

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22406014

研究課題名(和文) ワクチン導入がアフリカでのロタウイルス下痢症および流行株変異に与える影響の検証

研究課題名(英文) Effects of rotavirus vaccine on circulating strains in Africa

研究代表者

中込 とよ子 (Nakagomi, Toyoko)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：40155693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：乳幼児の重症下痢症の原因になっているロタウイルスに対するワクチンがアフリカを含め世界各地に導入されている。本研究は、ワクチンの流行株に与える影響を検証する基盤情報の構築のため、マラウイにおける小児下痢症入院患者検体の解析を行った。その結果、アフリカ諸国で特徴的に多いG8株は、ウシロタウイルスとの頻繁な遺伝子分節再集合の結果ではなく、ヒトの間で流行を繰り返していること、アフリカに突発出現したG12株は同時期に流行しているWa型のヒトロタウイルスと交雑を起こした証拠が得られたが、DS-1型の株との交雑の痕跡はなかった。本研究の成果は、マラウイにおけるロタウイルスの重要な分子疫学的基盤情報である。

研究成果の概要(英文)：Safe and efficacious vaccines have been introduced to protect children from rotavirus, a major cause of severe acute gastroenteritis in children worldwide. This study aimed at providing a molecular epidemiologic basis on which to understand the effects of rotavirus vaccines on circulating wild-type rotavirus strains by analyzing clinical samples collected from children admitted to a sentinel hospital in Blantyre, Malawi. This study revealed that Malawian G8 strains evolved over the last decade through genetic reassortment with other human rotaviruses, changing their VP4 genotypes while maintaining conserved genotype constellations for the remaining structural and non-structural proteins. Analysis of Malawian G12P[6] strains and representative, co-circulating strains provided molecular evidence for complex stages of reassortment events that a G12 VP7 gene donor strain underwent with contemporary, locally-circulating strains possessing different genetic backgrounds.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：ウイルス学

キーワード：ロタウイルス ワクチン 遺伝子型 全ゲノム解析 アフリカ マラウイ

1. 研究開始当初の背景

ロタウイルスは、地球規模で見ると年間約50万人の5歳未満児の死亡原因になっている。世界でもっとも広く使われているワクチンは、血清型がG1P[8]である単価ワクチンである。このワクチンが、血清型が完全に異型であるG2P[4]ウイルス株に対しても有効であることを、本研究に先行するブラジル東北部での海外学術調査研究(2006~2009)によって証明したが(Correia, et al., J Infect Dis, 201: 363-369, 2010)、同時に、単価ヒトロタウイルスワクチンの定期接種への導入により、地域の流行株が事実上すべてワクチンとは血清型の共通性が全くないG2P[4]株に置き換わってしまったことを発見した(Nakagomi, et al., Arch Virol, 153:591-593, 2008)。

ロタウイルスワクチンがロタウイルス流行株の変異に与える影響を検証するにあたり、基盤的分子疫学情報を整備することが重要である。とくにアフリカでは、先進国で50%以上と、もっとも普遍的にみられるG1P[8]株が17%を占めるに過ぎず、G1P[8]、G2P[4]、G3P[8]、G4P[8]、G9P[8]の5大遺伝子型を合わせても高々31%である。これに対して、その起源がウシロタウイルスであると想像されているG8株が12%に及んでおり、特にマラウイではその蔓延が高度になることが知られている(Cunliffe, et al., J infect Dis, 202 (Suppl): S168-174, 2010)。

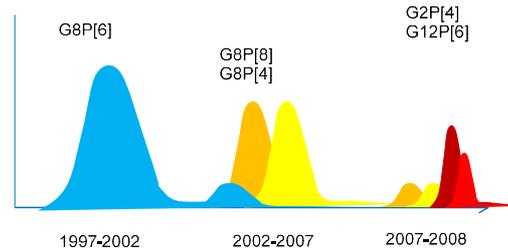
一方、G12株は、最初アジアに突発出現したが、2000年代に入ってネパールではもっとも優勢な株になっていることを我々が初めて報告した(Uchida, et al., J Clin Microbiol, 44: 3499-3505, 2006)。その後、世界の他の地域からも報告が増加し、2007年前後からマラウイにも出現するようになった(Cunliffe, et al., Emerg Infect Dis, 15: 87-90, 2009)。また、ほぼ時を同じくして、マラウイでは過去10年間の分子疫学的調査にもかかわらず1株も検出されなかったG2株が出現した(Nakagomi, et al., Vaccine, 30 (Suppl 1): A140-151, 2012)。これらの急激な遺伝子型の変化は、ロタウイルスワクチンの定期接種化(2012年11月)前の現象であり、ワクチンによる集団内への免疫形成など人為的な介入がない状態での変動であった。

2. 研究の目的

本研究では単価ロタウイルスワクチンがマラウイでのロタウイルス下痢症および流行株変異に与える影響を検証することを最終目標に、ブランタイアの定点病院における下痢症入院患者の臨床情報と患者検体の解析を行い、マラウイにおけるロタウイルス流行の分子疫学レベルでの基盤情報を構築することを目的とした。とくに、(a) マラウイをはじめとするアフリカ諸国で流行しているG8株が同時に流行しているウシロタウイルスとの頻繁な遺伝子分節再集合 genetic reassortmentの結果生じているのかどうか、種

間伝播の観点から意義を明らかにすること、また、(b) 2007年前後に突然出現したG12株の出現における遺伝子分節再集合の関わりを明らかにすること、の二点の解明に焦点を絞った。

マラウイでの12年間の疫学調査期間中におけるG8株の変動とG2, G12の出現 (模式図)



3. 研究の方法

解析に用いた臨床検体は、すべてマラウイ南部の大都市であるブランタイアの定点病院であるQueen Elizabeth Hospitalの5歳未満の下痢症による入院(一部外来)患者から得たものである。また、全ゲノム解析に用いたすべての株は培養細胞を使って分離した(Nakagomi, et al., Vaccine, 30 (Suppl 1): A140-151, 2012; Nakagomi, et al., J Gen Virol, 94: 1273-1295, 2013)。

合計34株のロタウイルスゲノムをQIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN Sciences, Germantown, MD, USA)により抽出し、ランダムプライマーを用いて、Super Script III Reverse Transcriptaseにより、cDNAを作製した。さらに、ロタウイルス各遺伝子分節の末端配列に特異的なプライマーを使い、GoTaq® Green Master Mix system (Promega Corporation, Madison, WI, USA)により、各遺伝子分節の増幅産物を得て、ABI Prism 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA)により塩基配列を決定した。取得した塩基配列については、RotaC ver 2.0により、遺伝子型構成を決定するとともに、MEGA 5により分子系統学的解析を行った。

4. 研究成果

(a) マラウイで流行していたG8株の全ゲノム解析

最初に1997年から2007年までの10年間にわたり収集された299株のG8ロタウイルス株の分布を解析した。その結果、G8ロタウイルス株の検出頻度には大きな変動があり、最低は2005-2006年の5.2%であり、最高は2000-2001年の54%であった。また、G8ロタウイルス株はP[6]、P[8]およびP[4]という3つの異なるP型と組み合わせたり、それぞれの相対頻度は、59%、10%および31%であった。この10年間の調査期間のうち、最初の5年間では、G8P[6]株が73%と大半を占め、これにG8P[4]株が27%と続いた。しかし、後半の5年間では状況が一変し、G8P[6]株は10%

Table 1. 27 の G8 株の遺伝子型内での系統(あるいは群).

Strain	Year	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
MW1-333	1997	G8-I	P[4]-I	I2-I	R2-III	C2-I	M2-I	A2-I	N2-I	T2-I	E2-I	H2-I
MW1-006	1997	G8-I	P[4]-I	I2-III	R2-III	C2-III	M2-III	A2-III	N2-II	T2-II	E2-I	H2-II
MW1-023	1997	G8-I	P[6]-I	I2-I	R2-III	C2-I	M2-III	A2-I	N2-I	T2-I	E2-I	H2-II
MW1-131	1997	G8-I	P[6]-I	I2-I	R2-III	C2-I	M2-III	A2-I	N2-I	T2-I	E2-I	H2-II
OP2-506	1998	G8-I	P[4]-I	I2-III	R2-III	C2-III	M2-III	A2-III	N2-II	T2-II	E2-I	H2-II
NeO2-007	1998	G8-I	P[6]-I	I2-I	R2-III	C2-I	M2-III	A2-I	N2-I	T2-I	E2-I	H2-II
NeO2-025	1998	G8-I	P[6]-I	I2-I	R2-III	C2-I	M2-III	A2-I	N2-I	T2-I	E2-I	H2-II
MW1-467	1998	G8-I	P[6]-I	I2-II	R2-II	C2-I	M2-II	A2-I	N2-I	T2-I	E2-III	H2-II
MW1-860	1999	G8-I	P[6]-I	I2-II	R2-II	C2-I	M2-II	A2-I	N1	T2-I	E2-III	H1
MW2-026	1999	G8-I	P[6]-I	I2-II	R2-II	C2-I	M2-II	A2-I	N2-III	T2-I	E2-III	H2-II
MW2-489	2000	G8-I	P[4]-I	I2-I	R2-III	C2-I	M2-I	A2-I	N2-I	T2-I	E2-I	H2-I
MW2-624	2001	G8-I	P[4]-I	I2-I	R2-III	C2-I	M2-I	A2-I	N2-I	T2-I	E2-I	H2-I
OP2-384	2001	G8-I	P[6]-I	I2-II	R2-II	C2-I	M2-II	A2-I	N2-III	T2-I	E2-I	H2-II
MW2-924	2002	G8-I	P[4]-I	I2-I	R2-III	C2-I	M2-I	A2-I	N2-I	T2-I	E2-I	H2-I
OP2-668	2003	G8-I	P[6]-I	I2-I	R2-I	C2-II	M2-I	A2-II	N2-I	T2-I	E2-III	H2-I
MW2-1114	2004	G8-I	P[4]-I	I2-I	R2-I	C2-II	M2-I	A2-II	N2-I	T2-I	E2-I	H2-I
MW2-1189	2004	G8-I	P[6]-I	I2-I	R2-I	C2-II	M2-I	A2-II	N2-I	T2-I	E2-I	H2-I
MW2-1238	2005	G8-I	P[4]-I	I2-I	R2-I	C2-I	M2-I	A2-I	N2-I	T2-I	E2-II	H2-I
MW2-1246	2005	G8-I	P[4]-I	I2-I	R2-I	C2-I	M2-I	A2-I	N2-I	T2-I	E2-II	H2-I
QOP002	2005	G8-I	P[4]-I	I2-I	R2-I	C2-I	M2-I	A2-I	N2-I	T2-I	E2-II	H2-I
QEC29	2005	G8-I	P[6]-I	I2-I	R2-II	C2-II	M2-I	A2-II	N2-III	T2-I	E2-I	H2-I
QEC257	2006	G8-I	P[4]-I	I2-I	R2-I	C2-I	M2-I	A2-I	N2-I	T2-I	E2-II	H2-I
QEC287	2006	G8-I	P[8]-I	I2-I	R2-II	C2-II	M2-I	A2-II	N2-III	T2-I	E2-I	H2-I
QEC289	2006	G8-I	P[8]-I	I2-I	R2-II	C2-II	M2-I	A2-II	N2-III	T2-I	E2-I	H2-I
QOP250	2007	G8-I	P[4]-I	I2-I	R2-I	C2-I	M2-I	A2-I	N2-I	T2-I	E2-II	H2-I
QOP340	2007	G8-I	P[4]-I	I2-I	R2-I	C2-II	M2-I	A2-I	N2-I	T2-I	E2-IV	H2-I
QOP387	2007	G8-I	P[4]-I	I2-I	R2-I	C2-II	M2-I	A2-I	N2-I	T2-I	E2-IV	H2-I

に激減する一方、G8P[4]および G8P[8]がそれぞれ 47%および 43%を占めた。

これらの G8 株から各年代および異なる P 型との組み合わせを反映するように代表的株を選び出し、細胞培養に馴化させ、最終的に 27 株の全ゲノム塩基配列決定を行った。その内訳は、G8P[4]株が 14 株、G8P[6]株が 11 株、G8P[8]株が 2 株であった。全ゲノム解析の結果、その遺伝子型構成は 1 株のゲノグループ間遺伝子分節再集合体を除き、G8-P[4]/P[8]/P[6]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 であった。すなわち、ウイルス表面を構成しウイルス中和に關与するタンパク質をコードする遺伝子分節以外の内部および非構造タンパク質はヒトロタウイルス DS-1 ゲノグループのそれと一致した。これら 27 株の G8 ウイルス株について、個々の遺伝子分節の分子系統樹を作成し、それぞれの株がもつ配列が、遺伝子型内での系統(あるいは群)のどこに所属するかを解析した (Table 1)。

この結果、G8 株間で遺伝子分節の交換が高頻度に行われていること、また、ウシロタウイルスの種間伝播の痕跡は認められないことがわかった。とくに、G8 ロタウイルス株はアフリカ以外の地域ではきわめてまれである一方、ウシロタウイルスには普遍的に見られるので、種間伝播が強く疑われてきた経緯があり、本研究の結果は重要な新知見である。

(b) 2007-2008 年に突然出現した G12 株の全ゲノム解析

2007 年から 2008 年にかけて行われた臨床試験のときに、それ以前の 10 年間でまったく見られなかった G12P[6]が全体の 27% に達し、もっとも優勢なロタウイルス遺伝子型となった。この G12P[6]株の出現は次の二点からきわめて重要である。第一に、G12P[6]は G2P[4]と同様、ワクチン株の遺伝子型である G1P[8]に対して、完全に異型であること。第二に、この前後から世界的に G12 株の増加が報告されるように、今や六大遺伝子型の一つになりつつあることである。

4 つの G12P[6]株、それぞれ 1 株ずつの G1P[8]、G12P[8]、G2P[4]株について、全ゲノムレベルでの塩基配列決定を行った。2 つの G12P[6]株で long RNApattern を持つ株の遺伝子型構成は G12-P[6]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1 であり、残る 2 つの G12P[6]株で short RNApattern を持つ株の遺伝子型構成は G12 -P[6]-I2-R2-C2-M1-A2-N2-T2-E2-H2 であった (Table 2)。すなわち、前者は典型的な Wa-like genotype constellation であり、後者は、Wa genogroup のウイルスから M1 遺伝子(VP3 遺伝子分節)を遺伝子再集合により獲得したと思われる DS-1 genetic background の単一遺伝子分節再集合体であった。

さらに、これら 4 株の G12P[6]株と同時期に流行していた 1 株ずつの G1P[8]、G12P[8]、G2P[4]株について、全ゲノムレベルでの塩基配列の相同性および分子系統関係を解析したところ、Wa genogroup background である long RNA pattern の G12P[6]株は、G12 株がマラウイに侵入した後で、同時期に流行してい

Table 2. ゲノム分節の遺伝子型構成が明らかになっているG12P[6]株

Strain name	Year of detection	Country	Host	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
RV161-00	2000	Bangladesh	Human	G12	P[6]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E1	H2
RV176-00	2000	Bangladesh	Human	G12	P[6]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E6	H2
N26-02	2002	Bangladesh	Human	G12	P[6]	I2	R2	C2	M2	A2	N1	T2	E6	H2
Dhaka12-03	2003	Bangladesh	Human	G12	P[6]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
Matlab13-03	2003	Bangladesh	Human	G12	P[6]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T2	E1	H1
US6597	2005-2006	USA	Human	G12	P[6]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
CAU195	2006	South Korea	Human	G12	P[6]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
CAU214	2006	South Korea	Human	G12	P[6]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
MAL39	2007	Malawi	Human	G12	P[6]	I2	R2	C2	M1	A2	N2	T2	E2	H2
MAL88	2007	Malawi	Human	G12	P[6]	I2	R2	C2	M1	A2	N2	T2	E2	H2
MAL12	2007	Malawi	Human	G12	P[6]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
MAL40	2007	Malawi	Human	G12	P[6]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
GER172-08	2008	Germany	Human	G12	P[6]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
3176WC	2009	South Africa	Human	G12	P[6]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1

た Wa genogroup のウイルス株と遺伝子分節再集合を起こした結果として生じた可能性が高いと考えられた。一方、DS-1 genogroup background である short RNA pattern の G12P[6] 株と同じく DS-1 genogroup background である G2P[4]株あるいは、G8 株がもつ内部タンパク質および非構造タンパク質との相同性や分子系統的近縁性は十分高いとは言えず、G12 株がマラウイに侵入した後に、これらの株との間で遺伝子分節再集合を起こしたことを示唆する所見は得られなかった。マラウイあるいはアフリカの他の国に侵入した G12 株の本来の起源はアジア、とくにベンガル湾周辺国であると想定されるが、バングラデッシュには、DS-1 genogroup background である short RNA pattern の G12P[6]株が検出されている(Table 2)。

興味深いことに、マラウイの 2 株が VP3 遺伝子を Wa-like genotype constellation のウイルスから遺伝子再集合により獲得しているように、バングラデッシュの G12P[6]株も純粋な DS-1-like genotype constellation のウイルスは検出されておらず、どれもゲノグループ間遺伝子分節再集合体 intergenogroup reassortant であった(Table 2)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

1. Nakagomi T, Doan YH, Dove W, Ngwira B, Iturriza-Gómara M, Nakagomi O, Cunliffe NA. G8 rotaviruses with conserved genotype constellations detected in Malawi over 10 years (1997-2007) display frequent gene reassortment among strains co-circulating in humans. J Gen Virol 94: 1273-1295, 2013 査読有

2. Trainor E, Lopman B, Iturriza-Gomara M, Dove W, Ngwira B, Nakagomi O, Nakagomi T, Parashar U, Cunliffe N. Detection and molecular characterisation of noroviruses in hospitalised children in Malawi, 1997-2007. J Med Virol 85(7):1299-1306, 2013 査読有
3. Doan YH, Nakagomi T, Aboudy Y, Silberstein I, Behar-Novat E, Nakagomi O, Shulman LM. Identification by full genome analysis of a bovine rotavirus transmitted directly to, and causing diarrhea in a human child. J Clin Microbiol 51(1): 182-189, 2013 査読有
4. Nakagomi T, Nakagomi O, Dove W, Doan YH, Witte D, Ngwira B, Todd S, Duncan Steele A, Neuzil KM, Cunliffe NA: Molecular characterization of rotavirus strains detected during a clinical trial of a human rotavirus vaccine in Blantyre, Malawi. Vaccine 30 Suppl 1: A140-151, 2011. 査読有

[学会発表](計 3 件)

1. Nakagomi T. G8 rotaviruses with conserved genotype constellations detected in Malawi over 10 years display frequent gene reassortment among strains co-circulating in humans. 15th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim, Singapore, March 2013.
2. Nakagomi T, Doan YH, Dove W, Iturriza-Gomara M, Ngwira B, Nakagomi O, Cunliffe N. Full-genome analysis of G8 rotavirus strains in Malawi over a 10-year-period. The 11th International Symposium on Double-Stranded RNA Viruses. Puerto Rico, USA, 27 November -1 December, 2012.

3. Nakagomi T, Nakagomi O, Dove W, Doan YH, Witte D, Ngwira B, Todd S, Steele AD, Neuzil KM, Han HH, Cunliffe NA.
Molecular characterization of rotavirus strains detected during a clinical trial of a human rotavirus vaccine in Blantyre, Malawi: XV International Congress of Virology, Sapporo, 11-16 September, 2011.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中込 とよ子 (Nakagomi Toyoko)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：40155693

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし