

2022 年 3 月～9 月の道央圏都市部における 呼吸器系ウイルス流行状況

Report of Respiratory Viruses in Urban Areas
of the Central Hokkaido Region from March to September 2022

田宮 和真

Kazuma TAMIYA

Key words : respiratory virus (呼吸器系ウイルス) ; RT-qPCR (定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応) ;
HRV (ヒトライノウイルス) ; RSV (RS ウイルス) ; molecular phylogenetic tree (分子系統樹)

ヒトに感染する呼吸器系ウイルスはインフルエンザウイルス、RS ウイルスをはじめとして多くの種が報告されている。多くは咳嗽、咽頭痛、発熱など軽症の急性感染症様症状の原因となるものの、一部は乳幼児などの高リスク者に対して重篤な病態を引き起こすことがある。呼吸器系ウイルスは主に飛沫や接触を介してヒトからヒトへと感染が成立するため、感染拡大の防止には適切な公衆衛生対応が求められる。公衆衛生対応の基盤を確立するためには、各ウイルスの集団における感染実態を把握することが重要となる。

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) は 2019 年 12 月に中国から初めて報告された後、全世界的に感染が拡大した^{1, 2)}。ゲノム変異によって感染性や抗原性が変化した様々な系統のウイルスが出現し、複数回の流行の波の主体となっている³⁾。2022 年 3 月～9 月に道内ではオミクロン株の感染が拡大した。特に 7 月～9 月には BA.5 系統が流行し、新規陽性者数は急激に増加した⁴⁾。一方、社会における対応については強い行動制限は行わず、社会経済活動を維持しながら感染拡大を防止する方針が運用された期間である⁵⁾。

本調査では、2022 年 3 月～9 月にかけて当所に搬入された呼吸器由来検体を用いて主要な呼吸器系ウイルス 8 種類のゲノムを検出する RT-qPCR 法を実施することで、北海道における各呼吸器系ウイルスの感染実態を明らかにすることを目的とした。

方 法

1. 検体

2022 年 3 月～9 月に道央圏都市部 1 保健所から当所に行政検査依頼された呼吸器由来検体の中で (ア) SARS-CoV-2 遺伝子陰性、(イ) 20 歳以上、(ウ) 発熱・咳嗽・咽頭痛等の

急性感染症様症状を呈する、の 3 条件をすべて満たす 432 検体を対象とした。検体種は唾液 424 検体、鼻腔拭い液 7 検体、スワブ 1 検体で、性別は男性 260 検体、女性 172 検体だった (表 1)。年齢中央値 (四分位範囲) は 39 歳 (32-49) であった。保健所受理月は 8 月が 162 検体と研究対象期間内で最多であった。なお、本研究は当所倫理審査委員会の

表 1 検体属性 (n=432)

	n (%)
検体種	
唾液	424 (98)
鼻腔拭い液	7 (2)
スワブ	1 (0)
性別	
男	260 (60)
女	172 (40)
年代	
20代	74 (17)
30代	160 (37)
40代	90 (21)
50代	42 (10)
60代	33 (8)
70歳以上	33 (8)
保健所受理月	
3 月	39 (9)
4 月	50 (12)
5 月	60 (14)
6 月	38 (9)
7 月	72 (17)
8 月	162 (38)
9 月	11 (3)

承認を得て実施した（課題番号：E23-19）。行政検査の残余検体を利用したため、個々のインフォームドコンセントは実施せず、当所ホームページにてオプトアウトの権利を明示した。

2. 核酸抽出及び RT-qPCR

QIAamp Viral RNA Mini Kit（Qiagen 社）の説明書に従い検体から核酸を抽出した。8 種類のウイルス（インフルエンザウイルス A 型（IAV）、ヒトアデノウイルス（HAdV）、RS ウイルス（RSV）、ヒトパラインフルエンザウイルス 1 型（HPIV-1）、ヒトライノウイルス（HRV）、ヒトメタニューモウイルス（HMPV）、ヒトコロナウイルス NL63（NL63）、ヒトコロナウイルス OC43（OC43）を検出対象とし、プライマー及びプローブ配列については既報を参考とした⁶⁻⁹⁾。プライマー（200 nmol/L）、プローブ（200 nmol/L）、抽出核酸及び One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix（Takara Bio 社）を混合し、Thermal Cycler Dice Real Time System III（Takara Bio 社）を用いて 52℃ 5 分、95℃ 10 秒の後、95℃ 5 秒、55℃ 30 秒を 40 サイクル行う RT-qPCR を実施した。陽性対照にはウイルス RNA（GenBank Accession No.：RSV；LC474558、HPIV-1；LC764863、HMPV；LC671556、NL63；LC687396、OC43；LC687400）、当所保管臨床検体（HRV）及び当所保管臨床分離株（IAV、HAdV）を用いた。

3. サンガーシーケンス

RT-qPCR で HAdV、RSV 及び HRV が陽性となった検体を OneScript Plus Reverse Transcriptase（Applied Biological Materials 社）で逆転写し、cDNA は -30℃ にて保管した。各ウイルスの系統解析対象領域を KOD One PCR Master Mix（Toyobo 社）を用いて増幅し、アガロースゲル電気泳動後に目的のバンドをゲルから切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit（Qiagen 社）を用いて精製した。精製産物は BigDye Terminator v3.1（Thermo Fisher Scientific 社）で処理後、3500xL Genetic Analyzer（Applied Biosystems 社）で遺伝子配列を解読した。

4. 分子系統解析

HAdV はヘキソン C4 領域の 350 bp を解析対象とした¹⁰⁾。RSV は F 遺伝子領域の 380 bp を解析対象とし、遺伝子配列を解読後に型別を試みた¹¹⁾。

HRV は VP4/VP2 領域の 390 bp を解析対象とした¹²⁾。各型の参照配列を取得し¹³⁾、今回解読した配列と合わせて MAFFT¹⁴⁾ version7.520 を用いてマルチプルアラインメントを行った。系統樹推定は IQ-TREE2¹⁵⁾ version2.2.7 を用いて最尤法で実施した。進化モデルには GTR+I+ Γ を設定し、Ultrafast Bootstrap を 1,000 回繰り返した。作図には FigTree version1.4.4 を用いた。

結 果

1. 呼吸器系ウイルス遺伝子の検出

研究対象期間に HRV が 7 症例 9 検体（2.1%）、RSV が 3 症例 3 検体（0.7%）、IAV が 1 症例 1 検体（0.2%）、HAdV が 1 症例 1 検体（0.2%）から検出された（表 2）。ウイルス遺伝子陽性検体のうち男性が 6 検体、年代は 20 代 6 検体、30 代 4 検体、40 代 3 検体であった。ウイルス種別検体受理月は、HRV が 5 月 3 検体、6 月 1 検体、8 月 5 検体、RSV が 7 月 3 検体、IAV が 8 月 1 検体、HAdV が 8 月 1 検体であった。1 症例において HRV と HAdV が同時に検出された。CT 値は最小で 26.6、最大で 38.0 であり、35.0 以上が 4 検体あった。遺伝子検出検体の検体種はすべて唾液であった。

2. 分子系統解析

HAdV、RSV 及び HRV 陽性検体について検出された遺伝子配列を解読し型別を実施した。HAdV は解析対象領域の増幅が認められず、型別不明であった。RSV は A 型 1 検体、型別不明 2 検体であった（表 2）。HRV は A 型 6 検体、C 型 1 検体、型別不明 2 検体であった（図 1、表 2）。配列を解読できた HRV_A 型 6 検体のうち、2 検体（検体番号 72828、75930）は遺伝的に近縁であった一方、ほかの検体については各配列間の遺伝的距離が比較的離れており異なる型に

表 2 呼吸器系ウイルス遺伝子陽性検体の属性

検体番号	ウイルス	型別	検体受理日	年代	性別	症状	CT 値	備考
72828	HRV	A	5 月 5 日	30	男	咽頭痛	30.5	
75677	HRV	A	5 月 27 日	20	男	発熱、咳、鼻水、咽頭痛	32.2	
75814	HRV	不明	5 月 31 日	30	女	鼻水	38.0	
75930	HRV	A	6 月 3 日	30	女	鼻水、喉イガイガ感	30.7	75814 と同一症例
76871	RSV	不明	7 月 3 日	40	男	発熱、倦怠感、鼻水、咳	31.8	
78239	RSV	不明	7 月 23 日	40	女	咳、咽頭痛	34.9	
79587	RSV	A	7 月 31 日	40	女	咽頭痛	31.8	
80137	IAV	未実施	8 月 5 日	20	女	発熱、咳、咽頭痛	27.8	
80155	HRV	C	8 月 5 日	20	男	咳、咽頭痛	29.1	
80438	HRV	不明	8 月 7 日	20	男	咳、咽頭痛	37.8	80155 と同一症例
81097	HRV HAdV	A 不明	8 月 12 日	30	男	発熱、倦怠感、咽頭痛	37.0 36.9	
81251	HRV	A	8 月 13 日	20	女	発熱、咳、鼻汁	33.7	
83517	HRV	A	8 月 28 日	20	女	発熱	26.6	

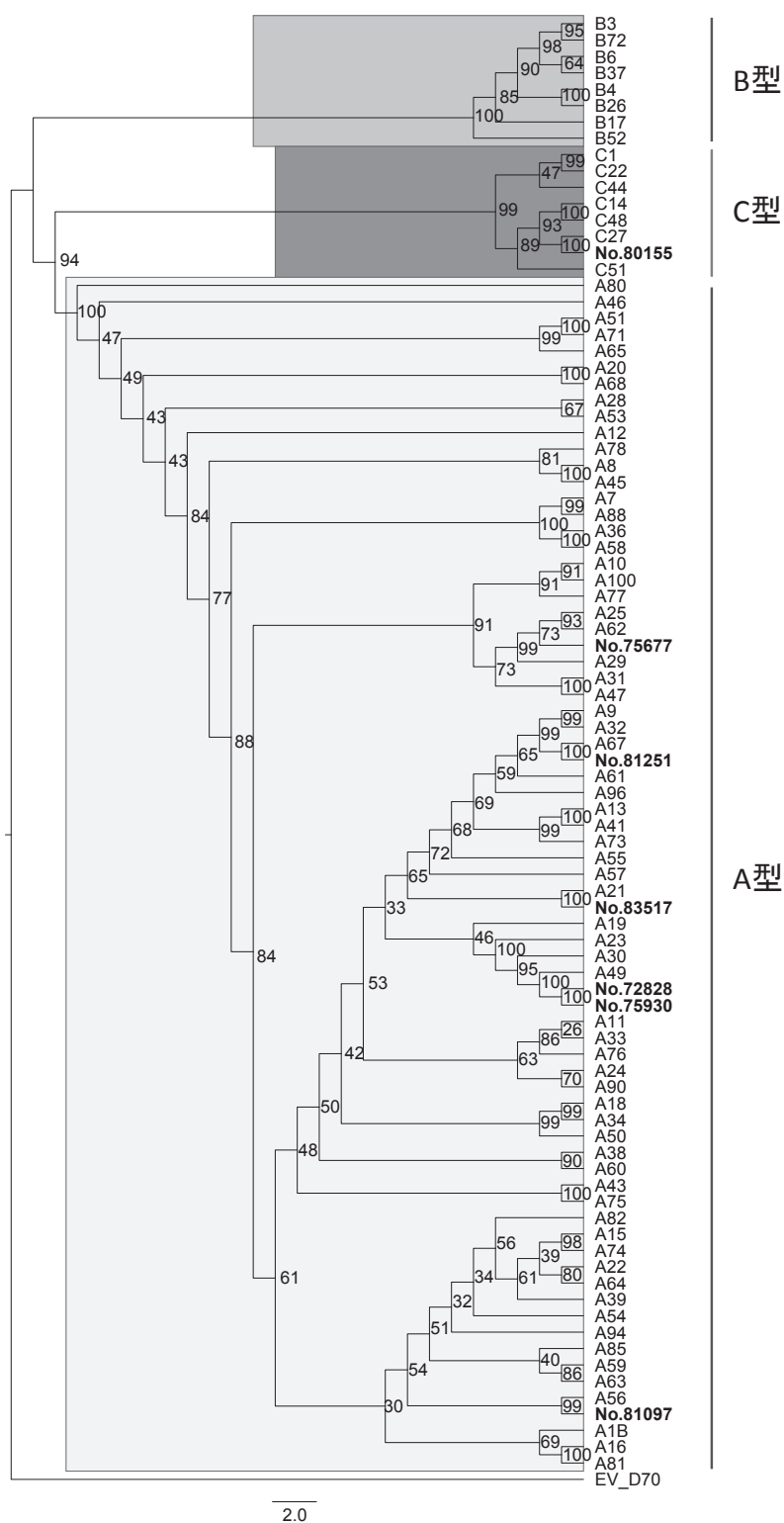


図1 HRV_VP4/VP2 部分領域における分子系統樹

太字：検出検体、細字：各型参照配列
 背景色は薄い順に A 型、B 型、C 型
 root：エンテロウイルス D70
 ラベルは bootstrap (%) を表す

分類された。BLAST 検索で GenBank 登録株の配列と比較したところ、3 検体において研究対象期間の国内において登録された株に最も相同性が高いことが認められた（表 3）。

本調査研究は公益財団法人大同生命厚生事業団地域保健

福祉研究助成を受けて実施しました。報告を終えるにあたり、本調査研究にご協力頂いた関係機関各位に深謝いたします。

表3 BLAST 検索上位 5 配列に国内登録株が含まれた HRV 検体

検体番号	上位 5 株登録名	登録年月	登録地域	一致率 (%)	ミスマッチ数	Accession No.
80155	Rhinovirus C Niigata3259/22-JPN	2022 年 6 月	新潟	99.7	1	LC765463.1
	Rhinovirus C5 isolate Rhinovirus C5/human/USA/MA-Broad_MGH-16597/2023	2023 年 12 月	マサチューセッツ	99.5	2	PV178538.1
	Rhinovirus C5 isolate Rhinovirus C5/human/USA/MA-Broad_MGH-23068/2025	2025 年 1 月	マサチューセッツ	98.5	6	PV260489.1
	Rhinovirus C isolate RV/Leipzig/2015/375	2015 年 10 月	ライプツィヒ	98.2	7	ON768436.1
	Rhinovirus C isolate RV/Leipzig/2016/472	2016 年 3 月	ライプツィヒ	98.2	7	ON768481.1
81097	Rhinovirus A56 HRV-A56/22086/Tokyo/2022	2022 年 7 月	東京	99.7	1	LC801264.1
	Human rhinovirus A56 isolate HRVA56/TH/B29034/2018	2018 年 6 月	タイ	99.0	4	MW677992.1
	Rhinovirus A strain HRV-A56-MON127-TUNI09	2009 年 -	チュニジア	98.5	6	KM234346.1
	Rhinovirus A isolate 210	2012 年 6 月	キプロス	98.2	7	KP068545.1
	Human rhinovirus A isolate P142	2009 年 10 月	マレーシア	98.2	7	HM044201.1
83517	Rhinovirus A21 HRV-A21/22180/Tokyo/2022	2022 年 9 月	東京	99.0	4	LC801265.1
	Human rhinovirus sp. isolate 37	2020 年 11 月	サウジアラビア	98.7	5	MW886262.1
	Rhinovirus A21 strain RvA21/USA/2021/7EN4ET	2021 年 5 月	USA	98.2	7	MZ540943.1
	Rhinovirus A21 strain RvA21/USA/2021/WHUSCA	2021 年 6 月	USA	98.2	7	MZ835609.1
	Rhinovirus A isolate KEN/Kilifi/HRV/5103/2015-09-01	2015 年 9 月	ケニア	98.2	7	MW622351.1

文 献

- Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, Zhao X, Huang B, Shi W, Lu R, Niu P, Zhan F, Ma X, Wang D, Xu W, Wu G, Gao GF, Tan W: A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.*, **382**(8), 727-733 (2020)
- Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL: Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat. Rev. Microbiol.*, **19**, 141-154 (2021)
- Koelle K, Martin MA, Antia R, Lopman B, Dean NE: The changing epidemiology of SARS-CoV-2. *Science*, **375**, 1116-1121 (2022)
- 川代愛梨, 田宮和真, 大久保和洋: 2022 年 1 月から 2023 年 3 月における北海道の新型コロナウイルス変異株の推移. *道衛研所報*, **73**, 37-40 (2023)
- 内閣官房ホームページ: 第 1 回 新型インフルエンザ等対策推進会議, https://www.cas.go.jp/jp/seisaku/ful/taisakusuisin_dail_2023.html (確認: 2025 年 5 月 23 日)
- 中村一哉, 岸田典子, 藤崎誠一郎, 高下恵美, 白倉雅之, 渡邊真治, 長谷川秀樹, 久場由真仁, 竹前喜洋, 影山 努, 長野秀樹, 高橋知子, 新開敬行, 清水耕平, 小澤広規, 安達啓一, 小橋奈緒, 森 愛, 三好龍也, 河瀬 曜, 吉富秀亮, 眞榮城徳之, 岡峰友恵: インフルエンザ診断マニュアル (第 5 版) (令和 5 年 8 月), 国立感染症研究所, 東京, 2023
- Hammitt LL, Kazungu S, Welch S, Bett A, Onyango CO, Gunson RN, Scott JAG, Nokes DJ: Added value of an oropharyngeal swab in detection of viruses in children hospitalized with lower respiratory tract infection. *J. Clin. Microbiol.*, **49**(6), 2318-2320 (2011)
- Feng ZS, Zhao L, Wang J, Qiu FZ, Zhao MC, Wang L, Duan SX, Zhang RQ, Chen C, Qi JJ, Fan T, Li GX, Ma XJ: A multiplex one-tube nested real time RT-PCR assay for simultaneous detection of respiratory syncytial virus, human rhinovirus and human metapneumovirus. *Virol. J.*, **15**(1), 167 (2018)
- Kaida A, Kubo H, Takakura K, Sekiguchi J, Yamamoto SP, Kohdera U, Togawa M, Amo K, Shiomi M, Ohyama M, Goto K, Hase A, Kageyama T, Iritani N: Associations between co-detected respiratory viruses in children with acute respiratory infections. *Jpn. J. Infect. Dis.*, **67**(6), 469-475 (2014)
- 藤本嗣人, 花岡 希, 小長谷昌未, 清水英明, 松島勇紀, 岡部信彦, 荻 美貴, 秋吉京子, 中村雅子: 咽頭結膜熱・流行性角結膜炎検査, 診断マニュアル (第 3 版) 平成 29 年 3 月, 国立感染症研究所, 東京, 2017
- 白戸憲也, 高山郁代, 富田有里子, 小林 淳, 松山州徳,

- 竹田 誠, 木村博一, 安達啓一, 塚越博之, 駒根綾子, 筒井理華, 高橋雅輝, 五十嵐映子, 岡部信彦: 病原体検出マニュアル ヒトオルソニューモウイルス (RS ウイルス) 令和 5 年 8 月改定 第 4.0 版, 国立感染症研究所, 東京, 2023
- 12) Ai J, Zhu Y, Duan Y, Zhang M, Lu G, Sun Y, Jin R, Shang Y, Li C, Xu B, Chen X, Xie Z: A multicenter study on molecular epidemiology of rhinovirus isolated from children with community acquired pneumonia in China during 2017–2019. *Infect. Genet. Evol.*, **106**, 105384 (2022)
 - 13) パーブライト研究所ホームページ: エンテロウイルス, <https://www.picornaviridae.com/ensavirinae/enterovirus/enterovirus.htm> (確認: 2025 年 5 月 26 日)
 - 14) Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD: MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief. Bioinform.*, **20**(4), 1160–1166 (2019)
 - 15) Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, Schrempf D, Woodhams MD, von Haeseler A, Lanfear R: IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Mol. Biol. Evol.*, **37**(5), 1530–1534 (2020)