

201123039A

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

網羅的ロタウイルス分子疫学基盤構築とワクチン評価

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 片山 和彦

平成24(2012)年3月

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

網羅的ロタウイルス分子疫学基盤構築とワクチン評価

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 片山 和彦

平成 24 (2012) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告書

網羅的ロタウイルス分子疫学基盤構築とワクチン評価

片山和彦・・・・・・・・・・ 7

II. 分担研究報告書

わが国におけるロタウイルスワクチンの医療経済効果

中込 治・・・・・・・・・・ 15

地球規模で見たロタウイルス G2 株の 34 年間にわたる分子進化学的変遷

中込 とよ子・・・・・・・・・・ 19

全遺伝子配列にもとづく G9P[19] ヒトロタウイルスの系統遺伝学的解析

小林宣道・・・・・・・・・・ 23

医学倫理基準に従ったロタウイルスの疫学調査手法の整備

辰巳 正純・・・・・・・・・・ 27

リバーシジェネティクス系を利用した、ロタウイルスの
外層タンパク質 VP4 の解析

谷口 孝喜・・・・・・・・・・ 45

ロタウイルスのナショナルサーベイランスプランの構築

神谷 元・・・・・・・・・・ 49

下痢症ウイルス蛋白質分子構造の解析

ハンスマン・グラント・・・・ 53

ロタウイルス増殖システムの基盤構築

下池 貴志・・・・・・・・・・ 57

分子疫学基盤の開発

藤井 克樹、岡 智一郎・・・・ 59

ロタウイルスの RNA-PAGE によるパターン解析

村上 耕介・・・・・・・・・・ 63

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別冊

I. 総括研究報告書

網羅的ロタウイルス分子疫学基盤構築とワクチン評価・総括

研究代表者

片山 和彦

国立感染症研究所 ウイルス第二部

研究要旨

ロタウイルス (RV) は、乳幼児の重症胃腸炎の最大の原因である。我が国の総患者数は年間 80 万人、さらに 15 人に一人 (78000 人) の入院があると推定され、予後の悪い RV 脳症や死亡例が存在するにも関わらず、国家レベルのサーベイランスシステムが存在しない。平成 23 年度 11 月より任意接種によって導入された RV ワクチンには、85-95%の重篤化阻止効果がある。しかし、生ワクチンであるため接種開始後には、ワクチン株と野外株との遺伝子組換え体が発生し、地域の中で広がり、ワクチン由来株による感染事故が発生する可能性もある。本研究班では、世界的に見てもウイルスの病原性、防御免疫のメディエータなどに関する科学的なデータが乏しい RV について、我が国における RV 入院患者症例から分離される RV の全長ゲノム塩基配列の解析と蓄積、症例の解析を行う、RV 分子疫学基盤を構築し、ワクチンの影響を評価するための研究基盤整備を行っている。

A. 研究目的

ロタウイルス (RV) は乳幼児における急性重症胃腸炎の主な原因ウイルスであり、糞口感染によってヒトからヒトへと容易に伝播する。RV に感染すると 2~4 日の潜伏期間を経て下痢および嘔吐が発現し、その結果として重度の脱水症を引き起こす。時に、合併症として痙攣、肝炎、腎炎、心筋炎、脳症、腸重積などを伴う重症例も認められる。世界では毎年 60~80 万人が RV 感染症により死亡しており、我が国においても毎年数名の死亡例が報告されている。また、我が国における RV 感染症の総患者数は年間 80 万人におよび、感染者の 15 人に 1 人 (およそ 78000 人) が入院していると推定される。概ね 5 歳までにほとんどの小児が RV に感染するが、一度の感染で十分な防御免疫が成立しないことが多く、複数回発症することも珍しくない。

平成 23 年度 11 月より任意接種によって導入された RV ワクチンには、85-95%の重篤化阻止効果がある。しかし、生ワクチンであるため接種開始後には、ワクチン株と野外株との遺伝子組換え体が発生し、地域の中で広がり、ワクチン由来株による感染事故が発生する可能性もある。本研究班では、世界的に見てもウイルスの病原性、防御免疫のメディエータなどに関する科学的なデータが乏しい RV について、我が国における RV 入院患者症例から分離される RV の全長ゲノム塩基配列の解析と蓄積、症例の解析を行う、RV 分子疫学基盤を構築し、ワクチンの影響を評価するための研究基盤整備を行うことを目的とした。

初年度は、可能な限り日本全国の小児科病院から RV による嘔吐下痢症により入院した乳幼児患者のアクティブサーベイランスを実施可能な体制の整

備と、採取した便検体に含まれる RV のスクリーニング、全ゲノムセグメント塩基配列解析を可能とする核酸増幅システムの構築を目的として研究活動を行った。

B. 研究方法、結果の総括

日本全国を北海道、東北、関東、関西、四国九州ブロックに分け、分担研究者にブロック担当者を依頼し、各ブロックごとに疫学調査に協力が得られる小児科病院に研究への協力を要請し、拠点を決定した。

各ブロックを担当する研究分担者と協議を繰り返し、症例の絞り込み条件、サンプリングから保存発送、ロタウイルススクリーニング、ゲノム解析手法など調査の概要を決定した。決定した条件は、1) 拠点病院にて重篤な嘔吐下痢症で入院した症例から、倫理面に配慮しながら便検体を採取する。2) 症例に関する情報を添付し、便検体と共に国立感染症研究所(感染研)ウイルス第二部に発送する。3) 受け入れた検体は、全て、感染研ウイルス第二部にてロタクロンによるロタウイルスの同定検査を行う。4) ロタウイルス陽性を呈した検体からロタウイルス RNA を抽出精製し、ロタウイルス遺伝子型の調査を行う。5) 可能な限り、全ての全長ゲノム塩基配列を決定し、データベースに蓄積する。6) 得られた全てのデータは、感染研ウイルス第二部内のデータベースに保管管理する。7) ウイルス学的データ解析、研究は、国立感染症研究所ウイルス第二部第一室、藤田保健大学、札幌医科大学で行う。8) 分子疫学研究は長崎大学を中心に実施することとした。各ブロック、並びに検査並びに総括を行う全ての研究は、各拠点病院、大学において、先行して承認された感染研の倫理条項に適合するよう研究環境を整備して、実施した。我が国で初めて本格的に始まる全国的なロタウイルス感染症のアクティブサーベイランスに関する調査方針、基盤構築に成功した。なお、我が国における全国的なアクティブサーベイランスプランは、神谷研究分担者によって、ロタウイルスサーベイランスを実施しているアメリカの CDC に情報提供並びにアドバイスの依頼を行い、2 回の会議を経て構築した。

上記、研究計画は、札幌医科大学小児科・辰巳正純らを中心に、疫学調査に使用する各種書式を作成

し、ヒトを対象とする医学研究倫理審査に申請して、承認された(別紙として関係書類を添付した)。

長崎大学・中込らは、わが国の 5 歳未満のロタウイルス下痢症発生をモデルとするシミュレーションを行った。その結果、入院患者は年間 33,000 人、外来受診者が 68 万人となり、入院と外来にかかる直接費用がそれぞれ 43 億円と 88 億円と推定され、間接費用を含めた総額は 241 億円となった。このモデルでワクチンを導入すると、ロタウイルスワクチンが費用対効果に優れたものであると結論された。また、本分子疫学調査班を分子疫学のオーガナイザーとしてまとめ、全国の拠点病院、ブロックの設定を行った。

札幌医科大学・小林らは、ヒトロタウイルスの伝播の様態を把握するため、日本周辺のアジアにおけるロタウイルス株の解析に着手した。今年度は中国・武漢市において検出された遺伝子型 G1P[8] の 3 株、タイ国で以前に分離された G9P[19] の 2 株について全ゲノム配列解析を行った。さらに、国立感染症研究所ウイルス第二部・藤井を受入れ、ロタウイルスの扱い方・ゲノム解析の方法など研究手技について研修を行った。

藤田保健大学・谷口らは、リバーシジェネティクス系を利用して、ロタウイルスの外層タンパク質 VP4 の解析を行った。外層蛋白質 VP4 は、トリプシンなどの蛋白質分解酵素により、切断され、ウイルス粒子表面で VP5' VP8' に解裂する。ロタウイルスは、この解裂によって感染性粒子となり、細胞に侵入、増殖を開始する。リバーシジェネティクスにより、細胞内で VP4 が解裂した状態を作り出すことで、細胞から放出された時点ですでに感染性を有する粒子となるように遺伝子を改変したロタウイルスの作製を試みた。しかし、細胞内で VP4 を解裂させると、ウイルス粒子形成が阻害されることが明らかになった。ロタウイルス粒子の形成には、細胞内で VP4 が完全な形を保つ必要があることが示された。

国立感染症研究所ウイルス第二部では、受け入れた便検体のロタウイルススクリーニング、ロタウイルス増殖培養、全ゲノム塩基配列決定のための基盤技術の構築を行った。特に、Long distance RT-PCR と、ゲノムセグメント特異的プライマーセットを用いて、11 種類の RNA セグメントから、それぞれ全長

の PCR 増幅産物を得ることができる系の構築に成功したのは、来年度からの分子疫学研究の展開において大きな成果となった。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒト由来の便材料を用いた研究であるため、倫理委員会に研究内容を申請し、承認を受けた後に検体採取並びに解析を行った。組換え DNA 実験は全て国立感染症研究所の承認を得た上で実験計画に基づいて、認定施設内で実施した。

D. 結論

平成23年度に本研究班の活動によって設定した、全国を5つのブロック、それぞれのブロックを統括する分担研究者の病院ベースのネットワークを用いて、ロタウイルス感染症の入院事例を対象に網羅的な情報検出と、検体のサンプリング、蓄積を開始した。当初予定していた病院数を上回る研究協力病院が得られ、受け入れ検体数の大幅な増加が予測されるに至った。

全塩基配列解析のため、全ゲノム増幅法の開発に成功した。今後、順調なデータ蓄積が見込まれる。また、ロタウイルスの病原性等基礎的な側面の研究を推進するため、研究基盤の構築も始まった。来年度以降、順調に研究が展開することが予想される。来年度は、ロタウイルス流行動向調査との連動、情報共有を視野に入れて活動を行う予定である。

E. 研究発表

英文論文発表のみ掲載

1. Hansman, G. S., Biertumpfel, C., Georgiev, I., McLellan, J. S., Chen, L., Zhou, T., Katayama, K., Kwong, P. D. Crystal structures of GII.10 and GII.12 norovirus protruding domains in complex with histo-blood group antigens reveal details for a potential site of vulnerability. *Journal of virology* vol. 85, 6687-701, 2011.
2. Hansman, G. S., Shahzad-Ul-Hussan, S., McLellan, J. S., Chuang, G. Y., Georgiev, I., Shimoike, T., Katayama, K., Bewley, C. A., Kwong, P. D. Structural basis for norovirus inhibition and fucose mimicry by citrate. *J of Virol.* Vol.86, 284-92, 2012.
3. Hansman G. S., Taylor D. W., McLellan J. S., Smith T. J., Georgiev I., Tame J. R. H., Park Sam-Yong., Yamazaki M., Gondaira F., Miki M., Katayama K., Murata K., Kwong P. D. Structural basis for broad detection of genogroup II noroviruses by a monoclonal antibody that binds to a site occluded in the viral particle. *J. Virol.* published ahead of print 25 Jan. 2012.
4. Kawamura, N. Tokoeda, Y. Oshima, M. Okahata, H. Tsutsumi, H. Van Doorn, L. J. Muto, H. Smolenov, I. Suryakiran, P. V. Han, H. H. Efficacy, safety and immunogenicity of RIX4414 in Japanese infants during the first two years of life. *Vaccine* vol. 29(37):6335-41. 2011.
5. Ghosh S, Urushibara N, Taniguchi K, Kobayashi N. Whole genomic analysis reveals the porcine origin of human G9P[19] rotavirus strains Mc323 and Mc345. *Infect Genet Evol.* 2012. [Epub ahead of print]
6. Ghosh S, Gatheru Z, Nyangao J, Adachi N, Urushibara N, Kobayashi N. Full genomic analysis of a G8P[1] Rotavirus strain isolated from an asymptomatic infant in Kenya provides evidence for an artiodactyl-to-human interspecies transmission event. *J Med Virol*, 2011, 83:367-376.
7. Ghosh S, Gatheru Z, Nyangao J, Adachi N, Urushibara N, Kobayashi N. Full Genomic analysis of a simian SA11-like G3P[2] Rotavirus strain isolated from an asymptomatic infant : identification of novel VP1, VP6, and NSP4 genotype. *Infect Genet Evol*, 2011, 11:57-63.
8. Ghosh S, Paul SK, Hossain MA, Alam MM, Ahmed MU, Kobayashi N. Full genomic analyses of two human G2P[4] rotavirus strains isolated in 2005 : Identification of caprine-like VP3 gene. *J Gen Virol.*, 2011, 92:1222-1227.

9. Ghosh S, Paul SK, Yamamoto D, Nagashima S, Kobayashi N. Full Genomic analysis of human rotavirus strains possessing the rare P[8]b VP4 subtype. *Infect Genet Evol*, 2011, 11:1481-1486.
10. Ghosh S, Adachi N, Gatheru Z, Nyangao J, Yamamoto D, Ishino M, Urushibara N, Kobayashi N. Whole genomic analysis reveals the complex evolutionary dynamics of Kenyan G2P[4] human rotavirus strains. *J Gen Virol*, 2011, 92:2201-2208.
11. Doan YH, Nakagomi T, Cunliffe NA, Pandey BD, Sherchand JB, Nakagomi O. The occurrence of amino acid substitutions D96N and S242N in VP7 of emergent G2P[4] rotaviruses in Nepal in 2004-2005: a global and evolutionary perspective. *Arch Virol* 2011 156(11):1969-1978.
12. Sato T, Nakagomi T, Nakagomi O. Cost-effectiveness analysis of a universal rotavirus immunization program in Japan. *Jpn J Infect Dis*. 2011;64(4):277-83.
13. Nakagomi O, Nakagomi T: Rotarix in Japan. *Rotarix in Japan: Expectations and Concerns. Biologics in Therapy* 1(1): 2011 <http://dx.doi.org/10.1007/s13554-011-0007-5>
14. Yoshiki Fujii, Takashi Shimoike, Hirotaka Takagi, Kosuke Murakami, Reiko Todaka-Takai, Park YoungBin, Takaji Wakita and Kazuhiko Katayama. Amplification of all 11 RNA segments of group A rotavirus based on reverse transcription polymerase chain reaction. *Micobiol. and Immunol*, in submission.
15. Komoto S, Wakuda M, Ide T, Niimi G, Maeno Y, Higo-Moiguchi K, Taniguchi K: Modification of the trypsin cleavage site of rotavirus VP4 to a furin-sensitive form does not enhance replication efficiency. *J Gen Virol* 92(2914-2921), 2011
16. Dipanjan Dutta, Shiladitya Chattopadhyay, Parikshit Bagchi, Umesh Chandra Halder, Satabdi Nandi, Anupam Mukherjee, Nobumichi Kobayashi, Satoshi Komoto, Koki Taniguchi, Mamta Chawla-Sarkar: Active participation of cellular chaperone Hsp90 in regulating the function of Rotavirus non structural protein 3 (NSP3). *J Biol Chem* 286(22), 20065-20077, 2011
17. Mitsutaka Wakuda, Tomio Ide, Jun Sasaki, Satoshi Komoto, Junichi Ishii, Takeshi Sanekata, and Koki Taniguchi: Identification of a porcine rotavirus closely related to a novel group of human rotaviruses, J19 and B219. *Emerg Infect Dis* 17(8), 1491-1493, 2011
18. Yokoyama T, Sugimoto N, Taniguchi K, Komoto S, Yuno T, Ohta K, Hashimoto H, Seno A, Ashida A, Fujieda M, Nishio S, Ueno K, Shimizu M, Yachie A.: Molecular and immunochemical detection of rotavirus in urinary sediment cells of children with rotavirus gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect* 17(8), 1190-1193, 2011
19. Jelle Matthijnssens, Max Ciarlet, Sarah M. McDonald, Houssam Attoui, Krisztien Banyai, J. Rodney Brister, Javier Buesa, Mathew D. Esona, Mary K. Estes, Jon R. Gentsch, Miren Iturriza-Gomara, Reimar Johne, Carl D. Kirkwood, Vito Martella, Peter P.C. Mertens, Osamu Nakagomi, Viviana Parreño, Mustafizur Rahman, Franco M. Ruggeri, Linda J. Saif, Norma Santos, Andrej Steyer, Koki Taniguchi, John T. Patton, Ulrich Desselberger, Marc Van Ranst: Uniformity of Rotavirus Strain Nomenclature Proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol* 156(8), 1397-1413, 2011
20. Kamiya H, Nakano T, Kamiya H, Yui A, Taniguchi K, Parashar U, the Rotavirus Epidemiology Study Group: Rotavirus-associated gastroenteritis

hospitalizations among Japanese children aged <5 years: active rotavirus surveillance in Mie Prefecture, Japan. Jap J Infect Dis 64(6):482-487, 2011

21. Nakano I, Taniguchi K, Ueda H, Maeno Y, Yamamoto N, Wakata Y, Matsubara T, Ozaki N. Matsubara T, Ozaki N: Sudden death from systemic rotavirus infection: a case report. J Clin Microbiol 49(12): 4382-4385, 2011
22. Sugata K, Taniguchi K, Yui A, Nakai H, Asano Y, Hashimoto S, Ihira M, Yagasaki H, Takahashi Y, Kojima S, Matsumoto K, Kato K, Yoshikawa T Analysis of rotavirus antigenemia in hematopoietic stem cell transplant recipients. Transplant Infect Dis 2011 (in press)

F. 知的所有権の出願・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

II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

「ロタウイルス分子疫学基盤構築とワクチン評価」

平成 23 年度（初年度）研究分担報告書

わが国におけるロタウイルスワクチンの医療経済効果

研究分担者 中込 治

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・感染免疫学講座

研究要旨

ロタウイルスワクチンの導入により、ロタウイルスによる疾病負担が減少することが期待されるが、ワクチンの経済効果が問題になる。そこで、わが国の 5 歳未満のロタウイルス下痢症発生をモデルとするシミュレーションを行った。その結果、入院患者は年間 33,000 人、外来受診者が 68 万人となり、入院と外来にかかる直接費用がそれぞれ 43 億円と 88 億円と推定され、間接費用を含めた総額は 241 億円となった。このモデルでワクチンを導入すると、入院患者が 1600 人に、また、外来患者が 10 万人に減少し、疾病負担は 30 億円にまで減少する。しかし、ワクチン接種費用全体を 2 万円としても 220 億円という巨額の費用が発生する。その結果、ワクチン導入後の疾病負担は 250 億円と計算され、社会的視点からの増分費用は 9 億円となった。また、1 QALY あたりの増分費用対効果比は 86 万円となり、ロタウイルスワクチンが費用対効果に優れたものであると結論された。

A. 研究目的

ロタウイルス下痢症は、嘔吐、発熱、下痢を主症状とし、毎年 1～5 月に乳幼児を中心に流行する普遍的な病気である。3～5 歳までに事実上すべての小児が感染するが、そのほとんどは軽症である。しかし、2～3%の症例で強い脱水症を起し、ときには脳炎・脳症や多臓器不全、播種性血管内凝固症候群など重篤な病態を合併することがある。さらに、免疫不全児に感染すると、症状が遷延し重症化する。わが国の人口動

態統計にみられるロタウイルス性腸炎による年間数例の死亡はこのような不幸な症例であると思われる。また、ロタウイルスは入院加療が必要な胃腸炎の約 40%の原因となっている。

ロタウイルス下痢症は、発展途上国では 5 歳未満の小児死亡の大きな原因であり、世界保健機関がワクチンの開発を先導して来た。現在、世界規模で使用されているワクチンは、グラクソスミスクライン社が臨床開発した Rotarix とメルク社による RotaTeq

の 2 つである。これらのワクチンの少なくとも 1 つは、アメリカ合衆国、中南米(ブラジル、メキシコ、ニカラグアなど)、ヨーロッパ(ベルギー、ルクセンブルグ、オーストリアなど)、オーストラリアなど世界 20 カ国以上で乳児期の定期予防接種に組み込まれている。

厚生労働省は、2011 年 7 月 1 日にグラクソスミスクライン社に対し Rotarix の製造販売承認を与えた。その後国家検定を経て、11 月 21 日から Rotarix の接種がはじまり、わが国においてもロタウイルス下痢症はワクチンで予防可能な疾患(vaccine preventable disease: VPD)となった。しかし、ロタウイルス下痢症は罹患率は高くても致命率が低く、有効な治療法が確立しており、定期接種への導入という政策決定にあたっては、ワクチンの経済効果が問題になる。本研究では、定期接種化した場合のロタウイルスワクチンの医療経済学的効果を評価することを目的にした。

B. 研究方法

ロタウイルスワクチンを定期接種に導入した場合と未導入の場合とのそれぞれについて、わが国のバースコホートである 110 万人の新生児集団を 5 年間追跡したときに発生するロタウイルス下痢症による入院患者数と外来受診者数を計算機模擬実験から得た。入力条件のうち 5 歳未満の小児の入院率だけを変更して実験を行った。ベースケースに使用する入院率として、疫学研究が行われた秋田県由利本荘市、三重県津市

および伊勢市のデータを参考に、1000 人・年あたり 6 例の入院発生を使った。実験結果に基づき、入院と外来にかかる直接医療費、間接費として保護者の遺失賃金、ワクチン接種にかかる費用、質調整生存年(QALY)を算出した。1QALY 獲得に必要な増分費用が 600 万円未満なら、ワクチンの導入は費用対効果に優れると評価した。

C. 研究結果

このモデルでワクチン未導入の場合、ロタウイルス下痢症による入院患者は年間 33,000 人、外来受診者が 68 万人となり、入院と外来にかかる直接費用がそれぞれ 43 億円と 88 億円と推定された。間接費用は入院に関連して 12 億円、外来受診に関連して 98 億円と推定された。したがって、医療保険的視点からするとわが国におけるロタウイルスの疾病負担は 131 億円であり、間接費用を含めた社会的視点からは 241 億円となった。

このモデルでワクチンを導入すると、入院患者が 1600 人に、また、外来患者が 10 万人に減少し、それに応じて、直接費用と間接費用の総計が 30 億円にまで減少した。しかし一方で、ワクチン接種のために 220 億円の費用が発生した。ワクチン導入後のロタウイルスの疾病負担は、医療保険的視点からすると 235 億円、社会的視点からは 250 億円と計算された。したがって、医療保険的視点、社会的視点からの増分費用は、それぞれ、104 億円、9 億円となった。

ワクチンを導入することにより獲得する効用に関し、このモデルではロタウイルス

に起因する死亡を考慮に入れていないが、ワクチン未導入時のロタウイルス下痢症入院患者や外来患者に起因する効用の損失を積算すると 1,219 QALYs となった。ワクチンの有効性は入院の予防に対して 95%、外来の予防に対して 85%であるので、予防接種プログラム導入後にもなお残る効用の損失は 153 QALYs であった。したがって、予防接種導入によって獲得する効用は、この差である 1066 QALYs となった。

1 QALY あたりの増分費用対効果比は、医療保険の視点からみると、980 万円となった。また、社会的視点からは、86 万円と計算された。わが国の社会が 1 QALY を獲得するために医療に費やしてもよいと考える上限は、500~600 万円であるから、1 QALY あたりの増分費用対効果比がこの上限値（閾値）よりずっと小さい 86 万円であるということは、ロタウイルスワクチンが費用対効果に優れたものであると結論される。

C. 考察

われわれが社会全体の立場から計算したときには、諸外国と同様にロタウイルスワクチンを他のワクチンと同時に接種し、接種に伴う新たな生産性損失がないと仮定した（先進諸国では既存のジフテリア・破傷風・百日咳の 3 種混合ワクチン、肺炎球菌ワクチン、インフルエンザ菌 b 型ワクチンとの同時接種を原則としている）。その結果、ロタウイルスワクチンは費用対効果に非常に優れるとなったが、わが国の慣行である単独接種で計算すると、2 回接種で接種完了

の Rotarix ワクチンであっても 1 QALY あたりの増分費用対効果比は 880 万円となり、ロタウイルスワクチンの費用対効果は消失する。さらに、ワクチン接種費用は現在約 3 万円と言われており、ベースケースに使用した 2 万円を大幅に上回っている。これも 1 QALY あたりの増分費用対効果比を高くするものであり、費用対効果の消失につながる。

E. 結論

臨床試験および先行導入した諸外国のデータが示す優れたロタウイルスワクチンであるが、これを定期接種に導入し、費用対効果のあるものにするためには、接種方法やワクチン接種費用をいかに下げるかなどの社会技術的問題解決が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sato T, Nakagomi T, Nakagomi O. Cost-effectiveness analysis of a universal rotavirus immunization program in Japan. *Jpn J Infect Dis*. 2011;64(4):277-83.

2) Nakagomi O, Nakagomi T: Rotarix in Japan. *Rotarix in Japan: Expectations and Concerns. Biologics in Therapy* 1(1): 2011 <http://dx.doi.org/10.1007/s13554-011-0007-5>

2) 中込 治、中込とよ子：ロタウイルス胃腸炎とロタウイルスワクチン：化学療法の領域 27(8)：1789-1799, 2011

3) 中込とよ子、中込 治：初承認されたロタウイルスワクチン（ロタリックス）の接種時期に関する添付文書の懸念：日本医事新報 4572：30-33, 2011

4) 中込 治、中込とよ子：わが国におけるロタウイルス感染症の現状とロタウイルスワクチン：日本医事新報 4572：73-79, 2011

2. 学会発表

1) Nakagomi O, Doan YH, Nakagomi T, Cunliffe NA. A global and evolutionary perspective of the G2 VP7 genes of rotavirus strains detected over the last 34 years: 4th European Rotavirus Biology Meeting, Reggio Calabria, Italy, 2-5 October, 2011

2) Nakagomi O, Nakagomi T. Emergence of G2 rotaviruses in Brazil as re-evaluated from the perspective of molecular epidemiology: 2nd European Expert Meeting on Rotavirus Vaccination, Padova, Italy, 12-13 April, 2011

3) 伊藤陽里、中込とよ子、中込 治：京都府南丹地区におけるロタウイルス胃腸炎入院に起因する疾病負担とその評価，第52回日本臨床ウイルス学会、津市、6月11日、12日、2011

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

地球規模で見たロタウイルス G2 株の 34 年間にわたる分子進化的変遷

研究分担者 中込 とよ子
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・感染免疫学講座

研究要旨

単価ヒトロタウイルスワクチンは世界でもっとも多用されているワクチンである。最近、世界各地で、単価ワクチン株と血清学的に交差性のない G2 株の増加が見られる。そこで、データベース上に登録されている G2 ロタウイルス VP7 遺伝子と新たに決定したネパールの G2 VP7 遺伝子の塩基配列情報にもとづいて、34 年間にわたる G2 株の分子進化的変遷を解析した。その結果、G2 株には 4 つの分子系統といくつかの亜系統が存在することが明らかになった。これらの系統と、抗原部位にある 4 つのアミノ酸残基 (87, 96, 213, 242) に存在するアミノ酸との間には一定の対応関係があった。また、D96N のアミノ酸変異を特徴とする系統 IVa とその亜系統である S242N を特徴とする IVa-3 が近年もっとも優位を占める G2 VP7 遺伝子であった。とくに最近の 5 年間では、事実上すべての G2 株が系統 IVa となり、その 3 分の 2 を IVa-3 が占めていた。ロタウイルス G2 株の VP7 遺伝子は、1 つの系統の中から新しい系統が出現し、それが優位となり、その中からまた新たな系統が出現するというダイナミックな変化の中で進化していることが伺われた。

A. 研究目的

ロタウイルスの防御免疫には血清型特異的免疫が重要であるという考え方が支配的である。そこで、G1P[8]株をワクチン株とする単価ロタウイルスワクチンがブラジルでの乳児定期予防接種に導入されて以来、ロタウイルス下痢症の割合が減少する一方、検出ロタウイルスに占める G2P[4]株の割合が高まったことにより、これがワクチンによる血清型シフトなのか自然の変動範囲であるのかに関する議論が高まった。ネパールはロタウイルスワクチンの未導入国の 1 つであるが、2003/2004 年の流行期における G2P[4]株の検出割合がわずか 1%であったのに、2004/2005 年の流行期における G2P[4]株の検出割合が 33%に急上昇した。先行研究によれば、このような急増あるいは再出現に際し、VP7 の中和抗原決定部位の 1 つである A 領域に存在する 96 番目のアミノ酸で、アスパラギン酸からアスパラギンへのアミノ酸置換が並行して起こっていることが報告されている。そこで、われわれはこの急激に出現した G2P[4]株の VP7 遺伝子分節の塩基配列を決定し、96 番目のアミノ酸置換の有無を調べるとともに、過去 34 年にお

ける G2VP7 遺伝子の分子系統解析を行うことを目的に本研究を行った。

B. 研究方法

ネパールで 2004/2005 年の流行期に採取した 67 株の G2 株のうち、45 株の G2P[4]株の VP7 遺伝子分節の塩基配列を決定した。過去 34 年間にわたり DNA データベースに登録されている 339 株の G2P[4]株の VP7 遺伝子分節の塩基配列情報にもとづき、MEGA4 により分子系統解析を行った。

C. 研究結果

ネパールでの G2P[4]株の VP7 遺伝子分節の塩基配列を決定したところ、45 株すべてで 96 番目のアミノ酸にアスパラギン酸からアスパラギンへの置換 (D96N 変異) が起こっていた。

DNA データベースに登録されている 339 株の VP7 遺伝子分節の塩基配列情報とネパールの 45 株の G2P[4]株にもとづき、分子系統樹を作成した。分子系統樹の情報は以下のように要約できる。

(1) 系統樹解析により 4 つの系統といくつかの亜系統の存在がわかった。

(2) 分子系統と、ウイルスの中和抗原部

位にある4つのアミノ酸残基(87, 96, 213, 242)との間には一定の対応関係があった。

(3) 分子系統の中で、D96Nのアミノ酸変異を特徴とする系統 IVa とその亜系統である S242N を特徴とする IVa-3 が近年もっとも優位を占める G2 VP7 遺伝子であった。

(4) 最近の5年間では、すべての G2 株が D96N をもつ系統 IVa となり、その3分の2を IVa-3 が占めている。

(5) 2004年以降に G2 株が急増したネパールの株はすべて IVa-3 であったが、ブラジルでは2006~2007年を境に IVa-1 から IVa-3 への変遷(S242N)が起っていた。

D. 考察

本研究の結果として得られた、すべてのネパール株で96番目のアミノ酸がアスパラギン酸からアスパラギンへの置換を有している観察事実を、過去34年におけるG2VP7遺伝子の分子系統進化の中に位置づけると、この変化が系統 IVa に特徴的に起こっており、近年の G2 株はすべて系統 IVa になっていた。この現象は96番目のアミノ酸置換により、系統 IVa 株が選択的優位性を獲得したためであると思われる。そこで、今後、この部位を含め抗原決定領域のアミノ酸に自然選択が働いているかどうかを確認する必要がある。

E. 結論

ロタウイルス G2 株の VP7 遺伝子は、1つの系統の中から新しい系統が出現し、それが優位となり、その中からまた新たな系統が出現するというダイナミックな変化の中で進化しているものと思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Doan YH, Nakagomi T, Cunliffe NA, Pandey BD, Sherchand JB, Nakagomi O. The occurrence of amino acid substitutions D96N and S242N in VP7 of emergent G2P[4] rotaviruses in Nepal in 2004-2005: a global and evolutionary perspective. Arch Virol 2011 156(11):1969-1978.

2) 中込とよ子、中込 治: ロタウイルス感

染症:最新医学 66(12): 2641-2648, 2011

2. 学会発表

1. Nakagomi T, Nakagomi O, Dove W, Doan YH, Witte D, Ngwira B, Todd S, Steele AD, Neuzil KM, Han HH, Cunliffe NA. Molecular characterization of rotavirus strains detected during a clinical trial of a human rotavirus vaccine in Blantyre, Malawi. XV International Congress of Virology, Sapporo, September 11-16, 2011

2. Doan YH, Nakagomi T, Cunliffe NA, Pandey BD, Sherchand JB, Nakagomi O. Possible implication of amino acid substitution D96N in the VP7 gene of G2P[4] strains emerging in Nepal and elsewhere in the context of the evolution of G2 strains. XV International Congress of Virology, Sapporo, September 11-16, 2011

3. Bhattachan P, Nakagomi T, Cunliffe NA, Yokoo M, Pandey BD, Sherchand JB, Nakagomi O. Successive replacement of G12P[6] rotavirus strains over 2 years in Nepal. XV International Congress of Virology, Sapporo, September 11-16, 2011

4. Nakagomi O, Doan YH, Nakagomi T, Cunliffe NA. A global and evolutionary perspective of the G2 VP7 genes of rotavirus strains detected over the last 34 years: 4th European Rotavirus Biology Meeting, Reggio Calabria, Italy, 2-5 October, 2011

5. Nakagomi O, Nakagomi T. Emergence of G2 rotaviruses in Brazil as re-evaluated from the perspective of molecular epidemiology: 2nd European Expert Meeting on Rotavirus Vaccination, Padova, Italy, 12-13 April, 2011

6. 中込 治、Doan YH、中込とよ子: 地球規模で見たロタウイルス G2 株の34年間にわたる分子進化学的変遷: 第65回日本細菌学会東北支部総会、山形市、平成23年8月18日、19日

8. Doan YH, Nakagomi T, Nakagomi O. The evolution and global distribution of G2VP7genes over the last 34 years: 第48回日本ウイルス学会九州支部総会、北九州市、平成23年8月26日、27日

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

全遺伝子配列にもとづく G9P[19] ヒトロタウイルスの系統遺伝学的解析

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り、開発途上国では多くの乳幼児死亡を起こしていると推定される。ロタウイルスはヒト以外の哺乳動物、鳥類に広く分布し、稀に異なる動物種間での伝播が起こることが報告されている。本研究では従来からブタロタウイルスとの関連が示唆されていたヒトロタウイルス株 Mc323、Mc345（RVA/Human-tc/THA/Mc323/1989/G9P[19]、RVA/Human-tc/THA/Mc345/1989/G9P [19]）について全遺伝子配列を決定し、動物ロタウイルスとの関連を正確に解析することを目的とした。これらは1987-1989年にタイ・チェンマイにおいて小児の下痢便から検出され、G血清型9、亜群Iという非定型の特徴を持つ株として報告されたものである。既知のVP7、VP4以外の9遺伝子分節（Mc345株のNSP5遺伝子を除く）の配列を決定し、既知のロタウイルス遺伝子配列とともに系統解析を行った。その結果、これら2株の各遺伝子分節の配列は96%以上の高い一致率を示し、VP1、NSP5遺伝子を除くすべての遺伝子分節は系統的にブタロタウイルスと極めて近縁であった。VP1、NSP5遺伝子の由来は推定できなかったが、通常ヒトロタウイルスとは系統的に異なっていた。このことからMc323、Mc345株は、ブタロタウイルスが人に直接感染、伝播したウイルスである可能性が高いと結論づけられた。

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。また広く哺乳動物、鳥類にも分布している。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、ロタウイルスの疫学的調査に用いられている。ヒトではG1-G4、P[4]、P[6]、P[8]が普遍的に多いことが知られ、それぞれの動物種においても高頻度にみられる遺伝子型がある。

ロタウイルスは稀に異なる動物種間で感染・伝播することがあり、ヒト、動物個体における混合感染により遺伝子分節のリアソートメント（遺伝子再集合）を起こすことも知られる。従来、VP7、VP4遺伝子の解析に基づいて動物-ヒト間での伝播やロタウイルス間のリアソートメントを調べた報告は多数ある

が、それ以外の遺伝子分節についてはあまりよく調べられていない。そのような自然界でのロタウイルスの動態を明らかにするには全遺伝子配列にもとづく解析が必要である。

2008年にロタウイルスの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の各遺伝子に対応する各々の遺伝子型を合わせた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が表記されることとなった。これに加えて各遺伝子分節の系統解析を行うことにより、ロタウイルス株の遺伝学的位置づけをより明確にすることができる。そこで最近、分子疫学的研究に全遺伝子配列に基づく解析が頻繁に行われるようになってきている。

本研究ではタイの小児下痢症例より分離され、非定型ロタウイルスと記載された2つのG9P[19]株、Mc323、Mc345について全遺伝子配列を決定し、動物ロタウイルスとの関連を解析した。P[19]はヒトロタウイルスでは稀

な型であり、G1、G3、G5、G9 との組み合わせを持つ株がインド、タイ、ベトナム、台湾で報告されている。ヒト以外では唯一ブタでの報告があり、G3P[19]の株が中国で検出されている。G9P[19]株の全遺伝子分節が調べられた株は2株あるが、そのVP1-VP4 遺伝子は一部しか配列が決定されておらず、全遺伝子分節の全配列が判明している株は存在しない。Mc323、Mc345 株は1987-1989年にタイ・チェンマイにおいて小児の下痢便から検出され、VP4、VP7、NSP5 遺伝子の配列のみが既に決定されている。我々はこれら2株について、残りの8遺伝子分節の配列を決定し、G9P[19]株の全遺伝子情報を得た。その解析により、G9P[19]ロタウイルスの全遺伝子の由来をはじめて正確に推定することが可能となった。

B. 研究方法

Mc323、Mc345 株 (RVA /Human-tc/THA/Mc323/1989/G9P[19]、RVA /Human-tc/THA/Mc345/1989/G9P[19]) はタイ・チェンマイにおいてそれぞれ生後4ヶ月、7ヶ月の女児の下痢便から検出され、MA104細胞にて分離培養された。これらのウイルス株の検出および解析の経緯についてはすでに報告されている (J Infect Dis, 166:227-234, 1992)。これらが見つかる元となった調査は1987-1989年に行なわれ、A群ロタウイルスの陽性検体158検体の解析において、亜群IでRNAパターンがロング (Mc323) またはリアレンジメントを起こした分節が見られる (Mc345) 非定型的ロタウイルスとして報告された。G遺伝子型はG9と分類され、VP7、VP4 遺伝子配列によりG9P[19]と判定された。NSP5遺伝子についても解析され、Mc345株のNSP5遺伝子は、Mc323のそれがリアレンジメントを起こしたことによって生じたことが報告された (Virology, 224:446-452, 1996)。

今回の研究では、札幌医科大学衛生学講座において凍結保存されていたこれら2株の組織培養液を用いた。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。VP4、VP7、NSP5遺伝子以外のすべての遺伝子分節を解析したが、Mc323株のみ、NSP5遺伝子の配列を確認のため今回再度決定した。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。

C. 研究結果および考察

- (1) Mc323、Mc345 株の全遺伝子分節に基づく遺伝子型 (VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5 遺伝子) は、G9-P[19]-I5-R1-C1-M1-A8-N1-T1-E1-H1 に属し、ほぼ同一のRNAパターンを示した。これら2株間の遺伝子配列の一致率は、NSP5 遺伝子を除き、96.2-98.8%と高かった。NSP5 遺伝子はMc345株においてリアレンジメントが起きていることがすでにわかっており、一致率は95.0%とやや低かった。
- (2) Mc323、Mc345 株のVP7、VP4 遺伝子の配列は既に決定されている。VP4 遺伝子はタイにおけるブタ P[19]ロタウイルスのそれと同じ系統に属し、VP7 遺伝子は殆どのヒト G9 ロタウイルスが属する系統とは異なる系統に属しており、これにはタイのブタロタウイルスが含まれていた。
- (3) Mc323、Mc345 株のVP6 遺伝子はブタロタウイルスに特徴的なI5型に属し、系統樹でもタイのブタロタウイルスのVP6 遺伝子と同じクラスターに属した。
- (4) Mc323、Mc345 株のVP2、VP3、NSP1-4 遺伝子は、いずれもブタロタウイルスに近縁であり、それらと同一のクラスターを形成していた。
- (5) Mc323、Mc345 株のVP1、NSP5 遺伝子は既知のヒトロタウイルス、ブタロタウイルスとの関連は明白ではなかったが、主要なヒトロタウイルス株のそれらとは同じクラスターには含まれていなかった。
- (6) 以上をまとめると、Mc323、Mc345 株の遺伝子分節は、VP1、NSP5 を除き、ブタロタウイルス、しかもこれらの株が見つかったタイのウイルスに極めて近縁であった。VP1、NSP5 遺伝子との関連は明らかではないが、少なくとも通常のヒトロタウイルスとは遺伝学的に近い関係には

ないので、動物ロタウイルスに由来している可能性は残されている。今後動物ロタウイルスの遺伝子配列情報の蓄積により、明らかになってゆくものと思われる。

- (7) 上記の結果より、Mc323、Mc345 株はブタロタウイルスがヒトに直接感染したウイルスであることが示唆された。以前の研究でも限られた遺伝子分節による系統解析、ハイブリダイゼーションによる解析などから、G9P[19]株がブタロタウイルスに近いことが報告されていたが、今回全遺伝子配列の解析により、ブタロタウイルスとの密接な関連が確認された。ただしVP1、NSP5 遺伝子についてはブタロタウイルスとの関連は不明確であり、今後の遺伝子配列情報の蓄積を待つ必要があると考えられた。

D. 結論

タイの G9P[19] ヒトロタウイルス株 Mc323、Mc345 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、これら 2 株の遺伝子分節は、VP1、NSP5 を除き、ブタロタウイルスに極めて近縁であることが判明し、これら 2 株がブタからヒトに直接感染したウイルスであることが示唆された。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ghosh S, Urushibara N, Taniguchi K, Kobayashi N. Whole genomic analysis reveals the porcine origin of human G9P[19] rotavirus strains Mc323 and Mc345. *Infect Genet Evol.* 2012. [Epub ahead of print]
- 2) Ghosh S, Gatheru Z, Nyangao J, Adachi N, Urushibara N, Kobayashi N. Full genomic analysis of a G8P[1] Rotavirus strain isolated from an asymptomatic infant in Kenya provides evidence for an artiodactyl-to-human interspecies transmission event. *J Med Virol*, 2011, 83:367-376.
- 3) Ghosh S, Gatheru Z, Nyangao J, Adachi N, Urushibara N, Kobayashi N. Full Genomic analysis of a simian SA11-like G3P[2] Rotavirus strain isolated from an asymptomatic infant : identification of novel VP1, VP6, and

NSP4 genotype. *Infect Genet Evol*, 2011, 11:57-63.

- 4) Ghosh S, Paul SK, Hossain MA, Alam MM, Ahmed MU, Kobayashi N. Full genomic analyses of two human G2P[4] rotavirus strains isolated in 2005 : Identification of caprine-like VP3 gene. *J Gen Virol.*, 2011, 92:1222-1227.
- 5) Ghosh S, Paul SK, Yamamoto D, Nagashima S, Kobayashi N. Full Genomic analysis of human rotavirus strains possessing the rare P[8]b VP4 subtype. *Infect Genet Evol*, 2011, 11:1481-1486.
- 6) Ghosh S, Adachi N, Gatheru Z, Nyangao J, Yamamoto D, Ishino M, Urushibara N, Kobayashi N. Whole genomic analysis reveals the complex evolutionary dynamics of Kenyan G2P[4] human rotavirus strains. *J Gen Virol*, 2011, 92:2201-2208.

2. 学会発表

- 1) Kobayashi N, Ghosh S, Paul SK, Nagashima S. Full-genomic analysis of human rotavirus strains which have VP4 genes belonging to a rare P[8] subtype (P[8]B). 15th International Congress of Virology, 2011, Sapporo.
- 2) Gosh S, Adachi N Gatheru Z, Nyangao J, Ishino M, Urushibara N, Kobayashi N. Full genomic analysis of human G2P[4] rotavirus strains from Africa. 15th International Congress of Virology, 2011, Sapporo.
- 3) Yamamoto D, Kawaguchiya M, Ghosh S, Ichikawa M, Numazaki K, Kobayashi N. Full genomic analysis of rare G6P[9] human rotavirus detected in Japan. 15th International Congress of Virology, 2011, Sapporo.

F. 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