

において名古屋市を除く県内全保健所管内の医療機関の協力を得て採取された感染症患者から得た EV-71 分離株 38 件を用いた。表 1 に疾患別の EV-71 分離件数を示した。EV-71 は手足口病患者 22 名 (20.4%) から分離されているが、この年手足口病患者から最も多く分離されたウイルスはコクサッキーウイルス A6 型で 44 件 (40.7%) であった。

2. 遺伝子検査法

分離ウイルスから High Pure Viral RNA Kit (Roche, Germany) を用いてウイルス RNA を抽出した。EV-71 の VP1 遺伝子領域の解析には 189-222 プライマーを用いた One-step RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction: 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応) 法 (Promega, USA) により遺伝子を増幅した。1.5%アガロースゲル電気泳動後、ethidium bromide 染色下に検出した PCR 産物を pGEM-T ベクターに組み込みクローニング後、塩基配列を決定した。検出された EV-71 については、データベース上に登録されている海外分離株の遺伝子配列をもとに NJ (Neighbor-Joining) 法を用いた分子系統樹解析を行い、遺伝子型を決定し解析した。

C. 研究結果

系統樹解析の結果を図 1 に示した。38 株中 16 株 (42.1%) は B5 型、22 株 (57.9%) は C2 型であった。B5 型、C2 型とも推定アミノ酸配列の相違は認められなかったが、塩基配列の違いにより B5 型は 4 つに分かれた。いずれも 2012 年に東南アジアや山形県で検出されたものと近縁であったが、2012 年に愛知県で分離された株とは異なっ

ていた。C2 型は 3 つのグループに分かれ、2012 年に沖縄で検出されたものに近い 2 グループと 2012 年に台湾で分離された株に近い 2 株に分かれた。この 2 株の塩基配列は同じで、1 株は江南市で 7 月に、1 株は岡崎市で 8 月に発症した患者から分離されたものであった。検出時期は B5 型が 4 月～11 月で 7 月 8 月が最も多く、C2 型は 3 月～9 月に検出され、7 月が 13 件と検出件数の 6 割近くを占めた (表 2)。疾患別に遺伝子型による疾患別の割合を表 3 に示した。無菌性髄膜炎患者からの検出割合は B5 型で 19% (3/16)、C2 型で 18% (4/22) と同じであった。年齢別の検出数を表 4 に示した。いずれも 0 歳児が最も多く検出されたが、B5 型は 0 歳～4 歳児、C2 型は 0 歳～7 歳児から検出された。地区別の検出状況を把握するため保健所別検出件数を表 5 に、保健所管内別の地図を図 2 に示した。尾張地区が 1 番の一宮から 6 番の半田までが含まれ、三河地区が 7 番の衣浦東部から 11 番の豊橋市までとなる。B5 型は 16 件中 11 件が尾張地区から検出されている。C2 型は一宮を除く 10 の保健所管内から検出されているが三河地区が 22 件中 14 件 (66.6%) と比較的多かった。

D. 考察

EV-71 の B 型は、1973 年から 1984 年までは、B1 型が分離され、以降、B2 型、B3 型、B4 型と年を経るごとに型が変遷し 2003 年～2013 年までは B5 型であった。一方、C 型は、C1 型が 1987 年から分離され、1997 年から C2 型と C4 型が検出されはじめ、2010 年以降は C2 型が主に分離されている。愛知

県では1993年まで、1年に1遺伝子型が分離されていたが、以降複数の遺伝子型が検出されるようになったが主流となる遺伝子型は1種類であった。ところが、2000年にはB4型14株、C4型10株と、2003年にはB5型10株とC1型20株と複数の遺伝子型が主流となり、2013年はそれらに次いで複数の遺伝子型(B5型とC2型)が主流となった年であった。

近年、東アジアでは、遺伝子型BおよびCのEV-71が同時に伝播している。さらに、1990年代後半以降、B3、B4及びC1、C2、C4が、東アジアの多くの地域で分離されている。1997年以降、国内で分離される遺伝子型はB4、B5及びC2、C4に変化している。本研究により愛知県で2013年に分離されたEV-71は2012年に東南アジアで検出されたものに近縁なウイルスであった。同時期もしくは直前に東アジア地域から国内に持ち込まれたEV-71が、本県においても流行したことが推測され、近隣諸国との交流がより活発に進められていることが影響しているものと考えられた。

今回流行したB5型とC2型には病原性の違いがないことが推測されたが、分離された患者の年齢層、居住地、発症時期には若干の違いが認められた。同じ遺伝子型のウイルスでも、遺伝子的相違もみとめられることから侵入経路が多岐にわたるものと思われた。

E. 結論

2013年に愛知県で分離されたEV-71は2種類の遺伝子型が主流となって流行した。侵入経路も複数あり、近隣諸国の流行株の影響を受けていると思われる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamashita T, Adachi H, Hirose E, Nakamura N, Ito M, Yasui Y, Kobayashi S, Minagawa H: Molecular detection and nucleotide sequence analysis of a new Aichi virus closely related to canine kobuvirus in sewage samples. *J Medic Microbiol* 63(5):715-720, 2014

2. Hara S, Kawada J, Kawano Y, Yamashita T, Minagawa H, Okumura N, Ito Y: Hyperferritinemia in neonatal and infantile human parechovirus-3 infection in comparison with other infectious diseases. *J Infect Chemother* 20(1):15-19, 2014

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表 1、疾患別エンテロウイルス 71 型分離件数

疾患名	患者数	分離数	%
手足口病	111	22	20.4
無菌性髄膜炎	47	7	15.9
不明熱性疾患	45	5	11.1
心筋炎	7	1	14.3
ヘルパンギーナ	39	1	2.6
不明発疹症	48	1	2.1
上気道炎	133	1	0.8
(合計)	430	38	8.8

表 2、エンテロウイルス 71 型分離件数(月別)

年齢	分離件数	遺伝子型別	
		B5	C2
3 月	1		1
4 月	3	1	2
5 月			
6 月	1		1
7 月	17	4	13
8 月	8	5	3
9 月	4	2	2
10 月	1	1	
11 月	3	3	
合計	38	16	22

表 3、エンテロウイルス 71 型疾患別遺伝子型別分離件数

疾患名	B5	(%)	C2	(%)
手足口病	8	(50)	14	(64)
無菌性髄膜炎	3	(19)	4	(18)
不明熱性疾患	3	(19)	2	(9)
心筋炎	1	(6)		
ヘルパンギーナ			1	(5)
不明発疹症	1	(6)		
上気道炎			1	(5)
合計	16	(100)	22	(100)

表 4、エンテロウイルス 71 型分離件数(年齢別)

年齢	分離件数	遺伝子型別	
		B5	C2
0 歳	15	8	7
1 歳	3	1	2
2 歳	4	1	3
3 歳	6	1	5
4 歳	6	4	2
5 歳	1		1
6 歳			
7 歳	2		2
不明	1	1	
合計	38	16	22

表 5、エンテロウイルス 71 型分離件数(保健所別)

番号	保健所名	分離件数	遺伝子型別	
			B5	C2
1	一宮	2	2	
2	江南	1		1
3	春日井	9	8	1
4	津島	4		4
5	知多	2	1	1
6	半田	1		1
7	衣浦東部	3	1	2
8	豊田市	8	2	6
9	岡崎市	5	1	4
10	豊川	2	1	1
11	豊橋市	1		1
	合計	38	16	22

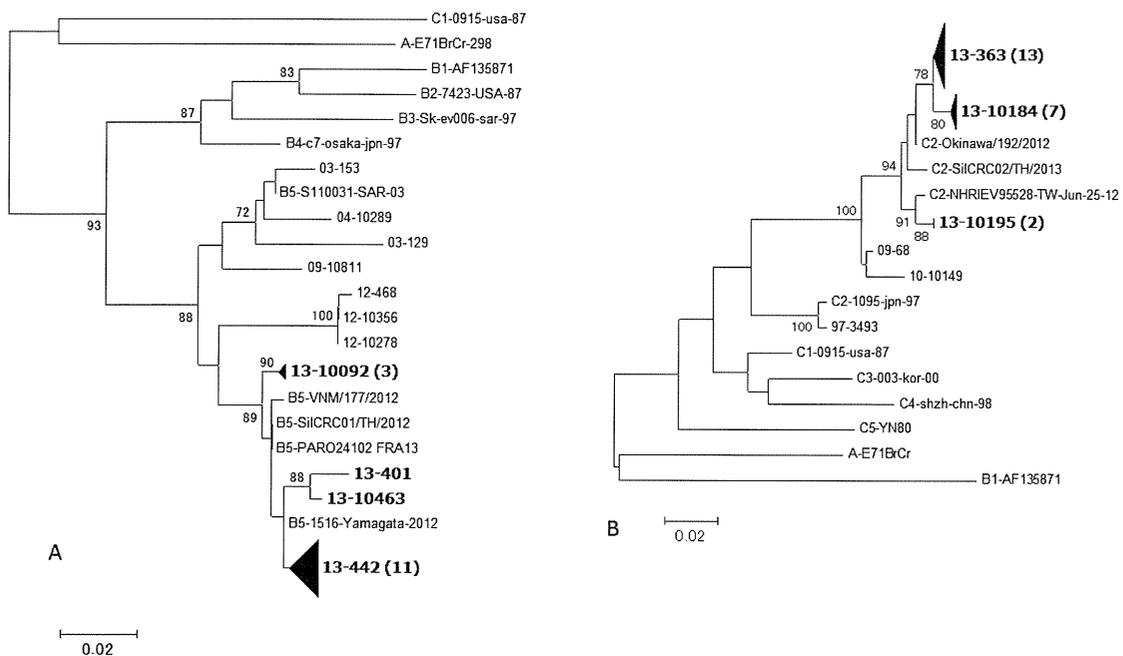


図1、エンテロウイルス71型分離株の系統樹解析 (NJ法)

2013年に愛知県で分離された株を太字で示した (A : B5型、B : C2型)。括弧内の数字は分離株数。

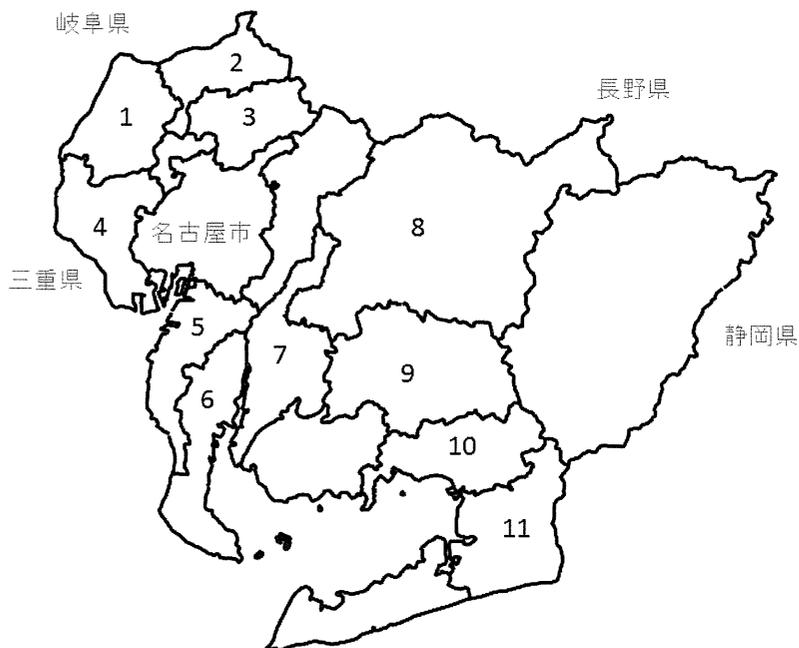


図2、愛知県地図とEV-71が分離された保健所管内 (表5) の位置。

平成 26 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) 清水博之

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
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

I. 日本の急性胃腸炎患者および日本・タイのブタ便検体からのヒトコサウイルスの検出
とその遺伝的解析

研究要旨

日本の小児の急性胃腸炎患者検体からヒトコサウイルスを検出した。検出率は 0.16%と低いですが、この患者では他の病原体の検出はなく、このウイルスが下痢起因ウイルスと考えられた。またタイ、日本の下痢および健常なブタ糞便からもこのウイルスが検出され、人獣共通感染症の可能性が考えられた。

A. 研究目的

小児の急性胃腸炎は日本では死亡者は少ないものの、毎年多くの子どもが感染する。下痢起因ウイルスとしてノロウイルス GI・GII、ロタウイルス、アストロウイルス、サポウイルス、アデノウイルスの検出が行われているが、ウイルス未検出の検体も多い。一方、近年メタ遺伝子解析の方法から下痢症検体などから、新たなウイルスの検出が報告されている。ピコルナウイルス科のウイルスの発見が多く、そのひとつとしてヒトコサウイルス(HCoSV)がある。我々は日本で急性胃腸炎のために、小児科外来を受診した患者の検体から、このウイルスの検出を行い、1 例が陽性であった。その全長配列決定を行い、ウイルス学的特徴を調べた。一方、河川や水処理場の排水

中に HCoSV の検出率が高いことから、環境への汚染があることが知られている。そこで動物への感染状況を調べる目的で、日本およびタイの飼育ブタ糞便中の HCoSV を検出した。

B. 研究方法

2010 年 11 月から 2012 年 4 月までに日本の 6 カ所(北海道、東京、静岡、京都、大阪、佐賀)の小児科外来を受診した急性胃腸炎の患者から 630 件の糞便検体を得た。検体から核酸を抽出し、(RT)-PCR 法にて、A、B、C 群ロタウイルス、ノロウイルス GI・GII、アデノウイルス、サポウイルス、アストロウイルス(classic および MLB、VA)、ヒトパレコウイルス、エンテロウイルス、アイチウイルス、ヒトボカウイルス、サフォードウイルスおよび HCoSV の検出を行

った。HCoSV のスクリーニングは 5'UTR 領域を使用した。陽性検体に関してはさらに細菌の検索 (LAMP 法)、ウイルスの遺伝子解析を行い、臨床症状を得た。

(倫理面への配慮)下痢症患者検体の採取に関しては日本大学医学部の倫理委員会にて承認を得た (25-13-0)。

タイ、チェンマイ近郊のブタ飼育農場で採取された糞便検体を用いた。2012 年に 21 農場で採取された 3 週齢以下の下痢症状のある哺乳仔ブタから得た 105 検体および、2010 年に 24 農場から採取された 3 週齢以下の健康な哺乳仔ブタから得た 52 検体を使用した。さらに 2009 年の 7 月～9 月に日本の健康なブタから得た 90 検体を使用した。26 検体は北海道の農場で 3～11 ヶ月齢のブタから採取した。64 検体は東京の 6 農場で 6 ヶ月齢以上のブタから採取した。

C. 研究結果

1. 1 例 (10928 株) で HCoSV が陽性であった (陽性率: 0.16%)。この検体で他のウイルスは検出されず、*Campylobacter jejuni* 及び *coli*、*Salmonera spp*、verotoxin-producing *E. coli* は陰性であった。患者は 6 ヶ月の男児で発熱や嘔吐、上気道炎の症状はなく、便患変血液混入はなかった。離乳食開始直後で家族に同様の症状はなかった。プロバイティックスの投与で症状は軽快した。なお、1 ヶ月後に再度下痢で受診し、この時はロタウイルス G1P[8]陽性で、HCoSV を含め、他のウイルスは陰性であった。

2. 上記 1 株 (10928/2012/JPN) について、たんぱく質コード領域の全塩基配列決定を行った (図 1)。7328 塩基、2133 アミノ酸であった。HCoSV-A 種に属することがわか

った。パキスタンの 6572 株と最も相同性が高かった (表 1)。A 種内の genotype の同定のため、VP1 の塩基配列を他の A 種の株と調べたところ系統樹解析の結果は図 2 のようになり、他の株とは別の枝を形成していた。VP1 の塩基配列で最も類似の株は A3 の 6572 株で 68.6%、アミノ酸配列で最も類似の株は A9 である NP9 株で 72.3% の相同性であった。

3. ブタ便からの検出結果は以下のようであった。タイのブタでは、下痢の仔ブタでは 58.1% が陽性、健康な仔ブタで 50.0% 陽性であった。日本の健康なブタでは 18.9% が陽性であった。5'UTR 領域を系統樹解析の結果 (図 3)、ブタの株はすべて A 種であった。なおこれらの VP1 領域の解析を試みたが、増幅されなかった。

D. 考察

1. 日本の小児急性胃腸炎の患者 630 検体から HCoSV を 1 例検出した。検出率は 0.16% であった。
2. この検体からは他の胃腸炎ウイルスおよび調べた細菌は検出されなかった。他の病原体、非病原体による胃腸炎の可能性はあるが、HCoSV による胃腸炎と考えられ、日本の臨床検体からの報告は初めてである。これまでの報告では患者からの検出率が低いこと、ウイルス量が低いこと、健康人からも検出されることから、HCoSV の病原性に関しては疑問が持たれていた。今回の結果から低検出率であるものの病原体となる可能性が示唆された。これは他のピコルナウイルス科のパレコウイルスなどで知られている。また今回検出した株は A 種の中の新しい遺伝子型であると考えられた。
3. 日本の健康なブタおよびタイの下痢、

健康な仔ブタから高率で HCoV が検出され、人獣共通感染症である可能性が考えられた。ブタでの検出はポリビアで 1 例報告されているが、検出率を測定できたのは初めてである。

D. 結論

日本の小児の急性胃腸炎患者検体から HCoV を検出した。検出率は 0.16% と低いが、この患者では他の病原体の検出はなく、このウイルスが下痢起因ウイルスと考えられた。またタイ、日本の下痢および健康なブタ糞便からもこのウイルスが検出され、人獣共通感染症の可能性が考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Thongprachum A, Takanashi S, Kalesaran AFC, Okitsu S, Mizuguchi M, Hayakawa S, Ushijima H: A four-year study of viruses that cause diarrhea in Japanese pediatric outpatients. *J Med Virol*, 2015, in press.
2. Tran DN, Pham TMH, Ha MT, Hayakawa S, Mizuguchi M, Ushijima H: Molecular epidemiology of influenza A virus infection among hospitalized children in Vietnam during postpandemic period. *J Med Virol*: 2015, in press.
3. Ushijima H, Thongprachum A, Tran DN, Fujimoto T, Hanaoka N, Okitsu S, Takanashi S, Mizuguchi M, Hayakawa S: Rapid diagnostic tests apply for pediatric infections at outpatient clinic setting. *Clin Lab* 61, 2015, in press.
4. Khamrin P, Thongprachum A, Okitsu S, Maneekarn N, Hayakawa S, Ushijima H: Comparison of three rapid tests for

detection of norovirus in stool samples of acute gastroenteritis pediatric patients. *J Trop Pediatr* 60: 481-483, 2014

5. Saikruang W, Khamrin P, Suantai B, Okitsu S, Hayakawa S, Ushijima H, Maneekarn N: Detection of diarrheal viruses circulating in adult patients in Thailand. *Arch Virol* 159: 3371-3375, 2014
6. Ushijima H, Fujimoto T, Müller WEG, Hayakawa S: Norovirus and Foodborne Disease. *Food Safety* 2: 37-54, 2014
7. Okitsu S, Khamrin P, Thongprachum A, Nishimura S, Kalesaran AFC, Takanashi S, Shimizu H, Hayakawa S, Mizuguchi M, Ushijima H : Detection and molecular characterization of human cosavirus in a pediatric patient with acute gastroenteritis, Japan. *Infect Genet Evol* 28: 125-129, 2014
- 8 Okitsu S, Khamrin P, Thongprachum A, Kalesaran AF, Takanashi S, Shimizu H, Maneekarn N, Mizuguchi M, Hayakawa S, Ushijima H: Molecular characterization and sequence analysis of the 2B region of Aichivirus C strains in Japan and Thailand. *Infect Genet Evol* 26: 89-94, 2014
9. Ushijima H, Nishimura S, Thongprachum A, Shimizu-Onda Y, Tran DN, Pham NTK, Takanashi S, Dey SK, Okitsu S, Yamazaki W, Mizuguchi M, Hayakawa S: Sensitive and rapid detection of *Campylobacter* species from stools of diarrheal children in Japan by LAMP method. *Jap J Infect Dis* 67:

374-378, 2014

10. Saikruang W, Khamrin P, Suantai B, Ushijima H, Maneekarn N: Molecular detection and characterization of Aichivirus A in adult patients with diarrhea in Thailand. *J Med Virol* 86: 983-987, 2014

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* 23: 65-74, 2014

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* 9: e89071, 2014

13. 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* 86: 988-994, 2014

14. 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* 86: 1210-1218, 2014

15. 井上茉南、高梨さやか、牛島廣治、沖津祥子、崎山弘、水口雅：定期接種ワクチンとロタウイルスワクチン累積接種率の比較。日本小児科学会雑誌 印刷中、2015

16. 牛島廣治、沖津祥子、早川智、Kittigul L、高梨さやか：ロタウイルスワクチンによるヒトと環境中のロタウイルスの動向。臨床とウイルス 42: 231-236, 2014

17. 牛島廣治、Thongprachum A、沖津祥子、秋原志穂：変異株（シドニー型）の国内動向。感染対策 ICT ジャーナル 9: 348-354, 2014

18. Tran DN, Nguyen TQN, Okitsu S, Hayakawa S, Mizuguchi M, Ushijima H: Epidemiology of rubella epidemic in Vietnam. *臨床とウイルス* 42: 35-46, 2014

2. 学会発表

1. 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予防接種率の検討—定期接種ワクチンとの比較。第117回日本小児科学会学術集。名古屋市、2014年4月

2. 高梨さやか、Thongprachum Aksara、沖津祥子、水口雅、牛島廣治：ロタウイルスワクチン導入移行期における同ウイルスの遺伝子型の検討。第117回日本小児科学会学術集会。名古屋市、2014年4月

3. 沖津祥子、Thongprachum Aksara、西村修一、高梨さやか、清水博之、早川智、牛島廣治：日本の急性胃腸炎患者から検出されたヒトコサウイルスの解析。第55回日本臨床ウイルス学会。札幌市、2014年6

月

4. Okitsu S, Khamrin P, Thongprachum A, Nishimura S, Takanashi S, Shimizu H, Hayakawa S, Ushijima H: Detection and genetic characterization of human cosavirus in a pediatric patient with diarrhea, Japan. XVIth International Congress of Virology, 2014年7月、モントリオール (カナダ)
5. Okitsu S, Khamrin P, Thongprachum A, Takanashi S, Hayakawa S, Manee,karn N, Mizuguchi M, Ushijima H: Detection of cosavirus in porcine stool samples in Thailand. The 10th China-Japan International Conference of Virology, 2014年8月、長春 (中国) .
6. Ushijima H, Takanashi S, Thongprachum A, Khamrin P, Okitsu S, Mizuguchi M, Hayakawa S. Recent trend of diarrheal viruses in Japan. The 10th China-Japan 4.
7. Thongprachum A, Khamrin P, Takanashi S, Okitus S, Maneekarn N, Mizuguchi M, Hayakawa S, Ushijima H: The emergence of norovirus GII.4 variant 2013 in Japanese pediatric patients. 5th International conference on Caliciviruses, 2014年10月、北京 (中国)
5. Kalesaran AFC, Thongprachum A, Pangemanan DHC, Takanashi S, Okitsu S, Hayakawa S, Warouw SM, Mizuguchi M, Ushijima H: Circulating rotavirus in hospitalized pediatric patients, with the predominance of G1P[8]DS-1-like human rotavirus in Manado, Indonesia. International Meeting on Emerging Diseases and Suiveillance, 2014年10月、ウイーン (オーストリア)
6. Thongprachum A, Takanashi S, Okitsu S, Mizuguchi M, Hayakawa S, Ushijima H: The emergence of a new norovirus GII.1 2012 vaiant in Japanese pediatric patients in associated with gastroenteritis. 第17回日本臨床腸内微生物学会. 東京都港区, 2014年10月
7. Thongprachum A, Khamrin P, 矢澤伸、沖津祥子、水口雅、早川智、牛島廣治: Pathogenesis and molecular analysis of norovirus gastroenteritis. 第46回日本臨床分子形態学会総会・学術集会, 東京都新宿区, 2014年10月
8. Thongprachum A, Chan-it W, Takanashi S, Okitsu S, Kobayashi M, Nishimura S, Kikuta H, Yamamoto A, Sugita K, Baba T, Mizuguchi M, Hayakawa S, Ushijima H: Molecular epidemiology and genetic analyses of norovirus in Japan, 2006-2014. 第46回日本小児感染症学会学術集会, 東京都新宿区, 2014年10月
9. 牛島廣治、Tran Dinh Nguyen, Thongprachum A, Pham NTK, 花岡希、藤本嗣人、高梨さやか、沖津祥子、水口雅、早川智: 小児科外来での感染症の迅速診断薬の評価. 第46回日本小児感染症学会学術集会, 東京都新宿区、2014年10月
10. 高梨さやか、Dey, SKi Sakib N, Thongprachum A, Kalesaran A, 井上茉南、沖津祥子、水口雅、牛島廣治: バングラデシュにおける下痢原性微生物の疫学調査と迅速診断薬の評価. 第46回日本小児感染症

学会学術集会. 東京都新宿区、2014年10月

11. Kalesaran A, Thongprachum A, 高梨さやか、沖津祥子、Damajanty PHC., Sarah, WM. 早川智、水口雅、牛島廣治: Molecular detection of diarrheal viruses associated with acute gastroenteritis in pediatric patients in Indonesia. 第46回日本小児感染症学会学術集会. 東京都新宿区、2014年10月
12. 高梨さやか、Thongprachum A、沖津祥子、早川智、牛島廣治: 日本のロタウイルスワクチン導入移行期における同ウイルスの分子疫学的検討. 第62回日本ウイルス学会学術集会 2014年11月、横浜市.
13. Kalesaran A、Thongprachum A、高梨さやか、沖津祥子、早川智、牛島廣治: Molecular epidemiology of circulating rotavirus in hospitalized acute gastroenteritis children, in North Sulawesi, Indonesia. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜市、2014年11月
14. Thongprachum A, Yazawa S, Okitsu S, Takanashi S, Mizuguchi M, Hayakawa S, Ushijima H : Molecular changes of

- norovirus GII.4 variants in associated different binding patterns to human blood group substances. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜市、2014年11月
15. Khamrin P、Thongprachum A、高梨さやか、沖津祥子、清水英明、早川智、牛島廣治: Multiple novel astroviruses in children with acute gastroenteritis in Japan. 第62回日本ウイルス学会学術集会 横浜市、2014年11月
 16. Khamrin P、Thongprachum A、高梨さやか、沖津祥子、水口雅、早川智、牛島廣治: Multiple Astrovirus MLB1, MLB2, VA2, and Classic Human Astrovirus Clades in Children with Acute Gastroenteritis in Japan. 第11回日本小児消化管感染症研究会 大阪市、2015年2月
- F. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1. 日本の小児急性胃腸炎患者から検出された
10928/2012/JPN のタンパクコード領域の比較

Region	Nucleotide sequence identity (%)					
	HCoVS-A1	HCoSV-A2	HCoSV-A3	HCoSV-B1	HCoSV-D1	HCoSV-E1
	553	6344	6572	2263	5004	AUS/81
VP4	98.0	96.5	98.0	81.3	72.0	91.3
VP2	62.4	66.0	70.9	59.6	56.2	55.7
VP3	66.8	71.1	72.5	64.2	50.7	58.0
VP1	58.1	52.7	66.1	48.7	43.8	44.4
2A	39.7	59.3	55.6	37.1	38.7	32.7
2B	98.8	88.1	87.3	64.1	65.2	63.6
2C	93.5	93.9	64.2	70.6	70.9	69.9
3A	92.9	92.5	91.3	61.5	58.1	61.4
3B	89.4	92.9	94.7	77.1	80.7	71.9
3C	62.4	92.9	62.1	62.4	61.4	60.4
3D	93.3	92.8	57.5	65.2	67.9	67.2

Yellow colored: higher than 80%

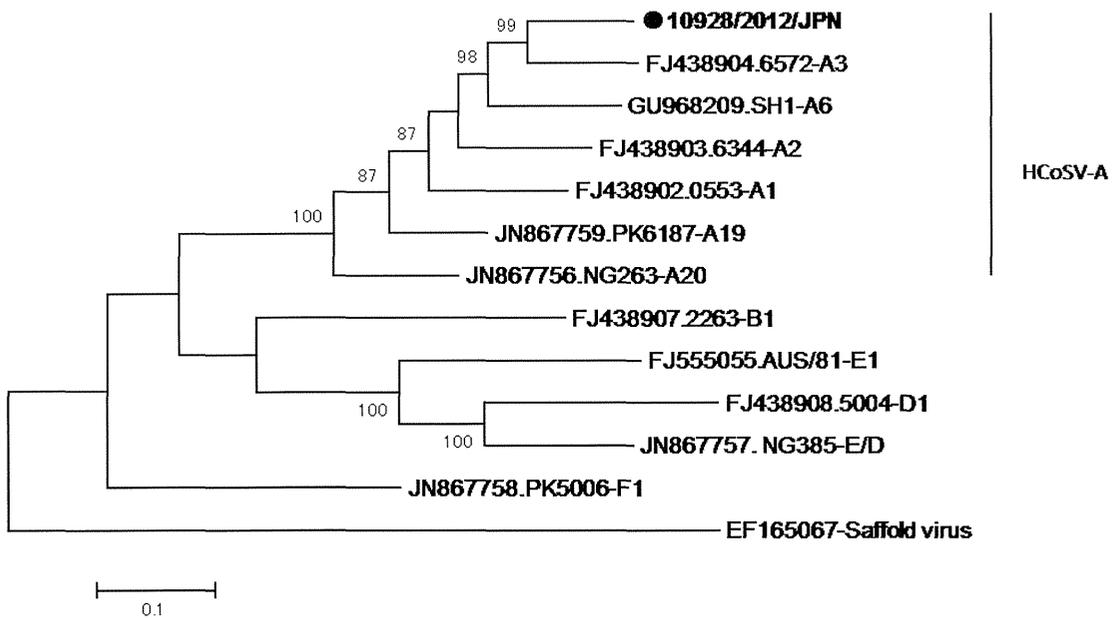


図 1. 日本の小児急性胃腸炎患者から検出された
HCoSV 10928/2012/JPN 株の全塩基配列の系統樹解析

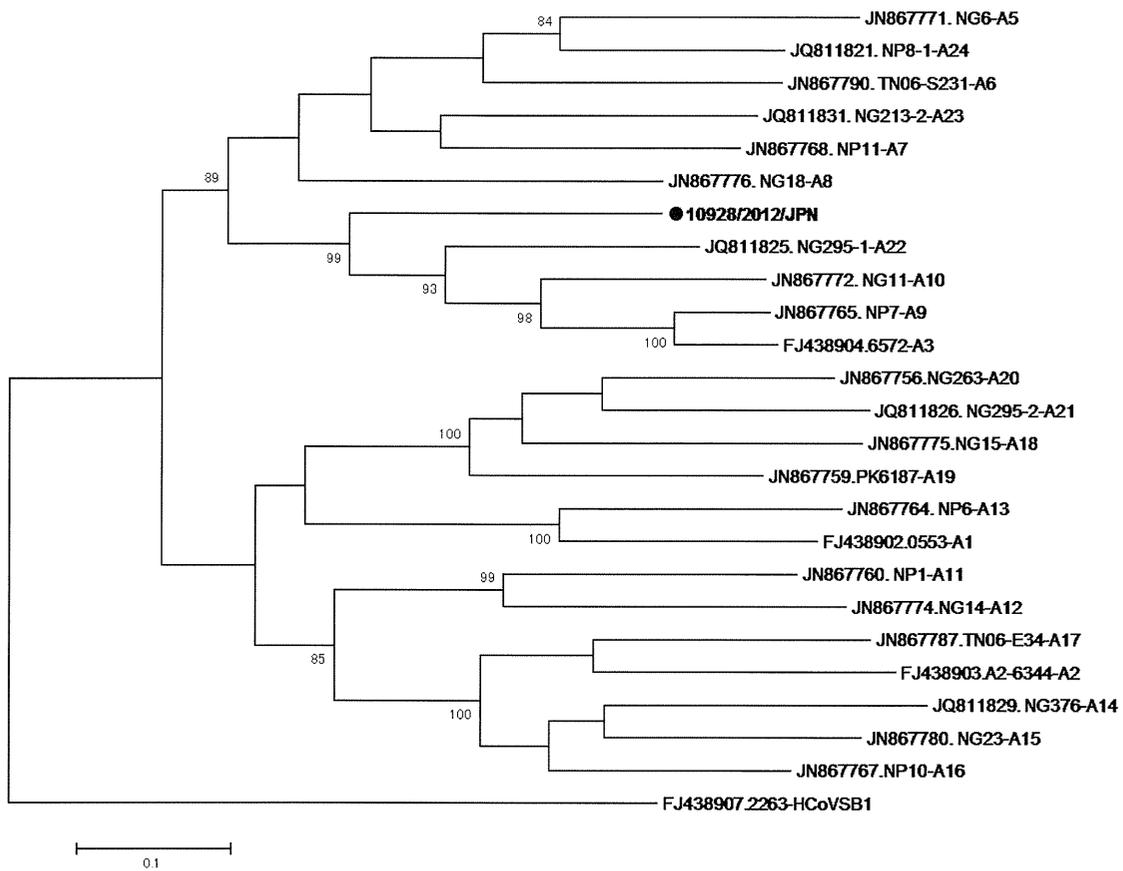


図 2. 10928/2012/JPN の VP1 領域の塩基配列による系統樹解析

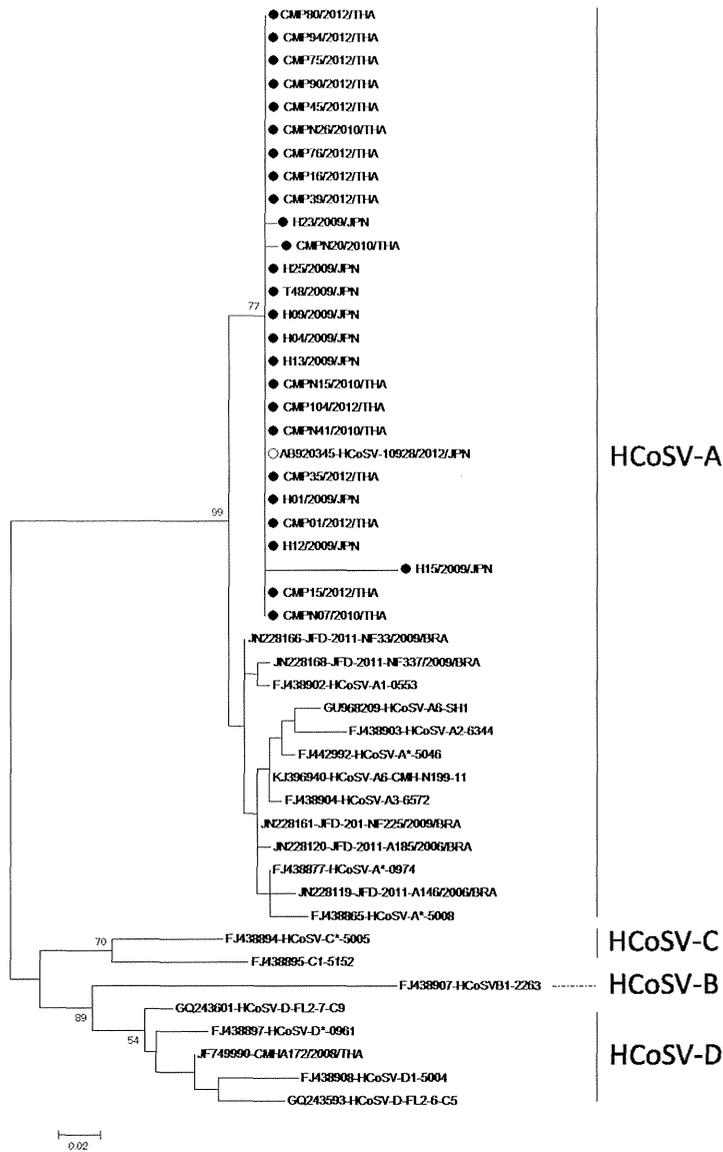


図 3. 日本及びタイのブタから検出した HCoSV 5'UTR 領域の系統樹解析

2. ベトナムにおける入院中の子どものヒトライノウイルス感染症の臨床、疫学およびウイルス学的研究

研究要旨

ヒトライノウイルスは下気道感染の重要な病原体であった。他の病原体との重感染でより重症化した。ライノウイルスの多様な遺伝子型の存在とその流行の変化、新しい型の存在を示した。

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。ライノウイルス A、B、C の 3 種があり 150 以上の遺伝子型が存在する。RV は鼻咽腔スワブから PCR 法で遺伝子が検出される。一般的な風邪のウイルスであるが、時に RV は喘息増悪や細気管支炎を来すことがある。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 virus (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。今年度はベトナムにおける急性呼吸器感染症で入院した小児における RV の臨床的特徴と遺伝子の多様性、特に下気道感染との関連で昨年度からの研究を深めた。

B. 材料と方法

ベトナム・ホーチミン市でホーチミン第二子ども病院に入院中の呼吸器感染症の中で、スクリーニングにより RV と判定された 329 検体の中でランダムに 58 検体を選び VP4/2 配列の詳細な検討と臨床成績を解析した。(倫理面への配慮)呼吸器感染症患者検体の採取に関してはホーチミン第二子ども病院および日本大学医学部の研究倫理委員会にて承認を得た。承認番号はそれぞれ

#25A/QD-ND2 と 25-15-0 である。

C. 研究結果と考察

HRV-A は 44/58 すなわち 75.9%、HRV-C は 14/58 すなわち 24.1%で見出され、HRV-B は検出されなかった。HRV-A の中で 21 の遺伝子型が見出された。一番多いのは A21 (9 株)であり、その中でも異なった遺伝子配列の多様性をしめした。HRV-A の 1 株

(VNM308-MAY. 2010) は以前からの報告の型と異なっており、一番近い A88 と A89 と塩基で 13%の違いがあった。

BLAST検索ではこの 3 株は近縁の関係にあり、新しい型と思われた(図 1)。これらはタイ、カンボジア、ベトナムという近隣諸国で見いだされた。またこれらの 3 株は Pairwise-distance で他の株(型)と離れており違うクラスターと考えられた。

HRV-C は 10 の異なる型が見いだされた。一番多いのは C-10 (n=3)であった。

RV は幾つかのピークをもって 1 年間で見られた。HRV-A と HRV-C は毎月のように検出され、はっきりした季節間の差はなかった。一年中 RV が見いだせることは遺伝子の多様性に起因する。型が月ごとによって変わり、持続するにしても数か月である。いくつかの型が同時にある季節に集積して見られることがある(図 2)。

RV単独感染症の臨床的特徴を他のウイル

スと比較すると、発熱の頻度は低い。しかし重症の低酸素症は他のウイルス感染の場合より高い(12.4% vs. 5.1%, $p=0.002$)。白血球数、好中球数はHRV単独感染で高かった。しかし細菌感染とは区別できなかつた。他のウイルス感染と比較すると好塩基球数は高い。好塩基球数が高いことは反応性の気道疾患の指標であるので、我々の成績は以前の成績と同様に喘息との関連の重要なリスク因子として当てはまる。

下気道感染はRV単独感染例の2/3に見られた。すなわちRVは重症の感染をきたすということを示している。RV単独感染と比較し、RVの他の病原体との重感染は発熱と下気道の所見を示す。したがって他の病原体との重感染はより重症をきたす。HRV-AとHRV-Cでは疫学的に臨床的に差がなかった(表1)。以前の研究でRSVは雨季に多く見出された。そして細気管支炎や肺炎の原因

となっていることを示した。しかしながらRVもこれらの疾患の1/5程の原因となっていた。乾季においてRSVは頻度が少ない。したがって乾季はRVの関与が高くなる。RVは下気道感染としてより意味を持つと考えられる。

今後より簡単な迅速診断法の開発、ワクチンと治療薬の開発が望まれる。

D. 結論

ライノウイルスは呼吸器感染として重要な病原体で一般の上気道感染以外、入院患児の重篤な下気道感染の原因であった。ライノウイルスの多様な遺伝子型の存在とその流行の変化、新しい型の存在を示した。

E. 研究発表

前記掲載参照

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

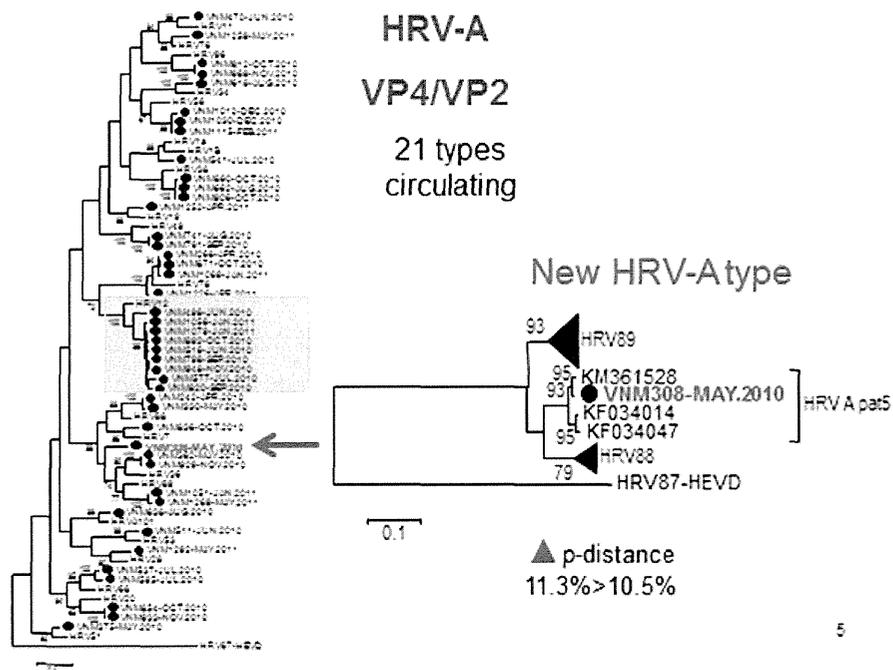


図 1. ベトナムの小児呼吸器感染症患者から検出されたヒトライノウイルス

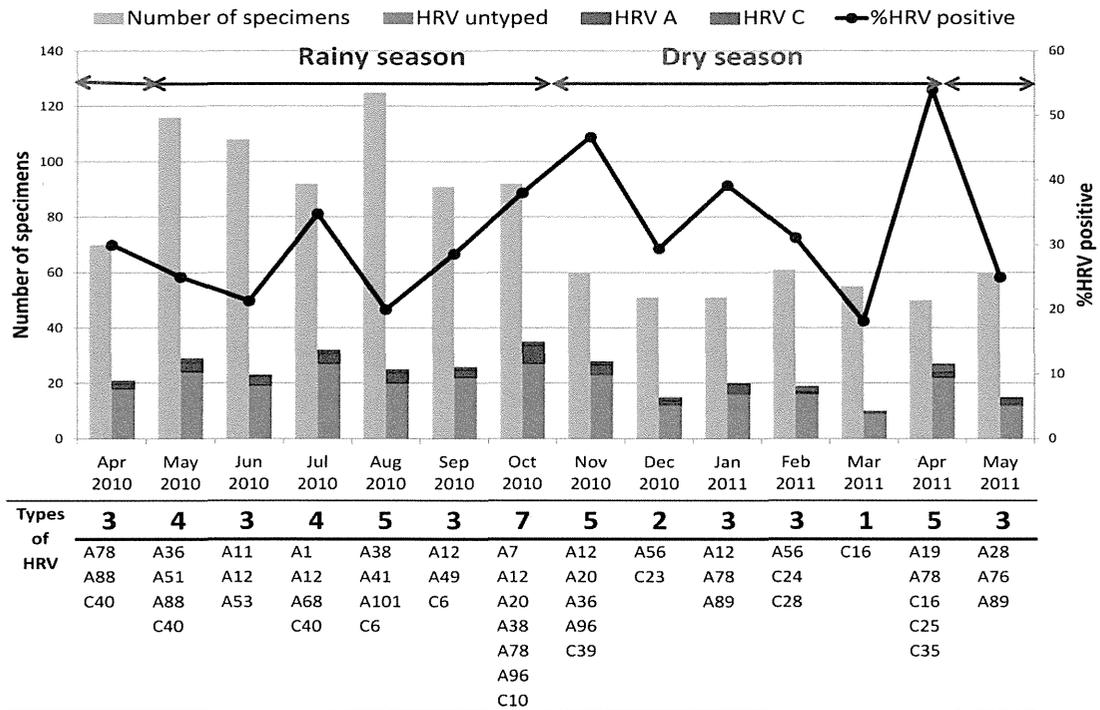


図 2. ヒトライノウイルスの月別検出数

表 1. ライノウイルスの単感染と共感染での臨床症状の比較

Characteristic(%)	HRV Monoinfect (n=234)	HRV Coinfect (n=91)	p
Median age (IQR)	9(4-19)	9(3-14.5)	
Days bf hos.	3(1-5)	2(2-4)	
Fever	50.0	71.4	<0.001
Retraction	57.3	70.3	0.032
SpO2≤92%	12.4	12.1	
WBC(x10 ³ /mm ³)(IQR)	11.9(10-15.2)	11.4(9.17-15.5)	
Eosinophil(/mm ³)(IQR)	239(109-482)	127(62-268)	<0.001
URIs	26.9	19.8	
Laryngitis	3.0	2.2	
Bronchiolitis	34.6	40.7	
Pneumonia	35.5	37.4	

▶ HRV co-infections had more severe symptoms.

Clinical features of HRV A and C infection

▶ No significant difference

▶ HRV A did not differ from HRV C clinically.

「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

劇症型新生児心筋炎を惹起したコクサッキーウイルス B2 型の性状解析

吾郷昌信 長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学分野 客員准教授
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
永田典代 国立感染症研究所 感染病理部
陣内久美子、高柳利光 (独)国立病院機構 佐賀病院 小児科
濱口 陽、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

2013 年に相次いで発生したコクサッキーウイルス B2 型 (CVB2) 周産期垂直感染による劇症型新生児心筋炎患者より分離されたウイルスの性状について比較解析を行った。ゲノム全長の遺伝子解析により、これらの CVB2 は構造タンパク質領域が CVB2、非構造タンパク質領域が他のエンテロウイルス B に属するウイルスとのキメラウイルスである可能性が強く示唆された。心筋炎患者から採取した臓器内のウイルス量を比較したところ、肺の CVB2 量は検出限界値未満であったのに対し、心筋内には他の臓器の 7 万倍以上もの CVB2 が存在した。この結果は、心筋炎では呼吸障害は認められず、重症呼吸障害では心機能に異常はなかったとする臨床所見を支持すると共に本分離株が心臓に対するトロピズムを有する可能性が考えられた。塩基配列からも VP1 領域内に劇症型心筋炎由来 CVB2 に共通するアミノ酸置換を伴う塩基置換が認められた。また、心筋炎由来ウイルスは大型の plaque を形成するにもかかわらず細胞 1 個当りのウイルス産生量が少ないという一見矛盾した結果が得られたことから細胞間の感染効率あるいはアポトーシスの誘導能が高い可能性が考えられた。Plaque size、アポトー시스への関与が示唆されている 2Apro にそれぞれの *in vitro* ウイルス増殖性状を反映する可能性のあるアミノ酸置換を伴う塩基置換が認められた。乳呑みマウスにおける致死効果について調べたところ、劇症型心筋炎由来ウイルスが最も強い病原性を示し、他の分離株も各ウイルスを分離した患者の病態を反映する傾向が認められた。

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。

2013年佐賀県、長崎県において無菌性髄膜炎を併発する劇症型新生児心筋炎、重症呼吸障害の患者が相次いで発生し、患者材料から何れも原因ウイルスとしてCVB2が検出、分離、同定され、劇症型心筋炎で死亡した患者の剖検時に摘出された心筋組織からは免疫染色により大量のウイルス抗原が検出された。また、4症例中2症例からは母親由来の検体からも同じ塩基配列を有するCVB2が検出され、他の2症例でも出産直前に感染を疑わせる症状を呈しており、また他県においてもCVB2による同様の症例の発生が認められた。したがって、これまでは全く注目されることはなかったが、CVB2は経胎盤垂直感染して新生児に極めて重篤な症状を惹起する周産期感染ウイルスであることが強く示唆された。さらに、CVB2の新生児重症感染患者の臨床症状は無菌性髄膜炎症状は必ず認められるものの、心筋炎症状を呈した患者は何れも死亡したが呼吸器症状は全く認められず、重症呼吸障害を呈した患者では呼吸器症状の憎悪は認められたものの心筋炎の症状は全く見られず、何れも生還したことから、今回新生児重症感染を惹起したCVB2は病原性、臓器特異性において異なる性状を有するウイルスであることが疑われた。

したがって、今回は新生児重症感染例より分離したウイルスに加えて、同時期に上気道炎患者より分離したCVB2および標準株のウイルス性状について比較解析を行った。

B. 研究方法

臓器内ウイルスの定量

佐世保市で無菌性髄膜炎と心筋炎を併発し、死亡した患者の髄液及び剖検時に採取した心筋、肺、肝臓組織を用いた。各臓器組織は、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。臓器内感染性ウイルスの定量は、HeLa細胞を用いてplaque法により行った。

供試ウイルス

分離CVB2として、佐賀県唐津市で経胎盤垂直感染により劇症型心筋炎(無菌性髄膜炎を併発)を発症し、死亡した新生児の心筋組織より分離NS13-004株および髄液より分離したNS13-005株、同様に長崎県佐世保市で劇症型心筋炎(無菌性髄膜炎を併発)を発症し、死亡した新生児の心筋組織より分離したNS13-010株、佐賀市で重症性呼吸障害(無菌性髄膜炎を併発)を発症した新生児の糞便より分離したNS13-060株および髄液より分離したNS13-007株および同時期に長崎県松浦市で上気道炎を発症した小児の咽頭拭い液より分離したNS13-008株の6株と標準株であるOhio-1株を使用した。何れの株もHeLa細胞を用いて増殖させ、分離株は分離後継代2代以内のものを使用した。

ウイルスゲノム全長の遺伝子解析

各ウイルス液からQIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を使用してゲノムRNAを抽出し、oligo d(T)プライマーを用いたRT反応により全長cDNAを合成した。これを鋳型としてゲノム全長を4つのフラグメントに分けてPCRにより合成し、BigDye Terminator v3.1 およびABI Prism 3130(何れもApplied Biosystems)を用いて各増幅フラグメントの塩基配列を解読し、ゲノム全長の塩基配列を決定した。ゲノム解析は、遺伝子解析ソフトウェアGENETYX ((株)ゼネティックス)を使用して行った。

分離ウイルスの一段増殖

分離ウイルスをm.o.i. 7~10 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。

マウス感染実験

各群 5-7 匹の生後 24 時間以内の乳呑み ddY マウスに 10^3 CCID₅₀ の分離ウイルス液を脳内 (ic) 接種し、感染後 24 日目まで観察した。

C. 研究結果および考察

劇症型新生児心筋炎患者における臓器内 CVB2 量

長崎県佐世保市で CVB2 感染により劇症型新生児心筋炎を発症し、死亡した患者の心筋、肝臓、肺の各組織内および髄液中の感染性ウイルス量を plaque 法により測定した結果を Table 1 に示す。肝臓組織中の CVB2 量が 1.5×10^3 PFU/g tissue であったのに対して、心筋組織中にはその 7 万倍以上、 1.1×10^8 PFU/g tissue もの圧倒的な量の CVB2 が存在し、前回報告した佐賀県唐津市の劇症型心筋炎で死亡した新生児の結果と良く一致した。同様に、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。一方、肺組織における CVB2 量は検出限界値未満で、呼吸器症状は皆無であったとする臨床所見を裏付ける結果であった。以上の結果より、CVB2 には心筋に対して特異性を示す、即ち臓器特異性の異なるウイルスが存在する可能性が示唆された。

新生児重症感染を惹起した CVB2 の全ゲノム比較解析

劇症型新生児心筋炎患者心筋組織から分離された NS13-004 株、NS13-010 株、重症呼吸障害患者髄液から分離した NS13-007 株、同時期に通常の上気道炎を発症した小児から分離された NS13-008 株および当研究室で保有する CVB2 標準株である Ohio-1 株のゲノム全長の塩基配列を決定し、比較解析を行った。

その結果、Ohio-1 株は全長 7,411 塩基 (3'末端 poly A を除く) からなり、既報の配列と完全に一致した。これに対して、臨床分離株は何れも 7,407 塩基で標準株より 3'末端の 4 塩基に欠損が認められた。標準株と臨床分離株の塩基配列を比較すると相同性は 80% で、アミノ酸レベルでは 77 ヶ所に相違が認められ、標準株とはかなり異なる配列を有することが明らかとなった。臨床分離株間の相同性は 99% で、3-6 ヶ所のアミノ酸置換部位が存在した。

標準株と臨床分離株の構造タンパク質 (P1) 領域における塩基配列を比較すると 97% の相同性が認められた。アミノ酸レベルでも 97% と高い相同性を示し、臨床分離株は何れもこう CVB2 標準血清で中和されたこれまでの結果を支持する結果が得られた。ところが、P1 領域より保存され高い相動性を示すはずの非構造タンパク質 (P2-P3) 領域における塩基配列を比較すると標準株との相同性は 82-88% で、アミノ酸レベルでも 95% と P1 領域より低値を示した。このため P2-P3 領域における相同性検索を行ったところ、同じエンテロウイルス (EV) B に属する CVB3、エコーウイルス 6 型 (Echo 6)、Echo 13、EV85、Echo 11、Echo 30 により近縁であることが判明した。さらに、臨床分離株と EVB に属するウイルスとの P2-P3 領域における系統樹解析を行ったところ、臨床分離株 (赤矢印) は既報の CVB2 (青矢印) とは全く異なるクラスターを形成した (Fig. 2)。また、3'非翻訳領域 (NTR) についても相同性検索を実施したところ P2-P3 領域と同様、他の EVB に属するウイルスの方がより近縁であったため、3'-NTR の予測二次構造を作成して比較したところ、臨床分離株の構造は CVB2 標準株とは明らかに異なり、CVB4、EV87 等に近い構造をとることが分かった。以上の結果より、劇症型新生児心筋炎等の患者から分離された臨床分離株はすべて P1 領域が CVB2、P2 領域以降は EVB に属する他の EV とのキメラウイルスで