

感染症発生動向調査における呼吸器系ウイルスの検索

若月紀代子・山崎俊治・香月隆延

福岡市保健環境研究所保健科学部門

Search of Respiratory Viruses in Infectious Disease Surveillance

Kiyoko WAKATSUKI, Shunji YAMASAKI and Takanobu KATSUKI

Health Science Division, Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment

Summary

2003年10月～2004年5月に感染症発生動向調査で得られたインフルエンザを含む呼吸器系疾患が疑われる134検体について、検体から直接PCR及びダイレクトシーケンスを実施し、Influenza C virus, Human metapneumovirus, Human respiratory syncytial virusの検索を行った。

その結果 Influenza C virus が 2 件, Human metapneumovirus が 2 件, Human respiratory syncytial virus が 5 件検出され、呼吸器系疾患におけるウイルス検査には、遺伝子検査を併用することが必要と考えられた。

Key Words : Influenza C virus, Human metapneumovirus, Human respiratory syncytial virus

はじめに

福岡市では平成4年から福岡県結核・感染症発生動向調査事業に参画している。病原体定点から搬入される検体は、例年インフルエンザが最も多い。

2003/2004シーズンでは、インフルエンザを含む呼吸器系疾患の検体は2003年10月から搬入が始まり、2004年1月をピークに2004年5月まで続いた。これら搬入検体のうち、63検体から Influenza A virus (Inf.A) または Influenza B virus (Inf.B) が、8検体からは他のウイルスが、残り63検体はウイルス分離陰性となり、通常の細胞培養法でのウイルス分離率は53%に過ぎなかった。

そこで、Influenza C virus (Inf.C), Human metapneumovirus (hMPV), Human respiratory syncytial virus (RSウイルス)の検索を試みた。これらのウイルスは、当所で行っている細胞培養法では検出困難であったり、凍結融解に弱いため細胞接種時に死滅しやすかったりする。このため、ウイルス分離陰性の検体にはこれらのウイルスが含まれる可能性が考えられる。

今回、検体から直接PCR及びダイレクトシーケンスを実施し、これらのウイルス検索を行ったので報告する。

材料と方法

1. 材料

2003年10月～2004年5月に感染症発生動向調査で得られたインフルエンザを含む呼吸器系疾患が疑われる134検体を材料とした。検体は咽頭ぬぐい液、咽頭うがい液、鼻汁、喀痰、気管吸引液で、患者年齢は0歳0ヶ月から66歳6ヶ月（平均12歳9ヶ月）であった。

なお、ウイルスの混合感染を想定して、検査材料には、ウイルス分離陽性検体も使用した。

2. 方法

検体からのRNA抽出は、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用い、DNase処理後 Super Script で50℃、1時間反応させ cDNAを作製した。

PCRはそれぞれ表1に示すプライマー及び反応条件を用い、2nd PCRまで実施した^{1,2)}。なお、Inf.Cに関しては山形大学医学部の松崎の示す方法（未発表）に従った。

PCR陽性となった場合、PCR産物を ABI PRISM 310 Genetic Analyzerを用いてダイレクトシーケンスを行った。決定した塩基配列についてBLASTを用い、

GenBank 登録株との相同性検索を行った。

表1 各ウイルスのプライマー, PCR 条件, 目的のバンドの大きさ

プライマー	Inf.C		hMPV		RS ウィルス	
	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd
NS+24 / NS-750	NS+171 / NS-586		MPVF 1f / MPVF 1r		RSVAB F / RSVAB R	A型 : RSVA F / RSVA R
						B型 : RSVB F / RSVB R
PCR	94	hot start	94	2min	94	2min
条件	94	30s	94	1min	94	1min
35cycles	49 (2nd 51)	30s 35cycles	54	1min	35cycles	50 (2nd 60) 1min
	72	1min	72	1min	72	1min
	72	9min	72	7min	72	7min
	4	hold	4	hold	4	hold
目的の バンド	728bp	416bp	450bp		838bp	A型 : 334bp B型 : 183bp

結果

134 検体中 9 検体から、新たに呼吸器系ウイルスが検出された（表2）。

Inf.C は 2 月に発症した急性脳炎及び 3 月に発症したインフルエンザ患者から検出された。GenBank に登録されていた配列とそれぞれ 99% の相同性を示した。また、2 株間における相同性も 99% であった。

hMPV は 3 月及び 4 月に発症したインフルエンザ患者から検出された。BLAST 検索の結果、登録されていた配列とそれぞれ 99 % の相同性であった。この 2 検体から検出された hMPV の genotype は、A と B で異なり、そのた

め両株間の相同性は 85% と低かった。

RS ウィルス A 型は 12 月及び 1 月に発症した計 3 名のインフルエンザ患者から検出された。そのうち 1 検体からはエコーウィルス 16 型が分離されており、混合感染と考えられた。BLAST 検索では登録株と 96 ~ 98 % の相同性が認められ、3 株間の相同性については 96 ~ 100% であった。

RS ウィルス B 型は 10 月に発症した RS ウィルス感染及び 12 月に発症したインフルエンザ患者の 2 検体から検出された。BLAST 検索の結果、登録株と 98 ~ 97 % の相同性で、2 株間では 99% の相同性であった。

表2 ウィルスの検出結果

検出ウイルス	臨床診断名	発症日	年齢	その他
1 Inf.C	急性脳炎	2004 年 2 月	5 歳 3 ヶ月	
2 Inf.C	インフルエンザ	2004 年 3 月	5 歳 6 ヶ月	
3 hMPV genotype B	インフルエンザ	2004 年 3 月	12 歳 11 ヶ月	
4 hMPV genotype A	インフルエンザ	2004 年 4 月	4 歳 4 ヶ月	
5 RS ウィルス A 型	インフルエンザ	2003 年 12 月	5 歳 4 ヶ月	エコーウィルス 16 型との混合感染
6 RS ウィルス A 型	インフルエンザ	2003 年 12 月	2 歳 7 ヶ月	
7 RS ウィルス A 型	インフルエンザ	2004 年 1 月	3 歳 0 ヶ月	
8 RS ウィルス B 型	RS ウィルス感染	2003 年 10 月	3 歳 8 ヶ月	
9 RS ウィルス B 型	インフルエンザ	2003 年 12 月	3 歳 8 ヶ月	

考察

現在福岡市では、感染症発生動向調査において RD18S ,

HEp2, Vero, CaCo2 細胞の 4 細胞を用いて分離培養を行っている。さらに、冬季は MDCK 細胞を用い、インフルエンザウイルスの分離を行っている。

Inf.C は MDCK 細胞に対し、低感受性もしくは培養されても観察が難しく³⁾、現在の体制では分離が難しい状況にある。実際、Inf.C は福岡市ではここ 10 年間分離されなかつたが、今回の検索により 2 検体から検出された。

Inf.C は、全国的にみると 2003/2004 シーズンは 32 検体と例年に比べ多数検出されている（国立感染症研究所感染症情報センター HP）。特に山形県⁴⁾で 25 株分離されており地域流行も報告されている。Inf.C による感染は 2 ~ 3 日続く 38 ~ 40 の発熱と 2 週間以上の鼻汁過多を主症状とし、臨床像に特徴がないため流行をなかなか捉えることができない⁵⁾。その症状は軽症であることが多いとされているが、重症例を起こしうる可能性も指摘されている^{3,6)}。

今回、急性脳炎より一例検出されたが、この患者は、当所において検出できなかつたものの病院において迅速診断キットで RS ウィルス陽性、またその後の問い合わせにより RS ウィルス及び Inf.AH1 に対し抗体価が上昇していたことが判明している。そのため Inf.C による急性脳炎とは考えにくいが、いずれにしても現在のところ Inf.C の監視が十分ではなく、その動向もはっきりとしない。今後、Inf.C の動向を監視していく必要があると考えられる。

hMPV は 2001 年に分離された新しいウィルスで、臨床症状は RS ウィルスやインフルエンザと似ている^{7,8)}。hMPV は LLC-MK2 細胞により分離され、前記した分離培養では検出ができない。そのため、当所ではこれまでに本ウィルスを検出できなかつたが、今回遺伝子検査を用いたことで初めて hMPV を検出した。

本ウィルスは、2003 年に宮城県⁸⁾から日本で初めて分離されて以降、全国でも 2002 年が 10 件、2003 年が 86 件、2004 年が 59 件の検出報告が行われてあり（国立感染症研究所感染症情報センター HP）、また広島県⁹⁾では小児の流行も確認されたことから、今後の動向に注意すべきウィルスと考えられる。

乳幼児の冬季呼吸器感染症の原因であり、時に重症化し肺炎を起こすこともある RS ウィルスは、HEp2 細胞で分離可能であるが、凍結融解操作によりウィルスの感染価が激減する。本市の感染症発生動向調査体制では、採取された検体は病院で瞬間凍結後、当所に搬入されている。そのため、その時点では感染性を失っている可能性がある。今回、本ウィルスについて検出を試みたところ、

RS ウィルス A 型と B 型が合計 5 検体から検出され、本ウィルスの検査には遺伝子検査を併用することが有効であった。

今回用いた遺伝子検出は、細胞の準備が必要ない反面、RNA 抽出から始まりシーケンスまで煩雑な手間がかかる。また、あくまでも遺伝子の検出にすぎないため、感染性があるかどうかの評価が難しい側面がある。しかし、こういった遺伝子検査を併用することで、これまでに検出不可能であった様々なウィルスへの対応が可能となる。

今回、用いた 134 検体の中から計 9 件のウイルスを新たに検出することができた。これらは今まで検出できなかつたウイルスであり、感染症発生動向調査における呼吸器系ウイルス検査については、遺伝子検査の併用が必要であると考えられた。

文 献

- 1) Teresa C.T.Peret, 他 : Characterization of Human Metapneumoviruses Isolated from Patients in North America , J Infect Dis , 185 , 1660-1663 , 2002
- 2) J.Stockton, 他 : Multiplex PCR for Typing and Subtyping Influenza and Respiratory Syncytial Viruses , J Clin Microbiol , 36 , 2990-2995 , 1998
- 3) 松原啓太, 他 : 1999/2000 年冬季に広島県内で分離された C 型インフルエンザの検討 , 感染症学雑誌 , 78 (6) , 470-475 , 2004
- 4) 安孫子千恵子, 他 : 2001-04 シーズンの山形県におけるインフルエンザの流行 , 山形県衛生研究所報 , 37 , 51-54 , 2004
- 5) 大里外眞郎 : 医科ウイルス学 (改訂第 2 版) , 339 , 南江堂 , 2000
- 6) 松崎葉子, 他 : 1996 年と 1998 年に山形県内でとられた C 型インフルエンザの流行 , 臨床とウイルス , 28 , 41-46 , 2000
- 7) van den Hoogen BG, 他 : A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease , Nat Med , 7 , 719-724 , 2001
- 8) 後藤郁男, 他 : インフルエンザ様患者からの Human metapneumovirus の分離 - 宮城県 , IASR , 24 , 64-65
- 9) 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(2) , 129-137 , 2004