

## 胃腸炎ウイルスの研究

—岡山県における血清型 G9 型 A 群ロタウイルスの流行状況について—

葛谷光隆，濱野雅子，木田浩司，藤井理津志，金谷誠久\*（ウイルス科）

\*（独）国立病院機構 岡山医療センター小児科

【調査研究】

## 胃腸炎ウイルスの研究

—岡山県における血清型G9型A群ロタウイルスの流行状況について—

Studies on Viruses Causing Non-bacterial Gastroenteritis in Okayama

—Prevalence of Serotype G9 Group A Rotaviruses in Okayama Prefecture—

葛谷光隆, 濱野雅子, 木田浩司, 藤井理津志, 金谷誠久\* (ウイルス科)

Mitsutaka Kuzuya, Masako Hamano, Kouji Kida, Ritsushi Fujii and Tomohisa Kanadani

\*(独)国立病院機構 岡山医療センター小児科

### 要 旨

岡山県における血清型G9型(G9型)A群ロタウイルス(ARV)の流行状況を明らかにするため、2000年9月～2008年8月の8シーズンに県内で採取されたARV陽性の胃腸炎患者糞便553検体についてG型別調査を実施した。その結果、126検体(22.8%)がG9型と同定され、G1型(33.1%)及びG3型(31.1%)に次ぐ値であることが明らかになった。調査8シーズン中5シーズンでG9型が検出され、ARV全体に占める割合は2001/02シーズンが28.8%、2002/03シーズンが4.7%、2005/06シーズンが55.4%、2006/07シーズンが1.1%、2007/08シーズンが72%であり、特に2005年以降は隔年で大きな流行を起こしていた。さらにG9型陽性例の外殻スパイク蛋白の遺伝子型はすべてP[8]型であり、また遺伝子解析の結果、検出された株の外殻糖蛋白及び外殻スパイク蛋白遺伝子は高度に(相同性98.5%以上)保存されていることがわかった。このようなG9型流行の背景について、G9型は近年新たに出現した型のため住民の抗体保有率が全体として低かったことが基本にあり、さらに2001/02シーズンに県内へ侵入したウイルスが県下全域へと広がるのに数年間を要したこと、その後はG9型に対する抗体を保有しない2歳以下の乳幼児がある程度蓄積する必要があったために、隔年で流行を繰り返したのではないかと考えられた。

[キーワード：A群ロタウイルス、血清型G9型、疫学調査、遺伝子相同性、系統解析]

[Key words : group A rotavirus, serotype G9, epidemiological analysis, nucleotide sequence identity, phylogenetic analysis]

### はじめに

A群ロタウイルス(ARV)は、外殻糖蛋白(VP7)の抗原性により20の血清型に分類されているが、そのうちヒトから検出される頻度が高いことがわかっているのはG1～G4型である<sup>1)</sup>。しかしながら、近年になってヒトの間に出現したG9型によって世界的な流行が確認されるなど、G1～G4型以外の流行動向が注目されている。一方、近年になり複数のメーカーにより作成された第2世代ARVワクチンの導入が世界的に進められており、我が国でも将来的に採用される可能性が考えられる<sup>2)</sup>。しかしながら、これらのワクチンにはG9型は含まれていないことから、ワクチンの有効性を予測する上でも、本型の流行状

況を事前に把握しておくことは非常に重要であると思われる。そこで、岡山県におけるG9型ARVの流行状況を把握するため、2000年～2008年に採取された胃腸炎患者糞便について調査を行った。

### 材料及び方法

#### 1. 糞便検体

2000年9月～2008年8月の8シーズン(前年9月～翌年8月までを1シーズンとする)に(独)国立病院機構 岡山医療センター小児科で採取され、市販のARV検査キットで陽性となった胃腸炎患者糞便553検体を検査対象とした。糞便の10%乳剤を調整後、8,000rpm 15分間の遠心分離

を行って採取した上清を以下の試験に用いた。

## 2. G型別及び外殻スパイク蛋白(VP4)の遺伝子型別

### 方法

市販のG型別用酵素抗体法キット(ロタMA, 株式会社セロテック)もしくは, 市販キット(QIAamp Viral RNA mini kit, 株式会社キアゲン)により糞便から抽出したRNAを用いて, Gouveaら<sup>3)</sup>の報告に基づき逆転写PCR(RT-PCR)法を実施することでG型別を行った。さらにG9型と同定された場合には, Wuら<sup>4)</sup>の方法に従いRT-PCR法によりVP4の遺伝子型(P型)を決定した。

## 3. 遺伝子配列決定法

G型別及びP型別検査時に増幅したVP7及びVP4遺伝子を, アガロース電気泳動を行って特異バンド部分を切り出し, DNA gel extraction kit(日本ミリポア株式会社)によりPCR産物の抽出・精製を行った。得られたDNAについて, PCRに用いたプライマーを使用し, オートシーケンサー(Long-Read Tower, 株式会社ベリタス)により塩基配列を決定した。

## 4. 塩基配列データの解析

塩基配列の解析は市販ソフトウェア(Genetyx MAC ver.13, ソフトウェア開発株式会社)を用いて実施した。また, 遺伝子系統解析はClustal W(フリーソフト)を用い, ARV標準株を参照株として近隣結合法により実施した。なお系統解析については, 同様の解析を1,000回繰り返した場合に, 同一結果が得られる回数(ブートストラップ値)でその信頼性を評価した。

割合を図1に示した。2001/02シーズンにはじめてG9型が検出され, しかもその割合が全体の28.8%とG型の中では最も多くを占めていた。翌シーズンにもわずかながら検出されたが, その後2シーズンは全く検出されなくなった。しかしながら, 2005/06シーズン及び2007/08シーズンには, G9型がARV全体のそれぞれ55.9%及び72.0%を占めるという広範な流行が確認された。以上のことから, G9型の流行は年々その間隔が短くなると同時に, 規模も拡大する傾向にあることがわかった。

次に, ARV陽性例について検体採取週の中央値を算出したところ, G9型は第12週(3月中旬~下旬)となり, G1~G4型の値(G1型:第13週, G2型:第14週, G3型:第12週, G4型:第13週)に比べると検出時期が早い部類に属するものの, 他の型に比べて大きな差は認められなかった。また年齢別検出状況を調べたところ, 特定の年齢層からG9型が検出されるといった傾向は認められず, 他のG型と同様に1歳をピークとする検出パターンが認められた(データを示さず)。

表1 ARVのG型別成績(2000/01~2007/08シーズン)

G型	流行シーズン								合計(%)
	2000/01	2001/02	2002/03	2003/04	2004/05	2005/06	2006/07	2007/08	
G1	8	8	35	20	29	26	46	11	183(33.1)
G2	9	7	0	0	0	1	29	1	47(8.5)
G3	2	12	33	60	31	14	12	8	172(31.1)
G4	0	6	14	0	2	0	0	0	22(4.0)
G9	0	14	4	0	0	52	1	53	124(22.4)
G12	0	1	0	0	0	0	0	0	1(0.2)
G1&G2	0	0	0	0	0	0	1	0	1(0.2)
G1&G9	0	0	0	0	0	0	0	1	1(0.2)
G2&G3	0	1	0	0	0	0	0	0	1(0.2)
G3&G9	0	1	0	0	0	0	0	0	1(0.2)
合計	19	50	86	80	62	93	89	74	553

## 結 果

### 1. G9型ARV検出状況

G型別の結果, 553検体すべてが型別可能であった(表1)。G9型についてみると, 単独で検出されたのが124検体, G1型及びG3型との混合検出が各1検体の, 計126検体(22.8%)から検出された。なお, シーズン別の検出状況では, 調査8シーズン中2001/02シーズン, 2002/03シーズン, 2005/06シーズン, 2006/07シーズン, 2007/08シーズンの計5シーズンでG9型が検出された。各シーズンごとのG型別検出

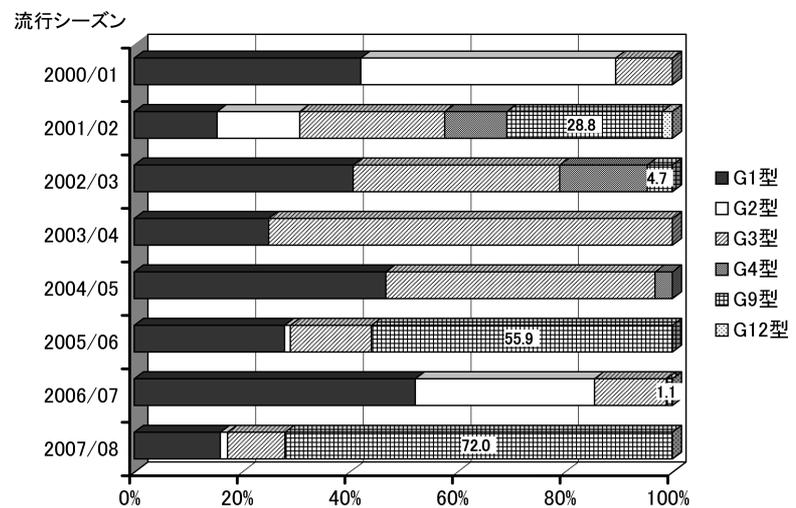


図1 シーズン別のG型別分布割合

## 2. 感染性胃腸炎患者数の推移

2000年～2008年の冬季(前年第45週～翌年第20週)における、岡山県感染症発生動向調査に基づく定点医療機関あたり(定点あたり)の感染性胃腸炎患者数の推移を図2に示した。例年ARVの流行が認められる第5週～第18週頃に着目すると、G9型の割合が50%を超えた2005/06シーズン及び2007/08シーズンにおいては、いずれも定点あたり患者数が他シーズンの値を上回っており、G9型の流行により県下全域で多数の患者が発生していたものと推察された。さらにピーク時の患者数についても、2005/06シーズンが13.9人及び2007/08シーズンが16.6人と増加傾向にあることもわかった。

## 3. G9型株のP遺伝子型別結果

G9型と同定された124検体(混合感染の2例を除く)について、P型の同定を試みたところ、すべてP[8]型であることがわかった。

## 4. VP7遺伝子解析結果

G9型代表株として2001/02シーズンの4株、2005/06シーズンの6株、及び2007/08シーズンの5株について、VP7遺伝子の塩基配列及び予測アミノ酸配列について相互に比較を行った(表2)。その結果、15株のVP7は遺伝子(nt)及びアミノ酸(aa)配列とも98.8%以上という高い相同性を有していることがわかった。詳しくみると、同一シーズンの株間では、ntレベルで99.6%以上、aaレベルで99.4%以上という極めて高い相同性が認められたが、異なるシーズンの株間ではntで98.8～99.6%、aaで98.8～99.4%であり、シーズン間でVP7遺伝子に若干の違いが認められた。

次に県内で検出された株と、これまでに世界各地で検出されたG9型株の遺伝的関連性をみるため、2001/02シーズン、2005/06シーズン及び2007/08シーズン代表株それぞれ2株ずつ計6株のVP7遺伝子について、近隣結合法による系統解析を実施した。結果は図3に示すように、県内検出株はいずれも系統樹上の比較的近い部分に位置付けられ、大きくみると、1995年以降に日本をはじめオーストラリア、ブラジル、アメリカ、中国など

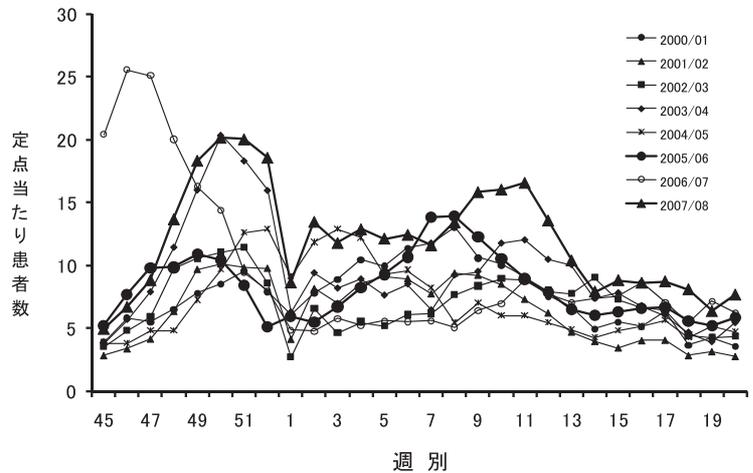


図2 2000～2008年の8シーズンにおける感染性胃腸炎患者数  
2000年～2008年の冬季(前年第45週～翌年第20週)における、岡山県感染症発生動向調査に基づく定点医療機関あたりの感染性胃腸炎患者数の推移を示す。

表2 VP7遺伝子及びアミノ酸配列相同性

G9型株(解析数)	相同性値(%)		
	2001/02株	2005/06株	2007/08株
2001/02 シーズン株 (4)	99.8～100* (100**)	99.0～99.3 (99.1～99.4)	98.8～99.1 (99.1)
2005/06 シーズン株 (6)		99.8～100 (99.4～100)	99.4～99.6 (98.8～99.1)
2007/08 シーズン株 (5)			99.6～100 (100)

\*遺伝子配列相同性値 \*\*アミノ酸配列相同性値

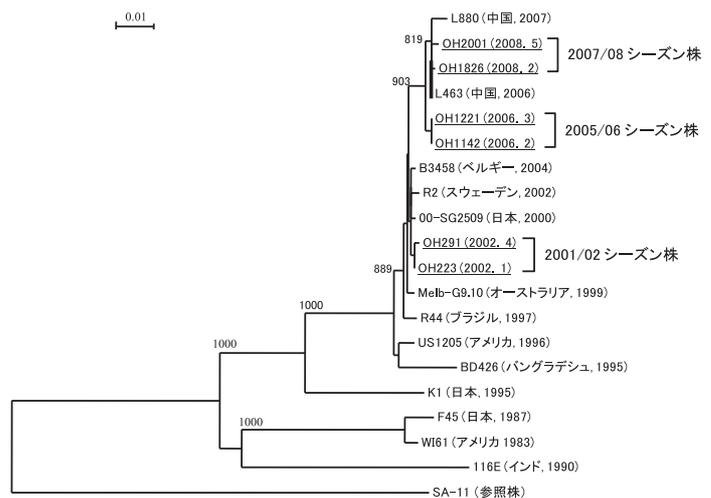


図3 VP7遺伝子配列の系統解析結果

サルARVのSA-11株(G3型)を参照株として、近隣結合法により系統解析を実施した(1,000回のブートストラップを行い、800以上の数値を系統樹上に示す)。県内で検出された株はアンダーラインで示し、括弧内に検出年月を記した。既知のG9型株については、その由来国及び分離年を括弧内に示す。なお、遺伝的距離(サイトあたりの塩基期待置換数)をスケールバーで示した。

世界各地で検出されたG9型株と同じ系統に属することがわかった。

## 5. VP4 遺伝子解析結果

VP7 の比較を行った 15 株について VP4 遺伝子配列を決定し、遺伝子及びアミノ酸配列の相同性を相互に比較した(表3)。その結果、15 株の VP4 遺伝子は nt 配列で 98.7%以上、aa 配列で 98.5%以上という高い相同性を有していることがわかった。詳しくみると、同一シーズンの株間の比較、もしくは 2005/06 シーズン株と 2007/08 シーズン株の比較では、nt レベルで 99.3%以上、aa レベルで 99.4%以上という極めて高い相同性が認められたが、2001/02 シーズン株と他シーズン株との比較では、nt 配列で 98.7~99.9%、aa 配列で 98.5~99.1%とやや相同性値が低く、時間の経過とともに VP4 遺伝子に若干の変異が生じていることがわかった。

次に VP7 遺伝子の場合と同様に、各シーズン代表 2 株の VP4 遺伝子についても系統解析を実施した(図4)。その結果、県内検出株は系統樹上のほぼ同様な部分にそれぞれ位置づけられ、大きくみると 2004~2005 年にヨーロッパやアジアなどで検出された G9P[8]型株の VP4 遺伝子と密接に関連していることが明らかになった。

## 考 察

今回の調査により、8 シーズン中 5 シーズンで G9 型 ARV が検出され、また検出数でも全体の 22.8%と G1 型 (33.1%)及び G3 型 (31.1%)に次ぐ割合を占めるなど、県内において本ウイルスが広く流行していることが明らかになった。G9 型は 1983 年にアメリカではじめて検出され、その後 1988 年にかけて日本やユーゴスラビアでも確認されたが、その時点ではヒトからごく稀に検出されるのみであった<sup>1)</sup>。ところが 1990 年代半ば頃から、世界各地で G9 型の検出報告が相次ぐようになり、現在では従来からヒトの間で流行している G1~G4 型に次ぐ第 5 の G 型として注目されている<sup>1),5)</sup>。日本においても、Zhou らが全国 5 ヶ所の病院(北海道、東京、舞鶴、大阪、佐賀)において 1998 年頃から G9 型の陽性例がしだいに増加したことを報告している<sup>6)</sup>。特に、G9 型の割合が 1998/99

表 3 VP4 遺伝子及びアミノ酸配列相同性

G9型株(解析数)	相同性値(%)		
	2001/02株	2005/06株	2007/08株
2001/02 シーズン株 (4)	99.9~100* (99.7~100**)	98.9~99.9 (98.5~98.8)	98.7~99.1 (98.5~99.1)
2005/06 シーズン株 (6)		99.9~100 (100)	99.3~99.9 (99.4~99.7)
2007/08 シーズン株 (5)			99.4~100 (99.4~100)

\*遺伝子配列相同性値 \*\*アミノ酸配列相同性値

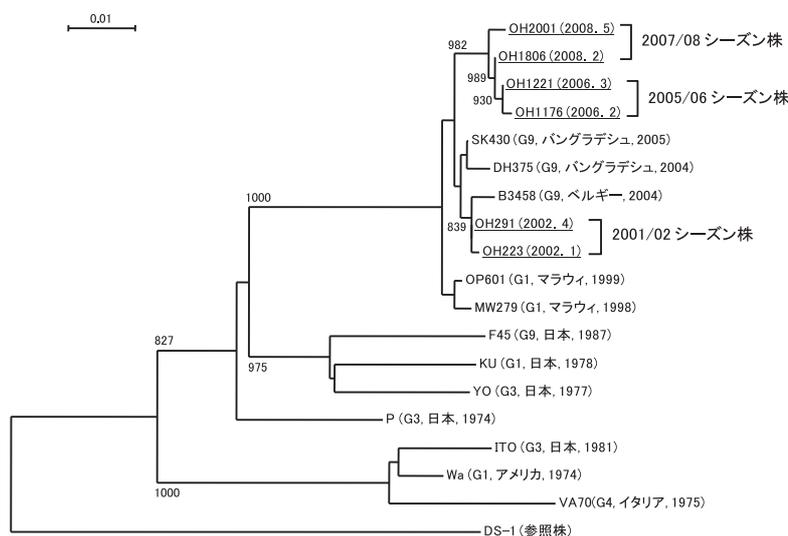


図 4 VP4 遺伝子配列の系統解析結果

ヒト ARV の DS-1 株 (P[4] 型) を参照株として、近隣結合法により系統解析を実施した (1,000 回のブートストラップを行い、800 以上の数値を系統樹上に示す)。県内で検出された株はアンダーラインで示し、括弧内に検出年月を記した。既知の P[8] 型株については、その G 型、由来国及び分離年を括弧内に示した。なお、遺伝的距離 (サイトあたりの塩基期待置換数) をスケールバーで示した。

シーズンの東京で 52.9%、及び 1999/2000 シーズンの佐賀で 78.4%に達したことは注目に値する。さらに Zhou ら<sup>6)</sup> は、1996 年以降に我が国で検出された計 58 株の G9 型についてその P 型を調べ、57 株が P[8] 型であったと報告している。今回の調査で、岡山県においても 2001/02 シーズンに G9 型がはじめて確認され、しかも県内で検出された株の VP4 がいずれも P[8] 型であったことから、1990 年代後半頃から始まった全国的な G9 型流行が、2001/02 シーズンには岡山県にも波及し、その後県下に広まったものと考えられた。

2001/02 シーズンに県内に侵入した G9 型が、当該シーズンには ARV 全体の 28.8%を占めるという比較的大きな流行を起こした。翌シーズンにもわずかながら G9 型が検出されたものの、その後 2 シーズンは全く検出されなくなった。しかしながら、2005/06 及び 2007/08 シーズン

ンにはG9型がARV全体のそれぞれ55.4%及び72%を占めるなど、年を経るごとに流行間隔が短くなるとともに、規模も拡大する傾向にあることが明らかになった。また、G9型が高率に検出された2005/06及び2007/08シーズンのARV流行時期において、感染性胃腸炎患者数がいずれも例年を上回っていたことなどから、県下全域で当該ウイルスが流行していたことが強く示唆された。その一方で、今回検出されたG9型株はいずれもP型がP[8]であり、さらにVP7及びVP4遺伝子解析結果から、今回の株が遺伝的にも極めて近縁であることがわかった。これらのことは、ほぼ類似した性状のウイルスが繰り返し流行していたことを示している。G9型がこのような流行形態を取るに至った背景について明確なことはわからないものの、G9型は近年新たに出現した型のため住民の抗体保有率が全体として低かったことが基本にあり、さらに2001/02シーズンに県内へ侵入したウイルスが県下全域へと広がるのに数年間を要したこと、その後はG9型に対する抗体を保有しない2歳以下の乳幼児がある程度蓄積する必要があったために、隔年で流行を繰り返したのではないかと考えられた。今後、ARVの病原性に関与すると考えられている非構造蛋白NSP4の比較を行うなど、さらに詳しい解析により流行拡大要因について明らかにする必要がある。

現在、第2世代ARVワクチンの導入が世界的に進められており、我が国でも将来的に導入される可能性がある<sup>2)</sup>。第2世代ワクチンのうち世界的に最も導入が進んでいるのはGlaxoSmithKline社が開発したRotarix<sup>®</sup>と、Merck社が開発したRotaTeq<sup>®</sup>である。これらのワクチンは、いずれも弱毒生ワクチンであるが、Rotarix<sup>®</sup>はヒトARVの89-12株(G1P[8])のみを用いた単価ワクチンであり、一方のRotaTeq<sup>®</sup>は、ウシARVのWC3株にG1～G4型のVP7遺伝子とP[8]型のVP4遺伝子を組み込んだ遺伝子分節組換え体ワクチンである。しかしながら、いずれのワクチンにもG9型は含まれていないため、本ウイルスに対する有効性については未知数である。ただし、両ワクチンともP[8]型を含んでいるため、VP4を介した免疫

によりG9P[8]型ARVに対して感染防御が期待できるものの、2005/06及び2007/08シーズンのようにG9P[8]型がARVの過半数を占めるような流行において、ワクチンがどの程度有効性を示すのかは、今後の検討課題であると思われる。また、ワクチン導入にともなってG1～G4型の感染が抑制された場合に、G9型などそれ以外の型のARVがどのような流行動向を示すかについても注意深く監視する必要がある。

## 文 献

- 1) 小林宣道, 浦沢正三: ロタウイルス, ウイルス, 50, 157-172, 2000
- 2) 中込とよ子, 中込 治: ロタウイルスワクチンの現状と展望, 病原微生物検出情報, 26, 14-16, 2005
- 3) Gouvea, V., Glass, R. L., Woods, P., Taniguchi, K., Clark, H. F., Forrester, B. and Fang, Z. Y.: Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens, J. Clin. Microbiol., 28: 276-282, 1990
- 4) Wu, H., Taniguchi, K., Wakasugi, F., Ukae, S., Chiba, S., Ohseto, M., Hasegawa, A., Urasawa, T., Urasawa, S.: Survey on the distribution of the gene 4 alleles of human rotaviruses by polymerase chain reaction., Epidemiol. Infect., 112: 615-622, 1994
- 5) Phan, T. G., Khamrin, P., Quang, T. D., Dey, S. K., Takanashi, S., Okitsu, S., Maneekarn, N., Ushijima, H.: Detection and genetic characterization of group A rotavirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Japan, J. Virol., 81: 4645-4653, 2007
- 6) Zhou, Y., Li, L., Okitsu, S., Maneekarn, N., Ushijima, H.: Distribution of human rotaviruses, especially G9 strains, in Japan from 1996 to 2000, Microbiol. Immunol., 47: 591-599, 2003