

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。

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。

B. 研究方法

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

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。

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。

B. 研究方法

1. 京都府南丹地区における疫学調査：

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行以上あるか、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 期：2010/3～2011/2、 期：2011/3～2012/2、 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行以上あるか、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(期：77例、 期：56例、 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 期：37.8例(42.2%)、 期：26.7例(47.7%)、 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 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。 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 期のロタウイルス胃腸炎入院率は3.9人/1000人・年は、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1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

3. 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

4. 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

4. 特許取得: なし
5. 実用新案登録: なし
6. 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見られる

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 より後に広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ノイヌロタウイルスのそれにきわめて近く、VP1、VP3、VP6、NSP3、NSP5 遺伝子もネコノ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、ネコノ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ノ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、ネコノ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.

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

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

3. 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。

4. 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 (10^8 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

3. 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.

6. 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

4. 特許取得：なし
5. 実用新案登録：なし
6. その他：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 25 年度研究分担報告書

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 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] 株台頭の可能性があるため、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	栃木県県北家畜保健衛生所
	山口 修	栃木県県北家畜保健衛生所
	佐藤 満雄	栃木県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

5. 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群口タウイルス(GBR)、C群口タウイルス(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)。

6. 材料(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。

7. 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45 300秒、95 30秒の後、95 5秒、55 20秒、72 20秒を40サイクル行った。

8. 方法(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

3. 結果(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。

4. 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つ

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少な例と考えられた。

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

4. 論文発表

なし

5. 学会発表

なし

8. 実用新案登録：なし
9. その他：なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

7. 特許取得：なし

表1. ウシロタウイルスとの鑑別のため使用したプライマー配列及びプローブ配列

標的病原体	標的遺伝子	プローブ配列 5'-3'(FAM/TAMRA)	プライマー配列
BEV	5'UTR	CGCACAAATCCAGTGTGCTACGTCGTAAC	GCCGTGAATGCTGCTAATCC GTAGTCTGTTCCGCCTCCACCT
BCV	nucleocapsid	CCTTCATATCTATACACATCAAGTTGTT	CTGGAAGTTGGTGGAGTT ATTATCGGCCTAACATACATC
GBR	VP6	GTCACATGTGTCTCAGGCATGGAAGC	TGGCAGGTGGTCAGGTAATAA ACACCACACGTTCTAGCTTTCAG
GCR	VP6	CCAGGATTTCCATGGGAACAGACGT	GCCAATACGAGAAGGATTCC TCTTCACGGATGCAACTAGC
BToV	nucleocapsid	CCAGCAGTCACTATCTTTGCCATTTGA	CGTATTCAAAACCAAGAGCGTG GTGCAGTCTCATTTGCCATC
MRV	3	ATGATCCAGCATCTATCGAAACTRTATAAAGC	CCGATATATCTGGGAATGCAG CTGACGGGAAAGTGGTRGTCA
BLV	pol	GAACGCCTCCAGGCCCTTCA	CCTCAATTCCTTTAAACTA GTACCGGGAAGACTGGATTA
BHV-1	gE	TGGGGCTCCGGGCTTTACGTCT	CAATAACAGCGTAGACCTGGTC GCTGTAGTCCCAAGCTTCCAC
BAV	hexon	TTCATCWCTGCCACWCAAAGCTTTTTT	CRAGGGAATAYTGTCTGAAAATC AAGGATCTCTAAATTTCTCCAAGA
S. Dublin	vagC	TTTTTCGAGCTGCGCAACGAGC	GGGTGAGCGAGCTGGAAA CGCCATAAAGTCCGGGTCA
S. Enteritidis	sefA	TGGTGGTGTAGCCACTGTCCCGT	GGTAAAGGGGCTTCGGTATC TATTGGCTCCCTGAATACGC
S. Typhimurium	fic	ACCTGGGTGCGGTACAGAACCCT	TGCAGAAAATTGATGCTGCT TTGCCAGGTTGGTAATAGC
Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis	IS900	AAGACCGACGCCAAAGACGCTGCGA	CAGCGGCTGCTTTATATTCC GCAGAGGCTGCAAGTCTG
Clostridium perfringens	cpb	AACGGATGCCTATTATCACCAACT	ATTTTCATTAGTTATAGTTAGTTCAC TTATAGTAGTATTTTGCCTATATC
Cryptosporidium parvum	18s	AAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTAAAT	CAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTT CTGCTTTAAGCACTCTAATTTCTCAAA
ETEC	K99	ATTTTAAACTAAAACGAGCCCGGCA	GCTATTAGTGGTCATGGCACTGTAG TTTGTGTTGGCTAGGCAGTCATTA
Eimeria zuernii/bovis	ITS1	TGGCCTGTTGTGGATAGTTACTG(zuernii) GCCTTATGGATAGTTAGTCTCC(bovis)	TGTCTAYACACTMCATCCAACCT GACCACAGTGTGGAAATGC
-ACTIN	Actin	TCGCTGTCCACCTCCAGCAGATGT	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

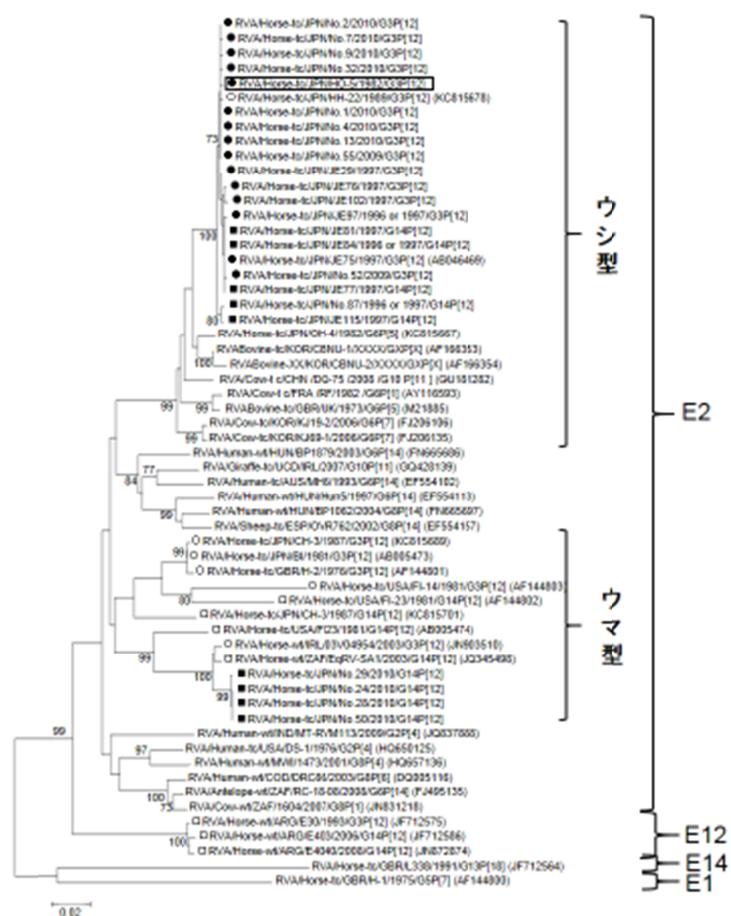


図2. 我が国のウマRVのNSP4における系統樹

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 第一

室

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

9. 材料および方法

<試験サンプル>

本研究に用いた口タウ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。

<口タウウイルス dsRNA の精製>

口タウウイルスゲノム 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 40 μ L 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

5. 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、口タウウイルス 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。

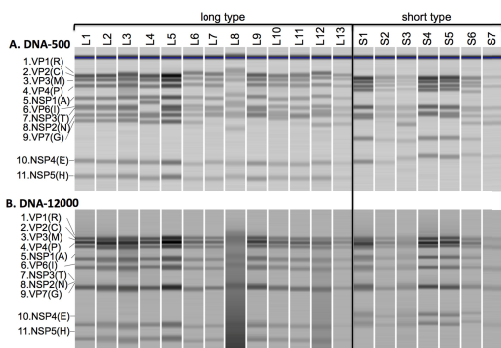


図1. ロタウイルスdsRNAのDNA-500 kitとDNA-12000 kitによる泳動パターン

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)。

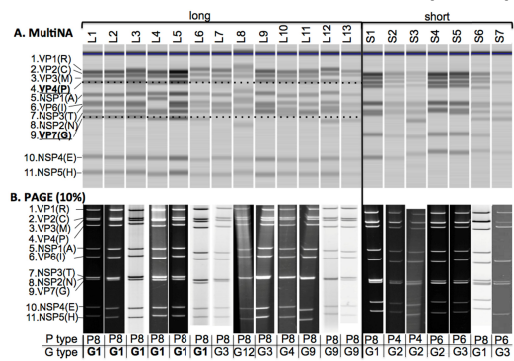


図2. ロタウイルスdsRNAのMultiNAPとRNA-PAGEとの泳動パターンの比較

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

タウウイルスゲノム dsRNA 泳動パターン解析は、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

6. 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 Conference on Caliciviruses China 2013, November Bijing/China

2) **Murakami K.**, Park YB., Kurihara C., Oka T., **Shimoike T.**, T-Todaka 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、脇田隆字、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**、脇田隆字、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ノロ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ック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

10. 特許取得：なし

11. 実用新案登録：なし

12. 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）の間に、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

10. 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。

11. 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。

12. 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口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

7. 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

8. 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口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：我が国で流行した口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口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

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

- 13. 特許取得：なし
- 14. 実用新案登録：なし
- 15. 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

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

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 細胞のサブクローニングを行い、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

13. 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(札医大分譲)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, acetyl tyrsin 2.5 μg/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)

14. 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 μl) を acetyl tyrsin 30 μg/ml で 37 °C 30 分処理したものを 10 μl/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 μl 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。

15. 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 μl 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 μl 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

6. hRVA 増殖性クローンの分離及び性状

MA104s-C4 より Wa 及び DS1 とともにウ

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。

7. MA104s サブクローンにおける hRVA 持続感染について

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 hRVA7 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。

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

C4D10において培地交換直後では抗原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

9. 論文発表 なし

10. 学会発表

高木弘隆、藤井克樹、小林直道、戸高玲子、棚林清、片山和彦、多様なA群口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

16. 特許取得：なし

17. 実用新案登録：なし

18. 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。

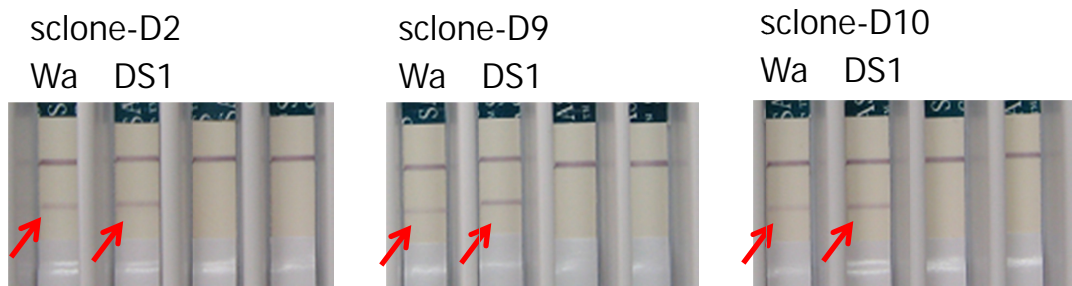


図 2. MA104s-C8 再クローニングによる hRVA 増殖結果
2/24 の sub-clone で hRVA-DS1 の優良な増殖性を示した。

D1 D2 D3 D4 D5 D6



図 3. MA104s-sclone による hRVA 持続感染性検討-1

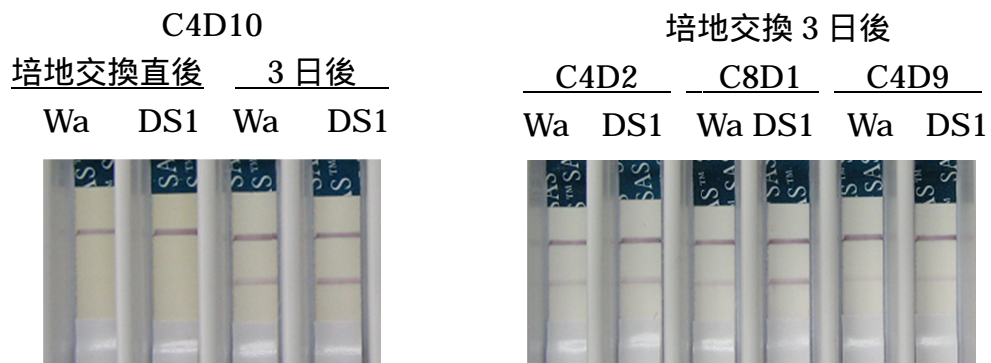
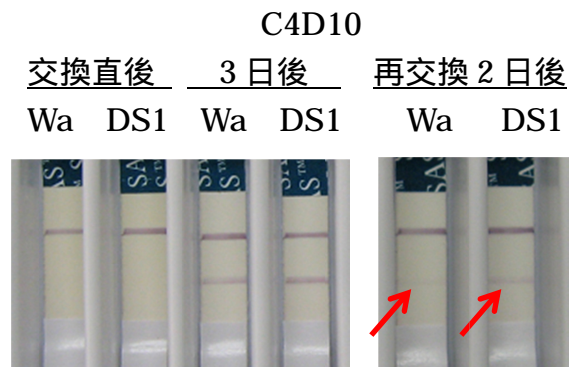


図 4. MA104s-sclone による hRVA 持続感染性検討-2
培地交換 1 回目及び 2 回目での培養上清中 hRVA 抗原シグナル



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⁾ またはシークエンスにより 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)

