

goat affinity-purified antibody against rabbit IgG (Cappel, MP Biomedicals, Solon, OH, USA). RV-infected MA104 cells (in-house) were used as positive controls.

#### RT-PCR to detect rotavirus RNA in stool and urine sediments

Thereafter, stools and urinary sediments were analysed with nested RT-PCR to detect viral dsRNA (encoding the VP7 outer capsid protein and serotypes G1, 2, 3, 4, 8, and 9) by use of consensus primers [8]. RNA was extracted with TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). PCR was first carried out with initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of 94°C for 1 min, 54°C for 1 min, and 72°C for 1.5 min. Multiplex PCR was then carried out for 30 cycles. The PCR products were analysed by electrophoresis on 1% agarose gel containing ethidium bromide, and visualized under UV light.

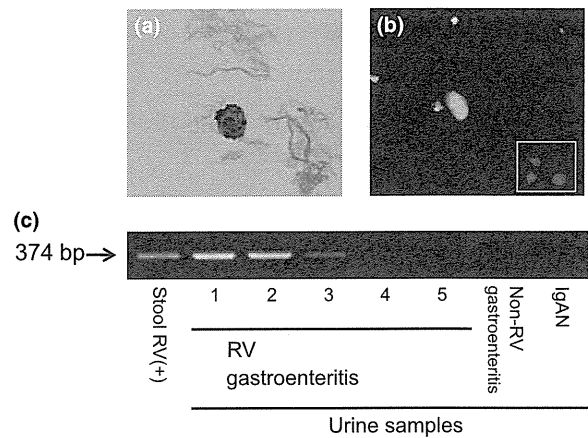
## Results

A small but significant number of inclusion-bearing cells were frequently detected in the urine samples of patients with RV gastroenteritis (Fig. 1a). These cells were positive for CK but negative for epithelial membrane antigen, which indicated that they were of renal tubular epithelial cell origin, similar to the CK-positive cells in the urine of an IgA nephropathy patient (data not shown). Furthermore, we found that about 40% of the CK-positive cells (fluorescein isothiocyanate) coexpressed RV antigens (rhodamine), as represented by the double-positive cells with orange cytoplasm in the merged picture (Fig. 1b).

In nested RT-PCR experiments, a clear PCR product was detectable in stool samples of patients with RV gastroenteritis (Fig. 1c, lane 1). RV dsRNA was detectable in four of five patients with RV gastroenteritis, although to a variable degree (Fig. 1c, lanes 2–6). Importantly, no PCR product was detectable when non-RV gastroenteritis or IgA nephropathy samples were used for the assay. Representative samples are shown in Fig. 1c (lanes 7 and 8). The RV dsRNA in the stools and urinary sediments were all of serotype G3 (374 bp), because no PCR products were obtained when primers for other serotypes were used for the assay.

## Discussion

This is the first study to find evidence of RV infecting the urinary sediment cells of immunocompetent children with RV gastroenteritis, using urinary sediments from affected patients.



**FIG. 1.** Detection of rotaviral antigens and double-stranded RNA in urinary sediments of rotavirus (RV)-infected patients. (a) Renal tubular cell-shaped inclusion-bearing cell. (b) Immunofluorescent staining of renal tubular cells: a cytokeratin-positive cell (fluorescein isothiocyanate: green) coexpressing RV antigen (rhodamine: red); a double-positive cell with orange cytoplasm (merged: orange). The cells in the lower box are RV-infected MA104 cells (positive controls). (c) Results of nested RT-PCR of urinary sediments. Four of five RV-infected patients showed RV RNA. The stool of an RV-infected patient was used as a positive control. The urine from a non-RV gastroenteritis patient and an IgA nephropathy (IgAN) patient were used as negative controls.

To confirm RV infection of the kidney, direct analysis with a kidney section is preferable to analysis of urinary sediments. However, it is very difficult to obtain kidney sections, because RV gastroenteritis is always self-limiting, and renal biopsy has ethical implications. We therefore selected urine samples from patients with RV gastroenteritis.

Inclusion-bearing cells were observed in the urinary sediments of RV gastroenteritis patients (Fig. 1a). In general, inclusion-bearing cells in the urine indicate viral infection [9]. Taken together, these results suggest that RV infects urinary sediment cells in RV gastroenteritis patients.

We then found cells double-positive for RV antigen and CK (Fig. 1b) in the urinary sediments of RV gastroenteritis patients, indicating RV infection of renal tubular epithelial cells. Moreover, nested RT-PCR detected RV dsRNA in the urinary sediments of RV gastroenteritis patients.

We did not investigate clinical significance in this study, and therefore the relationship of RV kidney infection to RV gastroenteritis remains uncertain. It is also unclear what types of urinary sediment cell are infected by RV in addition to renal tubular epithelial cells. The findings of this study were obtained from a small sample, and therefore they must be confirmed in a larger one. It is essential to conduct further studies to examine the clinical aspects of RV renal infection.

## Acknowledgements

---

We thank S.Kouraba for her excellent technical assistance and K. Katayama for useful discussions.

## Transparency Declaration

---

There are no conflicts of interest to declare.

## References

---

1. Chitambar SD, Tatte VS, Dhongde R, Kalrao V. High frequency of rotavirus viremia in children with acute gastroenteritis: discordance of strains detected in stool and sera. *J Med Virol* 2008; 80: 2169–2176.
2. Blutt SE, Kirkwood CD, Parreno V et al. Rotavirus antigenemia and viremia: a common event? *Lancet* 2003; 362: 1445–1449.
3. Lynch M, Lee B, Azimi P et al. Rotavirus and central nervous system symptoms: cause or contaminant? Case reports and review. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 932–938.
4. Ioi H, Kawashima H, Nishimata S et al. A case of Reye syndrome with rotavirus infection accompanied with high cytokines. *J Infect* 2006; 52: e124–e128.
5. Morita T, Ashida A, Fujieda M et al. Four cases of postrenal renal failure induced by renal stone associated with rotavirus infection. *Clin Nephrol* 2009; 73: 398–402.
6. Morrison C, Gilson T, Nuovo GJ. Histologic distribution of fatal rotaviral infection: an immunohistochemical and reverse transcriptase in situ polymerase chain reaction analysis. *Hum Pathol* 2001; 32: 216–221.
7. Ramig RF. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol* 2004; 78: 10213–10220.
8. Gouvea V, Glass RI, Woods P et al. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 276–282.
9. Boyd JF, Nedelkoska N. Further observations on inclusion-bearing cells in urinary sediment in infectious diseases. *J Clin Pathol* 1967; 20: 835–840.

# Analysis of rotavirus antigenemia in hematopoietic stem cell transplant recipients

K. Sugata, K. Taniguchi, A. Yui, H. Nakai, Y. Asano, S. Hashimoto, M. Ihira, H. Yagasaki, Y. Takahashi, S. Kojima, K. Matsumoto, K. Kato, T. Yoshikawa. Analysis of rotavirus antigenemia in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2012; **14**: 49–56. All rights reserved

**Abstract :** Systemic rotavirus infection, such as rotavirus antigenemia, has been found in immunocompetent rotavirus gastroenteritis patients. However, the pathogenesis of rotavirus infection in immunocompromised transplant recipients remains unclear. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to measure rotavirus antigen levels in serially collected serum samples obtained from 62 pediatric patients receiving allogeneic hematopoietic stem cell transplants (HSCT). Rotavirus antigen was detected in 43 (6.8%) of 633 serum samples (8 of 62 patients). The duration of rotavirus antigenemia ranged between 1 and 10 weeks, and diarrhea was concurrent with rotavirus antigenemia in Cases 3, 6, 7, and 8. The level of viral antigen in the transplant recipients ( $0.19 \pm 0.20$ ) was significantly lower than that observed in serum samples collected from immunocompetent patients on either day 1 ( $0.49 \pm 0.18$ ,  $P = 0.0011$ ) or day 3 ( $0.63 \pm 0.09$ ,  $P = 0.0005$ ). A patient who received a graft from a human leukocyte antigen (HLA)-mismatched donor was at significant risk for rotavirus antigenemia ( $P = 0.024$ ; odds ratio = 9.44) in comparison to patients who received grafts from HLA-matched donors. Although the duration of antigenemia was clearly longer in HSCT patients than in immunocompetent rotavirus gastroenteritis patients, the levels of viral antigen were not as high. Therefore, mismatched HLA may be a risk factor for rotavirus antigenemia after HSCT.

**K. Sugata<sup>1</sup>, K. Taniguchi<sup>2</sup>, A. Yui<sup>2</sup>, H. Nakai<sup>1</sup>, Y. Asano<sup>1</sup>, S. Hashimoto<sup>3</sup>, M. Ihira<sup>4</sup>, H. Yagasaki<sup>5</sup>, Y. Takahashi<sup>5</sup>, S. Kojima<sup>5</sup>, K. Matsumoto<sup>6</sup>, K. Kato<sup>6</sup>, T. Yoshikawa<sup>1</sup>**

Departments of <sup>1</sup>Pediatrics, <sup>2</sup>Virology and Parasitology, <sup>3</sup>Hygiene, Fujita Health University School of Medicine, Toyoake, Aichi, Japan, <sup>4</sup>Faculty of Clinical Engineering, Fujita Health University School of Health Sciences, Toyoake, Aichi, Japan, <sup>5</sup>Department of Pediatrics, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan, <sup>6</sup>Division of Hematology-Oncology, Children's Medical Center, the Japanese Red Cross Nagoya First Hospital, Nagoya, Japan

Key words: rotavirus; antigenemia; hematopoietic stem cell transplantation; pediatric

Correspondence to:  
Tetsushi Yoshikawa, MD, Department of Pediatrics,  
Fujita Health University School of Medicine, Toyoake,  
Aichi 4701192, Japan  
Tel: +81-562-939251  
Fax: +81-562-952216  
E-mail: tetsushi@fujita-hu.ac.jp

Received 3 May 2011, revised 15 June, 20 June 2011, accepted for publication 28 June 2011

DOI: 10.1111/j.1399-3062.2011.00668.x  
*Transpl Infect Dis* 2012; **14**: 49–56

Rotavirus is the major cause of gastroenteritis in young children worldwide. Severe dehydration caused by rotavirus-induced diarrhea and vomiting can be fatal in developing countries. In addition, the gastroenteritis induced by rotavirus infection causes a large economic burden in developed countries. Rotaviral infection is generally benign and self-limited in immunocompetent children. In contrast, it has been reported that rotavirus can cause severe diarrhea resulting in fatal outcomes for immunocompromised transplant recipients (1–5). Thus, the pathogenesis of rotaviral infection may differ between immunocompetent and immunocompromised individuals.

Initially, rotavirus replication was thought to be limited to the gastrointestinal tract in patients with rotavirus gastroenteritis. However, recently, rotavirus antigen and RNA were detected in the sera of rotavirus-infected children (6–9). In addition, rotavirus antigen was detected not only in the serum but also in several organs, including the stomach, intestine, liver, lung, spleen, kidney, pancreas, thymus, and bladder in rotavirus-infected animals (10). These findings suggest that rotavirus spreads beyond the intestine in children with rotavirus gastroenteritis, resulting in systemic viral infection. Recently, we found that rotavirus antigenemia was frequently observed during the acute phase of rotavirus

gastroenteritis (11). Rotavirus antigen peaked on day 2 of the illness, with the amount of viral antigen gradually decreasing to nearly undetectable levels by day 6. We also found that cytokines were involved in controlling antigenemia levels. The results of this study, together with those from previous studies (7, 8, 12, 13), suggested that host immune responses have important roles in regulating viral replication. Therefore, the kinetics of rotavirus antigenemia in transplant recipients may be different from those in immunocompetent rotavirus gastroenteritis patients. In this study, we sought to elucidate the kinetics of rotavirus antigenemia in hematopoietic stem cell transplant (HSCT) recipients. We measured rotavirus antigen levels in serum samples serially collected from pediatric HSCT recipients and analyzed the associations between antigenemia and clinical features.

## Patients and methods

### Patient characteristics

Between September 2004 and February 2007, 62 patients received allogeneic HSCT (17 with allogeneic bone marrow transplant [BMT] from human leukocyte antigen [HLA]-matched siblings, 9 with allogeneic BMT from HLA-mismatched siblings, 22 with allogeneic BMT from unrelated donors, 2 with peripheral blood stem cell transplants, and 12 with umbilical cord blood transplants) at the Division of Hematology-Oncology at the Children's Medical Center, the Japanese Red Cross Nagoya First Hospital, or the Department of Pediatrics at the Nagoya University Graduate School of Medicine. The patients' guardians provided written consent for their participation in this study. This study was approved by the review boards of the 3 institutes. Patient characteristics are summarized in Table 1 and include age, gender, underlying diseases, type of graft, HLA matching, having received total body irradiation (TBI) or anti-thymocyte globulin (ATG) in conditioning regimen, and occurrence of acute graft-versus-host disease (GVHD).

### Patient management

Details of the conditioning regimen and GVHD prophylaxis have been previously described (14, 15). In brief, patients with hematologic malignancies were conditioned with high-dose chemotherapy consisting

of melphalan (180 mg/m<sup>2</sup>) plus busulfan (16 mg/kg) or TBI (12 Gy). Patients with severe aplastic anemia were conditioned with 200 mg/kg cyclophosphamide and 10 mg/kg rabbit ATG for transplantation from a matched sibling donor. For patients transplanted with an unrelated bone marrow donor, TBI (5–10 Gy) was added (16). GVHD prophylaxis consisted of cyclosporine or tacrolimus with short-term methotrexate. All patients received trimethoprim-sulfamethoxazole orally or inhaled pentamidine as prophylaxis against *Pneumocystis jirovecii*. The standard doses of oral amphotericin B and acyclovir were administered as prophylaxis for fungal and herpes simplex virus infections. Intravenous  $\gamma$ -globulin preparations were administered weekly during the first 3 months as prophylaxis for cytomegalovirus (CMV) infection. In addition, ganciclovir was given as preemptive therapy against CMV infection following a positive result from a CMV antigenemia assay. Acute and chronic GVHD was diagnosed and graded according to established criteria.

### Experimental design

Serum samples were collected from 62 recipients at the time of HSCT, weekly for 3 or 4 months post transplant. Ultimately, 633 serum samples were analyzed in this study. In addition to these samples, 15 serum samples were collected from rotavirus gastroenteritis patients on days 1, 3, and 5 of illness and used as controls. Clinical data were collected retrospectively and assessed to determine associations with rotavirus antigenemia.

### Rotavirus antigen detection

Rotavirus antigen was measured using a previously described enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of VP6 antigen of the virus (11). Diluted serum (1:16, 50  $\mu$ L) was used to detect rotavirus antigen. Ninety-six-well plates (Nalgen Nunc, Rochester, New York, USA) coated with a monoclonal antibody against the VP6 antigen of rotavirus (YO-156) (17) were used for the ELISA (18). The plates were incubated with 50  $\mu$ L of diluted serum at 4°C overnight. Then, 50  $\mu$ L of anti-human rotavirus hyperimmune rabbit serum (diluted 1:5000 with phosphate buffered saline [PBS] containing 0.05% Tween-20 [PBST] and 2.5% skim milk) was added to each well. Peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) (diluted

**Patient characteristics and risk factors for rotavirus antigenemia after hematopoietic stem cell transplantation**

Categories	Rotavirus antigenemia		Odds ratio (95% CI)	P
	Yes (n = 8)	No (n = 54)		
Age (years)	7.4 ± 5.6	8.3 ± 5.1	...	0.652
Sex				
Male	4	37	0.46 (0.10–2.06)	0.312
Female	4	17		
Underlying disease*				
Malignancy	4	36	2.0 (0.44–8.93)	0.368
Non-malignancy	4	18		
Total body irradiation				
Yes	6	41	1.05 (0.18–5.85)	0.955
No	2	13		
Anti-thymocyte globulin				
Yes	4	11	0.25 (0.05–1.19)	0.080
No	4	43		
Acute graft-versus-host disease (grade 2–4)				
Yes	3	17	0.77 (0.16–3.58)	0.705
No	5	37		
Source of the graft				
Related donor	3	23	1.0	
Unrelated donor	3	19	1.21	0.827
CBT	1	11	0.70	0.760
PBSCT	1	1	7.67	0.206
HLA matching				
Match	1	31	9.44 (1.09–82.11)	0.024
Mismatch	7	23		

\*Acute lymphoblastic leukemia, 23; aplastic anemia, 12; acute myeloid leukemia 11; myelodysplastic syndrome, 4; rhabdomyosarcoma, 1; malignant lymphoma, 2; neuroblastoma, 1; others, 8.  
CI, confidence interval; CBT, cord blood transplant; PBSCT, peripheral blood stem cell transplant; HLA, human leukocyte antigen.

**Table 1**

1:5000, Jackson ImmunoResearch Laboratory Inc., West Grove, Pennsylvania, USA) was used as a secondary antibody. Finally, the amount of rotavirus VP6 antigen bound to specific monoclonal antibody was assessed by adding substrate. The optical density (OD) was read using spectrophotometry at 492 nm, and an appropriate cut-off value was established based on data from 20 serum samples collected from control subjects. As the mean OD of the control samples was  $0.084 \pm 0.014$ , we defined 0.13 (mean + 3 standard deviations [SD]) as the baseline value in this study.

### Measurement of rotavirus-specific IgG

Serum anti-rotavirus IgG antibody titer was determined using sandwich ELISA. Briefly, 96-well plates were coated with rabbit anti-rotavirus serum diluted 1:10,000 in 10 mM PBS overnight at 4°C. After the plates were washed twice with 10 mM PBS containing 0.05% PBST, then 1% bovine serum albumin in PBST was added, and the plates were incubated for 4 h at 4°C. The plates were washed twice with PBST. SA-11-infected culture fluid was then added to the plates and incubated for 1 h at 37°C. Serum samples diluted with 2.5% skim milk in

PBST were allowed to react for 1 h at 37°C. After washing 4 times with PBST, donkey anti-human IgG (H+L) conjugated to horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratory Inc.) diluted 1:1000 in 2.5% skim milk in PBST was added. The plates were incubated for 1 h at 37°C, then washed 4 times with PBST, and o-phenylenediamine-2HCl substrate was added. The OD was read by spectrophotometry at 492 nm. As the mean OD of the control samples was  $0.047 \pm 0.026$ , we defined  $0.124$  (mean + 3 SD) as the baseline value in this study.

### Statistical analyses

Statistical analyses were performed using JMP7 (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA). A Mann-Whitney *U*-test was used to compare the levels of rotavirus antigenemia between sera collected from transplant recipients and immunocompetent rotavirus gastroenteritis patients (days 1, 3, and 5). The antigen levels in 16-fold and 4-fold diluted serum samples were compared using a Wilcoxon's signed-ranks test. The anti-rotavirus IgG antibody levels with and without rotavirus antigenemia were compared using a Student's *t*-test.

To elucidate risk factors for rotavirus antigenemia in transplant recipients, pre-transplant variables and transplant variables were compared between recipients with and without antigenemia. Pre-transplant variables included age, gender, and underlying diseases. Transplant variables included TBI, ATG, HLA matching, type of graft source, and acute GVHD. The ages of the recipients with and without rotavirus antigenemia were compared using a Student's *t*-test. Odds ratios (and 95% confidence intervals) were based on  $2 \times 2$  contingency tables and were calculated to assess the association between rotavirus antigenemia and demographics. The significance of measurement was determined by chi-square and Fisher's exact tests.

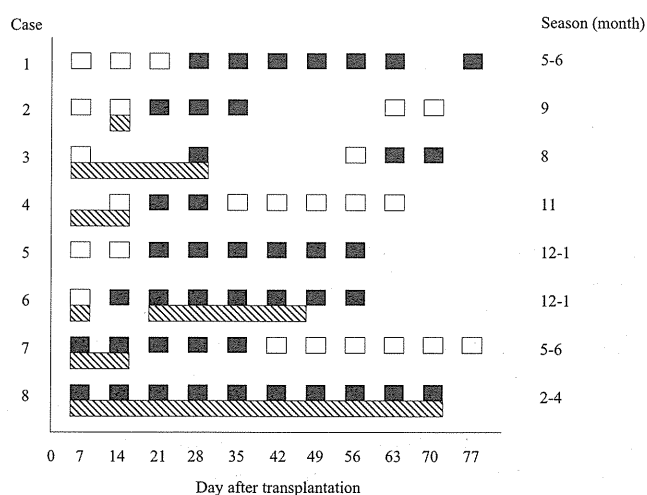
### Results

Rotavirus antigen was detected in 43 (6.8%) of 633 serum samples (8 of 62 patients). The kinetics and season of rotavirus antigenemia are shown in Figure 1. Rotavirus antigenemia lasted between 1 and 10 weeks. Rotavirus antigenemia started within 4 weeks of the transplant in all 8 recipients. Although the endemic seasons for rotavirus gastroenteritis are generally in the winter and spring in Japan, rotavirus

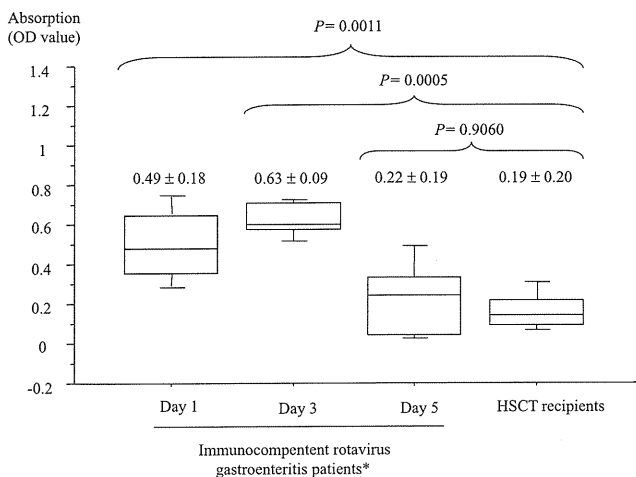
antigenemia was observed in non-endemic periods in Cases 1, 2, 3, 4, and 7. Figure 1 also shows a temporal relationship between rotavirus antigenemia and diarrhea. Diarrhea was concurrent with rotavirus antigenemia in Cases 3, 6, 7, and 8. Meanwhile, rotavirus antigenemia persisted after the cessation of diarrhea in Cases 6 and 7. Moreover, diarrhea was not observed during rotavirus antigenemia in Cases 1, 2, and 5.

To determine whether the amount of serum rotavirus antigen was higher in HSCT recipients than in immunocompetent rotavirus gastroenteritis patients, the antigen levels were compared between the 2 groups (Fig. 2). As expected, rotavirus antigen peaked on day 3 after illness onset in the serum samples collected from immunocompetent rotavirus gastroenteritis patients. The levels of rotavirus antigenemia in the transplant recipients ( $0.22 \pm 0.19$ ) and day 5 serum samples collected from immunocompetent rotavirus gastroenteritis patients ( $0.19 \pm 0.20$ ) were similar ( $P = 0.9060$ ). The level of viral antigen in the transplant recipients was significantly lower than that observed in either day 1 ( $0.49 \pm 0.18$ ,  $P = 0.0011$ ) or day 3 ( $0.63 \pm 0.09$ ,  $P = 0.0005$ ) of serum samples collected from immunocompetent rotavirus gastroenteritis patients. Although a remarkable peak in rotavirus antigen levels was observed in immunocompetent rotavirus gastroenteritis patients (11), no such peak was seen in the kinetics of rotavirus antigenemia in HSCT recipients (data not shown).

As rotavirus antigenemia levels were low in HSCT recipients, antigen level was measured using less dilute



**Fig. 1.** Associations between rotavirus antigenemia (black boxes) and diarrhea (shaded bars) are shown. White boxes indicate antigenemia-negative serum samples.



**Fig. 2.** Comparison of rotavirus antigen levels between immunocompetent rotavirus gastroenteritis patients and hematopoietic stem cell transplant (HSCT) recipients. \*Days after onset of the illness. OD, optical density.

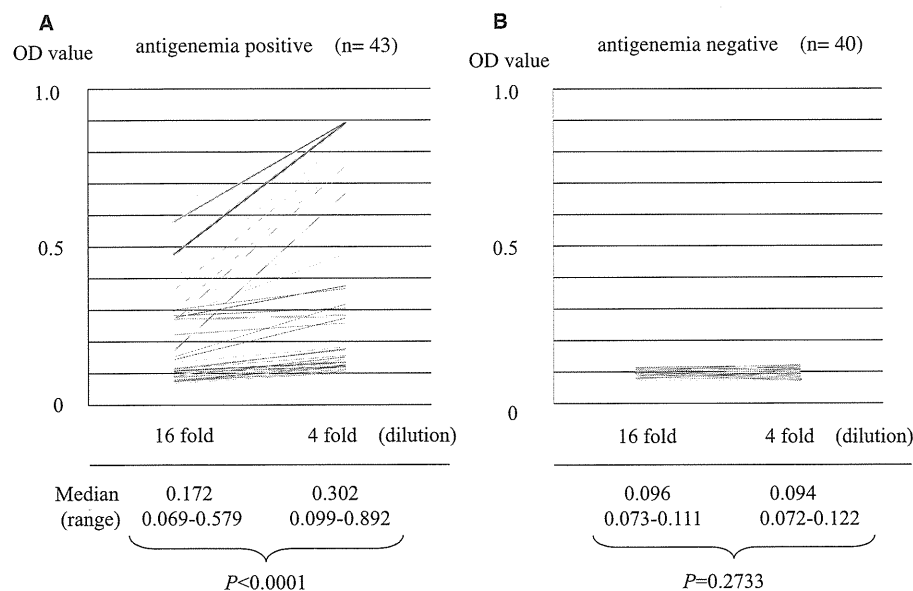
sera (1:4) to determine whether these positive samples contained low levels of rotavirus antigen. Forty-three antigen-positive serum samples and 40 randomly selected antigen-negative samples were used in this experiment (Fig. 3). The lower dilutions of antigen-positive serum samples (1:4) demonstrated significantly higher rotavirus antigen levels than the 1:16 diluted sera ( $P < 0.0001$ ). However, no statistical difference was observed between 1:4 and 1:16 dilutions of antigen-negative samples ( $P = 0.2733$ ). In addition, the

immune response against rotavirus was also examined to confirm rotavirus infection; only one recipient with rotavirus antigenemia demonstrated a marked increase in rotavirus IgG antibody titers (Fig. 4).

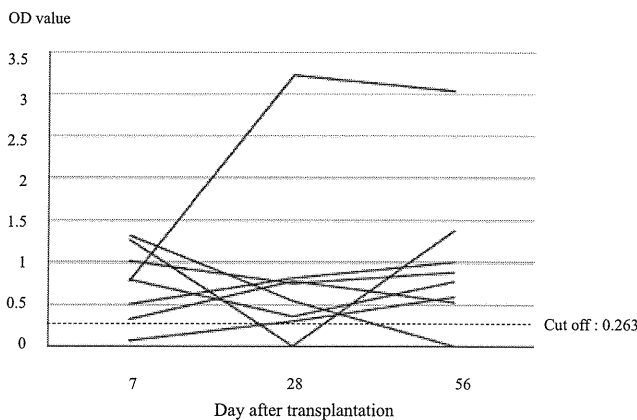
Table 1 summarizes the results of statistical analyses identifying risk factors for rotavirus antigenemia in HSCT recipients. No statistical difference was seen between the ages of recipients with ( $7.4 \pm 5.6$  years) and without ( $8.3 \pm 5.1$  years) rotavirus antigenemia ( $P = 0.652$ ). Moreover, neither gender ( $P = 0.312$ ) nor underlying disease ( $P = 0.368$ ) correlated with occurrence of rotavirus antigenemia. Of the 4 transplant-related variables, neither having received TBI ( $P = 0.955$ ), having received ATG ( $P = 0.080$ ), complications from acute GVHD ( $P = 0.705$ ), nor type of graft source (related vs. unrelated;  $P = 0.827$ , related vs. cord blood;  $P = 0.760$ , related vs. peripheral blood stem cell transplant;  $P = 0.206$ ) were associated with occurrence of rotavirus antigenemia. However, a patient who received a graft from an HLA-mismatched donor was at significant risk for rotavirus antigenemia ( $P = 0.024$ ; odds ratio = 9.44) in comparison to patients who received a graft from an HLA-matched donor.

## Discussion

Although it has been reported that rotavirus can cause severe clinical manifestations in immunocompromised transplant recipients (1–4), few studies have been conducted to elucidate the full spectrum of



**Fig. 3.** Comparison of rotavirus antigen levels between 16-fold and 4-fold diluted serum samples to determine rotavirus antigenemia. OD, optical density. (A) Antigenemia positive (n = 43). (B) Antigenemia negative (n = 40).



**Fig. 4.** Kinetics of anti-rotavirus immunoglobulin G (IgG) antibody titers in rotavirus antigenemia-positive patients ( $n = 8$ ). IgG antibody titers were determined using enzyme-linked immunosorbent assay. OD, optical density.

rotavirus infection in transplant recipients (4, 19–21). In this study, rotavirus antigen was detected in 43/633 (6.8%) serum samples, and rotavirus antigenemia was observed in 8/62 (12.9%) transplant recipients. To the best of our knowledge, this is the first study that demonstrates rotavirus antigenemia in transplant recipients. Stelzmueller et al. (4) demonstrated that rotavirus infection was observed in 1.5% of solid organ transplant (SOT) recipients, and the highest frequency of rotavirus infections was observed in pediatric liver transplant recipients (52%) based on conventional rotavirus antigen detection analysis of stool samples. In addition, previous reports have identified rotavirus infection in 10–12% of pediatric BMT recipients (1, 20). Thus, although the clinical specimens used to detect rotavirus antigen were different, the frequency of antigenemia in our pediatric HSCT recipients was similar to previous studies (1, 20).

Both rotavirus-specific neutralizing antibodies and CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells have been shown to play important roles in terminating rotavirus infection (22–25). In addition to adaptive immunity, it has been suggested that the innate immune response is also important for protecting the host from rotaviral infection (13, 26). Thus, it is likely that rotaviral infection would be more severe in transplant recipients with severe immunosuppression than in immunocompetent children. Persistent rotavirus excretion in the stool has been documented in children with a congenital T-cell deficiency (27) and BMT recipients (5). We previously reported that the duration of rotavirus antigenemia in immunocompetent rotavirus gastroenteritis patients was short (11). Our present study suggests

that rotavirus antigenemia persists for a longer period in transplant recipients, and this corresponds to rotavirus excretion in the stool (5).

To confirm specificity of the low levels of antigenemia in transplant recipients, antigen levels were measured in less diluted serum samples (Fig. 3). As less dilute (1:4) sera demonstrated statistically higher levels of antigen than that of a higher dilution (1:16), we considered that serum demonstrating low level of antigen really contained low levels of rotavirus antigen. Ray et al. (8) and Blutt et al. (9) reported that serum rotavirus antigen levels were negatively associated with rotavirus antibody levels in children with rotavirus antigenemia. Moreover, serum rotavirus antigen levels were significantly lower in patients who had a subsequent infection than in those with primary infection (7). The ages of the patients in this study ranged between 8 months and 23 years old. Thus, most of the recipients in this study could have previously had a primary rotavirus infection, which may have caused their lower levels of rotavirus antigen. Further detailed immunologic analysis of rotavirus infection is needed to clarify the pathogenesis of the characteristic kinetics of rotavirus antigenemia (low levels and long duration) observed in HSCT recipients.

Seven of 8 recipients with rotavirus antigenemia failed to demonstrate an antibody response against rotavirus. There are 2 possible explanations for such a low immune response rate. One is low immunogenicity of the low levels of antigenemia, and another is severe immunosuppression in transplant recipients. Although it is not clear whether positive antigenemia indicates active rotaviral infection, a serological assay is insufficient for monitoring rotavirus antigenemia in HSCT recipients.

It has been suggested that rotavirus can cause severe diarrhea (1, 3–5) and toxic megacolon (28), and may be confused with enteric GVHD (29), which results in significant morbidity in transplant recipients. As shown in Figure 1, persistent diarrhea and rotavirus antigenemia were concurrent in Cases 3, 6, 7, and 8. Meanwhile, rotavirus antigenemia persisted for a few weeks after the resolution of diarrhea in Cases 3, 6, and 7. Diarrhea was not observed in the 2 cases with persistent rotavirus antigenemia. Although it would be difficult to prove an association between rotavirus antigenemia and persistent diarrhea, because no complete examinations were carried out to exclude all other pathogens that would cause diarrhea, the current findings suggest that rotavirus antigenemia may be involved in the persistent diarrhea in HSCT recipients in some recipients. It was difficult to determine how many patients without rotavirus antigenemia had



diarrhea during the observation period following transplantation, because this study was a retrospective study using stored serum samples. Therefore, future prospective study is needed to elucidate the precise association between rotavirus antigenemia and diarrhea.

Moreover, asymptomatic rotavirus antigenemia was demonstrated in these patients. Asymptomatic rotavirus excretion in stool has also been reported in HSCT recipients, which could potentially make them index cases for nosocomial rotavirus infections (19). Thus, it is important to elucidate the ability of virus to be transmitted from asymptomatic rotavirus antigenemia patients. A prospective study that concurrently monitors rotavirus antigenemia and viral excretion in the stool is currently underway.

Notably, the timing after transplantation and occurrence of rotavirus antigenemia in non-endemic seasons in HSCT recipients were quite different from expected. According to a previous study based on detecting rotavirus antigen in stool, the median duration of rotavirus infection is 20 days after SOT (4). In our study, rotavirus antigenemia started within 4 weeks after transplant in all 6 cases except for Cases 7 and 8. Six of the 8 recipients were cared for in laminar airflow rooms at the beginning of rotavirus antigenemia. Although medical personnel may have caused nosocomial transmission, the likelihood of this possibility is very low, because standard precautions were thoroughly followed. Kang et al. (20) detected rotavirus antigen in the stool of an HSCT recipient at the time of pre-transplant screening. From a clinical standpoint, a large-scale molecular epidemiological study is needed to elucidate the route of viral transmission in HSCT recipients. In addition to the timing of rotavirus antigenemia, the seasons in which the rotavirus antigenemia occurred are another remarkable finding in this study. Although the endemic seasons in Japan for rotavirus infection are the winter and spring, rotavirus antigenemia was observed in the summer and fall in several cases (Fig. 1). Recently, a similar finding was demonstrated in SOT recipients (4). One possible mechanism for rotavirus antigenemia outside of its endemic season is the persistence of rotavirus infections in immunocompromised patients. Further human or animal studies are necessary to determine whether rotavirus can persistently infect a host.

We believe that this is the first report to demonstrate HLA mismatches as a significant risk factor for rotavirus antigenemia after HSCT, which is similar to Epstein-Barr virus (EBV) infection (30). ATG administration, which is another well-known risk factor for EBV infection after HSCT (30), tended to be a risk for

rotavirus antigenemia, though it did not reach the level of statistical significance. Several characteristic factors have been suggested to pose significant risks for each viral infection in HSCT recipients. The present study suggests that the risk factors for rotavirus antigenemia are similar to those for EBV infection after HSCT. If the clinical significance of rotavirus antigenemia in HSCT recipients is confirmed, predictions about patients at high risk for rotavirus antigenemia would be important for improving their prognosis. Further clinical analysis of rotavirus antigenemia should be continued to determine the significance of rotavirus antigenemia on the morbidity or mortality of HSCT recipients.

### Acknowledgements:

*Funding:* Funding for this research was obtained from Research Promotion of Emerging and Re-emerging Infectious Diseases (H21-Shinko-009) from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

*Presentation:* These data were presented at the 47th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America, Washington, D.C., October 2008.

### References

1. Yolken RH, Bishop CA, Townsend TR, et al. Infectious gastroenteritis in bone-marrow-transplant recipients. *N Engl J Med* 1982; 306: 1010–1012.
2. Willoughby RE, Wee SB, Yolken RH. Non-group A rotavirus infection associated with severe gastroenteritis in a bone marrow transplant patient. *Pediatr Infect Dis J* 1988; 7: 133–135.
3. Kanfer EJ, Abrahamson G, Taylor J, Coleman JC, Samson DM. Severe rotavirus-associated diarrhoea following bone marrow transplantation: treatment with oral immunoglobulin. *Bone Marrow Transplant* 1994; 14: 651–652.
4. Stelzmueller I, Wiesmayr S, Swenson BR, et al. Rotavirus enteritis in solid organ transplant recipients: an underestimated problem? *Transpl Infect Dis* 2007; 9: 281–285.
5. Liakopoulou E, Mutton K, Carrington D, et al. Rotavirus as a significant cause of prolonged diarrhoeal illness and morbidity following allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2005; 36: 691–694.
6. Blutt SE, Kirkwood CD, Parreno V, et al. Rotavirus antigenaemia and viraemia: a common event? *Lancet* 2003; 362: 1445–1449.
7. Fischer TK, Ashley D, Kerin T, et al. Rotavirus antigenemia in patients with acute gastroenteritis. *J Infect Dis* 2005; 192: 913–919.
8. Ray P, Fenaux M, Sharma S, et al. Quantitative evaluation of rotaviral antigenemia in children with acute rotaviral diarrhea. *J Infect Dis* 2006; 194: 588–593.
9. Blutt SE, Matson DO, Crawford SE, et al. Rotavirus antigenemia in children is associated with viremia. *PLoS Med* 2007; 4: e121.
10. Crawford SE, Patel DG, Cheng E, et al. Rotavirus viremia and extraintestinal viral infection in the neonatal rat model. *J Virol* 2006; 80: 4820–4832.

11. Sugata K, Taniguchi K, Yui A, et al. Analysis of rotavirus antigenemia and extraintestinal manifestations in children with rotavirus gastroenteritis. *Pediatrics* 2008; 122: 392–397.
12. Feng N, Kim B, Fenaux M, et al. Role of interferon in homologous and heterologous rotavirus infection in the intestines and extraintestinal organs of suckling mice. *J Virol* 2008; 82: 7578–7590.
13. Aich P, Wilson HL, Kaushik RS, Potter AA, Babiuk LA, Griebel P. Comparative analysis of innate immune responses following infection of newborn calves with bovine rotavirus and bovine coronavirus. *J Gen Virol* 2007; 88: 2749–2761.
14. Azuma E, Kojima S, Kato K, et al. Conditioning with cyclophosphamide/antithymocyte globulin for allogeneic bone marrow transplantation from HLA-matched siblings in children with severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19: 1085–1087.
15. Matsuyama T, Horibe K, Kato K, Kojima SS. Bone marrow transplantation for children with acute myelogenous leukaemia in the first complete remission. *Eur J Cancer* 2000; 36: 368–375.
16. Kojima S, Inaba J, Yoshimi A, et al. Unrelated donor marrow transplantation in children with severe aplastic anaemia using cyclophosphamide, anti-thymocyte globulin and total body irradiation. *Br J Haematol* 2001; 114: 706–711.
17. Taniguchi K, Urasawa T, Urasawa S, Yasuhara T. Production of subgroup-specific monoclonal antibodies against human rotaviruses and their application to an enzyme-linked immunosorbent assay for subgroup determination. *J Med Virol* 1984; 14: 115–125.
18. Taniguchi K, Urasawa T, Morita Y, Greenberg HB, Urasawa S. Direct serotyping of human rotavirus in stools by an enzyme-linked immunosorbent assay using serotype 1-, 2-, 3-, and 4-specific monoclonal antibodies to VP7. *J Infect Dis* 1987; 155: 1159–1166.
19. van Kraaij MG, Dekker AW, Verdonck LF, et al. Infectious gastro-enteritis: an uncommon cause of diarrhoea in adult allogeneic and autologous stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26: 299–303.
20. Kang G, Srivastava A, Pulimood AB, Dennison D, Chandy M. Etiology of diarrhea in patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation in South India. *Transplantation* 2002; 73: 1247–1251.
21. Kamboj M, Mihu CN, Sepkowitz K, Kernan NA, Papanicolaou GA. Work-up for infectious diarrhea after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: single specimen testing results in cost savings without compromising diagnostic yield. *Transpl Infect Dis* 2007; 9: 265–269.
22. Franco MA, Greenberg HB. Immunity to rotavirus infection in mice. *J Infect Dis* 1999; 179 (Suppl 3): S466–S469.
23. Franco MA, Tin C, Rott LS, VanCott JL, McGhee JR, Greenberg HB. Evidence for CD8 + T-cell immunity to murine rotavirus in the absence of perforin, fas, and gamma interferon. *J Virol* 1997; 71: 479–486.
24. Green KY, Kapikian AZ. Identification of VP7 epitopes associated with protection against human rotavirus illness or shedding in volunteers. *J Virol* 1992; 66: 548–553.
25. Ward RL. Mechanisms of protection against rotavirus in humans and mice. *J Infect Dis* 1996; 174(Suppl 1): S51–S58.
26. Barro M, Patton JT. Rotavirus nonstructural protein 1 subverts innate immune response by inducing degradation of IFN regulatory factor 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 4114–4119.
27. Wood DJ, David TJ, Chrystie IL, Totterdell B. Chronic enteric virus infection in two T-cell immunodeficient children. *J Med Virol* 1988; 24: 435–444.
28. Stelzmueller I, Dunst KM, Hengster P, et al. A cluster of rotavirus enteritis in adult transplant recipients. *Transpl Int* 2005; 18: 470–474.
29. Troussard X, Bauduer F, Gallet E, et al. Virus recovery from stools of patients undergoing bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1993; 12: 573–576.
30. Curtis RE, Travis LB, Rowlings PA, et al. Risk of lymphoproliferative disorders after bone marrow transplantation: a multi-institutional study. *Blood* 1999; 94: 2208–2216.

## 三重県で流行しているヒトロタウイルスの外層タンパク質 VP7 コード遺伝子の性状

神谷 元・油井 晶子・井手 富彦・谷口 孝喜  
(藤田保健衛生大学医学部・ウイルス・寄生虫学教室)

### 1. 緒 言

ロタウイルスは、非細菌性の急性胃腸炎である冬季乳幼児嘔吐下痢症の病原ウイルスである。ロタウイルス胃腸炎は、乳幼児での急性胃腸炎の約40%を占め、また脱水症状を呈する頻度も高く、重篤化しやすい。ロタウイルス感染症により、開発途上国を中心として年間60万人の乳幼児の死亡があると算定されている<sup>1</sup>。一方、わが国のような先進国においては、死亡例は稀であるものの、重篤な例が多いため入院に占める割合が高く、医療経済的にも重視されている。ロタウイルスの感染力はきわめて高く、感染性ウイルス粒子1~10個でも感染が成立する。したがって、衛生状態をいかに改善しても、その制御は困難とされ、開発途上国のみならず開発国においても、ほぼ100%の乳幼児が5歳までに感染し、発症すると報告されている。そこで、ワクチンによる防御が最優先であると考えられてきた。2006年には、2種類の経口生ワクチン RotaTeq と Rotarix が開発され、100カ国以上で認可され、すでに多くの国で定期接種されている<sup>2,3</sup>。わが国においても、これら2種のロタウイルスワクチンの承認申請がされ、Rotarix については2011年6月に承認され、RotaTeq についても2011年末頃に承認される予定である。近い将来、これらワクチンの導入が行われると期待されている。

ロタウイルスは、レオウイルス科に属す。レオウイルス科の大きな特徴は、ゲノムが分節した遺伝子からなっていることである。ロタウイルスのゲノムは11本の分節RNA 遺伝子で構成され、それぞれの遺伝子は1個の蛋白質をコードしている。ロタウイルス粒子は、三層構造からなり、最内層は、VP1, VP2とVP3, 内層はVP6, 外層はVP7とVP4からなる。外層を構成する粒子表面の2種の感染防御抗原VP7とVP4は、

2種の独立した血清型(遺伝子型)GタイプとPタイプを規定する。ロタウイルスは、ほとんどすべての哺乳動物、鳥類に存在し、動物由来のロタウイルスを含めると、23のGタイプと32のPタイプが存在する。このうちヒトでは約10のGタイプと10のPタイプが報告されている。主要なGタイプはG1~G4, G9で、主要なPタイプはP[8], P[4]である<sup>4</sup>。VP4とVP7はさまざまな組み合わせが可能であるが、G1P[8]がもっとも頻度が高い<sup>4</sup>。

血清型の分布は地域により、年により異なり、ワクチンの導入にあたっては、GタイプとPタイプの分布状況は重要な基礎的データとなる。われわれは、コホートの規模の適切さから、三重県を対象として、2003年~2007年の小児におけるロタウイルス感染症の疾病負担を評価し、ワクチン導入の有用性や費用対効果を検討した<sup>5</sup>。その後、本調査をさらに拡大し、2007年~2009年での疫学調査に加え、三重県内の5病院から収集した小児の急性下痢症患者便中のロタウイルスの血清型(GタイプとPタイプ)の解析も行った(Kamiya et al, 投稿中)。160検体についてGタイプおよびPタイプを判別したところ、G3P[8](117; 73.1%), G1P[8](23; 14.4%), G9P[8](16; 10.0%)の順で検出された。異なる3市においてGタイプ、Pタイプの流行状況は概ね同様であり、調査期間中に県内ではG3P[8]が主な血清型として流行していたことが判明した(Kamiya et al, 投稿中)。Gタイプを規定するVP7 遺伝子がコードするVP7は、もっとも主要な感染防御抗原であり、VP7 遺伝子の経年変異の解析は、流行しているヒトロタウイルスの性状の把握や、ロタウイルスワクチンの導入前後での変異の追跡を行うために、きわめて重要な情報を与える。本研究では、三重県に分布するG3P[8]株およびG9P[8]株の

Properties of the VP7 Gene of Human Rotaviruses in Mie Prefecture, Japan.  
Kamiya, H., Yui, A., Ide, T., and Taniguchi, K.  
(Department of Virology and Parasitology, Fujita Health University, School of Medicine)

※本短報は原著論文ではありません。引用を禁じます。

VP7 遺伝子の塩基配列を決定し、これまで報告されている塩基配列と比較検討した。

## 2. 研究方法

2007年11月～2009年10月の期間、三重県内の3都市（津、松阪、伊勢）での4病院（国立病院機構三重病院、国立病院機構三重中央医療センター、松阪中央総合病院、山田赤十字病院）における5歳未満小児の急性下痢症の疫学調査の過程で患者便を入院時に収集した（Kamiya et al, 投稿中）。迅速診断キットにてロタウイルス感染の有無を検査し、陽性と判定された160検体について、RT-PCR法によりロタウイルスのGタイプおよびPタイプを判定した。便サンプルをPBSで10%便懸濁液とし、低速遠心後の上清を、ウイルス破壊液（SDS, 2-mercaptoethanol, EDTA）でウイルスを分解しフェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿でRNAを抽出した。抽出RNAについてA群ロタウイルスに共通のプライマーを使用した逆転写反応を用い、1st PCRを行い、続いて各GタイプあるいはPタイプに特異的なプライマーを用いた2nd PCRを行い、生成物をアガロースゲル電気泳動にて泳動し、増幅長を確認することでGタイプおよびPタイプを確定した。このGタイプおよびPタイプの決定において得られた14株のG3P[8]株および5株のG9P[8]株について、1st PCRにより得られた完全長PCR産物（G3では1062塩基で、G9では1061塩基）を精製し、塩基配列決定用サンプルとした。1st PCRに用いたプライマーは、T31（5'GGCTTTAAAAGAGA-GAATTTCCGTCTGG'：塩基No.1-28；forward）とT32（5'GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG3'：塩基No.1039-1062；reverse）であり、塩基配列決定に用いたプライマーは、T31、T32、376R（5'AATAGATCCTGTTGGCCATCC3'：塩基No.376-396；reverse）および620F（5'TGGATTTCAATGGGATCATCTTG3'：塩基No.5928-620；forward）である。ABI Prism BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kits（PE Biosystems, Foster City, CA, USA）にて処理し、ABI Prism 310 Genetic Analyzerにて、塩基配列を決定した。系統樹はMEGA（v4.1）ソフトウェアを用いてNJ法で解析した。

## 3. 研究結果

RT-PCRにより決定したGタイプ、Pタイプの中で、もっとも高頻度で検出したG3P[8]株について、三重県下の異なる病院から集めた14名由来のG3ウイルス株（CH5, CH19, CH20, CH24, IS79, IS83, IS93, MA109, MA115, MA156, MI79, MI170, MI180, MI187）のVP7遺伝子の全塩基配列（1,062塩

基）を決定した。その結果、CH5とMI79の2株が、他の12株と1塩基（No.481塩基）の違いがあり、1アミノ酸残基（No.145アミノ酸）の置換があるのみで、それ以外の塩基配列はまったく同一であった。また系統関係を検討した結果、その塩基配列は、近年アジア、ロシア各地で検出されたG3タイプの配列と、同一のクラスターに属していることが判明した（図1）。一方、欧米でのG3の配列は異なるクラスターに属していた。

さらに、数年前に主要であり、今回の調査でもG3、G1に次いで3番目に多かったG9タイプについても、異なる病院から集めた5株（IS28, MA42, MI69, MI71, MI92）について、VP7遺伝子の全塩基配列（1,061塩基）を決定した。その結果、互いに類似しているものの、異なる2種類（MA42, MI92のグループとIS28, MI69, MI71のグループ）のG9ロタウイルスが分布していることが判明した。MA42とMI92の間では、3塩基、1アミノ酸（247番目の残基）の違いが、2つのグループ間では10塩基の違いがあったが、4つのアミノ酸置換は、VP7の8, 46, 65, 247番目の残基にみられた。これら2グループのG9株のVP7遺伝子の塩基配列についても、これまで報告されている配列と比較し系統樹を作成した（図2）。G3株と同様に、これら2グループのG9株についても、近年アジア各地で検出されたG9タイプの配列と、同一のクラスターに属しているが、欧米のG3とは異なるクラスターに属していることが判明した（図2）。

## 4. 考 察

本研究は、三重県内4病院における5歳未満の乳幼児における急性下痢症の前向き観察研究（2007年11月1日～2009年10月31日）の一環である。その主たる目的は、わが国におけるロタウイルス胃腸炎の疾病負担を明らかにすることにある。その過程で、わが国における血清型の分布状況と主要な遺伝子の塩基配列の情報を把握することは、近い将来のロタウイルスワクチン導入に向けてきわめて重要な基礎データになる。

ヒトロタウイルスについてだけでも、Gタイプが11種類、Pタイプが10種類報告されている。主要なGタイプがG1, G2, G3, G4, G9で、主要なPタイプがP[4], P[8]である。P[8], P[4]とG1, G2, G3, G4の組み合わせで、約88%のロタウイルスがカバーできる<sup>4</sup>。しかし、年と場所で大きく異なり、最近ではG9P[8], G9P[6]も台頭し、場所によってはG9P[8]がほとんどを占める場合もある<sup>7,8</sup>。ロタウイルスの感染防御は、タイプを超えた交叉性はあるものの、タイプ特異性が強い<sup>9,10</sup>。こうして、G, Pタイプの世界的な分布状況の把握は、ワクチン開発に必要で、今後

は、その分布に合わせたワクチンの調製が行われるようになるであろう。

現在世界で使用されているヒトロタウイルスワクチンは、RotaTeq と Rotarix の 2 種類である。RotaTeq は、ウシロタウイルスをベースとし、VP7 遺伝子のみヒトロタウイルス G1, G2, G3, G4 由来である 4 株と、VP4 遺伝子のみヒトロタウイルス P[8] 由来の 1 株の 5 株の混合物である。一方、Rotarix は、G1P[8] の特異性を有する野生株を培養細胞で瀕回継代することで弱毒化したものである。ヒトで主要な G1 ~ G4 のうち、G2 は、G1, G3, G4 とはかなり抗原性が異なる G タイプである。Rotarix が投与されたのち、その地域での G2 の分布状況が大きく変化したとの報告がなされた。すでに、米国、ブラジル、ベルギーなどで、Rotarix の導入後、G タイプの分布が変化し、G2 の検出率が高まったとの報告がある。実際に、Rotarix の作用であるのかそうでないのかは結論が出されていないが、ワクチン投与前後のその地域における G タイプの分布状況は、綿密に把握すべきである。そこで、本研究のように、ワクチン投与が開始される前に、分布するロタウイルスの性状を詳細に把握することは、ワクチン投与による、自然界でのヒトロタウイルス株の分布に与える影響を把握する上できわめて重要である。

感染性胃腸炎入院症例の原因となったロタウイルスの主要な G タイプについて、2 種の感染防御抗原をコードする VP7 遺伝子と VP4 遺伝子の塩基配列、推定アミノ酸配列を把握することにより、分布しているロタウイルスの各タイプのより詳細な性状を知ることができる。これらの遺伝子情報をもとに、今後の分布ロタウイルスの変遷をトレースすることが可能となり、それにより今後導入が予想されるロタウイルスワクチンによる影響を捉えることが容易となる。

160 例のサンプルから得られた G タイプ、P タイプの組み合わせは圧倒的に G3P[8] が多く、近年まで G1P[8] が流行の主流であるとする世界各国および国内のデータと異なる結果であった。また、この G3 株の塩基配列はほぼ同一であり、大きく変異することなく県内で流行していたことが示唆された。G9 株については、2 つのグループに分けられたが、塩基配列の違いが少なかった。流行の主流となる血清型は年次ごとに差異が生じ、ワクチン導入の効果を考慮するうえでも重要な情報となる。流行する血清型の変遷と各血清型内での変異を長期的に把握するため、G タイプおよび P タイプの分布状況と VP7 遺伝子の塩基配列について今後も調査が必要である。

326 アミノ酸からなる VP7 の主要な抗原領域は、3 領域存在する。A 領域：アミノ酸 No.87 ~ 100, B 領

域：アミノ酸 No.140 - 151, C 領域：アミノ酸 No.207 - 223 である。特に、A 領域と C 領域の抗原性が高いことが示されている。これらは、三次元的には隣接してコンフォメーションをとっているとされている<sup>13</sup>。

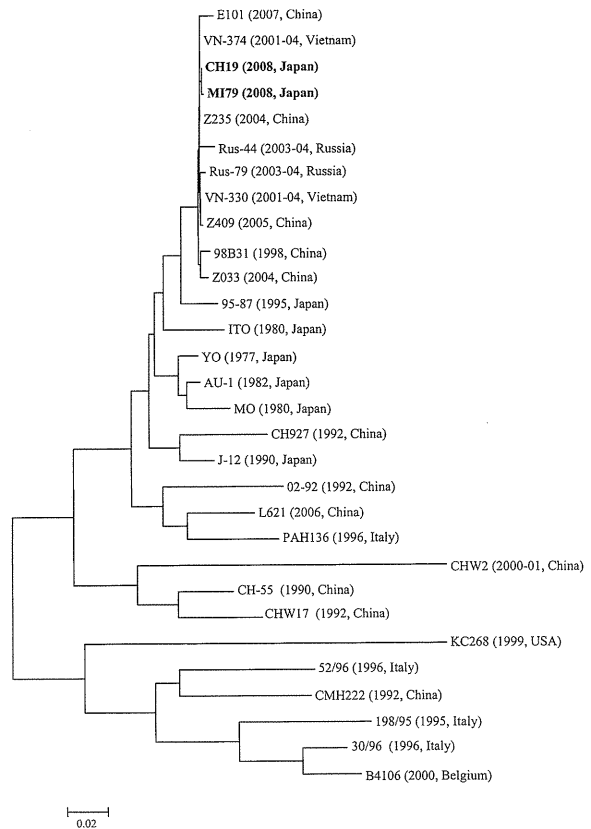


図1 三重県に分布する G3 ヒトロタウイルスの VP7 遺伝子の系統樹ウイルス株名 (分離年, 分離国) で示した。本研究で解析したウイルス株はボールド体かつ下線で強調した。スケールは、変異率を示す。

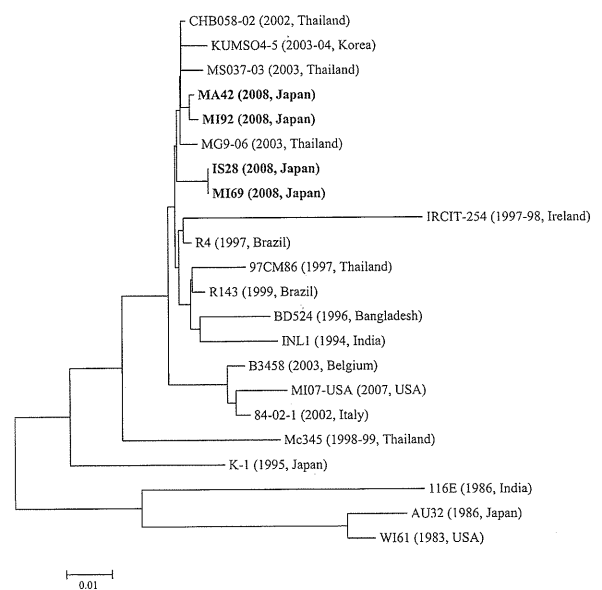


図2 三重県に分布する G9 ヒトロタウイルスの VP7 遺伝子の系統樹ウイルス株名 (分離年, 分離国) で示した。本研究で解析したウイルス株はボールド体かつ下線で強調した。スケールは、変異率を示す。

本調査での、14株のG3タイプのVP7遺伝子の解析により、一塩基を除き塩基配列が一致しており、特定の株がきわめて優先して流行していることを示している。ただ、2株(CH5とMI79)において他の12株と一ヶ所異なるアミノ酸はB領域に含まれるNo.145であり、エピトープレベルでの抗原性の違いがあると思われる。三重県での乳児の集団において、抗原性の高いA領域やC領域に対する抗体による圧力からの変異がなかったと思われる。一方、5株のG9タイプのVP7遺伝子の解析では、異なる二種類のG9株が流行していることが判明した。しかし、二種類のG9株間でのアミノ酸置換は、アミノ酸No.8, 46, 65であり、ともに主要な抗原領域に含まれておらず、互いのウイルス間で大きな抗原変異はないと判断される。以上の結果より、三重県下で流行しているロタウイルス(特にG3特異性を有する株)は、高度に保存されたまま県内で流行していることが示唆された。

世界的なGタイプの分布状況においては、G1が最も主要であり、本調査にみられるG3がもっとも多く分布することは、めづらしい。文献的にも、最近、アジアを中心にG3の分布が多くなっていることが報告されるようになってきた。2000年以前と以降で検出されたG3のVP7遺伝子の塩基配列には大きな差があり、本調査で検出したG3ウイルスは、アジア、ロシアで2000年以降検出されたG3と類似していた。G9は2003年頃より数年その分布が拡大し、その後減少した<sup>16</sup>。三重県でのG9ウイルスについても、アジアで2000年以降検出されたG9ウイルスと類似しており、アジアでのヒトロタウイルスのVP7遺伝子の共通した変遷が推測される。一方、比較できる遺伝子情報が少ないが、欧米のヒトロタウイルスのVP7遺伝子とは、系統樹でのクラスターが異なっており、地理的な分離により、ロタウイルスの交流が少なく、個々に変異が進行していることが示唆された。

今後、長期的にウイルスの塩基配列の点変異の蓄積を追跡し、これらの配列が今後どのように変異していくのかを追跡するのは興味深い。RotaTeqは、ウシロタウイルスをベースとし、VP7遺伝子あるいはVP4遺伝子のみヒトロタウイルス由来である。投与が開始されるとWC3株が自然界に散布されることになる。WC3株と野生株との自然界でのリアソートメントが起こる可能性は否定できない。Rotarixについては、G2タイプに対して感染防御効果がやや弱いとされ、G2タイプの分布が増加する可能性が示唆されており、こうしたウイルスのモニタリングも、また必要である。こうして、今後、ワクチン導入前後でのウイルスの変異、変化を追跡することは意義深い。

## 総 括

わが国でのロタウイルスワクチン導入にあたり、ワクチンの効果やワクチン導入による流行タイプへの影響を把握するためには、ワクチン導入前後のロタウイルスの性状の把握は重要な基礎的データとなる。そこで、2007年11月～2009年10月に三重県内の5病院から小児急性胃腸炎入院患者便検体を収集し、Gタイプを決定したウイルス株の一部を用いてロタウイルスのVP7遺伝子の塩基配列を決定し、解析を行った。

世界的にG1が最も高頻度で検出されるのであるが、三重県で圧倒的に多かったG3タイプと決定された14名由来のG3ウイルス株の塩基配列を決定したところ、2株が一塩基の違いを示すのみでほぼ同一であった。この地域では、ロタウイルスの少なくともVP7遺伝子は、高度に保存されたまま流行していることが示唆された。またその塩基配列の系統解析では、近年アジア各地で検出されたG3タイプの配列と、同じクラスターに属していることが判明した。わが国で2003年頃に主要であり、本調査でG3, G1に次ぐ頻度で検出されたG9タイプについては5株のVP7遺伝子を解析したが、塩基配列が類似しているものの異なる2種類のウイルスに分類された。塩基配列の系統解析では、G3株と同様に、近年アジア各地で検出されたG9タイプの配列と、同じクラスターに属していることが判明した。

こうしたヒトロタウイルスの感染防御抗原をコードしているVP7遺伝子の解析は、ワクチン導入に向けた基本的データを提供するとともに、ワクチン投与によるロタウイルス分布に与える影響を把握するために有用であると思われる。

## 謝 辞

本研究にあたり、ご指導いただいた現川崎医科大学附属川崎病院小児科中野貴司教授に深謝いたします。また、便材料の採取、便懸濁液の調製にご協力いただいた、国立病院機構三重病院小児科、臨床検査部、国立病院機構三重中央医療センター、山田赤十字病院小児科、および松阪中央総合病院小児科のスタッフの皆さまに感謝いたします。

本研究の一部は、厚生労働省科学研究費 医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業助成(研究課題名:ワクチンの有用性向上のためのエビデンス及び方策に関する研究)を受けたものである。

## 文 献

- 1) Parashar, U. D., Gibson, C. J., Bresse, J. S., and Glass, R. I. (2006) Rotavirus and severe child-

- hood diarrhea. *Emerg. Infect. Dis.* 12. 304–306.
- 2) Ruiz-Palacios, G. M., Pérez-Schael, I., Velázquez, F. R., Ábate, H., Breuer, T., Clemens, S. C., Cheuvart, B., Espinoza, F., Gillard, P., Innis, B. L., Cervantes, Y., Linhares, A. C., López, P., Macías-Parra, M., Ortega-Barría, E., Richardson, V., Rivera-Medina, D. M., Rivera, L., Salinas, B., Pavía-Ruz, N., Salmerón, J., Rüttimann, R., Tinoco, J. C., Rubio, P., Nuñez, E., Guerrero, M. L., Yarzabal, J. P., Damaso, S., Tornieporth, N., Sáez-Llorens, X., Vergara, R. F., Vesikari, T., Bouckennooghe, A., Clemens, R., De Vos, B., O’Ryan, M., and Human Rotavirus Vaccine Study Group. (2006) Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N. Engl. J. Med.* 354. 11–22.
  - 3) Vesikari, T., Matson, D. O., Dennehy, P., Van Damme, P., Santosham, M., Rodriguez, Z., Dallas, M. J., Heyse, J. F., Goveia, M. G., Black, S. B., Shinefield, H. R., Christie, C. D., Ylitalo, S., Itzler, R. F., Coia, M. L., Onorato, M. T., Adeyi, B. A., Marshall, G. S., Gothefors, L., Campens, D., Karvonen, A., Watt, J. P., O’Brien, K. L., DiNubile, M. J., Clark, H. F., Boslego, J. W., Offit, P. A., Heaton, P. M., and Rotavirus Efficacy and Safety Trial (REST) Study Team. (2006) Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *N. Engl. J. Med.* 354. 23–33.
  - 4) Santos, N. and Hoshino, Y. (2005) Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev. Med. Virol.* 15. 29–56.
  - 5) Kamiya, H., Nakao, T., Inoue, M., Kamiya, H., Abd, T. T., Patel, M., Orenstein, W. A., and Parashar, U. D. (2009) A retrospective evaluation of hospitalizations for acute gastroenteritis at 2 sentinel hospitals in central Japan to estimate the health burden of rotavirus. *J. Infect. Dis.* 200. S140–146.
  - 6) Taniguchi, K., Wakasugi, F., Pongsuwanna, Y., Urasawa, T., Ukae, S., Chiba, S., and Urasawa, S. (1992) Identification of human and bovine rotavirus serotypes by polymerase chain reaction. *Epidemiol. Infect.* 109. 303–312.
  - 7) O’Ryan, M. (2009) The ever-changing landscape of rotavirus serotypes. *Pediatr. Infect. Dis.* 28. S60–S62.
  - 8) Ribas, M. A., Nagashima, S., Calzado, A., Acosta, G., Tejero, Y., Cordero, Y., Piedra, D., and Kobayashi, N. (2011) Emergence of G9 as a predominant genotype of human rotaviruses in Cuba. *J. Med. Virol.* 83. 738–744.
  - 9) Gorrell, B. J. and Bishop, R. F. (1999) Homotypic and heterotypic serum neutralizing antibody response to rotavirus proteins following natural primary infection and reinfection in children. *J. Med. Virol.* 57. 204–211.
  - 10) Ward, R. L., Clark, F., and Offit, P. A. (2010) Influence of potential protective mechanisms on the development of live rotavirus vaccines. *J. Infect. Dis.* 202. S72–S79.
  - 11) Carvalho-Costa, F. A., Araújo, I. T., Santos de Assis, R. M., Fialho, A. M., de Assis Martins, C. M., Bóia, M. N., and Leite, J. P. (2009) Rotavirus genotype distribution after vaccine introduction, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 15. 95–97.
  - 12) Zeller, M., Rahman, M., Heylen, E., Coster, S. D., Vos, S. D., Arijs, I., Novo, L., Verstappen, N., Van Ranst, M., and Matthijssens, J. (2010) Rotavirus incidence and genotype distribution before and after national rotavirus vaccine introduction in Belgium. *Vaccine* 28. 7507–7513.
  - 13) 谷口孝喜 (1995) ウイルスの抗原構造. 病態生理 14. 731–738.
  - 14) Cuong, N. T., Minh, N. B., Anh, D. D., Thu, N. H., Tu, N. T., Nam, T. V., Thuy, V. T., Ogino, M., Alam, M. M., Nakagomi, T., Nakagomi, O., and Yamashiro, T. (2009) Molecular epidemiology of rotavirus diarrhea among children in Haiphong, Vietnam : the emergence of G3 rotavirus. *Vaccine* 27. F75–F80.
  - 15) Mitui, M. T., Chan, P. K., Nelson, E. A., Leung, T. F., Nishizono, A., and Ahmed, K. (2011) Co-dominance of G1 and emerging G3 rotaviruses in Hong Kong : a three-year surveillance in three major hospitals. *J. Clin. Virol.* 50. 325–333.
  - 16) Li, D., Liu, N., Yu, J. M., Zhang, Q., Cui, S. X., Zhang, D. L., Yang, S. H., Cao, D. J., Xu, Z. Q., and Duan, Z. J. (2009) Molecular epidemiology of G9 rotavirus strains in children with diarrhea hospitalized in mainland China from January 2006 to December 2007. *Vaccine* 27. F40–F45.

(平成 23 年 9 月 7 日受理)

【保健師に知ってもらいたい予防接種の最新情報】

## 肺炎球菌， Hib， ロタウイルス

川崎医科大学附属川崎病院小児科

中野貴司



日本国内でも 2011 年から、子宮頸がん小児用肺炎球菌、Hib ワクチンが公費助成で接種できるようになった。また、同年 7 月にはロタウイルスワクチンが承認された。これら 3 種のワクチンの最新情報を紹介する。

## はじめに

人類とワクチンの歴史はエドワード・ジェンナーの種痘(1798年)に始まる。以降 200 年余の間に、さまざまなワクチンが開発された(表 1)<sup>1)</sup>。本稿では、肺炎球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、Hib(インフルエンザ菌 b 型；*Haemophilus influenzae* type b)、ロタウイルス(Rotavirus)の 3 つのワクチンについて概説するが、これらは比較的新しい、近年開発されたワクチンである。

現在の Hib ワクチンと同種の製剤である Hib 結合型ワクチンが、世界で初めて導入されたのは 1987(昭和 62)年であった(表 1)。わが国で接種できるようになったのが 2008(平成 20)年 12 月で、実に世界に 20 年の遅れをとってしまい、「ワクチン後進国」「ワクチンギャップ」という言葉がしばしば使われた。しかしその後、わが国でも次々と新しいワクチンが登場している。

小児用の肺炎球菌結合型ワクチンは 2010(平成 22)年 2 月に国内導入され、2000(平成 12)年の海外デビューから 10 年の遅れまでに縮めることができた。ロタウイルス改良型ワクチンは、2006(平成 18)年の海外に遅れること 5 年で、2011(平成 23)年、わが国でも承認された。

肺炎球菌， Hib， ロタウイルス  
ワクチンの位置づけ

ポリオ、DPT、麻疹、風疹、日本脳炎などのワクチンは、予防接種に関する規定を定めた法律「予防接種法」にもとづいて接種され、「定期接種」と呼ばれる。これら予防接種の費用は、一般的に自治体による公費負担で実施される。

「定期接種」以外に、個人の希望により接種する「任意接種」がある。水痘、ムンプス、小児のインフルエンザなどは任意接種で、自治体によっては一部公費助成が行われる場合もあるが、一般的には個人が接種費用を負担する。



表1 世界におけるワクチン開発の歴史

年代	弱毒生	不活化	蛋白・多糖体	遺伝子組換え
18世紀	種痘(1798)			
19世紀	狂犬病(1885)	腸チフス(1896) コレラ(1896) ペスト(1897)		
20世紀前半	BCG(1927) 黄熱(1935)	百日咳(1926) インフルエンザ(1936)	ジフテリアトキソイド(1923) 破傷風トキソイド(1926)	
20世紀後半	ポリオ生 麻疹 ムンプス 風疹 腸チフス 水痘 ロタ(1998) コレラ	ポリオ不活化 狂犬病 日本脳炎 ダニ媒介脳炎 A型肝炎	23価肺炎球菌多糖体(1983) 髄膜炎菌多糖体 Hib多糖体(1985) 髄膜炎菌結合型 Hib結合型(1987) B型肝炎血漿由来 腸チフス多糖体 百日咳無細胞型	B型肝炎 コレラトキシンB
21世紀	インフルエンザ生(2003) ロタ改良(2006) 帯状疱疹(2006)		肺炎球菌結合型(2000)	ヒトパピローマ(2006)

(Plotkin:文献<sup>1)</sup>より引用し作成)

2010年秋、「子宮頸がん等ワクチン接種緊急促進事業」が国により制定され、2011年からは国内の多くの自治体で、子宮頸がんワクチンとともに小児用の肺炎球菌とHibワクチンが公費助成で接種できるようになった。この事業は、国際標準にならって3種ワクチンの近未来の定期接種化をめざして始められたものであるが、分類としては現在も任意接種の位置づけにある(表2)。

「定期接種」「任意接種」と分けると、予防接種法で定められた定期接種のほうが大切で、任意接種は希望者のみが接種すればよいという印象をもつ人もいるかもしれないが、決してそうではない。子どもたちを病気から守るためには、任意接種のワクチンも定期接種に劣らず大切な存在である。

予防接種の利点として、世界の隅々まで同一の方法で普及させることができ、貧富の差を問わず、病気を守ることでできる費用対効果の高い手段ということが知られている。この数十年

表2 定期接種と任意接種

1. 法律にもとづく予防接種

定期の予防接種…実施主体は市町村

\* 予防接種法並びにその委任を受けた命令である予防接種施行令、予防接種施行規則および予防接種実施規則にもとづき、公権力ないし行政が関与

\* 積極的勧奨(接種を受けさせるよう努める)

あり…一類疾病(DPT, ポリオ, MR, 日脳など)

なし…二類疾病(高齢者インフルエンザ)

2. 法律にもとづかない予防接種

いわゆる“任意の”予防接種…希望者が接種

\* 水痘, ムンプス, Hib, 肺炎球菌, HPV, ロタウイルスなど

間、ワクチンの分野では遅れをとってきた日本であるが、早く世界標準に追いつくことが必要である。世界保健機関(WHO)が推奨する予防接種の一覧(表3)においても、肺炎球菌、Hib、ロタウイルスワクチンは、すべての子どもたちに推奨するワクチンとして位置づけられている。

表3 WHOが推奨する予防接種

すべての子どもたちに推奨	一定の地域で推奨
BCG	一定の地域で推奨
B型肝炎	日本脳炎
ポリオ	黄熱
DPT	
Hib	一定の対象に推奨
肺炎球菌結合型	ムンプス
ロタ	風疹
麻疹	インフルエンザ(不活化)
ヒトパピローマ	

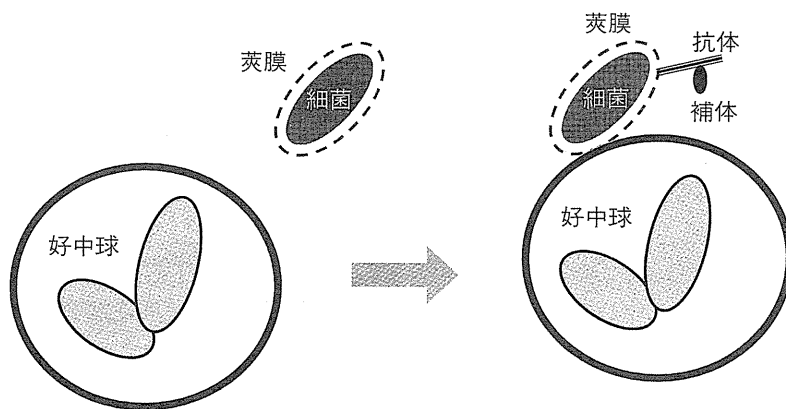
WHO: Recommended Routine Immunization- Summary of WHO Position Papers, [http://www.who.int/immunization/policy/immunization\\_tables/en/index.html](http://www.who.int/immunization/policy/immunization_tables/en/index.html), Updated September 14, 2010 より

表4 細菌多糖体ワクチンの課題

- 免疫原性が弱い
- T細胞非依存抗原であるため、乳児や低年齢児では十分な免疫を誘導できない
- 侵襲性感染症(invasive infection)罹患のハイリスクグループであるHIV感染者、血液腫瘍患者、骨髄移植患者などで免疫原性が不良である
- 接種により獲得された免疫は数年後には減弱し、追加接種によるブースター効果は認められない
- 気道粘膜での菌定着を防ぐ効果はあまり期待できず、集団免疫効果に乏しい

(中野:文献<sup>3)</sup>より)

図1 細菌の莢膜多糖体と食細胞による貪食(肺炎球菌, Hib など)



菌体表面には莢膜多糖体が存在し、食細胞による貪食に抵抗している。

莢膜に対する抗体、さらに補体が菌に結合しオプソニン化を受けると、細菌は貪食される。ワクチンは、この抗体を誘導する。

(中野:文献<sup>3,4)</sup>より)

## 多糖体ワクチンと結合型ワクチン

小児用の肺炎球菌とHibワクチンは、いずれも結合型ワクチンである。肺炎球菌やHibでは、菌体の表面に存在する莢膜多糖体が病原性の主役を担っており、莢膜多糖体に対する抗体が血中に存在することにより好中球が菌を貪食することを促し発病予防に役立つ。したがって、肺炎球菌やHibワクチンの主成分は莢膜多糖体抗原である(図1)<sup>3,4)</sup>。

肺炎球菌やHibによる疾患を予防するため

に最初に開発されたのは、多糖体ワクチン(poly-saccharide vaccine)であった。多糖体ワクチンにより小児でも一定の効果は確認されたが、多糖体ワクチンには表4に示すような課題があった。とくに、細菌性髄膜炎をはじめとする肺炎球菌やHibによる重症疾患は、乳児や低年齢児で罹患率が高いため、彼らに十分な免疫を付与できないワクチンでは有用性が低い。その課題を克服する目的で開発されたのが、結合型ワクチン(conjugate vaccine)である<sup>3,4)</sup>。

では、結合型ワクチンと多糖体ワクチンとは、どこが異なるのだろうか。結合型ワクチン

は、キャリア蛋白に莢膜多糖体を結合させてワクチンの有効成分としてあることが特徴である。たとえば、わが国の小児用肺炎球菌ワクチン(商品名：プレベナー®)のキャリア蛋白は非病原性のジフテリア蛋白CRM197であり、Hib ワクチン(商品名：アクトヒブ®)では破傷風トキソイドをキャリア蛋白として用いている。

多糖体は元来 T 細胞非依存性抗原であり、B 細胞を直接刺激する。しかし乳児の B 細胞は未熟で、多糖体抗原の刺激に対する免疫応答が十分ではない。そのため、多糖体ワクチンでは乳児に免疫を付与することができない。しかし、キャリア蛋白を結合させることにより、多糖体は T 細胞依存性抗原に変換される。したがって、結合型ワクチンは乳児に接種しても良好な免疫反応を誘導することができ、効果を期待できるのである<sup>3,4)</sup>。

## 肺炎球菌ワクチン

肺炎球菌による重篤な感染症は IPD (invasive pneumococcal disease) と総称される。IPD とは、髄膜炎、菌血症、関節炎、骨髄炎、腹膜炎、血液培養陽性の肺炎など、本来は無菌環境である身体深部で肺炎球菌が増殖する疾患である。肺炎球菌は気道常在菌でもあり、保菌していても必ず症状が出るわけではないが、皮膚や粘膜バリアの破綻、体力や免疫力の低下は発症の引き金となる。

肺炎球菌には 90 以上の血清型の菌が存在するが、小児に IPD を引き起こす血清型は概ねいくつか限定されている。現在、わが国で使用されている小児用肺炎球菌ワクチンは、4, 6 B, 9 V, 14, 18 C, 19 F, 23 F という小児の IPD の原因となる頻度が高い 7 つの血清型の肺炎球菌莢膜多糖体抗原を含有する。わが国で

は IPD のみが肺炎球菌ワクチンの効能・効果として承認されているが、海外では中耳炎や肺炎の予防が適応に含まれる国も多い。

米国では、2000 年から日本の定期接種のようにすべての子どもたちを対象として肺炎球菌ワクチンの接種が始まった。CDC の報告<sup>6)</sup>によれば、5 歳未満小児における IPD 年間罹患率は、1998 (平成 10) ~ 1999 (平成 11) 年の平均 95.2 例/10 万人から 2004 (平成 16) 年の 22.6 例/10 万人と 4 分の 1 から 5 分の 1 に減少した。さらに、肺炎球菌ワクチンに含まれる 7 つの血清型による IPD 年間罹患率は、1998 ~ 1999 年の年間平均 78.9 例/10 万人から、2004 年の 2.7 例/10 万人と、約 30 分の 1 まで顕著に減少した。

小児用肺炎球菌ワクチンの普及による間接効果として、米国では高齢者 IPD の減少も報告された<sup>6)</sup>。接種された子どもたちに呼吸器粘膜免疫が付与され、IPD を起こす肺炎球菌の定着率が低下し、周囲への感染伝播を防ぐことにつながったと考えられている。図 2 にその結果を示すが、1998 ~ 2003 (平成 15) 年に 5 歳未満小児の IPD 発症率が 94% 減少したこととあわせて、65 歳以上の高齢者においても 65% の IPD 減少が観察された。5 歳未満児は小児用肺炎球菌ワクチンの接種対象年齢であるが、65 歳以上の世代は接種を受けてはいない。本ワクチンの導入により高齢者への間接効果、すなわち集団免疫効果も期待できるのであれば、大変素晴らしいことである。

## Hib ワクチン

グラム陰性桿菌であるインフルエンザ菌は、莢膜の有無により莢膜株と無莢膜株に分けられる。莢膜株はさらに、莢膜多糖体の抗原性により a, b, c, d, e, f の 6 血清型に分類され

図2 高齢者のIPD予防にもつながった小児用肺炎球菌ワクチン導入の  
間接効果(米国)

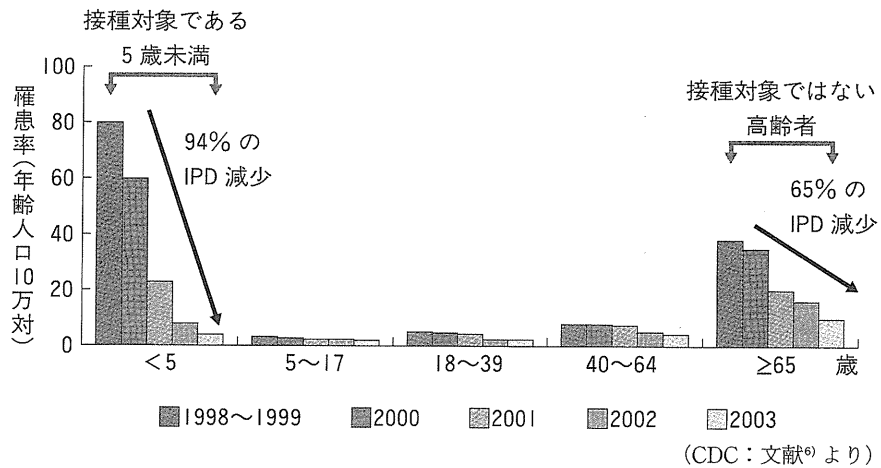


表5 インフルエンザ菌の分類

株(血清型)	疾患	好発年齢層
莢膜株	b 細菌性髄膜炎, 喉頭蓋炎, 肺炎, 菌血症 → <b>全身性疾患</b> (重篤な侵襲性感染症をひき起こす)	乳幼児 (患者の90%以上は5歳未満児)
	a, c, d, e, f 上記と同様(ただし, まれ)	乳幼児
無莢膜株	気管支炎, 中耳炎, 結膜炎, 副鼻腔炎 → <b>局所感染</b> (比較的軽症)	小児, 成人

(中野:文献<sup>4)</sup>より)

る。Hibとは、莢膜多糖体の血清型がb型であるインフルエンザ菌の略称である(表5)<sup>4)</sup>。

中耳炎、副鼻腔炎など上気道感染症や比較的軽症のインフルエンザ菌による疾患の多くは無莢膜株が原因である。Hibは主として、重篤な侵襲性感染症(invasive infection)の原因となる。侵襲性感染症とは、肺炎球菌ワクチンの項でも述べたように、髄液、血液など、本来は無菌環境である部位から原因菌が分離される感染症のことをさす。Hibによる侵襲性感染症のなかで最も頻度が高いものは髄膜炎で、その他には喉頭蓋炎がよく知られている。

Hibによる侵襲性感染症を予防することが、

本ワクチンに期待される効果である。日本より20年ほど早くHibワクチンを導入していた海外諸国では、すでに素晴らしい有効性が立証され、髄膜炎をはじめHib疾患の目覚ましい減少が確認されている(表6)<sup>3,6)</sup>。

## 同時接種の意義と安全性

肺炎球菌やHibワクチンなどワクチンの種類が増え、わが国でも海外と同様に、複数のワクチンを一度の受診機会に同時接種することが一般化してきた。