

表1、エンテロウイルス 71 型分離数と分離株の遺伝子型

年	分離数	遺伝子型								
		B1	B2	B3	B4	B5	C1	C2	C3	C4
1973	2	2								
1978	116	4								
1982	3	2	1							
1983	8	6								
1984	2	2								
1985	20		3							
1986	3									
1987	9						3			
1988	7						4			
1989	8						1			
1990	11						8			
1992	3						3			
1993	31						22		1	
1997	14			1				4		6
1998	3							3		
2000	29				14					10
2001	2				2					
2003	29					10	20			
2004	2					1				
2005	12									9
2006	65							2		28
2007	1							1		
2008	1									1
2009	7					2		3		2
2010	56							29		1
2011	4							3		
2012	5					4		1		
2013	35					1		3		
総数	488	16	4	1	16	18	61	49	1	57

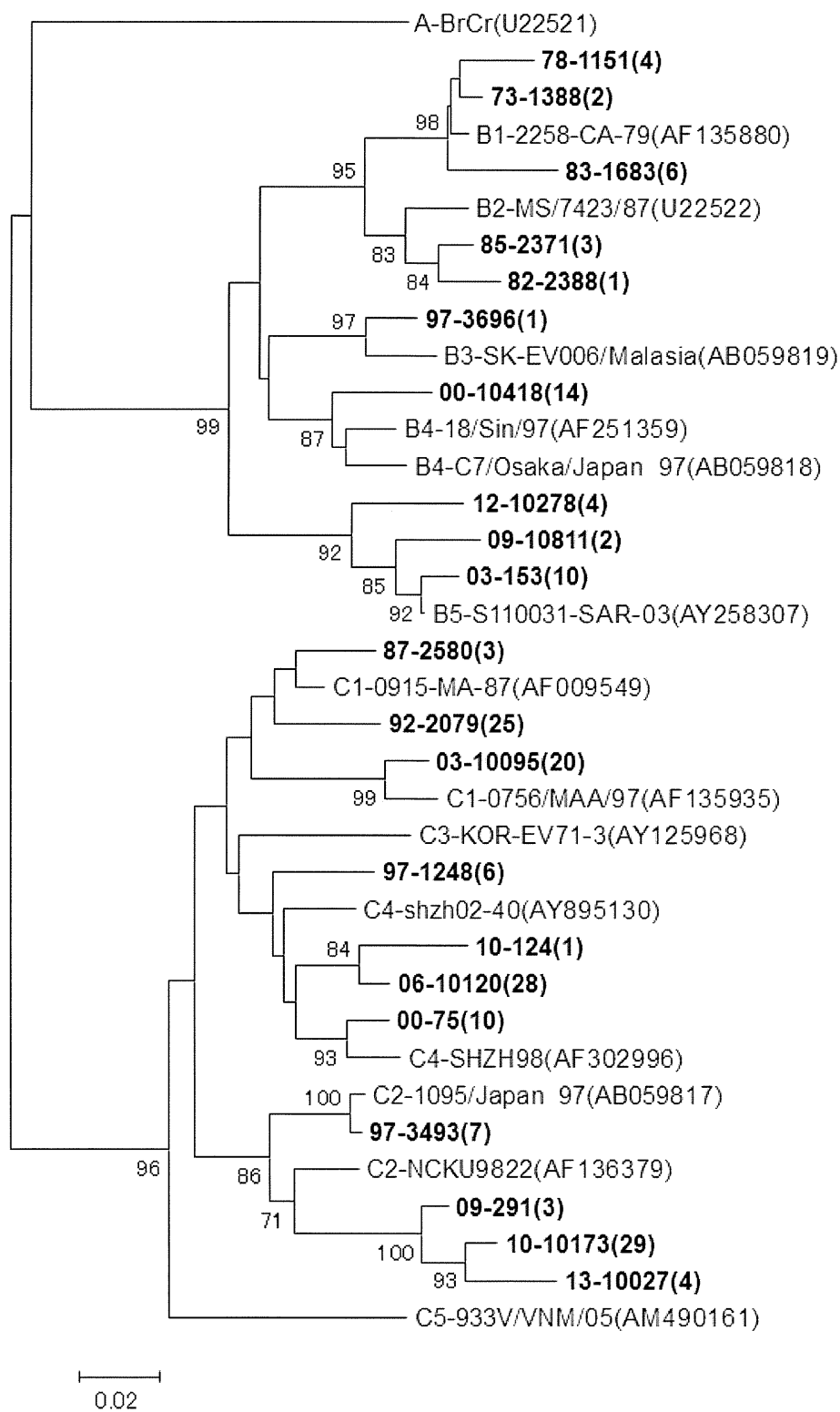


図1、エンテロウイルス分離株の系統樹解析 (NJ 法)

分離株を太字で表し、分離年-株番号 (同一配列の分離株数) とした。データベースから得た配列は、遺伝子型-株名 (accession no.) で表した。

平成 25 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

不活化ポリオワクチンの有効性・安全性の検証及び国内外で進められている
新規腸管ウイルスワクチン開発に関する研究 (H25-新興-一般-012)

研究協力者 牛島 廣治 日本大学医学部客員教授
沖津 祥子 日本大学医学部客員研究員
Tran Dinh Nguyen 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. ベトナムにおいて入院中の小児におけるヒトライノウイルスに関する研究

研究要旨：ヒトライノウイルス(RV)は急性呼吸器感染症で入院している患者にとって最も一般的(30%)なウイルスであった。RV は重症疾患を起こす可能性があった。様々なタイプの RV が流行していた。この研究では入院が必要な重篤な呼吸器感染症を起こす RV の役割に焦点を当てた。

A. 研究目的

ヒトライノウイルス(RV)はピコルナウイルス科のエンテロウイルス属に属するエンベロープのない、一本鎖 RNA ウイルスである。種としては rhinovirus A、B、C の 3 種があるが、100 以上の血清型があり、さらに他に 50 以上の遺伝子型が存在する。上気道感染に加えて、RV はさらに重篤な疾患の患者においても PCR 法でしばしば検出される。RV の臨床症状は無症状の状態から一般の風邪、喘鳴、肺炎まで広い。また RV は喘息増悪や細気管支炎に重要な役割を果たす。しかし、RV は臨床診療ではルーチンとして診断されず、インフルエンザや Respiratory syncytial ウイルス (RSV) のようなウイルスと比較した RV の臨床的インパクトはまだよく知られていない。この研究の目的はベトナムにおける急性呼吸器感染症(ARI)で入院した小児における RV の臨床的特徴と遺伝的多様性について研究をすることである。

B. 研究方法

研究はベトナム南部の第 2 こども病院で 14 ヶ月間実施した。ARI で入院した患者を発症 7 日以内に登録した。鼻咽頭スワブを採取し、核酸を抽出した後、PCR 法にて RV と 13 種類の呼吸器ウイルスを検出した。臨床データを解析した。陽性検体の RV を VP4/2 配列に基づいて分類した。

C. 研究結果と考察

1082 名の患者がこの研究に登録された。何らかのウイルスが陽性であった率は 64.6% であった。RV は最も一般的なウイルスで 30%に達し、次は RSV (24%) であった。RV 陽性のなかで、共感染は 28%に見られ、ほとんどは RSV との共感染なのであった (2 症例では 3 種感染であった)。325 の RV 陽性検体から、ランダムに 54 検体を選び、分類のために VP4/2 遺伝子配列を増幅した。系統樹解析の結果、RV A (41/54) が RV

C(13/54)より高頻度に検出され、RV B は検出されなかった。

RV 感染の月齢分布:6 ヶ月以下、6-11 ヶ月、12-23 ヶ月、24-35 ヶ月、36-59 ヶ月、60 ヶ月以上に分けると、すべての月齢でほぼ30%と同じ割合となった。

RV 感染の季節性:ベトナム南部は熱帯性気候であり、5月から10月の雨季と11月から4月の乾季の2つに分けられている。他の研究で、すでにRVは1年を通して感染が見られることが報告されているが、種による違いを調べたところ、RV A はどの月でも検出され、RV C は検出されない月もあった。

RV 感染の臨床的特徴:RV 陽性患者群の有熱の割合は、RV 陰性群に比べ低かった(50対75%、 $p < 0.001$)。2群間で呼吸促迫と陥没呼吸の割合に変わりはないが、RV 感染群では非感染群に比べ低酸素の割合が高値であった(12.4%対6.9%、 $p = 0.009$)。RV 陽性群では陰性群に比べ、上気道感染率が有意に高かった(26.9%対20.2%、 $p = 0.037$)が、RV 陽性患者の2/3(70.1%)は下気道感染と診断された。そこでRVは重症疾患を引き起こす可能性がある。RV 共感染では単独感染に比べ、有熱と陥没呼吸の割合が高かった。これはRVと他のウイルスとの共感染がRV 単独感染に比べより重篤な疾患を引き起こしたことを示すと思われる。他の研究と異なり、我々の結果ではRV A とRV C の間に有意差はなかった。

それらの重症度に差はなかった。

RV と RSV 感染の臨床的特徴(表1):RV 感染患者はRSV 感染者に比べ年長で、彼らは低酸素の割合が高く、有熱、陥没呼吸の割合は低かった。診断と関係なく、RSV にく

らべ上気道感染を起こしやすいが、細気管支炎も引き起こしやすかった。それ故RVは重症疾患を引き起こしやすいと考えられた。これまでの研究の結果から、雨季にはRSVが流行することをすでに見いだしている。雨季はRSVの最盛期であり、細気管支炎(33.5%対19.4%)や肺炎(26.56%対18.1%)を起こすことはRVよりも高率であったが、RVは入院が必要な細気管支炎、肺炎の1/5の原因であった。乾季はRSVの閑散期であり、RVは細気管支炎(31.5 vs 5.4%)、肺炎(23 vs 3.4%)を引き起こすことにかけてRSVを上回った。

配列解析:この研究のRV Aのすべての配列をA種血清型プロトタイプとともに解析した。この群では流行しているA種RVには21の血清型が認められた。NCBIデータベース上でblast検索を行うと1株は新しい遺伝子型決定の基準であるp値以上を示した(p 値 >10.5)。確認のため、この株の全配列決定の予定である。この群はC種では9つの遺伝子型が流行していた。

D. 結論

RVはARIで入院している患者にとって最も一般的(30%)なウイルスであった。RVは重症疾患を起こす可能性があった。様々な遺伝子型のRVが流行していた。この研究では入院が必要な重篤な呼吸器感染症を起こすRVの役割に焦点を当てた。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Dey SK, Hoq I, Okitsu S, Hayakawa S, Ushijima H: prevalence, seasonality, and peak

- age of infection of enteric adenoviruses in Japan, 1995-2009. *Epidemiol Infect* 141:958-960, 2013
2. Trinh QD, Pham NT, Le Nguyen NT, Lam BQ, Le Phan KT, Troonq KH, Le TQ, Nguyen HT, Tang TC, Izumi Y, Komine-Aizawa S, Ushijima H, Hayakawa S: Seroprevalence of chlamydomphila pneumoniae in HIV-infected children in Vietnam. *J Infect Chemother*;19:538-541, 2013
 3. Shimizu-Onda Y, Akasaka T, Yagyu F, Komine-Aizawa S, Tohya Y, Hayakawa S, Ushijima H: The virucidal effect against murine norovirus and feline calicivirus as surrogates for human norovirus by ethanol-based sanitizers. *J Infect Chemother* 19:779-781, 2013
 4. Thongprachum A, Khamrin P, Chan-It W, Malasao R, Chaimongkol N, Okitsu S, Mizuguchi M, Maneekarn N, Hayakawa S, Ushijima H: Emergence of Norovirus GII/4 2006a and 2006b Variants in Hospitalized Children with Acute Gastroenteritis in Thailand. *Clin Lab*, 59: 271-276, 2013
 5. Khamrin P, Okitsu S, Ushijima H, Maneekarn N: Complete genome sequence analysis of novel human bocavirus reveals genetic recombination between human bocavirus 2 and human bocavirus 4. *Infect Genet Evol.* 17: 132-136, 2013
 6. Okitsu S, Khamrin P, Thongprachum A, Kongkaew A, Maneekarn N, Mizuguchi M, Hayakawa S, Ushijima H: Whole-genomic analysis of G3P[23], G9P[23] and G3P[13] rotavirus strains isolated from piglets with diarrhea in Thailand, 2006-2008. *Infect. Genet. Evol* 18: 74-86, 2013
 7. Müller WE, Schröder HC, Schlossmacher U, Grebenjuk VA, Ushijima H, Wang X: Induction of carbonic anhydrase in SaOS-2 cells, exposed to bicarbonate and consequences for calcium phosphate crystal formation. *Biomaterials* 34:8671-8680, 2013
 8. Chan-It W, Thongprachum A, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H: Genetic analysis and homology modeling of capsid protein of norovirus GII.14. *J Med Virol.* *J Med Virol* 86: 329-334, 2014
 9. Chaimongkol N, Khamrin P, Malasao R, Thongprachum A, Kongsricharoern T, Ukarapol N, Ushijima H, Maneekarn N: Molecular characterization of norovirus variants and genetic diversity of noroviruses and sapoviruses in Thailand. *J Med Virol.* 2014 in press
 10. Tran DN, Nguyen TQ, Nguyen TA, Hayakawa S, Mizuguchi M,

- Ushijima H: Human bocavirus in children with acute respiratory infections in Vietnam. *J Med Virol.* 2014 in press
11. Thongprachum A, Chan-it W, Khamrin P, Saparpakorn P, Okitsu S, Takanashi S, Mizuguchi M, Hayakawa S, Maneekarn N, Ushijima H: Molecular epidemiology of norovirus associated with gastroenteritis and emergence of norovirus GII.4 variant 2012 in Japanese pediatric Patients. *Infect Genet Evol.* 2014, in Press
 12. Yazawa S, Yokobori T, Ueta G, Ide M, Altan B, Thongprachum A, Nishimura T, Nakajima T, Kominato Y, Asao T, Saniabadi AR, Furukawa K, Kuwano H, Pendu JL, Ushijima H: Blood group substances as potential therapeutic agents for the prevention and treatment of infection with norovirus: proving novel binding patterns in human tissues. *Plos One* 2014 (In press).
 13. 吉田弘道、山中龍宏、巷野悟郎、太田百合子、山口規容子、牛島廣治：育児不安尺度の作成に関する研究 その1 *小児保健研究* 72: 680-689, 2013
 14. Homma K, Wakana N, Ushijima H, Tanaka E. Immune factors in breast milk. - Immunoglobulin and apoptosis of human milk cells. *日本母乳哺育学会雑誌*, 7: 42-54, 2013
2. 学会発表
 1. Thongprachum A, 高梨さやか、沖津祥子、早川智、牛島廣治：Increased of norovirus in Japanese pediatric patients associated with the emergence of GII/4 variant 2012. 第54回日本臨床ウイルス学会。倉敷市、2013年6月
 2. Tran DN, 高梨さやか、沖津祥子、早川智、水口雅、牛島廣治：Genetic characterization of human influenza A virus in Vietnam from 2010 to 2011. 第45回日本小児感染症学会総会・学術集会。札幌市、2013年10月
 3. 牛島廣治、西村修一、Thongprachum A、Tran DN、Pham NTK、高梨さやか、沖津祥子、水口雅、早川智：LAMP, PCR および培養法を用いた小児下痢便からのカンピロバクターの検出。第45回日本小児感染症学会総会・学術集会。札幌市、2013年10月
 4. 沖津祥子、Khamrin P、Thongprachum A, 高梨さやか、早川智、牛島廣治：タイでブタから検出された porcine kobuvirus 一株の全長配列の決定、およびタイ、日本の株における 2B 領域の解析。第61回日本ウイルス学会学術集会。神戸市、2013年11月
 5. 牛島廣治、Thongprachum A, Khamrin P, 高梨さやか、沖津祥子、

- 小林正明、西村修一、菊田英明、山本あつ子、杉田久美子、馬場常嘉、水口雅、早川智：The emergence of norovirus GII.4 variant 2012 in Japanese pediatric patients. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 神戸市、2013年11月
6. Tran DN、高梨さやか、沖津祥子、Nguyen TQN、Ha MT、Tran TTL、水口雅、早川智、牛島廣治：Human Rhinovirus infections in hospitalized children in Vietnam. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 神戸市、2013年11月
7. Thongprachum A、Khamrin P、高梨さやか、沖津祥子、小林正明、西村修一、菊田英明、山本あつ子、杉田久美子、馬場常嘉、水口雅、早川智、牛島廣治：A wide variety of gastroenteritis viruses circulating in Japanese pediatric patients. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 神戸市、2013年11月
8. 井上茉南、高梨さやか、牛島廣治、沖津祥子、崎山弘、水口雅：府中市におけるロタウイルスワクチン累積接種率の検討—定期接種ワクチンとの比較. 第10回日本小児消化管感染症研究会. 東京都港区、2014年2月.
9. Thongprachum A, Takanashi S, Okitus S, Kobayashi M, Nishimura S, Kikuta H, Yamamoto A, Sigita K, Baba T, Mizuguchi M, Hayakawa S, Ushijima H: Molecular and epidemiological trend of sapovirus and astrovirus infection in Japanese pediatric patient, 2009-2013. 第10回日本小児消化管感染症研究会. 東京都港区、2014年2月.
- F. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

表1. ヒトライノウイルスとRSウイルスの感染の臨床的特徴の比較

Characteristic(%)	RV only (+) (n=234)	RSV only (+) (n=184)	<i>p</i>
Median age (IQR)	9(4-19)	7(3-13.5)	0.021
Prematurity	12.0	9.8	
Malnutrition	9.8	6.5	
Fever	50.0	73.9	<0.001
Cough	90.2	93.5	
Runny noses	72.6	85.3	0.002
Tachypnea	40.6	41.8	
Retraction	57.3	69.0	0.015
Wheezing	63.2	61.4	
SpO ₂ ≤92%	12.4	3.8	0.002
URIs	26.9	18.5	0.047
Laryngitis	3.0	1.1	
Bronchiolitis	34.6	44.6	0.043
Pneumonia	35.5	35.9	
Hos. Duration (d)(IQR)	5(3-8)	6(4-8)	

平成 25 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

不活化ポリオワクチンの有効性・安全性の検証及び国内外で進められている

新規腸管ウイルスワクチン開発に関する研究 (H25-新興一般-012)

研究協力者 牛島 廣治 日本大学医学部客員教授

沖津 祥子 日本大学医学部客員研究員

Thongprachum Aksara 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. 2009-2013 年に急性胃腸炎で小児外来を受診した日本の小児におけるヒトパレコウイルス、エンテロウイルス、アイチウイルスの検出

研究要旨：小児科外来を急性胃腸炎で受診した患者から EV、HPeV、AiV の検出を行ったところ、それぞれ 6.1%、6.6%、0.1%検出された。これまで検出を行っていた 5 種類のウイルスに加えることで、検出率は 70.4%と上昇した。それぞれの単独感染に加え、EV、HPeV では二重感染、三重感染が多く認められた。EV、HPeV はどの月齢でも、月齢 12-23 ヶ月で多く、また両ウイルスは一年中認められたが、EV は 7 月にピークがあった。

A. 研究目的

急性胃腸炎の疑いで小児科外来を受診した小児便検体から、下痢を引き起こすウイルスとして A 群、C 群ロタウイルス、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、2005-2006 年では 67%、2006-2007 年では 46%、2008-2009 年では 55%で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。これらはピコルナウイルス科のヒトパレコウイルス (HPeV)、サフォールドウイルス (SAFV)、ヒトコサウイルス (HCoSV) やヒトボカウイルス (HBoV) などである。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 2009-2013 年の日本の検体から HPeV、アイチウイルス (AiV)、エンテロウイルス (EV) を検出し、その検出率、年齢分布、季節性について研究した。

B. 研究方法

日本各地 (北海道、東京、静岡、京都、大阪、佐賀) の小児科外来を急性胃腸炎の疑いで受診した小児から便検体を採取した。期間は 2009 年 7 月～2013 年 6 月までの 4 年間である。年齢は 1 ヶ月から 14 歳までであった。総検体数は 2381 であった。これらの便検体から RNA を抽出し RT-PCR 法によって EV、HPeV、アイチウイルスを検出した。

C. 研究結果と考察

2381 検体のうち、1676 検体 (70.4%) で何らかのウイルスが検出された。このうち EV は 146 検体 (6.1%)、HPeV は 156 検体 (6.6%)、AiV は 2 検体 (0.1%) であった (表 1)。HPeV、EV はそれぞれ単独感染が 89 件、56 件認められたが、そのほかのウイルスとの混合感染が多く、特にノロウイルス GII との二重感染が多かった。また三重感染も認められた (表 2)。HPeV、EV はすべての年齢層で検出されたが、月齢 12-23 ヶ月で最も多く、6-11 ヶ月がそれに続いた。HPeV は 1 年中、散発的に検出され、特にピークは認められなかった。一方 EV は 1 年中認められたが、7月にピークを認めた。

D. 考察

今回これまでのロタウイルス、ノロウイルス、サポウイルス、アデノウイルス、アストロウイルスの検出に加えて、HPeV、EV、AiV の検出を行ったところ、全体の検出率は 70.4% に上昇した。それぞれの割合は EV と HPeV はそれぞれ、6.1% (146/2381) と 6.6% (156/2381) で、AiV は 2 検体の 0.1% であった。また、EV と HPeV はそれぞれの単独感染が 60.9%、36.9% で、他のウイルス、とくに A 群ロタウイルスやノロウイルス GII との二重感染、三重感染が多かつ

た。AiV の 2 例は単独感染であった。HPeV 感染は一年中認められ、EV も一年中検出されたが、7月にピークがあった。HPeV、EV 感染の年齢分布ではすべての年齢に検出され、月齢 12-23 ヶ月で最も多かった。今後の課題として SAFV、HCoSV や HBoV の検討を行いたい。

E. 結論

小児科外来を急性胃腸炎で受診した患者から EV、HPeV、AiV の検出を行ったところ、それぞれ 6.1%、6.6%、0.1% 検出された。これまで検出を行っていた 5 種類のウイルスに加えることで、検出率は 70.4% と上昇した。それぞれの単独感染に加え、EV、HPeV では二重感染、三重感染が多く認められた。EV、HPeV はどの月齢でも、月齢 12-23 ヶ月で多く、また両ウイルスは一年中認められたが、EV は 7月にピークがあった。

F. 研究発表

前記掲載

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

表1. 2009-2013年に日本各地の小児胃腸炎患者からのヒトパレコウイルス、エンテロウイルス、アイチウイルスの検出頻度

Diarrhea viruses	No. of positive case (%)				Total
	2009-2010	2010-2011	2011-2012	2012-2013	
Single-Infection					
EV	33	21	25	10	89
HPeV	18	10	18	10	56
AIV	1	1	0	0	2
Double-Infection					
RAV + EV	6	0	2	6	14
RAV + HPeV	4	6	9	4	23
NoV GII + EV	4	14	7	8	33
NoV GII + HPeV	17	14	10	14	55
SV + EV	0	1	1	2	4
SV + HPeV	2	0	2	1	5
AdV + EV	0	1	0	0	1
AdV + HPeV	2	1	1	1	5
HAstV + EV	0	0	1	0	1
HAstV + HPeV	0	0	3	0	3
Triple-Infection					
RAV + NoV GII + HPeV	0	1	2	2	5
RAV + NoV GII + EV	0	0	1	0	1
RAV + AdV + EV	0	0	1	0	1
RAV + SV + HPeV	0	0	0	1	1
NoV GII + HPeV + EV	0	0	1	1	2
NoV GII + HAstV + HPeV	0	0	0	1	1
Total of positive cases	87(15.1%)	70(13.1%)	84(14.0%)	61(8.3%)	302(12.7%)

平成 25 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

不活化ポリオワクチンの有効性・安全性の検証及び国内外で進められている

新規腸管ウイルスワクチン開発に関する研究 (H25-新興-一般-012)

協力研究者 牛島 廣治 日本大学医学部客員教授

沖津 祥子 日本大学医学部客員研究員

Khamrin Pattara チェンマイ大学医学部講師

Thongprachum Aksara 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

3. タイ、日本のブタから検出されたアイチウイルス C の 2B 領域の解析

研究要旨：アイチウイルス C の 2B 領域を調べた。この研究で調べたタイの下痢症の仔ブタ、健康なブタ、日本の健康なブタからの検出株はすべて変異型であった。このことはこの配列は病原性の遺伝因子ではないことを示している。

A. 研究目的

アイチウイルス C はピコルナウイルス科のコブウイルス属のウイルスで以前ブタコブウイルスとして知られていたが、2012 年にアイチウイルス C としてコブウイルス科の第 3 の属として承認されたウイルスである。下痢症の仔ブタからのみならず、健康なブタからも検出され、その病原性についてははっきりしていない。しかし、最近中国で重症下痢疾患の集団感染からこのウイルスが検出され、その遺伝子解析の結果から検出されたウイルスが 2B 領域に 90 核酸の欠損が認められた変異型であったことから、この変異型と病原性の関係が注目されている。この研究ではタイの下痢症の仔ブタから検出した 1 株の前期配列を決定し、これが変異型であったことから、タイの下痢、健康なブタおよび日本の健康なブタから検出した株に関して 2B 領域の解析を行った。

B. 研究方法

すでに報告したタイの 1 株 (CMP06/2007/THA) の全塩基配列を決定し、これまで知られているハンガリーや中国の株との比較を行った。タイの健康な仔ブタ 52 検体からアイチウイルス C 株の検出を行った。陽性株から 6 株およびすでに下痢症の仔ブタから検出した 6 株、および日本の健康なブタから検出した 4 株についても RT-PCR 法にて 2B 領域の増幅を行い、その配列を調べた。

C. 研究結果

CMP06/2007/THA 株の全塩基配列と GenBank database 上の 13 株との比較を行ったところ、系統樹解析および相同性解析の結果から中国の WUH1/2011/CHN との相同性が最も高かった。また 2B 領域は変異型であった。タイの健康な仔ブタ糞便 52 検体のうち 94% (47 検体) がアイチウ

イルス C 陽性であった。この陽性検体およびすでに以前報告したタイの下痢仔ブタから検出した検体、日本の健康なブタから検出した検体についてもすべて変異型であった。これらの系統樹解析をおこなったところ、変異型のみで一つのクラスターが形成されるということはなかった(図 1)。また、推測されるアミノ酸配列を調べたところ、ハンガリーで検出されたプロトタイプと比べて 3 カ所のアミノ酸置換が検出された。

D. 考察

アイチウイルス C は今までに 13 株の全塩基配列が報告されている。そのうち 3 株はハンガリーの株で後の 10 株は中国で検出された株である。このうち中国で 5 株が変異型として報告されており、そのうち 3 株は重症な下痢症の集団感染から検出されたことが示された。変異型では 2B 領域にハンガリーで検出されたプロトタイプでは見られた繰り返し配列がなく、結果として 90 核酸 (30 アミノ酸) の欠失が見られた。今回の結果から、タイ、日本の検出株すべて

が変異型であり、これらの国では変異型が流行していることがわかった。また、タイでは下痢症、健康ブタどちらからも変異型が検出され、日本の検出ブタも健康であったことから、病原性とは直接の関連はないものと考えられた。

今後、病原性を確認するためにも、同一個体での継続的な調査が必要と考えている。

結論

アイチウイルス C の 2B 領域を調べた。この研究で調べたタイの下痢症の仔ブタ、健康なブタ、日本の健康なブタからの検出株はすべて変異型であった。このことはこの配列は病原性の遺伝因子ではないことを示している。

F. 研究発表

前記掲載

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

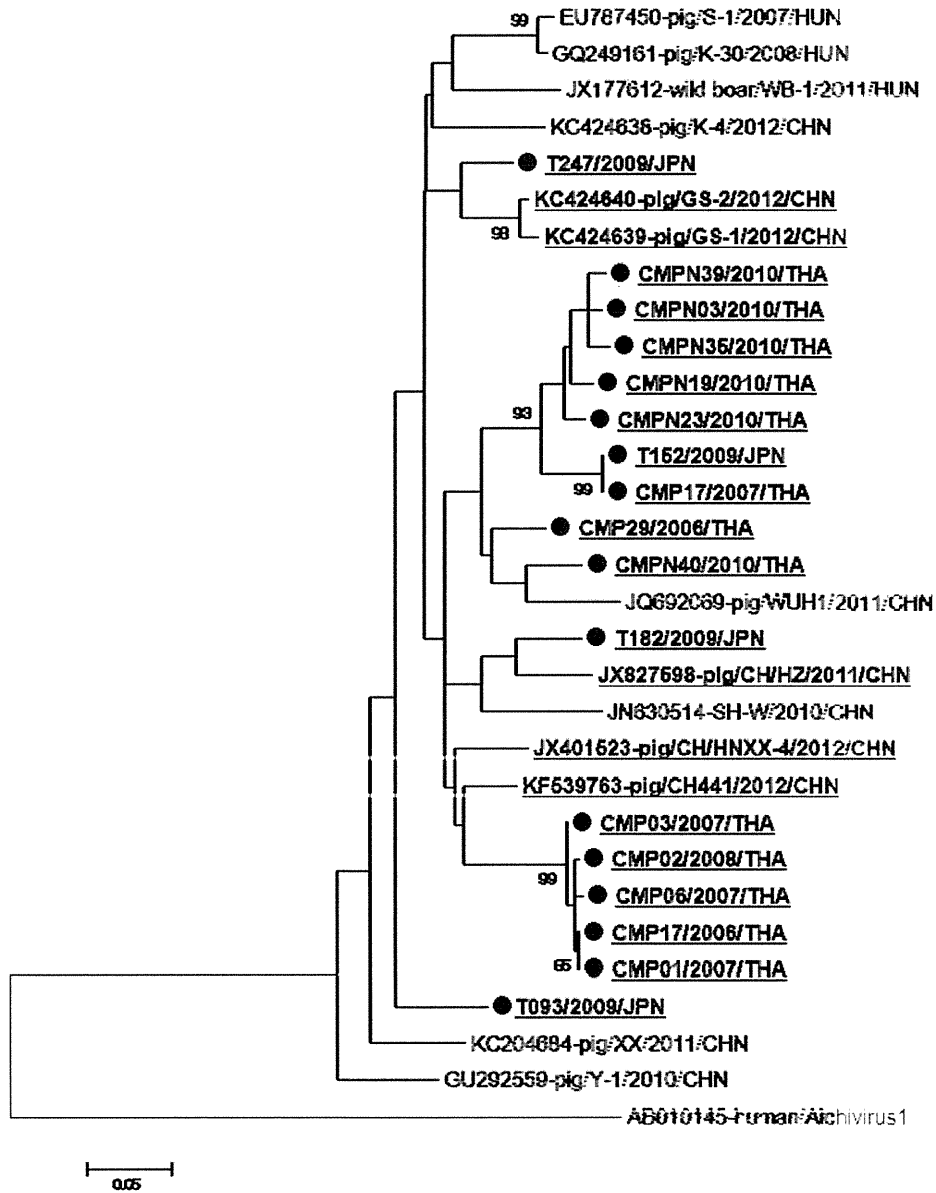


図1. アイチウイルス C の 2B 領域の核酸配列の系統樹

● : この研究で配列を調べた株 (CMP:タイの下痢症検体から得た株、CMPN:タイの健康な仔ブタから得た株、T:日本の健康なブタから得た株。

下線:変異型を示す。

厚生労働省科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

「不活化ポリオウイルスワクチンの有効性・安全性の検証及び国内外で進められている新規腸管ウイルスワクチン開発に関する研究」 分担研究報告書

周産期垂直感染により新生児重症感染を惹起したコクサッキーウイルス B2 型

吾郷昌信 長崎県環境保健研究センター 保健科長

北川由美香、松本文昭、吉川 亮 長崎県環境保健研究センター 保健科

陣内久美子、高柳利光 (独)国立病院機構 佐賀病院 小児科

片野晴隆、永田典代、佐藤由子、鈴木忠樹 国立感染症研究所 感染病理部

森内浩幸 長崎大学大学院医歯薬学研究科 小児病態制御学

清水博之 国立感染症研究所 ウイルス第二部

相次いで発生した周産期垂直感染が強く疑われる新生児重症感染例より原因ウイルスの検出および分離を行った。出生後、無菌性髄膜炎と心筋炎を併発して死亡した症例では臍帯、臍帯血、心筋、髄液をはじめとするすべての検体からコクサッキーウイルス B2 型(CVB2)遺伝子が検出され、心筋、髄液等からは同じ CVB2 が分離された。臍帯及び臍帯血から検出された CVB2 遺伝子は、他の検体由来検出遺伝子及び分離ウイルスの増幅領域における塩基配列が同一であり、しかも心筋内には髄液中の 6 万倍の CVB2 が存在し、免疫組織染色でも大量のウイルス抗原が検出されたことから、本症例の直接的な死亡原因は経胎盤感染した CVB2 による心筋炎である可能性が強く示唆された。また、出生後、無菌性髄膜炎、重症呼吸障害を併発した症例においても母児全ての検体から増幅領域において同一塩基配列を有する CVB2 が検出、分離同定されたことから、本症例も CVB2 の垂直感染であることが明らかとなった。両症例から分離された CVB2 の性状について若干の検討を行ったところ、標準株(Ohio-1)とは明らかに異なる性状を示した。また、これらの症例以外にも同シーズンに CVB2 による新生児重症感染例が続発したことから、本ウイルスを周産期感染ウイルスとして改めて認識し、その感染予防対策の必要性が示唆された。

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。HEV 感染により上気道炎、ヘルパンギーナ、手足口病、下痢、急性出血性結膜炎など比較的軽微なものから重篤な新生児心筋炎、若年型糖尿病、無菌性髄膜炎、脳炎、麻痺、急性灰白髄炎等多彩な病状を呈す

る。

HEV-B に属するコクサッキーウイルス B (CVB) は主に夏季に流行し、上気道炎を引き起こすほか、しばしば無菌性髄膜炎を合併することもあるが、予後は比較的良好である。しかしながら、心筋炎や若年型糖尿病などの重篤な疾患の原因となる可能性も示唆されており、特に新生児にはウイルス血症により深刻な全身感染病態を惹き起こすこともある。

今回、周産期垂直感染が強く疑われる新生児重症感染例より CVB2 を検出、分離・同定し、分離ウイルスの性状について若干の検討を行ったので報告する。

B. 研究方法

患者由来検体

無菌性髄膜炎と心筋炎を併発後、死亡した症例 1 より採取した臍帯、臍帯血、咽頭拭い液、便、血清、髄液及び解剖時に採取した左心室心筋組織を用いた。臍帯及び心筋組織は Hanks 平衡塩類溶液を用いて 10% (w/w) 乳剤を作製し、その遠心上清を使用した。無菌性髄膜炎、重症呼吸障害を併発した症例 2 では母児の咽頭拭い液と便及び児の髄液を検体として供試した。その他、重症呼吸障害を併発した別の症例からは、母児の咽頭拭い液、便及び血清、新生児心筋炎を発症して死亡したもう 1 例からは、児の血清、髄液、便、咽頭拭い液及び剖検時に採取された心筋、肺、肝臓組織を症例 1 と同様に調製して使用した。

ウイルス遺伝子の検出、同定

ウイルス RNA の抽出には、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) し、Nix らの方法に準じて CODEHOP VP1 RT-snPCR により HEV 遺伝子の検出を行った。HEV 遺伝子が検出された場合は、

BigDye Terminator v1.1 および ABI Prism 3130(何れも Applied Biosystems)を用いて増幅産物の塩基配列を決定した。決定した VP1 領域の塩基配列は、Blast 検索を行い、最も高いスコアを示したデータベースに基づいて型別同定を実施した。ウイルス分離・型別同定、臓器内ウイルスの定量及びウイルス抗原の検出

患者由来材料は、HeLa 細胞に接種してウイルス分離を行った。CPE が認められなかった場合は、同細胞で 3 代目まで盲継代を繰り返した。明瞭な細胞変性効果 (CPE) が認められ、CPE が細胞全体に広がった時点で harvest して凍結融解を 3 回行った後の遠心上清を分離ウイルスのストック液として、使用するまで -80°C で保存した。分離ウイルスの型別同定は、前述の CODEHOP VP1 RT-snPCR を基にした遺伝子型別同定と抗血清を用いた中和法を併用して行った。対照ウイルスとして CVB2 標準株(Ohio-1)を使用した。臓器内のウイルス量は plaque 法により定量した。また、ホルマリン固定した心筋組織内のウイルス抗原は、特異抗体を用いた免疫染色により検出した。

分離ウイルスの一段増殖

分離ウイルスを m.o.i. 5~10 PFU/cell で HeLa 細胞に感染させ、経時的に harvest して凍結融解を 3 回行った後の遠心上清中のウイルス量を plaque 法により測定した。経時的なウイルス増殖量をプロットして一段増殖曲線を作成し、各ウイルスの一段増殖に要する時間を算定した。

C. 研究結果および考察

佐賀県で発生した症例 1 は、出生 2 日前より母体に 39 度前後の高熱及び腭炎を疑う著明な腹痛を合併し、その後分娩。出生後、日齢 1 に呻吟、日齢 3 に 38 度前

Sample	CODEHOP PCR	Partial Sequencing	Virus isolation
Umbilical cord	+	CVB2	
Cord blood	+++	CVB2	
Baby Serum (7 days)	++	CVB2	
Baby Serum (8 days)	++	CVB2	
Baby Serum (9 days)	++	CVB2	○ (CVB2)
Baby Throat swab (8 days)	++	CVB2	○ (CVB2)
Baby Stool (8 days)	+	CVB2	
Baby Rectal swab (9 days)	+	CVB2	
Baby Cerebrospinal fluid (6 days)	+++	CVB2	○ (CVB2)
Baby Myocardium tissue (9 days)	++++	CVB2	○ (CVB2)

Table 1. Detection, isolation, and identification of coxsackievirus B2 in clinical specimens of case 1

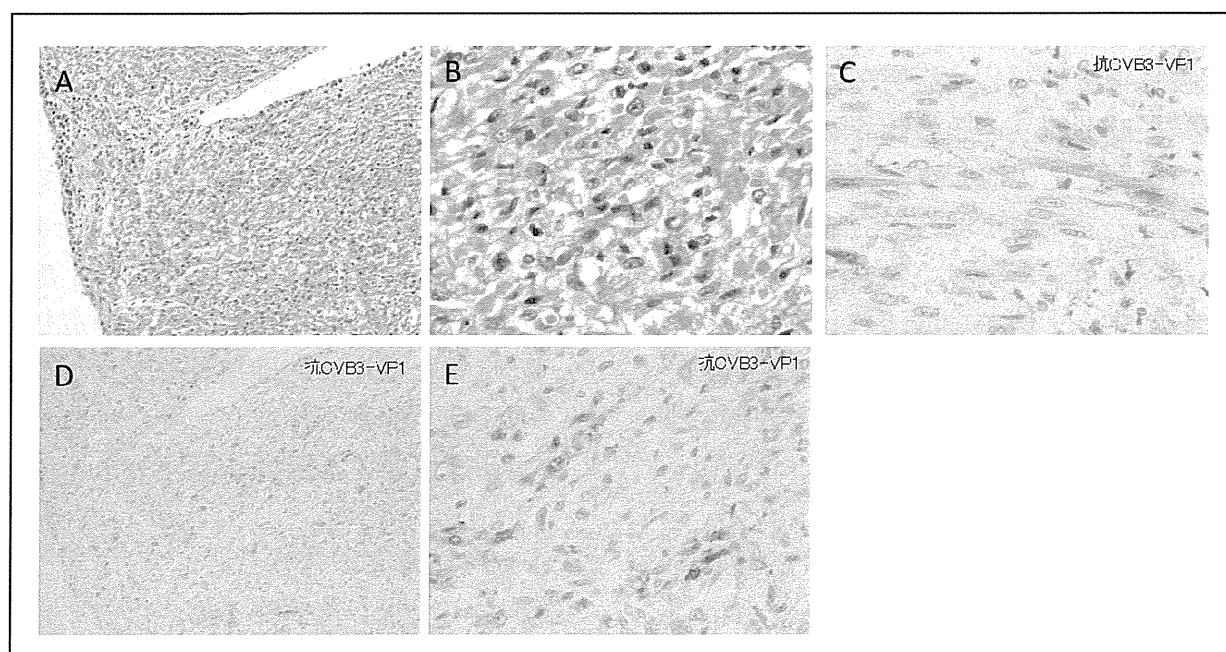


Fig. 1. Immune detection of coxsackievirus in heart tissue

Tissue	Virus yeild (PFU/g tissue)	(1) / (2)
Myocardial tissue (1)	1.8×10^8	60,000
Cerebrospinal fluid (2)	3.0×10^3	

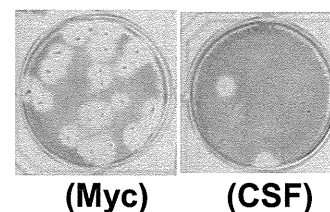


Table 2. Quantitation of coxsackievirus B2 in myocardial tissue and cerebrospinal fluid

後の一時的発熱を認め、日齢5に著名な肝機能障害、血小板低下、無菌性髄膜炎及び顕著な心筋炎症状を呈し、日齢9に死亡した。剖検では、心臓に心筋壊死が広範囲に認められた。本症例より採取した臍帯、臍帯血、咽頭拭い液、便、血清、髄液及び解剖時に採取した左心室心筋組織の10%(w/w)乳剤からウイルス遺伝子の検出・同定、ウイルスの分離同定を行った結果をTable 1に示す。供試した新生児由来のすべての検体からCVB2遺伝子が検出され、咽頭拭い液、血清、髄液及び心筋組織からはCVB2が分離された。臍帯及び臍帯血からもVP1増幅領域(372bp)において新生児由来検体から検出したCVB2遺伝子及び分離したCVB2と同一塩基配列のCVB2遺伝子が検出されたことから、本症例は経胎盤感染したCVB2による重症垂直感染例であることが明らかとなった。さらに、髄液中及び心筋組織内のウイルス量を直接定量したところ、前者では 3.0×10^3 PFU/g tissueであったのに対して、後者では実にその6万倍の 1.8×10^8 PFU/g tissueのCVB2が存在した(Table 2)。いずれの組織中のCVB2も感染させたHeLa細胞に感染後3日目には直径3.0~5.0 mmの大型のplaqueを形成した。また、剖検により採取された心筋組織切片のHE染色像では、心筋

線維の融解、好酸性壊死像、筋線維間の浮腫および炎症性細胞浸潤が認められ、免疫染色によるウイルス抗原検索では、心筋組織内の極めて多数の細胞が特異的に染色されたばかりか、ほとんど変化が見られない心筋細胞にもウイルス抗原が認められた(Fig. 1)。以上の結果より、症例1の新生児の直接の死亡原因はCVB2による劇症型心筋炎であることが強く示唆された。症例1の約2週間後に同じ佐賀県内で発生した症例2は、出産2日前より母体に39度前後の高熱および咽頭痛を認め、2日後に腹部緊満が出現し、緊急帝王切開。出生直後より呻吟、多呼吸が認められ、日齢2に呼吸障害重篤化。日齢5に呼吸障害は改善するも肝機能障害、血小板低下、無菌性髄膜炎を合併したが、不整脈は認められなかった。その後、γグロブリン製剤の大量投与により症状が改善し、人工換気離脱、経口授乳が可能となり回復の経過を辿った。本症例では母児の咽頭拭い液及び便並びに児から採取した髄液からウイルス遺伝子の検出・同定、ウイルスの分離同定を行ったところ、母児全ての検体からVP1増幅領域において同一塩基配列を有するCVB2が検出され、児の便および髄液から分離されたCVB2も同一塩基配列であった(Table 3)。したがって、本症例も経胎盤

Sample	CODEHOP PCR	Partial Sequencing	Virus isolation
Mother throat swab	+	CVB2	×
Baby throat swab (8 days)	++	CVB2	×
Mother stool	+	CVB2	×
Baby stool (8 days)	++	CVB2	O (CVB2)
Baby cerebrospinal fluid (5 days)	+++	CVB2	O (CVB2)

Table 3. Detection, isolation, and identification of coxsackievirus B2 in clinical specimens of case 2

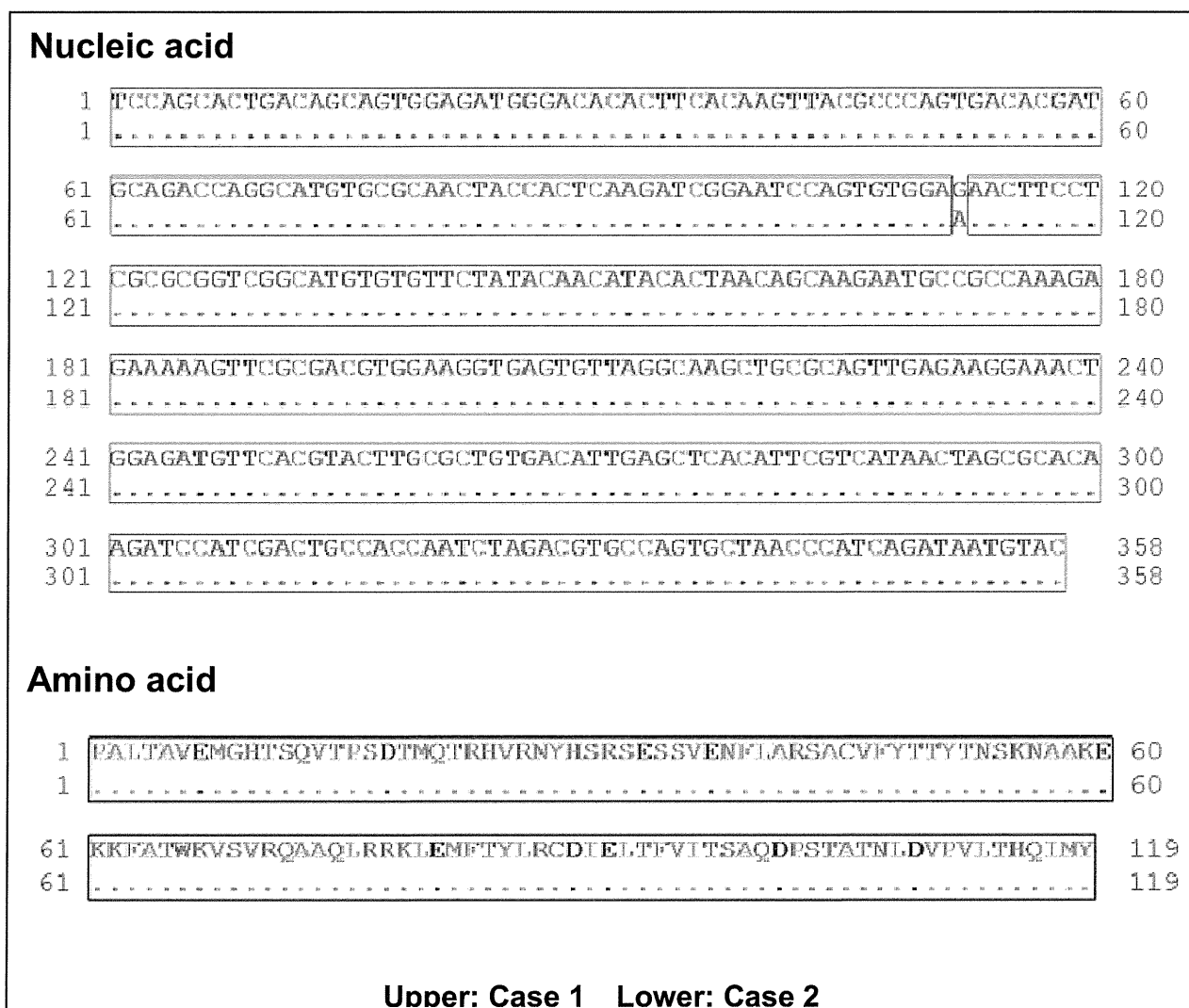


Fig. 2. Alignments of nucleic acid and amino acid sequences of coxsackievirus B2 clinical isolates

感染した CVB2 による周産期垂直感染症例であることが示唆された。

両症例から検出された CVB2 遺伝子 VP1 増幅領域の塩基配列を比較したところ、両者には 1 塩基の違いが認められたが、アミノ酸レベルでは同一配列であった (Fig. 2)。また、両症例から検出された CVB2 VP1 領域の塩基配列は、2010 年に大阪のヘルパンギーナ患者より分離された株及び福岡県の水系から分離された株に近縁であった。

佐賀県での 2 症例に引き続き、長崎県内でも佐賀県の 2 症例の約 1 か月後の 7 月中旬に垂直感染が疑われる新生児重症性呼吸障害の患者が発生し、採取された咽頭拭い液及び便から CVB2 が検出された。母親からの検体は採取時期が遅く、垂直感染を証明するには至らなかったが、出産 2 日目から発熱、咽頭痛が認められていた。この症例の約 2 か月後には無菌性髄膜炎を併発する新生児劇症型心筋炎が発生し、咽頭拭い液、便、髄液、血清及び剖検時に摘出した心臓、肝臓及び肺の 10% 乳剤のすべてから CVB2 遺伝子が検出され、心筋組織からはウイルス (CVB2) も分離された。検出された CVB2 遺伝子及び分離ウイルスの VP1 増幅領域における塩基配列は完全に一致した。摘出臓器内のウイルス量は、肺が検出限界値未満、肝臓が 1.4×10^4 PFU/g tissue であったのに対し、心筋組織内からは実に肝臓の約 8,000 倍、 1.1×10^8 PFU/g tissue の CVB2 が検出された。このウイルス量は、症例 1 で検出されたウイルス量とほぼ同等であったことから CVB2 による劇症型心筋炎が直接の死亡原因であると考える。母親由来の検査材料が得られなかったため証明できなかったが、出産 2 日前に母親に 38 °C 台の発熱が認められ

ていることから本症例も周産期垂直感染の可能性が高いものと思われる。加えて、長崎県における両症例から検出された CVB2 は、VP1 増幅領域内において、佐賀県の症例 1 で検出された CVB2 と同一の塩基配列であった(吾郷ら、未発表データ)。

また、佐賀県内では症例 2 とほぼ同時期に切迫早産で帝王切開により出生した児が日齢 2 より発疹の出現と重症呼吸障害を発症した症例においても CVB2 が検出されている。さらに、佐賀県及び長崎県以外にも周産期感染が強く疑われる CVB2 による同様の症例の発生が島根県(新生児心筋炎)及び熊本県(重症性呼吸障害)でも確認されている(飯塚ら、原田ら未発表データ)。今回発生した CVB2 による新生児重症感染例は、家族歴、出産状況及び新生児の発症時期をから判断して証明されていない症例も含め、その殆どは経胎盤による垂直感染である可能性が高いことから、CVB2 は容易に胎盤を通過できる性状を有するウイルスであることも十分考えられる。また、今回の新生児重症感染例は、無菌性髄膜炎に併発して重症呼吸障害を発症した症例と劇症型心筋炎を発症した症例に大別された。佐賀県で 2 例、長崎県で 1 例、熊本県の 1 例も加えて計 4 例が発症した前者では主症状は無菌性髄膜炎と重度の呼吸障害で、心臓の異常は認められておらず、前例回復している。一方、佐賀県、長崎県及び島根県で各 1 例ずつ、計 3 例が発症した後者では無菌性髄膜炎症状と劇症型心筋炎症状を呈したが、呼吸障害は認められていない。後者の症状を呈した 3 名の新生児のうち、島根県の症例を除く 2 名が死亡している。この違いは宿主側の要因も当然考慮しなければならないが、