

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	佐多 徹太郎	富山県衛生研究所（平成27年度）
研究分担者	小淵 正次	富山県衛生研究所（平成28-29年度）
研究協力者	小淵 正次	富山県衛生研究所ウイルス部（平成27年度）
	滝澤 剛則	富山県衛生研究所ウイルス部（平成27年度）
	米田 哲也	富山県衛生研究所ウイルス部（平成28-29年度）

研究要旨

25種類の呼吸器ウイルスを検出できる duplex リアルタイム (r) RT-PCR 法を開発し、入院例を含む急性呼吸器感染症 (ARI) 罹患小児の検体からウイルスの検出を行なった。その結果、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、呼吸器症状が長引く児や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动向調査を実施している。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るとはいえない。一方で、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実験室内診断の必要が出てきた。

そこで、本研究では迅速かつ網羅的な呼吸器ウイルス遺伝子検出法を開発して、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（平成28年度改良）、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、パレコウイルス（平成28年度追加）、サフォードウイルス（平成28年度追加）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（平成28-29年度）。

RSウイルスおよびライノウイルス陽性検体について、RT-PCR法によりウイルス遺伝子を増幅し、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詳細な解析を行った。

（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。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。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。

今回の調査対象のなかで呼吸器症状が2週間以上続く保育園入園1年以内の2歳未満児（44名）についてみたところ、ライノウイルスが最も多く（19.0%）、ウイルスが検出された児の半数からは複数のウイルスが検出された。

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。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. RSウイルス流行株の解析

2014/15年シーズン（平成26年冬季）における全国ならびに富山県内の定点あたりのRSウイルス感染症患者報告数は過去10年間で最多であった。そこで、その原因を明らかにするため、平成25年10月～平成27年5月の期間に本研究で採取されたRSウイルス陽性検体（35検体）について

ウイルス学的検索を行った。その結果、2014/15年シーズンおよびその前シーズンのいずれもサブグループAに属するウイルスがサブグループBより多く、2014/15年シーズンには前者の割合が67%から74%に増加したことが明らかになった。両シーズンともサブグループA流行株の遺伝子型はNA1とその変異型のON1であったが、2014/15年シーズンにはON1の割合が50%から94%に急増した。

3. ライノウイルス流行株の解析

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。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、ライノウイルスは呼吸器症状が長引く保育所入園後間もない児や入院例を含む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。

2014/15年シーズンに富山県内においてRSウイルスの主流株となったON1は2010年にカナダで見つかった変異株で、中和抗体の標的抗原であるG蛋白の遺伝子に72塩基の繰り返し配列の挿入がみられる。今回の調査で、この変異ウイルスの流行が患者数の増加につながった可能性が示唆されたことから、RSウイルス感染症についても発生動向を監視していく必要があると思われた。

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

- 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, 小栗絢子, 新谷尚久, 八木信一, 稲畑 良, 稲崎倫子, 佐賀由美子, 名古屋真弓, 佐多徹太郎, 滝澤剛則. 富山県におけるRSウイルス感染症の流行と流行ウイルスの分子疫学. 第63回日本ウイルス学会学術集会, 福岡, 2015年11月.
- 2) 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.
- 3) 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.

- 4) 八木信一, 足立雄一, 小渕正次. 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.
- 5) 小渕正次, 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.
- 6) 八木信一, 足立雄一, 米田哲也, 小渕正次, 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.
- 7) Obuchi M, Yoneda T, Shintani N, Yagi S, Oguri A, Taneichi H, Inasaki N, Saga Y, Itamoch M. 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。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。