

表 2. 検出ウイルスと患者情報

検出ウイルス	検出数	性別 (男/女)	年齢(歳) (mean ± SD)	臨床症状	検出数
RSV 計	42	29/13	0.6 ± 1.1		
Subgroup A	40	28/12	0.6 ± 1.1	上気道炎	1
				気管支炎	7
				細気管支炎	14
				肺炎	15
				喘息	1
Subgroup B	2	1/1	0 ± 0.0	上気道炎	1
				肺炎	1
HRV 計	29	15/14	3.1 ± 3.2		
Species A	10	7/3	1.6 ± 2.0	気管支炎	2
				細気管支炎	2
				肺炎	2
				喘息	4
Species B	7	3/4	4.1 ± 3.9	上気道炎	2
				細気管支炎	1
				肺炎	3
				喘息	1
Species C	12	5/7	3.7 ± 3.4	上気道炎	1
				気管支炎	2
				細気管支炎	1
				肺炎	5
				喘息	1
				その他	2
HPIV 計	5	2/3	4.8 ± 4.0	上気道炎	1
				細気管支炎	3
				肺炎	1

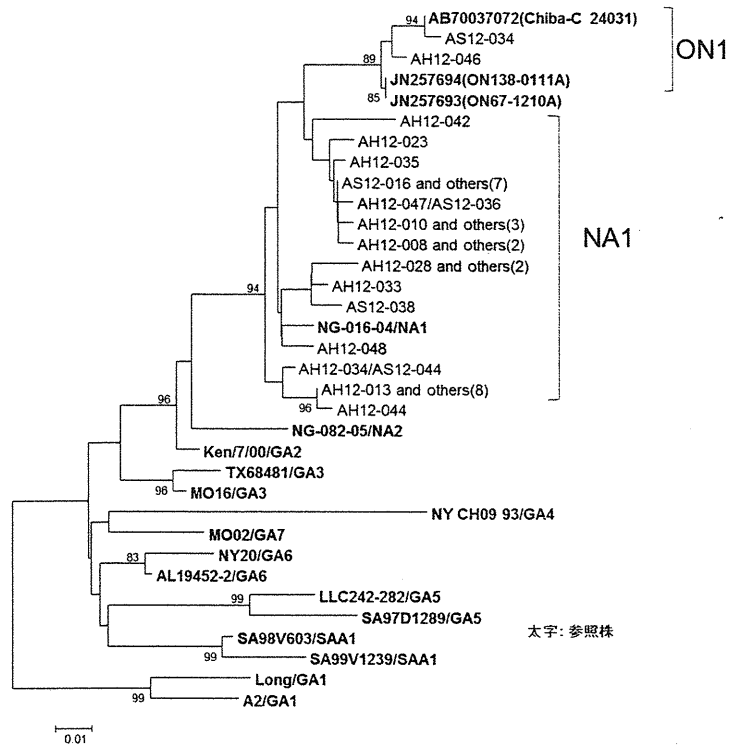


図 1. RSV-A の G 遺伝子領域分子系統樹 (240/312bp)

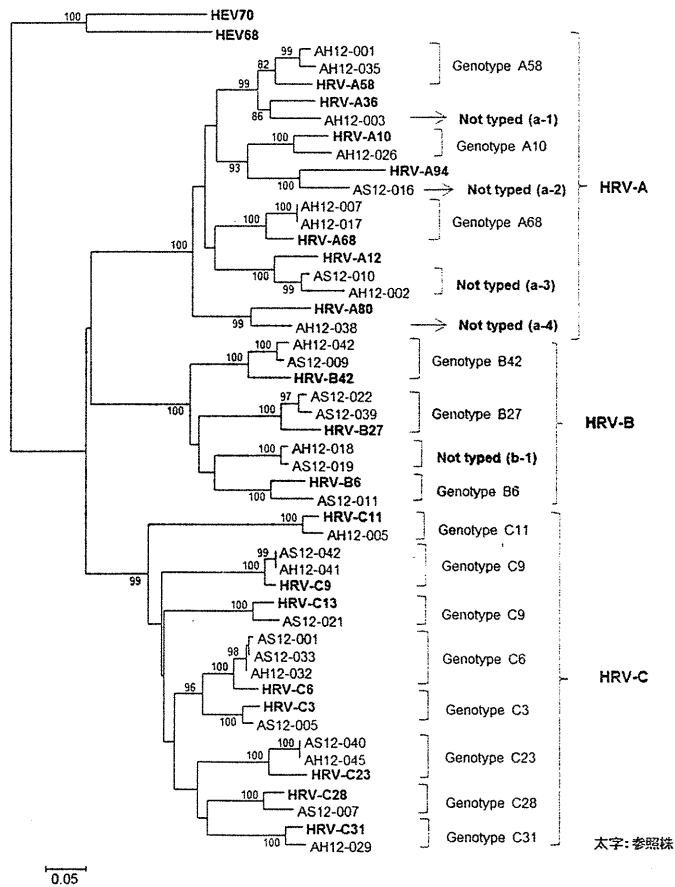


図 2. HRV の VP4/VP2 領域分子系統樹 (420bp)

さいたま市における夏季かぜ症候群ウイルスサーベイランス

研究協力者 宇野優香 さいたま市健康科学研究センター

大泉佐奈江、蕪木康郎 さいたま市健康科学研究センター

## 研究要旨

さいたま市における夏季（2012年5月から10月）の急性呼吸器感染症(ARIs)ウイルスサーベイランスを実施した。その結果、ARIs患者から採取された99検体から、ヒトライノウイルス(HRV)：27株、ヒトパラインフルエンザウイルス(HPIV)：24株、ヒトメタニューモウイルス：10株、Respiratory Syncytial ウイルス：9株、ヒトエンテロウイルス：8株、アデノウイルス：7株、ヒトボカウイルス：5株、およびヒトコロナウイルス：2株が検出された。インフルエンザウイルスは検出されなかった。さいたま市の夏季ARIs症例にはHRV、HPIVなど多種ARIsウイルスの関与が明らかとなった。

## A. 研究目的

急性呼吸器感染症(ARIs)の原因ウイルスは、インフルエンザウイルス(FuIV)をはじめとして、Respiratory Syncytial ウイルス(RSV)、ヒトライノウイルス(HRV)など多種類のウイルスがある。

さいたま市ではこれまでインフルエンザ流行期のFuIVサーベイランスは実施されているが、その他のARIsウイルスサーベイランス、とくに夏季のARIs流行実態は未解明である。

本研究は、さいたま市域の2012年夏季のARIsウイルスサーベイランスを実施し、ウイルス流行状況把握を試みる。

## B. 研究方法

2012年5月14日から同年10月28日までの期間に、さいたま市感染症発生動向調査に基づく病原体定点医療機関3ヶ所を受診したARIs患者（上気道炎：42例、下気道炎：57例）から採取された鼻腔あるいは咽頭拭い液99検体を用いた。

核酸抽出後、HRVおよびヒトエンテロウイルス(HEV)のVP4/VP2領域遺伝子、ヒトパラインフルエンザウイルス(HPIV)のHN遺伝子、RSVのN遺伝子、ヒトメタニューモウイルス(HMPV)のF遺伝子、ヒトコロナウイルス(HCoV)のPolymerase 遺伝子、アデノウイルス(AdV)のhexon 遺伝子ならびにヒトボカウイルス(HBoV)のNP1 遺伝子をそれぞれ(RT-)PCRにより増幅・検出した。増幅産物はダイレクトシークエンスにより塩基配列を決定後、FASTA 検索(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/>)で確認した。

ウイルス分離は6種類(CaCo-2、FL、RD-18s、Vero/E6、HEp-2およびMDCK細胞)の細胞を用いて実施した。分離株の同定は感染培養液上清を用い、上述の方法で同定した。FluVはリアルタイムPCRでA型とB型を検出した。

## C. 研究結果

1) ウイルス検出状況(図1および表1)

上気道炎患者42例の年齢分布は、0～4歳：

37例、5～9歳4例、10～14歳が1例：であった。これら42症例中33検体から、HPIV:12株、HEV:6株、HRV:6株、RSV:4株、AdV:4株、HMPV:3株、HCoV:2株およびHBoV:2株がそれぞれ検出された。このうち5検体からは複数のウイルスが検出され、その内訳は、HRVとHPIV:2例、HEVとHCoV:1例、HPIVとAdV:1例、HRVとHPIVとRSV:1例である。

なお、残る9検体からはウイルス未検出であった。

下気道炎患者57例の年齢分布は、0～4歳:55例、5～9歳:1例および10～14歳:1例であった。これら57症例中46検体から、HRV:21株、HPIV:12株、HMPV:7株、RSV:5株、AdV:4株、HBoV:3株およびHEV:2株がそれぞれ検出された。このうち7検体からは複数のウイルスが検出され、その内訳は、HRVとHPIV:2例、AdVとHBoV:2例、HRVとRSV:1例、HMPVとAdV:1例、HRVとHPIVとRSV:1例であった。

なお、残る11検体からはウイルス未検出、また、FluVはすべての患者から不検出である。

## 2)HRV および HMPV 分子系統解析

HRVのVP2/VP4領域系統解析結果を図2に示した。Species A:15株、species B:1株、species C:11株に分類された。

HMPVのF遺伝子系統解析結果を図3に示した。Subgroup A2:1株、subgroup B1:6株、subgroup B2:3株に分類された。

表1 ウイルス検出数

ウイルス	検出型	上気道炎	下気道炎
HRV	A	3	12
	B	0	1
	C	3	8
HEV	A4	1	1
	A5	1	0
	A9	2	0
	B5	1	0
	E9	1	1
HPIV	1	5	4
	2	1	1
	3	6	7
RSV	A	3	5
	B	1	0
HMPV	A2	1	0
	B1	1	5
	B2	1	2
HCoV	OC43	1	0
	NL63	1	0
AdV	1	0	1
	2	2	1
	3	1	0
	4	0	1
	5	0	1
HBoV		2	3
不検出		9	11

## D. 考察

2012年5月中旬から10月末までの期間に、さいたま市内の医療機関を受診したARIs患者から採取された鼻腔あるいは咽頭拭い液99検体からARIsウイルス検索を試みた。その結果、79検体(80%)からウイルスが検出され、上気道炎例ではHPIV、HEV、HRV、RSV、AdV、HMPV、HCoV、HBoV、下気道炎例では、HRV、HPIV、HMPV、RSV、AdV、HBoV、HEVが優位順で検出された。

これらのことから、さいたま市における夏季ARIsはHRV、HPIV、HMPV、RSV等のウイルス感染が主要な原因であると思われる。加えて、HRV、RSV感染は感染喘息の一起因ウイルスであることが報告されており、サーベイランス対象疾患として重要であろう。

今回の夏季サーベイランスでは、RSV検出数は多くはない。RSVは迅速体外診断試薬が臨床診断に活用されていること、調査した期間が夏

季に限定した期間であったことなどが要因と思われる。

検出株の分子系統解析を試みた結果、HRV は 3 つの species、HMPV は 3 つの subgroup に分類された。両ウイルスの各 species あるいは subgroup はいずれも分子遺伝学的に顕著な偏りは認められなかった。

これまで、さいたま市では散发例から ARIs ウイルスの検出を試みた成績はあるが、通年の ARIs ウイルスサーベイランスは実施していない。今回、夏季に限定した ARIs ウイルスサーベイランスを実施した結果、HRV、HPIV、HMPV、RSV 等、多種類のウイルスの浸潤を明らかにした。加えて、HCoV および HBoV についても当センターでは初めて確認された。

いっぽう、2011/2012 シーズン(2011 年 8 月から 2012 年 7 月)に実施した FluV サーベイランスでは 1 月を中心に計 45 株が検出されているが、本研究で実施した夏季では、FluV は全く検出されていない。

本研究により、さいたま市では 2011 年第 2 四半期からほぼ一年間をとおした主要 ARIs ウイルスサーベイランス成績が初めて得られた。

サーベイランス機能の更なる充実と運用体制の進展を図ることにより、効果的 ARIs ウイルスサーベイランスが期待できると考える。

#### E. 結論

- 1) さいたま市における 2012 年夏季の ARIs 患者検体のウイルス検索を行った結果、上気道炎症例の 79% および下気道炎症例の 81% から HRV、HPIV、HMPV、RSV 等、多種類の ARIs ウイルスが検出された。
- 2) HRV27 株および HMPV10 株の分子系統解析を実施した。その結果、HRV-A:15 株、-B:1 株、-C:11 株に、HMPV-A2:1 株、B1:6 株、B2:3 株に、それぞれ属する株であった。なお、両ウイルスともに分子遺伝学的に顕著な偏りは認められなかった。

#### F. 研究成果公表

- 1) 学術論文  
なし
- 1) 学会公表  
なし

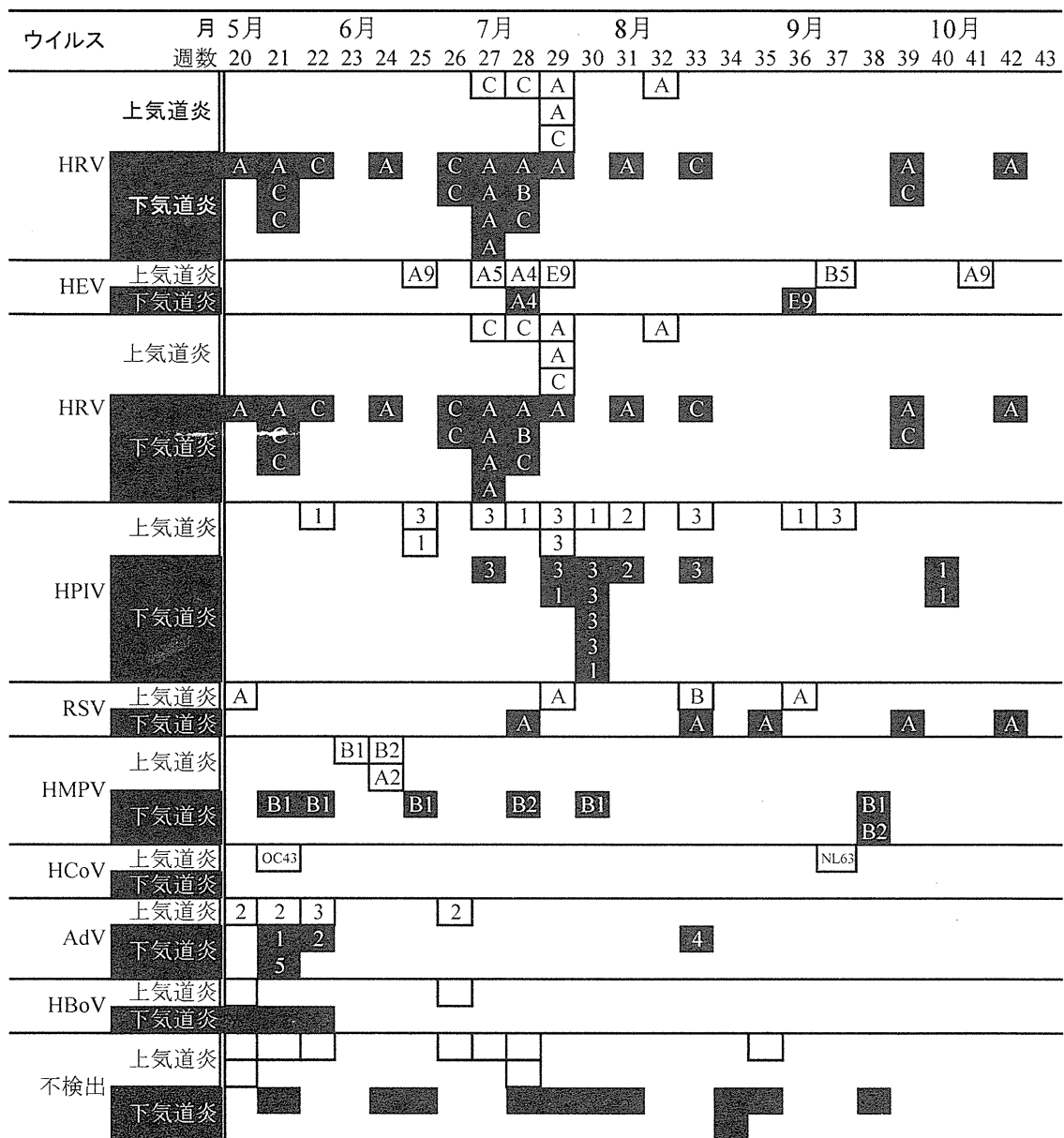


図1 ウイルス検出状況  
横軸は感染症発生動向調査における報告週

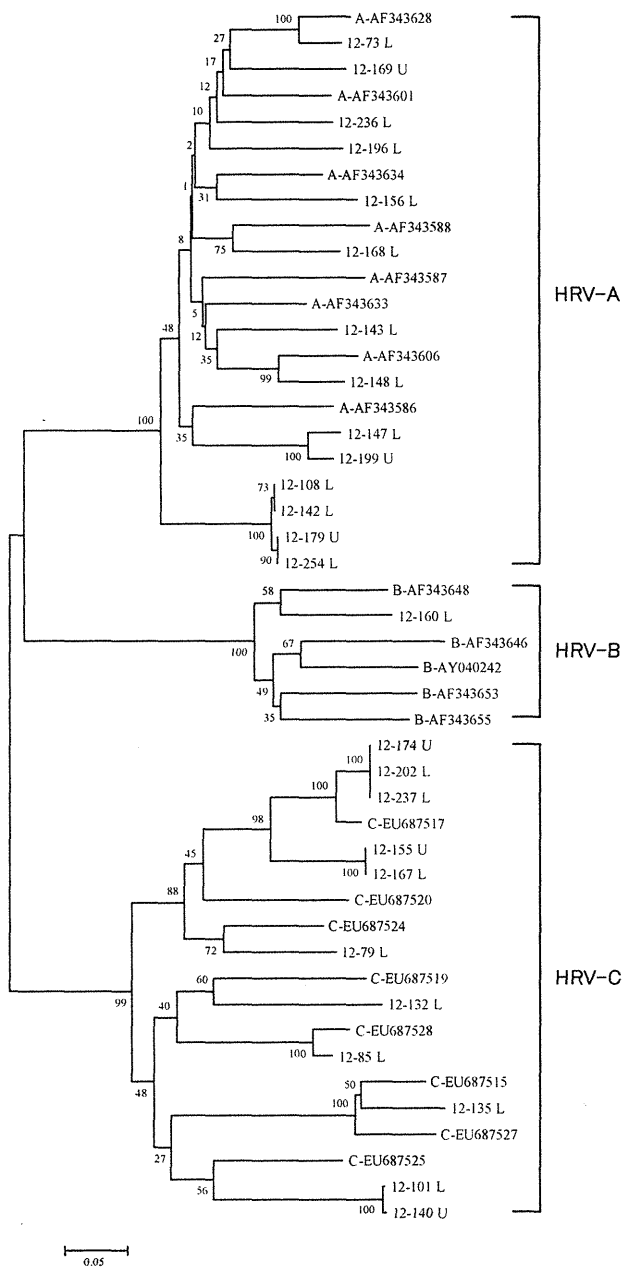


図2 HRV VP4/VP2領域分子系統樹 (266nt)  
U: 上気道炎 L: 下気道炎、他は参照株

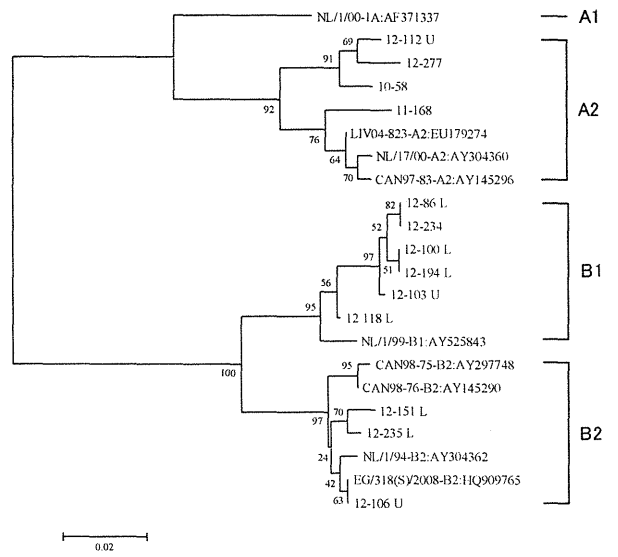


図3 HMPV F遺伝子分子系統樹 (327nt)  
U: 上気道炎 L: 下気道炎、他は参照株

## 静岡市におけるヒトボカウイルスサーベイランス

研究協力者 柴原乃奈 静岡市環境保健研究所

伊藤史恵、小林雅史、鈴木 忍 静岡市環境保健研究所

### 研究要旨

2011年4月から2012年10月の間、静岡市内7ヶ所の医療機関を受診した患者から採取された計449検体から、ヒトボカウイルス(HBoV)遺伝子の検出を試みた。その結果、16検体(3.6%)からHBoVが検出され、検出株は遺伝子型1型および2型に分類された。患者年齢は2歳未満児が多く、その診断名は多様であった。陽性16検体のうち12検体(75%)では、アデノウイルスなど計9種類のウイルスが同時に検出された。

#### A. 研究目的

ヒトボカウイルス(HBoV)は2005年に呼吸器疾患患者から発見されたウイルスで、その後世界各地で報告されている新興感染症の一つである。

HBoVの人への病原性は当初、下気道炎、肺炎等の呼吸器疾患として報告されたが、その後、消化器疾患からの検出報告がなされた。

そこで、静岡市におけるHBoV浸潤等を把握するため、市内7ヶ所の定点医療機関を受診した患者検体からHBoV遺伝子の検出・解析を試みた。

#### B. 研究方法

2011年4月から2012年10月の間に、静岡市感染症発生動向調査事業に基づく定点医療機関7ヶ所を受診した患者から採取された咽頭ぬぐい液244検体、糞便72検体、髄液89検体、血液20検体、尿13検体、皮膚8検体、眼脂2検体および心嚢水1検体、計449検体を検査に供した。

核酸抽出後、Allanderらの方法に準じNPI遺伝子の一部を増幅し、増幅産物を精製後、

ダイレクトシーケンスによる相同性解析、VP2遺伝子の一部について系統樹解析を実施した。

またHBoV増殖部位の推定を目的に、Dengらの方法に準じNPI遺伝子の一部についてリアルタイムPCR[で増幅し、10コピー/反応を検出限界とし、咽頭ぬぐい液1ml中あるいは糞便1g中のコピー数を算出した。

#### C. 研究結果

供試449検体中、16検体(3.6%)からHBoVが検出された。診断名別の検出数(率)は、呼吸器疾患：9(6.8%)、消化器疾患：4(8.3%)、その他の疾患(不明熱、脳炎・脳症・髄膜炎、発疹症、熱性けいれん、川崎病等)：3(1.1%)であった。検出陽性検体は呼吸器疾患では咽頭ぬぐい液：8 および糞便：1、消化器疾患では糞便：3 および咽頭ぬぐい液：1、ならびにその他の疾患では咽頭ぬぐい液：3である(表1)。

年齢別陽性数(率)は、0歳：7(4.6%)、1歳：7(6.4%)、2歳～5歳：0(0%)および6歳以上：1(1.3%)であった。性別陽性数(率)は男



性:8(3.0%)および女性:8(4.3%)であった(表 1)。

2011 年および 2012 年の月別検出数(%)は、2011 年は 5 月:1(5%)、6 月:2(28.6%)、および 12 月:1(4.3%)、2012 年は 4 月:2(6.1%)、6 月:5(16.1%)、7 月:4(9.5%)、8 月 1(2.0%)であった(図 1)。

HBoV 検出と年齢別、性別、診断名別および月別の間で Fisher の直接確率検定を行った。その結果、検出と年齢別、性別および診断名別との間では、いずれも有意差は認められなかったが、月別では 6 月に有意差を認めた( $p < 0.05$ )。

検出された 16 株の内、12 株について VP2 領域の系統樹解析を実施した結果、1 型: 7 株、2 型: 5 株に分類された(表 2 および図 2)。

また、HBoV 陽性の同一検体からアデノウイルス、サイトメガロウイルス等、計 9 種類のウイルスが同時検出 (12/16)された(表 2)。

HBoV 陽性 12 検体について、1ml あるいは g あたりのコピー数算出を試みた。4 検体(No.7,8,10 および 14))は  $2.5 \times 10^2$  から  $1.1 \times 10^7$  コピーであったが、他の 8 検体は検出限界以下の値であった(表 3)。

#### D. 考察

今回の検討から、静岡市においては少なくとも 2011 年時点で既に 2 歳未満の患児を主に HBoV 感染が確認され、その時期は 4 月～8 月期に多発していた。HBoV 抗体保有調査成績から、小児の多くが 5 歳までに HBoV 初感染を受けていることなど報告されている。

我われの検討では HBoV 陽性検体のうち 12 検体(75%)から、アデノウイルス、サイトメガロウイルスなど計 9 種類のウイルスが同時検出された。

HBoV 陽性検体から同時に複数のウイルスが検出される報告もあり、疾病との関連、等、

精査が必要である。

検体中の HBoV *NPI* 遺伝子数は 500 から  $1 \times 10^9$  コピー/ml であったことが報告されており、我われの成績でも同程度の成績が得られた。しかし、検出限界以下の検体が多く、また、用いた検体は採取病日、液の量、検査実施までの期間や凍結融解回数、等が一定ではなく、HBoV 一次および二次増殖器官等の推定は困難であった。

一方、HBoV および他のウイルス DNA/RNA の検出期間やウイルス増殖器官、二次感染などの要因等について不明のことは多い。加えて、検討した症例の診断名はさまざまであったこと、例数も不定であったことなど、更に症例数を重ねた検討が必要である。

#### E. 結論

静岡市における HBoV サーベイランスの結果、陽性率は 3.6%で、ウイルスは 2 歳未満の小児、時期は初夏に多く検出された。検出株は 1 型および 2 型に分類された。

ウイルスは呼吸器疾患のほか、消化器疾患および他の疾患症例からも多く検出された。

HBoV 陽性検体の 75%から他のウイルスが同時に検出された。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

該当なし。

##### 2. 学会発表

該当なし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

表 1 診断名および性別にみる HBoV 陽性数

診断名	検体種別	検体総数	男女別内訳	年齢分布	HBoV陽性数	
呼吸器疾患	咽頭ぬぐい液等	132	男	70	0歳～14歳	7
			女	62		2
消化器疾患	糞便等	48	男	27	0歳～12歳	1
			女	18		3
その他の疾患	その他*	269	男	168	0歳～63歳	0
			女	104		3

\*咽頭ぬぐい液:123、便:28、髄液:79、血液:17、尿:12、皮膚:8、眼脂:1および心嚢水:1

表 2 HBoV 陽性者概要

No	年齢性別	検体	診断名	臨床症状	発症	採取	同時検出	株名	遺伝子型
1	1 女	便	感染性胃腸炎	下痢、嘔吐、けいれん	'11/5/13	'11/5/13	NoVGH/4	11V017	1
2	0 男	咽頭ぬぐい液	下気道炎	発熱(38.2℃)、気管支炎	'11/6/6	'11/6/8	HRV	11V030	2
3	0 男	便	感染性胃腸炎	発熱(38.0℃)、腸重積症、嘔吐	'11/6/8	'11/6/9	AdV2.PoV3	11V032	2
4	1 男	咽頭ぬぐい液	下気道炎	発熱(40.2℃)、気管支炎	'11/12/17	'11/12/28	—	11V157	2
5	0 女	便	感染性胃腸炎	下痢、嘔吐、無熱性けいれん	'12/4/13	'12/4/14	CMV	12V016	—
		咽頭ぬぐい液						12V019	
6	1 男	咽頭ぬぐい液	下気道炎	発熱(40.0℃)、咽頭炎、気管支炎	'12/5/24	'12/6/2	AdV2	12V074	1
7	0 女	咽頭ぬぐい液	発疹症	発熱(37.8℃)、水痘(水疱)、鼻汁、咳嗽	'12/6/7	'12/6/8	—	12V087	2
8	0 女	咽頭ぬぐい液	上気道炎	発熱(39℃)、上気道炎、乳児肝炎	'12/6/22	'12/6/26	HPIV3.CMV	12V099	—
		便						12V100	
9	1 女	咽頭ぬぐい液	ヘルパンギーナ	発熱(38.0℃)、口内炎、咳嗽、鼻汁	'12/6/22	'12/6/22	CA4	12V101	—
10	1 男	咽頭ぬぐい液	下気道炎	発熱(40.0℃)、肺炎	'12/6/27	'12/7/6	AdV2	12V106	1
11	9 女	咽頭ぬぐい液	発疹症	発熱(38.9℃)、紅斑	'12/7/9	'12/7/11	—	12V121	—
12	1 男	咽頭ぬぐい液	下気道炎	発熱(40℃)、上気道炎、気管支炎、下痢	'12/7/15	'12/7/20	HPIV3.AdV2	12V127	2
13	1 男	咽頭ぬぐい液	下気道炎	発熱、肺炎	'12/7/26	'12/7/27	—	12V131	—
14	1 男	咽頭ぬぐい液	下気道炎	呼吸不全、気管支喘息	'12/8/27	'12/8/29	HPeVI	12V176	1

表 3 HBoV *NPI* 遺伝子数

No.	検体	採取病日	copies / ml or / g
7	咽頭ぬぐい液	1	2.5E+02
8	便	5	1.1E+04
10	咽頭ぬぐい液	9	3.8E+02
14	咽頭ぬぐい液	1	1.1E+07

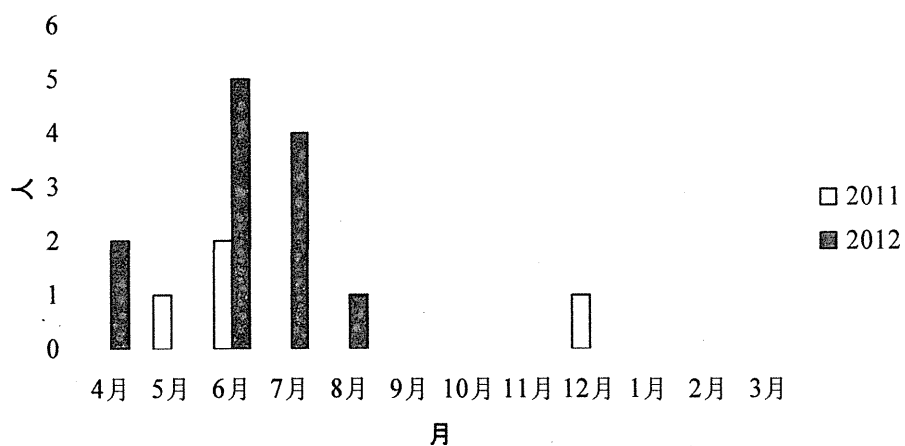


図 1 HBoV の月別検出数(2011 および 2012 年)

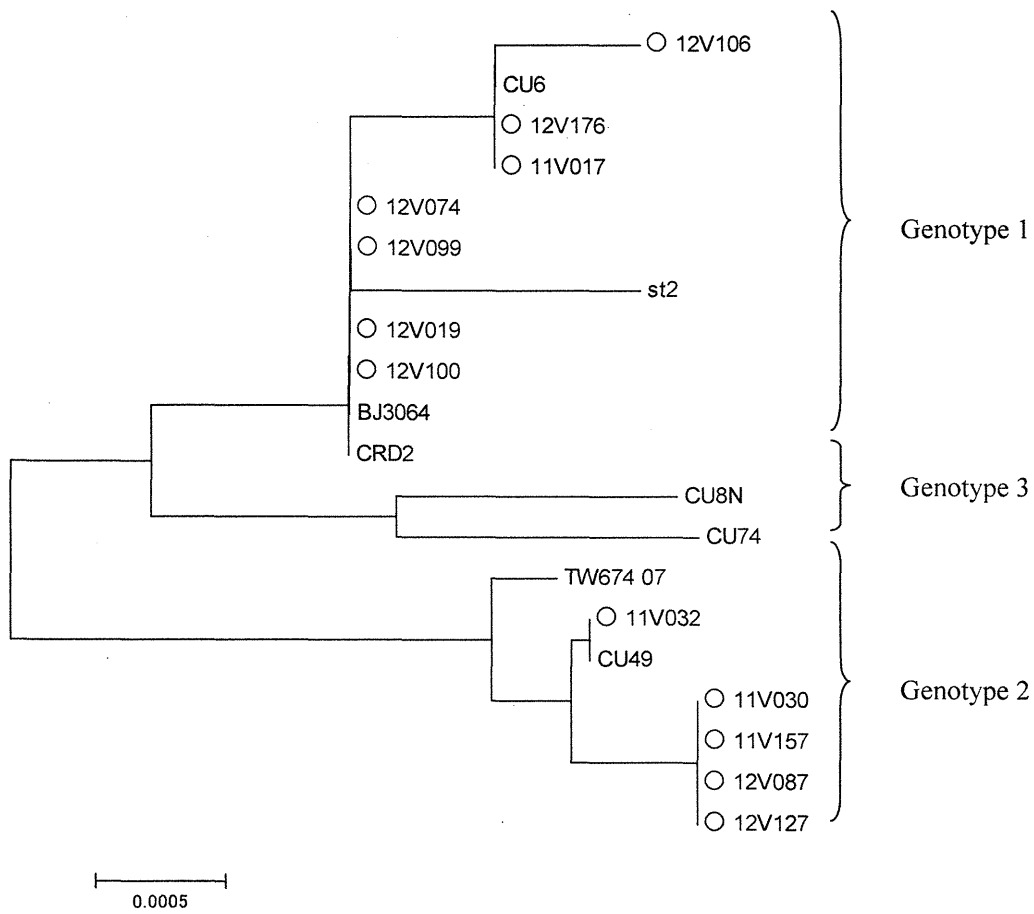


图 2 HBoV VP2 遗传子系統樹解析

### 本邦におけるヒトライノウイルスC の分子疫学

研究協力者	清田直子	熊本県保健環境科学研究所
研究協力者	櫛淵泉美	栃木県保健環境センター
研究協力者	小林美保	群馬県衛生環境研究所
研究協力者	塚越博之	群馬県衛生環境研究所
	原田誠也	熊本県保健環境科学研究所
	野田雅博	国立感染症研究所
	木村博一	国立感染症研究所

#### 研究要旨

本邦における急性呼吸器感染症(ARIs)患者から検出されるヒトライノウイルス(HRV)species C (-C) の VP4/VP2 領域の分子疫学解析を行うため、2009年4月～2011年12月の間に熊本県および栃木県の ARIs 患者から採取された鼻咽腔ぬぐい液あるいは気管吸引液 1,345 検体の HRV 検索を実施した。その結果、165 検体(12.3%)から HRV が検出され、そのうち 63 株が HRV-C であった。代表的な 19 株の HRV-C について、近隣結合(NJ)法と最尤(ML)法による系統樹解析を行い、これら 19 株は 11 の genotype に分類され、いずれも 1870 年代前半を起源として、その後分岐した可能性が考えられた。また、塩基置換速度は  $3.07 \times 10^{-3}$  substitutions/site/year と推定され、インフルエンザウイルス A のヘマグルチニン遺伝子とほぼ同等の速度であることが示唆された。

#### A. 研究目的

ヒトライノウイルス(HRV)は急性呼吸器感染症 (ARIs) を引き起こす主要な病原体で、通常感冒の主な原因であるが、下気道炎や肺炎も引き起こすことがある。また、小児気管支喘息の発症および増悪因子としても注目される ARIs ウイルスである。

HRV の species には、A、B および C があり、血清型は 100 を超すことが報告されている。このうち、HRV-C は新しく発見された species であり、詳しい疫学は未だ不明である。

本研究は、わが国の HRV-C 検出株の VP4/VP2 領域の詳細な分子疫学解析を行う。

#### B. 研究方法

2009年4月から2011年12月に、熊本県および栃木県の病原体定点医療機関を受診した ARIs 患者から採取された鼻咽腔ぬぐい液あるいは気管吸引液 1,345 検体(熊本県：735 検体、栃木県：610 検体)を試験に供した。RT-PCR により HRV の VP4/VP2 領域の増幅・検出を行い、PCR 増幅産物についてダイレクトシーケンシング法による塩基配列解析を行った。また、近隣結合(NJ)法および最尤 (ML)法による系統樹解析、pairwise distance 解析ならびに positive pressure 解析を行った。

#### C. 研究結果

##### 1) HRV 検出成績

上気道炎、気管支炎、肺炎等の呼吸器症状を

示した患者由来 1,345 検体中、165 検体 (12.3%) から HRV が検出された。Species 別の検出数は、HRV-A : 98 件、HRV-B : 4 件および HRV-C : 63 件であった(表 1)。HRV-C 陽性患者の主な臨床症状別の検体数は、上気道炎 : 40(14)件、気管支炎 : 18(2)件、喘息性気管支炎 : 3(2)件、肺炎 : 2(1)件であった。

なお、()内数字は後述する系統樹解析に用いた株数を示す(表 2)。

## 2)HRV-C の系統樹解析

今回検出された HRV-C のうち、19 株について NJ 法による VP4VP2 領域分子系統樹解析を実施した。HRV-C 参照株として、Simmonds らが報告した参照株を用いた。その結果、19 株は 11 の genotype に分類された(図 1)。

つぎに、ML 法による分子系統樹解析を実施した。その結果、解析株は 1870 年代前半に分岐した可能性が推定された。また、塩基置換速度は  $3.07 \times 10^{-3}$  substitutions/site/year と算出された(図 2)。

## 3)HRV-C の pariwise(p)-distance 解析および positive pressure 解析

p-distance 算出値は  $0.253 \pm 0.044$  (mean  $\pm$  SD) を示し、株間の p-distance は比較的長いことが判明した。また、positive pressure 解析を行ったが、今回の解析領域においては positive selection site は見られなかった。

## D. 考察

本邦(熊本県、栃木県)において多く検出される HRV は、HRV-C と HRV-A であり検出頻度はほぼ同程度であった。また、今回の分子疫学解析成績から、わが国では多様な遺伝子型に分類される HRV 株が流行しており、臨床診断学的に上気道炎のみならず下気道炎も含む様々な ARIs に関与していることが示唆された。

今回検出された HRV-C 株の ML 法による系統樹解析成績から、これら HRV-C 株は 1870 年代

に起源を有し、その後、現存する多様な遺伝子型に進化したことが示唆された。また、VP4/VP2 領域解析部位の進化速度 ( $3.07 \times 10^{-3}$  substitutions/site/year) はインフルエンザウイルスのヘマグルチニン遺伝子の進化速度 ( $1.7 \times 10^{-3}$  substitutions/site/year) とほぼ近似の進化速度であることが示唆された。

## E. 結論

本研究により、わが国で流行する HRV-C は HRV-A と同様に種々の呼吸器疾患に関与していることが示唆された。また、最近の流行株は遺伝子学的に多様な株であり、VP4/VP2 領域解析部位の進化速度はインフルエンザウイルス A のヘマグルチニン遺伝子の進化速度と近似の進化速度であると考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Yoshida A, Kiyota N, Kobayashi M, Nishimura K, Tsutsui R, Tsukagoshi H, Hirano E, Yamamoto N, Ryo A, Saitoh M, Harada S, Inoue O, Kozawa K, Tanaka R, Noda M, Okabe N, Tashiro M, Mizuta K, Kimura H: Molecular epidemiology of the attachment glycoprotein (G) gene in respiratory syncytial virus in children with acute respiratory infection in Japan in 2009/2010. J Med Microbiol, 61, 820–829, 2012

### 2. 学会発表

1) 清田直子、西村浩一、水田克巳、野田雅博、木村博一：熊本県におけるヒトライノウイルスと RS ウイルスの分子疫学. 第 53 回臨床ウイルス学会、2012 年 6 月、豊中市

2) 清田直子、小林美保、塚越博之、西村浩一、原田誠也、野田雅博、木村博一：本邦におけるヒトライノウイルス C の分子疫学. 第 82 回日本感染症学会西日本地方会学術集会、2012 年 11 月、福岡市

表 1. HRV species 別検出数

Species	株数
HRV-A	98
HRV-B	4
HRV-C	63
合計	165

表 2. HRV-C 陽性検体の主症状および検体数

主症状	検体数
上気道炎	40 (14)
気管支炎	18 (2)
喘息性気管支炎	3 (2)
肺炎	2 (1)
合計	63 (19)

( )内数字は系統樹解析に用いた株数

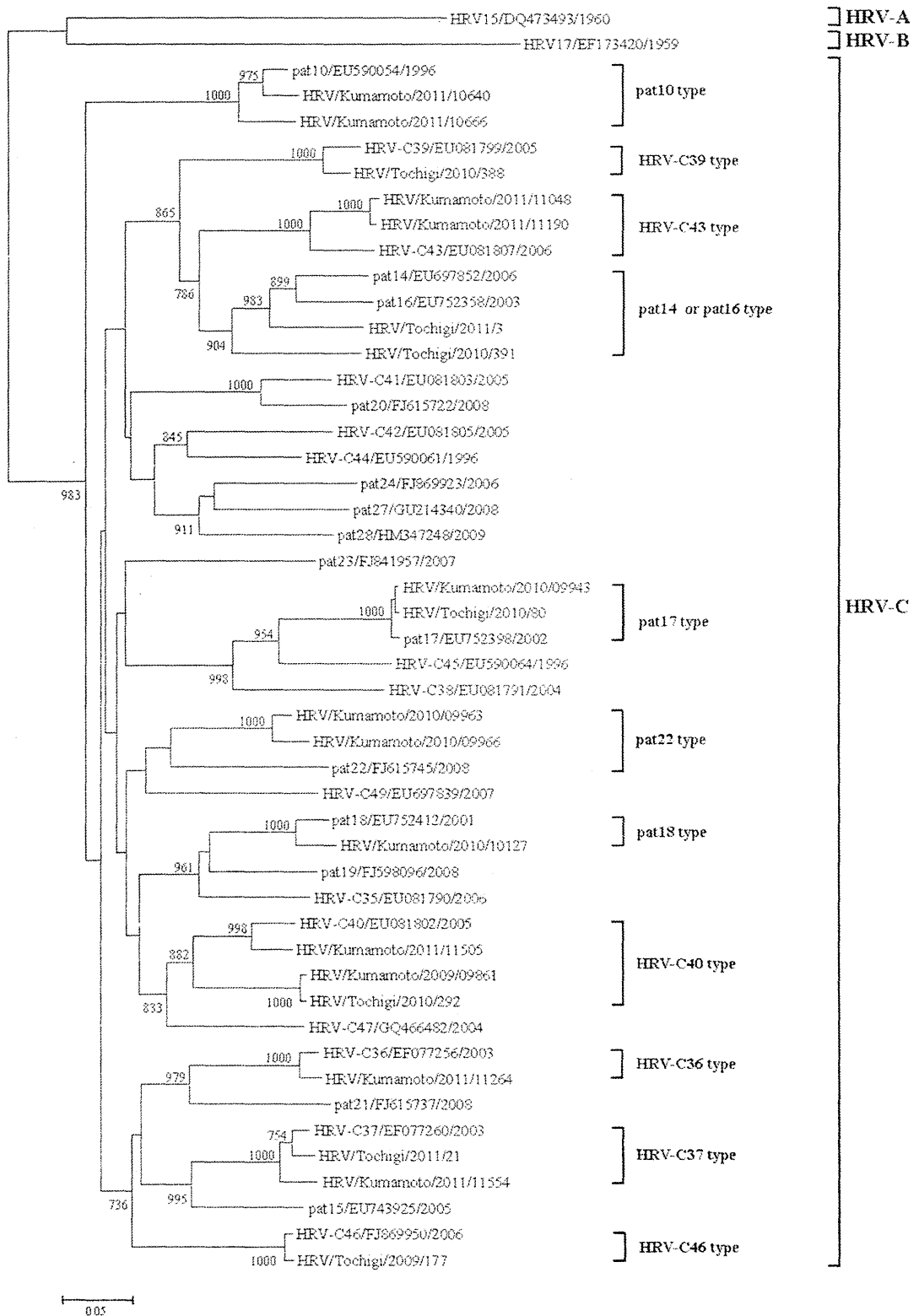


図 1HRV VP4/VP2 領域(390nt)分子系統樹 (NJ 法)



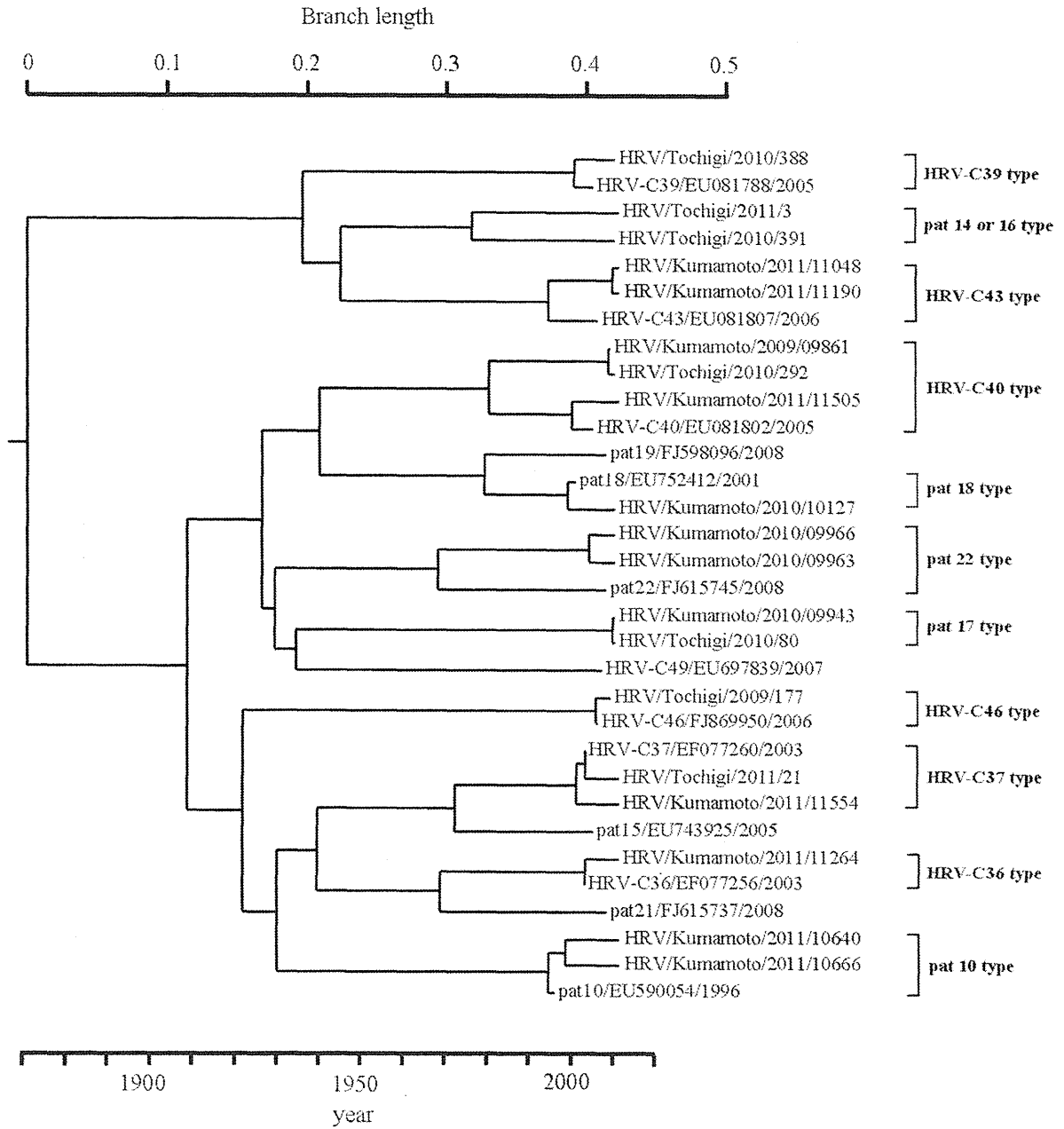


図 2. HRV VP4/VP2 領域 (390nt) 分子系統樹 (ML 法)

## Real-time RT-PCR による RS ウイルスおよびヒトメタニューモウイルス遺伝子の検出

研究協力者 横井 一、田中俊光 千葉県環境保健研究所

野田雅博 国立感染症研究所

木村博一 国立感染症研究所

### 研究要旨

svARI に関与するウイルスの検出法の開発を目的として、Real-time RT-PCR 法による RS ウイルス (RSV)、及びヒトメタニューモウイルス (HMPV) の検出系の構築について検討した。その結果、RSV の F 遺伝子に対する Real-time RT-PCR 法は、RSV 感染症の遺伝子診断に有用であることが明らかとなった。一方、HMPV の F 遺伝子に対する Real-time RT-PCR 法は、Nested PCR 法に比べ感度が低く、特に genotype A2 や B1 に対する検出感度が低い傾向が示唆されたことから、更なるプライマーと TaqMan プローブの改良が必要であると考えられた。

### A. 研究目的

重症呼吸器感染症 (svARI) に関与するウイルスとして、インフルエンザウイルス (FluV)、RS ウイルス (RSV)、ヒトメタニューモウイルス (HMPV)、ヒトライノウイルス (HRV)、及びパラインフルエンザウイルス (PIV) などが知られている。中でも RSV と HMPV の臨床症状は類似しており、特に乳幼児において重症化しやすい傾向がある。

近年、RT-PCR 法がウイルス遺伝子の検出法として用いられるようになり、ウイルス量が少ない臨床検体から高感度に RSV または HMPV 遺伝子を検出することが可能となり、これらのウイルスの流行状況調査や集団感染事例におけるウイルス検出法として、主要な診断技術となっている。

しかしながら、RT-PCR 法による遺伝子検出は、電気泳動による PCR 産物の確認、及び得られた PCR 産物の確認 (シーケンス解析等) を必要とするため、迅速性に欠ける一面もある。

そこで、本研究では svARI に関与するウイル

スの検出法の開発を目的として、迅速性、高感度、及び定量性を併せ持った Real-time RT-PCR 法に着目し、RSV の検出と subgroup 型別、及び HMPV の検出が可能な遺伝子診断法の構築について検討した。

### B. 研究方法

ウイルス RNA の調製には、VeroE6 細胞により分離された RSV (subgroup A と subgroup B の 2 株)、及び HMPV (genotype A2 と genotype B2 の 2 株) の培養上清を使用した。また、臨床検体における本法の有用性 (検出感度と特異性) を検討するための臨床検体として、2003 年 12 月から 2011 年 7 月、及び 2011 年 10 月から 11 月までの期間に上気道炎または下気道炎 (気管支炎、肺炎) の呼吸器症状を呈して千葉市内の医療機関を受診した患者から採取された臨床材料 154 検体 (咽頭拭い液 74 検体、鼻汁 76 検体、気管吸引液 2 検体、及び喀痰 2 検体) を使用した。これらのウイルス株または検体から High

Pure Viral RNA Kit (Roche) を使用してウイルス RNA の抽出し、Super Script (Invitrogen) により cDNA を作製した。

Real-time RT-PCR 用プライマーおよび TaqMan MGB プローブは、RSV の F 遺伝子領域 (表 1) と HMPV の F 遺伝子領域 (表 2) に設計した。

Real-time RT-PCR法の検量線作成に使用するコントロールプラスミドは、RSウイルスF遺伝子とヒトメタニューモウイルスF遺伝子のPCR産物をTAクローニングすることにより作製した。すなわち、PCR産物をTOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen) を用いてpCR4-TOPO vectorにサブクローニングし、その塩基配列をBig Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (ABI) を用いたダイレクトシーケンス法により確認した後、Plasmid Mini Kit (Qiagen) により精製した環状プラスミドを制限酵素Spe I で切断して直鎖状プラスミドとした後、UV260nmのOD値を測定し、コントロールプラスミドのコピー数を算出した。なお、今回、コントロールプラスミドの作製に用いたPCR産物の塩基配列をBLASTサーチによって検索した結果、RSV subgroup Aの配列はAB574192、RSV subgroup Bの配列はHQ317233、HMPV genotype A2の配列はGQ153651、及びHMPV genotype B2の配列はHM197719と最も高い相同性を示した。

Real-time RT-PCR 法は、1 tube あたり 25 $\mu$ L の反応量で実施した。22.5 $\mu$ L の Real-time PCR 反応液 (QuantiTect Probe PCR Master Mix (Qiagen)、100 $\mu$ M プライマー、10 $\mu$ M TaqMan MGB プローブ、及び RNase-free 滅菌蒸留水を混合) に 2.5 $\mu$ L の cDNA 溶液を加えた後、ABI 7300 Real-time PCR system (ABI) を使用して増幅反応を行った。反応条件は、95 $^{\circ}$ C 15 分 (DNA polymerase の活性化) の後、94 $^{\circ}$ C 15 秒 (熱変性) と 56 $^{\circ}$ C 75 秒 (アニーリングと伸長反応) の反応を 45 回繰り返した。また、前述のコントロールプラスミ

ドについては、TE buffer にて 10 倍段階希釈を行い、2.5 $\times 10^7$  copies/2.5 $\mu$ L から 2.5 $\times 10^1$  copies/2.5 $\mu$ L までの 10 倍希釈系列を作製し、cDNA 溶液と同様に増幅反応を行った。反応終了後に ABI Sequence Detection System Software ver. 1.4 を使用して各希釈系列のコントロールプラスミドの増幅反応から得られたデータに基づいて検量線を作成し、ウイルス遺伝子 (cDNA) の検出と定量解析を実施した。

Real-time RT-PCR法との検出感度を比較するためのConventional RT-PCR法とNested PCR法は、病原体検出マニュアル (国立感染症研究所) に準拠し、RSVのN遺伝子 (表1)、HMPVのF遺伝子 (表2) に対するPCR法を実施した。

### C. 研究結果

RSV の subgroup A と subgroup B、及び HMPV の genotype A2 と genotype B2 の各コントロールプラスミドの 10 倍段階希釈系列について、Real-time RT-PCR 法による増幅曲線および検量線の検討を実施した。その結果、2.5 $\times 10^1$  copies/tube から 2.5 $\times 10^7$  copies/tube の範囲内で、PCR サイクル数に比例した遺伝子の増幅が認められた。また、X 軸にコントロールプラスミドのコピー数 (対数表示)、Y 軸に PCR サイクル数 (Ct 値) をプロットした場合の検量線は、図 1 に示すように RSV subgroup A ( $R^2=0.999$ 、Slope: -3.42)、RSV subgroup B ( $R^2=0.999$ 、Slope: -3.49)、HMPV genotype A2 ( $R^2=0.999$ 、Slope: -3.46)、及び HMPV genotype B2 ( $R^2=0.999$ 、Slope: -3.42) において、それぞれ良好な直線性を示した。以上の結果から、本法による RSV と HMPV の検出と定量が可能であることが明らかとなり、検出感度は各血清型ともに 2.5 $\times 10^1$  copies/tube であると推定された。

RSV と HMPV 分離株の培養上清から抽出した RNA から逆転写反応により作製した各 cDNA 溶液の 10 倍段階希釈液を用いて、

Real-time RT-PCR 法の検出限界について確認した。その結果、RSV subgroup A で 9.9copies/tube (Ct 値:40.34)、RSV subgroup B で 1.4copies/tube (Ct 値: 40.98)、HMPV genotype A2 で 17.0copies/tube (Ct 値: 37.01)、及び HMPV genotype B2 で 2.8copies/tube (Ct 値:38.30) まで PCR 増幅曲線が得られた。

臨床検体から抽出した RNA から作製した cDNA を用いて Real-time RT-PCR 法と Conventional RT-PCR 法、または Nested PCR 法との検出感度と特異性の検討を行った。その結果、RSV の N 遺伝子に対する Conventional RT-PCR 法を基準とした場合の Real-time RT-PCR 法の検出感度は 100%、特異性は 92.7% であった (表 3)。Nested PCR 法を基準とした場合の検出感度は 100%、特異性も 100% であった (表 3)。また、データには示していないが Real-time RT-PCR 法と Nested PCR 法による RSV の subgroup 型別の結果の乖離はなかった。

一方、HMPV の F 遺伝子に対する Conventional RT-PCR 法を基準とした場合の Real-time RT-PCR 法の検出感度は 95.2%、特異性は 93.2% であった (表 4)。Nested PCR 法を基準とした場合の検出感度は 55.8%、特異性は 95.5% であった (表 4)。なお、データには示していないが Nested PCR 法によって陽性となり、Real-time RT-PCR 法で陰性となった 19 検体の遺伝子型は、genotype A2 が 17 検体、genotype B1 が 2 検体であった。

さらに、他の呼吸器ウイルス (インフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、ライノウイルス、コクサッキーウイルス、エコーウイルス、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、ヒトポカウイルス) に対する本法の交差反応について確認した結果、遺伝子の増幅は認められなかった。

#### D. 考察

本研究で検討した Real-time RT-PCR 法は、RSV の F 遺伝子領域と HMPV の F 遺伝子領域にプライマーと TaqMan MGB プローブを設計した。

RSV では subgroup A と B を検出するための sense プライマーと antisense ライマー、及び subgroup A と B に特異的な TaqMan MGB プローブをそれぞれ設計し、1 tube で RSV 遺伝子の検出と同時に subgroup の型別も可能な系を構築した。その結果、 $2.5 \times 10^1$  copies/tube 以上の遺伝子が存在すれば、RSV 遺伝子の検出と定量が可能であり、他の呼吸器ウイルスとの交差反応もなく高い特異性を有することが確認された。また、RSV の Real-time RT-PCR 法の検出感度は、N 遺伝子に対する Conventional RT-PCR 法よりも高く、Nested PCR 法と同等であった。さらに、Real-time RT-PCR 法による subgroup の型別結果も Nested PCR 法と一致した。このことから、本法は RSV を対象とした遺伝子診断に十分に応用可能であることが明らかとなった。

一方、HMPV では genotype A1 と A2 を検出するための sense プライマーを 1 種類、genotype B1 と B2 を検出するための sense プライマーを 1 種類、全ての genotype に共通の antisense ライマーを 1 種類、及び genotype A と genotype B に特異的な TaqMan MGB プローブをそれぞれ設計し、1 tube で全ての遺伝子型の検出が可能な系を構築した。その結果、RSV と同様に  $2.5 \times 10^1$  copies/tube 以上の遺伝子が存在すれば、HMPV 遺伝子の検出と定量が可能であり、他の呼吸器ウイルスとの交差反応もなく高い特異性を有することが確認された。しかしながら、HMPV の Real-time RT-PCR 法の検出感度は、F 遺伝子に対する Conventional RT-PCR 法とほぼ同等であり、Nested PCR 法よりも低いものであった。特に genotype A2 や B1 に対する検出感度が低い傾向が今回の結果から示唆されたことから、更なるプライマーと TaqMan プローブの改良が必要であると考えられた。