

平成 22 年度 厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

エンテロウイルス感染症制御のための診断・予防治療に関する国際連携研究
—エンテロウイルス流行株の分子疫学的解析—

分担研究者 山崎謙治（大阪府立公衆衛生研究所）
協力研究者 中田恵子（大阪府立公衆衛生研究所）
協力研究者 左近直美（大阪府立公衆衛生研究所）

研究要旨 平成 22 年 4 月から 12 月の間に大阪府内で採取された小児の臨床検体から培養細胞または RT-PCR により 171 株(17 血清型)のエンテロウイルスウイルスが検出された。RT-PCR による検出は viral protein (VP)4 領域を増幅する PCR 法が検出感度が高く、またシーケンスによるウイルス同定は VP1 領域によるものの方が確実であった。

A. 研究目的

エンテロウイルス(EV)は小児科領域における普遍的なウイルスであり、多数の血清型が存在し、毎年多くのウイルス型が流行する。多くの EV は培養細胞で容易に分離され、中和により同定が可能である。しかし一方でウイルスに変異が起こり易く、難中和性を示したり、あるいは培養細胞で増殖できないウイルスも存在する。こうした状況をふまえて RT-PCR によるウイルスの検出、シーケンスによるウイルスの同定の頻度が上昇している。変異ウイルスに対応する必要性や、中和用抗血清供給が不足している国々が存在することなどから、新鮮分離株のシーケンスデータをジーンバンクに登録することが重要であると考えられるので、それを最大の目標として、平成 22 年度は異なる RT-PCR 法の感度の有意差およびシーケンスデータの有用性について検討を行った。

B. 研究方法

検査対象として平成 22 年度大阪府感染症発生動向調査事業検査定点の医療機関で採取された EV 感染を疑う患者材料を用いた。ウイルス分離は RD18s 細胞および Vero 細胞を用いた。分離されたウイルスは viral protein (VP)1 領域を増幅する RT-PCR¹⁾ を行い、Primer 012, 040 および 011 のセットまたは 187, 188, 189 および 222 のセットを用い、94°C 30 秒、50°C 1 分、72°C 1 分を 35 サイクル行い、増幅された PCR 産物についてダイレクトシーケンシングを行い、BLAST 検索により血清型を決定した。検体からの直接的な検出は VP4 領域を増幅する seminested RT-PCR²⁾ を行い、1st PCR には Primer EVP2 および OL68-1 を、2nd PCR には Primer EVP4 および OL68-1 を用い、94°C 30 秒、55°C 1 分、72°C 1 分を 35 サイクル行い、同様に血清型を決定した。

検体採取については、感染症法による事業であるので個々の同意は得ていない。

また行政機関への検査情報の報告には患者名等を記載せず I.D 番号を用いている。

C. 結果および考察

患者材料 588 検体から培養細胞により 74 株のウイルスが分離され（分離率 12.6%）、RT-PCR により 164 株のウイルスが検出された（検出率 27.9%）（表 1）。検出された EV は 17 血清型が同定され、主な流行ウイルスはコクサッキーウイルス (Cox)A2, CoxB2, エコーウイルス(Echo)6, EV71 であった。全体として RT-PCR の検出率が高く、CoxA5, CoxA6, CoxA9, EV68 およびライノウイルス(RV)は培養細胞では分離されなかった。CoxA5, CoxA6 は培養細胞への感受性が低いのは明らかなので哺乳マウスを用いた再分離を試みている。EV68 は平成 21 年に大阪府では初めて検出されたウイルスであるが、遺伝子型が RV に近いことから、培養細胞への感受性は低いと考えられる。Echo3 は培養細胞のみで分離された。他に培養細胞のみで分離されたウイルスが 6 株みられた。分離、RT-PCR いずれも陽性であったウイルスは 1 例を除いてすべて血清型が一致した。一致しなかった 1 例は分離—Echo25、RT-PCR—CoxA4 であった。

VP1 領域のシーケンスによる血清型別は容易であったが、VP4 領域では 4 血清型でホモロジーが低かった（表 2）VP4 全塩基配列(207b)を基にして標準株で作成した分子系統樹では流行株が同じ血清型のクラスターに入らず、同定できない型があることがあきらかになった（山崎ら、未発表データ）が、アミノ酸配列による分子系統樹からは CoxB5 を除いて同定できることが判明した（山崎ら、未発表データ）ことから、同定困難であった 4

血清型はアミノ酸配列に基づく同定、あるいは VP1 領域の PCR を再度行い同定をした。

以上のようにシーケンスによる血清型の同定は VP1 領域が優位であったことから、検体を用いて VP1、VP4 領域の seminested RT-PCR による検出感度の比較を行った(表 3)。その結果 VP4 領域の PCR は VP1 領域の PCR よりもほぼ 1.4 倍検出感度が高いことが明らかとなった。

現在 RT-PCR 陽性で分離陰性の検体について哺乳マウスを用いた分離を試みている。またシーケンスデータ登録のために VP 伝領域を増幅する RT-PCR (primer EVP4 および 011)を行い、CoxA4 の配列解読を完了した。今後クローニングを行い、さらに完全な解析を行う予定である。

D. 結論

ウイルス検出方法(培養細胞、RT-PCR)、PCR 増幅領域は目的に応じて適切な方法を選択することが必要である。

E. 文献

- 1) Oberste MS, et al., J Clin Microbiol 38: 1170-1174, 2000
- 2) 石古博昭, 他, 臨床とウイルス 27: 283-293, 1990

F. 研究発表

1.論文発表

山崎謙治、中田恵子: エンテロウイルス 71 による手足口病の成人例. 小児科 52: 377-381, 2011

2.学会発表

山崎謙治、中田恵子: 日本国内における急性胃腸炎患者からのピコビル

ナウイルスの検出. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島市、2010 年 10 月

1.特許取得
なし
2.実用新案登録
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

表 1 分離および PCR 法による検出ウイルス数

ウイルス	培養細胞	RT-PCR	ウイルス	培養細胞	RT-PCR
CoxA2	1	2	Echo6	11	16
CoxA4	17	23	Echo9	2	2
CoxA5	0	10	Echo25	2	3
CoxA6	0	4	Echo30	1	1
CoxA9	0	1	EV68	0	4
CoxB1	4	7	EV71	19	28
CoxB2	13	18	Polio2	2	4
CoxB4	1	6	Rhino	0	35
Echo3	1	0	Total	74	164

表 2 VP4 シーケンスによる同定困難株

Serotype	1st	2nd
Echo6	E6 Nuc 83% E6 A.A 98%	E7 Nuc 81% E7 A.A 95%
Echo30	E30 Nuc 81% E30 A.A 98%	CB3 Nuc 81% CB4 A.A 94%
CoxB2	CB2 Nuc 83% CB2 A.A 97%	E18 Nuc 81% CB5 A.A 95%
CoxA9	CA9 Nuc 85% CA9 A.A 97%	EV75 Nuc 81% E33 A.A 94%

表 3 RT-PCR 法の検出感度の比較

		VP4	
		陽性	陰性
VP1	陽性	15	3
	陰性	10	55

平成 22 年度 厚生労働科学研究費補助金
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)研究報告書
「エンテロウイルス感染症制御のための診断・予防治療に関する国際連携研究」

「RD-A 細胞の継代培養法の基礎的検討」

研究分担者：藤本嗣人	国立感染症研究所感染症情報センター	第 4 室長
研究協力者：花岡 希	国立感染症研究所感染症情報センター	研究員
吉田 弘	国立感染症研究所ウイルス第二部	主任研究官
小長谷昌未	国立感染症研究所感染症情報センター	協力研究員
木村 愛	国立感染症研究所感染症情報センター	実習生
榎本 美貴	兵庫県立健康生活科学研究所	感染症部 主任
清水 英明	川崎市衛生研究所	
近野 真由美	京都市衛生環境研究所	

研究要旨：

【目的】ポリオウイルスの分離の際に使用される細胞は RD-A 細胞および L20B 細胞である。しかし、RD-A 細胞が WHO の推奨する培養法で細胞が維持しにくいことが観察されたため、改良出来るか否かを検討した。

【方法】1) PCR 法により RD-A 細胞のマイコプラズマ汚染をチェックし、マイコプラズマフリーの細胞を確保した。ゲンタマイシン添加の有無により細胞増殖等に変化があるか否かを確認した。

2) 培養細胞について、①培地の種類(MEM および DMEM)、②添加牛血清濃度(5%または 10%FBS)、③非必須アミノ酸の増量を行った。これらの異なった条件で培養し、細胞の状態を継代培養後 2 日、7 日、9 日および 14 日目に観察比較した。

【結果】1) RD-A 細胞がマイコプラズマに汚染されていないことを確認した。その細胞についてゲンタマイシン(最終濃度 50 μ g/mL)の添加は RD-A 細胞の成育に影響しなかった。

2) 2 日目では DMEM を使用した場合の方が MEM より細胞の増殖が速いように観察されたが明確な差は見られなかった。7 日目(および 9 日目)では DMEM を用いた場合のみコンフルエントとなり、MEM ではコンフルエントとならなかった。14 日目では 10%FBS および非必須アミノ酸を添加した DMEM 培地での培養のみでコンフルエントであった。

【考察】RD-A 細胞の培養には MEM でなく、DMEM を用いることでコンフルエント細胞が得られやすかった。添加 FBS 濃度は 5%でも 10%でも 7 日では大きな違いがなかった。この結果から RD-A 細胞の維持管理には DMEM を使用することが有効であることが示唆された。

A. 研究目的・背景

ポリオ根絶計画において、ウイルス分離を実施して野生型ポリオウイルスが分離されないことは根絶の重要なエビデンスである。そのため、日本国内においてはポリオ感染源調査がいくつかの地方衛生研究所において実施されている。

その際に、使用される細胞は RD-A 細胞および L20B 細胞の 2 種類が必須とされている(1)。RD 細胞は通常 MEM 培地によって増殖あるいは維持されていることが多い。MEM 培地(Eagle's MEM)は、1959 年 Harry Eagle により開発された組織培養用の培地である(2)。Eagle's MEM は、哺乳動物細胞の増殖に欠かせないビタミン、アミノ酸等の必要最低量を含む。

それに対して、アミノ酸含量を 2~4 倍含んだ強化培地が開発され、DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium)はその代表的な培地といえる(3)。

病原体検出マニュアル(国立感染症研究所、地方衛生研究所全国協議会)によると RD 細胞(4)の増殖には 10%FBS が用いられている。これは、WHO の国際的なガイドラインに基づくものである。しかし、我々はポリオウイルスの分離に国際的に用いられている RD-A がこの増殖培地ではコンフルエントになりにくいこと、および、細胞が傷みやすいことに苦慮した。そこで、培養条件の最適化に取り組んだ。なお、RD-A について RD(A)と記載する例が見られるが本報告では RD-A と記載した。

B. 方法

細胞:WHO ポリオ実験室ネットワークによる米国 CDC から国立感染症研究所ウイルス第 2 部に分与された RD-A 細胞

を用いた。

マイコプラズマ汚染の確認: マイコプラズマの 16S rDNA 領域内の特定領域を増幅する nested PCR を実施した。プライマー配列は我々で設定した。

プライマーは 1st PCR に F1, 5'-ACACCATGGGAGTTGGTAAT および R1-2, 5'-CTTCATCGACTTCCAGACCCAAGGCAT を用いた。セカンド PCR には、F2, 5'-GTTCTTTGAAAAGTGAAT および R2, 5'-GCATCCACCAAAAAGTCT を用いた。

温度条件は、1stPCR も 2ndPCR も次の条件を用いた。

94 °C 2 min

↓

94 °C 30 sec

55 °C 30 sec

30 cycles

72 °C 30 sec

増幅産物の有無およびバンドサイズをアガロースゲル電気泳動で確認した。

培地: Dulbecco's modified Eagle's Medium (high glucose) (和光, Cat No.044- 29765)および Minimum Essential Medium Eagle (Sigma, Cat No.M4655)を用いた。

非必須アミノ酸: Non-Essential Amino Acids for MEM Eagle (MP, Cat No.#1681049)を使用した。

ゲンタマイシン: Sigma Gentamicin Solution (50mg/ml, Cat.G1397) を培地 500ml に対して 1ml の割合で添加した。

細胞の観察: 25cm² セルカルチャーフラスコ(BD Falcon, Cat. 353109)に各細胞を培養液 5mL 中に 10⁵ 個含むように継代し、CO₂ インキュベーター内で培養して細胞を顕微鏡で観察した。細胞を継代し

た日を Day 0 として、Day2、Day7、Day9 および Day 14 について観察し、必要に応じて写真で記録した。

培養液組成：次の 8 通りについて試験した。

	培地	FBS(%)	アミノ酸追加
No.1	MEM	10	なし
No.2	MEM	5	なし
No.3	MEM	10	有
No.4	MEM	5	有
No.5	DMEM	10	なし
No.6	DMEM	5	なし
No.7	DMEM	10	有
No.8	DMEM	5	有

C. 結 果

C-1 細胞の状態

図1にRD-A細胞がコンフルエントになった状態と間隙がある状態の顕微鏡写真を示した。

培養日数による細胞の状態

図2に示した。

Day2：8種類の培養液のいずれも細胞がプレートに接着していた。DMEM培地で培養したNo.5～8の方がやや増殖が速いことが観察された。

Day7：DMEM培地を用いたNo.5～8のみがコンフルエントとなった。MEM培地で培養したNo.1～4では、細胞間に隙間が残った。

Day9：Day7とほとんど同じであった。

Day14：No.5、No.7でコンフルエントの状態が維持され、その他では細胞が傷んでいた。

D. 考 察

MEMに換えてDMEMを用いることで、

RD-A細胞をコンフルエントの状態にしやすく、細胞を維持しやすいことが示された。

RD細胞は、1969年にMcAllisterらにより確立されたヒト横紋筋腫由来の株化細胞である(4)。榮ら(5)はRD-18S細胞をRD細胞のクローニングにより樹立した。その際に、RD細胞は様々な特性を持つ細胞の混合体(コクサッキーA群ウイルスに対する感受性を指摘している)であると述べている。我々は、RD-18S細胞に関してはMEMで容易にコンフルエントの状態に出来ていた。RD-A細胞がDMEMでコンフルエントになりやすいのは、クローニングされた細胞の特性によるものであると推定された。

現在、ポリオウイルスの分離にはMEMを用いることがゴールドスタンダードとなっている。今後は、DMEMとMEMを用いた場合でのポリオウイルスに対するRD-A細胞の感受性に違いがあるか否かを調べる予定である。DMEMを用いてポリオウイルスに対する感受性が上昇すれば国際的な標準法を再検討することも考慮すべきかもしれない。

E. 結 論

RD-A細胞の培養には、一般的に用いられているMEM培地でなく、DMEM培地を用いた方が、細胞がコンフルエントになりやすく、その後の維持も長期間出来ることが示唆された。

F. 文 献

- 1) World Health Organization : Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation. 2003 (<http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF03/www737.pdf>).

2) Eagle H : Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science*. 21: 130. 432-437, 1959.

3) Dulbecco R, Freeman G: Plaque production by the polyoma virus. *Virology* . 8: 396-397, 1959.

4) McAllister RM, Melnyk J, Finkelstein JZ, Adams EC Jr, Gardner MB. : Cultivation in vitro of cells derived from a human rhabdomyosarcoma. *Cancer*. 24: 520-526, 1969.

5) 榮賢司、石原佑弐、森下高行、西尾治、鷺見順子、井上裕正 : RD 細胞からのクローン株、RD-18S のコクサッキーA 群とエコーウイルスに対する感受性. *感染症学雑誌*. 59: 664-669, 1985.

F. 論文発表

1) 榎本美貴、高井伝仕、藤本嗣人、近平雅嗣 : 兵庫県におけるポリオ感染源調査 (2002 年～2009 年) —健康児の糞便からのウイルス分離—. 兵庫県立健康生活科学研究所健康科学研究センター研究報告.1: 5-8, 2010.

2) 藤本嗣人、花岡希、安井良則、小長谷昌未、岡部信彦、高崎智彦、清水博之 : エンテロウイルス遺伝子が検出され EV71 抗体上昇が確認された急性脳炎(辺縁系脳炎)症例、2010 年 4 月. *病原微生物検出情報*. 31: 235, 2010.

3) 中村雅子、平野映子、小和田和誠、石畝史、望月典郎、藤本嗣人、花岡希、谷口清州、岡部信彦、山岸善也 : 2004～2009

年の 6 年間における流行性角結膜炎患者 113 名からのアデノウイルス検索—福井県. *病原微生物検出情報*, 31: 237-238, 2010.

4) 近野真由美、吉岡政純、杉江真理子、馬口敏和、中村剛、木澤正人、梅垣康弘、安武廣、木戸毅、三宅健市、石川和弘、藤本嗣人 : 14 年間 (1996 年～2009 年) におけるコクサッキーA 群ウイルスの乳のみマウス、RD-18S および Vero 細胞による分離状況—京都市. *病原微生物検出情報*, 32: 20-21, 2011.

5) Enomoto M, Fujimoto T, Konagaya M, Hanaoka N, Chikahira M, Taniguchi K, Okabe N.: Cultivation for 21 days should be considered to isolate respiratory adenoviruses from samples containing small numbers of adenoviral genomes. *Jpn J Infect Dis*. 63(5): 338-341, 2010.

6) Kaneko H, Aoki K, Ohno S, Ishiko H, Fujimoto T, Kikuchi M, Harada S, Gonzales G, Koyanagi K, Watanabe H, Suzutani T: Complete genome analysis of a novel intertypic recombinant human adenovirus causing epidemic keratoconjunctivitis in Japan. *J Clin Microbiol*, 49(2): 484-490, 2010.

7) Konno M, Yoshioka M, Sugie M, Maguchi T, Nakamura T, Kizawa M, Umegaki Y, Yasutake H, Ishikawa Y, Hanaoka N, Okabe N, Taniguchi K, Shimizu H, Fujimoto T: Fourteen years surveillance of Coxsackie virus group A in Kyoto 1996-2009, by using mouse, RS-18S and Vero cells. *Jpn J Infect Dis*.

in press.

G. 学会発表

- 1) 藤本嗣人：パネルディスカッション 1
感染症の遺伝子診断の進歩と今後の方向性：ウイルス疾患（アデノウイルスなど）の迅速疾患、第 84 回日本感染症学会総会学術集会、京都市 2010 年 4 月
- 2) 藤本嗣人、小長谷昌未、清水英明、石丸陽子、谷口清州、岡部信彦：インフルエンザ AH1pdm の新規超高速 PCR (Hyper-PCR) による短時間検出同定、第 84 回日本感染症学会総会学術集会、京都市 2010 年 4 月
- 3) 藤本嗣人、谷口清州、岡部信彦：インフルエンザ AH1N1 パンデミック時の他項目ウイルス検索、第 51 回日本臨床ウイルス学会、高松市 2010 年 6 月
- 4) 藤本嗣人：日本のアデノウイルス感染症サーベイランス、第 11 回日本アデノウイルス研究会シンポジウム、東京都 2010 年 10 月
- 5) 中村 雅子、平野 映子、小和田和誠、石畝 史、望月 典郎、藤本 嗣人、花岡 希、岡部 信彦：アデノウイルス 54 型

と 53 型の福井県への侵淫状況、第 58 回日本ウイルス学会学術総会、徳島市 2010 年 11 月

- 6) 林 昌宏、藤本嗣人、小長谷昌未、モイメンリン、小滝徹、倉根一郎、高崎智彦：近年のチクングニヤ熱の流行と迅速診断法の検討、第 58 回日本ウイルス学会学術総会、徳島市 2010 年 11 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

日本、中国、タイの下痢症検体から分離されたアデノウイルス 41 型 9 株についてヘキソン、ペントン、ファイバー (ショートファイバーおよびロングファイバー) について全ゲノム塩基配列を決定した。

塩基配列は DDBJ に登録した。Accession number は、AB610510 ~ AB610545 で、2011 年 7 月に公開予定である。

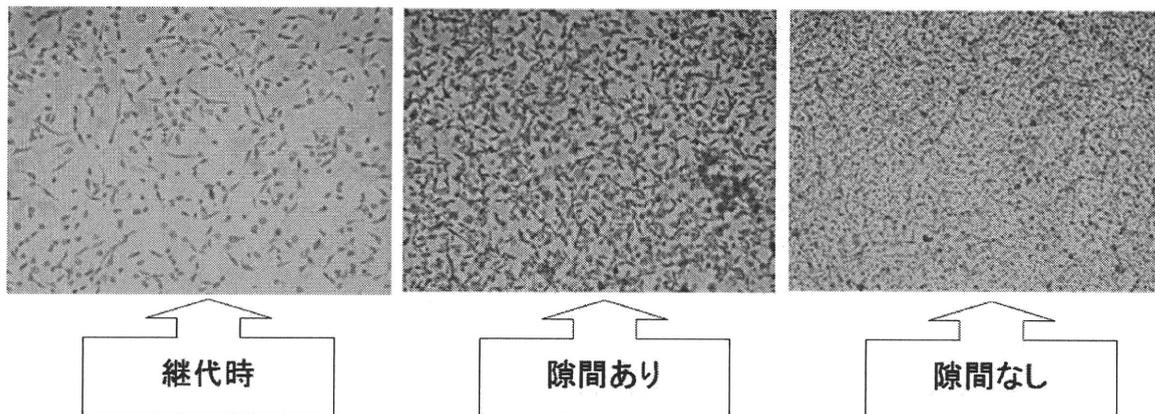


図1. RD-A 細胞の増殖増

左から、継代当日、MEM による培養で 7 日経っても隙間があるもの、DMEM の使用によりコンフルエントになった状態

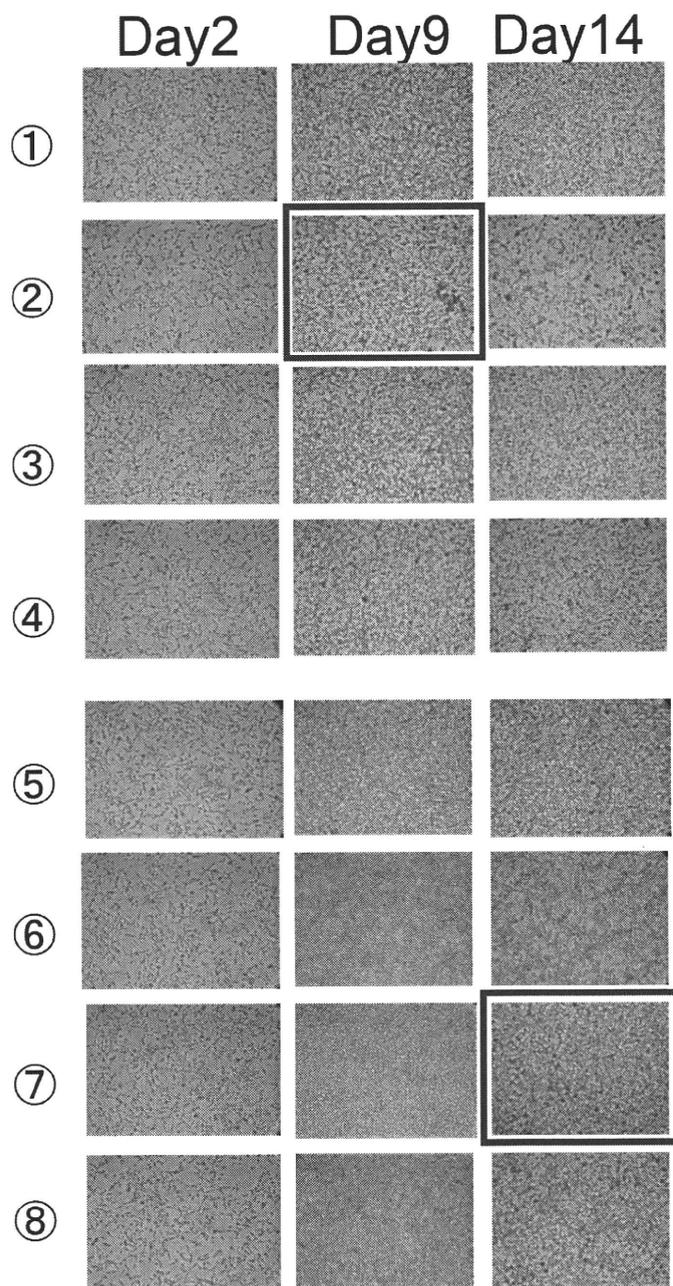


図 2. 培地組成および培養日数別の RD-A 細胞の増殖

	培地	FBS(%)	アミノ酸追加
No.1	MEM	10	なし
No.2	MEM	5	なし
No.3	MEM	10	有
No.4	MEM	5	有
No.5	DMEM	10	なし
No.6	DMEM	5	なし
No.7	DMEM	10	有
No.8	DMEM	5	有

*写真を赤で囲ったものは、上から図 1 の間隙あり、間隙なし に用いたもの。

厚生労働科学研究費補助金 インフルエンザ等新興再興感染症研究事業
エンテロウイルス感染症制御のための診断・予防・治療に関する国際連携研究
分担研究報告書

研究分担課題名： ブタコブウイルスのウイルス血症と VP1 遺伝子領域の解析

研究分担者： 牛島廣治 藍野大学医療保健学部藍野健康科学センター・教授

研究協力者： 沖津祥子 東京大学大学院医学系研究科・客員研究員

Pattara Khamrin チェンマイ大学医学部・講師

清水博之 国立感染症研究所ウイルス II 部・室長

研究要旨

タイの健康なブタの血清中にブタコブウイルス RNA が検出された。これまで報告されたハンガリーや中国のブタコブウイルスの VP1 領域の解析結果では核酸の配列は 84-98%と一致したが、タイ、日本の検体にはこれより低い一致度(79%)が認められる検体があった。いくつかのクラスターに分けることが可能であった。3D 領域がウシコブウイルス様の塩基配列を示した日本の H023 株の VP1 領域はブタコブウイルスの VP1 と類似であった。

A. 研究目的

コブウイルスはピコルナウイルス科に属し、ヒトの下痢症の原因となるアイチウイルス、ウシで発見されたウシコブウイルス、近年ブタで発見されたブタコブウイルスの 3 つの種が知られている。この中でブタコブウイルスは 2009 年に発見され、ハンガリー、中国、タイ、日本、韓国で報告されている。健康なブタの便でも高頻度 (19 から 65%) で報告され、下痢症のブタ便での検出率は 84.5-99%と大変高く、疾患との係わりははっきりしていない。

ブタコブウイルスのゲノムは 8.2-8.3kb で、単一の polyprotein をコードしている。この polyprotein は翻訳後、3 つの構造タンパク (VP0、VP3、VP1) と 7 つの非構造タンパク (2A-2C、3A-3D) に切断される。これまで 3 つのウイルスの全塩基配列が報告されているが、検出には 3D 領域を RT-PCR 法

にて検出されてきた。この研究ではウイルス血症の検出と遺伝子 VP1 領域の解析を行った。

B. 研究方法

2004—2008 年に 1 カ月齢から 7、8 カ月齢までのタイの健康なブタ 376 例から得た血清を使用した。RNA を抽出し、RT-PCR 法にて 3D 領域を増幅した。確認のために遺伝子解析を行った。

日本とタイのブタコブウイルス陽性便検体(133/293 戸 127/131)から各 10 検体を選び、VP1 領域に新しく設定した primer で増幅を行った。得られた PCR 産物の遺伝子解析を行った。さらにブタから得られた 3D 領域がウシコブウイルス様である検体 H023 株についても VP1 領域の解析を行った。

さらに報告されているハンガリーや中国の株と比較した。

C. 結果

健康なブタの血清中のブタコブウイルス検出率は月齢とともに上昇し、4 カ月齢で47%とピークとなった後、一旦減少したが、6 カ月齢で47%となった。まとめると376例中17%が陽性であった。

タイ、日本の陽性検体20例のうちで585bpの遺伝子産物が得られた検体に関して解析を行った。報告されている中国からの12検体、ハンガリーの2検体はそれぞれ類似性が高い(84-84%)が、タイと日本の検体にはばらつきが見られた。日本とタイの検体の一部は過去の報告された検体とは異なるクラスターを作っていることがわかった。一検体は最低で79%と他との一致度が低かった。しかし3D領域がウシコブウイルス様の塩基配列を示したH023株のVP1領域はブタコブウイルスのVP1と類似であった。

D. 考察

タイの健康なブタにおいてブタコブウイルスが蔓延していることが、再確認され、ウイルスが消化管から血清中に漏出していることが確認された。

今までの報告からブタコブウイルスの遺伝子は互いに非常に類似であると考えられていたが、VP1領域はいくつかのクラスターに分類することが可能であった。タイと日本のウイルスはハンガリーや中国から報告されているウイルスに比べ、VP1領域で変異に富んでいることがわかった。

謝辞

検体の採取にご協力いただいたチェンマイ大学、麻布大学、帯広畜産大学の各先生に感謝いたします。

E. 結論

健康なブタの血清中にブタコブウイルスRNAが検出された。これはReuterらの報告と一致する。これまで報告されたハンガリーや中国のブタコブウイルスのVP1領域の解析結果では核酸の配列は84-98%と一致したが、タイ、日本の検体にはこれより低い一致度(79%)が認められる検体があった。いくつかのクラスターに分けることが可能であった。3D領域がウシコブウイルス様の塩基配列を示した日本のH023株のVP1領域はブタコブウイルスのVP1と類似であった。

F. 健康危機情報

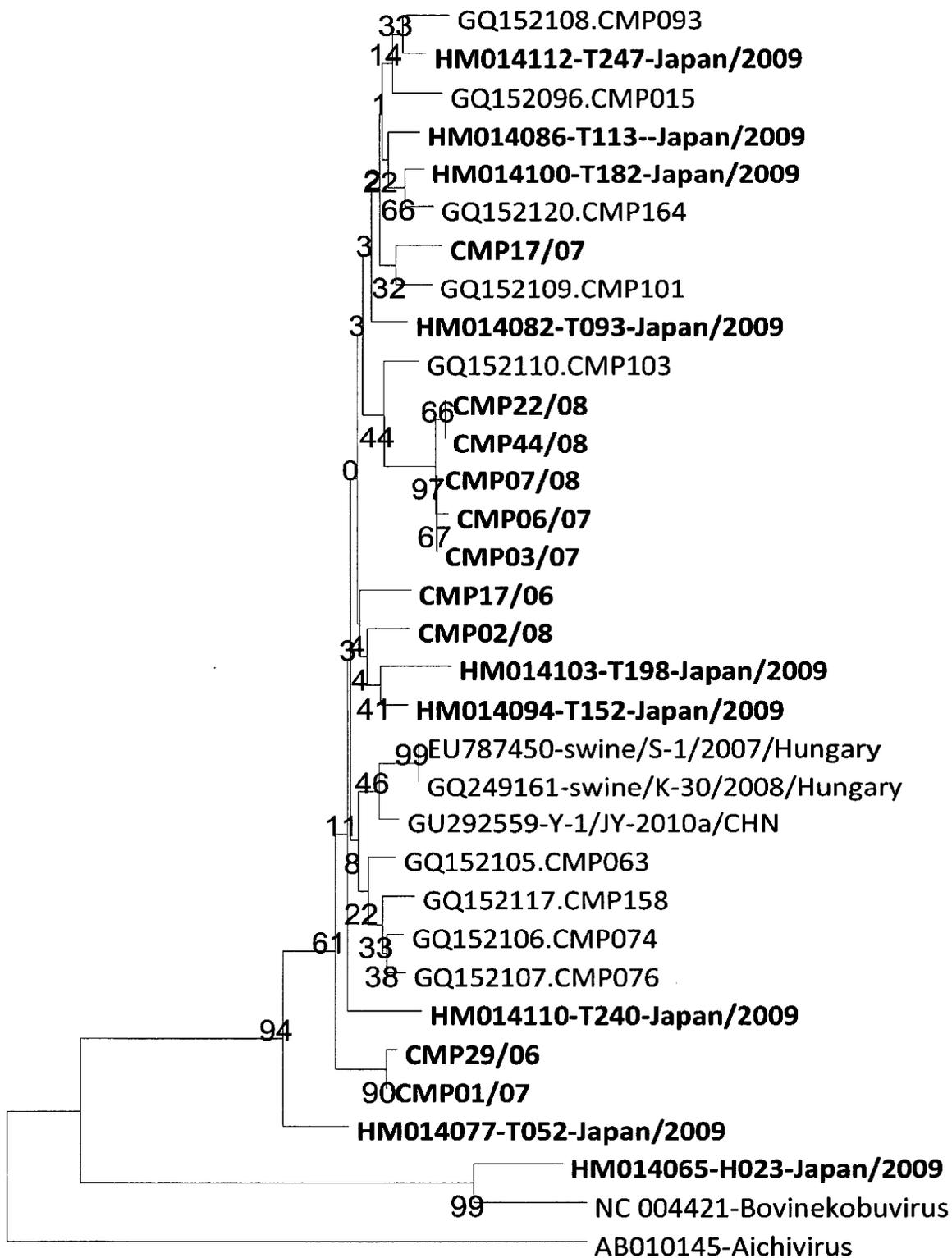
なし。

G. 研究発表

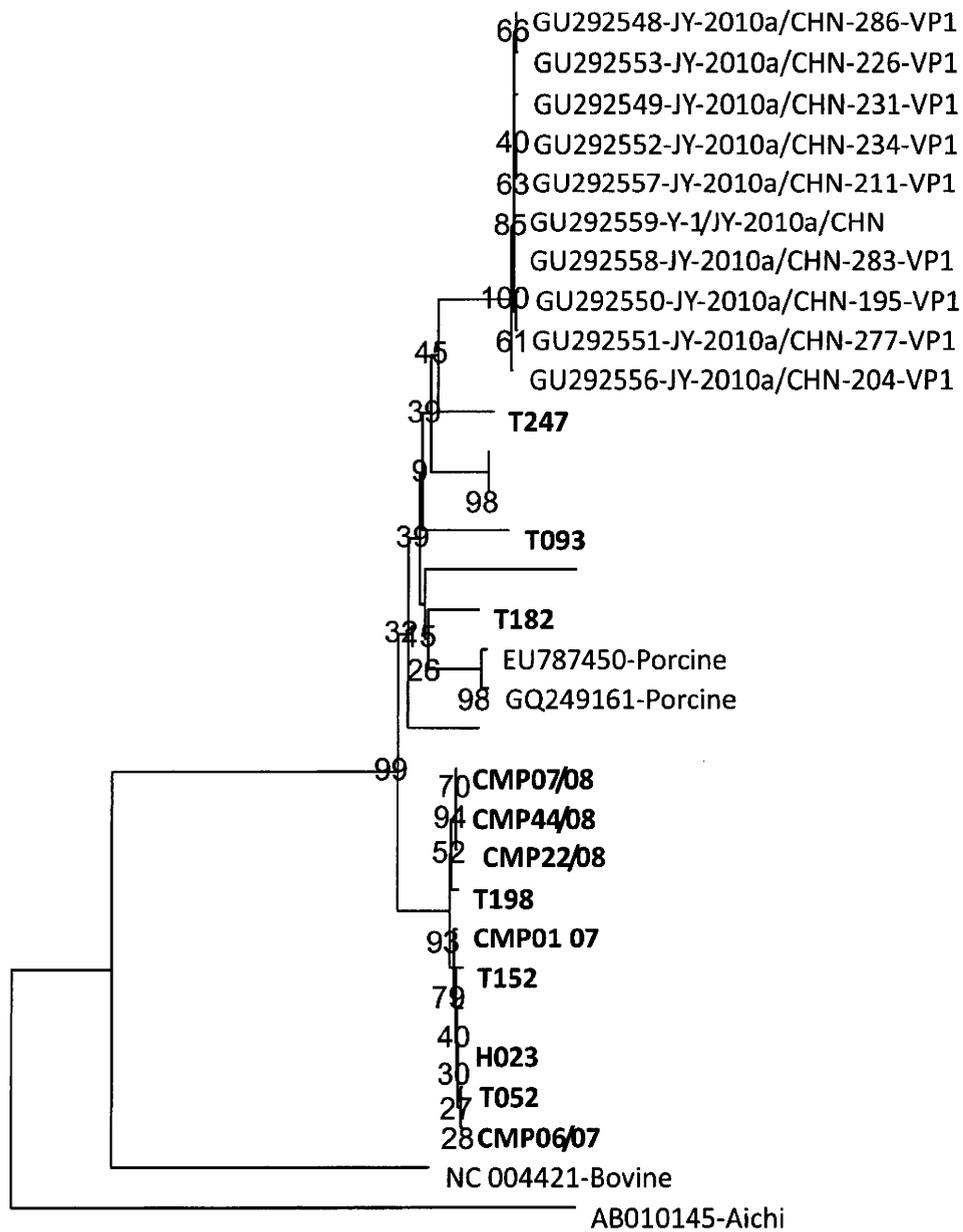
1. 論文発表

- 1) Khamrin P, Maneekarn N, Hidaka S, Kishikawa S, Ushijima K, Okitsu S, Ushijima H. Molecular characterization of kobuviruses in stool samples collected from healthy pigs in Japan. *Infect Gen Evol*, 10:950-954. 2010.
- 2) Pham NT, Trinh QD, Chan-It W, Khamrin P, Shimizu H, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. A novel RT-multiplex PCR for detection of Aichi virus, human parechovirus, enterovirus, and human bocavirus among infants and children with

- acute gastroenteritis. *J Virol Methods*, 169(1):193-197, 2010.
- 3) Pham NT, Chan-it W, Khamrin P, Nishimura S, Kikuta H, Sugita K, Baba T, Yamamoto A, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. Detection of human parechovirus in stool samples collected from children with acute gastroenteritis in Japan during 2007-2008. *J Med Virol*. 83(2): 331-336, 2011.
- 4) Pham NTK, Takanashi S, Tran DN, Quang DT, Abeysekera C, Abeygunawardene A, Khamrin P, Okitsu S, Shimizu H, Mizuguchi M, Ushijima H. Human parechovirus infection in children hospitalized with acute gastroenteritis in Sri Lanka. *J Clin Microbiol*. 49(1):364-366, 2011.
2. 学会発表
- 1) Khamrin P, Okitsu S, Ushijima H. Molecular epidemiology of human and animal kobuviruses 第 51 回日本臨床ウイルス学会 (2010.6.19-20) 高松
- 2) Pham TKN, Chan-it W, Khamrin P, 清水英明、沖津祥子、牛島廣治. Human parechovirus from stool in Japan, Thailand, and Sri Lanka, 2005-2008. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (2010.11.7-9) 徳島
- 3) Pham NTK, Thongprachum A, Nishimura S, Sugita K, Baba T, Yamamoto A, Kikuta H, Okitsu S, Ushijima H. Detection and molecular characterization of human parechovirus from stool samples collected from children with acute gastroenteritis in Japan during 2007-2008. 第7回日本小児消化管感染症研究会 (2011.2.12) 大阪
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし



3D region



VP1 region

厚生労働科学研究費補助金 インフルエンザ等新興再興感染症研究事業
エンテロウイルス感染症制御のための診断・予防・治療に関する国際連携研究
分担研究報告書

研究分担課題名：日本、タイ、スリランカの小児のヒトパレコウイルスによる急性下痢症

研究分担者：牛島廣治

藍野大学医療保健学部藍野健康科学センター・教授

研究協力者：沖津祥子

東京大学大学院医学系研究科・客員研究員

Ngan Thi Kim Pham

東京大学大学院医学系研究科

清水博之

国立感染症研究所ウイルス II 部

研究要旨

急性下痢症の原因ウイルスとしてのヒトパレコウイルスの検出を遺伝子学的手法で行った。6 か月 24 か月の小児を中心に、ウイルス性下痢症と思われる検体の 8~15% の頻度で見られた。1~14 遺伝子型の中で 1~4 型が多いが 10, 11 型をスリランカで見出した。

A. 研究目的

ヒトパレコウイルスは、ピコルナウイルス科のパレコウイルス属に分類される。ゲノムは約 7.3kb の長さで、1 つの ORF となり、翻訳後に 3 つの構造蛋白 (VP0, VP1 と VP3) と、7 つの非構造蛋白 (2A-2C と 3A-3D) に切断される。現在 VP1 領域の遺伝子配列の比較から新しい遺伝子型が同定され、14 遺伝子型に分かれている。しかしながら 9~13 の遺伝型の配列はまだ公表されていない。

一方、ウイルス性下痢症は小児の死亡および罹患が多く重要な疾患である。勿論、ロタウイルス、ノロウイルス、アデノウイルス、サポウイルス、アストロウイルスは下痢症ウイルスの中でも重要な病因であるが、急性下痢症の半数以上に診断がつかないのが現状である。最近、ヒトパレコウイルスがウイルス性下痢症の原因のひとつと考えられている。ここでは 2005 年から 2008 年まで、日本、タイ、スリランカの小児の

下痢便からのヒトパレコウイルスの検出を行い、さらに分子疫学的検討を行った。

B. 研究方法

材料：691 総検体のうち、362 検体はスリランカで 2005 年 9 月から 2006 年 8 月に集められたものである。他の 329 検体はロタウイルス、アデノウイルス、ノロウイルス、アストロウイルス陰性の検体で、タイの 2005 年 1 月から 12 月までの 82 検体と、日本の 5 か所のクリニックで 2007 年 7 月から 2008 年 6 月までの 247 検体である。

方法：スクリーニングとして 5' UTR 領域の ev22(+) と ev22(-) のプライマーを用い、270bp の産物を得た。遺伝子型の決定には Benschop らの VP1 領域のプライマーを用いた。PCR 産物が得られない時には、新たに設定した 2 つの新しいプライマーを用いた。PCR 産物は遺伝子解析を行った。

C. 結果

a. 日本の検体からの検出：日本の 247 検体のうち 20 検体 (8.1%) から検出された。

患者の月齢は5か月から51か月であり、半数は18か月以下であった。年間通して検出された。20検体中18検体で遺伝子型が決定され、16検体が1型で2検体が3型であった。

b. タイの検体からの検出：82検体中12検体(14.6%)が陽性であった。陽性検体の月齢は6から24か月であった。4つの遺伝子型があり、1から4型に属し特に1型が4検体であった。

c. スリランカの検体からの検出：362検体中30検体(8.3%)が陽性であった。ほぼ年間を通して見られ、5月はないものの、10月～11月に多かった。年齢は多くが6か月から2歳であった。30検体のうち27検体がVP1領域のPCR産物を得た。27検体中15検体はVP1領域全体の塩基配列が決められた。残りの12検体は477塩基が解析された。全塩基が決められた15検体では、1型が7検体、4型が4検体、残りの4検体は公表されている遺伝子型に属さなかった。その4検体は系統樹上2つ(AとB)に分けられた。Aは3型に最も近いものの相同性が高くなく(nt:67.6%, aa:82.8%)、またBはAに最も近いものの相同性は高くなかった(nt:64.7%, aa:73.6%)。国際ピコルナウイルス命名委員会に同定を依頼しAは10型、Bは11型とわかった。最終的には、スリランカのヒトパレコウイルスは1型が11検体、3型が1検体、4型が5検体、5型が3検体、10型が5検体、11型が2検体であった。

d. スリランカ株の系統樹：既に報告されている株を参考にして、スリランカの株の系統樹を図に示した。1型7株、4型4株、10型2株、11型2株である(LKで示す)。

D. 考察

これは日本、タイ、スリランカでの急性胃腸炎からヒトパレコウイルスを調べた報告である。タイ、スリランカでは初めての報告である。それぞれ8.1%、14.6%、8.3%に認められた。したがってウイルス性下痢症の原因ウイルスとして稀ではないと考えられる。特に6か月から24か月の乳幼児に見られる。10型、11型は最初の報告である。謝辞：日本、タイ、スリランカでの検体採取にご協力を戴いた医療スタッフならびに研究者に深謝します。

E. 結論

わが国での報告はあるものの、タイ、スリランカでは最初の報告である。ヒトパレコウイルスは8～15%と高い頻度で見出された。多くは6か月から2歳の子どもに見られた。スリランカで10、11型を見出したように多様な遺伝子型が見出された。

F. 健康危機情報

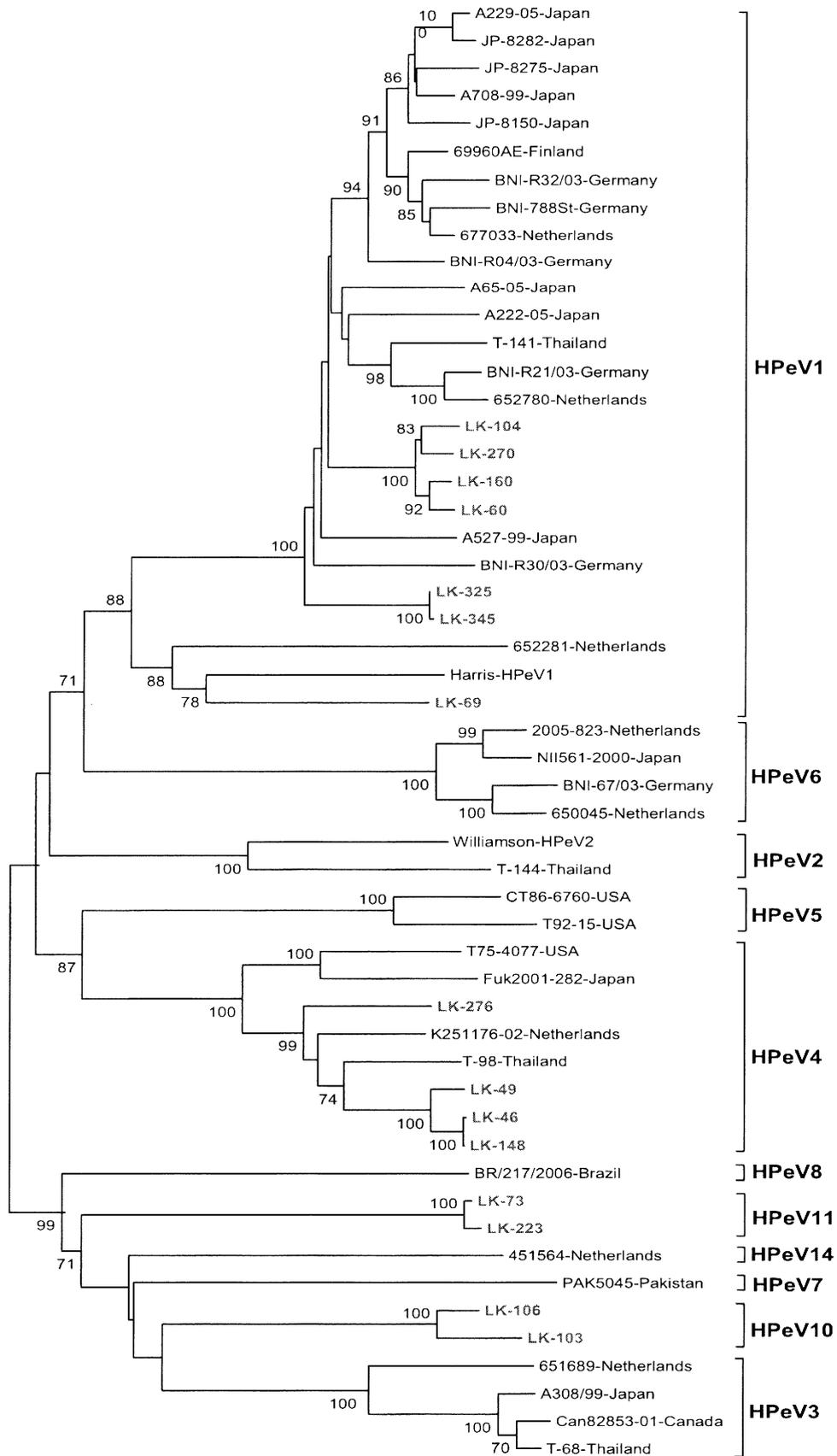
なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Khamrin P, Maneekarn N, Hidaka S, Kishikawa S, Ushijima K, Okitsu S, Ushijima H. Molecular characterization of kobuviruses in stool samples collected from healthy pigs in Japan. *Infect Gen Evol*. 10:950-954. 2010.
- 2) Pham NT, Trinh QD, Chan-It W, Khamrin P, Shimizu H, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. A novel RT-multiplex PCR for detection of Aichi virus, human parechovirus, enterovirus, and human bocavirus among infants and children with

- acute gastroenteritis. *J Virol Methods*, 169(1):193-197,2010.
- 3) Pham NT, Chan-it W, Khamrin P, Nishimura S, Kikuta H, Sugita K, Baba T, Yamamoto A, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. Detection of human parechovirus in stool samples collected from children with acute gastroenteritis in Japan during 2007-2008. *J Med Virol*. 83(2): 331-336, 2011
- 4) Pham NTK, Takanashi S, Tran DN, Quang DT, Abeysekera C, Abeygunawardene A, Khamrin P, Okitsu S, Shimizu H, Mizuguchi M, Ushijima H. Human parechovirus infection in children hospitalized with acute gastroenteritis in Sri Lanka. *J Clin Microbiol*. 49(1):364-366, 2011.
2. 学会発表
- 1) Khamrin P, Okitsu S, Ushijima H. Molecular epidemiology of human and animal kobuviruses 第51回日本臨床ウイルス学会 (2010.6.19-20) 高松
- 2) Pham TKN, Chan-it W, Khamrin P, 清水英明、沖津祥子、牛島廣治. Human parechovirus from stool in Japan, Thailand, and Sri Lanka, 2005-2008. 第58回日本ウイルス学会学術集会 (2010.11.7-9) 徳島
- 3) Pham NTK, Thongprachum A, Nishimura S, Sugita K, Baba T, Yamamoto A, Kikuta H, Okitsu S, Ushijima H. Detection and molecular characterization of human parechovirus from stool samples collected from children with acute gastroenteritis in Japan during 2007-2008. 第7回日本小児消化管感染症研究会 (2011.2.12) 大阪
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし



「エンテロウイルス感染症制御のための診断・予防治療に関する国際連携研究」
分担研究報告書

ヒトライノウイルスの高感度検出同定法に関する検討

吾郷昌信 長崎県環境保健研究センター 保健科長

CODEHOP VP1 RT-snPCR 法による冬期普通感冒の主要な原因ウイルスであるヒトライノウイルス(HRV)の検出同定について検討を行った。100 の血清型が存在する HRV-A 及び HRV-B に属するウイルスのうち、供試した標準株 48 株は全て検出同定が可能であった。Sequencing 用 primer には reverse 側 primer の AN88 が効果的であった。感冒症状を呈した患者由来材料 238 検体から本法によりヒトのエンテロウイルス属に属するウイルス 185 株が同定された。185 株のうち、ヒトエンテロウイルス A(HEV-A)及び HEV-B に属するウイルスが 181 株、HRV に属するウイルスが 4 株であった。4 株の HRV は、何れも培養細胞では分離不可能とされ、最近新たに分類された HRV-C に属するウイルスで、4 株中 3 株が下気道炎(気管支炎)の患者から検出された。約半数の HRV-A および B に加えて臨床検体から HRV-C も検出同定可能であったことから、迅速高感度な本法は、HEV のみならず HRV の検出同定にも有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

ピコルナウイルス科に属するエンテロウイルス属は、現在 10 の種に分類されている。このうち、ヒトに対して病原性を有するものは、ヒトエンテロウイルス(HEV) A~D およびヒトライノウイルス(HRV) A~C の 7 種に分類され、200 以上にも上る多数の血清型が存在する。

一般に、HEV はアデノウイルスと並んで夏期における普通感冒(夏かぜ)の原因ウイルスとして知られる。一方、HRV は冬期普通感冒の代表的な原因ウイルスとして知られ、その 50%が本ウイルスに因るものと考えられ、最近では喘息発作の要因としての重要性が指摘されている。

しかしながら、両ウイルスともわが国の上気道炎における実態の詳細は明らかにされていない。

HEV 及び HRV の分離同定は主に中和試験により行われてきたが、煩雑で長時間を要する上に、特に HRV では効率良く増殖する細胞株が少ない上に、分離されても抗血清が十分に整備されていないため型別同定まで至らないことが少なくない。近年、臨床検体から直接 RT-PCR 法でウイルス遺伝子を増幅し、VP4 領域の塩基配列を解読することにより迅速にウイルスの型別同定が行われるようになってきたが、比較的保存された領域のためエンテロウイルス属であることは確認できるも