

さらに継続，検討していく必要がある。

ARI レファレンス機能強化を図るため代表的な ARI ウイルスについて検査に必要なレファレンス参照株，標準品等の整備，拡充を継続して展開している。またレファレンス機能強化にむけた検査法の普及，等は重要であることから，病原体検出マニュアルの整備を継続実施している。今年度はメタニューモウイルス編を公開した。今後，わが国における代表的な ARI ウイルスの一 RV や PIV 等の病原体検出マニュアルも順次，作成，公開に努める予定である。

さきに実施した ARI アンケート調査結果をふまえ，サーベイランスを実施する人材確保の見地から，国立保健医療科学院が主催するウイルス研修の機会を活用して ARI ウイルスに関する実習（細胞培養，ウイルス分離培養・同定，遺伝子検査，等）を実施した。今後，さまざまな機会を活用して同様の試みを図り，技術の紹介・普及に努める。

#### E. 結論

ARI の効果的なサーベイランス体制構築のため包括的な研究を行った。研究第二年次の成果は以下のとおりである。

1. RSV, hMPV, RV, PIV および hBoV 等のさまざまなウイルスの ARI への関与を確定した。
2. RSV, RV および hBoV について詳細な分子疫学解析，流行株の生物学的性状検討を行った。
3. RSV 感染に起因する病態，とくに感染喘息への関与を臨床ウイルスおよび遺伝子学的に解析した。

4. 地方衛生研究所における ARI ウイルスサーベイランスに関わる実験室体制整備を試み，評価等を行った。

5. 限定施設内の感染症流行実態を調査した原因の一部を確定した。

6. 一集団の ARI ウイルスの血清抗体調査を実施した。

#### F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Katsumi Mizuta, Chieko Abiko, Yoko Aoki, Asuka Suto, Hitoshi Hoshina, Tsutomu Itagaki, Noriko Katsushima, Yoko Matsuzaki, Seiji Hongo, Masahiro Noda, Hirokazu Kimura, and Katsumi Ootani: Analysis of monthly isolation of respiratory viruses from children by cell culture using a microplate method: a two-year study from 2004 to 2005 in Yamagata, Japan. *Jpn.J.Infect.Dis.* 61:196-201,2008

2) Katsumi Mizuta, Yoko Matsuzaki, Seiji Hongo, Akira Ohmi, Michiko Okamoto, Hidekazu Nishimura, Tsutomu Itagaki, Noriko Katsushima, Hitoshi Oshitani, Akira Suzuki, Yuki Furuse, Masahiro Noda, Hirokazu Kimura and Tadayuki Ahiko: Stability of the seven hexon hypervariable region sequences of adenovirus types 1-6 isolated in Yamagata, Japan between 1988 and 2007. *Virus Res.* (in press)

3) Yoko Matsuzaki, Tsutomu Itagaki, Chieko Abiko, Yoko Aoki, Asuka Suto, and Katsumi Mizuta: Clinical impact of human

metapneumovirus genotypes and genotype-specific seroprevalence in Yamagata, Japan. *J. Med. Virol.* 80:1084-1089, 2008.

4) Yamaguchi T, Kimura H, Kurabayashi M, Kozawa K, Kato M: Interferon- $\gamma$  enhances human eosinophil effector functions induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or interleukin-5. *Immunol Lett* 118(1): 88-95, 2008.

5) Hishinuma-Igarashi I, Mizuta K, Saito Y, Ohuchi Y, Noda M, Akiyama M, Sato H, Tsukagoshi H, Okabe N, Tashiro M, Kimura H: Phylogenetic analysis of human bocavirus (HBoV) detected from children with acute respiratory infection in Japan. *J Infect in press*.

6) Kazuko Goto-Sugai, Hiroyuki Tsukagoshi, Katsumi Mizuta, Masahiro Noda, Masahiko Kato, Miho Akiyama, Toshiyuki Sugai, Yoshihiro Saito, Nobuhiko Okabe, Masato Tashiro, and Hirokazu Kimura, Phylogenetic analysis of major genes in respiratory

syncytial virus isolated from infant with bronchiolitis. Manuscript in Preparation.

7) 松田俊二, 野田雅博: 重症心身障害児(者)病棟における感染症流行について, *医療*, 62(12), 679-683 (2008)

## 2.学会発表

1) 松田俊二, 野田雅博: 重症心身障害児(者)病棟における感染症流行について 第62回国立病院総合医学会(平成20年11月21・22日)11月22日 東京都(東京国際フォーラム)

2) 松田俊二: 重症心身障害児(者)病棟における感染症流行について 第78回日本感染症学会西日本地方会(平成20年12月5・6日)12月5日 広島市(広島国際会議場)

## H.知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

厚生労働科学研究費補助金（新興再興感染症 研究事業）  
研究報告書

地方における呼吸器ウイルス感染症サーベイランス  
-特にアデノウイルスの疫学-

研究協力者 水田 克巳 山形県衛生研究所 研究主幹（兼）微生物部長

研究要旨 1988-2007年に山形で分離したアデノウイルス 1-6型のヘキソン、Hypervariable region (HVR) のシーケンス解析を行った。その結果、各血清型では、長期にわたり 99-100%の相同性で塩基が保存されていることが明らかとなった。この結果から、HVRが、血清型を決定する部位として安定して保存されていることが示唆され、この部位はむしろ Serotype-specific region と呼ぶべきであると論文にして提唱した。

#### A.研究目的

感染症の制御は、どのような病原体がいつ、どのような感染症をおこしているか、その疫学を解明すること、即ち病原体サーベイランスシステムをベースとした疫学研究なしにはありえない。山形県では、特にウイルス分離に基づいた呼吸器ウイルス感染症の疫学研究を実施してきた。今年度は、1988年から2007年までの20年間に山形で分離されたアデノウイルス(Ad)についてシーケンス解析を行った。

#### B.研究方法

のべ62,778件の鼻咽頭拭い液検体から、4-6種類の細胞を用いたマイクロプレート法を使用し、ウイルス分離を行った。分離されたAd1-6型は合計2,587株にのぼった。各年に分離されたAd1-6型について、それぞれ数株をランダムに選び、ヘキソン蛋白のいわゆる Hypervariable

Region (HVR) を含む領域の遺伝子配列を決定し、20年間に各血清型で変異があったのか否かを検索した。

#### C.研究結果

##### Ad1

41株で975bpを解析した。3株で9-15bpの欠損を認めた。これらの欠損株をのぞいた株間の塩基相同性は99-100%であった。20世紀半ばに分離されたAd1 Prototype (Ad1P)の塩基配列は、1989-2007年に山形で分離された株と一致した。

##### Ad2

40株で987bpを解析した。1株で3bpの挿入を認めた。この株をのぞいた株間の塩基相同性は99.4-100%であった。Ad2Pの塩基配列は、1988-2006年に山形で分離された株と一致した。

#### Ad3

39 株で 918bp を解析した。Y-88-507 と Y97-1721 の 2 タイプに大きく分類された。しかし、両者間でも 4bp の違いしかなく、全体の解析株間の塩基相同性は 99.6-100% であった。レファレンス株 Ad3a、Ad3c の配列も 1988-1999 年に山形で分離された株と一致した。

#### Ad4

23 株で 894bp を解析した。20 株は Y91-164 と 100% 同じで 1 株は 1bp 違いであった (99.9-100% の相同性)。残りの 2 株は同じ配列で、Y91-164 に比し 12bp の欠損、18bp の違いが認められた (代表株 1597-Yamagata-03)。Ad4P の塩基配列は、欠損のない 1597-Yamagata-03 と 1bp 違いであった。

#### Ad5

43 株で 939bp を解析した。大きく Y88-158 と Y98-5197 タイプ (両者間で 54bp 程度の違い) に分けられた。塩基相同性は、Y88-158 タイプ 内で 99.7-100%、Y98-5197 タイプ 内で 99.4-100% であった。両タイプの代表株間では 93.9% であった。ユニークな Y98-5197 タイプ は 1988 年から 2007 年までに 8 株散発的に分離された。Ad5P の配列は、1988 年から 2006 年までの山形分離株と一致した。

#### Ad6

35 株で 972bp を解析した。Y88-71 タイプ と Y88-71 と比べて 3bp 欠損が 2 ケ所、6bp の欠損が 1 ケ所、63 塩基の違いある Y88-3882 タイプ が見つかった。Y88-71 タイプ

の株間の塩基相同性は 99-100% であった。Y88-3882 タイプ は全く同じ塩基配列の株が 1988 年から 2002 年までに 5 株散発的に分離された。Ad6P の配列は、Y88-71 に類似していた。

#### D. 考察

Ad の HVR は、血清型間では変異が確かに蓄積している部分であるといえるが、Ad 1-6 の各血清型でみると、20 年間にわたり同部位は、①挿入や欠損がない株では変異が 1% に満たないこと、②遺伝子の挿入や欠損があったとしても、それらは繰り返しあるいは地域を越えて観察され、確立されている変異であると考えられること、から 1 つの血清型としては安定して保存されている領域であることが示唆された。

#### E. 結論

HVR は、血清型を決定づける部位として長期間安定して保存されており、Scrotype-specific region と呼ぶべきであると考えられ、論文にして提唱した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Katsumi Mizuta, Chieko Abiko, Yoko Aoki, Asuka Suto, Hitoshi Hoshina, Tsutomu Itagaki, Noriko Katsushima, Yoko Matsuzaki, Seiji Hongo, Masahiro Noda, Hirokazu Kimura, and Katsumi Ootani: Analysis of monthly isolation of respiratory viruses from children by cell culture using a microplate method: a two-year study from 2004 to 2005 in

Yamagata, Japan. *Jpn.J.Infect.Dis.*  
61:196-201,2008

2) Katsumi Mizuta, Yoko Matsuzaki,  
Seiji Hongo, Akira Ohmi, Michiko  
Okamoto, Hidekazu Nishimura,  
Tsutomu Itagaki, Noriko Katsushima,  
Hitoshi Oshitani, Akira Suzuki, Yuki  
Furuse, Masahiro Noda, Hirokazu  
Kimura and Tadayuki Ahiko: Stability  
of the seven hexon hypervariable region  
sequences of adenovirus types 1-6  
isolated in Yamagata, Japan between

1988 and 2007. *Virus Res.* (in press)

3)Yoko Matsuzaki, Tsutomu Itagaki,  
Chieko Abiko, Yoko Aoki, Asuka Suto,  
and Katsumi Mizuta: Clinical impact of  
human metapneumovirus genotypes  
and genotype-specific seroprevalence in  
Yamagata, Japan. *J.Med.Virol.*  
80:1084-1089,2008.

## 栃木県における呼吸器ウイルス発生動向調査

研究協力者 平田 明日美 栃木県保健環境センター  
大金 映子 栃木県保健環境センター  
船渡川 圭次 栃木県保健環境センター

### 研究要旨

栃木県のウイルスサーベイランス検査体制の整備等を図り、これまで検査未対応の急性呼吸器感染症(ARI)ウイルスを対象にウイルスサーベイランスを実施した。その結果、RSウイルス、ヒトメタニューモウイルス、ライノウイルスおよびヒトボカウイルス等が検出された。

#### A. 研究目的

栃木県保健環境センターにおいては、これまで急性呼吸器感染症(ARI)ウイルスに係る病原体サーベイランスはインフルエンザウイルス(Infl)、アデノウイルス(AdV)等は既の実施されており、いくつかの成果が得られ公衆衛生行政に活用されている。

一方、ARIの主な原因は数百種類におよぶウイルス群である。そこで当センターにおいてこれまでウイルスサーベイランス未対応のRSウイルス(RSV)、ヒトメタニューモウイルス(hMPV)、ライノウイルス(HRV)およびヒトボカウイルス(hBoV)等のARIウイルスサーベイランス検査体制を新たに整備・拡充し、より効果的なARIウイルスサーベイランスを実施することを試みる。

#### B. 研究方法

病原体サーベイランス体制の整備:ウイルス分離培養体制を充実させるため、ウイルス分離に用いる感染標的細胞の種を再構築した。すなわち、これまでウイルスサーベイランス検査には常時、4種類(呼吸器疾患に限る)の培養細胞(MDCK、HEp-2、VeroおよびA549細胞)を用いて実施してきたが、今回新たにMRC-5細胞(ヒト2倍体)を追加導入するとともにVero細胞をVero E6細胞に変更した。あわせてウイルス培養条件として33°C、

0.5%CO<sub>2</sub>を追加した。また、遺伝子学的検査体制を充実させるため、前述したそれぞれのARIウイルスのRT-PCR法あるいはPCR法を新たに整備した。

供試材料:発生動向調査事業に基づき2008年4月~2008年12月の間、当センターへ搬入された呼吸器疾患患者検体(鼻汁、咽頭ぬぐい液)190検体を用いた。

試験方法:ウイルス分離培養および特異遺伝子検出を病原体検査マニュアル<sup>1,2)</sup>および既報<sup>3,4)</sup>に準じて実施した。遺伝子解析はそれぞれの特異遺伝子を増幅後、増幅産物の塩基配列解析および近隣結合法による系統解析を行った。

#### C. 研究結果

ウイルス分離培養および遺伝子検出を試みた結果、RSV、hMPV、HRV、hBoV、InflおよびAdVがそれぞれ31株、2株、24株、2株、31株および5株、検出された(表1)。

RSVの月別検出状況は11、12月を中心に7月から12月の間に検出された。RT-PCR法で検出された31株を解析した結果、30株がSubgroup A、1株がSubgroup Bに分類される株であった。HEp-2細胞を用いたウイルス分離培養で9株の分離に成功した。これら分離株のN遺伝子(290bp)の分子系統樹を図1に示す。分離株

は全て Subgroup A に分類され、分離株間のホモロジーは 99.3% 以上を示し、アミノ酸置換はみられなかった。

hMPV の月別検出状況は 4 月にウイルス分離培養 (Vero E6 細胞) および RT-PCR 法で 2 株分離/検出された。

HRV は 1 年を通して計 24 株検出 (RT-PCR 法) された。検出された 24 株のうち 13 株の HRV の VP4-2 遺伝子 (266bp) の分子系統樹を図 2 に示す。10 株が Genogroup A、3 株が Genogroup C に分類され、Genogroup 間のホモロジーは低かった。

hBoV は 5 月および 7 月にそれぞれ 1 株が検出された。

#### D. 考察

栃木県における ARI ウイルスサーベイランスをより効果的に実施するため、検査体制の整備を試みた。従前から実施してきたウイルス分離培養と遺伝子検査の更なる充実を図った結果、今回、新たに RSV、hMPV、HRV および hBoV が検出された。検出された RSV の遺伝子解析結果から、その多くは Subgroup A で N 遺伝子のホモロジーが高かったことから、県内で流行した RSV は遺伝学的に近縁な株であったことが推察された。HRV は 1 年を通して Genogroup A および C が検出されたが、その遺伝子型は多彩であった。分離培養で検出された HRV の解析結果<sup>5)</sup>ではすべての株が Genogroup A および B に分類されている。この結果は、Genogroup C に属する HRV の培養細胞を用いた分離増殖は困難であることを示唆しているとも考えられる。症例を重ねて検討する必要がある。hMPV は 4 月に、hBoV は 5 および 7 月にそれぞれ検出された。

分離増殖が可能なウイルスにおいて、今回の検討では PCR 法で検出されたものの分離増殖不成功の検体が多数あったことから、適期の検体採取と輸送および供試までの保管等の条件整備、ウイルス分離増殖法の更なる習熟も今後の検討課題であろう。

一方、分離が困難なウイルスの検出には PCR 法が有効であった。しかし、全ての検体について PCR 法等の遺伝子検査を日常のサーベイランスに活用するためには、高コスト、マンパワー等、解決すべき課題も残される。細胞培養法にて原因ウイルスが検出できなかった場合、PCR 法などの他の複数の検査法を併用することも今後検討されるべきであろう。

栃木県ではこれまでに InfV などの県内分離株の詳細な解析を実施し、薬剤耐性株の県内での流行などを確定している。他の ARI ウイルスについても県内の臨床ウイルス分離株を保存し、将来の種々の調査に活用することも県域の公衆衛生対策に大きく寄与する重要な要因と思われる。今後、効果的サーベイランスの実施に向けた更なる検討が必要と思われる。

#### E. 結論

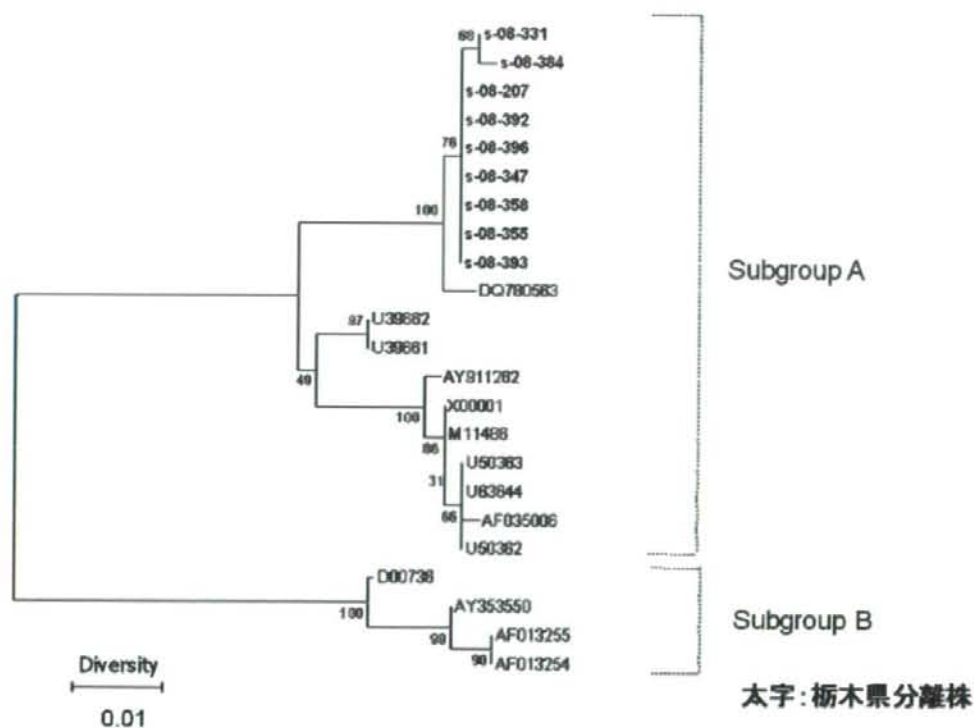
新たに体制整備、構築した ARI ウイルスサーベイランスを実施した結果、栃木県において初めて RSV、hMPV、HRV および hBoV が検出された。

#### F. 参考文献

- 1) 病原体検査マニュアル RS ウイルス  
<http://www.nih.go.jp/niid/reference/RS-manual.pdf>
- 2) 病原体検査マニュアル ヒトメタニューモウイルス  
<http://www.nih.go.jp/niid/reference/hMPV-manual.pdf>
- 3) C.Savolainen, S.Blonqvist, Mick N.Mulderst, and T.Hovi: Genetic clustering of all 102 human rhinovirus prototype strains: serotype 87 is close to human enterovirus 70. *J Gen Virol* 83:333-340, 2002
- 4) Allander, T., M.T.Tammi, M.Eriksson, A.Bjerkner, A.Tiveljung-Lindell, and B.Andersson: Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci U S A*

表 1 2008 年 4 月から 12 月に搬入された呼吸器感染症のウイルス検出結果

| 検体<br>採取月 | 検出数(分離株数) |          |   |          |   |           |          |            |            |            |
|-----------|-----------|----------|---|----------|---|-----------|----------|------------|------------|------------|
|           | 4         | 5        | 6 | 7        | 8 | 9         | 10       | 11         | 12         | 計          |
| InfV      | 8<br>(7)  |          |   |          |   | 4<br>(3)  | 1<br>(1) | 5<br>(5)   | 13<br>(13) | 31<br>(29) |
| AdV       |           | 1<br>(1) |   | 2<br>(2) |   | 1<br>(1)  |          | 1<br>(1)   |            | 5<br>(5)   |
| RSV       |           |          |   | 1        | 2 | 2         | 1        | 10<br>(4)  | 15<br>(5)  | 31<br>(9)  |
| hMPV      | 2<br>(2)  |          |   |          |   |           |          |            |            | 2<br>(2)   |
| HRV       | 2         |          |   | 4        | 4 | 5         | 1        | 6          | 2          | 24         |
| hBoV      |           | 1        |   | 1        |   |           |          |            |            | 2          |
| 計         | 12<br>(9) | 2<br>(1) |   | 8<br>(2) | 6 | 12<br>(4) | 3<br>(1) | 22<br>(10) | 30<br>(18) | 93<br>(45) |

図 1 Phylogenetic tree of RSV based on *N* gene sequences (290 bp)



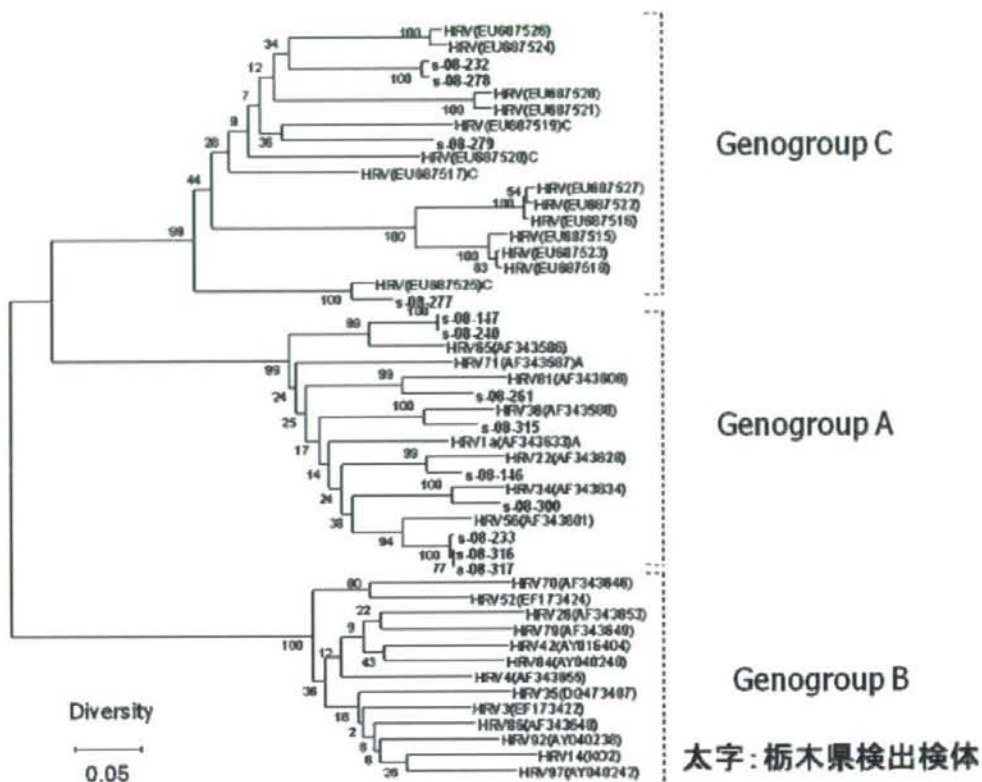


図2 Phylogenetic tree of HRV based on VP4-2 genes sequences (266 bp)

沖縄県における Respiratory Syncytial Virus 感染症の流行状況と  
分離株の遺伝子解析

研究協力者 中村 正治 沖縄県衛生環境研究所  
糸数 清正 沖縄県衛生環境研究所  
平良 勝也 沖縄県衛生環境研究所  
木村 博一 国立感染症研究所感染症情報センター  
野田 雅博 国立感染症研究所ウイルス第三部

### 研究要旨

沖縄県における Respiratory Syncytial Virus (RSV) 感染症の発生状況は、全国の流行期（冬季）と異なり、いずれの年も夏季に流行がみられた。検出 RSV 株の遺伝子型は、サブグループ A が主流であったが、同時期にサブグループ B も検出された。分離 RSV 株の G protein 領域の分子系統樹解析の結果、GA2 型と BA 型に分類された。

### A. 研究目的

沖縄県は、わが国の最南西端に位置する島嶼県で、わが国の他の殆どの地域と異なる亜熱帯地域に属している。これまで本県における呼吸器ウイルス感染症（ARI）の病原体サーベイランスは、インフルエンザウイルスを主体に実施され、それ以外の ARI ウイルス検査体制は不十分であり、その実態が十分に把握されていなかった。そこで本研究では ARI ウイルスサーベイランス体制の一層の強化を図るとともに、小児の重要な ARI の一つである RSV 感染症に焦点をあて、の流行状況把握と病原体検索を実施した。

### B. 研究方法

患者発生状況は、2006 年～2008 年に感染症発生動向調査に基づき沖縄県内の小児科定点から報告された患者情報を集計解析した。

ウイルス検索用の検体は、2008 年 6 月から 12 月の間に 1 小児科外来クリニックにおいて、急性上気道炎あるいは下気道炎と臨床診

断された患者の咽頭拭い液 60 検体を供試した。検出 RSV はサブグループの分類、G protein 領域の分子系統樹解析を実施した。

### C. 研究結果

調査期間の RSV 患者報告総数は 1,728 人で、2006 年が 448 人、2007 年が 647 人、2008 年が 606 人であった。患者報告数の最も多かった月は、2006 年が 8 月、2007 年が 6 月、2008 年が 7 月で、いずれの年も夏季に集中していた。患者年齢層は 1 歳未満が 852 (49.3%) 人、1 歳児が 659 (38.1%) 人、2 歳児が 167 (9.7%) 人で、これらの年齢層で全体の 97.1% を占めた。

RSV は、60 検体中 14 検体 (23.3%) から検出された（ウイルス分離培養：8 検体、RT-PCR：6 検体）。症状別の RSV 検出数は、上気道炎患者由来が 49 検体中 7 検体 (14.3%)、下気道炎患者由来が 11 検体中 7 検体 (63.6%) であった。また RSV のサブグループ分類を RT-PCR で実施した結果、サブグループ A が 12 検体、サブグループ B が 2 検体であった。

分離ウイルス株8株のG protein遺伝子の分子系統樹解析を実施した結果、7株が genotype GA2, 1株が genotype BA に分類された。

#### D. 考察

わが国の RSV 感染症は、主に冬季に流行が見られるのに対し、沖縄県の流行は夏季が中心であった。比較的降水量の多い季節に流行する様相は、雨季に流行する熱帯地域の流行様相と類似していた。しかし、降水量は年によって変動があり、流行に関与する要因としてその他の要因も考慮する必要がある。沖縄県では、わが国での患者発生が減少する夏季においても本症に対する注意が必要であると思われた。

患者は2歳以下の乳幼児に集中しており、下気道炎症状を呈する患者からウイルスが多く検出され、小児のサーベイランス対象疾患として重要である。

2008年の流行期に検出されたウイルスはサブグループAが主流であったが、サブグループBも同時期に検出され、既報と同様に1つの流行期に両サブグループの循環が観察された<sup>12)</sup>。また分離 RSV 株の分子系統樹解析結果から、近年ブラジルやベルギー、インドから報告された株と同一のクラスターを形成した。このことは、遺伝子学的に近縁な

RSV が世界各地で流行していることを示唆している。

本研究により亜熱帯気候地帯に位置する沖縄県の RSV 感染症の疫学の一端を把握することができた。しかし、ARI の全体像を解明するために、さらに詳細かつ効果的なサーベイランスを継続して実施する必要がある。

#### E. 結論

沖縄県における RSV 感染症の流行は、わが国の他の多くの地域の流行とは異なり夏季に流行することが特徴的であり、検出 RSV 株はグローバルな株に遺伝子学的に近似であった。

#### F. 参考文献

1. Sato, M., Saito, R., Sakai, T., et al. (2005): Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus infections among children with acute respiratory symptoms in a community over three seasons. *J. Clin. Microbiol.*, 43, 36-40.
2. Zlateva, K. T., Vijgen, L., Dekeersmeaker, N. et al. (2007): Subgroup prevalence and genotype circulation patterns of human respiratory syncytial virus in Belgium during ten successive epidemic seasons. *J. Clin. Microbiol.*, 45, 3022-3030.

気道症状を呈する児におけるRSウイルス分離状況と臨床的背景の検討

菅井 和子 国立病院機構横浜医療センター小児科  
藤塚 麻子 国立病院機構横浜医療センター小児科  
木村 博一 国立感染症研究所感染症情報センター  
野田 雅博 国立感染症研究所ウイルス第三部

研究要旨

小児において重症化し、入院を要する急性疾患の中でも下気道感染症の割合は非常に高く、中でもRespiratory syncytial virus(RSV)感染症は、新生児期には致死的となる児もあるばかりでなく、乳幼児期の感染により気道過敏性亢進状態が持続し、気管支喘息発症にも大きく関与する重要なウイルス感染症のひとつである。今回、2007年秋～2008年春のシーズン中、気道症状を来し国立病院機構横浜医療センターを受診し鼻汁検体採取可能であった児62名のRSV分離状況と臨床背景に関して検討を行った。対象児の月齢は、生後3週間から生後44ヶ月（平均±SD 13.3ヶ月±10.5ヶ月）。男児40名女児22名。RSV培養陽性は22名、うち迅速キットでは陰性だったが培養陽性だった児が3名いた。保険適応などの理由でRSV迅速検査を施行していなかった児で、RSV培養陽性だった児が4名いた。RSV培養陽性群での、検体採取病日は3.7±1.4日、RSV迅速キット陽性だったが培養陰性群の検体採取病日は4.4±1.4日だった。RSV培養陽性、陰性で入院期間、入院中の治療内容に差はなかった。

感染兆候を伴い気道症状を有する児においては、常にRSV感染も念頭におき、治療や経過観察を行う必要性を再認識した。

A. 研究目的

Respiratory syncytial virus(RSV)は、乳幼児において気道感染をきたす代表的なウイルスであり、その一部の児は急性細気管支炎など喘鳴を呈する下気道に病変をきたす。喘鳴を来した患者の約半数は、RSV感染後に気道過敏性亢進が持続することも以前から知られている<sup>1)</sup>。さらに、過去のコホートスタディの結果からは、3歳までのRSV下気道感染の既往は、他のウイルスの下気道感染症と違い、5～6歳までの3回/1年間以上の喘鳴と相関があるとのデータや<sup>2)</sup>、乳児期に入院を要したRSV感染を起こした児は、アトピー素因などに差がない対照群に比しても、学童期における気管支喘息、アレルギー性鼻結膜炎の罹患率が有意に高値

であり、また吸入性アレルゲンに対する特異的IgE値陽性率がRSV罹患群で有意に高値であったとの報告もある<sup>3)</sup>。このように、RSV感染と気管支喘息発症には強い関連性がある。しかし、一方でRSV感染児の喘鳴は、アレルゲン感作と関連しないtransient wheezerである可能性のデータ<sup>4)</sup>や、1歳以降の幼児の喘鳴にはむしろライノウイルスとの関連が強いとのデータもある<sup>5)</sup>。

今回、2007年秋～2008年春まで、気道症状を呈して受診した児の臨床的背景と鼻汁より分離されたウイルスに関して検討した。

B. 研究方法

2007年11月6日から2008年2月5日まで

に、国立病院機構横浜医療センター小児科を受診し気道症状を有した児のうち、児もしくは保護者から口頭にて同意を得た後、鼻汁検体が採取可能であった児を対象とした。

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、既製のUniversal Transport Medium(UTM: Copan innovation, Italy)を用いた。保存検体は採取後、4℃で保存した。保存検体は国立感染症研究所にて、ウイルス分離同定された。HEp-2C細胞、MRC-5細胞、Vero-E6細胞およびRD-18S細胞を感染標的細胞として試料からのウイルス分離を行った。

RSV 抗原迅速検査は、RSV キット(イムノカード ST RSV, 株式会社ティエフビー)を使用し検体採取後直ちに検査した。

#### C. 研究結果

62名を対象とした。うち、51名には、RSV 迅速キットにて院内でRSV 抗原検索を行った。対象児の月齢は、生後3週間から生後44ヶ月(平均±SD 13.3ヶ月±10.5ヶ月)。男児40名女児22名であった。RSV 培養陽性は22名、うち迅速キットでは陰性だったが、培養陽性だった児は3名いた。3歳以上であり保険適応でないため迅速検査を行っていなかった児2名、熱性痙攣が主症状で気道症状は軽微だった児1名、もともと気管支喘息があり喘息発作が主症状と考え外来フォローのため迅速キットを施行していなかった児1名が、RSV 培養では陽性だった。RSV 迅速キット陽性だった児のうち18名では、RSV 培養陰性だった。RSV 培養陽性群での、検体採取病日は $3.7 \pm 1.4$ 日、RSV 迅速キット陽性だったが培養陰性群の検体採取病日は $4.4 \pm 1.4$ 日だった。

培養でRSV 陽性だった22名中入院した児は17名、迅速キットで陽性だったが培養では検出されなかった18名中入院した児は18名全員であった。両群の入院期間は $6.12 \pm 1.8$ 日、 $6.17 \pm 1.9$ 日と差はなかった。入院中の治療内容では、プレドニゾン投与を要した児が RSV 培

養陽性群で6名(35.2%)、RSV 培養陰性群は6名(33.3%)。過去の報告でRSV 感染による喘鳴への効果の報告<sup>6)</sup>があるロイコトリエン受容体拮抗薬内服は、RSV 陽性群11名(64.7%)、培養陰性群では9名(50.0%)に使用していた。

#### D. 考察

現在、RSV 迅速キットの保険適応は入院を要する3歳未満の児となっているが、今回の結果からは4名が検査対象外で迅速検査を行っていなかったが、RSV 培養陽性であった。それらの患者のうち、3名はもともと気管支喘息加療中の中等症以上の児であった。RSV 判明で治療内容としては大きく変わらないが、気管支喘息児であれば尚更その後の経過に悪影響を及ぼす可能性が高いため、常に感染を伴う喘鳴のエピソードのある場合には、RSV はじめ気道過敏性亢進を来すウイルス感染を念頭におき、経過観察する必要があると考える。

今回、RSV 迅速キット陽性であったが培養陰性だった症例においては、検体採取日時が培養陽性群と比較して遅い傾向にあった。RSV 細気管支炎の場合、下気道症状ピークは4~6病日めとなるが、それ以前にウイルス量はピークに達している可能性も示唆される。

RSV 細気管支炎治療においては、エビデンスレベルの高いコンセンサスを得られた効果的な治療がないのが現状である。RSV ウイルス培養陽性群、陰性群との間では入院中の治療内容に差はみられなかった。

#### E. 結論

気道感染を伴った喘鳴を呈する児においては、常に気道過敏性亢進に影響を及ぼすウイルス群の関与を考慮しつつ治療や経過観察にあたる必要性を再認識した。また、RSV 培養でより高い検出を求めるとあたっては、気道症状出現のより早い時期での検体採取が有効である可能性が示唆された。

F. 参考文献

- 1) Carlsen KH, Larsen S, Bjerve O et.al:  
Acute bronchiolitis ; predisposing factors  
and characterization of infants at risk.  
*Pediatr Pulmonol* 3 : 153-160,1987
- 2) Martinez FD, Wright AL, Taussig  
LM,et.al : Asthma and wheezing in the  
first six years of life. The Group Health  
Medical Associates. *N Eng J Med* 332 ;  
133-138,1995
- 3) Sigurs N, Gustafsson PM, Bjarnason R,  
et.al : Severe respiratory syncytial virus  
bronchiolitis in infancy and asthma and  
allergy at age 13. *Am J Respir Crit Care  
Med* 171 : 137-141,2005
- 4) Bont L, Steijn M, Van Aalderen WM,  
et.al : Seasonality of long term wheezing  
following respiratory syncytial virus  
lower respiratory tract infection. *Thorax*  
59 : 512-516, 2004
- 5) Kotaniemi-Syrjanen A, Vainionpaa R,  
Reijonen TM, et.al : Rhinovirus-induced  
wheezing in infancy- the first sign of  
childhood asthma? *J Allergy Clin  
Immunol* 111 : 66-71,2003
- 6) Bisgaard H : A randomized trial of  
montelukast in respiratory syncytial  
virus postbronchiolitis. *Am J Respir  
Crit Care Med* : 167. 379-383, 200

乳幼児気管支炎患者から分離された Respiratory Syncytial ウイルス(RSV)の  
主要遺伝子解析について

研究協力者 塚越 博之 群馬県衛生環境研究所  
菅井 和子 国立医療センター横浜病院  
木村 博一 国立感染症研究所感染症情報センター  
水田 克巳 山形県衛生研究所  
秋山 美穂 国立感染症研究所感染症情報センター  
斎藤 義弘 東京慈恵会医科大学小児科  
野田 雅博 国立感染症研究所ウイルス第三部

#### 研究要旨

Respiratory Syncytial ウイルス(RSV)は、主に冬期の急性呼吸器疾患を起こすウイルスとして知られている。また、乳幼児に肺炎や細気管支炎などを引き起こす頻度の高いウイルスであるが、それらを引き起こすウイルス側の遺伝学的な要因には不明な点が多い。そこで、2005～2006年にかけて、入院加療を必要とした神奈川県在住の気管支炎乳幼児患者から分離された RSV17 株の Nucleoprotein(N), Glycoprotein (G)及び Fusion (F)遺伝子に関する分子疫学解析を行った。その結果、7 株は Subgroup A、10 株は Subgroup B に分類され、さらに G 遺伝子の系統解析から、それぞれの分離株は、固有のクラスターに分類され Subgroup A では GA2、Subgroup B では BA に分類された。以上のことから、GA2 や BA に属する RSV も乳幼児の気管支炎に関与することが推定された。

#### A.研究目的

Respiratory Syncytial ウイルス(RSV)は、パラミクソウイルス科、ニューモウイルス属に属する主要な呼吸器ウイルスである。特に、乳幼児の初感染(1歳以下)においては、高率(約30～40%)に発熱・気管支炎を引き起こし、入院加療が必要になることも少なくない<sup>1)</sup>。また、RSVは、気管支喘息の発症・増悪に関与し、本ウイルスが原因となった感染喘息は難治性であることが示唆されている<sup>2)</sup>。RSVは、ウイルス表面のエンベロープにG蛋白とF蛋白という2つの主要な抗原を発現してい

る。G蛋白はウイルスが呼吸器上皮細胞に接合する際に働き、F蛋白はウイルスゲノムを細胞内に侵入させ、合胞体形成に作用する。RSVはG蛋白の抗原性の違いから大きく2つのSubgroupに分けられ、さらに複数の遺伝子型が認められている。RSVによる気管支炎あるいは感染喘息の発症・増悪のメカニズムには未知の部分が多いが、特定の遺伝子型のRSVが気管支炎を引き起こしやすいという報告もある<sup>3)</sup>。しかしながら、現在のところ、気管支炎や肺炎を引き起こすウイルス側の要因には不明な点が多い。

そこで、本研究においては、2005～2006年の間に入院加療を必要とした神奈川県在住の気管支炎乳幼児患者 17 名から分離された RSV の主要遺伝子の分子疫学解析を行った。

## B. 研究方法

RSV による気管支炎で横浜市 A あるいは B 病院にて入院加療を必要とした神奈川県在住の乳幼児 17 名(月齢:4.7±3.4 ヶ月)を対象とした(表)。すべての患者の初診時には、発熱、喘鳴が見られた。また、胸部 X 線所見では、RSV が原因となる気管支炎に典型的とされる hyperinflation を示していた。両親から口頭でインフォームドコンセントを得た後、患者から咽頭拭い液を採取し材料とした。

咽頭拭い液を前処理後、常法にて HEp-2、HEL、RD および MDCK 細胞に接種した。また、他の呼吸器疾患の原因となる細菌の検索も行った。RSV 分離株は、常法にて RNA 抽出後、主要遺伝子 Nucleoprotein (N), Glycoprotein (G), Fusion (F)の一部について RT-PCR、シーケンス解析を行った<sup>4)</sup>。得られたシーケンスを CLUSTAL W によりアライメント後、Tree Explorer にて系統樹を作成した<sup>5)</sup>。

## C. 研究結果

RSV の G 遺伝子(Subgroup A; 240bp, Subgroup; 294bp)の分子系統解析から患者由来 17 株のうち、7 株は Subgroup A、10 株は Subgroup B に分類された(図 1)。さらに、Subgroup A は GA2 に、Subgroup B は BA に分類された。分離株間での相同性は、Subgroup A では 88%、Subgroup B では 89.5%であった。

F 遺伝子(550bp)系統解析でも、固有のクラスターに分類された(図 2)。分離株間での相同性は、Subgroup A では 85.1%、Subgroup B では 89.3%であった。

N 遺伝子(296bp)は、それぞれの株における変異が少なく、解析の結果から Subgroup A の分離株間のホモロジーは 99.5%以上、Subgroup B 分離株間では 99%以上であった(図 3)。なお、今回の対象からは RSV 以外の病原体は検出されなかった。

## D. 考察

今回の結果から、乳幼児に気管支炎を引き起こした RSV は、G 遺伝子の系統解析から Subgroup A では GA2、Subgroup B では BA に分類された。これまでに、Martinello らは乳幼児に気管支炎を起こした RSV の G 遺伝子の分子疫学解析を行った結果、特定の遺伝子型(GA3 型)が他の遺伝子型に比し有意に気管支炎を引き起こすことを示唆している<sup>3)</sup>。しかしながら、GA3 以外の遺伝子型の RSV も気管支炎の原因となりうる可能性が示唆された。これらの気管支炎や肺炎の病態には、気管支や肺で起こる感染症による炎症のみならず、気管支喘息などに見られる気道過敏性の亢進にはアレルギー性の炎症も複合していることが示唆されている<sup>7)</sup>。また、RSV 感染における重症化には Th-1/Th-2 バランスの崩壊も示唆されている<sup>8)</sup>。よって、RSV による呼吸器感染症の重症化の要因として、宿主側の前述した要因も示唆されている。さらに、RSV による気管支炎は、ウイルス側の要因ではなく、むしろ宿主側の要因、例えば低年齢、低体重、鼻腔 RSV 量によるという報告もある<sup>9,10)</sup>。さらに、近年の報告では、RSV の受容体である Toll-like receptor (TLR) 4 の polymorphisms が重症化と密接に関連することも報告されている<sup>11,12)</sup>。

結論として、本研究の結果から、GA3 や BA といった遺伝子型のウイルスが小児における気管支炎や肺炎の原因となりうることを示唆された。RSV は乳幼児の気管支炎や肺炎を含む重症呼吸器感染症の大きな原因であり、今後さらなる分子疫学的な研究および



分子レベルでの気道過敏性の亢進に関するメカニズムの解明が必要であろう

#### E. 結論

GA2 と BA 遺伝子型の RSV が本疾患に関与することがわかった。

#### F. 参考文献

1. Peter LC and James EC Jr. (2006) Respiratory syncytial virus and metapneumovirus, In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Martin MA, Lamb RA, Roizman B, Straus SE (eds) *Fields Virology*. Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia, vol 2, pp 1601-1646.
2. Leung AK, Kellner JD, Davies HD (2005) Respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Natl Med Assoc* 97: 1708-1713.
3. Martinello RA, Chen MD, Weibel C, Kahn JS. (2002) Correlation between respiratory syncytial virus genotype and severity of illness. *J Infect Dis*. 186: 839-842.
4. Parveen S, Sullender WM, Fowler K, Lefkowitz EJ, Kapoor SK, Broor S. (2006) Genetic variability in the G protein gene of group A and B respiratory syncytial viruses from India. *J Clin Microbiol* 44: 3055-3064.
5. Kim YK, Choi EH, Lee HJ. (2007) Genetic variability of the fusion protein and circulation patterns of genotypes of the respiratory syncytial virus. *J Med Virol*. 79: 820-828.
6. Osioy C (1998) Direct detection of respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, and adenovirus in clinical respiratory specimens by a multiplex reverse transcription-PCR assay. *J Clin Microbiol* 36: 3149-3154.
7. Falsey AR, Walsh EE (2000) Respiratory

syncytial virus infection in adults. *Clin Microbiol Rev* 13: 371-384.

8. Mejías A, Chávez-Bueno S, Ramilo O. (2005) Respiratory syncytial virus pneumonia: mechanisms of inflammation and prolonged airway hyperresponsiveness. *Curr Opin Infect Dis*. 18: 199-204.
9. Bonnet D, Schmaltz AA, Feltes TF (2005) Infection by the respiratory syncytial virus in infants and young children at high risk. *Cardiol Young*. 15: 256-265.
10. Ebbert JO, Limper AH (2005) Respiratory syncytial virus pneumonitis in immunocompromised adults: clinical features and outcome. *Respiration*. 72: 263-269.
11. Tal G, Mandelberg A, Dalal I, Cesar K, Somekh E, Tal A, Oron A, Itskovich S, Ballin A, Houry S, Beigelman A, Lider O, Rechavi G, Amariglio N. (2004) *J Infect Dis*. 189: 2057-2063.
12. Awomoyi AA, Rallabhandi P, Pollin TI, Lorenz E, Szein MB, Boukhalova MS, Hemming VG, Blanco JC, Vogel SN. (2007) Association of TLR4 polymorphisms with symptomatic respiratory syncytial virus infection in high-risk infants and young children. *J Immunol*. 179: 3171-3177.

#### G. 研究発表

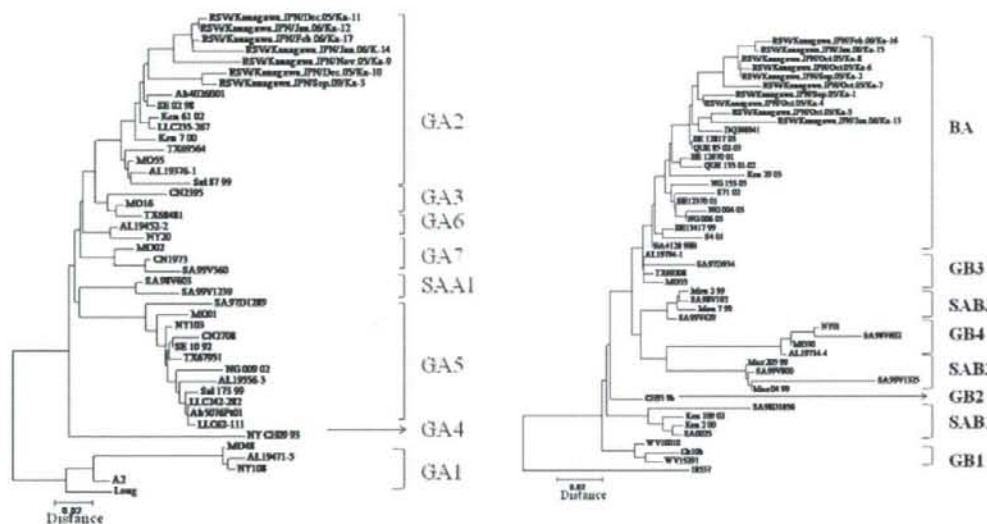
Kazuko Goto-Sugai, Hiroyuki Tsukagoshi, Katsumi Mizuta, Masahiro Noda, Masahiko Kato, Miho Akiyama, Toshiyuki Sugai, Yoshihiro Saito, Nobuhiko Okabe, Masato Tashiro, and Hirokazu Kimura, Phylogenetic analysis of major genes in respiratory syncytial virus isolated from infant with bronchiolitis. Manuscript in Preparation.

#### H. 知的財産の出願・登録状況

なし。

表 患者及びウイルス

| Patient no. | Age (months) | Onset date   | Strains                        | Subgroup |
|-------------|--------------|--------------|--------------------------------|----------|
| 1           | 2            | Sep 7, 2005  | RSVi/Kanagawa.JPN/Sep.05/Ka-1  | B        |
| 2           | 6            | Sep 7, 2005  | RSVi/Kanagawa.JPN/Sep.05/Ka-2  | B        |
| 3           | 3            | Sep 9, 2005  | RSVi/Kanagawa.JPN/Sep.09/Ka-3  | A        |
| 4           | 2            | Oct 1, 2005  | RSVi/Kanagawa.JPN/Oct.05/Ka-4  | B        |
| 5           | 11           | Oct 2, 2005  | RSVi/Kanagawa.JPN/Oct.05/Ka-5  | B        |
| 6           | 3            | Oct 11, 2005 | RSVi/Kanagawa.JPN/Oct.05/Ka-6  | B        |
| 7           | 5            | Oct 11, 2005 | RSVi/Kanagawa.JPN/Oct.05/Ka-7  | B        |
| 8           | 9            | Oct 20, 2005 | RSVi/Kanagawa.JPN/Oct.05/Ka-8  | B        |
| 9           | 8            | Nov 4, 2005  | RSVi/Kanagawa.JPN/Nov.05/Ka-9  | A        |
| 10          | 6            | Dec 2, 2005  | RSVi/Kanagawa.JPN/Dec.05/Ka-10 | A        |
| 11          | 11           | Dec 6, 2005  | RSVi/Kanagawa.JPN/Dec.05/Ka-11 | A        |
| 12          | 1            | Jan 1, 2006  | RSVi/Kanagawa.JPN/Jan.06/Ka-12 | A        |
| 13          | 4            | Jan 2, 2006  | RSVi/Kanagawa.JPN/Jan.06/Ka-13 | B        |
| 14          | 1            | Jan 2, 2006  | RSVi/Kanagawa.JPN/Jan.06/K-14  | A        |
| 15          | 1            | Jan 10, 2006 | RSVi/Kanagawa.JPN/Jan.06/Ka-15 | B        |
| 16          | 2            | Feb 3, 2006  | RSVi/Kanagawa.JPN/Feb.06/Ka-16 | B        |
| 17          | 4            | Feb 10, 2006 | RSVi/Kanagawa.JPN/Feb.06/Ka-17 | A        |



Subgroup A

Subgroup B

図1 RSV G gene 分子系統樹



東北地域で分離されたライノウイルスの分子疫学

研究協力者 平田 明日美 栃木県保健環境センター  
水田 克巳 山形県衛生研究所  
五十嵐 郁美 福島研衛生研究所  
木村 博一 国立感染症研究所感染症情報センター  
野田 雅博 国立感染症研究所ウイルス第三部

研究要旨

2001～07年に山形県および福島県で分離されたライノウイルス(HRV)計91株のVP4-2遺伝子の系統解析を行った。系統樹上、90株はgenogroup A(HRV-A)、1株がgenogroup B(HRV-B)に分類された。HRV-Aに属する株はさらに多数のクラスターに分かれた。以上のことから、調査期間中、東北地方で流行していたHRVは多彩な遺伝子型のHRV-Aが主体であった可能性が示唆された。

A. 研究目的

HRVはピコルナウイルス科ライノウイルス属のRNAウイルスである。HRVには、100種類以上の血清型が存在し、VP1<sup>1)</sup>あるいはVP4-2<sup>2)</sup>遺伝子の系統解析により、遺伝子群HRV-A及びHRV-Bに分類されることがわかっている。また、近年ではHRV-AあるいはHRV-B以外の遺伝子群のHRV-Cが存在することも報告されている<sup>3)</sup>。近年まで、HRVはcommon coldの主たる病因ウイルスという認識にとどまっていたが、最近の知見において、このウイルスが喘息の発症あるいは増悪に密接に関与することが示唆され、再び着目されつつある。しかし、HRVは血清型および遺伝子型が非常に多いこと、またウイルス分離同定が比較的困難であることなどから、十分な疫学研究が行われていないのが現状である。今回、本研究において、東北地域(山形県・福島県)で分離されたHRVのVP4-2遺伝子の分子疫学解析を行ったのでその概要を報告する。

B. 研究方法

2001～07年に山形県および福島県で分離さ

れたHRV計91株(表)を用い、RNAを抽出後、常法にてVP4-2遺伝子をRT-PCR法で増幅した<sup>2)</sup>。次に、増幅産物の塩基配列解析および近隣結合法による系統解析を行った。

C. 研究結果

ライノウイルス分離株のVP4-2遺伝子系統樹解析結果を図1および2に示した。解析結果から、分離株91株のうち、90株がHRV-A、1株がHRV-Bに分類された。系統樹上、HRV-Aはさらに多数のクラスターに分類された。各クラスターのウイルスと患者の年齢、疾患名、検体採取年および検体採取時期には因果関係が見られなかった。

D. 考察

今回の結果から、2001～07年に東北地域(山形県・福島県)で分離されたウイルスは、その多くがHRV-Aであり、季節や患者の年齢などとあまり関係なく、多彩な遺伝子型のHRVが流行していたことが示唆された。小児の喘息の発症と増悪には、HRVとRSVなどが密接に関与することが報告されている。今後、この原因