

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：84407

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460819

研究課題名(和文) 乳幼児呼吸器感染症ウイルスの分子疫学ならびに予防・治療をめざした基礎研究

研究課題名(英文) Molecular epidemiology and research on prevention and anti-viral agent against respiratory viruses for young children

研究代表者

改田 厚 (Kaida, Atsushi)

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・微生物部・主任研究員

研究者番号：50372131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：乳幼児呼吸器感染症の主原因はウイルス感染である。我々の先行研究では、6歳未満の乳幼児では、ライノウイルス(HRV)、パラインフルエンザウイルス(HPIV)が全検出ウイルスの40%近くを占めていた。本研究では、HRV、HPIV1～3型に焦点をあて、ゲノム解析、分子疫学解析をおこなうとともに期間中に突発的な検出増加と世界的流行が認められたエンテロウイルスD68型陽性株について、ゲノム解析をおこない、世界中の検出株と比較をおこなった。

研究成果の概要(英文)：One of the major causative agents of respiratory tract infections among children is respiratory virus. Our previous study suggested that human rhinovirus (HRV) and human parainfluenza viruses (HPIVs) accounted for about 40% of the total detected respiratory viruses from specimens of patients with respiratory symptoms. This study focused on HRV and HPIV types 1, 2, and 3 and performed a molecular epidemiological analysis. Also, complete genome sequences of the enterovirus D68 strains detected during the study period were also analyzed and compared with strains identified from other areas in the world.

研究分野：呼吸器感染症ウイルスの分子疫学および基礎研究

キーワード：分子疫学 ウイルスゲノム パラインフルエンザウイルス ライノウイルス エンテロウイルスD68

1. 研究開始当初の背景

乳幼児呼吸器感染症の主要原因はウイルス感染である。我々の先行研究において、乳幼児呼吸器感染症検体を用いた多項目(19ウイルス、サブタイプ含)の主要な呼吸器感染症ウイルスの遺伝子検査をおこなった。その結果、6歳未満の乳幼児では、ライノウイルス(HRV)、パラインフルエンザウイルス(HPIV)が全検出ウイルスの40%近くを占めており、重要な病原体であることを明らかにした。そこで、HRV、HPIVに焦点をあて、研究をおこなうことにした。

2. 研究の目的

本研究では、乳幼児呼吸器感染症の主要原因ウイルスであるが、その詳細な実態が不明であるHRV、HPIVについて、陽性株のゲノム解析、分子疫学解析をおこない、流行実態の解明、国内流行ウイルス株の解析を目的とした。また、両ウイルスについて、迅速ウイルス検出法の構築、抗ウイルス薬、ワクチンの開発に向けた基礎的研究をおこなうことで、臨床現場、治療、予防に貢献可能な知見、公衆衛生に資する知見獲得を目的とした。本研究期間中に呼吸器感染症の原因として世界的に突発的な出現・流行を繰り返したエンテロウイルスD68型(EV-D68)を複数検出したことから、その陽性株について、分子疫学解析をおこなった。

3. 研究の方法

1) HPIVの疫学解析

HPIVは、1~4型に分類される。1, 2, 3型について、hemagglutinin-neuraminidase (HN) 遺伝子領域の全塩基配列を解読、決定し、分子疫学解析を実施した。

2) 培養細胞を用いた効率的なHRV、HPIV分離方法の構築の試み

抗ウイルス活性物質の探索において、培養細胞を用いた効率的なウイルス感染実験系の構築が重要である。HRVについては、複数の初代培養細胞、細胞株、HPIVについては、Vero E6細胞株のTMPRSS2 (trans membrane protease, serine 2) 遺伝子恒常発現細胞株を樹立し、ウイルス遺伝子が陽性となった臨床検体を用いて、分離検査をおこない、培養系の評価をおこなった。

3) EV-D68型の全長ゲノム解析と分子疫学

研究期間中の複数年にわたり、18株のEV-D68株が検出された。2010年に検出された14株を含め、全長ウイルスゲノムの決定、流行解析、陽性株の分子疫学解析を実施した。

4. 研究成果

1) HPIVの疫学解析

HPIV-1, HPIV-2は、2010~2015年の期間に検出された73株、25株のHN遺伝子領域の塩基配列解読・分子疫学解析を実施した。HPIV-3については、2011~2017年に検出された50

株のHN遺伝子領域を用いた。HPIV-1, HPIV-3は、複数年の検出ウイルスが同一クラスターに分類されるなど、検出年による特徴的な傾向は認められなかった。一方、HPIV-2については、検出年により、単一遺伝グループが形成される傾向が示唆された。現在、上記ウイルスの遺伝グループと特定の臨床症状に関連が認められるか、検討を進めている。

2) ウイルス高感受性細胞株の樹立

Vero E6細胞株のTMPRSS2遺伝子恒常発現細胞株を樹立した。高コピー数の呼吸器ウイルス遺伝子を含む呼吸器感染症由来の臨床検体を用いて、恒常発現細胞株によるウイルス分離を試みた。その結果、TMPRSS2遺伝子発現細胞は、非発現細胞株と比較して、特にヒトパラインフルエンザウイルス(HPIV)2型、3型の分離率が著明に増加した。しかしながら、HPIV1型、4型、RSウイルスやヒトメタニューモウイルスについては、分離率の改善は認められなかった。今後、特に患者の多いHPIV-3について、抗ウイルス活性物質の探索等に応用可能な系と考えられた。

HRVについて、7種の呼吸器由来細胞株を使用し、HRV-A, HRV-Cウイルスゲノム陽性の臨床検体を用いて分離を試み、高感受性細胞株を探索したが、分離効率のよい細胞株は樹立できなかった。

3) 呼吸器感染症検体からのEV-D68検出と全長ウイルスゲノム解析、分子疫学解析

EV-D68は、呼吸器感染症の原因ウイルスであり、日本では、2010年夏に初めて流行した。2012年以降、欧米における急性弛緩性麻痺、急性弛緩性脊髄炎との関連が示唆され、注目が高まっている。今回、2010年以降の呼吸器感染症検体におけるEV-D68の検索、陽性株の全長ゲノム解読、分子疫学解析をおこなった。2010年11月~2015年12月に呼吸器症状が認められた10歳未満の2,215検体を対象に遺伝子検査をおこなった結果、18検体(0.8%)がEV-D68陽性であり、2013、2015年のみ検出が認められた。系統樹解析の結果、2013年検出株、2015年検出株は、2010年検出株とはそれぞれ異なるクラスターを形成したことから、流行年によって、遺伝的に異なる特徴を持ったEV-D68株が流行したことを明らかにした。別途、複数の麻痺症例において、EV-D68の検出を試みたが、陽性例は認められなかった。

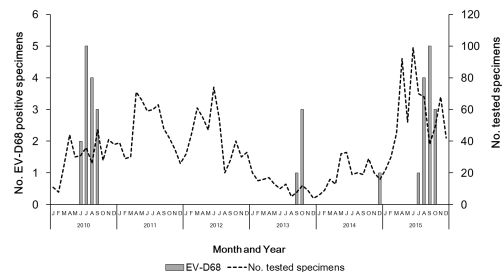


図1. 大阪市におけるEV-D68検出状況(2010~2015年)

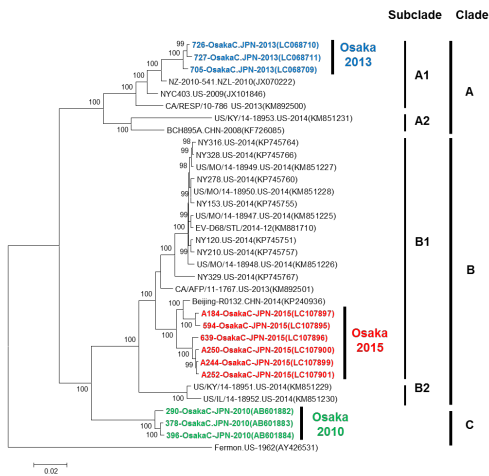


図2. 大阪市における2010~2015年に検出されたEV-D68株の全長ゲノムを用いた系統樹解析

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4件)

- 1) Kaida A, Kubo H, Iritani N, Yamamoto SP, Hase A, Takakura KI, Kageyama T. Frequent respiratory viral infections in a young child in a 27-month follow-up study. *JMM Case Rep.* 2014;1(4):e003020. 査読有
- 2) Kaida A, Kubo H, Takakura K, Sekiguchi J, Yamamoto SP, Kohdera U, Togawa M, Amo K, Shiomi M, Ohyama M, Goto K, Hase A, Kageyama T, Iritani N. Associations between co-detected respiratory viruses in children with acute respiratory infections. *Jpn J Infect Dis.* 2014;67(6):469-75. 査読有
- 3) Kaida A, Iritani N, Yamamoto SP, Kanbayashi D, Hirai Y, Togawa M, Amo K, Kohdera U, Nishigaki T, Shiomi M, Asai S, Kageyama T, Kubo H. Distinct genetic clades of enterovirus D68 detected in 2010, 2013, and 2015 in Osaka City, Japan. *PLOS ONE* 2017 12(9): e0184335. 査読有
- 4) Kaida A, Iritani N, Kanbayashi D, Yamamoto SP, Hirai Y, Hakui N, Fujimori R, Mori H, Hirokawa H, Ogasawara J, Kubo H. Ten-Year Surveillance of Measles Virus from 2007-2016 in Osaka City, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2018 71(2):152-154. 査読有

[学会発表](計7件)

- 1) 改田 厚, 入谷展弘, 山元誠司, 平井有紀, 廣川秀徹, 影山 努, 久保英幸

麻しん診断例から検出された麻しんウイルス株の分子疫学解析 (大阪市 2007~2014年)

第46回日本小児感染症学会総会・学術集会、東京 (2014.10.18-19)

- 2) Kaida A, Kubo H, Iritani N, Yamamoto SP, Hase A, Kageyama T.

Frequent respiratory viral infections in a young child in a 27-month follow-up study.

International Congress on Medical Virology 2014, タイ (2014.11.5-7)

- 3) Kaida A, Yamamoto SP, Iritani N, Kohdera U, Togawa M, Amo K, Nishigaki T, Kageyama T, Kubo H.

Reemergence of enterovirus D68 in 2013, Osaka, Japan.

31st Annual Clinical Virology Symposium, 米国 (2015.4.26-29)

- 4) 改田 厚, 天羽清子 エンテロウイルス68型の再出現 大阪市 2013年 第56回日本臨床ウイルス学会, 岡山市 (2015.6.13-14)

- 5) 改田 厚, 園府寺 美, 天羽清子, 塩見正司

大阪市で検出されたエンテロウイルスD68型の分子疫学解析 (2010~2015年) 第57回日本臨床ウイルス学会, 郡山市 (2016.6.18-19)

- 6) 改田 厚

麻しん診断例における麻しんウイルス検出状況と遺伝子型推移 (大阪市 2007~2016年)

第58回日本臨床ウイルス学会, 長崎市 (2017.5.28-29)

- 7) Kaida A, Iritani N, Yamamoto SP, Kanbayashi D, Hirai Y, Kohdera U, Togawa M, Amo K, Shiomi M, Nishigaki T, Kageyama T, Kubo H.

Single genetic clades of Enterovirus D68 strains in 2010, 2013, and 2015 in Osaka City, Japan. 19th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology, ポルトガル (2016.9.14-17)

[図書](計4件)

- 1) 改田 厚
乳幼児は注意を!! RSウイルス感染症

大阪府立公衆衛生研究所メールマガジン かわら版@iph 2014 - 第136号 - (2014)

- 2) 改田 厚, 入谷展弘, 山元誠司, 上林大起, 平井有紀, 西尾孝之, 久保英幸, 外川正生, 天羽清子, 園府寺 美, 西垣敏紀, 塩見正司, 浅井定三郎, 影山 努, 伯井紀隆, 森 宏美, 西 貴美, 安井典子, 榎田晴美, 細井舞子, 青木理恵, 坂本徳裕, 廣川秀徹, 半羽宏之, 松本健二, 吉村高尚

エンテロウイルス D68 型の再出現と系統樹解析 (2010~2015 年) 大阪市
病原微生物検出情報 36 (12), 17-18
(2015)

- 3) 改田 厚、久保英幸、平井有紀、山元誠司、廣川秀徹、入谷展弘、西尾孝之
大阪市内の麻疹診断例における麻疹ウイルス検出と分子疫学解析
(2013-2015 シーズン)
大阪市立環境科学研究所報告、平成 26 年度、第 77 集、17-20 (2015)
- 4) 改田 厚
大阪市内での 11 年間にわたる麻疹ウイルス検出状況と遺伝子型推移 (2007~2017 年)
臨床とウイルス 46(1), 11-17(2018)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

改田 厚 (Atsushi Kaida)
大阪健康安全基盤研究所・微生物課・主任
研究員 研究者番号：50372131

(2) 研究分担者

山元 誠司 (Seiji P Yamamoto)
大阪健康安全基盤研究所・微生物課・研究員
研究者番号：20649008

奥 勇一郎 (Yuichiro Oku)
兵庫県立大学・環境人間学部・准教授
研究者番号：10456832

久保 英幸 (Hideyuki Kubo)
大阪健康安全基盤研究所・微生物課・主幹研究員
研究者番号：20321937