

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860434

研究課題名(和文) インドネシアにおける新興ウイルスを含めた胃腸炎ウイルスの分子疫学及び臨床像の調査

研究課題名(英文) Investigation on molecular epidemiology and clinical features of diarrheal viruses including emerging strains in Indonesia

研究代表者

高梨 さやか (TAKANASHI, Sayaka)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：20645709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：インドネシア・マナド市小児科に入院した急性胃腸炎児441名の便検体を回収し、11種の下痢原性ウイルスを対象にRT-PCR法を施行した。262検体(59.4%)が陽性、うちA群ロタウイルス156検体(59.5%)、ノロウイルス G1143検体(16.4%)、アストロウイルス10検体(3.8%)、サポウイルスとパレコウイルス7検体(2.7%)、エンテロウイルス6検体(2.3%)、アデノウイルス5検体(2%)、ノロウイルスG13検体(1.1%)、アイチウイルス1検体(0.4%)で検出した。当該地域に侵因する胃腸炎ウイルスの多様性と、A群ロタウイルスのワクチンターゲットとしての重要性が再認識された。

研究成果の概要(英文)：Four hundred and forty one fecal specimens were collected from hospitalized pediatric patients and screened for diarrheal viruses by RT-PCR. Nine target viruses were detected in 262 out of 441 (59.4%) samples. Group A rotavirus (59.5%), followed by norovirus G11 (16.4%), were the most predominant viral agents. Other viruses such as astrovirus (3.8%), sapovirus (2.7%), human parechovirus (2.7%), enterovirus (2.3%), adenovirus (2%), norovirus G1 (1.1%), and Aichi virus (0.2%) were also detected. Rotavirus cases were found throughout the year, with two peaks in April and September. G1P[8] strain was the most prevalent (69.5%) G-P combination, followed by G3P[8] (16.8%). This study confirmed the diversity of viruses causing acute gastroenteritis among pediatric patients in Indonesia, with group A rotavirus being the most predominant viral agents. They emphasize the importance of introducing rotavirus vaccines in Indonesian children as a prevention strategy to reduce the disease burden.

研究分野：小児感染症

キーワード：急性胃腸炎 ロタウイルス ノロウイルス 小児 インドネシア

## 1. 研究開始当初の背景

WHO と UNICEF の共同研究チーム報告によると、2010 年の全世界 5 歳未満乳幼児死亡の約 6 割が感染症によるものであり、約 1 割 (約 75 万人) が下痢性疾患で生命を絶たれ、そのほとんどが発展途上にある国で発生していると推計されている (Liu et al., Lancet, 2012)。この重要な公衆衛生的問題に対処するためには、起因微生物の適切な同定法の確立と、有効なワクチン開発が必要であるが、急性胃腸炎の原因ウイルスの多様さ、その遺伝子型の種類の多さが大きな障壁となっている。

研究代表者の研究グループは、日本国内及びタイ、バングラデシュ、ベトナム等との共同研究の中で、多様な下痢原性ウイルスを検出する感度の良い遺伝子増幅系を構築し、従来より報告が多くみられているノロウイルスやロタウイルス、サポウイルス、アストロウイルス等に加えて近年では、アイチウイルス、パレコウイルス、ボカウイルス、サフォールドウイルスなどの新興する下痢症関連ウイルスの検出・遺伝学的特徴について発表してきた (Takanashi et al., J. Clin. Microbiol, 2011; Khamrin et al., Emerg. Infect. Dis., 2011; Pham and Takanashi et al., Emerg. Infect. Dis., 2010; Phan and Takanashi et al., J. Virol., 2007)。パレコウイルスは新生児期の発熱、ときに髄膜炎症状を呈する児からの検出報告、サフォールドウイルスはポリオが否定された急性弛緩性麻痺の児からの検出報告等で大きな注目を集めている。

インドネシアは東南アジア南部の熱帯国であり、下痢性疾患は新生児関連死、傷害死に次いで 5 歳未満乳幼児死亡の原因として第 3 位と重要な位置を占める。しかし、インドネシアにおいては新興胃腸炎ウイルスに関する報告は皆無で、ノロウイルスやロタウイルスに関しても 2000 年代に首都ジャカルタ周辺で実施された限られた検討のみである。

WHO は 2009 年の position paper においてロタウイルスワクチンの national immunization program 導入を推奨し、早晚同ワクチンが普及することが予想される中、胃腸炎ウイルスの病原性を加味した自然界における多様性の解明に貢献することは、global leader を目指す日本に求められる使命の一つと言える。

## 2. 研究の目的

(1) インドネシア・スラウェシ島北部マナド市内で急性胃腸炎症状による入院患児における下痢原性ウイルスの疫学情報 (季節性、患児の年齢分布、重症度) を得る。

(2) 遺伝子解析により、同地域に流行しているウイルスと reference 株との相同性を検証する。

## 3. 研究の方法

(1) 研究対象者

2013 年 4 月から 2014 年 7 月までインドネシア・マナド市 Sam Ratulangi 大学附属病院小児科に 24 時間以内に 3 回/日以上軟便または 1 回/日以上嘔吐を呈して入院した 0~5 歳までの患児 441 人を対象とした。

(2) ウイルス検出方法

我々が開発した RT-multiplex PCR 法 (Khamrin et al., J. Virol. Methods, 2011) を用い、便中から 11 種類の下痢原性ウイルス (ノロウイルス [NoV] Genogroup [G] I, GII, A 群ロタウイルス [RVA], B 群ロタウイルス, C 群ロタウイルス, アデノウイルス, アストロウイルス, エンテロウイルス, サポウイルス, アイチウイルス, パレコウイルス) の検出を行った。

(3) ウイルス遺伝子系統樹解析

PCR 増幅産物を用いて、direct sequencing 法にてウイルスの遺伝子配列を得た。ClustalX 及び MEGA6.06 を用いて系統樹解析を行った (Tamura et al., Mol Biol and Evol. 2007)。

(4) 倫理的配慮: インドネシア側 (Sam Ratulangi 大学 No:01/KEP/II) 及び日本側 (東京大学 No:10275) 双方の倫理委員会の承認を得た。

## 4. 研究成果

(1) 検出ウイルスとその季節性

262 検体 (59.4%) が何らかのウイルス陽性で、そのうち A 群ロタウイルス 156 検体 (59.5%)、ノロウイルス GII43 検体 (16.4%)、アストロウイルス 10 検体 (3.8%)、サポウイルスとパレコウイルス 7 検体 (2.7%)、エンテロウイルス 6 検体 (2.3%)、アデノウイルス 5 検体 (2%)、ノロウイルス GI3 検体 (1.1%)、アイチウイルス 1 検体 (0.4%) で検出した。RVA は年間を通じて認められたが、4 月の雨季に一つ、9 月の乾季にもう一つのピークがみられた (図 1)。

(2) RVA 陽性患児とウイルスが検出されなかった患児との臨床症状の比較

臨床情報は限られた内容のみ得ることができた。RVA 陽性患児はウイルスが検出されなかった児に比して発熱、脱水の割合が優位に高かったが、母乳栄養及び嘔吐の割合は両群で有意差はなかった (表 1)。

(3) RVA と NoV GII の遺伝子解析

RVA の G 遺伝子型として G1 が 75% と最多で、次いで G3 (16.8%)、G9 (1.4%)、G4 (0.5%) が検出され、2 検体は G3 と G9 の混合感染であった。P 遺伝子型としては P[8] が 94.1% と最多で、次いで P[6] (3.2%)、P[9] (0.5%) が検出され、3 検体は P[8] と P[6] の混合感染であった。GP combination としては G1P[8] が最多 (69.5%) で、次いで G3P[8] (16.8%) が多く検

出される傾向は他国同様であったが、G4P[6] や G1P[9] などの既報告の少ない株も検出された。NoV の遺伝子型としては、2013 年中に回収した 11 検体では GII.14 が最多 (45.4%)

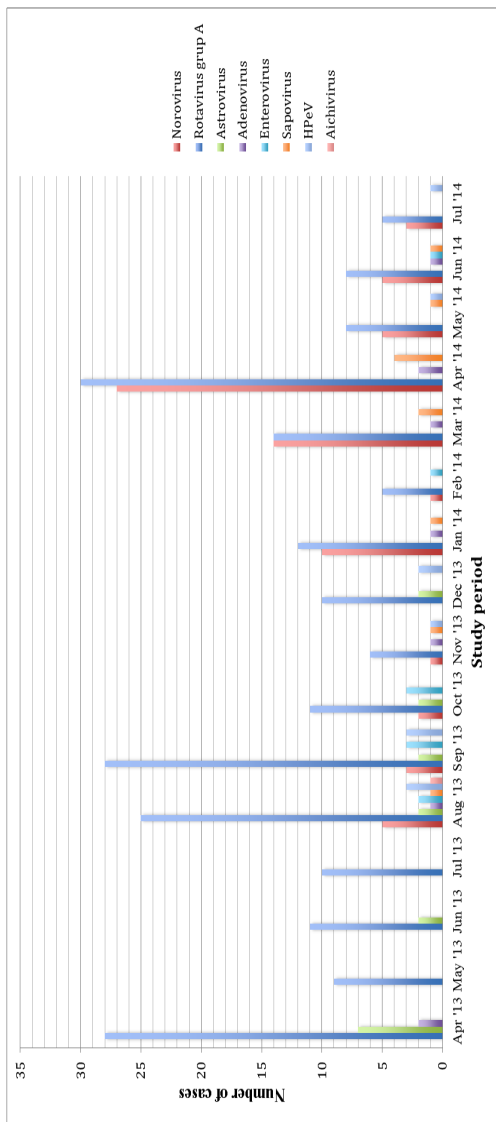


図1：2013年4月より2017年7月までに胃腸炎罹患児から検出されたウイルスの季節性

	Group A rotavirus positive (%)	Viral agent negative (%)	P value	OR
Fever	53	37	$3.3 \times 10^{-2}$ *	1.92
Vomiting	56	60	$66 \times 10^{-2}$	N/A
Dehydration	45	12	$5.3 \times 10^{-4}$ *	6
Breastfeeding history	37	27	$17 \times 10^{-2}$	N/A

\* : <0.05, statistically significant

表1：RVA 陽性患児とウイルスが検出されなかった患児との臨床症状の比較

で、その他 GII.3 (18.2%)、GII.4/Sydney/2012 (9.1%)、GII.6 (9.1%) が検出された。一方、2014 年中に回収した 43 検体では、GII.4/Sydney/2012 が最多(79.1%)で、その他 GII.17(11.6%)、GII.14 (4.7%)、GII.3 (2.3%)、GII.1 (2.3%) であり、全世界的に流行した variant である GII.4/Sydney/2012 のインドネシアへの侵淫が示唆された。

#### (4) RVA の系統樹解析

ブタで最も流行している RVA の遺伝子型は G4P[6] であるが、興味深いことに今回のスタディが対象としたヒト検体中にも G4P[6] を 1 株見出した。この株の VP7 遺伝子を解析し

たところ、インドおよびブラジルから検出されたブタ由来の株と高い相動性を示し、系統樹上はヒト由来の G4 株が属する G4a ではなく G4e lineage に属していた (図2)。VP4 遺伝子解析結果ではヒトから検出された lineage I および II に属する P[6] と近縁であり、ブタ由来の株 (例えば B176685/Por/Japan/2002 や M33516/Por/USA/1983) とは相動性が低かった (図3)。

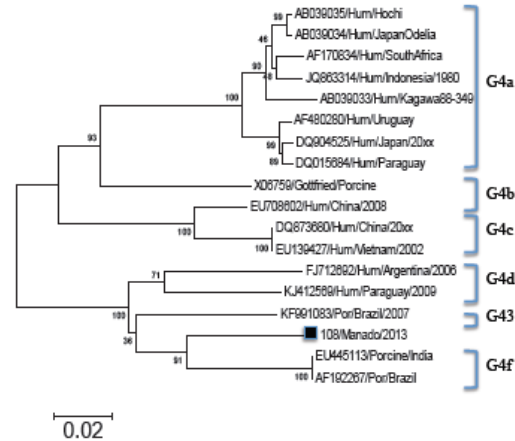


図2：Neighbour-joining method にて作成したヒトとブタ由来の RVA G4 株 VP7 遺伝子の系統樹 (今回のスタディで検出した株を 標記)

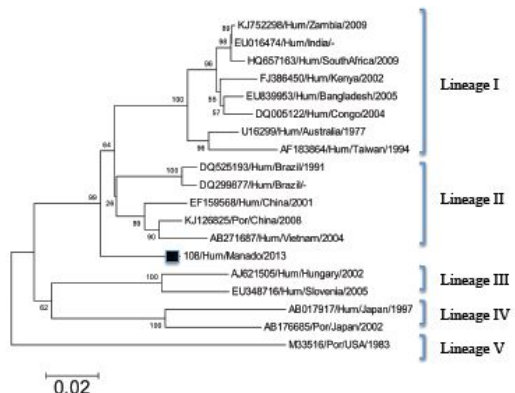


図3：Neighbour-joining method にて作成したヒトとブタ由来の RVA G4 株 VP4 遺伝子の系統樹 (今回のスタディで検出した株を 標記)

#### 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11件)

Takanashi S, Thongprachum A, Okitsu S, Nishimura S, Kobayashi M, Kikuta H, Yamamoto A, Sugita K, Baba T, Hayakawa S, Mizuguchi M, Ushijima H. Molecular epidemiological traits of group A rotaviruses in Japanese children during transitional period of rotavirus vaccine implementation, 2011-2014. Clin Lab. 2017 in press

( 査読あり )

Ushijima H, Thongprachum A, Khamrin P, Takanashi S, Okitsu S, Maneekarn N, Hayakawa S. Evaluation of Immunochromatography Tests and New Enzyme Immunoassay for Detection of Novel GII.17 Norovirus in Stool Samples. *Jpn J Infect Dis.* 2017 24;70(3):326-328. doi:

10.7883/yoken.JJID.2016.413 ( 査読あり )

Thongprachum A, Khamrin P, Pham NT, Takanashi S, Okitsu S, Shimizu H, Maneekarn N, Hayakawa S, Ushijima H. Multiplex RT-PCR for rapid detection of viruses commonly causing diarrhea in pediatric patients. *J Med Virol.* 2017;89(5):818-824. doi:

10.1002/jmv.24711 ( 査読あり )

Okitsu S, Khamrin P, Hanaoka N, Thongprachum A, Takanashi S, Fujimoto T, Mizuguchi M, Shimizu H, Hayakawa S, Maneekarn N, Ushijima H. Cosavirus (family Picornaviridae) in pigs in Thailand and Japan. *Arch Virol.* 2016;161:159-63. doi:

10.1007/s00705-015-2637-2 ( 査読あり )

Khamrin P, Thongprachum A, Takanashi S, Okitsu S, Maneekarn N, Hayakawa S, Ushijima H. Evaluation of immunochromatography tests for detection of novel GII.17 norovirus in stool samples. *Euro Surveill.* 2015 Jul 16;20(28).

<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=21185> ( 査読あり )

Ushijima H, Thongprachum A, Tran DN, Fujimoto T, Hanaoka N, Okitsu S, Takanashi S, Mizuguchi M, Hayakawa S. Rapid diagnostic tests apply for pediatric infections at outpatient clinic setting. *Clin Lab.* 2015;61(1-2):195-9. ( 査読あり )

Thongprachum A, Takanashi S, Kalesaran AF, Okitsu S, Mizuguchi M, Hayakawa S, Ushijima H. Four-year study of viruses that cause diarrhea in Japanese pediatric outpatients. *J Med Virol.* 2015;87(7):1141-8.

doi:10.1002/jmv.24155 ( 査読あり )

Okitsu S, Khamrin P, Thongprachum A, Nishimura S, Kalesaran AF, Takanashi S, Shimizu H, Hayakawa S, Mizuguchi M, Ushijima H. Detection and molecular characterization of human cosavirus in a pediatric patient with acute gastroenteritis, Japan. *Infect Genet Evol.* 2014 ;28:125-9. doi: 10.1016/j.meegid.2014.09.019 ( 査読あり )

り )

Ushijima H, Nishimura S, Thongprachum A, Shimizu-Onda Y, Tran DN, Pham NT, Takanashi S, Dey SK, Okitsu S, Yamazaki W, Mizuguchi M, Hayakawa S. Sensitive and rapid detection of campylobacter species from stools of children with diarrhea in Japan by the loop-mediated isothermal amplification method. *Jpn J Infect Dis.* 2014;67(5):374-8. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/67/5/67\\_374/article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/67/5/67_374/article) ( 査読あり )

Okitsu S, Khamrin P, Thongprachum A, Kalesaran AF, Takanashi S, Shimizu H, Maneekarn N, Mizuguchi M, Hayakawa S, Ushijima H. Molecular characterization and sequence analysis of the 2B region of Aichivirus C strains in Japan and Thailand. *Infect Genet Evol.* 2014 ;26:89-94. doi: 10.1016/j.meegid.2014.05.010. ( 査読あり )

Thongprachum A, Chan-It W, Khamrin P, Saparpakorn P, Okitsu S, Takanashi S, Mizuguchi M, Hayakawa S, Maneekarn N, Ushijima H. Molecular epidemiology of norovirus associated with gastroenteritis and emergence of norovirus GII.4 variant 2012 in Japanese pediatric patients. *Infect Genet Evol.* 23:65-73, 2014 doi: 10.1016/j.meegid.2014.01.030. ( 査読あり )

[ 学会発表 ] ( 計 19 件 )

金子明依、高梨さやか、井上茉南、崎山弘、沖津祥子、牛島廣治、水口雅. Rotarix 接種児の便から検出されたワクチン株 VP7 遺伝子の変異. 第 13 回日本小児消化管感染症研究会, 大阪大学中之島センター ( 大阪府大阪市 ), 2017/02/04, 11-5.39.

Thongprachum A, Pham K, 高梨さやか, 沖津祥子, 菊田英明, 山本あつ子, 小林正明, 杉田久美子, 西村修一, 馬場常嘉, 水口雅, 早川智, 牛島廣治. First report of salivirus (family of Picornaviridae) gastroenteritis in children in Japan. 第 48 回日本小児感染症学会総会・学術集会, 岡山コンベンションセンター ( 岡山県岡山市 ), 2016/11/19-20, G-2-17.

Aksara Thongprachum, Tsuguto Fujimoto, Sayaka Takanashi, Shoko Okitsu, Satoshi Hayakawa, Hiroshi Ushijima. A variety of virus commonly causing diarrhea detected in untreated sewage. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌コンベンションセンター ( 北海道札幌

市), 2016/10/23-25, W3-6-03.  
Hiroshi Ushijima, Hiroyuki Saito, Yuko Shimizu, Hiroko Sato, Aksara Thongprachum, Pattara Khamrin, Shoko Okitsu, Sayaka Takanashi, Niwat Maneekarn, Satoshi Hayakawa. Immune response against different genotypes of noroviruses in two adults with the recurrent Infection. 6th International Calicivirus Conference, (Savannah, USA) 2016/10/9-13, 03.2  
Ushijima H, Thongprachum A, Khamrin P, Okitsu S, Takanashi S, Maneekarn N, Hayakawa S. The gastroenteritis viruses circulating in Japanese pediatric patients. The 11th Japan-China International Conference of Virology, The 11th Japan-China International Conference of Virology (Kotoiki-so, Kagawa, Kagawa) 2016/07/01-02, (Rota/Reo/Noro/Enterovirus)  
Thongprachum Aksara, 沖津祥子, 高梨さやか, 早川智, 生島廣治. わが国小児のノロウイルス GII.17 胃腸炎の流行について. 第 57 回日本臨床ウイルス学会, 磐梯熱海温泉ホテル華の湯(福島県郡山市) 2016/06/18-19, 2B-25  
Nusrat Khandoker, Aksara Thongprachum, Sayaka Takanashi, Shoko Okitsu, Satoshi Hayakawa, Hiroshi Ushijima. Molecular Epidemiology of Group A Rotavirus in Children with Acute Gastroenteritis in Japan. 第 57 回日本臨床ウイルス学会, 磐梯熱海温泉ホテル華の湯(福島県郡山市), 2016/06/18-19, 2B-24. 76.  
金子明依, 高梨さやか, Thongprachum Aksara, 井上茉南, 沖津祥子, 早川智, 水口雅, 生島廣治. ロタウイルスワクチン様株に起因する急性胃腸炎の実態調査. 第 119 回日本小児科学会学術集会ロイトン札幌(北海道札幌市) 2016/05/13-15, 1-0-077  
高梨さやか, Thongprachum Aksara, 沖津祥子, 早川智, 水口雅, 生島廣治. 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分子疫学的特徴の解明 第 119 回日本小児科学会学術集会、ロイトン札幌(北海道札幌市) 2016/05/13-15, 研究助成-7  
Thongprachum Aksara, Takanashi S, Okitsu S, Hayakawa S, Ushijima H. Long-term survey on genetic diversity of norovirus in Japanese children. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡国際会議場(福岡県福岡市) 2015.11.22-24  
生島廣治, Thongprachum Aksara, Khamrin Pattara, 菊田英明, 山本あつ子, 西村修一, 小林正明, 杉田久美子, 馬場常嘉,

疋田敏之, 中山栄一, 清水英明, 清水優子, 高梨さやか, 沖津祥子, 早川智. 2014/2015 のノロウイルスの特徴 - GII.17 とイムノクロマトとの関連を中心に - 第 47 回日本小児感染症学会総会、学術集会、ザ・セレクトン福島(福島県福島市) 2015.10.31-11.1. D-1-23  
高梨 さやか (指定発言). Multiplex-PCR を用いて診断したパレコウイルス感染症 2 か月男児例. 第 614 回日本小児科学会東京都地方会講話会、慈恵会医科大学(東京都港区) 2014 年 12 月 8 日.  
高梨さやか, Thongprachum Aksara, 沖津祥子, 早川智, 生島廣治. 日本の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分子疫学的検討. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2014 年 11 月 10 日 ~ 12 日 P1-045  
Angela Kalesaran, Aksara Thongprachum, 高梨さやか, 沖津祥子, 早川智, 生島廣治. Molecular epidemiology of circulating rotavirus in hospitalized acute gastroenteritis children, in North Sulawesi, in Indonesia. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2014 年 11 月 10 日 ~ 12 日 P1-048  
Pattara Khamrin, Aksara Thongprachum, 高梨さやか, 沖津祥子, 清水英明, 早川智, 生島廣治. Multiple novel astroviruses in children with acute gastroenteritis in Japan. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2014 年 11 月 10 日 ~ 12 日 02-6-10  
A. F. C. Kalesaran, A. Thongprachum, D. H. C. Pangemanan, S. Takanashi, S. Okitsu, S. Hayakawa, S. M. Warouw, M. Mizuguchi, H. Ushijima. Circulating rotavirus in hospitalized pediatric patients, with the predominance of G1P[8] DS-1-like human rotavirus in Manado, Indonesia. International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance 2014, (Vienna, Austria) 2014 October 31-November 3. 23.174  
Kalesaran Angela, Thongprachum Aksara, 高梨さやか, 沖津祥子, Pangemanan H. C., Damajanty, Warouw M. Sarah, 早川智, 水口雅, 生島廣治. Molecular detection of diarrheal viruses associated with acute gastroenteritis in pediatric patients in Indonesia. 第 46 回日本小児感染症学会、京王プラザホテル(東京都新宿区) 2014 年 10 月 18 日 ~ 19 日 H-2-17  
杉本美紀, 森川美佳, 武井 剛, 星野英紀, 村田 敬寛, 檜垣(狩野) 博嗣, 井

田孔明、渡辺 博、高梨さやか、水口 雅、  
牛島廣治、高橋尚人、岡 明. 可逆性の脳  
梁膨大部病変を伴ったロタウイルス脳症  
の1例. 第46回日本小児感染症学会、京  
王プラザホテル(東京都新宿区)、2014  
年10月18日~19日 H-2-8

Shoko Okitsu, Pattara Khamrin, Aksara  
Thongprachum, Shuichi Nishimura,  
Sayaka Takanashi, Hiroyuki Shimizu,  
Satoshi Hayakawa, Hiroshi Ushijima.  
Detection and genetic  
characterization of human cosavirus in  
a pediatric patient with diarrhea,  
Japan. International Union of  
Microbiological Societies Congresses  
2014, (Montreal, Canada) 2014 July  
27-August 1. VIR-PM2045

〔図書〕(計 1件)

高梨 さやか. ロタウイルスワクチン.  
予防接種小児科臨床ピクシス 4 (渡辺  
博 監修). pp.122-129, 中山書店, 東  
京, 2014.

〔産業財産権〕  
該当なし

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.development.m.u-tokyo.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高梨 さやか (TAKANASHI, Sayaka)  
東京大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 20645709

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

牛島 廣治 (USHIJIMA, Hiroshi)  
日本大学・医学部・上席研究員  
研究者番号: 10091068

沖津 祥子 (OKITSU, Shoko)  
日本大学・医学部・客員研究員  
研究者番号: 10082215

### (4) 研究協力者

カレサラン アンジェラ (KALESARAN Angela)  
トンプラチュム アクサラ (THONGPRACHUM  
Aksara)