

厚生労働科学研究費補助金

(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)

分担研究報告書(平成 25 年度)

研究課題「Hib、肺炎球菌、HPV及びロタウイルスワクチンの各ワクチンの有効性、安全性並びにその投与方法に関する基礎的・臨床的研究」

『わが国に分布するヒトロタウイルスの遺伝子型(GタイプとPタイプ)の解析』

主任研究者：庵原俊昭(国立病院機構三重病院)

分担研究者：谷口孝喜(藤田保健衛生大学医学部ウイルス・寄生虫学)

中野貴司(川崎医科大学医学部小児科)

研究協力者：神谷元(国立感染症研究所感染症情報センター)、フランス・

エコウ・デニス(東京医科歯科大学)、浅田和豊、菅秀(国立

病院機構三重病院)、田中孝明(川崎医科大学小児科)、梅本

正和(うめもとこどもクリニック)、黒木春郎、伊東宏明(外

房こどもクリニック)

研究要旨：2013年1月～12月に三重県、岡山県、千葉県内の6医療施設から収集した小児の急性胃腸炎患者(外来および入院)便139例中のロタウイルスの遺伝子型(GタイプとPタイプ)を調査した。その結果、Gタイプについては、G1が117例(84.2%)で最も多く、次いで、G9が16例(11.5%)、G2が2例(1.4%)、G3が2例(1.4%)、G3+G9が2例(1.4%)であった。経年的変化を見ると、2012年では、G1が60.0%、G3が23.8%、G9が12.3%であり、2011年の調査では、G3が60.7%で最も多く、G1が32.5%、G9が2.1%であった。2007-2010年では、圧倒的にG3の分布が多かった。こうして、わが国における主要なGタイプはG3からG1に徐々に変化したことがわかる。一方、Pタイプについては、2013年においてP[8]が135例(97.1%)、P[4]が1例(0.7%)、未決定2例(1.4%)であり、2007年以来、P[8]が主要であった。

A. 研究目的

ロタウイルスは乳幼児胃腸炎の主要な病原体である。地球レベルでは、開発途上国を中心としてロタウイルス感染症により、年間40～60万人の乳幼児の死亡があると算定されている。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、

重篤な例が多く、その結果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。また、胃腸炎以外の疾患(脳炎、脳症などの中枢神経疾患なども含む)との関連も指摘されている。

ロタウイルスの感染力はきわめて高く、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、ほぼすべての乳幼児が 5 歳までに感染し、発症すると報告されている。そこで、予防にはワクチンによる防御が最優先とされ、2006 年に 2 種類の経口生ワクチン：RotaTeq と Rotarix が開発された。すでに 100 カ国以上で認可され、30 カ国以上で定期接種されている。わが国においても、Rotarix は 2011 年 11 月から、RotaTeq は 2012 年 7 月から投与が開始されている。当初低かった投与率は順調に高まり、地域により違いはあるが、全国的に 45% を超えるようになった（2013 年 3 月現在）。本研究班では、2007 年より三重県を中心としてわが国におけるヒトロタウイルスの遺伝子型（G タイプと P タイプ）の分布状況を調査している。ワクチン投与前から投与後、そしてワクチン接種率の上昇に伴い、ヒトロタウイルス遺伝子型の分布に変化がみられるかどうかを調査することはきわめて興味深い。また投与率の拡大とともに、ワクチン投与による野生株の分布に与える影響の有無（リアソータントの出現など）を検討する意義は大きくなる。

ロタウイルスは、コア、内層、外層の 3 層構造からなる。外層には、VP7 と VP4 の 2 種のタンパク質（ともに感染防御抗原を担う）が存在し、それぞれ、G タイプ、P タイプを規定する。ロタウイルスの遺伝子型は多様であり、動物を含めると、G タイプは 27 種以上、P タイプは 37 種以上が報告されており、ヒトでもそれぞれ 10 種以上の存在が知られている。G タイプおよび P タイプの分布は地域により、年によりかなり異なり、また複数の G タイプおよび P タイプが同時に分布する。そこで、ワクチンの導入にあたっては、G タイプおよび P タイプの分布は重要な基礎的データとなる。本研究では、三重県を主として、岡山県、千葉県

を加え、外来、入院例の双方について、G タイプおよび P タイプの分布を継続して調査した。

B. 研究方法

（1）三重県内の病院（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；入院患者）、うめもとこどもクリニック（外来患者）、岡山県の川崎医大病院（入院および外来患者）、千葉県の外房こどもクリニック（外来患者）における 5 歳未満小児の急性下痢症の患者便を収集した。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 139 例のサンプルについて、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。具体的には、便サンプルを PBS で 10% 便懸濁液とし、低速遠心後の上清を、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。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 タイプあるいは各 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 タイプを決定した。

C. 研究結果と考察

三重県、岡山県、千葉県内の医療施設から収集した小児の急性胃腸炎患者（外来および入院）便 139 例について、RT-PCR により G タイプ、P タイプを決定した。

その結果、139 例の G タイプについては、G1 が 117 例（84.2%）で最も多く、次いで、G9 が 16 例（11.5%）、G2 が 2 例（1.4%）、G3 が 2 例（1.4%）、G3+G9 が 2 例（1.4%）であった。

これまでの結果と比較すると、2012年では、130例の調査で、G1が78例(60.0%)、G3が31例(23.8%)、G9が16例(12.3%)であり、2011年の191例を用いた調査では、G3が116例(60.7%)で最も多く、G1が62例(32.5%)、G9が4例(2.1%)であった。さらに溯って、2007-2010年では、圧倒的にG3の分布が多かった。こうして、この3年でわが国における主要なGタイプはG3からG1に徐々に変化したことがわかる。

一方、Pタイプについては、2013年に収集した139例について、P[8]が135例(97.1%)、P[4]が1例(0.7%)、未決定2例(1.4%)であった。2011年、2012年でもP[8]はそれぞれ、91.5%(173例/189例)、93.1%(121例/130例)とほとんどを占めた。2007-2010年でも、ほとんどがP[8]であった。こうして、2013年ではわが国において、これまで世界的に最も主要な遺伝子型として知られるG1P[8]が圧倒的であることを示した。

ごく少数であるが、一部のサンプルについて、G2P[8]、G3P[6]、G9P[4]、G3P[4]といった非定型の組み合わせを有するロタウイルス株が検出されているが、これらについては、さらに検討を加え、結果の確認ができれば、Gタイプを規定するVP7遺伝子およびPタイプを規定するVP4遺伝子以外の10遺伝子の遺伝子型を決定し、その生成の背景を究めたい。

わが国における遺伝子型の分布状況を把握することは、今後のワクチン投与の遺伝子型分布に対する影響を検証するために、きわめて重要な基礎データであると考えらる。

2012年より主要となったG1P[8]は、現在使用されている両ワクチンの有効性がもっとも高いことが推定される遺伝子型であり、今後、両ワクチンが有効に作用し、わが国におけるロタウイルスによる胃腸炎が顕著

に減少することが期待される。

海外において、ロタウイルスワクチン導入後に、遺伝子型の変化がみられるとの報告がなされている。こうした遺伝子型の変化がわが国において、ワクチン導入前後で観察されるか、もし変化があった場合、それは、使用したワクチンによる影響なのかを明確にすることは重要である。こうして、本研究の意義は大きい。今後、Gタイプ、Pタイプの決定に加えて、代表的な株、非定型的な株について、VP7遺伝子、VP4遺伝子の塩基配列解析を進めていき、自然に存在するロタウイルス株遺伝子の変遷を調査したい。また、投与されたロタウイルスワクチンはともに生ウイルスであるので、被投与者の便中に排泄されることになり、それが投与を受けていないヒトに感染する例が報告されている。すでに諸外国で報告のある、野生株とのリアソートメントなどのサーベイも行う必要がある。さらに、外来と入院における遺伝子型の違いを中心として、胃腸炎の重篤度と遺伝子型の関連を解析する必要がある。

F. 研究発表

1) 学会発表

1. 神谷元、梅本正和、谷口孝喜、庵原俊昭、中野貴司：三重県津市におけるロタウイルス感染性胃腸炎外来症例の検討。第17回日本ワクチン学会。三重。2013

2) 論文

1. Kawamura Y, Ohashi M, Ihira M, Hashimoto S, Taniguchi K, Yoshikawa T: Nationwide survey of rotavirus-associated encephalopathy and sudden unexpected death in Japan. Brain Dev. In press
2. Matsuoka T, Yodoshi T, Sugai M, Hiyane M, Matsuoka T, Akeda H, Ohfu M,

Komoto S, Taniguchi K. .A case of mild encephalopathy with a reversible splenic lesion associated with G5P[6]rotavirus infection. Case Reports in Pediatrics. 2013;2013:197163

3. Komoto S, Maeno Y, Tomita M, Matsuoka T, Ohfu M, Yodoshi T, Akeda H, Taniguchi K. Whole genomic analysis of a porcine-like human G5P[6] rotavirus strain isolated from a child with diarrhea and encephalopathy in Japan. J Gen Virol. 94(7):1568-75, 2013.

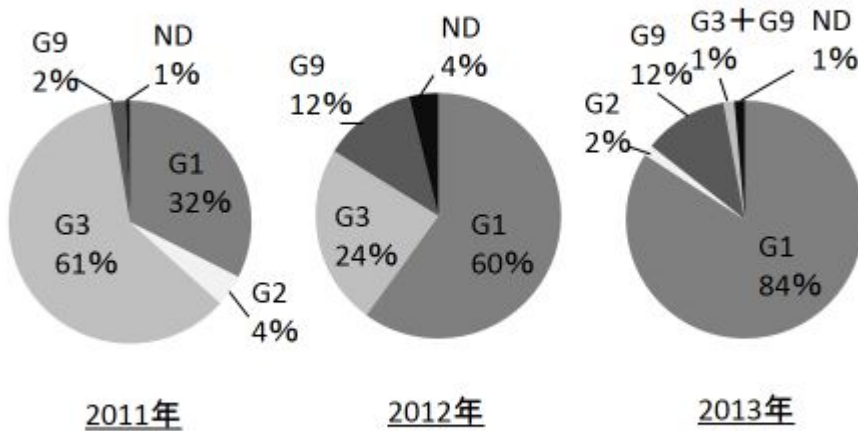
G . 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

H . 謝辞

下痢便の収集、処理にあたり、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、うめもとこどもクリニック、川崎医大病院、外房こどもクリニックのスタッフの皆さまに多大なご協力をいただきました。ここに深謝申し上げます。

2011～2013年 G type



2011～2013年 P type

