

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10455

研究課題名(和文) 乳幼児のサポウイルス感染症の分子疫学と感染免疫

研究課題名(英文) Molecular epidemiology and immunology of sapovirus infection in infants and children

研究代表者

沖津 祥子 (OKITSU, Shoko)

日本大学・医学部・客員研究員

研究者番号：10082215

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：小児の急性胃腸炎の原因ウイルスとして多様なウイルスが知られている。日本ではロタウイルスワクチンが2011年に接種開始されたことからロタウイルスによる胃腸炎は減少した。今後重要性が増すと思われるサポウイルスの疫学、感染免疫を調べた。頻度は平均5.2%で年によって異なり、遺伝子型はGI.1が多いが他に7種類の遺伝子型が検出された。遺伝子型特異的な免疫が成立すると考えられたが、血清抗体価の測定結果からは年齢との間に相関はなかった。乳児は母親からの受動免疫を得ていた。2020年の新型コロナウイルス感染症の流行中には胃腸炎患者の減少およびSaV陽性数が減少したが、その翌年は上昇した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児の急性胃腸炎は日本では死亡者数は少ないものの誰でも罹患する疾患で乳幼児やその家庭における負担となっている。その原因ウイルスは多く、その一つであるロタウイルスに対するワクチンは2020年に日本で定期接種となった。そこで今後どのようなウイルスが流行するか知ることが、感染防御対策を探るために重要である。この研究では原因ウイルスの一つであるサポウイルスを対象として流行疫学とその特徴を調べ、一方で遺伝子型に対する免疫を調べた。ロタウイルスワクチンの影響と新型コロナウイルス感染症流行の影響を考えて継続的な調査が必要である。

研究成果の概要(英文)：A variety of viruses are known to cause acute gastroenteritis (AGE) in infants and children. In Japan, rotavirus vaccination has been implemented since 2011, and then numbers of rotavirus-induced AGE gradually decreased. Hereafter, the sapovirus-induced AGE seems to increase, therefore, molecular epidemiology and characterization of sapovirus (SaV) genotypes were studied. The prevalence of SaV infection has changed year by year, and was average 5.2%. The predominant genotype was GI.1 and other seven genotypes were detected. In the infected children, genotype-specific immunity was elicited, however, age-dependent antibody titers in the sera were not observed in the healthy subjects using the virus-like particles of SaV. The infants were given passive immunity against SaV from their mothers.

Numbers of collected stool samples in the AGE children and of SaV-positive samples decreased during the COVID-19 epidemic, and the numbers of them increased in the following year.

研究分野：公衆衛生学

キーワード：ウイルス性胃腸炎 サポウイルス 分子疫学 小児 感染免疫

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

世界の5歳以下の乳幼児の死亡原因として急性胃腸炎(下痢症)は2008年の15%(134万人)<sup>1)</sup>から、2016年には12.7%(44.6万人)と減少しているが、まだ死亡原因の5番目である<sup>2)</sup>。その病原体としては原虫、細菌、ウイルスなど多くの病原体があるが、なかでも抗菌薬が無効であるウイルスの脅威は残されており、ロタウイルス(RVA)が最もよく知られている。RVA以外の多様なウイルスが胃腸炎の病原体となり、患者の症状から病因ウイルスを特定することは難しい。日本では急性胃腸炎で死亡する小児は少ないものの罹患者数は多く、乳幼児やその家庭における負担は大きい。病因ウイルスとしてはRVA、ノロウイルスGの頻度が高いが、他のウイルスとしてサポウイルス(SaV)があげられる。一方、ロタウイルスワクチンが日本でも2011年から任意接種として導入され、年々接種率が上昇するとともにRVAの検出が減少している。しかし急性胃腸炎患児は減少していない。これまでの研究ではRVAやノロウイルスに比べ、サポウイルスの乳幼児における散発性急性胃腸炎に関する研究の蓄積は少ない。

### 2. 研究の目的

(1) 研究期間において群馬県の一カ所の小児科外来を急性胃腸炎の疑いで訪れた小児から提供された便検体からSaVを検出し、そのウイルスの遺伝子型を調べて、流行疫学を明らかにした。さらにSaVの全カプシド領域(VP1)の配列を決定するとともにポリメラーゼ領域の配列を調べて組換えが起こっていないか、変異型が流行していないか調べた。

(2) SaVに対する免疫状態を調べるために、SaVの人工粒子(virus-like particle)を抗原として使用して抗体価を調べた。検体としては様々な年齢の健康人の血清を使用した。受動免疫を調べる目的で母親の血清、母乳、健康な乳幼児の血清を使用して抗体価の測定を行った。

### 3. 研究の方法

(1) これまで研究代表者は単一の小児科外来に依頼して、受診した急性胃腸炎患児から便検体を継続して提供いただいている。この研究期間(2019年7月-2022年6月)においても検体を提供いただき、検体から核酸を抽出し、SaVに対する特異的プライマーを用いたRT-PCR法によってSaVを検出した。陽性検体においてはその核酸配列を調べて遺伝子型を同定するとともに、ポリメラーゼ領域の遺伝子配列を調べて遺伝子型を決定し、組換えがないか調べた。また、カプシド領域全体の配列決定をし、これまでの流行株や同時期に日本、アジア、世界で流行している株との比較を行った。さらに過去(2014-2019年)の検体において検出したSaVについて上記の検索を行い、SaVの流行遺伝子型について詳細な検討を行った。なおこの研究では1年を7月から翌年の6月までとした。

(2) SaVのVLPを抗原としたELISAによって、抗体価の測定を行った。血清ではIgG抗体価、母乳(初乳および成乳)ではIgA抗体価の測定を行った。タンパク量のわかった抗SaV抗体の基準品はないため、スクリーニング後に抗体価の高いサンプルを基準としてunitを算出した。測定検体は、健康人の血清81検体、および37組の母親とその出産した乳児の血清と母乳を使用した。

(3) SaVのスクリーニングを行う際に他の下痢症ウイルスも同時にスクリーニングを行い、研究期間、地域における流行ウイルスを調べた。ウイルスとしてはロタウイルス(RVA)、ノロウイルスGIおよびGII、アストロウイルス(HAstV)、アデノウイルスを対象とした。RVA、HAstVに関しては遺伝子型を検出できるプライマーを使用して、RT-PCRを行い、配列決定によって遺伝子型の同定を行った。

(4) 急性胃腸炎患者からの便検体に係わる研究は日本大学の倫理委員会の承認を受けて行った(29-9-0、29-9-1、29-9-2)。また対応のある母親とその出産した乳児からの血清および母乳に係わる研究は東京大学(2020232NI)および日本大学倫理委員会(P20-12-2)の承認を受けた。

### 4. 研究成果

#### (1) 新型コロナウイルス感染症(COVID-19)の影響

日本では2020年春からCOVID-19の流行が始まり、新しい感染症であること、そしてその感染力の強さから、感染制御対策が全国規模でなされた。社会活動の制限(各種の人が集まるイベントの中止、学校や保育園への出席停止、休園など)公衆衛生概念の普及と徹底(マスク、手洗い励行)がなされ、また医療施設を受診することへのためらいも見られた。その結果として急性胃腸炎の患者の減少が日本全体で認められ、この研究においても採取検体数が2019-2020年には90、2020-21年には42と減少した。しかし2021-2022年は105と検体数の上昇が見られた。これらのことから日本における下痢症ウイルスの流行の変遷にはロタウイルスワクチンの普及

とともに COVID-19 の流行も影響していると考えられる。

## (2) 2014-2017 年の SaV の流行疫学と遺伝子型の解析

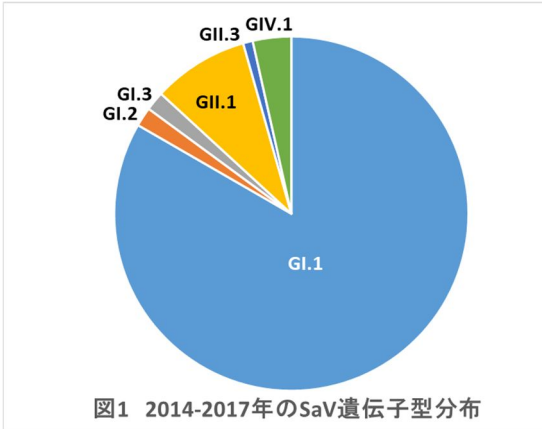


図1 2014-2017年のSaV遺伝子型分布

など 5 種類の遺伝子型が検出された (図 1)。GI.1 が最頻出遺伝子型であることはこれまでの日本および各国の報告と一致する。この期間では特に季節性は見られなかった。また SaV 陽性検体の 36% は SaV 単独感染であるものの、他の 64% はノロウイルス、RVA など他の下痢症ウイルスとの共感染が認められた。SaV GI.1 について、全カブシド領域の配列解析を行い、その系統樹解析を行った。同じ GI.1 でも配列が異なる 2 種類が存在することがわかった。

研究期間前に採取した検体に関して詳細な解析を行い、まとめた<sup>3)</sup>。この 3 年間では 5.0% の頻度 (114/2259) で SaV が検出された。これはこれまでの日本での報告 (1.7 ~ 19.2%) と比べて同程度であった。各年の結果は 2014-2015 年が 2.0% (11/553)、2015-2016 年が 6.8% (59/872)、2016-2017 年が 5.3% (44/834) であった。遺伝子型では GI.1 が最も多く 83.3% を占め、他に GI.2、GI.3、GII.1、GII.3、GIV.1

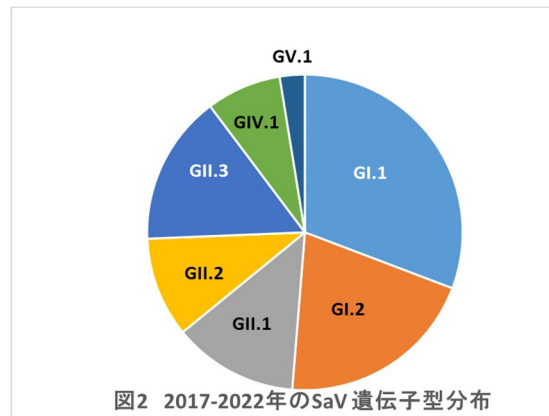


図2 2017-2022年のSaV遺伝子型分布

## (3) 2017-2022 年の SaV の流行疫学と遺伝子型の解析

この研究期間では検体数の減少が見られ、これは COVID-19 流行の影響と考えられる。5 年間の全検体数は 690 で、特に 2019-2020 年は 90 検体、2020-2021 年は 42 検体と減少した。この 5 年間では平均すると 5.7% の SaV が検出され、検出頻度としては前研究期間と変化はなかった。COVID-19 流行前の 2017-2018 年での 8.5% (23/272)、2018-2019 年の 6.6% (12/181) に比べ、流行期の 2019-2020 年では 2.2% (2/90) と減少し、特に 2020-2021 年では全く検出されなかった。2021-2022 年には 1.9% (2/105) と検体数、陽性数ともに前年に比べ上昇した。遺伝子型は前研究期間と同様に GI.1 が最も多かったが頻度は 30.8% と減少した。また全 7 種類とより多様な遺伝子型が検出された (図 2)。前研究期間では見られた GI.3 は消失し、一方で新たに GII.2 が認められた。なおまれな遺伝子型である GV.1 は 2014-2017 年の研究で使用したスクリーニング・プライマーでは検出できないことが報告されたため、この研究期間ではヒトの SaV 遺伝子型すべてを検出できるプライマー を使用したところ<sup>4)</sup> 1 例を検出した。

## (4) 再感染例の解析

2014-2017 年の研究期間では 3 例の再感染例があり、3 例ともにそれぞれ 2 回の SaV 感染があり、再感染では 1 度目とは別の遺伝子型が検出された。2017-2022 年では 2 例の再感染例があり、1 例では 4 回、1 例では 2 回の SaV 感染があったが、すべて別の遺伝子型による感染であった。SaV 感染では遺伝子型に特異的な免疫が成立していることが考えられた。

## (5) SaV の人工粒子を使用した血清、母乳中の抗体価の測定

SaV 感染は重症度が低いため点滴などの際に SaV 感染患者から採血することはできなかった。そこで別の目的で外来を受診した非下痢症患者または健康人から得た血清を用いて SaV 抗原に対する抗体価の測定を行った。抗原の遺伝子型として GI.1 と GIV.1 を使用した。乳児から成人までの血清 81 検体では 2 種類の遺伝子型に対する IgG 抗体価に年齢との間に相関は認められず、個人差が大であった。母親、生後 6 週齢、14 週齢の乳児血清中の IgG 抗体価を比較すると、GI.1、GIV.1 とともに母親、6 週齢児、14 週齢児の順に低下した。一方 6 週齢児でも母親よりも IgG 抗体価が高値を示す例もあった。初乳中の IgA 抗体価は成乳に比べて高かった。母乳および、母親から胎盤を通して児への SaV に対する受動免疫が認められた。

## (6) SaV 以外の下痢症ウイルスの分子疫学

SaV のスクリーニングと同時に他の下痢症ウイルス (RVA、HAstV) についても分子疫学研究を行った。

RVA のワクチン開始後における遺伝子型の変遷

ロタウイルスワクチンは前述のように日本では 2011 年および 2012 年から 2 種類のワクチンが承認され、任意接種として接種され、2020 年 10 月からは定期接種化された。任意接種開始後、

日本全体の接種率は次第に上昇したことがわかっている。研究期間である 2014-2020 年の対象患児における接種率も 32.4 から 62.2%と上昇した。ここでは任意接種期間である 2014-2020 年<sup>5)</sup>。RVA の検出率は 2014-2015 年の 44.7%から、2018-2019 年には一時的に 35.4%となったが、全体として 21.6%であった。2019-2020 年には前述のように検体数が 90 と低下し、RVA は検出されなかった。

検出された遺伝子型は 2014-2015 年では G1P[8]I1 と G1P[8]I2、2015-2016 年では G2P[4]I2 と G9P[8]I2、2017-2018 年では G1P[8]I2 と G8P[8]I2、2018-2019 年では G8P[8]I2 と、毎年流行株に変化が見られた。2016-2017 年では一般的ではない mixed genotype( P 遺伝子型が P[4]と P[8]を検出するなど複数の遺伝子型が検出されたもの)が多かったがこれらは翌年には持ち越されなかった。2016-2017 年には G3 遺伝子型が流行した。G3 はこれまでも流行した遺伝子型であるが、ここで検出された G3 はウマから検出された G3 と配列が類似した株で、世界中での流行が報告された。このように新しく変異したウイルスが世界で流行すると日本においても流行することがわかった。RVA では GP 遺伝子型だけでなく I 遺伝子型も調べることが重要であることが確認された。RVA の遺伝子型が年ごとに変遷することがわかった。

#### HAstV の遺伝子型の検出

2014-2021 年の 7 年間の 2841 検体において HAstV の検出を行った。以前よりも知られていた classic HAstV 以外に MLB と VA という遺伝子の配列に大きく違いがある HAstV があることがわかっているが、日本ではこれらに関する疫学調査はこれまで 1 報のみであった<sup>6)</sup>。そこでこの研究ではすべてのタイプを検出できるプライマーを用いて検出した。その結果、世界での多くの報告では classic HAstV が MLB と VA に比べて多いとされているが、日本では classic HAstV に比べ、MLB と VA が多いことがわかった。これは過去の 1 報と同じであった。すなわち検出された 130 検体(4.6%)のうち、classic HAstV は 56 検体で、MLB と VA は合わせて 74 検体であった。MLB1 が最も多く(45.4%) classic HAstV の中では HAstV1 が最も多かった。Classic HAstV の中で HAstV1 が最も多いという結果は日本および世界でのこれまでの報告と一致する。まれな MLB3 が日本の小児の検体から初めて検出された。3 検体の HAstV3 が検出され、組換え体であることがわかった。この結果をまとめた<sup>7)</sup>。

#### (7) 研究のまとめ

SaV、RVA、HAstV の流行疫学と遺伝子型の変遷を調べたが、下痢症ウイルスの流行にはロタウイルスワクチン接種の普及が影響していた。すなわちワクチン接種率の上昇とともに RVA 下痢症の減少が確認されたが、ウイルス下痢症患者そのものは存在し、ノロウイルスが多いものの SaV や HAstV など多様なウイルスがあることがわかった。またロタウイルスワクチンの定期接種化と COVID-19 の流行が同時期となったため、今後の動静を注視していくことが必要と考えられる。

SaV に対する感染免疫能は、感染患児において遺伝子型特異的な免疫が誘導されるが、長期的には維持されないと考えられた。一方母親からその出産児には母乳および胎盤を介して受動免疫が与えられることが明らかとなった。

#### < 引用文献 >

- 1) Black et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet* 2010; 375: 1969-87.
- 2) Troeger et al. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoea in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect Dis.* 2018; 18(1)1211-28.
- 3) Okitsu et al. Diversity of human sapovirus genotype detected in Japanese pediatric patients with acute gastroenteritis, 2014-2017. *J Med Virol* 2021;93:4865-74.
- 4) Oka et al. Polymerase chain reaction primer sets for the detection of genetically diverse human sapoviruses. *Arch Virol.* 2020; 165: 2335-40.
- 5) Okitsu et al. Changing distribution of rotavirus A genotypes circulating in Japanese children with acute gastroenteritis in outpatient clinic, 2014-2020. *J Infect Public Health* 2022; 8:816-25.
- 6) Khamrin, Okitsu et al. Multiple astrovirus MLB1, MLB2, VA2 clades, and classic Human astrovirus in children with acute gastroenteritis in Japan. *J Med Virol* 2016; 88: 356-360.
- 7) Okitsu et al. Molecular epidemiology of classic, MLB, and VA astroviruses in Japanese children with acute gastroenteritis, 2014-2021: Emergence of MLB3 strain in Japan. *Microbiol Spectrum* 2023; in press.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Okitsu S, Khamrin P, Thongprachum A, Hikita T, Kumthip K, Pham NTK, Takanashi S, Hayakawa S, Maneekarn N, Ushijima H. | 4. 巻<br>93                |
| 2. 論文標題<br>Diversity of human sapovirus genotypes detected in Japanese pediatric patients with acute gastroenteritis, 2014-2017 | 5. 発行年<br>2021年           |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Medical Virology   | 6. 最初と最後の頁<br>4865 ~ 4874 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1002/jmv.26934  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>該当する              |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Okitsu S, Khamrin P, Hikita T, Thongprachum A, Pham NTK, Hoque SA, Hayakawa S, Maneekarn N, Ushijima H.                                     | 4. 巻<br>15              |
| 2. 論文標題<br>Changing distribution of rotavirus A genotypes circulating in Japanese children with acute gastroenteritis in outpatient clinic, 2014-2020 | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Infection and Public Health  | 6. 最初と最後の頁<br>816 ~ 825 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.jiph.2022.06.009   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>該当する            |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>沖津 祥子、Khamrin Pattara、疋田 敏之、恩田 優子、Hoque Sheikh、早川 智、牛島 廣治。 |
| 2. 発表標題<br>日本の急性胃腸炎小児おけるアストロウイルスの検出と遺伝子型の検討                           |
| 3. 学会等名<br>第69回日本ウイルス学会学術集会   |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>沖津祥子、清水優子、Pham,TKN、Khamrin P、早川智、牛島廣治       |
| 2. 発表標題<br>2017～2020年における小児外来での急性胃腸炎患児におけるサボウスの検出と分子疫学 |
| 3. 学会等名<br>第62回日本臨床ウイルス学会学術集会                          |
| 4. 発表年<br>2021年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

日本大学医学部病態病理学系微生物学分野  
<http://www.nihon-u.med-microbe.jp/>

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)           | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                     | 備考 |
|-------|-------------------------------------|---|----|
| 研究協力者 | 牛島 廣治<br><br>(USHIJIMA Hiroshi)     | 日本大学・医学部病態病理学系微生物学分野・上級研究員<br><br>(32665) |    |
| 研究協力者 | 疋田 敏之<br><br>(HIKITA Toshiyuki)     | ひきた小児科クリニック・院長                            |    |
| 研究協力者 | カムリン パターラ<br><br>(KHAMRIN Pattara)  | チェンマイ大学・医学部・准教授                           |    |
| 研究協力者 | ホク シーク<br><br>(HOQUE Sheikh Ariful) | ダッカ大学・CARS・主席研究員                          |    |
| 研究協力者 | 恩田 優子<br><br>(ONDA-SHIMIZU Yuko)    | 日本大学・医学部病態病理学系微生物学分野・非常勤職員<br><br>(32665) |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関  |  |  |  |
|---------|----------|--|--|--|
| タイ      | チェンマイ大学  |  |  |  |
| バングラデシュ | ダッカ大学    |  |  |  |
| 米国      | ピッツバーグ大学 |  |  |  |