

図2 HRV VP1 領域遺伝子系統樹(339nt)

●および▲：本事例株、他は参照株

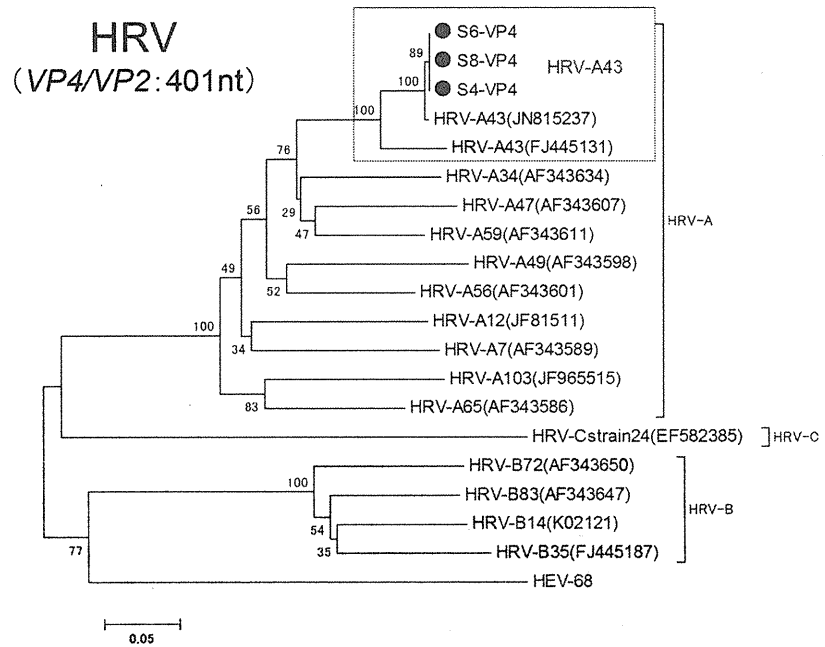


図3 HRV VP4/VP2 領域分子系統樹(401nt)

●：本事例株、他は参照株

## 重症心身障害児（者）病棟における感染症の流行について

研究協力者 松田俊二 国立病院機構愛媛病院  
鈴木由美 国立病院機構下志津病院  
小村珠喜 島根県保健環境科学研究所  
（現）島根県出雲保健所  
中村雅子 福井県衛生環境研究センター  
野田雅博 国立感染症研究所

### 研究要旨

国内には重症心身障害児（者）施設が多数あり、感染症の流行がたびたび発生して問題となっている。本研究では感染症流行の現状とその病原体の概要を調べることを目的とした。全国49施設の平均では1病棟あたり0.5回/年の流行がみられると考えられたが、流行する感染症は病原体不明の呼吸器感染症が約半数を占めていた。そこで、愛媛病院での呼吸器感染症流行について2007年より迅速検査（アデノウイルス、RSウイルス、ストレプトコックス）による病原体検索を行ってきた。2009年度からPCRとウイルス分離による病原体検索を、さらに2011年度からは下志津病院もこの研究に加わった。その結果、ライノウイルス、エンテロウイルス、メタニューモウイルスの流行が確認され、それぞれで流行経過・臨床症状に特徴がみられた。しかし、なお病原体不明の呼吸器感染症の流行も多く、今後の更なる調査研究の続行が必要と考えられた。

### A.研究目的

国内には重症心身障害児（者）施設（長期滞在型の療養施設）が約180施設あり、施設内での感染症の流行が問題となっている。これら施設内で流行する感染症は、インフルエンザウイルス（InfV）やノロウイルス（NoV）感染の流行は報告されているが、それ以外の感染症〔多くは急性呼吸器感染症（ARIs）〕はほとんどが病原体不明のままである。そこで、2007年より5年間の愛媛病院での感染症の流行状況を調査し、全国アンケート調査も行った。その結果、各施設で平均毎年1～2回の感染症流行があり、その半数は病原体不明のARIsの流行であることが判明した。この病原体不明のARIsについて、迅速検査やウイルス分離・PCRで病原体の検出を試みた。また、2011年度からは下志津病院の同施設でも調査研究を開始した。

### B.研究方法

国立病院機構愛媛病院の重症心身障害児（者）病棟（入院患者160人）での2007年から5年間の感染症流行について発生状況調査を行った。全国調査の時と同様に感染症の病棟内流行を同一症状の患者が5名以上発生した場合とした。

愛媛病院重症心身障害児（者）施設内での2007年11月15日から2010年10月末までの間に病原体診断には、インフルエンザウイルス抗原（ポクテムインフルエンザA/B、シスメックス社）、咽頭アデノウイルス抗原（イムノカードST アデノウイルス、TFB社）、鼻腔RSウイルス抗原（イムノカードST RSV, TFB社）、咽頭A群β溶連菌抗原（イムノカードEX ストレップA、TFB社）の4キットを用いた。

患者から採取された咽頭および鼻腔ぬぐい液は、2009年度は島根県保健環境科学研究所および2011

年度は福井県衛生環境研究センターに送付し、PCRとウイルス分離によりウイルスの同定を試みた。なお、2011年度より下志津病院の同施設でも調査研究を開始した。

### C. 研究結果

愛媛病院の重症心身障害児（者）病棟（入院患者160人）での2007年1月1日から2012年1月末までの5年間の感染症流行（同一時期に同一症状の患者が5名以上発生した場合）は表1のとおりであった。臨床検査より半数がNV感染症、インフルエンザ、マイコプラズマ、ヘルパンギーナと判明したが、残りの半数は病原体不明のARIsであった。

2007年の全国調査結果では、感染症流行回数は合計61回（0.49回/病棟/年）で、NV感染症およびインフルエンザの流行が多く各々16回および12回であったが、最も多いのは病原体不明のARIsの25回の流行であった（0.2回/病棟/年）（表2）。

表3に迅速検査による病原体検索の結果を示した。鼻腔ぬぐい液からRespiratory Syncytial ウイルス（RSV）とInfVがそれぞれ1名ずつ検出されたが、アデノウイルス抗原は検出されなかった。咽頭ぬぐい液からのストレプトコッカス抗原は74名中8名が陽性であった。

表4にウイルス検索結果を示す。2009年10月と2011年8月（下志津病院）にヒトライノウイルス（HRV）、2011年3月と2011年9月にヒトメタニューモウイルス（HMPV）、2010年11月にはエンテロウイルス（EV）の流行が確認された。

表5に病原体が検出された呼吸器感染症の流行性・症状・合併症・検査結果の特徴などを示した。ストレプトコッカス感染症は流行性ほとんど無く、比較的高熱が多く抗生物質が有効であった。マイコプラズマ感染症の流行は限定されていた。HRVは流行性が非常に高く、短期間に感染が拡大したが、一部の肺炎や気管支炎を併発した症例以外は比較的発熱は低く持続期間も短かった。EVやHMPV感染症は中程度の流行性を示したが、発熱期間が比較的長く、肺炎の合併例が多く見られた。

表6に各感染症の流行時期を示した。2010年まで

はHRV、EV、マイコプラズマの流行は10～11月に、HMPVの流行は3月にみられ、既報どおりの時期に流行がみられた。しかし、2011年は一般の報告とは異なり、8月にHRV、9月にHMPVの流行があった。また、今回のPCR・ウイルス分離による検索でも病原体が不明であった感染症の流行が4回（44%）みられた。

### D. 考察

重症心身障害者施設では、病原体不明のARIsの流行がかなり高頻度で起こっていることがわかった。全国の他の長期滞在型施設（特に老人施設）でも同様な問題があるかと推察される。

迅速検査は普及しているが、今回の調査では病原体検出は困難な場合が多く、PCRやウイルス分離が必要であることが示唆された。しかし、PCRやウイルス分離でも病原検出困難な流行もかなりあることが明らかとなり、さらに、精査が必要である。

今回の検索では既報どおりの時期にHRV、EV、マイコプラズマ、HMPVの流行があったが、2011年にはこれまで報告が少ない8月にHRV、9月にHMPVの流行がみられ、流行時期が変化してきている可能性も考えられた。今後、さらに詳細なウイルス検索と流行抑止対策が必要と考える。

### E. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) 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) 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

2) 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

表1. 愛媛病院重心病棟における感染症流行

発生年	診断名	内訳
2007	NoV 感染症	22 病棟 (3/31-4/8) 患者 11 名、職員 4 名
		21 病棟 (4/8-4/20) 患者 19 名 (疑い 12 名)、職員 6 名
		24 病棟 (4/19-5/2) 患者 11 名 (疑い 12 名)、職員 3 名
	インフルエンザ	23 病棟 (4/8-4/25) 患者 20 名 (疑い 12 名)
	ヘルパンギーナ	21 病棟 (7/27-8/4) 患者 9 名
	病原体不明の発熱	21 病棟 (3/11-3/19) 患者 21 名
		21 病棟 (8/22-9/10) 患者 10 名
2008	病原体不明の発熱	22 病棟 (3/2-3/12) 患者 7 名
		21 病棟 (4/17-4/22) 患者 16 名
	ヘルパンギーナ	23 病棟 (4/14-5/11) 患者 21 名
2009	病原体不明の発熱	23 病棟 (5/9-6/4) 患者 9 名
		21 病棟 (5/25-6/16) 患者 5 名
		22, 23 病棟 (10/1-10/27) 患者 51 名
		22 病棟(11/1-11/12) 患者 9 名
2010	病原体不明の発熱	23 病棟 (2/1-2/19) 患者 22 名
		21, 22 病棟 (3/8-4/12) 患者 32 名
		23 病棟 (7/8-7/19) 患者 11 名
		22, 23, 21 病棟 (10/14-11/16) 患者 23 名
2011	病原体不明の発熱	22 病棟 (4 月)
		23 病棟 (8/22-9/15) 患者 12 名
2012	インフルエンザ	22, 23 病棟 (1/16-1/25) 患者 5 名 職員 3 名

表2. 重心病棟での感染症発生状況、アンケート調査 (全国 49 施設、2008 年)

内訳	診断名	感染症回数 (頻度)	平均感染者数	平均持続期間
呼吸器感染症	インフルエンザ	12 回 (0.1 回/病棟/年)	15.1 人	14.8 日
	アデノウイルス感染症	4 回	6.5 人	16.2 日
	病原体不明	25 回 (0.2 回/病棟/年)	13.1 人	12.4 日
消化器感染症	NoV 感染症	16 回 (0.13 回/病棟/年)	16.7 人	16.0 日
	ロタウイルス感染症	1 回	14.0 人	16.0 日
	不明	2 回	7.0 人	5.0 日

\* :149 施設の合計病棟数 125 病棟と入院患者数 4951 人 (33~40 人/病棟)

\*\* :125 病棟での感染症流行回数 : 61 回 (0.49 回/病棟/年)

表 3. 呼吸器感染症の病原体の迅速検査法による検索と陽性率

期間	インフルエンザ A (ポステム)	インフルエンザ B (ポステム)	RSV(イムノカード ST)	アデノウイルス(イ ムノカードST)	ストレプトA (イム ノカードEX)
2007/11/15- 2008/3/31	0/21	0/21	1/23	0/23	+--+ 5/18 ± 5/18
2008/4/27- 2008/12/27	1/7	0/7	0/7	0/7	± 2/7
2009/1/17- 2009/12/11	0/14	0/14	0/38	0/26	++ 2/26 (± 2/26)
2010/2/5- 2010/10/30	0/12	0/12	0/21	0/23	+ 1/23 (± 3/23)
合計 (2007/11/15- 2010/10/30)	1/54	0/54	1/89	0/79	+ 8/74 (± 12/74)

表 4. 病棟内での呼吸器感染症の病原体の PCR・ウイルス分離による検索

検索	検体内訳および結果
1	検体採取期間： 2009年7月17日～11月9日 検体： 12症例の咽頭・鼻腔ぬぐい液 各12検体 結果： PCR (and 培養) 8症例の咽頭 and/or 鼻腔ぬぐい液より HRV 検出
2	検体採取期間： 2010年3月8日～4月16日 検体： 7症例の咽頭・鼻腔ぬぐい液 各7検体 結果： PCR (and 培養) 4症例の咽頭 and/or 鼻腔ぬぐい液より HMPV 検出
3	検体採取期間： 2010年10月14日～11月27日 検体： 10症例の咽頭・鼻腔ぬぐい液 各10検体 結果： PCR (and 培養) 10症例の咽頭 and/or 鼻腔ぬぐい液より EV 検出
4	検体採取期間： 2011年8月16日～8月25日 (下志津) 検体： 6症例の鼻腔ぬぐい液 6検体 結果： PCR (and 培養) 5症例の鼻腔ぬぐい液より HRV 検出
5	検体採取期間： 2011年8月22日～10月1日 検体： 19症例の咽頭ぬぐい液7検体、鼻腔ぬぐい液 各19検体 結果： PCR (and 培養) 13症例の咽頭 and/or 鼻腔ぬぐい液より HMPV 検出

表 5. 病原体検出症例の症状

病原体	流行性	症状	合併症	検査	治療
ストレプトコッカス	±	低～高熱、 1週間前後	気管支炎、肺炎	好中球増加、 CRP 上昇	抗生剤
マイコプラズマ	+	低～高熱、 咳	気管支炎、肺炎	好中球軽度増加	抗生剤
ライノウイルス	+++	数日間、 低熱、鼻汁	少ない	CRP 軽度上昇	-
メタニューモウイルス	++	高熱、咳、 1週間前後	肺炎の合併が多い	リンパ球の減少、 単球の増加	-
エンテロウイルス	+(+)	様々	肺炎の合併が多い	好中球の増加	-

表 6. 呼吸器ウイルス流行の検出時期

	2009年	2010年	2011年	2012年
1月				InfV
2月		病原体不明		
3月		HMPV		
4月			病原体不明	
5月				
6月				
7月		病原体不明		
8月			HRV (下志津)	
9月			HMPV	
10月	HRV	マイコプラズマ		
11月	病原体不明	EV		
12月				

### 重症呼吸器感染症サーベイランスに係わる実態調査

#### 分担研究者

小澤 邦壽 群馬県衛生環境研究所

#### 研究協力者

吉住 正和 群馬県衛生環境研究所

塚越 博之 群馬県衛生環境研究所

#### 研究代表者

木村 博一 国立感染症研究所

## 研究要旨

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・増悪や肺炎などの重症呼吸器感染症 (svARI)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、感染症発生動向調査 (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、svARI 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。

### A. 研究目的

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・増悪や肺炎などの重症呼吸器感染症 (svARI)に関与することが知られている。特に、乳児では、RSV やヒトメタニューモウイルス (HMPV)による感染は重症化しやすい傾向にあるとされている<sup>1)</sup>。また、本邦においては、数百万人の喘息患者が存在し、さらに本疾患によって年間 4,000 人もの死者が発生するといわれ、これらには RSV や HMPV が密接に関与していることも示唆されている<sup>2)</sup>。

一方、地方衛生研究所(地研)等では感染症発生動向調査 (病原体サーベイランス)に基づき、5 類感染症である RSV や InfV などの検査診断を行っているが、svARI の感染症発生動向調査における

検査状況などの実態はほとんど明らかになっていない。そこで、本研究では、地研における感染症発生動向調査に基づく svARI の実態を解明することを目的とした。

### B. 研究方法

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、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℃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。

### C. 研究結果

77の地方衛生研究所等のうち、svARIの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svARI由来の検体は、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(図1)。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(図1)。

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(図2)。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(表1)。

### D. 考察

本研究の結果から、全国の地方衛生研究所等において、年間2,000件以上のsvARIの検体が検査されている。しかし、本邦におけるsvARI患者数は、推定で100万人以上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た。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、svARI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。したがって、今後、RSVが本邦のsvARIにどの程度関与しているのか調査する必要がある。

### E. 結論

感染症発生動向調査に基づきsvARIの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ス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。

### F. 参考文献

1. Yorita KL, Holman RC, Steiner CA, Effler PV, Miyamura J, Forbes S, Anderson LJ, Balaraman V. Severe bronchiolitis and respiratory syncytial virus among young children in Hawaii. *Pediatr Infect Dis J*. 2007; 26(12):1081-8.
2. Busse WW, Lemanske RF Jr, Gern JE. Role of viral respiratory infections in asthma and asthma exacerbations. *Lancet*. 2010; 376(9743):826-34.

### G. 研究発表

#### 論文発表

1. 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*; 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.* 2011; in press.
  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.* 2011; in press.
  4. Nishina A, Kimura H, Kozawa K, Sommen G, Favero F, Heimgartner H, Koketsu M, Furukawa S. 3,3-(2,6-Dimethylphenyl)-2-Selenoxo-1,3-Thiazolidin-4-One suppresses hydrogen peroxide-induced cytotoxicity on PC12 cells via activation of MAPK. *Int J Toxicol.* 2011; in press.
  5. 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.
  6. 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.

#### H. 知的財産の出願・登録状況

なし

#### I. その他

##### 謝辞

アンケート調査にご協力いただきました地方衛生研究所等の担当者の先生方に感謝申し上げます。

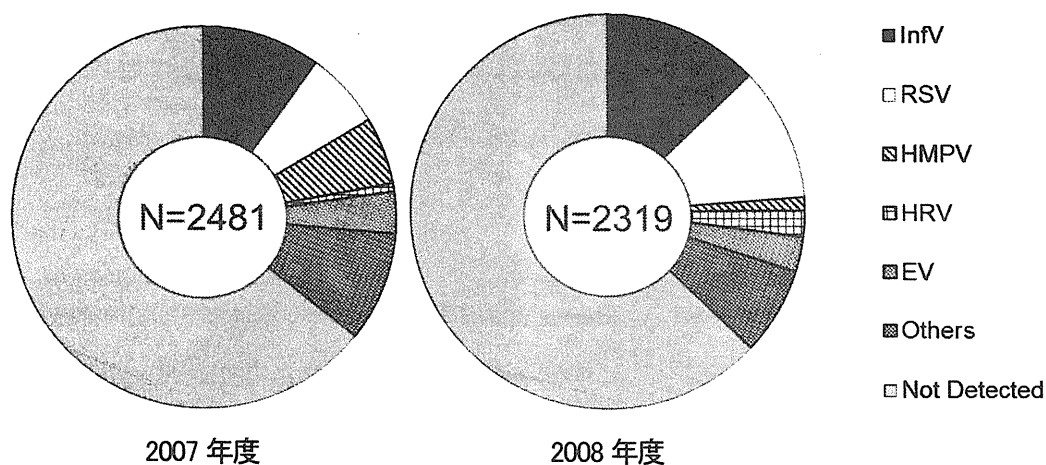


図1 重症呼吸器感染症におけるウイルス検出状況

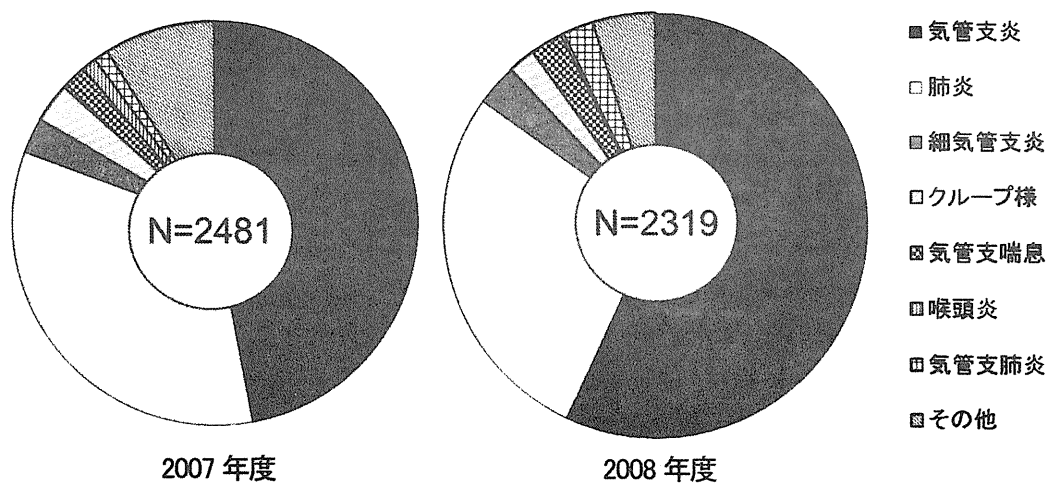


図2 重症呼吸器感染症の臨床診断名による分類

表1 臨床診断名とウイルス検出状況

	InfV	RSV	HMPV	HRV	HEV	Others	ND	Total
気管支炎	367	195	95	47	66	19	1515	2488
肺炎	50	113	52	7	61	54	1065	1482
細気管支炎	1	59	4	2	6	4	69	144
クループ様	11	3	0	3	3	0	102	128
気管支喘息	4	6	4	3	3	0	81	108
喉頭炎	0	1	3	0	2	2	25	36
気管支肺炎	4	15	3	3	1	-2	53	83
その他	108	21	6	2	14	12	142	331
	545	413	167	67	156	400	3052	4800

ND; Not detected

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）  
分担研究報告書

重症呼吸器症サーベイランスによって把握した Enterovirus 68 感染症の流行と喘息発作

研究分担者	調 恒明	山口県環境保健センター
研究協力者	中川（岡本） 玲子	山口県環境保健センター
	戸田昌一	山口県環境保健センター
	濱岡修二	山口県環境保健センター
	渡邊宜朗	山口県環境保健センター

### 研究要旨

小児の重症呼吸器症、特に喘息とウイルス感染の関連を明らかにする目的で、2010年から2011年にかけて山口大学医学部小児科に入院した患者のうち動脈血 SpO<sub>2</sub> が 95%以下に低下した患者の咽頭ぬぐい液について、PCR 法を用いて 10 種類のウイルス検索を行った。その結果、2010年8月をピークに 26 人の喘息患者から enterovirus 68 ウイルスを検出した。これらの患者の多くは、喘息の長期管理を受けておらず、9 名については喘息の既往そのものが認識されていなかったが、殆どの患者で IgE の顕著な上昇を認めた。このことから、アトピー体質の小児において喘息に関する長期的管理が重要である事が示唆された。また今後、enterovirus 68 の流行時の喘息の発症に注意が必要である。

### A. 研究目的

ライノウイルス、RS ウイルス、インフルエンザ H1N1/2009 pdm など、呼吸器系のウイルス感染によるぜんそく発作の増悪が指摘されている。喘息により山口大学医学部小児科に入院した小児の咽頭ぬぐい液のウイルス検索を行ったところ、2010年の入院患者 26 名から enterovirus 68 を検出した。これまで enterovirus 68 は、呼吸器症状を起こすウイルスであることが知られていたが、喘息との関連はほとんど知られていない。これらの患者の検査所見、病歴などをまとめ、enterovirus 68 により惹起される喘息発作の特徴について解析を行った。

### B. 研究方法

対象とする患者は、2010年6月から9月までの間に喘息発作により山口大学医学部小児科に入院した患者 35 人（男：女=23：12、平

均年齢 3.5 歳)である。患者の喘息の重症度は、軽症、中等症、重症、呼吸不全に分類した。入院患者の咽頭ぬぐい液を検体とし、RT-PCR 法により、エンテロウイルス、RS ウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス、ライノウイルス、インフルエンザウイルス、アデノウイルス、ヒトボカウイルスの検出を行い、増幅された DNA 断片について、遺伝子配列を決定し、系統樹解析を行った。系統樹解析には、EV 68 の翻訳開始部位から 390 塩基対の配列を利用し、NJ 法にて解析を行った。血清 IgE 値については、ELISA 法を用い、SRL 社で検査を行った。

### C. 研究結果

2010年6月から9月までの間に山口大学医学部小児科に入院した喘息患者 35 名について検討した。喘息発作の重症度は、軽症が 2 名

(5.7%)、中等度が20名(57.1%)、重症が13名(37.1%)、呼吸不全を呈した症例はなかった。35名の入院患者のうち26名(74.3%)の患者よりEV 68のRNAが検出された。ライノウイルス、パラインフルエンザウイルス、ヒトボカウイルスが、それぞれ8名(22.9%)、2名(5.7%)、1名(2.9%)から検出された。一方これらの検体からは、これまで喘息を誘発するといわれているRSウイルス、インフルエンザウイルスは検出されなかった。

EV 68ウイルスのみが検出された26人(男:女 = 19:7、平均年齢4歳)の臨床像をまとめると、軽症例は1例、中等症は14例、重症は14例呼吸不全を呈した患者はいなかった。また、喘息または喘鳴の既往のあった患者16人では、重症持続型1例、軽症持続型1例、間欠型14例であった。10例においては喘鳴、喘息の既往がなかった。加えて、ステロイド、リユーコトリエン阻害剤内服などの長期の喘息の管理が行われていた例は、2例のみであった。発熱は平均36.7度と軽度で、SpO<sub>2</sub>は低下(平均91.4%)していた。白血球数は上昇(平均:13,849.6/mm<sup>3</sup>)、CRPは平均1.76mg/dlと軽度の上昇していた。26例すべての患者においてIgEの上昇(27-5,840 IU/ml、平均:1117.2)がみられた。

系統樹解析を行ったところ、今回検出したウイルスの塩基配列はお互いに類似しており(図1)、2004年にウイルスの全ゲノム塩基配列が報告されたFermon株との比較では、翻訳開始部位の上流35塩基を欠失していること以外は類似していた(図2)。エンテロウイルスにおいては翻訳開始部位上流のRNAの2次構造が、翻訳効率、複製効率に関与していることが知られており、今回の流行株とFermon株との病原性の差異、その原因については今後の解析が待たれる。

2004年から2009年までに我が国にかける

病原体サーベイランスにより検出、報告されたEV 68ウイルスは、毎年10件以下であったが、2010年には、日本で116例が報告されており顕著な流行があったことがわかる(図3)。

#### D. 考察

EV 68ウイルスが呼吸器症状を起こすことは報告されていたが、気管支喘息との関連ははっきりしていなかった。今回の研究で、EV 68の流行により入院した患者を経験した。これまでの入院患者と比較すると、明らかに重症患者の割合が高く、EV 68はほかのウイルス感染などよりも、より重症の喘息を惹起しやすいことが示唆された。EV 68単独感染により喘息を起こした患者の26例のうち、喘息治療の長期管理下にあったのは2例だけであり、10例では喘鳴或いは喘息の既往がみられなかった。これらの患者においてもハウスダスト等に対する血清IgEが上昇しており、潜在的にアトピー体質を持つ患者における喘息管理が今後の重要な課題である。

#### E. 結論

日本においても、また米国における本ウイルス発見後の36年間のサーベイランスにおいてもウイルス検出の報告はきわめて少ないが、2010年には大阪市、フィリピンなどでEV 68の感染による呼吸器症が報告されており、今後の流行に注意が必要である。また、EV 68の感染が比較的重症の喘息発作を引き起こすことから、EV 68流行時におけるアトピー体質患者の喘息管理もまた今後の課題である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Hasegawa, S., Matsushige, T., Inoue, H., Shirabe, K., Fukano, R., Ichiyama, T. Serum and cerebrospinal fluid cytokine profile of patients

with 2009 pandemic H1N1 influenza virus-associated encephalopathy. *Cytokine*, 2011; 54(2):167-72.

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*. 2011 in press

3) Hasegawa S, Hirano R, Okamoto-Nakagawa R, Ichiyama T, Shirabe K, . Enterovirus 68 infection in children with asthma attacks: Virus-induced asthma in Japanese children *Allergy* 2011; 66(12) 1618-1620

## 2.学会発表

なし

## G. 知的所有権の取得状況

なし

## H. 参考文献

1. Busse WW, Lemanske RF Jr, Gern JE. Role of viral respiratory infections in asthma and asthma exacerbations. *Lancet*. 2010; 376: 826-34.
2. Tregoning JS, Schwarze J. Respiratory viral infections in infants: causes, clinical symptoms, virology, and immunology. *Clin Microbiol Rev*. 2010; 23: 74-98.
3. Azevedo AM, Durigon EL, Okasima V, Queiroz DA, de Moraes-Vasconcelos D, Duarte AJ, Grumach AS. Detection of influenza, parainfluenza, adenovirus and respiratory syncytial virus during asthma attacks in children older than 2 years old. *Allergol Immunopathol*. 2003; 31: 311-7.
4. O’Riordan S, Barton M, Yau Y, Read SE, Allen U, Tran D. Risk factors and outcomes among children admitted to hospital with pandemic H1N1 influenza. *CMAJ* 2009; 2010; 182: 39-44.
5. Hasegawa S, Hirano R, Hashimoto K, Haneda Y, Shirabe K, Ichiyama T. Characteristics of atopic children with pandemic H1N1 influenza viral infection in atopic children: - Pandemic H1N1 influenza reveals “occult” asthma in of childhood-. *Pediatr Allergy Immunol* 2010: in press.
6. Oberste MS, Maher K, Schnurr D, Flemister MR, Lovchik JC, Peters H, Sessions W, Kirk C, Chatterjee N, Fuller S, Hanauer JM, Pallansch MA. Enterovirus 68 is associated with respiratory illness and shares biological features with both the enteroviruses and the rhinoviruses. *J Gen Virol*. 2004; 85: 2577-2584.
7. Japanese Society of Allergy and Clinical Immunology. Japanese Pediatric Guidelines for the Treatment and Management of Asthma 2008, 1<sup>st</sup> Edn. Tokyo: Kyowa Kikaku 2008.
8. Morikawa A, Nishima S. New Japanese pediatric guidelines for the treatment and management of bronchial asthma. *Pediatr Int* 2007; 49: 1023-1031.
9. Ishiko H, Shimada Y, Yonaha M, Hashimoto O, Hayashi A, Sakae K, et al.: Molecular diagnosis of human enteroviruses by phylogeny-based classification using the VP4 sequence. *J Infect Dis*. 2002; 185: 744-54.
10. Abels S, Nadal D, Stroehle A, Bossart W. Reliable Detection of Respiratory Syncytial Virus Infection in Children for Adequate Hospital Infection Control Management. *J Clin Microbiol*. 2001; 39: 3135-9.
11. Aguilar JC, Perez-Brena MP, Garcia ML, Cruz N, Erdman DD, Echevarria JE. Detection and Identification of Human Parainfluenza Viruses 1,

- 2, 3, and 4 in Clinical Samples of Pediatric Patients by Multiplex Reverse Transcription-PCR. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 1191-5.
12. Hara M, Takao S, Fukuda S, Shimazu Y, Miyazaki K. Human metapneumovirus infection in febrile children with lower respiratory diseases in primary care settings in Hiroshima, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2008; 61:500-2.
13. Ishiko H, Miura R, Shimada Y, Hayashi A, Nakajima H, Yamazaki S, et al. Takeda N. Human Rhinovirus 87 Identified as Human Enterovirus 68 by VP4-Based Molecular Diagnosis. *Intervirology.* 2002; 45: 136-141
14. Pandemic influenza H1N1 diagnosis manual ver. 2 2009 [in Japanese], issued from National Institute of Infectious Diseases
15. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987; 4: 406-425.
16. Balvay L, Soto Rifo R, Ricci EP, Decimo D, Ohlmann T. Structural and functional diversity of viral IRESes. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1789: 542-57.
17. Kawahara N, Hasegawa S, Hashimoto K, Matsubara T, Ichiyama T, Furukawa S. Characteristics of asthma attack with long-term management for bronchial asthma. *Pediatr Int* 2009; 51: 657-660.
18. Jensen JR, Sand TT, Jorgensen AS, Thestrup-Pederson K. Modulation of natural killer cell activity in patients with atopic dermatitis. *J Clin Dermatol* 1984; 82: 30-34.
19. Lever RS, Lesko MJ, Mackie RM, Parrott DM. Natural-killer cell activity in atopic dermatitis. *Clin Allergy* 1984; 14: 483-490.
20. Kawakami Y, Tomimori Y, Yumoto K, et al. Inhibition of NK cell activity by IL-17 allows vaccinia virus to induce severe skin lesions in a mouse model of eczema vaccinatum. *J Exp Med* 2009; 206: 1219-1225.
21. Khetsuriani N, Lamonte-Fowlkes A, Oberst S, Pallansch MA. Enterovirus surveillance--United States, 1970-2005. 2006; 55: 1-20
22. Smura T, Ylipaasto P, Klemola P, Kaijalainen S, Kyllönen L, Sordi V, et al. Cellular tropism of human enterovirus D species serotypes EV-94, EV-70, and EV-68 in vitro: implications for pathogenesis. *J Med Virol* 2010; 82: 1940-1949.

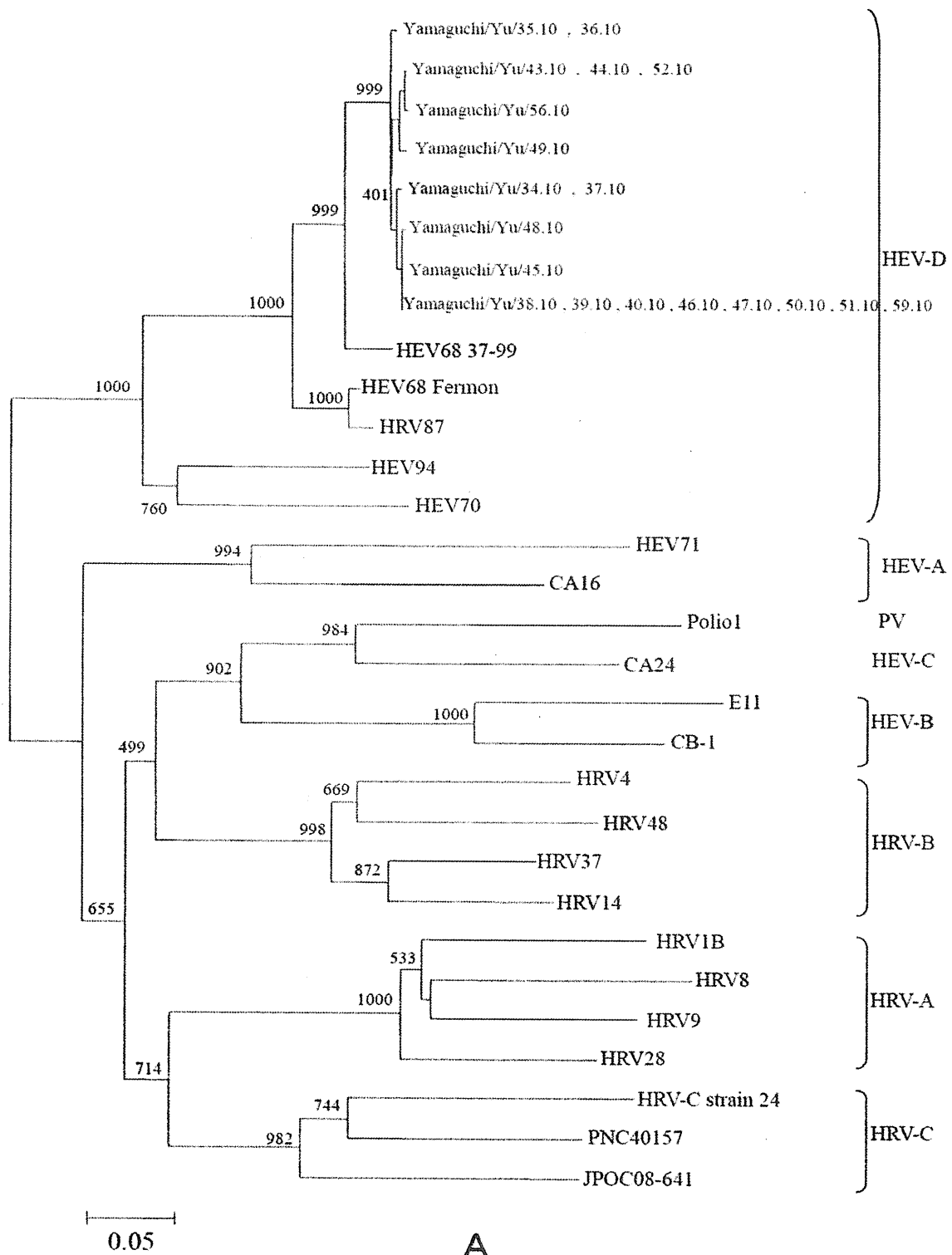


图1

EV68 strain Fermon	1	TTTGTTCAC	TTTGCTTTG	ANATAATCTC	ACCTCAAAA	ACCTCCAGTACATAACATT	119
YU-34	59	TCTTATTTATCAACTTGCTTTTGATAACTTCAATCAGAAA	-----	-----	-----	-----	99
YU-35	59	TCTTATTTATCAACTTGCTTTTGATAACTTCAATCAGAAA	-----	-----	-----	-----	99
YU-38	59	TCTTATTTATCAACTTGCTTTTGATAACTTCAATCAGAAA	-----	-----	-----	-----	99
YU-43	60	TCTTATTTATCAACTTGCTTTTGATAACTTCAATCAGAAA	-----	-----	-----	-----	100
YU-45	60	TCTTATTTATCAACTTGCTTTTGATAACTTCAATCAGAAA	-----	-----	-----	-----	100
YU-48	60	TCTTATTTATCAACTTGCTTTTGATAACTTCAATCAGAAA	-----	-----	-----	-----	99
YU-49	60	TCTTATTTATCAACTTGCTTTTGATAACTTCAATCAGAAA	-----	-----	-----	-----	100
YU-56	60	TCTTATTTATCAACTTGCTTTTGATAACTTCAATCAGAAA	-----	-----	-----	-----	100

EV68 strain Fermon	120	TAAAGAGTTAAACTT	ATTTATAA	CAATGGGAGCTCAAGTTAC	TAGACAGCAA	AACTGGTA	179
YU-34	100	-----	ATTT	CAATAATGGGAGCTCAAGTTACCAGACAGCAA	AACTGGTA	-----	142
YU-35	100	-----	ATTT	CAATAATGGGAGCTCAAGTTACCAGACAGCAA	AACTGGTA	-----	142
YU-38	100	-----	ATTT	CAATAATGGGAGCTCAAGTTACCAGACAGCAA	AACTGGTA	-----	142
YU-43	101	-----	ATTT	CAATAATGGGAGCTCAAGTTACCAGACAGCAA	AACTGGTA	-----	143
YU-45	101	-----	ATTT	CAATAATGGGAGCTCAAGTTACCAGACAGCAA	AACTGGTA	-----	143
YU-48	100	-----	ATTT	CAATAATGGGAGCTCAAGTTACCAGACAGCAA	AACTGGTA	-----	142
YU-49	101	-----	ATTT	CAATAATGGGAGCTCAAGTTACCAGACAGCAA	AACTGGTA	-----	143
YU-56	101	-----	ATTT	CAATAATGGGAGCTCAAGTTACCAGACAGCAA	AACTGGTA	-----	143

EV68 strain Fermon	180	CTCACTGAGAATGCTAACATTCGTCACAAATGGATCTCATATACATACAATCAGATAA	236
YU-34	143	CCCACGAGAATGCCAACATCGCCACAAATGGATCTCATATCACATACAATCAGATAA	199
YU-35	143	CCCACGAGAATGCCAACATCGCCACAAATGGATCTCATATCACATACAATCAGATAA	199
YU-38	143	CCCACGAGAATGCCAACATCGCCACAAATGGATCTCATATCACATACAATCAGATAA	199
YU-43	144	CCCACGAGAATGCCAACATCGCCACAAATGGATCTCATATCACATACAATCAGATAA	200
YU-45	144	CCCACGAGAATGCCAACATCGCCACAAATGGATCTCATATCACATACAATCAGATAA	200
YU-48	143	CCCACGAGAATGCCAACATCGCCACAAATGGATCTCATATCACATACAATCAGATAA	199
YU-49	144	CCCACGAGAATGCCAACATCGCCACAAATGGATCTCATATCACATACAATCAGATAA	200
YU-56	144	CCCACGAGAATGCCAACATCGCCACAAATGGATCTCATATCACATACAATCAGATAA	200

图2

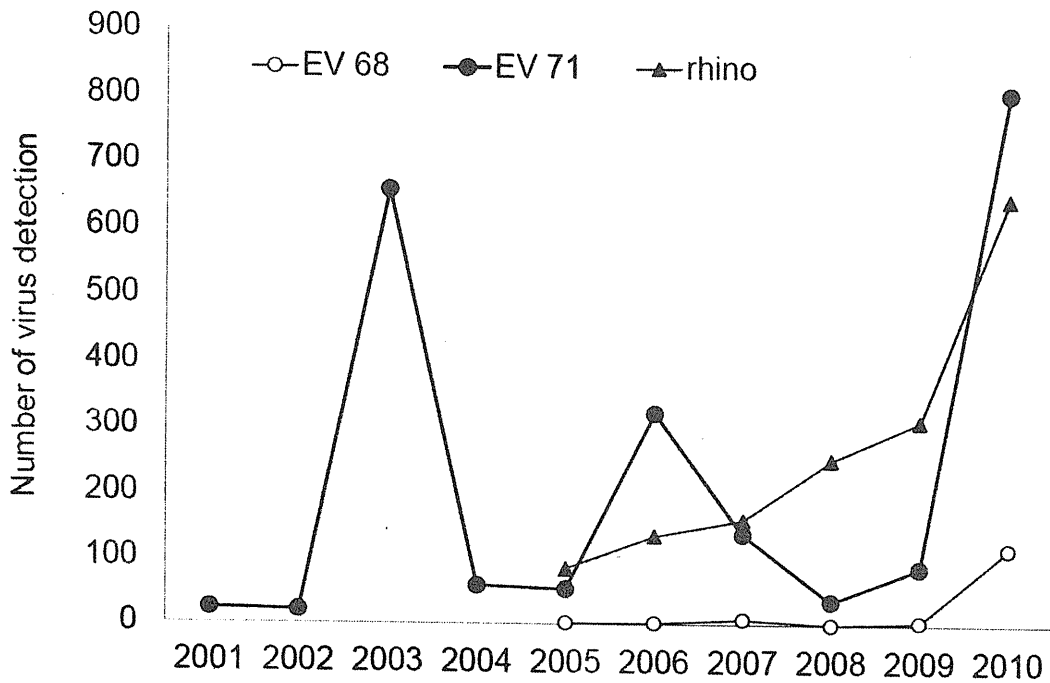


图3



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）  
分担研究報告書

呼吸器ウイルス遺伝子の網羅解析に関する研究

研究分担者	氏名	黒田 誠	所属	国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター
研究協力者	氏名	水田克巳	所属	山形県衛生研究所
		野田雅博		国立感染症研究所・感染症情報センター
		関塚剛史		国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター

### 研究要旨

呼吸器ウイルスは、かぜ様症候群を引き起こすだけでなく、気管支炎や肺炎などの引き起こす重症呼吸器ウイルス感染症の対策はますます重要になっている。本研究は、次世代シーケンサーの解析能力を駆使し、呼吸器ウイルス感染症患者から供試頂いた検体（各種臓器・組織検体）から核酸配列を網羅的に解読し、検体中に内在する微生物を全て抽出して微生物カタログ作製を目的としている。本年度は、山形県保健所および衛生研究所の依頼を受け、2件の小流行した不明呼吸器疾患について網羅配列解読による病原体検索を行った。1件目は山形県の精神病棟内で小流行した発熱・咳・咽頭痛を主訴とする原因不明の呼吸器疾患、2件目は幼稚園児の発熱を主訴とした原因不明の呼吸器疾患であった。残念ながら2件とも既知呼吸器ウイルスの配列は見いだせず、新規性のあるウイルス配列も存在しなかった。

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。

#### A. 研究目的

呼吸器ウイルスは、かぜ様症候群を引き起こすだけでなく、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よく知られている。本邦における、重症呼吸器感染症(肺炎)による年間死亡者数は推定で 10 万人を超えており、新興ウイルス(A(H1N1)pdm や SARS ウイルス)の出現を考慮すると、重症呼

吸器ウイルス感染症の対策はますます重要になっている。多くの呼吸器ウイルスの解明が進展している一方、臨床的に重症化した呼吸器ウイルス感染が疑われる症例の半数以上において病原ウイルスが検出されていない。既知ウイルス配列情報のみでは対応できず、不明病態(脳炎、下痢、サイトカインストーム)において病原体の包括的な検索が不可欠にな

っている。本研究では、次世代シーケンサーの解析能力を駆使し、重症呼吸器ウイルス感染症患者から供試頂いた検体（各種臓器・組織検体）から核酸配列を網羅的に解読し、検体中に内在する微生物を全て抽出して微生物カタログを作製する。

## B. 研究方法

山形県衛生研究所・水田先生から供試頂いた呼吸器感染症の疑いのある不明病検体（咽頭・便検体）を用いて病原体検索を試みた。

### 1) 核酸抽出：

凍結組織（左肺上葉および気管、咽頭ぬぐい液）から、Total nucleic acid purification kit (Ambion) を用いて Total RNA を抽出した。病態に関与する RNA ウイルス・病原細菌の検出感度が向上することから、RNA のみを抽出することにした。

### 2) 網羅配列解読のライブラリー作製：

RNA から DNA ライブラリーを作成するために、ScriptSeq mRNA-seq library preparation kit (EpiCentre) を用いて DNA ライブラリーを作成した。

### 3) 次世代シーケンサーによる網羅塩基配列解読：

次世代シーケンサー illumina GAIIX で DNA ライブラリーの網羅解読を行った。解読キットは、TruSeq SBS kit v5 (illumine) を使用した。通常、1 サンプルにつき数千万本の解読リードを取得する（リード長は 159 塩基）。解読リードに内在するヒトゲノム配列を削除し、残った解読リードを用いて相同性検索（blastn および blastx）を行い、病原体を検索した。現在公開されているほぼ全ての生物種の配列を内包している米国 NCBI nt および nr 配列データベース(2011年7月11日版)に対して相同性検索を行い病原体候補を検索した。得られた結果を MEGAN (v.4.62.7) にて類似性が見られた生物種の一覧図を得た（MEGAN の閾値：1 ヒット以上、score 100.0 以上）。

（倫理面への配慮）

微生物検査として網羅配列解読による病原体検出を行った。患者配列を特定する作業は

行わず、個人情報に結びつく配列解析は一切行っていない。

## C. 研究結果

### 1) 網羅塩基配列解読による病原体検出

1 件目の精神病棟患者の左肺上葉および気管剖検サンプルから、38,660,782 本 および 37,240,052 本の 125 塩基・解読リードを取得した。これら解読リードを 1 本 1 本個別に相同性検索した結果、既知ウイルス配列を検出することはできなかった。新規ウイルスの配列の場合、タンパク質のアミノ酸配列の類似性で検出することができるため blastx 法でも検討したが、新規ウイルス配列の候補は検出できなかった。また、少量の口腔常在菌の検出が見られたが、その検出量から誤嚥により検出されたものと想定された（図 1）。

2 件目の幼稚園集団事例では、3 症例からの咽頭ぬぐい液を個別に網羅解読し（～1000 万本）、病原体検索を行ったが、残念ながら既知呼吸器ウイルスの配列は見いだせず、新規性のあるウイルス配列も存在しなかった（図 2）。

### 2) アンプリコン・シーケンシング法による HA のヘテロアレルの定量解析

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（図 3）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（図 4）、今回のアンプリコン・シーケンシング (38 万本、図 5、6) 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 (図7)。

#### D. 考察

昨今の革新的な技術による次世代シーケンサーの登場で多くのメンデル遺伝病や不明病の解明が進んでいる。各種病理所見において感染症疑いのある症例が半数以上にのぼり、既存の検査法で十分に病原体を特定するのは困難な現状である。本研究課題では、不明感染症の起因病原体に結びつく基礎データを得ることにある。一般的に、症例に特徴的な病態から適切な病原体検査を実施するのが常法であるが、本研究課題では臨床情報に関係なく、つまり偏見無く、ありのままの配列情報として提供できることがポイントである。

2件の不明呼吸器疾患事例について、決定的な病原体の確定には至らなかった。他、呼吸器感染症に係る病原体 (マイコプラズマ、レジオネラ等) においても検出されなかった。インフルエンザウイルスによる肺炎等では解読量の1%程度 (数万本) の検出量が得られるため、該当検体からは病原体の検出を期待できる検出方法である。従って、感染症とは無関係の発症事例だったのか、もしくは検査した剖検組織では集団感染の原因特定には不十分だったのかもしれないと思われる。

アンプリコン・シーケンシング法によるウイルスの病原性を評価する解析手法を構築した。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することができる。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なっていくと思われる。

#### E. 結論

本研究課題において、不明病態から病原体と想定されるウイルスを網羅配列解読法により偏見無く検出することを目標としている。今年度行った2事例について明確な病原体を解明できなかったが、未だ半数以上の不明症例が存在することを考慮すると、従来法では答えの出せない症例にはより重厚に網羅検査を遂行すべきだと考えている。

従来の遺伝子検査法では多種多様に変異を導入するRNAウイルス全てを検出するためには、検査数が膨大になり煩雑にならざるを得ない。次世代シーケンサーによる検出・鑑別法は一部の研究者しか扱えない状況だが、手法の簡便化と機器類・検査費用の低価格が実現すれば幅広く病原体検査に適応できると考えられる。将来の先端的な病原体検査法の開発を視野に入れ、半数以上にのぼる不明感染症例を詳細に解析しながら、広範な感染症対策に貢献するシステムを構築すべきだと考えている。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

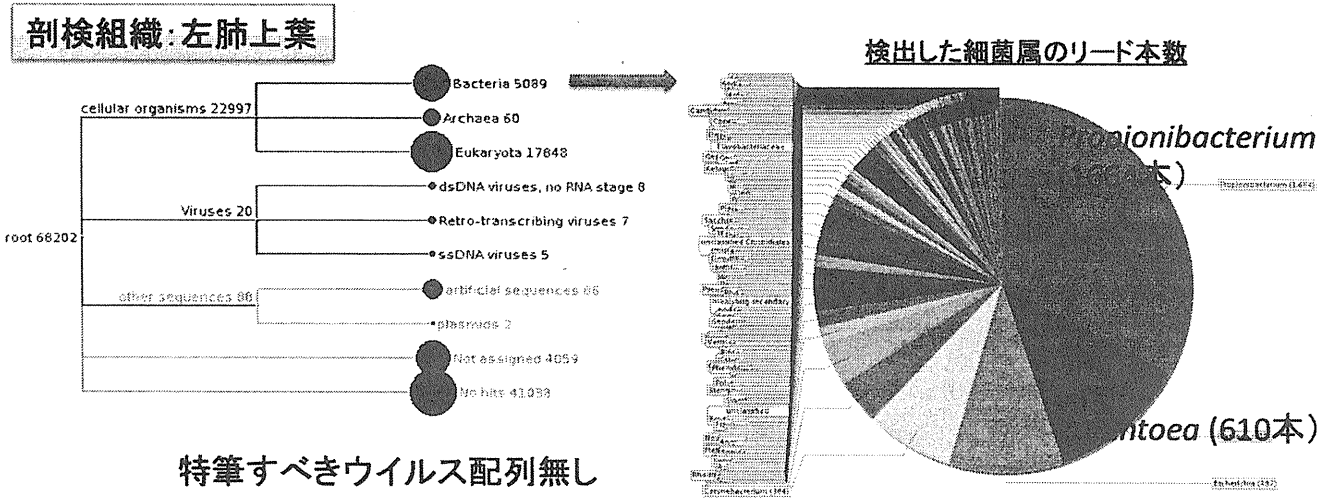


図1 山形県・精神病棟の集団呼吸器疾患発症例の剖検サンプル(左肺上葉)からの網羅的病原体検索。検出された生物種の割合を示している。

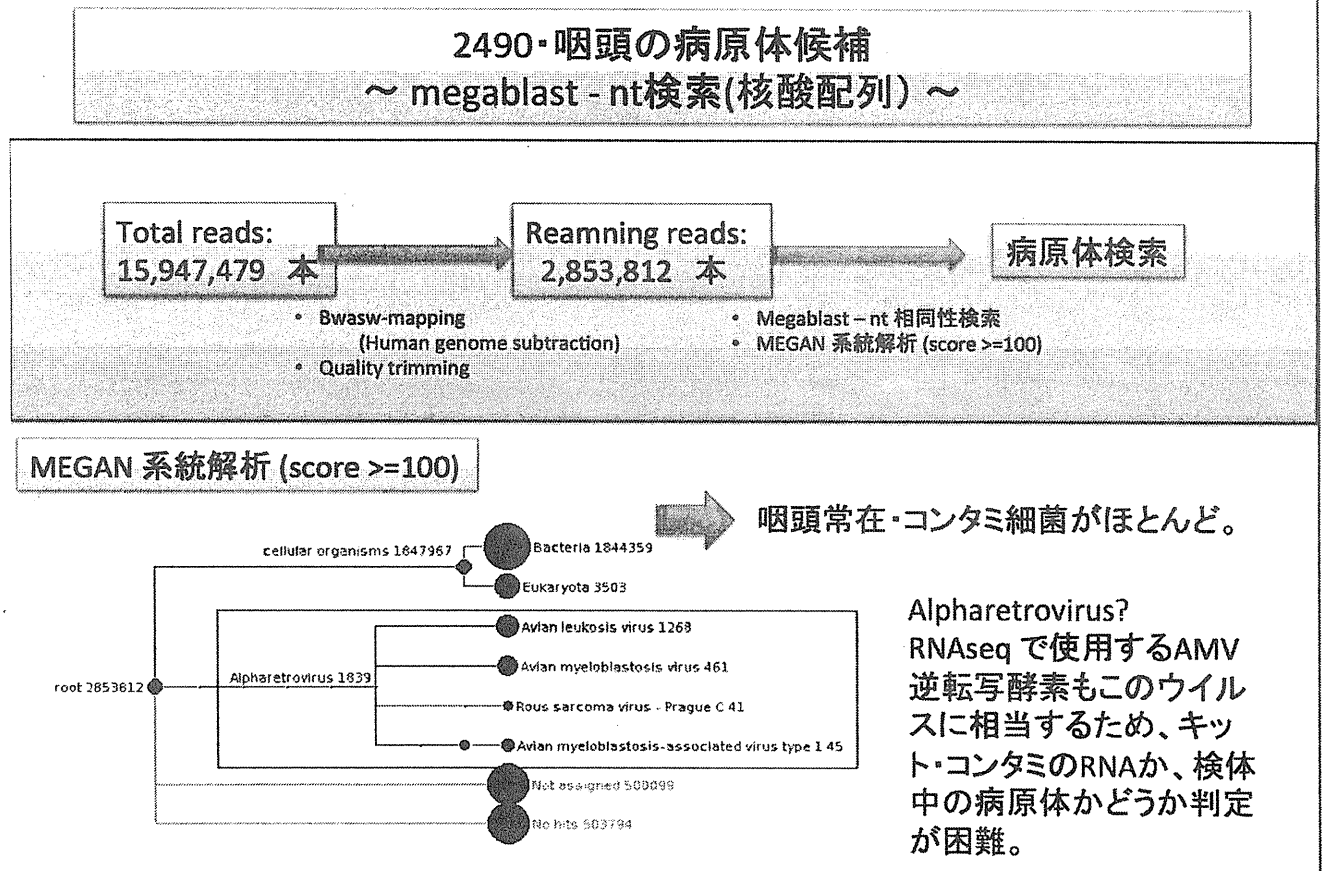


図2 山形県・幼稚園の集団呼吸器発症例の咽頭ぬぐい液からの網羅的病原体検索。検出された生物種の割合を示している。