

## 埼玉県におけるRSウイルス検出状況及び遺伝子解析結果

小川泰卓 富岡恭子 鈴木典子 峯岸俊貴 青沼えり  
中川佳子 内田和江 篠原美千代 岸本剛

Detection and Phylogenetic Analysis of Respiratory Syncytial Virus in Saitama

Yasutaka Ogawa, Kyoko Tomioka, Noriko Suzuki, Toshitaka Minegishi, Eri Aonuma,  
Keiko Nakagawa, Kazue Uchida, Michiyo Shinohara, and Tsuyoshi Kishimoto

### はじめに

RSウイルス (Respiratory Syncytial Virus, 以下 RSV) は、急性呼吸器症状を引き起こすウイルスであり、下気道感染症の主要な原因ウイルスである。乳幼児では重症化しやすく、乳幼児における肺炎の約50%、細気管支炎の約50~90%がRSVによるとされ、公衆衛生上重要なウイルスである<sup>1)</sup>。主要抗原の一つであるG蛋白の多様性により2つのサブグループ (RSV-A及びRSV-B) に分類され、さらにRSV-Aは11、RSV-Bは22の遺伝子型に細分類される<sup>2)</sup>。

埼玉県における感染症発生動向調査事業においては、2016年4月の改正感染症法全面施行に伴いRSV感染症を定常調査対象疾患に定め積極的な検体収集を行ったことで、法改正以前に比べRSV感染症検体が大幅に増加した。そこで今回、2015年1月から2018年3月の埼玉県におけるRSVの検出状況及び埼玉県で検出されたRSVの分子生物学的特徴とRSV感染症の流行状況との関連を検討したので報告する。

### 材料

#### 1 RSV 感染症患者発生状況

感染症発生動向調査事業により2015年1月から2018年3月の期間に、全国及び埼玉県の小児科定点医療機関から報告されたRSV感染症患者報告数を使用した。

#### 2 RSV 検出状況

感染症発生動向調査事業により2015年1月から2018年3月の期間に、埼玉県の小児科病原体定点でRSV感染症と診断された患者から採取された呼吸器検体 (咽頭拭い液、鼻腔拭い液及び鼻汁、以下RSV感染症検体という) 180検体を材料とした。患者の疫学情報は検体とともに提出された調査票より収集した。

#### 3 塩基配列の決定及び分子疫学解析

前項2のRSV感染症検体のうちRSV遺伝子陽性であった161検体に加え、RSV感染症以外の疾患と診断され、ウイルス検索によりRSVが検出された13検体を材料とした。さらに、過去からの流行ウイルスの遺伝子型の推移を把握する

ことを目的として、当所に保存されていた1995年から2014年に採取されたRSV陽性検体45検体及び分離株30株についても、遺伝子型別を行った。

### 方法

#### 1 RSV 感染症患者発生状況の観察

埼玉県及び全国のRSV感染症患者定点報告数とRSV感染症検体からのRSV検出数の推移を比較、観察した。

#### 2 RSV の検出及び患者疫学情報の収集

##### (1) 疫学情報の収集

RSV感染症検体とともに提出された調査票より、患者の年齢、性別、臨床症状、発生の状況等の疫学情報を収集した。

##### (2) 培養細胞によるRSVの分離

RSV感染症検体の遠心上清100µlをFL細胞及びMRC-5細胞に接種し、2週間培養し細胞変性効果(CPE)を観察した。CPEが確認されなかった細胞は盲継代をし、さらに2週間観察した。CPEが確認された細胞については、培養上清を遺伝子検査に供試した。

##### (3) ウイルス核酸抽出及び逆転写反応によるcDNAの作製

QIAamp Viral RNA mini Kit(QIAGEN)またはEZ1 Virus Mini Kit v2.0(QIAGEN)を用いて、RSV感染症検体又は培養上清からウイルス核酸を抽出し、PrimeScript RT reagent kit(TAKARA BIO)を用いて逆転写反応を行い、cDNAを作製した。核酸抽出及び逆転写反応は、それぞれの製品説明書に従い行った。

##### (4) リアルタイムPCR

プライマー及びプローブはHuら<sup>3)</sup>が報告したのものを用いた(表1)。TaqMan™ Universal PCR Master Mix(Thermo Fisher Scientific)25µlにフォワードプライマー及びリバースプライマーを終濃度0.5µMに、プローブを終濃度0.2µMになるようそれぞれ添加し、ジエチルピロカーボネート(DEPC)処理水を加え45µlとした後、cDNAを5µl加えた。

表1 リアルタイムPCR用プライマー及びプローブ配列

用途	名称	配列(5'-3')	position※
リアルタイムPCR RSV-A	A21	GCT CTT AGC AAA GTC AAG TTG AAT GA	1144-1169
	A102	TGC TCC GTT GGA TGG TGT ATT	1225-1205
	APB48	FAM- ACA CTC AAC AAA GAT CAA CTT CTG TCA TCC AGC -TAMRA	1171-1203
リアルタイムPCR RSV-B	B17	GAT GGC TCT TAG CAA AGT CAA GTT AA	1139-1164
	B120	TGT CAA TAT TAT CTC CTG TAC TAC GTT GAA	1242-1213
	BPB45	FAM- TGA TAC ATT AAA TAA GGA TCA GCT GCT GTC ATC CA -TAMRA	1166-1200

※RSV-A:A2株(KT992094) RSV-B:B1株(AF013254) に基づく

表2 conventional PCR用及びシーケンス用プライマー配列

用途	名称	サブグループ	配列(5'-3')	position※
conventional PCR	ABG490	AB共通	ATG ATT WYC AYT TTG AAG TGT TC	5170-5192
	F164	AB共通	GTT ATG ACA CTG GTA TAC CAA CC	5834-5812
シーケンス	AG655	A	GAT CYC AAA CCT CAA ACC AC	5328-5347
	BG517	B	TTY GTT CCC TGT AGT ATA TGT G	5197-5218
	F1	AB共通	CAA CTC CAT TGT TAT TTG CC	5670-5651

W:A or T, Y:C or T

※サブグループA及びAB共通:A2株(KT992094) サブグループB:B1株(AF013254) に基づく

反応条件は、50℃ 2分、95℃ 10分の初期反応後、95℃ 15秒、60℃ 1分の反応を45サイクル行った。

## 結果

### 3 RSV 分子疫学解析

#### (1) conventional PCR

プライマーはParveenら<sup>4)</sup>が報告したものをを用いた(表2).Premix Taq<sup>TM</sup>(Ex Taq<sup>TM</sup>Version 2.0)(タカラバイオ)25μlにフォワードプライマー及びリバースプライマーを終濃度0.5μMになるようそれぞれ添加し、DEPC処理水を加え45μlとした後、cDNAを5μl加えた。反応条件は、94℃ 1分の初期反応後、94℃ 40秒、50℃ 45秒、72℃ 45秒の反応を35サイクル行い、最終伸長反応を72℃ 5分行った。増幅産物は、電気泳動により目的サイズの遺伝子増幅を確認した。

#### (2) 塩基配列の決定及び分子疫学解析

PCRにより得られた増幅産物をExoSAP-IT Express PCR Cleanup Reagents(Thermo Fisher Scientific)又はQIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN)を用いて精製し、BigDye Terminator V1.1 Cycle Sequencing Kit(Thermo Fisher Scientific)を用いてサイクルシーケンス反応後、3500 Genetic Analyzer(Thermo Fisher Scientific)で塩基配列を決定した。なお、シーケンス用プライマーにはParveenら<sup>4)</sup>及びPeretら<sup>5)</sup>が報告したものをを用いた(表2)。

得られた塩基配列はBLAST検索による相同性解析及び近隣結合法により分子系統樹を作成し、遺伝子型別を行った。解析には、G蛋白C末端超可変領域の塩基配列(RSV-A:237塩基、ただし、遺伝子型ON1は309塩基、RSV-B:264塩基、ただし、遺伝子型BAは324塩基)を用いた。

なお、本研究は埼玉県衛生研究所倫理審査委員会の承認を得て行った。

#### 1 RSV感染症患者発生状況

2015年1月から2018年3月までの埼玉県及び全国の週別RSV感染症患者報告数を図1,2に示した。

埼玉県では2015年は36週(9月第1週)から報告数が増加し始め、49週(12月第1週)に流行のピークに達した後、報告数は2月にかけて減少した。2016年は31週(8月第1週)から報告数が増加し始め、2015年より2か月早い40週(10月第1週)に流行のピークに達した。全国的には年末にかけ徐々に報告数が減少していったが、埼玉県ではピークを迎えた後に急速に報告数が減少した。2017年は27週(7月第1週)から報告数が増加し始め、2016年よりさらに1か月早い35週(8月第4週)にピークを迎え、集計開始以降もっとも早く、もっとも大きい流行になった。ピークに達した後、報告数は減少したものの、これまでと比較して非流行期としては報告数がやや多い状態が2018年3月まで続いた。

#### 2 RSVの検出及び患者疫学情報

##### (1) 患者疫学情報

RSV感染症検体180検体の疫学情報をまとめた。性別は男性101名(56.1%)、女性79名(43.9%)でやや男性が多かった。年齢は、1か月から12歳11か月まで、中央値1歳4か月、平均値1歳7か月であった。年齢構成は1歳未満が60名(33.3%)、1歳が71名(39.4%)、2歳が31名(17.2%)、3歳以上が18名(10.0%)であった。症状は発熱が156名(86.7%)平均38.8℃、下気道症状(肺炎又は気管支炎)が165名(91.7%)に認められた。発生の状況は、散発111名(61.7%)、家族内感染19名(10.6%)、地域流行19名(10.6%)、保育所28名(15.6%)、その他3名(1.1%)であった。海外渡航歴は全例でなかった。

表3 月別RSV検出状況

検出ウイルス	年 月	2015						2016						計					
		1-8	9	10	11	12	計	1-3	4	5	6	7	8		9	10	11	12	計
RSV-A				1	3		4		1			1	4	6	7	2	1		22
RSV-B					1	4	5		3			2	4	6	10	15	5	3	48
その他ウイルス			1				1		5	2	1	1	1						10
陰性																1			1
合計		0	1	2	7	0	10	0	9	2	4	9	13	18	17	6	3		81

検出ウイルス	年 月	2017												計	2018				計
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		1	2	3	計	
RSV-A		2			1	2	2	2	11	10	7	12	3	3	55	5	2	3	10
RSV-B		4	2	1	2		1	1			3	1			15			2	2
その他ウイルス												3	1		4	1			1
陰性										1					1			1	1
合計		6	2	2	4	2	3	12	10	11	16	4	3	75	6	2	6		14

(2) RSV検出状況

月別のRSV検出数及びRSV以外のウイルス検出数の推移を表3及び図3に示した。

2015年は10検体が搬入され9件のRSVが検出された。流行の拡大に併せて11月にRSVが7件と最も多く検出された。サブグループ別では、検出されたRSV 9件のうちRSV-Aが4件、RSV-Bが5件検出された。

2016年は法改正の影響により、検体数が大幅に増加した。81検体が搬入され、70件のRSVが検出された。4月、5月には合わせて11検体が搬入されRSVが4件検出されたが、残りの7件からはライノウイルスやボカウイルスなどRSV以外の呼吸器感染症ウイルスがより多く検出された。RSVの検出数は7月から増加し、9月には18件検出され最大となった。11月以降には検出数は減少した。サブグループ別では検出されたRSV 70件のうちRSV-Aが22件、RSV-Bが48件とRSV-Bが68.6%を占めた。月別では、9月まではほぼ半数ずつの検出であったが、流行のピークを迎えた10月にはRSV-Bが88.2%と大部分を占めた。

2017年は75検体が搬入され、70件のRSVが検出された。流行の始まった7月から検出数が増加した。サブグループ別では、RSV-Aが55件、RSV-Bが15件検出された。検出数の増加した7月以降はRSV-Aが92.3%と大部分を占めた。

2018年は3月までに14検体が搬入され、RSV-Aが10件、RSV-Bが2件検出された。

3 RSV分子疫学解析

RSV-A及びRSV-Bの分子系統樹をそれぞれ図4, 5に示した。

RSV-Aは解析の結果、6つの遺伝子型に分類された。検出年の古い順から、GA2 (1995年)、GA7 (1997年から2002年)、GA5 (2000年から2004年)、NA2 (2002年から2006年)、NA1 (2006年から2014年)、ON1 (2013年から) で、現在主流のON1は2013年から検出されはじめ、2015年以降は全てON1であった。2017年までの検出株は、系統樹上で大きな変化は認められなかった。しかし、2018年の検出株10株のうち5

株は、系統樹上でやや離れた場所にまとまって位置した(図4中のクラスターA)。これらの株は2011年12月及び2012年1月にインドで検出された株と最も相同性が高く、次いで2013年1月にフィリピンで検出された株と相同性が高かった。

RSV-Bは解析の結果、8つの遺伝子型に分類された。検出年の古い順に、GB4 (1995年から1996年)、GB3 (1995年から2000年)、SAB3 (2000年)、BA8 (2007年)、BA10 (2007年から2012年)、BA9 (2008年から)、BA12 (2009年)、BA13 (2011年から2012年) で、現在主流のBA9は2008年から検出され、2013年以降は全てBA9であった。検出されたBA9株は系統樹上で大きな変化は認められなかった。なお、2001年から2006年の間はRSV-Bの検出がなかったため情報が得られなかった。

考察

埼玉県で検出されたRSVの分子生物学的特徴とRSV感染症の流行状況との関連を明らかにするため、検出されたRSVの分子疫学解析を行った。

RSVのサブグループ別の検出状況は、2015年は搬入検体数が少なく、年間を通しての流行状況は不明であったが、報告数が増加した11月にはRSV-A、RSV-Bがほぼ半数ずつ検出され、混合流行の可能性が推察された。2016年は9月までは2015年と同様にRSV-AとRSV-Bはほぼ半数ずつの検出であったが、流行のピークを迎えた10月にはRSV-Bが88.2%と大部分を占めた。RSV-Aの流行は9月でおさまり、10月からはRSV-Bが主体の流行に変化したことが示唆された。この傾向は全国的にも同様であった<sup>6)</sup>。2017年は検出数の増加した7月以降はRSV-Aが92.3%と大部分を占め、一度流行のおさまったRSV-Aが再び流行したと考えられた。2018年は3月までは、2017年と同様にRSV-Aが大部分を占めている状況であった。このような詳細な流行状況は、搬入検体数が増加したことで初めて明らかとなった。

1995年から2014年の埼玉県における流行ウイルスの状況

は、検体数が少ないことに加え、2003年頃まではサブグループの同定がされていなかったため詳細は不明であった。今回、改めて同定を行ったところ、国内の報告とほぼ同様の傾向で流行サブグループが変化していることが確認された(データ示さず)。また、1年から3年のうちに流行サブグループが変化していることが認められた。

分子疫学解析の結果、RSV-Aは6つの遺伝子型に分類された。現在主流のON1はNA1から進化した新しい遺伝子型で、2010年にカナダで初めて検出され<sup>7)</sup>、G蛋白C末端第二可変領域に72塩基(24アミノ酸)のリピート配列を有している。日本では、2012年に千葉県、栃木県、神奈川県及び山口県でON1が検出された<sup>8)</sup>。埼玉県では2013年に初めて検出され、2015年以降はそれまでの主要遺伝子型であったNA1に置き換わり、検出されたRSV-Aは全てON1であった。系統樹上でやや離れた場所に位置した2018年の検出株5株(図4中のクラスターA)については、今後更なる解析が必要であり、また、この株の流行が拡大するか監視をする必要がある。

RSV-Bは8つの遺伝子型に分類され、現在主流のBA9は埼玉県では2008年に初めて検出された。2008年から2012年まではBA9以外の遺伝子型も検出されたが、2013年以降は全てBA9に置き換わった。RSV-Bは複数の遺伝子型が同時に検出された年が多く、中でも2007年から2012年の間で5つの遺伝子型が検出された。一方、RSV-Aは単独の遺伝子型のみが検出される傾向があった。

埼玉県のRSV感染症患者の発生状況は、2015年以降は全国と同様の傾向であった。RSV感染症は例年、季節性インフルエンザに先駆けて秋頃から流行が拡大し、12月頃にピークを迎えその後終息に向かうことが知られているが、数年前より夏から秋にかけても患者が増加することが報告されている<sup>9)</sup>。埼玉県でも2012年からその傾向がみられ、2016年、2017年は明らかに流行が早く始まった。流行の早かった2016年、2017年の検出株と例年通りのピークであった2015年の検出株は系統樹上で大きな変化は認められなかった。このことから、流行の前倒しの原因については、今回解析したG蛋白C末端領域との関連は低い可能性が示唆された。一方、Shobugawaらは夏季のRSVの流行には、気温が高く、かつ相対湿度が高いことが必要であると報告した<sup>9)</sup>。亜熱帯気候に属する沖縄では、RSVの流行は夏季にあることから、九州以北においても温暖化等の影響でRSVの流行パターンが変化している可能性が考えられた。今後も流行状況の変化を注視する必要がある。

RSV感染症の流行を早期に、あるいは事前に探知することは、RSV感染症の予防の観点から重要である。現在、抗RSV-F蛋白単クローン抗体であるバリビズマブが先天性心疾患等を持つハイリスク児を対象にRSV感染症の重症化予防のために用いられている。感染予防対象者は、RSV感染症の流行開始前に本剤の血清中濃度を有効濃度以上に高めておく必要がある。近年のRSV感染症の流行開始時期の早まりを受けて、「日本におけるバリビズマブの使用に関するガイドライン」<sup>10,11)</sup>の投与計画の項目が、「各年度のRSV流行時期は年

度によって変動している。さらに、地域差があり都道府県において流行開始時期にばらつきがあることから、感染症発生動向調査等、入手し得るデータを参考に投与開始時期を決定することが重要である。」と改訂された(2018年4月)。この改訂により感染症発生動向調査が明記され、RSV感染症に関する情報提供が今後さらに重要になると考えられる。また、今後の研究成果や感染症発生動向調査による患者報告及び病原体解析のデータに基づいた、RSV感染症の流行予測プログラム等の開発が望まれる。

RSVは2歳までにはほぼ100%の人が感染し、そのうち20~30%で下気道症状が出現するとされ、その後、生涯を通して再感染が起こるが、年長の子や成人では重症となることは少ない<sup>1)</sup>。本研究における患者の年齢構成は2歳未満が72.3%を占め、この年齢の患者はRSVの初感染と推測される。下気道症状の出現割合を比較すると、本研究では91.2%に下気道症状が認められており、前述の20~30%と比べて非常に高い割合となった。この理由として、下気道症状の有無がRSV感染症を疑う条件の一つとなっており、下気道症状のある患者に検体採取が偏ってしまった可能性が考えられた。

RSVは1~2年おきに流行するサブグループが入れ替わり、また数年おきに新しい遺伝子型のウイルスが流行する。新しい遺伝子型又はその候補が報告されているが<sup>12-15)</sup>、今回行ったG蛋白C末端領域の解析結果からは、埼玉県において新たな遺伝子型の流行は認められなかった。しかし、新規遺伝子型は病原性あるいは重症化に関与する可能性があり、新規遺伝子型の出現や流行ウイルスの変化を監視し、県民や医療機関に情報提供することは、とりわけ小児医療の領域で有用である。そのため、今後も継続的に病原体情報の収集・解析を行っていく必要がある。

## 文献

- 1) 国立感染症研究所: IDWR 2017年第34週 注目すべき感染症 RSウイルス感染症, 19(34), 8-10, 2017
- 2) 木村博一, 野田雅博, 石和徳, 他: IASR 2014年6月号 RSウイルスの臨床ウイルス学, 35(6), 139-140, 2014
- 3) Hu A, Colella M, Tam JS et al. : Simultaneous detection, subgrouping, and quantitation of respiratory syncytial virus A and B by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), 149-54, 2003
- 4) Parveen S, Sullender WM, Fowler K et al. : Genetic variability in the G protein gene of group A and B respiratory syncytial viruses from India. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(9), 3055-64, 2006
- 5) Peret TC, Hall CB, Schnabel KC, et al. : Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. *Journal of General Virology*, 79(9),

2221-9, 1998

6) 齋藤玲子, 田邊郁望, 日比野亮信:RSウイルスサーベイランス手法の開発 -2016-17年シーズンの本邦におけるRSウイルスの分子疫学研究-, 新興・再興感染症の発生に備えた感染症サーベイランスの強化とリスクアセスメント 厚生労働科学研究費補助金 (新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業) 平成28年度 総括・分担研究報告書 (研究代表者 松井珠乃), 164-169, 2017

7) Eshaghi A, Duvvuri VR, Lai R, et al. : Genetic variability of human respiratory syncytial virus A strains circulating in Ontario: a novel genotype with a 72 nucleotide G gene duplication. *PLoS ONE*, 7(3), e32807, 2012

8) Hiroyuki Tsukagoshi, Hajime Yokoi, Miho Kobayashi et al. :Genetic analysis of attachment glycoprotein (G) gene in new genotype ON1 of human respiratory syncytial virus detected in Japan. *Microbiol Immunol*, 655-659, 2013

9) Shobugawa Y, Takeuchi T, Hibino A, et al. : Occurrence of human respiratory syncytial virus in summer in Japan. *Epidemiology & Infection*, 145(2), 272-284, 2017

10) パリビズマブの使用に関するガイドライン作成検討委員会:日本におけるパリビズマブの使用に関するガイドライン. 日本小児科学会雑誌, 106(9), 1288-1292, 2002

11) 日本小児科学会 予防接種・感染症対策委員会:「日本におけるパリビズマブの使用に関するガイドライン」の一部改訂について. 2018年4月

12) Baek YH, Choi EH, Song MS, et al. : Prevalence and genetic characterization of respiratory syncytial virus (RSV) in hospitalized children in Korea. *Archives of Virology*, 157(6), 1039-1050, 2012

13) Hirano E, Kobayashi M, Tsukagoshi H, et al. : Molecular evolution of human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein (G) gene of new genotype ON1 and ancestor NA1, *Infection, Genetics and Evolution*, 28, 183-191, 2014

14) Auksornkitti V, Kamprasert N, Thongkomplew S, et al. : Molecular characterization of human respiratory syncytial virus, 2010-2011: identification of genotype ON1 and a

new subgroup B genotype in Thailand., *Archives of Virology*, 159(3), 499-507, 2014

15) Ren L, Xiao Q, Zhou L, et al. : Molecular characterization of human respiratory syncytial virus subtype B: a novel genotype of subtype B circulating in China. *Journal of Medical Virology*, 87(1), 1-9, 2015

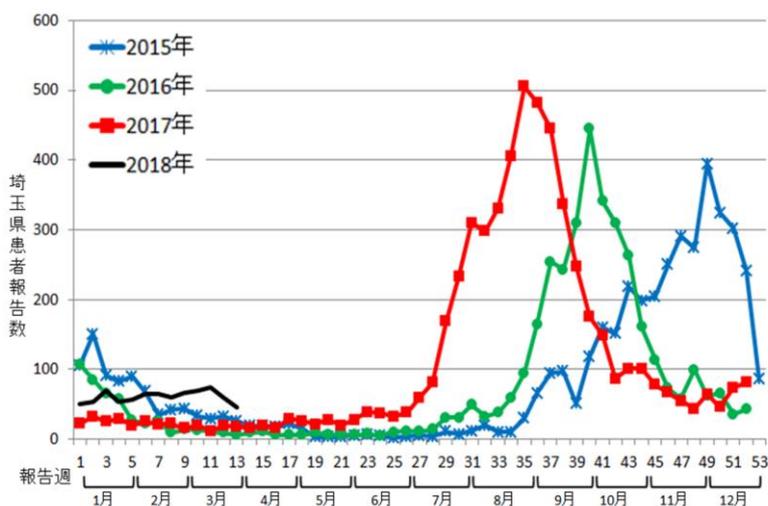


図1 月別RSV感染症患者報告数(埼玉県)

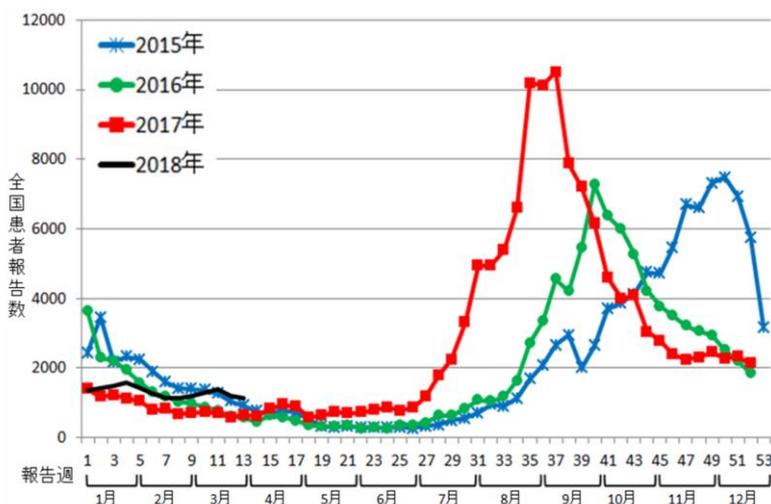


図2 月別RSV感染症患者報告数(全国)

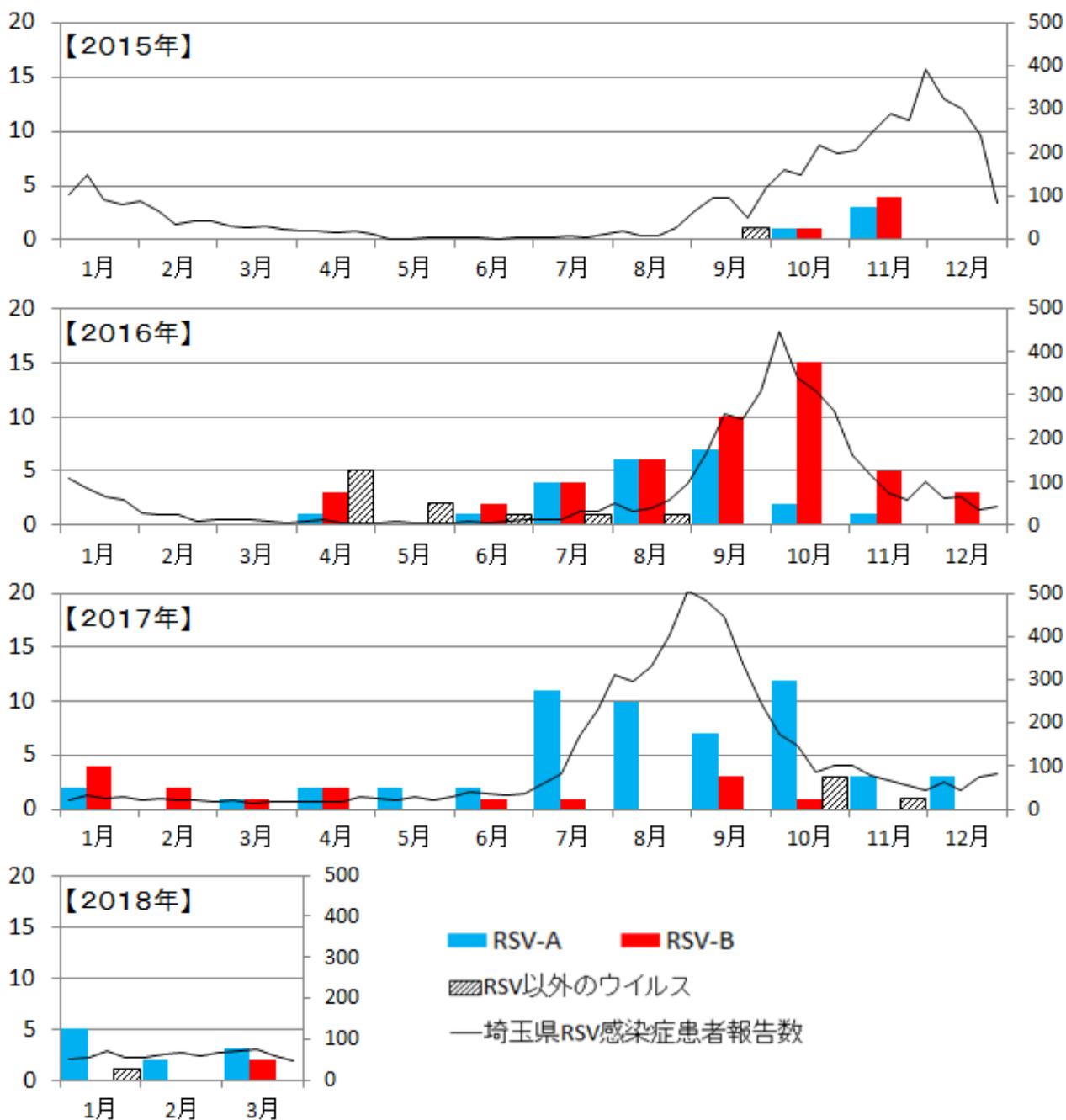


図3 月別のRSV及びRSV以外のウイルス検出数の推移  
 (縦軸左側：ウイルス検出数 縦軸右側：埼玉県RSV感染症患者報告数)

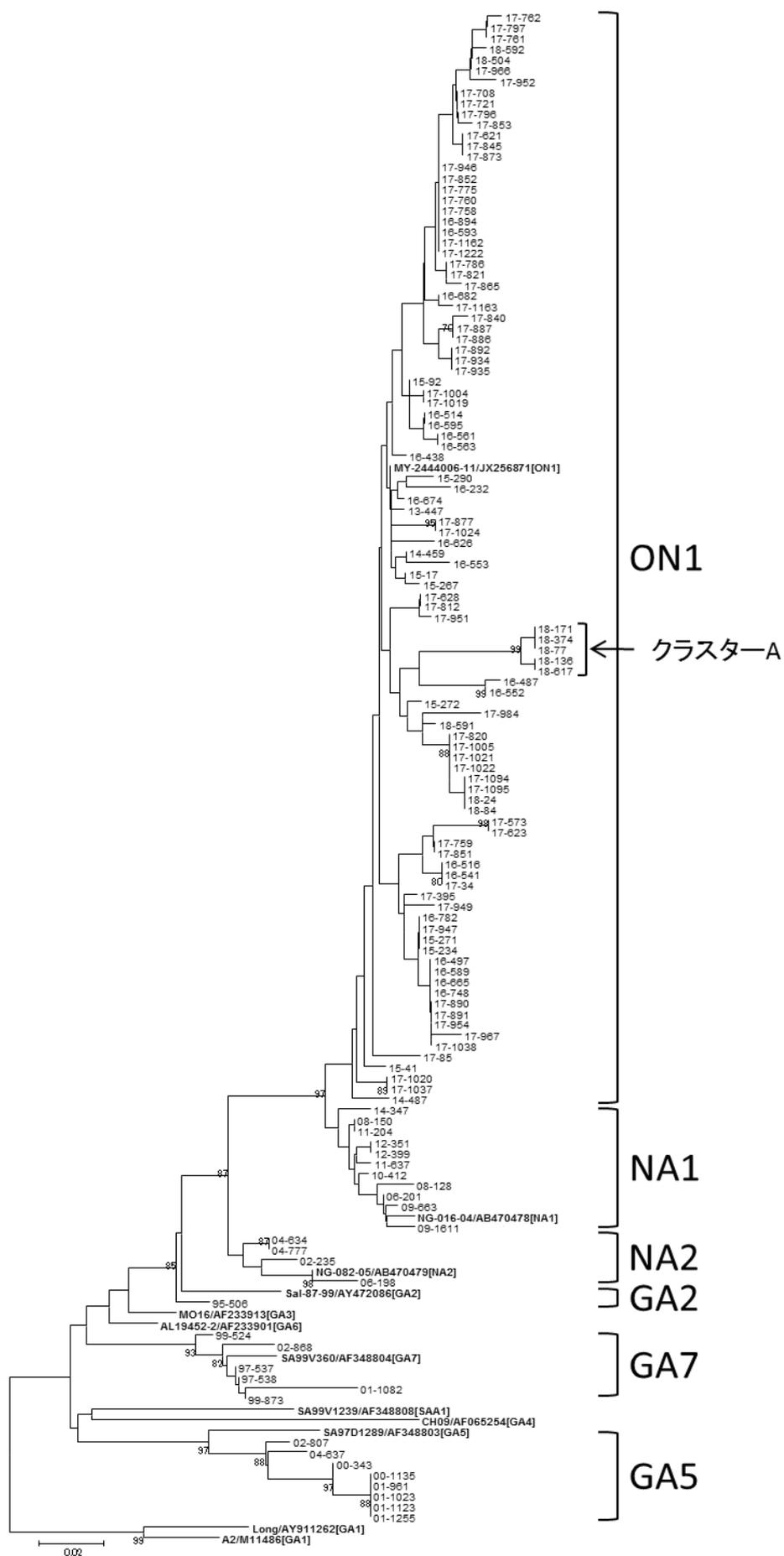


図4 RSV-A分子系統樹(近隣結合法) 237塩基(ただしON1は309塩基)を解析に用いた  
 埼玉県検出株:採取年-検体番号 参照株(太字):株名/登録番号[遺伝子型] クラスターA:本文参照

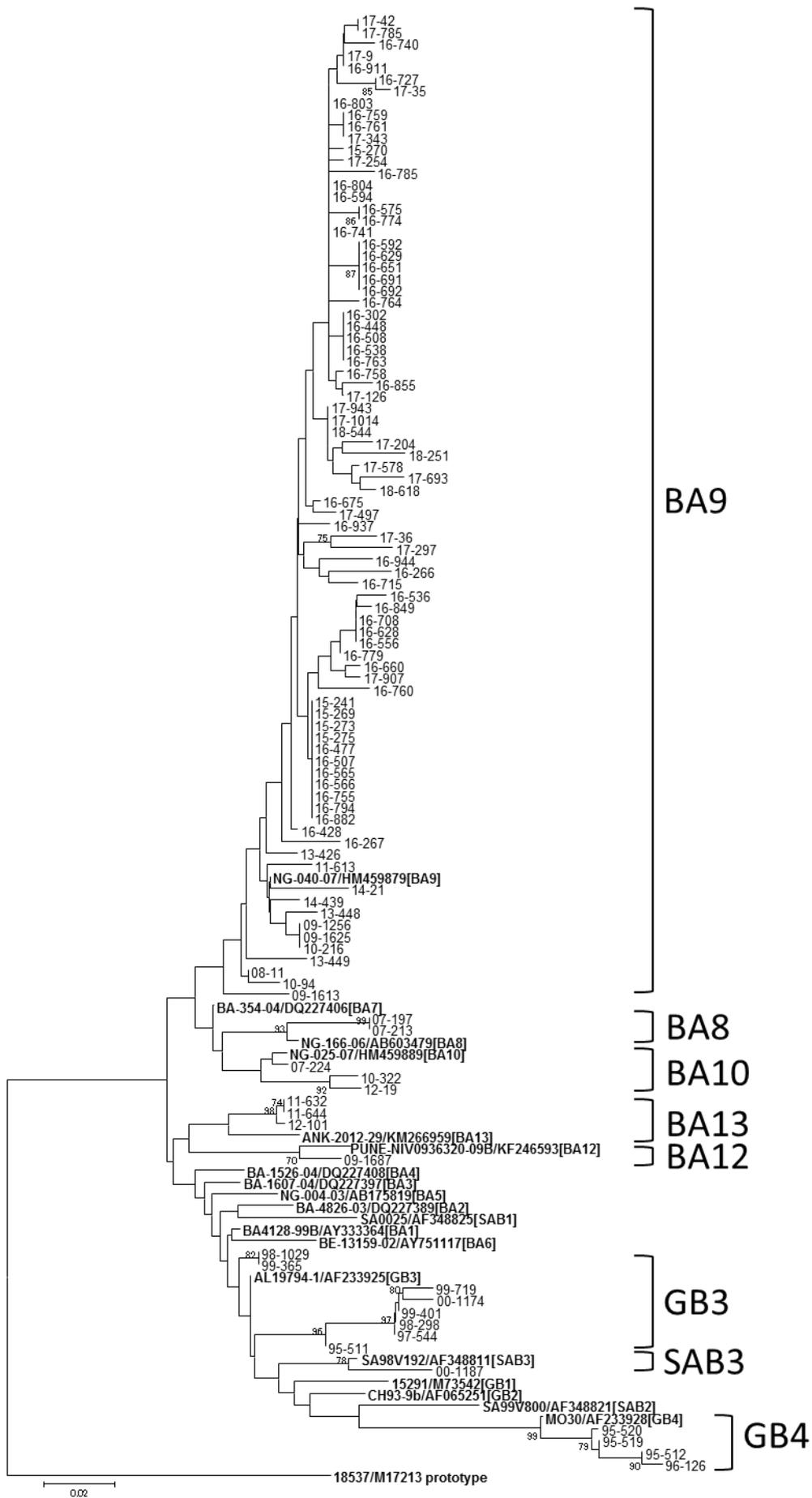


図5 RSV-B分子系統樹(近隣結合法) 264塩基(ただしBAは324塩基)を解析に用いた埼玉県検出株:採取年-検体番号 参照株(太字):株名/登録番号[遺伝子型]