

## 千葉市内の1小児科クリニックにおける重症呼吸器ウイルスの検出状況

田中俊光、小林圭子、横井一

### 要旨

2009年1月から2010年12月までの期間に、千葉市内の1小児科クリニックで採取された鼻汁145検体について、重症呼吸器ウイルスの検出を行った。鼻汁145検体中、(RT-)PCRによる各ウイルスの検出数(検出率)は、RSウイルス(RSV)が72検体(49.7%)、ヒトライノウイルス(HRV)が36検体(24.8%)、ヒトメタニューモウイルス(hMPV)が8検体(5.5%)、ヒトポカウイルス(HBoV)が8検体(5.5%)であった。また、培養細胞によりが24検体からRSVが分離され、分子系統解析を行った結果、13検体からサブグループA(遺伝子型GA2が12株、GA5が1株)、10検体からサブグループB(遺伝子型BA)が検出された。また、1株からサブグループA(遺伝子型GA2)とB(遺伝子型BA)の両方が検出された。

### 1 はじめに

重症呼吸器ウイルスの包括的なサーベイランスの一環として、1小児科クリニックにおいて下気道炎、またはRSV感染症と診断された患者を対象にRSV、HRV、hMPV、HBoVの検出を行い、病原ウイルスの特定及び系統解析をすることにより地域的な流行状況を把握し、公衆衛生行政における感染症予防対策に活用することを目的とした。

### 2 方法

2009年1月から2010年12月までの期間に、千葉市内の1小児科クリニックで下気道炎(肺炎、気管支炎)と診断された89名の患者、及びRSV感染症と診断された56名の患者の計145名から、受診時に保護者の同意を得た上で採取した鼻汁を検体とした。Nylon Regular Flocked Swab(Copan)で鼻汁を採取の後、Universal Transport Medium(Copan)に良く浸し、10以下で保持して1週間以内に当所に搬入した。搬入後、速やかに遠心分離を行い、その上清を分取してHigh Pure Viral RNA Kit(Roche)を用いてウイルス核酸を抽出した。(RT-)PCRは病原体検出マニュアル(国立感染症研究所)に準拠した。すなわちRSVについてはStocktonらの報告したN蛋白領域を標的とした方法、HRVについてはSavolainenらの報告したVP4-2領域を標的とした方法、hMPVについてはPeretらの報告したF蛋白領域を標的とした方法、HBoVについてはAllanderらの報告したNP1領域を標的とした方法を用いた。

また、ウイルス分離を目的にVero-E6、HEp-2、

RD-18S、CaCo-2、MDCK細胞に検体上清を接種した。RSV特有のCPE(合胞形成)が確認された検体については、培養上清から上記と同様にRNAを抽出し、Peretらが報告したG蛋白領域を標的としたRT-PCRを実施した。

臨床検体からの直接(RT-)PCR産物、培養上清のRT-PCR産物はHigh Pure PCR Product Purification Kit(Roche)で精製した後、Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems)を用いてシーケンス反応を行い、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer(Applied Biosystems)を使用してダイレクトシーケンス法により塩基配列の決定をした。また、得られた塩基配列についてはDDBJのBLASTで検索を行い、既知のウイルスとの相同性を確認した。なお、培養上清に対して行ったRSVのRT-PCRで得られた塩基配列についてはMEGA4を使用し、Clustal Wによるアライメント後、NJ法により分子系統樹を作成した。

### 3 結果

検査を実施した145検体のうち、複数のウイルスが検出されたものも含め、臨床検体からの直接(RT-)PCRとウイルス分離で、117検体(80.7%)からウイルスが検出された。各ウイルスの検出数(率)は、RSVが72検体(49.7%)、HRVが36検体(24.8%)、hMPVが8検体(5.5%)、HBoVが8検体(5.5%)、アデノウイルス(AdV)が4検体(2.8%)、コクサッキーウイルス(CV)が1検体(0.7%)、単純ヘルペスウイルス(HSV)が1検体(0.7%)であった。

診断名別では、下気道炎と診断された 89 検体中、63 検体 (70.8%) からウイルスが検出され、各ウイルスの検出数 (率) は、HRV が 32 検体 (36.0%)、RSV が 20 検体 (22.5%)、hMPV が 8 検体 (9.0%)、HBoV が 7 検体 (7.9%)、AdV が 3 検体 (3.4%)、CV が 1 検体 (1.1%)、HSV が 1 検体 (1.1%) であった (表 1)。なお、ウイルスが検出された 63 検体のうち、8 検体から複数のウイルスが検出された。

RSV 感染症と診断された 56 検体中、54 検体 (96.4%) からウイルスが検出され、各ウイルスの検出数 (率) は、RSV が 52 検体 (92.9%)、HRV が 4 検体 (7.1%)、HBoV が 1 検体 (1.8%)、AdV が 1 検体 (1.8%) であった (表 2)。

また、培養細胞に RSV 特有の CPE (合胞形成) を認められたものは 24 検体で、培養上清の RT-PCR の結果、サブグループ A が 13 検体、サブグループ B が 10 検体、サブグループ A と B の両方が 1 検体から検出された。A、B 併せて 25 株の RSV の分子系統樹を図 1 に示した。サブグループ A では 14 株のうち 13 株が遺伝子型 GA2、1 株が GA5 に分類された。サブグループ B の 11 株はすべて遺伝子型 BA に分類された。

#### 4 考 察

2 年間にわたり、1 小児科クリニックにおいて検出される重症呼吸器ウイルスを調査した。その結果、全検体の 80.7% からウイルスが検出された。当該小児科クリニックでは、呼吸器疾患患者に対して、インフルエンザウイルスや RSV や AdV などの市販迅速診断キットによる検査を状況に応じて実施しており、RSV 感染症と診断された 56 名のうち、54 名が RSV 迅速診断キット陽性であった。このことが RSV 感染症と診断された患者からのウイルス検出率を高めている要因であると考えられる。下気道炎と診断された 89 名は、上記市販迅速診断キット陰性のものであるが、HRV が 32 検体 (36.0%) と最も多く検出され、一般に症状が軽いと考えられていた一方で、小児において肺炎や気管支炎などを引き起こす公衆衛生上重要なウイルスであることが示唆された。なお、検出された 32 検体の遺伝子群は、A と C がそれぞれ 16 検体ずつで、遺伝子群 B が検出されないことが特徴であった (表 3)。次に検出数が多かったのは RSV であったが、検出された 20 検体 (22.5%) のうち、17 検体がサブグループ A で、サブグループ B に比べて優位であった。これに対し RSV 感染症と診断された患者では、検出された 52 検体の RSV のうちサブグループ A が 24 検体、サブグループ B が 27 検体、サブグループ A と B の両方が 1 検体と、サブグループによる優位差がみられなかった (表 4)。また、RSV 感染症と診断された患者の臨床症状は上気道炎が 6 名、下気道炎が 39 名、上気道炎と下気道炎の両方を呈したものが 11 名と、下気道炎を呈した患者が多かったが、臨床症状によっても検出されるサブグル

ープによる優位差は見られなかった。このことは RSV の市販迅速診断キットの反応性と RSV のサブグループの間に何らかの相関があるものと考えられたが、今後の更なる抗原解析や遺伝子解析等の検証が必要である。

この他、下気道炎患者から hMPV が 8 検体、HBoV が 7 検体から検出されたが、hMPV が 8 検体すべて単独で検出されているのに対し、HBoV は 7 検体中、単独で検出されたのが 2 検体に過ぎず、残りの 4 検体は RSV、1 検体が HRV と一緒に検出されるなど、他のウイルスと混合感染を呈していることが特徴であった。

培養細胞により分離された RSV の遺伝子解析の結果、サブグループ A の遺伝子型 GA2、GA5、サブグループ B の遺伝子型 BA が検出された (図 1)。このことは近年、世界で流行している RSV の遺伝子型に合致しているが、2005 年以降、国内での遺伝子型 GA5 の検出は珍しく、GA5 が本市に浸潤しているかに興味を持たれた。そこで GA5 が検出された検体が採取された時期を挟み、分離陰性であった臨床検体のうち、サブグループ A が検出された 9 検体について、G 蛋白領域の RT-PCR を実施して、遺伝子解析を行ったが、9 検体ともすべて遺伝子型 GA2 であった。遺伝子型 GA5 が検出された患者についての情報を主治医から得たが、海外渡航歴も無く、他の患者と同じく周辺の保育所に通っており、疫学的な特徴は認められなかった。

2 年間にわたり、1 小児科クリニックにおいて検出される重症呼吸器ウイルスを調査することにより、地域での流行状況を把握することができた。しかし、重症呼吸器ウイルスの全体像を明らかにするには、更なる調査が必要と考えられ、今後、パラインフルエンザウイルスなどの他のウイルスの検査項目を加え、解析していくことが重要であると考えられる。

本研究は平成 22 年度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) 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 (研究代表者: 木村博一) の一環として実施した。

表1 下気道炎と診断された検体からのウイルス検出状況

検出ウイルス	検出数	検出率(%)
HRV	28	31.5
RSV	14	15.7
hMPV	8	9.0
RSV+HBoV	3	3.4
RSV+HRV	2	2.2
HBoV	2	2.2
RSV+HBoV+AdV	1	1.1
HRV+HBoV	1	1.1
HRV+AdV	1	1.1
AdV	1	1.1
CV	1	1.1
HSV	1	1.1
計	63	70.8

表2 RSV 感染症と診断された検体からのウイルス検出状況

検出ウイルス	検出数	検出率(%)
RSV	48	85.7
HRV	2	3.6
RSV+HRV	2	3.6
RSV+HBoV	1	1.8
RSV+AdV	1	1.8
計	54	96.4

表3 下気道炎と診断された検体から検出したウイルスの型別

検出ウイルス	検出数	検出率(%)	型	検出数
HRV	32	36.0	A	16
			C	16
RSV	20	22.5	A	17
			B	3
hMPV	8	9.0	A2	4
			B1	1
			B2	3
HBoV	7	7.9		7
AdV	3	3.4	1	1
			2	2
CV	1	1.1	B4	1
HSV	1	1.1		1

表4 RSV 感染症の臨床症状と遺伝子型別

臨床症状	検体数	サブグループ	検出数
上気道炎	6	A	2
		B	3
下気道炎	39	A	18
		B	18
上気道炎 +	11	A	4
		B	6
下気道炎		A+B	1
計	56		52

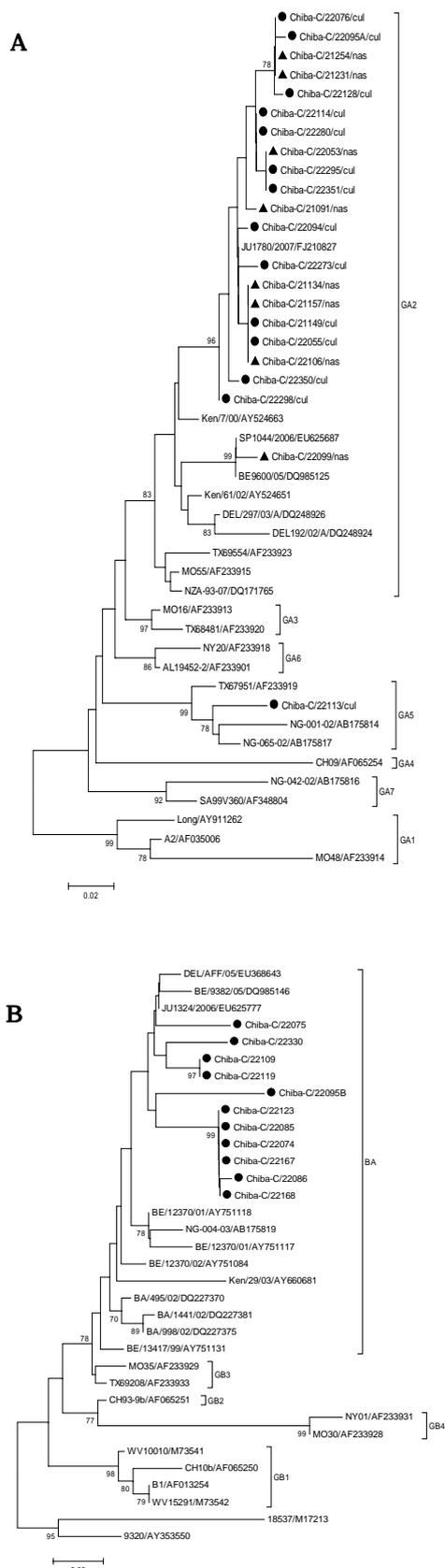


図1 RSV サブグループ A 及び B の G 蛋白領域遺伝子の塩基配列に基づく分子系統樹