

高齢者福祉施設において発生した急性呼吸器感染症集団発生事例におけるウイルス検査について

○吉富秀亮、芦塚由紀、中村麻子、小林孝行、梶原淳陸、香月進（福岡県保健環境研究所）
黒田誠（国立感染症研究所）

1. はじめに

2018年1月、福岡県内の高齢者福祉施設において、C群ライノウイルスが原因と推定される急性呼吸器感染症の集団発生事例が発生したので、ウイルス検査の概要を報告する。

2. 経過

1月11日、管轄保健所に高齢者福祉施設（入所者45名、職員46名）において、複数の入所者が発熱又は呼吸器症状を呈しているとの報告があった。管轄保健所は感染症集団感染事例として、原因究明及びまん延防止のため、健康調査及び疫学調査を行った。

同月12日、患者10名（すべて入所者、入院患者4名を含む、79歳～97歳、男性1名、女性9名）から咽頭ぬぐい液10検体が採取され当所に搬入された。当所は、後述する呼吸器マルチプレックスPCR法を用いて、16種類の呼吸器ウイルスを対象にした網羅的な遺伝子検査を行った結果、ウイルスは検出されなかった。

同月22日、同10検体を国立感染症研究所に送付し、行政検査依頼により次世代シーケンサー検査法によるウイルス探索が実施された。

同月29日、次世代シーケンサー検査の結果、10検体中1検体からライノウイルスの3Dpol遺伝子配列を検出したとの報告を受けた。当所は検査対象をライノウイルスに絞り、より高感度なライノウイルスNested RT-PCR法を行った結果、10検体中2検体からC群ライノウイルス遺伝子が検出され、441bpを決定した。

同月31日、決定された441bpに基づき、さらに高感度なC群ライノウイルス特異的Nested RT-PCR法を新規に構築し再検査した結果、10検体中8検体からC群ライノウイルス遺伝子が検出され、310bpが100%一致した。C群ライノウイルスが検出された8名のうち4名は入院患者であった。さらに同日、2名の患者から咽頭ぬぐい液が採取され、同法を用いて検査した結果、C群ライノウイルスは検出されなかった。

2月1日、本事例の原因はC群ライノウイルスと推定され、1月19日以降に新たな発症者がいないことやウイルスの潜伏期間等を考慮し、終息したと判断された。

図：ウイルス検査の経過（黒丸は検査実施日を示す）

ウイルス検査の方法	結果	日付 (1月)										(2月)				
		(探知日)	11日	12日	...	22日	23日	24日	25日	26日	...	29日	30日	31日	(終息日)	
1 呼吸器マルチプレックスPCR法	0/10		●													
2 次世代シーケンサー検査法	1/10				送付		●	●	●			結果受領				
3 ライノウイルスNestedPCR法	2/10											●	●			
4 C群ライノウイルス特異的NestedPCR法	8/10													●	●	

3. 臨床症状

初発有症者の発症日は1月4日と推定され、1月18日までに計43名（入所者39名、職員4名）が発症、8名が入院、2名（いずれも90代女性）が死亡した。有症者の年齢は入所者が66～98歳、職員が23～63歳であった。主な症状は、発熱、咳、痰、呼吸困難、喘鳴等の呼吸器症状であった。

4. ウイルス検査

本事例の検査は、4つの方法を用いた（図）。それぞれの検査法の特徴を記述する。

- ① 呼吸器マルチプレックスPCR法は、当所が開発した16種類の呼吸器系ウイルスを網羅的に検出する方法である。同法は2003年にSARSコロナウイルスによる重症呼吸器感染症が大流行したことから健康危機管理対策として開発された。同法は38本（19セット）のプライマーを用いて、インフルエンザウイルス（A, B, C）、パラインフルエンザウイルス（1, 2, 3, 4）、コロナウイルス（229E, OC43, NL63）、RSウイルス、ヒトメタニューモウイルス、ボカウイルス、アデノウイルス、ライノウイルス、クラミジア・ニューモニエ、マイコプラズマ・ニューモウイルスを検出する。ライノウイルスの検出プライマーは、反応性の異なる3セット（NCR1/NCR2, SRHI1/SRHI2, EVP4/OL68-1）が含まれている。

- ② 次世代シーケンサー検査法は、検査対象の病原体を限定することなく病原体の遺伝子を検出する方法である。同法は病原体の遺伝子変異の影響を受けず、病原体の塩基配列情報を得ることができる。一方、感度は通常のPCRと同程度であること、検査コストが高いこと等が課題として挙げられる。また、ヒトゲノム情報および常在細菌フローラを含む多量のデータが得られるため、病原体に特化し認証を得た鑑別診断ではない。そのため、NGS検査結果を解釈するためには感染症学の専門知識と経験を持ち合わせていることが望ましく、患者所見及び疫学情報を合わせ総合的に評価する必要がある。

- ③ ライノウイルスNested PCR法は、①に含まれるSRHI1/SRHI2プライマーセットに1本のプライマーを追加し、PCR反応を2回重ねて行う方法である（SRHI1/SRHI2→SRHI1/Nestrihi1）。2012年に当所が検討した結果では、①の方法に比べて約1万倍感度が高いことが示唆されている（第59回福岡県公衆衛生学会）。

- ④ C群ライノウイルス特異的Nested PCR法は、③によって解析されたC群ライノウイルスの塩基配列に基づき、特異的なプライマーを設計し、本事例において新規に構築された。同法の検出感度は他の方法（①～③）と比較して最も高いと考えられる。

5. ライノウイルスについて¹⁾

ライノウイルスは1957年に初めて分離された、ピコルナウイルス科ライノウイルス属に分類されるウイルスである。ライノウイルスは100種類以上の血清型が存在し、3つの遺伝子群（A, B及びC群）に分類される。A群とB群は細胞培養法により分離可能であるが、C群は分離不可能であると考えられている。

ライノウイルスは、小児を中心に普通感冒（かぜ）や気管支炎、肺炎を引き起こすことが知られている。主な臨床所見は鼻漏、鼻閉、くしゃみなどである。潜伏期は約1～4日である。急性の呼吸器系感染症の半数はライノウイルスによるものと考えられるが、症状は軽く一般には数日で軽快する。伝播様式は飛沫感染及び接触感染と考えられている。有効なワクチン・治療法は開発されていない。ライノウイルスはアルコール消毒薬に抵抗性があると言われていることから、集団発生事例においては飛沫感染対策に加え、消毒に次亜塩素酸ナトリウムを用いることも視野に入れる必要がある。

6. 総括

今回の事例はC群ライノウイルスを原因とする急性呼吸器感染症集団発生事例であることが推定された。C群ライノウイルスが原因と推定された感染症集団発生事例は珍しい。高齢者施設におけるA群ライノウイルスが原因と推定された集団感染事例は過去に報告されている²⁾³⁾。ライノウイルスは小児を中心に幅広い年代層が罹患する上気道炎の主な原因であるが、高齢者においては重症化し入院が必要となったり、死亡したりする場合もあることを考慮する必要がある。また、高齢者施設等において集団感染が発生した場合は、速やかに感染拡大防止対策を講じることが重要であると考えられる。

ライノウイルス感染症は感染症発生動向調査事業の対象ではないため、ライノウイルスの流行状況の性状の変化を把握することは困難である。当所が用いた呼吸器マルチプレックスPCR法は2008年頃に開発され、以後、高感度化のための改良を続けてきた。開発当時から、多種類が存在するライノウイルスの検出は困難であったため、予め3種類のプライマーセットが導入されていたが、本事例ではいずれも反応しなかった。この原因は、プライマー配列の相同性が低下していること、検体中のウイルス量が検出感度未満であったことが考えられた。これらのことから、今後はSinglePCR法ではなくNestedPCR法を用いることや、検出プライマー配列の見直しが必要であると考えられた。さらに、保健所における検体採取器材の整備状況の把握や統一された検体採取方法の周知等も必要であると考えられた。

最後に、本事例は本県において初めて次世代シーケンサーを活用して感染症集団発生の起因病原体を特定できた事例である。今回、国立感染症研究所が実施した次世代シーケンサー検査が原因解明のためのきっかけであった。当所は、次世代シーケンサー検査によりライノウイルスが検出された後、即時に新たな独自のプライマーセットを設計し、3日以内に再検査の結果を提示することができた。今後、集団感染事例発生時の初動検査において原因不明となった場合は、ウイルス・細菌を問わず検出可能な次世代シーケンサーの積極的な活用も一つの手段であることを認識する必要がある。

7. 謝辞 検体採取等調査にご協力いただきました医療機関の先生方、保健所等関係各位に深謝いたします。

8. 参考資料・参考文献

1) ライノウイルス検出マニュアル（平成21年7月） 2) 板持ら、病原微生物検出情報 37：179～180, 2016

3) 宮崎ら、病原微生物検出情報 38：129～130, 2016