

資料

広島県で検出されたRSウイルスの遺伝子型について (2011-2019年)

池田 周平, 谷澤 由枝, 鈴藤 和, 島津 幸枝, 重本 直樹

Genotypes of RS virus detected in Hiroshima prefecture (2011-2019)

SYUHEI IKEDA, YUKIE TANIZAWA, MADOKA SUZUTO, YUKIE SHIMAZU and NAOKI SHIGEMOTO

(Received October 25, 2019)

広島県内で流行するRSウイルスの遺伝子検出は以前から行われていたが、RSウイルスA型やB型のサブグループの分類や、詳細な遺伝子型の把握までは行われていなかった。

今回の研究では、2011年1月から2019年3月までに検出されたRSウイルスのサブグループや遺伝子型を同定した。その結果、多くのシーズンで、前シーズンに流行した遺伝子型と異なる遺伝子型のRSウイルスが流行していることが明らかになった。遺伝子型の変遷は、RSウイルスA型については2015/16シーズンを境に流行の遺伝子型がNA1からON1に入れ替わっており、B型についてはBA9が総じて優勢であった。また、BA9のアミノ酸配列で特徴的なアミノ酸配列の置換が確認された。

Key words : RSウイルス, 遺伝子型, ON1, NA1, BA9

緒 言

RSウイルス (RSV) 感染症は、乳幼児期に多く感染するウイルス感染症の一つで、ほぼ2歳までに100%が初感染を受けると言われており、乳幼児における肺炎の約50%、気管支炎の50~90%がRSV感染症によるものとされている [1, 2]。RSVはニューモウイルス科オルソニューモウイルス属に分類される一本鎖 (-) RNA をゲノムとして持つウイルスであり、Gタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列により、大きくA型とB型の2つのサブグループに分かれる [2, 3]。さらに、A型は14遺伝子型、B型は24遺伝子型に分けられ [4]、シーズンにより流行するウイルスの遺伝子型に変化が見られる。

今回2011~2019年に広島県で検出されたRSVの流行遺伝子型等を明らかにしたので報告する。

材料及び方法

1 材料

2011年1月~2019年3月までに感染症発生動向調査事業において、広島県内の医療機関 (主に小児科) で気道炎患者1316名から採取された、1903検体を対象とした。

2 検査方法

(1) リアルタイムRT-PCRによるRSV遺伝子の検出

各検体からQIAamp Viral RNA mini Kit (QIAGEN) を用いてウイルスRNAを抽出し、QuantiTect Virus +ROX Vial Kit (QIAGEN) を用いてBonroyらが報告した方法 [5] を参考にリアルタイムRT-PCRを行った。PCR反応には、当所で改良したプライマー及びプローブ (表1) を使用し、50℃ 20分→95℃ 15分→ [95℃ 15秒, 60℃ 1分 (45サイクル)] →40℃ 30秒の反応条件で、RSV遺伝子の有無を確認した。

表1 RSウイルス遺伝子検出用リアルタイムRT-PCRのプライマー及びプローブ

	プライマー及びプローブ名	配列 (5'-3')
Forward primer	RSV_fw2	GCTCTTAGCAARGTCAAGTTRAATGATACA
Reverse primer	RSV_rev2	GTTTYTGACATCATAATTRGGAGT
Probe	RSV_probe2	VIC-CTRTCATCYAGCAAATACAC-MGB

(2) コンベンショナルPCRによるRSV遺伝子の増幅

リアルタイムRT-PCRでRSV陽性となった検体の抽出RNAについて、PrimeScript™ RT reagent Kit Perfect Real Time (TaKaRa) を用いて37℃ 15分→85℃ 5秒の条件で逆転写を行い、cDNAを合成した。さらに、合成cDNAを鋳型としてGoTaq® Colorless Master Mix (Promega) を用い、94℃ 2分→[94℃ 40秒, 50℃ 45秒, 72℃ 45秒 (35サイクル)] →72℃ 10分→4℃の条件で1st-PCRを行い、電気泳動により陽性バンドの有無を確認した。陽性バンドが確認できない場合には、1st-PCR産物を鋳型として、94℃ 2分→[94℃ 40秒, 58℃ 45秒, 72℃ 45秒 (25サイクル)] →72℃ 10分→4℃の条件で2nd-PCRを行い、同様に陽性バンドを確認した。使用したプライマー [6] を表2に示す。

(3) 遺伝子型の決定及び系統樹解析

(2) の1st-PCRまたは2nd-PCRの増幅産物について、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した後、日本DNAデータバンク (DDBJ) のBLAST検索によりデータベースに登録されている相同性の高い遺伝子配列と比較し、RSV-AまたはBのサブタイプを決定した。さらに、各サブタイプごとに、得られた塩基配列及び参照ウイルス株の配列を用いて、ClustalWによりマルチプルアライメントを実施し、NJ法により分子系統樹を作成して遺伝子型を決定した [4]。また、アライメント後の配列を基にアミノ酸配列を決定し、配列の比較を行った。

結果及び考察

リアルタイムRT-PCRにより、RSV陽性となった患者は327名 (383検体) で、その内、222検体 (内1名については2つの遺伝子型が検出された) について、RSVの遺伝子型別を行った。

RSVが検出された患者の年齢分布をみると (図1)、2歳以下がほぼ大半を占めた (78.8%)。RSV-Aが検出された2歳以下の割合は80.7%、RSV-Bでは76.1%となった。これは、2014年~2017年の国内におけるRSV感染症患者の年齢分布 [2] とおおよそ一致していた。

RSVサブグループのシーズン別変遷をみると、検出割合はほぼ毎年変化しており、2012/2013、2014/2015、2015/2016及び2017/2018シーズンはRSV-Aが優勢で、2013/2014、2016/2017及び2018/2019シーズンはRSV-Bが優勢であった (図2)。2014/2015シーズンと2015/2016シーズンはRSV-Aが2シーズン連続で優勢であったが、2014/2015シーズンの主流遺伝子型はNA1、2015/2016シーズンはON1であり、異なる遺伝子型であったため、RSV-Aが連続して流行したと考えられた。

遺伝子型の変遷をみると、RSV-AではNA1とON1が検出された。ON1はNA1のC末端領域に72塩基の繰り返し配列が挿入されている新しい遺伝子型 [7] で、2010年にカナダで初めて検出され、その後世界中で検出が確認されている。今回の研究で、広島県では2012/2013シーズンから検出が確認され、国内においても同様な報告

表2 RSVウイルス遺伝子増幅用コンベンショナルPCRのプライマー

		プライマー名	配列 (5'-3')
1st-PCR	Forward primer	ABG490	ATGATTWYCAYTTTGAAGTGTTTC
	Reverse primer	F164	GTTATGACACTGGTATACCAACC
2nd-PCR※	Forward primer	AG655	GATCYCAAACCTCAAACCAC
	Reverse primer	F164	GTTATGACACTGGTATACCAACC

※2nd-PCRでは1検体あたり2通りのPCRを実施した (AG655&F164及びBG517&F164)

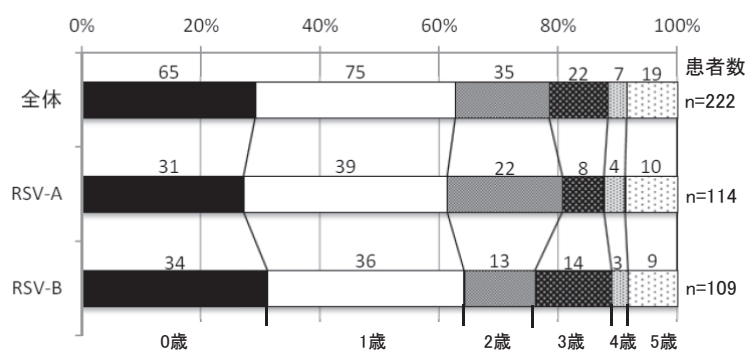


図1 広島県におけるRSVが検出された患者の年齢分布 (2011年1月~2019年3月) (RSV-A及びBの重複感染者1名を含むので患者数の合計は一致しない)

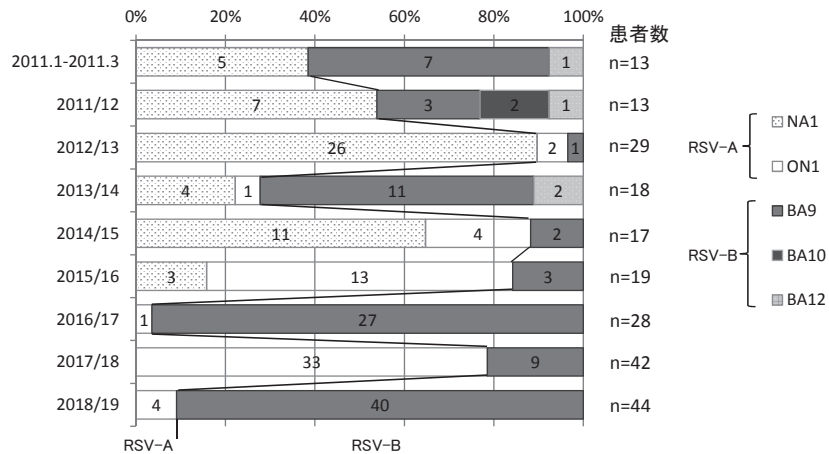


図2 広島県におけるRSV遺伝子型別状況 (2011年1月～2019年3月)
各シーズンは4月から翌年の3月まで

[8, 9] があることから, ON1がこの時期にはすでに日本の各地に入っていたものと思われた. NA1とON1の検出割合は, 2014/2015シーズンまではNA1が優勢であったが, 2015/2016シーズンにはNA1とON1の割合が逆転し, このシーズン以降NA1は検出されず, RSV-Aの流行型はON1に置き換わっていたと考えられた. 一方, RSV-Bでは, BA9, BA10及びBA12が検出された. 検出割合は総じてBA9が優勢であり, この傾向は日本国内や中国でも同様である [4, 8]. ただし, BA9のアミノ酸配列を比較すると, 2016年3月以前に検出されたBA9に対し2016年4月以降に検出されたBA9では, 61%の検体で (41/76検体) 254番目のアミノ酸残基がトレオニンからイソロイシンに置換していた (図3). 同様に, 2017年4月以降に検出されたBA9では, それ以前に検出されたBA9のアミノ酸残基と比較すると, 89.6% (43/48

検体) の検体で290番目のアミノ酸残基がトレオニンからイソロイシンに置換していた. トレオニンはO-グリコシド結合部位であり, 糖鎖の結合はタンパク質の構造に重要である. O-グリコシド結合部位の喪失や出現により抗原性が変化する可能性が示唆されており [10], このようなアミノ酸の変異により, BA9が複数のシーズンに継続して流行の主となる事が可能となったのではないかと考えられた.

今回の研究で, RSVの流行遺伝子型はシーズン毎に変化していることが判明した. 近年, RSV感染症は全国的に従来より早い時期に流行のピークを迎えており, 広島県でも同様の傾向にある. このような流行状況の変化にRSVの遺伝子型がどのように関わっているのかは不明であるため, 今後もRSVのシーズン毎の動向について, 継続して調査をしていきたい.

文 献

- [1] Glezen WP, Taber LH, Frank AL, Kasel JA. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *Am J Dis Child*. 1986; 140 (6): 543-546.
- [2] 国立感染症研究所. RSウイルス感染症2014年1月～2018年9月. 病原体検出情報. 2018 ; 39 (12) : 207-209.
- [3] Afonso CL, Amarasinghe GK, Bányai K, Bào Y, Basler CF, Bavari S, Bejerman N, Blasdel KR, Briand FX, Briese T et al. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016. *Arch Virol*. 2016; 161 (8): 2351-2360.
- [4] Song J, Wang H, Shi J, Cui A, Huang Y, Sun L, Xiang X, Ma C, Yu P, Yang Z et al. Emergence of BA9 genotype of human respiratory syncytial virus subgroup B in China from 2006 to2014. *Sci Rep*. 2017; 7 (1): 16765.
- [5] Bonroy C, Vankeerberghen A, Boel A, De Beenhouwer H. Use of a multiplex real-time PCR to study the incidence of human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus infections during two winter seasons in a Belgian paediatric hospital. *Clin Microbiol Infect*. 2007; 13 (5): 504-509.
- [6] Parveen S, Sullender WM, Fowler K, Lefkowitz EJ, Kapoor SK, Broor S. Genetic variability in the G protein gene of group A and B respiratory syncytial viruses from India. *J Clin Microbiol*. 2006; 44 (9): 3055-3064.
- [7] Eshaghi A, Duvvuri VR, Lai R, Nadarajah JT, Li A, Patel SN, Low DE, Gubbay JB. Genetic variability of human respiratory syncytial virus A strains circulating in Ontario: a novel genotype with a 72 nucleotide G gene duplication. *PLoS One*. 2012; 7 (3): e32807.
- [8] 齋藤玲子, 齋藤孔良, Isolde Caperig Dapat, 近藤大貴, 八神 錬, 日比野亮信, 蒲浦川由郷, 池澤 滋, 加地はるみ, 齊藤 匡, 西藤成雄, 他. わが国のRSVの分子疫学. 病原体検出情報. 2014 ; 35 (6) : 148-149.
- [9] 田中俊光, 横井 一, 水村綾乃, 木原顕子, 都竹豊茂, 中台啓二, 原木真名. G遺伝子上に72塩基の重複を有するRSウイルス変異株. 病原体検出情報. 2012 ; 33 (4) : 99-100.
- [10] Okamoto M, Dapat CP, Sandagon AMD, Batangan-Nacion LP, Lirio IC, Tamaki R, Saito M, Saito-Obata M, Lupisan SP, Oshitani H. Molecular characterization of respiratory syncytial virus in children with repeated infections with subgroup B in the Philippines. *J Infect Dis*. 2018; 218 (7): 1045-1053.

