

愛媛県におけるヒトボカウイルス感染の分子疫学的解析

菅美樹 青木里美 山下育孝 服部昌志 大倉敏裕 四宮博人

Molecular epidemiological analysis of human bocavirus infections in Ehime prefecture

Miki KAN, Satomi AOKI, Yasutaka YAMASHITA, Msashi HATTORI,
Toshihiro OHKURA, Hiroto SHINOMIYA

Human bocavirus (HBoV) was newly discovered virus that was first identified from nasopharyngeal specimens of patients in 2005. Since then, there has been growing evidence that HBoV is associated with lower respiratory tract infections in children. In this study, we investigated the presence of HBoV by PCR in clinical specimens sampled from pharyngeal swab fluid in Ehime prefecture from 2011 to 2014 and performed molecular epidemiological analysis of the detected HBoV. Nine patients (2.0%) among 443 patients tested positive for HBoV. Seven samples among the nine were drawn from February to May in 2012, and the remaining two were drawn in April 2013. The nine patients were from 0 to 2 years old, and 7, 1 and 1 of them were diagnosed with lower respiratory infections, unidentified fever and unidentified skin rashes, respectively. It was also found that 2 of 9 strains belong to HBoV group 1 while 7 strains to group 2. The above findings suggest that HBoV infections have been spreading among children in Ehime.

Keywords : human bocavirus, lower respiratory infection, molecular epidemiology

はじめに

ヒトボカウイルス(Human bocavirus:HBoV)は、2005 年にスウェーデンで呼吸器感染症患者の鼻咽頭ぬぐい液から発見されたウイルスで、パルボウイルス科パルボウイルス亜科ボカウイルス属に分類され、エンベロープを有さない直鎖1本鎖の DNA ウイルスである¹⁾。パルボウイルス科の中では、HBoV は、ヒトパルボウイルス B19 に続き人に感染する 2 番目のウイルスとして登録された。HBoV は一般的には細胞培養による検出は困難で、2009 年に Ronald らはヒト気管支上皮細胞による細胞培養法を報告したが²⁾、この方法は手技が複雑で検査コストが高く、ルーティン検査としては不向きで、現状では遺伝子検査による診断が一般的である。HBoV の発見以来、世界各地で主に乳幼児の呼吸器感染症例から検出され^{3,4)}、呼吸器感染症の重要な原因ウイルスとなっている。国内の報告

例^{5,6)}では、主に小児の気管支炎・肺炎等の下気道炎の主要な原因ウイルスであり、春から夏に多く検出されている。他県の状況を考慮すると愛媛県内においても発生が予測されるが、本県における侵淫状況は全く不明である。

そこで、今回、遺伝子学的手法を用いて HBoV の検出を行い、本県における HBoV が関与する呼吸器感染症の流行実態を把握するとともに、疾病への関与について疫学的解析を行ったので報告する。

材料と方法

1 検査材料

感染症発生動向調査事業において、2011 年 9 月から 2014 年 3 月までに定点医療機関で採取され、当研究所に搬入された検体(咽頭ぬぐい液)から 1 か月あたり 9~15 件を無作為に抽出した。総検体数は 443 検体で、内訳は男児 254 例(1.9±2.0 歳)、女児 189 例(2.1±3.1

表 1 検体の詳細内訳

内訳	検体数	
総数	443	
男:女	254	189
<年齢別 男:女>		
0歳	46	40
1歳	91	70
2歳	59	30
3歳	22	23
4歳	15	5
5歳	8	5
6歳以上	13	16
<臨床診断別 男:女>		
下気道炎	144	114
上気道炎	22	13
不明熱	64	48
手足口病・不明発疹症	22	13
その他	2	1

歳)であった。臨床診断名の内訳は、気管支炎、肺炎等の下気道炎 258 検体、上気道炎 35 検体、不明熱 112 検体、手足口病・不明発疹症 35 検体、その他 3 検体であった(表 1)。

2 遺伝子検査

検査材料は、3000 rpm, 20 分遠心後、上清 200 µlを High Pure Viral RNA kit (Roche)を用いて DNA を抽出した。

スクリーニングは、Allander¹⁾らの方法を参考にし、NP1 領域(354 bp)を標的とする PCR 法を行った。プライマーは、188F, 542R を使用し、94°C 3 分の反応後、94°C 30 秒、54°C 30 秒、72°C 1 分の反応サイクルを 40 回繰り返し、最後に 72°C 7 分の伸長反応を行った。陽性検体については、Chieochansin⁷⁾らの方法を参考に、VP1 領域

(723 bp)及び VP2 領域(648 bp)を標的とした PCR 法を行った。プライマーについては、VP1 領域は、VPF1, VPR1, VP2 領域は、VPF2, VPR2 を使用し、94°C 3 分の反応後、94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 1 分の反応サイクル 40 回繰り返し、最後に 72°C 7 分の伸長反応を行った。増幅産物は、MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN)で精製後、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、BLAST による相同性検索を行った。また、得られた VP1-2 領域(1210 bp)の塩基配列についてアライメントを行い、近隣接合法 (NJ 法)により系統樹を作成した。

結果

遺伝子検査により、443 名からの検体中 9 検体から HBoV が検出され、検出率は 2.0%であった。詳細について表 2 に示す。陽性例の年齢構成は、0 歳 2 例、1歳 4 例、2 歳 3 例で、1 歳児に多くみられ、男女比は 6:3 であった。臨床症状として全例で発熱がみられ、体温の平均は、39.2 度であった。臨床診断では、下気道炎 7 例 (78%)、不明熱 1 例 (11%)、不明発疹症 1 例 (11%)であり、下気道炎患者検体から多く検出され、うち 2 例は下気道炎に加え胃腸炎症状を呈していた。重複感染について、下気道炎 2 例からアデノウイルス 1 型、ライノウイルスがそれぞれ検出され、重複感染率は 22.2% (2/9)であった。HBoV は、2012 年に 7 例、2013 年に 2 例検出され、初春～初夏である 2 月～5 月に集中して検出された(図 1)。

検出された HBoV の 9 株と国内外での検出株の遺伝子解析に基づき系統樹を作成した(図 2)。その結果、2012 年に検出された 6 株と 2013 年に検出された 1 株が Group2 に分類された。Group2 の相同性は、99.7～100%で、2008 年に大阪市、2009 年に福島県から検出された株と近縁であった。また、Group1 は、2012 年、2013 年に

表 2 ヒトボカウイルスが検出された 9 症例の詳細

No	検体採取日	年齢	性別	発熱 (°C)	臨床症状			同時に検出されたウイルス	型別 (Group)
					下気道炎	胃腸炎	発疹		
1	2012/2/2	0	M	39.2	○			アデノウイルス 1 型	2
2	2012/2/20	1	M	40.3					2
3	2012/3/1	2	F	38.5	○				2
4	2012/3/5	1	F	39.5	○				2
5	2012/3/8	1	M	39.5	○				2
6	2012/4/6	0	M	38.7	○	○			1
7	2012/5/18	1	M	39.0	○	○			2
8	2013/4/8	2	F	40.0			○		1
9	2013/4/15	2	M	38.4	○			ライノウイルス	2

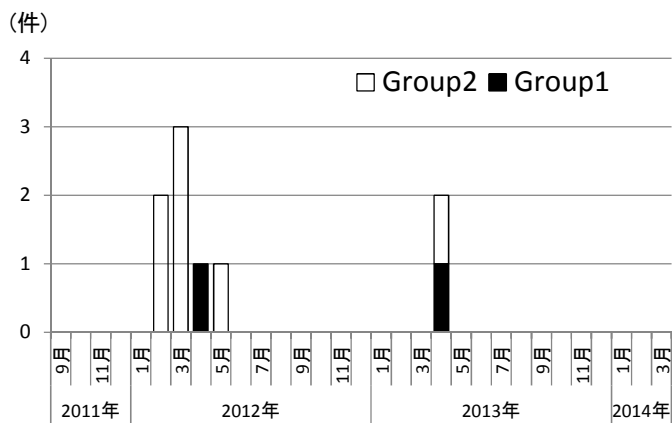


図1 愛媛県における HBov の検出状況
(2011年9月～2014年3月)

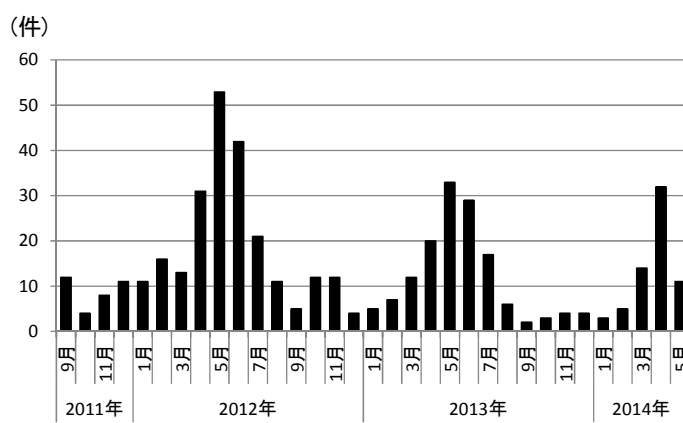


図3 全国における HBov の検出状況
(2011年9月～2014年5月)

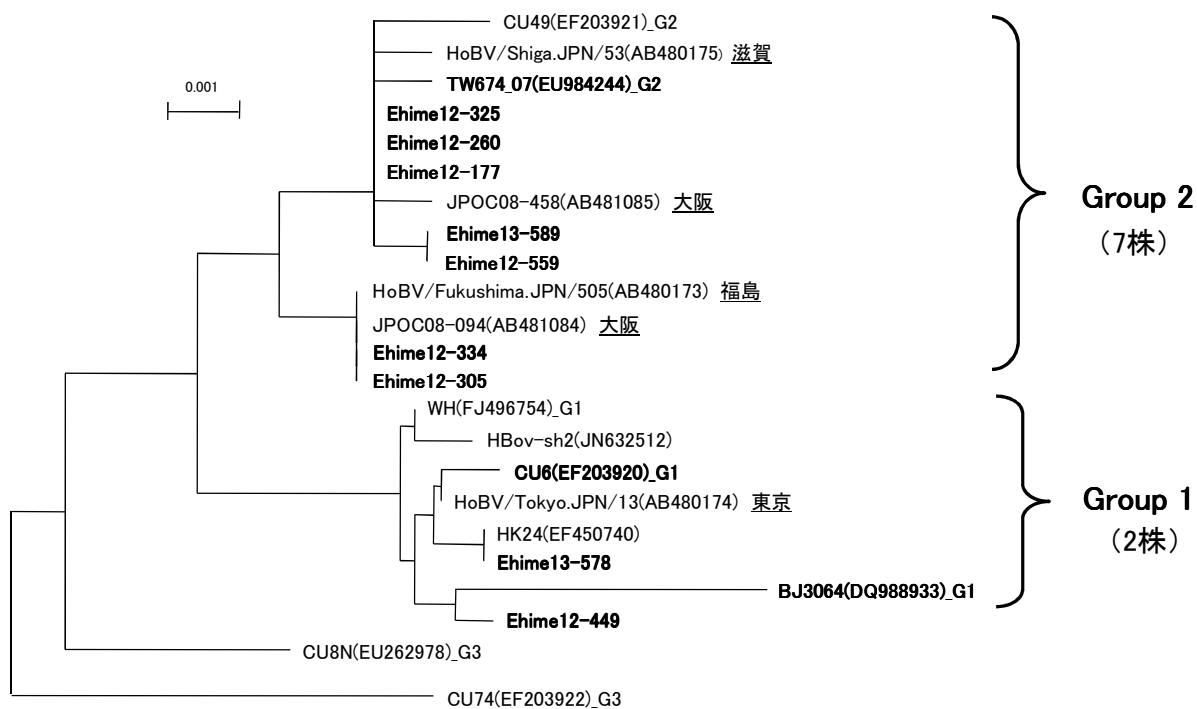


図2 愛媛県で検出された HBov (9 株) と国内検出株の系統樹

各 1 株検出され、相同性は、99.2～99.9%で、2009 年に東京都から検出された株と近縁であった。

考察

2011 年 9 月から 2013 年 3 月までに感染症発生动向調査事業において採取された咽頭ぬぐい液 443 検体中 9 検体から HBov が検出され、検出率は 2.0%であった。全国において HBov が検出された年は、2012 年が 2013 年より多く^{8,9)}、2012 年にはより大きな流行があったことが示唆された(図 3)。愛媛県では 2012 年に

7 例、2013 年に 2 例が検出され 2012 年に多いという同様の傾向であった。また、全国集計では通年を通して検出されているが、特に検出数が増加する季節は初春～夏の 2～7 月であり、5 月ごろにピークに達している。

愛媛県においては 2～5 月に全例が検出されており、季節性についても同様の傾向が見られた。年齢について、石黒ら¹⁰⁾や Endo ら¹¹⁾は、抗 HBov VP1-IgG 抗体価は、6 歳以上でほぼ 100%であり、5 歳までに多くの小児が HBov に初感染していたと報告している。今回の調査において、HBov は、0～2 歳児から検出され、1 歳児が最

も多かったことから、初感染の好発年齢は、1 歳頃であることが推察された。また、3 歳以上の 107 検体から HBoV は検出されていないことから、すでに抗体を獲得している可能性が考えられた。下気道炎と診断された患者から多く検出されたことは、改田ら⁵⁾や矢野ら⁶⁾の報告と同様の傾向であり、愛媛県においても小児の下気道炎を引き起こす原因ウイルスとしての関与が示唆された。一般的には、HBoV 感染症が重症化する例は少ないと考えられているが、基礎疾患のある乳児で重篤な細気管支炎を起こしたという報告¹²⁾があることから、低年齢層における呼吸器感染症原因ウイルスとして、今後も注意が必要である。

遺伝子型の系統樹解析では、Group1 が 2 例、Group2 が 7 例検出された。咽頭ぬぐい液を検体とした過去の報告において、Li ら¹³⁾は、中国において 2008～2010 年に 1 か月～9 歳までの小児 1238 例を対象とした調査研究を実施し、141 例の HBoV を検出し、131 例が Group1 であったと報告している。また、川上ら¹⁴⁾は、2008 年～2009 年に徳島県において、0 か月～40 歳の 863 例を対象とした調査において、30 例から HBoV を検出し、遺伝子型は、2008 年は Group1 が多く、2009 年、2010 年は Group2 が主であったと報告している。さらに近年、矢野ら⁶⁾は三重県で 2011 年～2013 年に小児 675 名を対象とした調査において、21 名から HBoV が検出され、遺伝子解析を実施した 17 名のうち Group1 が 4 名、Group2 が 12 名、Group3 が 1 名であったと報告しており、愛媛県での検出状況を考慮すると、近年、下気道炎の原因となる HBoV の遺伝子型は、Group1 から Group2 に推移している可能性がある。また、愛媛県において、2012 年は 2～5 月に HBoV の検出が集中し、そのうち 6 例が Group2 であったことから、この時期に HBoV の地域流行が起こっていた可能性が示唆された。

まとめ

1 愛媛県における HBoV の検出率は 2%で、下気道炎を主症状とする 0～2 歳児から検出された。

- 2 検出例の解析により、HBoV 感染を疑わせる要素として、下気道炎の臨床症状、年齢及び季節性の 3 つの要素が重要であった。
- 3 ウイルスの遺伝子解析により 2012 年 2 月から 5 月に愛媛県で地域流行が起こっていた可能性が示唆された。
- 4 以上より、愛媛県における HBoV 感染症の実態把握および疾病への関与について知見を得た。
なお、本研究は、「愛媛県立衛生環境研究所特別研究調査事業費」によりなされたものである。

文献

- 1) Allander T. et al: National academy of sciences,102, 12891-6(2005)
- 2) Ronald Dijkman et al: J of Virology, 83(15):7739-48(2009)
- 3) Susanna K P Lau et al: J Inf Dis, 196: 986 z 93(2007)
- 4) Maggi F. et al: J Clin Virol, 38: 321-5(2007)
- 5) 改田厚ほか: 病原微生物検出情報月報, 29: 161-2(2008)
- 6) 矢野拓弥ほか: 病原微生物検出情報月報, 35(4): 111-2(2014)
- 7) Chieochansin T. et al: Virus Res, 129(1): 54-7(2007)
- 8) 病原体検出情報 IASR: <http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr/510-surveillance/iasr/graphs/3058-iasrgv42012.html>
- 9) 病原体検出情報 IASR: <http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr/510-surveillance/iasr/graphs/4285-iasrgv42013.html>
- 10) 石黒信久ほか: モダンメディア, 53(10): 259-66(2007)
- 11) Endo R. et al: J Clin Microbilo, 45: 3218-23(2007)
- 12) Simon A. et al: J Infect, 54(3): e125-7(2006)
- 13) Li G. et al: Emer Inf Dise, 17(9): 1775-77(2011)
- 14) 川上百美子ほか: 徳島県保健製薬環境センター年報, 1: 13-7(2011)