

短報

ライノウイルスの分子疫学解析

吉富秀亮・石橋哲也・中村朋史・世良暢之・松田健太郎^{*1*2}

福岡県におけるライノウイルス (HRV) の詳細な発生動向と臨床症状との関連を明らかにすることを目的に、呼吸器症状を呈する小児279名を対象にHRVを含む呼吸器系ウイルスの網羅的な遺伝子検査を行った。その結果、HRVが94名 (33.7%) の小児から検出された。次に検出されたHRVと呼吸器症状との関連を明らかにすることを目的にHRVの分子疫学解析を行った。SRHI1/SRHI2プライマーを用いたPCRにより検出された69検体についてHRVの遺伝子群別を行った結果、A群HRV (HRV-A) が33検体 (47.8%)、B群HRV (HRV-B) が1検体 (1.4%)、及びC群HRV (HRV-C) が35検体 (50.8%) 検出された。さらに、HRVの遺伝子群と小児の呼吸器症状の関連を検討した結果、HRV-AとHRV-Cとの間に顕著な差は認められなかった。今回の調査では、HRVの遺伝子群と軽度から中等度までの呼吸器症状との間に関連性はないことが示唆された。

[キーワード: ライノウイルス、分子疫学解析]

1 はじめに

ライノウイルス (以下 HRV) はピコルナウイルス科エンテロウイルス属の一本鎖RNAウイルスである。HRVは急性呼吸器疾患の原因ウイルスであり、感冒や気管支炎、肺炎を引き起こすことが知られている¹⁾。

HRVsは100以上の血清型があるが、遺伝子群はA群 (HRV-A)、B群 (HRV-B) 及びC群 (HRV-C) に分類される²⁾。近年、この遺伝子群分類に基づくHRVと臨床症状との関連性について検討されてきており、HRV-Cが重症呼吸器症状の原因となるという報告もなされた³⁾。

そこで、当所では2009年から2010年にかけて呼吸器症状を呈する小児を対象に検体を採取し、ライノウイルスの分子疫学解析を行った。

2 材料及び方法

2・1 検体

検体は2009年5月から2010年10月に呼吸器症状を呈した小児から採取した鼻汁279検体を用いた。小児の平均月齢は22ヶ月齢 (最小2ヶ月齢、最大179ヶ月齢) であった。性別は男性146名、女性133名であった。呼吸器症状の重度別に上気道炎、下気道炎、軽症喘鳴、及び中等度喘鳴に分類した。なお、研究対象者へは承諾書により同意を得た。本研究計画は平成22年福岡県保健環境研究所疫学研究倫理審査委員会において審査、承認されている (許可番号第21-2号、平成22年5月10日)。

2・2 マルチプレックスPCR法

16種類の呼吸器系ウイルスを網羅的に検出するために当所で開発したマルチプレックスPCR法を用いた。マルチプレックスPCR法 (4グループのマルチプレックスPCR) は鼻汁検体よりQIAamp Viral RNA mini Kit (Qiagen) を用いてウイルスRNAを抽出し、表1に示すプライマー及びOne-Step RT-PCR Kit (Qiagen) によって行った。各グループのアニーリング温度はグループ①、②及び④は55℃、グループ③は58℃とした。PCR反応後、マイクロチップ電気泳動装置MultiNA (島津製作所社製) を用いて電気泳動を行った。陽性バンドが確認された検体についてはダイレクトシーケンスによりウイルスの同定を行った。

2・3 ライノウイルスの遺伝子群別

遺伝子群別はHRVのVP4/VP2領域の塩基配列549bpを系統解析することにより行った。表1-③に示すSRHI1/SRHI2プライマーを用いてVP4/VP2領域が増幅された69検体についてダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。遺伝子群別のための参照配列はYu Jinらの報告⁴⁾を参考にDNA Data Bank of Japan (DDBJ)⁵⁾ から入手した (例: HRV-A; DQ473507、HRV-B; DQ473486、HRV-C; EF582386)。系統解析は塩基配列解析ソフトウェアMolecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version5⁶⁾ を用いClustalWにより整列後、近隣結合法 (Neighbor-Joining, NJ法) により系統樹を作成することにより行った。Bootstrap testは1000回行った。

福岡県保健環境研究所 (〒818-0315 太宰府市大字向佐野39)

*1 松田小児科医院 (〒816-0952 大野城市下大利1-7-18)

*2 久留米大学病院 (〒830-0011 久留米市旭町67番地)

表 1. マルチプレックス PCR 法に用いたプライマー

| グループ | 呼吸器ウイルス | プライマー名 | 配列 (5'→3') | PCR産物 (bp) | 参考文献 |
|------|----------------------------|----------|--------------------------------|------------|---|
| ① | hRSV | vrsP1 | GGAACAAGTTGTTGAGGTTTATGAATATGC | 279 | Cane and Pringle (1991) |
| | | vrsP2 | TTCTGCTGTCAAGTCTAGTACACTGTAGT | | |
| | Influenza virus A | mia1 | CAGAGACTGAAGATGTCTTTGCTGG | 212 | Donofrio <i>et al.</i> (1992) |
| | | mia2 | GCTCTGTCCATGTTATTTG | | |
| | Influenza virus B | mib1 | AAAAATTACACTGTTGGTTCGGTG | 362 | Donofrio <i>et al.</i> (1992) |
| | | mib2 | AGCGTTCCTAGTTTACTTGG | | |
| | hMPV | hmpv1 | CCCTTTGTTTCAGGCCAA | 416 | S. Bellau-Pujol <i>et al.</i> (2005) |
| | | hmpv2 | GCAGCTTCAACAGTAGCTG | | |
| | Rhinovirus | NCR1 | CGGTAATTTTGTACGCCAGTTT | 501 | Andeweg AC <i>et al.</i> (1999) |
| | | NCR2 | GAAACACGGACCCCAAAGTAGT | | |
| ② | Parainfluenza virus type 1 | PIS1+ | CCGGTAATTTCTCATACCTATG | 317 | Echevarria <i>et al.</i> (1998) |
| | | PIS1- | CCTTGGAGCGGAGTTGTTAAG | | |
| | Parainfluenza virus type 2 | PIP2+ | AACAATCTGCTGCAGCATTT | 507 | Echevarria <i>et al.</i> (1998) |
| | | PIP2- | ATGTCAGACAATGGGCAAAT | | |
| | Parainfluenza virus type 3 | para3.1 | CTCGAGGTTGTCAAGGATATAG | 189 | Karron <i>et al.</i> (1994) |
| | | para3.2 | CTTTGGGAGTTGAACACAGTT | | |
| | Parainfluenza virus type 4 | PIP4+ | CTGAACGGTTGCAATTCAGGT | 451 | Aguilar <i>et al.</i> (2000) |
| | | PIP4- | TTGCATCAAGAATGAGTCCT | | |
| | GAPDH | GAPDH1 | TCATCCATGACAACCTTTGGTATCGTG | 564 | Gueudin <i>et al.</i> (2003) |
| | | GAPDH2 | CTCTTCTCTTGTGCTCTTG | | |
| ③ | HCoV 229E | MD1 | TGGCCCCATTAATAATGTGT | 573 | Vabret <i>et al.</i> (2001) |
| | | MD3 | CCTGAACACCTGAAGCCAAT | | |
| | Rhinovirus | SRHI1 | GCATCIGYARYTTCACCACCANCC | 549 | Savolainen <i>et al.</i> (2002) |
| | | SRHI2 | GGGACCAACTACTTTGGGTGTCGGTGT | | |
| | Influenza virus C | CHAA | ACACTTCCAACCAATTTGG | 485 | Zhang and Evans (1991) |
| | | CHAD | CCTGACAGCAACTCCCTCAT | | |
| | HCoV OC43 | MF1 | GGCTTATGTGGCCCTTACT | 335 | Vabret <i>et al.</i> (2001) |
| | | MF3 | GGCAAATCTGCCAAGAATA | | |
| | HCoV NL63 | N3-PCR2 | ATTAGGAATCAATTACAGCAAGCTGTG | 255 | Astrid Vabret <i>et al.</i> (2005) |
| | | N5-PCR2 | GATAACCAAGTCGAAGTCACCTAGTTC | | |
| ④ | Rhinovirus | EVP4 | CTACTTTGGGTGCCGTGTT | 530 | Shimizu H. <i>et al.</i> (1999) |
| | | OL68-1 | GGTAAAYTCCACCACCANCC | | |
| | <i>C. pneumoniae</i> | CP16s1 | TGACAACTGTAGAAAATACAGC | 463 | Gaydos <i>et al.</i> (1994) |
| | | CP16s2 | CGCCTCTCTCTATAAAT | | |
| | Bocavirus | 188F | GACCTCTGTAAGTACTATTAC | 354 | Allander T <i>et al.</i> (2005) |
| | | 542R | CTCTGTGTTGACTGAATACAG | | |
| | <i>M pneumoniae</i> | MP16s1 | AAGGACCTGCAAGGGTTCGT | 277 | F. J. M. van Kuppeveld <i>et al.</i> (1992) |
| | | MP16s2 | CTCTAGCCATTACCTGCTAA | | |
| | Adenovirus | Adeno P1 | GCCGAGAAGGGCGTGCAGGTA | 134 | Hierholzer JC <i>et al.</i> (1993) |
| | | Adeno P2 | ATGACTTTTGGAGTGGATCCCATGGA | | |

表 2-1. 呼吸器症状を呈する小児における呼吸器系ウイルスの検出状況

| 検出されたウイルス | 検出数 | % |
|--------------|-----|------|
| HRV感染 | 94 | 33.7 |
| HRV単独 | 71 | 25.4 |
| 2種混合感染 | 18 | 6.5 |
| HRV/AdV | 9 | 3.2 |
| HRV/BoV | 3 | 1.1 |
| HRV/RSV | 3 | 1.1 |
| HRV/hMPV | 1 | 0.4 |
| HRV/Myco | 1 | 0.4 |
| HRV/PIV1 | 1 | 0.4 |
| 3種混合感染 | 5 | 1.8 |
| HRV/BoV/AdV | 1 | 0.4 |
| HRV/PIV1/AdV | 2 | 0.7 |
| HRV/RSV/AdV | 2 | 0.7 |
| HRV以外 | 112 | 40.1 |
| RSV | 37 | 13.3 |
| RSV/AdV | 2 | 0.7 |
| PIV1 | 27 | 9.7 |
| PIV1/AdV | 2 | 0.7 |
| PIV1/Myco | 1 | 0.4 |
| hMPV | 24 | 8.6 |
| AdV | 8 | 2.9 |
| EV68 | 5 | 1.8 |
| EV68/AdV | 1 | 0.4 |
| BoV | 2 | 0.7 |
| CoV | 2 | 0.7 |
| Myco | 1 | 0.4 |
| 不検出 | 73 | 26.2 |
| 合計 | 279 | 100 |

表 2-2. 呼吸器症状の重度別にみた HRV 検出状況

| 検出されたウイルス | 呼吸器症状 | | | |
|---------------|-------|------|------|-------|
| | 上気道炎 | 下気道炎 | 軽症喘鳴 | 中等度喘鳴 |
| HRV単独 | 7 | 14 | 44 | 6 |
| HRV/AdV | | 3 | 5 | 1 |
| HRV/BoV | | 1 | 2 | |
| HRV/RSV | | | 3 | |
| HRV/hMPV | | | 1 | |
| HRV/Myco | | 1 | | |
| HRV/PIV1 | | | 1 | |
| HRV/BoV/AdV | | | 1 | |
| HRV/PIV1/AdV | | | 2 | |
| HRV/RSV/AdV | | 1 | 1 | |
| 小計 | 7 | 20 | 60 | 7 |
| HRV以外の呼吸器ウイルス | 4 | 16 | 80 | 12 |
| 不検出 | 9 | 10 | 48 | 6 |
| 合計 | 20 | 46 | 188 | 25 |

表 2-1 及び表 2-2 の略語説明 :

HRV: Rhinovirus, PIV1: Parainfluenzavirus 1, hMPV: human Metapneumovirus,

AdV: Adenovirus, BoV: Bocavirus, Myco: *Mycoplasma pneumoniae*,

RSV: RSVirus, EV68: Enterovirus68, CoV: Coronavirus

混合感染について :

HRV/AdV は HRV と AdV の 2 種混合感染を示す。

HRV/BoV/AdV は HRV と BoV と AdV の 3 種混合感染を示す。

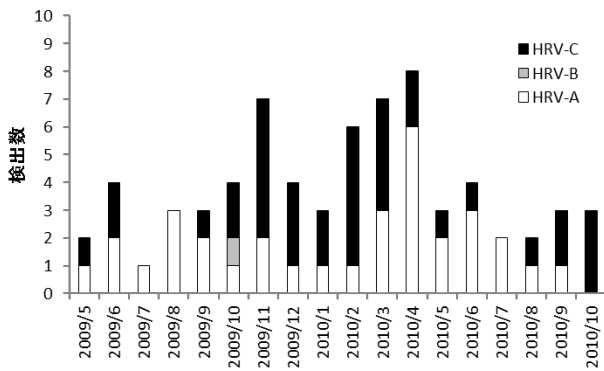


図1. HRV-A,B,C 群の経時的検出状況

表3. HRV 遺伝子群別と呼吸器症状の分類

| HRV遺伝子群 | 呼吸器症状 | | | | 計 |
|---------|-------|------|------|-------|----|
| | 上気道炎 | 下気道炎 | 軽症喘鳴 | 中等度喘鳴 | |
| HRV-A | 0 | 9 | 22 | 2 | 33 |
| HRV-B | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| HRV-C | 5 | 8 | 18 | 4 | 35 |
| 計 | 6 | 17 | 40 | 6 | 69 |

3 結果及び考察

マルチプレックスPCR法を用いて呼吸器症状を呈する小児の呼吸器系ウイルスの検出を行った結果を表2-1に示す。HRVは94検体（33.7%）から検出され、そのうち71検体（75.5%）はHRV単独感染、18検体（19.1%）は2種混合感染、5検体（5.3%）は3種混合感染であった。HRV以外の呼吸器ウイルスは112検体（40.1%）から検出された。ウイルス別にみると、RSウイルスの検出数が最も多く37検体（13.3%）、次いでパラインフルエンザウイルス1型が27検体（9.7%）、ヒトメタニューモウイルスが24検体（8.6%）検出された。

HRVの検出状況を呼吸器症状の重度別に示す（表2-2）。HRVは上気道炎を呈する小児20名中7名（35%）、下気道炎を呈する小児46名中20名（43%）、軽症喘鳴の小児188名中60名（32%）、中等度喘鳴の小児25名中7名（28%）から検出された。HRVの検出率は下気道炎を呈する小児において43%と最も高かったが、呼吸器症状の重度による大きな差は認められなかった。HRVと他の呼吸器ウイルスとの混合感染は、上気道炎を呈する小児は認められず、下気道炎を呈する小児20名中6名（30%）、軽症喘鳴の小児60名中16名（27%）、中等度喘鳴の小児7名中1名（14%）で認められた。また、HRVと他の呼吸器系ウイルスとの3種混合感染は軽症喘鳴の小児60名中4名（6.7%）にのみ検出された。混合感染の組み合わせは、HRVとアデノウイルスが同時に検出された検体が多かったが、アデノウイルスは年間通して検出されており、重症化との関連は今回の調査においては明らかにできなかった。

HRVが検出された69検体について、HRVのVP4/VP2領域の系統解析を行った結果を図2に示す。その結果、33検体

（47.8%）がHRV-Aに、1検体（1.4%）がHRV-Bに、35検体（50.8%）がHRV-Cに分類された。経時的にみると、HRVは調査期間において夏季にやや少なくなる傾向はあったものの毎月検出されており、HRV-AとHRV-Cの経時的な検出状況について差は認められなかった（図1）。呼吸器症状の重度別にHRV遺伝子群を分類した結果、HRV-A及びHRV-Cは症状が重度になるにつれ検出数が多い傾向にあったが、遺伝子群間の傾向の差は認められなかった（表3, 図2）。今後、HRV感染が臨床症状に及ぼす影響を長期的な観察研究により明らかにしたい。

4 まとめ

HRVは呼吸器症状を呈する小児279名中69名（33.7%）から検出された。また、HRVは約25%の割合で他の呼吸器系ウイルスと混合感染しており、混合感染は軽度の呼吸器症状を引き起こす原因となるが、中等度以上の重症化の原因とはならないことが示唆された。さらに、遺伝子群別を行った結果、HRV-Aは47.8%、HRV-Bは1.4%、HRV-Cは50.8%であったが、遺伝子群と臨床症状との関連性は明らかにならなかった。

文献

- 1) Rueckert, In *Fields Virology*, 609-654, 1996
- 2) Palmenberg AC *et al.*, *Science*, 324, 55-59, 2009
- 3) J.Bizzintino *et al.*, *Eur Respir.*, 37, 1037-1042, 2011
- 4) Yu Jin *et al.*, *J. Clin. Microbiol.* 47, 2895-2900, 2009
- 5) DNA Data Bank of Japan, <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>
- 6) Molecular Evolutionary Genetics Analysis, <http://www.megasoftware.net/>
- 7) Cane and Pringle, *J. Gen. Virol.* 72, 349-357, 1991
- 8) Donofrio *et al.*, *PCR Methods Appl.*, 1, 263-268, 1992
- 9) Bellau-Pujol *et al.*, *J. Virol. Methods.*, 126, 53-63, 2005
- 10) Andeweg AC *et al.*, *J. Clin. Microbiol.* 37, 524-530, 1999
- 11) Echevarria *et al.*, *J. Clin. Microbiol.*, 36, 1388-139, 1998
- 12) Karron *et al.*, *J. Clin. Microbiol.*, 32, 484-488, 1994
- 13) Aguilar *et al.*, *J. Clin. Microbiol.*, 38, 1191-1195, 2000
- 14) Gueudin *et al.*, *J. Virol. Methods*, 109, 39-45, 2003
- 15) Savolainen *et al.*, *Respir. Rev.*, 4, 91-98, 2002
- 16) Zhang and Evans, *J. Virol. Methods.*, 1991
- 17) Astrid *et al.*, *Emerg Infect Dis.*, 11, 1225-1229, 2005
- 18) Shimizu H. *et al.*, *Jpn.J.Infect.Dis.*, 52, 12-15, 1999
- 19) Gaydos *et al.*, *J. Clin. Microbiol.*, 32, 903-905, 1994
- 20) Allander T *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 12891-12896, 2005
- 21) Kuppeveld *et al.*, *App. Env. Micro.*, 2606-2615, 1992
- 22) Hierholzer *et al.*, *J Clin Microbiol*, 3, 1886-1891, 1993

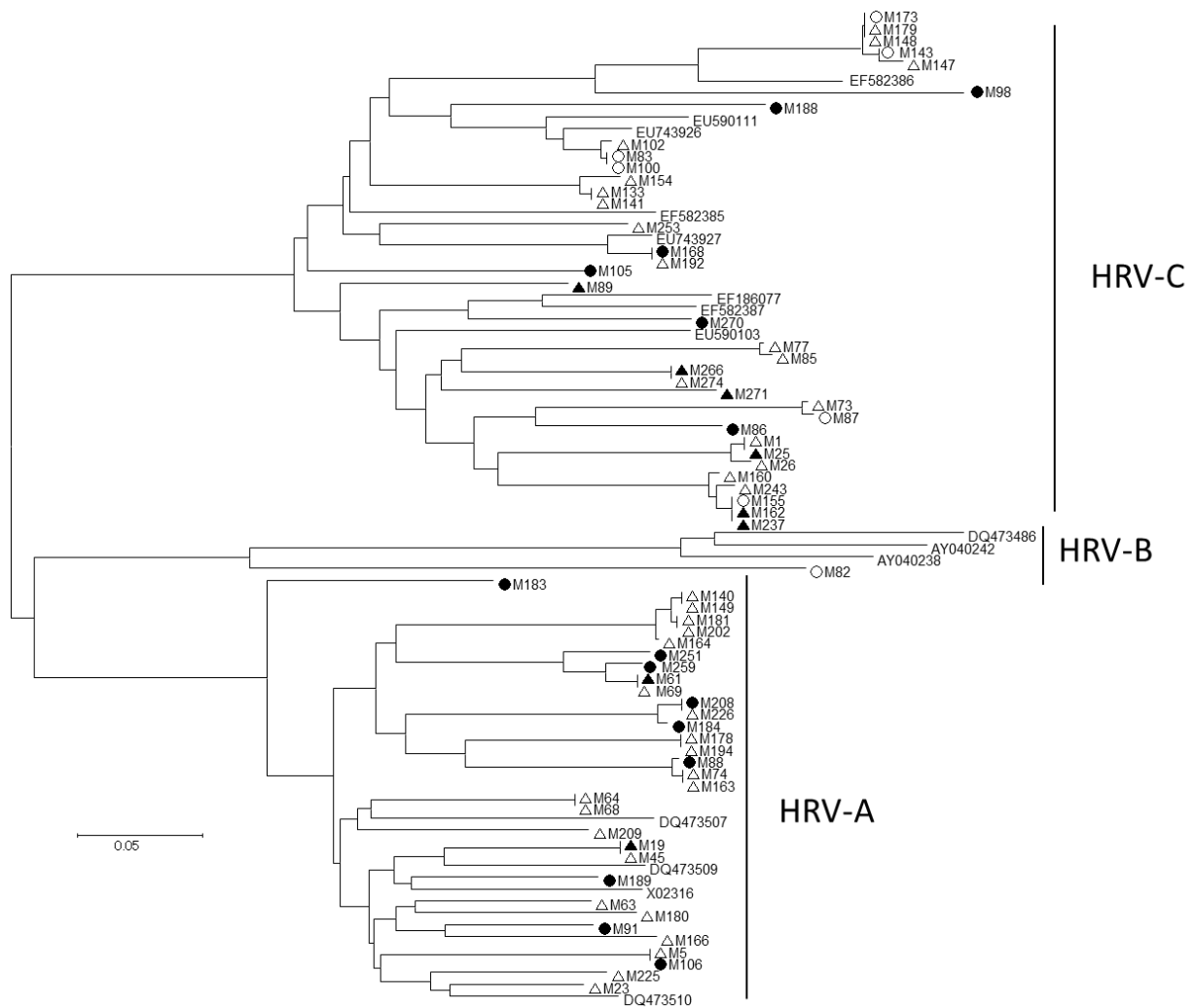


図 2. HRV の系統樹解析結果

* サンプルは呼吸器症状の重度別に、○:上気道炎、●:下気道炎、△:軽症喘鳴、▲:中等度喘鳴をサンプル名の前に付記する。記号のない配列は参照株を示す (例: EF582386)。

(英文要旨)

Molecular Epidemiologic Analysis of the Rhinovirus in Fukuoka

Hideaki YOSHITOMI, Tetsuya ISHIBASHI, Tomofumi NAKAMURA, Nobuyuki SERA, and
Kentarou MATSUDA *1

*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences,
Mukaizano 39, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan*

*1 *Matsuda Children's Hospital, Shimoori 1-7-18, Onojoyou, Fukuoka 816-0952, Japan*

*1 *Kurume University Hospital, asahi-machi 67, Kurume, Fukuoka 830-0011, Japan*

To investigate prevalence of rhinovirus, we carried out an exhaustive search of the respiratory virus. Among 279 children with respiratory symptoms, HRV was detected from 94 samples (33.7%) and had coinfecting with other respiratory virus at a rate of approximately 25%. In addition, as a result of phylogenetic analysis of 69 samples, 33 samples (47.8%) were classified as HRV-A, 1 sample (1.4%) was classified as HRV-B, and 35 samples (50.8%) were classified as HRV-C. However, there was no significant relationship between detected HRV-genogroup and the clinical symptom of the patient.

[Key words ; Rhinovirus , Molecular evolutionary analysis]