

# サーベイランスにおける呼吸器感染症からのウイルス検出 (2010年度)

中村雅子・平野映子・小和田和誠・石畝 史・望月典郎

Virus Surveillance of Acute Respiratory Infections in Fukui Prefecture, in 2010

Masako NAKAMURA, Eiko HIRANO, Kazuaki KOWADA, Fubito ISHIGURO, Michio MOCHIZUKI

## 1. はじめに

急性呼吸器感染症の起因ウイルスとしてはインフルエンザウイルスがまず挙げられるが、それ以外にもRSウイルス、アデノウイルス、ライノウイルス、コロナウイルスなど200種以上<sup>1)</sup>のウイルスがある。最近10年間でもヒトメタニューモウイルス<sup>2)</sup>やヒトボカウイルス<sup>3)</sup>など新たなウイルスが報告されている。

インフルエンザA(H1N1)2009の流行時には発熱外来や入院・重症事例の検査を行なったが、インフルエンザ陰性の検体も多く、他の病原体による同様の症例の紛れ込みが相当数あったと考えられた<sup>4)</sup>。このような危機管理に備えるために、呼吸器系ウイルスの効率的な検査法をサーベイランスに導入し、県内の流行状況を明らかにしておくことが必要である。

当センターにおける呼吸器系感染症のサーベイランスでは、以前は2~3種類の細胞を用いたウイルス分離法でアデノウイルスやエンテロウイルスの一部を検出してきた。しかし、検出できるウイルスの種類は少なかったため、呼吸器系疾患のウイルス検索の充実を目指して、遺伝子検査法を順次検討していった。

まず2007年度から2年間の調査研究「福井県内に流行する呼吸器系感染症の原因ウイルスの究明—ヒトメタニューモウイルスとRSウイルスについて—」により、RSウイルスとヒトメタニューモウイルスの検出法の検討と県内流行状況の調査を行い<sup>5)</sup>、これらのウイルスをサーベイランスの病原体検査に追加した。また、2008年度からエンテロウイルスおよびライノウイルスの遺伝子検査を導入した。さらに、今年度からは調査研究「アデノウイルスの病原体サーベイランスの効果的な運用に関する研究」によりアデノウイルスの解析を、また「重症呼吸器ウイルス感染症のサーベイランス・病態解明及び制御に関する研究」により、ヒトボカウイルスの検出を検討している<sup>6)</sup>。

これらの方法を導入した結果、今年度の呼吸器感染症の検体からのウイルス検出率はかなり向上し、県内の流行状況を把握することが可能となったので、その概要を報告する。

## 2. 材料と方法

### 2.1 材料

2010年4月~2011年3月、福井県内の病原体定点において、インフルエンザ様疾患を除く上気道炎、下気道炎などの急性呼吸器系症状を示す患者152名から採取した咽頭拭い液・鼻汁・喀痰など152検体。

このうち85検体は呼吸器系疾患サーベイランスにより、67検体は調査研究「アデノウイルスの病原体サーベ

ランスの効果的な運用に関する研究」により採取された。

### 2.2 方法

#### 2.2.1 ウイルス分離

検体はウイルス輸送培地(VTM:0.5%BSA,ペニシリン500U/mL,ストレプトマイシン500µg/mL,ゲンタマイシン100µg/mL,アンフォテリシンB2µg/mL添加MEM培地)に採取し、搬入後に0.22µmフィルターでろ過し検査に供した。

細胞はHEp-2細胞とCaCo-2細胞を用い、どちらも増殖液は2%FBS添加GIT培地(和光純薬)、維持液はイーグルMEM培地「ニッスイ」(日水製薬)を使用した。

ウイルス分離は96wellマイクロプレート単層培養法で37°C炭酸ガス培養を行い、1週間ずつ3代継代した。CPEが現れた場合はウイルス液を100TCIDに調製し、デンカ生研などの中和抗血清を用いて中和試験を行った。

#### 2.2.2 RT-PCR法・PCR法

EZ1 Virus Mini Kit v2.0(QIAGEN)を用い、検体200µLから60µLの核酸抽出液を得、RT-PCR法およびPCR法の試料とした。

RSウイルスとヒトメタニューモウイルスは、Teresaら<sup>7)8)</sup>が報告したRSウイルスのglycoprotein領域およびヒトメタニューモウイルスのfusion領域を増幅するプライマーを用い、AccessQuick RT-PCR System(Promega)を使用するone-step RT-PCR法を行った。

ヒトボカウイルスは、Allanderらの方法<sup>3)</sup>に準じ、Ex Taq(TaKaRa)を使用して、NP1領域を増幅するPCR法<sup>9)</sup>を行った。

アデノウイルスは、Miura-Ochiai<sup>10)</sup>らの方法に準じ、Speed STAR HS DNA Polymerase(TaKaRa)を使用してhexon領域を増幅するPCR法を行ない、増幅産物の350bpの塩基配列をBLAST検索することにより型別した。

ライノウイルスおよびエンテロウイルスは、W. Allan Nixらの方法<sup>11)</sup>に準じ、逆転写にSuperScript III(Invitrogen)を、PCR反応にEx Taq(TaKaRa)を使用しVP-1領域を増幅するRT-PCR法を行った。その後、増幅産物の塩基配列をBLAST検索することにより同定した。

## 3. 結果

### 3.1 ウイルス検出状況

RSウイルスが23件、ヒトメタニューモウイルスが5件、ヒトボカウイルスが4件、アデノウイルスが37件、ライノウイルスが14件およびエンテロ系ウイルスが21件、合計104件のウイルスが検出された。それぞれのウイルスの型別の検出数は表1に示すとおりである。

このうち2種類のウイルスが重複検出された検体が7検体あったので、152検体中97検体がウイルス陽性という結果であった。

RSウイルス、ヒトメタニューモウイルス、ヒトボカウイルスおよびライノウイルスはすべてウイルス分離陰性であった。アデノウイルスは1型3件を除きウイルス分離陽性で容易に中和可能であった。

A群コクサッキーウイルス4型・6型・16型およびエンテロウイルス71型はウイルス分離陰性であった。B群コクサッキーウイルス1型・2型、エコーウイルス6型・25型はウイルス分離陽性で容易に中和可能であった。エンテロウイルス68型は2件中1件がCaCo-2細胞3代目でウイルス分離陽性であった。

表1 ウイルス検出状況

		検出数(分離陽性)
RSウイルス	RSV(A)	20 (0)
	RSV(B)	3 (0)
ヒトメタニューモウイルス		5 (0)
ヒトボカウイルス		4 (0)
アデノウイルス	AdV1	13 (10)
	AdV2	13 (13)
	AdV3	9 (9)
	AdV5	1 (1)
	AdV6	1 (1)
ライノウイルス		14 (0)
エンテロ系ウイルス	CoxA4	4 (0)
	CoxA6	3 (0)
	CoxA16	1 (0)
	CoxB1	2 (2)
	CoxB2	3 (3)
	Echo6	3 (3)
	Echo25	2 (2)
	Entero68	2 (1)
	Entero71	1 (0)
合 計		104
(陰性)		55
重複検出	HboV、ライノ	1
	RS(A)、ライノ	2
	RS(A)、CoxB1	1
	Ad2、CoxA4	1
	Ad2、ライノ	2

### 3.2 月別検出数

月別の検出状況を図1に示す。

RSウイルスは11月～翌年1月に主に検出された。ヒトメタニューモウイルスは5月と翌年2月、3月に、ヒトボカウイルスは8月、10月、11月、翌年1月に検出された。

アデノウイルスは、6月～8月には1型および2型が多く検出され、翌年2月～3月には3型が多く検出された。

ライノウイルスは1年を通じて検出された。エンテロ系ウイルスは6月～8月に主に検出された。

### 3.3 患者年齢および症状

ウイルス陽性となった患者の年齢および症状を表2に示す。年齢および最高発熱の差の検定はDuncan's multiple range testにより行った。

患者年齢はバラツキが大きかったが、RSウイルスとヒトメタニューモウイルスが平均1.4歳、1.0歳と低く、アデノウイルスとエンテロ系ウイルスが3.0歳と若干高かった(RSウイルスとエンテロ系ウイルス、ヒトメタニューモウイルスとエンテロ系ウイルスおよびヒトメタニューモウイルスとアデノウイルスがP<0.01、RSウイルスとアデノウイルスがP<0.05)。

受診時の最高発熱はアデノウイルスが平均39.21度と最も高く、ライノウイルスが38.54度と最も低かったが、あまり差が見られなかった(ヒトボカウイルスとライノウイルスがP<0.01、アデノウイルスとライノウイルスがP<0.05)。

上気道炎と下気道炎の発症率を比較すると、RSウイルスは下気道炎が高く、アデノウイルスとエンテロ系ウイルスは上気道炎が高かった。ヒトメタニューモウイルス、ヒトボカウイルスおよびライノウイルスは例数は少ないが差はみられなかった。検査対象にアデノウイルス疑いで採取した検体を含むため、呼吸器症状に加えて結膜炎を起こしていた検体が25検体あったが、このうち11検体からアデノウイルスが検出された。

重複検出7例については特に重篤な症例はなかったが、アデノウイルスとライノウイルスが重複検出された2例は発熱が39.8度および40.0度と単独検出例に比較して高かった。

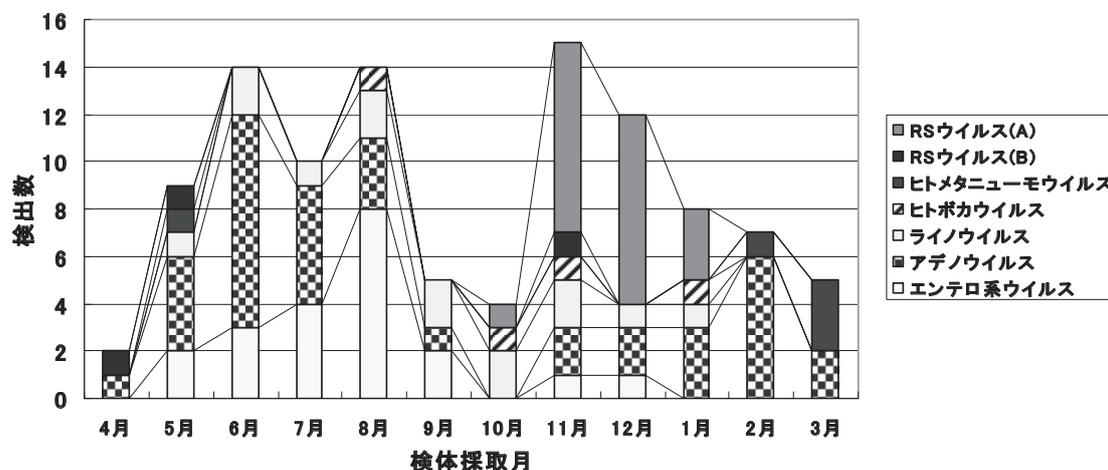


図1 呼吸器系ウイルス月別検出状況 (2010年4月～2011年3月、福井県)

表2 患者年齢および症状

検出ウイルス	年齢	症 状			
		発熱(°C)	上気道炎	下気道炎	その他の症状
RSウイルス	1.4 ± 1.4	38.95 ± 0.95	2	21	結膜炎1
ヒトメタニューモウイルス	1.0 ± 1.0	39.02 ± 0.61	2	3	
ヒトボカウイルス	2.5 ± 0.6	39.13 ± 0.68	2	2	結膜炎1
ライノウイルス	2.1 ± 1.8	38.54 ± 0.87	7	7	結膜炎2
アデノウイルス	3.0 ± 2.3	39.21 ± 0.55	34	2	結膜炎11、発疹2、嘔吐1、下痢1
エンテロ系ウイルス	3.0 ± 1.7	38.88 ± 0.81	18	1	結膜炎4、発疹1、嘔吐2、下痢1

\*\* : P&lt;0.01 , \* : P&lt;0.05

#### 4. 考 察

従来からのウイルス分離法に加え遺伝子検出法を併用することによって、検査対象ウイルスが増え、呼吸器系ウイルスの流行状況をより正確に把握することが可能になった。

RSウイルスとヒトメタニューモウイルスは福井県においては2007年度から検査項目に加えている。

今年度は、RSウイルスは11月～12月にA型が多く検出された。前回の調査<sup>5)</sup>と同じく、検討した他のウイルスに比べて患者年齢が低く、症状では下気道炎の割合が高かった。RSウイルスはインフルエンザ流行前の11月から翌年1月にかけて流行があるといわれている。これまでの県内の流行状況をみると、2008年のみ夏季にA型の流行があったが、その他の年は冬季に流行した。2007/08シーズンにはA型とB型両方が検出されたが、その他の年は2008/09シーズンにはA型、2009/10シーズンにはB型、2010/11シーズンにはA型と、どちらかの型が主流となった。両方の型が検出された年は流行規模が大きかった。

また、ヒトメタニューモウイルスは、2月～5月に検出された。調査を始めた2007年には通年に渡って検出されたが、それ以降は他の報告<sup>12) 13)</sup>と同じく春季にのみ検出されている。

ボカウイルスは2005年にスウェーデンで発見された<sup>3)</sup>新しいウイルスである。県内では今回初めて検出され、国内他の報告<sup>9)</sup>と同様、福井県においても乳児の呼吸器感染症の一因となっていることが示唆された。今後過去の侵淫状況を調査するとともに、サーベイランス項目に加え、その動向を把握していきたい。

アデノウイルスは、調査研究用にアデノウイルス疑いの検体を収集していた関係で検出数が多かった。例年は検出されない2月～3月に3型が多く検出された。この頃咽頭結膜熱の患者報告数も増加しており、冬季に咽頭結膜熱の小流行が確認された。検出されたほとんどの検体が分離陽性で中和試験可能であり、呼吸器系の検体については緊急性を求められない場合は遺伝子検査はあまり必要ないと考えられた。ただ、眼科疾患を引き起こすアデノウイルスには分離が困難であったり中和抗血清がない型が多く<sup>14)</sup>、結膜拭い液からの検出には遺伝子検査が必要である。

ライノウイルスは年間を通じて検出され、他のウイルスとの重複検出も多かった。重症例は少ないが気管支喘息の憎悪に関係しているといわれている。今回の調査では最高発熱は他のウイルスよりも低く、重複感染例でも特に重症化した例はなかったが、今後も継続して調査する必要があると考えられる。

エンテロ系ウイルスについては、夏季を中心に多種類の

ウイルスが検出された。この中には本年に流行した手足口病の原因ウイルスであるA群コクサッキーウイルス16型やエンテロウイルス71型も含まれていた。B群コクサッキーウイルスやエコーウイルスはウイルス分離・中和試験可能であったがA群コクサッキーウイルスは遺伝子検査でしか検出できなかった。

また、重症呼吸器系感染症に関与することが知られているエンテロウイルス68型が、8月に2件検出された。いずれも3才男児で、症状は1名は40.3度の発熱と結膜炎、1名は39.0度の発熱と気管支炎であった。この他に9月に不明熱の患者からも1件検出された。エンテロウイルス68型はこれまで国内ではあまり検出数が多くなかったが、大阪市の報告<sup>15)</sup>をはじめ、2010年には全国的に検出数が増加していた。福井県においても同様の流行がみられたと考えられる。

以上をまとめると、全検体中63.8%がウイルス陽性となった。陽性率はウイルス分離のみであった頃は30%程度であったので、検出率が大幅に向上した。遺伝子検査は呼吸器系ウイルスの検索において有用であったが、個別に実施するのは多くの費用と手間がかかるという問題もあった。今後、パラインフルエンザウイルスなども追加予定であるが、項目が増えるのに伴い、マルチプレクス法による検出も検討し導入していく必要がある。

一方、ウイルスの検出にはウイルス分離がゴールドスタンダードであり、ウイルス分離を充実させることも重要である。当センターではこれまでRSウイルス、ヒトメタニューモウイルス、ヒトボカウイルス、ライノウイルスについては有用な培養系を有していない。今年度から実施している調査研究ではこれらウイルスのいくつかについて細胞培養法の確立も目標としている。

効率的なウイルス分離を行った上で、分離できないウイルスや、健康危機管理上迅速性やより感度の良い検出が求められる場合などに遺伝子検査を適宜追加して、より充実した呼吸器系疾患のサーベイランスをめざしていく考えである。

#### 5. まとめ

- 2010年4月～2011年3月、福井県内の急性呼吸器系症状を示す患者から採取した咽頭拭い液など152検体について呼吸器系ウイルスの検出を行ったところ、97検体からウイルスが検出された。
- 検出されたウイルスは、多い順にアデノウイルス(37)、RSウイルス(23)、エンテロ系ウイルス(21)、ライノウイルス(14)、ヒトメタニューモウイルス(5)およびボカウイルス(4)であった。

3. ウイルス分離に遺伝子検査を併用することによって、陽性率が向上した。

## 謝 辞

検体採取にご協力いただきました各健康福祉センターおよび医療機関の方々に深謝いたします。

なお、この報告の中のアデノウイルスに関しては平成 22 年度厚生労働省科学研究費補助金「国際的な感染症情報の収集、分析、提供機能およびわが国の感染症サーベイランスシステムの改善・強化に関する研究」により、ボカウイルスに関しては平成 22 年度厚生労働省科学研究費補助金「重症呼吸器ウイルス感染症のサーベイランス・病態解明及び制御に関する研究」により実施した。

## 参考文献

- 1) 堤裕幸：風邪の全体像，臨床とウイルス，34，391-395(2006)
- 2) Van den Hoogen B.G. et al : A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease., Nat.Med., 7, 719-724(2001)
- 3) Allander T.et al. : Cloning of human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 102, 12891-12896(2005)
- 4) 中村雅子他：福井県における新型インフルエンザ(AH1N1pdm)への検査対応について，福井県衛生環境研究センター年報，8，92-96(2009)
- 5) 中村雅子他：福井県内の小児および高齢者におけるヒトメタニューモウイルスとRSウイルスの流行状況，福井県衛生環境研究センター年報，7，50-55(2008)
- 6) 平野映子他：福井県におけるヒトボカウイルス（中間報告），新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業「重症呼吸器ウイルス感染症のサーベイランス・病態解明及び制御に関する研究」平成 22 年度総括・分担報告書，36-37(2011)
- 7) Teresa C.T.Peret et al. : Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. , J.Gen.Virol., 79, 2221-2229(1998)
- 8) Teresa C.T.Peret et al. : Characterization of Human Metapneumoviruses Isolated from Patients in North America, J.Infect Dis., 185, 1660-1663(2002)
- 9) H.Igarashi et al. : Pylogenetic analysis of Human Bocavirus(HBoV)Detected From Children with Acute Respiratory Infection in Japan, J.Infect., 58,311-313(2009)
- 10) Miura-Ochiai R et al. : Quantitative Detection and Rapid Identification of Human Adenoviruses, J. Clin. Microbiol., 45, 958-967( 2007)
- 11) W.Allan Nix et al. : Sensitive,Seminested PCR Amplification of VP1 Sequences for Direct Identification of All Enterovirus Serotypes from Original Clinical Specimens, J. Clin. Microbiol., 44, 2698-2704(2006)
- 12) 高尾信一他：本邦において初めて流行が確認された小児の human metapneumovirus 感染症の臨床的、疫学的解析，感染症学雑誌，78，129-137(2003)
- 13) Katsumi Mizuta et al. : Endemicity of human metapneumovirus subgenogroups A2 and B2 in Yamagata,Japan,between 2004 and 2009, Microbiol Immunol., 54, 634-638(2010)
- 14) 藤本嗣人他：新型アデノウイルス 53 型と 54 型の同定について，病原微生物検出情報，31，236-237(2010)
- 15) 改田厚他：呼吸器感染症、熱性けいれんの乳幼児からのエンテロウイルス 68 型の検出—大阪市，病原微生物検出情報，31，300(2010)