

て分離された。エンテロウイルスの分離頻度は、両地区浄化センターの1日あたりの処理量が大きく異なるにもかかわらず（北部地区が35,771m<sup>3</sup>/日、南部地区が3,399m<sup>3</sup>/日）、ほとんど変わらなかった。このことはエンテロウイルスを対象とした環境ウイルスサーベイランスが、下水道普及率等が異なる都市部と地方部のいずれにおいても適用可能であることを示唆している。

両地区で分離されたコクサッキーウイルスB群やエコーウイルスは、VP1領域の相同性解析結果から、中国などアジア地域との密接な関係があることが伺われた。今後は、分離時期、分離地域及び患者分離株等を詳しく比較する必要があると思われた。

#### D 結論

下水流入水からのウイルス分離はポリオウイルス及びエンテロウイルス等の腸管系ウイルスの環境ウイルスサーベイランスとして有

用であり、地域のヒト集団で顕性、不顕性感染として流行している可能性があるウイルスの状況を包括的に把握することが可能であることが示唆された。

#### G 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表

世良暢之、前田詠里子、吉富英亮、田上四郎、石橋哲也、吉田 弘、Environmental Surveillance of Enterovirus in the sewage water in Fukuoka prefecture of Japan, Asia Environmental Surveillance、久留米市、平成23年7月

#### H 知的所有権の取得情報

なし

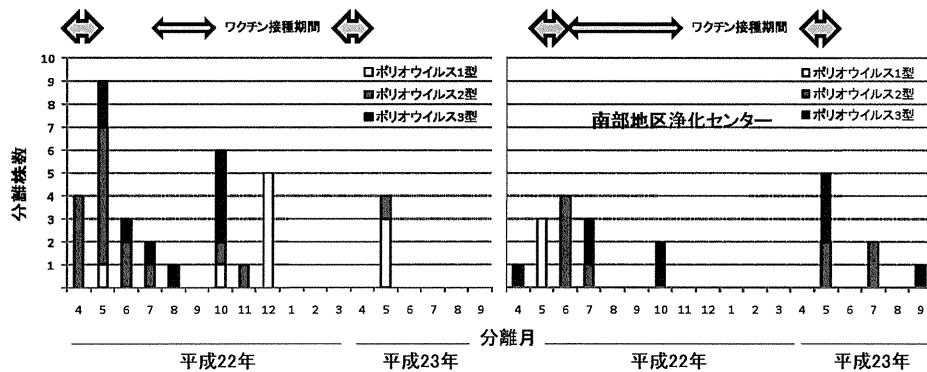


図1 ポリオウイルス分離株数の月毎推移

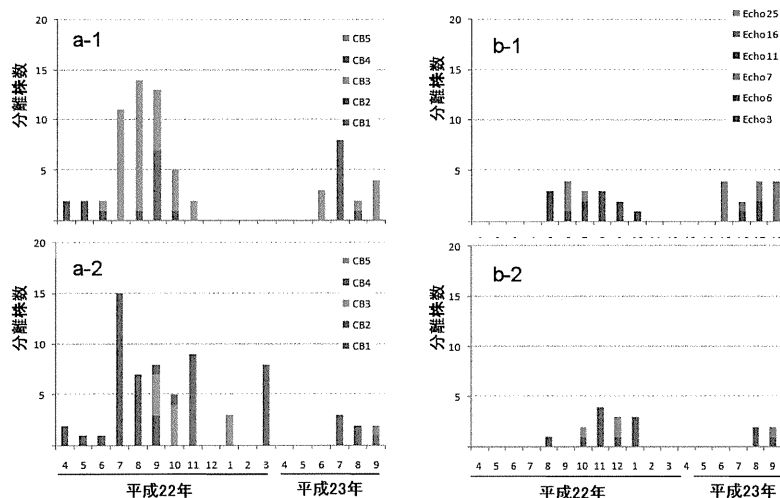


図2 北部及び南部地区浄化センター流入水におけるエンテロウイルス分離状況  
(aはコクサッキーウイルスB群、bはエコーウイルス)  
(a-1及びb-1は北部地区、a-2及びb-2は南部地区)

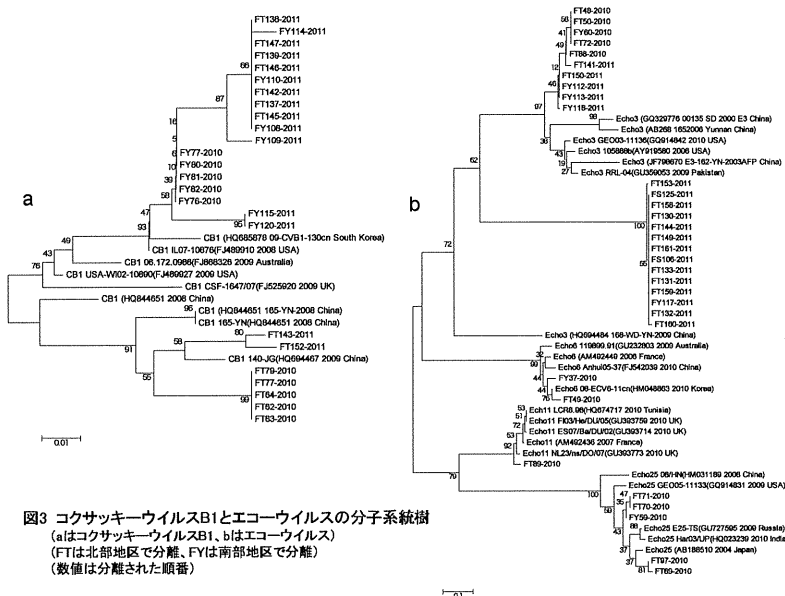


図3 コクサッキーウイルスB1とエコーウイルスの分子系統樹  
(aはコクサッキーウイルスB1、bはエコーウイルス)  
(FTは北部地区で分離、FYは南部地区で分離)  
(数値は分離された順番)

平成 23 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 23 年度における小児のエンテロウイルス(EV)感染症で特徴的であったのは手足口病の大流行であり、コクサッキーウイルス A6 が新たな原因ウイルスとして位置づけられた。平成 22～23 年に分離された EV の 26 株の塩基配列をジーンバンクに登録した。viral protein(VP)4/VP2 領域のシーケンスによるウイルス同定における問題点を解析した。

#### 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 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。平成 23 年度は手足口病の疫学的解析、分離株の塩基配列登録等を実施した。

#### B. 研究方法

検査対象として平成 23 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。方法は昨年度とほぼ同様であり、ウイルス分離は RD18s 細胞、Vero 細胞および哺乳マウスを用いた。分離されたウイルスは viral protein (VP)1 領域を増幅する RT-PCR 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/VP2 領域を増幅する seminested RT-PCR 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。

また分離株の VP1 および VP4/VP2 領域の塩基配列を DDBJ に登録した。

## C. 結果および考察

### 1. 手足口病の疫学的解析

2010 年および 2011 年シーズンはそれぞれ手足口病の流行の規模が大きく、特徴的な流行パターンを示した。2010 年 1 月～2011 年 12 月の期間に、大阪府立公衆衛生研究所に搬入された手足口病疑患者のウイルス検出状況、患者性別および年齢情報を表 1 に示した。2010 年では主要原因ウイルスが EV71 であり、2011 年ではコクサッキーウイルス A(CA)6 であることがわかる。EV71 は 2010 年 7 月に検出数がピークとなり、2010 年 12 月以降、検出されなかった。一方で、CA6 は 2011 年 7 月にピークとなり、2011 年 9 月以降は検出されていない。また、CA6 の検出数が減少し始めた 2011 年 8 月以降、入れ替わるように CA16 が検出され始め、2011 年 12 月まで検出数が増加した。

さらに、ウイルス分離ができた EV71 ; 10 株、CA6 ; 13 株、CA16 ; 7 株について RT-PCR 法で VP1 領域を増幅し、ダイレクトシーケンス法で決定した塩基配列について系統樹解析 (EV71;615bp、CA6、CA16;356bp) を実施した (図 1、図 2)。2010 年に検出された EV71 は、同年に検出されている大阪市、広島県の株と同じクラスターで、全てサブジェノグループ C2 に分類された。また、CA6 はこの期間に検出された全ての株と同じクラスターに分類され、その中には 2011 年に採取された静岡県の株、2008 年に採取されたフ

インランドの株、2010 年に採取された中国の株が含まれている。

2010 年 1 月～2011 年 12 月、大阪府では手足口病疑患者から検出された主なウイルスはダイナミックに入れ替わり、2011 年には手足口病の主原因とはなりにくい CA6 が主流となった。2011 年のように、通常流行しにくいタイプのウイルスが流行に関与した場合、患者数の増加が予測されるため、今後もウイルス型別を含めたサーベイランスが必要である。

### 2. VP4/VP2 領域のシーケンスによる型同定の問題点

昨年度報告したように VP4/VP2 領域を増幅する RT-PCR は VP1 領域よりも感度が高いことから、臨床検体からの直接的な EV の検出に多用されている。VP1 領域においては塩基配列の相同性がおよそ 75%以上であれば同一の血清型と認められるとされている (Oberste MS, J. Virol, **73**, 1941-8,1999 )が、表 2 に示したように VP4/VP2 領域では 90%近い相同性が見られた場合には信頼できる同定が可能である。同定が困難であった型の内、エコーウイルス (Echo)3、Echo6、コクサッキーウイルス B(CB)2 は最近の流行株が登録されていないことが要因であると考えられた。これら 3 血清型は VP1 ではいずれもホモの型では 81%以上、ヘテロでは 70%以下の相同性であった。CB4 は VP4/VP2 で CB4 登録株と 95%、2 株の CA9 と 92%の相同性であった。この CA9 は VP4/VP2 のみが登録されていたのでそれ以後の解析は不能であった。VP1 では CB4 と 95%、CA9 とは 66%の相同性を示した。CB1 は CB1 登録株と 94%、Echo30 とは 93%の相同性を示したが、この Echo30 登録株は VP2 を支点とした Echo30 と CB1 のシ

ーケンス上のキメラウイルスであった。  
VP1 では CB1 と 93%、Echo30 とは 68%  
の相同性であった。

### 3. 分離株の塩基配列の登録

分離されたエンテロウイルス 26 株  
(CA2, 4, 6, CB2, 4, Echo3, 6, 9, 25, EV71) の  
VP1 および VP4/VP2 の塩基配列データを  
DDBJ に登録した (accession No AB688661  
～AB688700)。

### 4. タイ国との協力調査

タイ国におけるエンテロウイルス疫学  
実地調査はタイ国内洪水被害により、  
2011 年 7 月予定を延期して 2012 年 2 月  
26 日～3 月 1 日に現地調査を行った。

## D. 結論

1) 2010年8月から2011年8月の期間、  
大阪府においてCA6が多数検出され、そ  
の大半が2011年6月および7月に採取され  
た検体から検出された (88.7%)。CA6陽  
性患者の診断名は手足口病がもっとも多  
く 59.6%、次いでヘルパンギーナが28.1%  
であった。系統樹解析では、同シーズンの  
静岡の株、2008年のフィンランドの株  
および2010年の中国の株と同じクラスター  
に分類された。

2) VP4領域のシーケンスによる型同  
定にはおよそ90%の相同性を必要とした。  
新鮮分離株塩基配列の登録は型同定確定  
に有効であると考えられた。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

山崎謙治: エンテロウイルス感染症. 防  
菌防黴学雑誌 **39**: 319-327, 2011

中田恵子、山崎謙治、加瀬哲男: コク  
サッキーA6 (CA6) 型による手足口病の  
成人例—大阪府—. 病原微生物情報 **32**  
No.8 (378): 16-17. 2011

中田恵子、山崎謙治、左近直美、加瀬  
哲男: 2010～2011 年の手足口病流行の疫  
学的・ウイルス学的解析—大阪府—. 病  
原微生物情報 **33** No.3 (385). 2012

### 2. 学会発表

なし

## F. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

表 1. 手足口病疑い患者からのウイルス検出状況

	2010年1～12月	2011年1～12月
患者数	31	100
ウイルス検出患者数(%)	19 (48.7)	73 (73)
EV71 (%)	15 (79.0)	0
CA16 (%)	0	20 (27.4)
CA6 (%)	2 (10.5)	47 (64.4)
その他	2 (10.5)	6 (8.4)
患者性別		
男(%)	18 (58.1)	60 (60)
女 (%)	13 (41.9)	38 (38)
不明(%)	0	2 (2)
患者年齢;中央値 (範囲)	4歳 (1ヶ月～40歳)	2.5歳 (1ヶ月～29歳)

表 2. VP4/VP2 領域塩基配列による型同定

Genotype	Highest score	Second highest	Genotype	Highest score	Second highest
E3	CB1 81%	E11 81%	CA9	CA9 90%	CB4 79%
E6	E6 86%	CB1 81%	CA10	CA10 93%	CA4 77%
E7	E7 90%	E19 80%	CA16	CA16 95%	EV71 75%
E11	E11 88%	CB1 82%	CB1	CB1 94%	E30 93%
E25	E25 93%	CB5 82%	CB2	CB2 83%	CB3 81%
E30	E30 81%	CB3 79%	CB3	CB3 97%	CB2 82%
CA2	CA2 90%	CA6 76%	CB4	CB4 95%	CA9 92%
CA4	CA4 98%	CA6 76%	CB5	CB5 91%	CB1 82%
CA5	CA5 83%	CA8 75%	EV68	EV68 92%	CA18 72%
CA6	CA6 92%	CA10 78%	EV71	EV71 97%	—

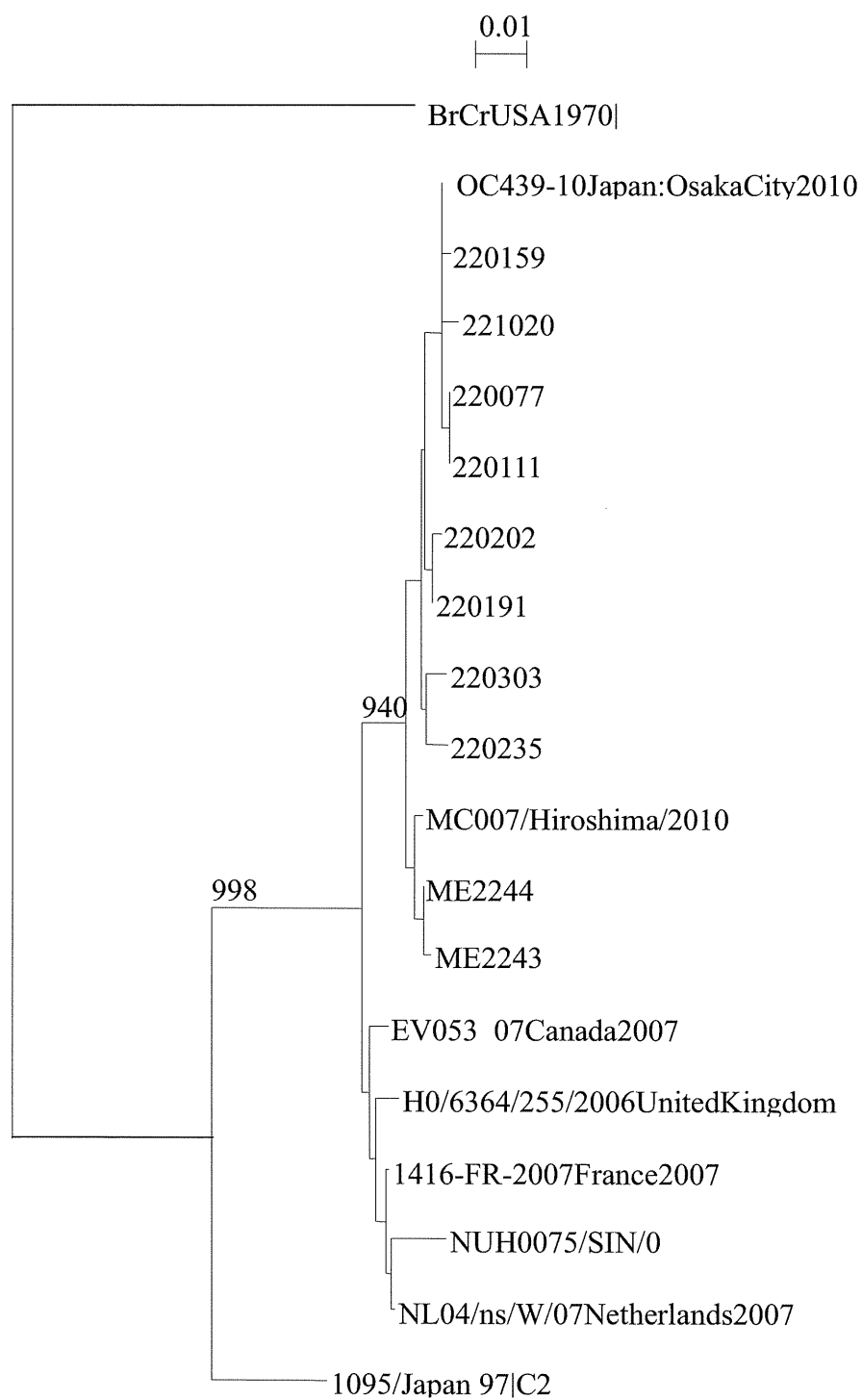


図1. EV71のVP1領域系統樹解析 (615bp)

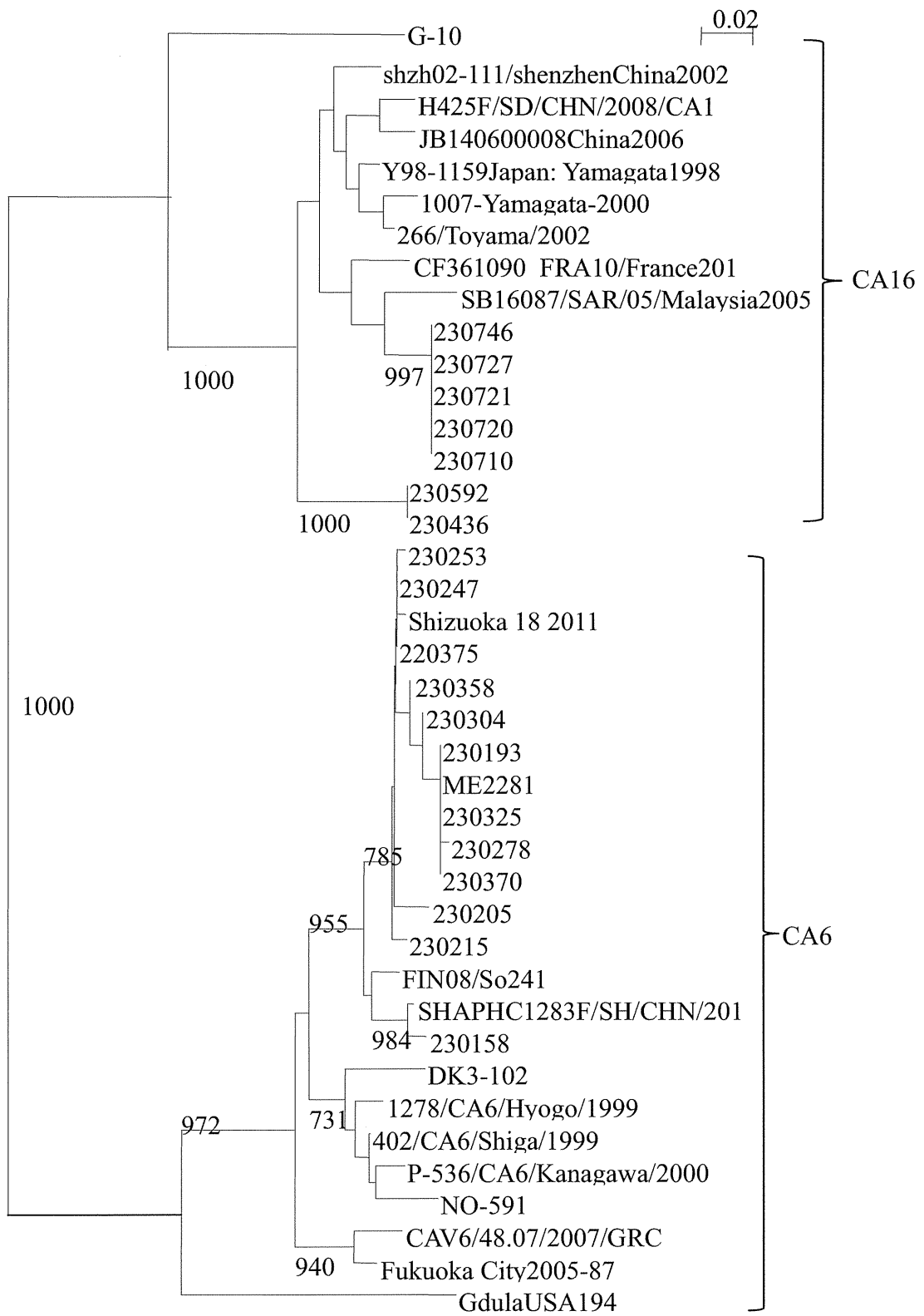


図2. CA6およびCA16のVP1領域系統樹解析 (356bp)



平成 23 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」

「2011 年に手足口病を引き起こしたコクサッキーウイルス A 群 6 型」

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  
小林 正明 小林小児科  
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 石川和弘 京都市衛生環境研究所

研究要旨：

【目的】2011 年(平成 23 年)に日本国内でコクサッキーウイルス A 群(CVA)6 型による手足口病(HFMD)が流行したので、次の 3 点を研究目的とした。1) その代表株を選び塩基配列を決定すること。2) 過去の流行株と 2011 年の流行株のゲノム部分配列を比較して 2011 年株の特徴を調べる。3) ウイルスを分離する。

【方法】1) 静岡県の手足口病患者から分離された CVA6 について RT-PCR およびサンガー法により全塩基配列を決定した。

2) 京都市、兵庫県等で採取された株について VP4 領域を比較して系統解析した。

3) 静岡県で HFMD 患者 11 名から採取された咽頭ぬぐい液 11 件および直腸ぬぐい液 6 件の合計 17 検体から RD-A 細胞を用いてウイルス分離をおこなった。

【結果】1) 2011 年に分離した CVA6 代表株(Shizuoka 18)を選び塩基配列(7,434bp)を決定して DDBJ に登録(AB678778)した。

2) 1996～2011 年に京都市(49 件)、兵庫県(12 件)、静岡県(13 件)、神奈川県(1 件)および東京都(1 件)で検出された合計 76 件の CVA6 について VP4 領域(207bp)の塩基配列を決定して系統解析をおこなった。

3) 臨床検体 17 件の 100%で CVA6 が分離された。

【考察】1) VP1 領域(915 塩基)を解析した結果、CA6 標準株 Gdula(AY421764)と 753/915 塩基(82.3%)、アミノ酸配列では 289/305 残基 (94.8%) 一致し、CA6 と同定された。全塩基配列では、非構造タンパク(3B、3C、3D)をコードする領域で標準株との違いが目立った。

2) VP4 領域の解析により 2011 年に流行した CVA6 は京都市、兵庫県、東京都ではほぼ同じ配列であり、2009 年に流行した株と近縁であった。

3) CVA6 は RD-A 細胞を使用することにより臨床検体から分離することが可能であった。

## A. 研究目的・背景

2011年にCVA6による大規模な手足口病(HFMD)の流行が発生した。それまでCVA6はヘルパンギーナの病原体と認識されており、病原性が変化したことが推測された。そこで2011年およびそれ以前に検出されたCVA6ウイルスについて、ウイルスの変異を分子疫学的に解析した。

また、起因病原体を分離保存することはその後のウイルス解析上重要なので、培養細胞によるCVA6の分離も試みた。

## B. 方法

**全塩基配列の決定**：CVA6塩基配列を標準株であるGdula株(AY421764)の塩基配列を参考に我々が作製したプライマーを使用して決定した。末端配列の決定には5'-Full RACE Core Set[TAKARA:6122]およびSMARTer(tm) Pico PCR cDNA Synthesis Kit [TAKARA: 634928]を使用した。決定した配列はDDBJに登録した。

**過去の流行株と2011年に分離されたCVA6の比較**：1996～2011年に京都市(49件)、兵庫県(12件)、静岡県(13件)、神奈川県(1件)および東京都(1件)で検出された合計76件のVP4領域を系統解析した。解析にはMEGA4(<http://www.megasoftware.net/>)を使用した。モデルはKimura-2-parameterにより、系統樹の確かさはブートストラップ値1000で確認した(図1)。

**培養胞によるCVA6の分離**：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(1)を用いた。培養条件は昨年の本研究班報告書に記載した

## C. 結果

### 全塩基配列の決定

A群に含まれるCVA6の全塩基配列は限られているため、Shizuoka 18株について完全長の塩基配列(7,434bp)を決定しGenBankに登録した(AB678778)。A群エンテロウイルス間におけるゲノム遺伝子組換えが示唆された。全長7434bpをCVA6標準株のGdula株(7434bp)の全塩基配列(AY421764)とホモロジー解析したところ80%の類似性であった。SimPlot解析の結果、図1のとおりGdula株とのSimilarityが低い部分が見られた。

### 過去の流行株と2011年に分離されたCVA6の比較

VP4領域(207bp)における解析で、2011年に流行したCVA6(京都市、兵庫県、静岡県、東京都)は同じクラスターを形成した。1996年～2009年までに分離されたCVA6とは異なっていた。

1996～2009年までに京都市で分離されたCVA6(49件)は7つのクラスターに分類された。京都市で2009年に分離されたCVA6は2011年流行株に近縁であった。

**CVA6の分離**：静岡県で17名の患者から採取された咽頭検体(17件)および直腸ぬぐい液(6件)の全てからCVA6が分離された。

## D. 考察

2011年に国内で大規模な流行を引き起こしたCVA6は過去に国内で流行したCVA6とVP4領域で異なっていた(図1)。2011年のCVA6代表株(Shizuoka18)について塩基配列を決定したところCVA6標

標準株の Gdula 株との Similarity が低い領域が 3B protein(5348..5413) 、 3C protein(5414..5962) および 3D protein(5963..7348)をコードする領域に見られた。これらはウイルス複製に関与するタンパクであり、この部分での変異についてさらに詳細な検討が必要と思われた。

2011年の流行株はVP4領域では一つのクラスターを形成した。分離年により異なったクラスターが見られ、異なったクラスターのから代表株を選んで全塩基配列の解析を進めている。

ウイルス分離に関して、我々は本研究班で昨年度の研究報告で RD-A 細胞によるウイルス分離を報告した。RD-A 細胞を用いることで 2011年に流行した CVA6 を分離することが出来ることが分かった。

## E. 結 論

2011年に HFMD の流行を引き起こした CVA について塩基配列および分離法を検討した。その結果、2011年流行株は過去の分離株と VP4 領域で異なったクラスターを形成した。1株の全塩基配列を調べたところ、非構造タンパク(3B、3C、3D)をコードする領域で標準株(Gdula)との類似性が低かった。

## F. 文 献

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

## G. 論文発表

1: ○Fujimoto T, Iizuka S, Enomoto, M, Yamashita K, Abe K, Hanaoka N, Okabe N, Yoshida H, Yasui Y, Kobayashi M, Fujii, Y, Tanaka H, Yamamoto M, Shimizu H. An outbreak of hand, foot, and mouth disease due to coxsackievirus A6 in Japan, 2011. *Emerg Infect Dis*. 2012; 18(2): 337-9 .

2: Adhikary AK, Banik U, Okabe N, ○Fujimoto T. Molecular characterization of human adenovirus type 8 (HAdV-8), including a novel genome type detected in Japan. *Jpn J Infect Dis*. 2011; 64(6):493-8.

3: Adhikary AK, ○Fujimoto T, Okabe N.: Human adenovirus species C (HAdV-C) fiber protein. *Virology*. 2011; 424(1):1.

4: Nakamura M, Hirano E, Kowada K, Ishiguro F, Yamagishi Z, Adhikary AK, Hanaoka N, Okabe N, Taniguchi K, ○Fujimoto T.: Surveillance of Adenovirus D in patients with epidemic keratoconjunctivitis from Fukui Prefecture, Japan, 1995-2010. *J Med Virol*. 2012 Jan; 84(1):81-6.

5: Akiyoshi K, Suga T, Fukui K, Taniguchi K, Okabe N, ○Fujimoto T.: Outbreak of epidemic keratoconjunctivitis caused by adenovirus type 54 in a nursery school in Kobe City, Japan in 2008. *Jpn J Infect Dis*. 2011 Jul;64(4):353-5.

6: 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 coxsackievirus group A in Kyoto 1996- 2009 using mouse, RD-18S,

and Vero cells. Jpn J Infect Dis. 2011;64 (2):167-8.

7: Matsushima Y, Shimizu H, Kano A, Nakajima E, Ishimaru Y, Dey SK, Watanabe Y, Adachi F, Suzuki K, Mitani K, ○Fujimoto T, Phan TG, Ushijima H: Novel Human Adenovirus Strain, Bangladesh. Emerg Infect Dis. 2012 in press.

8: 富岡鉄平、島田智恵、○藤本嗣人、松井珠乃、佐藤弘、八幡裕一郎、橘とも子、岡部信彦: 日本紅斑熱発生地域および近隣の発生が少ない地域における知識および受診行動. 感染症誌 85: 180~183, 2011.

9: ○藤本嗣人、花岡希: アデノウイルス感染症の病原体迅速診断. 小児科 52(12): 1923~1929, 2011.

10: 小林正明、○藤本嗣人、岡部信彦: コクサッキーウイルス A6 ウイルス感染が明らかになった手足口病. 小児科 52(11): 1443~1444, 2011.

11: ○藤本嗣人、竹田誠、中村雅子、榎本美貴、岡部信彦: RS ウイルスの検査診断. 小児科 52(11): 1463~1469, 2011.

12: 山口展正、○藤本嗣人、岡部信彦: アデノウイルスを中心に耳鼻咽喉科領域よりアデノウイルスを診る. 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 83(5): 195~200, 2011.

13: ○藤本嗣人、花岡希、谷口清州、岡部信彦: 病原体検査のための検体採取 10 原則. 小児科 52(4): 471~475, 2011.

14: 榎本美貴、高井伝仕、○藤本嗣人、岡藤輝夫、飯尾潤、吉田真策、近平雅嗣: 兵庫県の手足口病患者から検出したエンテロウイルス 71 型の分子疫学解析 (2008-2010). 兵庫県立健康生活科学研究所研究報告 2: 10~14, 2011.

(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(病原微生物検出情報)

1) 小林正明、藤本嗣人、花岡希、小長谷昌未、安井良則、谷口清州、岡部信彦: 2011 年のコクサッキーウイルス A6 型感染による手足口病の臨床的特徴—静岡県. 病原微生物検出情報 (2011/7/20 速報)

2) 榎本美貴、高井伝仕、近平雅嗣、花岡希、岡部信彦、谷口清州、清水博之、藤本嗣人、岡藤輝夫、岡藤隆夫、飯尾潤、田中一宏: 2010~2011 年の手足口病患者からのコクサッキーウイルス A6 型の検出状況—兵庫県. 病原微生物検出情報 (Vol. 32 p. 196: 2011 年 7 月号)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

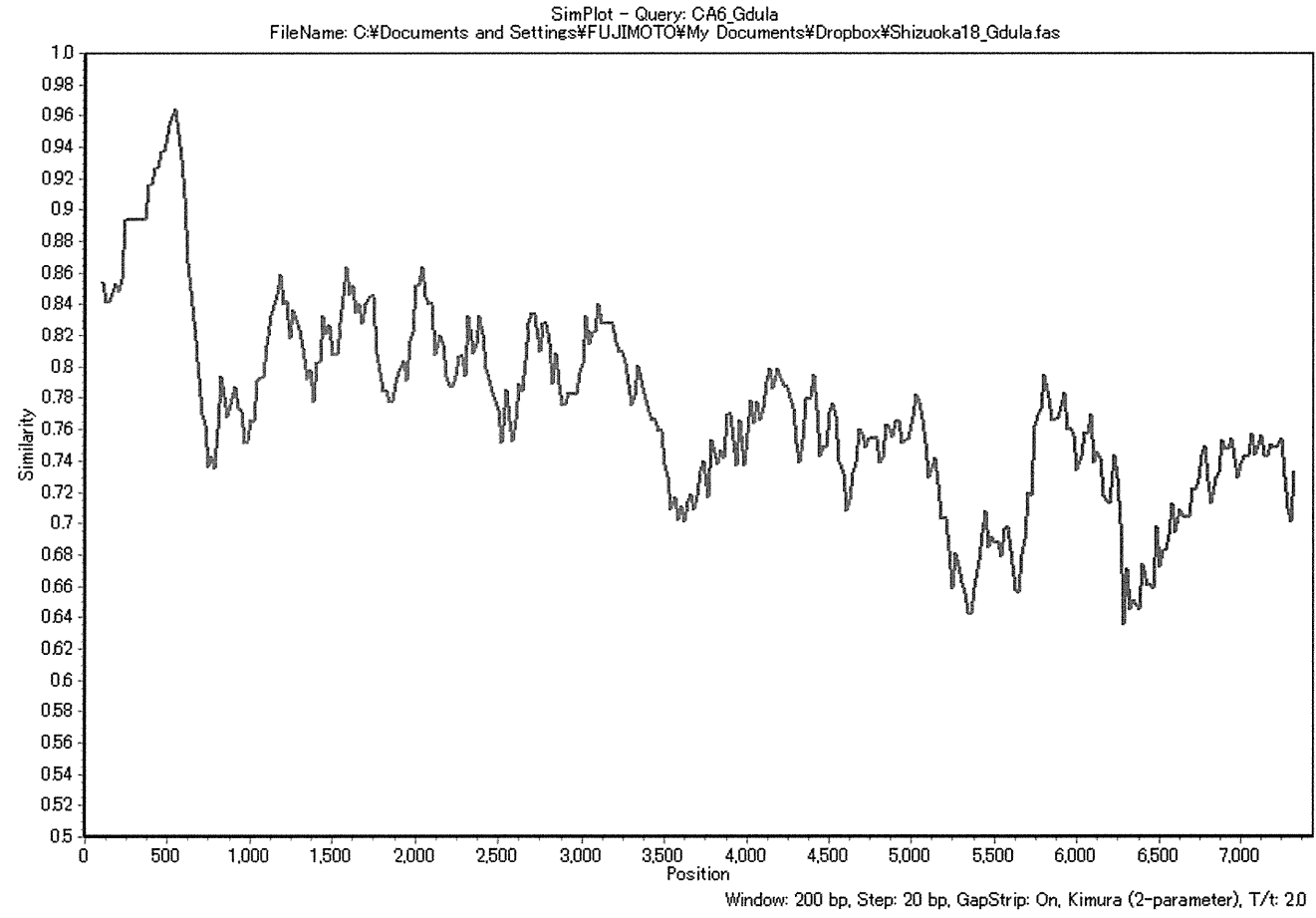


図 1. CVA6 標準株(Gdula)と 2011 年株の全塩基長での比較

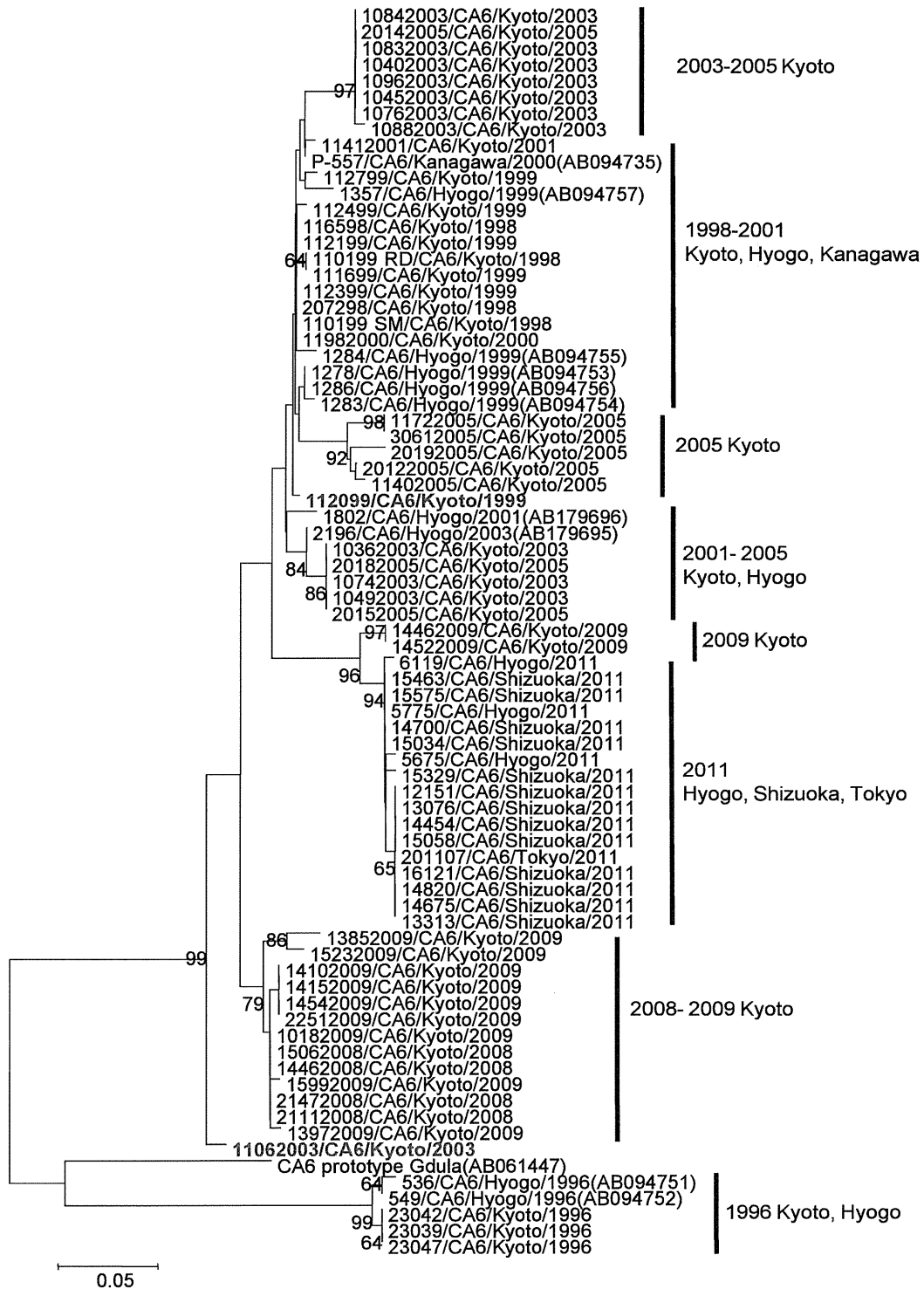


図 2. 1996～2011 年の国内分離株の系統解析(VP4 コード領域 207bp)

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： タイ国の小児下痢症便からのサフォールド・カルジオウイルスの検出

研究分担者： 牛島廣治 日本大学医学部病態病理学系微生物学分野・客員教授  
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

サフォールウイルスはピコルナウイルス科のカルジオウイルス属に属する。呼吸器疾患および胃腸炎に関係があるとされている。サフォールドウイルスは日本を含め幾つかの国で報告されている。ここでは 2007 年、チェンマイ 150 名の小児胃腸炎児において分子疫学的手法で調べた。4 名 (2.7%) が陽性であった。すべてに他の下痢症ウイルスとの混合感染であった。系統樹では 1～9 の型に分かれるが 1, 2 型がそれぞれ 2 株であった。

#### A. 研究目的

ピコルナウイルス科の *Cardiovirus* 属は *Theiler murine encephalomyocarditis virus*, *encephalomyocarditis virus* と *Saffold virus (SAFV)* に分かれている。SAFV は米国の不明熱の小児の糞便から見いだされた。SAFV は糞便、呼吸器分泌液から見いだされているが疾患との関係が明らかではない。日本でも Itagaki らの報告がある。ここではチェンマイの下痢で入院している小児から SFV の検出を行った。

#### B. 研究方法

2007 年 1 月から 12 月までチェンマイの病院に入院した 150 名の小児の下痢便で調べた。年齢は 1 歳から 5 歳である。SAFV 特異プライマーを用い 5' UTR 領域の nested PCR で診断した。陽性の検体では VP1 領域の増

幅後、遺伝子解析を行った。すでに報告が見られる配列と、我々の配列を比較した。我々の配列は GenBank に登録されている。

#### C. 結果

150 検体中 4 検体 (2.7%) が陽性を示した。2 検体 (CMH023/2007; CMH038/2007) は 2 月に、1 検体 (CMH045/2007) は 3 月に、1 検体 (CMH143/2007) は 11 月に見いだされた。CMH023/2007 は *Norovirus GII/16*, CMH045/2007 は *Norovirus GII/4* との混合感染で、CMH143/2007 は *human parechovirus* との混合感染であった。これらの株を他の SAFV と比較するため VP1 領域の遺伝子解析と他の株との比較のため系統樹解析を行った。CMH023/2007 と CMH143/2007 は SAFV1 と類似し (報告されている株との比較: 87.6%-88.9%), CMH038/2007 と CMH045/2007

は SAFV2 と類似した（報告されている株との比較：94.8%–95.6%）。

#### D 考察

我々の 4 株は norovirus, rotavirus, parechovirus との混合感染であり、SAFV が病原性と関係があるのかは明らかではなかった。我々の SAFV の頻度は Beijing での報告 (3.2%) と一致する。Chiang Mai では SAFV1 と SAFV2 が見いだされたが、他の地域で、また違う時期ではどうであるかは今後検討する必要がある。

#### 謝辞

この研究は Chiang Mai 大学との共同研究であり、Niwat Maneekarn 教授および Nattika Nantachit 氏の協力に深謝します。

#### C. 結論

2007 年、チェンマイ 150 名の小児胃腸炎児において SAFV を分子疫学的手法で調べた。4 株 (2.7%) が陽性であった。すべてに他の下痢症ウイルスとの混合感染であった。系統樹では 1～9 の型に分かれるが 1, 2 型がそれぞれ 2 株であった。

#### F. 健康危機情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1.

1. Khamrin P, Chaimongkol N, Malasao R, Suantai B, Saikhruang W, Kongsricharoen T, Ukorapol N, Okitsu S, Shimizu H, Hayakawa S, Ushijima H, Maneekarn N. Detection and molecular

characterization of cosavirus in adults with diarrhea, Thailand. *Virus Gene* 20011, Dec 16 (E pub)

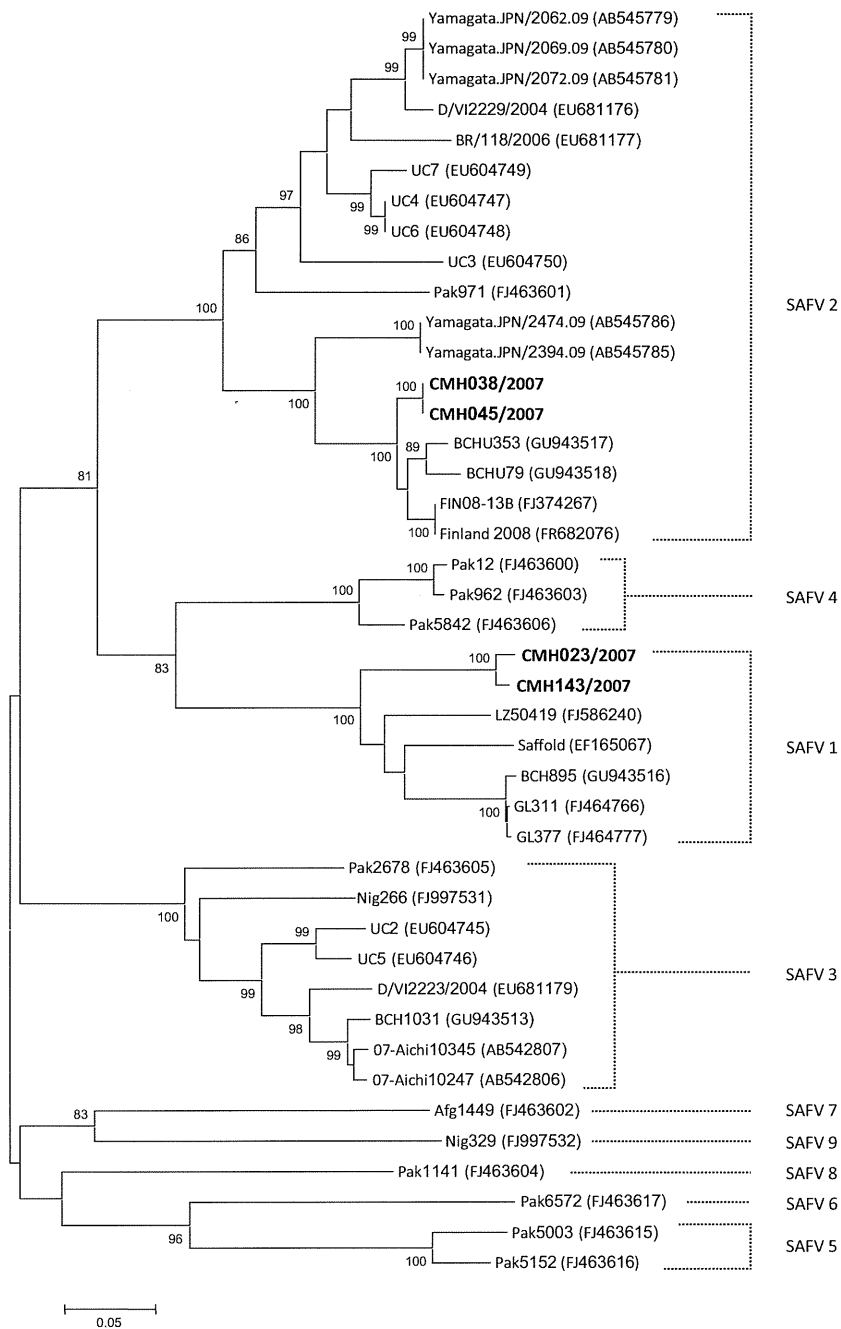
2. Okitsu S, Khamrin P, Thongprachum A, Hidaka S, Kongkaew S, Kongkaew A, Maneekarn N, Mizuguchi M, Hayakawa S, Ushijima H. Sequence analysis of porcine kobuvirus VP1 region detected in pigs in Japan and Thailand. *Virus Gene* 2011 Epub
3. Khamrin P, Okitsu S, Ushijima H. A single-tube multiplex PCR for rapid detection of 10 diarrheal viruses in stool samples collected from children with diarrhea. *J Virol Methods*; 173:380-393, 2011.
4. Khamrin P, Okitsu S, Ushijima H. Saffold cardioviruses in children with diarrhea, Thailand. *Emerg Infect Dis* 17:1150-1152, 2011.

##### 2. 学会発表

1. Ushijima H, Khamrin P, Pham TK, Thongprachum A, Okitsu S, Hayakawa S, Maneekarn N. RT-multiplex PCR for detection of diarrheal viruses. International Union of Microbiology Society International Congress of Virology. 2011.9. 15 Sapporo
2. Khamrin P, Chaimongkol N, Nantachit N, Okitsu S, Ushijima H, Maneekarn N. Saffold cardioviruses in pediatric patients with diarrhea, Thailand. International Union of Microbiology Society International



- Congress of Virology. 2011.9. 15  
Sapporo
3. Okitsu S, Khamrin P, Thongprachum A, Hayakawa S, Maneeakarn N, Ushijima H. Molecular characterization of VP1 region of porcine kobuviuse. International Union of Microbiology Society International Congress of Virology.
- 2011.9. 15 Sapporo
4. 牛島廣治: ウイルス性下痢症の最近の動向 第49回埼玉県小児感染免疫懇話会 平成23年7月30日 大宮ソニックシティ906 (代表 高見澤勝)
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし



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： タイ国の成人下痢症患者からのコサウイルスの検出と特徴

研究分担者： 牛島廣治 日本大学医学部病態病理学系微生物学分野・客員教授

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

Khamrin Pattara チェンマイ大学医学部微生物学・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： ヒトコサウイルス(HCoSV) はピコルナウイルス科の新しい属である。このウイルスが下痢症と明確に関係があるか明らかではない。ここではタイ国においてそれぞれ 150 名の下痢症小児および成人の便から RT-PCR で HCoSV の疫学を行った。1 名の成人で陽性であった。HCoSV の A~D の内 D に属していた。

#### A. 研究目的

急性胃腸炎は小児、成人で通常見られる疾患であり、死亡の大きな原因となる。最近メタゲノミック解析で幾つか下痢と関係するウイルスが見出されている。一旦ウイルスが見出されると、疫学的に調べる必要がある。ヒトコサウイルス(HCoSV)はピコルナウイルス科のウイルスでパキスタンやアフガニスタンの健常な子ども、非ポリオの弛緩性麻痺の子どもで見出された。またスコットランドの高齢者でも見出された。さらに環境中にも見出されている。その後幾つかの国でも健常児や下痢症の子どもから見出されている。現時点では A~E の種に分けられ、さらに A1-A4, B1, C1, D1, E1 の 8 遺伝子型に分けられる。幾つかの国での報告が見られるが、病態や病気との関連は明らかではない。ここでは、タイの 1 成人で下痢症便より HCoSV を見出したので報告する。

#### B. 研究方法

2008 年の 1 月から 12 月までチェンマイのそれぞれ 150 名の小児、大人の患者下痢便を用いた。10%の便上清からウイルス RNA を抽出し、RT-nested PCR を行った。5' UTR 領域の 316bp が産生される。増幅物は遺伝子解析がなされた。既に報告されている配列と比較し、系統樹を作製した。

#### C. 結果

全検体中、成人の 1 株 CMHA172/2008 で陽性となった。登録されている D1 株の 5' UTR と 93.6%から 95.4%の類似性があった。また A1, B1, C1 との比較では 82.3 から 87.7%の相同性があった(表 1)。図 1 に見られるように 5' UTR 領域では CMHA172/2008 は D に属していた。

#### D. 考察

タイでの HCoSV の報告は今までない。この 1 例は HCoSV-D に属していた。非常に症例数が少ないので臨床的意義ははっきりし

ない。ロタウイルスやノロウイルスの頻度は多いが全体的には半数ほどは検出できなかった。我々の研究からは、アイチウイルス、ヒトパレコウイルス、エンテロウイルスなどの頻度はロタウイルス、ノロウイルスと比較したら少ないが見出されている。例えば日本、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。それぞれ8.1%、14.6%、8.3%に認められた。しかし現時点ではHCoSVの頻度は少ないと思われる。

謝辞：この研究はチェンマイ大学のNattawan Chaimongkol, Rungnapa Malasao, Boonpa Suantai, Wilaiporn Saikhruang, Tipachan Kongsricharoern, Nuthapong Ukarapol, Niwat Maneekarn先生との共同研究である。

#### E. 結論

タイでの1HCoSV成人感染者の報告である。頻度は1%以下であったが、その病態については良くわからない。今後とも疫学調査を行う必要がある。

#### F. 健康危機情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Khamrin P, Chaimongkol N, Malasao R, Suantai B, Saikhruang W, Kongsricharoern T, Ukarapol N, Okitsu S, Shimizu H, Hayakawa S, Ushijima H, Maneekarn N. Detection and molecular

characterization of cosavirus in adults with diarrhea, Thailand. *Virus Gene* 20011, Dec 16 (E pub)

2. Okitsu S, Khamrin P, Thongprachum A, Hidaka S, Kongkaew S, Kongkaew A, Maneekarn N, Mizuguchi M, Hayakawa S, Ushijima H. Sequence analysis of porcine kobuvirus VP1 region detected in pigs in Japan and Thailand. *Virus Gene* 2011 Epub
  3. Khamrin P, Okitsu S, Ushijima H. A single-tube multiplex PCR for rapid detection of 10 diarrheal viruses in stool samples collected from children with diarrhea. *J Virol Methods*; 173:380-393, 2011.
  4. Khamrin P, Okitsu S, Ushijima H. Saffold cardioviruses in children with diarrhea, Thailand. *Emerg Infect Dis* 17:1150-1152, 2011.
2. 学会発表
  1. Ushijima H, Khamrin P, Pham TK, Thongprachum A, Okitsu S, Hayakawa S, Maneekarn N. RT-multiplex PCR for detection of diarrheal viruses. International Union of Microbiology Society International Congress of Virology. 2011.9. 15 Sapporo
  2. Khamrin P, Chaimongkol N, Nantachit N, Okitsu S, Ushijima H, Maneekarn N. Saffold cardioviruses in pediatric patients with diarrhea, Thailand. International Union of Microbiology Society