

1 1. 富山県におけるロタウイルスワクチン導入後のウイルス流行株の遺伝子解析

○稲崎 倫子 (富山県衛生研究所)

【研究の必要性と目的】

A群ロタウイルス(RVA)は小児を中心に胃腸炎を引き起こすウイルスであり、重症化例や死亡例もみられることから小児医療上重要な病原体である。RVAの遺伝子は11の分節から構成されており、これらの分節が複数の株間で入れ替わった遺伝子再集合体(リアソータント)が出現することがある。従来の遺伝子型別では、構造蛋白質であるVP7およびVP4をコードする2種類の分節に基づく遺伝子型(それぞれG型、P型)の判定が行われていた。近年では、全分節の塩基配列に基づく遺伝子型別が進んでいる。従来の遺伝子型G1、G3、G4、G9のウイルスはWa遺伝子群(P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1)を、遺伝子型G2のウイルスはDS-1遺伝子群(P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2)を有していた¹⁾。

国内では2011年11月に1価のRVA生ワクチン(Rotarix)が、2012年7月には5価のRVA生ワクチン(RotaTeq)が認可されたことで任意接種が開始され、富山県内における新生児のワクチン接種率は2013年4月の時点で60%を超えていた²⁾。2020年10月には、RVAワクチンが定期接種となった。ワクチン導入後の2012年以降、国内ではG1型のリアソータント株の流行が確認されており¹⁾、RVAの遺伝子型構成が複雑化していると考えられる。これらのリアソータント株は、従来のG型およびP型による遺伝子型別では確認不可能なため、検出には全分節における遺伝子型別が必要である。

リアソータント株の出現とワクチン導入との関連や、病原性や流行への影響については明らかにされていない。そこで本研究では、富山県内でワクチン導入前後に採取されたRVA株について、複数のウイルスの全塩基配列を同時に読取可能な次世代シーケンサーを用いて全分節を対象とした遺伝子解析を行うことにより、リアソータント株の出現とワクチンの導入や流行との関連についての情報を得ることを目的とする。

【方法】

1) 胃腸炎患者検体からのRVA VP7遺伝子検出

2010年1月から2020年12月の期間に、発生動向調査事業の病原体定点医療機関およびその他の県内医療機関で採取された小児胃腸炎症例の便または吐物326検体(県西部の医療機関278検体、県東部の医療機関48検体)について、イムノクロマト法によりRVAの検出を行った。陽性と判定された検体の乳剤上清からQIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)を用いてRNAを抽出し、国立感染症研究所の病原体検出マニュアル³⁾に準じて1st RT-PCR

およびマルチプレックス 2nd PCR により遺伝子型 G1、G2、G3、G4、G8、G9 の VP7 遺伝子を検出した。得られた PCR 産物からダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、WEB 検索ツールである BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) または Rotavirus A Genotype Determination (<https://www.viprbrc.org/brc/rvaGenotyper.spg?method=ShowCleanInputPage&decorator=reo>) を用いて G 遺伝子型を判定した。

2) 次世代シーケンサーを用いた RVA の全塩基配列の解読と遺伝子解析

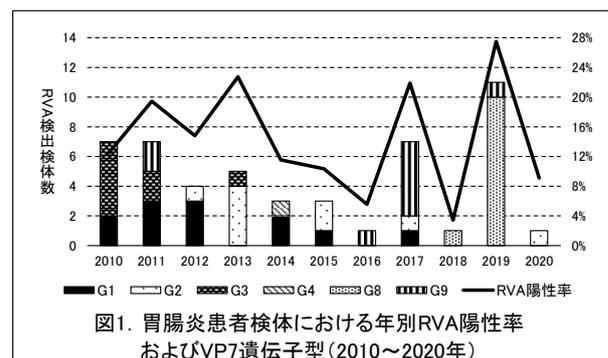
RVA の VP7 遺伝子が検出された便 18 検体の乳剤上清から QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用い、マニュアルに従って RNA を抽出した。ただし、キャリア RNA 無添加の Buffer AVL を用い、DDW にて核酸を溶出した。溶出した RNA より、次世代シーケンサー網羅的病原体検査法手順書⁴⁾に従い RNA-Seq ライブラリを調製した。次世代シーケンサーは iSeq 100 システムを使用し、iSeq 100 i1 Reagents v1 (illumina) を用いてペアエンド、150 サイクルの条件で、2 回に分けて塩基配列を解読した。

解読したデータより、国立感染症研究所が提供する解析ツール VirusTAP⁵⁾を用いて RVA の各分節の塩基配列を決定した。分節の部分配列のみが得られた検体については、部分配列の BLAST 検索上位株をリファレンス配列として、CLC Genomics Workbench 6.0.1 (CLC bio) を用いて次世代シーケンサー解読データをマッピングして塩基配列を決定した。これらの塩基配列について、BLAST または Rotavirus A Genotype Determination を用いて遺伝子型を判定し、各検体の遺伝子型構成を確認した。また、各分節の塩基配列について、MEGA6 を用いて近隣結合法による系統樹解析を行った。

【実施内容・結果】

1) RVA VP7 遺伝子型の流行の推移 (図 1)

胃腸炎患者検体 326 検体のうち、50 検体 (県西部 37 検体、県東部 13 検体) から RVA の VP7 遺伝子が検出された。RVA 陽性検体の採取月は 1 月～7 月であった。RVA 検出率は、2010 年～2013 年は 12.5%～22.7% で推移したのに対し、2014 年、2015 年、2016 年、2018 年、2020 年の検出率は 12% を下回っていた。しかし、2017 年には 22.6%、2019 年には 27.5% と増加した。検出株の G 遺伝子型別を行ったところ、G1 が 12 例と最も多く、G8 が 11 例、G2、G9 がそれぞれ 9 例、G8 が 8 例、G4 が 1 例であり、主流遺伝子型はほぼ毎年入れ替わっていた。G1 は 2010～2012 年、2014、2015、2017 年と最も多くの年にまたがって検出され、2011 年、2012 年、2014 年には最も多く検出された。G3 は 2010～2011 年には主流遺伝子型の 1 つであったものの、2013 年を最後に検出されなくなった。ワクチン導入以前の 2010 年、2011 年に検出されなかった G2 は、2013 年には主流遺伝型となり、その後 2015、2017、2020 年にも検出された。RVA 陽性率が上昇した 2017 年および 2018 年には、それぞれ 2012～2016 年まで大きな流行の無かった



G9 型、2017 年まで県内で検出報告の無かった G8 が主流遺伝子型となっていた。患者のワクチン接種歴が判明している症例は 3 例（Rotarix2 例、種類不明 1 例）あり、いずれも検出ウイルスは G2 型であった。

2) RVA の全分節における遺伝子解析

RVA 陽性便 18 検体（遺伝子型 G1 : 6 例、G2 : 3 例、G3 : 3 例、G8 : 1 例、G9 : 5 例）について次世代シーケンサーを用いて遺伝子解読を行った結果、すべての検体において全 11 分節の遺伝子型が決定された（表 1）。

表1. 次世代シーケンサーにより解読したRVAの全分節における遺伝子型

| 採取年- 検体番号 | ワクチン 接種歴 | 遺伝子型 | | | | | | | | | | |
|-----------|-------------|------|------|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|
| | | VP7 | VP4 | VP6 | VP1 | VP2 | VP3 | NSP1 | NSP2 | NSP3 | NSP4 | NSP5 |
| 2010-1 | 無 | G1 | P[8] | I1 | R1 | C1 | M1 | A1 | N1 | T1 | E1 | H1 |
| 2010-2 | 無 | G3 | P[8] | I1 | R1 | C1 | M1 | A1 | N1 | T1 | E1 | H1 |
| 2011-1 | 無 | G9 | P[8] | I1 | R1 | C1 | M1 | A1 | N1 | T1 | E1 | H1 |
| 2011-2 | 無 | G9 | P[8] | I1 | R1 | C1 | M1 | A1 | N1 | T1 | E1 | H1 |
| 2011-3 | 無 | G1 | P[8] | I1 | R1 | C1 | M1 | A1 | N1 | T1 | E1 | H1 |
| 2011-4 | 無 | G3 | P[8] | I1 | R1 | C1 | M1 | A1 | N1 | T1 | E1 | H1 |
| 2011-5 | 無 | G1 | P[8] | I1 | R1 | C1 | M1 | A1 | N1 | T1 | E1 | H1 |
| 2012-1 | 不明 | G1 | P[8] | I2 | R2 | C2 | M2 | A2 | N2 | T2 | E2 | H2 |
| 2013-1 | 不明 | G3 | P[8] | I1 | R1 | C1 | M1 | A1 | N1 | T1 | E1 | H1 |
| 2013-2 | 不明 | G2 | P[4] | I2 | R2 | C2 | M2 | A2 | N2 | T2 | E2 | H2 |
| 2015-1 | Rotarix | G2 | P[4] | I2 | R2 | C2 | M2 | A2 | N2 | T2 | E2 | H2 |
| 2015-2 | 不明 | G1 | P[8] | I2 | R2 | C2 | M2 | A2 | N2 | T2 | E2 | H2 |
| 2017-1 | 不明 | G9 | P[8] | I1 | R1 | C1 | M1 | A1 | N1 | T1 | E1 | H1 |
| 2017-2 | 不明 | G9 | P[8] | I1 | R1 | C1 | M1 | A1 | N1 | T1 | E1 | H1 |
| 2017-3 | 不明 | G1 | P[8] | I1 | R1 | C1 | M1 | A1 | N1 | T1 | E1 | H1 |
| 2018-1 | 不明 | G8 | P[8] | I2 | R2 | C2 | M2 | A2 | N2 | T2 | E2 | H2 |
| 2019-1 | 無 | G9 | P[8] | I1 | R1 | C1 | M1 | A1 | N1 | T1 | E2 | H1 |
| 2020-1 | Rotarix | G2 | P[4] | I2 | R2 | C2 | M2 | A2 | N2 | T2 | E2 | H2 |

網掛はDS-1遺伝子群の遺伝子型を示す。

2010 年、2011 年および 2017 年に採取した G1 型 4 株、2010～2013 年に採取した G3 型 3 株、2011 年および 2017 年に採取した G9 型の 5 株は、いずれも従来の G1、G3、G9 株と同一の Wa 遺伝子群を有していた。これに対し、G1 型のうち 2012 年および 2015 年に採取された 2 株は、VP7、VP4 遺伝子を除く 9 分節の遺伝子型が DS-1 遺伝子型構成を有する DS-1 like G1P[8]リアソータント株であった。この遺伝子型は、国内で 2012 年以降に流行が確認されている遺伝子型であった¹⁾。また、G9 型のうち、2019 年に採取された 1 株は、NSP4 遺伝子のみ DS-1 遺伝子群である E2 型を有するリアソータント株（G9P[8]-E2 株）であった。このリアソータント株は 2018 年に東京都で初めて検出が報告されており⁶⁾、本研究で解読した 1 株の NSP4 遺伝子の部分配列(732 bp)は、2018 年に東京都で検出された G9P[8]-E2 株（Genbank accession No. LC477642）の塩基配列と一致した。

G2 型の 3 株における遺伝子型構成は、いずれも従来の株と同様の DS-1 遺伝子群であった。ワクチン（Rotarix）接種歴のある患者においてもリアソータント株は確認されなかった。G8 型の 1 株の遺伝子型構成は、過去にアフリカ大陸で散発的に確認された G8 株や、2014 年以降に国内で確認された G8 株^{6,7)}と同一の DS-1 like 遺伝子型構成を有していた。

解読した各分節の塩基配列のうち、解読配列の短いものを除いて系統樹解析を行った（図 2）。2012 年および 2015 年に採取された DS-1 like G1P[8]株の DS-1 遺伝子群である 9 分節のうち 6 分節（VP6、VP2、VP3、NSP1、NSP2、NSP3）は、2013～2020 年の G2 型とは明らかに異なるクラスターに分類されたことから、県内で検出された DS-1 like G1 株と、2013

～2020年に県内で検出されたG2株のこれらの分節はそれぞれ独自に進化したと考えられた。2017年に採取されたWa like G1株において、VP7遺伝子および系統樹解析が不可能であったNSP1遺伝子を除く9分節は、2010-2011年のWa like G1株よりも2017年のG9株と互いに近縁であり、2017年のG1株とG9株のこれらの分節は共通の由来を持つ可能性が示唆された。2019年に採取されたG9P[8]-E2株のNSP4遺伝子は、2013～2020年のG2株と共通のクラスターに分類され、解読配列における塩基配列が99.8%～100%一致したことから、G9P[8]-E2株のこの分節はG2株に由来すると考えられた。

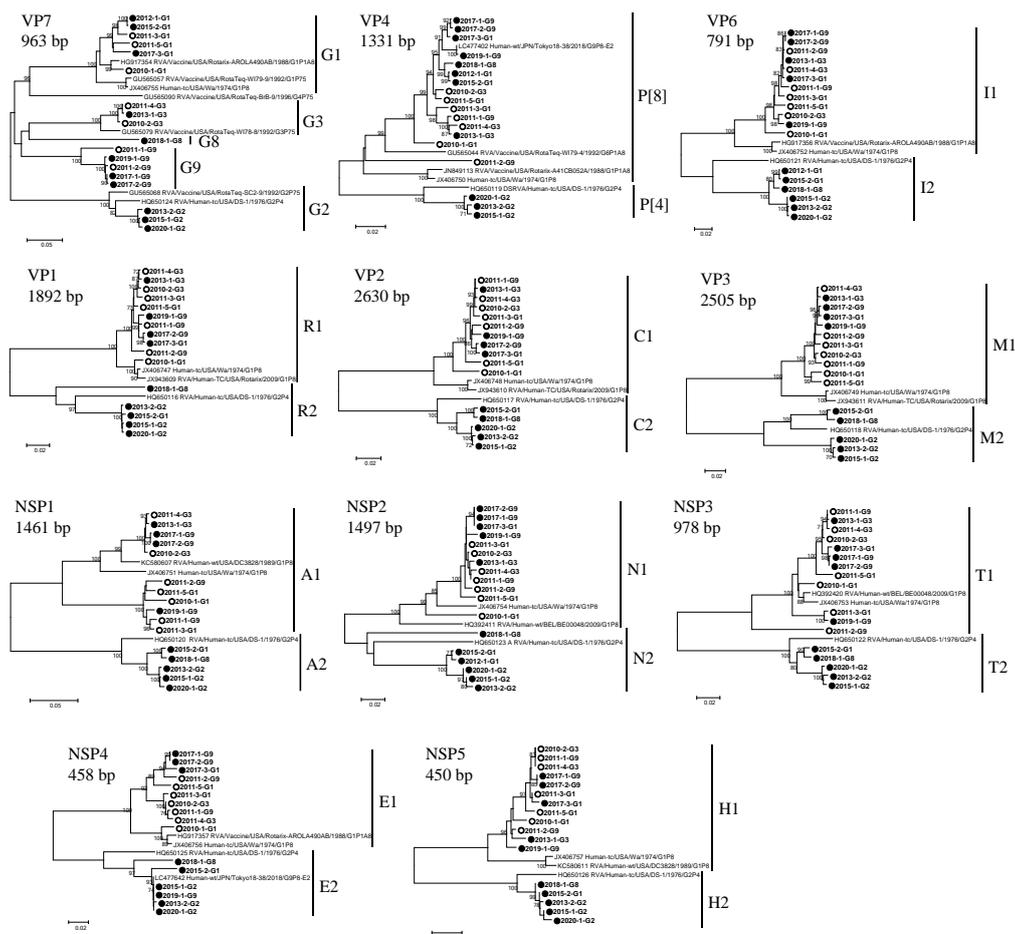


図2. 近隣結合法による各分節の部分配列の系統樹

分岐上の数値は、ブートストラップ値(1000回試行)の70%以上の値を示す。太字は本研究検出株を示す。うち○はワクチン導入前(2010～2011年)の株を、●はワクチン導入後(2012年以降)の株を示す。検体名は「採取年-検体番号-VP遺伝子型」で示す。解読配列の短い検体は系統樹から除いた。

【考察と今後の課題】

RVAの全分節における遺伝子解析により、ワクチン導入後に県内でリアソータント株が確認された。2012年および2015年には、国内で2012年以降に流行したDS-1 like G1P[8]リアソータント株が県内でも確認されており、2012年および2014年にはG1型が主流型となったことから、リアソータント株の出現がG1の流行に関与した可能性が示唆された。東京都で2018年に確認されたG9P[8]-E2株は、2019年には富山県にも侵入していたと考えられた。しかし、県内でこの株が検出された2019年にはG9型の大きな流行はみられず、2017年に県内で流行したG9型の遺伝子型は従来株と同一であったことから、G9型リアソ

ータント株の出現と流行との関連は認められなかった。

ワクチン接種済の患者からはリアソータント株は検出されず、ワクチン接種とリアソータント株への感染との関連は確認されなかった。

解読配列の系統樹解析により、異なる G 遺伝子型を持つウイルスの間で近縁な塩基配列を持つ分節が確認されたことから、RVA は遺伝子再集合を繰り返しながら流行を続けていると考えられた。

ワクチン導入後のリアソータント株の出現や、過去にはマイナーであった遺伝子型の流行が、ワクチン導入の影響であるか一時的な流行であるかは、現時点では判定が困難であった。今後はワクチンが定期接種となり、接種率が上昇することでワクチン導入の流行への影響がさらに明らかになると考えられるため、今後も長期的に RVA の流行遺伝子型の動向を注視する必要があると考えられた。

【謝辞】

本研究の実施にあたり、検体採取等にご協力いただきました厚生センター、富山市保健所、健康課、生活衛生課、感染症発生動向調査定点医療機関の関係各位ならびに新谷尚久先生(しんたにこどもクリニック)に深謝いたします。

【参考文献】

1. 藤井克樹. (2019). IASR, 40, 204-205
2. 予防接種・ワクチン分科会予防接種基本方針部会. ロタウイルス作業班中間報告書. (2013). <https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-10601000-Daijinkanboukouseikagakuka-Kouseikagakuka/0000030083.pdf>
3. 国立感染症研究所. ロタウイルスの検出法. (2014). <http://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/Rota2014.pdf>
4. 国立感染症研究所. 次世代シーケンサー (Next-generation sequencing: NGS) 網羅的病原体検査法手順書. (2016). https://gph.niid.go.jp/genepid-j/ngs_sop_draft_ver2.pdf
5. Yamashita A, Sekizuka T, Kuroda M. (2016). Front Microbiol., 7, 32
6. Fujii Y, Oda M, Somura Y, et al. (2020). Jpn J Infect Dis., 73, 26-35
7. Kondo K, Tsugawa T, Ono M, et al. (2017). Emerg Infect Dis., 236, 968-972

【経費使途明細】

| 使 途 | 金 額 |
|--|-----------|
| 次世代シーケンサー試薬 iSeq 100 i1 Reagent | 209,220 円 |
| PCR 試薬 TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV) | 86,391 円 |
| エタノール(99.5)分子生物学用 | 4,390 円 |
| 合 計 | 300,001 円 |
| 大同生命厚生事業団助成金(利息1円を含む) | 300,001 円 |