

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、duplex リアルタイム（r）RT-PCR 法により呼吸器ウイルスの検出を行った。過去3年間の調査結果と合わせ、ライノウイルスが最も多く検出された。本ウイルスは、通年で流行がみられるが春季に多く検出され、多種類の遺伝子型が同時に流行している実態が明らかになった。さらに、重症例からも多く検出されることから、上気道炎のみならず下気道炎においても検査対象にすべき重要なウイルスであることが示された。本研究で開発したrRT-PCR法は、ARI起因ウイルスを網羅的に検出できることから、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

全国の地方衛生研究所（地衛研）では、感染症法に基づいて感染症発生動向調査（患者および病原体サーベイランス）を実施している。しかし、インフルエンザやRSウイルス感染症以外の急性呼吸器感染症（ARI）については、検体の収集が困難であったり、検査法が標準化されていないことなどから、十分なサーベイランスが行われていないとはいえない。一方で、平成28年4月1日から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実験室内診断の必要性が出てきた。

そこで、本研究では呼吸器ウイルス遺伝子診断法を開発して、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）。25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、ヒトポカウイルス、パレコウイルス、サフォードウイルス）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、小児入院例を対象に加えた。

ライノウイルス陽性検体について、RT-PCR法によりウイルスのVP2/VP4遺伝子領域を増幅し、ダイレクトシーケンス法によりPCR増幅産物の塩基配列を決定してウイルス株の遺伝子型を同定した。

（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

平成25年10月～平成29年12月において、ARI罹患小児860名から検体を採取し、呼吸器ウイル

スを検出・同定した。その結果、860検体から21種類のウイルスが検出された(計985株)。ウイルス別ではライノウイルスが289例と最も多く検出され、全体の29.3%を占めた(図1)。次いで、ヒトボカウイルスが171例(17.4%)で、これら2種類のウイルスで約半数を占めた。ヒトボカウイルスは、大半が他の呼吸器ウイルスと同時に検出された(データ未提示)。一方で、コロナウイルス229E株、パレコウイルスはそれぞれ1例、アデノウイルスDおよびサフォードウイルスは全く検出されなかった(図1)。

気管支炎や肺炎などの下気道炎といった重症例(酸素吸入あり、一部上気道炎)についても呼吸器ウイルスを検索するため、平成28年11月～平成29年9月にかけて入院患児14名から検体を採取してウイルスの検出を行った(表1)。その結果、ライノウイルスが3名から検出された。また、パラインフルエンザウイルス3型およびパレコウイルス3型がそれぞれ2名から検出された。これらのうち、1名はライノウイルスとパレコウイルス3型の重複感染であった。さらに、RSウイルスB、コロナウイルスOC43株、コロナウイルスNL63株がそれぞれ1名から検出された。

2. ライノウイルス流行株の解析

これまで本研究で、ライノウイルスは上・下気道炎の区別なく高率に検出されるウイルスであることを報告してきた。ライノウイルスはA、B、Cの3つの種に分類され、現在167種類の遺伝子型が報告されているが、国内流行株の種類や遺伝子型の詳細はほとんど解析されていない。そこで、本ウイルスの流行実態を明らかにするために、平成27年1月～平成28年12月までの富山県におけるライノウイルスの検出状況および検出された流行株の種類と遺伝子型を調べた。

ライノウイルス陽性の194検体において、ライノウイルスA、B、Cはそれぞれ104例(53.6%)、18例(9.3%)、60例(30.9%)であった。ウイルスは通年で検出されたものの、春季に多い傾向がみられた(図2)。ライノウイルスAは平成27、28年においてそれぞれ20種類、18種類の遺伝子型がみられたが、平成27年ではA78、A82、A40が、平成28年にはA28、A58が多かった。ライノウイルスCにおいても多くの遺伝子型の流行が認めら

れたが、ライノウイルスAと同様に平成27年と平成28年では主流株の遺伝子型は異なっていた。ライノウイルスA、B、Cは、いずれも上・下気道炎患者から検出され、種による相違は認められなかった。

D. 考察

本研究では、ARI起因ウイルスを迅速かつ網羅的に検出できる実験室内診断法を開発してその有用性を検証するため、患者検体を収集してウイルスを検索してきた。呼吸器ウイルスを取りこぼしなく検出するため、これまで報告されている主要な呼吸器ウイルス25種類を検出可能なduplex rRT-PCRの系を構築した。平成25年10月～平成29年12月の約4年間にわたり、ほぼ毎週、通年でARI罹患小児検体を収集してウイルスの検出を行なった。その結果、860検体から21種類のウイルスが検出された。その中でも、ライノウイルスが最も多く検出され、全体の1/3を占めた。ライノウイルスは鼻かぜの原因ウイルスとして知られているが、いくつもの遺伝子型が同時に流行することが通年の患者発生につながっているものと思われた。さらに、昨年度および今年度の調査結果より、ライノウイルスは入院例を含むSARI罹患小児からも多く検出されており、上気道炎のみならず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。したがって、ライノウイルスはARIやSARIのウイルス検査で優先して検査すべき病原体であるといえる。

改正感染症法の施行に伴い、地衛研では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となり、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法はインフルエンザを含む呼吸器ウイルスを網羅的に検出できる実験室内診断法であることから、インフルエンザ非流行期のARI病原体検査にも有用であると思われる。rPCR法は検出感度や特異性が高く、分離培養が困難な病原ウイルスも検出・同定できる。一方で、蛍光プローブ等の試薬類が高価である。しかし、今回の調査結果から、25種類のうち16種類のウイルス、すなわち、1) ライノウイルス、2) RSウイルスA、3) RSウイルスB、

4) A型インフルエンザウイルス、5) B型インフルエンザウイルス、6) パラインフルエンザウイルス1型、7) パラインフルエンザウイルス2型、8) パラインフルエンザウイルス3型、9) パラインフルエンザウイルス4型、10) ヒトメタニューモウイルス、11) コロナウイルスOC43株、12) コロナウイルスNL63株、13) エンテロウイルス、14) アデノウイルスB、15) アデノウイルスC、16) ヒトボカウイルスを検索対象とすることで、ほとんどカバーできることが明らかとなった。これらウイルスを本法で検出する場合、96ウェルプレート1枚につき10検体を同時に検査することで、類似の市販キットと比較して1/4程度にコストを抑えることができる。したがって、他の地衛研でも本法を検査に用いることは十分可能であると思われる。

E. 結論

ARIの起因ウイルス25種類を迅速・簡便かつ網羅的に検出できるrRT-PCR法を開発し、入院例を含む患児から検体を収集して呼吸器ウイルスを検索した。その結果、本法がARIの実験室内診断法として有用であることが確かめられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 小淵正次, 米田哲也, 新谷尚久, 八木信一, 小栗絢子, 種市尋宙, 稲崎倫子, 佐賀由美子, 板持雅恵. 富山県におけるライノウイルス感染

症と流行ウイルスの分子疫学. 第65回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2017年10月.

- 2) 八木信一, 足立雄一, 米田哲也, 小淵正次, 藤田修平. 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第2報. 第50回日本小児呼吸器学会, 東京, 2017年11月.

- 3) Masatsugu Obuchi, Tetsuya Yoneda, Naohisa Shintani, Shinichi Yagi, Ayako Oguri, Hiromichi Taneichi, Noriko Inasaki, Yumiko Saga, Masae Itamochi. Molecular epidemiology of rhinovirus in children with acute respiratory tract infections in Toyama, Japan. The 10th World Congress of the World Society for Pediatric Infectious Diseases. 中国・深圳市, 2017年12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。

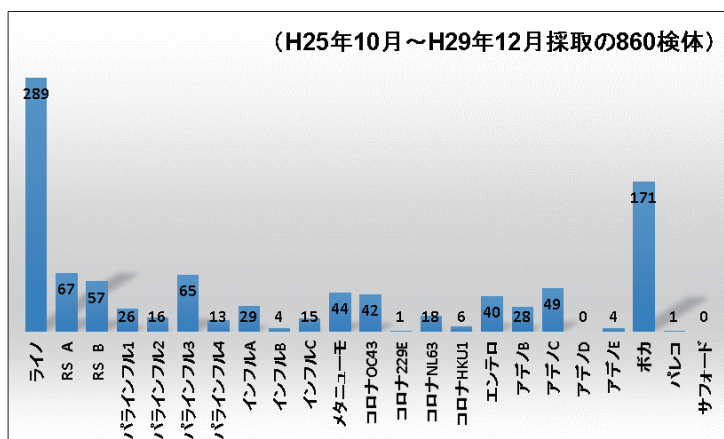


図1. 呼吸器ウイルスの検出

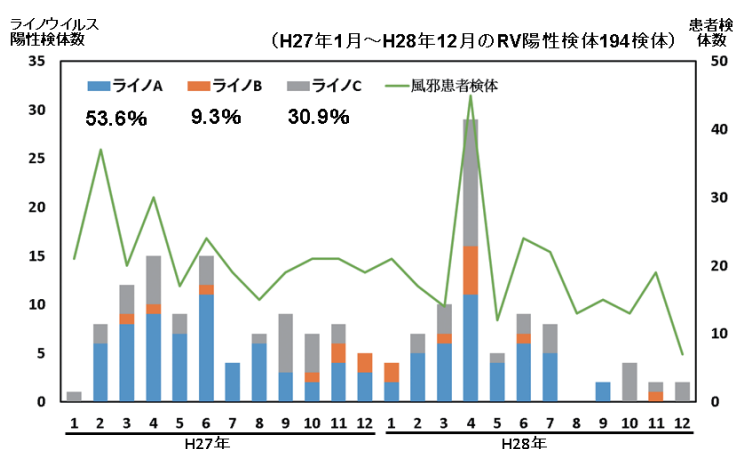


図2. ライノウイルスの季節性

表1. 入院症例におけるウイルスの検出

| 患者 | 年齢 | 性別 | 臨床診断 | 検体採取日 | 検出ウイルス |
|----|-------|----|----------|--------|--------------------|
| 1 | 2歳2か月 | 女 | 下気道炎 | 11月22日 | RSウイルスB |
| 2 | 1歳7か月 | 女 | 肺炎 | 11月25日 | - |
| 3 | 1歳1か月 | 女 | 下気道炎 | 12月8日 | コロナウイルスOC43株 |
| 4 | 新生児 | 男 | 上気道炎 | 12月9日 | パレコウイルス3型 |
| 5 | 8歳0か月 | 男 | 肺炎 | 1月30日 | - |
| 6 | 2歳9か月 | 男 | 扁桃炎 | 3月13日 | パレコウイルス3型、ライノウイルスC |
| 7 | 4歳0か月 | 男 | 気管支肺炎 | 7月28日 | コロナウイルスNL63株 |
| 8 | 2歳3か月 | 男 | 肺炎 | 4月20日 | ライノウイルス(種未同定) |
| 9 | 3歳2か月 | 女 | 反復性関節炎疑い | 6月10日 | - |
| 10 | 1歳6か月 | 男 | 急性上気道炎 | 6月22日 | パラインフルエンザウイルス3型 |
| 11 | 2歳2か月 | 女 | 急性呼吸不全 | 6月26日 | - |
| 12 | 2歳3か月 | 男 | 急性気管支炎 | 7月10日 | パラインフルエンザウイルス3型 |
| 13 | 5歳0か月 | 男 | 喘息性気管支炎 | 9月6日 | - |
| 14 | 3歳4か月 | 男 | 喘息性気管支炎 | 9月6日 | ライノウイルスC |

(H28年11月～H29年9月の大学附属病院入院患者、酸素吸入あり)