

【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 (2014/2015シーズン) -
Epidemiological Studies on Viruses Causing Non-bacterial Gastroenteritis in Okayama
- Surveillance of Rotavirus A from Sporadic Gastroenteritis in Okayama Prefecture (2014-2015) -

藤原香代子, 藤井理津志, 濱野雅子, 磯田美穂子, 松岡保博, 井上 勝*, 濃野 信**,
金谷誠久*** (ウイルス科)

*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
Kayoko Fujiwara, Ritsushi Fujii, Masako Hamano, Mihoko Isoda, Yasuhiro Matsuoka,
Masaru Inoue, Shin Nouno, Tomohisa Kanadani
(Virology Section)

*Department of Pediatrics, Okayama Red-Cross Hospital,

**Nouno Pediatric Clinic,

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

要 旨

2014/2015 シーズン (2014 年 9 月 ~ 2015 年 8 月) の散発胃腸炎患者ふん便 472 件について, イムノクロマト法または酵素抗体法によるロタウイルス A の検索を行い, 陽性となった 33 件について, VP7 遺伝子及び VP4 遺伝子を標的とした二系統の逆転写 PCR 法により, ロタウイルス A の遺伝子検索を実施した。その結果, 32 件でロタウイルス A 遺伝子が確認された。検出時期は 11 月, 1 月 ~ 5 月及び 7 月で, ピークは 4 月であった。年齢別では, 1 歳及び 2 歳が各 8 件で最も多かった。遺伝子が検出された 32 件について, G 遺伝子型別及び P 遺伝子型別を実施したところ, G9P[8] が 25 件, G1P[8] 及び G3P[8] がそれぞれ 3 件, G2P[4] が 1 件であった。検体数, ロタウイルス A 遺伝子陽性数及び G 遺伝子型検出状況を 2012/2013 シーズン及び 2013/2014 シーズンと比較した結果, 検体数及びロタウイルス A 遺伝子陽性数はともに減少し, 主流型は G1 から G9 に入れ替わった。また, G1P[8] の 3 件について, 従来株と遺伝子再集合体由来株との簡易的な鑑別を行った結果, 1 件が遺伝子再集合体由来株と推定された。

[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する 2 本鎖 RNA をゲノムとして持つウイルスで, 外殻糖たん白 (VP7) 及び外殻スパイクたん白 (VP4) をコードする遺伝子に基づき, それぞれ G (Glycoprotein の略号) 遺伝子型及び P (Protease sensitive の略号) 遺伝子型に分類される¹⁾。現在までに, G 遺伝子型については G1 ~ G27, P 遺伝子型については 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, そのうち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 は小児の急性胃腸炎の病原体としてきわめて重要視されていることから, 本ウイルスの感染予防を目的とした生ワクチンが複数メーカーで開発され, その導入が世界

的に進められている⁴⁾。主なものとしては, ヒト RVA 株 (G1P[8] 型) 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ウシ RVA 遺伝子組み換え株に由来する 5 価ワクチンである RotaTeq[®] (メルク社製) が知られている。我が国においては Rotarix[®] が 2011 年 7 月に, RotaTeq[®] が 2012 年 1 月にそれぞれ製造承認され導入が開始された。

我々は, 県内における RVA 流行状況を継続的に調査し, 特定の血清型の流行推移⁵⁾⁻⁷⁾や, 遺伝子再集合体 RVA の県内侵入⁸⁾等を明らかにしてきた。特に 2011/2012 シーズンに県内侵入が確認された遺伝子再集合体 RVA は, 異なるゲノグループ間 (G1 型プロトタイプである Wa ゲノグループと G2 型プロトタイプである DS-1 ゲノグループ) の遺伝子再集合体に由来する株であった。すなわちこの株は,

VP7 及び VP4 遺伝子型は Wa 株と同じ G1P[8] であるが、VP6、NSP4 及び NSP5/6 遺伝子型が DS-1 株と同一であった。

これまでの結果を踏まえて、2014/2015 シーズンも引き続き散発胃腸炎患者からのウイルス検出と遺伝子型別を行い、県内の RVA 流行状況についてワクチンの影響等を解析した。

2 対象と方法

2.1 対象

2014 年 9 月～2015 年 8 月(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散発胃腸炎患者(年齢 0 歳～13 歳)ふん便 472 件を用いた。

2.2 方法

市販の RVA 検出キット(イムノクロマト法または酵素抗体法)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、ふん便乳剤から市販キット(QIAamp Viral RNA mini kit, 株式会社キアゲン)により RNA を抽出した。この RNA を用いて、Gouvea ら⁹⁾の方法による逆転写 PCR(以下「RT-PCR」という。)法で G 遺伝子の検出及び型別を、Wu ら¹⁰⁾の方法による RT-PCR 法で P 遺伝子の検出及び型別を実施した。また検体数、RVA 遺伝子陽性数及び G 遺伝子型の検出状況について、過去 2 シーズン(2012/2013 シーズン及び 2014/2015 シーズン)と比較解析した。さらに G1P[8] と判定された株については、2011/2012 シーズンに県内侵入が確認された異なるゲ

ノグループ間(Wa ゲノグループと DS-1 ゲノグループ)の遺伝子再集合体由来株(VP7 及び VP4 遺伝子型は G1 型プロトタイプの Wa 株と同じ G1P[8] であるが、VP6、NSP4 及び NSP5/6 遺伝子型は G2 型プロトタイプの DS-1 株と同一である株)か否かを簡易的に判別するため、NSP4 遺伝子と NSP5/6 遺伝子を増幅する RT-PCR 法⁸⁾を実施した。電気泳動により産物サイズの比較を行い、NSP4 産物 > NSP5/6 産物の株は従来株、NSP4 産物 < NSP5/6 産物の株は遺伝子再集合体由来株と推定した。

3 結果

3.1 ウイルス検出状況

市販キットによる RVA のスクリーニングを行った患者ふん便 472 件のうち、陽性となった 33 件について RT-PCR 法による遺伝子検索を行ったところ、32 件(総検体数の 6.8%)から RVA 遺伝子が検出された。

月別の検査検体数と RVA 遺伝子の検出率を図 1 に示す。RVA 遺伝子は 11 月、1 月～5 月及び 7 月で検出され、検出率は 4 月が 34.4%(11/32 件)、2 月及び 3 月が各 25.0%(8/32 件)の順で高かった。

RVA 遺伝子は 0 歳～13 歳の患者検体から検出され、1 歳及び 2 歳が各 8 件で最も多く、0 歳及び 4 歳の各 5 件、3 歳の 3 件と続いた。(表 1)

3.2 G 遺伝子型及び P 遺伝子型の解析

RVA 遺伝子が確認された 32 件すべてで、G 遺伝子型及び P 遺伝子型が判定可能であった。各 G 遺伝子型の月別

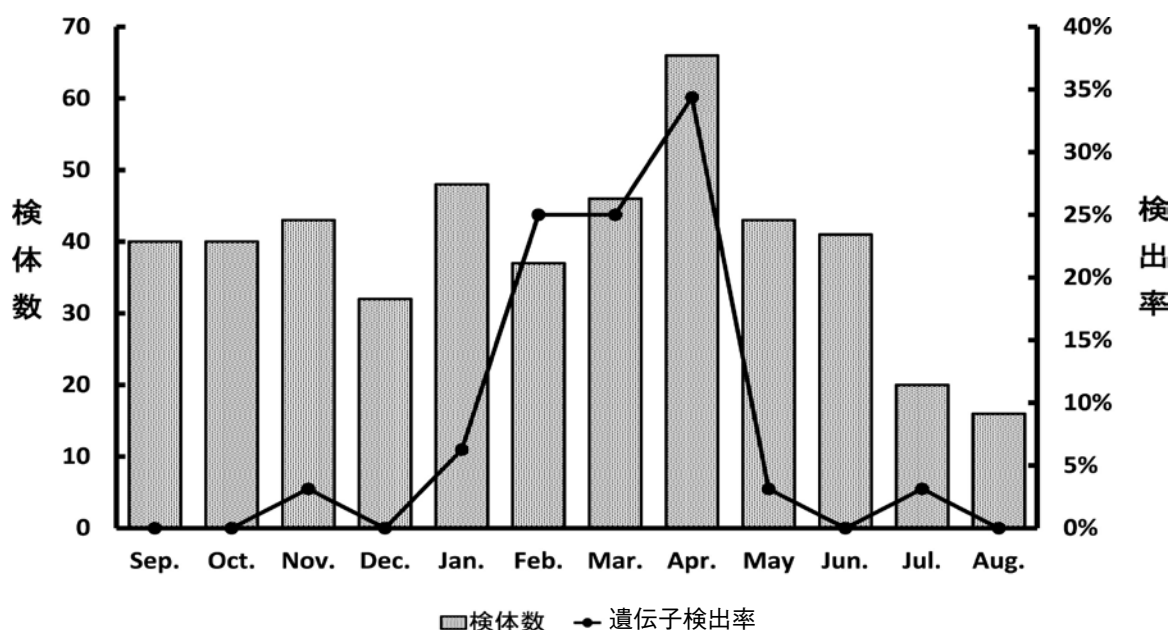


図 1 月別ロタウイルス A 検査状況 (2014/2015 シーズン)

表1 各G遺伝子型の年齢別検出状況

遺伝子型	年齢(歳)														計
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
G1		2							1						3
G2			1												1
G3	1		1	1											3
G9	4	6	6	2	5						1			1	25
計	5	8	8	3	5	0	0	0	1	0	1	0	0	1	32

表2 各G遺伝子型の月別検出状況

遺伝子型	採取年月												計 (%)	
	2014.09	2014.10	2014.11	2014.12	2015.01	2015.02	2015.03	2015.04	2015.05	2015.06	2015.07	2015.08		
G1					1			1			1			3 (9.4)
G2								1						1 (3.1)
G3								3						3 (9.4)
G9			1		1	8	8	6	1					25 (78.1)
計	0	0	1	0	2	8	8	11	1	0	1	0		32

検出状況を表2に示す。G遺伝子型の内訳は、G9が25件(78.1%)と最も多く、次いでG1及びG3が各3件(9.4%)、G2が1件(3.1%)であった。

G9は11月及び1月～5月に検出され、特に2月～4月に集中して検出された。G9以外では、G1の検出は1月、4月及び7月であったのに対し、G2及びG3の検出はともに4月のみであった。

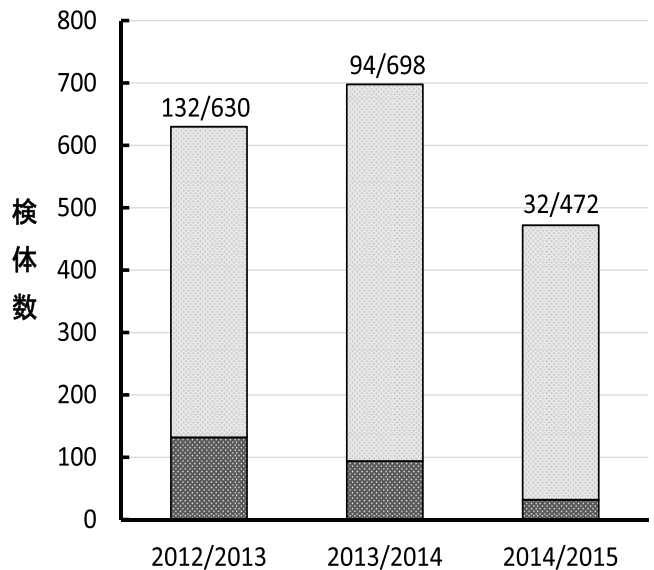
G9の検出年齢は0歳～13歳で、特に0～4歳で多く検出された。G1は1歳及び8歳、G2は2歳、G3は0歳、2歳及び3歳から検出された。(表1)

P遺伝子型の内訳は、P[8]が31件(96.9%)、P[4]が1件(3.1%)であった。G遺伝子型及びP遺伝子型の組み合わせの内訳は、G9P[8]が25件(78.1%)で最も多く、G1P[8]及びG3P[8]が各3件(9.4%)、G2P[4]が1件(3.1%)であった。

3.3 RVA遺伝子検出状況の比較(2012/2013シーズン～2014/2015シーズン)

2012/2013シーズン～2014/2015シーズンの検体数及びRVA遺伝子陽性数の推移を図2に示す。検体数は、2012/2013シーズンが630件、2013/2014シーズンが698件であった¹¹⁾¹²⁾のに対し、2014/2015シーズンは472件と大きく減少した。RVA遺伝子の検出率は、2012/2013

シーズンは20.9%(132/630件)¹¹⁾、2013/2014シーズンは13.5%(94/698件)¹²⁾、2014/15シーズンは6.8%(32/472件)と2シーズン続けて低下した。



グラフ上部に総検体数及び陽性数を示す(陽性数/総検体数)
□陰性数 ■陽性数

図2 RVA遺伝子検出状況の比較(2012/13~2014/15シーズン)

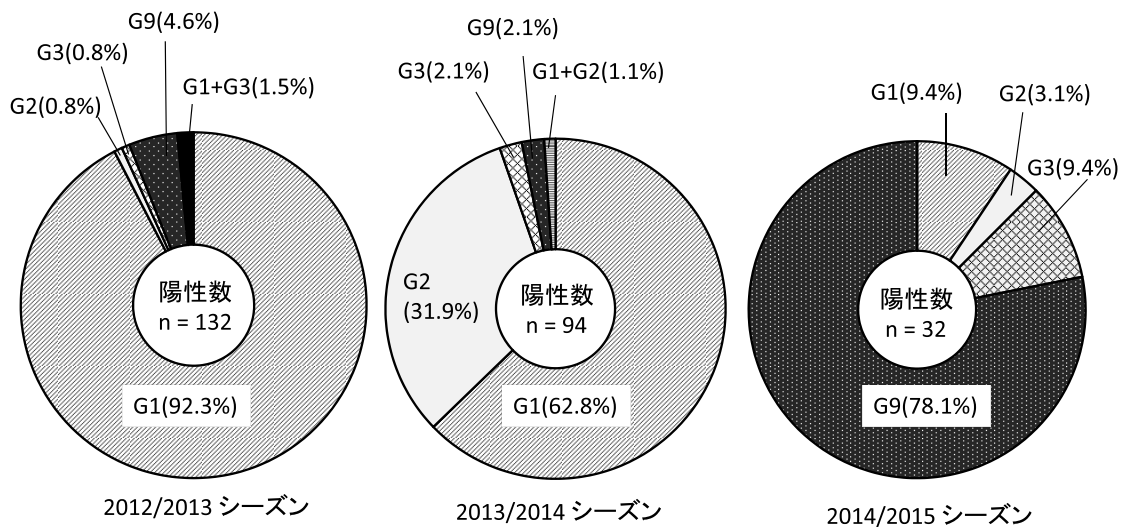


図3 G遺伝子型別検出状況の比較 (2012/13 ~ 2014/15 シーズン)

同期間のG遺伝子型検出状況の比較を図3に示す。2012/2013シーズン及び2013/2014シーズンは主流型がG1であったのに対し、2014/2015シーズンは主流型がG9に入れ替わった。

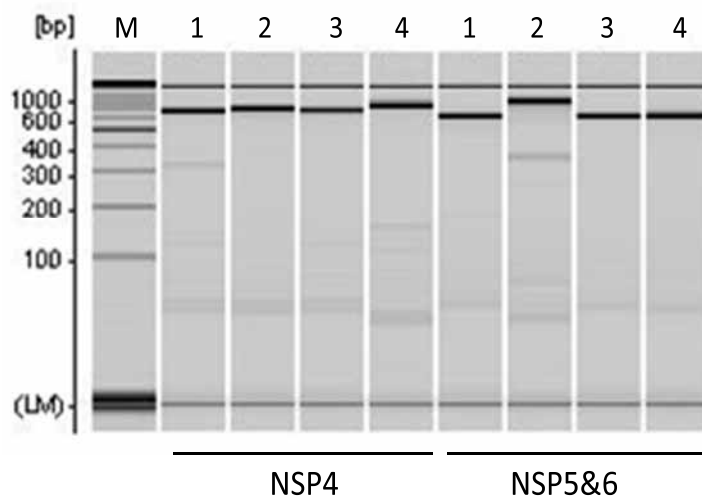
3.4 G1P[8]の遺伝子再集合体由来株解析

G1P[8]と同定された3件について、NSP4及びNSP5/6遺伝子のPCR産物サイズの比較を行ったところ、8歳の患者検体から検出された1件が遺伝子再集合体由来株と推定された(図4)。

4 考察

2014/2015シーズンの岡山県内におけるRVAの流行は、G9P[8]を主流型とし、検出が2月~4月に集中したものであった。

検体数は過去2シーズンはそれぞれ630件、698件であったのに対し、2014/2015シーズンは472件と大きく減少した。また、RVA遺伝子検出率は、ワクチン導入前の7シーズン(2004/2005シーズン~2010/2011シーズン)は20.4%~30.1%で変動していた^{6,7)}のに対し、ワクチン導入後の3シーズンはそれぞれ20.9%、13.5%、6.8%と2シーズン続けて低下した。これらの検体数の減少及びRVA遺伝子検



M : Marker	3 : Sample 2 (従来株)
1 : Wa 株	4 : Sample 3 (従来株)
2 : Sample 1 (遺伝子再集合体由来株)	

図4 G1P[8]における遺伝子再集合体由来株の簡易解析結果

出率の低下は、ともにワクチンによって RVA の流行が抑制された結果である可能性が考えられた。

G 遺伝子型検出状況は、2012/2013 シーズン及び 2013/2014 シーズンは主流型が G1 であったのに対し、2014/2015 シーズンは主流型が G9 に入れ替わった。G9 はヒトから多く検出される遺伝子型のひとつであり、県内では 2001/2002 シーズンから存在が確認されている¹³⁾。これまで 2001/2002 シーズン (28.8%)、2005/2006 シーズン (55.4%) 及び 2007/2008 シーズン (72.0%) での主流型であり¹³⁾、2014/2015 シーズンは 6 シーズンぶりの主流型となった。この要因のひとつに、Rotarix® (グラクソ・スミスクライン社製) が G1、RotaTeq® (メルク社製) が G1 ~ G4 でそれぞれ構成されているため、これらの遺伝子型の流行が抑制され、結果的に G9 の検出比率が高まった可能性が考えられた。しかしながら、ワクチンが導入される前にも G9 の検出率が高いシーズンが認められるため¹³⁾、2014/2015 シーズンの G9 の増加は自然変動の範囲内である可能性も否定できない。従って、今回の RVA の主流型の変化がワクチンの影響により生じたものと判断することは、現時点では困難と考える。

G1P[8] の遺伝子再集合体由来株は、2011/2012 シーズンに県内で初めて存在が確認された⁸⁾。これまでのシーズンで検出された G1P[8] のうち、2011/2012 シーズンは 74.1% (20/27 件)⁷⁾、2012/2013 シーズンは 31.3% (36/115 件)¹¹⁾、2013/2014 シーズンは 100% (58/58 件)¹²⁾ が遺伝子再集合体由来株と推定され、3 シーズン連続の流行がみられた。一方、2014/2015 シーズンは、G1P[8] の検出数が 3 件と低下し、遺伝子再集合体由来株と推定されたのはこのうち 1 件のみであった。このことから、遺伝子再集合体由来株は、県内で初めて存在が確認された 2011/2012 シーズン以降の 4 シーズンで継続して検出されたものの、流行自体は終息に向かっている可能性が考えられた。

RVA の流行に対するワクチンの影響を検証していくため、検体数及び RVA 遺伝子の検出率の動向、また遺伝子再集合体由来株を含めた RVA 遺伝子型の推移について、今後も中長期にわたるモニタリングが必要と考える。

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) 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. and Hoshino, Y.: Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. Rev 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) Kuzuya M, Fujii R, Hamano M, Kida K, Mizoguchi Y et al.: Prevalence and molecular characterization of G1P[8] human rotaviruses possessing DS-1-like VP6, NSP4, and NSP5/6 in Japan. Med Virol. 2014 Jun; 86(6): 1056-64. doi: 10. 1002 / jmv. 23746. Epub 2013 Sep 16
- 9) 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
- 10) Wu, H., Taniguchi, K., Wakasugi, F., Ukae, S., Chiba, S. et al.: Survey on the distribution of the gene 4 alleles of human rotaviruses by polymerase chain reaction., Epidemiol.Infect., 112: 615-622, 1994
- 11) 濱野雅子 藤井理津志 木田浩司 葛谷光隆 榎原幸二ら: 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
- 12) 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
- 13) 葛谷光隆, 濱野雅子, 木田浩司, 藤井理津志, 井上勝ら: 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, 岡山県環境保健センター年報, 34, 85-89, 2010