

の配列をそのまま直接データベース検索に用いることで、より高い感度のウイルス検出ができることが分かった。リード数が比較的少ない今回のようなケースにおいては、リードを直接検索に用いる手法が薦められると思われる。一方で、この手法はリード数や検体数が多いケースにおいては、ソフトウェアのさらに多くの解析を要求するとともに、結果の人的な処理もコンティグを用いた解析よりも多くの時間を要求されると考えられることから、さらに効率の良いシステム、解析手法が将来的には開発される必要がある。

東京女子医大からの重症呼吸器疾患患者検体からは、ヒトコロナウイルス NL63 が検出され、既に培養によって検出されていた *Moraxella catarrhalis* の配列も確認された。この検体および鳥取県衛生環境研究所ウイルス種検出の結果は、次世代シーケンスを用いなければ得られない結果であった。以上の結果により、次世代型シーケンスにより、ウイルス分離を行わずに直接原因ウイルスを同定することが可能であることが示された。

E. 結論

次世代型シーケンサーを用いて、多検体でも呼吸器感染症の原因ウイルスを同定できるシステムを構築した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文作成準備中

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

グループ	臨床診断名
1	咽頭炎、扁桃炎、気管支炎、肺炎、突発性発疹
2	咽頭炎、扁桃炎、気管支炎、肺炎、急性心筋炎
3	咽頭炎、扁桃炎、肺炎
4	咽頭炎、扁桃炎、呼吸窮迫
5	咽頭炎、扁桃炎、気管支炎
6	咽頭炎、扁桃炎、手足口病、肺炎、気管支炎
10	扁桃炎、ヘルパンギーナ、肺炎、気管支炎、呼吸器症状（熱、鼻汁、咳）、小脳失調

図1. 病原体が検出されたグループが含む症例

Group	Number of contigs	E-value	Sequence with the highest score	Identity (%)
2	4	$0 - 1.9 \times 10^{-78}$	Human coronavirus HKU1 strain	93-98
3	1	3.2×10^{-171}	Human coronavirus HKU1 strain	93
4	8*	$0 - 1.5 \times 10^{-42}$	Human enterovirus*	73-90
4	1	1.3×10^{-99}	Influenza C virus (C/Ann Arbor/1/50), segment 7	99
10	7	$2.6 \times 10^{-100} - 1.3 \times 10^{-86}$	Human herpesvirus 1 strain KOS	90-100

*これらのコンティグは、ヒトエンテロウイルスの3つの型 (B, 98, 100) に対し、ほぼ同等の相同性を示す

図2. 鳥取県衛生環境研究所検体の次世代型シーケンス解析
(コンティグによる解析)

グループ	コンセンサス(bp)	リード数	リファレンス長(bp)	リファレンス名
2	17065	1002	29926	Human coronavirus HKU1
3	12343	503	29926	Human coronavirus HKU1
4	2032	143	7389	Human enterovirus B
4	806	68	7422	Human enterovirus 98
4	874	52	7421	Human enterovirus 100
4*	1172	36	1968	Influenza C virus (C/Ann Arbor/1/50), segment 4
5	9426	292	29926	Human coronavirus HKU1
5	1043	21	30738	Human coronavirus OC43
5*	803	23	2130	Influenza C virus (C/Ann Arbor/1/50), segment 3
10	47113	1389	152261	Human herpesvirus 1

*グループ4と5からはインフルエンザCのすべての分節について、相同性のあるリードが検出された

図3. 鳥取県衛生環境研究所検体の次世代型シーケンス解析
(シングルリードによる解析)

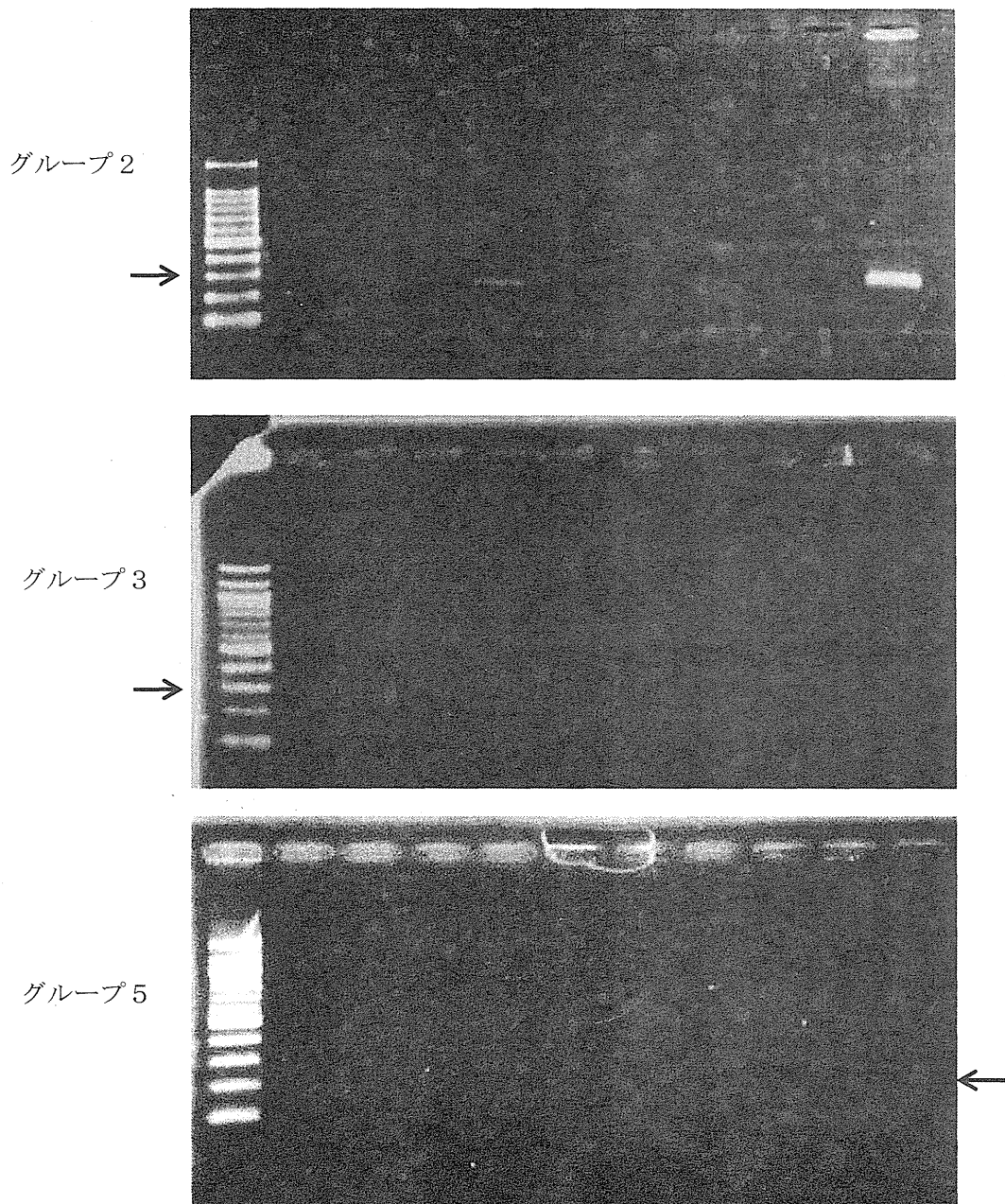


図4. PCRによるグループ2、3、5各検体中のコロナウイルス HKU1 strain の検出
 コロナウイルス HKU1 に特異的なプライマーにより、各グループに含まれる 10 検体中の
 どの検体にこのウイルスが含まれるかを検出した。矢印は標的の PCR 産物(およそ 250 bp)
 を示す。グループ3の一検体からはサイズの異なる PCR 産物が検出されている。

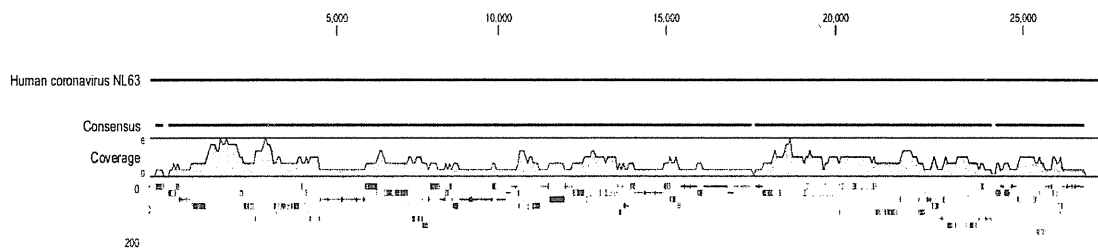


図5. 次世代シーケンスによる東京女子医大検体からのヒトコロナウイルス NL63 の検出

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

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

研究協力者 石岡大成 吉住正和 塚越博之 群馬県衛生環境研究所

研究協力者 倉井大輔、石井晴之 杏林大学医学部第一内科

研究要旨

呼吸器ウイルスが急性呼吸器症状を呈する夏から初秋の入院患者の約 15% (6/39 例) に検出された。特に、慢性呼吸器疾患（気管支喘息、COPD）の急性増悪に多く検出された。人工呼吸器や昇圧剤による治療を必要とする重症例 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。

A. 研究目的

呼吸器ウイルスは、かぜ症候群の他に予後や ADL: activity of daily living に影響を与える重症感染症を引き起こすこともある¹⁻³⁾。しかし呼吸器ウイルス感染症の診断はインフルエンザウイルスを除き一般的には困難で、我が国の成人肺炎や慢性呼吸器疾患の増悪に呼吸器ウイルス感染症がどのように関与しているかは不明である。

本研究の目的は、入院を必要とした急性呼吸器疾患において気道検体から PCR 法を用いて呼吸器ウイルスの検出を行い、疾患重症度を中心とした臨床的検討を行うことである。

研究方法

1. 研究デザイン：前向き観察研究
2. 対象患者：2012 年 8 月 1 日から 10 月 30 日に杏林大学医学部附属病院を受診し、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。

3. 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。
4. 対象ウイルス：RS ウイルス (RSV)、ライノウイルス (HRV)、ヒトメタニューモウイルス (HMPV)、インフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、ボカウイルス、アデノウイルスを PCR 法にて同定した。
5. 観察項目：主要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。
6. 定義：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。Chronic Obstructive Pulmonary Disease (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、致死的な発作や初期治

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。

7. 臨床的改善については、Halm らの基準⁴⁾を一部変更し、下記の条件を満たす場合と定義した。
 - ① 呼吸不全なし（室内気で SpO₂90%以上もしくは PaO₂60Torr 以下かつ、人工呼吸器の使用なし）
 - ② 解熱（37.5 度未満）
 - ③ 血圧 90mmHg 以上
 - ④ 脈拍 100 回/分以下
 - ⑤ 経口摂取（5 割以上）
 - ⑥ 意識障害なし
8. ADL の自立は、入院前の ADL 評価には KATS index⁵⁾を一部修正し、介助の必要なしに、食事、着替え、移動、入浴、トイレへの移動、排泄コントロールができることと定義した。

B. 研究結果

観察期間中に検体採取をした症例は 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。表 1 に疾患割合を示す。

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 の急性増悪と喘息発作の症例にのみウイルスが検出されたので、これらの基礎疾患を有する症例（COPD 急性増悪 6 例、喘息発作 6 例）に注目して臨床的特徴を検討した。

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。

C. 考察

本研究において、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、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、以前の海外報告^{6, 7)}と同

様で呼吸器ウイルスの関与が示唆された重要な結果である。

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。

本研究の結果より、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。

今回の観察期間は夏から初秋にかけての限定した短期間のみでの調査であり、十分な結果であったとは言い切れない。呼吸器ウイルス感染症は季節により流行するウイルスの種類が大きく異なるため、本研究も通年性の観察期間が必要であると思われる。また慢性呼吸器疾患患者では、無症状の時期にも呼吸器ウイルスが検出され、基礎疾患自体の病状に影響を与える報告⁸⁾もみられる。そのため今後は、長期間に渡り基礎疾患の病状とウイルス検出の調査研究を行うことが必須と考えられた。

D. 結論

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。

E. 参考文献

1. Choi SH, Hong SB, Ko GB, Lee Y, Park HJ, Park SY, Moon SM, Cho OH, Park KH, Chong YP, Kim

SH, Huh JW, Sung H, Do KH, Lee SO, Kim MN, Jeong JY, Lim CM, Kim YS, Woo JH, Koh Y. Viral Infection in Patients with Severe Pneumonia Requiring Intensive Care Unit Admission. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012; 186: 325-32.

2. Miggins M, Hasan A, Hohmann S, Southwick F, Casella G, Schain D, Liu H, Bihorac A, Moldawer L, Efron P, Ang D. The potential influence of common viral infections diagnosed during hospitalization among critically ill patients in the United States. *PLoS One.* 2011; 6:e18890.

3. Gozalo PL, Pop-Vicas A, Feng Z, Gravenstein S, Mor V. Effect of influenza on functional decline. *J Am Geriatr Soc.* 2012; 60:1260-7.

4. Halm EA, Fine MJ, Marrie TJ, Coley CM, Kapoor WN, Obrosky DS, Singer DE. Time to clinical stability in patients hospitalized with community-acquired pneumonia: implications for practice guidelines. *JAMA* 1998; 279: 1452-7.

5. KATZ S, FORD AB, MOSKOWITZ RW, JACKSON BA, JAFFE MW. Studies of illness in the aged. The index of ADL: A standardized measure of biological and psychosocial function. *JAMA.* 1963; 185: 914-9.

6. De Serres G, Lampron N, La Forge J, Rouleau I, Bourbeau J, Weiss K, Barret B, Boivin G. Importance of viral and bacterial infections in chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. *Clin Virol.* 2009; 46:129-33.

7. Beasley R, Coleman ED, Hermon Y, Holst PE, O'Donnell TV, Tobias M. Viral respiratory tract infection and exacerbations of asthma in adult patients. *Thorax.* 1988; 43: 679-83.

8. Tom MA, Donaldson GC, Johnston SL, Openshaw PJ, Wedzicha JA. Respiratory syncytial virus, airway inflammation, and FEV1 decline in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 173: 871-876.

研究発表

1. 論文発表

- (1) Kobayashi M, Tsukagoshi H, Ishioka T, Mizuta K, Noda M, Morita Y, Ryo A, Kozawa K, Kimura H. Seroepidemiology of Saffold coronavirus (SAFV) genotype 3 in Japan. J Infect. (in press).
- (2) Seki E, Yoshizumi M, Tanaka R, Ryo A, Ishioka T, Tsukagoshi H, Kozawa K, Okayama Y, Goya T, Kimura H. Relationships between cytokine profiles, signaling pathways (Akt, p38 MAPK, ERK1/2, and IκB-α), and pharmacological effects of fluticasone propionate in respiratory syncytial virus-infected human fetal lung fibroblasts. Cell Biol Int. (in press).
- (3) Kato M, Ishioka T, Kita H, Kozawa K, Hayashi Y, Kimura H. (2012) Eosinophil granular proteins damage bronchial epithelial cells infected with respiratory syncytial virus. Int Arch Allergy Immunol. 158(1):11-18.

- (4) Yoshida A, Kiyota N, Kobayashi M, Nishimura K, Tsutsui R, Tsukagoshi H, Hirano E, Yamamoto N, Ryo A, Saitoh M, Harada S, Inoue O, Kozawa K, Tanaka R, Noda M, Okabe N, Tashiro M, Mizuta K, Kimura H. (2012) Molecular epidemiology of attachment glycoprotein (G) gene in respiratory syncytial virus in children with acute respiratory infection in Japan in 2009/2010. J Med Microbiol. 61:820-829.
- (5) 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. (2012) Molecular epidemiological study of human rhinovirus species ABCs from patients with acute respiratory illnesses in Japan. J Med Microbiol. 61(Pt 3):410-419..

F. 知的財産の出願・登録状況

なし

表 1 疾患別の臨床情報（ウイルス検出と重症度）

	肺炎 (15 例)	COPD 急性増悪 (6 例)	喘息発作 (6 例)	その他* (12 例)	合計 (39 例)
平均年齢（歳）	72	71	61	65	69
性別（男：女）	10:5	4:2	2:4	4:8	20:19
ウイルス検出例 (%)	0 (0)	2 (33)	4 (67)	0 (0)	6 (15)
重症例（治療） (%)	4 (27)	2 (33)	0 (0)	0 (0)	6 (15)
予後不良例 (%)	4 (27)	2 (33)	1 (17)	5 (41)	12 (32)

*その他には、膠原病関連肺疾患 4 例、間質性肺炎 3 例など

**報告時、2 例は入院中で予後判定から除外

表 2 COPD 急性増悪症例の臨床像

No.	年齢 (歳)	性別	入院 期間 (日)	ウイルス 検出	臨床的 改善(日)	ADL 自立	重症 治療	予後 不良	細菌	合併 疾患	COPD 病期	検体 採取 月
1	67	女	16	RSV	16	×	○	死亡	-		IV	8
2	70	男	9	-	4	○	×	生存	S.p		III	8
3	84	女	10	RSV	7	○	×	生存	-		†	8
4	64	男	31	-	4	○	×	転院	H.flu	§	IV	9
5	76	男	31	-	31	×	○	死亡	H.flu		IV	9
6	64*	男	6	-	**	○	×	生存	-	¶	IV	10

* 検体採取後他院に転院

** 転院のため不明

§ 肺塞栓症・タコツボ心筋症・肺癌

¶ 心不全

† 不明

S.p 肺炎球菌

H.flu インフルエンザ菌

表 3 喘息発作症例の臨床像

No.	年齢 (歳)	性別	入院期間 (日)	ウイルス 検出	呼吸不全の 改善(日)*	臨床的 改善(日)	ADL 自立	重症 治療	予後 不良	検体 採取 月
1	58	女	19	-	12	12	○	×	0	8
2	91	女	35	HMPV	17	23	×	×	1	8
3	90	女	34	-	6	6	×	×	0	8
4	50	女	11	RSV	8	8	×	×	0	9
5	28	男	7	HRV	5	5	○	×	0	10
6	47	男	10	HRV	5	5	○	×	0	10

*呼吸不全の改善は SpO₂ 90%以上になるまでの入院期間とした。

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

研究分担者 小澤邦壽 群馬県衛生環境研究所

研究協力者 宮地裕美子 菅井和子 独立行政法人国立病院機構横浜医療センター小児科
小林美保 丹羽祥一 塚越博之 石岡大成 高田勇人 群馬県衛生環境研究所

野田雅博 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

小児の呼吸器感染症は、入院の原因疾患の上位を占める。入院の適応判断のためには、初診時において呼吸障害の程度や日常生活への支障の程度を客観的に把握しトリアージする必要がある。今回、2010年1月～5月までに気道感染症のため受診もしくは入院した患者において、臨床像より重症度を評価し、ウイルス検出結果と臨床的なアウトカムの比較を行い、重症度定義に関し検討した。

患児より鼻汁を採取し、RT-PCR法にてウイルス検索を行った。respiratory syncytial virus (RSV)、human rhino virus (HRV)、human parainfluenza virus (HPIV)、human metapneumo virus、human boca virus のいずれかが検出された全242例(月齢 25.7 ± 30.2 歳)を対象とし、重症度スコアを定義し、各症例の臨床像との比較検討を行った。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。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。

重症度の評価が重要であることを示した。今回、当院に気道感染症の診断で受診した児に関しその臨床像より簡便な方法にて重症度を評価し、原因ウイルス、臨床的なアウトカムの比較を行い、臨床的な重症度の定義について検討を行った。

A.研究目的

小児の急性疾患においてウイルス感染による呼吸器感染症は重要な疾患である。入院の適応を判断するためには、的確に初診時の呼吸状態を判断しトリアージする必要がある。2006年、アメリカ小児科学会 [American Academy of Pediatrics, Pediatrics,2006.]は、乳児細気管支炎の診断と治療の指針として Diagnosis and Management of Bronchiolitis を発表し、外来治療または入院治療の選択には

B.研究方法

2010年1月～5月までに気道感染のため受診もしくは入院した児242例より口頭により保護者から同意を得て鼻腔分泌物を採取した。明らかな細菌性肺炎は除外した。鼻

汁検体採取に際してのスワブは、Advanced flocced swabs(Copan innovation, Italy)を用い、ウイルス保存輸送液は、既成の Universal Transport Medium(UTM : Copan innovation, Italy)を用いた。採取した保存液は-80°Cにて保存し、RT-PCR法によりウイルス検索を行った。respiratory syncytial virus (RSV)、human rhino virus (HRV)、human metapneumo virus (HMPV)、human parainfluenza virus (HPIV)、human boca virus (HBoV)、adenovirus (AdV)のいずれかが検出状況を調査すると共に、各症例の臨床像から重症度を評価し、入院適応を判断する上での臨床的定義の検討を行った。

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。

尚、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。

C.研究結果

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(表1, 2)。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(表2, 図1)。

D.考察

呼吸障害の重症度分類として、過去にくつか報告されているが[Carroll CL, et. al.: Ann Allergy Asthma Immunol, 2005.] [Chalut DS, et. al.: The Journal of pediatrics, 2000.] [Reed C, et. al.: PLoS One, 2012.] [Fujitsuka A:アレルギー, 2011.]、いずれの報告でも用いられていた多呼吸、喘鳴、陥没呼吸、酸素需要の4項目を今回採用した。また小児の呼吸障害では、しばしば経口摂取などの日常生活障害も要因となり、入院を要する事があるため、本検討では哺乳障害(経口摂取不良)も重症度の1項目として採用し、重症度分類を行った。

E.結論

今回の我々の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。初診時で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。

また、中等症重症のウイルス分離率は、軽症と比較し有意差に高かった。小児の呼

吸器感染において重症化する児はより検出率が高く、検出ウイルスとしては HRV、RSV、HPIV が上位を占め、また、HRV と RSV の混合感染もそれらに次ぎ多かった。重症例では、HEV 検出例が多く見られた。

F.研究発表論文発表

1) 論文

- ①菅井和子、野田雅博、木村博一：
感染症迅速診断キットの有用性と限界 2.
RSウイルス 小児科 53 巻 04 号
p417-422, 2012
- ②宮地裕美子、菅井和子:特集Ⅱ呼吸器ウイルス感染症と気管支喘息 ウイルス感染の喘息に及ぼす臨床的影響 臨床免疫・アレルギー科, 58(4): 419-424,2012

2) 学会発表

- ① Murata M. , Sugai K. , Kobayashi M. , Fujitsuka A., Kaburagi Y., Noda M. , Kimura H.
Identification of respiratory viruses in asthmatic Japanese children with recurrent wheezing . Asia Pacific Association of Pediatric Allergy, Respiriology & Immunology 2012 第 16 回
(joint congress of 16th Taiwan Academy of Pediatric Allergy Asthma Immunology & 34th The Chinese Society of Immunology)Taipei, 2012 年 10 月 19-21 日

G.知的財産権の出願・登録状況：なし

表1 ウイルス検出例の臨床症状

	人数 (%)
発熱 (37.5°C以上)	122 (50.4)
発熱期間 (日)	1.92±2.6
多呼吸	57 (23.6)
喘鳴	175 (72.3)
陥没呼吸	79 (32.6)
酸素需要	60 (24.8)
哺乳障害	101 (41.7)

表2 重傷度別入院患者

	症例数(人)	入院例(人)
軽傷	112 (46.3)	36 (32.1)
中等症	86 (35.5)	77 (89.5)
重症	44 (18.2)	43 (97.7)

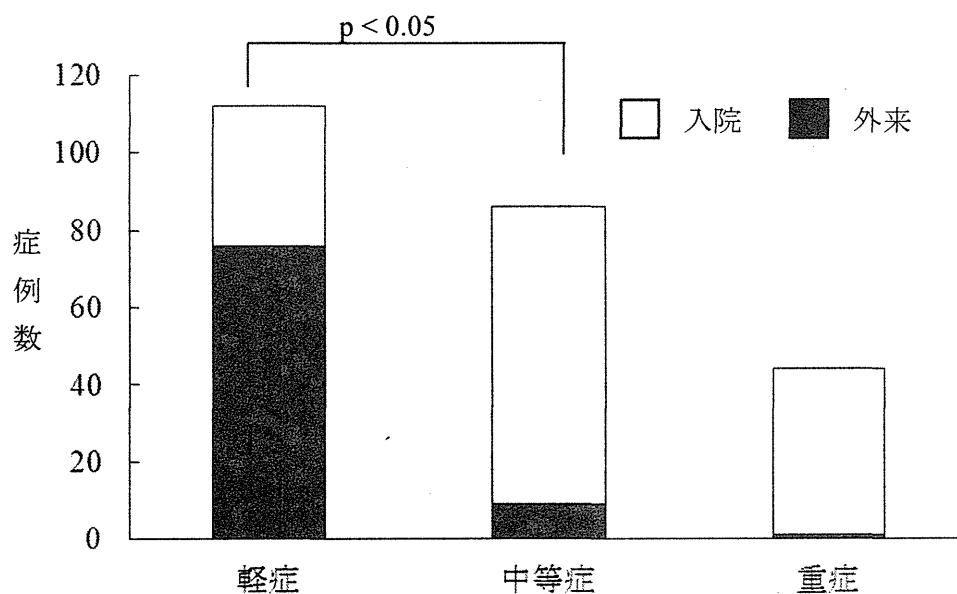
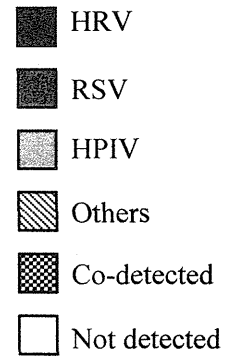
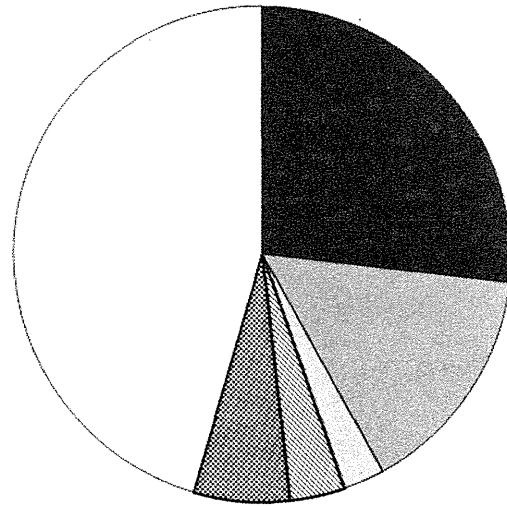
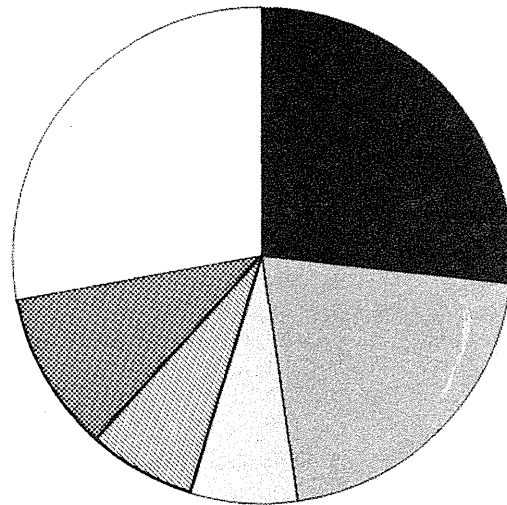


図1 重症度別入院患者数の比較

(A) 軽症群



(B) 中等症群



(C) 重症群

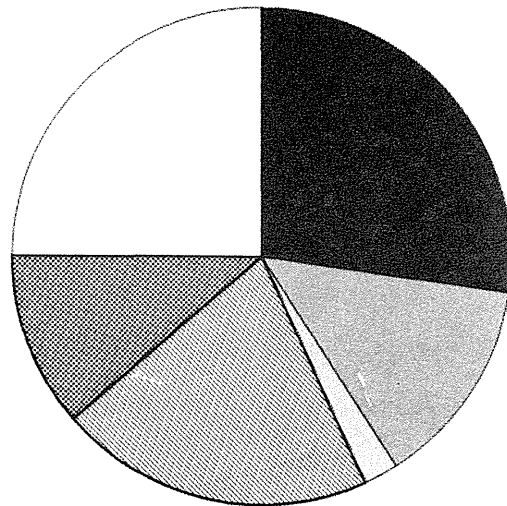


図2 呼吸器症状重症度別検出ウイルス

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

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
研究協力者 吉住正和 塚越博之 小澤邦壽 群馬県衛生環境研究所
野田雅博 国立感染症研究所

研究要旨

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、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。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、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。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。以上のことから、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

小児の気管支喘息(喘息)の増悪因子として、ウイルス、細菌、マイコプラズマ、クラミジアなどがあるが、このうち最も重要なのはウイルス感染と考えられる。過去の報告や最近の我々の報告から、小児喘息発作の原因ウイルスとしては、ライノウイルス（HRV）、respiratory syncytial (RS) ウイルス、エンテロウイルス、パラインフルエンザウイルス、インフルエンザウイルスなどが指摘されている (1, 2)。その中でも、ライノウイルスは、幼少期における喘鳴の発症や増悪の病態に関与しており、さらに喘息の発症・増悪(virus-induced asthma)の誘導に深く関与することが報告されている (3, 4)。

ウイルス感染による乳児喘息を引き起こす原因を考える場合、感染細胞から産生が誘導され

るさまざまなサイトカインが深く関与することが示唆されている (4, 5)。ウイルス感染による炎症性サイトカインの産生充進は、乳幼児の幼弱な気道を強く傷害し、これらのサイトカイン産生と気道リモデリングには、肺組織に多く含まれる線維芽細胞が深く関与していることが推察される (6)。

また、ステロイド剤は喘息などのアレルギー性疾患において最も有効性が高い薬剤である。これまでに、デキサメサゾンによる上皮細胞の ICAM-1 発現抑制作用が報告されているが (7)、ウイルス感染によって引き起こされるサイトカインストームに対する本剤の抑制機構については、いまだ解明に至っていないと思われる。

そこで、本研究においては、HRV 感染胎児肺線維芽細胞 (MRC-5 細胞) によって惹起される

サイトカイン産生機構の解明、さらに、これらサイトカイン産生系へのステロイド抑制機構の解明を目的とした以下の内容の研究を行った。

B. 研究方法

1. ウイルス

HRV (type 14, V-103-501-558 strain, ATCC, VR-1124AS/GP) をヒト胎児肺線維芽細胞 (MRC-5, ATCC; CCL-171) にて培養・増殖した後、細胞培養液を 5,000rpm, 30 分, 4°C にて遠心分離した。遠心分離した上清は、フィルターを用いて精製・濃縮し、試料として用いた。

2. サイトカインの測定

MRC-5 細胞を、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 Multiplicity of infection (MOI) の HRV を感染させ、24 時間後の培養上清を回収した。この上清中に含まれる 28 種類のサイトカインについて解析を行った。

C. 研究結果

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(図 1)。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(図 1)。

D. 考察

本研究により、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。

今回の結果において、HRV 感染 MRC-5 細胞からは、IL-5、IL-10、および IL-13 といった Th2 サイトカインの産生が明らかになった。特に、IL-13 は気道過敏性の亢進、粘液産生、気道リモデリング等の気道組織における気管支喘息の病態形成といった免疫系機能に関与しているといわれ (8)、HRV 感染が自然免疫系を介して、IL-13 を主体とした Th2 免疫機構を増強し、このことが気道のリモデリングに至る主要なカスケードになっているのではないかと考えられた。

また、HRV 感染は、線維芽細胞への好酸球および好中球をリクルートすることが考えられた。

線維芽細胞は、上皮組織下にある結合組織中にあり、組織が損傷を受けると損傷部に移動してコラーゲン等を生成して修復の役割をする (9)。一方で、この線維芽細胞は、HRV に感受性があるという特徴を持っており、気道の重症化病態においては、ウイルス感染が上皮細胞にとどまらず、線維芽細胞にまで感染し、その結果、結合組織成分の過剰な合成による基底膜肥厚や気道過敏性の亢進といった気道リモデリングに関与している。

一方、IL-12 の若干の上昇は認められたものの、代表的な Th1 サイトカインである IFN- γ は、HRV 感染によっても産生が有意に上昇していないこともわかった。MRC-5 細胞への RV 感染は、弱い炎症を誘導したことから、乳幼児の気道における微小環境での Th1、Th2 免疫機構を傷害し、小児喘息の重要なメカニズムである Th2 免疫機構を増大することが示唆された。これらのことは、HRV 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が示唆されたが、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。

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。

E. 結論

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。

F. 参考文献

1. Lemanske RF Jr, Jackson DJ, Gangnon RE, Evans MD, Li Z, Shult PA, Kirk CJ, Reisdorf E, Roberg KA, Anderson EL, Carlson-Dakes KT, Adler KJ, Gilbertson-White S, Pappas TE, Dasilva DF, Tisler CJ, Gern JE. Rhinovirus illnesses during infancy predict subsequent childhood wheezing. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;116:571-577.
2. Sigurs N, Gustafsson PM, Bjarnason R, Lundberg F, Schmidt S, Sigurbergsson F, Kjellman B. Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy and asthma and allergy at age 13. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171:137-141.
3. Johnston, S. L. Overview of virus-induced airway disease. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2004;2: 150-156.
4. Kotaniemi-Syrjänen, A., Vainionpää, R., Reijonen, T. M., Waris, M., Korhonen, K., and Korppi, M. Rhinovirus-induced wheezing in infancy--the first sign of childhood asthma? *J. Allergy Clin Immunol.* 2003;111:66-71.
5. Martinez, F. D. Maturation of immune responses at the beginning of asthma. *J. Allergy Clin Immunol.*

1999;103:355-361.

6. Barnes, P. J. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Clin Invest.* 2008;118:3546-3556.

7. Suzuki T, Yamaya M, Sekizawa K, Yamada N, Nakayama K, Ishizuka S, Kamanaka M, Morimoto T, Numazaki Y, Sasaki H. Effects of dexamethasone on rhinovirus infection in cultured human tracheal epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;278:L560-71.

8. Lachowicz-Scroggins ME, Boushey HA, Finkbeiner WE, Widdicombe JH.

Interleukin-13-induced mucous metaplasia increases susceptibility of human airway epithelium to rhinovirus infection. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010;43:652-61.

9. Puxeddu, I., Bader, R., Piliponsky, A. M., Reich, R., Levi-Schaffer, F., and Berkman, N. The CC chemokine eotaxin/CCL11 has a selective profibrogenic effect on human lung fibroblasts. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006;117:103-110.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Seki E, Yoshizumi M, Tanaka R, Ryo A, Ishioka T, Tsukagoshi H, Kozawa K, Okayama Y, Okabe-Kado J, Goya T, Kimura H. Cytokine profiles, signalling pathways and effects of fluticasone propionate in respiratory syncytial virus-infected human foetal lung fibroblasts. *Cell Biol Int.* in press.
- 2) Yoshizumi M, Kimura H, Okayama Y, Nishina A, Noda M, Tsukagoshi H, Kozawa K, Kurabayashi M. Relationships between cytokine profiles and signaling pathways in parainfluenza virus-infected lung fibroblasts. *Front in Virol* 2010;1:124.
- 3) 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.

4) Tsukagoshi H, Masuda Y, Mizutani T, Mizuta K, Saitoh M, Morita Y, Nishina A, Kozawa K, Noda M, Ryo A, Kimura H. Sequencing and phylogenetic analyses of Saffold cardiovirus (SAFV) genotype 3 isolates from children with upper respiratory infection in Gunma, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2010;63(5):378-80.

5) Itagaki T, Abiko C, Ikeda T, Aoki Y, Seto J, Mizuta K, Ahiko T, Tsukagoshi H, Nagano M, Noda M, Mizutani T, Kimura H. Sequence and phylogenetic analyses of Saffold cardiovirus from children with exudative tonsillitis in Yamagata, Japan. *Scand J Infect Dis.* 2010;42(11-12):950-2.

6) Kato M, Tsukagoshi H, Yoshizumi M, Saitoh M, Kozawa K, Yamada Y, Maruyama K, Hayashi Y, Kimura H. Different cytokine profile and eosinophil activation are involved in rhinovirus- and RS virus-induced acute exacerbation of childhood wheezing. *Pediatr Allergy Immunol.* 2011;22(1 Pt 2):e87-94.

7) 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.* 2011;11:168.

8) 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.* 2011;64:262-3.

9) 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 its similarity to coxsackievirus infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2011;30:680-3.

10) 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.* 2011;64:87-9.

11) Omura T, Iizuka S, Tabara K, Tsukagoshi H, Mizuta K, Matsuda S, Noda M, Kimura H. Detection of human metapneumovirus genomes during an outbreak of bronchitis and pneumonia in a geriatric care home in Shimane, Japan, in autumn 2009. *Jpn J Infect Dis.* 2011;64:85-7.

H. 知的財産の出願・登録状況

なし