

23. ヒトと犬猫の間におけるA群ロタウイルスの異種間伝播の危険性に関する研究

○楠原 一 (三重県保健環境研究所・微生物研究課)

小林 隆司 (三重県保健環境研究所・微生物研究課)

【研究目的】

A 群ロタウイルス (RVA) は乳幼児に合併症を伴う重篤な下痢症を引き起こす。本ウイルスは犬猫をはじめ、多くの動物種が保有する一方で宿主特異性は強いと考えられてきたが、近年、異種間伝播を示唆する報告がある^{1~4)}。そこで本研究では、ヒトおよび愛玩動物としてヒトと濃厚な接触が予想される犬猫から検出された RVA を対象として遺伝子解析を実施し、犬猫の RVA がヒトに感染するリスクについて検証した。

【材料と方法】

犬猫の検体：2012 年および 2013 年の 6 月から 8 月の間に県内保健所に収容された犬 56 頭および猫 61 頭から採取した直腸拭い液を検体とした。

ヒトの検体：三重県感染症発生動向調査事業において、2009 年から 2013 年の 5 年間に県内検査定点医療機関等で採取された感染性胃腸炎患者の検体数は合計 765 検体であり、このうち 98 検体から RVA が検出された。その VP7 遺伝子型 (G 型) 別 RVA 陽性検体数を表 1 に示した。本研究では、すでに RVA の検出が確認されているこれらの検体の便乳剤を対象とした。

表1 感染性胃腸炎の検体数とVP7遺伝子型別RVA陽性検体数

年	検体数	VP7遺伝子型別RVA陽性検体数			
		G1	G3	G9	型別不可
2009	95	6	2	2	0
2010	144	1	7	0	0
2011	129	10	3	0	1
2012	214	28	2	1	0
2013	183	32	0	1	2
合計	765	77	14	4	3

RT-PCR 法による RVA 検出と VP7 および VP4 遺伝子型 (P 型) 別: RVA の検出と G 型別には、VP7 遺伝子を標的とした Gouvea らの RT-PCR 法を用いた⁵⁾。RVA が検出された検体は、VP4 遺伝子を標的とした Wu らの RT-PCR 法に従い P 型を決定した⁶⁾。

VP7 および VP4 遺伝子の塩基配列の決定と解析：G および P 型別で得られた RT-PCR 産物のダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。解析は、RVA 分類ツールである RotaC^{2.0} (<http://rotac.regatools.be/>) を利用した遺伝子型別と、市販のソフトウェアである GENETYX ver. 8 を用いた一致率の算出およびフリーのソフトウェアである MEGA ver. 5 を用いた近隣結合法による系統解析を実施した。

全遺伝子配列に基づく遺伝子型別：全 11 遺伝子分節の配列（全ゲノム）に基づく遺伝子型別は、各ゲノムの RT-PCR 産物のダイレクトシーケンスにより得られた塩基配列から RotaC^{2.0} を利用して行った。各ゲノムの RT-PCR 法に使用したプライマーは、全遺伝子配列に基づく遺伝子型別に関連する報告を参考に合成し、必要に応じて各プライマーを組み合わせ使用した^{4,7,8)}。

【結 果】

犬猫からの RVA 検出状況：VP7 遺伝子を標的とした RT-PCR 法を行った結果、猫 61 頭中 5 頭から RVA 遺伝子が検出され、RT-PCR 産物のサイズから、検出された RVA は全て G3 型であった。続いて VP4 遺伝子を標的とした RT-PCR 法を行った結果、検出された RVA は全て P[9] 型であった。一方、犬から RVA は検出されなかった。

ヒトから検出された RVA の P 型別：すでに RVA G3 型の検出が確認されている検体のうち、便乳剤の残余が認められた 2010 年の 7 検体と 2011 年の 3 検体（表 1）について P 型別を行った。その結果、検出された RVA は全て P[8] 型であった。

塩基配列を基にした遺伝子型別：ヒトおよび猫から検出された RVA について、G および P 型別で得られた RT-PCR 産物の塩基配列をダイレクトシーケンスにより決定し、遺伝子型別を行った。その結果、RotaC^{2.0} による遺伝子型別および近隣結合法による系統解析のどちらにおいても、猫 2 頭から検出された RVA は G3P[9] 型、3 頭から検出された RVA は G6P[9] 型に分類された。ヒトから検出された RVA の遺伝子型は、いずれの方法でも G3P[8] 型であった。G3 型および G6 型 VP7 遺伝子、P[9] 型 VP4 遺伝子の系統樹を図 1 に示した。G3 型 VP7 遺伝子の系統樹は 2 つのクラスターを形成し、今回検出されたヒトと猫の RVA は別のクラスターに分類された（図 1-a）。その一致率はヒトから検出された 10 株間で 98.4~100%、猫から検出された 2 株間で 100%、ヒトと猫の間で 90.6~91.4%であった。G6 型 VP7 遺伝子の系統樹は、既知の配列において宿主別のクラスターを形成した（図 1-b）。今回猫から検出された G6 型 VP7 遺伝子は、3 株ともヒトを宿主とする RVA のクラスターに分類され、最も近縁であった KF17 株と 99.0%以上の一致率を示した。P[9] 型 VP4 遺伝子の系統樹は 2 つのクラスターを形成し、今回検出された猫の RVA は 1 つのクラスターに分類されたが、このクラスター内で G3P[9] 型 2 株と G6P[9] 型 3 株は分岐した（図 1-c）。AU-1 株が G3P[9] 型の 2 株と最も近縁で、その一致率は 97.9%と 98.1%であったのに対し G6P[9] 型の 3 株とは 95.2~95.5%であった。一方、KF17 株が G6P[9] 型の 3 株と最も近縁で、その一致率は 99.0%以上%であったのに対し G3P[9] 型の 2 株とは 94.9~95.3%であった。

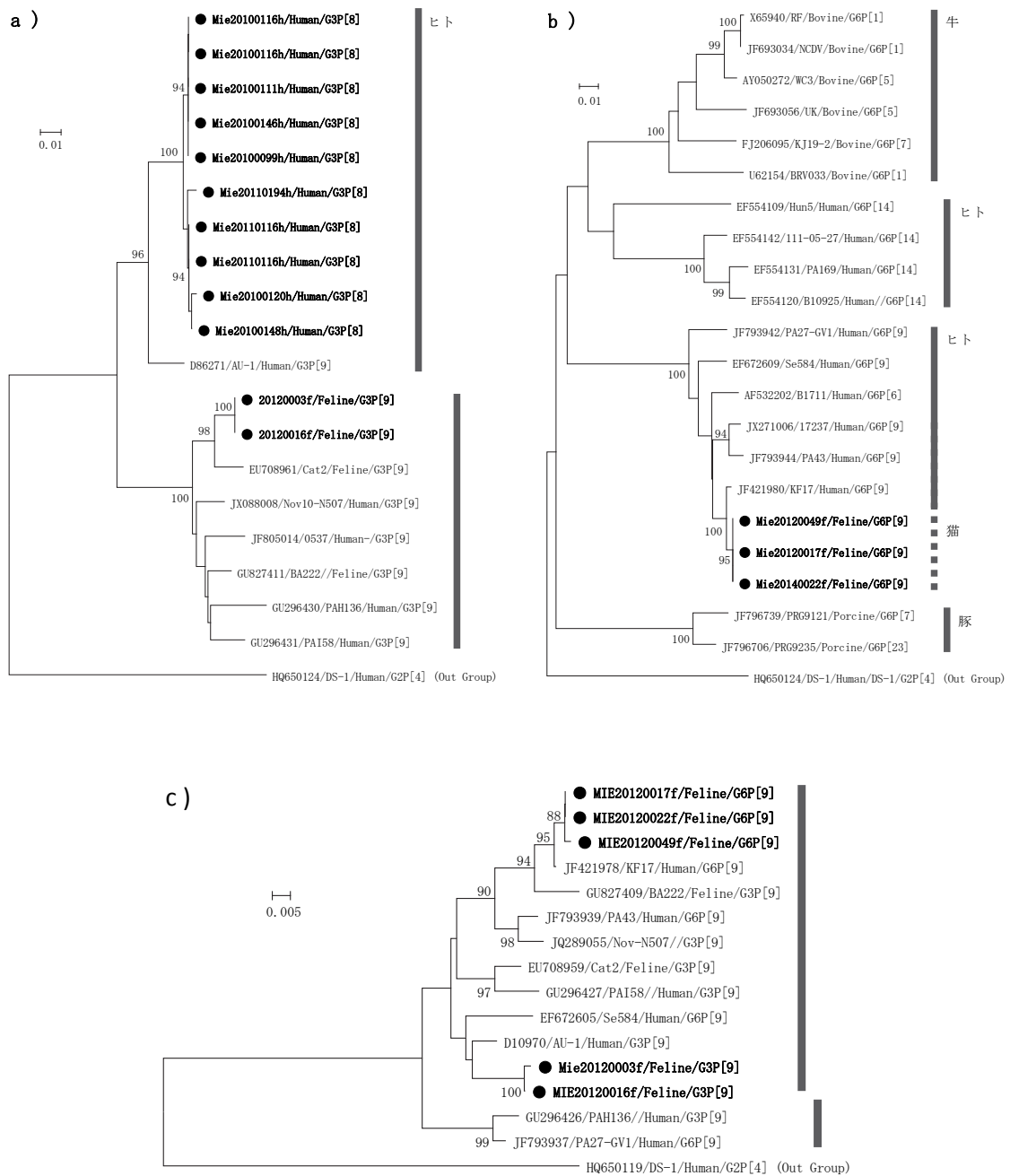


図1 近隣結合法による系統樹解析 a)G3型VP7遺伝子, b)G6型VP7遺伝子, c)P[9]型VP4遺伝子 ●は本研究で検出した株を示し, 検体番号/宿主/遺伝子型の順に太字で表記している。その他は参照株で, アクセッション番号/株名/宿主/遺伝子型の順に表記している。

G6P[9]型 RVA の全遺伝子型別: 今回猫 3 頭から検出された G6P[9]型 RVA の全 11 遺伝子分節の配列に基づく遺伝子型別を行った結果、3 株中 1 株 (Mie20120022f 株) について全遺伝子型を決定することができた。表 2 に参照株との比較を示した。Mie20120022f 株はヒト KF17 株と全遺伝子型が一致した。また、その他の G6 型 RVA や G3 型 RVA のヒト PAI58 株と猫 BA222 株とは 11 分節中 7 分節以上の遺伝子型が一致した。

表2 全遺伝子分節の遺伝子型の比較

株	宿主	遺伝子分節										
		VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
Mie20120022f	Feline	G6	P[9]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T3	E3	H3
KF17	Human	G6	P[9]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T3	E3	H3
Se584	Human	G6	P[9]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T1	E2	H3
17237	Human	G6	P[9]	I2	R2	C2	M2	A3	N1	T6	E2	H3
PA169	Human	G6	P[14]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3
Hun5	Human	G6	P[14]	I2	R2	C2	M2	A11	N2	T6	E2	H3
RF	Bovine	G6	P[1]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3
WC3	Bovine	G6	P[5]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3
PAI58	Human	G3	P[9]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3
AU-1	Human	G3	P[9]	I3	R3	C3	M3	A3	N3	T3	E3	H3
Cat2	Feline	G3	P[9]	I3	R3	C2	M3	A3	N1	T6	E3	H3
BA222	Feline	G3	P[9]	I2	R2	C2	M2	A3	N1	T3	E2	H3

※Mie20120022f と一致した遺伝子型をグレーで塗り潰している。

【考察と今後の展望】

これまで G6 型 RVA が猫から検出された報告はなかったが、本研究ではじめて猫が G6 型 RVA を保有することが証明された。一般にヒト、特に小児の感染性胃腸炎から検出される RVA の主要な VP7 遺伝子型は G1~4 と 9 型である。G6 型 RVA は偶蹄類に多いことから、ヒトで検出された場合には、偶蹄類からヒトへ異種間伝播を起こしている可能性が考えられるが、一方でヒトから検出された G6 型 RVA に猫が関連していたことを示唆する報告もある^{4,9)}。今回検出された猫の G6 型 RVA (Mie20120022f 株) の全遺伝子分節の遺伝子型は、国内でヒトから検出された G6 型 RVA (KF17 株) と一致しており、特に宿主細胞との結合に重要な役割を担うスパイク蛋白をコードする VP4 遺伝子の塩基配列は非常に近縁であった。このことから、Mie20120022f 株がいつごろ偶蹄類と猫およびヒトの間で起きた異種間伝播により形成された遺伝子再集合体 (リアソータント) であるのかは今後の研究に委ねられるが、ヒトに感染する危険性は非常に高いと考えられる。

今回検出された RVA の 5 株中 3 株が RT-PCR 法による遺伝子型別で G3 型と判別された後、塩基配列を基にした遺伝子型別で G6 型であることが明らかとなった。この異なる結果は、Gouvea らの RT-PCR 法では G6 型 RVA のプライマーは設計されていないため、プライマー結合部位の塩基配列が類似していたことによる交差反応と考えられる。遺伝子型別の精度を上げるためには、塩基配列を基にした遺伝子型別による確認や、G6 型を含めた稀な遺伝子型も型別可能な RT-PCR 法を開発するなどの対策が求められる。

本研究で検出された G3P[8]型 RVA はヒトの主要な遺伝子型の 1 つであるが、VP7 遺伝子の系統樹解析の結果から、比較した猫の G3P[9]型 RVA とは直接的な関連はないと考えられる。しかし、G3 型 RVA はヒト以外にも猿、犬、猫、馬など多くの哺乳動物が保有し、異種間伝播の報告もあるため、さらに対象を広げて調査をすることが必要である。

犬と猫はヒトにとって最も身近な動物であり、2012 年のわが国における飼育総数は 2000 万頭を超えている。しかし近年、室内で飼育する家庭も多くなり、ヒトと犬猫が触れ合う機会が多くなったことで、動物由来感染症の問題が起きている。本研究結果は RVA が動物由来感染症の病原体となり得ることを示唆するものであり、犬猫の寄生虫や口腔内細菌による日和見感染症だけではなく、RVA の異種間伝播やヒト由来 RVA と動物由来 RVA のリアソータントの出現は懸念すべき問題である。一方、国内におけるロタウイルスワクチンの導入に伴い、ワクチン株と野外株のリアソータントの出現やワクチン株の毒性復帰等も懸念されている。今後、ヒトでは稀な遺伝子型の検出が増加し、流行する遺伝子型が変化する可能性があるため、分子疫学を重視した監視体制を整備する必要がある。

【参考文献】

- 1) Mattison K, et al: *Emerg. Infect. Dis.*, **13**, 1184-1188, 2007.
- 2) De Grazia S, et al: *Emerg. Infect. Dis.*, **13**, 1091-1093, 2007.
- 3) Summa M, et al: *J. Clin. Virol.*, **53**, 244-247, 2012.
- 4) Ben Hadj Fredj M, et al: *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 630-634, 2013.
- 5) Gouvea V, et al: *J. Clin. Microbiol.* **28**, 276-282, 1990.
- 6) Wu H, et al: *Epidemiol. Infect.* **112**, 615-622, 1994.
- 7) Fujii Y, et al: *Microbiol. Immunol.*, **56**, 630-638, 2012.
- 8) Jeong S, et al: *PLOS ONE*, **9**, e97127, 2014.
- 9) Yamamoto D, et al: *Virus Genes*, **43**, 215-223, 2011.

【謝辞】

研究助成を頂きました公益財団法人大同生命厚生事業団に深謝致します。

【経費使途明細】

医薬材料費	
Ex Taq (DNA 合成酵素)	42,525 円
SuperScript II Reverse Transcriptase (逆転写酵素)	107,100 円
BigDye XTerminator 精製キット (DNA 精製キット)	24,360 円
QIAamp Viral RNA Mini Kit (RNA 抽出キット)	111,825 円
Oligo@SIGMA-Plate (プライマー合成)	26,061 円
合計	311,871 円