

- 1) 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.* 2012; 56:630-638.
  - 2) Kitaura K, Fujii Y, Matsutani T, Shirai K, Suzuki S, Takasaki T, Shimada S, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, Ogasawara K, Kurane I, Suzuki R: A new method for quantitative analysis of the T cell receptor V region repertoires in healthy common marmosets by microplate hybridization assay. *J Imm Method* 2012, 384:81-91
2. 学会発表
- 1) 藤井克樹、下池貴志、高木弘隆、Dennis Francis、村上耕介、朴英斌、戸高玲子、脇田隆宇、片山和彦：RT-PCRによるA群ロタウイルスの全11セグメントの増幅法の構築 第60回日本ウイルス学会学術集会(大阪)2012年11月13-15日
  - 2) 高木弘隆、藤井克樹、村上耕介、戸高玲子、下池貴志、小林宣道、片山和彦：A群ロタウイルス(RVA)の分離・増殖における感受性細胞株のクローニングによる検討 第60回日本ウイルス学会学術集会(大阪)2012年11月13-15日
  - 3) 村上耕介、岡智一郎、下池貴志、藤井克樹、朴英斌、戸高玲子、脇田隆宇、松田幹、片山和彦：ノロウイルスVLPのCaco-2細胞への結合に関するタンパク質の探索 第60回日本ウイルス学会学術集会(大阪)2012年11月13-15日
  - 4) 戸高玲子、村上耕介、岡智一郎、高木弘隆、朴英斌、下池貴志、藤井克樹、脇田隆宇、中西章、片山和彦：カリシウイルスのユニバーサルなプラスミドベースリバーシジェネティックシステム 第60回日本ウイルス学会学術集会(大阪)2012年11月13-15日
  - 5) 下池貴志、高木弘隆、岡智一郎、村上耕介、戸高玲子、朴英斌、藤井克樹、脇田隆宇、片山和彦：マウスノロウイルス感染細胞内のウイルス蛋白質とそのゲノムRNAの局在 第60回日本ウイルス学会学術集会(大阪)2012年11月13-15日
  - 6) 戸高玲子、岡智一郎、村上耕介、下池貴志、藤井克樹、朴英斌、高木弘隆、脇田隆宇、中西章、片山和彦：Development of plasmid DNA transfection-based reverse genetics system for murine norovirus and feline calicivirus 第35回日本分子生物学会年会(福岡)、平成24年12月11-14日
  - 7) 村上耕介、岡智一郎、下池貴志、藤井克樹、朴英斌、戸高玲子、脇田隆宇、松田幹、片山和彦：Screening for candidate receptor on Caco-2 involved in norovirus binding by mass spectrometry from different approaches 第35回日本分子生物学会年会(福岡)、平成24年12月11-14日

- 8) YoungBin Park, Reiko Todaka, Takashi Shimoike, Kosuke Murakami, Yoshiki Fujii, Takaji Wakita, Kazuhiko Katayama : Evaluation of two newly developed human norovirus detection system direct RT-PCR and BLEIA 第35回日本分子生物学会年会（福岡）、平成24年12月11-14日
- 9) 藤井克樹：ロタウイルスの新知見 ウイルス性下痢症研究会第24回学術集会（大阪）2012年11月12日
- 10) 藤井克樹：ロタウイルスゲノム解析と

分子疫学 衛生微生物技術協議会第  
33回研究会（横浜）2012年6月28-29  
日

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 研究分担報告書

## わが国におけるウシロタウイルスの基礎疫学調査

研究分担者 水谷 哲也、 長井 誠

東京農工大学・農学部・国際家畜感染症防疫研究教育センター

### 研究協力者

石川県南部家畜保健衛生所 福田 藤子、高井 光、村上 俊明、小澤 正

北海道立畜産試験場 小原 潤子

栃木県北家畜保健衛生所 小池 新平、山口 修

栃木県南家畜保健衛生所 佐藤 満雄

新潟県中央家畜保健衛生所 会田 恒彦

新潟県上越家畜保健衛生所 石田 秀志

静岡県畜産技術研究所 赤松 裕久

鳥取県倉吉家畜保健衛生所 増田 恒幸

近畿大学農学部生石農場 岸 昌生

日本獣医生命科学大学獣医学部環境保健学科 青木 博史

東京農工大学農学部獣医学科 田中 知己

東京農工大学農学部 FS センター 神田修平、小林 優

動物衛生研究所 恒光 裕先生の研究グループ

### 研究要旨

平成 24 年度から我が国に導入されたロタウイルスワクチン RotaTeq は、ヒト-ウシ再集合体ロタウイルスを使用していることから、酪農や肉用牛生産等畜産現場におけるウシに対する影響が懸念される。そこでウシロタウイルスの疫学調査基盤を構築するため、畜産現場における効率的なウシロタウイルス検出法を検討した。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 ELISA 1 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<sup>4</sup> 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。以上より、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と考えられた。

#### A. 研究目的

牛ロタウイルス病は養牛経営において育成前期の下痢による発育不良（ウシ A 群ロタウイルス）や成牛の下痢に伴う乳量の減少（ウシ B および C 群ロタウイルス）により経済損失を伴う疾病であるが、法令で監視伝染病に指定されていないことから、その対策が遅れており、各地で冬季を中心とした発生が認められる。特にウシ A 群ロタウイルスについては、他の感染症と混合感染すると症状は重篤化し、哺乳期の子牛においては死亡の原因となる。ウシ B および C 群ロタウイルスについては、我が国における症例も限られており、日本での実態は依然不明な点が多い。予防にはウシ A 群ロタウイルスの不活化ワクチンが応用されており、母牛に接種し、初乳を介して子牛を免疫するが、接種を行っている農家は一部に限られているのが現状である。

ロタウイルスワクチン RotaTeq は、ワクチン原株のウシロタウイルスの VP4 および VP7 遺伝子をヒトロタウイルスのそれと入れ替えた 5 種類のヒト-ウシ再集合体ロタウイルス株からなる多価生ワクチンであり、元株がウシ由来の株であるにも

かかわらずウシに対する病原性は検討されていない。また、ロタウイルスはウイルス粒子内部に 11 本 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）が出現することから、ワクチン株が畜産現場に漏出し、反芻獣やその他の家畜由来のロタウイルス株との遺伝子組換え体が発生する可能性がある。これらのことから、家畜のロタウイルス、特にウシロタウイルスに対する監視をこれまで以上に強化する必要がある。そこで、RotaTeq 導入前後のわが国のウシロタウイルスの基礎疫学を解明するため、まず第 1 段階として畜産現場におけるウシロタウイルスの効率かつ効果的な診断法の検討を行った。

#### B. 研究方法

ヒト用ロタウイルス簡易診断キット（ヒト用キット）のほとんどは VP6 蛋白に対するモノクローナルまたはポリクローナル抗体を使用していることから、ウシロタウイルス 13 株について VP6 遺伝子の塩基配列を決定して系統樹解析を行い、それぞれに対する相同性の低い 4 株

(RVA/Cow-tc/JPN/IS-1/1996/G6P[5]、RVA/Cow-tc/JPN/IS-8/1997/G6P[11]、RVA/Cow-tc/USA/NCDV/1967/G6P[1]およびRVA/Cow-XX/XXX/KK-3/XXXX/G10P[11])を選定した。ウイルス株はMA-104細胞を用いて培養し、 $1 \times 10^7$ TCID<sub>50</sub>/mlの濃度に調整して各試験に供した。

ヒト用キットは、イムノクロマト法5種類(ディップスティック‘栄研’ロタ(栄研化学)、ラピッドテスト ロターアデノ(積水メディカル)、BD Rota/Adeno エグザマン スティック (バクトン・ディッキンソン)、ラピッドエスピー<ロタ>(DSファーマバイオメディカル)、イムノカード ST ロタウイルス (ティ エフ ビー))、ラテックス凝集反応2種類(ロタレックスドライ(積水メディカル)およびロタスクリーン(デンカ生研))およびELISA1種類(ロタクロン(ティ エフ ビー))を用い、ウシロタウイルスを10倍段階希釈し、検出感度を調べた。

ウイルス分離はMA-104細胞を用い、トリプシン(Sigma, T0303)を15単位/ml、培地に添加して37°Cで回転培養を行った。

RT-PCRは、Gouveaら(J Clin Microbiol 28, 276-282 (1990))のVP7を標的としたプライマーを用いて実施した。RNAの抽出はRNeasy Mini Kit (QIAGEN)で行い、OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN)を使用した。

また、ウイルス分離陰性の子牛の下痢便の10%乳剤14検体から直接RNAをISOGEN LS(ニッポンジーン)で抽出し、イルミナ社の次世代シーケンサーによる解析を

実施した。ライブラリーの調整は、NEBNext mRNA Library Prep Master Mix Set for Illumina (New England Biolabs)を用いて行った。得られたデータはCLC Genomics Workbench 5.5 (CLC バイオジャパン)を用いて解析した。

### C. 研究結果

イムノクロマト法： $1 \times 10^7$ TCID<sub>50</sub>/mlの濃度に調整した4株のウシロタウイルスを10倍段階希釈し、5種類のキットの検出限界を調べたところ、検出限界はディップスティック‘栄研’ロタで、 $1 \times 10^3$ TCID<sub>50</sub>/ml、ラピッドテスト ロターアデノで $1 \times 10^1 \sim 10^2$ TCID<sub>50</sub>/ml、BD Rota/Adeno エグザマン スティックで $1 \times 10^1 \sim 10^2$ TCID<sub>50</sub>/ml、ラピッドエスピー<ロタ>で $1 \times 10^0 \sim 10^1$ TCID<sub>50</sub>/ml、イムノカード ST ロタウイルスで $1 \times 10^0 \sim 10^1$ TCID<sub>50</sub>/mlであり、ディップスティック‘栄研’ロタが最も高い検出感度を示した(表1)。

ラテックス凝集反応：ラテックス凝集反応の検出限界は、ロタレックスドライが $1 \times 10^1$ TCID<sub>50</sub>/ml、ロタスクリーンが $1 \times 10^0$ TCID<sub>50</sub>/mlであり、イムノクロマト法よりも若干低い傾向にあった(表1)。

ELISA：ELISAを用いたキットロタクロンの検出限界は $1 \times 10^1 \sim 10^2$ TCID<sub>50</sub>/mlであった(表1)。

RT-PCR：Gouveaらのプライマーは農林水産省の定める家畜の病性鑑定指針に記載されているため、現場で病性鑑定を行っている全国の家畜保健衛生所で使用さ

れている。このプライマーを用いたワンステップ RT-PCR の検出感度は  $0\sim 1\times 10^3\text{TCID}_{50}/\text{ml}$  であり、KK3 株を検出することができなかった (表 1)。

ウイルス分離：ウイルス分離では 4 株すべて、元の濃度である  $1\times 10^7\text{TCID}_{50}/\text{ml}$  を示した (表 1)。

次世代シーケンス：ウイルス分離陰性である 14 検体中 2 検体にロタウイルス遺伝子が 11 分節すべて確認され (図 1)、CLC Genomics Workbench 5.5 によるウシロタウイルスに多い VP4 遺伝子型 P[1]、[5] および [11]、および VP7 遺伝子 G6、G8 および G10 の代表株配列へのマッピングで、簡易的に VP4 および VP7 遺伝子の型別が可能であった (図 2)。さらに詳細に解析した結果、2 株の遺伝子型は、G10-P[11]-R2-C2-M2-I2-A3-N2-T6-E2-H3 および G6-P[5]-R2-C2-M2-I2-A3-N2-T6-E2-H3 であった。

#### D. 考察

畜産において病性鑑定材料は、畜舎や放牧場等家畜が飼養されている場所に立ち入り、採材する以外に収集する手段がない。家畜の飼養場所は農林水産省の定める家畜飼養管理衛生基準に基づき、家畜保健衛生所の職員や管理獣医師以外は防疫上の観点から立ち入ることが制限されている。したがって、現場においてウシロタウイルス株を収集するには家畜保健衛生所また

は管理獣医師の協力が必要不可欠である。しかしながら、産業動物の診療業務を行う管理獣医師は全国的に不足しており、現場採材を依頼しにくい状況にある。また、家畜保健衛生所においては口蹄疫、高病原性鳥インフルエンザや牛海綿状脳症といった国家経済に影響を及ぼす疾病が近年連続して発生し、これらの重要家畜伝染病に対する業務量が増加したのに対し、それに見合う職員数の増員がなされていない。このため、ウシロタウイルス病のような損失の無視できない疾病であっても、監視伝染病に指定されていない理由から、それに費やす労力や時間は限られており、ウシロタウイルスの採材および材料の提供を依頼する場合、省力的かつ効率的な方法を提示する必要がある。このことから、操作や判定が簡単であるヒト用キットの応用は有用と考えられる。これまで家畜保健衛生所や一部の家畜診療所において、ウシロタウイルス病の診断にヒト用キットは用いられてきたものの、キットによる検出感度は考慮されていなかった。Nemoto ら (J Vet Med Sci 73, 1247-1250 (2010)) は、ウマロタウイルスのヒト用キットでの検出感度を調べ、キットの種類により感度に差があることを報告している。しかしながら、ウシロタウイルスについてヒト用キットの検出感度を調べた報告はない。そこで、ウシロタウイルスのヒト用キットでの検出感度を調べた。その結果、Nemoto らの報告と同様に、8 種中 6 種に使用したウイルス株に対する  $10\sim 100$  倍の検出感度の

差が認められた。このことは、ヒト用キットはヒトのロタウイルスに対するモノクローナルおよびポリクローナル抗体が使用されていることから、この抗体のウシロタウイルスおよびウマロタウイルスの各株に対する反応性の相違がその原因の1つである可能性が考えられた。さらにキット間を比較すると10~1000倍の検出感度の差が認められ、ディップスティック‘栄研’ロタがすべての株に最も高い検出感度を示した。この結果はNemotoらの結果と一致し、ディップスティック‘栄研’ロタはウマロタウイルス同様、ウシロタウイルスに対しても最も有用なヒト用キットと考えられた。本キットはウイルス分離よりも $1 \times 10^4$ 倍感度が低いものの、畜産現場で採材する際のスクリーニング法として意義が高く、有効活用することで、効率的にウシロタウイルス株の収集が可能と思われた。

RT-PCRは感度が高く、ヒト用キットと比較して労力と時間を要する点を除けば有用な手法と考えられたが、今回使用したプライマーでは検出感度が低く、KK3株では産物を得ることができなかった。このことは、今回使用したプライマーはヒトのロタウイルスの遺伝子情報からデザインされたものであり、しかも使用する目的が検出よりも型別に重点がおかれていることが原因と思われた。検出感度はプライマーを変更することで改善することが可能と考えられ、現在、株間の多様性が比較的少ないVP6、NSP2およびNSP3遺伝子におい

てプライマーを設計し、予備試験でウイルス分離と同様以上の検出感度を確認しており、さらなる実験を実施する予定である。

次世代シーケンサーはウイルス分離陰性の検体においてもロタウイルス遺伝子の検出が可能であり、同時に11分節すべての遺伝子型別が可能であり、ウイルス分離を行わないことでin vivoにおけるウイルスの状態に忠実な遺伝子解析を行うことができる有用な検査方法と考えられた。ライブラリーの作成には、dsRNAのロタウイルス遺伝子を目的としたキットは市販されていないので、mRNAを目的としたキットを流用したが、このキットでもライブラリーの作成が可能であり、遺伝子情報を得ることができた。しかしながら、遺伝子の部分によってはリードのカバレッジの良好でない箇所が認められたことから、ライブラリー作成の行程においてdsRNAに適合した方法の改良が必要と考えられた。

## E. 結論

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効率的にウシロタウイルス株を収集することが可能であるが、検出感度はウイルス分離の $10^4$ 分の1であり、ウイルス分離の実施が可能な場合はウイルス分離を行うべきである。また次世代シーケンスは1度に11分節すべてのゲノム情報を得ることができ、効率的かつ効果的なウシロタウイルスの基礎疫学調査のツールである。

2. 学会発表

なし

J. 健康危険情報

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

K. 研究発表

1. 論文発表

なし

表 1. 各種検査法によるウシロタウイルスの検出感度

ロタウイルス株	方法	市販キット及び使用プライマー	ウイルスの希釈倍率								
			$\times 10^0$	$\times 10^1$	$\times 10^2$	$\times 10^3$	$\times 10^4$	$\times 10^5$	$\times 10^6$	$\times 10^7$	$\times 10^8$
S-1/96	免疫クロマト法	ディップスティック 栄研 <sup>1</sup> ロタ	+	+	+	+					
		ラビットテスト ロター-アデノ	+	+	+						
		BD ロタ/アデノ エクザマン	+	+							
		ラビットエスピー<ロタ>	+								
		イムノカードST ロタウイルス	+								
	ラテックス凝集反応	ロタレックスドライ	+	+							
		ロタスクリーン	+								
		ELISA	+	+							
		RT-PCR	VP7 (Beg9-End9*)	+	+	+					
		ウイルス分離		+	+	+	+	+	+	+	+
S-8/97	Immuno chromatographic assay	ディップスティック 栄研 <sup>1</sup> ロタ	+	+	+	+					
		ラビットテスト ロター-アデノ	+	+							
		BD ロタ/アデノ エクザマン	+	+	+						
		ラビットエスピー<ロタ>	+								
		イムノカードST ロタウイルス	+								
	Latex agglutination assay	ロタレックスドライ	+	+							
		ロタスクリーン	+								
		ELISA	+	+							
		RT-PCR	VP7 (Beg9-End9*)	+	+						
		Virus isolation		+	+	+	+	+	+	+	
NCDV	Immuno chromatographic assay	ディップスティック 栄研 <sup>1</sup> ロタ	+	+	+	+					
		ラビットテスト ロター-アデノ	+	+							
		BD ロタ/アデノ エクザマン	+	+	+						
		ラビットエスピー<ロタ>	+	+							
		イムノカードST ロタウイルス	+	+							
	Latex agglutination assay	ロタレックスドライ	+	+							
		ロタスクリーン	+								
		ELISA	+	+							
		RT-PCR	VP7 (Beg9-End9*)	+	+	+	+				
		Virus isolation		+	+	+	+	+	+	+	
KK3	Immuno chromatographic assay	ディップスティック 栄研 <sup>1</sup> ロタ	+	+	+	+					
		ラビットテスト ロター-アデノ	+	+							
		BD ロタ/アデノ エクザマン	+	+	+						
		ラビットエスピー<ロタ>	+	+							
		イムノカードST ロタウイルス	+	+							
	Latex agglutination assay	ロタレックスドライ	+	+							
		ロタスクリーン	+								
		ELISA	+	+	+						
		RT-PCR	VP7 (Beg9-End9*)	+	+						
		Virus isolation		+	+	+	+	+	+	+	

\* :Gouvea et al J Clin Microbiol 28, 276-282 (1990)



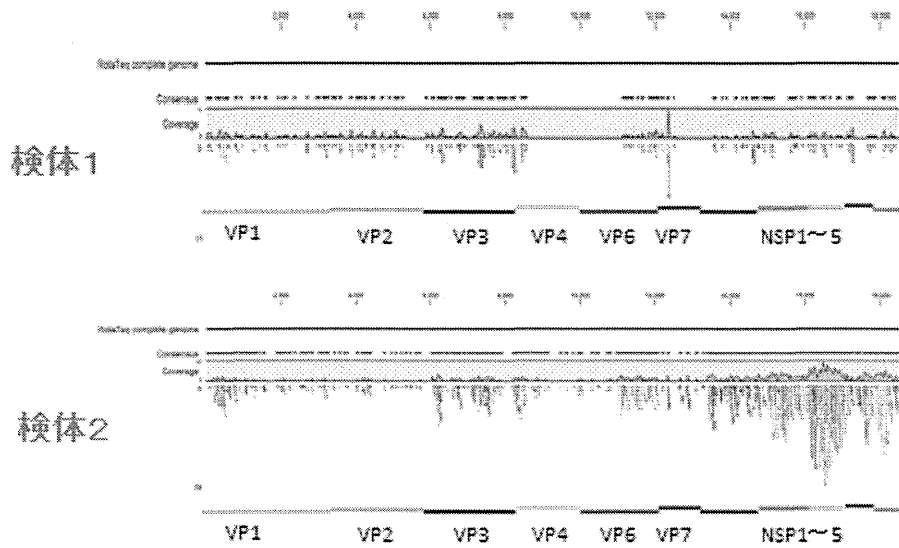


図1 ウイルス分離陰性検体からの次世代シーケンスによるウシロタウイルス遺伝子の検出

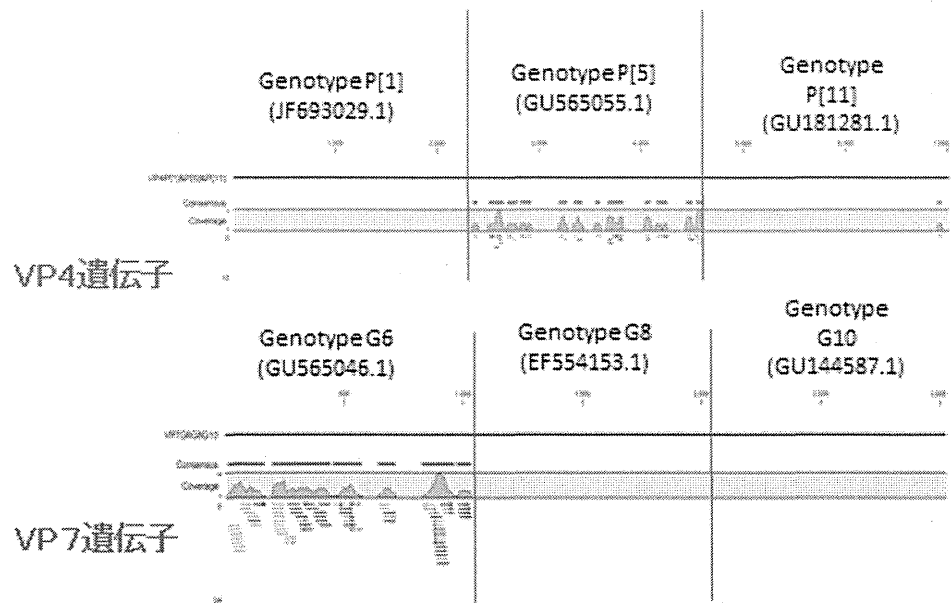


図2 CLC Genomics Workbench 5.5による検出株の遺伝子型別

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(2 年目) 研究分担報告書

## 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

分担研究者 高木 弘隆 国立感染症研究所 バイオセーフティ管理室  
研究協力者 斎藤 典子 国立感染症研究所 感染病理部電子顕微鏡室

### 【研究要旨】

A 群ヒトロタウイルス(以下 hRVA)は罹患者の糞便材料に大量に排出される。しかし、hRVA は培養細胞を用いて増殖させ、臨床分離株として単離培養に成功する確率は 50%程度である。hRVA の培養細胞への馴化には時間がかかり、継代数も増す為、病原性や遺伝子配列が臨床検体と異なる場合があることが知られている。本研究では、限界希釈法による培養細胞のクローン化とそれによる臨床材料からの直接的分離率の向上を検討した。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。

### A. 研究目的

hRVA は小児下痢症の主原因の一つであり、罹患者からのウイルス大量に排出されること、強い環境耐性を示すことから、施設・病院などでの感染制御は困難を極める。臨床材料からのウイルス分離及び株樹立の確率は 5 割程度であり、盲継代の回数がかさむこと、これが病原性・遺伝子へ少なからず影響を及ぼすことが懸念されている。近年、分子生物学的技術の発達により、細胞での分離培養を行わずに分子生物学的解析を行う機会が増えてきた。しかし、臨床材料は有限リソースであり、確実な hRVA の *in vitro* 培養系は必須である。

hRVA 細胞培養系はサル胎児腎由来 MA104 細

胞或いはヒト大腸がん由来 Caco-2 細胞などが用いられているが MA104 は ATCC より事実上入手が不可能になり、Caco-2 は ATCC 由来株において trypsin 感受性が高く trypsin 共存下での培養には不向きである。加えて両細胞株は一般的に 3-8 継代の盲継代が必要といわれ、origin の病原性・遺伝子情報に影響を及ぼすことは否めない。また MA104 は細胞の継代数が増えると hRVA 分離が難しくなるとも言われている。

本研究では、限界希釈法による MA104 細胞及び RVA DS-1 株感受性のアフリカミドリザル腎由来 CV-1 細胞をベースとした細胞クローニングを行い、hRVA に対して高感受性なク

ローンを検索するとともに、各標準株及び臨床材料での増殖性を検討した。

## B. 研究方法

### (1) 供試細胞株

①MA104S(札幌医大より分譲株)

②MA014R(理化学研究所分譲株)

③CV1(JCRB9049、HSBR 分譲株)

### (2) 供試 A 群ロタウイルス(以下 RVA)

①Wa(VR-2019、ATCC 分譲株)

②DS-1(VR-2550、ATCC 分譲株)

③SA-11(Simian rotavirus、VR-1565、ATCC 分譲株)

### (3) 試薬類

①細胞増殖用培地： 4%Fetal bovine serum 含有イーグル培地(以下 4%FBS-EMEM)

②Acetyltrypsin： Sigma (Cat-N0.6767)

③RVA 増殖用培地： 0.15%Bovine serum albumin、2  $\mu$ g/ml Acetyltrypsin 含有イーグル培地

(以下 0.15%BSA/AT2.5-EMEM)

④RV-A 測定用 ELISA キット： Rotacclone® (TFB)

### (4) hRVA 増殖用細胞クローニング

供試細胞 3 株の各浮遊液を 96well-plate 上にて 2 倍段階希釈を用いた限界希釈を行い、各々 12clones を得た。これらを 24well-plate に播種し単層シートとなるまで培養した。単層シートとなった cell-plate を PBS(-) で洗浄後 RV 増殖用培地に置換し、前処理済み \*RVA-Wa 株を  $1.4 \times 10^4$ TCID<sub>50</sub>/well となるよう接種した。36°C・5%CO<sub>2</sub> 存在下で 8 日間培養し

CPE 発現の有無を観察するとともに、培養上清を回収し 2 倍希釈したものを Rotacclone® にて RVA 抗原測定を行った。Rotacclone® での吸光度が 0.5 を超えたものを「増殖優良 clone」として細胞を回収し、維持培養を行った。

\*前処理：acetyltrypsin 30  $\mu$ g/ml として、37°C・30 分インキュベートした。

### (5) 増殖優良 clones からの trypsin 耐久性試験

RVA 増殖培地をベースとして、acetyltrypsin 含量を 2~8  $\mu$ g/ml として RVA 非存在下で 8 日間培養し、著しい細胞剥離等のないものを選定した。

### (6) RVA 標準株増殖性試験および臨床材料(糞便上清)からの hRVA 直接分離・増殖試験

試験(4)及び(5)の結果より選定された cell-clone を 6well-plate および 24well-plate に各々播種し単層シートとなるまで培養後、PBS(-)にて細胞を洗浄し RV 増殖用培地に置換した。RVA 標準株 3 株は 102 希釈したものを 6well-plate へ 100  $\mu$ l/well で接種し、臨床材料 6 検体は  $\phi$ 0.2  $\mu$ m フィルターろ過後、acetyltrypsin を 20  $\mu$ g/ml となるよう添加して 37°C・30 分処理をし、これを各 30  $\mu$ l/well で 24well-plate に接種した。36°C・5%CO<sub>2</sub> 存在下で培養し、RVA 標準株は 8 日目に、臨床材料は 5 日目及び 7 日目の培養上清を回収後、これらを 2 倍希釈したものを Rotacclone® にて RVA 抗原測定を行った。

## C. 研究結果及び考察

### (1) hRVA 増殖用細胞クローニング

供試細胞株より HRV-Wa 増殖性の高いものとして、MA104S より C4 及び C8 の 2clones、MA104R より C12 の 1clone、CV1 より C2.3 の 1clone の計 4clones を得ることができた(写真 1-a~g)。また MA104S-C4、-C8 および CV1-C2.3 では CPE 発現はわずかであったが、MA104R-C12 では顕著な CPE 発現が観察された。

(2)RVA 標準株と臨床材料を用いた各 cell-clone での RVA 増殖性

標準株 3 株を用いた各 cell-clone での増殖性は clone ごとに異なる増殖性を示し、SA-11 株は MA10S-C8 で、Wa 株は MA104S-C4 で、DS-1 株は CV1-C2.3 でそれぞれ良好な増殖性を示した(グラフ 1)。そして 3 種類の cell-clone を用いた臨床材料からの直接分離・増殖では 6 検体(G1P8 : 1、G1 : 1、G3P8 : 3、G9P8 : 1) 中 4 検体で 1 継代目から明確な RVA 増殖が認められ、G1 および G3P8 の 1 検体でその増殖は著明であった(グラフ 2)。

今回 cell-clone を作製・選定してゆく過程で細胞の Mycoplasma 汚染 (*M. orale*、*M. arginini*) が確認されたため、一時的に検討を中断し除染を実施した。すべての clone からの Mycoplasma 除染が確認された後、検討を再開したところ、MA104R-C12 における CPE 発現がほとんど見られず、RVA 増殖も除染前の 1/5~1/10 に低下した。また MA104S や CV1 のクローンでもわずかにみられた CPE はほとんど認められなくなった。そこで MA104-C4 に RVA-Wa 株を感染させ 6 日間培養後に固定し、これを走査電子顕微鏡にて観察したところ、細胞の一部において、穏やかにバディングしてくる状況が観察され、対象として著明な CPE を発現する SA-11 株感染細胞とは全く異なることが示された(写真 2-a~d)。このこと

から元来 HRVA において培養細胞感染における CPE 発現は非常に穏やかであり、Mycoplasma などの co-factor により発現増強が起こる可能性がある。各 cell-clone の Mycoplasma 感染と RVA 感染時の CPE 発現については引き続き検証する。

#### D. 結論

hRVA 陽性材料から効率よくウイルスを分離・増殖させるべく、従来 RVA 培養に使用している MA104 細胞(2 種類)及び CV1 細胞より限界希釈法による細胞クローニングを行い、標準株である RVA-Wa 株を増殖指標としたところ、計 4 種類の cell-clone を得るに至った。RVA 標準株の増殖性は clone によって異なることが示された。また臨床材料からの直接分離・増殖を試みたところ、6 検体中 4 検体で 1 継代目からの明確な増殖が認められた。

E. 健康危険情報： なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

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.* 2012; 56:630-638.

##### 2. 学会発表

1) 高木弘隆、藤井克樹、村上耕介、戸高玲子、下池貴志、小林宣道、片山和彦：A 群ロタウイルス(RVA)の分離・増殖における感受性細胞株のクローニングによる検討 第 60 回日本ウイルス学会学術集会(大阪) 2012 年 11 月

13-15 日

2) 藤井克樹、下池貴志、高木弘隆、Dennis Francis、村上耕介、朴英斌、戸高玲子、脇田隆字、片山和彦：RT-PCR による A 群ロタウイルスの全 11 セグメントの増幅法の構築 第 60 回日本ウイルス学会学術集会（大阪）2012 年 11 月 13-15 日

3) 戸高玲子、村上耕介、岡智一郎、高木弘隆、朴英斌、下池貴志、藤井克樹、脇田隆字、中西章、片山 和彦：カリシウイルスのユニバーサルなプラスミドベースリバーシジェネティクスシステム 第 60 回日本ウイルス学会学術集会（大阪）2012 年 11 月 13-15 日

4) 下池貴志、高木弘隆、岡智一郎、村上耕介、

戸高玲子、朴英斌、藤井克樹、脇田隆字、片山和彦：マウスノロウイルス感染細胞内のウイルス蛋白質とそのゲノム RNA の局在 第 60 回日本ウイルス学会学術集会（大阪）2012 年 11 月 13-15 日

5) 戸高玲子、岡智一郎、村上耕介、下池貴志、藤井克樹、朴英斌、高木弘隆、脇田隆字、中西章、片山和彦：Development of plasmid DNA transfection-based reverse genetics system for murine norovirus and feline calicivirus 第 35 回日本分子生物学会年会（福岡）、平成 24 年 12 月 11-14 日

G. 知的所有権の出願・登録状況： なし

写真1-a MA104S-origin

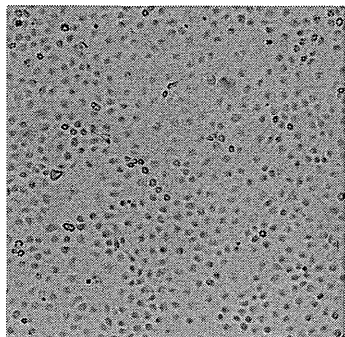


写真1-b MA104S-C4

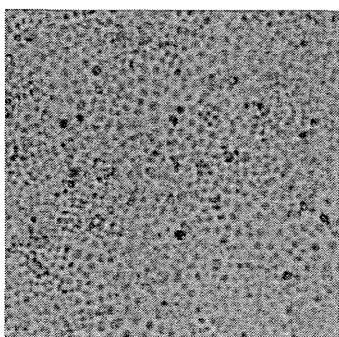


写真1-c MA104-C8

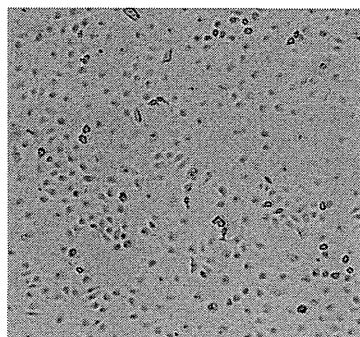


写真1-d. MA104R-origin

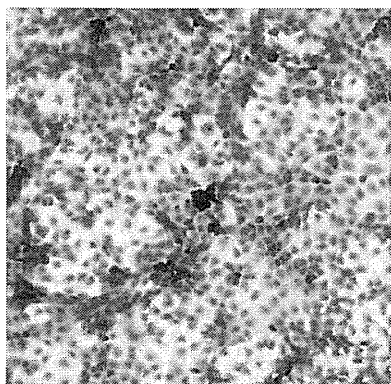


写真1-e. MA104R-C12

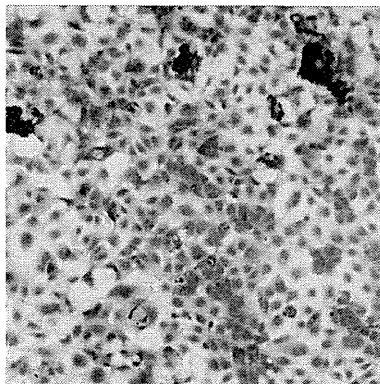


写真 1-f. CV1-origin

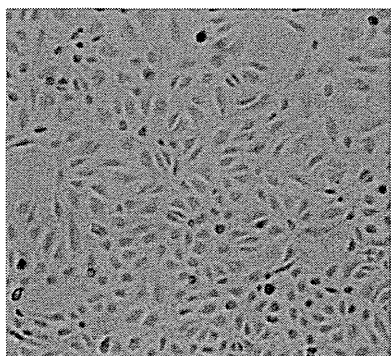
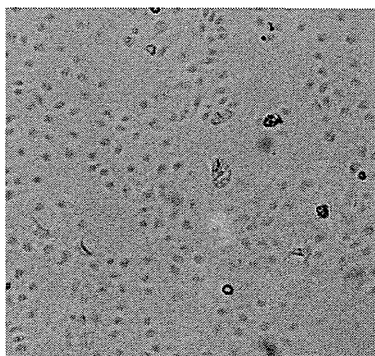
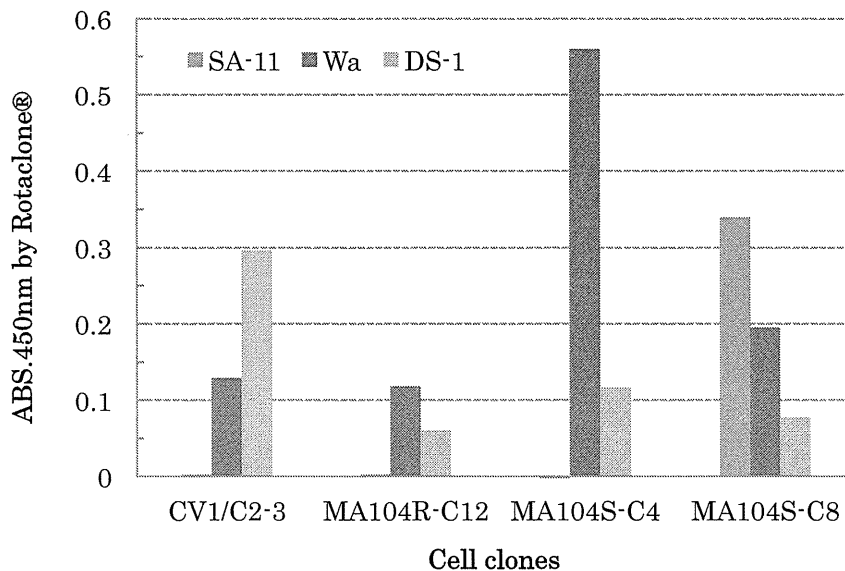


写真 1-g. CV1-C2.3



グラフ 1. RVA 標準株による各 cell-clone での増殖性



グラフ 2. RVA 陽性臨床材料を用いた各 cell-clone による直接分離・増殖性

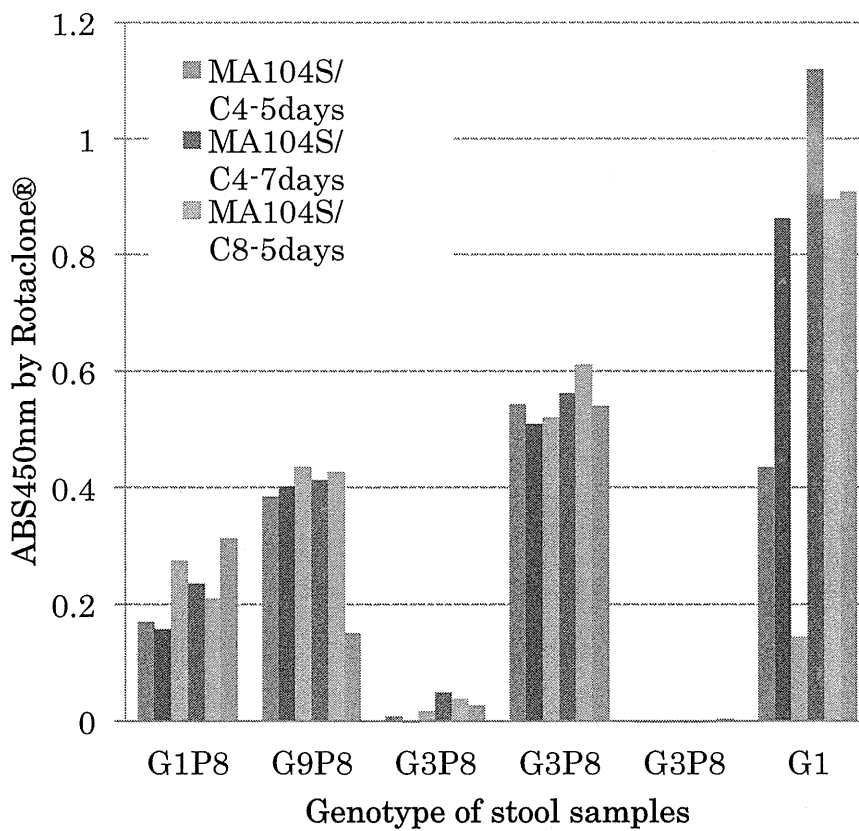


写真 2-a. RVA-Wa 感染 MA104S-C4 細胞(感染 6 日目): サークル内は RVA 様粒子を確認

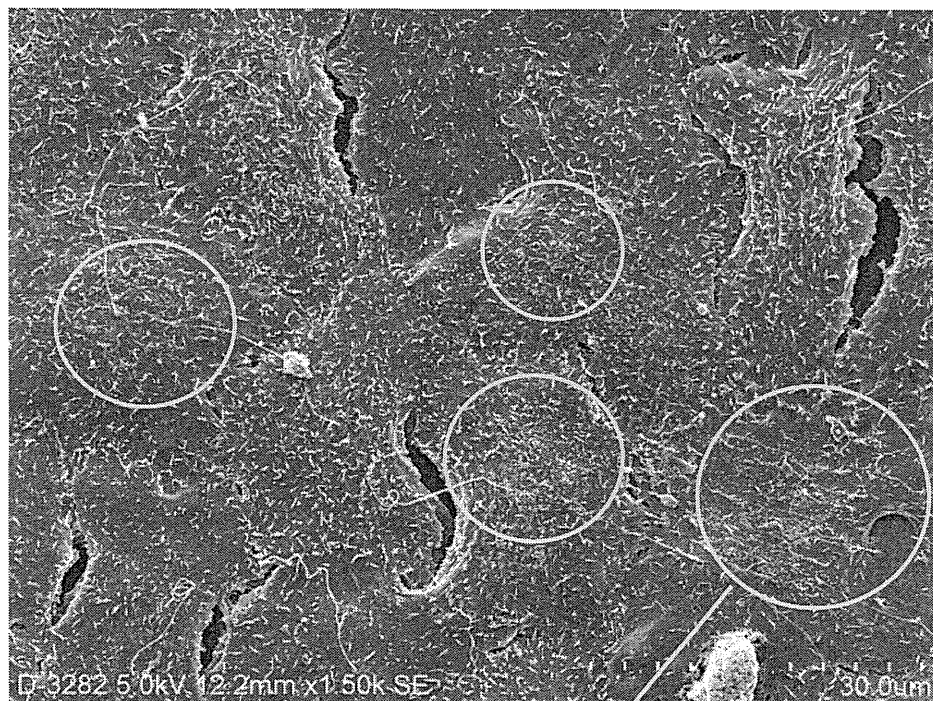


写真 2-b. ~100nm の均一な RVA 様粒子

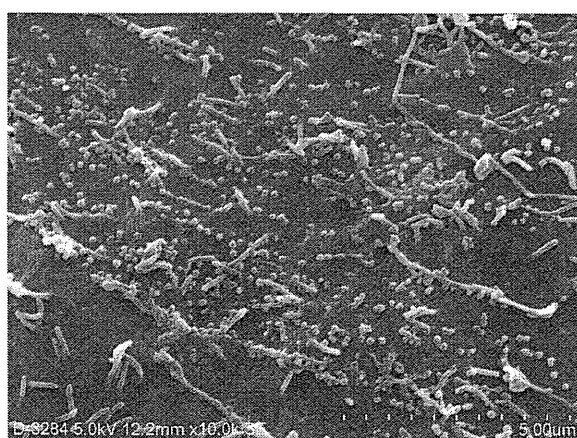




写真 2-c. 非感染 MA104S-C4 細胞

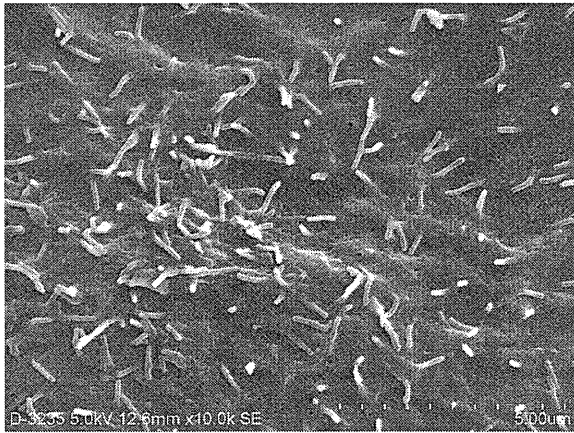
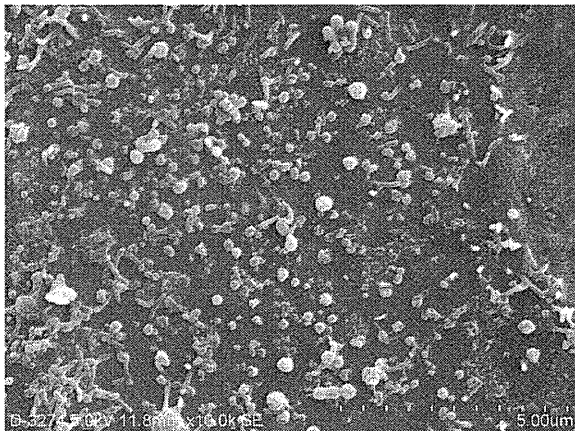


写真 2-d. (参考)RVA-SA11 株感染 MA104S-C4 細胞 : CPE が顕著



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

## マイクロチップ電気泳動による RNA-PAGE の検討

研究分担者 村上 耕介、下池 貴志

研究協力者 フランシス デニス

国立感染症研究所ウイルス第二部第一室

### 研究要旨

ロタウイルスは、コア、内殻、外殻の 3 層で構成される二重殻粒子で、コア内に 11 本の分節二本鎖 RNA (double-stranded RNA : dsRNA) をゲノムとして有する。患者便検体より抽出したゲノム RNA をアクリルアミドゲルにより電気泳動すると (RNA-PAGE)、分子量の差によって各分節を分離することができる。この泳動パターンは、群および遺伝子型によって異なるため、RNA-PAGE の泳動パターンから群、遺伝子型を大まかに分類することができる。しかし、RNA-PAGE は、泳動条件が異なると泳動パターンが異なるため、施設が異なると簡単に比較することができない。この問題点を解決するため、本分担研究では、施設間誤差の小さい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。

## A. 研究目的

ロタウイルスは、コア、内殻、外殻の3層で構成され、11本の分節二本鎖RNA (double-stranded RNA: dsRNA) をゲノムとしてコア内に有する。内殻を構成するVP6の抗原性によりA-G群に分類され、このうちA-C群がヒトに感染する。さらにA群は、スパイクを構成するVP4、外殻を構成するVP7の遺伝子型によって、それぞれP[1]-P[35]、G1-G26に分類される。これらの分類は主に遺伝子解析により行われるが、各群、遺伝子型ごとに異なるプライマーを用意しなければならないことから、作業が煩雑である。

患者便検体より抽出したゲノムRNAをアクリルアミドゲル電気泳動すると(RNA-PAGE)、分子量の差によって各分節が分離される。この泳動パターンは、群および遺伝子型によって異なる。そのため、RNA-PAGEの泳動パターンから大まかな群、遺伝子型を簡便に分類することができる。しかし、RNA-PAGEは、泳動条件が異なると泳動パターンに差が生じるため、施設間で簡単に比較することができない。

近年、微小基板上に作製した微細な流路内で電気泳動を行う「マイクロチップ電気泳動」が実用化され、DNAやRNAを分離することが可能となった。この手法で使用されるマイクロチップや試薬は高精度で管理されているため、施設間誤差が小さいという特徴があり、各施設で得られた泳動パターンを容易に比較可能である。

そこで本研究では、マイクロチップ電気泳動をRNA-PAGEの代替法として使用することを目的とし、その泳動条件について検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. ロタウイルス dsRNA

ロタウイルス患者の便検体(KN-6、NT-9)から、TRIzol LS Reagent (Invitrogen) と Direct-zol RNA MiniPrep キット (ZYMO Research) を用いてゲノム dsRNA を抽出した。

### 2. 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(ATTO)、Tris/Glycine

SDS bufferにてSDS-PAGEを行った。泳動後、ゲルはSYBR-Gold (Invitrogen) で染色し、トランスイルミネーターにて、RNAのバンドを検出した。

### 3. マイクロチップ電気泳動

抽出したRNAは、DEPC処理したDWにて懸濁し、マイクロチップ電気泳動装置 (MultiNA MCE-202: 島津製作所) により分析した。泳動には、MultiNA専用の試薬キットを使用した; DNA-500 キット、DNA-1000 キット、DNA-2500 キット、DNA-12000 キット (島津製作所)。蛍光色素は、SYBR-Gold (Invitrogen) および GelStar (Takara) を使用した。装置の操作は取扱説明書に準じて行った。施設間誤差の検証実験では、試薬キットに含まれる低分子量マーカーおよび高分子量マーカーの移動度を0%、100%とし、各セグメントの移動度を数値化して比較を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒト由来の便材料を用いた研究であるため、倫理委員会に研究内容を申請し、承認を受けた後に検体採取並びに解析を行った。

## C. 研究結果

患者便検体から得られた2つのロタウイルスゲノムRNAをRNA-PAGEにより分離し、SYBR Goldで検出した結果、KN-6はショートタイプ、NT-9はロングタイプとして分別できた。またセグメント2, 3, 4および7の移動度がわずかに異なっていた(図1左)。

次に、同じサンプルをMultiNAによりマイクロ電気泳動を行った。MultiNAの専用試薬キットはDNA/ssRNAの泳動用に最適化されていることから、DNA用キット(DNA-500 キット、DNA-1000 キット、DNA-2500 キット、DNA-12000 キット)を用いてdsRNAを泳動可能であるかどうかを調べた。その結果、DNA-12000 キットが、各セグメントを最も分離できることを明らかにした。続けてdsRNAを検出する蛍光色素(SYBR-Gold、GelStar)を検討した。その結果、SYBR-GoldがGelStarに比べて明瞭にバンドを検出できた。さらにSYBR-Goldの濃度を1、2、3倍と変更して泳動した。SYBR-Goldの濃度を2倍にした

ところ、シグナル強度が増加したことから、バンドを明瞭に検出することができた。一方で濃度を3倍にしたところ、シグナルに加えてノイズシグナルも増加し、バンドが不明瞭になった。

DNA-12000 キット、および2倍濃度 SYBR-Gold を用いて KN-6 および NT-9 のマイクロチップ電気泳動を行った結果、セグメント 10, 11 の移動度に差があり、ショートタイプ、ロングタイプを判別できた。しかし、セグメント 1-4、セグメント 7-9 は分離度が悪く、それぞれが1つのクラスターとして検出された。KN-6 のセグメント 5 は NT-6 に比べ、移動度がわずかに遅いように見えたが、バンドが鮮明でないことから判別できなかった。(図 1 右)

施設間誤差を検証するため、NT-6 を3台の装置で測定した。装置1台につき4枚のマイクロチップをセットし、各チップ3回ずつの測定を行った。合計36回の試験について各セグメントの移動度を比較したところ、標準偏差は0.5以下であり、大きな誤差が認められなかった。

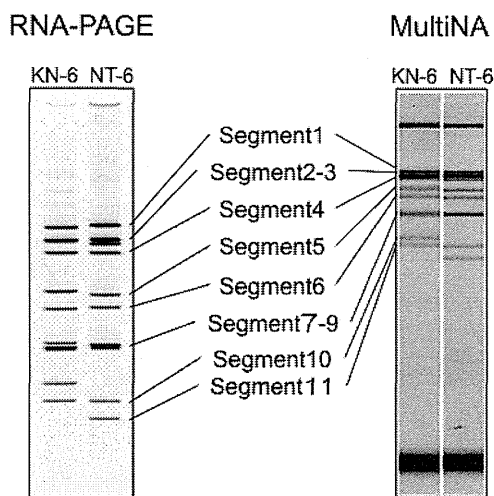


図1 RNA-PAGE と MultiNA による  
ロタウイルス dsRNA の泳動パターン  
の比較

### C. 考察

マイクロチップ電気泳動は主に DNA および ssRNA を対象としており、ロタウイルスゲノムのような dsRNA の検討は行われていない。そこで本研究では、DNA 用試薬により dsRNA を泳動する条件を検討した。

今回使用した MultiNA には DNA 用に4種類、RNA 用に1種類の専用試薬キットが開発されており、このうちいずれの DNA 用キットでも dsRNA を泳動可能であった。また、本研究班の葛谷分担研究者(岡山県環境保健センター)が RNA 用キットを検討したところ、同様の結果が得られた。しかし、RNA 用キットでは還元剤としてホルムアルデヒドを使用するため、DNA 用キットの方が安全面で優れていると考えられた。

泳動条件の最適化を行った結果、DNA-12000 と SYBR-Gold (2倍濃度) の組合せが最も分離能が高く、明瞭なシグナルを取得できた。しかし、この条件でも RNA-PAGE に比べて分離能が悪く、特にセグメント 2, 3、セグメント 7-9 は各セグメントが重なってしまい、判別が困難であった。

MultiNA の仕様上、1,000-12,000 bp の DNA を泳動する場合の分離能は 20% である。本研究で対象としているサンプルが dsRNA であることから直接比較することができないが、マイクロチップ電気泳動するとロタウイルス dsRNA はこのレンジに入ることから、装置の性能(分離能)に関わっている可能性がある。なお、一般に、泳動距離を長くすることで分離能が改善されるが、マイクロチップ電気泳動では泳動距離を変更することが不可能であるため、これ以上の改善は難しいと考えられた。

次に施設間誤差を検証するため、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。「研究方法」で記述した通り、各セグメントの移動度を数値化し、合計36回の測定結果を比較したところ、各測定結果で誤差がほとんど認められなかった。このことから、マイクロチップ電気泳動は dsRNA を安定かつ正確に分離できることが示唆され、異なる施設の泳動結果を高精度に比較できることが期待された。また、この結果は、移動度が安定した指標となることを示唆しており、今後さらに多くのサンプルデータを蓄積することで、前述のセグメント 2, 3 およびセグメント 7-9 が未分離の状態でも、移動度を比較することで、ある程度の群・遺伝子型分類が可能となると考えられた。