

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

研究分担者	辰巳 正純	札幌医科大学	医学部小児科
研究協力者	堤 裕幸	札幌医科大学	医学部小児科

研究要旨

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。本分担研究では、臨床現場の医師の視点を生かし、ロタウイルス感染症による入院患者のアクティブサーベイランスを行う際の医学倫理基準に従った疫学調査手法の整備と、便検体情報シート、同意書などの基本フォーマット作成を行った。

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。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。

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。

本分担研究では、我が国におけるロタウイルス感染症のサーベイランスを立ち上げるにあたり、臨床現場の医師の視点を生かし、ロタウイルス感染症による入院患者のアクティブサーベイランスを行う際

の医学倫理基準に従った疫学調査手法の整備と、便検体情報シート、同意書などの基本フォーマット作成を行った。

B. 研究方法、結果ならびに考察

国立感染症研究所のヒトを対象とする医学研究倫理に従った研究申請を行い、全ての研究計画が承認された。添付資料として、研究計画書、医師用説明書、患者様（保護者様）への説明書、患者様同意書、便検体情報カード¹、中枢神経合併症例詳細記載用紙、病院用患者集計用紙を添付した。臨床情報管理に管理は、以下の様に定義した。

（情報管理方法）

病院（主治医）：同意書、暗号化した検体整理番号とカルテとの連結データを主治医の責任でカルテと同レベルのセキュリティで保管管理する。病院用患者集計用紙も保管管理する。

便検体、便検体情報カード（中枢神経合併症例詳細記載用紙記載データ）病院用患者集計用紙写し、以上 3 点をセットで感染研に提出する。

↓

<以降、個人を特定可能なデータは、削除され、連結不能となる。>

↓

感染研(研究代表者):便検体、便検体情報カード(中枢神経合併症例詳細記載用紙記載データ)、病院用患者集計用紙写し、RV 研究データを管理する。研究代表者が本研究に必要と認めた場合、感染研に蓄積、管理されたデータを研究分担者に提供する。

↓↑

研究分担者:感染研に蓄積され、管理されたデータの提出を研究代表者に依頼できる。

国立感染症研究所・倫理委委員会により承認された書類は、本報告書に別添した。

C. 結論

本研究により、平成 24 年度流行、25 年度の我が国におけるロタウイルス入院症例の収集が可能となった。

D. 研究発表

英文:

1. 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.

邦文:なし

学会発表:

1. 辰巳正純ほか、「札幌市におけるヒトロタウイルス G2P[4]株 VP7 遺伝子の解析」第 5 2 回日本臨床ウイルス学会、2011 年 6 月
2. Tatsumi, Yoshinobu Nagaoka, Takeshi Tsugawa, Hiroyuki Tsutsumi. Sequence analysis of the VP7 gene of human rotavirus G2P[4] isolated in sapporo city, Japan during 1987-2010
3. 辰巳正純 「ロタウイルス感染症の現状と対策」第 3 6 回東日本小児科学会・ランチョンセミナー 2011 年 10 月

E. 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

研究計画書

本研究の研究計画の概要は以下のとおりです。この研究計画は国立感染症研究所ヒトを対象とした医学研究倫理審査委員会で審査され、国立感染症研究所長により承認されたものです。

研究課題名：網羅的ロタウイルス分子疫学基盤構築とワクチン評価

実施機関名：国立感染症研究所 ウイルス第二部第一室

研究責任者氏名・役職：片山和彦・室長

〔研究の目的と概要〕

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。我が国では、就学前小児が RV 感染症により、小児科外来を受診するリスクは約 50%、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る。また、予後の悪い RV 脳症や死亡例も存在する。RV ワクチンには 85-95% の重篤化阻止効果がある。日本でも、平成 23 年 11 月より任意接種が始まった。RV ワクチンは弱毒化生ワクチンであり、接種者体内で増殖し、防御免疫を誘導する一方、ワクチン株は体外に排泄される。RV は 11 本の 2 本鎖 RNA 分節を遺伝子として持ち、分節 RNA を交換することで容易に変異ウイルス (遺伝子組換え体) が出現する。従って、ワクチン接種開始後には、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、やがてはワクチン由来株による感染事故が発生する可能性も否定できない。さらに、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は乏しい。

本研究は、国家レベルで RV の分子疫学調査基盤を構築し、ワクチン導入効果の多角的評価を試みる。RV は小児科領域の感染症である。全国を幾つかのブロックに分割し、ブロックを統括する分担研究者により小児科病院ベースのネットワークを構築する。RV 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、蓄積を行うため、対象患者の絞り込みのためのクライテリアを整備し“便検体情報カード”、“並びに中枢神経合併症例詳細記載用紙”を作成した。また、感染研ウイルス第二部では、サンプリングされた検体を用いて、RV 分子疫学解析を実施する。2012 年より RV の臨床データと、RV 全ゲノムの分子遺伝学的解析結果の蓄積を進め、分子疫学研究を行う。以上により、ワクチン効果により激変が予想される疫学像を解析し、その予防と流行制御に関する科学的評価、ワクチン投与方法に関する提言を導くことができる。疫

学・分子疫学情報の解析から重篤化の関与因子を同定できれば、次世代ワクチン開発、ワクチン・安全性の評価システム構築が期待できる。RV の特性、病原性発現機構の解明の他に、腸重積症へのワクチンの影響などに対応できる研究基盤を構築する。

〔研究対象〕

RV の疫学調査を担当する研究分担者、研究協力者の病院において平成26年3月31日までに嘔吐下痢症により受診し、入院した乳幼児患者を対象とする。提供者の目標数は、1000例/年とする。(臨床研究に従事する医師により、米国CDCによって実施されたアクティブサーベイランスに用いられたアンケートフォーマットを参考として“便検体情報カード”、“並びに中枢神経合併症例詳細記載用紙”を作成した。これらを用い、嘔吐下痢症による入院患者の絞り込みを行い、糞便を中心とした検体を採取する。)

〔研究方法〕

RV の疫学調査を担当する研究分担者、研究協力者の病院において採取された検体よりRV特異的ELISA(ロタクロン)、RT-PCRを用いてRV陽性を示す検体を選択する。検体より、情報に従ってRNAを抽出し、RV特異的なプライマーを用いて、11本の全ウイルスゲノムセグメントをRT-PCRにより増幅し、各セグメントの配列を解析する。得られた配列情報は分子疫学調査に用いる。

国立感染症研究所に検体、“便検体情報カード”、“並びに中枢神経合併症例詳細記載用紙”を集約、保管し研究を行う。便検体の解析データは、“便検体情報カード”、“並びに中枢神経合併症例詳細記載用紙”と連結させ、国立感染症研究所(村山庁舎)ウイルス第二部のインターネット接続のないコンピュータ内に保管する。感染研における解析データは、必要に応じて研究代表者の管理の下、分担者、協力者で共有し、研究を行う。解析データと患者個人との連結は、主治医によってのみ可能である。研究代表者を含む研究班員は、患者個人を特定することはできない。

〔本研究がもたらす成果〕

本研究により、RVワクチン効果により激変が予想されるRVの疫学像を解析し、その予防と流行制御に関する科学的評価、ワクチン投与方法に関する提言を導くことができる。RVの疫学・分子疫学情報の解析から重篤化の関与因子を同定できれば、RV次世代ワクチン開発、RVワクチン安全性の評価システム構築が期待できる。RVの特性、病原性発現機構の解明の他に、腸重積症へのRVワクチンの影響などに対応できる研究基盤を構築できる。

ご担当医師 殿

本研究の目的:本研究、網羅的ロタウイルス分子疫学基盤構築とワクチン評価 (H23-新興一般-005) 研究班(片山班)は、小児のロタウイルス感染症について疫学調査や臨床的重症度の評価を行うことになりました。ロタウイルス感染症は毎年冬から春先にかけて乳幼児を中心に流行し、ウイルス性胃腸炎のなかで最も頻度が高い原因ウイルスであり、毎年多くの子供たちが脱水やけいれん等により入院、治療を受けております。近年、ワクチン投与によりロタウイルス感染症の重症化を予防することができるようになり、日本でもロタウイルスワクチン接種が受けられるようになりました。

そこで当研究班は、ロタウイルスワクチン投与前後でロタウイルス感染による入院症例や中枢神経合併症例を研究することで、より効果的なロタウイルス感染症予防方法を検討することにしたしました。主に下痢や嘔吐などの胃腸炎症状を呈する入院患者様を対象として、患者様の便を採取させていただき、ロタウイルスの型別や症状について詳しく研究したいと考えております。

なお、検体の便は研究目的以外には使用せず、個人情報については厳重に管理し、外部に決して漏らさない事を固くお約束します。研究による解析結果と患者様個人は、担当医師の先生のみが連結可能です。

研究の趣旨をご理解いただき、ご協力いただければ幸いです。

説明者の資格:必ず担当医師が行って下さい。

説明について:添付の研究計画書および患者様用説明書をよくご理解いただき、これに基づいてご説明下さい。また、当研究課題の費用負担が無いこと等、利益相反についても説明して下さい。

同意と代諾について: 便検体提供者ご本人様に添付の「同意書」に必要事項の記入と署名をお願いしてください。便検体提供者が未成年もしくは何らかの理由で説明の理解と意思表示ができない場合は、その方に代わってインフォームド・コンセントを与える方(提供者の法定代理人等、提供者の意思及び利益を代弁できると考えられる方)に対し説明を行い、同意を得て下さい。

プライバシーの保護について:

同意書は担当医師もしくは、担当地区の研究分担者、研究協力者において保管してください。検体は必ず個人情報を削除した状態でご送付下さい。連結可能匿名化を実施しますので、対応表は担当医師が保管して下さい。(本研究の研究代表者、研究分担者、研究協力者は、個人の特定が不可能である。担当医師のみ、カルテに記載した便検体番号を照合することにより、検体と個人が特定できる。)

便検体の送付先および問い合わせ先:

国立感染症研究所

所属・役職・氏名 ウイルス第二部第一室 室長 片山和彦

TEL: 042-561-0771 FAX: 042-561-4729

E-mail: katayama@nih.go.jp

以上、ご協力のほどよろしくお願いいたします。

※患者様用説明書

「網羅的ロタウイルス分子疫学基盤構築とワクチン評価」への 協力のご依頼

本病院では、国立感染症研究所と共同で網羅的ロタウイルス分子疫学基盤構築とワクチン評価に関する研究を行っております。

本文書は、担当医師により採取した患者様の便を、この研究のために使用することに同意していただきたく、研究内容や研究倫理上の配慮などを説明したものです。

この文書をよくご理解いただき、患者様（または、提供者本人の代わりにつとめる方、保護者様）が、患者様の便検体をこの研究に使用することに同意して下さる場合には、「同意書」にご署名いただき、同意の表明を示していただくようお願いいたします。

1 〔研究目的について〕

昨年2011年から、ロタウイルスワクチンによりロタウイルス感染症の重症化を予防することができるようになり、日本でもロタウイルスワクチン接種が受けられるようになりました。ロタウイルス感染症による入院症例や中枢神経合併症例の便に含まれるロタウイルスを研究することで、より効果的なロタウイルス感染症予防、治療方法を検討することにいたしました。

2 〔研究の方法〕

乳幼児のおう吐下痢症の入院患者様の便検体をご提供いただき、便にロタウイルスが含まれているかどうかを検査します。ロタウイルスが検出された場合、ロタウイルスの遺伝子配列と、患者様の病気の程度について研究をいたします。この研究は、国立感染症研究所を中心とした研究チームによって、全国的な規模で実施され、今後の効果的なロタウイルス感染症予防、治療方法を検討することに役立つものです。

この病院で担当医師により採取されたお子様の便検体の提供をお願い致します。

研究期間は平成24年1月から平成26年年3月までです。この研究は、便の中

に含まれるロタウイルスを調べる研究であり、ご提供いただいた便検体は、患者様の遺伝子情報の解析など、他の用途に用いることはありません。

3 [個人情報の取扱いについて]

この研究では、個人が特定できないように、当病院の担当医師において検体から名前、住所、カルテ番号など個人を特定可能な情報を削除してから、研究を行います。従って、患者様（保護者様）の個人情報（プライバシー）は保護されます。

4 [研究協力の任意性について]

この研究のために便検体を提供するかどうかは、患者様（保護者様）の自由意思です。提供しなかったことにより不利益を受けることはありません。また、同意した場合であっても、患者様（保護者様）の意思によりいつでも撤回できます。

5 [試料提供者に対する利益及び不利益について]

この研究は患者様の病気の治療を直接の目的としていませんので、患者様（保護者様）がこの研究に協力することによって、治療の上で不利益になることは一切ありません。この研究の成果は、将来のロタウイルスの診断・病態の把握・予防・治療などの向上に貢献すると期待されます。

患者様（保護者様）からご提供頂く便検体に含まれるロタウイルス研究の結果についてお知りになりたい場合は、担当医師の先生にお尋ね下さい。

6 [研究成果の公表について]

患者様（保護者様）の協力によって得られた研究成果は、学会発表や学術雑誌等で公に発表されることがありますが、個人情報はすべて削除されていますのであなたのプライバシーを侵害する恐れはありません。

7 [費用負担について]

患者様（保護者様）に研究のために通常の診療費以上の費用が請求されることはありません。

8 [利益相反について]

研究課題「網羅的ロタウイルス分子疫学基盤構築とワクチン評価 (H23-新興-一般-005)」については、インフルエンザ等新興再興感染症研究事業の一環として行われており、厚生労働省研究補助金で賄われております。

9 [本研究に関する問い合わせ先について]

疫学研究責任者：中込 治 (なかごみ おさむ)

(所 属)長崎大学医学部大学院・医歯薬学総合研究科 (役 職) 教授

TEL: 095-819-7063 FAX: 095-819-7064 E-mail: onakagom@nagasaki-u.ac.jp

同意書

医療機関： _____

主治医(説明者)： _____ 殿

私は研究題目「網羅的ロタウイルス分子疫学基盤構築とワクチン評価 (H23-新興一般-005)」について、担当医師 _____ より説明文書を受け取り、これに基づいて説明を受け、その意義、方法について十分理解しました。ついては、当該研究のために便検体を提供することに同意いたします。

(どちらかに○を付けて下さい。)

- | | |
|-------------------------|---------------|
| 1 研究目的について | 説明を受けた・受けなかった |
| 2 ①担当医師により採取された便の提供について | 説明を受けた・受けなかった |
| ②研究計画について | 説明を受けた・受けなかった |
| ③本研究終了後の試料の取扱いについて | 説明を受けた・受けなかった |
| ④提供者自身の遺伝情報の解析について | 説明を受けた・受けなかった |
| 3 個人情報の取扱いについて | 説明を受けた・受けなかった |
| 4 研究協力の任意性について | 説明を受けた・受けなかった |
| 5 試料提供者に対する利益及び不利益について | 説明を受けた・受けなかった |
| 6 研究成果の公表について | 説明を受けた・受けなかった |
| 7 費用負担について | 説明を受けた・受けなかった |
| 8 利益相反について | 説明を受けた・受けなかった |
| 9 本研究に関する問い合わせ先について | 説明を受けた・受けなかった |

平成 年 月 日

氏名 (試料提供者本人または代諾者) _____ (署名)

(代諾者の場合本人との関係) _____

住所 _____

連絡先電話番号 _____

説明者の氏名及び職名 _____ (署名)

便検体情報カード

入院日：20__年__月__日

下痢症研究整理番号：_____病院_____番*

1. 年齢は5歳未満ですか？ (はい・いいえ)
2. 今回の症状は7日以内に起こったものですか？ (はい・いいえ)
3. 通常よりゆるい便が24時間内に3回以上ありましたか、または他の疾患で説明できない激しい嘔吐がありましたか？ (はい・いいえ)

1~3 がすべて「はい」の場合は保護者の同意書を得て、裏面の質問項目に記入してください。

注：*便検体番号は病院ごとに1から始まる通し番号です。(年度が変わっても1から始めないでください)

入院日：20__年__月__日

下痢症研究整理番号：_____病院_____番*

4. 採便同意書への親の署名（署名済・未署名）

5. 住所：_____（市・町・村） 6. 性別：（男・女）

7. 誕生日：20__年__月__日 年齢：__歳__ヶ月

8. 発症日：20__年__月__日初発症状（発熱、下痢、嘔吐、腹痛、意識障害）

9. 便採取日：20__年__月__日

	参考	1点	2点	3点
10. 下痢の期間（ <input type="text"/> 日間） → <input type="text"/> 点		1～4日	5日	≥6日

11. 最多下痢回数(24時間で <input type="text"/> 回) → <input type="text"/> 点		1～3回	4～5回	≥6回
---	--	------	------	-----

12. 嘔吐期間（ <input type="text"/> 日間） → <input type="text"/> 点		1日	2日	≥3日
---	--	----	----	-----

13. 最多嘔吐回数(24時間で <input type="text"/> 回) → <input type="text"/> 点		1回	2回	≥3回
---	--	----	----	-----

14. 腋窩体温（ <input type="text"/> 度） → <input type="text"/> 点		37.1～38.4℃	38.5～38.9℃	>39.0℃
--	--	------------	------------	--------

15. 脱水レベル 無・有(軽度 or 重度) → <input type="text"/> 点	体重減少	-----	1～5%	≥6%
入院 有			→ <u>2</u> 点(上記の合計点に加算して下さい。)	

合計 点

16. ロタウイルスワクチン接種：（有・無）ワクチン名：（ロタリックス・ロタテック）

1回目：20__年__月__日（__週齢）

2回目：20__年__月__日（__週齢）

3回目：20__年__月__日（__週齢）

17. その他の合併症（腸重積、腎不全、腎結石等）を認めた場合記入して下さい。

18. 中枢神経系合併症（けいれん、意識障害等）の有無（無・有）

有の場合のみ次ページの質問紙表に進んで下さい。

医師署名_____

20__年__月__日

中枢神経合併症例詳細記載用紙

けいれん、意識障害等中枢神経合併症を認めた
場合のみ記載してください。

入院日：20__年__月__日

便検体番号：_____病院_____番

1. 中枢神経合併症は入院後何日目に出現しましたか。 入院後_____日目
2. バイタルサイン：体温 _____℃、心拍数 _____/分、血圧 _____/_____, SpO2 _____%
3. 意識状態 JCS: _____点 GCS: E _____ + V _____ + M _____ = _____
4. けいれん持続時間 _____分、けいれんはなかった。
5. 脱水の程度（体重減少率） _____ないかごく軽度、 _____1～5%、 _____6%以上
6. 意識障害出現時血糖値 _____未施行・施行（ _____mg/dl）
7. 意識障害出現時血液ガス分析 未施行・施行

静脈血・ 動脈血・ キャピラリー

pH P02 PC02 BE

8. 基礎疾患の有無 _____有・無

有りの場合あてはまるものを丸で囲んで下さい。

熱性けいれんの既往、てんかん、周産期障害、脳奇形、頭部外傷後遺症、

髄膜炎後遺症、脳出血後遺症、先天性心疾患、不整脈、

その他（ _____ ）

9. けいれんについて _____有・無

有の場合、けいれんは四肢、上肢（左・右・両）、下肢（左・右・両）にみられ

間代性、強直生、ミオクロニーであった。

10. 眼球： 眼球偏倚（左・右・上・下・正中）、瞳孔（散瞳・縮瞳）

11. 小脳症状の有無 _____有・無

12. 意識障害出現時脳波 _____施行・未施行

施行の場合所見 有・無

有の場合あてはまる所見を丸で囲んで下さい。

びまん性高振幅徐波、平坦脳波

その他記載する所見がある場合は記入して下さい。

13. 髄液検査 施行・未施行

施行の場合 細胞数 個／3、 蛋白 mg/dl、糖 mg/dl

14. 電解質濃度 Na mEq/l、 K mEq/l、 Cl mEq/l

15. 肝機能 AST IU/l、 ALT IU/l、 LDH IU/l

16. MRI 施行・未施行

施行の場合あてはまる所見を丸で囲んで下さい。

- ・T1強調画像で低信号、T2強調・FLAIR画像で高信号域の病変を認める
- ・拡散強調画像で高信号域の病変を認める
- ・特に拡散強調画像で脳梁膨大部に高信号の病変を認める。
- ・異常所見なし

その他記載する他の所見がある場合は記入して下さい。

17. 治療薬剤

ジアゼパム・ミダゾラム・フェノバルビタール・フェニトイン・
その他 ()

18. 転帰 (治療・合併症・死亡・その他_____)

合併症(後遺症)を認めた場合どのような合併症を認めたか記入して下さい。

表 1. Japan Coma Scale

III	刺激をしても覚醒しない状態
300	痛み刺激にまったく反応しない
200	痛み刺激で少し手足を動かしたり、顔をしかめる
100	痛み刺激に対し、払いのけるような動作をする
II	刺激すると覚醒する状態
30	痛み刺激を加えつつ呼びかけを繰り返すと、辛うじて開眼する
20	大きな声または体をゆさぶることにより開眼する
10	普通の呼びかけで容易に開眼する
I	刺激しないでも覚醒している状態
3	自分の名前、生年月日がいえない
2	見当識障害がある
1	意識清明とはいえない

表 2. 乳幼児の意識レベル判定法

III	刺激をしても覚醒しない状態
300	痛み刺激にまったく反応しない
200	痛み刺激で少し手足を動かしたり、顔をしかめる
100	痛み刺激に対し、払いのけるような動作をする
II	刺激すると覚醒する状態(刺激をやめると眠り込む)
30	呼びかけを繰り返すと、辛うじて開眼する
20	呼びかけると開眼して目を向ける
10	飲み物を見せると飲もうとする。あるいは乳首を見せれば欲しがって吸う
I	刺激しないでも覚醒している状態
3	母親と視線が合わない
2	あやしても笑わないが、視線は合う
1	あやすと笑う。ただし不十分で、声を出して笑わない

表 3. Glasgow Coma Scale

Glasgow Coma Scale

Glasgow Coma Scale 乳児用改訂版

活動	最良反応	活動	最良反応
E 開眼(Eye Opening)		E 開眼(Eye Opening)	
自発開眼	4	自発開眼	4
声かけで開眼	3	声かけで開眼	3
痛み刺激で開眼	2	痛み刺激で開眼	2
開眼せず	1	開眼せず	1
V 発語(Verbal Response)		V 発語(Verbal Response)	
見当識良好	5	機嫌よく喃語を喋る	5
混乱した会話	4	不機嫌	4
不適切な言葉	3	痛み刺激で泣く	3
言葉にならない音声	2	痛み刺激でうめき声	2
発声せず	1	声を出さない	1
M 運動(Motor Response)		M 運動(Motor Response)	
命令に従う	6	正常な自発運動	6
疼痛部位の認識可能	5	触れると逃避反応	5
痛み刺激で逃避反応	4	痛み刺激で逃避反応	4
異常な四肢の屈曲反応	3	異常な四肢の屈曲反応	3
異常な四肢の伸展反応	2	異常な四肢の伸展反応	2
動かさない	1	動かさない	1

記載例: E3+V2+M4=9

患者集計用紙

email アドレス : katayama@nih.go.jp

FAX 送信番号 : 042-561-4729

_____ 病院 _____ 年 _____ 月分

検体整理番号 _____ 番から _____ 番まで

入院症例 _____ 例

同意書が得られた数 _____ 例

採便できた数 _____ 例

脳炎・脳症例 有 ・ 無

急性胃腸炎後の腸重積症例 有 ・ 無

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

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

研究分担者 谷口 孝喜 藤田保健衛生大学医学部ウイルス・寄生虫学

研究協力者 河本 聡志 藤田保健衛生大学医学部ウイルス・寄生虫学

研究要旨

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。ロタウイルスは、タンパク質分解酵素による VP4 の開裂により感染性を獲得する。生体内では、腸管でのトリプシンにより、この活性化は行われている。本研究では、リバーシジェネティクスの効率を上げること、および VP4 の開裂の意義を検討する目的で、細胞外に存在するトリプシンと同様に細胞内に存在するフェーリンにも感受性が生じるように、VP4 の開裂部位にアミノ酸変異を導入し、得られたウイルスの性状を検討した。本ウイルスは、予想に反し、親株と比較して、増殖能が低く、トリプシンを与えないと、プラーク形成もできなかった。その理由は、細胞内で、VP4 が開裂すると、細胞外への放出効率が悪くなることが示唆された。その他、リバーシジェネティクス系の効率の向上のための試みも行った。

A. 研究目的

ロタウイルスは、乳幼児嘔吐下痢症の病原体であり、開発途上国では、年間 60 万人の乳幼児の死亡の原因となっている。わが国のような先進国においては、死亡例は少ないものの、重篤な例は多く、入院に占める率は高い。また、胃腸炎以外の疾患との関連が強く示唆されており、特に、脳症・脳炎といった中枢神経系疾患との関連も注目されている。

ロタウイルスの病原性の基盤は明確でない。つまり、ロタウイルスのどの遺伝子のどの領域がロタウイルスの病原性に関与するのかが明確でない。したがって、ワクチンの弱毒化

の機構はわからない。そこで、毒力復帰があり得るのか、組換えによる病原性の復帰があり得るのかもよくわからない。さらには、免疫の仕組みもよくわかっていない。こうして、実用的なワクチンの開発が先行した形になっている。病気を起こさないから、弱毒となった、良く効くから、こうした免疫が働いているのだろうといった推測に基づいている。今後、こうした基本的な問題に対して、解析を進める必要があるだろう。

本研究では、こうした背景のもと、各遺伝子の機能を解析することを目的としている。まずは、ロタウイルスの外層タンパク質で、

感染防御抗原である VP4 タンパク質の機能の解析を進める。解析の方法として、われわれが世界に先駆けて開発したリバースジェネティクス系を利用した。

エンベロープウイルスの多くは、表面スパイク蛋白質が宿主プロテアーゼによって切断、活性化されて膜融合活性を獲得する。非エンベロープウイルスであるロタウイルスも外殻（外層）スパイク蛋白質 VP4 がトリプシンで VP8*と VP5*に切断され活性化されることで感染性を獲得する。今回、ロタウイルスにおけるリバースジェネティクス系を用いて、VP4 上のトリプシン切断領域にフューリン様プロテアーゼ認識配列を導入した組換えロタウイルス (KU//rVP4-R247Furin) を作製し、トリプシン非存在下でのロタウイルスの多段階増殖の可能性を試みた。

また、現時点では、VP4 しかリバースジェネティクスの系が利用できない現状であるので、他の遺伝子に活用できるような改良も試みた。

B. 研究方法

VP4 遺伝子を含む T7 プラスミドの調製

部位変異は、QuickChange II site-directed mutagenesis kit (Stratagene)を利用して、行った。使用したプライマーは、5' AGAGATGTAAGACACcgTAGAGCGCAAGCTAATGAAG 3 と 5' ATTAGCTGCGCTCTAcgGTGTcTTACATCTCTAGCAGTC3' である。

細胞とウイルス

サル腎臓由来細胞株 COS-7、MA104 および CV-1 細胞は、Eagle's MEM + 5%FCS で培養した。ヒト大腸 adenocarcinoma 細胞株 LoVo 細胞は Ham's F12 培養液+ 10%FCS で培養した。

KU//rVP4 (VP4 遺伝子のみ SA11 株由来で他の遺伝子はすべて KU 株由来) を親株として用いた。フューリン認識部位を導入したサルロタウイルス SA11 株の VP4 遺伝子を有するプラスミド DNA を調製し、すでに開発したリバースジェネティクス法により、フューリン認識部位を有する VP4 をもつ KU 株を基本とするウイルス: KU//rVP4-R247Furin を作成した。対照として、KU//rVP4 を用いた。ヘルパーウイルスとしては、ヒトロタウイルス KU 株を利用した。

抗血清

抗ビリオン抗体は、精製 SA11 ビリオンをモルモットに免疫し得た。抗 VP5 抗体は、2種の合成ペプチド (SA11 VP5 配列由来): 296FKPANYQYTYTRDGEVET313 と 444LDRLYGLPAADPNNGKE460 を KLH に結合し、ウサギに免疫して得た。

ウェスタンブロッティング

精製ビリオンを SDS-PAGE で電気泳動し、PVDF 膜にトランスファーした。ウイルスタンパク質は、抗ロタウイルスビリオンか抗ロタウイルス VP5 のポリクロナール抗体、ペルオキシダーゼ標識抗体で反応させ、化学発光により検出した。

C. 研究結果および考察

COS-7 細胞にプラスミドを導入し、ヘルパーウイルスとしてヒトロタウイルス KU 株を感染させた後に、KU 株 VP4 に対する中和モノクローン抗体 (YO-2C2 および ST-2F1 抗体) 存在下で培養を行い、cDNA 由来 VP4 遺伝子を有する KU//rVP4-R247Furin を単離した。

KU//rVP4-R247Furin の増殖効率を検討し、

以下の結果を得た。KU//rVP4-R247Furin はトリプシン非存在下では多段階増殖し得ず、プラークを形成できなかつた。さらに、トリプシン存在下でも MA104 および CV-1 細胞における増殖能は野生型 VP4 を有する親株 KU//rVP4 に比べて大きく低下していた。KU//rVP4-R247Furin 感染細胞では、総ウイルス量は親株 KU//rVP4 とほぼ同じであったが、培養上清中のウイルス量が著しく低下していたが、細胞結合分画でのウイルス量が多かつた。一方で、LoVo 細胞（フューリン発現を欠損）においては、KU//rVP4-R247Furin は親株 KU//rVP4 と同程度の増殖能を示した。また、フューリンの阻害剤である Dec-RVCR-CMK 存在下では増殖能は回復した。

以上の結果は、細胞内フューリンによる VP4 切断効率は低いものの、細胞内での VP4 切断活性化はウイルス粒子の放出効率を著しく低下させ、ロタウイルスの増殖には負に作用する可能性が考えられた。現在、フューリンによる VP4 切断とロタウイルス増殖能の関連について検討を進めている。

ヘルパーウイルスを利用しないリバーシジェネティクス系の確立への試みを行った。しかしながら、いまだ成功していない。今後、引き続き、現状の条件下での VP4 の解析を続けるとともに、ヘルパーウイルスを利用しないリバーシジェネティクス系の確立への試みを行いたい。

D. 研究発表

論文発表

1. 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

afurin-sensitive form does not enhance replication efficiency. *J Gen Virol* 92(2914-2921), 2011

2. 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
3. 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
4. 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
5. Jelle Matthijnsens, 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.