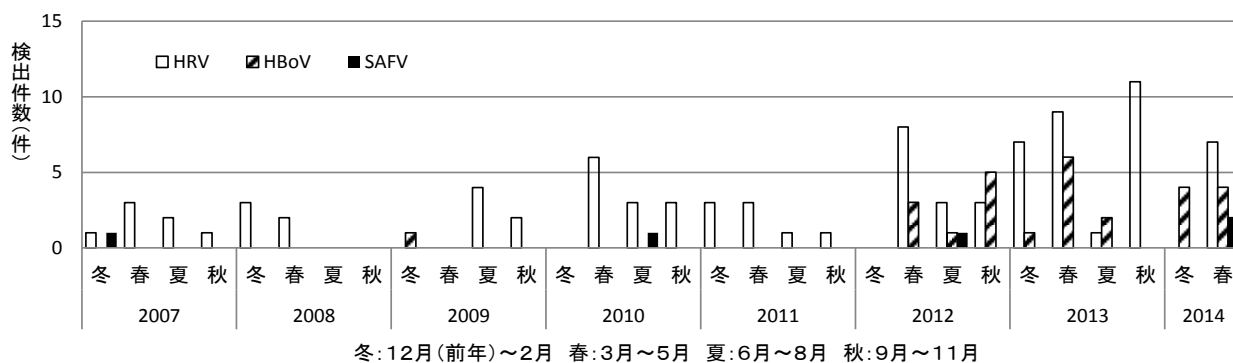


図1-2 経年の検出数の推移(HRV、HBoV、SAFV)

検出が続いており、この状況は、一過性のものか、同

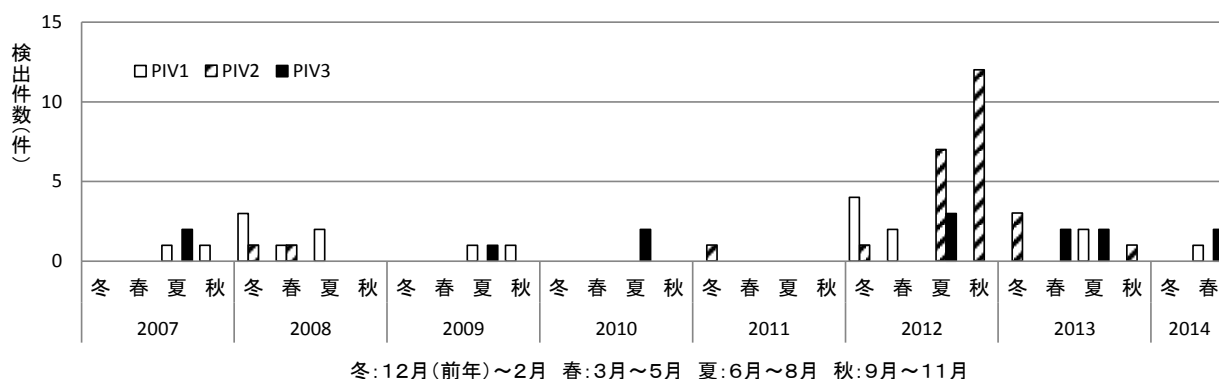


図1-3 経年の検出数の推移(PIV1、PIV2、PIV3:PIV4は未検出)

表3 検出ウイルスの複数検出状況

	検出数	RSV	hMPV	HRV	PIV1	PIV2	PIV3	HBoV	SAFV	Inf	Adeno	Entero	3種のウイルス検出例
RSV	114	87(76.3)	5	2	3	3			1		3	8	HRV,PIV1 PIV2,Entero
hMPV	65		54(83.1)	2						2	1		HBoV,Adeno
HRV	87			70(80.4)	1		1	3		2	3	1	PIV3,Adeno
PIV1	19				13(68.4)							1	
PIV2	27					22(81.5)		1					
PIV3	14						11(78.6)	1					
HBoV	27							18(66.7)				2	
SAFV	5								4(80.0)		1		

()内は、単独で検出された検体数／検出数(%)

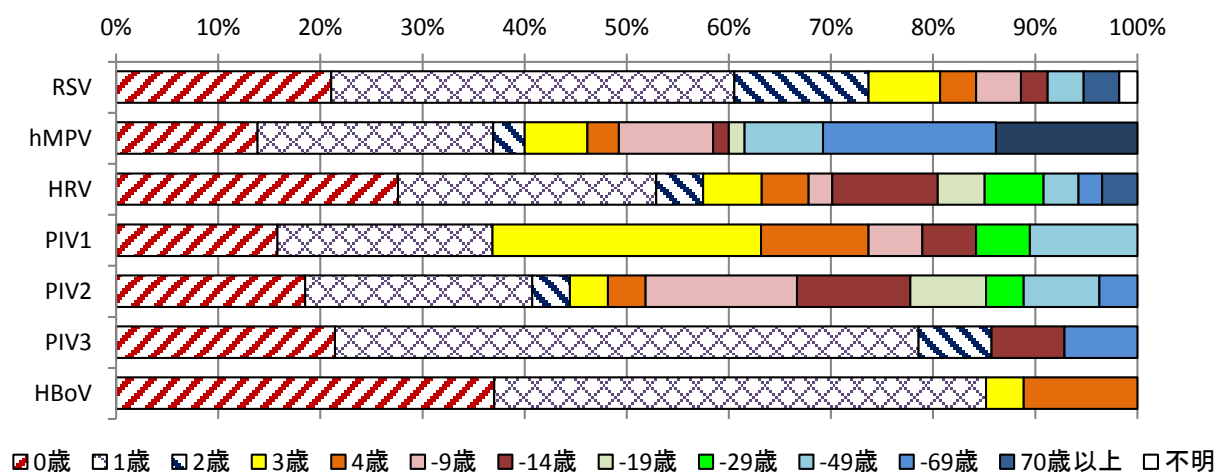


図2 ウイルス検出者の年齢区分 (HBoVは、4歳以下を対象に検査を実施)