

論文の内容の要旨

論文題 Study on Aichi virus, parechovirus, and bocavirus detected in children with acute gastroenteritis in Japan, Bangladesh, Thailand, Vietnam, and Sri Lanka

和訳 日本、バングラデシュ、タイ、ベトナム、スリランカの急性胃腸炎の小児で検出されたアイチウイルス、パルコウイルス、ボカウイルスに関する研究

指導教員 水口 雅 教授
東京大学大学院医学系研究科
平成 20 年 4 月進学
保健学博士課程
国際保健学専攻
氏名 PHAM Thi Kim Ngan

抄録

急性胃腸炎は乳幼児の最も一般的な疾患のひとつである。今でも世界中で罹患および死亡の最も重要な原因である。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、アストロウイルスは最も重要な病因ウイルスとして確立されている。しかし、急性胃腸炎患者の半分以上の病因ウイルスはまだ、診断されていない。最近、アイチウイルス、ヒパレコウイルス (HPeV)、ヒボカウイルス (HBoV) もこの疾患の病原体として考えられるようになってきた。そこでこの研究の目的は日本、バングラデシュ、タイ、ベトナム、スリランカの急性胃腸炎の小児からこれらのウイルスの分子疫学を行うことである。

急性胃腸炎の乳幼児から採取した 1603 検体の糞便を研究対象とした。このうちスリランカの 362 検体を除いてこれらの検体はすでに RT-PCR 法によりロタウイルス、ノロウイルス、サポウイルス、アデノウイルス、アストロウイルスが陰性であることを確認している。アイチウイルス検出には日本、バングラデシュ、タイ、ベトナムで 2002 ~ 2005 年に採取された 912 検体を用いた。HPeV と HBoV の検出には日本、タイ、スリランカで 2005 ~ 2008 年に採取した 691 検体を用いた。アイチウイルスのスクリーニングには 3CD junction 領域を増幅するプライマーを用いて nested PCR を行った。HPeV のゲノム検出には 5'-UTR 領域を増幅するプライマーを用いて RT-PCR 法を行い、VP1 領域の配列決定により遺伝子型を調べた。HBoV は N1 領域を増幅するプライマーにより PCR を行い、VP1/VP2 領域の配列決定により遺伝子型を決定した。

調べた 912 検体の中でアイチウイルスは 28 検体 (3.1%) で陽性であった。この中で 14 検体 (6.5%) は日本で検出され、バングラデシュでは 10 検体 (2.5%)、ベトナムで 3 検体 (1.6%)、タイで 1 検体 (0.9%) であった。日本、タイ、ベトナムのアイチウイルス株は遺伝子型 A に属し、一方バングラデシュの検体の多くは遺伝子型 B に属していた。28 検体のうち、12 株をアイチウイルスのカプシド遺伝子の増幅と配列決定に使用した。使用した検体と対照

株のカプシド遺伝子の核酸配列から作成した系統樹はアイチウイルス株がふたつのクラスターに分類されることを示していた。カプシド遺伝子を基にしたアイチウイルスの分類によると、日本、タイ、ベトナム、ドイツで検出された株は lineage I に属し、lineage II にはバングラデシュとブラジルの株が含まれた。この研究で使用された株 17 株と対照株のカプシド遺伝子の核酸配列から、遺伝子型 A と B を区別する 5 つの新しいプライマーを設計した。この新しいプライマーを用いた nested PCR 法を 17 の遺伝子型がすでにわかっている株に応用した。すなわちカプシド遺伝子を基にした遺伝子型特異的なプライマーを用いて、アイチウイルスの遺伝子型 A と B を区別する nested PCR 法の開発を行った。新しく開発した PCR の結果、使用した 17 の検体全てで適正な PCR 産物が得られ、新しいプライマーは遺伝子型 A と B を区別でき、その結果はカプシド遺伝子の核酸配列による結果と一致した。遺伝子型特異的プライマーによる nested PCR 法はアイチウイルスの遺伝子型を分別する有用な方法である。

HPeV は日本で 8.1% (247 検体中 20)、タイで 14.6% (82 検体中 12 検体)、スリランカで 8.3% (362 検体中 30) 検出された。検出された HPeV の遺伝子型決定を行ったところ、日本で陽性の 20 検体中 18 検体で VP1 遺伝子の配列決定に成功し、その多く (15 検体) は HPeV1 と同定された。残りの 2 検体は HPeV3 であった。タイの HPeV 株は 9 株でカプシド遺伝子の配列決定に成功した。これらは HPeV1-4 の 4 つの遺伝子型に分類され、多くの株 (5 株) は HPeV1 に属していた。さらに稀な HPeV2 が 1 検体検出された。スリランカでは 27 株の VP1 遺伝子の配列決定に成功した。HPeV1 が 11 株、HPeV3 が 1 株、HPeV4 が 5 株、HPeV5 が 3 株であった。5 株は HPeV10、残りの 2 株は HPeV11 と同定された。これはスリランカの急性胃腸炎の乳幼児に HPeV が流行しているという初の報告である。さらに HPeV10 と HPeV11 検出は初の報告である。スリランカの HPeV 流行株には多様性があることも注目すべきことである。

HBoV は日本で 1.6% (247 検体中 4)、タイで 1.2% (82 検体中 1) 検出された。このうち日本の 3 株は group 1 に属し、残りの日本の 1 株とタイの株は group 2 に属していた。

現在、アイチウイルス、HPeV、エンテロウイルス、HBoV 検出については 1 検体に対してそれぞれ 1 セットのプライマーを用いる RT-monoplex PCR 法が使用されている。これに比べて、RT-multiplex PCR 法は 1 本の反応チューブの中にそれぞれ別のウイルスゲノムを増幅可能な複数の特異的プライマーペアを入れた方法で、1 回のテストで 2 つ以上の標的を検出することが可能である。この RT-multiplex PCR 法は迅速で経費を抑えた研究室診断法として単純で可能性のある方法である。この研究では急性胃腸炎の乳幼児から採取した糞便中のアイチウイルス、HPeV、エンテロウイルス、HBoV を検出する RT-multiplex PCR 法を開発した。

まとめると、バングラデシュ、タイ、ベトナムの便検体から初めてアイチウイルスを検出した。タイとスリランカの急性胃腸炎の小児から HPeV を初めて検出した。さらにこの研究で新しい HPeV10 と 11 の検出を初めて報告した。

この研究は RT-multiplex PCR 法により急性胃腸炎の乳幼児の便検体から、アイチウイルス、HPeV、エンテロウイルス、HBoV を検出した初の報告である。この研究ではアジアの急性胃腸炎の小児から今まであまり調べられていないアイチウイルス、HPeV、HBoV について分子疫学上の新たな知見を提供するものである。