

## 大分県における急性呼吸器感染症からのウイルス検出状況 (2012~2013年)

加藤 聖紀 本田 颯子 田中 幸代\*1 小河 正雄\*2、緒方 喜久代

## Isolation of Viruses from the Acute Respiratory Infections in Oita Prefecture, 2012-2013

Miki Kato, Akiko Honda, Sachiyo Tanaka, Masao Ogawa, Kikuyo Ogata

Key Words : 急性呼吸器感染症 acute respiratory infections, ウイルス virus, マルチプレックスPCR法 MultiplexPCR assays

## 要 旨

2012年1月から2013年12月に感染症発生動向調査事業で採取された検体のうち、急性呼吸器感染症と診断された272検体について、呼吸器系ウイルスの検索を行った。その結果、134検体 (49.3%) から144件のウイルスを検出した。そのうちウイルス分離は28検体 (20.9%) であった。

呼吸器疾患の原因ウイルスの検索には遺伝子検査が有用であり、マルチプレックスPCR法によりスクリーニングすることで迅速かつ特異的にウイルスを検出することが可能である。

## はじめに

急性呼吸器感染症の原因の約80%はウイルスである<sup>1)</sup>。病院や施設等でインフルエンザのみならず急性呼吸器感染症の集団発生が起こった場合、病原体の特定が急がれる。呼吸器系ウイルスの効率的な検査法を導入することで検出率が向上することにより、各関係機関に迅速に検査結果を還元することが可能となり、診療の一助となるとともに感染拡大の防止につながる。また、大分県における急性呼吸器感染症の原因ウイルスの動向を把握することにより、流行の早期探知が可能となり、対策を講じるの一助となる。

## 材料及び方法

大分県内の医療機関より感染症発生動向調査事業として2012年及び2013年に採取された929検体のうち、急性呼吸器感染症と診断された咽頭及び鼻腔ぬぐい液及び糞便272検体を対象とした。

ウイルス分離にはHEp-2、RD-18s、Caco-2、MARC 145、Vero9013、VeroE6、LLC-MK2、MDCKの8種の細胞を使用し、細胞変性効果を指標に3代まで継代培養を行った。

また臨床検体から直接にPCR法によるウイルス遺

伝子の検索を行った。検体を前処理後、QIAamp Viral RNA Mini Kitを用いてRNAを抽出し、PrimeScriptRT reagent Kit with gDNAEraserを用いて得られたc-DNAをテンプレートとしてRNAウイルスの検索を行った<sup>2)</sup>。呼吸器系ウイルス12種類についてはPujolらのマルチプレックスRT-PCR法<sup>3)</sup>を実施した。またQIAamp Viral DNA Mini Kitを用いてDNAを抽出し、ヘルペスウイルス属<sup>4)</sup>、ヒトボカウイルス、アデノウイルス及び肺炎マイコプラズマの検索を行った。

検索対象ウイルスは表1のとおりである。分離ウイルスの同定はアデノウイルス及びエンテロウイルス属については中和試験を行い、中和試験が困難な分離株及び臨床検体から遺伝子を検出したウイルス

表1 検査対象ウイルス一覧

ウイルス名	産物のサイズ	備 考
Respiratory syncytial virus(RSV)	279	
Influenza virus A	212	multiplex set1
Influenza virus B	362	
Human metapneumovirus	416	
Parainfluenza virus1	317	multiplex set2
Parainfluenza virus2	507	
Parainfluenza virus3	189	
Parainfluenza virus4	451	
Rhinovirus	549	
Human coronavirusOC43	573	multiplex set3
Human coronavirus229E	335	
Influenza virus C	485	
Adenovirus	554	multiplex set4
Human bocavirus	354	
Mycoplasma pneumoniae	782	
Enterovirus属	650	VP0
Parechovirus	194	5' NTR検出用
Human herpes virus属	215~315	検出用

\*1福祉保健部薬務室, \*2別府大学

については、ダイレクトシークエンス法で遺伝子配列を決定した後、BLASTにて相同性検索を行った。

### 結 果

2012年及び2013年に採取された急性呼吸器感染症の検体272検体のうち134検体（検出率49.3%）から144件（1検体につき複数検出したものを含む）のウイルスを検出した。最も多く検出されたのはライノ

ウイルスで31件（21.5%）、次いでRSウイルス21件（14.6%）、パラインフルエンザウイルス17件（11.8%）、HHV-6 14件（9.7%）、アデノウイルス11件（7.6%）などであった（表2）。

呼吸器系ウイルス12種の他に4セットとしてDNAウイルス2種及び肺炎マイコプラズマのマルチプレックスPCRも呼吸器系ウイルスと同様のPCR条件で検出可能であるとわかった。

表2 月別ウイルス検出数

2012年

ウイルス名	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	合計
Rhinovirus		1		1		3			2	1	3	1	12
Respiratory syncytial virus(RSV)	1	1	2					1	1	2		1	9
Parainfluenza virus1				1									1
Parainfluenza virus2		2											2
Parainfluenza virus3	1						1						2
Parainfluenza virus4	1												1
CoxsackievirusA2			1			1	1	1					4
CoxsackievirusA6						1						1	2
CoxsackievirusA9								2					2
CoxsackievirusB4							1						1
Adenovirus5					1								1
Human herpes virus1(HSV)												1	1
Human herpes virus6(HHV-6)						1	2						3
Mycoplasma pneumoniae											1		1
月計	3	4	3	2	1	6	5	4	3	3	4	4	42

2013年

ウイルス名	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	合計
Rhinovirus	1		1	1	3		1	3	2	1	6		19
Respiratory syncytial virus(RSV)		2	4	1			1	1	1	2			12
Human metapneumovirus		1	3	2			1						7
Influenza virus A H3N unknown			1										1
Parainfluenza virus1		1	1							1			3
Parainfluenza virus3					1	4	1						6
Parainfluenza virus4									1	1			2
CoxsackievirusA6							2						2
CoxsackievirusA8										1			1
CoxsackievirusA9						1							1
CoxsackievirusB3				1									1
CoxsackievirusB4							1						1
Echovirus6							1	1					2
Echovirus11									1				1
Echovirus25												1	1
Echovirus30							2	3					5
Enterovirus68							2		1				3
Parechovirus1							1				1		2
Adenovirus1						1							1
Adenovirus2				1						1			2
Adenovirus3							1		2	1	1	1	6
Adenovirus5								1					1
Human herpes virus1(HSV)										1			1
Epstein-Barr virus(EBV)	1												1
Human herpes virus5(CMV)					1					2	2		5
Human herpes virus6(HHV-6)				1	2	3	2		1	1	1		11
Human herpes virus7(HHV-7)		1											1
Human bocavirus		1		1	1								3
月計	2	6	10	8	8	9	16	9	9	12	11	2	102

## 考 察

呼吸器系ウイルスにはある程度の季節性が認められ、ライノウイルスは秋から冬にかけて流行し、RSウイルスは冬から春先と秋からの流行に伴って多く検出された。2013年、アデノウイルスは咽頭結膜熱の秋から冬の流行に伴い、上気道炎で同じ時期に多く検出された。エンテロウイルス属は夏に多く検出され、特に2013年はエコーウイルスの流行が見られた。

呼吸器系ウイルスの検索には、ウイルス分離と遺伝子検査を併用することで検出率を向上させることができる。さらに、マルチプレックスRT-PCR法を用いることで同時に多くの種類のウイルスのスクリーニング検査をすることができ、迅速かつ特異的な検査診断結果が得られるようになった。しかし、今回ヘルペスウイルス属のように、持続潜伏感染するウイルスも検出されていることより、検出されたウイルスが急性呼吸器感染症の原因と断定するには注意を要する場合もあり、総合的に判断する必要がある

あると考える。

近年呼吸器ウイルスの集団発生ではインフルエンザ以外は起こっていないが、この手法を用いて今後も引き続き検査を進めていくとともに、集団発生が起こった場合は迅速な検査結果を提供することで感染拡大防止に貢献したい。

## 参 考 文 献

- 1) 木村博一他：急性呼吸器ウイルス感染症の検査診断法概要 IASR 29 277-278 (2008)
- 2) 病原体診断マニュアル（地方衛生研究所全国協議会・国立感染症研究所編）
- 3) S Bellau-Pujol他：Development of three multiplexRT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses journal of Virological Methods 126 53-63 (2005)
- 4) Donard R: Detection and Analysis of Diverse Herpesviral Species by Consensus Primer PCR journal of Clinical Microbiology 1666-1671(1996)