

- | | |
|--|--|
| 好井健太郎、有川二郎、高島郁夫：ロシアのボルガ川流域におけるハンタウイルス感染症の疫学的研究、第55回日本ウイルス学会（2007.10） | ウイルス学会（2007.10） |
| 13) 宮下大輔、荻和宏明、瀬戸隆弘、好井健太郎、吉松組子、有川二郎、高島郁夫：メキシコの野生げっ歯類におけるハンタウイルス感染症の疫学調査、第55回日本ウ | H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし |

ハンタウイルス感染症の疫学的研究

分担研究者 苅和宏明 北海道大学大学院獣医学研究科 准教授

研究要旨

ハンタウイルスはげっ歯類を病原巣動物として自然界に分布し、人が感染すると腎症候性出血熱(HFRS)やハンタウイルス肺症候群(HPS)などの重篤な疾病を引き起こす。ハンタウイルスには様々なウイルスが知られているが、それぞれのウイルスが特定の自然宿主を持つことが大きな特徴となっている。日本においては Seoul ウイルスと Hokkaido ウイルスがそれぞれドブネズミと北海道のエゾヤチネズミに保有されている。このようにハンタウイルスは野生げっ歯類の集団に長年にわたって安定して維持されているが、集団内における感染様式の詳細は明らかにされていなかった。そこで、本研究では北海道の中川町と当別町の森林でエゾヤチネズミの捕獲調査を行い、ハンタウイルスのげっ歯類集団内での感染動態の解明を試みた。

A. 研究目的

ハンタウイルスはげっ歯類を自然宿主とする、マイナス一本鎖の RNA ウイルスで、Hantaan、Seoul、Puumala など 20 種類以上のウイルスの存在が知られている。本ウイルスは人に感染すると腎症候性出血熱(HFRS)やハンタウイルス肺症候群(HPS)などの重篤な疾患を引き起こす。ハンタウイルスは野生げっ歯類の集団に長年にわたって維持されているが、げっ歯類集団内での感染様式は詳細に調べられていなかった。そこで北海道の中川町と当別町の森林でエゾヤチネズミを捕獲し、ハンタウイルスの一種である Hokkaido ウイルスのげっ歯類集団における感染様式の解明を試みた。

B. 研究方法

1. げっ歯類の疫学調査

北海道の中川町と当別町の森林において合計 199 匹のエゾヤチネズミを捕獲し、血液、肺、腎臓、脾臓、肝臓を採取した。採取した臓器は使用時まで -80°C で保存し、血清は抗体検査時まで -40°C で保存した

2. IFA による抗体検出

ヨーロッパヤチネズミ由来の Puumala ウイルスを Vero E6 細胞に感染させ、14 日間 CO_2 インキュベーター内で培養した。感染細胞を回収後、細胞を 24 穴スライドに滴下し、4 時間 CO_2 インキュベーター内で培養した。感染細胞を冷アセトンで固定し、抗原スライドとして用いた。エゾヤチネズミ血清を抗原スライドに滴下して 37°C で 1 時間保温し、リン酸緩衝液(PBS)で 3 回洗浄した。FITC 標識プロテイン G を滴下して 1 時間保温後、洗浄して蛍光顕微鏡下で細胞を観

察した。細胞質内に散在する顆粒状の蛍光が観察されるものを陽性反応と判定した。

3. ELISAによる抗体検出

北海道のエゾヤチネズミから検出されたハンタウイルスのヌクレオキャプシド(NP)を大腸菌で発現させたものを抗原としてELISAを実施した(Ab-ELISA)。抗原をコートした96穴プレートをカゼインでブロッキングし、さらにげっ歯類の血清をアプライした。抗体の検出はペルオキシダーゼ標識プロテインGを用いた。

4. ELISAによる抗原検出

NPに対する免疫家兎血清を96穴プレートにコートし、エゾヤチネズミの肺乳剤をアプライした後、Puumalaウイルス感染マウス血清を反応させた。抗原の検出はペルオキシダーゼ標識抗マウスIgGを用いた。

5. PCR

ハンタウイルスのS遺伝子を標的としてPCRを行った。RNAの抽出は型のごとく行い、SuperScript IIを用いて逆転写反応を行った後、Platinum Taq DNA Polymeraseを用いてウイルス遺伝子の増幅を行った。PCR産物は増幅断片の内側のプライマーを用いてさらにNested-PCRにより増幅を行った。

(倫理面からの配慮について)

本調査は日本国内の野生動物保護の理念に基づいて、北海道に事前に申請され、許可されたものである。

C. 研究結果および考察

北海道の中川町と当別町の森林において合計199匹のエゾヤチネズミを捕獲し、血液、

肺、腎臓、脾臓、肝臓を採取した。次にエゾヤチネズミの血清を用いてAb-ELISAがハンタウイルスの抗体検出法として有用であるかどうかについて検討した。IFAで抗体陽性となった8例はAb-ELISAでも全例が陽性であり、さらにIFA陰性の2例がAb-ELISAでは陽性となった。Ab-ELISAのIFAに対する感度は100%で特異性は99%であった。したがってAb-ELISAはエゾヤチネズミの抗体検出法として有用であることが明らかになった。次にAg-ELISAによりエゾヤチネズミの肺からのハンタウイルスNPの検出を行った。199匹中、抗体陰性の2例のみが陽性を示した。これらの2例からはいずれもウイルスRNAが検出された。したがってAg-ELISAもエゾヤチネズミ集団内のハンタウイルス感染の検出法として有用であることが判明した。Ab-ELISAとAg-ELISAを組み合わせることにより、感染げっ歯類の検出をもれなく容易に行うことが可能になった。エゾヤチネズミ集団全体の抗体保有率は5.0%(10/199)であった。オスとメスの抗体保有率を比較するとそれぞれ11.5%(6/52)と2.7%(4/147)であり、オスの抗体保有率が有意に高かった($P<0.01$)。この現象は他のハンタウイルスについても報告されており、エゾヤチネズミの集団でもオスがHokkaidoウイルスの感染伝播に重要な役割を果たしていることが示唆された。

ウイルスRNAの検出された中川町の7例の個体について肺、脾臓、腎臓および血餅中のハンタウイルスRNA量をReal-time PCRによって解析した。いずれの個体においても、肺もしくは脾臓でウイルス量が高い傾向が認められた。特に感染初期と考えられる抗体陰性で抗原陽性の2例の肺中ウイルスRNA量は他の個体よりも10倍から100倍高いことが判

明した。したがって感染動物体内のウイルスの複製は感染初期に活発に起るが、持続感染期ではウイルスの複製が低下していることが示唆された。

D. 結論

北海道のエゾヤチネズミに保有される Hokkaido ウイルスの感染調査を行った。まず、新規に開発した抗体検出用と抗原検出用の ELISA が、エゾヤチネズミにおける Hokkaido ウイルスの感染状況を調査する上で有用であることを確認した。Hokkaido ウイルスの感染率はオスの方がメスよりも有意に高く、オスがウイルスの伝播や感染の維持により重要な役割を担っている可能性が示唆された。また Hokkaido ウイルスの遺伝子が検出された個体の中で、抗体陰性のもので陽性のものが見られた。前者は感染直後で抗体がまだ産生されていない個体であり、後者は感染後一定時間が経過して抗体が産生されても、ウイルスが持続感染している個体であると考えられた。感染直後の個体は持続感染個体と較べて検出されるウイルス量が明らかに多く、感染初期にはウイルスの複製が活発に起っていることが示唆された。

本研究により、ハンタウイルスの野生げっ歯類集団内における、感染様式の一端が明らかになった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Bin Abu Daud, N.H., Kariwa, H., Tanikawa,

Y., Nakamura, I., Seto, T., Miyashita, D., Yoshii, K., Nakauchi, M., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., and Takashima, I.: Mode of Infection of Hokkaido Virus (Genus *Hantavirus*) among Grey Red-Backed Voles, *Myodes rufocanus*, in Hokkaido, Japan. *Microbiol. Immunol.* 51: 1081-1090, 2007

2) Kariwa, H., Yoshimatsu, K., and Arikawa, J.: Hantavirus infection in East Asia. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 30: 341-356, 2007. Review.

3) Kariwa, H., Lokugamage, K., Lokugamage, N., Miyamoto, H., Yoshii, K., Nakauchi, M., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Ivanov, L.I., Iwasaki, T., and Takashima, I. A comparative epidemiological study of hantavirus infection in Japan and Far East Russia. *Jpn. J. Vet. Res.* 54: 145-161, 2007.

2. 学会発表

1) 瀬戸隆弘、苺和宏明、谷川洋一、Nur Hardy Bin Abu Daud、中村一郎、宮下大輔、好井健太郎、高島郁夫：ロシアのボルガ川流域に生息する野生げっ歯類におけるハンタウイルスの感染調査と遺伝子解析：第143回日本獣医学会、つくば（2007, 4）

2) 宮下大輔、苺和宏明、村田亮、Nur Hardy Bin Abu Daud、瀬戸隆弘、好井健太郎、高島郁夫：メキシコの野生げっ歯類におけるハンタウイルス感染症の血清疫学調査：第144回日本獣医学会、江別（2007, 9）

3) 村田亮、好井健太郎、原田祐里、苺和宏明、高島郁夫：ウエストナイルウイルスの E 蛋白上糖鎖付加がウイルス増殖に与える影

- 響: 144 回日本獣医学会、江別 (2007, 9)
- 4) 大森優紀、伊川綾恵、川上和江、好井健太郎、苺和宏明、高島郁夫: ダニ媒介性脳炎ウイルスのウイルス様粒子およびその組換え発現プラスミドを抗原とした針無加圧式注射によるワクチン接種の有効性の検討: 144 回日本獣医学会、江別 (2007, 9)
- 5) 中内美名、好井健太郎、苺和宏明、高島郁夫: SARS コロナウイルス N たんぱく質の粒子形成における機能領域の解析: 第 55 回日本ウイルス学会、札幌 (2007, 10)
- 6) 瀬戸隆弘、苺和宏明、谷川洋一、吉松組子、中村一郎、宮下大輔、中内美名、好井健太郎、有川二郎、高島郁夫: ロシアのボルガ川流域におけるおけるハンタウイルス感染症の疫学的研究: 第 55 回日本ウイルス学会、札幌 (2007, 10)
- 7) 宮下大輔、苺和宏明、瀬戸隆弘、好井健太郎、吉松組子、有川二郎、高島郁夫: メキシコの野生げっ歯類におけるハンタウイルス感染症の疫学調査: 第 55 回日本ウイルス学会、札幌 (2007, 10)
- 8) Arikawa, J., Yoshimatsu, K., and Kariwa, H.: Epidemiology and epizootiology of hantavirus infection in East Asian countries: VII International Conference on HFRS, HPS, and Hantaviruses, Buenos Aires (2007, 6)
- 9) Yoshimatsu, K., Taruishi, M., Kariwa, H., and Arikawa, J.: Studies on structure and function of N and GP of Hantaan virus: VII International Conference on HFRS, HPS, and Hantaviruses, Buenos Aires (2007, 6)
- 10) Kariwa, H., Tanikawa, Y., Bin Abu Daud, N. H., Lokugamage, N., Lokugamage, K., Seto, T., Miyashita, D., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Yoshii, K., Nakauchi, M., and Takashima, I.: Animal models for Puumala virus infection using several rodent species of laboratory animal: VII International Conference on HFRS, HPS, and Hantaviruses, Buenos Aires (2007, 6)
- 11) Yoshii, K., Goto, A., Obara, M., Ueki, T., Ikawa, A., Ishizuka M., Kariwa, H., and Takashima, I.: Role of the N-linked glycan of envelope protein of tick-borne encephalitis virus in viral maturation process: US-Japan Cooperative Medical Science Program, 41st Joint Working Conference on Viral Diseases, Baltimore, (2007, 7)
- 12) Kariwa, H., Seto, T., Tanikawa, Y., Nakamura, I., Hashimoto, N., Bin Abu Daud, N.H., Nakauchi, M., Miyashita, D., Tkachenko, E.A., Ivanov, L.I., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., and Takashima, I.: Epidemiological study of hantavirus infection in Volga-Side Federal Region, Russia: US-Japan Cooperative Medical Science Program, 41st Joint Working Conference on Viral Diseases, Baltimore, (2007, 7)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ミゾリピンの in-vitro におけるサル痘ウイルス増殖抑制効果

分担研究者 西條政幸

国立感染症研究所ウイルス第1部第3室室長

研究要旨:サル痘ウイルスは、天然痘の病原体である痘瘡ウイルスと同様にポックスウイルス科オルソポックスウイルスに分類される二本鎖 DNA ウイルスであり、ヒトにおいて天然痘類似疾患(ヒトサル痘)を引き起こす。Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase 阻害薬活性を有するミゾリピンを含む薬剤、シドフォビル、S2242、ピダラピン、リバビリンのサル痘ウイルス増殖抑制効果について検討した。各薬剤のウイルス増殖抑制効果は、プラーク減少法による 50% inhibitory concentration (IC₅₀) を測定することよった。ミゾリピン、シドフォビル、S2242、ピダラピン、リバビリンのサル痘ウイルス 8 株(コンゴ盆地型 4 株、西アフリカ型 4 株)に対する IC₅₀ は、それぞれ 4.3±1.9, 4.3±1.0, 6.4±0.4, 3.7±0.5, 18±9.9 µg/ml であった。ピダラピンを除く薬剤の細胞毒性(50% effective dose, ED₅₀)は、200 µg/ml を上回ることから、ミゾリピンとシドフォビルの抗サル痘ウイルス活性は、選択的である。動物実験においてシドフォビルの霊長類にけるサル痘に対する治療効果が確認されていることから、ミゾリピンもサル痘に対する治療薬の候補のひとつとなり得る。

A. 研究目的

天然痘の病原体である痘瘡ウイルスがバイオテロリズム病原体として用いられる危険性が指摘されていることから、天然痘が根絶された今日においても、安全で効果的な抗ウイルス薬の開発とその評価が重要である。本研究では、霊長類において天然痘類似疾患であるサル痘を引き起こすサル痘ウイルス(痘瘡ウイルスと同様にポックスウイルス科オルソポックスウイルス属に分類される)の Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) 阻害薬活性を有するミゾリピンを含む薬剤、シドフォビル、S2242、ピダラピン、リバビリンなどに対する薬剤感受性を検討した。

B. 研究方法

- 1) ウイルス. 国立感染症研究所に保管されているサル痘ウイルス 8 株 (Anteaten 株, Orangutang 株, Liberia 株, SEN 株, Congo-8 株, Zr-599 株, コンゴ民主共和国でのヒトサル痘患者から分離された 2 株) を用いた。尚、はじめの 4 株は西アフリカ型に分類され、後半の 4 株はコンゴ盆地型サル痘ウイルスに分類される。
- 2) 薬剤 . ミゾリピン (4-carbamoyl-1-β-d-ribofuranosylimidazolium-5-olate), シドフォビル [(S)-1(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine, cidifovir, CDV], S2242

[2-amino-7-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl) purine, S2242], ビダラビン (adenine arabinoside, vidarabine), リバビリン (α - β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide, ribavirin) を用いた。ミゾリピンとリバビリンは、町田治彦博士 (ヤマサ醤油株式会社) から供与を受けた。シドフォビルは De Clercq 博士 (Rega Institute for Medical Research, Katholieke Universiteit, Belgium) より供与された。

- 3) 薬剤感受性試験. サル痘ウイルスの薬剤感受性は, Vero 細胞におけるプラーク減少法によった. 各薬剤のサル痘ウイルスに対する 50% inhibitory concentration (IC_{50}) を測定した.
- 4) 細胞毒性試験. 抗ウイルス剤の毒性は, Cell Proliferation Reagent (WST-1) (Roche Diagnostics 社) を用いて, 測定した. 簡単に説明すると, 9 穴マイクロプレート (Falcon 社) の各ウエルに, 5000 個/穴のおおのの細胞を MEM-10FBS 中で 2 時間培養した. 次いで, 各穴の底に接着している細胞を残して, 培養液を取り除き, 各濃度に調整された抗ウイルス剤を含む MEM-10FBS を加えて, 細胞を 72 時間培養した. 各穴に 10 μ l の WST-1 を加え 37°C で 2 時間反応させた. そして, WST-1 から細胞に残存する mitochondrial succinate-tetrazolium-reductase system 活性により形成された formazan を 650nm のフィルターを使用して, ELISA リーダーで測定した. 抗ウイルス剤が含まれないコントロール細胞穴の細胞活性に比較して, 50% の細胞活性 (形成された formazan が半分になった) を呈した抗ウイルス剤の濃度を, 50% effective

concentration (EC_{50}) とした.

(倫理面からの配慮について)

特記事項はない.

C. 研究結果

- 1) 各薬剤のサル痘ウイルス増殖抑制効果. ミゾリピン, シドフォビル, S2242, ビダラビン, リバビリンのサル痘ウイルス 8 株に対する IC_{50} は, それぞれ 4.3 ± 1.9 , 4.3 ± 1.0 , 6.4 ± 0.4 , 3.7 ± 0.5 , 18 ± 9.9 μ g/ml であった. ビダラビンを除く薬剤の細胞毒性 (50% effective dose, ED_{50}) は, 200 μ g/ml を上回った. ビダラビンの ED_{50} は, 5.2 μ g/ml であった.

D. 考察

今回の検討に用いられた 5 種類の抗ウイルス剤の中で, 実際に感染症に限らず臨床応用されているのは, シドフォビル, ミゾリピン, リバビリン, ビダラビンの 4 種である. S2242 は, 現在, 臨床応用に向けて開発途中の薬剤である. De Clercq らにより開発された, ヘルペスウイルスやポックスウイルスなどの広い DNA ウイルスに抗ウイルス活性を有するシドフォビルが, 動物実験においてサル痘ウイルスが分類されるオルソポックスウイルス感染症に有効であることが報告されている. この薬剤は, ポックスウイルスに分類されるウイルスにより引き起こされる伝染性軟属腫や orf の治療に有効であると報告されている. このように, シドフォビルは, 天然痘の治療に有効な薬剤の 1 つであると考えられている. その薬剤とほぼ同等の効果をミゾリピンは示した. ミゾリピンは, イミダゾール誘導体であり, わが国では腎臓移植後の

免疫抑制薬、自己免疫疾患、ネフローゼ症候群に対する治療薬として用いられている。ミゾリピンはアデノシンリン酸化酵素でリン酸化され、1 輪三体となり、これが IMPDH や 1 リン酸化グアノシン合成酵素の活性を阻害する。つまり、細胞内 de novo 経路での 1 リン酸化イノシンから 1 リン酸化グアノシンの合成が阻害され、DNA 合成を阻害する。ミゾリピンの免疫抑制作用は、この機序によるものと考えられている。一方、本研究で明らかにされたように、ミゾリピンには強いサル痘ウイルス活性が認められる。しかし、ミゾリピンの免疫抑制作用により、ヒトにおけるサル痘ウイルス感染症や天然痘にミゾリピンを用いることには、慎重にならざるを得ない。

データには示さなかったが、単純ヘルペスウイルスに抗活性を示す DNA ポリメラーゼ阻害剤であるフォスカルネット (trisodium phosphonoformate, foscarnet) のサル痘ウイルス増殖抑制効果を検討したが、全く活性は認められなかった。

本研究成果は、ヒトサル痘や天然痘の治療薬や治療法の開発に資するものと考えられる。

E. 結論

ミゾリピン、シドフォビル、S2242、ピダラピン、リバビリンのサル痘ウイルスに対する増殖抑制効果を検討した。ミゾリピンには、シドフォビルと同等の抗サル痘ウイルス活性が認められた。動物実験においてシドフォビルの霊長類にけるサル痘に対する治療効果が確認されていることから、ミゾリピンもサル痘に対する治療薬の候補のひとつとなり得る。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) Shirato K, Nishimura, H., Saijo, M., Okamoto, M., Noda, M., Tashiro, M., Taguchi, F.: Diagnosis of human respiratory syncytial virus infections using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *J. Virol. Methods* 139:78-84, 2007
- 2) Ike, F., Bourqade, B., Sato, H., Saijo, M., Kurane, I., Morikawa, S., Yamada, Y., Jaubert, J., Berard, M., Nakata, H., Hiraiwa, N., Mekada, K., Takakura, A., Itoh, T., Obata, Y., Yoshiki, A., Montagutelli, X.: LCMV infection in a wild-derived mouse inbred strain undetected by dirty bedding sentinel health monitoring and revealed after embryo transfer. *Comp. Med.* 53:272-281, 2007
- 3) Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Fukushi, S., Yokoyama, M., Harashima, A., Sato, Y., Saijo, M., Morikawa, S., Sata, T.: Participation of both host and virus factors in induction of severe acute respiratory syndrome in F344 rats infected with SARS coronavirus. *J. Virol.* 81:1848-1857, 2007
- 4) Sakai, K., Mizutani, T., Fukushi, S., Saijo, M., Endoh, D., Kurane, I., Takehara, K., Morikawa, S.: An improved procedure for rapid determination of viral RNA sequences of avian RNA viruses. *Arch. Virol.* 152:1763-1765, 2007

- 5) Morikawa S, Saijo M, Kurane I.: Current knowledge on lower virulence of Reston Ebola virus (in French: Connaissances actuelles sur la moindre virulence du virus Ebola Resoton). *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis* 30:391-398, 2007
- 6) Saijo, M., Georges-Courbot, M.C., Marianneau, P., Romanowski, V., Fukushi, S., Mizutani, T., Georges, A.J., Kurata, K., Kurane, I., Morikawa, S.: Recombinant nucleoprotein-based diagnostic systems for Lassa fever: development of diagnostic assays, which do not require infectious virus for antibody and antigen detection. *Clin. Vac. Immunol.* 14:1182-1189, 2007
- 7) Fukushi, S., Mizutani, T., Sakai, K., Saijo, M., Taguchi, F., Yokoyama, M., Kurane, I., Morikawa, S.: Amino acid substitutions in S2 region enhance SARS-CoV infectivity in rat ACE2-expressing cells. *J. Virol.* 81: 10831-10834, 2007
- 8) Morikawa, S., Saijo, M., Kurane, I.: Recent progress in molecular biology of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 30:375-389, 2007
- 9) Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Sato, Y., Morikawa, S., Saijo, M., Itamura, S., Saito, T., Ami, Y., Odagiri, T., Tashiro, M., Sata, T.: Pathology and virus dispersion in cynomolgus monkeys experimentally infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus via different inoculation routes. *International J. Exp. Pathol.* 88:403-414, 2007
- 2.学会発表
- 1) Saijo, M: Cytokine responses in monkeys infected with monkeypox virus: xSAMPLES Japan seminar. Yokohama (2007. 5)
- 2) Saijo M: Highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, lacking B5R membrane protein expression, protects monkeys from monkeypox: The 1st US-Japan Biodefence Meeting, Washington (2007. 6)
- 3) 西條政幸: 国立感染症研究所における新興ウイルス感染症対策と感染動物実験: 第4回北海道実験動物研究会, 札幌(2007, 7)
- 4) Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Hasegawa, H., Iwata, N., Ogata, M., Fukushi, S., Mizutani, T., Kurane, I., Kurata, T., Morikawa, S.: Therapeutic vaccination with a highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, for protection of nonhuman primates from monkeypox: 41st annual meeting of the US-Japan Cooperative Medical Science, Baltimore (2007. 7)
- 5) 西條政幸、網康至、須崎百合子、永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、緒方もも子、福士秀悦、水谷哲也、佐多徹太郎、倉田毅、倉根一郎、森川茂: 高病原性コンゴ盆地型サル痘ウイルス(MPXV)と低病原性西アフリカ型MPXVの鑑別可能な定量的PCR法によるMPXV感染症の診断: 第55回日本ウイルス学会・学術集会, 札幌(2007.10)
- 6) 佐藤朝光、江下優樹、酒井宏治、見明史雄、牛島廣治、高崎智彦、小滝徹、遠藤大二、福士秀悦、西條政幸、緒方もも子、倉根一郎、森

- 川茂、水谷哲也:タイで採集されたネツタイシマカからの RDV 法による RNA ウイルスの検出: 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌 (2007.10)
- 7) 水谷哲也、西村秀一、酒井宏治、前田健、清水博之、遠藤大二、福士秀悦、西條政幸、緒方もも子、倉根一郎、森川茂:新興ウイルス感染症の網羅的検出方法の確立と応用:第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌(2007.10)
- 8) 酒井宏治、水谷哲也、福士秀悦、西條政幸、緒方もも子、遠藤大二、倉根一郎、森川茂:網羅的ウイルスゲノム検出方法を用いたリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)の同定:第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌 (2007.10)
- 9) 福士秀悦、前田健、平井明香、新倉綾、山田靖子、横山勝、吉川泰弘、水谷哲也、酒井宏治、西條政幸、倉根一郎、森川茂:コウモリ由来 ACE2 を用いた SARS コロナウイルスの感染性の解析:第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌(2007.10)
- 10) 西條政幸、網康至、永田典代、長谷川秀樹、福士秀悦、水谷哲也、飯塚愛恵、佐多徹太郎、倉田毅、倉根一郎、森川茂:高度弱毒化天然痘ワクチン LC16m8 の暴露後使用時の天然痘予防効果:霊長類におけるサル痘モデルによる検討:第 11 回日本ワクチン学会学術集会、横浜 (2007.12)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

ウイルス性胃腸炎の診断、疫学および予防に関する研究

分担研究者 中込 治 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究要旨:A 群ロタウイルスの中で、もっとも優勢を占めているG1ロタウイルス株の相対的検出率の増加とVP7 遺伝子の変化との間の関係から、多様な遺伝子プールの中から、抗原性の上で選択的有利性をもったウイルス株が増加してくるという機序が提唱されている。そこで、本研究では、G2 ロタウイルス株についても同様のことが起こっているのかどうかを分子疫学的に解析した。その結果、G2 ロタウイルス株が87%に増加した年でも、数%しかない年でも、また、中等度に流行している年でも、VP7 遺伝子の系統に変化はなく、また、抗原性を決定している部位にも変化は見られなかった。このことから、G2 ロタウイルス株の流行の大きさは G2 ロタウイルスの VP7 遺伝子の変化よりも、G1 ロタウイルス株流行の大きさに影響されている可能性がある。

A. 研究目的

A 群ロタウイルスは乳幼児の胃腸炎のもっとも重要な病原体であり、ロタウイルスにみられる多数の血清型のうち、G1がもっとも優勢を占めていることが多くの疫学的調査から明らかにされている。秋田県のある地域で10年間に優勢を占めたG1ロタウイルス株の相対的検出率の増加とVP7 遺伝子の変化との間にどのような関係があるかを調べた結果、G1 株の相対的検出頻度が増加するときには、多様なG1-VP7 遺伝子プールのなかから、抗原性決定部位にアミノ酸置換をもったVP7 遺伝子をもつG1 ロタウイルス株が優勢株として流行していることがわかった。しかし、1990-1991年ではG2 株が87.2%と最も高い頻度で検出された。そこで、90%近くまで増加した年のG2 株、25%近くまで増加した年のG2 株、数%にと

どまる年のG2 株に、G1 株でみられたのと同様な違いがあるのかどうか、すなわち、多様なG2-VP7 遺伝子プールのなかから、抗原性決定部位にアミノ酸置換をもったVP7 遺伝子をもつG2 ロタウイルス株が優勢株として流行しているの可否かを解析した。

B. 研究方法

すでに公表されているKoshimura et al (2000, Microbiol Immunol 44(6):499-510)の論文で明らかにされている10年間11シーズン中で優勢を占めたロタウイルス株の保存検体を利用した。この11シーズン中、G2 が優勢を占めた1シーズンのSH6(90H305)株のほか、SH3 (89H306)、SH4 (89H354)、SH5 (90H094)、SH11 (94H086)、合計5検体を再利用した。これら5検体からゲノム

RNA を抽出し、Reverse Transcription (RT)-PCR 法で VP7 遺伝子を増幅した後、塩基配列を決定した。決定した塩基配列をもとに Clustal W で多重整列させた後、Neighbor-Joining 法で分子系統樹を作成した。

(倫理面からの配慮について)

本研究で使用した検体はすでに公表済みの論文に基づくデータによるものである。使用した検体についての個人情報をもとより症例の属性も切り離されており、まったく遡及できないので倫理上の問題はない。

C. 研究結果

本研究で解析した 5 株の VP7 遺伝子の分子系統樹は、すでに知られている G2-VP7 遺伝子の 3 つの系統のうち、すべてが第 3 系統に属するものであり、G1-VP7 遺伝子で観察されたような多様性はなかった。また、これらの異なるパターンの株間には、いわゆる抗原性決定部位である A, B, C および F には置換が見られなかった。アミノ酸置換をみると、SH3 から SH4 にかけては 1 箇所の変化、さらに SH5 との間には、SH3 と SH4 とのそれぞれからから 1 箇所および 2 箇所の変化があった。SH5 (G2 が 25%) から SH6 (G2 が 87% に増加) にかけては、4 箇所に置換がみられた。しかし、SH6 に特異的にみられたアミノ酸配列のアミノ酸についてみると、抗原決定部位においてはよく保存されており、また構造上大きな影響がみられるとは考えがたかった。

C. 考察

本研究の結果は、昨年度行った G1VP7 遺伝子

の解析された結果から導き出された結論、すなわち、G1 株の相対的検出頻度が増加する原因には、その集団に新しい G1-VP7 遺伝子をもったロタウイルス株が侵入してくるばかりではなく、多様な G1-VP7 遺伝子プールを背景に、入れ替わりたかわりプールの中からそのときにもっとも選択的有利性をもつ VP7 遺伝子をもつ G1 ロタウイルス株が集団内で選択され流行するという仮説が、G2 ロタウイルス株については成り立たないことを示唆している。G2 ロタウイルス株の流行の大きさは G2 ロタウイルスの VP7 遺伝子の変化によるものではなく、G1 ロタウイルス株流行の大きさに影響されている可能性がある。

E. 結論

ロタウイルスの血清型が不規則に変動する背景として、多様な遺伝子プールの中から、抗原性の上で選択的有利性をもったウイルス株が増加してくるという機序が提唱されている。本研究の結果から、ロタウイルスの血清型が不規則に変動する背景として、G1 ロタウイルス VP7 遺伝子の変化が G2 ロタウイルスの VP7 遺伝子の変化よりも影響が大きい可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Montenegro FM, Correia JB, Falbo AR, Dove W, Nakagomi T, Nakagomi O, Cuevas LE, Cunliffe NA, Hart CA. Anticipating rotavirus vaccines in Brazil: detection and

- molecular characterization of emerging rotavirus serotypes G8 and G9 among children with diarrhoea in Recife, Brazil. *J Med Virol.* 79: 335-340, 2007
- 2) Ahmed K, Nakagomi T, Nakagomi O. Molecular identification of a novel G1 VP7 gene carried by a human rotavirus with a super-short RNA pattern. *Virus Genes.* 2007
- 3) Pun SB, Nakagomi T, Sherchand JB, Pandey BD, Cuevas LE, Cunliffe NA, Hart CA, Nakagomi O. Detection of G12 human rotaviruses in Nepal. *Emerging Infectious Diseases* 13, 482-484, 2007
- 4) Papaventis DC, Dove W, Cunliffe NA, Nakagomi O, Combe P, Grosjean P, Hart CA. Norovirus infection in children with acute gastroenteritis, Madagascar, 2004-2005. *Emerging Infectious Diseases* 13, 908-911, 2007
- 5) Ahmed, K, Ahn, D.D., Nakagomi, O. Rotavirus G5P[6] in a child with diarrhea, Vietnam. *Emerging Infectious Diseases* 13, 1232-1235, 2007
- 6) Cunliffe NA, Allan C, Lowe SJ, Sopwith W, Booth AJ, Nakagomi O, Regan M, Hart CA. Healthcare-associated rotavirus gastroenteritis in a large paediatric hospital in the UK. *Journal of Hospital Infection* 67(3):240-244, 2007.
- 7) Cunliffe N, Nakagomi O. Introduction of rotavirus vaccines in developing countries: remaining challenges. *Annals of Tropical Paediatrics* 27(3):157-167, 2007.
- 8) Nakagomi O, Cunliffe NA. Rotavirus vaccines: entering a new stage of deployment. *Current Opinion of Infectious Diseases* 20(5):501-507, 2007.
- 2.学会発表
- 1) 中込治 ロタウイルスワクチンの現状と課題. 第48回 日本臨床ウイルス学会, 富山 (2007.6)
- 2) Nakagomi T, Nakagomi O: Molecular epidemiology of rotavirus: Emergence of G12 strains in 2003-2005, Nepal. The Forty first Joint Working Conference on Viral Diseases: US-Japan Cooperative Medical Science Program, Baltimore, USA (2007. 7)
- 3) Nakagomi O, Nakagomi T: Molecular epidemiology of rotavirus: The genetic relationships among the VP7 genes of various G1 rotavirus strains that dominated in Akita, Japan during a 10 year period. The Forty first Joint Working Conference on Viral Diseases: US-Japan Cooperative Medical Science Program, Baltimore, USA (2007. 7)
- 4) 中込とよ子, 中込治: ロタウイルスワクチンのインパクト: 定期接種導入後のブラジルにおけるロタウイルス下痢症の発生状況. 第55回日本ウイルス学会学術集会, 札幌 (2007. 10)
- 5) Nakagomi O, Yokoo M, Nakagomi T: Rotavirus in Japan: Disease burden and the perception of parents and pediatricians towards rotavirus vaccines. The Sixth

- | | |
|---|---|
| <p>Meeting of the Asian Rotavirus
Surveillance Network Bangkok, Thailand
(2007. 12)</p> | <p>治. 小児科医および3歳児保護者のロタウイ
ルスワクチンに対する意識: 北九州市におけ
る質問紙調査. 第11回日本ワクチン学会,
横浜 (2007. 12)</p> |
| <p>6) Nakagomi O, Sherchand J, Nakagomi T,
Dove W, Pandey BD, Cuevas LE, Hart AC,
Cunliffe NA: Rotavirus Diarrhea among
children aged less than 5y in Nepal: A 2
year study (November 2005 - October
2007) The Sixth Meeting of the Asian
Rotavirus Surveillance Network Bangkok,
Thailand (2007. 12)</p> | <p>H. 知的財産権の出願・登録状況</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 特許取得
なし 2. 実用新案登録
なし 3. その他
なし |
| <p>7) 横尾美智代、宮城由美子、中込とよ子、中込</p> | |

厚生労働科学研究費補助金(国際医学協力研究事業)

分担者研究報告書

シングルプライマー増幅を用いた A 群および B 群ロタウイルスの塩基配列決定

分担研究者 谷口孝喜 藤田保健衛生大学医学部教授

研究要旨:ロタウイルスのゲノムは2本鎖 RNA からなる。この特徴を利用して、シングルプライマー増幅を用いたクローニング法が Lambden ら(1992)により開発されている。本研究では、その方法を利用して、わが国で分離され、その性状が詳細に調査されている A 群ヒトロタウイルス KU 株(G1P1A)と B 群ブタロタウイルス SKA-1 株のゲノムのクローニングを行った。KU 株については、11 本すべての全塩基配列の決定を終えた。

A. 研究目的

ロタウイルスは、ヒトを含むきわめて多くの哺乳動物、鳥類に分布し、これまで、数多くのウイルス株が分離されてきた。ロタウイルスのゲノムは、分節した11本の2本鎖 RNA で構成されるが、両末端を含め、全塩基配列が決定されているウイルス株は決して多くない。また、分離頻度、病原性ともにもっとも高い A 群に対し、B 群～G 群ロタウイルスの存在も知られている。B 群については、ヒト由来 ADRV 株、マウス由来 IDIR 株での解析は進んでいるが、他の株についての情報は少ない。

一方、ロタウイルスのゲノムの塩基配列決定は精力的になされているが、5'、3' 末端配列については、PCR に用いた共通プライマー配列をそのまま示した例が多い。

本研究では、5'、3' 末端配列についても正確に決定すべく、Lambden ら(1992)により開発させたシングルプライマー増幅を用いたクローニング法を利用し、わが国で分離され、その性状が詳細に調査されている A 群ヒトロタウイルス KU 株

(G1P1A)と B 群ブタロタウイルス SKA-1 株のゲノムのクローニングを行った。

B. 研究材料と方法

ヒトロタウイルス KU 株は MA-104 細胞で増殖した試料を、B 群ブタロタウイルス SKA-1 株を実験的に感染したブタ下痢便を試料とした。2本鎖 RNA(dsRNA)を抽出後、Lambden の方法を改変した方法でクローニングを行った。プライマーは、5' CCCTCGAGTACTAAGTACTAGTAACTGATCACCTCTAGACCTTT3' の 5' 末端をリン酸化、3' 末端側をアミノ化したものと、5' AAAGGTCTAGAGGTGATCAGTAACTAGTTAGTACTCGAGGG3' を使用した。

C. 研究結果

1) ヒトロタウイルス KU 株

上述の方法により、11 本すべての遺伝子のクローニングが可能であった。mRNA からの RT-PCR および、ゲノム dsRNA のダイレクトシー

ケンスで両末端の塩基配列決定が終了している VP4 および VP7 遺伝子を除く9本の遺伝子の全塩基配列を決定した。構造蛋白質 VP1, VP2, VP3, VP6 遺伝子はそれぞれ塩基数 3,303、2,723、2,591、1,356 で、コードアミノ酸数 1,088、892、835、397 で、非構造蛋白質 NSP1～NSP5 遺伝子はそれぞれ塩基数 1,564、1,058、1,075、750、664 で、コードアミノ酸数 486、317、310、175、197 であった。これまですでに明らかな VP4、VP7 遺伝子の結果と合わせ、総塩基数 18,505、総コードアミノ酸数 5,798 であった。

2) ブタロタウイルス SKA-1 株

上述の方法により、セグメント3～11 について、対応する長さの cDNA が得られ、クローニングが可能であった。塩基数の多い、セグメント 1、2 については、増幅が十分ではないが、クローニングを試みている。セグメント 3～11 について、現在、塩基配列の決定が進行中であり、他の B 群ロタウイルスの塩基配列との比較を行い系統樹を作成する予定である。

D. 考察

ここで使用したシングルプライマー法は、5' および 3' 末端を含めて、全塩基配列を決定するのにきわめて有効な方法であった。特に、B 群ロタウイルスのように塩基配列情報の少ないロタウイルスの解析に有用である。本研究で得られた、SKA-1 株の cDNA を用いて、本株の全塩基配列を早急に決定し、今後の B 群ロタウイルスの解析に利用したい。

E. 結論

シングルプライマー法によりクローニングを行い、A 群ヒトロタウイルス KU 株のゲノムの全塩基配列を決定し、B 群ブタロタウイルス SKA-1 株のゲノムのクローニングを行った。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Rahman M, Matthijnsens J, Yang X, Delbeke T, Arijis I, Taniguchi K, Iturriza-Gomara M, Iftekhharuddin N, Azim T, Van Ranst M.: Evolutionary history and global spread of the emerging G12 human rotaviruses. *J Virol.* 81(5): 2382-2390, 2007
- 2) Fleming FE, Graham KL, Taniguchi K, Takada Y, Coulson BS: Rotavirus-neutralizing antibodies inhibit virus binding to integrins alpha2beta1 and alpha4beta1. *Arch Virol.* 152 :1087-101, 2007

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

新種ヒトロタウイルス B219 の全遺伝子配列の解析

分担研究者 小林宣道 札幌医科大学医学部衛生学講座 教授

研究要旨: バングラデシュにおける成人下痢症例より検出された非定型的ヒトロタウイルス B219 の全遺伝子配列を決定し、その特徴を解析した。B219 の遺伝子配列は既知の A 群、B 群、C 群ヒトロタウイルスおよび A-G 群動物ロタウイルスとは異なる新種(群)のロタウイルスであると考えられた。B219 の遺伝子配列は既知のロタウイルスとは明らかに異なるが、ウイルス蛋白の基本的な構造には多くの共通点が認められた。

A. 研究目的

ロタウイルスはレオウイルス科の一員であり、分節 2 本鎖 RNA をゲノムとして有する。内殻蛋白 VP6 の抗原性および遺伝子学的性状に基づいて A-G の 7 群(種)に分類される。ロタウイルスはヒトおよび動物(哺乳類、鳥類)に広く分布するが、ヒトにおける感染が知られるのは A, B, C 群の 3 群のみである。A 群は乳幼児下痢症の主要な原因ウイルスとして世界中に広く分布する。B 群は主に成人に下痢を起こす特異なウイルスで、その分布は今のところ中国、インド、バングラデシュに限られている。C 群ロタウイルスは A 群同様、小児の下痢の原因となるが、検出頻度は非常に低い。一方、1997 年に中国の成人下痢症の原因として報告された ADRV-N(J19 株)は A, B, C 群のいずれとも異なる新しい群のロタウイルスと考えられている。我々は 2000-2001 年にバングラデシュでの疫学調査において、既知のものとは異なる非定型的なロタウイルスを成人下痢症例より検出した。本研究ではこのウイルスの分類学的位置づけを明らかにし、既知のロタウイルスとの関係を調べるため、このウイルスの全遺伝子配列を決定し、推定されるウイルス蛋白のアミノ酸配列の解析を行った。

B. 材料・方法

研究対象としたロタウイルス B219 は、2002 年 4 月にバングラデシュ中央部マイメンシ市の SK 病院において、成人下痢症例(65 歳女性)より検出されたものである。このウイルスは RT-PCR で A, B, C 群ロタウイルスとは同定されなかったこと、A-G 群ヒトおよび動物ロタウイルスとは RNA パターンが明らかに異なることから非定型的ロタウイルスと考えられた。

便検体よりウイルス RNA を抽出精製し、単一プライマー増幅法または J19 株の遺伝子配列をもとに設計したプライマーをもとに RT-PCR を行いウイルス cDNA を増幅し、得られた産物を用いてダイレクトシーケンス法にて塩基配列を決定した。各遺伝子毎に CLUSTAL W を用いて系統解析を行ったほか、推定されるウイルス蛋白のアミノ酸配列について既知のロタウイルスの特徴と比較解析した。また本研究では、これまで遺伝子配列の決定が行われていなかった B 群ヒトロタウイルスの VP1, VP3 遺伝子の遺伝子配列を決定した。

C. 研究結果

B219 株の 11 遺伝子分節の全塩基配列が決定された。11 本の各 RNA 分節は、A, B, C 群ロタ

ウイルスのそれに比べると、長さに多少の違いが認められたが、J19 株とはほぼ完全に一致していた。遺伝子配列の一致率は、B219 株は A,B,C 群ロタウイルスのそれとは 60%未満であったが、J19 株とは 87-94%の高い一致率がみられた。J19 株との間で高い一致率が見られたのは VP7 (94.0%)、VP6 (93.9%)、NSP5 (93.7%)、VP2 (93.4%) などであり、一致率が低かったのは NSP3 (87.4%)、NSP4 (87.7%) などであった。A-C 群との間では、B 群との配列の一致率は A,C 群に比して比較的高かった。

内殻蛋白で群特異抗原を有する VP6 は、B219 は B 群ロタウイルスとの相同性が比較的高く、特に N 末端および C 末端付近では一致するアミノ酸が多く見られた。

B219 の VP7 には他のロタウイルスと同様にシグナルペプチド配列が見られた。A, B 群と比較すると配列の多様性は高かったが、プロリン、システイン残基の多くが保存され、N-グリコシレーションサイトが 1 ヲ所存在した。

B219 の VP4 には、既知のロタウイルスと同様に N 末端側に、推定的なトリプシン開裂部位が認められた。これにより VP4 は VP8 と VP5 (各々アミノ酸数 249 および 562) に開裂すると考えられた。J19 株とのアミノ酸一致率は VP8 で 90%、VP5 で 97.3% であり、VP5 での高い保存性は A,B 群ロタウイルスと同様であった。

NSP4 には既知のロタウイルスのそれにおいても報告されているように、N 末端側半分に疎水性領域、C 末端側半分に親水性領域が認められた。ただし A 群、B 群ロタウイルスで報告されているような、C 末端付近のエンテロトキシン様配列と相同な配列は B219 の NSP4 には同定されなかった。

ロタウイルスの VP1 には他の 1 本鎖、2 本鎖 RNA ウイルスの RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ

蛋白と共通な、酵素活性に必須のモチーフが見られる。B219、および今回配列を決定した B 群ロタウイルスの VP1 にもそのモチーフの存在が確認された。

D. 考察

B219 の全遺伝子の配列は、既知の A-C 群ロタウイルスのそれとは明らかに異なり、新しい群に属するロタウイルスとして記載できると考えられた。また既知のロタウイルスにおいて知られるウイルス蛋白の基本的な構造、機能的なモチーフが B219 のそれらにも見出されたことは、このウイルスがロタウイルス属としての特徴を有していることを意味している。各ウイルス蛋白における保存的および多様性部位の特徴を明らかにすることにより、ロタウイルス蛋白の機能解析を進める一助になるものと期待される。

E. 結論

B219 は J19 とともに A-C 群とは異なる新種のロタウイルスであると考えられた。B219 の遺伝子配列は既知のロタウイルスのそれとは遺伝学的に異なるが、ウイルス蛋白の基本的な構造は類似していた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

- 1) Alam, M.M., Kobayashi, N., Ishino, M., Ahmed, M.S., Ahmed, M.U., Paul, S.K., Muzumdar, B.K., Hussain, Z., Wang, Y-H., Naik, T.N.: Genetic analysis of an ADRV-N-like rotavirus strain B219 detected in a sporadic case of adult diarrhea in Bangladesh. Arch. Virol. 152:199-208, 2007.

学会発表

- 1) 長嶋茂雄、石埜正穂、小林宣道：成人下痢
症由来の新奇なヒトロタウイルス B219 株の
分子疫学的解析：第 77 回日本衛生学会、
大阪(2007、3)

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

厚生労働科学研究費補助金(社会保障国際協力推進研究事業)

分担者研究報告書

分担研究課題:2006-2007年の間に流行したノロウイルスのウイルスゲノム解析

分担研究者:本村和嗣(国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター 研究員)

研究要旨:ノロウイルスは、他の RNA ウイルス同様に高変異性と考えられる。ノロウイルス感染症の監視と制御には、自然界で生じる変異の種類や分布等、変異の実態を正確に把握する必要がある。しかし、これまで国内で流行したノロウイルスのゲノム情報は著しく少ない。そこで我々は、我が国において冬期に流行したノロウイルスのゲノム情報の蓄積を開始した。今回は、2006-2007 冬期に全国各地で流行したノロウイルス GII/4 株のゲノム解析をおこなった。37 の糞便試料から GII/4 ゲノム全長(約 7.5 kbps)の塩基配列を得た。ウイルスのキャプシド蛋白質 VP1・VP2 をコードする領域について系統樹解析を行なった結果、(i) これまでに、我が国で流行した株とは異なること、(ii) 5 月に日本国内に存在し、11~12 月までに全国に広がったこと、(iii) キャプシド蛋白質の最も外側に位置するループ領域に変異をもつこと、などが示唆された。

A. 研究目的

ノロウイルスは、わが国においては秋から冬季にかけて流行する感染性胃腸炎の原因ウイルスである。ノロウイルス感染症は、食品産業、医療施設、高齢者施設などに、社会的、経済的、人的被害をもたらしている。昨秋冬季(2006-2007 シーズン)は、過去最悪の症例数が報告された。RNA をゲノムにもつノロウイルスは、他の RNA ウイルス同様に易変異性で、ゲノム情報を常時変化させている。我々は、我が国に流行するノロウイルスゲノム全長の配列情報を継続的に蓄積し、データベース化する作業を 2007 年 1 月より開始した。収集したゲノム情報の解析をもとに流行発生のしくみを検討し、ノロウイルス感染症の予防と監視に役立てることをめざしている。2006 秋冬期に全国各地で流行したノロウイルス GII/4 株のゲノム解析と予備的成果を報告する。

B. 研究方法

2006 年 05 月 15 日から 2007 年 01 月 03 日の間に、11 の道府県で発生し、各道府県の衛生研究所にてノロウイルス感染症と確定した 55 症例を対象とした(Fig. 1)。糞便中のノロウイルス

ゲノム RNA を抽出した。糞便に PBS を加え 10%懸濁液を作成し、11000×g、20 分間遠心の後、その上清を RNA 抽出液とした。この RNA 抽出液より、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を使って、ノロウイルス RNA を抽出した後、G2SKF と Oligo dT₃₀SXN (Katayama K et. al; Virology. 2002 Aug 1;299(2):225-239.)を用いて cDNA を合成した。cDNA を template にして、4 種の GII/4 特異的プライマーを用いて相互に重複する NoV ゲノム cDNA 断片 2 種(約 5.3kb, 2.5kb)を PCR 増幅した。ABI3730 (Applied Biosystems) を用い、direct sequence 法により、塩基配列を調べた。37 の糞便試料について、GII/4 ゲノム全長(約 7.5 kbps)の塩基配列を得た。

(倫理面からの配慮について)

なし

C. 研究結果

系統樹解析の結果、2006 秋冬期に我が国で流行した株の大半は、(i) これまでに、我が国で流行した株とは異なること、(ii) 5 月に日本国内で発生し、11~12 月までに全国に広がった