

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：84407

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460832

研究課題名(和文) ノロウイルスの変異率と流行に関する研究

研究課題名(英文) Impact of the rate of mutations on the norovirus epidemiology

研究代表者

左近 直美 (Sakon, Naomi)

大阪府立公衆衛生研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：50291216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ノロウイルスの長期にわたるシステムティックな疫学研究により、ノロウイルスに対する免疫は集団レベル、個体レベルともに遺伝子型特異的であり、その持続期間は2～3年であることを示した。また、繰返される感染によって免疫は増強されることが推察された。多様な遺伝子型の存在下で、年齢や感染歴を背景にダイナミックにヒトの中で流行している。これらはノロウイルスワクチンの基礎的知見となる。

研究成果の概要(英文)：The characteristics of natural immunity against norovirus were analyzed by long-term molecular epidemiological study involving systematic surveillance covering all age groups and routes of infection was performed in the province of Osaka, Japan. There was evidence at both the facility and individual levels that genotype-specific herd immunity lasted long enough to influence the endemic norovirus genotype in the next season. Thus, norovirus circulates through human populations in a uniquely dynamic fashion. We contribute to the basic knowledge of the norovirus vaccine development.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ノロウイルス 遺伝子型 変異 再感染 免疫

1. 研究開始当初の背景

ノロウイルスは数年おきに変異したウイルス株が世界的大流行を引き起こし社会経済に大きな損失を与える。細胞培養系および動物モデルがないことから、ワクチン、抗ウイルス薬等による予防対策や感染症の拡大防止対策への実効的な薬剤評価などが打ち出せない。特に、感染によって得られる獲得免疫については持続期間、多様な遺伝子型に対する防御能が実際の感染例から測定できない。ノロウイルスには 30 を超える遺伝子型があり、GII.4 は毎年流行を形成することが知られているが、この原因は十分解明されていない。過去の流行株の分子疫学的解析から、GII.4 の遺伝子変異速度は他の遺伝子型のノロウイルスよりも早いことが示唆されている。この GII.4 の変異速度は、高い変異率で知られる HIV やインフルエンザウイルスと同程度であることから、「GII.4 の高い変異率」が流行形成に関与するものと推測されている。しかし、これを直接的に証明した研究報告はない。

2. 研究の目的

ノロウイルスによる胃腸炎は毎年流行を繰返し、社会的経済的損失が極めて大きな感染症である。毎年流行を繰返す要因は明らかにされておらず、30 以上ある遺伝子型の中で、GII.4 は世界的大流行の原因となっている。ウイルスの変異が GII.4 流行持続の背景にあると推測されている。しかし、これを直接証明した研究はない。本研究は、長年収集した様々な感染者由来の試料を利用して、感染個体で増幅したウイルスの多様性 (in vivo) とウイルスがもつ RNA polymerase の fidelity (in vitro) を解析する。ヒト集団におけるノロウイルスの変異ベクトルを明らかにし、流行形成のメカニズムに関する理解を深化させ効果的な抑止法開発に繋げる。

3. 研究の方法

1) ノロウイルスの流行をシステマティックな検査体制に基づき、全年齢層を網羅した 10 年にわたる長期的で系統的な分子疫学的解析を行う。2002 年 4 月から 2012 年 3 月の 10 シーズンに大阪府管内(大阪市、堺市、東大阪市、高槻市を除く)において検出されたノロウイルスを対象とした。グループ A は小児散発例(15 歳未満)で 682 件、グループ B は 15 歳未満の集団発生 489 事例(1973 件)、成人におけるノロウイルスの流行を解析するため食中毒事例より明らかに成人集団(15 歳~65 歳)における発生と考えられる 368 事例(1,901 件)をグループ C とした。高齢者(65 歳以上)の集団発生 312 事例(1,186 件)をグループ D とした。ノロウイルスの同定には N/S 領域(ORF1C 末端から ORF2N 末端の約 300 塩基)に設計されたプライマーによる検出を行い、その領

域の塩基配列の相同性から遺伝子型別を行った。

年齢と有症期間の関連をみるため、集団発生事例における 63 事例 1,468 症例から経過表を基に年齢、遺伝子型別に有症期間をプロットし、Pearson 解析を行った。

2) 再感染および繰返される集団発生

解析対象期間内においてノロウイルス集団発生事例が複数回認められた施設および個人について、検出されたノロウイルスについて解析した。個人発症例は 2008 年 4 月から 2012 年 3 月までの 4 シーズンに小児科を受診し、感染性胃腸炎で当所に病原体検査依頼があった 806 患児 1153 検体を対象とした。

3) 個体内における変異

同一食中毒事例において同一汚染源からの感染とした場合、個体別に検出される変異について次世代シーケンサーを用いた deep sequencing 法にて解析した。また、一個体における同一遺伝子型の再感染におけるノロウイルス NS 領域の配列決定と変異ウイルス排泄期間内における変異を検索した。

4. 研究成果

1) グループ A, C, D は GII.4 が主要な遺伝子型であったが、グループ B はシーズンによって流行の主要遺伝子型が異なる特異的なパターンを示した。年齢構成が一致するグループ A, B における流行遺伝子型を 0 歳、1 歳、2 歳、3-5 歳、6-9 歳、10-14 歳別に解析した。グループ B はシーズンによる遺伝子型の特徴が認められたが、2 歳までは GII.4 が主要な株であることが分かった。2 歳までは両親との接触が多く、成人層の流行の影響を受けやすい。GII.4 の侵淫状況が他の遺伝子型に比べ大きいことを示した。

年齢の上昇と有症期間に有意な逆相関があることがわかった。(P < 0.00001, Pearson correlation coefficient test)。再感染によって有症期間が短縮される傾向が認められたが、年齢の上昇とともに有症期間が有意に減少することを初めて証明し、再感染によるブースト効果の可能性もしくは共通抗体の存在も考えられた。

2) 再感染および繰返される集団発生事例

調査期間にノロウイルス集団発生の繰返し事例数はグループ B で 38 施設 55 事例(集団発生 93 事例)、グループ D で 4 施設 4 事例(集団発生 8 事例)であった。グループ B において同一遺伝子型が繰返し検出された事例はわずか 3 事例であり、異なる遺伝子型が次の原因となっていた。個体レベルでは再検出が確認できたのは 16 患児 20 事例 36 検体であった。再検出者の年齢中央値は 1 歳 6 ヶ月(5 ヶ月~13 歳)、再検出の間

隔は平均 7.9 ヶ月(22 日~23 ヶ月)であった。16 事例からは異なる遺伝子型が、4 事例からは同一遺伝子型のノロウイルスを検出した。同一遺伝子型が検出された事例のうち、2 事例は異なるシーズンに GII.4 2006b と 2008a の cluster に属するウイルスに感染していた。その他 2 事例は 36 日後と 46 日後に検出領域の配列が 100%一致したウイルスが検出され、持続排泄と考えられた。再感染時の症状は先行する感染の症状と同じであった。GII.4 以外の遺伝子型による同一遺伝子型の再感染は認められなかった。自然感染における小児のノロウイルス再感染の実態をウイルス検出により直接的に明らかにすることが出来た。

3) 個体内における変異

個体内における変異がどの程度出現しているのかを検出するため、GII.4 と GII.6 を原因とした食中毒事例から 3 症例ずつを対象として N/S 領域のディープシーケンスを実施した。得られた配列において個体間、および個体内でアミノ酸置換を伴う変異は認められなかった。また、変異の出現は個体により差が大きく、個体要因が大きく関与すると考えられた。

次に、GII.3 感染症例について 12 日間 7 検体を採取した。VP1 および VP2 領域を RT-PCR にて増幅し、7 検体全てで増幅を確認した。増幅産物の deep sequence を実施した (MiSeq, Illumina) とし、得られたコンセンサスシーケンス 2483bp において塩基配列の相違は認めなかった。本症例では患児は嘔吐下痢を発症しておらず、不顕性感染を許容する免疫によるプレッシャーが変異株の出現を抑制できることが示唆された。変異株の出現には免疫回避が要因するとの報告があるが、ウイルス複製を許容する状況がなければ変異株の出現を説明できない。総じて、NV 感染における発症病理について、感染を完全に防御しないが、発症を防御する免疫レベルとこれを決定する未知の因子が存在することが示唆された。

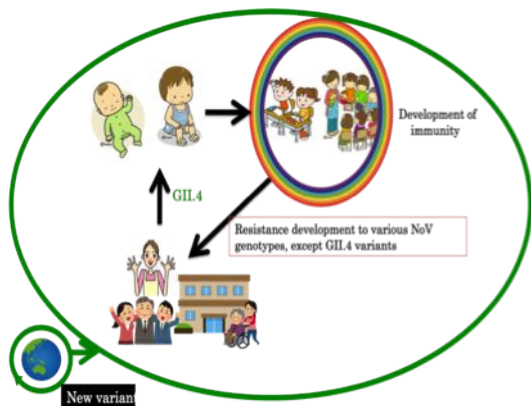


図. Norovirus circulation and acquisition of immunity.

以上の結果より、ノロウイルス流行におけるモデルを考えた。幼少期よりノロウイルスに繰り返し暴露、感染する。特に 2 歳までは両親からの感染が中心で成人での流行遺伝子型の影響を受ける。小児の間にはいくつかの中心となる遺伝子型に感染 (流行) し、それらへの抗体を獲得すると同時に、共通抗体、ブースト効果の存在が示唆された。世界的に流行する GII.4 は流行にともなって免疫プレッシャーを受け変異株を出現させ、新たな流行、再感染を引き起こしている。これらの結果は、ワクチン開発に基礎的な知見を提供する。

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 4 件)

1. Sakon N, Yamazaki K, Nakata K, Kanbayashi D, Yoda T, Mantani M, Kase T, Takahashi K, Komano J. Impact of Herd Immunity on the Circulatory Dynamism of Norovirus: A 10-year Longitudinal Study of Viral Acute Gastroenteritis. *J Infect Dis*. 査読有、211、2015、pp.879-888. doi: 10.1093/infdis/jiu496.
2. Chapellier B, Tange S, Tasaki H, Yoshida K, Zhou Y, Sakon N, Katayama K, Nakanishi A. Examination of a plasmid-based reverse genetics system for human astrovirus. *Microbiol Immunol*. 査読有、59(6)、2015、pp.586-596. doi: 10.1111/1348-0421.12317.
3. 上林大起、左近直美、入谷展弘、三好龍也 他 16 名. 大阪府におけるノロウイルスの流行状況 (2010-2013). 大阪府立公衆衛生研究所報、査読有、53、2015、pp.15-21.
4. 左近直美、加瀬哲男、新たなノロウイルス流行株に対する迅速体外診断薬の評価. 医学と薬学. 72、2015、pp.1895-1899.

[学会発表](計 4 件)

1. Sakon N, Motooka D, Nakamura S, Kase T, Komano J. An infant with repeated asymptomatic norovirus infection. 第63回日本ウイルス学会 福岡.2015.
2. Sakon N, Yamazaki K, Nakata K, Kanbayashi D, Yoda T, Mantanai M, Kase T, Takahashi K, Komano J. Genotype analysis of circulating norovirus - Implication to immunity against norovirus. The 13th Awaji International forum on infection and immunity. Nara.2014.
3. 左近直美、駒野淳、加瀬哲男. 小児集団胃腸炎におけるノロウイルス感染症の有症期間～ウイルス遺伝子型と年齢に関する解析. 第62回日本ウイルス学会. 横浜.2014.
4. 左近直美、萬谷雅宣、中田恵子、上林大起、駒野淳、加瀬哲男. 自然感染における小児のノロウイルス再感染. 第61回日本ウイルス学会. 神戸.2013

〔図書〕(計 0件)

〔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

<http://www.iph.pref.osaka.jp/infection/noro/noro.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

左近直美 (SAKON, Naomi)
大阪府立公衆衛生研究所・感染症部・
ウイルス課・主任研究員
研究者番号：50291216

(2)研究分担者

上林大起 (Kanbayashi, Daiki)
大阪府立公衆衛生研究所・感染症部・

ウイルス課・研究員
研究者番号：50622560

(3)連携研究者

中田恵子 (Nakata, Keiko)
大阪府立公衆衛生研究所・感染症部・
ウイルス課・主任研究員
研究者番号：50516747

(4)協力研究者

駒野淳 (KOMANO Jun)
国立病院機構名古屋医療センター臨床研
究センター・統括診療部・臨床検査科長
研究者番号：60356251

中村昇太 (NAKAMURA, Shota)
大阪大学・微生物病研究所・特任教授
研究者番号：90432434