

34. 新しい遺伝子再集合ロタウイルスの全遺伝子解析による 神戸市での発生状況調査

○森 愛（神戸市環境保健研究所）

【研究の目的】

A 群ロタウイルス（RVA）は乳幼児の重症急性胃腸炎の主要な原因ウイルスであり、世界中のほぼすべての小児がロタウイルスに感染、発症する。発展途上国では多数の死亡者が発生し、先進国においても重症化により入院を要する場合が少なくない。

平成 28 年 4 月の感染症法改正によって病原体サーベイランスの体制が強化され、それに伴い、神戸市における RVA の発生状況をウイルス性状の面から解析することが可能となった。ロタウイルスは 11 分節の 2 本鎖 RNA をゲノムとして持ち、そのうちの 2 分節にコードされる蛋白質（VP7、VP4）の遺伝子型により GxP[x]と表記されることが多いが、11 分節全ての塩基配列を決定すれば、流行株の変遷をより詳細に把握することができる。また、神戸市では 2016 年 4 月以降、2013 年に世界で初めて報告された新しいタイプの RVA¹⁾と同一性の高い G3 ウイルスが複数検出された²⁾。このウイルスはウマ由来の G3 ウイルスと既存のヒトウイルスとの遺伝子再集合によって出現したリアソータントウイルスと考えられており、国内における発生状況は不明な点が多い。本研究では、多検体の全塩基配列を同時に解析することが可能な次世代シーケンサー（NGS）を利用して新しいタイプを含む RVA の全塩基配列の決定を試み、神戸市での RVA による感染性胃腸炎の発生動向を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】

1) 調査対象

神戸市感染症発生動向調査において、2016 年 4 月から 2018 年 6 月に搬入された主に感染性胃腸炎と診断された患者便検体のうち、医療機関における検査あるいは搬入後の迅速診断キット（ディップスティック‘栄研’ロタ）による検査で RVA 陽性であったものを対象とした。

2) マルチプレックス RT-PCR とダイレクトシーケンス法による VP7 の遺伝子型決定

ウイルス保存液に懸濁した便検体を遠心分離、0.45 μ m フィルターで濾過後、QIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN）を用いて RNA を抽出した。国立感染症研究所の病原体検出マニュアル³⁾に基づき nested RT-PCR を行い、1st および 2nd の増幅産物からダイレクトシーケンス法で VP7 遺伝子の部分塩基配列を決定し、BLAST 検索により遺伝子型を確認した。

3) NGS による全塩基配列の解読と遺伝子解析

ILLUMINA®社の Miseq を使用し、2 回に分けて実施した。2)で抽出した RNA を用いて、NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit for ILLUMINA® (New England Biolabs) によりライブラリーを作製した。初回は Komoto らの方法⁴⁾を参考に Miseq Reagent Kit v2 (300 Cycles) で 8 検体を解析した。2 回目は Miseq Reagent Nano Kit v2 (500 Cycles) で 16 検体を解析した。得られたデータの解析には、国立感染症研究所が提供する GenEpid-J の VirusTAP⁵⁾を用いた。BLAST 検索により、得られた RVA 遺伝子の遺伝子型を決定した。また、既知のウイルス株の配列と合わせて、Maximum Likelihood 法により系統樹解析を行った。その際、VP7 については、2) で得られた結果と比較し、より長い配列を使用した。

【実施内容・結果】

1) VP7 の遺伝子型決定

調査期間中の迅速診断キットによる RVA 陽性検体数は 25 で、そのうち 24 検体について VP7 の遺伝子型を決定した。内訳は、G2、G3、G9 がそれぞれ 6、12、6 であった (表 1)。

表 1. 2016 年 4 月-2018 年 6 月の検出状況

VP7 遺伝子型	期間 (9月-翌年8月を1シーズンとする)			計
	2016.4-2016.8	2016.9-2017.8	2017.9-2018.8	
G2	3	1	2	6
G3	2	8	4	12
G9	0	4	2	6
計	5	11	8	24

2) NGS による全塩基配列の解読と遺伝子解析

各キットを使用して Miseq により解読できた塩基配列 (%) を表 2 に示す。Miseq Reagent Kit v2 では全検体で全遺伝子分節のデータを得ることができたが、Miseq Reagent Nano Kit v2 では 16 検体中 4 検体で解析に必要なデータを得られなかった。解読できた検体においても、解析結果が連続しない複数の分断された短い配列となる分節も見られたが、これは検体に含まれる RNA の状態に起因する可能性がある。いずれのキットでもデータ量が少なかった VP6、NSP4、NSP5 は遺伝子型決定のみ行い、その他の遺伝子についても得られた配列が短いものは系統樹解析から除いた。各ウイルスの遺伝子型を表 3 に、既知のウイルスの配列と合わせて作成した各遺伝子の系統樹 (部分配列) の一部 (G3-VP7、C2-VP2) を図 (a, b) に示す。G3 は全てウマ由来の VP7 を有する DS-1 様 G3 (10 株は P[8]、2 株は P[x]) であった。G2、G3、G9 のいずれも、一部を除き、同シーズンに検出されたウイルスは同じクラスターに入った。他の遺伝子も、概ね図に示した遺伝子と同様に分岐していた。

表 2. 使用キットごとの解読塩基数 (各遺伝子の全塩基数を 100% として解析検体中の最少-最多 (中央値) %)

使用キット	解析 検体数	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
Reagent Kit v2 (300 Cycles)	8	94.7 -97.0 (96.3)	87.8 -98.5 (97.5)	80.8 -79.2 (82.0)	98.5 -98.8 (98.6)	94.2 -96.8 (94.5)	97.8 -98.4 (98.0)	95.0 -96.7 (95.8)	85.1 -88.7 (86.1)	88.0 -95.3 (94.8)	40.5 -63.1 (47.1)	50.2 -81.3 (63.4)
Reagent Nano Kit v2 (500 Cycles)	16*	53.1 -90.5 (93.0)	71.7 -98.3 (94.5)	31.6 -81.7 (40.0)	76.7 -98.8 (93.7)	75.9 -98.3 (94.2)	58.6 -99.7 (97.8)	69.9 -90.7 (92.3)	69.5 -85.4 (83.7)	49.5 -95.7 (94.9)	29.1 -54.5**	39.8***

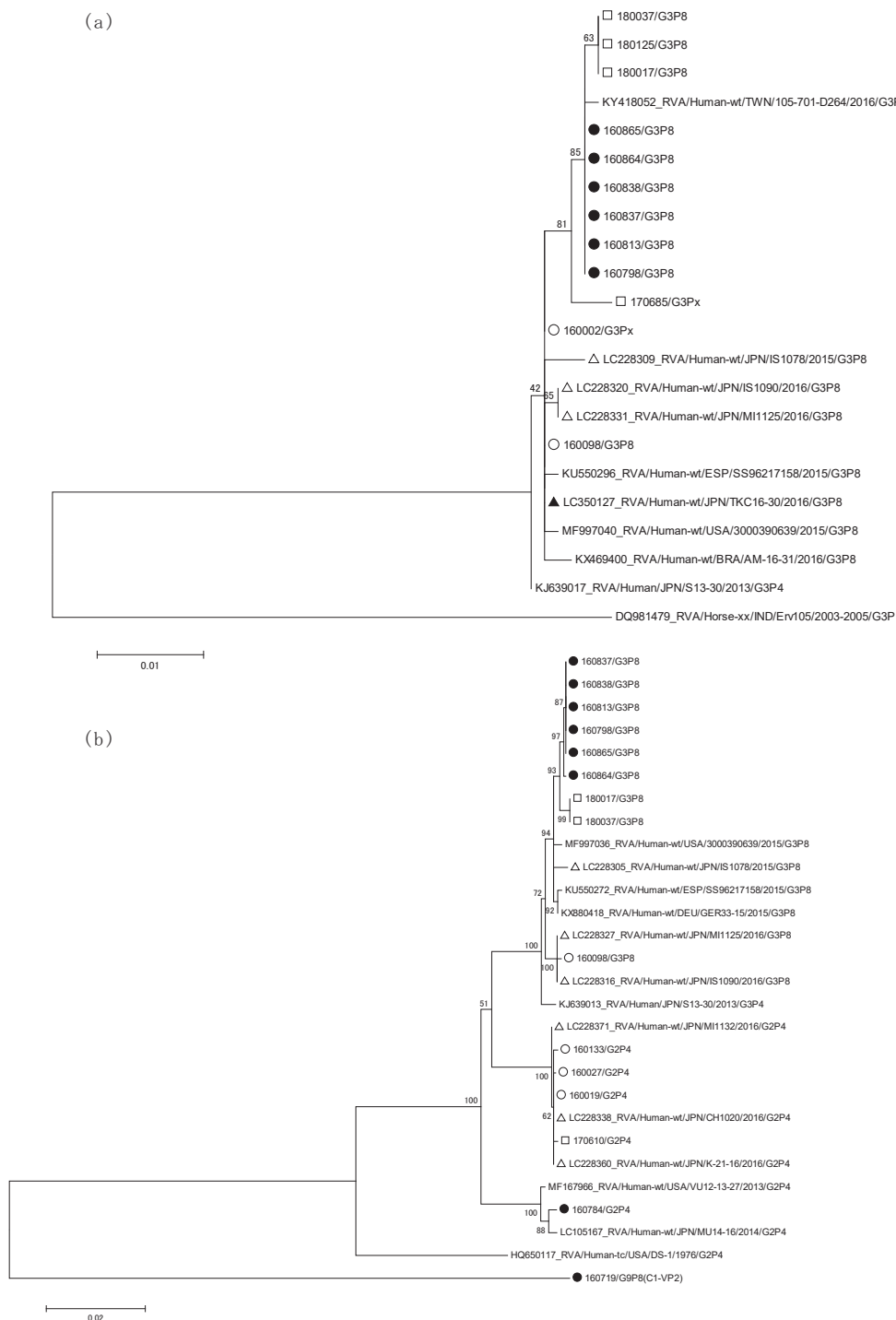
* うち4検体は解析に必要なデータを得られなかった

** 解析に必要なデータを得られたのは2検体

*** 解析に必要なデータを得られたのは1検体

表 3. NGS により決定した遺伝子型

ウイルス	遺伝子型											
	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5	
160019, 160027, 160133, 160784*, 170610*	G2	P[4]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2	
160098, 160798, 160813, 160837, 160838, 160864*, 160865, 180017*, 180037*, 180125	G3	P[8]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2	
160719*, 180811*, 180838*, 170014*, 180071**	G9	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1	

* NSP4, NSP5はE_x, H_x** NSP5はH_x

【考 図. 遺伝子分節の系統樹解析 (a)G3-VP7 (798bp)、(b) C2-VP2 (2463bp)
 神戸市 (○15/16、●16/17、□17/18 シーズン)、 三重県 (△)、札幌市 (▲)

2016 年 4 月～2018 年 6 月の調査期間中、最も多かったのは、12 検体から検出されたウマ由来 VP7 を有する DS-1 様 G3P[8]（または P[x]）であった。ウマ由来 DS-1 様 G3 ウイルスは、2013 年にそれぞれ仙台¹⁾、タイ⁴⁾、オーストラリア⁷⁾ で発生した患者から検出されて以降、ヨーロッパ⁸⁾、ブラジル⁹⁾等世界各地で見つかっており、仙台のウイルスは G3P[4]、その他は全て G3P[8]である。これらの G3 ウイルスは互いに似た配列を有しており、多くの遺伝子分節は、日本等アジア地域で 2012 年に初めて確認され流行していた DS-1 様 G1P[8]と相同性が高いことが報告されている^{4,7)}。一方、最初の報告から数年の間に VP4¹⁾、NSP2⁹⁾、NSP4^{6,8)} では遺伝子再集合が起こっていると見られ、その動向が注視されている。

神戸市内の G3 ウイルスは、シーズン毎に少しずつ異なるクラスターを形成していた。15/16 シーズン（○）は国内外から報告されている同時期のウイルスと類似しており、その中でも VP7（図 a）は札幌市（▲）、その他の遺伝子（図 b）は三重県（△）の患者⁶⁾ から検出されたウイルスと相同性が高く、同じ由来のウイルスが国内の複数地域に広がっていたことが示唆された。一方、16/17（●）、17/18（□）シーズンの系統樹解析では、VP7 のみ報告されている台湾のウイルスが同じクラスターに入ったが、他の遺伝子については類似するウイルスは未登録であった。VP7 以外の系統樹解析から、16/17、17/18 シーズンの市内のウイルスは、神戸市の 15/16 シーズンおよび国内から報告済みのウイルスに直接由来するものではないが、同じ起源を有していると考えられ、16/17、17/18 シーズンと類似するウイルスは台湾等別の地域でも流行していた可能性がある。また、遺伝子再集合が報告されている NSP4 についての系統樹解析は行わなかったが、部分配列を得られた 15/16、16/17 シーズンのウイルス 6 株の塩基配列を確認したところ、2013 年の仙台、タイ、オーストラリアのウイルスではなく、2015、2016 年の三重県やヨーロッパのウイルスに近かった。同時期に、前者に近い NSP4 を有するウイルスも報告されており⁹⁾、世界各地で様々に変異した G3 ウイルスが同時に流行していることが示唆された。

本研究で解析した RVA は全て、G2、G3 が DS-1 様、G9 が Wa 様であった。いずれの型も同シーズンのウイルスは概ね同じクラスターに入るものの、別のクラスターに入るウイルスも少数ではあるが認められることから、同じ型であってもシーズン毎あるいはシーズン中に時折、異なる由来のウイルスが市内に侵入していると考えられた。一方で、解析した全ての遺伝子分節の系統樹は、概ね似た分岐を示しており、同じ G 型のウイルス内で遺伝子再集合が起きた形跡はなかった。また、G2 ウイルスと G3 ウイルスはいずれも DS-1 様であるが、今回の系統樹解析ではそれぞれ別のクラスターに分かれており（図 b）、両者の間でも遺伝子再集合は起こっていないことが確認された。しかしながら、上述のとおり G3 ウイルスでは既に複数の分節の遺伝子再集合が報告されており、神戸市内でも同シーズンに多様な RVA が侵入、流行していることから、今後、新しいタイプのウイルスが出現することは十分に考えられる。そのため、継続した解析により、ウイルスの動向を監視していくことが重要である。NGS の利用は、多検体からのウイルス遺伝子検出に非常に有効な手段である一方、検体の状態や解析に使用する試薬の違いにより得られるデータに差があり、よ

り費用対効果の高い方法を検討していく必要がある。今後、NGS を用いて多くのウイルスを長期に渡って解析することができれば、流行の変遷だけでなく、ワクチン接種や重症度等との関連の解明にもつながることが期待できる。

【参考文献】

- 1) Malasao R, et al., Virus Genes 50:129-133, 2015
- 2) 森愛, 奴久妻聡一, 他, 病原微生物検出情報 37:115-116, 2016
- 3) 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）」
<http://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/Rota2014.pdf>
- 4) Komoto S, et al., PLoS One 11:e0148416, 2016
- 5) Yamashita A, et al., Front Microbiol Feb 2;7:32. doi: 10.3389/fmicb.2016.00032. eCollection 2016
- 6) Komoto S, et al., J Med Virol 90:890-898, 2018
- 7) Cowley D, et al., J Gen Virol 97:403-410, 2016
- 8) Dórá R, et al., Acta Microbiol Immunol Hung 63:243-255, 2016
- 9) Guerra SF, et al., J Gen Virol 97:3131-3138, 2016

【経費使途明細】

使 途	金 額
Miseq Reagent Kit v2 (300 Cycles)	183,708 円
Miseq Reagent Nano Kit v2 (500 Cycles)	61,182 円
合成 DNA	50,716 円
実験室用ダストボックス	2,592 円
実験ノート	410 円
振込手数料	1,404 円
合 計	300,012 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円