

あり、R231 や R241 の切断は必須ではないとの可能性が示されている。そこで、まず R241 をヒスチジンに変異を加え (R241H)、その増殖能を、CV-1 細胞におけるプラーク形成能より検討した。R241H 変異株は野生株と同程度の増殖能およびトリプシン依存性を示した。一段階増殖曲線においても顕著な違いは見られなかった。したがって、アミノ酸 No.241 のアルギニン残基での切断はロタウイルスの感染性の獲得には必須ではないことが示された。

ついで、R231, R241, R247 を R231K, R241K, R247K に変異を導入した組換えロタウイルスを作成した。アルギニン残基の C 末端ペプチド結合を特異的に切断するアルギニルエンドペプチダーゼおよびリジン残基の C 末端ペプチド結合を特異的に切断するリシルエンドペプチダーゼを利用して、231, 241, 247 の切断の意義を確認した。

アルギニルエンドペプチダーゼ処理による感染性獲得を検討した。KU//rVP4-R241K および KU//rVP4-R231K では、アルギニルエンドペプチダーゼ処理により感染性の上昇がみられた。一方、KU//rVP4-R247K および KU//rVP4-R231K, R247K は、アルギニルエンドペプチダーゼ処理により感染性の上昇がなく、R247 が重要であることが示された。

結果 2

KU//rVP4-R247Furin の増殖効率を検

討し、以下の結果を得た。KU//rVP4-R247Furin はトリプシン非存在下では多段階増殖し得ず、プラークを形成できなかった。さらに、トリプシン存在下でも MA104 および CV-1 細胞における増殖能は野生型 VP4 を有する親株 KU//rVP4 に比べて大きく低下していた。KU//rVP4-R247Furin 感染細胞では、総ウイルス量は親株 KU//rVP4 とほぼ同じであったが、培養上清中のウイルス量が著しく低下していたが、細胞結合分画でのウイルス量が多かった。一方で、LoVo 細胞 (フェーリン発現を欠損) においては、KU//rVP4-R247Furin は親株 KU//rVP4 と同程度の増殖能を示した。また、フェーリンの阻害剤である Dec-RVKR-CMK 存在下では増殖能は回復した。

結果 3

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

ロタウイルス感染性の獲得には R247 における切断が必須であるが、残る 2 個のアルギニン残基 (R231 および

R241) における切断は必須ではない可能性が示唆された

今後、リバーシジェネティクス系とアルギニルエンドペプチダーゼ/リシルエンペプチダーゼを用いることで、各残基における切断の重要性を詳細に検討したい。

細胞内フューリンによる VP4 切断効率は低いものの、細胞内での VP4 切断活性化はウイルス粒子の放出効率を著しく低下させ、ロタウイルスの増殖には負に作用する可能性が考えられた。現在、フューリンによる VP4 切断とロタウイルス増殖能の関連について検討を進めている。

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。

ヘルパーウイルスを利用しないリバーシジェネティクス系の確立への試みを行った。しかしながら、いまだ成功していない。今後、引き続き、現状の条件下での VP4 の解析を続けるとともに、ヘルパーウイルスを利用しないリバーシジェネティクス系の確立への試みを行いたい。

E. 結論

ロタウイルスのリバーシジェネティク

ス系を利用して、VP4 タンパク質の解析を行い、開裂領域のアミノ酸 No. 247 のアルギニン残基の切断が感染性の獲得にもっとも重要であること、VP4 の細胞内開裂は、ロタウイルスの増殖には不都合であることなどが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Komoto S, Wakuda M, Ide T, Niimi G, Maeno Y, Higo-Moiguchi K, Taniguchi K: Modification of the trypsin cleavage site of rotavirus VP4 to afurin-sensitive form does not enhance replication efficiency. *J Gen Virol* 92(2914-2921), 2011
- 2) Dutta D, Chattopadhyay S, Bagchi P, Umesh Chandra Halder, Satabdi Nandi, Mukherjee A, Kobayashi N, Komoto S, Taniguchi K, Chawla-Sarkar M: Active participation of cellular chaperone Hsp90 in regulating the function of Rotavirus non structural protein 3 (NSP3). *J Biol Chem* 286(22), 20065-20077, 2011
- 3) Wakuda M, Ide T, Sasaki J, Komoto S, Ishii J, Sanekata T, Taniguchi K: Identification of a porcine rotavirus closely related to a novel group of human rotaviruses, J19 and B219. *Emerg Infect Dis* 17(8), 1491-1493, 2011
- 4) Yokoyama T, Sugimoto N, Taniguchi K, Komoto S, Yuno T, Ohta K, Hashimoto H, Seno A, Ashida A, Fujieda M, Nishio S, Ueno K, Shimizu M, Yachie A.: Molecular

- and immunochemical detection of rotavirus in urinary sediment cells of children with rotavirus gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect* 17(8), 1190-1193, 2011
- 5) Jelle Matthijnssens, Max Ciarlet, Sarah M. McDonald, Houssam Attoui, Krisztien Banyai, J. Rodney Brister, Javier Buesa, Mathew D. Esona, Mary K. Estes, Jon R. Gentsch, Miren Iturriza-Gomara, Reimar Johne, Carl D. Kirkwood, Vito Martella, Peter P.C. Mertens, Osamu Nakagomi, Viviana Parreo, Mustafizur Rahman, Franco M. Ruggeri, Linda J. Saif, Norma Santos, Andrej Steyer, Koki Taniguchi, John T. Patton, Ulrich Desselberger, Marc Van Ranst: Uniformity of Rotavirus Strain Nomenclature Proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol* 156(8),1397-1413, 2011
 - 6) Kamiya H, Nakano T, Kamiya H, Yui A, Taniguchi K, Parashar U, the Rotavirus Epidemiology Study Group : Rotavirus-associated gastro- enteritis hospitalizations among Japanese children aged <5 years: active rotavirus surveillance in Mie Prefecture, Japan. *Jap J Infect Dis* 64(6):482-487, 2011
 - 7) Nakano I, Taniguchi K, Ueda H, Maeno Y, Yamamoto N, Wakata Y, Matsubara T, Ozaki N. Matsubara T, Ozaki N: Sudden death from systemic rotavirus infection: a case report. *J Clin Microbiol* 49(12): 4382-4385, 2011
 - 8) Sugata K, Taniguchi K, Yui A, Nakai H, Asano Y, Hashimoto S, Ihira M, Yagasaki H, Takahashi Y, Kojima S, Matsumoto K, Kato K, Yoshikawa T Analysis of rotavirus antigenemia in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Transplant Infect Dis* 2011 (in press) Taniguchi K, Komoto S: Genetics and reverse genetics of rotavirus. *Curr Opin Virol* 2:399-407, 2012
 - 9) Ghosh S, Shintani T, Urushibara N, Taniguchi K, Kobayashi N: Whole genomic analysis of a human G1P[9] rotavirus strain reveals intergenomic reassortment events. *J Gen Virol* 98:1700-1705, 2012
 - 10) Sugata K, Taniguchi K, Yui A, Nakai H, Asano Y, Hashimoto S, Ihira M, Yagasaki H, Takahashi Y, Kojima S, Matsumoto K, Kato K, Yoshikawa T.: Analysis of rotavirus antigenemia in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Transplant Infect Dis* 14(1):49-56, 2012
 - 11) Kawamura Y, Sugata K, Nakai H, Asano Y, Ohashi M, Kato T, Nishimura N, Ozaki T, Yui A, Taniguchi K, Yoshikawa T: Correlation between serum matrix metalloproteinase and antigenemia levels in patients infected with rotavirus. *J Med Virol* 84:986-991, 2012
 - 12) Komoto S, Kawagishi T, Kobayashi T, Ikizler M, Iskarpatyoti J, Dermody TS, Taniguchi K: A plasmid-based reverse genetics system for mammalian orthoreoviruses driven by a

- plasmid-encoded T7 RNA polymerase. *J Virol Methods* 196:36-39, 2013
- 13) 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.* 166(3-4):474-485, 2013
- 14) 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
- 15) Komoto S, Taniguchi K. Genetic engineering of rotaviruses by reverse genetics. *Microbiol Immunol* 57(7):479-486, 2013
- 16) Komoto S, Maeno Y, Tomita M, Matsuoka T, Ohfu M, Yodoshi T, Akeda H, Taniguchi K. 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(7):1568-1575, 2013.
2. 学会発表
- 1) Komoto S, Wakuda M, Maeno Y, Yui A, Higo-Moriguchi, K, Sasaki J, Ishikawa K, Taniguchi K. Modification of the trypsin cleavage site of rotavirus VP4 to furin-sensitive does not enhance replication efficiency. XV International Congress of Virology 2011 September 11-16, Sapporo
- 2) 河本聡志、富田万祐子、谷口孝喜：ロタウイルスのVP4トリプシン開裂部位の解析. 第60回日本ウイルス学会、大阪、2012
- 3) 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 23-25 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」

総合研究分担報告(平成 23～25 年度)

札幌市で検出されたロタウイルスにおける抗原変異の長期的観察

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 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 G1P[8]株について VP7 遺伝子と NSP4 遺伝子ならびに G2P[4]株 VP7 遺伝子の変遷を解析した。札幌市の G1P[8]株 VP7 遺伝子の解析では大きく 3つの系統 I、II、IV に分類することができ、このうち系統 I は年代を問わず広く分布しており生存に有利な株であることが示唆された。また同遺伝子の塩基置換速度は世界で検出されている G1P[8]株と比較すると比較的進化速度がゆっくりであり安定した株の印象を受けた。札幌市の G1P[8]株 NSP4 遺伝子の解析では抗原部位 II 番を中心とした変遷がみられ大きく 3 系統に分岐する傾向が見られた。Enterotoxigenic site には変異を認めなかった。非構造蛋白である NSP4 遺伝子も抗原部位を中心とした遺伝子の変遷が確認され、その進化速度は最外殻に位置する VP7 遺伝子と同等かそれ以上であることが確認された。次に札幌市の G2P[4]株 VP7 遺伝子の解析では 20 年を隔てて検出された G2P[4]株はすべて同じ系統に属し、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。札幌市で長期的に観察したロタウイルス G1P[8]株 VP7 遺伝子、NSP4 遺伝子ならびに G2P[4]株 VP7 遺伝子の解析でともに可変領域や抗原部位を中心に変異が確認された。それぞれの遺伝子は各々独自の進化をするため疫学調査継続の重要性、必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

れ規定している。様々な研究において G1P[8]株が世界中で最も重要なタイプであることが証明され、さらに 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変異株に備えた継続的な疫学研究が重要である。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、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 年間の便検体について後方視的な疫学研究を企画した。また世界的にみて優先株である G1P[8]株の VP7 遺伝子と NSP4 遺伝子について、また今後台頭が予測される G2P[4]株 VP7 遺伝子についてそれぞれの変遷を調べることもあわせて目的とした。

B. 研究方法

[札幌市ロタウイルス G1P[8]株 VP7 遺伝子、NSP4 遺伝子の解析]

1987 年～2012 年の 25 年間に札幌市で収集した下痢症患児 3218 検体、うち 2000 年度までの検体で迅速診断キット（イム

ノクロマト法）により A 群ロタ陽性と判明した 541 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 1987 年～2000 年度までの検体のなかから G1P[8]株を抽出し全 VP7 遺伝子と NSP4 遺伝子のシーケンスを行った。系統解析後、コード領域の塩基配列をベイズ推定により進化速度を推定した (BEAST ver1.5)。VP7 遺伝子については系統解析で分類した 4 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。結晶解析で決定された既報の VP7 蛋白立体構造を鋳型として SWISS-MODEL を用いて札幌 G1P[8]株の 3 次元立体構造を予測した。予測した立体構造を Chimera により画像化し、変異部位の局在を可視化した。

[札幌市ロタウイルス G2P[4]株 VP7 遺伝子の解析]

同様に 1987 年～2012 年の 25 年間に札幌市で収集した下痢症患児 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。G ならびに P タイピング決定後 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]株が入れ替わり優先株となって混沌とした傾向を示した。

[札幌市ロタウイルス G1P[8]株 VP7 遺伝子の解析]

1987 年から 2000 年度までの札幌市の G1P[8]株 VP7 遺伝子の解析では VP7 遺伝子は大きく 3 つの系統 I、II、IV に分類することができた。このうち系統 I は年代を問わず広く分布しており生存に有利な株であることが示唆された。この生存に有利な系統 I を特徴づけるアミノ酸は 2 個あり何れも VP7 蛋白の外表面に位置し VP7 蛋白の中和ドメインとサブユニット間の境界に局在していた。また同遺伝子の塩基置換速度は世界で検出されている G1P[8]株と比較するとやや遅かった。

[札幌市ロタウイルス G1P[8]株 NSP4 遺伝子の解析]

1987 年から 2000 年度までの札幌市の G1P[8]株 NSP4 遺伝子の解析では抗原部位 II 番を中心とした変遷がみられ大きく 3 系統に分岐する傾向が見られたが VP7 と異なりどの系統も通年を通して検出された。調べたすべての株で Enterotoxic site には変異を認めなかった。非構造蛋白である NSP4 も抗原部位を中心とした遺伝子の変遷が確認され、その進化速度は最外殻に位置する VP7 遺伝子と同等かそれ以上であることが確認された。

[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 G1P[8]株 VP7 遺伝子、NSP4 遺伝子ならびに G2P[4]株 VP7 遺伝子を解析した。札幌市 VP7 遺伝子の解析では系統 I が生存に有利な株であることが示され、系統 I を決定する 2 個のアミノ酸は VP7 蛋白の外側に位置し、VP7 蛋白の中和ドメインとサブユニット間の境界に局在しており中和抗体からのエスケープ、ロタウイルス複製の際に重要な VP7 蛋白の分離に影響を与える可能性が考えられた。また塩基置換速度は札幌市の VP7 遺伝子は他の都市と比べるとややゆっくりとしており安定した株の印象を受けた。一方、NSP4 遺伝子の解析では VP7 遺伝子とは異なる独自の変遷を起こしていることが確認された。非構造蛋白である NSP4 遺伝子も抗原部位 II を中心とした容易な変異が確認され塩基置換速度も最外殻蛋白である VP7 と同等かそれ以上であったことから、今後も NSP4 遺伝子を含めた疫学調査の必要性、重要性が再確認された。また札幌市 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であったが、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。札幌市で近年検出された G2P[4]株も近年世界で広く分布している亜系統と同じ系統（亜系統 IVa-1 と

IVa-3) にすべて属しているため、札幌市で検出された 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、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 G1P[8]株 VP7 遺伝子、NSP4 遺伝子、G2P[4]株 VP7 遺伝子の解析ではともに可変領域や抗原部位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) Nagaoka Y, Tatsumi M, Tsugawa T, Yoto Y, Tsutsumi H. 2012.

Phylogenetic and computational structural analysis of VP7 gene of group A human rotavirus G1P[8] strains obtained in Sapporo, Japan from 1987 to 2000.

J Med Virol. 84(5):832-8.

2) 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. 学会発表

1) 辰巳正純:ロタウイルス感染症の現状と対策-ワクチンの重要性と今後の課題-, 第44回日本小児感染症学会総会・学術集会、北九州市、11月24日、25日、2012

2) 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 23-25 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」
総合研究分担報告(平成 23~25 年度)

我が国の家畜における 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

ウシ A 群ロタウイルスを原株としたヒト用ロタウイルス生ワクチン (RotaTeq) が平成 24 年度から市販された。また、近年、A 群ロタウイルス (RV) は種の壁を越え、動物からヒト、あるいはヒトから動物へ感染することが報告されており、畜産現場における RV への監視の必要性が高まっている。そこで本研究では、まず畜産現場における効率的な分子疫学検査法を検討し、それを利用してウシ、ウマ及びブタにおける RV の分子疫学調査を実施した。また、ウシ RV 感染症との類症鑑別を行うため、ウシ下痢症についての迅速診断法も開発し、検体材料の類症鑑別に応用するために条件を検討中である。RV 検査法の検討では、イムノクロマト法による簡易検査でスクリーニングを行い、陽性となった糞便検体について次世代シーケンスを実施し、解析ソフトで全遺伝子型を迅速かつ簡便に行う方法を確立した。この方法を用いたウシ RV の分子疫学調査では、調査した我が国のウシ RV35 株は全て典型的なウシの遺伝子型を示し、RotaTeq あるいはヒト RV との遺伝子再集合は認められなかった。ウシ RV の 1 株はこれまでに報告のない G15-P[14] 遺伝子型を示したが、各遺伝子分節の解析でウシ RV どちらの遺伝子再集合で出現した株と考えられた。ウマ RV は、調査 24 株全てが典型的なウマ型の遺伝子型を示し、ヒト RV との組み換えは確認されなかった。しかし系統樹解析を実施したところ、この 24 株中 20 株の NSP4 はウシ RV のクラスターに分類された。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が、このウシ型 NSP4 はウマ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 については調査した 8 株中の 1 株は NSP5 遺伝子がヒトでしか報告のない H2 型を保有しており、ヒト RV の NSP5 がブタ RV のそれと組み変わった可能性が考えられた。今回の研究では、我が国の家畜には各家畜固有の RV が浸潤していることが確認され、ウシにおいては RotaTeq やヒト RV との遺伝子組み換えは確認されなかった。しかし、ウマ RV にはウシ RV と、ブタ RV ではヒト RV との遺伝子組み換えを示唆する知見が得られたことから、今回確立した分子疫学検査法を用いて今後も家畜の RV を監視し続ける必要があると考えられた。

1. 研究目的

A 群ロタウイルス (RV) は各種動物の若齢個体に下痢を起こす病原体であり、家畜の RV 感染症は経営において育成前期の下痢による発育不良により経済損失を伴

う疾病であるが、法令で監視伝染病に指定されていないことから、その対策が遅れており、各地で冬季を中心とした発生が認められる。家畜の RV については、他の感染症と混合感染すると症状は重篤化

し、哺乳期の家畜においては死亡の原因となる。予防にはウシ及びウマ RV の不活化ワクチンが応用されており、母畜に接種し、初乳を介して子牛あるいは子馬を免疫するが、接種を行っている農家は一部に限られているのが現状である。RV ワクチン RotaTeg は、ワクチン原株のウシ RV の VP4 および VP7 遺伝子をヒト RV のそれと入れ替えた 5 種類のヒト-ウシ再集合体 RV 株からなる多価生ワクチンであり、元株がウシ由来の株であるにもかかわらずウシに対する病原性は検討されていない。また、RV はウイルス粒子内部に 11 本 2 本鎖 RNA 分節を遺伝子として持ち、分節 RNA を交換することで容易に変異ウイルス（遺伝子組換え体）が出現することから、ワクチン株が畜産現場に漏出し、反芻獣やその他の家畜由来の RV 株との遺伝子組換え体が発生する可能性がある。これらのことから、家畜の RV に対する監視をこれまで以上に強化する必要がある。また、家畜にはそれぞれの家畜固有の RV が報告されているが、近年、異種動物由来の RV 間に遺伝子分節の交換による遺伝子再集合体が確認されている。そこで、畜産現場における RV の効率かつ効果的な診断法を特にウシを中心に検討し、その方法を用いてウシ、ウマ及びブタの RV の分子疫学調査を行った。

B. 研究方法

1. 材料

4 株のウシ RV :
RVA/Cow-tc/JPN/IS-1/1996/G6P[5]、
RVA/Cow-tc/JPN/IS-8/1997/G6P[11]、
RVA/Cow-tc/USA/NCDV/1967/G6P[1] 及び

RVA/Cow-XX/XXX/KK-3/XXXX/G10P[11] を用い、ヒト用の RV 簡易検出キット：イムノクロマト法 5 種類（ディップスティック ‘栄研’ ロタ（栄研化学）、ラピッドテスト ロターアデノ（積水メディカル）、BD Rota/Adeno エグザマン スティック（ベクトン・ディッキンソン）、ラピッドエスピー<ロタ>（DS ファーマバイオメディカル）、イムノカード ST ロタウイルス（ティ エフ ビー）、ラテックス凝集反応 2 種類：ロタレックスドライ（積水メディカル）及びロタスクリーン（デンカ生研）及び ELISA 1 種類：ロタクロン（ティ エフ ビー）の感度を検討した。

次世代シーケンスによる遺伝子型別は、イルミナ社の MiSeq を用い、ウシ RV については 36 株、ウマ RV は 24 株、ブタ RV は 8 株を遺伝子解析に供した。

2. 方法

[ヒト用の RV 簡易検出キットの感度の検討]

4 株のウシ RV を 10 倍段階希釈し、ヒト用の RV 簡易検出キットそれぞれの感度を比較した。さらに MA-104 細胞を用いたウイルス分離及び Gouvea ら（J Clin Microbiol 28, 276-282 (1990)）の VP7 を標的としたプライマーを用いた RT-PCR との感度の比較も行った。

[次世代シーケンスを用いた遺伝子型別]

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。

[ウシ RV 感染症の識別検査]

ウシ RV と類症鑑別の必要な病原体、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)、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もとに設計した。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) については既知のプライマー及びプローブを用いた。それぞれの Primer 及び Probe 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°C 300 秒、 95°C 30 秒の後、 95°C 5 秒、 55°C 20 秒、 72°C 20 秒を 40 サイクル行った。

C. 研究結果

1. 結果

[ヒト用の RV 簡易検出キットの感度]

$1 \times 10^7 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ の濃度に調整した 4 株のウシ RV を 10 倍段階希釈し、5 種類のイムノクロマト法によるキットの検出限界を調べたところ、検出限界はディップスティック ‘栄研’ ロタで、 $1 \times 10^3 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 、ラピッドテスト ロターアデノで $1 \times 10^1 \sim 10^2 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 、BD Rota/Adeno エグザマン スティックで $1 \times 10^1 \sim 10^2 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 、ラピッドエスピー<ロタ>で $1 \times 10^0 \sim 10^1 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 、イムノカード ST ロタウイルスで $1 \times 10^0 \sim 10^1 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ であり、ディップスティック ‘栄研’ ロタが最も高い検出感度を示した。ラテックス凝集反応の検出限界は、ロタレックスドライが $1 \times 10^1 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 、ロタスクリーンが $1 \times 10^0 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ であり、イミュノクロマト法よりも若干低い傾向にあった。ELISA を用いたキットロタクロンの検出限界は $1 \times 10^1 \sim 10^2 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ であった。RT-PCR では、Gouvea らのプライマーは農林水産省の定める家畜の病性鑑定指針に記載されているため、現場で病性鑑定を行っている全国の家畜保健衛生所で使用されている。このプライマーを用いたワンステップ RT-PCR の検出感度は $0 \sim 1 \times 10^3 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ であり、KK3 株を検出することができなかった。ウイルス分離では 4 株すべて、元の濃度である $1 \times 10^7 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ を示した。

[次世代シーケンシングによる遺伝子型別]

次世代シーケンサー MiSeq により得られた fastq ファイルを CLC Genomics Workbench 5.5 にインポートし、データベース上から得たウシ、ウマ及びブタ RV の

各遺伝子分節の代表的な遺伝子型を参照配列として reads をマッピングすることで簡易的な遺伝子型別を行ったところ、ディップスティック‘栄研’ロタ陽性の糞便は全て、全 11 遺伝子分節の配列の遺伝子型別を行うことができた。

[ウシ RV 感染症の類症鑑別]

作成したプライマー及びプローブを用いて、ウシ B 群ロタウイルス、ウシ C 群ロタウイルス、牛トロウイルス、哺乳類オルソレオウイルス、アイメリアを識別することができた。既知のプライマー及びプローブも併用し、ウシ RV 感染症との類症鑑別に応用するために条件を検討中である。

[ウシ、ウマ及びブタ RV の遺伝子解析]

ウシ RV の分子疫学調査では、調査した我が国のウシ 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。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。しかし系統樹解析を実施したところ、24 株中 20 株の NSP4 はウシ RV のクラスターに分類された。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、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

畜産において病性鑑定材料は、畜舎や放牧場等家畜が飼養されている場所に立ち入り、採材する以外に収集する手段がない。家畜の飼養場所は農林水産省の定める家畜飼養管理衛生基準に基づき、家畜保健衛生所の職員や管理獣医師以外は防疫上の観点から立ち入ることが制限されている。したがって、現場において家畜の RV 株を収集するには家畜保健衛生所または管理獣医師の協力が必要不可欠である。しかしながら、産業動物の診療業務を行う管理獣医師は全国的に不足しており、現場採材を依頼しにくい状況にある。また、家畜保健衛生所においては口蹄疫、高病原性鳥インフルエンザや牛海綿状脳症といった国家経済に影響を及ぼす疾病が近年連続して発生し、これらの重要家畜伝染病に対する業務量が増加したのに対し、それに見合う職員数の増員がなされていない。このため、ウシ RV 感染症のような損失の無視できない疾病であっても、監視伝染病に指定されていない理由から、それに費やす労力や時間は限られており、今回、ウシ RV 感染症の識別に開発したリアルタイム RT-PCR の手法は有用と考え、現在、類症鑑別に応用するために条件を検討中である。

家畜の RV の採材および材料の提供を依頼する場合、省力的かつ効率的な方法を提示する必要がある。このことから、操作や判定が簡単であるヒト用キットの

応用は有用と考えられる。これまで家畜保健衛生所や一部の家畜診療所において、RV 感染症の診断にヒト用キットは用いられてきたものの、キットによる検出感度は考慮されていなかった。Nemoto ら (J Vet Med Sci 73, 1247-1250 (2010)) は、ウマ RV のヒト用キットでの検出感度を調べ、キットの種類により感度に差があることを報告している。しかしながら、ウシ RV についてヒト用キットの検出感度を調べた報告はない。そこで、ウシ RV のヒト用キットでの検出感度を調べた。その結果、Nemoto らの報告と同様に、8 種中 6 種に使用したウイルス株に対する 10~100 倍の検出感度の差が認められた。このことは、ヒト用キットはヒトのロタウイルスに対するモノクローナルおよびポリクローナル抗体が使用されていることから、この抗体のウシ RV およびウマ RV の各株に対する反応性の相違がその原因の 1 つである可能性が考えられた。さらにキット間を比較すると 10~1000 倍の検出感度の差が認められ、ディップスティック ‘栄研’ ロタがすべての株に最も高い検出感度を示した。この結果は Nemoto らの結果と一致し、ディップスティック ‘栄研’ ロタはウマ RV 同様、ウシ RV に対しても最も有用なヒト用キットと考えられた。さらにブタの糞便検体についてもウシ同様の感度を有することも確認した。本キットはウシ RV ではウイルス分離よりも 1×10^4 倍感度が低いものの、畜産現場で採材する際のスクリーニング法として意義が高く、有効活用することで、効率的に家畜の RV 株の収集が可能と思われた。

次世代シーケンサーは一度に RV 遺伝子 11 分節全ての遺伝子を解析できる有用な検査方法である。ディップスティック ‘栄研’ ロタで陽性を示す糞便のほとんどが、今回の手法により遺伝子型別が可能であったことから、ウイルス分離を行わないことで *in vivo* におけるウイルスの状態に忠実な遺伝子解析を行うことができる優れた技術と考えられた。ウシ RV について実施した次世代シーケンス解析では、36 株のウシ RV 全てが典型的なウシの遺伝子型を示し、RotaTeq あるいはヒト RV との遺伝子再集合を認めないことが明らかになった。ウシ RV の 1 株はこれまでに報告のない G15-P[14] 遺伝子型を示したが、各遺伝子分節の解析でウシ RV どちらの遺伝子再集合で出現した株と考えられた。ウマ RV は、調査した全株が典型的なウマ型の遺伝子を示し、ヒト RV との組み換えは確認されなかった。しかしこの中の殆どが NSP4 はウシ型を示し、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 はウマ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 については調査した全ての株はブタ型の遺伝子分節を保有していたが、この中の 1 株は NSP5 遺伝子がヒトでのみ報告されている H2 型であった。この株の NSP5 以外の遺伝子はブタ型であり、ヒト RV の NSP5 がブタ RV と遺伝子組み換えを起こしたものである可能性が考えられた。

E. 結論

今回検討した畜産現場における効率的な RV 感染症診断法及び RV 遺伝子型別は、今後我が国におけるヒトから家畜、家畜からヒトへの RV 感染を監視する上で有用であり、我が国の畜産現場における RV 感染症対策にも役立つと考えられた。

今回の研究結果から、ヒト RV と家畜あるいは家畜の RV どうしの遺伝子組み換えが確認されたことから、今後、RotaTeq と野外のウシ RV との遺伝子組み換え株の出現を含め、家畜全体の RV を監視し続ける必要があると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

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. 2013. Detection

of Bovine Group A Rotavirus Using Rapid Antigen Detection Kits, RT-PCR and Next-Generation DNA Sequencing. J Vet Med Sci. 75, 1651-1655.

2. 学会発表

長井 誠、南-福田 藤子、小原潤子、小池新平、赤松裕久、土赤 忍、片山幸枝、大場真己、佐々悠木子、大松 勉、古谷哲也、片山和彦、白井淳資、水谷哲也、糞便を材料とした次世代シーケンスによるウシ A 群ロタウイルスの遺伝子型別、第 156 回日本獣医学会学術集会、2013 年 9 月、岐阜

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

マイクロチップ電気泳動による RNA-PAGE の検討

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

ロタウイルスは、コア、内殻、外殻の 3 層で構成される二重殻粒子で、コア内に 11 本の分節二本鎖 RNA (double-stranded RNA : dsRNA) をゲノムとして有する。患者便検体より抽出したゲノム RNA をアクリルアミドゲルにより電気泳動すると (RNA-PAGE)、分子量の差によって各分節を分離することができる。この泳動パターンは、群および遺伝子型によって異なるため、RNA-PAGE の泳動パターンから群、遺伝子型を大まかに分類することができる。しかし、RNA-PAGE は、泳動条件が異なると泳動パターンが異なるため、施設が異なると簡単に比較することができない。この問題点を解決するため、本分担研究では、施設間誤差の小さいマイクロチップ電気泳動装置を用いたロタウイルス RNA パターン解析系の構築を試みた。マイクロチップ電気泳動装置 MCE-202 MultiNA (MultiNA、島津製作所) は、本研究で設定したポリマーと泳動条件において、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った。MultiNA-RNA-pattern (MultiNA-RNAP) は、塩基配列が等しい場合、再現性良く同じ MultiNA-RNAP を示すこと、塩基は列が異なる場合には異なる MultiNA-RNAP を示すことが明らかになった。今後、MultiNA-RNAP をスタンダードフラグメントに対する相対移動度として数値化することで、パターン判別プログラムを構築し、地理的に離れたラボ間であっても利用可能な、簡便かつ高感度なロタウイルス株鑑別が実現可能となる。

A. 研究目的

ロタウイルスは、コア、内殻、外殻の 3 層で構成され、11 本の分節二本鎖 RNA (double-stranded RNA : dsRNA) をゲノムとしてコア内に有する。内殻を構成する VP6 の抗原性により A-G 群に分類され、このうち A-C 群がヒトに感染する。さらに A 群は、スパイクを構成する VP4、外殻

を構成する VP7 の遺伝子型によって、それぞれ P[1]-P[35]、G1-G26 に分類される。これらの分類は主に遺伝子解析により行われるが、各群、遺伝子型ごとに異なるプライマーを用意しなければならないことから、作業が煩雑である。

患者便検体より抽出したゲノム RNA をアクリルアミドゲル電気泳動すると

(RNA-PAGE)、分子量の差によって各分節が分離される。この泳動パターンは、群および遺伝子型によって異なる。そのため、RNA-PAGE の泳動パターンから大まかな群、遺伝子型を簡便に分類することができる。しかし、RNA-PAGE は、泳動条件が異なると泳動パターンに差が生じるため、施設間で簡単に比較することができない。

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

本研究では、施設間誤差の小さいマイクロチップ電気泳動装置を用いたロタウイルス RNA パターン解析系の構築を試みた。

B. 研究方法

材料および方法

<試験サンプル>

ロタウイルス実験室標準株 Wa 株、Hochi 株、69M 株、WI61 株、臨床分離株 (G1P1[8])、サルロタウイルス SA-11 (ATCC より購入) を用いた。本研究に用いたヒト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

初年度：RNA-PAGE の条件設定

ヒトロタウイルスおよびサルロタウイルスの培養細胞による増殖系によって増殖したロタウイルスの RNA-PAGE が可能となった。ヒトロタウイルスについては、ひと株の臨床分離株をテストしたのみである。RNA-PAGE によるゲノム検出系は、A 群のみならず、B, C 群ロタウイルス検出も可能であることに加え、バンドパターンからある程度の株分別も可能であると思われ、ロタウイルスのスクリーニングに有用である。今後、臨床検体を用いた検討を継続すると共に、パターンの蓄積を行うことで、ロタウイルス株分別用データベースとしても利用可能であると思われた。

次年度：マイクロチップ泳動条件の最適化と RNA-PAGE との比較

マイクロチップ電気泳動は dsRNA を安定して分離できるが、11 セグメントの分離能力は RNA-PAGE の方が高かった。施設間誤差を検証するため、NT-6 を 3 台の装置で測定した。装置 1 台につき 4 枚のマイクロチップをセットし、各チップ 3 回ずつの測定を行った。合計 36 回の試験について各セグメントの移動度を比較したところ、標準偏差は 0.5 以下であり、大きな誤差が認められなかった。マイクロチップ電気泳動装置を用いたロタウイルス RNA パターン解析系は、異なる施設の泳動結果を高精度に比較できるため、RNA パターン解析による全国多施設によるロタウイルス流行株の疫学調査に有用と思われた。

最終年度：RNA-PAGE, MultiNA, QIAxcel

Advanced system の比較検討

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 を使い、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-1200kit 以上に dsRNA を分離できることが明らかになった。

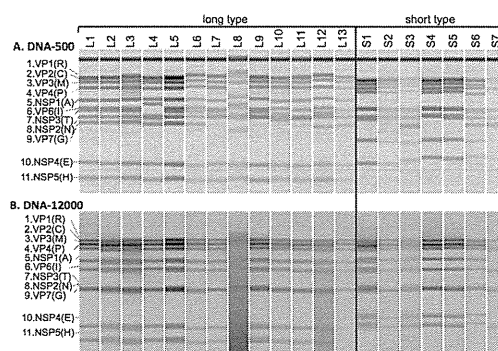


図1. ロタウイルスdsRNAのDNA-500 kitとDNA-12000 kitによる泳動パターン

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 MultiNA 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異なる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。MultiNAP と RNA-PAGE の比較検討を行った (図 2)。

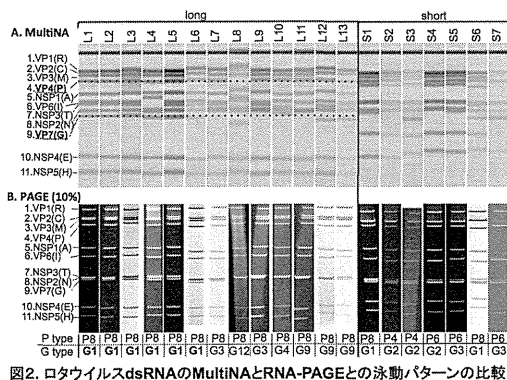


図2. ロタウイルスdsRNAのMultiNAとRNA-PAGEとの泳動パターンと比較

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ことが示唆された。

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。おそらく、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、依然として不明なままである。今後、塩基配列の変化をどの程度検出できるのか十分に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 dsRNA のモビリティシフトをスタンダードとの

相対移動度で数値化している。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よいが、異なる場合、相対移動度の算出に影響が出る。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、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を構築できる。

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 Conference on Caliciviruses China 2013, November Beijing/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 Beijing/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 への結合に関与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