

機関番号：34441

研究種目：基盤研究（B）海外

研究期間：2007 ～ 2010

課題番号：19406026

研究課題名（和文） 新しい診断法を用いたアジアにおける小児ウイルス感染症の分子疫学、予防と治療の研究

研究課題名（英文） Molecular epidemiology using new diagnostic methods, therapy and prevention for pediatric viral infection in Asia

研究代表者

牛島 廣治 (USHIJIMA HIROSHI)

藍野大学・医療保健学部・特任教授

研究者番号：10091068

研究成果の概要（和文）：

アジアの小児で、HIV、風疹ウイルス、下痢症ウイルス(11種類)、呼吸器系ウイルス（6種類）の分子疫学を行った。総じて、我が国と同様の分子疫学の結果を得たが、ヒトと動物との組換えウイルスが稀ではあるが見られたことは興味深い。さらに未だ報告のない新しい株を見出した。ブタ、ウシ、環境中にヒトに関するウイルス汚染が見られた。人獣感染症の危険性が示唆された。風疹ウイルスの疫学調査から風疹ワクチンの必要性が強く認められた。

研究成果の概要（英文）：

Molecular epidemiological studies of HIV, rubella virus, 11 types of diarrheal viruses and 7 types of respiratory viruses were conducted in children in Asia. Overall, the results of the molecular epidemiological studies in Asia were similar to those in Japan. It was interesting to find that the reassortant strains of viruses among human and animal were observed in Asia. Moreover, we also discovered the new strains of the viruses. Our studies demonstrated that pigs, calves and environmental contaminations were served as the original sources for virus infection to human. This issue rises the important concerning of zoonosis infection. Our epidemic survey study of rubella virus also suggested that the rubella vaccine is necessary in developing countries.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2008年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2009年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2010年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
総計	13,000,000	3,900,000	16,900,000

研究分野：小児感染症学、国際保健学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：ウイルス感染、小児、アジア、診断法

## 1. 研究開始当初の背景

アジアの多くの発展途上国では、母子感染（経胎盤および母乳による）、気道・経口あるいは血液を介する感染症による小児の死亡が多い。また、新興感染症が小児にも広がる危険性がある。感染症の広がりにはウ

ルス側の変異も大きく関係する。ウイルスの変異を知ることはより有効なワクチン開発に必要である。アジアでは経済的な理由で既に市販されている検査試薬も殆ど使われていない。従って今までわが国の研究者による子どもを視点とした継続的なアジアの感染

症の研究は殆どなされていない。

## 2. 研究の目的

このような状況の下、最先端の方法で疫学、予防、治療を行うことが望ましいが、そのためにはわが国の研究者自身によるか、または指導・援助が必要である。しかも緊急性を要する。ワクチンの開発を視野において(1)血液関連感染症の分子疫学調査、(2)下痢症ウイルスおよびエンテロウイルスの診断と分子疫学的検索、(3)呼吸器系ウイルス、麻疹・風疹ウイルスの診断、(4)小児のウイルス性感染症と環境汚染との接点を探る。

## 3. 研究の方法

アジアから来た大学院生の出身国を中心に、ウイルス感染症と思われる小児の血液、便、鼻咽分泌物などを、現地で不活化し安全な方法でわが国に輸送する。また現地で、イムノクロマト法などの迅速診断法を用いてその有用性を評価するとともに臨床成績もまとめる。輸送した検体は multiplex RT-PCR などの遺伝子診断を行うと共に、必要に応じて遺伝子解析を行う。さらに酵素抗体法も必要に応じて行う。

## 4. 研究成果

(1) HIV : 2004-2005 年のベトナム・ホーチミン市の HIV 陽性患児のサブタイプは CRF01\_AE で、V3 ループは GPGQ が 90% を占め、当時ベトナムで流行している株と類似した。プロテアーゼ領域および RT 領域に耐性変異を見出した。クラミジアニューモニアエ抗体が 33% 陽性であり、免疫不全での日和見感染による死亡が予測された。(2) 風疹ウイルス : ベトナム、ラオスなどでは風疹ワクチンが定期接種となっておらず、風疹の流行や先天性風疹症候群が見られる。ラオスの学童の血清風疹抗体を調べたが 53% が陰性であった。ベトナムで発熱・発疹で外来を訪れる患者の 25% が風疹であった。風疹ウイルスは Clade 2B であった。(3) ベトナムで呼吸器感染症を遺伝子診断した。RSV を 42%、ライノウイルスを 29%、A 型インフルエンザを 5%、B 型インフルエンザを 1%、ヒトメタニューモウイルスを 1.4%、パラインフルエンザウイルスを 4% 見出した。(4) ロタウイルス、ノロウイルス、アストロウイルスのイムノクロマト診断はアジアの検体でも有効であった。ロタウイルスでは G1 型、ノロウイルスでは GII /4 が優勢であった。ヒトパレコウイルス、ヒトボカウイルス、アイチウイルスをアジアの国でも見出した。しかしバングラデシュではロタウイルスは G2P[8] が多く、アデノウイルスは血清型 9, 10, 40 を検出した。稀な株としてタイで G3P[10] のロタウイルス、スリランカでヒトパレコウイルス 10,11 型、バング

ラデシュでサポウイルスの自然界での組換え体を見出した。またタイで Saffold ウィルスを見出した。(5) タイのブタから E 型肝炎ウイルス抗体、ブタ コブウイルス遺伝子、G3,G9,P[23],P[13] のロタウイルスを見出した。タイのウシからウシコブウイルス遺伝子を見出した。(6) 中国のカキからノロウイルスを見出し、最近の流行株の遺伝子と一致した。

以上のことから遺伝子診断法、遺伝子解析法、イムノクロマト法などを用い、アジアで初めてのウイルス検出が可能となった。稀ではあるが日本で検出されていない株の下痢症ウイルスが見出された。また、風疹の流行が見られる国でのウイルス遺伝子解析が行われた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 108 件)

- ① Khamrin P, Chaimongkol N, Nantachit N, Okitsu S, Ushijima H, Maneekarn N. 2011. Saffold cardioviruses in children with diarrhea, Thailand. *Emerg Infect Dis*, In press. (査読有)
- ② Chan-it, W, Thongprachum A, Dey SK, Phan TG, Khamrin P, Okitsu S, Nishimura S, Kobayashi M, Kikuta H, Baba T, Yamamoto A, Sugita K, Hashira S, Tajima T, Ishida S, Mizuguchi M, Ushijima H. Detection and genetic characterization of rotavirus infections in non-hospitalized children with acute gastroenteritis in Japan, 2007-2009. *Infect Genet Evol*, 11:415-422, 2011. (査読有)
- ③ Okitsu S, Khamrin P, Thongprachum A, Maneekarn N, Mizuguchi M, Ushijima H. Predominance of Porcine Rotavirus P[23] Genotype in Piglets with Diarrhea in Northern Thailand. *J Clinical Microbiol*, 49:442-445, 2011. (査読有)
- ④ Pham NTK, Takanashi S, Tran DN, Trinh DQ, 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*, 49:364-366, 2011. (査読有)

- ⑤ 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. (査読有)
- ⑥ Khamrin P, Maneekarn N, Malasao R, Nguyen TA, Ishida S, Okitsu S, Ushijima H. Genotypic linkage of VP4, VP6, VP7, NSP4, NSP5 genes of rotaviruses circulating among children with acute gastroenteritis in Thailand. *Infect Genet Evol* 10:467-472, 2010. (査読有)
- ⑦ Pham NTK, Trinh QD, Takanashi S, Abeysekera C, Abeygunawardene A, Shimizu H, Khamrin P, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. Novel human parechovirus from Sri Lanka. *Emerg Infect Dis*, 16:130-132, 2010. (査読有)
- ⑧ Pham NTK, Trinh QD, Khamrin P, Maneekarn N, Shimizu H, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. Diversity of human parechoviruses isolated in stool samples collected from Thai children with acute gastroenteritis. *J Clin Microbiol*, 48: 115-119, 2010. (査読有)
- ⑨ Khamrin P, Maneekarn N, Kongkaew A, Kongkaew S, Okitsu S, Ushijima H. Porcine kobuvirus in piglets, Thailand. *Emerg Infect Dis*, 15: 2075-2076, 2009. (査読有)
- ⑩ Khamrin P, Thongprachum A, Chaimongkol N, Chusri P, Okitsu S, Ushijima H, Maneekarn N. Evolutionary consequences of G9 rotaviruses circulating in Thailand. *Infect Genet Evol*, 9: 1394-1399, 2009. (査読有)
- ⑪ Dey SK, Thongprachum A, Ohta Y, Phan TG, Nishimura S, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H. Molecular and epidemiological trend of rotavirus infection among infants and children in Japan. *Infect Genet Evol*. 9; 983-986, 2009. (査読有)
- ⑫ Dey SK, Thongprachum A, Islam AR, Phan GT, Rahman M, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H. Molecular analysis of G3 rotavirus among infants and children in Dhaka City, Bangladesh after 1993. *Infect Genet Evol*.9; 955-961, 2009. (査読有)
- ⑬ Chanit W, Thongprchum A, Khamrin P, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. Intergenogroup recombinant sapovirus in Japan, 2007-2008. *Emerg Infect Dis*, 2009; 15(7): 1084-1087. (査読有)
- ⑭ Dey SK, Hayakawa Y, Rhaman M, Islam R, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H. G2 strain of rotavirus among infants and children, Bangladesh. *Emerg Infect Dis*, 15: 91-94, 2009. (査読有)
- ⑮ Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. Bovine Kobuviruses from Cattle with Diarrheic. *Emerg Infect Dis*, 14: 985-986, 2008. (査読有)
- ⑯ Khamrin P, Okitsu S, Ushijima H, Maneekarn N. Novel nonstructural protein 4 genetic group in rotavirus of porcine origin. *Emerg Infect Dis*, 14(4): 686-688, 2008. (査読有)
- ⑰ Nguyen TA, Hoang LP, Phan LD, Hoang KT, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. Use of sequence analysis of the VP4 gene to classify recent Vietnamese rotavirus isolates. *Clinical Microbiol Infect*, 14: 235-241, 2008. (査読有)
- ⑱ Shiota T, Okame M, Takanashi S, Khamrin P, Takagi M, Satou K, Masuoka Y, Yagyu F, Shimizu Y, Kohno H, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H. Characterization of broad reactive monoclonal antibody against Norovirus genogroup I and II: Recognition of a novel conformational epitope. *J Virol*, 81: 12298-1230, 2007. (査読有)
- ⑲ Pham NT, Khamrin P, Nguyen TA, Dey SK, Phan TG, Okitsu S, Ushijima H. Isolation and molecular characterization of Aichi viruses from fecal specimens collected in Japan, Bangladesh, Thailand and Vietnam. *J Clin Microbiol*, 45: 2287-2288, 2007. (査読有)
- ⑳ Phan TG, Khamrin P, Quang TD, Dey SK, Takanashi S, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Detection and genetic characterization of group A rotavirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Japan. *J Virol*, 81: 4645-4653, 2007. (査読有)
- ㉑ Phan TG, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Evidence of intragenic

recombination in G1 rotavirus VP7 genes. *J Virol*, 81:10188-10194, 2007. (査読有)

- ② Phan TG, Khamrin P, Quang TD, Dey SK, Takanashi S, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Detection and genetic characterization of group A rotavirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Japan. *J Virol*, 81: 4645-4653, 2007. (査読有)

〔学会発表〕 (計 95 件)

- ① Pham NTK. 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学術集会、平成 23 年 2 月 12 日、ブリーゼプラザ (大阪市)
- ② 牛島 廣治、ウイルス性下痢症の最近の動向、札幌市小児科医会研究会、平成 22 年 1 月 29 日、札幌グランドホテル (北海道札幌市)
- ③ 牛島 廣治、ウイルス性下痢症の最近の動向、さいたま市民医療センター講演会、平成 22 年 12 月 22 日、さいたま市民医療センター (埼玉県さいたま市)
- ④ Dey SK, Seasonal pattern and genotype distribution of rotavirus and norovirus infection in Japan. 第 42 回日本小児感染症学会総会・学術集会、平成 22 年 11 月 27 日、仙台国際センター (宮城県仙台市)
- ⑤ 牛島廣治、ウイルス性下痢症診断へのイムノクロマトキットの応用、第 42 回日本小児感染症学会総会・学術集会、平成 22 年 11 月 27 日、仙台国際センター (仙台市)
- ⑥ 森田英嗣、細胞内膜輸送系を介した RNA 非エンベロープウイルス外への放出、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、平成 22 年 11 月 9 日、あわぎんホール (徳島市)
- ⑦ Dey SK, Complete genome sequence and phylogenetic analysis of three Japanese sapovirus isolate. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、平成 22 年 11 月 9 日、あわぎんホール (徳島市)
- ⑧ Chan-it W, Emergence of a new norovirus GII.6 variant among infants and children with acute gastroenteritis in Shizuoka, Japan during 2008-2009, 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、平成 22 年 11 月 9 日、あわぎんホール (徳島市)
- ⑨ Pham TKN, 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、平成 22 年 11 月 7 日、あわぎんホール (徳島市)
- ⑩ Ushijima K, Evaluation of immunochromatography test kit for rapid detection of diarrheal viruses. Forth International Conference on Calicivirus. 平成 22 年 10 月 18 日、Hotel Santa Cruz Plaza, (サンタ・クルーズ、チリ)
- ⑪ Khamrin P, Molecular epidemiology of human and animal kobuvirus. The 8<sup>th</sup> China-Japan International Conference of Virology. 平成 22 年 7 月 6 日、Press Plaza, (中国ハルビン市)
- ⑫ Okitsu S., Predominance of porcine rotavirus P[23] among piglets with diarrhea in Chiang Mai, Thailand. The 8<sup>th</sup> China-Japan International Conference of Virology. 平成 22 年 7 月 6 日、Press Plaza, (中国ハルビン市).
- ⑬ Ushijima H, Immunochromatography test for rapid detection of diarrheal viruses. The 8<sup>th</sup> China-Japan International Conference of Virology. 平成 22 年 7 月 6 日、Press Plaza, (中国ハルビン市).
- ⑭ Khamrin P, Molecular epidemiology of human and animal kobuviruses 第 51 回日本臨床ウイルス学会、平成 22 年 6 月 19 日、サンポート高松シンボルタワー (高松市)
- ⑮ 沖津祥子、タイ国チェンマイ近郊農場におけるブタ血清中の E 型肝炎ウイルス抗体、第 51 回日本臨床ウイルス学会、平成 22 年 6 月 19 日、サンポート高松シンボルタワー (高松市)
- ⑯ 牛島廣治、ウイルス性胃腸炎の現状(ロタウイルス、ノロウイルスを中心に) 子どもの食品媒介感染症、第 98 回多摩小児科臨床懇話会、平成 22 年 6 月 11 日、杏林大学(三鷹市)
- ⑰ Pham N, Molecular epidemiology of human parechovirus and other minor viruses in Asia. 第 113 回日本小児科学会学術集会、平成 22 年 4 月 23 日、いわて県民情報交流センター(盛岡市)
- ⑱ 江下優樹、タイ国産ネッタシマカのチックングニヤ感受性、第 62 回日本衛生動物学会大会、平成 22 年 4 月 4 日、鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島市)
- ⑲ 牛島廣治、ノロウイルス感染症の現状と対策、第 84 回日本感染症学会総会、平成 22 年 4 月 6 日 国立京都国際会館(京都市)

- ⑳ 秋原志穂、2007-2008年冬期の小児科病棟における感染性胃腸炎のサーベイランス、第84回日本感染症学会総会学術集会、平成22年4月5日、国立京都国際会館（京都市）

〔図書〕（計5件）

- ① Dey SK, et al., Nova Science Publishers, Molecular Detection, Treatment,, Diarrhea: Causes, Types and Treatments, 2010, 232 (71-93)
- ② Maneekarn N, et al. CRC Press, Molecular Detection of Human Viral Pathogens, 2009, 1152 (791-800)
- ③ Khamrin P, et al. m CRC Press, Molecular Detection of Human Viral Pathogens, 2009, 1152 (111-117).
- ④ Ushijima H, et al., CRC Press,: Molecular Detection of Foodborne Pathogens, 2009, 879 (63-73)
- ⑤ 牛島廣治、他、みみずく舎、バイオセーフティの事典、2008、354(266-268)

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：血液型関連物質を用いたノロウイルスの感染防御又は除去

発明者：矢澤 伸、小湊慶彦、牛島廣治

権利者：国立大学法人群馬大学

種類：PCT/JP2009

番号：063273

出願年月日：平成21年7月24日

国内外の別：国際

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

牛島 廣治 (USHIJIMA HIROSHI)

藍野大学・保健医療学部・特任教授

研究者番号：10091068：

### (2) 連携研究者

沖津 祥子 (OKITSU SHOKO)

東京大学・医学系研究科・客員研究員

研究者番号：10082215