

Fidelity (Invitrogen) を用いて PCR 反応を行い、ハンタウイルス遺伝子の増幅を行った。

5. ハンタウイルス遺伝子の塩基配列の決定

ハンタウイルス S、M、および L 遺伝子の塩基配列を決定するために、PCR によるウイルス遺伝子の増幅後、PCR 産物を電気泳動した。Gel Indicator™ (BioDynamics Laboratory Inc.) でゲルを染色した後目的のバンドを切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega) を用いて PCR 産物を精製した。この精製 PCR 産物を鋳型にサマルシークエンスを行い、ハンタウイルス遺伝子の塩基配列を決定した。

6. 遺伝子解析と系統樹解析

S、M および L 遺伝子の塩基配列を決定後、GENETYX-MAC version 10.1 (Software Development Co. Ltd.) により既知のハンタウイルス遺伝子との一致率を求めた。近隣接合法 (NJ 法) を用いてハンタウイルス各遺伝子の多重解析を行い、MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 4.0 プログラムパッケージを使用して系統樹を作成した。

7. ハンタウイルス感染げっ歯類からのウイルス分離

ハンタウイルス遺伝子が検出された野鼠の肺を乳鉢、乳棒、および海砂を用いてすり潰し、培地で 10% に希釈後、4°C、10,000rpm で 5 分間遠心し沈殿を取り除いた。これを 12.5cm² フラスコに単層培養した Vero E6 細胞に重層し、2,000rpm で 60 分間遠心した。その後、重層した乳剤を取り除いて 4~5 日おきに培地を交換しながら

培養した。2 週間おきにトリプシン処理により細胞を回収し、RT-PCR による遺伝子検出、および IFA による抗原検出に用いた。

8. フォーカス減少中和試験 (FRNT)

培地で 2 倍階段希釈した被検血清と同量のウイルス液を混合し、37°C で 1 時間、5%CO₂ 条件下で反応させた。その混合液 50 μl を 96 ウェル平底マイクロプレート (Nalge Nunc International K.K.) 上に単層培養した Vero E6 細胞 (4.0 × 10⁴ 個/ウェル) に重層し、再び 37°C で 1 時間、5%CO₂ 条件下で反応させた後、重層液を除去し、Modified Eagle Medium L-Glutamine [+] (Gibco) にカルボキシメチルセルロースおよび FBS をそれぞれ 1.5% および 5% になるように添加した培地を各ウェル 300 μl 重層し、37°C、5%CO₂ 条件下で 5 日間培養した。培地を除去後、PBS で 1 回洗浄後、メタノールを各ウェル 100 μl 加えて 15 分間静置し、細胞を固定した。このプレートを IFA で染色し、フォーカス数を数えた。中和抗体価は、被検血清のフォーカス数が血清対照ウェルのフォーカス数より 80% 以上減少した最高の血清希釈倍率の逆数で表した。中和抗体価は、被検血清 (もしくは MAb、マウス感染血清) のフォーカス数が血清対照ウェルのフォーカス数より 80% 以上減少した最高の血清希釈倍率の逆数で表した。

9. HFRS 患者の感染ウイルス型の鑑別

それぞれの HFRS 患者がどのハンタウイルスの感染を受けたのかを明らかにするために、交差中和試験による感染ウイルス型の鑑別を行った。型鑑別は、各種ハンタウイルスを患者血清により中和し、あるウイルスに対する中和抗体価が他の

ウイルスに対するものよりも4倍以上高い場合に、そのウイルスの感染歴があったと判定した。また、4倍未満の差しかみられない場合は型鑑別不能、すべてのウイルスに対していずれの希釈においても80%未満のフォーカス減少が見られなかった場合は陰性と判定した。

(倫理面からの配慮について)

HFRS 患者血清はインフォームドコンセントのもとづいて極東ロシアで採取されたものを日本に輸入し、実験に用いた。日本での実験時には血清はコード番号のみで識別され、患者氏名等の個人情報は一切不明である。

C. 研究結果

ハバロフスク近郊の野生げっ歯類における ハンタウイルス感染の疫学調査

2002年と2005年に極東ロシア、ハバロフスク市郊外においてハンタウイルス感染症の疫学調査を実施し、合計152匹のげっ歯類が捕獲された。そのうち、本研究にはハンタウイルスを保有していると考えられるハントウアカネズミ(2002年;8匹、2005年;29匹)、セズジネズミ(2002年;47匹)、およびタイリクヤチネズミ(2002年;40匹、2005年;21匹)を選抜し、それらについてハンタウイルスの抗体検査とウイルス遺伝子の検出を行い、げっ歯類におけるハンタウイルス感染状況を調査した。IFAにより抗ハンタウイルス抗体の検出を試みたところ、2002年の検体については、セズジネズミ47検体中5検体(10.6%)、タイリクヤチネズミ40検体中5検体(12.5%)が抗体陽性となったが、ハントウアカネズミについてはすべて抗体陰性であった。また、2005年のサンプルについては、ハントウアカネズミ29検体中10検体

(34.5%)、タイリクヤチネズミ21検体中1検体(4.8%)が抗体陽性となった。

野生げっ歯類からのハンタウイルスの分離 とその性状解析

2005年捕獲のハントウアカネズミ29検体、2002年捕獲のセズジネズミ47検体の肺からRNAを抽出した後、RT-PCR法によりウイルス遺伝子の検出を試みた。ハントウアカネズミについては、抗体陽性であった#167、172、186、199、および209と、抗体陰性であった#166からウイルス遺伝子が検出された。また、セズジネズミについては、抗体陽性である#56、57、61、および65からウイルス遺伝子が検出された。これらの検体以外からは、抗体陰性、陽性に関わらず、ウイルス遺伝子は検出されなかった。ウイルス遺伝子陽性のげっ歯類の肺をVero E6細胞に接種し、ハンタウイルスの分離を試みた。その結果、ハントウアカネズミから1例、セズジネズミ4例からウイルスが分離された。分離された合計5株のハンタウイルスのうち、ハントウアカネズミ#209由来株をKhekhtsir/AP209/2005 (AP209)株、セズジネズミ#57由来株をGalkino/AA57/2002 (AA57)株と命名し、それぞれについてダイレクトシーケンス法によりS、M、およびL遺伝子についてほぼ全長の塩基配列を決定した。ハントウアカネズミから分離されたAP209株はAMRVと、セズジネズミから分離されたAA57株はHTNVと同じクラスターに位置したため(図1、S遺伝子の成績のみ示す)、ハントウアカネズミからはAMRVが、セズジネズミからはHTNVが分離されたことが判明した。AP209株およびAA57株と、その他のハンタウイルスのS、M、およびL各遺伝子の翻訳領域全長の塩基配列とアミノ酸配列の相同性を比較した。その結果、AP209株は中国東北部由来のAMRV

H5 株と、S、M、および L 遺伝子のいずれについても塩基配列で 89%以上、アミノ酸配列で 98%以上一致した。また、AA57 株は中国東北部由来の HTNV(FEV)である Bao14 株と、S、M、および L 遺伝子のいずれについても塩基配列で 97%以上、アミノ酸配列で 99%以上一致した。従って、ハントウアカネズミ由来の AP209 株は AMRV、セスジネズミ由来の AA57 株は HTNV の亜型の一つである FEV であることが判明した。

2 つの分離株 (AP209 株と AA57 株) とその他のハンタウイルスについて、各種ハンタウイルス感染マウス血清を用いて FRNT を行い、その反応性を比較することで抗原性状の解析を行った。その結果、抗 AP209 血清はホモのウイルス株と AMRV H5 株に対してそれぞれ 1:640 と 1:320 の中和抗体価を示したが、他のウイルス株に対してはほとんど中和活性を示さなかった (表 1)。一方、抗 AA57 血清はホモのウイルス株に対して 1:2560 という非常に高い中和抗体価を示したが、AMRV に対しては 1:640、HTN 76-118 株に対しては 1:160、SEOV に対しては 1:40 という中和抗体価を示した (表 1)。また、抗 Bao14 (FEV) 血清と抗 Bao10 (FEV) 血清も、AA57 株に対しては 1:320 と 1:160 という高い中和抗体価を示したが、その他のウイルス株に対しては比較的低い中和抗体価を示した (表 1)。さらに、SEOV SR-11 株の抗血清についても、ホモのウイルス株に対しては 1:40 の中和抗体価を示したが、その他のウイルス株に対しては中和活性を示さなかった。以上のことから、遺伝子解析の結果と同様に、抗原的にも AP209 株は AMRV に、AA57 株は HTNV の亜型である FEV に属することが示唆された。

極東ロシアの HFRS 患者の感染ウイルス型

の推定

AMRV AP209 株、HTNV (FEV) AA57 株、および SEOV SR-11 株を用いた FRNT により、極東ロシアにおいて臨床的に HFRS と診断された患者の感染ウイルス型鑑別を行った。1998 年から 2000 年に発症した沿海地方の HFRS 患者の血清を、都市部であるウラジオストク市内のものと過疎部である市外のものに分けて FRNT を行った。ウラジオストク市内のサンプルにおいては SEOV:60.0%、AMRV:20.0%、HTNV:8.0%と、今回調べた全てのウイルス型の感染がみられたが (図 2)、特に SEOV による感染が最も多発していることが示唆された。一方、市外のサンプルは AMRV による感染と判定されるものが 64.3%を占め (図 2)、市内と市外で HFRS が異なる流行パターンを示すことが判明した。1965 年から 1998 年に発症したハバロフスク地方の HFRS 患者について、同様に FRNT による感染ウイルス型の鑑別を行った。その結果、これらの血清のうち、HTNV (FEV) に特異的に反応するものが 34.4%を占め (図 2)、HTNV の流行が沿海地方よりも大きな割合を占めていることが示唆された。しかし、沿海地方の患者血清とは異なり、型鑑別できなかったものが 62.5%にも上った (図 2)。そのほとんどは AMRV、HTNV (FEV) 両方に強く反応し、どちらの感染かを特定するには至らなかった。また、沿海地方のウラジオストク市外の患者における結果と同様に、SEOV に強く反応するものは全くみられなかった (図 2)。沿海地方で発生した HFRS 患者については性別に関する情報が得られたので、FRNT による型鑑別の結果に基づいて患者の男女比を比較した。その結果、SEOV による患者の男女比はおおよそ 1:1 であるのに対し、AMRV による患者の男女比はおおよそ 6:1 で、

AMRVによる患者は明らかに男性の方が多かった。また、今回調査した HFRS 患者の多くは発病月が判明していたので、FRNT による型鑑別の結果を基に月別患者発生状況を調査した。その結果、SEOV による患者発生は春～初夏にかけて一つのピークが見られた。一方、AMRV、HTNV による患者発生は春～初夏にかけてのピークに加え、さらに夏～初冬にかけてもう一つのピークが現れるという二峰性のパターンを示した。

D. 考察

ハンタウイルス感染症は野生げっ歯類が病原巣動物となること、ウイルスごとに固有のげっ歯類を宿主とすることなどから、げっ歯類と人における疫学調査を行うことにより、HFRS および HPS の予防対策に有用な情報を得ることができる。極東ロシアはロシア連邦の中でも HFRS 発症率はそれほど高くない地域であるが、致死率は 5%以上と高く、病原性の高いハンタウイルスが流行していると考えられている。近年その原因ウイルスは AMRV、HTNV (FEV)、および SEOV であることが明らかとなったが、ウイルスそのものは未だ分離されておらず、またこれらウイルスの人での流行状況についても不明な点が多い。そこで、本研究では、極東ロシアの野生げっ歯類の疫学調査とウイルス分離を行い、分離株を用いた血清交差中和試験により、人におけるハンタウイルスの感染状況を調査した。2002 年と 2005 年に極東ロシア、ハバロフスク市郊外 (Khekhtsir と Galkino)において捕獲されたハントウアカネズミ、セスジネズミ、およびタイリクヤチネズミについて抗ハンタウイルス抗体とハンタウイルス遺伝子の保有状況を調査した。その結果、ハントウアカネズミ 10 例、セスジネ

ズミ 5 例、タイリクヤチネズミ 6 例から抗ハンタウイルス抗体が検出された。また、ハントウアカネズミとセスジネズミについて RT-PCR によるハンタウイルス遺伝子の検出を行ったところ、遺伝子陽性検体のほとんどが抗ハンタウイルス抗体も陽性であった。ハンタウイルス遺伝子が検出された検体からウイルス分離を行ったところ、ハントウアカネズミ 1 検体とセスジネズミ 4 検体からハンタウイルスを分離することに成功した。遺伝子および抗原解析の結果からハントウアカネズミから分離された AP209 株は AMRV に、セスジネズミから分離された AA57 株は HTNV に属することが明らかになった。また、これらの分離株は極東ロシアで HFRS 患者から検出された AMRV および HTNV とウイルスのアミノ酸配列がそれぞれ 99%以上一致した。したがって、極東ロシアの広い範囲でハントウアカネズミとセスジネズミが HFRS の病原巣動物となっていること、また 2 つの新規分離株は人に対して病原性のあるハンタウイルスであることが示唆された。

交差中和試験により極東ロシア各地で発生した HFRS 患者の感染ウイルス型の鑑別を行ったところ、ウラジオストク市内では SEOV による感染が、ウラジオストク市以外の沿海地方では AMRV による感染が最も多発していることが示唆された。つまり、ウラジオストク市内では SEOV を媒介するドブネズミが、市外では AMRV を媒介するハントウアカネズミがそれぞれの地域での HFRS の流行に最も寄与していると考えられる。また、ハバロフスク地方では HTNV (FEV)による感染が最も多発しており、ゆえに HTNV を媒介するセスジネズミがその流行に最も寄与していると考えられる。沿海地方で発生した HFRS 患者の型鑑別の結果を男女別に分けてみると、男女比が感染ウイル

スごとで大きく異なることが判明した。つまり、SEOVによる患者は男女比が1:1であるに対し、AMRVによる患者は6:1と明らかに男性の方が多かった。おそらくこれは、森林に入る機会が多い猟師や林業従事者に男性が多く、森林を棲みかとするハントウアカネズミに接触する機会が女性よりも男性に多いことに起因するものと思われる。

このように、極東ロシアの中でも地域ごとに人の間で流行するウイルスが異なることや、ウイルスによって患者の男女比や流行する季節が異なることが判明した。HFRSの流行様式は、げっ歯類と人間双方の様々な要因が複雑に絡み合うことによって決定されと考えられる。従って、ハンタウイルスの感染リスクを包括的に評価し、広く一般住民に情報を提供して注意喚起を行っていく必要がある。病原巣動物となり得るげっ歯類について今後も継続的な調査を行い、またHFRS患者からも性別や発症時期だけでなく職業等の詳細な情報を集めることで、HFRSのリスクファクターを解明していくことが重要である。

なお、本研究はハバロフスク・ペスト防疫研究所のLeonid I. Ivanov博士、Russian Academy of Medical Science, VladivostokのRaisa Slonova博士との共同研究である。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tegshduuren E, Yoshimatsu K, Taruishi M, Endo R, Shimizu K, Koma T, Yasuda SP, Kariwa H, Arikawa J, Ishihara C.

Different cross-reactivity of human and rodent sera to Tula virus and Puumala virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 33: e67-73. 2010.

2. 学会発表

- 1) Saasa N, Kariwa H, Sanchez-Hernandez C, Romero-ALmaraz M deL, Yoshida H, Sanada T, Seto T, Yoshikawa K, Yoshii K, Ramos C, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I : Establishment of enzyme-linked immune-sorbent assay to detect anti-hantavirus antibodies in Mexico. 第149回日本獣医学会学術集会、武蔵野(2010, 3)
- 2) 吉田喜香、苺和宏明、真田崇弘、Saasa N、瀬戸隆弘、吉松組子、有川二郎、好井健太郎、高島郁夫：メキシコ由来のハンタウイルスに対するモノクローナル抗体の作出と各種ハンタウイルスに対する反応性の検討：第150回日本獣医学会学術集会、帯広(2010, 9)
- 3) 真田崇弘、苺和宏明、谷川洋一、Nur Hardy AD、瀬戸隆弘、永田典代、吉松組子、有川二郎、好井健太郎、高島郁夫：Puumala ウイルスを感染させたシリアンハムスター (*Mesocricetus auratus*)の感染動態の解析：第150回日本獣医学会学術集会、帯広(2010, 9)
- 4) 山崎翔子、好井健太郎、持館景太、村田亮、真田崇弘、苺和宏明、高島郁夫：2008年北海道におけるダニ媒介性脳炎ウイルスの分立性状解析：第150回日本獣医学会学術集会、帯広(2010, 9)
- 5) 柳原なつみ、好井健太郎、後藤明子、伊川綾恵、石塚万里子、苺和宏明、高島郁夫：

- ダニ媒介性脳炎ウイルスの E 蛋白の糖鎖付加がウイルス性状に与える影響: 第 150 回日本獣医学会学術集会、帯広 (2010, 9)
- 6) 高野絢子、大森優紀、好井健太郎、横澤香奈、苅和宏明、高島郁夫: ダニ媒介性脳炎ウイルス Sofjin 株の感染性 cDNA の構築: 第 150 回日本獣医学会学術集会、帯広 (2010, 9)
- 7) 好井健太郎、寸田祐嗣、苅和宏明、Holbrook M、高島郁夫: ダニ媒介性脳炎/オムスク出血熱のキメラウイルスの作成と性状解析: 第 150 回日本獣医学会学術集会、帯広 (2010, 9)
- 8) 吉田喜香、苅和宏明、真田崇弘、Saasa N、瀬戸隆弘、吉松組子、有川二郎、好井健太郎、高島郁夫: メキシコの野生げっ歯類が保有するハンタウイルスの抗原性解析: 第 58 回日本ウイルス学会、徳島 (2010, 11)
- 9) 真田崇弘、苅和宏明、永田典代、谷川洋一、Nur Hardy AD、瀬戸隆弘、吉松組子、有川二郎、好井健太郎、高島郁夫: Puumala ウイルスを感染させたシリアンハムスター (*Mesocricetus auratus*) の感染動態の解析: 第 58 回日本ウイルス学会、徳島 (2010, 11)
- 10) 高野絢子、大森優紀、好井健太郎、横澤香奈、苅和宏明、高島郁夫: ダニ媒介性脳炎ウイルス Sofjin 株の感染性 cDNA の構築: 第 58 回日本ウイルス学会、徳島 (2010, 11)
- 11) 好井健太郎、寸田祐嗣、苅和宏明、Holbrook M: ダニ媒介性脳炎/オムスク出血熱のキメラウイルスの作成と性状解析: 第 58 回日本ウイルス学会、徳島 (2010, 11)
- 12) 戸谷理詩、好井健太郎、村田亮、秋田沙希、田中智久、苅和宏明、梅村孝司、高島郁夫: ウエストナイルウイルスの E 蛋白糖鎖付加が鳥類における病原性に与える影響の解析: 第 58 回日本ウイルス学会、徳島 (2010, 11)
- G. 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

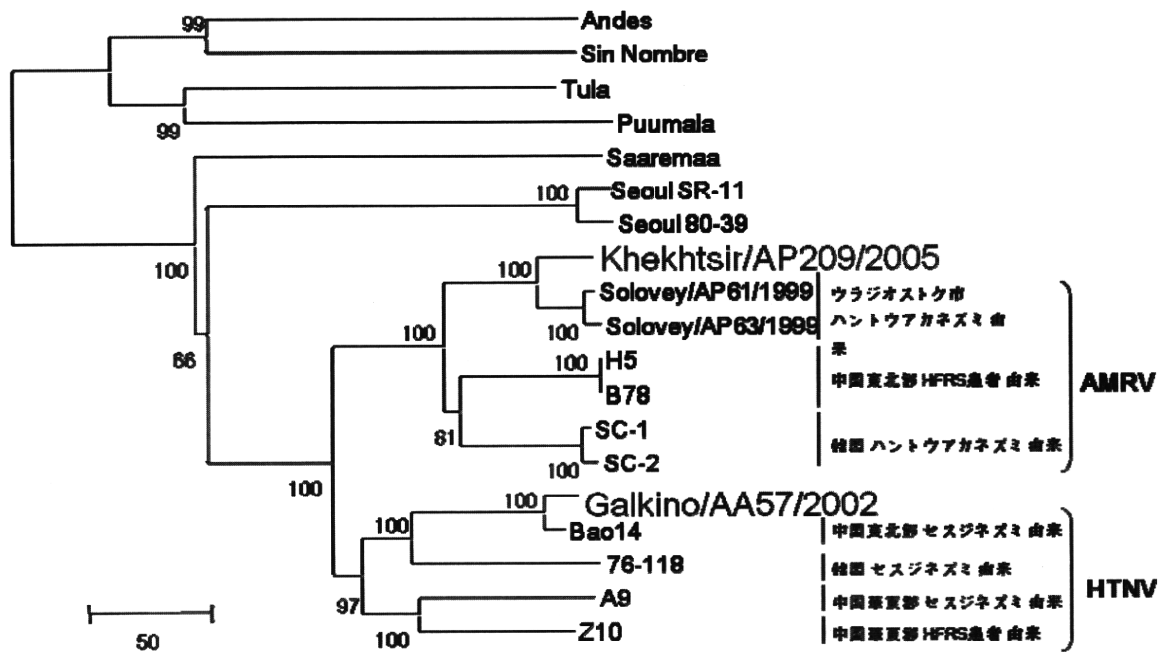


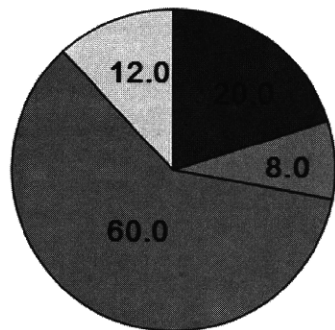
図1. S遺伝子（コード領域全長）をもとに作成したハンタウイルスの系統樹

表1. 各種ハンタウイルス感染マウス血清を用いた中和試験による抗原性解析

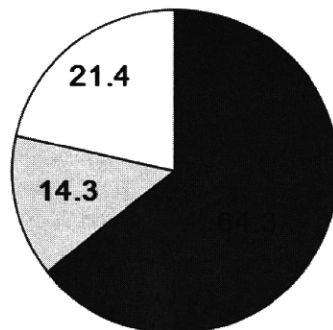
抗血清	ウイルス					
	AMRV		HTNV		SEOV	
	H5	Khekhtsir AP209	76-118	Galkino AA57	SR-11	
AMRV	H5	* 80	80	< 20	20	< 20
V	Khekhtsir AP209	320	* 640	< 20	40	20
	Bao14	80	80	80	320	20
HTNV	Bao10	40	40	20	160	< 20
	Galkino AA57	640	640	160	* 2560	40
SEOV	SR-11	< 20	< 20	< 20	< 20	* 40

* : Homologous reaction

沿海地方 ウラジオストク市内



沿海地方 ウラジオストク市外



ハバロフスク地方

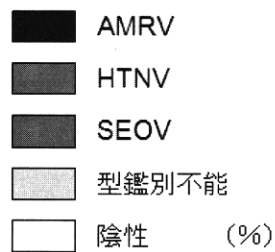
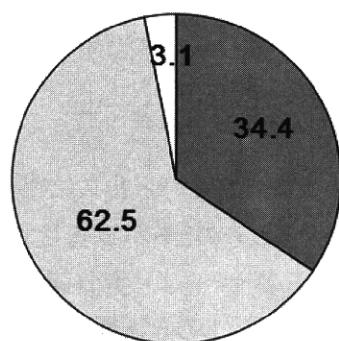


図2. 極東ロシアにおけるHFRS患者のハンタウイルス型鑑別の割合(%)

厚生労働科学研究費補助金(地球規模保健課題推進研究事業)
分担者研究報告書

ウイルス性出血熱の診断法の開発に関する研究
「LCM ウイルス感染の診断システムの開発」

研究分担者 西條政幸 国立感染症研究所ウイルス第一部部長
研究協力者 木下一美 国立感染症研究所ウイルス第一部第三室
研究協力者 森川茂 国立感染症研究所ウイルス第一部第一室室長
研究協力者 永田典代 国立感染症研究所感染病理部第二室室長

研究要旨:リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(lymphocytic choriomeningitis virus, LCM ウイルス)は、アレナウイルス科アレナウイルス属に分類される。LCM ウイルスは齧歯類関連ウイルスであり、ヒトにおいても中枢神経感染症(髄膜炎、脳炎)を引き起こす。本研究では、バキュロウイルスにより発現・精製された LCM ウイルスの組換え核蛋白(NP)に対する単クローン抗体を作製し、その抗体を用いて病理組織中の LCM ウイルス抗原検出における有用性を検討した。本研究で作製された単クローン抗体は、同ウイルス感染症の診断に有用であることが明らかにされた。

A. 研究目的

リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(以下、LCM ウイルス)は、アレナウイルス科アレナウイルス属に属し、その宿主は野生のげっ歯類である。LCM ウイルス感染ネズミでは病気を起こすことはなく、持続感染している。マウスなどの実験動物やペットのハムスターなどが、LCM ウイルスに感染していて、ヒトへの感染源となることがある。ヒトにおける LCM ウイルス感染症は人獣共通感染症の一つである。ヒトが LCM ウイルスに感染すると、インフルエンザ様症状から無菌性髄膜炎、脳炎など多彩な臨床症状を呈する。妊婦がこのウイルスに感染すると、経胎盤感染を起こし胎児に感染が広がり、水頭症や脈絡網膜炎などを伴う先天的異常を起こすことが知られている。

近年 LCM ウイルスに感染していたヒトが死亡し、そのヒトが臓器提供者(ドナー)となり、そのドナーより実質臓器の提供を受けた移植患者(レシピエント)が LCM ウイルスに感染し死亡するという感染事例が報告されている。

本研究では、LCM ウイルス感染症の診断システムの確立を目的として、LCM ウイルスの主要構造蛋白である核蛋白(NP)に対する特異的抗体の、同ウイルス感染動物(マウス)の臓器における、免疫組織化学的解析による抗原検出法における有用性を検討した。

B. 研究方法

1. 単クローン抗体およびポリクローナル抗体

組換えバキュロウイルス発現システムを用いて、組換え LCM ウイルス核蛋白(LCMV-rNP)を発現、精製し、それをアルミニウムアジュバントとともにウサギを免疫して得られたウサギ血清を抗 LCMV-rNP ポリクローナル抗体として用いた。また、LCMV-rNP をマウスに免疫して、常法に従い得られた 3 種類の単クローン抗体(24-2-E3-31、24-1-E10-42 および 25-2-E5-27)を用いた。

2. 感染動物臓器の調整

LCM ウイルス WE 株(10^5 PFU)を C3H/HeJ マウスに腹腔内接種し、感染後 9 日目の臓器(肝臓・腎臓・副腎)を採材した。

3. 免疫組織化学法による臓器中の LCM ウイルス抗原の検出

1 次抗体に単クローン抗体またはウサギポリクローナル抗体を用いて、マウスステインキットあるいはシンプルステインマウス MAX-PO(ニチレイ)を用いて免疫染色を行った。抗原の賦活化は、pH9 あるいは pH6 の緩衝液で 121°C 、15 分処理によった。

C. 研究結果

1. 免疫組織化学法

抗 LCMV-rNP ポリクローナル抗体および各単クローン抗体を用いた免疫組織化学法により、LCM ウイルスを感染させたマウスの臓器中の LCM ウイルス抗原検出を試みた。単クローン抗体 3 種とポリクローナル抗体とも全てウイルス抗原に対して明瞭な陽性反応を示したが、ポリクローナル抗体お

よび 25-2-E5-27 では非特異反応が認められた。単クローン抗体 24-1-E10-42 を用いた抗原検出結果を図 1 に示した。感染マウスの腎臓(図 1A)・副腎(図 1B)においては、炎症性細胞浸潤は見られなかった。腎糸球体と皮質の血管内皮細胞に、副腎では皮質細胞にウイルス抗原が認められた。肝臓においては(図 3C)、類洞内に好中球、単核系細胞を中心とした慢性の細胞浸潤が見られ、微小な出血とそれに伴う炎症性細胞浸潤が見られた。肝細胞、類洞の内皮細胞の細胞質内にウイルス抗原が陽性であった。一部の小葉間静脈(V)には、広い細胞質を持った大型の細胞の剥離がみられ、抗原陽性であった。

D. 考察

アレナウイルスの NP はウイルス粒子の構造蛋白であるが、ウイルス感染細胞や持続感染細胞にも最も多く含まれるウイルスタンパク質である。本研究で作製された単クローン抗体が、NP を発現する組換え蛋白だけでなく、感染動物の実質臓器中のウイルス抗原を特異的に検出することが明らかにされた。

中でも、単クローン抗体 24-2-E3-31 が LCM ウイルス抗原検出に特に有用であることが明らかにされた。成績は示していないが、得られた 3 種の単クローン抗体は、それぞれ異なるアミノ酸配列(いわゆるエピートプ)を認識することが明らかにされている。また、アレナウイルス属ウイルスの中でも、LCM ウイルスの核蛋白にのみ特異的に結合し、ラッサウイルスや南米出血熱の原因

であるフニンウイルスには結合しないことが確認されている。これらの単クローン抗体は、このウイルス感染症の診断のみならず、LCM ウイルスの機能解析や治療法の開発にも応用が可能であると考えられる。

2003年以降、LCMウイルスに感染していたヒトがドナーとなり、そのドナーより臓器提供を受けたレシピエントが LCM ウイルスに感染し死亡するという事例が、アメリカで 3 例、オーストラリアで 1 例報告されている。2006 年のオーストラリアの事例では、ドナーは、死亡直前にいた旅先のヨーロッパで LCM ウイルスに感染したことが確認されている。

わが国では、今のところヒトにおける LCM ウイルス感染の報告はなく、臨床医にとっても LCM ウイルス感染症は感染性疾患としてあまり認識されていない。しかし、LCM ウイルス感染症の診断システム整備は、我が国においても重要な課題のひとつと考えられる。

E. 結論

(1)本研究で作製された LCM ウイルス核蛋白に対する単クローン抗体は、他のアレナウイルスには交叉反応を示さず、免疫組織化学検査において組織中の LCM ウイルス抗原に特異的に反応した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Saijo, M., Morikawa, S., Kurane, I.: Recent progress in the treatment for Crimean-Congo hemorrhagic fever and future perspectives. *Future Virology*

5:801-809, 2010

2) Nakayama, E., Yokoyama, A., Miyamoto, H., Igarashi, M., Kishida, N., Matuno, K., Marzi, A., Feldmann, H., Ito, K., Saijo, M., Takada, A.: Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of filovirus species-specific antibodies. *Clinical and Vaccine Immunology* 17:1723-1728, 2010

3) 西條政幸:アレナウイルス. *日本臨床* 68(増刊号):431-434, 2010

4) 西條政幸:南米出血熱の診断法の概要. *日本医事新報* 4495: 83-84, 2010

2. 学会発表

1) 木下一美, 酒井宏治, 永田典代, 王麗欣, 伊藤(高山)睦代, 中道一生, 森川茂, 倉根一郎, 西條政幸. リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス核蛋白の単クローン抗体を用いた診断法の開発. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島(2010.11)

2) 伊波興一朗, 中内美奈, 谷口怜, 福士秀悦, 水谷哲也, 緒方もも子, 西條政幸, 倉根一郎, 森川茂. アルゼンチン出血熱の実験室診断法の患者血清を用いた評価. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島(2010.11)

3) 西條政幸, 福士秀悦, 水谷哲也, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂. 3 分節 RNA の塩基配列に基づく中国新疆ウイグル自治区におけるクリミア・コンゴ出血熱ウイルスの分子疫学と進化. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島(2010.11)

- 4) Saijo, M., Fukushi, S., Mizutani, T., Kurane, I., Morikawa, S. Evolutional events of Crimean-Congo hemorrhagic fever viruses in Xinjinag, China, assessed with 3 segmented RNA genes. 44th US-Japan Cooperative Medical Science, Viral Diseases Panel Meeting, Sapporo, Japan (2010.06)
- 5) Saijo, M. Molecular epidemiology on Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections based on the 3 segmented RNA genes. BIT's 1st World Congress of Virus and Infections-2010, Busan, Korea (2010.07)
- G. 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

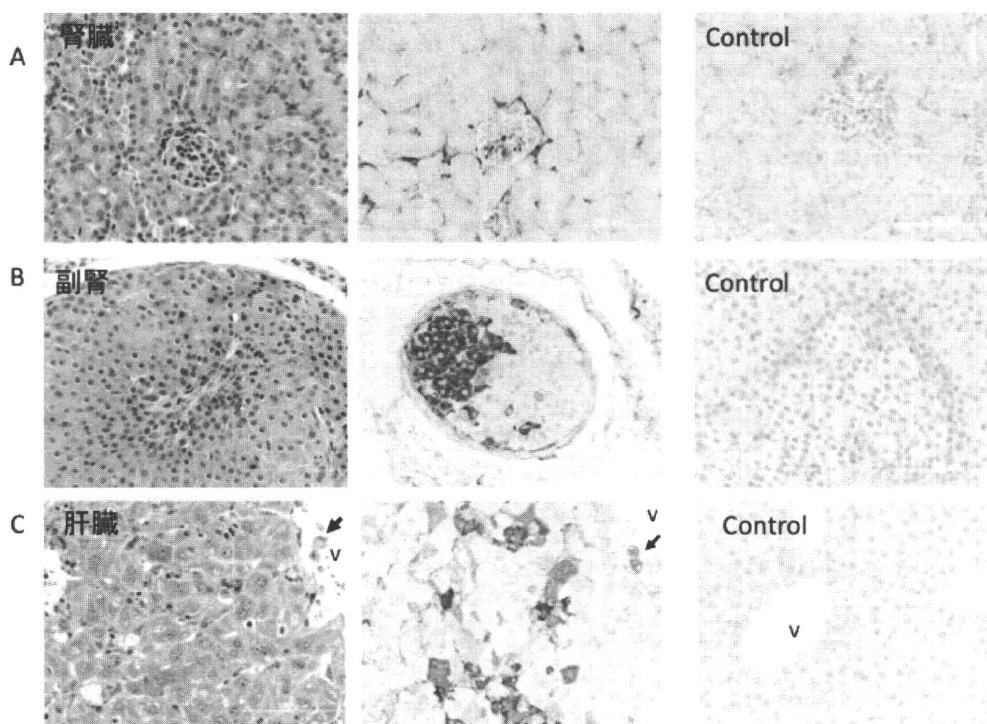


図 1. 単クローン抗体 24-1-E10-42 を用いた免疫組織化学法による感染マウス臓器中の LCM ウイルス抗原の検出(左から HE 染色、単クローン抗体を用いた免疫染色、非感染組織) 24-1-E10-42, pH9, x1000

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

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: ロタウイルスワクチンは、発展途上国を含め世界の20カ国以上で定期接種に導入されている。われわれは、わが国におけるウイルス性下痢症の疫学と疾病負担に関する研究を行い、わが国にはすでにロタウイルスワクチンが導入されている国と変わらない疾病負担があることを明らかにしてきた。これらの世界的に使用されている2つのロタウイルスワクチンがわが国でも承認申請中である。本研究は、わが国にロタウイルスワクチンが導入された場合の効果を評価する基礎的資料として、ワクチンの定期接種導入で先行するブラジルにおける単価 G1P[8]ロタウイルスワクチンの効果を検証することを目的として行った。この結果、ブラジルでは、単価 G1P[8]ワクチンは、ワクチン株とは完全に異型である G2P[4]に起因するロタウイルス下痢症を含め、ロタウイルス下痢症の発症予防に高い有効性(vaccine effectiveness)を示したが、ワクチン接種後の期間が長引くにつれ、その有効性が低下していくことが分かった。この傾向は、入院治療が必要なロタウイルス下痢症よりもすべての重症ロタウイルス下痢症に対するワクチンの有効性において顕著に見られた。本研究の結果として、この単価ロタウイルスワクチンは、血清型の壁を超えて有効に働くが、ワクチンによる免疫の持続がどこまでどの程度継続するか見極める必要があると思われた。わが国では、3歳から5歳のロタウイルス下痢症患者も少なくないことからワクチンによる免疫の持続の問題は重要である。

A. 研究目的

急性胃腸炎は世界的にみると小児期の疾病と死亡の主要な原因であり、5歳未満の小児死亡の約17%を占める。急性胃腸炎を起こす病原体は多いが、その中でA群ロタウイルスは最も重要な病原体として知られている。地球規模で見ると、1年間にロタウイルス下痢症に罹患する小児は1.1億人以上、そのうち医療機関を受診する者は2500万人、入院にいたる小児は200万人、さらにロタウイルス下痢症で死亡するのは50万人以上

と推定されている。世界中の小児は3~5歳までに少なくとも1度のロタウイルス感染を経験する。

そこで、ロタウイルス胃腸炎の重症化による入院を減らすことを目的とした安全で有効な2種類のワクチンが開発された。メルク社が開発した5価ウシ・ヒトロタウイルス組換え体ワクチンであるRotaTeqとグラクソスミスクライン社が開発した単価ヒトロタウイルスワクチンであるRotarixである。いずれかのワクチンを承認し、かつ、定期接種に導入している国は、アメリカ合衆国、オーストラリ

ア、ヨーロッパや中南米の一部の国など、すでに20カ国以上におよんでいる。

わが国では、両方のロタウイルスワクチンとも、臨床治験を終了し、その成績をもって医薬品医療機器総合機構に承認申請を出している。したがって、いよいよわが国でも、任意接種ワクチンとして使用可能になるものと推察される。このような状況から、われわれは、わが国にロタウイルスワクチンが導入された場合の効果を評価する基礎として、ワクチンの定期接種で先行するブラジルにおける単価ロタウイルスワクチンの効果を検証してきた。今年度は、ワクチンにより獲得された免疫の持続を見るために、ワクチン接種から異なる期間での有効性 vaccine effectiveness の再解析を目的として研究を行った。

B. 研究方法

ブラジル、ペルナンブーコ州都レシフェにある中核的小児病院を併設するフィゲイラ教授記念総合医学研究所において、2006年3月から2008年1月までの2年間に、5歳未満の小児下痢症患者から便検体を収集するとともに、ロタウイルスワクチン接種歴をワクチンカードにより確認した。ロタウイルスの検出はELISA(Rotaclone)によった。陽性の者をロタウイルス下痢症とし、ロタウイルス陰性の下痢症患者を対照として、ワクチンの有効性(%)を $(1-OR) \times 100$ により算出した。

(倫理面からの配慮について)

本研究は、英国リバプール大学と学術交流協定を締結し、熱帯における感染症研究に関してリバプール大学との間で研究協力の覚書を交換した上で、リバプール大学の海外拠点の1つを利用して行ったものである。当該研究は、リバプール大学の倫理委員会およびフィゲイラ教授記念総

合医学研究所の倫理委員会の承認を受けた。なお、長崎大学の研究者は検体から個人情報へは遡及できないようになっている。

C. 研究結果

調査期間における小児下痢症患者のうちワクチン接種の対象月齢であり、かつ生後6ヶ月以上で、ロタウイルスワクチンの接種の有無をワクチンカードで確認できたのは564人であった。ロタウイル

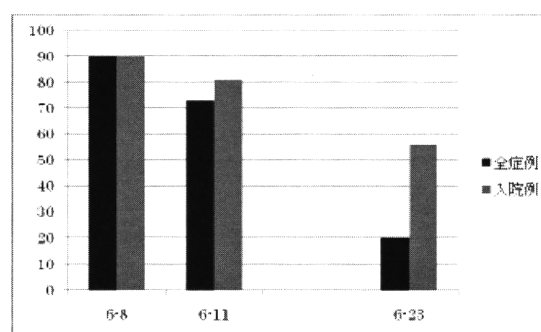


図1. すべての血清型のロタウイルス下痢症に対する有効性。縦軸は有効性を%で表記したものであり、横軸は追跡した患児の月齢である。

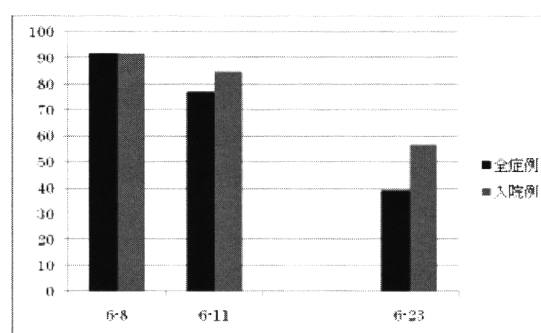


図2. 血清型 G2P[4]のロタウイルス下痢症に対する有効性。縦軸は有効性を%で表記したものであり、横軸は追跡した患児の月齢である。

スワクチンの接種者は438人であり(1回接種者69人、2回接種者369人)、未接種者は126人、すなわち接種率は78%であった。ロタウイルスワ

クチンの有効性を 6-8 ヶ月(接種後3ヶ月のフォローアップ)、6-11 ヶ月(接種後 6 ヶ月)、6-23 ヶ月(接種後 1 年 6 ヶ月)とフォローアップ期間を変えていくと、すべての血清型のロタウイルス下痢症に対しても、また、血清型 G2P[4]のロタウイルス下痢症に対しても、その有効性が次第に低下してきていることが観察された(図1~2)。

C. 考察

ブラジルでは、ロタウイルスワクチンの定期接種への導入から2年が経過して、全期間での平均の接種率は 77%と高く、また、この単価 G1P[8]ロタウイルスワクチンの有効性が高いこと、また、この単価ロタウイルスワクチンが血清型(遺伝子型)の壁を超えて有効に働いていることを最近報告した(文献1)。また、このような異型免疫の有効性はブラジルの他の地域で、この研究とは異なる疫学的手法で行った研究でも確認された(Gurgel, et al. *Gastroenterology* 137:1970-1975, 2009)。しかし、単価ロタウイルスワクチンによる異型免疫の持続性については検討されていなかった。先進諸国で行われたワクチンの臨床試験の結果は、ワクチン接種後、少なくとも2年、あるいは3年間にわたり重症化を防止する免疫が高いレベルで持続することが示されている。しかし、本研究の結果は、ワクチン接種後の時間の経過とともにワクチンの有効性が低下していく傾向が見られ、その傾向はロタウイルス下痢症の重症度が低い方が顕著であるように見える。わが国では、3歳から5歳のロタウイルス下痢症患者も少なくないことからワクチンによる免疫の持続の問題は重要であると考えられる。

E. 結論

わが国においてロタウイルスワクチンが承認さ

れ、これが定期接種に導入されれば、ロタウイルス胃腸炎による大幅な入院数の減少が期待される一方、長期間にわたる防御免疫の持続が確保されるかどうか見極める必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Correia JB, Patel MM, Nakagomi O, Montenegro FM, Germano EM, Correia NB, Cuevas LE, Parashar UD, Cunliffe NA, Nakagomi T. Effectiveness of monovalent rotavirus vaccine (Rotarix) against severe diarrhea caused by serotypically unrelated G2P[4] strains in Brazil. *J Infect Dis.* 201; 363-369, 2010.
- 2) Cunliffe NA, Booth JA, Elliot C, Lowe SJ, Sopwith W, Kitchin N, Nakagomi O, Nakagomi T, Hart CA, Regan M. Healthcare-associated viral gastroenteritis among children in a large pediatric hospital, United Kingdom. *Emerg Infect Dis* 16:55-62, 2010
- 3) Ahmed K, Batuwanthudawe R, Chandrasena TG, Mitui MT, Rajindrajith S, Galagoda G, Pun SB, Uchida R, Kunii O, Moji K, Abeyasinghe N, Nishizono A, Nakagomi O. Rotavirus infections with multiple emerging genotypes in Sri Lanka. *Arch Virol* 155:71-75, 2010
- 4) Sato T, Nakagomi T, Naghipour M, Nakagomi O. Modeling seasonal variation in rotavirus hospitalizations for use in evaluating the effect of rotavirus vaccine. *J Med Virol* 82(8):1468-1474, 2010
- 5) Sharma S, Nakagomi T, Nakagomi O, Paul VK, Bhan MK, Ray P. Convalescent phase sera from children infected with G12 rotavirus cross neutralizes rotavirus strains belonging to the Wa genogroup. *J Gen Virol.*

- 91(Pt 7):1794-1799, 2010
- 6) Ahmed K, Ahmed S, Mitui MT, Rahman A, Kabir L, Hannan A, Nishizono A, Nakagomi O. Molecular characterization of VP7 gene of human rotaviruses from Bangladesh. *Virus Genes*. 40(3):347-356, 2010
- 7) Matthijnssens J, Rahman M, Ciarlet M, Zeller M, Heylen E, Nakagomi T, Uchida R, Hassan Z, Azim T, Nakagomi O, Van Ranst M. Reassortment of human rotavirus gene segments into G11 rotavirus strains. *Emerg Infect Dis*16(4):625-30, 2010
- 8) Adiku TK, Dove W, Grosjean P, Combe P, Nakagomi T, Nakagomi O, Hart CA, Cunliffe NA. Molecular characterization of rotavirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Madagascar during 2004-2005. *J Infect Dis* 202 (Suppl 1): 175-179, 2010
- 9) 中込 治, 中込とよ子: ロタウイルスワクチン: わが国への導入の展望と課題 臨床とウイルス 38(5): in press, 2010
- 10) 中込とよ子, 中込 治: 新時代のワクチン戦略について考える: ロタウイルスワクチン. 臨床検査 54(11): 1392-1399, 2010
- 2.学会発表
- 1) 中込とよ子・中込治: 単価ロタウイルスワクチンの異型ウイルス株に対する有効性の検証: ブラジルでの調査 第14回日本ワクチン学会学術集会 東京 (2009. 12)
- 2) 佐藤尊範, 中込 治, 中込とよ子: ロタウイルスワクチン導入に関する医療経済学的評価: ロタウイルス下痢症による入院率の違いが費用対効果に及ぼす影響. 第14回日本ワクチン学会学術集会 東京 (2009. 12)
- 3) 中込とよ子, 中込治, 有澤孝吉: ロタウイルスの遺伝子型特異的免疫に関する分子疫学的解析第58回日本ウイルス学会学術集会 徳島 (2009. 11)
- 4) Nakagomi O, Doan YH, Nakagomi T. Zoonotic origin of rotaviruses as revealed by the genome analysis. *Emerging and Re-emerging Vector-Borne and Zoonotic Viral Infectious Diseases in Southeast Asia, Hanoi, Vietnam* (2010. 9)
- 5) Doan Y H, Nakagomi T, Nakagomi O. Phylogenetic analysis of G2P[4] strains with emerging importance after rotavirus vaccine introduction. *Emerging and Re-emerging Vector-Borne and Zoonotic Viral Infectious Diseases in Southeast Asia, Hanoi, Vietnam* (2010. 9)
- 6) Hoa T N T, Nakagomi T, Nakagomi O. Continued dominance in Nepal of G12P[6] rotavirus strains that are fully-heterotypic to currently licensed vaccines. *Emerging and Re-emerging Vector-Borne and Zoonotic Viral Infectious Diseases in Southeast Asia, Hanoi, Vietnam* (2010. 9)
- 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（社会保障国際協力推進研究事業）
分担者研究報告書

ロタウイルスの分子疫学に関する研究

ヤギロタウイルスの全遺伝子配列の決定およびヒトロタウイルスとの遺伝学的関連に関する解析

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

ロタウイルスは小児下痢症の主要な原因ウイルスであるとともに、多くの哺乳動物や鳥類にも分布している。本研究では、遺伝学的な解明があまり行なわれていないヤギロタウイルスについて全遺伝子配列を決定するとともに、既知の動物・ヒトロタウイルスとの遺伝学的関連を解析した。バングラデシュにおいて分離されたヤギロタウイルス（*caprine rotavirus*）GO34株の全遺伝子配列を決定したところ、全遺伝子分節に基づく遺伝子型は、G6-P[1]-I2-R2-C2-M2-A11-N2-T6-E2-H3と決定された。GO34株のVP4, VP6, VP7, NSP4遺伝子はウシロタウイルス、NSP1遺伝子はヒツジロタウイルスのそれらに系統的に近かったが、VP2, VP3遺伝子の配列は、既知のヒト・動物ウイルスとの関連性はやや低かった。VP1, VP6, NSP2遺伝子はヒトロタウイルスのG2, G6, G8, G12株のそれらと高い関連を示し、NSP4遺伝子はヒトG6P[14]株に近かった。以上の結果より、ヤギロタウイルスは既知のヒト、動物ロタウイルスと部分的に関連しており、とくにウシ、ヒツジ、アンテロープ等の偶蹄類・反芻動物のロタウイルス、G2, G6, G8, G12など一部のヒトロタウイルス株と起源を同じくすることが示唆された。

A. 研究目的

ロタウイルス（A群）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。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。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。また2008年以降、ロタウイルスの11本の全遺伝子分節に基づく遺伝子型別が提唱された。これにより、VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5の各遺伝子の遺伝子型を連結し、G-P-I-R-C-M-A-N-T-E-H遺伝子型としてロタウイルス株の遺伝子学的性状を表記することが可能となっている。

ロタウイルスは小児下痢症の主要な原因ウイルスであるとともに、多くの哺乳動物や鳥類にも分布している。動物種によって分布するロタウイルスの遺伝子学的性状は異なるが、ロタウイルスは稀に異なる動物種間で感染・伝播することがあると考えられ、それを示唆する多くの報告がある。ロタウイルスの種間伝播の様態や自然界における生態を解明するためには、各動物種に固有のロタウイルスについての全遺伝子配列の情報を確保しておくことが不可欠である。動物ロタウイルスのうち、ウシ、ブタ、ヒツジ、サル、ウサギ、トリのロタウイルスについては全遺伝子配列が決定されているが、ヤギロタウイルスについては解析されていない。本研究ではヤギロタウイルスの全遺伝子配列を決定するとともに、既知の動物・ヒトロタウイルスとの遺伝学的関連について解析を行った。

B. 研究方法

バングラデシュ北部のマイメンシン市郊外において、1999年6-10月、下痢症状を呈する子ヤギ（3月未満）より便検体259検体を採取した。ポリアクリルアミドゲル電気泳動によりロタウイルスのRNA分節を8検体において検出した。これらを用いて、バングラデシュ農科大学においてMA104細胞におけるウイルスの組織培養を行ない、3株（GO34, GO100, GO102）が分離された。経代培養は5回まで行ない、さらにプラーク純化して得られたウイルスクローンを研究対象として用いた。ウイルスRNAはQIAamp Viral RNA mini kitにより抽出した。各ロタウイルス遺伝子はRT-PCRにより遺伝子全長を、または互いに重複する末端配列を有し全長をカバーする複数の部分配列を増幅した。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に登録されている代表的なG型、P型ヒトロタウイルス株、動物ロタウイルス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。

（倫理面からの配慮について）

本研究はバングラデシュ農科大学獣医学部との共同研究として実施された。ウイルス分離はバングラデシュ農科大学において行ない、ロタウイルスより抽出精製されたRNA検体のみを用いて札幌医科大学で遺伝学的解析を実施した。

C. 研究結果

- (1) GO34, GO100, GO102 株は同一のRNAパターンを示した。これら3株について最初に、VP7 遺伝子全長配列、VP4, VP6, NSP4, NSP5 遺伝子の部分配列を決定したところ、互いに99.7-100%の一致率を示した。従ってこれら3株はほぼ同一のウイルス株と考えられた。そこでGO34株を代表株として全遺伝子配列決定とさらなる分

子疫学的解析を行った。

- (2) GO34株のゲノム全長は18503塩基であった。各遺伝子配列について既知の型の株との一致率を調べた結果、VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5 遺伝子の遺伝子型は、G6-P[1]-I2-R2-C2-M2-A11-N2-T6-E2-H3と判定された。この遺伝子型構成はヒツジ、ウシのロタウイルスのそれに類似していた。
- (3) GO34株の各遺伝子分節を系統遺伝学的に解析し、配列の一致率を調べた結果、遺伝子の一部は以下のように既知の動物ロタウイルス株と高い関連性があることが判明した。
 - i) VP4 : bovine A5 (G1P[8])
 - ii) VP6, VP7, NSP4, NSP5 : bovine RUBV319 (G6P[11])
 - iii) VP6, NSP4, NSP5 : bovine RUBV3 (G3P[3])
 - iv) NSP1 : ovine OVR762 (G8P[14])
- (4) VP2, VP3 遺伝子は、ヒト、動物のロタウイルスのそれとは90%未満の一致率を示した。
- (5) GO34株の遺伝子の一部は、以下の既知のヒトロタウイルス株と高い関連性があることが判明した。
 - i) NSP1 : G6P[14] ロタウイルス株
 - ii) VP4, NSP1, NSP4 : G8P[1]株（反芻動物由来と推測される株）
 - iii) NSP4 : L26 (G12)
 - iv) VP1 : RV161-00, RV176-00, N26-02 (G12), DRC86, DRC88 (G8), B1711 (G6P[6])
 - v) NSP2 : RV161-00, RV176-00, N26-02 (G12), DRC86, DRC88 (G8), B1711 (G6P[6]), IS2, NR1 (G2)
 - vi) VP6 : IS2, NR1 (G2), B1711 (G6P[6]), DRC86, DRC88 (G8), RV161-00, RV176-00, N26-02 (G12)

D. 考察

本研究ではヤギロタウイルス株の全遺伝子配列を初めて決定し、系統遺伝学的・分子疫学的解析を行った。ヤギロタウイルスGO34株の遺伝子配列は既知のウシやヒツジのロタウイルスに類似しており、反芻動物の間でロタウイルスが伝播したこと、あ

るいは共通の祖先ウイルスから各反芻動物においてロタウイルスが分子進化を遂げたことが示唆された。GO34 株の遺伝子配列の類似は、バングラデシュやインドのウシロタウイルスとの間で顕著にみられており、このことは、地域内での反芻動物の間でロタウイルスが伝播したことを示唆している。また既知のロタウイルスとの関連が低い遺伝子分節 (VP2, VP3 遺伝子) も見られた。それらはヤギロタウイルスに固有である場合と、他の動物種のロタウイルスとの間で起きたリアソートメントにより獲得された場合の2つの可能性が考えられる。

小児の下痢症の原因として高頻度に見られるヒトロタウイルスは、それぞれ Wa 株、DS-1 株をプロトタイプとする2つの遺伝子群に大きく分けられる。本研究の結果より、ヤギロタウイルスは、他の反芻動物由来のロタウイルスとともに、ヒト DS-1 様ロタウイルスと遺伝学的に近いことが明らかとなった。この知見は、ヒト DS-1 様ロタウイルスが反芻動物のロタウイルスと起源を同じくすることを示唆すると考えられる。G6, G8 はヒトロタウイルスでは稀でウシロタウイルスに多い型であるが、それら G6, G8 ヒトロタウイルスが GO34 の一部の遺伝子と密接な関連を持つことは、反芻動物とヒトの間のロタウイルス伝播を示唆する知見として興味深い。

従来、ヒト・動物を含めてロタウイルスの分子疫学的研究は VP7, VP4 遺伝子のみを用いたものが多かったが、今後全遺伝子分節の配列に基づいた解析が進むことにより、ロタウイルスの動物種間の感染の様態や自然界における生態学的特長が、より明確に理解されることが期待される。

E. 結論

ヤギロタウイルスとしては初めて、バングラデシュの GO34 株の全遺伝子配列を決定し、各遺伝子分節について系統遺伝学的・分子疫学的に解析した。その結果、GO34 株はウシなど反芻動物のロタウイルスに近縁であり、また一部の遺伝子分節は G2, G6, G8, G12 ヒトロタウイルスとも遺伝学的に関連していることが明らかとなった。

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) Ghosh S, Kobayashi N, Nagashima S, Chawla-Sarkar M, Krishnan T, Ganesh B, Naik T. Full genomic analysis and possible origin of a porcine G12 rotavirus strain RU172. *Virus Genes*, 2010, 40:382-388.
- 2) Nagashima S, Kobayashi N, Paul SK, Ghosh S, Chawla-Sarkar M, Hossain MA, Krishnan T. Identification of P[8]b subtype in OP354-like human rotavirus strains by a modified RT-PCR method. *Jpn J Infect Dis*, 2010, 63:208-211.
- 3) Ghosh S, Alam MM, Ahmed MU, Talukdar RI, Paul SK, Kobayashi N. The complete genome constellation of a caprine group A rotavirus strain reveals common evolution with ruminant and human rotavirus strains. *J Gen Virol.*, 2010, 91:2367-2373.

2. 学会発表

- 1) Ghosh S, Kobayashi N, Ishino M, Naik T. Molecular characterization of VP1-3 and NSP1-3 genes of porcine group A rotavirus G12 strain RU172: Evidence for porcine origin of human G12 strains. 14th International Congress on Infectious Diseases. 2010, Miami, FL, USA.
- 2) Yamamoto D, Kobayashi N, Ghosh S, Nagashima S, Krishnan T, Chawla-Sarkar M, Paul SK, Aung TS. Full genome sequence analysis of group B human rotaviruses. 14th International Congress on Infectious Diseases. 2010, Miami, FL, USA.
- 3) Kobayashi N, Yamamoto D, Ghosh S, Alam MM, Krishnan T, Chawla-Sarkar M, Aung TS, Wang Y-H. Genetic diversity and molecular evolution of human group B rotaviruses based on full-length sequences of whole genome segments. The 8th Japan-China International

- Conference of Virology. 2010, Harbin, China.
- 4) Gatheru Z, Nyangao J, Adachi N, Ghosh S, Kobayashi N. Evidence for ruminant or camelid origin of a human G8P[1] group A rotavirus strain isolated from an asymptomatic infant in Kenya. 9th International Rotavirus Symposium, 2010, Johannesburg, South Africa.
 - 5) Ghosh S, Kobayashi N. Full genomic analysis of an artiodactyl-like group A rotavirus G8P[1] strain detected from an asymptomatic infant in Kenya. 12th Western Pacific Congress on Chemotherapy and Infectious Diseases, 2010, Singapore.
 - 6) Ghosh Souvik, Gatheru Zipporah, 足立憲昭、小林宣道. Whole genomic analysis reveals artiodactyl origin of a human group A rotavirus strain from an asymptomatic infant in Kenya. 第 58 回日本ウイルス学会 2010 年 11 月、徳島.
 - 7) 山本大、Ghosh S、小林宣道、葛谷光隆、Wang Y-H, Naik TN, Paul SK. 全遺伝子配列に基づく C 群ヒトロタウイルスの遺伝学的多様性の解析. 第 58 回日本ウイルス学会 2010 年 11 月、徳島.

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