

【調査研究】

胃腸炎ウイルスの疫学的研究
—岡山県の散発胃腸炎患者から検出されたロタウイルス A 遺伝子再集合体株の解析
(2012-2017) —

Epidemiological Studies on Viruses Causing Non-bacterial Gastroenteritis in Okayama
—Molecular Characterization of Reassortant Rotavirus A Strains Detected from Sporadic
Gastroenteritis in Okayama Prefecture (2012-2017) —

松岡保博, 野宮加代子*, 梶原香代子**, 濱野雅子, 木田浩司

井上 勝***, 濃野 信****, 金谷誠久*****

*現 岡山県備前保健所, **現 岡山県感染症情報センター,

岡山赤十字病院小児科, *のうの小児科, *****国立病院機構岡山医療センター小児科

MATSUOKA Yasuhiro, NOMIYA Kayoko*, KAJIHARA Kayoko**, HAMANO Masako,

KIDA Kouji, INOUE Masaru***, NOUNO Shin****, KANADANI Tomohisa*****

要 旨

2018年に実施した、ヒトから検出されたロタウイルス A についての過去6シーズン (2011/12年~2016/17年) の遡り調査で、動物由来株との遺伝子再集合体と考えられる株が30株検出された。今回、これらの株について、その由来や流行状況を明らかにするため、系統樹解析やゲノム全11分節の遺伝子型別を実施した。その結果、2017年に検出されたG8型株は、2014年に北海道でアウトブレイクを起こした bovine-likeG8P[8]株 (ウシロタウイルス A との遺伝子再集合体) と DS-1-likeG1P[8]株の遺伝子再集合によって発生し、既に国内に定着していると推察された。また、国内で2016年頃から広く流行が認められている equine-likeG3型 (ウマロタウイルス A との遺伝子再集合体) が、2012/13年シーズンには既に県内に侵淫していたことが明らかとなった。今後は、このような遺伝子再集合体の株の正確な流行把握のために、ゲノム全11分節の遺伝子解析が必要であると考えられた。

[キーワード: ロタウイルス A, 胃腸炎, 遺伝子再集合体, ワクチン, 系統樹解析]

[Key words : Rotavirus A, Gastroenteritis, Reassortant, Vaccine, Phylogenetic analysis]

1 はじめに

ロタウイルス A (以下「RVA」という。)は、レオウイルス科に属し、ゲノムに11分節の2本鎖RNAを有する¹⁾。このうち第9分節にコードされた外殻糖たん白 (VP7) の塩基配列に基づき G 遺伝子型が、第4分節にコードされた外殻スパイクたん白 (VP4) の塩基配列に基づき P 遺伝子型が分類されており、ヒトから検出される頻度が高いのは G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] 及び G9P[8] である^{1), 2)}。また、近年では、遺伝子解析機器の性能向上に伴い、2008年に Matthijnsens ら³⁾ が報告した、ゲノム全11分節の配列に基づく遺伝子型別法が広く活用されるようになった。

RVA は小児の主要な胃腸炎起因ウイルスであり、重篤な症状を引き起こすこともあるため、本ウイルスの感染制御を目的として、生ワクチンの開発導入が世界的

に進められてきた⁴⁾。主なものとしては、ヒト RVA 株 (G1P[8]) 由来の単価ワクチンである Rotarix® (グラクソ・スミスクライン社製) 及びウシ RVA にヒト RVA の G1 から G4 型の VP7 遺伝子と P[8] の VP4 遺伝子を組み込んだ遺伝子組換え株に由来する5価ワクチンである RotaTeq® (メルク社製) が知られており、我が国においては前者が2011年7月に、後者が2012年1月にそれぞれ製造承認され導入が開始された。

これまで我々は、県内における RVA 流行状況及び感染性胃腸炎患者を継続的に調査し、ワクチン導入前後の RVA 遺伝子検出率、G 遺伝子型、感染性胃腸炎患者数等を比較解析することで、ワクチンの効果及び流行遺伝子型への影響を把握してきた^{5)~11)}。しかしながら、調査に利用していた G 型別用 Multiplex-PCR 法において誤判定が生じることが報告されたことから¹²⁾、2018年に

過去6シーズン（2011/12年から2016/17年）の廻り調査を実施した¹³⁾。その結果、G3型をG1型と誤判定した29株、G8型をG3型と誤判定した1株の計30株の存在が明らかとなり、遺伝子解析の結果、全ての株が動物由来株との遺伝子再集合体であると考えられた。特に2016/17年シーズンに検出されたG8型は県内初の検出例であり、2014年に北海道でアウトブレイクを起こして以降、国内での拡大が注視されている。そこで今回我々は、これらの株について、他の国内検出株を含めた系統樹解析やゲノム全11分節の遺伝子型別を実施し、その由来や流行状況を推定した。

2 方法

2.1 対象

2018年に実施した調査¹³⁾で、Gouvea らの方法¹⁴⁾によりG遺伝子型が誤判定された2012/13年シーズンのG3型4株、2013/14年シーズンのG3型3株並びに2016/17年シーズンのG3型22株及びG8型1株を対象とした（表1）。

2.2 遺伝子型の決定と近縁株の推定

G3型株については、病原体検出マニュアル「ロタウイルス」¹⁵⁾に従い、VP7遺伝子の一部を標的としたPCR法を実施した。得られた増幅産物について、それぞれのPCRで使用したプライマーを用いたダイレクトシーケンシング法により塩基配列を決定した。また、G8型株につ

表1 調査対象とした誤判定株

G遺伝子型	シーズン	株名
G3型	2012/13年シーズン	OH4037, OH4105, N2033, N2015
	2013/14年シーズン	OH4460, OH4521, NN621
	2016/17年シーズン	OH5633, OH5643, OH5658, OH5663, OH5665, OH5671, OH5685, OH5703, OH5718, OH5724, OH5725, OH5735, OH5749, OH5767, OH5781, N2789, N2791, N2808, N2816, N2824, N2825, N2838
G8型	2016/17年シーズン	N2793

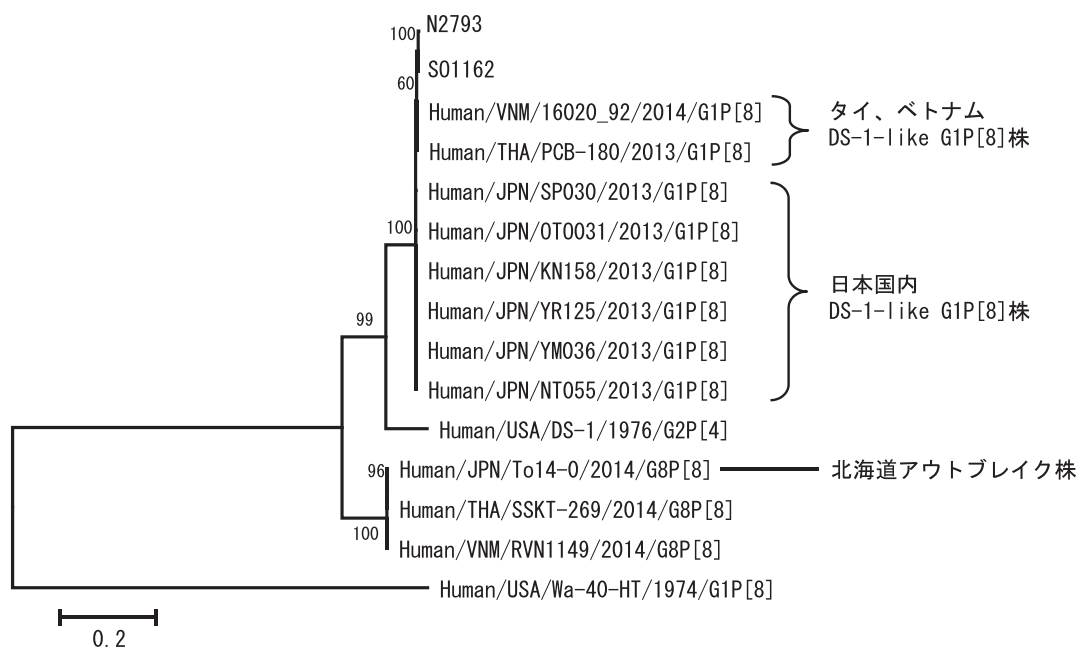


図1 N2793のVP1遺伝子系統樹

VP1遺伝子（3247bp）について、最尤法による系統樹解析を実施した（1000 bootstrap）。

いては、県内で初めて検出され、由来を詳細に解析する必要があることから、同様の方法でVP1遺伝子の全長の塩基配列を解読するとともに、その他10分節の一部の塩基配列（各500塩基以上）を解読し、RotaC v2.0 (<http://rotac.regatools.be/>) によりそれぞれの遺伝子型を決定した。さらに、近縁株を特定するため、BLAST検索 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) も実施した。

2.3 系統樹解析

G3型株のVP7遺伝子の一部（660塩基）及びG8型株のVP1遺伝子の全長（3247塩基）について、MEGA7を用い、最尤法による系統樹解析を実施した。

3 結果

3.1 G8型株（N2793株）の遺伝子型の決定

2017年4月に検出されたG8型株（N2793株）についてゲノム全11分節の遺伝子型を調べた。その結果、遺伝子型構成は、G8-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2であった。

3.2 BLAST検索によるN2793株の近縁株の確認

N2793株の塩基配列の変異や遺伝子再集合の可能性を探るため、ゲノム全11分節を対象としたBLAST検索を実施した。その結果、最も一致率が高かった株は、2017年3月に千葉県内の医療機関で感染性胃腸炎の2歳8か

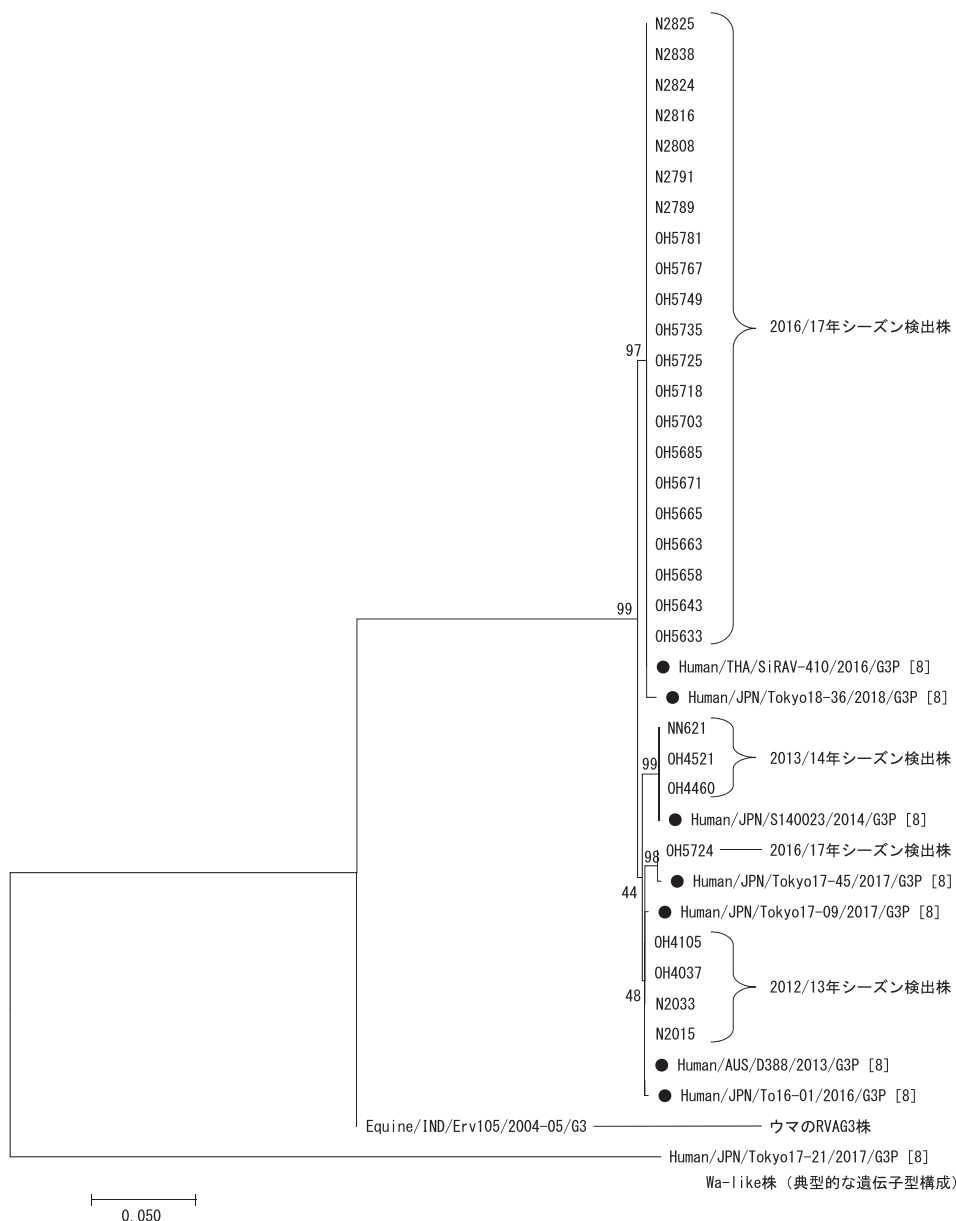


図2 G3型29株のVP7遺伝子領域系統樹

VP7遺伝子の一部（660塩基）について、最尤法による系統樹解析を実施した（1000 bootstrap）。

●: equine-likeG3P [8] 株

月の子供から検出されたG8型であるSO1162株¹⁶⁾であった。一方、2014年に北海道でアウトブレイクを起こしたbovine-likeG8P[8]株との一致率は、10分節はそれぞれ99%以上と高かったものの、VP1遺伝子をコードする分節は86.7%と低かった。

3.3 N2793株のVP1遺伝子の系統樹解析

N2793株のVP1遺伝子の由来を探るため、系統樹解析を実施した(図1)。その結果、N2793株は、タイ、ベトナム又は日本国内で検出されたDS-1-likeG1P[8]株と同じクレードに属しており、北海道でアウトブレイクを起こしたG8型株の属するクレードとは遺伝的に遠い場所にクラスターを形成していた。

3.4 G3型29株のVP7遺伝子の系統樹解析

G3型29株について、VP7遺伝子の系統樹解析を実施した(図2)。その結果、これらの株は、2016/17年シーズンのOH5724株を除いてシーズンごとに別クレードに属していた。また、典型的な遺伝子構成を持つWalikeG3P[8]株とは遺伝的に距離が認められ、29株が属するクレードが形成するクラスターにはequine-likeG3P[8]株が含まれていた。

4 考察

G8型は、以前はヒトからの検出は稀であったが、2014年、ウシRVAG8型が起源と推定されるVP7遺伝子を有する株(bovine-likeG8P[8]株)が北海道でアウトブレイクを起こし¹⁷⁾、現在は東南アジアを中心に流行している¹⁸⁾。今回解析したN2793株は、2017年4月に検出され、その遺伝子型構成はbovine-likeG8P[8]株と同じG8P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2であった。しかしながら、VP1遺伝子の塩基配列は両者間で異なっており、BLAST検索でN2793株との一致率が最も高かったのは、千葉県で2017年3月に検出されたSO1162株(G8型)¹⁶⁾であった。系統樹解析の結果、N2793株のVP1遺伝子は、タイ、ベトナム又は日本国内で検出されたDS-1-likeG1P[8]株と同じクレードに属していた。これらの結果を勘案すると、N2793株と同じ遺伝子構成を有する株は、bovine-likeG8P[8]株とDS-1-likeG1P[8]株の遺伝子再集合によって2014年以降に発生したと考えられる。また、VP1遺伝子の系統樹でDS-1-likeG1P[8]株と同じクレードに属するG8型株は、世界でもN2793株とSO1162株の2株のみしか報告されておらず、希少な遺伝子構成であると考えられるが、これらが地理的に距離のある千葉県と岡山県で同時期に検出されたことから、国内には既に定着していると推察される。

ウマRVAG3型が起源と推定されるVP7遺伝子を有する株(equine-likeG3型株)は、2015年頃から世界各地で報告されている^{19), 20)}。国内では2016年頃から広く流行が認められるが²¹⁾、我々が2018年に実施した遡り調査により、2012/13年シーズンには、既に県内に侵淫していたことが明らかとなった。また、今回実施した系統樹解析により、2012/13年シーズンに県内で検出された4株と2017年に東京で検出されたTokyo17-09株が同じクレードに属していたことから、これらの株は長く国内に定着していると推察される。

2011年にRVAワクチンが導入されて以降、ロタウイルス胃腸炎の患者数は減少傾向にあるが^{22)~24)}、一方でこれまで見られなかった遺伝子型構成を持つ株(DS-1-like株)や、動物由来株との遺伝子再集合体の発生が報告されている^{16), 21), 25), 26)}。こうした株の発生がワクチンの影響によるものであるかは不明であるが、オーストラリアでは、導入したワクチンの種類によって流行株に違いがあったことが報告されている²⁷⁾。また、国内では、2018/19年シーズンのG8型の検出割合が、前例のない増加を示している²⁸⁾。今回解析したN2793株は、世界で2例目の報告となる希少な遺伝子型構成のG8型であるが、2018/19年シーズンの流行株には、同じ遺伝子型構成を有する株が含まれる可能性があり、今後の侵淫状況に注意を払う必要がある。RVAの正確な流行把握のためには、ゲノム全11分節の遺伝子型別解析が有用であり、検査実施体制の構築が必要である。

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) Santos N, Hoshino Y: Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine, *Med. Virol.*, 15, 29-56, 2005
- 3) Matthijnsens J, Ciarlet M, McDonald S M, Attoui H, Banyai K, et al.: Uniformity of rotavirus Classification Working Group (RCWG), *Arch. Virol.*, 156, 1397-1413, 2011
- 4) 中込 治, 中込とよ子: ワクチンによるロタウイルスの感染制御, *ウイルス*, 60, 33-48, 2010
- 5) 葛谷光隆, 濱野雅子, 藤井理津志, 小倉 肇, 金谷誠久ら: 岡山県におけるA群ロタウイルス検出状況と血清型分布の最近の動向, *病原微生物検出情報*, 26, 4-6, 2005

- 6) 葛谷光隆, 濱野雅子, 木田浩司, 藤井理津志, 岸本壽男ら: 岡山県におけるA群ロタウイルスの検出状況と血清型分布の最近の動向, 病原微生物検出情報, 32, 71-72, 2011
- 7) 濱野雅子, 木田浩司, 藤井理津志, 岸本壽男, 葛谷光隆ら: 岡山県におけるA群ロタウイルスの検出状況 (2010/11~2012/13シーズン), 病原微生物検出情報, 35, 68-69, 2014
- 8) 濱野雅子, 藤井理津志, 木田浩司, 葛谷光隆, 橋原幸二ら: 胃腸炎ウイルスの疫学的研究-岡山県の散发胃腸炎患者におけるロタウイルスAの流行状況 (2012/2013シーズン) -, 岡山県環境保健センター年報, 38, 55-58, 2014
- 9) 藤原香代子, 藤井理津志, 濱野雅子, 磯田美穂子, 松岡保博ら: 胃腸炎ウイルスの疫学的研究-岡山県の散发胃腸炎患者におけるロタウイルスAの流行状況 (2013/2014シーズン) -, 岡山県環境保健センター年報, 39, 119-123, 2015
- 10) 藤原香代子, 藤井理津志, 濱野雅子, 磯田美穂子, 松岡保博ら: 胃腸炎ウイルスの疫学的研究-岡山県の散发胃腸炎患者におけるロタウイルスAの流行状況 (2014/2015シーズン) -, 岡山県環境保健センター年報, 40, 63-67, 2016
- 11) 梶原香代子, 濱野雅子, 木田浩司, 谷川徳行, 磯田美穂子ら: 胃腸炎ウイルスの疫学的研究-岡山県の散发胃腸炎患者におけるロタウイルスAの流行状況 (2015/2016シーズン) -, 岡山県環境保健センター年報, 41, 67-72, 2017
- 12) 藤井克樹: ロタウイルスの遺伝子型別法に関する注意, 病原微生物検出情報, 38, 172-174, 2017
- 13) 木田浩司, 野宮加代子, 松岡保博, 梶原香代子, 濱野雅子ら: 胃腸炎ウイルスの疫学的研究-岡山県の散发胃腸炎患者におけるロタウイルスAの流行状況 (2009-2017) -, 岡山県環境保健センター年報, 43, 99-105, 2019
- 14) Gouvea V, Glass R I, Woods P, Taniguchi K, Clark H F, et al. : Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens, J. Clin. Microbiol., 28, 276-282, 1990
- 15) 国立感染症研究所: 病原体検出マニュアル「ロタウイルス」, 2019
- 16) Kamiya H, Tacharoenmuang R, Ide T, Negoro M, Tanaka T, et al. : Characterization of an Unusual DS-1-Like G8P[8] Rotavirus Strain From Japan in 2017: Evolution of Emerging DS-1-Like G8P[8] Strains Through Reassortment, JPN. J. Infect. Dis., 72(4), 256-260, 2019
- 17) Kondo K, Tsugawa T, Ono M, Ohara T, Fujibayashi S, et al. : Clinical and Molecular Characteristics of Human Rotavirus G8P[8] Outbreak Strain, Japan, 2014, Emerg. Infect. Dis., 23(6), 968-970, 2017
- 18) Tacharoenmuang R, Komoto S, Guntapong R, Ide T, Sinchai P, et al. : Full Genome Characterization of Novel DS-1-Like G8P[8] Rotavirus Strains That Have Emerged in Thailand: Reassortment of Bovine and Human Rotavirus Gene Segments in Emerging DS-1-Like Intergenogroup Reassortant Strains, PLoS One, 11(11), e0165826, 2016
- 19) Utsumi T, Wahyuni M R, Doan H Y, Dinana Z, Soegijanto S, et al. : Equine-like G3 Rotavirus Strains as Predominant Strains Among Children in Indonesia in 2015-2016, Infect. Genet. Evol., 61, 224-228, 2018
- 20) Cowley D, Donato M C, Roczo-Farkas S, Kirkwood D C : Emergence of a Novel Equine-Like G3P[8] Intergenogroup Reassortant Rotavirus Strain Associated With Gastroenteritis in Australian Children, J. Gen. Virol., 97(2), 403-410, 2016
- 21) Komoto S, Ide T, Negoro M, Tanaka T, Asada K, et al. : Characterization of Unusual DS-1-like G3P[8] Rotavirus Strains in Children With Diarrhea in Japan, J. Med. Virol., 90(5), 890-898, 2018
- 22) Asada K, Kamiya H, Suga S, Nagao M, Ichimi R, et al. : Rotavirus Vaccine and Health-Care Utilization for Rotavirus Gastroenteritis in Tsu City, Japan, Western Pac. Surveill. Response J., 7(4), 28-36, 2016
- 23) Fujii Y, Noguchi A, Miura S, Ishii H, Nakagomi T, et al. : Effectiveness of Rotavirus Vaccines Against Hospitalisations in Japan : BMC Pediatr., 17(1), 156, 2017
- 24) Araki K, Hara M, Tsugawa T, Shimano C, Nishida Y, et al. : Effectiveness of Monovalent and Pentavalent Rotavirus Vaccines in Japanese Children, Vaccine., 36(34), 5187-5193, 2018
- 25) Fujii Y, Nakagomi T, Nishimura N, Noguchi A, Miura S, et al. : Spread and Predominance in Japan of Novel G1P[8] Double-Reassortant Rotavirus Strains Possessing a DS-1-like Genotype Constellation Typical of G2P[4] Strains, Infect. Genet. Evol., 28,

426-33, 2014

- 26) Komoto S, Tacharoenmuang R, Guntapong R, Ide T, Haga K, et al. : Emergence and Characterization of Unusual DS-1-Like G1P[8] Rotavirus Strains in Children With Diarrhea in Thailand, PLoS One, 10 (11), e0141739, 2015
- 27) Roczo-Farkas S, Kirkwood D C, Cowley D, Barnes L G, Bishop F R, et al. : The Impact of Rotavirus Vaccines on Genotype Diversity: A Comprehensive Analysis of 2 Decades of Australian Surveillance Data, J. Infect. Dis., 218(4), 546-554, 2018
- 28) 国立感染症研究所感染症疫学センター：ロタウイルス 2004年9月～2019年8月, 病原微生物検出情報, 40, 201-203, 2019