

福島県で検出されたライノウイルスの分子疫学的解析

北川和寛 富田望 鈴木理恵 柏木佳子 金成篤子 風間秀元
微生物課

要 旨

2014 年 1 月から 2015 年 12 月の 2 年間に感染症発生動向調査より搬入された咽頭拭い液検体からウイルス検索を行った結果、ライノウイルスを多数検出した。

ライノウイルス検出検体の疫学情報等について解析した結果、症状別では下気道炎が最も多く、年齢は乳幼児、季節は秋に多く検出を認めた。

また、遺伝子解析では多数の遺伝子型が認められ、遺伝子型の多様性が示唆された。

キーワード：ライノウイルス，混合感染，遺伝子解析，RS ウイルス

はじめに

ヒトライノウイルス（以下，“HRV”とする。）はピコルナウイルス科ライノウイルス属に分類されるウイルスである。HRV は A, B, C の 3 つの遺伝子群に分類されているが、その塩基配列の違いから 100 以上の血清型の存在が知られている^{1, 2)}。症状は一般的に軽症で、主に普通感冒の原因ウイルスの一つとして知られている。一方、小児の喘鳴や喘息の増悪に関与することも報告されている^{1, 2)}。さらに、遺伝子群の違いによって症状の程度が異なることや上気道のみならず下気道でもウイルスが増殖することが報告³⁾されており、重症化するおそれがあるが、そのウイルスの解析はあまり進んでいない。

当所では感染症発生動向調査事業において網羅的ウイルス遺伝子検索を実施しており、その結果検出された HRV について詳細な解析を実施した結果を報告する。

材 料

感染症法に基づく感染症発生動向調査事業において 2014 年 1 月から 2015 年 12 月の間にウイルス性の感染症（インフルエンザ診断を除く）が疑われた患者から採取された咽頭拭い液（鼻腔・咽頭・鼻汁）948 検体を用いた。

方 法

以下、1, 2 のいずれかの方法を用いウイルス検出を行った。

1 ウイルス分離

検体を培養細胞（RD-A, A549, Vero, LLC-MK2, MDCK）に接種し、ウイルス分離を試みた。中和試験又は、コンベンショナル RT-PCR^{1, 4)}により遺伝子を増幅し、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、GenBank による BLAST 解析又は NJ 法による系統樹解析により同定を行った。

2 臨床検体からの病原体検索

RS ウイルス（以下，“RSV”とする。）、エンテロ（以下，“HEV”とする。）・ライノウイルス、アデノウイルス（以下，“AdV”とする。）、ヒトメタニューモウイルス（以下，“hMPV”とする。）を検出するため、検体から核酸抽出し、リアルタイム RT-PCR 法^{5, 6)}を行った。リアルタイム RT-PCR で陽性となった検体については、コンベンショナル RT-PCR^{1, 4)}により各目的遺伝子の増幅を試み、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、GenBank による BLAST 解析又は NJ 法による系統樹解析により同定を行った。

結果及び考察

1 ウイルス検索結果

咽頭拭い液について、ウイルス分離及び臨

床検体からの病原体検索結果を表 1 に示した。948 検体中 552 検体からウイルスが検出され、検出率は 58.2 %であった。HRV は最も多い 166 検体から検出され全体の 30 %を占めた。陽性検体 552 検体中 81 検体 (14.7 %) は 2 ～ 3 種類のウイルスが同時に感染する混合感染であり、その組み合わせは 22 種類であった。

混合感染が認められた 22 種類の組み合わせのうち 20 種類は、ピコルナウイルス科エンテロウイルス属のウイルスであった。混合感染の 81 検体中最も多く検出されたのは HRV で、64 検体で 11 種類の組み合わせが確認された。最も多い混合感染の組み合わせの種類は HRV/RSV で 21 検体から検出され、混合感染の 25.9 %を占めた。

HRV と RSV の混合感染の組み合わせには、感染を高める何らかの要因がある可能性が考えられた。

2 ライノウイルスの分子疫学的解析

1) 月別ライノウイルス検出状況

HRV は 3 つの遺伝子群に分類されることが知られている^{1, 2)}。月別の HRV 検出数と遺伝子群毎の検出数を図 1 に示す。遺伝子群の分類が可能であった 161 検体中 89 検体が A 群で最も多く、次いで C 群が 56 検体、B 群が 16 検体であった。HRV 全体の検出は、2014 年の 1 月及び 4 月以外の通年で認めた。

表 1 病原体検索結果

ウイルス種	検出数	ウイルス種	検出数
HRV	102	Ad	55
HRV/AdV	10	B19	5
HRV/B19	1	CA	113
HRV/CA	16	CA/Ad	2
HRV/CA/HHV	1	CA/HHV	1
HRV/Echo	2	CA/hMPV	1
HRV/HEV NotTyped	1	CB	1
HRV/Flu B	1	Echo	11
HRV/hMPV	8	EV68	4
HRV/PeV	2	EV68/AdV	1
HRV/RSV/CA	1	EV68/HHV	1
HRV/RSV	21	Ev NotTyped	3
HRV以外		FluB	2
RSV/Ad	5	Fu1A	1
RSV/CA	1	HHV1	5
RSV/CB	1	HHV5	4
RSV/Echo	2	hMPV	34
RSV/EV68	1	PeV	12
RSV/HHV	1		
RSV	119	総検出数	552
		総検体数	948

春から流行し、10 月をピークに検出された。冬季である 12 月、1 月には検出が減少していた。冬季はインフルエンザの流行期であり、インフルエンザ以外の呼吸器感染症、特に HRV と混合感染しやすい RSV ウイルス感染症患者報告数が減少する季節であることが HRV 感染者を減少させる一つの要因と推測された。

月別の遺伝子群別の検出状況は、A 群及び C 群ともに秋季をピークに検出を認めた。秋季に主要な遺伝子群である A 群及び C 群が同時期に検出されることが、検出数が増加する要因と示唆された。

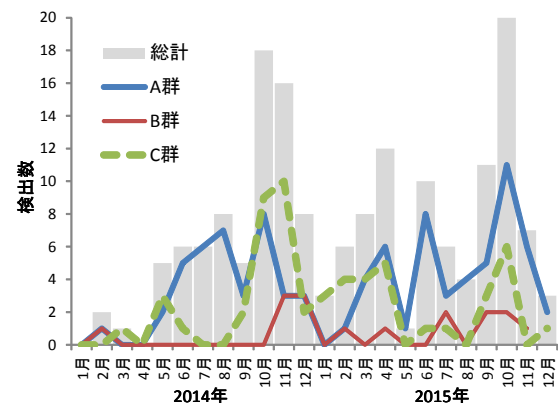


図 1 月別遺伝子群別検出数

2) 診断名別検出状況

診断名別のウイルス検出数を表 2 に示す。普通感冒の原因ウイルスとして知られ、一般的に軽症とされる HRV であるが、166 検体中 32 検体が上気道炎診断の患者から、91 検体が下気道炎検体からの検出であり、上気道炎よりも症状が重い下気道炎由来からの検出が多く認められた。

HRV 感染症は、混合感染による重症化（下気道炎症状）や下気道炎の原因ウイルスとされている RSV 等を含まない HRV 単独感染においても上気道炎 22 検体に比べ、下気道炎が 59 検体と下気道炎由来の検体から多く検出された。また、無菌性髄膜炎や脳炎・脳症、心筋症等の症状が重い診断名の検体からも検出を認めた。

診断名別に HRV の遺伝子群について解析した結果（表 3）、遺伝子群と診断名毎の割

表2 診断名別ライノウイルス検出状況（ウイルス種，遺伝子群，年齢）

		上 気 道 炎	下 気 道 炎	無 菌 性 髄 膜 炎	脳 炎、 脳 症	心 筋 症	手 足 口 病	ヘル パン ギー ナ	発 疹 症	結 膜 炎 等	感 染 性 胃 腸 炎	そ の 他	総 計
検 出 ウ イ ル ス	HRV	22	59	1	1	1	5		3		4	6	102
	HRV/AdV	3	4							1		2	10
	HRV/B19											1	1
	HRV/CA	3	1		1		4	3	4				16
	HRV/CA/HHV								1				1
	HRV/Echo	1										1	2
	HRV/HEV NotTyped	1											1
	HRV/Flu B											1	1
	HRV/hMPV	2	5		1								8
	HRV/PeV								1			1	2
	HRV/RSV/CA		1										1
	HRV/RSV		21										21
遺 伝 子 群	A	16	43		2		7	1	6	1	3	10	89
	B	5	9						2				16
	C	11	37	1	1	1	1		1		1	2	56
	NotTyped		2				1	2					5
年 齢	0歳	10	35	1		1		1	4		2	5	59
	1歳	11	38		3		5	1	3	1		2	64
	2歳	2	11				2					1	16
	3歳	3	2						1		1	1	8
	4歳		1					1				1	3
	5歳以上	6	4				2		1		1	2	16
	総計	32	91	1	3	1	9	3	9	1	4	12	166

合に大きな差は認められなかった。

また、年齢別に比較した結果（表 3）、166 検体中 59 検体が 0 歳、64 検体が 1 歳で乳幼児が大部分を占める結果となった。上気道炎、下気道炎及び発疹関連等多くの診断名からの検体の検出が多いことから HRV は乳幼児に感染しやすい可能性が示唆された。さらに、主に乳幼児が多く感染する下気道炎症状の RSV 疑い症例との混合感染が数多く含まれており、低年齢層からの検出が多い要因と考えられた。

3) ライノウイルスの遺伝子群別検出割合

混合感染を引き起こしやすい遺伝子群の有無を調べるため HRV が単独感染した検体と HRV とその他のウイルスが混合感染した検体について HRV の遺伝子群毎の検出数を表 3 に示した。

各遺伝子群の中に含まれる混合感染の割合は、A 群が 89 検体中 35 検体で約 39 %、B 群が 16 検体中 9 検体で約 56 %、C 群が 56 検体中 15 検体で約 27 %であった。検出数は少ないが、B 群の混合感染の割合が高かった。

HRV との混合感染の組み合わせの中で最

も多い RSV についてウイルス性状を確認するため遺伝子群を解析した結果を表 3 に示す。

RSV は乳幼児急性呼吸器感染症の主要な原因ウイルスの一つであり、抗原性の違いから A 型と B 型 2 つの遺伝子群に分類される⁷⁾。HRV と RSV が混合感染していた RSV は、22 検体中 A 型及び B 型共に 11 検体であり、割合に差は認められなかった。このことから、HRV と RSV は混合感染を非常に起こしやすいウイルスであるが、その要因が HRV と RSV とともに特定の遺伝子群によるものではないものと考えられた。

4) ライノウイルスの遺伝子型別検出状況

既報の基準株^{8, 9)}を用いた系統樹解析による遺伝子群よりさらに詳細な遺伝子型の分類を行い、月別に集計した結果を表 4 に示す。

2014 年、2015 年の 2 年間で A 群 32 種 76 検体、B 群 7 種 13 検体、C 群 12 種 43 検体、既知の遺伝子型に分類できない型 34 検体に分類された。型別ができた 51 種 132 検体の型別検出数の中央値は 2 であり、流行や混合感染を起こしやすい特定の遺伝型は認められ

表3 遺伝子群別HRV及びRSV検出数

ウイルス種	HRV				RSV		総計
	A	B	C	NotTyped	A	B	
HRV	54	7	41				102
HRV/AdV	8		2				10
HRV/B19	1						1
HRV/CA	8		5	3			16
HRV/CA/HHV		1					1
HRV/Echo	1	1					2
HRV/HEV NotTyped			1				1
HRV/Flu B	1						1
HRV/hMPV	6	2					8
HRV/PeV	2						2
HRV/RSV/CA			1			1	1
HRV/RSV	8	4	7	2	11	10	21
RSV/Ad					3	2	5
RSV/CA					1		1
RSV/CB					1		1
RSV/Echo					1	1	2
RSV/EV68					1		1
RSV/HHV					1		1
RSV					67	52	119
検出数	89	16	56	5	86	66	552

ず非常に多様なウイルスタイプが地域に蔓延している可能性が示唆された。

系統樹解析結果より多様な遺伝子型が検出された検体の中でも、同一検体採取地域の同一遺伝子型検体の検体間において塩基配列が異なっていることから、遺伝子型だけでなく遺伝子型の中の subtype 間でも多様性が認められた。

HRV は、ウイルス分離の困難な遺伝子群の存在や多様な血清型等のためワクチンが開発されていない。喘鳴、喘息患者での増悪との関係性や混合感染が多い RSV 感染症、本研究以外のその他の呼吸器ウイルスとの関係性（混合感染等）についても研究が進んでいない。さらに、下気道炎や中枢神経症状等の重症例からのウイルス検出も認められていることから、今後も発生動向を注視し解析を進めていきたい。

謝 辞

本調査を行うにあたり、検体の採取にご協力いただきました県民の皆様、定点医療機関の諸先生方に深く感謝いたします。

引用文献

- 1) 国立感染症研究所 ライノウイルス検査マニュアル
<http://www0.niid.go.jp/niid/reference/Rhinovirus-manual.pdf> 2016/2/4
- 2) 岡山吉道，木村博一，羅智靖．4．ライノウ

イルス．田代真人，牛島廣治．ウイルス感染症の検査・スタンダード，2011；44-47.

3) Bizzintino J, Lee WM, Laing IA, et al. Association between human rhinovirus C and severity of acute asthma in children. Eur Respir, 2011；37：1037-1042.

4) 石古博昭，他．臨床とウイルス．1999；27：283-293.

5) Curi Kim. Jamal A. Ahmed. Rachel B. Eidex ., et al. : PLoS ONE. Comparison of Nasopharyngeal and Oropharyngeal Swabs for the Diagnosis of Eight Respiratory Viruses by Real-Time Reverse Transcription-PCR Assays, 2011, 6：1-6.

6) Caroline Tapparel, Samuel Cordey, Sandra Van Belle ., et al. : New Molecular Detection Tools Adapted to Emerging Rhinoviruses and Enteroviruses, J. Clin. Microbiol. 2009；47：1742-1749.

7) Teresa C.T.Peret, Caroline B. Hall ., et al. Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community, Journal of General Virology, 1998；79：2221-2229.

8) Yury A, A C Palmenberg, Wai-Ming Lee et al. : Molecular modeling, organ culture and reverse genetics for a newly identified human rhinovirus C. Nature Medicine, 2011；17：627- 632.

9) A C Palmenberg, David S, Ryan K. et al. , : Sequencing and Analyses of All Known Human Rhinovirus Genomes Reveal Structure and Evolution, 2009；324：55-59.

表4 遺伝子型別HRV検出数（月別）

Subtype	2014												2015												総計
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A1																						1		1	2
A7												1													1
A10																				1		1			2
A11																						1	1		2
A12						1	1				1	1											1		5
A15							1																		1
A16								1							1					1					3
A20							1	1																	2
A24																		1			1				2
A28																						3			3
A34							1																1		2
A36								1																	1
A38						2		1																	3
A40								1												1	1	1	1	1	6
A56										1		1									1	1	1	1	2
A57																1									1
A58									1	2	2														5
A61								1																	1
A62																				1					1
A65																3									3
A66										2															2
A67																		1	1						2
A68																						2			2
A73																1									1
A77																							1		1
A78		1				2										1		2		1					7
A80																					1				1
A82								1		1															2
A85																			1						1
A88										1							1	1							3
A89							2															1			3
A98								1		1				1											3
A Species					2				1												2	1			6
B6												2													2
B37											1														1
B42																							1		1
B69												1				1					1	2			5
B70														1											1
B83											2														2
B84		1																							1
B Species																			1		1				2
C1														1											1
C2													1			2									3
C3																						1			1
C4										1			1								1	2			5
C5					1	1																			2
C6					1																				1
C7											1	1							1		1	1			5
C8					1					4	3	1						1			1			1	12
C9								1	1																2
C10														2											2
C11										1	3														4
C15								1	1							1	1					1			5
C Species			1							1	3			1	3	2									11
NotTyped								1		1		1			3			3	1		1	2	2		15
総計	0	2	1	0	5	6	6	8	5	18	16	8	3	6	8	12	1	10	6	4	11	20	7	3	166