

重症心身障害児（者）病棟における感染症の流行について

研究協力者 松田俊二 国立病院機構愛媛病院
小村珠喜 島根県保健環境科学研究所

研究要旨

国内には約 200 の重症心身障害児（者）施設があるとされている。それぞれの施設では感染症の流行がしばしば発生して問題となっている。本研究では感染症流行の現状とその病原体を調べることを目的とした。5 人以上が同一の症状を示した場合を流行とすると、全国 49 施設を対象とした調査では 1 病棟あたり 0.5 回/年の流行があり、愛媛病院を含む中四国の 10 施設では 1 病棟あたり 0.5～1 回/年の流行がみられた。流行する病原体では、同定できているものではインフルエンザウイルスとノロウイルスが多かったが、半数以上は病原体不明の呼吸器感染であった。迅速検査（アデノウイルス、RS ウイルス、ストレプトコッカス）ではストレプトコッカスが散発的に陽性であった以外はほとんどが陰性で、流行との関連は不明であった。流行時のウイルス検索（咽頭・鼻腔ぬぐい液の PCR 検査とウイルス分離）では、愛媛病院の平成 21 年 11 月の呼吸器感染症流行でヒトライノウイルス（HRV）が、また平成 22 年 4 月の呼吸器感染症流行ではメタニューモウイルス（HMPV）が確認された。ストレプトコッカス、HRV、HMPV、マイコプラズマ感染者の臨床経過・症状にはそれぞれ特徴がみられた。HRV は流行性が強かったが症状は軽く数日で回復した。HMPV は流行性は中等度であったが症状は強く 1 週間ほど持続した。今後のさらに病原体の検索や症状と比較をすすめ、流行防止を図ることが重要である。

A. 研究目的

国内には重症心身障害児（者）施設（長期滞在型の療養施設）が多数あり、平成 17 年の時点で全国では 180 施設、収容人員は 17,875 人であり、国立病院機構施設への入院患者がその内の 40%以上を占めている。

これらの各施設では多人数が長期間入院生活を送っているため、感染症の流行がしばしばみられて問題となっている。しかし、これら流行する感染症の詳細は十分には解明されていない。インフルエンザウイルス（InfV）やノロウイルス（NV）感染の流行は容易に同定されるが、それ以外の感染症（多くは呼吸器感染症）はほとんどが病原体不明のままである。そこで、全国と中四国の国立病院機構施設を対象にアンケート調査を行った（一昨年報告）。さらに、愛媛病院を対象として、感染症の病棟内流行状況を 4 年間追跡した。流行時の咽頭・鼻腔ぬぐい液から迅速検査キットや PCR・

ウイルス分離などで病原体の検出を試みた。病原体の同定された場合は臨床経過・症状を比較検討した。

B. 研究方法

国立病院機構愛媛病院の重症心身障害児（者）病棟（入院患者 160 人）での平成 19 年から 22 年の 4 年間の感染症流行について調査を行った。全国アンケート調査の時と同様に感染症の病棟内流行を同一症状の患者が同時期に 5 名以上発生した場合とした。

さらに、愛媛病院重症心身障害児（者）施設内での平成 19 年 11 月 15 日から平成 22 年 10 月末までの感染症発症者について以下の 4 種類の検査キットを用いて病原体検索を行った。

1. インフルエンザウイルス抗原（ポステムインフルエンザ A/B、シスメックス社）
2. 咽頭アデノウイルス抗原（イムノカード ST アデ

ノウイルス、TFB 社)

3. 鼻腔 RS ウイルス抗原 (イムノカード ST RSV, TFB 社)

4. 咽頭 A 群 β 溶連菌抗原 (イムノカード EX ストレップ A, TFB 社)

一部の流行では、感染者の咽頭と鼻腔ぬぐい液を島根県保健環境科学研究所に依頼して、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

感染症の流行状況について平成 19 年、21 年にアンケート調査を行ったが、全国調査では感染症流行回数は 0.49 回/病棟/年で、病原体は InfV と NV が多かったが、最も多いのは病原体不明の呼吸器感染症であった (0.2 回/病棟/年)。中四国の 10 施設 (31 病棟) に対する調査でも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 (昨年報告)。

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 22 年 11 月末までの 4 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 と InfV の流行が見られ、平成 19 年 7 月と平成 20 年 4 月にはヘルパンギーナの流行が見られた。その他各年に 2~5 回の病原体不明の感染症流行がみられた。平成 22 年 10 月にはマイコプラズマ感染症の流行が 1 病棟でみられた。病原体不明の感染症流行では経過や臨床症状にも違いがみられ、それぞれ異なる病原体が関係している可能性が考えられた。

表 2 に迅速検査キットを用いた病原体検索の結果を示した。鼻腔拭い液から Respiratory Syncytial ウイルス (RSV) と InfV がそれぞれ 1 名から検出されたが、流行との関係はなかった。咽頭アデノウイルス抗原は全検査で検出されなかった。咽頭ストレプトコッカス抗原は 74 名中 8 名が陽性であったが、散発的であり流行との関係は考えられなかった。

さらに病原体を検索するために地方衛生研究所と共同してウイルス検索を PCR とウイルス分離を用いてお

こなった。表 3 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 (一部は昨年報告)。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、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)。検索 3 では 32 症例の検体のうち 4 症例から HMPV、1 症例からエンテロウイルス 71 が検出された。HMPV は系統樹解析からサブグループ B2 の同一株由来であった。検索 2、3 の結果からこの 2 つの感染症流行は HHRV と HMPV によると考えられ、臨床経過や症状との比較検討を行った。またマイコプラズマが複数検出された流行 (検索 4) についても比較検討を行った。

表 4 に病原体が検出された流行の特徴をまとめた。ストレプトコッカス陽性例は散発的で流行性は低いと考えられ、比較的高熱が多かったが持続期間は一定しなかった。HRV は流行性が非常に高く、短期間に多数に波及した。しかし、低熱であり数日で回復する例が多く、合併症も少なかった。HMPV は流行性は中等度 (HRV より低い) と考えられた。しかし、高熱が 1 週間くらい持続し、肺炎合併例も少数みられた。リンパ球減少と単球増加がみられた。マイコプラズマは流行性は低いが、肺炎・気管支炎が多く、症状も多様であった。

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ろうと推察された。

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。HRV は 10~11 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。また流行性が非常に強く感染防策にも関わらず拡大した。HMPV は 3~4 月の流行で検出され、症状が重篤である特徴があった。

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）や症状の詳細の解明には、さらに調査研究が必要である。

E. 研究発表

1. 論文発表

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。国立医療学会誌、医療 62(12):679-683, 2008

2) 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

2) 松田俊二、小村珠喜、野田雅博：重症心身障害児（者）病棟における呼吸器感染症の流行について。第 80 回日本感染症学会西日本地方会、平成 22 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 respiratory syncytial 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：ディップスティ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

5. 高尾信一、下藁広行、柏宏ら：本邦において初めて確認された小児の human metapneumovirus 感染症の臨床的、疫学的解析。感染症学会 雑誌 78:129-37, 2004

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
	23 病棟 (4/8-4/25)	患者 20 名 (疑い 12 名)
インフルエンザ	21 病棟 (7/27-8/4)	患者 9 名
ヘルパンギーナ	21 病棟 (3/11-3/19)	患者 21 名
不明熱	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1月1日～12月31日 (40、60、60名/病棟)

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

2010年1月1日～10月31日 (40、60、60名/病棟)

不明熱	23 病棟 (2/1-2/19)	患者 22 名
	21 病棟 (3/8-3/30)	患者 16 名
	22 病棟 (4/1-4/12)	患者 16 名
	23 病棟 (7/8-7/19)	患者 11 名
マイコプラズマ感染症	22 病棟 (10/1-10/31)	患者 9 名

表 2. 上気道感染の病原体の迅速検査法による検索

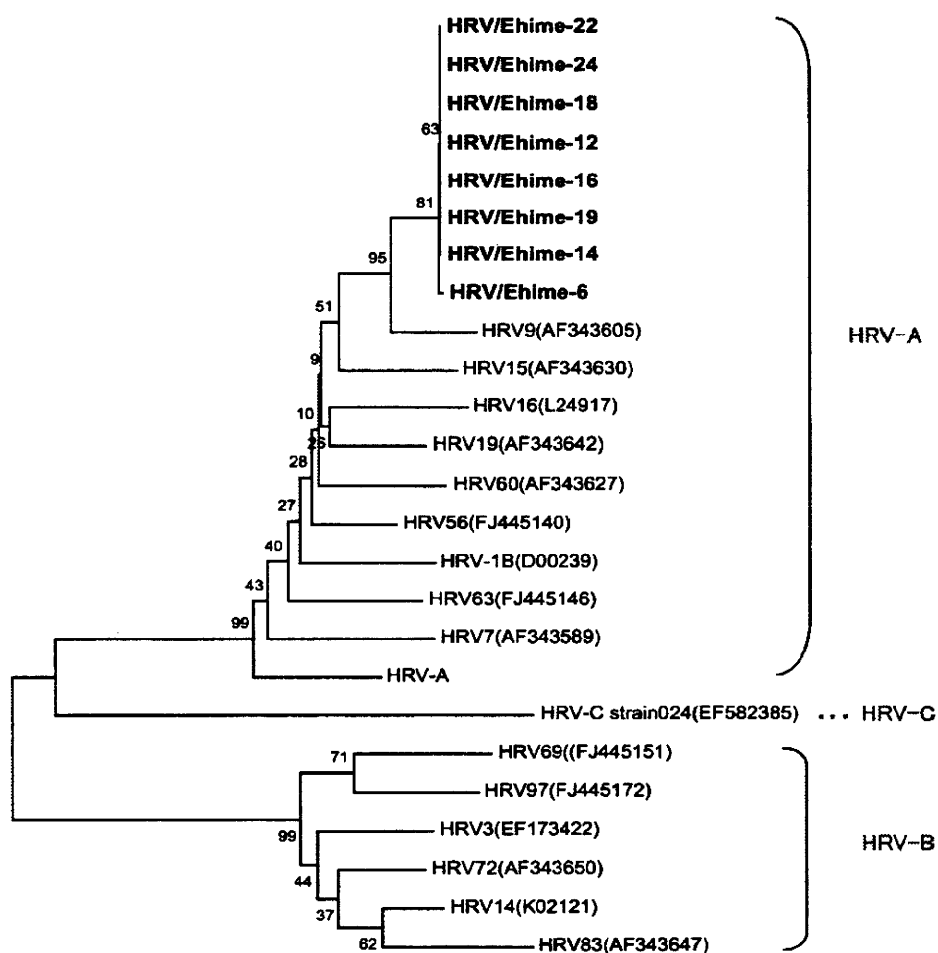
期間	インフルエンザ A (ポステム)	インフルエンザ B (ポステム)	RSV(イムノカード ST)	アデノウィルス(イムノカード ST)	ストレプト A (イムノカード EX)
2007/11/15- 2008/3/31	0/21	0/21	1/23	0/23	+ - + + 5/18 (± 5/18)
2008/4/27- 2008/12/27	1/7	0/7	0/7	0/7	(± 2/7)
2009/1/17- 2009/12/11	0/14	0/14	0/38	0/26	++ 2/26 (± 2/26)
2010/2/5- 2010/10/30	0/12	0/12	0/21	0/23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

表 3. 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>
3	<p>検体採取期間： 2009年11月17日～2010年4月9日</p> <p>検体： 32症例の咽頭・鼻腔ぬぐい液 各32検体</p> <p>結果： PCR 4症例の咽頭 and/or 鼻腔ぬぐい液より HMPV 検出</p>

表 4. 病原体と臨床経過・症状との比較

病原体	治療	流行性	臨床症状	検査
ストレプトコッカス	抗生剤有効	± (1 週間前後)	低～高熱 +2 : 気管支炎、肺炎	好中球増加 CRP 上昇
HRV	対症療法	+3 (数日間)	低熱、鼻汁、 ± : 気管支炎、肺炎	変動なし
HMPV	対症療法	+2 (1 週間前後)	高熱、 ± : 気管支炎、肺炎	リンパ球減少、 CRP 上昇
マイコプラズマ	抗生剤有効	+1 ((数日～1 週間以上))	低～高熱、 +3 : 気管支炎、肺炎	好中球増加 (軽度)



0.05

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

重症呼吸器感染症サーベイランスに係わる実態調査に関する研究

分担研究者

小澤 邦壽 群馬県衛生環境研究所

研究協力者

吉住 正和 群馬県衛生環境研究所

塚越 博之 群馬県衛生環境研究所

研究代表者

木村 博一 国立感染症研究所

研究要旨

RSウイルス (RSV)やインフルエンザウイルス (InfV)などの呼吸器ウイルスは、気管支喘息の増悪や肺炎などの重症呼吸器感染症 (svARI)に関与することが知られている。しかし、本邦における svARI の実態は明らかとなっていない。そこで、全国 77 カ所の地方衛生研究所(地研)等に、アンケート調査を行い、感染症発生動向調査に基づく svARI の実態を明らかにした。2007 年度の結果では、全国で 2,000 件を超える検体を地研が検査を行っていた。検出された起因ウイルスは InfV や RSV が多かったが、60%以上の症例では起因病原体は不明であった。

A. 研究目的

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

一方、地方衛生研究所等では感染症発生動向調査に基づき、5 類感染症である RSV や InfV などの検査診断を行っているが、svARI の感染症発生動向調査における検査状況などの実態はほとんど明らかになっていない。そこで、本研究では、感染症発生動向調査に基づく svARI の実態を解明し、呼吸器ウイルス感染と svARI との関連を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

地方衛生研究所全国協議会のネットワークを活用し、全国 77 カ所の地方衛生研究所等を対象とした svARI に関するアンケート調査を実施した。本調査では、重症呼吸器感染症を、①気管支炎、②細気管支炎、③クループ様疾患、④気管支喘息、⑤肺炎、⑥喉頭炎、⑦気管支肺炎、⑧38℃以上の発熱 + 下気道炎と定義し、感染症発生動向調査の結果を基に、臨床症状（発熱や下気道炎など）、検出方法（ウイルス分離や PCR など）、検出結果（RSV、InfV、不検出など）、さらに集団発生などの情報について調査を行った。なお、倫理面への配慮として、本研究においては、感染症発生動向調査事業に基づく検体情報を扱っており、個人情報の保護に十分配慮して行った。

C. 研究結果

77 の地方衛生研究所等のうち、svARI の検査診断を

行わない10施設を含む69施設から回答が得られた(回答率 89.6%)。アンケート調査の結果、得られた2007年度における総検体数は、2,481検体であった。一つの地方衛生研究所で検査されたsvARI由来の検体は、平均で36検体であったが、検体数には施設間で大きなばらつきがあった(最大222検体, 最小0検体)。また、冬期や春期において検体数が、多くなる傾向が見られた(図1)。一方、2007年度において、最も多く検出されたウイルスは、InfVであり、全体の10.0%であった(図2)。次いで、RSVも多く検出されており、HMPVなどが原因となることも明らかとなった。一方で、全体の60%以上の検体では、病原体(ウイルス)が検出されておらず、原因が不明となっている検体が数多く存在することも明らかとなった。また、秋期から冬期にかけての検体数の増加は、InfVやRSVの流行によることが推測された(図3)。

D. 考察

本研究の結果から、2007年度においては全国の地方衛生研究所等において、2,000件以上のsvARIの検体が検査されている。しかし、本邦におけるsvARI患者数は、推定で100万人以上存在することを考慮すると、本疾患においては調査期間中においては、十分な病原体サーベイランスが行われていないと考えられた。現行の感染症法においては、臨床検体の提供が義務化されていないため、ボランティアベースによる主治医の協力に頼っている点が多い。したがって、svARIのサーベイランスを強化するためには、新たな検体提供および収集システムの構築が必要であることも示唆された。また、本研究においては、InfVやRSVが多くのsvARIから検出されているが、検体数と検出ウイルスには各施設間で大きな差がある。また、過半数の検体においては起因病原体が不明となっていることから、検査設備などのさらなる充実も必要であることが推定された。

E. 結論

感染症発生動向調査に基づきsvARIの実態を把握す

る研究を行った結果、最も多く検出されたウイルスはInfVとRSVであった。また、過半数の検体からは起因ウイルスが検出されなかった。今後、有効なsvARIのサーベイランスを実施するには、病原体サーベイランスの義務化、各地研の検査設備や検査体制の整備が必要であると思われた。

F. 参考文献

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

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.* 2010. doi: 10.1111/j.1399-3038.2010.01026.x. [Epub ahead of print]
- 3) Yoshizumi Y, 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 Microbiol.* 2010; 1 (Article124):1-7.

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

I. その他

謝辞

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

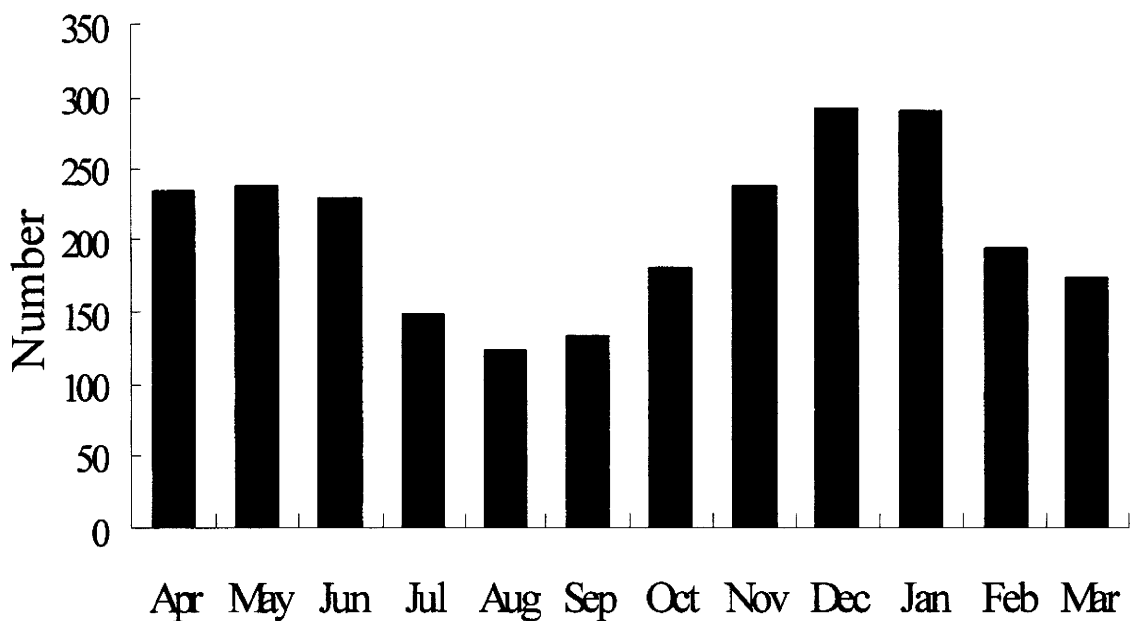


図1 季節における検体数の推移

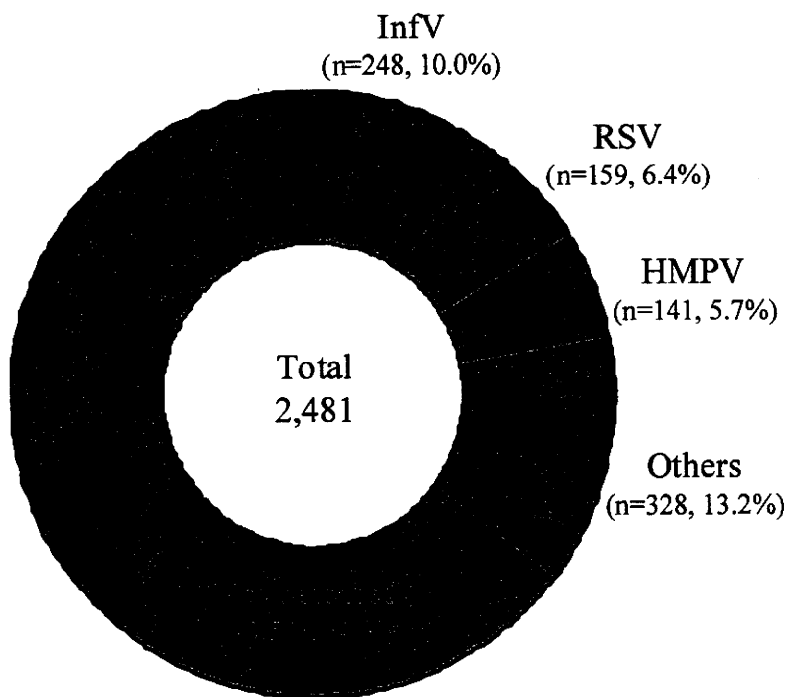


図2 svARI検体のウイルス検出状況

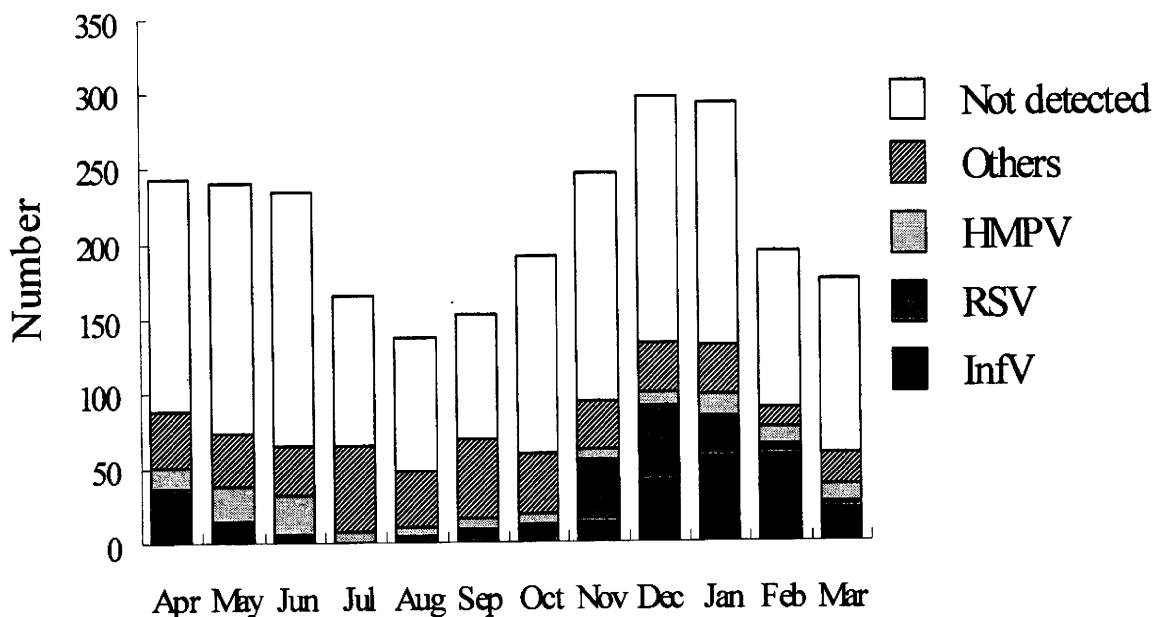


図3 季節におけるウイルス検出状況

呼吸器系ウイルスの遺伝子検出法に関する検討に関する研究

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

研究要旨

呼吸器疾患は、感染症の中で小児の死亡、入院原因の大きな割合を占めている。その大半はウイルス性の感染症であり、病原体サーベイランスにおけるウイルス検出は重要である。変異率の高い RNA ウイルスの PCR による検出は、変異をもつ配列データの蓄積にともなって primer の見直しが必要となると考えられる。また、RNA ウイルス検出用 PCR の標的遺伝子は、変異の少ない polymerase 等の細胞内タンパク質をコードする遺伝子が選択されているが、血清型を反映することが出来ないため今後、表面抗原遺伝子を標的とする PCR に変更することを検討する必要がある。今回、human metapneumovirus, RS virus を例に検討を行った。

A. 研究目的

現在、地方衛生研究所で特に RNA ウイルスの検出に用いられている PCR primer の妥当性を評価することを試みた。

B. 研究方法

病原体サーベイランス事業において呼吸器症状を呈した患者から採取された合計 208 検体について、地方衛生研究所で標準的に用いられている PCR 法により、ヒトライノウイルス(HRV)、エンテロウイルス(EV)、Respiratory syncytial ウイルス(RSV)、ヒトパラインフルエンザウイルス(PIV)、ヒトメタニューモウイルス(hMPV)、ヒトボカウイルス(hBoV)について検索を行った。

2010 年に呼吸器症状を呈して、医療機関を受診した患者から採材された検体（咽頭拭い液または鼻汁）から RNA を抽出後、HRV、EV は EVP4/EVP2 領域、RSV は N 遺伝子、PIV は HN、

P 遺伝子、hMPV は F 遺伝子、hBoV は NP1 領域について、PCR 法を行い、増幅された遺伝子については塩基配列の解析を行った。また、用いている primer 配列とデータベース上に登録されている塩基配列の比較を行った。

C. 研究結果

HRVA が 40 件、HRVB が 4 件、HRVC が 31 件、EV68 が 15 件、RSVA が 11 件、RSVB が 14 件、PIV1 は 4 件、PIV2 が 6 件、PIV3 が 13 件、PIV4 が 7 件、hMPV A2 が 7 件、hMPV B2 が 2 件、HBoV が 4 件検出された。不検出の検体は、50 検体で不検出率は約 25%であった。検体は、熟練した小児科医によって採取されており、検体不良の可能性よりも、ウイルス性の感染症ではなかったか、もしくは検出感度が十分でなかった可能性が考えられた。Primer が設計されて以後、多くの塩基配列が登録されていると考えられることから、現在登録されている塩基配列

と PCR primer 配列を比較した。Human metapneumovirus の F 遺伝子の配列と primer 配列の比較では、1st primer set の配列の 2 カ所程度に変異のある配列があり、効率の低下が起こりうると考えられた (表 1、2)。RS virus の N 遺伝子では、forward, reverse primer とともに 4、5 カ所の塩基置換が存在したため検出不能となる変異ウイルスが多く存在すると考えられた (表 3、4)。このことから、検出用 primer の再設計を行う必要が考えられた。表面抗原遺伝子のデータベース上の配列を alignment すると比較的保存された配列を見いだすことが出来たため (data not shown)、表面抗原遺伝子を標的とした primer の設計は可能であると考えられた。

D. 考察

山口県における病原体サーベイランスにおいて呼吸器症状を呈した患者から得られた検体の病原ウイルス遺伝子検出率は、75%であった。遺伝子検出に使用されている primer 配列と報告された配列の比較を行ったところ、特に RS virus については、検出用 primer 配列とデータベース上の報告遺伝子配列との乖離が大きく、このために不検出となるウイルスが存在する可能性が考えられた。

E. 結論

RNA ウイルスの場合、遺伝子配列の変異が蓄積するため、定期的な primer の変更が必要である。今後 human metapneumovirus、RS virus について、ウイルス表面抗原の G protein 遺伝子を増幅する検出系を検討し、検出と同時に塩基配列

によって、より正確な系統樹解析が可能となる検出系を開発する。

F. 健康危険情報

なし

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. Phylogenetic Analysis of Human Metapneumovirus from Children with Acute Respiratory Infection in Yamaguchi, Japan, during Summer 2009, JJID, 63, 139-140, 2010

2) Hasegawa S, Hirano R, Hashimoto K, Haneda Y, Shirabe K, Ichiyama T. Characteristics of pandemic H1N1 influenza viral infection in atopic individuals - Pandemic H1N1 influenza reveals "occult" asthma - Pediatric Allergy and Immunology, in press.

3) Hasegawa, S., Matsushige, T., Inoue, H., Shirabe, K., Fukano, R., Ichiyama, T. Serum and cerebrospinal fluid cytokine profile of patients with 2009 pandemic H1N1 influenza virus-associated encephalopathy Cytokine, in press

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

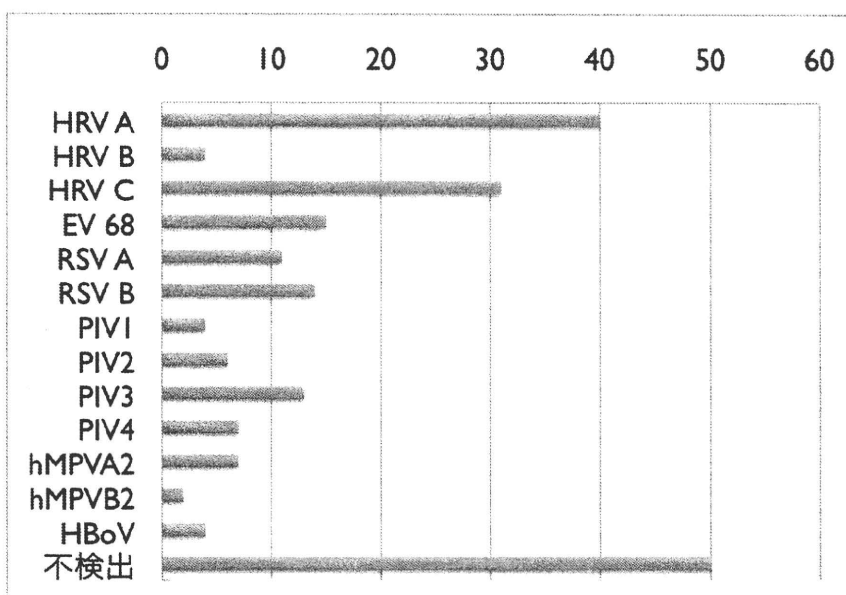


図1 2010年に山口県環境保健センターで検出された呼吸器系ウイルスの検体数

表1 HMPV 検出用 forward primer 配列とデータベース上の変異配列

MPVF1f (F)	CTTTGGACTTAATGACAGATG
gb EF088285.1	CTTTAGACTTAATGACAGATG
gb EU262949.1	CTTTAGACTTAATGCCAGATG

表2 HMPV 検出用 reverse primer 配列とデータベース上の変異配列

MPVF1r (R)	GTCTTCCTGTGCTAACTTTG
MPVF1r (R)相補的配列.	CAAAGTTAGCACAGGAAGAC
gb FJ168779.1	CAAAGTCAGCACAGGAAGAC
gb EU857561.1	CAAGGTCAGCACAGGAAGAC
gb EF589610.1	CAAAGTCTGCACAGGAAGAC

表3 RS virus 検出用 forward primer 配列とデータベース上の変異配列

RSVAB1 (F):5'-	GTCTTACAGCCGTGATTAGG
AB370047 and five other seq.	GTCTTACAGCTGTGATTAGG
RSHBCNP and nine other seq.	GTCTTACAGCAGTAATTAGG
AF295544 and ten other seq.	GCCTCACTGCAGTCATTAGG
DQ780568 and one seq.	GTCTTACAGCAGTAATCAGG
AF054667	GCCTAACTGCAGTCATTAGG

表4 RS virus 検出用 reverse primer 配列とデータベース上の変異配列

RSVAB2(R):5'-	GGGCTTTCTTTGGTTACTTC
RSVAB2(R) compl	GAAGTAACCAAAGAAAGCCC
AF295544	GAATTACCTAAAGAAAGTCC
AF295543 and one seq.	GAATTACCTAAAGAGAGTCC

呼吸器ウイルス遺伝子の網羅解析に関する研究

研究分担者	氏名	黒田 誠	所属	国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター
研究協力者	氏名	栗村正之	所属	米沢市立病院・神経内科
		水田克巳		山形県衛生研究所
		野田雅博		国立感染症研究所・ウイルス第3部
		水谷哲也		国立感染症研究所・ウイルス第1部
		関塚剛史		国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター

研究要旨

呼吸器ウイルスは、かぜ様症候群を引き起こすだけでなく、気管支炎や肺炎などの引き起こす重症呼吸器ウイルス感染症の対策はますます重要になっている。本研究は、次世代シーケンサーの解析能力を駆使し、呼吸器ウイルス感染症患者から供試頂いた検体（各種臓器・組織検体）から核酸配列を網羅的に解読し、検体中に内在する微生物を全て抽出して微生物カタログ作製を目的としている。山形県で小流行した呼吸器感染症の疑いのある不明病検体（咽頭・便検体）の網羅配列解読の結果、便検体から Human parechovirus (HPeV)の塩基配列を検出し、HPeV 全長配列の決定により HPeV-3 型のウイルス感染の疑いがあることを明らかにした。HPeV-3 の VP1 配列に対する特異プライマーを用いて RT-PCR 検査したところ、他便検体から6検体の陽性バンドを確認し、他咽頭・髄液検体からは検出されなかった。不明病態から病原体と想定されるウイルスを網羅配列解読法により偏見無く検出することができた。多種多様に変異導入する RNA ウイルス全てを検出するためには次世代シーケンサーによる検出・鑑別法は有用と考えられる。手法の簡便化と機器類・検査費用の低価格が実現すれば幅広く病原体検査に適応されると想定されるため、将来の先端的な病原体検査法の開発を視野に入れて広範な感染症対策に貢献するシステムを構築していきたい。

A. 研究目的

呼吸器ウイルスは、かぜ様症候群を引き起こすだけでなく、気管支炎や肺炎などの重症呼吸器感染症を引き起こすことがよく知られている。本邦における、重症呼吸器感染症(肺炎)による年間死亡者数は推定で10万人を超えており、新興ウイルス(A(H1N1)pdm や SARS ウイルス)の出現を考慮すると、重症呼吸器ウイルス感染症の対策はますます重要になっている。多くの呼吸器ウイルスの解明が進展している一方、臨床的に重症化した呼吸器ウイルス感染が疑われる症例の半数以上において病原ウイルスが検出されていない。既知ウイルス配列情報のみでは対応できず、不明病態（脳炎、下痢、サイトカインストーム）において病原体の包括的な検索が不可欠になっている。本研究では、次世代シー

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

B. 研究方法

山形県衛生研究所・水田先生から供試頂いた呼吸器感染症の疑いのある不明病検体（咽頭・便検体）を用いて病原体検索を試みた。Viral nucleic acid purification kit, (Roche)にて DNA/RNA 混合サンプルを調整し、total RNA を SuperScript Choice System for cDNA synthesis (Invitrogen)の Radom priming 法にて二本鎖 cDNA(ds-cDNA)に合成した。DNA と ds-cDNA の混合物 2 µg から Genomic DNA sample prep

kit (Illumina)を用いて Illumina DNA ライブラリーを作製した。ライブラリーのインサート長の平均が ~300 bp になるよう調整した。Illumina 社 Genomic Analyzer II により、83 mer の解読リードを約 1000 万本取得するよう調整し、DNA ライブラリーを解読した。解読試薬は、Illumina Sequencing kit (ver. 5) を用いた。解読生データを、Illumina SCS2.8/RTA1.8 にて処理し、fastq フォーマットの配列データを取得した。

全取得解読リードからヒトゲノム配列を削除するため、maq (v.0.71)を用いてヒト・レファレンス配列にマッピングし、マッピングしなかった解読リードを回収した。更に、ヒト・クローン配列 (BAC, Cosmid, Fosmid など) のカスタム・データベースに MEGABLAST 検索してヒト配列を出来る限り削除した。残った解読リードを病原体候補の塩基配列と想定し、NCBI nt および NCBI nr データベースに対し blastn および blastx 検索し、得られた結果を MEGAN (v.3.9.0)にて類似性の見られた生物種の一覧図を得た (MEGAN の閾値: 1 ヒット以上、score 35.0 以上)。

候補病原体の RT-PCR 増幅は、PrimeScript® II High Fidelity One Step RT-PCR Kit (TaKaRa)を用いて行い、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems)と ABI 3700xl DNA sequencer にて配列確定を行った。得られた配列断片を PhredPhrap にてアセンブルし、病原体の全長配列を取得した。

病原体配列のアライメントは、ClustalW による neighbor-joining (NJ) 法で 1000 回の bootstrapping を行って信頼性を評価した。系統樹は FigTree ver. 1.2.3 を使って作成した。

(倫理面への配慮)

微生物検査として網羅配列解読による病原体検出を行った。患者配列を特定する作業は行わず、個人情報に結びつく配列解析は一切行っていない。

C. 研究結果

1) 網羅塩基配列解読による病原体検出

咽頭検体(1360)から計 5,152,715 本の解読リー

ドを得た (図 1)。病原体候補となるウイルス種を相同性検索にて調べたところ、Human parechovirus (HPeV)に類似したリード 3 本を見出すことができた (図 2)。細菌種においては、多数の咽頭・口腔常在菌が検出されたため、病因に関与するかどうか判別できないものが多数含まれていた (図 3)。

便検体(1361)から計 13,596,374 本の解読リードを取得した (図 1)。病原体候補となるウイルス種を相同性検索にて調べたところ、Human parechovirus (HPeV)に類似したリード 1,505 本を検出し、病因ウイルスと想定される検出量を得た (図 4)。また、咽頭検体(1360)で検出されたウイルス種と同一であった。細菌種においては、多数の腸内常在菌が検出されたため、病因に関与するかどうか判別できないものが多く含まれていた (図 5)。

2) Human parechovirus (HPeV) 全長配列の決定

咽頭検体(1360)および便検体(1361)から同一のウイルス種 HPeV を検出したため、より詳細なウイルス鑑別のために HPeV 全長配列の確定を行った。これまで、HPeV 1 型から 9 型までの全長配列が知られており、それら塩基配列のアライメント結果から共通プライマーを作成した。便検体(1361)の精製 RNA から RT-PCR にて 2 箇所に分けて全長配列を RT-PCR 増幅することができた (図 6)。サンガー法により、全長 6.7 kb の配列を確定した。確定した全長配列の polyprotein 領域(ATG - stop codon: 6534 nt) の系統樹解析により、HPeV-3 に非常に近い HPeV であることが分かった (図 7)

3) HPeV-3 VP1 の RT-PCR 法による検体検査

他検体でも HPeV-3 の感染・保有が見られるかどうか HPeV-3 の VP1 に対する特異的 RT-PCR で検討したところ、6 便検体で陽性バンドを検出した (5 検体は陰性) (図 8)。また、同一患者の咽頭および髄液検体からは検出されなかった。咽頭検体(1360)の網羅解読法では HPeV を検出できたが、おそらく、咽頭における HPeV ウイルス量が極端に低いことが原因だと推察された。

D. 考察

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

実際、本研究で網羅解読した便検体から一般的な検査項目に入っていない HPeV-3 の塩基配列を検出した。HPeV はピコルナウイルス科に属する線状 (+) 鎖 RNA ウイルスであり、以前は Echo22 (HPeV-1), Echo23 (HPeV-2) として分類されていたが、1999 年に新たにパレコウイルス属として改名されたウイルスである。現在のところ、1 から 14 型まで知られている。

HPeV-3 は 2004 年に伊藤らが症例および分離 HPeV-3 配列を報告しており、国内では胃腸炎、呼吸器疾患患者から分離されている。さらに、新生児感染症、敗血症様疾患、乳幼児突然死症候群(SIDS)からも検出されている。

本症例の病態で特徴的であったこととして、筋肉痛の訴えがあった。この病態と関連するかどうか確定的ではないが、HPeV-3 は HPeV-1 と比較して中枢神経症状を伴う割合が高いとの報告があることから、HPeV-3 の関与が疑われる。

また、HPeV-1 と比べ HPeV-3 の培養細胞 CPE 出現が非常に遅いことが知られている。CPE が出現するには 3~14 日の培養を必要とし、山形県衛生研究所においてもウイルス分離が非常に

困難であったことと合致していた。

一般的なウイルス鑑別には ELISA 法が好ましいが、HPeV-3 から 6 型の抗血清の入手が難しく、RT-PCR などの遺伝子検査が主流である。しかしながら、報告される数多くの病原体をあまねく検査同定するためには、技術革新による網羅性を利用する時代になったと言えるであろう。

E. 結論

本研究課題において、不明病態から病原体と想定されるウイルスを網羅配列解読法により偏見無く検出することができた。HPeV-3 は新規ウイルス種ではないが、従来の遺伝子検査法で多種多様に変異を導入する RNA ウイルス全てを検出するためには、検査数が膨大になり、煩雑にならざるを得ない。次世代シーケンサーによる検出・鑑別法は一部の研究者しか扱えない状況だが、手法の簡便化と機器類・検査費用の低価格が実現すれば幅広く病原体検査に適応できると考えられる。将来の先端的な病原体検査法の開発を視野に入れ、半数以上にのぼる不明感染症例を詳細に解析しながら、広範な感染症対策に貢献するシステムを構築すべきだと考えている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

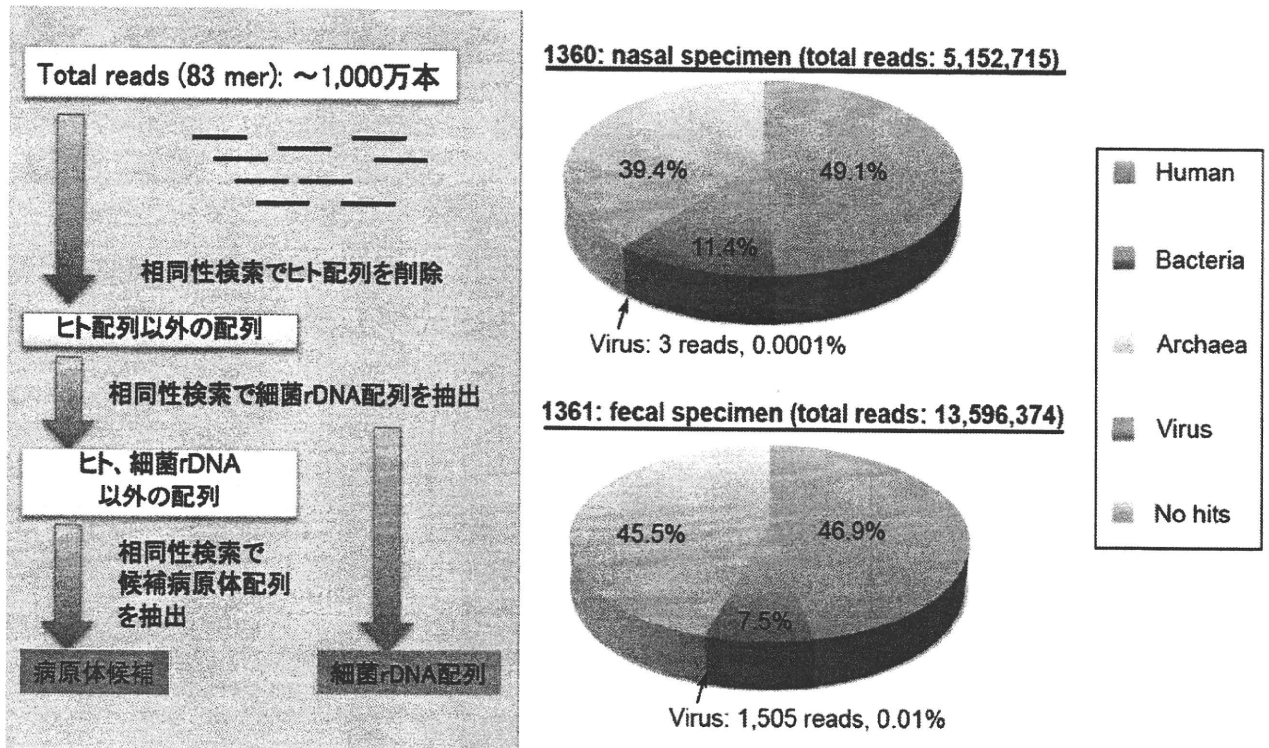


図1 ヒト検体からの網羅的病原体検索。咽頭検体(1360) および便検体(1361)の網羅配列解読により、検出された細菌・ウイルスの割合を示している。

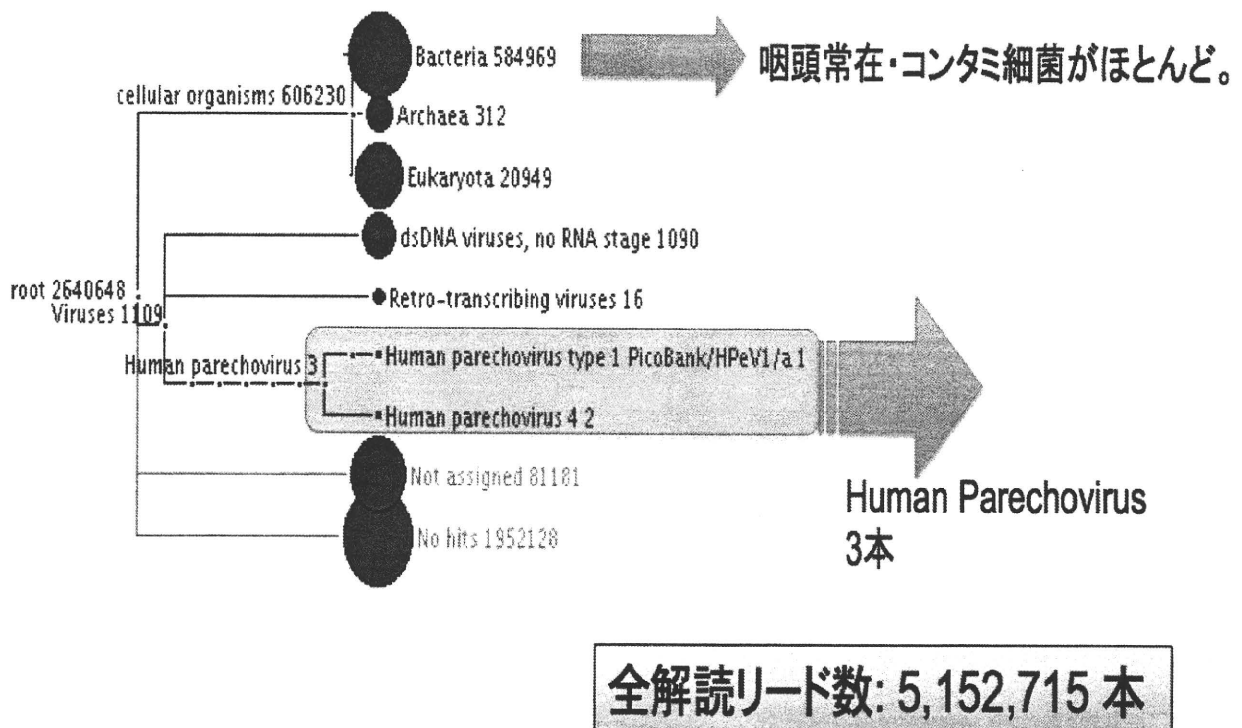


図2 咽頭検体(1360)から検出されたウイルス種の特定。特徴的な Human Parechovirus を検出した。

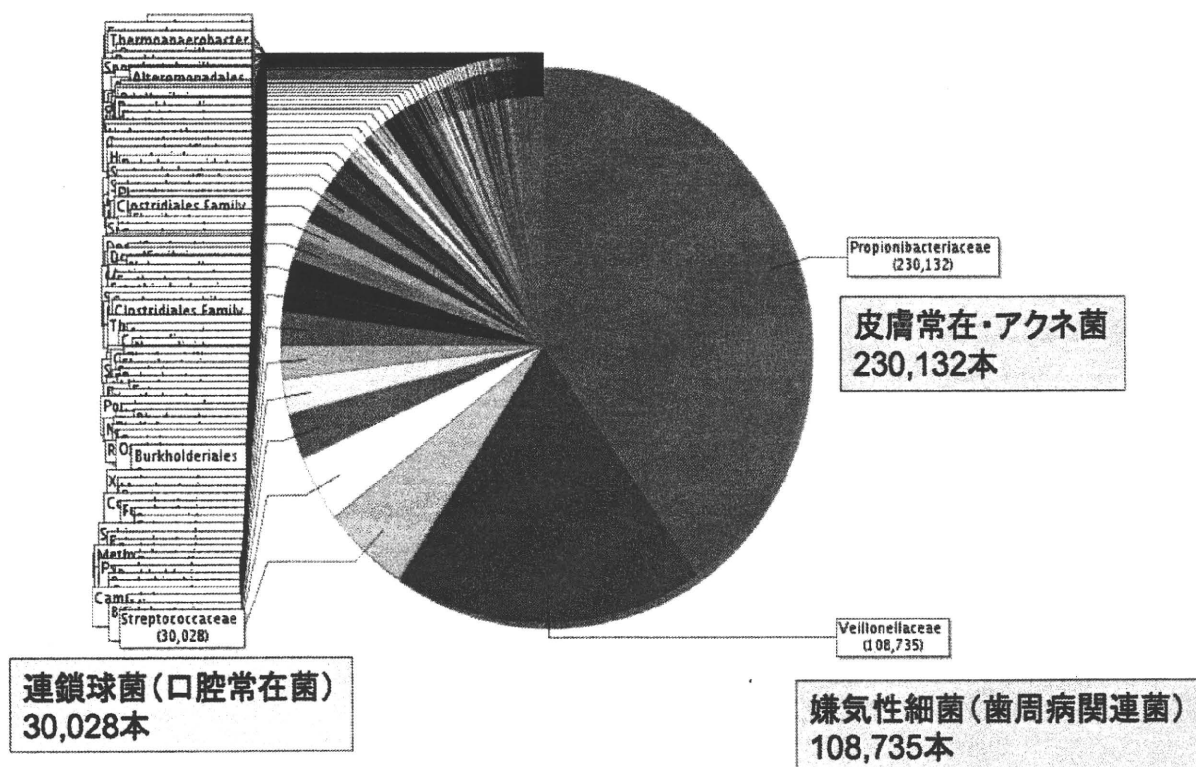
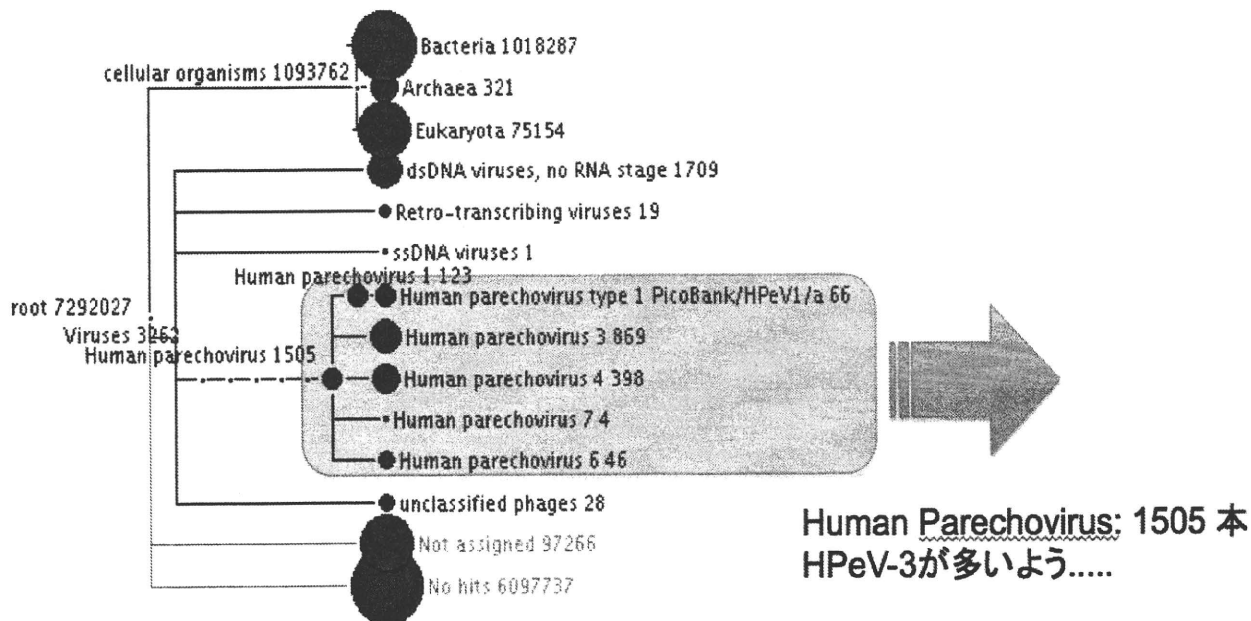


図3 咽頭検体(1360)から検出された細菌種の特定。咽頭・口腔常在細菌が検出され、呼吸器感染症における起因菌であるかどうか判別不能。



全解読リード数: 13,596,374 本

図4 便検体(1361)から検出されたウイルス種の特定。特徴的な Human Parechovirus を多数検出した。

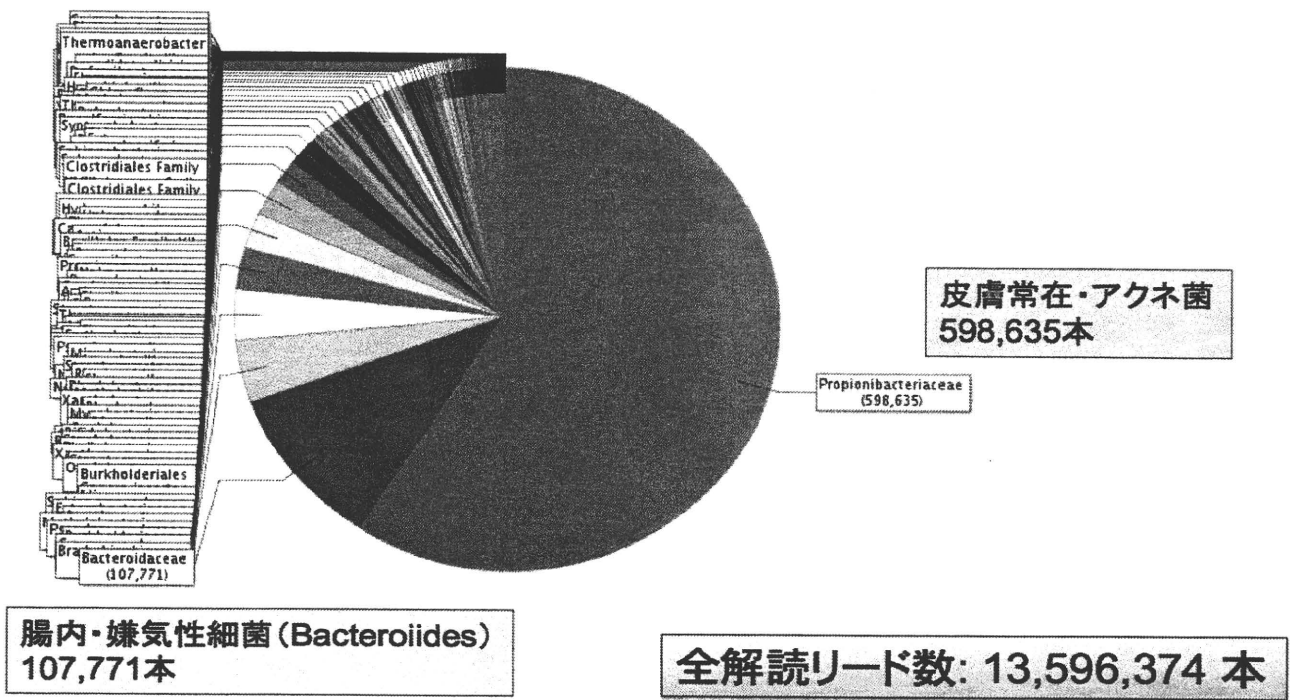


図5 便検体(1361)から検出された細菌種の特異。腸内常在細菌が検出され、呼吸器・腸管感染症における起因菌であるかどうか判別不能。

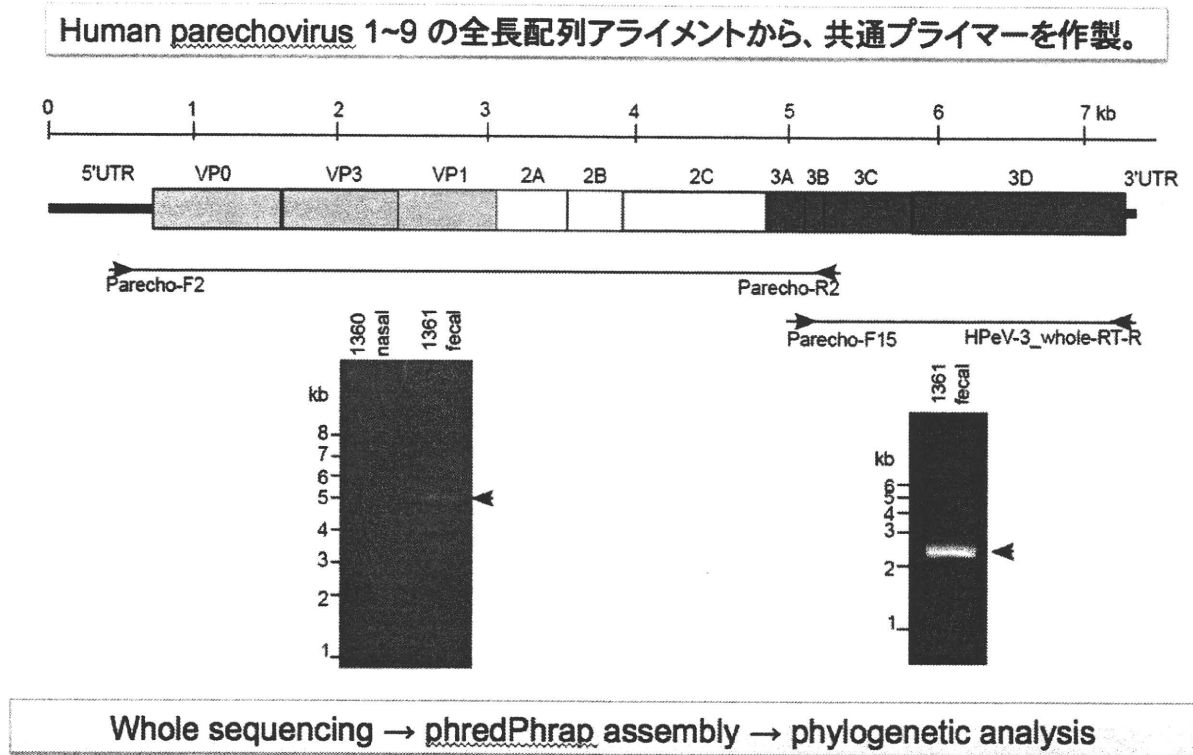


図6 図4における便検体(1361)の網羅配列解読の結果から、Human Parechovirus (HPeV) の全長配列のRT-PCR増幅。2箇所に分けて増幅し、配列決定した。

HPeV polyprotein領域 (VP0 – 3D: ATG...stop) のNJ系統樹

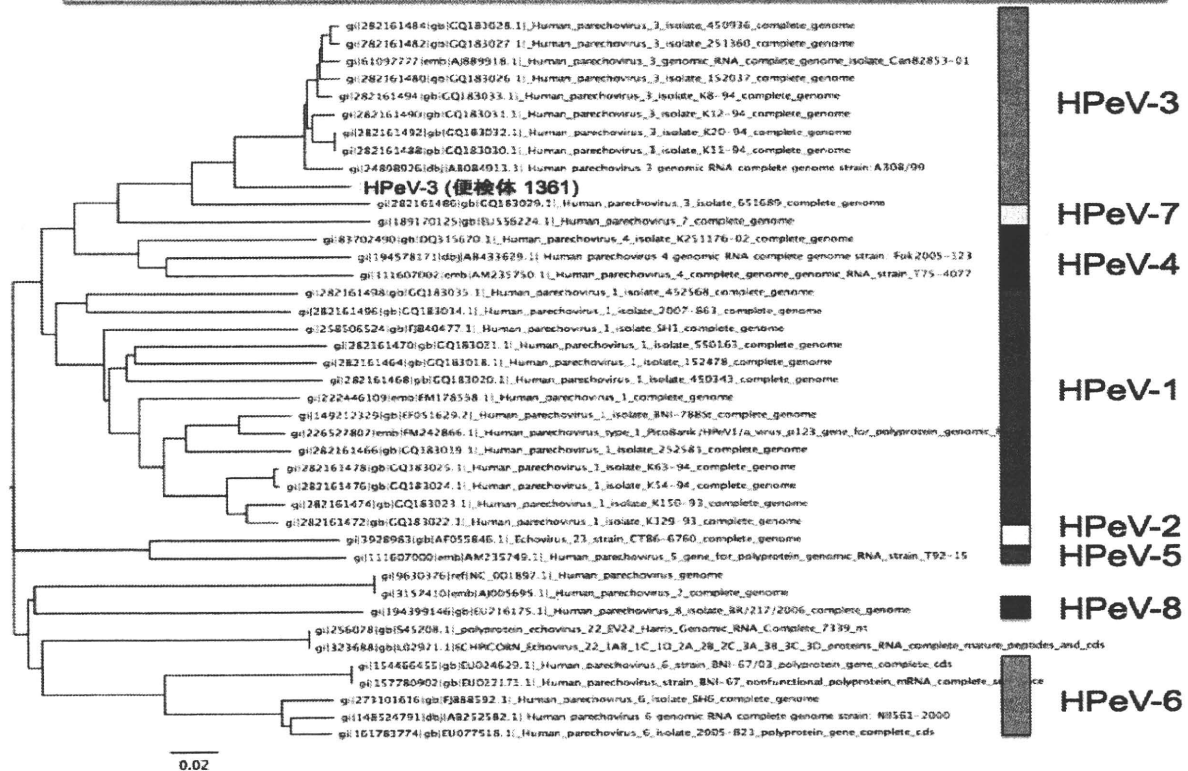


図7 便検体(1361)から検出し配列確定した HPeV-3 polyprotein の系統樹解析。ClustaW, NJ – 1000x bootstrapping にて系統樹を作成した。検出された HPeV は、HPeV-3 型に近い事がわかった。

他検体について Human Parechovirus-3 (HPeV-3) VP1 の RT-PCR解析

茶は便検体、黒は咽頭、青は髄液

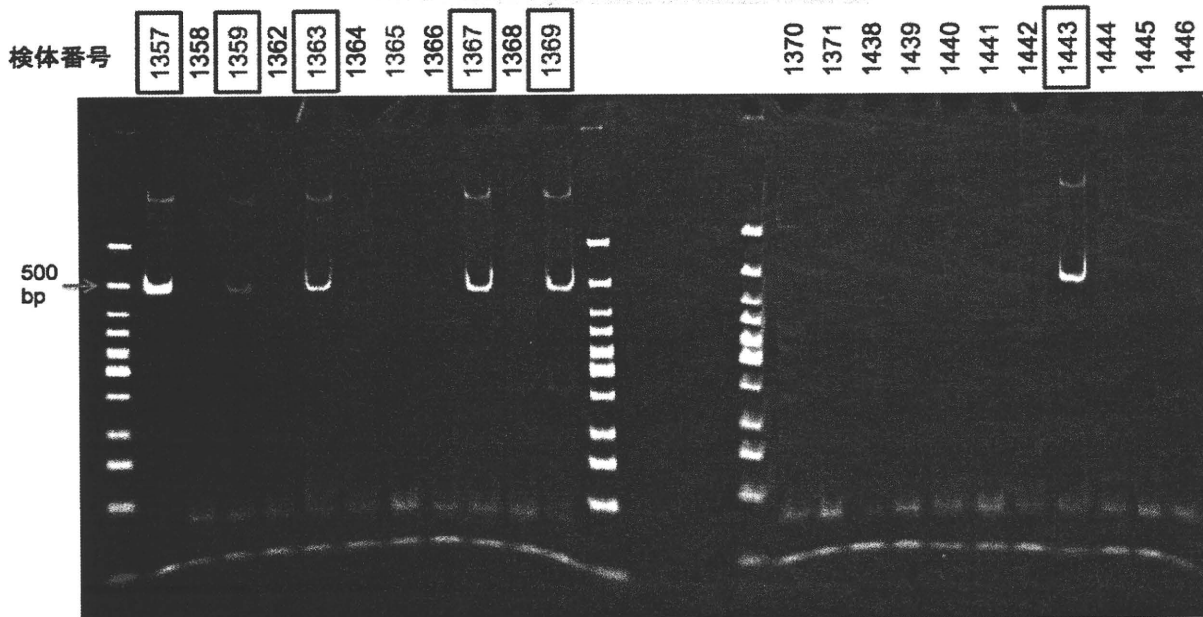


図8 HPeV-3 VP1 に対する RT-PCR にて、他便検体でも陽性バンドを確認した。