

小児科外来におけるインフルエンザ様疾患患者からのウイルスの検出状況

西嶋陽奈、小倉惇¹⁾、堀田千恵美、平良雅克、追立のり子、秋田真美子、小川知子

The viruses detected from Influenza-like illness patients who came to the pediatric clinics

Haruna NISHIJIMA, Athushi OGURA, Chiemi HOTTA, Masakatu TAIRA, Noriko OITATE, Mamiko AKITA, Tomoko OGAWA

Summary

Children with symptoms of influenza, who are examined at the pediatric clinic, are tested for the influenzavirus by a simple test kit using a nasopharyngeal swab. In some cases, the influenzavirus is not detected, and these children are diagnosed with influenza-like illness (ILI). The purpose of this study was to investigate viruses other than the influenzavirus, in cases of respiratory symptoms in young children diagnosed as ILI. We examined 299 children diagnosed with ILI, who visited the pediatric clinic between April 2014 and March 2015. Nasopharyngeal swabs were collected from these cases. Viral nucleic acids were extracted from samples and amplified by PCR. We detected at least one type of virus agent in each of the 189 cases, with 247 viruses being detected overall. Viruses from the genus Enterovirus, for example human coxsackievirus A or human rhinovirus, were identified most commonly. Human coxsackievirus A was detected mainly in the summer of 2014, and human rhinovirus was detected through all the seasons of 2015. However, respiratory syncytial virus, human metapneumovirus, and human bocavirus did not show seasonal distribution. Furthermore, 47 cases showed co-detection with different viruses in the same patient. Human bocavirus were detected most commonly in 47 cases. In seventy-nine percent of cases that human bocavirus was detected, there were co-detected cases. We conclude that human bocavirus may be associated with co-infection in viral upper respiratory infections in children.

キーワード：インフルエンザ様疾患、小児科外来、鼻咽頭ぬぐい液、アデノウイルス、ヒトボカウイルス、エンテロウイルス属、ヒトメタニューモウイルス、RSウイルス、パラインフルエンザウイルス、重複検出

Key words: influenza like-illness, pediatric clinic, nasopharyngeal swab, adenovirus, human bocavirus, genus enterovirus, human metapneumovirus, respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, co-detection

(受付：平成28年7月6日、受理：平成28年9月29日)

はじめに

発熱、上気道炎や全身倦怠感などのインフルエンザ様症状を呈し、臨床的にインフルエンザを疑われながらも、インフルエンザウイルスが検出されない呼吸器感染症(以下、ILI)患者は通年存在する。特に小児の呼吸器感染症の頻度は、成人に比較し高く、関連するウイルスは多岐に渡る。しかし、小児科外来でインフルエンザウイルス以外の病原体を診断することは困難であり、年間相当数のインフルエンザ様の症例が原因不明となってしまう。さらに、成人では軽症で済む場合でも、小児では重症化することがあり問題になる。入院小児を対象とした重症呼吸器感染症から検

出されたウイルスは多い順に、RSウイルス(RSV)、エンテロウイルス(EV)属、ヒトメタニューモウイルス(hMPV)、ヒトボカウイルス(HBoV)と報告されている¹⁾。これら入院患者を中心としたウイルスの検出状況に比べて、小児科外来におけるウイルスの流行状況はほとんど把握されていない。入院に至らない患者のウイルス検出情報は、診断や治療の一助となり、情報を基に対応していくことは、特に小児の呼吸器感染症の重症化や流行拡大の防止に役立つと考える。

今回、ILI患者の検体からウイルスを検出し、若干の知見を得たので報告する。

1) 現：千葉県君津健康福祉センター

表 1 年齢別患者数とウイルス陽性患者数

年齢 (歳)	患者数 (名)	ウイルス陽性患者数 (名)
0	11	7
1	52	41
2	19	17
3	26	20
4	39	29
5	22	15
6	27	14
7	28	12
8	19	7
9	18	7
10	11	5
11	10	5
12	7	5
13	2	1
14	4	2
15	1	0
16	1	0
17	1	1
年齢不明	1	1
総計	299	189

対象と方法

小児科外来 2 施設 (2014 年 4 月～2015 年 2 月は 1 施設、2015 年 3 月～2016 年 3 月は 2 施設) の外来を受診した ILI 患者から、書面同意を得て鼻咽頭ぬぐい液を採取した。ILI 患者の症例定義は、発症後 24～72 時間以内の急性期に受診し、突然の発熱 (≥38℃) に加えて、上気道炎症状又は活動性の低下および倦怠感などの全身症状を呈するが、インフルエンザ簡易キットで陽性とならなかった者であつて、他の疾患に臨床診断されなかった者とした。

検出するウイルスは、アデノウイルス (AdV)²⁾³⁾、HBoV⁴⁾、エンテロウイルス (EV) 属 (ヒトライノウイルス (HRV)、コクサッキーウイルス A 群・B 群 (CA・CB) 等)⁶⁾⁷⁾、

hMPV⁸⁾⁹⁾、RSV⁸⁾¹⁰⁾、パラインフルエンザウイルス (PIV)¹¹⁾¹²⁾ の 6 種類とした。鼻咽頭ぬぐい液を検体として、High Pure Viral RNA Kit (Roche) で核酸を抽出し、realtime PCR および conventional PCR を実施した。使用したプライマーは、一部改変したものを含む。PCR 陽性検体は、Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit version 1.1 (Applied Biosystems) を用いたシークエンス法で塩基配列を決定し、Blast 検索により同定した。

調査票から得た年齢 (月齢まで)、性別、検体採取日の情報を加え、集計解析を行った。

本研究は、千葉県衛生研究所疫学倫理審査委員会の審査を経て実施した。

結果

1. ウイルスの検出状況

研究期間中に検体を提供した ILI 患者は 299 名であり、年齢幅は 0～17 歳、平均年齢は 5 歳 6 ヶ月 (中央値は 5 歳) であった。299 名のうち、189 名 (63%) の検体から対象としたウイルスが検出された (表 1)。299 名の男女比は 6 : 4 であり、ウイルスが検出された 189 名の男女比は 5 : 5 であった。

189 名の検体から検出されたウイルスは計 247 であった。2014 年 4 月～2015 年 2 月までは検体数が少なかったものの、2014 年 4～7 月には CA、PIV、HBoV の割合が高かった。2015 年 3 月～2016 年 2 月にかけては、2 施設から 6～52 の範囲で検体が得られた。2015 年 3 月～2016 年 1 月には AdV、HBoV、HRV、RSV が継続して、2015 年 7～10 月には CA が多く検出された (表 2)。

調査期間を通して検出されたウイルスとその患者数は、CA が 41 名 (11%)、HRV が 36 名 (10%)、AdV が 33 名 (9%)、HBoV が 28 名 (8%)、RSV が 25 名 (7%)、PIV

表 2 月別ウイルス検出状況

	2014年			2015年												2016年					合計				
	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月		12月	1月	2月	3月
CA			9	9	3	3	1						1			3	2	4	5				1		41
HRV		2	6				3					5	6	3			2	1	1	3	2		2		36
AdV		1	2	1	1								3	1	1	3	1	4	4	3		7	1		33
HBoV		2	9										1	3	2	2	1		2	1			5		28
RSV		1	1	1			1					1				1		2	4	4	2	6	1		25
PIV		1	5	8	3		1					1			2	1			1			1			24
hMPV	1											5	6			2			1			3	1		19
EV属型未同定													3			1	1	2	4	5	3	13	2		34
EVD68																			4						4
EchoV						1				1		1													3
陰性			4	4	2	3	1	2		2	2	9	8	6	3	2	4	5	11	10	5	22	5		110
検出ウイルス数	1	7	32	19	7	4	6			1		14	22	6	5	14	5	20	22	14	5	37	6		247

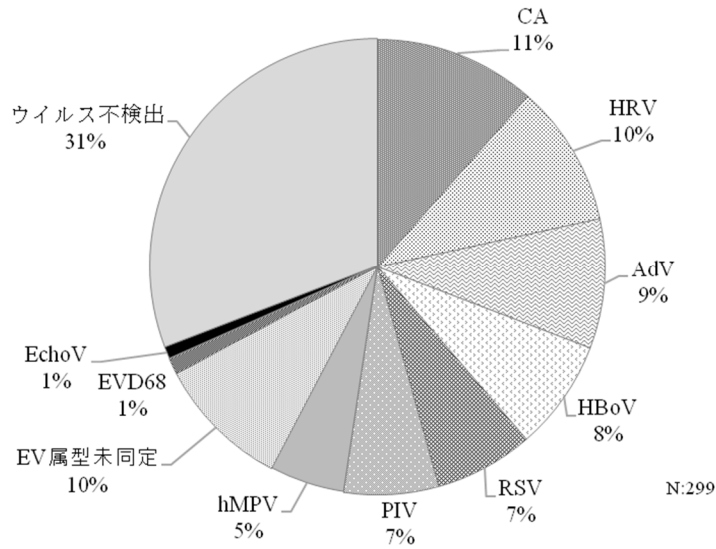


図1 各ウイルス検出状況

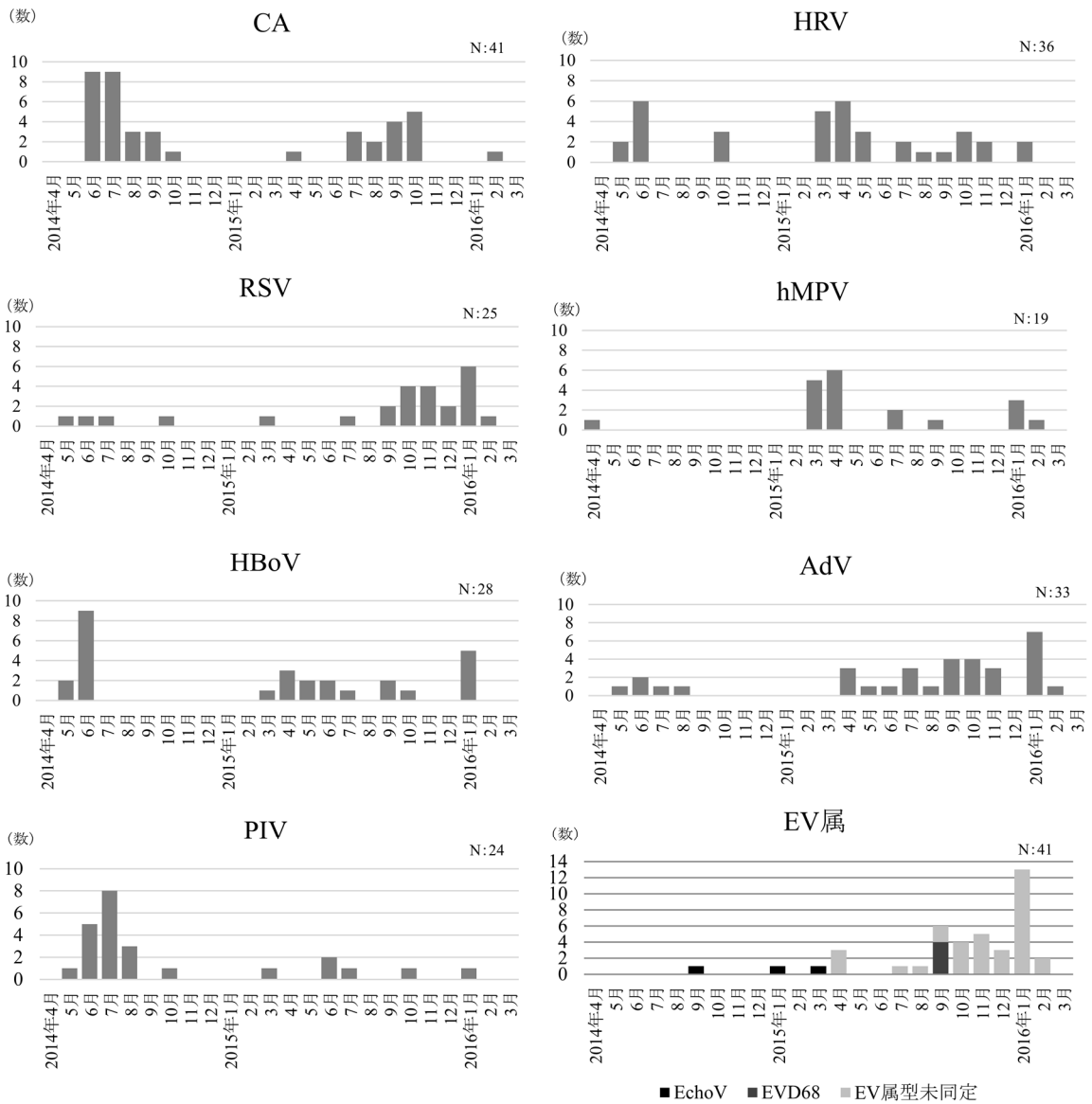


図2 各ウイルスの月別検出状況

が 24 名 (7%)、hMPV が 19 名 (5%)、EVD68 が 4 名 (1%)、エコーウイルス (EchoV) が 3 名 (1%)、EV 属型未同定が 34 名 (10%) であった。また、110 名 (31%) からは対象としたウイルスは検出されなかった (図 1)。

それぞれのウイルスについて、年月ごとの検出数を示した (図 2)。最も多かった CA は、2014 年 6~10 月、2015 年 7~10 月に集中して検出された。次いで多く検出された HRV は、2014 年は 6 月に 6 名から、2015 年 3 月~2016 年 1 月にかけては、連続的に 1~6 の範囲で検出された。2014 年は夏季に集中して CA が、2015 年は HRV が通年に渡り検出された。RSV は 2015 年 9 月以降毎月検出され、2016 年 1 月に 6 名からと最も多く検出された。hMPV は

2015 年 3~4 月で 11 名からの検出となり、2015 年 7、9 月 2016 年 1、2 月にも検出された。HBoV は 2014 年 6 月に 9 名からと多く、2015 年 3 月~2016 年 1 月にも継続して検出された。AdV は 2014 年 5~8 月、2015 年 4~11 月、2016 年 1、2 月に検出された。PIV は 2014 年 6~8 月に多く検出された。EV 属は EVD68 が 9 月に集中して 4 名から検出された。また、EV 属型未同定が 2015 年 9 月~2016 年 2 月にかけて多かった。

2. 重複検出

ウイルスが検出された 189 名のうち 47 名 (25%) で、1 検体から 2 種類以上、105 のウイルスが検出された。このうち、2 種類のウイルスが検出されたのは 36 名で、患者

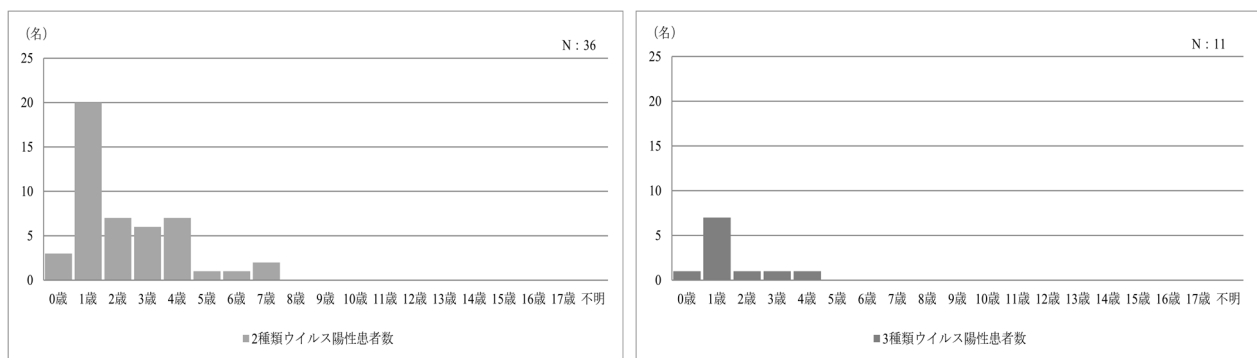


図 3 重複検出例の年齢患者分布

表 3 重複検出されたウイルスの組み合わせ

2種類陽性		3種類陽性	
組み合わせ	患者数 (名)	組み合わせ	患者数 (名)
HBoV+HRV	4	HBoV+HRV+RSV	1
HBoV+AdV	3	HBoV+HRV+AdV	1
HBoV+PIV	4	HBoV+CA+PIV	1
HBoV+hMPV	2	HBoV+AdV+CA	1
HBoV+EV属型未同定	2	HBoV+EV属型未同定+RSV	2
		HBoV+CA+RSV	1
AdV+CA	3	AdV+CA+PIV	1
AdV+RSV	2	AdV+RSV+HRV	1
AdV+hMPV	2	AdV+RSV+EV属型未同定	1
AdV+EVD68	2		
AdV+EV属型未同定	2		
AdV+PIV	1		
AdV+HRV	1		
CA+PIV	3	CA+RSV+HRV	1
CA+RSV	1		
HRV+hMPV	1		
HRV+RSV	1		
RSV+EV属型未同定	2		
	36		11

表4 各ウイルスの陽性数に占める重複検出数の割合

ウイルス	割合 (重複検出数/陽性患者数)
HBoV	79% (22/28)
AdV	64% (21/33)
EVD68	50% (2/4)
RSV	48% (12/25)
PIV	46% (11/24)
HRV	31% (11/36)
CA	29% (12/41)
EV属型未同定	26% (9/34)
hMPV	26% (5/19)

の年齢幅は0～7歳、平均年齢は2歳11ヶ月（年齢中央値は2歳3ヶ月）であった。3種類のウイルスが検出されたのは11名で、年齢幅は0～4歳、患者の平均年齢は1歳10ヶ月（年齢中央値は1歳6ヶ月）であった。重複検出であった患者の年齢分布を示した（図3）。重複したウイルスは、HBoVが22名、AdVが21名、RSVが13名、CAが12名、HRVが11名、PIVが10名、EV属型未同定が9名、hMPVが5名、EVD68が2名の検体から検出された。ウイルスの組み合わせを示した（表3）。各ウイルスの陽性患者のうち重複検出症例となった割合は、高い順にHBoVが79%、AdVが64%、EVD68が50%、RSVが48%、PIVが46%、HRVが31%、CAが29%、EV属型未同定が26%、hMPVが26%であった（表4）。

考察

299名のうち189名の検体から247のウイルスを検出し、検出率は63%であった。濱田らによる2007年～2012年5年間の下気道感染症入院小児から検出された呼吸器ウイルスの臨床的検討では、ウイルス検出率は65%であり、ほぼ同様の検出率であった¹⁾。しかし、最も多く検出されたウイルスはRSVで、次いでEV属、hMPV、HBoVの順に報告されている¹⁾。また、田中らによる千葉市内の1小児科クリニックにおける重症呼吸器ウイルスの検出状況でも、RSVが最も多く検出され、次いでHRV、hMPV、HBoVであり¹³⁾、本調査の検査結果と異なっていた。これは、入院患者や重症患者を中心としたウイルスの検出状況のためと考えられた。本調査では、EV属であるCA、HRVが多く検出された。2014年の夏季はCAが多く、2015年は通年HRVが検出された。調査期間中のEV属の種類は、年によって異なる傾向が認められた。夏季にCAが多かつ

たことは、手足口病やヘルパンギーナに罹患していても、発疹等が出現していない初期段階であったり、典型的な症状がなく臨床診断がつかなかったものがILIにされたと考えられた。多く検出されたHRVは、鼻風邪の原因ウイルスであるが、喘息を悪化させるとも言われ、重症患者から検出されている^{14) 15)}。当所では、HRVを原因とした集団呼吸器感染症も経験している。結果から、HRVが軽い鼻風邪様症状だけでなく、熱や倦怠感等のインフルエンザ様症状を引き起こし、季節性をもたずに通年存在していることが改めて示された。

重症呼吸器感染症から検出されるウイルスとして多いRSV、hMPV、HBoVについては、特徴がいくつかわかった。

RSVの感染は、特に小児の呼吸器感染症の重症化や蔓延につながるため¹⁶⁾、感染症発生动向調査事業の定点疾患として流行状況が把握されている。千葉県内では年々報告数が増加しており、特に2014年12月は過去4年間の定点あたりの報告数が最も高かった。今回、2015年7月以降、継続して検出されており、RSVが通年存在したが、2014年は5名、2015年は20名に留まった。RSV感染は、病原体診断のつかないILIとなることは比較的少ないことがわかり、千葉県の流行状況、重症患者のウイルス検出状況と異なることが示された。このことは、RSV感染時の多くが、38℃以上の高熱や上気道炎症状、全身倦怠感等を呈さず、鼻炎を主訴として微熱で軽快する場合、もしくは細気管支炎などの重症化に即座に移行することから、ILIとはならないことが原因ではないかと考えられた。

hMPVは2001年¹⁷⁾に、HBoVは2005年¹⁸⁾に発見された比較的新しいウイルスであり、肺炎患者等の重症呼吸器感染症から検出されることが報告されている^{19) 20)}。hMPVは春先に¹⁾、HBoVは冬～春²¹⁾に流行するとされるが、これら流行期は入院患者を中心とした検出状況を基に示されており、小児科外来での流行状況は現在までほとんど得られていなかった。今回、hMPVは春季だけでなく、2015年7、9月、2016年1、2月にも検出され、HBoVは2014年6月に、さらに2015年3月～2016年1月にかけて検出された。両ウイルスは明確な季節性を認めず通年存在することがわかり、入院患者の報告とは異なっていた。

ウイルスが検出された189名のうち、47名（25%）の検体からウイルスが重複検出された。2種類のウイルスが

検出された患者の平均年齢は 2 歳 10 ヶ月、3 種類のウイルスが検出された患者の平均年齢は 1 歳 10 ヶ月となり、どちらも 1 歳児での重複検出が多かった。また、年齢幅は 2 種類陽性で 0~7 歳、3 種類陽性で 0~4 歳であり、8 歳以降の重複検出は見られなかった。これら結果から、0 歳児の場合、移行抗体によって感染防御されると考えられ、移行抗体の減衰や様々なウイルスへ暴露する機会が増える時期、特に 1 歳児では、複数のウイルスへ感染すると考えられた。一方、重複検出が見られなかった 8 歳以降では、既感染で得た免疫により、複数のウイルスへは感染しにくい状態になることが推察された。重複検出されたウイルスは HBoV が最も多く、さらに HBoV 陽性患者の 79% が重複検出症例であったことから、ウイルスの重複感染に HBoV が関与している可能性が示唆された。重複感染は、病態の重症化と相関していることが報告されている²²⁾。HBoV が呼吸器系に留まらず、全身性に免疫反応を引き起こしているとの報告もあり²⁰⁾、HBoV が他のウイルスの感染の引き金に、さらには重症化の原因になる可能性も示唆された。しかし、HBoV の不顕性感染に関しては十分に把握されていないこと、HBoV の初感染の場合は、1 か月以上継続して遺伝子が検出されるという報告もあり²³⁾、HBoV の感染が不顕性または回復期であった可能性も、遺伝子検査だけでは説明できない。今後 HBoV と重複感染の関係について明らかにしていくには、ペア血清を用いた抗体の変動を調べることで、患者情報に関する聞き取り調査を十分に行い検討していくことが必要であると考えられた。

ウイルスが検出されなかった患者 110 名は、検査対象以外のウイルスが原因であったことが考えられた。インフルエンザ簡易キット陽性者は対象から除外したが、適切な検体採取時期ではなかった場合はウイルス量が少なく、簡易キットで陰性になる可能性があるため、インフルエンザウイルスの遺伝子検査の必要性が示唆された。適切な検体採取時期であった場合も、ヒトコロナウイルスやパレコウイルス等の呼吸器感染症を引き起こすウイルスを併せて検討が必要であると考えられた。

小児科外来で得られた ILI 患者の原因ウイルスを検討し、2 年間の検出状況を示した。検出されたウイルスは年や季節ごとに異なる流行状況であった。CA、HRV を含む EV 属の検出が多いことや、RSV は通年検出されたが、ILI の

ウイルスとしては少ないこと、また hMPV や HBoV は、入院患者中心の報告と異なり、季節性を認めず通年存在していることがわかった。さらに、ウイルスの重複感染に HBoV が何らかの関連性をもつ結果が得られた。

小児科外来におけるウイルスの検出情報は病原診断の一助となり、このことは治療法の決定や感染対策に役立てることができる。今後も継続的な ILI の検討から、年ごとのウイルス流行状況を把握し、さらには検出されたウイルスと重症呼吸器感染症との関係について明らかにすることが必要であると考えられた。

謝辞

検体採取にご協力頂きました、くろさきこどもクリニック黒崎知道先生、外房こどもクリニック黒木春郎先生ならびに関係各位に深謝いたします。

参考文献

- 1) 濱田洋通, 小倉惇, 堀田千恵美, 涌井拓, 小川知子, 寺井勝: 2007 年~2012 年 5 年間の下気道感染症入院小児から検出された呼吸器ウイルスの臨床的検討, 感染症学雑誌, 88, 423-429(2014).
- 2) Heim,A., Ebnet,C., Harste,G., Akerblom,P.P.: Rapid and Quantitative Detection of Human Adenovirus DNA by Real-Time PCR., Journal of Medical Virology., 70, 228-239(2003).
- 3) Okada,M., Ogawa,T., Kubonoya,H., Yoshizumi,H., Shinozaki,K.: Detection and sequence-based typing of human adenoviruses using sensitive universal primer sets for the hexon gene., Archives of Virology, 152, 1-9(2007).
- 4) Choi,J.H., Chung,Y.S., Kim,K.S., Lee,W.J., Chung,I.Y., Oh,H.B., Kang,C.: Development of real time PCR assay for detection and quantification of human bocavirus., Journal of Clinical Virology, 42, 249-253(2008).
- 5) Misigo,D., Mwaengo,D., Mburu,D.: Molecular detection and phylogenetic analysis of Kenyan human bocavirus isolates., Journal of Infection in Developing Countries, 8, 221-227(2014).
- 6) Kaida,A., Kubo,H., Takakura,K., Sekiguchi,J., Yamamoto,S., Kohdera,U., et al.: Associations between

- Co-Detected Respiratory Viruses in Children with Acute Respiratory Infections., Japanese Journal of Infectious Diseases, 67, 469-475(2014).
- 7) Nix,W.A. , Oberste,M.S. , Pallansch,M.A. : Sensitive, Seminested PCR Amplification of VP1 Sequences for Direct Identifation of All Enterovirus Serotypes from Original Clinical Specimens. , Journal of Clinical Microbiology, 44, 2698-2704(2006).
- 8) 高尾信一:RSウイルス,ヒト・メタニューモウイルス., 臨床とウイルス, 40, 124-133(2012).
- 9) Peret,T.C.T, Boivin,G., Li,Y., Couillard,M., Humphrey,C., Osterhaus,A.D.M.E., et al. : Characterization of Human Metapneumoviruses Isolated from Patients in NorthAmerica., The Journal of Infectious Diseases, 185, 1660-1663(2002).
- 10) Parveen,S., Sullender,W.M., Fowler,K., Lefkowitz,E.J., Kapoor,S.K., Broor,S. : Genetic Variability in the G Protein Gene of Group A and B Respiratory Syncytial Viruses from India., Journal of Clinical Microbiology, 44, 3055-3064 (2006).
- 11) Echevarria,J.E. , Erdman,D.D. , Swierkosz,E.M. , Holloway,B.P., Anderson,L.J., et al. : Simultaneous Detection and Identification of Human Parainfluenza Virus 1,2 and 3 from Clinical Samples by Multiplex PCR., Journal of Clinical Microbiology, 36, 1388-1391(1998).
- 12) Aguilar,J.C. , Brena,M.P.P. , Garcia,M.L. , Cruz,N. , Erdman,D.D. , Echevarria,J.E. : Detection and Identification of Human Parainfluenza Viruses 1, 2,3,and 4 in Clinical Sample of Pediatric Patients by Multiplex Reverse Transcription-PCR. , Journal of Clinical Microbiology, 38, 1191-1195(2000).
- 13) 田中俊光, 小林圭子, 横井一: 千葉市内の1小児科クリニックにおける重症呼吸器ウイルスの検出状況., 千葉県環境保健研究所年報, 18, 49-51(2011).
- 14) Kusel,M.M.H., Klerk,N.H., Keadze,T., Vohma,V., Holt,P.G., Johnston,S.L., Sly,P.D. : Early-life respiratory viral infections, atopic sensitization, and risk of subsequent development of persistent asthma. , The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 119, 1105-1110(2007).
- 15) Teeratakulpisarn,J., Pientong,C., Ekalaksananan,T., Ruangsiripiyakul,H., Uppala,R. : Rhinovirus infection in children hospitalized with acute bronchiolitis and its impact on subsequent wheezing or asthma: a comparison of etiologies. , Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology, 32, 226-234(2014).
- 16) 堤裕幸: RS ウイルス感染症の疫学と病態, 小児感染免疫, 26, 67-76(2014).
- 17) van den Hoogen,B.G., de Jong,J.C., Groen,J., Kuiken,T., deGroot,R., Fouchier,R.A.M., et al. : A newlydiscovered human pneumovirus isolated from youngchildren with respiratory tract disease. , Nature Medicine , 7 , 719-724(2001).
- 18) Allander,T.Tammi,M.T. , Eriksson,M. , Bjerkner,A.,Lindell,A.T.,Andersson,B. : Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples., Proceedings of the National Academy of Sciences, 102, 12891-12896(2005).
- 19) 生方公子: 侵襲性ならびに呼吸器系感染症の原因微生物検索—網羅的検索法へのパラダイムシフト—, 小児感染免疫, 23, 257-263(2011).
- 20) 石黒信久, 遠藤理香, 有賀正: ヒトボカウイルス感染症, モダンメディア, 53, 259-266(2007).
- 21) Ma,X., Endo,R., Ishiguro,N., Ebihara,T., Ishiko,H., Ariga,T., Kikuta,H. : Detection of Human Bocavirus in Japanese Children with Lower Respiratory Tract Infections.,Journal of Clinical Microbiology , 44 , 1132-1134(2006).
- 22) 伊藤雄介, 大呂陽一郎, 松林里絵, 松林正: アデノウイルスとサイトメガロウイルスの感染が重複し肺炎の重症化をきたした一例, 小児感染免疫, 19, 388-392(2007).
- 23) Martin,E.T., Kuypers,J., McRoberts,J.P., Englund,J.A., Zerr,D.M. : Human Bocavirus 1 Primary Infection and Shedding in Infants., The Journal of Infectious Diseases, 212, 516-524(2015).