

30. 福岡県で流行しているアストロウイルスの 分子疫学的解析による流行実態の把握

○上田 紗織、小林 孝行、中村 麻子、芦塚 由紀（福岡県保健環境研究所）

【研究目的】

感染性胃腸炎の原因となるアストロウイルスは、従来型ヒトアストロウイルス CAstV 1型～8型（CAstV 1-8）と、2008年頃から報告されているアストロウイルス MLB-AstV 1型～3型（MLB 1-3）及びVA-AstV 1型～5型（VA 1-5）の3種類の遺伝子型がある¹⁾。本研究は、福岡県におけるアストロウイルスのこれらの遺伝子型の流行状況を明らかにすることを目的として、福岡県結核・感染症発生動向調査事業で得られた糞便検体を対象に3種類の遺伝子型を同時に検出する方法を用いてアストロウイルスを検出した。

【研究の必要性】

アストロウイルスは、小児において感染性胃腸炎を引き起こす公衆衛生上重要なウイルスである。また、急性脳炎患者の糞便からMLB-AstVが検出されるなど、胃腸炎以外の症状を引き起こす可能性が示唆されている²⁾。我々はこれまでに、福岡県の終末処理場の流入水中から従来型のCAstVだけでなくMLB-AstV及びVA-AstVを検出した（第66回日本ウイルス学会学術集会にて発表）。一方、2018年の感染症発生動向調査における感染性胃腸炎患者の糞便検体125件を検査した結果、9件のCAstVを含め74件は陽性であったが、MLB-AstVおよびVA-AstVは検出されていない。また、51件は陰性であった（陰性率40.8%）。この理由として、これまでの検出用プライマーのMLB-AstV及びVA-AstVに対する反応性が低いこと、感染性胃腸炎患者以外の糞便検体にもアストロウイルスが含まれていることが考えられた。

終末処理場の流入水の調査より、福岡県において従来型のCAstVだけでなくMLB-AstV及びVA-AstVが流行していることが推察されるが、臨床検体からこれらの遺伝子型が検出された事例はない。CAstVだけでなく、MLB-AstV及びVA-AstVを含めた遺伝子型の流行実態の把握は、福岡県のアストロウイルス感染症の予防及び対策に寄与するために必要である。

【研究計画】

1) 検体

2018年福岡県感染症発生動向調査で採取された0歳0ヶ月～10歳9ヶ月の患者糞便検体136件（咽頭結膜熱1件、感染性胃腸炎125件、手足口病6件、突発性発しん2件、無菌性髄膜炎1件、その他の疾患1件）を対象とする。

2) アストロウイルスの検出

糞便検体から、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出し、CAstV、MLB-AstV 及び VA-AstV の ORF1b 領域の一部 (409bp) を標的としたプライマー³⁾を用いて、QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN) でアストロウイルスを検出する。

3) 検出されたアストロウイルスの系統解析

アストロウイルスが検出された検体について、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) による DNA 精製を行い、2) で用いたプライマー及び BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) でシーケンス PCR 反応を行う。その後、3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) によるシーケンスで配列を取得する。得られた配列と NCBI⁴⁾ から取得した参照配列について MEGA7⁵⁾ を用いて近隣接合法 (Bootstrap 値: 1000) により系統樹を作成する。

4) これまでの調査で得られた結果との比較

ORF2 領域を標的としたこれまでの調査結果と、本研究で得られた結果を比較する。

5) 遺伝子型と臨床症状の関連を検討

検出されたアストロウイルスの遺伝子型と発生動向調査で得られた臨床症状の関連について考察する。

【実施内容・結果】

1) 糞便検体から検出されたアストロウイルスの検出数と遺伝子型

2018 年の感染症発生動向調査で得られた糞便検体 136 件についてアストロウイルスの検出を行った結果、感染性胃腸炎 14 件からアストロウイルスが検出された。検出された 14 件について系統樹を作成したところ、CAstV 1 が 7 件 (検体番号 1-7)、CAstV 4 が 1 件 (検体番号 8)、CAstV 8 が 3 件 (検体番号 9-11) 及び MLB-AstV 1 が 3 件 (検体番号 12-14) であった (図 1)。また、これまでの調査で陰性であった 5 件から、CAstV 1 が 1 件、CAstV 4 が 1 件及び MLB 1 が 3 件検出され、CAstV 1 と判定されていた 3 件が CAstV 8 であった (表 1)。

2) アストロウイルス陽性患者から検出された遺伝子型と臨床症状の関連

アストロウイルス陽性患者の年齢は 0 歳 9 ヶ月から 4 歳 0 ヶ月 (平均値: 1 歳 6 ヶ月)、性別は男 10 名、女 4 名であった。これらの陽性患者から検出された遺伝子型と臨床症状について表 1 に示す。ほとんどの検体において下痢が見られた (14 件中 13 件)。CAstV 1 で、下痢以外にも嘔気、嘔吐又は腹痛が見られた (7 件中 3 件)。また、CAstV 1 (7 件中 6 件) と MLB 1 (3 件中 2 件) で 38°C 以上の高熱が見られた。さらに、CAstV 1 で紅斑及びバラ疹が 1 件、下気道炎が 1 件、CAstV 8 で上気道炎及び気管支炎が 1 件と、胃腸炎以外の症状が見られた。一方、CAstV 4 と MLB 1 の臨床症状は下痢のみであった。

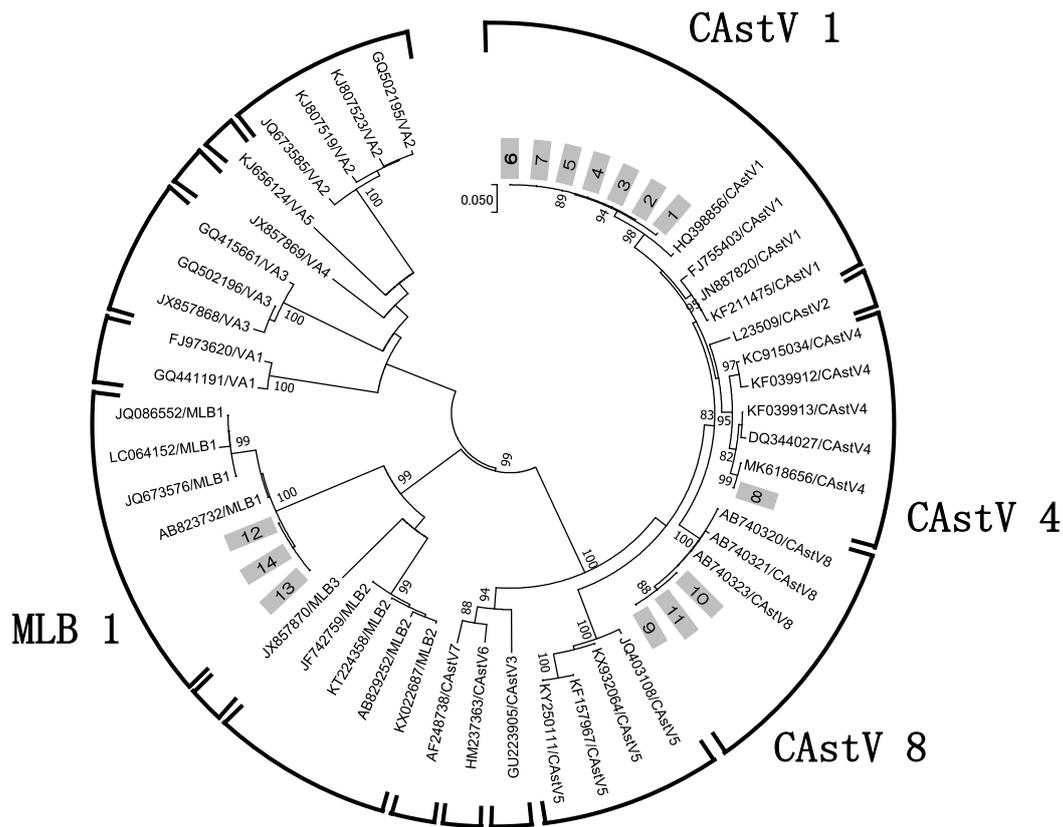


図 1 検出されたアストロウイルスの ORF1b 領域の一部 (292bp) における系統樹 (近隣接合法、Bootstrap 値 : 1000)

検体番号	遺伝子型	年齢	性別	発熱 (°C)	臨床症状	これまでの調査結果
1		2歳3ヶ月	女	39.0	下痢・嘔気・嘔吐・腹痛	CAstV 1
2		1歳4ヶ月	女	38.3	下痢	CAstV 1
3		1歳1ヶ月	男	38.2	嘔気・嘔吐	CAstV 1
4	CAstV 1	4歳0ヵ月	男	38.5	下痢・紅斑・バラ疹	CAstV 1
5		0歳10ヶ月	男	38.4	下痢・下気道炎	CAstV 1
6		3歳5ヶ月	女	39.0	下痢・嘔吐・腹痛	CAstV 1
7		0歳9ヶ月	男	不明	下痢	陰性
8	CAstV 4	2歳5ヶ月	男	37.4	下痢	陰性
9		1歳3ヶ月	女	不明	下痢	CAstV 1
10	CAstV 8	1歳7ヶ月	男	不明	下痢	CAstV 1
11		1歳8ヶ月	男	37.8	下痢・上気道炎・気管支炎	CAstV 1
12		2歳11ヶ月	男	38.9	下痢	陰性
13	MLB 1	1歳3ヶ月	男	39.2	下痢	陰性
14		2歳5ヶ月	男	不明	下痢	陰性

表 1 アストロウイルス陽性患者の検体情報及び臨床症状

【考察と今後の課題】

本研究より、これまでの調査で陰性であった検体から CAstV 1、CAstV 4 及び MLB 1 が検出された。このことから、本研究で用いた方法は、遺伝子型ごとの流行を把握する上で有用と考えられた。また、CAstV 1 と判定されていた検体が CAstV 8 であった。今回は ORF1b 領域の一部を解析したが、今後、領域全体の解析による詳細な遺伝子型の分類を行う必要がある。

本研究で MLB 1 が検出されたことから、福岡県では、2018 年に従来型の CAstV に加えて MLB-AstV が流行していた可能性がある。国内では、2012 年頃に MLB-AstV を含む 3 種類の遺伝子型が検出されている⁶⁾。福岡県でも 2018 年以前からアストロウイルスの 3 種類の遺伝子型が流行していたことが予想されるため、遡って流行の推移を調査することが必要である。また、今後も継続して 3 種類の遺伝子型の流行状況を把握することが重要である。

臨床症状は遺伝子型ごとに胃腸炎症状の種類や発熱の程度、胃腸炎以外の症状の有無が異なる傾向が見られた。本研究では、感染性胃腸炎患者からアストロウイルスが検出されたが、今後も継続して感染性胃腸炎以外の疾患も含めた検出を行い、遺伝子型と臨床症状の関連について解析する必要がある。

【参考文献】

- 1) Pérot *et al.*, Astrovirus Diagnostics. *Viruses* 2017, 9, 10; doi:10.3390/v9010010.
- 2) Sato *et al.*, Acute encephalopathy in an immunocompromised boy with astrovirus-MLB1 infection detected by next generation sequencing. *J Clin Virol* 2016 May;78:66-70. doi: 10.1016/j.jcv.2016.03.010. Epub 2016 Mar 9.
- 3) Finkbeiner, S. R. *et al.*, Human stool contains a previously unrecognized diversity of novel astroviruses. *Virology Journal* 2009, 6:161.
- 4) NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>
- 5) Kumar *et al.*, MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33(7):1870-1874.
- 6) Khamrin *et al.*, Multiple astrovirus MLB1, MLB2, VA2 clades, and classic human astrovirus in children with acute gastroenteritis in Japan. *Research Support, Non-U.S. Gov't J Med Virol.* 2016 Feb;88(2):356-60. doi: 10.1002/jmv.24337. Epub 2015 Aug 6.

【経費使途明細】

使 途	金 額
消耗品費 (試薬・書籍等)	2 9 7, 6 9 6 円
旅費 (R. 2. 10. 28~31 川崎市・東京都)	6 7, 2 0 0 円
謝金 (研究補助 1 名×2 日間)	1 6, 1 0 4 円
参加費 (情報収集×2 回)	1 9, 0 0 0 円
合 計	4 0 0, 0 0 0 円
大同生命厚生事業団助成金	4 0 0, 0 0 0 円