

短報

インフルエンザ様疾患からの インフルエンザウイルスおよび パラミクソウイルスの検出

渡邊寿美, 斎藤隆行, 新川隆康

Detection of Influenza Virus and Paramyxoviridae from Influenza-like Illness

Sumi WATANABE, Takayuki SAITO
and Takayasu NIKKAWA

はじめに

かぜ様疾患の病原体のほとんどはウイルスであるといわれており、その種類は多岐にわたる。冬季のインフルエンザ流行期においては、インフルエンザあるいはインフルエンザ様疾患と診断された症例からインフルエンザウイルスが多数分離されてくるが、他のウイルスが分離されたり、ウイルス分離陰性となる症例も少なくない。また、インフルエンザ流行期の前後、あるいは時期はずれのインフルエンザ様疾患については、インフルエンザウイルスが分離されない症例の割合が多い。そこで、インフルエンザ様疾患の病原体検索を充実させるため、数種類の細胞を用いてインフルエンザ以外の呼吸器疾患関連ウイルスの分離を試みると共に、急性呼吸器感染症の原因として重要でありこれまで分離経験の少ないパラミクソ科に属するウイルス（パラインフルエンザウイルスおよびRS (Respiratory Syncytial) ウイルス) の遺伝子検出を試みたので報告する。

材料と方法

1. 検査材料

平成14年度から16年度（平成14年4月から17年3月）の3年間に検査依頼のあった集団かぜ患者検体および感染症発生動向調査の病原体定点から提供されたインフルエンザ様疾患患者検体を用いた。検体数は、集団かぜ（う

がい液）124検体、インフルエンザ様疾患（咽頭拭い液または鼻腔拭い液）605検体である。

2. ウイルス分離

全ての検体について、MDCK 細胞および Caco-2細胞を用いてインフルエンザウイルス分離検査を行った。2代の継代培養を経ても細胞変性効果（CPE）が確認できなかったものをインフルエンザウイルス分離陰性検体とし、他のウイルスを対象とした分離検査を行った。使用した細胞は、RD-18S, HeLa, Vero, Hep-2, GMK, LLC-MK2およびVeroE6の7種類である。

3. 遺伝子検出

ウイルス分離陰性検体について、インフルエンザウイルス A(H1)型, A(H3)型, B 型, パラインフルエンザウイルス1~3型, RS ウイルスを対象にRT-PCR による各ウイルス遺伝子の検出を行った。患者検体からQIAamp Viral RNA mini kit (Qiagen) を用いてRNAを抽出した。抽出RNAは、Oligo(dt)₁₂₋₁₈PRIMER (Invitrogen) および Super Script II RT (Invitrogen) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を作製した。Taq ポリメラーゼは Gene Taq (ニッポンジーン) を使用した。PCR 反応に使用したプライマーおよびPCR産物の分子サイズは表1のとおりである。また、各ウイルスのPCR条件は以下のとおりである。インフルエンザウイルスは1stPCR, 2ndPCRともに既報¹⁾のと通りの温度条件、変性94°C1分、アニーリング55°C1分、伸長72°C1分で行ったが、検出効率を上げるため、1stPCRは40サイクル、2ndPCRは30サイクルで行った。パラインフルエンザウイルスの温度条件は1stPCRが94°C1分、50°C1分、72°C1分、2ndPCRが94°C1分、58°C1分、72°C1分²⁾、インフルエンザウイルスの場合と同様に1stPCRは40サイクル、2ndPCRは30サイクルで行った。RSウイルスの温度条件は参考文献では1stPCRが94°C1分、50°C1分、72°C1分、2ndPCRが94°C1分、60°C1分、72°C1分と設定されているが³⁾、一台の装置で同時に増幅する目的でパラインフルエンザと同じ温度条件で予備実験を行った結果、非特異的反応は見られずかつ増幅効率も同等であることが確認できたので、2ndPCRのアニーリング温度をパラインフルエンザウイルスと同じ58°Cに設定することにし、温度条件、サイクル数ともにパラインフルエンザウイルスの条件に合わせて行った。なお、インフルエンザウイルスの1stPCR、パラインフルエンザウイルスおよびRSウイルスのPCRについては、それぞれの型別プライマーを混合して使用し、インフルエンザウイルスの2ndPCRの場合のみ各型別にPCR反応を行った。PCR産物を2%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した後、紫外線を照射して特異バンドを観察確認した。

表1 対象ウイルスと使用プライマー

ウイルス	型(亜)別	1stPCR (分子サイズ)	2ndPCR (分子サイズ)	
インフルエンザ	B型	KF1/KF2 (329bp)	KF3/KF4 (192bp)	清水ら ¹⁾
	A(H1)型	KF5/KF6 (431bp)	KF7/KF8 (197bp)	
	A(H3)型	KF9/KF10 (578bp)	KF11/KF12 (232bp)	
パラインフルエンザ	1型	PIP1+/PIP1- (477bp)	PIS1+/PIS1- (316bp)	Echevarriaら ²⁾
	2型	PIP2+/PIP2- (507bp)	PIS2+/PIS2- (203bp)	
	3型	PIP3+/PIP3- (477bp)	PIS3+/PIS3- (102bp)	
RS	A型	RSVABF/RSVABR (838bp)	RSVAF/RSVAR (334bp)	Stocktonら ³⁾
	B型	A, B共通	RSVBF/RSVBR (183bp)	

表2 集団かぜ検体からのウイルス分離および遺伝子検査結果

検出ウイルス	平成14年度			平成15年度			平成16年度			計
	12月	1月	2月	12月	1月	2月	12月	1月	2月	
検体数	9	35	0	14	29	0	0	29	8	124
ウイルス分離										
インフルエンザA(H3)型	4	12		10	9			3	2	40
インフルエンザB型		6						6		12
単純ヘルペス1型	1*							1		2
コクサッキーB1型				1*						1
分離陰性検体数	5	17		4	20			19	6	71
PCRによる遺伝子検出										
インフルエンザA(H3)型	2	4		2	12				1	21
インフルエンザB型		1						3		4

* 同一検体からインフルエンザウイルスA(H3)型が分離されている

表3 インフルエンザ様疾患検体からのウイルス分離および遺伝子検査結果

検出ウイルス	平成14年度				平成15年度				平成16年度					計		
	4~11月	12月	1月	2月	3月	4~11月	12月	1月	2月	3月	4~11月	12月	1月		2月	3月
検体数	4	15	77	33	10	2	16	121	66	6	0	10	43	165	37	605
ウイルス分離																
インフルエンザA(H3)型		2	56	6	2	1	5	98	48	4			11	45	13	291
インフルエンザB型			2	14	5			1	2				15	75	9	123
アデノ1型				1												1
アデノ2型														1		1
アデノ3型									1							1
アデノ4型				1												1
コクサッキーB5型												1				1
単純ヘルペス1型							1									1
未同定							1									1
分離陰性検体数	4	13	19	11	3	1	9	22	15	2		9	17	44	15	184
PCRによる遺伝子検出																
インフルエンザA(H3)型		1	1	1				1								4
インフルエンザB型			3	1												4
パラインフルエンザ2型								1								1
RS								1	1			1				3

結 果

1. 集団かぜ検体のウイルス検索

124検体についてウイルス分離検査を行った結果、53検体(42.7%)から55株のウイルスが分離された(表2)。分離ウイルスの内訳は、インフルエンザウイルスが52株、その他のウイルス(単純ヘルペスウイルスおよびコクサッキーウイルス)が3株であった。単純ヘルペスウイルスのうちの1株とコクサッキーウイルスは、同一検体からインフルエンザウイルス A(H3)型も分離されており、それぞれ別々の培養細胞から分離された。分離陰性検体は71検体あり遺伝子検出を試みたところ、25検体(35.2%)からインフルエンザウイルス遺伝子が検出された。内訳は、A(H3)型21、B型が4であった。

2. インフルエンザ様疾患検体のウイルス検索

605検体についてウイルス分離検査を行った結果、421株のウイルスが分離された(表3)。分離ウイルスの内訳は、インフルエンザウイルスが414株で68.4%を占め、他のウイルス(アデノウイルス、コクサッキーウイルス、単純ヘルペスウイルスおよび未同定)は7株であった。ウイルス分離陰性検体は、184検体であった。ウイルス分離陰性検体のうち155検体について遺伝子検出を試みたところ、12検体(7.7%)から各ウイルスの特異遺伝子が検出された。内訳は、インフルエンザ A(H3)型が4、同 B型が4、RS が3、パラインフルエンザ2型が1であった。

考 察

集団かぜ検体からのインフルエンザウイルス分離率は41.9%であったが、これに遺伝子検出の結果を加味するとインフルエンザウイルス検出率は62.1%となった。なお、結果は示していないが、インフルエンザウイルス検出陰性者のうち急性期および回復期のペア血清の抗体検査によりインフルエンザの感染が確認された27例を加えれば集団かぜ患者のインフルエンザウイルス陽性率は83.9%と高率であった。一方、感染症発生動向調査のインフルエンザ様疾患検体では、インフルエンザウイルス分離率は68.4%であり、遺伝子検出の結果を加味しても69.8%とインフルエンザウイルスの検出率はほとんど変わらなかった。

検体からのウイルス分離率に差が出た理由は、検体採取方法の差によるものと考えられる。山崎ら⁴⁾の報告によれば、うがい液中の感染価ウイルス量は 10^4 pfu/mlを超えるものがなく、咽頭および鼻腔拭い液は 10^4 pfu/mlを超えるものが約半数であった。遺伝子検出の利点は、検体中に分離に十分なウイルス量が存在しない場合、あるいはウイルスの感染力が失われてしまった場合でも、検出率を補うことができる点にある。今回行ったウイル

ス検出の成績から、集団かぜの病原体調査にインフルエンザウイルスの遺伝子検出を加えるとウイルス検出率の向上に効果的であり、感染症発生動向調査のインフルエンザ様疾患検体に対して遺伝子検出を試みるのであれば、インフルエンザウイルス以外のウイルスを対象とした方がより効果的であると考えられる。

今回の調査では、全検体の約30%がインフルエンザウイルス不検出という結果になった。インフルエンザ流行期に検出されてくる呼吸器疾患関連ウイルスとしては、RSウイルス、パラインフルエンザウイルス、アデノウイルス、エンテロウイルス、ライノウイルス等が挙げられる。病原微生物検出情報によれば平成15年1~12月にインフルエンザおよびインフルエンザ様疾患患者から分離されたインフルエンザ以外のウイルスで最も多かったのがアデノウイルスであり⁵⁾、我々の成績でも異なる型のアデノウイルスが分離されている。一方、RSウイルスやパラインフルエンザウイルスは分離例が少ない。両ウイルスは、健康成人に対しては比較的軽症状ですんでしまうが、小児(特に乳幼児)に細気管支炎や肺炎等重篤な状況を引き起こすことがある。また、インフルエンザ非流行期ではあるが、RSウイルス⁶⁾やパラインフルエンザウイルス3型⁷⁾による集団発生事例の報告もある。さらに、平成15年の感染症法の改正に伴い、RSウイルス感染症が5類感染症定点把握疾患に新たに加わったことなどから、これらのウイルスの動向把握ができる体制を整える必要があると思われる。今回の調査では、両ウイルスの検出における作業効率をあげるため、一台の装置で同時に遺伝子増幅を行う方法を実施した。その結果、インフルエンザ様疾患検体からRSウイルスおよびパラインフルエンザウイルスを検出することができたことから、感染症発生動向調査においては、これらウイルスの遺伝子検出を導入することが効果的であると考えられる。

今後、PCR法を用いたヒトメタニューモウイルス検出系の検討を考えている。このウイルスは、RSウイルスやパラインフルエンザウイルスと同じパラミクソウイルス科に分類されており、国内での分離⁸⁾や疫学調査⁹⁾の報告もある。RSウイルスとパラインフルエンザウイルスの遺伝子検出系にこのヒトメタニューモウイルスも加え、パラミクソウイルス科に属するウイルスの動向把握を充実させていきたいと考えている。

(平成17年7月22日受理)

文 献

- 1) 清水英明, 渡邊寿美, 今井光信: Nested-PCR 法によるインフルエンザウイルスの検出, 感染症学雑誌, 71, 522-526 (1997)

- 2) Echevarria, J.E., Erdman, D.D., Swierkosz, E.M., Holloway, B.P. and Anderdon, L.J.: Simultaneous detection and identification of human parainfluenza viruses 1, 2 and 3 from clinical samples by multiplex PCR, *J.Clin.Microbiol.*, **36**, 1388-1391 (1998)
- 3) Stockton J., Ellis J.S., Saville M., Clewley J.P. and Zambon M.C.: Multiplex PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses, *J.Clin.Microbiol.*, **36**, 2990-2995 (1998)
- 4) 山崎雅彦, 三田村敬子, 川上千春: インフルエンザ迅速診断キットの現況, *インフルエンザ*, **4**, 43-50 (2003)
- 5) 国立感染症研究所感染症情報センター: アデノウィルスと咽頭結膜熱2003, *病原微生物検出情報*, **25**, 94-96 (2004)
- 6) 改田 厚, 村上 司, 入谷展弘, 久保英幸, 石井営次, 浜本芳彦: 保育所における RS ウイルスの集団感染事例—大阪市, *病原微生物検出情報*, **25**, 235-236(2004)
- 7) 尾西 一, 大矢英紀, 川島栄吉, 庄田丈夫, 表佐和, 大田良子ほか: 中学校でのパラインフルエンザウイルス3型による集団かぜ—石川県, *病原微生物検出情報*, **20**, 223-224 (1999)
- 8) 後藤郁男, 山本紀彦, 植木 洋, 佐藤千鶴子, 渡邊節, 秋山和夫ほか: インフルエンザ様患者からの human metapneumo virus の分離—宮城県, *病原微生物検出情報*, **24**, 64-65 (2003)
- 9) 高尾信一, 下菌広行, 柏 弘, 松原啓太, 坂野 堯, 池田政憲ほか: 本邦において初めて流行が確認された小児の human metapneumovirus 感染症の臨床的, 疫学的解析, *感染症学雑誌*, **78**, 129-137 (2004)