

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：84407

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590839

研究課題名(和文) 小児の呼吸器系ウイルスの侵淫度を探る

研究課題名(英文) Investigation of the viral etiology of respiratory tract infection in children.

研究代表者

森川 佐依子 (Morikawa, Saeko)

大阪府立公衆衛生研究所・その他部局等・主任研究員

研究者番号：40321939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：小児科病院からは呼吸器症状のある小児の鼻汁を、事業所職員の子供からは、毎週健康状態の聞き取りと、うがい液を採取して、中に含まれる呼吸器ウイルスを網羅的に検出した。小児科病院では患児検体の83%から1種以上のウイルスが検出された。最も多く検出されたのはA群ライノウイルスで、全検体の22%から検出された。事業所職員の子供8名からも継続して呼吸器ウイルスの検出を試みたが、頻度の高い児では、無症状の時に採取した検体の42%からウイルスが検出された。無症状時に最も多く検出されたのはA群ライノウイルス(5%)で、ライノウイルス感染による症状は多様であり、発症、重症化は宿主側の要因が大きいと考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, separate two-step real-time PCR assays were used to detect 14 RNA viruses and a DNA virus. 1) 512 nasal aspirates from the pediatric hospital with respiratory symptoms and 2) 286 gargle specimens (obtained by rinsing the throat with distilled water) from 8 children once a week were tested. 1) Of 512 specimens analyzed, 424 (83%) were positive for 1 or more viruses. Human rhinovirus species A (HRV-A) was the most frequently detected (22% of total samples). 2) The parents of children noted the existence of respiratory symptoms and systemic symptoms (fever or rash) at the time of each sampling. HRV-A was the most common agents (5%) detected from the samples of children without any symptoms. These results suggested that HRV-A is highly common respiratory agent in children and the clinical severity of HRV infections is dependent on mainly host's factors. Respiratory viral infection without any symptoms may play an important role in the viral circulation in human populations.

研究分野：ウイルス感染症

キーワード：呼吸器ウイルス 重複感染 ライノウイルス 無症状感染者 リアルタイムPCR 小児

1. 研究開始当初の背景

小児科領域では、急性呼吸器感染症は1年を通じて最も多く認められる疾患である。原因となるのはほとんどがウイルスであることが知られているが、ウイルス種も多彩であり、さらに同一種のウイルスが多くの血清型に分けられるため、大半が症状からの診断のみで、多種の原因ウイルスを詳細に解析したデータは少ない。

申請者の所属研究所である地方衛生研究所では、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」に基づき、感染症発生動向調査を行っている。搬入される呼吸器由来検体の多くは小児科からの検体であり、臨床医のニーズとして、単に定点把握疾患の検査結果のみを還元するのではなく、原因ウイルスを迅速に検出し、重感染の有無、症状との関連性といった情報を合わせて還元することが、その後の臨床現場での診断や重症化予測の一助となると考えられる。

さらに乳児では、呼吸器感染症は重篤になりやすく、ある種のウイルスではその後の喘息の誘発因子となることが報告されているが、近年新しく発見されたウイルスや、ウイルスの重感染との関連については詳細に調べられていない。

これまでは原因ウイルスの検索法としてウイルス分離がゴールドスタンダードであったため、培養細胞にて分離できるウイルスのみが検出され、遺伝子学的手法を用いた検出により病原体として検出されるまでは、難分離性のウイルスや新しく発見されたウイルスについては、多くが陰性と判断されていた。また、分離培養法の欠点として、同時に複数のウイルスを分離することが不可能であるため、検体中に複数の病原ウイルスが存在していても、増殖しやすいウイルスが先に増殖してしまうことが多く、重感染を見付け出すことが困難であった。

従って、迅速性に優れ、重感染の検出も可能なリアルタイム PCR での呼吸器系ウイルスの検出系を構築し、上気道由来検体を用いた網羅的なウイルス解析を行うことで、重感染の有無、感染後の症状との関連性といった情報を医療期間に迅速に還元する必要があると考えられた。

2. 研究の目的

地方衛生研究所である利点を生かし、年間に多数搬入される呼吸器由来検体から、病因となったウイルスについて、近年呼吸器感染症との関連が明らかとなった新興ウイルス、重感染を含めできるだけ多種類を迅速に検出する系を構築する。

呼吸器症状を有する小児の上気道由来検体、および症状のない小児からの検体を用い、ウイルスを網羅的に検出する。

得られた結果を比較し、個々のウイルスの流行期、重症化リスクなど病原性に関する因子について解析し、早期診断と重症化予防対

策に役立てることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ウイルス検出系の構築

文献にて報告があるプライマー・プローブセットを基本とした呼吸器ウイルスのリアルタイム PCR 法による検出系について、該当するウイルスが陽性であると判明している検体を用いて検討した。さらに1枚のプレートで多検体を処理できるように、温度サイクルの統一を行った。各検出系の検出限界は、ターゲットとなるウイルス遺伝子を組み込んだプラスミドを定量し、希釈系列を検出して決定した。インフルエンザウイルスの検出は、国立感染症研究所にて作成されたマニュアルに従った。

(2) 小児の上気道由来検体からのウイルス検出

2013年第17週から2014年第16週まで、小児病院から上気道症状を呈する小児の鼻汁を検体として採取し、臨床症状の聞き取りとともに当所に搬入した。得られた検体より核酸を抽出後に(1)にて構築したリアルタイム PCR の系にてウイルスを検出した。検出結果は週単位で小児科に還元した。

2013年第25週から2014年第26週まで、8名の健康小児(年齢3~9歳)から毎週うがい液を採取し、健康状態の聞き取りを実施した。検体採取日の1週間前~2日後の間に、咳、咽頭痛、鼻汁などの呼吸器症状がある、もしくは発熱、発赤などの全身症状がある場合を「症状あり」、上記の症状が認められなかった場合を「症状なし」と定義した。

うがい液から核酸を抽出し、上記と同様にリアルタイム PCR にてウイルスを検出した。検出ウイルスの情報は毎週保護者に還元した。

、いずれの研究においても、保護者に研究内容を説明の上、署名による同意が得られた児を対象とした。

ウイルスの略語:

パラインフルエンザウイルス(PIV), RSウイルス(RSV), ヒトメタニューモウイルス(hMPV), エンテロウイルス(EV), ライノウイルス(RV), ボカウイルス(BoV), パレコウイルス(PeV) アデノウイルス(AdV), コロナウイルス(CoV) インフルエンザウイルス(FluV)

4. 研究成果

(1) ウイルス検出系の構築

15種(血清型一部含む)の呼吸器ウイルスをターゲットとした、リアルタイム PCR の系を選択した。一部の系では、プライマー配列、反応サイクルを改変し、検出系の統一を図った。検出限界は、各検出系共に、おおよそ100コピー/テストであった(表1)。

反応サイクルは、95 と 60 の2ステップに統一したが、CoV NL63, 229E, HKU-1 の3型については、60 では検出感度が低下した

ため 95 と 55 の 2 ステップとした。

EV と RV については共通の領域をリアルタイム PCR にて検出後、陽性であったものについては Ishiko¹⁾らの方法にて VP4/2 領域の一部の遺伝子配列を解析して型別を行うこととした。リアルタイム PCR が陽性であったものの、VP4/2 領域の増幅が出来なかった検体については EV/RV 型別不可とした。

表1. 本研究に用いたプライマープロベットの

ウイルス	ターゲット	プライマー・プロベットの参考文献	検出限界 (copy/mL)
PIV1	HN	Templeton et al. J.Clin.Microbiol. 2004 p.1564-1569を改変	6.55×10 ²
PIV3	HN	Templeton et al. J.Clin.Microbiol. 2004 p.1564-1569を改変	5.30×10 ²
PIV2	NP	Childlow et al Viruses 2009 p.42-56	1.0×10 ²
PIV4	NP	van de Pol et al. J. Clin. Microbiol. 2007 p.2260-2262	1.0×10 ¹
RSV	F	Mentel et al. J. Med.Microbiol. 2003 p.893-896	2.22×10 ²
hMPV	M	Raymond et al. J.Clin.Microbiol. 2009 p.743-750	2.47×10 ²
EV/RV	5NTR**	Tapparel et al. J. Clin. Microbiol. 2009 p.1742-1749	Echo 9.76×10 ¹⁰
BoV	NP-1	Neske F et al. J. Clin. Microbiol. 2007 p.2116-2122	5.05×10 ²
CoV229E	NC	Childlow et al Viruses 2009 p.42-56	1.0×10 ²
CoVNL63	NC	Childlow et al Viruses 2009 p.42-56	1.17×10 ²
CoVOC43	NC	Childlow et al Viruses 2009 p.42-56	2.19×10 ²
CoV HKU	ORF 1a/b	Childlow et al Viruses 2009 p.42-56	1.11×10 ²
PeV	5NTR	Nix et al. J. Clin. Microbiol. 2008 p.2519-2524	1.0×10 ²
AdV(ACDF)	hexon	Wong et al. J. Med. Virol. 2008 p.856-865	1.0×10 ²
AdV(BE)	hexon	Wong et al. J. Med. Virol. 2008 p.856-865	1.0×10 ²
FluV typeA	MP	Nakauchi et al. J. Virol. Methods. 2011 p.156-162	7.5*
FluV AH1999	HA	Nakauchi et al. J. Virol. Methods. 2011 p.156-162	6.8*
FluV AH3	HA	Nakauchi et al. J. Virol. Methods. 2011 p.156-162	7.1*
FluV B	NS	Nakauchi et al. J. Virol. Methods. 2014 p.110-115	8.2*

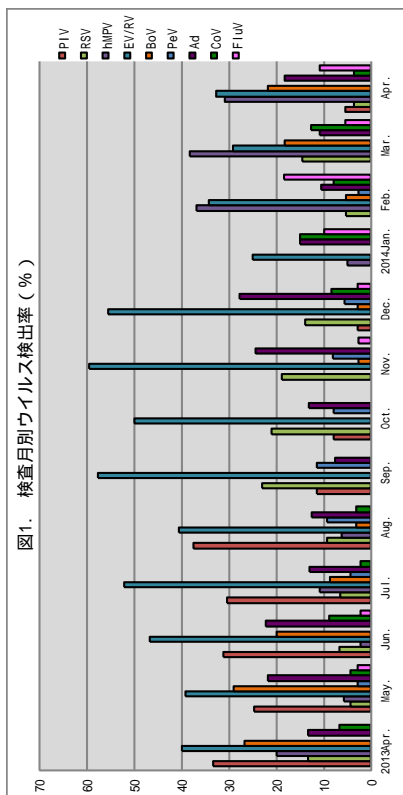
* 文献に記載の限界値

** NTR=non translated region

(2) 小児の上気道由来検体からのウイルス検出

小児病院に依頼して、呼吸器症状を呈する小児から、本人および保護者の同意のもと鼻汁を採取した。1年間の研究期間に 512 検体を得た。リアルタイム PCR による各ウイルスの検出状況を図 1 に示す。

1 検体あたりのウイルス検出数は 1 種が 264 検体 (51.6%) と全体の約半数を占め、2 種が (22.7%)、3 種が (7.4%) であった。最も多くウイルスが検出されたのは 5 種で 1 検体



(0.2%)からであり、検査項目が全て陰性であったものは 88 検体 (17.2%) であった。重複感染が多かったのは、BoV、PeV、RV であった。続いて、RV はシーズンを通じて最も多く検出されたが、単独で検出された割合 (51.4%) と、他のウイルスと同時に検出された割合がほぼ等しかったことから、感染が症状に及ぼす影響を解析した。

RV を除いた検出率上位 5 種のウイルス (PIV3 型、RSV、hMPV、BoV、AdV) と RV について、単独感染時、2 重感染時での入院日数と喘鳴の有無、酸素投与の有無を比較した。PIV3 型と RV との重感染では PIV3 型の単独感染に比較して入院日数が長くなり、AdV と RV の重感染では、AdV の単独感染に比較し酸素投与が必要となった児が多かった事が示された。しかし、その他のウイルスでは単独感染と比較して RV が重複感染していても、入院日数、酸素投与の有無、喘鳴の有無に有意な差は認められなかった。

一方で、RV 単独感染時とその他のウイルスの単独感染時での入院日数に有意な差は認められず、RV 感染によって起こる臨床像は、入院が必要な事例から特に現病歴に影響を与えない場合まで多様であることが推察された。

8 名の小児から、毎週うがい液を採取し、1年間で合計 286 検体を得た。

健康状態の聞き取りの結果、200 検体は「症状なし」の期間に採取されたと判断した。「症状なし」の検体のうち 22.5%にあたる 45 検体から呼吸器ウイルスが検出され、その中の 4 検体は 2 種のウイルスが同時に検出された。内訳は、RV と AdV の同時検出が 3 検体、EV/RV 型別不可と CoV 229E の共検出が 1 検体であった。「症状なし」の検体からのウイルス検出率は、個人により 9.1%~42.9%と差が見られた。同様に「症状あり」の検体からの検出率も 18.2%~57.1%と個々で差があった。

「症状あり」の検体では、86 検体のうちの 27 検体 (31.4%) から 1 つ以上のウイルスが検出された。27 検体のうちの 2 検体は RV と PIV の共検出であった。

「症状なし」、「症状あり」の各期間に採取された検体で最も多く検出されたのは、いずれも RV であり、「症状なし」の 10.0%、「症状あり」の 14.0%の検体から検出された (表 2)。

「症状なし」の期間に採取された検体より検出されたのは EV、RV、PeV、CoV HKU-1 と 229E、AdV であり、「症状あり」から検出されたのは、上記ウイルスに加えて CoV OC43、PIV2 型、4 型、RSV であった。FluV、BoV、hMPV は期間を通じて検出されなかった。検出されなかったウイルスについては、対象者が流行の影響を受けなかったためと考えられた。

また、RV の遺伝子型別を実施したところ、「症状なし」検体から検出された場合の RV であっても、検出されてから引き続いて 2 週間は同型の RV が検出されることがあるが、その後は異なる型の RV が検出されることが

表2. 小児のうがい液からの検出ウイルス

ウイルス	採取時の状況	検出数(%)
エンテロウイルス68型	症状なし	1 (0.5)
	症状あり	1 (1.2)
ライノウイルス	症状なし	20 (10.0)
	症状あり	12 (14.0)
パレコウイルス	症状なし	8 (4.0)
	症状あり	2 (2.3)
コロナウイルス HKU-1	症状なし	1 (0.5)
	症状あり	0 (0)
コロナウイルス 229E	症状なし	3 (1.5)
	症状あり	2 (2.3)
コロナウイルス OC43	症状なし	0 (0)
	症状あり	1 (1.2)
バラインフルエンザウイルス 2型	症状なし	0 (0)
	症状あり	1 (1.2)
バラインフルエンザウイルス 4型	症状なし	0 (0)
	症状あり	1 (1.2)
RSウイルス	症状なし	0 (0)
	症状あり	2 (2.3)
アデノウイルス	症状なし	5 (2.5)
	症状あり	2 (2.3)
エンテロウイルス/ライノウイルス 型別不可	症状なし	11 (5.5)
	症状あり	5 (5.8)

ら、症状が認められない場合でも短期間で RV は気道上皮から排除されることがわかった。

遺伝子増幅法によるウイルスの検出では、ウイルスの感染性についてはわからないため、検出したウイルスが疾患の原因であるのか、過去の感染を反映しているのか、発症直前の状態であるのかが明らかではなかった。今回我々は、同一児から連続して検体を採取したことで、検出ウイルスと症状との関連を明らかにすることが出来た。

、 どのいずれの検体からも、最も多く検出されたのは RV であった。検出された RV の遺伝子型別を比較した結果、特定の遺伝子型と重症度に関連はなく、RV 感染における症状は無症状から入院が必要とされる状態まで様々である事が明らかとなった。本研究の結果、重症化にはウイルス側よりも宿主側の因子が大きいと推測された。

呼吸器ウイルスの多くは、感染後速やかに排除されるため、無症状の児の存在は RV の感染環において重要な役割を担っていると考えられた。

<関連文献>

- 1) 石子博昭他 臨床とウイルス(1999) 27: 283-293

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 6 件)

1. Morikawa S, Hiroi S, Kase T. Detection of respiratory viruses in gargle specimens of healthy children.

J Clin Virol. (査読有) 2015 Mar;64:59-63. doi: 10.1016/j.jcv.2015.01.006. Epub 2015 Jan 13.

2. Hiroi S, Morikawa S, 全 9 名 Trivalent influenza vaccine-induced antibody response to

circulating influenza a (H3N2) viruses in 2010/11 and 2011/12 seasons. Hum Vaccin Immunother. (査読有) 2015 Feb;11(2):386-90. doi: 10.1080/21645515.2015.1009338.

3. 前田章子、森川佐依子、全 5 名 インフルエンザウイルス抗体価測定に関する問題点 -2006/07 シーズンワクチン株 A/広島/52/2005 (H3N2) の非特異的凝集抑制物質 (nonspecific inhibitor) 感受性に関する検討- (査読有) 2012 年第 86 巻第 4 号 p.400-404 <http://journal.kansensho.or.jp/Disp?pdf=0860040400.pdf>

[学会発表](計 4 件)

1. 森川佐依子、園府寺 美、加瀬哲男 ライノウイルス重感染と重症度との関連 第 89 回日本感染症学会総会 平成 27 年 4 月 16 日 京都国際会館(京都市左京区岩倉大鷲町)
2. 森川佐依子、加瀬哲男 小児うがい液からの継続したウイルス検出の試み 第 57 回日本感染症学会中日本地方会 平成 26 年 10 月 24 日 岡山コンベンションセンター(岡山市北区駅元町)
3. 保坂泰介(中野こども病院 全 10 名)、森川佐依子(大阪府立公衆衛生研究所) ヒトメタニューモウイルス感染症入院症例における単独感染と重感染の臨床的検討 第 46 回日本小児感染症学会学術集会 平成 26 年 10 月 19 日 京王プラザホテル(東京都新宿区新宿)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森川 佐依子 (MORIKAWA, Saeko)

大阪府立公衆衛生研究所・ウイルス課・主任研究員

研究者番号: 40321939