

ノロウイルス感染後におけるウイルス遺伝子及び腸管粘膜免疫の推移について

徳島県保健環境センター
山本保男・嶋田啓司*

Yasuo YAMAMOTO, Keiji SHIMADA*
Tokushima Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences

Key words: ノロウイルス ELISA IgA
遺伝子 腸管免疫

I はじめに

ノロウイルス (以下 NV) はウイルス性食中毒や学校・老人介護施設などでウイルス性胃腸炎の集団発生を引き起こすなど、公衆衛生上重要な位置を占めるウイルスの一つである。

最近の研究により、NVに対する抵抗性は獲得免疫のみならず、組織-血液型抗原が大きく関与することが判明した。今回、我々はNV感染・発症者から長期間にわたり糞便を獲得する機会が得られたので、腸管粘膜から分泌される抗NV特異IgA抗体の産生状況を継続測定するとともに、糞便中NV遺伝子を検査し、感染性ウイルスの排泄期間について考察したので報告する。

II 材料及び方法

1 糞便材料

平成14年2月に弁当を推定原因食品とする集団食中毒事例が発生し (喫食者数: 174名, 有症者数: 122名), 検査の結果NVが検出された。検出されたNVはgenogroup II (以下GII) であり, genotype 3であった。この事例においてNVが検出された有症者10名についてインフォームドコンセントの後, 感染後10日, 14日及び1ヶ月から10ヶ月後まで月1度の糞便採取を依頼した。

2 遺伝子検出法

遺伝子検出に用いたプライマーは1st PCRにCOGF/SKR, 2nd PCRにCOGF/Rを使用し, サザンハイブリダイゼーションにより確認した。

3 糞便中NV特異IgA抗体の測定

(1) 測定法: 酵素抗体法 (ELISA)

(2) 試薬

- ・抗原: 組み替えDNA技術によりバキュロウイルスで発現させたウイルス様中空粒子 (virus like particle: VLP) を国立感染症研究所ウイルス第2部から分与を受け用いた。起因ウイルス (GII: Mexico/89/MX類似株) に抗原的に一番近いVLPとしてVLP・809 (図1), 対照としてGIのVLP・rcvを使用した。濃度は100ng/100μlを使用した。
- ・ブランク抗原: ウシ血清アルブミンをコーティング用緩衝液で溶解 (100ng/100ml) して用いた。
- ・コーティング用緩衝液: 0.05M carbonate-bicarbonate緩衝液

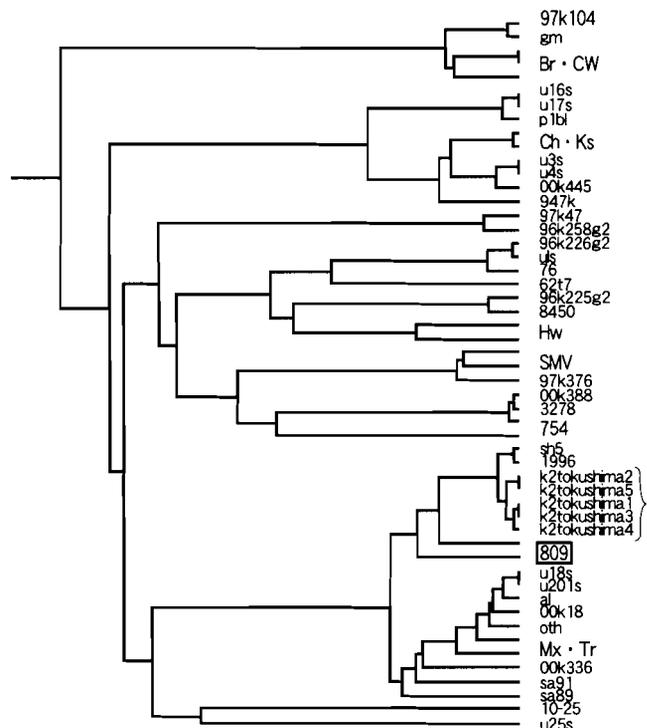


図-1 検出ウイルスの系統樹 (GII)

* (現 徳島県徳島保健所)

(pH9.6)。

- ・PBS-T: 0.05% Tween20を含むPBS
- ・1% SM/PBS-T: 1% skim milkを含むPBS-T。
- ・5% SM/PBS-T: 5% skim milkを含むPBS-T。
- ・基質: Tetramethylbenzidine (TMB) を0.05M phosphate-citrate 緩衝液 (pH9.6) で0.1mg/ml に溶解する。

(3) 操作手順

- ・VLPを96平底プレートの奇数列の各ウェルに100μl 加え、ブランク抗原をプレートの偶数列の各ウェルに100μl 加え、プレートを4℃に一夜置く。
- ・各ウェルの液を除き、5% SM/PBS-Tを加え4℃に一夜置く。
- ・各ウェルの液を除き、PBS-Tで4回洗浄する。
- ・糞便の20倍 (w/w) から2560倍までの2倍階段希釈系列を1% SM/PBS-Tで作製し、各希釈液をVLPウェル及びブランク抗原ウェルにそれぞれ100μl ずつ加え、37℃に1時間置く。
- ・各ウェルの液を除きPBS-Tで4回洗浄する。
- ・各ウェルにHRP-conjugated goat anti-human IgAを100μl 加え37℃に1時間置く。
- ・各ウェルの液を除き、PBS-Tで4回洗浄する。

- ・TMB溶液を各ウェルに100μl 加え、遮光して室温に30分置く。
- ・4N硫酸を各ウェルに50μl 加え、反応を停止する。
- ・450nmで吸光度を測定する。

(4) 判定

ブランク抗原に比べ、OD値が0.2以上の差が認められた検体を陽性とした。抗体価は陽性を示した最高希釈倍数の逆数を 10×2^n で示し、抗体陽性者の幾何平均値 (GMT) で表した。

III 結 果

1 NV遺伝子検出の推移

感染後の遺伝子検出の推移を図2に示した。感染後11日前後で10名中5名が2nd PCRで検出されなかったが、2名は12日後でも1st PCRで検出された。14日後では11日前後で検出された5名中3名が検出されなかった。

2 糞便中特異IgAの測定結果

20倍以上の抗体価を示した陽性者数を抗原毎、日数毎に表-1に示した。起因ウイルスと抗原的に一番近いVLP・809に対しては、感染後4日前後に10名中5名にNV特異IgA抗体が検出され、それ以後は70~100%の抗体保有率であった。同抗原は感染後4日目から10日後にかけて急上昇し、調査期間中を通じ最高の平均抗体価を示した。14日後から60日

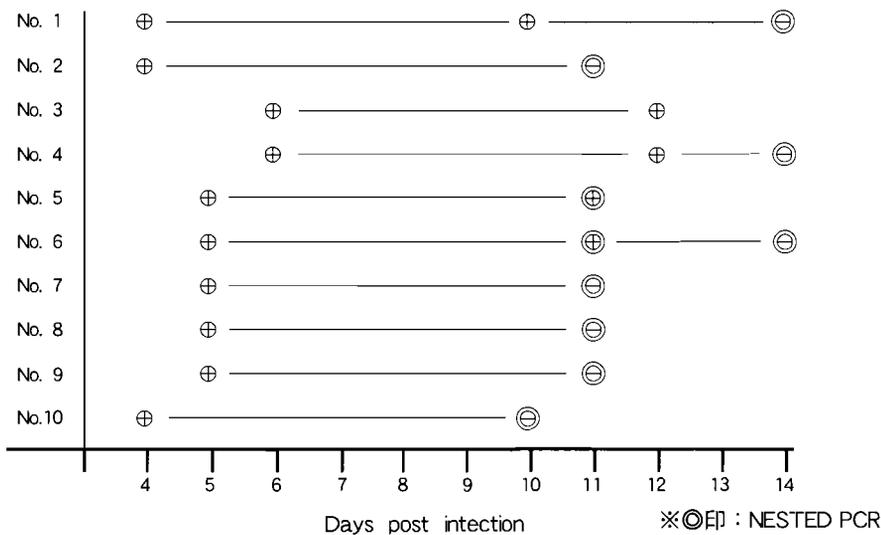


図-2 ノロウイルス遺伝子検出の推移

表-1 各抗原に対する抗体陽性者数の推移

日数 抗原	4日	10日	14日	30日	60日	90日	120日	150日	180日	210日	240日	270日	300日
890	5	7	8	8	7	8	8	9	7	8	7	9	8
GI	3	6	5	5	6	6	5	5	4	8	7	3	6
n =	10	10	8	10	10	10	8	10	10	10	10	9	9

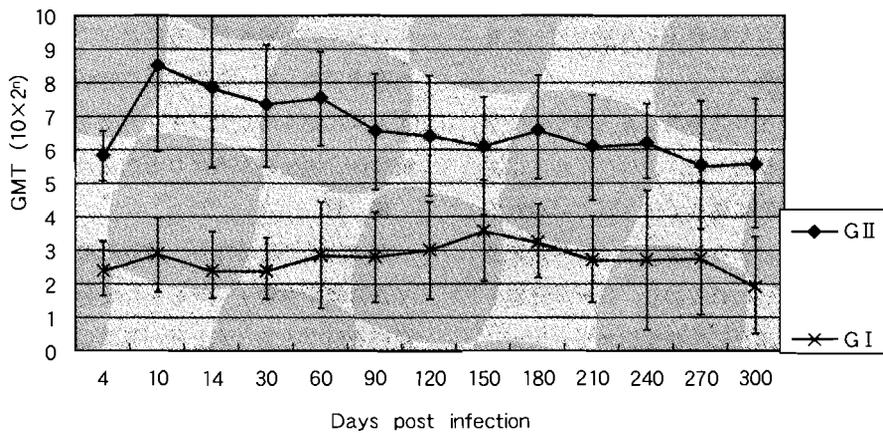


図-3 各抗原に対する抗体価の推移

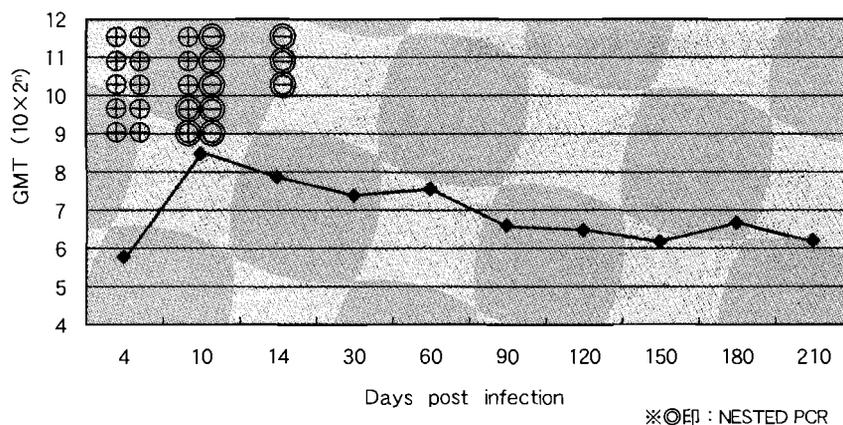


図-4 遺伝子検出状況と糞便中特異IgA抗体の相関について

後までは低下傾向を示したが、比較的高い抗体価であった。60日後から90日後にかけて平均抗体価は約1/2低下し、それ以後300日後まで発症直後とほぼ同じ価を示しながら低下傾向を示した。

一方、対照として測定したGIであるVLP・rCVは全調査期間中を通じ、抗体価の顕著な変動はみられなかった。

3 糞便中NV遺伝子と特異IgA抗体の関係

糞便中のNV遺伝子検出状況と、糞便中抗NV特異IgA抗体の検出状況を図4に示した。感染後10日前後で特異IgA抗体が最高値を示したが、同じ糞便中のNV遺伝子は10名中5名が2ndPCRでも遺伝子は検出されなかった。さらに最高値に近い価を示した発症後14日目には検査可能であった8名全員が2ndPCRでも遺伝子不検出であった。

4 血液型との関係

血液型が判明した有症者24名のうちA型が11名、B型が7名、O型が5名、AB型が1名であった。

IV 考察

NVは遺伝学的に多様であり、現在genogroupe

I (GI) とgenogroupe II (GII) でそれぞれ14と17の遺伝子型に分類されている。しかも各遺伝子型は血清型と非常に緊密な関係を保持している。何度となくNVに罹患することは多様な抗原性との関係が推測されている。

今回の我々の成績において糞便中NV特異IgA抗体は感染後10~14日で最高値を示し、以後10ヶ月後まで漸減し、10ヶ月後にはほぼ感染直後のレベルであった。しかし、10ヶ月後でも対照のGIに比べ明らかに高レベルであった。10ヶ月後の糞便中IgA量がNVを不活化するための十分量であるか否かは不明であるが、NVの感染・発症に免疫学的2次応答が関与していることが明らかになっていること、及び10ヶ月後の糞便中IgA量から考え免疫学的2次応答を惹起するに必要な免疫記憶細胞が十分量であることが推測され、感染防御効果があることが示唆された。ボランティアによるNVによる感染実験の結果¹⁾、分泌型の未発症者はNV投与後2~3日後にのみ唾液中のNV特異IgA抗体が上昇していたが、このことは免疫学的2次応答が惹起することにより、発症を防いだと推測されている。

一方、同じ感染実験の結果、感染者の唾液中のNV特異I

g A量はウイルス投与後2週間でピークに達していた。このことは感染後10～14日で糞便中NV特異Ig A量がピークを示した我々の成績も同様であった。

今回、我々は糞便中のノロウイルス特異Ig A量と共にウイルス遺伝子の消長についても検討した。ノロウイルスによる胃腸炎症状の持続期間は一般的に短く1～3日といわれている。そして、RT-PCR法による糞便中ウイルス遺伝子の排泄期間は発症後7～14日といわれており、我々の成績も同様であった。ノロウイルスは未だに培養細胞等での培養に成功していないことから、その感染性ウイルスの排泄期間は不明である。NVの感染性は非常に強く10～100個のウイルス量で感染が成立するといわれているが、糞便中の特異Ig A量が感染後10日後に最高値を示していたことから、この時期のNVが不活化されている可能性が強く示唆された。

最近の研究により、NVに対する抵抗性に組織一血液型抗

原が大きく関与していることが判明した。今回の事例においては全ての血液型から有症者がでて、かつ有症率が70%という高率であった。このことは今回の事例においては、起因ウイルスに対するレセプターを全ての血液型の人が保有し、免疫学的2次反応があまり惹起されなかったことを示している。

謝 辞

稿を終えるに当たり、検体採取にご協力頂いた方々及びウイルス様中空粒子(VLP)を分与していただいた国立感染症研究所ウイルス第2部の名取克郎先生、武田直和先生に感謝いたします。

文 献

- 1) Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, et al 1 : Nat Med. 9. 54 8-553 (2003)