

ロタウイルスワクチン をめぐる話題

国立感染症研究所

ウイルス第二部第一室

片山和彦

ロタウイルスの歴史

ロタウイルス（レオウイルス科）

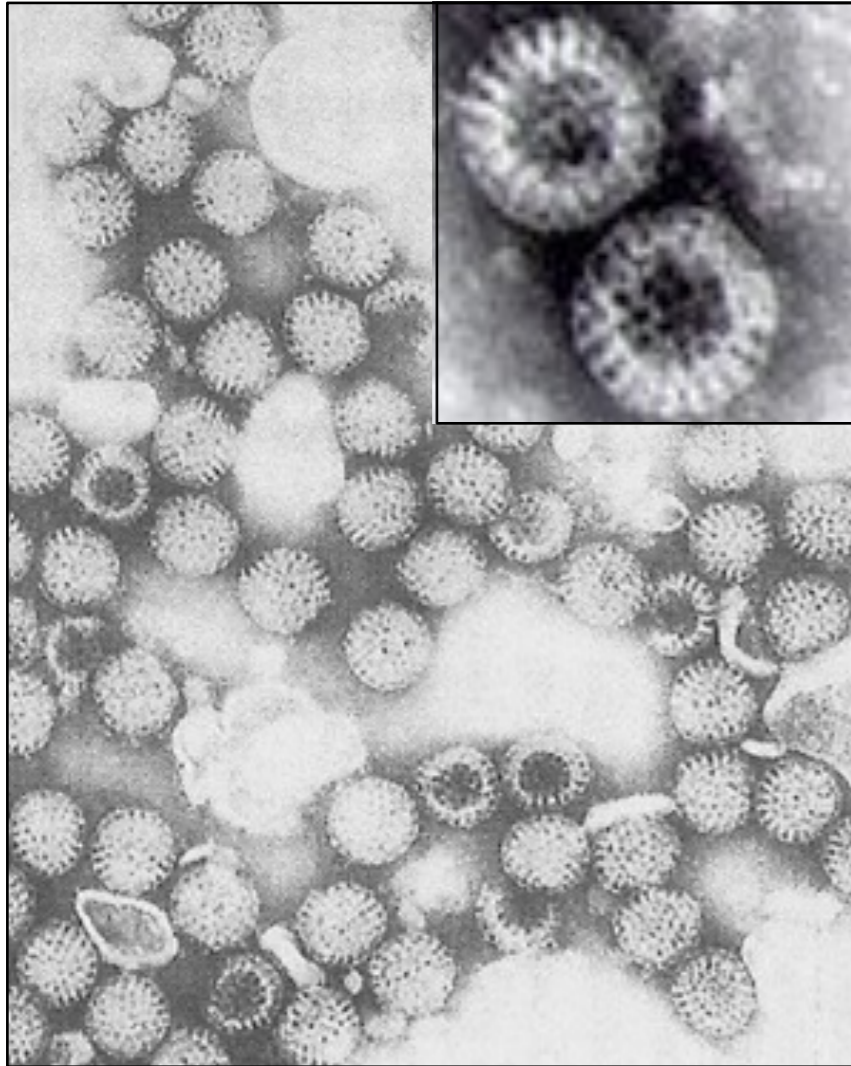


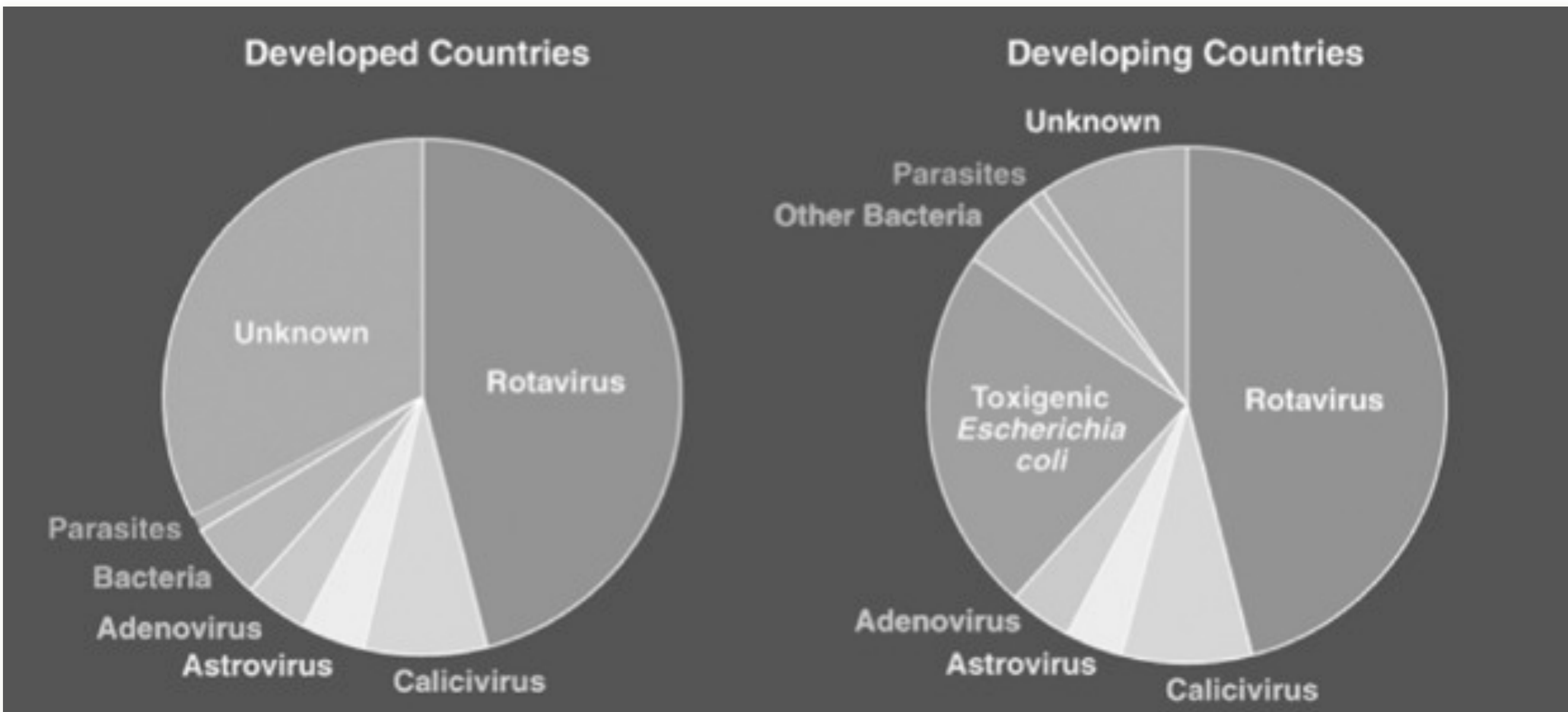
Photo from Dr. Kapikian.

- 1973年、オーストラリアのDr. Bishopが下痢症患者の便から原因と思われるウイルスを発見。
- その形状からロタウイルスと命名。「ロタ」はラテン語で「車輪」を意味する。
- このウイルスが乳幼児の重傷下痢症の主な原因であることが判明。
- 培養細胞で培養可能。
- ワクチン開発
 ロタシールド（1998年）・・・1999年撤収
 ロタリックス（2004年）
 ロタテック（2006年）
- 2011年～2012年日本でワクチン接種開始。

重症下痢症の原因となる病原体の割合

先進国

発展途上国



ロタウイルスは、入院を必要とする重症下痢症症例の半数近くを占める。

ロタウイルス感染症の概要

感染経路：糞口感染（ヒト→ヒト感染）

潜伏期間：2～4日

ウイルス排出は発症から3～5日後がピーク。
ウイルスの増殖能は非常に高い。
患者の便1 g中には数億～数兆個（ 10^{12} 個）
のウイルス粒子が含まれる。

臨床症状：下痢（白色水様便）・嘔吐 → 脱水症

発熱・腹部不快感・肝炎・腎炎・心筋炎・脳炎（脳症）・
胆道閉鎖症・腸重積

患者数：ロタウイルス感染症による死者数は世界で年間50-60万人。

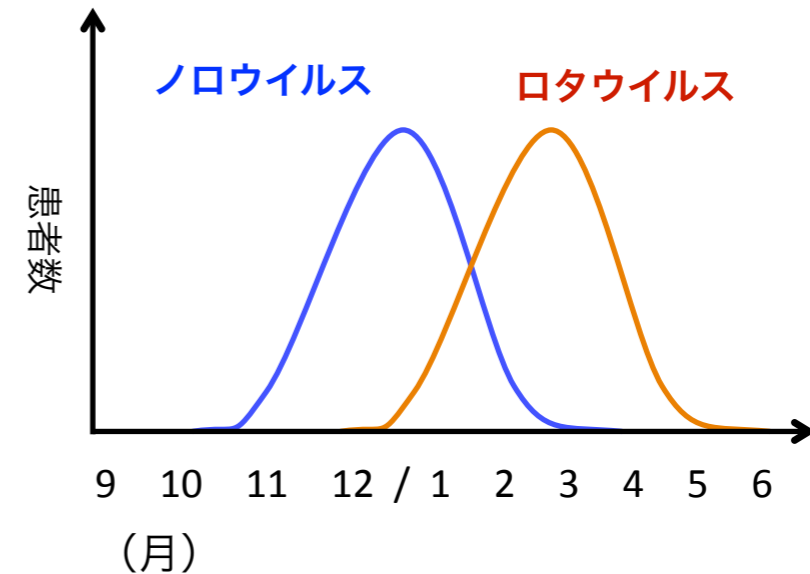
先進国でも、5歳までにほぼ100%がロタウイルスに一度は感染する。

我が国では年間患者数は80万人、入院数は7-8万人、死亡数は10人前後。

就学前小児がロタウイルス感染症で受診する確率は約50%。

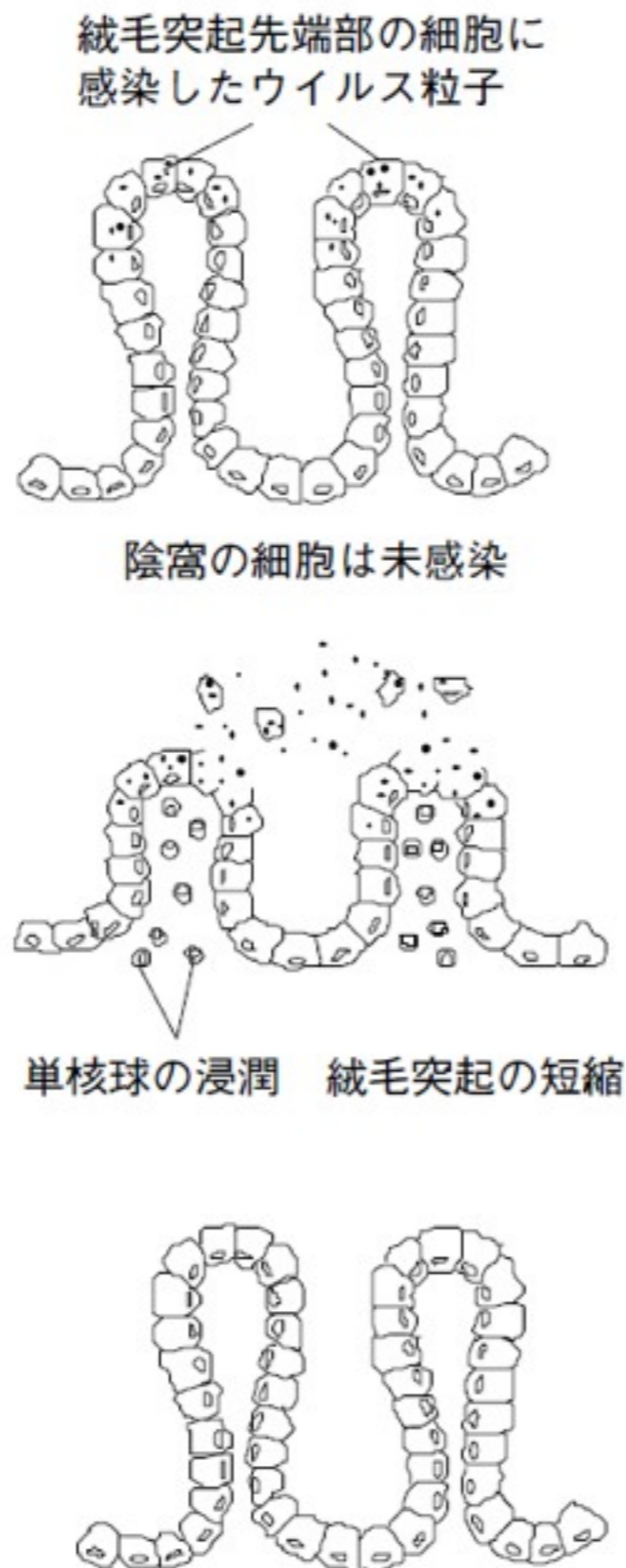
感染者の15人に1人が入院、40人に1人が重症化する。

ウイルス性胃腸炎の発生推移



ロタウイルスの感染病理

感染
↓
発症 (2~4日)
↓
回復 (6~7日)



腸管内に侵入したロタウイルスが絨毛突起先端部の上皮細胞に感染

↓

増殖したウイルス粒子の腸管腔内への放出

↓

感染細胞は破壊され、上皮の脱落。この結果、糖、水分、塩の吸収不良

↓

腸管腔内での水分の増加

↓

下痢および脱水

↓

主として細胞性免疫によるウイルス感染細胞の排除

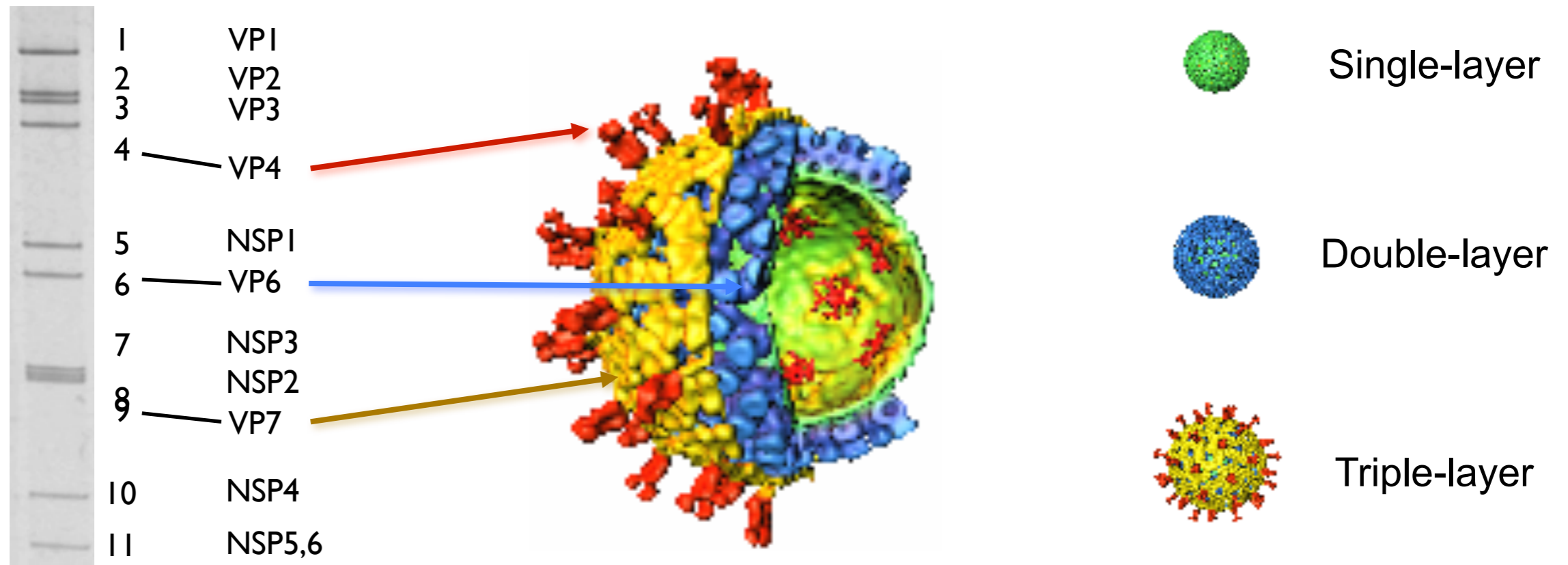
↓

陰窩の細胞が分化し、絨毛上皮を修復する

↓

組織学的回復

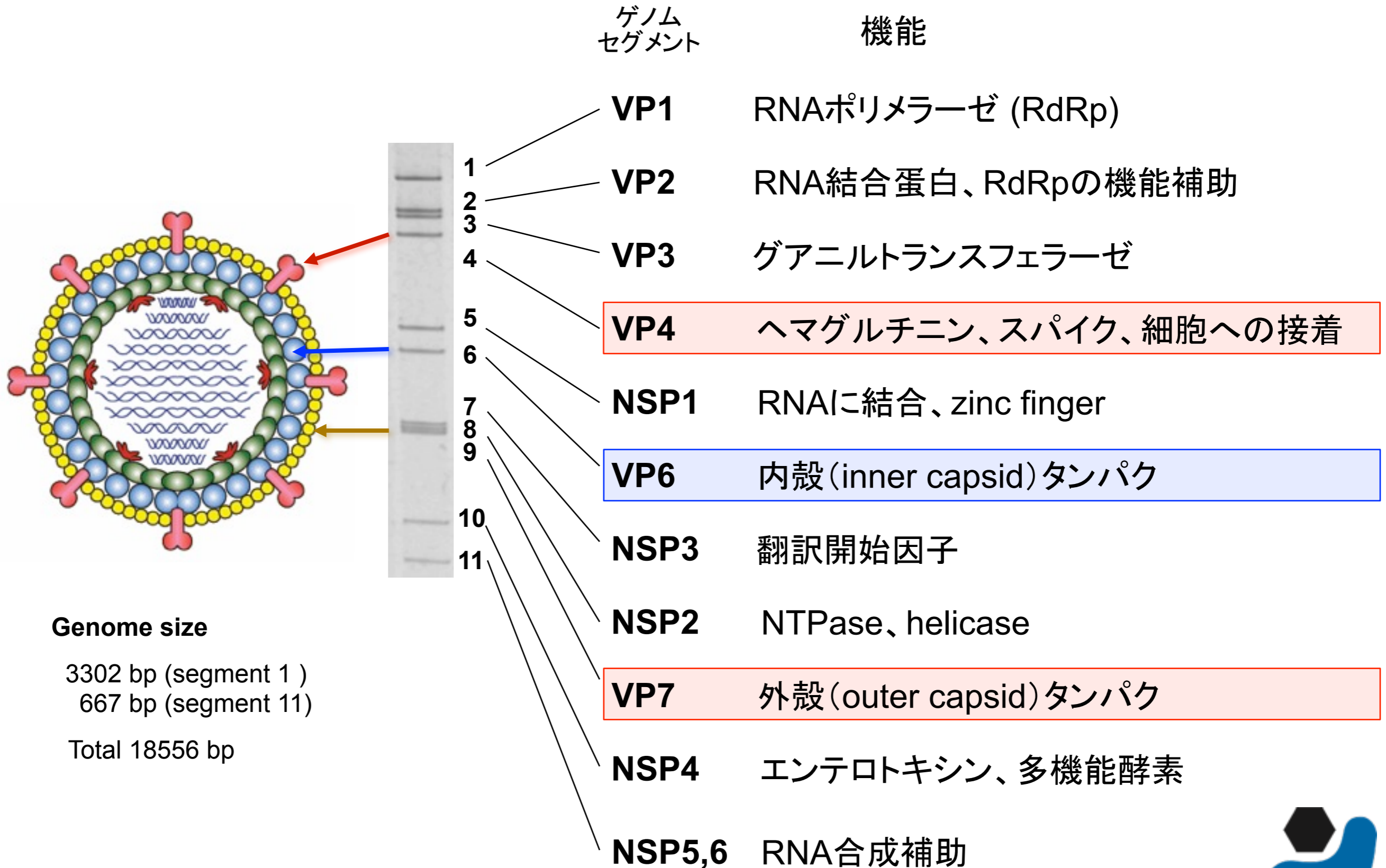
ロタウイルスの形状と性質



Double stranded
11 segment RNA

- ゲノムは2本鎖RNA。11本の遺伝子分節を持つ。
- 11本の遺伝子は6種類の構造蛋白と6種類の非構造蛋白をコードしている。
- 直径約75 nmの正二十面体構造。(スパイク蛋白(VP4)を含めると約100 nm)
- 外殻、内殻、コア蛋白からなる3重構造を持つ。
- エンベロープを持たない。(石鹼やアルコール消毒は無効)
- 培養細胞で継代可能。(トリプシンによるVP4の開裂が必要)

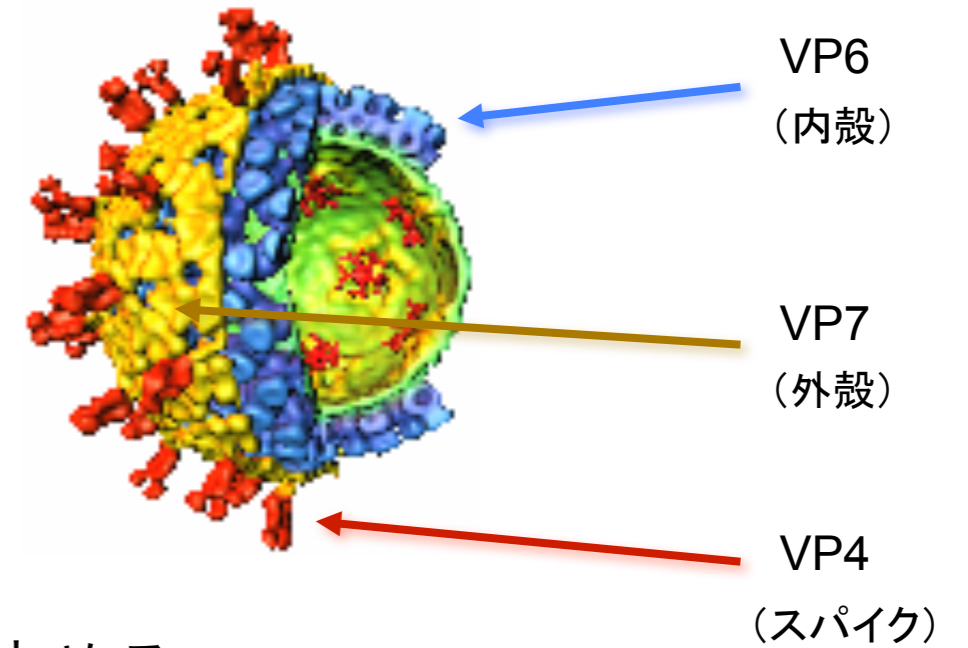
ロタウイルスのゲノム構造と機能



ロタウイルスの分類

VP6の血清型に基づき7群に分類される

ヒトへの感染が認められているのはA, B, C群のみ。



群
(Serogroup)

A ヒトロタウイルス感染症の大部分を占める。

B 一部の地域で数件報告されているのみ。

C たまに集団感染例が報告される。(2%程度)

D ブタ、ウサギ、鳥類

E ブタ

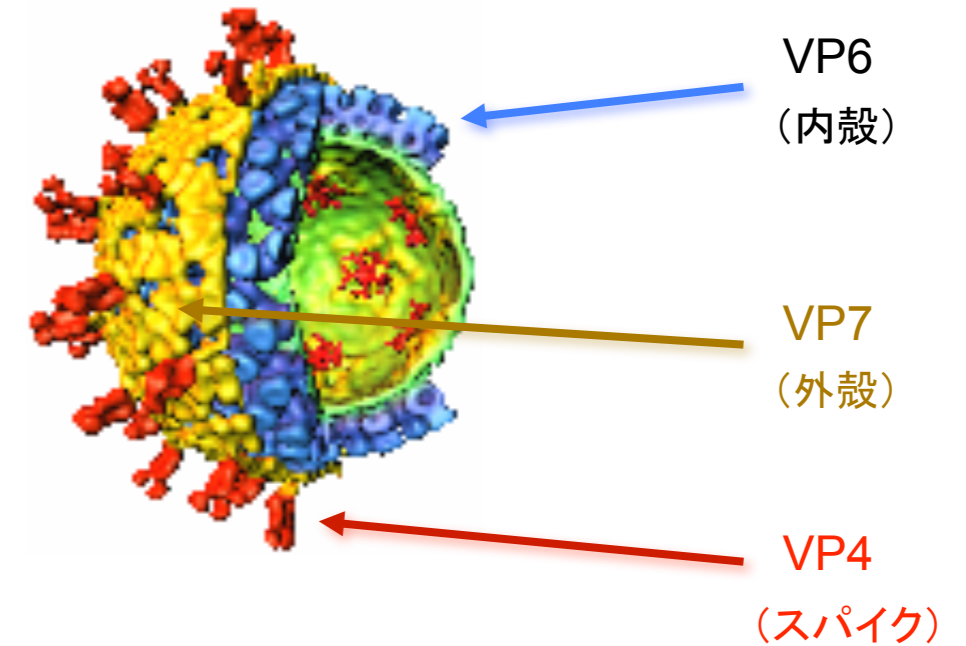
F 鳥類

G 鳥類

ヒトへの感染例は無い

ロタウイルスの分類

A群ロタウイルスは遺伝子の相同性に基づいて各遺伝子型に分類される。(80%以上なら同型)
特に疫学調査にはG type (VP7) とP type (VP4) の組み合わせが用いられる。



遺伝子型	血清型
例) Wa株	G1P[8] P[8] = P1A = P1A[8]
DS-1株	G2P[4]

G typeは27種 (ヒトは11種)、P typeは35種 (ヒトは13種) 存在している。
野外株の90%はG1P[8]、G2P[4]、G3P[8]、G4P[8]、G9P[8]で占められている。

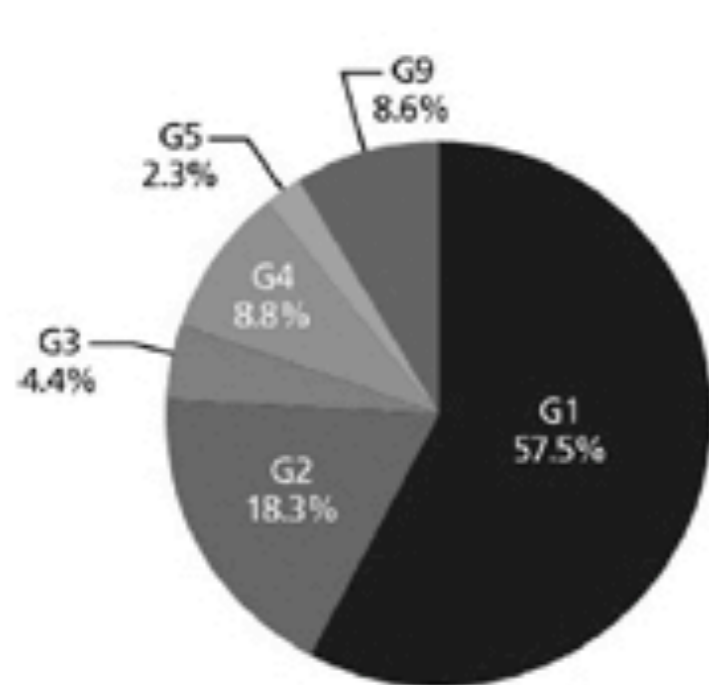
11本の全遺伝子分節に基づく遺伝子型分類法

VP7 - VP4 - VP6 - VP1 - VP2 - VP3 - NSP1 - NSP2 - NSP3 - NSP4 - NSP5

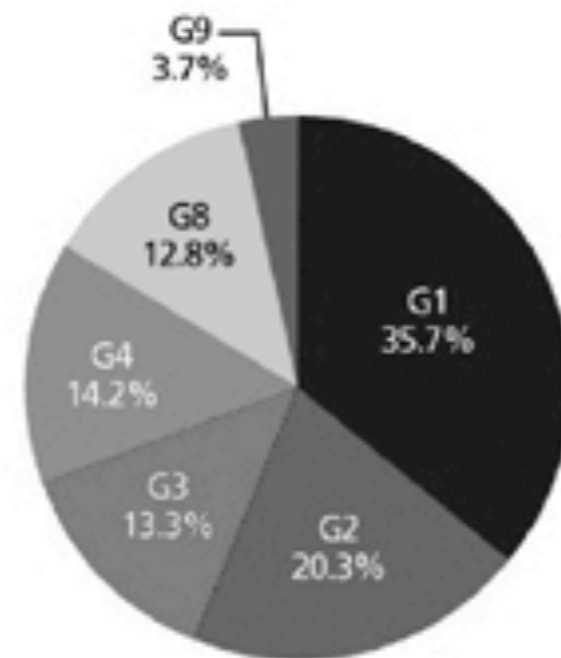
Wa株	G1-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1
DS-1株	G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2

Segment	Gene name	Genotype
1	VP1	R
2	VP2	C
3	VP3	M
4	VP4	P
6	VP6	I
9	VP7	G
5	NSP1	A
8	NSP2	N
7	NSP3	T
10	NSP4	E
11	NSP5	H

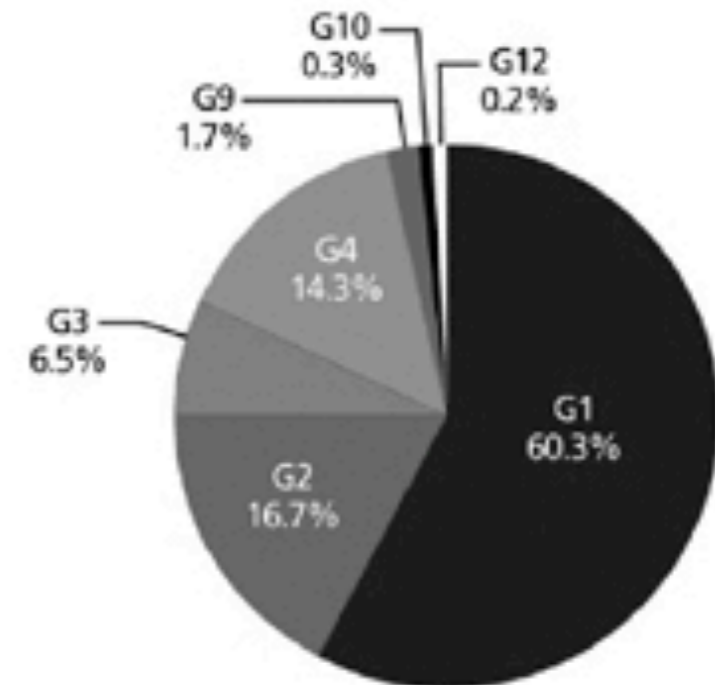
Distribution of Human Group A Rotavirus G Serotypes by Review of Strains (N=45,571) Collected 1973-2003



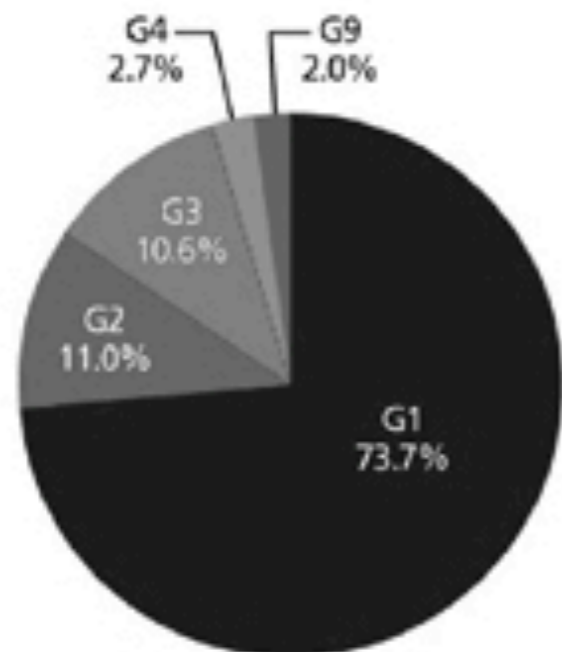
South America & Nicaragua
(n = 2950)



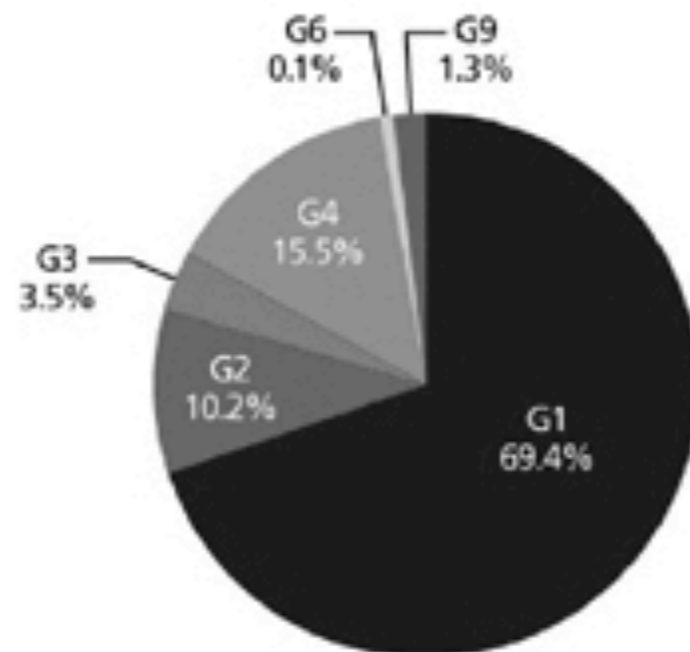
Africa
(n = 2133)



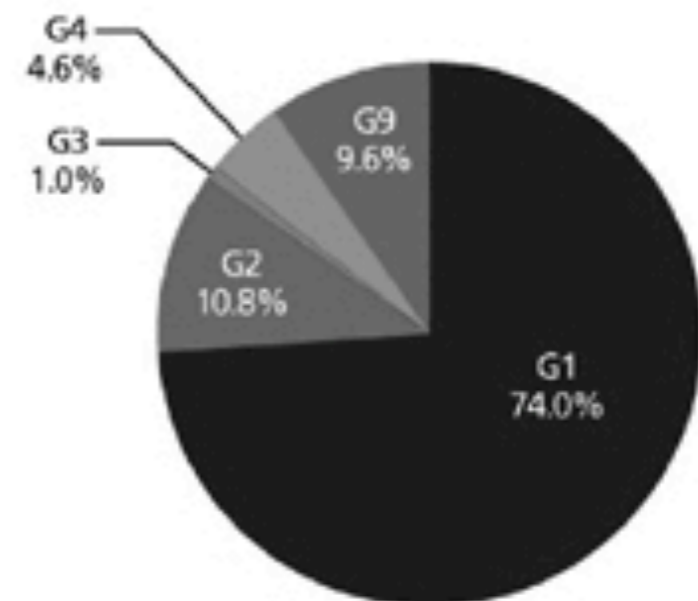
Asia
(n = 13126)



North America
(n = 2892)

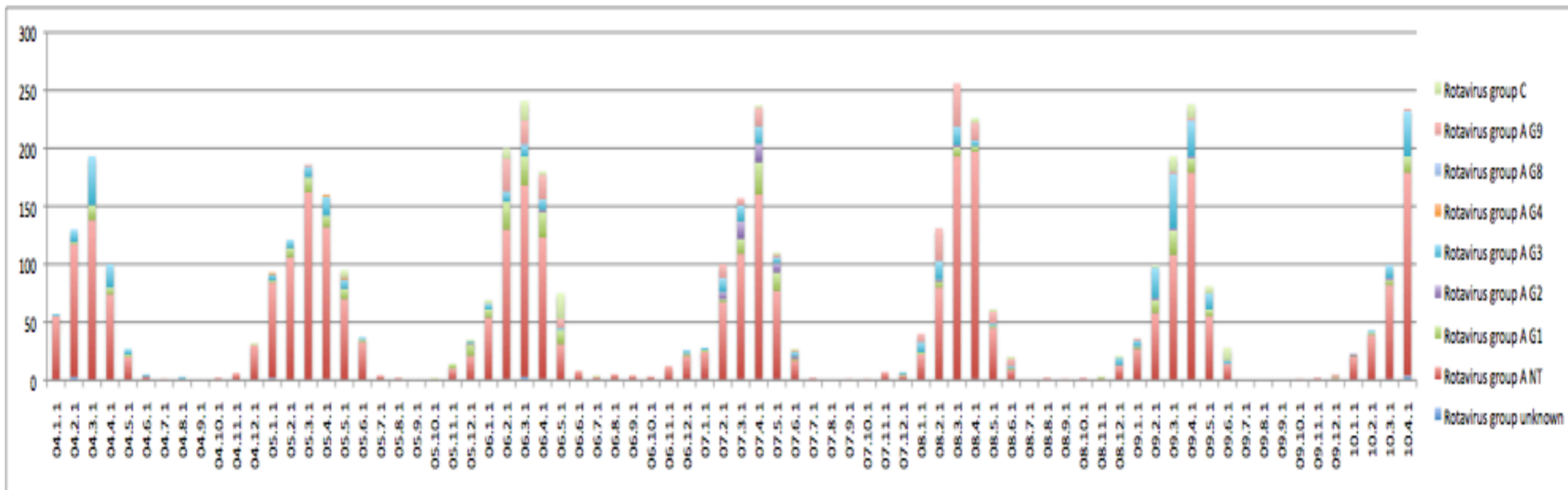


Europe
(n = 17475)



Australia/Oceania
(n = 6995)

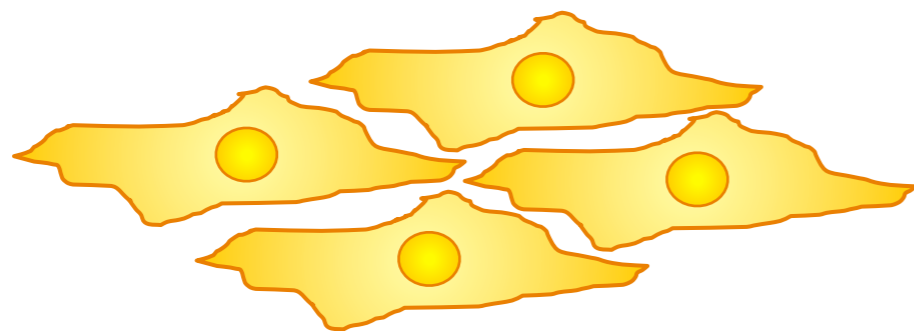
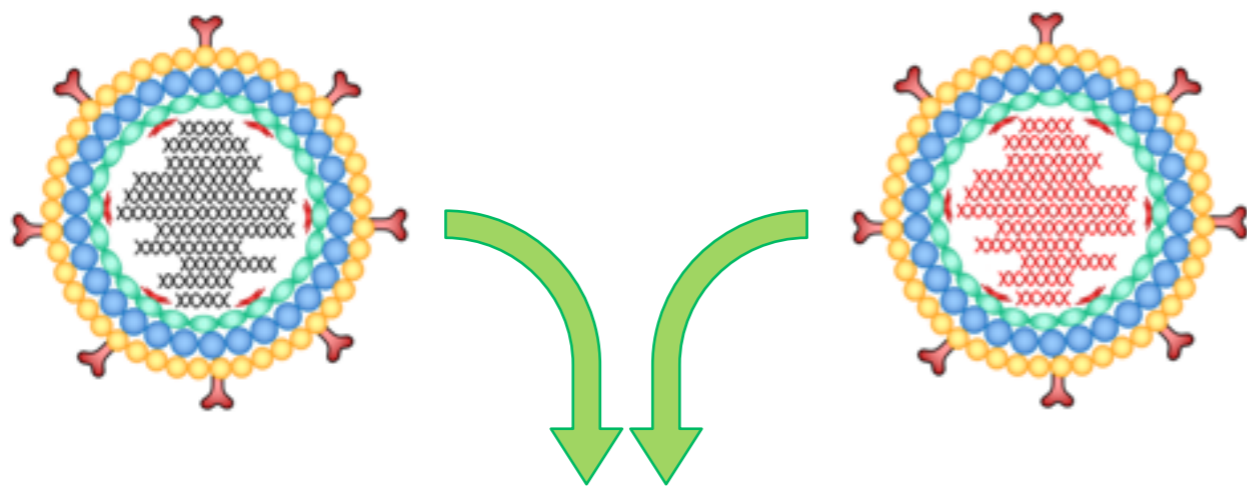
日本におけるロタウイルスサーベイランス(2004-10)



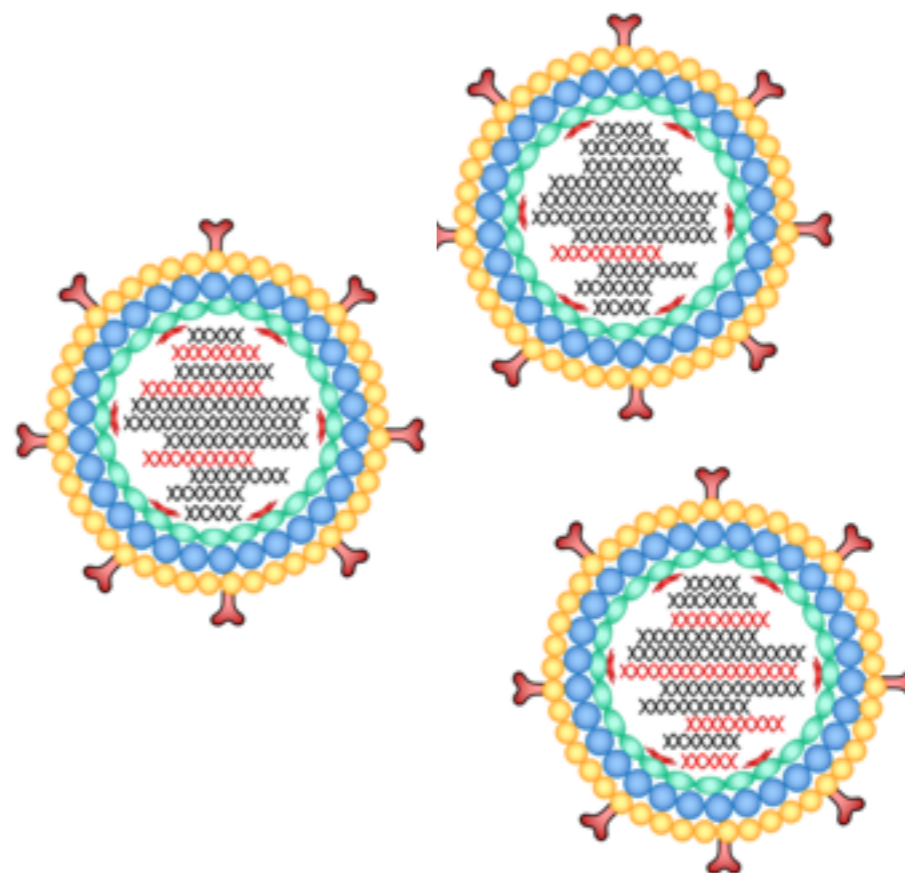
ロタウイルス型別の検出割合(2004-10)



ロタウイルスの遺伝子再集合(リアソートメント)



異なる型のウイルスが同時に感染すると
遺伝子が組み換わったリアソータントが
出現する。



ロタウイルスワクチン

第一世代

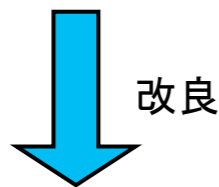
ロタシールド(**RotaShield**)

サルロタウイルスをベースにしたリアソータントの4価の生ワクチン。
被接種者11,000人に1人と推定される腸重積症を副反応として起こす疑いにより市場から撤収。

元来、生後4～10ヶ月は腸重積の好発時期である。
腸重積の好発時期にワクチンを接種していたため、
ワクチンにより腸重積を誘発しやすかった？

サルロタウイルスが腸重積の誘発に関わっている？
(他種のロタウイルスは誘発しない)

・・・腸重積の発症機序については結論は出ていない。



改良

第二世代(現行のワクチン)

ロタリックス(**Rotarix**): ヒトロタウイルスを弱毒化した単価の生ワクチン

ロタテック(**RotaTeq**): ウシロタウイルスをベースにしたリアソータントの5価の生ワクチン

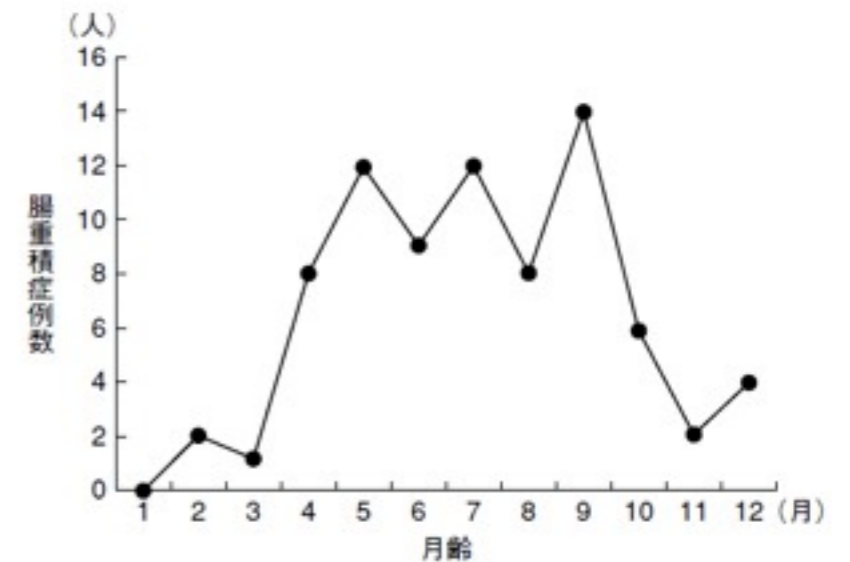


図7 アメリカ合衆国における腸重積症発症の月齢別分布

腸重積症の発生は月齢4～9カ月にピークがあり、月齢1～3カ月にはきわめて少なく、この時期に腸重積症を発症するリスクが非常に小さいことがわかる。

Kapikian et al(26)より引用

ロタウイルスワクチン

商品名	ロタリックス	ロタテック
	(GSK)	(MSD)
親ウイルス株	ヒトロタウイルス (G1)	ウシロタウイルス (G6)
構成	単価 (G1P[8])	5価 (G1, G2, G3, G4, P[8])
弱毒化の原理	培養細胞で頻回継代	VP7、VP4以外はウシロタウイルス由来
接種回数	2回	3回
接種時期	6-24週 (4週以上間隔をあける)	6-32週 (4週以上間隔をあける)
利点	接種回数が少ない	多型の免疫原性を有する
日本での販売	2011年11月販売開始	2012年7月販売開始



ロタウイルスワクチン

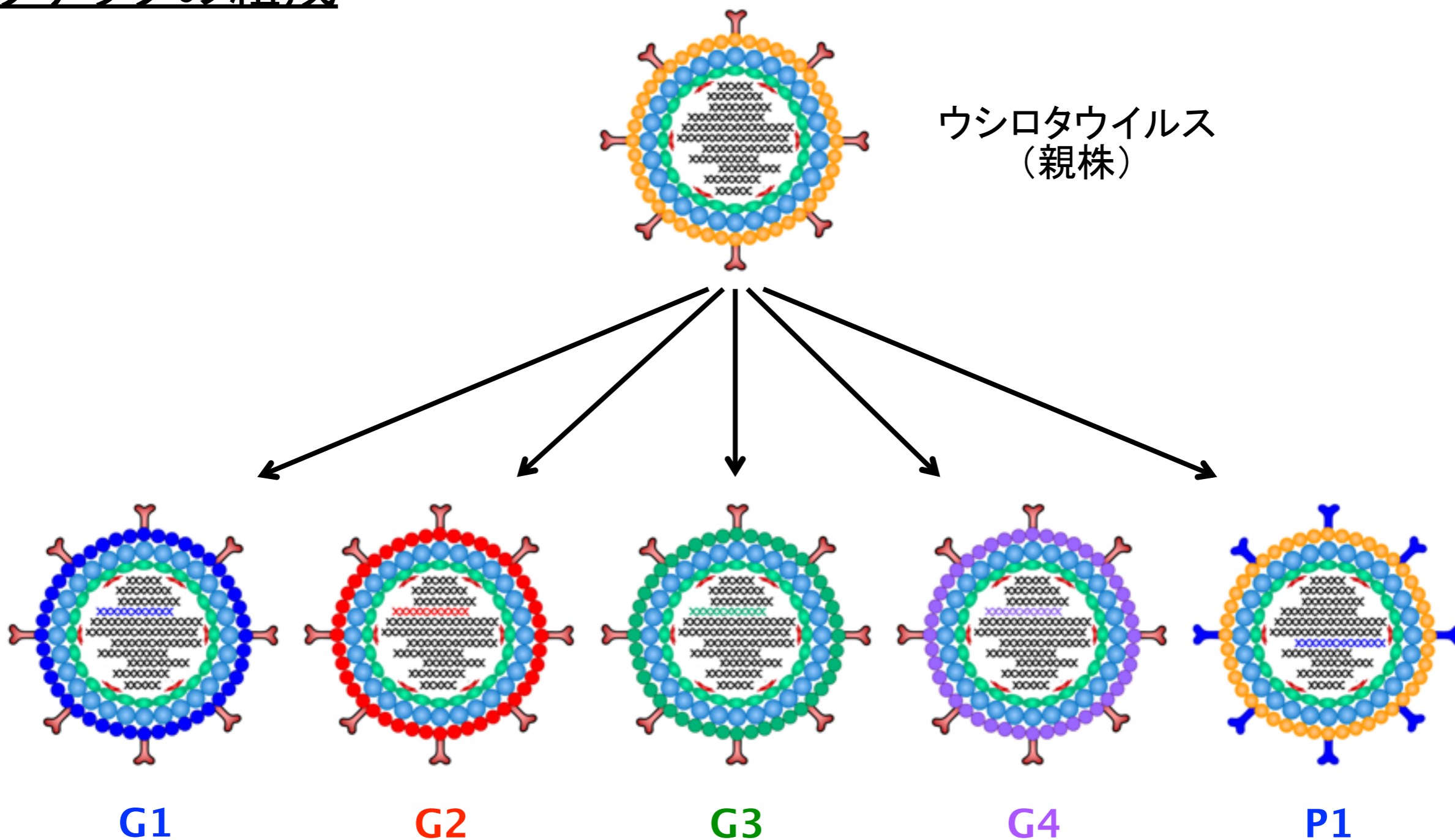
表3 現行の2大ワクチンの腸重積症に関する臨床試験の結果

	追跡期間	対象乳児数		腸重積症		Relative Risk (95% CI)
		ワクチン	プラセボ	ワクチン	プラセボ	
Rotarix	0～31日	31,673	31,552	6	7	0.85 (0.3 – 2.42)
	0～100日	NA	NA	9	16	0.56 (0.25 – 1.24)
	0～1年	10,159	10,010	4	14	0.28 (0.1 – 0.81)
RotaTeq	0～42日	35,150	35,150	6	5	1.20 (0.37 – 3.93)
	0～1年	35,150	35,150	12	15	0.80 (0.35 – 1.71)

Glass et al (23) に基づき一部修正して作成

- いずれのワクチンも腸重積のリスクを上昇させない。
- いずれのワクチンも感染防御率7割、重篤化阻止率9割以上であり、同等の効果が得られる。
- ワクチンの作用機序は不明。
- 生ワクチンであるため、野外株とのリアソータント出現、強毒復帰の可能性が懸念される。
- ワクチン導入前と後のサーベイランス、基礎研究は始まったばかり。

ロタテックの組成



ウシロタウイルスに、ヒトロタウイルスのG1, G2, G3, G4, P1を組み換えた5種のリアソータントウイルスの混合物

アメリカにおけるロタウイルスワクチンの効果

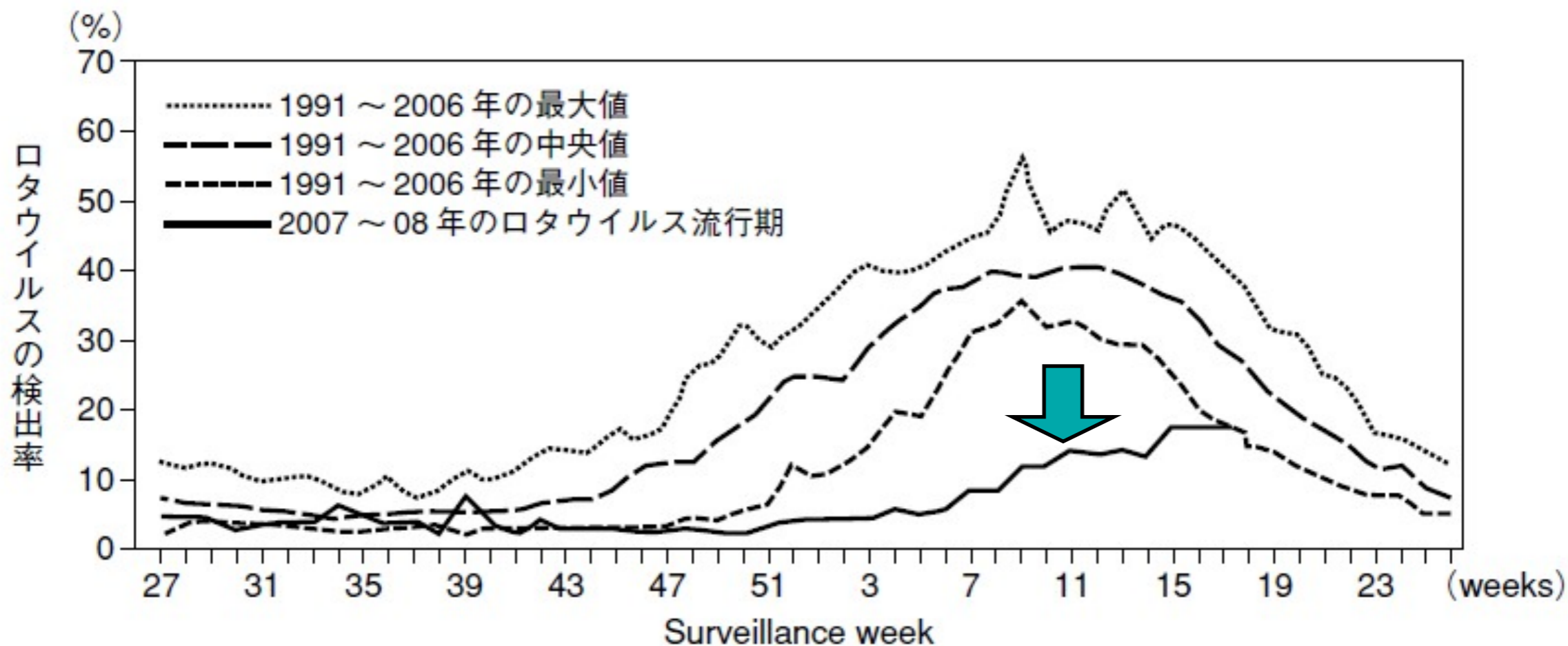


図13 アメリカ合衆国での1991～2006年における胃腸炎患者に占めるロタウイルス検出率の週別変動と2007年から2008年にかけてのロタウイルス流行期における検出率の週別変動との比較

ロタウイルスワクチンの定期接種導入後2年目にあたる2007年から2008年にかけてのロタウイルス流行期における検出率の変動をみると、毎年みられたロタウイルス胃腸炎の発生が明確に遅延し、かつ明瞭なピークが現れないままにロタウイルスの検出率が下がってきていた。これはワクチンが有効に働いていることを示唆していると考えられる。

CDC(40)より引用

ロタウイルスについてのまとめ

- ロタウイルスゲノムは11分節の2本鎖RNAで構成される。
- 乳幼児の重症下痢症の主な原因ウイルスである。
- 内殻タンパク(VP6)の血清型によりA～Gの7群に分類される。
流行株のほとんどはA群ロタウイルス。
- 外殻タンパク(VP7: G type)とスパイクタンパク(VP4: P type)の遺伝子型が流行の把握に重要。
- 複数の株間で容易に遺伝子再集合(リアソートメント)を起こす。

2. イムノクロマト法

市販例



ラピッドテスト<ロタ・アデノ>

感度 $3.4 \sim 4.6 \times 10^4$ TCID₅₀ /mL



ディップスティック '栄研'ロタ

100 ng/mL



イムノカードST ロタウイルス

1.9×10^6 粒子/ mL

特徴：比較的簡便かつ短時間（10～15分）で検出可能。

比較的高感度（ラテックス凝集法の10倍程度）

抗VP6モノクローナル抗体を使用。



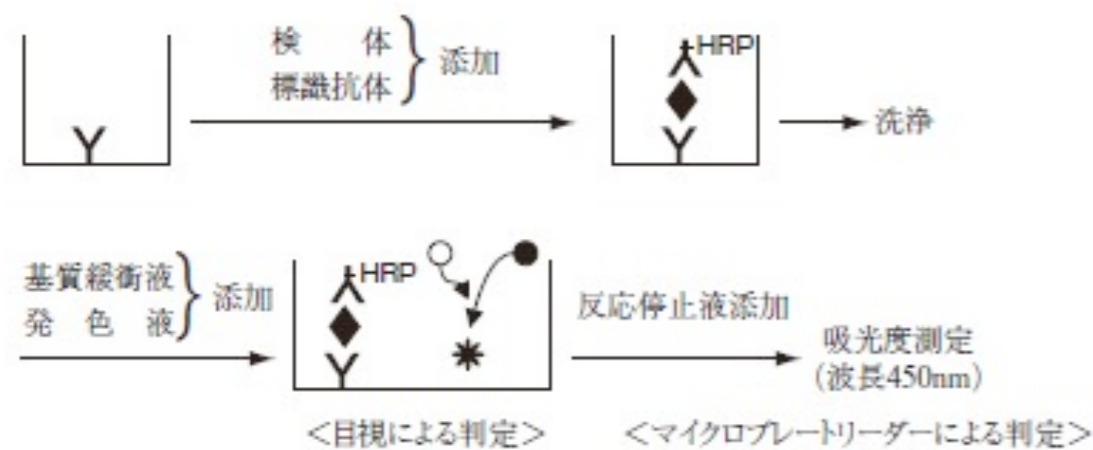
3. ELISA法

市販例：ロタクロン（TFB）

特徴：抗VP6モノクローナル抗体を使用。

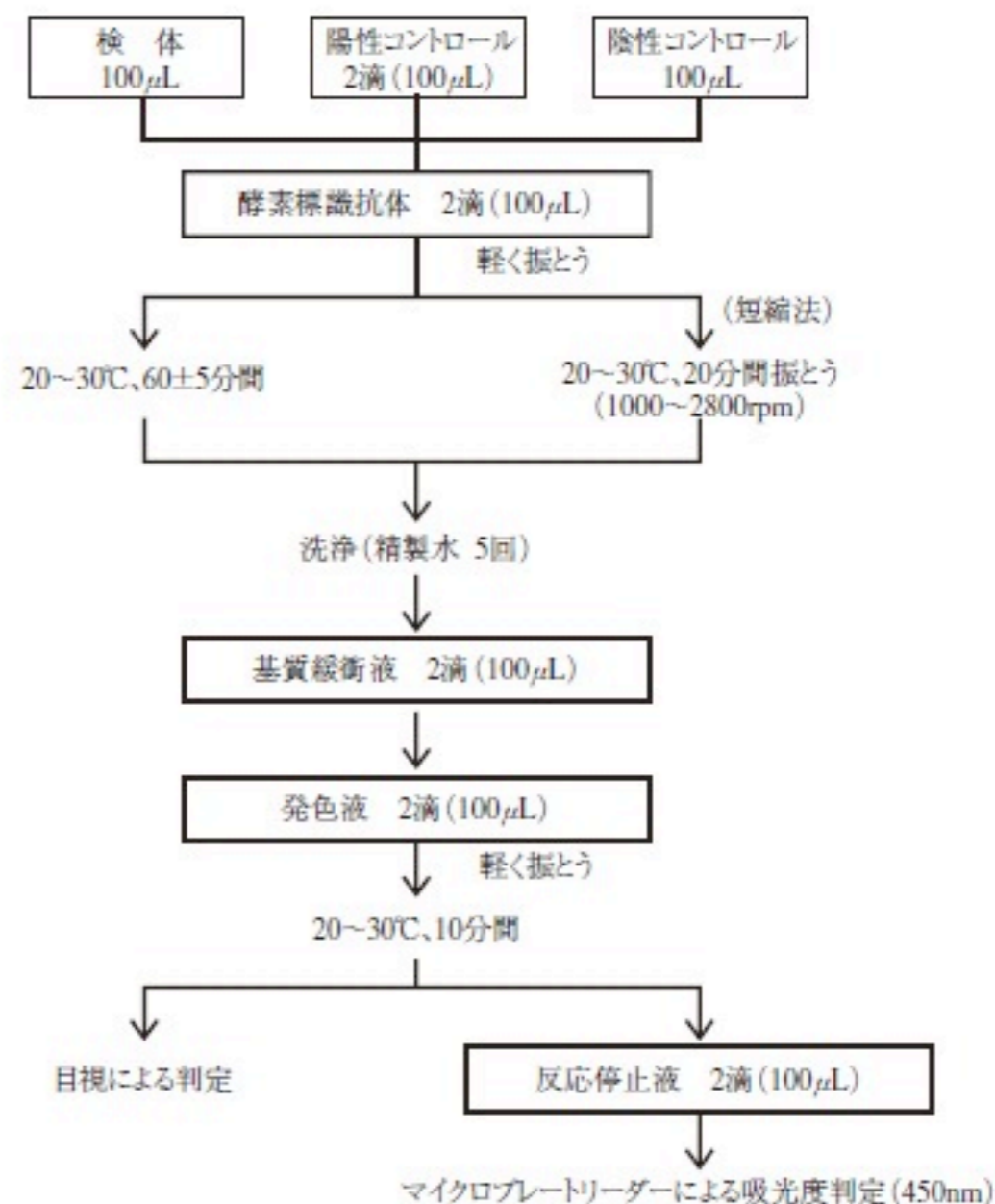
やや煩雑（60～90分）だが高感度（ 1.5×10^6 粒子/mL）。

客観的に定量可能。



- Y : 抗ロタウイルスモノクローナル抗体
- ◆ : ロタウイルス抗原
- HRP : ホースラディッシュペーパーオキシダーゼ標識抗ロタウイルスモノクローナル抗体
- : 基質
- : 発色液
- * : 発色物質

【操作法概略】



4. 電気泳動によるロタウイルスゲノムRNAの検出

○ サンプル（ウイルス培養上清や患者便10%乳剤）から

Trizol LSにてRNAを抽出し、PAGEでRNAのバンドを確認。

ゲル：10% ポリアクリルアミドゲル

バッファー：Tris-Glycine buffer

泳動条件：30mA、3hr

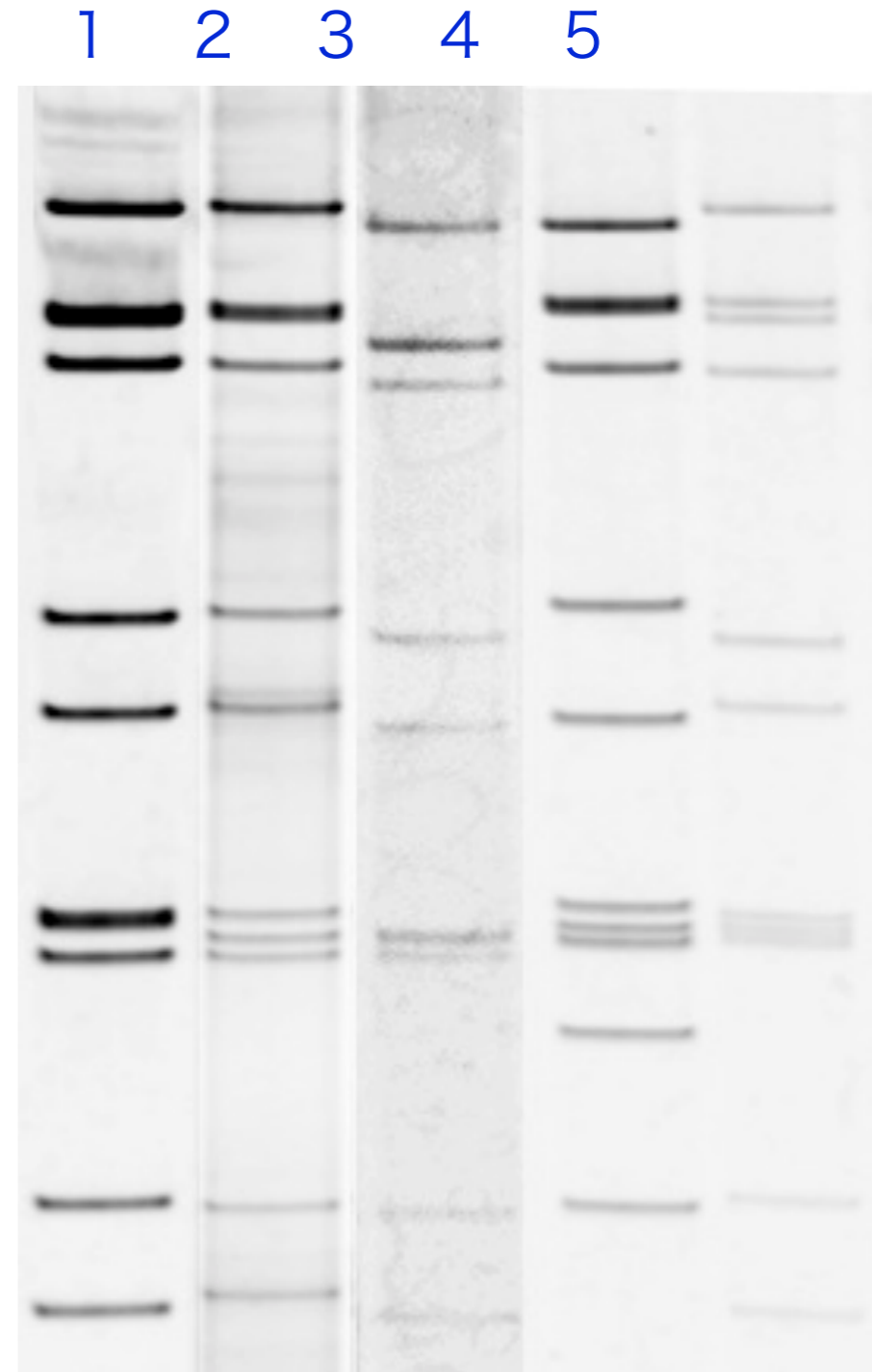
検出：SYBR Gold

1. 患者検体 (G1P[8])
2. Wa (G1P[8])
3. Hochi (G4P[8])
4. 69M (G8P[10])
5. WI61 (G9P[8])

特徴：感度はイムノクロマト法より少し落ちる。

A群以外のロタウイルスも検出可能。

群や遺伝子型まで推定可能。



5. RT-PCRによるロタウイルス遺伝子の増幅・シーケンス解析法

Rotavirus genome (dsRNA)



primers



使用プライマー

Gene		Sequence (5' - 3')	Product size (bp)
VP1	Forward	GGCTATTAAAGCTGTACAATGG	3302
	Reverse	GGTCACATCTAAGCACTCTAATC	
VP2	Forward	GGCTATTAAAGGCTCAATGG	2687
	Reverse	TACAGTTCGTTTATAATGCG	
VP3	Forward	TGCGTTTTACCTCTGATGGTG	2591
	Reverse	TCACATCATGACTAGTGTGTTAAG	
VP4	Forward	TGGCTTCGCTCATTATAGACA	2359
	Reverse	GGTCACATCCTCAATAGCG	
VP6	Forward	GGCTTTAAAACGAAGTCTTC	1356
	Reverse	GGTCACATCCTCTCACT	
VP7	Forward	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCC	1062
	Reverse	GGTCACATCATAACAATTCTAATC	
NSP1	Forward	GGCTTTTTTTTATGAAAAGTCTTGTG	1566
	Reverse	CTAGGCGCTACTCTAGT	
NSP2	Forward	GGCTTTTAAAGCGTCTCAGTC	1059
	Reverse	GGTCACATAAGCGCTTTCTATTTC	
NSP3	Forward	GGCTTTTAAATGCTTTTCAGTGGTTG	1066
	Reverse	GGTCACATAACGCCCTATAG	
NSP4	Forward	GGCTTTTAAAAGTTCTGTTCGAGAG	751
	Reverse	GGTCACATTAAGACCATTCC	
NSP5	Forward	GGCTTTTAAAGCGCTACAGT	664 or 816
	Reverse	GGTCACAAAACGGGAGTGGGGA	

各遺伝子の両端配列に対するプライマーで逆転写およびPCR



PCR products



アガロースゲルでバンド確認、シーケンス解析に用いる

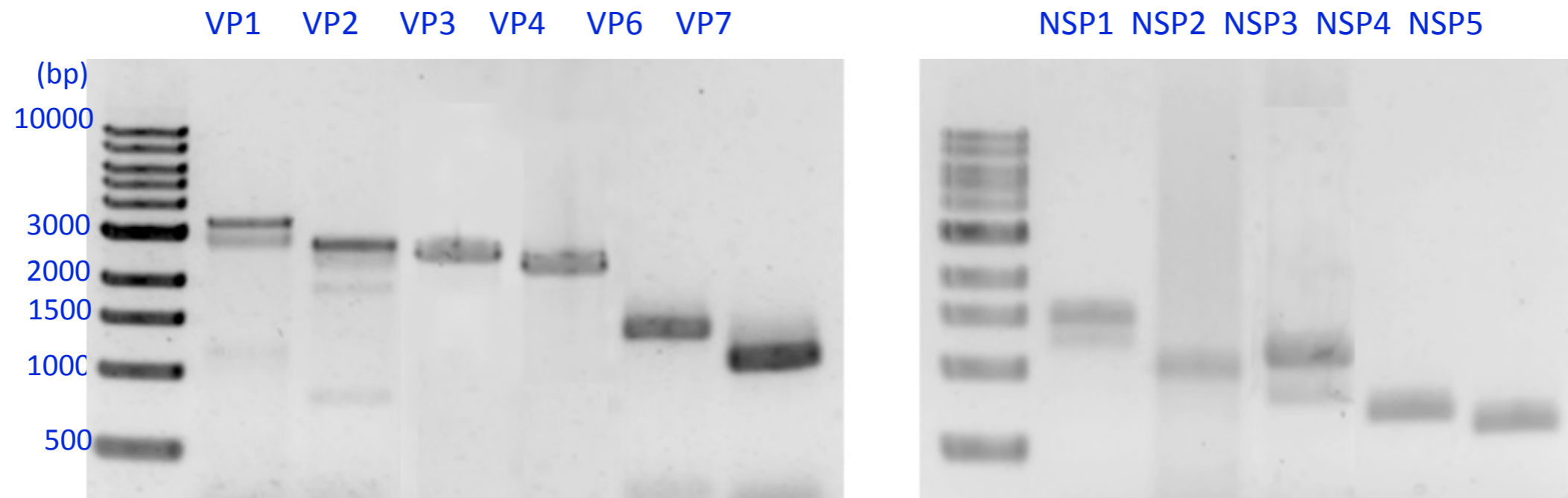
5. RT-PCRによるロタウイルス遺伝子の増幅・シーケンス解析法

サンプル：Wa株

逆転写酵素：PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara)

PCR酵素：Prime STAR Max / Prime STAR GXL (Takara)

ゲル：1% アガロースゲル



各バンドを切り出して、シーケンス解析に用いる

VP6, NSP4, NSP5などは両端の配列が安定しているため検出に用いることも可能。
感度は最も高い。

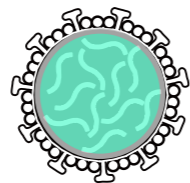
**網羅的口タウイルス分子疫学基盤構築と
ワクチン評価
(H23-新興-一般-005)**

平成24年度(2年目) 年度末班会議

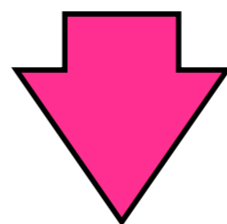
ロタウイルスワクチン

商品名	ロタリックス	ロタテック
	(GSK)	(MSD)
親ウイルス株	ヒトロタウイルス (G1)	ウシロタウイルス (G6)
構成	単価 (G1P[8])	5価 (G1, G2, G3, G4, P[8])
弱毒化の原理	培養細胞で頻回継代	VP7、VP4以外はウシロタウイルス由来
接種回数	2回	3回
接種時期	6-24週 (4週以上間隔をあける)	6-32週 (4週以上間隔をあける)
利点	接種回数が少ない	多型の免疫原性を有する
日本での販売	2011年11月販売開始	2012年7月販売開始

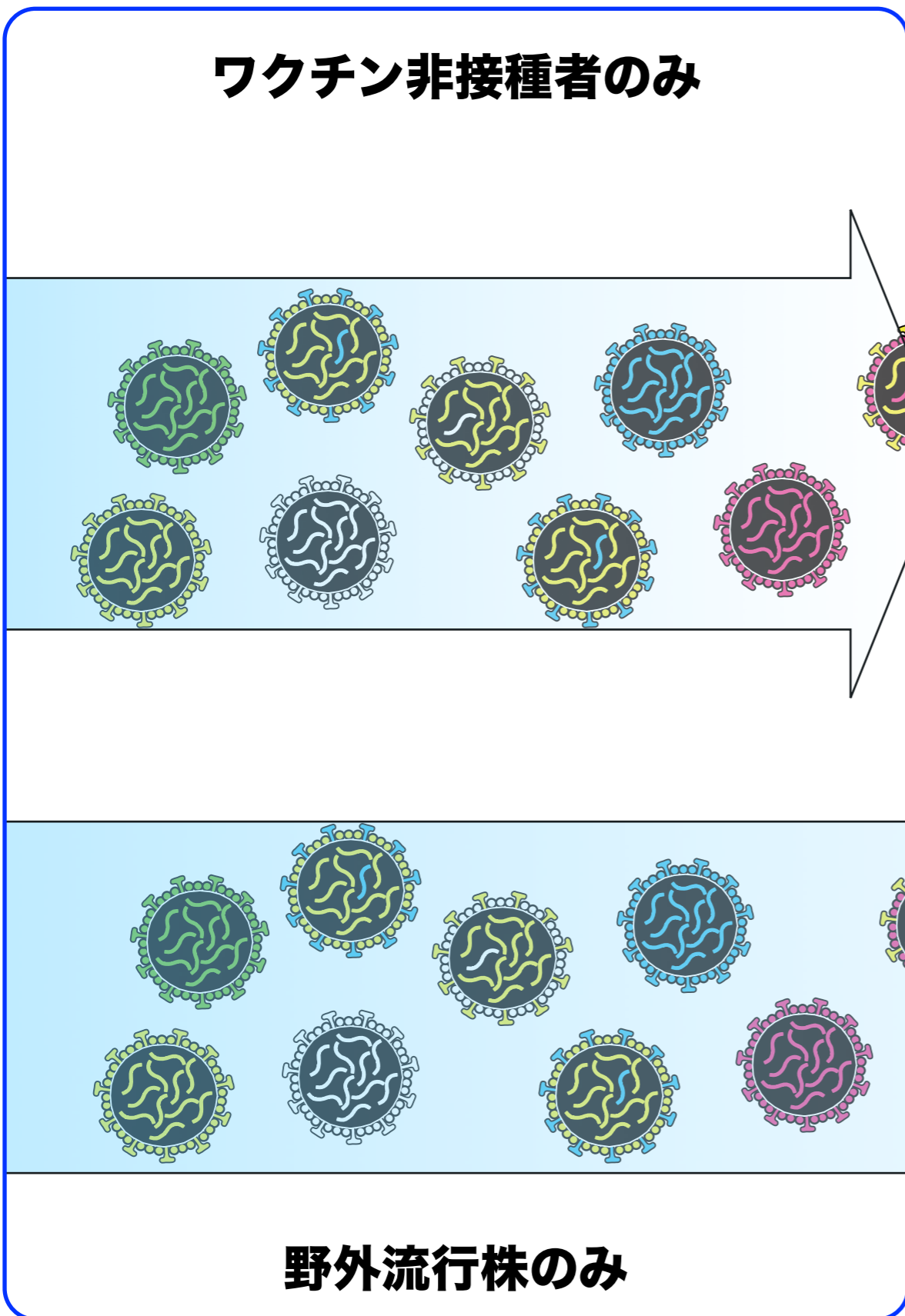




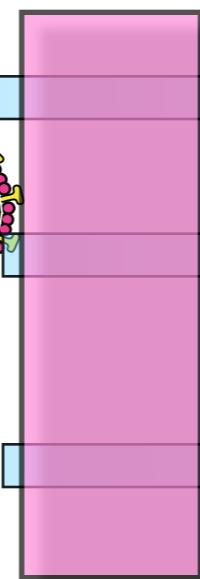
2011年夏よりワクチン投与開始



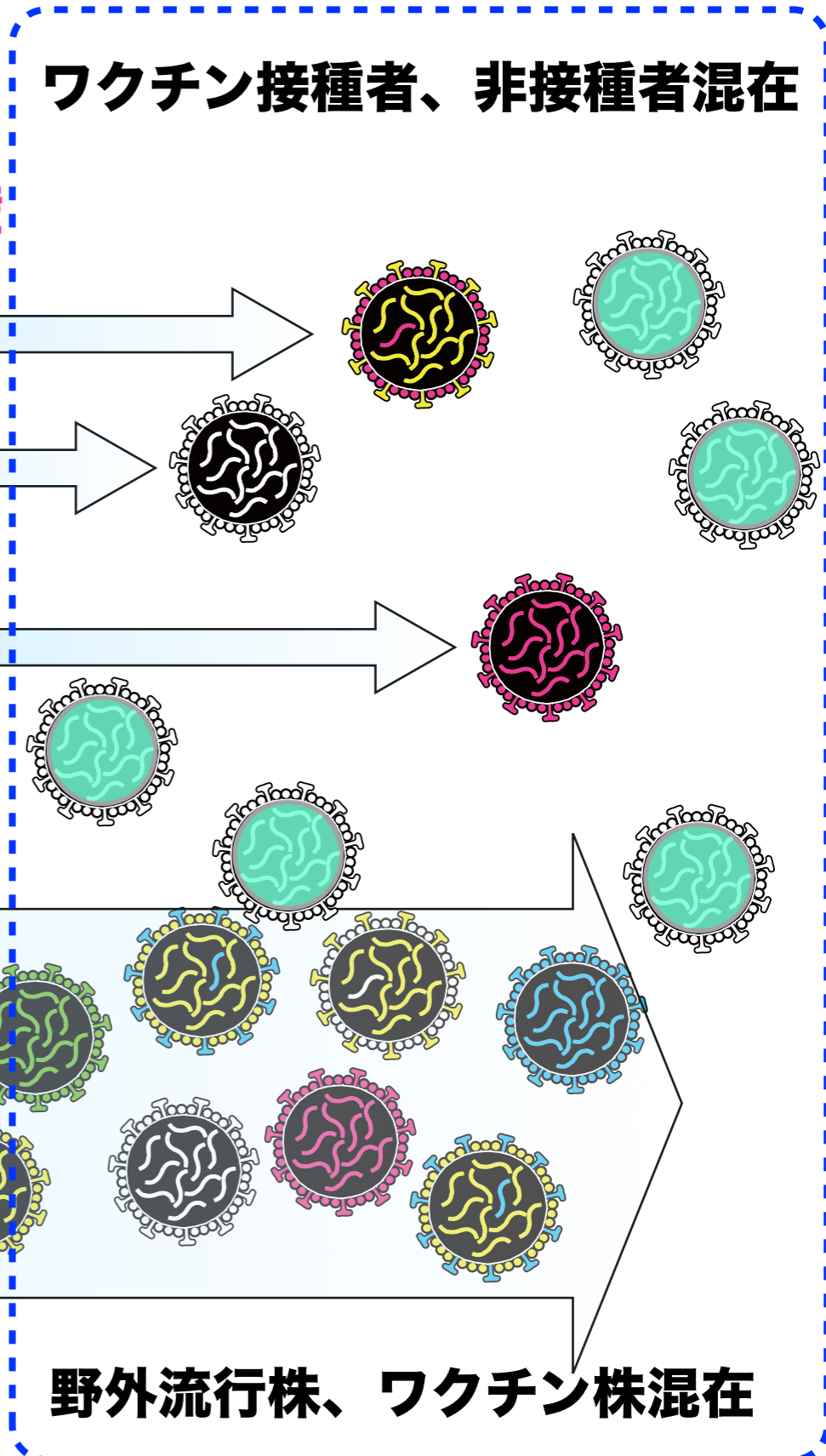
ワクチン非接種者のみ



ワクチン防壁



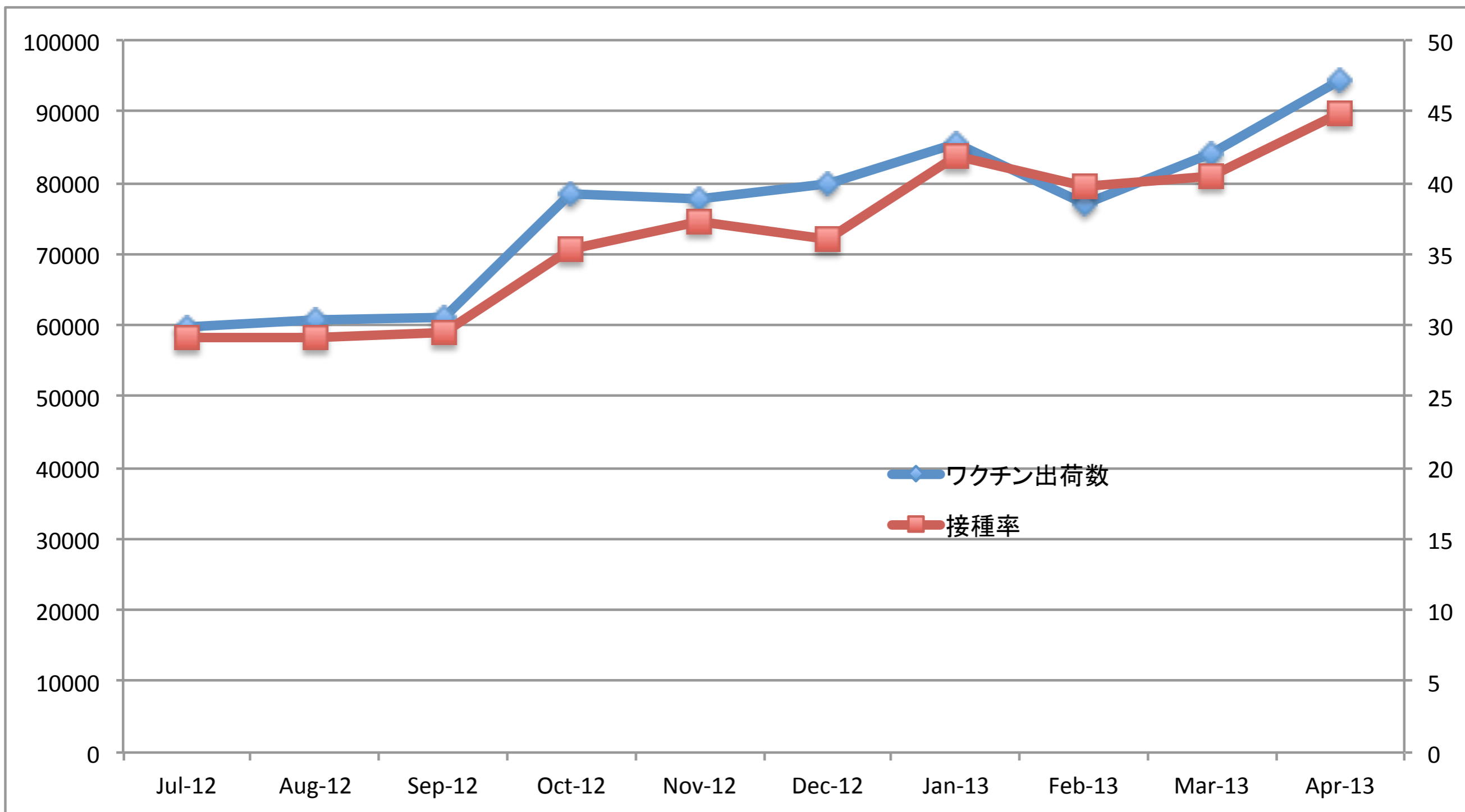
ワクチン接種者、非接種者混在



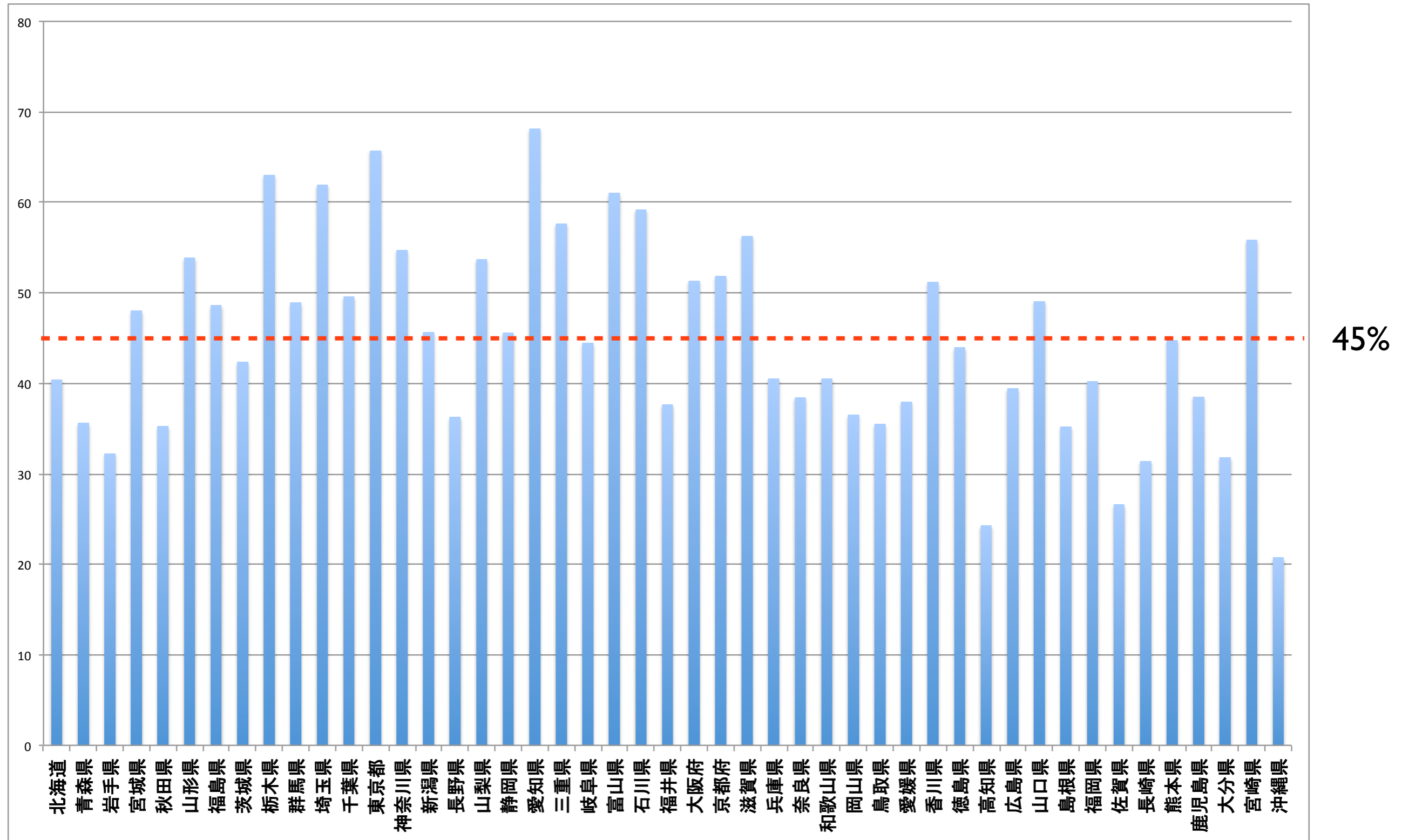
野外流行株のみ

野外流行株、ワクチン株混在

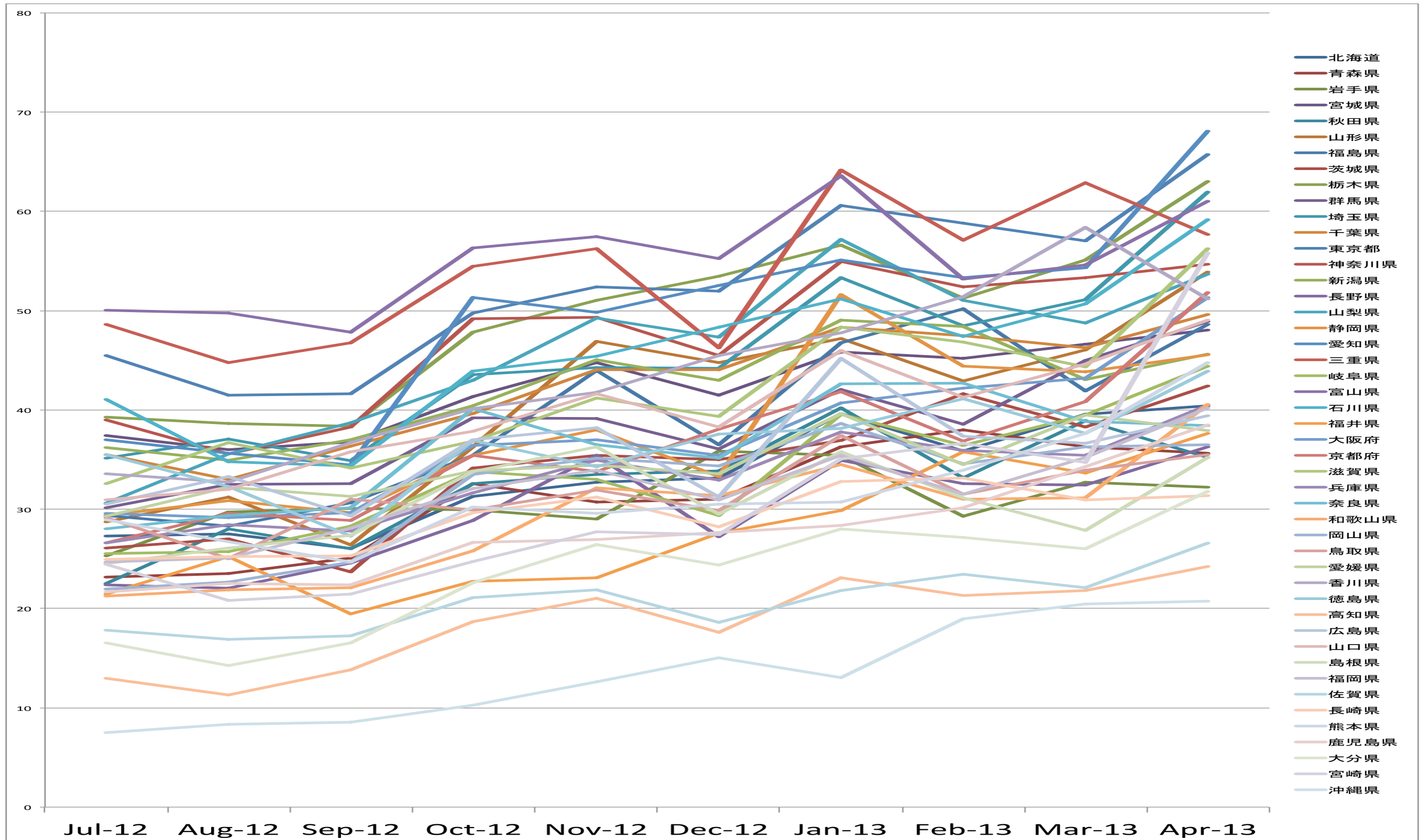
2012年7月から2013年4月までのワクチン出荷数と 接種率の変動



2013年4月の都道府県別ワクチン接種率接種率



2012年7月から2013年4月までの都道府県別 ワクチン接種率の変動



ゲノム遺伝子型構成解析による
網羅的ロタウイルス分子疫学基盤構築

網羅的ロタウイルス分子疫学基盤構築とワクチン評価 研究班活動の背景

- ロタウイルスワクチン（弱毒生ワクチン）導入
 - ロタリックス：ヒトG1P[8]単価
 - ロタテック：ウシロタベース 5 価G1, 2, 3, 4, P[8]
 - 重篤化阻止型ワクチン・作用機序不明
- 脆弱なナショナルサーベイランス体制（レファレンスセンターもない）
- ワクチンによる予防と環境へのワクチン株放出が始まると疫学像変化が起きる
- ロタウイルス株と症状重篤化の関係が不明

本研究班の構成メンバー

(敬称略)

北海道：小樽協会病院小児科：辰巳正純

秋田県：由利組合病院：三浦忍

秋田県：秋田大学小児科：野口篤子

宮城県：宮城県立こども病院：三浦克志

東京都：東京医科大学：河島尚志

東京都多摩地域：公立昭和病院：大場 邦弘

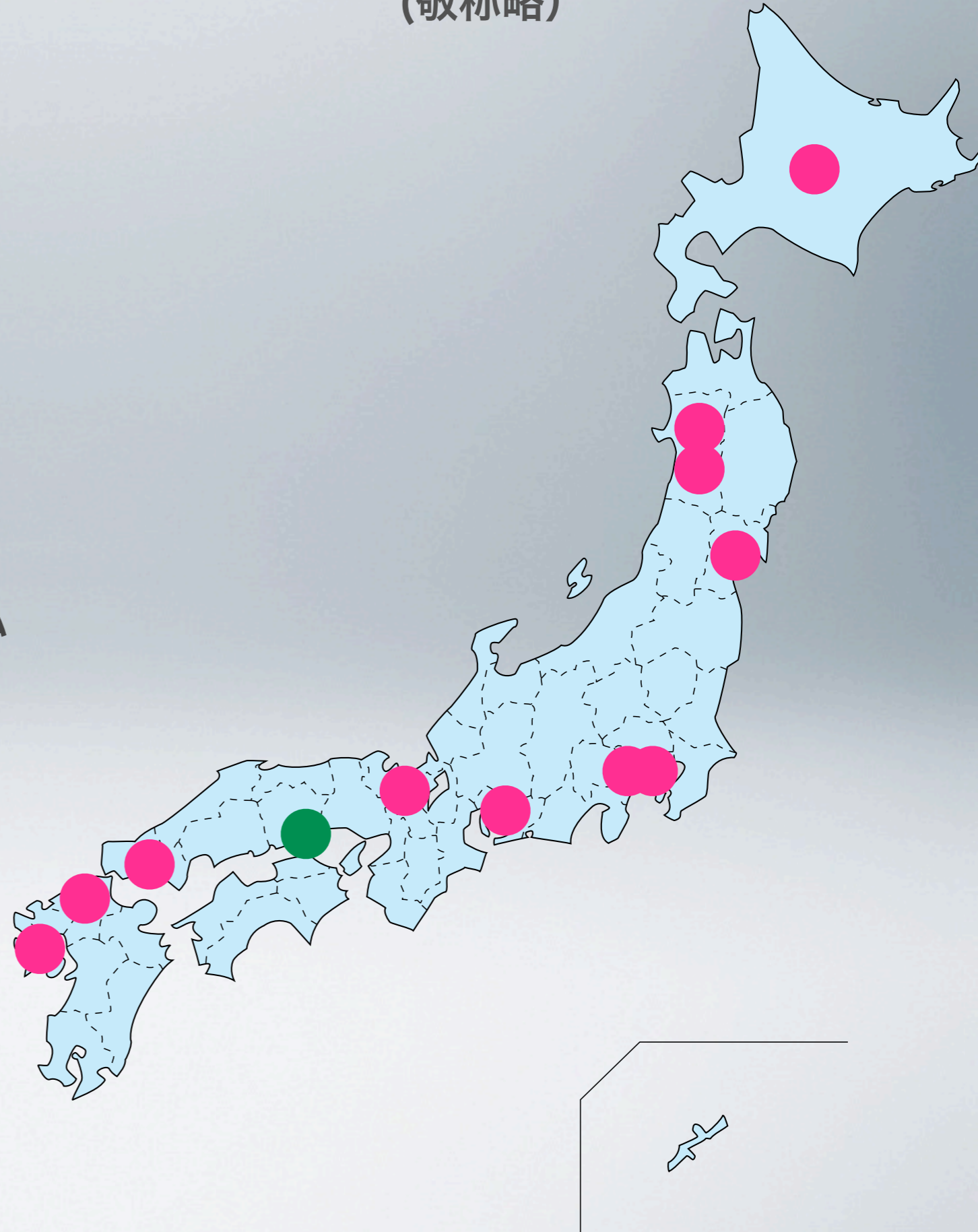
愛知県：江南厚生病院：西村直子

京都府：公立南丹病院小児科：伊藤陽里

山口県：山口大学小児科：長谷川俊史

福岡県：福岡市立こども病院：青木知信

岡山県：葛谷光隆



背景

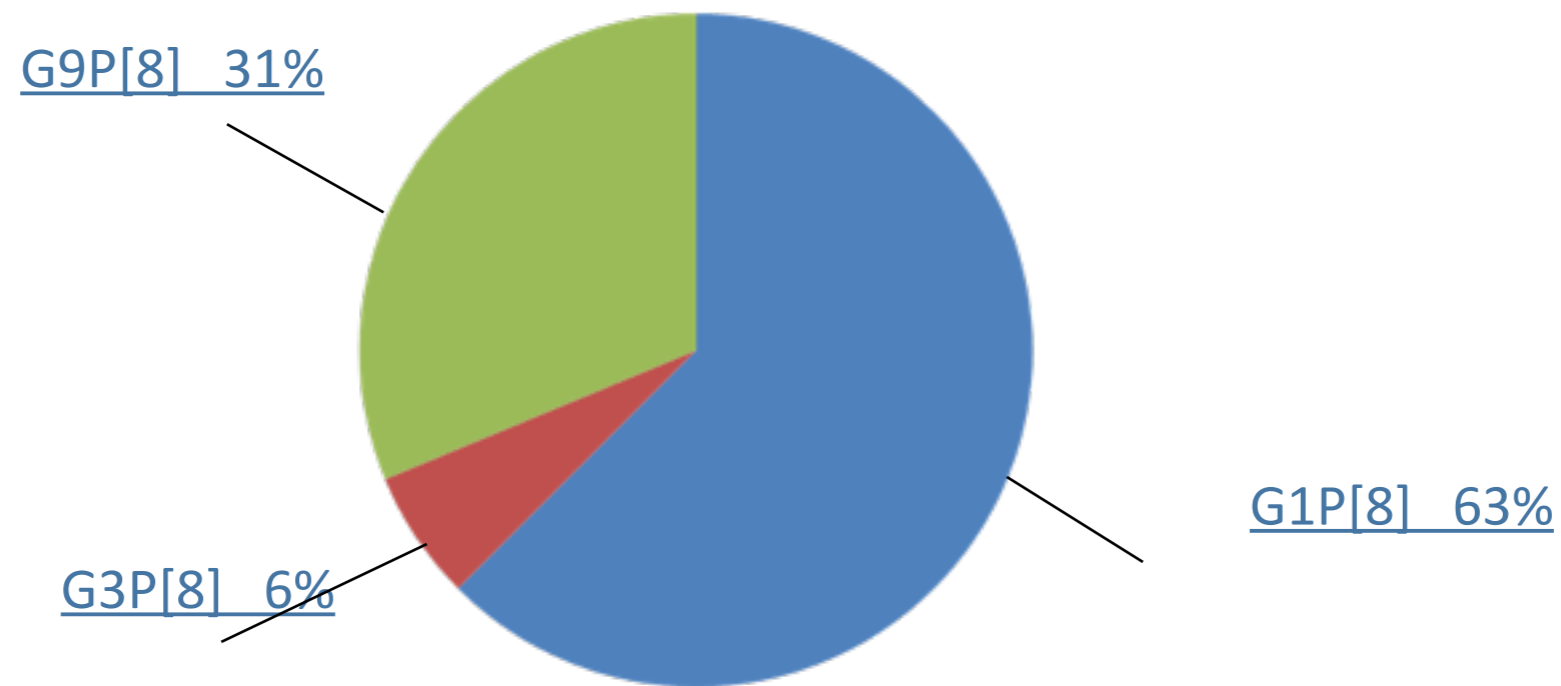
近年、我が国においてロタウイルスワクチンの接種が開始された（2011年11月ロタリックス、2012年7月ロタテック）。ワクチンの導入によって流行株に変化が生じる可能性があるため、それら監視する必要がある。厚生労働科学研究“網羅的ロタウイルス分子疫学基盤構築とワクチン評価（H23-新興-一般-005）”の活動として、昨年より全国の病院から検体を収集して、網羅的なロタウイルス分子疫学調査を開始した。

検体：全国の病院からロタウイルス感染症疑いの入院症例（重症例）の便検体を収集。

対象病院：

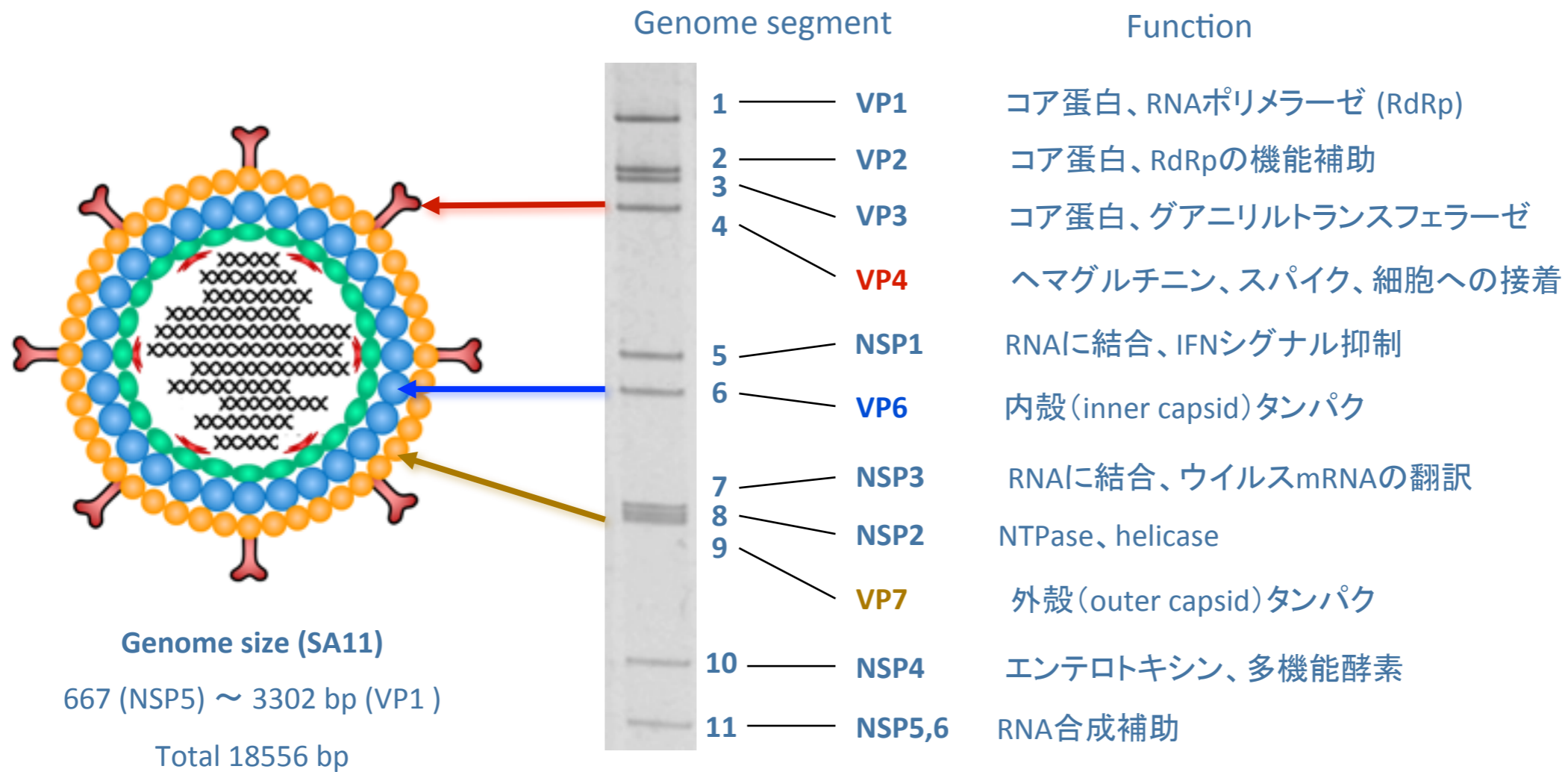
- 苫小牧病院（北海道）
- 由利組合総合病院（秋田県）
- 公立昭和病院（東京都）
- 江南厚生病院（愛知県）
- 公立南丹病院（京都府）
- 山口大学医学部附属病院（山口県）

2012年に検出されたロタウイルスVP7およびVP4遺伝子型



全国6病院（北海道6、秋田44、東京5、愛知54、京都16、山口3）から得られた検体についてGおよびPタイプを決定したところ、G1P[8]が80検体（63%）、G3P[8]が8検体（6%）、G9P[8]が40検体（31%）であった。

ロタウイルスのゲノムと構造



11セグメント全ての遺伝子型を調べなければ、遺伝子再構成体（リアソータント）の実態が把握できない。

VP7 - VP4 - VP6 - VP1 - VP2 - VP3 - NSP1 - NSP2 - NSP3 - NSP4 - NSP5

例

Wa G1P[8] G1- P[8]- I1- R1- C1- M1- A1- N1- T1- E1- H1
DS-1 G2P[4] G2- P[4]- I2- R2- C2- M2- A2- N2- T2- E2- H2

方法：RT-PCRによるロタウイルス全セグメントの増幅

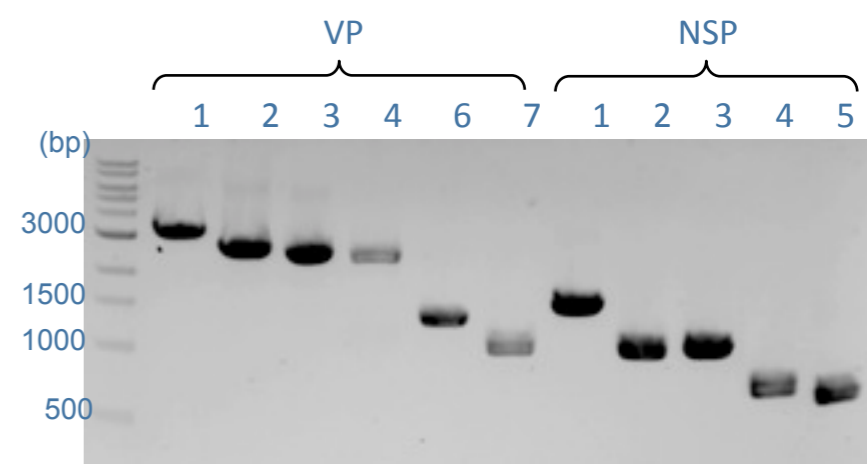
Table 1. Rotavirus gene-specific primers used for RT-PCR amplification

Primer name	5'- Sequence -3'	Tm Value	Position	Product size (bp)	Full genome size (bp)
VP1 F primer	GGCTATTAAAGCTRTACAATGG	53.0-54.8	1-22	3299	3302
VP1 R primer	CACATCTAAGCACTCTAATCTTG	55.1	3277-3299		
VP2 F primer	GGCTATTAAAGGCTCAATGG	54.3	1-20	2696	2717
VP2 R primer	TTGGCGTTTACARTTCGTTCA	52.6-54.6	2676-2696		
VP3 F primer	TGCGTTTTACCTCTGATGGTG	56.5	24-44	2566	2591
VP3 R primer	TCACATCATGACYAGTGTGTTAAG	55.3-57.1	2566-2589		
VP4 F primer	GGCTATAAAATGGCTTCGCT	54.3	1-20	2362	2359
VP4 R primer	GGGGGTCACATCCTC	54.8	2348-2359 (+3)		
VP6 F primer	GGCTTTWAAACGAAGTCTTC	52.2	1-20	1356	1356
VP6 R primer	GGTCACATCCTCTCACT	53.1	1340-1356		
VP7 F primer	GGCTTTAAAAGMGAGAATTTCC	53.0-54.8	1-22	1062	1059
VP7 R primer	GGGGGTCACATCATAACAATTCT	56.7	1041-1059 (+3)		
NSP1 F primer	GGCTTTTTTTTATGAAAAGTCTTG TG	53.9	1-25	1547	1564
NSP1 R primer	CTAGGCGCTACTCTAGT	53.1	1531-1547		
NSP2 F primer	GGCTTTTAAAGCGTCTCAGTC	56.5	1-21	1058	1058
NSP2 R primer	GGTCACATAAGCGCTTTCATTC	56.9	1036-1058		
NSP3 F primer	GGCTTTTAATGCTTTTCAGTGGTTG	57.2	1-25	1050	1050
NSP3 R primer	GGTCACATAACGCCCTATAG	58.5	1030-1050		
NSP4 F primer	CTTTTAAAAGTTCTGTTCCGAGAG	55.3	3-26	739	750
NSP4 R primer	AAGACCATTCCCTCCATTAAC	52.6	721-741		
NSP5 F primer	GGCTTTTAAAGCGCTACAGT	54.3	1-20	663	663
NSP5 R primer	GGTCACAAAACGGGAGTGGGGA	62.3	642-663		

Enzyme:
PrimeSTAR GXL DNA polymerase (Takara)

98 °C , 10 sec
55 °C , 10 sec
68 °C , 40 sec

40 cycles



結果 1. 全セグメントの遺伝子型構成

Wa-like

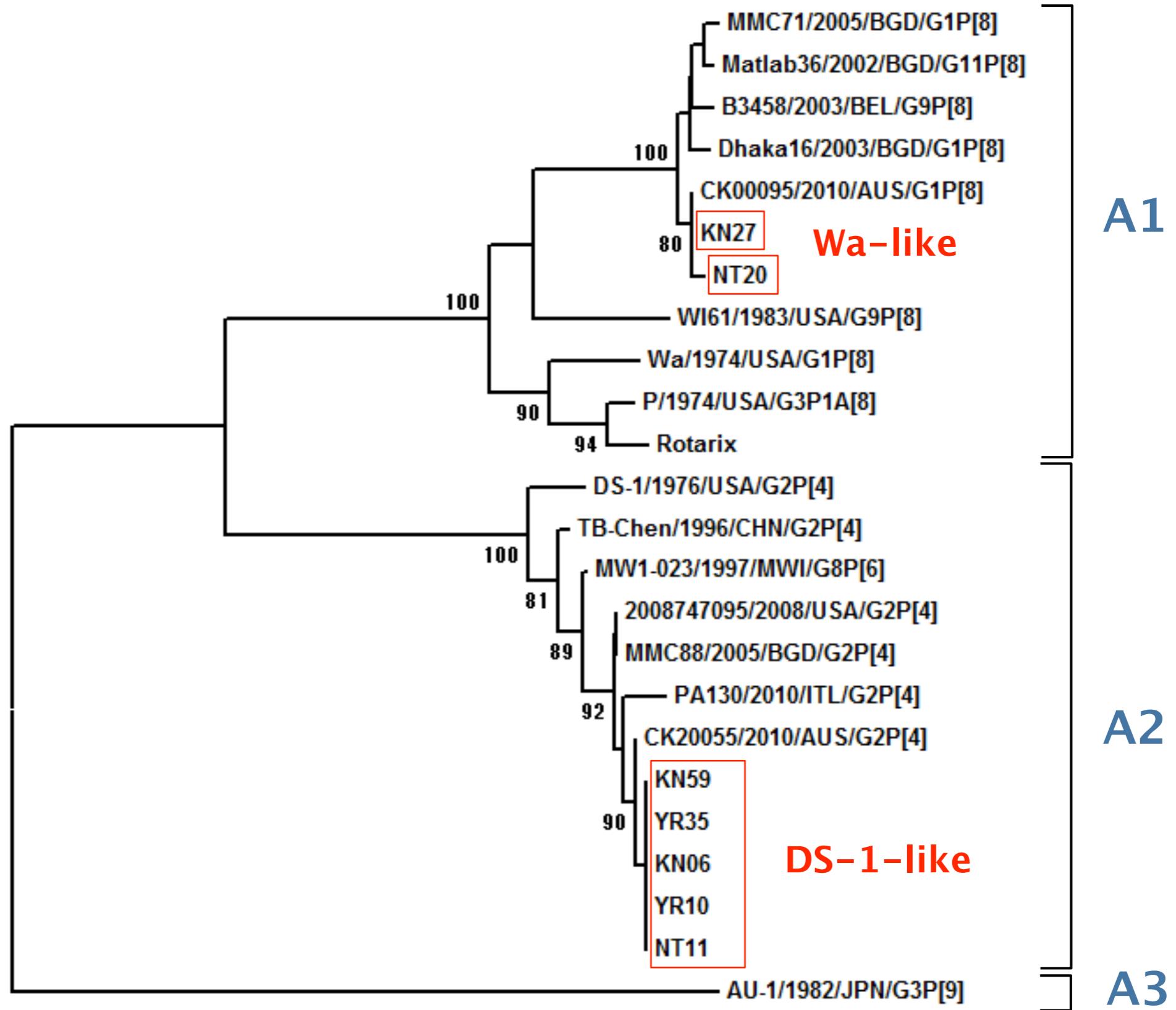
Sample	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
NT-20	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
KN-27	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1

DS-1-like

Sample	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
NT-11	G1	P[8]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
KN-06	G1	P[8]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
KN-59	G1	P[8]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
YR-10	G1	P[8]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
YR-35	G1	P[8]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2

G1P[8]型のうち、2/3以上の検体がDS-1-like遺伝子型構成であった

結果 2. NSP1の系統樹解析



0.02

まとめ

- 2012年に日本で検出されたG1P[8]型ロタウイルス7検体について全11セグメントの遺伝子型構成を解析したところ、Wa-like遺伝子型構成(G1-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1)が2検体、DS-1-like遺伝子型構成(G1-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2)が5検体であった。
- DS-1-like G1P[8]がロタウイルス重症事例における主流行株になったという報告は過去に無く、現時点では、世界的に見ても異例である。今後、この株が長期に渡り流行を引き起こすか否か、ロタウイルスワクチンの効果が及ぶのか、監視を続ける必要がある。
- 重症事例に認められた DS-1-like遺伝子型構成(G1-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2)は、我が国において本年度主要流行株となりつつある。片山班では、重症事例前検体の8割以上となることが予測されている。この現象は、オーストラリアなどワクチン先行国の動向を探る必要がある。
- 我が国において、従来のGP遺伝子型解析だけでは把握できない多様なウイルス株(リアソータント)が既に存在している。これには、急速に普及したワクチンの防壁が関与している可能性がある。これらを監視するためには、全遺伝子型構成解析による分子疫学調査が今後も必要不可欠である。