

GenogroupI (GI)、 GenogroupII (GII) に特異的なものを用いた。SLV、AsI のプライマーは当研究室で構造蛋白領域に新たに設定したのものを用いた。PCR 産物は、ダイレクトシークエンスにより塩基配列を決定し、系統解析を行った。また、同じ検査材料について、電子顕微鏡法(EM)も併せて行った。

C. 研究結果

3年間で491名中376名(76.6%)からウイルスを検出した。また、これらウイルス検出者376名中61名(16.2%)からは複数のウイルスを検出した。3年間で1998年11月～1999年8月(98-99年)、1999年9月～2000年8月(99-00年)、2000年9月～2001年8月(00-01年)の3シーズンに分けて検出率を比較すると、98-99年は79%(49/62)、99-00は84.1%(127/151)、00-01は71.3%(197/276)で、3シーズンとも70%以上と高率であった。また、複数のウイルスを検出した頻度も15～17%とほぼ同様であった。

ウイルス検出検体についてウイルス別の検出状況をみた(図1)。NLVが45～49%と最も高い検出率を示した。次いでRVが40%と高かった。なお、NLVを検出した211名のうち36名(17%)はRVを同時に検出した。3番目に高い検出率を示したのは、98-99年がAd、99-00年と00-01年がSLVで両ウイルスは共に7～8%であった。

ウイルス別月別の検出状況を図2に示した。NLVは11～5月に検出され、12月に大きなピークがみられた。RVは1～5月に検出され、2、3月にピー

クがみられた。SLVは11～6月に検出され、4～6月にピークがみられた。AsIは2～6月に検出され、Adは通年的に検出された。

年令別のウイルスの検出状況をみると、RVは0～1才をピークとして、2才以下で全体の6割を占めた。NLVは0～1才に、SLVは1～2才にピークがみられるが、7才以上の学令期まで各年令から検出された。Ad、AsIは2才以下から検出された。

NLVとSLVについては系統解析を行った。3シーズン別の遺伝子型の検出状況を系統樹とあわせて図2～4に示した。GIの優位な遺伝子型は、98-99年はSOV型、99-00年はCV型とDSV型、00-01年はSOV型とシーズンごとに変動がみられた。GIIの遺伝子型は、3シーズンともLV型が60～70%近くを占め、優位な遺伝子型は変わらなかった。LV型を除くと、98-99年はMX型、99-00年はErfurt型、00-01年はMX型が多くみられた。また、00-01年にはLeeds型、465型(近似株がないためサンプル番号で示した)というこれまで国内ではほとんど報告のない新しい株がみられ、多様な遺伝子型が検出された。

SLVの遺伝子型は、Sapporo型が19株と最も多く、99-00年、00-01年の優位な遺伝子型であった。London型は00-01年、Parkville型は00-01年の1シーズンのみ、Stockholm型は99-00年、00-01年の2シーズンみられた。

D. 考察

小児急性胃腸炎患者のウイルス検

索の結果、3年間で491名中376名(76.6%)からウイルスを検出した。NLVが45~49%と最も高い検出率を示し、次いでRVが40%と高かった。NLVは、RVを主とした他の胃腸炎ウイルスと同時に検出される事が多くみられ、特にRVの流行ピークの2~3月に多かった。これら混合感染の場合のNLVは、EMは陰性でRT-PCRのみの検出であることが多く、微量のウイルスを検出したものであった。

NLVの遺伝子型は3シーズンともLV型が最も優位に検出されたが、その他の遺伝子型はシーズンごとに変動がみられた。00-01ではLeeds型、465型というこれまで国内ではほとんど報告のない新しい株がみられたが、これらの遺伝子型は同時期の食中毒事例でも検出されていた。

これまで、SLVについては十分評価を受けたプライマーがないため、国内での報告はほとんどなかった。今回新たに設定したプライマーによって、SLVの主な遺伝子型であるSapporo型、London型、Parkville型、Stockholm型を検出することができ、良好な結果が得られた。今回作成したプライマーについて、今後さらに検討を加えていきたいと思う。検出遺伝子型はSapporo型が最も多く、その他の遺伝子型はシーズンごとに変動がみられた。

E. 結論

小児急性胃腸炎のなかで、NLVはRVと同様高頻度に検出された。また、これらのウイルスに次いでSLVが多く検

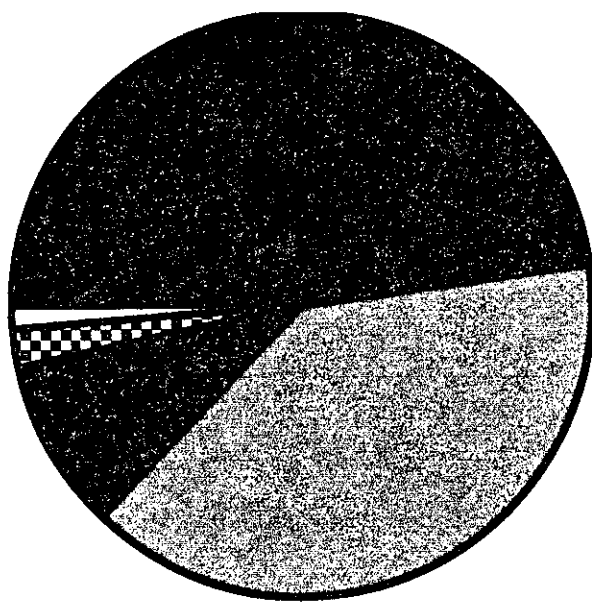
出された。

F. 研究発表

学会発表

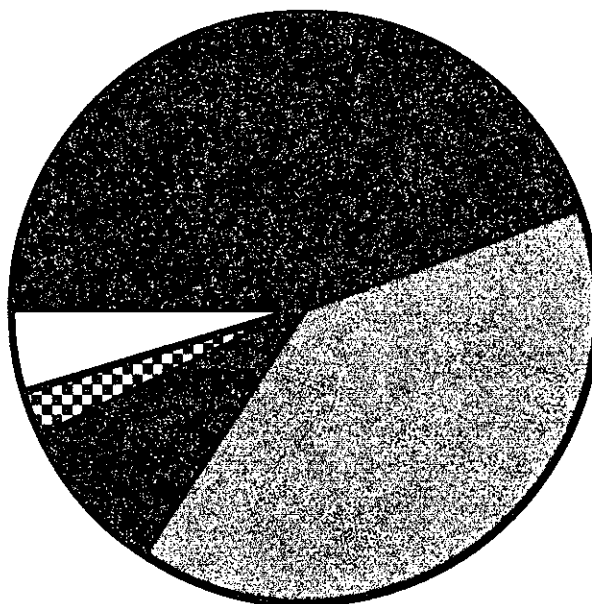
第49回日本ウイルス学会(2001)にて発表

図1 年別ウイルス別検出比率



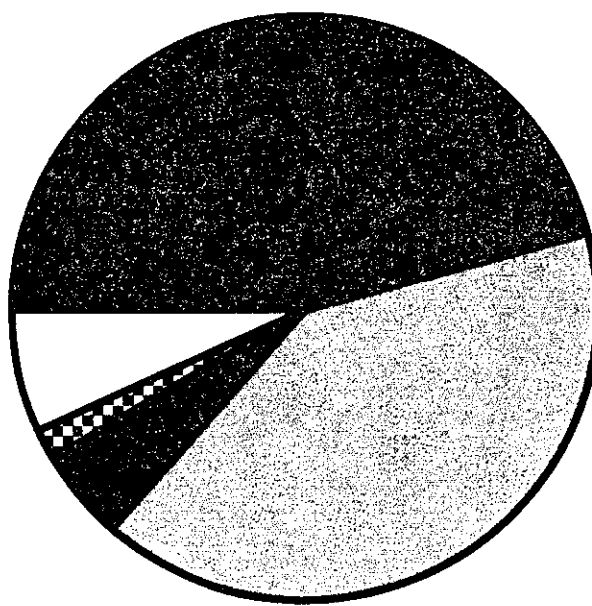
00-01

n=202, Mix=35



99-00

n=127, Mix=19



98-99

n=49, Mix=7



図2 ウイルス別月別検出比率

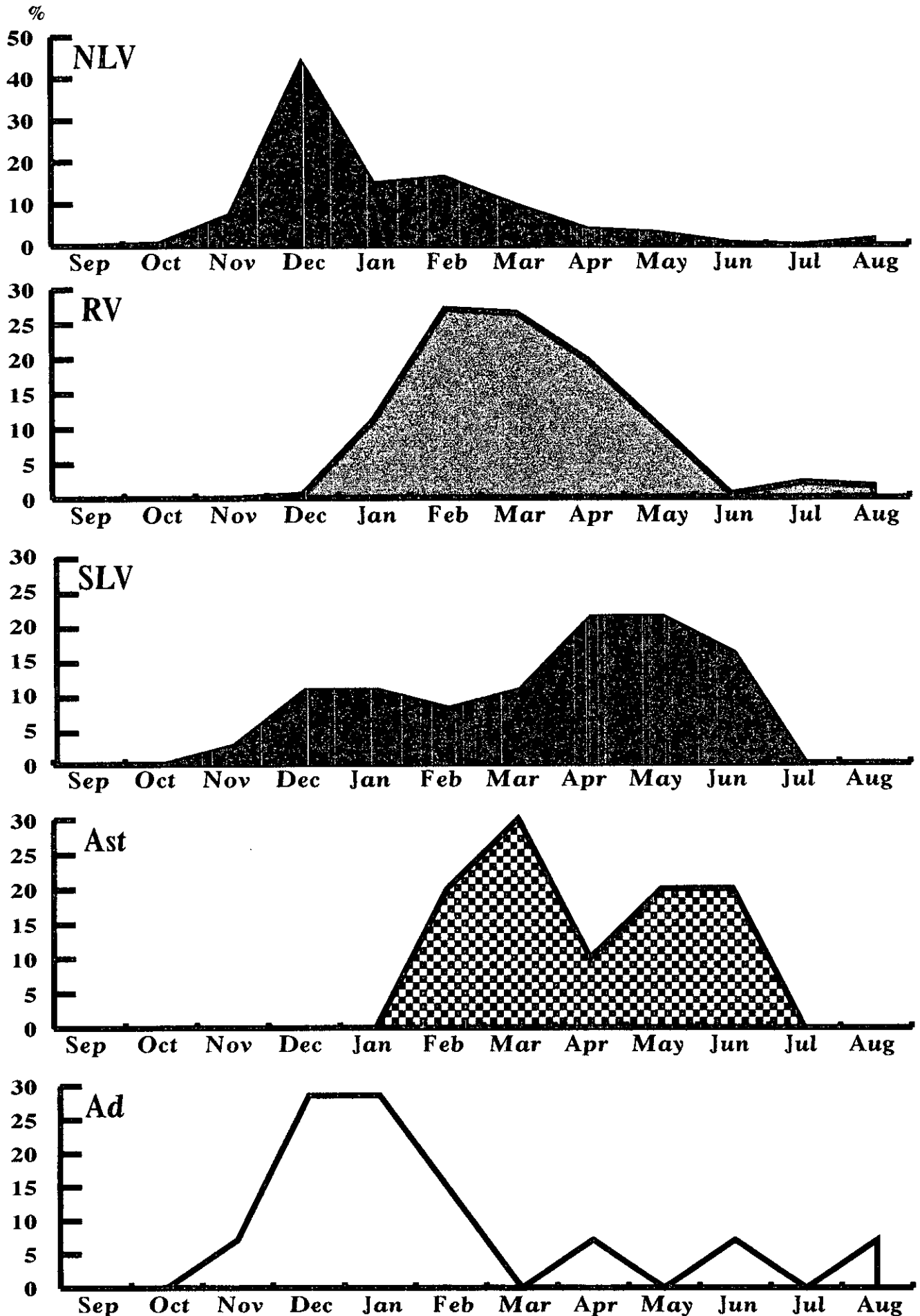


図3 NLV・GIの遺伝子
型別検出比率と系統樹

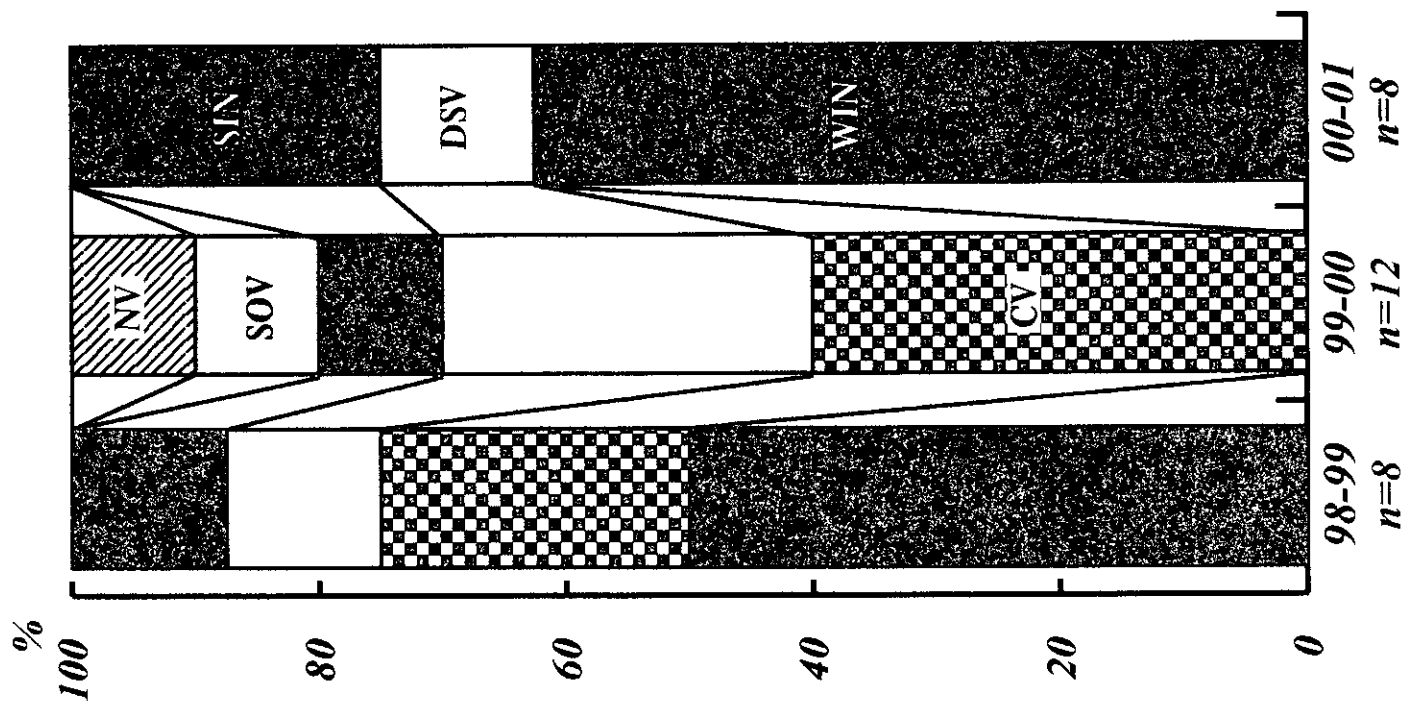
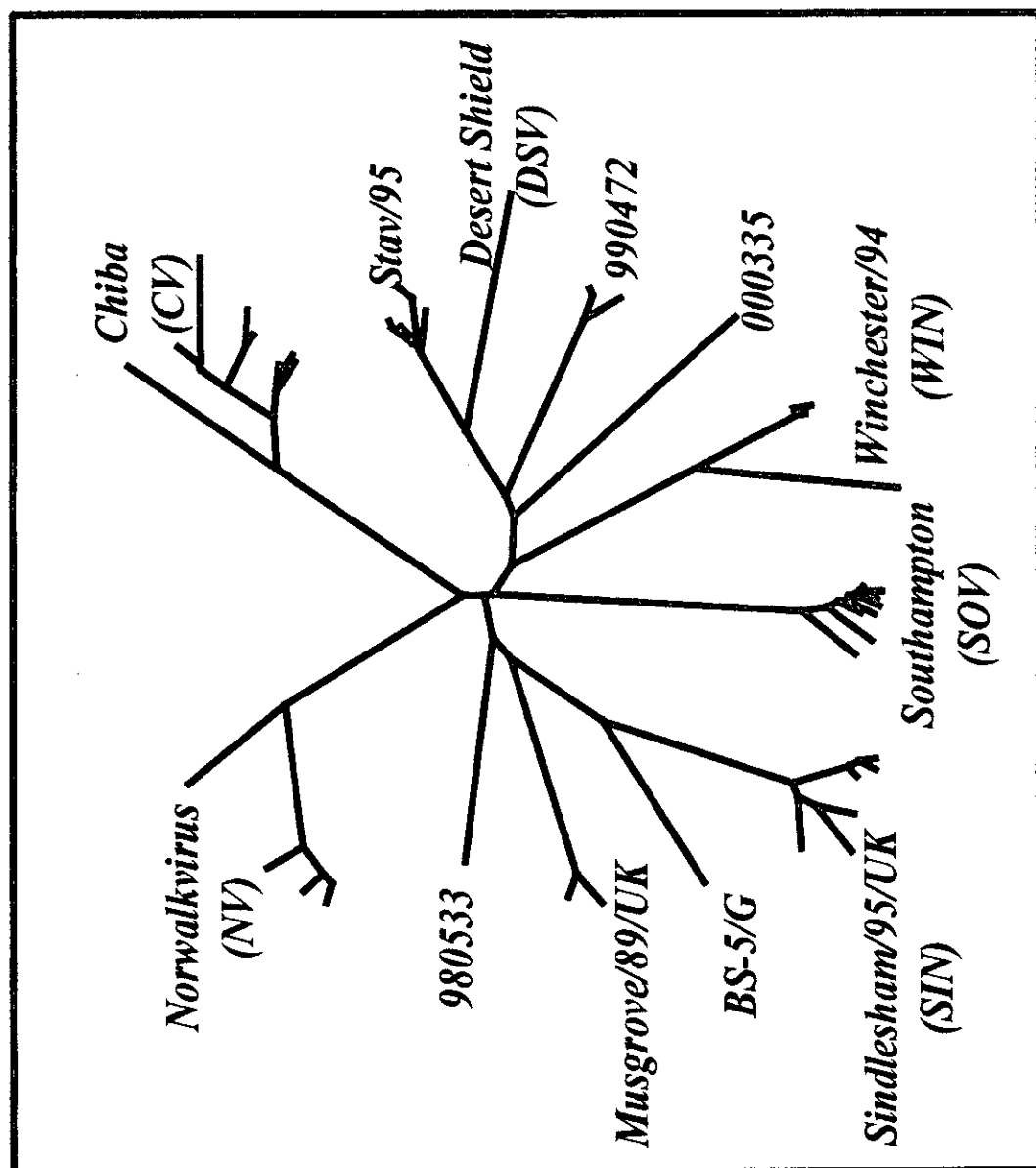


図4 NLV・GIIの遺伝子
型別検出比率と系統樹

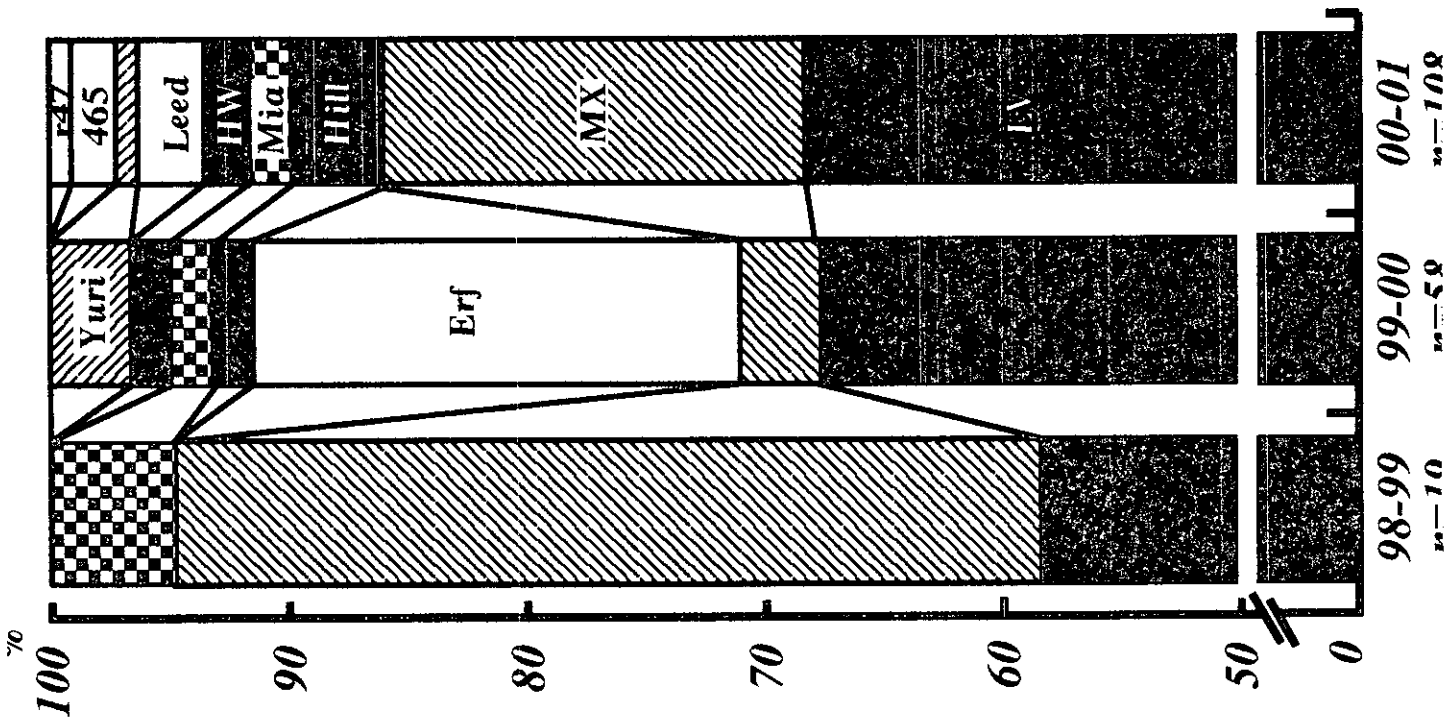
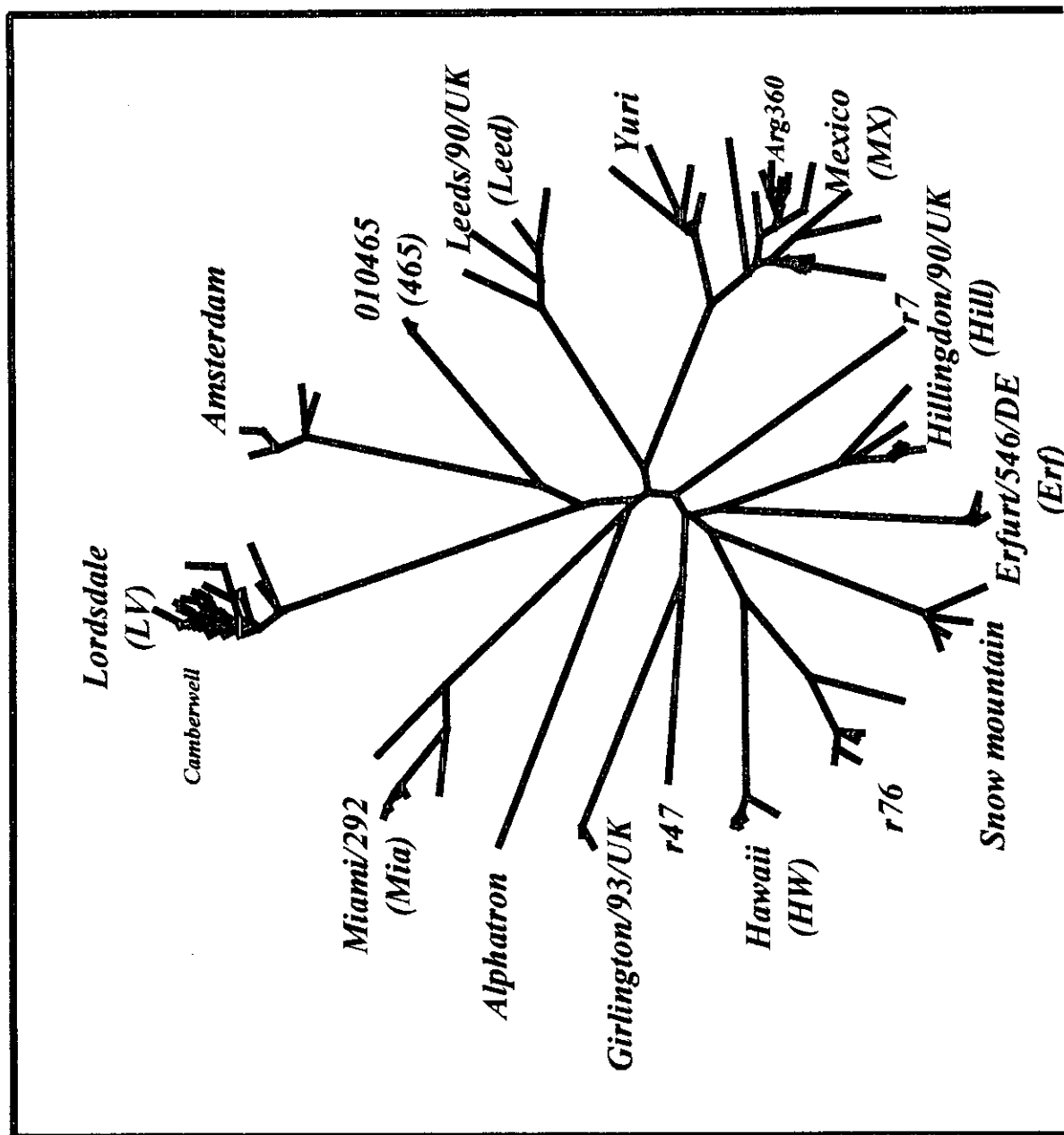
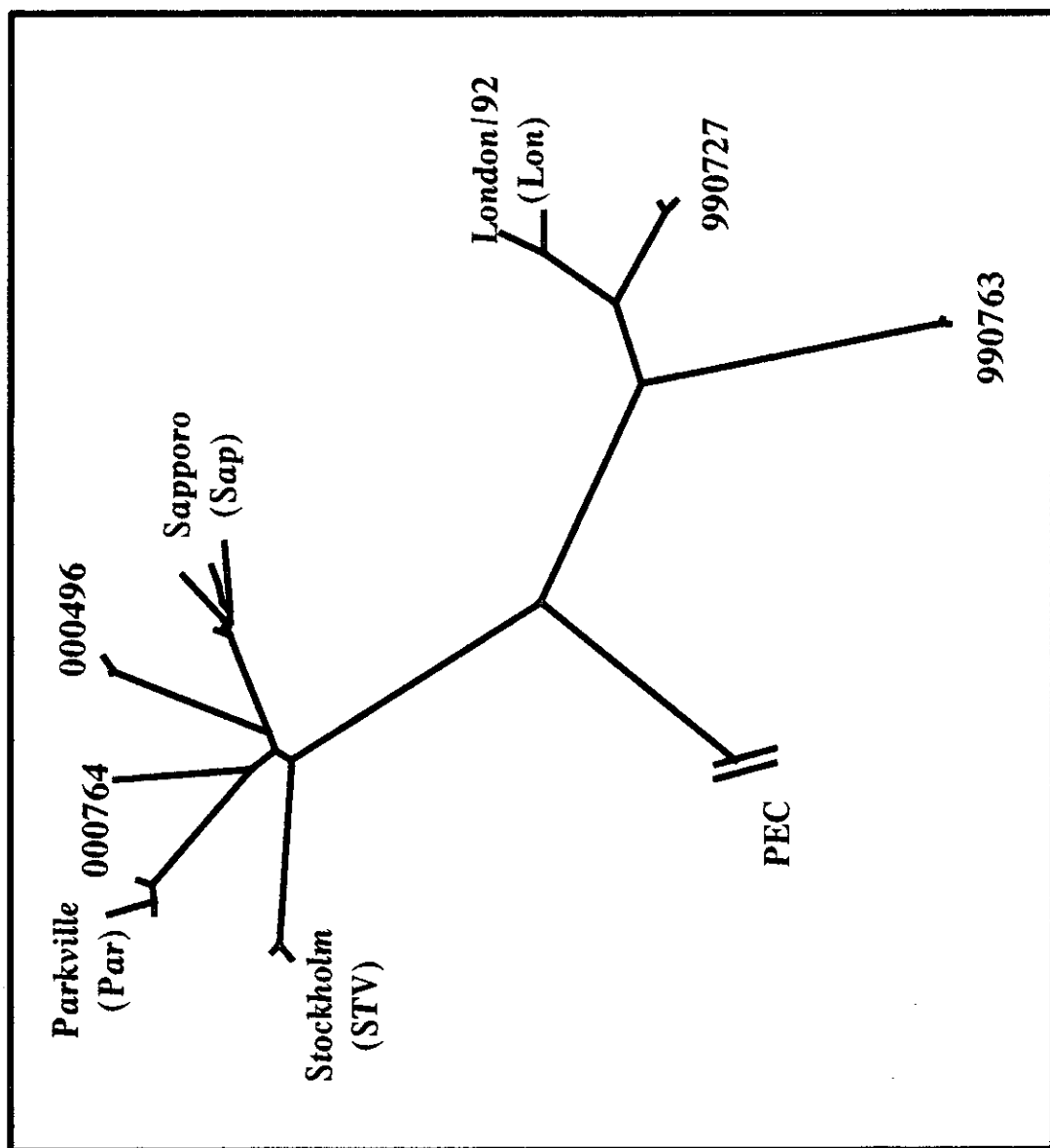
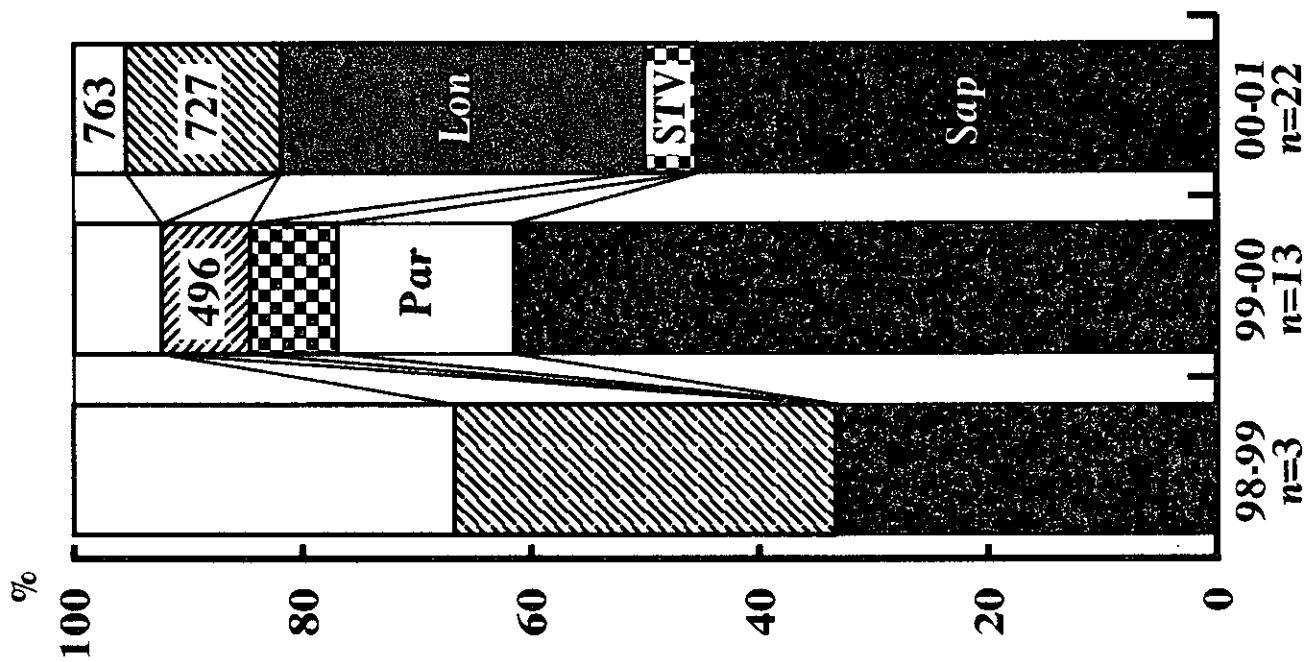


図5 SLVの遺伝子型別
検出比率と系統樹



平成13年度厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

食品由来のウイルス性感染症の検出・予防に関する研究 日本の各地から検出されたノーウォークウイルスの遺伝子配列について

分担研究者 西尾 治 (国立公衆衛生院 衛生微生物学部)

近年ノーウォークウイルス(NV)による食中毒様集団発生が多発している。そこで全国で発生した食品関連下痢症患者のふん便、推定原因食品およびカキ養殖海域からの海水から検出されたNV257件の遺伝子型を明らかにした。わが国ではNVのgenogroup 2がgenogroup 1よりも3倍程度多く、MXおよびYuri型が主流であった。多く検出された型は食品および海水から主として検出され、食品のウイルス汚染と食中毒様下痢症集団発生の関連性が強く示唆された。

A. 研究目的

平成13年度に厚生労働省に報告された食中毒様集団発生事例のうちウイルス性は247事例で、そのうち245事例はノーウォークウイルス(NV)によるものであった。食中毒の原因物質のうち、NVによる患者数は2番目に多く8,800余人であり、実際にはこの患者数よりもかなり多いと考えられている。NVによる食中毒様集団発生は社会的に見ても重要である。しかしNVは遺伝子配列が多様性に富むため、遺伝子診断を行う上においても困難をきたすことが多い。現実PCRで増幅されたDNAの確認試験にハイブリダイゼーションあるいは遺伝子配列を調べて判定を行うことにしているが、時としてハイブリダイゼーションで反応しないものも見られる。これはNVの遺伝子の配列とプローブの配列が合わない事による。現在流行しているNVの遺伝子配列を調べる事は遺伝子診断および感染経路を明らかにする分子疫学調査を行う上で極めて重要であると考えられる。そこで今回は日本の各地から食品関連下痢症患者、二枚貝（主にカ

キ）、二枚貝の養殖海域の海水から検出されたNV遺伝子配列を調べる事とした。

B. 研究材料と方法

検査材料は全国各地で2000年の冬から2002年1月の間に食品を介する食中毒様集団発生事例の患者便および原因食品と推定されたものおよび二枚貝の養殖海域の海水を用いた。検査材料からのRNA抽出、RT-PCR法は下痢症ウイルス診断マニュアルおよび厚生労働省食品保健課が平成13年11月に通知した方法に従って行った。

本研究では、RT-PCR法で陽性となった患者ふん便226件、食品はその殆どがカキで26件および海水5件のPCR産物を用い、遺伝子配列の決定は主にダイレクトシークエンスで行った。ポリメラーゼ領域はG1では4562～4861、G2では4289～4588の、カプシド領域はG1では5364～5663、G2では5088～5367の位置で解析を行った。なお一部は大腸菌に組み込んだ後ダイターミネーター法で行った。

C. 研究成績

1) 2000年から2002年のポリメラーゼ領域の遺伝子型

患者から検出されたNVのうちgenogroup 1(G1)は57件、genogroup 2(G2)は179件でG2のほうがほぼ3倍多かった。ポリメラーゼ領域ではG1では9遺伝子型が、G2では11遺伝子型が見られた。また最近の検査ではカプシド領域を検査するように指示しているのでカプシド領域のPCR産物を用い遺伝子配列から、G1およびG2ともに4つの遺伝子型が見出された。それぞれの系統樹は図1、2に示した。なお、ポリメラーゼ領域のP1 I、P1 II、P1 III、P1 IV、P1 V、P2 I、P2 II、P2 III、P2 IV、P2 V、カプシド領域のC1 I、C1 II、C2 IおよびC2 IIは相同性80%以内の代表株が見当たらなかったため、当方で仮に遺伝子型とした。

表1. 全国各地からの NV G1 遺伝子型検出状況(2000年~02年)(ポリメラーゼ領域)

検体 型	患者					食 品	海 水	計
	九 州	中 国	中 部	関 東	東 北			
P1 I	2	2		1				5
DSV								0
P1 II				1				1
P1 III	1			1		1		3
NV	1	5		6				12
P1 IV	3				1			4
South	1			5	1			7
Chiba			15	1	2	1		19
P1 V		1						1
Mur5A	1							1
計	9	8	15	15	4	2	0	53

表1には2000年から2002年1月の間に日本の各地から検出されたNV G1遺伝子型別に地区別の患者、食品および海水の成績を示した。

患者から多く検出された遺伝子型は九州地区ではP1 IV、中国および関東地区ではNV、中部および東北地区ではChiba型であった。

食品からはP1 IIIおよびChibaがそれぞれ1件から見出された。

G2では各地域ともに4つから9つの遺伝子型が検出され、九州、中国および関東地区ではMXおよびYuri型が主流で、この2つの遺伝子型が66%を占めた。また食品からはMX、YuriおよびP2 I型が、海水からはMX型が検出された。

表2. 全国各地からの NV G2 遺伝子型検出状況(2000~02年)(ポリメラーゼ領域)

検 体 型	患者					食 品	海 水	計
	九 州	中 国	中 部	関 東	東 北			
P2 I		3		6		1		10
P2 II		2			1			3
Camber	4	3		13	3			23
Hawaii		2						2
P2 IV		1						1
P2 III		1		3				4
MX	7	16		24	2	17	5	71
Asb1				2				2
Khs1				1				1
P2 VI	3			1				4
P2 V	2	4		5	1			12
Yuri	13	3		30		3		49
計	29	35	0	85	7	21	5	182

2) 2001年から2002年のカプシド領域の遺伝子型

カプシド領域は2001年11月からカプシド領域のプライマーを用いることにしたので、例数は未だ少数である。

表 3. 全国各地からの NV

G1 遺伝子型検出状況 (カプシド)

検体 型	患者		食品	計
	九州	中国		
Sindles		2		2
NV				0
Chiba	1		1	2
South				0
DSV				0
C1 I				0
C1 II	1			1
Winches	1	1		2
CIX				0
計	3	3	1	7

表 4. 全国各地からの NLV

G2 遺伝子型検出状況(カプシド)

検体 型	患者		食品	計
	九州	中国		
Camber				0
Hawaii				0
Wortley		1		1
C2 I	2			2
C2 II				0
MX	6	2	1	9
Seacroft	12		2	14
Alpha				0
計	20	3	3	26

G1では4つの遺伝子型が検出されているが、いずれも少数であった。食品からはChiba型が検出された(表3)。

G2では4つの遺伝子型が検出され、MXとSeacroftが多く検出され、この2つが88%を占めた(表4)。

D. 研究考察

近年の2年間における食品関連下痢症の集団発生患者から検出されたNVの遺伝子型を解析したところ、G2がG1よりも多く、日本ではこの傾向がここ数年続いている。遺伝子型ではここ数年MXが多く見られており、依然としてこの型が濃厚に存在していると考えられる。この型は食品および海水からも最も多く検出されており、環境中にこの型が多く存在し、カキ等の二枚貝で濃縮され、その結果として食中毒様集団発生を起こしていると推測される。

さらにYuri型はかつては秋田県の一部に限局して見られたが、2000年頃から全国で散発的に見出され、2001年から各地で多く検出されるようになってきている。実際にこの型は食品からも検出され、今後このYuri型による集団発生が多くなる危険性が予測される。

また、近年Camber型が多く検出されるようになってきているので、この型の消長についても監視する必要があると考えている。

E. 論文

1) Qiu-Hong Wang, Junko Kakizawa, Le-Ying Wen, Mitsugu Shimizu, Osamu Nishi o, Zhao-Yin Fang, and Hiroshi Ushijima. Genetic Analysis of the Capsid Region of Astroviruses. J. Med. Virology. 64: 245-255, 2001.

2) 新川奈緒美、上野伸宏、本田俊郎、吉

国謙一郎、有馬忠行、湯又義勝、伊東祐治、増満弘史、田中義文、中野秀人、馬場俊行、中俣和幸、西尾 治：ウチムラサキ貝が原因で夏季に発生したノーウォーク様ウイルスによる食中毒事例—鹿児島県—。病原微生物検出情報, 22:222-223, 2001。

F. 学会発表

- 1) 新川奈緒美、永田告治、松野重夫、西尾 治、鹿児島県における胃腸炎集団発生事例および自生カキから検出された Norwalk virus の疫学的検討、第 42 回日本臨床ウイルス学会、2001, 6, 6-7, P70
- 2) 李 蕾、清水英明、周玉梅、西尾 治、杉田久美子、上田勇一、西村修一、金保珠、西村忠史、黒岩利正、中谷茂和、牛島廣治、分子疫学的方法による小児下痢症アデノウイルスの検討、第 42 回日本臨床ウイルス学会、2001, 6, 6-7, P73、名古屋
- 3) 川本 歩、加藤由美子、西尾 治：ヒトと環境水およびカキから検出した Norwalk virus の遺伝子解析、第 49 回日本ウイルス学会総会、2001, 11, 18-29, P. 83 大阪
- 4) 西尾 治、加藤由美子、秋山美穂、辰巳正純、本間真二郎、中田修二、磯村思无、パキスタンの乳幼児からの NV および SV 検出状況、第 49 回日本ウイルス学会総会、2001, 11, 18-29, P. 88, 大阪
- 5) 李 蕾、清水英明、西尾 治、沖津祥子、牛島廣治、1999 年—2000 年日本での小児下痢症におけるアデノウイルスの検討、第 49 回日本ウイルス学会総会、2001, 11, 18-29, P. 90, 大阪
- 6) Grant Hansman, Doan Lan, Shoko Okitsu, Osamu Nishio, Yumiko Kato, Hiroshi Ushijima, Sporadic cases of Norwalk-like virus infection in Vietnam reveal two

distinct cluster in Genogroup II、第 49 回日本ウイルス学会総会、2001, 11, 18-29, P. 89, 大阪

- 7) Doan Thi Phuong Shoko Okitsu, Osamu Nishio, Hiroshi Ushijima, Distribution of rotavirus G serotype among hospitalized children of Ho Chinh city, Vietnam, 第 49 回日本ウイルス学会総会、2001, 11, 18-29, P. 213, 大阪

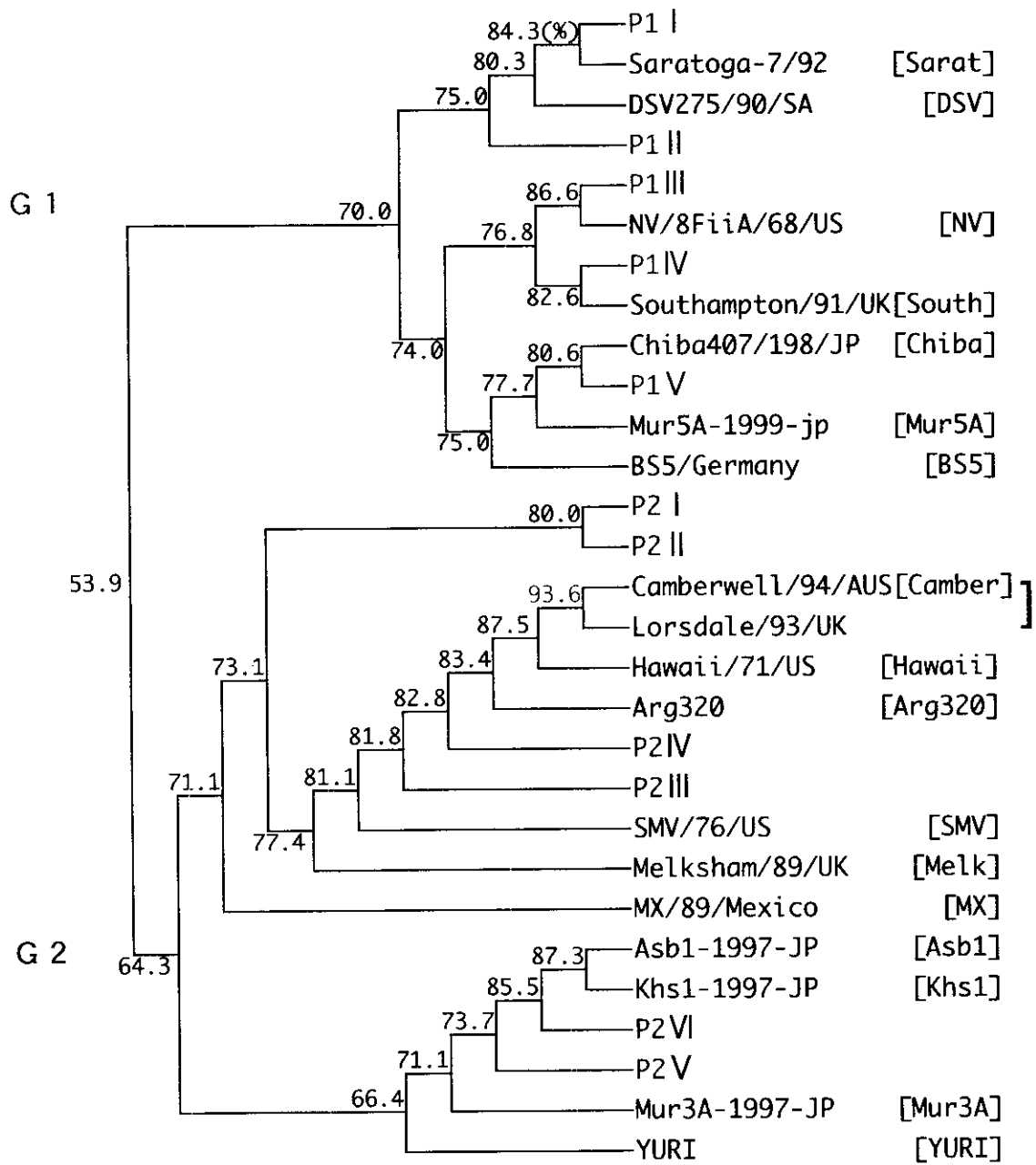


図1. ポリメラーゼ領域の系統樹

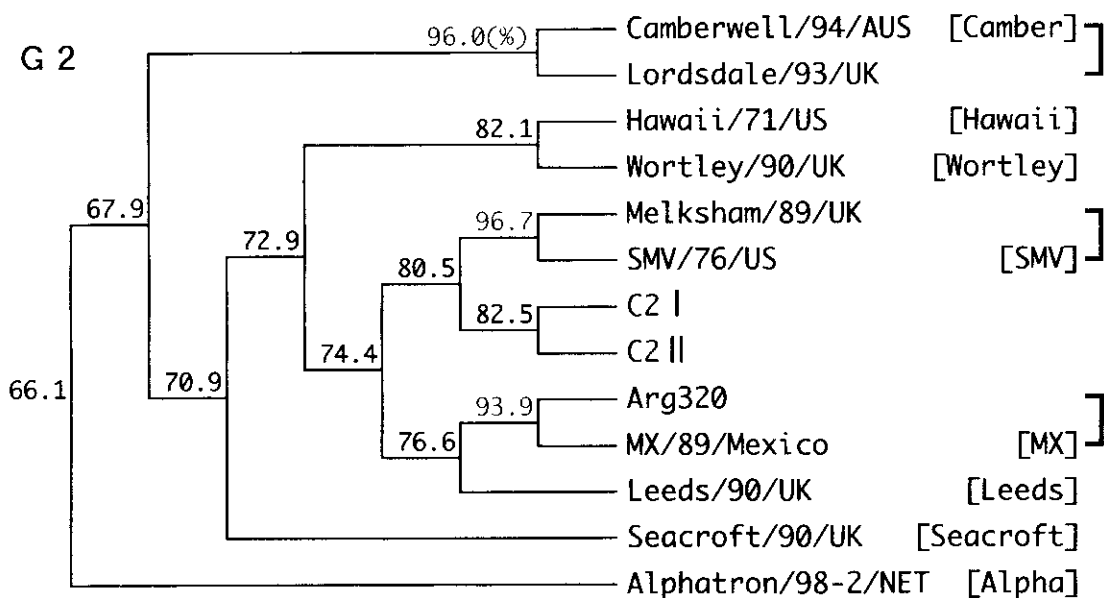
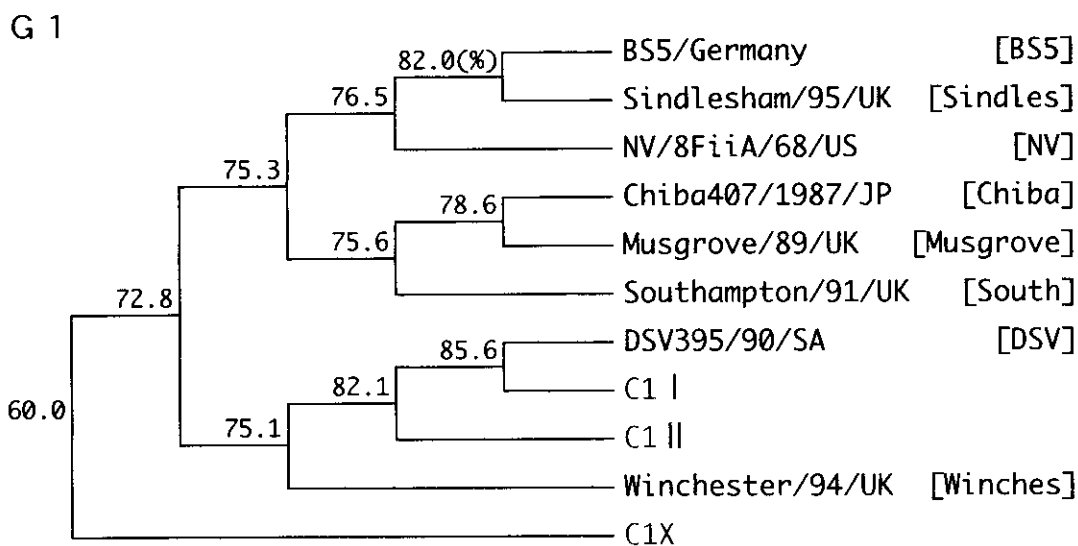


図2. カプシド領域の系統樹

新規ノーウォークウイルス 10 株の遺伝子解析

分担研究者 片山和彦 国立感染症研究所 ウイルス製剤部

協力研究者 白土東子 国立感染症研究所 ウイルス製剤部

研究要旨

NLV の疫学調査を推進し、NLV の流行予測や予防衛生を推進するためには、ウイルスの抗原性、ジェノム塩基配列の情報が有用である。しかし、現在までに全塩基配列が明らかにされた NLV は 10 株に満たない。そこで、本研究では新たに NLV 10 株の完全長ジェノム塩基配列を決定し、遺伝子全長にわたる詳細な解析を行った。

Similarity plot analysis の結果、NLV は ORF1 と ORF2 のジャンクション領域がもっとも高度に塩基配列が保存された領域であることが明らかになった。Similarity window analysis の結果、NLV は GI, GII ともに ORF1 と ORF2 のジャンクション領域で recombination を起こすことが確認された。従って、NLV は ORF1 を用いた分子系統樹解析と、ORF2 以降の領域を用いた分子系統樹解析では、異なる結果を与えることが明らかになった。また、統計学的手法を用いて分子系統解析を評価し、NLV のジェノタイプングにもっとも適した方法を検討した結果、NLV は ORF1 2 ジャンクションから ORF2 の capsid N-terminal/shell domain にかけての塩基配列を用いて pairwise distance 算出しジェノタイプングを行うと、NLV-VLP の抗原性の違いを反映したジェノタイプングが可能であることが明らかとなった。

A. 研究目的

ノーウォーク様ウイルス (Norwalk-like viruses; NLV) は、非細菌性集団食中毒の主因となるばかりでなく、冬季に多発する非細菌性胃腸炎の原因としても疑われている。NLV 感染症は、当初の予想以上に世界的に流行を繰り返し、ヒトの健康維持に多大な損害を与えている可能性が示唆されている。NLV の疫学調査を推進し、NLV の流行予測

や予防衛生を推進するためには、ウイルスの抗原性、ジェノム塩基配列の情報が有用である。しかし、NLV は培養細胞で増殖させることが出来ないばかりか、ヒト以外の動物に感染しないため研究が遅れており、現在までに全塩基配列が明らかにされた NLV は 10 株に満たない。

これまでの研究から、NLV には、遺伝子配列が大きく異なるジェノグループ I (GI),

ジェノグループ II (GII)の 2 グループが存在すること、抗原性が互いに異なる複数のウイルス株が存在することが知られており、NLV が極めて多様性に富む遺伝子配列を持つウイルスであることが予測されている。しかし、現状ではジェノム全長を用いた塩基配列の多様性やリコンビネーションの解析、分子遺伝学的かつ統計学的な分析手法に基づいたタイピングが十分に検討できない。そこで本研究では、新たに NLV 10 株の完全長ジェノム塩基配列を決定し、遺伝子全長にわたる詳細な解析を施行した。

B. 研究方法

材料

埼玉県内で発生した食中毒事例の患者より採取された糞便検体 9 検体と、和歌山県で発生した集団胃腸炎患者より採取された糞便検体 1 検体を用いた。

塩基配列の決定

採取された NLV 感染患者糞便よりキアゲン社の Viral RNA kit を用いて抽出した RNA を鋳型として、Taqqed Long RT-PCR で NLV ゲノム全長を互いに 200nt ほどオーバーラップするように 2 分割して増幅した。この増幅産物の塩基配列を primer walking 法を用いて決定した。さらに、リコンビネーションの確認された株は、株特異的な primer をゲノムの 5'末端、3'末端付近に合成し、これらを用いた long RT-PCR により約 7000nt を改めて増幅し、リコンビネーション部位付近の塩基配列を再決定した。

塩基配列の解析

新たに決定した 10 株の (SzUG1, WUG1, Saitama U1, U3, U4, U16, U17, U18, U25, U201) 塩基配列と核酸データベース上に報告されていた 8 株 Norwalk virus (M87661); NV68, Southampton virus (L07418); S0, BS5 (AF093797) Chiba virus (AF145896), Lordsdale virus (X86557); LD, Camberwell virus (AF145896); CW, Hawaii virus (U07611), MD145-12 (AY032605)、合計 18 株を Clustal X でグループ別にアライメントした。アライメントした塩基配列はグループごとに GCG の Plot Similarity を用いて全長にわたる塩基配列の Similarity を調べた。全 18 株とアウトグループとして用いた Sapporo like virus; Manchester strain; MC の Pairwise distance は clustal X (パラメーター clustal W 1.6, kimura) を用いて算出し、分子系統樹は Neighbor Joining 法を用いて作成した。系統樹の信頼性は bootstrap 検定を 1000 回行って調べた。Pairwise distance の分散分析には stat view を用いた。

C. 研究結果および考察

ジェノムの特徴

ジェノムには、3つの open reading frame (ORF) が存在していた。ジェノム 5'末端と ORF2 上流に 18 塩基の高度に保存された塩基配列が認められた。また、3'末端近傍には RNA のヘアピン構造が全ての株に共通して認められた。これらは、NLV のレプリケーションに重要な役割を果たすと考えられた。最も相同性の高い領域は ORF1 と ORF2 (capsid 蛋白質がコードされている) の境界付近約 200 塩基

(ORF1/ORF2 junction region から 200 塩基ほど)であった。本領域は RT-PCR の標的領域として最も適していると思われた。興味深いことに、その下流に位置する ORF2 の中央部付近はゲノム全体で最も相同性の低い領域(約 20%の相同性)であることが明らかになった。この領域は NLV 粒子表面に出ている突起部分のアミノ酸をコードすると考えられており、NLV の抗原型が多数存在するのは本領域の多様性に起因する可能性がある。

分子遺伝学的解析

1. 全長配列を用いた解析

分子系統樹は NV, SO, BS5, Chiba, SzUG1, WUG1 と LD, CW, MD145-12, Hawaii, Saitama U1, U3, U4, U16, U17, U18, U201, U25 の 2 グループに分岐していた(図 1)。2 つのグループは既報の genogroup I (GI) と genogroup II (GII) に相当する。Genogroup 内分岐のブートストラップ値を見ると、いずれも 950 以上(*印)を示しており、本系統樹の樹型は統計学的に支持された。樹型の支持された系統樹に対し、pairwise distance の分散分析を行うことによってクラスター分けの尺度が与えられれば、タイピングが実行可能である。そこで次に、全長および領域別に算出した distance のヒストグラムを求めた(図 2)。アウトグループとした MC と NLV の属間 distance (縞)、GI と GII のグループ間 distance (白)、それ以外の distance (黒)をそれぞれ棒グラフにプロットした。全長塩基配列を用いた distance のヒストグラムは、A, B, C つのエリアに分割可能であり、C が属間 distance、B がグル

ープ間 distance、A がそれ以下のクラスの distance に相当していた。A はさらに幾つかのエリアに細分化できるかもしれないが、解析に用いた株数が少なく客観的な指標が得られなかった。この検討により、ゲノム全長の塩基配列を用いた場合には、統計学的に支持された系統樹を distance でクラスター分けし、NLV のジェノタイピングを行うことが可能であることが示唆された。

2. ORF 別解析

ORF1 の分子系統樹は、ほとんどの分岐がブートストラップ値 950 以上を示し、統計学的に支持された。ORF2, ORF3 は、GI と GII の分岐が統計学的に支持されたが、GI 及び GII 内部の分岐にはブートストラップ値が 950 以下で統計学的に支持されない部分も存在した(図 1)。次に分散分析の結果を見ると ORF1, 2 の distance のヒストグラムは、全塩基配列を用いた場合と同様に A, B, C のエリアが、C ; 属間、B ; グループ間、A ; それ以下に相当していた。しかし、ORF3 は、属間 distances とグループ間 distances の値が重なり、区別できなかった(図 2)。これは、ORF3 の系統樹では SLV と NLV のクラスターを分けられないことを意味する。従って、ORF3 は、これ以降の解析から除外した。Distance 算出に用いた塩基数は、ORF1 が約 5000 塩基であったのに対し、ORF2 は 1600 塩基、ORF3 は 700 塩基であり、この差が ORF1 と ORF2, 3 に認められたブートストラップ値の差を生み出している可能性がある。そこで、次に ORF1, ORF2 をコードされている蛋白質の機能ドメインごとに細分

化して分子系統解析を行った。

3. 機能ドメイン別解析

ORF1 は ORF2 以降の機能ドメイン毎の分子系統樹に比べいずれの領域もブートストラップ値が 950 以上を示す分岐が多く、ORF1 と ORF2 のブートストラップ値の差は distance 算出に用いた塩基数の差に依存していないと考えられた。ブートストラップ値は、分子系統解析に用いた遺伝子の進化速度が早い場合に低下することがある。注目すべきことに、WUG1 と Saitama U1 は ORF1 の N-terminal から RNA dependent RNA polymerase (polymerase) までの系統樹上の近縁関係と、capsid N/S 以降の系統樹での近縁関係が異なっていた (図 1)。これは ORF1 と ORF2 の間の何処かで、NLV ジェノムのリコンビネーションが起きていることを示している。

4. リコンビネーションの解析

WUG1 を基準株として GI に属するその他の株 (図 3a)、同様に U1 を基準株として GII に属するその他の株 (図 3b) との similarity plot analysis を行った。WUG1 株は ORF1 は SO 株に最も類似しているが、ORF2 以降は BS5 株に類似していた。同様に U1 株は、ORF1 が LD, CW と類似しており、ORF2 以降は僅かではあるが LD、CW よりも U3、U16 に似た配列を示すことが明らかになった。この結果は WUG1 と U1 が ORF1 と ORF2 の間でリコンビネーションを起こしていることを強く示唆していた。リコンビネーションの位置を詳細に特定するために、ORF1 と ORF2 にまたがる約 1kb

の核酸配列を用いて、同様に解析を行ったところ、similarity の変化は、ORF2 の開始コドン直近上流に存在する NLV 全株に共通して保存されている consensus sequence (5'-GTR AAT GAW GAT GGC GTC-3')を境に起きていた。NLV はタイピングに ORF1 を用いる場合と、ORF2 以降を用いる場合に異なる結果を与える株があることが明らかになった。

5. Polymerase と capsid N/S domain の比較

ジェノムリコンビネーションを考慮に入れると、タイピングに使用する部分配列は ORF1 から一つ、ORF2 以降から 1 つ候補を選び比較しなければならない。そこで、ORF1 から樹系が統計学的に支持された Polymerase 領域を、ORF2 以降からは信頼できる樹系が得られた capsid N-terminal ~ shell domain (capsid N/S) を選択した。幸運なことに、両候補領域共に NLV の RT-PCR のターゲットとして広く用いられてきた領域であり、データベース上に既報の塩基配列が数多く存在する。特に capsid N/S は我々がデザインした RT-PCR primer SK シリーズの標的領域である。そこで、2001 年末までに核酸データベース上に公開されていた NLV の塩基配列のうち Polymerase もしくは capsid N/S を 250 塩基以上含む物を対象とし、Polymerase (101 株)、capsid N/S (75 株) の分子遺伝学的解析を行った。

分析の結果 Polymerase、capsid N/S 共に 3 つのエリアが形成された。エリア B と C は、ジェノム全長を用いた解析結果と同様、

それぞれ SLV/MC と NLV 間 distance、GI、GII 間 distance に相当していた。エリア A は更に 2 つのエリア(A1 and A2)に分かれる可能性が示された。エリア A を統計学的に分けることが可能であれば各エリアの平均値 $\pm 2SD$ もしくは $3SD$ で genogroup 以下のレベルのクラスタリングが可能になる。そこで Polymerase、capsid N/S それぞれの株を genogroup 別にアライメントして distance を求めた (図 4 にエリア A の拡大図を示した)。GI、GII 共に Polymerase 領域のヒストグラムは領域の境界が解らず、細分化できなかった。Polymerase 領域では genogroup 以下のクラスターを定義する客観的な指標が得られなかった。しかし、capsid N/S は明らかに独立した 2 つのピークが存在しており、領域を 2 分割することが可能であった。次に細分化した 2 つのエリア A1、A2 の平均値 $\pm 3SD$ を求めたところ、互いにエラーバーの重なりのない分布を持っていた。つまり、GI ではエリア A2 (distance 0.221 ± 0.063) の関係で束ねることで、GII でも同様にエリア A2 (distance 0.261 ± 0.105) の関係で束ねることで genogroup 以下のクラスタリングが可能であることが明らかとなった。

Capsid N/S domain を用いた NLV のジェノタイプピン

Capsid N/S の配列を用いて描いた NJ 法による分子系統樹を図 5 に示した。GI、GII のクラスター内部を前述の基準でクラスタリングしてみると、GI に 9 クラスター、GII に 11 クラスターが存在することが明らかにな

った。我々は、これらのクラスターをジェノタイプとして位置づけ、GI/1, GI/2 . . .、GII/1, GII/2 . . . と表記した。バキュロウイルスによって発現させた中空粒子 (図 5 星印) の抗原性の違いとジェノタイプの相関関係を調べたところ、異なるジェノタイプは互いに異なる抗原性を示すことが明らかになった。

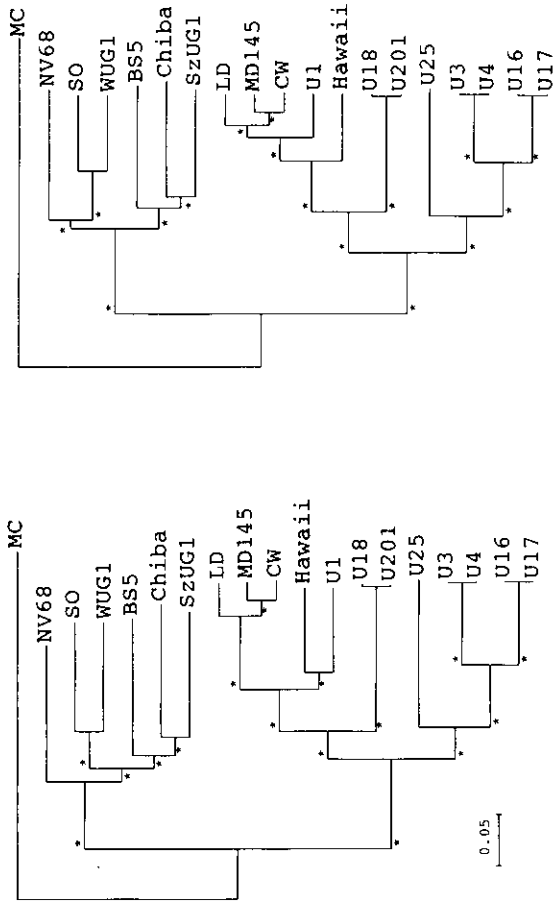
学会発表

1) 影山努、小嶋慈之、福士秀悦、星野文則、片山和彦、武田直和 Norwalk virus ゲノムリコンビネーションの解析 第 4 2 回日本ウイルス学会、2001。

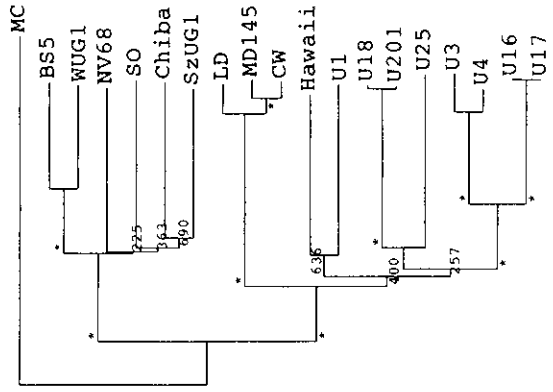
論文発表

1) Shigeyuki Kojima, Tsutomu Kageyama, Shuetsu Fukushi, Fuminori B. Hoshino, Michiyo Shinohara, Kazue Uchida, Katsuro Natori, Naokazu Takeda, Kazuhiko Katayama., Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses., Journal of Virological Methods vol 100 p107-114, 2002.

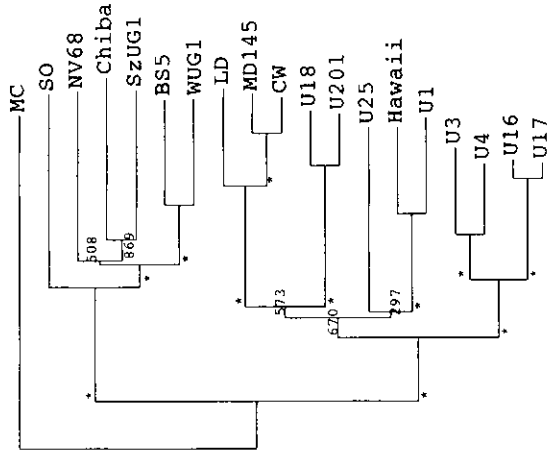
Full length



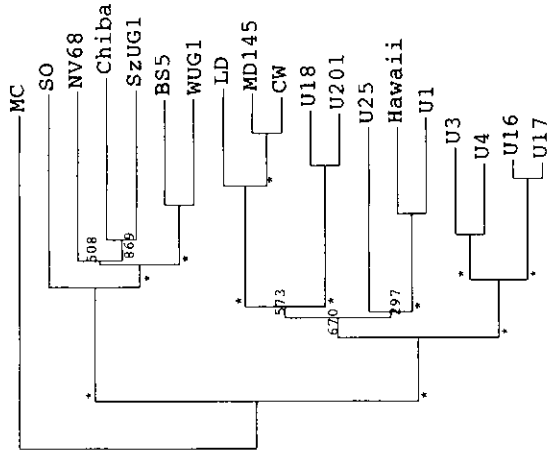
ORF1



ORF2

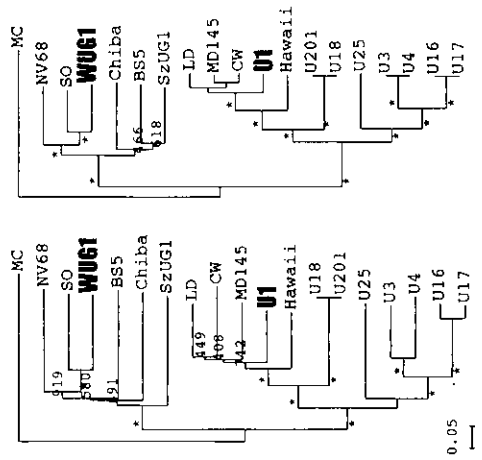


ORF3

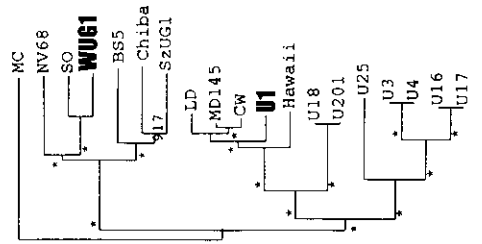


ORF1

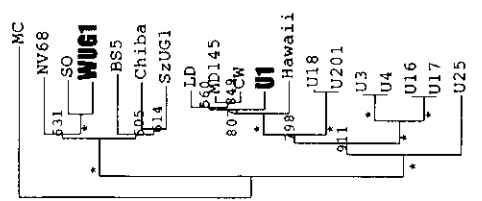
N-terminal



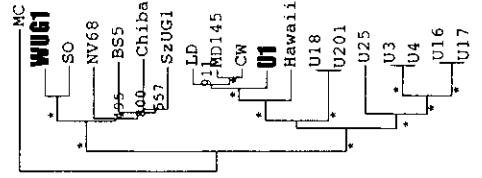
3A-like



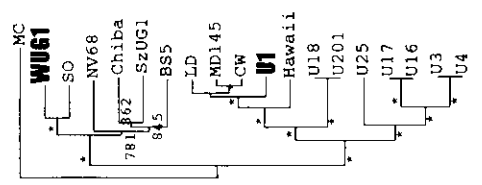
VPg



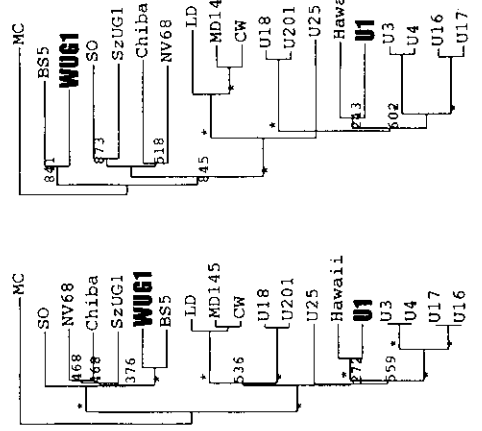
3C-like



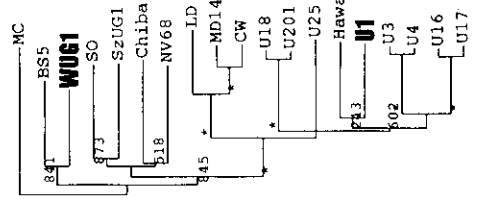
polymerase



N/S domain

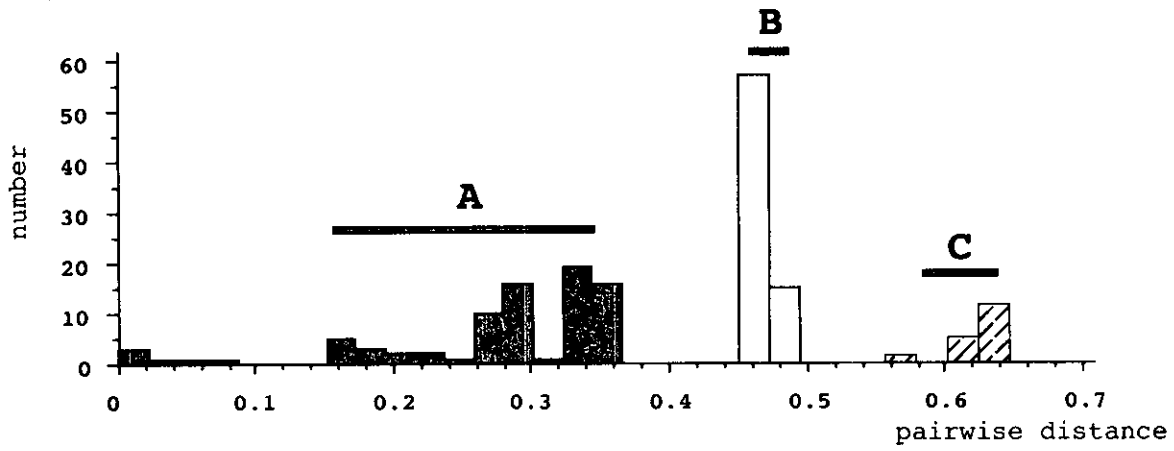


P domain

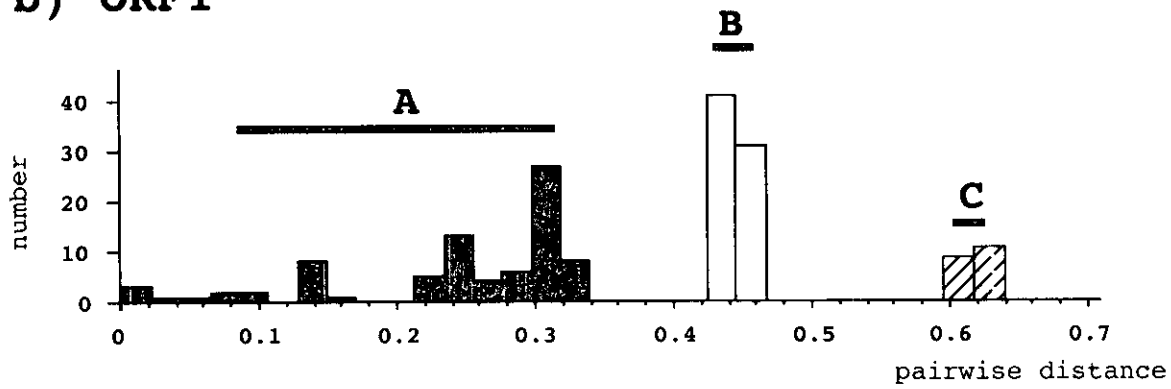


ORF2 / capsid

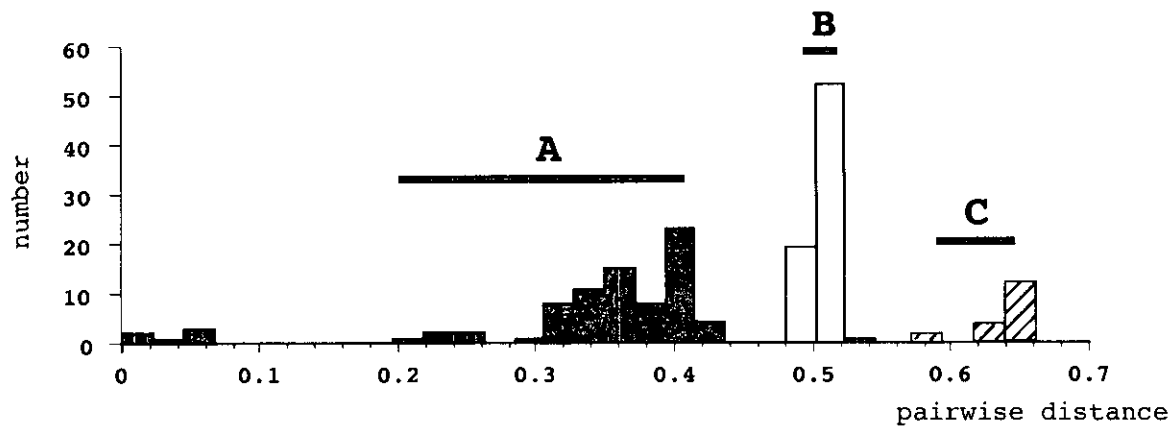
a) Full length



b) ORF1



c) ORF2



d) ORF3

