

Molecular Epidemiology of Diarrheal Viruses in Children  
with Acute Gastroenteritis in Japan from 2003 to 2006

日本の 2003-2006 年の急性胃腸炎患児における下痢症ウイルスの分子疫学的研究

指導教員：水口 雅 教授

国際保健学専攻 発達医科学教室

平成 17 年 4 月入学

学生証番号 57112 ・ Phan Gia Tung ファン ジャ トンク

要旨本文

急性胃腸炎は発展途上国、先進国でともに未だに大きな健康問題であり、これらの国々では急性胃腸炎は全死亡の原因のトップの一つになっている。急性胃腸炎による小児の死亡率は先進国に比較して発展途上国において高い。この 20 年の間に、小児下痢による全世界の死亡人数は減少したものの、下痢による入院率は上昇している。病因論的の解明や、経口補液療法の普及に伴う治療法の発展にも関わらず、全世界の小児の死亡や罹患している病気の最重要なものの一つであり続けている。一方様々な病原微生物の中で、ウイルスは全世界の小児における急性胃腸炎の重要な原因として捉えられており、わが国においても同様である。このため、本研究の目的は日本における小児の急性胃腸炎の下痢原性ウイルスに対して分子疫学的検討を行う事とした。

2003 年 7 月から 2006 年 6 月まで、筆者らが共同研究をしている日本の 5 都市（舞鶴、東京、札幌、佐賀、大阪）の小児科外来において、急性胃腸炎と診断されたすべての小児から収集した 1,650 個の便検体を用いて本研究は行われた。2 つのグループの下痢原性ウイルスを検出するために、2 種類のマルチプレックス PCR を施行した。第一のグループは A, B, C 群ロタウイルスとアデノウイルスを、第二のグループはアストロウイルス、ノロウイルス、サポウイルスを含むものである。ロタウイルスの遺伝子型分析は特異プライマーを用いた PCR か、VP4 または VP7 遺伝子のダイレクトシーケンスで行った。後者の場合は新規のまたは新興するロタウイルスバリエーションにおけるアミノ酸変異を検出するためにアライメント解析を

行った。ノロウイルスとサポウイルスの遺伝子解析は、キャプシド領域の遺伝子でそれぞれの遺伝子群および遺伝子型の reference strain と本研究の strain を核酸、およびアミノ酸レベルで比較して行った。それに加えて、ノロウイルスとサポウイルスのポリマーゼ領域の配列も組み換えウイルスの発見やそのブレイクポイント解析のために行われた。

本研究では、急性胃腸炎の小児に 6 種の下痢原性ウイルスが存在していることが示された。しかし、B 群ロタウイルスは検出されなかった。全体として検査した便検体の 35.9% から下痢原性ウイルスが検出された。ロタウイルスは 1,650 個の検体のうち 258 個、15.6% から検出された。ロタウイルス感染症の主なピークは 3 月から 4 月にかけてであった ( $P < 0.05$ )。特に興味深いのは、2003 年から 2004 年にかけて新規バリエーションのロタウイルス G3 が 97.6% という高い検出率をもって初めてみられたという点である。このバリエーションのロタウイルス G3 は 1990 年から 1995 年に日本で流行していた株とは相同性が低く、16 個のアミノ酸変異を認めた。これは特に、VP7 遺伝子の A および C 抗原領域に認められた。他の流行株である G1 や G4、G9 は検出されなかった。興味深い事に、2004 年から 2005 年にかけては 50%、2005 年から 2006 年にかけては 72.7% という高い検出率でロタウイルス G1 が再度最流行株として認められた。G 遺伝子型は全ての検体において決定できたのであるが、P 遺伝子型に関しては一般的な特異プライマーでの RT-PCR を用いても 32 検体において決定できなかった。このため、遺伝子解析が行われ、結果的にこれらのうち 31 検体は、P[8]であることが証明された。興味深い事に、このロタウイルス P[8]は VP4 遺伝子のプライマー結合部に 4-6 個のミスマッチがあることが判明した。ロタウイルス G1 内の遺伝子学的多様性をさらに理解するために、11 の lineage と 17 の sublineage に分類する新規の分類法を考案した。それぞれの lineage、sublineage に特異的なアミノ酸変異が 34 個認められた。注目に値することとして、VP7 遺伝子の 29-75 および 211-213 番目のアミノ酸において、2 つの短いモチーフを認め、これらが樹形図解析における lineage および sublineage に分ける決め手となることが明らかになった。日本においては、ロタウイルス G1 に関しては少なくとも 3 つの異なるクラスター (sublineage 1a, sublineage 1d, sublineage 2c) が流行していることが判明した。これらの中で、sublineage 1d と sublineage 2c は新規のクラスターとして認められた。これは、近い将来日本においてロタウイルスワクチンが導入された場合に、ワクチン株が流行株に与える影響を評価するための基礎的データとして重要である。もう一つの興味深い発見は、新規の intragenic の組み換えウイルス、Ban-59 を認めたことである。樹形図解析を施行すると、VP7 遺伝子の異なる領域を解析すると、このロタウイルス G1 は異なる lineage4 と 6 に分類されることがわかった。この結果は我々の知る限り、ロタウ

ウイルス G1 における intragenic recombination の報告として初めてのものである。この現象はロタウイルス G1 の進化に関する知識を深め、遺伝子学的多様性の起源を知る上で重要である。

11.6%の検体においてノロウイルスが陽性であり、11月から1月にかけて主なピークがみられた ( $P < 0.05$ )。ノロウイルスは8個の遺伝子型 GI/1, GI/4, GII/1, GII/2, GII/3, GII/4, GII/6, GII/7 に属していた。2003年から2004年にかけて GII/3 が GII/4 より多く最流行株として検出された。2003年から2004年にかけて検出された GII/3 は 5424JP/03-04 以外は GII/4 のポリメラーゼと GII/3 のキャプシドによる新規の組み換えウイルスであった。5424JP/03-04 は GIIb のポリメラーゼと GII/3 のキャプシドによる新規の組み換えウイルスであった。本研究は日本において GIIb が存在している事を示した最初の研究ということになる。さらに興味深い事に、GIIb は2004年から2005年にかけてまったく検出されなかったのが、2005年から2006年にかけて日本で GIIb を含めたこの2つの組み換えウイルスが最流行株となったということである。明らかに、組み換えが起きる事によって新規の株がヒトにおいて流行することがありうる。2003年から2004年にかけて4%しかなかった GIIb が2005年から2006年には81.5%にまでなったということは、このウイルスが日本において、病原性が高かった事を示唆している。GII/3 の新規の組み換えウイルスが流行している際に、2002年から2003年に75.6%と流行していた GII/4 が2003年から2004年に34.5%、2005年から2006年に37.2%と急速に検出率が低下した。2004年から2005年にはノロウイルス GII/4 は80.5%の検出率で再度、最流行株となった。2004年から2005年に検出されたノロウイルス GII/4 は2003年から2004年および2005年から2006年に検出されたものとは、同じ遺伝子型に属しながらも異なるクラスターを形成していた。その他の興味深い発見は、今までに報告のない intergenotype の組み換えウイルス Hokkaido133 と、intersubgenotype 組み換えウイルス Miami292 が検出されたことである。これらは、ノロウイルスにおいて intersubgenotype 組み換えウイルスの報告としては初めてであり、ノロウイルスにおいては組み換えのスピードがはやいことを示すものとして意義深い。

一方、全体として、62個、3.8%の検体からサポウイルスが検出された。2003年から2004年にかけては、ピークは6月であったのが、2004年から2006年にかけては11月であった ( $P < 0.05$ )。2003年から2004年のサポウイルスは、genogroup I の中で genotype 1 と 6 に分けられ、それぞれ92.9%と7.1%を占めていた。2004年から2005年にかけては、GI/1 が13%と低い検出率であったのに比して GI/6 が74.2%と高い最流行株となった。珍しいサポウイルスである GI/2 と GI/8 がそれぞれ2

検体で検出され、6.4%を占めていた。これらを併せて考えると、日本において急性胃腸炎に関連するサポウイルスの遺伝子型に関して、珍しいGI/6が流行してきているという、遺伝子型の推移の初めての報告となる。2005年から2006年にかけてGI/1が再度最流行株として82.3%という高い検出率をもって認められた。対照的に、それまで多かったサポウイルスGI/6は2005年から2006年には急速に減少した。一方で、検出されたGI/6のほとんど(78.3%)が大阪で検出されており、これはGI/6による小児のアウトブレイクとしては初めての報告となり、このウイルスの脅威を印象づけるものである。GI/1のポリメラーゼとGI/8のキャプシドをもつ5862JP/04-05と5821JP/04-05を検出し、新規の組み換えウイルスがgenogroup Iでも起きている事、また日本国内で組み換えが起きている可能性を示唆する報告としては、本研究が初めてのものである。これはgenogroup Iにおける組み替えの頻度が極めて低いためにこれまで検出が難しかったことによる。さらに、私の遺伝子分析によると、サポウイルスは7個の遺伝子型に分類されると考えられた。