

## 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：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2013

課題番号：25893181

研究課題名(和文) Whole genome characterization of rotavirus strains circulating during a clinical trial of human rotavirus vaccine in Nha Trang, Vietnam.

研究課題名(英文) Whole genome characterization of rotavirus strains circulating during a clinical trial of human rotavirus vaccine in Nha Trang, Vietnam.

研究代表者

ドアンハイ イエン (Doan, Hai Yen)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：90701243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,100,000円、(間接経費) 330,000円

研究成果の概要(和文)：発展途上国でのロタウイルスワクチンの有効性が低い原因を探るため、ベトナムでの有効性が低かった5価ロタウイルスワクチンの臨床試験が行われたときに流行していたG1P[8]とG3P[8]のロタウイルスの全ゲノム解析を行ったところ、G1P[8]株およびG3[8]株の遺伝子型構成はG1/G3-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-E1-H1であった。分子系統樹解析の結果とあわせて、ベトナムで流行している野生株は先進国と大きく変わることがなかった。すなわち、発展途上国でのロタウイルスワクチンの有効性が低い原因は流行株の違いが主たる原因ではないと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In an attempt to get insight into the cause of lower efficacy of rotavirus vaccines in developing countries, whole genome analysis was performed on G1P[8] and G3P[8] strains that predominated during a clinical trial of the pentavalent rotavirus vaccine in Vietnam. Their genotype constellation was found to be G1/G3-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-E1-H1. Taken together with the result of the phylogenetic analysis, it was concluded that rotavirus strains circulating in Vietnam was no more different than the strains circulating in high-income countries. Thus, the lower efficacy is unlikely to be explained by the diversity of circulating strains.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：衛生学・公衆衛生学

キーワード：ロタウイルス ワクチン 遺伝子型 野生株 有効性 全ゲノム解析

### 1. 研究開始当初の背景

ロタウイルスワクチンは、重症ロタウイルス下痢症の予防にとって有効な手段である。これまでに臨床開発されたロタウイルスワクチンは、すべて経口接種型の弱毒生ワクチンである。現在、世界的に使用可能なワクチン、すなわち、WHOの事前承認を取得したロタウイルスワクチンは単価経口弱毒生ヒトロタウイルスワクチン(ロタリックス®)と5価経口弱毒生ロタウイルスワクチン(ロタテック®)の2つである。この二種類のロタウイルスワクチンは、世界の多くの国で使用承認を取得しており、ともに先進工業国で重症下痢症を90~95%予防するという高い有効性を示している。しかし、発展途上国での有効性は芳しくない。

ベトナムでは5価ロタウイルスワクチン(ロタテック®)の臨床試験が行われたが、このワクチンは日本をはじめとする先進国で約95%の重症ロタウイルス下痢症予防効果を示しているのに対し、ベトナムではその有効性が64%と低値であった。有効性が低い原因の第一に挙げられるのが、流行している野生株が先進国で流行している野生株と異なる可能性があることである。とくに、ロタウイルスワクチンが先進国でのロタウイルス遺伝子型の分子疫学的情報に基づて開発されたされた経緯を考慮すれば、第一に検討しなければならない課題である。

### 2. 研究の目的

本研究は、ベトナム中部のナチャン市で5価ロタウイルスワクチン(ロタテック®)の臨床試験が行われたときに流行していたロタウイルス野生株が先進工業国での野生株とどのように違うのか明らかにすることを目的にした。

### 3. 研究の方法

文部科学省の委託事業である「ベトナムにおける長崎大学感染症研究プロジェクト」において、北部および中部ベトナムの小児病院における下痢症ウイルスの分子疫学的研究が行われ、2007年から2008年にかけて、南部のナチャン市にあるカンホア総合病院の小児科入院患者から740検体の便検体が収集された。このうち、ロタウイルスが検出され解析後凍結保存されていた355検体を出発材料とした。この時期は、5価ロタウイルスワクチン(ロタテック®)の臨床試験がナチャン市で行われた時期に一致していた。このときに流行していた優勢な野生株は、前期の委託事業の報告から明らかにされ、G1P[8]とG3P[8]であった。そこで、この遺伝子型を持つそれぞれ2株、合計4株を全ゲノム解析の対象とした。

これら4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 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Neighbour-Joining法を用いて分子系統樹を描出するとともに、p-distanceを計算するなどの分子系統学的解析を行った。

### 4. 研究成果

本研究のために選別した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ところ、2つのG1P[8]株の遺伝子型構成はG1-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-E1-Hであり、2つのG3[8]株の遺伝子型構成はG3-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-E1-H1であった。すなわち、いずれも典型的なWa-like genotype constellationであり、Wagenogroupのウイルスであった。さらに、それぞれの遺伝子型内での分子系統関係を調べるため、DNAデータベースに登録されている株を対象にして、同一遺伝子型の塩基配列をダウンロードして、分子系統樹を描いた。その結果、11の遺伝子分節のすべてにおいて、これら4株のロタウイルスは、世界のその他の地域で流行しているヒトロタウイルスのいずれかとクラスターを形成するとともに、これらの株は2000年代に検出された現代のWa-like genotype constellationを持つヒトロタウイルスと高い塩基配列一致率を示した。この中には、臨床試験での5価ワクチンの有効性が95%と高かった米国および43%と低かったバングラデッシュも含まれた。

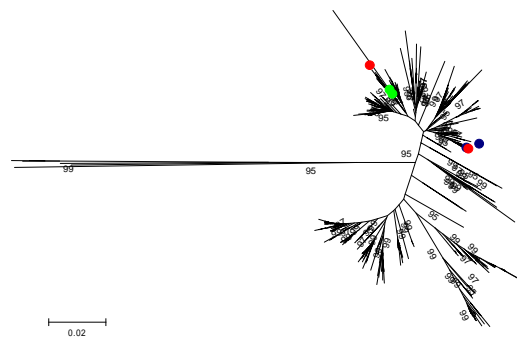


図1: G1 VP7 遺伝子の分子系統樹  
系統樹中、赤印をつけた遺伝子配列が今回解析したベトナムの2株NT0247(2007)およびNT0445(2008)であり、青印は米国で検出されたG1株のVP7遺伝子、緑印はバングラデッシュで検出されたG1株のVP7遺伝子である。

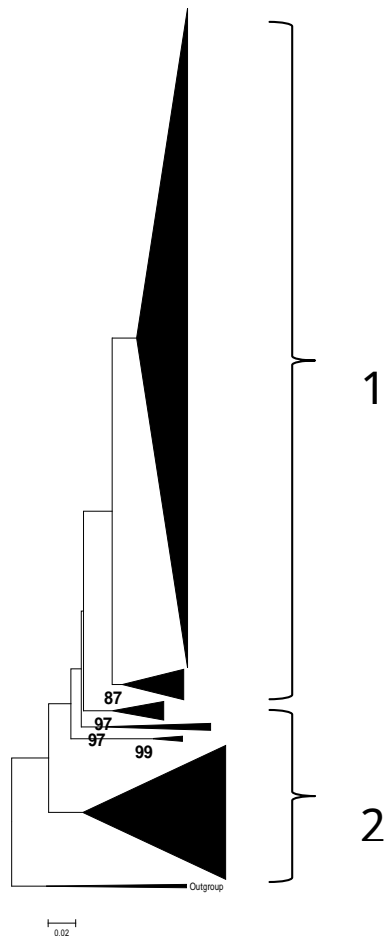


図 2: G3 VP7 遺伝子の分子系統樹

G3 をもつロタウイルスには本来の宿主がヒトであるヒトロタウイルスと動物を宿主とする動物ロタウイルスに大別できる。数字の 1 で示した大きなクラスターがヒトロタウイルスであり、数字の 2 で示した大きなクラスターが動物ロタウイルスである。ベトナムの 2 株、すなわち、NT0241(2007)および NT0643(2008)はこのヒトロタウイルスクラスターに含まれる。

これらの結果から、ベトナムで流行しているロタウイルスの野生株は他の先進国および発展途上国で流行している野生株と大きく変わることがないことがわかった。すなわち、発展途上国でのロタウイルスワクチンの有効性が上がらない原因は、懸念されているような流行株の違いが第一の原因ではないと考えられる。したがって、発展途上国におけるロタウイルス下痢症発生の月例分布の違い、母乳によるワクチンテイクの阻害の可能性、微量栄養元素の不足による免疫応答の低下、年間を通じてのロタウイルスへの曝露、共存する腸管病原体の影響などがどのようにワクチンの有効性に影響するかを究明し、その対策を講じる必要があると思われる。

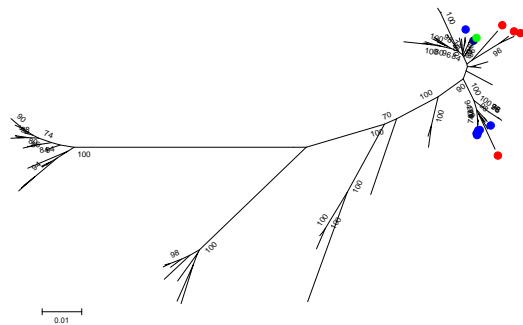


図 3: P[8] VP4 遺伝子の分子系統樹

系統樹中、赤印をつけた遺伝子配列が今回解析したベトナムの 4 株であり、青印は米国で検出された P[8]株の VP4 遺伝子、緑印はバングラデッシュで検出された P[8]株の VP4 遺伝子である。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Doan, Y.H.: Whole genome characterization of rotavirus strains circulating a clinical trial of human rotavirus vaccine in Nha Trang, Vietnam. Asian African Research Forum 2014, January 20-22, 2014, Sendai International Center, Sendai, Japan

〔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

ドアン ハイ イエン (Doan Hai Yen)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：90701243

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし