

型と西アフリカ型に分類され、前者の病原性は後者のそれよりも高く、コンゴ盆地型サル痘ウイルスによるヒトサル痘では致死的な場合もある。

2003年に、アメリカ合衆国においてヒトサル痘がアフリカ大陸以外で初めて流行した。この流行は、ペット用に輸入されたげっ歯類がサル痘ウイルスに感染していて、そのげっ歯類から、同時に、かつ、同一個所で飼育されていたプレーリードッグに感染が広がり、感染プレーリードッグからさらにヒトへ感染したことによる。

コンゴ民主共和国におけるサル痘の流行では、死亡する例が見られるが、西アフリカ型サル痘ウイルスが原因であった米国でのヒトサル痘の流行時には死亡した者はなく、また、比較的軽症であった。これらのことから、コンゴ盆地型サル痘ウイルスは西アフリカ型サル痘ウイルスより病原性が高いものと考えられる。実際、私たちはカニクイザルを用いてコンゴ盆地型サル痘ウイルスの病原性が、西アフリカ型サル痘ウイルスのそれより高いことを証明した。10<sup>6</sup>PFU の Zr-599 と Liberia 株をそれぞれカニクイザルに皮下接種すると、Zr-599 感染の場合には4頭中3頭が死亡し、Liberia 株感染の場合には3頭中1頭が死亡した。最近、Chenらは、その病原性の違いの遺伝子背景として、数多くある遺伝子の中でも *D14L*、*D10L*、*B10R* に責任があるものと考えている (Chen N, et al., *Virology* 340:46-63, 2006) と報告している。そこで本研究では、Zr-599 株と Liberia 株の *D14L*、*D10L*、*B10R* 遺伝子の塩基配列を決定した。

## 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 2 株 (Zr-599 株と Liberia 株) を用いた。Zr-599 株および Liberia 株は、それぞれコンゴ民主共和国およびリベリアのヒトサル痘患者から分離された。
- 2) カニクイザルにおけるサル痘ウイルス感染実験。それぞれ 4 頭のカニクイザルに、1 頭あたり 10<sup>6</sup>PFU のサル痘ウイルス Zr-599 株および Liberia 株を大腿部皮下接種経路で感染させた。感染後、毎日臨床症状を観察した。Liberia 株サル痘ウイルスを感染させた4頭中1頭は、グラム陽性球菌敗血症を合併し、感染後11日目にサル痘に非典型的な経過で死亡した。この個体については、検討から除外した。
- 3) *D14L*、*D10L*、*B10R* 遺伝子の塩基配列の決定。*D14L*、*B10R*、および、*B14R* 遺伝子の塩基配列は、ダイレクトシーケンス法により、ABI3100 を用いて決定された。*D14L*、*D10L*、*B10R* 遺伝子の PCR による増幅に用いられたプライマーセットは、*D14L*-F (GTTGTATGAGAGTATGATC) と ( D14L-R TATGAAGGTGGAGAGCGTGAC )、*B10R*-F ( CATATTATACACTGGTTAACG ) と *B10R*-R (CTCTACTTGTGAAGAACTATC)、( D10L-F CTATACTCATATTAATCCATGGAC ) と *D10L*-R

(GTTGGTATATTCCATAGTAGC)であった。

(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) Zr-599 株と Liberia 株の霊長類のける病原性。4頭のZr-599株感染カニクイザルのうち、3頭(75%)が死亡した。一方、3頭のLiberia株感染カニクイザルにおいては1頭(33%)が死亡した。末梢血液中のウイルスゲノム血症レベルを比較すると、Zr-599株感染カニクイザルにおけるレベルの方がLiberia株感染カニクイザルにおけるレベルより約10倍高い値を示した(データ未表示)。

2) *D14L*, *D10L*, *B10R* 遺伝子の塩基配列。本研究で決定されたこれらの遺伝子の塩基配列は、GenBank にそれぞれ登録された(表)。207個からなる分泌型補体結合蛋白(secreted complement binding protein)をコードする遺伝子はLiberia株では欠損していた。Zr-599株の病原因子(virulent factor)のアミノ酸は221個と予想されるのに対して、Liberia株は118個のアミノ酸からなると予想された。Liberia株のIL-1B結合蛋白(IL-1B binding protein)をコードするB14R遺伝子塩基配列解析結果によると、Zr-599のその蛋白は207個のアミノ酸からなる蛋白であるのに対して、同じくコンゴ盆地型Zaire-96-I-1株のそれは326個のアミノ酸からなる蛋白であった。一

方、Liberia株のIL-1B結合蛋白は、163個のアミノ酸からなる蛋白であった。

### D. 考察

本研究では、コンゴ盆地型サル痘ウイルスZr-599株が西アフリカ型サル痘ウイルスLiberia株より霊長類において病原性が高いことが確認された。この病原性の違いには、*D14L*, *D10L*, *B10R* 遺伝子の差異が寄与しているのではないかと指摘されていた。

興味深いことに、Zr-599のIL-1B結合蛋白のアミノ酸は、同じくコンゴ民主共和国でヒトサル痘患者から分離されたサル痘ウイルスZaire-96-I-1株のそれが326個のアミノ酸からなる蛋白であるのに対して、フレームシフトの結果207個のアミノ酸からなる蛋白であった。詳細な機能解析の研究を要するものの、Zr-599株のIL-1B結合蛋白の機能は、欠損しているものと予想される。つまり、この欠損IL-1B結合蛋白を発現するZr-599は、Liberia株より強い病原性を示すことから、IL-1B結合蛋白は、病原性を規定する因子でない可能性が高い。

以上の成績からZr-599株の病原性の方がLiberia株のそれより高いのは、1)Liberia株で*D14L*遺伝子が欠如していること、2)Liberia株の発現する病原因子が機能していないことによるものと考えられる。

### E. 結論

Zr-599株の病原性は、Liberia株のそれよりも高いことを示した。その病原性の違いの原因遺伝子として、これまで予想されていた

D14L, D10L, B10R 遺伝子の中でも、D14L と B10R がより強く、その病原性の違いに寄与していると予想される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Saijo, M., Suzutani, T., Mizuta, K., Kurane, I., Morikawa, S.: Characterization and susceptibility to antiviral agents of herpes simplex virus type 1 that codes a unique thymidine kinase gene with an amber codon between the first and the second initiation codons. *Arch Virol* 153:303-314, 2008
- 2) Saijo, M., Ami, Y., Suzuki, Y., Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Ogata, M., Fukushi, S., Mizutani, T., Iizuka, I., Sakai, K., Sata, T., Kurata, T., Kurane, I., Morikawa, S.: Diagnosis and assessment of monkeypox virus (MPXV) infection by quantitative PCR assay: differentiation of Congo Basin and West African MPXV strains. *Jpn J Infect Dis* 61:140-142, 2008
- 3) Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Fukushi, S., Harashima, A., Sato, Y., Saijo, M., Taguchi, F., Morikawa, S., Sata, T.: Mouse-passaged severe acute respiratory syndrome coronavirus induces an exacerbated pneumonia in mice. *Am J Pathol* 172:1625-1637, 2008
- 4) Ami, Y., Nagata, N., Shirato, K., Watanabe, R., Iwata, N., Nakagaki, K., Fukushi, S., Saijo, M., Morikawa, S., Taguchi, F.: Co-infection of respiratory bacterium with SARS coronavirus induces an exacerbated pneumonia in mice. *Infect Microbiol* 52:118-127, 2008
- 5) 福士秀悦, 平井明香, 新倉綾, 山田靖子, 前田健, 吉川泰弘, 横山勝, 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発現細胞を用いた SARSコロナウイルスの感染性の解析. *獣医畜産新報* 61:199-201, 2008
- 6) 北本憲利, 森川茂, 西條政幸, 加藤陽二, 田中智之: 抗ワクシニアウイルス単クローン抗体のサル痘ウイルスに対する反応性とその有用性. *感染症学雑誌* 82:224-225, 2008
- 7) Watanabe, S., Mizutani, T., Sakai, K., Kato, K., Tohya, Y., Fukushi, S., Saijo, M., Yoshikawa, Y., Kurane, I., Morikawa, S., Akashi, H.: Ligation-mediated amplification for effective rapid determination of viral RNA sequences (RDV). *J Clin Virol* 43:56-59, 2008
- 8) Saijo, M., Morikawa, S., Kurane, I.: Real-time quantitative polymerase chain reaction for virus infection diagnostics. *Exp Opin Med Diagnost* 2:1155-1171, 2008

## 2.学会発表

- 1) 西條政幸, 塩田智之, 錫谷達夫, 倉根一郎, 森川茂: 293T細胞におけるHSV-1組換えチミジンリン酸化酵素の発現と薬剤感受性試験への応用: 第18回抗ウイルス療法研究会, 鹿児島(2008. 5)
- 2) Saijo, M.: Virological insight into Crimean-Congo hemorrhagic fever outbreak in Xinjiang, China: Third AREVA-Pasteur Forum, Shanghai, China (2008. 6)
- 3) Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Hasegawa, H., Iwata, N., Ogata, M., Fukushi, S., Mizutani, T., Kurane, I., Kurata, T., Morikawa, S.: Post-exposure vaccination with a highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, for protection of nonhuman primates from monkeypox: 13th International Conference on Infectious Diseases, KL, Malaysia (2008. 6)
- 4) Izuka, I., Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Hasegawa, H., Ogata, M., Sakai, K., Fukushi, S., Mizutani, T., Kurane, I., Morikawa, S.: The loop-mediated isothermal amplification-based diagnostics for monkeypox virus infection: 13th International Conference on Infectious Diseases, KL, Malaysia (2008. 6)
- 5) 西條政幸: 1類感染症: 第3回輸入感染症講習会, 逗子市(2008. 9)
- 6) 水谷哲也, 山尾卓也, 江下優樹, 片野晴隆, 黒田誠, 関塚剛史, 渡辺俊平, 明石博臣, 竹原一明, 木原悠希, 佐藤朝光, 西村美保, 酒井宏治, 福士秀悦, 西條政幸, 緒方もも子, 中内美名, 倉根一郎, 森川茂: ウイルスの網羅的検出法(RDV法)と次世代シーケンサーによる新しいウイルスの発見: 第56回日本ウイルス学会学術集会, 岡山市 (2008. 10)
- 7) 酒井宏治, 網康至, 水谷哲也, 岩切章, 山本正悟, 平井明香, 須崎百合子, 滝本一弘, 田原口元子, 飯塚愛恵, 福士秀悦, 西條政幸, 永田典代, 長谷川秀樹, 山田靖子, 倉根一郎, 森川茂: 急性呼吸器疾患患者から分離された新型レオウイルスの性状解析及びマウスでの感染実験: 第56回日本ウイルス学会学術集会, 岡山市 (2008. 10)
- 8) 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 福士秀悦, 西條政幸, 森川茂, 佐藤由子, 佐多徹太郎: SARS-CoV感染動物モデルを用いたSARS発症機序の解明と治療法の検討: 第56回日本ウイルス学会学術集会, 岡山市 (2008. 10)
- 9) 石岡賢, 佐藤友香, 金子久俊, 西條政幸, 錫谷達夫: HSV-1に対するアシクロビルとインターフェロンが相乗効果を示す機構について: 第56回日本ウイルス学会学術集会, 岡山市 (2008. 10)
- 10) 西條政幸, 網康至, 須崎百合子, 永田典代, 長谷川秀樹, 飯塚愛恵, 塩田智之, 緒方もも子, 酒井宏治, 中内美名, 福士秀悦, 水谷哲也, 倉根一郎, 森川茂: 劇

症型サル痘に関する解析:性状, ウイルス学的所見, 病理: 第56回日本ウイルス学会学術集会, 岡山市 (2008. 10)

- 11) 飯塚愛恵, 西條政幸, 網康至, 須崎百合子, 永田典代, 長谷川秀樹, 塩田智之, 緒方もも子, 酒井宏治, 中内美名, 福士秀悦, 水谷哲也, 倉根一郎, 森川茂: Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法によるサル痘迅速診断: 第56回日本ウイルス学会学術集会, 岡山市 (2008. 10)
- 12) 福士秀悦, 中内美名, 酒井宏治, 西條政幸, 水谷哲也, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂: リフトバレー熱ウイルスのNP1に対する単クローン抗体の作製と抗原検出ELISA法への応用: 第56回日本ウイルス学会学術集会, 岡山市 (2008. 10)
- 13) 中内美名, 福士秀悦, 酒井宏治, 水谷哲也, 緒方もも子, 倉根一郎, 西條政幸, 森川茂: 南米出血熱の実験室診断法の

開発: 第56回日本ウイルス学会学術集会, 岡山市 (2008. 10)

- 14) 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, 塩田智之, 佐多徹太郎, 倉田毅, 倉根一郎, 森川茂: 高度弱毒痘そうワクチンLC16m8の霊長類におけるサル痘発症予防: 長期予防効果に関する検討: 第12回日本ワクチン学会学術集会, 熊本市 (2008. 11)

#### 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

表. コンゴ盆地型と西アフリカ型のサル痘ウイルスの病原性の違いに対する責任遺伝子候補 *D14L*, *B10R*, *B14R* の塩基配列解析結果に基づく性質

ORF	ウイルス株	サイズ	機能	アミノ酸配列の相同性	GenBank アクセション番号
<i>D14L</i>	Zr-599	207	分泌型補体結合蛋白	-	AB371721
	Liberia	欠損			This study
	Zaire-96-I-1	207		100	AF380138
	Liberia_1970_184	欠損			DQ011156
<i>B10R</i>	Zr-599	221	病原因子 (virulence factor)	-	AB371718
	Liberia	118*		100	AB371722
	Zaire-96-I-1	221		100	AF380138
	Liberia_1970_184	118*		100	DQ011156
<i>B14R</i>	Zr-599	207†	IL-1β binding protein	-	AB371719
	Liberia	163‡		99.4	AB371723
	Zaire-96-I-1	326†		96.6	AF380138
	Liberia_1970_184	163‡		99.4	DQ011156

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)

研究分担者研究報告書

ウイルス性下痢症の疫学、ワクチンと疾病負担に関する研究

.....  
ウイルス性胃腸炎の診断、疫学および予防に関する研究

研究分担者 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:わが国でロタウイルスワクチンが認可・導入された場合の影響を評価することを目的として、既報の疫学的データをもとに必要な指標を算出し、決定樹を含むモデルを作成した。このモデルを使い、現状およびワクチン導入を行った場合のロタウイルス下痢症による入院患者発生数がどのようになるかを予測した。その結果、5歳までに約6.5%の小児がロタウイルスによる入院を経験し、出生コホート1000人の仮定の行政単位では、67人が入院することになると推定した。ロタウイルスワクチンが任意接種として導入されれば、入院患者は51人、定期接種となれば18人になると推定された。

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、わが国においても5歳未満の乳幼児下痢症による入院の約半数を占める病因となっている。現在、2つの有効性と安全性が確立されたロタウイルスワクチンが存在し、世界の100カ国以上で認可され、少なくとも10カ国で定期接種に導入されている。ロタウイルスワクチンを定期接種に導入した国ではすでにワクチンの効果によると思われる下痢症に占めるロタウイルスの割合の低下が起こっている。本研究では、わが国でロタウイルスワクチンが認可・導入された場合の影響を評価することを目的とした。

B. 研究方法

すでに公表されている Nakagomi T, et al. J Infect Dis, 192[Suppl 1]: 106-110, 2005 の論文から、本研究に必要な疫学的指標を算出した。これ

らの指標を用いた決定樹を含むモデルを作成し、現状およびワクチン導入を行った場合の入院患者発生数および直接医療費に関するシミュレーションをコンピュータにより試行した。

(倫理面からの配慮について)

本研究で使用したデータはすでに公表されている論文から引用し、モデル化したものであるため倫理上の問題はない。

C. 研究結果

現状およびワクチン導入を行った場合の入院患者発生数および直接医療費に関するシミュレーションを行いうるコンピュータプログラムを作成し、このモデルから得た数値が現実の下痢症入院症例の年齢分布とよく適合することを確認した。このモデルによれば5歳までに約6.5%の小児がロタウイルスによる入院を経験し、直接医療費は人口

15万人の地方都市(出生コホート1000人)では約67人が入院することになり、約1000万円になると推定した。ロタウイルスワクチンが任意接種として導入されれば、入院患者は約51人、定期接種となれば約18人になると推定された。

### C. 考察

入院にいたる重症ロタウイルス下痢症の抑制効果が95%であるワクチンが認可されても、直ちに入院患者が消失するわけではない。現行の予防接種施行状況の中で、どのようにロタウイルスワクチンを接種するかに関するモデルが必要である。特に、ロタウイルスワクチンには、第1回目の接種を6~12週という限られた期間に行い、2回目の接種を24週未満に終了しなければならないという制約がある。世界のほとんどの国でDPT三種混合ワクチンと(ポリオと)の同時接種を行っている。わが国では、3ヶ月未満の乳児全員を対象とした接種が可能なワクチンはBCGのみである。しかし、BCGの接種は免疫不全児への接種を回避するため、現実には生後3ヶ月に達してから行われている。したがって、6~12週の全乳児への接種には心理的バリアがあろう。さらに、同時接種を行わないとすれば、BCG、ポリオ、ロタウイルスという3つのワクチンを限られた時期に相前後して行う実施上の困難が伴う。社会全体でワクチンの影響があらわれるような接種率の向上には工夫が必要である。

### E. 結論

わが国にロタウイルスワクチンが認可・導入されても、任意接種下では少なくとも1ドーズを接種する乳児は25%程度にとどまると想定され、定期

接種化により接種率が80%程度に上昇しなければ、社会全体に入院数の減少として目に見えるような変化は起こらないと想定される。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Nakagomi T, Cuevas LE, Gurgel RG, Elrokhsi SH, Belkhir YA, Abugalia M, Dove W, Montenegro FM, Correia JB, Nakagomi O, Cunliffe NA, Hart CA. Apparent extinction of non-G2 rotavirus strains from circulation in Recife, Brazil, after the introduction of rotavirus vaccine. *Archives of Virology* 153: 591-593, 2008
- 2) Kheyami AM, Nakagomi T, Nakagomi O, Dove W, Hart CA, Cunliffe NA. Molecular Epidemiology of Rotavirus Diarrhea among Children in Saudi Arabia: First detection of G9 and G12 Strains. *Journal of Clinical Microbiology* 46:1185-1191, 2008
- 3) Gurgel RQ, Cunliffe NA, Nakagomi O, Cuevas LE. Rotavirus genotypes circulating in Brazil before national rotavirus vaccination: a review. *Journal of Clinical Virology* 43:1-8. 2008
- 4) Naghipour M, Nakagomi T, Nakagomi O. Issues with reducing the rotavirus-associated mortality by vaccination in developing countries. *Vaccine*. 26: 3236-3241 2008
- 5) Nakagomi T, Correia JB, Nakagomi O, Montenegro FM, Cuevas LE, Cunliffe NA, Hart CA. Norovirus infection among children with



- acute gastroenteritis in Recife, Brazil: disease severity is comparable to rotavirus gastroenteritis. *Archives of Virology* 153: 957-960, 2008
- 6) Bozdayi G, Dogan B, Dalgic B, Bostanci I, Sari S, Battaloglu NO, Rota S, Dallar Y, Nishizono A, Nakagomi O, Ahmed K. Diversity of human rotavirus G9 among children in Turkey. *Journal of Medical Virology* 80:733-740, 2008
- 7) Al-Mashhadani MN, Nakagomi O, Dove W, Ahmed H, Nakagomi T, Hart CA, Cunliffe NA. Norovirus gastroenteritis among children in Iraqi Kurdistan. *Journal of Medical Virology* 80:506-509, 2008
- 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56回 日本ウイルス学会, 岡山 (2008.10)
- 2) 中込とよ子: ロタウイルス脳炎・脳症: 抗原血症との関連はあるのか. 第56回日本ウイルス学会学術集会, 岡山 (2008. 10)
- 3) 中込治, 中込とよ子: ネパールに大規模出現した新興株 G12P[6]ロタウイルスの分子疫学第56回 日本ウイルス学会, 岡山 (2008.10)
- 4) 中込とよ子, 中込治: 東アジアと南米に新興出現した G12P[9]ロタウイルスのゲノムの相同性 第56回 日本ウイルス学会, 岡山 (2008.10)
- 5) 中込治, 中込とよ子, 横尾美智代, 佐藤尊範: ロタウイルスワクチンのわが国への導入に関する検討. 第12回日本ワクチン学会, 熊本 (2008. 11)
- 6) 中込とよ子, 中込治: 定期接種に導入したロタウイルスワクチンの有効性の検証: ブラジルの調査 第12回日本ワクチン学会, 熊本 (2008. 11)
- 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

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

ウイルス性下痢症の病態解析に関する研究:

VP4 上の交叉性中和エピトープの抗原モザイクを有する感染性ロタウイルスの調製

研究分担者 谷口孝喜 藤田保健衛生大学医学部教授

研究要旨:我々は、すでにヘルパーウイルスを用いた系ではあるが、ロタウイルスのリバースジェネティクス系を開発した。本年度は、この系を利用して、VP4 上の交叉性中和エピトープの抗原モザイクを有する感染性ロタウイルスの調製を行った。VP4には、3つの交叉性中和エピトープ(I, II, および III)が存在するが、部位特異的変異を導入することにより、サルロタウイルス SA11 株由来の VP4 の交叉性中和エピトープ II を、ヒトロタウイルス DS-1 株のそれと入れ替えた。得られたキメラウイルスは、交叉性中和エピトープ II の抗原性は確かに DS-1 型に、他のエピトープは SA11 型であった。また、増殖能、プラーク形成能についても、SA11 型と DS-1 型の中間の性質を示した。

A. 研究目的

ロタウイルスは、冬季乳幼児嘔吐下痢症の病原ウイルスである。ロタウイルスは、ヒトを含むわけて多くの哺乳動物、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。ウイルスの複製、病原性の解析において、他のウイルスで開発されているようなリバースジェネティクス系はなかなか開発されず、2006年に、我々の研究室で初めて、ヘルパーウイルスを利用した系ではあるが、その開発に成功した。その時点では、人工的な変異は、アミノ酸変異を伴う塩基配列の変異までは行えず、制限酵素切断部位の破壊にとどまっていた。ここでは、人工的にアミノ酸変異を伴う塩基変異を加え、新たなロタウイルスを人工的に作成することを試みた。標的を VP4 上の交叉性中和エピトープとし、SA11 由来エピトープ II を DS-1 由来エ

ピトープ II に置換した、抗原モザイクを有するロタウイルスの調製を行うことを目的とした。

B. 研究材料と方法

サルロタウイルス SA11 株の VP4 遺伝子上の交叉性中和エピトープ II をヒトロタウイルス DS-1 株に置換したプラス鎖 RNA 発現プラスミドを構築した。このプラスミド DNA を COS7 細胞に導入し、ヘルパーウイルスとしてのヒトロタウイルス KU 株を感染し、KU 株に対する抗 VP4 中和モノクロン抗体存在下で培養した。得られた組換えロタウイルスを選別し、プラーク純化を行い、その VP4 遺伝子を解析した。さらに得られた組換えロタウイルスの高原性、細胞での増殖能、プラーク形成能などの生物学的性状を測定した。

C. 研究結果

1) 組換えロタウイルスの調製

上述の方法により、サルロタウイルス SA11 株の VP4 上の交叉性中和エピトープ II がヒトロタウ

ウイルス DS-1 株のエピトープに置換した抗原モザイクを有する組換えロタウイルスの作出が可能であった。このウイルスの分離にあたっては、ポリアクリルアミド電気泳動による二本鎖 RNA の泳道パターン、VP4 遺伝子の塩基配列決定により確認した。

#### 2) 組換えロタウイルスの性状

VP4 の抗原モザイクを有するウイルスは、以下の性質を示した。

- a) SA11 株の VP4 上の交叉性中和エピトープ II に反応する中和モノクロン抗体: KU-6B11, ST-1F2 抗体は、本抗原モザイクウイルスには反応せず、DS-1 株の VP4 上の交叉性中和エピトープ II に反応する中和モノクロン抗体: S2-2F2 抗体は反応した。一方、交叉性中和エピトープ I あるいは III に反応する中和モノクロン抗体の反応に変化はなかった。
- b) 得られた高原モザイクウイルスの1段階増殖能の検討では、親株である SA11-KU の組換え体と、ヒトロタウイルス DS-1 株の中間の増殖能を示した。同様に、ブランクサイズも親株である SA11-KU の組換え体と、ヒトロタウイルス DS-1 株の中間のサイズを示した。

#### D. 考察

我々の開発したリバースジェネティクス的手法を利用して、VP4 上の交叉性中和エピトープの抗原モザイクを有する感染性組換えロタウイルスを作成した。これは、アミノ酸に人工的に変異を加えた感染性ウイルスの調製としては、世界初のウイルスである。将来的に、VP7 にも中和エピトープの抗原モザイクを有するロタウイルスを

調整することで、次世代のロタウイルスワクチンの開発にも繋がる研究成績と言い得る。ただ、本リバースジェネティクス系の効率はいわゆる低い現状なので、効率を上げるべく、条件の詳細な検討が必要である。

#### E. 結論

リバースジェネティクス系を利用して、VP4 上の交叉性中和エピトープの抗原モザイクを有する感染性ロタウイルスの調製を行った。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Komoto S, Kugita M, Sasaki J, Taniguchi K: Generation of recombinant rotavirus with an antigenic mosaic of cross-reactive neutralization epitopes on VP4. *J Virol* 82(13):6753-6757, 2008
- 2) K Sugata, K Taniguchi, A Yui, F Miyake, S Suga, Y Asano, M Ohashi, K Suzuki, N Nishimura, T Ozaki, T Yoshikawa: Analysis of rotavirus antigenemia and extraintestinal manifestations in children with rotavirus gastroenteritis. *Pediatrics* 122:392-397, 2008
- 3) Yi-Pei Lin, Su-Yuan Chang, Chuan-Liang Kao, Koki Taniguchi, Li-Ming Huang, Fu-Tian Chiang, and Chun-Nan Lee: Determination of Rotavirus VP6 Genogroup by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol* 46(10):3330-3337, 2008

#### 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

下痢症ウイルスの病原性

バングラデシュにおける小児および成人由来ロタウイルスに関する分子疫学的研究

研究分担者 小林宣道 札幌医科大学医学部衛生学講座

研究要旨

小児下痢症の主要な原因ウイルスであるロタウイルスは成人下痢症からも低頻度ながら検出されることが知られるが、成人および小児に由来するロタウイルスの関連についてはあまり調べられていない。本研究では、バングラデシュ北部マイメンシン市において、2004-2006年の2年間、小児および成人より下痢便検体を採取し、ロタウイルスの検出および遺伝子型別を行なうとともにそれらの系統遺伝学的関係を解析した。小児、成人におけるロタウイルスの検出率は各々26.4%、10.1%であり、遺伝子型ではともにG2が最も多く、G1、G9がそれに続き、新興型のG12も少数検出された。小児および成人由来の、G1、G2、G9、G12を規定するVP7遺伝子、P[4]、P[6]、P[8]を規定するVP4遺伝子は各型内で互いに約98%以上の一致率を示し、系統解析ではいずれも単一のクラスターに分類された。以上の結果から、小児由来、成人由来のロタウイルスは遺伝学的に極めて近いものであることが明らかとなり、主要な型、低頻度の型に関係なく、遺伝学的に同じロタウイルスが小児と成人の間で伝播していることが示唆された。

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、11本の分節化した2本鎖RNAをゲノムとして有する。ヒトの腸管に感染することが知られるA-Cの3群のうち最も広く分布するのがA群ロタウイルス（以下、ロタウイルスと呼ぶ）である。ウイルス粒子の最外層を構成する2種の構造蛋白VP7、VP4の遺伝子配列により遺伝子型（各々G型、P型）が区別され、ヒトではG1-G4、P[4]、P[6]、P[8]が普遍的に多い。

ロタウイルスは5歳未満の小児における重症下痢症の主要な原因ウイルスであり、先進国、発展途上国を問わず世界中に広く分布している。全世界では途上国を中心に毎年60万人以上の乳幼児がロタウイルス下痢症により死亡していると推定されている。そのため、ロタウイルスワクチンの開発が早くから試みられ、現在ロタウイルス

下痢症の重症化を予防する効果が認められた2種類のワクチンが2006年以降、世界的に普及している。しかしロタウイルス下痢症による小児の死亡数が最も多い南アジア地域ではまだそれらのワクチンは使用されていない。現在使用されているワクチンは生ワクチンであり、その抗原型はこれまでヒトにおける主流ウイルスの型（G1P[8]、またはG1-G4およびP[8]）が用いられている。しかし近年世界的に分布が拡大している新興型（G9、G12等）に対する有効性は十分に検証されていない。したがってロタウイルスの流行疫学、すなわちその抗原型の頻度を疫学的に調査することは、既存のワクチンの有効性を評価したり、また今後ワクチンの改良を行なうための基礎資料として重要である。特にバングラデシュは南アジアでロタウイルス下痢症の多い地域であり、ロタウイルスの疫学調査の

必要性については論を俟たない。

ロタウイルスは小児のみならず、成人下痢症からも低頻度ながら検出されることが知られる。成人では地域散发例、施設内集団感染（特に高齢者）、旅行者下痢症などとして知られる。しかし小児のロタウイルス下痢症との関連はよくわかっておらず、流行曲線や抗原型の比較により、関連を論じた研究が数編あるに過ぎない。唯一詳細な研究としては中国武漢市での分子疫学的研究（2006）があり、成人と小児由来に最も多かった G3 型ロタウイルスが遺伝学的に同一であり、同じロタウイルスが小児と成人の間で伝播していることが初めて報告された。しかし他の地域、他の抗原型に関してはわかっていない。

本研究はバングラデシュの北部マイメンシン市周辺での小児および成人下痢症におけるロタウイルスの分布および遺伝子型を 2 年間にわたり調査・解析したものである。この研究ではロタウイルス流行株の遺伝子型とその世界的な系統遺伝学的位置づけを小児および成人由来ロタウイルスについて解析し、さらに小児、成人由来ロタウイルスの関連を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

バングラデシュ北部のマイメンシン市および郊外の 3 医療施設において、2004 年 7 月から 2006 年 6 月の 2 年間、下痢症状を呈して来院した成人および小児より便検体を採取し、研究材料とした。本研究では 16 歳未満を小児、16 歳以上を成人と定義し、小児より 1627 検体、成人より 913 検体、計 2540 検体を採取した。便材料は PBS にて 10% 懸濁液としてその後の解析に用いた。ロタウイルスの検出は、10% 懸濁液よりウイルス RNA を抽出し、これをポリアクリルアミドゲルにおいて電気泳動し、銀染色により 11 本の分節 RNA (RNA パターン) を同定することにより行なわれた (RNA-PAGE 法)。

ロタウイルス陽性検体からは RNAid kit によりウイルス RNA を抽出・精製し、これを用いて Multiplex RT-PCR により G-type、P-type を決定した。また NSP4 遺伝子型、VP6 遺伝子型についても Multiplex RT-PCR により決定した。

ロタウイルスの系統遺伝学的解析のため、同定された各 G-type、P-type における VP7 遺伝子および VP4 遺伝子の全長の配列を RT-PCR-ダイレクトシーケンス法により決定した。RT-PCR 産物は Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System により精製し、BigDye Terminator ver.3.1 cycle sequencing kit を用いてダイデオキシ法によるシーケンス反応を行い、配列を ABI Prism 3100 genetic analyzer により決定した。得られた遺伝子配列は、GenBank に登録されている世界中の代表的な G 型、P 型ウイルス株の配列情報と比較し、Genetyx-Win ver.5.1 を用いて、2 つの遺伝子配列の一致率の計算を行い、MEGA ver.4.1 を用いて多数の遺伝子配列からの系統解析を行った。一部の興味深いウイルス株については VP6、NSP1-NSP5 の遺伝子配列の決定と系統解析も行った。

一部のロタウイルス株について性状を詳しく調べるため、分離培養を行なった。便検体の懸濁液を滅菌濾過フィルターにより濾過した濾過液にアセチル化トリブシンを加えて活性化させた後、MA104細胞に接種し、回転培養を 3-12 日行ない、さらに 4 代目まで経代培養した。ロタウイルスの組織培養における増殖の有無は RNA-PAGE 法により確認した。

### (倫理面からの配慮について)

本研究においては協力医療機関の担当者（医師）に依頼し、下痢症患者にロタウイルス調査について説明を行い、便検体採取への同意を得た。

## C. 研究結果

- (1) ロタウイルスは小児からの下痢便検体の 26.4% (430/1627)、成人からの下痢便検体の 10.1% (92/913) に検出された。成人では 31-40 歳の年齢群での検出率が最も高く (14.3%)、51-60 歳 (12.6%) がそれに続いた。ロタウイルスの検出率は、小児、成人ともに 3-4 月に最も高かったが、小児では 8 月にもピークが見られた。
- (2) 全ロタウイルス陽性検体より、各月の検出率に応じた数の代表検体を各病院より任意に選び、小児 113 検体、成人 42 検体の計 155 検体について G 型、P

型を決定した(表1)。小児および成人で最も高頻度であったのは G2 (各々 54.0%、47.6%)、続いて G1 (各々 21.2%、26.2%)、G9 (各々 15.9%、9.5%) であった。G12 は小児 4 検体、成人 1 検体に検出された。G2 ロタウイルスでは P[4]を有するものが最も多く、少数のものが P[6]または P[8]を伴っていた。G1 は P[8]を持つものが多かった。G9 ロタウイルスでは P[4]、P[6]、P[8]のいずれの型も認められた。G12 では 1 検体のみ P[4]で、他はすべて P[6]であった。

- (3) ロタウイルスの RNA パターンの観察では、G2 ロタウイルスはショートパターンを示し、小児、成人由来ウイルスは非常に似たパターンを示した。G1、G9、G12 ロタウイルスはロングパターンを示し、小児と成人の間で RNA パターンは類似していたが、RNA 分節 2、3、7、8 には株による若干の泳動度の違いが認められた。
  - (4) 各 G 型より代表的ロタウイルス株を選び、計 39 株について主に VP7、VP4 遺伝子の配列をもとに系統遺伝学的解析を行った。
  - (5) G1 ロタウイルス 11 株 (小児 6 株、成人 5 株) の VP7 遺伝子は、互いに 98.9-99.9% の高い一致率を示し、系統樹ではクラスター 5 の中の単一のサブクラスター 5a に位置していた。クラスター 5 にはインド、タイなどのアジアのウイルスが多く含まれていた。
  - (6) G2 ロタウイルス 12 株 (小児 6 株、成人 6 株) の VP7 遺伝子は、互いに 97% 以上の高い一致率を示し、系統樹ではクラスター 5 の中の単一のサブクラスター 5a に位置していた (図 1)。このサブクラスターにはナイジェリアなどのアフリカのロタウイルスが含まれており、バングラデシュの G2 ロタウイルスはそれらとは 97.5-98.3% の高い一致率を示した。
  - (7) G9 ロタウイルス 11 株 (小児 6 株、成人 5 株) の VP7 遺伝子は、互いに 98% 以上の高い一致率を示し、系統樹では近年世界中で分布が拡大しているクラスター 3 の中に位置していた (図 2)。
- このクラスターの中のウイルスでは、タイやオーストラリアで検出されたウイルスと極めて高い一致率を示した。
- (8) G12 ロタウイルス 5 株 (小児 4 株、成人 1 株) の VP7 遺伝子は、互いに 97.8-100% の高い一致率を示し、系統樹では 2000 年以降世界各地で報告されているロタウイルスのクラスターであるクラスター 3 に位置していた。今回調べられた G12 株は、最近バングラデシュのダッカで検出された G12 ロタウイルスや、インド、ネパールで報告されたウイルスと特に高い一致率 (97.5-98.2%) を示した。
  - (9) G2P[4]ロタウイルス 4 株 (小児 2 株、成人 2 株) の VP4 遺伝子配列は互いに 98.1-98.6% と高い一致率を示し、系統樹では同じクラスター 3 に属していた。
  - (10) P[6]ロタウイルス 5 株 (小児 4 株 : G9 (2 株)、G12 (2 株); 成人 1 株 (G12)) の VP4 遺伝子配列は互いに 98-100% の高い一致率を示し、系統樹では同じクラスター 2 に属していた。
  - (11) P[8]ロタウイルス 9 株 (小児 4 株、成人 5 株 ; G1、G2、G9) の VP4 遺伝子配列は互いに 98-100% の高い一致率を示し、系統樹では同じクラスターに属していた。
  - (12) 非定型的な遺伝子型 G2P[8]を有する SK424 株の VP6、NSP4 遺伝子の配列を決定し、系統解析を行ったところ、いずれも DS-1 株 (サブグループ I、G2P[4]ロタウイルスのプロトタイプ) のクラスターに属していることが分かった。
  - (13) G12P[6]ロタウイルスで小児由来の SK277 株、成人由来の SK423 株の VP6、NSP1-NSP5 の遺伝子配列を決定したところ、これら 2 株のいずれの遺伝子も配列は全く同じであった。系統解析ではこれら 2 株の調べた 6 遺伝子はすべて Wa 株 (G1P[8]ロタウイルスのプロトタイプ) のクラスターに属しており、最近バングラデシュのダッカで検出、報告された G12 ロタウイルス株の一つ Dhaka12-03 株に遺伝学的にきわめて近いことが明らかになった。

#### D. 考察

本研究はバングラデシュ北部地域において小児および成人におけるロタウイルスの分子疫学的研究を行なったものである。成人下痢症におけるロタウイルスの検出率は約10%と他の国での報告(5-10%)とほぼ同じであり、ロタウイルスはどの地域においても一定の割合で成人に感染していることが示唆される。今回の研究では G2 が小児、成人ともに最多であり、また G1, G9, G12 のいずれも小児、成人で検出された。G1, G2, G9, G12 の VP7 遺伝子の配列はいずれの G 型内でも極端に高い一致率を示し、系統遺伝学的解析でも同じクラスターに位置していた。このことは、主要な G 型(G2)、低頻度の G 型(G1, G9, G12)を問わず、遺伝学的に殆ど同一のウイルスが小児、成人に分布していることを示している。同じことは VP4 遺伝子の系統遺伝学的解析からも裏付けられた。今回解析された P[6]、P[8]ウイルスが異なる G 型を持ちながらも、各 P 型内で VP4 遺伝子配列が高い一致率を示したことは、VP4 遺伝子分節が異なる G 型ロタウイルス間でリアソートメントにより置換されたことを示唆している。

小児と成人の間でのロタウイルスの分子疫学的、系統遺伝学的研究は、中国・武漢市での報告が一つあるのみである。この研究では G3 が小児、成人ともに高頻度であり、遺伝学的に同一であった。今回、同様に小児・成人間のロタウイルスの密接な関連を示す結果がバングラデシュで、しかも G3 とは異なる他の G 型のロタウイルスにおいて得られたことから、ヒトロタウイルスは国や主要な G 型に関係なく、小児と成人の間で伝播していることが示唆される。

成人におけるロタウイルス感染の意義は今まであまり考えられることはなかったが、小児由来のロタウイルスが成人由来のそれと同じであることは、成人が小児のロタウイルス下痢症の感染源となっている可能性があることも示唆している。この知見はロタウイルスの自然界での動態および感染対策を考える上で重要である。すなわち成人のロタウイルス感染あるいは保有が、ロタウイルスの自然界での維持に関与し、夏季に無くなるも冬季に流行する小児ロタウイルス下痢症の発生に寄与している可能性が

ある。このような知見を考慮すると、成人のロタウイルス下痢症対策や、下痢症を有する成人と健康小児の接触を遮断することも、小児のロタウイルス下痢症のコントロールに有効である可能性があると考えられ、本研究は成人ロタウイルス感染に関し新たな意義を提示したといえる。

G9、G12ロタウイルスは新興型として近年世界的に分布が増加しつつあることが知られる。バングラデシュでは主に首都ダッカでの調査で、G9 は1995年より、G12 は2000年より検出されているが、今回北部地域にも分布が拡大していることが明らかになった。G9、G12 ロタウイルスは、すでに多くの報告があるように、リアソートメントにより様々なウイルス株に由来する遺伝子分節により構成され、遺伝学的に多様であり、ヒトにおいて増殖に適合したものが伝播、維持されていると考えられる。したがって今後もこれら新興型の頻度と遺伝学的背景を調べることは、新興型の自然界における存続のメカニズムを解明し、またワクチンの開発を進める上で重要であると考えられる。

#### E. 結論

バングラデシュ北部地域でのロタウイルスに関する分子疫学的研究により、小児および成人の間で遺伝学的に同じロタウイルスが分布、伝播している様態が明らかとなった。主要な遺伝子型 G2 のほか、新興型 G9、G12 も小児、成人の間に分布していることが判明した。

#### F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Alam MM, Kobayashi N, Ishino M, Nagashima S, Paul SK, Chawla-Sarkar M, Krishnan T, Naik TN. Identical rearrangement of NSP3 genes found in three independently isolated virus clones derived from mixed infection and multiple passages of rotaviruses. Arch Virol, 2008, 153:555-559.
- 2) Aung TS, Kobayashi N, Oo KY, Aung

- MS. Prevalence of human rotavirus in adult diarrheal patients in Myanmar, 2002-2003. Myanmar Journal of Current Medical Practice, 2008, 12:2-5.
- 3) Nagashima S, Kobayashi N, Ishino M, Alam MM, Ahmed MU, Paul SK, Ganesh B, Chawla-Sarkar M, Krishnan T, Naik TN, Wang Y-H. Whole genomic characterization of a human rotavirus strain B219 belonging to a novel group of the genus Rotavirus. *J Med Virol*, 2008, 80:2023-2033.
  - 4) Ghosh S, Samajdar S, Sinha M, Kobayashi N, Taniguchi K, Naik TN. Molecular characterization of rare bovine group A rotavirus G15P[11] and G15P[21] strains from eastern India: identification of simian SA11-like VP6 genes in G15P[21] strains. *Virus Genes*, 2008, 37:241-249.
  - 5) Samajdar S, Ghosh S, Chawla-Sarkar M, Mitra U, Dutta P, Kobayashi N, Naik TN. Naik. Increase in prevalence of human group A rotavirus G9 strains as an important VP7 genotype among children in eastern India. *J Clin Virol*, 2008, 43:3340339.
  - 6) Samajdar S, Ghosh S, Dutta D, Chawla-Sarkar M, Kobayashi N, Naik TN. Human group A rotavirus P[8] Hun9-like and rare OP354-like strains are circulating among diarrhoeic children in Eastern India. *Arch Virol*, 2008, 153:1933-1936.
  - 7) Paul SK, Kobayashi N, Nagashima S, Ishino M, Watanabe S, Alam MM, Ahmed MU, Hossain MA, Naik TN. Phylogenetic analysis of rotaviruses with genotypes G1, G2, G9 and G12 in Bangladesh: evidence for a close relationship between rotaviruses from children and adults. *Arch Virol*, 2008, 153:1999-2012.
  - 8) Wang Y-H, Kobayashi N, Zhou X, Nagashima S, Zhu Z-R, Peng J-S, Liu M-Q, Hu Q, Zhou D-J, Watanabe S, Ishino M. Phylogenetic analysis of rotaviruses with predominant G3 and emerging G9 genotypes from adults and children in Wuhan, China. *J Med Virol*, 2009, 81:382-389.
- ## 2. 学会発表
- 1) Wang Y-H, Kobayashi N, Zhou X, Nagashima S, Zhu Z-R, Sun S-H, Liu M-Q, Peng J-S, Hu Q, Zhou D-J. Molecular epidemiology of rotaviruses in Wuhan, China, Jun. 2006-Feb. 2008: predominance of variant G3 strains and increase of G9 strains. The 7th Japan-China International Conference of Virology. June, 2008, Tokyo.
  - 2) Kobayashi N, Nagashima S, Alam M, Wang Y-H, Krishnan T, Chawla-Sarkar M. Whole sequence analysis of novel group rotavirus B219 and group B rotaviruses. The 7th Japan-China International Conference of Virology. 2008, Tokyo.
  - 3) Zhou X, Kobayashi N, Wang YH, Zhu ZR, Zhou DJ, Sun SH. Molecular epidemiologic analysis of group A rotaviruses in children with diarrhea in Wuhan city, China, 2007. The 13th International Congress on Infectious Diseases. 2006, Kuala Lumpur, Malaysia.
  - 4) Chawla-Sarkar M, Dutta D, Bagchi P, Krishnan T, Nagashima S, Kobayashi N. "Host cellular proteins": key determinants of rotavirus infection and pathogenesis. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections. 2008, Sapporo.
  - 5) 長嶋茂雄、渡辺祥二郎、石埜正徳、小林宣道. バングラデシュ (マイメンシン市) における小児および成人下痢症由来A群ロタウイルスの分子疫学的解析. 第78回日本衛生学会、2008年3月、熊本.
  - 6) 小林宣道、長嶋茂雄、石埜正徳、渡辺祥二郎、Wang Yuanhong, Zhou Xuan. 中国・武漢市における成人および小児下痢症由来 G1, G3, G9 ロタウイルスの分子疫学的解析. 第56回日本ウイルス学会 2008年10月、岡山



- 7) 長嶋茂雄、Paul Shyamal, 渡辺祥二郎、石埜正徳、小林宣道。バングラデシュにおける小児および成人下痢症由来A群ロタウイルスの遺伝子学的解析。第56回日本ウイルス学会 2008年10月、岡山
- 8) 渡辺祥二郎、小林宣道。中国・武漢市における成人および小児由来 G1, G3,

G9 ロタウイルスの分子疫学的解析。第40回日本小児感染症学会 2008年11月、名古屋。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表1 小児、成人由来ロタウイルスにおけるG型、P型の頻度

Genotype		Frequency (%)	
G-type	P-type	Children	Adults
G1	P[6]	9 (8.0)	
G1	P[8]	10 (8.8)	6 (14.3)
G1	P[4] + [8]	1 (0.9)	
G1	P[4] + [6] + [8]	3 (2.7)	5 (11.9)
G1	ND	1 (0.9)	
G2	P[4]	52 (46.0)	18 (42.9)
G2	P[6]	3 (2.7)	
G2	P[8]		1 (2.4)
G2	P[4] + [6]	6 (5.3)	
G2	P[4] + [6] + [8]		1 (2.4)
G4	P[4]	1 (0.9)	
G4	P[6]		1 (2.4)
G4	P[8]		1 (2.4)
G9	P[4]	1 (0.9)	
G9	P[6]	5 (4.4)	
G9	P[8]	5 (4.4)	4 (9.5)
G9	P[4] + [6]	4 (3.5)	
G9	P[4] + [8]	2 (1.8)	
G9	ND	1 (0.9)	
G12	P[4]	1 (0.9)	
G12	P[6]	3 (2.7)	1 (2.4)
G1 + G2	P[4]	1 (0.9)	
G1 + G2	P[6]	1 (0.9)	
G1 + G2	P[4] + [6] + [8]		3 (7.1)
G1 + G2 + G4	P[6]		1 (2.4)
G2 + G4 + G9	P[4] + [6] + [8]	1 (0.9)	
ND	P[6]	1 (0.9)	
ND	P[8]	1 (0.9)	
Total		113 (100)	42 (100)

ND not determined

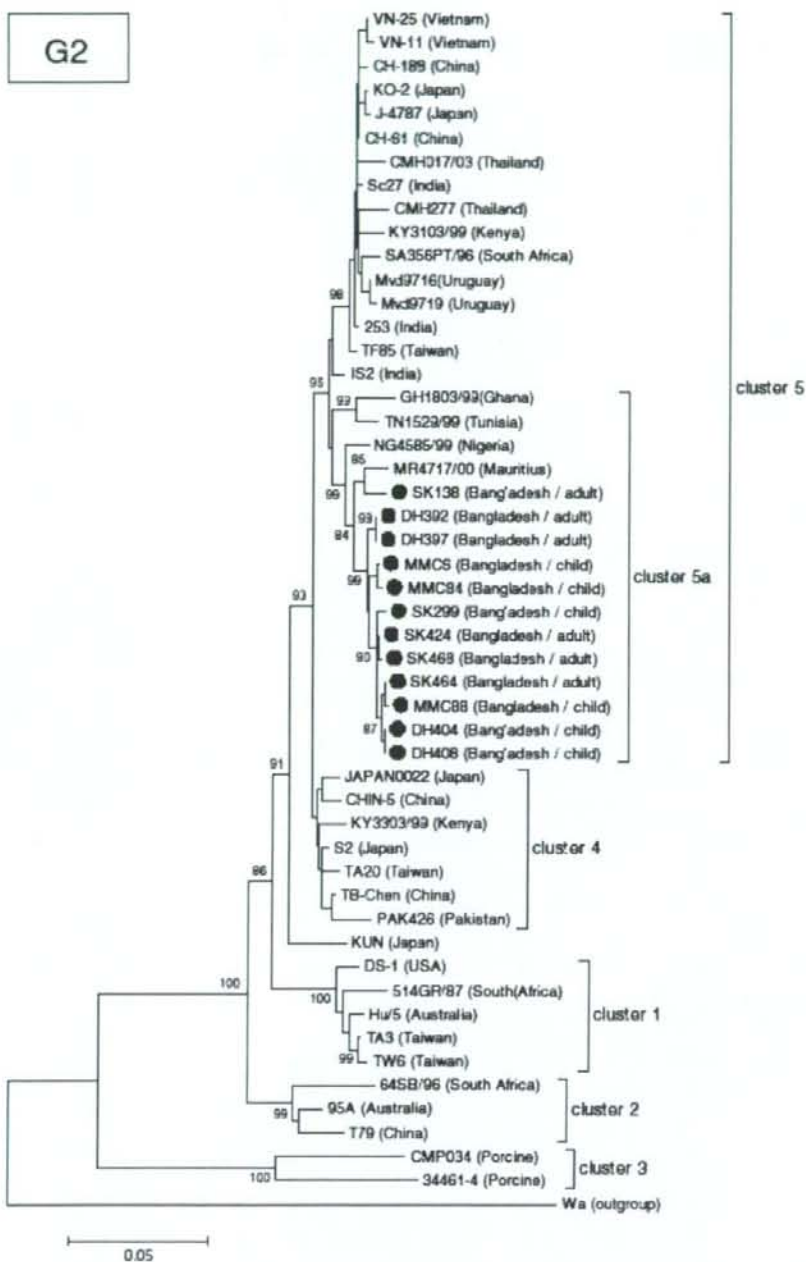


図1 G2 ロタウイルス VP7 遺伝子の系統樹。本研究にて Bangladesh で検出されたロタウイルスを黒丸で示す。

G9

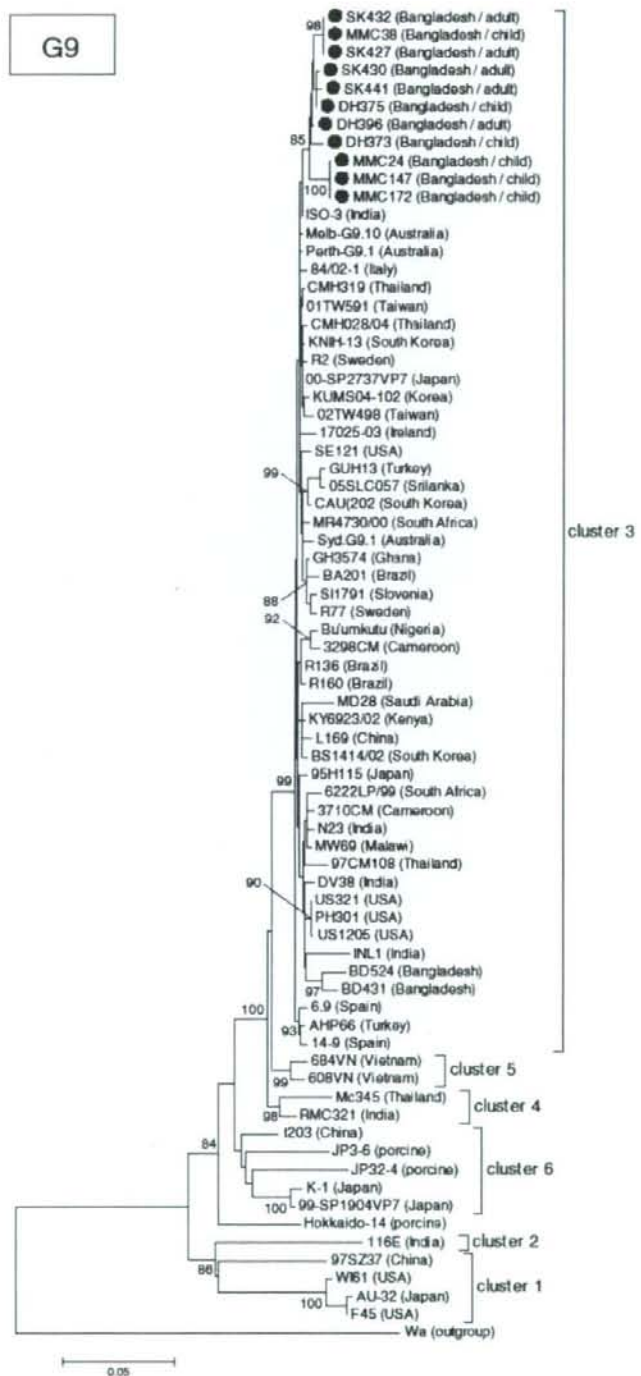


図2 G9 ロタウイルス VP7 遺伝子の系統樹. 本研究にてバングラデシュで検出されたロタウイルスを黒丸で示す。