

ノロウイルスGI型キャプシド遺伝子の分子進化に関する研究

担当責任者 木村博一 国立感染症研究所
四宮博人 愛媛県立衛生環境研究所

研究協力者

小林美保 塚越博之 佐々木佳子 小澤邦壽(群馬県衛生環境研究所)
吉澄志磨(北海道衛生研究所) 古川紗耶香(青森県環境保健センター)
植木洋(宮城県保健環境センター) 水越文徳(栃木県保健環境センター)
本谷匠(茨城県衛生研究所) 篠原美千代(埼玉県衛生研究所)
鈴木理恵子(神奈川県衛生研究所) 佐原啓二(静岡県環境衛生科学研究所)
左近直美(大阪府立公衆衛生研究所)
重本直樹(広島県立総合技術研究所保健環境センター)
岡本玲子 調恒明(山口県環境保健センター) 山下育孝(愛媛県衛生環境研究所)
原田誠也(熊本県保健環境科学研究所) 清水英明 岡部信彦(川崎市健康安全研究所)
小平彩里 柴田伸一郎(名古屋市衛生研究所) 高橋知子(岩手県食肉衛生検査所)
岩切章(宮崎県小林食肉衛生検査所)
黒田誠 関塚剛史 山下明史 加納和彦(国立感染症研究所)

研究要旨

ノロウイルス (NoV) GI 全長キャプシド遺伝子の分子進化に関する研究を行った。解析領域のベイジアン MCMC 法による時系列系統解析、ベイジアンスカイラインプロット解析、Positive/Negative selection site の検索およびエピトープ予測を行った。時系列系統解析の結果から、NoV GI は、ブタ NoVGII から、約 4000 年前、ウシ NoVGIII から 3000 年前に分岐し、その後、約 830 年間を経て、速い速度(約 10^{-3} substitutions/site/year)で独自に進化してきたことが示唆された。また、positive selection site は2箇所のみで、P2 ドメインの血液型物質結合部位におけるエピトープも少なかった。このことからキャプシド蛋白は中和抗体宿主からの生体防御の圧力を受けにくく、かつ中和抗体が誘導されにくい性質を有することが推測された。

A. 研究目的

ノロウイルス(NoV)は、カリシウイルス科、ノロウイルス属に分類され、ウイルス性急性胃

腸炎の主な原因となる。現在、NoV は、5つの遺伝子群(GI~GV)に分類されている。このうち、ヒトに感染するのは主に GI と GII のウイルス

で、GI はさらに 9 遺伝子型、GII は 22 遺伝子型に細分類されている¹⁾。このように、NoV は他のウイルス、例えばエンテロウイルスなどと同様に、遺伝学的に多様でかつ抗原性も多様であると考えられている。NoV ゲノムは 3 つの ORF から構成され、ORF2 は主要ウイルス抗原であるキャプシド蛋白(VP1)をコードしている。このように、NoV の抗原性はキャプシド遺伝子(ORF2)の遺伝学的多様性を反映し、ORF2 の分子進化を解明することは重要であると思われる。このような背景から、今回、NoVGI ORF2 領域の分子進化を解明することを目的とした研究を行った。以下に概要を述べる。

B. 研究方法

GenBank に登録されている NoV キャプシド遺伝子の全長配列 (1593nt) のうち、GI 型 65 株、ブタ NoV GII 3 株およびウシ NoV GIII 1 株についてベイジアン MCMC 法による時系列解析を行った。KAKUSAN4²⁾ を用いて塩基置換モデルを検討し、GTR- Γ モデルを選択した。時系列系統樹の作成、分岐年代の推定、進化速度の計算には BEAST v1.75³⁾ を使用し、計算回数は 5000 万回とした。同様の方法により、計算回数を 6500 万回として NoV GI を対象としたベイジアンスカイラインプロット解析を行った。また、DataMonkey⁴⁾ を用いて Positive selection site および Negative selection site を検索した。さらに NoV GI の各遺伝子型の参照株を用いて、LEPS⁵⁾、BCPRED⁶⁾、FBCPRED⁶⁾、BepiPred⁷⁾、Antigenic⁸⁾ および LBtope⁹⁾ を併用してエピトープ解析を行った。10 残基以上連続し、4 種類以上のソフトウェアで共通して推定されている箇所をエピトープとみなした。

C. 研究結果

ベイジアン MCMC 法により作成した時系列系統樹を図 1 に示す。解析株の遺伝起源は約

4000 年前であると推定された。その後、約 830 年前に GI が分岐し、さらに GI.1-9 の 9 つの遺伝子型へ分岐したと推測された。GI 型の平均進化速度は 1.25×10^{-3} substitution/site/year (95%HPD $7.04 \times 10^{-3} \sim 1.81 \times 10^{-3}$) であった。

キャプシド遺伝子において推定される Positive selection site は Pro10, Thr10, Ser10 および Ser557, Leu557, Val557 の 2 箇所であった (表 1)。これらのアミノ酸置換は FEL 法および IFEL 法で共通であった。また、Negative selection site については SLAC 法、FEL 法および IFEL 法で 400 箇所以上のアミノ酸が該当した。

また、各遺伝子型において複数の箇所がエピトープであると推定された (表 2)。GI.1 の参照株におけるエピトープおよび血液型物質結合部位¹⁰⁾を図 2 に示す。

D. 考察

本研究において、完全長 NoV GI キャプシド遺伝子に関する分子進化に関する研究を行った。その結果、ヒト NoV GI は、ブタ NoV GII から約 4000 年前、ウシ NoV GIII から 3000 年前に系統樹上分岐したことが推定された (図 1)。また、NoV GI は、これらのウイルスから遺伝学的に分岐後、現在から約 900 年遡る間にさらに 9 つの遺伝子型に分岐したことが推定された。また、NoV GI.1、GI.2、GI.4、GI.5 および GI.6 の遺伝子型のウイルスは、同じ始祖ウイルスから分岐し、系統樹上、同系統であることも示唆された。さらに、NoV GI の進化速度は、約 10^{-3} substitutions/site/year であることも推定された。

また、ベイジアンスカイラインプロット解析から、NoV GI は、約 500 年以上前から、ヒトに順化 (adaptation) し、遺伝学的に一定の population を形成してきたことが示唆された (図示せず)。さらに、P2 ドメインに Positive selection site は同定されないことから、NoV GI キャプシ

ド蛋白は、宿主の生体防御の圧力を受けにくい特性を持つことが推定された（表1）。

NoV の capsid には、超可変領域（Protruding 2 domain, P2 ドメイン）が存在する。そして、この P2 ドメインの可変性が NoV capsid 蛋白の抗原性の多様性の主な原因となっていることが示唆されている。P2 ドメインにおけるエピトープ解析の結果、図2に示すように、P2 ドメインの血液型物質結合部位（NoV 感染に重要な部位）に抗体誘導可能なエピトープは、ほとんど存在しないことが推定された。したがって、NoV GI の capsid 蛋白は宿主の中和抗体を誘導しにくい性質を有することも推察された。

E. 結論

完全長 NoV GI capsid 遺伝子に関する分子進化に関する研究を行った。その結果、ヒト NoV GI は、ブタ由来 NoV GII から約 4000 年前、ウシ NoV GIII から 3000 年前に系統樹上分岐したことが推定された。NoV GI は、現在から約 900 年遡る間にさらに 9 つの遺伝子型に分岐したことが推定された。NoV GI の進化速度は、約 10^{-3} substitutions/site/year であることも推定された。また、capsid 領域に Positive selection site は非常に少なく、宿主の生体防御の圧力を受けにくい特性を持つことが推定された。さらに、P2 ドメインの血液型物質結合部位に抗体誘導可能なエピトープはほとんどなく、NoV GI の capsid 蛋白は宿主の中和抗体を誘導しにくい性質を有することもわかった。

F. 参考文献

- 1) Kroneman, A. *et al.* Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch. Virol.* **158**, 2059–2068 (2013).
- 2) Tanabe, A. S. Kakusan4 and Aminosan: two programs for comparing nonpartitioned,

proportional and separate models for combined molecular phylogenetic analyses of multilocus sequence data. *Mol Ecol Resour.* **11**, 914–921 (2011).

- 3) Drummond, A. J. & Rambaut, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol.* **7**, 214 (2007).
- 4) Pond, S. L. & Frost, S. D. Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. *Bioinformatics.* **21**, 2531–2533 (2005).
- 5) Wang, H. W., Lin, Y. C., Pai, T. W., Chang, H.T. Prediction of B-cell linear epitopes with a combination of support vector machine classification and amino acid propensity identification. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, (2011).
- 6) EL-Manzalawy, Y., Dobbs, D. & Honavar, V. Predicting linear B-cell epitopes using string kernels. *J. Mol. Recognit.* **21**, 243–255 (2008).
- 7) Larsen, J. E., Lund, O. & Nielsen, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res.* **2**, 2 (2006).
- 8) Rice, P., Longden, I. & Bleasby, A. EMBOSS: the European molecular biology open software suite. *Trends Genet.* **16**, 276–277 (2000).
- 9) Singh, H., Ansari, H. R. & Raghava, G. P. Improved method for linear B-cell epitope prediction using antigen's primary sequence. *PLoS One* **8**, e62216 (2013).
- 10) Choi, J. M. *et al.* Atomic resolution structural characterization of recognition of histo-blood group antigens by Norwalk virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. US A.* **105**, 9175–9180 (2008).

G. 研究発表

1. 論文発表

Mizukoshi F, Kuroda M, Tsukagoshi H, Sekizuka T, Funatogawa K, Morita Y, Noda M, Katayama K, Kimura H*. A food-borne outbreak of gastroenteritis due to genotype G1P[8] rotavirus among adolescents in Japan. *Microbiol Immunol.* **58(9)**, 536-539 (2014).

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

2. 学会発表
なし

図1 ノロウイルスキャプシド遺伝子の時系列系統樹(MCMC法)

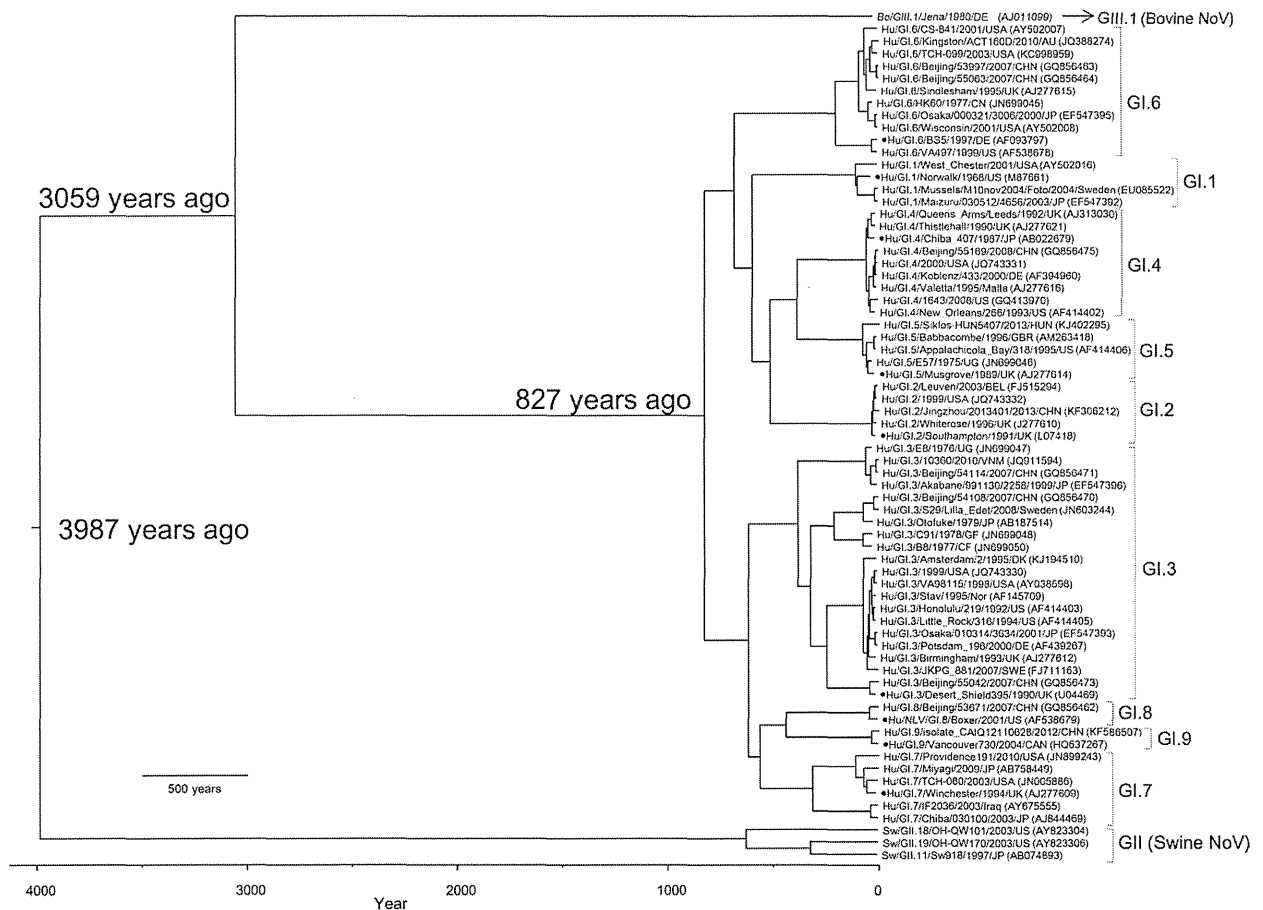


図2 GI.1/Norwalk/1968/US 株の P2 ドメインにおける推定エピトープ

```

10      20      30      40      50
M M A S K D A T S S V D G A S G A G Q L V P E V N A S D P L A M D P V A G S S T A V A T A G Q V N
60      70      80      90      100
P I D P W I I N N F V Q A P Q G E F T I S P N N T P G D V L F D L S L G P H L N P F L L H L S Q M Y
110     120     130     140     150
N G W V G N M R V R I M L A G N A F T A G K I I V S C I P P G F G S H N L T I A Q A T L F P H V I A
160     170     180     190     200
D V R T L D P I E V P L E D V R N V L F H N N D R N Q Q T M R L V C M L Y T P L R T G G G T G D S F
210     220     230     240     250
V V A G R V M T C P S P D F N F L F L V P P T V E Q K T R P F T L P N L P L S S L S N S R A P L P I
260     270     280     290     300
S S M G I S P D N V Q S V Q F Q N G R C T L D G R L V G T T P V S L S H V A K I R G T S N G T V I N
310     320     330     340     350
L T E L D G T P F H P F E G P A P I G F P D L G G C D W H I N M T Q F G H S S Q T Q Y D V D T T P D
360     370     380     390     400
T F V P H L G S I Q A N G I G S G N Y V G V L S W I S P P S H P S G S Q V D L W K I P N Y G S S I T
410     420     430     440     450
E A T H L A P S V Y P P G F G E V L V F F M S K M P G P G A Y N L P C L L P Q E Y I S H L A S E Q A
460     470     480     490     500
P T V G E A A L L H Y V D P D T G R N L G E F K A Y P D G F L T C V P N G A S S G P Q Q L P I N G V
510     520     530     540     550
F V F V S W V S R F Y Q L K P V G T A S S A R G R L G L R R *
    
```

●血液型抗原との結合に関与すると考えられているアミノ酸残基

■P2 ドメイン

□予測されたエピトープ

表1 NoVGI キャプシド遺伝子における Positive selection sites

変異箇所	SLAC	FEL	IFEL
Pro10Thr, Gln, Thr, Ser			
Thr10Ser		○	○
Ser10Pro, Thr			
Ser557Leu			
Leu557Ile		○	○
Val557Ile			

表2 各参照株において予測されたエピトープ

解析株 (GenBank accession No.)	位置	予測されたエピトープ
GI.1/Norwalk/1968/US (M87661)	32-43	AMDPVAGSSTAV
	316-325	<u>APIGF^PDLGG</u>
	377-388	<u>SPPSHPSGSQVD</u>
	480-496	FLTCVPNGASSGPQQLP
GI.2/Southampton/1991/UK (L07418)	33-45	MEPVAGPTTAVAT
	413-423	<u>AANLAPPVFPP</u>
	437-448	PGPNNRSAPNDV
	501-511	NGVGAGPQQLP
GI.3/Desert Shield395/1990/UK (U04469)	314-326	<u>YHAFESPAPIGF^P</u>
GI.4/Chiba 407/1987/JP (AB022679)	29-43	DPIPIDPVAGSSTAL
	157-167	PVEVPLEDVRN
	317-327	<u>APAPAGFPDLG</u>
	386-397	<u>TSPPSDSGGANT</u>
	435-445	IPGPNQSGSPN
	501-510	SSSTGPQQLP
GI.5/Musgrove/1989/UK (AJ277614)	9-19	TPSADGANGAG
	29-41	EPLPLDPVAGAST
	319-329	<u>APTGF^PDLGTS</u>
	436-447	IPGPNTAHKPNL
GI.6/BS5/1997/DE (AF093797)	312-325	<u>PFVPLESPAPVGFP</u>
GI.7/Winchester/1994/UK (AJ277609)	28-41	AEPLPLEPVVGAAT
	189-200	LRAGGASSGTDP
	314-326	<u>YHAFESPAPLGFP</u>
	392-402	<u>GARVDPWKIPS</u>
	495-506	PNTGGGPQNLPT
GI.8/Boxer/2001/US (AF538679)	189-200	LRSGGASSGTDP
	342-353	<u>PTELSTGDPSGK</u>
	441-453	TVSNPKVPCTLPQ
	499-509	PNAGGGPQTLP
GI.9/Vancouver730/2004/CAN (HQ637267)	20-33	QLVPENNNTSEPIN
	318-334	<u>HAFESPAPLGFPDFGDG</u>
	351-366	<u>NDPVVVG^NVQPYNPQF</u>
	374-385	<u>VVENPTPDQVAT</u>

※P2 ドメインに該当する箇所を下線で示した。

下痢症ウイルス水環境サーベイランスの研究

担当責任者 片山 浩之 東京大学大学院工学系研究科 准教授

研究要旨

雨天後の東京湾において、ウイルスを経時的に採取し、濃度変動を調べた。従来よりも大容量の水試料からウイルスを濃縮した結果、ウイルス測定における酵素反応が阻害されるという現象が見られた。今後、阻害を抑制するためのウイルス検出前処理法の開発が必要である。

A. 研究目的

下痢症ウイルスについては、不顕性感染により保持されているものもあるため、病院等の患者由来の試料のみならず、健常者を含む試料からの検出が必要となる。下水試料などの水環境試料は、地域で発生する糞便汚染を受けた水であるため、ウイルスの発生動向に関して貴重な情報が含まれていると考えられる。ここでは、下水や水環境などを対象に、存在するウイルスを正確に定量すること、および網羅的にウイルスを測定することを目標として手法の開発を行うとともに、我が国の糞便に存在しているウイルスを把握することを目的とする。

B. 研究方法

東京湾のお台場付近の沿岸域において、雨天後に採取した水試料を対象とした。

試料中のウイルス濃度を測定し、また検出阻害の評価・軽減処理を行った。

まず、1次濃縮として、船上における試料採取時にアスピレーターと接続させたカートリッジ型陰電荷 MF 膜に水試料 3 - 99 L（多くは 15 - 30 L）からウイルスを吸着させ、東京大学でウイルスを誘出した。さらに、1次濃縮を終えた試料は 4 °C 以下で冷蔵保存し、UF 膜を

用いた遠心ろ過により 2次濃縮を行った。

濃縮試料に対して核酸抽出、逆転写、real-time PCR を行い、ノロウイルス GI および GII (NoV GI, GII), アイチウイルス (AiV) および PMMoV の濃度を定量した。また、RNA ウイルス測定時には、検出阻害を評価するために、プロセスコントロールとしてマウスノロウイルス (MNV) を濃縮試料に添加し、また検出阻害を軽減するために、RNA 抽出液の 10 倍希釈を行った。RNA 抽出液の 10 倍希釈を行った場合と行わなかった場合のウイルス定量濃度を比較し、より濃度が高かったものを真の濃度に近い測定値とみなし、結果として採用した。

C. 研究結果

RNA 抽出液の 10 倍希釈を行わなかった場合のウイルス検出阻害が見られた試料の割合は、隅田川河口で 25 % (3/12) , 目黒川河口で 83 % (10/12) , 測線観測地点で 83 % (15/18) , お台場で 93 % (14/15) であった。また、検出阻害軽減処理として RNA 抽出液の 10 倍希釈を行った結果、阻害が見られた試料の割合は、隅田川河口で 17 % (2/12) , 目黒川河口で 33 % (4/12) , 測線観測地点で 39 % (7/18) , お台場で 60 % (9/15) となった。

測定対象としたウイルスとして、ノロウイルス GI、GII、アイチウイルスおよびトウガラシ微斑ウイルス (PMMoV) が広く検出されたが、PMMoV の濃度が最も高く、 10^6 copies/L 近い濃度を示した。一方、ノロウイルスはもっとも濃度が高い時でも 10^4 copies/L 程度であった。

D. 考案

ウイルスの直接的な検出を試みた結果からは、本調査において採取された試料中の阻害物質濃度が非常に高かったことを示していると考えられる。

10 倍希釈後にウイルス測定した結果からは、RNA 抽出液の 10 倍希釈により全体としてみれば検出阻害が軽減されたことを示しているが、一方で、軽減の程度には採水地点による差が見られることも示している。特に、お台場においては RNA 抽出液の 10 倍希釈を行った後にも 60% の試料で検出阻害が見られた。水理学的な条件により、お台場の採水地点周辺海域に阻害物質が輸送され、蓄積されている可能性がある。さらに、阻害が見られた試料の割合を鉛直方向別に見ると、低層において中層より、中層において表層より検出阻害が強く見られることが分かる。この結果は、再び、水理学的な条件により、深さ方向に阻害物質濃度の勾配があることを示唆している。

E. 結論

降雨後の東京湾沿岸において、15L 以上の水試料を採取した場合には、ウイルスの測定において酵素反応阻害が生じることが分かった。今後、阻害の軽減のための処理法を開発する必要があることが分かった。

F. 研究発表

1. 論文発表 (発表誌名巻号・頁・発行年記入)
なし
1. 学会発表
国内会議
第 51 回環境工学研究フォーラム、2014 年
12 月 20 日 (土) ~22 日 (月) 山梨大学

国際会議
なし
2. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
 1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

タイ王国東北部における、下水および臨床検体に分布するノロウイルスの分子疫学

担当責任者 本村 和嗣 大阪大学微生物病研究所
日本-タイ新興再興感染症共同研究センター 特任准教授（常勤）

研究要旨

ノロウイルスの生活環はよくわかっていない。そのため、早期におけるノロウイルスの新変異株検出は、未だ、確立されていない。我々は、下水環境と臨床検体由来の検体を対象に、(i) 分布する遺伝子型の比較、(ii) 遺伝子型の時間的動態、変動について、解析をおこなった。タイ王国の地方衛生研究所や関連病院との連携し、経時的に、自然環境（河川、下水）、同地域にて急性胃腸炎で入院していた患者糞便試料を収集した。下水環境では、GI, GIIが検出されていたが、臨床検体ではGII、特にGII.4が主として検出されていた。また、臨床検体で検出されたものは、2-3か月間において下水環境で検出されることがわかった。今後、さらに解析をすすめ、流行の監視、予想に寄与する知見を得たい。

A. 研究目的

ノロウイルスは、河川や水中生物などの自然環境、汚染食材などの生活環境中に、多様な遺伝子型が混在している。本研究では、ノロウイルス新変異株の早期検出、ゲノム配列からの特徴を抽出することを目的としている。

本研究では、タイ王国の地方衛生研究所や関連病院との連携し、経時的に、自然環境（河川、下水）、同地域にて急性胃腸炎で入院していた患者糞便試料を収集する。（1）次世代型ゲノム解析装置を用いたゲノム情報の収集、（2）推定抗原エピトープ領域に変異を蓄積しているノロウイルスの分布状況、（3）サンガー法による全ウイルスゲノムを明らかにし、進化系統、近縁関係、流行株のアミノ酸の特徴を同定し、分子モデリング法を用いて、カプシド蛋白質の特徴を明らかにする。新変異株出現により、流行が予測された場合は注意喚起を促し、ウイルス性下痢症制圧、医療と福祉の向上について寄与したい。

環境中そして臨床検体における遺伝子型や

亜株の種類、分布、動態を明らかにする。これらの解析をもとに流行発生のしくみを検討し、流行株の検出、サーベイランス、リスク評価、創薬やワクチン開発等に幅広く役立つ重要な科学基盤を提供すると考えている。

B. 研究方法

2013年9月から2014年8月の間に、Udon Thani 県にある下水処理前7地点、と Bung Kan 県にある下水処理前6地点、を4か月に一回、採水し収集した。臨床検体は、同時期に、Udon Thani 県 Phen 病院、そして Bung Kan 県 Srivilai 病院で発生した感染性胃腸炎症例を対象とする。ヒトノロウイルス感染症の診断には、イムノクロマト法であるクイックナビTM-ノロ2（デンカ生研）を用いる。陽性となった患者糞便試料、を対象とした。

カプシド遺伝子シエル領域配列を調べた。糞便試料を出発材料とし、糞便に PBS を加え 10%懸濁液を作成し、11000×g、20 分間遠心の後、その上清を RNA 抽出液とした。この RNA

抽出液より、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を使って、ノロウイルス RNA を抽出した後、G2SKF-G2SKR (Katayama K et. al; Virology. 2002 Aug 1;299(2):225-239.)を用いて cDNA を合成した。cDNA を template にして、カプシド遺伝子シエル領域を PCR で増幅した。ABI 3130 (Life technologies 社)を用いて、遺伝子増幅産物の配列情報を取得した。配列集団の系統関係の解析は最尤法により解析した。

(倫理面からの配慮について)

ヒト由来臨床材料を使う研究は、関連機関の倫理審査会の承認を得て、提供者本人に十分な説明を行い、承諾を得た上で行った。

C. 研究結果

(i) ウドンターニ県では、下水：21 検体、ブンカーン県では、下水：18 検体を出発材料とし、カプシド遺伝子シエル領域の配列情報を取得した。GI が検出されたのは、ウドンターニ県では 13 検体、ブンカーン県では 7 検体であった。

(ii) ウドンターニ県由来の下水(n=13)より、GI.2, GI.3, GI.4, GI.10, GI.12 が検出された。ブンカーン県由来の下水(n=7)より、GI.2, GI.3, GI.4, GI.8, GI.15 が検出された。異なる遺伝子型が検出された。(iii) GII では、ウドンターニ県由来の下水(n=11)より、GII.2, GII.3, GII.4, GII.10, GII.6 が検出された。ブンカーン県由来の下水(n=6)より、GII.2, GII.4, GII.15 が検出された。(iv) 臨床検体では、GII のみしか検出されなかった。ウドンターニ県では 19 検体、ブンカーン県では 2 検体であった。(v) GII.3, GII.4, GII.11 が検出された。GII.4 は、21 検体中 18 検体を占めていた。更に、GII.4 18 検体中、11 検体が Sydney 2012 であった。(iv) 臨床検体の季節変動との関連性について調べた。GII 21 検体中、17 検体が 12-1 月に検出されていた。

D. 考案

下水環境中には、GI そして GII、多種多様な遺伝子型が検出されていた。しかし、近辺の病院で得られた入院由来の臨床検体では、GII のみで、大半が GII.4 であった。このことより、GI もしくは GII.4 以外の GII の遺伝子型は病原性が低く、下痢症が重症化せず、病院で検出されない可能性が考えられる。また、今回、GII.4 の中で 11 検体が、2012-2013 年に、世界で大流行を引き起こした Sydney 2012 であった。本症例は全て集団発生ではなく、単発発生のものである。タイの東北部では、海産物の生食習慣はない。季節変動とノロウイルスの発生について関連性を調べたところ、日本と同様 12-2 月に多く検出されていた。タイ東北部では、この時期は最も寒い季節である。温度、湿度ともに、最低になる。よって、GII.4 は、寒い乾燥した環境に粒子構造上、安定性を示し、病原性が高いウイルスである可能性が考えられる。ノロウイルスの生活環解明のために、感染経路について調査したい。今後、ウイルス遺伝情報の包括的収集および情報科学的手法による解析は、ノロウイルスの流行予測の基盤情報となることが期待される。

E. 結論

今年度は、タイ国内におけるノロウイルス検出ネットワーク構築、および、下水環境、病院で検出されたノロウイルスの分子疫学を行った。次年度は、次世代シーケンサーを用いて、下水環境および臨床検体からのノロウイルス流行株の動態を調べ、その意義について考察したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Endo Y., Noguchi S., Hara Y., Hayashi Y., **Motomura K.**, Murakami N., Tanaka S., Yamashita S., Goto Y., Matsumoto N., Nonaka I., Nishino I. Dominant mutations in ORAI1 cause tubular aggregate myopathy with hypocalcemia by constitutive activation of store-operated Ca²⁺ channel Hum Mol Genet. Vol.9 2014 p1-p12

2. 学会発表

国際会議

1. **Motomura, K.**, Ode, H., Yokoyama, M., Oka, T., Katayama, K., Noda, M., Tanaka, T., Takeda N., Sato, H., Norovirus Surveillance Group of Japan. Deep Sequencing-based analysis of norovirus populations in individuals with acute gastroenteritis. Asian-African research forum on emerging and reemerging infections. :2014; Sendai

2. **Motomura K.**, Introduction of application study on NGS. Asian-African research forum on emerging and reemerging infections. :2014; Sendai

3. **Motomura K.**, Yokoyama M., Ode H., Oka T., Katayama K., Noda, M., Tanaka, T., Sato, H., Takeda N., Norovirus Surveillance Group of Japan. Dynamic Aspect of Norovirus GII.4 Genome in Nature. Asian-African research forum on emerging and reemerging infections. :2014; Sendai

4. Saeng-aroon S., Locket R., Pliapat T., Sangkitporn S., Kondo M., Takebe Y., Nakayama E., Takeda N., **Motomura K.**, Shioda T., Distribution of HIV-1 subtypes in female sex workers recently infected with HIV-1 in Thailand.

Asian-African research forum on emerging and reemerging infections. :2014; Sendai

5. **Motomura K.**, Takeda N., Distribution of Norovirus Genotypes through Genomic Analysis in Japan and Thailand. JGRID Vietnam-Thailand seminar :2014; Hanoi

6. **Motomura, K.**, Ode, H., Yokoyama, M., Oka, T., Katayama, K., Noda, M., Tanaka, T., Takeda N.1, Sato, H., Norovirus Surveillance Group of Japan. Deep Sequencing-based analysis of norovirus populations in individuals with acute gastroenteritis IUMS :2014; Montreal

7. Sato H., Yokoyama M., Nakamura H., **Motomura, K.**, Strong constraints on changes in capsid protein of norovirus pandemic lineage GII.4_2006b after the onset of outbreaks IUMS :2014; Montreal

8. **Motomura, K.**, Norovirus Surveillance Group of Japan. Genetic evolution of norovirus for survival in human population as a strategy DASAN Conference :2014; Kyoungju

9. Endo Y., Noguchi S., Hara Y., Hayashi Y., **Motomura K.**, Murakami N., Tanaka S., Yamashita S., Goto Y., Matsumoto N., Nonaka I., Nishino I. Dominant mutations in ORAI1 cause tubular aggregate myopathy with hypocalcemia by constitutive activation of store-operated Ca²⁺ channel World Muscle Society ;2014; Berlin

国内会議

10. 本村和嗣、横山勝、大出裕高、中村浩美、岡智一郎、片山和彦、野田衛、田中智之、武田直和、佐藤裕徳、 Norovirus Surveillance Group

- of Japan. ノロウイルス感染者体内における混合感染の解析 第88回日本感染症学会学術集会 ;2014; 福岡
11. 本村和嗣、飯塚節子、中村昇太、元岡大祐、大出裕高、杉浦互、佐藤裕徳、田中智之、武田直和、ノロウイルス集団食中毒事例におけるウイルス亜集団遺伝系統の包括的解析 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. ;2014; 横浜
12. 佐藤裕徳、横山勝、本村和嗣、中村浩美、岡智一郎、片山和彦、武田直和、野田衛、田中智之、Norovirus Surveillance Group of Japan ヒト集団におけるノロウイルス流行株の多様性と進化 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. ;2014; 横浜
13. Saeng-aroon S., Locket R., Plipat T., Sangkitporn S., Kondo M., Takebe Y., Nakayama E., Takeda N., Motomura K., Shioda T., Distribution of HIV-1 subtypes in female sex workers recently infected with HIV-1 in Thailand. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. ;2014; 横浜
14. 佐藤裕徳、本村和嗣、横山勝 ノロウイルスの多様性と進化の制約 第 37 回 日本分子生物学会. ;2014; 横浜
- G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

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

担当責任者 中込 治 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 教授

研究要旨

ロタウイルスワクチンがロタウイルスの野生株に及ぼす影響を評価する基盤情報として、わが国で過去 31 年間に検出された 19 株の G2 ロタウイルス株の全遺伝子分節の塩基配列を決定した。わが国の 19 株とデータベース上の 131 株を合わせた、150 株の G2 株の各遺伝子分節ごとの分子系統的解析から G2 ロタウイルス株は、突然変異の蓄積と遺伝子分節再集合を通して、allele を変化させながら段階的に進化してきていることが分かった。

A. 研究目的

ロタウイルスワクチンの接種率の向上に伴い、下痢症患者から検出される野生ロタウイルス株に何らかの影響がおよぶことが予想される。とくに単価ロタウイルスワクチンについては、遺伝子型が異なる G2 株の相対的増加との因果関係についての議論がある。本研究は、このような議論の基盤情報として、わが国における G2 株の分子進化の様相を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1980-2011 の 31 年間に検出された 35 株の G2 株から VP7 遺伝子の分子系統樹に基づいて、選択した 19 株から抽出したゲノム RNA を用いて、全遺伝子分節の塩基配列を決定した。また、データベースに登録されている G2 株に由来する全遺伝子分節の塩基配列を MEGA6 により解析した。

C. 研究結果

19 株の G2 ロタウイルス株についてゲノム遺伝子型構成 (VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5) を決定したとこ

ろ、8 株が DS-1 型遺伝子型構成(G2- P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2)を示す一方、11 株が G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N1-T2-E2-H2 を示す遺伝子分節再集合体であった。これらの日本の 19 株とデータベース上の 131 株を合わせた、150 株の G2 株の各遺伝子分節ごとに分子系統樹を作成し、分子進化の様相をみたところ、VP7, VP4, VP2, NSP1 および NSP5 遺伝子分節では、allele I から allele IVa へ、VP6, VP1, VP3, NSP2, NSP3 および NSP4 遺伝子分節では、allele I から allele V へと、段階的に進化してきていることがわかった。

なお、1983 年に秋田市で検出された 83A001 株はすべての遺伝子分節において G2 株のプロトタイプである DS-1 株と同一 lineage (allele I) に属していた。

D. 考案

NSP2 遺伝子分節再集合体であった 11 株は、DS-1 型遺伝子型構成をもつ典型的な G2 ロタウイルス株が Wa 型のウイルスから NSP2 遺伝子を獲得した後、さらに拡散、伝播を続けている間に遺伝子型内で遺伝子分節再集合 (intragenotype reassortment) を重ねて形成され

たものと考えられた。

E. 結論

G2 ロタウイルス株は、突然変異の蓄積と遺伝子分節再集合を通して、allele を変化させながら段階的に進化してきている。

F. 研究発表

1. 論文発表 (発表誌名巻号・頁・発行年記入)

- 1) Kinoshita S, Noguchi A, Miura S, Nakagomi T, Nakagomi O, Takahashi T. A retrospective, hospital-based study to determine the incidence of rotavirus hospitalizations among children less than 5 years of age over a 10-year period (2001-2011) in Akita prefecture, Japan. *Jpn J Infect Dis* 2014; 67:464-468.
- 2) Fujii Y, Nakagomi T, Nishimura N, Noguchi A, Miura S, Ito H, Doan YH, Takahashi T, Ozaki T, Katayama K, Nakagomi O. Spread and predominance in Japan of novel G1P[8] double-reassortant rotavirus strains possessing a DS-1-like genotype constellation typical of G2P[4] strains. *Infect Genet Evol* 2014; 28: 426-433.

2. 学会発表

国内会議

- 1) 中込とよ子、中込治、団海燕 ロタウイルスの分子疫学：マラウイにおけるG12P[6]株の突発出現の背景 第62回日本ウイルス

学会学術集会 横浜 2014.11.10-12

- 2) 金子美穂、中込とよ子、中込治 自己対照症例系列(SCCS)法によるロタウイルスワクチンの腸重積発症リスクの評価 第18回日本ワクチン学会学術集会 福岡 2014.12.6-7

国際会議

- 1) Doan, Y.H., Nakagomi, T., Agbemabiese, C.A., Nakagomi, O. Molecular evolution of G2P[4] rotavirus strains at the whole genome level. The 11th International Rotavirus Symposium, New Delhi, India, 3-5 September, 2014
- 2) Nakagomi, O., Nakagomi, T. Genetic diversity of rotaviruses: from genogroup to genotype constellation. The 38th Joint Panels Meeting of the Viral Diseases of the United States-Japan Cooperative Medical Science Program Taipei, Taiwan, 28-29 January, 2015

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

ロタウイルスの網羅的ゲノム解析と分子疫学調査

担当責任者 藤井 克樹 国立感染症研究所 ウイルス第二部 主任研究官

研究要旨

我々の研究室では、これまでロタウイルス（RV）胃腸炎の入院症例の便検体を全国の病院から収集して網羅的な分子疫学調査を行ってきた。前シーズンから引き続き、2013/14年シーズンに収集した検体について解析した結果、RV陽性検体（秋田2検体、愛知6検体、山口7検体の計15検体）の遺伝子型分布はG1が1検体（6.7%）、G2が8検体（53.3%）、G9が6検体（40.0%）であった。このG1株は、シーケンス解析結果とPAGEの結果からWa-like G1であると推定された。2012年および2013年に大きな流行をもたらしたDS-1-like G1株は1例も見られなかった。しかし、2013/14年シーズンは検体数が少ないため、このデータだけでDS-1-like G1株が全国的に消失したとは断定できず、今後は調査方法を病院ベースから地衛研ベースに転換して、RV流行株の監視を続ける必要がある。本年度は既に全国14の地衛研から1000近い胃腸炎患者の便検体を収集したため、今後これらの検体について全ゲノム解析を進め、時系列分子疫学解析を行う予定である。

A. 研究目的

ロタウイルス（RV）は乳幼児の重症胃腸炎の主な原因ウイルスであるが、ワクチンが開発されて以降、患者数は徐々に減少し始めている。わが国においても、2種類のRVワクチンが2011年11月（ロタリックス）および2012年7月（ロタテック）に導入され、その接種率は50%程度で推移していると推計されている。従って、今後はワクチンの選択圧によりRV流行株の遺伝子型が変化する可能性や、ワクチンの効果が及ばないウイルス株が出現する可能性などが懸念される。しかし近年まで、わが国ではRVの検体を継続的に採取・解析して流行株の監視を行うシステムが存在せず、遺伝子配列の変遷データがほとんど蓄積されていなかった。そこで当研究室では、2012年以降、全国の病院から急性胃腸炎の入院症例の便検体を収集し、重症RV感染症の網羅的分子疫学調査を実施してき

た。その調査の結果、2012年から2013年にかけて、非定型的な遺伝子型構成を持つDS-1-like G1P[8]型（G1-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2）のウイルスが全国的に流行していることを明らかにした。この新しいウイルス株が、今後どれほどの期間、どれほどの地域で流行し続けるか監視を続ける必要がある。

本研究の目的は全国の地方衛生研究所（地衛研）から収集したRV検体のゲノム解析であるが、本報告書では、前シーズンから引き続き2013/14年シーズンに収集したRV陽性検体の解析結果について報告し、この数年間のRV流行株の変遷について総括を行うことにより、今後のRV分子疫学研究の道標を示す。

B. 研究方法

2013/14年シーズン（2013年9月～2014年3

月)は、由利組合総合病院(秋田県)、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4病院から、急性胃腸炎による5歳未満の入院症例の便検体を収集した。

各便検体から10%PBS懸濁液を調製し、ELISA法(ロタクロン)を用いてRVのスクリーニングを行った。RV陽性検体について、TRIzol® LS Reagent(Life technologies)およびDirect-zol RNA MiniPrep Kit(ZYMO Research)を用いてウイルスRNAを抽出した。各RNAサンプルについてPAGEによる電気泳動パターン解析およびVP7シーケンス解析を行った。

C. 研究結果

2013/14年シーズンは秋田27検体、京都15検体、愛知6検体、山口19検体の合計67検体を収集した。このうちELISA法でRV陽性(OD値0.15以上)を示したのは秋田2検体、愛知6検体、山口7検体の合計15検体のみであり、京都の検体は全て陰性であった。RV陽性検体は全て2014年1-3月に収集した検体であった。

VP7シーケンス解析の結果、その遺伝子型分布はG1が1検体(6.7%)、G2が8検体(53.3%)、G9が6検体(40.0%)であった。このG1株は、シーケンス解析結果とPAGEの結果から、Wa-like G1であると推定された。また、採取された地域別に見ると、秋田は2検体ともG9、愛知はG1が1/6、G2が3/6、G9が2/6であり、山口はG2が5/7、G9が2/7であった。2012年および2013年に大きな流行をもたらしたDS-1-like G1株は1例も見られなかった。

D. 考察

2013/14年シーズンにおけるRV流行株の調査の結果、少なくとも過去2年間にわたって流行していたDS-1-like G1株が1例も検出されなかった。ただし、検体を収集した期間がRV流

行シーズンの前半のみであり、検体数が前シーズンより圧倒的に少ないため、このデータだけでDS-1-like G1株が全国的に消失してしまったと断じるのは早計であろう。

RVの流行株は、シーズンごと・地域ごとに大きく異なることが、これまでの調査から明らかになっている。また、特定の遺伝子型のウイルスがしばらく流行すると、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環境が生まれる。しかし毎年新生児(=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が一定の間隔を置いて再び流行する可能性がある。つまり、DS-1-like G1株が一旦調査の網にかからなくなっても、水面下で小規模な感染集団として維持され、数年後に再び現れる可能性は十分に考慮しなければならない。また、ワクチンの普及により感染者(特に入院症例)は大幅に減少すると考えられるが、ウイルスの特性上、患者が完全にゼロになるとは考えにくく、ワクチンでカバーできないウイルス株が出現する可能性もあるため、今後も継続的な疫学調査が必要である。しかも、DS-1-like G1株は、従来行われてきたgenotyping法(multiplex-PCR法)では判別不可能であるため、今後のRV疫学調査は全ゲノムセグメントの解析が要求されることになる。

このような状況を受け、我々の研究室では今後、全国の地衛研から胃腸炎患者の便検体を収集して、次世代シーケンサーによるRVの全ゲノム解析を行い、RV流行株の監視を行う予定である。これまでは病院ベースの調査を行ってきたが、RVワクチンの導入によりRV感染症の入院患者数は大幅に減少傾向にあるため、今後は病院ベースの調査ではRV陽性検体を効率良く収集できなくなる事が予想される。従って、今後は病院ベースではなく地衛研ベースの調査にシフトするのが妥当と考えられる。今年度

は既に、北海道立衛生研究所、青森環境保健センター、宮城保健環境センター、栃木県保健環境センター、群馬県衛生環境研究所、埼玉県衛生研究所、神奈川県衛生研究所、静岡県環境衛生科学研究所、大阪府公衆衛生研究所、広島県保健環境センター、山口県環境保健センター、愛媛県衛生環境研究所、福岡県保健環境研究所、熊本県保健環境科学研究所の 14 地衛研から 1000 近い胃腸炎患者の便検体を収集している。このうち北海道、埼玉、静岡、大阪、広島、山口、熊本から収集した検体には合計で 80 程度の RV 陽性検体が含まれている。更にこれらの検体には、我々が RV 分子疫学調査を始めた 2012 年より前の検体も含まれるため、過去に遡って調査することで、RV 流行株の変化や進化の過程を大規模に解析可能となり、場合によっては DS-1-like G1 株の発生由来についても解明できる可能性が期待される。

E. 結論

2012 年に新しく発見され、2012-13 年にかけて主要流行株となっていた DS-1-like G1 株が、2013/14 年シーズンには 1 例も検出されなかった。しかし、検体数が少ないため、DS-1-like G1 株が完全に消失したとは断定できず、今後は調査方法を病院ベースから地衛研ベースに変換して、RV 流行株の監視を続ける必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Komoto S, Pongsuwanna Y, Ide T, Wakuda M, Guntapong R, Dennis FE, Haga K, Fujii Y, Katayama K, Taniguchi K: Whole genomic analysis of porcine G10P[5] rotavirus strain P343 provides evidence for bovine-to-porcine interspecies transmission. *Vet Microbiol.* 2014, 174(3-4):577-583

2) Fujii Y, Nakagomi T, Nishimura N, Noguchi A, Miura S, Ito H, Doan YH, Takahashi T, Ozaki T, Katayama K, Nakagomi O: Spread and predominance in Japan of novel G1P[8] double-reassortant rotavirus strains possessing a DS-1-like genotype constellation typical of G2P[4] strains. *Infect Genet Evol.* 2014, 28:426-33.

3) Dennis FE, Fujii Y, Haga K, Damanka S, Lartey B, Agbemabiese CA, Ohta N, Armah GE, Katayama K: Identification of Novel Ghanaian G8P[6] Human-Bovine Reassortant Rotavirus Strain by Next Generation Sequencing. *PLoS One* 2014, 9(6):e100699. doi: 10.1371/journal.pone.0100699

4) Masuda T, Nagai M, Yamasato H, Tsuchiaka S, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Nishiura N, Sassa Y, Omatsu T, Furuya T, Koyama S, Shirai J, Taniguchi K, Fujii Y, Todaka R, Katayama K, Mizutani T: Identification of novel bovine group A rotavirus G15P[14] strain from epizootic diarrhea of adult cows by de novo sequencing using a next-generation sequencer. *Vet Microbiol* 2014, 171(1-2):66-73

5) 藤井克樹: ロタウイルス検出マニュアル, 国立感染症研究所ウェブサイト

2. 学会発表

国内会議

1) 藤井克樹: Impact of next generation sequencing technologies on whole genome analysis of rotaviruses (シンポジウム) 第 62 回日本ウイルス学会学術集会(横浜) 2014 年 11 月 10-12 日

2) 河本聡志、井手富彦、和久田光毅、Dennis Francis Ekow、芳賀慧、藤井克樹、片山和彦、谷口孝喜：タイで検出された G10P[5]ブタロタウイルス P343 株ゲノムの全塩基配列の解析 第 62 回日本ウイルス学会学術集会（横浜）2014 年 11 月 10-12 日

3) 井手富彦、河本聡志、森口匡子、Dennis Francis Ekow、芳賀慧、藤井克樹、片山和彦、Shofiqur Rahman、梅田浩二、Sa Van Nguyen、辻孝雄、谷口孝喜：ミャンマーにおける G12P[8]ヒトロタウイルスの全塩基配列に基づく遺伝子解析 第 62 回日本ウイルス学会学術集会（横浜）2014 年 11 月 10-12 日

4) 藤井克樹：ロタウイルスの分子疫学とロタウイルスワクチン（シンポジウム） 第 63 回日本感染症学会東日本地方会総会学術集会・第 61 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会（東京）2014 年 10 月 29-31 日

国際会議

1) Yoshiki Fujii, Yen Hai Doan, Toyoko Nakagomi, Osamu Nakagomi, Kazuhiko Katayama : Continued circulation of novel G1P[8] double-reassortant strains carrying the DS-1-like genotype constellation in Japan. 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID)（台北）2015 年 1 月 25-29 日

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

北海道におけるロタウイルス胃腸炎の分子疫学的検討

担当責任者 津川 毅 札幌医科大学臨床研修センター・小児科 特任助教

研究要旨

北海道におけるロタウイルス胃腸炎の疫学的検討を外来患者の散発例と過去に乳児院で発生した集団発生例において検討した。2010年～2014年の外来患者の193検体（年間24～50検体）の解析では、年毎にG1P[8]、G2P[4]、G3P[8]、G9P[8]が単独あるいは複数同時に流行した。1981年～2001年における乳児院での8集団発生例では、G1P[8]が4流行、G3P[8]が2流行、G2P[4]とG4P[8]が各1流行あり、全11分節の遺伝子型は典型的なWa様、DS-1様の遺伝子型構成であった。

A. 研究目的

ロタウイルスは5歳までにほぼ全ての子供が感染し、小児の急性胃腸炎による入院の半数程度を占め、その感染による胃腸炎で発展途上国を中心に年間約20万人の死亡があると推定されている。先進国では重症脱水による死亡は少ないが、入院治療費などの経済的負担や、胃腸炎関連けいれん、脳炎・脳症などの合併症や死亡も問題となっている。現行のロタウイルスワクチンの重症胃腸炎の予防効果は先進国で約90%とされた。わが国では2011年に認可され、近年ロタウイルス胃腸炎の減少についての報告がわが国でも増えてきている。またワクチン導入における、ワクチン株の便中への排泄による周囲への感染、流行する野生株の遺伝子型の変化や、ワクチン株と野生株との遺伝子組換えなどの分子疫学的な変化についても継続的な監視が必要と考えられる。ロタウイルス遺伝子は11本の2本鎖RNAで構成されている。近年の分子生物学的技術の進歩により、全遺伝子配列を解析する事が多くの施設で可能となり、2008年にはロタウイルス分類ワーキンググル

ープにより各分節の塩基相同性による分類法が提唱され、遺伝子組換え（リアソータント）などの詳細な検討が進められてきている。

今回、ワクチン導入前後のロタウイルス株のG/P遺伝子型変化について外来患者便を用いて解析すると同時に解析例の少ない1980年代のロタウイルス胃腸炎集団発生例の便検体を用いて、ロタウイルス全11分節の遺伝子型解析を行い北海道におけるロタウイルスの分子疫学的変化について検討した。

B. 研究方法

1. 研究協力施設

なかた小児科（外来患者）

札幌中央乳児院（施設入所者）

2. 糞便検体と臨床情報

上記施設の保護者から同意の上で採取された糞便ならびに臨床情報。外来患者からは2010年以降の193検体、施設入所者からは1981～2001年の8流行の糞便検体を採取し、臨床情報は外来患者から保護者への説明と同意の上で取得した。

3. 核酸抽出と RT-PCR、塩基配列決定

10%糞便検体から RNA 抽出キットを用いて遺伝子を抽出し、RT-PCR 法を用いてロタウイルス遺伝子を増幅した。PCR 産物の大きさは 1%アガロース電気泳動で確認し、一部の産物は PCR 産物精製後にダイレクトシーケンス法にて塩基配列を決定した。

C. 研究結果

1. 外来患者のロタウイルス胃腸炎

2010 年は 44 検体のうち G1P[8]が 18 検体、G3P[8]が 19 検体と過半数を占め、2011 年は 24 検体のうち G2P[4]が 15 検体と過半数を占めた。2012 年は 50 検体のうち 48 検体が G1P[8]と大多数を占め、2013 年は 46 検体のうち G1P[8]が 23 検体、G9P[8]が 12 検体と有意に検出され、2014 年は 29 検体のうち G1P[8]が 11 検体、G2P[4]が 9 検体と過半数を占めた (図 1)。

2. 乳児院ロタウイルス胃腸炎集団発生

G1P[8]が 4 流行、G3P[8]が 2 流行、G2P[4]と G4P[8]が各 1 流行検出された。また、G/P 遺伝子分節以外の 9 分節も含めた全 11 分節の遺伝子型は、G1P[8]、G3P[8]、G4P[8]は Wa 様遺伝子型構成 (I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1) であり、G2P[4]は DS-1 様遺伝子型構成 (I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2) であった (表 1)。VP7 (G) 遺伝子について既知の株との相同性解析を行ったところ、G1P[8]は Wa 株と 92-93%、G3P[8]は Ito 株と 95%、G4P[8]は Hocht 株と 99%、G2P[4]は DS-1 株と 95%の一致率を示した (図 2a)。VP4 遺伝子 (P) では、G1P[8]、G3P[8] G4P[8]が Wa 株とそれぞれ 89-92%、92%、98%の一致率を示し、G2P[4]は DS-1 株と 94%の一致率を示した (図 2b)。

D. 考案

1. 外来患者のロタウイルス胃腸炎

1987 年～2009 年の札幌市におけるロタウイルス G/P 遺伝子型 (302 検体) の解析 (図 3) では、2000 年以前は G1P[8]が流行株として検出されていたが、2000 年以降は年毎に流行株が変化していた。また、ロタウイルス遺伝子型はインフルエンザと異なり、国毎だけでなく地域により流行株が異なる傾向があり、その実例として 2011 年は倉敷市 (岡山県) では G3P[8]が 85%、津市 (三重県) では G3P[8]が 54%、G1P[8]が 35%、いすみ市 (千葉県) では G1P[8]が 67%、G3P[8]が 29%検出されていたが (神谷元 2014. 病原微生物検出情報 35:71-73)、今回の札幌市 (北海道) での検討では G2P[4]が 67%、G1P[8]が 25%検出されるなど流行株の遺伝子型が大きく異なっていた。

2. 乳児院ロタウイルス胃腸炎集団発生

上述の全 11 分節の塩基配列による分類法により、ヒトロタウイルスは主に Wa 様遺伝子型構成 (G1/3/4/9-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1)、DS-1 様遺伝子型構成 (G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2) をとる事が多いと報告されていたが、2012 年にわが国において秋田、京都、愛知から DS-1 様 G1P[8] (2 重組換え体 : G1-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2) が多数検出された報告 (Fujii 2014. Infect Genet Evol 28:426-433) があった。今回は G/P 遺伝子型の解析だけでなく、全 11 分節の塩基配列の解析を行ったが、典型的な Wa 様遺伝子型構成、DS-1 遺伝子型構成をとり、近年わが国において報告されている遺伝子組換え体は認めなかった。

E. 結論

外来患者のロタウイルス胃腸炎については今後も便検体・臨床情報の採取を継続し、ロタウイルス遺伝子型の検討に加えて、臨床情報の検討も加えていく。乳児院ロタウイルス胃腸炎