

1 小児科外来クリニックの急性気道炎患児から分離された RS ウイルスの分子系統解析

中村正治 糸数清正 平良勝也 川木達能¹⁾ 木村博一²⁾ 野田雅博²⁾

Phylogenetic Analysis of Respiratory Syncytial Virus Isolated from Children with Acute Respiratory Inflammation in One Pediatric Outpatient Clinic in Okinawa

Masaji NAKAMURA, Kiyomasa ITOKAZU, Katsuya TAIRA, Tatsuyoshi KAWAKI¹⁾, Hirokazu KIMURA²⁾ and
Masahiro NODA²⁾

要旨 : 2008 年 6 月から 12 月の間に沖縄県の 1 小児科クリニックの急性気道炎患児における RSV を調査した。RSV は、RT-PCR により、咽頭拭い液 60 検体中 14 検体(23.3%)から検出された。また、細胞培養により 8 株の RSV が分離された。分子系統解析の結果、分離された 8 株のうち 7 株はサブグループ A の遺伝子型 GA2, 1 株はサブグループ B の遺伝子型 BA であった。これらの沖縄株は近年の国内株のみならず、ブラジル、ベルギー、インドなどの世界各地の株と遺伝子学的に近縁であった。これらの結果は、既報と同様に、異なる遺伝子型の RSV が 1 つの流行期に循環していることを示すとともに、RSV が迅速に世界中に拡大することを示唆していた。また調査結果は、沖縄県とわが国の他の地域における RSV 感染症流行期の違いは、ウイルス側の要因ではないことを示唆している。

Abstract : We investigated respiratory syncytial virus in children with acute respiratory disease at one pediatrics clinic in Okinawa from June to December 2008. RSV was detected in 14(23.3%) of 60 clinical specimens by RT-PCR, and 8 RSV isolates were isolated by cell culture. Phylogenetic analysis showed that 7 of the 8 new isolates were classified into genotype GA2 within subgroup A, and one into genotype BA within subgroup B. These Okinawa isolates were genetically related with not only the recent Japanese isolates but also the distant countries' isolates such as Brazil, Belgium and India. These results suggested that different RSV genotypes circulate in an epidemic period and that RSV spreads rapidly worldwide, as described previously. In addition, this study suggests that the difference of the prevalent season of RSV infection between Okinawa and other area of Japan may not be dependent on the aspects of strain.

Key words: RS ウイルス Respiratory syncytial virus, 分子系統解析 Phylogenetic analysis, サブグループ A と B Subgroup A and B, 遺伝子型 GA2 Genotype GA2, 遺伝子型 BA Genotype BA

I はじめに

Respiratory syncytial virus (RSV) は、パラミクソウイルス科ニューモウイルスに属する RNA ウイルスで、乳幼児の急性呼吸器感染症(ARIs) の主要原因ウイルスの一つである¹⁾。生後 1 歳までに半数以上、2 歳までにほぼ 100%の小児が感染する。また、乳幼児の肺炎や細気管支炎の 50-90%は、RSV が原因であると報告されており、特に 6 ヶ月未満児や早産児、先天性心疾患を有する児は重症化しやすい²⁾。米国で開発された予防薬(パリピズマブ)の販売が、わが国でも 2002 年から開始されたことから、RSV 流行時期を早期に把握することは、ハイリスク児のいる病院等では特に重要である³⁾。

RSV 感染症の流行は、概して温帯地方では冬季に、熱帯地方では雨季に見られ¹⁾、わが国でも 11 月から 1 月に患者数が増加する。しかし、沖縄県においては、5 月から 9 月の夏季に患者数が増加し、わが国の他の地域と異なった流行像を呈する⁴⁾。このことは、本県と他府県で流行する RSV のタイプが異なることを推測させるが、これまでに沖縄県で検出された RSV の遺伝子解析に関する報告は見当たらない。RSV は、その表面の糖タンパクである G タンパクのモノクローナル抗体に対する反応性の違い等からサブグループ A と B に分けられ、さらに各サブグループ内でいくつかの遺伝子型に分類される。本稿では、2008 年 6 月から 12 月の間に県内 1 小児科で実施した病原体サーベイランスにおけ

1) あおぞら小児科 2) 国立感染症研究所

*本研究は厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業によって実施した。

る RSV 検出状況と、県内分離株及び国内外株の G protein 遺伝子の分子系統解析結果を報告する。

II 材料及び方法

材料は、2008 年 6 月から 12 月の間に沖縄本島南部地域の 1 小児科外来クリニックにおいて急性上気道炎(咽頭炎、喉頭炎等)または下気道炎(気管支炎、肺炎等)と臨床診断された患者のうち、市販の簡易診断キットでインフルエンザ A、B が陰性であった患者の臨床検体(咽頭拭い液)60 検体を保護者の同意を得て採取し試験に供した。

検体は、遠心分離後に上清を分取し、QIAamp Viral RNA Mini kit(Qiagen, Germantown, Md., USA)を使用して、ウイルス RNA を抽出し、既報のプライマー⁵⁾を用いて、RSV の G protein 遺伝子を標的とした RT(reverse transcriptase)-PCR を実施した。

また、ウイルス分離を目的に HEp-2, Vero E6, Vero9013, LLC-MK2, RD, MRC 細胞に検体上清を接種して培養し、RSV 特有の合胞体(syncytium)が観察された検体については、培養上清から前述と同様に RNA を抽出して RT-PCR を実施した。増幅産物は、QIAquick PCR Purification kit (Qiagen) で精製し、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)を使用してシーケンス反応後、Genetic Analyzer 3130xl (Applied Biosystems) を使用してダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。

決定した塩基配列は、DDBJ (DNA Data Bank of Japan) の BLAST search により RSV のサブグループを分類した。分子系統樹は、RSV の G protein 遺伝子の一部 270bp について MEGA4 ソフトウェアを使用し⁶⁾、Clustal W によるアラインメント後、NJ 法(塩基置換モデル: Kimura's 2-parameter)により作成した⁷⁾。

III 結果

臨床検体の PCR の結果を表 1 に示した。検体は 6、7 月に多く採集され、RSV もこの二月のみで検出された。検出率はそれぞれ 23.5%、41.7%であった。全体では 60 検体中 14 検体(23.3%)から検出された。症状別の検出率は、上気道炎患者由来が 49 検体中 7 検体(14.3%)、下気道炎患者由来が 11 検体中 7 検体(63.6%)であった。

ウイルスの分離培養の結果、8 検体(13.3%)で HEp-2, LLC-MK2 または Vero9013 細胞に RSV 特有の syncytium が観察された。これらは、培養上清の PCR により RSV と同定され、G protein 遺伝子の BLAST search の結果、7 株がサブグループ A、1 株がサブグループ B であった。

表 1. 臨床検体からの RSV 検出状況

Month	No. of specimens	RSV (%)	RSV/URI (%)	RSV/LRI (%)
June	17	4 (23.5)	2/14(14.3)	2/3(66.7)
July	24	10 (41.7)	5/18(27.8)	5/6(83.3)
August	6	0	0/5(0)	0/1(0)
September	4	0	0/4(0)	0
October	8	0	0/7(0)	0/1(0)
November	1	0	0/1(0)	0
December	0	0	0	0
Total	60	14(23.3)	7/49(14.3)	7/11(63.6)

URI: Upper respiratory inflammation(上気道炎)

LRI: Lower respiratory inflammation(下気道炎)

分離された 8 株の RSV の分子系統樹を図 1 に示した。サブグループ A の分子系統樹において今回分離された 7 株は全て遺伝子型 GA2 に分類され、さらに GA2 の中で 2 つのサブクラスター(I 及び II)を形成した。7 株中 5 株は国内株(NG-016-04)、ブラジル株(JU1780/2007)と、残りの 2 株は国内株(NG-082-05)、ベルギー株(BE/9600/05)、ブラジル株(SP1044/2006)とクラスターを形成した。一方、2001-03 年の国内株(NG-001-02, S02-1 等)は、GA5 や GA7 に属しており異なる遺伝子型であった。

サブグループ B の 1 株は、遺伝子型 BA に分類され、2005-06 年に分離されたインド株(DEL/AFF/05)、ブラジル株(JU1324/2006)、ベルギー株(BE/9382/05)、国内株(NG-064-06, NG-013-05)とクラスターを形成した。一方、2002-03 年の国内株(S02-71, NG-004-03)は、BA 型内で異なるクラスターに分類された。

IV 考察

1 小児科クリニックの急性気道炎患者における RSV を調査した。その結果、全検体の 23.3%から RSV が検出された。このことは、RSV が小児の ARIs の原因ウイルスとして、公衆衛生上重要であることを示すとともに、上気道炎患者に比べ、下気道炎患者からの検出率が高かったことは、小児に肺炎や細気管支炎等を惹起するウイルスとして臨床上のインパクトも大きいと言える。また、6、7 月に採集された検体から集中して検出されたことは、感染症発生動向調査に基づく RSV 患者報告数のピークと一致しており、わが国の他の地域と異なる状況を如実に表している。

遺伝子解析の結果、細胞培養法により分離された 8 株はサブグループ A の遺伝子型 GA2 及びサブグループ B の遺伝子型 BA であった。この結果は既報と同様に 1 つの流行期に異なる遺伝子型のウイルスが存在することを示している⁵⁾。近年世界的に流行している RSV の遺伝子型はサブグループ A

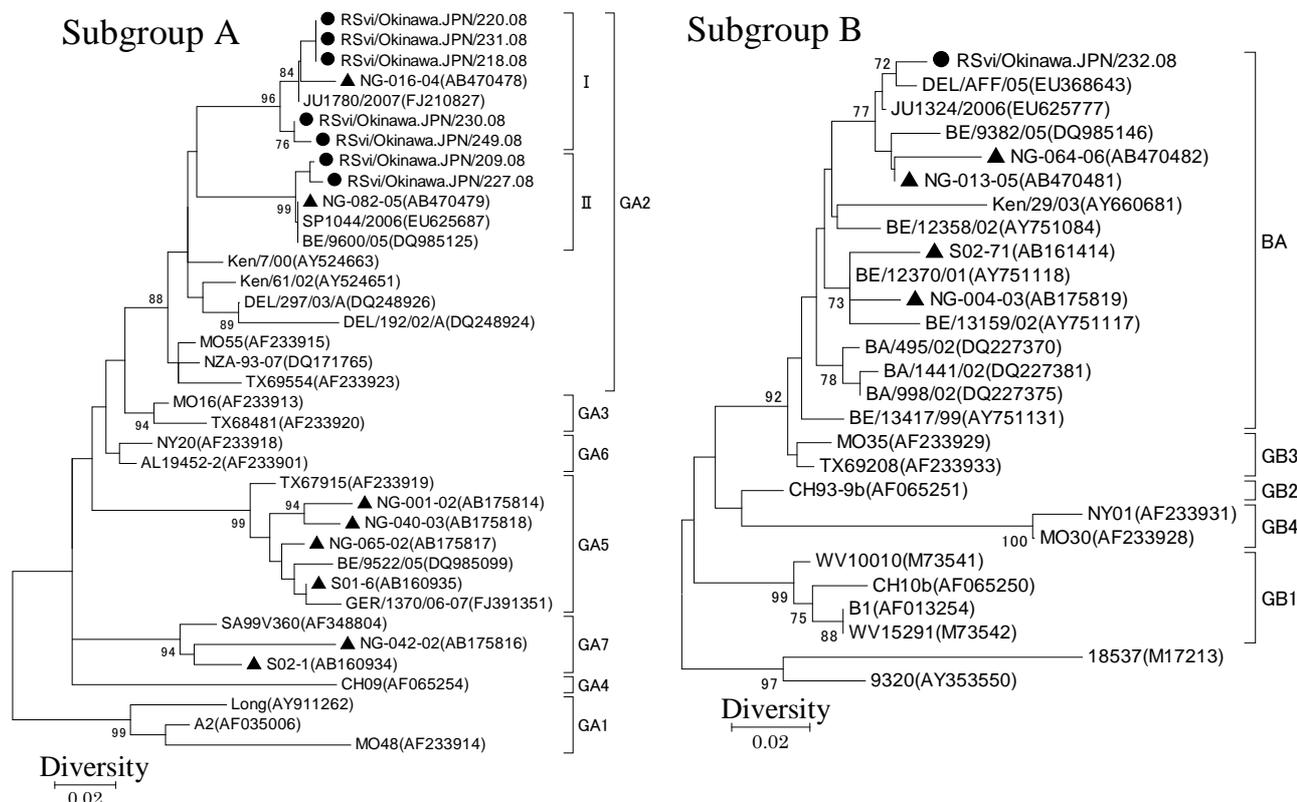


図 1. RSV サブグループ A 及び B の G protein 遺伝子の塩基配列に基づく分子系統樹

●は沖縄株, ▲は国内株を示す. 分類名は株名及びアクセッションNo.を示す. ブートストラップ値は 70%以上のみを示す.

の GA2, GA5 及びサブグループ B の BA である^{8,9)}. 今回の分子系統解析結果も同様で, サブグループ A の沖縄 7 株は, すべて GA2 に分類された. さらに GA2 の中でも 2004 年以降に検出された国内株やベルギー, ブラジル等の国外株と遺伝子学的に近縁であったことは, RSV が迅速に世界中に拡大することを示唆している. サブグループ B においても同様で, 沖縄株は, BA 型内で 2005 年以降の株と近縁に分類されている. BA 型ウイルスは, 1999 年にプエノスアイレスで分離され¹⁰⁾, その後急速に世界中に拡大している. この遺伝子型の RSV は G 遺伝子の第 2 可変領域に 60 ヌクレオチド(20 アミノ酸)の重複を有し, 他の RSV には見られない特徴がある. この大きな抗原変異によりサブグループ B の他の遺伝子型よりも優勢に拡大しているものと推察されている⁸⁾.

本県の RSV 感染症の流行期は夏季に観察され, 冬季に流行する我が国の他の地域と大きく異なる. 系統樹解析の結果は, この違いが RSV 自体の違いによるものではないことを示唆していた. 比較的降雨量の多い季節に患者が増加する様相は, 雨季に流行する熱帯地域の流行状況に類似している. しかしながら, 沖縄県の降雨量は年によって差が大きく, 患者報告数との間に相関が見られない. 何故, 夏季に流行するかは不

明であるが, このような状況は本県のインフルエンザの流行においても見られる¹¹⁾. 今後は生活様式やその他の環境要因を含めた更なる検討が必要であろう.

本研究により沖縄県における RSV 感染症の分子疫学の一端を把握することができた. しかし, ARIs の全体像を理解するためには, さらに詳細な研究が必要である.

V 参考文献

- 1) Collins, P.L. and Crowe, J.E., Jr. (2007) Respiratory syncytial virus and metapneumovirus. P. 1601-1646. In D.M. Knipe and P.M. Howley (ed), *Fields Virology*. vol. 1. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- 2) 堤裕幸(2005) RS ウイルス感染症. *感染症学雑誌*, 79 : 857-863.
- 3) National Institute of Infectious Diseases and Tuberculosis and Infectious Diseases Control Division, Ministry of Health, Labour and Welfare (2008) Respiratory syncytial virus infection, as of September 2008. *Infect. Agents Surveillance Rep.*, 29:271-273
- 4) 中村正治・糸数清正・平良勝也・玉那覇康二・稲福恭雄・

- 古謝由紀子・桑江なおみ(2008)沖縄県における過去3年間のRSウイルス感染症流行状況. 病原微生物検出情報, 29:278-279
- 5) Peret, T.C., Hall, C.B., Schnabel, K.C., Golub, J.A., Anderson, L.J. (1998) Circulation Patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. *J. Gen. Virol.*, 79:2221-2229.
- 6) Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007) Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24:1596-1599.
- 7) Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Biol. Evol.*, 4:406-425.
- 8) Parveen, S., Sullender, W.M., Fowler, K., Lefkowitz, E.J., Kapoor, S.K., Broor, S. (2006) Genetic variability in the G protein gene of group A and B respiratory syncytial viruses from India. *J. Clin. Microbiol.*, 44:3055-3064.
- 9) Reiche, J. and Schweiger, B. (2009) Genetic variability of group A respiratory syncytial virus strains circulating in Germany from 1998 to 2007. *J. Clin. Microbiol.*, 47:1800-1810.
- 10) Trento, A., Galiano, M., Videla, C., Carballal, G., Garcia-Barreno, B., Melelo, J.A., Palomo, C. (2003) Major changes in the G protein of human respiratory syncytial virus isolates introduced by a duplication of 60 nucleotides. *J. Gen. Virol.*, 84:3115-3120
- 11) 平良勝也・仁平稔・大野惇・糸数清正・岡野祥(2008) 2005/06 シーズン夏季のインフルエンザの流行-沖縄県. 病原微生物検出情報, 27:304-305.