

30. 呼吸器ウイルス感染症の流行拡大における 不顕性感染の役割

○森川 佐依子 （大阪健康安全基盤研究所）

【研究目的】

呼吸器ウイルス感染症の感染経路は、飛沫を介したヒトーヒト感染が主要であることから、不顕性もしくは症状の軽度な感染者の行動に伴って流行が拡大すると考えられる。成人は小児に比較して行動範囲が広いため、他の地域へのウイルスの持ち込みを担っている可能性が高い。

そこで、健康成人を対象に、研究期間中毎週うがい液を採取するとともに健康状態を聴き取り、呼吸器ウイルスの検出を試み、不顕性感染の重要度について検討する。

【研究の必要性】

ウイルスを原因とする呼吸器感染症の頻度は高く、特に小児では急性呼吸器感染症の起因病原体の大半を占めると言われている。ウイルス性呼吸器感染症の多くは小児では重症化する事も多く感染頻度も高いが、行動範囲を考慮すると、地域への持ち込みは成人が担っている事が考えられる。そこで、成人を対象として定期的に呼吸器ウイルスを検索する事で、症状の有無と検出ウイルス、検出時期（流行期）との関連が明らかになると考える。

【研究計画】

健康成人から毎週 1 回決められた曜日にうがい液を採取し、研究期間を通じて呼吸器疾患ウイルスの検出を行う。検体採取時には、全身および呼吸器症状の有無、家庭内での発生状況を聞き取る。得られたうがい液から核酸を抽出し、リアルタイム PCR 法にてウイルス遺伝子を検出する。ウイルス遺伝子が陽性であった場合、必要に応じて遺伝子配列を解析し、型別を行なう。

【実施内容・結果】

一事業所職員に研究計画と方法を説明し、同意が得られた者を対象とした。紙コップ、滅菌蒸留水 10mL、滅菌検体採取容器、過去 1 週間の症状を聴き取る目的の自記式質問票（調査表：図 1）を各事務室に配布し、対象者自身がうがい液を採取し、調査票と共に所定の場所に静置するよう依頼した。対象者は連結可能匿名化を行い、各自に割り付けられた ID のみを採取容器、質問票に記載する事とした。

うがい液は回収後 200 μ L を分取し、核酸抽出に供した。核酸抽出は MagDEA Viral

DNA/RNA200 (GC) キ ャ ャ ャ ャ
(Precision System Science)
を用い、全自動核酸抽出機
(Precision System Science)
にて行った。抽出した核酸はインフルエンザ診断マニュアル¹⁾
に従いリアルタイム RT-PCR 法
による A、B 型インフルエンザウ
イルス (FluA または FluB) 遺伝
子の検出を行った。パラインフ
ルエンザウイルス (PIV) 1~4 型、
RS ウイルス (RSV)、ヒトメタニ
ューモウイルス (hMPV)、エンテ
ロウイルス (EV)/ライノウイル
ス (RV) 共通領域、ボカウイルス
(BoV)、パレコウイルス (PeV)、
アデノウイルス (AdV)、ヒトコロ
ナウイルス (hCoV) OC43、NL63、
229E、HKU-1、C 型インフルエン
ザウイルスを対象とし、ランダム
プライマーを用いた逆転写反

応後に各ウイルス遺伝子をターゲットとしたリアルタイム PCR 法を行い検出した²⁾。EV/RV
については共通領域を検出するため、陽性となった場合は核酸を用いて VP4-2 領域に対す
る semi-nested RT-PCR を行い³⁾、増幅産物のダイレクトシーケンスにて遺伝子配列を決定
し、BLAST 相同性検索にて遺伝子型を決定した。

症状については、調査票の回答が、咳・喉の痛み・鼻水といった呼吸器症状のみに限定
されている場合を「呼吸器症状のみ」、発熱・頭痛・腹痛の少なくとも 1 つ以上が「あり」
と回答されている場合を「全身症状あり」として集計した。

11 名から文書による同意を得た。2017 年 11 月 8 日を初日とし、その後は 2018 年 3 月
26 日までの毎週月曜日にうがい液を採取した。2018 年の第 1 回目は 1 月 4 日に採取した。
当日にうがい液が採取できなかった場合で、翌日に採取が可能であった場合は研究対象と
したが、それ以降の場合、当該週は未実施 (NT) とした (図 2)。1 人より同種のウイルスが
複数回検出された場合、型もしくは遺伝子型が同じ場合は持続感染とした。

のべ 226 検体を得られた。各検体、質問票は「ID - 採取月/採取日」を表記し管理した。
対象者の年齢は 29 歳~54 歳 (平均 42.0 歳、中央値 41 歳) であった。全対象者に配偶者
がおり、8 名は 1~4 名の子どもを持つ親であった (研究開始 2017 年 11 月 1 日時点の年齢)。

調査票			
この度は検体採取にご協力いただき、ありがとうございます。			
◎ うがい液と一緒にご提出下さい。			
本日の日付: _____ 年 _____ 月 _____ 日、 ID: _____			
本日以前の 1 週間について			
1. あなたの健康状態で当てはまるものに○を付けて下さい。			
● 発熱 (1. なし 2. あり 3. 分からない)			
「あり」の場合			
最高 _____ °C、	_____ 月 _____ 日頃~	_____ 月 _____ 日頃	
● 咳 (1. なし 2. あり 3. 分からない)			
● のどの痛み (1. なし 2. あり 3. 分からない)			
● 鼻水 (1. なし 2. あり 3. 分からない)			
● 頭痛 (1. なし 2. あり 3. 分からない)			
● 腹痛 (1. なし 2. あり 3. 分からない)			
*症状がある方のみ 今回の症状で医療機関を受診しましたか。			
1. はい 診断名 _____ 2. いいえ			
● その他 気になる症状がありましたら記載してください。			
(_____)			
2. あなたと同居している家族について 症状があった方の健康状態でてはまるものに○を付けて下さい。(ない場合は記入しないで下さい。)			
● 発熱 (1. なし 2. あり 3. 分からない)			
「あり」の場合			
最高 _____ °C、	_____ 月 _____ 日頃~	_____ 月 _____ 日頃	
● 咳 (1. なし 2. あり 3. 分からない)			
● のどの痛み (1. なし 2. あり 3. 分からない)			
● 鼻水 (1. なし 2. あり 3. 分からない)			
● 頭痛 (1. なし 2. あり 3. 分からない)			
● 腹痛 (1. なし 2. あり 3. 分からない)			
● その他 (_____)			
当該家族とあなたの間柄 (例. 第 1 子) _____ 、年齢: _____ 、			
性別 (男性・女性)、うがい液の採取 (有り・無し)			
ありがとうございました。			

図1. 対象者に配布した自記式質問票
毎週対象者が記載しうがい液の採取と共に指定の場所に提出を依頼した。

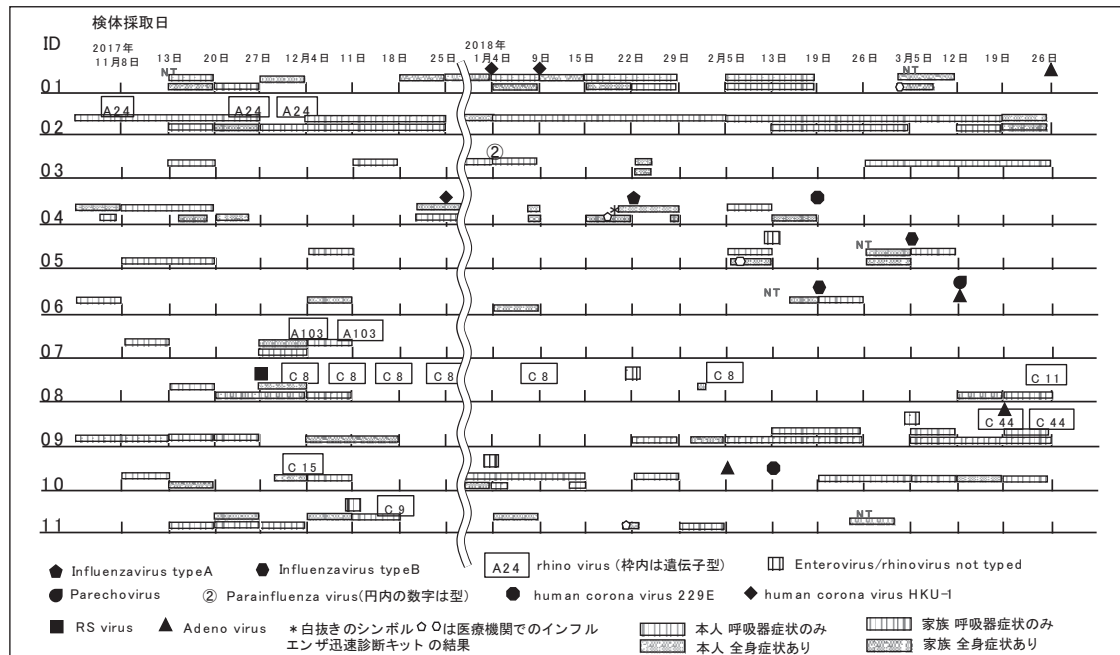


図2. 検体採取日と検出ウイルス、症. との関連

研究期間中に全員から何らかの呼吸器ウイルスが検出された。それぞれのウイルス検出数は1～9回であった。34検体がウイルス陽性であり36ウイルスが検出された。ウイルス検出前後の1週間に本人が無症状であったのは11検体(01-3/26、04-2/19、06-3/12、08-12/11、12/18、12/25、1/9、1/22、3/26、10-2/5、2/13)、先行して家族のみに症状がみられたのは上述の本人が無症状であった1検体(08-3/26)を含めた5検体(04-1/22、2/14、08-11/27、3/26)、先行して本人発症後ウイルスが検出され引き続いて家族に症状がみられたのは2検体(01-1/5、02-11/8)であった。RVが6名から7種検出された。ID:02、07、08、09の4名はRVの持続感染と考えられた。検出初回から最終回までの間隔は、途中の検出されなかった時期を含めると、長いものでは9週間であった。RV以外で連続して同じウイルスが検出されたのはhCoV HKU-1のみであった。本人が無症状で検出されたウイルスは持続感染中のRV C8を除いて、AdVが3検体、hCoV 229Eが2検体、PeVおよびRV C11各1検体であった。

【考察と今後の課題】

健常成人を対象に毎週うがい液を採取し、症状と検出ウイルスとの関連をみた。ウイルスが検出される前後1週間に何らかの症状があったのは23検体であった。症状があった個人についても当日の勤務に従事していることから、無症状時に検出された11検体を併せた34検体の採取日には、該当者は通勤時にウイルスを周囲に伝播している可能性が否定できないと考えられた。一方で、本人からウイルスが検出された後に家族に症状が認められた例は、先行して家族に症状が認められた後に本人からウイルスが検出された例よりも少ないことから、成人→家族(子ども)よりも家族(子ども)→成人の方が伝播しやすい要因、例えばウイルス排出量の違いなどが存在する事も考えられた。しかしながら有症の家族に対

するウイルス検出は検体採取の時期等の問題で未実施であることが多く、ウイルスの家族内感染の順番については考察できず、並行して家族の検体も採取する必要性を感じた。

本研究では事業所内で短期間に同一ウイルスが検出された事例は 10-2/13 および 04-2/19 から検出された hCoV 229E と 06-3/12、09-3/19 および 01-3/26 から検出されたアデノウイルスの 2 事例であった。こちらについても、04-2/19 からウイルスが検出される前に家族にも症状が認められ、家族間もしくは事業所内のどちらからの伝播なのかははっきりしない点から家族検体の採取が重要であると考えられた。アデノウイルスについては型別を行っていないため同一ウイルスの伝播であるかが明らかでない点があり、アデノウイルスの型および遺伝子配列等のさらに踏み込んだ解析が必要と考えられた。

2 週間以上にわたって検出されることが多かった RV について、ID:02 および 08 はいずれも途中で検出されない時期を含むが、長期間にわたり RV が検出された。特に ID:08 は 9 週にわたり RV C8 が検出され、3 週目以降は症状も消失し常在ウイルスの様相を呈した。しかし最後に検出されてから 7 週間には異なる型の RV が検出されていることから、宿主の状態により長期に RV が排出される事はあるが最終的には上気道よりクリアランスされている事が推測された。呼吸器ウイルスの多くは流行期を持ち、非流行期中にウイルスがどのように存在しているかについては明らかになっていない。RV の長期検出例は、無症状の成人が呼吸器ウイルスのキャリアになっている可能性を示唆するものだと考えられた。

一方で本研究では、多種のウイルスを検出する目的から各ウイルスの遺伝子を検出している。厳密には、ウイルス遺伝子の検出が感染性を持つウイルスの排出を示すものではないため、周囲への感染源となっていると断定はできない。しかし、継続して毎週うがい液を採取・検査することで、成人においても家族や周囲からの感染を機にウイルスが上気道で増殖し、時に無症状のまま長期に渡って排出している事が明らかとなった。

【謝辞】

本研究を行うにあたり、研究費を助成頂きました大同生命厚生事業団様、また検体採取、情報提供、遺伝子検査等に携わって頂きました全ての皆様に深謝致します。

【参考文献】

- 1) 国立感染症研究所 リアルタイム RT-PCR(TaqMan Probe 法)による同定 インフルエンザ診断マニュアル (第 3 版) 平成 26 年 9 月 p.24-28
- 2) S. Morikawa, S. Hiroi, T. Kase. Detection of respiratory viruses in gargle specimens of healthy children. *Journal of Clinical Virology*. 2015; 64: 59-63.
- 3) H. Ishiko, Y. Shimada, M. Yonaha, O. Hashimoto, A. Hayashi, K. Sakae, N. Takeda. Molecular diagnosis of human enteroviruses by phylogeny-based classification by use of the VP4 sequence. *J. Infect. Dis.* 2002; 185(6): 744-754.

【経費使途明細】

使 途	金 額
検体採取用消耗品（紙カップ・滅菌蒸留水）	4,481 円
検査用プラスチック製品（ピペットチップ・PCR チューブ・プレート）	91,778 円
検査用試薬（PCR 反応試薬・バッファー）	142,613 円
リアルタイム PCR 用プライマー/プローブ	61,128 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円