

RSウイルスサーベイランス手法の開発 －2016-17年シーズンの本邦におけるRSウイルスの分子疫学研究－

研究分担者 齋藤 玲子 新潟大学大学院医歯学総合研究科国際保健学分野
研究協力者 田邊 郁望 新潟大学大学院医歯学総合研究科国際保健学分野
日比野 亮信 新潟大学大学院医歯学総合研究科国際保健学分野

研究要旨

RSウイルスの病原体に対するサーベイランスを行うため、全国12地域の小児医療機関と協力し、RSウイルスの分子疫学調査を行った。2016年7月から同年12月8日までに233症例の鼻咽頭拭い検体が収集され、そのうち迅速診断キット陽性が158件（68.1%）、陰性が74件（31.9%）であった。型別ではA型が21件（23.1%）、B型が70件（76.9%）と判定された。地域別ではB型が主に西日本の9地域で優勢であり、主に東日本の3地域ではA型とB型の混合流行が見られた。我々の調査では全国的な流行時期は9月であり、感染症発生動向調査のピークより1カ月ほど早かった。G遺伝子第2高度可変部のシーケンスを樹形図解析したところ、A型の遺伝子型はON1型、B型はBA9型であった。ON1型は地域別に固有の遺伝子配列を持った株が流行しており、BA9型は全国的に似た遺伝子を持ったウイルスが広く流行していることが分かった。また、BA9型に近いウイルスで、変異が大きく、新しい遺伝子型として定義できる可能性のあるウイルスが見つかった。新しい遺伝子型のウイルスの発生は症例数増加の原因となる可能性がある。このような株の監視や、流行時期の変化などを把握するためにも、今後もRSウイルスの分子疫学調査を実施し疫学データの集積を続けていきたい。

A. 研究目的

RSウイルス感染症は、乳幼児に「かぜ」を引き起こす呼吸器ウイルス感染症であり、感染症発生動向調査の5類定点疾患（小児科）として全国の患者発生動向が把握されている。平成28年度に改正感染症法が施行され、感染症発生動向調査との連動をめざし、病原体サーベイランスが強化された。しかしながら、現行ではRSウイルス感染症は、病原体サーベイランスの対象となっていないため、全国的な病原体動向が把握されていない。我々は、全国各地の小児科医と協力し、RSウイルスの病原体の垂直サーベイランスを行ったため、結果を報告する。

B. 研究方法

2016-2017年シーズンに12地域（北海道、青森、新潟、東京、静岡、三重、滋賀、奈良、香川、山

口、熊本、沖縄）の小児科医療機関（外来および入院）の臨床医に調査を依頼した。発熱、咳、鼻汁などの急性呼吸器症状を呈して外来を受診した小児に対し、保護者に対し十分なインフォームドコンセントを得た上で、主治医が患児の鼻腔ぬぐい液、または鼻腔吸引液を採取し、RSV迅速診断キットによるスクリーニングを行った。入院患者に対しては主治医が調査への協力を保護者に依頼し、インフォームドコンセントを得られた患者を対象とした。迅速診断キットで陽性と判断された場合に、性、年齢、発症日、受診日、受診時の体温や症状について記録し、検体は、ウイルス輸送培地に保存した。採取された検体は、新潟大学に輸送され、臨床検体からRNAを抽出し、M蛋白遺伝子をターゲットとしたリアルタイムPCRにより、RSVを検出した。A型、B型の型別を、F蛋白遺伝子をターゲットにしたコンベンシヨナ

ルPCRにより行った。二つの検出法でRSVが陽性だった検体についてG蛋白第二可変領域をターゲットにしたコンベンショナルPCRを行い、PCR産物を遺伝子シーケンスした。得られたウイルスの遺伝子型分類は、樹形図解析（NJ法）により行った。なお、迅速診断キット陰性症例についても同様に承諾を得た上で検体採取と臨床情報の聴取を行った。キット陽性、陰性とも、可能であれば、週に1例ずつ検体を採取するよう各地の臨床医に依頼した。

（倫理面への配慮）

本調査においては、検体採取と患者情報聴取に当たって各医療機関にて患者および保護者に十分な説明を行い、保護者から承諾書を取得した。調査については新潟大学医学部倫理委員会にて承認を受けた。

C. 研究結果

2016年7月から同年12月8日までに、233症例が収集された。そのうち迅速診断キット陽性は158件（68.1%）、陰性は74件（31.9%）、実施していないものが1件であった。

採集された検体のうち、194症例はコンベンショナルPCRによる型別検査でA型が21件（23.1%）、B型が70件（76.9%）と判定された。全体的にB型が優勢であり、北海道、東京、静岡、香川、山口、熊本、沖縄では、B型が優勢であるもののA型との混合流行であり、青森と新潟ではB型のみが検出された（表1）。A型のみが検出された地域はなかった。遺伝子型ではA型はON1型が8件、B型はBA9型が18件検出された。

調査地域全体の疫学曲線では、当教室のデータでの流行のピークは、感染症発生動向調査でのピークより1カ月ほど早い9月であった。今シーズンは直近10年間の感染症発生動向調査と比較しても流行の早期化がみられた。調査期間を通して、どの月もB型が優勢であった（図1）。地域別には、A型とB型が混合流行していた東日本での流行のピークはおおむね9月に多く（図2）、B型が主に流行していた西日本でのピークは10月が多く（図3）、地域により流行のピークにずれがみられた。

樹形図解析では、今シーズンのON1型は、青森と新潟から地域別に固有の遺伝子配列を持つウイルスが検出された（図4）。この2地域のON1型株はそれぞれブートストラップ値が91%、98%と高く、明確にクラスターとして分岐していた。BA9型はON1型とは異なり地域別に偏らず、全国で似た遺伝子をもつウイルスが広域に流行していたとみられる。2014/2015年シーズンにはBA9型に類似であるものの、遺伝子変異の大きいRSV株が沖縄から1株検出されており、同様の株が今シーズンは香川から3株検出された（図6）。これらのBA9型変異株を含めたBA9型グループの最大のp-distanceは0.127、含めなかった場合は0.076であった。また、BA9変異株の中でのp-distanceは0.017、ブートストラップ値は100であった。BA9型変異株をBLAST検索でデータベース上にある世界中の株と比較したところ、95%より高い類似性を持つ株は見つからなかったため、この3株をBA9から独立した新しい遺伝子型と定義することとした。

D. 考察

全国12地域の調査では、2016-17年シーズンはB型優勢の地域が多数を占める状況であった。過去の調査を振り返ると、2シーズン前の調査では全地域でA型が優勢であり、昨シーズンの調査では全国的にA型とB型が混合流行していた。今シーズンはB型優勢であり、直近の3シーズンでA型優勢からB型優勢の流行に変化している。流行するRSウイルスの型は2年から3年ごとにA型とB型が交互に入れ替わることが知られており、今回B型優勢であったことに合致する。流行する型が入れ替わるのは、型に特異的な集団免疫の蓄積によるものと考えられている。

疫学曲線を見ると、今回の我々の調査による症例数と、定点発生動向調査での患者発生数は、流行のピークに約1カ月のずれがあった。しかしその数の推移はおおむね一致していたため、何らかの原因で定点発生動向調査とのずれが生じていたと思われるが、全体的には流行の実態を反映していると考えられる。

樹形図解析では、今シーズンのON1型は青森と新潟の2地域ごとで固有の遺伝子配列をもつウ

ウイルスが流行していた。昨シーズンは今シーズンのような地域別の明確な特徴は認められず、全国的に似た遺伝子配列を持つウイルスが広く流行していた。それに対して今シーズンからON1型は各地域において独自の遺伝子配列をもつウイルスが流行し始めたと考えられる。BA9型については、昨シーズンから引き続き全国的に似たウイルスが広く流行していたが、変異の大きいBA9類似型株が香川から3株検出されている。この株は1シーズン前に沖縄からも1株検出された。G蛋白第二可変領域における新しい遺伝子型の定義は、グループ内でのp-distanceが0.07以内で、70%以上のブートストラップ値を持つことを基準としている。我々が見つけたBA9型変異株はこの基準を満たしている。BA9変異株を抜いたBA9型クラスターは単一の遺伝子型としての基準にはほぼ収まるものの、BA9型変異株を加えた場合は、基準を大きく超える。BA9変異株はすでにBA9型クラスターから外れていると考えられる。さらにBLAST検索でも類似性の高い株が見つからないことから、新しい遺伝子型として定義できると考える。

過去の我々の調査で、新しい遺伝子型の出現(NA1)が症例数の増加につながったことが判明しており、今回のBA9変異型株が今後の流行拡大に関与する可能性も否定できない。来シーズンにどの地域で検出されるかなど、継続した調査が必要である。

E. 結論

RSウイルスは5類定点疾患であり、わが国のサーベイランスでは小児科定点による発生動向調査による患者発生数が把握されている。RSウイルスの遺伝子型などの病原体調査は地方衛生研究所レベルで行っているところもあるが、全国の情報を集約する体制は確立されていない。我々の研究はその点で国のサーベイランスを補完する垂直サーベイランスとしての意義がある。また、RSウイルスに対する治療薬では臨床試験において優秀な成績をあげているものが存在し、今後日本で認可され使用される可能性がある。治療薬導入後の型・遺伝子型の変化や、薬剤耐性変異などについて基礎データを集めるという意味でも、RSウ

イルスについて十分な調査やサンプルの収集を行っておくことが重要である。

謝辞:

日本外来小児科学会リサーチ委員会の先生方
永井崇雄先生 (香川; 永井小児科医院)
長田伸夫先生 (北海道; ひらおか公園小児科)
富本和彦先生 (青森; とみもと小児科クリニック)
加地はるみ先生 (東京; 加地クリニック)
西藤成雄先生 (滋賀; 西藤小児科こどもの呼吸器・アレルギークリニック)
青木オ一志先生 (奈良; あおき小児科)
鈴木英太郎先生 (山口; 鈴木小児科医院)
島田 康先生 (熊本; しまだ小児科)
浜端宏英先生 (沖縄; アワセ第一医院)

日本外来小児科学会リサーチ委員会以外の先生方
佐野康子先生 (新潟; 佐野医院)
田中敏博先生 (静岡; 静岡厚生病院小児科)
谷口清州先生 (三重; 国立病院機構三重病院)
中村晴奈先生 (三重; 国立病院機構三重病院)

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

・Hassan Zaraket, Reiko Saito, Japanese Surveillance Systems and Treatment for Influenza. *Curr Treat Options Infect Dis* 2016; 8(4): 311-328.

2. 学会発表

・田邊郁望. 2015-16年シーズンの本邦におけるRSウイルスの分子疫学研究. 第65回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第63回日本化学療法学会東日本支部総会 合同学会. 2016年10月27日. 新潟
・田邊郁望. 2015-16年シーズンの本邦におけるRSウイルス罹患児の臨床症状とウイルス量の推移. 第48回日本感染症学会総会. 2016年11月20日. 岡山

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

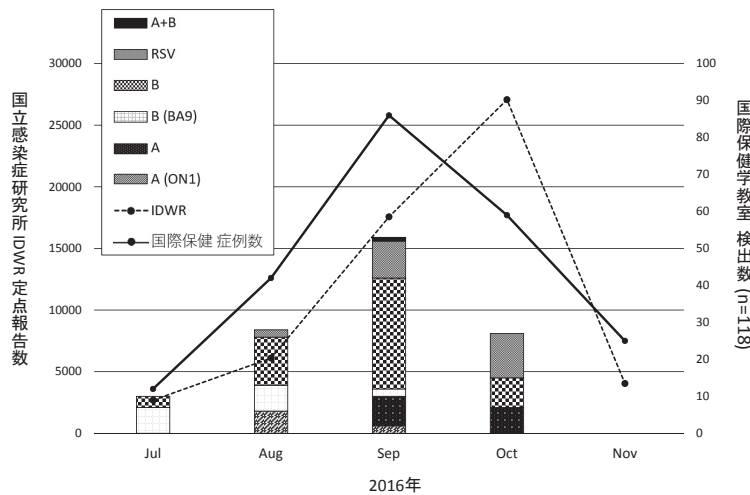
なし

(表1) 2016-2017年シーズン RSウイルスSubgroup・Genotype

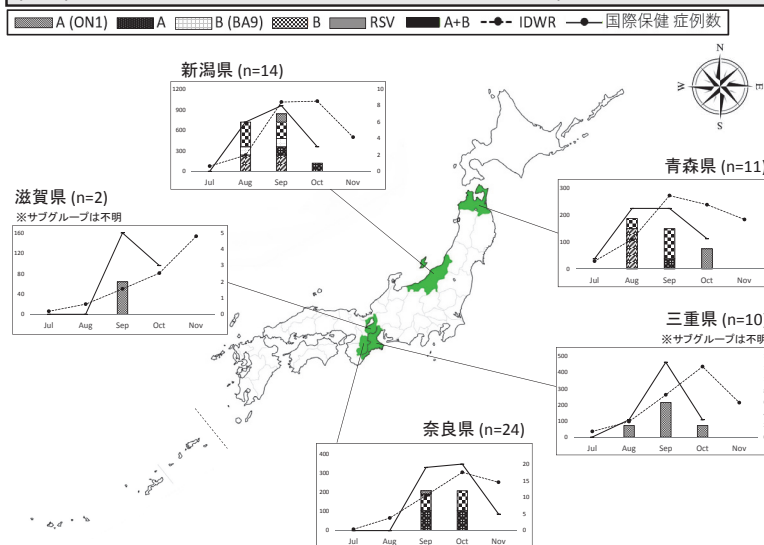
(2016.12.8 現在)

	全症例数	Subgroup						Genotype		Genotype 型別不能			検査中
		A	B	A+B	型別不能	陰性	検査中	ON1	BA9	A	B	A+B	
北海道	28	-	8	1	-	9	10	-	-	-	-	-	19
青森県	16	4	5	-	3	4	-	4	-	-	2	-	3
新潟県	17	6	7	-	1	3	-	4	2	-	3	-	4
東京都	11	-	1	-	4	6	-	-	-	-	-	-	7
静岡県	3	-	1	-	1	1	-	-	1	-	-	-	1
三重県	19	-	-	-	10	9	-	-	-	-	-	-	10
滋賀県	8	-	-	-	2	4	2	-	-	-	-	-	4
奈良県	44	12	11	-	1	10	10	-	-	-	-	-	34
香川県	26	-	10	-	1	10	5	-	4	-	-	-	12
山口県	24	-	8	-	-	4	12	-	1	-	2	-	17
熊本県	10	-	5	-	2	3	-	-	-	-	-	-	10
沖縄県	27	-	14	-	1	12	-	-	10	-	2	-	3
合計	233	21	70	1	26	75	39	8	18	-	9	-	85

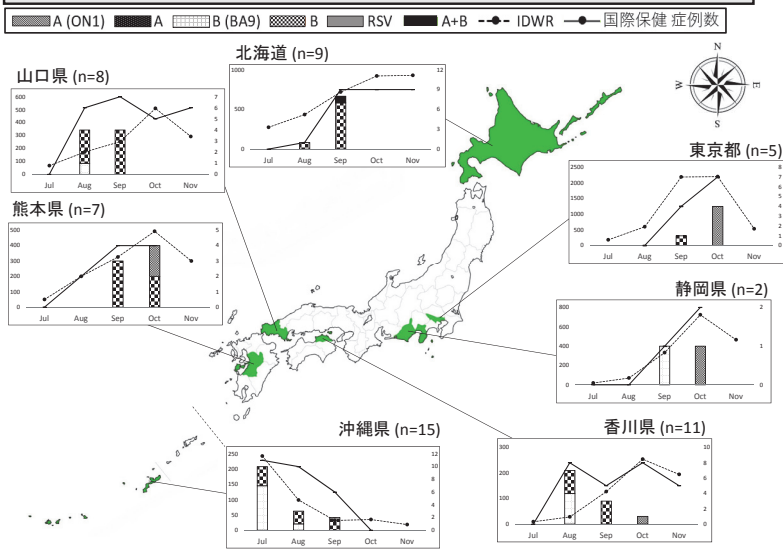
(図1) 2016-17年シーズン RSウイルス月別疫学曲線



(図2) 2016-17年シーズン RSウイルス疫学曲線 (A・B混合流行地域)



(図3) 2016-17年シーズン RSウイルス疫学曲線 (B型の流行地域)



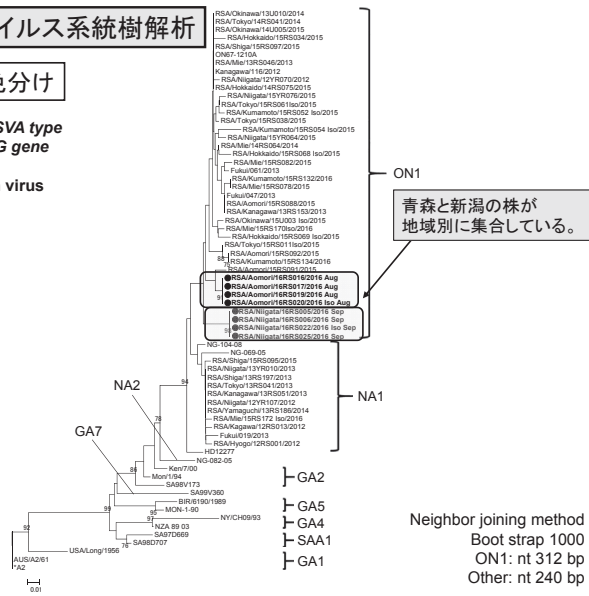
(図4) A型 RSウイルス系統樹解析

採取地域別に色分け

2016-2017 season RSV A type
Hyper Variable II on G gene

- : 2016-2017 season virus Aomori Niigata

*Root virus strain: A2



Neighbor joining method
Boot strap 1000
ON1: nt 312 bp
Other: nt 240 bp

(図5) B型 RSウイルス系統樹解析

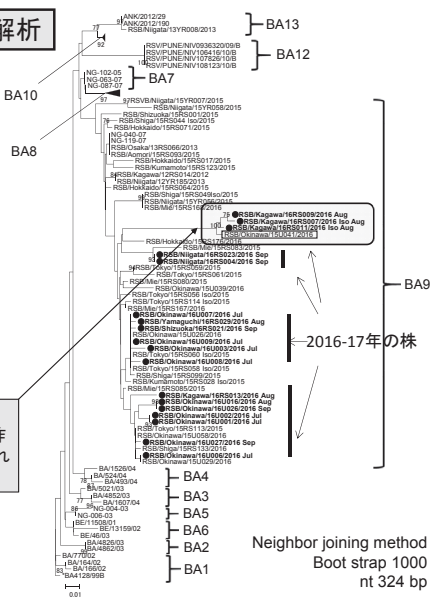
採取地域別に色分け

2016-2017 season RSV B type
Hyper Variable II on G gene

- : 2016-2017 season virus Niigata Shizuoka Kagawa Yamaguchi Okinawa

*Root virus strain: BA4128/99B

BA9型変異株
2016-17年に香川県から3株、昨シーズンに沖縄から1株検出されている。



Neighbor joining method
Boot strap 1000
nt 324 bp