

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月22日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590620

研究課題名（和文） アジアにおけるウイルス性胃腸炎起因ウイルスの分子疫学的研究

研究課題名（英文） Molecular epidemiological study of viral gastroenteritis in Asia

研究代表者

沖津 祥子（OKITSU SHOKO）

東京大学・大学院医学系研究科・客員研究員

研究者番号：10082215

研究成果の概要（和文）：(1)日本、タイで乳幼児急性胃腸炎患者検体から、ノロウイルス、ロタウイルスの流行株を解析した。(2)ノロウイルス、ロタウイルスの迅速診断キットの開発を継続し、3種類のウイルスを同時に検出できるキットの評価を行った。(3)ピコルナウイルス科ウイルスの検出を行った。(4)ブタコブウイルスの VP1 領域の解析を行い、仔ブタ正常血清中からもウイルスを検出した。(5)タイで検出した G3P[23], G9P[23], G3P[13] 遺伝子型のブタロタウイルスの全 11 ゲノムの解析を行った。

研究成果の概要（英文）：1. This study reported the detection and molecular characterization of norovirus and rotavirus in the stool samples collected from infants and children with acute gastroenteritis in Japan and Thailand. 2. This study evaluated newly developed immunochromatography kits (IC kit) for detection of norovirus, or rotavirus from clinical samples. Furthermore, this study evaluated an IC kit for simultaneous detection of 3 kinds of diarrheal viruses (rotavirus, norovirus, and adenovirus). 3. This study also reported the detection of viruses in *Picornaviridae* family from stool samples collected from infants and children with acute gastroenteritis. 4. This study reported the genomic characterization of VP1 region of porcine kobuvirus in the porcine stool samples in Japan, and Thailand, and detection of the porcine kobuvirus in the serum samples from healthy piglets in Thailand. 5. This study reported the whole-genomic analysis of G3P[23], G9P[23] and G3P[13] rotaviruses isolated from piglets with diarrhea in Thailand, 2006-2008.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学、公衆衛生学・健康科学

キーワード：ウイルス、小児、胃腸炎、アジア、分子疫学、人獣共通感染症

1. 研究開始当初の背景

乳幼児のウイルス性胃腸炎は開発途上国、

開発国を問わず、頻繁にみられる感染症であるが、その制御は難しい。開発国では死亡者

は少ないものの誰でも感染し、また施設内で一旦流行が始まるとその制圧は難しい。一方開発途上国を中心に今でも年間数十万人の死亡者が出ている疾患である。その主たるウイルスはロタウイルス、ノロウイルス、アデノウイルス、サポウイルス、アストロウイルスであるが、近年ピコルナウイルス科を初め、多くの新たなウイルスが検出されている。また、同じウイルス種の中でも、流行株の変遷、新たな変異株の出現が報告されている。これらのウイルスには人獣共通感染ウイルスも多く、種間感染が新たなウイルス出現に関与することが知られている。

2. 研究の目的

(1) 日本およびアジアにおいて、人類共通感染症の観点から、ヒトおよび若い家畜（ウシ、ブタ）に感染する下痢症ウイルスの検出を行い、検出ウイルスの分子疫学、遺伝子学的検索によってウイルス学的特徴、ウイルスの病原性を調べることを目的とする。

(2) 国内および海外共同研究者に依頼し、日本およびアジアにおける若い家畜（ウシ、ブタ）から下痢症便、および健常な便の採取を行うとともに、これらの便からロタウイルス、カリシウイルス、コブウイルス、E型肝炎ウイルスなどの検出およびピコルナウイルス科の新しいウイルスの検出を行う。

(3) すでに下痢症仔ブタ便検体から検出したロタウイルスの株において、全 11 本のウイルス遺伝子分節の検出を行い、詳細な解析を行う。

(4) ピコルナウイルス科のウイルスは組換えが起こりやすいことが知られており、検出したウイルスにおいて詳細に解析を行う。

(5) ブタコブウイルスは健常個体においても検出頻度が高いことが知られており、病原性について疑問がもたれている。個体の週齢と検出頻度との関係を調べ、抗体保有率の検索を行う。また、感染経路を考え、飼育環境におけるブタコブウイルスの検出を行う。

3. 研究の方法

国内外の研究協力者から、小児科外来を受診した乳幼児下痢症患者の便検体からウイルス核酸の抽出を行う。また家畜の下痢症便検体および健常便検体、または血清を採取し、これらからウイルス核酸を抽出す

る。ターゲットとするウイルスに対して設定したプライマーを用いて PCR 反応を行うことでウイルスの検出を行う。検出したウイルスに関してはその遺伝子配列を決定し、分子遺伝子学的解析を行う。過去に検出されたウイルスの配列や、近年の流行株との比較を行い、ウイルスの進化、組み換え、再集合（ロタウイルス）などを調べる。

4. 研究成果

(1) 2007-2013 年の日本の小児科外来を受診した急性胃腸炎患者の下痢便検体からウイルスの検出を行ったところ、最も多いウイルスはノロウイルスであった。ノロウイルスは GII.4 が多く、GII.4/2006b 変異型が大勢を占めたが、2009-2010 年には 2008a 変異型も検出された。2012 年晩期になると 2012 変異型が多く見られた。この年は 2006 年に次ぐ、全国的な流行がみられた。次に検出頻度の高いウイルスはロタウイルスで 2007~2009 年では G1P[8] が最頻出株であったが、2009~2010 年には G3P[8] が最頻出株となった。次年度では G3P[8] が多いものの最頻出株は G1P[8] となった。そのほかのウイルスとしてボカウイルス、サポウイルス、アストロウイルス、パレコウイルス、エンテロウイルス、サフォールドウイルスなどが検出されたが、どのウイルスも頻度は 10% 以下であった。

(2) 2010~2011 年、タイ・チェンマイでウイルス性下痢症の分子疫学を行った。411 便検体中 50% が陽性、ノロウイルス GII が 16%、A 群ロタウイルスが 15%、ヒトボカウイルスが 6%、アデノウイルスが 5%、エンテロウイルスが 4%、ヒトパレコウイルスが 1% であった。アストロウイルス、サフォールドウイルス、サポウイルス、アイチウイルス、コサウイルスは 1% 以下であった。ロタウイルスは G1P[8] が 45%、G9P[8] が 36% であった。ノロウイルスは GII/4 の 2010 変異型が多数を占めた。

(3) 近年発見された新しいウイルスの検出をタイの急性胃腸炎患者検体から試みた。入院小児の検体からピコルナウイルス科のサフォールドウイルスを、コサウイルスを成人の検体から検出した。また、パルボウイルス科のボカウイルスを検出した。どれも多くは共感染であった。

(4) 10 種類の下痢症ウイルスを同時に 1 本のチューブの中で検出する multiplex-PCR 法を開発した。下痢症の原因ウイルスは種類が多く、検出には時間がかかるが、それを簡略化するために考案し、実際の検体を用いて有用性を明らかとした。

(5) 市販のノロウイルス・イムノクロマトキット、ロタウイルスのイムノクロマトキットの評価を行い、集団感染での対応が可能であることを示した。ノロウイルスのキットは近年検出のGII.4変異型の検出も可能であった。また、ロタウイルス、アデノウイルス、ノロウイルスの3種類のウイルス抗原同時検出キットの評価を行った。PCR法と比べ、精度は同等だが感度がノロウイルス、アデノウイルスで低かった。

(6) タイと日本のブタ便から検出されたブタコブウイルスのVP1領域の解析を行った。系統樹解析の結果、5つのlineageに分別可能で、従来報告されている株に比べてこれらの株は多様性に富んでいた。タイの健康なブタの各週齢の血清中のブタコブウイルスを調べ、17%の頻度で検出された。また、3D領域の検索からウシコブウイルスに近いと報告されていた1株のVP1領域は他のブタコブウイルスの株と類似しており、ブタコブウイルスでの組換えの存在が予想された。

(7) チェンマイの下痢症の仔ブタから検出されたA群ロタウイルス4株(G3P[23] 遺伝子型2株, G9P[23]1株, G3P[13]1株)について、全11ゲノムの解析を行った。遺伝子型間、遺伝子型内での遺伝子再集合が観察された。同時期のヒトでの流行株とは類似していないが、同じ地域のブタロタウイルスの遺伝子分節が検出された。一方、遺伝子分節によっては約20年前の株(ブタ由来のヒトの株)の遺伝子が保存されていた。まれなNSP3 T7遺伝子型がタイで初めて検出され、これはこの遺伝子型がブタ由来であることを支持する結果であった。

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45件)

- ① Okitsu S, et al. (8名中1番目) 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. DOI: 10.1016/j.meegid.2013.05.005. (査読有)
- ② Khamrin P, Okitsu S, et al. (4名中2番目) 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. doi: 10.1016/j.meegid.2013.03.040. (査読有)

- ③ Thongprachum A, Okitsu S, et al. (10名中6番目) Emergence of norovirus GII/4 2006a and 2006b variants in hospitalized children with acute gastroenteritis in Thailand. *Clin Lab*, 59 (3+4): 271-276, 2013. DOI: 10.7754/Clin.Lab.2012.120316 (査読有)
- ④ Dey SK, Okitsu S, et al. (5名中3番目). Prevalence, seasonality, and peak age of infection of enteric adenoviruses in Japan, 1995-2009. *Epidemiol Infect.* 2013, 141(5):958-60. DOI: 10.1017/S0950268812001586. (査読有)
- ⑤ Khamrin P, Okitsu S, et al. (13名中9番目) Three clusters of Saffold viruses circulating in children with diarrhea in Japan. *Infect Genet Evol.* 13: 339-343, 2013. DOI:pii: S1567-1348(12)00356-5. 10.1016/j.meegid.2012.11.004. (査読有)
- ⑥ Thongprachum A, Okitsu S, et al. (13名中4番目). Reemergence of New Variant G3 Rotavirus in Japanese Pediatric Patients, 2009-2011. *Infect Genet Evol.* 13: 168-174, 2013. DOI: 10.1016/j.meegid.2012.09.0. (査読有)
- ⑦ Chan-It W, Okitsu S, et al. (7名中5番目) Emergence of a new norovirus GII.6 variant in Japan, 2008-2009. *J Med. Virol.* 84: 1089-1096, 2012. DOI 10.1002/jmv.23309. (査読有)
- ⑧ Khamrin P, Okitsu S, et al. (8名中4番目) Detection of human bocavirus 1 and 2 from children with acute gastroenteritis in Japan. *J Med Virol*, 84: 901-904, 2012. DOI: 10.1002/jmv.23274. (査読有)
- ⑨ Khamrin P, Okitsu S, et al. (9名中6番目) Circulating of human bocavirus 1, 2, 3, and 4 in pediatric patients with acute gastroenteritis in Thailand. *Infection, Genetics and Evolution*, 12: 565-569, 2012. DOI: 10.1016/j.meegid.2012.01.025. (査読有)
- ⑩ Khamrin P, Okitsu S, et al. (12名中8番目). Detection and molecular characterization of cosavirus in adults with diarrhea, Thailand. *Virus Genes*, 2012; 44(2)244-246. DOI 10.1007/s11262-011-0700-y. (査読有)
- ⑪ Okitsu S, et al. (10名中1番目) Sequence analysis of porcine kobuvirus VP1 region detected in pigs in Japan and Thailand. *Virus Genes*, 2012 ; 44(2): 253-257. DOI:

- 10.1007/s11262-011-0692-7. (査読有)
- ⑫ Dey SK, Okitsu S, et al. (8名中6番目) Seasonal pattern and genotype distribution of sapovirus infection in Japan, 2003 - 2009. *Epidemiol Infect* 2012 140(1): 74-77. DOI:10.1017/S0950268811000240. (査読有)
- ⑬ Khamrin P, Okitsu S, et al. (7名中6番目) Comparison of the rapid methods for screening of group A rotavirus in stool samples. *J Trop Pediatr*, 2011, 57(5) 375-377. DOI:10.1093/tropej/fmq101. (査読有)
- ⑭ Khamrin P, Okitsu S, et al. (6名中4番目) Scaffold cardioviruses in children with diarrhea, Thailand. *Emerg Infect Dis* 17:1150-1152, 2011. DOI: 10.3201/eid1706.101983. (査読有)
- ⑮ Khamrin P, Okitsu S, et al. (6名中4番目) A single-tube multiplex PCR for rapid detection in feces of 10 viruses causing diarrhea. *J Virol Methods* 2011; 173: 390-393. DOI.org/10.1016/j.jviromet.2011.02.012. (査読有)
- ⑯ Chan-it W, Okitsu S, et al. (12名中3番目) Detection and genetic characterization of norovirus infection in children with acute gastroenteritis in Japan, 2007-2009. *Clin Lab*. 2011, 57: 213-220. <http://www.clin-lab-publications.com/> (査読有)
- ⑰ Dey SK, Okitsu S, et al. (5名中4番目) Genetic diversity and emergence of norovirus GII/4-2006b in Japan during 2006-2007. *Clin Lab*, 57: 193-199, 2011. <http://www.clin-lab-publications.com/> (査読有)
- ⑱ Dey SK, Okitsu S, et al. (4名中3番目) Novel recombinant sapovirus in Bangladesh. *Clin Lab* 2011; 57: 91-94. <http://www.clin-lab-publications.com/> (査読有)
- ⑲ Chan-it, W, Okitsu S, et al. (17名中6番目) 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. DOI:10.1016/j.meegid.2010.11.018. (査読有)
- ⑳ Okitsu S, et al. (6名中1番目) Predominance of porcine rotavirus P[23] genotype in piglets with diarrhea in Northern Thailand. *J Clin Microbiol*, 49(1): 442-445, 2011. DOI: 10.1128/JCM.02263-10. (査読有)
- ㉑ Pham NTK, Okitsu S, et al. (11名中8番目) Human parechovirus infection in children hospitalized with acute gastroenteritis in Sri Lanka. *J Clin Microbiol*. 2010 Nov 3, 49(1):364-366, 2011. DOI: 10.1128/JCM.02151-10 (査読有)
- ㉒ Pham NT, Okitsu S, et al. (11名中9番目) Detection of human parechovirus in stool samples collected from children with acute gastroenteritis in Japan during 2007-2008. *J Med Virol*. 2011; 83(2): 331-336. DOI: 10.1002/jmv.21740. (査読有)
- ㉓ Pham NTK, Okitsu S, et al. (9名中7番目) Human bocavirus infection in children with acute gastroenteritis, Japan and Thailand. *J Medical Virol*, 2011 83(2): 286-290. DOI: 10.1002/jmv.21876. (査読有)
- ㉔ Khamrin P, Okitsu S, et al. (8名中6番目) Evaluation of the newly developed immunochromatography test kit for rapid detection and differentiation of norovirus GI and GII. *J Trop Pediatr* 2010, 56(5) 368-369. DOI: 10.1093/tropej/fmp134. (査読有)
- ㉕ Khamrin P, Okitsu S, et al. (7名中6番目) Molecular characterization of kobuviruses in stool samples collected from healthy pigs in Japan. *Infect Gen Evol*, 10:950-954. 2010. DOI: 10.1016/j.meegid.2010.06.001. (査読有)
- ㉖ Dey SK, Okitsu S, et al. (6名中5番目) Molecular and epidemiological trend of sapovirus and astrovirus infection in Japan. *J Trop Pediatr*. 2010 56(3):205-207. DOI: 10.1093/tropej/fmp082. (査読有)
- ㉗ Dey SK, Okitsu S, et al. (6名中3番目) Seasonal pattern and genotype distribution of norovirus infection in Japan. *Pediatr Infect Dis J* 2010 23: 29(5): e32-e34. DOI: 10.1097/INF.0b013e3181d742bf. (査読有)
- ㉘ Dey SK, Okitsu S, et al. (5名中4番目) Novel recombinant norovirus in Japan. *Virus Genes*, 2010; 40(3): 362-364. DOI: 10.1007/s11262-010-0459-6. (査読有)
- ㉙ Khamrin P, Okitsu S, et al. (7人中6番目) Genotypic linkage of VP4, VP6, VP7,

NSP4, NSP5 genes of rotaviruses circulating among children with acute gastroenteritis in Thailand. Infect Genet Evol 2010 10:467-472. DOI: 10.1016/j.meegid.2010.03.002.

(査読有)

[学会発表] (計 31 件)

- ① Thongprachum A, 他. The emergence of norovirus GII/4 2012 outbreak in Japanese pediatric patients. 第9回日本小児消化管感染症研究会・学術集会、2013年2月9日、北浜フォーラム (大阪府)
- ② 高梨さやか、他。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G遺伝子型の検討。第9回日本小児消化管感染症研究会・学術集会、2013年2月9日、北浜フォーラム (大阪府)
- ③ Thongprachum, A, 他. 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、2012年11月24日、西日本総合展示場・北九州国際会議場 (福岡県)
- ④ Thongprachum A, 他. Reemergence of variant G3 rotavirus in Japanese pediatric patients. 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月14日、大阪国際会議場 (大阪府)
- ⑤ Thongprachum A, et al. Picornaviruses associated with gastroenteritis in Japan and Thailand. The 16th Annual meeting of Japanese Society for Neurovirology. 2012年8月30日、国立感染症研究所 (東京都)
- ⑥ 沖津祥子、他. タイ国の健康なブタ血清中のブタコブウイルス。第53回日本臨床ウイルス学会、2012年6月16日、千里ライフサイエンスセンター (大阪府)
- ⑦ Khamrin P, et al. Molecular characterization of human bocavirus isolated from children with acute gastroenteritis in Japan and Thailand. The 9th Japan-China International Conference of Virology. 2012年6月12日、北海道大学 (札幌)。
- ⑧ Okitsu S, et al. Full genome analysis of rotavirus P[23] collected from piglets with diarrhea in Thailand, 2006-2008. The 9th Japan-China International Conference of Virology. 2012年6月12日、北海道大学 (札幌)。
- ⑨ Ushijima H, et al. Novel picornaviruses in children and adults with diarrhea, Thailand. The 9th Japan-China International Conference of Virology. 2012年6月12日、北海道大学 (札幌)。
- ⑩ Khamrin P, et al. Novel picornaviruses in children and adults with diarrhea, Thailand. 第8回日本小児消化管感染症研究会、2012年2月11日、日本教育会館 (東京都)
- ⑪ Thongprachum A, et al. Molecular epidemiological trend of diarrheal virus infections in Japanese pediatric patients, 2009-2011. 第8回日本小児消化管感染症研究会、2012年2月11日、日本教育会館 (東京都)
- ⑫ Thongprachum A, et al. Molecular epidemiology of diarrheal viruses circulating in pediatric patients in Japan, 2009-2010. 第42回日本小児感染症学会総会・学術集会、2011年10月30日、岡山コンベンションセンター (岡山県)
- ⑬ Ushijima H, et al. RT-multiplex PCR for detection of diarrheal viruses. XV International Congress of Virology, 2011年9月15日、札幌コンベンションセンター (北海道)
- ⑭ Khamrin P, et al. Saffold cardiociruses in pediatric patients with diarrhea, Thailand. XV International Congress of Virology, 2011年9月15日、札幌コンベンションセンター (北海道)
- ⑮ Okitsu S, et al. Molecular characterization of VP1 region of porcine kobuvirus. XV International Congress of Virology, 2011年9月15日、札幌コンベンションセンター (北海道)
- ⑯ Thongprachum A, et al. Genetic characterization of group A rotavirus circulating among children with acute gastroenteritis in Japan in 2009-2010. 第52回日本臨床ウイルス学会、2011年6月11日、三重県総合文化センター (三重県)
- ⑰ Pham NTK, et al. 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、2011年2月12日、ブリーゼプラザ (大阪府)
- ⑱ 牛島廣治、他。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、2010年11月27日、仙台国際センター (宮城県)
- ⑲ Dey SK, et al. 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、2010 年 11 月 27 日、仙台国際センター（宮城県）
- ⑳ Pham TKN, et al. 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、2010 年 11 月 9 日、あわぎんホール（徳島県）
- ㉑ Chan-it W, 他. 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、2010 年 11 月 9 日、あわぎんホール（徳島県）
- ㉒ Dey SK, et al. 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、2010 年 11 月 9 日、あわぎんホール（徳島県）
- ㉓ Ushijima K, et al. Evaluation of immunochromatography test kit for rapid detection of diarrheal viruses. Forth International Conference on Calicivirus. 2010 年 10 月 18 日, Hotel Santa Cruz Plaza, (チリ).
- ㉔ Ushijima H, et al. Immunochromatography test for rapid detection of diarrheal viruses. The 8th China-Japan International Conference of Virology. 2010 年 7 月 6 日、Press Plaza, Harbin, China.
- ㉕ Okitsu S, et al. Predominance of porcine rotavirus P[23] among piglets with diarrhea in Chiang Mai, Thailand. The 8th China-Japan International Conference of Virology. 2010 年 7 月 6 日、Press Plaza, Harbin, China.
- ㉖ Khamrin P, et al. Molecular epidemiology of human and animal kobuvirus. The 8th China-Japan International Conference of Virology. 2010 年 7 月 6 日、Press Plaza, Harbin, China.
- ㉗ 沖津祥子、他. 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、2010 年 6 月 19 日、サンポート高松シンボルタワー（香川県）
- ㉘ Khamrin P, et al. Molecular epidemiology of human and animal kobuviruses. 第 51 回日本臨床ウイルス学会、2010 年 6 月 19 日、サンポート高松シンボルタワー（香川県）

〔図書〕（計 3 件）

- ① Dey SK, Okitsu S, Ushijima H. Nova Science Publishers, Inc, NY, USA, Diarrheal Viruses: Classification, Morphology, Genome Organization, Molecular Detection, Treatment, In, "Diarrhea: Causes, Types and Treatments", Ed. Hannah M. Wilson, 2010. pp 232 (pp. 71-96)
- ② 沖津祥子、牛島廣治. 羊土社(東京)、アストロウイルス, ウイルス感染症の検査・診断スタンダード (編集: 田代真人、牛島廣治)、2011 年、p455 (p138-142)。
- ③ 牛島廣治、沖津祥子、Khamrin P、医薬ジャーナル社 (大阪)、ロタウイルスの診断、ロタウイルス胃腸炎の予防と治療の新しい展開 (編集: 神谷齊、庵原俊昭) 2012 年、p135 (p91-103)。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沖津 祥子 (OKITSU SHOKO)

東京大学・大学院医学系研究科・客員研究員

研究者番号：10082215

(2) 海外研究協力者

KHAMRIN PATTARA

タイ・チェンマイ大学医学部講師