

# 胃腸炎ウイルスの疫学的研究

—岡山県で検出されたG2型ヒトロタウイルスの分子疫学的解析—

葛谷光隆, 濱野雅子, 木田浩司, 溝口嘉範, 藤井理津志, 金谷誠久\* (ウイルス科)

\* (独) 国立病院機構 岡山医療センター小児科

【調査研究】

## 胃腸炎ウイルスの疫学的研究

—岡山県で検出されたG2型ヒトロタウイルスの分子疫学的解析—

Studies on Viruses Causing Non-bacterial Gastroenteritis in Okayama

— Molecular epidemiological analysis of genotype G2 human Rotaviruses isolated in Okayama Prefecture —

葛谷光隆, 濱野雅子, 木田浩司, 溝口嘉範, 藤井理津志, 金谷誠久\* (ウイルス科)

\* (独) 国立病院機構 岡山医療センター小児科

Mitsutaka Kuzuya, Masako Hamano, Kouji Kida, Yoshinori Mizoguchi, Ritsushi Fujii and Tomohisa Kanadani\* (Department of Virology)

\*Department of Pediatrics, National Hospital Organization Okayama Medical Center

### 要 旨

岡山県におけるG2型ロタウイルスA (RVA) の流行状況及び流行株の性状を明らかにするため、2000年9月～2010年8月の10シーズンに県内で採取されたRVA陽性の胃腸炎患者糞便720検体についてG型別を実施したところ、50検体(7.0%)がG2型と同定された。G2型は、調査10シーズン中6シーズンで断続的に検出されたが、シーズン毎のG2型相対頻度(RVA全体に占めるG2型割合)には15.4～47.4%と比較的高い場合と、1～3%と低い場合とが認められた。次に、県内で検出されたG2型の代表株について遺伝子解析を実施したところ、VP4及びVP6遺伝子には大きな違いはみられなかったが、VP7及びNSP4遺伝子についてはそれぞれ大きく2系統が存在し、それらの組み合わせにより、分離株はVP7遺伝子クラスターIV及びVで代表される2つのグループに分類されることがわかった。さらに、シーズンごとのG2型相対頻度と流行株のVP7遺伝子クラスターとの比較から、クラスターの異なる株間において、その伝播性などに違いがあることが示唆された。

[キーワード: ロタウイルス, G2型, 疫学調査, 遺伝子相同性, 系統解析]

[Key words: Rotavirus A, Genotype G2, Epidemiological analysis, Nucleotide sequence identity, Phylogenetic analysis]

### 1 はじめに

ロタウイルスA (RVA) は、レオウイルス科に属する2本鎖RNAをゲノムとして持つウイルスであり、外殻糖蛋白(VP7)および外殻スパイク蛋白(VP4)をコードする遺伝子に基づき、それぞれG (Glycoproteinの略号) 遺伝子型(G型)及びP (Protease sensitiveの略号) 遺伝子型(P型)に分類される<sup>1)</sup>。現在までのところ、G型についてはG1～G27型が、P型についてはP[1]～P[35]型がそれぞれ確認されており<sup>2)</sup>、さらに両者の組み合わせによって多くの遺伝子型が存在しうるが、そのうちヒトから検出される頻度が高いのは、G1P[8]型、G2P[4]型、G3P[8]型、G4P[8]型、およびG9P[8]型である<sup>1), 3)</sup>。

RVAは小児急性胃腸炎の重要な病原体であることから、本ウイルスの感染予防を目的とした生ワクチンが複数メーカーで開発され、その導入が世界的に進められている<sup>4)</sup>。主なものとしては、ヒトRVA株(G1P[8]型)由来の単価ワクチンであるRotarix<sup>®</sup> (グラクソ・スミスクライン社製)、及びヒトRVAのG1～G4型のVP7遺伝子とP[8]型のVP4遺伝子を組み込んだ、ウシRVA遺伝子組み換え株に

由来する5価ワクチンのRotaTeq<sup>®</sup> (メルク社製)が知られている。我が国においては、Rotarix<sup>®</sup>が2011年7月に、RotaTeq<sup>®</sup>が2012年1月にそれぞれ製造承認され導入が開始された。しかしながら、既にこれらのワクチンを導入した一部の国においては、RVA検出率低下の一方で、G2型の相対頻度の急増が報告されている<sup>5)</sup>。したがって、我が国においても同様な現象の発生が危惧されることから、ワクチンの本格的な普及を前に、G2型の流行状況やウイルス性状を把握しておくことは極めて重要と思われる。そこで、2000年～2010年の11年間に県内で検出されたG2型RVAについて分子疫学的解析を実施した。

### 2 材料及び方法

#### 2.1 糞便検体

2000年9月～2010年8月の10シーズン(前年9月～翌年8月までを1シーズンとする)に(独)国立病院機構 岡山医療センター小児科で採取され、市販のRVA検査キットで陽性となった胃腸炎患者糞便720検体を検査対象とした。糞便の10%乳剤を調整後、8,000rpm 15分間の遠心分

離を行った上清を以下の試験に用いた。

## 2.2 G型及びP型別方法

市販キット (QIAamp Viral RNA mini kit, 株式会社キアゲン) により糞便乳剤から抽出したRNAを用いて、Gouveira<sup>6)</sup>の報告に基づき逆転写PCR (RT-PCR) 法を実施することでG型別を行った。さらにG2型と同定された場合には、Wuら<sup>7)</sup>の方法に従いRT-PCR法によりP型を決定した。

## 2.3 遺伝子配列決定法

G型及びP型の同定検査時に増幅したVP7及びVP4遺伝子産物について、アガロース電気泳動を行って特異バンド部分を切り出し、DNA gel extraction kit (日本ミリポア株式会社) によりPCR産物の抽出・精製を行った。さらに、内殻蛋白VP6及び非構造蛋白NSP4をコードする遺伝子についても、それぞれの遺伝子分節の両端に相補的なプライマーを用いて増幅した産物を同様に精製した。精製DNAについて、PCRに使用したプライマーを用いてオートシーケンサー (3500 ジェネティックアナライザ, 株式会社アプライド・バイオシステムズ) により塩基配列を決定した。

## 2.4 塩基配列データの解析

塩基配列の解析は市販ソフトウェア (Genetyx WIN ver.11, ソフトウェア開発株式会社) を用いて実施した。また、遺伝子系統解析はClustal W (フリーソフト) を用い、RVA標準株を参照 (outgroup) 株として近隣結合法により実施した。なお系統解析については、同様の解析を1,000回繰り返した場合に、同一結果が得られる回数 (ブートストラップ値) でその信頼性を評価した。

## 3 結果

### 3.1 G2型RVA検出状況及びP型別結果

G型別の結果、720検体すべてが型別可能であった。G2型についてみると、単独で検出されたのが50検体 (6.9%)、及びG1型との混合が1検体の計51検体 (7.0%) から検出された (表1)。シーズン別の検出状況では、調査10シーズン中6シーズン (2000/01, 2001/02, 2005/06, 2006/07, 2007/08及び2009/10シーズン) でG2型が検出された。また、シーズン毎のG2型相対頻度 (RVA陽性全体に占めるG2型の割合) は図1に示すとおりで、相対頻度が15.4~47.4%と比較的高いシーズン (2000/01, 2001/02及び2006/07シーズン) と、1~3%と低いシーズン (2005/06, 2007/08及び2009/10シーズン) とが認められた。さらに、RVA陽性患者年齢の中央値 (メジアン) をG型別に算出したところ、G2型が1.5歳と、他のG型 (いずれも1.0歳) に比べやや高いことがわかった (データを示さず)。なお、G2型と同定された50検体 (混合感染の1例を除く) について、P型の同定を試みたところ、すべてP[4]型であることがわかった。

### 3.2 VP7遺伝子及びアミノ酸配列解析結果

G2P[4]型代表株として2000/01シーズンの2株、2001/02シーズンの2株、2005/06シーズンの1株、2006/07シーズンの3株、2007/08シーズンの1株及び2009/10シーズンの3株の計12株について、VP7遺伝子のオープン・リーディング・フレーム (ORF) に相当する部分 (981bp) の塩基配列を決定し、データベース上の既知株の配列とともに近隣結合法により系統解析を行った。結果は図2 Aに示すように、今回検出されたG2P[4]型株のVP7遺伝子は、92.6%

表1 RVAのG型別成績 (2000/01~2009/10シーズン)

G型	流行シーズン										合計 (%)
	2000/01	2001/02	2002/03	2003/04	2004/05	2005/06	2006/07	2007/08	2008/09	2009/10	
G 1	8	8	35	20	29	26	46	12	8	31	223 (31.0)
G 2	9	7	0	0	0	1	29	1	0	3	50 (6.9)
G 3	2	12	33	60	31	14	12	8	66	57	295 (41.0)
G 4	0	6	14	0	2	0	0	0	0	0	22 (3.1)
G 9	0	14	4	0	0	52	1	53	0	0	124 (17.2)
G12	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.1)
G1 & G2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1 (0.1)
G1 & G3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.1)
G1 & G9	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1 (0.1)
G2 & G3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.1)
G3 & G9	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.1)
合計	19	50	86	80	62	93	89	75	75	91	720

以上という高いブートストラップ値をもって2つの異なるクラスターに分類された。すなわち2000/01、2001/02及び2006/07シーズンの7株はいずれも、Paulらの報告<sup>8)</sup>によるクラスターIVに、残りの5株(2005/06、2007/08及び2009/10シーズン株)はクラスターVにそれぞれ属することがわかった。また、遺伝子及びアミノ酸配列の相同性比較では、同一クラスター内では遺伝子で99.1%以上、アミノ酸で98.8%以上という高い相同性を有していたのに対し、異なるクラスター間では遺伝子で95.9~96.1%及びアミノ酸で96.9~98.2%の相同性であり、クラスター分類に一致した相同性の差異が認められた。なお、これらのクラスターには、近年世界的な流行が確認されている、いわゆる再流行タイプ株が多く属することが報告されている<sup>9)</sup>。

次に、異なるクラスターの株間における抗原性の差異について明らかにするため、VP7アミノ酸配列についても比較検討を行ったところ、クラスターの相違と一致したアミノ酸置換部分が計5か所(15、45、87、129及び287番目のアミノ酸残基部分)で認められた(データを示さず)。そのうち87番目のアミノ酸残基部分は、G型特異的中和エピトープを構成する領域に位置することが明らかになっている<sup>1)</sup>。

### 3.3 VP4遺伝子解析結果

VP7遺伝子の比較を行った12株について、VP4遺伝子配列(ORFの5'側1,005bp部分)を決定し、既知のP[4]型株の配列とともに系統解析を行った(図2B)。その結果、12株のVP4遺伝子はいずれも、VP7遺伝子の場合のような明瞭なクラスターには分けられず、近年に検出されたG2P[4]型株とともに、Paulらの報告<sup>8)</sup>によるクラスターⅢに分類されることがわかった。

### 3.4 VP6及びNSP4遺伝子解析結果

VP7遺伝子クラスターの異なる株間相互の関係についてさらに詳しく解析するため、各クラスターから3株ずつ計6株をピックアップして、そのVP6及びNSP4遺伝子のORF部分の塩基配列を決定し、既知の株の配列とともに系統解析を実施した。その結果、6株のVP6遺伝子は互いに極めて近縁であり、他のG2P[4]型株と同じくgenotype I2に分類されることがわかった(図3A)。

一方、6株のNSP4遺伝子についてはいずれも、G2P[4]型株の多くが属するgenotype E2に分類されたが、99.8%以上という高いブートストラップ値をもって2グループに分類しうることがわかった(図3B)。さらにVP7遺伝子クラスターとの関係では、一方のグループにはクラスターIVの株のみが、他方のグループにはクラスターVの株のみがそれぞれ属しており、VP7遺伝子とNSP4遺伝子とが密接な関連性を有することが明らかになった。

NSP4については、それ自体でエンテロトキシン様活性を有するなど、RVAの病原性に重要な役割を持つことが示唆されている<sup>10)</sup>。そこで、異なるNSP4遺伝子グループに属する6株について、そのアミノ酸配列をG2P[4]型の標準株であるDS-1株の配列とともにアライメントし比較を行った。結果は図4に示すように、6株のNSP4には計7カ所に置換部位が認められたが、エンテロトキシン活性に関与する領域(115~135番目のアミノ酸残基部分)にはグループ間で大きな違いはみられなかったが、ウイルス構成蛋白結合領域部分にグループの相違に一致した置換部位が2カ所(137及び140番目のアミノ酸残基部分)認められた。このうち137番目のアミノ酸残基部分は、抗NSP4抗体が認識す

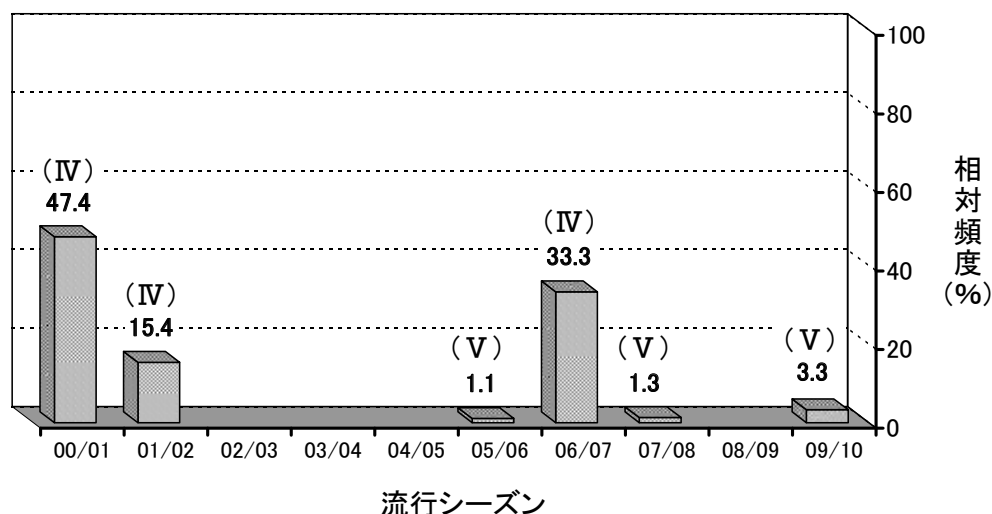


図1 G2型相対頻度とVP7遺伝子クラスターとの関連性

グラフ及びグラフ上の数値は各シーズンのG2型の相対頻度を、括弧内は流行株のVP7遺伝子クラスター名をそれぞれ示す。

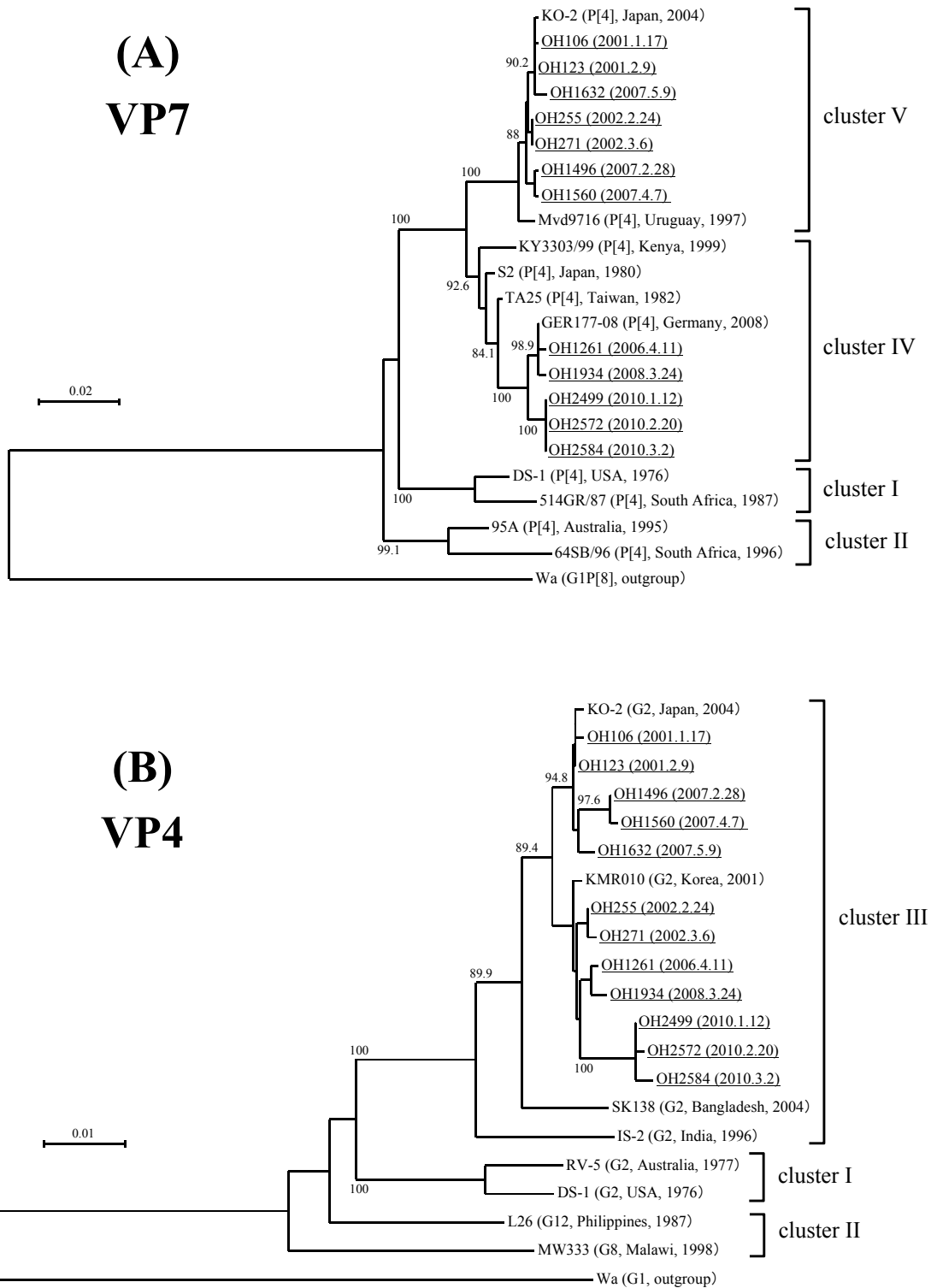


図2 VP7及びVP4遺伝子の系統解析結果

ヒトRVAのWa株 (G1P[8]型) を参照株として、VP7遺伝子 (パネルA) 及びVP4遺伝子 (パネルB) について近隣結合法により系統解析を実施した (1,000回のブートストラップを行い、800以上の数値をパーセントで系統樹上に示す)。県内で検出された株はアンダーラインで示し、括弧内に検出年月日を記した。既知の株については、G型またはP型、由来国及び分離年を括弧内に示す。なお、遺伝的距離 (サイトあたりの塩基置換期待数) をスケールバーで示した。VP7及びVP4遺伝子のクラスター分類はPaulらの報告<sup>9)</sup>にしたがった。

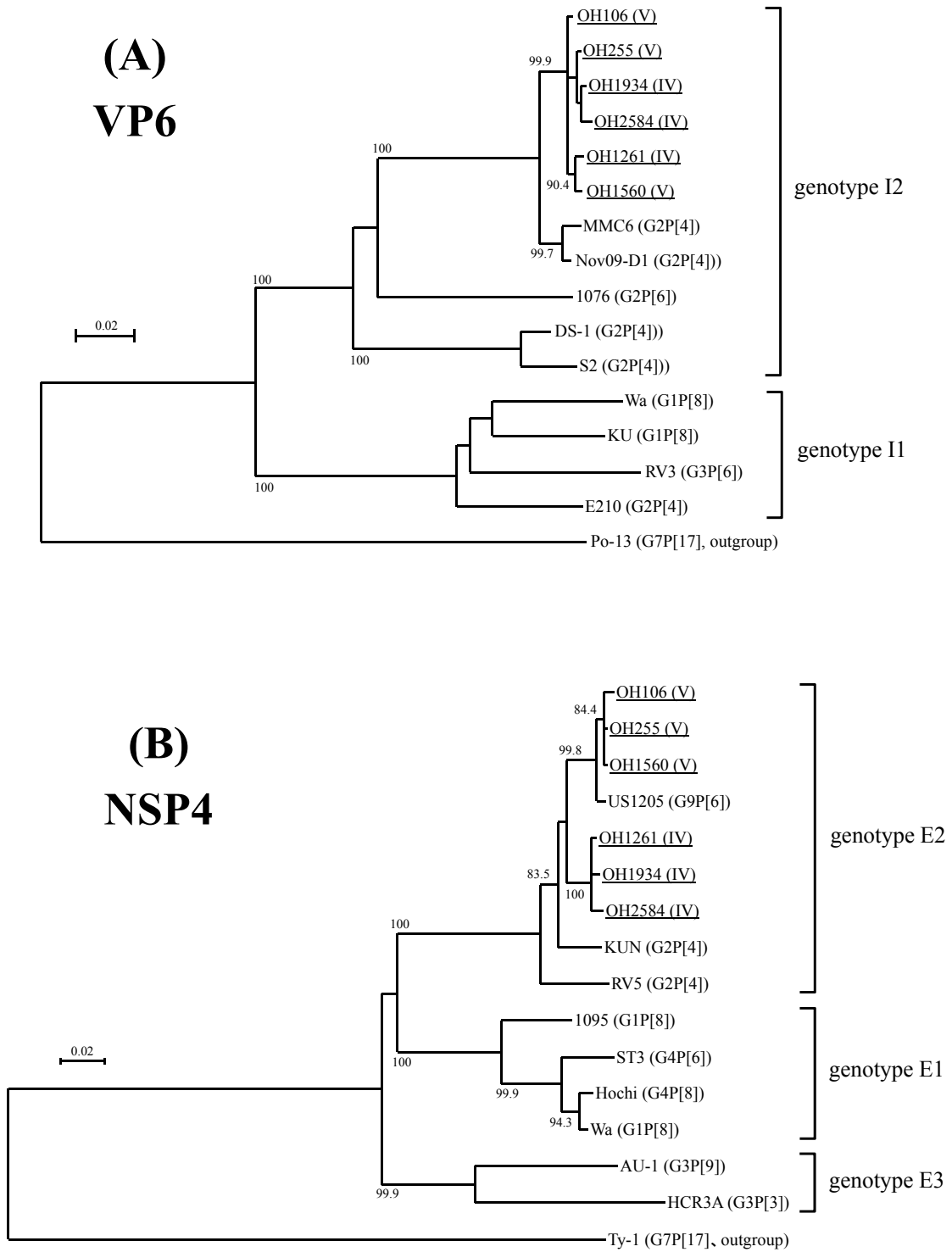


図3 VP6及びNSP4遺伝子の系統解析結果

トリRVAのPo-13株 (VP6遺伝子) 及びTy-1株 (NSP4遺伝子) を参照株として、VP6遺伝子 (パネルA) 及びNSP4遺伝子 (パネルB) について近隣結合法により系統解析を実施した (1,000回のブートストラップを行い、800以上の数値をパーセントで系統樹上に示す)。県内で検出された株はアンダーラインで示し、括弧内にVP7遺伝子クラスター名を記した。既知の株については、G型及びP型を括弧内に示す。なお、遺伝的距離 (サイトあたりの塩基置換期待数) をスケールバーで示した。VP6及びNSP4遺伝子のgenotype分類はMatthijnsensらの報告<sup>2)</sup>にしたがった。

DS-1	1:MEKLTDLNYSVITLMNNTLHTILEDPGMAYFPYIASVLTVLFALHKASIPTMKIALKT	60
OH106 (V)	1:..F.....S.....T.....	60
OH255 (V)	1:..F.....S.....T.....	60
OH1560 (V)	1:..F.....S.....T.....	60
OH1261 (IV)	1:..F.....S.....T.....	60
OH1934 (IV)	1:..F.....S.....T.....	60
OH2584 (IV)	1:..F.....S.....T.....	60
▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼		
DS-1	61:SKCSYKVVKYCIVTIFNTLLKLAGYKEQITTKDEIEKQMDRVVKEMRRQLEMIDKLTTR	120
OH106 (V)	61:.....L.....D.....	120
OH255 (V)	61:.....L.....	120
OH1560 (V)	61:.....L.....	120
OH1261 (IV)	61:.....L.....	120
OH1934 (IV)	61:.....L.....	120
OH2584 (IV)	61:.....L.....R.....	120
▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼		
DS-1	121:IEQVELLKRIYDKLMVRSSTDEIDMTKEINQKNVRTLEEWENGKNPYEPKEVTAAM	175
OH106 (V)	121:.....I.....S.....	175
OH255 (V)	121:.....I.....G.....S.....	175
OH1560 (V)	121:.....I.....S.....	175
OH1261 (IV)	121:.....C.....I..Q..G.....S.....	175
OH1934 (IV)	121:.....I..Q..G.....S.....	175
OH2584 (IV)	121:.....I..Q..G..I.....S.....	175

図4 NSP4アミノ酸配列アライメント結果

VP7遺伝子クラスターの異なる株（括弧内にクラスター名を示す）の予測アミノ酸配列について、G2P[4]型標準株のDS-1株の配列とともにアライメントを行った。ウイルス構成蛋白結合領域を灰色で示し、エンテロトキシン活性部位を枠で囲んだ。また、抗NSP4抗体により認識されるアミノ酸残基部分を矢印（▼）で示した。

るエピトープの一つであることが明らかにされている<sup>11)</sup>。

### 3.5 相対頻度とVP7遺伝子クラスターとの関連性

これまでの遺伝子解析結果から、遺伝的に異なる2種類の株が県内で流行していたこと、及びそれらがVP7遺伝子クラスターによって区別可能であることが明らかになった。そこで、流行株の属するVP7遺伝子クラスターと相対頻度との関係をシーズンごとにみたところ（図1）、2000/01及び2001/02シーズンはクラスターIVの株が連続して流行したものの、2005/06シーズンはクラスターVの株が、次シーズンには再びクラスターIVの株が、その後はクラスターVの株が流行するなど、シーズンによって流行株がめまぐるしく変化していることがわかった。さらに、クラスターIVの株が流行したシーズンには相対頻度が15.4～47.4%と比較的高く、逆にクラスターVの株が流行したシーズンには1.1～3.3%と低いことも明らかになった。

## 4 考 察

本研究により、2000年～2010年までの10シーズン中6シーズンでG2型の流行が確認されるなど、本型が県内にお

いて断続的に流行している実態が明らかになった。10シーズンに検出されたRVA株のうち、G2型の占める割合は全体で7%と低率であったものの、G2型の相対頻度が15.4～47.4%と比較的高いシーズンと、1～3%と低いシーズンがあるなど、相対頻度にはばらつきのあることがわかった。我が国においてRVAの継続的な流行調査を行っている例はあまり多くないものの、牛島らのグループが全国5ヵ所の病院（北海道、東京、舞鶴、大阪、佐賀）で行った調査によると<sup>12)～14)</sup>、2000年～2009年にG2型の相対頻度が10%を超えていたのは2000/01、2001/02、2004/05及び2006/07シーズンの計4シーズンで、その他のシーズンでは相対頻度がいずれも0～5%と低率であり、本県と類似した傾向が認められている。さらに、相対頻度が10%を超えていた4シーズンのうち2000/01、2001/02及び2006/07シーズンについては、本県でも相対頻度が高かったシーズンにあたっており、当該シーズンにはG2型が全国的に広く流行していたことが推察された。

2000年～2010年に県内で検出されたG2型の代表株について遺伝子解析を行ったところ、VP7遺伝子クラスターIV

及びVで代表される遺伝的に異なる2種類の株が、断続的に流行していたことが明らかになった。これら遺伝的に異なる株間においては、VP4及びVP6遺伝子には大きな違いはみられなかったものの、VP7及びNSP4遺伝子については数カ所にわたってアミノ酸置換部位が認められた。特にVP7については、あわせて5か所のアミノ酸置換部位が存在し、さらにそのうち1カ所は、G型特異的中和エピトープを構成する領域に位置するなど、これらの株間でVP7の抗原性が異なる可能性が強く示唆された。また、2000/01及び2001/02シーズンを除いて、同じVP7遺伝子クラスターの株が連続して流行することがなかったという事実も、このことを裏付けるものではないかと思われた。

シーズンごとのG2型相対頻度について、VP7遺伝子クラスターⅣの株が流行したシーズンは15.4~47.4%と高く、それに対してクラスターⅤの株が流行したシーズンは1.1~3.3%と低くなるなど、VP7遺伝子クラスターの異なる株間において、伝播性などに違いがあることが示唆された。本研究におけるNSP4遺伝子の比較・解析結果から、VP7遺伝子クラスターⅣとⅤの株間で、ウイルス構成蛋白結合部位に2か所のアミノ酸置換部位が認められ、しかもそのうち1か所は抗体認識部位に位置するなど、両者のNSP4には機能的及び抗原的差異のあることが示唆された。したがって、NSP4の機能的な違いがウイルスの増殖性に何らかの影響を及ぼしている可能性も考えられるが、NSP4の機能的差異のみで増殖性等の違いを結論づけることはできないため、他の遺伝子の比較・解析が必要と思われる。また今回は、流行株の一部について解析を行っているに過ぎないため、さらに多くの株についての解析結果も必要である。

我が国では2012年よりRVAワクチンの導入が開始されたが、今のところ全国レベルにおけるG2型相対頻度の上昇等は確認されていない(国立感染症研究所 片山私信)。これは、RVAワクチンが導入後間もないことや、我が国ではRVAワクチンが任意接種の対象であるため、RVA流行に対するワクチンの影響がさほど出ていないことによるのかもしれない。今後、摂取率の上昇に伴ってブラジルで確認されたようなG2型相対頻度の上昇<sup>9)</sup>も危惧されるが、その際より伝播力の優れるVP7遺伝子クラスターⅣの株が流行した場合には、流行がさらに拡大する可能性も考えられる。その危険性を事前に察知するためにも、G2型流行株の遺伝子レベルにおける継続的な監視が必要ではないかと思われる。

## 文 献

- 1) 小林宣道, 浦沢正三: ロタウイルス, ウイルス, 50: 157-172, 2000
- 2) Matthijssens, J., Ciarlet, M., McDonald, S. M., Attoui, H., Banyai, K., Brister, J. R., Buesa, J., Esona, M. D., Estes, M. K., Gentsch, J. R., Iturriza-Gomara, M., Johne, R., Kirkwood, C. D., Martella, V., Mertens, P. P., Nakagomi, O., Parreno, V., Rahman, M., Ruggeri, F. M., Saif, L. J., Santos, N., Steyer, A., Taniguchi, K., Patton, J. T., Desselberger, U., Van Ranst, M.: Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch. Virol.*, 156: 1397-413, 2011
- 3) Santos, N. and Hoshino, Y.: Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol.* 15: 29-56, 2005
- 4) 中込とよ子, 中込 治: ロタウイルスワクチンの現状と展望, 病原微生物検出情報, 26, 14-16, 2005
- 5) Gurgel, R. Q., Cuevas, L. E., Vieira, S. C., Barros, V. C., Fontes, P. B., Salustino, E. F., Nakagomi, O., Nakagomi, T., Dove, W., Cunliffe, N., Hart, C. A.: Predominance of rotavirus P[4]G2 in a vaccinated population, Brazil. *Emerg Infect Dis.*, 10: 1571-1573, 2007.
- 6) Gouvea, V., Glass, R. I., Woods, P., Taniguchi, K., Clark, H. F., Forrester, B. and Fang, Z. Y.: Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens, *J. Clin. Microbiol.*, 28: 276-282, 1990
- 7) Wu, H., Taniguchi, K., Wakasugi, F., Ukae, S., Chiba, S., Ohseto, M., Hasegawa, A., Urasawa, T., Urasawa, S.: Survey on the distribution of the gene 4 alleles of human rotaviruses by polymerase chain reaction., *Epidemiol. Infect.*, 112: 615-622, 1994
- 8) Paul, S. K., Kobayashi, N., Nagashima, S., Ishino, M., Watanabe, S., Alam, M. M., Ahmed, M. U., Hossain, M. A., Naik, T. N.: Phylogenetic analysis of rotaviruses with genotypes G1, G2, G9 and G12 in Bangladesh: evidence for a close relationship between rotaviruses from children and adults. *Arch. Virol.*, 153: 1999-2012, 2008
- 9) Doan, Y. H., Nakagomi, T., Cunliffe, N. A., Pandey, B. D., Sherchand, J. B., 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.*, 156 : 1969-1978, 2011
- 10) Ball, J. M., Tian, P., Zeng, C. Q., Morris, A. P., Estes, M. K. : Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science*, 272 : 101-104, 1996
  - 11) Hyser, J.M., Zeng, C. Q., Beharry, Z., Palzkill, T., Estes, M. K. : Epitope mapping and use of epitope-specific antisera to characterize the VP5\* binding site in rotavirus SA11 NSP4. *Virology*, 373 : 211-228, 2008
  - 12) Phan, T. G., Khamrin, P., Quang, T. D., Dey, S. K., Takanashi, S., Okitsu, S., Maneekarn, N., Ushijima, H. : Detection and genetic characterization of group A rotavirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Japan. *J. Virol.*, 81 : 4645 - 4653, 2007
  - 13) Dey, S. K., Thongprachum, A., Ota, Y., Phan, T. G., Nishimura, S., Mizuguchi, M., Okitsu, S., Ushijima, H. : Molecular and epidemiological trend of rotavirus infection among infants and children in Japan. *Infect. Genet. Evol.*, 9 : 955-961, 2009
  - 14) Chan-it, W., Thongprachum, A., Dey, S. K., Phan, T. G., Khamrin, P., Okitsu, S., Nishimura, S., Kobayashi, M., Kikuta, H., Baba, T., Yamamoto, A., Sugita, K., Hashira, S., Tajima, T., Ishida, S., Mizuguchi, M., Ushijima, H. : Detection and genetic characterization of rotavirus infections in non-hospitalized children with acute gastroenteritis in Japan, 2007-2009. *Infect. Genet. Evol.*, 11 : 415-422, 2011