

**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)**

「粘膜免疫誘導型新規結核ワクチンの開発」

平成26年度 分担研究報告書

ヒトパラインフルエンザ2型ウイルス(hPIV2)感染状況に関する研究

研究分担者：庵原 俊昭(国立病院機構三重病院)

研究協力者：菅 秀、中村 晴奈、長尾 みづほ(国立病院機構三重病院)

矢野 拓弥、西中 隆道(三重県保健環境研究所)

**研究要旨**

ヒトパラインフルエンザ2型ウイルス(hPIV2)をベクターとした粘膜免疫誘導型新規結核ワクチンを開発する際、健常人におけるhPIV2特異的抗体価に関する血清疫学、および上気道感染や下気道炎の症状のある小児においてどの程度hPIV2が病態に関与しているかを把握しておくことが重要である。本邦におけるhPIV2感染に関する詳細な臨床ウイルス学的文献的報告は乏しく、今回の研究を計画するに至った。2013年11月以降に三重病院小児病棟に呼吸器症状を呈し入院となった症例(153検体)の上気道分泌液よりhPIVの検出をPCR法により実施した。hPIV1、hPIV2、hPIV3がそれぞれ5検体(3.3%)で検出された。hPIV2は生後3か月、5か月、1歳、2歳、4歳の症例で検出され、発熱、喘鳴を主症状としていた。三重病院および関連クリニックで、症状の無い健常小児(0-17歳：300名)および妊婦とその出生児臍帯血(119ペア)より採取された血清中のhPIV抗体価を測定した。hPIV1,2,3,4すべてに対して、5歳以上で90%以上の症例がHI抗体価10倍以上であった。母体から胎児への経胎盤移行により、新生児の臍帯血HI抗体価は母体とほぼ同程度であった。hPIV1,2,4では出生後に移行抗体が低下して、その後3-5歳にかけて抗体陽性率が上昇していくパターンであった。hPIV3ではより早期にHI抗体陽性率が上昇し、かつ全年齢群でHI抗体価幾何平均値が高値であった。以上の結果より、低頻度ではあるが、hPIV2は、乳幼児における発熱、喘鳴を伴う呼吸障害を引き起こし、多くが5歳までに初感染することが示唆された。

**A. 研究目的**

ヒトパラインフルエンザ2型ウイルス(hPIV2)は乳幼児には感冒様疾患を起こすが、成人には病原性はあまりないといわれている。hPIV2をベクター化し、外来遺伝子を組込むことにより、粘膜免疫誘導型新規結核ワクチンを開発する際、健常人におけるhPIV2特異的抗体価に関する血清疫学、および上気道感染や下気道炎の症状

のある小児においてどの程度、hPIV2が病態に関与しているかを把握しておくことが重要である。本邦におけるhPIV2感染に関する詳細な臨床ウイルス学的文献的報告は乏しく、今回の研究を計画するに至った。

本研究では、hPIV2の感染の有無をPCRにて探索する同時に、近縁ウイルスであるhPIV1、hPIV3、hPIV4も探索し、感染実態を把握する。患者基本情報及び臨床情

報も併せて解析を実施し、病態との関連を明らかにすること、健康小児におけるパラインフルエンザ特異的抗体価を測定し、日本における血清疫学を明らかにすること、を目的とする。

## B. 研究方法

### (1) 呼吸器症状を有する小児における、感染ウイルスの検出、同定

2013年11月より咳嗽、発熱、喘鳴などの症状を呈して国立病院機構三重病院小児病棟に入院した小児より、スワブ採取棒を用いて咽頭粘液を採取した。BDユニバーサルバイラルトランスポート(ベクトンディッキンソン、日本)に浸漬した後、速やかに-80℃で保存した。検体の解析は、三重大学医学系研究科病態解明医学講座(野阪哲哉教授)で実施する。RNA抽出はTRIzol Plus RNA Purification Kitを用いて行い、RT-PCRでhPIV1、hPIV2、hPIV3、hPIV4の検出を行った<sup>1)</sup>。

### (2) hPIV2感染症における臨床的特徴の解析

検体採取可能であった症例においては、年齢、性別、発症月、主症状、診断名、臨床検査データ、治療内容、合併症、転帰などの臨床情報を収集した。クリニカルデータシートを作成し、診療録より情報を収集した。

### (3) hPIV感染の血清疫学的解析

hPIV1、hPIV2、hPIV3、hPIV4の特異的抗体価の測定を行った。0から17歳の健康小児の保存血清を使用して、赤血球凝集抑制(HI)抗体価測定を実施した。また、母体から新生児への移行抗体解析のために、臍帯血および母体血におけるHI抗体価の

測定も実施した。抗体価測定は三重県保健環境研究所で実施した。

### (倫理面への配慮)

当研究は三重病院倫理審査委員会(受付番号23-24)にて承認を受けた。

#### (1) 対象となる個人の権利の擁護

本研究では、被験者の氏名、住所などの個人情報収集しない。被験者の同定や照会には、匿名化IDを用いて行われる。すべての関係者は個人情報保護のため最大限の努力を払う。

(2) 対象となる個人への利益と不利益  
被験者に直接的な利益はない。検体採取に侵襲性を有するため肉体的、精神的苦痛の不利益が生じる可能性がある。

#### (3) 対象となる個人から理解、同意を得る方法

文書による説明および文書による同意を得る。具体的には、研究の目的・背景、研究方法及びスケジュール、この研究の成果によって医療にどのように貢献できるか、本研究に参加することによる利益および不利益、人権、プライバシーの保護、研究協力の任意性と撤回の自由、研究計画書などの開示、費用負担および謝礼に関する事項、研究についての問い合わせ・連絡先、などについて説明する。被験者が小児等の理由で意志の確認が困難な場合は、保護者その他の代理人を代諾者として、同意を得る。

研究内容については各主治医から対象者には文書で充分説明の上同意を得て実施している。

## C. 研究結果

### (1) 呼吸器症状を有する小児における、

hPIV の検出、同定および臨床像の解析

2013 年 11 月以降に三重病院小児病棟に入院となった患者の中で、呼吸器症状を呈しかつ本研究に関するインフォームドコンセントを取得可能であった症例は現在まで 279 名であった。症例の臨床的特徴を以下に記載する。男性 161 名、女性 118 名で、年齢群別症例数は、0 歳 90 名、1 歳以上 5 歳未満 156 名、5 歳以上 10 歳未満 26 名、10 歳以上 15 歳未満 6 名、15 歳以上 1 名、であった。平均月齢 28.2 か月（中央値 18 か月）であった。診断名は、肺炎 87 名が最も多く、その他気管支炎、上気道炎、細気管支炎、気管支喘息、インフルエンザ、などであった（図 1）。

採取された咽頭ぬぐい液から、RT-PCR 法により hPIV 遺伝子検出を行った。現在まで 153 検体の解析が終了し、hPIV1、2、3 がそれぞれ 5 検体(3.3%)より検出された。hPIV2 が検出された 5 症例の臨床像は、以下の通りであった。

症例 : 3 か月女児。症状 : 呼吸困難症状あるが全身状態は中程度不良。バイタルサイン : SpO<sub>2</sub> 96%, 最高体温、呼吸数は不明。

症例 : 5 か月男児。最終診断 : 肺炎。症状 : 喘鳴（その他、発熱、乾性咳、透明鼻汁）。バイタルサイン : SpO<sub>2</sub>:97%、最高体温 38.5 度、HR134/分、RR30/分。

症例 : 1 歳 0 か月男児。最終診断 : 気管支炎。症状 : 呼吸困難、陥没呼吸、喘鳴あり全身状態不良。バイタルサイン : SpO<sub>2</sub> 99%, RR30/分、最高体温 38.5 度。

症例 : 2 歳 6 か月男児。最終診断 : 喘息様気管支炎。症状 : 喘鳴（その他、発熱、湿性咳、透明鼻汁）。バイタルサイン : SpO<sub>2</sub>:93%、RR52/分、最高体温 38 度、

HR128/分。

症例 : 4 歳 3 か月男児。最終診断 : 急性咽頭喉頭炎。症状 : 咽頭痛（その他、発熱のみ）。バイタルサイン : SpO<sub>2</sub>:97%、最高体温 39.2 度。

(2) hPIV 感染の血清疫学的解析

0 から 13 歳および 17 歳での各年齢 20 検体（計 300 検体）また母体から新生児への移行抗体解析のため、臍帯血 119 検体、母体血 119 検体をペアで hPIV1,2,3,4 特異的 HI 抗体価測定を実施した。

**HI 抗体陽性率** : hPIV1,2,3,4 に対する HI 抗体価 10 倍以上、20 倍以上、40 倍以上の年齢別割合をグラフに示した（図 2）

hPIV1,2,3,4 すべてに対して、5 歳以上で 90%以上の症例が HI 抗体価 10 倍以上であった。hPIV1,2,4 では出生後に移行抗体が低下して、その後 3-5 歳にかけて抗体陽性率が上昇していくパターンであった。しかし、hPIV3 抗体は早期に上昇傾向を示し、2 歳で 18 例(90%)が HI 抗体 10 倍以上であった。HI 抗体価 20 倍以上および 40 倍以上の割合は、hPIV1,2,4 では全年齢群で低く、最も陽性率が高い 17 歳においても、それぞれ 4 例(20%)、9 例(45%)、1 例(5%)のみが HI 抗体価 40 倍以上であった。それに対して、hPIV3 では HI 抗体価 20 倍以上、40 倍以上の割合は全年齢において高く、4 歳以上は 80%以上であった。

**HI 幾何平均抗体価(GMT)** : hPIV1,2,3,4 に対する各年齢での GMT を示した（図 3）。hPIV1,2,4 では、年齢とともに緩やかに GMT 上昇傾向を示した。17 歳における GMT はそれぞれ、16.2、24.6、14.6 であった。それに対して、hPIV3 では全

年齢で他の hPIV に比べて高い GMT を示し、17 歳では 105.6 であった。

**母体血および臍帯血の HI 抗体陽性率：**  
hPIV1,2,3,4 に対する母体血および臍帯血での抗体陽性率を示した（図 4）。母体血における抗体陽性率は、17 歳での陽性率と同様の傾向であった。80%以上の検体で hPIV1,2,3,4 すべてに対して 10 倍以上の HI 抗体価を示したが、40 倍以上の抗体陽性率はそれぞれ 2%, 37%, 87%, 5%であった。臍帯血における HI 抗体価陽性率は、母体血とほぼ同様であった。母体血および臍帯血の HI 抗体価 GMT より、抗体濃縮率を求めた（図 5）。hPIV1,2,3,4 に対する HI 抗体濃縮率は、それぞれ 113%, 93%, 96%, 125%であった。

#### D. 考察

ヒトパラインフルエンザウイルスは世界中に分布し、全年齢において急性呼吸器感染症を引き起こす<sup>2)</sup>。特に乳幼児においては、軽度の上気道感染症から致死的下気道感染症まで幅広い疾病の原因ウイルスとして重要である。しかしながら、特異的抗ウイルス薬が存在しないこと、ワクチンが存在しないこと、培養細胞を用いた hPIV 分離が容易ではなく PCR 法による遺伝子検出もあまり積極的に行われていないこと、などの理由から本邦における hPIV 感染（症）の実態は十分に把握されていない。

三重県における呼吸器系ウイルスの感染症発生動向調査では、2009 年から 2012 年において呼吸器系疾患患者検体から RT-PCR 法で 17.3%に hPIV が検出されており<sup>3)</sup>、呼吸器感染ウイルスとしての hPIV

の臨床的重要性が示唆されている。本研究においても、hPIV1,2,3 がそれぞれ呼吸器症状を呈して入院した小児において 3.3%ずつ検出された。hPIV2 は生後 3 か月、5 か月、1 歳、2 歳、4 歳の症例で検出され、発熱、喘鳴を主症状としていた。いずれも、対症療法で軽快し後遺症は認められていない。低頻度ではあるが、hPIV2 は、乳幼児における発熱、喘鳴を伴う呼吸障害を引き起こす原因ウイルスと成り得ることが示唆された。

また、本研究においては小児期における hPIV 感染状況を、血清疫学的にも明らかにした。母体および臍帯血の HI 抗体価解析結果より、母体の保有する抗体は経胎盤的にほぼ同濃度で新生児に移行することが判明した。その結果、新生児（臍帯血）における 10 倍以上の HI 抗体保有率はすべての hPIV に対して 80%以上であった。しかしながら、抗体保有率は 1 歳以降低下し、2-3 歳児では最低値を示しその後上昇カーブを示した。これは、移行抗体の減衰と生後の自然感染により獲得された抗体の推移を示すものであり、hPIV は 5 歳までに多くが初感染することが示唆された。

#### E. 結論

低頻度ではあるが、hPIV2 は、乳幼児における発熱、喘鳴を伴う呼吸障害を引き起こす原因ウイルスと成り得る。hPIV2 初感染の多くは 5 歳までに起こることが示唆された。

(参考文献)

1) Aguilar JC, Perez-Brena MP, Garcia ML, Cruz N, Erdman DD, Echevarria 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.* 38, 1191–1195: 2000.

2) Karron RA, Collins PL: Parainfluenza viruses. *Fields Virology* 6<sup>th</sup> edition. Philadelphia: Wolters Kluwer / Lippincott Williams & Wilkins, 996-1023, 2013

3) 矢野拓弥、前田千恵、楠原一、赤地重宏、松野由香里、山寺基子、岩出義人、片山正彦、山口哲夫：三重県におけるパラインフルエンザウイルスの動向。 *三重保環研年報* 57:53-56, 2012

F. 研究発表

1 . 著書、論文

1) Yano T, Maeda C, Akachi S, Matsuno Y, Yamadera M, Kobayashi T, Nagai Y, Iwade Y, Kusuhara H, Katayama M, Fukuda M, Nakagawa Y, Naraya S, Takahashi H, Hiraoka M, Yamauchi A, Nishinaka T, Amano H, Yamaguchi T, Ochiai H, Ihara T, Matsuzaki Y: Phylogenic analysis and seroprevalence of influenza C virus in Mie Prefecture, Japan in 2012. *Jpn J Infect Dis* 67:127-131, 2014

2) 矢野拓弥、落合 仁、庵原俊昭：三重県における急性呼吸器症状を呈した小児から検出されたコロナウイルス(HCoV-OC43) . *感染症学雑誌* 88:708-710, 2014

3) 矢野拓弥、落合 仁、渡辺正博、庵原俊昭：呼吸器症状を呈した小児から検出されたヒトボカウイルスの流行疫学および遺伝子系統樹解析(2010～2013年) . *小児感染免疫* 26:369-375, 2014

4) Yano T, Fukuda M, Maeda C, Akachi S, Matsuno Y, Yamadera M, Kobayashi A, Nagai Y, Kusuhara H, Kobayashi T, Amano H, Nishinaka T, Ochiai H, Watanabe M, Nakamura H, Suga S, Ihara T: Epidemiological investigation and seroprevalence of human parainfluenza virus in Mie Prefecture in Japan during 2009-2013. *Jpn J Infect Dis* 67:506-508, 2014

2 . 学会

なし

G . 知的所有権の出願・登録状況 ( 予定を含む )

なし