

201318005A

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 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 片山 和彦

平成 26 (2014) 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 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 片山 和彦

平成 26 (2014) 年 3 月

## 目次

I.	総括研究報告書	5
	研究組織	7
	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	9
II.	分担研究報告書	17
	わが国におけるロタウイルス株の遺伝子型分布：2012年流行期	
	中込 治	19
	わが国におけるロタウイルス胃腸炎による入院率と地域差の存在：京都府南丹地区および秋田県由利地区における入院率の比較	
	中込 とよ子	23
	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	27
	リバーシジェネティクス系を利用した、ロタウイルスの外層タンパク質 VP4 の解析	
	谷口 孝喜	33
	札幌市におけるヒトロタウイルス G2P[4]株 VP7 遺伝子の解析	
	辰巳 正純	37
	家畜におけるA群ロタウイルスの分子疫学調査	
	水谷 哲也・長井 誠	41
	マイクロチップ電気泳動によるロタウイルスの型分類	
	下池 貴志・村上 耕介	47
	2012/13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	53
	臨床材料からの効率的なA群ロタウイルスの分離法開発に関する検討	
	高木 弘隆	57
	岡山県におけるロタウイルス A の検出状況（2010/11～2012/13シーズン）	
	葛谷 光隆・濱野 雅子	63
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	67

# I. 総括研究報告書

## 研究組織

研究代表	片山和彦	国立感染症研究所ウイルス第二部第一室
研究分担	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
	中込とよ子	長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・感染免疫学講座
	小林宣道	札幌医科大学医学部衛生学講座
	谷口孝喜	藤田保健衛生大学医学部ウイルス・寄生虫学
	辰巳正純	北海道社会事業協会小樽病院小児科
	水谷哲也	東京農工大学農学部
	下池貴志	国立感染症研究所ウイルス第二部第一室
	藤井克樹	国立感染症研究所ウイルス第二部第一室
	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	森俊彦
小原敏生		苫小牧市立病院小児科
飯田一樹		北海道社会事業協会小樽病院小児科
野口篤子		秋田大学医学部小児科
三浦忍		由利組合総合病院
三浦克志		宮城県立こども病院総合診療科
大場邦弘		公立昭和病院小児科
河島尚志		東京医大病院
西村直子		江南厚生病院こども医療センター
伊藤陽里		公立南丹病院
長谷川俊史		山口大学医学部病院
青木知信		福岡市立こども病院
葛谷光隆、濱野雅子		岡山県環境保健センター
河本聡志		藤田保健衛生大学医学部ウイルス・寄生虫学
長井誠		東京農工大学農学部
ゴッシュ・ソウビク		札幌医科大学医学部衛生学講座
フランシス・エコー・デニス		東京医科歯科大学大学院
戸高玲子		国立感染症研究所ウイルス第二部第一室

(敬称略)

平成 25 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、平成24年度までに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。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、驚くべきことにその優勢株は、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全セグメント全長塩基配列決定によって明らかになった。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。平成25年度は、北海道、秋田県、宮城県、東京都、愛知県、京都府、山口県の7都道府県9病院からRV下痢症入院患者のロタウイルス陽性患者便検体165検体の内、Wa-like G1タイプが32検体（19%）、DS-1-like G1タイプが100検体（61%）、G2タイプが10検体（6%）、G3タイプが3検体（2%）、G9タイプが20検体（12%）であった。2011/12シーズンに発見されたDS-1-like G1タイプの流行が、2012/13シーズンに入っても引き続き優勢になっていることが明らかとなった。このウイルス株は特に東日本・北日本で多く検出されており、今後の動向に注意が必要である。現在ワクチン接種率は、全国平均で45%に達しており、ワクチンによる淘汰圧上昇がロタウイルスのゲノム遺伝子型構成に影響を与え、新規リアソータントの出現を加速させている可能性も否定できない。我々は、ロタウイルスの未知の変化に対応すべく、ロタウイルスの11ゲノムセグメントを対象とした分子疫学的研究を継続していく必要がある。

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。

3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継続した。最終年度からは全ゲノム解析に次世代シーケンスシステム(NGS)を導入し、増加する検体数に対応した。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継続した。昨年度から開始した動物のロタウイルスに関する分子疫学調査も継続し、データを蓄積した。

## 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。本年度は、2012/13年シーズンは、NTT東日本札幌病院(北海道)、小樽協会病院(北海道)、

由利組合総合病院(秋田県)、宮城県立こども病院(宮城県)、東京医科大学病院(東京都)、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9病院から入院症例の便検体を収集した。

2012/13年シーズンは全国9病院から344検体を収集し、そのうち236検体がELISA法で陽性であった。このうち、165検体のフルゲノムシーケンス解析が現在までに完了している。その内訳は、Wa-like G1タイプ(G1-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1)が32検体(19%)、DS-1-like G1タイプ(G1-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2)が100検体(61%)、G2タイプ(G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2)が10検体(6%)、G3タイプ(G3-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1)が3検体(2%)、G9タイプ(G9-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1)が20検体(12%)であった。主流行株であるDS-1-like G1タイプの地域分布について調べたところ、各病院から収集した検体のうちDS-1-like G1タイプが占める割合は、NTT東日本札幌病院は56%(15検体)、小樽協会病院は20%(1検体)、由利組合総合病院は67%(6検体)、宮城県立こども病院は100%(2検体)、公立昭和病院は33%(1検体)、江南厚生病院は97%(63検体)、公立南丹病院は38%(8検体)、山口大学医学部附属病院12%(4検体)であった。2012/13年シーズンの我が国におけるロタウイルス分子疫学調査の結果、昨シーズンから流行が確認されていた新しいタイプのウイルス、DS-1-like G1が引き続いて主要流行株であることが判明した。

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。しかし、それ以降は同株に加えてG3P[8]株やG2P[4]株、G9P[8]株が入り替わり優先株となって混沌とした傾向を示していたことを明らかにした。次に札幌市で検出されたG2P[4]株についてVP7遺伝子の変遷を解析した。この結果、20年を隔てて検出されたG2P[4]株は全て同じ系統に属し、G1P[8]株VP7遺伝子とは異なる進化形式をとることが示唆された。このことからロタウイルスの経時的疫学調査を

継続することがロタウイルスの流行のメカニズムを研究する上で重要であることが明らかになった。

感染研の藤井らは、昨シーズンから引き続き、全国的なロタウイルス (RV) の分子疫学調査を行った。2012/13年シーズンは北海道、秋田県、宮城県、東京都、愛知県、京都府、山口県の7都道府県9病院からRV下痢症入院患者の便検体を収集し、全ゲノムシーケンス解析を実施した。その結果、RV陽性だった165検体の内、Wa-like G1タイプが32検体 (19%)、DS-1-like G1タイプが100検体 (61%)、G2タイプが10検体 (6%)、G3タイプが3検体 (2%)、G9タイプが20検体 (12%) であった。このことから、2011/12シーズンに発見されたDS-1-like G1タイプの流行が、2012/13シーズンに入っても引き続き優勢になっていることが明らかになった。このタイプのウイルスは特に東日本・北日本で多く検出されており、今後の動向に注意が必要であることを示唆した。

東京農工大学の水谷、長井らは、ウシを中心に、ウマ及びブタから近年分離されたRV (ウシ 36 株、ウマ 24 株及びブタ 8 株) の全遺伝子配列を調べ、解析を行った。また、ウシRV感染症を効率よく摘発するため、RV感染症の類症鑑別が可能で、同時に他の疾病が診断できる診断系を作出した。我が国のウシRVの遺伝子解析を継続し、平成25年度のウシにおけるロタウイルスの分子疫学象を明らかにした。我が国では、ウシから検出されるロタウイルスは、典型的なウシRVの遺伝子型を示し、RotaTeqあるいはヒトRVの遺伝子分節の組み換えは認められなかった。ウシRVの1株はG15-P[14]というこれまでに報告のない遺伝子型の組み合わせを示したが、ウシRV間の遺伝子再集合で出現した株と考えられた。ウマロタウイルスの場合、全てのウマRVは典型的なウマRVの遺伝子型を示し、ヒトRV遺伝子分節は確認されなかった。しかし、系統樹解析の結果、多くのウマロタウイルス株のNSP4遺伝子はウシ型であることが判明した。NSP4遺伝子はRVの宿主指向性と病原性に関わり、異種動物由来RVと組変わった場合には弱毒化が認められる場合があるが、このウシ型NSP4は子馬への病原性を保ちながらウマへの浸潤を広めた希少な例と考えられた。ブタRVについては1株のNSP5遺伝子以外は、全て典型的なブタ型の遺伝子型を示した。NSP5遺伝子がヒトRVにしか報告のないH2型に

分類された1株は、ヒトRVとブタRVとの遺伝子再集合である可能性が考えられた。

感染研・高木らは、MA104s細胞より得たクローンC4及びC8から再クローニングを行い、新たに4種類の優良なサブクローンを得た。このうち7代以上の継続継代を行い、サブクローンC4D10及びC8D1でhRVA増殖性を保存していることを確認した。またサブクローンにおいて培養7日目に上清除去・洗浄・培地交換を行い、さらに培養を続けた結果、培養上清中のhRVA抗原シグナルが明瞭化し、かつCPE発現がみられないことからhRVAが持続感染状態にあることを明らかにした。今後CPE発現促進あるいは顕在化についてはさらに検討を要するがワクチン接種、後の防御抗体産生状況などを簡便に確認するための細胞株として利用できるかもしれない。

中込治らは、網羅的ロタウイルス分子疫学基盤構築とワクチン評価研究班の一環として、今後のワクチンの有効性評価の基礎データとするため、わが国に流行しているロタウイルス株の血清型 (遺伝子型) の分布を全国6ヶ所に設けた協力病院の小児科入院患者の臨床検体を解析することにより明らかにした。すなわち、2012年のロタウイルス流行期中に132のロタウイルス検体が得られたが、そのVP7遺伝子型は、G1が83 (63%)、G3が9 (7%)、G9が40 (30%) 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。すなわち、G/P型の組み合わせではG1 P[8]株が優勢であった。なお、この優勢なG1P[8]株が分子疫学的に極めて興味深い成り立ちの株であることが分かった。今後、ワクチンの接種率が高まるに連れて、接種率に地域差が大きく生じるようであれば、ロタウイルスの遺伝子型の分布に変化が起こる可能性があり、さらに地域を拡大して継続的な調査が必要であると考えられた。

中込とよ子らは、網羅的ロタウイルス分子疫学基盤構築とワクチン評価研究班の一環として、今後のワクチンの有効性評価の基礎データとするため、京都府南丹地区および秋田県由利地区におけるロタウイルス胃腸炎による入院率を同一の診断基準および同一の検査で診断し、それぞれ、3.9人/1000人・年および11.4人/1000人・年と算出した。すなわち、京都府南丹地区のロタウイルス胃腸炎による入院



率は、秋田県由利地区の約3分の一に相当する入院率であることが分かり、ロタウイルス胃腸炎の入院率には明らかな地域差が存在することを示した。また、わが国では5歳になるまでに、約20人から50人に1人がロタウイルス胃腸炎に罹患し、その治療のために、入院を余儀なくされていると推測した。

感染研・村上、下池は、ロタウイルスの11分節ゲノム二本鎖RNA (dsRNA) 解析法である、polyacrylamide gel electrophoresis (RNA-PAGE) の問題を解決し、施設間で11本のdsRNAのPAGEパターン比較を行うため、マイクロチップ電気泳動装置MCE-202 MultiNA (MultiNA、島津製作所) を導入し、条件の検討を開始した。昨年度、DNA-500 kit を用い、泳動電圧を標準値の50%として、標準の2倍濃度のSYBR Gold存在下で泳動すると、dsRNAのバンドの分解能が高く、再現性に優れた解析が可能であることを明らかにした。本年度は、互いに塩基配列の異なるロタウイルス株を用い、RNA-PAGEパターンと、MultiNA-RNA-pattern (MultiNA-RNAP) の比較検討を行った。RNA-PAGEでは、塩基は列が異なるロタウイルス株を完全に分別することができなかった。しかし、MultiNA-RNAPでは鑑別が可能であった。また、塩基配列が等しい場合、再現性良く同じMultiNA-RNAPを示すことが明らかになった。MultiNA-RNAPを用いた簡便かつ高感度なロタウイルス株鑑別が実施可能であることを明らかにした。

札幌医科大学・小林らは、(1) 中国における主要な遺伝子型G3P[8] ヒトロタウイルス、(2) 中国でのG3P[9] 型ヒトロタウイルス株について全遺伝子配列を決定し、各遺伝子分節の分子進化の様態や、世界中のヒトまたは動物ロタウイルス株との関連を解析した。中国・武漢市において2000～2013年の期間に検出された33株のG3P[8]株の全遺伝子分節は、同一の遺伝子型 (Wa遺伝子群) に属していた。それらの株間で各遺伝子分節の主系統は本研究の全期間にわたり概ね保持されていたが、VP1, VP4, VP6, NSP1-NSP5遺伝子において時折異なる系統が出現し、様々なアレル配座 (allele constellation) が見られた。このことから、同じ遺伝子型G3P[8]であっても長期間のうちに、非構造蛋白遺伝子を中心に他のロタウイルス株との間でリアソートメントが起きた

ことが示唆された。中国で検出された2株のG3P[9]型ヒトロタウイルスは、ヒトロタウイルスでは稀なAU-1遺伝子群に属していたが、NSP5遺伝子型はH6で、AU-1株のそれ (H3) とは異なっていた。系統解析から、これらG3P[6]株はネコ/イヌのロタウイルスがヒトへ直接的感染、伝播した可能性、またはネコ/イヌおよび他の動物ロタウイルス間で形成された遺伝子再集合体がヒトへ感染した可能性が示唆した。

協力研究者である岡山県の葛谷らは、岡山県におけるロタウイルス A(RVA)流行状況を把握するため、(独)国立病院機構岡山医療センター小児科の協力を得て、胃腸炎患者における RVA 検出状況および検出ウイルスのVP7遺伝子型(G型)分布状況について継続的な調査を実施した。今回は RVA ワクチンの国内導入前後の時期にあたる2010～2013年の3シーズンの状況について報告した。岡山県における RVA のシーズン別検出率は2010/11が30.1%、2011/12が18.5%、2012/13が12.6%と低下傾向が見られた。RVAの検出率のピークは、1～3月、ピーク時の値は前報<sup>2)</sup>同様44.3～69.7%と高率であったが、2010/11シーズンに比べて2011/12、2012/13両シーズンは、やや低い傾向であった。また、2011/12、2012/13両シーズンは、少数ながら夏季(6月、7月)にRVAが検出された。次に、RVA陽性262件のG型別を行った。3シーズンを通してのG型別割合はG3型65.7%、G1型30.5%、G9型2.3%、G2型1.1%で、その他にG1&G3の混合感染例が1例認められた(表)。シーズン別では、2010/11、2011/12シーズンは2008/09、2009/10シーズンに引き続きG3型が優占型となったが、2011/12シーズンにはG1型の割合が増加し、2012/13シーズンは6シーズンぶりにG1型が優占型となったことを報告した。2011/12シーズンの岡山県において、これまでに検出されたことのないタイプのRVAを報告した。このウイルスは、VP7およびVP4遺伝子型(P型)がG1型プロトタイプのWa株と同じG1P[8]型であるのに対し、VP6、NSP4およびNSP5/6遺伝子型はG2型プロトタイプのDS-1株と同一であるという、異なるゲノグループ間(WaゲノグループとDS-1ゲノグループ)の遺伝子再集合体(リアソータント)に由来する株であった。さらに、

この株が同シーズンに検出された G1 型全体の 71.4%を占めて広く流行したことも明らかにした。2012/13 シーズンにおけるリアソータント株の流行状況を明らかにするため、G1P[8]と同等された 49 株について RT-PCR 法により NSP4 および NSP5/6 遺伝子全長をそれぞれ増幅し、両者の鎖長を比較した。その結果、25 株 (51.0%)がリアソータント株と推定され、これまで遺伝的に不安定であるとされてきた異なるゲノムグループ間のリアソータント株が、2 シーズン連続で広範な流行を起こしたことが今回初めて明らかにした。

藤田保健大学・谷口らは、ロタウイルスのリバースジェネティクスの改良にあたり、レオウイルスの系をモデルとして用いた。T7RNA ポリメラーゼの供給に、組換えワクシニアウイルスを利用する、あるいは、T7 RNA ポリメラーゼ発現 BHK 細胞の利用することが考えられた。本研究では、T7 RNA ポリメラーゼ発現プラスミドを用いたレオウイルスの遺伝子操作系の確立を試みた。その結果、レオウイルスゲノムをコードする 10 個の T7 プラスミドと pC-T7pol を共導入した L929 細胞では、ウイルス量は少ないものの、組換えレオウイルスが回収された。また、インターフェロン産生能が欠損している BHK-21 細胞にこれら 11 個のプラスミドを同様に共導入したところ、組換えレオウイルスの回収効率は著しく上昇することを明らかにした。

#### (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。

#### 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、蓄積が継続され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、全国平均で約45%に達したことが明らかになった。昨年、本研究班の調査対象地域では、最大で5%に満たなかった異から考えると、劇的な摂取率上昇を示した。ワクチン導入前後にあたる3シーズンのRVA流行状況を解析したところ、ウイルス検出率の低下傾向や、リアソータント株の2シーズン連続の流行など、これまででない状況が観察された。今後従来とは異なる流行パターンに移行するおそれもあり、広範囲での継続的かつ詳細な監視体制の強化が必要である。また、今回2シーズン連続の流行が明らかとなったリアソータント株は、今後新たな流行株として定着する可能性も十分に考えられる。

また、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パターン解析系を構築した。今後、本方法のさらなる検討により、病原性大腸菌O-157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。さらには、NGSの導入によりロタウイルス全ゲノム塩基配列解析の効率を飛躍的に向上させることに成功した。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

- 1) [Fujii Y](#), Kitaura K, Matsutani T, Shirai K, Suzuki S, Takasaki T, Kumagai K, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, Hamada Y, Kurane I, Suzuki R: Immune-Related Gene Expression Profile in Laboratory Common Marmosets Assessed by an Accurate

- Quantitative Real-Time PCR Using Selected Reference Genes. PLoS ONE 2013, 8(2): e56296.
- 2) Murakami K, Kurihara C, Oka T, Shimoike T, Fujii Y, Takai-Todaka R, Park Y, Wakita T, Matsuda T, Hokari R, Miura S and Katayama K: Norovirus binding to intestinal epithelial cells is independent of histo-blood group antigens. PLoS ONE 2013, 8(6): e66534.
  - 3) Minami-Fukuda F, Nagai M, Takai H, Murakami T, Ozawa T, Tsuchiaka S, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Nishiura N, Sassa Y, Omatsu T, Furuya T, Koyama S, Shirai J, Tsunemitsu H, Fujii Y, Katayama K, Mizutani T.: Detection of Bovine Group A Rotavirus Using Rapid Antigen Detection Kits, RT-PCR and Next-Generation DNA Sequencing. J Vet Med Sci. 2013, 75(12): 1651-5
  - 4) Doan YH, Nakagomi T, Aboudy Y, Silberstein I, Behar-Novat E, Nakagomi O, Shulman LM. Identification by full genome analysis of a bovine rotavirus transmitted directly to, and causing diarrhea in a human child. J Clin Microbiol 51(1): 182-189, 2013
  - 5) Hoa Tran TN, Nakagomi T, Nakagomi O. Evidence for genetic reassortment between human rotaviruses by full genome sequencing of G3P[4] and G2P[4] strains co-circulating in India. Trop Med Health 41(1): 13-20, 2013
  - 6) Do LP, Nakagomi T, Doan YH, Kitahori Y, Nakagomi O. Molecular evolution of the VP7 gene of Japanese G2 rotaviruses before vaccine introduction. Arch Virol 159: 315-319, 2014
  - 7) Tatsumi M, Nagaoka Y, Tsugawa T, Yoto Y, Tsutsumi H. 2013. Characterization of the NSP4 gene of group A human rotavirus G1P[8] strains circulating in Sapporo, Japan from 1987 to 2000. J Med Virol 11 SEP DOI: 10.1002/jmv.23723.
  - 8) 辰巳正純. 2013. [連載]薬の知識 ロタテック (5 価経口弱毒生ロタウイルスワクチン). 臨床消化器内科 28 巻 11 号日本メディカルセンターp156-1563.
  - 9) Wang Y-H, Pang B-B, Zhou X, Ghosh S, Tang W-F, Peng J-S, Hu Q, Zhou D-J, Kobayashi N. Complex evolutionary patterns of two rare human G3P[9] rotavirus strains possessing a feline/canine-like H6 genotype on an AU-1-like genotype constellation. Infect Genet Evol, 2013, 16:103-112.
  - 10) Ghosh S, Urushibara N, Chawla-Sarkar M, Krishnan T, Kobayashi N. Whole genomic analyses of asymptomatic human G1P[6], G2P[6] and G3P[6] rotavirus strains reveal intergenogroup reassortment events and genome segments of artiodactyl origin. Infect Genet Evol, 2013, 16:165-173.
  - 11) Wang YH, Pang BB, Ghosh S, Zhou X, Shintani T, Urushibara N, Song YW, He MY, Liu MQ, Tang WF, Peng JS, Hu Q, Zhou DJ, Kobayashi N. Molecular epidemiology and genetic evolution of the whole genome of G3P[8] human rotavirus in Wuhan, China, from 2000 through 2013. PLoS ONE, 2014, in press.
  - 12) Komoto S, Kawagishi T, Kobayashi T, Ikizler M, Iskarpatyoti J, Dermody TS, Taniguchi K: A plasmid-based reverse genetics system for mammalian orthoreoviruses driven by a plasmid-encoded T7 RNA polymerase. J Virol Methods 196:36-39, 2013.
  - 13) Komoto S, Taniguchi K. : Genetic engineering of rotaviruses by reverse genetics. Microbiol Immunol 57(7):479-486, 2013
  - 14) Komoto S, Maeno Y, Tomita M, Matsuoka T, Ohfu M, Yodoshi T, Akeda H, Taniguchi K. Whole genomic analysis of porcine-like human G5P[6] rotavirus strain isolated from a child with diarrhea and encephalopathy in Japan. J Gen Virol. 94(7):1568-75, 2013.
  - 15) Kawamura Y, Ohashi M, Ihira M, Hashimoto S, Taniguchi K, Yoshikawa T: Nationwide survey of rotavirus-associated encephalopathy and

sudden unexpected death in Japan. Brain Dev. 2013

- 16) Ghosh S, Taniguchi K, Aida S, Ganesh B, Kobayashi N. Whole genomic analyses of equine group A rotaviruses from Japan: Evidence for bovine-to-equine interspecies transmission and reassortment events. Vet Microbiol. 2013;166(3-4):474-85.

#### 学会発表

- 3) 藤井克樹、村上耕介、戸高玲子、中込とよ子、中込治、片山和彦：ゲノム遺伝子型構成解析による網羅的ロタウイルス分子疫学基盤構築 第54回日本臨床ウイルス学会、2013年6月、倉敷
- 4) 西村直子、野口篤子、伊藤陽里、辰巳正純、大場邦弘、中込治、中込とよ子、藤井克樹、片山和彦：我が国で流行したロタウイルスの遺伝子型の全国分布（2012年） 第54回日本臨床ウイルス学会、2013年6月、倉敷
- 5) 伊藤陽里、中込とよ子、中込治、藤井克樹、片山和彦：京都府南丹地区におけるロタウイルス胃腸炎入院率 第54回日本臨床ウイルス学会、2013年6月、倉敷
- 6) 三浦忍、野口篤子、藤井克樹、中込治、片山和彦、中込とよ子、高橋勉：秋田県由利地区におけるロタウイルス胃腸炎による入院率 第54回日本臨床ウイルス学会、2013年6月、倉敷
- 7) 村上耕介、藤井克樹、戸高玲子、片山和彦：ノロウイルス小腸上皮細胞への結合メカニズムの解析 第54回日本臨床ウイルス学会、2013年6月、倉敷
- 8) 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25回学術集会、2013年11月、神戸
- 9) 藤井克樹、下池貴志、戸高玲子、片山和彦：ゲノム遺伝子型構成解析による網羅的ロタウイルス分子疫学研究（2012年） 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月、神戸
- 10) 高木弘隆、藤井克樹、小林宣道、棚林清、片山和彦：多様なA群ロタウイルス株に対応する感受性 MA104 細胞クローン樹立の試み 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月、神戸
- 11) 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：カリシウイルスのリバースジェネティクスシステムを用いた感染性粒子の研究 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月、神戸
- 12) 村上耕介、戸高玲子、朴英斌、藤井克樹、下池貴志、脇田隆字、栗原千枝、穂刈量太、松田幹、片山和彦：ノロウイルスの小腸上皮細胞への結合メカニズム 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月、神戸
- 13) 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間とそのゲノムRNAとの相互作用 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月、神戸
- 14) 中込治、中込とよ子。連続して流行する同一の遺伝子型（G12P[6]）内でのロタウイルス株の進化：ネパールでの分子疫学的観察。第54回日本臨床ウイルス学会、2013年6月、倉敷。
- 15) Doan YH, Gauchan P, 中込とよ子、中込治. Continued circulation of multiple G2 strains with virtually identical VP7 genes before vaccine introduction in Nepal. 第54回日本熱帯医学会大会、2013年10月、長崎
- 16) Tran ATL, 吉田レイミント, 中込とよ子, Gauchan P, 有吉紅也, Dang AD, 中込治, Vu TD. A high incidence of intussusception revealed by a retrospective hospital-based study in Nha Trang, Vietnam between 2009 and 2011. 第54回日本熱帯医学会大会、2013年10月、長崎
- 17) Doan YH, 中込とよ子、中込治. わが国で検出されたG2ロタウイルス株の全ゲノムレベルでの分子進化解析。第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月、神戸
- 18) 中込治、中込とよ子。ネパールにおけるロタ

ウイルス B の分子疫学. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月, 神戸

- 19) Nakagomi O, Alam MM, Pun SB, Gauchan P, Yokoo M, Doan YH, Hoa-Tran TN, Nakagomi T, Pandey BD. 2013, 11. The first identification of Rotavirus B from children and adults with acute diarrhoea in Kathmandu, Nepal. Vaccines for Enteric Diseases (VED 2013), Bangkok, Thailand.
- 20) Do LP, Nakagomi T, Nakagomi O. 2013, 1. Systematic Literature Review on the Global Distribution of Rotavirus Genotypes. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections (AARF) 2013, Tokyo.
- 21) Nakagomi O. 2013, 3. To what extent will selection pressure after mass rotavirus vaccination influence circulating rotavirus strains? 15th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim, Singapore
- 22) 辰巳正純: 日本の予防接種を考える, 第 17 回日本ワクチン学会学術集会総会、津市、12 月 1 日、2013
- 23) 小林宣道、Ghosh S、新谷つづみ、Wang Y-H、Zhou X、Pang BB. 全遺伝子配列に基づく中国の主流型 G3P[8] ヒトロタウイルスの 12 年間にわたる分子進化様態の解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2013 年 11 月 10 日、神戸.
- 24) 河本聡志、川岸崇裕、富田万祐子、小林剛、谷口孝喜: T7 RNA ポリメラーゼ発現プラスミドを用いたレオウイルスの遺伝子操作系. 第 61 回日本ウイルス学会、神戸、2013

#### G. 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    |   |

## II. 分担研究報告書

平成 25 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」

研究分担報告

わが国におけるロタウイルス株の遺伝子型分布：2012 年流行期

研究分担者	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
研究協力者	西村直子	江南厚生病院
	三浦 忍	由利組合総合病院
	伊藤陽里	公立南丹病院
	長谷川俊史	山口大学医学部小児科学講座

## 研究要旨

網羅的ロタウイルス分子疫学基盤構築とワクチン評価研究班の一環として、今後のワクチンの有効性評価の基礎データとするため、わが国に流行しているロタウイルス株の血清型（遺伝子型）の分布を全国 6 ヶ所に設けた協力病院の小児科入院患者の臨床検体を解析することにより明らかにした。すなわち、2012 年のロタウイルス流行期中に 132 のロタウイルス検体が得られたが、その VP7 遺伝子型は、G1 が 83 (63%)、G3 が 9 (7%)、G9 が 40 (30%) 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。すなわち、G/P 型の組み合わせでは G1 P[8]株が優勢であった。なお、この優勢な G1P[8]株が分子疫学的に極めて興味深い成り立ちの株であることが分かった。今後、ワクチンの接種率が高まるに連れて、接種率に地域差が大きく生じるようであれば、ロタウイルスの遺伝子型の分布に変化が起こる可能性があり、さらに地域を拡大して継続的な調査が必要であると考えられる。

## A. 研究目的

網羅的ロタウイルス分子疫学基盤構築とワクチン評価研究班の一環として、わが国に流行しているロタウイルス株の血清型（遺伝子型）の分布を明らかにし、今後ワクチンの使用による変化を評価するための基礎データとする。

## B. 研究方法

1. 供試検体：2012 年 2 月～7 月のロタウイルス胃腸炎流行期に全国 6 病院（愛知県江南厚生病院、秋田県由利組合総合病院、京都府公立南丹病院、北海道苫小牧市立病院、東京都昭和病院、山口県山

病院	遺伝子型	3月	4月	5月	6月	7月	遺伝子型合計	(%)
由利組合総合病院	G1		6	18	6	2	32	73
	G3		1	1			2	5
	G9	1	5	3	1		10	23
	病院計	1	12	22	7	2	44	100
公立南丹病院	G1		2	9			11	69
	G3		3				3	19
	G9		1	1			2	13
	病院計		6	10		0	16	100
江南厚生病院	G1		11	5	8	2	26	46
	G3		1	3			4	7
	G9		23	4			27	47
	病院計		35	12	8	2	57	100
苫小牧市立病院	G1			6			6	100
	病院計			6			6	100
昭和病院	G1		2	2	1		5	83
	G9		1				1	17
	病院計		3	2	1	0	6	100
山口大学附属病院	G1			2	1		3	100
	病院計			2	1		3	100
	G1		21	42	16	4	83	63
	G3		5	4	0	0	9	7
	G9	1	30	8	1		40	30
	合計	1	56	54	17	4	132	100

口大学附属病院) で入院加療した5歳未満のロタウイルス胃腸炎症例の便から検出されたロタウイルス。

2. ゲノム解析：便検体からロタウイルス RNA を抽出し、中和抗原をコードしている VP4 遺伝子分節と VP7 遺伝子分節の部分塩基配列を解析して遺伝子型を決定した。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

### C. 研究結果

2012年のロタウイルス流行期中に132のロタウイルス検体が得られた(江南厚生病院57、由利組合総合病院44、京都府公立南丹病院16、苫小牧市立病院6、昭和病院6、山口大学病院3)。VP7遺伝子型はG1が83(63%)、G3が9(7%)、G9が40

(30%)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。遺伝子型の分布は地域(病院)により多少の違いがみられたが、すべての地域でG1が優勢であり、かつ流行期全体にわたっていた。すなわち、G/P型の組み合わせではG1 P[8]株が優勢であった。なお、この優勢なG1P[8]株が分子疫学的に極めて興味深い成り立ちの株であることが分かった。

ロタウイルス胃腸炎の流行期は北の地域が南より遅れてピークを迎える傾向があった。年齢分布にG遺伝子型の違いによる差は認められなかった。

### D. 考察

今回の網羅的調査で、ロタウイルスの遺伝子型の分布には大きな地域差が存在しない可能性が高いことが分かった。これは、本研究班の研究の中で、同一診断基準により検査されたロタウイルス陽性検体にもとづく、京都府南丹地区および秋田県由利地区における入院率の比較において、約3倍の大きな開きがあることが分かったが、この違いが流行ウイルス株の違い(ウイルス株の毒力の違い)によるものであると明確に示唆するような結果は得られなかった。

今後、ワクチンの接種率が高まるに連れて、接種率に地域差が大きく生じるようであれば、ロタウイルスの遺伝子型の分布に変化が起こる可能性があり、さらに地域を拡大して継続的な調査が必要であると考えられる。



## E. 結論

ロタウイルスワクチンが第一の標的とする入院患者における遺伝子型分布は、G1 P[8]株が優勢であった。今後、ワクチンの接種率が高まるに連れて、ロタウイルスの遺伝子型の分布に変化が起こる可能性があり、継続的な調査が必要である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Doan YH, Nakagomi T, Aboudy Y, Silberstein I, Behar-Novat E, Nakagomi O, Shulman LM. Identification by full genome analysis of a bovine rotavirus transmitted directly to, and causing diarrhea in a human child. *J Clin Microbiol* 51(1): 182-189, 2013
- 2) Hoa Tran TN, Nakagomi T, Nakagomi O. Evidence for genetic reassortment between human rotaviruses by full genome sequencing of G3P[4] and G2P[4] strains co-circulating in India. *Trop Med Health* 41(1): 13-20, 2013
- 3) Do LP, Nakagomi T, Doan YH, Kitahori Y, Nakagomi O. Molecular evolution of the VP7 gene of Japanese G2 rotaviruses before vaccine introduction. *Arch Virol* 159: 315-319, 2014

### 2. 学会発表

- 1) 西村直子, 野口篤子, 伊藤陽里, 辰巳正純, 大場邦弘, 中込治, 中込とよ子, 藤井克樹, 片山和彦. 我が国で流行し

たロタウイルスの遺伝子型の全国分布. 第54回日本臨床ウイルス学会, 2013年6月, 倉敷.

- 2) 中込治, 中込とよ子. 連続して流行する同一の遺伝子型 (G12P[6]) 内でのロタウイルス株の進化: ネパールでの分子疫学的観察. 第54回日本臨床ウイルス学会, 2013年6月, 倉敷.
- 3) Doan YH, Gauchan P, 中込とよ子, 中込治. Continued circulation of multiple G2 strains with virtually identical VP7 genes before vaccine introduction in Nepal. 第54回日本熱帯医学会大会, 2013年10月, 長崎
- 4) Tran ATL, 吉田レイミント, 中込とよ子, Gauchan P, 有吉紅也, Dang AD, 中込治, Vu TD. A high incidence of intussusception revealed by a retrospective hospital-based study in Nha Trang, Vietnam between 2009 and 2011. 第54回日本熱帯医学会大会, 2013年10月, 長崎
- 5) Doan YH, 中込とよ子, 中込治. わが国で検出された G2 ロタウイルス株の全ゲノムレベルでの分子進化解析. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 2013年11月, 神戸
- 6) 中込治, 中込とよ子. ネパールにおけるロタウイルス B の分子疫学. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 2013年11月, 神戸
- 7) Nakagomi O, Alam MM, Pun SB, Gauchan P, Yokoo M, Doan YH, Hoa-Tran TN, Nakagomi T, Pandey BD. 2013, 11. The first identification of Rotavirus B from children and adults with acute

diarrhoea in Kathmandu, Nepal.  
Vaccines for Enteric Diseases (VED  
2013), Bangkok, Thailand.

- 8) Do LP, Nakagomi T, Nakagomi O. 2013,  
1. Systematic Literature Review on  
the Global Distribution of Rotavirus  
Genotypes. Asian-African Research  
Forum on Emerging and Reemerging  
Infections (AARF) 2013, Tokyo.
- 9) Nakagomi O. 2013, 3. To what extent  
will selection pressure after mass  
rotavirus vaccination influence

circulating rotavirus strains? 15th  
International Conference on  
Emerging Infectious Diseases (EID)  
in the Pacific Rim, Singapore

#### G. 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

平成 25 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」

研究分担報告

わが国におけるロタウイルス胃腸炎による入院率と地域差の存在：京都府南丹地区および秋田県由利地区における入院率の比較

研究分担者	中込とよ子	長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・感染免疫学講座
研究協力者	伊藤陽里	公立南丹病院
	三浦 忍	由利組合総合病院
	野口篤子	秋田大学・大学院医学系研究科・小児科学講座
	高橋 勉	

## 研究要旨

網羅的ロタウイルス分子疫学基盤構築とワクチン評価研究班の一環として、今後のワクチンの有効性評価の基礎データとするため、京都府南丹地区および秋田県由利地区におけるロタウイルス胃腸炎による入院率を同一の診断基準および同一の検査で診断し、それぞれ、3.9 人/1000 人・年および 11.4 人/1000 人・年と算出された。すなわち、京都府南丹地区のロタウイルス胃腸炎による入院率は、秋田県由利地区の約 3 分の一に相当する入院率であることが分かり、ロタウイルス胃腸炎の入院率には明らかな地域差が存在することが示された。また、わが国では 5 歳になるまでに、約 20 人から 50 人に 1 人がロタウイルス胃腸炎に罹患し、その治療のために、入院を余儀なくされていると推測された。

### A. 研究目的

網羅的ロタウイルス分子疫学基盤構築とワクチン評価研究班の一環として、京都府南丹地区および秋田県由利地区におけるロタウイルス胃腸炎による入院率を算出し、今後のワクチンの有効性評価の基礎データとする。

### B. 研究方法

1. 京都府南丹地区における疫学調査：2010/3～2012/2 の症例は電子カルテを後方視的に調査した。この期間のロタウイルス胃腸炎は、便中のロタウイルス抗原陽性（SRL にて ELISA で測定）であった急性胃腸炎とし、検査未施行例については、ロタウイルス流行期（1 月～6 月）と

非流行期（7月～12月）のロタウイルス陽性率で補正した。

2012/3以降のロタウイルス胃腸炎は急性胃腸炎（24時間以内に3回以上の通常よりゆるい便が3回以上あるか、他の疾患で説明できない激しい嘔吐がある発症後7日以内の症例）の全症例から得た便検体を感染研に送付し、ELISAでのロタウイルス抗原陽性をもってロタウイルス胃腸炎と定義した。検討期間はⅠ期：2010/3～2011/2、Ⅱ期：2011/3～2012/2、Ⅲ期：2012/3～2012/2とした。

公立南丹病院の医療圏の小児はほぼ全例が当院で入院加療を行っていることからこの地区の5歳未満人口(5128人)を母集団として入院率を算出した。

## 2. 秋田県由利地区における疫学調査：

2012年2月～2013年1月の1年間に急性胃腸炎（24時間以内に3回以上の通常よりゆるい便が3回以上あるか、他の疾患で説明できない激しい嘔吐がある発症後7日以内の症例）と診断し、由利組合総合病院で入院加療を要した5歳未満児72症例を対象とした。このうち、感染研において被検者の便検体からロタウイルスが検出された症例をロタウイルス胃腸炎とした。由利組合総合病院の医療圏(由利本荘市、にかほ市)の小児はほぼ全例が当院で入院加療を行っていることから両市の5歳未満人口(3853人)を母集団として入院率を算出した。市外在住の症例、入院後発症例は除外した。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在

せず、倫理面への配慮は不要である。

## C. 研究結果

1. 京都府南丹地区での疫学調査の結果：急性胃腸炎と診断された5歳未満の症例は173例（Ⅰ期：77例、Ⅱ期：56例、Ⅲ期：40例）で、検査未施行例を補正したロタウイルス胃腸炎はⅠ期：37.8例（42.2%）、Ⅱ期：26.7例（47.7%）、Ⅲ期：20例（50%）となり、急性胃腸炎入院患者の半数はロタウイルス胃腸炎だった。公立南丹病院は医療圏内唯一の総合病院で、5歳未満の入院例はほぼ全て管理していることからⅢ期におけるロタウイルス胃腸炎入院率は3.9人/1000人・年と算出された。Ⅲ期におけるロタウイルス胃腸炎18例（90%）は6～35ヶ月児で、6ヶ月未満の患児はいなかった。

## 2. 秋田県由利地区での疫学調査の結果

急性胃腸炎と診断された72例中68例から検体が得られた。ウイルスの流行期である2月から7月までのシーズン中の解析症例は68例であり、便ロタウイルス検査により44例(65%)で陽性であった。1年間のロタウイルス入院率は11.4人/1000人・年で、5歳未満児の20人に1人がロタウイルス腸炎で入院していると推測された。ロタウイルス陽性者の82%が、ワクチン接種標的月齢である6-35カ月に集中していた。

## D. 考察

本研究班の統一基準によって明らかになった京都府南丹地区でのⅢ期のロタウイルス胃腸炎入院率は3.9人/1000人・年