

平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)「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」

分担研究報告書

『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』

研究代表者: 庵原俊昭 (国立病院機構三重病院)

研究分担者: 谷口孝喜 (藤田保健衛生大学医学部ウイルス・寄生虫学教授)

中野貴司 (川崎医科大学医学部小児科教授)

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)、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)

平成 25 年度に引き続き、2014 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)由来の下痢便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。今年度はロタウイルス胃腸炎がきわめて少なく、調査した下痢便は 43 例のみであった。GタイプではG2が20例(47%)で最も多く、次いでG1が15例(35%)、G9が7例(16%)、G3が1例(2%)であった。PタイプではP[8]が23例(53%)、P[4]が20例(47%)の順に検出された。G・Pタイプの組み合わせでは、G2P[4]が20例(47%)、G1P[8]が15例(35%)、G9P[8]が7例(16%)、G3P[8]が1例(2%)の順に検出された。2014年に最も多くの割合を占めたG2の一部においてVP7遺伝子の塩基配列を決定し系統樹を作成した結果、a-1に属していることが示された。

A. 研究目的

急性胃腸炎の病原体は多様であるが、その中でロタウイルスはもっとも頻度が高く検出され、症状が重い乳幼児胃腸炎に関連する病原体である。地球レベルでは、アフリカ、アジアの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)との関連も示唆されている。

ロタウイルスの感染力はきわめて高く、ヒトでは、データは古いがボランティア試験(成人)では50%感染量は感染性粒子10個以下で、感染性粒子1個で~25%の成人の感染が成立すると報告されている。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ヵ国以上で認可され、60ヵ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月から接種が開始されている。接種率は順調に高まり、地域により違いはあるが、全国的にほぼ50%に達している。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。ワクチン導入前後、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。また接種率の拡大とともに、ワクチン投与による野生株の分布に与える影響があるかないか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、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タイプの分布状況の把握は重要な基礎的データを提供することとなる。本研究では、三重県を主として、岡山県、千葉県、医療施設における外来、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

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43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。

便サンプルをMEM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。

一部のG2株のVP7遺伝子については塩基配列を決定し、系統樹解析をMEGA6により行った。

(倫理面について)

本研究は国立病院機構三重病院の倫理委員会により承認されている。

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 43 例について、RT-PCR により G タイプ、P タイプを決定した。

2014 年ではロタウイルス胃腸炎がきわめて少なく、調査した下痢便は 43 例のみであった、G タイプでは G2 が 20 例 (47%) で最も多く、次いで G1 が 15 例 (35%)、G9 が 7 例 (16%)、G3 が 1 例 (2%) であった(図 1)。P タイプでは P[8] が 23 例 (53%)、P[4] が 20 例 (47%) の順に検出された。G・P タイプの組み合わせでは、G2P[4] が 20 例 (47%)、G1P[8] が 15 例 (35%)、G9P[8] が 7 例 (16%)、G3P[8] が 1 例 (2%) の順に検出された。平成 26 年度に最も多くの割合を占めた G2 の一部において VP7 遺伝子の塩基配列を決定し、他の G2 ロタウイルスとの比較により系統樹を作成し、

a-1 に属していることが示された(図 2)。

2007-2009 年では、圧倒的に G3 の分布が多かった: G3 が 160 例中 117 例 (73%)。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。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、2014 年では突如 G2 が主要になったことがわかる。

一方、P タイプについては、2007 年以来、ずっと P[8] が主要であったが、2014 年に、P[4] が主要となった。これは、ロタウイルスの G タイプと P タイプの組み合わせにおいて、G2 と P[4] の組み合わせが一般的であることから、2014 年の G2 分布が高まったことによる結果である。

2014 年において G2P[4] が著しく増加したことから、ワクチン接種との関連は今のところ不明であるが、今後ともワクチン導入前後の遺伝

子型の継続的な分布調査は重要であると考えられる。

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、今後ともわが国における遺伝子型の分布状況を継続的に調査する意義は大きい。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と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。また、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。

D. 研究発表

1. Komoto S, Wandera Apondi E, Shah M, Odoyo E, Nyangao J, Tomita M, Wakuda M, Maeno Y, Shirato H, Tsuji T, Ichinose Y, Taniguchi K: Whole genomic analysis of human G12P[6] and G12P[8] rotavirus strains that have emerged in Kenya: identification of porcine-like NSP4 genes. *Infect Genet Evol*, 27:277-293, 2014
2. Komoto S, Pongsuwanna Y, Ide T, Wakuda M, Guntapong R, Dennis FE, Haga K, Fujii Y, Katayama K and Taniguchi K: Whole genomic analysis of porcine G10P[5] rotavirus strain P343

provides evidence for bovine-to-porcine interspecies transmission. *Vet Microbiol.* 173(3-4):577-583, 2014

E. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

F. 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。

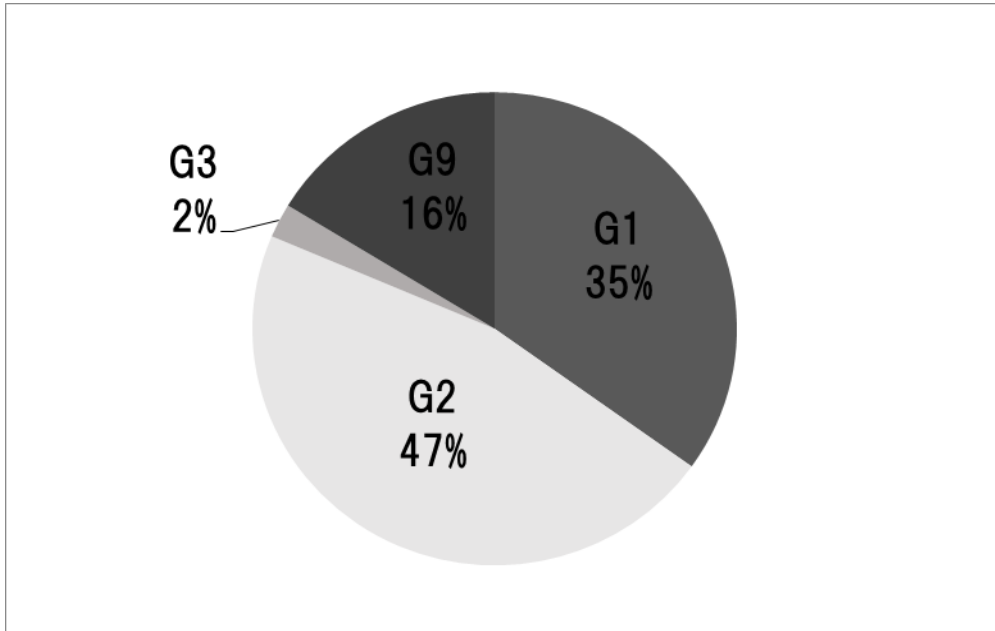


図1 2014年におけるGタイプの分布状況

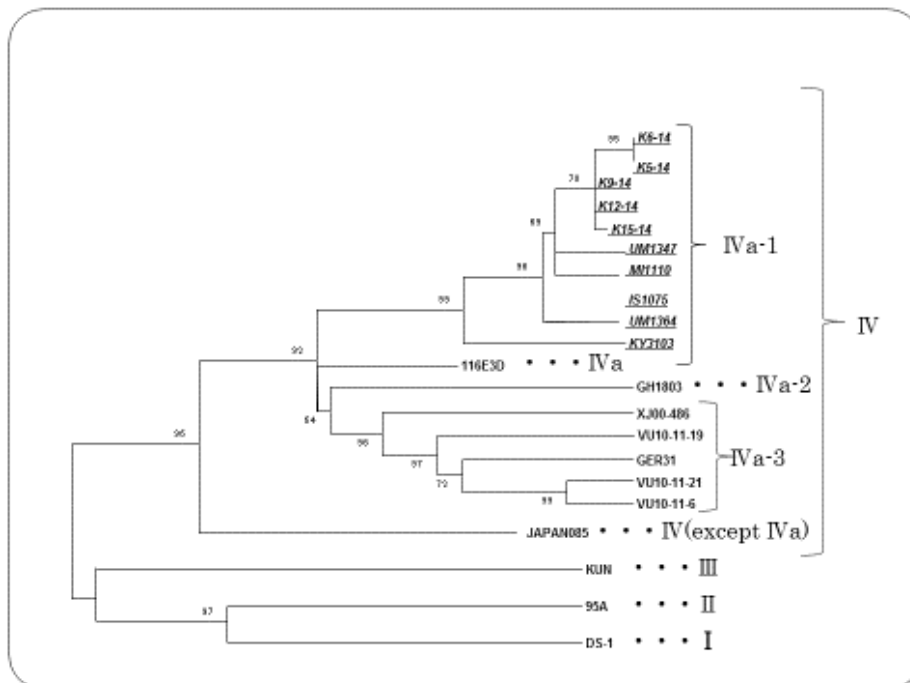


図2 G2 ロタウイルスの系統樹

本研究で検出したウイルス株には下線を引いてある。