

機関番号：339616

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20790752

研究課題名(和文) 造血幹細胞移植患児におけるロタウイルス抗原血症の解析

研究課題名(英文) Analysis of rotavirus antigenemia in hepatopoietic stem cell transplanted children

研究代表者

菅田 健 (SUGATA KEN)

藤田保健衛生大学・医学部・助教

研究者番号：60454401

研究成果の概要(和文)：我々は免疫正常な乳幼児ロタウイルス(以下RV)胃腸炎入院患児に対し、ウイルス学的解析を実施し、抗原血症は約5日間、抗原量は第2病日をピークとし徐々に減少することの確認をした。一方で、免疫抑制状態にある患児についてのRV感染は不明な点が多いため、今回我々は造血幹細胞移植を受けた患児血清を用い同様の検討をおこなった。その結果、免疫正常患児に比して長期間、低レベルでの抗原血症が続いていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We've already reported that rotavirus antigenemia has been found in immunocompetent rotavirus gastroenteritis patients. However, the pathogenesis of rotavirus infection in immunocompromised transplant recipients remains unclear. Serially collected serum samples obtained from the patients receiving allogeneic hematopoietic stem cell transplants were measured rotavirus antigen levels using a previously established enzyme-linked immunosorbent assay.

Rotavirus antigenemia occurred in hematopoietic stem cell transplant (HSCT) recipients. Although the duration of antigenemia was clearly longer than in immunocompetent rotavirus gastroenteritis patients, the levels of antigen were not as high.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：ロタウイルス感染症・抗原血症

キーワード：ロタウイルス、抗原血症、免疫抑制状態、造血幹細胞移植、抗RV IgG抗体

1. 研究開始当初の背景

(1) ロタウイルス(RV)は冬季乳幼児下痢症の病因ウイルスであり、小腸上皮細胞で特異

的に増殖し、局所感染を起こすウイルスの典型と考えられてきた。

(2) しかしRV感染に伴う中枢神経合併症、肝

障害など胃腸炎以外の腸管外合併症との関連性も報告されるようになった。さらにヒトおよびマウスにおいて RV 粒子内部抗原である VP6 が血清中に検出できることが 2003 年のランセット誌に報告された。そこで我々は免疫正常な乳幼児 RV 胃腸炎入院患児に対し、ウイルス学的解析を実施し抗原血症の確認ならびにウイルス抗原量と全身症状との関連性を明らかにした。

(3) 一方で免疫抑制状態にある患児の RV 感染症に対しての報告は少なく、疫学や病態に解明されていない部分が多くある。

2. 研究の目的

(1) これまでに我々は免疫正常な乳幼児 RV 胃腸炎入院患児に対し、ウイルス学的解析を実施し抗原血症の確認ならびにウイルス抗原量と全身症状との関連性を明らかにした。

(2) これに対し、免疫抑制状態にある患児に関する RV 感染症の報告は少なく、解明されていない部分が多い。そのため①血液疾患や悪性腫瘍などにより造血幹細胞移植（以下 HSCT）を受けた長期入院患児を対象に RV 抗原血症が起きているかの確認をする。また HSCT 後の抗原血症は期間や抗原量の測定を行うとともに、免疫正常な RV 胃腸炎患児の抗原血症陽性例との比較を行い詳細な検討をする。(3) また HSCT 後の RV 抗原血症を確認できた場合には抗体価の測定を行い、その RV 抗原血症による宿主の液性免疫誘導にどのように影響しているかを評価する。

3. 研究の方法

平成 16 年 9 月から平成 19 年 2 月にかけて名古屋大学小児科および名古屋第一日赤小児医療センターにて HSCT を受けた入院患児 63 名（男児 42 名、女児 21 名）を対象とした。被検血清は、移植日を第 0 日として約 1 週間

毎に経時的に採取された。

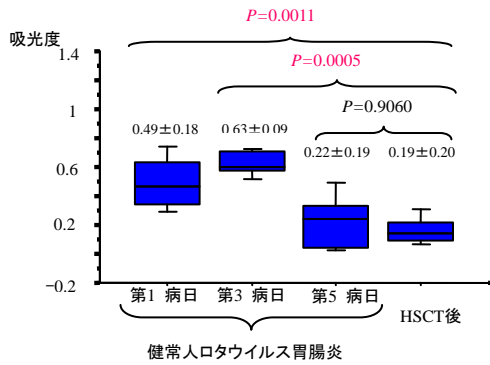
(1) RV 抗原量の測定は A 群ロタウイルスに広く反応する VP6 に対するモノクローナル抗体 (Y0-156) を用いた EIA 法で測定し、OD 値として表現した。①初期検討では被検血清を 16 倍希釈で測定、②抗原陽性となった血清については再度 4 倍希釈で測定した。③また健康人の RV 胃腸炎患児から、第 1、3、5 病日に採取した血清（各病日 5 検体）を抗原量の比較対象とした。さらに下痢、発熱、肝機能障害などの臨床症状は診療録を後方視的に調べた。

(2) また RV IgG 抗体測定は SA-11 株を用いた EIA 法で行い、抗原陽性例および陰性例の移植日を第 0 日として、第 28 日、第 56 日における抗体価を測定した。

4. 研究成果

(1) 690 検体中 43 検体 (6.2%) (68 人中 9 人 (13.2%)) から RV 抗原血症が陽性となった。抗原量 (OD 値) は 0.053~1.345 (平均: 0.193) であった。これらを対象とした健康人 RV 胃腸炎の血清と比較をしたところ第 1 (OD 値: 0.49±0.18)、第 3 病日 (OD 値: 0.63±0.09) と HSCT 後の抗原量を比較すると、有意に前者のほうが高く ($P=0.0011$)、健康人の第 5 病日の OD 値 (0.22±0.19) と HSCT 後の抗原量がほぼ同程度 ($P=0.9060$) であった。(図 1)

図 1 健康児と HSCT 患児の抗原量比較



(2)次に抗原血症の持続期間は1週から10週で平均は4.8週であった。移植後病日については、全ての症例で1ヶ月未満に抗原陽性となったことがわかった。HSCT後にクリーンルームに在室していた期間中に抗原陽性となった症例も認められた。また下痢と同時期に抗原血症を認め、更にGVHDと認識されていた症例も認められた。抗原陽性例の時期については様々であり、RV胃腸炎の非流行期であった症例も認めた(表1)。

表1 抗原量ならびに抗原血症の推移

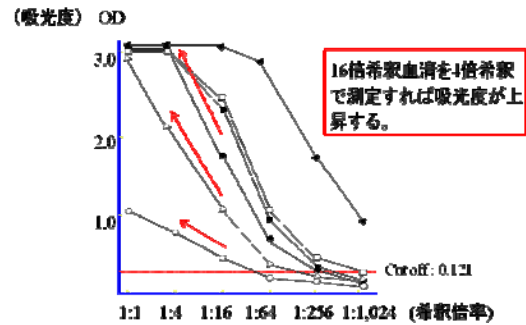
症例	抗原量	持続期間(週)	移植後(日)	季節
1	0.12~0.87	7	21~63	5月~6月
2	0.102	1*	7*	9月
3	0.08~0.15	3	14~28	9月
4	0.15~0.26	2	21~28	8月
5	0.08~0.10	2	7~14	11月
6	0.20~0.34	6	14~49	12月~1月
7	0.07~1.35	7	21~63	8月~10月
8	0.05~0.07	5	0~28	5月~6月
9	0.07~0.50	10	14~77	2月~4月

*1ポイントのみ

(3)①次に抗原陽性となった検体については、被検血清の至適希釈倍率を決定するため、4倍希釈の血清で抗原測定を行った。これは免疫健全のロタウイルス胃腸炎患児の血清中抗原測定においては、16倍希釈が至適希釈倍率であることが分かる(図2)。今回測定したHSCT後の患児血清中の抗原量はカットオフ

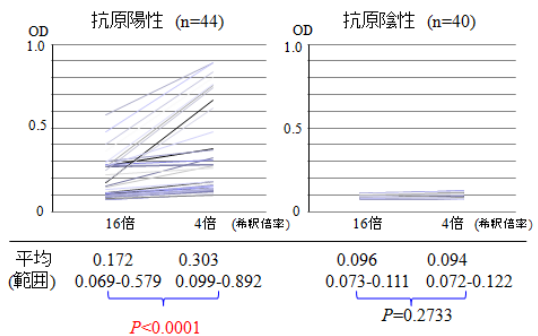
値付近の検体が多く含まれるため、4倍希釈の血清で測定すると特異的な反応であるかを確認した。

図2 被検血清の至適希釈倍率の決定



②HSCT後の抗原陽性血清44検体および抗原陰性検体40検体において、16倍から4倍に血清希釈倍率を変えて抗原測定し、それぞれ比較検討した(図3)。その結果、抗原陽性例は4倍希釈血清が16倍希釈血清に比して有意に高値となった($P < 0.0001$)。しかし抗原陰性検体例では4倍および16倍希釈血清において有意差は認めなかった($P = 0.2733$)。

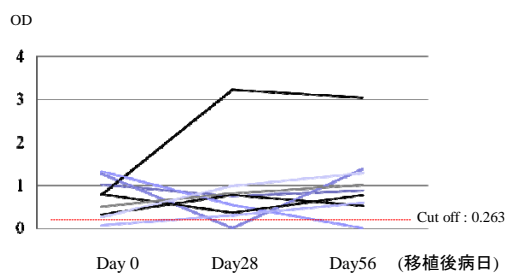
図3 16倍と4倍希釈血清の抗原量比較



(4) RV抗原血症による宿主の液性免疫誘導にどのように影響しているかを評価する目的で抗ロタウイルスIgG抗体を測定した。①まず抗原陽性9例のロタウイルスIgG抗体価を移植日、移植後第28病日、第56病日に測定した(図4)。1例のみが抗体上昇を

認めたと、残りの8例は抗体上昇を認めなかった。これらの結果により HSCT 患児の RV 抗原血症では宿主液性免疫誘導は低率であることが示唆された。また HSCT 後の RV 抗原血症は、宿主の免疫抑制による影響と RV 感染に伴う抗原刺激が弱い可能性があると考えられた。

図4 抗原血症陽性例の経時的 RV IgG 抗体価の推移



②次に移植後第0病日、第56病日における RV IgG 抗体価を抗原陽性9例と陰性54例で測定し比較検討した(表2)。RV 抗原陽性例、陰性例ともに第0病日と第56病日の RV IgG 抗体価に有意差は認めなかった($P=0.214$)、($P=0.118$)。また RV 抗原陽性例と陰性例間で第0病日の RV IgG 抗体価に有意差は認めなかった($P=0.767$)。これらの結果より移植前 RV IgG 抗体は、RV 抗原血症防御には有効でない可能性が示唆された。

表2 抗原血症陽性例と陰性例 RV IgG 抗体価の比較

対象患児	検体採取日	血清中RV IgG抗体価 (median, range)	P value
RV抗原陽性 (n=9)	Day 0	0.704 (0.065-1.320)	0.214
	Day56	1.052 (0.521-3.040)	
RV抗原陰性 (n=54)	Day 0	0.978 (0.041-2.183)	0.118
	Day56	1.107 (0.203-2.964)	

これらの実験結果により HSCT 患児に認められた低レベル、長期間にわたる RV 抗原血症は特異的であることが証明された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7件)

1) Ihira M, Sugiyama H, Enomoto Y, Higashimoto Y, Sugata K, Asano Y, Yoshikawa T. 2010 Direct detection of human herpesvirus 6 DNA in serum by variant specific loop-mediated isothermal amplification in hematopoietic stem cell transplant recipients. J Virol Methods. 査読有, 167(1):103-106

2) Sugata K, Enomoto Y, Sugiyama H, Fujita A, Miyake F, Asano Y, Yoshikawa. Single episode of Behcet's disease-like symptoms caused by herpes simplex virus reactivation. 2009 Pediatr Int. 査読有, 51(4):577-578

3) Yoshikawa T, Ohashi M, Miyake F, Fujita A, Usui C, Sugata K, Suga S, Hashimoto S, Asano Y. 2009 Exanthem subitum-associated encephalitis: nationwide survey in Japan. Pediatr Neurol. 査読有, 41(5):353-8

4) Sugata K, Taniguchi K, Yui A, Miyake F, Suga S, Asano Y, Ohashi M, Suzuki K, Nishimura N, Ozaki T, Yoshikawa T. 2008 Analysis of rotavirus antigenemia and extraintestinal manifestations in children with rotavirus gastroenteritis. Pediatr. 査読有, 122(2):392-397

5) Ihira M, Ohta A, Sugata K, Suga S, Asano Y, Yoshikawa T. 2008 Loop-mediated isothermal amplification for discriminating between human herpesvirus 6A and B. J Virol Methods. 査読有

154(1-2):223-225.

6) Fujita A, Ihira M, Suzuki R, Enomoto Y, Sugiyama H, Sugata K, Suga S, Asano Y, Yagasaki H, Kojima S, Matsumoto K, Kato K, Yoshikawa T. 2008 Elevated serum cytokine levels are associated with human herpesvirus 6 reactivation in hematopoietic stem cell transplantation recipients. J. Infect. 査読有 57(3):241-248.

7) Ohashi M, Sugata K, Ihira M, Asano Y, Egawa H, Takada Y, Uemoto S, Yoshikawa T. 2008 Human herpesvirus 6 infection in adult living related liver transplant recipients. Liver Transpl. 査読有 14(1):100-109.

〔学会発表〕(計9件)

1) 菅田 健 造血幹細胞移植患児で観察された長期間、低レベルロタウイルス抗原血症の病態解明 第58回日本ウイルス学会. 2010年11月7日 徳島

2) 菅田 健 膠原病患者における帯状疱疹発症リスクの解析: 水痘帯状疱疹ウイルス ELISPOT アッセイによる特異的細胞性免疫能の評価 第25回ヘルペスウイルス研究会 2010年5月27日 浜松

3) Ken Sugata Factors in association with three important herpesviruses (CMV, HHV-6, and EBV) reactivation after hematopoietic stem cell transplant. 34th Annual International Herpesvirus Workshop 2009 July 29 USA Ithaca

4) 菅田 健 免疫不全患児におけるロタウイルス感染症の病態解明: 院内感染リスクの高い小児病棟内での状況把握. 第57回日本ウイルス学会. 2009年10月26日 東京

5) 菅田 健 造血器腫瘍の化学療法中に BKV 感染を認めた2小児例 第41回日本小児感染症学会 2009年11月15日 福井

6) Ken Sugata Analysis of rotavirus antigenemia in hematopoietic stem cell transplant recipients. IDSA 2008 October 28th USA Washington DC

7) Ken Sugata Analysis of rotavirus antigenemia in hematopoietic stem cell transplant recipients. 4th ACPID 2008 July 4th Indonesia Surabaya

8) 菅田 健 造血幹細胞移植患児におけるロタウイルス抗原血症の解析. 第49回日本臨床ウイルス学会 2008年6月15日 犬山

9) 菅田 健 Norovirus 胃腸炎による高度脱水で死亡した1小児例 第44回中部日本小児科学会 2008年8月24日 富山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅田 健 (SUGATA KEN)

藤田保健衛生大学・医学部・助教

研究者番号: 60454401