

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

我が国におけるロタウイルス分子疫学解析手法の確立と 2011/12 年および 2012/13 年シーズンの解析結果

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

我が国におけるロタウイルス (RV) の分子疫学調査を行うにあたり、RV ゲノムの各セグメントの 5' 端および 3' 端近傍に universal primer を設計し、RT-PCR 法によるゲノム全長の増幅および効率的な塩基配列解析法を確立した。また、次世代シーケンサーを用いて更に効率的に全塩基配列を決定する手法についても確立した。分子疫学調査は 2011/12 年シーズンおよび 2012/13 年シーズンにかけて実施した。調査期間中、7 都道府県 10 病院 (北海道 3 病院、秋田県、宮城県、東京都 2 病院、愛知県、京都府、山口県) から、RV 下痢症入院患者の便検体を収集し、ウイルスの全塩基配列解析を実施した。2011/12 年シーズンは 119 例、2012/13 年シーズンは 236 例の RV 陽性検体を収集した。2011/12 年シーズンの 119 検体について VP7 の遺伝子型を決定したところ、G1 が 74 検体 (62%)、G3 が 8 検体 (7%)、G9 が 37 検体 (31%) であった。更に全てのゲノム遺伝子型構成 (VP7- VP4- VP6- VP1- VP2- VP3- NSP1- NSP2- NSP3- NSP4- NSP5) を調べたところ、G1 タイプ 74 検体のうち、19 検体は典型的な Wa-like 遺伝子型構成 (G1- P[8]- I1- R1- C1- M1- A1- N1- T1- E1- H1) であったが、54 検体は VP7 と VP4 以外が DS-1-like 遺伝子型構成 (G1- P[8]- I2- R2- C2- M2- A2- N2- T2- E2- H2) を示す新しいタイプのリアソータントであった。2012/13 年シーズンの 236 検体中、165 検体についても解析を行ったところ、この DS-1-like G1 タイプが 61% (100 検体) を占めていた。このことから、2011/12 年シーズンに初めて確認された DS-1-like G1 ウイルスの流行は、2012/13 年シーズンも継続していることが明らかとなった。

A. 研究目的

ロタウイルス (RV) は乳幼児の重症胃腸炎の最大の原因であり、我が国における年間の患者数は 70-80 万人、入院数は 7-8 万人におよぶと推定されている。また、

時に腎炎や腸重積、脳炎・脳症などの重篤な合併症を引き起こすこともあり、年間数人から 10 人前後の患者が、RV が原因で命を落としている。しかし、2011 年 11 月 (ロタリックス) および 2012 年 7 月 (ロ

タテック) から RV ワクチンが接種可能となったため、RV による疾病負担が減少することが期待されている。但し、この 2 種類のワクチンは、いずれも経口生ワクチンである事から、ワクチンによる発症、ワクチン株と野生株とのリアソータントの出現などが懸念されている。また、ワクチンの導入によって、流行株の遺伝子型分布が変化する可能性、更にはワクチンが無効なウイルス株が発生する可能性もあるため、それらを監視する必要がある。ところが、我が国における RV サーベイランス体制は貧弱であり、これまで全国的な RV の分子疫学調査は行われておらず、RV ワクチンの効果を検証する事や、ワクチン導入による流行株の変化を監視する事が出来ない状況であった。そこで我々は、RV による入院症例の便検体を全国の病院から収集し、我が国における初の全国的 RV 分子疫学調査を開始した。

B. 研究方法

1. 検体の採集

2011/12 年シーズンは、苫小牧市立病院 (北海道)、由利組合総合病院 (秋田県)、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 6 病院から入院症例の便検体を収集した。2012/13 年シーズンはこれに加えて、NTT 東日本札幌病院 (北海道)、小樽協会病院 (北海道)、宮城県立こども病院 (宮城県)、東京医科大学病院 (東京都) の 4 病院からも収集することができた。

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。逆転写反応には PrimeScript[®] cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ) を用い、プライマーは random 6 mer を用いて行った。PCR 反応は PrimeSTAR[®] GXL DNA polymerase (タカラバイオ) を用いた。各セグメントに特異的なプライマー (表 1) を用いて PCR を行い、得られた PCR 産物についてダイレクトシーケンス法にて塩基配列を解読した。また、2012/13 シーズン以降の検体については次世代シーケンサーを用いて解析を行った。サンプルは抽出した RNA から 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

1. 2011/12 年シーズンの解析結果

2011/12 年シーズンは 6 病院から 165 検体を収集し、このうち 119 検体が RV 陽性であった。シーケンス解析の結果、

119 検体の内、VP7 遺伝子型の内訳は G1 が 74 検体 (62%)、G3 が 8 検体 (7%)、G9 が 37 検体 (31%) であった (表 2)。更に、全てのゲノム遺伝子型構成 (VP7- VP4- VP6- VP1- VP2- VP3- NSP1- NSP2- NSP3- NSP4- NSP5) を調べたところ、G1 タイプ 74 検体のうち、19 検体は典型的な Wa-like 遺伝子型構成 (G1- P[8]- I1- R1- C1- M1- A1- N1- T1- E1- H1) であったが、54 検体は VP7 と VP4 以外が DS-1-like 遺伝子型構成 (G1- P[8]- I2- R2- C2- M2- A2- N2- T2- E2- H2) を示す新しいタイプのリアソータントであった。また、1 検体は Wa-like ウイルスと DS-1-like ウイルスの混合感染であった。G3 および G9 のウイルスは全て Wa-like 遺伝子型構成であった。ただし、G9 には 2 種の lineage が存在し、一方 (24 検体) は世界的に広く流行している株であり、もう一方 (13 検体) はこれまでに報告されていないブタ RV に類似した配列を有していた。

2. 2012/13 年シーズンの解析結果

2012/13 年シーズンは 9 病院から 344 検体を収集し、そのうち 236 検体が RV 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 (表 3)。昨シーズンに引き続いて主流株であった 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。残りの検体については引き続き解析中である。

D. 考察

従来、RV 遺伝子型の世界分布は G1P[8]、G2P[4]、G3P[8]、G4P[8]、G9P[8] の 5 種類が全体の 90% を占めていることが分かっている。また、G1P[8] 型のウイルスは通常 Wa-like 遺伝子型構成 (G1- P[8]- I1- R1- C1- M1- A1- N1- T1- E1- H1) を有しており、他の遺伝子型との間でリアソートメントが起こっても優勢とはならず、流行株として定着することは無かった。従って、本研究で発見された DS-1-like 遺伝子型構成を持つ G1P[8] 型ウイルス (G1- P[8]- I2- R2- C2- M2- A2- N2- T2- E2- H2) が広い範囲で流行を引き起こしたのは、これまでの常識を覆す世界で初めての例である。塩基配列の解析結果から、DS-1-like G1 ウイルスの検体間の相同性は極めて高く、ほとんどが clonal strain であると考えられる。従って、この DS-1-like G1 ウイルスはごく最近、Wa-like G1 ウイルスと DS-1-like G2 ウイルスの間のリアソートメントにより発生し、それを単一起源として我が国全土に急速に広がり、2011/12 年シーズン以降の流行を引き起こしたと考えられる。また、このウイルスの塩基配列はアメリカおよびオーストラリアで報告されたウ

ウイルスに近いことが判明したが、他の地域（特に日本および近隣アジア地域）におけるこれまでのRV分子疫学調査が不十分である以上、このリアソータントウイルスがどこで発生し、どのように広がったのかを結論付けることは困難である。

我が国における遺伝子型の地域分布について詳しく見ると、地域によって流行している遺伝子型の割合が大きく異なっていることが分かる。例えば、2011/12年シーズンはDS-1-like G1ウイルスは本州にある全ての病院から検出されたが、北海道の病院からは1例も検出されなかった。しかし2012/13年シーズンになると、北海道でも検出されたウイルスの約半数がDS-1-like G1であった。愛知県はDS-1-like G1の割合が突出して高かった（97%）。また、ブタロタウイルスに類似したG9タイプのウイルスは、2011/12年シーズンは愛知県で多く（13検体中12検体、残り1検体は京都）、2012/13年シーズンは山口県で多く見られた（13検体中12検体、残り1検体は北海道）。G2タイプは2011/12年シーズンは1検体も検出されなかったが、2012/13年シーズンは東日本（北海道～東京）において10検体検出された。これらのことから、RVの流行遺伝子型は、地域ごと・シーズンごとに目まぐるしく変化することが分かる。

どのような要因でこのような変化が起こるのか明確には分かっていないが、考えられる要因としては以下のようなものがある。まず1つ目は単純な伝播のスピードである。RVの重症患者の大部分は乳幼児であるため、患者自身の行動範囲が狭く、糞口感染という特性上、（例えば飛沫

感染する病原体よりも）離れた地域へ伝播するのに時間がかかると考えられる。

2つ目は感受性集団の免疫状態の影響である。RVは感染する度に軽症化する傾向があるため、特定の遺伝子型のウイルスが流行するとそのウイルスに対する集団免疫が形成され、それ以外のウイルスが流行し易くなると考えられる。ただし毎年新生児（＝新しい感受性集団）が生まれるため、同じ遺伝子型のウイルスでも一定の間隔で流行を繰り返す、あるいは比較的小規模な流行が毎年継続することになる。3つ目はワクチンによる影響である。現在我が国では2種類のワクチンが接種可能であるが、どちらも高額であり任意接種であることから、未だ接種率はあまり高くない（50%未満）。また、自治体により助成の有無・程度が異なるため、地域ごとの接種率の差を生み、これが流行する遺伝子型に影響を与える可能性がある。これらの要因が複雑に絡み合い、流行遺伝子型の地域差やシーズンごとの変化をもたらしていると考えられる。

本研究では遺伝子型と重症度（重症度スコアおよび中枢神経症状の有無）との相関性についても調査しているが、これまでに明確な偏りは確認されていない。特に中枢神経症状については症例が少なく、結論を得るためには更なる継続調査が必要である。また、重症度と遺伝子型の関連性を厳密に検証するには、RV感染症の軽症例や不顕性感染例についても調べる必要があり、今後の課題である。

本研究において新しく発見されたDS-1-like G1タイプのウイルスは、従来の検出・検査法（イムノクロマト法や

ELISA 法、multiplex-PCR 法など) では区別できないため、今後は VP7、VP4 だけでなく、全セグメントの塩基配列解析による分子疫学調査が必要不可欠である。また、こ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

我が国における全国的な RV 分子疫学調査の結果、これまでにどの国からも報告されていない新しいタイプのリアソータウイルス DS-1-like G1P[8]が検出され、これが 2011/12 年シーズンおよび 2012/13 年に渡って大流行を引き起こしていることが明らかとなった。このウイルスの今後の動向には注意が必要であり、継続的に監視するべきである。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujii Y, Shimoike T, Takagi H, Murakami K, Todaka-Takai R, Park Y, Katayama K: Amplification of all 11 RNA segments of group A rotavirus based on reverse transcription polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol.* 2012; 56:630-638.
- 2) Kitaura K, Fujii Y, Matsutani T, Shirai K, Suzuki S, Takasaki T, Shimada S, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, Ogasawara K, Kurane I, Suzuki R: A new method for quantitative analysis of the T cell receptor V region repertoires in healthy common marmosets

by microplate hybridization assay. *J Imm Method* 2012, 384:81-91

- 3) 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.
 - 4) 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.
 - 5) 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、下池貴志、高木弘隆、Dennis Francis、村上耕介、朴英斌、戸高玲子、脇田隆字、片山和彦: RT-PCR による A 群ロタウイルスの全 11 セグメントの増幅法の

構築 第 60 回日本ウイルス学会学術集会
(大阪) 2012 年 11 月 13-15 日

- 2) 高木弘隆、藤井克樹、村上耕介、戸高玲子、下池貴志、小林宣道、片山和彦：A 群ロタウイルス (RVA) の分離・増殖における感受性細胞株のクローニングによる検討 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 (大阪) 2012 年 11 月 13-15 日
- 3) 村上耕介、岡智一郎、下池貴志、藤井克樹、朴英斌、戸高玲子、脇田隆字、松田幹、片山和彦：ノロウイルス VLP の Caco-2 細胞への結合に関与するタンパク質の探索 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 (大阪) 2012 年 11 月 13-15 日
- 4) 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：カリシウイルスのユニバーサルなプラスミドベースリバーシジェネティクスシステム 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 (大阪) 2012 年 11 月 13-15 日
- 5) 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とそのゲノム RNA の局在 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 (大阪) 2012 年 11 月 13-15 日
- 6) 戸高玲子、岡智一郎、村上耕介、下池貴志、藤井克樹、朴英斌、高木弘隆、脇田隆字、中西章、片山和彦：Development of plasmid DNA transfection-based reverse genetics system for murine norovirus and feline calicivirus 第 35 回日本分子生物学会年会 (福岡)、平成 24 年 12 月 11-14 日
- 7) 村上耕介、岡智一郎、下池貴志、藤井克樹、朴英斌、戸高玲子、脇田隆字、松田幹、片山和彦：Screening for candidate receptor on Caco-2 involved in norovirus binding

by mass spectrometry from different approaches 第 35 回日本分子生物学会年会 (福岡)、平成 24 年 12 月 11-14 日

- 8) YoungBin Park, Reiko Todaka, Takashi Shimoike, Kosuke Murakami, Yoshiki Fujii, Takaji Wakita, Kazuhiko Katayama：Evaluation of two newly developed human norovirus detection system direct RT-PCR and BLEIA 第 35 回日本分子生物学会年会 (福岡)、平成 24 年 12 月 11-14 日
- 9) 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 24 回学術集会 (大阪) 2012 年 11 月 12 日
- 10) 藤井克樹：ロタウイルスゲノム解析と分子疫学 衛生微生物技術協議会第 33 回研究会 (横浜) 2012 年 6 月 28-29 日
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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

16) 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

17) 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

18) 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

19) 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

20) 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

21) 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：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1. ロタウイルスの各セグメント特異的プライマー

Primer name	5' - Sequence -3'	Tm Value	Position	Product size (bp)	Full genome size (bp)
VP1 F primer	GGCTATTAAGCTRTACAATGG	53.0-54.8	1-22	3299	3302
VP1 R primer	CACATCTAAGCACTCTAATCTTG	55.1	3277-3299		
VP2 F primer	GGCTATTAAGGCTCAATGG	54.3	1-20	2696	2717
VP2 R primer	TTGGCGTTTACARTTCGTTC	52.6-54.6	2676-2696		
VP3 F primer	AGTAGTGYGTTTTACCTCTG	52.2-54.3	19-38	2571	2591
VP3 R primer	TCACATCATGACYAGTGTGTTAAG	55.3-57.1	2566-2589		
VP4 F primer	GGCTATAAAATGGCTTCGCT	54.3	1-20	2362	2359
VP4 R primer	GGGGGTCACATCCTC	54.8	2348-2359 (+3)		
VP6 F primer	GGCTTTWAAACGAAGTCTTC	52.2	1-20	1356	1356
VP6 R primer	GGTCACATCCTCTCACT	53.1	1340-1356		
VP7 F primer	GGCTTTAAAAGMGAGAATTTC	53.0-54.8	1-22	1062	1059
VP7 R primer	GGGGGTCACATCATACAATTCT	56.7	1041-1059 (+3)		
NSP1 F primer	GGCTTTTTTTATGAAAAGTCTTGTG	53.9	1-25	1547	1564
NSP1 R primer	CTAGGGGCTACTCTAGT	53.1	1531-1547		
NSP2 F primer	GGCTTTTAAACGCTCTCAGTC	56.5	1-21	1058	1058
NSP2 R primer	GGTCACATAACGCGTTTCTATTC	56.9	1036-1058		
NSP3 F primer	GGCTTTTAATGCTTTTCAGTGGTTG	57.2	1-25	1050	1050
NSP3 R primer	GGTCACATAACGCCCTATAG	58.5	1030-1050		
NSP4 F primer	CTTTTAAAAGTTCTGTTCCGAGAG	55.3	3-26	739	750
NSP4 R primer	AAGACCATTCTTCCATTAAC	52.6	721-741		
NSP5 F primer	GGCTTTTAAACGCTACAGT	54.3	1-20	663	663
NSP5 R primer	GGTCACAAAACGGGAGTGGGGA	62.3	642-663		

表2. 2011/12年シーズンの解析結果(検体数)

病院名 (都道府県)	苫小牧 (北海道)	由利 (秋田)	昭和 (東京)	江南 (愛知)	南丹 (京都)	山口大 (山口)	合計
RV positive	5	42	3	52	14	3	119
Wa-like G1	5	5	1	5	2	1	19
DS-1-like G1	0	26	2	16	8	2	54
G1 (mix)	0	0	0	1	0	0	1
G3	0	2	0	3	3	0	8
G9	0	9	0	27	1	0	37

表3. 2012/13年シーズンの解析結果(検体数)

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 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)

臨床材料からの効率的な A 群ロタウイルスの分離方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
研究協力者 齋藤典子 同研究所 感染病理部電子顕微鏡室

研究要旨

臨床材料から簡便かつ効率よく A 群ロタウイルスを分離・培養可能な手法を開発すべく、汎用感受性細胞 MA104 及び CV-1 を用いて、Wa 株及び DS1 株を増殖指標として細胞クロニングを行った。その結果札幌医大分譲 MA104S 細胞より増殖性優良な細胞クローンを得ることができた。またこれらの細胞クローンにおいては Wa 及び DS1 が持続感染を起こしうることを示唆され、臨床材料からの hRVA 分離手法を大きく見直し検証する必要性が示された。

A. 研究目的

これまで A 群ロタウイルス(以下 hRVA)の分離培養については成功率が 5 割程度であり、さらに多数回の盲継代を要するなど煩雑である。加えて臨床材料そのものに大量にウイルスが含まれること、本研究の主題でもある分子疫学的手法が発達し培養法を用いない解析が可能になったことなどから、培養細胞を用いた古典的な分離手法はあまり用いられなくなった。しかしながらワクチンが導入され、その効果を評価する上で流行株に対する中和抗体価は非常に重要であり、そのためにはその年の流行株の分離・ストック作製および中和抗体価測定は必須となる。必然的に培養細胞増殖系は必要となるのである。

本研究においてはこれまでの細胞培養手法を見直し、hRVA 培養における細胞株や培養条件の改善を図るとともに、簡便かつ明瞭に①臨床材料からの直接分離、②感染力価測定などの評価、の実現させることを目的とした。また感受性細胞である MA104 細胞は ATCC より日本への分譲が不可となっていることから、国内で調達できる細胞株を用いて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)
- ・ sRVA-SA11 株(ATCC VR-1565)

*sRVA : サルロタウイルス

(2) 培養細胞

- ・ MA104S (札幌大より分譲)
- ・ MA104R (理化学研究所より有償分譲)
- ・ CV-1 (JCRB9049)

(3) 試薬類

- ・ 5%FBS-EMEM (細胞培養用培地)
- ・ 0.15%BSA-EMEM/acetyltrypsin 2.5 μ g/ml 含有 (ウイルス増殖用培地)
- ・ Acetyltrypsin : Sigma Cat NO. 6767

(4) RVA 検出キット

- ・ Rotaclone® (TFB) : ELISA キット
- ・ デイップ スティック ‘栄研’ ㊦ (栄研化学) : IC キット

2. 方法 1

各細胞株からの hRVA 感受性クローン抽出

限界希釈法により各細胞株より 24 クローンを作出し、trypsin 耐性 ($\sim 3 \mu$ g/ml)、Wa 及び DS1 接種後のウイルス増殖性を指標として優良クローンを抽出した。またこれらのうち MA104S から得られた細胞クローンに対して、限界希釈法により 24 クローンを作成し、同様の手法でサブクローニングを実施した。

3. 方法 2

MA104s サブクローン細胞への hRVA 接種後の持続感染性の検討

MA104S クローン細胞へ hRVA を接種・培養し、CPE 非発現/培養上清抗原 (+) の状態を確認後、この細胞を走査電子顕微鏡で観察すると細胞表面に virion-budding 様の像が観察された。これより hRVA の持続感染性が考えられたため、方法 1 により得られた MA104S サブクローン細胞を用い

て、hRVA 接種後 7 日目に培養上清除去・洗浄・培地交換を行い、更に 3 日間培養し、その上清中の抗原を IC 検出キットにて確認した。

(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. 結果 1

hRVA 高感受性細胞クローン及びサブクローン細胞の抽出

最初のクローニングにより、MA104S で 2 クローン、MA104R で 1 クローン、CV-1 で 1 クローン、hRVA 増殖優良な高感受性細胞クローンを抽出した。この中で MA104S-C4 及び C8 の 2 クローンが細胞の安定性・ウイルス増殖性ともに優れていたため、これらからさらに限界希釈法にてサブクローニングを実施し、C4 から 3 クローン (C4D2、C4D9、C4D10)、C8 から 1 クローン (C8D1) を抽出した。このサブクローンを 7 代以上継代後に Wa 及び DS1 の増殖性を確認したところ、C4D10 及び C8D1 で増殖性が安定していることが認められた。

2. 結果 2

hRVA 持続感染性の検討

方法 1 で得られた 4 つのサブクローン C4D2、C4D9、C4D10 及び C8D1 に対し、Wa 及び DS1 を接種し、培養-上清除去・洗浄・培地交換を行いさらに 3 日間培養したところ、培養上清中の抗原シグナルは C4D10

において最も強かった。その他のサブクローンでも明瞭な抗原シグナルが確認された。また C4D10 について、さらに上清除去・洗浄・培地交換を行い培養 2 日後に上清中の抗原を確認したところ、明瞭なシグナルが確認された。

D. 考察

臨床材料からの効率的な hRVA 分離・増殖を目指し、感受性細胞のクローニングという手法からアプローチを試み、従来汎用されてきた MA104 細胞より、増殖性優良なクローンを得るに至った。これまでの検討では ATCC 標準株による検討を行っており、臨床材料については得られた MA104S サブクローンをを用いて検討を続行する。またこれまで培養上清を新たな細胞に接種するという盲継代法にかわり、「培地交換による感染細胞継続培養」という手法によるウイルス分離法も試みる。今回「CPE 非発現→持続感染」ということの一面が示唆されたことは大きな収穫であろう。今後は特異抗体を用いた細胞内分布解析や感染細胞の TEM 観察など持続感染の証拠を集め、その解析を進めてゆくことも可能であろう。またサブクローンの一部では継続培養により CPE 様の形状変化も認められているため、このサブクローンをを用いて感染価測定系や中和試験系などの構築が大いに期待できよう。

E. 結論

臨床材料からの hRVA の効率的な分離培養を目指し、汎用されている感受性細胞株のクローニングを行い、ウイルス増殖

性優良なクローンを得ることができた。またこれらのクローンにおいて、hRVA-Wa 及び DS1 が持続感染に至り、効率よくウイルスを産生してい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

1) 高木弘隆、藤井克樹、村上耕介、戸高玲子、下池貴志、小林宜道、片山和彦：A 群ロタウイルス (RVA) の分離・増殖における感受性細胞株のクローニングによる検討 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 (大阪) 2012 年 11 月 13-15 日

2) 藤井克樹、下池貴志、高木弘隆、Dennis Francis、村上耕介、朴英斌、戸高玲子、脇田隆字、片山和彦：RT-PCR による A 群ロタウイルスの全 11 セグメントの増幅法の構築 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 (大阪) 2012 年 11 月 13-15 日

3) 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

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 23 年～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
Sato T, <u>Nakagomi T</u> , <u>Nakagomi O</u>	Cost-effectiveness analysis of a universal rotavirus immunization program in Japan.	Jpn J Infect Dis	64	277-283	2011
<u>Nakagomi O</u> , <u>Nakagomi T</u>	Rotarix in Japan: Expectations and Concerns.	Biol Ther	1	eCollection	2011
Doan YH, <u>Nakagomi T</u> , Cunliffe NA, Pandey BD, Sherchand JB, <u>Nakagomi O</u>	The occurrence of amino acid substitutions D96N and S242N in VP7 of emergent G2P[4] rotaviruses in Nepal in 2004-2005: a global and evolutionary perspective.	Arch Virol	156	1969-1978	2011
Komoto S, Wakuda M, Ide T, Niimi G, Maeno Y, Higo-Moiguchi K, <u>Taniguchi K</u>	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
Dutta D, Chattopadhyay S, Bagchi P, Halder UC, Nandi S, Mukherjee A, Kobayashi N, Komoto S, <u>Taniguchi K</u> , Chawla-Sarkar M	Active participation of cellular chaperone Hsp90 in regulating the function of Rotavirus non structural protein 3 (NSP3).	J Biol Chem	286	20065-20077	2011
Wakuda M, Ide T, Sasaki J, Komoto S, Ishii J, Sanekata T, <u>Taniguchi K</u>	Identification of a porcine rotavirus closely related to a novel group of human rotaviruses, J19 and B219.	Emerg Infect Dis	17	1491-1493	2011
Yokoyama T, Sugimoto N, <u>Taniguchi K</u> , 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	1190-1193	2011

Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Bányai K, Brister JR, Buesa J, Esona MD, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gómara M, Johne R, Kirkwood CD, Martella V, Mertens PP, Nakagomi O, Parreño V, Rahman M, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, <u>Taniguchi K</u> , Patton JT, Desselberger U, Van Ranst M.	Uniformity of Rotavirus Strain Nomenclature Proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG).	Arch Virol	156	1397-1413	2011
Kamiya H, Nakano T, Kamiya H, Yui A, <u>Taniguchi K</u> , Parashar U, the Rotavirus Epidemiology Study Group	Rotavirus-associated gastroenteritis hospitalizations among Japanese children aged <5 years: active rotavirus surveillance in Mie Prefecture, Japan.	Jap J Infect Dis	64	482-487	2011
Nakano I, <u>Taniguchi K</u> , 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	4382-4385	2011
Sugata K, <u>Taniguchi K</u> , 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	49-56	2011
<u>Nakagomi T</u> , <u>Nakagomi O</u> , Dove W, Doan YH, Witte D, Ngwira B, Todd S, Duncan Steele A, Neuzil KM, Cunliffe NA	Molecular characterization of rotavirus strains detected during a clinical trial of a human rotavirus vaccine in Blantyre, Malawi.	Vaccine	30	A140-151	2012
Doan YH, <u>Nakagomi T</u> , <u>Nakagomi O</u>	Repeated circulation over 6 years of intergenogroup mono-reassortant G2P[4] rotavirus strains with genotype N1 of the NSP2 gene.	Infect Genet Evol	12	1202-1212	2012

Matthijnssens J, <u>Nakagomi O</u> , Kirkwood CD, Ciarlet M, Desselberger U, Van Ranst M	Group A rotavirus universal mass vaccination: how and to what extent will selective pressure influence prevalence of rotavirus genotypes?	Expert Rev Vaccines	11	1347-1354	2012
Ghosh S, Urushibara N, Taniguchi K, <u>Kobayashi N</u>	Whole genomic analysis reveals the porcine origin of human G9P[19] rotavirus strains Mc323 and Mc345.	Infect Genet Evol.	12	471-477	2012
Ghosh S, Shintani T, Urushibara N, Taniguchi K, <u>Kobayashi N</u>	Whole genomic analysis of a human G1P[9] rotavirus strain reveals intergenogroup reassortment events.	J Gen Virol	93	1700-1705	2012
Shintani T, Ghosh S, Wang Y-H, Zhou X, Zhou D-J, <u>Kobayashi N</u>	Whole genomic analysis of human G1P[8] rotavirus strains from different age groups in China.	Viruses	4	1289-1304	2012
<u>Taniguchi K</u> , Komoto S	Genetics and reverse genetics of rotavirus.	Curr Opin Virol	2	399-407	2012
Sugata K, <u>Taniguchi K</u> , 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	49-56	2012
Kawamura Y, Sugata K, Nakai H, Asano Y, Ohashi M, Kato T, Nishimura N, Ozaki T, Yui A, <u>Taniguchi K</u> , Yoshikawa T	Correlation between serum matrix metalloproteinase and antigenemia levels in patients infected with rotavirus.	J Med Virol	84	986-991	2012
<u>Fujii Y</u> , <u>Shimoike T</u> , Takagi H, Murakami K, Todaka-Takai R, Park Y, <u>Katayama K</u>	Amplification of all 11 RNA segments of group A rotavirus based on reverse transcription polymerase chain reaction.	Microbiol Immunol	56	630-638	2012
Kitaura K, <u>Fujii Y</u> , Matsutani T, Shirai K, Suzuki S, Takasaki T, Shimada S, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, Ogasawara K, Kurane I, Suzuki R	A new method for quantitative analysis of the T cell receptor V region repertoires in healthy common marmosets by microplate hybridization assay.	J Imm Method	384	81-91	2012

Hansman GS., Shahzad-UI-Hussan S., McLellan JS., Chuang GY., Georgiev I., <u>Shimoike T.</u> , Katayama K., Bewley CA., Kwong PD.	Structural basis for norovirus inhibition and fucose mimicry by citrate.	Journal of Virology	86	284-292	2012
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	<u>G8 rotaviruses with conserved genotype constellations detected in Malawi over 10 years (1997-2007) display frequent gene reassortment among strains co-circulating in humans.</u>	J Gen Virol	94	1273-1295	2013
<u>Nakagomi T.</u> , Kato K, Tsutsumi H, <u>Nakagomi O</u>	<u>The burden of rotavirus gastroenteritis among Japanese children during its peak months: an internet survey.</u>	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, <u>Matsutani T</u> , Shirai K, Suzuki S, Takasaki T, Kumagai K, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, Hamada Y,	Immune-Related Gene Expression Profile in Laboratory Common Marmosets Assessed by an Accurate Quantitative Real-Time PCR Using	PLoS ONE	8	e56296	2013

Kurane I, Suzuki R	Selected Reference Genes.				
<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 <u>Katayama K</u>	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>	<u>Molecular evolution of the VP7 gene of Japanese G2 rotaviruses before vaccine introduction.</u>	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

