

201225011A

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 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 木村 博一

平成 25 年 (2013 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

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 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 木村 博一

平成 25 年 (2013 年) 3 月

目次

I. 総括研究報告書

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.....	1
木村博一	

II. 分担研究報告書

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.....	21
野田雅博	

山口県における呼吸器症ウイルスサーベイランス.....	96
調 恒明	

呼吸器ウイルス遺伝子の網羅解析に関する研究.....	101
黒田 誠	

未知のウイルスを検出するための新しい分離法・同定法の開発.....	113
水谷哲也	

重症呼吸器ウイルス感染症の臨床的定義及び実態に関する研究.....	122
小澤邦壽	

小児における重症呼吸器ウイルス感染症の臨床的定義に関する研究.....	127
小澤邦壽	

ライノウイルス感染ヒト胎児肺線維芽細胞によって産生が誘導される サイトカインプロファイルに関する研究.....	132
木村博一	

呼吸器感染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.....	139
竹田 誠	

呼吸器感染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.....	149
松山州徳	

呼吸器ウイルスに対する生体防御に関する研究.....	156
岡山吉道	

新規ワクチン開発と感染細胞モデル系の構築.....	161
梁 明秀	

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 24 年度 総括研究報告書

研究代表者 木村 博一

平成 25 年 (2013 年) 3 月

平成 24 年度 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 24 年度 総括研究報告書

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

研究分担者

小澤邦壽 群馬県衛生環境研究所

調 恒明 山口県環境保健センター

竹田 誠 国立感染症研究所ウイルス第三部

野田雅博 国立感染症研究所ウイルス第三部

松山州徳 国立感染症研究所ウイルス第三部

水谷哲也 国立感染症研究所ウイルス第一部

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

岡山吉道 日本大学医学部生体機能医学系分子細胞免疫・アレルギー学分野

梁 明秀 横浜市立大学大学院医学研究科分子生体防御学

研究協力者

筒井理華 吉田綾子 青森県環境保健センター

水田克巳 山形県衛生研究所

荒川美果 榎渕(大貫)泉美 栃木県保健環境センター

塚越博之 吉住正和 小林美保 群馬県衛生環境研究所

昆美也子 新潟県保健環境科学研究所

平野映子 福井県衛生環境研究センター

小渕正次 富山県衛生研究所

柴原乃奈 静岡市環境保健研究所

大内好美 吉田時子 滋賀県衛生科学センター

中川(岡本)玲子 山口県環境保健センター

小村珠喜 島根県保健環境科学研究所

清田直子 熊本県保健環境科学研究所

平良勝也 仁平稔 沖縄県衛生環境研究所

横井 一 田中俊光 千葉県環境保健研究所

宇野優香、神田典子 さいたま市健康科学研究センター

竹内恵美 横須賀市健康安全科学センター

吉岡政純 京都市衛生環境研究所

山下暁朗 横浜市立大学大学院医学研究科分子生体防御学

川上志保 横浜市立大学医学部微生物学
斎藤義弘 東京慈恵会医科大学小児科
森田幸雄 東京家政大学家政学部
藤塚麻子 神奈川県立こども医療センター
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
菅井和子 村田宗紀 宮地裕美子 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
鈴木由美 国立病院機構下志津病院
岡崎 薫 国立病院機構香川小児病院
古谷哲也 国立大学法人東京農工大学 農学部附属国際家畜感染症防疫研究教育センター
石井晴之 倉井大輔 皿谷 健 杏林大学医学部第一内科
安部昌子、田原舞乃、酒井宏治、白戸憲也、松山州徳 国立感染症研究所ウイルス第三部
佐藤 弘 加納和彦、 国立感染症研究所感染症情報センター
網 康至 国立感染症研究所動物管理
加藤 篤 国立感染症研究所放射能管理室
前仲勝実、福原秀雄 北海道大学薬学研究院
江角真理子 日本大学医学部病態病理学系病理学分野

研究要旨

ほとんどの呼吸器ウイルスは、重症呼吸器感染症を引き起こすことが示唆されているが、その実態や病態については不明な点が多い。また、これらのウイルスに対するワクチン開発もほとんどなされていない。そこで、本研究は、重症呼吸器ウイルス感染症を中心とした包括的なウイルスサーベイランス、重症化の病態・機序解明、重症化の臨床的な指標化およびワクチン開発に資する研究を行った。

- 1) 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。ARIs 症例検体から 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(HPIV) 等が本疾患へ強く関与していることを明らかにした。また、これらの分離・検出株の分子疫学解析結果から、我が国で流行しているそれぞれのウイルスは固有の遺伝学的多様性を有すること、ウイルスによっては特徴的な流行様相を示すことが示唆された。喘息患者からの検出は、rhinovirus が最も多く、そのなかで rhino A と C が多く検出された。さらに、重度心身障害児(者)施設内の ARIs 流行は HMPV、HRV および HPIV 感染が主な原因であることが示唆された。
- 2) 小児科領域の呼吸器ウイルス感染症の重症度は、簡便に救急の現場でも把握できるよう、多呼吸、喘鳴、陥没呼吸、酸素需要、哺乳障害の 5 項目の有無で、重症度が適切であると思われた。0-1 項目は軽症、2-3 項目は中等症、4-5 項目は重症と。重症度分類において、中等症重症では、入院率が 90%と高く、軽症と比較し有意差を認めた。また、中等症重症においてウイルス分離率が 70%を越え、軽症と比較し有意差を認めた。検出ウイルスとしては HRV、RSV、HPIV が上位を占め、HRV と RSV の混合感染もそれらに次ぎ多かった。小児のウイルス性呼吸器感染症において、初診時の臨床症状による評価により入院予測が可能であると考えられた。

- 3)成人領域における重症度の指標は、入院後の昇圧剤使用、人工呼吸器使用および予後を考慮すべきと考えられた。この指標を用いた成人重症例の入院患者の検討を行った結果、6例中1例でRSウイルスが検出された。また、予後不良6例中2例で呼吸器ウイルス（死亡退院1例でRSウイルス、ADLの低下により自宅退院困難1例でヒトメタニューモウイルス）が検出された。以上より、成人の急性呼吸器症状を呈する入院患者に呼吸器ウイルス感染が関与し、重症に至る可能性が示唆された。また、小児科領域の呼吸器ウイルス感染症の臨床的な重症度の指標には、多呼吸、喘鳴、陥没呼吸、酸素需要および経口摂取の困難度の計5項目が有用であることが示唆された。
- 4)次世代シークエンサーによる解読リードを病院・地方衛生研究所等でも情報解析できるよう、ネットワーク経由で病原体鑑別するための情報解析パイプラインを構築した。情報解析を習熟していくても簡単な講習会により利用できるよう利便性を考えて作成した。また、次世代型シークエンサーを用いて簡便で迅速なシステム、および多検体を同時に解析するシステムを構築した。このシステムを用いて、重症呼吸器感染症の網羅的解析を実施した。将来的に衛生研究所において次世代型シークエンサーを使用して解析する際の基礎的情報になると考えられる。
- 5)コロナウイルスにおいては、臨床株と ATCC 株を混合して継代すると、プロテアーゼの発現した細胞では、両ウイルスは共に同じように増殖するのに対し、プロテアーゼの無い細胞では、3継代で臨床株は消失し、ATCC 株だけが残存した。これらの結果は、臨床検体から分離したコロナウイルスの維持には、適当な濃度のプロテアーゼあるいは TMPRSS2 発現が必要であることを示唆している。
- 6)ヒトパラインフルエンザウイルス 1 型から 4 型ならびにマウスパラインフルエンザウイルス 1 型 (SeV) の F タンパクが TMPRSS2 で効率よく活性化される。また、ヒトの TMPRSS2 のみならずマウス TMPRSS2 が、同様の活性を持つことが明らかになった。また、TMPRSS2 の発現は、SeV の in vivo 感染において、必ずしも必要でないことが示された。さらに、P3 位の保存グルタミン残基が、SeV のヒト呼吸器上皮細胞における増殖に重要であることが示された。P3 位にグルタミン残基を持つことが、ヒトの呼吸器で増殖する上で重要であり、P3 位にグルタミンをもつ基質に特異性の高いプロテアーゼによって、多くの呼吸器感染症ウイルスが活性化を受けていることを示唆する。
- 8)新型コロナウイルス(HCoV-EMC/2012)のリアルタイム RT-PCR 法による検査診断法の開発・検査診断マニュアル・標準物質(陽性コントロールなど)を作成し、全国衛生研究所における当該ウイルス検査診断体制の確立・普及を行った。
- 9)ヒトマスト細胞に RSV は、感染しないことがわかった。RSV および HRV がヒトマスト細胞を直接活性化することはなく、IgE 依存性の脱顆粒を増強しなかった。HRV 感染によってヒト気管支上皮細胞から産生される thymic stromal lymphopoietin (TSLP)をヒトマスト細胞に5日間添加するとマスト細胞の FcεRIβの発現が増強された。したがって TSLP に長期にマスト細胞が暴露されるとアレルギーによる FcεRI を介したマスト細胞の活性化が増強されることが示唆された。初回喘鳴患者 (3 歳未満) では、86%の症例が RSV あるいはおおよび HRV に感染していた。喘鳴を繰り返した症例にトリプターゼ濃度が高い傾向があった。ウイルス感染と感作が同時に起こることが喘息の発症に極めて重要であることが示唆された。
- 10)HPIV3 感染症に対する有効な感染阻止法や治療法は確立されていない。コムギ無細胞タンパク質合成系を用いた hPIV3 外被タンパク質 hemagglutinin-neuraminidase (PIV3-HN) を合成し、マンノース被覆リポソームと組み合わせた新しいワクチンの開発を行った。また、HN 全長タンパク質

を抗原としたモノクローナル抗体を新たに作製に成功した。

11)ライノウイルス (HRV) 感染ヒト肺線維芽細胞(MRC-5 細胞)が産生するサイトカインのプロファイリングを目的とした研究を行った。また、炎症性疾患に対する治療に広く用いられているステロイド (Fluticasone propionate) の抗炎症効果を *in vitro* で検証した。その結果、HRV 感染 MRC-5 細胞は、種々の炎症性サイトカイン、Th2 サイトカインや気道リモデリングに関連するサイトカインを多量に産生することが明らかになった。特に Th2 サイトカインの産生は Fluticasone propionate により有意に抑制された。ゆえに、HRV の感染によって引き起こされるサイトカイン産生は、感染による過剰な炎症とアレルギー性炎症および気道リモデリングに関与することが示唆された。

A.研究目的

本邦において、重症呼吸器感染症による年間死亡者数は推定で 10 万人を超えていることが推定される。これらの症例の中に、少なからず呼吸器ウイルスが関与していることが推定されるが、その実態は不明であると思われる。特に、乳幼児においては、RSV やヒトメタニューモウイルス (HMPV) 感染による呼吸器感染症は重症化しやすい傾向があるが、重症感染症を引き起こすウイルスの種類や疫学には不明な点が多い。また、市中肺炎以外については、呼吸器感染症の重症度の指標は定まっていない。さらに、喘息は、本邦において増加の一途をたどっており、死者数も毎年 4000 名を超えていることが推定されるが、これらのウイルスは喘息の発症と増悪にも密接に関与することが知られている。加えて、多くの呼吸器ウイルスの効果的なワクチンは未だに開発されていない。このような背景から、重症例を含む呼吸器ウイルス感染症の包括的なウイルスサーベイランス、臨床的な重症度の指標化、重症化の病態解明および効果的なワクチン開発も視野に入れた研究は重要でかつ必要性が極めて高いと思われる。本研究においては、国内の呼吸器ウイルス感染症のサーベイランス、病態解明および制御の拠点である全国地方衛生研究所、大学医学部・大

学病院および国立感染症研究所により以下の内容の研究を行った。

B.研究方法

1. 包括的な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)自治体衛生研究所における重症 (sv)ARIs ウイルスサーベイランス機能充実・強化を図り、積極的な svARIs ウイルスサーベイランス実施と科学的根拠に基づく地域・国の svARIs 感染実態把握を行った。また、自治体衛生研究所等と連携し、検査診断に係る側面的技術協力を行った。

2)小児 svARIs 症例の原因ウイルス究明と臨床像、治療知見等を基盤とした解析を試みた。特に、小児気管支喘息の発症要因、発症時の検出 ARIs ウイルス種、検出頻度、ARIs の重症度基準に即し検出ウイルス種、増悪要因、等について前/後方視的解析を行った。また、これまでの研究知見を基にして、新たな svARIs 重症度基準の策定と策定基準に即応した治療指針等の確立を試みた。

3)国立病院に設置されている重度心身障害児(者)施設内で発生した svARIs 症例の原因ウイルス究明と効果的治療、病

棟内感染制御を図ることにより、院内施設の衛生医療対策を行った。対象ウイルスは、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(HPIV)、ヒトコロナウイルス(HCoV) およびヒトボカウイルス(HBoV)とした。

2. 重症呼吸器ウイルス感染症の実態調査および重症度の臨床的な指標化に関する研究

1)成人においては、研究デザインを前向き観察研究とした。対象患者は、2012年8月1日から10月30日に杏林大学医学部付属病院を受診し、咳嗽・痰・発熱などの呼吸器感染症状を有した同意の得られた18歳以上の入院症例を対象とした。検体採取方法：喀痰およびスワブにて鼻咽頭拭い液を採取した。種々の呼吸器ウイルスを(RT-)PCR法にて同定した。観察項目は気道検体からのウイルス同定とし、副次項目はウイルス検出症例に注目し、臨床的特徴や予後について評価した。定義は、肺炎は喀痰・発熱・呼吸困難などの臨床症状に加え、胸部エックス線写真で新たな陰影や陰影の増悪を認める症例と定義した。COPDの急性増悪は咳嗽、喀痰、呼吸困難などの呼吸器症状が増加し入院治療が必要、かつ他疾患の合併が除外された症例と定義した。喘息発作は気管支喘息の発作を起こし、致命的な発作や初期治療が奏効せず入院治療を必要とした症例と定義した。また、重症度に関しては、対象症例の呼吸器疾患だけではなく合併症の有無にも関わるため集中治療の必要性和転帰に注目し以下のように評価した。重症

例(治療)は、入院後5日以内の人工呼吸器もしくは昇圧剤による治療を有した症例と定義した。予後不良例は、死亡退院、もしくは新たに自宅生活が困難となった症例と定義した。

2)小児科領域における重症度は呼吸症状のうち、多呼吸、喘鳴、陥没呼吸、酸素需要、哺乳障害の5項目について有無について調査し、満たす項目別に重症度を設定した。0-1項目は軽症、2-3項目は中等症、4-5項目は重症とした。なお、呼吸数に関してはAHAガイドラインに準拠し、1歳未満は呼吸数60回/分 \leq 、1歳以上3歳未満は呼吸数40回/分 \leq 、4歳以上、13歳未満は呼吸数30回/分 \leq 、13歳以上は呼吸数20回/分 \leq を多呼吸と定義した。

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

1)ヒト胎児肺線維芽細胞(MRC-5, ATCC; CCL-171)を、常法により培養した後、マイクロプレートに播種し、MRC-5細胞に1MOIのHRVを感染させ、24時間後の培養上清および細胞を回収した。サイトカイン産生とシグナルタンパク産生との関連性について検討するため、培養上清中に含まれる29種類のサイトカインの解析およびRSV感染MRC-5細胞のリン酸化シグナル関連タンパク質について解析を行った。また、コルチコステロイド(fluticasone propionate)のRSV感染によるサイトカイン産生抑制効果に関する研究も行った。

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

1)H1PV1 (09-2272株)、HPIV2 (09-2331株)、HPIV3 (09-1835株)は、臨床分

- 離株を用いた。HPIV4 は、ATCC より標準株を購入した。SeV は、感染を容易に検出するために赤色蛍光タンパク質 (RFP) を発現する組換えセンダイウイルス (SeV-RFP(wt)) を用いた。細胞は、通常の Vero 細胞、ヒト TMPRSS2 を発現する Vero 細胞(Vero/TMPRSS2)、通常の HeLa 細胞、ならびにマウス TMPRSS2 を発現する HeLa 細胞 (HeLa/mouseTMPRSS2) を利用した。
- 2) Reverse genetics 手法を用いて、SeV F タンパク質の P3 位のアミノ酸 (Q) を A、S、I および V に変異させた変異株 4 種ならびに P2 位のアミノ酸 (S) を R および V に変異させた変異株 2 種 (SeV-RFP-S115R、-S115V) を作成した。
 - 3) HIPV1~4 型および SeV-RFP(wt) を Vero、Vero/TMPRSS2 細胞、SeV-RFP(wt) を HeLa、HeLa/mouseTMPRSS2 細胞 SeV-RFP(wt)、SeV-RFP-Q114A、-Q114S、-Q114I、-Q114V、-S115R、-S115V をヒト肺上皮細胞株 Calu3 細胞、ヒト腸管上皮細胞株 Caco2 細胞へ感染させて、経時的にウイルス増殖を解析した。
 - 4) 上記ウイルスそれぞれの F タンパク質の細胞質内領域のペプチドを合成し、ウサギを免疫して抗血清を作成した。F タンパク質を検出し、F タンパク質の開裂について解析した。
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
 - 1) TMPRSS2 を発現した細胞 (HeLa-TMPRSS2) と、TMPRSS2 非発現細胞 (HeLa) に ATCC 株 (lab) と臨床株 (ci-N、ci-S) を感染させ感染価を比較した。また、VSV シュードタイプウイルスの表面に、ATCC 株と臨床株の S 蛋白をもたせたものを作成し、細胞侵入実験に用いた。さらに、それぞれ ATCC 株と臨床株を 10 の 3 乗 PFU 混合して細胞に感染させ、培養液中のウイルスを Real-time PCR により、それぞれのウイルスの存在比を定量した。
 - 2) 新たに、リアルタイム RT-PCR 法による HCoV-EMC/2012 の検査診断法の開発、検査診断マニュアルの作成および標準物質(陽性コントロールなど)の作成・配布を行い、全国衛生研究所の検査診断体制を確立した。
 6. 呼吸器ウイルスに対する生体防御に関する研究
 - 1) ヒトマスト細胞に RSV と HRV が直接感染するかあるいは付着するかをマスト細胞にウイルスを添加し、real time RT-PCR 法でウイルス RNA の増幅、ウイルス蛋白の存在を免疫染色法にて調べた。ヒトマスト細胞は、末梢血由来培養マスト細胞 (12-15 週培養)、あるいは臍帯血由来培養マスト細胞 (12-15 週培養)を用いる[1]。RSV は long strain (ATCC[®] Number: VR-26TM)、HRV は strain HGP (ATCC[®] Number: VR-482TM) および strain 1059 (ATCC[®] Number: VR-284TM)を用いる。RSV 抗体は FITC 標識モノクローナル RSV 抗体 (IMAGENTM)を使用する。RSV RNA の定量解析は RSV F (fusion) 蛋白に対するプライマーを設計した。
 - 2) RSV あるいは HRV がヒトマスト細胞を直接活性化するかまたは IgE 依存性の脱顆粒を増強するかをウイルス添加による脱顆粒の程度をヒスタミン遊離量を指標に調べた
 - 3) RSV あるいは HRV 感染したヒト正常気道上皮細胞 (NHBE) のマスト細胞への影響を共培養の系と NHBE の細胞上清を用いる系を用いて検討する。
 - 4) RSV あるいは HRV 感染後に初めて喘

鳴を起こした3歳未満の子供の喀痰中のマスト細胞トリプターゼが増加している症例が喘息へ移行するのかを3年追跡調査した。

7. 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) コムギ無細胞系発現ベクター pEU-E01-GST-PIV3HN および pEU-E01-His-PIV3HN を構築し、コムギ無細胞タンパク質合成系を用い、PIV-3-HN タンパク質全長タンパク質の合成を行った。
- 2) 正常細胞の不死化を誘導するレンチウイルスベクターとして pLenti6_TERT, pLenti6_HPVI6-E7, pLenti6_sh-p16_TetOff_FRT-GFP-BSD を作製した。作製したベクターを用い、MRC-5/TERT 細胞に不死化誘導因子を導入した。次にこれらの細胞株に 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、抗生物質である Zeocin または Puromycin を用いて安定発現系細胞株を樹立した。

C. 研究結果

1. 包括的な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) 山形県、沖縄県、栃木県、山口県、新潟県、群馬県、福井県、熊本県、千葉県、静岡市、さいたま市および横須賀市のそれぞれの県・市域における svARIs ウイルスサーベイランス(2012年1月～2012年11月末)の結果、RSV: 253株、HMPV: 150株、HRV: 527株、HPIV: 150株、HCoV: 35株および HBoV: 66株等がそれぞれ分離・検出された。その他、エンテロウイルス(EV)、サフォードカルディオウイルス

(SAFV)、パレコウイルス、インフルエンザウイルス(FuIV)およびアデノウイルス(AdV)等の ARIs ウイルスが分離・検出された。

- 2) 山形県においては、HPIV1 型(-1)の分離株数は隔年で増多傾向を示したが、流行の明瞭な季節性はない。HPIV-1 好発年齢は2～4歳で、HPIV-3 患児年齢に比し、やや高い傾向を示した。2002-2009年の HPIV-1 分離株 182株について、HN 遺伝子の塩基配列(1,233bps)を解析した結果、分離株は大きく2つのクラスターに分類され、これらは1980年代後半に分岐した可能性が推測された。HPIV-2はHPIV-1が増多傾向を示した翌年の秋季から冬季に多数分離される傾向を示す。好発年齢は3-5歳であり、HPIV-3好発年齢に比し、やや高い年齢を示した。分離代表株の遺伝子解析結果から、流行株は3つの clade に分類される。好発年齢は2歳以下の乳幼児が50%以上を占め、低年齢児 svARIs の重要な原因ウイルスである。HPIV-4が2011年9月～2012年2月にかけて、HPIV-4a および-4b 混合の地域流行を確認した。
- 3) 沖縄県域においては、RSV が 87 株(14.2%)、HMPV が 23 株(3.8%)、HPIV が 48 株(7.8%)、HRV が 34 株(5.6%)、HBoV が 33 株(5.4%)、AdV が 50 株(8.2%)、EV が 72 株(11.8%)、ヒトパレコウイルスが 19 株(3.1%)、FuIV が 4 株(0.7%)、ヒトヘルペスウイルス1型が 7 株(1.1%)、合計 377 株のウイルスが 326 検体(53.3%)から検出された。また、ARIs ウイルス不検出であった 385 検体から、HCoV 26 株(6.8%)が検出された。検出株は HCoV-NL63 が 8 株(2.1%)、-OC43 が 15 株(3.9%)、-HKU1 が 3 株(0.8%)に分類された。

- 4)新潟県域においては、2010年12月、2011年1月、2月および7月の検体から HCoV-NL63 が10株および2011年2月、3月、5月、6月および7月の検体から HCoV-OC43 が10株検出されたが、HCoV-229E および HCoV-HKU1 は検出されなかった。検出株のスパイク領域の遺伝子解析結果から、HCoV-OC43 は2つのクラスターに分かれ、それぞれのクラスターで検出時期が異なっていた。
- 5)福井県において、HMPV は55検体(6.9%)から検出され、検出時期は主として1月から6月期であった。検出55株の *F* 遺伝子について系統樹解析等を行った結果、subgroup A2 が31株、subgroup B1 が2株および subgroup B2 が22株にそれぞれ分類された。検出株間の相同解析では subgroup A2 分類株では95.6-100%、subgroup B2 分類株では97.5-100%と高かった。また、検出55株の *F* 遺伝子では positive selection site は確認されなかった。
- 6)山口県において、RSV はほぼ年間を通じて検出された。2008年4月-2010年3月期および2011年4月-2012年12月期は subgroup A(-A)分類株が、また2010年4月-2011年3月期は subgroup B(-B)がそれぞれ優勢に検出された。RSV-A 分類株の genotype はすべて GA2、RSV-B 分類株はすべて BA に近縁であった。2012年に検出された subgroup A のうち2株は、G 遺伝子上に72塩基の重複を有する変異株であった。
- 7)栃木県においては、RSV : 42株、HRV : 29株および HPIV : 5株等が分離・検出された。検出 RSV は subgroup A : 40株、subgroup B : 2株に分類された。RSV-A 分類株は、genotype NA1 : 38株 および C 末端超可変領域に72塩基の重複を有する genotype ON1 : 2株に分類された。RSV-B 分類株はすべて genotype BA に分類された。検出 HRV は、species A(-A) : 10株(34.5%)、species B(-B) : 7株(24.1%) および species C(-C) : 12株(41.4%)にそれぞれ分類された。我が国では HRV-A および-C 分類株がこれまで主流とされているが、本研究では HRV-B 分類株が高率(24.1%)に検出された。分子系統樹解析の結果、HRV-A、-B および-C は、それぞれ7、4 および8つの genotype に分類された。HRV-A のうち5株および HRV-B のうち2株は、これまでの genotype とは異なる genotype に分類された。
- 8)我が国の ARIs 患者から検出される HRV-C の *VP4/VP2* 領域の分子疫学解析を行うため、2009年4月~2011年12月の間に熊本県および栃木県の ARIs 患者から採取された鼻咽腔ぬぐい液あるいは気管吸引液1,345検体の HRV 検索を実施した。その結果、165検体(12.3%)から HRV が検出され、そのうち63株が HRV-C であった。代表的な19株の HRV-C について、近隣結合(NJ)法と最尤(ML)法による系統樹解析を行い、これら19株は11の genotype に分類され、いずれも1870年代前半を起源として、その後、分岐した可能性が示唆された。また、塩基置換速度は 3.07×10^{-3} substitutions/site/year と推定された。
- 9)Real-time RT-PCR 法による RSV および HMPV 検出系の構築を試みた。その結果、RSV の *F* 遺伝子に対する Real-time RT-PCR は、RSV 感染症の遺伝子診断に有用であることが明らかとなった。
- 10)2010年11月から2012年5月にかけて

て横浜医療センター小児科を受診した ARIs 患児から採取された鼻腔拭い液 151 検体について、(RT-)PCR により原因ウイルスの検索を行った。その結果、HRV が 43 株、RSV が 21 株、HMPV が 7 株、HPIV が 6 株、AdV が 5 株および HBoV が 7 株、それぞれ検出された。これまでのウイルス検出成績は臨床所見等とあわせて、小児の新たな ARIs 重症度基準の策定の基礎データに活用した。

11) 愛媛病院および下志津病院において重心施設内の ARIs 流行症例について、原因ウイルスの究明を本年度も継続して行った。本年度は HMPV および HRV の流行が確認され、2009 年 10 月から 2012 年 9 月までの 3 年間で HRV:4 回、HMPV:3 回、HPIV:2 回、HCoV と EV がそれぞれ 1 回、合計 11 回の ARIs ウイルス流行が確認された。また、それぞれのウイルスでは流行経過・臨床症状・検査所見などに特徴がみられた。いっぽう、病原体不明の ARIs 流行も約 30% 存在し、実態を明らかにして流行防止を図るには、今後も調査研究の継続が必要と考えられた。また、重症心身障害児(者)施設において 2011 年 10 月～2012 年 8 月に発生した ARIs 9 事例について、原因ウイルスの探索を試みた。その結果、HRV が 3 事例、HPIV が 2 事例、HMPV が 1 事例、HCoV が 1 事例からそれぞれ検出された。HMPV や HRV はこれまでも当該施設にて流行が確認されており、一定の比率で病棟内流行を引き起こすことが考えられた。

2. 重症呼吸器ウイルス感染症の実態調査および重症度の臨床的な指標化に関する研究

1) 成人重症例は 39 例であった。平均年齢

は 69 歳 (64-78)、男性 20 例：女性 19 例であった。肺炎が 15 例で最も多く、COPD 急性増悪と気管支喘息が 6 例ずつと次いで多かった。呼吸器ウイルスが検出されたのは、全症例の 15% (6/39 例) で、その内訳は RSV3 例、HRV2 例、HMPV1 例であった。その 6 例の基礎疾患は COPD 急性増悪 2 例と喘息 4 例であった。肺炎症例は 15 例あったが、呼吸器ウイルスの検出は認めなかった。重症例(治療)は 6 例(肺炎 4 例、COPD 急性増悪 2 例)で、全体の 15% を占めていた。その重症例(治療) 6 例のうち、呼吸器ウイルス (RSV) が検出されたのは、1 例 (17%) であった。予後不良例(死亡・自宅退院不能例)は 12 例 (31%) みられたが、このうち呼吸器ウイルスが検出されたのは 2 例 (17%; RSV 1 例、HMPV 1 例) であった。COPD の急性増悪症例 6 例(表 2)のうち、2 例 (33%) で RSV が検出されたが、喀痰の一般細菌培養では有意な菌を認めなかった。また COPD 病期が III・IV 期と進行した閉塞性換気障害を認める症例が大半を占め、ADL の低下例が 2 例みられた。今回、呼吸器ウイルスが検出された COPD の急性増悪 2 例において胸部エックス線写真では明らかでなかったが、胸部 CT で気管支周囲のすりガラス影をみとめ気管支肺炎の所見を呈していた。気管支喘息発作例 6 例(表 3)は全例とも呼吸不全を呈していたが、重症例(治療)は含まれていなかった。呼吸器ウイルスは 4 例 (67%) で検出され、RSV1 例、HRV2 例、HMPV1 例であった。予後不良例は HMPV が検出された 1 例のみだったが、その症例は死亡退院ではなかった。

2) 小児科領域における対象は 242 例、男

児 78 例(32.3%)、女児 164 例(67.8%)。調査時月齢は、 25.7 ± 30.2 カ月 (Mean \pm SD, 1~13 歳)。入院は 157 例(64.9%)、気管支喘息の診断は 134 例(55.4%)であった。何らかの呼吸器ウイルスが検出された児は 157 例(64.9%)、検出されたウイルスの種類と頻度は、HRV65 例(26.6%)、RSV41 例(16.9%)、HPIV10 例(4.1%)、RSV+HRV9 例(3.7%)、HEV7 例(2.9%)、HMPV5 例(2.1%)、Adv4 例(1.7%)、HRV+Adv4 例(1.7%)、HBoV3 例(1.2%)検出なし 86 例(35.5%)であった。今回定義した重症度分類において、軽症は 112 例(46.3%)、中等症 86 例(35.5%)、重症 44 例(18.2%)であった。それぞれの重症度におけるウイルス検出率は、軽症 54.5%、中等症 73.3%、重症 75.0%であった。軽症と中等症、軽症と重症では有意差を認め、中等症と重症には有意差を認めなかった。検出されたウイルスの種類と頻度を臨床的重症度別に図 2 に示す。重症度分類における入院率は軽症 32.1%、中等症 89.5%、重症 97.7%であり、軽症と中等症、軽症と重症において有意差を認め、中等症と重症には有意差を認めなかった。

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

1)HRV 感染 24 時間後では、炎症性サイトカインの IL-6、TNF- α 、Th1 サイトカインの IL-12、Th2 サイトカインの IL-5、IL-10、および IL-13、好中球遊走サイトカインの IL-8 および IP-10、単球遊走サイトカインの MCP-1、増殖因子である PDGF-bb および VEGF 等、多くのサイトカインが有意に産生された。これらのサイトカイン産生はステ

ロイド剤である Fluticasone propionate により有意に抑制された。

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

- 1)HIPv1 (09-2272 株)、HPIV2 (09-2331 株)、HPIV3 (09-1835 株)、HPIV4 (ATCC)、SeV-RFP(wt)は、トリプシン非添加の状態では、Vero 細胞では、プラークを形成できないが、Vero/TMPRSS2 細胞においては、トリプシン非添加の状態でも明瞭なプラークを形成することが明らかになった。
- 2)HIPv1 (09-2272 株)、HPIV2 (09-2331 株)、HPIV3 (09-1835 株)、HPIV4 (ATCC) は、トリプシン非添加の状態では、Vero 細胞では、多段階増殖できないが、Vero/TMPRSS2 細胞においては、トリプシン非添加の状態でも多段階増殖することが明らかになった。
- 3)SeV-RFP(wt)は、トリプシン非添加の状態では、Vero や HeLa 細胞には、感染はするものの、最初に感染した細胞から次の細胞へと感染が拡大することはできない(多段階増殖できない)が、Vero/TMPRSS2 や HeLa/mouse TMPRSS2 細胞においては、トリプシン非添加の状態でも、感染が効率よく拡大し、多段階増殖することが明らかになった。
- 4)HPIV1 (09-2272 株)、HPIV3 (09-1835 株)、HPIV4 (ATCC)、SeV-RFP(wt)を Vero あるいは Vero/TMPRSS2 細胞に感染させて培養液にトリプシン添加、あるいは非添加の状態では培養後、F タンパク質を SDS-PAGE ならびに Western blot 法にて解析した。その結果、HIPv1 (09-2272 株)、HPIV3 (09-1835 株)、HPIV4 (ATCC)、SeV-RFP(wt)のすべての F タンパク質が、トリプシン非依存的に TMPRSS2 によって開裂することが明らかになった。

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

1) ATCC 株のウイルス増殖は TMPRSS2 発現細胞と非発現細胞では変わりは無かったが、臨床株では非発現細胞で10分の1程度低かった。同様の結果は VSV シュードタイプウイルスを用いた感染実験でも見られた。ウイルスの宿主プロテアーゼ利用を解析するために、カテプシンの阻害剤 (EST) と TMPRSS2 の阻害剤 (camostat) を用いてウイルスの細胞侵入阻止効果を調べたところ、ATCC 株では EST に阻止される傾向に、臨床株ではカモスタットに阻止される傾向にあった。この傾向がウイルスの増殖に及ぼす影響を調べるために、ATCC 株と臨床株を混合して増殖させ、その存在比をリアルタイム PCR で定量したところ、TMPRSS2 の無い細胞では、臨床株は3継代で消失した。臨床株は ATCC 株のように、カテプシンを利用出来るように馴化したと考えられる。

2) リアルタイム RT-PCR 法による HCoV-EMC/2012 の検査診断法の開発、検査診断マニュアルの作成および標準物質(陽性コントロールなど)の作成・配布を行った結果、全国衛生研究所で当該ウイルスの検査診断が可能になった。

6. 呼吸器ウイルスに対する生体防御に関する研究

1) ヒトマスト細胞に RSV が直接感染するかをマスト細胞に RSV (MOI = 0.1, 1, および 10) を添加し 24, 48, 72 および 96 時間後に real time RT-PCR 法でウイルス RNA の増幅、ウイルス蛋白の存在を免疫染色法にて調べたが、全く感染は認められなかった。

2) RSV (MOI = 0.1, 1, および 10) をヒトマスト細胞に添加 3, 5, および 48 時間後のヒスタミン遊離量を調べたところ、RSV はヒトマスト細胞を直接活性化しなかった。RSV (MOI = 0.1, 1, および 10) および IgE をヒトマスト細胞に添加 3, 5, および 48 時間後に anti-IgE を添加し、脱顆粒を検討したが、IgE 依存性の脱顆粒を RSV 添加は増強しなかった。

3) RSV (MOI = 0.1) をヒト気管支上皮細胞に添加 3 時間後、IgE で感作したヒトマスト細胞と 48 時間共培養し、マスト細胞を回収して anti-IgE で刺激し、ヒスタミン遊離量を調べた。ヒト気管支上皮細胞は何ら脱顆粒に影響を及ぼさなかった。

4) HRV がヒトマスト細胞を直接活性化するかまたは IgE 依存性の脱顆粒を増強するかを調べた。HRV (MOI = 0.1, 1, および 10) はヒトマスト細胞を直接活性化しなかった。また、IgE 依存性の脱顆粒をウイルス添加は増強しなかった。

5) 初回喘鳴児 (3 歳未満) の喀痰中のマスト細胞トリプターゼが増加している症例が喘息へ移行するのかを3年追跡調査を開始した。55 例では、RSV 単独感染、RSV+HRV 複合感染、HRV 単独感染を合わせると 86% に達した。喀痰の細胞分画結果では、好酸球数の増加を認めた。現時点では喘鳴を繰り返した症例にトリプターゼ濃度が高い傾向はあるものの有意差はなかった。

7. 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) 昨年度より引き続き、新規 HPIV3 経鼻ワクチンの開発のための基盤研究を実施した。本法は、樹上細胞やマクロフ

ページなどの抗原提示細胞に直接的かつ効率的に抗原を運ぶことが可能であり、従来と比較して少量の抗原タンパク質で免疫誘導が可能である。我々はマンノース被覆リポソーム (Mannose coated liposome: MCL) を用いたワクチンデバイスを開発するため、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて作製した hPIV3-HN 全長タンパクを MCL 内に封入した。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 μg にまで増加した。

- 2) マウスミエローマ細胞を用いたハイブリドーマを作製した結果、HN に特異的なクローンが、48 種類樹立できた。13 種類のハイブリドーマ上清全てがリコンビナント HPIV3-HN タンパク質を認識できることが確認された。
- 3) ヒト胎児肺由来線維芽細胞 MRC-5 細胞に hTERT および p16INK4 に対する shRNA を定常的に導入し、通常培養法にて長期培養を行った。現段階で少なくとも 120 回以上の継代が可能な不死化 MRC-5/hTERT_shp16 細胞を樹立した。また、これらの細胞株にウイルス感染時に上清中に分泌型アルカリフォスファターゼ (SEAP) を分泌するレポーター遺伝子 pIRES-ISREx5-AP-1x5-NF-kBx5-SEAP を導入し、ウイルス感染を定量的に検出できる細胞系を構築できた。

D. 考察

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) 全国域の ARIs ウイルスサーベイランスを実施した結果、RSV、HMPV、HRV、HPIV、HBoV および HCoV 等、多数の svARIs ウイルス株が分離・検

出された。また、種々の ARI ウイルスの流行パターンが明らかになった。

- 2) 分離検出された種々の ARI ウイルスの分子疫学解析を行った結果、山形県の HPIV-1 分離株においては、大きく 2 つのクラスターに分類され、これらは 1980 年代後半に分岐した可能性があること、分離 HPIV-3 株は 3 つの clade に分類されることを示唆した。また、福井県で検出された HMPV は HMPV-A2 および -B2 が主流で、-B1 は僅かであり、F 遺伝子には positive selection site は確認されないことを明らかにした。栃木県で検出された RSV-A の一部は新しい genotype ON1 であることと以前 genotype GA2 分類株は現在では genotype NA1 に進化分類されることを示した。また、熊本県で検出された HRV-C について ML 法による系統樹解析を行った結果、これらの株は 1870 年代前半を始祖ウイルスとする多数の genotype に分類された。また、塩基置換速度は 3.07×10^{-3} substitutions/site/year と推定した。
- 3) 重度心身障害児・者施設内の ARIs 流行は、HRV、HPIV、HMPV、HCoV などに起因することが推察された。それぞれの原因ウイルス別の臨床所見、流行様相には特徴的な所見、様相が示された。

2. 重症呼吸器ウイルス感染症の実態調査および重症度の臨床的な指標化に関する研究

- 1) 入院を要した成人の急性呼吸器疾患症例の約 15% に 3 種類の呼吸器ウイルス (RSV、HRV および HMPV) が検出された。検出された症例は COPD や喘息など慢性呼吸器疾患の急性増悪例であり、呼吸器ウイルスの関与が示唆された重要な症例と思われる。また、人工

呼吸器管理を必要とした重症例(治療) 1例ではRSVが検出され、その例は最終的に死亡退院となった。この結果もRSV感染が予後不良である以前の海外報告と一致した2)。更に、入院治療を要した喘息発作例ではADL低下例の割合が高く、自宅退院困難になった症例でHMPVが検出されており、呼吸器ウイルス感染の全身状態(ADLの低下)に影響を与える可能性が考えられた。さらに、呼吸器ウイルス感染が全身状態(ADLの低下や基礎疾患の増悪)への影響、また人工呼吸器や昇圧剤を必要とする重症例に潜在的に関与している可能性が示唆された。

2)小児領域においては、呼吸器ウイルス感染症の臨床的な重症度指標として、多呼吸、喘鳴、陥没呼吸、酸素需要の4項目と経口摂取の困難度も重症度の1項目、計5項目が有用であることが示唆された。

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

1)HRV感染によってヒト胎児肺線維芽細胞が、多くのサイトカインを産生・放出することが明らかになった。これらの多量のサイトカイン産生のなかで、Th1細胞とTh2細胞のバランスがTh2細胞優位になることが、部分的にはあるが喘息の発症や症状の悪化に関与していることが示唆された。

2)ステロイド剤はウイルス感染によって産生が上昇したTh2サイトカインをはじめとするいくつかのサイトカイン産生の抑制に関与することも示唆され、HRV感染により引き起こされる喘息の病態緩和につながると考えられた。

3)HRV感染によるMRC-5細胞の炎症性

サイトカインを中心としたサイトカインの異常産生による生体反応機構は、単に呼吸器感染症として急性の気道炎症を惹起するだけではなく、喘息の発症や増悪および気道リモデリング等の重要な機構になっていると考えられた。

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

1)HIPV1、HPIV2、HPIV3、HPIV4、ならびにSeVもまた、TMPRSS2を自身の膜融合タンパク質の活性化(開裂)に利用できることが明らかになった。TMPRSS2は、自身の活性化のために自己開裂する酵素であり、開裂部位のP1-P2-P3位のアミノ酸はそれぞれR-S-Qであるが、SeVや、ヒトメタニューモウイルス、インフルエンザウイルスH1亜型の膜融合タンパク質のそれらと同一である。また、インフルエンザウイルスH2亜型、H3亜型、ヒトパラインフルエンザ1型のそれらも、アミノ酸の性質や構造上、R-S-Qと非常に似通ったもの(R-S-EまたはR-T-Q)で構成されている。一方、ヒトへの感染性を持たないウイルスでは、それらのアミノ酸は、TMPRSS2のものとは類似性をあまり有していない。また、TMPRSS2以外の膜貫通型セリンプロテアーゼのP1-P2-P3位のアミノ酸は、R-S-Qとは、性質の異なるアミノ酸で構成されている。すなわち、P1-P2-P3位のアミノ酸にR-S-Qあるいは、それらと類似性をもつアミノ酸を有することが、TMPRSS2による開裂ならびにヒトの呼吸器上皮での増殖に重要であると推測した。そこで、SeVのReverse geneticsの系を用いて、そのことを検証した。その結果、P2位のS残基の変異は、SeVの増殖に大きな影響を与えなかったが、P3位のQ残基の変異は、

SeV の増殖に顕著な低下を引き起こした。

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

1) 臨床分離株は ATCC 株と比較して TMPRSS2 をエンドソームのカテプシンよりも好んで利用し、細胞侵入することを示唆している。しかし、ATCC 株も元は 1966 年に分離された臨床株である。当時の論文を調べると、培養液の組成にはトリプシンが含まれておらず、また継代にもトリプシンが含まれないことから、このウイルスはプロテアーゼの無い環境に馴化したと考えられる。一方、近年分離されたウイルスの培養液にはトリプシンが含まれていた記載がある。生体内のウイルスは肺胞特異的なプロテアーゼ、特に TMPRSS2 を利用して感染すると考えられるので、生体内にあるウイルスそのものを分離するためには、TMPRSS2 発現細胞を使うことが望ましいと思われた。

2) 新型コロナウイルス(CoV-EMC/2012)の検査診断法の確立・普及により、全国衛生研究所において当該ウイルスの検査診断が可能になった。

6. 呼吸器ウイルスに対する生体防御に関する研究

1) 今まで、RSV や HRV が直接ヒトマスト細胞セルラインを活性化させ、脱顆粒を起こすという報告があるが、我々の研究結果では、ヒトマスト細胞では再現性は取れなかった。RSV が気道上皮細胞に感染すると、様々なサイトカインが気道上皮細胞から産生されるが、直接、脱顆粒を惹起することはできなかった。HRV 感染によってヒト気管支上皮細胞から産生される TSLP をヒト

マスト細胞に 5 日間添加するとマスト細胞の FcεRIβ の発現が増強された。したがって TSLP に長期にマスト細胞が暴露されるとアレルギーによる FcεRI を介したマスト細胞の活性化が増強されることが示唆された。生まれて初めて喘鳴を起こした 3 歳未満の子供では、86% の症例が RSV あるいは/および HRV に感染していた。喘鳴を繰り返した症例において喀痰中トリプターゼ濃度が高い傾向があったので、今後症例数をさらに増やし統計処理を行う予定である。

7. 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) HN-MCL を 5 μg タンパク/15 μL (マウス 1 匹分) になるよう調製し、polyIC アジュバント存在下または非存在下にて Balb/C マウスに経鼻投与した。HN-MCL と polyIC と共投与した群では、抗原特異的な血中 IgG および鼻洗浄液中の IgA 抗体が認められたことから、個体差はあるものの有意に抗体産生を誘導したと考えられた。

2) hTERT および p16INK4 に対する shRNA 導入細胞は、今後種々のウイルスに感受性があるか否かの検討を行う。分泌型アルカリフォスファターゼ (SEAP) を分泌するレポーター遺伝子 pIRES- ISREx5-AP-1x5-NF-kBx5-SEAP を導入細胞は TNF-α や LPS 刺激においても細胞上清中に SEAP を分泌することから、本細胞はウイルス感染にともなう pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) を検出する新たなアッセイ系としても活用可能であると思われる。

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 EV68 などの ARIs への関与を明らかにした。
 - 2) 上記 svARIs ウイルスについて、詳細な分子疫学解析等を行い、それぞれのウイルス感染症の我が国の最近の疫学を明らかにした。
 - 3) 医診連携体制のもとに実施した小児 ARIs を対象にした研究成果を基に、小児科領域の ARIs 重症化基準を策定、公開した。
 - 4) 施設内の svARIs ウイルス流行の原因ウイルスを診断し、治療指針、感染拡大防止対策の一助とした。
 - 5) 地方衛生研究所における svARIs ウイルスサーベイランスに係る不断の側面的技術協力を行った。
2. 重症呼吸器ウイルス感染症の実態調査および重症度の臨床的な指標化に関する研究
 - 1) 成人における呼吸器ウイルスが入院を必要とした喘息・COPD の急性増悪患者に検出された。呼吸器ウイルスの気道感染が呼吸不全を引き起こし入院が必要となるだけでなく、集中治療を必要とし生命予後や ADL の低下も引き起こしうると考えられた。
 - 2) 小児科領域における呼吸器ウイルス感染症の重症度分類は多呼吸、喘鳴、陥没呼吸、酸素需要および経口摂取不良の 5 項目が有用であることが示唆された。この項目により、初診時臨床症状による評価により入院予測が可能であると考えられた。
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
 - 1) 本研究により、HRV 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。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
 - 1) TMRSS2 のウイルス性肺炎発症に重要であることの可能性とヒトの呼吸器ウイルスの膜融合タンパク質が、P3 位に Q を持つ意義を強く示唆する結果が示された。
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
 - 1) HeLa-TMRSS2 細胞は HCoV-229E の臨床株の分離と維持に良い培養細胞である。また、プロテアーゼ阻害剤のカモスタットは、SARS や NL63 と同様に 229E の感染も抑えることができることが解った。
 - 2) 新型コロナウイルス (CoV-EMC/2012) の検査診断法の確立・普及により、全国衛生研究所において当該ウイルスの検査診断が可能になった。
6. 呼吸器ウイルスに対する生体防御に関する研究
 - 1) RSV と HRV は気管支喘息の増悪と発症に深く関わっていることが分っているが、これらウイルスは直接マスト細胞を刺激して脱顆粒を起こさせることはなかった。RSV や HRV の感染によって産生される気道上皮細胞からのサイトカインはマスト細胞の機能を制御する可能性がある。生まれて初めて喘鳴を起こした 3 歳未満の子供では、86% の症例が RSV あるいは/および HRV に感染しており、喘鳴を繰り返し

た症例において喀痰中トリプターゼ濃度が高い傾向があったことより、ウイルス感染と感作が同時に起こることが喘息の発症に極めて重要であることが示唆された。

7. 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) マンノースリポソームに包含した小麦胚芽系で作成したHPIV-3 HNタンパクは、マウスにおいて効果的なIgGおよびIgAを誘導することが示唆された。
- 2) MRC-5 細胞の不死化およびレポーター遺伝子の導入により、種々の呼吸器ウイルスの分離および感染確認が容易になると思われる。

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mizuta K, Abiko C, Aoki Y, Ikeda T, Matsuzaki Y, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, Noda M, Kimura H, Ahiko T. Seasonal patterns of respiratory syncytial virus, influenza A virus, human metapneumovirus, and parainfluenza virus type 3 infections based on virus isolation data between 2004 and 2011 in Yamagata, Japan. *Jpn J Infect Dis.* in press.
- 2) Kiyota N, Kushibuchi I, Kobayashi M, Tsukagoshi H, Ryo A, Nishimura K, Hirata-Saito A, Harada S, Arakawa M, Kozawa K, Noda M, Kimura H. Genetic analysis of VP4/VP2 coding region in human rhinovirus species C detected from the patients with acute

respiratory infection in Japan. *J Med Microbiol.* In press.

- 3) Seki E, Yoshizumi M, Tanaka R, Ryo A, Ishioka T, Tsukagoshi H, Kozawa K, Okayama Y, Goya T, Kimura H. Cytokine profiles, signaling pathways, and effects of fluticasone propionate in respiratory syncytial virus-infected human fetal lung fibroblasts. *Cell Biol Int.* in press.
- 4) Nishi M, Sakai Y, Akutsu H, Nagashima Y, Quinn G, Masui S, Kimura H, Perrem K, Umezawa A, Yamamoto N, Lee SW, Ryo A. Induction of cells with cancer stem-cell properties from non-tumorigenic human mammary epithelial cells by defined reprogramming factors. *Oncogene* 2013 : 1-10.
- 5) Abiko C, Mizuta K, Aoki Y, Ikeda T, Itagaki T, Noda M, Kimura H, Ahiko T. An outbreak of parainfluenza virus type 4 infections among children with acute respiratory infections, in the 2011-12 winter season in Yamagata, Japan. *Jpn J Infect Dis.* in press.
- 6) Sakano C, Kuroda M, Sekizuka T, Ishioka T, Morita Y, Ryo A, Tsukagoshi H, Kawai Y, Inoue N, Takada H, Ogasawara Y, Nishina A, Shimoda M, Kozawa K, Oishi K, Kimura H. Genetic analysis of non-hydrogen sulfide-producing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Infantis isolates in Japan. *J Clin Microbiol.* 51(1):328-330, 2013.
- 7) Nakamura M, Hirano E, Ishiguro F, Mizuta K, Noda M, Tanaka R, Tsukagoshi H, Kimura H. Molecular epidemiology of human