

下痢症ウイルスの分子疫学的研究

Sheikh Ariful Hogue^{1), 2)}, 早川 智¹⁾, 牛島廣治¹⁾

Molecular epidemiology of viral gastroenteritis

Sheikh Ariful Hogue^{1), 2)}, Satoshi HAYAKAWA¹⁾, Hiroshi USHIJIMA¹⁾

要旨

小児下痢症の原因となるウイルスを同時に検出する方法を開発し、わが国とバングラデシュにおいて再現性をもって患者糞便と下水、河川水など環境中のウイルスを検出することができた。特に、ロタウイルスワクチンは感染頻度を減らすのみならず、重症度を低下させることを明らかにした。

1. はじめに

上下水道のインフラストラクチャが整っていない途上国では、細菌あるいはウイルスによる胃腸炎が大きな問題である。マラリアやジカ、デングなど節足動物媒介感染や性感染症と並び旅行者感染症の中で最も多くみられるが、現地人の間でも流行を繰り返し、とくに小児の場合にはしばしば生命にかかわることがある。ロタウイルスのように有効なワクチンが開発されても予防効果は完全ではなく、免疫学的に異なったウイルス株の流行を見ることも多い。本研究では、ロタワクチンによる集団の免疫応答の変化と、環境中における下痢症ウイルスの存在様式と頻度について分子疫学的研究を行った。

2. 目的

1) 2017年に流行したG8P[8]ロタウイルスに対するロタウイルスワクチンの効果

ロタウイルスは依然として急性ウイルス性胃腸炎の大きな原因となっている。通常は幼児期に感染し、下痢・嘔吐を示すが、加齢とともに免疫ができて症状は軽くなる。ヒトの場合はA群ロタウイルスが中心であるが、その中でもG1P[8], G2P[4],

G3P[8], G4P[8]とG9P[8]が原因となっている。その中でも特にG1P[8]が最も重要であるが、稀にG6, G8, G12が検出される。現在では、ロタウイルス胃腸炎による重症化をワクチンにより予防することを目的にRotarixとRotaTeqという1価と5価のワクチンが使用されている。しかし、これら2つのワクチンにはG8は含まれておらず、G8の感染予防が可能かどうかは不明である。本研究では、G8P[8]の流行時にワクチンの有無による症状の軽重を検討した。

2) ダッカ市の下水中の腸管ウイルスの分子疫学的研究

近年、細菌性食中毒による死亡が抗菌薬の適切な投与で減少する一方、腸管ウイルスによるウイルス性食中毒は減少していない。現在140種以上のウイルスがヒトの腸管感染症に関係するとされており、主要なものとしてロタウイルス、ノロウイルス、A型肝炎ウイルス、アストロウイルス、アデノウイルスがあげられる。バングラデシュでは、小児下痢症患者にロタウイルス(33%)、ノロウイルス(28%)が多く見いだされるが、アストロウイルス(3%)、

1) 日本大学医学部

2) Cell and Tissue Culture Laboratory, Centre for Advanced Research in Sciences (CARS), University of Dhaka, Dhaka, Bangladesh

早川 智 : hayakawa.satoshi@nihon-u.ac.jp

アデノウイルス (2%) の報告もある。ロタウイルスの中では、G2 (46%), G1 (25%) が主要なウイルスサブタイプである。これらのウイルスは、食物、水、ヒトの糞便が付着した器物などから伝播するが、感染力の強ささと重篤性から、ノロウイルスが最も注目されている。ノロウイルス感染が蔓延する原因の一つは、小児期の免疫が保持されず大人でも感染を繰り返すことや有効なワクチンが存在しないためである。ノロウイルス、ロタウイルスを含め、糞便中に排泄された下痢症ウイルスは先進国においては下水として不活化処理される。しかしながらバングラデッシュなど途上国では下水は処理をされずに直接、川や排水路に流される。下水を含む河川水はしばしば灌漑、洗濯、水泳などに利用される。雨季には下水が洪水として家屋に流れてくることもある。バングラデッシュの下水の細菌汚染は既に調べられているが、ウイルスについては殆ど報告がない。本研究ではウイルス性下痢症で重要なロタウイルス、ノロウイルス、アデノウイルスの有無について住宅地および病院近辺の下水を調査した。

3. 対象と方法

- 1) 日本及びバングラデッシュにおいて倫理委員会と患者あるいは保護者の同意を得て、遺伝子検出法により下痢便検体からウイルスのスクリーニングを行った。A群ロタウイルス陽性の場合、遺伝子型、遺伝子配列をさらに調べた。G8P[8]陽性の場合にはワクチン使用の有無、Vesikariスコアを用い重症度の比較を行った。
- 2) 2017年2月から10月の全国6か所(北海道、東京、静岡、京都、大阪、佐賀のクリニック)の小児の322下痢便検体を用いた。ウイルスRNAを抽出した後、ランダムプライマーを用いてcDNAを作製し、11種のウイルスを4つのセットに分けてmultiplexあるいはmonoplex PCR法で行った。A群ロタウイルスのG遺伝子型(VP7)別、ノロウイルスの遺伝子型別は遺伝子解析を行った後、BLAST検索を用いて型を決めた。また、ロタウイルスのP遺伝子型(VP4)やI遺伝子型(VP6)は型別のmultiplex PCRを用いた。
- 3) 2016年2月から2017年4月までダッカの大学や住宅地付近の6か所の下水から毎月1回500mlをペットボトルに採取した。100mlをポリエチレン

グリコールで濃縮した後に、ウイルスRNAを抽出、cDNAの作製後、RT-PCRを行い、場合によってはNested PCR、遺伝子解析、リアルタイムPCRでの定量を行った。

4. 結果

4.1 小児下痢症の分子疫学と2017年に流行したG8P[8]ロタウイルスに対するロタウイルスワクチンの効果

- 1) 本研究において検討した322検体中97検体でノロウイルスGII (30%), 68検体でA群ロタウイルス (21%), 58検体でヒトパレコウイルス (18%), 19検体がエンテロウイルス (6%), 16検体がアデノウイルス (5%), 13検体がサポウイルス (4%), 10検体がアストロウイルス (3%)であった。
- 2) 1検体がノロウイルスGI, アイチウイルス, BおよびC群ロタウイルスは見いだされなかった。
- 3) A群ロタウイルス68検体中G8P[8]が78%, G3P[8]が9%, G2P[4]が3%, G9P[8]が9%に見られた。
- 4) ノロウイルスGII97検体中GII.4が83%, GII.2が7%, 9検体は遺伝子型が不明であった。GII.4はSydney_2012でGII.Pe_GII.4のリコンビナント型であった。
- 5) 静岡県の1小児科クリニックの2017年2月から7月までの80例の下痢便から58例にA群ロタウイルスを見出した。その中で53例がG8P[8]であった。G8P[8]以外の型との間で重症度には差がなかった。ワクチンを行うことによって重症例が少なくなった。(図1, 表1と2は文献1から引用)

4.2 ダッカ市の下水中の腸管ウイルスの分子疫学的研究

- 1) 下水検体延べ85検体中32検体でロタウイルス陽性、41検体がノロウイルス陽性、64検体がアデノウイルス陽性であった。
- 2) 陽性であった11検体を用いロタウイルスの遺伝子型検出を行った。multiplex PCRで遺伝子型を決定した。1検体から1種の遺伝子型を検出したものが4検体、2種のウイルスが5検体、4種の遺伝子型が2検体で検出された。しかし、遺伝子型は特定な型ではなく、G1, G2, G3, G8 および

G9が検出された。

- 3) ロタウイルスの遺伝子型はG3P[8], G9P[8], ノロウイルスはGII.4 (Sydney) であった。
- 4) リアルタイムPCRでロタウイルスが $10^5 \sim 10^7$ コピー数/ml, ノロウイルスは $10^2 \sim 10^3$ コピー数/mlの濃度で見られた。

5. 考 察

本研究の結果を要約すると以下のとおりである。

- 1) 2-6月にかけてG8P[8]という従来稀であった型が流行した。ロタウイルスが6月まで続いていたことは今後も季節との関連を含めて検討する必要がある。また、ノロウイルスは昨年GII.2の大きな流行がみられ、その後再びGII.4の流行と

なりつつあると思われ、2017年の冬の流行も緊急に検討する必要がある。

- 2) 現行のロタウイルスワクチンはG8P[8]症例の中で中等度以上の割合を少なくすることが可能であり、ワクチンとして使用した型以外にも有効であることが判明した。
- 3) バングラデッシュでは、一年を通して下水・河川水中に高頻度でヒトに感染を起こしうる濃度の下痢症関連ウイルスを検出できた。これらのウイルスが現地における小児下痢症、旅行者感染症の原因となると考えられた。

6. 結 語

臨床検体や環境検体を用いたPCRやダイレクト

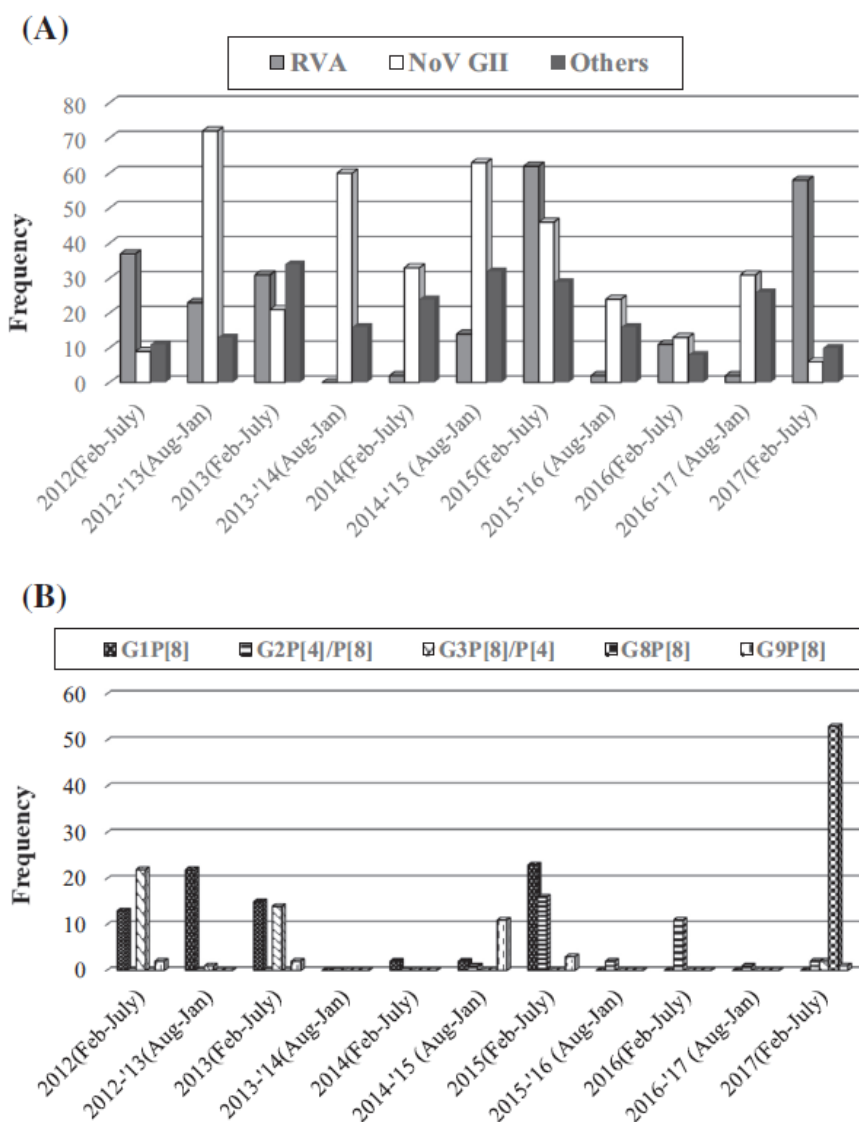


図1 小児下痢症糞便中のウイルス出現頻度

表1 感染者の背景

Characteristics ^a	RVA-positive AGE (n = 58)	RVA-negative AGE (n = 22)	P	G8P[8]-RVA-positive AGE (n = 53)	G8P[8]-RVA-negative AGE (n = 27)	P
Age: median, month (1st-3rd quartile)	28 (20-55)	25 (15-40)	0.15	28 (20-57)	26 (15-39)	0.10
Age group: n (%)						
0-12 m	5 (8.6)	2 (9.1)	0.83	4 (7.5)	3 (11.1)	0.80
13-24 m	18 (31.0)	9 (40.9)		17 (32.1)	10 (37.0)	
25-36 m	12 (20.7)	5 (22.7)		10 (18.9)	7 (25.9)	
37-48 m	6 (10.3)	2 (9.1)		6 (11.3)	2 (7.4)	
49-60 m	4 (6.9)	2 (9.1)		4 (7.5)	2 (7.4)	
>60 m	13 (22.4)	2 (9.1)		12 (22.6)	3 (11.1)	
Sex: n (%)						
Male	38 (65.5)	16 (73)	0.603	35 (66)	19 (70)	0.80
Female	20 (34.5)	6 (27)		18 (34)	8 (30)	
Vesikari score (mean ± SD)	9.53 ± 3.7	6.45 ± 2.9	0.001*	9.38 ± 3.6	7.3 ± 3.7	0.02*
Severity n (%)						
Mild	15 (25.9)	11 (50.0)	0.01	14 (26.4)	12 (44.4)	0.18
Moderate	18 (31.0)	9 (40.9)		18 (34.0)	9 (33.3)	
Severe	25 (43.1)	2 (9.1)		21 (39.6)	6 (22.2)	
Clinical features						
Max. number stools/day (median)	3 (1-5)	2 (1-3)	0.04*	3 (1-5)	2 (1-4)	0.47
Diarrhea duration (median)	4 (2-5)	2 (1-4)	0.002*	4 (2-5)	2 (1-4)	0.04*
Max. number Vomiting/day (median)	2 (0-3)	1 (0-2)	0.30	2 (0-3)	1 (0-3)	0.48
Vomiting duration (median days)	1 (0-2)	1 (0-1)	0.25	1 (0-2)	1 (0-1)	0.58
Temperature (mean ± SD)	38.2 ± 1.1	37.6 ± 1.1	0.03*	38.2 ± 1.1	37.6 ± 1.1	0.02*
Dehydration						
Yes (1-5%, >6%)	42 (34, 8)	9 (8, 1)	0.009*	38 (32, 6)	13 (10, 3)	0.04*
No	16	13		15	14	
Treatment						
Yes (rehydration, hospitalization)	43 (42, 1)	9 (8, 1)	0.005*	39 (38, 1)	13 (12, 1)	0.02*
No	15	13		14	14	

^a Means were compared by Unpaired t-tests, medians were compared by Mann-Whitney U tests, groups were compared by Pearson Chi-square test. Asterisks indicate statistically significant values.

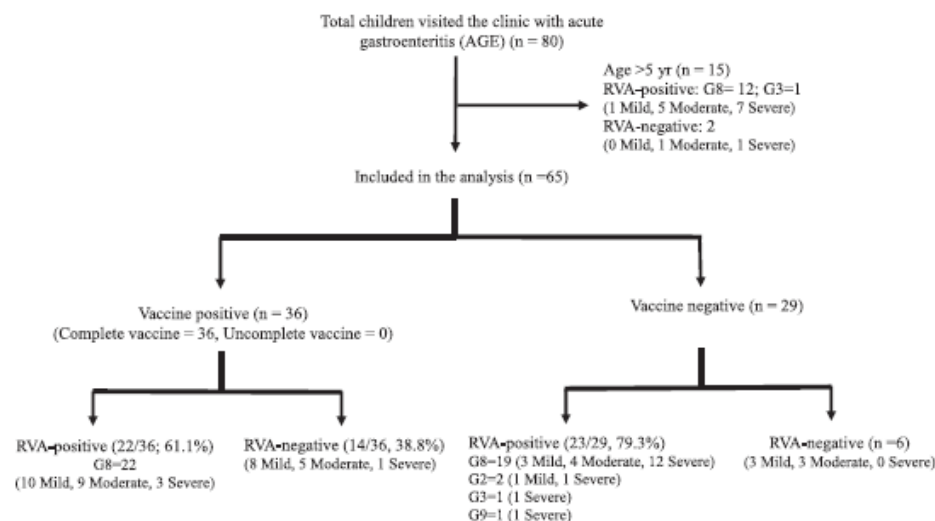


Fig. 2. A flow diagram showing the distribution of AGE in vaccinated and unvaccinated children. Abbreviation: Acute gastroenteritis (AGE); RVA, Rotavirus type A infection.

シーケンスによる分子遺伝学的解析は、ウイルス下痢症の病態並びに環境評価に極めて有用である。これらの方法論は他のウイルス感染症や人獣感染症、感染症学的な環境評価に応用が可能と考えられる。

文 献

1) Hoque SA, Kobayashi M, Takanashi S, Anwar KS, Watanabe T, Khamrin P, Okitsu S, Hayakawa S, Ushijima H. Role of rotavirus vaccination on an emerging G8P[8] rotavirus strain causing an

outbreak in central Japan. Vaccine. 2018 Jan 2;36(1):43-49.

2) 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 May;89(5):818-824.

3) Khamrin P, Kumthip K, Supadej K, Thongprachum A, Okitsu S, Hayakawa S, Ushijima H, Maneekarn N. Noroviruses and sapoviruses associated with acute gastroenteritis in pediatric patients in Thailand: increased detection of recombinant norovirus GII.P16/GII.13 strains. Arch Virol. 2017 Nov;162(11):3371-3380.

表2 ロタワクチン接種と臨床造像

Table 3
Comparison of clinical characteristics in vaccinated and unvaccinated RVA-positive AGE cases.

Characteristics ^a	RVA-positive AGE cases		P-value
	Vaccinated (n = 22)	Unvaccinated (n = 23)	
Vesikari Score (mean ± SD)	7.32 ± 3.4	10.9 ± 3.6	0.001*
<i>Clinical features</i>			
Max. number stools/day (median)	2 (1 – 3)	3 (2 – 6)	0.012*
Diarrhea duration (median)	3 (2 – 4)	5 (4 – 6)	0.009*
Max. number Vomiting/day (median)	1 (0 – 2)	2 (1 – 4)	0.108
Vomiting duration (median days)	1 (0 – 1)	1 (0 – 2)	0.195
Temperature (mean ± SD)	37.6 ± 1	38.6 ± 1.3	0.006*
<i>Dehydration</i>			
No	10 (45%)	6 (26%)	0.3
1–5%	11 (50%)	13 (57%)	
>6%	1 (5%)	4 (17%)	
<i>Treatment</i>			
No	9 (41%)	6 (26%)	0.4
Rehydration	13 (59%)	16 (70%)	
Hospitalization	0 (0%)	1 (4%)	

^a Means were compared by Unpaired t-tests, medians were compared by Mann-Whitney U tests, groups were compared by Pearson Chi-square tests. Asterisks indicate statistically significant values.

