

令和 4 年 6 月 14 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：2019～2021

課題番号：19K24260

研究課題名（和文）G4P[6]ブタロタウイルスのヒトへの種間伝播と適応過程の解明

研究課題名（英文）Interspecies transmission and adaptation process of G4P[6] porcine rotaviruses to humans

研究代表者

金子 美穂（後藤美穂）（Kaneko, Miho）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・助教

研究者番号：50599909

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：ベトナムのロタウイルス下痢症患者から検出されたG4P[6]株の全ゲノム解析を行ったところ、すべてのG4P[6]株はブタロタウイルスに一般的に見られる遺伝子型構成（G4-P[6]-11/15-R1-C1-M1-A8-N1-T1/T7-E1-H1）を有していた。分子系統解析の結果とあわせて、これらは本来はブタを宿主とする株であると結論づけられた。このG4P[6]ブタロタウイルスはロタウイルス下痢症の原因の約2%を占めていた。また、互いに疫学的関連のない患者から同一のG4P[6]ブタロタウイルス株が検出されたことから、これらの株が同地域でヒト-ヒト感染により維持されていた可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ロタウイルスは発展途上国のみならず先進国においても乳幼児の重症下痢症の原因として最も重要な病原体である。本研究では、本来はブタを宿主とするG4P[6]ロタウイルスが宿主の壁を越えてヒトに感染（種間伝播）し、さらにヒトからヒトへの感染を起こしたという可能性を示唆する結果を得た。このような動物由来のロタウイルスに対する現行のロタウイルスワクチンの効果は不明であり、本研究はその流行動態を注視する必要性を提示するとともに、ベトナムにおいてはP[6]遺伝子型の判別と塩基配列の解析がロタウイルス株の本来の宿主の推定に有用であることを示した。

研究成果の概要（英文）：Whole-genome analysis of G4P[6] strains detected in Vietnamese children with rotavirus diarrhea revealed that these strains had genotype constellations of G4-P[6]-11/15-R1-C1-M1-A8-N1-T1/T7-E1-H1, which are commonly found in porcine rotaviruses. Taken together with the results of phylogenetic analysis, it was concluded that all of these G4P[6] strains were of porcine origin, accounting for approximately 2% of the causes of rotavirus diarrhea. The detection of identical G4P[6] porcine rotavirus strains in symptomatic children who were epidemiologically unrelated to each other suggested that these strains may have been circulating among children by human-to-human transmission in those areas.

研究分野：ロタウイルスの分子疫学

キーワード：ロタウイルス 種間伝播 G4P[6] 遺伝子型 ブタ ベトナム 急性胃腸炎 全ゲノム解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ロタウイルスは発展途上国のみならず先進国においても乳幼児の重症下痢症の原因として最も重要な病原体である。ヒトを本来の宿主とするヒトロタウイルスに加え、動物を本来の宿主とするロタウイルスが宿主の壁を越えてヒトに感染(種間伝播)することが知られており、新型ヒトロタウイルス株の出現に寄与し得るという点から重要である。ヒトロタウイルスの場合、11本に分節化された二本鎖 RNA ゲノムがコードする遺伝子のうち血清型を担う G 遺伝子と P 遺伝子の遺伝子型は主に G1, G2, G3, G4, G9, G12 と P[4], P[6], P[8]の組み合わせから成ることが知られているため、これを逸脱した遺伝子型をもつロタウイルスが動物由来の株であると推測することは合理的である。

一方、G4P[6]ブタロタウイルスはヒトロタウイルスにも一般的に見られる G 遺伝子型と P 遺伝子型をもつことからあまり注目を集めてこなかったが、G4P[6]ブタロタウイルスのヒトへの感染例がベトナムを含むアジアを中心に散発的に報告されており(Kaneko et al., Arch Virol, 2018)、ベトナムのブタにおいては G4P[6]株が最も優勢であるとの報告(Pham et al., Vet Microbiol, 2014)とあわせると、アジアにおいては一般に認識されているよりも高頻度にブタからヒトへの G4P[6]ロタウイルスの種間伝播が起きている可能性が考えられた。

2. 研究の目的

ベトナムの下痢症患児におけるロタウイルス流行株の状況を明らかにするとともに、G4P[6]株の全ゲノム配列を決定し、分子系統解析を行うことにより、(1) ベトナムの小児のロタウイルス感染における G4P[6]ブタロタウイルスの寄与を評価すること、(2) G4P[6]ブタロタウイルスの種間伝播の様式とヒトへの適応過程を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) G 遺伝子型・P 遺伝子型の判定 (G-P タイピング)

2015年7月から2017年6月までの24か月間にWHOサーベイランスの下でベトナムの北部および中部の病院を受診した下痢症患児より採取された1252のロタウイルス陽性糞便検体のうち、遺伝子型未同定の345検体からQIAamp Viral RNA Mini Kit(Qiagen)を用いてゲノムRNAの抽出を行い、multiplex RT-PCRによりロタウイルスゲノムのG遺伝子型・P遺伝子型の判定を行った。

(2) 全ゲノム解析

G4株とP[6]株に加え、ブタロタウイルスに由来すると予想されたG9P[19]株とG3P[23]株について全ゲノムシーケンズを行った。抽出したゲノムRNAに対し、TURBO DNA-free Kit(Thermo Fisher Scientific)を用いてDNase処理を行った後、NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina(New England Biolabs)とNEBNext Multiplex Oligos for Illumina(New England Biolabs)を用いて、インデックス付きアダプターを付加したcDNAライブラリーを調製し、Agencourt AMPure XP magnetic beads(Beckman Coulter)を用いて精製した。精製したcDNAライブラリーの品質は電気泳動により定性的に評価し、DNA quantification Qubit dsDNA HS Assay Kit(Thermo Fisher Scientific)とQubit fluorometer(Thermo Fisher Scientific)を用いて定量的に評価した。塩基配列の解読は、MiSeq Reagent Kit v2 300-cycle(Illumina)を用いて次世代シーケンサーMiSeq(Illumina)で行った。得られた配列リードを基に、CLC Genomics Workbench v7.0.3(CLC Bio)及びVirusTAP(Yamashita et al., Front Microbiol, 2016)を併用し、de novo assemblyによりロタウイルスゲノムを再構築した。得られたゲノム配列を基にMEGA 7あるいはMEGA Xを用いて分子系統解析を行った。

4. 研究成果

(1) ロタウイルス流行株のG-P遺伝子型の出現頻度

本研究によりG-Pタイピングを行った345検体と既に終了していた907検体とを合わせ、2015年7月から2017年6月までの24か月間に採取された1252のロタウイルス陽性糞便検体に含まれるロタウイルス株のG-P遺伝子型の分布が明らかとなった。本研究の主な対象であるG4P[6]株は28検体(2.2%)に検出され、G8P[8]株、G3P[8]株、G9P[8]株、G1P[8]株、G2P[4]株に次いで多かった。また、G4P[8]株は9株(0.7%)、G3P[6]株、G5P[6]株、G9[6]株がそれぞれ1株(0.1%)、3株(0.2%)、2株(0.2%)検出された。

2007年から2008年の15か月間にベトナムのニャチャンにおいて実施した先行研究の結果(Do

et al., J Med Virol. 2017)と比較すると、優勢株の構成割合は大きく変化していたが、G4P[6]株の割合は同程度(先行研究では1.6%)だった。

また、非典型的な G-P 遺伝子型をもつ株として、G8P[14]株が2株(0.2%)、G9P[19]株が1株(0.1%)、G3P[23]株が1株(0.1%)検出された。

(2) G4 株/P[6]株、G9P[19]株、G3P[23]株の全ゲノムシーケンス

G-P タイピングの結果、P[6]遺伝子型あるいは G4 遺伝子型をもつロタウイルス株は43株だった。これらに加え、G9P[19]株と G3P[23]株を全ゲノムシーケンシングに供した結果、11 遺伝子分節すべての遺伝子型を決定できたのは G4P[6]株が26株、G3P[6]株が1株、G5P[6]株が3株、G9P[6]株が2株、G4P[8]株が9株、G9P[19]株が1株、G3P[23]が1株だった。このうち3株の G4P[6]株については、一部の遺伝子分節において全長配列の決定には至らなかった。

遺伝子型構成

表1に全ゲノムシーケンシングを行った株の遺伝子型構成を示す。

G4P[6]株/G5P[6]株/G9P[6]株の遺伝子型構成は G4/G5/G9-P[6]-I1/I5-R1-C1-M1-A8-N1-T1/T7-E1-H1 であり、ブタロタウイルスに特徴的な遺伝子型(I5、A8、T7)を少なくとも1つは有していた。G9P[19]株/G3P[23]株についても同様だった。

G4P[8]株と G3P[6]株の遺伝子型構成は G4P[8]/G3P[6]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1 であり、典型的なヒトロタウイルスの Wa-like 株と一致していた。

表1. 全ゲノム解析を行ったロタウイルス株の遺伝子型構成

VP7/VP4	株数	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
G4P[6]	14	I1	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H1
	11	I1	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1
	1	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H1
G3P[6]	1	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
G5P[6]	2	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1
	1	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H1
G9P[6]	1	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1
G9P[19]	1	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H1
G3P[23]	1	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H1
G4P[8]	9	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1

全ゲノム解析

遺伝子分節ごとに分子系統樹を作成した。結果の例として G4 株の VP7 遺伝子と P[6]株の VP4 遺伝子の分子系統樹(Neighbor-Joining 法)を図1に示す。いずれの系統樹においても、ヒトから検出された株の配列のみで構成されるヒトロタウイルスクラスターが形成され、そのクラスターの外にブタから検出された株とヒトから検出されたブタロタウイルス様株の配列が混在していた。G4 の系統樹において、本研究で小児から検出された9つの G4P[8]株の G4 配列はすべてヒトロタウイルスクラスター内に含まれていたが、G4P[6]株の G4 配列はすべてその外に位置していた(図1A)。また、P[6]の系統樹においては、本研究で検出された P[6]配列は VP7 の遺伝子型に依らずすべてヒトロタウイルスクラスターの外に位置していた(図1B)。

他の遺伝子分節においても同様の系統関係が確認されたことから、G4P[8]株がいずれも典型的なヒトロタウイルスである一方、G4P[6]株を含むすべての P[6]株はブタロタウイルスに由来し、ヒトロタウイルスとのリアソートメントは起こしていないと結論づけた。これらのことは、G9P[19]株と G3P[23]株についても同様であった。

さらに、次の3グループの P[6]株については、同一グループ内の株間で全ての遺伝子分節において互いの塩基配列の一致率が99%を上回っており、3組の同一株であると考えられた。

グループ1: G4P[6]-11、G4P[6]-12

グループ2: G4P[6]-26、G4P[6]-27、G4P[6]-28

グループ3: G5P[6]-1、G5P[6]-2

これらの株は異なる地区/自治体に居住する互いに疫学的関連のない患児から検出されており、発症日が最短で6日、最長で6週以上離れていた。このことから、これらの P[6]株が同地域の小児集団内で一定の期間にわたり維持されていた可能性が考えられた。

本研究の結果、ベトナムのロタウイルス下痢症の患児において、本来はブタを宿主とする P[6]ロタウイルス株を原因とする症例は2.7%であり、そのうち82%は G4P[6]株によるものだったこと

とから、ブタからヒトへの種間伝播における G4P[6]株の重要性が示唆された。さらに、G4P[6]株と G5P[6]株の一部がヒトからヒトへの感染を起こしていた可能性が示された。ただし、同一株に感染したブタから複数のヒトへの感染が独立に起きた可能性を否定するためには、患児とブタ(ブタの排泄物に汚染された物)との接触歴や同地域のブタにおけるロタウイルス流行株の分子疫学情報を得る必要がある。

また、現行のワクチン接種による免疫応答が P[6]ブタロタウイルスに対して交差反応性を示すかどうかを検証することも今後の課題である。

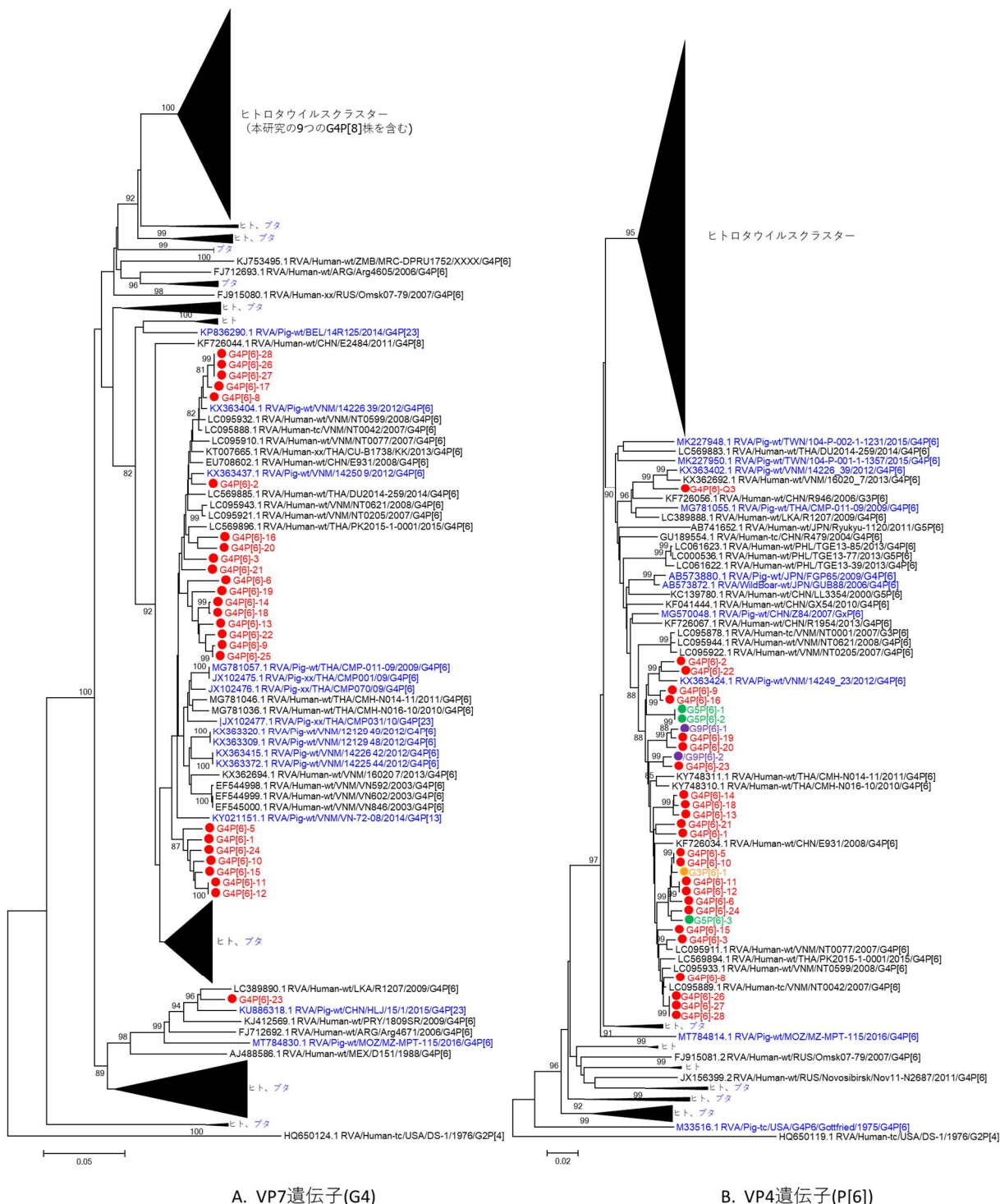


図 1. A: VP7 遺伝子(G4)の分子系統樹、B: VP4 遺伝子(P[6])の分子系統樹
 本研究で検出した G4P[6]株は赤色、G3P[6]株はオレンジ色、G5P[6]株は緑色、G9P[6]株は紫色に色分けし、配列名の先頭に印を付した。その他の配列は検出された動物種に応じて色分けした(ヒトは黒色、ブタは青色)。いずれも最上部にヒトロタウイルスクラスターが形成されたが、G4P[6]株の G4 配列および P[6]株の P[6]配列はそれぞれこのクラスターの外に位置していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	チャン ティ グエン ホア (Tran Thi Nguyen Hoa)	ベトナム国立衛生疫学研究所・ウイルス学部門・エンテロウイルス研究室・室長	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ベトナム	国立衛生疫学研究所			