

I. 総括研究報告書

研究組織

研究代表

片山和彦 国立感染症研究所ウイルス第二部第一室

研究分担

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
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
小林宣道 札幌医科大学医学部衛生学講座
谷口孝喜 藤田保健衛生大学医学部ウイルス・寄生虫学
辰巳正純 北海道社会事業協会小樽病院小児科
水谷哲也 東京農工大学農学部
下池貴志 国立感染症研究所ウイルス第二部第一室
藤井克樹 国立感染症研究所ウイルス第二部第一室
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

森俊彦 N T T 東日本札幌病院小児科
小原敏生 苫小牧市立病院小児科
飯田一樹 北海道社会事業協会小樽病院小児科
野口篤子 秋田大学医学部小児科
三浦忍 由利組合総合病院
三浦克志 宮城県立こども病院総合診療科
大場邦弘 公立昭和病院小児科
河島尚志 東京医大病院
西村直子 江南厚生病院こども医療センター
伊藤陽里 公立南丹病院
長谷川俊史 山口大学医学部病院
青木知信 福岡市立こども病院
葛谷光隆、濱野雅子 岡山県環境保健センター
河本聡志 藤田保健衛生大学医学部ウイルス・寄生虫学
長井誠 東京農工大学農学部
ゴッシュ・ソウビック 札幌医科大学医学部衛生学講座
フランシス・エコー・デニス 東京医科歯科大学大学院
戸高玲子 国立感染症研究所ウイルス第二部第一室

(敬称略)

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」
総合研究代表報告(平成 23～25 年度)

網羅的ロタウイルス分子疫学基盤構築とワクチン評価・総括

研究代表者 片山 和彦 国立感染症研究所 ウイルス第二部

研究要旨：平成 23 年度に本研究班の活動によって設定した、研究分担者の関係病院ベースのネットワーク（8 都道府県、12 病院）の協力の下、ロタウイルス感染症入院事例の網羅的情報検出、検体サンプリング、ウイルス学的データ、臨床データの蓄積および解析を開始した。ロタウイルスの全 11 ゲノムセグメント増幅法の開発に成功したこと、次世代シーケンスシステム（NGS）の導入に成功したことにより、2011/12 シーズンに 131 入院事例、2012/2013 シーズンに 165 入院事例のロタウイルスゲノム全セグメント全長塩基配列決定に成功した。VP7 遺伝子型は G1 が 63%、G3 が 6%、G9 が 31%であった。VP4 遺伝子型は全て P[8]であった。ワクチンの第一の標的である入院患者におけるロタウイルスの遺伝子型分布を調査し、全国で優勢株が同様であった。驚くべきことに、全ゲノム塩基配列解析の結果、G1P[8]の過半数が一般的な Wa-like な遺伝子型構成ではなく、DS-1-like 遺伝子分節再集合体であることが明らかになった。これらの結果は、ロタウイルスが予想をはるかに超えた形で遺伝子分節再集合を起こして進化していることを示していた。また、ブタ様セグメントのヒトロタウイルスへの侵入も検出した。本研究において、2011/12 シーズンに発見された DS-1-like G1 タイプは、2012/13 シーズンに入っても引き続き優勢であった。このウイルス株は特に東日本・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。現在ワクチン接種率は、全国平均で 45%に達しており、ワクチンによる淘汰圧上昇がロタウイルスのゲノム遺伝子型構成に影響を与え、新規リアソータントの出現を加速させている可能性も否定できない。我々は、わが国においてロタウイルスの入院症例では、GP 遺伝子型解析だけでは把握できない多様なロタウイルス株が流行していることを明らかにした。本研究で構築した分子疫学基盤を活用し、ロタウイルスの未知の変化に対応すべく、ロタウイルスの 11 ゲノムセグメントを対象とした分子疫学的研究を継続していく必要がある。本研究班で調査対象としたロタウイルス感染重症入院症例におけるワクチン接種率は極めて低く、現時点において 284 例（2012/13 シーズン 115 例、2013/14 シーズン 169 例解析終了）の症例中、5 例、つまり、1.76%であった。さらに 5 例の内、ワクチン接種終了後 1 年以上経過後の入院症例は 1 例のみであった。調査対象地域によりワクチン接種率が異なっているため、重症化阻止に対してどの程度効力を発揮しているかは、今シーズンの検体（2013/14 シーズン、3 月から 6 月にかけて）を解析する必要がある。

A. 研究目的

本研究の第一の目的は、国家レベルでロタウイルス（RV）の分子疫学調査基盤を構築し、RVワクチン導入効果を多角的に評価することである。現在、我が国に存在する公的RV情報データベースは、国立感染症研究所感染情報センターの病原体検出情報である。この情報源は地方衛生研究所からのデータ報告に基づいており、報告総数から見ても明らかのようにRV感染症の実態を捉えているとは言い難い。そこで、全国を5つのブロックに分割し、それぞれのブロックを統括する研究者が病院ベースのネットワークを構築し、RV感染症事例（重症の入院事例を含む）を対象に網羅的な情報検出と、RV全ゲノム塩基配列を対象とした分子疫学情報の蓄積を行った。情報は、臨床的側面、ワクチンの投与の有無、ゲノム塩基配列などから多角的に解析し、RV感染症重篤化に関与する因子の同定、ワクチン評価等に役立てる。

本研究の第二の目的は、全国規模のRV感染症の疫学情報、ゲノム塩基配列情報の蓄積とバイオインフォマティクスによる解析で、RVの基礎的研究に関する情報基盤を提供し、病原性発現機構研究、ワクチン作用機序研究の推進に寄与することである。RVの病原性発現機構やワクチンの作用機序に関する研究は遅れており、わが国へ導入された生ワクチンの弱毒化の分子基盤も解明されていない。ワクチンの作用機序を理解して効果予測、評価を行うためには、ウイルスの病原性、免疫誘導などに関する基礎的研究、流行の疫学や流行株の分子疫学的研究が必須である。

2年目は、可能な限り日本全国の小児科病院からRVによる嘔吐下痢症により入院した乳幼児患者のアクティブサーベイランスを実施可能な体制の整備と、採取した便検体に含まれるRVのスクリーニング、全ゲノムセグメント塩基配列解析を可能とする核酸増幅システムの構築を目的として研究活動を行った。また、我が国の流行動向を把握するため、周辺諸国のロタウイルス流行についても調査を行った。

我が国に導入されたロタウイルスワクチンの内、ロタテックはウシロタウイルスをベースとしたワクチン

である。このワクチンが環境中に大量に放出されることにより生じるウシロタウイルスリアソータントへの影響は、やがてヒトロタウイルスに入り込み、ロタウイルス感染症へ影響を与える可能性がある。そこで、動物のロタウイルスに関する分子疫学調査データ蓄積も行った。

B. 研究方法、結果の総括

日本全国を北海道、東北、関東、関西、四国九州ブロックに分け、分担研究者に各ブロックの研究協力協力が得られる小児科病院への協力要請拠点を決定した。

各ブロックを担当する研究分担者と協議を繰り返し、症例の絞り込み条件、サンプリングから保存発送、ロタウイルススクリーニング、ゲノム解析手法など調査の概要を決定した。決定した条件は、1) 拠点病院にて重篤な嘔吐下痢症で入院した症例から、倫理面に配慮しながら便検体を採取する。2) 症例に関する情報を添付し、便検体と共に国立感染症研究所(感染研)ウイルス第二部に発送する。3) 受け入れた検体は、全て、感染研ウイルス第二部にてロタクロンによるロタウイルスの同定検査を行う。4) ロタウイルス陽性を呈した検体からロタウイルスRNAを抽出精製し、ロタウイルス遺伝子型の調査を行う。5) 可能な限り、全ての全長ゲノム塩基配列を決定し、データベースに蓄積する。6) 得られた全てのデータは、感染研ウイルス第二部内のデータベースに保管管理する。7) ウイルス学的データ解析、研究は、国立感染症研究所ウイルス第二部第一室、藤田保健大学、札幌医科大学で行う。8) 分子疫学研究は長崎大学を中心に実施することとした。疫学調査には以下の大学、病院の研究協力を得た。札幌医科大学小児科、NTT 東日本札幌病院（北海道）、小樽協会病院（北海道）、苫小牧市立病院（北海道）、秋田大学医学部（秋田県）、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）。

辰巳らは、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。しかし、それ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ていたことを明らかにした。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。このことからロタウイルスの経時的疫学調査を継続することがロタウイルスの流行のメカニズムを研究する上で重要であることが明らかになった。

感染研の藤井、下池らは、我が国におけるロタウイルス（RV）のサーベイランス体制を整え、全国的なロタウイルス（RV）の分子疫学調査を行った。2011/12年シーズンは北海道、秋田県、東京都、愛知県、京都府、山口県の6都道府県の病院からRV下痢症入院患者の便検体を収集し、VP7およびVP4のシーケンス解析を行い、各々の遺伝子型を決定した。その結果、これまでに131入院事例のロタウイルスゲノム全セグメント全長塩基配列決定に成功した。VP7遺伝子型はG1が63%、G3が6%、G9が31%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。ワクチンの第一の標的である入院患者におけるロタウイルスの遺伝子型分布を調査し、全国で優勢株が同様であることが分かった。しかし、驚くべきことに、全ゲノム塩基配列解析の結果、G1P[8]の過半数が一般的なWa-likeな遺伝子型構成ではなく、DS-1-like遺伝子分節再集合体であることが明らかになった。これらの結果は、ロタウイルスが予想をはるかに超えた形で遺伝子分節再集合を起こして進化していることを示していた。わが国においてロタウイルスの入院症例では、GP遺伝子型解析だけでは把握できない多様なロタウイルス株が流行していることを初めて明らかにすることができた。さらに、G9には2種類のclusterが見られ、世界的に広く流行しているcluster（27検体）と、これまでに報告されていないブタRVに類似したcluster（13検体）に分類された。このブタRVに類似したclusterのウイルスは、既に中部・近畿地方において、ヒトRVとして流行していた。ブタRVに類似したセグメントのヒトRVへの侵入は、ヒトRVの進化に動物のロタウイルスセグメントの侵入が深く関わっている可能性を示唆した。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になった。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ことを示唆した。

東京農工大学の水谷、長井らは、我が国に導入されたロタウイルスワクチンの内、ウシロタウイルスをベースとした5価ワクチンであるロタテックの環境への放出により生じるウシロタウイルスリアソータントへの影響、ひいてはヒトロタウイルス感染症へ与える影響を把握するため、次世代シーケンステクノロジーを用いたウシロタウイルスの疫学調査基盤の構築を試みた。ヒト用ロタウイルス簡易診断キット（イムノクロマト法5種類、ラテックス凝集反応2種類およびELISA1種類）についてウシロタウイルス4株に対する検出感度を比較した結果、ディップスティック‘栄研’ロタ（栄研化学、東京）の検出感度が最も高いことが確認されたが、ウイルス分離はその 10^4 倍感度が高かった。イルミナ社のMiSeqを用いた次世代シーケンスでは、ウイルス分離陰性の糞便検体からもロタウイルス遺伝子を検出でき、11分節すべてのウイルス遺伝子の型別が可能であった。畜産現場においてはディップスティック‘栄研’ロタ陽性の糞便を採材することで迅速で効率的なウシロタウイルス株の収集が可能と思われたが、可能な限りウイルス分離を実施すべきとした。また、次世代シーケンステクノロジーは検出と同時に、1度に11分節すべての遺伝子解析が可能であり、ウシロタウイルスの疫学調査の強力なツールであるばかりでなく、ヒトロタウイルスの全ゲノム配列解析、特に混合感染事例における全ゲノム配列解析に応用可能であることが示された。さらに長井らは、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。我が国のウシ RV の遺伝子解析を継続し、平成 25 年度のウシにおけるロタウイルスの分子疫学象を明らかにした。我が国では、ウシから検出されるロタウイルスは、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、ウシ RV 間の遺伝子再集合で出現した株と考えられた。ウマロタウイルスの場合、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、多くのウマロタウイルス株の NSP4 遺伝子はウシ型であることが判明した。NSP4 遺伝子は 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について報告した。

感染研・高木らは、A 群ヒトロタウイルス (以下 hRVA) の分離培養成功率向上のため、限界希釈法による培養細胞のクローン化とそれらを用いた臨床材料からの直接的分離を検討した。hRVA-Wa 株を増殖指標として用い、hRVA の増殖効率の良い細胞株をクローニングした。MA104 細胞では 2 clones、CV-1 細胞では 1 clone の hRVA 増殖効率の良いクローンを得た。ロタウイルス実験室分離株 SA-11、DS-1 標準株の増殖性はクローンによって異なっていた。これらの細胞クローンを用いて、患者糞便材料からの hRVA の単離培養を試みたところ、6 検体中 4 検体において 1 継代目での良好なウイルス増殖が確認された。これら 4 種類の優良なサブクローンのうち 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を確認した。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を明らかにした。今後 CPE 発現促進あるいは顕在化についてはさらに検討を要するがワクチン接種、後の防御抗体産生状況などを簡便に確認するため、細胞株としての利用する可能性を示した。

中込治らは、迅速なロタウイルス全ゲノム解析への RNA-PAGE の応用を目的として、研究を行った。ロタウイルスワクチンの導入によってロタウイルス下痢症患者から検出される野生ウイルス株に何らかの影響が及ぼされることが予想されている。このような問題の解析のために臨床分離株にもとづく分子疫学基盤構築が要求されるのであるが、これは単にロタウイルスの G および P 遺伝子型の変化のみではなく、全ゲノムに基づいたウイルス「株」の変化を追跡する必要がある。このような「株」のレベルでの同定と解析のため electropherotyping という 11 分節の 2 本鎖 RNA からなるゲノムのポリアクリルアミドゲル電気泳動に基づく解析法が使われる。本研究では、electropherotyping により、どのようなロタウイルスの分子進化情報が得られるのかという一例を示すことを目的に、同一の G および P 遺伝子型 (G12P[6]型) の中におけるウイルス株の分子進化を electropherotyping により解析した。G12P[6]型のロタウイルスが連続して優勢遺伝子型として流行しているネパールにおいて、2007 年 11 月から 2010 年 2 月までの 28 か月間に検出され、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により electropherotype を決定できた 147 検体の G12P[6]型ロタウイルスを解析した。その結果、ネパールでは、単一の G12P[6]株が連綿として流行しているのではなく、一時期には 1 つの優勢株が少数の劣勢株とともに一定期間 (約 6 か月) 流行し、これが新たな優勢株に次々と置き換わっていくというダイナミックなしかたで進化していることがわかった。このように electropherotyping は比較的単純な解析法でありながら、重要な分子疫学情報を提供することが可能であり、全ゲノム塩基配列解析によって、さらにどのような情報を取得すべきかについて有用な示唆を与えるものであることを明らかにした。さらに中込治らは、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G1P[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ことを示唆した。中込とよ子らは、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・年と算出した。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1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を示した。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した。長崎大学・中込とよ子らは、本年度、ロタウイルスサーベイランスで得られる非通常株の全ゲノム解析によりどのような分子進化情報が得られるのかという一例を示すことを目的に行った。すなわち、かつてインドで分離されたG3P[4]株（107E1B）とG2P[4]株（116E3D）の全ゲノムを解析により、「107E1B株は、G2P[4]株が同時期に流行していたG3ヒトロタウイルスからVP7遺伝子を遺伝子分節再集合の機序により獲得したものである」ことを示すことを目的とした。107E1Bの遺伝子型構成はG3-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2、116E3Dは

G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2であった。すなわち107E1BはVP7を除き116E3Dと同じDS-1型の遺伝子型構成であった。これら2株の遺伝子分節（VP7以外）の塩基配列は、99.83 - 100%の一致率であり、どの分節でもわずか2塩基以下が不一致であった。一方、107E1BのVP7遺伝子はヒトロタウイルスG3VP7遺伝子の76%が所属する主要な系統に属し、かつ、2004年に登録されたインドのロタウイルス株RMC437と99.3%の一致率であった。この全ゲノム解析の結果、107E1Bと116E3Dの2株は同一クローンに属することが分かり、同時期に流行しているロタウイルス株間で遺伝子分節再集合が起こっていることが示された。

感染研・村上、下池は、RNA-PAGEの精度向上と、アッセイ間変動、施設間変動を制御するため、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。3台の装置でそれぞれ4枚のマイクロチップをセットし、各マイクロチップで3回の測定を実施した。各セグメントの移動度を相対移動度として数値化し、合計36回の測定結果を比較した。各測定結果で誤差がほとんど認められなかった。しかし、チップ内の泳動距離が短いため、ロタウイルスゲノム11文節のうち幾つかは一つのバンドブロード名バンドとして分離され、11セグメント全ての分離はできなかった。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。さらに詳細に比較検討するため、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）を比較した。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ことを明らかにした。

札幌医科大学・小林らは、(1)中国における最近の主流型G1P[8]ヒトロタウイルス、(2)非定型的G1P[9]型ヒトロタウイルス株（K8株、日本）、(3)

非定型的G4P[10]型ヒトロタウイルス株（57M株、インドネシア）について全遺伝子配列を決定し、世界に分布するヒトロタウイルスまたは動物ロタウイルス、および現行のワクチン株との関連を解析することを目的として研究を行った。中国・武漢市において乳児、幼児、成人の下痢症例便検体から分離された3株のG1P[8]株の全遺伝子分節は、1株のNSP3遺伝子分節を除き、互いに遺伝的にきわめて近縁で、近年アジアで検出されたヒトロタウイルスと同じクラスターに属していた。乳児からの分離株E1911が持つNSP3遺伝子は、インドで報告されたブタ様ヒトロタウイルスに近縁であり、遺伝子再集合に起因してブタロタウイルスに由来することが示唆された。中国のG1P[8]株の外殻蛋白VP7、VP4における中和抗原部位を現行の1価および5価ワクチンのそれと比較すると、数個のアミノ酸の違いが認められた。G1P[9]型ヒトロタウイルスK8株は、ヒトロタウイルスのWa遺伝子群、AU-1遺伝子群間の遺伝子再集合体、G4P[10]型ヒトロタウイルス57M株はヒトロタウイルスWa遺伝子群とG8P[10]株間の遺伝子再集合体であると考えられた。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たことが示唆された。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した。

藤田保健大学・谷口らは、平成23年度に引き続き、

リバーシジェネティクス系を利用して、ロタウイルスの外層タンパク質 VP4 の解析を行った。ロタウイルスは、タンパク質分解酵素による開裂：VP4 VP8^{*} + VP5^{*} により感染性を獲得する。生体内では、腸管でのトリプシンにより、この活性化は行われている。VP4 のトリプシン開裂部位のアルギニン残基 231, 241, 247 の感染性獲得における意義を検討するために、リバーシジェネティクス系を利用してこれら3カ所の各アルギニン残基に変異を導入した組換えロタウイルスを作成し、各残基の重要性を感染性ウイルスを用いて検討した。その結果、R247 が感染性獲得に最も重要であることが示された。さらに、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を試みたが、十分な成果が得られなかった。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、レオウイルスの系をモデルとして用いた。T7RNAポリメラーゼの供給に、組換えワクシニアウイルスを利用する、あるいは、T7 RNAポリメラーゼ発現 BHK 細胞の利用することが考えられた。本研究では、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することを明らかにした。今後、引き続き、高効率なリバーシジェネティクス系の確立への試みを続けることとした。

協力研究者である岡山県の葛谷らは、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た。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した。岡山県におけるRVAの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た。RVAの検出率のピークは、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。次に、RVA 陽性 262 件の G 型別を行った。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ことを報告した。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。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。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した。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒト由来の便材料を用いた研究であるため、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並びに解析を行った。組換え DNA 実験は全て国立感染症研究所の承認を得た上で実験計画に基づいて、認定施設内で実施した。

D. 結論

平成23年度に本研究班の活動によって設定した、病院ベースのネットワークを用いて、ロタウイルス感染症の入院事例を対象とした網羅的な情報検出と、検体のサンプリング、蓄積が継続され流行期の検体解析が行われた。

全ゲノムセグメントを対象とした網羅的塩基配列解析は、これまでの疫学では検出し得なかった新規リアソータントロタウイルスの感染事例が重症ロタウイルス感染症での入院症例に含まれていたことを明らかにした。これらの結果は、ロタウイルスが予想をはるかに超えた形で遺伝子分節再集合を起こして進化していることを示していた。また、ブタ様セグメントがヒトロタウイルスに侵入したことも検出した。動物のロタウイルスセグメント侵入は、ウシロタウイルスベース生ワクチン(ロタテック)の接種により加速される可能性も有り、今後も厳重な注意が必要である。

ワクチンの接種率は、地域によって差があるが、全国平均で約45%に達したことが明らかになった。昨年、本研究班の調査対象地域では、最大で5%に満たなかった異から考えると、劇的な摂取率上昇を示した。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。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。

また、高精度なマイクロチップ電気泳動装置を用いた新規ロタウイルスRNAパターン解析系を構築した。今後、本方法のさらなる検討により、病原性大腸菌O157などで施行され、流行株解析に大きな実績を上げているパルスネットの様なパターンデータベース構築によるロタウイルス流行株の大規模な疫学調査施行への可能性も見えてきた。さらには、NGSの導入によりロタウイルス全

ゲノム塩基配列解析の効率を飛躍的に向上させることに成功した。

E. 研究発表

論文発表のみ掲載

- 1) Ghosh S, Urushibara N, Taniguchi K, Kobayashi N. Whole genomic analysis reveals the porcine origin of human G9P[19] rotavirus strains Mc323 and Mc345. *Infect Genet Evol*, 2012, 12:471-477.
- 2) Ghosh S, Shintani T, Kobayashi N. Evidence for the porcine origin of equine rotavirus strain H-1. *Vet Microbiol*, 2012, 158:410-414.
- 3) Ghosh S, Shintani T, Urushibara N, Taniguchi K, Kobayashi N. Whole genomic analysis of a human G1P[9] rotavirus strain reveals intergenogroup reassortment events. *J Gen Virol*, 2012, 93:1700-1705.
- 4) Shintani T, Ghosh S, Wang Y-H, Zhou X, Zhou D-J, Kobayashi N. Whole genomic analysis of human G1P[8] rotavirus strains from different age groups in China. *Viruses*, 2012, 4:1289-1304.
- 5) Mukherjee A, Mullick S, Kobayashi N, Chawla-Sarkar M. The first identification of rare human group A rotavirus strain G3P[10] with severe infantile diarrhea in eastern India. *Infect Genet Evol*, 2012, 12:1933-1937.
- 6) Bhowmick R, Halder UC, Chattopadhyay S, Chanda S, Nandi S, Bagchi P, Nayak MK, Chakrabarti O, Kobayashi N, Chawla-Sarkar M. Rotaviral enterotoxin nonstructural protein 4 targets mitochondria for activation of apoptosis during infection. *J Biol Chem*, 2012, 287:35004-35020.
- 7) Bagchi P, Nandi S, Chattopadhyay S, Bhowmick R, Halder UC, Nayak MK, Kobayashi N, Chawla-Sarkar M. Identification of common human host genes involved in pathogenesis of different rotavirus strains: an attempt to recognize probable antiviral targets. *Virus Res*. 2012, 169:144-153.
- 8) Ghosh S, Urushibara N, Kawaguchiya M, Shintani T, Kobayashi N. The origin of two rare human P[10] rotavirus strains. *Infect Genet Evol*, 2013, 13:292-300.
- 9) Sumi A, Rajendran K, Ramamurthy T, Krishnan T, Nair GB, Harigane K, Kobayashi N. Effect of temperature, relative humidity, and rainfall on rotavirus infections in Kolkata, India. *Epidemiol Infect*, 2013, in press (2012, Epub ahead of print)
- 10) Taniguchi K, Komoto S: Genetics and reverse genetics of rotavirus. *Curr Opin Virol* 2:399-407, 2012
- 11) 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
- 12) Rahman S, Higo-Moriguchi K, Htun KW, Taniguchi K, Icatlo FC, Tsuji T, Kodama Y, Nguyen SV, Umeda K, Oo HN, Myint YY, Htut T, Myint SS, Thura K, Thu HM, Fatmawati NND, Oguma K: Randomized placebo-controlled clinical trial of immunoglobulin Y as adjunct to standard supportive therapy for rotavirus-associated diarrhea among pediatric patients. *Vaccine* 30:4661-4669, 2012
- 13) 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
- 14) Kawamura Yoshiki, Sugata Ken, Nakai Hidetaka, Asano Yoshizo, Ohashi Masahiro, Kato Tomochika, Nishimura Naoko, Ozaki Takao, Yui Akiko, Taniguchi Koki, Yoshikawa Tetsushi: Correlation between serum matrix metalloproteinase and antigenemia levels in patients infected with rotavirus. *J Med Virol* 84:986-991, 2012.
- 15) 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.* 56:630-638, 2012
- 16) Nagaoka Y, Tatsumi M, Tsugawa T, Yoto Y, Tsutsumi H. 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, 2012.
- 17) Nakagomi T, Nakagomi O, 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 Suppl 1: A140-151, 2012
- 18) Doan YH, Nakagomi T, Nakagomi O. 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.
- 19) Noguchi A, Nakagomi T, Kimura S, Takahashi Y, Matsuno K, Koizumi H, Watanabe A, Noguchi H, Ito T, Ohtsuka M, Uemura N, Takeda O, Komatsu A, Kikuchi W, Komatsu M, Fukaya H, Miura S, Toda H, Nakagomi O, Takahashi T: Incidence of intussusception as studied from a hospital-based retrospective survey over a 10-year period (2001-2010) in Akita Prefecture, Japan. *Jpn J Infect Dis* 65(4): 301-305, 2012.
- 20) 中込とよ子, 中込 治: ロタウイルス感染症とロタウイルスワクチン. *メディカル・テクノロジー* 40(9): 1005-1008, 2012
- 21) 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.
- 22) 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
- 23) 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
- 24) 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

- 25) 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
- 26) 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.
- 27) 辰巳正純.2013. [連載]薬の知識 ロタテック (5価経口弱毒生口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.
- 28) 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.
- 29) 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.
- 30) 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.
- 31) 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.
- 32) Komoto S, Taniguchi K.: Genetic engineering of rotaviruses by reverse genetics. Microbiol Immunol 57(7):479-486, 2013
- 33) Komoto S, Maeno Y, Tomita M, Matsuoka T, Ohfu M, Yodoshi T, Akeda H, Taniguchi K. Whole genomic analysis of porcine-like human G5P[6] rotavirus strain isolated from a child with diarrhea and encephalopathy in Japan. J Gen Virol. 94(7):1568-75, 2013.
- 34) 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
- 35) 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.

F. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他

