

は、秋田県由利地区における入院率である 11.4 人/1000 人・年の約 3 分の一に相当する入院率であり、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。

一方、京都府南丹地区においても秋田県由利地区においても、過去に発表した後方視的調査よりやや小さい入院率（南丹地区では 5.1 人/1000 人・年、由利地区では 13.7 人/1000 人・年）となっているが、地域差に関しては、ほぼ同様の結果が得られた。

すなわち、本研究班でロタウイルス胃腸炎の入院率を出せるのは、公立南丹病院と秋田の由利組合総合病院の 2 か所だけである。この 2 病院を定点とした疫学調査によって、すでに論文を公表しているが、すでに公表した後方視的調査からの推定値と同様の結果が出たということは、大きな意義がある。

E. 結論

わが国の 5 歳未満児におけるロタウイルス胃腸炎による入院率には地域差があるが、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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakagomi T, Doan YH, Dove W, Ngwira B, Iturriza-Gómara M, Nakagomi O, Cunliffe NA. G8 rotaviruses with conserved genotype constellations detected in Malawi over 10 years

(1997–2007) display frequent gene reassortment among strains co-circulating in humans. *J Gen Virol* 94 (6): 1273–1295, 2013

- 2) Nakagomi T, Kato K, Tsutsumi H, Nakagomi O. The burden of rotavirus gastroenteritis among Japanese children during its peak months: an internet survey. *Jpn J Infect Dis* 66 (4): 269–275, 2013
- 3) Gauchan P, Nakagomi T, Sherchand JB, Yokoo M, Pandey BD, Cunliffe NA, Nakagomi O. Continued circulation of G12P[6] rotaviruses over 28 months in Nepal: successive replacement of predominant strains. *Trop Med Health* 41 (1): 7–12, 2013

2. 学会発表

- 1) Nakagomi T. 2013, 3. G8 rotaviruses with conserved genotype constellations detected in Malawi over 10 years display frequent gene reassortment among strains co-circulating in humans. 15th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim, Singapore.
- 2) Doan YH, Nakagomi T, Nakagomi O. 2013, 3. Genomic characterization of the first G8 human rotavirus detected in Japan. 15th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim, Singapore.
- 3) Gauchan P, Sasaki E, Nakagomi T,

- Nakagomi O. 2013, 1. Re-appraisal of the Burden of Rotavirus Hospitalization in Vietnam. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections (AARF) 2013, Tokyo.
- 4) Nakagomi T, Nakagomi O. Estimating the risk of intussusceptions during the first week after the first dose of the monovalent human rotavirus vaccine to Japanese infants 6-20 weeks of age. Vaccines for Enteric Diseases (VED 2013), Bangkok, Thailand.
- 5) 大城亮作, 中込とよ子, 中込治. 成人の急性下痢症におけるロタウイルス A の陽性割合 : a systematic review. 第 54 回日本臨床ウイルス学会, 2013 年 6 月, 倉敷
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 中込とよ子, 中込治, 堤裕幸, 加藤一也. アンケート調査により得た直接非医療費と生産性損失に基づくロタウイルスワクチン予防接種の費用対効果. 第 17 回日本ワクチン学会学術集会, 2013 年 11 月, 津
- 9) 中込とよ子, 中込治. Super-short pattern をもつ特異なヒトロタウイルス AU19 の全ゲノムレベルでの解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月, 神戸
- 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

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

研究分担者 小林宣道 札幌医科大学医学部衛生学講座
研究協力者 ゴッシュ ソウ 札幌医科大学医学部衛生学講座
ビック

研究要旨

ロタウイルスは小児下痢症の主要な原因ウイルスであり、その重症化の予防のためワクチンが世界的に用いられている。またロタウイルスは哺乳動物、鳥類に広く分布し、稀に異なる動物種間での伝播が起こることが報告されている。今年度の本研究では(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することを目的とした。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ていることが示唆された。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された。

A. 研究目的

ロタウイルス(A群)は5歳未満の小児における重症下痢症の主要な原因ウイルスであり、先進国、発展途上国を問わず世界中に広く分布している。また広く哺乳動物、鳥類にも分布している。ロタウイルスはレオウイ

ルス科の一員であり、11本の分節化した2本鎖RNAをゲノムとして有する。ウイルス粒子の最外層を構成する2種の構造蛋白VP7、VP4の遺伝子配列により遺伝子型(各々G型、P型)が区別され、ロタウイルスの疫学的調査に用いられている。ヒトではG1-G4, G9, P[4],

P[6], P[8]が普遍的に多いことが知られ、それぞれの動物種においても高頻度にみられる遺伝子型がある。ヒトロタウイルスには2種類の主要な遺伝子群、Wa および DS-1 遺伝子群があり、そのほか比較的稀に見られる AU-1 遺伝子群が知られる。今年度の本研究では、最近 10 年以上にわたり中国において主要な遺伝子型である G3P[8]ヒトロタウイルス、中国で検出された G3P[9] 型ヒトロタウイルス株を対象とし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することを目的とした。

B. 研究方法

1. 材料

中国の G3P[8]、G3P[9]ロタウイルスは、共同研究機関である湖北省・武漢市疾病対策予防センターにおいて収集・保管されているものを用いた。同センターでは市内 5 か所の病院から下痢便検体を供与されており、ロタウイルスの検出と G/P 型別が行われている。本研究においては、2000 年から 2013 年まで、毎年概ね 1-3 株の G3P[8]ロタウイルスをランダムに選び、計 33 株を対象として解析した。G3P[9] 株は、上記の期間で検出されたのは 2 株のみ (2006 年および 2011 年) であり、これらを研究対象とした。

2. 方法

ウイルス RNA は QIAamp Viral RNA mini kit により抽出し、RT-PCR により各ロタウイルス遺伝子の全長または互いに重複する末端配列を有し全長をカバーする複数の部分配列を増幅した。PCR 産物は Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System により精製し、BigDye

Terminator ver. 3.1 cycle sequencing kit を用いてダイデオキシ法によるシーケンス反応を行い、配列を ABI Prism 3100 genetic analyzer により決定した。得られた遺伝子配列は、GenBank に登録されている代表的な G 型、P 型ヒトロタウイルス株、動物ロタウイルスの配列情報と比較し、MEGA ver. 5 を用いて多数の既知遺伝子配列とともに系統解析を行った。

(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. 結果 1

解析した 33 株はすべて G3-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1 遺伝子型を有し、Wa 様遺伝子群に属していた。全 11 分節の塩基配列は、一部の株を除き互いに高い一致率 (>95%) を示した。VP6 遺伝子、NSP1 遺伝子、NSP2 遺伝子、NSP3 遺伝子では株間での多様性が認められた (一致率: 83-100%)。VP7, VP2, VP3 遺伝子はすべての株が単一の系統に属し、一致率は極めて高かった (98-100%)。各遺伝子分節の主系統は本研究の全期間 (約 12 年間) 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、さまざまなアレル配座 (allele constellation) が見られた。最も顕著な変化が見られたのは NSP1 遺伝子であった。解析された多くの G3P[8] 株はポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) では類似した RNA パターンを示したが、泳動度が

大きく異なる 2 種類の第 5 遺伝子分節 (NSP1 遺伝子) が観察され、泳動度の遅いもの、早いものをそれぞれ E-A1-1、E-A1-2 と名付けた。E-A1-1 は研究期間全体を通じて認められたが、E-A1-2 は 2006-2007 シーズンに現れ急増したものの 2009-2010 年以降減少していった。E-A1-1、E-A1-2 の NSP1 遺伝子は、系統樹ではそれぞれ A1-1、A1-2 の系統に分類された。A1-1 はさらに 2 つの亜系統 A1-1a、A1-1b に区別された。A1-1 系統には Y0 株をはじめ米国の G3P[8] 株や古い G1P[8] 株が含まれ、古くから維持されてきた系統であると考えられた。A1-2 系統には比較的新しい G1, G3, G9, G12 株が含まれ、A1-1 より後に拡がった系統であると考えられた。異なる遺伝子分節で非主系統が同時に存在する株が少数見られた (例: VP1 と NSP2 遺伝子、VP4 と VP6 遺伝子、など)。しかし多くの株では、各遺伝子分節における非主系統への置換は遺伝子分節間で規則性はなく、分節毎に独立して起きていることが示唆され、それら非主系統の遺伝子の多くは中国以外の G3 または他の遺伝子型株とクラスターを形成していた。

2. 結果 2

G3P[9] ロタウイルス 2 株 (L621 および E2451) の遺伝子型は、G3-P[9]-I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H6 であった。これら 2 株の VP1, VP3, VP4, VP6, NSP2, NSP5 遺伝子は遺伝学的にきわめて近く高い一致率 (>97%) を示したが、VP7 と NSP1 遺伝子ではやや低く、さらに低い一致率は VP2 (87%), NSP3 (86%) and NSP4 (92%)

の各遺伝子で見られた。系統遺伝学的に AU-1 遺伝子群のプロトタイプ AU-1 株と同じクラスターに属した遺伝子は、L621 株では VP4, VP6, NSP1 遺伝子、E2451 株では VP2, VP4, VP6, NSP1, NSP3, NSP4 遺伝子のみであった。これら 2 株の VP4, VP7, NSP4 遺伝子は典型的なネコ/イヌロタウイルスのそれにきわめて近く、VP1, VP3, VP6, NSP3, NSP5 遺伝子もネコ/イヌロタウイルスと共通の起源をもつと考えられた。2 株の NSP1 遺伝子はグアナコのロタウイルスと高い一致率を示し、L621 株の VP2 遺伝子はウマ、サル、ウサギロタウイルスと、2 株の NSP2 遺伝子はウサギロタウイルスとクラスターを形成していた。

D. 考察

G3P[8] ヒトロタウイルス株の分子疫学的研究は、主流株の全ゲノムにおける変異を長期間解析したものであり、アジアでは初めての研究である。これにより、G3P[8] ヒトロタウイルスが同時期の Wa 遺伝子群ロタウイルスとの間でリアソートメントを起こしながら変異を蓄積させてきた様態が明らかとなった。またリアソートメントを起こした遺伝子は主に非構造蛋白遺伝子であり、自然界ではより頻繁に変異が起きていると考えられた。中でも NSP1 遺伝子の変化は顕著であり、A1 遺伝子型に属する一つのクラスターの増加が数年間観察され、集団免疫の回避やウイルス増殖における何らかの利点を獲得したことが推測される。VP4 ではクラスターの変化が見られたものの、VP7 は観察期間を通じて変化は見られず、遺伝学的

にきわめて安定であると考えられた。ロタウイルスの優勢な G/P 型が数年間持続した後、他の型に置き換わることはよく報告されており、これは優勢な型に対する免疫応答が集団において高まることが一因と理解されている。しかし中国の G3 ロタウイルスでは長年これが優勢でありつつも VP7 遺伝子は変化を見せておらず、その後 G1, G9 へと主要な型がシフトしている。このことは VP7 への免疫応答が優勢な G 型の変化の主たる要因ではないことを示唆している。

G3P[9]はヒトロタウイルスにおける稀な AU-1 遺伝子群において特徴的な G/P 型である。AU-1 株の遺伝子型は G3-P[9]-I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3 であるが、今回の解析で NSP5 遺伝子型 H6 も H3 とともに AU-1 遺伝子群ヒトロタウイルスで一般的な型であることが示された。また AU-1 遺伝子群に属する株は、ネコ/イヌロタウイルス株との関連が強く、それらからの直接伝播や共通の祖先ウイルスから分子進化した可能性が考えられるほか、ウマやウサギなど他の動物に由来または関連する遺伝子分節も含まれていると考えられた。したがって AU-1 遺伝子群のロタウイルスはネコ/イヌ及びその他の動物種のロタウイルスの遺伝子分節が再集合による、複雑な遺伝学的背景を有すると考えられた。

E. 結論

中国・武漢市における主流型 G3P[8] ヒトロタウイルスを 12 年間にわたり追跡し、その全遺伝子の分子進化を解析した。その結果、非構造蛋白遺伝子を中心にリ

アソートメントにより変異が蓄積する様態が明らかとなった。AU-1 遺伝子群に属する 2 株の G3P[9] ヒトロタウイルスの全遺伝子を解析した結果、AU-1 遺伝子群のロタウイルスが、ネコ/イヌをはじめその他の動物種のロタウイルスに起源を持つ遺伝子分節により成り立っていることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.

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.

2. 学会発表

- 1) 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

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

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

研究分担者 谷口 孝喜 藤田保健衛生大学医学部ウイルス・寄生虫学
研究協力者 河本 聡志 藤田保健衛生大学医学部ウイルス・寄生虫学

研究要旨

ロタウイルスと同じレオウイルス科に属するレオウイルスについては、cDNA のみから感染性ウイルスを調製することが可能である。ロタウイルスのリバーシジェネティクスの改良にあたり、レオウイルスの系はそのモデルとなり得る。一方、レオウイルスの系においても、T7RNA ポリメラーゼの供給には、組換えワクシニアウイルスの利用、あるいは、T7 RNA ポリメラーゼ発現 BHK 細胞の利用を必要としている。そこで、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した。

A. 研究目的

ロタウイルスのリバーシジェネティクスは、ヘルパーウイルスの利用、ts 変異株の利用、リアレンジ株の利用と、T7RNA ポリメラーゼを発現するワクシニアウイルスの利用などを必要とし、cDNA のみによるシステムはまだ開発されていない。哺乳類オルソレオウイルス（レオウイルス）は、10 本の分節二本鎖 RNA (dsRNA) をゲノムとして保有し、多分節 dsRNA ウイルスの複製機構および病原性を解析する上で優れたモデルである。近年、cDNA のみから感染性レオウイルスの作製を可

能にする遺伝子操作系が開発され、従来の系では困難であった任意のウイルスゲノム改変を可能にした。T7 RNA ポリメラーゼを発現している培養細胞にレオウイルスゲノムをコードする T7 プラスミドを導入することで、感染性レオウイルスを作製できる。これまで、T7 RNA ポリメラーゼの供給は、組換えワクシニアウイルス rDIs-T7pol あるいは BHK-T7 細胞の使用に限られてきた。本研究では、さらに幅広く応用できる 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。

B. 研究方法

1. 材料

レオウイルス 3 型 (T3D) およびそのゲノムである 10 本の遺伝子に対する T7 プラスミドは、Vanderbilt University、Dermody 博士より供与された。

2. 方法

レオウイルス 3 型 (T3D) のゲノムをコードする 10 個の T7 プラスミドと T7 RNA ポリメラーゼ発現プラスミド pC-T7pol を L929 細胞あるいは BHK-21 細胞に共導入し、5 日間培養後にプラークアッセイで組換えレオウイルスを回収した。

(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

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 (~ 10 PFU/ml)。

次に、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した (10^3 PFU/ml)。

D. 考察

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が確立された。理論上は、この系はあらゆる培養細胞に適用可能であり、レオウイルス増殖過程の解析のみならず、安全性

が確認された細胞株を用いることで、医療用レオウイルスベクターの開発といった臨床応用にも役立つと期待される。現在、さまざまな細胞株を用いてこの遺伝子操作系の適用を試みている。

E. 結論

これまで報告されていない、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が確立された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) Komoto S, Taniguchi K.: Genetic engineering of rotaviruses by reverse genetics. *Microbiol Immunol* 57(7):479-486, 2013
- 3) Komoto S, Maeno Y, Tomita M, Matsuoka T, Ohfu M, Yodoshi T, Akeda H, Taniguchi K. Whole genomic analysis of aporcine-like human G5P[6] rotavirus strain isolated from a child with diarrhea and encephalopathy in Japan. *J Gen Virol.* 94(7):1568-75, 2013.
- 4) 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

- 5) 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.

2. 学会発表

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

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

「ロタウイルス分子疫学基盤構築とワクチン評価」

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

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となって混沌とした傾向を示した。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。このことから疫学調査継続の必要性、重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、G2P[4]株、G3P[8]株、G4P[8]株、G9P[8]株でロタウイルス全検出の 9 割以上を占め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、また一部の地域では G2P[4]株の台頭が報告されてきている。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 年間分の便検体について後方視的な疫学研究を企画した。また今後日本での G2P[4]株の台頭に備え G2P[4]株 VP7 遺伝子について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児3218検体で迅速診断キット（イムノクロマト法）によりA群ロタウイルス陽性と判明した736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G2P[4]株を抽出し全VP7遺伝子のシーケンスを行い系統解析を行った。また系統解析で分類した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。

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]株が入れ替わって優先株となり混沌とした傾向を示した。

[札幌市ロタウイルスG2P[4]株VP7遺伝子の解析]

1987年から2010年度までの札幌市のG2P[4]株VP7遺伝子の解析では20年を隔てて検出された株すべてが同じ系統IVに属しその安定性を示した。さらに系統IV亜系の調査では近年世界で優占株を占めている亜系統IVa-1とIVa-3が、札幌市でも同様に検出された。アミノ酸解析では可変領域を中心に変異を起こしてい

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G2P[4]株VP7遺伝子を解析した。札幌市G2P[4]株VP7遺伝子の系統樹解析では20年を隔てて検出された株は、全て同じ系統IVに属しており、G1P[8]株VP7遺伝子とは異なり、比較的安定した株の印象を受けた。近年世界で検出されているG2P[4]株をみると亜系統IVa-1とIVa-3に多く分布している。札幌市で近年検出されたG2P[4]株も同じ亜系統にすべて属しているため、G2P[4]株は世界と同様に進化、分布していることが伺える。G1P[8]株VP7遺伝子と比べると検出された検体が全て同じ系統に属したG2P[4]株VP7遺伝子は、とても安定した印象を受けるが、アミノ酸解析では可変領域を中心に変異が確認されたため、今後も継続的に遺伝子の変遷を確認することが重要と考えられた。ワクチン導入に伴い今後日本でもG2P[4]株台頭の可能性は残るため、G2P[4]株含めたロタウイルス血清疫学調査の重要性が改めて再確認された。

E. 結論

札幌市で長期的に観察したロタウイルスG2P[4]株VP7遺伝子の解析では、可変領域を中心とした変異が確認され、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) 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.

2) 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.

2. 学会発表

1) 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

家畜における A 群ロタウイルスの分子疫学調査

研究分担者	水谷 哲也	東京農工大学農学部
	長井 誠	東京農工大学農学部
研究協力者	大松 勉	東京農工大学農学部
	土赤 忍	東京農工大学農学部
	大場 真己	東京農工大学農学部
	福田 藤子	石川県南部家畜保健衛生所
	宮元 みち子	石川県南部家畜保健衛生所
	高井 光	石川県南部家畜保健衛生所
	村上 俊明	石川県南部家畜保健衛生所
	早川 裕二	石川県南部家畜保健衛生所
	小澤 正	石川県南部家畜保健衛生所
	小原 潤子	北海道立畜産試験場
	小池 新平	栃木県北家畜保健衛生所
	山口 修	栃木県北家畜保健衛生所
	佐藤 満雄	栃木県南家畜保健衛生所
	会田 恒彦	新潟県中央家畜保健衛生所
	石田 秀志	新潟県上越家畜保健衛生所
	赤松 裕久	静岡県畜産技術研究所
	増田 恒幸	鳥取県倉吉家畜保健衛生所
	岸 昌生	近畿大学農学部生石農場
	青木 博史	日本獣医生命科学大学獣医学部
	田中 知己	東京農工大学農学部
	神田修平	東京農工大学農学部
	小林 優	東京農工大学農学部
	恒光 裕	動物衛生研究所
	根本 学	日本中央競馬会競走馬総合研究所

研究要旨

A 群ロタウイルス (RV) は稀に異なる動物種間で感染することがあり、ヒトあるいは動物の体内で混合感染することにより遺伝子分節を交換する遺伝子再集合を起こすことが知られている。また、ウシ RV を親株に用いたヒト用 RV ワクチン RotaTeq が、平成 24 年夏より我が国での接種が開始され、ウシを飼養している農場への侵入を監視する必要性が生じている。そこで本研究では、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。ウシ RV の分子疫学調査では、今回開発した RV 感染症との識別を行うリアルタイム RT-PCR を応用するために、類症鑑別に応用すべく条件を検討中である。遺伝子解析では、我が国のウシ RV 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、全ての遺伝子分節はいずれもウシ RV 由来の遺伝子型であり、ウシ RV どちらの遺伝子再集合で出現した株と考えられた。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、多くの株の NSP4 はウシ型であることが判明し、NSP4 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有な例と考えられた。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。

A. 研究目的

A 群ロタウイルス (RV) はレオウイルス科に属し、11 本の 2 本鎖 RNA を遺伝子として保有する。ウイルス粒子の最外殻を構成する 2 種類の構造蛋白は、宿主に免疫誘導を起こすため、この蛋白 VP7 及び VP4 をコードする遺伝子の型で分類されている。しかし近年、稀に RV は異なる動物種間で感染し、遺伝子分節を交換する遺伝子再集合を起こすことがあり、全ての遺伝子分節の解析が必要という考え方

から全遺伝子分節に基づく遺伝子型の分類が提唱された。

平成 24 年度に我々は、ウシ RV 株を親株としたヒト用 RV ワクチン RotaTeq の我が国での接種開始を受け、このワクチン株がウシを飼養する農家へ侵入することを監視するため、畜産現場で効率よくウシ RV を検出し、解析する系を確立した。今年度はそれに加えて、RV 感染症との類症鑑別を可能とするため、ウシの下痢症を診断できるリアルタイム RT-PCR の系の

作出を試みた。

さらに、昨年確立した次世代シーケンスによるRV全遺伝子解析法を利用してウシ、ウマ及びブタRVの全遺伝子配列を決定し、解析を行った。

B. 研究方法

1. 材料

[ウシRVとの鑑別検査]

ウシRV感染症と類症鑑別を要する病原体を15種類選定した。B群ロタウイルス(GBR)、C群ロタウイルス(GCR)、牛トロウイルス(BToV)、哺乳類オルソレオウイルス(MRV)及びアイメリア(*Eimeria zuernii*、*Eimeria bovis*)に対する特異的プライマー及びプローブをGenBankに登録されている配列を元に設計した。また、牛エンテロウイルス(BEV)、牛コロナウイルス(BCV)、牛白血病ウイルス(BLV)、牛ヘルペスウイルス1(BHV-1)、牛アデノウイルス(BAV)、サルモネラ(*S. Dublin*、*S. Enteritidis*、*S. Typhimurium*)、*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*、*Clostridium perfringens*、*Cryptosporidium parvum*、毒素原性大腸菌(ETEC)及び内部コントロールである β -Actinについては既報のものを使用した(表1)。

[家畜のRVの全遺伝子解析]

1982年から2014年にかけて分離あるいは検出されたウシRV36株、ウマRV24株及びブタ8株を使用した。

2. 方法

[ウシRVとの鑑別検査]

それぞれのプライマー及びプローブ領域の塩基配列を含むDNA(gBlocks® Gene

Fragments:IDT社)の希釈系列(5.0×10^6 コピー/reaction ~ 1.0×10^0 コピー/reaction)を作成し、Real-time PCRの感度を検証した(n=2)。リアルタイムPCRの機器はLightCycler nano(Roche)を用いた。DNAを対象とする反応にはPremix Ex Taq(Perfect Real time: TaKaRa社)、RNAを対象とする反応にはOne step PrimeScript RT-PCR Kit(Perfect Real time: TaKaRa社)を使用し、反応条件は全て45°C300秒、95°C30秒の後、95°C5秒、55°C20秒、72°C20秒を40サイクル行った。

[家畜のRVの全遺伝子解析]

次世代シーケンスのライブラリーの作成は、ウイルスRNAをISOGEN LS(ニッポンジーン)で抽出し、DNaseIで処理した後、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

1. 結果1

[ウシRVとの鑑別検査]

作出した系について、対象としたすべての病原体に対する検出感度の検証したところ、 5.0×10^2 ~ 1.0×10^0 コピー/reactionと感度の高いことが示された。現在、類症鑑別に応用するために条件を検討中である。

2. 結果2

我が国のウシRV35株はG6/G10-P[5]/P[11]-I2-R2-C2-M2-A3/A13-N2-T6-E2-H3の典型的なウシの遺伝子型

を示し、RotaTeq あるいはヒト RV の遺伝子分節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を示したが、G15、P[14] 及びその他の遺伝子分節 (I2-R2-C2-M2-A3-N2-T6-E2-H3) のいずれもウシ RV 由来の遺伝子型であった (図 1)。ウマ RV は、調査した 24 株全てが G3/G14-P[12]-I2/I6-R2-C2-M3-A10-N2-T3-E2-H7 の典型的なウマ型であり、ヒト RV 遺伝子分節は確認されなかった。我が国で分離されたウマ RV 株 HH-22 株は NSP4 においてウシ型のクラスターに分類されたと報告されている (Ghosh ら, 2013)。このことから、NSP4 について系統樹解析を行ったところ、24 株中 20 株の NSP4 はウシあるいはウシ型の RV で構成されるクラスターに分類された (図 2)。ブタ RV については調査した 8 株は G4/G5/G9-P[6]/P[7]/P[13]/P[19]/P23]-I5-R1-C1-M1-A8-N1-T1-H1/H2 の遺伝子型を示した。この中の 1 株の NSP5 遺伝子はヒト RV にしか報告のない H2 型であった。

D. 考察

ウシ RV との鑑別のために開発したリアルタイム RT-PCR の系は、ウシの下痢症の診断に有効であり、これを用いて効率的にウシ RV の検出が可能と考えられたことから、ウシ RV のサーベイランスを効率的に実施できる補助手段と考えられた。現在、類症鑑別に応用するために条件を検討中である

ウシ RV の全遺伝子解析では、RotaTeq やヒト RV の遺伝子分節は認められなかった。新たな遺伝子型の組み合わせである G15-P[14] 株においてもその他の遺伝子

分節が全てウシ RV の型であったため、ウシ RV どちらの遺伝子再集合で出現した RV と考えられた。

NSP4 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ことが報告されている。今回、我が国のウマ RV の多くの株に認められたウシ型 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有な例と考えられた。

ブタ RV の 1 株の遺伝子型は、G5-P[7]-I5-R1-C1-M1-A8-N1-T1-E1-H2 であり、NSP5 の遺伝子型 H2 はヒト RV しか報告がない。それ以外はブタ RV の遺伝子型であることから、ブタ RV とヒト RV との遺伝子再集合の結果生じた株である可能性が考えられた。

E. 結論

ウシ RV 以外のウマ RV 及びブタ RV において、他種 RV 間との遺伝子再集合の可能性のある株が認められた。特にブタ RV に認められた NSP5 はヒト RV でしか報告のない型であり、ヒトと家畜において RV の感染や伝播があることが示唆された。このことから、今後も家畜の RV について監視を継続していく必要があると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

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

表1. ウシロタウイルスとの標的病原体

BEV
BCV
GCR
GCR
BToV
MRV
BLV
BHV-1
BAV
S. Dublin
S. Enteritidis
S. Typhimurium
Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis
Clostridium perfringens
Cryptosporidium parvum
ETEC
Eimeria zuernii/bovis
β-ACTIN

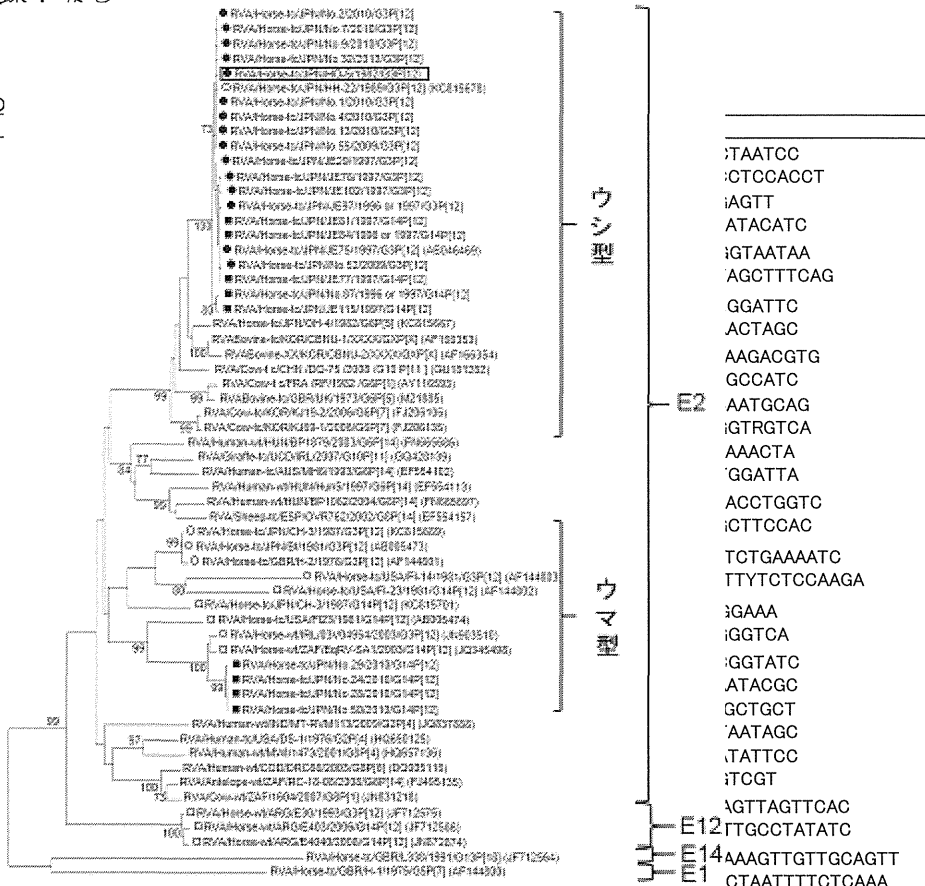


図2. 我が国のウマRVのNSP4における系統樹

ITS1	TGGCGTGTGTGGATAGTAACTG(zuernii) GCCTTATGGATAGTAACTGCTCC(bovis)	TGTGTATACACATMCATCCAACCT GACCACAGTGTGGAAATGC
Actin	TCGCTGCCACCTCCAGCAGATGT	AGCGCAAGTACTCCGTGTG CGGACTCATCGTACTCCTGCTT

1997年分離株

- G6 -P[5] -I2-R2-C2-M2-A3-N2-T6-E2-H3
- G6 -P[11] -I2-R2-C2-M2-A3-N2-T6-E2-H3
- G6 -P[11]-I2-R2-C2-M2-A13-N2-T6-E2-H3
- G10-P[11]-I2-R2-C2-M2-A13-N2-T6-E2-H3

2012年、2013年分離(検出)株

- G6 -P[5] -I2-R2-C2-M2-A3-N2-T6-E2-H3
- G6 -P[5] -I2-R2-C2-M2-A13-N2-T6-E2-H3
- G6 -P[11] -I2-R2-C2-M2-A3-N2-T6-E2-H3
- G10-P[11]-I2-R2-C2-M2-A3-N2-T6-E2-H3
- G10-P[11]-I2-R2-C2-M2-A13-N2-T6-E2-H3
- G15-P[14] -I2-R2-C2-M2-A3-N2-T6-E2-H3

図1. 我が国のウシRVの遺伝子型

マイクロチップ電気泳動によるロタウイルスの型分類

研究分担者 下池 貴志¹⁾、村上 耕介¹⁾、藤井 克樹¹⁾

研究協力者 Francis, E.Denis^{1,2)}

¹⁾ 国立感染症研究所、ウイルス第二部

²⁾ 東京医科歯科大学大学院

研究要旨

ロタウイルスの 11 分節からなるゲノム二本鎖 RNA (dsRNA) は、polyacrylamide gel electrophoresis (RNA-PAGE) により分離、検出できる。しかし、11 本の dsRNA のバンドパターンは泳動条件により変化するため、施設間、アッセイ間でのパターン比較が難しい。我々は、この問題を解決し、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。

A. 研究目的

ロタウイルスは、11 分節の二本鎖 RNA (dsRNA) をゲノムとして持つ。ロタウイルス患者便検体から、RNA を抽出し、ポリアクリルアミド電気泳動を行うと、ロタウイルスの 11 本のゲノム dsRNA セグメントをバンドとして検出することができる (RNA-PAGE)。RNA-PAGE で検出される 11 本のゲノム dsRNA のバンドパターンは

ウイルスの遺伝子配列によって異なることが明らかにされている。RNA-PAGE パターンは、A, B, C 群ロタウイルスを分別することが可能であるばかりか、A 群ロタウイルスの株特異的パターンを示すことが知られており、簡便なロタウイルスの株分別手法として用いられてきた。しかし、その泳動パターンは、微細な泳動条件の違いで変化するため、アッセイ間差、施設間差が大き

く、同一ゲル状での比較検討を要するなど、株鑑別法として普及させるには問題があった。本研究では、これらの問題を克服し、RNA-PAGE パターン比較による株鑑別が実現できるような基盤技術の構築を目的として、新規に開発されたマイクロチップ型電気泳動システム、カセット型キャピラリー一流路を用いた電気泳動システムを用いて検討を行った。

B. 研究方法

1. 材料および方法

<試験サンプル>

本研究に用いたロタウイルス陽性便検体は、RNA-PAGE パターン解析を行い、ゲノムセグメント NSP5 の移動距離が長いタイプ (long type) 14 種類 (L1-L14) と、短いタイプ (short type) 8 種類 (S1-S8) の計 22 検体を選択して用いた。これら 22 検体は、次世代シーケンサーを用いて全塩基配列を明らかにし、VP4 (P 型) と VP7 (G 型) の遺伝子型を決定した。

<ロタウイルス dsRNA の精製>

ロタウイルスゲノム dsRNA は、10% 便検体 (v/w) PBS 懸濁液より TRIzol LS Reagent (Life technologies)、及び Direct-zol RNA MiniPrep kit (ZYMO Research) を用いて抽出、精製した。dsRNA は、最終的に 40uL の RNA 用 DW を用いて溶出し、以下の解析に用いた。

<比較検討のための RNA-PAGE>

RNA-PAGE には、10% ホモジーニアスポリアクリルアミドゲル (ATTO) を用いた。定電流 30mA で 100min 泳動した後、CYBR Gold (Life technologies) を用いて dsRNA を染色し、イメージアナライザー LAS-3000

(FUJIFILM) により dsRNA を検出した。

<マイクロチップ電気泳動、並びにカセット型キャピラリー電気泳動>

マイクロチップ電気泳動は、MultiNA MCF-202 (島津製作所) を用いて実施した。泳動に用いるポリマーには、DNA-500, DNA-1000, DNA-2500, DNA-12000 及び RNA kit (島津製作所) を用い、染色には SYBR Gold を用いた。

カセット型キャピラリー電気泳動は、QIAxcel Advanced system (QIAGEN) を用いた。キャピラリーカセットには、QIAxcel DNA High Resolution Kit (1200) を用いた。泳動後のパターン解析は、4 種類の解析方法 OH 500, OH 800, OH1200, OH1600 を用いて実施した。

(倫理面への配慮)

国立感染症研究所「ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会」に事前申請し、承認を受けた内容に沿って研究を実施した。

C. 研究結果

1. 泳動条件の最適化

MultiNA MCF-202 による dsRNA の泳動には、5 種類のポリマーキット DNA-500, DNA-1000, DNA-2500, DNA-12000 及び RNA kit を用い、泳動電圧、染色用の CYBR Gold の濃度を変化させつつ最適化を実施した。DNA-1000 kit, DNA-2500 kit, 及び DNA-12000 kit の比較検討において、ロタウイルス dsRNA が最も良好に分離されたのは、DNA-12000 kit であった。500bps の DNA をターゲットとした DNA-500 kit は、本ポリマー推奨の電圧で泳動したところ、泳動速度が速すぎ、dsRNA が十分に分離し