

ないまま泳動が終了してしまい、最も分離状態が悪かった。そこで、泳動電圧を標準の50%、dsRNAの染色にCYBR Goldを標準の2倍濃度で添加して泳動を実施した。DNA-12000 kitを用いたMultiNAPとの比較を図1に示した。共に long type と short type の区別が可能であった。DNA-500 kitでは、dsRNAのバンドを9本分別可能であったが、DNA-12000 kitでは8本のみ分別可能であった。サンプル L8 では、DNA-12000 kitではバックグラウンドが高く、dsRNAのバンドの検出が困難であったが、DNA-500 kitでは、9本のバンドが得られた。以上より、DNA-500 kitはDNA-12000kit以上にdsRNAを分離できることが明らかになった。

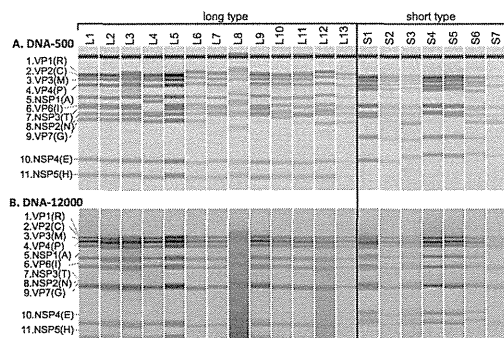


図1. ロタウイルスdsRNAのDNA-500 kitとDNA-12000 kitによる泳動パターン

2. QIAxcel Advanced system

ロタウイルス検体 L14、S8 を用いて、QIAxcel Advanced system (QIAGEN) の検討に用いた。L14およびS8のdsRNAは、QIAxcel DNA High Resolution Kit (1200)を用いて泳動した。泳動プログラムには、OH500, OH800, OH1200, OH1600の4種類を用いて条件の最適化を行った。その結果、OH1600で、泳動電圧を2.0kVにした場合、11本全てのバンドが分離可能であることが

明らかとなった。バンドの分離はMultiNAPよりもシャープで有り、かつ、高感度であった。しかし、キャピラリーカセット間変動、ウェル間変動があり、同一サンプルであってもモビリティシフトが観察されるなど、再現性に問題があった。

3. MultiNAP と RNA-PAGE の比較

1. で得られた泳動条件の結果から得られた最適化された条件を用いたMultiNAPとRNA-PAGEの比較検討を行った(図2)。

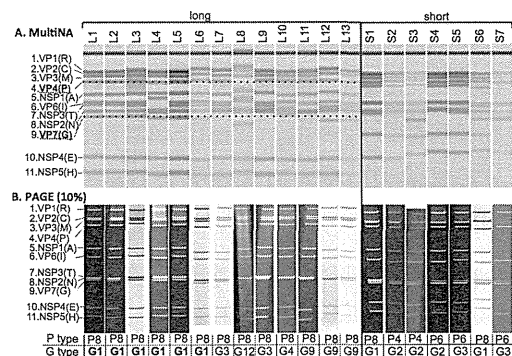


図2. ロタウイルスdsRNAのMultiNAPとRNA-PAGEとの泳動パターンの比較

どちらのdsRNAバンドパターン解析を用いても、通常ロタウイルスの遺伝子型別で実施されているG,Pタイピングを反映できることが明らかになった。また、分離できるdsRNAのバンド数は、RNA-PAGEは10本、MultiNAPでは9本であった。しかし、RNA-PAGEは異なるゲル間での再現性が低く、安定した結果が得られなかった。

以上から、MultiNAPは、dsRNAのバンド分別能は、RNA-PAGEよりも低い、再現性が高く、アッセイ間変動、チップ間変動も少なく、モビリティを数値化することで、異なる施設間でもバンドパターン比較が可能である事が示唆された。

D. 考察

ロタウイルスゲノム dsRNA 泳動パターン

ン解析は、従来より RNA-PAGE で行われてきた。しかし、RNA-PAGE は、アッセイ間差、ゲル間差、施設間差などが大きく影響し、同一ゲル内で、隣り合うレーンでパターン比較を行う必要があった。本研究で、検討した MultiNA を用いた dsRNA 泳動パターン解析は、DNA-500 kit、CYBR Gold 2 倍濃度、通常の半分の電圧といった細かな最適化を行うことで、高分解能の dsRNA 泳動パターンが再現性良く得られることが明らかになった。本検討により、MultiNA による dsRNA 泳動パターン (MultiNAP) を数値化し、施設間でパターン比較を行うことが可能となった。MultiNAP は、ロタウイルス dsRNA の塩基配列依存的に変化するが、パターン変化の程度と塩基配列の違いは比例関係に無い。塩基配列の違いが dsRNA の分子形状や電荷に影響を与え、モビリティがシフトするためパターン変化が起きると考えられているが、詳細に解析された例は無く、依然としてパターン変化と塩基配列の違いの関係は不明である。今後、塩基配列の変化をどの程度検出できるのか検討を重ねていく必要がある。

MultiNAP では、Lower marker, Upper marker をスタンダードとしてサンプルと同時に泳動することで、サンプルのモビリティをスタンダードとの相対移動度で数値化できる。本検討では Lower marker, Upper marker に DNA を使用した。このため、同時に泳動する dsRNA の濃度、サンプルに含まれる夾雑物などによって、スタンダードのモビリティシフトが、影響を受ける可能性がある。この際、スタンダードと dsRNA が同程度に影響を受け、モビリティシフトが起きれば問題ないが、異なる

場合、相対移動度の数値に影響が出る。この問題を解消するためには、Lower marker, Upper marker を既知配列の dsRNA にする必要がある。今後、検討を進める予定である。

E. 結論

本年度最適化した MultiNAP 用いて、ロタウイルス 11 分節 dsRNA の泳動パターン分析を行うことで、野外流行株の簡便な比較検討が可能となった。今後、既知配列を持つ dsRNA スタンダードを導入するなど、MultiNAP の精度を上げること、モビリティシフトの数値化により、自動判定を行うことなどにより、on line や web site を利用した簡便かつ高精度なロタウイルス株解析システムの構築を目指す。

F. 研究発表

1. 論文発表

Murakami K., Kurihara C., Oka T., Shimoike T., Fujii Y., Takai-Todaka R., Park YB., Wakita T., Matsuda T., Hokari R., Miura S., and Katayama K. Norovirus binding to intestinal epithelial cells is independent of histo-blood group antigens. 2013 PLoS One, 14: e66534

2. 学会発表

1) Shimoike T., Takagi H., Oka T., Murakami K., T-Todaka R., Park YB., Fujii Y., Wakita T., and Katayama K. The localization and interaction among the viral proteins and RNAs of Murine Norovirus in RAW264.7 cells 5th International Conferenc

e on Caliciviruses China 2013, November Bijing/China

2) Murakami K., Park YB., Kurihara C., Oka T., Shimoike T., T-Toda R., Wakita T., Mutsuda T., Hokari R., and Katayama K.

Study of histo-blood group antigen-independent mechanism of norovirus-cell binding.

5th International Conference on Caliciviruses China 2013, November Bijing/China

3) 村上耕介、岡智一郎、下池貴志、藤井克樹、朴英斌、戸高玲子、松田幹、片山和彦

ノロウイルス様中空粒子の腸上皮細胞株 Caco-2 への結合に関するタンパク質のプロテオミクス解析

日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月、仙台市

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、脇田隆宇、片山和彦

第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月、神戸

5) 村上耕介、戸高玲子、朴英斌、藤井克樹、下池貴志、脇田隆宇、栗原千枝、穂苅量太、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

6) 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

7) 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

カリシウイルスのリバーシジェネティッ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 1 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

2012/13 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 国立感染症研究所 ウイルス第二部

研究要旨

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となった。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。

A. 研究目的

これまでに我々は、ロタウイルスの効率的なフルゲノムシーケンス解析方法を確立し、RV 感染症による入院症例の便検体を全国の病院から収集するためのネットワークを構築し、我が国における全国的な RV 分子疫学調査を開始した。2011/12 シーズンには全国 6 都道府県 (北海道、秋田県、東京都、愛知県、京都府、山口県) の 6 病院から 119 検体の RV 陽性検体を収集することができた。全検体のフルゲノムシーケンス解析を行ったところ、62% (74 検体) はこれまでに報告されていない新しいタイプの遺伝子型構成 (G1- P[8]- I2- R2- C2- M2- A2- N2- T2-

E2- H2) を持つウイルスであった。このウイルスは、従来から世界的に流行していた Wa-like G1 タイプのウイルス (G1- P[8]- I1- R1- C1- M1- A1- N1- T1- E1- H1) と、DS-1-like G2 タイプウイルス (G2- P[4]- I2- R2- C2- M2- A2- N2- T2- E2- H2) の間で、近年リアソートメントを起こして発生したと考えられ、今後の動向が注目されている。このタイプのウイルスがシーズンを跨いで流行し続けるのか否かに注意を払いつつ、2012/13 シーズンの検体収集およびシーケンス解析を実施した。

B. 研究方法

1. 検体の採集

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。

2. RVスクリーニング

収集した便検体を10%PBS懸濁液に調製し、ELISA法（ロタクロン）によりRVのスクリーニングを行った。OD値0.15以上を陽性と判定した。

3. 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。ウイルスRNAはNEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina（NEB）を用いて調製し、次世代シーケンサーMiSeq（illumina）でRVのフルゲノムシーケンス解析を行った。

（倫理面への配慮）

本研究はヒト患者由来の便検体を用いた研究であるため、各関係施設の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および解析を行った。

C. 研究結果

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（表）。

残りの検体については引き続き解析中である。

D. 考察

2012/13年シーズンは、昨シーズンに引き続きDS-1-like G1タイプが全国的に主流株であった。ただし、その検出割合は北日本や東日本（特に愛知県）で高く、西日本（特に山口県）では低い傾向があった。DS-1-like G1タイプのウイルスは、昨シーズンも北海道以外の地域から検出されていたが、今シーズンは北海道にも侵入し、その流行地域を全国に広げている。その一方で検出率に地域差があり、全国に均一に流行しているわけではない。

我が国において検出されている DS-1-like G1 タイプのウイルス遺伝子解析の結果から、VP7 と VP4 はアメリカで検出されている株、それ以外のセグメントはオーストラリアで検出されている株に近いことが分かっているが、我が国や近隣諸国における過去のデータ蓄積が乏しいため、このリアソータントがどの地域で発生し、どのように流行が広がったのかを解明するのは困難である。この新しいタイプのウイルスの病原性や、これに対するワクチンの効果、このウイルスが今後も流行を引き起こし続けるのか否か、といった点が今後の重要な研究テーマである。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 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

2. 学会発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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

5) 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

6) 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

7) 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

8) 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

9) 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

イルスのリバーシ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

10) 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

11) 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

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. 病院ごとの検出されたロタウイルス遺伝子型

病院 (都道府県)	NTT札幌 (北海道)	小樽 (北海道)	由利 (秋田)	宮城 (宮城)	昭和 (東京)	東京医大 (東京)	江南 (愛知)	南丹 (京都)	山口 (山口)	合計
RV Positive	28	39	9	3	4	8	89	22	34	236
Wa-like G1	1	0	1	0	0	0	1	12	17	32
DS-1-like G1	15	1	6	2	1	0	63	8	4	100
G3	0	0	0	0	0	0	1	0	2	3
G9	6	3	0	0	0	0	0	1	10	20
G2	5	1	2	0	2	0	0	0	0	10
解析済み	27	5	9	2	3	0	65	21	33	165
未解析	1	34	0	1	1	8	24	1	1	71

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

研究分担者 高木弘隆 国立感染症研究所 バイオセーフティ管理室

研究要旨

A 群ロタウイルス(以下 hRVA)患者の臨床材料から直接かつ効率的にウイルスを分離・増殖するべく、MA104s 細胞のサブクロニングを行い、Wa および DS1 を指標として増殖性が優良な 4 つのサブクローンが得られた。またこれらのクローンは CPE 非発現性があるため、持続感染性を検討したところ、7 日後に洗浄・培地交換を行い引き続き培養した結果、3 日目において上清中の抗原シグナル増強が IC キットにて確認された。1 クローンではさらに同様の操作を行っても 2 日後には抗原シグナルが顕在化した。臨床材料からのウイルス分離を目指すに当たり、細胞と手法の両面での改善が見込まれる。

A. 研究目的

hRVA 患者臨床材料(糞便)から細胞培養法により、直接かつ効率的にウイルスを分離・増殖させることは一般的に難しく、また材料中に大量に排出されること、イムノクロマト法など簡便な検査薬の開発もあり、一部の増殖しやすいウイルス株を除き、hRVA に関しルーチンとして細胞培養法を用いることはほとんどなかった。昨年度に hRVA 感受性細胞である MA104 をクローニングすることにより、細胞培養法による臨床材料からの hRVA 分離・増殖の改良を試み、細胞クローニングにより良好な細胞クローンを得た。しかしながらその後 Mycoplasma 汚染が判明し、これを clean-up したところ各クローンで

hRVA 増殖効率が一様に低下してしまった。今回はこれを解消すべく各細胞クローンに対し、再クローニングを行い hRVA 増殖効率の復帰を図るとともに、これらクローンにおける CPE 非発現性についても若干の検討を行うこととした。

B. 研究方法

1. 材料

(1) 供試ウイルス

- ・hRVA-Wa 株(ATCC VR-2018)
- ・hRVA-DS1 株(ATCC VR-2550)

(2) 培養細胞

MA104s(札幌大分譲)より hRVA-Wa 増殖性を指標として得られた clone4 及び 8(以下 C4、C8)

- (3)細胞培養用及びウイルス増殖用培地
 - ・ 5%FBS-EMEM(細胞培養用)
 - ・ 0.15%BSA-EMEM, acetyltyrpsin 2.5 μ g/ml 含有
- (4)hRVA 検出試薬(以下 IC キット)
ディップスティック“栄研”ロタ(栄研化学)

2. 方法 1

MA104s-C4 及び C8 からの細胞再クローニング

各細胞クローンを 2 倍段階希釈による限界希釈を行い、各々 24 の細胞クローンを作成した。これらを 24well-plate に播種し、単層細胞を形成後、ウイルス培養用培地に置換した。hRVA-Wa 及び hRVA-DS1 の各ストック ($10^2 \sim 10^3$ TCID₅₀/50 μ l) を acetyltrypsin 30 μ g/ml で 37°C・30 分処理したものを 10 μ l/well で接種し、36°C・5%CO₂ 下 7 日間静置培養した。その後上清 50 μ l を採取し、IC キットで hRVA 抗原シグナルを確認し、シグナルの強弱から hRVA 増殖性のよい細胞クローンを選択した。

3. 方法 2

hRVA/MA104s クローン細胞における持続感染性の検討

方法 1 で得られた細胞クローンのうち 4 クローンを選出し、12well-plate に播種した。クローニングと同様に Wa 株及び DS1 株を各細胞クローンに接種し、36°C・5%CO₂ 下 7 日間静置培養した。培養上清を 50 μ l 採取し、IC キットでウイルス抗原シグナルを確認後、EMEM にて 1 回洗浄後、

ウイルス培養用培地を新たに加え、IC キットで上清中抗原シグナルを確認した。36°C・5%CO₂ 下 3 日間静置培養後、培養上清 50 μ l を採取し IC キットにてウイルス抗原シグナルを確認した。

(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. hRVA 増殖性クローンの分離及び性状

MA104s-C4 より Wa 及び DS1 ともにウイルス増殖性が優良なサブクローン 3 株 (D2、D9 及び D10) を得た (図 1)。またこれらのクローン性状保存性について、7 代以上細胞を継代し同様の増殖性試験を行った結果、scloneD10 において優良な hRVA 増殖性が保存されていた。

また MA104s-C8 において、Wa の増殖性がよいものは認められず、DS1 において増殖性が優良なサブクローン 2 株を得た (図 2)。これらのうち scloneD1 のクローン性状保存性が優良であった。

2. MA104s サブクローンにおける hRVA 持続感染性について

結果 1 で得られた sclone のうち、C4D2、C4D9、C4D10 及び C8D1 の 4 株について hRVA 7 日間培養後に洗浄・培地交換を行い、その 3 日後の培養上清について IC キットにて確認した。7 日目において hRVA 抗原シグナルが最も強かった C4D10 については培地交換直後の上清も IC キットで確認した。

C4D10 において培地交換直後では抗原

シグナルは認められなかったが、3日後では非常に強いシグナルがみられた。また他のサブクローンでも明瞭なシグナルが認められ、C1D8においてはDS1で特にシグナルが強かった(図3)。C4D10においてはさらに洗浄2回・培地交換を行い、2日後にICキットによる上清中の抗原を確認したところ、明瞭なシグナルがみられた(図4)。加えて一連の培養過程においてC8D1でのみ弱いながらもCPE発現が確認された。

D. 考察

今回再クローニングにより、Mycoplasma除染後のウイルス増殖性低下を補うだけのMA104sサブクローンを得ることができたことは、今後の培養系改良に大きく貢献できるものと考えられる。また持続感染性検討において、CPE非発現状態でWa及びDS1を継続して産生することが示唆され、昨年度のSEM観察の裏付けをする結果のひとつとなった。これまでは一般的に、培養上清を回収し、新たな細胞に接種するという盲継代法が取られてきたが、今回の結果から「培地交換による継続培養」という別の可能性が示唆された。臨床材料からのhRVA分離・増殖手法についても今回の方法を応用し、検証してゆく。加えてサブクローンのうちC8D10において、CPE発現の兆候がみられているので、これを利用し簡便な感染力価測定の開発についても可能性がみえてきた。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。それに

よりワクチン接種後の防御抗体産生状況などを簡便にとらえてゆくことが可能となるだろう。

E. 結論

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が確認された。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が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

高木弘隆、藤井克樹、小林宜道、戸高玲子、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(神戸) 2013年11月

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

図1. MA104s-C4再クローニングによるhRVA増殖結果
3/24のsub-cloneで優良な増殖性を示した。

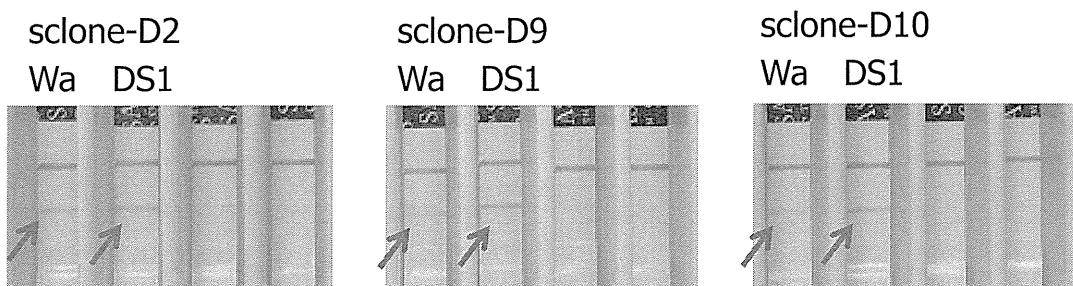


図2. MA104s-C8再クローニングによるhRVA増殖結果
2/24のsub-cloneでhRVA-DS1の優良な増殖性を示した。

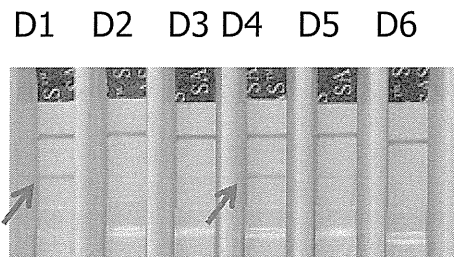


図3. MA104s-cloneによるhRVA持続感染性検討-1

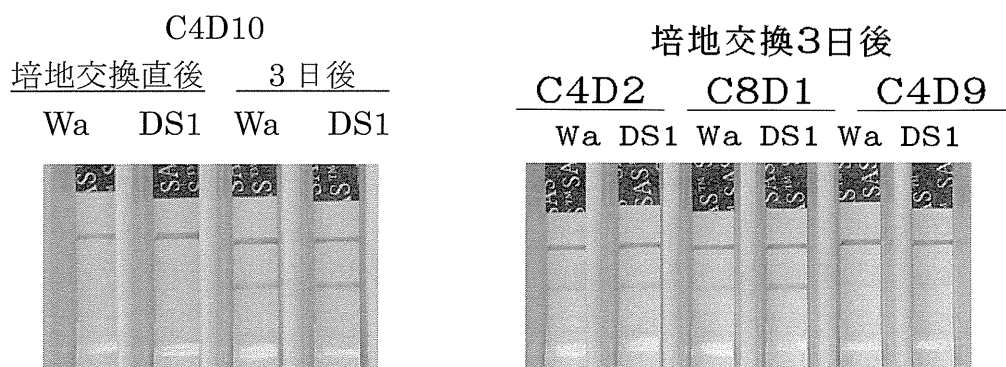
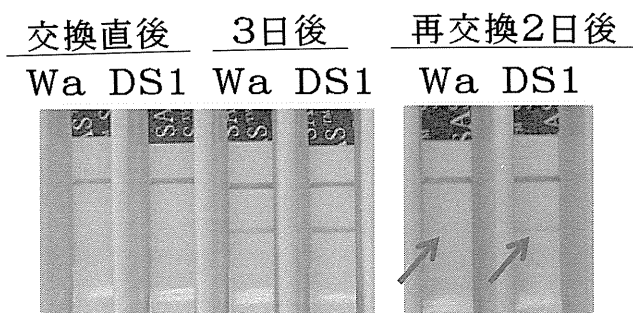


図4.MA104s-cloneによるhRVA持続感染性検討-2
培地交換1回目及び2回目での培養上清中hRVA抗原シグナル

C4D10



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」

研究協力報告

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)

研究協力者	葛谷光隆	岡山県食肉衛生検査所
研究協力者	濱野雅子	岡山県環境保健センター
	木田浩司	岡山県環境保健センター
	藤井理津志	岡山県環境保健センター
	溝口嘉範	岡山県環境保健センター
	岸本壽男	岡山県環境保健センター
	金谷誠久	独立行政法人国立病院機構岡山医療センター
	福岡義久	独立行政法人国立病院機構岡山医療センター

研究要旨

我々は、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ており、2000～2010 年の 10 シーズンについては本誌既報^{1),2)}である。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する。

2010 年 9 月～2013 年 6 月までの 3 シーズン(9 月～翌年 8 月を 1 シーズンとする。2012/2013 シーズンは 6 月まで)のウイルス性胃腸炎を疑う患者糞便 1288 件(2010/11 : 438 件、2011/12 : 410 件、2012/13 : 440 件)を対象とし、RVA 検出市販キット(ELISA 法またはイムノクロマト法)による検査を実施するとともに、陽性例について Gouvea らの逆転写 PCR(RT-PCR)法³⁾ またはシーケンスにより G 型を同定した。

検査の結果、262 検体(20.3%)から RVA が検出された。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、シーズン別検出率に大きな変動がみられなかった前報²⁾とは異なる結果であった。図に検査数および RVA 検出率の経時的推移を示す。RVA の検出率のピークは、前報よりやや早く 1～3 月、ピーク時の値は前報²⁾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(図)。次に、RVA 陽性 262 件の G 型別結果を示す。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。

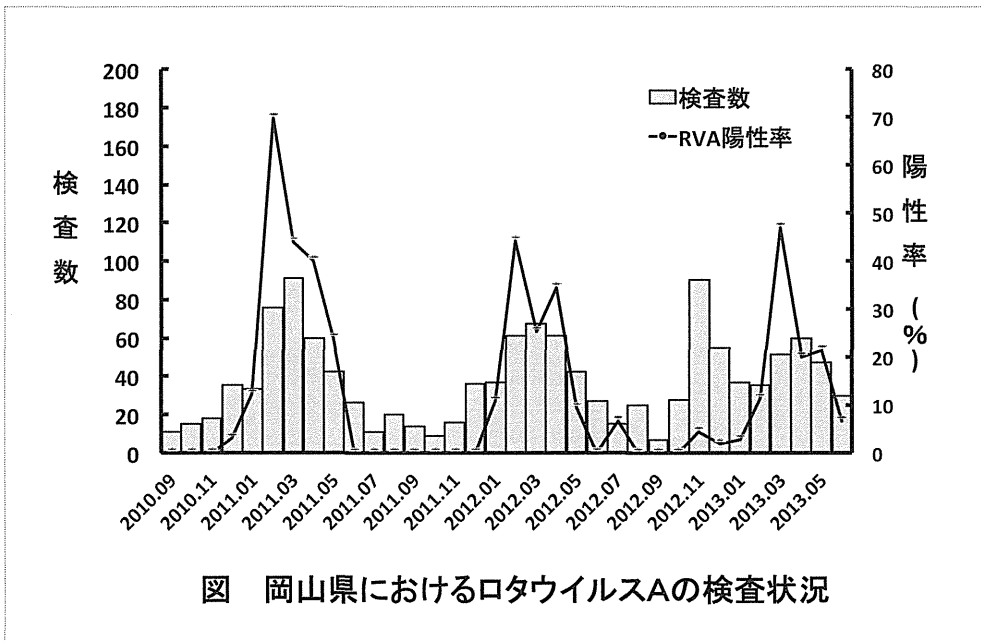
我々は、2011/12 シーズンの岡山県において、これまでに検出されたことのないタイプの RVA を報告した⁴⁾。このウイルスは、VP7 および VP4 遺伝子型(P 型)が G1 型プロトタイプの Wa 株と同じ G1P[8]型であるのに対し、VP6、NSP4 および NSP5/6 遺伝子型は G2 型プロトタイプの DS-1 株と同一であるという、異なるゲノグループ間(Wa ゲノグループと DS-1 ゲノグループ)の遺伝子再集合体(リアソータント)に由来する株であった。さらに、この株が同シーズンに検出された G1 型全体の 71.4%を占めて広く流行したことも明らかにした⁴⁾。本株を簡易的に見分けるには、通常の G および P 型別に加え、NSP4 および NSP5/6 遺伝子の全長を比較することが有効と考えられる⁴⁾。そこで、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]と同定された 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なった。

わが国においては、RVA ワクチンとして Rotarix® (GSK 社)が 2011 年 11 月から、RotaTeq® (MSD 社)が 2012 年 5 月から導入された。今回、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、これまでにない状況が観察された。期間・地域ともに限定された調査であるため、これらの状況とワクチン導入との関係は明確ではないが、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が、本株は通常の型別のみでは発見できないため、簡便かつ確実な検査法の開発が望まれる。

参考文献

- 1) 葛谷光隆, 他, IASR 26: 4-6, 2005
- 2) 葛谷光隆, 他, IASR 32: 71-72, 2011
- 3) Gouvea V., et al., J Clin Microbiol 28: 276-282, 1990
- 4) Kuzuya M., et al., J Med Virol 85, 2013 (in press)



III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

(平成 25 年度)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Doan YH, <u>Nakagomi T</u> , Aboudy Y, Silberstein I, Behar-Novat E, <u>Nakagomi O</u> , 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	182-189	2013
Hoa Tran TN, <u>Nakagomi T</u> , <u>Nakagomi O</u>	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	13-20	2013
<u>Nakagomi T</u> , Doan YH, Dove W, Ngwira B, Iturriza-Gómara M, <u>Nakagomi O</u> , 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	1273-1295	2013
<u>Nakagomi T</u> , Kato K, Tsutsumi H, <u>Nakagomi O</u>	The burden of rotavirus gastroenteritis among Japanese children during its peak months: an internet survey.	Jpn J Infect Dis	66	269-275	2013
Gauchan P, <u>Nakagomi T</u> , Sherchand JB, Yokoo M, Pandey BD, Cunliffe NA, <u>Nakagomi O</u>	Continued circulation of G12P[6] rotaviruses over 28 months in Nepal: successive replacement of predominant strains.	Trop Med Health	41	7-12	2013
Ghosh S, Urushibara N, Kawaguchiya M, Shintani T, <u>Kobayashi N</u>	The origin of two rare human P[10] rotavirus strains.	Infect Genet Evol	13	292-300	2013

Wang Y-H, Pang B-B, Zhou X, Ghosh S, Tang W-F, Peng J-S, Hu Q, Zhou D-J, <u>Kobayashi N</u>	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	16	103-112	2013
Ghosh S, Urushibara N, Chawla-Sarkar M, Krishnan T, <u>Kobayashi N</u>	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	16	165-173	2013
Komoto S, Kawagishi T, Kobayashi T, Ikizler M, Iskarpatyoti J, Dermody TS, <u>Taniguchi K</u>	A plasmid-based reverse genetics system for mammalian orthoreoviruses driven by a plasmid-encoded T7 RNA polymerase.	J Virol Methods	196	36-39	2013
Ghosh S, <u>Taniguchi K</u> , 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	166	474-485	2013
Kawamura Y, Ohashi M, Ihira M, Hashimoto S, <u>Taniguchi K</u> , Yoshikawa T	Nationwide survey of rotavirus-associated encephalopathy and sudden unexpected death in Japan.	Brain Dev		In press	2013
Komoto S, <u>Taniguchi K</u>	Genetic engineering of rotaviruses by reverse genetics.	Microbiol Immunol	57	479-486	2013
Komoto S, Maeno Y, Tomita M, Matsuoka T, Ohfu M, Yodoshi T, Akeda H, <u>Taniguchi K</u>	Whole genomic analysis of a porcine-like human G5P[6] rotavirus strain isolated from a child with diarrhea and encephalopathy in Japan.	J Gen Virol	94	1568-1575	2013
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, <u>Fujii Y</u> , <u>Katayama K</u> , <u>Mizutani T</u>	Detection of Bovine Group A Rotavirus Using Rapid Antigen Detection Kits, RT-PCR and Next-Generation DNA Sequencing.	The journal of veterinary medical science	75	1651-1655	2013

<u>Fujii Y</u> , 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	8	e56296	2013
<u>Murakami K</u> , Kurihara C, Oka T, <u>Shimoike T</u> , <u>Fujii Y</u> , 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	8	e66534	2013
<u>Tatumi M</u> , Nagaoka Y, Tsugawa T, Yoto Y, Tsutsumi H.	Characterization of the NSP4 gene of group A human rotavirus G1P[8] strains circulating in Sapporo, Japan from 1987 to 2000.	Journal of medical virology	Sep	DOI: 10.1002/jmv.23723.	2013
Do LP, <u>Nakagomi T</u> , Doan YH, Kitahori Y, <u>Nakagomi O</u>	Molecular evolution of the VP7 gene of Japanese G2 rotaviruses before vaccine introduction.	Arch Virol	159	315-319	2014
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, <u>Kobayashi N</u>	Molecular epidemiology and genetic evolution of the whole genome of G3P[8] human rotavirus in Wuhan, China, from 2000 through 2013.	PLoS ONE		(in press)	2014

