

千葉市の感染症発生動向調査における急性呼吸器ウイルスの検出状況

土井妙子、水村綾乃、小林圭子、横井 一

要 旨

2010 年 6 月から 2012 年 3 月までの期間に、千葉市内の 1 か所の小児科定点及び 1 か所の内科定点で採取された臨床材料 457 検体について、急性呼吸器ウイルスの検出を行った。臨床材料 457 検体のうち、各ウイルスの検出数（検出率）は、インフルエンザウイルス（Flu）が 122 検体（26.7%）、RS ウイルス（RSV）が 92 検体（20.1%）、パラインフルエンザウイルス（PIV）が 32 検体（7.0%）、ヒトメタニューモウイルス（hMPV）が 37 検体（8.1%）、ヒトボカウイルス（HBoV）が 69 検体（15.1%）、エンテロウイルス（EV）が 24 検体（5.3%）、ヒトライノウイルス（HRV）が 140 検体（30.6%）、アデノウイルス（AdV）が 21 検体（4.6%）であった。

また、臨床材料 457 検体のうち、124 検体（27.1%）から 2 種類以上のウイルスが検出され、特に HBoV は検出された 69 検体のうち 58 検体から他の呼吸器ウイルスが検出された。

1 はじめに

急性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 か所の小児科定点及び 1 か所の内科定点においてインフルエンザ、上気道炎、下気道炎等の急性呼吸器疾患と診断された患者を対象にインフルエンザウイルス（Flu）、RS ウイルス（RSV）、パラインフルエンザウイルス（PIV）、ヒトメタニューモウイルス（hMPV）、ヒトボカウイルス（HBoV）、エンテロウイルス（EV）、ヒトライノウイルス（HRV）、アデノウイルス（AdV）の検出を行い、病原ウイルスの特定及び系統解析を行う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

2010 年 6 月から 2012 年 3 月までの期間に、千葉市内の 1 か所の小児科定点でインフルエンザ、上気道炎（上気道炎、咽頭炎等）、アデノウイルス感染症、下気道炎（下気道炎、気管支炎、肺炎等）又は RS ウイルス感染症と診断された患者から採取された臨床材料 441 検体及び 1 か所の内科定点でインフルエンザと診断された患者から採取された臨床材料 16 検体の計 457 検体（咽頭拭い液 41 検体、鼻汁 415 検体、喀痰 1 検体）を使用した。これらの検体から High Pure Viral RNA Kit（Roche）を使用してウイルス RNA を抽出し、Super ScriptIII（Invitrogen）により cDNA を作製した。

Flu は M 遺伝子領域と HA 遺伝子領域を標的としたリアルタイム RT-PCR¹⁾、RSV は N 遺伝子領域を標的

とした RT-PCR²⁾、PIV は HN 遺伝子領域を標的としたマルチプレックス RT-PCR³⁾、hMPV については F 遺伝子領域を標的とした RT-PCR⁴⁾、HBoV は NP1 領域を標的とした PCR⁵⁾、EV 及び HRV は VP4-2 領域を標的とした RT-PCR⁶⁾ を実施した。

RT-PCR 又は PCR により陽性となった RSV、PIV、hMPV、HBoV、EV、HRV の増幅産物を High Pure PCR Product Purification Kit（Roche）で精製し、Big Dye Terminator cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems）を用いてサイクルシーケンス反応を行った後、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer（Applied Biosystems）により塩基配列を決定した。得られた HRV の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、近隣結合法による系統樹解析を行った。また、RSV、PIV、hMPV、HBoV 及び EV の塩基配列については DDBJ の BLAST 検索を行い、既知のウイルス株との相同性を確認した。

一方、AdV、Flu 及び一部の EV については、Vero-E6、HEp-2、RD-18S、CaCo-2、MDCK 細胞によるウイルス分離を行った。細胞変性効果（CPE）が確認された検体のうち、AdV 及び EV については中和試験により血清型の同定を行った。Flu については、0.75%モルモット赤血球を用いて血球凝集（HA）価を測定した後、国立感染症研究所から分与されたインフルエンザウイルス同定キットを用いて赤血球凝集抑制（HI）試験を行い同定した。

3 結果

検査を実施した 457 検体のうち、臨床検体からの RT-PCR、PCR 及びウイルス分離によって、397 検体 (86.9%) からウイルスが検出された。各ウイルスの検出数 (検出率) は、Flu が 122 検体 (26.7%)、RSV が 92 検体 (20.1%)、PIV が 32 検体 (7.0%)、hMPV が 37 検体 (8.1%)、HBoV が 69 検体 (15.1%)、EV が 24 検体 (5.3%)、HRV が 140 検体 (30.6%)、AdV が 21 検体 (4.6%) であった (表 1)。

PIV の各血清型の検出数 (検出率) は、1 型が 11 検体 (2.4%)、2 型が 9 検体 (2.0%)、3 型が 12 検体 (2.6%) であった (表 2)。また、HRV が検出された 140 検体のうち 134 検体で species が判明し、各 species の検出数 (検出率) は、A が 72 検体 (15.7%)、B が 4 検体 (0.9%)、C が 58 検体 (12.7%)、であった (表 3)。

なお、臨床検体 457 検体のうち 124 検体 (27.1%) から 2 種類以上の呼吸器ウイルスが検出された。特に HBoV は検出された 69 検体のうち 58 検体が他の呼吸器ウイルスとの共検出例であった (表 4、表 5)。HBoV と同時に検出された呼吸器ウイルスの中で、HRV が 24 検体と最も多く、次いで RSV が 15 検体であった。

月別の検出数を図 1 に示した。Flu は 12 月～4 月、RSV は 11 月～2 月、PIV は 6 月～12 月、hMPV は 11 月～4 月、EV は 7 月～12 月にかけて検出される傾向が認められた。HBoV 及び HRV は通年検出された。

各ウイルス陽性検体における症状の割合を図 2 に示した。Flu、EV、AdV では、上気道炎 (上気道炎、咽頭炎、咽頭痛及び扁桃炎) の症状を示す割合が高かった。また、Flu は上気道炎に次いで発熱のみの症状を示す割合も高かった。一方、RSV、hMPV、HBoV 及び HRV では、下気道炎 (下気道炎、気管支炎及び肺炎) の症状を示す割合が高かった。PIV は 1 型では上気道炎の割合が高かったのに対し、2 型及び 3 型では下気道炎の症状を示す割合が高かった。

4 考察

1 年 8 か月にわたり、1 か所の小児科定点及び 1 か所の内科定点において検出される急性呼吸器ウイルスを調査した。その結果、全検体の 86.9% からウイルスが検出された。各ウイルスの流行期は、Flu では冬～春、RSV では秋～冬、PIV では夏～冬、hMPV では冬～春、EV では夏～冬である一方、HBoV 及び HRV では通年であることが示唆された。

検出数が最も多かったのは HRV の 140 検体、次いで Flu の 122 検体であった。HRV は鼻風邪の原因ウイルスとして一般的に症状が軽いと考えられているが、気管支炎や肺炎の患者もおり、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 140 検体のうち 134 検体の系統解析を行った結果、species A

が 72 検体、B が 4 検体、C が 58 検体と species B が少ないことが特徴であった。

PIV は 32 検体検出され、6 月～12 月に主に検出された。その血清型は 1 型が 11 検体、2 型が 9 検体、3 型が 12 検体であり、2 型が 1 型及び 3 型と比べ少ないことが特徴であった。また、1 型は上気道炎の割合が高かったのに対し、2 型及び 3 型では下気道炎の症状を示す割合が高く、2 型及び 3 型は下気道炎の原因となる可能性が高いことが示唆された。しかしながら、PIV の病原体検査の開始が 2010 年 6 月であり、検査数が少ないため、継続的な調査が必要である。

一方、457 検体のうち 124 検体 (27.1%) から 2 種類以上のウイルスが検出された。特に HBoV は検出された 69 検体のうち 58 検体が他の呼吸器ウイルスとの共検出例であった。今回の調査において、HBoV は下気道炎の症状を示す割合が高いことが明らかとなったが、同時に HRV と RSV が共に検出される検体も多かったことから、HBoV と症状の関連性については、さらなる検討が必要であると考えられる。さらに、2 種類以上の共検出例において、検出ウイルスと症状との関連を評価する場合には、検出されたウイルスの量や発病日から検体の採取日までの間隔など総合的な視点が必要であると思われる。

1 年 8 か月にわたり、1 か所の小児科定点及び 1 か所の内科定点において検出される急性呼吸器ウイルスを調査することにより、各ウイルスの検出状況 (流行の時期) や症状との関連をある程度把握することができた。しかしながら、今回は調査期間が短いことから、流行の全体像を明らかにするためには、今後も継続的な調査が必要であると考えられる。

参考文献

- 1) 国立感染症研究所: インフルエンザ診断マニュアル (第 2 版), 病原体検出マニュアル 2012
- 2) Stockton J, Ellis JS, Saville M, Clewley JP, Zambon MC : Multiplex PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncytial virus. J Clin Microbiol 1998 ; 36 : 2990 - 5
- 3) Echevarria JE, Erdman DD, Swierkosz EM, Holloway BP, Anderson LJ : Simultaneous detection and identification of human parainfluenza viruses 1, 2, and 3 from clinical samples by multiplex PCR. J Clin Microbiol 1998, 36 : 1388 - 91
- 4) 高尾信一, 下藺広行, 柏弘, 松原啓太, 坂野堯, 池田政憲ら: 本邦において初めて流行が確認された小児の human metapneumovirus 感染症の臨床的, 疫学的解析 感染症学雑誌 2004 ; 78 : 129 - 137
- 5) Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B : Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory

tract samples. Proc Natl Acad Sci USA 2005, 102(36) : 12891 - 6

- 6) 石古博昭, 島田康司, 與那覇麻里, 栄賢司: 遺伝子系統解析によるエンテロウイルスの同定. 臨床とウイルス 1999;27:283 - 6

表 1 急性呼吸器疾患と診断された臨床材料からのウイルス検出状況

検出ウイルス	検出数	検出率(%)
Flu	122	26.7
RSV	92	20.1
PIV	32	7.0
hMPV	37	8.1
HBoV	69	15.1
EV	24	5.3
HRV	140	30.6
AdV	21	4.6

表 2 パラインフルエンザの血清型別検出数

PIV血清型	検出数	検出率(%)
PIV-1	11	2.4
PIV-2	9	2.0
PIV-3	12	2.6
PIV合計	32	7.0

表 3 ヒトライノウイルスの species 別検出数

HRV species	検出数	検出率(%)
HRV-A	72	15.7
HRV-B	4	0.9
HRV-C	58	12.7
HRV species 不明	6	1.3
HRV合計	140	30.6

表 5 3種類の呼吸器ウイルスが検出された臨床検体

検出ウイルス	検体数
HBoV-HRV-Flu	1
HBoV-HRV-RSV	2
HBoV-HRV-PIV	2
HBoV-HRV-EV	1
HBoV-HRV-AdV	1
HBoV-RSV-PIV	1
HBoV-RSV-hMPV	1
HBoV-RSV-AdV	1
HBoV-hMPV-Flu	1
HRV-RSV-Flu	1
HRV-RSV-EV	1
HRV-RSV-AdV	1
HRV-PIV-EV	1
RSV-hMPV-AdV	1

表 4 単独及び2種類呼吸器ウイルスが検出された臨床検体

	Flu	RSV	PIV	hMPV	HBoV	EV	HRV	AdV
Flu	100※							
RSV	2	51						
PIV		3	13					
hMPV	2	1		16				
HBoV	6	10	5	6	11			
EV		2	3	2		6		
HRV	9	13	3	6	17	8	69	
AdV		1	1	1	3		4	7

※ 単独で呼吸器ウイルスが検出された検体数

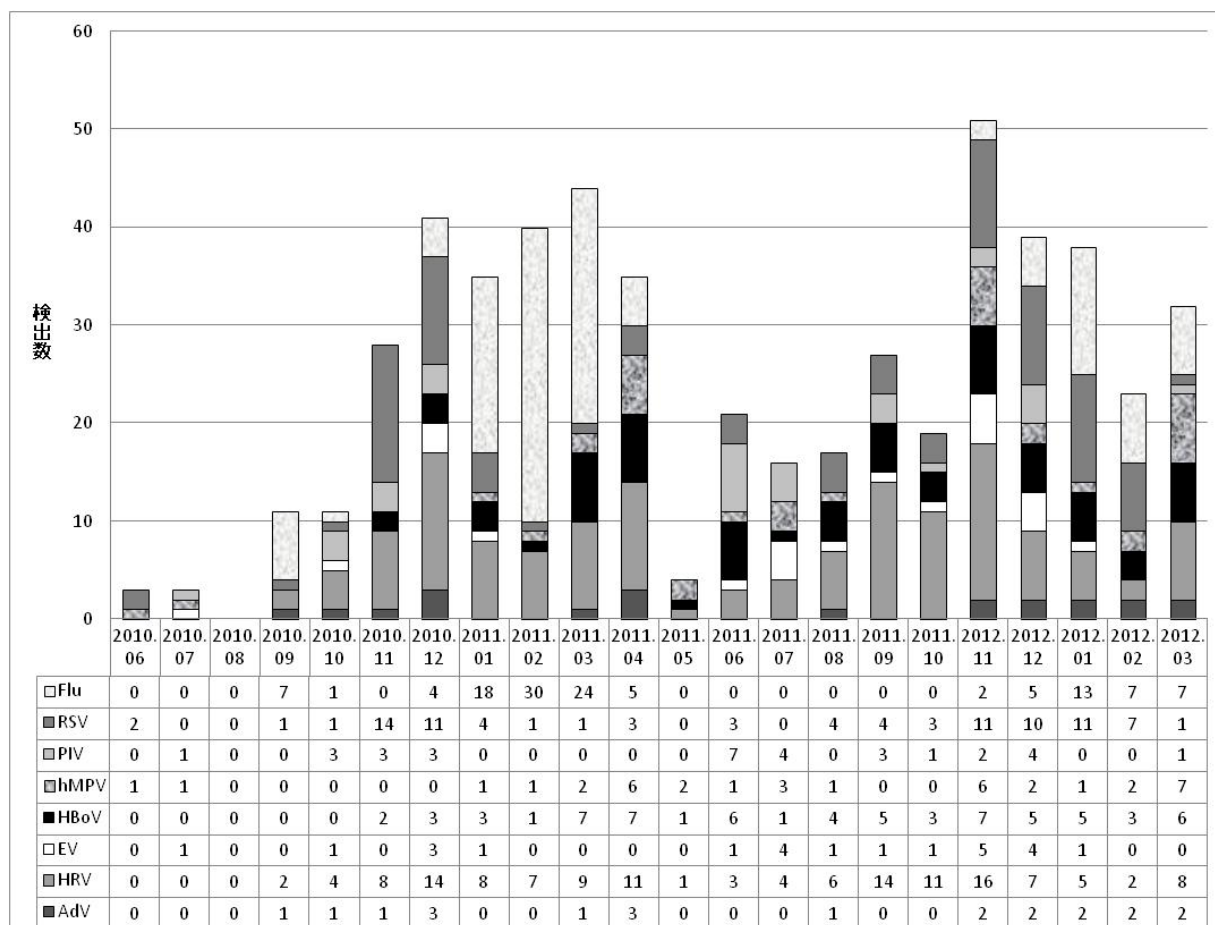


図1 月別ウイルス検出状況（2010年6月～2012年3月）

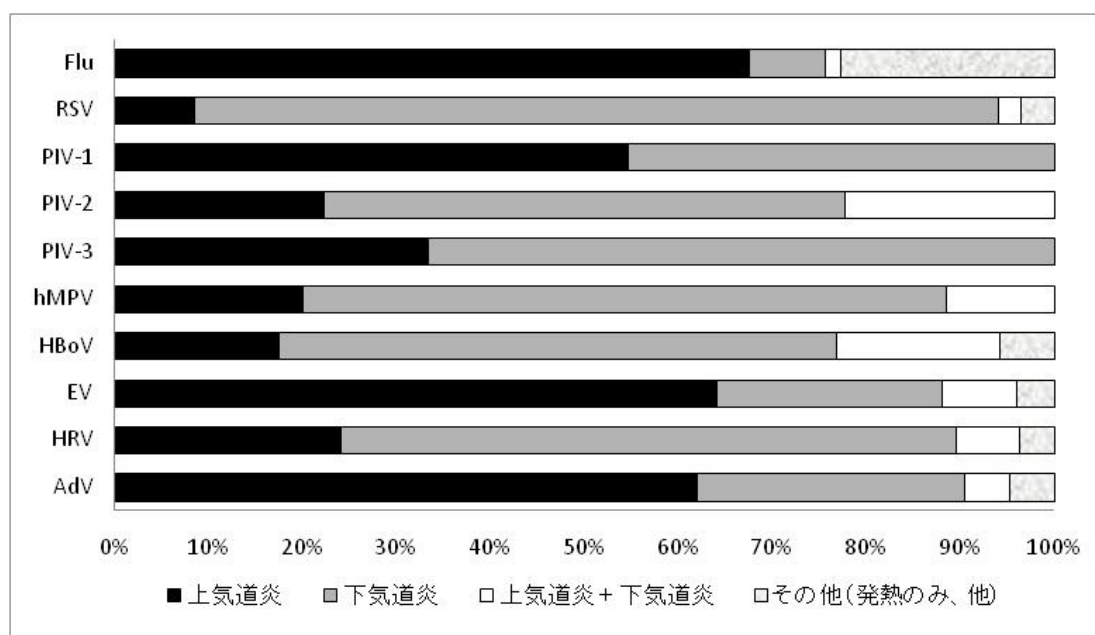


図2 ウイルス陽性検体と症状