

201123026A

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 総括・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

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 総括・分担研究報告書

研究代表者 木村 博一

平成 24 (2012) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

- 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

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-----23
野田雅博
2. 重症呼吸器感染症サーベイランスに係わる実態調査-----83
小澤邦壽
3. 重症呼吸器症サーベイランスによって把握した
Enterovirus68 感染症の流行と喘息発作-----87
調 恒明
4. 呼吸器ウイルス遺伝子の網羅解析に関する研究-----93
黒田 誠
5. 衛生研究所における未知のウイルスの同定に関する研究-----100
水谷哲也
6. 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-----106
竹田 誠
7. 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-----109
松山州徳
8. 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-----114
梁 明秀
9. RS ウイルス感染ヒト胎児肺繊維芽細胞によって産生が誘導されるサイトカインと
シグナル伝達経路との相互関係に関する研究-----118
木村 博一

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----125

- IV. 研究成果の刊行物・別刷

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 総括研究報告書

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

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 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 国立感染症研究所感染症情報センター

松山州徳 国立感染症研究所ウイルス第三部

水谷哲也 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疫学解明部門

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

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

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

石岡大成 吉住正和 小林美保 群馬県衛生環境研究所

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

小渕正次 富山県衛生研究所

昆 美也子 新潟県保健環境科学研究所

筒井理華 吉田綾子 青森県環境保健センター

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
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
岡山吉道 日本大学大学院医学研究科先端医学系分子細胞免疫アレルギー学分野
斎藤義弘 東京慈恵会医科大学小児科
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
田中良太 関 恵理奈 杏林大学医学部
落合里衣 東京都小児総合医療センター
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
久保田 耐 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

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・機序解明およびワクチン開発に資する研究を行い、以下の研究成果が得られた。

1. 包括的な急性呼吸器感染症（ARIs）における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)ARIs 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)次世代シーク

- エ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。
- 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、毎年 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思われる。
 - 重症呼吸器ウイルス感染症 (svARIs) の原因ウイルスの一つにヒトパラインフルエンザウイルス (HPIV) がある。HPIV には 14 型が知られているが、その中でも HPIV4 による感染では、症状が軽く報告数も少ないため、これまであまり重要視されてこなかった。しかし、近年、重症例からの検出報告もあるため、2010 年及び 2011 年の 2 年間に山口県内で呼吸器疾患患者より採取された 600 検体について HRV、HMPV、HBoV、HPIV などについてウイルス学的検索を行ったところ 22 検体から HPIV4 が検出された。HPIV4 陽性患者の症状から HPIV4 が重症呼吸器症の原因ウイルスとなることが示唆された。
 - 国内において、検出された HRV について系統樹解析を行った。主に HRV species A および C が検出され、*p*-distance に基づく系統解析およびタイピングを行った結果、検出株は多くのタイプに分類された。本邦においても遺伝学的に多様な HRV が流行していた可能性が示唆された。
 - 小児における RSV 単独感染例と HRV 単独感染例を比較すると年齢は有意に RSV 例で低かった。また、診察時の SpO₂ 最低値は RSV 例が有意に低く、酸素投与有無は RSV 例が有意に多かった。RV 単独感染例と RSV と HRV 混合感染例の比較では、混合感染例で呼吸状態は有意に悪かった。この結果より、従来の報告と同様に RSV は低月齢児で初回喘鳴の原因ウイルスとして重要で、感染時の月齢が低い方が入院・重症化のリスクが高いことが証明された。また、HRV は反復喘鳴の児で喘鳴の悪化要因となり、特に年長喘息児で重症化するリスクが高く、喘息児の呼吸症状増悪に HRV 感染関与の可能性が示唆された。
 - RS ウイルス (RSV) やインフルエンザウイルス (InfV) などの呼吸器ウイルスは、気管支喘息の発症・増悪や肺炎などの呼吸器ウイルス感染症に関与することが知られている。しかし、本邦における svARI の実態は明らかとなっていない。そこで、全国 77 カ所の地方衛生研究所等に、アンケート調査を行い、感染症発生动向調査 (病原体サーベイランス) に基づく svARI の実態を明らかにした。その結果、重症呼吸器ウイルス感染症を含む患者から検出されているウイルスでは InfV が最も多く RSV が次いで多く検出されてい

- た。臨床診断名では、気管支炎が最も多く、次いで肺炎が多かった。診断名ごとのウイルス検出状況では、気管支炎では InfV が多かったが、肺炎、細気管支炎では RSV が多く検出されていた。RSV の病原微生物検出情報への報告数は InfV に比べて少ないが重症呼吸器感染症に深く関与していることが明らかとなった。したがって、今後本邦の svARI において、RSV の関与の程度をさらに詳細に調査する必要がある。
5. 肺に特異的に存在する膜貫通型セリンプロテアーゼ (TMPRSS2) がコロナウイルス (CV) の S 蛋白を活性化し、細胞侵入を促進させることを発見した。また、TMPRSS2 発現細胞では、2つの経路より CV が感染することもわかった。この結果から、TMPRSS2 とカテプシンの阻害剤の同時投与により、CV 感染を阻止できる可能性が示唆された。さらに、HPIV-1 には、その増殖にトリプシン要求型の株と、非要求型の株が存在することを明らかにした。F タンパクのアミノ酸の違いを解析したが、差異は見られなかった。
 6. コムギ無細胞タンパク質合成系を用い、抗原となる PIV-3-HN 全長タンパク質合成系の確立を行った。また、ヒトテロメラーゼ hTERT を定常的に発現するヒト肺繊維芽細胞 (MRC5) に、ヒトパピローマウイルス E7 またはサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 p16 に対する特異的 shRNA を安定的に発現するクローンを樹立した。これらの不死化細胞により、今後、種々の呼吸器ウイルス分離が可能になることが示唆された。
 7. 次世代シーケンサーによる Deep-sequencing 法は、従来法と比べて一度に膨大な解読量を得られるため、患者検体に内在する病原体のヘテロポピュレーションを塩基レベルで解析することができる。そこで薬剤耐性・病原性に関与する遺伝子領域を集中的に解読するアンプリコン・シーケンシング法を利用して、2009 パンデミック・インフルエンザウイルス (A/H1N1/2009pdm) のヘマグルチニン (HA) に内在するヘテロポピュレーションの存在比を定量的に解析した。以前の A/H1N1/2009pdm 肺剖検サンプルの網羅解読で HA の antigenic site Ca2 に GGT (Gly239) と AAT (Asn239) が 75%:25% の割合で混在していることを分かっており、今回のアンプリコン・シーケンシング (38 万本) でも 63.7%:36.3% と同等の精度で存在比を確定することができた。アンプリコン解析のほうが網羅解読よりも安価で無駄がなく、ウイルス配列に変異が集積しやすいホットスポットを集中的に解読できる。病原性・薬剤耐性に関与するアレルの同定など、各ウイルス種において個別領域に絞った変異解析は重要な課題であり、高度な微生物検査のひとつとしてシステムを構築した。
 8. 多くの呼吸器感染症ウイルスがその増殖のために宿主のタンパク分解酵素 (プロテアーゼ) を利用している。ウイルスの膜融合タンパクが、プロテアーゼによって開裂を受けることによって、はじめて膜融合活性を発揮することができるためである。TMPRSS2 は、呼吸器上皮に発現している膜貫通型セリンプロテアーゼであるが、これまでの研究で、本酵素が、インフルエンザウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス、ヒトメタニューモウイルスの膜融合タンパク質を開裂し、これらのウイルスの増殖を促進することが明らかにされていた。本酵素のウイルス性肺炎発症における *in vivo* での重要性を明らかにするために、マ

ウスパラインフルエンザウイルス 1 型 (セндаイウイルス) を用いて研究を開始した。セндаイウイルスの膜融合タンパク質 (F タンパク質) もまた、ヒトならびにマウス TMPRSS2 で開裂し、活性化することが明らかになった。F タンパク質の開裂部の P2 位、P3 位のアミノ酸に変異を導入し、TMPRSS2 による活性化の変化について解析を行った。その結果、P2 位のアミノ酸が、F タンパク質の TMPRSS2 に対する基質特異性に関与していることが示された。

9. 急性呼吸器感染症 (ARI) に関連するウイルスの中で、インフルエンザウイルスについては非常によく研究され、抗ウイルス薬とワクチンが開発されているが、他のウイルスに関しては、その罹患率や危険性と比較して、よく研究されているとは言い難い。ARI ウイルスの研究を難しくしている原因は様々にあるが、その一つは、肺胞の性質を維持している良い培養細胞株がないことにある。そこで、ヒトコロナウイルス (SARS、NL63) の感染を指標として、これらが良く感染する細胞を開発すると共に、ヒト肺胞上皮由来 Calu-3 細胞と比較し、コロナウイルスの感受性とその感染メカニズムを明らかにした。
10. 幼少期における呼吸器ウイルス感染は、喘息の発症と増悪に密接に関連していることが強く示唆されている。また、呼吸器に存在する線維芽細胞は、喘息患者に生じる気道リモデリングに重要な役割を果たすと考えられている。本研究では、RS ウイルス (RSV) 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行うとともにサイトカイン産生に重要なシグナル伝達機構解明を目的とした研究を行った。さらに、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、RSV 感染 MRC-5 細胞は、種々の炎症性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。これらのうち、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。また、このサイトカイン産生には Akt、p38MAPK、ERK1/2 および I κ B α のリン酸化が密接に関与することも明らかになった。以上のことから、RSV の感染によって引き起こされる大量の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。
11. ヒトパラインフルエンザウイルス (human parainfluenza virus, PIV) などによる呼吸器ウイルス感染は小児や老人における下気道炎の原因となるばかりではなく、感染喘息の引き金や増悪因子となることが知られている。しかしながら、これらのウイルスの感染症に対する有効な治療薬やワクチンは開発されていない。また、病原体分離や阻害剤スクリーニングのための優れた培養細胞モデル系は構築されていない。そこで、我々は、コムギ無細胞系を用いたパラインフルエンザウイルス 3 型外被タンパク質 (PIV3-HN) とマンノース被覆リポソームを組み合わせた新しいワクチンの開発を行った。また、広いウイルス感染トポロジーを有するヒト不死化培養細胞の樹立し、これらにレポーター遺伝子を組み込むことで、簡易にウイルス感染をモニタリングかつ定量できる細胞の構築に成功した。さらに、外被タンパク質に対するモノクローナル

抗体を作製し、ウイルス感染を阻止できる中和抗体の開発を行った。

12. 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。

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、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。さらに、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か、あるいは過去に開発を断念している。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、患者疫学の実態解明、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、大学医学部微生物学教室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) 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 ARI 患者検体から ARI 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。

2) 代表株の系統保存・遺伝子情報の集積を行った。また、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) ARI 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。医療施設内における ARI 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。

4) 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。

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

び検査診断法に関する研究

1) 地方衛生研究所全国協議会のネットワークを活用し、全国 77 カ所の地方衛生研究所等を対象とした svARI に関するアンケート調査を実施した。本調査では、呼吸器内科および小児科専門医の助言を受け、重症呼吸器感染症を含む対象疾患を①気管支炎、②細気管支炎、③クループ様疾患、④気管支喘息、⑤肺炎、⑥喉頭炎、⑦気管支肺炎、⑧38°C以上の発熱 + 下気道炎の 8 種類に分類し、感染症発生動向調査 (病原体サーベイランス)の結果を基に、臨床症状 (発熱や下気道炎など)、検出方法 (ウイルス分離や PCR など)、検出結果 (RSV、InfV、不検出など)、さらに集団発生などの情報について調査を行った。なお、本研究においては、倫理面への配慮として感染症発生動向調査事業に基づく検体情報を扱っており、個人情報の保護に十分配慮して行った。

2) 呼吸器症状を主訴とし、医療機関を受診した患者由来検体 (咽頭拭い液または鼻汁) から RNA および DNA を抽出後、HRV、EV は EVP4/EVP2 領域、RSV は *N* 遺伝子、PIV は *HN* 遺伝子、HMPV は *F* 遺伝子、HBoV は NP1 領域について、PCR 法を行い、増幅された遺伝子については塩基配列の解析を行った。また、各々の方法における primer 配列とデータベース上に登録されている塩基配列の比較なども行い、PCR 条件の最適化に関する研究も行った。

3) 重症呼吸器ウイルス感染症患者から供試された検体 (各種臓器・組織検体) から核酸配列を

次世代シーケンサーあるいは RDV 法により検出された病原体ゲノムを網羅的に解読し、検体中に内在する微生物を含めた微生物カタログを作製した。

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

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 1 MOI の RSV 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説明・制御に関する研究

ウイルス感染を容易に検出するために緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現する組換えセンダイウイルス (SeV-GFP) 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。SeV-GFP を Vero、Vero/TMPRSS2、HeLa および HeLa/mouseTMPRSS2 細胞へ感染させ、経時的に感染の広がりを蛍光顕微鏡で観察した。SeV の HN

タンパク質、ならびにFタンパク質を発現するプラスミドを構築し、両プラスミドを赤色蛍光タンパク質(RFP)を発現するプラスミドとともにVero細胞に発現させ、膜融合能(細胞融合)の程度を蛍光顕微鏡下で観察した。TMPRSS2の効果を解析するために一部の細胞には、TMPRSS2を発現するプラスミドを同時に導入した。トリプシン添加による効果を対照として解析した。開裂部のP2位(アミノ酸115番目)、P3位(アミノ酸114番目)にアミノ酸変異を導入したFタンパク質を用いて上記の膜融合解析を実施した。導入した変異は、Q114A、Q114S、Q114N、Q114V、Q114I、S115RおよびS115Vである。

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

VSV シュードタイプウイルスの表面に、それぞれのコロナウイルス(SARS、NL63)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。これらのシュードタイプウイルスは感染細胞でGFPを発現するので、容易に感染価を調べることができる。また、本物のSARS-CoVを用いて細胞に感染させ、侵入したウイルスをReal-time PCRで検出することにより、感染価を定量した。今回はHeLa細胞にTMPRSS2とコロナウイルスのレセプター(ACE2)を発現させた細胞(HeLa-ACE2-TMPRSS2)と、TMPRSS2非発現細胞(HeLa-ACE2)を共にウイルスに感染させ感染価を比較した。また、肺由来の細胞株(Calu-3、BEAS2B、MRC-5、A549、HPAEPiC)にSARSコロナウイルスを感染させ、感受性を比較した。さらにsiRNAを用いてCalu-3細胞のTMPRSS2をノックダウンし、SARSコロナウイルスの感受性

を調べるとともに肺由来細胞でのプロテアーゼ依存性を調べた。

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) 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。精製はグルタチオンセファロースビーズまたはニッケルアガロースビーズによるカラム法を用いた。GST-PIV3HN間の切断はTEVプロテアーゼを用いて行った。

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_HPV16-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の樹立を試みた。

3) マンノース被覆リポソームをPBSで希釈後、SDSで脂質膜破壊サンプルバッファーと混合し、100°Cで加熱処理した。リポソームのコレステロール量が5もしくは10 µgになるように、ゲルにアプライし、電気泳動後、ゲルを固定化し、Quick-CBB PLUS(Wako, 178-00551)で染色し、ルミノ・イメージ・アナライザーLAS-3000(FULIFILM)にとりこみ、汎用解析ソフトMulti

Gauge (FUJIFILM) にて定量した。

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、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) なども分離・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 species A ; 62 株、species B ; 3 株および species 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、分子疫学的解析を試みた。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 species A そのほか species 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。

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・解析を実施した。

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する検討を行った。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 SpO2 最低値はそれぞれ RSV 例で有意に低く、酸素投与の有無は RSV 単独感染例で有意に多かった。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。

15)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。

16)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。

17)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やサーベイランスなどに関する技術研修を実施した。

18)薬剤耐性・病原性に関与する遺伝子領域を集中的に解読するアンプリコン・シークエンシング法を利用して、2009 パンデミック・インフルエンザウイルス (A/H1N1/2009pdm) のヘマグルチニン (HA) に内在するヘテロポピュレーションの存在比を定量的に解析した。以前の A/H1N1/2009pdm 肺剖検サンプルの網羅解読で HA の antigenic site Ca2 に GGT (Gly239) と AAT (Asn239) が 75% : 25% の割合で混在していることを分かっており、今回のアンプリコン・シークエンシングでも 63.7% : 36.3% と同等の精度で存在比を確定可能であった。

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)77 の地方衛生研究所等のうち、検査診断を行わない10施設を含む69施設から回答が得られた (回答率 89.6%)。アンケート調査の結果、得られた2007年度および2008年度における総検体数は、それぞれ2,481と2,319検体であった。また、一つの地方衛生研究所等で検査された重症呼吸器ウイルス感染症 (svARI) を含む症例の検体は、1施設あたり平均で2007年度では36.0検体 (最大222検体, 最小0検体)、2008年度では33.6検体 (最大211検体, 最小0検体) であり、検体数には施設間で大きなばらつきがあった。2007年度、2008年度ともに、最も多く検出されたウイルスは、InfV (11.4%) であり、次いで、RSV (8.6%) が多く検出されていた。その他にもヒトメタニューモウイルス

(HMPV)、ライノウイルス (HRV) やエンテロウイルス (EV) が検出されていた。また、全体の63.6%の検体では、病原体 (ウイルス) が検出されておらず、原因が不明となっている検体が数多く存在することも明らかとなった。臨床診断名では、2007年度、2008年度ともに、気管支炎 (51.8%) が最も多く、次いで肺炎 (30.9%) が多かった。臨床診断名においては、冬期において気管支炎が増加する傾向が見られたが、診断名による季節の変動は見られなかった。気管支炎、細気管支炎、肺炎について、検出されたウイルスを比較したところ、気管支炎ではInfVが多かったが、肺炎および細気管支炎ではRSVが最も多かった。

2)ヒトライノウイルス (HRV) のVP4/VP2領域において、株間の遺伝学的距離 (*p*-distance) を基にしたタイピング法を開発した。その結果、HRVの種によらず、<10% divergenceにより、各タイプの同定が可能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

RSV感染24時間後では、炎症性サイトカインのIL-1 β 、IL-6、TNF- α 、抗炎症性サイトカインのIL-1ra、Th1サイトカインのIFN- γ およびIL-2、IFN- λ 1a、Th2サイトカインのIL-4、IL-5、IL-10、およびIL-13、造血因子のG-CSF およびGM-CSF、好中球遊走サイトカインのIL-8 およびIP-10、好酸球遊走サイトカインのeotaxin, およびRANTES等、多くのサイトカイン

ンが有意に産生された。これらのサイトカイン・産生はコルチコステロイドの一種である fluticasone propionate により有意に抑制された。また、RSV 感染により、Akt、p38MAP、ERK1/2、および IκBα のリン酸化が有意に増強した。これらのシグナル蛋白のリン酸化は fluticasone propionate により有意に抑制されたが、IκBα のリン酸化は阻害されなかった。

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)SeV-GFP は、Vero 細胞や HeLa 細胞においては、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かった。一方、Vero/TMPRSS2 細胞ならびに HeLa/mouseTMPRSS2 細胞では、感染が効率よく拡大し、SeV-GFP が多段階増殖することが明らかになった。

2)開裂部の P3 位 (アミノ酸 115 番目) の変異 (Q114A、Q114S、Q114N、Q114V および Q114I) では、いずれの場合も 20~50%程度の膜融合能の低下が起こったが、その程度は、トリプシンによって F タンパク質を活性化させた場合も、TMPRSS2 による場合も、同等であり、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、開裂部の P2 位 (アミノ酸 115 番目) の変異 (S115R および S115V) では、TMPRSS2 に依存した膜融合の方が、トリプシンに依存した膜融合に比較して、強く低下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)SARS と NL63 のシュードタイプウイルスの HeLa-ACE2-TMPRSS2 への感染価は HeLa-ACE2 と比較して、3~5 倍高くなった。しかし Calu-3 細胞への感染を、これらシュードタイプウイルスでは全く確認することができなかった。一方、本物の SARS、NL63 は HeLa 細胞に良く感染できたが、Calu-3 細胞へは SARS のみが感染することができた (Hela 細胞の 1/1000 程度の効率で)。

2)SARS は Calu-3 細胞に感染できることがわかったので、この細胞が TMPRSS2 を利用して細胞侵入していることを調べるために、siRNA を用いて TMPRSS2 をノックダウンし、SARS を感染させ、Real-Time PCR で感染価を測定した。結果、TMPRSS2 を抑えることにより、ウイルスの感染も 1/6 に抑えられることがわかった。また、前回の報告で、セリンプロテアーゼ阻害剤 (Camostat) が TMPRSS2 を特異的に抑えることを示したが、今回は Calu-3 細胞での SARS 感染阻止効果を調べた。その結果、Calu-3 への SARS の感染は Camostat により 1/10 程度に抑えられることがわかった。

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)真核生物型無細胞タンパク質合成技術であるコムギ胚芽タンパク質合成システムを用いて、リコンビナント PIV3-HN 全長タンパク質の作製を試みた。無細胞合成用の pEU-E01-GST ベク

ターに PIV3-HN 全長 cDNA をサブクローニングした。次に全自動コムギ無細胞系タンパク質合成装置 PROTEMIST-DT-II を用いて GST 融合 PIV3-HN タンパク質の大量合成を行った。合成した GST 融合 PIV3-HN タンパク質を、グルタチオンセファロースビーズによるカラム法を用いて精製し、TEV プロテアーゼを用いて GST タグを切断した。その結果、PIV3-HN タンパク質の可溶性が顕著に低下した。

2)従来の方法では、抗原タンパク質が拡散してしまうため、樹上細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞に直接的に抗原を運ぶことが困難であった。しかし、マンノース被覆リポソーム内に抗原を封入することで、マンノースレセプターを有する抗原提示細胞に、効率的に抗原を取り込ませることが可能となる。そこで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、コムギ無細胞系を用いて作製した高濃度 HN タンパク溶液 (565 µg/ mL) を用いたりポソームの製造を試みた。タンパク質封入後の PIV-3-MCL を 1 µm フィルターに通過させ、タンパク凝集物を除去した。次に確認のために SDS でリポソーム脂質膜を破壊後、コレステロール量を測定し、4 mg chol/ mL に調製した。抗原封入りポソームを 4 µg chol/ mL に調製し、動的光散乱式粒径分布測定装置 LB-500 (HORIBA) にて粒度分布測定した。Empty-MCL の平均粒径は 519 nm、HN-MCL は 882 nm となった。HN-MCL は Empty-MCL に比べ凝集傾向が強く、

二次粒子が生成し、このような数値が測定されたと考えられたが、抗原としての機能は保持されていると考えられる。

3)PIV3 感染症を阻止できるモノクローナル抗体を作製するため、コムギ無細胞系を用いて作製し、PIV3-HN 全長タンパク質を BALB/c マウスにアジュバントとともに足底に免疫し、4週間後に脾細胞を分離し、マウスミエロマー細胞を用いたハイブリドーマ作製に成功した。

4)正常細胞の不死化を誘導するレンチウイルスベクター、pLenti6_TERT, pLenti6_HPV16-E7, Lenti6_sh-p16_TetOff_FRT-GFP-BSD を作製した。作製したウイルスベクターを MRC-5/TERT 細胞に感染させ、通常培養法にて長期培養を行った。現段階で少なくとも 100 回以上の分裂が可能な 3 株の不死化 MRC-5 細胞の誘導に成功した。

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)各地方衛生研究所において、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。これらの株の県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。詳細な成果は、各報告書を参照されたい。

2)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が

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。

3)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 であり、それぞれ遺伝学的に多様であった (> 30% divergence)。また、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。

4)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、さらなる株の収集と解析が必要である。

5)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。

6)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 SpO2 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。

7)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 ARI 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。

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) 全国の地方衛生研究所等において、年間 2,000 件以上、重症呼吸器感染症を含む患者の検査診断が実施されている。しかし、本邦における重症呼吸器感染症の患者数は、数多く存在することを考慮すると、本疾患においては調査期間中においては、十分な病原体サーベイランスが行われていないと考えられる。現行の感染症法においては、臨床検体の提供が義務化されていないため、ボランティアベースによる主治医の協力を頼っている点が多い。したがって、これらの疾患のサーベイランスを強化するためには、新たな検体提供および収集システムの構築が必要であることも示唆された。また、検体数と検出ウイルスには各施設間で大きな差がある。また、半数の検体においては起因病原体が不明となっていることから、検査設備やマニュアルなどのさらなる充実も必要であることが推定された。病原微生物検出情報の報告数と本研究の結

果を比べると RSV は InfV よりも svARI に深く関与していることが示唆された。さらに、重症呼吸器ウイルス感染症の定義や位置づけについても再考し、本邦における今後の重症呼吸器感染症のより正確かつ詳細な実態解明を行っていく必要がある。

2) ライノウイルスにおいては、*p-distance* を用いた数理統計解析法により、系統樹上、各株のタイピングを行うことが可能になった。今後、他の呼吸器ウイルスにおいても本法が応用可能であるか否か検討が必要である。

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) RSV 感染によって、ヒト胎児肺線維芽細胞が Akt, p38MAPK, ERK1/2 および I κ B α のシグナル経路を介して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とサイトカインバランスの不均衡が、部分的にはあるが喘息の病態生理や気道リモデリングに関与していることが示唆された。また、今回の結果から、RSV は、肺の気道上皮細胞のみならず線維芽細胞にも感染し、種々のサイトカイン産生を亢進することも明らかになった。このことは、RSV 感染によって生ずる重症化、特にサイトカインストームへの関

与も示唆する。

2)シグナル伝達経路として Akt、p38MAPK、ERK1/2 および I κ B α のリン酸化が特異的に関与していることも推察された。多くのサイトカインのシグナル蛋白とされる NF- κ B は、阻害蛋白である I κ B α により核内移行を抑制されているが、ウイルス感染などの刺激により I κ B α のリン酸化が起こり、I κ B α から遊離した NF- κ B の核内移行によりサイトカイン産生シグナルが核に伝達される。ステロイドが I κ B α mRNA を誘導し I κ B α を増加させることにより NF- κ B の核内移行を抑制しているとの報告もあり、本研究結果もこれに準ずるものと考えられる。このようにステロイドによるシグナル伝達機構の抑制がサイトカイン産生の抑制に関与することも示唆され、RSV 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。

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)TMPRSS2 は、自身の活性化のために自己開裂する酵素である。自身の開裂部位の P1-P2-P3 位のアミノ酸はそれぞれ R-S-Q であり、センダイウイルスや、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での増殖に重要であると推測した。

2)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 位のアミノ酸を S から V、あるいは、S から R に変異させることにより、トリプシンでの開裂に比して、TMPRSS2 による開裂が大幅に低下したと考えられ、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

ヒト肺胞上皮由来の培養細胞株は、Calu-3 を除いて SARS-CoV に感受性を示さなかった。これは、細胞の様々な抗ウイルス効果が働いたためと考えられ、SARS はこれを回避する機構を備えていることが報告されている。今後、細胞のインターフェロン応答等をノックダウンして、Calu-3 のウイルス感受性を高める試みを行う。

6. 重症呼吸器ウイルス感染症関連ウイルスの防