

千葉市におけるヒトライノウイルス検出状況

西川 和佳子、坂本 美砂子

(環境保健研究所 健康科学課)

要旨 ヒトライノウイルス (HRV) の地域的な流行状況を把握するため、小児における4年間の検出状況を解析した。その結果、HRVの流行状況は2013年から2015年の3年間と2016年では検出のピークが異なっていたこと、また、HRVと共に下気道炎を呈するウイルスが多数検出されることが明らかとなり、小児は短期間でHRVに再感染することが示唆された。

Key Words : ヒトライノウイルス, 小児, 下気道炎

1. はじめに

ヒトライノウイルス (HRV) は、ピコルナウイルス科エンテロウイルス属に分類される一本鎖 RNA ウィルスで、A、B、Cの3つの遺伝子群に分類される。HRVは急性呼吸器疾患の原因ウイルスの一つであり、症状の多くは普通感冒といった軽症であるが、一方で喘息等の他の呼吸器疾患と密接に関連している可能性が高い。HRVの感染率は小児に高く、年齢が高くなるにつれて低くなり、また、HRV感染症は温帯地域では1年中存在するが、初秋と晩春に多いとされる¹⁾。

当所では、急性呼吸器ウイルスの網羅的なサーベイランスを実施しているが、過去の報告において検出数が最も多かったのはHRVで、HRVが検出された患者の中には気管支炎や肺炎の症状も見受けられ、公衆衛生上重要なウイルスであることが示唆された^{2), 3)}。そこで今回、地域的な流行状況を把握し、感染予防対策の一助となることを目的に、4年間のHRV検出状況を解析したので報告する。

2. 材料と方法

2.1 検査材料

2013年1月から2016年12月までの期間に、市内の小児科定点(1ヶ所)で急性呼吸器疾患(インフルエンザ、上気道炎、咽頭炎、アデノウイルス感染症、下気道炎、気管支炎、肺炎、RSウイルス感染症等)と診断された患者の臨床検体1,254検体(鼻汁1,011検体、唾液16検体、うがい液1検体、口腔ぬぐい液5検体、

咽頭ぬぐい液216検体、喀痰3検体、気管吸引液2検体)を検査材料とした。患者の年齢幅は0~50歳、平均年齢は2.6歳(中央値1歳)、性別は男性698名、女性556名であった。

2.2 検査方法

検索ウイルスはHRVのほか、エンテロウイルス(EV(コクサッキーウイルス(Cox)、エコーウイルス(Echo)を含む))、ヒトメタニューモウイルス(hMPV)、ヒトコロナウイルス(HCoV)、RSウイルス(RSV)、パラインフルエンザウイルス(PIV)1~3型、ヒトボカウイルス(HBoV)、アデノウイルス(AdV)及びインフルエンザウイルス(Flu)とした。

AdV及びFluを除いたウイルスは、High Pure Viral RNA Kit (Roche)を使用して検査材料200 μ LからRNAを抽出し、Super Script III (Invitrogen)を用いた逆転写反応によりcDNAを作製後、RT-PCR法またはReal Time (RT-)PCR法を実施した。HRV⁴⁾、EV⁴⁾、hMPV⁵⁾、HCoV⁶⁾はRT-PCR法による検出を実施し、陽性となった検体は、増幅産物をHigh Pure PCR Product Purification Kit (Roche)で精製し、Big Dye Terminator cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用いてサイクルシーケンス反応を行った後、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) (一部はABI PRISM 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems))により塩基配列を決定した。得られた塩基配列についてMEGA6を使用し、Clustal Wによるアライメント後、近隣結合法による

系統樹解析を行った。なお、HRV の解析部位は VP4/VP2 領域の 266bp とした。RSV⁷⁾、hMPV⁸⁾、PIV1~3 型、HBoV は Real Time (RT)-PCR 法による検出を実施した。なお、PIV1~3 型及び HBoV は、当所で独自に設計したプライマーと TaqMan MGB プローブを使用した。

一方、AdV、Flu 及び一部の EV は、RD-A、HEp-2、Vero-E6、CaCo-2、MDCK 細胞によるウイルス分離を行い、AdV 及び EV は中和試験により血清型の同定を行った。Flu は、国立感染症研究所から分与されたインフルエンザウイルス同定キットを用いて赤血球凝集抑制試験を行い同定した。

3. 結果

検索を実施した 1,254 検体のうち、317 検体 (25.3%) から HRV が検出された。検出された検査材料の内訳は鼻汁 294 検体、咽頭ぬぐい液 20 検体、喀痰 2 検体、気管吸引液 1 検体で、遺伝子群の内訳は A 群 (HRV-A) が 172 検体 (54.3%)、B 群 (HRV-B) が 8 検体 (2.5%)、C 群 (HRV-C) が 137 検体 (43.2%) であった (表 1)。年ごとの検出率は 20.6~29.3% で (表 2)、遺伝子群間の検出率は、各年で HRV-A では 44.3~64.1%、HRV-C では 34.6~52.3% と開きがあったが、HRV-B では 1.3~3.4% と大きな差はみられなかった (図 1)。

月別の HRV 検出状況を図 2 に示した。HRV は通年で検出され、特に 4 月、次いで 10 月に多い傾向がみられた。遺伝子群別では、HRV-A は 4 月から 10 月にかけて多く検出される傾向にあり、逆に HRV-C は 6 月が最も少なく、それ以降は 12 月まで段階的に増加し 12 月と 2 月に検出のピークがみられた。HRV-B の検出は散発的で、特段の傾向はみられなかった。各年では、2013 年は 10 月、2014 年及び 2015 年は 4 月が検出のピークで、2016 年は検出ピークがなく通年で横ばいであった (図 3)。

患者年齢別の HRV 検出状況を表 3 に示した。0 歳が 79 検体、1 歳が 168 検体、2 歳が 45 検体であり、3 歳以上は 1~11 検体であった。遺伝子群別では全ての遺伝子群に共通して 1 歳が最多、次いで 0 歳から多く検出された (図 4)。また、各年においても同様の傾向を示した (図 5)。

HRV が検出された患者の診断名の割合を図 6 に示した。下気道炎が 76.0%、上気道炎が 12.0%、RS ウイルス感染症が 7.6%、インフルエンザが 2.5% を占め、その他 (ヘルパンギーナ、ウイルス性発疹症、手足口病) が 1.9% であった。遺伝子群別では、多い順に HRV-A は下気道炎 (74.4%)、上気道炎 (12.8%)、RS ウイル

ス感染症 (9.9%)、インフルエンザ (1.2%)、その他 (ウイルス性発疹症、ヘルパンギーナ) (1.7%)、HRV-B は下気道炎 (62.5%)、RS ウイルス感染症 (37.5%)、HRV-C は下気道炎 (78.8%)、上気道炎 (11.7%)、インフルエンザ (4.4%)、RS ウイルス感染症 (2.9%)、その他 (ヘルパンギーナ、手足口病) (2.2%) であった。

HRV とその他の急性呼吸器ウイルスの共検出数を表 4 に示した。HRV が検出された 317 検体のうち、131 検体 (41.3%) は HRV 単独の検出、186 検体 (58.6%) は他の急性呼吸器ウイルスとの共検出例で、そのうち HRV と他 1 種類の急性呼吸器ウイルスとの共検出は 144 検体 (45.4%)、他 2 種類の急性呼吸器ウイルスとの共検出は 41 検体 (12.9%)、他 3 種類の急性呼吸器ウイルスとの共検出は 1 検体 (0.3%) であった。共検出例で検出の多かった急性呼吸器ウイルスは、多い順に HBoV、RSV、hMPV であった (表 5)。これは、他 1 種類及び他 2 種類の共検出に共通していた (図 7)。なお、HRV と他の急性呼吸器ウイルスの共検出の組み合わせは表 6 のとおりであった。

同一年に同一の遺伝子群の HRV が複数回検出された患者の検出状況を表 7 に示した。該当する患者は 13 名おり、全員が 2 歳以下で、診断名は下気道炎であった。これら 13 名から検出された HRV の系統樹を図 8 及び図 9 に示した。患者 No.9 及び No.10 ではそれぞれ初回と 2 回目に検出された HRV の塩基配列は 100% 一致したが、残りの 11 名は各患者内でそれぞれ検出された HRV の塩基配列は異なった。これら 11 名から検出された遺伝子群の内訳は、5 名が HRV-A、6 名が HRV-C で遺伝子群による差はみられなかった。また、同一の遺伝子群が 2 回検出された患者は 9 名、3 回及び 4 回検出された患者はそれぞれ 1 名で、検体採取の間隔が最も短いもので患者 No.13 の 26 日であった。なお、他の患者間で塩基配列が 100% 一致するものが 2 組あった (患者 No.5 の 26262 と患者 No.6 の 26322、患者 No.5 の 26358 と患者 No.6 の 26380)。

4. 考察

4 年間にわたり、小児科定点における急性呼吸器疾患の患者から検出された HRV の調査を実施した。HRV の検出率は各年 20% 台であった。しかし、遺伝子群間では HRV-B は 1.3~3.4% と各年で検出率に差がないことに対し、HRV-A は 44.3~64.1%、HRV-C は 34.6~52.3% と各年で検出率にばらつきがみられた。

HRV の流行時期は、通年で検出があるものの、2013 年から 2015 年にかけては 4 月または 10 月に検出のピ

ークがみられたことから、春季または秋季を主体とした流行があることが示唆された。しかし、2016年は季節的な検出ピークが認められず通年で横ばいであり、他年とは異なる傾向を示したことから、今後の発生動向を注視する必要があると考えられた。また、HRV-Aは4月から10月にかけて検出が多かったが、HRV-Cは6月の検出が最も少なく、それ以降は段階的に増加し、12月と2月に検出のピークが認められ、遺伝子群間では流行時期が異なることが明らかとなった。HRVが検出された患者の年齢は、0歳～2歳が全年齢の92.1%を占めた。その中でも1歳が最多で、次いで0歳からの検出が多く、各遺伝子群及び各年においても同様の傾向が認められたことから、HRVは小児の中でもとりわけ0歳から2歳までの感染が多いものと考えられた。

診断名では下気道炎が76.0%と最も多く、さらに、検出されたHRVのうち58.6%が他のウイルスとの共検出例であった。共検出されたウイルスのうちHBoVが最も多く、次いでRSV、hMPVの順であった。これらのウイルスはHRVと同様に下気道炎の症状を呈する割合が高く³⁾、どのウイルスに起因して下気道炎を発症したか推察するためには、ウイルス量、発症から検体採取までの日数、さらには抗体価などを考慮する必要があると考えられた。

同一年に同一の遺伝子群が複数回検出された患者のうち、患者No.9とNo.10はそれぞれ初回と2回目に検出したHRVの塩基配列は100%一致した。これは、2回目の検体採取が初回から4日目または5日目と短期間であったため、初回時に感染したHRVを2回目も検出したものと考えられた。一方、残りの11名は、検出されたHRVの塩基配列はそれぞれ一致しなかったことから、別の型のHRVに複数回感染したものと推察された。これらの患者は、全員2歳以下で下気道炎を呈し、検体採取の間隔が最も短いもので26日であった。以上のことから、小児のうち特に2歳以下では、短期間でHRVに再感染し、同様の症状を呈するものと考えられた。なお、他の患者間で塩基配列が100%一致した2組のHRVは、疫学状況からその当時地域で流行していた株と考えられた。

今回の調査によりHRVは小児において繰り返し下気道炎を引き起こす公衆衛生上重要なウイルスであることが改めて示唆された。今度も急性呼吸器ウイルスのサーベイランスを継続し、発生動向を注視するとともに、HRVと共検出ウイルスの関連性について検討が必要であると考えられた。

文 献

- 1) 国立感染症研究所：ライノウイルス検査マニュアル，病原体検出マニュアル，2009.
- 2) 田中俊光，小林圭子，横井一：千葉市内の1小児科クリニックにおける重症呼吸器ウイルスの検出状況，千葉市環境保健研究所年報，第18号：2011，49-51.
- 3) 土井妙子，水村綾乃，小林圭子，横井一：千葉市内の感染症発生動向調査における急性呼吸器ウイルスの検出状況，千葉市環境保健研究所年報，第20号：2013，49-52.
- 4) 石古博昭，島田康司，與那覇麻里 他：遺伝子系統解析によるエンテロウイルスの同定，臨床とウイルス，27：1999，283-293.
- 5) 高尾信一，下菌広行，柏弘 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，78：2004，129-137.
- 6) Vijgen L, Moes E, Kayaerts E *et al.* : A pan-coronavirus RT-PCR assay for detection of all known coronaviruses, *Methods Mol. Biol.*, 454 : 2008, 3-12.
- 7) 横井一，田中俊光，水村綾乃 他：Real-time RT-PCR法によるRSウイルス遺伝子の検出とサブグループ型別，感染症誌，86：2012，569-576.
- 8) 水村綾乃，土井妙子，田中俊光 他：リアルタイムRT-PCRによるヒトメタニューモウイルス遺伝子の検出，千葉市環境保健研究所年報，第21号：2014，47-50.

表1 検査材料別検出数

検査材料	検出数			
	HRV-A	HRV-B	HRV-C	合計
鼻汁	159	8	127	294
咽頭ぬぐい液	12		8	20
喀痰			2	2
気管吸引液	1			1
合計	172	8	137	317

表2 年別検出数

	2013年	2014年	2015年	2016年	合計
HRV-A	50	39	39	44	172
HRV-B	1	3	2	2	8
HRV-C	27	46	37	27	137
HRV合計	78	88	78	73	317
全検体数	266	348	286	354	1,254
検出率(%) (HRV合計/全検体数)	29.3	25.3	27.3	20.6	25.3

表3 年齢別検出数

年齢	検出数
0歳	79
1歳	168
2歳	45
3歳	11
4歳	3
5歳	4
6歳	1
7歳	2
8歳	1
不明	3
計	317

表4 共検出ウイルスの検出状況

共検出ウイルスの数	検出数	検出率(%)
HRV単独	131	41.3
HRV+他1種類	144	45.4
HRV+他2種類	41	12.9
HRV+他3種類	1	0.3

表5 共検出ウイルスの検出回数

検出順位	共検出ウイルス	検出回数
1	HBoV	69
2	RSV	55
3	hMPV	40
4	PIV	16
5	HCoV	13
6	Flu	12
7	AdV	11
8	Cox	7
9	Echo	3
9	EV	3

表 6 HRV と急性呼吸器ウイルスの共検出状況

診断名	共検出ウイルスの組み合わせ				検出数	診断名	共検出ウイルスの組み合わせ			検出数	
	HRV	AdV	hMPV	RSV			HRV	HCoV	RSV		
下気道炎	HRV	AdV	hMPV	RSV	1	上気道炎	HRV	HCoV	RSV	1	
	HRV	AdV	hBoV		3		HRV	AdV		5	
	HRV	Cox	EV		1		HRV	Cox		4	
	HRV	Cox	hMPV		1		HRV	Echo		1	
	HRV	Flu	hBoV		2		HRV	Flu		1	
	HRV	hBoV	hMPV		9		HRV	hBoV		4	
	HRV	hBoV	PIV		4		HRV	HCoV		1	
	HRV	hBoV	RSV		6		HRV	hMPV		2	
	HRV	HCoV	hMPV		2		HRV			22	
	HRV	hMPV	PIV		1		RSウイルス 感染症	HRV	EV	RSV	1
	HRV	hMPV	RSV		3			HRV	hBoV	RSV	3
	HRV	PIV	RSV		2	HRV		hMPV	RSV	1	
	HRV	AdV			2	HRV		PIV	RSV	1	
	HRV	Echo			2	HRV		hBoV		1	
	HRV	EV			1	HRV	RSV		15		
	HRV	Flu			1	HRV			2		
	HRV	hBoV			35	インフルエンザ	HRV	Flu		8	
	HRV	HCoV			9	ウイルス性 発疹症	HRV	Cox		1	
	HRV	hMPV			20	手足口病	HRV	hBoV		1	
	HRV	PIV			8	ヘルパン ギーナ	HRV	HCoV		1	
	HRV	RSV			21		HRV			2	
HRV				104							

表 7 同一年に同一遺伝子群が検出された患者の状況

患者 No.	採取		検体 No.	年 齢	診断名	検出ウイルス		
	年	月 日				HRV	その他	
1	2013年	1月22日	2538	0歳 11ヶ月	下気道炎	HRV-C	hMPV	hBoV
		6月3日	25176	1歳 3ヶ月				
2	2013年	7月31日	25250	0歳 10ヶ月	下気道炎	HRV-A	RSV	HCoV
		12月11日	25392	1歳 3ヶ月				
3	2013年	8月27日	25279	1歳 2ヶ月	下気道炎	HRV-A	EV	RSV
		10月1日	25307	1歳 3ヶ月				
		10月19日	25320	1歳 4ヶ月				
4	2014年	2月17日	2666	1歳 0ヶ月	下気道炎	HRV-C	RSV	
		4月2日	26137	1歳 1ヶ月				
5	2014年	7月20日	26262	1歳 11ヶ月	下気道炎	HRV-C		
		9月16日	26358	2歳 0ヶ月				
6	2014年	9月8日	26322	1歳 6ヶ月	下気道炎	HRV-C		
		10月6日	26380	1歳 7ヶ月				
7	2015年	2月18日	2772	0歳 11ヶ月	下気道炎	HRV-C	hMPV	HCoV
		9月8日	27272	1歳 5ヶ月				
		3月16日	2788	1歳 0ヶ月				
		6月8日	27181	1歳 3ヶ月				
8	2015年	11月9日	27343	1歳 8ヶ月	下気道炎	HRV-A	hBoV	
		12月18日	27412	1歳 9ヶ月				
		4月6日	27106	1歳 8ヶ月				
9	2015年	4月11日	27112	1歳 8ヶ月	下気道炎	HRV-A	hBoV	hBoV
		4月13日	27115	1歳 8ヶ月				
10	2015年	4月17日	27129	1歳 8ヶ月	下気道炎	HRV-A	hBoV	hBoV
		10月21日	27330	1歳 5ヶ月				
11	2015年	11月30日	27370	1歳 7ヶ月	下気道炎	HRV-A	RSV	hBoV
		4月25日	28231	0歳 7ヶ月				
12	2016年	10月18日	28494	1歳 1ヶ月	下気道炎	HRV-A	PIV	
		11月9日	28526	0歳 8ヶ月				
13	2016年	12月5日	28553	0歳 8ヶ月	下気道炎	HRV-C		

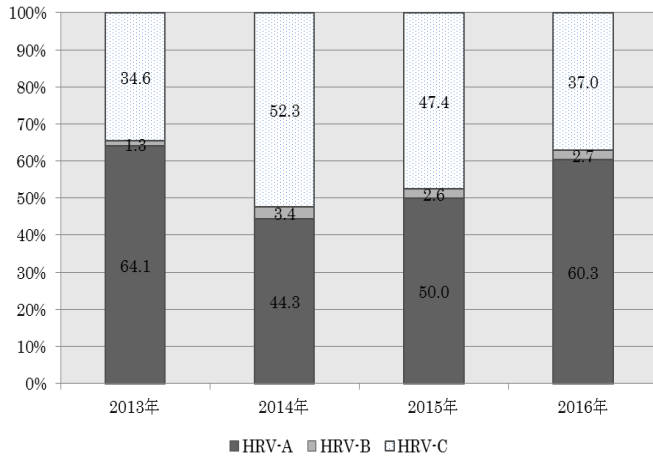


図1 各年における遺伝子群別検出率

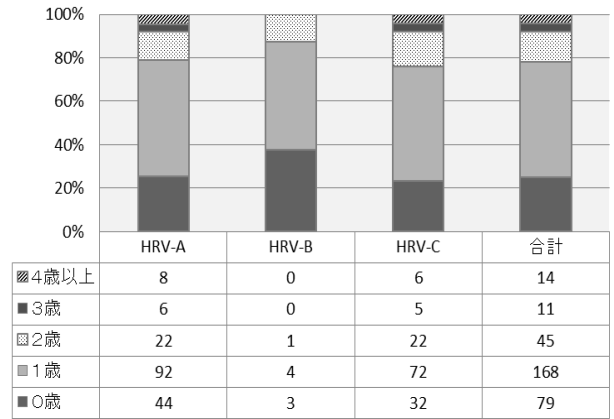


図4 遺伝子群別に見た年齢別検出状況

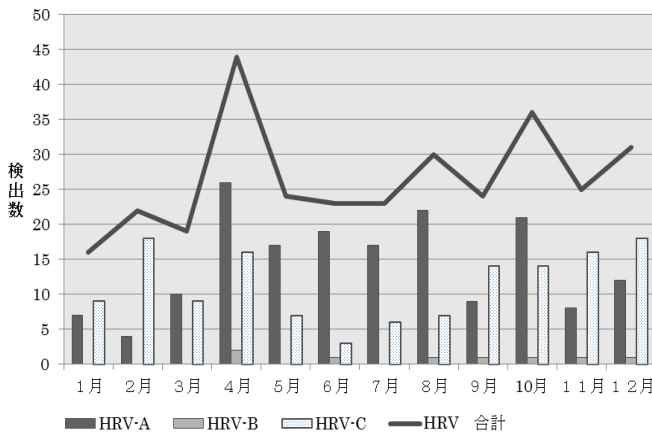


図2 月別検出数 (2013~2016年)

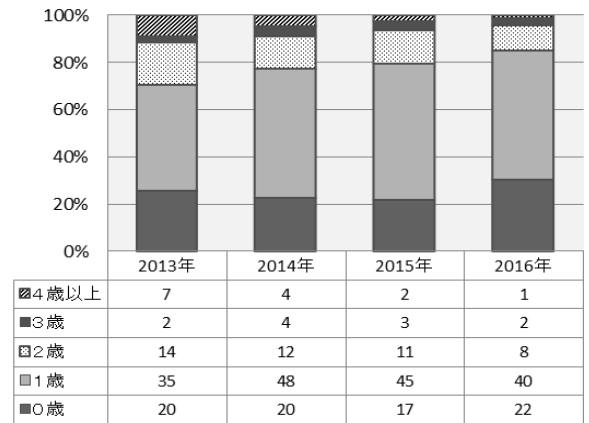


図5 各年における年齢別検出状況

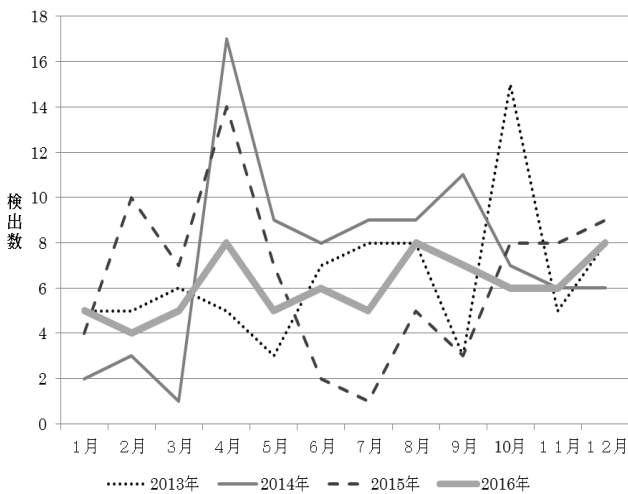


図3 年別に見た月別検出数

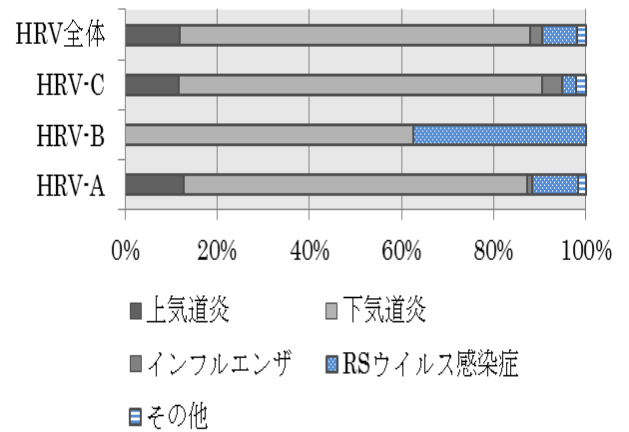


図6 診断名別検出状況

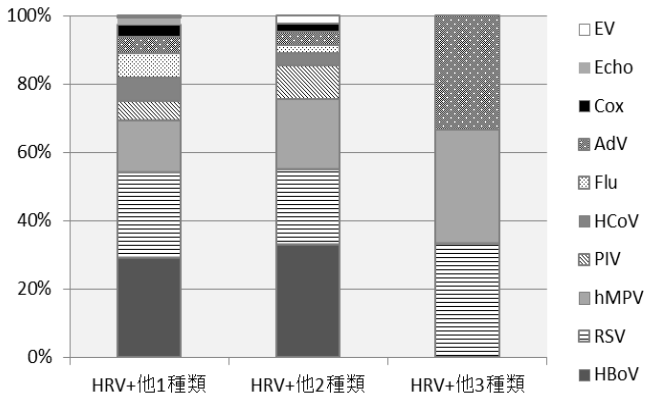


図7 共検出ウイルスの種類別検出状況

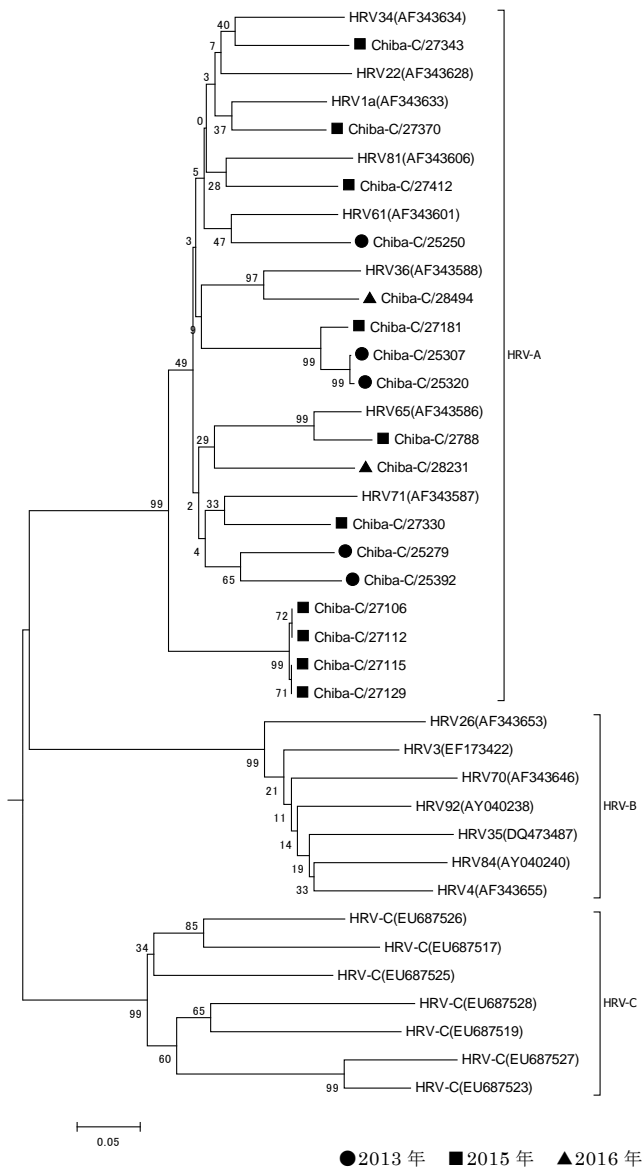


図8 同一年に同一遺伝子群が複数回検出された患者の系統樹 (HRV-A)

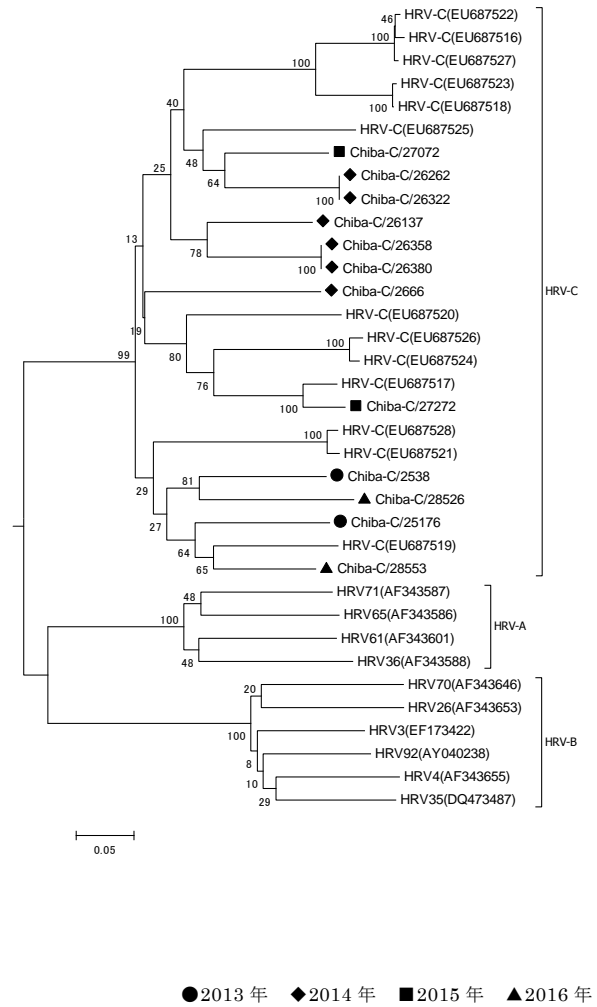


図9 同一年に同一遺伝子群が複数回検出された患者の系統樹 (HRV-C)