

- Kirkwood, Vito Martella, Peter P.C. Mertens, Osamu Nakagomi, Viviana Parreo, 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
6. Kamiya H, Nakano T, Kamiya H, Yui A, Taniguchi K, Parashar U, the Rotavirus Epidemiology Study Group : Rotavirus-associated gastro-enteritis hospitalizations among Japanese children aged <5 years: active rotavirus surveillance in Mie Prefecture, Japan. Jap J Infect Dis 64(6):482-487, 2011
7. 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
8. 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)
- 学会発表
1. Komoto S, Wakuda M, Maeno Y, Yui A, Higo-Moriguchi, K, Sasaki J, Ishikawa K, Taniguchi K. Modification of the trypsin cleavage site of rotavirus VP4 to furin-sensitive does not enhance replication efficiency. XV International Congress of Virology 2011 September 11-16, Sapporo
- E. 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（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

## 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

研究分担者 神谷 元 国立感染症研究所 感染情報センター

### 研究要旨

ロタウイルス感染症の国家レベルのサーベイランスを立ち上げるにあたり、現在すでに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状況調査を行い、本研究班におけるアクティブサーベイランスプラン、パッシブサーベイランスプランの立案、システム構築に協力した。

#### 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現し、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当たり、現在すでに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システムを参考にするため、CDC に協力を依頼し、アメリカにおける実情を調査した。

#### B. 研究方法、結果ならびに考察

北米では、2006 年 2 月にロタテックが、2008 年 8 月にロタリックスが導入された。これに伴い、全米のロタウイルスワクチン投与前後のサーベイランスデータは、CDC のレポートにより報告されている。米国におけるロタウイルスサーベイランスの実情を調査し、我が国のサーベイランスシステム構築の参考とするため、Tate., E. J 博士、Yen., C 博士、Centers for Disease Control and Prevention 1600 Clifton Rd. NE, MS-A47, Atlanta, GA 30333 を訪問した。また、札幌で開催された IUMS 期間中に Tate 博士に講演並びに本研究班の班会議へ招聘した。

CDC は、ロタウイルス感染症は 5 歳未満のほとんどの児で起こるため、全症例の検査室診断で確定することは現実的ではないと判断した。従って、重症例のトレンド、特に入院例や救急

外来受診例をモニタリングできるサーベイランス New Vaccine Surveillance Network (NVSN) を実施している。また、ワクチン導入により血清型の選択が起こり、これまで稀であった血清型や新たな血清型が出現する可能性が否定できないため、ウイルスの血清型のモニタリング目的のサーベイランス National Respiratory and Enteric Virus Surveillance System (NREVSS) を平行して実施している。前者は全米から3つの拠点病院を選び、その退院台帳からロタウイルス、あるいはロタウイルスに関連性のある病名の患者をレビューし、入院患者数の変化や救急外来受診者数の変化をモニタリングするアクティブサーベイランスである。後者は、全米の約90か所の定点検査室をネットワークで結び、ロタウイルスを対象として検査された検体数、そのうちロタウイルス陽性例のサンプル数を報告するパッシブサーベイランスである。また、一部の検査室はさらに National Rotavirus Strain Surveillance System (NRSSS) と呼ばれるネットワークを形成し、ロタウイルスの血清型の検出状況を時期や地理的要素を加味して解析している。

本研究班では、研究計画当初、可能な限り日本全国を網羅する小児科拠点ネットワークを構築し、全国からまんべんなくサンプリングされたロタウイルス患者便検体を調査対象とすることを目標としていた。しかし、ワクチン効果、特に費用対効果分析を行うためには、予防接種プログラムを実施した場合としない場合のそれぞれについて起こりえる状況を想定し、それぞれのアウトカムに該当する対象者が何人になるかを見いだす必要がある。この過程をもれなく行うためには、decision tree 等を作成し、集団を幾つかのパターンに分別してクラスタリングし、分析する必要がある。つまり、解析対象の非常に細かな情報が必要になるのである。CDCは、このような調査には、パッシブナリサーチでは不十分であると考え、大病院が対象地域の患者情報を詳細に把握可能な地域に、大規模な予算を投入して対象地域全新生児人口をカバーするアクティブサーベイランスを行ったのであ

る。我々も、CDCの方式を取り入れ、札幌医科大学を中心とした北海道の札幌、苫小牧、小樽、秋田大学を中心とした秋田地区、京都の日本海側に位置する南丹病院を中心とした地域、長崎大学を中心とした地域など幾つかの中核となる地域を標的としたアクティブサーベイランスを実施することとした。

一方、全国を網羅するロタウイルスのサーベイランスシステムは、2000年より、厚生労働省の感染症サーベイランスシステム NESID の一部として稼働しているが、小児科拠点の数が少なく、日本全国を網羅しているとは言い難い状況である。しかし、NESIDは、米国におけるパッシブサーベイランス、NRSSSなどに相当するシステムであると考えられることができる。本研究班で協力を要請した全国の拠点小児科病院を新たに加え、アクティブサーベイランスの結果をNESIDに反映させることによって、今後、NESIDをロタウイルスサーベイランスの基盤システムとして利用できるようになるかもしれない。

ロタウイルスは、11本のRNAセグメントをゲノムとして有する。現在、このうち外殻蛋白質の一つであるVP7の遺伝子型G typeingの一部がNESID情報として登録されている。ロタウイルスのワクチンは、生ワクチンであり、ワクチン接種が始まるとフィールドにワクチン株が大量に放出される。ワクチンによるロタウイルスに対する淘汰圧と、ワクチン株とのリアソータントの出現が、現在のロタウイルス流行像を激変させる可能性もある。フィールドのロタウイルス流行株の変遷をモニターすることにより、ロタウイルス疫学と感染制御に貢献することも重要な本研究の役割の一つである。来年度以降に展開される全ゲノム配列解析の情報を蓄積し、疫学データとして公開し、利用可能にする必要があると思われる。

### C. 結論

本研究により、平成24年度流行、25年度流行の調査に向け、我が国におけるアクティブサーベイランスとパッシブサーベイランスの基

本プランが立案できた。来年度より、データの蓄積と解析が始まる。

D. 研究発表

なし

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



発現を行った。

### 3. 融合タンパク質の精製

発現後、BL-21 を高速遠心にて濃縮し、超音波で菌体を破碎して、融合タンパク質の抽出を行った。発現タンパク質は HisTag 標識されているため、タロンカラムに吸着させ、イミダゾールにて溶出した。溶出後、タンパク質は、PBS に透析し、結晶化に用いた。

### 4. タンパク質の結晶化

キアゲン社のタンパク質結晶化キットを用い、精製した NoV P 領域-RV VP8' 融合タンパク質の結晶化を試みた。

(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。

## C. 研究結果、考察

NoV P 領域-RV VP8' 融合タンパク質は、5L の大腸菌カルチャーを用いた低温ショックによる発現で、ミリグラム単位の発現、精製が可能であった。精製した融合タンパク質の SDS-PAGE では、約 35 KDa に CBB 染色により単一のバンドが認められ、純度が極めて高いことが明らかになった。35 KDa のバンドは、ウエスタンブロッティングにより、ノロウイルス VP1 の抗血清との反応が認められた。さらにロタウイルス VP4 の抗血清との反応も認められた。以上から、本発現実験により、純度の高い His-Tag NoV P 領域-RV VP8' 融合タンパク質の発現に成功し、タンパク質は NoV, RV の抗原性を併せ持つことが明らかになった。次に、高純度 His-Tag NoV P 領域-RV VP8'

融合タンパク質を 5 mg 用いて、結晶化実験を行ったが、結晶は得られなかった。そこで、次に、Factor Xa により His Tag を切断し、ゲル濾過を行うことで、HisTag の除去された NoV P 領域-RV VP8' 融合タンパク質を、切断された His Tag と Factor Xa から分離精製した。精製後、再濃縮した NoV P 領域-RV VP8' 融合タンパク質を 5 mg 用いて再び結晶化を試みたが、結晶は得られなかった。

RV VP8' のペプチド挿入により、NoV P 領域に何らかの構造変化が起こり、結晶化を阻害していることが考えられた。

## D. 結論

本研究により、NoV-RV の融合構造タンパク質の発現に成功した。融合タンパク質は NoV, RV 双方の抗原性を有しており、新たなタイプの混合ワクチンの抗原として優れた抗原となり得る。しかし、融合タンパク質は、His Tag の有無にかかわらず、結晶を形成しなかった。また、電子顕微鏡観察においても一定の形状の粒子上構造物は観察できなかった。従って、VP8 挿入によりタンパク質の熱力学的安定性に変化が起き、粒子や結晶を形成できなかった可能性がある。粒子構造が形成されると、より安定した性状を示すことが予想され、将来ワクチンなどへの利用が考えられる。今後、VP8' 挿入部位をずらしつつ、検討を加え、融合タンパク質による粒子もしくは、結晶の形成を目指す。

## 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.
- 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

## ロタウイルス増殖システムの基盤構築

研究分担者 下池 貴志 国立感染症研究所 ウイルス第二部

### 研究要旨

本年度は、患者便検体からのロタウイルススクリーニングシステムの構築と、培養細胞を用いたロタウイルスの増殖法の導入、リアルタイム RT-PCR を用いた感染力価測定法の研究を行った。

### A. 研究目的

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 脳症や死亡例も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。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。本分担研究は、患者便検体からロタウイルスを分離培養する基本的な増殖系を国立感染症研究所ウイルス第二部にて稼働させることを目的とした。

### B. 研究方法

#### 1. ウイルス株

ロタウイルス実験室標準株 Wa 株、Hochi 株、69M 株、WI61 株、臨床分離株（G1P1[8]）、サルロタウイルス SA-11（ATCC より購入）を用いた。

#### 2. 細胞

サル胎児由来腎細胞 MA104 は、MEM 培地で培養増殖後、ロタウイルスの分離培養に用いた。アフリカミ

ドリザル腎細胞 CV-1、ヒト大腸上皮細胞 Caco2 も同様にロタウイルスの分離培養に用いた。

#### 3. ロタウイルス増殖の評価

ロタウイルス抗原検出キット、ロタクロンにより、細胞培養上清をテストし、培養上清にロタウイルスが存在するか否かを確認した。

（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。

### C. 研究結果、考察

サルロタウイルス SA-11 は、MA-104 細胞で効率よく増殖し、ウイルス接種後 1 週間の培養上清は、ロタクロンの強い陽性を示した。ヒトロタウイルス Wa 株、Hochi 株、69M 株、WI61 株、臨床分離株は、それぞれ、MA-104 細胞で増殖し、ロタクロンの陽性反応を示した。しかし、全てのウイルス株は、CV-1、Caco2 での試験の結果、1 週間後でも培養上清はロタクロン陰性を示した。ロタウイルス培養増殖では、VP4 解裂のため、培養上清にトリプシンを加え、トリプシン存在下で増殖を試みる。細胞によっては、トリプシンの抵抗性が弱いため濃度調整が困難な場合



があるが、CV-1, Caco-2はトリプシン抵抗性を示すため、濃度調整が可能である。そこで、本研究では、1~15 unitのトリプシン濃度を試したが、CV-1, Caco2での増殖には成功しなかった。また、細胞培養に血清を用いる場合、血清成分によるトリプシンの活性阻害が起きることが知られている。そこで、本研究では、アセチルトリプシンも試したが、CV-1, Caco2での増殖には成功しなかった。

MA104細胞をVP7, VP4抗体で免疫染色したところ、ロタウイルスの感染が認められる細胞と、認められない細胞が存在することが明らかになった。MA104細胞の表現系の多様化が、ロタウイルスに対する感受性に違いをもたらしている可能性もある。現在、感受性の良いMA104細胞を得るため、MA104細胞のクローニングを実施している。

#### D. 結論

本研究により、ヒトロタウイルスおよびサルロタ

ウイルスの培養細胞による増殖系を試験することができた。ヒトロタウイルスについては、ひと株の臨床分離株をテストしたのみであり、安定した増殖系の構築には、感受性細胞のクローニングによる効率向上など、現在収集中の臨床検体を用いたさらなる検討が必要である。

#### E. 研究発表

本年度は、特になし。

#### G. 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

## 分子疫学基盤の開発

研究分担者	藤井 克樹	国立感染症研究所	ウイルス第二部
研究分担者	岡 智一郎	国立感染症研究所	ウイルス第二部
研究協力者	戸高 玲子	国立感染症研究所	ウイルス第二部

### 研究要旨

一般にロタウイルスは、乳幼児の急性重症胃腸炎の主な原因ウイルスとして知られている。本研究班では、ロタウイルスワクチンと、全国規模のロタウイルスのサーベイランス研究を行うにあたり、患者から分離されたロタウイルスのゲノム全長塩基配列情報の解析と蓄積を予定している。そこで、本分担研究では、各セグメントRNAのシングルステップRT-PCRによる増幅用プライマーの設計と、増幅システムの構築を行った。

#### A. 研究目的

ロタウイルスは乳幼児下痢症の原因ウイルスとして広く一般に知られている。近年、ノロウイルスなどの話題に埋もれ気味であったが、ロタウイルス感染症制御のための単価弱毒化生ワクチン、Rotarix（ロタリックス）、5価弱毒化生ワクチン RotaTeq（ロタテック）が開発され、我が国への導入が間近となってきたことから、再び注目されている。

我が国において、ノロウイルスに代表される冬期集団食中毒、感染性胃腸炎が11月から2月にかけてピークを迎えた後、乳幼児流行性胃腸炎のピークが立ち上がる。これがロタウイルス感染症流行のピークである。一般にロタウイルスは、乳幼児の急性重症胃腸炎の主な原因ウイルスとして知られている。就学前小児がロタウイルス感染症により、小児科外来を受診するリスクは約50%と推定され、総患者数は年間80万人に及び、感染者の15人に一人（78000人ほど）が入院していると推定される。我々が毎年、ロタウイルス感染症によって被る社会的、経済的ダメージは、一般に認知されているよりもかなり大きなものであると思われる。

我が国におけるロタウイルスの分子疫学研究は、欧米諸国と比較すると遅れており、NESIDにおいてもG typingのみが報告されている。また、ロタウイルスの分子疫学の定番であるG type, P typeを継続して解析している研究機関も少ない。さらに、本研究班で研究目標の一つとしているロタウイルスの全ゲノム塩基配列解析と、データの蓄積を実施している施設は非常に少ない。また、ロタウイルスは粒子内部に11種類の2本鎖RNAをゲノムとして有しており、異なるロタウイルス間でゲノムの取り替えを頻繁に起こし、リアソータントが生じることが知られている。本年度より接種が開始されるロタウイルスワクチンは、弱毒生ワクチンであり、接種された乳幼児の体内で増殖したウイルスが、環境中に大量に放出され、野外流行株との間でリアソータントとなる可能性がある。

そこで、本研究では、ロタウイルスの全ゲノム解析とデータの蓄積を行い、ロタウイルスの分子疫学を推進することを目的として、全セグメントのRT-PCRによる増幅法について検討を行った。

## B. 研究方法

### <アライメントに用いたロタウイルス配列>

ロタウイルスのゲノム塩基配列は、各セグメント別に、CaliciWeb データベースからダウンロードして用いた。プライマーは、ダウンロードしたロタウイルスゲノム塩基配列を、セグメント別に GENETYX (R) バージョン 9.0.1 ソフトウェアでアライメントし、ゲノム両端部分の高度保存領域の塩基配列を用いてデザインした。以下にセグメント別に、用いた塩基配列を示した。

VP1 遺伝子 (Wa, DQ490539 ; Dhaka16, DQ492669 ; Hosokawa, DQ870489 ; B3458, DQ870501 ; MMC71, HQ670639 ; DS-1, DQ870505 ; DRC86, DQ005125 ; B4106, AY740741 ; RV176, DQ490551 ; SA11-H96, NC\_011507 ; AU-1, DQ490533 ; PA260-97, HQ661112),

VP2 遺伝子 (Wa, X14942 ; Dhaka16, DQ492670 ; B3458, DQ870502 ; MMC71, HQ670640 ; Hosokawa, DQ870490 ; DS-1, DQ870506 ; DRC86, DQ005124 ; RV176, DQ490552 ; TB-Chen, AY787652 ; B4106, AY740740 ; AU-1, DQ490536 ; PA260-97, HQ661113 ; SA11-H96, NC\_011506)

VP3 遺伝子 (Wa, AY267335 ; Dhaka16, DQ492671 ; B3458, DQ870503 ; MMC71, HQ670641 ; DS-1, AY277914 ; DRC86, DQ005123 ; RV176, DQ490553 ; KF17, JF421977 ; AU-1, DQ490537 ; B4106, AY740739 ; PA260-97, HQ661114 ; SA11-H96, NC\_011508)

VP4 遺伝子 (SA11-H96, DQ841262 ; PA260-97, HQ661115 ; DS-1, HQ650119 ; TB-Chen, AY787644 ; AK26, JF304929 ; ST3, L33895 ; DRC86, DQ005122 ; RV176, DQ490554 ; Wa, L34161 ; Hochi,

AB008295 ; KU, AB222784 ; B3458, EF990707 ; Dhaka16, DQ492672 ; 69M, M60600 ; AU-1, D10970 ; KF17, JF421978 ; PAI58, GU296427 ; B4106, AY740738 ; MG6, EF554096)

VP6 遺伝子 (Wa, K02086 ; Dhaka16, DQ492673 ; B3458, DQ870504 ; MMC71, EU979383 ; DS-1, DQ870507 ; DRC86, DQ005121 ; B4106, AY740737 ; RV176, DQ490555 ; KF17, JF421979 ; PAI58, GU296429 ; SA11-H96, NC\_011509 ; AU-1, DQ490538 ; MG6, EF554097 ; PA260-97, HQ661116)

VP7 遺伝子 (Wa, K02033 ; KU, D16343 ; Dhaka16, DQ492674 ; MMC71, EU839912 ; DS-1, AB118023 ; TB-Chen, AY787646 ; AK26, JF304931 ; AU-1, D86271 ; SA11-H96, NC\_011503 ; B4106, AY740736 ; ST3, X13603 ; Hochi, AB039035 ; MG6, EF554098 ; KF17, JF421980 ; B1711, EF554087 ; BP1062, FN665696 ; DRC86, DQ005120 ; WI61, AB180969 ; B3458, EF990708 ; A64, A01321 ; L26, M58290 ; RV176, DQ490556),

NSP1 遺伝子 (Wa, L18943 ; MMC71, HQ670642 ; Dhaka16, DQ492675 ; B3458, EF990709 ; DS-1\_L18945 ; DRC86, DQ005119 ; RV176, DQ490557 ; AU-1, D45244 ; KF17, JF421981 ; PAI58, GU296411 ; SA11-H96, NC\_011500 ; B4106, AY740735)

NSP2 遺伝子 (Wa, L04534 ; Dhaka16, DQ492676 ; B3458, EF990710 ; MMC71, HQ670643 ; DS-1, HQ650123 ; DRC86, DQ005118 ; RV176, DQ490558 ; B4106, AY740734 ; AU-1, DQ490534 ; T152, DQ146703 ; SA11-H96, NC\_011502)

NSP3 遺伝子 (Wa, X81434 ; Dhaka16, DQ492677 ; B3458, EF990711 ; DS-1,

HQ650122 ; DRC86, DQ005117 ; RV176,  
DQ490559 ; AU-1, DQ490535 ; KF17,  
JF421983 ; PA260-97, HQ661120 ; SA11-H96,  
NC\_011501 ; B4106, AY740733 ; PAI58, GU296414)

NSP4 遺 伝 子 (Wa, K0232 ; Dhaka16,  
DQ492678 ; B3458, EF990712 ; MMC71,  
EU979384 ; DS-1, HQ650125 ; DRC86,  
DQ005116 ; SA11-H96, NC\_011504 ; AU-1,  
D89873 ; KF17, JF421984 ; PA260-97,  
HQ661121 ; B4106, AY740732)

NSP5 遺 伝 子 (Wa, AF306494 ; Dhaka16,  
DQ492679 ; B3458, EF990713 ; DS-1,  
HQ650126 ; DRC86, DQ005115 ; RV176,  
DQ490561 ; AU-1, AB008656 ; KF17,  
JF421985 ; MG6, EF554103 ; SA11-H96,  
NC\_011505 ; PA260-97, HQ661122).

#### <プライマー配列>

これらの塩基配列のアライメントデータから、全てのウイルス株の間で、高度に核酸配列の保存された各遺伝子セグメントの5'と3'末端に設計した。

プライマー配列を以下に示した。

VP1F primer GGCTATTAAGCTRTACAATGG  
VP1R primer CACATCTAAGCACTCTAATCTTG  
VP2F primer GGCTATTAAGGCTCAATGG  
VP2R primer TTGGCGTTTACARTTCGTTCA  
VP3F primer TGCGTTTTACCTCTGATGGTG  
VP3R primer TCACATCATGACYAGTGTGTTAAG  
VP4F primer GGCTATAAAATGGCTTCGCT  
VP4R primer GGGGGTCACATCCTC  
VP6F primer GGCTTTWAAACGAAGTCTTC  
VP6R primer GGTCACATCCTCTCACT  
VP7F primer GGCTTTAAAAGMGAGAATTTCC  
VP7R primer GGGGGTCACATCATAACAATTCT  
NSP1F primer GGCTTTTTTTATGAAAAGTCTTGTG  
NSP1R primer CTAGCGCTACTCTAGT  
NSP2F primer GGCTTTTAAAGCGTCTCAGTC  
NSP2R primer GGTCACATAAGCGCTTTCTATTC  
NSP3F primer GGCTTTTAAATGCTTTTCAGTGGTTG

NSP3R primer GGTCACATAACGCCCTATAG  
NSP4F primer CTTTTAAAAGTCTGTTCGAGAG  
NSP4R primer AAGACCATTCTTCCATTAAC  
NSP5F primer GGCTTTTAAAGCGCTACAGT  
NSP5 R primer GGTCACAAAACGGGAGTGGGGA

#### <ウイルス増殖>

MA104 細胞（アカゲザル腎臓細胞系）を用いて、小林宣道教授（札幌医科大学医学部）より譲渡されたウイルスを増殖させた。MA104 細胞は、37°CのCO2インキュベーターで培養した。

ロタウイルス株 Wa (G1P [8])、DS-1 (G2P [4])、Hochi (G4P [8])、69M (G8P [10])、WI61 (G9P [8])、M37 (G1P [6]) と SA11-S1 (G3P [2]) をそれぞれ、37°C でアセチル化トリプシン（シグマ）の 10~20  $\mu$ g/mL で前処理し、活性化させた後、MA104 細胞に感染させ、1~2  $\mu$ g/mL のアセチルトリプシンを含む EMEM で、培養増殖させた。5 日間の培養後、感染細胞は、凍結融解を 3 回繰り返して、ハーベストした。細胞画分を除いた上清は、濾過（孔サイズ 0.22  $\mu$ m）後、-80°C で保管し、RNA 抽出に用いた。

#### <RNA 抽出精製、RT-PCR>

ロタウイルス RNA の抽出は、TRIzol (R) LS Reagent（ライフテクノロジー社）と Direct-zol RNA MiniPrep キット（ZYMO Research）を使用して行った。

RT-PCR は、各セグメント特異的リバープライマーと、PrimeScript (R) cDNA Synthesis キット（タカラ）を用いて cDNA を 42°C にて 30 分間合成した。合成後、PrimeScript の不活性化のため 70°C にて 15 分間の熱処理を加え、cDNA を得た。PCR は、各セグメント特異的プライマーセットと PrimeSTAR (R) GXL DNA Polymerase（タカラ）を使用して行った。増幅産物は、1.2%のアガロースゲルで電気泳動し、サイズを確認した。

#### C. 研究結果、考察

本研究で、新規にデザインしたそれぞれのゲノムセグメント特異的プライマーセットは、VP4 遺伝子型 (P [9] と P [14]) を除いて、ヒトに感染するロタウイルス株の増幅が可能であった。ウイルス株、Wa、DS-1、Hochi、69M、WI61、M37 と SA11-S1 の 11 セ

グメントは全て、増幅可能であった。しかし、VP4の増幅効率は、他のセグメントに比べると低い傾向が認められた。VP1とNSP3の増幅効率があまり良くない株も認められた。

以下に遺伝子別に増幅に成功した遺伝子型をまとめた。

VP7 : G1、G2、G3、G4、G8、G9

VP4 : P [2]、P [4]、P [6]、P [8] とP [10]

VP6 : I1、I2;

VP1 : R1、R2;

VP2 : C1、C2、C5;

VP3 : M1、M2、M5;

NSP1 : A1、A2、A5;

NSP2 : N1、N2、N5;

NSP3 : T1、T2、T5;

NSP4 : E1、E2;

NSP5 : H1、H2、H5

以上をまとめると、本プライマーセットは、流行している大部分のA群ロタウイルスの遺伝子型のゲノムセグメントを増幅可能であった。

VP4の増幅効率が、他の遺伝子セグメントよりも低い傾向にあったのは、リバープライマーの保存領域が12塩基と、ほかのプライマーよりも短めであることが影響している可能性がある。また、VP4リバープライマーは、VP6セグメントの3'末端に相補的な領域を持つため、プライマーがVP6に結合し、cDNA合成効率が低下している可能性もある。

ロタウイルスの全ゲノムセグメントの塩基配列を解析するためには、ゲノムの全ての領域を増幅する必要がある。ロタウイルスゲノムセグメントの5'、3'末端には、高度に保存された塩基配列モチーフが存在し、プライマーをデザインしやすいが、ゲノムセグメントの他の部分は、塩基配列の多様性があり、全てのタイプのロタウイルスをユニバーサルに増幅可能なプライマーデザインは困難であった。また、ゲノムセグメントの塩基長が長い、VP1;3.3kb, VP2;2.7kb, VP3;2.5kb, VP4;2.3kb, NSP1;1.6kb, VP6;1.3kbは、1セットのプライマーで増幅すること

が難しく、増幅領域が互いにオーバーラップするように、複数のプライマーセットを用いて増幅し、それらの塩基配列を組み上げることで、ゲノムセグメント全長の塩基配列決定を行ってきた。しかし、ゲノムセグメントの5'、3'末端を除く領域は、核酸配列の多様性が高く、プライマーデザインが難しいことが知られている。

本研究で、我々のデザインしたプライマーセットは、一度のRT-PCRによって、今まで分割して増幅してきたVP1;3.3kb, VP2;2.7kb, VP3;2.5kb, VP4;2.3kb, NSP1;1.6kb, VP6;1.3kbを含め、11種類のゲノムセグメント全てを増幅することが可能であり、今後のA群ロタウイルスの全塩基配列決定や、分子疫学に有用である。

#### D. 結論

本研究により、構築に成功したロタウイルスの全ゲノム増幅システムは、ロタウイルスの全長ゲノム塩基配列解析に基づく、分子疫学的研究の強力なツールである。

#### E. 研究発表

Yoshiki Fujii<sup>1</sup>, Takashi Shimoike<sup>1</sup>, Hiroataka Takagi<sup>2</sup>, Kosuke Murakami<sup>1</sup>, Reiko Todaka-Takai<sup>1</sup>, Park YoungBin<sup>1</sup>, Takaji Wakita<sup>1</sup> and Kazuhiko Katayama<sup>1\*</sup> Amplification of all 11 RNA segments of group A rotavirus based on reverse transcription polymerase chain reaction. *Micobiol. and Immunol.*, in submission.

#### G. 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

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

## ロタウイルスの RNA-PAGE によるパターン解析

研究分担者	村上 耕介	国立感染症研究所 ウイルス第二部
研究協力者	戸高 玲子	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。ロタウイルスは、患者便検体からロタウイルスのゲノム RNA を抽出し、RNA-PAGE を行うことで、A, B, C 群を含むタイプを分析し、疫学研究に役立てることができる。本分担研究では、ロタウイルスの RNA-PAGE を国立感染症研究所ウイルス第二部で実施できるよう、基盤技術の構築を行うことを目的とした。

### A. 研究目的

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 脳症や死亡例も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。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。本分担研究では、ロタウイルスの RNA-PAGE を国立感染症研究所ウイルス第二部で実施できるよう、基盤技術の構築を行うことを目的とした。

### B. 研究方法

#### 1. ウイルス株

ロタウイルス実験室標準株 Wa 株、Hochi 株、69M 株、WI61 株、臨床分離株（G1P1[8]）、サルロタウイルス SA-11（ATCC より購入）を用いた。

#### 2. 細胞

サル胎児由来腎細胞 MA104 は、MEM 培地で培養増殖

後、ロタウイルスの分離培養に用いた。アフリカミドリザル腎細胞 CV-1、ヒト大腸上皮細胞 Caco2 も同様にロタウイルスの分離培養に用いた。

#### 3. ロタウイルス増殖の評価

ロタウイルス抗原検出キット、ロタクロンにより、細胞培養上清をテストし、培養上清にロタウイルスが存在するか否かを確認した。

#### 4. 臨床検体および、培養上清からのウイルス RNA 抽出

ウイルス RNA 抽出には、酸フェノールクロロフォルム抽出法（AGPC 法）を応用した RNA 抽出液 Trizol LS（インビトロジェン）または、Isogen LS（和光純薬）を用いた。10%程度に懸濁した臨床便検体、もしくは培養上清から、RNA 抽出液のプロトコールに従い RNA を抽出精製した。

#### 5. RNA-PAGE

抽出した RNA は、DEPC 処理した DW にて懸濁し、RNA-PAGE dye を添加した後、10% アクリルアミドゲル（アトー）、Tris/Glycine SDS buffer にて SDS-PAGE を行った。泳動後、ゲルは、サイバーゴールド（インビトロジェン）で染色し、トランスイルミネーターにて、RNA のバンドを確認した。

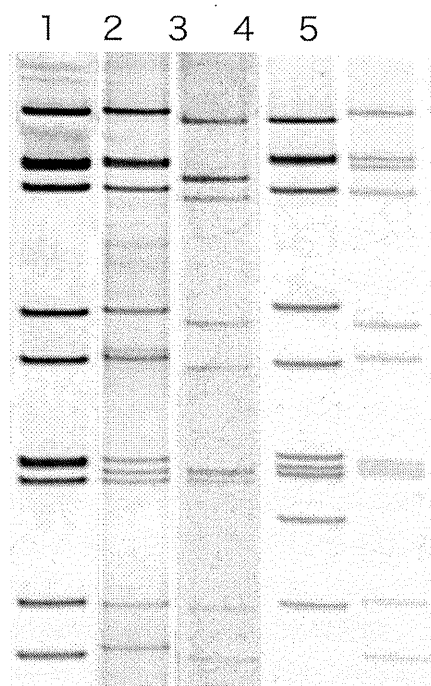
（倫理面への配慮）

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。

### C. 研究結果、考察

サルロタウイルスSA-11は、MA-104細胞で効率よく増殖し、ウイルス接種後1週間の培養上清は、ロタクロンの強い陽性を示した。ヒトロタウイルスWa株、Hochi株、69M株、W161株、臨床分離株は、それぞれ、MA-104細胞で増殖し、ロタクロンの陽性反応を示した。

それぞれの培養上清よりRNAを抽出し、RNA-PAGEを試行した。



1. G1P[8]のコントロールサンプル、2. Wa株、3. Hochi株、4. 69M株、5. W161株を泳動したところ、全てにおいて11本のゲノムRNAのバンドが確認可能であった。また、それぞれのパターンからロタウイルス株を分別可能であった。臨床分離株については、10% 2懸濁した便懸濁液から直接RNAを抽出し、同様にRNA-PAGEを試行し、11本のバンドが検出可能であった。

### D. 結論

本研究により、ヒトロタウイルスおよびサルロタウイルスの培養細胞による増殖系によって増殖したロタウイルスのRNA-PAGEが可能となった。ヒトロタウイルスについては、ひと株の臨床分離株をテストしたのみである。RNA-PAGEによるゲノム検出系は、A群のみならず、B、C群ロタウイルス検出も可能であることに加え、バンドパターンからある程度の株分別も可能であると思われ、ロタウイルスのスクリーニングに有用である。今後、臨床検体を用いた検討を継続すると共に、パターンの蓄積を行うことで、株分別データベースとしても利用可能であると思われた。

### E. 研究発表

本年度は、特になし。

### G. 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

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表



## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Hansman, G. S.</u> , Biertumpfel, C., Georgiev, I., McLellan, J. S., Chen, L., Zhou, T., <u>Katayama, K.</u> , 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	85	6687-701	2011
<u>Hansman, G. S.</u> , Shahzad-UI-Hussan, S., McLellan, J. S., Chuang, G. Y., Georgiev, I., Shimoike, T., <u>Katayama, K.</u> , Bewley, C. A., Kwong, P. D.	Structural basis for norovirus inhibition and fucose mimicry by citrate.	Journal of virology	86	284-92	2012
<u>Hansman G. S.</u> , Taylor D. W., McLellan J. S., Smith T. J., Georgiev I., Tame J. R. H., Park Sam-Yong., Yamazaki M., Gondaira F., Miki M., <u>Katayama K.</u> , 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.		In press	2012
Kawamura, N. Tokoeda, Y. Oshima, M. Okahata, H. Tsutsumi, H. Van Doom, 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	29	6335-41	2011
Ghosh S, Urushibara N, Taniguchi K, <u>Kobayashi N.</u>	Whole genomic analysis reveals the porcine origin of human G9P[19] rotavirus strains Mc323 and Mc345.	Infect Genet Evol.		In press	2012
Ghosh S, Gatheru Z, Nyangao J, Adachi N, Urushibara N, <u>Kobayashi N.</u>	Full genomic analysis of a G8P[1] Rotavirus strain isolated from an asymptomatic infant in Kenya provides evidence for an antrodactyl- to-human interspecies transmission event.	J Med Virol	83	367-376	2011

Ghosh S, Gatheru Z, Nyangao J, Adachi N, Urushibara N, <u>Kobayashi N.</u>	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.	11	57-63	2011
Ghosh S, Paul SK, Hossain MA, Alam MM, Ahmed MU, <u>Kobayashi N.</u>	Full genomic analyses of two human G2P[4] rotavirus strains isolated in 2005 : Identification of caprine-like VP3 gene.	J Gen Virol.	92	1222-1227	2011
Ghosh S, Paul SK, Yamamoto D, Nagashima S, <u>Kobayashi N.</u>	Full Genomic analysis of human rotavirus strains possessing the rare P[8]b VP4 subtype.	Infect Genet Evol.	11	1481-1486	2011
Ghosh S, Adachi N, Gatheru Z, Nyangao J, Yamamoto D, Ishino M, Urushibara N, <u>Kobayashi N.</u>	Whole genomic analysis reveals the complex evolutionary dynamics of Kenyan G2P[4] human rotavirus strains.	J Gen Virol.	92	2201-2208	2011
Doan YH, <u>Nakagomi T.</u> , Cunliffe NA, Pandey BD, Sherchand JB, <u>Nakagomi O.</u>	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.	156	1969-1978	2011
Sato T, <u>Nakagomi T.</u> <u>Nakagomi O.</u>	Cost-effectiveness analysis of a universal rotavirus immunization program in Japan.	Jpn J Infect Dis.	64	277-83	2011
<u>Nakagomi O.</u> <u>Nakagomi T</u>	Rotarix in Japan. Rotarix in Japan: Expectations and Concerns.	Biologics in Therapy	1	<a href="http://dx.doi.org/10.1007/s13554-011-0007-5">http://dx.doi.org/10.1007/s13554-011-0007-5</a>	2011
<u>Yoshiki Fujii.</u> <u>Takashi Shimoike.</u> <u>Hiroataka Takagi.</u> <u>Kosuke Murakami.</u> <u>Reiko Todaka-Takai.</u> <u>Park YoungBin.</u> <u>Takaji Wakita and Kazuhiko Katayama.</u>	Amplification of all 11 RNA segments of group A rotavirus based on reverse transcription polymerase chain reaction.	Micobiol. and Immunol		In submission	2012
Komoto S, Wakuda M, Ide T, Niimi G, Maeno Y, Higo-Moiguchi K, <u>Taniguchi K</u>	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

Dipanjan Dutta, Shiladitya Chattopadhyay, Parikshit Bagchi, Umesh Chandra Halder, Satabdi Nandi, Anupam Mukherjee, Nobumichi Kobayashi, Satoshi Komoto, <u>Koki Taniguchi</u> , Mamta Chawla-Sarkar	Active participation of cellular chaperone Hsp90 in regulating the function of Rotavirus non structural protein 3 (NSP3).	J Biol Chem	286	20065-20077	2011
Mitsutaka Wakuda, Tomio Ide, Jun Sasaki, Satoshi Komoto, Junichi Ishii, Takeshi Sanekata, and <u>Koki Taniguchi</u>	Identification of a porcine rotavirus closely related to a novel group of human rotaviruses, J19 and B219.	Emerg Infect Dis	17	1491-1493	2011
Yokoyama T, Sugimoto N, <u>Taniguchi K</u> , 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	1190-1193	2011
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. Kirkwood, Vito Martella, Peter P.C. Mertens, Osamu Nakagomi, Viviana Parreo, Mustafizur Rahman, Franco M. Ruggeri, Linda J. Saif, Norma Santos, Andrej Steyer, <u>Koki Taniguchi</u> , John T. Patton, Ulrich	Uniformity of Rotavirus Strain Nomenclature Proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG).	Arch Virol	156	1397-1413	2011

Desselberger, Marc Van Ranst					
<u>Kamiya H</u> , Nakano T, Kamiya H, Yui A, <u>Taniguchi K</u> , Parashar U, the Rotavirus Epidemiology Study Group	Rotavirus-associated gastro- enteritis hospitalizations among Japanese children aged <5 years: active rotavirus surveillance in Mie Prefecture, Japan.	Jap J Infect Dis	64	482-487	2011
Nakano I, <u>Taniguchi K</u> , 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	4382-4385	2011
Sugata K, <u>Taniguchi K</u> , 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		In press	