

令和元年6月17日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08628

研究課題名(和文) ロタウイルス感染症の病態解明:全身感染症についてのウイルス学的解析

研究課題名(英文) Pathogenesis of rotavirus antigenemia and extraintestinal manifestations

研究代表者

菅田 健 (Sugata, Ken)

藤田医科大学・医学部・講師

研究者番号：60454401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：1.血液腫瘍病棟で免疫低下状態にある全患者数の半数にRVの院内感染が発生したため血清および便を採取しウイルス学的解析を実施。胃腸炎のない半数の患児も含め過半数に長期間の抗原血症を認めていた。2.小児病院においてA群RV流行中にC群RVが混在していたことを明らかにし肝機能障害はC群RV群では認められなかった。3.RV5接種後下痢が遷延し、X-SCIDと診断された患児から採取した便、血清について型特異リアルタイムRT-PCRを実施。両検体で長期間G1遺伝子型RVゲノムが検出され、移植後は陰性化していた。RV陽性の便でPAGE解析を行い、NSP5遺伝子を含む遺伝子解析よりリアレンジメントを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の開発した型特異リアルタイムRT-PCR法は、ワクチン接種後の5種類の異なる遺伝子型の生体内増殖モニタリングに有用である。この手法を用い乳児院におけるRVワクチン接種後乳児のRVワクチン株の便排泄状況をモニタリングし、周囲における伝播のないことを報告した。腸管外合併症のある患者がワクチン接種後である場合にはどのような遺伝子型による合併症であるのか、または変異がみとめられているのかあるいはRNA血症もみとめているのかなどこれらが解明できればウイルス学的な意義は大変に大きく、ワクチン防御効果の検討だけではなく、次世代のワクチン開発においても貢献度は計り知れない。

研究成果の概要(英文)：1.28 children hospitalized for treatment of malignant diseases during the RV outbreak were enrolled in this study. 14 patients developed RVGE during the period.RV antigenemia was detected in 22 of the 28 patients.Mean age of the patients was significantly lower in RVGE than non RVGE group.2.30 hospitalized children with acute GE were enrolled for the diagnosis of GARV and GCRV.6 were positive for GCRV by ELISA, RT-PCR and electron microscopy, whereas 16 were positive for GARV.Hepatitis were not seen in GCRV group.3.7 month old boy diagnosed with X linked SCID demonstrated chronic GE following the 3rd administration of RV5 and failure to thrive.High copy numbers of RV5 genotype G1 RNA were detected in serially collected stool and serum samples. NGS analysis revealed genetic reassortment in the VP7 gene and the VP4 gene among vaccine strains. In addition,PAGE analysis suggested genetic rearrangements in several genes, and it was confirmed in the NSP5 gene by sequence analysis.

研究分野：小児感染症ウイルス

キーワード：ロタウイルス(RV) 抗原血症 C群ロタウイルス(GCRV) 型特異リアルタイムRT-PCR RV5(5価ロタウイルスワクチン) X-SCID リアソートメント リアソータント

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景
2. 【研究の学術的背景】
3. ロタウイルス胃腸炎は、これまで小腸粘膜上皮細胞局所でのウイルス増殖による疾患と考えられていた。2003年にEstesらのグループにより最初にLancet誌(2003 Nov 1;362(9394):1445-9.)に報告されたのを皮切りに、ここ数年患者血清からウイルス抗原が検出されたという報告が相次ぎ(Fischer TK, et al. J Infect Dis. 2005;192:913-9., Blutt SE, et al. PLoS Med. 2007 ;4:e121) 全身感染症としての病態が注目を集めている。我々はこれまでに免疫正常な乳幼児ロタウイルス胃腸炎入院患児に対し、ロタウイルス構成蛋白中最も多量なVP6に対するモノクローナル抗体(YO-156)を用い抗原血症を測定し、世界に先駆け健康乳幼児でのロタウイルス抗原血症の推移および発熱との関連性を明らかにした(Pediatrics, 122:392-7, 2008.) さらに血清サイトカイン値なども同時に解析し、世界に先駆け健康乳幼児での本疾患の病態を明らかにした。さらに、造血幹細胞移植患児では、これまでの常識を覆すように低レベルの抗原血症が長期間持続し、かつ一般的なロタウイルス胃腸炎の流行期である冬季や春季以外の時期にも抗原陽性となる患者を見出した(Transplant Infect Dis ,14:49 - 56 , 2012)。
4. 我々はロタウイルス胃腸炎同様、小児感染症領域での代表的な common disease である突発性発疹(突発疹)についての臨床ウイルス学分野で数多くの成果を上げてきた。HHV-6が本症の起因ウイルスであることを証明し(J Pediatr 114:535-539, 1989) その後数多くのウイルス学的診断法を開発するとともに(Pediatrics 84:675-677, 1989, J Clin Virol 39:22-6, 2007) HHV-6初感染時合併症として、脳炎・脳症(Pediatrics 89:888-890, 1992, Ann Neurol 33:597-603, 1993, J Clin Virol 2011, 51:12-9) など様々な臨床像を世界に先駆け報告し、HHV-6初感染時の臨床像解明に多大な貢献をしてきた。また、初感染に加え、他のヘルペスウイルス同様、HHV-6も造血幹細胞移植患者(N Engl J Med 324:634-635, 1991, Blood 78:1381-1384, 1991, J Infect. 2008 57:241-8) や肝移植患者(Transplantation 54:879-883, 1992, Liver Transplant 2008 14:100-9) で再活性化し、様々な臨床症状を呈することも明らかにした。このような、HHV-6に関する臨床ウイルス学的研究で培った我々小児科学教室の研究基盤を、ロタウイルス研究にも応用することで徐々に成果が出つつある。さらに、研究代表者である菅田は、3年半の米国CDC、胃腸炎ラボでの研究を通し、ロタウイルスをはじめとした胃腸炎ウイルスに関する分子疫学的解析について世界規模の調査研究に携わってきた。その間、ノロウイルス感染に伴う高度脱水により死亡した症例から分離されたノロウイルスについてウイルス学的解析を施行し、RNA血症を確認、血中・便中から同時に流行株であるG .4を同定した(J Ped Infect Dis , on line doi:10.1093/pit087, 2014)。
5. とところで、ロタウイルス胃腸炎については現在2種類の弱毒生ワクチンが開発され、我が国でも2011年末から臨床現場へ導入されている。しかしながら現時点では任意接種であり、約50-60%の接種率にとどまっている。今後ロタウイルス感染症が減少することは明らかであるが、当面ワクチン未接種者、ワクチン既接種者のロタウイルス性胃腸炎患児が混在することが予想される。我々はワクチン導入前からロタウイルス胃腸炎により入院した患児から血液や便などの臨床検体を採取しており、今後も同様のサンプルを収集することでロタウイルスに対して免疫のある患児とない患児双方からの検体採取が可能となる。このような臨床検体採取により、ロタウイルス抗原血症のメカニズム解明、さらにはそれがワクチンで誘導された免疫によりどのように変化するのか解明できる。また、先の全国調査(Brain Develop 2013 S0387-7604(13)00234-9) などを通し、ロタウイルス脳症や突然死例の病態解明に対する当施設の取り組みが広く認識されるようになっており、全国各地から症例の解析依頼がある。このような貴重なサンプルを用いることで、消化管外合併症の中でも最も重要な脳症・突然死例の病態解明も可能となる。

2. 研究の目的

研究目的(概要) 当該研究計画の目的について、簡潔にまとめて記述してください。我々は世界で初めて免疫正常なロタウイルス胃腸炎患児の抗原血症の推移を報告した(Pediatrics, 122:392-7, 2008.) その後の海外から同様の報告が相次ぎ、これらの結果はロタウイルス胃腸炎が全身感染症であることを強く示唆している。臨床的にもロタウイルス胃腸炎に伴う腸管外合併症、特に脳症や突然死例が大きな問題となっている(Brain Develop S0387-7604, 2013.)。しかしこのような腸管外合併症の発症機構に重要な役割を果たしていると想定される抗原血症の発症機構は未だ不明であるため、本研究ではロタウイルス抗原の血中への侵入機序、さらには抗原血症が中枢神経合併症をはじめとした腸管外合併症の病態形成にどのように関わっているか明らかにする。

3. 研究の方法

- 1) 3年間の研究期間中、胃腸炎患児から便、血清、中枢神経合併症のある症例からは髄液を採取。ロタウイルスの診断は便中ウイルス抗原検出法による。
- 2) ロタウイルス胃腸炎患児血清について、ウイルス抗原量、ゲノム量、抗体価を測定する。

- 脳症・突然死例から得られた髄液についても抗原量、ゲノム量を測定する。
- 3) ロタウイルス胃腸炎患児便検体を用い、分子疫学的解析を行う。
 - 4) 血清サイトカイン、ケモカインを CBA array 法で、MMP、TIMP、Cx を ELISA で測定する。
 - 5) 年齢、性別、臨床症状（疾患重症度）、ロタウイルスワクチン接種の有無、ロタウイルス抗体価、ロタウイルス遺伝子型などの因子および各バイオマーカーと抗原血症の関連性を解析する。

4. 研究成果

1. 免疫低下状態のロタウイルス (RV) 抗原血症：小児血液腫瘍専門病棟において、免疫低下状態である全患者数の半数に RV の院内感染が発生したため経時的に患児血清および便を採取しウイルス学的解析を行った。観察期間中に胃腸炎を発症しなかった半数の患児も含め全患者に長期間の抗原血症を認めていた。免疫低下状態の患児例で、不顕性に RV 抗原血症が起こっていたことを証明した。2. C 群 RV 散発例：RV は VP6 の抗原性にに基づき A 群から H 群に分類されているが、地域の小児病院において A 群 RV 流行中に C 群 RV が混在していたことを明らかにし、両群における腸管外合併症を比較し肝機能障害の合併頻度が C 群 RV 群で有意に低値であることを報告した。現行の RV 迅速抗原キットで陰性例に C 群 RV が含まれることを念頭におくべきである。3. RV 型特異的 real time PCR：乳児院と NICU における RV ワクチン接種後乳児の RV ワクチン株の便排泄状況を解析し、周囲における伝播のないことやワクチンの安全性を報告した。RV 型特異的 real time PCR を開発したことでワクチン接種後の 5 種類の異なる遺伝子型の生体内増殖モニタリングが可能となった。4. 血清中 RV 抗原量、ウイルスゲノム量の相関性：RV ワクチン (RV5) 接種後下痢が遷延し、X-SCID と診断された患児から採取した検体を用いてウイルス学的解析を行った。便、血清について上記 RT-PCR を実施。両検体で長期間 G1 遺伝子型 RV ゲノムが検出され、移植後は陰性化していた。RV 陽性の便で PAGE 解析を行い、NSP5 遺伝子を含む複数の遺伝子分節に変異バンドが認められ、この部分の遺伝子解析よりリアレンジメントを確認した。免疫不全患児の RV 胃腸炎は便だけでなく RNA 血症も長期間持続すること、また長期間のウイルス増殖によると思われる RV5 の遺伝子リアレンジメントを証明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Sugata K, Foytich K, Moon S, Metcalfe M, Yoshikawa T, Nishimura N, Ozaki T, Jiang B/ Comparison of Clinical Symptoms between Group A and Group C Rotavirus Infections in Japan/ *J Emerg Dis Virol*/ 2(4): doi <http://dx.doi.org/10.16966/jedv.122/> 2016/ 有
2. Sugata K, Hull J, Wang H, Foytich K, Moon S, Takahashi Y, Kojima S, Yoshikawa T, Jiang B/ Investigation of a Rotavirus Gastroenteritis Outbreak among Immunosuppressed Patients in a Hospital Setting/ *J Immunol Tech Infect Dis*/ 5:4: doi:10.4172/2329-9541.1000153/2016/ 無
3. Kawamura Y, Miura H, Mori Y, Sugata K, Nakajima Y, Yamamoto Y, Morooka M, Tsuge I, Yoshikawa A, Taniguchi K, Yoshikawa T./ Three infants with rotavirus gastroenteritis complicated by severe gastrointestinal bleeding./ *J Med Virol*./88(1):171-4. doi: 10.1002/jmv.24297./ 2016
4. Bautista-Marquez A, Velasquez DE, Esparza-Aguilar M, Luna-Cruz M, Ruiz-Moran T, Sugata K, Jiang B, Parashar U, Patel M, Richardson V./ Breastfeeding linked to the reduction of both rotavirus shedding and IgA levels after Rotarix® immunization in Mexican infants./ *Vaccine*./ 34(44):5284-5289. doi: 10.1016/j.vaccine./ 2016
5. Miura H, Kawamura Y, Sugata K, Koshiyama N, Yoshikawa A, Komoto S, Taniguchi K, Ihira M, Yoshikawa T./ Rotavirus vaccine strain transmission by vaccinated infants in the foster home. / *J Med Virol*/ 89(1):79-84. doi: 10.1002/jmv.24613./ 2017
6. Hiramatsu H, Suzuki R, Nagatani A, Boda H, Miyata M, Hattori F, Miura H, Sugata K, Yamada S, Komoto S, Taniguchi K, Ihira M, Nishimura N, Ozaki T, Yoshikawa T./ Rotavirus Vaccination Can Be Performed Without Viral Dissemination in the Neonatal Intensive Care Unit./ *J Infect Dis*./ 217(4):589-596. doi: 10.1093/infdis/jix590./ 2018
7. Wang H, Liu M, Sugata K, Wang Y, Hull J, Foytich K, Jiang B./ Development of a new enzyme immunoassay for improved detection of rotavirus in fecal specimens of vaccinated

8. Yoshikawa T, Ihira M, Higashimoto Y, Hattori F, Miura H, Sugata K, Komoto S, Taniguchi K, Iguchi A, Yamada M, Ariga T./Persistent systemic rotavirus vaccine infection in a child with X-linked severe combineimmunodeficiency./J Med Virol. 2019 Jun;91(6):1008-1013. doi: 10.1002/jmv.25410.

〔学会発表〕(計 5 件)

1.菅田健、三浦浩樹、河村吉紀、武藤太一郎、奥村彰久、井平勝、河本聡史、谷口孝喜、吉川哲史/ワクチン接種歴のあるロタウイルス胃腸炎男児から分離された G8P[8]株の分子疫学的解析/ 第 22 回日本ワクチン学会/ 2018 年

2.菅田健、三浦浩樹、河村吉紀、武藤太一郎、奥村彰久、井平勝、河本聡史、谷口孝喜、吉川哲史/ワクチン接種歴のあるロタウイルス胃腸炎男児から分離された G8P[8]株の分子疫学的解析/ 第 50 回日本小児感染症学会/ 2018 年

3.菅田健、三浦浩樹、服部文彦、山田雅文、有賀正、井平勝、河本聡史、谷口孝喜、吉川哲史/X-SCID 患児から長期間排泄された RV5 ワクチン株のウイルス学的解析/ 第 49 回日本小児感染症学会/ 2017 年

4.Sugata K, Miura H, Hattori F, Ihira M, Komoto S, Taniguchi K, Yamada M, Ariga T, Naga Y, Tozawa Y, Yohsikawa T/ Seven months-old-boy with persistent diarrhea after receiving of RotaTeq (RV5) diagnosed with X-SCID and detail virological examinations. / VED (Vaccines for Enteric Diseases) / 2017

5.菅田健、平松裕之、鈴木竜太、山田成樹、井平勝、三浦浩樹、長谷有里沙、宮田昌史、河本聡史、谷口孝喜、吉川哲史/ NICU におけるロタウイルスワクチン株の排泄状況 / 第 20 回日本ワクチン学会/ 2016 年

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：菅田 健

ローマ字氏名：Sugata Ken

所属研究機関名：藤田医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：60454401

(2)研究分担者

研究分担者氏名：井平 勝

ローマ字氏名：Ihira Masaru

所属研究機関名：藤田医科大学

部局名：医療科学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：10290165

(3)研究分担者

研究分担者氏名：三浦 浩樹

ローマ字氏名：Miura Hiroki

所属研究機関名：藤田医科大学

部局名：医学部

職名：助手

研究者番号（8桁）：10751761

(4)研究分担者

研究分担者氏名：工藤 寿子

ローマ字氏名：Kudo Kazuko

所属研究機関名：藤田医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：20303620

(5)研究分担者

研究分担者氏名：吉川 哲史

ローマ字氏名：Yoshikawa Tetsushi

所属研究機関名：藤田医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：80288472

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。