

収集期間  
2006年5月15日 - 2008年2月3日

全国19箇所の地研より  
糞便試料

\* 147検体



図1. 検体の収集地域と時期

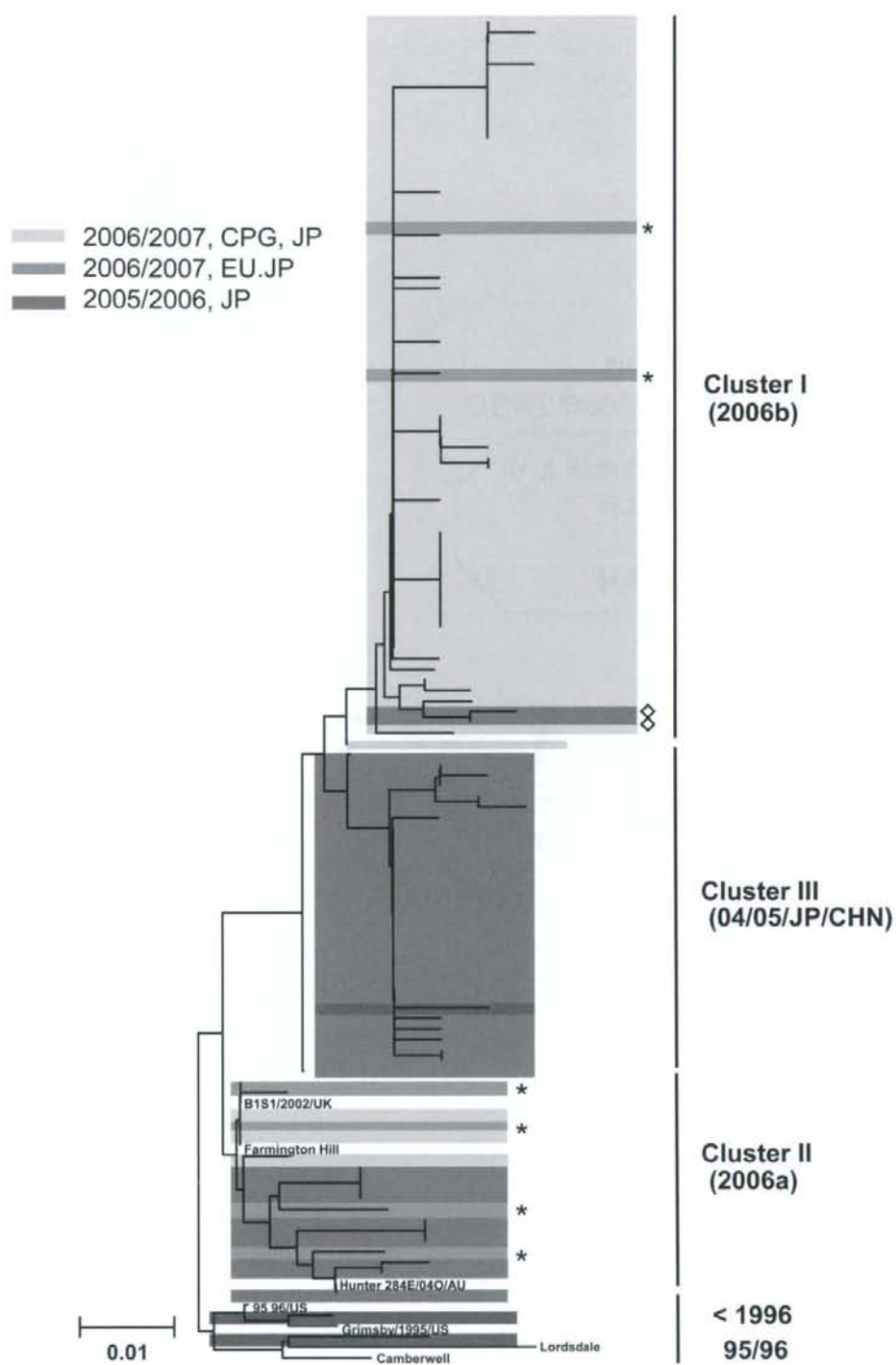


図2. VP1の分子進化系統樹解析(238 bps)

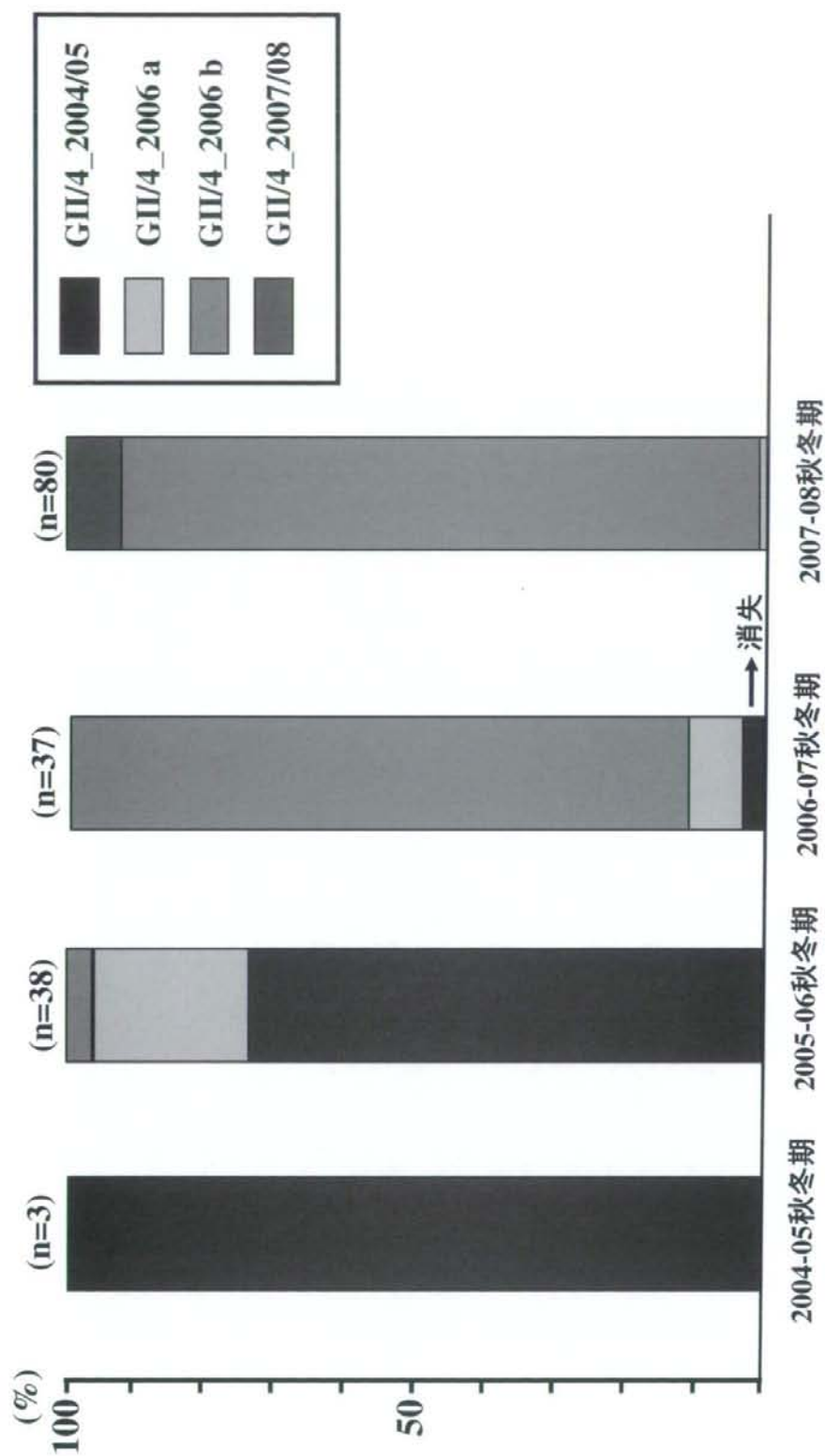


図3. 我が国におけるGI/4変異型の年次推移

2006-07年に流行したノロウイルスのキャプシド蛋白質分子モデル

研究分担者 横山 勝 国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター 研究員

研究要旨

ウイルス性食中毒・急性胃腸炎の原因ウイルスであるノロウイルスの流行株の変化の特徴を知るために、今年度は2006-2007年に流行したノロウイルス GII/4 キャプシド蛋白質 P ドメイン二量体の分子モデルを構築し、多様性解析と組み合わせで検討した。分子モデルと、これまでに決定された GII/4 単量体構造と比較すると、主鎖が大きく変化した部位は見られない。2006-2007年に流行したノロウイルス GII/4 キャプシド蛋白質の7つの特徴的な残基に、抗原性や感染受容体との結合様式を調節している可能性が示唆された。

A. 研究目的

ウイルス性食中毒・急性胃腸炎の原因ウイルスであるノロウイルスの、世界で流行する遺伝子型は GII/4 が主流である。ノロウイルスの世界的大流行は新型 GII/4 の出現と平行している。日本では2006-07年のシーズンに GII/4 が大流行した。このとき流行したノロウイルス GII/4 の多様性解析により、特に VP1 (キャプシド) に変異が蓄積されていた。キャプシドは感染受容体との相互作用を維持することが必要であるため、変化に規則性があると考えられる。

本研究は2006-7年に流行したノロウイルス GII/4 キャプシド蛋白質分子モデルを構築し、多様性解析と組み合わせることで、2006-7年に流行したノロウイルス GII/4 で特徴的な残基の役割を検討することを目的として行った。

B. 研究方法

(1) ノロウイルス GII/4 キャプシド蛋白質分子モデルの構築

ノロウイルス GII/4 キャプシド蛋白質分子モデルは、統合計算化学システム MOE (CCG社, カナダ) を用いて、ホモロジーモデリング法により構築した。ターゲット配列として Aichi3/2006/JP を、鋳型として GII/4 VA387 株のキャプシド蛋白質 P ドメイン構造 (PDB code: 2OBS) を用いて、キャプシド蛋白質 P ドメイン単量体を構築した。得られた立体構造を Norwalk virus キャプシド蛋白質多量体

構造 (PDB code: 1IHM) に重ね合わせることで、キャプシド蛋白質 P ドメイン二量体分子モデルを構築した。

(2) ノロウイルス GII/4 キャプシド蛋白質の多様性解析

Shannon の情報エントロピーを指標として、キャプシド全長のアミノ酸残基の多様性を解析した。得られたエントロピスコアをキャプシド蛋白質の分子モデルに表示した。

解析には、2006-2007年のシーズンに日本で流行し、国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターで取得したノロウイルス GII/4 のキャプシド全長のアミノ酸配列 (n = 37), および国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター以外で取得した配列 (n = 51) のキャプシド全長のアミノ酸配列を用いた。(2006-2007年のシーズンに日本, ヨーロッパ, 中国で流行したノロウイルス GII/4 のキャプシド全長のアミノ酸配列, 2006年以前に日本で流行したノロウイルス GII/4 のキャプシド全長のアミノ酸配列, 世界的大流行したノロウイルス GII/4; pre-1996, 1995-1996, 2002-2003, 2004-2005 を含む。)

C. 研究結果

(1) ノロウイルス GII/4 キャプシド蛋白質分子モデル

2006-2007年に流行したノロウイルス GII/4 キャプシド蛋白質 P ドメイン二量体の分子モデルを図1に示す。主鎖は過去に X 線

結晶構造解析法により決定された GII/4 単量体の構造とほぼ一致していた。P1 および P2 とともに主鎖が大きく変化した部位は見られない。

## (2) ノロウイルス GII/4 キャプシド蛋白質の多様性

多様性解析により得られたエントロピースコアをノロウイルス GII/4 キャプシド蛋白質 P ドメイン二量体の分子モデルに表示させた。(図 1) 分子モデルの主鎖が青で表される部位はアミノ酸がより保存されていることを示し、黄緑色で表されている部位はアミノ酸が保存されず、様々なアミノ酸がその部位を占有することを示す。P ドメインの中でも P2 ドメインの外側表面には、アミノ酸変異を許容する部位が多く、特に、ループのアミノ酸は GII/4 の中で保存されていないことがわかった。

## (3) 2006-07 年に流行したノロウイルス GII/4 キャプシド蛋白質で特徴的な残基

これまで流行したノロウイルス GII/4 では見られず、2006-2007 年に流行したノロウイルス GII/4 で保存されている残基を抽出すると、キャプシド蛋白質には 7 つの特徴的な残基 (L306, Y352, A356, P357, E372, H378, N412) が見出された。それらの残基の側鎖をスティックモデルで表示した。(図 1 および図 2) 7 つの特徴的な残基のうち 6 つ (Y352, A356, P357, E372, H378, N412) はキャプシド蛋白質二量体の外側表面に位置し、1 つ (L306) は側面に位置した。

キャプシド蛋白質の 7 つの特徴的な残基とノロウイルスのエントリーのための機能部位の位置を図 2 に示す。E372 と H378 はフコスの結合部位の近傍に位置する。L306 と H378 の側鎖は、レセプタとの相互作用に関与していると考えられている RGD モチーフの両端に近接した位置に配置されている。さらに、H378 の近傍には、RGD モチーフに類似している KGD モチーフも位置する。Y352, A356, P357, N412 は近傍に機能部位は見られないが、ほぼ一直線に配置されている。

## D. 考察

2006-2007 年に流行したノロウイルス

GII/4 キャプシド蛋白質の 7 つの特徴的な残基のうち L306 を除く 6 つはキャプシド蛋白質二量体の外側表面に位置していた。この外側表面のアミノ酸はより多様で GII/4 の中で保存されていない。ゆえに外側表面の特徴的な残基は、抗原性の変化に寄与している可能性が考えられる。

L306, E372, H378 の近傍にはフコスの結合部位やレセプタとの相互作用に関与する部位がある。これらの残基は感染受容体との相互作用に影響を与え、結合様式を調節している可能性が考えられる。

## E. 結論

2006-2007 年に流行したノロウイルス GII/4 キャプシド蛋白質分子モデルを構築し、多様性解析と組み合わせで検討した。2006-7 年に流行したノロウイルス GII/4 で特徴的な残基は、抗原性や感染受容体との結合様式を調節している可能性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) Motomura K, Oka T, Yokoyama M, Nakamura H, Mori H, Ode H, Hansman GS, Katayama K, Kanda T, Tanaka T, Takeda N, Sato H, the Norovirus Surveillance Group of Japan: Identification of Monomorphic and Divergent Haplotypes in 2006/2007 Norovirus GII/4 Epidemic Population by Genome-wide Tracing of Evolutionary History. *J. Virol.* 2008; 82: 11247-11262.

(2) Naganawa S, Yokoyama M, Shiino T, Suzuki T, Ishigatsubo Y, Ueda A, Shirai A, Takeno M, Hayakawa S, Sato S, Tochikubo O, Kiyoura S, Sawada K, Ikegami T, Kanda T, Kitamura K, Sato H: Net Positive Charge of HIV-1 CRF01\_AE V3 Sequence Regulates Viral Sensitivity to Humoral Immunity. *PLoS ONE* 2008; 3: e3206. (The first two authors contributed equally)

(3) Shirakawa K, Takaori-kondo A, Yokoyama M, Izumi T, Matsui M, Io K, Sato T, Sato H, Uchiyama T: Protein kinase A-mediated phosphorylation regulates the interaction

between APOBEC3G and HIV-1 Vif. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2008; 15: 1184-1191.

## 2. 学会発表

(1) Naganawa S, Yokoyama M, Kitamura K, Sato H. Net Positive Charge of HIV-1 CRF01\_AE V3 Sequence Regulates Viral Sensitivity to Humoral Immunity. Joint Meeting of the AIDS Panels US-Japan Cooperative Medical Science Program and NIID AIDS Research Center 20th Anniversary Symposium, Tokyo, Sep 12, 2008.

(2) Onyango C, Leligowicz A, Yokoyama M, Sato H, Song H, Nakayama E, Shioda T, Jaye A, Whittle H, Rowland-Jones S, Cotton M: HIV-2 Capsids Distinguishing High and Low Virus Load Patients in a West African Community Cohort. 11th Annual International Meeting of the Institute of Human Virology, September 11-13, 2008, Baltimore, Maryland, USA

(3) Oka T, Yokoyama M, Katayama K, Yamamoto M, Miyashita M, Ogawa S, Motomura K, Tsunemitsu H, Wakita T, Sato H, Takeda N: Substrate specificities of calicivirus-encoded 3C-like proteases. The Forum of the Network of Research Centers on Infectious Diseases Conference, Hall, National Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE) Hanoi, Vietnam, October 6, 2008

(4) Onyango C, Leligowicz A, Yokoyama M, Sato H, Song H, Nakayama E, Shioda T, Jaye A, Whittle H, Rowland-Jones S, Cotton M: HIV-2 Capsids Distinguishing High and Low Virus Load Patients in a West African Community Cohort. The 15th International Conference on AIDS and STIs in Africa. December 03-07, 2008, Dakar, Senegal

(5) 横山勝, 岡智一郎, 片山和彦, 山本真民, 宮下佳奈, 神田忠仁, 武田直和, 佐藤裕徳「サポウイルスプロテアーゼの基質認識に関わるアミノ酸残基の解析」第56回日本ウイルス学会学術集会, 岡山コンベンションセンター, 2008年10月,

(6) 岡智一郎, 横山勝, 片山和彦, 恒光裕, 山本真民, 宮下佳奈, 本村和嗣, 守宏美, 中村浩美, 脇田隆宇, 佐藤裕徳, 武田直和「カリシウイルスプロテアーゼの基質認識に影響する切断部位上流アミノ酸残基の解析」第56回日本ウイルス学会学術集会, 岡山コンベンションセンター, 2008年10月.

(7) 本村和嗣, 横山勝, 岡智一郎, 中村浩美, 守宏美, Hansmann GRANT, 片山和彦, 田中智之, 真崎宏則, 蔭本恭, 神田忠仁, 武田直和, 佐藤裕徳「ノロウイルスの免疫淘汰と周期的流行の分子機序」第56回日本ウイルス学会学術集会, 岡山コンベンションセンター, 2008年10月.

(8) 横山勝, 佐藤裕徳「相互情報量解析による HIV-1 CRF01\_AE V3 領域アミノ酸残基の共変異部位の同定」第22回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪国際交流センター, 2008年11月.

(9) 横山勝, 白川康太郎, 高折晃史, 佐藤裕徳「分子モデリングによるリン酸化 APOBEC3G の構造解析」第22回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪国際交流センター, 2008年11月.

(10) 岡智一郎, 横山勝, 片山和彦, 恒光裕, 山本真民, 宮下佳奈, 本村和嗣, 脇田隆宇, 佐藤裕徳, 武田直和「カリシウイルスプロテアーゼの活性発現に重要なアミノ酸残基の解析」第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008), 神戸ポートアイランド, 2008年12月.

(11) 横山勝, 岡智一郎, 片山和彦, 神田忠仁, 武田直和, 佐藤裕徳「カリシウイルスプロテアーゼ分子モデルによる基質認識の解析」第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008), 神戸ポートアイランド, 2008年12月.

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし.

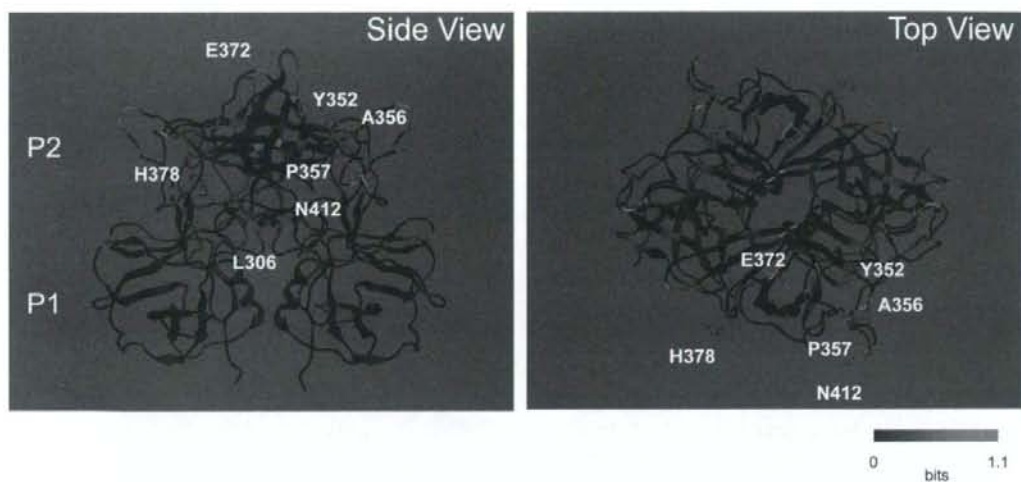


Figure 1 Structural model of the VP1 P domain dimer of the NoV GII/4 2006b strain. The model was constructed by homology modeling using the X-ray crystal structure of the P domain dimer of the 1995-1996 epidemic GII/4 strain. Shannon entropy scores expressed on the P domain model.

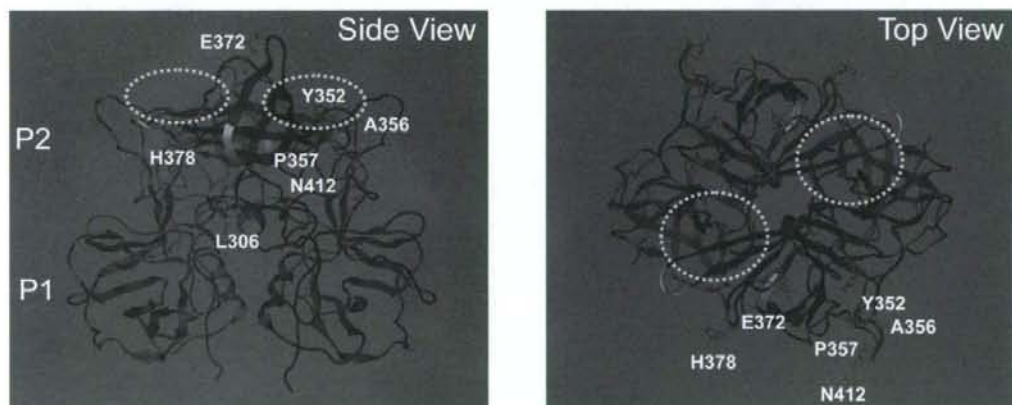


Figure 2. Side and top views of the P domain model. Reported functional sites for virus entry into the cells are highlighted. Yellow dot circles, the fucose ring binding sites formed by P-domain dimer (4); cyan chain, an RGD motif (48) on the  $\beta$  2 sheet of the P domain; orange chain indicates an additional RGD-like motif, KGD (46), on the tip of the  $\beta$  4-  $\beta$  5 loop of the P domain. Red sticks indicate side chains of amino acids unique to the 2006b strains.

E型肝炎ウイルスの安定性の検討

分担研究者 李天成（国立感染症研究所ウイルス第二部）

**研究要旨** 細胞培養系はウイルスの複製、増殖、感染のメカニズムの解明には欠かせない手法である。昨年度、我々はブタから分離した遺伝子型 3(G3)に属する HEV 株を PLC/PRF/5 細胞に接種し、HEV の増殖できるウイルス株を確立した。本年度、この培養系を用いて HEV の熱に対する安定性、消毒剤や、紫外線などに対する抵抗性を検討し、ウイルスを不活かにする条件を検討した。

協力研究者

劉 蘭軍(国立感染症研究所)

恒光 裕(動物衛生研究所)

A. 研究目的

E型肝炎ウイルス (Hepatitis E virus; HEV)はE型肝炎の原因ウイルスである。現在、少なくとも四つの遺伝子型が知られている。E型肝炎の一つの特徴は感染妊婦の死亡率が高いことで、実に20%に達するという報告もある。これまで先進国においてE型肝炎は輸入感染症と思われてきたが、近年、まったく海外渡航歴のない急性E型肝炎患者が発見されるなど、日本でもすでに土着しているウイルスであることが明らかになってきた。HEVが増殖できる培養細胞系は確立されておらず、ウイルス増殖、複製機序は未だに明らかではない。また、ワクチン開発のための基盤的情報が不足しているため、HEVによる食中毒対策が困難な状況にある。今回我々はブタから分離した遺伝子型3(G3) HEVをヒト肝癌細胞 PLC/PRF/5 に接種し、経時的に培養上清中の HEV RNA, HEV 抗原を RT-PCR, ELISA 法にて確認し、培養可能な系を樹立した。この培養系を用いて HEV の熱に対する安定性、消毒剤や、紫外線などに対する抵抗性を検討し、ウイルス不活化条件

を検討した。

B. 研究方法

- 1) 熱安定性: 培養細胞で増殖した G3 HEV を異なる温度 (37℃-100℃)、異なる時間 (1分間から1時間まで) 熱処理したあと、PLC/PRF/5 細胞に接種し、培養上清を三、四日置きに採取した。細胞培養上清のウイルス抗原、およびウイルス遺伝子を測定し、ウイルスが増殖するかどうかによって感染性を評価した。
- 2) 消毒剤に対する抵抗性: 培養細胞にて増殖した G3 HEV を異なる濃度の NaClO (62.5ppm-1000ppm) と混合して室温 30 分間反応させたあと、PLC/PRF/5 細胞に接種し、培養上清を三、四日置きに採取した。細胞培養上清のウイルス抗原、およびウイルス遺伝子を測定し、ウイルスが増殖するかどうかによって感染性を評価した。
- 3) 紫外線に対する抵抗性: 培養細胞にて増殖した G3 HEV をそれぞれ 10, 20, 30, 60, 120 分間 50uw 強度の紫外線照射したあと、PLC/PRF/5 細胞に接種し、培養上清を三、四日置きに採取した。細胞培養上清のウイルス抗原、およびウイルス遺伝子を測定し、ウイルスが増殖するかどうかによって感染性を評価した。



### C. 研究結果

G3 HEV を 60°C10 分間、65°C5 分間以上の熱処理、あるいは 50uw 強度で 30 分間紫外線照射により、PLC/PRF/5 細胞に対する感染性が消失し、これらの条件で HEV を不活かす可能性が示唆された。また、HEV は消毒剤 NaClO に対して一定の抵抗性を示したが、ウイルス増殖速度が遅くなり、感染力低下も観察された。

### D. 考察

HEV が増殖可能な培養細胞の樹立によって、HEV の不活化条件、消毒薬の評価を *in vitro* で容易に検討することが可能になった。加熱によりウイルスを不活化できる根拠を見いだしたことから、今後の HEV による食中毒対策に有力な科学根拠を提供できるものと思われる。消毒剤に関して使用最適な濃度をさらに検討する必要がある。

### F. 研究発表

#### 1. 学会発表

1. Li T-C, Miyamura T, Wakita T, Takeda N: Characterization of recombinant virus-like particles of genotype 3 hepatitis E viruses. The 7th Japan-China International Conference of Virology. Tokyo. Jun1-3, 2008.
2. Li TC, Liu LJ, Suzuki T, Tsunemitsu H, Kataoka M, Ngata N, Takeda N, Wakita T, Miyamura T. Efficient production of type 2 porcine circovirus-like particles by a recombinant baculovirus. XIV international Congress of Virology. Turkey. Istanbul, 10-15 August 2008.
3. 山下哲生, 宮崎 直幸, 森 嘉生, 森石恆司, 李 天成, 宮村達男, 武田直和, 月原富武, 吉村政人, 松浦善治: 分析能 3.5A の E 型肝炎ウイルス様粒子の結晶化と X 線結晶構造解析. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会, 岡

山, 2008. 10. 26-28.

4. 森 嘉生, 山下哲生, 嶋 亮一, 森石恆司, 李 天成, 武田直和, 松浦善治: E 型肝炎ウイルス様粒子の形成に重要なアミノ酸の同定と細胞吸着阻害モノクローナル抗体の作製. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会, 岡山, 2008. 10. 26-28.
5. 李 天成, 恒光 裕, 宮村達男, 脇田 隆宇, 武田直和: 培養細胞における E 型肝炎ウイルス(HEV)の増殖. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会, 岡山, 2008. 10. 26-28.

#### 2. 論文発表

- (1) Wang CY, Miyazaki N, Yamashita T, Higashiura A, Nakagawa A, T-C Li, Takeda N, Xing L, Hjalmarrsson E, Friberg C, Liou DM, Sung YJ, Tsukihara T, Matsuura Y, Miyamura T, Cheng RH. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of recombinant hepatitis E virus-like particle. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 2008 Apr 1;64(Pt 4):318-22. Epub 2008 Mar 29.
- (2) Yamamoto H, Li TC, Koshimoto C, Ito K, Kita M, Miyashita N, Arikawa J, Yagami K, Asano M, Tezuka H, Suzuki N, Kurosawa T, Shibahara T, Furuya M, Mohri S, Sato H, Ohsawa K, Ibuki K, Takeda N. Serological evidence for hepatitis e virus infection in laboratory monkeys and pigs in animal facilities in Japan. *Exp Anim.* 2008 Jul;57(4):367-76.
- (3) GRANT S. HANSMAN, TOMOICHIRO OKA, T-C Li, OSAMU NISHIO, MAMORU NODA, AND NAOKAZU TAKEDA. Detection of Human Enteric Viruses in Japanese Clams. *Journal of Food Protection.* 2008 Aug; 71(8): 1689-95.
- (4) T-C Li, Yuriko Suzuki, Yasushi Ami, Hiroshi

Tsunemitsu Tatsuo Miyamura, and Naokazu Takeda. Mice are not susceptible to hepatitis E virus infection *The Journal of Veterinary Medical Science*. 2008. Dec;70(12):1359-62.

- (5) Liu LJ, Suzuki T, Tsunemitsu H, Kataoka M, Ngata N, Takeda N, Wakita T, Miyamura T, Li TC. Efficient production of type 2 porcine circovirus-like particles by a recombinant baculovirus. *Arch Virol*. Nov 9, 2008.
- (6) Sugitani M, Tamura A, Shimizu YK, Sheikh A, Kinukawa N, Shimizu K, Moriyama M, Komiyama K, Li TC, Takeda N, Arakawa Y, Suzuki K, Ishaque SM, Roy PK, Raihan A, Hasan M. Detection of hepatitis E virus RNA and genotype in Bangladesh. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008 Dec 1.

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請:なし
2. 実用新案登録:なし
3. その他:なし

## サポウイルスの糞便中排泄期間および遺伝子変異の解析

分担研究者 岡 智一郎 国立感染症研究所 ウイルス第2部

研究協力者

岩切章、山本正悟 宮崎県衛生環境研究所

### 研究要旨

サポウイルス(SaV)はヒトに急性胃腸炎を引き起こす。本研究では SaV 集団感染事患者糞便中の SaV 遺伝子の定量的解析および変異解析を行い、SaV 遺伝子が発症後数日から約2週間、長い例では約1ヶ月間にわたって検出されることを明らかにした。さらに、約1ヶ月間にわたって SaV が体内に存在した場合、SaV 構造タンパク質コード領域にアミノ酸変異を伴う遺伝子変異が生じることも見いだした。

### A. 研究目的

サポウイルス(SaV)はカリシウイルス科に属する小型の球形ウイルスで、ヒトに急性胃腸炎を引き起こす。SaVのゲノムは約7,500塩基からなるプラス1本鎖のRNAで、構造遺伝子領域の塩基配列に基づき SaV は5つの genogroup (GI-GV)に分類される。ヒト由来の SaV 株は細胞培養系や実験動物系が確立されていないため、SaV の検出には nested reverse transcription polymerase chain reaction (nested RT-PCR)法が主に用いられている。最近、我々はヒト由来 SaV 検出のための real-time RT-PCR 法を構築した。SaV を原因とする散发性感染性胃腸炎事例の報告は増加傾向にある。また、最近では、乳幼児だけでなく大人を含む SaV 集団感染事例も

存在することが明らかとなってきた。しかし、急性胃腸炎発症後の糞便中 SaV 量については報告がない。本研究では、急性胃腸炎発症後の糞便中 SaV 量の推移、排泄期間、およびウイルス変異の有無を検討する目的で、SaV 集団感染事例の患者糞便中の SaV 遺伝子の経時的な定量、定性解析および遺伝子解析を行った。

### B. 研究方法

#### 1. 糞便材料

2002年5月に宮崎県内の障害者更生関連施設で発生した SaV 集団感染事例(事例1)のうち経時的な追跡調査が可能であった11名(12歳~20歳の入所者)と、2002年5月に宮崎県内の小学校で発生した SaV 集団感染事例(事例2)

のうち、経時的な追跡調査が可能であった6名(生徒4名、教員2名)の糞便について解析した(表1)。

## 2. 糞便からのウイルス核酸の抽出、cDNA の合成

10% 糞便乳剤 140 $\mu$ l から Viral RNA mini Kit (QIAGEN)を用いて、ウイルス RNA を抽出した。その後、DNase I 処理を行い、Superscript III と random hexamer もしくは Tx30SXN primer (Ishida et al., Jpn J Infect Dis. 61: 504-506., 2008)を用いて cDNA を合成し、以下の PCR 反応の鑄型とした。

## 3. ウイルス核酸の検出

SaV 核酸の検出には岡田らが確立した nested RT-PCR 法 (Okada et al., Arch. Virol. 151 :2503-2509., 2006)、および我々が構築した real-time RT-PCR 法 (Oka et al., J.Med.Virol. 78:1347-1353., 2006)を用いた。

## 4. ウイルスの遺伝子解析

上記3.の real-time RT-PCR 法によって SaV 核酸が2点以上陽性となったもの(検出限界は糞便 1g あたり  $1.29 \times 10^5$  copies)について遺伝子変異の有無を検討するため、SV-F13、-F14 primer (Okada et al., Arch. Virol. 151 :2503-2509., 2006)と Tx30SXN primer による 1st PCR を行い、その後さらに SV-F11 primer (Okada et al., Arch. Virol. 147 :1445-1451., 2002) と Tx30SXN primer による 2nd PCR を行い、SaV ゲノムの 3' 側約 2.3kb を増幅した。PCR には正確度の高い KOD-Plus DNA Polymerase (Toyobo)を用いた。

得られた増幅産物を 1%アガロース電気泳動し、QIAGEN Gel Extraction Kit で精製後、ダイレクトシーケンスを行った。

## C. 研究結果

Real-time RT-PCR 法によって2点以上、SaV 核酸が陽性となった患者は事例1で3名 (1-1、1-2、1-3)、事例2で1名 (2-1)であった。これら4名の患者の発症後の日数と糞便 1g あたりの SaV 遺伝子のコピー数は、1-1 が3日後に  $2.23 \times 10^9$  copies、11 日後に  $2.32 \times 10^5$  copies、1-2 が15 日後に  $2.24 \times 10^7$  copies、25 後日に  $7.94 \times 10^5$  copies、30 日後に検出限界以下、1-3 が6日後に  $2.87 \times 10^8$  copies、14 日後に  $2.66 \times 10^6$  copies、28 日後に  $2.38 \times 10^5$  copies、31 日後に検出限界以下、2-1 が3 日後に  $8.25 \times 10^9$  copies、12 日後に  $4.43 \times 10^6$  copies、26 日後に検出限界以下であった(表1)。また、real-time RT-PCR 法と nested RT-PCR 法の検出結果はほぼ一致した(表1)。SaV ゲノムの 3' 側約 2.3kb の遺伝子解析を行ったところ、1-1 と 2-1 では遺伝子変異は認められなかったが、1-2 では25日目に、1-3 では28日目に構造タンパク質コード領域内にアミノ酸変異を伴う遺伝子変異が同定された(1-2: G<sup>613</sup> TC (Val<sup>205</sup>) $\rightarrow$ G<sup>613</sup> TC (Val<sup>205</sup>) / A<sup>613</sup> TC (Ile<sup>205</sup>)の mix、GAG<sup>699</sup>(Glu<sup>233</sup>) $\rightarrow$ GAC<sup>699</sup> (Asp<sup>233</sup>)、1-3: AAT<sup>894</sup> (Asn<sup>298</sup>) $\rightarrow$ AAA<sup>894</sup> (Lys<sup>298</sup>)(表1)。なお、構造遺伝子領域の塩基配列に基づき genogrouping を行った結果、事例1、事例2で検出された SaV は GI の異なる cluster に属する株であることが示された(図1)。

## D. 考察

本研究により、急性感染性胃腸炎患者糞便中において SaV 遺伝子は発症後、経時的な減少が認められたものの、数日から約2週間、長い例では約1ヶ月間にわたって real-time RT-PCR 法および nested RT-PCR で検出可能なレベルの SaV 遺伝子が糞便中に排泄されていることが示された。さらに、本研究では長期間 SaV 排泄が続いた場合、SaV 遺伝子の変異が起こることが明らかとなった。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) 吉田徹也、粕尾しず子、畔上由佳、宮澤衣鶴、小林正人、白石 崇、岡 智一郎、片山和彦、武田直和

長野県内で発生したサポウイルスによる集団感染性胃腸炎の2事例

IASR Vol. 29 p. 129-132: 2008年5月号

(2) 大塚有加、近藤玲子、市川高子、山下育孝、大瀬戸光明、関谷安正、上田哲郎、芝 信明、岡智一郎、片山和彦、武田直和

結婚式場におけるサポウイルスを原因とする食中毒事例-愛媛県

IASR Vol. 29 p. 198-200: 2008年7月号

(3) Hansman GS, Oka T, Li TC, Nishio O, Noda M, Takeda N.

Detection of human enteric viruses in Japanese

clams.

J. Food. Prot. 71 (8): 1689-1695., 2008.

(4). Motomura K, Oka T, Yokoyama M, Nakamura H, Mori H, Ode H, Hansman GS, Katayama K, Kanda T, Tanaka T, Takeda N, Sato H; and the Norovirus Surveillance Group of Japan.

J Virol. 82(22): 11247-11262., 2008.

(5). Wu FT, Oka T, Takeda N, Katayama K, Hansman GS, Muo CH, Liang SY, Hung CH, Dah-Shyong Jiang D, Hsin Chang J, Yang JY, Wu HS, Yang CF.

Acute gastroenteritis caused by GI/2 sapovirus, Taiwan, 2007.

Emerg Infect Dis 14 (7): 1169-1171., 2008.

(6) Hansman GS, Oka T, Takeda N. Sapovirus-like particles derived from polyprotein.

Virus Res. 137 (2): 261-265., 2008.

(7) Ishida S, Yoshizumi S, Miyoshi M, Ikeda T, Okui T, Katayama K, Takeda N, Oka T.

Characterization of sapoviruses detected in Hokkaido, Japan.

Jpn J Infect Dis. 62 (6): 504-506., 2008.

(8) Oka T, Yamamoto M, Miyashita K, Ogawa S, Katayama K, Wakita T, Takeda N.

Self-assembly of sapovirus recombinant virus-like particles from polyprotein in

mammalian cells.

Microbiol Immunol 53 (1): 49-52., 2009

(9) Nakagawa-Okamoto R, Arita-Nishida-T, Toda S, Kato H, Iwata H, Akiyama M, Nishio O, Kimura H, Noda M, Takeda N, Oka T.

Detection of multiple sapovirus genotypes and genogroups in oyster-associated outbreaks.

Jpn J Infect Dis. 62 (1): 63-66., 2009.

(10) Harada S, Okada M, Yahiro S, Nishimura K, Matsuo S, Miyasaka J, Nakashima R, Shimada Y, Ueno T, Ikezawa S, Shinozaki K, Katayama K, Wakita T, Takeda N, Oka T.

Surveillance of pathogens in outpatients with gastroenteritis and characterization of sapovirus strains between 2002 and 2007 in Kumamoto Prefecture, Japan.

J Med Virol. *In Press*.

#### 学会発表

(1) Oka T, Iwakiri A, Yamamoto S, Katayama K, Wakita T, and Takeda N.

Sequential analysis of fecal sapovirus shedding  
第14回国際ウイルス学会、トルコ、2008年8月  
10-15日.

(2) Oka T, Yamamoto M, Miyashita K, Katayama K, Wakita T, and Takeda N.

Role of amino acid residues located upstream from cleavage site on sapovirus

ORF1 polyprotein processing

第14回国際ウイルス学会、トルコ、2008年8月

10-15日.

(21) 原田誠也、八尋俊輔、西村浩一、松尾繁、岡田峰幸、岡智一郎、武田直和

PCR法による集団及び散発下痢症事例の起因ウイルス調査

公衆衛生獣医師協議会、東京、2008年9月5日

(3) Oka T, Yokoyama M, Katayama K, Yamamoto M, Miyashita K, Ogawa S, Motomura K, Tsunemitsu H, Wakita T, Sato H, and Takeda N.

Substrate specificities of calicivirus-encoded 3C-like proteases

The Forum of the Network of Research Centers on Infectious Diseases、ベトナム、2008年10月6日

(4) 岡智一郎

「第14回国際ウイルス学会の報告」

ウイルス性下痢症研究会第20回学術集会、岡山、2008年10月25日

(5) 小澤一弘、岡智一郎、片山和彦、本村和嗣、中村浩美、守宏美、佐藤裕徳、武田直和

「調理従事者を対象としたノロウイルスの網羅的検出調査」

第56回日本ウイルス学会、岡山、2008年10月26-28日.

(6) 北島正章、岡智一郎、片山和彦、原本英司、片山浩之、武田直和、大垣真一郎

河川中のノロウイルスを指標にした地域流行株の把握

第56回日本ウイルス学会、岡山、2008年10月26-28日。

(7) 本村和嗣、横山勝、岡智一郎、中村浩美、守宏美、Hansman Grant、片山和彦、田中智之、真崎宏則、星野和彦、蒔本恭、秋山美穂、木村博一、神田忠仁、武田直和、佐藤裕徳

「ノロウイルスの免疫淘汰と周期的流行の分子機序」

第56回日本ウイルス学会、岡山、2008年10月26-28日。

(8) 吉田徹也、粕尾しず子、畔上由佳、内山友里恵、薩摩林一代、白石崇、岡智一郎、片山和彦、武田直和

「長野県内で発生したサポウイルスによる集団感染性胃腸炎の2事例」

第56回日本ウイルス学会、岡山、2008年10月26-28日。

(9) 原田誠也、岡田峰幸、岡智一郎、八尋俊輔、西村浩一、松尾繁、中島龍一、篠崎邦子、片山和彦、武田直和

「サポウイルスによる散発性下痢症の地域流行-熊本-」

第56回日本ウイルス学会、岡山、2008年10月26-28日。

(10) 植木洋、庄司美加、山本美和子、阿部勝彦、伊藤文明、池田義文、西尾治、岡智一郎、片山和彦、武田直和、野田衛

「カキを用いたサポウイルスの環境調査」

第56回日本ウイルス学会、岡山、2008年10月26-28日。

(11) 飯塚節子、岡智一郎、片山和彦、武田直和、野田衛

「サポウイルスとノロウイルスが検出された食中毒事例」

第56回日本ウイルス学会、岡山、2008年10月26-28日。

(12) 岩切章、山本正悟、岡智一郎、片山和彦、武田直和

「リアルタイムRT-PCR法を用いた急性胃腸炎患者糞便中のサポウイルス排泄期間の解析」

第56回日本ウイルス学会、岡山、2008年10月26-28日。

(13) 高木弘隆、遠矢幸伸、片山和彦、岡智一郎、武田直和、杉山和良

国内で分離されたマウスノロウイルスの安定性および消毒剤に対する感受性の検討

第56回日本ウイルス学会、岡山、2008年10月26-28日。

(14) 片山和彦、岡智一郎、脇田隆字、武田直和

リバーシジェネティクスを利用したノロウイルスの病原性発現機構の解析

第56回日本ウイルス学会、岡山、2008年10月26-28日。

(15) 岡智一郎、横山勝、片山和彦、恒光

裕、山本 真民、宮下 佳奈、本村 和嗣、守宏美、中村浩美、脇田隆字、佐藤裕徳、武田直和  
「カリシウイルスプロテアーゼの基質認識に影響する切断部位上流アミノ酸残基の解析」  
第56回日本ウイルス学会、岡山、2008年10月26-28日。

(16) 横山勝、岡智一郎、片山和彦、山本真民、宮下佳奈、神田忠仁、武田直和、佐藤裕徳  
「サポウイルスプロテアーゼの基質認識に関わるアミノ酸残基の解析」  
第56回日本ウイルス学会、岡山、2008年10月26-28日。

(17) 岡 智一郎、横山 勝、片山 和彦、恒光裕、山本 真民、宮下 佳奈、本村和嗣、脇田隆字、佐藤 裕徳、武田 直和  
「カリシウイルスプロテアーゼの活性発現に重要なアミノ酸残基の解析」  
第81回日本生化学会大会・第31回日本分子生物学会年会合同大会神戸、2008年12月9-12日

(18) 横山 勝、岡 智一郎、片山 和彦、神田忠仁、武田 直和、佐藤 裕徳  
「カリシウイルスプロテアーゼ分子モデルによる基質認識の解析」  
第81回日本生化学会大会・第31回日本分子生物学会年会合同大会、神戸、2008年12月9-12日

(19) 片山和彦、岡智一郎、脇田隆字、武田直和

「ノロウイルスプロテアーゼを利用したノロウイルスリバースジェネティクスシステムの制御」  
第81回日本生化学会大会・第31回日本分子生物学会年会合同大会、神戸、2008年12月9-12日

(20) 村上耕介、鈴木さやか、岡島徹也、灘野大太、岡 智一郎、片山和彦、武田直和、松田 幹  
「ノロウイルス・ウイルス様粒子(VLPs)のヒト腸上皮様 Caco-2 細胞への結合様式とウシ初乳のVLPs 結合抑制効果」  
第81回日本生化学会大会・第31回日本分子生物学会年会合同大会、神戸、2008年12月9-12日

(21) 原田誠也、八尋俊輔、西村浩一、松尾繁、岡田峰幸、岡智一郎、武田直和  
PCR 法による集団及び散发下痢症事例の起因ウイルス調査  
日本獣医学会学会年次大会(日本産業動物獣医学会、日本小動物獣医学会医及び日本公衆衛生学会合同年次大会)、岩手、2009年1月22-24日

## H. 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。



表1 サボウイルス解析結果

検体	性別	年齢	Symptoms at onset of illness					発症後経過 日	Real-time RT-PCR (copies/g stool)	nested RT-PCR		Accession No.	横道タンパク質コード領域内 部の遺伝子変異箇所	
			下痢	嘔吐	吐き気	腹痛	発熱 <sup>a</sup>			1st	2nd			
事例1														
1-1	M	14	+	+			3	2.23×10 <sup>5</sup>	+	+	AB455796	613 G/A, 699 G to C		
							11	2.32×10 <sup>5</sup>	-	+	AB455797			
1-2	M	12				+	+	15	2.24×10 <sup>5</sup>	+	+		AB455798	
								25	7.94×10 <sup>5</sup>	-	+		AB455799	
								30	-	-	-		-	
1-3	M	15	+	+			+	6	2.87×10 <sup>8</sup>	+	+		AB455800	894 T to A
								14	2.66×10 <sup>8</sup>	-	+		AB455801	
								28	2.38×10 <sup>5</sup>	-	+		AB455802	
								31	-	-	-		-	
1-4	M	15	+				7	3.95×10 <sup>5</sup>	-	-	-			
							22	-	-	-	-			
1-5	M	18	+		+	+	4	2.88×10 <sup>5</sup>	-	+	-			
							21	-	-	-	-			
1-6	M	16	+				2	5.62×10 <sup>5</sup>	+	+	-			
							14	-	-	-	-			
1-7	F	19	+			+	1	9.49×10 <sup>7</sup>	+	+	-			
							16	-	-	-	-			
1-8	M	16	+	+			5	5.77×10 <sup>8</sup>	+	+	-			
							20	-	-	-	-			
1-9	F	20	+			+	5	1.18×10 <sup>8</sup>	+	+	-			
							28	-	-	-	-			
1-10	M	13	+				3	1.02×10 <sup>8</sup>	+	+	-			
							25	-	-	-	-			
1-11	F	16	+				3	1.91×10 <sup>5</sup>	-	-	-			
							31	-	-	-	-			
事例2														
2-1	M	10	+	+			3	8.25×10 <sup>9</sup>	+	+	AB455803			
							12	4.43×10 <sup>9</sup>	-	+	AB455804			
							26	-	-	-	-			
							33	-	-	-	-			
2-2	M	10		+			2	1.32×10 <sup>9</sup>	+	+	-			
							19	-	-	+	-			
							26	-	-	-	-			
2-3	M	34	+				4	1.32×10 <sup>7</sup>	-	-	-			
							9	-	-	-	-			
2-4	F	26	+				5	3.84×10 <sup>7</sup>	-	+	-			
							10	-	-	-	-			
2-5	M	11				+	10	5.31×10 <sup>7</sup>	+	+	-			
							21	-	-	-	-			
							28	-	-	-	-			
2-6	M	12	+				14	9.38×10 <sup>5</sup>	-	+	-			
							28	-	-	-	-			

a: 37.0℃以上

厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)

「食品中のウイルスの制御に関する研究」

分担研究報告書

## 小児科外来急性胃腸炎患者糞便中の病原因子の解析

分担研究者 岡 智一郎 国立感染症研究所 ウイルス第2部

### 研究協力者

原田 誠也、八尋 俊輔、西村 浩一、松尾 繁 熊本県保健環境科学研究所

岡田 峰幸、篠崎 邦子

千葉県衛生研究所

島田 康

しまだ小児科

上野 剛彦

上野小児科医院

池澤 滋

いけざわこどもクリニック

### 研究要旨

2002年6月～2007年12月の間に熊本県内の小児科を急性胃腸炎症状で外来受診した患者糞便中のノロウイルス、アデノウイルス、ロタウイルス、サポウイルス、アストロウイルス、アイチウイルス、エンテロウイルス、胃腸炎原因細菌を検出し、ノロウイルスが主要な原因ウイルスであったこと、2005年以降はサポウイルスがノロウイルスについて2番目に多く検出されたこと、特に2007年にはサポウイルスの地域的流行があったことを明らかにした。

#### A. 研究目的

下痢症起因ウイルスには、ノロウイルス(NoV)をはじめ、アデノウイルス(AdV)、ロタウイルス(RoV)、サポウイルス(SaV)、アストロウイルス(AstV)、アイチウイルスが属するコブウイルス(KV)、エンテロウイルス(EntV)などがある。NoVは国内のほとんどの地方衛生研究所で検査が行われ、AdVとRoVは簡易検査キットが市販されている。一方、SaV、AstV、KV及びEntV

については一般的には検出されておらず、その発生動向については不明な点が多い。また、従来の調査は集団感染事例の病原因子の同定が主であり、外来患者における下痢症起因病原因子の同定はほとんど行われていない。そこで、本研究では急性胃腸炎症状で熊本県内の小児科医院を受診した外来患者糞便中の病原因子の調査を行った。

## B. 研究方法

### 1. 糞便材料

検査材料:2002年6月~2007年12月に熊本県内の3つの小児科のいずれかを急性胃腸炎症状を訴えて受診した患者の糞便、639検体を検査対象とした。

### 3. 細菌およびウイルスの検出

胃腸炎原因の細菌検査は一般的な培養法により行った。ウイルスRNAの抽出とcDNA作製は厚生労働省通知のNoV検査法に準じた。なお、AdVの検出にはDNaseI処理をしないRNA抽出液を用いた。NoVはリアルタイムRT-PCR法(Kageyama et al., J. Clin. Microbiol. 41: 1548-1557., 2003)で検出した。SaVはSR80/JV33プライマー(Vinje et al., J. Clin. Microbiol. 38: 530-536., 2000)、AstVはMon269/Mon270プライマー(Noel et al., J. Clin. Microbiol. 33: 797-801., 1995)、KVはC6261/C6779プライマー(Yamashita et al., J. Clin. Microbiol. 38: 2955-2961., 2000)、EntVはEvP4/OL68-1プライマー(Olive et al., J. Gen. Virol. 71: 2141-2147., 1990, Ishiko et al., J. Infect. Dis. 185: 744-754., 2002)を用いたマルチプレックスRT-PCR法で検出した。また、AdV、group A RoV及びgroup C RoVは、マルチプレックスRT-PCR法(Yan et al., Kansenshogaku Zasshi. 78: 699-709., 2004)にて検出した。なお、SaVについては、ポリメラーゼ/キャプシドジャンクション領域をターゲットとするSaV124F、SaV1F、SaV5F、SaV1245Rプライマー(Oka et al., J. Med. Virol. 78:1347-1353., 2006)を用いたRT-PCRも用いた。マルチプレックスRT-PCR法

もしくはRT-PCR法でSaV陽性となった検体は、別途SaVのキャプシド領域をターゲットとするuniversal nested RT-PCR、genogrouping RT-PCR(Okada et al., Arch. Virol. 151:2503-2509., 2006)、リアルタイムRT-PCR(Oka et al., J. Med. Virol. 78:1347-1353., 2006)を行い、検出率の比較を行った。

### 4. サポウイルスの遺伝子解析

Universal nested RT-PCRもしくはgenogrouping RT-PCR(Okada et al., Arch. Virol. 151:2503-2509., 2006)によって増幅した産物を、QIAquick Gel Extraction Kit(QIAGEN社)を用いて精製したのち、増幅産物のダイレクトシーケンスを行い、系統樹解析によりgenogroupの決定を行った。

## C. 研究結果

急性胃腸炎症状で小児科を受診した患者の糞便687検体中421検体(65.9%)から病原因子が検出された。内訳はNoVが260検体(61.8%)、このうちNoV G Iが20検体(4.8%)、NoV G IIが240検体(57.0%)、SaVが81検体(19.2%)、AstVが9検体(2.1%)、KVが1検体(0.2%)、group A RoVが48検体(11.4%)、group C RoVが1検体(0.2%)、AdVが19検体(4.5%)、EntVが13検体(3.1%)、胃腸炎原因細菌が11検体(2.6%)(*Campylobacter* 8検体、*Salmonella* 1検体、*enteroaggregative E. coli* 2検体)であった(表1)。このうち22検体(5.2%)は複数のウイルスの混合感染であった(表2)。

SaVの検出率はmultiplex RT-PCRが27.2%、RT-PCRが100%、universal nested RT-PCRが

95.1%、genogrouping RT-PCR が 100%、リアルタイム RT-PCR が 97.5%であった(表3)。糞便中の SaV-RNA 量は  $1.32 \times 10^5 \sim 1.07 \times 10^{11}$  コピー/グラム糞便であった。(表3)。遺伝子解析の結果、81 株の SaV の内訳は GI が 17 株、GII が 10 株、GIV が 51 株、GV が 3 株で、年毎に異なった genogroup が検出される傾向にあった(表3)。Multiplex RT-PCR に用いた SaV のポリメラーゼ領域をターゲットとするプライマーでは GIV、GV 株が全く検出されなかった(表3)。

#### D. 考察

本研究により、小児科外来患者では急性胃腸炎の原因ウイルスとして 2005 年以降は NoV について SaV の検出頻度が高いことが明らかとなった。SaV はキャプシド領域の配列により5つの genogroup (GI-V)に分類され、このうち GI、GII、GIV、GV 株がヒトから検出されているが、熊本県内の限られた地域において年毎に異なった genogroup に属する SaV 株が検出される傾向が認められた。また、遺伝子解析により、2007 年には熊本県内において SaV GIV 株の大規模な地域流行が発生したことも明らかとなった。ただし、これらの SaV GIV 株は塩基配列レベルで 8 つの亜型に分かれたことから、単一汚染源による暴露の可能性は低く、ヒトヒト間で伝播が起こっていたと考えられた。

NoV、SaV 感染症はいずれも下痢、嘔吐が主症状であり、臨床症状から両者を区別することは困難である。SaV による急性胃腸炎の実態を把握するために、今後は NoV に加え SaV についても検出を行うことが望まれる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Harada S, Okada M, Yahiro S, Nishimura K, Matsuo S, Miyasaka J, Nakashima R, Shimada Y, Ueno T, Ikezawa S, Shinozaki K, Katayama K, Wakita T, Takeda N, Oka T.

Surveillance of pathogens in outpatients with gastroenteritis and characterization of sapovirus strains between 2002 and 2007 in Kumamoto Prefecture, Japan.

J Med Virol. *In Press*.

##### 学会発表

(1) 原田誠也、八尋俊輔、西村浩一、松尾繁、岡田峰幸、岡智一郎、武田直和

PCR 法による集団及び散発下痢症事例の起因ウイルス調査

公衆衛生獣医師協議会、東京、2008 年 9 月 5 日

(2) 原田誠也、岡田峰幸、岡智一郎、八尋俊輔、西村浩一、松尾繁、中島龍一、篠崎邦子、片山和彦、武田直和

サポウイルスによる散発性下痢症の地域流行—熊本—

第56回日本ウイルス学会、岡山、2008 年10月26-28日。

(3) 原田誠也、八尋俊輔、西村浩一、松尾繁、岡田峰幸、岡智一郎、武田直和