

- antibody in the human and rodent serum. XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria, Rio de Janeiro, Brazil. September 23-27, 2012.
- 7) Amada T, Yoshimatsu K, Yasuda SP, Koma T, Shimizu K, Nishio S, Hayashimoto N, Takakura A, Arikawa J. Rapid and whole blood diagnostic test for detecting anti-hantavirus antibody in human and rodent. The 5th Asian Federation of Laboratory Animal Science Associations Congress, Bangkok, Thailand. October 10-12, 2012.
- 8) Morita K. Therapy of Japanese encephalitis virus. 25th International Conference on Antiviral Research (ICAR), Sapporo Japan. April 16-19, 2012.
- 9) Morita K. Mosquito-transmitted Disease Consortium. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2013, Tokyo, Japan. January 23-24, 2013.
- 10) Thuy Nguyen TT, Dang TA, Vu LD, Truong HT, Nabeshima T, Posadas-Herrera G, Dang DT, Ly Pham HL, Nguyen NB, Mai Le TQ, Huong Vu TQ, Morita K, Hasebe F. Molecular epidemiology of dengue virus type 4 in Vietnam. Asian-African research forum on emerging and reemerging infections 2013, Tokyo, Japan. January 23-24, 2013.
- 11) Phan NT, Bui TM, Dang TT, Do LP, Hoang DM, Posadas-Herrera G, Nabeshima T, Hasebe F, Morita K. Banna virus specific IgM antibody detected in the CSF collected from unknown encephalitis patients. Asian-African research forum on emerging and reemerging infections 2013, Tokyo, Japan. January 23-24, 2013.
- 12) Buerano CC, Nabeshima T, Alonzo MT, Suarez LA, Tun Mya MT, Inoue S, Matias RR, Natividad FF, Morita K. Molecular epidemiology of DENV3 in the Philippines. Asian-African research forum on emerging and reemerging infections 2013, Tokyo, Japan. January 23-24, 2013.
- 13) Kwallar AO, Inoue S, Muigai AW, Sang R, Kubo T, Morita K, Mwau M. A real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of yellow fever virus. Asian-African research forum on emerging and reemerging infections 2013, Tokyo, Japan. January 23-24, 2013.
- 14) Raekiansyah M, Okamoto K, Espada-Murao LA, Kubo T, Morita M. Physiological change of dengue virus-infected endothelial cells and its response to enhancing permeability effect of proinflammatory cytokines in vitro. Asian-African research forum on emerging and reemerging infections 2013, Tokyo, Japan. January 23-24, 2013.
- 15) 木下さやか, 中込とよ子, 中込 治. 秋田県由利地区における過去 10 年間のロタウイルス胃腸炎入院発生率の変動. 第 53 回日本臨床ウイルス学会, 豊中市. 2012 年 6 月 16-17 日
- 16) 中込 治, 中込 とよ子. ネパールで急激に増加した GII.13 ノロウイルス株の分子基盤. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪市. 2012 年 11 月 13-15 日
- 17) 有川二郎, 天田貴子, 林元展人, 吉松組子, 安田俊平, 清水健太, 駒 貴明, 五十

- 棲理恵, 高倉 彰. イムノクロマト法によるラットとヒト血清のハンタウイルス抗体迅速検出法の開発. 日本実験動物科学・技術九州 2012, 別府市. 2012 年 5 月 24-26 日
- 18) 天田貴子, 吉松組子, 安田俊平, 清水健太, 駒 貴明, 林元展人, 高倉彰, 有川二郎. イムノクロマト法による抗ハンタウイルス抗体の迅速抗体検出法の開発. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪市. 2012 年 11 月 13-15 日 (一般演題・ポスター)
- 19) 山田健太郎, 野口賀津子, 西園 晃. G タンパク質第 247 位に N 型糖鎖が追加された狂犬病ウイルス街上毒変異株の性状解析. 第 154 回日本獣医学会, 盛岡市. 2012 年 9 月 14-16 日
- 20) 山田健太郎, 野口賀津子, 西園 晃. G タンパク質への N 型糖鎖の追加が狂犬病ウイルス街上毒の増殖性・病原性に与える影響. 第 60 回ウイルス学会総会, 大阪市. 2012 年 11 月 13-15 日
- 21) 西園 晃, 渡辺一平. 渡航前狂犬病ワクチン接種後の中和抗体価の推移～ウイルス中和試験と迅速診断法による評価～. 第 16 回日本渡航医学会学術集会, 大阪. 2012 年 7 月 21-22 日
- 22) 西園 晃, 渡辺一平. 狂犬病ワクチン接種後の中和抗体価の推移～ウイルス中和試験と迅速診断法による評価～. 第 16 回日本ワクチン学会学術集会, 横浜市. 2012 年 11 月 17-18 日
- 23) 早坂大輔, 北浦一孝, 青木康太郎, 白井顕治, Dash Sima Simanti, 永田典代, 高松由基, 鈴木隆二, 森田公一. 日本脳炎ウイルス感染において TNF α は免疫応答を調節し重症化の抑制に働く. 第 47 回の本脳炎ウイルス生態学研究会, 阿蘇市. 2012 年 5 月 25-26 日
- 24) 高松由基, デイン ティアン デュク, 早坂大輔, 森田公一. 病原性の異なる日本脳炎ウイルス 2 株のマウスにおける病原性の違いを解明する試み. 第 47 回の本脳炎ウイルス生態学研究会, 阿蘇市. 2012 年 5 月 25-26 日
- 25) 吉川 亮, 鍋島 武, 井上真吾, 徳田昌紘, 池田秀樹, 森田公一, 吾郷昌信. 長崎県で発生した日本脳炎患者の実験室診断. 第 47 回の本脳炎ウイルス生態学研究会, 阿蘇市. 2012 年 5 月 25-26 日
- 26) 早坂大輔, 青木康太郎, 北浦一孝, 白井顕治, Dash Sima Simanti, 永田典代, 高松由基, 鈴木隆二, 森田公一. 日本脳炎ウイルス感染において TNF α は免疫応答を調節し重症化の抑制に働く. 第 53 回日本熱帯医学会大会, 帯広市. 2012 年 9 月 5-6 日
- 27) 高松由基, デイン ティアン デュク, 早坂大輔, 森田公一. 病原性の異なる日本脳炎ウイルス 2 株のマウスにおける病原性の違いを解明する試み. 第 53 回日本熱帯医学会大会, 帯広市. 2012 年 9 月 5-6 日
- 28) 青木康太郎, 早坂大輔, 森田公一. LAMP 法によるダニ媒介性脳炎ウイルス (TBEV) 遺伝子検出法確立. 第 53 回日本熱帯医学会大会, 帯広市. 2012 年 9 月 5-6 日
- 29) 早坂大輔, 青木康太郎, 北浦一孝, 白井顕治, Dash Sima Simanti, 永田典代, 高松由基, 鈴木隆二, 森田公一. 日本脳炎ウイルス感染において TNF α は免疫応答を調節し重症化の抑制に働く. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪市. 2012 年 11 月 13-15 日

- 30) 青木康太郎, 早坂大輔, 森田公一. RT-LAMP によるダニ媒介性脳炎ウイルス遺伝子検出法の確立. 第60回日本ウイルス学会学術集会, 大阪市. 2012年11月13-15日
- 31) 安部智子, 左一八, 渡邊一平, 池田潔, 森田公一, 鈴木隆. 抗 Dengue ウイルス剤の探索および性状解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会, 大阪市. 2012年11月13-15日
- 32) 内田玲麻, Espada-Murao Lyre Anni, 森田公一. Dengue ウイルス感染ヒト培養細胞における I 型インターフェロンの発現抑制. 第60回日本ウイルス学会学術集会, 大阪市. 2012年11月13-15日
- 33) 余福勲, 岡本健太, 森田公一. Expression of Dengue virus type 2 envelope protein in *Pichia pastoris* and application for sero-diagnosis. 第60回日本ウイルス学会学術集会, 大阪市. 2012年11月13-15日
- 34) 吉川亮, 徳田昌紘, 池田秀樹, 山口顕徳, 北川由美香, 鍋島武, 井上真吾, 森田公一, 吾郷昌信. 2010, 2011年に長崎県で発生した日本脳炎に関する疫学解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会, 大阪市. 2012年11月13-15日
- 35) 鍋島武, 井上真吾, 岡本健太, 遠藤友志郎, 一ノ瀬昭豊, Filipinas F. Natividad, 森田公一. 未知の蚊媒介性ウイルスを探索する. 第60回日本ウイルス学会学術集会, 大阪市. 2012年11月13-15日

なし
3. その他
なし

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

II. 分担研究報告

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(国際医学協力研究事業))
分担研究報告書

アルボウイルスの病原性に関する研究

研究分担者 森田 公一 (長崎大学熱帯医学研究所・教授)

研究協力者 竹上 勉 (金沢医科大学総合医学研究所生命科学研究領域・教授)

研究協力者 小西 英二 (大阪大学微生物病研究所・寄附研究部門教授)

研究要旨

アルボウイルス(蚊やダニで媒介されるウイルス)には多くのウイルスが含まれるが、アジアでは日本脳炎ウイルスやデングウイルスによる感染症が猛威をふるっている。本研究ではこの2つのアルボウイルスについてその病原性を解明し予防や治療の一助とするために研究を実施した。日本脳炎ウイルス(JEV)については、JEV ウイルス非構造タンパク質の非構造タンパク質 NS1 についてその機能を解析し、NS1 タンパク質の翻訳過程で合成される NS1'タンパクが鳥細胞でのウイルス増殖を促進している可能性を示す知見を得た。また、本研究において石川県で継続している JEV の調査においては分離されるウイルスは依然としてI型が継続しており、およびゲノム RNA の 3'UTR でのヌクレオチド欠失が認められた。これまでに分離したウイルスのうち、Ishikawa 株は Vero、C6/36 細胞では差はないが、ヒト神経芽腫細胞 IMR における増殖性が低く IFN に対する感受性が低下している事が明らかになった。デングウイルスの研究においては、デングウイルスの抗体によるウイルス中和(不活化)のメカニズムをより詳細に解明するため、ウイルス中和の標的である、エンベロープ蛋白に3つ存在するドメイン構造 I,II,III のうち、ドメイン II に対するマウス由来の型特異的中和抗体(7F4 抗体)を用いてエピトープブロッキング ELISA の手法により、インドネシア住民血清に含まれるドメイン II 抗体について検証し抗体結合阻害率が、中和抗体価と相関し、ドメイン II に対する抗体が血清中の中和抗体価を反映することが明らかとなり、7F4 抗体に対応するエピトープが、ヒトにおける型特異的中和抗体の誘導に重要な役割を果たすことを示唆する結果を得た。

A. 研究目的

本研究では、日本脳炎ウイルスの病原性について非構造タンパク質 NS1 とその変異体である NS1'の役割を明らかにすること、および日本で流行している日本脳炎ウイルスについてウイルス増殖性、ひいてはウイルス病原性に関するウイルス側因子の変異を明らかにするこ

と、さらにはデングウイルスの抗体によるウイルス中和メカニズムを明らかにするために、小西らの開発したデング1型ウイルスに対する型特異的マウスモノクローナル抗体である D1-IV-7F4(以下 7F4 抗体)を用いてエピトープブロッキング ELISA の手法により、デング流行国のヒト血清に含まれるドメイン II 標的型特

異的中和抗体的重要性を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 日本脳炎ウイルスNS1遺伝子の機能解析

細胞とウイルス: BHK、PS、DF1、Vero、C3/36 の哺乳動物、鳥、蚊由来の細胞を用いた。また、ウイルス株は1982年に大阪で蚊から分離された、JaOArS982株、および1960年に東京で患者から分離された、JaTH160株(国立感染症研究所より分与)を用いた。

感染性 cDNA の構築: 日本脳炎ウイルス RNA の cDNA を定法により作成し、pCR-Blunt-TOPO vector (Invitrogen) にクローニングしたのち PMW119 ベクターに遺伝子全長を挿入して感染性 cDNA を構築したのち、種々の塩基置換やウイルス株間のキメラウイルスを作成した。

ウイルスの定量: ウイルスの定量は BHK、DF1 細胞を用いたプラーク法やリアルタイム PCR 法によるウイルス遺伝子 RNA の定量により行った。

免疫染色と細胞観察: 一次抗体には NS1、NS1', E タンパク質特異的ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体を用い、二次抗体として蛍光標識の Alexa 568-標識抗マウス、Alexa 488 標識抗ウサギ抗体 (Invitrogen) を使用し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡 ZEISS LSM780 にて観察した。

(倫理面への配慮)

組換え DNA 実験については長崎大学組換え DNA 安全委員会への申請許可の下に行い、マウス実験における注意事項は長崎大学動物実験委員会申請許可等を受けて実施した。

2. 日本脳炎ウイルス野外株分離と性状解析

蚊の採集: 蚊採集のために蚊帳及びドライアイス CO₂ による採集法を用いた。蚊帳を張る場所は豚舎に近い稲田(3地点)で行っている。採集蚊 40 匹を1プールとして乳鉢にて PBS を入れ、破碎し、その破碎液は遠心法(10,000 x g、10 分間)にて分画した。

RNA 抽出及び RT-PCR: 蚊分画液を材料として Isogen 試薬を用いて RNA 抽出し、得られた RNA を用いて RT-PCR を行った。RT-PCR では、エンベロープ(E)蛋白、NS4a 蛋白領域、さらに 3'末端領域の JEV 特異的プライマーを用いた。

培養細胞: ウイルス分離のために培養細胞株 Vero 細胞を用いた。6 穴プレートを用い、5%牛胎児血清入りの MEM 培養液の中で Vero 細胞を継代し、そこに蚊抽出液を吸着させた。4-5 日間の培養の後、細胞変性の有無でウイルス存在を確認した。培養上清液については、さらに BHK 細胞を用いてウイルス力価を計測した。

遺伝子解析法: ウイルスゲノムに対応した複数のプライマーを用意し、PCR 産物をプレートにして直接的塩基配列解析法によりヌクレオチド配列を決定した。

遺伝子発現・細胞障害解析: 感染細胞 (Vero、IMR) から抽出された RNA を増幅・標識し、DNA マイクロアレイシステム、リアルタイム PCR を用いて宿主遺伝子の発現量を調べた。細胞・遺伝子・蛋白解析には免疫染色・ウェスタンブロット解析等を行った。

マウス実験: 病原性を調べるためにマウス ICR にウイルスを接種(ip)、生死を観察した

(倫理面への配慮)

組換え DNA 実験については金沢医大組換え DNA 安全委員会への申請許可の下に

行い、マウス実験における注意事項は金沢医大動物委員会申請許可等を受けて行っている。

3. デングウイルス中和機序に関する研究

ウイルス: DENV1 (望月株)、DENV2 (ニューギニア C 株)、DENV3 (H87 株)、DENV4 (H241 株) 及び日本脳炎ウイルス (JEV) を用いた。C6/36 細胞に感染させて得られた培養液をエピトープブロッキング ELISA 及び中和試験に用いた。

ヒト血清: デング流行地であるインドネシア国ジャカルタ都及びスラバヤ市で 1999 年から 2001 年にかけて住民 (30 歳) から採取された血清で、中和抗体価が 1:160 以上の 20 検体を対象とした。対照として、デング非流行地である日本人血清 2 検体を用いた。

モノクローナル抗体: DENV1 望月株免疫マウスから作製された 7F4 抗体を用いた。この抗体は、中和エスケープの手法で、ドメイン II 上のエピトープを標的にし (平成 22 年度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、節足動物が媒介する感染症への効果的な対策に関する総合的な研究報告書、分担研究「デング 1 型マウスモノクローナル抗体を用いた中和活性及び増強活性の解析」)、Vero 細胞を用いた中和試験では 1:10,000~1:20,000 の高い抗体価を示すことが明らかにされている。

ブロッキング ELISA: プレートにウサギ抗 DENV1 血清を感作後、DENV1 感染培養液、1:10 から 10 倍階段希釈したヒト血清、ビオチン化 7F4 抗体、アルカリホスファターゼ標識アビジン (Vector Laboratories、米国)、パラニトロフェニルリン酸の順に反応させ、415 nm における吸光度を測定した。ヒト血清非添加対照ウエルと比較して、吸光度が減少した割合から阻

害率を求めた。

中和試験: Vero 細胞を用いて、90% フォーカス減少法により、血清中の中和抗体価を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究におけるヒト血清の使用は、神戸大学大学院医学研究科医学倫理委員会において承認された。

C. 研究結果

1. 日本脳炎ウイルスの NS1 タンパク質の機能の解析

① 新規 NS1' の合成メカニズム

フレームシフト (-1 フレームシフト) により、本来の NS1 より長い NS1' タンパク質が合成されることはすでに知られているが今回、野生株の JaTH160 株と JaOArS982 株において前者では NS1' が合成されているが後者では合成されていないかった。両株のキメラウイルスや 1 塩基置換ウイルスを作成して、NS1' の合成を調べた結果、両ウイルスで NS1' の合成のオン・オフを決定しているのは NS2A 遺伝子の 62 番目の 1 塩基の差異によることが明らかになった。すなわち 62 の塩基が G の場合には NS1' が合成され A に置換されるとフレームシフトは起こらず、NS1 のみが合成された (図 1)。なお、野外分離日本脳炎ウイルスのほとんどは 62G となっている。

② NS1' 合成株のトリ細胞での増殖優位性

NS1 のみ合成するウイルス株と NS1' を合成するウイルス株を霊長類、トリ、ハムスター、蚊由来細胞に感染させその増殖性を確認した結果、NS1' を発現するウイルス株はトリ由来細胞 (DF1) で NS1 のみ発現する株にくらべて 10 倍

ほど高い増殖性をしめした(図2)。また、共焦点レーザー蛍光顕微鏡で NS1'の細胞内局在を観察した結果、NS1'はウイルス RNA 合成複合体の一部を形成し、かつ NS1 に比較して長時間細胞内にとどまっていることが明らかになった。

2. 日本脳炎ウイルス野外株分離と性状解析

蚊(コガタアカイエカ)採集結果を見ると、概ね 1,000 匹台の野外蚊(1,759 匹(2005 年)、1,458 匹(2006 年)、885 匹(2007 年)、990 匹(2008 年)、1336 匹(2009 年)、591 匹(2010 年)、275 匹(2011 年)、515 匹(2012 年))を採集している。共同研究者(村上)による長期間調査(6~10 月)では 2012 年における採集蚊数は例年と同等であった。RT-PCR における陽性サンプルについて Vero 細胞を用いたウイルス分離を行ったが、成功しなかった。これまでに分離した 2 株(Ishikawa-05 株(2005 年分離)、Ishikawa-10(2010 年分離))についての遺伝子解析の結果、分離ウイルスの遺伝子タイプは 1 型であり、E 蛋白のアミノ酸置換、ゲノム RNA の 3'UTR でのヌクレオチド欠失が明らかになった。新分離ウイルス 2 株(遺伝子タイプ 1 型)の生物活性を調べるために JaGAr01 株(遺伝子タイプ 3 型)との比較を行った。Vero、C6/36 細胞における増殖性は JaGAr01 株と同等であるが、ヒト神経芽腫細胞 IMR における複製力は低かった。マウスに対する毒性において JaGAr01 株との比較の結果、Ishikawa 株の毒性の低下がみられた。細胞(Vero)において β IFN 存在下でのウイルス増殖性をみると、Ishikawa-10 株は JaGAr01 株に比べ、明らかに IFN 感受性が低下していた。

3. デングウイルス中和機序に関する研究

① ブロッキング ELISA の阻害反応曲線:

7F4 抗体類似の抗体が流行地のヒト血清中に存在しているかを調べるために、インドネシア住民血清 20 検体を対象として、ブロッキング ELISA を行った。DENV1 に対する中和抗体価の異なる代表的な 4 検体と対照の日本人血清 1 検体を用いて、1:10~1:1,000,000 の希釈度で得られた反応曲線を図 3 に示す。中和抗体陰性の日本人血清には阻害が示されなかったのに対し、中和抗体価が 1:160 以上のインドネシア人血清 4 検体では 50%以上の阻害が 1:10 の希釈度で示された。さらに、中和抗体価の高い血清では、希釈度の高い条件でも阻害が示された。

② 50%阻害 ELISA 及び中和抗体価の相関:

ブロッキング ELISA における阻害の強さと中和抗体価との関係をさらに詳しく調べるために、50%阻害を示した血清の希釈度を 50%阻害 ELISA 抗体価として表し、中和抗体価との散布図を作成した(図 4)。その結果、DENV1 に対する中和抗体価と高い相関性が示された(相関係数は 0.817:P<0.001)。一方、その他の型の DENV や JEV に対する中和抗体価とは、有意の相関は認められなかった(P>0.05: データ示さず)。

D. 考察

日本脳炎ウイルスはフラビウイルス科のウイルスであり、非構造タンパク質 NS1 はウイルス RNA 合成複合体の一部を形成している。しかしフレームシフトが原因で合成される NS1'があるのは日本脳炎ウイルスやウエストナイルウイルスの脳炎を起こすフラビウイルスでのみ報告されている現象であり、病原性との関連が示唆されている。今回、本研究において NS2B の

62 番目の塩基がフレームシフトに重要な要素の 1 つであることが明らかとなった。今のところ NS1' と脳炎との関連は明らかではないが、トリでのウイルス増殖に優位に働く可能性が示唆された。このことは、日本脳炎ウイルスやウエストナイルウイルスがトリに関する事実と合致しており興味深い。

野外 JEV の調査においては、JEV が北陸地域に広く分布していることは他のデータも含めてみると明らかである。分離株について生物活性等を調査しているが、比較として用いている JaGAR01 株に比べ、病原性は必ずしも低くないが、2010 年分離の Ishikawa-10 株で若干の病原性低下がみられた。細胞(Vero)への障害作用についても両遺伝子タイプの JEV 株に差は見られず、またウイルス感染に伴う細胞における大きな差異はみられなかった。しかし、その性状においては Ishikawa-10 株では神経芽腫細胞での増殖性低下があり、これらの性状はマウスに対する毒性において同じ遺伝子タイプの JEV 株での差異に通じる現象と推定される。また IFN に対する感受性が異なる点については引き続き解析が必要であろう。

しかしながら、ここに示した結果は、現在の日本国内において多数派として分布しているウイルス(遺伝子タイプ 1 型)の毒性が低下していることを必ずしも意味しない。2007 年には日本脳炎患者が石川県において発生している。近い将来起こる可能性のある日本脳炎の感染、流行を防ぐためにはウイルスの遺伝子解析と共に、ウイルス複製制御、病原性の要因解析を行っていく必要があり、引き続き北陸地域分布ウイルスの分離の試み、遺伝子・細胞レベルからの解析を継続していくことが重要といえる。JE ワクチン問題があったことによる低年齢児における JEV ワクチン接種率低下と抗体陽性者数の減少がある現在、ウイルス病原性

解析はウイルス感染対策として重要なものと考えられる。

デングウイルスの抗体による中和機序研究に関して、今回用いたエピトープブロッキング ELISA は特異エピトープに対するモノクローナル抗体と検体中の抗体を競合的に反応させ、阻害率により検体中に存在する特異的な抗体を検出する方法である。交差性が高いウイルス感染症を鑑別するために用いられる血清診断法である。フラビウイルス感染症を鑑別する方法としては、これまでにマレー・溪谷脳炎ウイルス抗体とクンジンウイルス抗体の鑑別、ウエストナイルウイルス抗体とセントルイス脳炎ウイルス抗体の鑑別、ウエストナイルウイルス抗体と JEV 抗体の鑑別、そして JEV 抗体と DENV 抗体の鑑別を可能にする 4 つのブロッキング ELISA が報告されてきた。診断のみならず、多数検体を対象とした疫学調査にも用いられている信頼性の高い抗体検査法である。

今回、ブロッキング ELISA の手法により、インドネシア住民血清中には 7F4 に競合する DENV1 抗体が存在することが明らかとなった。しかも、50%阻害 ELISA 抗体価と DENV1 に対する中和抗体価に有意の相関が示されたことから、7F4 抗体に競合するヒト血清中の抗体は、DENV1 に対する中和における主要な役割を果たすと考えられる。

過去に感染を受けたヒトにおける血清中の中和抗体は E 蛋白のドメイン I と II に対するものであり、免疫マウスに示されるようにドメイン III に対する中和抗体の誘導は少ないとされる。そして、ドメイン I と II に対する主な抗体は、型交差性であり、中和活性が低いまたは無い。したがって、血清が示す中和抗体は、一部の抗体種が担っていることになる。本研究により、この中和抗体は、E 蛋白上の 7F4 エピトープにより誘導されることが示唆された。今後、予防

のためのワクチン研究や、治療のための抗体研究に 7F4 抗体の貢献が期待される。

E. 結論

日本脳炎ウイルスの NS1 タンパク質はフレームシフトにより NS1'を合成し、これによりトリ細胞での高い増殖性を獲得することで、自然界の中で効率よく拡散、増幅している可能性が示唆された。

石川県における採集野外蚊からの日本脳炎ウイルス分離は遺伝子型が I 型タイプであり、E 蛋白でのアミノ酸置換、ゲノム RNA の 3'UTR でのヌクレオチド欠失が明らかとなった。感染による細胞障害はタイプ 3 型 JEV 株 (JaGAR01)と同様にあり、病原性は必ずしも低いものではなかったが、タイプ 1 型ウイルスでは分離年によって、IFN に対する感受性、細胞間での複製力等の性状差異がみられた。こうしたウイルス変異、宿主応答がウイルス病原性に大きく影響することが再認識された。近年の国内分布 JEV の病原性変動に注意すべきと考える。

デングウイルス中和に関与するエピトープについてブロッキング ELISA の手法により、7F4 抗体に対応するエピトープが、ヒトにおける型特異的中和抗体の誘導に重要な役割を果たすことが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Okamoto K, Kinoshita H, Parquet Mdel C, Raekiansyah M, Kimura D, Yui K, Islam MK, Hasebe F, Morita K. Dengue virus strain DEN2 16681 utilizes a specific glycochain of syndecan-2 proteoglycan as a

receptor. *J Gen Virol* 93(4): 761-770, 2012

2) Furuta T, Murao LA, Lan NTP, Huy NT, Huong VTQ, Thuy TT, Tham VD, Nga CTP, Ha TTN, Ohmoto Y, Kikuchi M, Morita K, Yasunami M, Hirayama K, Watanabe N. Association of Mast Cell-Derived VEGF and Proteases in Dengue Shock Syndrome. *PLoSNTD* 6(2):e1505, 2012

3) Hasebe F, Thuy NTT, Inoue S, Yu F, Kaku Y, Watanabe S, Akashi H, Dat DT, Mai LTQ, Morita K. Serologic Evidence of Nipah Virus Infection in Bats, Vietnam. *Emerg Infect Dis* 18(3):536-537, 2012

4) Lauber C, Ziebuhr J, Junglen S, Drosten C, Zirkel F, Nga PT, Morita K, Snijder EJ, Gorbalenya AE. Mesoniviridae: a proposed new family in the order Nidovirales formed by a single species of mosquito-borne viruses. *Arch Virol*, 157(8):1623-1628, 2012

5) Shimasaki T, Ishigaki Y, Nakamura Y, Takata T, Nakaya N, Nakajima H, Sato I, Zhao X, Kitano A, Kawakami K, Tanaka T, Takegami T, Tomosugi N, Minamoto T, Motoo Y. Glycogen synthase kinase 3 β inhibition sensitizes pancreatic cancer cells to gemcitabine. *J Gastroenterol.* 47: 321-333, 2012

6) Nukuzuma S, Kameoka M, Sugiura S, Nakamichi K, Nukuzuma C, Miyoshi I, Takegami T. Exogenous Human Immunodeficiency Virus-1 Protein, Tat enhances replication of JC virus efficiently in neuroblastoma cell lines. *J Med Virol* 84: 555-561, 2012

7) Umehara H, Okazaki K, Masaki Y, Kawano M, Yamamoto M, Saeki T, Matsui S,

- Sumida T, Mimori T, Tanaka Y, Tsubota K, Yoshino T, Kawa S, Suzuki R, Takegami T, Tomosugi N, Kurose N, Ishigaki Y, Azumi A, Kojima M, Nakamura S, Inoue D. The Research Program for Intractable Disease by Ministry of Health, Labor and Welfare (MHLW) Japan G4 team: A novel clinical entity, IgG4-related disease (IgG4RD): general concept and details. *Mod Rheumatol* 22: 1-14, 2012
- 8) Ishigaki Y, Nakamura Y, Oikawa Y, Yano Y, Kuwabata S, Nakagawa H, Tomosugi N, Takegami T. Observation of live ticks (*Haemaphysalis flava*) by scanning electron microscope under high vacuum pressure. *PLoS One* 7: e32676, 2012
- 9) Zhang S, Kim T-S, Dong Y, Kanazawa S, Kawaguchi M, Gao N, Minato H, Takegami T, Nojima T, Miura Y. AT motif binding factor 1 (ATBF1) is highly phosphorylated in embryonic brain and protected from cleavage by calpain-1. *Biochem Biophys Res Commun* 427: 537-541, 2012
- 10) Arikawa T, Simamura E, Shimada H, Nishi N, Tatsuno T, Ishigaki Y, Tomosugi N, Yamashiro C, Hata T, Takegami T, Mogami H, Yamaguchi K, Nakamura T, Otani H, Hatta T, Shoji H. Expression pattern of Galectin 4 in rat placentation. *Placenta* 33: 885-887, 2012
- 11) Mulyatno KC, Yamanaka A, Yotoprano S, Konishi E. Vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* collected in Surabaya, Indonesia, during 2008–2011. *Jpn J Infect Dis.* 65(3): 274-276, 2012
- 12) Yamanaka A, Tabuchi Y, Mulyatno KC, Susilowati H, Hendrianto E, Soegijanto S, Konishi E. Dengue virus infection-enhancing and neutralizing antibody balance in children of the Philippines and Indonesia. *Microbes Infect.* 14(13):1152-1159, 2012
- 13) Yamaji H, Segawa M, Nakamura M, Katsuda T, Kuwahara M, Konishi E. Production of Japanese encephalitis virus-like particles using the baculovirus-insect cell system. *J Biosci Bioeng* 114(6):657-662, 2012
- 14) Konishi E, Kitai Y, Nishimura K, Harada S. Follow-up survey of Japanese encephalitis virus infection among humans in Kumamoto Prefecture, south-west Japan: status during 2009–2011. *Jpn J Infect Dis* 65(5):448-450, 2012
- 15) Yamaji H, Nakamura M, Kuwahara M, Takahashi Y, Katsuda T, Konishi E. Efficient production of Japanese encephalitis virus-like particles by recombinant lepidopteran insect cells. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012 Sep 5. [Epub ahead of print]
- 16) Sjatha F, Takizawa Y, Yamanaka A, Konishi E. Phylogenetic analysis of dengue virus types 1 and 3 isolated in Jakarta, Indonesia in 1988. *Infect Genet Evol* 12(8):1938-1943, 2012
- 17) Kuwahara M, Kitai Y, Kondo T, Konishi E. Survey of antibodies specific for West Nile virus in horses from 2006 to 2010 in Japan. *Jpn J Infect Dis* 65(6):553-555, 2012
- 18) 森田公一: ウエストナイル熱・ウエストナイル脳炎(pp.324-327), 黄熱病(pp.334-337), デング熱(pp.403-406), ニパウイルス感染

- 症(pp.423-426). (感染症事典編集委員会 (編): 感染症事典, オーム社, 東京 所収)2012
- 19) 森田公一: アルボウイルス. (柳雄介, 堤裕幸(編): 新編ウイルスの今日的意味, 医薬ジャーナル社, 大阪, pp.82-90 所収)2012
- 20) 村上学, 高田尊信, 前田雅代, 竹上勉: 石川市内の民家近辺における蚊の発生状況調査(2009-2011年). Urban Pest Management 2:109-113, 2012
2. 学会発表
- 1) Morita K. Therapy of Japanese encephalitis virus. 25th International Conference on Antiviral Research (ICAR), Sapporo Japan. April 16-19, 2012.
- 2) Morita K. Mosquito-transmitted Disease Consortium. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2013, Tokyo, Japan. January 23-24, 2013.
- 3) Thuy Nguyen TT, Dang TA, Vu LD, Truong HT, Nabeshima T, Posadas-Herrera G, Dang DT, Ly Pham HL, Nguyen NB, Mai Le TQ, Huong Vu TQ, Morita K., Hasebe F. Molecular epidemiology of dengue virus type 4 in Vietnam. Asian-African research forum on emerging and reemerging infections 2013, Tokyo, Japan. January 23 -24, 2013.
- 4) Phan NT, Bui TM, Dang TT, Do LP, Hoang DM, Posadas-Herrera G, Nabeshima T, Hasebe F, Morita K. Banna virus specific IgM antibody detected in the CSF collected from unknown encephalitis patients. Asian-African research forum on emerging and reemerging infections 2013, Tokyo, Japan. January 23-24, 2013.
- 5) Buerano CC, Nabeshima T, Alonzo MT, Suarez LA, Tun Mya MT, Inoue S, Matias RR, Natividad FF, Morita K. Molecular epidemiology of DENV3 in the Philippines. Asian-African research forum on emerging and reemerging infections 2013, Tokyo, Japan. January 23-24, 2013.
- 6) Kwallar AO, Inoue S, Muigai AW, Sang R, Kubo T, Morita K., Mwau M. A real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of yellow fever virus. Asian-African research forum on emerging and reemerging infections 2013, Tokyo, Japan. January 23-24, 2013.
- 7) Raekiansyah M, Okamoto K, Espada-Murao LA, Kubo T, Morita M. Physiological change of dengue virus-infected endothelial cells and its response to enhancing permeability effect of proinflammatory cytokines in vitro. Asian-African research forum on emerging and reemerging infections 2013, Tokyo, Japan. January 23-24, 2013.
- 8) 早坂大輔, 北浦一孝, 青木康太郎, 白井顕治, Dash Sima Simanti, 永田典代, 高松由基, 鈴木隆二, 森田公一. 日本脳炎ウイルス感染において TNF α は免疫応答を調節し重症化の抑制に働く. 第 47 回の本脳炎ウイルス生態学研究会, 阿蘇市. 2012年5月25日-26日
- 9) 高松由基, デイン ティアン デュク, 早坂大輔, 森田公一. 病原性の異なる日本脳炎ウイルス2株のマウスにおける病原性の違いを解明する試み. 第47回の本脳炎ウ

- ウイルス生態学研究会, 阿蘇市. 2012 年 5 月 25 日-26 日
- 10) 吉川亮, 鍋島武, 井上真吾, 徳田昌紘, 池田秀樹, 森田公一, 吾郷昌信. 長崎県で発生した日本脳炎患者の実験室診断. 第47回の本脳炎ウイルス生態学研究会, 阿蘇市. 2012 年 5 月 25 日-26 日
- 11) 早坂大輔, 青木康太郎, 北浦一孝, 白井顕治, Dash Sima Simanti, 永田典代, 高松由基, 鈴木隆二, 森田公一. 日本脳炎ウイルス感染において TNF α は免疫応答を調節し重症化の抑制に働く. 第 53 回日本熱帯医学会大会, 帯広市. 2012 年 9 月 5 日-6 日
- 12) 高松由基, ディンティアンデユク, 早坂大輔, 森田公一. 病原性の異なる日本脳炎ウイルス2株のマウスにおける病原性の違いを解明する試み. 第53回日本熱帯医学会大会, 帯広市. 2012 年 9 月 5 日-6 日
- 13) 青木康太郎, 早坂大輔, 森田公一. LAMP 法によるダニ媒介性脳炎ウイルス (TBEV) 遺伝子検出法確立. 第 53 回日本熱帯医学会大会, 帯広市. 2012 年 9 月 5 日-6 日
- 14) 早坂大輔, 青木康太郎, 北浦一孝, 白井顕治, Dash Sima Simanti, 永田典代, 高松由基, 鈴木隆二, 森田公一. 日本脳炎ウイルス感染において TNF α は免疫応答を調節し重症化の抑制に働く. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪市. 2012 年 11 月 13 日-15 日
- 15) 青木康太郎, 早坂大輔, 森田公一. RT-LAMP によるダニ媒介性脳炎ウイルス遺伝子検出法の確立. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪市. 2012 年 11 月 13 日-15 日
- 16) 安部智子, 左一八, 渡邊一平, 池田潔, 森田公一, 鈴木隆. 抗 Dengue ウイルス剤の探索および性状解析. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪市. 2012 年 11 月 13 日-15 日
- 17) 内田玲麻, Espada-Murao Lyre Anni, 森田公一. Dengue ウイルス感染ヒト培養細胞における I 型インターフェロンの発現抑制. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪市. 2012 年 11 月 13 日-15 日
- 18) 余福勲, 岡本健太, 森田公一. Expression of Dengue virus type 2 envelope protein in *Pichia pastoris* and application for sero-diagnosis. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪市. 2012 年 11 月 13 日-15 日
- 19) 吉川亮, 徳田昌紘, 池田秀樹, 山口顕徳, 北川由美香, 鍋島武, 井上真吾, 森田公一, 吾郷昌信. 2010, 2011 年に長崎県で発生した日本脳炎に関する疫学解析. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪市. 2012 年 11 月 13 日-15 日
- 20) 鍋島武, 井上真吾, 岡本健太, 遠藤友志郎, 一ノ瀬昭豊, Filipinas F. Natividad, 森田公一. 未知の蚊媒介性ウイルスを探索する. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪市. 2012 年 11 月 13 日-15 日
- 21) 竹上 勉, 村上 学, 石垣靖人, 田崎隆史, 及川陽三郎, 上村 清. 日本脳炎ウイルス石川株 (遺伝子タイプ 1 型) のインターフェロン感受性. 第 47 回 日本脳炎ウイルス生態学研究会, 熊本. 2012 年 5 月
- 22) 村上 学, 及川陽三郎, 上村 清, 竹上 勉. 石川県内豚舎周辺での蚊発生状況調査と日本脳炎ウイルス分布. 第 47 回 日本脳炎ウイルス生態学研究会, 熊本. 2012 年 5 月
- 23) 竹上 勉, 村上 学, 石垣靖人, 田崎隆史.

- Pathogenicity and IFN-sensitivity of Japanese encephalitis virus, Ishikawa strain (genotype 1) newly isolated in Ishikawa, Japan. 第16回 日本神経ウイルス研究会, 東京. 2012年8月
- 24) 島崎猛夫, 北野綾子, 石垣靖人, 高田尊信, 川上和之, 竹上 勉, 友杉直久, 源利成, 元雄良治. 膵癌の新規治療標的としての glycogen synthase kinase(GSK) 3 β : がん浸潤に対する作用. 第71回 日本癌学会学術総会, 札幌. 2012年9月
- 25) 村上 学, 竹上 勉. 石川県内豚舎周辺での蚊発生状況調査(2009~2012). 第19回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会, 大阪. 2012年11月
- 26) 竹上 勉, 村上 学, 石垣靖人, 田崎隆史, 奴久妻聡一. 日本脳炎ウイルス石川株(遺伝子タイプ1型)のIFN感受性を含めた生物活性の特性. 第60回 日本ウイルス学会, 大阪. 2012年11月
- 27) 奴久妻聡一, 亀岡正典, 杉浦重樹, 中道一生, 奴久妻智代子, 竹上 勉. HIV-1 Tat による神経芽細胞腫での JC ウイルス増殖促進. 第60回日本ウイルス学会, 大阪. 2012年11月
- 28) 村上 学, 竹上 勉. 石川県内豚舎周辺で採集したコガタアカイエカからの日本脳炎ウイルス分離(2009~2012). 第60回日本ウイルス学会, 大阪. 2012年11月
- 29) 谷口 真, 北谷和之, 近藤忠一, 橋本真由美, 浅野智志, 五十嵐靖之, 梅原久範, 竹上 勉, 岡崎俊朗. Regulation of autophagy and its associated cell death by sphingolipid rheostat. 第85回 日本生化学会, 福岡. 2012年12月
- 30) 竹上 勉, 村上 学, 石垣靖人, 谷口 真, 田崎隆史, 奴久妻聡一. Distribution and biological activity of new genotype Japanese encephalitis virus in Japan. 第35回日本分子生物学会, 福岡. 2012年12月
- 31) 小瀧将裕, 山口総平, 花原景子, 小西英二. マウスモノクローナル抗体を用いたデング1型ウイルスE抗原上の中和及び増強エピトープの解析. 第47回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 2012年5月
- 32) Sjatha F, Konishi E. Chimeric Japanese encephalitis-dengue DNA vaccine as a strategy to reduce induction of dengue virus infection-enhancing antibodies in mice. 第47回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 2012年5月
- 33) 山中敦史, 小西英二. インドネシア及びタイで分離されたデングウイルスの分子疫学解析. 第53回日本熱帯医学会. 2012年9月
- 34) 山中敦史, Supatra Thongrunkiat, Pongrama Ramasoota, 小西英二. Cell Fusing Agent Virus のタイ国における分離と分子系統樹解析. 第19回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会. 2012年11月
- 35) 小西英二. デングワクチンの開発と抗体依存性感染増強への対策. 第60回日本ウイルス学会学術集会. 2012年11月
- 36) Sjatha F, Kuwahara M, Sudiro TM, Konishi E. Dengue virus envelope protein domain III substitution on Japanese encephalitis DNA vaccine reduced induction of infection-enhancing antibodies in vaccinated mice. 第60回日本ウイルス学会学術集会. 2012年11月
- 37) Sudiro TM, Yunita R, Putri DH, Antonjaya U, Sjatha F, Dewi BE, Rukmana A, Mustaqim, Sudarmono P, Konishi E.

- Immunogenicity of DNA Vaccine Containing Premembrane & Envelope Genes of Dengue Virus Type 2 Indonesian Isolate. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 2012 年 11 月
- 38) 小瀧将裕, 小西英二. デング 1 型ウイルス E 抗原エピトープの解析: 感染中和及び増強活性のみを示すマウスモノクローナル抗体を用いたアプローチ. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 2012 年 11 月
- 39) 山中敦史, 小西英二. タイ国のネッタインマカから分離された Cell Fusing Agent Virus の分子進化解析. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 2012 年 11 月
- 40) 小西英二, 小瀧将裕, 山中敦史. デングワクチンによる感染増強抗体誘導の懸念と最小化の戦略. 第 16 回日本ワクチン学会学術集会. 2012 年 11 月
- 41) Soegijanto S, Sari DW, Yamanaka A, Kotaki T, Kameoka M, Konishi E. Awareness of using Ringer's Lactate Solution in Dengue Virus Infection can Induce Severity. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections (AARF) 2013. January 2013.
- 42) Morita K, Konishi E, Kurosu T, Minagawa N. Consortium Study: Inter-regional Study on Dengue Virus and Vector Mosquitoes. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections (AARF) 2013. January 2013.
- 43) Mulyatno KC, Churrotin S, Nindya I, Yamanaka A, Kotaki T, Kameoka M, Soegijanto S, Konishi E. Phylogenetic and Molecular Clock Analysis of Dengue Virus Strains Isolated in Surabaya and Sidoarjo, Indonesia, during 2011-2012. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections (AARF) 2013. January 2013.
- 44) Yotopranoto S, Mulyatno KC, Yamanaka A, Konishi E. Distribution of Aedes mosquito Immatures in Multiple Types Indoor and Outdoor Water-holding Containers in Dengue-endemic Districts in Surabaya, Indonesia, 2011-2012. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections (AARF) 2013. January 2013.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

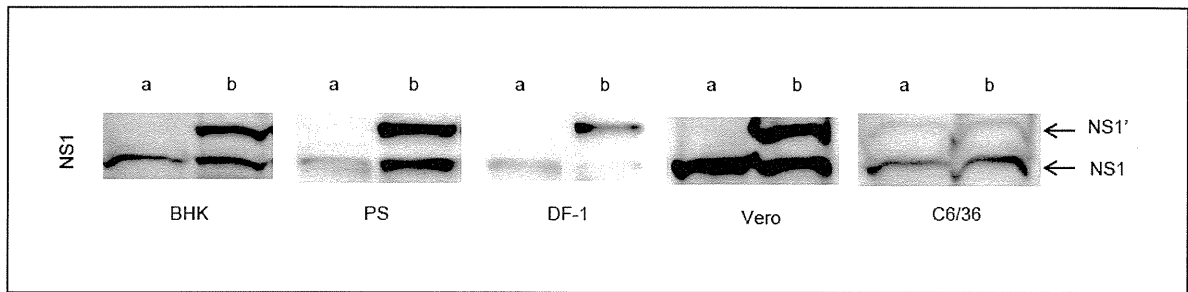


図 1. JaOArS982 株の感染性クローン(a)と JaTH160 株の感染性クローン(b)の各細胞内での NS1, NS1'の合成状況。前者は NS2A の 62 番目の塩基が A であり、後者は G である。自然界での日本脳炎ウイルス分離株はほとんどが 62G タイプとなっている。なお蚊細胞において 62 番目の塩基に関係なく NS1'が合成されている。

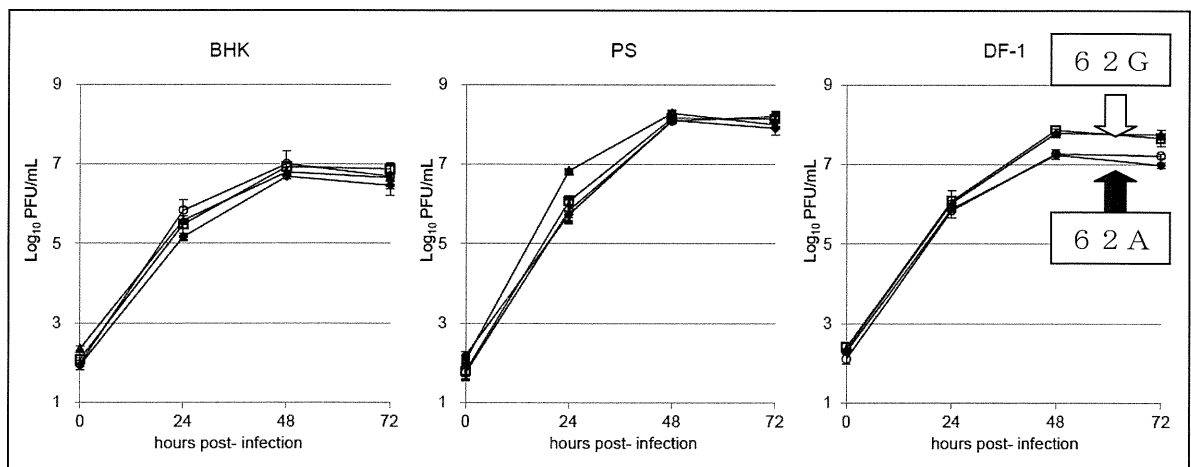


図 2. NS1 のみ合成する株 (62A) と比較して NS1'を合成する株 (62G) はトリ由来細胞において約 10 倍程度の高い増殖をしめす。BHK : ハムスター細胞、PS : ブタ細胞、DF1 : トリ由来細胞

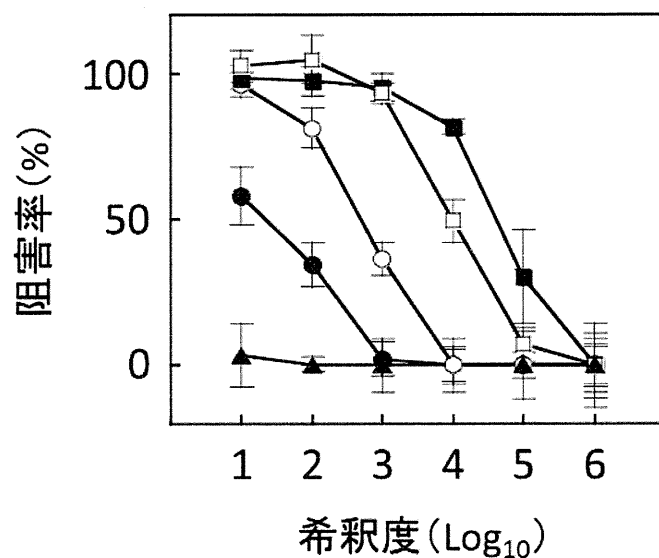


図 3. インドネシア住民血清を対象としたブロッキング ELISA。7F4 抗体結合阻害率を $10^1 \sim 10^6$ の血清希釈度で求めた。各血清の Vero 細胞を用いた中和抗体価は、1:160 (●)、1:320 (○)、1:1,280 (□)、1:5,120 (■) であった。抗体陰性の対象として日本人血清を用いた (▲)。2 回の実験で得られた平均値と標準偏差 (誤差棒) を示す。

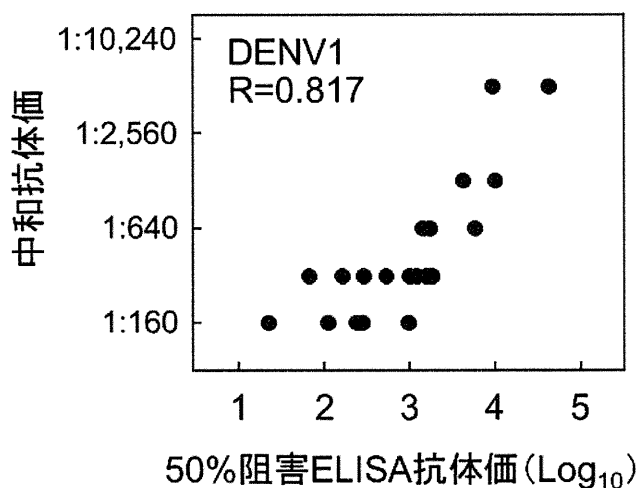


図 4. ブロッキング ELISA において 50%阻害を示した血清の希釈度 (50%阻害 ELISA 抗体価) と DENV1 に対する中和抗体価の相関。DENV1 に対して 1:160 以上の中和抗体価を示すインドネシア住民血清 20 名を対象とした。

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

ロタウイルスの分子疫学:

日本で検出された G2 ロタウイルス株 VP7 遺伝子の分子進化

研究代表者 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・教授)

研究要旨

ロタウイルスは小児の重症下痢症の第一の病因であり、大きな疾病負担の原因となっている。世界保健機関(WHO)はロタウイルスワクチンを全世界で定期接種に導入するよう勧奨し、生ワクチンが発展途上国を含め 30 か国以上で定期接種に導入されている。一方、ワクチンの普及により、下痢症患者から検出される野生ロタウイルス株に何らかの影響が及ぶことが予想される。とりわけ、わが国をはじめ世界の多くの国で使われている単価ロタウイルスワクチンとは遺伝子型が異なる G2 株については、ワクチン接種率が高い国での G/P 遺伝子型分布への影響の有無について議論がある。本研究は、このような議論のエビデンスとなる基盤情報を整備するため、わが国における過去 30 年にわたる G2 株の VP7 遺伝子の分子進化の様相を明らかにすることを目的として行った。1980-2011 の約 30 年間の間に検出された G2 株 VP7 遺伝子の塩基配列を決定するとともに、データベース上に登録されている G2VP7 遺伝子を加え、合計 54 株に由来するわが国における G2VP7 遺伝子の分子系統樹を作成した後、これをグローバルレベルでの G2VP7 遺伝子の分子進化の中に位置づけて解析した。わが国で 30 年にわたり検出された G2 株 VP7 遺伝子は、地球規模での進化系統樹の 2 系統と 2 亜系統に属するものであり、最近の株は IVa-1 に属し、IVa-3 が 2011 年に 1 株出現した。世界的には IVa-1 から IVa-3 への移行がみられ、単価ワクチンが定期接種に導入された地域において、この移行が加速される傾向がみられる。本研究は、わが国における G2 株 VP7 遺伝子の分子進化の様相を初めて明らかにしたものであり、ワクチン接種率の向上が野生株に与える影響を評価する際の重要な基盤情報になる。

A. 研究目的

ロタウイルスは小児の急性下痢症の主要な原因ウイルスであり、大きな疾病負担の原因となっている。世界保健機関(WHO)はロタウイルスワクチンの全世界での定期接種導入を勧奨し、WHO は単価および 5 価のワクチンを事前承認(prequalification)しているが、これらの 2

つの生ワクチンは発展途上国を含め 30 か国以上で定期接種に導入されている。このようなワクチンの接種率の向上により、下痢症患者から検出される野生ロタウイルス株に何らかの影響が及ぶことが予想される。とりわけ、わが国をはじめ世界の多くの国で使われている単価ロタウイルスワクチンとは遺伝子型が異なる

G2 株については、5 価ワクチンと同様に高い有効性が検証されている一方で、G/P 遺伝子型分布への影響の有無についての議論がある。

そこで、本研究は、このような議論のエビデンスとなる基盤情報を整備するため、わが国における過去 30 年にわたる G2 ロタウイルス株の VP7 遺伝子の分子進化の様相を明らかにすることを目的として行った。

B. 研究方法

1980年～2011年の31年間の間に検出されたG2株からゲノムRNAを抽出し、VP7遺伝子を逆転写し、PCR法により増幅した後、塩基配列を決定した。これにデータベース上に登録されているG2VP7遺伝子を加え、合計54株に由来するわが国におけるG2VP7遺伝子の分子系統樹を、われわれのグループが確立したグローバルレベルでのG2VP7遺伝子の分子進化系統樹(Doan YH, et al. Arch Virol 156:1969-1978, 2011)の中に位置づけて解析した。分子系統解析にはMEGA5.0を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究はすでに公刊されている論文に由来するウイルス株、データベース上に公開されている既存の塩基配列情報、および衛生研究所が感染症発生動向調査関連の病原体検査により得られたウイルス株を使用した研究であり、個人情報取り扱いの配慮や生命倫理に関する取り組みを必要とする研究を含まないため、人権の保護に関する法令の遵守への対応に該当しない。

C. 研究結果

わが国で 31 年(1980-2011)にわたり検出された G2 ロタウイルス 54 株の VP7 遺伝子は、

地球規模での進化系統樹の 3 系統、すなわち、系統 I、系統 III および系統 IV に属し、系統 IV に属する 51 のウイルス株はさらに亜系統 IVa-1 および亜系統 IVa-3 に分類された(図 1)。とくに最近の株の 3 分の 1 は IVa-1 に属し、IVa-3 に属していたのは 2011 年に検出された 1 株であった。

しかし、残る 3 分の 2 は、明確な系統あるいは亜系統を形成しない(ブートストラップ確率が 26%であるため)、いわば「系統 IV 中の系統 IVa 以外の遺伝子群」とでも呼ぶべき範疇に入るものであった(図 1)。興味あることに、2011 年にはこの「系統 IV 中の系統 IVa 以外の遺伝子群」に属する 2 株が 18 年の間隔をおいて出現した。このことはこの遺伝子群に属するウイルス株が連綿として存在してきていることを示唆している。

D. 考察

世界的には亜系統 IVa-1 から亜系統 IVa-3 への移行がみられ、単価ワクチンが定期接種に導入された地域において、この移行が加速される傾向がみられ、わが国においても今後亜系統 IVa-3 の G2 株が増加すると思われる。

E. 結論

本研究は、ロタウイルスワクチンの接種率の向上、とくに、わが国をはじめ世界の多くの国で使われている単価ロタウイルスワクチンの使用が増大した場合に議論となる可能性の高い野生ロタウイルス株の G/P 遺伝子型分布、とくに G2 株 VP7 遺伝子の分子進化について、重要な分子疫学的基盤情報を提供するものである。

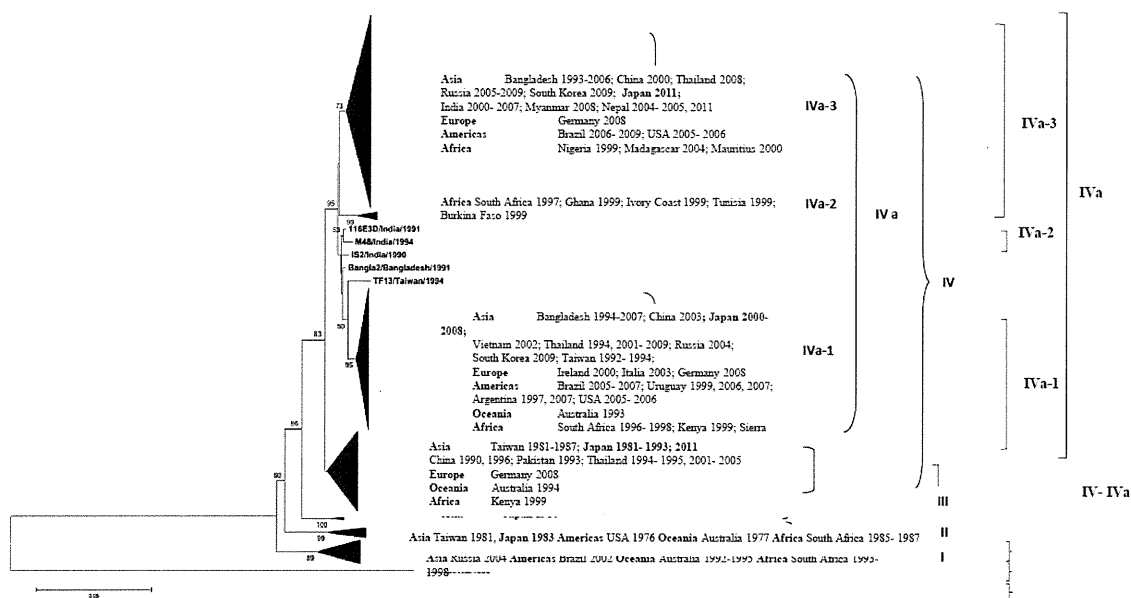


図1. わが国で31年(1980-2011)にわたり検出されたG2ロタウイルス54株のVP7遺伝子の地球規模でのG2VP7遺伝子の進化系統樹の中での位置づけ。系統の命名はDoan YH, et al. (Arch Virol 156:1969-1978, 2011)に従い、ブートストラップ確率が80%以上の場合、その数値を分岐点に示した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Doan YH, Nakagomi T, Nakagomi O. Repeated circulation over 6 years of intergenogroup mono-reassortant G2P[4] rotavirus strains with genotype N1 of the NSP2 gene. *Infect Genet Evol* 12(6):1202-1212, 2012
- 2) Nakagomi T, Nakagomi O, Dove W, Doan YH, Witte D, Ngwira B, Todd S, Duncan Steele A, Neuzil KM, Cunliffe NA. Molecular characterization of rotavirus strains detected during a clinical trial of a human rotavirus vaccine in Blantyre, Malawi. *Vaccine* 30 Suppl 1: A140-151, 2012
- 3) Noguchi A, Nakagomi T, Kimura S, Takahashi Y, Matsuno K, Koizumi H, Watanabe A, Noguchi H, Ito T, Ohtsuka M,

- Uemura N, Takeda O, Komatsu A, Kikuchi W, Komatsu M, Fukaya H, Miura S, Toda H, Nakagomi O, Takahashi T. Incidence of intussusception as studied from a hospital-based retrospective survey over a 10-year period (2001-2010) in Akita Prefecture, Japan. *Jpn J Infect Dis* 65(4): 301-305, 2012
- 4) Matthijnsens J, Nakagomi O, Kirkwood CD, Ciarlet M, Desselberger U, Van Ranst M. Group A rotavirus universal mass vaccination: how and to what extent will selective pressure influence prevalence of rotavirus genotypes? *Expert Rev Vaccines* 11(11):1347-54, 2012
- 5) Doan YH, Nakagomi T, Aboudy Y,