

[ノート]

## 兵庫県における A 群ロタウイルス検出状況と遺伝子解析の有用性 (2012/2013～2015/16 シーズン)

高井 伝仕\* 荻 美貴 押部 智宏 近平 雅嗣

### Prevalence and Molecular Characterization of Group A Rotavirus in Hyogo Prefecture (2012/13 - 2015/16 Epidemic Seasons)

Denshi Takai\*, Miki Ogi, Tomohiro Oshibe and Masatsugu Chikahira

*Infectious Disease Research Division, Public Health Science Research Center, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Consumer Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan*

We investigated the incidence of gastroenteritis viruses among infectious gastroenteritis patients aged  $\leq 15$  in Hyogo prefecture during the 2012/13 and 2015/16 epidemic seasons. Group A rotaviruses were detected from 70 (11.1%) of 632 fecal samples.

Genetic analysis indicated that DS-1-like G1P[8] rotavirus strain reported as the novel inter-genogroup reassortant was the dominant strain of G1P[8] in Hyogo prefecture during 2012/13 and 2014/15 seasons. In 2015/16 season, G2P[4] was the dominant strain in Hyogo prefecture, detected in 84.2% of rotavirus-positive samples. In this season, we detected a novel equine-like G3P[8] inter-genogroup reassortant strain.

Continuous rotavirus surveillance by detailed genetic analysis is useful for understanding the genetic diversity of rotavirus strains and maintaining effective vaccine program.

#### I はじめに

A 群ロタウイルス (RVA) は乳幼児の嘔吐下痢症の主要な原因ウイルスであり、激しい嘔吐や下痢、発熱等を起こす。RVA の遺伝子型は、一般的に中和抗原を包含する外殻糖蛋白 VP7 (G 型) 及び外殻スパイク蛋白 VP4 (P 型) の組み合わせで示される。両者の組み合わせにより多くの遺伝子型が存在するが、そのうちヒトから G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], 及び G9P[8] が多く検出されている<sup>1)</sup>。近年では全遺伝子解析による分子疫学

が進められ、RVA の 11 遺伝子分節すべてが解析されており、ヒトや動物間での異なる遺伝子群間で生じたと考えられる遺伝子再集合体 (リアソータント) を含めた新たな知見が蓄積されつつある。その結果、2013 年には従来とは異なる新たな遺伝子再集合 (リアソートメント) を起こしたと考えられる G1-P[8]-I2-E2-H2 株 (DS-1 類似 G1P[8] 株) が国内で初めて報告され<sup>2)</sup>、その後もこの類似株が複数報告されている<sup>3)</sup>。

また、途上国等では RVA による乳幼児の死亡率が高いことから、本ウイルスの感染予防を目的とした生ワクチンが開発され、その導入が世界的に進められている。わが国では、2011 年 11 月に単価ロタウイルスワクチンの Rotarix が、2012 年 7 月に 5 価ロタウイルスワクチンの RotaTeq の接種が開始されている。このため、ワクチンの導入による重症例の減少を含めた予防効果を把握する

感染症部

\*別刷請求先: 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町 2-1-29  
兵庫県立健康生活科学研究所 健康科学研究センター  
感染症部 高井 伝仕

ことが重要である。さらに、ワクチン株と野生株間等のリアソータント株や、ワクチンに対するエスケープ変異等をモニタリングして、ワクチン予防効果の持続を分子疫学的に把握することが重要視されている。

そこで本稿では、2012年9月から2016年8月までの4シーズンの兵庫県における小児の散発性感染性胃腸炎患者からウイルス検出を行い、RVA流行状況を把握するとともに、検出されたウイルスについて分子疫学的に解析したので報告する。

## II 材料と方法

### 1. 調査対象

2012年9月から2016年8月までに兵庫県感染症発生動向調査事業の病原体定点医療機関で採取された、主に散発性の感染性胃腸炎患者の糞便632検体を検査材料とした。なお、本研究では9月(第36週)から翌8月(第35週)を1流行シーズンとした。

### 2. ウイルス遺伝子の検出と遺伝子型別

便検体は滅菌蒸留水で調製した10%乳剤の遠心上清を用いた。検体140μlからE.Z.N.A Viral RNA Kit (Omega Bio-tek)で抽出したウイルスRNAについて、逆転写反応を行い、cDNAを作成した。RVAの遺伝子検出は、VP7(G)領域をターゲットとして、ウイルス性下痢症診断マニュアル<sup>4)</sup>に準じたRT-PCR法またはGomaraらの方法<sup>5)</sup>に従った。RVA以外の胃腸炎ウイルスの検出は、既報の方法に従った<sup>6)</sup>。遺伝子型別のためのVP7(G)領域及びVP4(P)領域の遺伝子増幅には、GomaraらあるいはFujiiらの方法<sup>7)</sup>を用いた。また、VP6(I)領域等についても、同様にGomaraらあるいはFujiiらの方法で増幅した。増幅DNAは、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)で精製し、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いたダイレクトシーケンシング法で塩基配列を決定した。得られた配列について、遺伝子型別ツールRotaC v2.0 (<http://rotac.regatools.be/>)あるいはMEGA6ソフトウェアで最尤法による系統樹解析を行い、遺伝子型を決定した。

## III 結果及び考察

### 1. 県内のロタウイルス胃腸炎の流行状況

感染症発生動向調査では、ロタウイルスワクチン導入に伴い、ロタウイルス胃腸炎の中でも特に重症が疑われる報告数を把握するための患者サーベイランスを2013

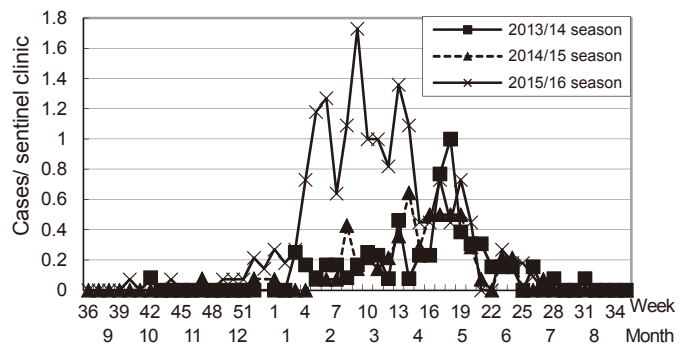


Fig.1 Weekly cases of infectious gastroenteritis caused by rotavirus per sentinel clinic from 2013/14 season to 2015/16 season in Hyogo Prefecture

年10月14日(第42週)から基幹定点を対象に実施している。これによる定点あたりの感染性胃腸炎(病原体がロタウイルスであるものに限る)の3年間の推移をFig.1に示した。

2013/14シーズンの週別患者数は、2014年第18週(4月27日~5月3日)、2014/15シーズンは2015年第14週(3月29日~4月4日)がピークで、それぞれの患者数は1.0及び0.6が最高値であった。一方、2015/16シーズンは2016年第9週(2月21日~27日)に1.7人となり、調査開始以降最も早く、かつ最大のピークとなり、第5~14週で1.0人を超える患者数が持続し、この3シーズンで最も患者数が多かった。

### 2. 県内のウイルス検出状況

感染性胃腸炎患者からのウイルス検出状況をTable 1に示した。病原体定点医療機関で採取された糞便632検体のうち、70検体(11.1%)からRVAが検出され、RVA以外にもノロウイルス、サポウイルス、アストロウイルス、腸管アデノウイルス、パレコウイルス等の胃腸炎起因ウイルスが検出された。RVAはノロウイルスに次いで2番目に多く検出され、RVAとノロウイルスで陽性検体全体の7割近くを占めていた。

RVAは1歳児から最も多く検出され(41.4%)、次い

Table 1 Number of gastroenteritis viruses detected from clinical specimens of infectious gastroenteritis in Hyogo prefecture (2012/13-2015/16 season)

Season	No. of samples	Total	Number of gastroenteritis viruses detected					
			RVA	NoV	SaV	HAstV	EAdV	HPeV
2012/13	194	88	29	44	6	4	4	1
2013/14	166	78	14	28	9	12	4	11
2014/15	157	41	8	21	7	0	2	3
2015/16	115	56	19	21	5	2	7	3
Total	632	263	70	114	27	18	17	18

RVA : group A rotavirus NoV : norovirus SaV : sapovirus HAstV : human astrovirus  
EAdV : enteric adenovirus HPeV : human parechovirus

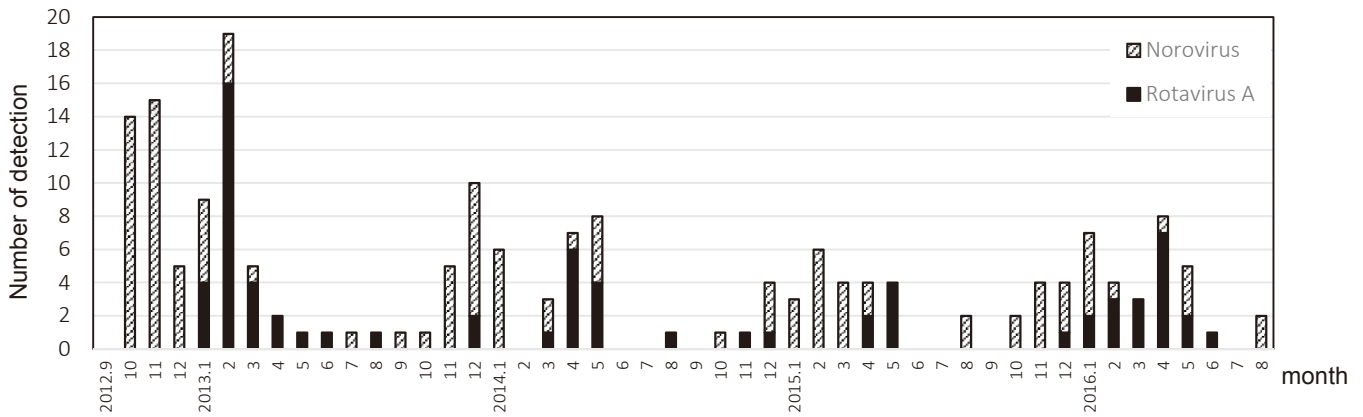


Fig.2 Monthly detection of rotavirus and norovirus, September 2012-August 2016, in Hyogo prefecture

で2歳(18.6%),0歳(15.7%),3歳(11.4%),4歳(2.9%)の順に多く,5~9歳では5.7%,10歳以上が4.3%で,0~3歳が全体の87.1%を占めていた。

Fig.2にRVA及びノロウイルスの月別検出状況を示した。いずれのシーズンも,シーズン初期にノロウイルスの検出数が増加し,ノロウイルスと入れ替わるようにRVA検出数が増加しており,ノロウイルスとRVAの流行に季節性が認められた。RVAの流行時期やその規模はシーズンによって異なり,2012/13シーズンのRVA検出数は,2月にピークが認められた。2013/14シーズン以降の3シーズンはいずれも冬期から春期にかけて検出数の増加が見られたのち,4~5月頃にピークが認められた。また,月別検出数は2013年2月に16名と,4シーズンで最大の検出ピークが確認されたのち,2013/14シーズン以降3シーズンの検出数は,減少傾向が確認された。全国の週別検出状況(病原微生物検出情報,シーズン別ウイルス検出状況;<http://www0.nih.go.jp/niid/idsc/iasr/Byogentai/Pdf/data96j.pdf>)においても,2013/14シーズン以降の3シーズンは2012/13シーズンと比較して検出数の減少が確認された。ワクチン接種が開始された2011/12シーズンは,全国,県内ともに2012/13シーズンと同等程度の検出数が確認されていることから,ワクチン接種の効果が2013/14シーズン以降に反映された結果,検出数減少に繋がった可能性が示唆された。なお,ワクチン接種効果としての患者数の推移を検討するためにも,継続的なサーベイランスが必要であると考えられた。

### 3. ロタウイルスの遺伝子解析

検出された70株について,VP7(G)領域及びVP4(P)領域の遺伝子型を決定したところ,G1P[8],G2P[4],G3P[8],G3P[9],及びG9P[8]の5遺伝子型に分類され

Table 2 Distribution of G and P genotypes of the rotavirus detected in Hyogo prefecture during 2012/13 and 2015/16 seasons

Season	Genotype (%)					Total
	G1P[8]	G2P[4]	G3P[8]	G3P[9]	G9P[8]	
2012/13	8 (27.6)	2 (6.9)			19 (65.5)	29
2013/14	10 (71.4)			1 (7.1)	3 (21.4)	14
2014/15	4 (50.0)	1 (12.5)			3 (37.5)	8
2015/16		16 (84.2)	1 (5.3)		2 (10.5)	19
Total	22	19	1	1	27	70

た(Table 2)。2012/13シーズンは,G9P[8]が65.5%(19/29),次いでG1P[8](27.6%),G2P[4](6.9%)の順に多かった。2013/14シーズンは,G1P[8]の71.4%に次いで,G9P[8](21.4%),G3P[9](7.1%)の順に検出され,2014/15シーズンは,G1P[8](50.0%),G9P[8](37.5%)及びG2P[4](12.5%)の順に多く検出された。これらの結果から2012/13~2014/15の3シーズンは,G1P[8]及びG9P[8]の二つの遺伝子型が地域や時期ごとに入れ替わりながら流行を繰り返していたことが考えられた。一方,2015/16シーズンは,過去3シーズンで3検体しか検出されなかったG2P[4]が84.2%(16/19)を占めていた。この遺伝子型は,大阪市や広島市等でも2015/16シーズンの流行が報告されており<sup>8)</sup>,全国的に流行の主体となっていたことが示唆された。また,2015/16シーズンのRVA検出数は,全国的にも過去3シーズンと比較して最も多く,このシーズンの患者サーベイランスにおける患者報告数も最も多かったことから,近年大規模な流行が見られなかったG2P[4]が免疫を持たない感受性者間で広がり,患者数の増加につながった可能性も考えられた。このG2P[4]検出数の増加が,現行ワクチン導入の影響であるのか現時点では詳細は不明であるが,今後のワクチン

Table 3 Distribution of G1P[8] rotavirus detected in Hyogo prefecture during 2012/13 and 2015/16 seasons

Season	RVA-positive	Genotype G1P[8] (%)	G1P[8] strains (%)	
			Wa	DS-1-like
2012/13	29	8 (27.6)	2 (25.0)	6 (75.0)
2013/14	14	10 (71.4)	1 (10.0)	9 (90.0)
2014/15	8	4 (50.0)	1 (25.0)	3 (75.0)
2015/16	19	n.d.	n.d.	n.d.
Total	70	22	4	18

n.d. : not determined

効果を捉えるためにも継続的なサーベイランスが必要と考えられた。

今回検出した 22 株の G1P[8] RVA について、定型的な Wa 株 (G1-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1) か、あるいはリアソータントとして報告された DS-1 類似株 (G1-P[8]-I2) かを調べるために、VP6 領域の解析を行った (Table 3)。22 株中 4 株の遺伝子型は、G1-P[8]-I1 で Wa 近縁株であり、18 株は G1-P[8]-I2 に分類され、DS-1 類似のリアソータントと推定された。2012/13 シーズン以降の 3 シーズンはこの DS-1 類似株が大部分を占めており、県内では G1 株の主体となっていたと考えられた。また、奈良県や岡山県では 2011/12 シーズン頃から DS-1 類似株の検出が報告されているため<sup>2,3)</sup>、2011/12 シーズンに兵庫県内で検出した G1P[8] 15 株の VP6 領域を新たに解析したところ<sup>6)</sup>、2 株が DS-1 類似株と推定された。これらの結果より、DS-1 類似株は 2011/12 シーズン頃から国内での感染が始まり、その後全国的に流行が拡大したと考えられた。なお、2015/16 シーズンは県内で G1P[8] は検出されておらず、今後の動向を注視する必要があると考えられた。

検出した G2P[4] の 19 株についても同様に VP6 領域の遺伝子型別を行ったところ、すべてが G2-P[4]-I2 で定型的な G2 株であり、リアソータントは確認されなかった。さらに、G3P[9] の 1 株、G9P[8] の 27 株でもリアソータントは確認されなかった。

一方、2015/16 シーズンに検出された 1 株の G3P[8] について VP6 領域の型別を行ったところ、G3-P[8]-I2 に分類され、一般的な G3-P[8]-I1 の G3 株とは異なるリアソータントと推定された。県内では 2015/16 シーズン以前の 3 シーズンに G3P[8] は検出されていないため、この G3P[8] 株 1 株と、2010/11~2011/12 シーズンに検出した 23 株<sup>6)</sup>とあわせた 24 株について、VP7 領域及び VP6 領域の系統樹解析を行った。

VP7 領域の最尤法による系統樹を Fig.3 に示した。2010/11~2011/12 シーズンの 23 株は、互いに 99~100% の相同性を示し、Wa 遺伝子群の代表的な G3P[8] 株である RVA/Human-tc/USA/P/1974/G3P1A[8] と 97~98% の相同性を示した。一方、2015/16 シーズンの 1 株 (S2015/16-11620) は、これらとは異なるクラスターに属しており、RVA/Human-tc/USA/P/1974/G3P1A[8] と 82% の相同性を示したが、2007 年にインドで報告された ウマ由来ロタウイルス である RVA/Horse-wt/IND/ErV105/XXXX/G3P[X] と 91% の相同性で、後者により高い相同性を示した<sup>9)</sup>。またこの株は、2013 年から 2015 年にオーストラリアやタイのほか、ハンガリー、スペイン等のヨーロッパ諸国でヒトから検出された株と 99% 以上の相同性を示し<sup>10-13)</sup>、さらに 2013 年に国内で検出された G3P[4] 株とも 99% 以上の高い相同性を示していた<sup>14)</sup>。なお、DS-1 遺伝子群の代表的な G2P[4] 株である RVA/Human-tc/USA/DS-1/1976/G2P1B[4] とは、72% の相同性であった。

VP6 領域の最尤法による系統樹を Fig.4 に示した。2010/11~2011/12 シーズンの 23 株は、VP6 領域でも互

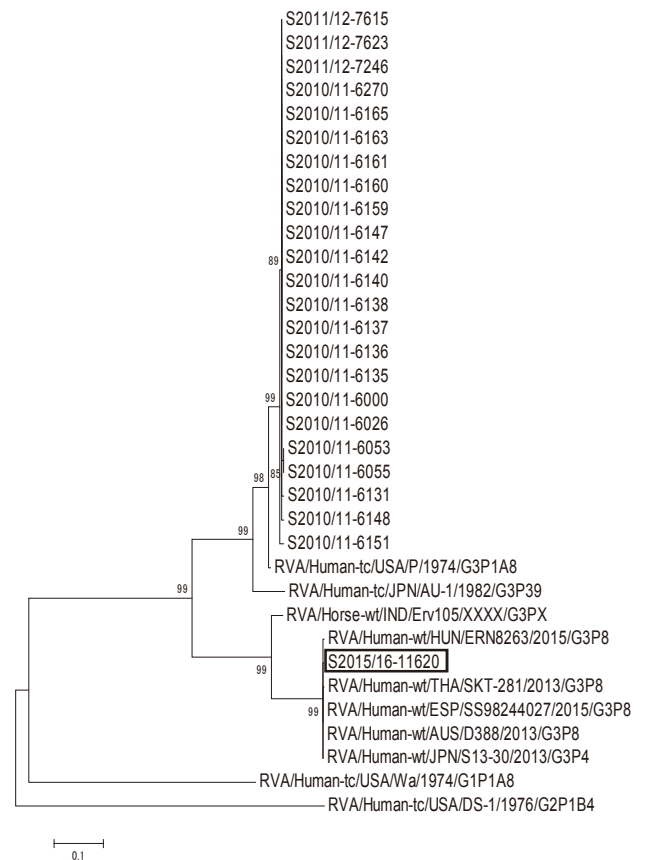


Fig.3 Phylogenetic tree based on the ORF sequences of the VP7 gene from G3P[8] strains isolated in Hyogo prefecture and other established strains



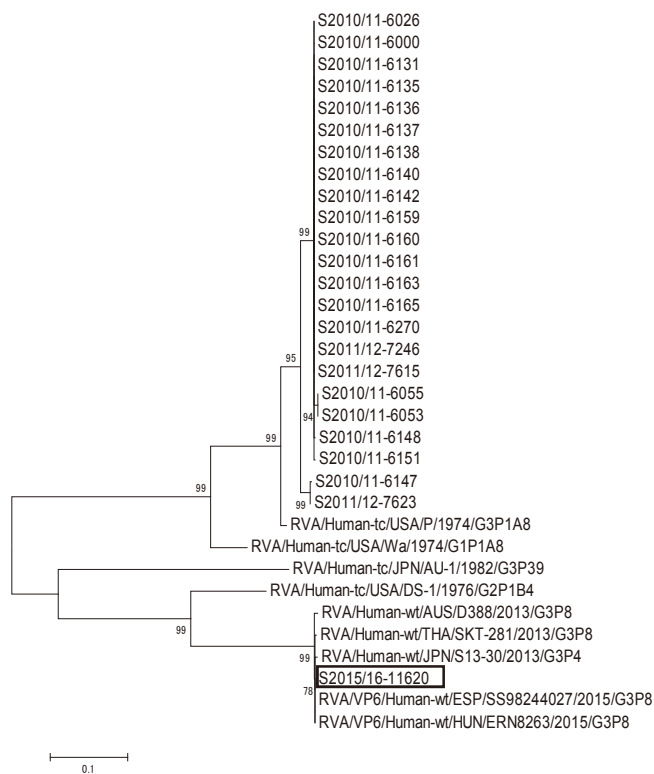


Fig.4 Phylogenetic tree based on the ORF sequences of the VP6 gene from G3P[8] strains isolated in Hyogo prefecture and other established strains

いに 97~100%の高い相同性を示し、RVA/Human-tc/USA/P/1974/G3P1A[8]とも 96~97%の相同性を示した。一方、2015/16 シーズンに検出した 1 株は VP7 領域と同様、これらとは異なるクラスターに属しており、RVA/Human-tc/USA/P/1974/G3P1A[8]と 80%の相同性であった。一方、RVA/Human-tc/USA/DS-1/1976/G2P1B[4]とは 87%の相同性を示し、この領域では DS-1 株により近縁で、2 型に分類された。この株は、VP6 領域以外に VP1, VP3, NSP1 及び NSP5 領域の遺伝子型別でもすべてが 2 型に分類されたことから、VP6 以降の領域が DS-1 類似のリアソータントであることが推定された。また、VP7 領域と同様に VP6 領域でも、オーストラリア、タイ等で検出された株に 99%以上の高い相同性を示していた。これらのことから、2015/16 シーズンに検出した 1 株は、VP6 以降の領域が DS-1 類似の遺伝子群を持つと考えられ、VP7 領域の解析では、ヒト-動物間のリアソータント株とも考えられた。国内では 2013 年以降に類似の株の検出が報告されていることから、他の株間とのリアソータメントを繰り返したのちに、国内にも侵入してヒト-ヒト間で感染を広げていると考えられた。このリアソータント株は、2016 年 4 月に県内の小児科を受診した 1 歳の軽症の散発性胃腸炎患者から検出された

後、さらなる感染は確認できなかったが、オーストラリアではこの近縁株が 2013/14 シーズンにおける G3P[8]の主要流行株であったことが報告されており<sup>12)</sup>、国内でも大きな流行を起こすことも考えられることから、継続的な分子疫学解析が必要であると考えられた。

#### IV 結論

2012 年 9 月から 2016 年 8 月までに病原体定点医療機関で採取された散発性感染性胃腸炎患者の糞便 632 検体についてウイルス探索を行ったところ、70 検体 (11.1%) から A 群ロタウイルスが検出された。新たなリアソータントとして報告されている DS-1 類似 G1P[8]は、県内では 2011/12 シーズンに検出されたのち、2012/13 シーズンから 2014/15 シーズンの 3 シーズンは、検出された G1P[8]株のうち大部分を占めていた。2015/16 シーズンには、近年大きな流行が見られなかった G2P[4]の流行が確認されるとともに、ヒト-動物間のリアソータントと考えられる G3P[8]株を検出した。

継続的なロタウイルスの遺伝子解析によりその流行状況を把握することは、大規模な感染症対策や今後のワクチン対策に有用な情報になると思われる。

#### 謝辞

感染症発生動向調査にご協力いただいた県疾病対策課及び検体採取にご協力いただいた関係機関の皆様方に感謝いたします。

#### 文献

- 1) 国立感染症研究所感染症疫学センター：IASR 病原微生物検出情報 (月報), **35** (3), 63-66 (2014)
- 2) Kuzuya, M., Fujii, R., Hamano, M., Kida, K., Mizoguchi, Y., Kanadani, T., Kishimoto, T.: Prevalence and molecular characterization of G1P[8] Human rotaviruses possessing DS-1-Like VP6, NSP4, and NSP5/6 in Japan. *J. Med. Virol.*, **86** (6), 1056-1064 (2014)
- 3) 杉本大地, 中野守, 稲田真知, 米田正樹, 藤谷美沙子, 北堀吉映: 奈良県の 2010/11~2014/15 シーズンにおける DS-1 類似 G1P[8]ロタウイルスの疫学的研究. *臨床とウイルス*, **44** (3), 121-126 (2016)
- 4) 国立感染症研究所: 病原体検出マニュアル ウイルス性下痢症検査マニュアル (第 3 版) (2003)
- 5) Iturriza-Gomara, M., Kang, G., Gray, J.: Rotavirus

- genotyping: Keeping up with an evolving population of human rotaviruses. *J. Clin. Virol.*, **31** (4), 259-265 (2004)
- 6) 高井伝仕, 荻美貴, 押部智宏, 近平雅嗣, 三村昌司: 兵庫県における胃腸炎ウイルス検出状況と遺伝子解析. 兵庫県立健康生活科学研究所健康科学研究センター研究報告, 第5号, 24-28 (2014)
- 7) Fujii, Y., Shimoike, T., Takagi, H., Murakami, K., Todaka-Takai, R., Katayama, K.: Amplification of all 11 RNA segments of group A rotaviruses based on reverse transcription polymerase chain reaction. *Microbiol. Immunol.*, **56** (9), 630-638 (2012)
- 8) 国立感染症研究所感染症疫学センター: IASR 病原微生物検出情報 (月報), **37** (7), 138-140 (2016)
- 9) Gulati, B. R., Deepa, R., Singh, B. K., Durga, C.: Diversity in Indian equine rotaviruses: Identification of genotype G10, P6[1] and G1 strains and a new VP7 genotype (G16) strain in specimens from diarrhetic foals in India. *J. Clin. Virol.*, **45** (3), 972-978 (2007)
- 10) Doro, R., Marton, S., Bartokne, A. H., Lengyel, G., Banyai, K.: Equine-like G3 rotavirus in Hungary, 2015 – Is it a novel intergenogroup reassortant pandemic strain? *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, **63** (2), 243-255 (2016)
- 11) Arana, A., Montes, M., Jere, K. C., Alkorta, M., Cilla, G.: Emergence and spread of G3P[8] rotaviruses possessing an equine-like VP7 and a DS-1-like genetic backbone in the Basque Country (North of Spain), 2015. *Infect. Genet. Evol.*, **44** (10), 137-144 (2016)
- 12) Cowley, D., Donato, C. M., Roczo-Farkas, S., Kirkwood, C. D.: Emergence of a novel equine-like G3P[8] inter-genogroup reassortant rotavirus strain associated with gastroenteritis in Australian children. *J. Gen. Virol.*, **97** (2), 403-410 (2016)
- 13) Komoto, S., Tacharoenmuang, R., Guntapong, R., Taniguchi, K.: Reassortment of human and animal rotavirus gene segments in emerging DS-1-like G1P[8] rotavirus strains. *PLoS. One.*, **11** (2), (2016)
- 14) Malasao, R., Saito, M., Suzuki, A., Imagawa, T., Oshitani, H.: Human G3P[4] obtained in Japan, 2013, possibly emerged through a human-equine rotavirus reassortment event. *Virus Genes.*, **50** (1), 129-133 (2015)

(平成 29 年 3 月 24 日受理)