

呼吸器系感染症における起因ウイルスの検出状況について

長谷川 道 弥*, 吉 田 靖 子*, 田部井 由紀子*, 長 島 真 美*
森 功 次, 平 田 一 郎*, 諸 角 聖**

Detection situation of the cause virus in the respiratory infection

Michiya HASEGWAWA*, Yasuko YOSHIDA*, Yukiko Tabei*, Mami NAGASHIMA*
Kohji MORI*, Ichiro HIRATA* and Satoshi MOROZUMI**

Keywords: 呼吸器感染症 Respiratory infectious disease, インフルエンザウイルス Influenza virus, RSウイルス Respiratory syncytial virus, アデノウイルス Adeno virus, ウイルス分離 Virus Isolation, RT-PCR Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

緒 言

インフルエンザは毎年冬期に流行する呼吸器系感染症の中でも症状の重篤さ、伝染力の強さなどの点からもっとも注意すべき疾患である。特に最近では高齢者や乳幼児におけるインフルエンザ対策の重要性が見直されている¹⁾。しかし、呼吸器系感染症の起因ウイルスとしてはインフルエンザウイルスの他にもRSウイルス、アデノウイルス、コロナウイルス等様々な種類があり、臨床症状だけで起因ウイルスの種類を特定することは困難である²⁾。また、当所におけるウイルス検査でも、これまではインフルエンザウイルスやアデノウイルスが主体でその他の起因ウイルスの検査は十分に行われておらず、インフルエンザをはじめとする呼吸器系感染症の起因ウイルスの実態は不明な点が多い。

そこで、我々は各種ウイルスの検査を導入して呼吸器系感染症起因ウイルスの解明を試みた。特に今回は、乳幼児において重症化することが多く³⁾、保育所や病院等の施設内感染も懸念される⁴⁾RSウイルスの遺伝子検査法について検討したので、起因ウイルスの検出状況と併せてその結果も報告する。

材料と方法

1) 検査材料

検査材料は2000年11月から2001年5月までの間に感染症発生動向調査で、上気道炎(咽頭炎、扁桃炎等)や下気道炎(仮性ク룹、肺炎、細気管支炎等)などの呼吸器系の症状やインフルエンザ様症状がみられた患者由来の咽頭拭い液および鼻腔拭い液の合計300検体である。

2) RT-PCR を用いたRSウイルス遺伝子検出法の検討

RSウイルスの標準株(A型: HT1303株, B型: HT1301株)および当研究所の分離株(B型: a,b,c株)を用いて

RT-PCR法によるRSウイルス検出法を検討した。ウイルス株からの遺伝子抽出は既報⁵⁾に従った。ウイルス液500 μLに8% NaCl加24%polyethyleneglycol(以下PEG)250 μLを加え、4℃で一晩放置した後、これを12,000 rpm, 4℃にて30分遠心分離し、沈査を滅菌蒸留水で再浮遊し、遺伝子学的診断材料とした。RNA抽出は、市販の凝集分配法による核酸抽出剤であるセパジーンRVR(三光純薬)を用いた。

RSウイルス遺伝子検出用のRT-PCR法については、Patonら⁷⁾のSingleRT-PCR法による遺伝子検出報告を基に、検出感度をさらに高めるためにFusion protein(F)領域に新たに設定した4個のプライマーによるNestedRT-PCR法を開発した。プライマーの塩基配列およびPCR産物のサイズは表1に示した。

またRSウイルスの型別はStocktonらの方法に準拠した型別RT-PCRによった。使用したプライマー⁸⁾はmajor nucleocapsid(N)領域からPhosphoprotein(P)領域のものである(表2)。これらのプライマーを使用して、増幅条件等の検討を行った。

3) 臨床材料からのウイルス遺伝子検査

臨床材料からの遺伝子検査はRNAウイルスではインフルエンザウイルス, RSウイルス, エンテロウイルスおよび麻疹ウイルスを, DNAウイルスではアデノウイルス, 単純ヘルペスウイルスおよびEBウイルスを対象として行った。インフルエンザウイルスについてはhemagglutinin領域に設定したプライマーを用いたRT-PCR法で行った。同様にRSウイルスについては前述のプライマー, エンテロウイルスは5'Non Code領域のプライマー, 麻疹ウイルスはFusion protein領域のプライマーを使用してRT-PCR法を行った。アデノウイルスについてはHexon領域に設定

* 東京都立衛生研究所微生物部ウイルス研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

** 東京都立衛生研究所微生物部

表1 RSウイルス検出用プライマーおよび増幅産物のサイズ

プライマー	配列 (5' 3')	位置	サイズ(bp)
1st			
RO3	TATAG CTGTA TCCAA AGTTT	6066-6085	512
RO4	ATAGA GGTGA TGTGT GTAAT	6558-6577	
2nd			
RO1	CTTGA AGGAG AAGTG AAC	6091-6108	480
RO2	TGATG TGTGT AATTT CCA	6553-6570	

表2 RSウイルスの型別用プライマーおよび増幅産物のサイズ

プライマー	配列 (5' 3')	位置	サイズ(bp)
1st			
RSVAB F	GTCTT ACAGC CGTGA TTAGG	1628-1647	838
RSVAB R	GGGCT TTCTT TGGTT ACTTC	2446-2465	
2nd			
RSVA F	GATGT TACGG TGGGG AGTCT	1863-1882	334
RSVAR	GTACA CTGTA GTTAA TCACA	2178-2197	
RSVB F	AATGC TAAGA TGGGG AGTTC	1859-1878	188
RSVB R	GAAAT TGAGT TAATG ACAGC	2028-2047	

したプライマー，単純ヘルペスウイルスはGlycoprotein D領域に，EBウイルスにおいてはBNA1領域にそれぞれプライマーを設定してPCR法により遺伝子検査を行った．なお，RT-PCR法およびPCR法は既報の手順に従って実施した^{5,6)}

4) 組織培養法によるウイルス分離試験

咽頭拭い液および鼻腔拭い液はペニシリン・ストレプトマイシン液を最終濃度500 U/mLになるように加えて検査材料とした．

ウイルス分離には，HeLa細胞，HEp-2細胞，RD-18S細胞，MDCK細胞を用いた．上記検査材料をそれぞれの細胞に接種して4代(4週間)継代培養を行い，細胞変性効果(Cytopathogenic effect:以下CPE)を指標にウイルスを確認した．CPEが確認されなかった場合をウイルス分離陰性とし，CPEが確認できた場合には市販の抗血清を用いた型別同定中和試験あるいは血球凝集抑制試験により，それぞれ分離ウイルスの血清型別を行った．

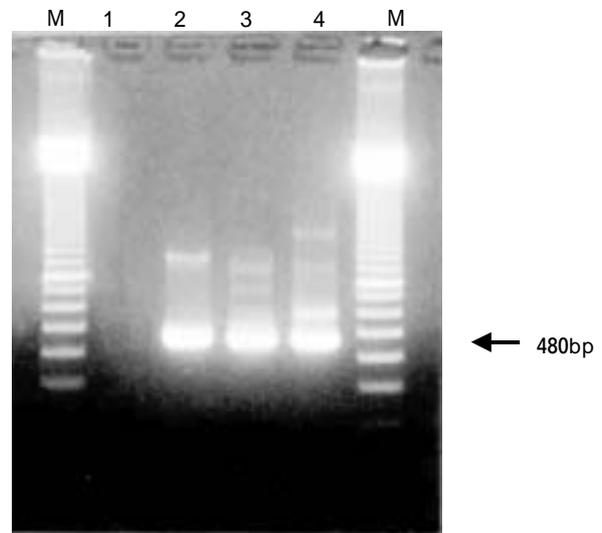
結 果

1) RSウイルス株を用いたRT-PCR法の検討

RSウイルス株から凝集分配法によって抽出したRNAについてRT-PCR法を行った．RNAはプライマーR03を用いて逆転写しcDNAにした後プライマーR04添加して1st-PCRを行った．増幅条件は，94℃，47℃，72℃各1分30秒，35サイクルとした．次に1st-PCR産物3μLに，プライマーRO1，RO2を添加し2nd-PCRを行った．増幅条件は1st-PCRと同様とした．増幅産物は，0.01%エチジウムブロマイドを加えた2%アガロースゲルで電気泳動した．その結

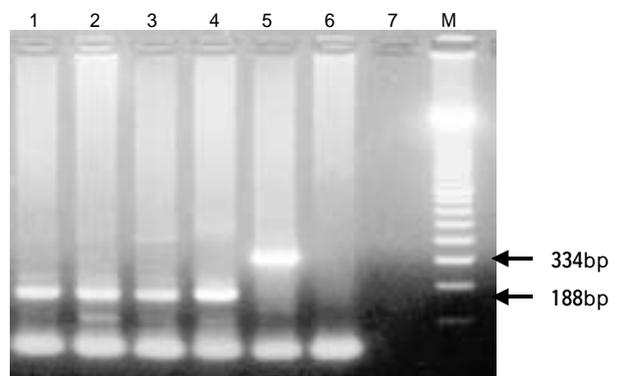
果，分離株00-1398，0-1411，および標準株HT1301株すべて480 bpの位置に特異的バンドを検出した．(図1)

RSウイルス型別PCR法の検討結果を図2に示した．RSウイルスから抽出したRNAは，major nucleocapsidからPhospho protein領域のプライマーRSVABF，RSVABRを用いてRTおよび1st-PCRを行った．RTは41℃60分，1st-PCRの増幅条件は，94℃，50℃，72℃で各35サイクルとした．次に，1st-PCR産物2μLに，プライマーRSAF，RSAR，RSBF，RSBRを添加後，94℃，60℃，72℃で各35サイクルの2nd-PCRを行った．その結果，タイプAの標準株HT1303株は334 bp，タイプBの標準株HT1301株および分離株00-1398,00-1411,00-1119いずれも188 bpの特異バンドが検出され型別する事が出来た．これらの成績から，今回検討したRSウイルスのRT-PCR法はRSウイルスの遺伝子検出に有用であることが確認されたので実際の検査に導入して検討した．



1: 陰性コントロール， 4: PC(RSV HT1301株)
2: 分離株 00-1398 M: 分子量マーカー
3: 分離株 00-1141

図1 RT-PCR法によるRSウイルスの検出



1: 分離株00-1398 Type:B 6: 陰性コントロール
2: 分離株00-1411 Type:B 7: ブランク
3: 分離株00-1119 Type:B M: 分子量マーカー
4: RSV HT1301株 Type:B 188bp
5: RSV HT1303株 Type:A 334bp

図2 PCR法によるRSウイルスの型別

2) ウイルス遺伝子検査成績

2000年11月から2001年5月に搬入された呼吸器系感染症患者からの検体数は11月から5月までの間、12月46件、3月67件と二峰性のピークを示し、合計300件搬入された。それらの遺伝子検査結果は表3に示したとおりである。

300件のうち158件(52.7%)からいずれかのウイルス遺伝子が検出された。検出された遺伝子はインフルエンザウイルスが71件(23.7%)と最も多く、次いでアデノウイルス58件(19.3%)、RSウイルス27件(9.0%)の順であった。その他に、麻疹ウイルス4件(1.3%)、エンテロウイルス3件(1.0%)、およびムンプス、ヒトヘルペス6型、単純ヘルペス、EBウイルスの遺伝子が各1件(0.3%)であった。

月別にウイルス遺伝子の検出をみると、インフルエンザウイルスは最初に検出されたのが1月で2件と例年に比較して遅い傾向であった。その後2月23件、3月27件と増加し、4月は19件検出されたが、5月には検出されなかった。4ヶ月間で合計71件が検出された。インフルエンザウイルスの型はAH1型が23件(32.3%)、AH3型が12件(16.9%)、B型36件(50.7%)であった。

それに対しアデノウイルスは期間中を通して多少の増減はあるものの、持続的に遺伝子が検出されるのが特徴で、11月4件、12月15件、1月10件と、12月を中心とするピークがあるものの、その後も2月5件、3月10件、4月6件、5月8件と検出は続いた。RSウイルスは27件検出された

が11月に10件、12月に7件、1月に5件と早い時期に多く検出された。麻疹ウイルスは3月以降に計4件、エンテロウイルスは2月と5月にそれぞれ1件、2件の検出があった。

3) 組織培養法によるウイルス分離結果

呼吸器系感染症患者検体(300件)からのウイルス分離成績を表4に示した。

ウイルスが分離されたのは300件中70件(23.3%)であった。

分離されたウイルスの内訳は、インフルエンザウイルスが56株(18.7%)と一番多く、次いでアデノウイルス11株(3.7%)であった。その他コクサッキーB群3型ウイルスと単純ヘルペス1型ウイルスおよびポリオ3型ウイルスが各1株分離されたが、遺伝子検査で27件検出されたRSウイルスは1株も分離されなかった。

分離されたインフルエンザウイルスは、AH1型が14株、AH3型が12株、B型が30株であった。また、分離細胞は、インフルエンザウイルスが分離された細胞はMDCK細胞、アデノウイルスはHEp-2細胞、コクサッキーウイルス、単純ヘルペスウイルスとポリオウイルスはHeLa細胞であった。

検出されたインフルエンザ、アデノ、RSの各ウイルス遺伝子毎に患者の年齢を比較した成績を表5に示した。インフルエンザウイルスが検出された71名のうち、12歳以下の年齢層が占める割合は93.0%で、検出平均年齢は5.4歳であったのに対し、アデノウイルスおよびRSウイルスは全

表3 遺伝子検査による呼吸器系感染症患者からのウイルス検出成績

年 月	検体数	陽性検体数(%) [*]	検出ウイルス					
			インフルエンザ	アデノ	RS	麻疹	エンテロ	その他 ^{**}
2000年11月	19	14 (73.7%)		4	10			
12月	46	22 (47.8%)		15	7			1
2001年1月	25	14 (56.0%)	2	10	5			
2月	48	29 (60.4%)	23	5	1		1	
3月	67	41 (61.2%)	27	10	3	2		1
4月	55	25 (45.5%)	19	6	0	1		1
5月	40	13 (32.5%)	0	8	1	1	2	1
計	300	158 (52.7%)	71	58	27	4	3	4

* : 同一検体から複数のウイルス検出例があるため陽性検体数は検出ウイルス数の合計とは一致しない

** : ムンプスウイルス、ヒトヘルペスウイルス6型、単純ヘルペスウイルスおよびEBウイルスを各1件検出

表4 組織培養による呼吸器系感染症患者からのウイルスの分離成績

年 月	検体数	陽性検体数(%)	検出ウイルス							
			インフルエンザ			アデノ		コクサッキー	単純ヘルペス	ポリオ
			AH1型	AH3型	B型	2型	3型	B3型	1型	3型
2000年11月	19	3 (15.8%)				1	1			1
12月	46	4 (8.7%)					3	1		
2001年1月	25	1 (4.0%)		1						
2月	48	21 (43.8%)	7	5	6	1	2			
3月	67	22 (32.8%)	3	3	16					
4月	55	17 (30.9%)	4	3	8		1		1	
5月	40	2 (5.0%)				2				
計	300	70 (23.3%)	14	12	30	4	7	1	1	1

表5 検出ウイルス毎にみた年齢構成

年齢(歳)	インフルエンザ ウイルス	RSウイルス	アデノウイルス
乳児(0-1)	11	24	17
幼児(2-5)	33	2	24
児童(6-12)	22	1	17
青年(13-19)	4	0	0
成人(20-)	1	0	0
計	71	27	58
平均年齢	5.4	0.7	3.8

て12歳以下の年齢層からの検出であり、検出平均年齢は前者が3.8歳、後者は0.7歳、RSウイルスの感染は、1歳以下の乳児に多いことが判明した。

同様に検出ウイルス遺伝子毎にみた臨床症状を表6に示した。インフルエンザウイルス感染症では、臨床診断名においてインフルエンザを疑うものが全体の70%以上を占めていた。一方、RSウイルスでは、気管支炎、肺炎、下気道炎等の呼吸器炎症と診断された患者が80%、アデノウイルスでは、インフルエンザ、咽頭炎、扁桃炎、肺炎、上気道炎、脳症など様々な臨床診断名であった。

考 察

2000年11月から2001年5月までの呼吸器系感染症患者の検体搬入状況は、12月をピークとする初期の小さな流行と、2月から4月にかけての大きな流行が見られた。今回導入したRT-PCR法による検査の結果を加えて病因ウイルスの推移を調査すると、流行初期に検出されたのは、主にRSウイルスとアデノウイルスであり、インフルエンザウイルス遺伝子検出数は1件にすぎなかった。特に11月に検出されたウイルスの70%がRSウイルスであった。

一方、流行の後期に検出されたウイルスはインフルエンザウイルスが主体であった。これまでインフルエンザウイルスの検出は流行初期にはほとんど検出されず、インフルエンザ検体の搬入と実際のウイルス検出との間に時間的なズレが生じることが多かった。その理由としては、インフ

表6 検出ウイルス毎に見た臨床症状

インフルエンザ ウイルス	RSウイルス	アデノウイルス
インフルエンザ	50	12
上気道炎	9	10
気管支炎	4	10
咽頭炎	4	9
急性脳症	1	5
肺炎	1	5
発熱	1	3
痙攣重積	1	1
計	71	58

ルエンザウイルスの力価が検出に至るまで上昇していない、あるいはウイルス検体に含まれるウイルス量が少ないため検出できない等が考えられていた。しかし、今回行ったRSウイルスの検査結果は、11月から1月の初期の流行は、RSウイルスによることを示しており、これまで陰性として計上されてきた呼吸器系感染症患者からの検体もRSウイルス陽性であった可能性が高いことが示唆された。

今回、Patonらの方法を基にさらに検出感度を上げることを目的として作成したプライマーによるRSウイルス遺伝子検査法は、冬季の呼吸器感染症検体の原因ウイルス検査に非常に有効であることが確認された。さらに、RSウイルスの型別検査が可能となったことで、院内感染や施設内感染の感染源調査等において有益な疫学情報が得られるようになった。

Tsutsumiら¹⁰⁾は日本においてRSウイルスの流行はA型とB型がそれぞれ独立して流行を繰り返していると報告している。2000年冬季から2001年春季に検索されたRSウイルスがすべてB型であったことから、今、シーズンはB型による流行であったことが推察された。

一方、今回RSウイルスが培養細胞から分離されなかったことは、同ウイルスが温度変化に敏感であるため、現在の検体搬入条件では輸送中に不活化されてしまうことが原因と考えられた⁹⁾。今後、輸送条件等を検討する必要がある。

また、一般に臨床症状からはウイルスの鑑別をするのは難しいとされているが、今回の調査で、各ウイルスにはそれぞれ流行時期、罹患年齢、主症状などに特徴がみられた。

今回、呼吸器系感染症の病因検索に、新たにRSウイルスの調査を導入した結果、ウイルス検出率は平均52.7%に上昇し、東京における呼吸器系感染症の原因ウイルスの実態をより明らかにすることができた。今後、更に多種のウイルス検出法を開発、日常検査に導入することが詳細な呼吸器系感染症の実体解明を行う上で重要である。

文 献

- 1) 池松秀之, 鍋島篤子, 角田恭治, 他: 高齢者に対するインフルエンザワクチンの効果: 1995年度流行時における解析: 感染症学雑誌, 1, 60-66, 1998
- 2) 石田正年: 臨床とウイルス, 23増刊号, 209-212, 1995
- 3) 堤 裕幸: 小児感染免疫, 2, 126-128, 2000
- 4) 武内可尚, 山口由美, 渡辺 淳, 他: 臨床とウイルス, 18, 186-191, 1990
- 5) 田部井由紀子: 東京都衛研年報, 49, 17-22, 1998
- 6) 長島真美: 東京都衛研年報, 48, 30-37, 1997
- 7) Paton, A. W., Pton, J, C. Lawrence, A. J., et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 30, 901-904, 1992
- 8) Stockton, J., Ellis, J. S., Saville, M., et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 36, 2990-2995, 1998
- 9) 鈴木 宏: 臨床とウイルス, 23, 増刊号, 220-224, 1995
- 10) Tsutusmi, H., Onuma, M., Kazuhiro, S., et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 26, 1171-1174, 1988