

[論文の内容の要旨]

論 文 題 目

A Prospective Study of Viral Gastroenteritis and Molecular Epidemiology of Astrovirus and Norwalk-like viruses in a Day Care Center

(保育施設におけるウイルス性胃腸炎の前向き研究と
アストロウイルスおよびノーウォークウイルスの分子疫学)

指導教官 牛島廣治教授
東京大学大学院医学系研究科
国際保健学専攻・平成 10 年入学
博士後期課程
87105 秋原志穂

緒言

急性胃腸炎は世界中の小児が罹患する最も重要な病気のひとつであり、発展途上国では死亡原因の 1 位あるいは 2 位にあたる。日本を含む先進国では下痢による死亡率は低い、ほとんどの小児が罹患する病気であることから問題視されている。急性胃腸炎の原因は大きく細菌性と、ウイルス性に分かれるが、我が国のような先進国ではウイルスが原因となる場合が多い。下痢症ウイルスが初めて発見されたのはわずか 28 年前の 1972 年であり、ノーウォーク様ウイルス (NLVs) が米国において検出されたのが最初であるが、それ以降次々と新しいウイルスが発見されている。下痢を起こすウイルスとして最も知られているのはロタウイルスであり、その他には、NLVs、アストロウイルス、腸管アデノウイルスなどがある。特に NLVs は分離培養が未だに成功していないことから、RT-PCR 法が普及する以前は確立された検査法がなかったため、研究に限界があった。近年 RT-PCR 法の普及とともに研究が進み、我が国でもロタウイルスに次いで急性胃腸炎発生の原因となることが明らかとなった。

これらのウイルスはしばしば保育施設、学校、病院、老人ホームなどの施設でおきる急性胃腸

炎の集団発生の原因となっている。特に保育園では呼吸器系の病気について乳幼児の罹患率が高いことから問題となっている。乳児を預かる保育園では園内に看護婦が必ず常勤することや、嘱託医の訪問が義務づけられているなどの保健管理がなされているが、保育園内では毎年急性胃腸炎を含む様々な感染症が流行する。Bartlettらは集団生活をしている乳幼児は家庭で保育されている乳幼児に比べて下痢の罹患率が2倍であると報告している。

これまでもウイルス性下痢症の前向きのコホート研究や、保育園を対象にした研究はいくつかあるが、それらのほとんどは下痢が発生した時にのみ検体を採取し、起因ウイルスを研究しているものである。ウイルス性下痢症は無症候性に感染する児がいたり、ウイルスが下痢症状の発症前に糞便中に排せつされている場合もあり、急性胃腸炎の集団発生が起きてからの観察ではウイルスの排せつ期間や伝播様式についての観察が十分できない。今まで、NLVs、アストロウイルス、ロタウイルス、アデノウイルス全てについての前向き研究はなされていない。さらに日本では保育園を対象とした無症候の時期を含むウイルス性下痢症の前向き研究の報告は今までにない。今回の研究は乳児を預かる保育園でのウイルス性下痢症の実際の発症について発症まえからの観察と原因ウイルスの同定、またそれらのウイルスと症状の関係、さらに検出したウイルスの遺伝子学的検討を行った数少ない研究である。

対象と方法

東京都内の乳児を預かる1ヶ所の保育園の園児を対象とし1999年6月1日から2000年7月31日までの14ヶ月間を観察期間とした。対象者は0歳児クラスの乳幼児で観察開始時には14人から開始し、最終的には新しく入園してきた園児を含め44人を7週間から61週間観察した。対象者の毎週の便検体を採取するため保育園を平均週3日訪問し、保育園内でおむつ内に排せつした便を採取した。

ロタウイルス、NLVs、アストロウイルス、アデノウイルスについて毎週検出を行った。ロタウイルスはELISAで、アデノウイルスはELISAとRT-PCRの両方で、アストロウイルスとNLVsはRT-PCRにより検出を行った。アストロウイルス、NLVsのPCR陽性検体はシーケンスを行い、遺伝子解析を行った。アストロウイルスについては便中のsIgA抗体検出ELISAを行い、特異的sIgAの有無を調べた。

結果

61週間の観察期間のなかで下痢のエピソードは107回起こり、一人あたり1年間で4.07回であった。下痢の集団発生は5回見られた。そのうち3回はアストロウイルスとNLVsによるものであることが明らかとなり、1回はアデノウイルスによることが疑われ、あとの1回は病因が確定できなかった。

今回はアストロウイルスとNLVsによる3回の集団発生について検討を行った。アストロウイルス1回目の集団発生は1999年6月4日に一人の女児からアストロウイルス検出されたことから始まり、その翌週にはNLVsも検出されアストロウイルスとNLVsとの混合感染であった。

最終的に14人中13人がアストロウイルスに感染し、5人が混合感染であった。感染しなかったのは2ヶ月の男児だけであった。

NLVsの集団発生は12月13日に2人の園児からNLVsが検出されたことから始まり、16人中15人の感染が確認された。6月にNLVsに感染した5人はすべてこの時にも感染した。NLVs集団発生の期間中、NLVの感染が続いているなかで、数日以上NLVsの排出が見られなくなり、その後再びNLVsの排出をするという症例が3例に見られた。またその3例中、1例はNLVsの排出がない時期にアストロウイルスの検出が見られた。2回目のアストロウイルスの集団発生は2000年6月5日から始まった。2000年4月に新入園児が加わり観察人数は約2倍になり、その集団発生時は対象者は33人であった。33人中25人の園児がアストロウイルスに感染し、そのうち2人は1回目のアストロウイルス発生の時にも感染していた。

1999年8月2日から始まった集団発生はアデノウイルスが検出できていることから原因はアデノウイルスが疑われた。しかし、その後もアデノウイルスは散発的に発生したが、下痢との関係が明らかでないことと、血清型が決定できなかったことから原因とは断定できなかった。

症状についてはアストロウイルス集団発生1回目（アストロウイルスのみに感染、アストロウイルスとNLVsの混合感染）、アストロウイルス集団発生2回目、NLVs集団発生の比較を行った。以下アストロウイルス1回目集団発生のうちアストロウイルスのみに感染した群をAst-I、アストロウイルスとNLVsに混合感染した群をmix、アストロウイルス集団発生2回めに感染した群をAst-II、NLVsの集団発生時にNLVsに感染した群をNLVsとする。ウイルス検出期間、期間内に起こした下痢の数、下痢の持続期間、発熱時の最高体温について比較したところ、Ast-IとAst-IIに違いは見られなかった。Ast-Iとmix、Ast-IとNLVsに下痢数に有意な差が見られた。またAst-IIとmix、Ast-IIとNLVsにも有意な差がみられた($P < 0.05$)。またAst-IIとNLVsの下痢の持続期間に有意な差が見られたが、その他の下痢の期間や最高熱には有意な差は見られなかった。

アストロウイルス、NLVsの両方に無症候の感染が見られた。感染していても全く症状を起こさない児もあったが、下痢を起こす以前、または以降にウイルスを排せつする場合も観察された。集団発生中、アストロウイルス感染の約50%が無症候であったが、NLVs感染では93%が症候性であった。またウイルスの検出期間はアストロウイルス、NLVs共に今までの報告よりは長いことが確認された。特にNLVsは今まで成人ボランティアのデータしかなかったが、今回は乳幼児の自然感染の結果が得られた。

アストロウイルスのIgAを観察期間を通しての便中から検出したところ、全員が感染後にIgAがすぐ上昇するわけではなかった。また、アストロウイルスの検出がみられなくても抗体値が上昇する場合もあった。

アストロウイルスの血清型は1回めと2回めで同じ1型であった。RT-PCRで型を判別した後、シーケンスを行い、核酸、アミノ酸の配列を比較したが、どちらのレベルでも標準株であるHAstV Oxford1株と94.5%の高いホモロジーを示した。またサンプル間の変異はほとんどなく96.2-100%のホモロジーであった。

NLVsはすべて genogroup II であったが、1 回目の集団発生で混合感染していたのは Toront 型であり、1999 年冬の集団では Camberwell / Lordsdale 型で、どちらも標準株と高いホモロジーを示した。

考察

今回の研究は東京都内にある 1 ケ所の保育園の園児を対象とし、14 ヶ月、61 週間に及ぶウイルス性下痢症に関する観察を行った結果、1 回のアストロウイルスと NLVs の混合感染、1 回のアストロウイルス、1 回の NLVs の集団発生を検出した。今まで下痢症ウイルスは主に冬期に発生すると言われていたが、今回の研究ではアストロウイルスは 2 回とも 6 月に発生した。夏場にアストロウイルスが検出された例も報告されているが、今回のように同じ場所で同じ 6 月に集団発生が起きるのは珍しい。しかし、これについての原因ははっきりしない。

新しい乳幼児が保育園に入園したときは感染の危険性は高くなると考えられるが、今回は 4 月の入園から 2 ヶ月経ってからの感染であり、そのみが原因とは言い切れない。両方の集団発生で検出された遺伝子型がまったく同じであることから、他の要因について続いて観察を行うことでアストロウイルスの発生について新しい知見が得られるかもしれない。便中の sIgA 抗体の検出の結果、園児により抗体の上昇の仕方は様々であった。ほとんどの園児が母乳を飲んでいたので月齢の低い乳児では母乳からの移行抗体の影響も考えられるが、母乳を飲んでいて園児であってもほぼ全員がアストロウイルスに感染した。一方、すでに離乳中の子供や、離乳が完了している子供も感染し、母乳栄養の有無とウイルス感染には関連が見られなかった。母乳からの移行抗体でアストロウイルスの感染の予防はできないことが示唆される。

NLVs の感染は 1999 年の 6 月にアストロウイルスとの混合感染で 1 回、1999 年の 12 月に再度見られた。各発生は genogroup II によるものであったが、サブタイプの違いはあった。NLVs の抗体は再感染を完全に予防するものでないことは報告されているとおり、実際にこの研究では 8 ヶ月という短い期間に 2 回の感染をする児が認められた。

今まで、下痢症ウイルスについては多くの疫学的な研究は行われているが、長期的な観察と検体採取が困難なこともあり、prospective study の数は少ない。さらにほとんどは下痢が発生したときのみの検体採取であり、下痢を起こしていない場合の検討をされている場合は少ない。特に日本ではアストロウイルス、NLVs についてのこのような研究は初めてのことであり、1 つの保育園内で 14 ヶ月の間にこれほど下痢の集団発生が起きていることを明らかにしたことは重要なことであり、従来の衛生管理の見直しや保育園の従事者、園児の両親に対する疾病予防について関心を高めることなどが必要となってくる。さらに、それぞれのウイルスの症状の違い、無症候の感染の割合や排せつ期間について明らかにしたことは今後保育園のような施設における下痢の集団発生を予防するための手がかりとなるにだろう。今回は 1 ケ所だけの研究であったが、さらにこのような研究を続けることで、ウイルス性下痢症の集団発生の頻度や重症度が明らかにできればワクチンの必要性が検討されることも考えられる。