

機関番号：84406

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790600

研究課題名（和文）

乳幼児呼吸器感染症の病原体網羅的検出法の構築および脳症、脳炎との関連解析

研究課題名（英文）

Establishment of gene detection system for multiple respiratory viruses and analysis its prevalence and association with encephalopathy or encephalitis.

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）：

呼吸器感染症の病原体は多く報告されている。本研究では、特にウイルス感染症に焦点を当て、multiplex real-time PCR 法を用いた 18 の呼吸器ウイルス検出系を構築し、乳幼児呼吸器感染症検体を用いて、1 年間を通じた病原体検出、流行解析をおこなった。その結果、(1) 呼吸器ウイルス感染症のうち、約 45%は、2 種以上の複数ウイルス陽性例であること、(2) 複数ウイルス陽性例は、特に春季に高い割合を示すことを明らかにした。従来、単一病原体に起因すると考えられていた呼吸器感染症において、複数の病原体共存例が多いことが示唆され、今後、共存の意義の解析が必要であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Many pathogens have been reported to associate with acute respiratory tract infections (ARTIs). In this study, we established 18 respiratory viruses detection system using multiplex real-time PCR. We surveyed respiratory viruses especially for children with ARTIs. The results showed that (1) a total of respiratory virus positive specimens, the co-detected viruses occupied approximately 45%, (2) the specimens co-detected with multiple viruses showed high proportion mainly in spring during the 1-year-study. Continued surveillance is needed to clarify the role and physiological importance of co-detected viruses in ARTIs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：地域保健、乳幼児呼吸器感染症

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。多くは軽快するが、乳幼児では入院治療や呼吸管理が必要となる場合がある。また、稀に脳症や脳炎を併発し、麻痺など後遺症のリスクが生じる可能性もある。乳幼児や高齢者、免疫不全の患者では重篤化し、死に至る場合もあるため、公衆衛生上のインパクトは大きい。呼吸器感染症の病原体を迅速かつ正確に検出、同定することは、有効な治療や感染拡大予防に非常に役立つとともに、病原体の詳細な流行解析が可能となるため、治療、予防、流行解析の3つの観点から非常に意義深い。しかしながら、呼吸器感染症の病原体はウイルス、細菌、真菌など多く報告されており、各々の病原体の検出を個別に試みることは困難である。また、最近まで、病原体の共検出が臨床症状に及ぼす影響について詳細に解析されることはほとんどなく、症状の重症度とその原因病原体との関連は、単一の病原体検出のみで解析されることが多かった。呼吸器感染症のうち約9割はウイルスが原因であると言われている。2000年代に入り、新たな呼吸器ウイルスの発見が相次いだ。これら新興呼吸器ウイルスを含めた包括的な検出系の構築、発生動向、他ウイルスとの共検出例の解析は、日本国内においてほとんど実施されておらず、詳細な解析が必要と考えられた。抗体を用いたウイルス抗原検出系は、対象ウイルスおよび血清型が多いことから困難と考え、遺伝子検出系に焦点を絞った。特に特異性が高い点、多くの研究機関において導入されている機器を利用する点を考慮し、**real-time PCR** 機器を用いた汎用性の高い検出系の構築に焦点を当てた。

2. 研究の目的

本研究では既報告の検出法と比較して、新興呼吸器ウイルスを含めた多項目の呼吸器ウイルスについて検出可能な系を構築することで、呼吸器ウイルスの包括的な検出・流行解析をおこなうことを目的にした。また、単一のウイルスの検出・流行解析のみならず、共検出例の動向について、疫学情報をもとに疾患と呼吸器ウイルス検出状況との関連についても解析をおこなった。一方、呼吸器感染症とは一見関連が低いと考えられる不明熱や熱性けいれん、乳幼児における急性脳症や脳炎併発症例についても、呼吸器ウイルスを探索することで、検出ウイルスの新たな病原性の検討を試みた。

3. 研究の方法

本研究では、TaqMan probe を用いた multiplex real-time PCR 法による18呼吸

器ウイルスの検出系を構築した [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、ヒトコロナウイルス (OC43, 229E, NL63, HKU1)、ヒトパラインフルエンザウイルス (1~4型)、ヒトボカウイルス、ヒトメタニューモウイルス、ヒトライノウイルス、RSウイルス]。TaqMan probe については、FAM, VIC, Cy5 の3つの蛍光色素を用いることで、同一ウェル中で最大3病原体の同時検出を可能とした。エンテロウイルス、ヒトライノウイルスは、RT-PCR 法での検証も並行して実施した。構築した検出系を検証するため、乳幼児の呼吸器感染症検体 (鼻汁、喀痰、咽頭ぬぐい液、気管吸引液)、不明熱、熱性けいれん検体 (鼻汁、咽頭ぬぐい液) および脳症、脳炎検体 (鼻汁、髄液) について、1年間を通して呼吸器ウイルス検出を試みるとともに、共検出例が判明した病原体については、臨床症状と照会し、引き起こす症状の傾向、重症度、および病原性変化との関連について解析した。一方、個々のウイルスについては、2007年に発見されたばかりで国内での解析が実施されていないヒトライノウイルスグループCの流行解析を実施した。多項目呼吸器ウイルス検出を継続して実施する中で2010年夏、エンテロウイルスの急増を認めたので、その同定ならびにゲノム配列の解読、分子疫学的手法を用いた解析を実施した。

4. 研究成果

Multiplex real-time PCR 法を用いて、2009年10月~2010年9月までの期間に採取された主に乳幼児の呼吸器感染症由来 427 検体 (インフルエンザ診断例は除外) について、調査した。その結果、361 検体 (84.5%) から596のウイルスを検出した。ウイルス陽性検体のうち、1種ウイルス陽性が55.1%、2種以上の複数ウイルス陽性が44.9%であり、複数ウイルス陽性例が高い割合を示すことを見いだした。検体数は月により変動するため、検出率を指標に解析した結果、春季(3~5月)に高い検出率を示すウイルスが多いことが示唆された (ヒトパラインフルエンザウイルス3型、ヒトボカウイルス、ヒトメタニューモウイルス、ヒトライノウイルス)。また、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も春季に高い割合を示すことから、春季は、異なるウイルスへの感染機会が高いことが示唆され、症状の遷延化、複雑な症状を呈する症例に関与する可能性が考えられた。以上の結果、冬季のみならず春季についても呼吸器感染症に注意が必要な時期であると考えられた。春季は、保育所、幼稚園、小学校など新しい社会生活が始まる時期であり、特に乳幼児においては、ウイルス

への初感染の機会が高くなることや、春季の呼吸器ウイルス検出数増加を反映しているのかもしれない。個々のウイルスについては、ヒトライノウイルス検出数が133と最も多く、全検出ウイルス数の22.3%を占めた。以下、RSウイルス (n=82)、ヒトボカウイルス (n=78)、アデノウイルス (n=67)、インフルエンザウイルスA (H1N1)2009 (n=50)、パラインフルエンザウイルス3型 (n=49)、エンテロウイルス (n=35)と続いた。また、国内での報告がほとんどない新興呼吸器ウイルスの1つであるヒトコロナウイルス HKU1 についても5株検出した。現在、分子疫学的手法を用いて陽性株の解析を実施している。今後のワクチン開発については、ヒトライノウイルス等、検出数が多数を占めるウイルスを標的にすると呼吸器感染症患者の発生抑制効果、症状の軽減効果が高いと推測された。

一方、ヒトライノウイルスについて、2008年11月～2009年10月までの期間に採取された336検体について遺伝子検査を実施した結果、84検体がヒトライノウイルス陽性であった。遺伝子型別を実施した結果、グループAが54株、グループBが0株、グループCが30株であった。統計学的手法を用いた解析の結果、流行期については、グループCは9～3月、グループAは3～11月であることが示唆された。

多項目呼吸器ウイルス検出を継続して実施する中で、2010年夏、エンテロウイルスの急増を確認した。RT-PCR法による特異的増幅産物のサイズが予想サイズと異なることから塩基配列を決定し、解析を進めた結果、国内では大規模検出が報告されていないエンテロウイルス68型 (EV68)と判明した。EV68陽性者 (15名)はすべて5歳以下の乳幼児であり、熱性けいれんの1例を除く14名は下気道炎症状を呈していた。海外での大規模検出もほとんどないことから、5'非翻訳領域の一部および全タンパク質コード領域について塩基配列を解読し、データベース上に登録されているEV68陽性株との塩基配列、アミノ酸相同性比較を実施した。また、海外で過去に報告されたEV68株のVP1領域について、近隣接合法を用いて分子系統樹を作成した。その結果、我々が検出したEV68株は、独自のクラスターを形成したことから過去海外で報告されたEV68株とは遺伝的に異なることが示唆された。過去報告株との詳細な比較検討の結果、抗ウイルス活性 (中和活性)に関与するVP1タンパク質のアミノ酸相同性の低下、ならびに5'非翻訳領域の塩基配列の一部欠失 (36塩基)が認められた。上記の2要因がEV68の急激な検出増加に関連している可能性が考えられた。不明熱、熱性けいれん検体については、呼吸器ウイルスが多く検出されたことから、そ

の関連について、更なる解析を進めている。脳炎・脳症由来検体については、一部、呼吸器由来検体からは呼吸器ウイルスが検出されるものの、髄液からの検出はほとんどない。今後の継続した調査が必要であると考えられた。

呼吸器ウイルスの遺伝子検出は高感度であるために、必ずしも検出ウイルスが実際の症状と直接関連するとは限らない。また、陰性の証明はできないこと、偽陽性の可能性があること、そして、ウイルスの性状解析には、ウイルスを分離することが欠かせないことから、他の手法の結果を含めた総合的な解析が重要であると考えられた。

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12件)

Kaida A, Kubo H, Sekiguchi J, Kohdera U, Togawa M, Shiomi M, Nishigaki T, Iritani N.

Detection of Enterovirus 68 in infants and children with acute respiratory tract infection or febrile convulsion in Osaka City, Japan

Emerging Infectious Diseases

2011 (in press). 査読有

Kaida A, Kubo H, Takakura KI, Iritani N. Detection and quantitative analysis of human bocavirus associated with respiratory tract infection in Osaka City, Japan.

Microbiology and Immunology

54: 276-281. 2010. 査読有

Iritani N, Kaida A, Kubo H, Abe N, Goto K, Ogura H, Seto Y

Molecular epidemiology of noroviruses detected in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis in Osaka City, Japan, during the seasons from 1996/97 through 2008/09.

Journal of Medical Virology

82:2097-105. 2010. 査読有

改田 厚、久保英幸、関口純一郎、入谷展弘、後藤 薫、長谷 篤、大町太一、舟木克枝、園府寺 美、天羽清子、塩見正司、中野嘉子、外川正生

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—大阪市病原微生物検出情報

31: 300. 2010

入谷展弘、久保英幸、改田 厚、関口純一郎、

後藤 薫、長谷 篤、齊藤武志、石黒正博、鎌倉和哉、吉田英樹、清原知子、石井孝司、野田 衛
大阪市で認められた A 型肝炎 3 症例について
病原微生物検出情報
31: 296-297. 2010

久保英幸 関口純一朗 入谷展弘 改田厚、後藤 薫、長谷 篤、天羽清子、久保和毅、佐々木 赴、塩見正司
2010 年のエンテロウイルス 71 型の分離状況—大阪市
病原微生物検出情報
31: 15-16. 2010

井川久史、大賀康弘、中山敬子、大西真司、入谷展弘、改田厚、阿部仁一郎、久保英幸、関口純一朗、小笠原 準、長谷 篤、中田恵子、山崎謙治、左近(田中)直美、依田知子、久米田裕子、吉田徹也
夏季に結婚式場で発生したノロウイルスによる集団胃腸炎事例—大阪市
病原微生物検出情報
31: 10-11. 2010

入谷展弘、改田厚、久保英幸、阿部仁一郎、西尾 治、後藤 薫、長谷 篤
市販生食用カキにおけるノロウイルスおよび A 型肝炎ウイルス汚染調査(2006-2007 ~ 2009-2010 シーズン)
大阪市立環科研報告 平成 21 年度 第 72 集: 7-12. 2010

入谷展弘、改田厚、阿部仁一郎、久保英幸、後藤 薫、長谷 篤
平成 20 年度に発生した非細菌性胃腸炎事例のウイルス学的調査—大阪市—
平成 20 年度感染症流行予測調査結果報告書 第 44 報: 55-57. 2009

後藤 薫、入谷展弘、久保英幸、改田厚、阿部仁一郎、小笠原 準、長谷 篤、山崎一夫、高倉耕一、今井長兵衛
大阪市におけるウエストナイルウイルスに対する蚊のサーベイランス(2008)
平成 20 年度感染症流行予測調査結果報告書 第 44 報: 24-33. 2009

久保英幸、改田厚、入谷展弘
大阪市で分離された季節性インフルエンザウイルスの型・亜型の動向およびオセルタミビル耐性 A(H1N1)株の解析
大阪市立環科研報告
平成 20 年度 第 71 集: 7-13. 2009

長谷 篤、小笠原 準、北瀬照代、中村寛海、和田崇之、梅田 薫、入谷展弘、久保英幸、

改田厚、阿部仁一郎、藤原佐美、後藤 薫
2008 年に大阪市内の食中毒原因調査において検出された下痢原性病原微生物
大阪市立環科研報告 平成 20 年度 第 71 集: 1-7. 2009

[学会発表](計 13 件)
中野嘉子、他
2010 年に流行したエンテロウイルス 68 について
第 24 回近畿小児科学会
2011. 03. 13 (神戸市)

奥野英雄、他
ライノウイルスによる呼吸器感染症の検討
第 24 回近畿小児科学会
2011. 03. 13 (神戸市)

改田厚、他
呼吸器ウイルス網羅的検出の試み—複数ウイルス検出例の解析およびヒトコロナウイルス HKU1 の検出—
第 42 回日本小児感染症学会総会・学術集会
2010. 11. 27-28 (仙台市)

井上岳司、他
呼吸器ウイルス感染症を来した慢性神経疾患児の臨床的検討
第 42 回日本小児感染症学会総会・学術集会
2010. 11. 27-28 (仙台市)

温井めぐみ、他
神経症状により当院で入院治療を行った新型インフルエンザ症例の検討
第 42 回日本小児感染症学会総会・学術集会
2010. 11. 27-28 (仙台市)

改田厚
気道感染ウイルスの流行状況
大阪小児科医会 第 155 回学術集会
2010. 11. 20 (大阪市)

改田厚、他
呼吸器感染症患者からのヒトライノウイルス C の検出および流行解析
第 58 回日本ウイルス学会学術集会
2010. 11. 07-09 (徳島市)

入谷展弘、他
2009/10 シーズンに大阪市内で認められた GII. 2 型ノロウイルス流行
第 58 回日本ウイルス学会学術集会
2010. 11. 07-09 (徳島市)

入谷展弘、他
市販生食用カキにおけるノロウイルスおよ

び A 型肝炎ウイルス汚染調査 (2006-2007～
2009-2010 シーズン)
平成 22 年度地方衛生研究所全国協議会近畿
支部ウイルス部会総会
2010.09.17 (奈良市)

改田 厚、他
呼吸器感染症患者からのヒトボカウイルス
の検出および定量解析
第 84 回日本感染症学会総会学術講演会
2010.04.05-06 (京都市)

中田恵子、他
大阪府・大阪市・堺市の連携による大阪府内
におけるノロウイルスの流行解析
第 57 回日本ウイルス学会
2009.10.25-27 (東京都)

中田恵子、他
ノロウイルスをモデルとした大阪府全域での健
康危機管理のための情報システムの構築
平成 21 年度地方衛生研究所全国協議会近畿
支部ウイルス部会
2009.09.17 (大阪市)

入谷展弘、他
平成 20 年度に発生した非細菌性胃腸炎事例
のウイルス学的調査-大阪市-
平成 20 年度大阪感染症流行予測調査会
2009.07.02 (大阪市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

改田 厚 (KAIDA ATSUSHI)

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 :