

令和 3 年 9 月 2 日現在

機関番号：17301

研究種目：奨励研究

研究期間：2020～2020

課題番号：20H01084

研究課題名 乳幼児突然死症候群（SIDS）とウイルス感染との関係解明

研究代表者

平倉 説子（HIRAKURA, Setsuko）

長崎大学・熱帯医学研究所・技能補佐員

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 480,000 円

研究成果の概要：本研究では長崎大学医学部法医学教室で採取、保管している2歳以下の死因不詳患者の肺を検体とした。凍結組織約30 mgから全RNAを抽出しRT-PCRによりcDNAを作製、RSVの核酸の特異的部位を認識するプライマーを用いてPCRを行いウイルス由来のRNAを検出した。また、他の呼吸器疾患系ウイルス13種についても検査した結果、11検体中でhMPV陽性2検体、PIV3陽性1検体、Rhino陽性1検体を認めた。しかし、感染症状（発熱、鼻水）はどの患者でも確認されておらず無症状での重複感染例があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の成果により、無症状の患者であっても呼吸器疾患系のウイルス由来RNAの陽性が認められた。これにより、乳幼児呼吸器へのウイルス感染と乳幼児突然死症候群（SIDS）が関連している可能性が示唆された。今回は凍結組織を用いての検査であったが、今後ホルマリン包埋サンプルからRNA抽出して検査範囲を広げることにより、さらにウイルス感染とSIDSの関連性を明らかにし、疾患予防につながる知見が得られることが期待でき、学術的、社会的意義がある。

研究分野：小児感染症学分野

キーワード：乳幼児突然死症候群（SIDS） RSウイルス ウイルス感染

1. 研究の目的

乳幼児突然死症候群(SIDS: Sudden Infant Death Syndrome)は、原則として1歳未満の乳幼児が、それまでの健康状態に何ら問題がなく、予兆や既往歴もないまま死に至る原因不明の疾病である。死亡状況調査や病理解剖によっても、いまだ原因の特定に至っていない。近年、SIDSと診断された乳幼児の解剖所見から、呼吸器系のウイルス感染症の可能性が示唆された。新生児が出生直後に母体から得る移行抗体は、生後9ヶ月頃には消失し、小児呼吸器疾患の代表的な病原体であるRSウイルス(RSV)は、2歳までに100%感染する。重症では小児肺炎となるが、ごく軽症の風邪様症状に留まるか、まったく無症状のこともある。RSVが下気道に感染した場合、気管支末端に局所的炎症が起こり、短時間で気道閉塞を引き起こし、窒息死に至る可能性が考えられる(図1)。本研究は、乳幼児呼吸器へのウイルス(RSV)感染とSIDSとの関連性を明らかにすることを目的としており、臨床検体からのウイルス検出と同時に、in vitroで感染状態を再現し、SIDSの発症機構を解明する。これにより、疾患予防につながる知見が得られる。



2. 研究成果

(1) 臨床検体からのウイルス由来核酸の検出

検体：長崎大学医学部法医学教室で採取、保管している2歳以下の死因不詳患者の凍結肺組織11検体。

方法：① 凍結肺組織約30mgから、RNA抽出キット(One Step RT-PCR Kit, キアゲン)を用いて全RNAを抽出した。抽出後、ナノドロップにより濃度を測定した。

② RT-PCRによりcDNAを作製、呼吸器疾患系ウイルスの核酸の特異的部位を認識するプライマーを用いてPCRを行い、ウイルス由来のRNAを検出した。対象とした呼吸器疾患系ウイルスは、RSV、インフルエンザA、B、hMPV、パラインフルエンザ1、2、3、4、ライノ、HCoV-229E、HCoV-OC43、アデノ、ボカの13種類である。

結果：① 凍結肺サンプル21~30mgから抽出できた全RNA量は27~110μgであった。RNA 8μgをPCRのテンプレートとしたが、抽出量が不十分だったものは各々使用可能上限量を用いた(表1)。

表1. サンプルごとの検体量および抽出した全RNA量

サンプル No.	凍結肺組織	QIAzol	ナノドロップ測定結果			収量	PCR使用量 μg
	mg	μl	ng/μl	260/280	260/230	μg	
サンプル01	30	300	1635.8	2.04	2.23	81.79	8.00
サンプル02	27	300	1120.4	2.00	1.98	56.02	6.00
サンプル03	28	300	1843.5	2.02	2.23	55.31	8.00
サンプル04	23.2	300	1193.6	1.99	1.63	35.81	7.00
サンプル05	21	300	1746.3	1.96	2.26	52.39	8.00
サンプル06	26.3	300	3666.6	1.93	2.30	110.00	8.00
サンプル07	28	300	790.5	2.00	2.28	23.72	4.74
サンプル08	25.5	300	1890.7	2.01	2.26	56.72	8.00
サンプル09	27.4	300	894.4	1.99	2.24	26.83	5.37
サンプル10	27.9	300	989.4	2.02	1.79	29.68	5.94
サンプル11	27	300	1857.8	1.97	1.91	55.73	8.00

(2) 呼吸器疾患系ウイルスの検出

- a. hMPV 陽性の確認：検死時に hMPV 陽性であった検体が凍結サンプルでも検出できるかを確認

結果：◎hMPV の検出を確認できた（図 2）。

◎PCR は RNA を希釈せず行う方がよい。

- ① サンプル 01：希釈なし
- ② サンプル 01：10 倍希釈
- ③ サンプル 02：希釈なし
- ④ サンプル 02：10 倍希釈

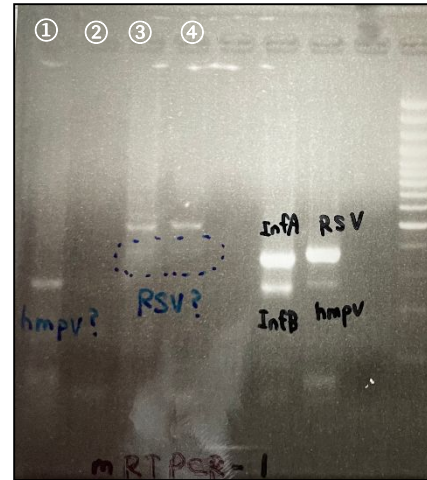


図 2. サンプル 01 および 02 の PCR 結果

b. その他のウイルスの検出

結果：11 検体中 4 検体で、1st-PCR において

呼吸器疾患系ウイルスの陽性を確認した。1st-PCR で陰性であっても、さらに 2nd-PCR、nested-PCR を行うと陽性となった検体が 5 検体、2 種類以上のウイルス陽性が 4 検体で確認された（表 2）。

表 2. 全サンプルのウイルス RNA 検査結果

	サンプル01	サンプル02	サンプル03	サンプル04	サンプル05	サンプル06	サンプル07	サンプル08	サンプル09	サンプル10	サンプル11
InfA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
InfB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RSV	-	△	△	-	△	-	-	△	-	△	-
hMPV	○	-	△	-	-	-	-	-	○	-	-
PIV 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PIV 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PIV 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-
PIV 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhinoウイルス	-	-	△	△	-	-	-	△	-	-	○
HCoV-229E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HCoV-OC43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Adenovirus	-	-	-	-	-	-	-	△	-	-	△
Human bocavirus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

○：1st-PCR で陽性が確認されたもの △：2nd-PCR、nested-PCR で陽性が確認されたもの

考察

- ・ 1st-PCR において呼吸器疾患系ウイルスが陽性となったのは、全体の 36%であった。無症状であっても 4 割程度の SIDS 患者がウイルスに感染していることが判明した。
- ・ 1st-PCR において結果が陰性だった 5 検体は、2nd-PCR、nested-PCR の結果陽性となった。検体に含まれていたウイルス由来 RNA がごく微量で、簡易検査では発見できない程度の感染もあると考えられる。この検体を含めると、全体の 81%が何らかの呼吸器疾患系ウイルスに感染していた可能性がある。
- ・ 最終的に、4 検体では 2 種類以上のウイルス由来 RNA が検出された。これらの患者は、重複感染となっていた可能性があり、単独感染よりも何らかの影響を受けやすかったことが考えられる。
- ・ 検出されたウイルスはごく微量であり、気管支末端に炎症を起こし閉塞につながることは考えにくい。ウイルス感染による何らかの信号が、未熟な乳幼児の神経系から呼吸器中枢に作用し、呼吸停止から窒息に至った可能性が考えられる。

主な発表論文等

- 〔雑誌論文〕 計0件
- 〔学会発表〕 計0件
- 〔図書〕 計0件
- 〔産業財産権〕
- 〔その他〕

—

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名
片上 幸美	(KATAGAMI Yukimi)
新宮 啓太	(SHINGU Keita)
三瀬 正秀	(MITSUMA Masahide)
池松 和哉	(IKEMATSU Kazuya)
吉田 レイミント	(YOSHIDA Lay Myint)