

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 24 年 4 月 10 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20406013

研究課題名（和文）ネパールでのロタウイルスワクチン導入が重症下痢症および流行株に及ぼす影響の評価

研究課題名（英文）Evaluation of the effect of rotavirus vaccine on severe diarrhea and circulating rotavirus strains in Nepal

研究代表者

中込 治（NAKAGOMI OSAMU）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：70143047

研究成果の概要（和文）：ロタウイルスは先進国にも発展途上国にもある普遍的ウイルス感染症であるが、感染の帰結による乳幼児死亡は発展途上国に偏在し、ネパールはそのような疾病負担が大きい国の 1 つである。世界保健機関は 2009 年に地球規模でのロタウイルスワクチンの定期接種への導入を勧奨し、ネパールにも早晩ロタウイルスワクチンが導入されると予想される。本研究では、ワクチンのインパクトを評価する基盤となるネパールにおけるロタウイルスおよびノロウイルス下痢症の分子疫学的特徴を明らかにするとともに、特に、ネパールに特有の、ワクチン株とは異型である G12P[6] 株の流行動態を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Virtually all children in the world are infected with rotavirus by the age of 5 years, but the outcome of infection differs considerably between developed and developing countries. Nepal is one of such countries where the burden of rotavirus disease is very high. In 2009, the World Health Organization issued a universal immunization of children with rotavirus vaccine, and Nepal is expected to introduce rotavirus vaccine sooner or later. This study revealed a substantial burden of rotavirus and norovirus diarrhea in Nepal, and described the molecular epidemiologic features of these gastroenteritis viruses on which the impact of rotavirus vaccine would be measured. This study also clarified how globally unusual G12P[6] rotavirus strains, yet very common in Nepal, evolved over time.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2009 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2010 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2011 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
総計	12,800,000	3,840,000	16,640,000

研究分野：医歯薬学 A

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：ロタウイルス、ワクチン、遺伝子型、分子疫学

1. 研究開始当初の背景

ロタウイルスは先進国にも発展途上国にもある普遍的ウイルス感染症である。しかし、感染の帰結は地域で著しく異なり、ロタウイ

ルスによる下痢と脱水のため、年間 60 万人の乳幼児が死亡している。WHO や世界ワクチン同盟がロタウイルス感染症の克服を最重要課題とする理由である。現在、ロタウイ

スワクチンは世界 100 カ国以上で認可され、欧米とラテンアメリカの 10 カ国で全乳児への定期接種に導入され、1000 万人の乳児への接種が進んでいる(Nakagomi and Cunliffe, *Current Opin Infect Dis*, 2007; Cunliffe and Nakagomi, *Ann Trop Paediatr*, 2007)。しかし、どの途上国でも同様のロタウイルス死亡があるわけではなく、死亡数の世界分布をみると、最大の問題がインド・バングラデシュ・ネパールにあることがわかる。

ネパールは、ヒマラヤ観光の基地として有名であるが、世界の最貧国の 1 つであり、ロタウイルス下痢症による乳児死亡率が著しく高い。本研究に先行する海外学術調査研究によって、ネパールにおいて世界でもまれな型のロタウイルス株(G12P[6])が高頻度に存在している実態を明らかにし、これが先進国を含めアジアの他地域への脅威となっていることを示した(Pun SB, et al. *Emerg Infect Dis* 13, 482-484, 2007)。その後、この特殊な G12P[6] ウイルス株は隣接するインドやバングラデシュに拡散しはじめた。

2. 研究の目的

本研究では、(1)ロタウイルスワクチン導入前のネパールにおけるロタウイルス下痢症による疾病負担と流行株の状況、とくに世界的にまれな G12P[6]型ロタウイルス株の流行動態を明らかにすること、および(2)研究期間中にロタウイルスワクチンが定期接種へ導入されると期待されたので、ワクチンの普及とともに、野外流行株にシフトがおこるか(ワクチンがカバーしない血清型の増加や動物由来ロタウイルス株の侵入)どうかを分子疫学的に解析すること、の 2 点を目的とした。

3. 研究の方法

本研究を実施にあたっては、目的(1)、すなわち、ロタウイルスワクチン導入前のネパールにおけるロタウイルス株の流行動態の把握のために、基幹定点病院において cross-sectional descriptive study design による分子疫学的解析を行った。一方、目的(2)、すなわち、ロタウイルスワクチンのインパクトの評価は、重症ロタウイルス下痢症の減少を指標にして、趨勢変動解析と症例対照研究によって証明する予定であった。また、ワクチンが流行株に与えるインパクトについては分離株を分子疫学的に解析する予定であった。

研究はネパールの首都カトマンズにある同国最大の小児病院: Kanti Children's

Hospital で行った。臨床情報および検体は、2005 年 11 月から 2011 年 1 月までの期間において、急性下痢症により入院または外来を受診した 5 歳未満の小児を対象とした。

具体的な分子疫学的解析は以下の方法によった。すなわち、下痢症患者便検体について、酵素免疫測定法(Rotacclone ELISA)を実施し、ロタウイルス陽性検体を選出した。これらの検体について、G 型に関しては Gouvea et al (1990)、P 型に関しては Gunasena et al (1993) の報告に準拠した semi-nested multiplex RT-PCR による genotyping を行った。一方、ノロウイルスに関しては、ゲノグループ GI および GII に特異的なプライマーを用いた real-time RT-PCR を行い、その陽性検体についてゲノム上の N/S 領域に設定したプライマーによる genotyping を行った。

4. 研究成果

研究期間中に検体を採取することができた 5 歳未満の急性下痢症患者は 4468 人であり、このうち 25.2%に相当する 1124 人がロタウイルス陽性であった。また、ノロウイルスに関しては、4437 人について検査をすることができ、8%に相当する 356 人がノロウイルス陽性であった。表 1 にロタウイルスとノロウイルスによる下痢症患者数を入院患者と外来患者に分けてみた結果を示した。ロタウイルスが入院患者の下痢症から検出される割合は、外来患者から検出される割合の 2 倍であるのに対し、ノロウイルスの検出割合は入院患者でも外来患者でも有意な違いは認められなかった。これはロタウイルスがより重症な下痢症の原因となっている割合が高いことを示している。また、ロタウイルス下痢症の検出割合がノロウイルス下痢症の 2.5 倍になっていることも、ロタウイルスの重要性を示している。しかし、それでも世界の他の地域のデータと比較するとロタウイルスが下痢症に占める割合は、少ない方である。

表 1. ネパールの小児におけるロタウイルスおよびノロウイルス下痢症

Patient Source	Rotavirus		Norovirus		Mixed Infection %
	N	%	N	%	
Inpatients (N=2697)	864	32.0	208	7.8	0.9
Outpatients (N=1771)	260	14.7	148	8.4	0.2
Total	1124	25.2	356	8.0	0.6

次にロタウイルス下痢症の年齢別発症状況をみると、6~23 ヶ月齢がもっとも罹患数が多いことがわかった。また、発展途上国であ

るにもかかわらず、6ヶ月齢未満のロタウイルス下痢症発症例が20%未満と比較的少なく、とくに生後2ヶ月未満は5%未満である。このことは接種開始が生後2ヶ月で、接種完了が生後6ヶ月であるロタウイルスワクチンにとっては、大きい効果が期待できる疫学的特徴である(図1)。

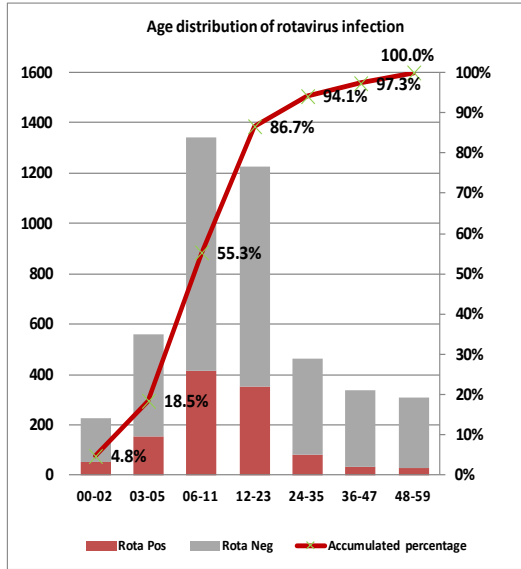


図1. ネパールの小児におけるロタウイルス下痢症の年齢別発症状況

図2にネパールにおけるロタウイルスの遺伝子型の相対頻度の経年変化を示した。この図から明らかなように、世界でもまれな遺伝子型であるG12P[6]株が高頻度に定着しているという特徴が確実に維持されていることがわかった。

G12P[6]株の相対出現頻度には21%~45% (平均32%)と流行年による変化が見られるが、変化の程度は他の遺伝子型の変化よりも小さく、また、ほとんどの年で最多の出現頻度となっていた。G12P[6]株について、相対出現頻度が高いのは、G2P[4]株であり、全体の16%を占めた。G2P[4]株は年度毎の出現頻度の変化が大きく、最終年度には、G12P[6]株をしのいで42%となった。ロタウイルスワクチン導入後のわれわれのブラジルでの疫学調査から、現行のロタウイルスワクチン(単価ロタウイルスワクチン)がG2P[4]株に有効であることが分かっている。この単価ロタウイルスワクチンがG12P[6]株に対しても、有効性を示せば、一般に異型株に対して有効であることが確立できたはずである。

2009年に世界保健機関によるロタウイルスワクチン接種勧奨がアジアやアフリカ諸国を含めた全世界に拡大された。これを機に、ネパールでも定期接種化が期待されたが、予想に反し、研究期間終了までにネパールにロタウイルスワクチンが導入されなかった。

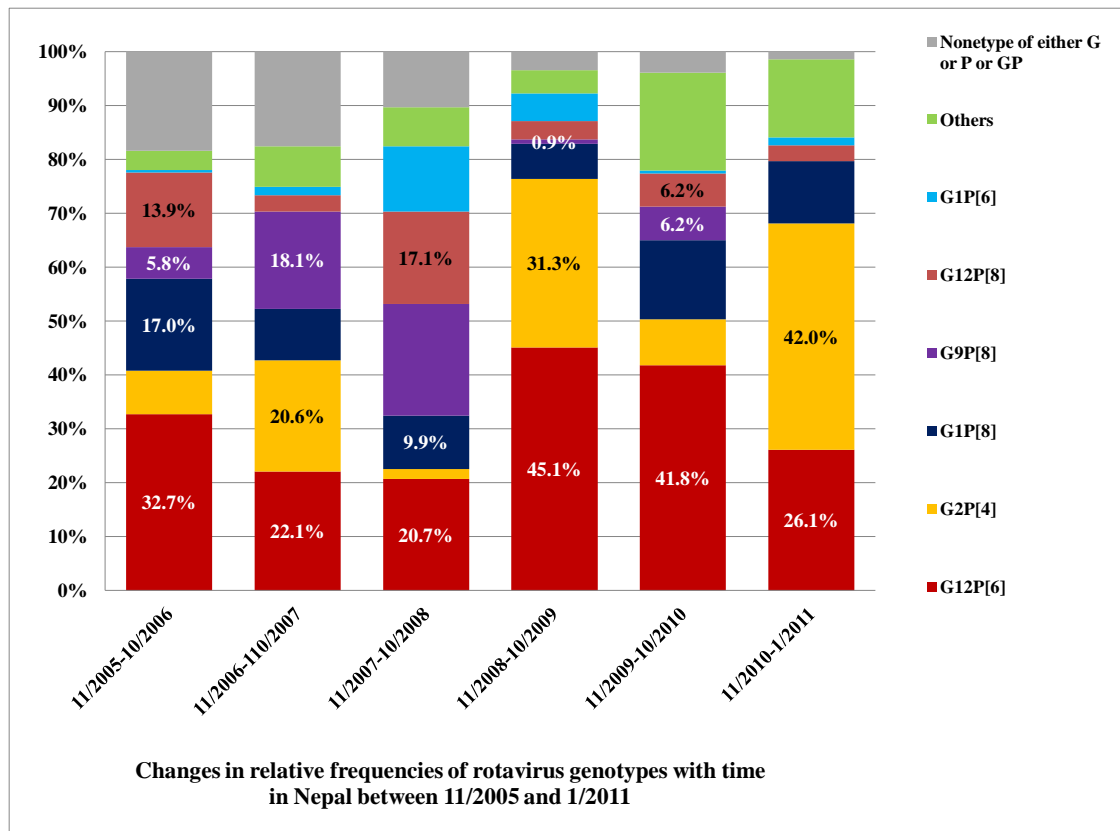


図2. ネパールにおけるロタウイルスの遺伝子型の相対頻度の経年変化

このことは、ワクチン戦略上のみならず、ロタウイルスの防御免疫メカニズムに関する科学的知見の上からも、重要な機会を逸したことになる非常に残念であった。

本研究ではさらに、ネパールのロタウイルス下痢症の分子疫学の上で大きな特徴である G12P[6]ウイルス株がどのように維持されているかを調べた。すなわち、2007 年 11 月から 2010 年 1 月までに収集した G12P[6]株 145 株について、ゲノム RNA の電気泳動を繰り返し、15 の electropherotype に分類できることに基づき、15 種類の G12P[6]ウイルス株が存在することを明らかにした。これは、ネパールにおいては G12P[6]という遺伝子型が何年にもわたり続いており、また、ロタウイルスの流行が年間を通じてみられるにもかかわらず、ただ 1 種類の G12P[6]ウイルス株が流行しているのではなく、多数の異なる株が流行していたことを示している。さらに、これら 15 種類の G12P[6]の間には出現頻度に大きな差があり、LP1, LP24, および LP27 という 3 種類のウイルス株が、この順序に、ほぼ置き換わるようにして出現してきていることが分かった。このことから、G12P[6]ウイルス株は、多数の同時に流行している株の中からよりフィットネスが高いウイルス株が出現し優勢になると、ふたたび別のさらにフィットネスが高いウイルス株に置換されるというダイナミックな動態をとりながら進化しているものと考えられる。

本研究では、ワクチンが導入された際に、必ず必要になる基盤情報の整備を当初の目的より拡大し、ネパールにおけるロタウイルス下痢症による疾病負担と流行株の状況、とくに世界的にまれな G12P[6]型ロタウイルス株の流行動態を明らかにすることに加え、世界各地でロタウイルスに次ぐ乳幼児の重症下痢症の病原体として注目を集めるようになったノロウイルスの流行動態を明らかにすることにした。このことは、ネパールにおけるノロウイルスの流行動態はまったく不明であったため、期せずして、きわめて有用な結果が得られた。

ネパールにおけるノロウイルス下痢症の特徴を要約すると、GII.4 が 32%を占め最も多い遺伝子型であることは世界の他の地域と同様であるが、これに続く遺伝子型が GII.3 と GII.13 (ともに 10%) であり、とくに世界的に出現頻度が高くない GII.13 の 2008 年以降の急激な増加と流行が注目された。

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 5 件)

① Doan YH, Nakagomi T, Cunliffe NA, Pandey BD, Sherchand JB, Nakagomi O. The occurrence of amino acid substitutions D96N and S242N in VP7 of emergent G2P[4] rotaviruses in Nepal in 2004-2005: a global and evolutionary perspective. Arch Virol 156(11): 1969-78, 2011

② Tate JE, Patel MM, Steele AD, Gentsch JR, Payne DC, Cortese MM, Nakagomi O, Cunliffe NA, Jiang B, Neuzil KM, de Oliveira LH, Glass RI, Parashar UD. Global impact of rotavirus vaccines. Expert Rev Vaccines 9:395-407, 2010

③ 中込 治, 中込とよ子: ワクチンによるロタウイルスの感染制御. ウイルス 60: 33-48, 2010

④ 中込とよ子, 中込 治: 新時代のワクチン戦略について考える: ロタウイルスワクチン. 臨床検査 54: 1392-1399, 2010

⑤ Sherchand JB, Nakagomi O, Dove W, Nakagomi T, Yokoo M, Pandey BD, Cuevas L, Hart CA, Cunliffe NA. Molecular Epidemiology of Rotavirus Diarrhea among Children Aged <5 Years in Nepal: Predominance of Emergent G12 Strains during 2 Years. J Infect Dis 200 (Suppl): 182-197, 2009

[学会発表] (計 3 件)

① Nakagomi O, Doan YH, Nakagomi T, Cunliffe NA. A global and evolutionary perspective of the G2 VP7 genes of rotavirus strains detected over the last 34 years: 4th European Rotavirus Biology Meeting, Reggio Calabria, Italy, 2-5 October, 2011

② Doan YH, Nakagomi T, Cunliffe NA, Pandey BD, Sherchand JB, Nakagomi O. Possible implication of amino acid substitution D96N in the VP7 gene of G2P[4] strains emerging in Nepal and elsewhere in the context of the evolution of G2 strains: XV International Congress of Virology, Sapporo, Convention Center, 11-16 September, 2011

③ 中込 治, Doan YH, 中込とよ子: 地球規模で見たロタウイルスG2株の34年間にわたる分子進化学的変遷: 第65回日本細菌学会東北支部総会、山形市、平成23年8月18日、19日

〔図書〕（計 2 件）

①中込とよ子, 中込 治: ロタウイルス感染症の世界の状況 pp 10-21 神谷斎、庵原俊昭編 「ロタウイルス胃腸炎の予防と治療の新しい展開」 医薬ジャーナル社、大阪、2012

②中込 治, 中込とよ子: ロタウイルス感染症の医療経済学 pp120-132 神谷斎、庵原俊昭 編 「ロタウイルス胃腸炎の予防と治療の新しい展開」 医薬ジャーナル社、大阪、2012

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中込 治 (Nakagomi Osamu)

研究者番号：70143047

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし