

## II. 分担研究報告書



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)

## わが国におけるロタウイルスワクチン評価のためのロタウイルスの分子疫学的基盤情報の構築

|       |       |                           |
|-------|-------|---------------------------|
| 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             |
|       | 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  | 小児科学講座                    |

### 研究要旨

わが国におけるロタウイルスワクチン評価のためのロタウイルスの分子疫学基盤情報の構築を目的として、3年間の研究期間の各年度に以下の3つの個別の課題を設定して研究を行った。すなわち、1 (2011): わが国におけるロタウイルスワクチンの医療経済効果、2 (2012): ロタウイルスの分子疫学的基盤情報としてelectrophenotypeの有用性に関する研究、3 (2013): 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) である。1では、われわれが構築した疫学的研究情報に基づいて、ロタウイルスによる疾病負担を計算し、医療経済分析を行った。その結果、社会的視点からの1 QALYあたりの増分費用対効果比は86万円となり、ロタウイルスワクチンが費用対効果に優れたものであると結論された。2では、ロタウイルスの「株」のレベルでの同定と解析のためにelectrophenotyping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の実例として、ネパールでのG12P[6]株の変化を追跡し、electrophenotyping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ることを示した。最終年では、3の課題に取り組み、2012年流行期におけるロタウイルス株の遺伝子型の全国分布状況を把握するため、6ヶ所の定点病院での132検体の解析結果をまとめ、G1P[8]株が優勢であること、現状では大きな地域差がないことを確認した。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。

## A. 研究目的

3つの課題があるため、これらを順番に分けて示す。

1. わが国の5歳未満のロタウイルス下痢症発生をモデルとするシミュレーションを行い、このモデルにワクチンを導入して費用対効果を評価する。

2. ロタウイルスの「株」のレベルでの同定と解析のために electropherotyping が有効であることを実際の分子疫学研究で示す。

3. ワクチンが広く使われる前の流行期におけるロタウイルス株の遺伝子型の全国分布状況を把握し、ベースライン情報とする。

## B. 研究方法

1. ロタウイルスワクチンを定期接種に導入した場合と未導入の場合とのそれぞれについて、新生児集団を5年間追跡したときに発生するロタウイルス下痢症による入院患者数と外来受診者数を計算機模擬実験から得た。ベースケースに使用する入院率として、疫学研究が行われた秋田県由利本荘市、三重県津市および伊勢市のデータを参考に、1000人・年あたり6例の入院発生を使った。実験結果に基づき、入院と外来にかかる直接医療費、間接費として保護者の遺失賃金、ワクチン接種にかかる費用、質調整生存年(QALY)を算出した。

2. ネパールにおける28か月間の疫学研究で得た539のロタウイルス陽性検体を出発材料としゲノムRNAを抽出し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によりゲ

ノム11分節の electropherotype を調べ、electropherotype が同一の検体を同一のウイルス株と定義した。遺伝子型 G12P[6] と同定した検体中ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により electropherotype を決定した147検体を使って解析した。

3. 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について、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

### 1. 結果 1

このモデルでワクチン未導入の場合、医療保険的視点からするとわが国におけるロタウイルスの疾病負担は131億円であり、間接費用を含めた社会的視点からは241億円となった。このモデルでワクチンを導入すると、入院患者が1600人に、また、外来患者が10万人に減少し、それに応じて、直接費用と間接費用の総計が30億円にまで減少した。一方で、ワクチン接種のために220億円の費用が発生した。1QALYあたりの増分費用対効果比は、社会的視点からは、86万円と計算された。

わが国の社会が1 QALYを獲得するために医療に費やしてもよいと考える上限は、500～600万円であるから、1 QALYあたりの増分費用対効果比がこの上限値(閾値)よりずっと小さい86万円であるということは、ロタウイルスワクチンが費用対効果に優れたものであると結論された。

### 2. 結果2

電気泳動法により electropherotype を決定した147検体の解析結果から28か月間にG12P[6]という遺伝子型は同一であるが、15株の異なるロタウイルスが流行していたことがわかった。このうち、出現頻度が10%以上あった優勢株は、electropherotype がLP1, LP24, およびLP27の3株であり、それぞれの相対出現頻度は10%, 32% および38%であった。これらの主要な electropherotype をもつウイルス株がお互いに入れ替わるように順次出現した。

### 3. 結果3

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。

## D. 考察

1. 臨床試験および先行導入した諸外国のデータが示す優れたロタウイルスワクチンであるが、これを定期接種に導入し、費用対効果のあるものにするためには、接種方法やワクチン接種費用をいかに下げかなどの社会技術的問題解決が必要である。

2. ネパールでは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が、本研究により、これが単一の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変化をしていることがわかった。ロタウイルスは、次々に出現するウイルス株のプールの中から、そのときの条件にもっとも適したウイルス株が選択され、優勢を占め、これが一時期続くと、また新しいより適したウイルス株によってとってかわられるという進化のしかたをしているものと考えられる。

3. 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

1. わが国にロタウイルスワクチンを定期接種ワクチンとして導入することは費用対効果に優れたものである。

2. 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ることが示された。

3. 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) Sato T, Nakagomi T, Nakagomi O. Cost-effectiveness analysis of a universal rotavirus immunization program in Japan. *Jpn J Infect Dis*. 2011;64(4):277-83.

2) Nakagomi O, Nakagomi T: Rotarix in Japan. *Rotarix in Japan: Expectations and Concerns*. *Biologics in Therapy* 1(1): 2011 <http://dx.doi.org/10.1007/s13554-011-0007-5>

2) 中込 治, 中込とよ子: ロタウイルス胃腸炎とロタウイルスワクチン: 化学療

法の領域 27(8): 1789-1799, 2011

3) 中込とよ子, 中込 治: 初承認されたロタウイルスワクチン(ロタリックス)の接種時期に関する添付文書の懸念: *日本医事新報* 4572: 30-33, 2011

4) 中込 治, 中込とよ子: わが国におけるロタウイルス感染症の現状とロタウイルスワクチン: *日本医事新報* 4572: 73-79, 2011

5) 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

6) 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.

7) Matthijnsens J, Nakagomi O, 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(11): 1347-1354, 2012

8) 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

9) 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

10) 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) Nakagomi O, Doan YH, Nakagomi T, Cunliffe NA. A global and evolutionary perspective of the G2 VP7 genes of rotavirus strains detected over the last 34 years: 4th European Rotavirus Biology Meeting, Reggio Calabria, Italy, 2-5 October, 2011

2) Nakagomi O, Nakagomi T. Emergence of G2 rotaviruses in Brazil as re-evaluated from the perspective of molecular epidemiology: 2nd European Expert Meeting on Rotavirus Vaccination, Padova, Italy, 12-13 April, 2011

3) 伊藤陽里, 中込とよ子, 中込 治: 京都府南丹地区におけるロタウイルス胃腸炎入院に起因する疾病負担とその評価, 第 52 回日本臨床ウイルス学会, 津市, 6 月 11 日, 12 日, 2011

4) Nakagomi O. How diverse are rotavirus strains circulating in low-income countries where the vaccine efficacy is low? June 19-20, 2012. The 46th Joint Working Conference on Viral Diseases. The Japan –United States Cooperative Medical Science Program. Beppu, Japan.

5) Nakagomi O, Do LP, Doan YH, Nakagomi

T. Genotype G2 strains in Japan in the global and evolutionary context. September 19-21, 2012. The 10th International Rotavirus Symposium. Bangkok, Thailand.

6) Nakagomi O. Molecular epidemiology of gastroenteritis viruses from the global perspective. December 10-12, 2012. The 6th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases and the 11th Nagasaki-Singapore Medical Symposium. Nagasaki, Japan.

7) 木下さやか, 中込とよ子, 中込治. 秋田県由利地区における過去 10 年間のロタウイルス胃腸炎入院発生率の変動. 平成 24 年 6 月 16 ~ 17 日第 53 回日本臨床ウイルス学会, 豊中市

8) 中込治, 中込とよ子. ネパールで急激に増加した GII.13 ノロウイルス株の分子基盤. 平成 24 年 11 月 13 日 ~ 15 日第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪市

9) 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

10) 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

11) 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

- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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
- 16) Do LP, Nakagomi T, Nakagomi O. 2013, Systematic Literature Review on the Global Distribution of Rotavirus Genotypes. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections (AARF) 2013, Tokyo
- 17) 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



## ロタウイルスの分子疫学とロタウイルス胃腸炎の入院率に関する基盤的情報

|       |                              |   |
|-------|------------------------------|---|
| 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 | 三浦 忍<br>伊藤陽里<br>野口篤子<br>高橋 勉 | 由利組合総合病院<br>公立南丹病院<br>秋田大学・大学院医学系研究科・小児科学講座 |

### 研究要旨

わが国に導入されたロタウイルスワクチンがおよぼす効果と野生株に与える影響について全国レベルで評価する基盤的方法を確立することを目的として、3年間の研究期間の各年度に以下の3つの個別の課題を設定して研究を行った。すなわち、1(2011): ワクチン導入後の増加が先行する導入国で報告されている G2 株の地球規模で見た分子進化学的変遷、2(2012): 過去の保存株にある G3P[4]型ロタウイルスの出現機構の解析を通して全ゲノム解析の有用性の実証、3(2013): 疾病負担評価に最も重要なロタウイルス胃腸炎による入院率の算出である。1では、ロタウイルス G2 株の VP7 遺伝子の系統関係を確立し、1つの系統の中から新しい系統が出現し、それが優位となり、その中からまた新たな系統が出現するというダイナミックな進化をしていることを明らかにした。2では、非通常株の全ゲノム解析によって、このような株の出現機構を明らかにすることができることを示した。3では、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ことを明らかにした。

### A. 研究目的

わが国に導入されたロタウイルスワクチンがおよぼす効果と野生株に与える影響について全国レベルで評価する一環として、3年間の研究期間の各年度に以下の

3つの個別の課題を設定して研究を行った。すなわち、1(2011): ワクチン導入後の増加が先行する導入国で報告されている G2 株の地球規模で見た分子進化学的変遷を明らかにすること、2(2012): 過

去の保存株にある G3P[4]型ロタウイルスの出現機構の解析を通して全ゲノム解析の有用性を示すこと、3 (2013): 疾病負担評価に最も重要なロタウイルス胃腸炎による入院率を算出すること、である。

## B. 研究方法

1. ネパールで 2004/2005 年の流行期に採取した 67 株の G2 株のうち、45 株の G2P[4]株の VP7 遺伝子分節の塩基配列を決定した。過去 34 年間にわたり DNA データベースに登録されている 339 株の G2P[4]株の VP7 遺伝子分節の塩基配列情報にもとづき、MEGA4 により分子系統解析を行った。

2. インドで分離された G3P[4] 株 (107E1B) および G2P[4] 株 (116E3D) から QIAamp Viral RNA mini kit によりゲノム RNA を抽出し、RT-PCR により全遺伝子分節の DNA を増幅した後、オートシーケンサーにより塩基配列を決定した。塩基配列の分子系統解析は MEGA5.0 を用いた。

3. 公立南丹病院 (京都府南丹地区) および由利組合総合病院 (秋田県由利地区) において、ロタウイルス胃腸炎 (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 日以内の症例で、便検体中にロタウイルス抗原を検出した症例) を抽出し、これらの病院のキャッチメント地区の 5 歳未満の小児人口を母集団として、ロタウイルス胃腸炎による入院率を計算した。

(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. ネパールで検出された 45 株の G2 VP7 遺伝子とデータベースに登録されている 339 株の G2 VP7 遺伝子にもとづき作成した分子系統樹の解析の結果、(1) 4 つの系統といくつかの亜系統の存在、(2) 分子系統と、ウイルスの中和抗原部位にある 4 つのアミノ酸残基 (87, 96, 213, 242) との間の対応関係、(3) 系統 IVa とその亜系統である IVa-3 が近年の優勢株であること、(4) 最近は、すべて系統 IVa となり、その 3 分の 2 を IVa-3 であること、(5) 2004 年以降に G2 株が急増したネパールの株はすべて IVa-3 であったが、ブラジルでは 2006~2007 年を境に IVa-1 から IVa-3 への変遷が起っていたことが明らかになった。

2. G3P[4] のロタウイルス株 (107E1B) の遺伝子型構成は G3P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 であることが分かった。一方、G2P[4] 株 (116E3D) G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 であることが分かった。これら 2 つのウイルス株の VP7 遺伝子以外の遺伝子分節の塩基配列の一致率を計算したところ、99.83 - 100% であり、不一致な塩基数は各分節で 2 塩基以下であった。一方、107E1B の VP7 遺伝子の分子系統解析を行ったところ、この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 lineage 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% の一致率であることがわかった

3. 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は、それぞれ、3.9 人/1000 人・年および 11.4 人/1000 人・年であった。

#### D. 考察

1. 本研究の結果として得られた、すべてのネパール株で 96 番目のアミノ酸がアスパラギン酸からアスパラギンへの置換を有している観察事実を、過去 34 年における G2VP7 遺伝子の分子系統進化の中に位置づけると、この変化が系統 IVa に特徴的に起こっており、近年の G2 株はすべて系統 IVa になっていた。この現象は 96 番目のアミノ酸置換により、系統 IVa 株が選択的優位性を獲得したためであると思われる。

2. 全ゲノム解析の結果から、107E1B は、典型的な DS-1 genogroup の株である 116E3D が同時期に流行している G3 ヒトロタウイルス株から VP7 遺伝子を genetic reassortment により獲得したものであることが示された。2 つのウイルス株の VP7 遺伝子分節を除く、10 遺伝子分節において塩基配列の不一致が 2 個以下であることから、これら 2 つのウイルスが同一クローンに属するものであることが証明された。本研究によ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を示す robust な証拠を得た。

3. 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 分の一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。その一方で、それぞれの地区での既報の入院率（南丹地区では 5.1 人/1000 人・年、由利地区では 13.7 人/1000 人・年）とは類似し、ほぼ同様の地域差があったことには、大きな意義がある。

#### E. 結論

1. ロタウイルス G 2 株の VP7 遺伝子は、1 つの系統の中から新しい系統が出現し、それが優位となり、その中からまた新たな系統が出現するというダイナミックな変化の中で進化しているものと思われる

2. 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って、このような株の出現機構を明らかにすることができることを示した。わが国で使用されているロタウイルスワクチンは被接種者の便中に排泄されることが知られており、野生株との間で遺伝子分節再集合を起こすことが想定される。本研究は、そのような検体が検出された場合、何をどう証明すればよいのかということに関する有用な基盤情報を提供する。

3. 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) Doan YH, Nakagomi T, Cunliffe NA, Pandey BD, Sherchand JB, Nakagomi O. 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* 2011 156(11):1969-1978.
- 2) 中込とよ子、中込 治：ロタウイルス感染症：最新医学 66(12)： 2641-2648, 2011
- 3) 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
- 4) 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.
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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, Nakagomi O, Dove W, Doan YH, Witte D, Ngwira B, Todd S, Steele AD, Neuzil KM, Han HH, Cunliffe NA. Molecular characterization of rotavirus strains detected during a clinical trial of a human rotavirus vaccine in Blantyre, Malawi. XV International Congress of Virology, Sapporo, September 11-16, 2011
- 2) Doan YH, Nakagomi T, Cunliffe NA, Pandey BD, Sherchand JB, Nakagomi O. Possible implication of amino acid substitution D96N in the VP7 gene of G2P[4] strains emerging in Nepal and elsewhere in the context of the evolution of G2 strains. XV International

- Congress of Virology, Sapporo,  
September 11-16, 2011
- 3) Bhattachan P, Nakagomi T, Cunliffe NA, Yokoo M, Pandey BD, Sherchand JB, Nakagomi O. Successive replacement of G12P[6] rotavirus stains over 2 years in Nepal. XV International Congress of Virology, Sapporo, September 11-16, 2011
  - 4) Nakagomi O, Doan YH, Nakagomi T, Cunliffe NA. A global and evolutionary perspective of the G2 VP7 genes of rotavirus strains detected over the last 34 years: 4th European Rotavirus Biology Meeting, Reggio Calabria, Italy, 2-5 October, 2011
  - 5) Nakagomi O, Nakagomi T. Emergence of G2 rotaviruses in Brazil as re-evaluated from the perspective of molecular epidemiology: 2nd European Expert Meeting on Rotavirus Vaccination, Padova, Italy, 12-13 April, 2011
  - 6) Nakagomi T, Doan YH, Dove W, Iturriza-Gomara M, Ngwera B, Nakagomi O, Cunliffe N. Full-genome analysis of G8 rotavirus strains in Malawi over a 10-year-period. D November 27 - December 1, 2012. The 11th International Symposium on Double-Stranded RNA Viruses. Puerto Rico, USA.
  - 8) Nakagomi O, Do LP, Doan YH, Nakagomi T. Genotype G2 strains in Japan in the global and evolutionary context. September 19-21, 2012. The 10th International Rotavirus Symposium. Bangkok, Thailand.
  - 9) 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. December 10-12, 2012. The 6th Nagasaki symposium on tropical and emerging infectious diseases and the 11th Nagasaki-Singapore medical symposium. Nagasaki, Japan.
  - 10) 木下さやか、中込とよ子、中込 治。秋田県由利地区における過去 10 年間のロタウイルス胃腸炎入院発生率の変動。平成 24 年 6 月 16～17 日 第 53 回日本臨床ウイルス学会, 豊中市
  - 11) 中込 治、中込 とよ子。ネパールで急激に増加した GII.13 ノロウイルス株の分子基盤。平成 24 年 11 月 13 日～15 日 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪市
  - 12) 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.
  - 13) 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.
  - 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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
- 17) 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
- 18) 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

## 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。本研究では主にアジアに分布する主要な遺伝子型および稀で非定型的な遺伝子型のヒトロタウイルスを対象に全遺伝子配列を決定することにより全遺伝子分節の遺伝子型および遺伝学的系統を解析し、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明することを目的とした。解析の対象としたのは、主要な遺伝子型としては中国におけるG3P[8]およびG1P[8]株、非定型的遺伝子型ではG1P[9] (K8株、日本)、G3P[9] (L621、E2451株、中国) G4P[10] (57M株、インドネシア)、G9P[19] (Mc323、Mc345、タイ) のロタウイルス株である。中国(武漢市)におけるG1P[8]、G3P[8]株の全遺伝子分節は、同一の遺伝子型(Wa遺伝子群)に属していたが、G3P[8]ロタウイルスの長期間にわたる観察では非構造蛋白遺伝子を中心に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、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。G3P[9]株はAU-1遺伝子群に属し、ネコノイヌロタウイルスとの関連が示唆され、G1P[9]株はヒトWaおよびAU-1遺伝子群間の、G4P[10]株はWaおよびDS-1遺伝子群間のリアソータントであると考えられた。G9P[19]株はブタロタウイルスにきわめて近かった。以上より、非定型的ヒトロタウイルスは、主要遺伝子群間で形成されたリアソータントまたは動物ロタウイルスが伝播したものであると考えられた。

### 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み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。

ロタウイルスは稀に異なる動物種間で感染・伝播することがあり、ヒト、動物個体における混合感染により遺伝子分節のリアソートメント(遺伝子再集合)を起こすことも知られる。従来、VP7、VP4 遺伝子の解析に基づいて動物-ヒト間での伝播やロタウイルス間のリアソートメントを調べた報告は多数あるが、それ以外の遺伝子分節についてはあまりよく調べられていない。そのような自然界でのロタウイルスの動態を明らかにするには全遺伝子配列にもとづく解析が必要である。

2008年にロタウイルスの11本の全遺伝子分節に基づく遺伝子型別が提唱された。これにより、VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5の各遺伝子に対応する各々の遺伝子型を合わせた G-P-I-R-C-M-A-N-T-E-H 遺伝子型としてロタウイルス株の遺伝子学的性状が表記されることとなった。これに加えて各遺伝子分節の系統解析を行うことにより、ロタウイルス株の遺伝学的位置づけをより明確にすることができる。そこで最近、分子疫学的研究に全遺伝子配列に基づく

解析が頻繁に行われるようになってきている。

本研究では、日本を取り巻くアジアにおけるヒトロタウイルスの分子疫学的状況を明らかにすることを目的として、定型および非定型のロタウイルス株の全遺伝子配列に基づく系統解析を行った。定型なロタウイルス株として、最近まで10年以上にわたり中国において主要な遺伝子型であった G3P[8]、その後の優勢な型 G1P[9] のヒトロタウイルス、非定型のロタウイルスとして、G1P[9] (K8 株、日本) G3P[9] (L621, E2451 株、中国) G4P[10] (57M 株、インドネシア) G9P[19] (Mc323, Mc345、タイ) の各型のロタウイルスを対象とした。これらの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した。

## B. 研究方法

### 1. 材料

中国の G1P[8], 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。G1P[8] 株は、2004、2005、2009年に検出された計3株、G3P[8] 株は2000年から2013年までの計33株(毎年概ね1-3株) G3P[9] 株は現在までに検出された2株(2006年および2011年)を研究対象とした。非定型のロタウイルス K8 株(G1P[9]) L621, E2451 株(G3P[9]) 57M 株(G4P[10]) Mc323, Mc345 株(G9P[19]) は札幌医科大学衛生学講座に以



前から保存されている組織培養分離株を用いた。

## 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

### 4. G3P[8]株 (中国)

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。

### 5. G1P[8]株 (中国)

3株のG1P[8]ヒトロタウイルスE1911, R588,

Y128は、Wa遺伝子群（Wa様遺伝子配座、G1-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1 -E1-H1）に属し、E1911株のNSP3遺伝子を除き、遺伝学的に互いに近縁で密接な関係が見られた。このことから乳児、幼児、成人の間で同一のロタウイルスが伝播したことが示唆された。これらの全ゲノムはG1P[8]のプロトタイプ株や他の古い株よりも、近年アジアや世界中で検出されヒトに普遍的に見られるG1-4,9型のWa遺伝子群ロタウイルスに密接に関係していた。T1遺伝子型のNSP3遺伝子において、R588株、Y128株は通常のWa遺伝子群ヒトロタウイルスと同じクラスターに属していたが、E1911株のNSP3遺伝子はブタロタウイルス様ヒトロタウイルス株(RMC321, mcs-13, mani-97)に近く、それらと同じクラスターに含まれていた。中国武漢市周辺におけるブタロタウイルスの遺伝子配列情報がないためその由来は明確にはわからないが、ブタロタウイルスがG1P[8]ヒトロタウイルスと同時に感染し、遺伝子再集合によりNSP3遺伝子がブタのウイルスから取り込まれたことが示唆された。VP7, VP4の中和抗原領域のアミノ酸配列を比較すると、1価および5価ワクチンのG1-VP7, P[8]-VP4とG1P[8]株の間で幾つかのアミノ酸の違いが認められた。

#### 6. G3P[9]株

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/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/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。

#### 4. G1P[9]株

日本で分離されたヒトロタウイルスK8株は、Wa遺伝子群に属するG1-VP7とAU-1遺伝子群に属するP[9]-VP4を持つユニークな株である。その全遺伝子を解析した結果、全遺伝子型は、G1-P[9]-I1-R3-C3-M3-A1-N1-T3-E3-H3と決定された。系統解析も行った結果、VP6, VP7, NSP1, NSP2遺伝子はWa遺伝子群に、VP1-4, NSP3-5遺伝子はAU-1遺伝子群に属することが判明し、AU-1遺伝子群のウイルスが遺伝子再集合によりWa遺伝子群の4遺伝子分節を獲得したウイルス(異なる遺伝子群間のリアソータント)であることが示唆された。

#### 5. G4P[10]株

G4P[10]ロタウイルス57Mは、G8P[10]の69M株とともにインドネシアで検出、分離されたロタウイルスで、11遺伝子分節の電気泳動パターンにおいてNSP5遺伝子の移動度がDS-1遺伝子群のそれよりも遅い"supershort"パターンを示すことが特徴的である。69M株の全遺伝子配列はすでに早い時期に報告されている

が、今回の研究では59M株の全遺伝子解析を行うとともに、69M株の遺伝子構成についても再検討を行なった。57M株の遺伝子型は、G4-P[10]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T2-E1-H2と決定され、系統解析の結果も合わせると、この株はWa遺伝子群に属するウイルスが69M株様のVP4, NSP3, NSP5を獲得した遺伝子再集合体であることが判明した。69M株は従来の文献ではDS-1遺伝子群に属するヒトロタウイルスとされてきたが、今回改めて系統解析を行ったところ、NSP1, NSP3, NSP5遺伝子は典型的なDS-1遺伝子群に属していたのに対し、VP1-3, VP6, NSP2, NSP4は偶蹄類のロタウイルス（または偶蹄類様P[14]ヒトロタウイルス株）に近縁であった。すなわち69M株はDS-1遺伝子群に属する典型的なヒトロタウイルスではなく、DS-1遺伝子群と偶蹄類ロタウイルスの遺伝子再集合体であると考えられた。ただしP[10]-VP4の由来は明らかではなかった。以上の知見から、57MはヒトロタウイルスのWa遺伝子群、DS-1遺伝子群の間の遺伝子群間リアソータントであり、そこにP[10]-VP4遺伝子が取り込まれた稀な成因によるウイルスであることが示唆された。

#### 6. G9P[19]株

G9P[19]のMc323、Mc345株の全遺伝子分節に基づく遺伝子型は、G9-P[19]-I5-R1-C1-M1-A8-N1-T1-E1-H1に属し、ほぼ同一のRNAパターンを示した。これら2株間の遺伝子配列の一致率は、NSP5遺伝子を除き、96.2-98.8%と高かった。NSP5遺伝子はMc345株においてリアレンジメントが起きていることがすでにわかっており、一致率は95.0%とやや低かった。Mc323、Mc345株のVP7、VP4遺伝子の配列は既に決定されている。VP4

遺伝子はタイにおけるブタP[19]ロタウイルスのそれと同じ系統に属し、VP7遺伝子は殆どのヒトG9ロタウイルスが属する系統とは異なる系統に属しており、これにはタイのブタロタウイルスが含まれていた。Mc323、Mc345株のVP6遺伝子はブタロタウイルスに特徴的なI5型に属し、系統樹でもタイのブタロタウイルスのVP6遺伝子と同じクラスターに属した。Mc323、Mc345株のVP2、VP3、NSP1-4遺伝子は、いずれもブタロタウイルスに近縁であり、それらと同一のクラスターを形成していた。Mc323、Mc345株のVP1、NSP5遺伝子は既知のヒトロタウイルス、ブタロタウイルスとの関連は明白ではなかったが、主要なヒトロタウイルス株のそれらとは同じクラスターには含まれていなかった。以上をまとめると、Mc323、Mc345株の遺伝子分節は、VP1、NSP5を除き、ブタロタウイルス、しかもこれらの株が見つけれられたタイのウイルスに極めて近縁であった。VP1、NSP5遺伝子との関連は明らかではないが、少なくとも通常のヒトロタウイルスとは遺伝学的に近い関係にはないので、動物ロタウイルスに由来している可能性が残されている。結論として、Mc323、Mc345株はブタロタウイルスがヒトに直接感染したウイルスであることが示唆された。

#### 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。

今回調べられた G3/G1P[8] 株の遺伝子配列は、VP7, VP4 遺伝子を含め、すでに1価、5価ワクチンを導入している国々のロタウイルスのそれにきわめて近縁であり、それらのワクチンは中国においても有効であると考えられた。ただしそれらのワクチン（あるいはその VP7, VP4 成分）の元になっているロタウイルス株は、20年以上前に分離されたものであり、現在の野外流行株には変異の蓄積により、アミノ酸の違いが生じていることも今回の研究で明らかになった。従って今後も継続的な調

査を行うことが必要であると考えられる。

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コモン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/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/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。一方 G9P[19] ロタウイルスはブタからの直接的な感染が示唆された。また G1P[9] 株、G4P[10] 株は、Wa, DS-1、または AU-1 遺伝子群間のリアソータントであることが示唆された。したがって、非定型的ヒトロタウイルス株の成因は主に動物からの感染、または遺伝子群間のリアソートメントであり、ヒトにおける増殖・適合性は低いと考えられる。しかしそのようなロタウイルスがさらなる変異により新興ウイルス株としてヒト集団の中で拡がる可能性もあり、非定型的ウイルス株についても監視してゆくことが必要と思われる。

## 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。G1P[8]株はWa 遺伝子群に属し、アジアの他の国の同型ウイルスと近縁であった。G3P[9]株はAU-1 遺伝子群に属し、ネコノイヌロタウイルスとの関連が示唆され、G1P[9]株はヒトWa およびAU-1 遺伝子群間の、G4P[10]株はWa およびDS-1 遺伝子群間のリアソータントであると考えられた。G9P[19]株はブタロタウイルスにきわめて近かった。以上より、非定型的ヒトロタウイルスは、主要遺伝子群間で形成されたリアソータントまたは動物ロタウイルスが伝播したものであると考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- (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, 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.
- (3) 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.
- (4) 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.
- (5) 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.
- (6) 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.
- (7) 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.

## 2. 学会発表

- (1) Kobayashi N, Ghosh S, Paul SK, Nagashima S. Full-genomic analysis of human rotavirus strains which have VP4 genes belonging to a rare P[8] subtype (P[8]B). 15th International Congress of Virology, 2011, Sapporo.
- (2) Gosh S, Adachi N Gatheru Z, Nyangao J, Ishino M, Urushibara N, Kobayashi N. Full genomic analysis of human G2P[4] rotavirus strains from Africa. 15th International Congress of Virology, 2011, Sapporo.
- (3) Yamamoto D, Kawaguchiya M, Ghosh S, Ichikawa M, Numazaki K, Kobayashi N. Full genomic analysis of rare G6P[9] human rotavirus detected in Japan. 15th International Congress of Virology, 2011, Sapporo.
- (4) Ghosh S, Shintani T, Taniguchi K, Kobayashi N. Whole genomic analysis of a rare human G1P[9] rotavirus strain. 9<sup>th</sup> Japan-China Conference of Virology, 2012, Sapporo (June 13, Hokkaido University)
- (5) Chawla-Sarkar M, Bhowmick R, Bagchi P, Kobayashi N. Modulation of both cell survival and apoptotic pathways during virus infection by rotavirus encoded non structural-4 (NSP4) and non structural-1 (NSP1) proteins. The 34<sup>th</sup> Naito Conference on Infection, Immunity and their Control for Health: Mucosal Barrier, Pathogen and Vaccine, 2012, Sapporo (Oct.18).
- (6) Kobayashi N, Wang YH, Zhou X, Pang BB, Liu MQ, Peng JS, Hu Q, Zhou DJ, Ghosh S. Molecular epidemiological analysis of G3P[9] rotaviruses from diarrheal patients in China. The 13<sup>th</sup> Asia-Pacific congress of Clinical Microbiology and Infection, 2012, Beijing (Oct.27).
- (7) Kobayashi N, Ghosh S. Interspecies transmission of rotaviruses evidenced by whole genomic sequence analysis. The 17<sup>th</sup> FAVA (Federation of Asian Veterinary Association) congress, 2013, Taipei (Jan.5)
- (8) 鷲見紋子、小林宣道. 感染症と気象変動の相関構造に関する研究. - インド・コルカタにおけるロタウイルスの流行動態を例として - 第64回北海道公衆衛生学会 2012年11月9日、札幌.
- (9) ゴッシュ ソウビツク、漆原範子、川口谷充代、新谷つづみ、小林宣道. Whole genomic analysis of a rare human G4P[10] rotavirus strain. 第60回日本

ウイルス学会学術集会 2012年11月14日、大阪。

(10) 小林宣道、ゴッシュ ソウビック、新谷 つづみ、ワン ユアンホン . Whole genomic analysis of G3P[9] rotaviruses from diarrheal patients in China. 第60回日本ウイルス学会学術集会 2012年11月14日、大阪。

(11) 新谷つづみ、ゴッシュ ソウビック、ワン ユアンホン、小林宣道 . 全遺伝子配列に基づく中国の G1P[8]ロタウイルス株の系統遺伝学的解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会 2012年11月14

日、大阪。

(12) 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回日本ウイルス学会学術集会 2013年11月10日、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

## リバース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

ロタウイルスは、タンパク質分解酵素による VP4 の開裂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。リバース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 の解析を行い、以下の結果を得た。1 . VP4 の開裂の意義を検討する目的で、細胞外に存在するトリプシンと同様に細胞内に存在するフューリンにも感受性が生じるように、VP4 の開裂部位にフューリン認識配列を導入し、得られたウイルスの性状を検討した。本ウイルスは、親株と比較して増殖能が低く、トリプシンを与えないと、プラーク形成も観察できなかった。細胞内で、VP4 が開裂すると、細胞外への放出効率が悪くなることが示唆された。2 . 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、リバースジェネティクス系を利用してこれら 3 ヲ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。3 . ロタウイルスのリバースジェネティクス系の改良のための試みの一貫として、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、L929 細胞および BHK-21 細胞において、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が可能であった。

### A. 研究目的

ロタウイルスは、直径 80nm の球状で、三層の構造をとり、最内層であるコアは、VP1, VP2, VP3 から、内層は VP6 から、外層は VP7 と VP4 からなる。コアに含まれるゲノムは 11 本の分節二本鎖 RNA 遺伝子 ( dsRNA ) で構成されている。ロタウイルスは、乳幼児嘔吐下痢

症の病原体であり、開発途上国では、年間 60 万人の乳幼児の死亡の原因となっている。わが国のような先進国においては、死亡例は少ないものの、重篤な例は多く、入院に占める率は高い。また、胃腸炎以外の疾患との関連が強く示唆されており、特に、脳症・脳炎といった中枢神経系疾患との関連も注目されて



いる。

ロタウイルスの病原性の基盤は解明されていない。つまり、ロタウイルスのどの遺伝子のどの領域がロタウイルスの病原性に与するのか明確でない。したがって、ワクチンの弱毒化の機構もわからない。そこで、点変異の蓄積あるいは組換えによる毒力復帰があり得るのかもよくわからない。

こうした背景のもと、本研究では、われわれが世界に先駆けて開発したリバーシジェネティクス系を利用して各遺伝子の機能を解析することを目的としている。まずは、ロタウイルスの外層タンパク質で、感染防御抗原である VP4 タンパク質の機能の解析を進めた。

エンペローブウイルスの多くは、表面スパイク蛋白質が宿主プロテアーゼによって切断、活性化されて膜融合活性を獲得することはよく知られているが、非エンペローブウイルスであるロタウイルスも外殻（外層）スパイク蛋白質 VP4 がトリプシンで VP8\*と VP5\*に切断され活性化されることで感染性を獲得する。今回、リバーシジェネティクス系を用いて、VP4 上の 3 ヶ所のトリプシン切断部位 R231、R241、および R247 の重要性を検討した。

VP4 上のトリプシン切断領域にフューリン様プロテアーゼ認識配列を導入した組換えロタウイルス (KU//rVP4-R247Furin) を作製し、トリプシン非存在下でのロタウイルスの多段階増殖の可能性を試みた。

また、現時点では、VP4 しかリバーシジェネティクスの系が利用できない現状であるので、他の遺伝子に活用できるような改良も試

みた。その試みの一貫として、レオウイルスのリバーシジェネティクス系の検討を行った。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

### 細胞

サル腎臓由来細胞株 COS-7、MA104 および CV-1 細胞は、Eagle's MEM + 5%FCS で培養した。ヒト大腸 adenocarcinoma 細胞株 LoVo 細胞は Ham's F12 培養液+ 10%FCS で培養した。組換えウイルスの調製

KU//rVP4 (VP4 遺伝子のみ SA11 株由来で他の遺伝子はすべて KU 株由来) を親株として用いた。COS-7 細胞に各プラスミドを導入し、ヘルパーウイルスとしては、ヒトロタウイル

ス KU 株を感染させた後、KU 株 VP4 に対する中和モノクロン抗体存在下で培養を行い、cDNA 由来 VP4 遺伝子を有する組換えロタウイルス：  
KU//rVP4-R241K, KU//rVP4-R231K, KU// rVP4-R247K, および KU//rVP4-R231K, R247K を作成した。

サル RV SA11 株の VP4 遺伝子上のトリプシン切断領域 (244IHYP247) にフーリン認識配列 (244RHRR247) を導入したプラス鎖 RNA 発現プラスミドを構築した。COS-7 細胞にプラスミドを導入し、ヘルパーウイルスとしてヒト RV KU 株を感染させた後に、KU 株 VP4 に対する中和モノクロン抗体存在下で培養を行い、cDNA 由来 VP4 遺伝子を有する KU//rVP4-R247Furin を単離した。対照として、KU//rVP4 を用いた。

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 日間培養後にブランクアッセイで組換えレオウイルスを回収した。

ヘルパーウイルスとしては、ヒトロタウイルス KU 株 (G1P[8]) を利用した。

#### 部位変異の導入

部位変異は、QuickChange II site-directed mutagenesis kit (Stratagene) を利用して、行った。

#### 抗血清

抗ビリオン抗体は、精製 SA11 ビリオンをモルモットに免疫し得た。抗 VP5 抗体は、2 種の合成ペプチド (SA11 VP5 配列由来)：

296FKPANYQYTYTRDGEV313 と 444LDRLYGLPAADPNNKE460 を KLH に結合し、ウサギに免疫して得た。

#### ウェスタンブロッティング

精製ビリオンを SDS-PAGE で電気泳動し、PVDF 膜にトランスファーした。ウイルスタンパク質は、抗ロタウイルスビリオンか抗ロタウイルス VP5 のポリクロナール抗体、ペルオキシダゼ標識抗体で反応させ、化学発光により検出した。

#### (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

### 結果 1

ロタウイルスのスパイクタンパク質 VP4 のトリプシン開裂部位には高度に保存されたアルギニン残基 R231、R241、および R247 が存在する。細胞侵入試験において、細胞侵入には、R247 の切断だけで十分であり、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 細胞におけるブラン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-RVKKR-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。

細胞内フェーリンによる 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、フェーリンによる 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

### 3. 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 Matthijnsens, 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.

#### 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

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」

総合研究分担報告書

## 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者 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。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。

[札幌市口タウウイルス 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 Enterotoxigenic 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。

[札幌市口タウウイルス 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口タウウイルス 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、口タウ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]株を含めた口タウ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口タウウイルス

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 24 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

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 どうし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少な例と考えられた。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。

### A. 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 RotaTeq 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

### 3. 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）ラピッドスタ ロタ - 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。

3. 方法（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。

4. 方法（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( $5.0 \times 10^6$  コピー/reaction ~  $1.0 \times 10^0$  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。

### C. 研究結果

1. 結果(ヒト用の RV 簡易検出キットの感度)

$1 \times 10^7$ TCID<sub>50</sub>/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、 $1 \times 10^3$ TCID<sub>50</sub>/ml、ラピッドテスト ロタ - アデノで  $1 \times 10^1 \sim 10^2$ TCID<sub>50</sub>/ml、BD Rota/Adeno エグザマン スティックで  $1 \times 10^1 \sim 10^2$ TCID<sub>50</sub>/ml、ラピッドエスピー<ロタ>で  $1 \times 10^0 \sim 10^1$ TCID<sub>50</sub>/ml、イムノカード ST ロタウイルスで  $1 \times 10^0 \sim 10^1$ TCID<sub>50</sub>/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  $1 \times 10^1$ TCID<sub>50</sub>/ml、ロタスクリーンが  $1 \times 10^0$ TCID<sub>50</sub>/ml であり、イム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クロンの検出限界は  $1 \times 10^1 \sim 10^2$ TCID<sub>50</sub>/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  $0 \sim 1 \times 10^3$ TCID<sub>50</sub>/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  $1 \times 10^7$ TCID<sub>50</sub>/ml を示した。

2. 結果(次世代シーケンスによる遺伝子型別)

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。

### 3. 結果（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。

### 4. 結果（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]/P[23]-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  $1 \times 10^4$  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、RotaTaq 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

### 4. 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

7. 特許取得：なし
8. 実用新案登録：なし
9. 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<sup>1)</sup>、村上 耕介<sup>1)</sup>、藤井 克樹<sup>1)</sup>

研究協力者 Francis, E.Denis<sup>1, 2)</sup>

<sup>1)</sup> 国立感染症研究所、ウイルス第二部

第一室

<sup>2)</sup> 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

### 4. 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 40 $\mu$ 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

#### 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。

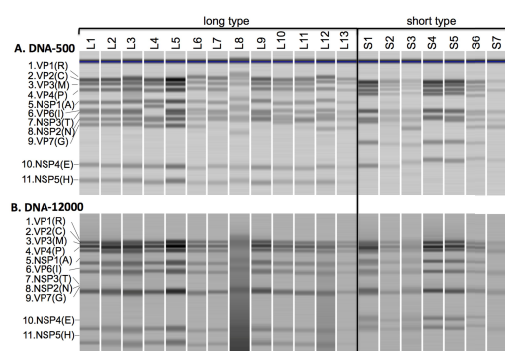


図1. ロタウイルスdsRNAのDNA-500 kitとDNA-12000 kitによる泳動パターン

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)。

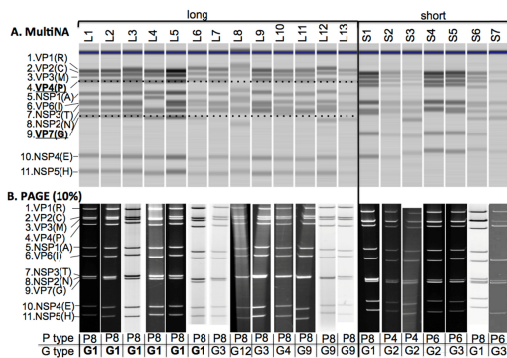


図2. ロタウイルスdsRNAのMultiNAとRNA-PAGEとの泳動パターンとの比較

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ことが示唆された。

#### D. 考察

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

##### 5. 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

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ことから、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

### 5. 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。

### 6. 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。

### 7. 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 6mer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

### 7. 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。

### 8. 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ントウイルス 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

### 6. 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

## 7. 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ス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

20) 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

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  | TTGGCGTTTACARTTCGTTCA     | 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  | GGCTATAAAAATGGCTTCGCT     | 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  | GGCTTTAAAAGMGAGAATTTCC    | 53.0-54.8 | 1-22           | 1062              | 1059                  |
| VP7 R primer  | GGGGGTCACATCATAACAATTCT   | 56.7      | 1041-1059 (+3) |                   |                       |
| NSP1 F primer | GGCTTTTTTTATGAAAAGTCTTGTG | 53.9      | 1-25           | 1547              | 1564                  |
| NSP1 R primer | CTAGGCGCTACTCTAGT         | 53.1      | 1531-1547      |                   |                       |
| NSP2 F primer | GGCTTTTAAAGCGTCTCAGTC     | 56.5      | 1-21           | 1058              | 1058                  |
| NSP2 R primer | GGTCACATAAGCGCTTTCTATTC   | 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 | AAGACCATTCTCCATTAAC       | 52.6      | 721-741        |                   |                       |
| NSP5 F primer | GGCTTTTAAAGCGCTACAGT      | 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<br>(都道府県) | 苫小牧<br>(北海道) | 由利<br>(秋田) | 昭和<br>(東京) | 江南<br>(愛知) | 南丹<br>(京都) | 山口大<br>(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<br>(都道府県) | NTT札幌<br>(北海道) | 小樽<br>(北海道) | 由利<br>(秋田) | 宮城<br>(宮城) | 昭和<br>(東京) | 東京医大<br>(東京) | 江南<br>(愛知) | 南丹<br>(京都) | 山口<br>(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 24 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ーニングを行った。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 臨床材料からの直接分離、 感染力価測定などの評価、 の実施を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

### 8. 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 μg/ml 含有(ウイルス増殖用培地)
- ・ Acetyltrypsin : Sigma Cat NO.6767

#### (4) RVA 検出キット

- ・ Rotacclone® (TFB) : ELISA キット
- ・ ティップスティック ' 栄研 ' ㊗(栄研化学) : IC キット

## 9. 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 (~3 µg/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。

## 10. 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

### 9. 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。

### 10. 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

8. 論文発表 なし

9. 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、小林宣道、片山和彦：A 群口タウイルス(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**

16. 特許取得：なし

17. 実用新案登録：なし

18. その他：なし