

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 B 溶連菌抗原 (イムノカード
EX ストレップ A, TFB 社)

一部の流行では、感染者の咽頭と鼻腔ぬぐい液を滋賀県衛生科学センターと島根県保健環境科学研究所 (表 4) に依頼して、PCR とウイルス分離にてウイルスの同定を試みた。

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) での平成 19 年 1 月 1 日から平成 21 年 11 月末までの 3 年間の感染症流行 (同時期に同症状の患者が 5 名以上発生した場合) は表 1 のとおりであった。平成 19 年は、3 月から 4 月にかけて NV の院内感染が 3 病棟で連続してみられた。4 月にインフルエンザが、7 月から 8 月にかけてヘルパンギーナが異なる病棟で流行した。3 月と 8~9 月に原因不明の発熱疾患の流行が同じ B 病棟でみられた。感染症の流行経過や臨床症状にも違いがみられ、両者で異なる病原体が関係していたと考えられた。平成 20 年は、3 月から 4 月にかけて 2 病棟で病原体不明の感染症の流行が見られた。4 月から 5 月の 27 日間に 21 名のヘルパンギーナの感染流行が見られた。平成 21 年は 5 月と 10~11 月に 5 回の病原体不明の感染症流行が見られた。

中四国の他の 9 施設 (31 病棟) に対するアンケート調査では平成 20、21 年にインフルエンザと NV 感染症の流行がそれぞれ 2 件、病原体不明の感染症の流行が 11 件みられており (表 2)、平成 19 年の全国アンケート調査と同様に病原体不明感染症の流行頻度が最も高かった。平成 19 年の全国調査の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、12 回であったが、最も多いのは病原体不明の呼吸器感染症の 25 回の

流行であった (0.2 回/病棟/年)。

表 3 に病棟内で発生する感染症の病原体迅速検査の結果を示した。鼻腔ぬぐい液から Respiratory Syncytial ウイルス (RSV) と InfV がそれぞれ 1 名ずつから検出されたが、アデノウイルス抗原は検出されなかった。咽頭拭い液からのストレプトコッカス抗原は 44 名中 7 名が陽性であった。

表 4 に滋賀県衛生科学センターおよび島根県保健環境科学研究所における感染症流行時のウイルス検索結果を示す。検索 1 では咽頭ぬぐい液 16 検体、鼻腔ぬぐい液 33 検体からの PCR による検索で、ボカウイルスは全て陰性であったが、ヒトメタニューモウイルス (hMPV) とヒトライノウイルス (HRV) が同一の鼻腔ぬぐい液から検出された。検索 2 では 12 名からの鼻腔および咽頭ぬぐい液のうち 8 名からの検体で HRV が検出され、系統樹解析から A グループの同一株由来であることがわかった (図 1)。

表 5 に病原体が検出された症例の発熱状況とその他の症状を示した。ストレップ A 陽性例は発熱持続期間はまちまちであったが比較的高熱が多く抗生物質が有効であった。RSV や hMPV 陽性例は発熱期間が比較的長く、下痢も伴っていた。HRV 陽性例は肺炎や気管支炎を併発した者以外は、比較的热は低く持続期間も短かった。

D. 考察

重症心身障害者施設では、病原体不明の呼吸器感染症の流行がかなりの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た。

病棟内での 1 月の発熱者 1 名で RSV が検出され、RSV が冬季の感染症流行に一部関与する可能性のあることが示唆された。HRV は 9~11 月の流行時に検出され、冬季早期の感染流行に関係する可能性が示唆された。hMPV は 5 月の流行時期の 1

名から検出されたが、1名のみであり流行に関係するかどうかは不明であった。咽頭ストレプトコッカス抗原は年間を通じて散発する発熱者から高頻度に検出されたが、散発的であり、病棟内での多人数への流行は考えられなかった。

臨床症状と病原体との関係、病原体毎の流行時期や流行形態(流行速度・人数など)の詳細の解明には、さらに調査研究が必要である。

E.研究発表

1. 論文発表 準備中

2. 学会発表

1) 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

F.参考文献

1. 原三千丸：2種類のアデノウイルス気道感染症迅速診断キットの比較検討．小児科臨床 55(10), 1899-1902, 2002
2. 林国樹、内山隆久、岩田美智子、佐野和三、矢内充、熊坂一成、稲毛康司：新たに開発された respiratorysyncytial virus 診断キットの性能比較．感染症学会雑誌 79(4), 276-283, 2005
3. 山中龍宏、高妻靖恵、征矢達雄：ディップスチック型免疫クロマト法によるA群溶血性レンサ球菌迅速検出キットの使用経験．医学と薬学 56(5), 785-789, 2006
4. 原三千丸：A型インフルエンザに対する迅速診断キットの比較検討．2005/2006年シーズン．小児科臨床 60(1), 129-135, 2007

表 1.愛媛病院重心病棟での感染症流行

2007年1月1日～12月31日 (40名/病棟、4病棟)	
NV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
不明熱	21病棟 (3/11-3/19) 患者 21名 21病棟 (8/22-9/10) 患者 10名
2008年1月1日～12月31日 (40、60、60名/病棟)	
不明熱	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年(11月まで)	
不明熱	23病棟 (5/9-6/4) 患者 9名 21病棟 (5/25-6-16) 患者 5名 23病棟 (10/1-10/26) 患者 30名 22病棟(10/1-10/27) 患者 21名 22病棟(11/1-11/12) 患者 9名

表 2. 重心病棟での感染症発生状況、アンケート調査 (中四国 10 施設、平成 20・21 年)

施設	平成 20 年	平成 21 年
1 T (4 病棟 151 名)	なし	なし
2 M (2 病棟 80 名)	インフルエンザ 1 件 (1 名)	なし
3 HN (3 病棟 119 名)	不明熱 1 件 (5 名)	不明熱 2 件 (11, 3 名)
4 K Se (2 病棟 76 名)	NV 1 件 (1 名)	インフルエンザ 1 件 (50 名) NV 1 件 (15 名) 不明熱 1 件 (13 名)
5 YU (3 病棟 117 名)	NV 1 件 (23 名)	インフルエンザ 1 件 (2 名)
6 Y (2 病棟 80 名)	インフルエンザ 1 件 (1 名)	なし
7 HT (4 病棟 148 名)	NV 1 件 (1 名)	なし
8 K Sh (5 病棟 205 名)	なし	インフルエンザ 1 件 (3 名)
9 K (3 病棟 118 名)	不明熱 1 件 (? 名)	インフルエンザ 1 件 (10 名) 不明熱 1 件 (? 名)
10 E (3 病棟 160 名)	不明熱 2 件 (7, 16 名) ヘルパンギーナ 1 件 (21 名)	不明熱 5 件 (9, 5, 30, 21, 9 名)

表 3. 上気道感染の病原体の迅速検査法による検索

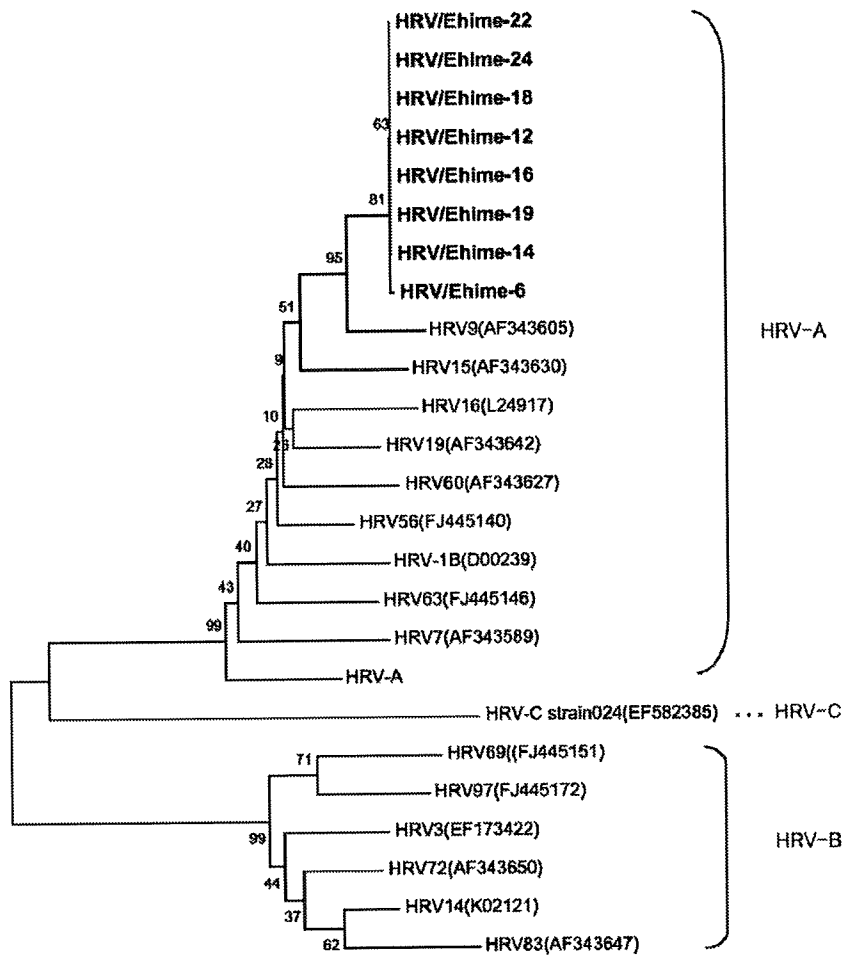
期間	インフルエンザ A (ポストエム)	インフルエンザ B (ポストエム)	RSV(イムノカード ST)	アデノウイルス(イムノカード ST)	ストレプト A (イムノカード EX)
2007/11/15-	0/21	0/21	1/23	0/23	+++ 5/18
2008/3/31					± 5/18
2008/4/27-	1/7	0/7	0/7	0/7	± 2/7
2008/12/27					
2009/1/17-	0/12	0/12	0/31	0/19	++ 2/19
2009/10/21					
合計	1/40	0/40	1/61	0/49	+ 7/44
(2007/11/15-					(± 9/44
2009/10/21)					

表 4. 感染症の流行時のウイルス検索

検索	検体内訳および結果
1	<p>検体採取期間： 2008年12月8日～2009年6月29日</p> <p>検体： 49検体（咽頭ぬぐい液 16検体、鼻腔ぬぐい液 33検体）</p> <p>結果： PCR ボカウイルスはすべて陰性</p> <p>2009年5月13日の患者MT 鼻腔ぬぐい液より hMPV と HRV 検出</p>
2	<p>検体採取期間： 2009年7月17日～11月9日</p> <p>検体： 12症例の咽頭・鼻腔ぬぐい液 各12検体</p> <p>結果： PCR 8症例の咽頭 and/or 鼻腔ぬぐい液より HRV 検出</p>

表 5. 病原体検出症例の症状

検体採取日	氏名	病原体	発熱最高(●)	持続(日)	その他の症状
08/1/25	TK	ストレプト	38.5	1	なし
08/2/25	MMo	ストレプト	38.0	6	鼻汁（軽度）
08/2/27	AY	ストレプト	39.0	4	嘔吐（1回）
08/3/25	YM	ストレプト	38.0	8	咳、肺炎
08/3/27	YS	ストレプト	38.5	1	なし
09/7/17	HS	ストレプト	39.0	9	鼻汁、咳
09/9/7	NO	ストレプト	39.0	8	鼻汁（軽度）
08/1/8	KU	RSV	38.0	6	下痢
09/5/13	MT	hMPV, HRV	39.0	8	下痢、鼻汁
08/9/11	KS	HRV	38.5	2	鼻汁
08/10/7	YM	HRV	37.5	2	鼻汁
09/10/7	KT	HRV	38.0	3	鼻汁、咳
09/10/18	RH	HRV	39.0	5	なし
09/10/21	MM	HRV	39.0	9	咳、肺炎
09/10/21	MO	HRV	38.5	4	鼻汁、咳
09/10/21	HT	HRV	38.5	2	鼻汁
09/11/9	AT	HRV	39.0	4	咳、気管支炎



0.05

图1 Phylogenetic tree of HRV based on VP4/VP2 genes sequences(340nt)

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

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：ヒトメタニューモウイルスサーベイランス

研究協力者	調 恒明	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
	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
	鈴木英太郎	鈴木小児科医院
研究分担者	野田雅博	国立感染症研究所ウイルス第三部

研究要旨

山口県内の1小児科医院において、2009年7月末から8月末にかけて、気管支炎もしくは肺炎と診断された乳幼児患者のうち、臨床的にヒトメタニューモウイルス（hMPV）感染が疑われた39例の咽頭拭い液検体についてPCR法による遺伝子検出を実施したところ、18例でhMPV特異的遺伝子が検出された。これらのhMPVのF遺伝子の系統樹解析から、4つの異なる起源を持つhMPVであることがわかった。hMPVが検出された乳幼児患者は、すべて同一市内に居住しており、夏季の1ヶ月弱の期間に、複数のsubgenogroupのhMPVによる地域流行が確認された。

A. 研究目的

ヒトメタニューモウイルス（hMPV）は、冬から春先にかけての小児の気管支炎、肺炎の原因の一つであるが、2001年に発見されたウイルスであり¹⁾、迅速診断キットが市販されておらず、感染症発生動向調

査の対象にもなっていないことから、国内において詳細な流行状況を把握する価値がある。今回山口県において、2009年夏期の呼吸器疾患の流行についてhMPVによることを明らかにし、分子疫学的解析を行った。

B. 研究方法

1. 患者検体

山口県の1医療機関を受診した乳

幼児から得られた咽頭ぬぐい液39検体を使用した。

2. RT-PCR、シーケンス及び系統樹解析

RT-PCR 及び塩基配列決定は常法に従った²⁾。hMPV の F 遺伝子の部

C. 研究結果

1. PCR による原因ウイルス検出

山口県宇部市の小児科医院を 2009 年 7 月末から 2009 年 8 月に呼吸器症状を訴えて受診し、咳症状が強く長引く患者 39 名について咽頭ぬぐい液を採取し nested RT-PCR 法により hMPV の F 遺伝子の検出を行った結果、18 例が陽性と判断された (表 1)。全ての検体について、その他の呼吸器疾患原因ウイルス (Adenovirus, enterovirus, para-influenza virus, human bocavirus, RS virus, rhinovirus, influenza virus) について PCR による検出を試み、parainfluenza type 1 が 1, type 3 が 2, human bocavirus が 1 例それぞれ検出されたが、hMPV との混合感染は確認されなかった。hMPV 感染者の発症日は 7 月 26 日から 8 月 19 日までで、年齢は 1 才から 5 才が多く、0 才児は 1 名のみであった。

2. 患者由来 hMPV の F 遺伝子の系統樹解析結果

検出された 18 例の hMPV の F 遺伝子の部分塩基配列についての系統樹解析 (図 1) から、14 例が subgenogroup A2 に、3 例が subgenogroup B1 に、そして、1 例が subgenogroup B2 に分類された。また、subgenogroup A2 に分類され

分塩基配列 (302 bp) に基づく系統樹は、Kimura-2 parameter 法 (bootstrap 1000 回) により作成した。

た 14 例については、さらに、それぞれ 11 例と 3 例が属する 2 つの subcluster に分類された。これらの塩基配列は 7 塩基異なっており、異なる起源を持つと考えられる。

D. 考察

山口県の 1 小児科医院を 2009 年 7 月下旬から 8 月に受診した小児のうち、臨床症状から hMPV 感染症を疑った 39 名のうち 18 例が PCR 陽性であった。これらの検体について系統樹解析を行い、4 つの異なる起源をもつウイルスであることがわかった。患者の発症日は、7 月 29 日から 8 月 21 日までであり、夏期の 1 ヶ月足らずの期間に 4 種類の独立した起源の hMPV 感染の流行が起こったことになる。患者は、いずれも保育園児であり集団における感染が流行の一因であると考えられた。

E. 結論

hMPV を含む呼吸器系ウイルス疾患は、喘息の増悪、あるいは発症因子と考えられており、一過性の疾患として看過することは出来ない³⁾。今後、感染拡大防止の視点から保育園等における病児保育のあり方を検討する必要があると思われる。また、迅速診断キットが市販されておらず、

感染症発生動向調査の対象になっていないことから、今後地方衛生研究所における検査を強化していくべき疾患の一つである。

F. 参考文献

1. Collins, P.L. and Crowe, J.E, Jr. (2007): Respiratory syncytial virus and metapneumovirus. p. 1601-1646. *In* D.M. Knipe and P.M. Howley (ed.), *Fields Virology*. vol. 1. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
2. Takao S, Shimoazono H, Kashiwa H, Shimazu Y, Fukuda S, Kuwayama M, Miyazaki K. (2003) Clinical study of pediatric cases of acute respiratory diseases associated with human metapneumovirus in Japan. *Jpn J Infect Dis*. 56(3):127-9.
3. García-García ML, Calvo C, Casas I, Bracamonte T, Rellán A, Gozalo F, Tenorio T, Pérez-Breña P.

(2007) Human metapneumovirus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma at age 5. *Pediatr Pulmonol*. 42(5):458-64.

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Toda S, Kimura H, Noda M, Mizuta K, Matsumoto T, Suzuki E, Shirabe K. 2010. 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

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 hMPV 陽性患者と検出ウイルス

患者	年齢	性別	診断名	発症日 (2009 年)	Strain	Subgroup	GenBank accession no.
1	1	F	細気管支炎	7/28	Yamaguchi 09-01	A2	AB533235
2	1	F	肺炎	7/26	Yamaguchi 09-03	A2	AB533239
3	2	F	肺炎	7/27	Yamaguchi 09-04	A2	AB533236
4	5	F	細気管支炎	7/30	Yamaguchi 09-07	A2	AB533237
5	2	M	細気管支炎	7/31	Yamaguchi 09-09	A2	AB533238
6	3	M	細気管支炎	7/31	Yamaguchi 09-10	A2	AB533240
7	8	M	肺炎	8/4	Yamaguchi 09-13	A2	AB533241
8	4	M	細気管支炎	8/4	Yamaguchi 09-14	A2	AB533242
9	9	F	細気管支炎	8/2	Yamaguchi 09-15	B2	AB533243
10	2	F	肺炎	8/7	Yamaguchi 09-17	B1	AB533244
11	4	M	肺炎	8/9	Yamaguchi 09-20	A2	AB533245
12	3	F	細気管支炎	8/8	Yamaguchi 09-22	A2	AB533246
13	4	M	細気管支炎	8/8	Yamaguchi 09-26	A2	AB533247
14	1	F	細気管支炎	8/12	Yamaguchi 09-29	A2	AB533248
15	6	F	肺炎	8/11	Yamaguchi 09-30	B1	AB533249
16	3	M	細気管支炎	8/11	Yamaguchi 09-31	B1	AB533250
17	4	M	肺炎	8/19	Yamaguchi 09-37	A2	AB533251
18	0(3 ヶ月)	F	細気管支炎	8/19	Yamaguchi 09-38	A2	AB533252

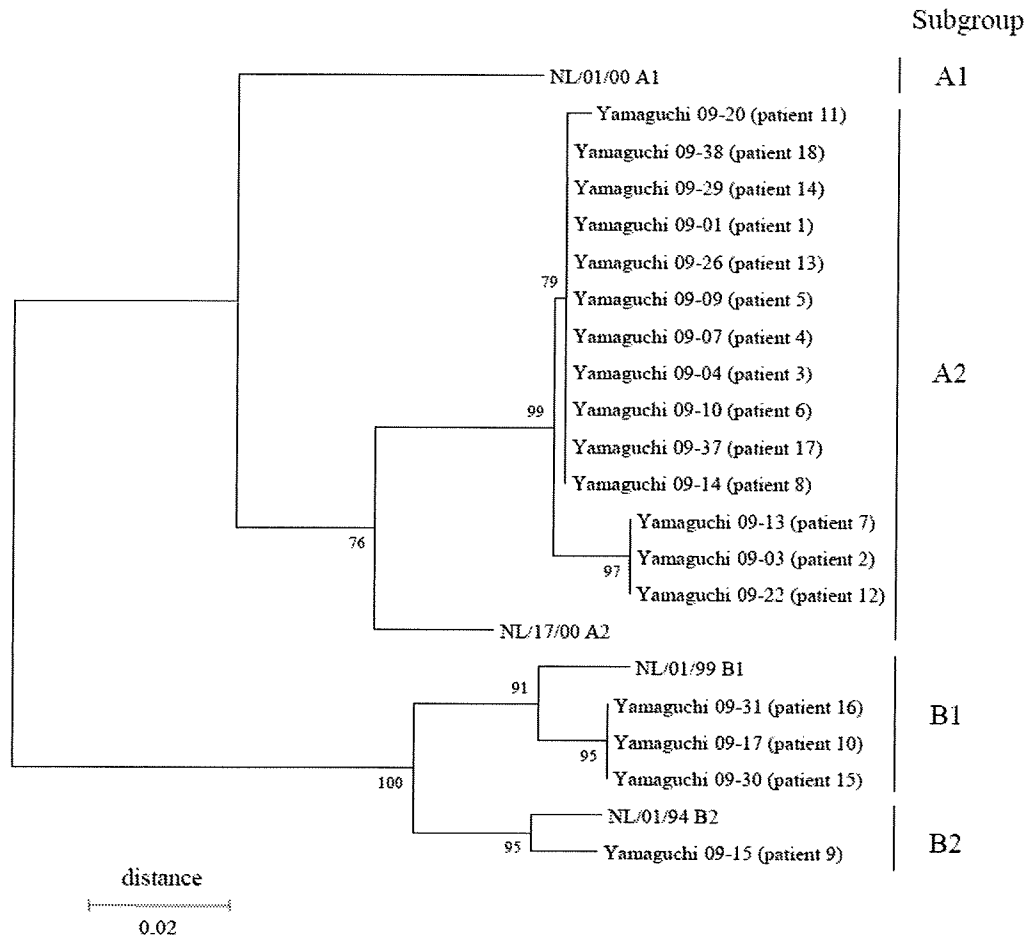


図1 患者から検出されたhMPVと参照株のF遺伝子の塩基配列を基にした分子系統樹

地方における呼吸器ウイルス感染症サーベイランス
-特にヒトメタニューモウイルスの疫学-

研究協力者 水田 克巳 山形県衛生研究所 副所長

研究要旨 2004-2009年に山形で分離したヒトメタニューモウイルス（hMPV）のシーケンス解析を行った。ウイルス分離の結果、hMPVは春（3-5月頃）に多く検出され、秋（9-11月頃）に少なかった。シーケンス解析の結果、遺伝子型A2,B2はほぼ毎年検出されたのに対し、B1の流行は2005年のみであり、地域における流行の主体はA2,B2である可能性が示唆された。

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。特に山形県では、ウイルスを分離し、保存し、解析することの延長線上にしか中長期的なウイルス感染症対策は存在しえないという考えに立ち、ウイルス分離を続けてきた。今年度は、2004年から2009年までに山形で分離されたヒトメタニューモウイルス（hMPV）の疫学研究のまとめとして、分離株のシーケンス解析を行い、遺伝子型を決定した。

B.研究方法

6種類の細胞を用いたマイクロプレート法（平成20年度研究成果：Mizuta K. et al.:Jpn.J.Infect.Dis.61:196-201,2008）を使用し、ウイルス分離を行った。2004年から2009年までにVeroE6細胞で分離されたhMPVは、年毎にそれぞれ18株、61株、49株、62株、57株、33株の合計280株となった。これらの分離株について、F領域の441bpsの遺伝子配列、遺伝子型を決定した。

C.研究結果

ウイルス分離の結果から、ピークを単純に月

別ウイルス分離数で見ると、2004年から2009年まで、それぞれ、4月、5月、5月、12月、1月、3月となった。

季節性を見ると、2004年は1-3月のみ、2008年は1-6月のみ、分離が認められたが、その他の年はほぼ1年を通してhMPVは分離された。しかし、いずれの年も9-11月頃は分離数が少ない傾向にあった。

遺伝子型としては、A1を除くA2,B1,B2が観察された。A2は2004年を除き毎年、B1は2004年の1株を除き2005年のみ、B2はすべての年に検出された。

D.考察と結論

hMPVは1年中流行しうるが、3-5月頃の春に多く、9-11月頃の秋に少ない傾向があった。しかし、2007年12月から2008年1月に流行が見られたように、流行パターンは年によってさまざまであり、サーベイランスは継続して実施していかなければならないことは言うまでもない。

遺伝子型で見るとA2,B2がほぼ毎年検出される一方、B1が流行したのは2005年のみであった。このことから、地域における流行の主体はA2,B2である可能性が示唆された。A1が山形・日本国内に本当に存在しないのか、あるいはB1のように数年に1回出現するのか、引き

続き広域で長期的に観察を続けていく必要がある。

F.研究発表

1. 論文発表

- 1) Mizuta K., Aoki Y., Suto A., Ootani K., Katsushima N., Itagaki T., Ohmi A., Okamoto M., Nishimura H., Matsuzaki Y., Hongo S., Sugawara K., Shimizu H. and Ahiko T. Cross-antigenicity among EV71 strains from different genogroups isolated in Yamagata, Japan, between 1990 and 2007. *Vaccine* 27:3153-3158,2009
- 2) Hishinuma-Igarashi I., Mizuta K., Saito Y., Ohuchi Y., Noda M., Akiyama M., Sato H., Tsukagoshi H., Okabe N., Tashiro M., and Kimura H.: Phylogenetic analysis of human bocavirus (HBoV) detected from children with acute respiratory infection in Japan. *J.Infect.* 58(4):311-3,2009
- 3) Akiyama M., Kimura H., Tsukagoshi H., Taira K., Mizuta K., Saitoh M., Nagano M., Sutoh A., Noda M., Morita Y., Sakatsume O., Okabe N. and 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.*58:638-43,2009

- 4) Aoki Y., Mizuta K., Suto A., Ikeda T., Abiko C., Yamaguchi I., Miura K., and Ahiko T. Importation of the evolving measles virus genotype D9 to Yamagata, Japan from Thailand in 2009. *Jpn.J.Infect.Dis.* 62:481-482
- 5) 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.

2. 学会発表

- 1) 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
- 2) 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

ヒトマスト細胞による気管支喘息の発症と気道リモデリングについて、
RS ウイルス感染も含めて

研究協力者 岡山 吉道 日本大学大学院医学研究科

A. 研究目的

気管支喘息患者において、持続する気道過敏性は、Th2 依存性の炎症で惹起されるのではなく、気道リモデリングによると考えられている。気道リモデリングはステロイド治療に抵抗性を示し、喘息の重症例、難治症例との関連が報告されている。現在、喘息の重症、難治症例の治療法の開発が最重要課題である。マスト細胞は 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ることはよく知られているが、マスト細胞がこの気道のリモデリングにも関与しているのかは不明であり、その詳細を検討することを目的とし、さらに RS ウイルス感染による喘息発作の機序を解明することを目的とした。

B. 研究方法

喘息の重症化あるいは気道リモデリングに関与があると考えられている Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) および amphiregulin さらに、RS ウイルス感染時単球系細胞からは血小板活性化因子 (platelet activating factor; PAF) が産生されるが、その受容体である PAF 受容体のヒト培養マスト細胞における発現を RT-PCR, FACS あるいは ELISA で検討した。また、これら蛋白のヒト肺マスト細胞における発現を *in vivo* で調べるため喘息患者および健康人の気管支粘膜の免疫組織化学染色を施行した。また、喘息患者および疾患コントロールの喀痰中のトリプターゼや amphiregulin, および EGF を測定した。また、ヒトマスト細胞に RS ウイルスを添加し、脱顆粒の有無を検討した。

C. 研究結果

1. IL-4 によるヒトマスト細胞における FcεRI 依存性 Thymic Stromal Lymphopoietin 発現の増強

FcεRI 依存性刺激でマスト細胞における TSLP mRNA 発現は 5.2 ± 2.9 倍に、IL-4 の前処置で 54 ± 16 倍に増加した ($P < 0.05$)。IL-4 の前処置後 FcεRI 依存性刺激 24 時間でマスト細胞内 TSLP 蛋白は有意に増加するも細胞上清では感度以下であった。産生遊離された TSLP は Protease で分解されたが monensin を使用し FACS で産生を確認した。IL-4 の至適前処置時間は 5 日から 7 日であった。全マスト細胞中の TSLP 陽性マスト細胞数比率は喘息患者で健康人に比較して統計学的有意に増加していた ($P < 0.0001$)。

2. FcεRI 依存性の刺激によりマスト細胞から産生される amphireglin は気道において喀痰産生および胚細胞化生に関与する

FcεRI の架橋によってマスト細胞から産生された、EGF のひとつである amphiregulin によって濃度依存性にヒト肺 mucoepidermoid carcinoma cell line NCI-H292 細胞における mucin (MUC) 2, MUC5AC mRNA の発現は増強を認めた。喘息患者の気管支粘膜においては 30% 程度のマスト細胞が amphiregulin 陽性であり、約 80% 以上の amphiregulin 陽性細胞がマスト細胞であった。正常コントロールでは amphiregulin 陽性細胞はほとんど存在しなかった。amphiregulin 陽性マスト細胞数と杯細胞の過形成の程度が統計学的有意な正の相関を示した。我々は喘息児の急性喘息発作時、回復期、安定期の喀痰中の amphireglin 濃度を測定したところ、急性喘息発作時のみ amphireglin 濃度は高値を示し、この濃度は喀痰中のトリプターゼ濃度と統計学的有意な正の相関を示した。

一方、疾患コントロールの感冒罹患児の喀痰中の amphireglin 濃度はほとんどの症例において感度以下であった。Amphireglin を添加しヒト正常気道上

皮細胞を数週間培養すると胚細胞化生が認められた。

3. PAFによるマスト細胞の活性化

PAF 受容体の発現は肺マスト細胞、および成人末梢血由来培養マスト細胞に高く、皮膚マスト細胞では非常に低かった。それに相関するがごとく、PAF 刺激で肺マスト細胞、および成人末梢血由来培養マスト細胞はヒスタミンを遊離するが、皮膚マスト細胞ではヒスタミン遊離は認められなかった。PAF 刺激によって即座に成人末梢血由来培養マスト細胞の細胞内カルシウムの上昇が観察され、それは PAF 受容体拮抗薬で阻害された。この PAF 刺激による脱顆粒は部分的に細胞外カルシウムを要求し、脱顆粒は即座であり、5 秒で完成した。PAF 刺激は PAF 受容体にカップルした $G\alpha_i$ を介し、PLC γ_1 と PLC β_2 の活性化により脱顆粒を惹起した。Protein kinase C (PKC) の阻害薬で PAF による脱顆粒は抑制された。

4. RS ウイルスのヒトマスト細胞に対する影響

RS ウイルスは MOI 10 までのウイルス量ではヒトマスト細胞には感染しなかった。RS ウイルスは MOI 10 のウイルス量でヒトマスト細胞の脱顆粒を惹起した。RS ウイルスは MOI 1 のウイルス量でヒトマスト細胞の IgE 依存性の脱顆粒を増強した。RS ウイルス感染児で初回の喘鳴時に喀痰中のトリプターゼ濃度が高いドナーがいることがわかった。

D. 考察

ヒトマスト細胞から喘息の重症化あるいは気道リモデリングに関与があると考えられている TSLP および amphiregulin が産生され、RS ウイルス感染時単球系細胞からは PAF が産生されるが、その受容体である PAF 受容体がヒト肺マスト細胞に発現していた。RS ウイルス量が気道の局所で非常に高くなるような状況ではマスト細胞の脱顆粒が惹起される可能性が示された。

E. 結論

マスト細胞は 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るのみならず、気道リモデリングにも関与していることが示唆された。マスト細胞は喘息の気道リモデリングの治療や発症の有望な標的となると考えられた。

F. 参考文献

1. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 1720-45, 2000
2. Cockcroft DW, Davis BE. Mechanisms of airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 118:551-9; quiz 60-1, 2006
3. Kariyawasam HH, Aizen M, Barkans J, Robinson DS, Kay AB. Remodeling and airway hyperresponsiveness but not cellular inflammation persist after allergen challenge in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 175:896-904, 2007
4. Woodman L, Siddiqui S, Cruse G, Sutcliffe A, Saunders R, Kaur D, Bradding P, Brightling C. Mast cells promote airway smooth muscle cell differentiation via autocrine up-regulation of TGF-beta1. *J Immunol* 181: 5001-7, 2008
5. Zhen G, Park SW, Nguyenvu LT, Rodriguez MW, Barbeau R, Paquet AC, Erle DJ. IL-13 and epidermal growth factor receptor have critical but distinct roles in epithelial cell mucin production. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36:244-53, 2007

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Okumura S, Yuki K, Kobayashi R, Okamura S, Ohmori K, Saito H, Ra C, Okayama Y: Hyperexpression of NOD2 in intestinal mast cells of Crohn's disease patients; preferential expression of inflammatory cell-recruiting molecules via NOD2 in mast cells. *Clin Immunol* 130: 175-185, 2009.
- 2 Kashiwakura J, Kawakami Y, Yuki K, Zajonc DM, Hasegawa S, Tomimori Y, Caplan B, Saito H, Furue M, Oettgen H, Okayama Y, Kawakami T: Polyclonal IgE can induce mast cell accumulation and cytokine

- production. *Allergol Int* 58(3):411-419, 2009.
- 3 Matsuda A, Okayama Y, Ebihara N, Yokoi N, Hamuro J, Walls AF, Ra C, Hopkin JM, Kinoshita S: Hyperexpression of the high-affinity IgE receptor- β chain in chronic allergic keratoconjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50(6):2871-2877, 2009.
 - 4 Okayama Y, Okumura S, Sagara H, Yuki K, Sasaki T, Watanabe N, Fueki M, Sugiyama K, Takeda K, Fukuda T, Saito H, Ra C: Fc ϵ RI-mediated thymic stromal lymphopoietin production by IL-4-primed human mast cells *Eur Respir J* 34:425-435, 2009.
 - 5 Matsuda A, Okayama Y, Terai N, Yokoi N, Ebihara N, Tanioka H, Kawasaki S, Inatomi T, Katoh N, Ueda E, Hamuro J, Murakami A, Kinoshita S: The role of interleukin-33 in chronic allergic conjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50(10):4646-4652, 2009.
 - 6 Yamaoka K, Okayama Y, Kaminuma O, Katayama K, Mori A, Tatsumi H, Nemoto S, Hiroi T: Proteomic approach to Fc ϵ RI aggregation-initiated signal transduction cascade in human mast cells. *Int Arch Allergy Immunol* 149 (Suppl. 1):73-76, 2009.
 - 7 Enomoto Y, Orihara K, Takamasu T, Matsuda A, Gon Y, Saito H, Ra C, Okayama Y: Tissue remodeling by hypersecreted epidermal growth factor and amphiregulin in the airway following an acute asthma attack. *J Allergy Clin Immunol* 124: 913-920, 2009.
 - 8 Matsuda A, Ebihara N, Yokoi N, Okayama Y, Watanabe Y, Kawasaki S, Tanioka H, Kawasaki S, Walls AF, Hamuro J, Kinoshita S, Murakami A: Basophils in the giant allergic keratoconjunctivitis. *Brit J Ophthalmol* 2010 In press.
 - 9 Kajiwara N, Sasaki T, Bradding P, Cruse G, Sagara H, Ohmori K, Saito H, Ra C, Okayama Y: Activation of human mast cells through the platelet activating factor receptor. *J Allergy Clin Immunol* 2010 In press.
2. 学会発表
 - 1 岡山吉道, 松田彰, 羅智靖: マスト細胞と高親和性 IgE 受容体 (シンポジウム 12 アレルギーと炎症細胞), 第 21 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 岐阜, 2009. 6. 6
 - 2 Ra C, Nunomura S, Suzuki Y, Okayama Y: Regulation of mast cell activation by Fc \cdot RI \cdot chain (International symposium: eosinophils, other inflammatory cells and molecules in allergy), 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 秋田, 2009. 10. 31
 - 3 岡山吉道, 松田彰, 小野芳啓, 羅智靖: アトピー関連遺伝子 ST2, IL-33 のアレルギー疾患における発現と発現機序 (ワークショップ 4 アレルギーの感作成立=発症なのか?), 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 秋田, 2009. 10. 29
 - 4 松田彰, 岡山吉道, 海老原伸行, 横井則彦, Andrew Walls, 羽室淳爾, 木下 茂: アトピー角結膜炎患者巨大乳頭組織における好塩基球の存在, 第 33 回角膜カンファレンス 大阪, 2009. 2. 19
 - 5 松田彰, 海老原伸行, 横井則彦, 川崎諭, 谷岡秀敏, 岡山吉道, 羽室淳爾, 木下 茂: インターロイキン 33 と慢性アレルギー性結膜炎, 第 113 回日本眼科学会総会, 東京, 2009. 4. 16
 - 6 Okayama Y, Kajiwara N, Saito H, Ra C: Activation of PAF receptor via PLC \cdot 2 activation leads to degranulation in human lung mast cells. 第 49 回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2009. 6. 14
 - 7 Okayama Y, Sagara H, Fueki M, Sasaki T, Sugiyama K, Fukuda T, Saito H, Ra C: Fc \cdot RI-mediated thymic stromal lymphopoietin production by IL-4-primed human mast cells. 第 19 回国際喘息学会日本北アジア部会, 東京, 2009. 7. 10
 - 8 権寧博, 寺門正裕, 関山明子, 神津悠, 竹下郁子, 松本健, 岡山吉道, 橋本修, 羅智靖: ErbB 受容体シグナルによる気道上皮透過性バリア機能の制御 (ミニシンポジウム), 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 秋田, 2009. 10. 29
 - 9 榎本幸典, 折原芳波, 高増哲也, 松田明生, 権寧博, 齋藤博久, 羅智靖, 岡山吉道: 気管支喘

息急性発作時に過剰産生される EGF と Amphyregulin の気道リモデリングへの関与の検討 (ミニシンポジウム), 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 秋田, 2009. 10. 31*

- 10 Okayama Y, Matsuda A, Sasaki T, Nunomura S, Ra C: The role of human Fc \cdot RI \cdot chain expressed in human mast cells in allergic

diseases 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 2009. 12. 2

- 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）
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：ライノウイルスの詳細な分子疫学解析に関する研究

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
	水田克巳	山形県衛生研究所
	平田明日美	栃木県保健環境センター
	塚越博之	群馬県衛生環境研究所
研究分担者	野田雅博	国立感染症研究所ウイルス第三部

研究要旨

ヒトライノウイルス（HRV）は、common cold の原因のみならず気管支炎や感染喘息の起因になりうることを示唆されている。今回、2003～07年に山形県で分離された急性呼吸器感染症（ARI）小児由来76株のHRV-A species（HRV-A）のVP4/VP2遺伝子領域の詳細な分子疫学解析を行った。その結果、分離株は、解析部位の塩基及びアミノ酸配列の相同性は各々66.6～100%、84.7～100%であり、系統解析では各々11あるいは8クラスターに分類された。以上のことから、多様な遺伝学的特徴を有するHRV-Aが山形県で流行していたことが推定された。

A. 研究目的

ヒトライノウイルス（HRV）は、common cold の原因のみならず、ウイルス性気管支炎や肺炎あるいは感染喘息（Virus-induced asthma）の原因となる呼吸器ウイルスである。特に、HRV species A（HRV-A）は多種類（血清型で数十種類以上）存在し、HRVによる感染症の主流となっていることが示唆されている。このような背景から、HRV-A

は重要な呼吸器ウイルスとして再認識されるようになってきている。しかし、過去20年以上、分子疫学解析を含む、HRV-Aの新たな知見は世界的にも極めて少ないのが現状である。そこで、今回、2003～07年に山形県で分離された急性呼吸器感染症（ARI）小児由来76株のHRV-A species（HRV-A）のVP4/VP2遺伝子領域の詳細な分子疫学解析を行った。

B. 研究方法

1. ウイルス

感染症発生動向調査により得られた76株のHRV-A（小児ARI由来）を材料とした。

2. RT-PCR、シーケンス及び系統樹解析

RT-PCR及びシーケンスは常法に従っ

た¹⁾。塩基（390bp）ならびにアミノ酸配列（130aa）に基づく系統樹は、Kimura-2 parameter法（bootstrap 1000回）により作成した。Interspecies及びintercluster pairwise distanceは常法により計算した。また、遺伝子解析領域において、すでに

GenBankに登録されているHRV-A株の網羅解析を行い、各クラスターの参照株の検討も行った。

C. 研究結果

1. 各クラスターの参照株の遺伝学的距離

図1に塩基配列、図2にアミノ酸配列を基にした参照株の系統樹を示す。各参照株の塩基配列を基にした遺伝学的距離は、 0.237 ± 0.030 (mean \pm SD)であった。

2. 分離株と参照株の相同性解析結果及び系統樹解析結果

分離株の相同性は塩基配列レベルでは、66.6~100%、アミノ酸配列レベルでは84.7~100%であった。また、図3に塩基配列、図4にアミノ酸配列を基にした分離株及び参照株の系統樹を示す。上述の株は、塩基配列に基づく系統樹解析では、11クラスター、アミノ酸配列に基づく系統樹解析では、8クラスターに明瞭に分類された。76株のうち、6株は臨床的に喘鳴を伴う気管支炎患者由来のHRV-Aであったが、それらの株は、塩基配列に基づく系統樹上では、クラスター2、3、5あるいは9、アミノ酸配列に基づく系統樹では、クラスター3、7あるいは8に位置した。

3. 分離株及び参照株の interspecies 及び intercluster pairwise distance

図5に塩基配列、図6にアミノ酸配列及び分離株及び参照株の interspecies 及び intercluster pairwise distance を示した。すべての株において、塩基配列を基にした interspecies distance は、 0.235 ± 0.048 、アミノ酸配列を基にした interspecies distance は、 0.076 ± 0.033 であった。

D. 考察

以上のことから、今回解析したHRV-Aは、遺伝学的多様であると同時に塩基配列を基にした系統樹上では11クラスター、アミノ酸を基にした系統樹上では8クラスターに

分類されることがわかった。また、これらのウイルスは種々の呼吸器ウイルス感染症（上記道炎、気管支炎など）に密接に関与していることが明らかになった。また、解析した株数は少ないものの、気管支炎から分離されたウイルスは特定のクラスターに分類されることも明らかになった。一般に、HRVは、軽症のかぜ症候群、common cold を引き起こすウイルスとしてよく知られている。しかし、最近では、HRVは、他の呼吸器ウイルス、例えばRSウイルス、ヒトメタニューモウイルスやパラインフルエンザウイルスと同様に気管支炎や肺炎の原因となることも知られている²⁾。また、HRVは、喘息の発症や増悪にも密接に関与するウイルスとして認識されるようになってきている²⁻⁴⁾。さらに、近年、培養できない新しい種、HRV-Cも種々のARIに密接に関与することが明らかになりつつある。それゆえ、HRVの疫学的な知見は重要であると考えられる。しかしながら、今まで、特に本邦も含めたアジア地域におけるHRVの疫学はほとんどわかっていない。今後、本研究と同様に、他のHRV、HRV-B及び-Cに関する詳細な分子疫学解析も必要であろう。

E. 結論

本邦で分離されたHRV-Aは、遺伝学的に多彩であるとともに種々の呼吸器ウイルス感染症に関与していることが明らかになった。

F. 参考文献

1. Savolainen C, Blomqvist S, Mulders MN, Hovi T, 2002. Genetic clustering of all 102 human rhinovirus prototype strains: serotype 87 is close to human enterovirus 70. *J. Gen. Virol.* 83, 333-340.
2. Jackson DJ, Gangnon RE, Evans MD, Roberg KA, Anderson EL, Pappas TE,

- Printz MC, Lee WM, Shult PA, Reisdorf E, Carlson-Dakes KT, Salazar LP, DaSilva DF, Tisler CJ, Gern JE, Lemanske RF Jr, 2008. Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high-risk children. *Am J Respir Crit Care Med.* 178, 667–672.
3. Johnston SL, 2007. Innate immunity in the pathogenesis of virus-induced asthma exacerbations. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 4, 267–270.
 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, Kimura H, 2010. Phylogenetic and cluster analysis of human rhinovirus genogroup A (HRV-A) isolated from children with acute respiratory infections in Yamagata, Japan. *Virus Res.* 147 (29), 265-274.
- G. 研究発表**
1. 論文発表
 1. Hishinuma-Igarashi I, Mizuta K, Saito Y, Ohuchi Y, Noda M, Akiyama M, Sato H, Tsukagoshi H, Okabe N, Tashiro M, Kimura H, 2009. Phylogenetic analysis of human bocavirus (HBoV) detected from children with acute respiratory infection in Japan. *J Infect.* 58(4), 311-313.
 2. Nakamura M, Itokazu K, Taira K, Kawaki T, Kudaka J, Nidaira M, Okano S, Koja Y, Tamanaha K, Kimura H, Noda M, 2009. Genotyping and phylogenetic analysis of G protein gene in respiratory syncytial virus (RSV) prevalent in Okinawa, Japan 2008. *Jpn. J. Infect. Dis.* 62(4), 326-327.
 3. 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-toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae*, 2009. *Jpn. J. Infect. Dis.* 62(4), 327-329.
 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, Kimura H, 2010. Phylogenetic and cluster analysis of human rhinovirus genogroup A (HRV-A) isolated from children with acute respiratory infections in Yamagata, Japan. *Virus Res.* 147 (29), 265-274.
 5. Toda S, Kimura H, Noda M, Mizuta K, Matsumoto T, Suzuki E, Shirabe K. 2010. Phylogenetic Analysis of Human Metapneumovirus from Children with Acute Respiratory Infection in Yamaguchi, Japan during Summer 2009 Japanese Journal of Infectious Diseases, in press.
 6. Kurosawa H, Fujita M, Kimura H, Kobatake S, Ohshima M, Nagai A, Kaneko S, Iwasaki S, Kozawa K, 2010. A Case of *Legionella* pneumonia Linked to a Hot Spring Facility in Gunma Prefecture, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* in press.
 2. 学会発表

なし
- G.知的財産権の出願・登録状況**
- なし

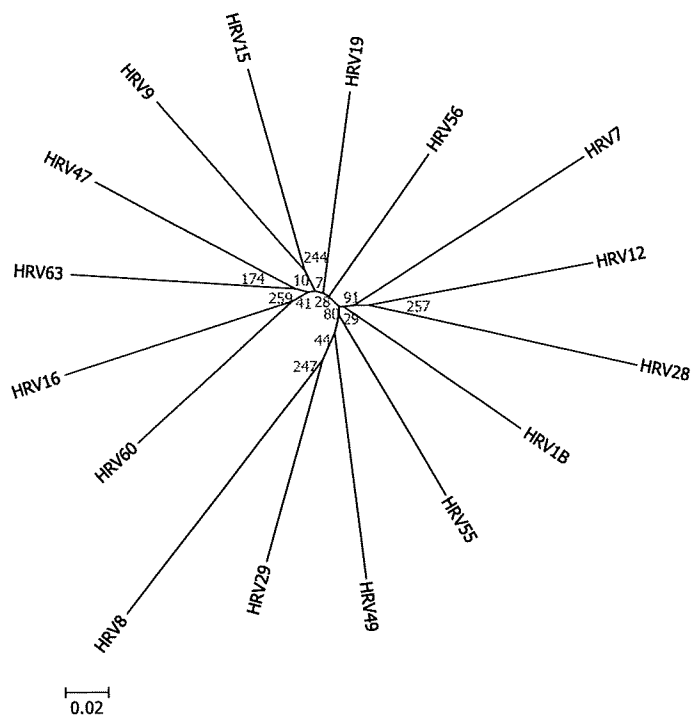


図1 HRV-A 参照株の VP4/VP2 領域の塩基配列を基にした分子系統樹

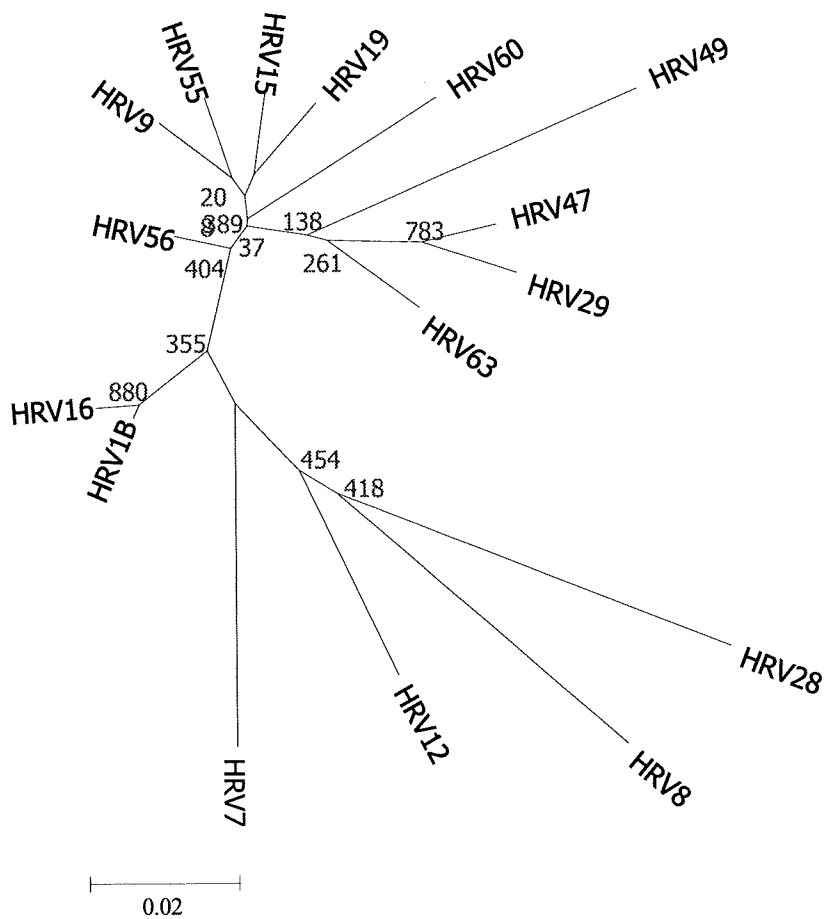


図2 HRV-A 参照株の VP4/VP2 領域のアミノ酸配列を基にした分子系統樹