

## 御抗体産生機構および制御に関する研究

1)一度の合成で約 1 mg の精製タンパク質が作製できた。そして、これらのタンパク質をマンノース被覆リポソームに封入した。今後は、本標品を BALB/c マウスに投与し、ワクチン抗原としての有効性を検討する予定である。

2)リポソーム内に封入されているタンパク質の定量を行ったところ、1 mg chol.あたりの HN タンパク封入量が 32  $\mu$ g にまで増加した。また、これは予備実験として低濃度 HN タンパク溶液 16  $\mu$ g/ mL を用いて製造した際に 1  $\mu$ g HN/ mg chol.であった場合と比較して、32 倍にまで封入量が増加した。HN タンパク封入 (包埋率) についても、両濃度の HN タンパク溶液を用いた場合、ともに 70%程度になった。これらの HN-MCL を 5  $\mu$ g タンパク/ 15  $\mu$ L (マウス 1 匹分) になるよう調製した。今後は OVA 封入リポソームをコントロールとして、マウスに免疫する予定である。これらのうち、HN に特異的なクローンが、48 株樹立出来た。今後、これらの細胞上清を用いて中和活性の検定を行う予定である。

3)pNifty-ISREx5-AP-1x5-NF-kBx5-SEAP 遺伝子または pIRES- ISREx5-AP- 1x5-NF-kBx5-GFP 遺伝子を導入し、ウイルス感染を定量的または視覚的に検出できる細胞系を構築した。今後は本細胞群を用いて広範囲な呼吸器ウイルスの感染感受性や細胞障害性について考察するとともに未知の病原性ヒト呼吸器ウイルスの検出を試みる予定である。

## E. 結論

### 1. 包括的な重症呼吸器ウイルス感染症のサーベイランスに関する研究

1)RSV、HMPV、HRV、HPIV、HBoV、HCoV および EV-68 など、種々ウイルスの(sv)ARI への関与を明らかにした。

2)RSV、HMPV、HRV、HPIV、HBoV、HCoV および EV-68 について詳細な分子疫学解析、流行株の生物学的性状検討を行い、それぞれのウイルスの代表株について株保存および遺伝情報を GenBank へ登録した。

3)RSV と HRV 感染に起因する病態、とくに感染喘息への関与を臨床学、臨床ウイルス学および分子生物学的に精査検討した。

4)施設内の ARIs ウイルス流行の原因ウイルスを確定し、治療指針、感染拡大防止の一助とした。

5)地方衛生研究所における ARI ウイルスサーベイランスに係る側面的技術支援を行った。

### 2. 重症呼吸器ウイルス感染症を含む症例における地方衛生研究所の検査診断の実態調査および検査診断法に関する研究

1)感染症発生動向調査に基づき重症呼吸器ウイルス感染症を含む症例に関する実態を把握する研究を行った結果、最も多く検出されたウイルスは InfV と RSV であった。特に RSV は svARI に深く関与しており今後詳細な調査が必要である。また、半数以上の検体からは起因ウイルスが検出されなかった。今後、有効な svARI のサーベイランスを実施するには、病原体サーベ

イランの義務化とともに各地方衛生研究所等の検査設備や検査体制の整備が必要である。

2)重症呼吸器ウイルス感染症の定義について、さらに検討を行うとともにその実態および原因となる病原体を明らかにすることが必要である。

### 3. 重症呼吸器ウイルス感染症のサイトカイン、シグナル伝達機構およびコルチコステロイドのサイトカイン産生抑制効果に関する研究

RSV 感染によりヒト肺線維芽細胞から、種々のサイトカイン産生が誘導されることが明らかになった。この産生機構には、Akt、p38MAPK、ERK1/2 および I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化が重要であることが判明した。また、産生された多量のサイトカインが種々の病態、サイトカインストーム、喘息の発症増悪および気道リモデリングに関与することも推察された。

### 4. ヒトパラミクソウイルス全般の病態解明・制御に関する研究基質

タンパク質の開裂部の P3 位のアミノ酸が Q であることは、TMPRSS2 で開裂性を受けることに重要ではあるものの、TMPRSS2 特異的ではないと考えられた。一方、P2 位のアミノ酸が S であることは、一般的にセリンプロテアーゼによる開裂に重要ではないと考えられるものの、TMPRSS2 で開裂性を受けることには、非常に重要でと考えられた。これらの結果は、ヒトの呼吸器ウイルスの膜融合タンパク質が、P1-P2-P3 位に R-S-Q 配列を持つ意義、あるいは、TMPRSS2 のウイルス性肺炎発症に重要であることの可能性を強く示唆する結果と考えられる。

### 5. ヒトコロナウイルス全般の感染機序解明、分離技術の向上・制御に関する研究

Hela-ACE2 は 2 種のコロナウイルスにとって、良い感受性細胞であるといえる。一方、肺胞上皮由来の Calu-3 細胞に感染する時、SARS コロナウイルスは、もっぱら TMPRSS2 を利用して侵入することと、セリンプロテアーゼインヒビターである Camostat により感染を阻止できることが解った。この結果は肺においても Camostat がウイルス感染を阻止する抗ウイルス薬となる可能性を示唆している。

### 6. 重症呼吸器ウイルス感染症関連ウイルスの防御抗体産生機構および制御に関する研究

1)HPIV-3 全長 HN 蛋白をマンノース被覆リポソームに封入可能であった。今後は、本標品を BALB/c マウスに投与し、ワクチン抗原としての有効性を検討する必要がある。

2)HN 蛋白に特異的抗体を産生するクローンが、48 株樹立した。今後、これらの細胞上清を用いて中和活性の検定を行う必要がある。

3)pNifty-ISREx5-AP-1x5-NF-kBx5-SEAP 遺伝子または pIRES- ISREx5-AP- 1x5-NF-kBx5-GFP 遺伝子を導入し、ウイルス感染を定量的または視覚的に検出できる細胞系を構築した。今後は本細胞群を用いて広範囲な呼吸器ウイルスの感染感受性や細胞障害性について考察するとともに未知の病原性ヒト呼吸器ウイルスの検出を試みる必要がある。

### F. 健康危機情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ikeda T, Mizuta K, Abiko C, Aoki Y, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, Matsuzaki Y, Fuji N, Imamura T, Oshitani H, Noda M, Kimura H, Ahiko T. Acute respiratory infections due to enterovirus 68, in Yamagata, Japan between 2005 and 2010. *Microbiol Immunol.* in press.
- 2) Arakawa M, Okamoto-Nakagawa R, Toda S, Tsukagoshi H, Kobayashi M, Ryo A, Mizuta K, Hasegawa S, Hirano R, Wakiguchi H, Kudo K, Tanaka R, Morita Y, Noda M, Kozawa K, Ichiyama T, Shirabe K, Kimura H. Molecular epidemiological study of human rhinovirus species ABCs from patients with acute respiratory illnesses in Japan. *J Med Microbiol.* 61(Pt 3):410-9, 2012..
- 3) Nishina A, Kimura H, Kozawa K, Sommen G, Nakamura T, Heimgartner H, Koketsu M, Furukawa S, A superoxide anion-scavenger, 1,3-selenazolidin-4-one suppresses serum deprivation-induced apoptosis in PC12 cells by activating MAP kinase. *Toxicol Appl Pharmacol.* 257(3):388-395, 2011.
- 4) Mizuta K, Saitoh M, Kobayashi M, Tsukagoshi H, Aoki Y, Ikeda T, Abiko C, Katsushima N, Itagaki T, Noda M, Kozawa K, Ahiko T, Kimura H. Detailed genetic analysis of hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein gene in human parainfluenza virus type 1 isolates from patients with acute respiratory infection between 2002 and 2009 in Yamagata prefecture, Japan. *Virology.* 8(1):533, 2011.
- 5) Sakano C, Morita Y, Goto K, Yokota Y, Annaka H, Fujita M, Kobatake S, Ishioka T, Hoshino T, Boonmar S, Pulsrikarn C, Nishina A, Kozawa K, Yamamoto S, Kimura H. Prevalence and genotype of *Salmonella Choleraesuis* in Gunma Prefecture, Japan. *Thai J Vet Med.* 41(3):321-326, 2011.
- 6) Itagaki T, Abiko C, Aoki Y, Ikeda T, Mizuta K, Noda M, Kimura H, Matsuzaki Y. Saffold cardiovirus infection in children associated with respiratory disease and the similarity to coxsackievirus infection. *Pediatr Infect Dis J.* 30(8):680-683, 2011.
- 7) Tsukagoshi H, Mizuta K, Abiko C, Itagaki T, Yoshizumi M, Kobayashi M, Kuroda M, Kozawa K, Noda M, Ryo A, Kimura H. The impact of saffold cardiovirus (SAFV) in patients with acute respiratory infection in Yamagata, Japan. *Scand J Infect Dis.* 43(8):669-671, 2011.
- 8) Tazaki E, Shimizu N, Tanaka R, Yoshizumi M, Kamma H, Imoto S, Goya T, Kozawa K, Nishina A, Kimura H. Serum cytokine profiles in patients with prostate carcinoma. *Exp Ther Med.* 2(5):887-891, 2011.
- 9) Fujitsuka A, Tsukagoshi H, Arakawa M, Goto-Sugai K, Ryo A, Okayama Y, Mizuta K, Nishina A, Yoshizumi M, Kaburagi Y, Noda M,

- Tashiro M, Okabe N, Mori M, Yokota S, Kimura H. A molecular epidemiological study of respiratory viruses detected in Japanese children with acute wheezing illness. *BMC Infect Dis.* 11:168, 2011.
- 10) Nishi M, Akutsu M, Masui S, Kondo A, Nagashima Y, Kimura H, Perrem K, Shigeri Y, Toyoda M, Okayama A, Hirano H, Umezawa A, Yamamoto N, Sam W. Lee SW, Ryo A. A distinct role for Pin1 in the induction and maintenance of pluripotency. *J Biol Chem.* 286(13):11593-11603, 2011.
- 11) Nakamura M, Taira K, Tsukagoshi H, Itokazu K, Nidaira M, Okano S, Kudaka J, Noda M, Takeda M, Kimura H. Detection of various respiratory viruses in patients with influenza-like illness before and after emergence of the 2009 Pandemic H1N1 influenza virus in Okinawa. *Jpn J Infect Dis.* 64(1):87-89, 2011.
- 12) Tanaka T, Yokoi H, Kobayashi K, Iwanade H, Noguchi Y, Mitsui Y, Okamoto A, Saitoh M, Noda M, Takeda M, Okabe N, Kimura H. First detection of measles virus genotype G3 in a Japanese woman: An imported case. *Jpn J Infect Dis.* 64(3):262-263, 2011.
- 13) Okabe N, Watanabe H, Ando S, Arakawa Y, Fujimoto T, Ikebe T, Imaoka K, Ishii N, Ito K, Kato H, Kimura H, Kobayashi M, Kurane I, Nozaki T, Sata T, Shimizu H, Tada Y, Takeda M, Tani N, Taniguchi K, Tashiro M, Taya K, Terajima J, Yamashita K, Wakita T. Annual Report on Findings of Infectious Disease Agents in Japan 2008. *Jpn J Infect Dis.* 62(supplement):1-131, 2011.
2. 著書
- 1) 木村博一, 菅井和子, 田代真人. Respiratory Syncytial(RS)ウイルス. 牛島廣治, 田代真人監修, ウイルス感染症の検査・診断スタンダード, 第1版, 東京:羊土社, 2011, 5月:40-43.
- 2) 木村博一, 水田克巳, 調恒明, 田代真人. ヒトメタニューモウイルスウイルス. 牛島廣治, 田代真人監修, ウイルス感染症の検査・診断スタンダード, 第1版, 東京:羊土社, 2011, 5月:57-59.
- 3) 田代真人, 木村博一. 臨床ウイルス感染症学概論. 牛島廣治, 田代真人監修, 臨床ウイルス学必携, 第1版, 東京:羊土社, 2011, 5月:24-30.
- 4) 岡山吉道, 木村博一, 羅智靖. ライノウイルス. 牛島廣治, 田代真人監修, ウイルス感染症の検査・診断スタンダード, 第1版, 東京:羊土社, 2011, 5月:44-47.
- 5) 水田克巳, 木村博一, 吉住正和, 田代真人. ヒトパラインフルエンザウイルス. 牛島廣治, 田代真人監修, ウイルス感染症の検査・診断スタンダード, 第1版, 東京:羊土社, 2011, 5月:36-38.
- 6) 水田克巳, 調恒明, 木村博一, 田代真人. ヒトアデノウイルス. 牛島廣治, 田代真人監

- 修, ウイルス感染症の検査・診断スタンダード, 第1版, 東京:羊土社, 2011, 5月:52-55.
- 7) 野田雅博, 水田克巳, 木村博一, 田代真人. ウイルス感染症の実験室内検査診断の概要と実際. 牛島廣治, 田代真人監修. ウイルス感染症の検査・診断スタンダード, 第1版, 東京:羊土社, 2011, 5月:202-204.
- 8) 塚越博之, 調恒明, 木村博一. ウイルス遺伝子増幅及び解析法. 牛島廣治, 田代真人監修, ウイルス感染症の検査・診断スタンダード, 第1版, 東京:羊土社, 2011, 5月:269-290.
- 9) 水田克巳, 木村博一. 調恒明, 酵素免疫測定法・免疫クロマト法. 牛島廣治, 田代真人監修, ウイルス感染症の検査・診断スタンダード, 第1版, 東京:羊土社, 2011, 5月:344-351.
- 10) 塚越博之, 小澤邦壽, 木村博一. 蛍光抗体法. 牛島廣治, 田代真人監修, ウイルス感染症の検査・診断スタンダード, 第1版, 東京:羊土社, 2011, 5月:352-362.

#### H. 知的財産の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

重症呼吸器ウイルス感染症のサーベイランス・病態解明及び制御に関する研究

平成 23 年度 分担研究報告書

研究代表者 木村 博一

平成 24 (2012) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
分担（サーベイランスグループ総括）研究報告書

包括的な重症呼吸器ウイルス感染症のサーベイランスに関する研究

研究分担者

野田雅博（国立感染症研究所感染症情報センター）

研究協力者

水田克巳（山形県衛生研究所）、平良勝也、仁平 稔（沖縄県衛生環境研究所）、  
中川（岡本） 玲子（山口県環境保健センター）、大貫泉美（栃木県保健環境センター）、  
横井 一、田中俊光（千葉市環境保健研究所）、昆美也子（新潟県保健環境科学研究所）、  
中村雅子、平野映子（福井県衛生環境研究センター）、吉岡政純（京都市衛生環境研究所）、  
清田直子（熊本県保健環境科学研究所）、小林美保（群馬県衛生環境研究所）、  
筒井理華、吉田綾子（青森県環境保健センター）、柴原乃奈（静岡市環境保健研究所）、  
竹内恵美（横須賀市健康安全科学センター）、宇野優香、神田典子（さいたま市健康安全科学センター）  
斎藤義弘（東京慈恵会医科大学青砥病院小児科）、菅井和子、村田宗紀（国立病院機構  
横浜医療センター小児科）、松田俊二（国立病院機構愛媛病院）、板垣勉（山辺こどもクリニック）、  
森田幸雄（東京家政大学家政学部）、鈴木由美（国立病院機構下志津病院）、  
岩崎志穂（横浜市立大学附属市民総合医療センター小児総合医療センター）、  
藤塚麻子（横浜市立大学附属市民総合医療センター小児科）、宮地裕美子（藤沢市民病院小児科）、  
黒田 誠（国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター）、  
水谷哲也（国立感染症研究所ウイルス第一部、現：東京農工大学）

研究代表者

木村博一（国立感染症研究所感染症情報センター）

研究要旨

包括的な重症（sv）急性呼吸器感染症（ARIs）ウイルスサーベイランスに関する研究を行った結果、以下の知見が得られた。1)svARIs 症例由来検体から ARIs ウイルス検索を試みた結果、Respiratory Syncytial ウイルス（RSV）、ヒトメタニューモウイルス（HMPV）、ヒトライノウイルス（HRV）、ヒトパラインフルエンザウイルス等が本疾患へ強く関与していることが明らかになった。これら分離・検出株の分子疫学解析結果から、我が国で流行している各々のウイルスは固有の遺伝学的多様性を有することが示唆された。2)次世代シーケンサー解析等によるウイルス遺伝子解析は、原因不明疾患の究明に極めて有効な実験室内検査診断法であることが示唆された。3)ウイルス感染による喘鳴は、RSV と HRV の関与が主体であることを明らかにするとともに、喘鳴出現状況、気管支喘息発症リスク因子等を検証し、ウイルス学的因果関係を明らかにした。4)施設内 ARIs 流行の原因ウイルス究明を試みた HMPV や HRV の感染を明らかにするとともに、臨床症状等の差異について検証した。5) 自治体衛生研究所等との連携を通じ、側面的技術支援を行った。

A. 研究目的

我が国におけるウイルスサーベイランスは自治体衛生研究所、医療機関、大学医学部等の連携体制のもとに実施されている。しかし、気管支炎や肺炎などの重症感染症を引き起こす多くの重症（sv）急性呼吸器感染症（ARIs）の

実態及び病態は充分には解明されていない。そこで、国内で実施された感染症発生动向調査等から得られた分離・検出株や患者情報を基に、svARIs患者の包括的なウイルスサーベイランス及び患者発生実態調査等を行い、全国レベルでの充実した呼吸器感染症対策に資するため

の総合的なレファレンス体制整備および機能強化に関する研究を行った。

## B. 研究方法

以下の項目について研究を実施した。

1. 各地域レベルで感染症発生動向調査事業等により収集された ARIs 患者検体から ARIs ウイルス分離・検出ならびに分離株の解析等を実施し、ウイルス学的・疫学的に svARIs との因果関係を検討した。また、代表株の系統保存・遺伝子情報の集積を行った。
2. 既知ウイルス感染が否定された場合あるいは起因ウイルス確定困難の場合、次世代シーケンサー、ウイルス網羅的検出法、等の検査診断技法を用いて、起因ウイルスの特定を試みた。
3. ARIs 患者における気管支喘息発症リスク因子とウイルス学的要因について検討した。
4. 医療施設内における ARIs の感染実態を調査し、院内感染制御に関する方策を検討した。
5. 自治体衛生研究所等との連携を通じ、側面的技術支援を行った。

## C. 研究結果

1. 山形県、沖縄県、青森県、栃木県、群馬県、新潟県、福井県、山口県、熊本県、千葉市、さいたま市、横須賀市、静岡市および京都市の各県域・市域の ARIs ウイルスサーベイランス (2011 年 1 月～11 月) の結果、Respiratory Syncytial ウイルス (RSV) ; 251 株、ヒトメタニューモウイルス (HMPV) ; 256 株、ヒトライノウイルス (HRV) ; 417 株、ヒトパラインフルエンザウイルス (HPIV) ; 310 株、ヒトボカウイルス (HBoV) ; 17 株およびヒトコロナウイルス (HCoV) ; 20 株がそれぞれ分離・検出された。その他、インフルエンザウイルス (InfV)、アデノウイルス (AdV) およびエンテロウイルス (EV) 等も分離・検出された。
2. 2005～2010 年に山形県の小児科を受診した ARIs 患者検体から EV68 型の検出を試みた。その結果、各年それぞれ 10、1、2、0、2 および 40 例の EV68 陽性例を確定した。分離・検出株の分子疫学解析の結果、3 つの Lineage に分類され、Lineage3 分類株では Fermon 株に比べ 3 塩基の欠損がみられた。
3. 2009～2011 年に沖縄県の ARIs 患者から検出された HMPV ; 18 株について、分子疫学解析をおこなった。その結果、沖縄株は HMPV subgroup A2 ; 17 株、subgroup B1 ; 1 株にそれぞ

れ分類され、subgroup A2 分類株は 3 つのクラスターを形成した。沖縄検出株と他の国内・国外株との間で相同性、系統解析を行ったが、沖縄株特有の変異はみられなかった。

4. 2011 年に京都市の ARIs 等患者検体から、ARIs ウイルス検索を行った。その結果、HMPV が 43 株 (Subgroup A2、B1 および B2) 検出された。HMPV 患者の好発年齢は 0～2 歳、好発月は 3 月であった。患者臨床データを解析した結果、高熱 (38 度以上)、咳嗽を伴う症例が多く、胸部 X 線画像診断で顕著な肺野所見を認めた。
5. 2009～2010 年に青森県、群馬県および熊本県の ARIs 患者から検出された RSV ; 50 株の分子疫学解析を実施した。その結果、検出株の遺伝子型は GA2 型および BA 型で、検出株間の相同性は非常に高い。また、G 遺伝子の C 末端超可変領域において複数のアミノ酸置換があり、positive selection site が確認された。
6. 2009 年 4 月～2011 年 12 月に熊本県の ARIs 患者検体からウイルス検索を実施した。その結果、100 検体 (41.8%) から ARIs ウイルスが検出され、そのウイルス内訳は HRV ; 38 株、RSV ; 26 株、HPIV ; 12 株、HMPV ; 7 株、HCoV ; 3 株、HBoV ; 3 株、EV ; 22 株および AdV ; 3 株であった。HRV 検出株は、主に species A および C に分類され、それぞれ遺伝学的に多様な株であった。
7. 2008 年から 2011 年に栃木県で検出された HRV ; 106 株および RSV ; 68 株について分子疫学解析を試みた。その結果、HRV は HRV spicis A ; 62 株、spicis B ; 3 株および spicis C ; 41 株に分類され、遺伝子学的に多様な株であった。RSV は subgroup A ; 48 株、subgroup B ; 20 株それぞれ検出され、subgroup A に属する株はすべて genotype GA2、subgroup B に属する株は 1 株を除き genotype BA に分類された。
8. 2011 年 4 月～9 月に青森県の svARIs 患者から検出された RSV ; 26 株および HRV ; 48 株について、分子疫学解析を試みた。その結果、RSV subgroup A に属する株は genotype GA2、subgroup B に属する株は genotype BA であった。HRV 株は spicis A、そのほか spicis C に分類された。
9. 2010 年～2011 年に山口県内の svARIs 患者 600 検体について HRV、HMPV、HBoV および HPIV 等の検索を行った。その結果、22 検体から HPIV4 型 (-4) が検出された。



HPIV-4 検出株の P 遺伝子 (202bp) について、遺伝子解析を行った結果、HPIV-4a ; 16 株、HPIV-4b ; 6 株に分類された。

10. 新潟県内の急性上・下気道炎患者から HCoV 検索を行い、計 20 株の HCoV が検出された。現在、論文公表準備中である。

11. 2011年に山形県で探知した成人 (6検体および剖検1例 ; 5月) および小児 (3検体 ; 12月) svARIs患者検体から次世代シーケンサーによるウイルス検索・解析を黒田誠研究分担者に依頼した。詳細は黒田誠研究分担報告書を参照されたい。

12. 2008年7月~2010年5月に RSV 感染症により入院加療を行った乳幼児例 114 例について、退院後の喘鳴出現状況を後方視的に検討した。入院中喘鳴を認めた例では、退院後、短期間で喘鳴出現し、家族喘息歴も有意に高かった。また、RSV 罹患後 40% の児では喘鳴が出現し、入院中の喘鳴やロイコトリエン拮抗薬内服の有無、月齢要因には有意差を認めなかった。

13. 急性喘鳴や喘息増悪に関与する種々の呼吸器ウイルスと臨床所見等に関し検討した。RSV 単独感染例および HRV 単独感染例の比較では、年齢および診察時の SpO<sub>2</sub> 最低値はそれぞれ RSV 例で有意に低く (P<0.05)、酸素投与の有無は RSV 単独感染例で有意に多かった (P<0.05)。HRV 単独感染例および RSV・HRV 混合感染例の比較では、呼吸状態は RSV・HRV 混合感染例で有意に悪かった。

14. 2011年に重症心身障害児 (者) 2 施設において発生した 6 ARIs 事例の原因ウイルス検索を試みた。その結果、2 事例から HMPV が計 14 株、1 事例から HRV が計 5 株検出された。HMPV 検出株は genotype A2 ; 13 株、genotype B2 ; 1 株に分類された。HRV 検出株は HRV-43 型 ; 4 株、HRV-64 型 ; 1 株に分類された。

14. 2009~2011年度、重症心身障害児 (者) 施設における ARIs の病原診断を行い、HMPV および HRV が病原ウイルスであったことを確定し、それぞれの流行状況、臨床所見には特徴的な差異がみられた。

15. RSV および HMPV の効率的検出に Real-time RT-PCR 法の応用を検討し、良好な成績が得られた。現在、論文公表準備中である。

16. 自治体衛生研究所等の技術者を対象としたウイルス研修 (事業主体 : 国立保健医療科学院) 等において、ウイルス感染症の検査診断、サーベイランス等に関する技術研修を実施した。

## D. 考察

衛生研究所グループはそれぞれの地域の svARI ウイルスサーベイランスを実施し、RSV、HMPV、HRV、HPIV、HBoV および HCoV 等、多数のウイルス株が分離・検出された。これらの株の地域あるいは国単位の分子疫学解析成績等から、いくつかの興味ある知見が得られた。特記すべき成果は、以下それぞれの個別研究報告書を参照されたい。

我が国の RSV は RSV-A 分類株は genotype GA2、subgroup B 分類株は genotype BA が主流である。本年度実施した分子生物学解析結果から、G 遺伝子の C 末端超可変領域において複数のアミノ酸置換があり、positive selection site が確認された。継続した解析モニタリングが必要である。

HRV は多数の株が分離・検出されたが、解析の結果、その多くは HRV-A および-C 分類株であり、それぞれ遺伝学的に多様である。

HPIV-1 山形分離株を解析した既報告で、我が国では本ウイルスは大きく 2 つのクラスターに分類される株が流行し、svARIs の原因ウイルスの一であることを明らかにした。本年は HPIV 山口検出株について解析を行い、多数の HPIV-4 が確定され、患者の臨床所見から HPIV-4 も svARIs の原因ウイルスとなりうることが示唆された。しかし、自治体衛生研究所が行っている ARIs ウイルスサーベイランスにおいて、HPIV を恒常的に検査診断実施している自治体衛生研究所は未だ少数である。今後の検査診断強化対象ウイルスの一つである。

HBoV は今年度新たに 17 株検出された。我われのこれまでの研究から、我が国では大きく 3 つのクラスターに分類される株が流行しており、地域特性を有することの可能性も推定される。今後、更なる株の収集、解析等の検討が必要である。

昨年度に引き続き、ウイルス検索困難な症例の病原ウイルス推定・確定に次世代シーケンサー等の活用を積極的に行い、病原ウイルスを速やかに特定することができた。この検査診断過程で我が国のウイルスサーベイランスに採用する検査診断技法は、サーベイランス精度向上を担保するうえウイルス種によっては複数の検査診断技法を併用することが検査診断精度向上に重要であることが再確認された。

いっぽう、次世代シーケンサー等の普及、恒常的活用を図るためには、検査費用、機器整

備等、解決すべき課題が残る。しかし、未知ウイルスあるいは新興感染症発生時の検査診断には極めて効果的な検査診断法の一つと考えられる。

医学部、大学、医療機関グループはRSV感染症により入院加療を行った乳幼児例について、退院後の喘鳴出現状況を後方視的に検討した。その結果、入院中喘鳴を認める場合、退院後、短期間で喘鳴出現し、家族喘息歴も有意に高く、RSV罹患後40%の児では喘鳴が出現し、入院中の喘鳴出現やロイコトリエン拮抗薬内服の有無、月齢には有意差を認めないことから、RSV感染が喘息増悪に強く関与していることが示唆された。

また、急性喘鳴や喘息増悪に関与する種々のARIsウイルスと臨床所見等に関して、RSV単独感染例およびHRV単独感染例で比較したところ、前者が年齢、診察時のSpO<sub>2</sub>最低値および酸素投与の有無が急性喘鳴発症の有意な要因であり、また、HRV単独感染例およびRSV・HRV混合感染例で比較したところ、後者が呼吸状態悪化の有意な要因であることを明らかにし、ウイルス起因の喘鳴・喘息症例の一治療指針となると思われる。

重度心身障害児2施設内のARI流行はHMPVおよびHRVが原因であり、特徴的な流行様相、臨床所見を明らかにした。我われは先に高齢者施設内のHMPV流行例から、本ウイルス感染では小児のみならず高齢者においても重症化すること、また、重度心身障害児施設を対象に実施した実態調査から、いずれの施設においてもすくなくならずARIs流行に遭遇していること、などを示している。長期入居施設内の感染症流行に際し原因究明、効果的対策等を究明することは入居者の健康、衛生環境保持には重要な課題と思われる。

ARIsは我々の日常生活に極めて密着している感染症であるが、重要度の認識に乏しい感染症でもある。今後、自治体衛生研究所において実施されるウイルスサーベイランス検査診断強化への期待は一層増大すると考える。

自治体衛生研究所で行なわれているウイルスサーベイランス成績は、近年とくにPCR検査を基にしたものが多い。科学テクノロジーの進展、マンパワー、技術の継承、等の種々の要因により効率的な検査診断法が採用されるべきであるが、少なくとも分離・検出株の保存、GenBank等への登録や調査研究成果の広くの公

表開示、Archivesの充実、などがなされていなければ自治体、国が所管すべき貴重な研究資産は消失する。

加えて、時代の変遷にそって、感染症も変遷し、新興・再興感染症も多く出現している現在、ウイルスサーベイランスを実施している自治体衛生研究所はPublic health laboratoryとしての責務遂行が強く期待されている。中長期的視点に基づくサーベイランス実施が増々重要であろう。

## E.結論

包括的なsvARIsサーベイランスに関する研究を行った。研究第二年次を以下のとおり結論する。

1. RSV、HMPV、HRV、HPIV、HBoV、HCoVおよびEV-68など、種々ウイルスの(sv)ARIへの関与を明らかにした。
2. RSV、HMPV、HRV、HPIV、HBoV、HCoVおよびEV-68について詳細な分子疫学解析、流行株の生物学的性状検討を行い、それぞれのウイルスの代表株について株保存および遺伝情報をGenBankへ登録した。
3. RSVとHRV感染に起因する病態、とくに感染喘息への関与を臨床学、臨床ウイルス学および分子生物学的に精査検討した。
4. 施設内のARIsウイルス流行の原因ウイルスを確定し、治療指針、感染拡大防止の一助とした。
5. 地方衛生研究所におけるARIウイルスサーベイランスに係る側面的技術支援を行った。

## F.健康危険情報

特記すべき事項なし。

## G.研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Itagaki T., Abiko C., Aoki Y., Ikeda T., Mizuta K., Noda M., Kimura H., and Matsuzaki Y.: Saffold cardiovirus infection in children associated with respiratory disease and its similarity to coxsackievirus infection. : *Pediatr. Infect. Dis. J.* 30:680-683, 2011.
- 2) Tsukagoshi H., Mizuta K., Abiko C., Itagaki T., Yoshizumi M., Kobayashi M., Kuroda M., Kozawa K., Noda N., Ryo A., and Kimura H.: The impact of saffold cardiovirus (SAFV) in patients with acute respiratory infection in Yamagata, Japan. *Scand. J. Infect. Dis.* 43:669-71, 2011

- 3) Ikeda T., Mizuta K., Abiko C., Aoki Y., Itagaki T., Katsushima F., Katsushima Y., Matsuzaki Y., Fuji N., Imamura T., Oshitani H., Noda M., Kimura H., and Ahiko T.: Acute respiratory infections due to enterovirus 68, in Yamagata, Japan between 2005 and 2010. *Microbiol.Immunol.* (in press)
- 4) Mizuta K., Saitoh M., Kobayashi M., Tsukagoshi H., Aoki Y., Ikeda T., Abiko C., Katsushima N., Itagaki T., Noda M., Kozawa K., Ahiko T. and Kimura H.: Detailed genetic analysis of hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein gene in human parainfluenza virus type 1 isolates from patients with acute respiratory infection between 2002 and 2009 in Yamagata prefecture, Japan. *Virology J.* 8:533, 2011
- 5) 板垣勉、松寄葉子：ヒトメタニューモウイルス感染症の臨床経過とウイルス排泄期間の検討、日本小児科学会雑誌 115 : (4) 782-787、2011
- 6) Fujitsuka A., Tsukagoshi H., Arakawa M., Sugai-Goto K., Ryo A., Okayama Y., Mizuta K., Nishina A., Yoshizumi M., Kaburagi Y., Noda M., Tashiro M., Okabe N., Mori M., Yokota S., and Kimura H. : A molecular epidemiological study of respiratory viruses detected in Japanese children with acute wheezing illness. *BMC Infect Dis*, 11: 168- 2011
- 7) Hasegawa S, Hirano R., Okamoto-Nakagawa R., Ichiyama T., Shirabe K. and Ichiyama T. : Enterovirus 68 infection in children with asthma attacks: Virus-induced asthma in Japanese children. *Allergy*, 2011 Dec; 66(12):1618-20. Doi: 10.1111/j. 1398-9995.2011.02725.x. Epub 2011 Sep 29
- 8) Arakawa M., Okamoto-Nakagawa R., Toda S., Tsukagoshi H., Kobayashi M., Ryo A., Mizuta K., Hasegawa S., Hirano R., Wakiguchi H., Kudo K., Tanaka R., Morita Y., Noda M., Kozawa K., Ichiyama T., Shirabe K. and Kimura H.: Molecular epidemiological study of human rhinovirus species ABCs from patients with acute respiratory illnesses in Japan. *J.Med.Microbiol.* 2011 Oct 20.
- 9) Tsukagoshi H, Mizuta K, Abiko C, Itagaki T, Yoshizumi M, Kobayashi M, Kuroda M, Kozawa K, Noda M, Ryo A, Kimura H. The impact of Saffold cardiovirus in patients with acute respiratory infections in Yamagata, Japan. *Scand J Infect Dis*. 2011; 43(8):669-71.
- 10) Ishioka T, Kimura H, Kita H, Obuchi M, Hoshino H, Noda M, Nishina A, Kozawa K, Kato M. Effects of respiratory syncytial virus infection and major basic protein derived from eosinophils in pulmonary alveolar epithelial cells (A549). *Cell Biol Int.* 2011; 35(5): 467-74.
- 11) Nakamura, M., Taira, K., Tsukagoshi, H., Itokazu, K., Nidaira, M., Okano, S., Kudaka, J., Noda, M., Takeda, M., Kimura, H. Detection of various respiratory viruses in patients with influenza-like illness before and after emergence of the 2009 pandemic H1N1 influenza virus in Okinawa. *Jpn J Infect Dis*, 64, 87-89, 2011
- 12) Omura T, Iizuka S, Tabara K, Tsukagoshi H, Mizuta K, Matsuda S, Noda M and Kimura H. Genetic analysis of F gene of human metapneumovirus (HMPV) detected during an outbreak in an old-age home in Shimane Japan, in 2009: *Jpn. J. Infect. Dis.*,64(1), 85-87, 2011
- 13) 松田俊二、小村珠喜、野田雅博、木村博一：重症心身障害児（者）病棟におけるヒト・メタニューモウイルス感染症の流行。感染症学雑誌、86 (2)、2012 (印刷中)
2. 学会発表
- 1) 水田克巳、松寄葉子、本郷誠治、勝島矩子、野田雅博、木村博一：小児の急性気道感染症におけるヒトメタニューモウイルスの疫学、第52回臨床ウイルス学会、2011年6月11-12日、津市
- 2) 水田克巳：シンポジウム3「市中ウイルス感染症と実験室診断」"ウイルス分離を未来の患者のために"、第52回臨床ウイルス学会、2011年6月11-12日、津市
- 3) 板垣勉：鼻咽腔 Saffold cardiovirus が検出された小児の臨床症状、日本小児科学会、2011年8月13日、東京都
- 4) 板垣勉、塚越博之、野田雅博、木村一博、松寄葉子：2008年に鼻咽腔から検出された Saffold cardiovirus の9例—気道感染症としての SAFV— 日本感染症学会東日本地方会学術集会、2011年10月28日、山形市
- 5) 宮地裕美子、菅井和子：乳幼児RSウイルス感染症入院例における退院後の喘鳴に関する検討、第48回小児アレルギー学会、2011年10月28-30日、福岡市
- 6) Fujitsuka A., Sugai K., Arakawa M., Mori M., Noda M., and Kimura H. : Effects of respiratory viral infections on the lower respiratory tracts of children, especially asthmatic children . *European Respiratory Society Annual Congress*, September 24-28 2011, Amsterdam (Thematic Poster session)
- 7) 菅井和子、藤塚麻子、高増哲也、塚越博之、岡山吉道、吉原重美、野田雅博、横田俊平、木村博一：ウイルス感染の喘息に及ぼす臨床的影響、第61回日本アレルギー学会秋季学術大会

シンポジウム、2011年11月10-12日、東京都

8) 木村博一、野田雅博、塚越博之、菅井和子、田代真人、小澤邦壽、岡部信彦：呼吸器ウイルス-特に喘息関連ウイルス (RSV) の基礎と最新の分子疫学-、第61回日本アレルギー学会秋季学術大会シンポジウム、2011年11月10-12日 東京都

9) 菅井和子：乳幼児の喘鳴性疾患における呼吸器ウイルス感染：第8回横浜小児先端医療セミナー、2011年9月9日、横浜市

10) 木村博一、塚越博之、野田雅博、岡山吉道、菅井和子、小澤邦壽、梁明秀、田代真人、水田克巳、岡部信彦：呼吸器ウイルス-特に喘息関連ウイルスの基礎、分子疫学および感染細胞のサイトカイン産生、第61回日本アレルギー学会秋季学術大会教育講演、2011年11月10-12日、東京都

11) 塚越博之、藤塚麻子、菅井和子、森雅亮、横田俊平、野田雅博、木村博一：喘鳴を呈する急性下気道感染児から検出された呼吸器ウイルスの疫学的解析、第60回日本感染症学会東日本地方会、2011年10月26-28日、山形市

12) 藤塚麻子、菅井和子、塩谷裕美、小林慈典、鏑木陽一、森雅亮：呼吸器ウイルスによる下気道感染時の喘息児への影響：第61回日本アレルギー学会秋季学術大会 2011年11月10-12日、東京都

13) 松田俊二、小村珠喜、野田雅博：重症心身障害児(者)病棟における感染症流行と病原体検索について、第65回国立病院総合医学会、

2011年10月8日、岡山市3. 講演会

14) 松田俊二：重症心身障害児(者)病棟における感染症の流行、第32回国立病院臨床検査技師協会四国支部学会、2011年8月20日、松山市

### 3. 著書

1) 小淵正次, 水田克巳, 田代真人. インフルエンザウイルス. 牛島廣治, 田代真人監修, ウイルス感染症の検査・診断スタンダード, 第1版, 東京:羊土社, 2011, 5月:32-35.

2) 水田克巳, 野田雅博. ウイルス分離培養. 牛島廣治, 田代真人監修, ウイルス感染症の検査・診断スタンダード, 第1版, 東京:羊土社, 2011, 5月:213-248.

3) 野田雅博, 水田克巳, 小澤邦壽. 中和試験. 牛島廣治, 田代真人監修, ウイルス感染症の検査・診断スタンダード, 第1版, 東京:羊土社, 2011, 5月:301-317.

4) 水田克巳, 野田雅博. 赤血球凝集・凝集抑制試験. 牛島廣治, 田代真人監修, ウイルス感染症の検査・診断スタンダード, 第1版, 東京:羊土社, 2011, 5月:318-343.

5) 野田雅博, 水田克巳. 粒子凝集法. 牛島廣治, 田代真人監修, ウイルス感染症の検査・診断スタンダード, 第1版, 東京:羊土社, 2011, 5月:363-369.

### H.知的財産権の出願・登録状況

該当なし

重症呼吸器ウイルス感染症のサーベイランスに関する研究  
-特にエンテロウイルス 68 型の疫学研究-

研究協力者 水田 克巳 山形県衛生研究所副所長  
板垣 勉 山辺こどもクリニック院長

## 研究要旨

2005-2010 年に呼吸器ウイルス感染症として山形県内の小児科を訪れた患者検体からエンテロウイルス 68 型 (EV68) の検出を試み、各年毎に、それぞれ 10、1、2、0、2 および 40 例の EV68 陽性例を認めた。EV68 の検出報告が少ない原因の 1 つは、遺伝子検出法と比較して、細胞培養における感度が低いことであると考えられ、ウイルス感染症の検査・サーベイランスにおいては、ウイルス分離培養と遺伝子検出のそれぞれの長所を生かして併用していくことが必要といえる。

## A. 研究目的

エンテロウイルス 68 型 (EV68) は、呼吸器感染症をひきおこすウイルスであるが、これまでに国内外を問わず、検出報告数は極めて少ない。2010 年、日本の各地で EV68 検出報告が相次いだ。同年、山形県でも、EV68 を分離、または遺伝子を検出したが、遺伝子検出に対して、ウイルス分離の感度が低かった。そこで、2005 年にまでさかのぼって、EV68 が本当に無かったのかどうか、EV68 遺伝子検出を試みることにした。

## B. 研究方法

山形県では、6 種類の細胞を用いたマイクロプレート法 (Mizuta K. et al: Jpn. J. Infect. Dis. 61:196-201, 2008) を使用し、2004 年以來ウイルス分離を行っている。2010 年 8 月から 10 月に急性気道感染症として小児科を訪れた患者の鼻咽頭拭い液から、RD-18S 細胞で 14 株の EV68 を分離した。一方、EV68 遺伝子を検出した検体は 38 例にのぼり、合計 40 例から EV68 が検出された (2 例はウイルス分離のみ陽性)。そこで、2005 年までにさかのぼり、インフルエンザウイルス陽性検体を除く、6,307 検体 (2005-2010 年を含む) について、VP3-VP1 部分のプライマーを用いて、EV68 遺伝子が増幅されるか否かを検討した。

## C. 研究結果

2005-2010 年の年毎に、それぞれ 10、1、2、0、2 および 40 例の EV68 陽性例を認めた。

2005-2009 年はいずれも RD-18S 細胞でウイルスが分離されず、EV68 遺伝子のみが増幅され、配列が EV68 と同定されたものである。全 55 陽性例のうち、平均年齢は 5.2 歳 (5 ヶ月-15 歳)、年齢分布は、5 歳未満が 31 例 (56.4%)、5-9 歳が 13 例 (23.6%)、10-15 歳が 11 例 (20%) であった。41 例が上気道炎、8 例が気管支炎や細気管支炎などの下気道炎、6 例はその他 (喘息など) であった。遺伝子解析の結果、これらのウイルスは 3 つの Lineages に分類された。Lineage1 は、2005 年、2010 年の流行の主流であり、2010 年に大阪から報告された株もこの Lineage に属するものである。Lineage2 は、オランダやフィリピンからも報告がある Lineage である。Lineage3 は、やはりオランダやフィリピンからも報告がある系統で、EV68 のプロトタイプ Fermon 株と比較すると 3 塩基の欠損がある株であった。

## D. 考察と結論

EV68 の検出報告が少ない原因の 1 つは、遺伝子検出法と比較して、細胞培養における感度が低いことにあると考えられた。このことから、ウイルス感染症の検査・サーベイランスにおいては、ウイルス分離培養と遺伝子検出のそれぞれの長所を生かして併用していくことが大切といえる。

2005-2010 年の EV68 陽性例は、いずれも 8-10 月の検体であり、EV68 の流行はこの期間に主としておこると考えられた。

EV68 の報告例の臨床診断は、下気道炎や喘息

の症例を多く含み、重症呼吸器ウイルス感染症との関連が強く示唆され、今後とも注意深くフォローしていく必要がある。

遺伝子解析の結果から、少なくとも Lineage2 と Lineage3 の複数の Lineage が世界の広範な地域で流行していたことが示唆された。Lineage と臨床症状との関連についても、症例を増やして検討していく必要がある。

## F.研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Itagaki T., Abiko C., Aoki Y., Ikeda T., Mizuta K., Noda M., Kimura H., and Matsuzaki Y.: Saffold cardiovirus infection in children associated with respiratory disease and its similarity to coxsackie virus infection. *Pediatr.Infect. Dis. J.* 30:680-683, 2011.
- 2) Tsukagoshi H., Mizuta K., Abiko C., Itagaki T., Yoshizumi M., Kobayashi M., Kuroda M., Kozawa K., Noda N., Ryo A., and Kimura H.: The impact of saffold cardiovirus (SAFV) in patients with acute respiratory infection in Yamagata, Japan. *Scand. J. Infect.Dis.* 43:669-71, 2011
- 3) Ikeda T., Mizuta K., Abiko C., Aoki Y., Itagaki T., Katsushima F., Katsushima Y., Matsuzaki Y., Fuji N., Imamura T., Oshitani H., Noda M., Kimura H., and Ahiko T.: Acute respiratory infections due to enterovirus 68, in Yamagata, Japan between 2005 and 2010. *Microbiol.Immunol.* (in press)
- 4) Mizuta K., Saitoh M., Kobayashi M., Tsukagoshi H., Aoki Y., Ikeda T., Abiko C., Katsushima N., Itagaki T., Noda M., Kozawa K., Ahiko T. and Kimura H.: Detailed genetic analysis of hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein gene in human parainfluenza virus type 1 isolates from patients with acute respiratory infection between 2002 and 2009 in Yamagata prefecture, Japan. *Virology J.* 8:533, 2011

5) 板垣勉、松寄葉子：ヒトメタニューモウイルス感染症の臨床経過とウイルス排泄期間の検討、*日本小児科学会雑誌* 115：(4) 782-787、2011

6) Ikeda T., Mizuta K., Abiko C., Aoki Y., Itagaki T., Katsushima F., Katsushima Y., Matsuzaki Y., Fuji N., Imamura T., Oshitani H., Noda M., Kimura H., and Ahiko T.: Acute respiratory infections due to enterovirus 68, in Yamagata, Japan between 2005 and 2010 *Micribiol.Immunol.* (in press)

### 2. 学会発表

- 1) 水田克巳、松寄葉子、本郷誠治、勝島矩子、野田雅博、木村博一：小児の急性気道感染症におけるヒトメタニューモウイルスの疫学、第52回臨床ウイルス学会、2011年6月11-12日、津市
- 2) 水田克巳：シンポジウム3「市中ウイルス感染症と実験室診断」”ウイルス分離を未来の患者のために”、第52回臨床ウイルス学会、2011年6月11-12日、津市
- 3) 板垣勉：鼻咽腔 Saffold cardiovirus が検出された小児の臨床症状、日本小児科学会、2011年8月13日、東京都
- 4) 板垣勉、塚越博之、野田雅博、木村一博、松寄葉子：2008年に鼻咽腔から検出された Saffold cardiovirus の9例—気道感染症としての SAFV—日本感染症学会東日本地方会学術集会、2011年10月28日、山形市

## G.知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

沖縄県における重症呼吸器ウイルスサーベイランス  
—特にヒトメタニューモウイルスの疫学・分子系統解析について—

研究協力者	仁平 稔	沖縄県衛生環境研究所
	平良 勝也	沖縄県衛生環境研究所
	野田 雅博	国立感染症研究所
	木村 博一	国立感染症研究所

## 研究要旨

沖縄県の重症呼吸器ウイルス感染症の実態を明らかにするため、2010年6月~2011年10月に沖縄本島中南部において、インフルエンザ以外の呼吸器感染症が疑われた患者から採取された356検体の咽頭拭い液を用いてウイルス検索を行った。その結果、Respiratory syncytial ウイルスが49株、ヒトメタニューモウイルス(HMPV)が15株、ヒトパラインフルエンザウイルスが25株、ヒトライノウイルスが18株、ヒトボカウイルスが18株、エンテロウイルスが32株、アデノウイルスが34株、ヒトパレコウイルスが13株、インフルエンザウイルスC型が1株、ヒトコロナウイルスが11株の計216株のウイルスが検出された。

HMPVについて、2009-2011年の間に検出された18株の疫学的解析を実施した。その結果、多くは既に報告されている情報と一致したが、沖縄県のHMPV流行の季節性に明瞭なピークはみられなかった。また、国内外の既報告株と分子系統解析を実施したが、沖縄県特有の変異はみられなかった。

### A. 研究目的

多くの呼吸器ウイルスは、気管支炎や肺炎などの重症呼吸器感染症を引き起こすことが知られているが、本邦においてその実態は多くが不明である。本研究では、沖縄県における重症呼吸器ウイルス感染症の実態を明らかにするため、重症呼吸器ウイルスサーベイランスを実施した。また、ヒトメタニューモウイルス(HMPV)に焦点を当て、疫学的および分子系統解析を実施した。

### B. 研究方法

2010年6月~2011年10月に沖縄本島中南部の3ヶ所の医療機関において、インフルエンザ以外の呼吸器感染症を疑われた患者から、臨床検体(咽頭拭い液)356検体を採集し、試験に供した。検索呼吸器ウイルスは、従前からのRespiratory syncytial ウイルス(RSV)、ヒトライノウイルス(HRV)、パラインフルエンザウイルス(PIV)、HMPV、エンテロウイルス(EV)、アデノウイルス(AdV)およびヒトボカウイルス(HboV)と、新たにヒト

パレコウイルス(HPeV)、ヒトコロナウイルス(HCoV)、およびインフルエンザウイルスC型(FluC)の計10種類の呼吸器ウイルスについて、RT-PCR法、PCR法およびウイルス分離法を実施した。また、HMPVについては、2009年に沖縄県の呼吸器ウイルス感染症患者から検出された4株を加え、疫学的解析を実施するとともに、*F* 遺伝子の一部(321bp)を解析し、国内外の既報告株と分子系統解析を実施した。

(倫理面への配慮)

咽頭拭い液は、医師が診察時に口頭で同意を得た上で採取したものであることから、倫理面の問題はないと判断した。

### C. 研究結果

#### 1) 重症呼吸器サーベイランス成績

356症例の患者の年齢は、0~4歳が302例で最も多く、次いで5~9歳が22例、10~14歳が11例、15~19歳が5例、20歳以上が2例および不明が14例であった(図1)。

臨床症状は、上気道炎が 98 例、下気道炎が 228 例およびその他が 30 例であった(図 2)。

ウイルス検索の結果、216 株のウイルスが検出、同定された(表 1)。内訳は RSV が 49 株、HMPV が 15 株、PIV が 25 株、HRV が 18 株、HBoV が 18 株、EV が 32 株、AdV が 34 株、HPeV が 13 株、FluC が 1 株および HCoV が 11 株であった。

月別ウイルス検出状況は、RSV では 2010 年 6 月から 2011 年 8 月までの毎月検出されたが、2011 年 9 および 10 月は検出されなかったこと、HRV では 2010 年は 7、9 および 11 月のみ検出されたが、2011 年は 2 月および 4~10 月の毎月検出されていること、などである。

臨床症状別ウイルス検出状況は、下気道炎症状を示した患者からの検出率 (62.3%) が上気道炎症状を示した患者からの検出率 (33.7%) よりも高値を示した。特に RSV は下気道炎症状を示した患者から、AdV は上気道炎症状を示した患者からの検出率がそれぞれ有意( $p<0.01$ )に高値を示した (図 3、4)。

#### 2) HMPV の疫学および分子系統解析

2011 年検出の 14 名および 2009 年検出の 4 名、計 18 名について解析を実施した。なお、2011 年検出のうち患者の症状等が不明の 1 名は解析から除外した。

患者年齢は 0~6 歳であった。ウイルス検出は、18 名中 16 名から HMPV のみ検出されたが、他の 2 名(11.1%)では複数ウイルスが検出 (HMPV と EV および HMPV と HRV) された。発生時期では明確な季節性はみられなかった(図 5)。

検出 18 株について分子系統解析を試みた結果(図 6)、17 株が A2 subgroup、1 株が B1 subgroup にそれぞれ分類され、また、A2 subgroup 17 株は 3 つのクラスターを形成した。A2 subgroup 17 株の塩基相同性は 96.0~100% と高く、アミノ酸相同性は 100% を示し、pairwise distance は 0.05 未満であった。沖縄検出株と他の国内・国外株で相同性を比較したが、沖縄株特有のアミノ酸変異はみられなかった。

#### D. 考察

本研究結果から、沖縄県における呼吸器感染症は多種類の呼吸器ウイルス感染により引き起こされていることが明らかとなった。

また、今年度研究で新たに HPeV、HCoV および FluC についてウイルス検索を試みた結果、当該ウイルス感染による患者の存在が確認された。

これまで検索した呼吸器ウイルスでは、特に RSV は下気道炎患者から多く検出されたことから、本県における重症呼吸器感染症原因ウイルスの一として、重要なウイルスであり、適切な疫学情報の提供は公衆衛生上有益な情報となるものと思われる。

本研究では HMPV 感染症について、患者年齢、他のウイルスとの重複感染率、流行株の遺伝学的分類主要など精査したが、いずれも国内・国外から既に報告されている知見と類似していた。

一方、HMPV の流行時期は北半球の温帯・亜寒帯気候の地域では冬季から春季、熱帯・亜熱帯気候に位置する台湾では春季から夏季、ベトナムでは雨季、であることが報告されている。南半球の熱帯・亜熱帯気候に位置するブラジルの流行時期は同様に冬季から春季である。

亜熱帯気候に位置する沖縄県では HMPV の明確な流行時期はみられなかった。

A2 subgroup に分類された検出株では系統樹解析の結果、3 つのクラスターを形成したが、同一クラスター分類株はそれぞれ高い相同性を示した。

#### E. 結論

今回、新たに HPeV、HCoV および FluC に起因する呼吸器感染症の発生が確認されたが、沖縄県の重症呼吸器ウイルス感染症については未だ不明な点も多いことから、呼吸器ウイルスサーベイランスは今後も継続させる必要がある。

HMPV に関する今回の研究結果から、沖縄県の HMPV 流行の季節性は明瞭ではない成績が得られたが、今後もデータの蓄積が必要である。

#### F. 参考文献

Peret TCT et al.(2002)Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in North America. J Infect Dis. 185: 1660-3.Colins PL and Crowe JE. (2007) Respiratory syncytial virus and metapneumovirus. Fields Virology. 5th ed. 1601-46.



## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

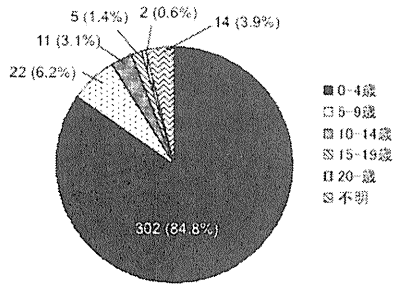


図1: 年齢群ごとの検体数

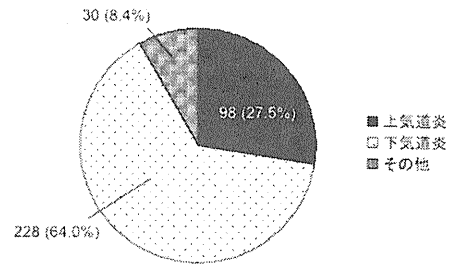


図2: 症状ごとの検体数

表1: ウイルス検索成績

	2010							2011							Total	rate (%)			
	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul			Aug	Sep	Oct
RSV	3	5	3	3	2	2	2	2	2	5	2	3	5	4	3			49	13.8%
HMPV	1	2	3	2			1			1	1	2		2				15	4.2%
FluV1									1	1			1					3	0.8%
FluV2				1														1	0.3%
FluV3	10	2								1	5	2	1					21	5.9%
HRV		1		2		2			1		1	3	2	1	2	1	2	18	5.1%
HRoV	1			1		4	2			1	3	4	1	1				18	5.1%
EV	1	3	3	1	2		3	2		2	3	4	2	2	1	2	1	32	9.0%
AdV	4	2	2	4		8	2	2		1	3	1	2	1		1	1	34	9.6%
HPeV		1		1	2	2	1			1				3	1	1		13	3.7%
FluC										1								1	0.3%
HCoV	1	1	2			3	2		1	1								11	3.1%
Not typed			1	1										1		1	1	5	1.4%
Not detected	8	15	16	12	15	9	12	9	14	3	6	5	10	5	8	11	7	155	45.3%

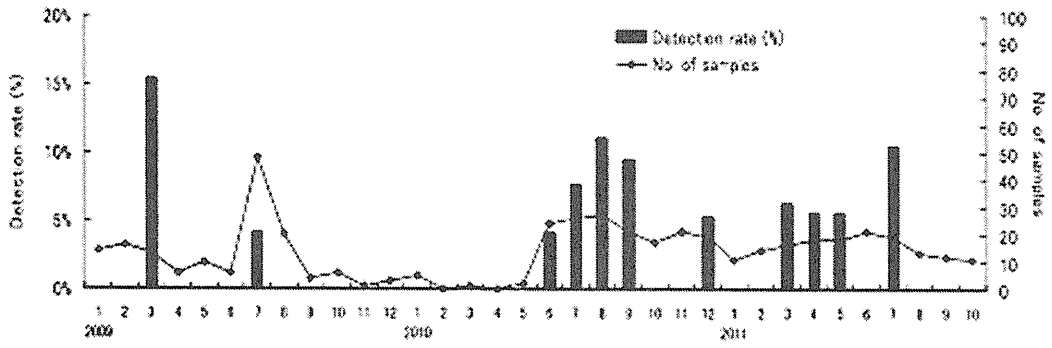


図5:沖縄県におけるHMPVの検出状況(2009~2011)

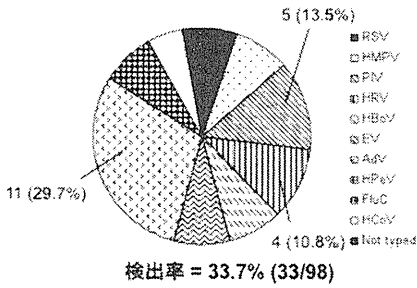


図3:上気道炎症患者からのウイルス検出成績  
上気道炎症を呈した98名中33名から、1種以上のウイルスが検出され、上位3種の検出数を示した

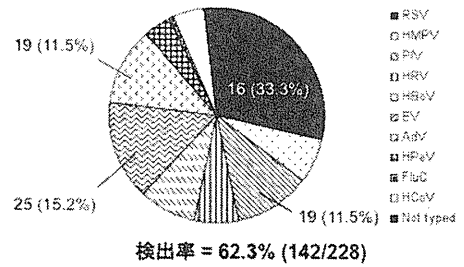


図4:下気道炎症患者からのウイルス検出成績  
下気道炎症を呈した228名中142名から、1種以上のウイルスが検出され、上位3種の検出数を示した

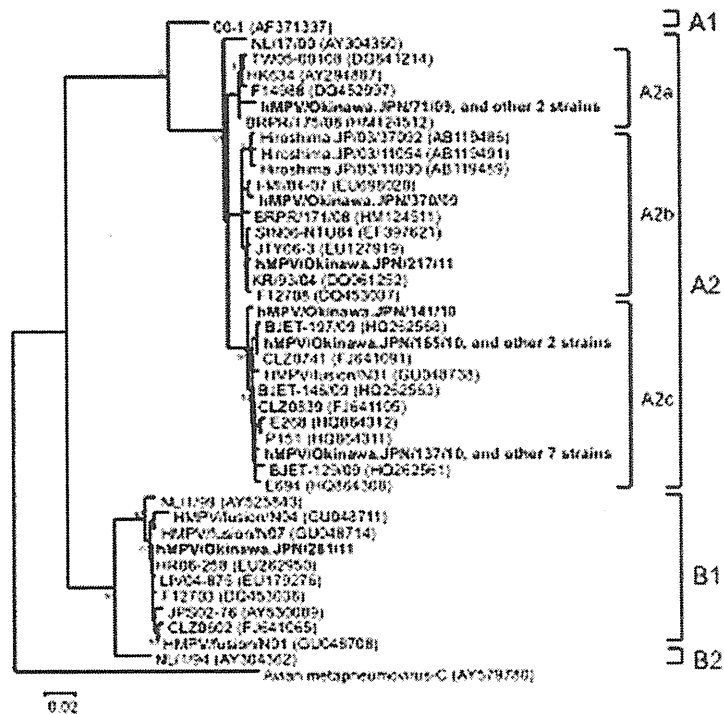


図6:F遺伝子の一部(321bp)に基づくHMPV系統樹

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
研究報告書

ヒトメタニューモウイルスの検索と疫学および臨床学的検討  
—とくに胸部レントゲン画像と重症度に関わる要因について—

研究協力者 吉岡 政純（京都市衛生環境研究所）  
近野真由美、杉江真理子、中村 剛、馬口 敏和、木澤 正人、  
梅垣 康弘、石橋 修、石川 和弘（京都市衛生環境研究所）、  
池田 雄史（京都市北保健センター）、清水 恒広（京都市立病院）、  
森本 佳子、山本 徹（社会保険京都病院）、中島 文明（愛生会山科病院）、  
研究分担者 野田 雅博（国立感染症研究所）  
研究代表者 木村 博一（国立感染症研究所）

## 研究要旨

2011年1月から2011年12月の間に、京都市内の3定点病院を受診した急性呼吸器感染症等患者から採取された咽頭ぬぐい液502検体から、呼吸器ウイルス検索を行った。その結果、ヒトメタニューモウイルス（HMPV）が43株検出され、検出株はHMPV subgroup A2、B1 および B2 型に分類された。年齢別検出率は0～2歳児の患者で高値、月別検出率は3月が高値を示した。

HMPV 陽性患者の臨床データを解析した結果、高熱（38度以上）、発咳を伴う症例が多くみられた。また、1～4歳児が0歳児に比し、重症化、要入院加療傾向を示した。

胸部 X 線画像診断された29症例のうち、16症例に延べ15ヶ所の肺野所見がみられた。末梢肺泡の浸潤影はみられず、肺門を中心に中枢側の気管支および気管支周囲に炎症があると考えられた。

### A. 研究目的

ヒトメタニューモウイルス（HMPV）は2001年に発見された新しいウイルスであり、重症呼吸器感染症の原因の一つである。しかし、これまで京都市における HMPV 感染症の疫学は把握されていない。そこで新たに検査診断体制を整備し、ウイルスサーベイランスと臨床学および疫学的検討を行った。

### B. 研究方法

2011年1月～12月までの間に、京都市内の3ヶ所の定点病院に発咳、発熱、上気道炎、下気道炎等の呼吸器症状を呈して外来受診した小児患者から採取された咽頭ぬぐい液502検体を用いた。

3 定点病院は市内北部、中心部および東部に所在し、年間の小児科受診者数はそれぞれ4,800、22,300 および 4,100 人である。

HMPV 検出は RT-PCR により実施し、RT-PCR により得られた増幅産物の相同性、系統樹解析を行った。

ウイルス分離は Vero E6 細胞を用い、33.5 度、2 週間間隔で継代培養を行い、細胞変性効果を指標にウイルス増殖の有無を判定した。その他、FL 細胞、RD-18S 細胞、Vero 細胞および MDCK 細胞並びに 0 日齢の乳のみマウス（脳内、腹腔内接種）を用いたウイルス分離をあわせて実施した。

臨床学的検討は患者カルテおよび胸部 X 線所見をもとに複数医師により検討された。

### C. 研究結果

#### 1) ウイルス検出および分離成績

咽頭ぬぐい液502検体の PCR を行った結果、43 検体（8.6%）から HMPV が検出された。また、PCR 陽性 43 検体のうち、6 検体（1.2%）