

フィールド分子疫学で 知る！ノロウイルス

東北大学大学院医学系研究科
微生物学分野
斉藤 繭子
2018年7月14日
みちのくウイルス塾

みちのくウイルス塾

1

ノロウイルス感染症

- 5歳未満の子供の重症下痢症の約 12%を占める.
- 高所得国でも約64万人の子供の入院がノロウイルスによるものと考えられている。
- 低中所得国では約20万人の死亡原因である。



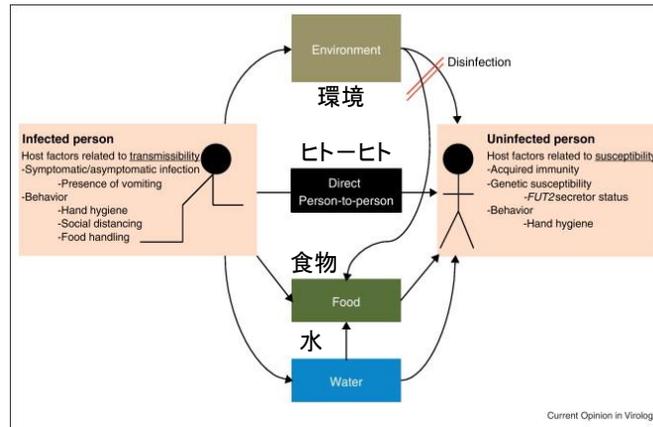
Patel MM, et al Emerg Infect Dis, 2008

みちのくウイルス塾

2

ノロウイルス感染

- 伝播経路: 糞口感染、経口(食物)、飲水、汚染物質との接触



Lopman B, Curr Opin Virol, 2012

みちのくウイルス塾

3

ノロウイルス

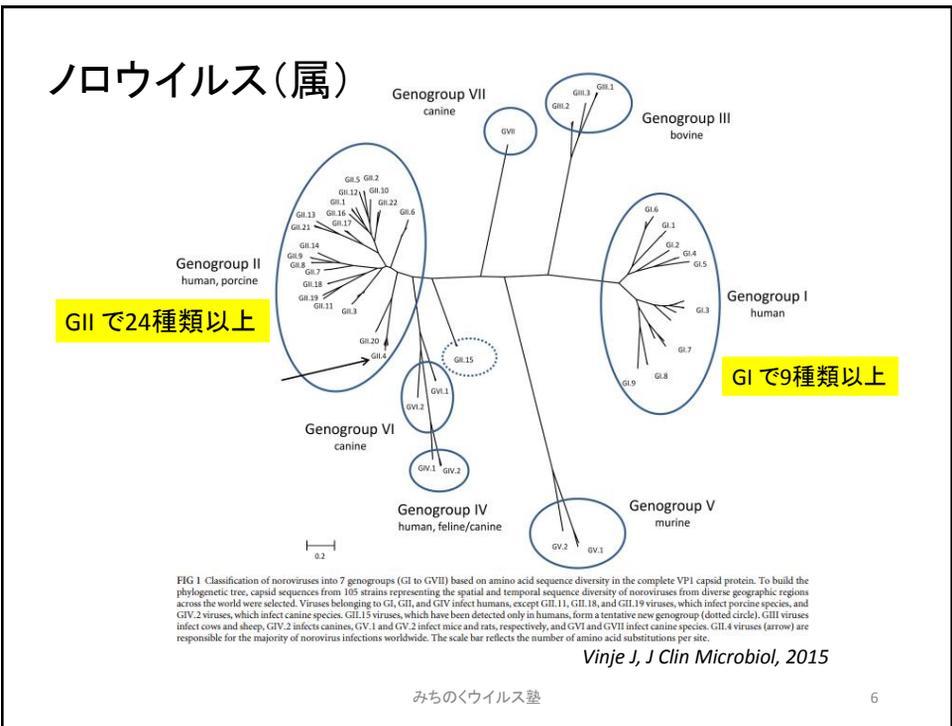
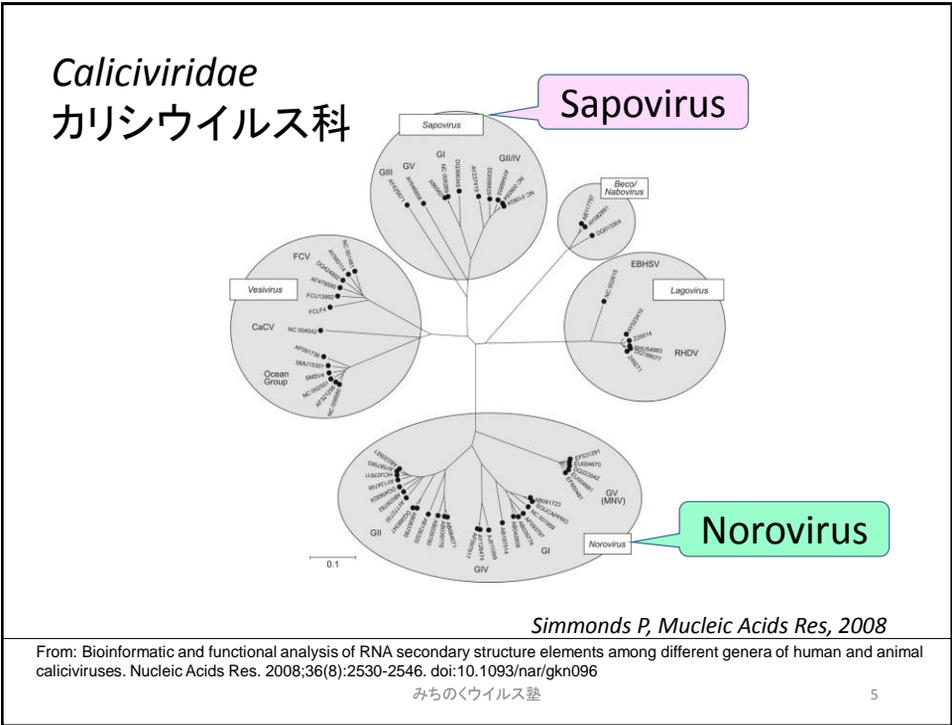
1968年, Ohio州Norwalk、小学校で集団発生した急性腸炎の病原体として1972年に確認された。

ウイルス学的特徴

- Envelopeを持たないプラス鎖一本鎖RNAウイルス
- 直径約30nmと小さい
- 多くの遺伝子型が存在
- 動物モデルがない
- 環境に強い
- 培養細胞でウイルス分離が難しい

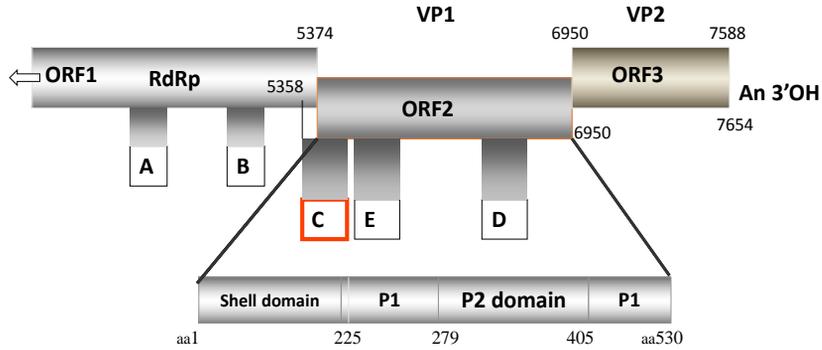
みちのくウイルス塾

4



ノロウイルスの遺伝子

Figure 1. Schematic representation of the location of the genomic regions of norovirus used for genotyping.

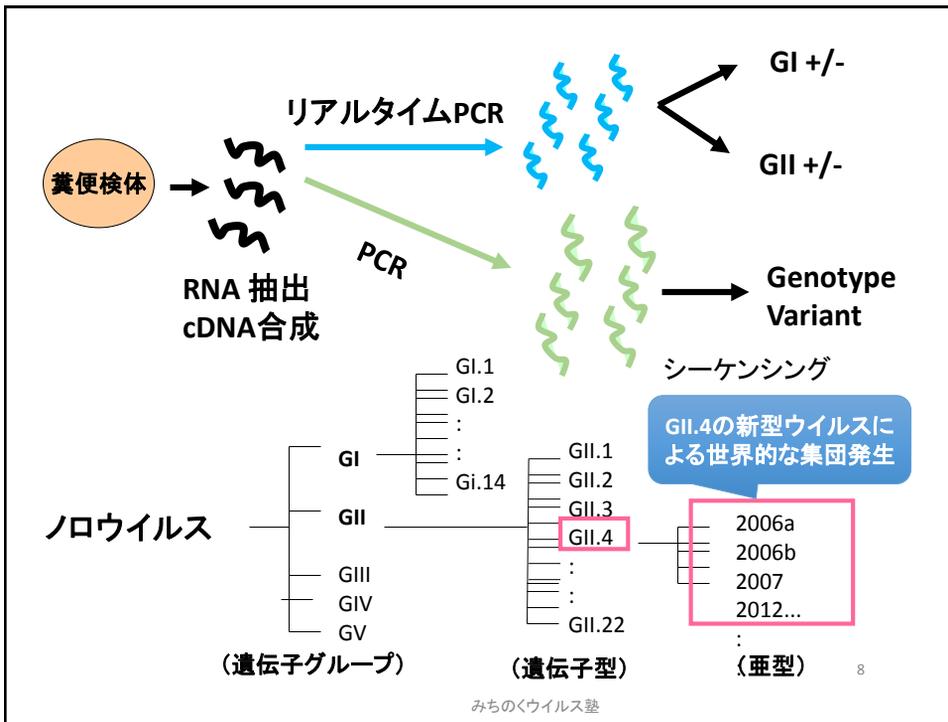


ORF: Open reading frame;
 RdRp: RNA-dependent RNA polymerase
 aa: Amino acid position

Modified from Siebenga JJ, J Infect Dis, 2009

みちのくウイルス塾

7



GII.4の新型ウイルスによる世界的な集団発生

2006a
 2006b
 2007
 2012...

みちのくウイルス塾

8

Norovirus in England

“WINTER VOMITTING DISEASE”

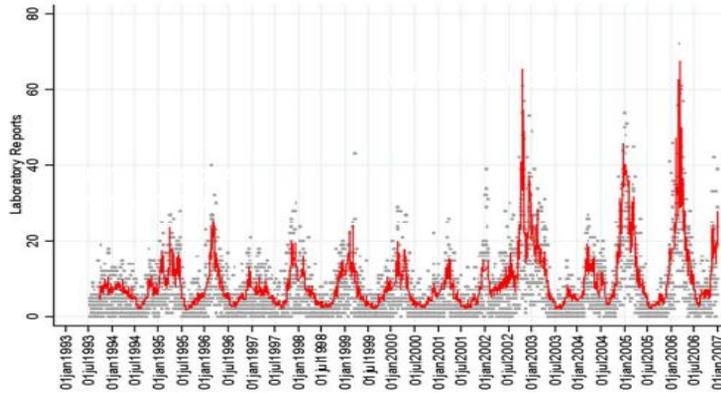


Figure 4. Daily norovirus laboratory reports (grey circles) and predicted values (red line) from full model including temperature, relative humidity, immunity, new variants and autoregressive terms and other confounders.
doi:10.1371/journal.pone.0006671.g004

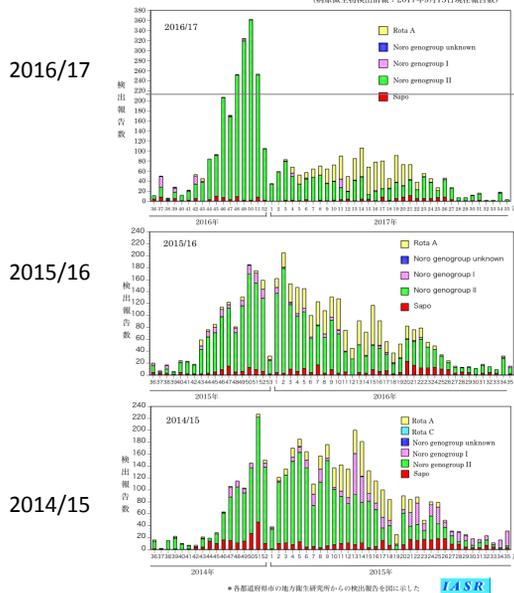
Lopman BA, PLoS One, 2009

みちのくウイルス塾

9

感性胃腸炎症例から検出された主なウイルス (日本)

選別ノロウイルス、サポウイルス、ロタウイルス検出報告数、2014/15-2016/17シーズン
(病原微生物検出情報：2017年9月13日現在報告数)



日本ではウイルス性下痢症の原因ウイルス第1位

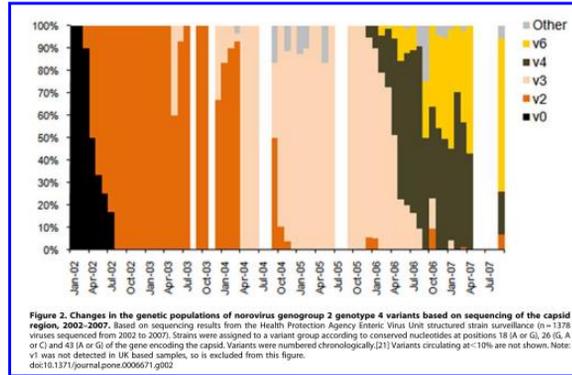
- ノロウイルス GII
- ノロウイルス GI
- ノロウイルス (未分類)
- ロタウイルス (group A)
- サポウイルス

国立感染症研究所感染症疫学センター
病原微生物検出情報事務局

みちのくウイルス塾

10

ノロウイルスの亜型の変遷(英国)

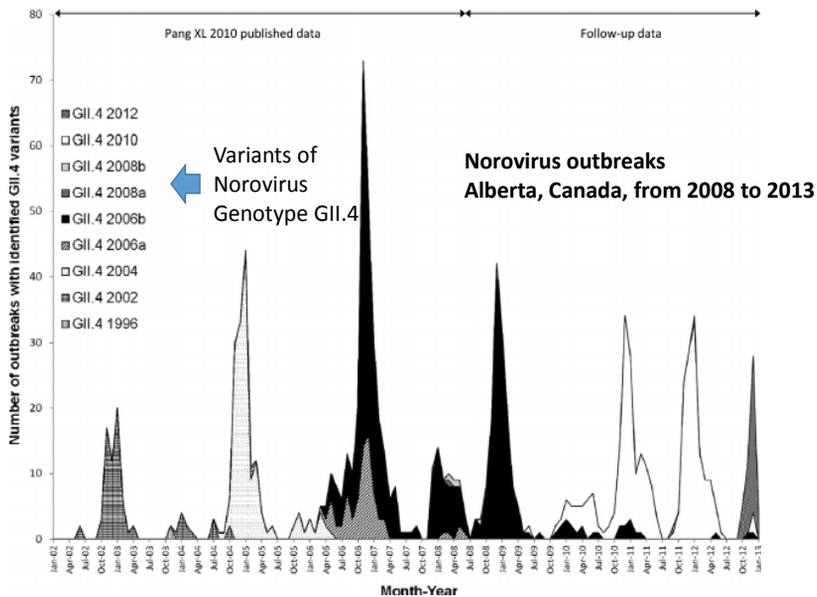


英国におけるGII.4型ノロウイルスの亜型の変遷 2002-2007

Lopman BA, Plos One, 2009

みちのくウイルス塾

,11



Hasing ME, J Clin Microbiol, 2013

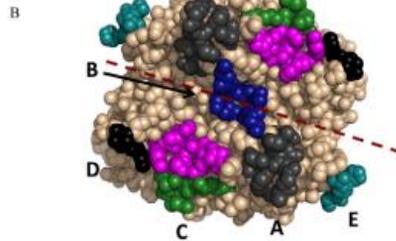
みちのくウイルス塾

12

ノロウイルス表面のエピトープの進化

A

VLP	Epitopes															
	A					B		C		D		E				
	284	286	287	288	308	312	323	322	340	376	383	384	395	407	412	413
GII.4.1974	G	S	H	D	T	N	L	K	A	Q	D	-	H	N	S	G
GII.4.1987	V	S	H	D	T	N	L	K	A	Q	D	-	H	N	T	G
GII.4.1997	A	S	H	D	T	N	W	K	E	Q	G	-	H	N	T	G
GII.4.2002	A	T	H	N	N	N	W	K	G	E	N	G	A	S	T	G
GII.4.2004	A	A	C	N	S	S	V	R	R	E	S	S	T	D	D	S
GII.4.2005	P	T	R	T	A	D	M	R	G	E	S	S	T	D	T	V
GII.4.2006	A	S	R	N	S	E	V	K	G	E	S	S	T	S	N	V
GII.4.2009	P	S	R	N	A	D	V	K	T	E	S	S	T	S	N	I

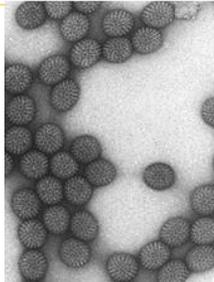


Lindesmith LC, PLoS Pathog, 2012

みちのくウイルス塾

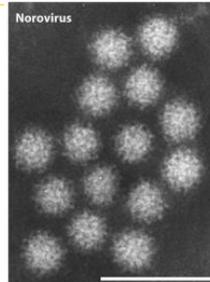
13

	ロタウイルス	ノロウイルス	サポウイルス
遺伝子	Segmented double-strand RNA	Single strand RNA	Single Strand RNA
年間死亡者数	453, 000 ^a	200, 000 ^b	?
遺伝子グループ	Group A	GI, GII, GIV	GI, GII, GIV, GV
遺伝子型	≥ 15 genotypes	≥ 33 genotypes	≥ 20 genotypes



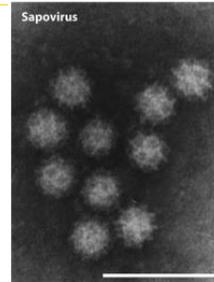
CDC, Public Health Image Library

1973年 はじめて確認
 1974年 rotavirus
 1981年 培養法の確立
 1980年代 ワクチン開発
 2000年代 ワクチン導入



Oka, CMR, 2015

1968年 Norwalkで集団感染
 1972年 確認
 2002年 norovirus
 2016年 培養法の確立へ



Oka, CMR, 2015

1976年 はじめて確認
 1977年 札幌で集団感染
 2002年 sapovirus

a. WHO, 2012
 b. Patel MM 2008

みちのくウイルス塾

14

Children's Hospital in Lima, 1995-1997

Human Caliciviruses as a Cause of Severe Gastroenteritis in Peruvian Children

CASE-CONTROL STUDY

Umesh D. Parashar,¹ Jin-Fen Li,¹ Rosa Cama,² Mark DeZalia,¹ Stephan S. Monroe,¹ David N. Taylor,² Dante Figueroa,⁴ Robert H. Gilman,^{2,3} and Roger I. Glass¹

Table 2. Human calicivirus reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and liquid hybridization assay (LHA) testing of fecal samples from 233 case patients with gastroenteritis and 248 control subjects, Lima, Peru, 1995-1997.

Test, result	No. (%) of children		P
	Case patients (n = 233)	Control subjects (n = 248)	
RT-PCR ^a			
Positive	30 (13)	12 (5)	
Negative	203 (87)	236 (95)	.002
LHA-GI ^b			
Positive	13 (5)	0 (0)	
Negative	220 (95)	248 (100)	<.001
LHA-GII ^c			
Positive	62 (27)	13 (5)	
Negative	171 (73)	235 (95)	<.001
RT-PCR ^d			
Positive	17 (7)	16 (6)	
Negative	216 (93)	232 (94)	.71
Any RT-PCR or LHA			
Positive	81 (35)	32 (13)	
Negative	152 (65)	216 (87)	<.001

^a Region B primers sets, including Mon431, Mon432, Mon433, and Mon434, for the detection of noroviruses.

^b LHA with GI-specific probes for GI/1, GI/2, and GI/3 clusters.

^c LHA with GII-specific probes for GII/1,4, GII/2, GII/3, GII/5, and GII/6,7 clusters.

^d Primer pair 289/290 was for the detection of noroviruses and sapoviruses.

Norovirus was found **35% of hospitalized children with diarrhea**, compared to **13 % of children with other disease.**

Parashar UD. *J Infect Dis*, 2004

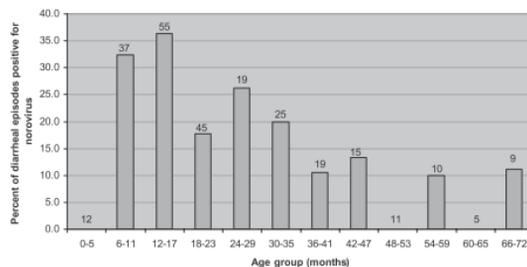
みちのくウイルス塾

15

NOROVIRUS IN PERUVIAN AMAZON IQUITOS - Community-based case-control Study

NOROVIRUS HIGHLY PREVALENT CAUSE OF ENDEMIC ACUTE DIARRHEA IN CHILDREN IN THE PERUVIAN AMAZON

Pablo Peñataro Yori, MPH,* Kellogg Schwab, PhD,†
Robert H. Gilman, MD,* Sharon Nappier, PhD,†
Daniel Velasquez Portocarrero, BS,‡ Robert E. Black, MD, MPH,*
Maribel Paredes Olortegui, BS,‡ Eric R. Hall, PhD,§
Christine Moe, PhD,¶ Juan Leon, PhD,|| Vita A. Cama, PhD,||
and Margaret Kosek, MD*



■ Norovirus was detected in **21.3% of diarrhea stool samples (n=263)** and **8.0% (n=75) in samples without diarrhea (p<0.01).**

Yori PP, *Pediatr Infect Dis J* 2009

みちのくウイルス塾

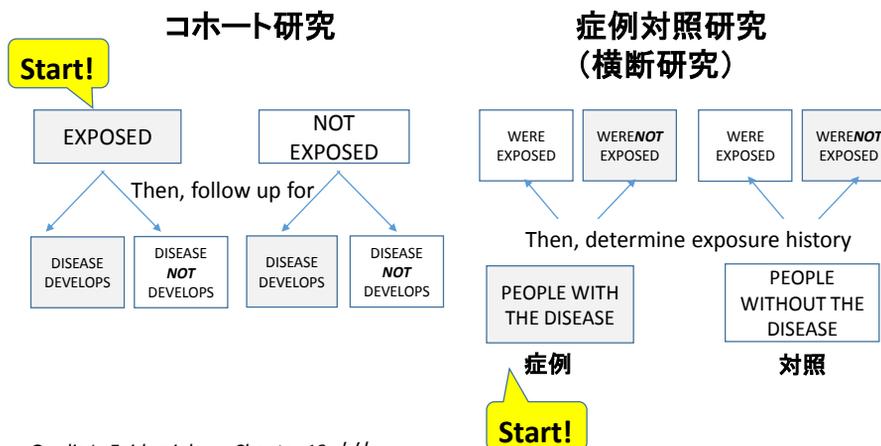
16

あなたがするなら？フィールド研究デザイン

⇒ノロウイルスによる下痢症や感染は、実際どのくらい発生しているのか、全体像を把握したい？

- A) 病院研究でできないことは？
- B) 症例研究でできないことは？
- C) コミュニティでの研究でやるべきことは？
- D) 日本国内？ 国外？

コホート研究と症例対照研究



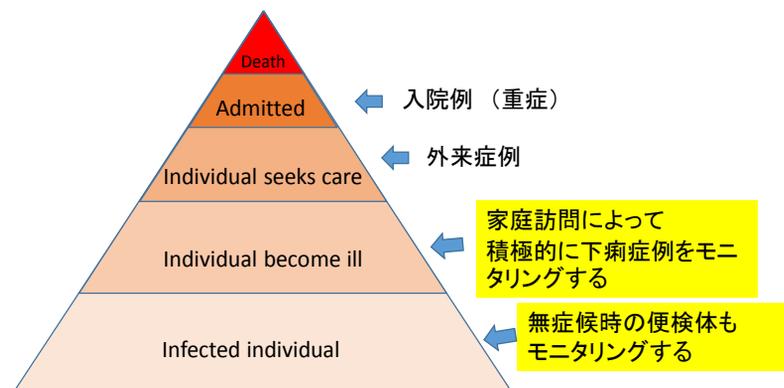
症例対照研究

- 有病率
- エピソードごとの評価
- 相関因子(オッズ比)
- 安価、迅速

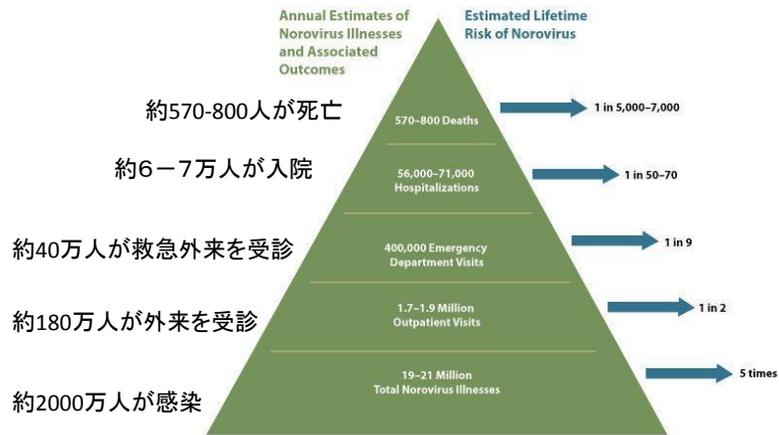
コホート研究

- 発症率
- 個人の繰り返し感染
- ウイルス排出期間
- リスク因子(リスク比)
- 高価、時間がかかる
- 脱落者
- 伝播

Passive surveillance v.s. Active surveillance in infectious disease



Burden of Norovirus in the United States



Estimates of the annual number of illnesses and associated outcomes for norovirus disease in the U.S., across all age groups. Lifetime risks of disease are based on a life expectancy of 79 years of age.

Burden of Norovirus Illness in the U.S./Norovirus Illness <https://www.cdc.gov/norovirus/trends-outbreaks/burden-US.html>

みちのくウイルス塾

21

Peruvian Birth Cohort Study 2007-2010, Lima, Peru



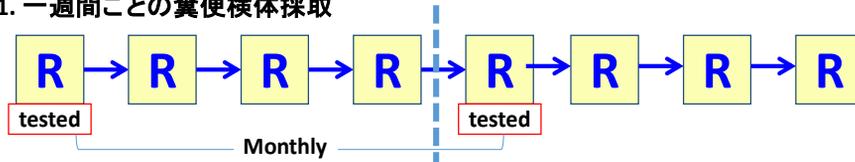
Lima Shanty Town –San Juan de Miraflores

みちのくウイルス塾

22

コホート研究での検体採取

1. 一週間ごとの糞便検体採取



2. 下痢症時の検体採取



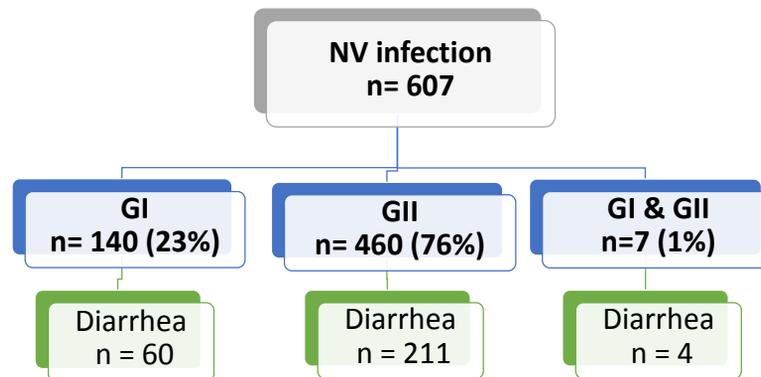
* RT-real-time PCR was used for the screening

みちのくウイルス塾

23

Results

- 291 children participated
- 4,978 child-months followed
- 2 year followed (n = 189)

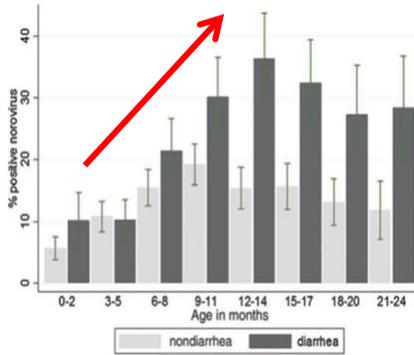


* RT-real-time PCR was used for the screening

みちのくウイルス塾

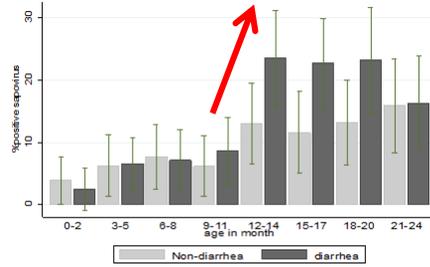
24

コミュニティにおける 便検体中のノロウイルスとサポウイルスの陽性率 下痢症 vs. 無症候



Norovirus

Saito M, Clin Infect Dis 2014



Sapovirus

Sanchez G, Clin Infect Dis, 2017

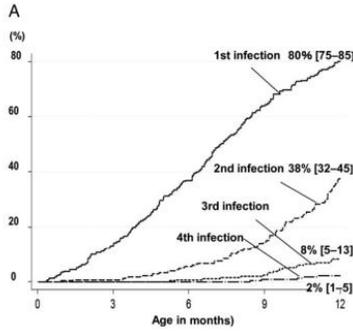
ペルー誕生コホート研究で検出されたロウウイルスの遺伝子型

Genogroup I			Genogroup II			
Genotype	n	%	Genotype	Variant	n	%
GI.2	6	1.7	GII.2		2	0.6
GI.3	10	2.8	GII.3		27	7.7
GI.4	5	1.4	GII.4	2006b	77	21.9
GI.5	14	4.0	GII.4	2007	52	14.8
GI.7	18	5.1	GII.4	2008	11	3.1
GI.8	10	2.8	GII.4	2010	1	0.3
			GII.5		4	1.1
			GII.6		53	15.1
			GII.7		1	0.3
			GII.9		6	1.7
			GII.12		9	2.6
			GII.14		13	3.7
			GII.15		1	0.3
			GII.17		23	6.6
			GII.22		1	0.3
			Undefined		7	2.0

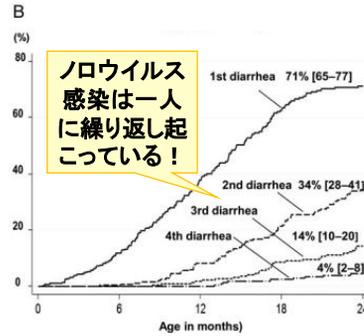
一つのコミュニティに多様なウイルスが混在している。

ノロウイルス感染の頻度

NV infection up to 12 months



NV-associated diarrhea up to 24 months

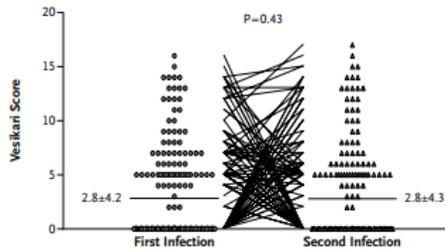


Saito M, Clin Infect Dis 2014

みちのくウイルス塾

27

A 196 Children with ≥ 2 Infections



ロタウイルスの研究では、再感染では症状の軽減

ノロウイルスでは??

B 149 Children with ≥ 3 Infections

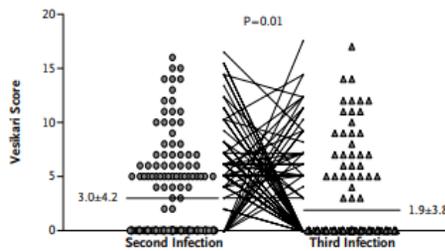


Figure 2. Vesikari Scores for Diarrheal Disease Severity in Consecutive Rotavirus Infections.

Gladstone, N Engl J Med, 2011

みちのくウイルス塾

28

ペルー人誕生コホートに見られた
同じ遺伝子型のノロウイルス、サポウイルスの繰り返し感染

	sapovirus	norovirus
異なる遺伝子型による感染	61/65 (94%)	147/151 (97%)
同じ遺伝子型の感染	GI.1=> GI.1 (n=3)	GI.5 => GI.5 (n=1) GII.4=> GII.4 (n=7) -same variant (n=2)* -different variant (n=5) GII.6 => GII.6 (n=1)*
検出された遺伝子型の数	14	18 (GII.4の亜型 n = 4)

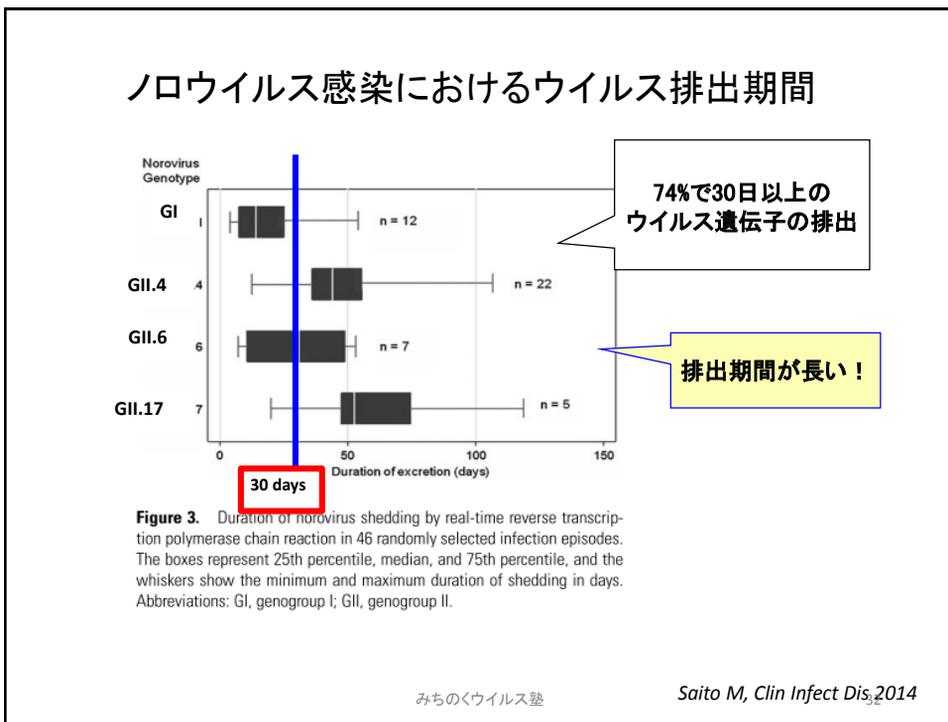
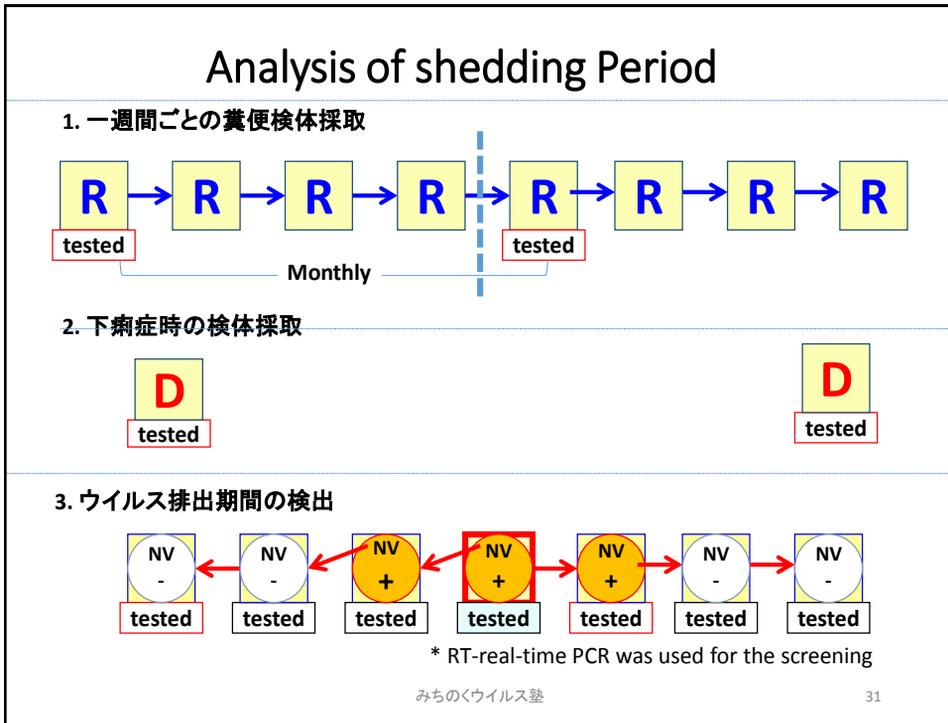
* Observed frequency of repeat infection was significant lower than that expected by chance

みちのくウイルス塾 29

ノロウイルス感染後の再感染と下痢症のハザード比

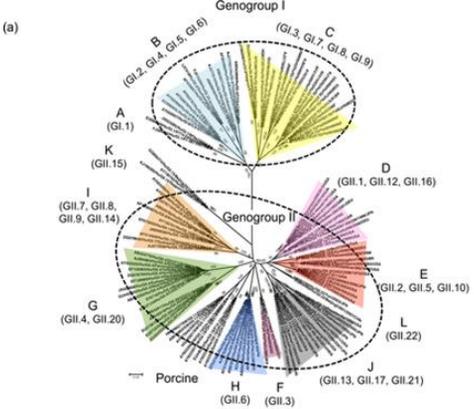
Table 1. Changes in Hazard Ratios of Sequential Norovirus Infection by Number of Previous Infections

No. of Previous Infections	No. of Sequential Episodes	Incidence per 100 Child-mo ^a	Hazard Ratio (95% CI) for Subsequent Event ^b	
			Adjusted	P Value
Previous norovirus infection				
0	197	12.46	Ref	
1	86	12.04	0.74 (.57-.95)	.020
≥2	27	11.07	0.58 (.38-.90)	.014
Norovirus diarrhea				
0	66	4.17	Ref	
1	38	5.32	0.79 (.53-1.18)	.256
≥2	9	3.69	0.44 (.18-1.10)	.079
Previous GII infection				
0	184	10.97	Ref	
1	60	8.30	0.55 (.41-.74)	<.001
≥2	6	4.32	0.23 (.11-.48)	<.001
Previous GII diarrhea				
0	67	3.99	Ref	
1	26	3.60	0.55 (.34-.87)	.011
≥2	2	1.44	0.18 (.05-.68)	.012



"Immunotype"

- ワクチン開発と評価に向けて



(a)

Primary Infection

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
A												
B			2		2	5	1			2		1
C		3	2			10	3	4	5			
D			1				1	2	1			
E		1	1			4	1	1				
F		1	3	2	1			4				
G		7	2	3	2	4	8	12	2	6		
H		2	5	5	1	2	17					
I		2	1			1	8	3				
J			1				10	5				
K												
L						1						1

Parra GI, PLoS Pathog, 2017

PLOS PATHOGENS

みちのくウイルス塾 33

フィリピンコホート研究のノロウイルスGII 再感染例での "immunotype"

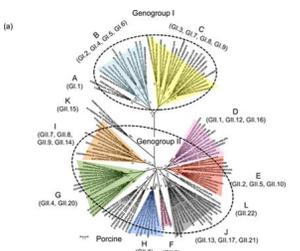
Children x #Repeated infection

39 x 2

5 x 3

1 x 4

	E	J	F	H	G	I	K
E		1	1		2	3	
J	2		1	1	3	1	
F	3			3			
H	6				1		
G	2		2	5		1	
I	2	1	1	1			
K	1				1		



(a)

Parra GI, PLoS Pathog, 2017

みちのくウイルス塾 34

フィールド研究でわかったこと

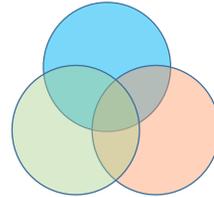
- 1歳児では無症候感染者が10-15%程度見られる。
- 乳幼児ではウイルスの排出期間がチャレンジスタディで言われていた2週間より長い。

フィールド研究でわかったこと(つづき)

- 多様なノロウイルスウイルスがコミュニティに分布しており、乳幼児から繰り返し検出される。
- 一度感染したら、その遺伝子特異的な免疫が成立すると考えられる。ただし、交差免疫についての詳細は不明。

感染症疫学研究チームづくり

- 医療者（医師、看護師）
- 検査技師
- ロジスティシャン／事務
- 疫学者
- 統計学者
- プログラマー/データマネージャー/エンコーダー
- バイオインフォマティクス



グローバルヘルスにおける下痢症

- 世界的な5歳未満の小児の死亡原因の**第二位**。
- 毎年76万人の5歳未満の小児が下痢症で死亡している。
- 安全な飲料水の提供と適格な衛生管理により、下痢症の発生数を有意に削減することができる。
- 下痢症は5歳未満の子供に栄養障害をもたらす原因の**第1位**である。

WHO, Fact sheet N° 330, 2013

疫学の教科書

- **Gordis L. Epidemiology: with STUDENT**
- **Nelson KE. Infectious Disease Epidemiology: Theory and Practice**



お薦めです。

みちのくウイルス塾

39

Acknowledgement

Tohoku University Graduate School of Medicine

Mariko Saito, Michiko Okamoto,
Tomomi Abe, Makiko Kishi, Sumie Abe,
Hitoshi Oshitani

Universidad Peruana Cayetano Heredia

Monica Pajuelo, Holger Mayta, Gerardo
Sanchez, Carmen Puemape

Asociación Benéfica PRISMA

Lilia Cabrera, Karina Roman

Johns Hopkins School of Public Health

Robert H. Gilman

**Tarlac Provincial Hospital
Community San Nicolas and La Paz,
Tarlac**

Research Institute for Tropical Medicine (RITM)

Amado Tandoc III, Edelwise
Mercado, Socorro Lupisan

Asian Foundation for Tropical Medicine

Marilu Ventrina, *Tarlac field
research team, Molecular Biology
laboratory staff at RITM*

Tohoku-RITM Collaborative Research Center on Emerging Infectious Diseases

Emiko Nakagawa, Marjelyn
Estanislao