

LAMP, SYBR green PCR, TaqManPCR法はいずれも 60 分で結果を得ることが可能であるが、SYBR green Tm assay、TaqMan real time PCRは cDNA を作製して DNA 増幅をおこなうが、LAMP法は RT 反応も同じチューブで反応を行うことができ簡便で勝っている。SYBR green real time PCR は非特異反応があり Tm assay で非特異反応は鑑別できる。

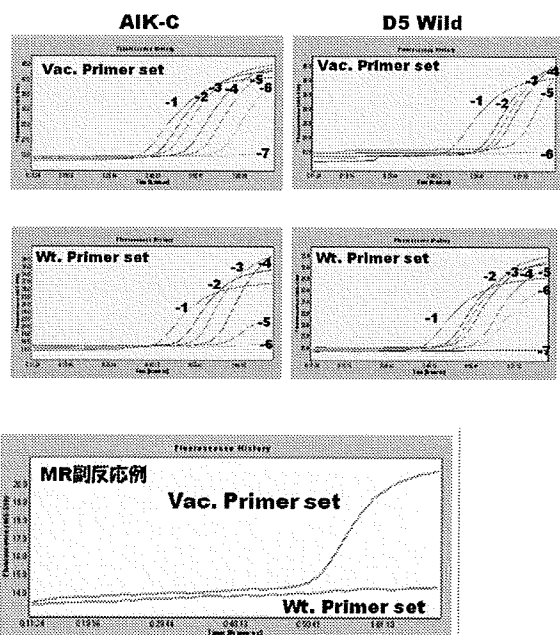


図 5. TaqMan PCR 砲によるワクチン株と野生株の鑑別

表 1. 各遺伝子増幅法による鑑別法の特徴

	RT-LAMP	SYBR green	TaqMan PCR
Primer設計	困難	容易	容易
cDNA合成	不用	必要	必要
非特異反応	少ない	あり	少ない
判定	反応速度	Tm値	反応速度

E. 結論

我が国で使用されている麻疹ワクチン株と流行野生株を鑑別する遺伝子増幅法を開発し 60-90 分で鑑別可能である。

F. 研究発表

1 論文発表

1. Nagai M, Xin JY, Yoshida N, Miyata A, Fujino M, Ihara T, Yoshikawa T, Asano Y, Nakayama I. Modified adult measles in outbreaks in Japan, 2007-2008. J Med Virol 2009; 81: 1094-1101.

2. 学会発表

1) 中山哲夫、澤田成史: 麻疹ウイルスワクチン株と野生株の鑑別 第 13 回日本ワクチン学会、2009. 9.26-27. 札幌.

G. 知的財産の出願、登録状況

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）
分担研究報告書

ウイルス感染症の効果的制御のための病原体サーベイランスシステムの検討
研究協力項目：麻疹ウイルス *N* 遺伝子検出定量のための One-step リアルタイム
RT-PCR 法の開発

研究協力者 木村博一 国立感染症研究所感染症情報センター
齋藤美香 小澤邦壽 群馬県衛生環境研究所
竹田 誠 国立感染症研究所ウイルス第三部
研究分担者 駒瀬勝啓 国立感染症研究所ウイルス第三部

研究要旨

我々が開発した麻疹ウイルス（MeV）遺伝子リアルタイム RT-PCR 法と市販の試薬（4種類）を one-step 法に応用した。検出限界値は、合成 RNA（MeV 全長 *N* 遺伝子 RNA）に換算して 100copies/assay であり、 $10^2 \sim 10^7$ copies/assay まで直線的な定量が可能であった。また、試薬によっては感度や反応性に差があることも示唆された。

A. 研究目的

2012 年を目標とした麻疹排除計画の遂行状況を正確に把握するためには麻疹患者の正確な実験室内診断が必要であることは言うまでもない。今まで、麻疹の検査診断には、他のウイルス疾患と同様に種々の検査法が開発されてきた。我々は既に、高感度・特異的かつ迅速な麻疹ウイルス検出・定量法のためのリアルタイム RT-PCR を新たに開発した。今回、この方法を基にさらなる検査診断の迅速化をはかるため、市販の 4 種類の one-step 法試薬を応用した結果若干の知見を得たので以下に報告する。

B. 研究方法

1. MeV 合成 RNA、プライマー・プローブ及びリコンビナントプラスミド

MeV の *N* 遺伝子全長 RNA の合成及び精製は既報に準じて行った。プライマー及びプローブの塩基配列を表 1 に示す。また、このプライマー

を用い、各遺伝子型のウイルス RNA を基に PCR 産物を作成し、pCR2.1-TOPO vector に遺伝子産物を組み込んだ。次に、リコンビナントプラスミドを常法に従い、*E. coli* に発現させ、発現菌体からプラスミドを精製した。さらに、精製溶液を 260nm の吸光度によりプラスミド濃度を決定した。

2. RNA 抽出及び逆転写反応 (RT)

ウイルス浮遊液の RNA 抽出には High Pure Viral RNA Kit (Roche Diagnostics) を用いた。One-step 法の試薬には、TaqMan RNA-to-cDNA 1-StepKit (Applied Biosystems)、Platinum Quantitative RT-PCR ThermoScript One-Step System (Invitrogen)、SuperScript III Platinum One-step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen)、Quantitect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN) 及び One Step PrimeScript RT-PCR Kit (TaKaRa) を用いた。

表 1. プライマー及びプローブ配列

Primer or Probe	Sequence (5' to 3') ^a	Polarity ^b	Location ^c	
Primer	MV-F	CAS RGT GAT CAA ART GRR ARY GAG CT	+	1368-1393
	MV-R	YCC TGC CAT GGY YTG CA	-	1600-1616
Probe ^d	MV-T	FAM-TCY GAT RCA GTR TCA AT-MGB-NQF	-	1530-1546

^a Mix bases in degenerated primers and probes are as follows: S=G/C, R=A/G, Y=C/T.

^b +, sense; -, anti-sense.

^c Corresponding nucleotide position of Mvi/Edmonston-wt.USA/54[A] strain full-length genome (GenBank accession No. AF266288).

^d Probe is labeled with 6-carboxyfluorescein (FAM) reporter dye at the 5' end, and with minor groove binder (MGB)-non-fluorescent quencher (NQF) at the 3' end of the oligonucleotide.

3. One-step リアルタイム PCR の至適化

常法に従い、各試薬のプライマー・プローブ濃度及び PCR 反応条件の至適化を行った。

C. 研究結果

1. 各試薬におけるプライマーとプローブ濃度及び反応条件について

TaqMan RNA-to-C_T 1-StepKit (Applied Biosystems) のプライマーとプローブの至適濃度に関するデータを図 1-2 に示す。

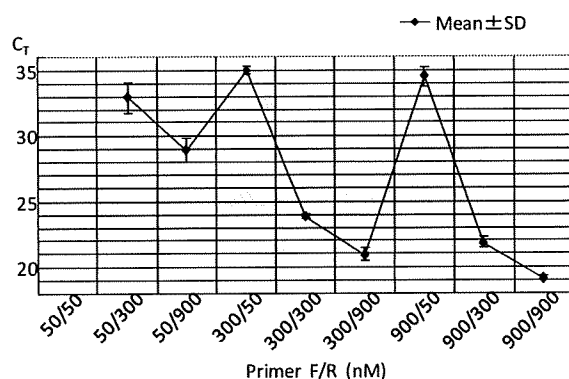


図 1. プライマーの至適濃度

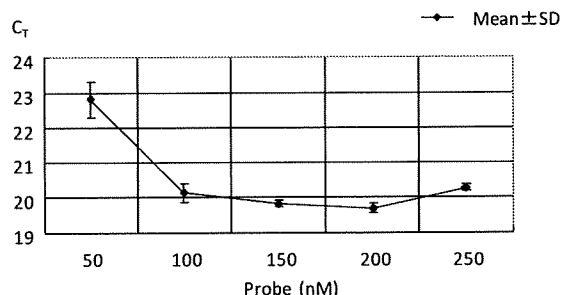


図 2. プローブの至適濃度

本試薬における各々の最小 Ct 値 (threshold cycles value) は、プライマーは 900nM、プロ

ーブは 200 あるいは 250 nM であることが推定された。また、アニーリング温度は 60°C が至適値であることがわかった (図示せず)。したがって、リアルタイム PCR の反応条件は、RNA 溶液 2µL、プライマー (MV-F/MV-R) 900nM、プローブ (MV-T) 250nM とし、他の試薬を含め全量 20µL とした。反応条件は、uracil-N-glycosylase (UNG) amplicon degradation (48°C・15 分)、95°C・10 分、続いて 95°C・15 秒、60°C・1 分を 40 サイクルとした。

次に、Platinum Quantitative RT-PCR ThermoScript One-Step System のプライマー及びプローブの至適濃度に関するデータを図 3-4 に示す。

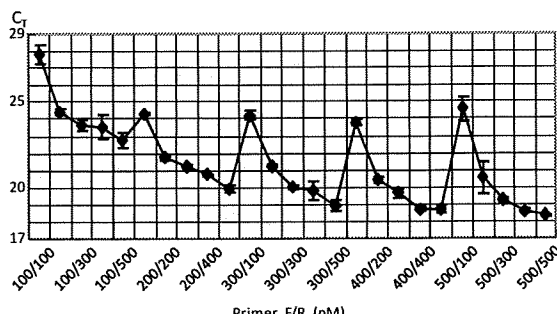


図 3. プライマーの至適濃度

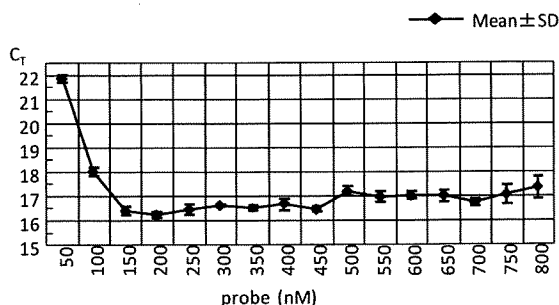


図 4. プローブの至適濃度

本試薬における各々の最小 Ct 値 (threshold cycles value) は、プライマーは 500nM、プローブは 200nM であることが推定された。また、アニーリング温度は 60°C が至適値であることがわかった (図示せず)。したがって、リアルタイム PCR の反応条件は、RNA 溶液 2 μ L、プライマー (MV-F/MV-R) 500nM、プローブ (MV-T) 200nM とし、他の試薬を含め全量 20 μ L とした。反応条件は、uracil-*N*-glycosylase (UNG) amplicon degradation (50°C・30 分)、95°C・5 分、続いて 95°C・15 秒、60°C・1 分を 40 サイクルとした。

なお、これ以外の試薬については、primer と probe の至適化ができなかった (図示せず)。

2. 本法の感度と定量直線性について

合成 RNA (全長 *N* 遺伝子) による各試薬における直線性及び感度に関するデータを図 5-6 に示す。両試薬とも、合成 RNA (全長 *N* 遺伝子) に 100copies/assay であることが推定された。プラスミドコントロールを用いた定量直線性では、 $10^2 \sim 10^7$ copies/assay において、良好な定量直線性を示した (図示せず)。

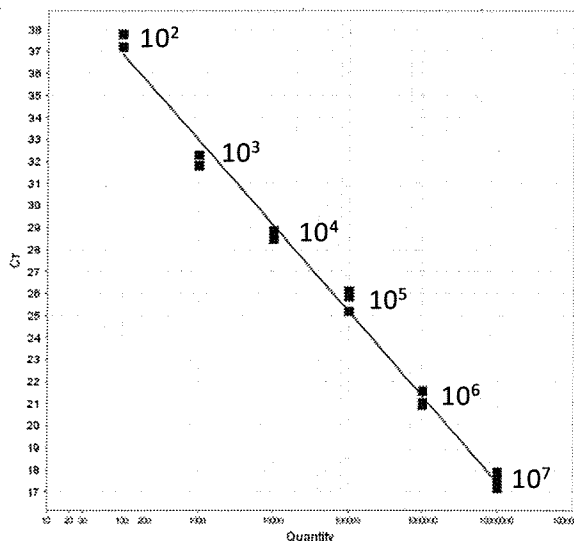


図 3. 直線性及び感度 (TaqMan RNA-to-C_T 1-Step Kit)

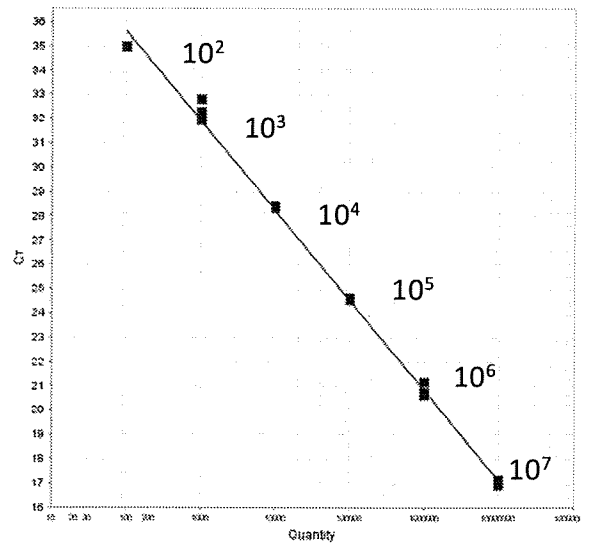


図 3. 直線性及び感度 (Platinum Quantitative RT-PCR ThermoScript One-Step System)

D. 考察

本邦においては、種々の遺伝子型 (A, D3, D5, D9 及び H1 型) の MeV が検出されている。したがって、リアルタイム RT-PCR 法においては、これらの MeV を確実に検出・定量可能にする必要がある。今回の One-step 法では、合成 MeV RNA に換算して、 $10^2 \sim 10^7$ copies/assay までの直線定量性が得られた。しかし、既に報告した 2 step 法に比し、より迅速化になったが (約 30 分短縮)、感度が 1 オーダー低いことがわかった。よって、本法 (One-step 法) を用いた場合、MeV ゲノム濃度が低い検体においては、測定結果に対する評価が困難な場合もありうる。また、プライマーとプローブの至適化ができなかった試薬に関してもさらなる検討が必要と思われた。本研究は、キャリアオーバーコンタミネーションのリスク低減やさらなる迅速化を目的に行ったが、One-step 法と同様の感度向上をめざし、さらに測定法を改変していく必要性があろう。

E. 結論

今回新たに開発された One-step リアルタイム RT-PCR 法によって、 $10^2 \sim 10^7$ copies/assay の MeV を検出・定量可能であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Akiyama M, Kimura H, Tsukagoshi H, Taira K, Mizuta K, Saitoh M, Nagano M, Sutoh A, Noda M, Morita Y, Sakatsume O, Okabe N, Tashiro M: Development of assay for the detection and quantitation of measles virus nucleoprotein (*N*) gene using real-time reverse transcription polymerase chain reaction (real-time RT-PCR). *J Med Microbiol.* 58 (5):638-643, 2009.
- 2). Sakano C, Morita Y, Shiono M, Yokota Y, Mokudai T, Sato-Motoi Y, Noda A, Nobusawa T, Sakaniwa H, Nagai A, Kabeya H, Maruyama S, Sato H, Kimura H: Prevalence of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars (*Sus scrofa leucomystax*) and pigs in Gunma Prefecture, Japan. *J Vet Med Sci.* 71(1): 21-25, 2009.
- 3). Nakagawa-Okamoto R, Arita-Nishida T, Toda S, Kato H, Iwata H, Akiyama M, Nishio O, Kimura H, Noda M, Oka T, Takeda N: Detection of Multiple Sapovirus Genotypes and Genogroups in Oyster-Associated Outbreaks. *Jpn J Infect Dis.* 62(1):63-66, 2009.
- 4). Mizuta K, Matsuzaki Y, Hongo S, Ohmi A, Okamoto M, Nishimura H, Itagaki T, Katsushima N, Oshitani H, Suzuki A, Furuse Y, Noda M, Kimura H, Ahiko T: Stability of seven hexon hypervariable region sequences of adenovirus types 1-6 isolated in Yamagata, Japan between 1988 and 2007. *Virus Res.* 140(1-2): 32-39, 2009.

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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）
呼吸器ウイルス研究小班総括研究報告書

ウイルス感染症の効果的制御のためのサーベイランスシステムの検討
—呼吸器ウイルス感染症の実験室診断法の研究—

研究分担者（呼吸器ウイルス研究小班統括）野田 雅博
国立感染症研究所ウイルス第三部 主任研究官

研究協力者（五十音順）

青木 洋子	山形県衛生研究所 主任研究員
秋山 美穂	国立感染症研究所感染症情報センター（現：株式会社サラヤ）
荒川 美果	栃木県保健環境センター 主任
五十嵐郁美	福島県衛生研究所 技師
大内 好美	滋賀県衛生科学センター 主査
岡山 吉道	日本大学大学院医学研究科先端医学系 准教授
小村 珠喜	島根県保健環境科学研究所 研究員
木村 博一	国立感染症研究所感染症情報センター 室長
小林 慈典	国立病院機構横浜医療センター小児科 医長
斎藤 義弘	東京慈恵会医科大学小児科 講師（兼）医局長
調 恒明	山口県環境保健センター 所長
菅井 和子	国立病院機構横浜医療センター小児科 医長
平良 勝也	沖縄県衛生環境研究所 研究員
田中千香子	滋賀県衛生科学センター 技師
塚越 博之	群馬県衛生環境研究所 主任
戸田 昌一	山口県環境保健センター 専門研究員
中村 正治	沖縄県衛生環境研究所 主任研究員
仁平 稔	沖縄県衛生環境研究所 研究員
平田明日美	栃木県保健環境センター 技師
藤塚 麻子	国立病院機構横浜医療センター小児科 医師
松田 俊二	国立病院機構愛媛病院 小児科医長（兼）臨床研究部長
水田 克巳	山形県衛生研究所 副所長
南 亮仁	佐賀県衛生薬業センター 技師

研究要旨

急性呼吸器感染症（ARI）の総合的なサーベイランス体制の整備・構築およびレファレンス機能強化をはかる目的で以下の研究を実施した。

ARI 症例由来試料の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）、ヒトボカウイルス（HBoV）、パラインフルエンザウイルス（PIV）、アデノウイルス等が多数分離された。それぞれのウイルスについて分子疫学解析を行い、我が国で流行しているウイルス株の詳細な遺伝学的性状の把握を継続した。

ARI ウイルスの制御のための効果的なサーベイランス実施を目的として、ウイルスサー

バイランス担当者を対象にした技術研修の実施，ARI ウイルス検出マニュアルの作成などを行った。

A.研究目的

我が国におけるウイルスサーベイランスは全国地方衛生研究所，医療機関，大学医学部等の密接な連携体制のもとに実施されている。しかし，これまで急性呼吸器感染症（ARI）ウイルスの包括的なレファレンス機能は，未だ充分には整備されていない。そこで，国立感染症研究所，地方衛生研究所，大学，医療機関等の密接な連携体制のもと，全国レベルでの充実したARI対策に資するための総合的なレファレンス体制整備および機能強化に関する研究を行う。今年度の研究事業は第三年次である。

B.研究方法

以下の項目について研究を実施した。

1. 各地域レベルでのARIウイルス分離検出株の解析および代表株の系統保存・遺伝子情報の集積を行う。
2. 病原体検索法（ウイルス分離培養法，遺伝子検出法等）および血清抗体測定法などの検査法の標準化，精度の向上等に関する検討ならびに検査法の普及を図る。
3. ARIウイルス検査に伴う標準品（ウイルス株，抗血清，プローブ等）の供給体制を充実する。
4. 血清疫学調査を試み，それぞれのウイルスの流行実態を血清疫学的に把握する。
5. ARIウイルス感染と病態について，感染ウイルス側および生体側から種々検討する。
6. 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証する。
7. ARIウイルスによる気管支喘息発症のリスク因子とウイルス学的要因について検討する。
8. ウイルス感染による喘息の分子レベルでの機序の解明を行う。

C.研究結果

1. 山形県，福島県，栃木県，群馬県，滋賀県，島根県，山口県，佐賀県および沖縄県域のARIウイルスサーベイランスの結果（2009年1月～11月），Respiratory Syncytial ウイルス（RSV）が41株，ヒトメタニューモウイルス（hMPV）が82株，ヒトライノウイルス（HRV）が52株，パラインフルエンザウイルス（PIV）が182株およびヒトボカウイルス（HBoV）が4株それぞれ分離／検出された。その他，インフルエンザウイルス，アデノウイルス，ムンプスウイルス，エンテロウイルスおよびヘルペスウイルス等が多数，分離検出された〔水田，青木，五十嵐，平田，塚越，大内，小村，南，中村〕。
2. 沖縄県における新型[A(H1N1)pdm virus, H1N1pdm] インフルエンザ様患者のARIウイルス検索を実施した結果，H1N1pdm陰性患者の18.8%からRSV，HRV，hMPVおよびPIVが検出された。HRVのVP4/VP2領域の系統樹解析の結果，検出HRVはspecies A（HRV-A），BおよびCに分類された〔中村，糸数，平良，仁平，木村，野田〕。
3. 島根県における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ARIウイルスを対象としたウイルスサーベイランスを実施した。その結果，RSV，hMPV，PIVおよびHRV等が新たに検出された〔小村〕。
4. 国立病院機構横浜医療センターを受診した小児下気道疾患患者170例のARIウイルス検索を実施した。その結果，RSV；83株，HRV；64株，hMPV；2株，PIV；2株およびHBoV；3株が検出された。36株のRSVのG遺伝子系統樹解析の結果，23株がSubgroup A（genotypeGA）および13株がSubgroup B（genotypeBA）に分類された。53株のHRVのVP4/VP2領域系統

樹解析の結果、22株が species A、5株が species B および 26株が species C に分類された [荒川, 平田, 菅井, 藤塚, 小林, 木村, 野田]。

5. 2002~08年に山形県で分離された PIV3 型 (PIV3) 計 91株の *HN* 遺伝子の分子系統樹解析を実施した結果、大きく3つのクラスター (Cluster 1; 24株, Cluster 2; 8株 および Cluster 3; 59株) に分類された。また、Cluster 1 に属する 14702株と Cluster 2 および Cluster 3 に属する山形由来株間では、それぞれ6および2カ所でアミノ酸置換がみられた [平田, 水田, 青木, 須藤, 塚越, 荒川, 木村, 野田]。

6. 国立病院機構横浜医療センター小児科に入院加療を必要とした3歳未満児58名を対象に、ウイルス学的検索ならびに気管支喘息発症のリスク評価を行った。RSV 感染児で入院前までに喘息と診断されていない26名の児の退院後の喘息発症は12名、喘息未発症群は14名であった。退院後の喘息発症群と喘息未発症群の平均月齢 (平均±SD) は前者 20.8±5.6ヶ月、後者 18.3±7.9ヶ月であった。呼吸症状の重症度では前者が有意に高い度数を示した [藤塚, 菅井, 木村, 野田]。

7. 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。*G* および *F* 遺伝子はプロトタイプと比較して、多くの置換が見られた [塚越, 菅井, 水田, 秋山, 斉藤, 木村, 野田]。

8. 全国49施設重症心身障害児 (者) 施設のアンケート調査から、1施設内の感染症流行は平均0.5回/年であった。中四国の愛媛病院を含む10施設では1施設あたり1~2回/年であった。流行が最も多いの

はARI (病原体不明) で、約半数を占めていた。愛媛病院におけるARI流行 (2009年11月) 例の原因究明を試みた結果、HRV の施設内流行が確認された。また、散発的にRSV および hMPV が検出された [松田, 大内, 田中, 小村]。

9. 2009年7月末から8月末に、山口県内の1小児科医院において気管支炎もしくは肺炎と診断された乳幼児患者のうち、臨床的に hMPV 感染が疑われた39例の咽頭拭い液検体について hMPV 遺伝子検出を実施した。その結果、18例から hMPV 特異的遺伝子が検出され、*F* 遺伝子系統樹解析から、4つの異なる起源を持つ hMPV と推定された [調, 戸田, 水田, 鈴木, 木村, 野田]。

10. 2004-2009年の間の山形県におけるARIサーベイランスの結果、計280株の hMPV が分離された。hMPV は春 (3-5月頃) に多数検出され、秋 (9-11月頃) には少なくなる傾向を示した。分離株の系統樹解析結果から、genotype A2 および B2 に属する hMPV はほぼ毎年検出されたが、genotype B1 の流行は2005年のみであり、地域における流行の主体は genotype A2 および B2 である可能性が示唆された [水田, 青木, 須藤, 我孫子]。

11. 病因が特定されなかったARI患者のHBoV検索を継続実施した結果、新たに8株検出された [水田, 荒川, 平田, 松田, 田中, 中村, 木村, 野田]。

12. 2003~07年に山形県で分離された76株のHRV-AのVP4/VP2遺伝子領域の分子疫学解析を行った。分離株解析部位の塩基およびアミノ酸配列の相同性は、それぞれ66.6~100%および84.7~100%、系統解析ではそれぞれ11あるいは8クラスターに分類された [木村, 水田, 平田, 塚越, 野田]。

13. 気管支喘息患者のマスト細胞の気道リモデリングへの関与を解明するため、ヒト肺マスト細胞におけるThymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) および血小板活性化因子 (Platelet activator factor; PAF) 受容体

の発現を検討した。マスト細胞は TSLP および PAF) 受容体を発現し, IgE 依存性のアレルギー反応の即時相を惹起し, さらに産生するサイトカインによって血管内皮細胞の接着因子の発現, 顆粒球の遊走, 活性化や生存延長を誘導することより炎症の持続させ, 気道リモデリングにも関与していることが示唆された [岡山]。

14. 今年度分離された RSV 臨床株のうちの 22 株の抗 RSV ヒト化モノクローナル抗体 (商品名: シナジス, アボット) に対する中和反応性を検討した。その結果, いずれの供試株も抗 RSV ヒト化モノクローナル抗体に対して $100 \times 2^{15-16}$ 倍の中和価を示し, 同抗体に対する非感受性株は検出されなかった [水田, 斎藤, 菅井, 木村, 野田]。

15. ARI ウイルス検査に伴う標準品の供給体制を拡充するため, 昨年度に引き続いて RSV, HRV, PIV, hMPV 等のそれぞれの国内臨床分離株増殖および遺伝子情報解析を継続実施し, レファレンス参照株として保存した。ウイルス株の血清学的同定に用いる標準抗血清はそれぞれのウイルスが血清学的に多型であること, 多くの機関において遺伝子解析が日常的に実施可能であることなどから, 遺伝子情報のジーンバンクへの登録, プローブの作成等の一層の進展を図った [野田, 木村, 水田, 調塚越, 平田, 荒川]。

16. 地方衛生研究所で実施されている病原体サーベイランスを実施する際の標準的な実験室検査法とするため, 病原体検出マニュアル HRV 編, PIV 編および HBoV 編を作成した [水田, 塚越, 平田, 木村, 野田]。

17. 地方衛生研究所等の技術者を対象とした短期研修ウイルス研修 (事業主体: 国立保健医療科学院) 等における ARI ウイルスサーベイランス及びレファレンスに関する研修を実施した [木村, 水田, 野田, 平良, 塚越, 平田]。

D. 考察

昨年度に引き続き, 総合的かつ効果的な

ARI サーベイランス体制を推進するための包括的な研究を実施した。

ARI サーベイランスおよび重症例等の病原検索を試みた我々の研究結果から, RSV, hMPV, HRV, PIV, HBoV 等の ARI ウイルスが多数検出され, 臨床症状等から呼吸器症状のみならず感染喘息をはじめとした多様な疾患に関与していることが推定された。

地方衛生研究所, 医療機関等の地域単位で実施された RSV, hMPV, HRV および PIV 等の分子疫学解析からいくつかの興味ある知見が得られた。このうち今年度, 重点的に検討した PIV-3 の HN 領域遺伝子の系統解析の結果, 我が国で流行した PIV-3 は大きく 3 つのクラスターに分類される株であった。また, 昨年度から継続詳細検討している HRV の VP4/VP2 遺伝子領域の系統解析の結果, 我が国で流行した HRV-A は 8~11 クラスターに分類されることを明らかにした。

HBoV の分子疫学解析結果は昨年度の研究報告書で報告したが, 今年度はさらに調査範囲等を拡大して継続実施している。さらに遺伝学上, 近縁と考えられるヒト以外の哺乳動物由来のパルボウイルスとの間で, 生物学的, 遺伝子学的性状の異同を検討するための予備検討に着手した。

ARI は我々の日常に極めて密着している感染症と考えられる, 反面, 重要度の認識に乏しい感染症でもある。昨年の H1N1pdm インフルエンザ出現の際には大きな社会的インパクトを示したことは記憶に新しい。地方衛生研究所で実施されている病原体サーベイランス成績から推定すると, 本研究を開始して以降, 徐々に ARI ウイルスサーベイランスを実施する機関が増加していると思われる。ARI レファレンス機能強化に向けた課題の一つとして検査法の標準化と普及は重要であることから, ARI ウイルスに関する病原体検出マニュアルを新たに 3 編作成し, 公開, 活用に向けた。

今後, さまざまな機会を活用して ARI

の重要性に関する啓発、技術紹介・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。研究第三年次の成果は以下のとおりである。

1. RSV, hMPV, HRV, 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学および遺伝学的に検討した。
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に係る側面的支援を行った。
5. 限定施設内の感染症流行実態を調査し、原因の一部を確定した。

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) Mizuta K, Matsuzaki Y, Hongo S, Ohmi A, Okamoto M, Nishimura H, Itagaki T, Noriko, Katsushima H, Oshitani K, Suzuki A, Furuse Y, Noda M, Kimura H, Ahiko T: Stability of the seven hexon hypervariable region sequences of adenovirus types 1-6 isolated in Yamagata, Japan between 1988 and 2007. *Virus Res.* 140: 32-40, 2009
- 2) Nakamura M, Itokazu K, Taira K, Kawaki T, Kudaka J, Nidaira M, Okano S, Koja Y, Tamanaha K, Kimura H, Noda M. Genotypic and phylogenetic analysis of the G gene of respiratory syncytial virus isolates in Okinawa, Japan, 2008. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 82:326-327, 2009
- 3) 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* 58(4):311-3, 2009.

- 4) Mizuta K, Hirata A, Suto A, Aoki Y, Ahiko T, Itagaki T, Tsukagoshi H, Morita Y, Obuchi M, Akiyama M, Okabe N, Noda M, Tashiro M, and Kimura H. Phylogenetic and cluster analysis of human rhinovirus species A (HRV-A) isolated from children with acute respiratory infections in Yamagata, Japan. *Virus Res* 147:265-274, 2010.
 - 5) Honma Y, Yoshii Y, Watanabe Y, Aoki N, Komiya T, Iwaki M, Arai H, Arakawa Y, Takahashi M, Kimura H, A case of afebrile pneumonia caused by non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae*. *Jpn. J. Infect. Dis.* 62(4), 327-329.
 - 6) Toda S, Kimura H, Noda M, Mizuta K, Matsumoto T, Suzuki E, Shirabe K: Phylogenetic analysis of human metapneumovirus from children with acute respiratory infection in Yamaguchi, Japan during summer 2009. *Jpn. J. Infect. Dis.* (in press)
- ### 2. 学会発表
- 1) Fujitsuka A, Sugai K, Kobayashi Y, Kimura H, Noda M, Kaburagi Y: Risk factors for bronchial asthma in infants after respiratory syncytial virus infection. *European Respiratory Society Annual Congress* ;12-16 Sept. 2009 Vienna, Austria
 - 2) 平田明日美、水田克巳、五十嵐郁美、秋山美穂、木村博一、岡部信彦、野田雅博、田代真人: 東北地域で分離されたライノウイルスの分子疫学、第 50 回日本臨床ウイルス学会、2009 年 6 月 13-14 日 高知市 五十嵐郁美、
 - 3) 五十嵐郁美、水田克巳、大内好美、田中千香子、齋藤義弘、秋山美穂、木村博一、岡部信彦、野田雅博、田代真人: 最近検出されたヒトボカウイルス (HBoV) の分子疫学、第 50 回日本臨床ウイルス学会、2009

年 6 月 13-14 日 高知市

4) 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、福岡市、平成

21 年 11 月 20 日

H.知的財産権の出願・登録状況
該当なし。

インフルエンザ様患者から検出された呼吸器ウイルス

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

2009年5月から2010年1月の間にインフルエンザ様患者から採取された臨床検体について、急性呼吸器感染症（ARI）ウイルス検索を実施した。その結果、インフルエンザ検査陰性検体の18.8%からRespiratory Syncytial ウイルス、ヒトライノウイルス（HRV）等のARIウイルスが検出された。HRVのVP4/VP2領域系統樹解析結果から、HRV speciesCも既に本県に拡散していることが判明した。本研究から、インフルエンザの流行期においても他のARIウイルスが同時に流行しており、ARI診断における実験室診断の重要性が確認された。

A. 研究目的

世界的な新型（H1N1pdm）インフルエンザの流行に伴い、2009年5月以降、沖縄県衛生環境研究所においても多検体のインフルエンザ検査を実施した。RT-PCR検査により、そのうちの約85%は、H1N1pdmあるいは季節性A型インフルエンザであることが確認されたが、いっぽう残りの約15%はインフルエンザ陰性であった。

本研究では、これらの臨床的にインフルエンザ感染が疑われた患者におけるインフルエンザ以外の急性呼吸器感染症（ARI）ウイルス検索を実施し、原因究明を試みた。

B. 研究方法

2009年5月から2010年1月の間にインフルエンザ様患者から採取された臨床検体（咽頭拭い液）のうち、インフルエンザRT-PCR（リアルタイムまたはコンベンショナル）検査の結果、A型およびB型共に陰性の85検体とA型陽性の70検体、計155検体を試験に供した。ARIウイルス検索はRespiratory Syncytial ウイルス（RSV）、ヒトメタニューモウイルス（hMPV）、パラインフルエンザウイルス（PIV）、ヒトライ

ノウイルス（HRV）およびエンテロウイルス（EV）について、RT-PCRおよび細胞培養法により実施した。またHRVについては、VP4/VP2領域の塩基配列を決定し分子系統樹解析を実施した。

C. 研究結果

ARIウイルス検出状況および各症例の特徴を表1に示した。ARIウイルスは、インフルエンザ陰性85検体のうち16検体（18.8%）から検出され、その内訳は、RSVが6株、hMPVが2株、PIV3が1株、HRVが4株およびEVが3株であった。またインフルエンザ陽性70検体のうち2検体（2.9%）からHRVが検出された。RSVが検出された6症例の患者年齢は11ヶ月～4歳で、臨床症状はすべての症例で発熱を伴い、うち2例が下気道炎、1例が上気道炎を呈した。検体採取月は7月および8月であった。HRVが検出された症例の患者年齢は8ヶ月～59歳で、臨床症状は上気道炎、肺炎、喘息発作、心不全等と多彩であった。検体採取月は5月、8月、10月および翌1月であった。またH1N1pdmインフルエンザウイルスとHRVが同時に検出された症例

は肺炎、低酸素血症等により呼吸管理が必要な入院症例であった。その他 hMPV が 2 株、PIV3 型が 1 株および EV が 3 株、それぞれ検出された (表 1)。

HRV の分子系統樹解析の結果、検出された HRV は 1 株が HRV-A、2 株が HRV-B、3 株が HRV-C に分類された (図 1)。

D. 考察

インフルエンザ検査が陰性であった 85 検体のうち 16 検体 (18.8%) から RSV などの ARI ウイルスが検出され、インフルエンザ流行期においても少なからず、他の ARI ウイルスが同時流行していることが判明した。このことから、臨床症状のみで ARI を診断することは容易でなく、ARI 診断には実験室診断が不可欠であるであることが示唆される。

RSV は、全て 7、8 月に採取された検体から検出され、既報¹⁾と同様の流行様相を示した。いっぽう、これまで common cold の原因ウイルスとして知られてきた HRV は、感染喘息に関与するウイルスとして近年、重要視されている²⁾。本研究においては、HRV が喘息や心不全患者から、また H1N1pdm インフルエンザの入院症例から検出されており、今後さらに詳細かつ継続的な調査が必要なウイルスである。また分子系統樹解析結果から HRV-A、-B とともに、新しい species³⁾である HRV-C に属する HRV が既に本県に拡散していることが新たに判明した。

以上のことから、ARI ウイルスサーベイランスに際しては、特定のウイルスにとらわれることなく ARI ウイルス全般を対象としたサーベイランス検査を実施することが、地域の ARI の流行状況を把握するうえで重要と思われる。また得られた検査情

報を迅速に医療現場へ還元することは、患者に対する適正な医療の提供に繋がるものと思われた。

E. 結論

インフルエンザ様患者の 18.8%から ARI ウイルスが検出されたことから、ARI 診断における実験室診断の重要性が示された。また包括的な病原体サーベイランスを実施することにより、地域における ARI の流行状況を的確に把握することが可能となり、患者に対する適正な医療の提供に繋がると思われた。

F. 参考文献

- 1) Nakamura M, Itokazu K, Taira K, Kawaki T, Kudaka J, Nidaira M, Okano S, Koja Y, Tamanaha K, Kimura H, Noda M. Genotypic and phylogenetic analysis of the G gene of respiratory syncytial virus isolates in Okinawa, Japan, 2008. *Jpn J Infect Dis.* 82;326-327, 2009
- 2) Wos M, Sanak M, Soja J, Olechnowicz H, Busse WW, Szczeklik A. The presence of rhinovirus in lower airways of patients with bronchial asthma. *AM J Respir Crit Care Med.* 177;1082-1089, 2008
- 3) Lamson D, Renwich N, Kapoor V, Liu Z, Palacios G, Ju J, Dean A, St George K, Briese T, Lipkin Wi. Mass Tag polymerase-chain-reaction detecting of respiratory pathogens, including a new rhinovirus genotype, that caused influenza like illness in New York State during 2004-2005. *J Infect Dis* 194;1398-1402, 2006

表1. 呼吸器系ウイルス検出状況および検出症例の特徴

INF (検体数)	検出 ウイルス	年齢	検体 採取月	主な臨床症状	検体No.
陰性(85)	RSV(6)	11m	7	発熱(39)、下気道炎	0900267
		1	7	発熱(40)、下気道炎	0900338
		4	7	発熱(38.9)、上気道炎	0900340
		1	7	発熱(40.5)	0900595
		1	8	発熱(38.5)	0900868
		2	8	発熱(41)	0900927
	hMPV(2)	2	7	発熱(40.1)、上気道炎	0900346
		2	7	発熱(38.6)、上気道炎	0900370
	PIV3(1)	2	5	発熱(39.7)	0900460
	HRV(4)	41	5	発熱(38.5)、下痢	0900165
		2	8	発熱(39.4)、上気道炎	0900703
		59	10	発熱(37.7)、肺炎、喘息発作	0901007
		8m	1	発熱(39)、心不全	1000012
	EV(3)	10	7	発熱(38.8)、上気道炎	0900384
		1	7	発熱(40)、上気道炎	0900216
		23	7	発熱(38.9)、上気道炎	0900445
	陽性(70)	HRV(2)	9	8	発熱(39)、肺炎、低酸素血症
6			10	発熱(37.7)、嘔吐、腹痛、低酸素血症	0901020

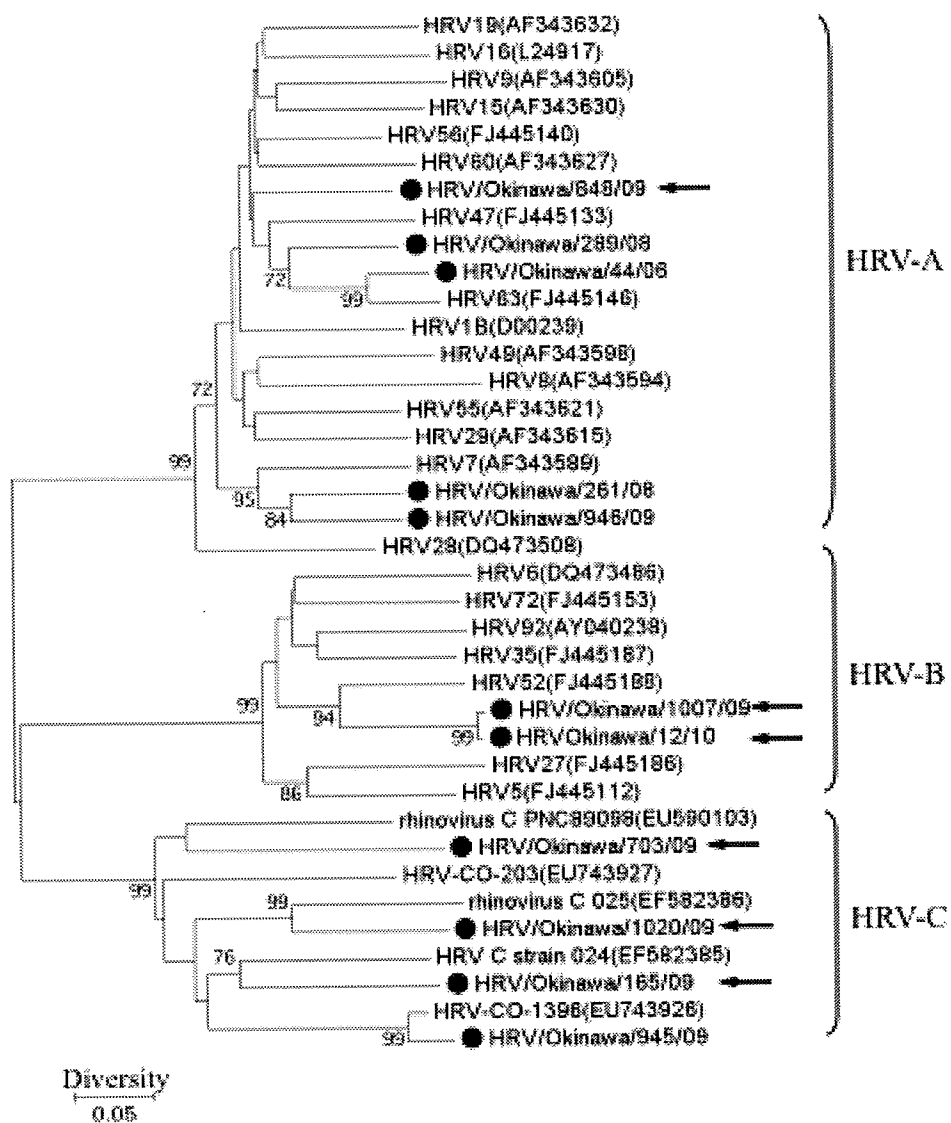


図 1. ライノウイルス *VP4/VP2* 領域の塩基配列 (420nt) に基づく分子系統樹
矢印は本研究検出株、●は沖縄株を示す。

島根県における呼吸器ウイルスサーベイランス

研究協力者 小村 珠喜（島根県保健環境科学研究所）
飯塚 節子（島根県保健環境科学研究所）
田原 研司（島根県保健環境科学研究所）
和田美江子（島根県保健環境科学研究所）
保科 健（島根県保健環境科学研究所）

研究要旨

種々の呼吸器ウイルス[RSウイルス（RSV）、ヒトメタニューモウイルス（HMPV）、パラインフルエンザウイルス（PIV）およびライノウイルス（HRV）]の検査診断体制を整備すると同時に2009年1月～12月に島根県内の医療機関17カ所において急性呼吸器感染症（ARI）患者から採取された鼻咽頭ぬぐい液272検体を用い、ウイルスサーベイランスを行った。その結果、本県においても多種類の呼吸器ウイルスが流行していることが明らかになった。

A. 研究目的

島根県における急性呼吸器感染症（ARI）ウイルスにかかわるサーベイランスは、これまで主にインフルエンザウイルス、エンテロウイルス、アデノウイルスなどの検査を実施してきた。しかしながら、主要なARIウイルスであるRSウイルス（RSV）やヒトメタニューモウイルス（hMPV）などのウイルス検査診断体制が未整備なため、これらのウイルスによる流行の実態は不明であった。そこで、県内のウイルス流行状況を把握し、今後の感染症対策の一助とすることを目的として呼吸器ウイルス検査診断体制を整備すると同時に、2009年1月～12月に島根県内の医療機関17カ所において急性呼吸器感染症（ARI）患者から採取された鼻咽頭ぬぐい液272検体を用い、ウイルスサーベイランスを行った。

B. 研究方法

2009年1月から12月の間に島根県内の医療機関17カ所においてARI患者から採取された鼻咽頭ぬぐい液272検体を用

いた。

ウイルス分離には、これまでMDCK細胞、FL細胞、HEL細胞、RD細胞、Vero細胞およびAG-1細胞を用いてきたが、HEp-2細胞およびVero E6細胞を新たに追加導入した。遺伝子学的検査は、RSV、hMPV、パラインフルエンザウイルス（PIV）、ヒトラインフルエンザウイルス（HRV）について病原体検出マニュアルおよび既報に準じた検査診断系を整備し実施した^{1,4)}。RT-PCR産物はダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した後、DDBJのBLAST検索を行い相同性の高いスコアを示したデータベースをもとに同定を行った。また、塩基配列のアライメントを行った後、近隣結合法による系統樹解析を実施した。

C. 研究結果

ウイルス分離および遺伝子検出成績を表1に示した。

RSVは1、2、8、11、および12月にそれぞれ1、1、1、2および3件、計8件検出された。このうち、ウイルス分離は

HEp-2細胞を用いて4株が分離されたが、その他の細胞ではいずれも分離されなかった。検出された8株のM2遺伝子222ntについて系統樹解析を行った結果、6株が genotype A2、2株が genotype B1 に分類された(図1)。hMPVは、3、7、8、9、10および12月にそれぞれ1、5、3、2、7および1株、計19件検出された。このうち、Vero E6細胞を用いて4株が分離された。検出された19株のF領域遺伝子314ntについて系統樹解析を行った結果、genotype B2が16株、genotype A2が3株であった(図2)。PIVは、PIV 1型が9および10月にそれぞれ1株ずつ、PIV 3型が8月に1株、計3株検出され、Vero E6細胞を用いてすべてウイルスが分離された。HRVは、1、2、6、8および9月にそれぞれ1、1、2、3および2株、計9株検出された。ウイルス分離はすべての細胞で陰性であった。検出された9株のうち6株のVP4/VP2領域360ntについて系統樹解析を行った結果、5株がHRV species A、1株がHRV species Cに分類された(図3)。

D. 考察

島根県におけるARIウイルスサーベイランスの充実を図るため、検査診断体制の整備を行うとともに臨床検体を用いたウイルスの検出・分離および遺伝学的解析を行った。

今回検出されたRSV8株のうち、6株が genotype A2 に分類される株であり、数は少ないが genotype A2 の年間を通しての検出が確認された。hMPVは19株のうち、genotype A2が3株、genotype B2が16株検出され、2009年の流行は genotype A2 と B2 による混合流行であったと考えられた。PIVはPIV 1型とPIV 3型がVero E6細胞を用いて分離された。PIVが検出された検体はいずれも診断名はインフルエンザであり、このうちPIV 1型が検出された症例は、医療機関で体外診断用医薬品を用いた迅速診断の結果、B型の感染が

疑われた症例であった。HRVは季節に関係なく検出された(HRV-Aが5株、HRV-Cが1株)。

今回検出されたウイルスの多くは、遺伝子検出のみであり、多種類の細胞を用いてウイルス分離を試みたもののウイルスが分離に成功した例は少なかった。今後、それぞれのウイルス分離に至適な細胞の選択等を行い、分離率の向上をはかりたい。遺伝子検査は感度、迅速性に優れており、分離率の低いあるいは分離培養不能のウイルスにとって有効な検査方法である。しかし、日常的に多種類のARIsウイルスを対象にしたサーベイランス検体に利用することは非効率である。今後、培養細胞を用いたウイルス分離と遺伝子検査法を適切に併用した、効果的なサーベイランス検査体制の構築をはかることが必要であると考えられる。

E. 結論

島根県において新たにARIsウイルスを対象とした検査診断体制を整備するとともに県内のARIウイルスサーベイランスを行った。その結果、多種類の呼吸器ウイルスが検出・分離され、県内においてもこれらのウイルスの流行が起きていることが推察された。

F. 参考文献

- 1) 病原体検出マニュアル RSウイルス
<http://www.nih.go.jp/niid/reference/RS-manual.pdf>
- 2) 病原体検出マニュアル ヒトメタニューモウイルス
<http://www.nih.go.jp/niid/reference/hMPV-manual.pdf>
- 3) Savolainen C, Blomqvist S, Mulders MN, Hovi T. Genetic clustering of all 102 human rhinovirus prototype strains: serotype 87 is close to human enterovirus 70. J Gen Virol. 2002 Feb;83(Pt 2):333-40.
- 4) Aguilar JC, Pérez-Breña MP, García ML, Cruz N, Erdman DD, Echevarría 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 Mar;38(3):1191-5

表1 ARIウイルス検出／分離成績（2009年1月～12月）

ウイルス	月	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	計
	検体数	14	30	24	26	15	9	13	49	38	29	10	15	272
RSV	検出数	1	1							1		2	3	8
	(分離数)	(1)	(0)							(0)		(1)	(2)	(4)
hMPV	検出数			1				5	3	2	7		1	19
	(分離数)			(0)				(2)	(1)	(0)	(0)		(1)	(4)
PIV	検出数								2		1			3
	(分離数)								(2)		(1)			(3)
HRV	検出数	1	1				2		3	2				9
	(分離数)	(0)	(0)				(0)		(0)	(0)				(0)

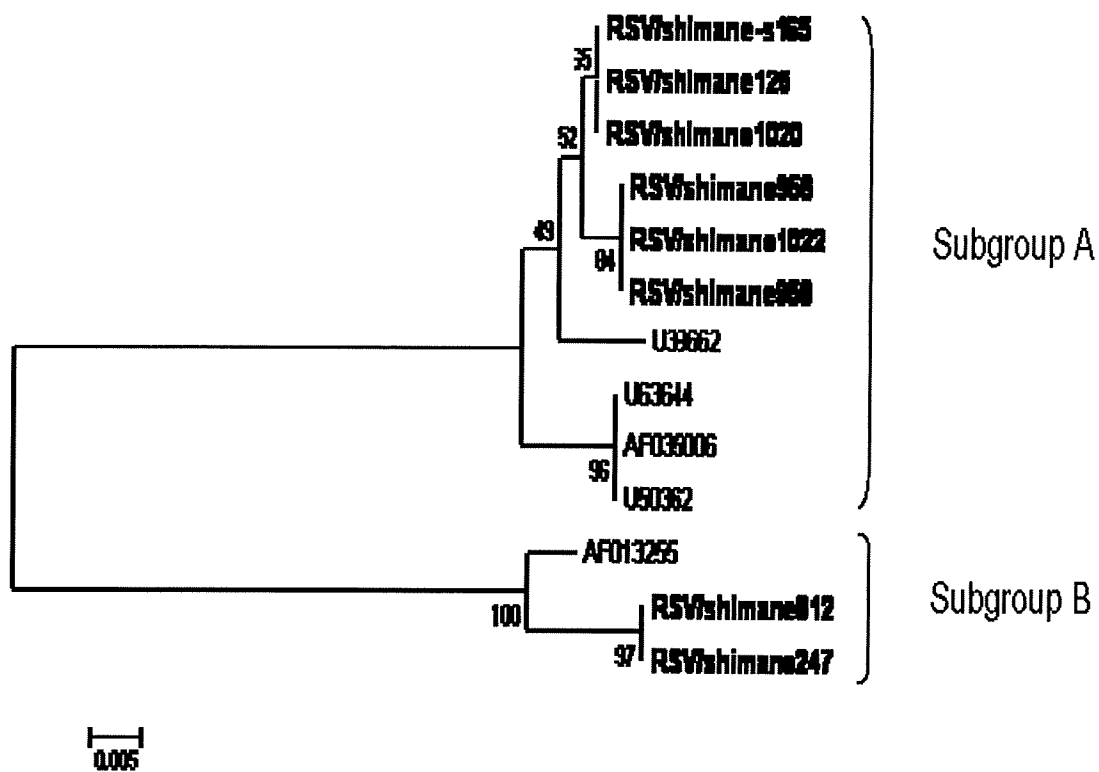
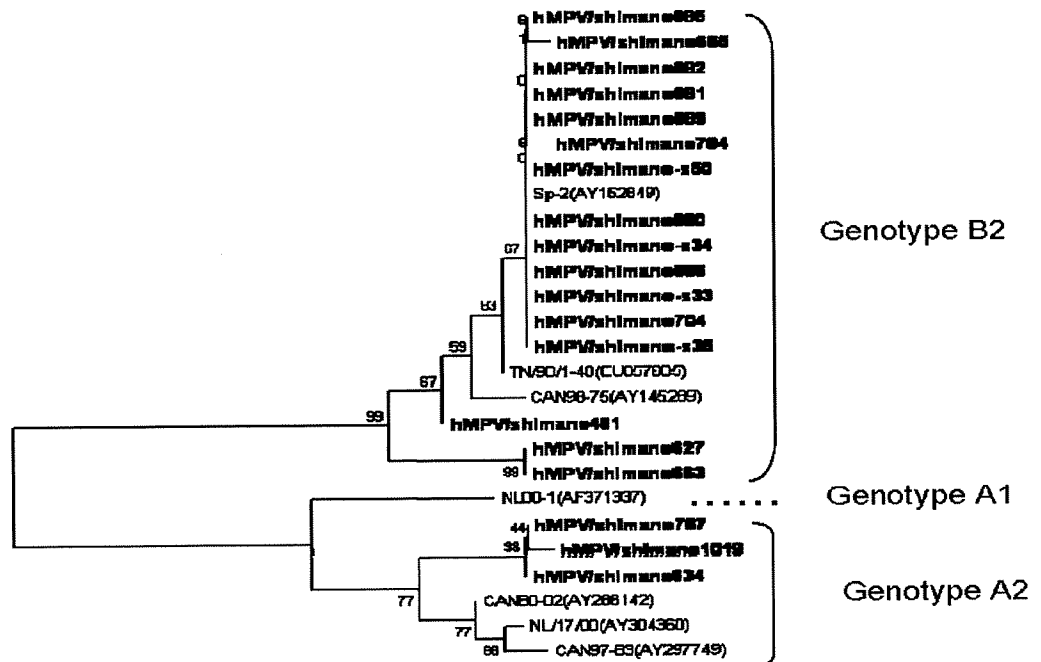
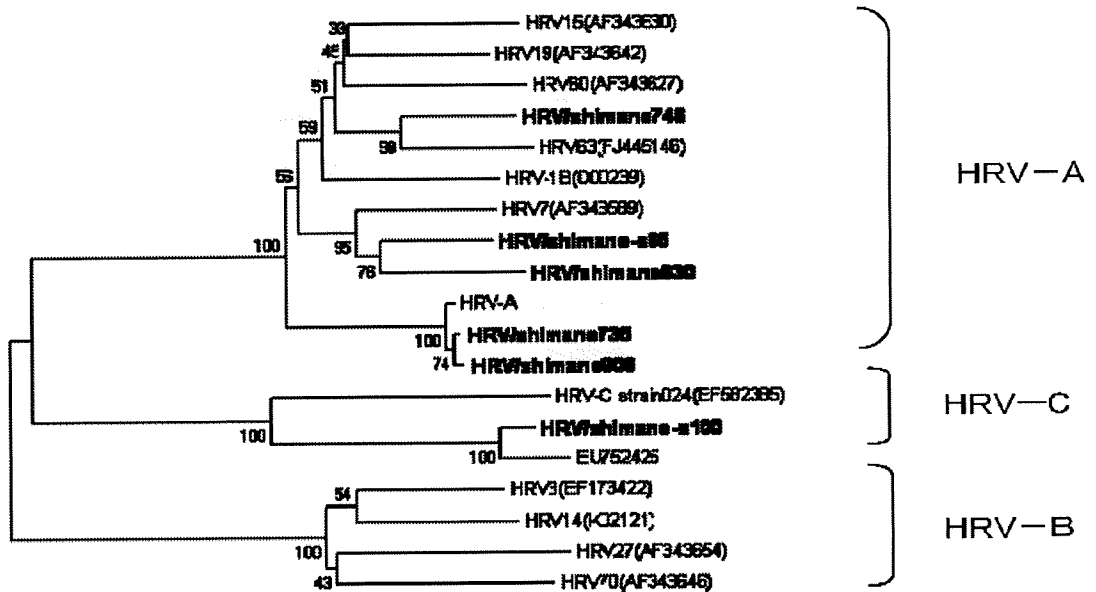


図1 Phylogenetic tree of RSV based on M2 gene sequence(222nt)

(太字が島根県検出株)



0.002 図2 Phylogenetic tree of HMPV based on *F* gene sequence(314nt)
(太字が島根県検出株)



0.05 図3 Phylogenetic tree of HRV based on *VP4/VP2* gene sequence(360nt)
(太字が島根県検出株)

小児急性下気道感染患者における急性呼吸器ウイルス遺伝子検出と解析
—特に RS virus および Rhinovirus について—

研究協力者 荒川 美果 栃木県保健環境センター
平田明日美 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
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
小林 慈典 国立病院機構横浜医療センター小児科
鏑木 陽一 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
野田 雅博 国立感染症研究所

研究要旨

2007~08年に国立病院機構横浜医療センター小児科を受診した下気道疾患患者170例の呼吸器ウイルス[Respiratory syncytial ウイルス (RSV)、ヒトライノウイルス (HRV)、ヒトメタニューモウイルス (hMPV)、パラインフルエンザウイルス (PIV) およびヒトボカウイルス (hBoV)]の検索を実施した。その結果、RSV83検体、HRV64検体、hMPV2検体、PIV2検体およびhBoV3検体が検出された。RSVはG遺伝子系統樹解析の結果、解析した36株のうち、23株がSubgroup A (genotypeGA) および13株がSubgroup B (genotypeBA) に分類された。HRVはVP4/VP2領域系統樹解析の結果、解析した53株のうち、22株がspecies A、5株がspecies B および26株がspecies C に分類され、遺伝学的に多様なクラスターを形成した。

A. 研究目的

小児急性疾患の中で下気道感染症の割合は非常に高く、原因の多くはウイルス感染であることが知られている。感染ウイルスの種類、感染時期によっては新生児期で重篤となる場合や、乳幼児期の感染により気道過敏性亢進状態が持続し、気管支喘息発症あるいは増悪にも大きく関与する場合がある。

そこで国立病院機構横浜医療センター小児科を受診した下気道疾患患者170例について、急性呼吸器感染症 (ARI) の主要原因ウイルスのRespiratory syncytial ウイルス (RSV)、ヒトライノウイルス (HRV)、ヒトメタニューモウイルス (hMPV)、パラインフルエンザウイルス

(PIV) およびヒトボカウイルス (hBoV) のウイルス検出を実施した。

B. 研究方法

2007~08年に下気道症状を呈し、国立病院機構横浜医療センターを受診し入院もしくは外来にて加療を要した児から採取された鼻腔ぬぐい液170検体を用いた。RNA抽出後、RSVはNおよびG遺伝子^{1,2)}、HRVはVP4/VP2領域遺伝子³⁾、hMPVはF遺伝子⁴⁾およびPIVはHN遺伝子⁵⁾をRT-PCR法により、またhBoVはNP1領域⁶⁾をPCR法によりそれぞれ増幅した。RSVのG遺伝子、HRVのVP4/VP2領域の増幅産物について、塩基配列解析および近隣結合法による系統樹解析を行った。