

令和元年6月6日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A) (海外学術調査)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02772

研究課題名(和文) 熱帯地域における小児下痢症原因ウイルスの多様性と感染伝播動態

研究課題名(英文) Genetic diversity and transmission dynamics of viral pathogen causing child diarrhea in tropical region

研究代表者

斉藤 繭子 (SAITO, MAYUKO)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：20598031

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,200,000円

研究成果の概要(和文)：ノロウイルスはウイルス性下痢症の病原ウイルスとして、年齢層によらず最も多く検出されるウイルスであり、発展途上国では年間20万人がノロウイルスによる下痢症で死亡していると推測されているが、ワクチンは商品化されていない。本研究ではフィリピン共和国のコミュニティにおいて、乳幼児とその家族の前向きコホート調査を行い、無症候期、下痢症期、回復期におけるノロウイルスの検出率、家族内感染率の算出やウイルス遺伝子解析を行った。さらに、ペルー共和国で行ったコホート研究の保存検体を用い、生後2年間のサポウイルス感染率、下痢症期・無症候期に検出される割合など疫学的解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ノロウイルスは、日本では食中毒の原因病原体として報告されることが多いが、家庭や施設内では、ヒトの排泄物に含まれたウイルスがさらにヒトへ感染することが感染予防の上で重要な課題である。乳幼児の便にノロウイルスが高率に検出されることは、近年低・中所得国でも報告されているが、無症候時や回復期も含めた報告は東南アジアでは初めてであり、これまでの家庭内での感染率についての報告は、小規模で限定的であった。本研究の成果は、ウイルスが宿主免疫を回避しながら進化するメカニズムの研究などに繋げることができる。また、近隣国における感染状況の把握は輸入感染症予防の面で意義があると考えている。

研究成果の概要(英文)：Norovirus is the virus most frequently detected in patients with viral diarrhea regardless of age group. In developing countries, it is estimated that norovirus diarrhea causes 200,000 death annually. However, the vaccine against norovirus infection has not been commercialized. In this study, we conducted a prospective cohort study of infants and their families in communities in the Philippines, and calculated the detection rate of norovirus in the asymptomatic period, diarrhea episodes and convalescent period, the infection rate among families, and analyzed genotype of viruses. In addition, epidemiological analyses were performed to calculate sapovirus infection rate up to two years of age, the positive prevalence during diarrhea episodes and asymptomatic periods, using archived samples in a cohort study, which was conducted in Peru.

研究分野：国際保健、感染症疫学、ウイルス学

キーワード：ノロウイルス サポウイルス ウイルス性下痢症 国際保健 感染症疫学 小児感染症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ノロウイルスはウイルス性下痢症の病原ウイルスとして、年齢層によらず最も多く検出されるウイルスである。欧米や日本では秋～冬期に多く発生し、日本では食中毒の原因としては細菌を含めても最も多く報告される病原体である。一方、発展途上国では年間 20 万人がノロウイルスによる下痢症で死亡していると推測され(1)、培養方法が確立していないため、ワクチンや治療薬、予防法に関する研究は遅れている。研究者らの先行研究では生後 2 年間にノロウイルス感染症は複数回、異なる遺伝子型に感染していることや、無症候であっても 10%以上にノロウイルス遺伝子が検出され、感染者の半数以上でその排出が1か月以上遷延することを報告した(2)。同じカリシウイルス科のサポウイルス感染症については、下痢症の起因ウイルスとして認識されているものの、ノロウイルスと同様に培養方法が確立しておらず、感染症学についての報告も限定的である。ロタウイルスワクチン導入後に相対的にこれらのウイルスの重要性は増しており、ワクチンを含めた感染予防対策のためには、感染症疫学的基盤の構築が不可欠である。

2. 研究の目的

本研究ではノロウイルス陽性例におけるウイルス遺伝子の遺伝子型の多様性、反復感染、ウイルス遺伝子の排出期間とそれに伴う家族内感染、伝播動態を明らかにし、今後の感染対策に役立てる目的とする。平行して同じカリシウイルス科のサポウイルス感染症についても解析を行う。

3. 研究の方法

フィリピン、ターラック市近郊のコミュニティにおいて、2才未満の乳幼児と同居する家族を対象とした前向きコホート調査を行った。家庭訪問にて2年間下痢症状の有無を確認し、3ヶ月ごとに定期的に乳幼児から便検体を採取した。下痢症を発症した際は、本人とその家族、および無作為に抽出した下痢症状のない他の乳幼児コホートとその家族(対照群)の便検体の提供を受け、ノロウイルス感染率についての症例対照研究を行った。ノロウイルス遺伝子グループ I (GI) と II (GII)、サポウイルス、ロタウイルスの検出をリアルタイム PCR 法で行い、ノロウイルスが陽性であった検体については遺伝子配列の解析 (NoroNet: <https://www.rivm.nl/en/noronet>) により遺伝子型を同定した。下痢症期・無症候期におけるノロウイルスの検出率、ノロウイルスの遺伝子型、反復感染、回復後のノロウイルス陽性率の解析を行った。さらに、ペルー共和国で行った出生コホート研究の保存検体を用い、サポウイルスの検出を行い、生後 2 年間の感染率、下痢症期・無症候期に検出される割合等を推定した。

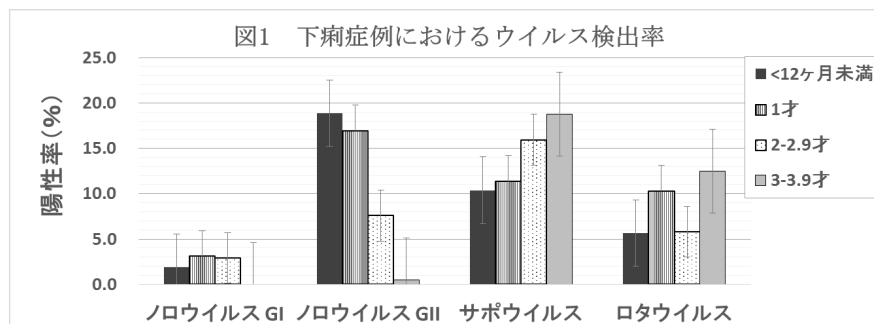
4. 研究成果

(1) 臨床検体と疫学データの収集

フィリピン共和国のコホート研究には 390 名の乳幼児コホートとその家族 1,246 名の合計 1,636 名が参加し、乳幼児コホートから 543 の下痢症のエピソードの便検体の提供を受けた。定期的に提供を受けた便検体、家族の検体、下痢症後の経過観察時など合計 6,451 の便検体の提供を受けた。

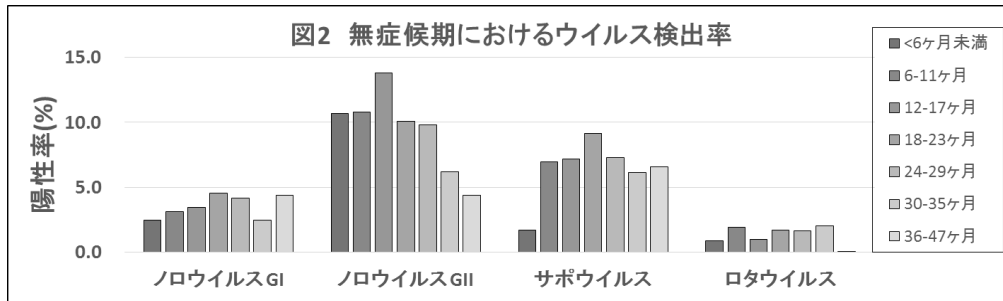
(2) フィリピン共和国のコホート 0-4 才児の便検体におけるノロウイルス・サポウイルス・ロタウイルス検出率

下痢症期に採取された便検体におけるノロウイルス GII、サポウイルス、ロタウイルスの検出率はそれぞれ 13.4%、12.5%、8.3%であった。(本研究に参加した乳幼児においては、ロタウイルスワクチン接種を受けていたものは 10%未満であった。) ノロウイルス GII の



検出率が年齢と共に減少するのに対して、サポウイルスでは 2 才、3 才での検出率が上昇するという異なる年齢の影響が見られた(図 1)。一方、無症候期の便検体においてもノロウイルス GII は 10.5%、サポウイルスは 7.3%の検体から検出され(図 2)、これは無症候期では 1.5%と低い割合でしか検出されなかったロタウイルスと非常に対照的であった。感染

後にウイルスを完全に排除できない可能性や、ウイルス保有者が一定の割合で存在することが明らかになった。ノロウイルス GI は下痢症症例（2.7%）、無症候期（3.7%）のいずれにおいても低い割合で検出された。



(3) ノロウイルスの反復感染の頻度と遺伝子型

無症候期を含めたノロウイルスの感染歴（合計 341）を、排出期間も考慮した上で個人別に見ると 214 名に少なくとも 1 回の感染歴があり、95 名で複数回、そのうち 18 名で 3 回、7 名で 4 回の感染歴が認められた。341 の感染のうち、78%（267/341）でノロウイルスの遺伝子型まで確認が可能であったが（表 1）、それによると同じ遺伝子型の反復感染は認めなかった。これは、先行研究で報告した 2 才までの出生コホート(2)とノロウイルス感染後に遺伝子型に特異的な免疫が維持されている可能性が示唆された。

(4) ノロウイルス陽性下痢症の回復期のノロウイルス陽性率

下痢症を認め、便検体の提供があった 543 例のうち、76 例についてノロウイルスが検出され、下痢症状回復後 8～14 日目、15～30 日目、30～61 日目のノロウイルス検出率はそれぞれ 34%、35%、16%であり、症状回復後も比較的多くの症例でノロウイルスが検出された。これが無症候期にもノロウイルスが検出されたことの原因の一つと考えられた。

(5) ノロウイルスの家族内感染率

乳幼児コホートに下痢症を認めた際に、ノロウイルスが陰性であった場合は家族におけるノロウイルスの検出率は 4%（19/426）であったが、ノロウイルスが陽性だった場合には家族からの検出率は 24%（46/190）と有意に高かった（オッズ比 6.8 [3.8-12.8]、 $P < 0.0001$ ）。無症候の乳幼児を対象として選択したコントロール群においてもノロウイルスが陰性であった場合には家族の陽性率が 3%（14/487）であったのに対し、乳幼児コホートがノロウイルス陽性であった場合は 15%（8/51）と有意に高く（オッズ比 6.3 [2.1-17.1]、 $P < 0.0001$ ）家族内でのノロウイルスの伝播が乳幼児のノロウイルス感染の有無と強く相関していることが明らかになった。

(6) ノロウイルスの遺伝子型解析結果

フィリピン共和国のコホート研究で得られたノロウイルス陽性検体のうち、ノロウイルスのポリメラーゼ、カプシド領域の遺伝子配列の解析結果は、GI、GII でそれぞれ 11 種類の組み合わせ、合計 22 種類を検出した（表 1）。ノロウイルスはポリメラーゼとカプシド領域の間で組み替えが起こりやすいが、組み換え型が疑われるものは GI で 4 種類、GII で 8 種類の合計 12 種類であり、全体の半数以上を占めノロウイルスの多様性が明らかになった。

表1: フィリピンのコホート調査で検出されたノロウイルスGI、GIIのポリメラーゼ領域とカプシド領域の遺伝子型

ノロウイルス	遺伝子型	
	組み換えなし	組み換えあり
遺伝子グループ I (GI)	GI.P1_GI.1, GIP3_GI.3, GIP.4_GI.4, GIP.5_GI.5, GIP6_GI.6, GI.P7_GI.7, GI.P9_GI.9	GI.Pa_GI.3, GI.Pb_GI.3, GI.Pb_GI.6, GI.Pd_GI.3
遺伝子グループ II (GII)	GII.P7_GII.7, GII.P15_GII.15, GII.P17_GII.17,	GII.P7_GII.6, GII.P12_GII.3, GII.P16_GII.2, GII.P16_GII.4, , GII.P16_GII.5, GII.P16_GII.13, GII.Pe_GII.4, GII.Pe_GII.2

(7) フィリピン共和国とペルー共和国におけるノロウイルス、サポウイルス感染率の比較

研究者らが本研究に先立ってペルー共和国で行った出生コホート研究(2)での観察期間は0-1才の2年間であり、本研究で施行したフィリピン共和国のコホート研究では2-3才児におけるこれらのウイルスの検出率、同時にロタウイルスの検出率も明らかにすることができた。ノロウイルス GII が検出される割合は2才以降に下痢症期、無症候期のいずれにおいても減少したが、ノロウイルス GI、サポウイルス、ロタウイルスでは減少傾向は認めないことが明らかになった(図1、図2)。

一方、ペルー共和国で保存されていた便検体のうち、コホート研究で生後2年間経過観察をすることができた100名を選出し、さらに下痢症状期と無症候期(3ヶ月ごと)の検体をリアルタイム法でサポウイルスを検出したところ、1才以降に下痢症期にサポウイルスが検出される割合は明らかに増加していた(3)。これはフィリピン共和国のコホート研究では、下痢症例から検出される割合は生後6ヶ月以降に増加し、0才と1才で比較すると、微増であったことと異なっている。また、同年齢期の検出率を比較すると、ペルー共和国でのノロウイルス、サポウイルスの検出率はフィリピン共和国での結果に比べて共に高い傾向にあった。これは、ノロウイルス検出においては、ペルー共和国の研究(2)では検出にワンステップのリアルタイムPCR法(相補的DNAを合成する逆転写とPCRを同じチューブで行う方法)を用いたこと、サポウイルス、ノロウイルス共に抽出キットが異なることなど、フィリピン共和国での検出法はペルー共和国でのそれよりも技術的に感度が低かった可能性がある。そのほか、宿主の背景因子としてノロウイルス感染との関連が示唆されている分泌型(ノロウイルスが吸着する糖鎖が細胞表面に発現する傾向があること)がペルーの人口に占める割合が非常に高い(>95%)ことや、その他の宿主因子・環境因子・他の病原体の分布が異なる可能性があり、感染リスクとなる因子について、今後更なる解析が必要である。

遺伝子型については一つのコミュニティレベルで異なる遺伝子型を持つ多様なノロウイルス、サポウイルスが流行しているという点では両国で同様の結果を得た。

<引用文献>

- (1) Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, Akazawa K, Vinjé J, Parashar UD. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg Infect Dis*. 2008;14:1224-31.
- (2) Saito M, Goel-Apaza S, Espetia S, Velasquez D, Cabrera L, Loli S, Crabtree JE, Black RE, Kosek M, Checkley W, Zimic M, Bern C, Cama V, Gilman RH; Norovirus Working Group in Peru. Multiple norovirus infections in a birth cohort in a Peruvian Periurban community. *Clin Infect Dis*. 2014;58:483-91.
- (3) Epidemiology of Sapovirus Infections in a Birth Cohort in Peru. Sánchez GJ, Mayta H, Pajuelo MJ, Neira K, Xiaofang L, Cabrera L, Ballard SB, Crabtree, Kelleher D, Cama V, Bern C, Oshitani H, Gilman RH, Saito M; Sapovirus Working Group. *Clin Infect Dis*. 2018;66:1858-1863.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

1. Sánchez GJ, Mayta H, Pajuelo MJ, Neira K, Xiaofang L, Cabrera L, Ballard SB, Crabtree, Kelleher D, Cama V, Bern C, Oshitani H, Gilman RH, Saito M; Sapovirus Working Group. Epidemiology of Sapovirus Infections in a Birth Cohort in Peru. *Clin Infect Dis*(査読有). 2018;66:1858-1863. doi:10.1093/cid/cix1103.
2. 齊藤繭子. ノロウイルス疫学研究のつば. *新潟医学会雑誌*(査読無). 2018年:第132巻、第7号、276-280.(新潟大学ミャンマー拠点(J-GRID)と新興再興感染症シンポジウム講演録).
3. Kagning Tsinda E, Malasao R, Furuse Y, Gilman RH, Liu X, Apaza S, Espetia S, Cama V, Oshitani H, Saito M. Complete Coding Genome Sequences of Uncommon GII.8 Sapovirus Strains Identified in Diarrhea Samples Collected from Peruvian Children. *Genome Announc*(査読有). 2017;26;5 pii:e01137-17. doi:10.1128/genomeA.01137-17.

[学会発表](計1件)

喜多浩士、当廣謙太郎、Joseph Bonifacio、川村和久、野口光徳、阿部智美、岡本道子、Robert H. Gilman、齊藤繭子、押谷仁. ノロウイルス GI のポリメラーゼ領域とカプシド領域を含んだPCRの検出系の開発と検査特性の評価. 第69回日本細菌学会東北支部総会. 2018年8月17-18日. 仙台.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

- (1) 齊藤繭子. フィールド分子疫学で知るノロウイルス, 第 17 回みちのくウイルス塾, 2018 年 7 月 14-15 日, 仙台.(講演)
- (2) 齊藤繭子. ノロウイルス, サポウイルス感染症の研究課題, 地方衛生研究所地域専門家会議, 2017 年 9 月 29 日, 仙台.(講演)

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 古瀬 祐気

ローマ字氏名: Furuse Yuki

所属研究機関名: 京都大学

部局名: ウイルス・再生医化学研究所

職名: 特定助教

研究者番号(8桁): 50740940

研究分担者氏名: 齊藤 麻理子(小畑 麻理子)

ローマ字氏名: Saito Mariko (Obata Mariko)

所属研究機関名: 東北大学

部局名: 大学院医学研究科

職名: 助教

研究者番号(8桁): 80404234

(2)研究協力者

研究協力者氏名: Amado Tandoc III

研究協力者氏名: Robert H. Gilman

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。