

論文の内容の要旨

論文題目 Norovirus Infection in Children: Studies on Rapid Detection Method and Molecular Epidemiological Characters

小児におけるノロウイルス感染症：迅速診断法の開発と分子疫学的特徴に関する研究

指導教員 五十嵐 隆教授

東京大学大学院医学系研究科

平成17年4月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 高梨 さやか

ノロウイルスは小児における非細菌性胃腸炎の主要な原因として全世界で報告されている。発展途上にある国においては毎年約 20 万人の子供の死亡を、先進国においては約 6 万 4 千件の入院を要する胃腸炎を引き起こしている。ノロウイルス胃腸炎はこのように日常的にみられる感染症で、その発見から 30 年以上経過しているにもかかわらず、臨床現場におけるこのウイルス感染症の診断は困難なままである。これは、ノロウイルスを培養可能な細胞系が存在せず、免疫学的な検査法の開発が遅滞していた事によるところが大きい。結果として、ノロウイルス感染症の自然経過や病原性について依然として明らかにされていないところが多い。

この博士論文は 4 つの章から構成されている。第 1 章では、簡便で迅速なノロウイルス感染症の診断法として、イムノクロマトグラフィー (IC) の開発・評価について述べた。全世界的な流行株である GII/3 と GII/4 のウイルス様中空粒子に対するウサギポリクローナル抗体を作成し、IC に組み込んだ。ウイルス様中空粒子と胃腸炎の患児より採取した便検体を用いて、Reverse transcription- polymerase chain reaction (RT-PCR) の結果をもとにこの IC の性能を評価した。結果は、一致率 84.1%、感度 69.8%、特異度 93.7%であった。RT-PCR でノロウイルス陽性となった検体を遺伝子解析すると、GII/3、GII/4 以外の遺伝子型も IC で検出できていた一方で、この 2 遺伝子型に属するノロウイルスも偽陰性となっていた検体があり、これが感度低下の要因となったと考えられた。

ノロウイルス以外の下痢原性ウイルス（A群ロタウイルス、アデノウイルス、サポウイルス、アストロウイルス）との交差反応性は認めなかった。検出限界が 10^{6-7} copies per gram of stool と十分低いことも考慮すると、開発された IC は実験室的なサポートのない環境におけるノロウイルス感染症のスクリーニングに有用と考えられた。

第2章では、ノロウイルス感染症の腸管外への影響を明らかにするため、ノロウイルス胃腸炎の患児から採取した便以外の検体から、ノロウイルス RNA 検出を試みた検討について記述した。39 人のノロウイルス胃腸炎のうち 6 人（15.4%）の血清から seminested RT-PCR でノロウイルス RNA が陽性となった。痙攣症状を呈した患児より採取された脳脊髄液は 2 検体ともに陰性であった。血清が陽性となった患児は陰性であった患児に比較して痙攣、小脳失調などの神経学的合併症を伴うことが多かった（ $p=0.028$ ）。血清陽性患児の便検体中ノロウイルス量の中央値は、血清陰性患児のものより高かったが統計的有意差はなく（ 9.8×10^9 copies per gram of stool versus 1.1×10^9 copies per gram of stool（ $p=0.117$ ））、血清陽性患児の血清中と便中のノロウイルス量には相関関係はなかった。しかしながら、同じ患児より採取された便と血清検体中のノロウイルスの遺伝子型は全て一致し（GII/3:1、GII/4: 5）、それぞれ高い相同性を示した（99.2% ~100%）。これらの事から、血清中に検出されたノロウイルス RNA は腸管由来のものと推察された。

第3章では、東京都内の保育園通園児における RT-PCR を用いた胃腸炎サーベイランス（2005年7月～2006年6月）の結果を記述した。6年前に同保育園で同様の手法を用いて行ったサーベイランスと比較して、全体の胃腸炎ウイルス検出率は低下したにもかかわらず（ $p<0.001$ ）、検出された胃腸炎ウイルスにおけるノロウイルスの割合は増加した（ $p<0.01$ ）。1年間の研究期間中に、20人の対象園児のうち18人がノロウイルス感染症を経験したが、この中には複数の遺伝子型に感染した児や、同じ遺伝子型に複数回感染した児も含まれていた。胃腸炎症状（1日3回以上の軟便と定義）を有した児と無症状の児（1回/週、定期採便）から採取された便中のノロウイルス量中央値に有意差は認めなかった（ 1.5×10^6 copies per gram of stool versus 2.6×10^4 copies per gram of stool（ $p=0.6$ ））。研究期間中にノロウイルス GII/6 による発症率 27.5% のアウトブレイクが発生したが、発端となったのは、アウトブレイク 2 日前に無症状で通園してノロウイルス GII/6 が検出された便を排出し、翌日より胃腸炎症状で休園した 2 歳女児と考えられた。この児の検体は 4.7×10^4 copies per gram of stool とウイルス量は低値であったが、園ではそれまでノロウイルス GII/3 と GII/4 のみ侵淫していたこともあり、アウトブレイクを引き起こしたと考察された。

最終章では、スリランカ・キャンディ市の小児胃腸炎入院例（2005年9月～2006年8月）におけるノロウイルスの分子疫学的特徴について記述した。5歳以下の患児 362 名より 1 検体ずつ便を採取し、RT-multiplex PCR にて 8 種の下痢原性ウイルス（A、B、C 群ロタウイルス、アデノウイルス、ノロウイルス GI、ノロウイルス GII、サポウイルス、アストロウイルス）の検出を試みた。このう

ち 5 種類のウイルスが検出され、ノロウイルス GII は全体の 10.5% の検体 (38 検体) で陽性となり、A 群ロタウイルスに次いで 2 番目に頻度高く検出された。ノロウイルス GI は検出されなかった。スリランカの小児由来のノロウイルス報告例は現在まで無く、この塩基配列は初めて GenBank に登録された。他の下痢原性ウイルスと混合感染をしていない 33 例のノロウイルス感染児の主な臨床症状は、下痢 (100%)、嘔吐 (72.7%)、37.5°C 以上の発熱 (51.5%) であった。ノロウイルスは、A 群ロタウイルスや 2 種類のウイルスの重複感染例と同等の胃腸炎重症度スコアを示した (平均値±SD: 12.1±3.0、10.9±3.0、10.6±3.0、 $p=0.156$)。各ウイルス群において、嘔吐回数・期間、下痢回数・期間、発熱頻度などの臨床症状及び、性別、年齢などの項目に有意な差異はみられなかった。10 月を除いて毎月ノロウイルス GII の検出がみられたが、北東モンスーンと南西モンスーン間の乾燥時期であり年間最低気温が記録される 1 月に、検出数のピークが認められた。38 個の全てのノロウイルス陽性検体に対し遺伝子解析を行い、全世界的に検出頻度が低いとされる GII/9 や GII/16 を含む 5 種類の遺伝子型が認められた。その中で GII/3 が 22 検体 (57.9%) と最多であり、日本を含むアジア各国から GenBank に登録されている株の塩基配列と 98% 以上の高い相同性を示した。

この研究で簡便迅速に施行できる IC 法の開発に成功したことにより、臨床現場においてノロウイルス感染症がさらに正しく認識されることが期待される。新たな病原論の展開としては、腸管から血流へノロウイルスが侵入し、腸管外症状を引き起こしている可能性が示唆された。無症状の小児がノロウイルスのアウトブレイクの発端となり得たことから、標準予防策の重要性が再認識された。スリランカの小児におけるノロウイルス感染症の実態が、本研究によって初めて明らかにされた。近年、ノロウイルス研究が増加する傾向にあるが、継続的なモニタリングと詳細な遺伝子解析が、このウイルスの進化の方向性を見極めるうえで重要と考えられた。