

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：84406

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790720

研究課題名（和文）

呼吸器感染症病原体共存の意義の解明および新興呼吸器ウイルス分離法の構築

研究課題名（英文）

Analysis of mutual association of co-detected respiratory viruses and establishment of emerging respiratory virus isolation method using cultured cells

研究代表者

改田 厚 (KAIDA ATSUSHI)

大阪市立環境科学研究所・研究員

研究者番号：50372131

研究成果の概要（和文）：

乳幼児における呼吸器感染症ウイルスの実態把握、共検出ウイルスの解析を目的とした。6歳未満の有症者 1,044 検体について多項目呼吸器ウイルス遺伝子検査を実施した結果、891 検体 (85.3%) から 1,414 のウイルスを検出した。陽性検体の 43.5% は複数ウイルス陽性であり。特に 3 歳未満で高い傾向が認められた。共検出ウイルスの統計学的解析の結果、一部のウイルス間では協調的、あるいは排他的な検出が認められ、ウイルス間相互作用が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to detect multiple respiratory viruses in young children with acute respiratory tract infections, and to analyze the combination of the co-detected viruses by statistical analysis. Of the tested 1,044 specimens (< 6 years of age), 891 were virus-positives. Viral co-detection was observed in 43.5% of virus-positive specimens. Moreover, the proportion of viral co-detection was higher in the age of < 3 years than other age groups. Statistical analysis showed that some combinations of co-detected viruses were positively or negatively correlated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学、公衆衛生学・健康科学

キーワード：呼吸器感染症、乳幼児、ウイルス、共検出

1. 研究開始当初の背景

呼吸器感染症は、年齢や性別に関係なく、年間を通して患者が発生する。その多くは軽快するが、乳幼児や高齢者、免疫不全の患者では重篤化し、死に至ることもある。保育所や学校、高齢者施設においては、感染者の集団発生を起こすため、公衆衛生上のインパクトは大きい。

2001 年以降、新たな呼吸器ウイルス[ヒト

メタニューモウイルス(hMPV) (2001)、ヒトコロナウイルス(HCoV)-NL63 (2004)、HCoV-HKU1 (2005)、ヒトボカウイルス(HBoV) (2005)] が相次いで発見された。これら新興ウイルスの流行状況、疾患との関連について、国内における知見が蓄積されつつある。ウイルスの性状、流行、臨床症状との関連を解析することは、疫学、治療、予防、学術的意義の観点から極めて重要である。しか

しながら、同一検体について、従来報告されている呼吸器ウイルスを含めた多項目の呼吸器ウイルスの検出、複数年にわたる調査、解析はほとんどおこなわれていない。また、国内において、複数ウイルス陽性例を対象とした、共検出ウイルスの解析、ウイルス共存の意義についての知見はない。

2. 研究の目的

本研究では、現在までに報告されている呼吸器ウイルスのうち、大部分を検出可能と推測される 19 項目のウイルス遺伝子検索を実施することで、乳幼児呼吸器感染症における呼吸器ウイルスの実態把握、ならびに共検出ウイルスの組み合わせの意義について解析することを目的とした。一方、培養細胞を用いた効率的なウイルス分離方法が報告されていない呼吸器ウイルス分離方法の開発も試みた。

3. 研究の方法

(1) 多項目呼吸器ウイルス遺伝子検出

大阪市感染症発生動向調査事業で 2010 年 1 月～2011 年 12 月までの期間にウイルス性呼吸器感染症と診断された 6 歳未満の呼吸器感染症乳幼児由来 1,044 検体を対象とした。検体からウイルス核酸を抽出後、ランダムヘキサマープライマーを用いて逆転写反応をおこない、マルチプレックス・リアルタイム PCR 法により 19 項目（アデノウイルス、インフルエンザウイルス [A, A(H1N1)2009, B, C]、エンテロウイルス、HCoV (OC43, 229E, NL63, HKU1)、ヒトパラインフルエンザウイルス (HPIV) (1～4 型)、HBoV、hMPV、ヒトライノウイルス、RS ウイルス (RSV) (A, B)] のウイルス遺伝子検索をおこなった。

(2) 共検出ウイルスの解析

ウイルス陽性検体の一部からは、複数のウイルス遺伝子が検出される。ウイルス陽性検体に占める複数ウイルス陽性例の割合について、月齢別 (0～5、6～11、12～23、24～35、36～47、48～59、60～71) の解析を試みた。一方、共検出ウイルスの組み合わせの意義を検討するため、統計学的手法を用いて、解析をおこなった。具体的には、無作為化テストを用いて、共検出ウイルスの協調的、排他的な相互作用を検討した。

(3) ウイルス分離方法改良の試み

近年、分子生物学的手法を用いて発見されたウイルスには、培養細胞への感受性が低く、効率的なウイルス分離方法が報告されていないものも多い。現在、ウイルス分離に用いられる細胞株は、ウイルス感受性が検討された既知細胞がほとんどである。本研究では、ウイルス感受性が不明の培養細胞を細胞バ

ンクから複数購入し、ウイルス遺伝子陽性となった検体を用いて、ウイルス感受性の検討をおこなった。分離条件は、33℃、5%CO₂ 存在下で、トリプシン存在、非存在下において検討をおこなった。

4. 研究成果

(1) 多項目呼吸器ウイルス検索

調査した 1,044 検体のうち、891 検体 (85.3%) がウイルス遺伝子陽性であった。ウイルス陽性検体のうち、43.5% からは複数のウイルス遺伝子が検出された。複数ウイルス陽性割合の月別推移を観察したところ、明らかな傾向は認められなかった (図 1)。ウイルス検出率は、全体を通じて 80～90% で推移していたが、2011 年後半は、顕著な減少が認められた。これは、同時期に国内での流行が認められた *Mycoplasma pneumoniae* の影響によるものと考えられた。月齢別に解析した結果、3 歳未満の乳幼児では、ウイルス陽性検体に占める複数ウイルス陽性検体の割合が、他の年齢層と比較して高い傾向が認められた (図 2)。以上の結果、低年齢層乳幼児では、呼吸器ウイルスに対する感染リスクが高いことが示唆され、注意が必要と考えられた。

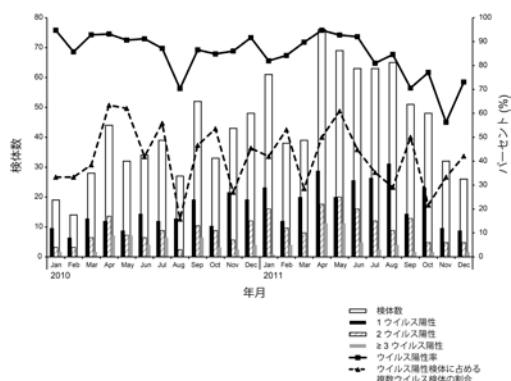


図 1. 月別ウイルス検出状況

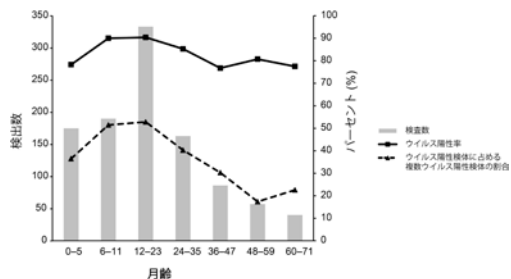


図 2. 月齢別複数ウイルス陽性割合

(2) 共検出ウイルスの解析

ヒトボカウイルス 1 型 とアデノウイルスは協調的な検出が認められた。一方、一部のパラミクソウイルス間 (HPIV-1 と HPIV-3、HPIV-1 と RSV A、HPIV-3 と hMPV、hMPV と RSV A) では排他的な検出傾向が認められた。以上の結果、呼吸器ウイルスの一部の組み合わせではウイルス間相互作用が示唆された。

(3) ウイルス分離方法改良の試み

現在、検討中であり、最終的な解析、評価は今後、実施予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

① Nakayama T, Sawada A, Kubo H, Kaida A, Tanaka T, Shigemoto N, Komase K, Takeda M. Simple method for differentiating measles vaccine from wild-type strains using loop-mediated isothermal amplification. **Microbiology and Immunology** 57, 246-251 (2013), 査読有
DOI: 10.1111/1348-0421.12029

② Kaida A, Kubo H, Sekiguchi J, Ohya M, Goto K, Hase A, Iritani N. Detection of five rash-associated viruses using multiplex real-time PCR during 2006-2011. **Japanese Journal of Infectious Diseases** 65, 430-432 (2012), 査読有
<http://dx.doi.org/10.7883/yoken.65.430>

③ Kaida A, Kubo H, Sekiguchi J, Hase A, Iritani N. Enterovirus 104 infection in adult, Japan, 2011. **Emerging Infectious Diseases** 8, 882-883 (2012), 査読有
DOI: 10.3201/eid1805.111890

④ 改田 厚、関口純一朗、久保英幸、入谷展弘、後藤 薫、長谷 篤
手足口病患者からのコクサッキーウイルス A6 型の検出
大阪市立環境科学研究所報告 74, 5-9 (2012), 査読無
http://www.city.osaka.lg.jp/kenko/cmsfiles/contents/0000196/196021/r2011_05-09_.pdf

⑤ 久保英幸、改田 厚、入谷展弘、関口純

一朗

大阪市における 2011/12 シーズンのインフルエンザウイルス流行株の解析
大阪市立環境科学研究所報告 74, 1-4 (2012), 査読無
http://www.city.osaka.lg.jp/kenko/cmsfiles/contents/0000196/196021/r2011_01-04_.pdf

⑥ 改田 厚、久保英幸、入谷展弘、関口純一朗、長谷 篤
ヒトパラインフルエンザウイルス感染症、**臨床とウイルス**、40, 142-149 (2012)

⑦ Iritani N, Kaida A, Abe N, Sekiguchi J, Kubo H, Takakura K, Goto K, Ogura H, Seto Y. Increase of GII.2 norovirus infections during the 2009-2010 season in Osaka City, Japan
Journal of Medical Virology 84, 517-525 (2012), 査読有
DOI: 10.1002/jmv.23211

⑧ Kaida A, Kubo H, Takakura K, Togawa M, Shiomi M, Kohdera U, Iritani N. Molecular Epidemiology of Human Rhinovirus C in Patients with Acute Respiratory Tract Infections in Osaka City, Japan
Japanese Journal of Infectious Diseases 64, 468-492 (2011), 査読有
<http://www0.nih.go.jp/JJID/64/488.pdf>

⑨ Kaida A, Kubo H, Sekiguchi J, Kohdera U, Togawa M, Shiomi M, Nishigaki T, Iritani N. Enterovirus 68 in Children with Acute Respiratory Tract Infections, Osaka, Japan
Emerging Infectious Diseases 17, 1494-1497 (2011), 査読有
DOI: 10.3201/eid1708.110028

⑩ Sekiguchi J, Kubo H, Kaida A, Takakura K, Goto K, Hase A, Iritani N. High incidence of human echovirus type 3 among children in Osaka, Japan during the summer of 2010
Japanese Journal of Infectious Diseases 64, 533-535 (2011), 査読有
<http://www0.nih.go.jp/JJID/64/533.pdf>

⑪ 改田 厚、久保英幸、関口純一朗、入谷展弘、後藤 薫、長谷 篤
呼吸器感染症検体中の多項目呼吸器ウイル

ス検出の試み—大阪市
病原微生物検出情報 32, 202-203(2011), 査
読無
[http://idsc.nih.go.jp/iasr/32/377/kj377
3.html](http://idsc.nih.go.jp/iasr/32/377/kj3773.html)

⑫ 改田 厚、久保英幸、関口純一朗、入谷
展弘、後藤 薫、長谷 篤
大阪市内で検出された麻しんウイルス株の
分子疫学的解析
大阪市立環境科学研究所報告 73, 1-6
(2011), 査読無
[http://www.city.osaka.lg.jp/kenko/cmsfi
les/contents/0000148/148573/r2010_01-06
.pdf](http://www.city.osaka.lg.jp/kenko/cmsfiles/contents/0000148/148573/r2010_01-06.pdf)

⑬ 後藤 薫、改田 厚、久保英幸、阿部仁一
郎、入谷展弘、小笠原 準、山崎一夫、高倉
耕一、北野雅昭、長谷 篤
大阪市域において2005年から2009年に実施
したウエストナイルウイルス保有蚊調査
大阪市立環境科学研究所報告 73, 7-14
(2011), 査読無
[http://www.city.osaka.lg.jp/kenko/cmsfi
les/contents/0000148/148573/r2010_07-14
.pdf](http://www.city.osaka.lg.jp/kenko/cmsfiles/contents/0000148/148573/r2010_07-14.pdf)

〔学会発表〕(計18件)

① 改田 厚、園侍寺 美、天羽清子、塩見
正司、入谷展弘
乳幼児呼吸器感染症における多項目呼吸器
ウイルス遺伝子検出
第54回日本臨床ウイルス学会
2013年06月09日
倉敷市芸文館

② 伊藤正寛、改田 厚、庵原俊昭
小児呼吸器感染症におけるRSウイルス、ヒ
トメタニューモウイルスの検出
第54回日本臨床ウイルス学会
2013年06月09日
倉敷市芸文館

③ 改田 厚、入谷展弘
麻しん診断例における発しん関連ウイルス
の検出ウイルス遺伝子検出
第54回日本臨床ウイルス学会
2013年06月08日
倉敷市芸文館

④ 駒瀬勝啓、竹田 誠、庵原俊昭、皆川洋
子、安井善宏、山下照夫、改田 厚、秋吉京
子
麻疹ウイルス流行株の推移とウイルス鑑別
方法の検討
第54回日本臨床ウイルス学会

2013年06月08日
倉敷市芸文館

⑤ 中野嘉子、天羽清子、改田 厚、外川正
生
コクサッキーウイルスB4感染により皮膚筋
炎を発症した一例
第44回日本小児感染症学会総会・学術集会
2012年11月25日
北九州国際会議場

⑥ 改田 厚
保育所入所児における呼吸器ウイルス検出
状況
第44回日本小児感染症学会総会・学術集会
2012年11月24日
北九州国際会議場

⑦ 改田 厚、久保英幸、関口純一朗、入谷
展弘
呼吸器感染症患者からのエンテロウイルス
104型の検出および遺伝子解析
第60回日本ウイルス学会学術集会
2012年11月14日
大阪国際会議場

⑧ 入谷展弘、改田 厚、山元誠司、久保英
幸
2012年4～6月に大阪市内保育所で多発し
た集団胃腸炎事例のウイルス学的調査
第60回日本ウイルス学会学術集会
2012年11月14日
大阪国際会議場

⑨ 實方 剛、入谷展弘、改田 厚、谷口孝
喜、油井晶子、Batbaatar Gunchin、Gotov
Choijamts
モンゴル国における急性胃腸炎患者からの
パレコウイルス、ボカウイルス、アイチウイ
ルスの検出
第60回日本ウイルス学会学術集会
2012年11月14日
大阪国際会議場

⑩ 勢戸祥介、小川貴史、今井一人、入谷展
弘、改田 厚、久保英幸
大阪市内で検出されたNorovirus GII.6の抗
原性および組織血液型抗原結合能について
第60回日本ウイルス学会学術集会
2012年11月14日
大阪国際会議場

⑪ 廣川秀徹、改田 厚、久保英幸、山元誠
司、入谷展弘、後藤 薫、長谷 篤、半羽宏
之、吉田英樹、松本健二
麻しん疑い症例における、発しん性ウイルス
感染症の鑑別診断

第 36 回大阪府医師会医学会総会
2012 年 11 月 11 日
大阪府医師会館

⑫ 改田 厚、入谷展弘
マルチプレックス・リアルタイム PCR 法による麻しんウイルス、風しんウイルス、ヒトパルボウイルス B19 の検出
第 53 回日本臨床ウイルス学会総会
2012 年 06 月 16 日
千里ライフサイエンスセンター

⑬ 入谷展弘、改田 厚、田中智之、野田 衛
カキ喫食を伴う食中毒疑い事例からのウイルスの検出
第 53 回日本臨床ウイルス学会総会
2012 年 06 月 16 日
千里ライフサイエンスセンター

⑭ 伊藤正寛、近野真由美、改田 厚、庵原俊昭
京都市病原体サーベイランスにおける RS ウイルス、ヒトメタニューモウイルスの検出
第 53 回日本臨床ウイルス学会総会
2012 年 06 月 16 日
千里ライフサイエンスセンター

⑮ 中山哲夫、改田 厚、駒瀬勝啓
麻疹ウイルス野生流行株とワクチン株との鑑別
第 53 回日本臨床ウイルス学会総会
2012 年 06 月 16 日
千里ライフサイエンスセンター

⑯ 改田 厚、入谷展弘
麻しん診断例における麻しんウイルス検出状況と陽性株の分子疫学的解析
第 86 回 日本感染症学会総会・学術講演会
2012 年 04 月 25 日
長崎ブリックホール

⑰ 改田 厚、園府寺 美、木野 稔、天羽清子、塩見正司
呼吸器感染症、熱性けいれんの乳幼児からのエンテロウイルス 68 型の検出
第 52 回日本臨床ウイルス学会
2011 年 6 月 11 日
三重県総合文化センター

⑱ 園府寺 美、木野 稔、改田 厚
ウイルス性下気道炎の臨床的特徴
第 52 回日本臨床ウイルス学会
2011 年 6 月 11 日
三重県総合文化センター

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

改田 厚 (KAIDA ATSUSHI)
大阪市立環境科学研究所・研究員
研究者番号：50372131

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：