

から HMPV が分離された (図 1)。

HMPV のほか、コクサッキーウイルス、インフルエンザウイルス、アデノウイルス、Respiratory Syncytial ウイルス (RSV)、等、計 12 種類のウイルスが分離された。

2) HMPV 遺伝子解析

17 株の HMPV *F* 遺伝子 (322bp) の塩基配列を決定し、系統樹解析を試みた。その結果、Subgroup A2 が 8 株 (47%)、Subgroup B1 が 6 株 (35%) および Subgroup B2 が 3 株 (18%) にそれぞれ分類された (図 2)。

3) HMPV 検出期間の検討

検体採取日がウイルス検出に及ぼす影響を検討した。その結果、発病から 4 日目 (20.0%) と 3 日目 (16.1%) で高い検出率を示した (表 1)。

4) 疫学的検討

まず、2 月下旬～4 月上旬の間に採取された検体、計 87 例について患者年齢別の HMPV 検出数を検討した。その結果、0 歳から 4 例 (検査検体数:21)、1 歳から 6 例 (同:20)、2 歳から 3 例 (同:10)、3 歳から 1 例 (同:5) および 4 歳から 1 例 (同:6) 検出された。5 歳以上では検出されなかった (同:25)。

この結果をもとに、HMPV が多く検出された 2 歳以下の小児 (462 例) に限定して、2011 年 1 月～12 月の HMPV 検出状況を検討した (図 3)。

各月の検体数は 24～55 例を推移し、6 および 7 月でそれぞれ 50 および 55 例の依頼数であった。いっぽう、HMPV 検出率は 2、3、4、5 および 9 月でいずれも 10%以上の値を示した。

5) 臨床学的検討

HMPV 陽性患者 43 名の初診時の診断名は、かぜ症候群ないしは上気道炎の診断が 16 例、気管支炎が 12 例、肺炎が 10 例、手足口病が 4 例、インフルエンザが 3 例、ヘルパンギーナが 1 例であった (一部症例で診断名の重複あり)。

HMPV 陽性患者 43 名中、37 名 (86.0%) では初診時 38 度以上の発熱を呈した。咳嗽は 24

名 (64.9%) (不明 6 例) でみられた。

HMPV 陽性患者 43 名のうち、下気道症状等の重症化のため 26 名が入院治療となった。入院患者 26 名の年齢分布は、0 歳 4 名、1 歳 14 名、2 歳 5 名、3 歳 2 名および 4 歳 1 名であった。外来治療患者は 17 名で、年齢分布は 0 歳 9 名、1 歳 4 名、2 歳 3 名および 5 歳 1 名であった (図 4)。今回の症例群では、0 歳の入院症例は少なかった。

入院時に喘鳴 (wheeze)、笛声音 (piping rale) 等 (26 例中 21 例) の所見を示した。

胸部 X 線画像診断を実施した 29 症例のうち、16 症例で延べ 15 ヶ所の肺野所見がみられた。すべての所見は肺門部に近い部位に存在し気管支周囲の炎症像であった。多い順に、右下肺野 (53.3%)、左下肺野および右上肺野 (20%)、左上肺野 (6.7%) であった。Air bronchogram を伴うような肺泡への浸潤を示唆する所見はなかった。なお、1 症例で右下肺野において過膨張所見を認めた。

典型的気管支肺炎の 2 症例の X 線画像を示す (図 5-1、2)。

6) 転帰

発病から初診までの日数を調査した。入院および外来症例、いずれも概ね 2 病日以内に医療機関を受診していた。

入院 26 例の病悩期間は 10 および 11 日間が多数を占めたが、一部では 15 日以上の長期間に及ぶ例もあった。

診断時に下気道症状 (下気道炎、肺炎、気管支炎) を有する群 (n=14) ではその平均病悩期間は 11.5 日間、有しない群 (n=12) のそれは 8.6 日間で両者間に有意な差を認めた (Mann-Whitney の U 検定 ; $P < 0.01$)。

なお、全症例は回復治癒している。

D. 考察

HMPV は 3 月をピークとした春季に多く検出

されたが、年間を通じて少数検出された。患者年齢は1歳児がもっとも多かったが、5歳児からも検出された。小児が春季に呼吸器症状を呈した場合、特に迅速診断でRSVやインフルエンザウイルス感染が否定された症例では、HMPV感染症を疑うことも必要と思われる。

検出HMPV株は相同性および系統樹解析により、Subgroup A2、B1およびB2型に分類される株であり、既報に類似した株であった。

今回の検討ではHMPVは最長11病日までPCRにより検出が可能であったがHMPV分離成功例は少数であった。今後、さらに症例を重ねた検討が必要であろう。

疫学および臨床学的検討を行った結果から、0歳の入院症例は少なく、1歳以上での入院症例が顕著であった。

また小児のHMPV感染症では、初診時に下気道症状を呈した症例では重症化する傾向にあり、下気道症状を有した入院症例は、初診時に下気道症状を有しない入院症例に比べて病期期間が長期化した。

入院症例では呼吸音の異常が高率にみられ、また胸部X線画像診断では肺門部に近い部分に肺野所見を多く認め、1例では右下肺野での過膨張所見もみられたことから、多くは末梢肺胞より中枢側の下気道気管支に炎症病変を生

じ閉塞機転が働くと考えられた。

RSVとの混合感染によりHMPV感染症が重症化することが報告されているが、今回の症例にはRSVが同時に検出されたものはなかった。

細菌の同時検出例があったが、常在菌の可能性も否定できず今回の検討では病因としての意義づけは困難であった。

E. 結論

急性呼吸器感染症等患者咽頭ぬぐい液から43株のHMPVがRT-PCRにより検出された。

疫学的及び臨床学的検討結果から、HMPVは0～2歳の患児から多数検出され、京都市においても小児の重要な重症呼吸器感染症の一である。

初診時に下気道症状を認める症例では病期期間が長期化する傾向がみられた。

入院症例の呼吸器および画像所見から、肺胞より中枢側下気道気管支に炎症病変があると考えられた。

F. 研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

なし

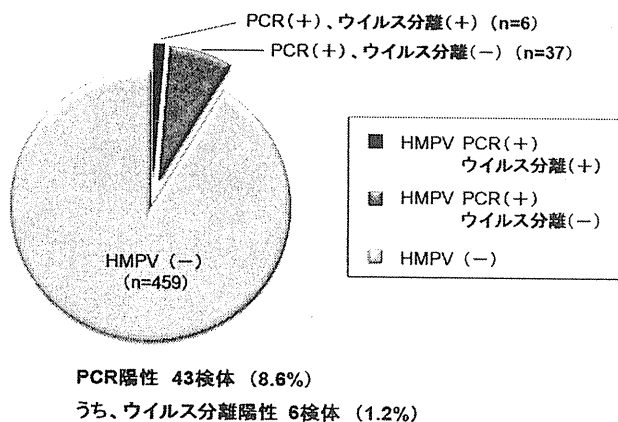


図1 HMPV の検出・分離率 (n=502)

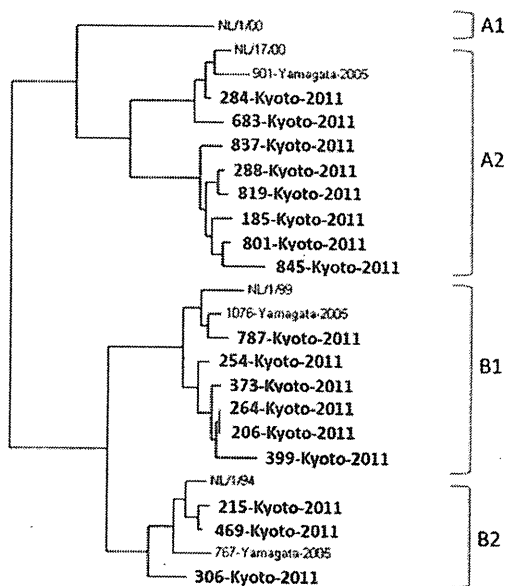


図2 HMPV F 遺伝子分子系統樹 (322nt)

*太字：京都市検出株

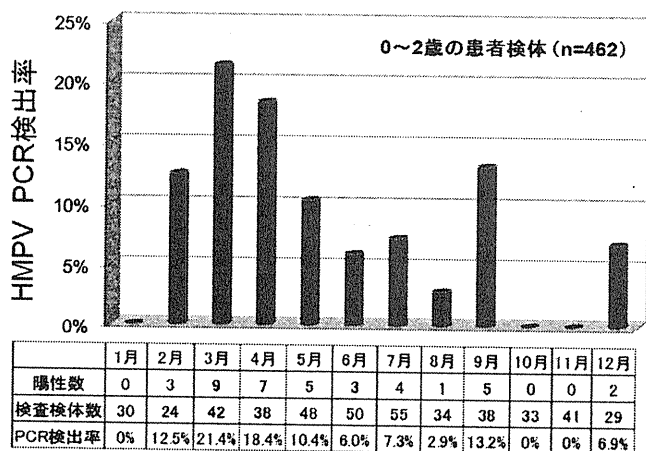


図3 HMPV 流行の推移

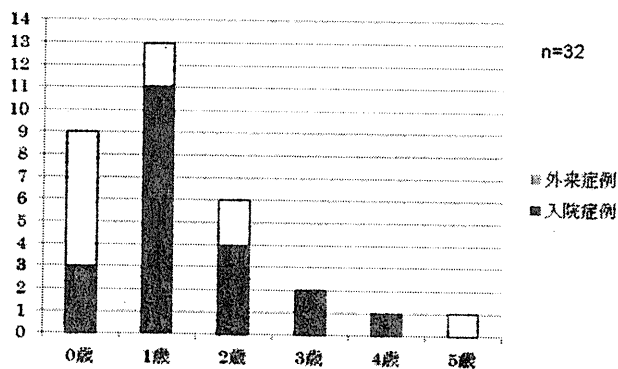


図4 外来症例、入院症例の年齢分布

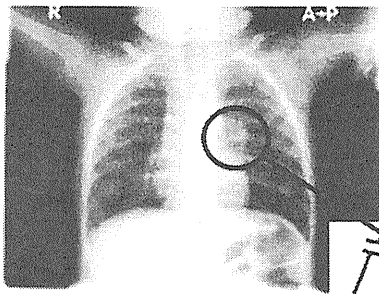


図 5-1

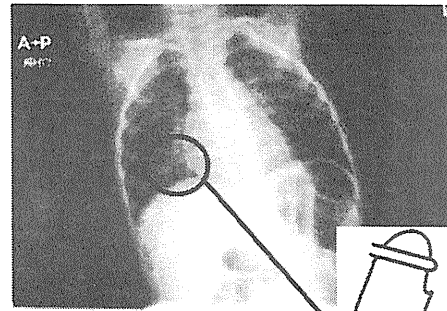
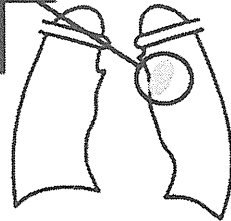


図 5-2

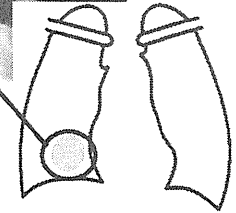


図 5 HMPV 感染症に典型的と考えられた気管支肺炎のレントゲン画像

表 1 発病から検体採取までの期間と、
HMPV 陽性数および検査検体数 (n=502)

病日	陽性数 / 検体数
0 日	3 / 67
1 日	6 / 167
2 日	5 / 91
3 日	10 / 62
4 日	10 / 50
5 日	4 / 22
6 日	3 / 15
7 日	0 / 6
8 日	0 / 7
9 日	1 / 6
10 日	0 / 1
11 日	1 / 1
12 日以上	0 / 5
不明	0 / 2

本邦におけるRespiratory syncytialウイルスの分子疫学

研究協力者	小林 美保	群馬県衛生環境研究所
	筒井 理華	青森県環境保健センター
	吉田 綾子	青森県環境保健センター
	清田 直子	熊本県保健環境科学研究所
	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

2009年から2010年にかけて青森県、群馬県および熊本県にて急性呼吸器感染症患者から採取された鼻咽頭拭い液について、RT-PCR法によるRespiratory syncytialウイルス（RSV）の検索を行った。合計709検体中、50検体からRSVを検出した。遺伝子型はGA2型およびBA型で、検出株間の相同性は非常に高く、これらの遺伝子型が国内で流行していたことが示唆された。また、G遺伝子のC末端超可変領域において複数のアミノ酸置換があり、positive selection siteが確認された。

A.研究目的

Respiratory syncytialウイルス（RSV）は呼吸器感染症の主な原因ウイルスの一つであり、乳幼児に対して重症下気道炎を引き起こすことが知られている。RSVの構造蛋白のうち、G蛋白は抗原性や病原性に関連し重要な役割を果たす。そこで、本邦におけるRSVの流行状況およびG蛋白領域における遺伝学的特徴を明らかにすることを目的とし、本研究を行った。

B.研究方法

2009年9月から2010年4月に青森県、群馬県および熊本県に所在する定点医療機関にて同意の得られた急性呼吸器感染症患者から採取された鼻咽頭ぬぐい液を材料とした。検体からRNA抽出後、Parveenらの方法¹⁾に準じてG遺伝子を対象としたRT-PCRを実施した。ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、近隣結合法により系統樹解析を行った。また、検出株のG遺伝子C末端超可変領域について、SLAC、FEL、IFELおよびREL法²⁾により、positive selection siteを検索した。さらに最尤法を用いて同領域における進化速度を計算した。

C.研究結果

鼻咽頭拭い液709検体中、50検体(7.1%)からRSVが検出された。RSVが検出された患者の臨

床症状は、細気管支炎や肺炎を主とする下気道症状を呈する者が多かった(表1)。

近隣結合法により作成した系統樹を図1に示す。検出株のうちSubgroup Aは34検体(遺伝子型は全てGA2型)、Subgroup Bは16検体(遺伝子型は全てBA型)であった。検出株間の相同性はSubgroup Aが97.7-100%、Subgroup Bが94.2-100%と非常に高かった。

C末端超可変領域におけるアミノ酸置換について推定されるpositive selection siteは、Subgroup AではAsn250Ser、Met262Glu、Asn273Tyr、Leu274Pro、Arg297LysおよびArg297Glu、Subgroup BではLeu237Proであった(表2)。また、検出株の進化速度はSubgroup Aが 1.92×10^{-3} substitution/site/year、Subgroup Bが 3.59×10^{-3} substitution/site/yearであった。

D.考察

本研究ではSubgroup A GA2型、Subgroup B BA型が各県で検出されており、2009/2010シーズンはこれらの型が本邦の急性呼吸器感染症に関連していることが推察された。近年では国外でもGA2型やBA型の報告が多く³⁾⁴⁾⁵⁾本邦でも同様の傾向であると考えられる。

検出株の相同性はSubgroup A、Bともに高かったがC末端超可変領域では複数箇所アミノ酸置換が確認された。このうち、一部のアミノ

酸は非同義置換率が同義置換率よりも高い positive selection site であり、変異が有利に働く site であると推測された。

E. 結論

本研究により 2009/2010 シーズンに採取された検体から国内では GA2 型あるいは BA 型が流行していることが示唆された。また、positive selection site と推定されるアミノ酸置換が確認されたことから、今後も新たな変異を引き起こす可能性があり、引き続き解析していく必要がある。

F 参考文献

- 1) Parveen, S., Sullender, W. M., Fowler, K., Lefkowitz, E. J., Kapoor, S. K. & Broor, S. Genetic variability in the G Protein gene of group A and B respiratory syncytial viruses from India. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 3055-3064.
- 2) Pond, S. L. & Frost, S. D. Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. *Bioinformatics.* 2005; 21: 2531-2533.
- 3) Rebuffo-Scheer, C., Bose, M., He, J., Khaja, S., Ulatowski, M., Beck, E. T., Fan, J., Kumar, S.,

Nelson, M. I. & Henrickson, K. J. Whole genome sequencing and evolutionary analysis of human respiratory syncytial virus A and B from Milwaukee, WI 1998-2010. *PLoS One.* 2011; 6: e25468.

4) Shobugawa, Y., Saito, R., Sano, Y., Zaraket, H., Suzuki, Y., Kumaki, A., Dapat, I., Oguma, T., Yamaguchi, M. & Suzuki, H. Emerging genotypes of human respiratory syncytial virus subgroup A among patients in Japan. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 2475-2482.

5) Galiano, M. C., Palomo, C., Videla, C. M., Arbiza, J., Melero, J. A. & Carballal, G. Genetic and antigenic variability of human respiratory syncytial virus (groups a and b) isolated over seven consecutive seasons in Argentina (1995 to 2001). *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 2266-2273.

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

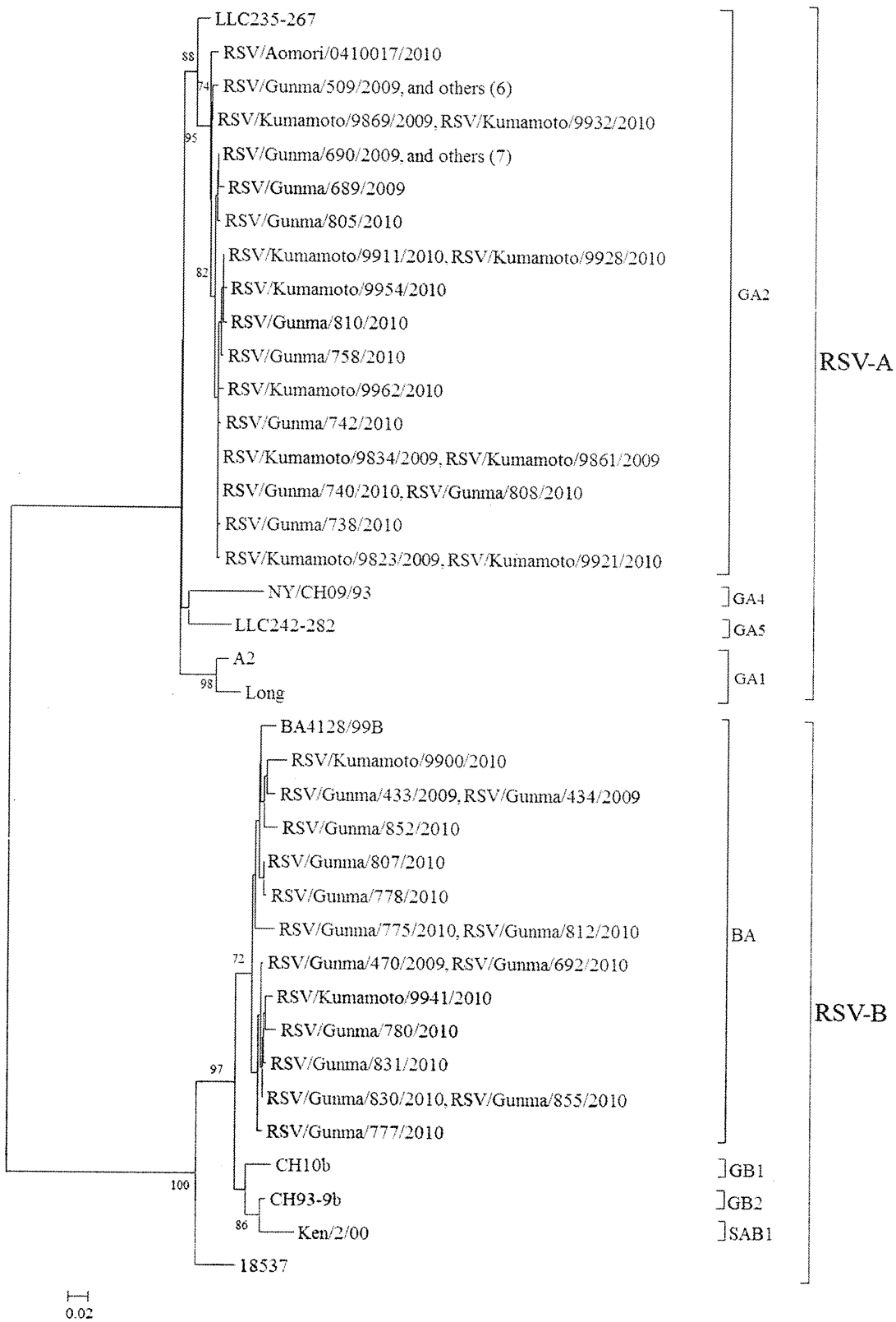


图 1 G 遺伝子 分子系統樹

表 1 RSV 陽性患者の臨床症状

Subgroup	遺伝子型	検出株数	臨床症状	
RSV-A	GA2	34	気管支炎	4
			細気管支炎	10
			肺炎	11
			上気道炎	5
			インフルエンザ様疾患	4
RSV-B	BA	16	気管支炎	2
			細気管支炎	6
			肺炎	5
			URI	3
計		50	気管支炎	6
			細気管支炎	16
			肺炎	16
			上気道炎	8
			インフルエンザ様疾患	4

表 2 C 末端両可変領域における positive selection site

SubgroupA			
変異箇所	変異	IFEL [†]	REL ^{††}
250 - Asn	Ser		*
262 - Met	Glu		*
273 - Asn	Tyr	*	
274 - Leu	Pro	*	
297 - Arg	Lys, Glu		*
SubgroupB			
変異箇所	変異	IFEL	REL
237 - Leu	Pro	*	

p -value < 0.1, Bayes factor > 20

熊本県におけるヒトライノウイルスの分子疫学

研究協力者	清田 直子	熊本県保健環境科学研究所
	西村 浩一	熊本県保健環境科学研究所
	原田 誠也	熊本県保健環境科学研究所
	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

熊本県における急性呼吸器感染症(ARIs)ウイルスの実態を明らかにするため、2009年4月～2011年12月の間にARIs患者から採取された咽頭ぬぐい液および鼻腔ぬぐい液239検体のウイルス検索を実施した。その結果、100検体(41.8%)からARIsウイルスが検出された。内訳は、ヒトライノウイルス(HRV)が38件、Respiratory syncytial ウイルスが26件、ヒトパラインフルエンザウイルスが12件、ヒトメタニューモウイルスが7件、ヒトコロナウイルスが3件、ボカウイルスが3件、エンテロウイルスが22件、アデノウイルスが3件検出された。また、検出されたHRVについて系統樹解析を行ったところ、主に species A および C が検出され、それらは多くの type に分類されたことから、遺伝学的に多様な type の HRV が流行していた可能性が示唆された。

A. 研究目的

急性呼吸器感染症(ARIs)の原因の大半がウイルスであり、特に小児や高齢者では重症化しやすい重要な感染症であるが、これまで熊本県ではインフルエンザウイルス(FluV)を除いた呼吸器ウイルスの感染実態は不明であった。

本研究は熊本県内の ARIs ウイルス感染実態を明らかにすることを目的に主要な ARIs ウイルスのサーベイランスを実施し、特にヒトライノウイルス(HRV)の分子系統解析を行った。

B. 研究方法

2009年4月から2011年12月に熊本県病原体定点医療機関を受診したARIs患者から採取された咽頭および鼻腔ぬぐい液239検体(2009年;86検体、2010年;46検体、2011年;107検体)を試験に供した。さらに、呼吸器症状を主徴としない患者(発疹症、手足口病など)から採取された咽頭ぬぐい液、髄液および便、等626検体(2009年;124検体、2010年;180検体、2011年;322検体)について、特にHRV検索

を追加試験した。

検索呼吸器ウイルスはHRV、Respiratory syncytial ウイルス(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)、ヒトコロナウイルス(HCoV)、ヒトボカウイルス(HBoV)、エンテロウイルス(EV)およびアデノウイルス(AdV)についてPCR法およびウイルス分離を実施した。PCR増幅産物について塩基配列解析を行い、近隣結合法による系統樹解析を行った。

C. 研究結果

(1)ARIs ウイルスサーベイランス成績

供試239検体の診断名別内訳はインフルエンザ(疑い含む)136検体、上気道炎33検体、下気道炎29検体、RSV感染症10検体およびその他31検体であった。

ウイルス検索の結果、239検体中100検体(41.8%)から検索対象の呼吸器ウイルスが検出された。検出ウイルスの内訳は、HRV38件、RSV26件、HPIV1型5件、HPIV2型2件、HPIV3

型 4 件、HPIV4 型 1 件、HMPV7 件、HCoV OC43 群 2 件、HCoV NL63 群 1 件、HBoV3 件、EV22 件および AdV3 件であった (表 1)。ウイルス陽性検体のうち 16 検体(16.0%)からは、複数ウイルスが同時に検出された (表 2)。

臨床診断でインフルエンザが疑われた 136 検体中 FluV 不検出であった 122 検体では、42 検体 (34.4%) から HRV、RSV など計 8 種類の呼吸器ウイルスが検出された (表 3)。

(2)HRV の分子疫学解析

呼吸器症状を主訴とした 239 検体および呼吸器症状を主訴としない 626 検体について HRV 検出を試みた。その結果、前者から 38 株(15.9%) および後者から 51 株 (8.1%) 検出された。陽性検体の臨床診断名別内訳は、前者はインフルエンザ 16、下気道炎 11、上気道炎 5 およびその他疾患 6、後者は発疹症 16、手足口病 16、ヘルパンギーナ 8、無菌性髄膜炎 3、およびその他疾患 8 であった。

呼吸器症状を主訴とした検討では HRV が単一検出されたもの 27 検体、HRV と他の ARI ウイルス同時検出されたもの 11 検体で、同時検出されたウイルスは主として RSV や HPIV であった。

呼吸器疾患とその他の疾患から検出された HRV 計 89 株について、VP4/2 領域系統樹解析結果を図 1 に示した。Species C については、Simmonds らが報告した参照株を用いた¹⁾。その結果、検出株は species A ; 54 株、species B ; 1 株、species C ; 34 株にそれぞれ分類され、species A および C が主な流行株であったことが示唆された。さらに、species A に分類された株は 24type に、species C は少なくとも 16type に分けられた。

D. 考察

本研究により、熊本県内の ARI 例では多くの呼吸器ウイルスが関与していることが明らかとなった。特に、ARI 患者検体から HRV は

通年、RSV は冬期に、高率に検出され、本県の主要な ARI 原因ウイルスであると考えられた。

インフルエンザが疑われ FluV 不検出であった検体から、多くの呼吸器ウイルスが検出された。そこで、2011 年 4 月以降は FluV が検出された検体についても、他の ARI ウイルスの検索を併行実施する検査体制に移行した。その結果、FluV 陽性 13 検体中 2 検体で HPIV3 型あるいは HBoV が、それぞれ同時に検出された。

本研究では PCR によるウイルス検索を主に実施したことから、検出法による検出期間、感染時期とウイルス排泄期間、感染性ウイルス、等、主因の判定にはさらに詳細な検討が必要である。

HRV はこれまでの報告から、近年 species A および C が主な流行株であることが知られている^{2), 3)}。今回、本県においても同様の傾向であることが確認された。species A および C に分類された検出株をさらに type 分類したところ、それぞれ多くの type に分類され、本県においては遺伝学的に多様な type の HRV が流行していたことが推察された。

Fry ら⁴⁾は、臨床上無症状の人からの HRV 検出を報告している。我われも呼吸器疾患を主訴としない疾患から HRV を検出した。しかし ARI 患者からの検出率は非 ARI 患者からの検出率に比べ高かったこと、ウイルス起因と考えられる喘鳴、喘息など、から HRV の呼吸器疾患への関与は大きいと思われる。

E. 結論

熊本県において、HRV や RSV 等多種の ARI ウイルスの感染実態を初めて明らかにした。

HRV 県内流行株は主に species A および C で、それらは遺伝学上、多様な type に分類された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 参考文献

1) Simmonds P. et al.(2010): Proposals for the classification of human rhinovirus species C into genotypically assigned types. *J. Gen. Virol.*, 91:

2409-2419

2) Arakawa M. et al. (2011): Molecular epidemi-

ological study of human rhinovirus species ABCs from patients with acute respiratory illnesses in Japan. *J. Med. Microbiol.*, in press.

3) Kaida A. et al. (2011): Molecular epidemiology of human rhinovirus C in patients with acute respiratory tract infections in osaka city, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 64:488-492

4) Fry A. M. et al. (2011): Human rhinovirus infections in rural Thailand: epidemiological evidence for rhinovirus as both pathogen and bystander. *PLoS One*, 6 (3):e17780

表 1. 2009 年 4 月～2011 年 12 月のウイルス検出状況

年 月	2009			2010				2011				合計
	4～6	7～9	10～12	1～3	4～6	7～9	10～12	1～3	4～6	7～9	10～12	
HRV	3	2	5	4		1	3	8	6	2	4	38
RSV			4	7			2	5		2	6	26
PIV1			3		2							5
PIV2			1	1								2
PIV3		1							3			4
PIV4											1	1
HMPV	1	3						2	1			7
HCoV OC43	1						1					2
HCoV NL63								1				1
HBoV	1							1	1			3
EV	1	1	2			1				2	15	22
AdV	2									1		3
合計	9	7	15	12	2	2	6	17	11	7	26	114

表 2. 混合感染検体数

	検体数
HRV+RSV	3
HRV+PIV1	1
HRV+PIV2	1
HRV+PIV3	2
HRV+HMPV	1
HRV+EV	1
HRV+RSV+HCoVOC43	1
HMPV+HBoV+HCoVNL63	1
RSV+EV	2
EV+AdV	1
HBoV+FluV*	1
PIV3+FluV*	1
合計	16

* 2011 年 4 月以降の検査によるもの

表 3. インフルエンザ疑い患者検体 (FluV 陰性) からのウイルス検出状況

	検出数	検出率 (%)
HRV	15	12.3
RSV	12	9.8
PIV	5	4.1
HCoV	2	1.6
HMPV	5	4.1
HBoV	1	0.8
EV	5	4.1
AdV	1	0.8

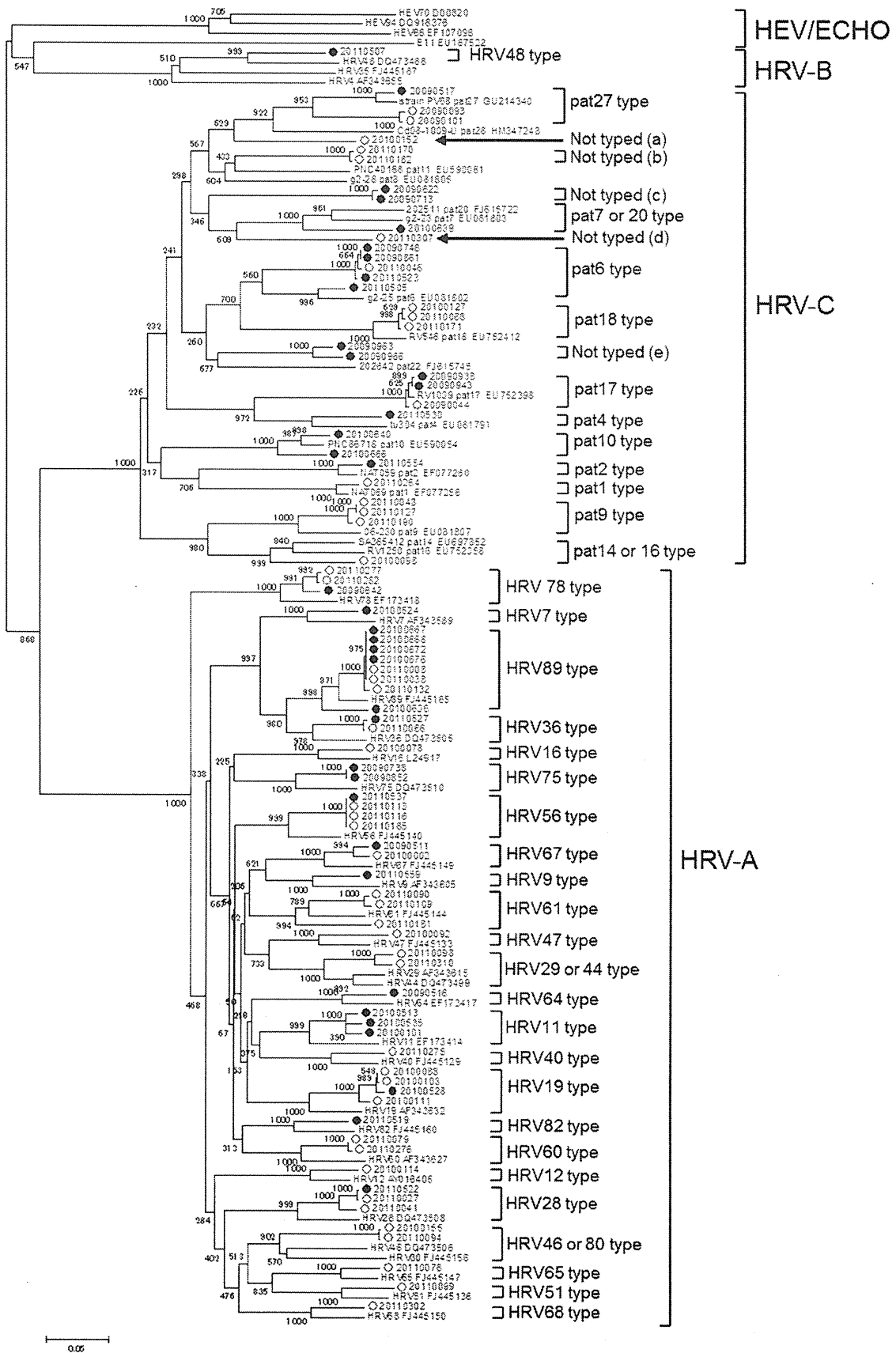


図 1. HRV VP4/2 領域遺伝子分子系統樹 (390nt)

(丸印は熊本県検出株。● : ARI 検体、○ : 呼吸器症状を主症状としない検体)

栃木県におけるヒトライノウイルスおよび Respiratory Syncytial ウイルスの分子疫学

研究協力者 大貫 泉美 栃木県保健環境センター
齋藤明日美 栃木県保健環境センター(現)栃木県保健福祉部生活衛生課
荒川 美果 栃木県保健環境センター(現)栃木県県北健康福祉センター
船渡川圭次 栃木県保健環境センター
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

栃木県における呼吸器ウイルス感染症の実態を把握するため、2008年から2011年の間に栃木県内で検出されたヒトライノウイルス(HRV) 106株および Respiratory syncytial ウイルス(RSV) 68株について疫学および分子系統樹解析を実施した。その結果、HRVはHRV spicis A; 62株、spicis B; 3株および spicis C; 41株に分類され、遺伝子学的に多様な株であった。RSVは subgroup A; 48株、subgroup B; 20株に分類され、subgroup Aはすべて genotype GA2、subgroup Bは1株を除きすべて genotype BAに分類された。

A. 研究目的

栃木県においては、2008年からヒトライノウイルス(HRV)、Respiratory syncytial ウイルス(RSV)、ヒトパラインフルエンザウイルス、ヒトメタニューモウイルスおよびヒトボカウイルス等の呼吸器ウイルスを対象にした病原体サーベイランスを実施している。

本研究ではこれまでに検出されたHRVおよびRSVについて、分子疫学解析を実施した。

B. 研究方法

2008年4月から2011年11月までに、県内の病原体定点医療機関を受診した患者から採取された咽頭ぬぐい液および鼻汁等、1,542検体を用いた。このうち呼吸器症状を呈した患者由来検体は1,085検体であった。RNA抽出後、HRVはVP4/VP2領域遺伝子(石古博昭ら:臨床とウイルス 27:283-293, 1999)、RSVはG遺伝子

(Sullender et al.: J Clin Microbiol. 31:1224-1231, 1993、Parveen S et al.: J Clin Microbiol 44: 3055-3064, 2006)をRT-PCR法によりそれぞれ増幅し、得られた増幅産物について塩基配列解析および

分子系統解析(Fujistuka et al.: BMC Infection. Diseases.11:168:1471-2334,2011)を行った。

C. 研究結果

(1) HRVの疫学および分子系統解析

RT-PCR法により106株のHRVが検出された。季節別発生状況はHRV spicis A (-A)およびHRV-Cは特に春から秋にかけて多く検出された。HRV-Bは検出数3株と少なく、季節性は確認できなかった(図1)。

症状別検出状況は、上気道炎および下気道炎患者からそれぞれ42株(39.6%)および43株(40.6%)検出された。その他、胃腸炎症状から2株、脳炎・脳症から3株検出された(図2)。

検出された106株のVP4/VP2領域系統樹解析の結果、HRV-A; 62株(58.5%)、HRV-B; 3株(2.8%)およびHRV-C; 41株(38.7%)に分類された。さらにHRV-Aは、大きく13のクラスターに分類された(図3)。

各speciesにおける相同性およびpairwise distanceの結果を表1に示した。塩基配列レベルでの各speciesにおける相同性は、HRV-Aで65.1

～100%、HRV-B で 73.6～89.3%および HRV-C で 55.5～100%であった。

今回検出された HRV-A のうち、脳症を呈した患者から検出された 3 株は、すべてクラスター1に分類された。また、下気道炎を呈した患者から検出された 43 株は、クラスター1～7および9～11の10のクラスターに分類されていた。

(2) RSV の疫学および分子系統解析

RT-PCR法により 68 株の RSV が検出された。分離株は、RSV subgroup A(-A)が 48 株(70.6%)、RSV-B が 20 株(29.4%)であった。

症状別検出状況は、上気道炎および下気道炎患者からそれぞれ 5 株(7.4%)及び 50 株(73.5%)検出された。また、インフルエンザ疑い患者症例の髄液から RSV-A が 1 株検出された(図 2)。

G 遺伝子領域系統樹解析の結果、subgroup A の 48 株はすべて genotype GA2 に分類された。subgroup B の 20 株は 19 株が genotype BA、1 株が他と異なる genotype に分類された(図 4 および 5)。塩基配列レベルでの相同性は、subgroup A では 82.0～100%、subgroup B では 75.5～100%であった(表 1)。

genotype BA に分類された 19 株のうち 1 株は BA に分類された他の 18 株と異なる配列を示し、18 株との相同性は塩基配列レベル、アミノ酸配列レベルでそれぞれ 92.3～98.5%および 84.2～90.8%だった。いっぽう、参照株 [BA4128_99 B/BA] との相同性は、99.0%および 97.5%と分離株との比較より高い相同性を示した。

genotype BA と異なる遺伝子型に分類された 1 株は、参照株 [CH93_9b/GB2] と塩基配列レベルで 97.9%の相同性を示した。

D. 考察

HRV は栃木県において春から秋にかけて上・下気道炎患者から多く検出された。また、稀に胃腸炎患者便(2 株; 2010 年)、脳炎患者咽頭ぬぐい液(1 株; 2010 年、2 株; 2011 年)から検出された。しかし、これらの患者個票に呼吸器症状の記載はなく、胃腸炎症状および脳炎症状が HRV に起因するものか否かは不明である。呼吸器症状を示さない患者由来検体から検出される HRV に関する報告は乏しく、今後の精査検討を要する。

栃木県内で検出された HRV は、HRV-A が 58.5%と最も多く、次いで HRV-C が 38.7%で、HRV-B は僅か 2.8%であった。また、HRV 分子

系統樹解析の結果、検出株は遺伝子学的に多様であり、とくに HRV-A は大きく 13 のクラスターに分類された。脳炎症状を呈した患者から検出された 3 株はすべて HRV-A のクラスター1に分類された。しかし、症例が少なく、また同時にアデノウイルス 2 型が検出された症例が 1 例と、HRV の脳炎への関与の判断は困難であった。脳炎症状と HRV の関連についてはさらなる症例の蓄積が必要である。

RSV は栃木県において、下気道炎患者から多く検出(73.5%)された。

RSV は HRV との重感染により重症化することが知られているが、今回の検討では 3 件で RSV と HRV 両ウイルスが同時に検出された。しかし、ウイルス分離、その他の検査診断を実施しておらず重複感染、重症化の確証は得られていない。また、RSV とパラインフルエンザウイルス 1 型が 2 件、HRV とパラインフルエンザウイルス 1 型が 1 件、RSV とボカウイルスが 1 件と、複数の呼吸器ウイルスが同時に検出された。いっぽう、各ウイルスの排泄検出期間等の知見に乏しく詳細は不明である。

また、検出された 68 株のうち、RSV-A が 70.6%(48 株)と多数を占めた。RSV-B のうち、参照株 [BA4128_99B/BA] と高い相同性を示した 1 株は、RSV 検出数の少ない 7 月に検出された。現在、RSV の国内の主要な流行 genotype は GA2 と BA であるが、今回検出された RSV-B のうち 1 株は、genotype GB2 と近縁の株であった。国内における GB2 の報告は少ないが、BA に分類された検体と臨床症状および疫学的に特に差異は認められなかった。今後も GA2 と BA に属する株が主に流行すると思われるが、RSV-B では、BA 株が少しずつ進化を続けながら流行(七種美和子ら:小児科 52:1453-1462、2011)しており、また、他の genotype の出現も考えられるため、その動向に注目している。

E. 結論

栃木県における 4 年間の検出 HRV および RSV についての分子疫学を実施した結果、県内で主流の HRV は HRV-A および HRV-C で、これらのウイルスは遺伝子学的に多様であった。RSV は、genotype GA2 および BA が主流であった。

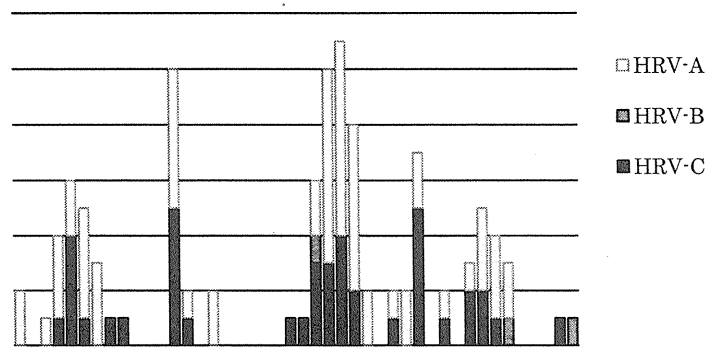


図1 HRV 季節別発生状況

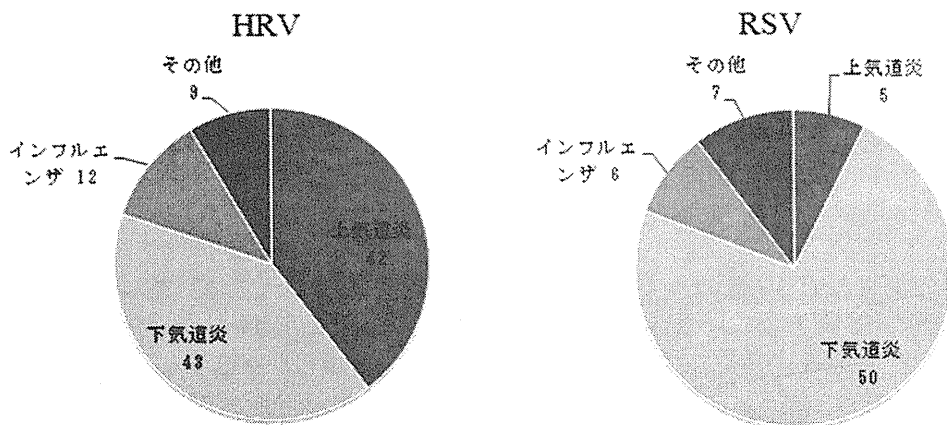
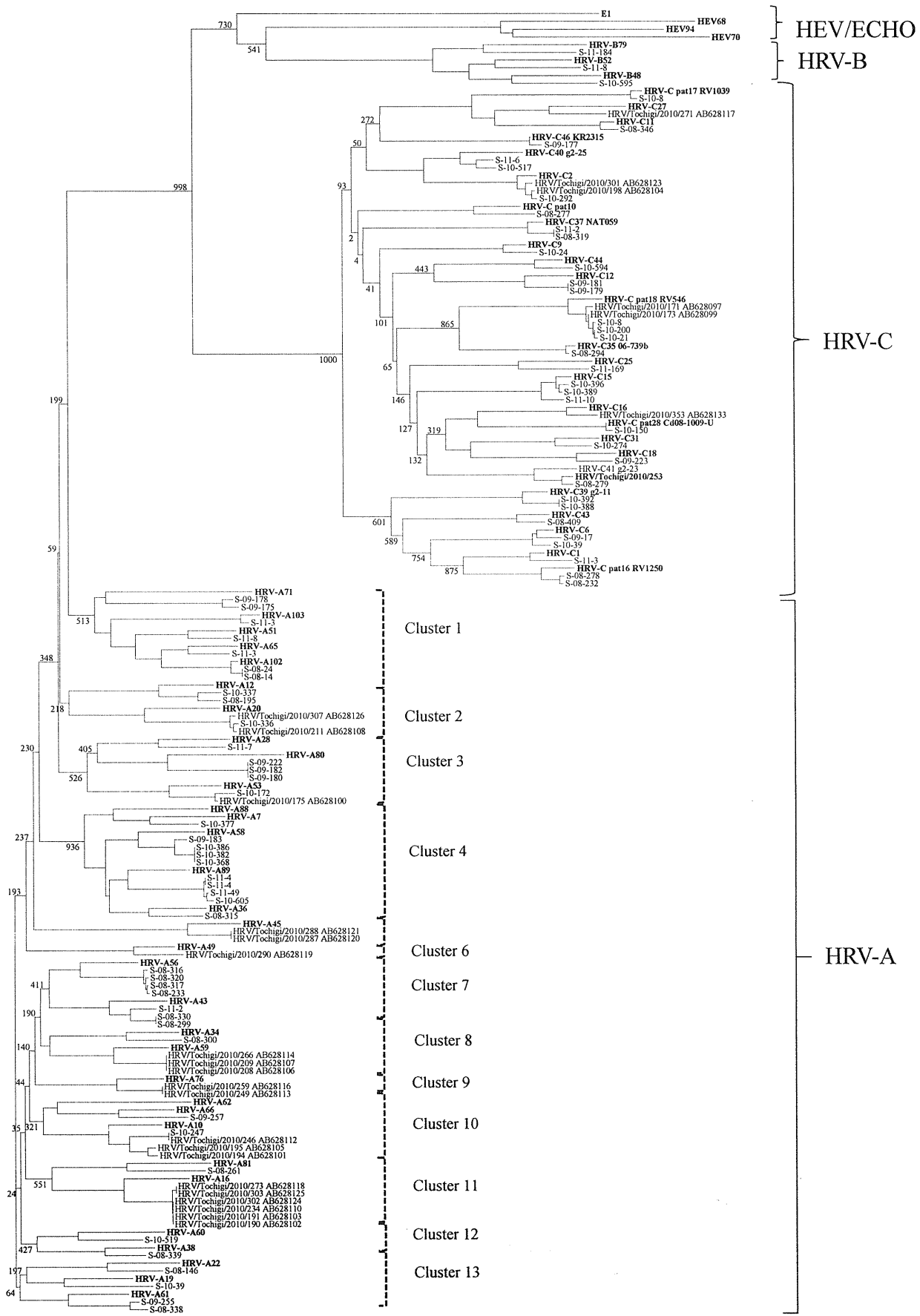


図2 症状別発生状況

表 1 Pairwise distance and identity of RSV and HRV strains

Virus	Identity (%)		Pairwise distance (mean±SD)	
	nucleotide sequences	amino acid sequences	nucleotide sequences	amino acid sequences
HRV-A	65.1 - 100	83.1 - 100	0.242 ± 0.047	0.080 ± 0.035
HRV-B	73.6 - 89.3	90.5 - 99.2	0.201 ± 0.046	0.047 ± 0.024
HRV-C	55.5 - 100	74.5 - 100	0.309 ± 0.069	0.136 ± 0.048
RSV-A	82.0 - 100	70.5 - 100	0.049 ± 0.048	0.090 ± 0.077
RSV-B	75.5 - 100	67.1 - 100	0.091 ± 0.048	0.140 ± 0.072



☒ 3 Phylogenetic tree of HRV based on VP4/VP2 coding region(390nt)

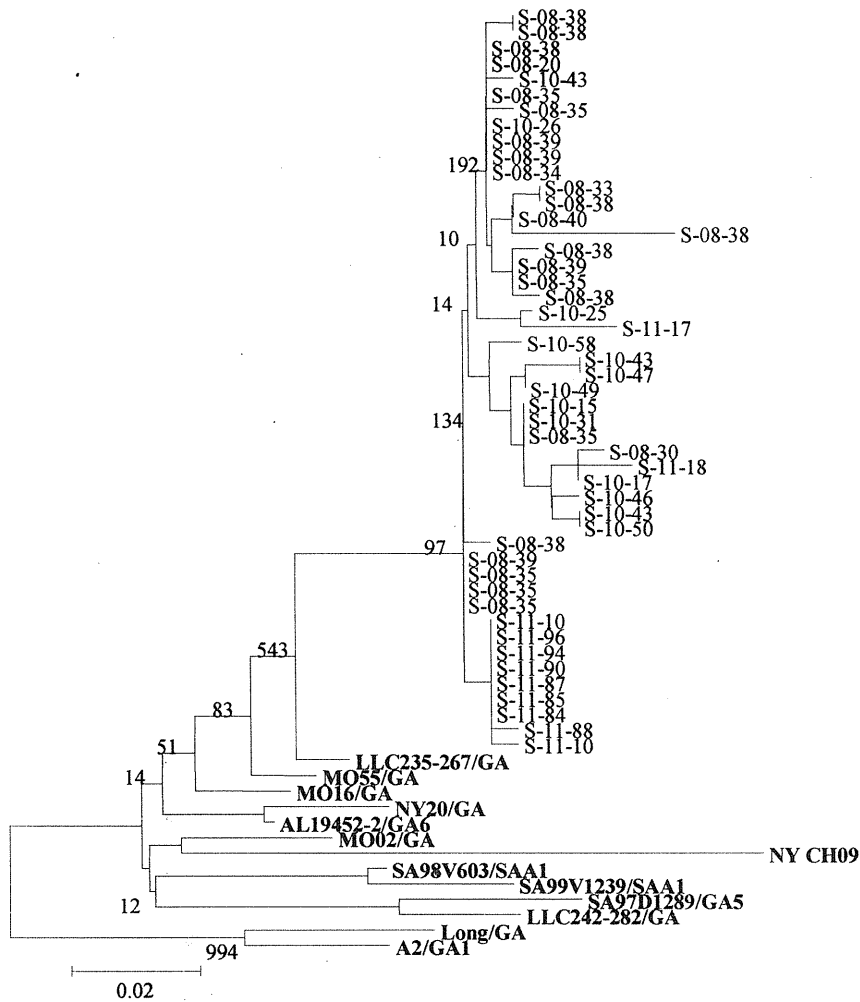


图 4 Phylogenetic tree of RSV-A based on G gene (240nt)

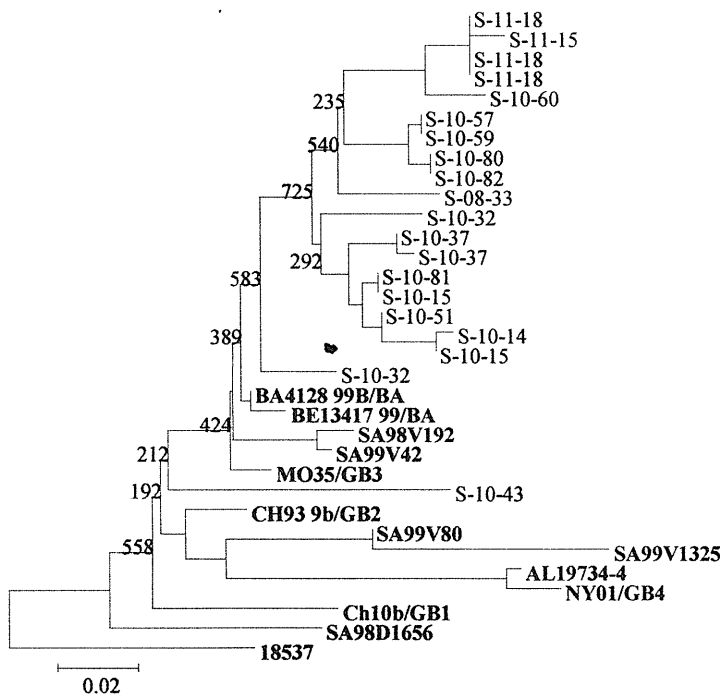


图 5 Phylogenetic tree of RSV-B based on G gene (294nt)

2011年に青森県で検出されたおよびRSVのG遺伝子
HRVのVP4/VP2遺伝子の分子疫学

研究協力者 筒井 理華 青森県環境保健センター
吉田 綾子 青森県環境保健センター
井上 治 青森県環境保健センター
三上 稔之 青森県環境保健センター
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

青森県における呼吸器ウイルス動向を把握するため、2011年4月から9月の間、医療機関を受診した呼吸器疾患児由来検体から、呼吸器ウイルスの検出を試みた。その結果、ライノウイルス（HRV）、RSウイルス（RSV）、ヒトメタニューモウイルス等が検出された。一部のRSVおよびHRV検出株について分子疫学解析を試み、RSV subgroup A(-A)はgenotype GA2およびRSV-BはBAに、HRVは主としてHRV spicisA(-A)およびHRV-Cにそれぞれ分類され、とくにHRVでは遺伝学的に多様な株が流行していた可能性が示唆された。

A. 研究目的

呼吸器ウイルス感染症は小児の重要な疾患で、乳幼児ではしばしば下気道炎や肺炎などを発症し重症化すること、喘息発作の悪化に関与することが知られている。

本研究では青森県内の急性呼吸器感染症（ARIs）の感染動向を明らかにするため、RSV、HRV、ヒトメタニューモウイルス（HMPV）、ヒトパラインフルエンザウイルス（HPIV）、ヒトボカウイルス（HBoV）およびアデノウイルス（AdV）の検出を試みた。特に、RSVおよびHRV検出株の一部について、分子疫学的解析を実施した。

B. 研究方法

2011年4月から9月の間、呼吸器症状を呈し病原体定点医療機関を外来受診あるいは入院患児から採取された鼻／咽頭ぬぐい液および鼻汁を用いウイルス検索を行った。

RNA抽出後、RSVはG遺伝子（Parveen et al.: J Clin Microbiol.44:3055-3064, 2006）、HRVはVP4/VP2領域遺伝子、HMPVはF遺伝子、HPIVはHN遺伝子、HBoVはNP1遺伝子およびAdVはhexon遺伝子をそれぞれ（RT-）PCR法により増幅し、増幅産物について、ダイレクトシーケンシングにより塩基配列解析を行った。RSVの

G遺伝子、およびHRVのVP4/VP2領域遺伝子について系統樹解析を行った。

C. 研究結果

ウイルス検索の結果、RSV44株（44/256、17.2%）、HMPV12株（12/256、4.7%）、HPIV7株（7/256、2.7%）、HRV52株（52/265、19.6%）、HBoV15株（15/265、5.7%）およびAdV14株（14/263、5.3%）がそれぞれ検出された（表1）。

上・下気道炎別のウイルス検出割合を図1および図2に示した。上気道炎患者群は、HRVが46%、AdVが34%、RSVが8%、HMPVが6%およびHPIVとHBoVがそれぞれ3%を示した。下気道炎患者群は、RSVが38%、HRVが33%、HBoVが13%、HMPVが9%、HPIVが5%およびAdVが2%を示した。

下気道炎患者群で検出割合が高い傾向を示したRSVとHRVについて、系統樹解析を実施した。

RSVが検出された44検体は、患者年齢が0～3歳（1.0（±0.86）歳（mean±SD））で、男女比は23/21であった。

検出RSV44株はRSV-Aが4株およびRSV-Bが40株にそれぞれ分類された。このうち、26株のRSV（RSV-A；3株およびRSV-B；23株）について、分子系統樹解析を実施した。RSV-A

の3株はすべて genotype GA2、RSV-B の23株はすべて BA に分類された (図4)。検出株間の塩基配列相同性は、RSV-A が 97.8~98.9%、RSV-B が 95.8~100%であった。

なお、RSV 陽性の44検体のうち、3検体から複数のウイルスが検出 (HRV1株、HBoV1株およびコクサッキーウイルス A6型1株) された。

HRV が検出された52検体は、患者年齢が0~8歳 (1.4 (±1.70) 歳 (mean±SD))、男女比は29/23であった。

検出 HRV 52株は HRV-A が39株、HRV-B 2株および HRV-C 11株にそれぞれ分類された。このうち、48株の HRV (HRV-A ; 36株、HRV-B ; 1株、HRV-C ; 11株) について、分子系統樹解析を実施した (図5)。検出株間の塩基配列の相同性は HRV-A が 74.4~100%、HRV-C が 67.2~100%であった。

なお、HRV 陽性52検体のうち、6検体から、複数のウイルスが検出 (RSV 1株、HMPV1株、HPIV3型1株、AdV1型1株、AdV2型1株、コクサッキーウイルス A6型1株) された。

D. 考察

今回、限定した短期間の成績ではあるが、この期間に青森県では RSV はサブグループ B が主に流行したと思われた。わが国の RSV は主に genotype GA2 および BA 株が検出されており (Fujitsuka et al. : BMC Infectious Diseases 11,

168.2011)、本県においても同様の成績が得られた。また、解析された26株はサブグループ A および B のいずれも 95%以上の高い相同性を示し、遺伝的に近縁な株が流行していたと思われた。

HRVは、主流がHRV -A、ほかにHRV -Cが流行したと思われた。既報(Arakawa et al. : J Med Microbiol. 60.2012)から本邦では主にHRV-Aが検出されており、本県においても同様の成績が得られた。また、解析された48株はHRV-Aおよび-Cのいずれも遺伝学的に多様であると思われた。今後も継続したARIsウイルスサーベイランスが必要である。

E. 結論

ARIs 患者検体から ARIs ウイルス検索を実施した結果、ウイルス検出率は約 50%を示した。RSV および HRV 検出株の分子疫学解析成績から RSV-A は genotype GA2、RSV-B は BA が主に流行していたこと、また、HRV は HRV -A および HRV-C が主に流行し、それらは遺伝学的に多様な株であった。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし