

呼吸器ウイルスの共感染に関する研究 -成人呼吸器ウイルス感染と喘息の増悪について-

研究分担者：木村 博一（群馬パース大学）

研究協力者：石井 晴之（杏林大学）

倉井 大輔（杏林大学）

皿谷 健（杏林大学）

山崎 一美（国立病院機構長崎医療センター）

松本 文昭（長崎県保健環境研究センター）

長澤 耕男（千葉大学）

研究要旨 呼吸器感染症のウイルス共感染に関する研究の一環として、喘息発作を主訴に受診した患者由来の臨床検体を用いて、通常の培養検査に加え、各種呼吸器ウイルスのPCRにより、病原体プロファイルを行った。その結果、成人喘息発作において、ライノウイルスAおよびCが最も多く検出され、その感染が喘息発作に関与することが推定された。

A. 研究目的

気管支喘息の発症・増悪には、様々な因子が関与していることが考えられる。その一つとして、小児においては、ウイルス感染、特にライノウイルス（HRV）やRSウイルス（RSV）が喘息の増悪因子であることが示唆されている¹⁾。一方で、成人においては、喘息発作と呼吸器ウイルス感染の関連について未だ不明な点も多く、日本での年間を通じての詳細な疫学データについては未だ報告がない¹⁾。このような背景から、我々は、呼吸器ウイルス感染と成人の喘息に及ぼす影響を明らかにするための研究を行った。また、これまでに喘息増悪に関与するとされる *Mycoplasma pneumoniae* や *Chlamidia pneumoniae* 感染の影響²⁾ も明らかにした。

B. 研究方法

1. 対象患者

2012年8月から2015年5月に喘息発作を主訴に杏林大学呼吸器内科を受診した計106人より、喀痰あるいは鼻咽頭拭い液を採取し、それらを前方視的に解析した。なお、本研究では18歳未満の

患者、慢性閉塞性肺疾患、肺炎、急性心不全等をもつ患者は除外した。なお、本研究への参加については書面での同意が得られた患者のみを対象としており、本研究のプロトコールは杏林大学の倫理委員会での承認を受けている（H24-021）。

2. 検体中の病原微生物検出

各検体を3,000g、30分遠心し、その上清を用いた。上清からQIAamp Viral RNA Mini Kit（Qiagen, Valencia, CA）を用いて、核酸抽出を行った。PrimeScript RT reagent Kit（Takara Bio, Otsu, Japan）を用いて、逆転写を行い、得られた産物を用いてRT-PCRを行った。本研究では、ヒトメタニューモウイルス（hMPV）、ライノウイルス（HRV）、エンテロウイルス、RSウイルス（RSV）、インフルエンザウイルス（Flu）、パラインフルエンザウイルス、コロナウイルス、アデノウイルス、サイトメガロウイルス、パルボウイルスB19、水痘帯状疱疹ウイルス、ボカウイルス、*M. pneumoniae*、*C. pneumoniae*のPCRを既報に従い施行した^{3, 4)}。得られたPCR産物は、ダイレクトシーケンス法で配列を決定し、BLASTで確認した。hMPV、RSV、HRVに関しては近隣結

合法 (NJ法) を用いて系統樹解析も行った。また、その他の一般細菌を検出するために細菌培養検査も行った。

C. 研究結果

1. 喘息発作時の入院及び外来患者での臨床像の比較

本研究で解析した106名のうち、入院症例は49例、外来症例は57例であった。年齢、性別、喫煙者の割合、白血球数やCRPなどに2群間で有意差を認めなかったものの、ウイルス陽性患者の割合は入院患者で有意に多かった (入院: 67.3%、外来: 19.3%)。

2. 入院患者におけるウイルス感染の有無での臨床像の比較

入院患者計49名のうち、何らかの呼吸器ウイルスが検出された患者は33名、検出されなかった患者は17名であった。この2群を比較すると、性別、年齢、喫煙の有無、SpO₂や重症度スコア、治療期間に有意差は認めなかった。ウイルスが検出された群で二酸化炭素の貯留傾向が認められたが、有意差は認められなかった (*p* value: 0.06)。

3. 喘息患者から検出された病原体

本対象患者106名のうち、ウイルスのみ検出された患者が44名、細菌のみが検出された患者が5名、ウイルス・細菌がともに検出された患者が5名であった。

ウイルスのみが検出された44名のうち、HRV-Aが12名、HRV-Cが11名とHRVが検出される患者が最も多かった。その他hMPV 9名、Fluが8名、RSV-Aが2名、RSV-Bが1名と続いた。HRV-Bに関しては1名のみであった。細菌とウイルスがともに検出された5名では、MRSA+hMPV、肺炎球菌+HRV-A、インフルエンザ菌+MSSA+HRV-C、緑膿菌+Flu、MSSA+Fluが各1名ずつであった。なお、既報で喘息発作に関連があると言われている *M. pneumoniae*、*C. pneumoniae* については、本研究では1例も検出されなかった。

検出されたウイルスの季節分布では、HRVは年間を通して検出されるものの秋に多い傾向があった。その他hMPVは春に多く、Fluは冬に多い傾向があった。しかし、ウイルス感染のある喘

息発作患者総数に関しては、季節ごとの差は認められなかった。

4. 系統樹解析

本研究で検出されたHRV、hMPV、Flu、RSVについてNJ法による系統樹解析を行った。最も検出数の多かったHRVについて図1に示す。本検討では、特定の遺伝子型が多く検出されるということではなく、遺伝学的に多様なウイルスが検出されたことが明らかとなった (図1)。

D. 考察

本研究では、喘息発作での入院患者の65.3%、外来患者の19.3%から何らかの呼吸器ウイルスが検出されており、成人でも小児と同様にウイルス感染が喘息発作の増悪に関与していると考えられた。また、入院患者において、ウイルス感染の有無で重症度に差があるかを検討したところ、ウイルス感染群で二酸化炭素が貯留傾向にあるものの、有意差は認められなかった。各ウイルスによっても喘息発作の重症度が異なる可能性があり、それぞれのウイルス感染で比較する必要があると考えられた。

また、本研究では様々なウイルスが検出されたが、なかでもHRV-AおよびRSV-Cがもっとも多く検出され、小児での報告と一致していた^{1, 4)}。更に、今回の検討から、hMPVやFlu、RSVも成人の喘息発作に関与していると推定された。季節性に関しては、HRVは年間を通して検出される

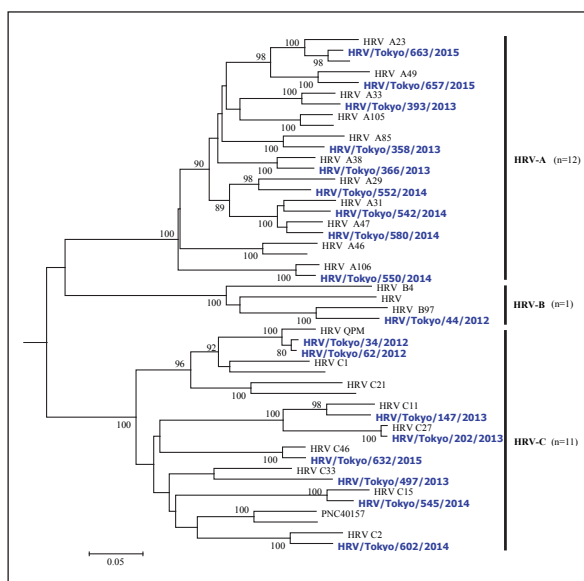


図1. HRV VP4/VP2 領域 (390bp) の系統樹 (NJ法)

ものの、秋に多く、hMPVは春に多く検出されていた。Fujitsukaらは小児の急性喘鳴で検出される呼吸器ウイルスについて検討しており、HRVの季節分布に関しては同様の傾向を示していた⁴⁾。一方でウイルス感染のある喘息発作患者の数に関しては、季節ごとの差は認めなかった。これは、それぞれのウイルスの流行時期が異なるためと考えられた。

既報では、*M. pneumoniae*や*C. pneumoniae*が喘息発作に関与するとの報告²⁾があるため、PCRを用いて検討したものの、106名中でこれらが検出された患者は一人もいなかった。本検討からは*M. pneumoniae*、*C. pneumoniae*は気管支喘息発作との関連は低いと推定された。

系統樹解析では、各ウイルスとも遺伝的に多様なウイルスが検出されていた。これらの結果から、気管支喘息発作に関与するのは特定の遺伝子型のウイルスではないと推定された。

E. 結論

成人の喘息発作においても、HRV-AやHRV-Cといったウイルス感染の関与が大きいことが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saraya T, et al. The molecular epidemiology of respiratory viruses associated with asthma attacks: A single-center observational

study in Japan. *Medicine (Baltimore)* . 2017; 96: e8204.

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

参考文献

- 1) Kurai D, et al. Virus-induced exacerbations in asthma and COPD. *Front Microbiol* 2013; 4: 293.
- 2) Martin RJ, et al. A link between chronic asthma and chronic infection. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 595-601.
- 3) Kurai D, et al. Pathogen profiles and molecular epidemiology of respiratory viruses in Japanese inpatients with community-acquired pneumonia. *Respir Investig* 2016; 54: 255-263.
- 4) Fujitsuka A, Tsukagoshi H, Arakawa M, et al. A molecular epidemiological study of respiratory viruses detected in Japanese children with acute wheezing illness. *BMC Infect Dis* 2011; 11: 168.