

【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におけるロタウイルスAの流行状況(2009-2017)—
Epidemiological Studies on Viruses Causing Non-bacterial Gastroenteritis in Okayama
—Surveillance of Rotavirus A from Sporadic Gastroenteritis in Okayama Prefecture (2009-2017)—

木田浩司, 野宮加代子, 松岡保博, 梶原香代子*, 濱野雅子,
橋本清美, 北村雅美*, 井上 勝**, 濃野 信**, 金谷誠久**** (ウイルス科)
*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,
****国立病院岡山医療センター小児科

KIDA Kouji, NOMIYA Kayoko, MATSUOKA Yasuhiro, KAJIHARA Kayoko*, HAMANO Masako,
HASHIMOTO Kiyomi, KITAMURA Masami*, INOUE Masaru**, NOUNO Shin***,
KANADANI Tomohisa**** (Virology Section)

*Okayama Prefectural Infectious Disease Surveillance Center,

Department of Pediatrics, Okayama Red-Cross Hospital, *Nouno Pediatric Clinic,

****Department of Pediatrics, National Hospital Organization Okayama Medical Center

要 旨

2011年に導入されたロタウイルスAワクチンの県内における流行への影響を検証するため、これまで用いてきた Multiplex-PCR法で生じるG遺伝子型の誤判定を、VP7遺伝子の解析によって2011年まで遡って修正し、2009年から2017年までの県内のロタウイルスAの流行状況について、4,961検体を対象として再解析した。その結果、G1と誤判定されたG3が29株、G3と誤判定されたG8が1株確認された。これらの株のVP7遺伝子は、近年出現した、ヒトロタウイルスと動物由来株との遺伝子再集合体とされる株と高い相同性を示した。また、いずれもワクチン導入後に県内に侵入したと推定された。しかしながら、ワクチン導入以降、特定のG遺伝子型の連続的な流行が確認されていないこと、胃腸炎患者におけるロタウイルスAの検出率が低下していること、ロタウイルスA流行期における感染性胃腸炎の定点あたり患者数が減少傾向にあること等を勘案すると、現在のところ、ワクチンは効果的に機能しているものと推察された。

[キーワード：ロタウイルスA, 胃腸炎, 逆転写PCR, 遺伝子再集合体, ワクチン]

[Key words : Rotavirus A, Gastroenteritis, Reverse-transcription PCR, Reassortant, Vaccine]

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、11分節の2本鎖RNAゲノムを有する¹⁾。このうちウイルスの中和に深く関わる外殻たん白をコードするゲノムは2分節あり、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いる。現在までに、G遺伝子型はG1～G27が、P遺伝子型はP[1]～P[35]がそれぞれ確認されており²⁾、さらに両者の組み合わせによって多くの遺伝子型が存在しうが、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), 3)}。

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～G4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)}。G遺伝子型については、1990年にGouveaらの開発したMultiplex-PCR法¹²⁾（以下「型別PCR法」という。）により決定してきたが、2017年、国立感染症研究所の藤井によって本法の再検証が行われ、現在の流行株において、ウマロタウイルスとヒトロタウイルスの遺伝子再集合体とされるEquine-like G3¹³⁾がG1に、また一部のG8がG3に、それぞれ誤判定されることが報告された¹⁴⁾。そこで我々は、既報の5シーズン(2011/2012～2015/2016)^{7)~11)}に2016/2017シーズンを加えた計6シーズンで型別PCR法においてG1又はG3と判定されたRVA検出株について、VP7遺伝子の塩基配列を解析することでG遺伝子型を修正した。また、得られた結果をもとに型別PCR法の誤判定の原因を推定するとともに、既報^{6)~11)}を含む8シーズン(2009/2010～2016/2017)におけるRVAの正確な流行状況について、再解析を行うとともに、ワクチンの効果について再検証を行った。

2 方法

2.1 対象

RVAの流行状況の解析については、2009年9月から

2017年8月までの8シーズン（毎年9月～翌年8月を1シーズンとする）に、県内の3医療機関で採取された胃腸炎患者のふん便4,961検体を対象とした（表1）。このうち、2016年8月までに検出されたRVAの解析結果については、既報^{6)~11)}からの引用を含むが、2009/2010シーズンの91検体、2010/2011シーズンの86検体、2011/2012シーズンの299検体、2012/2013シーズンの115検体、2013/2014シーズンの21検体、2014/2015シーズンの25検体及び2016/2017シーズンの657検体（合計1,294検体）については、冷凍保存ふん便を使用し、今回新たに解析対象に加えた。

2.2 スクリーニング及びRNAの抽出

今回新たに解析対象とした1,294検体について、電子顕微鏡又は市販のRVA検出キット（イムノクロマト法又は酵素抗体法）によりRVAのスクリーニングを行い、陽性となった検体について、市販キット（QIAamp Viral RNA mini kit, キアゲン社製）によりRNAを抽出した。

2.3 型別PCR法によるG遺伝子型の決定

スクリーニングで陽性となった検体から抽出したRNAを用い、Gouveaらの開発した方法¹²⁾に従い、VP7遺伝子を標的とした型別PCR法を実施し、得られた増幅産物の大きさからG遺伝子型を決定した。

表1 シーズン別検体数及びRVA遺伝子検出状況

シーズン	検体数	RVA検出数	参考文献
2009/2010	448 (91)*	94	6)
2010/2011	524 (86)	145	7)
2011/2012	709 (299)	126	7)
2012/2013	745 (115)	139	8)
2013/2014	719 (21)	106	9)
2014/2015	497 (25)	32	10)
2015/2016	662	62	11)
2016/2017	657 (657)	65	
合計	4,961	737	

* : 括弧内は新たに追加した検体数

2.4 VP7遺伝子の塩基配列解析によるG遺伝子型の修正

2011年9月から2017年8月までの6シーズンに、型別PCR法によってG1、G3又は両者いずれかとの混合感染と判定された359検体から抽出したRNAを用い、病原体検出マニュアル¹⁵⁾に従いVP7遺伝子を標的としたRT-PCR法を実施した。一部の検体については、Liuらの報告したnested PCR法¹⁶⁾を実施した。また、型別PCR法で混合感染と判定された4件については、検出されたG遺伝子型の型特異的プライマーセットを個別に用いたPCRをそれぞれ実施した。

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ス法により塩基配列を決定し、RotaC v2.0 (<http://rotac.regatools.be/>)による解析でG遺伝子型を決定した。さらに、誤判定が判明した株については、BLAST検索 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)を行い、近縁株を確認した。

2.5 型別PCR法による誤判定の原因推定

型別PCR法による誤判定の原因を解明するため、市販ソフトウェア (GENETYX ver.11, 株式会社ゼネティックス)を用いて、同法に使用するG遺伝子型特異的プライマーの結合部位を、誤判定株及び従来株の塩基配列に対するホモロジー検索で推定し、それぞれ比較解析した。

2.6 RVA流行期の定点あたり感染性胃腸炎患者数

2010年から2017年におけるRVA流行期の定点あたり感染性胃腸炎患者数について、岡山県感染症発生動向調査事業に基づき定点医療機関から報告された感染性胃腸炎患者数のうち、第5週から第18週についてシーズンごとに集計し、小児科定点数で除して算出した。

3 結果

3.1 G遺伝子型の修正

VP7遺伝子の塩基配列の解析によるG遺伝子型の修正結果を表2に示す。型別PCR法でG1と判定された株のうち2012/2013シーズンの2株、2013/2014シーズンの3株及び2016/2017シーズンの22株が、それぞれG3に修正された。また、2012/2013シーズンにG1及びG3の混合感染と判定された2件については、いずれもG3の単独感染に修正された。さらに、2016/2017シーズンに型別PCR法でG3と判定された10株のうち1株が、G8へ修正された。

BLAST検索の結果、G3に修正された株 (以下「G3誤判定株」という。)の塩基配列は、ウマロタウイルスとヒトロタウイルスの遺伝子再集合体とされるEquine-like G3株¹³⁾との一致率が約99%と高かった。また、G8に修正された株 (以下「G8誤判定株」という。)の塩基配列は、ウシロタウイルスとヒトロタウイルスの遺伝子再集合体とされるDS-1-like G8株¹⁷⁾との一致率が約99%と高かった。

3.2 型別PCR法による誤判定の原因推定

型別PCR法で使用するG3特異的プライマーのG3誤判定株に対するホモロジー検索によって推測された結合領域及びG3従来株への結合領域をそれぞれ図1-Aに、また、これらの結合領域におけるG3誤判定株及びG3従来株の塩基配列の比較結果を図1-Bに示す。G3従来株に対するG3特異的プライマーの結合領域において、G3従来株は1塩基、G3誤判定株は4塩基がプライマー配列と異なっていた (図1-B β領域)。また、ホモロジー検索によって推測されたG3誤判定株に対するG3特異的プライマー結合領域においては、G3従来株、G3誤判定株ともに認められる10塩基の挿入配列を除いて、G3従来株は4塩基、G3誤判定株は3塩基がプライマー配列と異なっていた (図1-B γ領域)。

G3及びG8特異的プライマーのG8誤判定株に対するホモ

表2 VP7遺伝子の解析によるG遺伝子型の修正

修正内容 (型)	シーズン					
	2011/2012	2012/2013	2013/2014	2014/2015	2015/2016	2016/2017
G1→G3	40→0	* 129→4	63→3	3→0	1→0	25→22
G3→G8	82→0	1→0	2→0	3→0	0→0	10→1

* : 型別PCR法によるG遺伝子型の株数 → VP7遺伝子の解析で修正したG遺伝子型の株数
修正前の株には、型別PCR法でG1又はG3との混合感染とされた株をそれぞれ含む

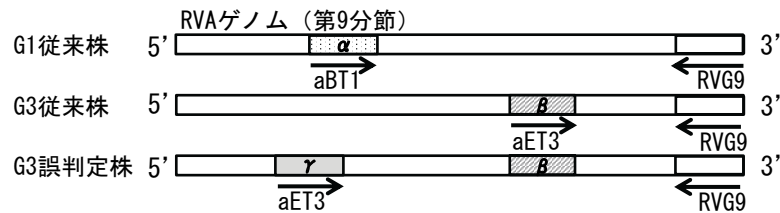
ロジー検索によって推測された結合領域及びG8従来株への結合領域をそれぞれ図2-Aに、また、これらの結合領域におけるG8誤判定株及びG8従来株の塩基配列の比較結果を図2-Bに示す。G8従来株に対するG8特異的プライマーの結合領域において、G8誤判定株は4塩基がプライマー配列と異なっていた（図2-B δ領域）。また、ホモロジー検索によって推測されたG8誤判定株に対するG3特異的プライマー結合領域においては、G8従来株は1塩基、G8誤判定株は2塩基がプライマー配列と異なっていた（図2-B

β領域）。

3.3 G遺伝子型の年別流行状況

VP7遺伝子の塩基配列の解析によって修正したRVAのG遺伝子型の年別流行状況を図3に示す。2009/2010から2016/2017までの8シーズンにおける主流型はそれぞれG3、G3、G3、G1、G1、G9、G2及びG3で、その検出割合はシーズンごとに異なっていた。G3誤判定株は、2012/2013シーズンに初めて4株が確認され、2014/2015及び2015/2016シーズンは確認されなかったものの、

A 型別プライマー結合領域

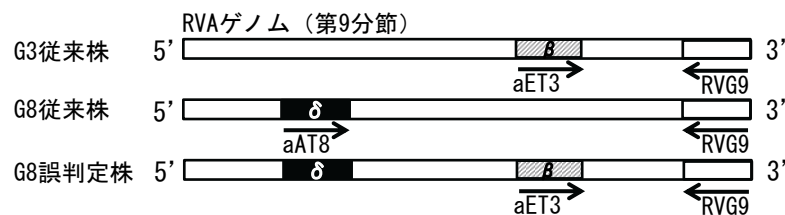


B 結合領域における塩基配列の比較

β領域	G3従来株	5'	CGTT	CGAAGAAGTTGCAACAG	3'
	G3誤判定株 (29株)	5'	CA	TTCGAAGAAGTTGCAACAG	3'
	aET3	5'	CGTTTGAAGAAGTTGCAACAG	3'	
γ領域	G3従来株	5'	TGTTTGTATTACCCAAGTGAAGCAGCAACAG	3'	
	G3誤判定株	(21株)	5'	TGTTTGTACTATCCTAACGAAGCTGCAACAG	3'
		(3株)	5'	TGTTTGTATTATCCTAACGAAGCTGCAACAG	3'
		(5株)	5'	TGTTTGTACTATCCTAGCGAAGCTGCAACAG	3'
	aET3	5'	CGTTTGAA-----GAAGTTGCAACAG	3'	

図1 G3誤判定株及び従来株に対するプライマー結合領域の塩基配列の比較
aBT1：G1特異的プライマー 囲み文字：プライマーと一致する塩基
aET3：G3特異的プライマー *：G3誤判定株間で塩基が異なる部位
RVG9：共通プライマー

A 型別プライマー結合領域



B 結合領域における塩基配列の比較

δ領域	G8従来株	5'	GTCACACCATTTGTAATTCG	3'	
	G8誤判定株	5'	AT	TACGTCATTTGTAATTCG	3'
	aAT8	5'	GTCACACCATTTGTAATTCG	3'	
β領域	G8従来株	5'	CTTTTGAAGAAGTTGCAACAG	3'	
	G8誤判定株	5'	CTTTTGAAGAAGTTGCAACAG	3'	
	aET3	5'	CGTTTGAAGAAGTTGCAACAG	3'	

図2 G8誤判定株及び従来株に対するプライマー結合領域の塩基配列の比較
aET3：G3特異的プライマー RVG9：共通プライマー
aAT8：G8特異的プライマー 囲み文字：プライマーと一致する塩基

2016/17シーズンにはG3従来株の9株よりも多い22株が確認された。G8誤判定株については、2016/2017シーズンに1株が確認され、これは県内で初めてのG8検出例であった。

3.4 RVAの遺伝子検出率及び流行期における定点あたり感染性胃腸炎患者数の推移

2009/2010シーズンから2016/2017シーズンまでの8シーズンにおけるRVAの遺伝子検出率及び流行期における定点あたり感染性胃腸炎患者数の推移を図4に示す。RVA遺伝子の検出率は、ワクチン導入前の2009/2010及び2010/2011の2シーズンは20%を超えていたが、ワクチンが導入された2011/2012シーズンから減少傾向を示し、2014/2015から2016/2017の3シーズンは10%を超えることなく推移した。これは、各シーズンにおけるRVAの流行期（第5週から第18週まで）の定点あたり感染性胃腸炎

患者数の推移と類似していた。

4 考察

Multiplex-PCR法による遺伝子型別は、複数のプライマーを混合して塩基の伸長反応を行うため、DNAシーケンサーを用いた塩基配列解析と比較して安価であり、様々な微生物の同定に用いられる。しかしながら、多くのウイルス、特にRNAウイルスのゲノムは容易に変異することが知られており、Multiplex-PCR法に用いるプライマーセットも必要に応じた改良が求められる。Gouveiraらの開発した型別PCR法¹²⁾もその一つであり、2017年、国立感染症研究所の藤井によって誤判定が生じることが報告された¹⁴⁾。そこで我々は、県内の患者から検出した株を用い、誤判定の原因を検証した。その結果、G3誤判定株については、G3特異的プライマーが本来結合すべきβ領域

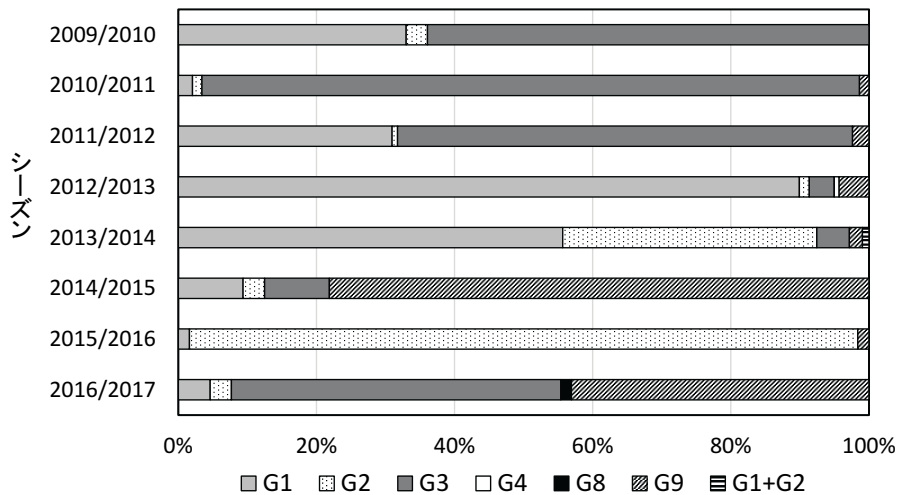


図3 VP7遺伝子の解析により修正したG遺伝子型の年別流行状況

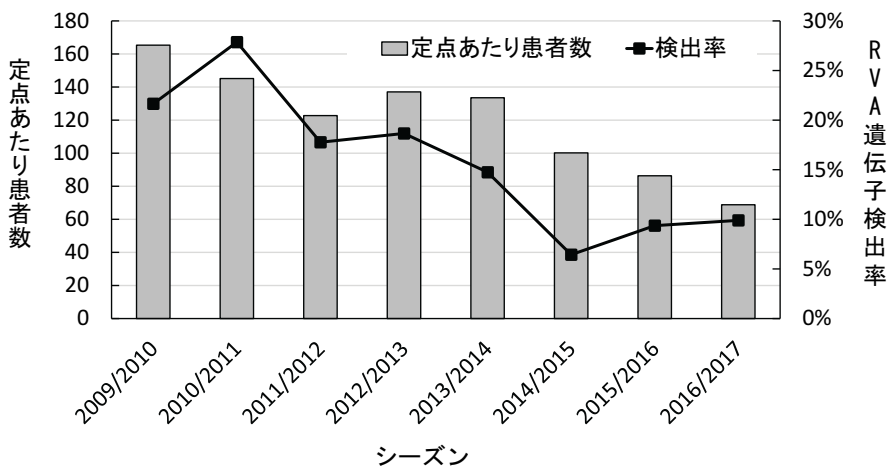


図4 RVAの遺伝子検出率及び流行期における定点あたり患者数の推移

定点あたり患者数は、RVA流行期である第5週～第18週に報告された感染性胃腸炎患者数を小児科定点数で除して算出した。

の塩基配列が従来株よりも3塩基多く異なる配列を示すとともに、誤って結合した γ 領域は従来株に4塩基の不一致があるのに比べ、G3誤判定株は3塩基の不一致しかないことが誤判定の原因と考えられた(図1)。これは、森らの報告¹⁸⁾と同様の結果であった。G8誤判定株については、G8特異的プライマーが本来結合すべき δ 領域の塩基配列のうち、PCR酵素の伸長反応に重要な3'末端を含む4塩基が異なる配列を示すため、G8特異的プライマーの δ 領域への結合よりもG3特異的プライマーの β 領域への結合が優先されたことが原因と考えられた(図2)。RVAの型別PCR法は、全国の地方衛生研究所において、長年標準的に実施されてきた。近年、学術的には次世代シーケンサーを用いた全ゲノム(11分節)の解析による遺伝子型別が主流になりつつあるが、機器、ランニングコストともに未だ高価であり、地方衛生研究所への導入は進んでいない。そのため、型別PCR法については、近年の流行株を考慮に入れたプライマーセットの早急な改良が望まれる。

今回我々は、2011年に導入されたワクチンの導入によるRVA流行への影響を評価するため、2009年まで遡って再解析を行った。G3誤判定株については、ワクチン導入後の2012/2013シーズンに県内で初めて確認され、2016/2017シーズンにはG3従来株よりも多かったことから、年々増加していると考えられた。また、G8誤判定株については、2016/2017シーズンに1株確認され、県内で初めてのG8検出例となった。G8は、国内では2006年に愛知県で初めて確認されたが¹⁹⁾、2016/2017シーズンには全国10道府県で確認されており²⁰⁾、今後も県内の発生動向に注視が必要と考えられた。また、BLAST検索の結果、誤判定株はG3、G8のいずれも近年になって出現した動物のロタウイルスとヒトロタウイルスの遺伝子再集合体であると考えられた^{13), 17)}。このことは、ヒトの集団に免疫がないことが誤判定株の増加の一因であることを示唆している。一方で、ワクチン導入以降のG遺伝子型全体の流行状況に着目すると、その検出割合は毎年異なっており、ワクチン導入前と同様に、特定の遺伝子型の連続的な流行は確認されなかった。また、ワクチン導入以降、胃腸炎患者におけるRVA遺伝子検出率及びRVA流行期における胃腸炎患者数は減少してきている。これらのことから、現在のところ、県内のRVAの流行は、一部の遺伝子型の検出割合が増加しているものの、全体としては抑制されており、ワクチンは効果的に機能しているものと推察された。

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) Matthijssens, 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
- 3) 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
- 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-岡山県の散発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-岡山県の散発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-岡山県の散発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-岡山県の散発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

報, 41, 67-72, 2017

- 12) 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
- 13) Malasao, R., Saito, M., Suzuki, A., Imagawa, T., Nukiwa-Soma, N. et al. : Human G3P[4] rotavirus obtained in Japan, 2013, possibly emerged through a human-equine rotavirus reassortment event, *Virus Genes*, 50, 129-133, 2015
- 14) 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
- 15) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル, 感染性胃腸炎（ロタウイルス 2014年12月版）
- 16) Liu, B., Fujita, Y., Arakawa, C., Kohira, R., Fuchigami, T. et al. : Detection of Rotavirus RNA and Antigens in Serum and Cerebrospinal Fluid Samples from Diarrheic Children with Seizures, *Jpn. J. Infect. Dis.*, 62(4), 279-283, 2009
- 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) 森愛, 奴久妻聡一, 植村卓, 田中忍, 中西典子ら：2016年4月に神戸市で検出されたA群ロタウイルスVP7遺伝子の解析, *病原微生物検出情報*, 37, 115-116, 2016
- 19) 小林慎一, 藤原範子, 安井善宏, 伊藤雅, 山下照夫ら：2005～2009年の5年間におけるA群ロタウイルス検出状況—愛知県, *病原微生物検出情報*, 32, 72-73, 2011
- 20) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報, ノロウイルス等検出速報, <https://www.niid.go.jp/niid/ja/iasr-noro.html> (2018.11.26アクセス)