

201225027A

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 片山 和彦

平成25(2013)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 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 片山 和彦

平成 25 (2013) 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

札幌市で検出されたロタウイルスにおける抗原変異の長期的観察

辰巳 正純・・・・・・・・・・ 19

2011/12年シーズンにおけるロタウイルス分子疫学解析

藤井 克樹、下池 貴志・・・・・・・・ 23

わが国におけるウシロタウイルスの基礎疫学調査

水谷 哲也、長井 誠・・・・・・・・ 27

臨床材料からの効率的なA群ヒトロタウイルスの分離方法開発に関する検討

高木 弘隆・・・・・・・・・・ 35

マイクロチップ電気泳動によるRNA-PAGEの検討

村上 耕介、下池 貴志・・・・・・・・ 43

ロタウイルスの分子疫学的基盤情報としてelectropherotypeの有用性に関する研究・G12P[6]型ロタウイルスの分子進化

中込 治・・・・・・・・・・ 49

ロタウイルスの分子疫学的基盤情報としての全ゲノム解析の有用性に関する研究・G3P[4]型ロタウイルスの出現機構の解析

中込 とよ子・・・・・・・・・・ 55

アジアのヒトロタウイルスの全ゲノム配列に基づく分子疫学的解析

小林 宣道・・・・・・・・ 61

リバーズ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のトリプシン開裂部位の解析

谷口 孝喜・・・・・・・・・・ 63

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・ 73

IV. 研究成果の刊行物・別冊

I. 総括研究報告書

平成 24 年度 厚生労働省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」

代表者報告書

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

平成23年度に本研究班の活動によって設定した、研究分担者の関係病院ベースのネットワーク（8都道府県、12病院）の協力の下、ロタウイルス感染症入院事例の網羅的情報検出、検体サンプリング、ウイルス学的データ、臨床データの蓄積および解析を開始した。ロタウイルスの全11ゲノムセグメント増幅法の開発に成功したことにより、これまでに131入院事例のロタウイルスゲノム全セグメント全長塩基配列決定に成功した。VP7遺伝子型はG1が63%、G3が6%、G9が31%でありG2は1例もなかった。VP4遺伝子型は全てP[8]であった。ワクチンの第一の標的である入院患者におけるロタウイルスの遺伝子型分布を調査し、全国で優勢株が同様であることが分かった。しかし、驚くべきことに、全ゲノム塩基配列解析の結果、G1P[8]の過半数が一般的なWa-likeな遺伝子型構成ではなく、DS-1-like遺伝子分節再集合体であることが明らかになった。これらの結果は、ロタウイルスが予想をはるかに超えた形で遺伝子分節再集合を起こして進化していることを示していた。また、ブタ様セグメントのヒトロタウイルスへの侵入も検出した。わが国においてロタウイルスの入院症例では、GP遺伝子型解析だけでは把握できない多様なロタウイルス株が流行していることを初めて明らかにすることができた。

ワクチンの接種率は未だ最大で5%に満たず、本研究班の調査結果は、ワクチンによる淘汰圧のかかる前のロタウイルスの疫学象を捕らえていると考えられる。今後、ワクチンによる淘汰圧上昇によりロタウイルスのゲノム遺伝子型構成にどのような影響が生じ、どのようなリアソータントの出現が加速されるのか、病原性の変化に与える影響があるのかなど、我々は、ロタウイルスの未知の変化に対応すべく、多角的な分子疫学的研究を継続する必要がある。

A. 研究目的

本研究の第一の目的は、国家レベルでロタウイルス（RV）の分子疫学調査基盤を構築し、RVワクチン導入効果を多角的に評価することである。現在、我が国に存在する公的RV情報データベースは、国立感染症研究所感染情報センターの病原体検出情報である。この情報源は地方衛生研究所からのデータ報告に基づいており、報告総数から見ても明らかなようにRV感染症の実態を捉えているとは言い難い。そこで、全国を5つのブロックに分割し、それぞれのブロックを統括する研究者が病院ベースのネットワークを構築し、RV感染症事例（重症の入院事例を含む）を対象に網羅的な情報検出と、RV全ゲノム塩基配列を対象とした分子疫学情報の蓄積を行った。情報は、臨床的側面、ワクチンの投与の有無、ゲノム塩基配列などから多角的に解析し、RV感染症重篤化に関与する因子の同定、ワクチン評価システムの構築等に役立てる。

本研究の第二の目的は、全国規模のRV感染症の疫学情報、ゲノム塩基配列情報の蓄積とバイオインフォマティクスによる解析で、RVの基礎的研究に関する情報基盤を提供し、病原性発現機構研究、ワクチン作用機序研究の推進に寄与することである。RVの病原性発現機構やワクチンの作用機序に関する研究は遅れており、わが国へ導入された生ワクチンの弱毒化の分子基盤も解明されていない。ワクチンの作用機序を理解して効果予測、評価を行う

ためには、ウイルスの病原性、免疫誘導などに関する基礎的研究、流行の疫学や流行株の分子疫学的研究が必須である。

2年目は、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。また、我が国の流行動向を把握するため、周辺諸国のロタウイルス流行についても調査を行った。

我が国に導入されたロタウイルスワクチンの内、ロタテックはウシロタウイルスをベースとしたワクチンである。このワクチンが環境中に大量に放出されることにより生じるウシロタウイルスリアソータントへの影響は、やがてヒトロタウイルスに入り込み、ロタウイルス感染症へ影響を与える可能性がある。そこで、本年度から、ウシロタウイルスの遺伝子セグメントに関するデータ蓄積も開始した。

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、分担研究者に各ブロックの研究協力協力が得られる小児科病院への協力要請拠点を決定した。

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。北海道ブロックは、札幌医科大学小児科・辰巳正純らを中心に、北海道社会事業協会小樽病院、苫小牧市立病院、NTT東日本札幌病院とした。東北地区は、中込治、とよ子を中心に秋田大学医学部、由利組合総合病院、宮城県立こども病院とした。関東地区は、片山を中心に、公立昭和病院（東京都多摩地区）、東京医大病院（東京都区部）とした。近畿地区は、中込、谷口を中心に、江南厚生病院（名古屋）、公立南丹病院（京都）、山陰地区は、山口大学医学部病院小児科、九州地区は福岡市立こども病院とした。

本年度、辰巳らは、札幌市で経年的に採取されたロタウイルスについて疫学調

査を行った。1987年から開始した調査では2000年度まではG1P[8]株が優先株であったが以降は同株に加えてG3P[8]株やG2P[4]株、G9P[8]株が入れ替わり優先株になり混沌とした傾向を示した。次に札幌市で検出されたG1P[8]株についてVP7遺伝子とNSP4遺伝子の変遷を解析した。札幌市のG1P[8]株VP7遺伝子の解析では大きく3つの系統I、II、IVに分類することができ、このうち系統Iは年代を問わず広く分布しており生存に有利な株であることが示唆された。また同遺伝子の塩基置換速度は世界で検出されているG1P[8]株と比較すると比較的進化速度がゆっくりであり安定した株の印象を受けた。札幌市のG1P[8]株NSP4遺伝子の解析では抗原部位II番を中心とした変遷がみられ大きく3系統に分岐する傾向が見られた。Enterotoxin siteには変異を認めなかった。非構造蛋白であるNSP4も抗原部位を中心とした遺伝子の変遷が確認され、その進化速度は最外殻に位置するVP7遺伝子と同等かそれ以上であることが確認された。札幌市で長期的に観察したロタウイルスG1P[8]株VP7遺伝子、NSP4遺伝子の解析ではともに可変領域や抗原部位を中心に容易な変異が確認され疫学調査の重要性、必要性が再確認された。

感染研の藤井、下池らは、我が国におけるロタウイルス（RV）のサーベイランス体制を整え、全国的なRVの分子疫学調査を開始した。2011/12年シーズンは北海道、秋田県、東京都、愛知県、京都府、山口県の6都道府県の病院からRV下痢症入院患者

の便検体を収集し、VP7およびVP4のシーケンス解析を行い、各々の遺伝子型を決定した。その結果、これまでに131入院事例のロタウイルスゲノム全セグメント全長塩基配列決定に成功した。VP7遺伝子型はG1が63%、G3が6%、G9が31%でありG2は1例もなかった。VP4遺伝子型は全てP[8]であった。ワクチンの第一の標的である入院患者におけるロタウイルスの遺伝子型分布を調査し、全国で優勢株が同様であることが分かった。しかし、驚くべきことに、全ゲノム塩基配列解析の結果、G1P[8]の過半数が一般的なWa-likeな遺伝子型構成ではなく、DS-1-like遺伝子分節再集合体であることが明らかになった。これらの結果は、ロタウイルスが予想をはるかに超えた形で遺伝子分節再集合を起こして進化していることを示していた。わが国においてロタウイルスの入院症例では、GP遺伝子型解析だけでは把握できない多様なロタウイルス株が流行していることを初めて明らかにすることができた。さらに、G9には2種類のclusterが見られ、世界的に広く流行しているcluster (27検体) と、これまでに報告されていないブタRVに類似したcluster (13検体) に分類された。このブタRVに類似したclusterのウイルスは、既に中部・近畿地方において、ヒトRVとして流行していた。ブタRVに類似したセグメントのヒトRVへの侵入は、ヒトRVの進化に動物のロタウイルスセグメントの侵入が深く関わっている可能性を示唆していた。

東京農工大学の水谷、長井らは、我が国

に導入されたロタウイルスワクチンの内、ウシロタウイルスをベースとした5価ワクチンであるロタテックの環境への放出により生じるウシロタウイルスリアソータントへの影響、ひいてはヒトロタウイルス感染症へ与える影響を把握するため、次世代シーケンステクノロジーを用いたウシロタウイルスの疫学調査基盤の構築を試みた。ヒト用ロタウイルス簡易診断キット(イムノクロマト法5種類、ラテックス凝集反応2種類およびELISA1種類)についてウシロタウイルス4株に対する検出感度を比較した結果、ディップスティック‘栄研’ロタ(栄研化学、東京)の検出感度が最も高いことが確認されたが、ウイルス分離はその 10^4 倍感度が高かった。イルミナ社のMiSeqを用いた次世代シーケンスでは、ウイルス分離陰性の糞便検体からもロタウイルス遺伝子を検出でき、11分節すべてのウイルス遺伝子の型別が可能であった。畜産現場においてはディップスティック‘栄研’ロタ陽性の糞便を採材することで迅速で効率的なウシロタウイルス株の収集が可能と思われたが、可能な限りウイルス分離を実施すべきと考えられた。また、次世代シーケンステクノロジーは検出と同時に、1度に11分節すべての遺伝子解析が可能であり、ウシロタウイルスの疫学調査の強力なツールであるばかりでなく、ヒトロタウイルスの全ゲノム配列解析、特に混合感染事例における全ゲノム配列解析に応用可能であることが示された。

感染研・高木らは、A群ヒトロタウイルス(以下 hRVA)の分離培養成功率向上のため、限界希釈法による培養細胞のクローニングとそれらを用いた臨床材料からの直接的分離を検討した。hRVA-Wa 株を増殖指標として用い、hRVA の増殖効率の良い細胞株をクローニングした。MA104 細胞では 2 clones、CV-1 細胞では 1 clone の hRVA 増殖効率の良いクローンを得た。ロタウイルス実験室分離株 SA-11、DS-1 標準株の増殖性はクローンによって異なっていた。これらの細胞クローンを用いて、患者糞便材料からの hRVA の単離培養を試みたところ、6 検体中 4 検体において 1 継代目での良好なウイルス増殖が確認された。今後、疫学研究における hRVA パネル株作製やバイオリソースの作製への貢献が期待できる。

中込治らは、迅速なロタウイルス全ゲノム解析への RNA-PAGE の応用を目的として、研究を行った。ロタウイルスワクチンの導入によってロタウイルス下痢症患者から検出される野生ウイルス株に何らかの影響が及ぼされることが予想されている。このような問題の解析のために臨床分離株にもとづく分子疫学基盤構築が要求されるのであるが、これは単にロタウイルスの G および P 遺伝子型の変化のみではなく、全ゲノムに基づいたウイルス「株」の変化を追跡する必要がある。このような「株」のレベルでの同定と解析のため electropherotyping という 11 分節の 2 本鎖 RNA からなるゲノムのポリアクリルアミドゲル電気泳動に基づく解析法が使われる。

本研究では、electropherotypingにより、どのようなロタウイルスの分子進化情報が得られるのかという一例を示すことを目的に、同一の G および P 遺伝子型 (G12P[6]型) の中におけるウイルス株の分子進化を electropherotyping により解析した。G12P[6]型のロタウイルスが連続して優勢遺伝子型として流行しているネパールにおいて、2007年11月から2010年2月までの 28 か月間に検出され、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により electropherotype を決定できた 147 検体の G12P[6]型ロタウイルスを解析した。その結果、ネパールでは、単一の G12P[6]株が連綿として流行しているのではなく、一時期には 1 つの優勢株が少数の劣勢株とともに一定期間(約6か月)流行し、これが新たな優勢株に次々と置き換わっていくというダイナミックなしかたで進化していることがわかった。このように electropherotyping は比較的単純な解析法でありながら、重要な分子疫学情報を提供することが可能であり、全ゲノム塩基配列解析によって、さらにどのような情報を取得すべきかについて有用な示唆を与えるものであることを明らかにした。

感染研・村上、下池は、RNA-PAGE の精度向上と、アッセイ間変動、施設間変動を制御するため、マイクロチップ電気泳動装置を用いたロタウイルス RNA パターン解析系の構築を試みた。3 台の装置でそれぞれ 4 枚のマイクロチップをセットし、各マイクロチップで 3 回の測定を実施した。各セグメントの移動度を相対移動度として数値

化し、合計36回の測定結果を比較した。各測定結果で誤差がほとんど認められなかった。しかし、チップ内の泳動距離が短いため、ロタウイルスゲノム11文節のうち幾つかは一つのバンドブロード名バンドとして分離され、11セグメント全ての分離はできなかった。マイクロチップ電気泳動は dsRNA を安定して分離できるが、11セグメントの分離能力は RNA-PAGE の方が高かった。マイクロチップ電気泳動装置を用いたロタウイルス RNA パターン解析系は、異なる施設の泳動結果を高精度に比較できるため、RNA パターン解析による全国多施設によるロタウイルス流行株の疫学調査に有用と思われた。

長崎大学・中込とよ子らは、本年度、ロタウイルスサーベイランスで得られる非通常株の全ゲノム解析によりどのような分子進化情報が得られるのかという一例を示すことを目的に行った。すなわち、かつてインドで分離された G3P[4] 株 (107E1B) と G2P[4] 株 (116E3D) の全ゲノムを解析により、「107E1B 株は、G2P[4] 株が同時期に流行していた G3 ヒトロタウイルスから VP7 遺伝子を遺伝子分節再集合の機序により獲得したものである」ことを示すことを目的とした。

107E1B の 遺 伝 子 型 構 成 は G3-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2、116E3D は G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 であった。すなわち 107E1B は VP7 を除き 116E3D と同じ DS-1 型の遺伝子型構成であ

った。これら 2 株の遺伝子分節 (VP7 以外) の塩基配列は、99.83-100% の一致率であり、どの分節でもわずか 2 塩基以下が不一致であった。一方、107E1B の VP7 遺伝子はヒトロタウイルス G3VP7 遺伝子の 76% が所属する主要な系統に属し、かつ、2004 年に登録されたインドのロタウイルス株 RMC437 と 99.3% の一致率であった。この全ゲノム解析の結果、107E1B と 116E3D の 2 株は同一クローンに属することが分かり、同時期に流行しているロタウイルス株間で遺伝子分節再集合が起こっていることが示された。

札幌医科大学・小林らは、(1) 中国における最近の主流型 G1P[8] ヒトロタウイルス、(2) 非定型的 G1P[9] 型ヒトロタウイルス株 (K8 株、日本)、(3) 非定型的 G4P[10] 型ヒトロタウイルス株 (57M 株、インドネシア) について全遺伝子配列を決定し、世界に分布するヒトロタウイルスまたは動物ロタウイルス、および現行のワクチン株との関連を解析することを目的として研究を行った。中国・武漢市において乳児、幼児、成人の下痢症例便検体から分離された 3 株の G1P[8] 株の全遺伝子分節は、1 株の NSP3 遺伝子分節を除き、互いに遺伝的にきわめて近縁で、近年アジアで検出されたヒトロタウイルスと同じクラスターに属していた。乳児からの分離株 E1911 が持つ NSP3 遺伝子は、インドで報告されたブタ様ヒトロタウイルスに近縁であり、遺伝子再集合に起因してブタロタウイルスに由来することが示唆された。中国の G1P[8] 株の外殻蛋白 VP7、VP4 における中和抗原部位を現行の 1 価および 5 価ワクチンのそれと

比較すると、数個のアミノ酸の違いが認められた。G1P[9]型ヒトロタウイルスK8株は、ヒトロタウイルスのWa遺伝子群、AU-1遺伝子群間の遺伝子再集合体、G4P[10]型ヒトロタウイルス57M株はヒトロタウイルスWa遺伝子群とG8P[10]株間の遺伝子再集合体であると考えられた。

藤田保健大学・谷口らは、平成23年度に引き続き、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開裂：VP4→VP8* + VP5*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。VP4のトリプシン開裂部位のアルギニン残基231, 241, 247の感染性獲得における意義を検討するために、リバーシジェネティクス系を利用してこれら3カ所の各アルギニン残基に変異を導入した組換えロタウイルスを作成し、各残基の重要性を感染性ウイルスを用いて検討した。その結果、R247が感染性獲得に最も重要であることが示された。さらに、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を試みたが、十分な成果が得られなかった。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、高効率なリバーシジェネティクス系の確立への試みを続ける。

(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、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とした網羅的な情報検出と、検体のサンプリング、蓄積のが開始され等研究班として初めての2012年3-5月の流行期の検体解析が行われた。

全ゲノムセグメントを対象とした網羅的塩基配列解析は、これまでの疫学では検出し得なかった新規リアソータントロタウイルスの感染事例が重症ロタウイルス感染症での入院症例に含まれていたことを明らかにした。これらの結果は、ロタウイルスが予想をはるかに超えた形で遺伝子分節再集合を起こして進化していることを示していた。また、ブタ様セグメントがヒトロタウイルスに侵入したことも検出した。動物のロタウイルスセグメント侵入は、ウシロタウイルスベース生ワクチン（ロタテック）の接種により加速される可能性も有り、今後も厳重な注意が必要である。

ワクチンの接種率は、地域によって差があるが、本研究班でカバーしている地域では、未だ最大で5%に満たないことが明らかになった。本研究班の研

究結果は、ワクチンによる淘汰圧のかかる前のロタウイルスの疫学象を捕らえていると考えられる。今後、ワクチンによる淘汰圧上昇によりロタウイルスのゲノム遺伝子型構成にどのような影響が生じ、どのようなリアソータントの出現が加速されるのか、病原性の変化に与える影響があるのかなど、我々は、ロタウイルスの未知の変化に対応すべく、多角的な分子疫学的研究を継続する必要がある。

また、全塩基配列解析のため、古典的だが効果的なロタウイルス全遺伝子セグメントの解析法であるRNA-PAGE法を再検討すると共に、高精度なマイクロチップ電気泳動装置を用いた新規ロタウイルスRNAパターン解析系の構築を試みた。今後、本方法のさらなる検討により、病原性大腸菌0157などで施行され、流行株解析に大きな実績を上げているパルスネットの様なパターンデータベース構築によるロタウイルス流行株の大規模な疫学調査施行への可能性も見えてきた。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、さらに事例の蓄積を行う。

E. 研究発表

論文発表のみ掲載

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, 12:471-477.

- 2) Ghosh S, Shintani T, Kobayashi N. Evidence for the porcine origin of equine rotavirus strain H-1. *Vet Microbiol*, 2012, 158:410-414.
- 3) Ghosh S, Shintani T, Urushibara N, Taniguchi K, Kobayashi N. Whole genomic analysis of a human G1P[9] rotavirus strain reveals intergenogroup reassortment events. *J Gen Virol*, 2012, 93:1700-1705.
- 4) Shintani T, Ghosh S, Wang Y-H, Zhou X, Zhou D-J, Kobayashi N. Whole genomic analysis of human G1P[8] rotavirus strains from different age groups in China. *Viruses*, 2012, 4:1289-1304.
- 5) Mukherjee A, Mullick S, Kobayashi N, Chawla-Sarkar M. The first identification of rare human group A rotavirus strain G3P[10] with severe infantile diarrhea in eastern India. *Infect Genet Evol*, 2012, 12:1933-1937.
- 6) Bhowmick R, Halder UC, Chattopadhyay S, Chanda S, Nandi S, Bagchi P, Nayak MK, Chakrabarti O, Kobayashi N, Chawla-Sarkar M. Rotaviral enterotoxin nonstructural protein 4 targets mitochondria for activation of

- apoptosis during infection. *J Biol Chem*, 2012, 287:35004–35020.
- 7) Bagchi P, Nandi S, Chattopadhyay S, Bhowmick R, Halder UC, Nayak MK, Kobayashi N, Chawla-Sarkar M. Identification of common human host genes involved in pathogenesis of different rotavirus strains: an attempt to recognize probable antiviral targets. *Virus Res*. 2012, 169:144–153.
 - 8) Ghosh S, Urushibara N, Kawaguchiya M, Shintani T, Kobayashi N. The origin of two rare human P[10] rotavirus strains. *Infect Genet Evol*, 2013, 13:292–300.
 - 9) Sumi A, Rajendran K, Ramamurthy T, Krishnan T, Nair GB, Harigane K, Kobayashi N. Effect of temperature, relative humidity, and rainfall on rotavirus infections in Kolkata, India. *Epidemiol Infect*, 2013, in press (2012, Epub ahead of print)
 - 10) Taniguchi K, Komoto S: Genetics and reverse genetics of rotavirus. *Curr Opin Virol* 2:399–407, 2012
 - 11) Ghosh S, Shintani T, Urushibara N, Taniguchi K, Kobayashi N: Whole genomic analysis of a human G1P[9] rotavirus strain reveals intergenomic reassortment events. *J Gen Virol* 98:1700–1705, 2012
 - 12) Rahman S, Higo-Moriguchi K, Htun KW, Taniguchi K, Icatlo FC, Tsuji T, Kodama Y, Nguyen SV, Umeda K, Oo HN, Myint YY, Htut T, Myint SS, Thura K, Thu HM, Fatmawati NND, Oguma K: Randomized placebo-controlled clinical trial of immunoglobulin Y as adjunct to standard supportive therapy for rotavirus-associated diarrhea among pediatric patients. *Vaccine* 30:4661–4669, 2012
 - 13) 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* 14(1):49–56, 2012
 - 14) Kawamura Yoshiki, Sugata Ken, Nakai Hidetaka, Asano Yoshizo, Ohashi Masahiro, Kato Tomochika, Nishimura Naoko, Ozaki Takao, Yui Akiko, Taniguchi Koki, Yoshikawa Tetsushi: Correlation between serum matrix metalloproteinase and antigenemia levels in patients infected with rotavirus. *J Med Virol* 84:986–991, 2012.
 - 15) Fujii Y, Shimoike T, Takagi H, Murakami K, Todaka-Takai R, Park Y, Katayama K. Amplification of all 11 RNA segments of group A rotavirus based on reverse transcription

- polymerase chain reaction.
Microbiol Immunol. 56:630-638,
2012
- 16) Nagaoka Y, Tatsumi M, Tsugawa T,
Yoto Y, Tsutsumi H. Phylogenetic
and computational structural
analysis of VP7 gene of group a
human rotavirus G1P[8] strains
obtained in Sapporo, Japan from
1987 to 2000. J Med Virol.
84(5):832-8, 2012.
- 17) 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
- 18) 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, 12:1202-1212, 2012.
- 19) 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.
- 20) 中込とよ子, 中込 治: ロタウイルス
感染症とロタウイルスワクチン. メ
ディカル・テクノロジー 40(9):
1005-1008, 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

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 24 年度研究分担報告書

札幌市で検出されたロタウイルスにおける抗原変異の長期的観察

研究分担者 辰巳 正純

北海道社会事業協会小樽病院 小児科

研究要旨

札幌市で経年的に採取されたロタウイルスについて疫学調査を行った。1987 年から開始した調査では 2000 年度までは G1P[8]株が優先株であったが以降は同株に加えて G3P[8]株や G2P[4]株、G9P[8]株が入れ替わり優先株になり混沌とした傾向を示した。次に札幌市で検出された G1P[8]株について VP7 遺伝子と NSP4 遺伝子の変遷を解析した。札幌市の G1P[8]株 VP7 遺伝子の解析では大きく 3 つの系統 I、II、IV に分類することができ、このうち系統 I は年代を問わず広く分布しており生存に有利な株であることが示唆された。また同遺伝子の塩基置換速度は世界で検出されている G1P[8]株と比較すると比較的進化速度がゆっくりであり安定した株の印象を受けた。札幌市の G1P[8]株 NSP4 遺伝子の解析では抗原部位 II 番を中心とした変遷がみられ大きく 3 系統に分岐する傾向が見られた。Enterotoxigenic site には変異を認めなかった。非構造蛋白である NSP4 も抗原部位を中心とした遺伝子の変遷が確認され、その進化速度は最外殻に位置する VP7 遺伝子と同等かそれ以上であることが確認された。札幌市で長期的に観察したロタウイルス G1P[8]株 VP7 遺伝子、NSP4 遺伝子の解析ではともに可変領域や抗原部位を中心に容易な変異が確認され疫学調査の重要性、必要性が再確認された。

A. 研究目的

ロタウイルスは小児下痢症の原因として最も多く、特に乳幼児に重症下痢症を引き起こし途上国を中心に年間 45 万人もの乳幼児が死亡している。感染防御に重要な中和抗体は最外殻蛋白である VP7、VP4 遺伝子が関与しており VP7 遺伝子は G 血清型

を VP4 遺伝子は P 血清型をそれぞれ規定している。様々な研究において G1P[8]株が世界中で最も重要なタイプであることが証明されている。またロタウイルスは多様性に富み抗原変化を繰り返すことから継続的なサーベイランスが必要である。2006 年以降 2 種類のロタウイルスワクチンが

世界各国で認可され、重症化を予防する上で高い効果を上げているが、これらのワクチンが定期接種化された国々ではワクチン投与後の血清型分布に変化が認められてきておりまた変異株に備えた継続的な疫学研究が重要である。日本でもこれら2種類のロタウイルスワクチンが発売になったが、日本でのロタウイルス血清疫学の長期観察研究はないため、札幌医大小児科で保存されている25年間の便検体について後方視的な疫学研究を企画した。また世界的にみて優先株であるG1P[8]株についてVP7遺伝子とNSP4遺伝子についてそれぞれ遺伝子の変遷を調べることもあわせて目的とした。

B. 研究方法

1987年～2012年の25年間に札幌市で収集した下痢症患者 3018 検体、うち2000年度までの検体で迅速診断キット(イムノクロマト法)によりA群ロタ陽性と判明した541検体を使用した。20%懸濁液からRNAを抽出しRT-PCR法でVP7/VP4遺伝子を増幅し、各 genotype に特異的なプライマーで nested PCR を行い、電気泳動パターンから G/P 遺伝子型を決定した。次に1987年～2000年度までの検体のなかからG1P[8]株を抽出し全VP7遺伝子とNSP4遺伝子のシーケンスを行った。系統解析後、コード領域の塩基配列をベイズ推定により進化速度を推定した(BEAST ver1.5)。VP7遺伝子については系統解析で分類した4系統群について系統間の推定アミノ酸配列を比較し、重要なアミノ酸変異を明

らかにした。結晶解析で決定された既報のVP7蛋白立体構造を鋳型としてSWISS-MODELを用いて札幌G1P[8]株の3次元立体構造を予測した。予測した立体構造をChimeraにより画像化し、変異部位の局在を可視化した。

C. 研究結果

[札幌市ロタウイルスの血清疫学調査]

1987年から開始したロタウイルス疫学調査では2000年度まではG1P[8]株が優先株であったが以降は同株に加えてG3P[8]株やG2P[4]株、G9P[8]株が入れ替わり優先株になり混沌とした傾向を示した。

[札幌市ロタウイルスG1P[8]株VP7遺伝子の解析]

1987年から2000年度までの札幌市のG1P[8]株VP7遺伝子の解析ではVP7遺伝子は大きく3つの系統I、II、IVに分類することができた。このうち系統Iは年代を問わず広く分布しており生存に有利な株であることが示唆された。この生存に有利な系統Iを特徴づけるアミノ酸は2個あり何れもVP7蛋白の外表面に位置しVP7蛋白の中和ドメインとサブユニット間の境界に局在していた。また同遺伝子の塩基置換速度は世界で検出されているG1P[8]株と比較するとやや遅かった。

[札幌市ロタウイルスG1P[8]株NSP4遺伝子の解析]

1987年から2000年度までの札幌市のG1P[8]株NSP4遺伝子の解析では抗原部位II番を中心とした変遷がみられ大きく3系統に分岐する傾向が見られたがVP7と

異なりどの系統も通年を通して検出された。調べたすべての株で Enterotoxigenic site には変異を認めなかった。非構造蛋白である NSP4 も抗原部位を中心とした遺伝子の変遷が確認され、その進化速度は最外殻に位置する VP7 遺伝子と同等かそれ以上であることが確認された。

C. 考察

札幌市で長期的に観察したロタウイルス G1P[8]株 VP7 遺伝子、NSP4 遺伝子を解析した。札幌市 VP7 遺伝子の解析では系統 I が生存に有利な株であることが示され、系統 I を決定する 2 個のアミノ酸は VP7 蛋白の外側に位置し、VP7 蛋白の中和ドメインとサブユニット間の境界に局在しており中和抗体からのエスケープ、ロタウイルス複製の際に重要な VP7 蛋白の分離に影響を与える可能性が考えられた。また塩基置換速度は札幌市の VP7 遺伝子は他の都市と比べるとややゆっくりとしており安定した株の印象を受けた。一方、NSP4 遺伝子の解析では VP7 遺伝子とは異なる独自の変遷を起こしていることが確認された。非構造蛋白である NSP4 遺伝子も抗原部位 II を中心とした容易な変異が確認され塩基置換速度も最外殻蛋白である VP7 と同等かそれ以上であったことから、今後も NSP4 遺伝子を含めた疫学調査の必要性、重要性が再確認された。

E. 結論

札幌市で長期的に観察したロタウイルス G1P[8]株 VP7 遺伝子、NSP4 遺伝子の解析ではともにともに可変領域や抗原部位を中心とした容易な変異が確認され、疫学調査の必要性、重要性が再確認された。今後ワクチン耐性株の出現やレア株等の出現、台頭に備え引き続き疫学調査を継続する方針である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nagaoka Y, Tatsumi M, Tsugawa T, Yoto Y, Tsutsumi H. 2012. Phylogenetic and computational structural analysis of VP7 gene of group a human rotavirus G1P[8] strains obtained in Sapporo, Japan from 1987 to 2000. J Med Virol. 84(5):832-8.

2. 学会発表

1) 辰巳正純：ロタウイルス感染症の現状と対策-ワクチンの重要性と今後の課題-，第44回日本小児感染症学会総会・学術集会、北九州市、11月24日、25日、2012

H. 知的財産権の出願・登録状況

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 24 年度（2 年目）研究分担報告書

2011/12 年シーズンにおけるロタウイルス分子疫学解析

研究分担者 藤井 克樹、下池 貴志 国立感染症研究所 ウイルス第二部

研究要旨

我が国におけるロタウイルス（RV）のサーベイランス体制を整え、全国的な RV の分子疫学調査を開始した。2011/12 年シーズンは北海道、秋田県、東京都、愛知県、京都府、山口県の 6 都道府県の病院から RV 下痢症入院患者の便検体を収集し、VP7 および VP4 のシーケンス解析を行い、各々の遺伝子型を決定した。その結果、RV 陽性だった 132 検体の内、VP7 遺伝子型の内訳は、G1 が 83 検体（62.9%）、G3 が 9 検体（6.8%）、G9 が 40 検体（30.3%）であった。ただし、G9 には 2 種類の cluster が見られ、世界的に広く流行している cluster（27 検体）と、これまでに報告されていないブタ RV に類似した cluster（13 検体）に分類された。このブタ RV に類似した cluster のウイルスは、既に中部・近畿地方において、ヒト RV として流行している事が示唆された。

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り、我が国における年間の患者数は 70-80 万人、入院数は 7-8 万人におよぶと推定されている。また、時に腎炎や腸重積、脳炎・脳症などの重篤な合併症を引き起こすこともあり、年間数人から 10 人前後の患者が、RV が原因で命を落としている。しかし、2011 年（ロタリックス）および 2012 年（ロタテック）から RV ワクチンが接種可能となった為、RV による疾病負担が減少することが期待されている。但し、この 2 種類のワクチンは、

いずれも経口生ワクチンである事から、ワクチンによる発症、ワクチン株と野生株とのリアソータントの出現などが懸念されている。また、ワクチンの導入によって、流行株の遺伝子型分布が変化する可能性がある為、それらを監視する必要性もある。ところが、我が国における RV サーベイランス体制は貧弱であり、これまで全国的な RV の分子疫学調査は行われておらず、RV ワクチンの効果を検証する事や、ワクチン導入による流行株の変化を監視する事も出来ない状況であった。そこで我々は、RV による入院症例の便検体を全国の病院か

ら収集し、我が国における初の全国的 RV 分子疫学調査を開始した。

B. 研究方法

<検体の採集>

2011/12 年シーズンは、苫小牧市立病院（北海道）、由利組合総合病院（秋田県）、公立昭和病院（東京都）、公立南丹病院（京都府）、江南厚生病院（愛知県）、山口大学医学部附属病院（山口県）の 6 病院から入院症例の便検体を収集した。便検体から 10%PBS 懸濁液を調製し、-80°C で保管した。

<RV 遺伝子解析>

ウイルス RNA の抽出は TRIzol[®] LS Reagent（Life technologies）および Direct-zol RNA MiniPrep Kit（ZYMO Research）を使用して行った。逆転写反応には PrimeScript[®] cDNA Synthesis Kit（タカラバイオ）を用い、プライマーは random 6 mer を用いて行った。PCR 反応は PrimeSTAR[®] GXL DNA polimerase（タカラバイオ）を用い、VP7 および VP4 に対するプライマーは、昨年度の報告書に記載したプライマーを用いて行った。得られた各セグメントの PCR 産物について、ダイレクトシーケンス法にて塩基配列を解読した。そして、得られた塩基配列のデータから、それぞれの遺伝子型を決定した。

C. 研究結果および考察

2011/12 年シーズンは、6 病院から 165 検体を収集し、このうち 132 検体が RV 陽

性であることを RT-PCR 法にて確認した。VP7 および VP4 のシーケンス解析の結果、132 検体の内、VP7 遺伝子型の内訳は G1 が 83 検体 (62.9%)、G3 が 9 検体 (6.8%)、G9 が 40 検体 (30.3%) であった。ただし、G9 には 2 種類の cluster が見られ、世界的に広く流行している cluster (27 検体) と、これまでに報告されていないブタ RV に類似した cluster (13 検体) に分類された。このブタ RV 近縁の cluster に分類された検体は愛知県 (11 検体) と京都府 (2 検体) に集中していた事から、このタイプのウイルスが既に中部・近畿地方において、ヒト RV として流行している事、また、地域によって流行株に偏りが存在する事が示唆された。VP4 の遺伝子型は全て P[8]であったが、1 検体のみ (愛知県)、P[8]b (G1P[8]b) に分類される配列が得られ、それ以外は全て P[8]a の配列であった。

E. 結論

2011/12 年シーズンにおける我が国の RV 流行株の分布は、G1P[8]、G3P[8]、G9P[8] (主流行株)、G9P[8] (ブタ RV 類似株) の 4 種類に大別された。ブタ RV 類似株は、中部・近畿地方において、既にヒト RV として流行していると考えられた。

H. 健康危険情報

なし

I. 研究発表

1. 論文発表