

平成 24 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) 協力研究報告書

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
—臨床検体および環境水中からのエンテロウイルス検出—

協力研究者 山崎謙治 中田恵子 左近直美 (大阪府立公衆衛生研究所)
研究代表者 清水博之 (国立感染症研究所)

研究要旨 平成 24 年度は臨床検体からのウイルス検出に加えて、下水流入水中エンテロウイルス消長についても検討を行った。ヒトおよび下水共にエコーウイルス 6、7 が多く検出され、それらが平成 24 年のウイルス流行の主流であったと考えられた。また下水からはレオウイルスが多数分離された。不活化ポリオワクチン導入時期以降の下水からはポリオウイルスは検出されなかった。

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 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。また平成 24 年 9 月から不活化ポリオワクチンが導入されたことに伴い、ポリオウイルス(Polio)の消長について調査することがここ数年の重要な課題となっている。平成 24 年度はヒトおよび下水流入水からの EV 分離および分離株の塩基配列登録等

を実施した。

B. 研究方法

ヒト対象として平成 24 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。

また環境対象として大阪府北部の 2 市（人口 48 万人）の全世帯を管轄する下水処理場にて平成 24 年 2 月から月 1 回の割合で調査を行った。採水は 10 g の綿花を重しと共にメッシュバッグに入れ、未処理流入水中に 2 日間浸せきした後、絞り出した下水 200mL を低速遠心し上清の一部を取り（分離材料”原水”）、残りを透析チューブに入れポリビニルピロリドン K-90 を用いておよそ 20 倍濃縮した（分離材料”濃縮液”）。遠心後の沈殿物に 10mL の PBS を加えて再浮遊させ、凍結融解した後、低速遠心し上清を回収した（分離材料”沈殿物”）。それぞれについて RD18s、Vero および L20B 細胞を用いてウイルス分離を行った。分離ウイルスは前記プライマー-EVP4、OL68-1 を用いて RT-PCR を行い EV の型同定を行った。またレオウイルス(Reo)は Spinner ら³⁾の方法により RT-PCR を行い同定を行った。

C. 結果および考察

平成 24 年 2 月から 11 月の間に培養細胞または RT-PCR により臨床検体から 95 株のウイルスが検出された(表 1)。検出された EV は 13 血清型が同定され、エコーウイルス(Echo)7 が多数を占めた。4 歳の無菌性髄膜炎患者から分離された Echo20 は稀なウイルス型であった。コクサッキーウイルス(Cox)A 群ウイルスは RT-PCR により検出された。Echo20 他昨年度検出されなかった型について DDBJ に登録を行った。

下水流入水からは同期間に 52 株のウイルスが分離された。EV は Echo6, 7 が

大半であり、ヒトにおける流行を反映していると考えられた。検体からの PCR による直接検出は可能であったが、シーケンスに基づく同定は不可能であり、複数のウイルスが混在していることが推測されることから、クローニングを行う必要があると思われた。下水から分離された Polio は VP1 全領域の遺伝子解析からすべてワクチン株と考えられた。検体別の分離陽性数は採水 12 検体中、原水 5、沈殿物 10、濃縮液 12 検体であった。1mL 当たりの平均ノロウイルス量が原水 10^5 、沈殿物 10^5 、濃縮液 10^6 コピーであったことから濃縮液中により多くのウイルスが含まれると考えられたが、沈殿物からのウイルス分離効率は濃縮液とほぼ同等であった。

D. 結論

臨床検体および下水流入水を用いて EV のサーベイランスを実施したが、下水流入水からのウイルス分離は EV サーベイランスの効率よい手段である。また臨床検体からのウイルス検出は EV 始め多種のウイルス、また培養不可能なウイルスのサーベイランスに有用な手段である。

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
- 3) Spinner ML, et al., Appl Environ Microbiol 67: 3016-3020, 2001

F. 研究発表

1.論文発表

中田恵子、山崎謙治、加瀬哲男：ヘルパンギーナ／不明熱症例における複数

のエンテロウイルス検出事例-大阪府.

IASR 34: 10、2013

2.学会発表

中田恵子、尾崎遙子、山崎謙治、加瀬哲男：エンテロウイルス感染症の Child-to-parent transmission に関する解析. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪市、2012 年 11 月

G. 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 臨床検体からの検出ウイルス

	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	計
Polio2					1						1
Echo6								4	3		7
Echo7				1	3	4	11	5	5		29
Echo9							4			1	5
Echo20				1							1
Cox A2					1	10					11
Cox A4				1	1	9	3				14
Cox A8						1					1
Cox A9				1	1	2	1		2		7
Cox A12						1	1		1		3
Cox B2										1	1
Cox B5				2	2			3			7
EV71						2	2		3	1	8
計	0	0	0	6	9	29	22	12	14	3	95

表 2 下水流入水からの分離ウイルス

	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	計
Polio2		3									3
Polio3		1									1
Echo6				1	1	2		3	4		11
Echo7		2			1		3	2	2		10
Cox B5						1					1
Reo	2	1	1	2	3	5	3	4	2	3	26
計	2	7	1	3	5	8	6	9	8	3	52

平成 24 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」
研究代表者：清水博之

全国情報による 2001～2012 年のコクサッキーウイルス A 群 6 型の病像

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
研究協力者：加納 和彦、花岡 希 同 研究員
牧野 友彦 国立感染症研究所 感染症情報センター 併任
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
榎本 美貴 兵庫県立健康生活科学研究所 感染症部 研究員
国立感染症研究所 協力研究員
小林 正明 小林小児科
全国地方衛生研究所、保健所

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(CA)6 型による手足口病(HFMD)が流行した。2011 年まで、CA6 はヘルパンギーナの起因ウイルスとして認識されてきた。2011 年の HFMD が臨床的に特殊であったのか否かを調べる。

【方法】2001 年から 2012 年に報告され病原体微生物検出情報 (IASR) で公表された CA6 検体 2740 件について、臨床症状として 1) 発熱、2) 上気道炎、3) 口内炎、4) 発疹、5) 水疱 を年別に調べ、その年ごとの発症頻度 (%) を 12 年間について比較した。2006 年は 3 名しか患者報告がなかったため、最小、最大の記載は、それ以外の年を用いた。2013 年 2 月 13 日現在得られた報告数を用いた。

さらに、臨床症状が増加傾向にあるか否かを散布図と相関分析で解析した。

【結果】12 年間に 2740 名から CA6 が検出された。1) 発熱は、合計 2360 名(86.1%)で見られた。2) 上気道炎は合計 807 名(29.5%)で報告され、最小 17.7%(2012 年)から最大 51.0%(2008 年)であり、HFMD の大規模流行があった 2011 年は 2012 年に次いで発症者の割合が少なかった。3) 口内炎は合計 1029 名(37.6%)で見られ、最小 26.9%(2001 年)で最大 45.8%(2003 年)であり、2011 年は 35.8%で報告された。4) 発疹は合計 1136 名(41.5%)に見られ、最小 9.7%(2003 年)で最大 61.0%(2011 年)であり増加傾向が見られた。5) 水疱は合計 424 名(15.5%)で、最小 0.0%(2004 年)で最大 24.0%(2011 年)であった。発疹のみならず水疱も近年増加している。

水疱と発疹で増加傾向が、上気道炎で減少が見られた。発熱、口内炎について発症頻度の増減は見られなかった。

【考察】2011 年の CA6 検出患者 1210 名中、発疹が 61.0%、水疱が 24.0%で報告され、この値は 2001～2012 年までで最高であった。一方上気道炎は 2012 年に次いで少なく、CA6 の病像がヘルパンギーナから HFMD へと移行していると考えられた。

A. 研究目的・背景

エンテロウイルスのうち HFMD およびヘルパンギーナを発症させるのは主に A 種である。なかでも A 種に属する CA16 およびエンテロウイルス 71 は HFMD の主要な起因病原体として知られる。

(A 種エンテロウイルスは、CA2～8、10、12、14、16 およびエンテロウイルス 71 から成る。)

ところが、2011 年に CA6 による大規模な手足口病(HFMD)の流行が発生した。それまで CA6 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。昨年度の研究報告書に示した系統樹(図 1)によっても年によって CA6 の遺伝子に変異していることが示され 2011 年の分離株は静岡、兵庫、東京でほぼ同じであった¹⁾。

そこで CA6 および HFMD を引き起こすエンテロウイルスの臨床的な特殊性を明らかにするため、2001 年から 2012 年までの臨床症状を経年的に比較検討した。

B. 方法

2001 年から 2012 年に報告され病原体微生物検出情報 (IASR) で公表された CA6 検体 2740 件について、次の 5 つの臨床症状の発症頻度(%)を年別に調べた。

1) 発熱、2)上気道炎、3)口内炎、4)発疹、5)水疱

頻度に関して最小、最大の記載に、2006 年は n=3 で極端に患者報告が少なかったため除外した。

2012 年のデータは 2013 年 2 月 13 日現在の数値であるため未報告を含む可能性があるがその調査日現在の数値を用いた。

2 年ごと(2006 年のように極端に検出

患者数が少ない影響を除くため)の症状別患者数を合計して年ごとの CA6 検出数に対する割合(%)を Excel(2007)により散布図および相関係数解析をおこなった。

なお、詳細な統計解析は、2012 年の結果が未だ確定していないので、今後に行うこととした。本報告では全体のトレンドをみることを目的に回帰分析をおこなうにとどめた。

また、一つの医院において、CA6 が陽性になった患者 28 名等に関して HFMD の症状をまとめた²⁾。患者は 2011 年 6～7 月に咽頭ぬぐい液および糞便から RT-PCR およびシーケンシング法により VP1 領域の塩基配列の BLAST 検索によって CA6 感染を確定した。

C. 結果

1. 年別の症状比較

12 年間に 2740 名から CA6 が検出された。年別に見た検出数は 3 件(2006 年)～1210 件(2011 年)と大きく差があり、中央値は 114 件であった。HFMD の大規模流行を引き起こした 2011 年に検出数が最大であった。

1) 発熱は、合計 2360 名(86.1%)で見られ、最小 59.7%(2001 年)から最大 93.4%(2007 年)で、2006 年を除く各年の平均は $83.6 \pm 10.3\%$ であった。2011 年は 84.9% で報告された。

2) 上気道炎は合計 807 名(29.5%)で報告され、最小 17.7%(2012 年)から最大 51.0%(2008 年)であった。2011 年は 22.1%であり、2012 年に次ぐ低頻度であった。

3) 口内炎は合計 1029 名(37.6%)で見られ、最小 26.9%(2001 年)で最大 45.8%(2003 年)であり、2011 年は 35.8% で報告された

4) 発疹は合計 1136 名(41.5%)に見られ、最小 9.7%(2003 年)で最大 61.0% (2011 年)であった。

口内炎の割合が最も高かった 2003 年に最小で、HFMD アウトブレイクを引き起こした 2011 年に最大の発症頻度であった。

5) 水疱は合計 424 名(15.5%)で、最小 0.0%(2004 年)で最大 24.0%(2011 年)であった。発疹のみならず水疱も 2011 年が最大の頻度であった。

2) 発症者の年別推移の検討

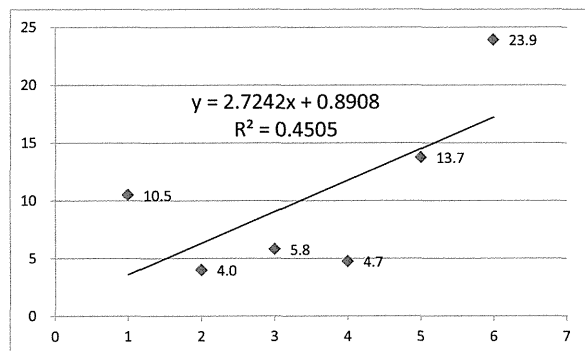


図 2.CA6 検出患者(n=2740)における水疱発症頻度(%)と年による散布図と相関分析

縦軸：発症頻度(%)

横軸：1(2001～2002 年) 患者数 n=191

2(2003～2004 年) n=101

3(2005～2006 年) n=415

4(2007～2008 年) n=360

5(2009～2010 年) n=401

6(2011～2012 年) n=1272

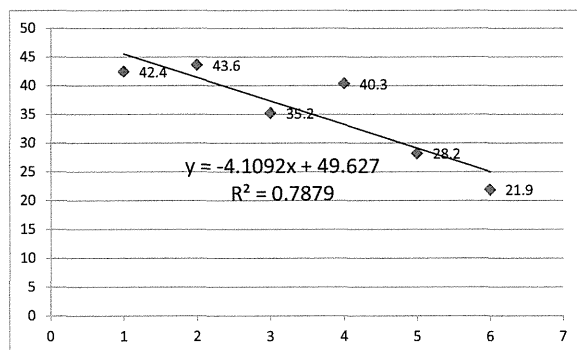


図 3.CA6 検出患者(n=2740)における上気道炎・発症頻度(%)と年による散布図と相関分析 (縦軸および横軸は図 2 に同じ)

HFMD とヘルパンギーナに関して、その特徴となる 5 つの臨床症状に関して相関分析(図 2 および図 3)の結果は次のとおりであった。

1) 発熱

$$y = 0.3786x + 85.107$$

$$R^2 = 0.0174$$

2) 上気道炎

$$y = -4.1092x + 49.627$$

$$R^2 = 0.7879$$

3) 口内炎

$$y = -0.7968x + 41.602$$

$$R^2 = 0.0911$$

4) 発疹

$$y = 8.1706x + 0.5493$$

$$R^2 = 0.6326$$

5) 水疱

$$y = 2.7242x + 0.8908$$

$$R^2 = 0.4505$$

この結果から、発熱、口内炎の頻度に変化は見られなかった。しかし、トレンドとして、上気道炎の減少、発疹および水疱の増加傾向が示された。

2. 一つの医療機関における CA6 による HFMD²⁾

2011 年の 28 症例の臨床像をまとめた。年齢は 9 ヶ月～9 歳で(平均 29.1 ヶ月)、性差はなかった。

1)発熱：全例で見られ平均 39.0℃(38.0～40.2℃)、平均有熱期間 1.5 日であった。

2)口腔粘膜疹：第 2 病日から確認でき、ヘルパンギーナ様だが、通常の HFMD と比較して口内痛や拒食の頻度が少ない。

3)水疱：第 3 病日には四肢や臀部に紅暈(こううん：発疹の周囲に生じた紅斑)を伴う水疱性病変が出現した。

【出現部位の特徴】通常 HFMD で小水疱が見られる手足より、むしろ上腕、大腿部、口囲、頸部および臀部に高頻度に認められた。

【水疱の形態的特徴】水疱は扁平で臍窩(さいか：へそ)を認め、通所の HFMD より大きく 10mm 以上に及ぶものがあるが、数日の経過で痂皮化(かひか：かさぶた)し治癒する。

【鑑別疾患】水痘

4) 追加的な観察による爪脱落症

治癒後 2 週間～2 ヶ月で追跡し得た 16 例中 6 例(37.5%)に爪甲脱落症(onychomadesis)が見られた。

D. 考察

HFMD は①手足の指(指趾)、手のひら、足底に小さな水疱からなる発疹、②微熱、③ほおの粘膜や舌の水疱などを特徴とする疾患である。

ヘルパンギーナは、①咽頭の入り口部分の直径 1～2mm ほどの小水疱性丘疹、②急激な発熱、③咽頭炎を特徴とする疾患である。

2011 年における CA6 患者の臨床症状

を評価する目的で 2001～2012 年の CA6 検出患者の臨床症状を検討したところ、

1)上気道炎は 22.1%の頻度で、調査期間中で最も低い 2012 年(17.7%)に次ぐ低頻度であった。

2)発疹と水疱はいずれも 2011 年に発症頻度が最も高かった。

CA6 において、上気道炎が減少傾向にあり、発疹(水疱)が増加傾向にあった。

一つの医療機関における CA6 検出患者 28 名の詳細な臨床的検討結果によると、2011 年の CA6 は通常の HFMD より大きな水疱がみられ、その部位が手足より上腕、大腿部、口囲、頸部および臀部に高頻度に見られた。

全国的な発生動向調査の結果、上気道炎の発症頻度が下がり、発疹および水疱が増加しているという結果が得られた。

これは CA6 による HFMD が多発した地域の一つの医療機関による詳細な解析の結果と一致していた。

詳細な臨床的な観察により発熱と、それに続くヘルパンギーナより軽症の口内炎、さらに水痘に似た水疱の出現が 2011 年の CA6 による HFMD の病像と考えられた。

現在、2011 年の分離株および過去の CA6 に関してフルゲノム解析をおこなっている。その結果、特徴的なアミノ酸が明らかになりつつある。CA6 による爪甲脱落症を伴う HFMD のアウトブレイクは 2008 年にフィンランドで報告され³⁾、日本でも 2009 年に報告がなされていた。さらに米国等⁴⁾、他国での報告もなされている。

これらの結果を総合的に考えると、2011 年に感染症発生動向調査で過去最大規模の HFMD 流行を引き起こした CA6 はそれまでの CA6 と異なった病原性を持

つことが強く示唆された。全国の発生動向調査の結果は、今回は散布図での解析しかしていないが、2009年からCA6の病像が変わったことを示しており、さらに統計学的に解析して確認する予定である。

これらの結果は、発生動向調査における臨床症状の発生頻度の変化をモニターすることの有用性を示すものと思われる。

【本研究の制約事項】発疹と水疱の関係は、発疹の一つの病像が水疱であるので、感染症発生動向調査において1人の患者において水疱が見られた場合に、発疹のみを選び水疱が選択されていない可能性がある。

2012年等の検体数が暫定値のため、データの数値が増加(あるいは、データ修正による減少もあり得る)すると考えられる。

E. 結 論

CA6 検出患者で発疹、水疱の発症頻度が増加傾向にあり、それは2011年のHFMD大規模流行時のCA6陽性患者28名の臨床的観察と一致した。2009年以降、CA6が非定形的なHFMDを引き起こしていることが示された。

F. 文 献

1) 藤本嗣人、花岡希、吉田弘、小長谷昌未、木村愛、榎本美貴、小林正明、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：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。厚生労働科学研究費補助金 エンテロウイルス感染制御のための診断・予防治療に関する国際連携研究平成24年度報告書、p.46

～51, 2012.

2) 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.

3) Osterback R, Vuorinen T, Linna M, Susi P, Hyypiä T, Waris M. Coxsackievirus A6 and hand, foot, and mouth disease, Finland. *Emerg Infect Dis.* 2009 Sep;15(9):1485-8.

4) Flett K, Youngster I, Huang J, McAdam A, Sandora TJ, Rennick M, Smole S, Rogers SL, Nix WA, Oberste MS, Gellis S, Ahmed AA. Hand, foot, and mouth disease caused by coxsackievirus a6. *Emerg Infect Dis.* 2012 Oct; 18(10):1702-4.

G. 研究発表

1. 論文発表

菅原民枝、藤本嗣人、大日康史、杉下由行、小長谷昌未、杉浦弘明、谷口清州、岡部信彦：病原体診断を伴うリアルタイムサーベイランスによる流行抑制の可能性—保育園での手足口病流行での事例検討—。感染症学雑誌 感染症誌 86: 405-410, 2012

Sugiura H, Fujimoto T, Sugawara T, Hanaoka N, Konagaya M, Kikuchi K, Hanada E, Okabe N, Ohkusa Y: Prescription surveillance and polymerase chain reaction testing to identify pathogens during outbreaks of infection. *BioMed Research International*, vol. 2013, Article ID 746053, 7 pages,

2013.doi:10.1155/2013/746053

藤本嗣人、花岡希、小長谷昌未：日常の実験手法となった Polymerase chain reaction (PCR)と電気泳動の進展：超高速 PCR(Hyper-PCR)および microcapillary electrophoresis (MultiNA). 臨床とウイルス 40: 184-191, 2012.

藤本嗣人：病原体検査と遺伝子検査_呼吸器・消化器ウイルス. 臨床と微生物 39(増刊号) : 570-574, 2012

2. 学会発表

菅原民枝、藤本嗣人、大日康史、杉下由行、谷口清州、岡部信彦：症候群サーベイランスと早期の検査による流行抑制の可能性：保育園での手足口病及び RS ウイルス感染症の流行での事例. 第 86 回日本感染症学会学術総会. 2012 年 4 月. 長崎市.

花岡希、小長谷昌未、藤本嗣人：リアルタイム PCR で陰性でキャピラリー電気泳動で陰性となる微量エンテロウイルス. 2012 年 4 月. 長崎市.

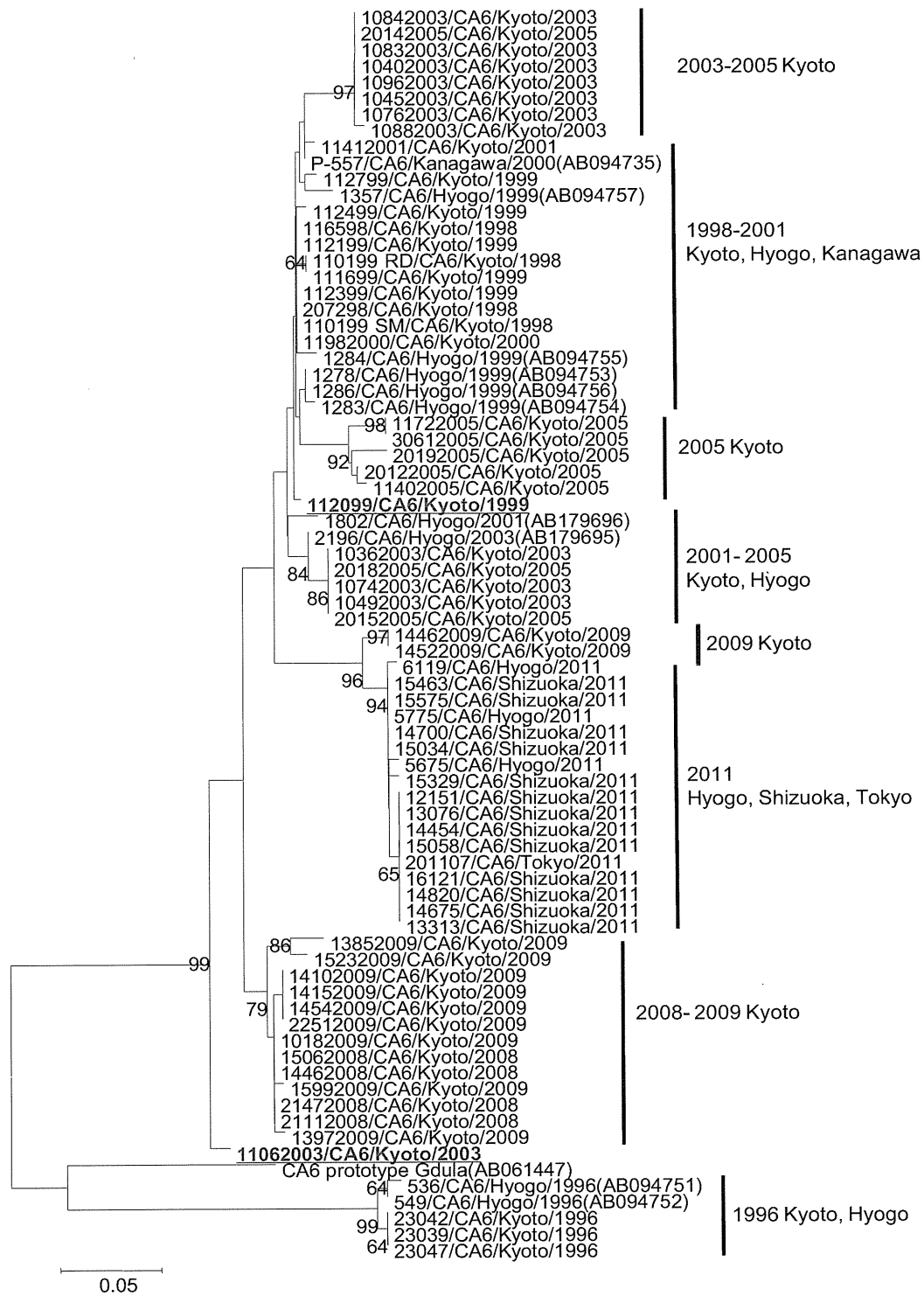


図 1. 1996～2011 年の国内分離株の系統解析(VP4 コード領域 207bp)¹⁾

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

分担研究者 牛島 廣治 日本大学医学部客員教授

協力研究者 沖津 祥子 日本大学医学部客員研究員

Pattara Khamrin チェンマイ大学医学部講師

Ngan Thi Kim Pham 日本大学医学部客員研究員

Aksara Thongprachum 東京大学大学院医学系研究科大学生

早川 智 日本大学医学部教授

1. 日本とタイにおける急性胃腸炎に関係するピコルナウイルス

研究要旨：小児急性胃腸炎の患者便検体からピコルナウイルス科のヒトパレコウイルス、サフォルドウイルス、ヒトコサウイルス、エンテロウイルスの検出を行った。タイの検体からは、サフォルドウイルス 2.7%、ヒトコサウイルス 0.2%、日本の検体からは、ヒトパレコウイルス 4.5%、サフォルドウイルス 2.5%、エンテロウイルス 7.4%が検出された。これらのウイルスは単独感染の場合と、すでに下痢の原因として知られているウイルスとの共感染の場合とがあり、これらのウイルスの病原性はまだはっきりしない。継続的な調査とさらなる研究が必要である。

A. 研究目的

我々は小児下痢検体から下痢を引き起こすウイルスとしてロタウイルス、ノロウイルス、アデノウイルス、サポウイルス、アストロウイルスの検出を行ってきたが、約50%ではこれらのウイルスが未検出であった。一方、近年ヒトの便検体から、下痢に関係するいくつかのウイルスが発見されている。それらはピコルナウイルス科のヒトパレコウイルス(HPeV)、サフォルドウイルス(SAFV)、ヒトコサウイルス(HCoSV)である。現在これらのウイルスの病原性についてはまだはっきりしておらず、その疫学的データも限られている。ここでは日本とタイの検体から HPeV、SAFV、HCoSV、エ

ンテロウイルス (EV) を検出し、その分子疫学的特徴を解析した。

B. 研究方法

1. HPeV : 2008年7月から2011年6月の間に日本国内6カ所（北海道、東京、静岡、大阪、京都、佐賀）の小児科外来を受診した1,642例の急性胃腸炎の乳幼児から採取した便検体を使用した。検体からRNAを抽出しRT-PCR法によってHPeVを検出した。配列解析をすることで遺伝子型の決定を行った。

2. SAFV : 2010年7月から2011年6月までの間に前記日本国内6カ所の小児科外来を受診した454例の急性胃腸炎の乳幼児から採取された便検体を使用した。2010年

1月から2011年12月までにタイ・チェンマイ大学の関連病院に入院した急性胃腸炎の小児407例から便検体を採取した。5'UTR領域を対象としたRT-PCR法で検出を行い、陽性検体に関してはVP1領域の解析を行った。

3. HCoV: 2010年1月から2011年12月までにチェンマイ大学の関連病院に入院した急性胃腸炎の小児407例から採取した便検体について5'-UTR領域を対象としたRT-PCR法で検出を行い、陽性検体に関しては配列の解析を行った。

4. EV: 2009年7月から2012年7月までに前記日本国内6カ所の小児科外来を受診した1671例の急性胃腸炎の小児患者の便検体から、RT-PCR法によってウイルスの検出を行った。

(倫理面への配慮) 日本での検体採取に関しては日本大学医学部で、タイでの検体採取に関してはチェンマイ大学で、それぞれ倫理委員会から研究の承認を受けた。

C. 研究結果

1. HPeV: 表1に示すように2008-2009年では665例中32例(4.8%)、2009-2010年では531例中28例(5.3%)、2010-2011年では446例中14例(3.1%)が陽性で、この期間の合計1642例中74例(4.5%)が陽性であった。遺伝子型ではHPeV1が最も多く56例で、その他HPeV3、HPeV4、HPeV6が検出された。またこれらの74例中30例(41%)で他のウイルスとの共感染があり、そのウイルスとしてはロタウイルス、ノロウイルス、サポウイルス、アデノウイルスであった(表2)。流行季節として7月と12月にピークがあったが、1年中検出された。年齢は7-24月齢で最も多かった。

2. SAFV: 日本の胃腸炎小児454例では7例が陽性(1.5%)であった。7例のうち、4例は他のウイルスとの共感染(ロタウイルス、ノロウイルス、ボカウイルス)であり、3例はSAFVの単独感染であった(表3)。VP1領域の配列解析の結果このうち5例がSAFV2、2例がSAFV3であった(図1)。タイの胃腸炎小児407例からは3例(0.7%)が検出され、その遺伝子型の決定は2例で行われ、SAFV1とSAFV6であった。

3. HCoV: タイの胃腸炎患児407例中1例がHCoV陽性(0.2%)であった。この遺伝子型はHCoV-Aであった。

4. EV: 日本の胃腸炎小児1671例中124例(7.4%)がエンテロウイルス陽性であった(表4)。この内訳として2009-2010年では532例中49例(9.2%)、2010-2011年では498例中28例(5.6%)、2011-2012年では641例中47例(7.3%)であった。このうち共感染は47例(37.9%)で認められた。表5のごとく、多様なウイルスとの共感染が認められたが、とくにノロウイルスが18例と多かった。

D. 考察

HPeVは日本で年間流行していることが確認され、検出率は4.5%であった。41%は他のウイルスとの共感染であった。遺伝子型はHPeV1が多いものの、多くの遺伝子型が検出された。SAFVはタイでは0.7%、日本では1.5%に検出された。日本の検体では7例中4例は共感染であったが、3例は単独感染であった。遺伝子配列の解析からSAFV2とSAFV3が検出され、SAFV2はさらに2つの亜型に分けることが可能であった。タイでのHCoVの検索では407例中1例の検出で、これはHCoV-Aであった。

EV は 7.4% に検出され、その 1/3 が他のウイルスとの共感染であった。

E. 結論

タイの検体では SAFV が 0.7%、HCoSV は 0.2%、日本の検体からは HPeV が 4.5%、SAFV が 1.5%、EV が 7.4% 検出された。他のウイルスとの共感染がある場合と、単独感染の場合があり、これらのウイルスが胃腸胃炎の原因となるかを決定するためには、健康小児からの検出を含め、今後のさらなる検討が必要と思われる。

(謝辞) 検体を採取いただいた菊田英明先生、山本あつ子先生、小林正明先生、西村修一先生、杉田久美子先生、馬場常嘉先生に深謝申し上げます。

F. 健康危険情報 特になし

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 Genes* 44: 244-246, 2012
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 Genes* 44: 253-257, 2012

3. Khamrin P, Thongprachum A, Kikuta H, Yamamoto A, Nishimura S, Sugita K, Baba T, Kobayashi M, Okitsu S, Hayakawa S, Shimizu H, Maneekarn N, Ushijima H: Three clusters of Saffold viruses circulating in children with diarrhea in Japan. *Infect Genet Evol* 13: 339-343, 2013

2. 学会発表

1. 沖津祥子、Thongprachum Aksara, 清水博之、早川智、牛島廣治: タイ国の健康なブタ血清中のブタコブウイルス. 第 53 回に本臨床ウイルス学会. 豊中市、2012 年 6 月
2. Ushijima H, Khamrin P, Thongprachum A, Tran DN, Hayakawa S, Okitsu S, Maneekarn N: Novel picornaviruses in children and adults with diarrhea, Thailand. The 9th Japna-China International Conference of Virology. 札幌市、2012 年 6 月
3. Thongprachum A, Khamrin P, Tran DN, Okitsu S, Maneekarn N, Mizuguchi M, Hayakawa S, Ushijima H: Picornaviruses associated with gastroenteritis in Japan and Thailand. Symposium "Current progress in enterovirus 71 research in the Asia-Pacific Region" The 16th Annual meeting of Japanese Society for Neurovirology. 新宿区、2012 年 8 月.
4. Thongprachum, A, 沖津祥子、牛島廣

治 : Molecular epidemiology trend of
diarrheal viruses circulating in
Japanese pediatric patients,
2010-2011. 第 44 回日本小児感染症学
会総会・学術集会. 北九州市、2012 年
11 月

表 1. 日本の小児急性胃腸炎検体における HPeV の検出

Year	Number of specimens tested	HPeV samples	The genotype of HPeV (%)				
			HPeV 1	HPeV 3	HPeV 4	HPeV 6	nontype
2008-2009	665	32 (4.8%)	23	5	1	3	0
2009-2010	531	28 (5.3%)	25	0	2	0	1
2010-2011	446	14 (3.1%)	8	1	1	4	0
Total	1642	74 (4.5%)	56	6	4	7	1

表 2. HPeV 陽性検体における共感染の割合

Year	Number of HPeV	Co-infection	Co-infected virus (case)			
			RAV	NoV	SaV	AdV
2008-2009	32	7	0	5	1	1
2009-2010	28	15	2	11	1	1
2010-2011	14	8	0	7	0	1
Total	74	30	2	23	2	3

表 3. 日本の急性胃腸炎小児検体からのサフォルドウイルスの検出

Lab ID	Collection date	Gender	Age (Year)	No. of diarrhea/24 hr (time)	Duration of diarrhea (day)	Fever ^a	Vomiting (time)	Cough, rhinorrhea	Dehydration	Co-infect virus	SAFV genotype	Remark ^c
9913	10/3/2010	M	6	Unknown	Unknown	No	No	No	No	-	SAFV3	1
9957	20/7/2010	F	3	Unknown	Unknown	Yes	5-6	No	No	-	SAFV2	1
9964	30/8/2010	F	1	3	6	No	No	No	No	-	SAFV2	2
9992	10/5/2010	F	1	1-3	6	Yes	1	No	Mild ^b	Rotavirus, Bocavirus	SAFV2	3
0032	14/10/2010	M	2	Unknown	3	No	No	No	No	Bocavirus	SAFV2	1
0169	8/9/2010	M	2	2-3	7	No	No	No	No	Norovirus	SAFV2	1
0312	28/4/2011	F	1	2-3	Unknown	Yes	2	No	No	Norovirus, Bocavirus	SAFV3	1

検出された 7 検体の臨床的特徴を示す。

a: 体温 37.8°C以上を有熱とした。

b: 5%以下の体重減少が見られた。

c: 数字は以下を示す。1: 患者は小児科外来で 1 度診療を受けた、2: 患者は小児科外来で 2 度以上の診療を受けた、3: 患者は小児科外来で輸液を受けた。

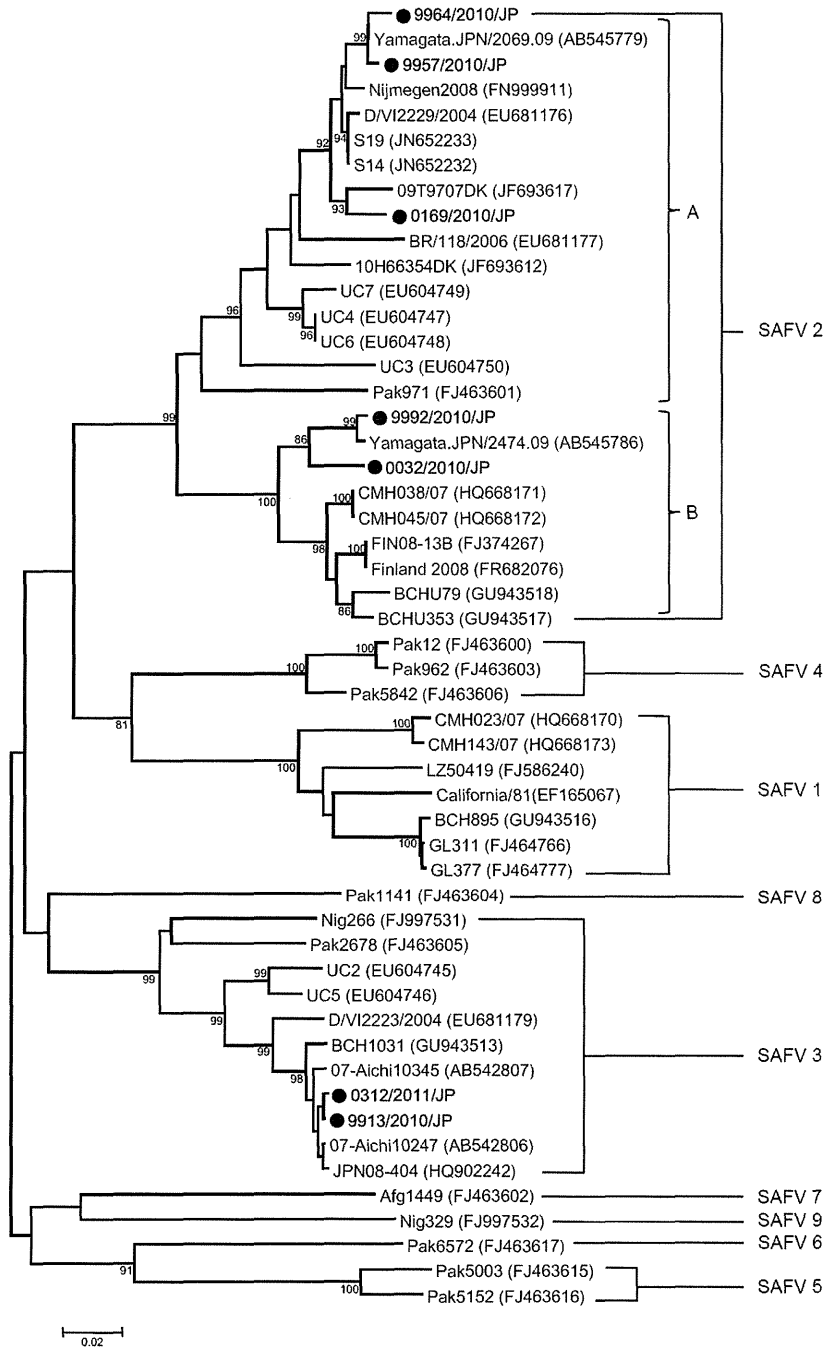


図1.日本の急性胃腸炎小児から検出されたサフォルドウイルスの系統樹.

●はこの研究で検出されたウイルスを示す。SAFV2A と 2B および 3 が検出された。

表4. 日本の小児急性胃腸炎患者の便検体からのエンテロウイルスの検出

Year	Number of specimens tested	Enterovirus samples
2009-2010	532	49 (9.2%)
2010-2011	498	28 (5.6%)
2011-2012	641	47 (7.3%)
Total	1671	124(7.4%)

表5. エンテロウイルス陽性検体における共感染の割合

Year	Number of EV	Co-infection	Co-infected virus (case)								
			RAV	NGII	SaV	AstV	BoV	RAV NGII	NGII BoV	NGII HPeV	NGII SAFV
2009-2010	49	12	5	4	0	0	2	0	0	0	1
2010-2011	28	20	1	6	1	0	6	0	6	0	0
2011-2012	47	15	3	8	1	1	0	1	0	1	0
Total	124	47	9	18	2	1	8	1	6	1	1

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

分担研究者 牛島 廣治 日本大学医学部客員教授

協力研究者 沖津 祥子 日本大学医学部客員研究員

Pattara Khamrin チェンマイ大学医学部講師

Dinh Nguyen Tran 東京大学大学院医学系研究科大学生

早川 智 日本大学医学部教授

2. ベトナムにおいて急性呼吸器感染症で入院中の小児におけるライノウイルス

研究要旨：ベトナムにおいて急性呼吸器感染症で入院した患児から鼻咽頭スワブを得て、ヒトライノウイルスを検出し、臨床データとの比較を行った。この結果、ヒトライノウイルスは患者の30%から検出され、1年を通して流行していることがわかった。また、臨床データとの比較では、ヒトライノウイルスが重篤な下気道感染症を起こすことがわかった。特に乾季では細気管支炎、肺炎におけるヒトライノウイルスが重要であることがわかった。

A. 研究目的

ピコルナウイルス科のライノウイルスは一般的な風邪の主原因であり、喘息悪化に関与することが知られている。しかしこのウイルスによる下気道感染を入院対象とすべきかについては、特に熱帯の国においては確立されていない。ここではベトナムで急性呼吸器感染症によって入院した小児におけるライノウイルス感染の影響と臨床的特徴を検討した。

B. 研究方法

ベトナム・ホーチミン市の第2子ども病院に2010年4月から2011年5月までに急性呼吸器感染症で入院した小児1082例から発症7日以内に採取した鼻咽頭スワブと臨床データを使用した。スワブからはmultiplex(hemi-)nested PCR法にてインフルエンザウイルスA、B型、RSウイルス、

ヒトメタヒューモウイルス、パラインフルエンザウイルス1-4型、コロナウイルス229EとOC43、アデノウイルス、ヒトボカウイルス、ライノウイルス(RV)の検出を行った。RV感染が確認された患者の臨床データを解析、比較した。

(倫理面への配慮) ベトナムでの検体採取に関してはホーチミン第2子ども病院にて倫理委員会から研究の承認を受けた。

C. 研究結果

1. 調べたウイルスの中で何らかのウイルスが検出されたものは、対象小児1082例のうち690例(63.8%)であった。このうちRVは325例(30%)で検出され、最多であった。RVと他のウイルスとの共感染は325例中82例であった(表1)。

2. 患者の年齢分布(四分位範囲)は4-19

カ月（中央値 10 カ月）、男女比は 2.4 であった。季節分布では 1 年を通して感染が見られた（図 1）。

3. 臨床データとの比較をすると RV 感染は以下の症状出現率において他のウイルス感染との間で有意差が見られた。すなわち有熱が 50.6%、動脈血酸素飽和濃度 (SpO₂ 92% 以下) が 11.9%、下胸部陥没 58.0%、喘鳴 63.8%、下気道感染 28.0%、クループ 2.9%、細気管支炎 34.2% であった。これらは RV 感染が重篤な下気道感染を引き起こすことを示している（表 2）。雨季における細気管支炎と肺炎の原因では RSV 感染によるものが 33.5%、26.5% であったが、一方乾季ではこの割合は 5.4%、3.4% と減少し、RV 感染による割合が

31.5%、23% と高率となった（図 3）。このことは乾季での肺炎、気管支炎の原因として RV の関与が高いことを示している。

D. 考察

RV 感染はベトナムで急性呼吸器感染症によって入院した患児において重篤な下気道感染症を引き起こしていることが示された。さらに乾季においては細気管支炎や肺炎の原因ウイルスとして重要である。

E. 結論

RV 感染症が入院にいたる重篤な呼吸器感染症の原因ウイルスであることを明らかとなった。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表 前掲