

## 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）

麻生 純平（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** まず、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、成人市中肺炎患（CAP）由来臨床検体を用い、次世代シーケンサーによる病原体プロファイルを行った。その結果、8割の本疾患患者から、原因と推定される微生物が検出された。また、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

成人市中肺炎（CAP）の原因となる病原体は、多数存在する。CAPから病原体を検出する場合、検出法の感度や特異性の問題などから、原因が不明となることも少なくない。また、CAPの原因となる病原体のうち、ウイルスの関与については未だに不明な点が多い。このような背景から、本研究においては、次世代シーケンサー（NGS）を用い、CAP患者由来の呼吸器臨床検体中に含まれる微生物の網羅解析を行い、本疾患の病原体プロファイリングを行った。

また、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。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。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*M. pneumoniae*や*C. pneumoniae*感染の影響も明らかにした。

さらに、特発性肺線維症（idiopathic pulmonary fibrosis, IPF）および間質性肺疾患（interstitial lung disease, ILDs）の増悪には、ウイルス感染が関与する可能性が示唆されている。しかし、関与するウイルスの詳細については不明な点が多い。本研究においては、IPFおよびnon-IPF ILDs症例から網羅的ウイルスの検索を行った。

### B. 研究方法

#### 1. 対象患者（CAPのNGS網羅解析）

本研究は、杏林大学医学部附属病院呼吸器内科を受診し、市中肺炎と診断され、文書にて研究内

容を説明し、同意の得られた24名を対象とした。対象患者から、気管支肺胞洗浄液、喀痰あるいは鼻咽頭拭い液といった呼吸器由来検体を採取した。

## 2. NGSによる微生物の網羅解析

採取検体から、QIAamp MinElute Virus Spin (QIAGEN) を用いて、キャリアRNAを添加せずに核酸抽出をおこなった。NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina (BioLabs) を用いて前処理を行い、NGSによるRNA-シーケンスを行った。得られたデータはMepicおよびMEGANを用いて網羅的に解析し、検体中の病原体プロファイリングをおこなった。

## 3. 対象患者（喘息増悪時の病原体検出）

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、急性心不全等を持つ患者は除外した。

## 4. 検体中の病原微生物検出

各検体を3000g、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。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。

## 5. 対象患者 (IPDおよびILDs患者)

2012年8月から2015年8月まで、杏林大学呼吸器内科を受診したIPF27例およびnon-IPF ILDs51例を本研究の対象とした。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 (HPIV)、コロナウイルス、アデノウイルス、サイトメガロウイルス (CMV)、パルボウイルスB19、水痘帯状疱疹ウイルス、ボカウイルス、ヘルペスウイルス6/7型 (HHV6/7)、*M. pneumoniae*、*C. pneumoniae*のPCRを既報に従い施行した。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。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。

## (倫理面への配慮)

なお、本研究のプロトコールは、杏林大学および国立感染症研究所の倫理委員会の承認を得ている。また、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。

## C. 研究結果

### 1. 臨床的特徴 (CAPのNGS解析)

対象患者24名中、入院患者が21名、外来患者が3名であった。また、年齢は19~91歳 (平均±標準偏差:  $57.1 \pm 22.3$ 歳) であった。性別は男性15名 (62.5%)、女性9名 (37.5%) でやや男性が多く含まれていた。肺炎の重症度を表すPSIスコアは  $3.0 \pm 1.44$  (平均±標準偏差) であった。

### 2. 病原体プロファイリング

対象患者24名中、19名 (79%) で何らかの病原体が検出された (図1)。最も多いのは細菌のみ検出された患者で14名であった。その中で、肺炎球菌が検出された患者が8名で最も多く、インフルエンザ桿菌が検出された患者が7名、肺炎マイコプラズマ、モラクセラ・カタラーリスが検出された患者が各2名であった。なお、これらの細菌が単独で検出されたのは3名のみであった。ウイ

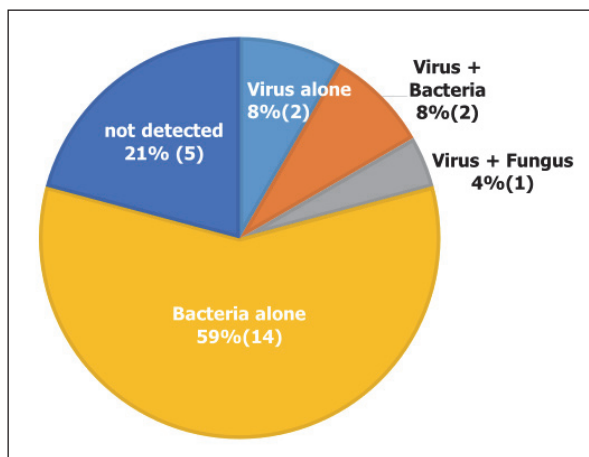


図 1. NGSにより市中肺炎患者から検出された微生物

ルスのみ検出された患者は2名であり、それぞれエンテロウイルスD68、ヒトRSウイルスが検出された患者が1名ずつ認められた。また、肺炎マイコプラズマとライノウイルスAが検出された患者、肺炎球菌とインフルエンザAが検出された患者、アスペルギルスと肺炎球菌が検出された患者を各1名ずつ認めた。

### 3. 喘息発作時の入院およ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%)。

### 4. 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、SpO<sub>2</sub>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)。

### 5. 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。

### 6. IPDおよびILDs患者から検出されたウイルス

5例(5/27, 18.5%)のIPF患者から、ウイルスが検出され、その内訳は、HHV7が2例、CMVが1例、HPIVが1例およびCMV+HHV7が1例から検出された。また、10例(10/51, 19.7%)のnon-IPFILDsからウイルスが検出され、その内訳は、HHV7が2例、インフルエンザウイルスが3例、HPIVが1例、インフルエンザウイルス+HHV7が1例およびCMV+HHV7が2例から検出された。

## D. 考察

### 1. 市中肺炎 (CAP) の病原体網羅解析について

市中肺炎 (CAP) に関与する病原体は、多岐に渡るため、同定が困難あるいは検査に時間を要する場合がある。また、診断後、速やかに抗菌剤を投与する症例が多いため、関与する病原体が細菌の場合、分離が困難になる可能性もある。今まで我々は、培養法、尿中抗原検出法およびPCR法により、本疾患患者の病原体プロファイルに関する研究を行った。その結果、本研究において、約60%のCAP症例から、起因と推定される病原体が検出されたが、残りの症例からは検出されなかった。一方、NGSによる病原体網羅解析は、これらの問題を克服するだけでなく、検出感度もPCR法と同等である。そこで、今回NGSを用い、本疾患における病原体の網羅解析を行った。その結果、症例数は、比較的少ないものの、約80%の

症例から、起因と推定される病原体が検出された。よって、CAP症例においてもNGSによる病原体の網羅解析は、起因となる病原体を確実に高率に検出可能であることが示唆された。

## 2. 喘息増悪時に検出されたウイルスについて

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<sup>1, 4)</sup>。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<sup>4)</sup>。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<sup>2)</sup>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。

## 3. IPDあるいはILDsから検出されたウイルスについて

特発性肺線維症 (IPF) あるいは、間質性肺疾患 (ILDs) の増悪時の症例から、一定の頻度でウ

イルスが検出された。また、検出されたウイルスは、IPFにおいてはヘルペスウイルスが多かったが、ILDsの症例からは、ヘルペスウイルスのみならず、インフルエンザウイルスやインフルエンザと他のウイルスが検出された症例もあった。これらのことから、両疾患の病態においては、少なからずヘルペスウイルスの持続感染あるいは呼吸器ウイルス感染が関与することが示唆された。

## E. 結論

CAP患者由来臨床検体を用い、次世代シーケンサーによる病原体プロファイルに関する研究を行った。その結果、約80%の症例から、起因と推定される病原体が検出された。また、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。さらに、特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) および間質性肺疾患 (interstitial lung disease, ILDs) の増悪には、一定の割合でウイルス感染が関与することが推定された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kurai D, Sasaki Y, Saraya T, Ishii H, Tsukagoshi H, Kozawa K, Ryo A, Ishioka T, Kuroda M, Oishi K, Takizawa H, Kimura H. Pathogen profiles and molecular epidemiology of respiratory viruses in Japanese inpatients with community-acquired pneumonia. *Respir Investig*. 2016 Jul; 54 (4) : 255-263.
- 2) 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.
- 3) Saraya T, Fujiwara M, Kimura H, Takei H, Takizawa H. A 17-year old woman with a solitary, mixed squamous cell and glandular papilloma of the bronchus. *Respirol Case Rep*. 2018 Nov 30; 7 (2) : e00393.
- 4) Takahashi M, Obara T, Matsuzaki Y, Maisawa S, Sasaki Y, Yoshino N, Shirasawa A, Iwabuchi K, Takahashi T, Kajita H, Ono

- Y, Ryo A, Kimura H, Muraki Y. Cocirculation of Influenza C Viruses with Distinct Internal Genome Constellations in Iwate Prefecture, Japan in 2016. *Jpn J Infect Dis.* 2018 Sep 21; 71 (5) : 393-395.
- 5) Saraya T, Ohkuma K, Tsukahara Y, Watanabe T, Kurai D, Ishii H, Kimura H, Goto H, Takizawa H. Correlation between clinical features, high-resolution computed tomography findings, and a visual scoring system in patients with pneumonia due to *Mycoplasma pneumoniae*. *Respir Invest.* 2018 Jul; 56 (4) : 320-325.
- 6) Saraya T, Kimura H, Kurai D, Tamura M, Ogawa Y, Mikura S, Sada M, Oda M, Watanabe T, Ohkuma K, Inoue M, Honda K, Watanabe M, Yokoyama T, Fujiwara M, Ishii H, Takizawa H. Clinical significance of respiratory virus detection in patients with acute exacerbation of interstitial lung diseases. *Respir Med.* 136: 88-92, 2018.
- 7) Saraya T, Nunokawa H, Ohkuma K, Watanabe T, Sada M, Inoue M, Honda K, Oda M, Ogawa Y, Tamura M, Yokoyama T, Kurai D, Kimura H, Ishii H, Goto H, Takizawa H. A novel diagnostic scoring system to differentiate between *Legionella pneumophila pneumoniae* and *Streptococcus pneumoniae pneumoniae*. *Inter Med. Intern Med.* 2018 Mar 30. doi: 10.2169/internal-medicine. 0491-17.
- 8) Saraya T, Ohkuma K, Watanabe T, Mikura S, Kobayashi F, Aso J, Nunokawa H, Honda K, Ogawa Y, Tamura M, Sada M, Oda M, Inoue M, Yokoyama T, Kurai D, Ishii H, Kimura H, Takizawa H. Diagnostic value of vascular endothelial growth factor, transforming growth factor- $\beta$ , interleukin-8, and the ratio of lactate dehydrogenase to adenosine deaminase in pleural effusion. *Lung.* 2018 Jan 20. doi: 10.1007/s00408-018-0090-1

## 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