

氏名	井手 富彦
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙第519号
学位授与の日付	平成28年3月10日
学位論文題名	Whole Genomic Analysis of Human G12P[6] and G12P[8] Rotavirus Strains that Have Emerged in Myanmar 「ミャンマーにおけるヒトロタウイルスG12P[6]およびG12P[8] 株の全塩基配列に基づく遺伝子解析」 PLoS ONE 10(5): e0124965. doi: 10. 1371. 2015. 5
指導教授	谷口 孝喜
論文審査委員	主査 教授 吉川 哲史 副査 教授 辻 孝雄 教授 吉田 俊治

## 論文内容の要旨

### 【目的と意義】

ロタウイルスは、冬季乳幼児嘔吐下痢症における重症急性胃腸炎の主要な病原ウイルスである。ロタウイルス胃腸炎により、発展途上国を中心として年間40万人以上の乳幼児死亡の原因となっている。感染性は極めて高く、感染性ウイルス粒子1~100個で感染が成立する。よって、衛生状態をいかに改善しようとも、その制御は困難とされ、先進国においても、ほぼすべての乳幼児が5歳までに感染し、発症すると報告されている。そこで、2006年に開発された2種の経口弱毒生ワクチンRotaTeqとRotarixは100か国以上で認可され、多くの国で定期接種化されており、その効果は極めて高いことが確認されている。ロタウイルスのゲノムは11本の分節した二本鎖RNAより構成され、6種の構造蛋白質(VP1~VP4, VP6, VP7)と6種の非構造蛋白質(NSP1~NSP6)をコードしている。ロタウイルスの遺伝子型は多様で、中和抗原VP7の遺伝子型であるGタイプはヒトではG1~G4, G9が主要である。また、地域により、G5, G8, G12など稀なGタイプが高頻度で分布する場合がある。G12については、最近世界各地で検出されているが、アフリカ諸国、ネパールなどでの高頻度の分布が報告されている。本研究では、ミャンマーにおいて検出された6株のG12株の全ゲノムシーケンスを決定し、系統解析により各遺伝子の系統関係を明らかにすることを目的とした。

### 【材料と方法】

2011年1月~3月に収集した、ミャンマーのDefense Services Obstetrics, Gynecology and Children Hospitalでの生後2か月~3歳の胃腸炎患者便の中で、ロタウイルス陽性54例のうち、G12と型別されたロタウイルス株のうち6例からRNAサンプルを抽出し、次世代シーケンサーMiSeqを用いて全ゲノムシーケンス解析を行った。得られたcontigシーケンスのBLAST(Basic Local Alignment Search Tool)検索から、これら6株の全ゲノムシー

ケンスが得られた。これら全ゲノムシーケンスを用いてRotavirus Classification Working Groupが提唱する、11遺伝子の個々の遺伝子型を並べて示す方式(VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5)に基づく全遺伝子型を決定した。さらに、MEGA6.06で11本の各遺伝子の系統解析を行った。

### 【結果】

ミャンマーでのGタイプ分布は、G2: 24例, G12: 17例, G1: 1例, G2+G12: 12例で、G12が混合感染例も合わせて54例中29例(53.7%)と高頻度に検出された。6株のG12株のうちG12P[8]である5株: A14, A25, P02, P39, P43の全ゲノムシーケンスに基づく全遺伝子型は、G12-P[8]-II-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1であり、一方、G12P[6]であるA23の全遺伝子型は、G12-P[6]-II-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1であった。これら6株のG12株のVP7遺伝子においては、G12のプロトタイプであるL26株(フィリピン、1987)とは88.9~90.7%、代表的レファレンス株であるT152株(タイ、1998)とは94.8~97.3%の一致率であった。系統解析では、G12P[8]の5株は互いに極めて類似しているが、G12P[6]であるA23は全11遺伝子分節がいずれも他の5株とは異なるクラスターに属することが明らかとなり、少なくとも起源の異なる2種類のG12株(ともにWa遺伝子群を基本骨格とする)がミャンマーに出現したことが推測された。また、A23のNSP4遺伝子は、ウシロタウイルス由来の遺伝子と類似しており、A23がウシロタウイルスとの遺伝子再集合体である可能性が示された。

### 【考察】

6株のG12株の全ゲノムシーケンス解析から、ミャンマーにおいては、少なくとも由来の異なる2種類のG12株が分布していることが推測された。ミャンマーでは高頻度にG12株が検出されており、11本の遺伝子分節の変異の推移や、現行のワクチンがこれらG12株に対しても十分に効果的であるかどうかについて追跡する必要がある。地域や年により異なるGおよびPタイプの分布状況の把握は、ワクチンの効果を検討する上で重要な基礎データを提供すると考える。また、MiSeqシーケンサーによる全ゲノムシーケンス解析は、G12株のような新興ロタウイルスの進化過程を精確に理解する助けとなるばかりでなく、非定型的ロタウイルス株の出現を迅速に高精度に把握するためにも有効であると思われる。

## 論文審査結果の要旨

本研究では、ミャンマーの小児病院で分離されたロタウイルスについて、次世代シーケンサーを使用し分子疫学的解析を行っている。ロタウイルス胃腸炎の予防を目的として弱毒生ワクチンが広く使用されるようになったが、一方でワクチン導入に伴うherd immunity効果により流行ウイルスの遺伝子型変化が懸念されている。中和抗原VP7の遺伝子型であるGタイプはヒトではG1~G4, G9が主要である。しかしながら本研究では、ミャンマーにおいてはG12株が53%程度を占めていることを明らかにしたうえで、次世代シーケンサーMiSeqを用いて得られた6株のG12株の全ゲノムシーケンスを決定し、系統解析により各遺伝子の系統関係を明らかにした。その結果、G12P[8]の5株は互いに類似しているが、G12P[6]であるA23は全11遺伝子分節がいずれも他の5株とは異なるクラスターに属することが明らかとなり、少なくとも起源の異なる2種類のG12株がミャンマーに出現したことが推測された。また、A23のNSP4遺伝子は、ウシロタウイルス由来株と類似しており、A23がウシロタウイルスとの遺伝子再集合体である可能性が示された。以上より、本研究は国際共同研究に基づく次世代シーケンサーを使ったロタウイルスに関する分子疫学的解析で、新知見を含み、かつ国際的な評価を得た医学専門誌に掲載されていることから学位論文として適切と判断した。