

表 1. 過去 6 シーズンにおけるサポウイルス検出情報

シーズン	2001/02	2002/03	2003/04	2004/05	2005/06	2006/07
検出情報	36	47	66	118	89	151

(IASR, 2009.5.21 現在)

表 2. 作製されたサポウイルスモノクローナル抗体の VLPs 抗原との反応性

	GI	GI	GII	GII	GII	GIV	GV
MAb	Mc114	Akita	Mc10	C12	Syd53	Syd3	NK24
1325	++	-	-	-	-	-	-
616	++	++	-	-	-	-	-
1015	-	-	-	++	++	-	-
819	-	-	-	-	-	++	-
1496	-	-	-	-	-	-	++
8127	++	++	+	+	+	+	++

図 1. IC 法における陽性検体反応実例

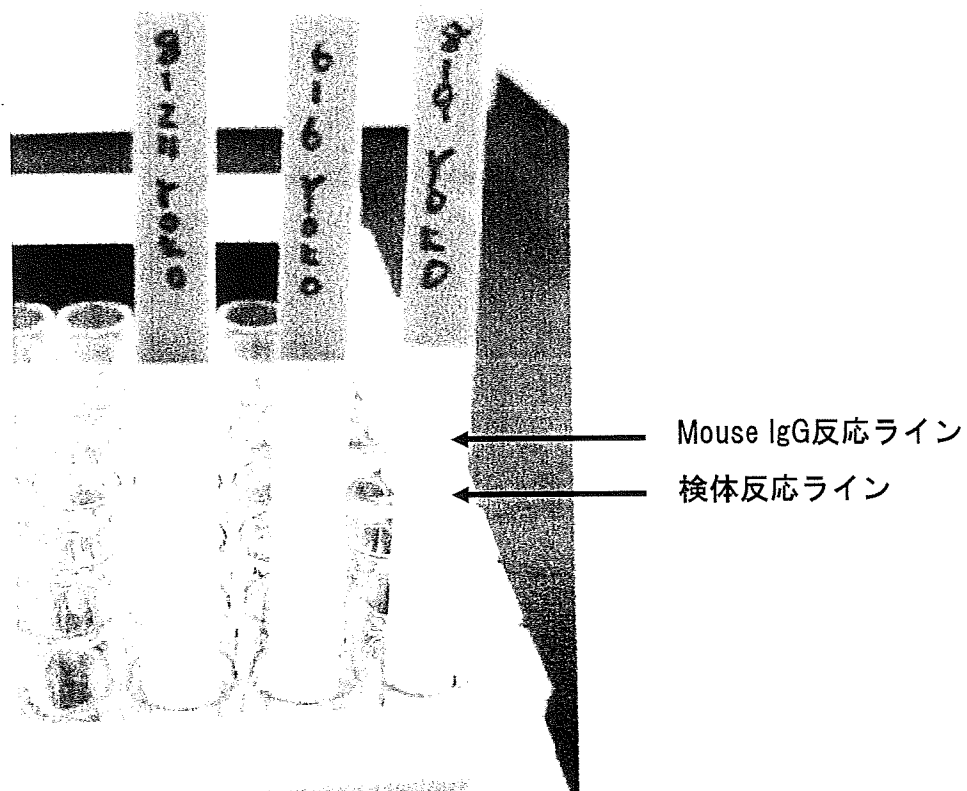


表 3. IC 法による臨床検体の SV 抗原検出成績

SV genogroup	検体数	検出(+)	コピー/g	検出(-)	コピー/g
I	5	3(60%)	$10^9, 10^{10}$	2	$10^7, 10^8$
II	7	1(14%)		6	
IV	6	1(17%)		5	
V	1	1			
合計	19	6(32%)		13	

平成 21 年度 厚生労働省新型インフルエンザ等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手法に関する研究」
分担者報告書

カリシウェブの整備と活用

研究分担者 三瀬敬治：札幌医科大学医学部衛生学講座
片山和彦：国立感染症研究所ウイルス第 2 部

研究要旨：食品由来のヒト下痢症原因ウイルスとして知られる、カリシウイルスの情報共有のためのウェブサイト (SNS)、カリシウェブ (<http://teine.cc.sapmed.ac.jp/~calici/ddbj/>) のリニューアル作業を行った。現在システムレビューから、デザインや使い勝手の改善作業を行っている。カリシウェブ内に構築した、カリシウイルスに特化した遺伝子データベースは、毎日更新プログラムの高速化により、数ギガ単位の登録があってもその日の内に更新終了が可能となった。デザインもカリシウェブとの統一性を持つものとした (2010 年 2 月 21 日現在登録データ数 11902 件、2008 年 8 月末から約 2000 アクセス)。また、カリシウェブ内のクローズトなフォーラム (プライベートフォーラム) を使って、系統樹作成サービス「楽しカリシ」を開始した。(2010 年 2 月 21 日現在登録者数 21 名、解析データ数 17)。

A. 研究目的

カリシウイルスのうちノロウイルス (NoV) やサポウイルス (SaV) によるヒトにおける下痢症の流行は、その多くが食品由来であり、日本を含む世界中で対策が求められている。

ウイルス性下痢症の研究には、現在流行しているウイルスとこれまで報告されたウイルスの遺伝子配列との比較による系統の把握が不可欠である。

分子生物学的手法の発展により、さまざまな遺伝子配列データの蓄積が進んでいる。しかしその反面、国際的な遺伝子データベース DDBJ、GenBank、EMBL の情報量はあまりに膨大なものとなっている。このため、検索を行っても必要な遺伝子配列を

見出すことが非常に困難な状況にある。

このため、必要な遺伝子情報を的確に検索し、比較検討を行い、またカリシウイルスの情報を共有する SNS の構築が必要である。本研究では、カリシウイルスに特化した SNS およびデータベースの構築と運用を検討するものである。

B.方法

B-1. カリシウェブのリニューアル：

2004 年にテストランとして公開したカリシウェブは、ウェブを用いた SNS の可能性そのものを検討するものであり、使い勝手の悪さやシステムの重さが指摘されてきた。

このため、SNS に熟達したウェブ作成

会社に依頼して、カリシウェブの主要メンバーとネット上で意見交換を行いながら、デザインや機能を摺り合わせつつ、リニューアル作業を行った。

B-2. カリシウェブ特化遺伝子データベースの構築と改善：

世界的遺伝子データベース DDBJ から、カリシウイルスである、ノロウイルス、サポウイルス、ヴェシウイルス、ラゴウイルス、以前使われていた名称である SRSV をキーワードにして DDBJ に登録されている遺伝子情報のリストを作成。このリストからカリシウェブ上の MySQL にデータベースを構築した。

データベースからはノロウイルス、サポウイルス、ヴェシウイルス、ラゴウイルス、以前使われていた名称である SRSV の種類、登録された最短配列長および最長配列長でデータを絞り込み、表示データも Organism, Host, Taxonomy, country, Strain, CDS-region, Last Update から選択できるものである。表示されたリストの Accession number をクリックすると、DDBJ に登録されている該当遺伝子配列の全データが表示される。

DDBJ の登録情報は毎日更新されるが、更新された指分けファイルが別個に公開されるため、指分けファイルを毎日一回ダウンロードし、カリシウイルスデータを抽出して、最新情報とする。すべてのプログラムは Perl 言語で書かれた。

B-3. 系統樹作成サービス「楽しカリシ」の開始：

カリシウェブの有効活用の試みとして、プライベートフォーラムを使って、系統樹作成サービス「楽しカリシ」を開始した。

カリシウェブのフォーラム参加には、そもそも、ユーザー登録が必要であり、管理者が所属などを確認した上でログイン可能となる。プライベートフォーラムはその中で、さらに再登録したメンバーのみがアクセス可能な、アクセス制限を行うことが可能である。未登録ユーザーもプライベートフォーラムの存在そのものは知ることができる。

この試みは、将来的にカリシウェブをできるだけオープンな SNS として公開し、その中で情報セキュリティの確保も可能である運用形態を模索する意味合いも含まれる。

C. 結果と考察

C-1. カリシウェブのリニューアル：

これまでカリシウェブにおいては、ハードウェア以外はすべて使用が無料、すなわちフリーウェアのシステムを用いてきた。つまり、いわゆる LAMP と呼ばれる、OS は Debian Linux、ウェブサーバは Apache、データベースは MySQL に、PHP と連動させた Xoops を使っていた。このうち、ユーザーインターフェースとなる Xoops はウェブシステムを用いた SNS 管理ツールとしては古くから使われているものであるが、フリーであるために、制作者の遊び心や、学術的な SNS としては不向きな構造を持っている。

ウェブ作成会社に委託してのシステム構築は、費用はかかるものの、デザインにおいても使い勝手においても、フィードバックをしながらのサイト構築となる。たとえば、登録ボタン一つのデザインや大きさ、画面上における場所についても、それぞれ

の意見が反映されることになり、学術情報 SNS 構築には適している。

また、新たな機能が要求された場合であっても、フリーのシステムでは、どこからシステムを構築し直すべきか不明である可能性があるが、制作を依頼した場合は、仕様が明らかである。

現在は、カリシウェブの主要メンバーとネット上で意見交換を行いながら、デザインや機能を摺り合わせつつ、リニューアル作業を行い、今後もさらに改善を進めていく。

B-2. カリシウェブ特化遺伝子データベースの構築と改善：

遺伝子データベースそのものに大きな問題点はなかったが、毎日一回行われるデータの更新プログラムで問題が生じた。

更新の指分けデータは日によってその情報量が大きく異なる。たとえば、バクテリアの染色体や、なんらかのゲノムそのものが登録された場合、一日の指分けファイルのサイズが数ギガ単位という巨大なものとなる。またデータに入っている遺伝子配列データも数百万塩基となってしまふ。

当初データの抽出に使われたプログラムでは、塩基対の数が長くなるに連れて、抽出にかかる時間が非常に長くなり、サーバの CPU やシステムにかかる負荷も増大した。

このため更新プログラムの全面的見直しと最適化を行い、巨大な登録があってもその日の内に更新可能となった。

現在は安定して動いている。

また、カリシウェブとのデザインの統合も行った。

カリシウェブの現状と本データベース

に関しての報告を 2009 年 10 月 24 日、ウイルス性下痢症研究会で行ったところ、最初の登録日をデータとして表示して欲しい、ロタウイルスでも同様なデータベースを作成可能か、というフィードバックを得た。現在対応の可否を検討中である。

B-3. 系統樹作成サービス「楽しカリシ」の開始：

系統樹の作成は、得られたウイルスの由来や、今後の流行予測には非常に重要である。また系統樹の作成には、基準となる配列の共有が必要であり、解析方法が異なると、有用な情報を得ることが困難である。

しかしながら、系統樹作成には特殊なソフトウェアが必要であり、コンピュータによる解析に慣れていない研究者にとって、取り扱いが容易ではない。

このため、カリシウェブ内のプライベートフォーラムを用いて、2009 年 7 月から系統樹作成サービス「楽しカリシ」を開始した。2010 年 2 月 21 日現在登録者数 21 名、解析データ数 17 である。

今後できるだけカリシウェブをオープンな SNS として運用するためには、情報セキュリティの確保が必要であるが、アクセス制限を設けることによるセキュリティ確保は有効に働いている。

現在の所、作成した系統樹は、「ダウンロード」機能によって、会員に公開される仕組みになっている。「ダウンロード」への登録はシステム管理者が行っている。

今後利用者と登録データの増加が見込まれるため、利用者が各自「ダウンロード」へ登録し、管理者はその認証を行うなどの工夫が必要である。

D.結論

カリシウイルスに特化した学術系 SNS カリシウェブは、情報共有の場として、情報セキュリティの確保をしながら改善されている。インターネットを用いたこのようなシステムは、実際に運用しながらユーザーのフィードバックを得ることが不可欠である。今後、カリシウェブが世界に情報を発信できるよう、利用者とともに改善を進めていくべきである。

E.研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

三瀬敬治, カリシウェブについて.
第 21 回ウイルス性下痢症研究会、2010 年
10 月、東京

研究成果の刊行に関する一覧表 (平成 21 年度)

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ooka T, <u>Terajima J</u> , Kusumoto M, Iguchi A, Kurokawa K, Ogura Y, Asadulghani M, Nakayama K, Murase K, Ohnishi M, Iyoda S, Watanabe H, Hayashi T.	Development of a multiplex PCR-based rapid typing method for enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> O157 strains.	J Clin Microbiol.	47	2888-94	2009
Izumiya H, Tada Y, Ito K, Morita-Ishihara T, Ohnishi M, <u>Terajima J</u> , Watanabe H.	Characterization of <i>Shigella sonnei</i> isolates from travel-associated cases in Japan.	Journal of Medical Microbiology	58	1486-91	2009
Kitajima M., Oka T., Haramoto E., Katayama H., Takeda N., <u>Katayama K.</u> , Ohgaki S.	Detection and genetic analysis of human sapoviruses in river water in Japan	Applied and Environmental Microbiology.	in press		
Iizuka S., Oka T., Tabara K., Omura T., <u>Katayama K.</u> , Takeda N., Noda M.	Detection of sapoviruses and noroviruses in an outbreak of gastroenteritis linked genetically to shellfish	Journal of Medical Virology.	in press		
Yamashita Y., Ootsuka Y., Kondo R., Oseto M., Doi M., Miyamoto T., Ueda T., Kondo H., Tanaka T., Wakita T., <u>Katayama K.</u> , Takeda N., Oka T.	Molecular characterization of sapovirus detected in a gastroenteritis outbreak at a wedding hall.	Journal of Medical Virology.	in press		

Oka T., Yokoyama M., <u>Katayama K.</u> , 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.	394	119-129	2009
Kitajima M., Oka T., Tohya Y., Katayama H., Takeda N., <u>Katayama K.</u>	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.	53	531-534	2009
Oka T., Miyashita K., <u>Katayama K.</u> , Wakita T., Takeda N.	Distinct genotype and antigenicity among genogroup II sapoviruses.	Microbiology and Immunology.	53	417-420	2009
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.	51	422-426	2009

Harada S., Okada M., Yahiro S., Nishimura K., Matsuo S., Miyasaka J., Nakashima R., Shimada Y., Ueno T., Ikezawa S., Shinozaki K., <u>Katayama K.</u> , 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.	81	1117-1127	2009
Ootsuka Y., Yamashita Y., Ichikawa T., Kondo R., Oseto M., <u>Katayama K.</u> , Takeda N., Oka T.	Molecular characterization of sapoviruses detected in sporadic gastroenteritis cases in 2007 in Ehime Prefecture, Japan.	Japanese Journal of Infectious Diseases.	62	246-248	2009
Yoshida T., Kasuo S., Azegami Y., Uchiyama Y., Satsumabayashi K., Shiraishi T., <u>Katayama K.</u> , 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.	45	67-71	2009
Iwakiri A., Ganmyo H., Yamamoto S., Otao K., Mikasa M., Kizoe S., <u>Katayama K.</u> , 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.	154	689-693	2009
Y. Someya, and N. Takeda.	Insights into the Enzyme-Substrate Interaction in the Norovirus 3C-like Protease.	J. Biochem.	146	509-521	2009
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	93-98	2009

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	779-785	2009
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	1728-1731	2009
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		147-156	2009
片山和彦	ノロウイルスについて	健康教室	894	74-79	2009
片山和彦	ノロウイルス、ロタウイルス	最新学校保健安全 ハンドブック		77-80	
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	39	20-26	2010
岡 智一郎	ノロウイルス、サポウイルス感染 症	臨床検査	53	665-672	2009
東京都健康安全研究 センター 微生物部 食品微生物研究科	東京都内の 3 保育園で発生した腸 管出血性大腸菌 O26 感染事例	病原微生物検出情 報	30	9-10	2009
勢戸和子, 田口真 澄, 原田哲也, 川津 健太郎, 神吉政史, 依田知子, 井上清, 柴田敏之, 萩原粒 子, 山本サエコ, 中 田栄子, 長澤登美 代, 伊吹てるみ, 濱 石裕紀	保育所における EHEC O157 集団感 染事例、2008 年一大阪府	病原微生物検出情 報	30	77-78	2009
勢戸和子	STEC	食品由来感染症と 食品微生物			2009

