

(別紙1)

## 総括研究報告書

課題番号：30-3

課題名：小児における感染症の重症化の病態解明に関する研究

主任研究者名（所属施設） 国立成育医療研究センター

（所属・職名） 生体防御系内科部感染症科・診療部長 宮入 烈

（研究成果の要約）小児における重症感染症の多くは普遍的な病原体の感染を契機に、従来健康な小児が発症するものである。ほとんどの症例が軽症であるにもかかわらず、一部の症例が重篤な転帰をたどる理由は不明である。我々はその要因として、未検出の病原体の存在、病原体の集団の中に異なる病原性をもった準種の存在、宿主の過剰な免疫反応、などの可能性を考え検討している。本年度は、百日咳菌の病原遺伝子の解析、次世代シーケンサーを用いた重症感染症例の検討で培養未検出の微生物を同定した。ヒトパレコウイルスの感染例について、髄液、血清、咽頭、便から検出されたウイルスの比較により準種を検出した。またインフルエンザの鋳型気管支炎症例については好酸球の異常活性化の所見を確認し、病態生理に関する知見を得た。

### 1. 研究目的

本研究の目的は、原因不明感染症の病原体を検出し、小児感染症が重症化に至る病態を検証することである。同時に、これまでの治療法の再評価を行い、新たな治療や予防の開発に資する情報を提供する事である。

小児期の感染症の多くは自然軽快するウイルス疾患であるが、同じウイルスに罹患しながら、急性呼吸不全、脳炎・脳症、心筋炎・敗血症を発症し死亡する例もある。現時点では有効な治療はなく、生命維持装置で管理し自然軽快を望むほかない。生来健康な患者が重症化する病態に、免疫学的な機序が介在することが報告されており、大量ステロイド療法やサイトカイン除去療法など侵襲性の高い治療法が行われている。しかし、その妥当性の検証は不十分であり、国際的には是非が問われている。

### 2. 研究組織

研究者	所属施設
宮入 烈	国立成育医療研究センター
宮原瑤子	国立成育医療研究センター
森田英明	国立成育医療研究センター
中村昇太	大阪大学微生物病研究所

### 3. 研究成果

本年度は目的を達成するために、複数の検討を行い以下の成果を得た。

(1) 百日咳患者についての重症度にかかわる検討について

百日咳症例 44 例について、人工呼吸器管理に至った最重症例とそれ以外の入院例の比較検討を行った。重症化に係る患者背景因子についての臨床的な検討については明らかな要因は認めなかった。菌の病原性に関する報告は少ないため、検討を行った。

25 名の百日咳患者から採取された呼吸器検体より抽出された核酸を用いて百日咳菌の病原性遺伝子 ; *ptxA*, *fim3*, *prn*, *ptxP* の遺伝子配列を同定し、それぞれのアレル型を同定し、その組み合わせから multi locus sequence typing (MLST)法に基づく百日咳菌の遺伝子型分類を行った。検出された百日咳菌の病原性遺伝子アレル型や MLST 法に基づく遺伝子型、および呼吸器検体中の菌量から対象患者を群分けし、臨床経過や検査結果の比較検討を行ったところ、重症例（気管内挿管例）に MLST2 型が有意に多いことが判明した。この所見と病態との関係は現時点では不明であり、今後の追加検証を要する。（分担宮入報告書参照：論文受理済み）

## 最重症の患者における探索的研究

次世代シーケンサーを用いて、感染症が疑われる症例について臨床検体からの抽出核酸を用いて病原体診断を行った。全 121 検体（血清 18 例、髄液 10 例、呼吸器 78 例、その他 15 例）について解析が行われた

次世代シーケンサーを感染症の診断検査として捉え感度や特異度の検証を行った報告は少ない。我々の過去の検討により、リアルタイム PCR による検出を基準として考えたときに、次世代シーケンサーによる検出の感度は 65% であり、これまでの検討で、検出感度を上げるための処理により、検出リード数を 100 倍に向上させた。

その後、検体処理法を改めて乳児の原因不明呼吸不全症例（ICU、ECMO 管理）の呼吸器検体について次世代シーケンサーを用いて検討したところ、*Ureaplasma parvum* および *Pneumocystis jirovecii* が検出された。リード数は *Ureaplasma parvum* 65,713、*P.jirovecii* 56 と明らかに *U.parvum* が多く原因菌であると考えられた。

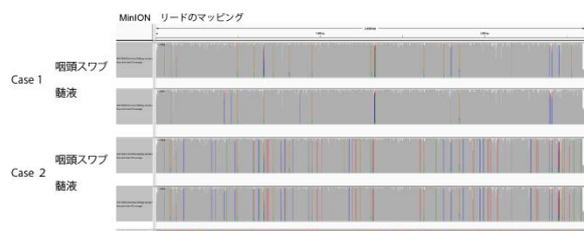
臨床検体を用いた次世代シーケンサーによる解析には更なる条件検討が必要であるが、将来的には臨床検査として本格的に導入される技術と見込まれ方法論の確立が必要である。（分担中村報告書参照）

(3) 次世代シーケンサーを用いて病原体の遺伝子学的な検討を行い、病原性、組織特異性、個体間の症状の違いに寄与する準種（quasispecies）の存在を明らかにする。

パレコウイルス準種の検証：重症感染症の要因となる病原因子を探索することを目的として、主に髄膜炎と診断された同一患者に由来する複数検体（呼吸器、消化器、血清と髄液）から次世代シーケンサーにより準種の検出を試みた。ウイルス粒子表面のカプシドタンパクである VP 領域を標的とし、プライマーを設計して増幅条件の検討を行った。作製した 7

ペアのプライマーから最も増幅効率の高いものを選択し、臨床検体からの PCR 産物の配列を調べたところパレコウイルスの VP 領域であることが確認できた。全 VP 領域 3kb を増幅、解読することが可能であることが確認されたため、重症化した患者からの呼吸器、消化器、血清、髄液検体を次世代シーケンサーによる解析を行い感染部位により性質の異なる準種の有無を検討した。

図： ヒトパレコウイルスを対象とした準種の検討



検討の結果、部位ごとに 1-8% を占める準種の存在を確認した。その一方で、シーケンスの違いはアミノ酸変異に寄与せず、その病的意義は不明であった。

(4) インフルエンザ重症化に関与する宿主因子の探索

インフルエンザ感染が重症化した患者（鑄型気管支炎）において、これまでの我々の検討により、食物アレルギーや喘息の既往がある事、また検出ウイルスのシーケンスからは、病原性の高い株の存在は否定的であった（Uda K, et al. J Infect Chemother. 2018;24:407-413）。追加の問診からこれらの患者は、過去のインフルエンザワクチンにより比較的強い副反応（前腕に至る腫脹や高熱）の既往があることが判明している。鑄型気管支炎は症状発現から数時間で呼吸不全に至ることから、鑄型気管支炎は宿主のインフルエンザに対する過敏性反応であることが仮説として浮上した。そこで鑄型気管支炎を発症した患者の急性期における免疫学的プロファイルを検討した。

その結果、末梢血中好酸球の異常活性化が認められることを見出した。更に、末梢血中のサイトカイン測定を行った結果、好酸球の動員、生存延長、活性化を制御するサイトカインである IL-5 の値が、感染局期に異常高値を示すことも見出した。これらの事実は、インフルエンザ感染に際し、IL-5 の異常産生とそれに伴う好酸球の活性化異常が、重症化に關与する可能性を示唆している。（森田分担研究報告書）

#### 4. 研究内容の倫理面への配慮

本研究の検体採取の際には、患者、または保護者から同意書を得た上で検討を行う。得られたサンプルにおいては、プライバシーの保護には十分配慮をし、成果を公表する場合には患者を同定できるような情報を一切含めず、匿名化による個人情報保護を行う。その方法として、患者の情報と検体番号は、患者識別対応表を作ることによって、匿名化され、その対応表は、当院の個人情報管理者によって管理され、他の人がアクセス出来ないようにする。研究終了後の検体は、今後発見される可能性のあるウイルスに対しての検索を行うために、採取されてから 10 年間、保存されるが、その後に廃棄される。