

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006 - 2008
 課題番号：18406018
 研究課題名（和文） アジアで発見された新種ヒトロタウイルスの性状と浸淫状況に関する研究
 研究課題名（英文） Study of characteristics and prevalence of novel species rotavirus detected in Asia
 研究代表者
 小林 宣道 (Kobayashi Nobumichi)
 札幌医科大学・医学部・教授
 研究者番号：80186759

研究成果の概要：

バングラデシュで成人下痢症より検出された非定型的ヒトロタウイルス B219 株の全遺伝子配列を決定し、遺伝子解析を行った結果、B219 株は従来から知られる A 群、B 群、C 群ロタウイルスとは遺伝学的に異なる新種（群）に属することが判明した。アジアでの成人・小児由来ロタウイルスの疫学調査では新種ロタウイルスは検出されず浸淫度は低いと考えられたが、A 群ロタウイルスは小児と成人の間で感染・伝播していることが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2006 年度 | 6,000,000 | 1,800,000 | 7,800,000 |
| 2007 年度 | 4,200,000 | 1,260,000 | 5,460,000 |
| 2008 年度 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 13,500,000 | 4,050,000 | 17,550,000 |

研究分野：病理

科研費の分科・細目：ウイルス学

キーワード：ロタウイルス、新種、成人、下痢症、分子疫学、アジア、新興型、B 群

1. 研究開始当初の背景

下痢症は先進国、開発途上国ともに普遍的にみられる疾患であり、特に開発途上国では 5 歳以下の小児の死亡原因の上位を占めている。下痢の原因には様々なものがあるが、2 歳以下の重症下痢症の原因として最も重要なのはロタウイルス（A 群）である。毎年世界では約 1 億 2 千万例が罹患し、約 60 万人の小児が死亡していると推定されている。

ロタウイルスはレオウイルス科の一員であり、分節 2 本鎖 RNA をゲノムとして有する。内殻蛋白 VP6 の抗原性および遺伝子学的性状に基づいて A-G の 7 群（種）に分類される。

ロタウイルスはヒトおよび動物（哺乳類、鳥類）に広く分布するが、ヒトにおける感染が知られるのは A, B, C 群の 3 群のみである。A 群は乳幼児下痢症の主要な原因ウイルスとして世界中に広く分布する。B 群は主に成人に下痢を起こす特異なウイルスで、その分布は今のところ中国、インド、バングラデシュに限られている。C 群ロタウイルスは A 群同様、小児の下痢の原因となるが、検出頻度は非常に低い。一方、1997 年に中国の成人下痢症の原因として報告された ADRV-N（J19 株）は A, B, C 群のいずれとも異なる新しい群のロタウイルスと考えられている。我々は

2000-2001年にバングラデシュにおいてロタウイルスの分布状況に関する疫学調査を行った際、従来より知られるA,B,C群のいずれにも属さないと思われる特異なロタウイルス B219株を成人下痢症例より検出した。このウイルスの分類学的位置づけ、J-19株との関連は不明であり、このようなウイルスがどの程度分布しているのかは未知であった。また本ウイルスを含めて、成人に感染するロタウイルスの実態についてもよくわかっておらず、その解明が待たれていた。

2. 研究の目的

本研究では、非定型的ロタウイルス B219株の全遺伝子配列を決定し、比較解析、系統解析を行うことにより、本ウイルスの分類学的位置づけを明らかにすることを第一の目的とした。これと同時に、まだ遺伝子配列が決定されていないB群ロタウイルスの一部の遺伝子分節(VP1, VP2 遺伝子)の配列を決定し、B219の遺伝子解析に用いることとした。次に、アジア数カ国においてロタウイルスの疫学的調査を行い、B219様のロタウイルスの分布状況を調べた。さらに成人、小児由来ロタウイルスに関して分子疫学的解析を行うことにより、成人、小児に分布するロタウイルスの関連を調べることを第二の目標とした。

3. 研究の方法

(1)非定型的ロタウイルス B219株の遺伝子解析

B219は2002年にバングラデシュ北部のマイメシ市において重症下痢症により病院を訪れた65歳の女性患者の便検体から検出されたウイルスである。B219は既知のA群、B群、C群とは異なるRNAパターンを示し、またそれらのウイルスを検出する従来の方法ではいずれのロタウイルスとも判定されなかった。本ウイルスの遺伝子配列の決定のため、single primer amplification法を用いて遺伝子分節の全長のcDNAを増幅し、これを用いて塩基配列を決定した。

(2)B群ロタウイルスの遺伝子解析

B群ロタウイルスとして用いた対象は、インドで検出されたCAL-1株、バングラデシュのBang373株、中国のWH-1株であった。これらのVP1, VP3遺伝子についてもsingle primer amplification法を用いて塩基配列を決定した。

(3)成人、小児に分布するロタウイルスに関する分子疫学調査

B219様新種ロタウイルスの分布を調査すると同時に成人、小児に分布するロタウイルス(A群等)の関連を調べるため、中国とバングラデシュにおいてロタウイルスの分子疫学的解析を行った。バングラデシュではマ

イメンシン市において2004年7月から2006年6月までの期間に得られた2540検体(小児:1627、成人913)を対象とした。中国では、武漢市の6病院において2000年12月から2008年2月までの期間、散発性下痢症例より得られた便材料6053検体(小児:2516、成人(15歳以上)3537)を対象とした。ロタウイルスの検出をRNA-PAGE法により行い、A群ロタウイルス陽性の一部の検体についてG血清型、P遺伝子型、亜群(またはVP6遺伝子型)、NSP4遺伝子型をRT-PCR法(またはELISA)により決定した。代表的なウイルス株について、RT-PCRおよびダイレクトシーケンシング法により主にVP7、VP4遺伝子の塩基配列を決定した。得られた遺伝子配列は、GenBankに登録されている既知の遺伝子情報と合わせ、MEGA4、CLUSTAL Wを用いて系統解析を行った。

4. 研究成果

(1) B219株の遺伝子配列とその特徴

B219株の11本の各RNA分節は、A,B,C群ロタウイルスのそれに比べると、長さにも多少の違いが認められたが、1997年、中国河北省における成人下痢症の集団発生の原因として報告されたJ19株のそれとはほぼ完全に一致していた。遺伝子配列の一致率は、B219株はA,B,C群ロタウイルスのそれとは60%未満であったが、J19株とは87-94%の高い一致率がみられた。J19株との間で高い一致率が見られたのはVP7(94.0%)、VP6(93.9%)、NSP5(93.7%)、VP2(93.4%)などであり、一致率が低かったのはNSP3(87.4%)、NSP4(87.7%)などであった。遺伝子の系統解析からはB219株はJ19株と最も近いところに位置し、これらはA,B,C群とは異なる独立したクラスターを構成すると考えられた。ただしB群とは比較的近いと考えられた。

B219株の構造蛋白VP6, VP7, VP4のアミノ酸配列はA,B,C群とは相同性が低かったが、親水性・疎水性プロファイルはB群ロタウイルスに類似していた。VP7, NSP4のN末端には、他のロタウイルス群でも見られるようなシグナル配列が存在した。B219のVP4は既知のロタウイルス群のそれより少し長い。既知のロタウイルスで知られるような、トリプシン開裂部位と考えられる部位が存在し、トリプシンにより開裂産物(VP8^{*}, VP5^{*})が生成すると考えられた。B219とJ19の間で、ウイルス蛋白のアミノ酸数に唯一違いが見られたのはVP4(外殻スパイク蛋白)であった。VP8^{*}および開裂部位ペプチド部分をコードする部分に塩基の挿入、欠失があり、B219のVP4はJ19に比して3アミノ酸長いと考えられた。B219, J19のRNA分節の5'末端の配列はGG-であり、これは他のロタウイルス

群でも見られる特徴であった。一方 3 末端には各口タウイルス群に特異的な配列が存在することが知られるが、B219, J19 は既知の A, B, C 群とは異なる、共通の 3 末端配列を有していた。

以上の結果から B219 株は J19 株とともに A, B, C 群とは異なる新しいヒト口タウイルスの群に属すると考えられた。5 末端の共通配列から、これらが口タウイルス属に属することが明らかであったが、3 末端の共通配列はユニークであり、従来知られる口タウイルス群とは異なる群(種)に属することを示唆していた。これらはともに成人下痢症より検出されたこと、また中国、バングラデシュで検出された点で B 群口タウイルスに似ている。またウイルス蛋白の性状も A, C 群よりも B 群に類似していた。このような知見から、新種のヒト口タウイルスは B 群口タウイルスと起源を同じくし、生態学的性状および病原性の面で B 群口タウイルスと共通性を有すると考えられた。

(2) バングラデシュにおける成人および小児由来 A 群口タウイルスの解析結果

A 群口タウイルスの検出率は小児 26.4%、成人 10.1%であった。小児および成人で最も高頻度であったのは G2(各々 54.0%、47.6%)、続いて G1(各々 21.2%、26.2%)、G9(各々 15.9%、9.5%)であった。G12 は小児 4 検体、成人 1 検体に検出された。G2 口タウイルス 12 株(小児 6 株、成人 6 株)の VP7 遺伝子は、互いに 97%以上の高い一致率を示し、系統樹では単一のクラスターに位置していた。このクラスターにはナイジェリアなどのアフリカの口タウイルスが含まれており、バングラデシュの G2 口タウイルスはそれらとは 97.5-98.3%の高い一致率を示した。G1 口タウイルス 11 株(小児 6 株、成人 5 株)の VP7 遺伝子は、互いに 98.9-99.9%の高い一致率を示し、系統樹では単一のクラスターに位置していた。このクラスターにはインド、タイなどのアジアのウイルスが多く含まれていた。G9 口タウイルス 11 株(小児 6 株、成人 5 株)の VP7 遺伝子は、互いに 98%以上の高い一致率を示し、系統樹では近年世界中で分布が拡大しているウイルスクローンのクラスターの中に位置していた。G12 口タウイルス 5 株(小児 4 株、成人 1 株)の VP7 遺伝子は、互いに 97.8-100%の高い一致率を示した。系統樹では 2000 年以降世界各地で報告されている G12 口タウイルスのクラスターの中に位置していた。今回調べられた G12 株は、最近バングラデシュのダッカで検出された G12 口タウイルスや、インド、ネパールで報告されたウイルスと特に高い一致率(97.5-98.2%)が見られた。

(3) 中国における成人および小児由来 A 群口タウイルスの解析結果

A 群口タウイルスの検出率は小児 24.3%、成人 8.6%であった。小児、成人ともに、10 月から翌年の 1 月までの冬期間に高い検出率が認められた。全期間を通じて G3 P[8]、亜群 11、NSP4 遺伝子型 B のウイルスが小児、成人ともに大部分を占めた。次いで G1 が多く、G2, G4, G9 が少数見られた。G9 は武漢では 2004 年に初めて検出され、2006 年以降 13 検体に見つかった。異なる年度に得られた G3 ウイルス 23 株(成人 16、小児 13)の VP7 遺伝子の配列は互いに 99%を超える高い一致率を示した。系統樹では G3 の VP7 遺伝子は大きく 3 つの系統に分けられたが、今回の中国・武漢の G3 口タウイルスはいずれも系統 3 に属し、過去に報告された少数の中国、タイ、マレーシアのウイルス株とともに一カ所に収束して配置された。しかし他のヒト・動物由来 G3 ウイルスとは距離が保たれており、従来の主要な G3 とは遺伝子学的に異なる新変異型の G3 口タウイルスであると考えられた。G1, G9 口タウイルスも小児、成人の間で VP7 遺伝子の一致率は 98%以上であり、系統樹においても同じ系統に属していた。成人における A 群口タウイルス感染の意義はよく知られていなかったが、今回の中国とバングラデシュの研究で、小児と成人の間で遺伝学的に同一の口タウイルスが分布していることが明らかとなった。しかも主要な G 型ばかりでなく、低頻度に見られた G 型においても成人からのウイルスは小児由来のそれと遺伝学的に同一であった。このことは、成人が小児の口タウイルス下痢症の感染源となっている可能性があることも示唆しており、感染対策を考える上で重要である。すなわち成人の口タウイルス下痢症対策や、下痢症を有する成人と健康小児の接触を遮断することも、小児の口タウイルス下痢症のコントロールに有効である可能性があると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 11 件)

Mukherjee A, Dutta D, Ghosh S, Bagchi P, Chattopadhyay S, Nagashima S, Kobayashi N, Dutta P, Krishnan T, Naik TN, Chawla-Sarkar M. Full genomic analysis of a human group A rotavirus G9P[6] strain from Eastern India provides evidence for porcine to human interspecies transmission. Archives of Virology, 2009, 印刷中(査読あり)

Wang Y-H, Kobayashi N, Zhou X, Nagashima S, Zhu Z-R, Peng J-S, Liu M-Q, Hu Q, Zhou D-J,

Watanabe S, Ishino M. Phylogenetic analysis of rotaviruses with predominant G3 and emerging G9 genotypes from adults and children in Wuhan, China. *Journal of Medical Virology*, 2009, 81:382-389. (査読あり)

Paul SK, Kobayashi N, Nagashima S, Ishino M, Watanabe S, Alam MM, Ahmed MU, Hossain MA, Naik TN. Phylogenetic analysis of rotaviruses with genotypes G1, G2, G9 and G12 in Bangladesh : evidence for a close relationship between rotaviruses from children and adults. *Archives of Virology*, 2008, 153:1999-2012. (査読あり)

Samajdar S, Ghosh S, Dutta D, Chawla-Sarkar M, Kobayashi N, Naik TN. Human group A rotavirus P[8] Hun9-like and rare OP354-like strains are circulating among diarrhoeic children in Eastern India. *Archives of Virology*, 2008, 153:1933-1936. (査読あり)

Samajdar S, Ghosh S, Chawla-Sarkar M, Mitra U, Dutta P, Kobayashi N, Naik TN. Increase in prevalence of human group A rotavirus G9 strains as an important VP7 genotype among children in eastern India. *J Clin Virol*, 2008, 43:334-339. (査読あり)

Nagashima S, Kobayashi N, Ishino M, Alam MM, Ahmed MU, Paul SK, Ganesh B, Chawla-Sarkar M, Krishnan T, Naik TN, Wang Y-H. Whole genomic characterization of a human rotavirus strain B219 belonging to a novel group of the genus Rotavirus. *J Med Virol*, 2008, 80:2023-2033. (査読あり)

Alam MM, Kobayashi N, Ishino M, Nagashima S, Paul SK, Chawla-Sarkar M, Krishnan T, Naik TN. Identical rearrangement of NSP3 genes found in three independently isolated virus clones derived from mixed infection and multiple passages of rotaviruses. *Arch Virol*, 2008, 153:555-559. (査読あり)

Ghosh S, Varghese V, Samajdar S, Sinha M, Naik TN, Kobayashi N. Evidence for bovine origin of VP4 and VP7 genes of human group A rotavirus G6P[14] and G10P[14] strains. *J Clin Microbiol* 2007, 45:2751-2753. (査読あり)

Sumi A, Kamo K, Ohtomo N, Kobayashi N. Study of the effect of vaccination on periodic structures of measles epidemics in Japan. *Microbiol Immunol* 2007, 51:805-814. (査読あり)

Wang Y-H, Kobayashi N, Zhou D-Z, Yang Z-Q, Zhou X, Peng J-S, Zhu Z-R, Zhao D-F, Liu M-Q, Gong J. Molecular epidemiologic analysis of group A rotaviruses in adults and children with diarrhea in Wuhan city, China, 2000-2006. *Arch Virol* 2007, 152:669-685. (査読あり)

Alam MM, Kobayashi N, Ishino M, Ahmed MS, Ahmed MU, Paul SK, Muzumdar BK,

Hussain Z, Wang Y-H, Naik TN. Genetic analysis of an ADRV-N-like rotavirus strain B219 detected in a sporadic case of adult diarrhea in Bangladesh. *Arch Virol*, 2007, 152:199-208. (査読あり)

〔学会発表〕(計 20 件)

石埜正穂、長嶋茂雄、三瀬敬治、小林宣道 . 下利便におけるプロテオーム解析 . 第 79 回日本衛生学会総会 2009 年 3 月 31 日、東京 .

Wang Y-H, Kobayashi N, Peng J-S, Nagashima S, Zhou X, Yang T, Hu Q, Zhou D-J. Molecular epidemiologic study of norovirus in sporadic cases of gastroenteritis in all age groups in Wuhan, China, 2008. 8th Asia Pacific Congress of Medical Virology, 2009 年 2 月 26 日、香港 .

Kobayashi N, Wang Y-H, Peng J-S, Nagashima S, Zhou X, Hu Q, Zhou D-J. Phylogenetic analysis of G4P[6] rotavirus strain R479 isolated in Wuhan, China. 8th Asia Pacific Congress of Medical Virology, 2009 年 2 月 26 日、香港 .

Kobayashi N, Wang Y-H, Zhou X, Nagashima S, Peng J-S, Zhu Z-R, Liu M-Q, Hu Q, Zhou D-J. Phylogenetic relatedness of G1, G3, and G9 rotaviruses between children and adults in Wuhan, China. 8th Asia Pacific Congress of Medical Virology, 2009 年 2 月 28 日、香港 .

Chawla-Sarkar M, Dutta D, Bagchi P, Krishnan T, Nagashima S, Kobayashi N. "Host cellular proteins": key determinants of rotavirus infection and pathogenesis. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections. 2008 年 12 月 16 日、札幌 .

長嶋茂雄、Paul Shyamal, 渡辺祥二郎、石埜正穂、小林宣道 . バングラデシュにおける小児および成人下痢症由来 A 群ロタウイルスの遺伝子学的解析 . 第 56 回日本ウイルス学会 2008 年 10 月 28 日、岡山

小林宣道、長嶋茂雄、石埜正穂、渡辺祥二郎、Wang Yuanhong, Zhou Xuan . 中国・武漢市における成人および小児下痢症由来 G1, G3, G9 ロタウイルスの分子疫学的解析 . 第 56 回日本ウイルス学会 2008 年 10 月 27 日、岡山

Zhou X, Kobayashi N, Wang YH, Zhu ZR, Zhou DJ, Sun SH. Molecular epidemiologic analysis of group A rotaviruses in children with diarrhea in Wuhan city, China, 2007. The 13th International Congress on Infectious Diseases. 2008 年 6 月 21 日、Kuala Lumpur, Malaysia.

Kobayashi N, Nagashima S, Alam M, Wang Y-H, Krishnan T, Chawla-Sarkar M. Whole sequence analysis of novel group rotavirus B219 and group B rotaviruses. The 7th Japan-China International Conference of Virology. 2008 年 6 月 2 日、東京 .

Wang Y-H, Kobayashi N, Zhou X, Nagashima

S, Zhu Z-R, Sun S-H, Liu M-Q, Peng J-S, Hu Q, Zhou D-J. Molecular epidemiology of rotaviruses in Wuhan, China, Jun. 2006-Feb. 2008: predominance of variant G3 strains and increase of G9 strains. The 7th Japan-China International Conference of Virology. 2008年6月2日, 東京.

Paul SK, Nagashima S, Kobayashi N, Ishino M, Watanabe S, Alam MM, Ahmed MU. Phylogenetic analysis of predominant G2, emerging G9 and G12 rotaviruses from children and adults in Bangladesh. The 42nd Joint Working Conference on Viral Diseases, The U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program. 2008年5月27日, 長崎.

長嶋茂雄, 渡辺祥二郎, 石埜正穂, 小林宣道. バングラデシュ(マイメンシン市)における小児および成人下痢症由来A群ロタウイルスの分子疫学的解析. 第78回日本衛生学会, 2008年3月29日, 熊本.

長嶋茂雄, 石埜正穂, 小林宣道. B群ヒトロタウイルスのVP1およびVP3遺伝子配列の解析. 第55回日本ウイルス学会 2007年10月22日, 札幌

Nagashima S, Ishino M, Kobayashi N, Alam MM, Ahmed MU. Whole genome characterization of a human rotavirus strain B219 that belongs to a novel rotavirus group. The 41st Joint Working Conference on Viral Diseases, The U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program. 2007年7月24日, Baltimore, USA.

長嶋茂雄, 石埜正穂, 小林宣道. 成人下痢症由来の新奇なヒトロタウイルス B219 株の分子疫学的解析. 第77回日本衛生学会 2007年3月28日, 大阪

小林宣道, 石埜正穂, 長嶋茂雄, 三瀬敬治, 鷺見紋子. 中国・武漢市における成人・小児下痢症由来 A 群ロタウイルスの分子疫学的解析. 第77回日本衛生学会 2007年3月28日, 大阪

小林宣道, 石埜正穂, 長嶋茂雄, 三瀬敬治, 鷺見紋子. 中国・武漢市における成人・小児下痢症由来 A 群ロタウイルスの分子疫学的解析. 第54回日本ウイルス学会 2006年11月20日, 名古屋

長嶋茂雄, 石埜正穂, 小林宣道. 成人下痢症由来の新種ヒトロタウイルス B219 株の遺伝子解析. 第54回日本ウイルス学会 2006年11月19日, 名古屋

Wang Y-H, Kobayashi N, Zhou D-J, Yang Z-Q, Zhu Z-R, Zhou X, Liu M-Q, Peng J-S, Li Y. Genetic and epidemiologic characterization of group A rotavirus among adults and children with diarrhea in Wuhan, China, Dec. 2000-Mar. 2006. The 6th China-Japan International Conference of Virology. 2006年6月23日, 上海.

Kobayashi N, Wang Y-H, Ishino M, Alam MM, Ahmed MU. Genetic analysis of an ADRV-N-like

novel human rotavirus detected in a sporadic case of adult diarrhea in Bangladesh. The 6th China-Japan International Conference of Virology. 2006年6月23日, 上海.

〔図書〕(計1件)

Kobayashi N, Ishino M, Wang Y-H., Chawla-Sarkar M, Krishnan T, Naik T.N. Diversity of G-type and P-type of human and animal rotaviruses and its genetic background. In A. Méndez-Vilas, Editor. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology (Microbiology Book Series – 2007 Edition) Formatex, Spain, 2007, 847-858.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林宣道 (Kobayashi Nobumichi)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号: 80186759

(2) 研究分担者

石埜正穂 (Ishino Masaho)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 30232325

鷺見紋子 (Sumi Ayako)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号: 10363699

長嶋茂雄 (Nagashima Shigeo)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号: 60433116

三瀬敬治 (Mise Keiji)
札幌医科大学・医学部・助手
研究者番号: 30200025

谷口孝喜 (Taniguchi Koki)

藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号: 40094213

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

T.N.Naik, T.Krishnan, M. Chawla-Sarkar
(インド国立コレラ腸管感染症研究所)
S.K.Paul (マイメンシン医科大学)
M.M.Alam (バングラデシュ農科大学)
T.S.Aung (ミャンマー国立保健研究所)
Y-H. Wang, X. Zhou (武漢市 CDC)