様式C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成２２年　６月　１日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2009
課題番号：１９６０４００１
研究課題名（和文）　ウイルス性胃腸炎の疫学、治療、予防に関する研究ーノロウイルスとＥ型肝炎ウイルスー
研究課題名（英文）　Study on molecular epidemiology, treatment, and prevention of viral gastroenteritis –norovirus and hepatitis E virus-

研究代表者
沖津　祥子（OKITSU SHOKO）
藍野学院短期大学・第一看護学科・講師
研究者番号：10082215

研究成果の概要（和文）：①日本、アジア各国における乳幼児急性胃腸炎検体からノロウイルスを検出し、検出頻度、ウイルスの遺伝子解析を行った。ノロウイルス迅速診断キットを開発し、その評価を臨床検体にて行った。②タイおよび日本の飼育ブタ検体(血清または糞便)からＥ型肝炎ウイルスの検出および抗Ｅ型肝炎ウイルス抗体価の測定を行った。③ヒトパレコウイルス、ボカウイルスを乳幼児急性胃腸炎検体から、ブタコブウイルスをタイ、日本のブタ糞便検体から検出した。

研究成果の概要（英文）：1.This study reported the detection and genetic characterization of norovirus in the stool samples collected from infants and children with acute gastroenteritis in Japan, Thailand, Vietnam, and Sri Lanka. Furthermore, this study also evaluated the newly developed immunochromatography assay kit for the rapid and easily detection of norovirus in clinical stool samples. 2. In this study, the report is about the detection of hepatitis E virus (HEV) in healthy porcine samples (serum and stool) collected from Thailand and Japan, and the detection of anti-HEV antibody titers in the serum samples from healthy pigs in Thailand. 3. This study reported the detection of human parechovirus and human bocavirus in the stool samples collected from infants and children with acute gastroenteritis, and detection of porcine kobuvirus in the porcine stool samples from Thailand and Japan.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2007 年度	1,800,000	116,682	1,916,682
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総　計	3,500,000	626,682	4,126,682

研究分野：国際保健学、ウイルス学
科研費の分科・細目：国際保健医療研究
キーワード：　ウイルス、感染症、環境、食品、抗体、アジア、人獣共通感染症

１．研究開始当初の背景

ウイルス性胃腸炎による死亡者は開発国では少ないものの、開発途上国では依然として多くロタウイルスによる死者だけでも年間 44 万人いると推定される。この疾患の主たる原因ウイルスとしてはロタウイルス、ノロウイルス、腸管アデノウイルス、サポウイルス、アストロウイルスが知られている。ロタウイルスについてはワクチンが実用化され、臨床試験も終了して世界中の国で使用できるようになってきた。それに伴い流行疫学研究が開発途上国においても進んできたが、その他のウイルスに関しては疫学的調査もその端緒についたところであった。ノロウイルス(NoV)は日本ではロタウイルスに次いで頻度が高く、食中毒の原因ウイルスとしても注目されており、感染性が高く、院内感染や施設内感染などヒトーヒト感染が注目されている。このウイルスの免疫学的検査法開発が遅れていたのは、試験管内培養ができないことと、抗原性の異なる genotype が多く存在するためであった。我々の研究グループでは日本の急性胃腸炎患者検体を用いて分子疫学的研究を行い、その研究をもとに迅速診断のできるイムノクロマトキットの開発を行ってきた。一方、E 型肝炎ウイルスは消化器症状を伴う急性肝炎を引き起こすウイルスで、アフリカ、アジア諸国では流行性肝炎の重要な起因ウイルスとなっている。これらの流行国では、食物、動物、水などの環境全体の対策が必要である。日本などの開発国では豚肉や野生動物の生食による感染が報告され、人獣共通感染症としての側面が注目されている。

２．研究の目的

この研究では NoV に焦点をあて、日本を初めアジア各国における疫学、治療、予防に関する研究を行うことを目的とする。感染予防をするためには迅速簡易な診断法の開発が重要である。そのための方法として抗原抗体反応を利用したイムノクロマトキットの開発を行い、臨床検体を用いてキットの評価を行った。ウイルスが変異しやすいことからキット検出能の監視と、流行疫学は必須である。さらに、日本では食中毒の原因ウイルスとして近年注目され、アジアでは流行性肝炎の原因ウイルスである E 型肝炎ウイルスの検出をタイおよび日本のブタ検体から試みた。一方、日本で小児科外来を訪れ急性胃腸炎と診断された患者の検体から、5 種類の主たる下痢症ウイルスの検出を試みても約 50%あまりの検体ではウイルスは検出されない。このことから今まで知られていないウイルスの存在も考えられるようになってきた。さらにアジアではヒトと動物の生活が近いことからウイルスが人獣共通感染することが多い。そのためにおこるウイルスの変異や新しいウイルスの興隆がおきる。ここではアイチウイルス、ヒトパレコウイルス、ボカウイルスなどの検出も行い、そのウイルスの解析を行った。

３．研究の方法

(1) 日本国内(北海道、東京、静岡、京都、大阪、佐賀)の小児科外来を受診し、ウイルス性胃腸炎と診断された乳幼児の下痢検体から、核酸を抽出し、RT-PCR 法によりウイルスの検出を行った。陽性検体に関しては配列決定を行い、ウイルスの分子遺伝学的解析を行った。

(2) アジア各国（タイ・チェンマイ、ベトナム・ホーチミン市、スリランカ・キャンディ）のウイルス性胃腸炎罹患乳幼児検体も上記と同様にウイルス検出を行い、陽性検体に関してはウイルスの配列決定とその解析を行った。

(3) 日本産､中国産の生カキから核酸を抽出し、下痢症起因 NoV の検出を行った。

(4) タイ･チェンマイ近郊の農場で健康なブタの血清を採取し､上記と同様にウイルスの検出を行った。また血清中の抗 E 型肝炎ウイルス抗体価を市販キットにより測定した。

(5) タイ･チェンマイ近郊の農場で飼育されている下痢症状を呈している仔ブタの便検体および日本の健康なブタ糞便から、ウイルスを検出し、その配列解析を行った。

(6) ヒトに感染する NoV のカプシド遺伝子を利用して virus-like particle(VLP)を作製し、これを抗原としてマウス、ウサギに免疫し､モノクローナル抗体を作製した。これらの抗体の抗原特異性を調べた。

(7) 上記で作製したモノクローナル抗体を使用して NoV 診断キットを開発し、臨床検体を用いてその評価を行った。対照法としては RT-PCR 法を用いた。

４．研究成果

(1) 国内産および中国産の生ガキ（加熱調理用）から NoV 検出を行った。ともに 6.7%で陽性となり、そのウイルスの配列は、近年の流行株と 99%一致した。

(2) 日本の 2005～2006 年では NoV（8.5%）の最頻出遺伝子型は GII.3 で、GII.4 と合わせて 90%となった。GII.3 の variant が最頻出株であった。2006～

2007 年（総検体数 628）には NoV は 14.4%で検出された。その遺伝子型は GII.4 が 91%であった。2007 年～2008 年(総検体数 477)では 19.3%の NoV が検出され、その遺伝子型は GII.4(77.2％)が最も多く、続いて GII.13(12.0%)、GI.4(7.6%)、GII.3(3.3%)であった。GII.4 はすべて 2006b cluster に属していた。すべての GII.13 株は GII.6(polymerase)領域と GII.13(capsid 領域)での recombinant 株であった。2008～2009 年(総検体数 662)では 32.6%の NoV が検出された。最頻出株は GII.4/2006b 株で 59.8%であった。GII.6/GII.13 recombinant 株は殆ど検出されなかった。GII.6 はすべて新しい cluster に属していた。このように NoV の流行には毎年、抗原性や、遺伝子構造に変遷が認められ、抗原抗体反応による検出や将来のワクチン開発を考えると、疫学的研究が重要であることを再認識した。

(3) アジア各国の急性下痢症乳幼児検体について NoV の分子疫学を行った。タイ・チェンマイの 2002-2004 年の NoV は GII/4 が最頻出株であった。2005 年では 6.8%が陽性で genotype は GII.4 が最も多く、GII.15、GII.6、GII.12 が続いた。GII.4 は新しい変異株であった。ベトナム・ホーチミン市における 2002-2003 年の解析では、NoV GII が A 群ロタウイルス続いて多く 5.5%であった。2005-2006 年の NoV として世界中で流行した 2006a、2006b という GII.4 の変異株が検出された。スリランカ（2005～2006 年）では NoV GII を８％の検体から検出した。この国での NoV 検出は初の報告である。今回の検体は流行株の GII.３、GII.4 が半数以上であったが、GII.9 や GII.16 などの珍しい遺伝子型も検出された。

(4) ヒトに感染する NoV の多くの遺伝子型と反応するモノクローナル抗体を作製し、そのエピトープを決定した。カプシドの P1 領域の立体構造に反応する抗体で、初の報告である。

(5) 上記抗体を使用して NoV を迅速、簡易に検出するイムノクロマトキットを作製し、その評価を行った。最初に作製したキットは最頻出の GII.3 および GII.4 を検出できるキットであった。RT-PCR 法と比較すると、感度 74～79%、精度 96～100%、一致率 92～95%で、他社 IC 製品とほぼ同様であった。次に広範囲な遺伝子型を検出できるキットを作製し、日本の近年(2007-2008 年)の検体を用いて評価を行った。RT-PCR 法を基準として感度（75.4%）、特異度（100%）、一致率（80%）であった。近年の流行株である GII.4/2006b cluster に属する株も検出可能であった。新たにして作製した NoVGⅠとⅡを鑑別可能な迅速診断キットを評価した。RT-PCR 法との比較で感度、特異度、一致率は、GI で 71.4%、99.2%、95.0%、GⅡで 88.8%、84.7%、87.1%であった。

(6) 今後のキット改良のため、新しく NoV VLP を 6 種作製した。サポウイルスのイムノクロマットキット作製を視野に入れてその VLP も 2 種作製した。

(7) タイ・チェンマイ近郊の農場でブタの血清を採取し、抗 E 型肝炎ウイルス IgG 抗体価の測定を行った。8 週齢以下では 2%、12 週齢以下では 11%、16 週齢以下では 25%、20 週齢以下では 80%が陽性であった。農場間では陽性率に相違は見られなかった。

(8) 2009 年の日本の健康なブタから E 型肝炎ウイルスの検出を行った。東京の便検体 5 例(1.9%)が陽性で、すべて genotype 3 であった。

(9) 従来、ロタウイルス、ノロウイルス、アデノウイルス、アストロウイルス、サポウイルスの検出を主として行ってきたが、近年新たなウイルスが多く検出されている。これらは新たな技術の進歩によるものである。そこで研究室で今までウイルスが未検出であった検体を対象としてヒトパレコウイルス、ヒトボカウイルス、アイチウイルスの検出を行った。日本（2007-2008 年）、タイ(2005 年)、スリランカ（2005～2006 年）の小児急性胃腸炎患者検体よりボカウイルス、ヒトパレコウイルス(HPeV) を検出した。ボカウイルスは 2%(日本)、1.2%(タイ)で陽性であった。HPeV は 8.1%(日本)、14.6%（タイ）、8.3%(スリランカ)で陽性であった。多くは HPeV1～4 であったが、スリランカの 5 検体は HPeV 10、2 検体は HPeV 11 であった。これは初の報告である。アイチウイルスはこの期間では検出されなかった。multiplex-PCR 法にてアイチウイルスの遺伝子型を検出する方法を報告した。

(10) タイの仔ブタ下痢便(2006-2008 年)よりロタウイルス 14 検体(10.7%)を検出

し、G3 が 5 例、G9 が 9 例であった。P genotype はすべて稀な P[23]であった。ウイルスの流行に変遷があり、リアソータントの集積があることがわかった。P[23]の完全長の配列決定を初めて行った。ブタサポウイルスを 1 検体（0.8%）検出し、新しい genogroup に属することがわかった。

(11) タイと日本のブタでブタコブウイルス（ピコルナウイルス科）の感染状況を調べた。タイの下痢の仔ブタから 99%、日本の健康なブタから 45.4%検出された。日本の 1 検体はウシコブウイルスに類似の配列であった。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 60 件）

① Pham NT, Chanit W, Okitsu S,(12 人中 10 番目). Detection of human parechovirus in stool samples collected from children with acute gastroenteritis in Japan during 2007-2008. J Med Virol. 2010, in Press. 査読有

② Khamrin P, Chan-it W, Okitsu S, (8 人中 6 番目). Evaluation of the newly developed immunochromatography test kit for rapid detection and differentiation of norovirus GI and GII. J Trop Pediatr 2010, in press. 査読有

③ Dey SK, Phathmmvang O, Okitsu S, (6 人中 3 番目). Seasonal pattern and genotype distribution of norovirus infection in Japan. Pediatr Infect Dis J 2010; 29(5): e32-e34 査読有

④ Dey SK, Phan TG, Okitsu S, (5 人中 4 番目). Novel recombinant norovirus in Japan. Virus Genes, 2010; 40(3): 362-364. 査読有

⑤ Khamrin P, Maneekarn N, Okitsu S, (6 人中 5 番目). Emergence of new norovirus variants and genetic heterogeneity of noroviruses and sapoviruses in children admitted to hospital with diarrhea in Thailand. J Med Virol, 2010; 82(2): 289-296.査読有

⑥ Pham NTK, Trinh QD, Okitsu S, (10 人中 8 番目). Novel human parechovirus from Sri Lanka. Emerg Infect Dis, 2010; 16(1):130-132.　査読有

⑦ Pham NTK, Trinh QD, Okitsu S,(8 人中 6 番目). Diversity of human parechoviruses isolated in stool samples collected from Thai children with acute gastroenteritis. J Clin Microbiol. 2010; 48(1): 115-119.査読有

⑧ Khamrin P, Maneekarn N, Okitsu S, (6 人中 5 癌目). Porcine kobuvirus in piglets, Thailand. Emerg Infect Dis, 2009; 15(12): 2075-2076.査読有

⑨ Khamrin P, Takanashi S, Okitsu S, (10 人中 7 番目). Immunochromatograpy test for rapid detection of norovirus in fecal specimens. J Virol Methods 2009;157(2):219-222.査読有

⑩ Takanashi S, Hashira S, Okitsu S, (11 人中 8 番目). Dectection, genetic characterization, and quantification of Norovirus RNA from sera of children with gastroenteritis. J Clin Virol 2009;44(2):161-3. 査読有

⑪ Pham NT, Trinh QD, Okitsu S, (11 人中 9 番目). Development of genotype-specific primers for differentiation of genotypes A and B of Aichi viruses. J Virol Methods. 2009; 156(1-2):107-110.査読有

⑫ Takanashi S, Okame M, Okitsu S, (11 人中 10 番目). Development of a rapid immunochromatographic test for noroviruses genogroup I and II. J Virol Method, 2008 ; 148(1-2):1-8, 査読有.

⑬ Khamrin P, Nguyen TA, Okitsu S, (9 人中 6 番目). Evaluation of immunochromatography and commercial enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of norovirus antigen in stool samples. J　Virol Methods, 2008; 147:360-363. 査読有.

⑭ Shiota T, Okame M, Okitsu S, (13 人中 12 番目). Characterization of broad reactive monoclonal antibody against Norovirus genogroup I and II: Recognition of a novel conformational epitope. J Virol,81(22):12298-12306, 2007. 査読有

⑮ Khamrin P, Maneekarn N, Okitsu S, (8 人中 7 番目). Genetic diversity of noroviruses and sapoviruses in children hospitalized with acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. J Med Virol, 2007 Dec; 79: 1921-1926, 2007.　査読有

⑯ Dey SK, Nguyen TA, Okitsu S, (9 人中 7 番目). Molecular and epidemiological trend of norovirus associated gastroenteritis in Dhaka City,

Bangladesh.　J Clin Virol, 2007; 40：218-223.　査読有

⑰ Nguyen TA, Khamrin P, Okitsu S, (10人中 9 番目). Evaluation of immunochromatography test for detection of rotaviorus and norovirus among Vietnamese children with acute gastroenteritis and the emergence of a novel norovirus GII.4 variant. J Trop Pediatr. 2007;53(4):264-9. 査読有.

⑱ Phan TG, Khamrin P, Okitsu S, (8 人中 5 番目). Detection and genetic characterization of norovirus in oyster from China and Japan. Clin Lab, 53 (7- 8): 405-412, 2007.　査読有

⑲ Phan TG, Kaneshi K, Okitsu S, (9 人中 8 番目). Genetic heterogeneity, evolution and recombination in noroviruses.　J Med Virol, 2007; 79(8): 1388-1400.査読有

⑳ Phan TG, Nishimura S, Okitsu S, (6 人中 5 番目). Multiple recombinant noroviruses in Japan. Clin Lab.53:567-70, 2007.　査読有

〔学会発表〕（計 56 件）

① Thongprachum A. Evaluation of immunochromatography kits for rapid detection of noroviruses in clinical specimens from Japan, Vietnam and Thailand. 第６回日本小児消化管感染症研究会　（2010.2.6）東京

② Pham K. Detection of human parechovirus in stool samples collected from children with acute gastroenteritis in Japan during 2007-2008. 第 57 回日本ウイルス学会(2009.10.25-27), 東京

③ カムリン・パタラ. Exceptionally high prevalence of porcine kobuviruses in piglets with diarrhea. 第57回日本ウイルス学会(2009.10.25-27), 東京

④ Thongprachum A. Evaluation of immunochromatography assay for rapid detection of norovirus antigen in stool samples collected in Thailand, 2005-2007. 第 57 回日本ウイルス学会(2009.10.25-27), 東京

⑤ 高梨さやか. スリランカにおける小児ノロウイルス胃腸炎の分子疫学的検討 第 50 回日本臨床ウイルス学会(2009, 6、13-14), 高知

⑥ Khamrin P. New norovirus immunochromatography for detection of GI and GII separately. 第 50 回日本臨床ウイルス学会(2009, 6、13-14), 高知

⑦ 高梨さやか. スリランカにおける小児ノロウイルス胃腸炎の分子疫学的検討 第 83 回日本感染症学会総会学術集会(2009.4.23-24)　東京

⑧ 沖津祥子,ウイルス性胃腸炎, 第 20 回日本臨床微生物学会総会　(2009.2.1) 仙台

⑨ Pham N. Detection and characterization of human bocavirus and human parechovirus from stool samples collected in Japan 2007-2008 第 83 回日本感染症学会総会学術集会(2009.4.23-24)　東京

⑩ 牛島廣治. イムノクロマト法によるノロウイルスの迅速診断 第 40 回日本小児感染症学会総会・学術集会（2008.11.15-16）名古屋

⑪ カムリン・パタラ. Immunochromatography test for rapid detection of norovirus in stool samples. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会(2008.10.26-28) 岡山

⑫ 沖津祥子. ノロウイルス感染症の診断 第 8 回名古屋市小児科医会総会（2008.10.5）名古屋

⑬ Okitsu S. Evaluation of the immunochromatography test for rapid detection of norovirus antigen in stool samples. IUMS 2008 (Meetings of the three divisions of the international union of Microbiological Societies 2008), XIV. International Congress of Virology, 10-15 August, Istanbul.

⑭ Ushijima H. Molecular epidemiology of norovirus and sapovirus in Asia. IUMS 2008 (Meetings of the three divisions of the international union of Microbiological Societies 2008), XIV. International Congress of Virology, 10-15 August, Istanbul.

⑮ Takanashi S. Development and evaluation of immunochromatography of norovirus: A novel rapid detection test for a highly communicable disease. 11th annual Scientific Congress 2008 of the Sri Lanka college of Paediatricans. June 20 to 22, 2008, Kandy, Sri Lanka.

⑯ 牛島廣治. 小児急性胃腸炎におけるノロウイルスのイムノクロマト法による迅速診断の評価 第 49 回日本臨床ウイルス学会　(2008.6.14-15) 犬山

⑰ 沖津祥子.ノロウイルス感染症の診断.第

82 回日本感染症学会総会（2008.4.17-18)、松江

⑱ Nguyen TA. Evaluation of the immunochromatography test for rapid detection of Norovirus antigen in stool samples. 第 4 回日本小児消化管感染症研究会 (2008.2.16) 新宿

⑲ Okitsu-Negishi S. Characterization of newly identified monoclonal antibody reacted with Norovirus GI and GII: Recognition of novel conformational epitope. Third International Calicivirus Conference, Nov 10-13, 2007, Cancun, Mexico.

⑳ Khamrin P. Evaluation of the immunochromatography test for rapid detection of Norovirus antigen in stool samples. Third International Calicivirus Conference, Nov 10-13, 2007, Cancun, Mexico.

㉑ Ushijima H. Molecular epidemiology of Norovirus and sapovirus infection in Asia. Third International Calicivirus Conference, Nov 10-13, 2007, Cancun, Mexico.

㉒ Nguyen TA. Evaluation of immunochromatography tests for detection of rotavirus and norovirus among Vietnamese children with acute gastroenteritis and the emergence of a novel norovirus GII/4 variant. 3rd Asian Society for Pediatric Research, Oct 6-8, 2007. Tokyo

㉓ Khamrin P. Immunochromatography test for norovirus detection. The 7th Japan-China International Conference of Virology, June 1 to 3, 2008, Tokyo

〔図書〕（計 3 件）

① 沖津祥子、他、中外医学社、小児科ー保護者に伝えたい 病気・検査のポイント100、2007 年、pp82-83(総ページ数 300)

② 沖津祥子、他、医歯薬出版、最新臨床検査項目辞典、2008 年、pp73-74(総ページ数 836)

③ 牛島廣治、沖津祥子、他、みみずく舎、バイオセーフティの事典、2008 年、pp226-228(総ページ数 354)

〔その他〕

① 新聞発表：Medical Tribune (2009.3.26 日号) p45

② ホームページ

http://square.umin.ac.jp/boshiken/

6．研究組織

（1）研究代表者

沖津祥子 (OKITSU SHOKO)
藍野学院短期大学・第一看護学科・講師
研究者番号：10082215