

図 2.喘鳴の有無別ウイルス検索成績
上位 3 種の検出数を示した。

表 2.HCoV 檢索成績

	2009				2010				2011				2012				Total	rate	
	1-3	4-6	7-9	10-12	1-3	4-6	7-9	10-12	1-3	4-6	7-9	10-12	1-3	4-6	7-9	10-12			
229E																	0	0.0%	
NL63											1			2	1	2	2	8	21%
OC43	2		2			1	4	3	1						1	1		15	39%
HKU1	2													1				3	8%
Total	4	0	2	0	0	1	4	3	1	0	1	0	3	2	3	2	26	68%	

新潟県におけるヒトコロナウイルスサーベイランス

研究協力者 昆美也子 新潟県保健環境科学研究所
渡部 香、田澤 崇、渡邊香奈子、田村 務 新潟県保健環境科学研究所
研究協力者 塚越博之 群馬県衛生研究所
研究協力者 水田克巳 山形県衛生研究所
野田雅博 国立感染症研究所
木村博一 国立感染症研究所

研究要旨

2010年8月から2011年12月までの間に急性上気道炎あるいは下気道炎を呈した患者から採取された咽頭および鼻腔ぬぐい液 179 検体から、RT-PCR によりヒトコロナウイルス(HCoV)を検索した。その結果、HCoV-NL63 および HCoV-OC43 がそれぞれ 10 株検出されたが、HCoV-229E および HCoV-HKU1 は検出されなかった。HCoV-NL63 は 12 月、HCoV-OC43 は 2 月から 5 月にかけて、それぞれ多数の株が検出された。スパイク領域の遺伝子解析結果から、HCoV-OC43 は 2 つのクラスターに分かれ、それぞれのクラスターで検出時期が異なっていた。

A. 研究目的

呼吸器ウイルスの一つである Human coronavirus(HCoV)は、これまで HCoV-229E や HCoV-OC43 が知られていたが、近年、HCoV-NL63 や HCoV-HKU1 など新しい型の HCoV が報告されている [PabbarajuK, et al., Coronaviruses. Manual of Clinical Microbiology 10th, 1410-1422, 2011; Gaunt ER, et al.: J Clin Microbiol, Aug, 2940-2947, 2010; Vijgen L et al.: Virology, 337, 85-92, 2005]。

HCoV 検査診断法としての効率的なウイルス分離法は未だ確立されておらず、現状ではウイルス検出に RT-PCR が多用されている。

我々は先に鼻咽頭炎患者から HCoV-229E の分離を報告 [広川智香ら、IASR, 29, 283, 2008] したが、その後、新たな分離成功例はない。そ

こで、本研究では RT-PCR を活用した HCoV 検索を試み、HCoV の急性呼吸器感染症への関与を検討した。

B. 研究方法

2010年8月から2011年12月までの間に、急性上気道炎あるいは下気道炎例のうち、病原ウイルスが特定できなかった 179 例の症例から採取された検体(咽頭および鼻腔ぬぐい液)を供試した。ウイルス検索は HCoV-229E、-OC43、-NL63 および HKU1 について実施した。

検体より RNA を抽出、RT を行い、1stPCR は Gaunt E.R らの membrane glycoprotein 領域および nucleocapsid phosphoprotein 領域の Outer プライマーを用い、マルチプレックス PCR を実施した。2ndPCR は個々の Inner sense と Outer antisense を用いて Heminested PCR を行い、それ

ぞれの増幅産物について分子量(229E:206bp、OC43:443bp、NL63:328bp および HKU1 : 297bp)をもとにした型鑑別スクリーニングを行った。陽性例はダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、近隣接合法により系統樹解析の後、型決定を行った。

また、spike protein をコードする遺伝子の一部を RT-PCR で増幅し、増幅産物の系統解析を行った。使用プライマーは、HCoV-OC43 は Ref strein OC43(AY391777)および HCoV-NL63 は Ref strein NL63(AY518894)をもとにそれぞれ設計した。

PCR 陽性検体はウイルス分離を併行して実施した。使用細胞は CaCo2 細胞および LLC-MK2 細胞で、細胞維持培養液に結晶トリプシン(T0134, SIGMA 社)を最終濃度 0.5µg/ml 添加し、2 週間隔で 5 継代、培養を行った。

C. 研究結果

型鑑別スクリーニングの結果、計 20 株(11%)の HCoV が検出された。内訳は、HCoV-NL63;10 株および HCoV OC43;10 株であった。患者 No9 からは HCoV-NL63 および HCoV-OC43 が同時検出された(表 1)。

なお、HCoV-229E および HCoV-HKU1 はいずれも検出されなかった。

陽性患者の年齢は 2 ヶ月齢から 10 歳(平均 2.7 歳)で、特に 3 歳以下の患者が 79%(15/19)を占めた。主たる臨床症状は発熱(16 人)、上気道炎(15 人)であった。HCoV-NL63 陽性群と HCoV-OC43 陽性群の間で、臨床症状には差異はなかった。

年月別検出状況は、HCoV-NL63 では、2010 年 12 月(5 株)ならびに 2011 年 1 月(3 株)、2 月(1 株)および 7 月(1 株)であった。HCoV-OC43 では、2011 年 2 月(4 株)、3 月(1 株)、5 月(3 株)、6 月(1 株)および 7 月(1 株)であった。

Spike 領域の系統解析を試みた。その結果、HCoV-NL63 では 6 株 [HCoV-NL63/Niigata.JPN/

(10-1575、10-1606、10-1697、10-1698、10-1708 および 11-22)] が 25222/2004/SWE (DQ231160) に近縁のクラスターに、1 株(HCoV-NL63/Niigata.JPN/11-119) が 41687/2007/ SWE (FJ656160)に近縁のクラスターに、それぞれ分類された(図 1)。

HCoV-OC43 では、2011 年 2 月に検出された 4 株 [HCoV-OC43/Niigata.JPN/(11-286、11-335、11-343 および 11-400)] は、84020 Belgium (AY903456)に近縁のクラスターに、2011 年 3 月以降に検出された 6 株 [HCoV-OC43/Niigata.JPN/(11-564、11-764、11-768、11-769、11-833 および 11-981)] は 34364 Belgium2004

(AY903455)に近縁のクラスターに分類された(図 2)。

なお、HCoV-NL63 スクリーニング陽性の 3 株(患者 No.8、9 および 10)は、spike protein 増幅不能のため系統解析から除外した。

一方、スクリーニング陽性例のうち患者 No.10 および 19 を除く 17 例について、ウイルス分離を試みたが、いずれも HCoV の増殖は確認できなかった。

D. 考察

これまで HCoV サーベイランスは新潟県、大阪市、横浜市など一部の地域からの報告に限られ、わが国の疫学は未だ十分に把握されていない。

これまで新潟県では HCoV サーベイランスはウイルス分離法を主体にして実施してきたが、本研究では RT-PCR の併用を試みた。その結果、HCoV はウイルス分離に比して高率 11% (20/179)に検出された。検出株は HCoV-NL63 と HCoV-OC43 の 2 種類に限られ、2008 年に報告した HCoV-229E は検出されなかった。HCoV-NL63 では冬季(12 月から 1 月)に、HCoV-OC43 は冬季から初夏(2 月から 5 月)に集中して検出された。

Vijgen らは、HCoV-OC43 の検出株は年毎に遺伝学的に異なる株であったこと、Gaunt ら、改田ら [IASR, 32,202, 2011] は優位な検出型は OC43、NL63、HKU1、229E の順であったことを報告している。これらのことから、今後も HCoV 検索を継続し、長期的な疫学知見の集積も必要である。

また、ウイルス分離法や RT-PCR 法などの検査診断法の確立、標準化が望まれる。

E. 結論

新潟県においては、HCoV は重要な急性上気道炎の原因ウイルスの一つであり、継続したサーベイランスが必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 昆美也子、渡部 香、田澤 崇、広川智香、渡邊香奈子：新潟県における新型インフルエンザ流行期とその前後の呼吸器ウイルス検出状況、医学検査、61(3)、548-554、2012

2) Kon M, Watanabe K, Tazawa T, Watanabe K, Tamura T, Tsukagoshi H, Noda M, Kimura H, Mizuta K: Detection of Human Coronavirus NL63 and OC43 in Children with Acute Respiratory Infections in Niigata, Japan, between 2010 and 2011, Jpn J Infect Dis, 65, 270-272, 2012

2) 学会発表

なし

表1 コロナウイルス検出状況

患者No	性別	年齢	発症年月日	検体採取日	診断名	症状	Spike領域増幅株名
<NL63>							
1	M	7	2010/11/30	2010/12/1	咽頭炎	発熱39.1℃, 上気道炎	HCoV-NL63/Niigata.JPN/10-1575
2	M	1	2010/12/11	2010/12/13	喘息性気管支炎	発熱40.5℃, 気管支炎	HCoV-NL63/Niigata.JPN/10-1606
3	F	4ヶ月	2010/12/21	2010/12/22	上気道炎	発熱38.3℃, 上気道炎	HCoV-NL63/Niigata.JPN/10-1697
4	F	2ヶ月	2010/12/21	2010/12/22	上気道炎	上気道炎	HCoV-NL63/Niigata.JPN/10-1698
5	M	7	2010/12/27	2010/12/27	咽頭炎	発熱39.3℃, 上気道炎	HCoV-NL63/Niigata.JPN/10-1708
6	M	8ヶ月	2011/1/3	2011/1/4	中耳炎	発熱39℃, 中耳炎	HCoV-NL63/Niigata.JPN/11-22
7	F	1	2011/1/18	2011/1/19	グループ 症候群	発熱38.6℃, 上気道炎	HCoV-NL63/Niigata.JPN/11-119
8	F	3	2011/1/30	2011/1/31	上気道炎	上気道炎, 中耳炎	-
9*	F	2	2011/2/20	2011/2/21	鼻咽頭炎	発熱38.6℃, 上気道炎	-
10	M	10	2011/7/27	2011/7/28	不明熱	発熱38℃, 上気道炎, 中耳炎	-
<OC43>							
11	M	1	2011/2/10	2011/2/15	上気道炎	発熱38℃, 上気道炎, 中耳炎	HCoV-OC43/Niigata.JPN/11-286
9*	F	2	2011/2/20	2011/2/21	鼻咽頭炎	発熱38.6℃, 上気道炎	HCoV-OC43/Niigata.JPN/11-335
12	M	2	2011/2/21	2011/2/23	上気道炎	発熱38.7℃, 上気道炎, 中耳炎	HCoV-OC43/Niigata.JPN/11-343
13	M	2ヶ月	2011/2/27	2011/2/28	上気道炎	上気道炎	HCoV-OC43/Niigata.JPN/11-400
14	M	3	2011/3/27	2011/3/29	上気道炎	発熱38℃, 上気道炎, 中耳炎	HCoV-OC43/Niigata.JPN/11-564
15	F	3	2011/5/15	2011/5/20	鼻咽頭炎	発熱40.2℃, 上気道炎, 熱性けいれん	HCoV-OC43/Niigata.JPN/11-764
16	M	2	2011/5/23	2011/5/25	急性気管支炎	発熱40.2℃, 気管支炎	HCoV-OC43/Niigata.JPN/11-768
17	F	8ヶ月	2011/5/24	2011/5/25	喘息性気管支炎	発熱39.4℃, 気管支炎	HCoV-OC43/Niigata.JPN/11-769
18	M	9	2011/6/27	2011/6/27	咽頭炎	発熱38.3℃, 上気道炎	HCoV-OC43/Niigata.JPN/11-833
19	F	1	2011/7/26	2011/7/27	鼻咽頭炎	発熱39℃, 上気道炎	HCoV-OC43/Niigata.JPN/11-981

*患者No. 9はNL63とOC43が共に検出

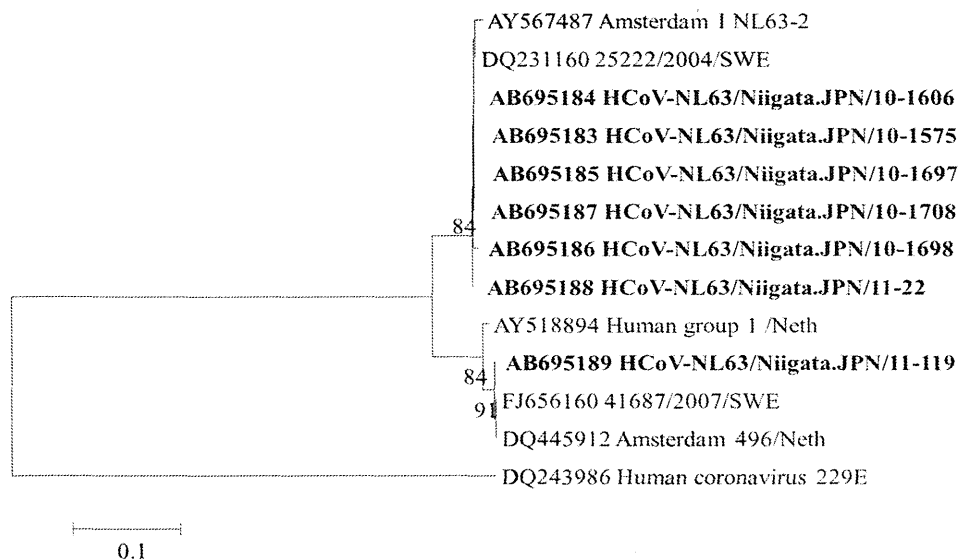


図1 NL63 spike 領域分子系統樹(588nt)

*太字は新潟県検出株

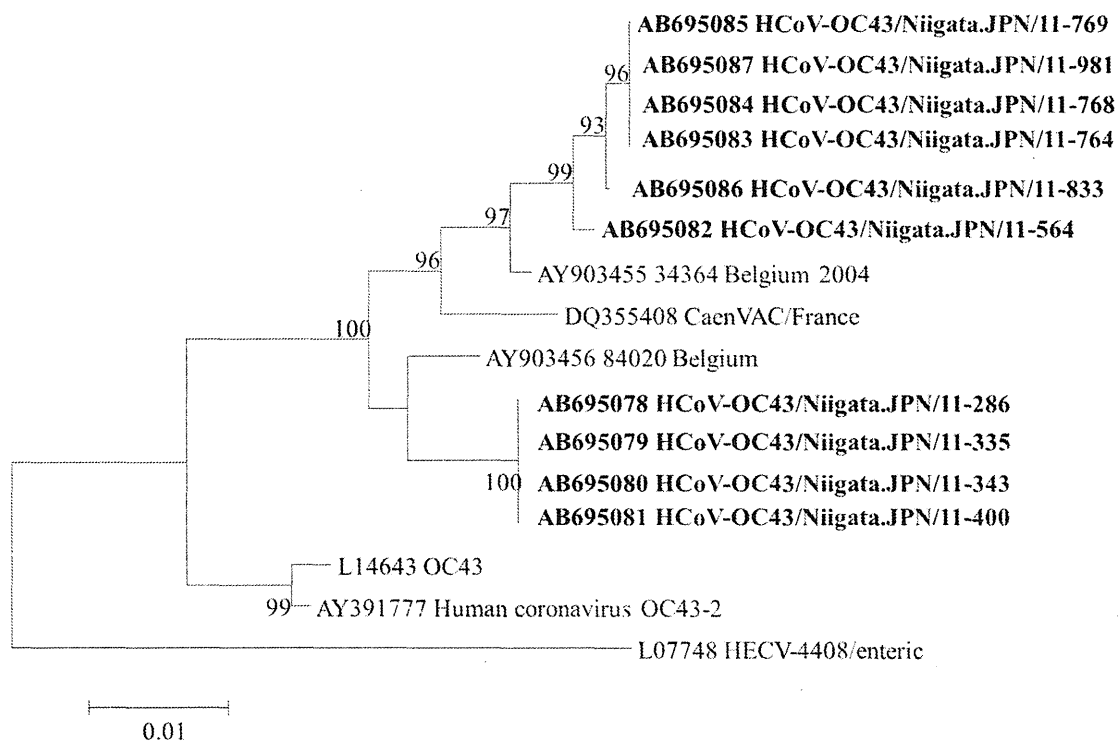


図2 OC43 spike 領域分子系統樹(1488nt)

*太字は新潟県検出株

福井県におけるヒトメタニューモウイルスの分子疫学

研究協力者 平野映子、中村雅子 福井県衛生環境研究センター
小和田和誠、山本 希 福井県衛生環境研究センター
研究協力者 塚越博之 群馬県衛生環境研究所
野田雅博 国立感染症研究所
木村博一 国立感染症研究所

研究要旨

2005年8月から2012年11月の間に、福井県で急性呼吸器感染症(ARIs)の患者から採取された鼻咽頭拭い液について、RT-PCRによりヒトメタニューモウイルス(HMPV)の検索を行った。計792検体中、55検体(6.9%)からHMPVが検出され、その流行は1月から6月期にみられた。*F*遺伝子の一部について遺伝子解析を行った結果、subgroup A2が31株、subgroup B1が2株およびsubgroup B2が22株にそれぞれ分類された。検出株間の相同性はsubgroup A2分類株では95.6-100%、subgroup B2分類株では97.5-100%と非常に高かった。HMPVの*F*遺伝子におけるpositive selection siteは確認されなかった。

A. 研究目的

ヒトメタニューモウイルス(HMPV)は2001年にオランダで発見された新しいウイルスで、乳幼児や高齢者、ハイリスク患者では肺炎や気管支炎や肺炎などの重症呼吸器疾患を引き起こす。

そこで福井県におけるHMPV感染症の疫学を明らかにするため、2005年から2012年の間の急性呼吸器感染症(ARIs)患者検体からHMPV検出と、検出株の*F*遺伝子の一部について分子生物学的解析を行った。

B. 研究方法

2005年8月~2012年11月の間に、県内の医療機関を受診したARIs患者から採取された鼻咽頭拭い液792検体を供した。

HMPV、Respiratory syncytial ウイルス(RSV)、ヒトライノウイルス(HRV)、ヒトボカウイルス(HBoV)、エンテロウイルスおよびアデノウイルス(AdV)を検索対象ウイルスとし、それぞれ

RT-PCRを実施した。

HMPVの解析は、*F*遺伝子の一部についてダイレクトシーケンシングにより塩基配列を決定し、近隣結合法による系統樹解析、single likelihood ancestor counting(SLAC)、fixed effects likelihood(FEL)およびinternal fixed effects likelihood(IFEL)法によりpositive selection siteを検索した。

C. 研究結果

鼻咽頭拭い液計792検体中、55検体(6.9%)からHMPVが検出された。ウイルス検出状況はHMPV単独で検出された検体が51検体、HMPVと他のウイルスが同時に検出されたものが4検体で、内訳はB群コクサッキーウイルス4型が1検体、AdVが2検体およびHBoVが1検体であった。RSVあるいはHRVが同時に検出された例はなかった。

月別HMPV検出数を図1に示した。12月を除き、ほぼ年間をとおして検出されたが、特に

1月から6月期の総検出数は45例(81.8%)を示した。

患者年齢は平均 7.0 ± 13.2 歳であったが、そのうち0歳児が12例、1歳児が13例、2歳児が12例、3歳児が9例で、3歳以下の乳幼児患者の総計は46例(83.6%)を示した。0歳児では subgroup A2 分類株が75%を占めた(図2)。

臨床症状は下気道炎が33例、上気道炎が10例、インフルエンザ様疾患が4例、その他の症状として胃腸炎が1例、咽頭結膜熱が1例および不明熱が4例、不明が2例であった(表1)。熱発は55例中49例でみられ、最高体温(平均)は $39.0 \pm 0.8^\circ\text{C}$ と高熱を呈した。

F 遺伝子の一部の系統樹解析を図3に示した。検出された計55株は、31株が genotype A(すべて subgroup A2)、24株が genotype B(subgroup B1: 2株、subgroup B2: 22株)にそれぞれ分類された。

検出株間の塩基相同性は subgroup A2 分類株が95.6-100%、subgroup B2 分類株が97.5-100%、アミノ酸相同性は subgroup A2 分類株が98.1-100%、subgroup B2 分類株が99.1-100%、といずれも高い相同性を示した。

pairwise distance は subgroup A2 分類株が 0.018 ± 0.013 、subgroup B2 分類株が 0.013 ± 0.008 であり、どちらも0.02未満と比較的低い値を示した(表2)。また、*F* 遺伝子の一部における positive selection site の検索を行ったが、いずれの株においても確認されなかった。negative selection site の検索では、SLAC、FEL および IFEL 法で105siteのうち33siteが共通であった。

D. 考察

福井県内の ARIs への HMPV 関与を検討した結果、2005年から2012年の間の55検体からウイルスが検出され、全 ARIs の6.9%を占めた。患者は3歳児以下の乳幼児が多いことから、本県では少なくとも2005年時点ではすでに乳幼

児、小児の ARIs の原因ウイルスの一つであったことが推察された。

HMPVとRSVが重感染を起こすと呼吸器感染症が重症化するとの報告もあるが、今回の検討ではRSVとの同時検出例はなかった。

山形県内の HMPV の流行様相は冬季から春季(1月~5月)に流行し、秋季(9月~10月)では流行が少ないことが報告されている。我われの今回の成績は1月から6月に多く検出されており、福井県でも山形県と同様の傾向であった。

HMPV はオランダでは5歳までに(既掲)、日本では遅くとも10歳までに初感染すると推測されているが、福井県では3歳以下の ARIs 患児からの検出例が多く、初感染年齢は低いことが推察される。

感染株は、0歳児では subgroup A2 分類株が多数(75.0%)を占め、年齢が上がるに従い subgroup A2 分類株の占める割合は減少し、いっぽうで subgroup B2 分類株の占める割合が増加した。また、下気道炎患者からは subgroup A2 分類株が多数(60.6%)検出され、ついで subgroup B2 分類株(33.3%)であった。しかし、臨床症状と subgroup 分類との相関は未だ確証はなく、今後さらに詳細な検討が必要である。

山形県での HMPV 流行株は subgroup A2 分類株と subgroup B2 分類株が主流(既掲)であり、福井県の研究成績も同様の傾向を示していた。

F 遺伝子の一部の遺伝学的相同性は subgroup A2 分類株では95.6-100%および subgroup B2 分類株では97.5-100%といずれも高く、subgroup A2、B1、B2 分類株それぞれの *F* 遺伝子の相同性は高いとする既報の成績を支持する。また、pairwise distance は subgroup A2、B2 分類株いずれも0.02未満と低く、positive selection site も確認されなかった。

これらの分子疫学解析結果から、県内の HMPV 流行株は遺伝学的に近縁の株の流行であったことが示唆された。

E. 結論

2005年8月から2012年11月の間に、福井県内のARI患者から提供された鼻咽頭拭い液から55株のHMPVが検出された。分子疫学解析結果から、県内の主要な流行は subgroup A2 あるいは subgroup B2 分類株で遺伝学的に極めて近縁な株の流行であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Yoshida A, Kiyota N, Kobayashi M, Nishimura K, Tsutsui R, Tsukagoshi H, Hirano E, Yamamoto N, Ryo A, Saitoh M, Harada S, Inoue O, Kozawa K, Tanaka R, Noda M, Okabe N, Tashiro M, Mizuta K, Kimura H.: Molecular epidemiology of the attachment glycoprotein (G) gene in respiratory syncytial virus in children with acute respiratory infection in Japan in

2009/2010. JMed Microbiol.61:820-9,2012

2) Nakamura M, Hirano E, Ishiguro F, Mizuta K, Noda M, Tanaka R, Tsukagoshi H, and Kimura H.: Molecular epidemiology of human metapneumovirus from 2005 to 2011 in Fukui, Japan. Jpn J Infect Dis. (accepted)

3) Matsuda S, Nakamura M, Hirano E, Kiyota N, Omura T, Suzuki Y, Noda M, Kimura H.: Prevalence of Human Metapneumovirus Infection in Hospital Wards Housing Patients with Severe Motor and Intellectual Disabilities (in press)

2. 学会発表

1) 吉田綾子、筒井理華、小林美保、塚越博之、清田直子、西村浩一、平野映子、野田雅博、岡部信彦、木村博一：2009/2010シーズンに国内で検出されたRSウイルスG遺伝子の分子疫学、日本感染症学会学術講演会、2012年4月、長崎市

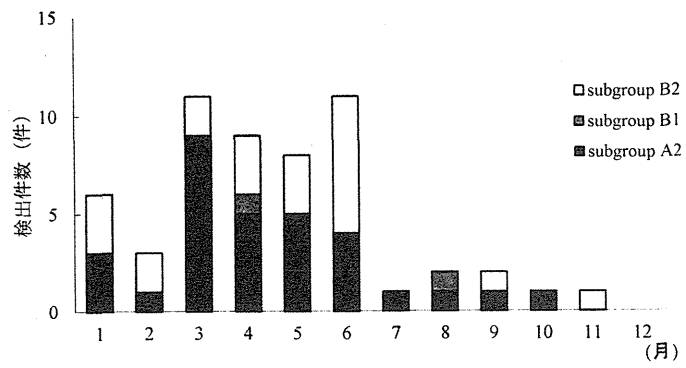


図1 月別検出件数

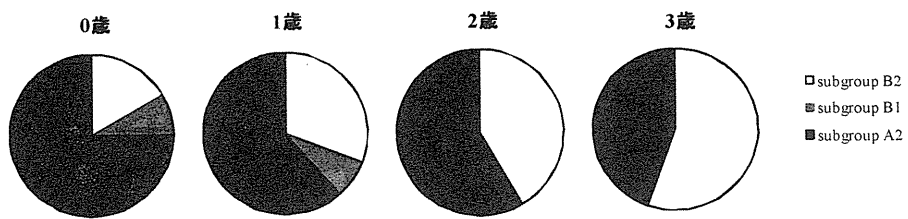


図2 年齢別検出 subgroup

表 1 HMPV 陽性患者の臨床症状

subgroup	臨床症状			
	上気道炎	下気道炎	インフルエンザ様疾患	その他
A2	6	20	1	4
B1	0	2	0	0
B2	4	11	3	4
計	10	33	4	8

表 2 検出株間の相同性と Pairwise distance

subgroup	Identity (%)		Pairwise distance (meanSD)	
	nucleotide	amino acid	nucleotide	amino acid
A2	95.6-100	98.1-100	0.018±0.013	0.005±0.005
B2	97.5-100	99.1-100	0.013±0.008	0.005±0.005

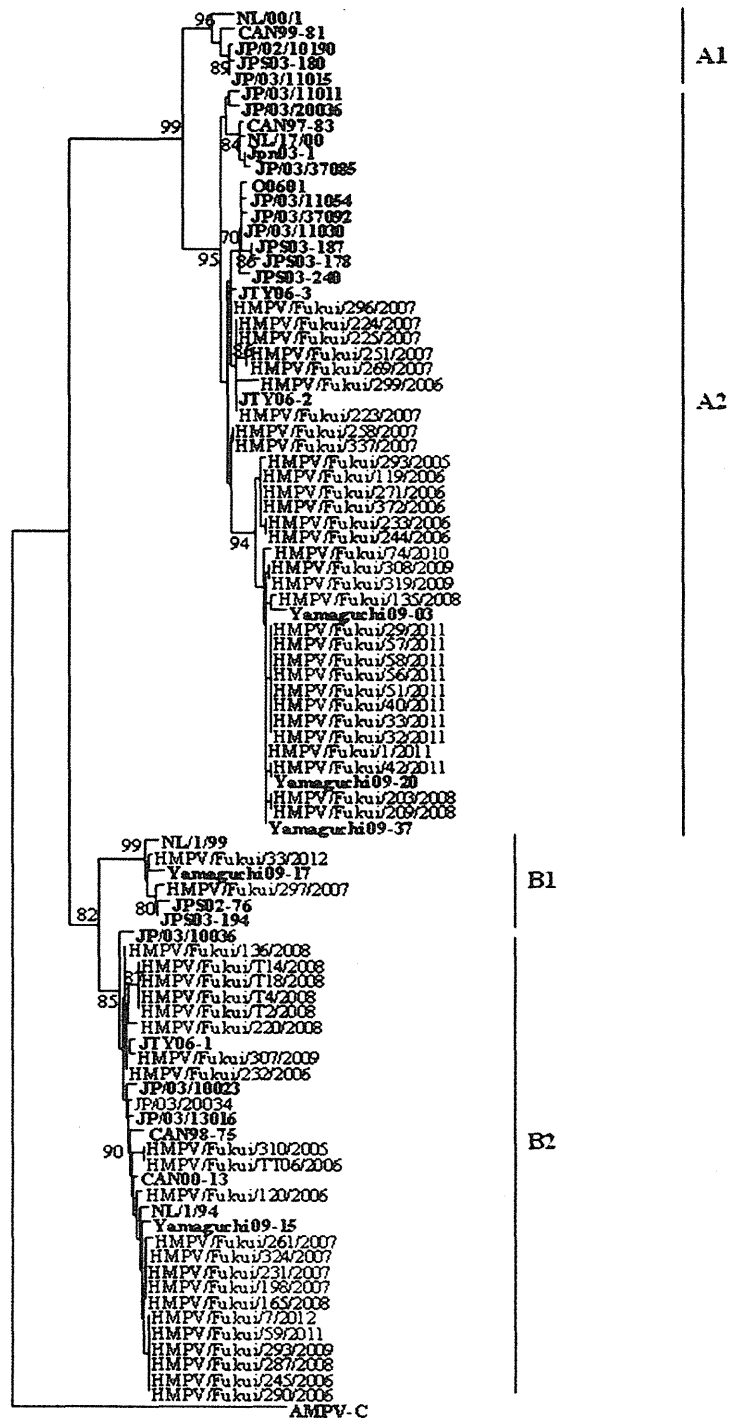


図3 HMPV F 遺伝子分子系統樹(317nt)

研究報告書

山口県で検出された Respiratory syncytial virus (RSV)について

研究協力者	岡本(中川)玲子	山口県環境保健センター
	戸田 昌一	山口県環境保健センター
	村田 祥子	山口県環境保健センター
	濱岡 修二	山口県環境保健センター
	富田 正章	山口県環境保健センター
	調 恒明	山口県環境保健センター

研究要旨

Respiratory syncytial virus (RSV)は乳幼児期に呼吸器感染症を引き起こす原因ウイルスとして重要なものである。2008年4月から2012年12月の5年間に山口県内で検出されたRSVについて解析を行った。ほぼ毎年 subgroup A が優勢であったが、2010年4月-2011年3月においては subgroup B が優勢であった。subgroup A の遺伝子型はすべて GA2、subgroup B の遺伝子型はすべて BA に近縁であった。2012年に検出された subgroup A のうち2株は G 遺伝子上に 72 塩基の重複を有する変異株であった。また、冬期だけでなくほぼ年間を通じて RSV は検出された。

A. 研究目的

重い呼吸器症状を引き起こすウイルスとして、ヒトライノウイルス(HRV)、エンテロウイルス(EV)、Respiratory syncytial virus (RSV)、ヒトパラインフルエンザウイルス(HPIV)、ヒトメタニューモウイルス(HMPV)、ヒトボカウイルス(HBoV)などが知られている。特に RSV は乳幼児期において重要なウイルスであり、冬期における呼吸器疾患入院患者の原因ウイルスの大部分を占め、また、乳児突然死症候群の原因の一つに挙げられている。

RSV には subgroup A と subgroup B があり、それぞれ複数の遺伝子型が存在する。

山口県内における流行状況を知るために、県内で検出された RSV について解析を行った。

B. 研究方法

2008年4月-2012年12月に呼吸器症状を呈して、医療機関を受診した患者から採材された検体(咽頭拭い液等)から RNA を抽出後、Parveenらの方法に準拠し、G 遺伝子の検出を行った。増幅された遺伝子については塩基配列の解析を行った。

また、Vero E6 細胞、HEp-2 細胞、Vero 細胞を用いてウイルス分離も行った。

C. 研究結果

1161 検体について検索を行った結果、RSV(A) が 81 株、RSV(B)が 29 株検出された。年齢分布を見ると 0-5 ヶ月齢 10 名、6-11 ヶ月齢 10 名、1 才 47 名、2 才 18 名、3 才 9 名、4 才 5 名、5 才 3 名、6 才以上が 8 名と、1 才が最も多かった(図 1)。ほぼ毎年、subgroup A と subgroup B の両方

が検出された。流行の主流は subgroupA であるが、平成 22 年度においては subgroupB が多く検出された。また、検出時期は冬期だけでなく、ほぼ一年中検出された(図 2)。G 遺伝子の解析を行ったところ、subgroupA の遺伝子型 GA2 が 81 株(図 3)、subgroupB の遺伝子型 BA が 29 株(図 4)であった。

D. 考察

冬期の乳幼児における最も注意すべき呼吸器ウイルスである RSV は、近年、感染症発生動向調査でも、夏期に検出報告が見られるようになってきたが、当所でも、年間を通して検出されていることがわかった。

検出された RSV の subgroup をみると、ほとんどの年で subgroup A が多く検出されていることがわかった。しかし、2010 年 4 月-2011 年 3 月においては subgroup B が優勢であった。

数年ごとに優勢な subgroup が入れ替わるという報告もあるので、今後も動向を見ていく必要があると考えられた。

検出された RSV の遺伝子解析を行った結果、subgroupA は遺伝子型 GA2、subgroupB は遺伝子型 BA に近縁であり、近年、本邦で多く検出されている遺伝子型と同じであった。その他の遺伝子型は検出されず、検出された時期における遺伝子型の違いは無かった。

2012 年 7 月と 11 月に、2011 年にカナダ、2012 年に千葉市で検出された subgroupA の G 遺伝子上に 72 塩基の重複を有する変異株と相同性が高い株が検出された。7 月分は海外から一時帰

国をした患児から検出された。しかし、11 月には渡航歴のない患児から検出された。これらの変異株は、韓国からも検出されている。今後、この株が主流になるか、これからの検出動向に注意をしていく必要があると考えられた。

E. 結論

山口県において検出された RSV はすべて subgroupA は遺伝子型 GA2 と subgroupB は遺伝子型 BA に近縁であった。検出年齢は 1 歳児が最も多かった。また、2011 年にカナダで初めて検出された subgroupA の G 遺伝子上に 72 塩基の重複を有する変異株と相同性の高い株が 2 株検出された。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

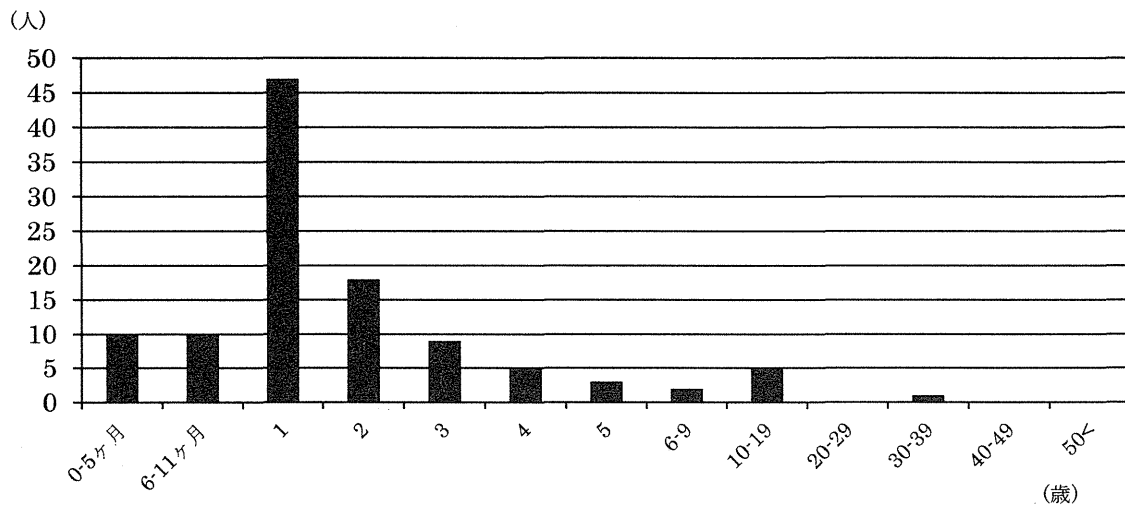


図1 年齢別検出状況

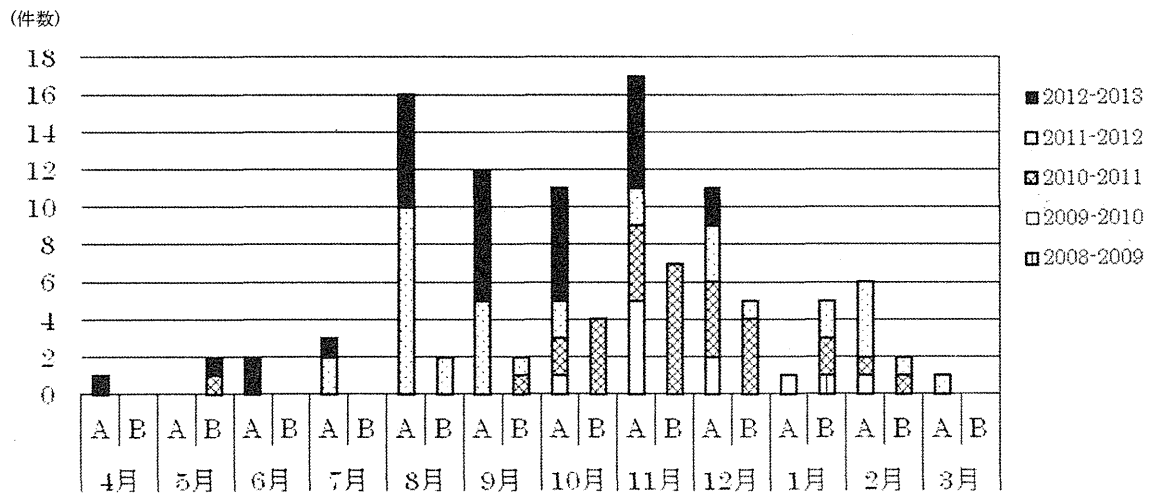
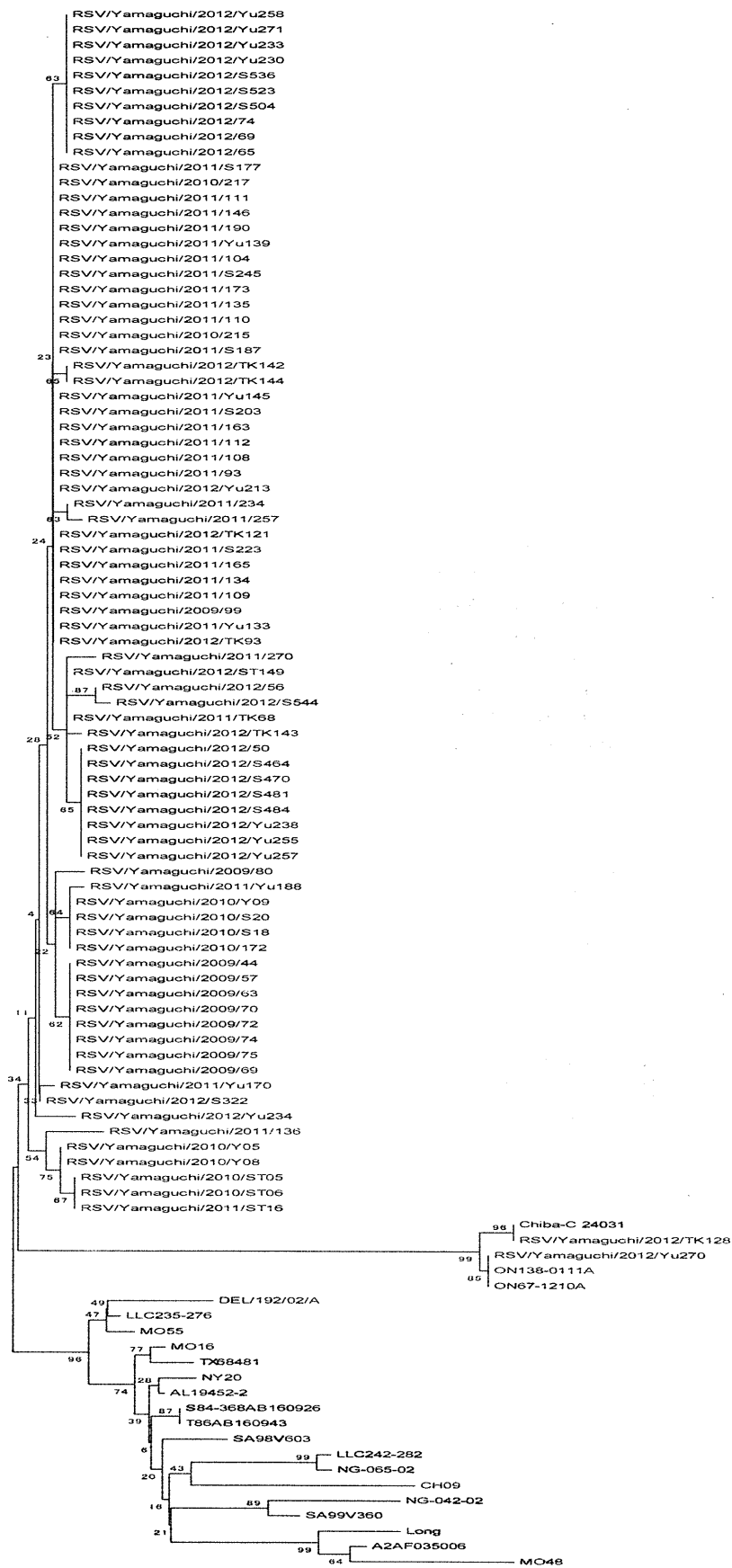
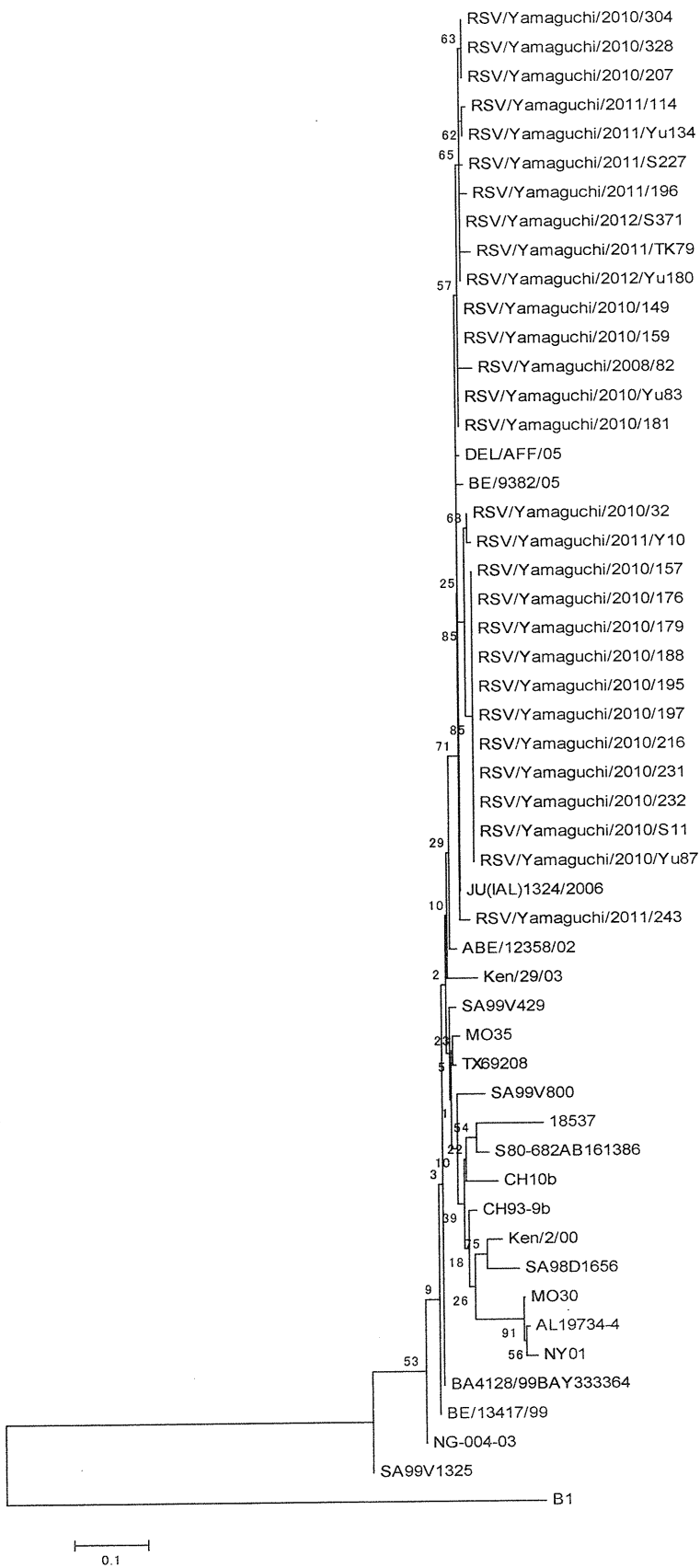


図2 年別、月別、subgroup 別検出状況



GA2

☒ 3 Phylogenetic analysis of RSV subgroup A (G gene)



☒ 4 Phylogenetic analysis of RSV subgroup B (G gene)

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

栃木県における小児呼吸器ウイルス感染症入院症例の原因ウイルス検索

研究協力者 櫛淵 泉美 栃木県保健環境センター
船渡川圭次 栃木県保健環境センター
井原 正博 済生会宇都宮病院
齋藤 真理 芳賀赤十字病院
野田 雅博 国立感染症研究所
木村 博一 国立感染症研究所

研究要旨

栃木県内の2医療機関に呼吸器疾患治療のため入院した患児から採取された咽頭ぬぐい液92検体を用いて、呼吸器感染症（ARIs）ウイルスの分離・検出を行った。その結果、Respiratory Syncytial ウィルス(RSV): 42株、ヒトライノウイルス(HRV): 29株およびヒトパラインフルエンザウイルス(HPIV): 5株等が分離・検出された。検出 RSV は subgroup A(-A): 40株、subgroup B(-B): 2株に分類された。RSV-A 分類株は、genotype NA1: 38株および C 末端超可変領域に 72塩基の重複を有する genotype ON1: 2株に分類された。RSV-B 分類株はすべて genotype BA に分類された。検出 HRV は、species A(-A): 10株(34.5%)、species B(-B): 7株(24.1%)および species C(-C): 12株(41.4%)にそれぞれ分類された。わが国では HRV-A および-C 分類株がこれまで主流とされているが、本研究では HRV-B 分類株が高率(24.1%)に検出された。分子系統樹解析の結果、HRV-ABCs は、それぞれ 7、4 および 8 つの genotype に分類された。HRV-A のうち 5 株および HRV-B のうち 2 株は、これまでの genotype とは異なる genotype に分類された。

A. 研究目的

小児では Respiratory Syncytial ウィルス(RSV) やヒトライノウイルス(HRV)などの急性呼吸器ウイルス感染により、ときに気管支炎、肺炎、喘鳴など臨床症状が重症化する。

本研究では、栃木県内の医療機関に入院治療中の小児急性呼吸器感染症(ARIs)患者を対象に、ARIs ウィルスの原因究明と検出ウイルスの分子生物学的解析を行い、県内の重症 ARIs の実態把握を試みる。

B. 研究方法

2012年7月から2012年12月までに、県内の

2 医療機関に呼吸器症状を呈して入院した患児 92 名から採取された咽頭ぬぐい液から ARIs ウィルスの分離・検出を行った。

ウイルス分離は検体を HEp-2 細胞および VeroE6 細胞にそれぞれ接種し、継代培養観察した。

ウイルス検出は検体からウイルス RNA を抽出し、RSV は G 遺伝子[Parveen S et al.: Genetic Variability in the G Protein Gene of Group A and B Respiratory Syncytial Viruses from India. J Clin Microbiol. 44:3055-3064, 2006]、HRV は VP4/VP2 領域遺伝子[石古博昭ら: 遺伝子系統樹解析によるエンテロウィルスの同定、臨床とウイルス、

27:283-293, 1999]、ヒトメタニューモウイルス (HMPV)は *F* 遺伝子、ヒトパラインフルエンザウイルス(HPIV)は *HN* 遺伝子を標的とした RT-PCR を実施し、得られた増幅産物について塩基配列解析及び分子系統解析を既報に準じて行った。

C. 研究結果

患者の年齢分布は0歳から12歳(2.5歳 \pm 3.2; mean \pm SD)、男女比は56:36、主な臨床症状は、気管支炎、細気管支炎、肺炎および喘息などである。

ウイルスは、RSV:42株(42/92, 52.2%)、HRV:29株(29/92, 31.5%)、HPIV:5株(5/92, 5.4%)、エンテロウイルス:5株(5/92, 5.4%)およびアデノウイルス:1株(1/92, 1.1%)が、それぞれ分離・検出された。

42株の検出 RSV は、subgroup A(-A):40株(95.2%)、-B:2株(4.8%)に分類された。

29株の検出 HRV は、species A(-A):10株(34.5%)、-B:7株(24.1%)、-C:12株(41.4%)に分類された。

2種類以上のウイルスが検出された検体は9検体で、その内訳を表1に示す。

ウイルスが検出された患者のデータを表2に示す。RSVが検出された患者の年齢(0.6歳 \pm 1.1; mean \pm SD)は、HRVが検出された患者の年齢(3.1歳 \pm 3.2; mean \pm SD)よりも低かった($P<0.05$)。HRVの species 間における患者の年齢は、HRV-A(1.6歳 \pm 3.2; mean \pm SD)が-C(3.7歳 \pm 3.4; mean \pm SD)より優位に低かった($P<0.05$)。Species による臨床症状の違いは認められなかった。

RSV-Aの *G* 遺伝子領域系統樹解析の結果、38株は genotype NA1 に、2株は genotype ON1 に分類された(図1)。genotype ON1 分類株:2株は、C末端に72塩基の重複を有し、カナダで検出された株[ON67-1210A(JN257693)]と98.3~99.2%の高い相同性を示した。RSV-B 分類株は、いずれも genotype BA に分類された。

HRVの *VP4/2* 領域系統樹解析の結果、HRV-A:10株、-B:7株および-C:12株は、それぞれ7、4および8つの genotype に分類された。HRV-A:10株のうち5株および-B:7株のうち2株は既報の参照株とは異なる genotype に分類された(図2)。

D. 考察

栃木県内の重症 ARIs 患者検体から検出されたウイルスは RSV が最も多く、次いで HRV であった。9検体からは RSV、HRV および HPIV が同時に検出され、これらウイルスが県内の重症 ARIs の主要な原因ウイルスであると思われた。

RSV-Aのうち2株は、2011年にカナダで報告された C'末端に72塩基の重複を有する genotype ON1 分類株 [ON67-1210A(JN257693)] と高い相同性を示した。わが国では、2012年に千葉県において genotype ON1 分類株と高い相同性を示す株の検出が報告 (IASR Vol. 33 p. 99-100: 2012) されている。わが国においても ON1 類似株が流行し、今後主要な genotype となる可能性もあり、ON1 分類株の病原性や今後の動向についてさらなる調査が必要と思われる。

同様に RSV-B では C'末端に60塩基の重複を有する genotype BA が1999年に初めて検出報告されて以降、現在では世界的に主要な流行 genotype となっている。

近年、HRVはHRV-Aおよび-Cが主な流行株である(Wisdom et al.: 既述; Arakawa et al.: 既述)が、今回の検討では、HRV-B 分類株の占める割合が24.1%と比較的高い値を示し、地域疫学特性あるいは、HRV-B 流行の増大等、未だその要因は不明である。また、HRV-B と-A および-Cについて、感染株の species 間の臨床症状の異同は確認できず、重症化機序へのHRV-B の確証は得られない。

また、HRV-B の新たな genotype の出現が報告

されており、本研究においても参照株と異なる genotype に分類される株が確認されたことから、今後、県内の HRV-B の動向を注意深くモニタリングすることが重要と考える。

E. 結論

栃木県内の重症 ARIs 患者検体から検出されたウイルスは、主に RSV と HRV で、これらウイルスが県内の重症 ARIs の重要な原因ウイルスである。

RSV-A G 遺伝子の C'末端領域に 72 塩基の重複を有する株が 2 株分離された。

わが国のこれまでの HRV 流行時の検出株に比し、HRV-B 分類株が高率に検出された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

表 1. 複数ウイルスが検出された検体の内訳

検出ウイルス	検体数
HRV-A+RSV-A	3
HRV-A+RSV-A+HPIV2	1
HRV-A+HPIV2	1
HRV-B+RSV-A	2
HRV-C+RSV-A	2
計	9