

急性呼吸器感染症の病原体サーベイランスの手法の開発

研究分担者 小淵 正次 富山県衛生研究所ウイルス部
研究協力者 米田 哲也 富山県衛生研究所ウイルス部

研究要旨

入院例を含む急性呼吸器感染症(ARI)罹患小児から検体を収集し、本研究で開発、改良を重ねた duplexリアルタイムRT-PCR法により呼吸器ウイルスの検出を行った。過去2年間の調査結果も合わせて、上・下気道炎いずれの検体からもライノウイルスが最も多く検出された。さらに、ウイルス検出例の1/3は複数のウイルスが検出され、ライノウイルスとの組合せが多かった。一方で、インフルエンザウイルスやRSウイルスなど上・下気道炎で検出率に大きな差がみられるウイルスも明らかになった。本法はARI起因ウイルスの網羅的検索のみならずインフルエンザ非流行期における病原体サーベイランスにも有用であると考えられる。

A. 研究目的

地方衛生研究所では、感染症法に基づいてインフルエンザウイルスサーベイランスを実施している。一方で、インフルエンザウイルス以外にも急性呼吸器感染症(ARI)の起因ウイルスには、乳幼児の下気道炎や喘息増悪に関わるRSウイルスやライノウイルスなど臨床的に重要なウイルスが含まれるが、十分なサーベイランスが行われていないとはいえない。平成28年4月1日からは改正感染症法の施行により、インフルエンザ非流行期においても病原体検査を実施することとなり、インフルエンザウイルス以外の呼吸器ウイルスについても検索する必要性が出てきた。

そこで、本研究では現在開発中の呼吸器ウイルス遺伝子診断系を用いて、ARI罹患小児検体からウイルスの検出を行い、ARIの流行実態を明らかにするとともにその有用性を評価した。

B. 研究方法

富山県内3カ所の小児科医院において、ARIで受診した小児から、鼻腔ぬぐい液を採取した(インフルエンザ迅速診断陽性例は除く)。23種類の呼吸器ウイルス(ライノウイルスA・B・C、RSウイルスA・B、パラインフルエンザウイルス1・2・3・4型、A・B・C型インフルエンザウイルス、

ヒトメタニューモウイルス、コロナウイルスOC43・229E・NL63・HKU1株、エンテロウイルス、アデノウイルスB・C・D・E、ヒトボカウイルス)を対象とした duplexリアルタイム(r)RT-PCR法によりウイルスを検出・同定した。さらに、重症急性呼吸器感染症(SARI)についてもウイルス検索を行うため、平成28年11月より小児入院例を対象に加えた。

ライノウイルスについて、rRT-PCRのプライマー配列を見直した。また、検索対象として新たにヒトパレコウイルスとサフォードウイルスの追加を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、「疫学研究における倫理指針」に基づき、富山県衛生研究所倫理審査委員会に申請し、承認された(平成25年度 受付番号4、9、平成26年度 受付番号3および平成28年度 受付番号25-4変)。

C. 研究結果

1. ARI罹患小児からの呼吸器ウイルスの検出

昨年の本研究で、上・下気道炎いずれの患児においてもライノウイルスが最も多く検出されたことを報告した。そこで、臨床症状と起因ウイルス

の関連を明らかにするため、本年度の調査分も含めてこれまでの全調査期間（2013年10月～2016年11月）の647名から検出されたウイルスを分析した。647名の内訳は上気道炎232名（年齢：1か月～14歳8か月、中央値：1歳8か月）、下気道炎415名（年齢：3週間～12歳5か月、中央値：1歳5か月）で、受診時体温は両者間でほとんど違いはみられなかった（38.6℃ vs 38.5℃）。昨年と同様に、上・下気道炎いずれにおいてもライノウイルスが最も多く検出され、それぞれ検出ウイルスの30.3%と30.7%を占めた（図1）。さらに、両者に共通の起因ウイルスとして、ヒトボカウイルスとパラインフルエンザウイルスがそれぞれ約17%と約10%を占めた。一方で、上気道炎患児ではインフルエンザウイルスが比較的多く（9.1%）、下気道炎患児からはRSウイルスが多く検出された（15.6%）。また、パラインフルエンザウイルス4型は下気道炎患児のみ（9名）から、コロナウイルス229E株は上気道炎患児のみ（1名）から検出された。アデノウイルスDは上・下気道炎いずれからも検出されなかった（データ未提示）。

同一患児からのウイルス検出数を比較したところ、上・下気道炎のそれぞれ129名（55.6%）と232名（55.9%）から1種類のウイルスが検出された（以下、単独感染）。一方で、複数のウイルスが検出された（以下、重複感染）児もそれぞれ57名（24.6%）と116名（28.0%）に上り、両者ともウイルス検出例の約1/3を占めた（図2）。ウイルス別に単独・重複感染例をみたところ、上・下気道炎いずれもライノウイルス検出例の約半数は他の呼吸器ウイルスとの重複感染であった（図3）。一方、両者に共通して、ヒトボカウイルスは単独感染よりも重複感染が多く、逆にパラインフルエンザウイルスやRSウイルスは重複感染よりも単独感染が多い傾向が見られた（図3）。

2. 入院例からの呼吸器ウイルスの検出

平成28年11月から平成29年1月にかけて、肺炎等下気道炎4例（1歳2例、2歳1例、8歳1例、いずれも酸素吸入あり）および上気道炎1例（新生児）から採取された検体より呼吸器ウイルスの検出を試みた。これら患児は、入院先で実施したインフルエンザウイルス、RSウイルス等のウイルス迅速診断、細菌培養検査が陰性であった。

rRT-PCRの結果、下気道炎患児2例からそれぞれ、RSウイルスB、コロナウイルスOC43株が検出された。一方、上気道炎の1例からはヒトパレコウイルス3型が検出された。

3. duplex rRT-PCRの改良

これまでの調査でウイルスが検出されなかった検体を対象として、次世代シーケンサーを用いて検体中のRNAの網羅解析を行ったところ、一部の検体からライノウイルスCの遺伝子が検出された（国立研究開発法人日本医療研究開発機構新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業、迅速・網羅的病原体ゲノム解析法を基盤とした感染症対策ネットワーク構築に関する研究平成27年度委託研究開発成果報告書）。検出されたライノウイルスCの遺伝子配列を調べた結果、本研究で用いたライノウイルス検出用のフォワードプライマーに3塩基のミスマッチが見つかった。そこで、この塩基配列に合わせてフォワードプライマーを作成し、反応液に最終濃度0.1 μMで加えた。その結果、これまで全く検出されなかったライノウイルスCも検出することができた（データ未提示）。

最近、ARIや急性胃腸炎の起因ウイルスとして報告されているヒトパレコウイルスおよびサフォードウイルスを検索対象に追加するため、duplex rRT-PCRの改良を行った。本法では、同一反応チューブ内で2種類のウイルス遺伝子を検出できるが、ヒトメタニューモウイルスおよびアデノウイルスE検出用の各チューブには当該ウイルス検出用のプライマー・プローブ（FAM標識）のみが含まれる。そこで、HEX標識したヒトパレコウイルスおよびサフォードウイルス検出用プライマー・プローブセット（塩基配列はSelvaraju *et al*, *J Clin Microbiol*, 51: 452-458, 2013; Naeem *et al*, *J Gen Virol*, 95: 1945-1957, 2014を参照）を作成した。これにより、同一反応チューブ内においてヒトメタニューモウイルス/ヒトパレコウイルス、アデノウイルスE/サフォードウイルスの組合せで2種類のウイルスが検出可能な反応系を構築した（データ未提示）。

D. 考察

昨年と同様に、上・下気道炎患児いずれにおい

でもライノウイルスが最も多く検出され、その割合も両者に違いはみられなかった。ライノウイルスは鼻かぜの原因ウイルスとしてよく知られているが、下気道炎の起因ウイルスとしても重要であることが示された。一方で、インフルエンザウイルスやRSウイルスなど上・下気道炎で検出率に大きな差がみられるウイルスも明らかになった。今回、ウイルスが検出された児の約1/3は他の呼吸器ウイルスとの重複感染であることが示されたが、単独感染と重複感染の臨床的違いは明らかにできなかった。

改正感染症法の施行に伴い、インフルエンザ非流行期においても検体の収集とウイルス検査を実施することになり、インフルエンザウイルス陰性例も検査結果の報告が義務付けられた。本研究で開発したduplex rRT-PCR法は2回の改良を重ね、呼吸器ウイルスを網羅的に検索できる遺伝子診断系となった。本法で得られた調査結果から、インフルエンザ非流行期には上・下気道炎に共通して検出率が高かったライノウイルスやヒトボカウイルス、パラインフルエンザウイルスなどを優先的に検査することで、効率的な実験室診断ができると考えられる。今後も調査を継続し、各ウイルスの季節消長などを明らかにすることにより、インフルエンザ流行期・非流行期別に検索対象となるウイルスパネルを提案していきたい。

今回の調査では、SARI患児からRSウイルスB、コロナウイルスOC43株が検出されたが、これらウイルスは同時期のARI患児からも検出された。したがって、ウイルスの種類と重症化傾向の関連性は明らかにできなかった。調査を継続して症例数を増やし、さらなる検討を重ねたい。

E. 結論

ライノウイルスは上気道炎のみならず下気道炎においても重要なARI起因ウイルスであることが明らかになった。さらに、本研究で開発したduplex rRT-PCR法はインフルエンザ非流行期のARI病原体サーベイランスにおいても有用なツールとなり得ることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) 新谷尚久, 小淵正次. 保育園入園後の呼吸器ウイルス重複感染に関する考察. 外来小児科. 23(1): 93-96, 2016.
 - 2) 新谷尚久, 小淵正次. 呼吸器症状が長引く乳幼児からの呼吸器ウイルスの検出 - 保育園低年齢児における遷延する呼吸器症状の解明に向けて. 小児科. 57(12): 1483-1488, 2016.
2. 学会発表
 - 1) 小淵正次, 新谷尚久. 呼吸器症状が長引く乳幼児からの呼吸器ウイルスの検出. 第57回日本臨床ウイルス学会, 福島, 2016年6月.
 - 2) 小淵正次, 新谷尚久, 八木信一, 小栗絢子, 米田哲也, 稲崎倫子, 佐賀由美子, 名古屋真弓, 板持雅恵, 稲畑 良. 急性上・下気道炎患児における呼吸器ウイルスの検索と疾患との関連性. 第64回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2016年10月.
 - 3) 八木信一, 足立雄一, 小淵正次. 富山市の地域クリニックにおける乳幼児の呼吸器ウイルス学的調査からこどものかぜ症候群を考える. 第49回日本小児呼吸器学会, 富山, 2016年10月.

G. 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

本研究の実施にあたり、臨床検体の採取にご協力いただいた小栗小児科医院の小栗絢子先生、八木小児科医院の八木信一先生、しんたにこどもクリニックの新谷尚久先生ならびに富山大学医学部小児科学教室の種市尋宙先生に深謝いたします。また、サフォードウイルスのrRT-PCR法の開発にご協力いただいた金沢医科大学医学部微生物学講座の姫田敏樹先生に深謝いたします。

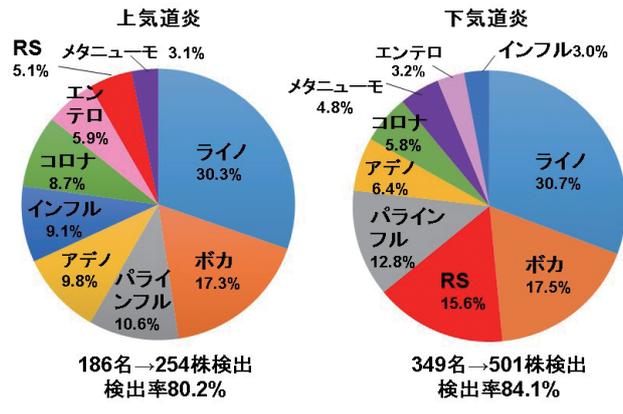


図1. 上・下気道炎別検出ウイルス

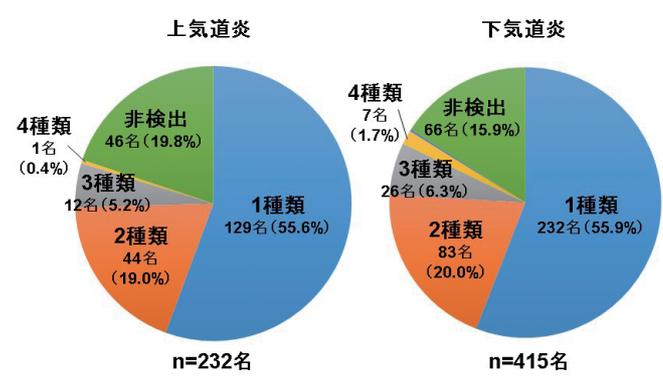


図2. 同一患者からのウイルス検出数

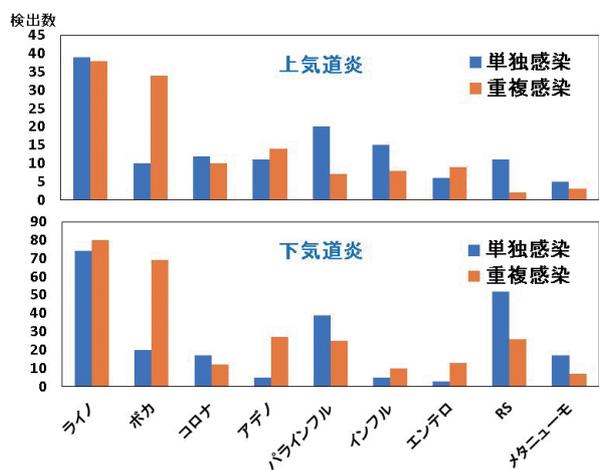


図3. ウイルス別単独・重複感染例数