

宮崎県の 2009/2010 シーズンにおけるインフルエンザ感染が

否定された症例からの呼吸器系 RNA ウイルスの検索

北野智一・三浦美穂・櫻井涼子・山本正悟*¹

Detection of Respiratory RNA viruses from Influenza Infection Negative Cases in Miyazaki Prefecture, 2009 – 2010 Influenza Season

Tomokazu KITANO, Miho MIURA, Ryoko SAKURAI, Seigo YAMAMOTO*¹

Abstract

In 2009, pandemic influenza A/H1N1 2009 [A(H1N1)pdm] virus caused by pandemic and spread throughout the world, including Miyazaki Prefecture in Japan. This 2009 – 2010 influenza season, we diagnosed by real time RT-PCR for influenza virus : A(H1N1)pdm, seasonal A(H1N1), seasonal A(H3N2), and Type B influenza viruses. Seven hundred fifty-four patients with influenza-like illness in this season were tested. We detected influenza viruses from 498 patients ; A(H1N1)pdm and A(H3N2) positive patients were 483 and 15, respectively. However, 256 patients were all influenza negative, except for type C influenza virus.

In this study, we tried to detect from 207 of 256 influenza negative patients using multiplex RT-PCR for 9 respiratory RNA viruses : human respiratory syncytial virus (hRSV), human metapneumovirus (hMPV), parainfluenza virus types 1–4 (PIV-1, -2, -3 and -4), human coronavirus OC43 and 229E (HCoV) and human rhinovirus (hRV). We detected respiratory viruses from 61 influenza negative patients, including hRSV(n=8), hMPV(n=10), PIV-1(n=1), PIV-3(n=6), PIV-4(n=2), hRV(n=32), co-infection hRV+PIV-3(n=1) and hMPV+PIV-3(n=1).

It was thought that this multiplex RT-PCR method was more effective for the surveillance of the respiratory virus than the method of the current use in our laboratory.

Key word : respiratory RNA viruses , multiplex RT-PCR, influenza virus

はじめに

2009年4月28日、日本政府が新型インフルエンザの発生を宣言した。以降、県内でもスクリーニング検査や臨床症状から新型インフルエンザが疑われる症例の検体が急激に増加し、検査対応に追われた。

検査対応としては、リアルタイム PCR 法を用いた遺伝子検出により迅速に結果を還元するとともに、細胞培養法による検体からの病原体分離も同時に行ってきた。

2009年度、リアルタイム PCR 法で検査した患者数は、のべ 754 名であり、498 名については、新型インフルエンザまたは A 香港型の遺伝子が検出され、うち 467 名からインフルエンザウイルスが分離された。一方、256 名については、その多くが発熱や呼吸器症状を呈していたにも関わらず、遺伝子検査とウイルス分離ともに陰性となった (Fig. 1)。

そこで今回、これらの遺伝子検査とウイルス分離ともに陰性となった例について病因を明らかにするため、ヒト RS ウイルス (hRSV)、ヒトメタニューモウイルス (hMPV)、ヒトライノウイルス (hRV)、パラインフルエンザウイルス 1 型から 4

*1 平成 23 年 3 月 退職

型 (PIV-1,-2,-3,-4), ヒトコロナウイルス OC43 および 229E (HCoV) の 9 種類の呼吸器系 RNA ウイルスの遺伝子検索を行ったのでその結果を報告する。

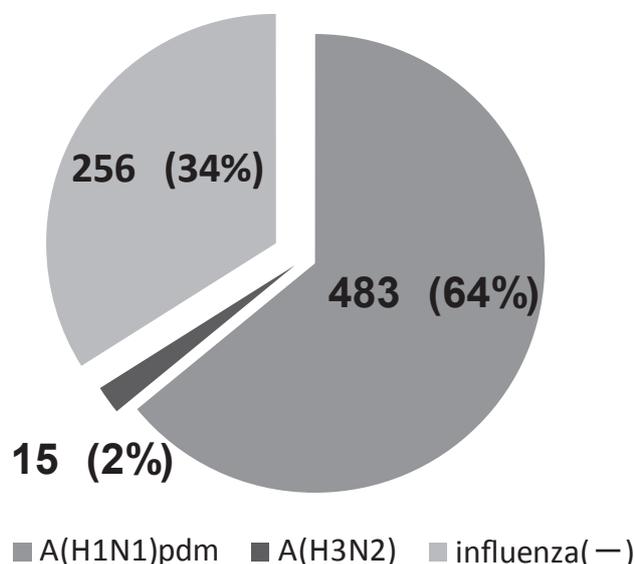


Fig. 1 Result of influenza detection by real time RT-PCR in patient from May, 2009 to March, 2010 (n=754)

材料および方法

2009年5月から2010年3月までに採取された検体において、インフルエンザ遺伝子検査陰性で、RD-18s 細胞, HEp-2 細胞, Vero 細胞, Caco-2 細胞, MDCK 細胞を用いた細胞培養法によってもウイルスが分離されなかった 256 検体のうち、遺伝子検査に供した抽出 RNA が残存していた 207 検体を対象に、 -80°C で凍結保存されていた抽出 RNA を検査に使用した。

RT-PCR は、Bellau-Pujol 1) の方法を参考に、3 種類の multiplex RT-PCR (multiplex1 ; hRSV, hMPV. multiplex2 ; PIV-1,-2,-3,-4. multiplex3 ; hRV, HCoV OC43 および 229E) により、9 種類の呼吸器系 RNA ウイルスの遺伝子検索を行った。標的と思われるバンドが検出されたものについては、それぞれのウイルスに特異的なプライマーセットを用い、再度 RT-PCR を行って泳動像を再確認した。

ウイルス遺伝子が検出されたものについては、

それぞれのウイルス遺伝子陽性検体のうち、ランダムに 1 つから 2 つの PCR 産物を選択し、ダイレクトシーケンス法にてウイルスの確認を行った。

結果

遺伝子検索の結果、207 検体中 61 検体 (29.5%) からウイルス遺伝子が検出された (Table 1)。検出された遺伝子の内訳は、hRSV ; 8 件, hMPV ; 10 件, PIV-1 ; 1 件, PIV-3 ; 6 件, PIV-4 ; 2 件, hRV ; 32 件が単独で検出され、hRV+PIV3, hMPV+PIV3 の複数検出検体がそれぞれ 1 件認められた。PIV-2, HCoV OC43 および 229E については今回の検査では検出されなかった。

Table 1 Number of respiratory virus detection by multiplex RT-PCR in influenza negative patients (n=207)

Mono-infection	
hRSV	8
hMPV	10
PIV1	1
PIV2	0
PIV3	6
PIV4	2
hRV	32
HCoV OC43	0
HCoV 229E	0
Co-infection	
RV+PIV3	1
hMPV+PIV3	1
Total	61

検出ウイルスごとの患者の臨床症状・年齢・入院状況を Table 2 に、検出ウイルスごとの月別検出状況を Fig.2 に示した。hRSV は 11 月をピークに 10 月から 1 月にかけて検出され、乳幼児に多く、下気道炎が 50% を占めた。hMPV は明かなピークはみられないが、6 月から 7 月、10 月から 12 月に検出され、罹患年齢は 1 歳から 81 歳と幅広いが、乳幼児から小児に多く、下気道炎が 70% を占めた。hRSV, hMPV はそのほとんどが入院事例であり、重篤化する傾向が示唆された。

hRV は今回最も多く検出され、6 月と 10 月に

Table 2 Information of patients that respiratory viruses detected by multiplex RT-PCR

	No. of positive patients	No. of fever	body temperature[°C] (median)	respiratory tract inflammation upper (pharyngalgia)	lower (bronchitis, pneumonia)	range of age** (median)	No. of hospitalization
Mono-infection							
hRSV	8	8 (100 %)	38.6 · 40.2 (39.1)	0	4	2M · 3Y (1.0Y)	6
hMPV	10	10 (100 %)	38.1 · 40.2 (39.0)	0	7	1Y · 81Y (4.0Y)	9
PIV1	1	1 (100 %)	39.0 (39.0)	0	0	8Y (8.0Y)	0
PIV3	6	5 (83.3 %)	38.0 · 39.8 (38.7)	5	0	12Y · 47Y (26.5Y)	0
PIV4	2	2 (100 %)	40.0 (40.0)	0	0	6M · 5Y (2.75Y)	1
hRV	32	32 (100 %)	37.3 · 40.0 (38.0)	5	1	9M · 40Y (10.0Y)	1
Co-infection							
hRV+PIV3	1	1 (100 %)	40.0 (40.0)	0	0	4Y (4.0Y)	1
hMPV+PIV3	1	1 (100 %)	40.1 (40.1)	0	0	2Y (2.0Y)	1

※ M ; month, Y ; year

それぞれピークを形成し、患者の90%は15歳以下の乳幼児や子供であった。下気道炎を起こした入院例が1例あったものの、多くは上気道炎で、症状は軽度なものが多く、発熱のみで呼吸器症状が無いものも多かった。最高体温も検出ウイルス中最も低く、中央値は38.0°Cであった。PIV-3は、6月のみに、12歳から47歳で検出され、成人に多くみられた。ほとんどの患者で上気道炎がみられ、一部の患者では頭痛や全身倦怠感もみられた。PIV-1およびPIV-4については、PIV-1が11月、PIV-4が10月と11月にそれぞれ1件ずつ検出された。罹患年齢は乳幼児から小児で、症状は発熱が主で呼吸器症状はほとんどみられなかった。

hRV+PIV3, hMPV+PIV3の混合感染例はそれぞれ1例と母数が少ないが、いずれも入院例であった。

考察

インフルエンザが否定された207検体中61件から6種類の呼吸器系RNAウイルス遺伝子が検出されたことから、宮崎県においてもhRSV, hMPV, PIV-1, PIV-3, PIV-4, hRVが侵入し、呼吸器症状を起こしていたことが明らかとなった。このうち、hMPV, PIV-1, PIV-3, PIV-4については、当所で初めての遺伝子検出であり、今後の

検査対応を考えなくてはならない。特にhMPVはhRSVと同様に乳幼児が下気道炎を呈し、その多くが入院するため、早急な対応が必要である。

今回検査に使用した検体はすべて細胞培養法によるウイルス分離を試みているが、今回遺伝子検索を行った9種類のウイルスの中で、2009年度に分離されたものはhRVが1株であった。一般に呼吸器系ウイルスは、細胞変性効果(CPE)の判断が難しく、また、鼻咽頭ぬぐい液中のウイルス量が少ない場合には分離に時間がかかり、種によっては、輸送培地のpHや塩濃度、凍結融解等に弱いものもあるため、分離が難しいとされている^{2,3,4,5)}。今後、ウイルス分離に使用する細胞の数や種類、検体の処理方法等についても検討が必要と考えられる。

今回、呼吸器系ウイルスの検出に遺伝子検査を用いることで、大幅に検出率を上げることができた。すなわち、新型インフルエンザが大流行した2009-2010シーズンの呼吸器症状を起こしたウイルスは、インフルエンザだけでなく、他のウイルスも関与していることが明らかになり、遺伝子検査の導入により、感染症発生動向調査において、より多くの情報を得ることが可能となった。今後、データを蓄積していくことで、より広範で正確な発生動向の把握に努めていきたい。

また、症状があったにも関わらず未だ原因の特

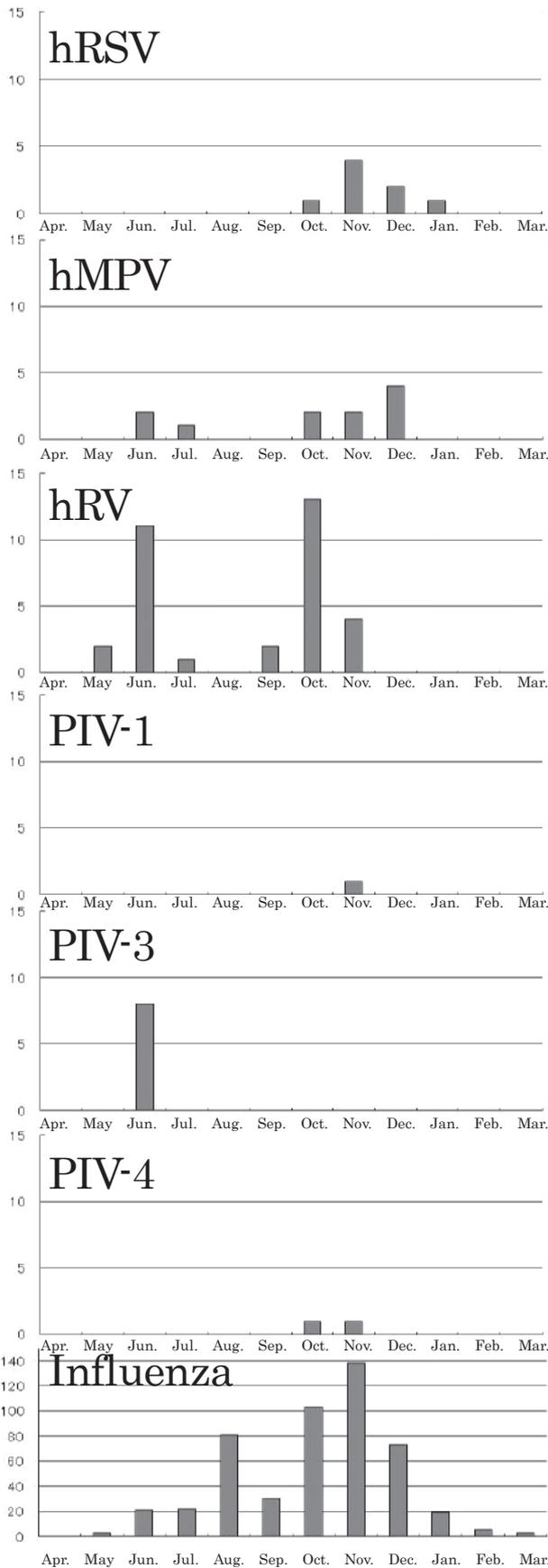


Fig. 2 Monthly detection of respiratory viruses from Apr 2009 to Mar 2010 in Miyazaki

定に至らないものが3割近く残っており、他のウイルス、細菌、クラミジア、マイコプラズマなどの呼吸器疾患に関与する様々な病原体検索についても検討していきたい。

参考文献

- 1) S. Bellau-Pujol et al., J Virol Methods 126 : 53-63, (2005)
- 2) 加藤四郎, 岸田綱太郎: 病原ウイルス学(第1版), 253-256, 金芳堂(京都), (1989)
- 3) 加藤四郎, 岸田綱太郎: 病原ウイルス学(第1版), 359-360, 金芳堂(京都), (1989)
- 4) 菊田英明: ヒト・メタニューモウイルス, ウイルス 56(2), 173-182, (2006)
- 5) 谷口清洲: 感染症の話ーRSウイルス感染症ー, 感染症発生動向調査週報, 6(22), 10-14, (2004)