

体の存在が明らかにされている。NoV の流行のメカニズムや、病原性、宿主特異性などを調べるためには、ウイルスの複製に関わる酵素群をコードしている ORF1 の塩基配列情報と、遺伝子組み換えを考慮に入れた NoV の分子進化学的解析が必要である。

NoV の genotype の内、約半数の genotype の全塩基配列が決定されていない。本研究では、全塩基配列の決定されていない genotype を中心に、全塩基配列の解析を試み、得られたゲノム全長塩基配列を用いて分子遺伝学的解析を施行した。

B. 研究方法

1. 材料

2006年4月～2007年3月に施行された食品関係事業従事者の検診より、NoV のリアルタイム RT-PCR により 10 の 6 乗コピー/g 糞便以上を示し、陽性を呈した糞便サンプルを用いた。

2. 方法

NoV 陽性の糞便サンプルから RNA を定法によって抽出し、ランダムプライマーで cDNA を合成した。合成した cDNA を鋳型として、NoV GI は GISK シリーズプライマー、NoV GII は GIISK シリーズプライマーを用いて Capsid N/S (ORF2 の N 末端) 領域を RT-PCR で増幅し、塩基配列情報を得た。得られた塩基配列情報は、NoV スタンダード塩基配列 (感染研より配布) と ClustalW を用いてアライメントし、Kimura 2 parameter 法を用いて distance を算出、Neighbor-Joining 法によって genotyping を行った。

Genotyping により GI/3, GI/10, GII/7, GII/13, GII/16 に分別された 5 株、新たな genogroup に分別された 1 株の合計 6 株を選択した。全塩基配列解析は、NoV GI ゲノム 5' 末端及び、ORF1, 2 ジャンクションに保存されている GTGAATGATGATGGCGTC、NoV GII ゲノム 5' 末端及び、ORF1, 2 ジャンクションに保存されている GTGAATGAAGATGGCGTC を基点に ORF1 領域を増幅し、増幅断片をプライマーウオーキング法で sequence して得た。遺伝子組み換えの疑われた株は、ORF1, ORF2 ジャンクション領域を含む約 2Kb を全塩基配列情報に基づいて合成した株特異的 sense primer, antisense primer を用いて、増幅し、ジャンクション領域の塩基配列を確認した。

得られた全塩基配列は、DDBJ に登録された NoV の全長塩基配列と ClustalW を用いてアライメントし、前述と同様に分子系統解析を行った。遺伝子の組み換えの検出には SimPlot を用いた。

C. 研究結果

全塩基配列解析を行った GI/3, GI/10, GII/7, GII/13, GII/16 に分別された 5 株、新たな genogroup に分別された 1 株の合計 6 株を、全長塩基配列の決定されている各 genotype の prototype とアライメントした。アライメントはゲノム全長、ORF1, ORF2, 3 を領域別にそれぞれ行った。解析した 6 株は、ORF1_ORF2: GI/14 like_GI/3, ORF1_ORF2: GI/14 like_GI/10, ORF1_ORF2: GII/6_GII/7, ORF1_ORF2: GII/6_GII/13, ORF1_ORF2: GII/4 like_GII/16, ORF1_ORF2: GII/new _New

genogroup と分別され、全ての株が遺伝子組換え体であることが示唆された。

SimPlot プログラムによる Boot Scan 解析の結果、遺伝子の組み換えは ORF1, ORF2 ジャンクション領域で起きていることが示された。

現在までに全塩基配列が決定された genotype の内、GI の 9 genotype の内、3 type、33%が、GII では、GII の 14 type の内、7 type、50%が遺伝子組換え体であることが明らかとなった。

D. 考察

本研究で対象とした 6 株は、全て遺伝子組換え体であった。NoV の遺伝子組換え体の頻度は GI が 33%、GII は 50%に達し、エンテロウイルスやフラビウイルス、トガウイルスなど、その他のプラス一本鎖 RNA ウイルスよりも明らかに高い値であった。この組換え頻度は、インフルエンザ等のセグメント RNA ウィルスに観察される遺伝子セグメントのリアソートメントに匹敵していた。ヒトに感染する NoV は、培養細胞を用いて増速させることができず、モデル動物も存在しない。そのため、ORF1 と ORF2, 3 が高頻度で組み変わることで、ノロウイルスの増殖や宿主細胞への様な影響を与えており、病原性や、流行とどの様な関係があるかは、不明である。しかし、我々が解析している株は、全てヒトの体内で増殖し、排泄された表現型であることから、多様な選択圧をくぐり抜けた結果であることを考えると、遺伝子に組み換えが NoV の増殖に有利に働いている可能性がある。また、ORF1 にコードされている非構造蛋白質と、ORF2, 3 に

コードされている構造蛋白質には、異なる種類の選択圧がかかり、異なる理由と、速度で進化している可能性がある。

今後、全長塩基配列が決定されていない NoV の genotype の塩基配列解析を継続し、年余にわたってデータを蓄積することが重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Kitajima M., Oka T., Haramoto E., Katayama H., Takeda N., Katayama K., Ohgaki S.

Detection and genetic analysis of human sapoviruses in river water in Japan
Applied and Environmental Microbiology.
In press

(2) Iizuka S., Oka T., Tabara K., Omura T., Katayama K., Takeda N., Noda M.

Detection of sapoviruses and noroviruses in an outbreak of gastroenteritis linked genetically to shellfish
Journal of Medical Virology. *In Press*

(3) Yamashita Y., Ootsuka Y., Kondo R., Oseto M., Doi M., Miyamoto T., Ueda T., Kondo H., Tanaka T., Wakita T., Katayama K., Takeda N., Oka T.

Molecular characterization of sapovirus detected in a gastroenteritis outbreak at a wedding hall.
Journal of Medical Virology. *In Press*

- (4) Oka T., Yokoyama M., Katayama K., Tsunemitsu H., Yamamoto M., Miyashita K., Ogawa S., Motomura K., Mori H., Nakamura H., Wakita T., Takeda N., Sato H.
Structural and biological constraints on diversity of regions immediately upstream of cleavage sites in calicivirus precursor proteins.
Virology. 2009; 394(1):119-129.
- (5) Kitajima M., Oka T., Tohya Y., Katayama H., Takeda N., Katayama K.
Development of a broadly reactive nested reverse transcription-PCR assay to detect murine noroviruses, and investigation of the prevalence of murine noroviruses in laboratory mice in Japan.
Microbiology and Immunology. 2009; 53(9):531-534.
- (6) Oka T., Miyashita K., Katayama K., Wakita T., Takeda N.
Distinct genotype and antigenicity among genogroup II sapoviruses.
Microbiology and Immunology. 2009 53(7):417-420.
- (7) Shinkawa N., Noda M., Yoshizumi S., Tokutake Y., Shiraishi T., Arita-Nishida T., Nishio O., Oka T., Hansman GS., Takeda N., Kimura H.
Molecular epidemiology of noroviruses detected in food handler-associated outbreaks of gastroenteritis in Japan.
Intervirology. 2008; 51(6):422-426. Epub 2009 Mar 4.
- (8) 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.
Journal of Medical Virology. 2009 ;81(6):1117-1127.
- (9) Ootsuka Y., Yamashita Y., Ichikawa T., Kondo R., Oseto M., Katayama K., Takeda N., Oka T.
Molecular characterization of sapoviruses detected in sporadic gastroenteritis cases in 2007 in Ehime Prefecture, Japan.
Japanese Journal of Infectious Diseases. 2009; 62(3):246-248.
- (10) Yoshida T., Kasuo S., Azegami Y., Uchiyama Y., Satsumabayashi K., Shiraishi T., Katayama K., Wakita T., Takeda N., Oka T.
Characterization of sapoviruses detected in gastroenteritis outbreaks and identification of asymptomatic adults with high viral load.

Journal of Clinical Virology. 2009;
45(1):67-71.

(11) Iwakiri A., Ganmyo H., Yamamoto S.,
Otao K., Mikasa M., Kizoe S., Katayama K.,
Wakita T., Takeda N., Oka T.

Quantitative analysis of fecal sapovirus
shedding: identification of nucleotide
substitutions in the capsid protein during
prolonged excretion.

Archives of Virology. 2009;
154(4):689-693.

(12) 片山和彦

ノロウイルス対策

「高校保健ニュース」, 2009年11月18日号.
株式会社少年写真新聞社

(13) 片山和彦

ノロウイルスについて

「健康教室」, 2010年1月号 通巻894号 東
山書房 p 74-79

(14) 片山和彦

ノロウイルス、ロタウイルス

ザ特集 最新学校保健安全ハンドブック
(書籍) p77-80

(15) 片山和彦、岡智一郎、高木弘隆

「ノロウイルス研究の現状とマウスノロウイ
ルス」 LABI021 No. 39 p20~26, 2010

2. 学会発表

(1) 岡智一郎、高木弘隆、遠矢幸伸、武田直
和、脇田隆字、片山和彦

バイオセンサー発現細胞を用いたネコカリシ
ウイルス感染検出系の構築

第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009
年12月9~12日.

(2) 本村和嗣、横山勝、大出裕高、中村浩美、
守宏美、岡智一郎、片山和彦、神田忠仁、田
中智之、武田直和、佐藤裕徳

ノロウイルス GII/4 ゲノムとキャプシド構造
の自然界での進化

第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、
2009年10月25~27日.

(3) 中西章、Benoit Chapellier, 片山和彦、
岡智一郎、武田直和

ノロウイルスを利用した経口ワクチン用ベク
ター作成の試み

第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、
2009年10月25~27日.

(4) 片山和彦、岡智一郎、脇田隆字

ノロウイルスリバーシジェネティックシス
テムのノロウイルスプロテアーゼを利用した
制御

第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、
2009年10月25~27日.

(5) 岡智一郎、高木弘隆、遠矢幸伸、武田直
和、脇田隆字、片山和彦

カリシウイルス増殖阻害物質スクリーニング
系の構築

第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、
2009 年 10 月 25-27 日.

(6) 北島正章、岡智一郎、遠矢幸伸、高木弘
隆、片山浩之、武田直和、片山和彦

Nested RT-PCR および Real-time RT-PCR によ
るマウスノロウイルス核酸検出系の構築

第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、
2009 年 10 月 25-27 日.

(7) 北島正章、岡智一郎、原本英司、片山浩
之、大垣眞一郎、武田直和、片山和彦

多摩川河川水からのサポウイルスの検出およ
び遺伝子解析

第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、
2009 年 10 月 25-27 日.

(8) 片山和彦、岡智一郎、高木弘隆、遠矢幸
伸、脇田隆字

マウスノロウイルスの複製機構の解析

第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、
2009 年 10 月 25-27 日.

(9) 高木弘隆、遠矢幸伸、片山和彦、岡智一
郎、杉山和良

マウスノロウイルス (MNV) のエタノール感受
性と粒子、遺伝子への影響について検討

第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、
2009 年 10 月 25-27 日.

(10) 片山和彦

「ノロウイルス研究の現状とマウスノロウイ
ルスのノロウイルス研究への有用性」

第 147 回日本日本獣医学会学術集会、日本実
験動物医学会シンポジウム、2009 年 4 月 2 日、
栃木県宇都宮市

(11) 本村和嗣、横山勝、大出裕高、中村浩美、
守宏美、岡智一郎、片山和彦、神田忠仁、田
中智之、武田直和、佐藤裕徳、Norovirus
Surveillance Group

ノロウイルス GII/4 の変異

ウイルス性下痢症研究会第 21 回学術集会、
東京、2009 年 10 月 24 日.

(12) Kitajima M., Oka T.,., Katayama K.,
Takeda N., Haramoto E., Katayama H., Ohgaki
S.

Seasonal distribution and genetic
diversity of noroviruses, sapoviruses, and
Aichi viruses in river water in Japan.

15th International Symposium on
Health-Related Water Microbiology. Greece,
May 31-Jun 05, 2009.

(13) Ueki Y., Shoji M., Okimura Y., Masago
Y., Miura T., Omura T., Oka T.,., Katayama
K., Takeda N., Noda M., Miyota Y.

Prevalence and genotypes of sapovirus in
wastewater, oysters and gastroenteritis
patients in Japan.

15th International Symposium on
Health-Related Water Microbiology. Greece,
May 31-Jun 05, 2009.

(14) Kitajima M., Oka T.,., Katayama K.,

Takeda N., Haramoto E., Katayama H., Ohgaki S.

Genetic diversity of noroviruses and sapoviruses in river water in Japan.

109th General Meeting of American Society for Microbiology. USA, May 17-21, 2009.

(15) 片山和彦

日本獣医公衆衛生学会 シンポジウム 「今、問題の食中毒」

平成 22 年 1 月 31 日 宮崎市 「ワールドコンベンションセンター・サミット」

(16) 片山和彦

希少感染症研修会

下痢症ウイルス ノロウイルス

平成 22 年 2 月 25 日 感染研戸山庁舎共用第一会議室

G. 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。

ノロウイルスの病原性に関する研究

研究分担者 染谷 雄一（国立感染症研究所・ウイルス第2部）

研究要旨：ノロウイルス 3C 様プロテアーゼはウイルスタンパク質の成熟化に必須の酵素である。酵素活性に必須と目される Glu54 残基に種々のアミノ酸置換を導入したが、多くの場合活性が有意に残存し、従って Glu54 残基は必須ではない。54 位に Leu、Ile あるいは Pro を有する変異酵素は厳密な基質特異性を示し、切断部位の P2 および P4 位に側鎖の大きな疎水性アミノ酸残基を要求した。また、3A/3B 切断部位（¹⁹⁸ATSE/G）の S200F 変異により、野生型酵素と変異 C 末端との間に強い相互作用が生じた。この相互作用は周辺残基の変異の影響を受け変化した。以上の結果は反応過程において酵素と基質が相互に感知していることを示唆する。

A. 研究目的

ノロウイルスによる嘔吐下痢症は、種々の下痢症ウイルス感染症なかで最も高頻度に発生する。現在、抗ノロウイルス薬は存在せず、その開発が待たれている。ノロウイルスゲノム上には 2C NTPase、3C 様プロテアーゼ、3D RNA 依存性 RNA ポリメラーゼといった酵素分子がコードされており、これら酵素の阻害剤はノロウイルス嘔吐下痢症治療薬、予防薬の候補として期待できる。中でも 3C 様プロテアーゼはノロウイルスタンパク質の成熟化に必須であるばかりでなく、本酵素がなければ宿主細胞においてウイルス粒子の複製に支障を来すことから、ノロウイルス感染症の病原性に中心的な役割を担っている。本研究では、3C 様プロテアーゼに着目し、遺伝子工学的手法により種々の改変プロテアーゼを作成し、酵素活性の発現様式、基質との相互作用に関して生化学的、構造生物学的観点か

ら解析、考察を行った。

B. 研究方法

ノロウイルスチバ株（Genogroup I, genotype 4）ゲノムの 3A 領域の一部と 3B VPg、3C 様プロテアーゼをコードする領域を GST 融合タンパク質として発現するように大腸菌発現ベクターに組み込んだ（pGEX-6P-3aBC）。このプラスミドをもとに部位特異的変異導入を施し、種々の変異プラスミドを作成した。各プラスミドを大腸菌 BL21-CodonPlus-RIL 株に導入し、目的タンパク質の発現およびプロテアーゼ活性の有無を SDS-PAGE の CBB 染色像、Western blotting により検出、判断した。大腸菌内で発現した GST 融合タンパク質は 3C 様プロテアーゼにより、GST-3a（3A の一部配列を有する GST）、3B VPg と 3C 様プロテアーゼの 3 つのタンパク質を生じる。

C. 研究結果

1. Glu54 残基のアミノ酸置換の効果

ノロウイルス 3C 様プロテアーゼはキモトリプシン様セリンプロテアーゼファミリーに属し、その活性中心は Glu54-His30-Cys139 であると推定された。Glu54 残基を他の 19 種類のアミノ酸に置換したところ、ほとんどの変異体がプロテアーゼ活性を有意に維持していた。このことは、典型的なセリンプロテアーゼとは異なり、Glu54 残基がプロテアーゼ活性に必須ではないことを示している。

2. Glu54 の Leu, Ile および Pro 変異酵素の性質

pGEX-6P-3aBC から発現する GST 融合タンパク質にはノロウイルス ORF1 ポリプロテインの 3A/3B 切断部位と 3B/3C 切断部位が含まれるが、Glu54 の Leu, Ile および Pro 変異酵素は 3B/3C 切断部位のみ切断した。この結果から、3B/3C 切断部位を切断後遊離した変異プロテアーゼが不活性型になるのか、あるいは、単に変異プロテアーゼは好んで 3B/3C 切断部位をするのか、2 つの可能性が考えられたので、後者を検証するために、2 つの切断部位に種々の変異を導入した。その結果、切断部位の P2 および P4 位に側鎖の大きな疎水性アミノ酸残基が 3A/3B 切断部位に導入される (¹⁹⁸ATSE/G → LTFE/G) と、Leu54 変異酵素は 2 つの切断部位を切断するようになった。従って、Leu54 変異酵素 (おそらく Ile54、Pro54 変異酵素も同様) は基質特異性が厳密化した酵素であると言える。54 位変異が基質特異性に影響することは興味深

い知見である。

3. 3A/3B 切断部位変異 (3A S200F) により明らかにされた酵素-基質相互作用

pGEX-6P-3aBC に対して 3A/3B 切断部位 (¹⁹⁸ATSE/G) の P2 位に S200F 変異が導入されると、野生型酵素と変異 C 末端との間に強い相互作用が生じていることが明らかになった。即ち、3A S200F 変異 pGEX-6P-3aBC を有する大腸菌の lysate をグルタチオンセファロースに通すと、GST-3a(S200F)だけでなく、3C 様プロテアーゼが共に精製された。この 2 つのタンパク質はゲルろ過でも分離しないので、切断反応が集結したあともプロテアーゼが 3A の C 末端が強固に結合していると判断した。P2 位のアミノ酸残基側鎖は酵素分子からの遊離に影響するのかもしれない。また、この強固な相互作用は 3A 200 位のアミノ酸残基側鎖の疎水性度に依存し、3A 198 位のアミノ酸置換により減弱した。更に、P2 ポケットを構成する 3C 様プロテアーゼの bII-cII ループのアミノ酸置換 (I109A, Q110A, R112A あるいは V114A) によっても顕著に減弱した。以上の結果は酵素反応過程において酵素分子と基質 (生成物) が相互に感知していることを示唆している。

D. 考察

1. 3C 様プロテアーゼの Glu54 残基は酵素活性に必須ではない。

2. 3C 様プロテアーゼの Glu54 の Leu, Ile および Pro 変異酵素は基質特異性が厳密化した酵素である。

3. 3A/3B 切断部位 (¹⁹⁸ATSE/G) の P2 位 (Ser200) に疎水性アミノ酸残基が導入

されると、酵素反応終結後、酵素分子と反応集結 C 末端に強固な相互作用が認められた。この相互作用は周辺残基の変異の影響を受け変化したことから、酵素反応過程において酵素分子と基質が相互に感知していることを示唆している。

E. 結論

ノロウイルス 3C 様プロテアーゼの 3 次元立体構造は X 線結晶構造解析により明らかにされている。本研究の成果、また、今後の変異導入解析の成果をタンパク質の立体構造と照らし合わせることにより、詳細なプロテオリシスの分子機構を明らかにできるものと期待される。更に、構造情報に基づいたプロテアーゼ阻害剤の開発を可能にし、将来的に治療薬として用いられる物質の創出につながるものと期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Y. Someya, and N. Takeda. (2009) Insights into the Enzyme-Substrate Interaction in the Norovirus 3C-like Protease. *J. Biochem.* 146(4), 509-521.

2. 学会発表

- (1) 熊谷安希子、久保田智巳、伊藤浩美、成松久、脇田隆字、石井孝司、染谷雄一、白土東子「X 線結晶構造解析によるノロウイルスと血液型抗原の結合解析」第 29 回日本糖質学会年会、高山 2009 年 9 月 9-11 日
- (2) 染谷雄一、白土東子、武田直和、脇田隆字「ノロウイルス様中空粒子の大きさに影響を及ぼすアミノ酸残基置換」第 57

日本ウイルス学会学術集会、東京 2009 年 10 月 25-27 日

- (3) 熊谷安希子、久保田智巳、伊藤浩美、成松久、脇田隆字、石井孝司、染谷雄一、白土東子「X 線結晶構造解析によるノロウイルスと血液型抗原の結合解析」第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京 2009 年 10 月 25-27 日
- (4) 染谷雄一、白土東子、脇田隆字「ノロウイルス中空粒子の昆虫細胞での発現」日本薬学会第 130 会、岡山 2010 年 3 月 28-30 日

G. 参考文献

- (1) Kentaro Nakamura, Yuichi Someya, Takashi Kumasaka, Go Ueno, Masaki Yamamoto, Takao Sato, Naokazu Takeda, Tatsuo Miyamura, and Nobuo Tanaka (2005) A norovirus protease structure provides insights into active/substrate-binding site integrity. *J Virol.* 79(21), 13685-13693.
- (2) Yuichi Someya, Naokazu Takeda, and Takaji Wakita (2008) Saturation Mutagenesis Reveals That Glu54 of Norovirus 3C-Like Protease is not Essential for The Proteolytic Activity. *J Biochem.* 144(6), 771-780.

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ新興・再興感染症研究事業）

「食品由来感染症調査における分子疫学的手法に関する研究」

研究分担報告書

サポウイルスの分子疫学的解析手法の確立

研究分担者 岡 智一郎 国立感染症研究所 ウイルス第2部

研究協力者

北島正章, 片山浩之 東京大学大学院 工学系研究科 都市工学専攻

原本英司 山梨大学大学院 医学工学総合研究部

研究要旨

サポウイルス(Sapovirus; SaV)は、近年、急性胃腸炎患者からの検出数が増加しており、公衆衛生上重要なウイルスである。本研究ではリアルタイム RT-PCR および RT-PCR を用いて、河川水中における SaV の存在状況を一年間調査し、中流から下流にかけて SaV 核酸の検出頻度が高くなること、いずれの地点でも冬期にその濃度が上昇すること、河川水中にもヒト糞便中と同様、多様な SaV が検出されることを明らかにした。さらに本研究を通じ、環境水中の SaV 検出率向上に有用な新たな RT-PCR も構築した。

A. 研究目的

サポウイルス(Sapovirus; SaV)は小型球形のノンエンベロープウイルスで、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5つの genogroup (GI, GII, GIII, GIV, GV)に分類され、このうちGI, GII, GIV, GV がヒトから検出されている。ヒト由来の SaV は細胞培養系や実験動物系が確立されていないため、その検出には主に reverse transcriptase polymerase chain reaction

(RT-PCR)法、リアルタイム RT-PCR 法が用いられている。SaV の感染ルートは主にヒト-ヒト感染によると考えられているが、最近になり、加熱不十分な貝の喫食による SaV 集団食中毒事例も明らかとなった。感染者糞便中 $10^5 \sim 10^{10}$ copies/g と高濃度の SaV が排泄されるため、一部が河川などの環境中に放出されている可能性がある。しかし、貝の生息域を含めた環境中の SaV の検出実施例はいまだ限られている。そこで本研究では、環境水中の SaV の動態を検討するため、関東地方の河川をモ

デルに、SaV 遺伝子の量的および質的変動を解析した。

B. 研究方法

1. 材料

2003年4月～2004年3月に多摩川上流から下流の5地点において毎月1回、500mL づつ河川水を採取し、計60試料を陽イオン添加型陰電荷膜法 (Haramoto et al. 2005 Appl. Environ. Microbiol. 71: 2403-2411., 2005) を用いてそれぞれ約0.7mLに濃縮した。各濃縮液140μlからそれぞれViral RNA mini Kit (QIAGEN社)を用いて、ウイルスRNAを抽出した。その後、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)を用いてcDNAを合成し、以下のPCR反応の鋳型とした。

2. サポウイルス核酸の検出

SaV 核酸の定量検出にはリアルタイム RT-PCR (Oka et al., J. Med. Virol. 78:1347-1353., 2006)を用いた。1サンプルあたり2ウェルを用い、再現性良く平均40サイクルまでに陽性シグナルが得られた試料を陽性と判断した。また、SaV のシーケンス解析を行うために、既報の2種類の RT-PCR (Okada et al., Arch. Virol. 147:1445-1451., 2002. および Okada et al., Arch. Virol. 151:2503-2509., 2006)と、本研究で新たに設計したプライマーに既報のプライマーを組み合わせた4種類の RT-PCR (single-round RT-PCR, nested RT-PCR, もしくは semi-nested RT-PCR) も行った (Kitajima et al., Appl

Environ Microbiol in press)。PCR増幅産物の有無は2%アガロースゲル電気泳動/エチジウムブロマイド染色によって検出した。

5. サポウイルスの遺伝子解析

RT-PCR によって得られた増幅産物は、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)を用いて精製後、pCR2.1 ベクター (Invitrogen) にクローニングし、1つの陽性サンプルにつき最低4クローンのシーケンスを行い、capsid 領域の塩基配列 (約400nt)を用いて系統樹解析を行った。SaV の genogroup, genotype は既報の分類法 (Hansman et al., Reviews in Medical Virology 17. 133-141. 2007) を用いた。

C. 研究結果

全60試料のうち、12試料(20%)がリアルタイム RT-PCR により SaV-RNA 陽性で、河川水中の最大濃度は 1.0×10^3 copies/L であった。リアルタイム RT-PCR とは別に今回検討した6種類の RT-PCR による SaV-RNA の陽性率は、0~17%と使用するプライマーセットにより大きく異なり、全ての RT-PCR による SaV-RNA の検出結果を合わせると、全60試料のうち15試料(25%)から SaV の配列が得られた。なお、リアルタイム RT-PCR 陽性の12試料のうち、10試料(83%)が RT-PCR でも陽性を呈した。検出された SaV の遺伝子解析の結果、GI/1, GI/2, GI/3, GI/5, GI/unclassified, GII/1, GII/2, GII/3, GV/1 が検出された。

D. 考察

本研究で対象とした多摩川では上流域に比べて中流域および下流域で SaV 遺伝子濃度および陽性率が高かったことから、河川流量に占める下水処理水の割合が高い中流域および下流域では、下水処理水の影響を受けて河川水が SaV に汚染されていると考えられた。また、河川水中の SaV 遺伝子濃度は冬期に上昇する傾向が認められたことから、この流域の SaV 感染者が冬期に増加していた可能性が示された。これらの結果から、河川水中の SaV 遺伝子を解析することにより、流域における SaV の流行状況および流行株を網羅的に把握することが可能になると期待される。また、既報のリアルタイム RT-PCR と本研究で新たに構築した RT-PCR は、今後、食用貝の生息域の SaV-RNA の検出への適用にも有用と考えられた。

E. 結論

既報のリアルタイム RT-PCR および新たに構築した RT-PCR を用いて、河川中の SaV 核酸の検出を行い、中流域から下流域にかけて SaV 核酸の検出頻度が高くなること、いずれの地点でも冬期にその濃度が上昇すること、河川水中にも急性胃腸炎患者糞便中と同様に、多様な SaV が検出されることを明らかにした。本研究で新たに構築した RT-PCR は、既報の方法では検出不能であった SaV-RNA を検出可能とし、河川水からの SaV-RNA 検出率向上をもたらした。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Kitajima M., Oka T., Haramoto E., Katayama H., Takeda N., Katayama K., Ohgaki S.

Detection and genetic analysis of human sapoviruses in river water in Japan
Applied and Environmental Microbiology.
In press

(2) Iizuka S., Oka T., Tabara K., Omura T., Katayama K., Takeda N., Noda M.

Detection of sapoviruses and noroviruses in an outbreak of gastroenteritis linked genetically to shellfish
Journal of Medical Virology. *In Press*

(3) Yamashita Y., Ootsuka Y., Kondo R., Oseto M., Doi M., Miyamoto T., Ueda T., Kondo H., Tanaka T., Wakita T., Katayama K., Takeda N., Oka T.

Molecular characterization of sapovirus detected in a gastroenteritis outbreak at a wedding hall.
Journal of Medical Virology. *In Press*

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

Structural and biological constraints on diversity of regions immediately upstream of cleavage sites in calicivirus precursor

proteins.

Virology. 2009; 394(1):119-129.

(5) Kitajima M., Oka T., Tohya Y., Katayama H., Takeda N., Katayama K.

Development of a broadly reactive nested reverse transcription-PCR assay to detect murine noroviruses, and investigation of the prevalence of murine noroviruses in laboratory mice in Japan.

Microbiology and Immunology. 2009; 53(9):531-534.

(6) Oka T., Miyashita K., Katayama K., Wakita T., Takeda N.

Distinct genotype and antigenicity among genogroup II sapoviruses.

Microbiology and Immunology. 2009 53(7):417-420.

(7) Shinkawa N., Noda M., Yoshizumi S., Tokutake Y., Shiraishi T., Arita-Nishida T., Nishio O., Oka T., Hansman GS., Takeda N., Kimura H.

Molecular epidemiology of noroviruses detected in food handler-associated outbreaks of gastroenteritis in Japan.

Intervirology. 2008; 51(6):422-426. **Epub 2009 Mar 4.**

(8) 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.

Journal of Medical Virology. 2009 ;81(6):1117-1127.

(9) Ootsuka Y., Yamashita Y., Ichikawa T., Kondo R., Oseto M., Katayama K., Takeda N., Oka T.

Molecular characterization of sapoviruses detected in sporadic gastroenteritis cases in 2007 in Ehime Prefecture, Japan.

Japanese Journal of Infectious Diseases. 2009; 62(3):246-248.

(10) Yoshida T., Kasuo S., Azegami Y., Uchiyama Y., Satsumabayashi K., Shiraishi T., Katayama K., Wakita T., Takeda N., Oka T.

Characterization of sapoviruses detected in gastroenteritis outbreaks and identification of asymptomatic adults with high viral load.

Journal of Clinical Virology. 2009; 45(1):67-71.

(11) Iwakiri A., Ganmyo H., Yamamoto S., Otao K., Mikasa M., Kizoe S., Katayama K., Wakita T., Takeda N., Oka T.

Quantitative analysis of fecal sapovirus

shedding: identification of nucleotide substitutions in the capsid protein during prolonged excretion.

Archives of Virology, 2009; 154(4):689-693.

(12) 岡智一郎:

ノロウイルス、サポウイルス感染症

「臨床検査」

2009; 53 (6): 665-672.

2. 学会発表

(1) 岡智一郎、高木弘隆、遠矢幸伸、武田直和、脇田隆字、片山和彦

バイオセンサー発現細胞を用いたネコカリシウイルス感染検出系の構築

第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009 年 12 月 9-12 日.

(2) 本村和嗣、横山勝、大出裕高、中村浩美、守宏美、岡智一郎、片山和彦、神田忠仁、田中智之、武田直和、佐藤裕徳

ノロウイルス GII/4 ゲノムとキャプシド構造の自然界での進化

第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 25-27 日.

(3) 中西章、Benoit Chapellier, 片山和彦、岡智一郎、武田直和

ノロウイルスを利用した経口ワクチン用ベクター作成の試み

第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 25-27 日.

(4) 片山和彦、岡智一郎、脇田隆字

ノロウイルスリバーシジェネティックスシステムのノロウイルスプロテアーゼを利用した制御

第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 25-27 日.

(5) 岡智一郎、高木弘隆、遠矢幸伸、武田直和、脇田隆字、片山和彦

カリシウイルス増殖阻害物質スクリーニング系の構築

第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 25-27 日.

(6) 北島正章、岡智一郎、遠矢幸伸、高木弘隆、片山浩之、武田直和、片山和彦

Nested RT-PCR および Real-time RT-PCR によるマウスノロウイルス核酸検出系の構築

第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 25-27 日.

(7) 北島正章、岡智一郎、原本英司、片山浩之、大垣眞一郎、武田直和、片山和彦

多摩川河川水からのサポウイルスの検出および遺伝子解析

第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 25-27 日.

(8) 片山和彦、岡智一郎、高木弘隆、遠矢幸伸、脇田隆字

マウスノロウイルスの複製機構の解析

第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、

2009年10月25-27日.

(9) 高木弘隆、遠矢幸伸、片山和彦、岡智一郎、杉山和良

マウスノロウイルス (MNV) のエタノール感受性と粒子、遺伝子への影響について検討
第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月25-27日.

(10) 岡智一郎:

カリシウイルスの新知見
ウイルス性下痢症研究会第 21 回学術集会、東京、2009年10月24日.

(11) 本村和嗣、横山勝、大出裕高、中村浩美、守宏美、岡智一郎、片山和彦、神田忠仁、田中智之、武田直和、佐藤裕徳、Norovirus Surveillance Group

ノロウイルス GII/4 の変異
ウイルス性下痢症研究会第 21 回学術集会、東京、2009年10月24日.

(12) Kitajima M., Oka T., Katayama K., Takeda N., Haramoto E., Katayama H., Ohgaki S.

Seasonal distribution and genetic diversity of noroviruses, sapoviruses, and Aichi viruses in river water in Japan.
15th International Symposium on Health-Related Water Microbiology. Greece, May 31-Jun 05, 2009.

(13) Ueki Y., Shoji M., Okimura Y., Masago

Y., Miura T., Omura T., Oka T., Katayama K., Takeda N., Noda M., Miyota Y.

Prevalence and genotypes of sapovirus in wastewater, oysters and gastroenteritis patients in Japan.

15th International Symposium on Health-Related Water Microbiology. Greece, May 31-Jun 05, 2009.

(14) Kitajima M., Oka T., Katayama K., Takeda N., Haramoto E., Katayama H., Ohgaki S.

Genetic diversity of noroviruses and sapoviruses in river water in Japan.

109th General Meeting of American Society for Microbiology. USA, May 17-21, 2009.

G. 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。

平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業
「広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究」
分担研究報告書

サポウイルス感染症における Immunochromatography(IC)法の開発

分担研究者 田中 智之 (堺市衛生研究所)
研究協力者 北元 憲利 (兵庫県立大学環境人間学部)
飯塚 節子 (島根県保健環境科学研究所)
山下 育孝 (愛媛県立衛生環境研究所)
森野 吉晴 (和歌山市衛生研究所)
岡 智一郎、白土 東子 (国立感染症研究所 ウイルスⅡ部)
高橋 幸三、三好 龍也、内野 清子、吉田 永祥、松尾 光子
(堺市衛生研究所)

研究要旨:

サポウイルス感染症におけるイムノクロマト迅速診断法の開発を試みた。サポウイルス VLPs 抗原から作製されたモノクローナル抗体にラテックス粒子を標識し、テストストリップ上で検出する方歩で、測定時間は約 20 分ある。現時点では genogroup I の臨床検体では約 60%、その他の genogroup II, IV では二割未満であった。検出感度や特異性を高めるため、より優れたモノクローナル抗体の作製、あるいは genogroup 特異的モノクローナル抗体を混合したカクテル IC 法の構築が今後の課題として残された。

A. 研究目的

サポウイルスはノロウイルスと同様のカリシウイルス科に属し、主に冬季乳幼児下痢症の原因として検出されているが、集団食中毒事例の報告もある。2008 年島根県における冷凍むき身アサリを原因とするサポウイルスとノロウイルス混合感染食中毒事例、2007 年和歌山市での身体障害者療護施設での施設内感染、修学旅行時の集団食中毒事例(横浜市)さらに熊本県 10 市町村に及ぶ広域流行事例などが報告されている。

サポウイルスの現在の検出法は RT-PCR

法による遺伝子検査と電子顕微鏡によるウイルス粒子の検出が中心である。いずれの方法においても高価な機器や試薬、技術の習得が必要であり、検査に長時間を要するなど感染拡大防止に迅速に対応しがたい短所がある。

今回、研究目的としたイムノクロマト法 (IC 法) はこれらの短所を補える検査方法である。IC 法によるサポウイルス迅速診断キットの実現によって、食中毒事例の的確な対応・感染拡大防止等が迅速に立ち上げられ、有用な検査方法となる。

B. 研究材料と方法

1. 材料

1) 臨床検体

島根県における食中毒事例および和歌山市における施設内感染事例から合計 19 糞便検体を用いた。その内訳は genogroup I 型 5 検体、genogroup II 型 7 検体、genogroup IV 型 6 検体、genogroup V 型 1 検体である。

2) モノクローナル抗体

IC 法開発に必要なモノクローナル抗体はバキュロウイルスで発現されたサポウイルス VLPs を免疫源とした。細胞融合の後にクローニングを行い、得られた陽性クローンを腹水化し多量の抗体作製を行った。VLPs は GI/1 (Mc114 株)、GI/5 (Yokote 株 = Akita 株)、GII/3 (Syd53 株)、GIV/1 (Syd3 株)、および GV/1 (NK24 株) で国立感染研にて作製された。

2. 方法

1) Latex 粒子標識方法

IC 法はラテックス粒子を以下の方法に従ってモノクローナル抗体に標識した。

抗サポウイルス (SV) モノクローナル抗体 #8127、#616、#819 の三種類を使用した。マウス腹水中の抗体はフリーゲン (協和純薬工業社製) 処理により不純物を除去し、Protein A を用いたカラムにより精製した。精製後、三種の抗体はラテックス IMMUTEX T0979B 0.394 μ m (JSR 社製) により標識した。またテストストリップのテストライン部には精製量の都合上、抗 SV 抗体 #8127 (未標識) 一種類のみを用いた。作製した標識抗体およびテストストリップを用い、以下に示す手順で試験を行った。

まず便検体を検体浮遊液で 10% 乳剤に調整した。既に 10% 乳剤になっている場合は検体浮遊液で 1:1 に希釈した。検体浮遊液にはクイック Ex-ノロウイルス『生研』 (デンカ生研社製) に添付されていたものを使用した。次に糞便乳剤をボルテックスミキサーなどで十分に攪拌後、8000g で 5 分間遠心し、上清を 96 穴マイクロプレート (NUNC-IMMUNOPLATE マキシソープ処理: nunc 社製) の三つのホールに 50 μ l ずつ分注した。その上から三種類のラテックス標識抗体をそれぞれのホールに一種類ずつ所要量滴下し、抗原と抗体を反応させた (#8127 標識抗体: 1.3 μ l、#616 標識抗体: 1.2 μ l、#819 標識抗体: 4.7 μ l)。続いて、このホールにテストストリップを挿入し、吸収・反応させ、20 分後にバンドを確認した。

ストリップにはテストライン部に抗 SV 抗体 #8127、コントロールライン部に抗マウスグロブリン抗体を固相化しているため、検体にサポウイルスが含まれていれば二本のラインが確認できる。陰性であればコントロールライン一本のみ確認され、これを結果判定基準とした (図 1)。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 結果

1. 作製されたモノクローナル抗体 6 種類の抗体が作製された (表 2)。それらの 5 種類は各 VLPs に対する homology の反応が認められたが、1 クローンは広範囲な交差反応性を示した。IC キットに使用

した抗体は#616は genogroup I 株から作製された VLPs を免疫源とした抗体で genogroup I のみの反応性しかない抗体である。#819 は同様に genogroup IV に homology な反応を示す。#8127 は genogroup I 型, II 型, IV 型および V 型に、反応性の強弱はあるものの広範囲交差反応性を示した。

2. IC キットによる検体との反応性

標識した3種類の抗体の中で、#616, #819 抗体は homology な臨床検体との反応性も見られなかった。交差反応性のある#8127 抗体の反応性は他に比べて比較的良い検出反応を示した。反応性の結果を表3にまとめた。今回の検出系でウイルス量との検討では、 10^9 /グラム以上のコピー数が求められる結果であった。

D. 考察

サポウイルス感染症は、2001/2002 シーズンの報告から一目瞭然、年々の増加傾向を示している(表1)。サポウイルスもノロウイルス同様に細胞培養系が確立されておらず、その診断、感染予防対策には多くの制限があり、ノロウイルス同様に研究・開発しなければならない課題が多々ある。

ノロウイルスはバキュロウイルス発現系を活かしてウイルス様粒子(VLPs)を作製し、それを用いたモノクローナル抗体の作製、抗原検出 ELISA 法および IC 法が構築された。これらは抗原診断試薬として広く医療現場や施設内で活用されている。15分という迅速診断の特徴を生かして、感染拡大防止に優れた威力を発揮している。

サポウイルスはノロウイルスと同じカリシウイルス科に属し、I, II, (III), IV, V の遺伝子グループを有し、I, II, IV, V はヒトの食中毒原因ウイルスである。RT-PCR 法や電子顕微鏡以外に未だ迅速な診断方法は開発されていない。

サポウイルスの VLPs を用いたモノクローナル抗体の作製に成功し、これらを用いた IC 法を構築・開発を試みた。

しかし、ノロウイルス抗体は多くの遺伝子グループおよび遺伝子型に交差反応するモノクローナル抗体であったが、今回作製されサポウイルスモノクローナル抗体には唯一の抗体が4つの遺伝子グループに交差反応する抗体で他はグループ特異性の抗体であった。この抗体を用いてラテックス粒子標識の IC 法開発し、臨床検体で反応性を試みた。反応性には成功したが、感度は極めて低く診断キットとしての道のりは遠いものであった。感度の低い原因として、1. 広範囲に交差反応する単一の抗体に焦点を合わせすぎた点、2. 各遺伝子グループに特異的に反応する3種類の抗体を標識し、カクテル IC 法を構築しなかった、点にある。また、遺伝子量の分かっている検体を用いた場合、 10^9 コピー/グラムのウイルス量が必要となり、とても現場に期待できるウイルス量ではなかった。

今回の研究から、これまで作成されたサポウイルスモノクローナル抗体を用いて迅速検査の IC 法の構築が可能であることが判明した。しかし、その検出率、感度の向上は今後、1. 最良のモノクローナル抗体作製を再度試みること、2. 広範囲反応性の抗体にこだわらず、カクテル IC

法の構築を試みることに、3. 検出感度向上の工夫を行うこと、等に向けて改良することであり平成 22 年度の課題である。

E. 結論

モノクローナル抗体を用いた迅速抗原検出 IC 法の構築がなされた。しかし、検出感度が低くモノクローナル抗体を含めた高感度の検出系構築に大きな課題を残した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 誌上発表

(1) Yasutaka Yamashita, Yuka

Ootsuka, Reiko Kondo, Mitsuaki Oseto, Mitsunori Doi, Takeshi Miyamoto, Tetsuroo Ueda, Hirokazu Kondo, Tomoyuki Tanaka, Takaji Wakita, Kazuhiko Katayama, Naokazu Takeda and Yomoichiro Oka. Molecular characterization of Sapovirus detected in a gastroenteritis as a wedding hall. (J.Med.Virol. in press)

(2) 田中 智之. 改良ノロウイルス抗原検出 EIA キットの評価. 医学と新薬 61(1);93-98, 2009

(3) 田中智之、田尻 仁、奥田真珠美、後藤泰浩、豊田 茂、佐藤雅久、五十嵐隆夫、田村 務、西川 眞. ノロウイルス抗原迅速診断試薬クイックナビ™ - ノロの評価. 医学と新薬 61(5);779-785, 2009

(4) 田中智之、三好龍也、内野清子. ノロ

ウイルス迅速診断法.

診断と治療 97(9); 1728-1731, 2009

(5) 田中智之. ロタウイルス、ノロウイルス、エンテロウイルス. 小児の市中感染症パーフェクトガイド, 分光堂 p147-p156, 2009 年

2) 学会発表

(1) Tomoyuki Tanaka, Daisuke Kato, Kunio Kamata, Tatsuya Miyoshi, Kiyoko Uchino, Hisaaki Yoshida, Hitoshi Tajiri, Masumi Okuda, Yoshiko Yamashita, Noritoshi Kitamoto and Naokazu Takeda.

Improved Norovirus rapid diagnostic kit, immunochromatography(IC) kit -its advantages as a prophylactic tool-

The 4th Bangladesh-Japan Joint International Conference on Microbiology, Food safety and Hygiene. 2009.3 Nara, Japan

(2) 本村和嗣、横山 勝、大出裕高、中村浩美、守 宏美、岡智一郎、片山和彦、神田忠仁、田中智之、武田直和、佐藤裕徳

ノロウイルス GII/4 ゲノムとキャプシド構造の自然界での進化

第 57 回日本ウイルス学会学術集会 2009 年 10 月 東京都

(3) 中田恵子、左近(田中)直美、入谷展弘、三好龍也、改田 厚、久保英幸、阿部仁一郎、後藤 薫、長谷 篤、内野清子、高橋幸三、田中智之、山崎謙治、加瀬哲男、高橋和郎、織田 肇

大阪府・大阪市・堺市の連携による大阪府内におけるノロウイルスの流行解析
第 57 回日本ウイルス学会学術集会 2009 年 10 月 東京都

(4) 三好龍也、内野清子、李 天成、武田

直和、北元憲利、田中智之
野生イノシシの E 型肝炎ウイルス保有状
況調査

第 57 回日本ウイルス学会学術集会
2009 年 10 月 東京都

(5) 東方美保、齋藤博之、白土東子、田中
智之、野田 衛

パンソルビン・トラップ法により汚染食
品から回収したノロウイルス遺伝子検出
条件

第 57 回日本ウイルス学会学術集会
2009 年 10 月 東京都

(6) 齋藤博之、東方美保、白土東子、田中
智之、野田 衛

食品のノロウイルス検査に向けたパンソ
ルビン・トラップ法の実用化の検討

第 57 回日本ウイルス学会学術集会
2009 年 10 月 東京都

(7) 田村 務、西川 眞、武田直和、田中
智之、鈴木 宏

新潟県における GII.4 ノロウイルス新変
異株[Apeldoorn317/2007/NL]に近縁な
ノロウイルスの検出動向

第 57 回日本ウイルス学会学術集会
2009 年 10 月 東京都

(8) Tomoyuki Tanaka, Hitoshi Tajiri,
Masumi Okuda, Yoshiko Nakayama, Tatsuya
Miyoshi, Kiyoko Uchino, Hisaaki Yoshida,
Noritoshi Kitamoto Daisuke Kato, Kunio
Kamata and Naokazu Takeda.

DEVELOPED NOROVIRUS ANTIGEN
DETECTION

IMMUNOCHROMATOGRAPHY(IC) KIT
WITH ADVANTAGES OF
PROPHYLACTIC TRIAGE IN PEDIATRIC

WARDS. The 13th Asian Pacific Congress
of Pediatrics and 3rd Asian Pacific Congress
of Pediatric Nursing, 2009.10. Shanghai,
China

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし