

いる。SaV のゲノムはプラス1本鎖の RNA で、少なくとも5つの genogroup (GI, GII, GIII, GIV, GV)に分類される。これまでに GI, GII, GIV, GV がヒトから検出されている。ヒト由来の SaV は培養細胞や実験動物での増殖系が確立されていない。そのため、SaV の検出は主に 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 は遺伝的に極めて多様であり、特に GI, GII 株は系統樹上、さらに細かな遺伝的クラスター (genotype)に分かれる。これまでにいくつかの genotyping 法が提唱されているが、これらの分類は研究グループによって異なり、また分類に使用している塩基配列の領域、長さも統一されていない。どのような SaV 株が流行しているのかを正確に把握するためには、ノロウイルスで確立されているような統一的手法による genotyping 法の確立が必要である。

通常、核酸検出による病原体サーベイランスでは数百塩基の PCR 増幅産物の塩基配列を解析し、どのような株が流行しているかの情報蓄積を行っている。

しかし、ノロウイルス、サポウイルスの専門家が集まる国際カリシウイルス学会において、genotyping を行う際の reference 株には、少なくとも構造タンパク質全長に対応する塩基配列が判明した株を用いることが提唱された。

我々はこれまでに衛生研究所と共同で SaV 核酸検出系の患者糞便への適用評価に取り組み、世界的にも最も多くの SaV 株の情報を有している。

本研究では、SaV 構造タンパク質コード領域全長配列を決定するための汎用性の高い手法を確立するとともに、SaV の genotype 解析方法の確立のための reference 株情報の蓄積を目指し、地方衛

生研究所との共同研究の結果得られた SaV 株のうち、従来の塩基配列解析に用いられてきた reference 株とは異なる遺伝的クラスターに属すると考えられる株の構造タンパク質コード領域全長配列を決定することを目的とした。

B. 研究方法

1. 材料

2006 年～2010 年に協力衛生研究所の検査によって SaV 陽性となった国内の急性胃腸炎患者の糞便乳剤、合計 198 検体から選択した。

2. サポウイルスのスクリーニング検出

10% 糞便乳剤 140μl から Viral RNA mini Kit (QIAGEN)を用いて、キットの指示に従い、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 を用いて cDNA を合成し、スクリーニング用の PCR 反応の鋳型とした。SaV 核酸の検出には千葉県衛生研究所の岡田らが確立した 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。

3. サポウイルス構造タンパク質コード領域全塩基配列の解析

10% 糞便乳剤140μlからViral RNA mini Kit (QIAGEN)を用いて、ウイルスRNAを抽出した。ただし、oligo dTを用いたcDNA合成ステップの効率をあげるため、QIAGEN AVL試薬には、付属の carrier RNAのかわりに、polyA配列を含まない yeast RNA (Ambion)を添加した。精製RNA 10μLに TX30SXN primer (5' - GAC TAG TTC TAG ATC

GCG AGC GGC CGC CCT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT-3') (20 pmol/ μ L) 1 μ Lを加え、92°C、2min denature後、37°Cとし、RT buffer (Invitrogen) 4 μ L, 100mM DTT (Invitrogen) 2 μ L, 10mM dNTP (Toyobo) 1 μ L, SuperScript III reverse-transcriptase (200 U/ μ L) 1 μ L (Invitrogen), RNaseOUT ribonuclease inhibitor (40 U/ μ L) (Invitrogen) 1 μ Lを加え、50°Cで2時間 cDNAを合成後、37°Cとし、RNaseH (2U/ μ L) (Invitrogen) 1 μ Lを加え、37°Cで30min反応後、95°C 5min加熱し、酵素を失活させ、以下のPCR 反応の鋳型とした。SaV構造タンパク質全長の塩基配列を決定するため、SaV特異的プライマーとウイルスゲノムの3'末端に存在するpolyA配列を利用したsemi-nested PCRを行った。

cDNA 2 μ L、10×KOD Plus DNA polymerase buffer 10 μ L、2.5mM dNTPs、25mM MgSO₄ 4 μ L、dimethylsulfoxide (Sigma) 2.5 μ L、F13 primer (5'-GAYYWGGCYCTCGCYACCTAC-3') (20pmol/ μ L) 2 μ L、F14 primer (5'-GAACAAGCTGTGGCATGCTAC-3') (20pmol/ μ L) 2 μ L、TX30SXN primer (20 pmol/ml) 2 μ L、KOD-Plus DNA polymerase (1 U/ μ L) (Toyobo) 2 μ Lを加え、合計100 μ Lとした。この反応液を94°C 10 min加熱後、94°C 30 sec、55°C 30 sec、68°C 5 minで35サイクル反応させ、その後、72°C で15 min反応後、4°Cに保温した。この1st PCR 反応液 2 μ Lに10×KOD Plus DNA polymerase buffer 10 μ L、2.5mM dNTPs 10 μ L、25mM MgSO₄ 4 μ L、dimethylsulfoxide (Sigma) 2.5 μ L、F11 primer (5'-GCY TGG TTY ATA GGT GGT AC -3') (20pmol/ μ L) 2 μ L、TX30SXN primer (20 pmol/ μ L) 2 μ L、KOD-Plus DNA polymerase (1

U/ μ L) (Toyobo) 2 μ Lを加え、合計 100 μ Lとし、各サンプルあたり8本ずつ作成した。この反応液を 1st PCRと同じ条件で2nd PCR を行った。

得られた約2.3kbの増幅産物を1%アガロース電気泳動し、QIAGEN Gel Extraction Kitで精製後、プライマーウォーキング法によってダイレクトシーケンスを行った。

C. 研究結果

本研究において、SaV 構造タンパク質全長コード領域(構造タンパク質開始コドンからゲノム末端までの約 2.3kb)の塩基配列を決定するための手法を確立し、この手法を用いて新たに21株の塩基配列を決定した。

D. 考察

SaV の RT-PCR による核酸検出には主にポリメラーゼ領域と構造タンパク質コード領域の2種類がターゲット領域として用いられている。我々の検討では、構造タンパク質コード領域をターゲットとするPCR 系の方がサポウイルスの検出率が高い。これまでの我々の研究グループの検討により、構造タンパク質コード領域の塩基配列に基づく系統樹解析で異なる遺伝子クラスターになる株間では、ウイルスの抗原性が異なることが明らかになりつつある。

検出率の高さと、抗原性との関連という観点から、SaV の場合もノロウイルスと同様、構造タンパク質の塩基配列に基づく genotyping を行うのが妥当と考えられる。

本研究では SaV の分子疫学手法の構築という観点から、SaV 構造タンパク質コード領域全長をカバーする遺伝子領域の増幅方法を確立し、この手法

を用いて新たに21株の配列を決定した。

今後、本研究班の分担研究者 三瀬 敬司 助教(札幌医科大学)により構築改良された「カリシウエブ」のカリシウイルスデータベース検索機能を用いて、国内外で登録された構造タンパク質全長の遺伝子配列を取得し、SaV の遺伝子タイピング法の確立を目指す。

E. 結論

国内で発生した急性胃腸炎患者の糞便中より検出された SaV 株のうち、新たな遺伝子クラスターと考えられる株を含む、合計21株について構造タンパク質全長コード領域をカバーする約 2.3kb の塩基配列を決定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Oka T, Takagi H, Tohya Y, Murakami K, Takeda N, Wakita T, Katayama K.

Bioluminescence technologies to detect calicivirus protease activity in cell-free system and in infected cells.

Antiviral Research. [Epub ahead of print]

(2) Oka T, Murakami K, Wakita T, Katayama K. Comparative site-directed mutagenesis in the catalytic amino acid triad in calicivirus proteases Microbiol Immunol. 2011.Feb; 55 (2): 108-114.

(3) Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Phanuwat C, Takeda N, Katayama K, Katayama H.

Genetic Diversity of Genogroup IV Noroviruses in Wastewater in Japan

Lett Appl Microbiol. 2011 Feb; 52 (2): 181-184.

(4) Bull RA, Hyde J, Mackenzie JM, Hansman GS, Oka T, Takeda N, White PA.

Comparison of the replication properties of murine and human calicivirus RNA-dependent RNA polymerases.

Virus Genes. 2010 Oct 20. [Epub ahead of print]

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

Development and application of a broadly reactive real-time reverse transcription-PCR assay for detection of murine noroviruses.

J. Virol. Methods. 2010 Nov;169(2):269-73.

(6) Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Takeda N, Katayama K, Katayama H.

Seasonal distribution and genetic diversity of genogroups I, II, and IV noroviruses in the Tamagawa River, Japan.

Environ Sci Technol. 2010 Sep 15;44(18):7116-22.

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

Detection of Sapovirus in oysters.

Microbiol Immunol. 2010 Aug;54(8):483-6.

(8) Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Nakamura H, Mori H, Kanda T, Oka T, Katayama K, Noda M,

Tanaka T, Takeda N, Sato H; Norovirus Surveillance Group of Japan.
Divergent evolution of norovirus GII/4 by genome recombination from May 2006 to February 2009 in Japan.
J. Virol. 2010 Aug;84(16):8085-97.

(9) 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
J. Med.Virol. 2010 Jul;82(7):1247-54.

(10) 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
Appl Environ Microbiol.
2010 Apr;76(8):2461-7

(11) 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.
J. Med.Virol. 2010 Apr;82(4):720-6.

(12) 岡智一郎, 片山和彦、小林慎一、飯高順子、野田衛

“愛知県と川崎市の食中毒事例から検出されたサボウイルス GI/2 の塩基配列の比較“

病原体微生物情報(IASR) Vol. 31 No. 11 (No. 369), 2010年11月号 p13-p14

2. 学会発表

(1) Harada S, Nishimura K, Kiyota N, Matsumoto K, Yahiro S, Okada M, Katayama K, Oka T.
Surveillance of pathogens in outpatients with gastroenteritis and genetic analysis of sapovirus strains between 2002 and 2009 in Kumamoto Prefecture, Japan
16th Federation of Asian Veterinary Associations Congress 2011
February 16-18, 2011.
Cebu City, Phillipines

(2) 岡智一郎、横山勝、高木弘隆、本村和嗣、村上耕介、佐藤裕徳、脇田隆字、片山和彦
カリシウイルスプロテアーゼ catalytic triad 形成残基のポリプロテイン切断活性への重要性
第 33回日本分子生物学会年会・第 83回日本生化学会大会合同大会
2010年12月7-10日、神戸

(3) 村上耕介、岡智一郎、脇田隆字、松田幹、片山和彦
ノロウイルスのヒト腸管由来培養細胞への結合様式
第 33回日本分子生物学会年会・第 83回日本生化学会大会合同大会
2010年12月7-10日、神戸

(4) 野田衛、片山和彦、石井孝司、岡智一郎、多田有希、山下和予、三瀬敬治、地方衛生研究所、

中村奈緒美、島田智恵、岡部信彦

「塩基配列情報共有化の食品媒介ウイルス感染症の疫学調査への応用」

第31回日本食品微生物学会総会、2010年11月11日～12日、滋賀

(5) 斎藤博之、東方美保、岡智一郎、片山和彦、田中智之、野田衛
食品検体のノロウイルス検査を目的としたパンソルビン・トラップ法の開発

第31回日本食品微生物学会総会、2010年11月11日～12日、滋賀

(6) 北元憲利、岡智一郎、片山和彦、Hansman GS、三好龍也、田中智之
サポウイルスに対する単クローン抗体の解析

第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日～9日、徳島

(7) 野田衛、入谷展弘、中田恵子、斎藤博之、田中忍、西川篤、北堀吉映、三谷亜里子、三瀬敬治、山下和予、岡智一郎、片山和彦、岡部信彦
関西で同時多発的に発生したノロウイルス食中毒事例の解析

第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日～9日、徳島

(8) 高木弘隆、北島正章、遠矢幸伸、岡智一郎、片山浩之、片山和彦、杉山和良
マウスノロウイルス(MNV)のマウス由来培養細胞での増殖性についての検討

第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日～9日、徳島

(9) 原田誠也、西村浩一、岡智一郎、片山和彦

「熊本県における感染性胃腸炎の起因病原体調査とサポウイルス genogroup の年次変化」

第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日～9日、徳島

(10) 斎藤博之、東方美保、岡智一郎、片山和彦、田中智之、野田衛

食品検体のノロウイルス検査のためのパンソルビン・トラップ法の開発と拡大適用

第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日～9日、徳島

(11) 村上耕介、岡智一郎、脇田隆字、松田幹、片山和彦

ノロウイルスのヒト腸管由来細胞への結合様式の解析

第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日～9日、徳島

(12) 北島正章、岡智一郎、原本英司、武田直和、片山和彦、片山浩之

国内の下水および河川水からの GenogroupIV ノロウイルスの検出および遺伝子解析

第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日～9日、徳島

(13) 岡智一郎、高木弘隆、遠矢幸伸、村上耕介、脇田隆字、片山和彦

ネコカリシウイルスの新規リバースジェネティクス系の構築

第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月

7日～9日、徳島

(14) 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22回学術集会
2010.11.6. 徳島

(15) 浅野有香、村上耕介、鈴木さやか、灘野大太、
宇理須厚雄、岡智一郎、片山和彦、松田幹
「母乳に含まれるヒトノロウイルス感染抑制因子の
探索」

日本農芸化学会中部支部第159回例会 2010年
10月30日 名古屋

(16) Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Takeda N,
Katayama K, Katayama H.

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

Fourth International Conference on Caliciviruses.

October 16-19, 2010, Santa Cruz, Chile

(17) Yokoyama M, Oka T, Katayama K, Kanda T,
Sato H.

Structural Insight into Substrate Recognition based
on P4 and P1 residues by Sapovirus 3C-like
Protease.

Fourth International Conference on Caliciviruses.

October 16-19, 2010, Santa Cruz, Chile

(18) Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Oka T,
Katayama K, Noda M, Tanaka T, Sato H, and
Norovirus Surveillance Group of Japan.

Evolution of Norovirus GII/4 in Japan by Genome

Recombination.

Fourth International Conference on Caliciviruses.

October 16-19, 2010, Santa Cruz, Chile

(19) Murakami K, Oka T, Wakita T, Matsuda T,
Katayama K.

Analysis of Mechanism of Human Norovirus
Binding to Caco-2 Cells.

Fourth International Conference on Caliciviruses.

October 16-19, 2010, Santa Cruz, Chile

(20) Oka T, Yokoyama M, Takagi H, Tohya Y,
Motomura K, Murakami K, Wakita T, Sato H,
Katayama K.

Antiviral Development

Fourth International Conference on Caliciviruses.

State-of-the Art

October 16-19, 2010, Santa Cruz, Chile

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 22 年度厚生労働科学研究費補助金
(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

研究分担報告書

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

研究分担者	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
研究協力者	飯塚 節子	島根県保健環境科学研究所
研究協力者	山下 育孝	愛媛県立衛生環境研究所
研究協力者	森野 吉晴	和歌山市衛生研究所
研究協力者	原田 誠也	熊本県保健環境科学研究所
研究協力者	西口 智子	堺市衛生研究
研究協力者	三好 龍也	堺市衛生研究
研究協力者	内野 清子	堺市衛生研究
研究協力者	吉田 永祥	堺市衛生研究
研究分担者	岡 智一郎	国立感染症研究所

研究要旨

Immunochromatography (IC) 法によるサポウイルス迅速診断系の構築を試みた。臨床検体及びサポウイルス特異抗体との反応系は構築されたが、検出感度が低いことが判明した。その理由として抗原検出モノクローナル抗体の反応性が、特に遺伝子型別 Genotype II、IV、V で極めて低いことが判明した。サポウイルス VLPs 発現系の改良と共に、新たなモノクローナル抗体の作製が大きな課題となった。検出抗体のカクテル化では明瞭なラインが得られ、一層の目視が可能となった。

A. 研究目的

ウイルス性急性胃腸炎の主な原因ウイルスはノロウイルスであるが、サポウイルスも主要な原因ウイルスで大きな流行事例が報告されている。例えば、2010 年

には愛知県、三重県、岐阜県の広域に亘り給食弁当を原因食とする集団食中毒事例で、喫食者 3,827 名中 655 名 (17.1%) が胃腸炎症状を呈し、有症者と原因施設の従事者からサポウイルス) が検出された。

2008年には島根県内では食材のアサリを原因食とする集団感染事例の報告がある。

サポウイルス遺伝子の検出法はRT-PCR法と電子顕微鏡によるウイルス粒子の検出がある。いずれの方法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迅速な感染拡大防止対応には十分に適していない。前年度の本研究班において15分で迅速診断可能な方法の一つであるイムノクロマト法(IC法)の開発について報告した。十分な感度が得られず感度向上が課題として越年した。

今回IC法の改良を試みたので、その進捗状況について報告する。

B. 研究方法

1. 材料

昨年度の検体、すなわち島根県内及び和歌山市内感染事例から合計19糞便検体を対象とした。しかし、微量の検体で再検査に対応できないものがほとんどであった。

今年度は新たに愛媛県内及び熊本県内でのサポウイルス感染事例から10検体を用いて検討した。

2. 方法 Latex 粒子標識方法

IC法はラテックス粒子の標識方法は前年度に準じた。即ち、

抗サポウイルス(SV)モノクローナル抗体#8127、#616、#819の三種類を用いてProtein Aを用いたカラムによりIgGを精製した。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抗SV抗体#8127、#616、#819抗体を用いた。糞便検体10%乳剤をクイックEx-ノロウイルス『生研』(デ

ンカ生研社製)に添付されていた検体浮遊液を使用した。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。その上から以下の三種類のラテックス標識抗体をそれぞれのホールに種類ごと所要量滴下し、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。

三種類の標識抗体を個別に反応させる方法では、サポウイルス遺伝子型の判別には有用であるが反応ラインが薄い短所が見られた。そこでこれらの三種類の標識抗体を混合して反応させると、コントロールラインおよび検体ラインが明瞭に目視出来た。ただし遺伝子型別の判定は出来ていない。

3. モノクローナル抗体

免疫源である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)から国立感染研にて作製された。

(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. 研究結果

IC 反応成績を図 I 及び表 I に示す。三種類の標識抗体を混合して反応させたものである。上段 4 検体の明瞭な反応ラインが読める。最下段は、判定は(+/-)であるが、採光の角度によつて淡薄なラインの形成が見られた。成績表 1. はの遺伝子型は、RT-PCR による成績を併記したものでこの IC 法からは判定できていない。表 2 は昨年の成績に今年度の成績を合わせ、かつ遺伝子型別の反応性をまとめた。

D. 考察

測定系の試みとして抗体カクテル化した反応系では、検体ライン、コントロールラインが極めて明瞭に目視、判定出来た。遺伝子型の判定があれば最良だが、食中毒事例に際してはサポウイルス定性のみでも危機対応、すなわち感染拡大防止に対応可能と考える。

一方、昨年の課題である反応性の向上に対する回答は十分ではなかった。いくつかの理由が考えられるが、大きな理由の一つは昨年以降 IC 法の中核であるモノクローナル抗体が得られなかったことである。その原因は多量のウイルス様粒子 (VLPs) が得られなかったことである。その原因は明らかでないが、現在 VLPs 発現方法の改良が積極的に行われている。

ラテックス標識やストリップの作製などの測定系過程に大きな課題はないと思われる。臨床検体は、ノロウイルスのように多量のかつウイルス量の豊富な検体入手が困難な場合があるが、全国地衛研

の協力を得て進めたいと考えている。

E. 結論

標識抗体をカクテル化することにより IC 法反応ラインが明瞭に目視できるようになった。しかし、検出感度は微増の状況である。サポウイルス VLPs の大量発現の技術的改良が積極的に行われているが、多量の VLPs の入手により IC 法の改良は可能である。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Kazushi Motomura, Masaru Yokoyama, Hiroataka Ode, Hiromi Nakamura, Hiromi Mori¹, Tadahito Kanda, Tomoichiro Oka, Kazuhiko Katayama, Mamoru Noda, Tomoyuki Tanaka, Naokazu Takeda, Hironori Sat^{1*}, and the Norovirus Surveillance Group of Japan

Divergent Evolution of Norovirus GII/4 by Genome Recombination over 2006-2009 in Japan . J.Virol, 2010.

(2) Yasutaka Yamashita, Yuka Ootsuka, Meiko Kondo, Mitsuaki Oseto, Mitsunori Doi, Takeshi Miyamoto, Tetsuroo Ueda, Hirokazu Kondo, Tomoyuki Tanaka, Takaji Wakita, Kazuhiko Katayama, Naokazu Takeda,, and Tomoichiro Oka. Molecular Characterization of Sapovirus Detected in a Gastroenteritis Outbreak at a Wedding Hall. J.Med.Virol. 2010, 82:720-726

(3) 田中智之. 院内感染予防における

ノロウイルス迅速診断法の活用
感染対策 ICT ジャーナル, 2010.5(4),
427-433

2. 学会発表

なし

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

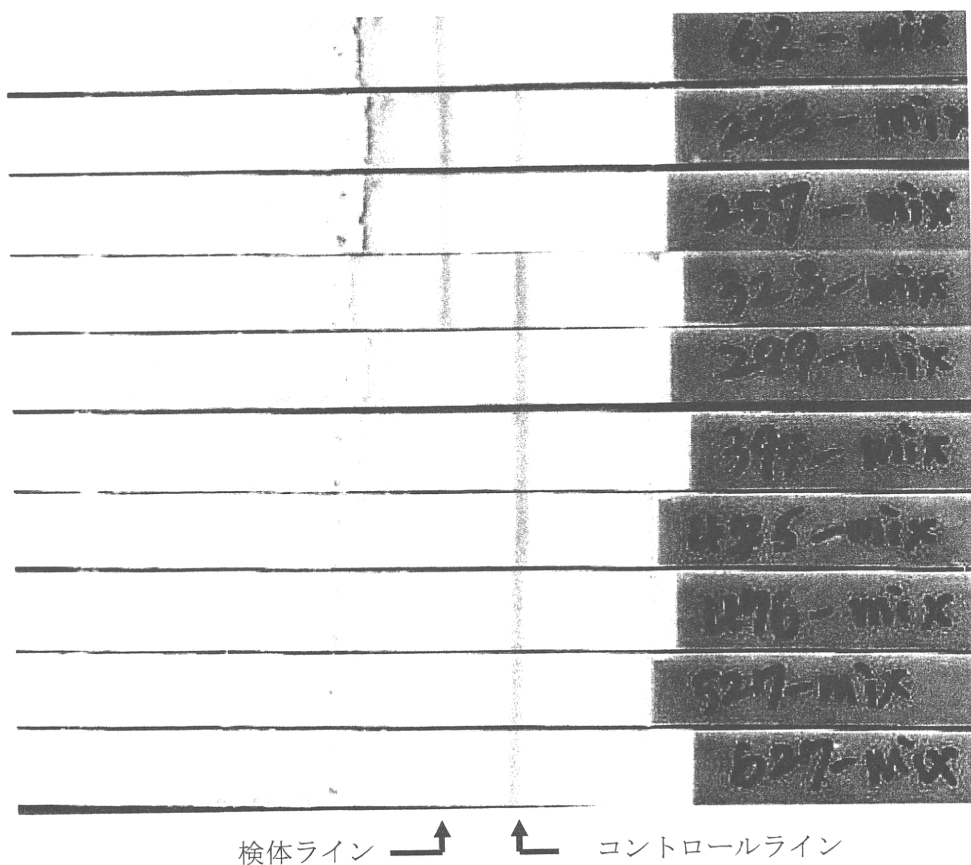


図 1 サポウウイルス イムノクロマト法の実際

No	検体番号	PCR 結果	遺伝子型	IC 法
1	10-62	1st +	GI	`+
2	10-223	1st +	GI	`+
3	10-257	1st +	GI	`+
4	10-323	1st +	GI	`+
5	10-299	1st +	GI	`-
6	10-394	1st +	GII	`-
7	10-475	Nest +	GII	`-
8	10-476	Nest +	GII	`-
9	10-527	1st +	GII	`-
10	10-627	1st +	GV	`+/-

表 1. 上記 図 1 の判定結果

Mbs / Genotype	GI	GII	GIV	GV
8127	6/10	1/11	2/6	1/2
616	5/6	0/6	0/6	0/2
819	0/6	0/6	0/6	0/2

表 2 IC 法によるサポウイルス測定結果

平成 22 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

カリシウェブの更新と展開

研究分担者 三瀬敬治：札幌医科大学医学部衛生学講座

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、カリシウェブをデザインから新しくし、URL も <http://teine.cc.sapmed.ac.jp/~calicinew/> に変更した。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、国立 DNA データバンク (DDBJ) から提供される更新ファイルのデータ形式が変更となり、必要なカリシウイルスの情報を取り出すためのプログラムに大幅な変更を加えた。また DDBJ に登録される情報に、長大なものが増加してきたため、昨年度よりも更なる高速化が必要とされ、毎日のデータ更新を行うプログラムを全面的に見直し、約 5 倍の高速化に成功。毎日の更新データ 1 ギガあたり 40 分で対応可能となった。デザインも新カリシウェブとの統一性を持つものとした (平成 23 年 3 月 2 日現在登録データ数 14967 件、平成 20 年 8 月末から約 5500 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における、系統樹作成サービスは順調に登録データ数を増やし、解析データ数は昨年の報告より 40 増加の、57 となった (平成 23 年 3 月 2 日現在：登録者数 23 名)。

A. 研究目的

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 の情報はあまりに膨大なものとなっている。

われわれはこれまで、必要な遺伝子情報を的確に検索し、比較検討を行うため、カリシウイルスに特化したデータベース、そしてカリシウイルスの情報を共有するインターネット上の場として「カリシウェブ」の構築と運用を行ってきた。

本年度は、昨年度に検討した新しいシステムとデザインに変更した「新カリシウ

ウェブ」を公開し、運用を開始した。データベースのプログラムも高速化が必要とされたため、大きな改善を行った。

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、ネット上で無料で提供されるコミュニケーション・マネジメント・システム (CMS) である Xoops を利用してきたが、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、平成 21 年度には CMS 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い、22年度に正式に公開した。

B-2. カリシウェブ特化遺伝子データベースの改善 (Flat-File 形式のデータへの対応) :

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からカリシウェブ上の MySQL にデータベースをしてきたが、毎日更新される大量のデータから必要な情報を取り出すために、DDBJ-XML 形式のデータを利用してきた。

しかし、DDBJ から DDBJ-XML 形式のデータ提供が平成 22 年 6 月 25 日で終了し、Flat-File 形式のデータによる提供となったため対応を行った。

すべてのプログラムは Perl 言語で書かれた。

B-3. カリシウェブ特化遺伝子データベースの改善 (データ更新の高速化) :

遺伝子解析技術の向上と共に、DDBJ へ登録される情報数が増加しているが、同時に、一度に非常に長いデータの登録が多くなってきている。毎日更新されるデータから、カリシウイルスに関するデータ抽出のプログラムは、データが長くなれば抽出に時間がかかってしまう。このため、プログラムを全面的に見直した。

すべてのプログラムは Perl 言語で書か

れた。

B-4. 系統樹作成サービス「楽しカリシ」の運用 :

新カリシウェブの公開と共に、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」も新しいシステムへと移行した。

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其中で、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。

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 CMS 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 :

新しく公開した新カリシウェブは、デザインが非常にシンプルで、使い勝手も向上した。図 1 に新旧のカリシウェブのトップページを示す。フォーラムは、ユーザー未登録者がアクセス可能なもの、ユーザー登録者のみアクセス可能なもの、さらにユーザー登録者の中で、再度登録を行ったものがアクセスできるプライベートフォーラムの三段階にセキュリティレベルが設定されている。利用者が直感的にフォーラムへ書き込めるようになった。

ダウンロードのページでは、登録ユーザーが自分でファイルをアップロードし、

サイト管理者がこれを認証することによって公開されるように変更した。これまでは、一度サイト管理者にデータを送って登録するシステムであったため、使い勝手が向上した。

現在は、カリシウェブの主要メンバーとさらに意見交換を行いながら、デザインや機能の改善を進めている。

C-2.カリシウェブ特化遺伝子データベースの構築と改善：

図 2 に Flat-File 形式のデータと DDBJ-XML 形式のデータを示す。

これまでは DDBJ-XML 形式のタグを利用して、必要なデータを選択してきたが、Flat-File 形式のデータでは困難である。DDBJ から Flat-File 形式のデータを DDBJ-XML 形式に変換するプログラム `ddbfff2ddbjxml.pl` が提供されたため、これをカリシウェブの更新プログラムに組み込んだ。

C-3.カリシウェブ特化遺伝子データベースの改善（データ更新の高速化）：

DDBJ から提供されるデータの中で最も長い行となるのは遺伝子の塩基配列と、そこから得られるアミノ酸配列である。このため、DDBJ-XML 形式に変換したデータから、これら 2 つの配列データ、さらに本データベースに不要出あることがわかっているデータを削除してから、再度データをサーチするアルゴリズムとした。表 1 にプログラムの流れを示す。C-2 で述べた Flat-File 形式のデータへの対応および、高速化のために新しく組み込んだ部分を下線で示している。

この結果、これまでは更新データが 1 ギガバイトの大きさの場合、更新完了まで 3 時間 30 分程度を要していたが、40 分程度で更新が完了するようになった。約 5 倍の高速化である。

デザインも新カリシウェブとの統一性を持つものとした。平成 23 年 3 月 2 日現在の登録データ数は 14967 件（平成 22 年同期より、約 3000 件増加）、平成 20 年 8 月末からのデータベースへのアクセス数は約 5500 回（平成 22 年同期より約 3500 回増加）と非常に活用されているのがわかる。

C-4. 系統樹作成サービス「楽しカリシ」の運用：

カリシウェブ内のプライベートフォーラムを用いて、平成 21 年 7 月から開始した系統樹作成サービス「楽しカリシ」は順調に解析データを増やし、平成 23 年 3 月 2 日現在の登録者数 23 名、解析データ数 57 である。これは平成 22 年同期より登録者数 2 名、解析データ数 40 の増加となった。

D. 研究発表

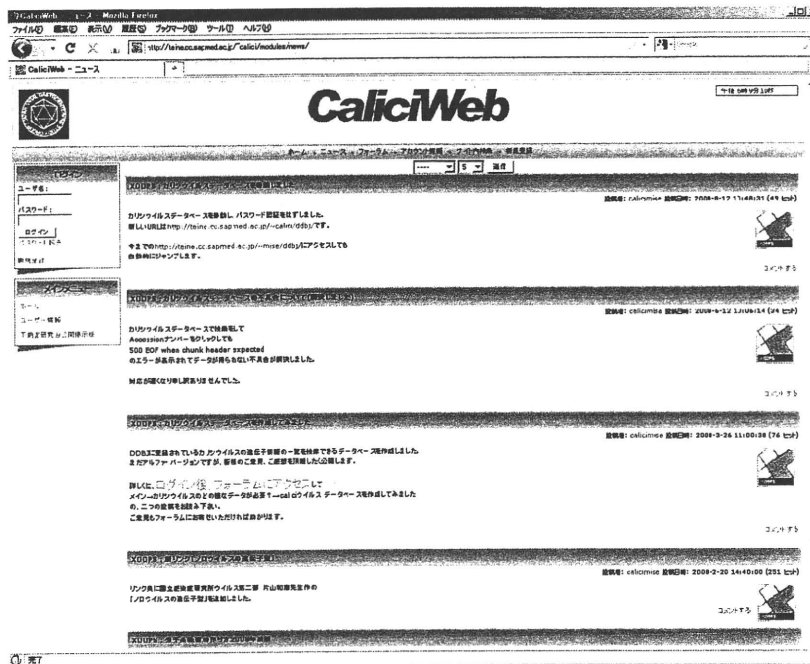
1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

(a)



(b)

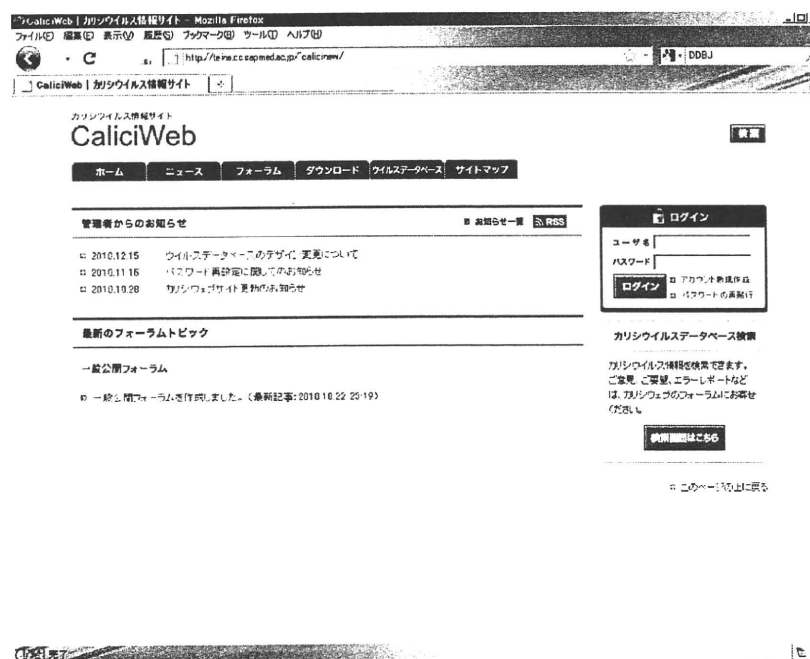


図 1 : 新旧カリシウェブのトップページ : (a)旧カリシウェブ。(b)新カリシウェブ

(a)

```
LOCUS      HQ008349                2446 bp    RNA    linear    VRL 20-NOV-2010
DEFINITION Bovine enteric virus Bo/16TE/2010/ITA polyprotein gene, partial
            cds.
ACCESSION  HQ008349
VERSION    HQ008349.1
KEYWORDS
SOURCE     Bovine enteric virus Bo/16TE/2010/ITA
ORGANISM   Bovine enteric virus Bo/16TE/2010/ITA
            Viruses: ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage:
            Caliciviridae: Norovirus.
REFERENCE  1 (bases 1 to 2446)
AUTHORS    Di Martino,B., Di Profio,F., Martella,V., Ceci,C. and Marsilio,F.
TITLE      Molecular detection and characterization of unclassified bovine
            enteric caliciviruses in Italy
JOURNAL    Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 2446)
AUTHORS    Di Martino,B., Di Profio,F., Martella,V., Ceci,C. and Marsilio,F.
TITLE      Direct Submission
JOURNAL    Submitted (30-JUL-2010) Scienze Biomediche Comparate, University of
            Teramo, Piazza Aldo Moro, 45, Teramo, TE 64100, Italy
FEATURES   Location/Qualifiers
            source          1..2446
                                /organism="Bovine enteric virus Bo/16TE/2010/ITA"
                                /mol_type="genomic RNA"
                                /isolate="Bo/16TE/2010/ITA"
```

(b)

```
<?xml version="1.0" standalone="no"?>
<!DOCTYPE DDBJXML SYSTEM "DDBJXML.dtd">
<DDBJXML>
<LOCUS>HQ008349</LOCUS>
<LENGTH>2446</LENGTH>
<MOLECULAR_FORM>linear</MOLECULAR_FORM>
<DIVISION>VRL</DIVISION>
<LAST_UPDATE>20-NOV-2010</LAST_UPDATE>
<DEFINITION>Bovine enteric virus Bo/16TE/2010/ITA polyprotein gene, partial</DEFINITION>
<ACCESSION>HQ008349</ACCESSION>
<VERSION>HQ008349.1</VERSION>
<KEYWORDS></KEYWORDS>
<SOURCE>Bovine enteric virus Bo/16TE/2010/ITA</SOURCE>
<ORGANISM>Bovine enteric virus Bo/16TE/2010/ITA</ORGANISM>
<TAXONOMY>Viruses: ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage:Caliciviridae:
Norovirus.</TAXONOMY>
<REFERENCE ID="1">
  <authors>Di Martino,B., Di Profio,F., Martella,V., Ceci,C. and Marsilio,F.</authors>
  <title>Molecular detection and characterization of unclassified bovine enteric caliciviruses in Italy</title>
  <journal>Unpublished</journal>
</REFERENCE>
<REFERENCE ID="2">
  <authors>Di Martino,B., Di Profio,F., Martella,V., Ceci,C. and Marsilio,F.</authors>
  <title>Direct Submission</title>
```

図2 Flat-File 形式データと XML 形式データ。(a)Flat-File 形式データ : 1 行に複数の情報が含まれており、プログラムでは情報抽出が困難。(b)XML 形式データ : タグ (“<”および “>”) で囲まれている部分) で情報が区切られており、情報抽出が容易。

表 1: 更新データから関連情報を抽出するプログラムの流れ。下線部は本年度改善した部分。

1. アップデートされた Flat-File 形式の更新ファイルを DDBJ から転送
2. ddbfff2ddbjxml.pl を用いて更新ファイルを XML 形式に変換
3. 塩基対、アミノ酸配列など、キーワードに無関係な情報を削除
4. Accession Number とキーワードでカリシウイルス関連データをピックアップ
5. カリシウイルス関連の Flat-File 形式のデータを DDBJ から転送
6. ddbfff2ddbjxml.pl を用いてデータを XML 形式に変換
7. データベースへの登録

研究成果の刊行に関する一覧表 (平成 22 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
Izumiya H, Pei Y, Terajima J, Ohnishi M, Hayashi T, Iyoda S, Watanabe H.	New system for multilocus variable-number tandem-repeat analysis of the enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> strains belonging to three major serogroups: O157, O26, and O111.	Microbiol Immunol.	54	569-577	2010
Masaaki Minami, Mariko Ichikawa, Hideyuki Matsui, Nanako Hata, Naoki Wakiyama, Masakado Matsumoto, Michio Ohta, Tadao Hasegawa	Prevalence of a Streptococcal Inhibitor of a Complement-Mediated Cell lysis-like Gene (<i>sicG</i>) in <i>Streptococcus Dysgalactiae subsp. Equisimilis</i> .	Current Microbiology	Epub ahead of print		2010
Tadao Hasegawa, Akira Okamoto, Takuya Kamimura, Ichiro Tatsuno, Sin-Nosuke Hashikawa, Mitsutaka Yabutani, Masakado Matsumoto, Keiko Yamada, Masanori Isaka, Masaaki Minami, Michio Ohta	Detection of invasive protein profile of <i>Streptococcus pyogenes</i> M1 isolates from pharyngitis patients.	Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica	118	167-178	2010

Masaaki Minami, Yukio Wakimoto , <u>Masakado</u> <u>Matsumoto</u> , Hideyuki Matsui, Yasue Kubota, Atsushi Okada, Masanori Isaka, Ichiro Tatsuno, Yasuhito Tanaka, Tadao Hasegawa	Characterization of <i>Streptococcus pyogenes</i> isolated from balanoposthitis patients presumably transmitted by penile-oral sexual intercourse.	Current Microbiology	61	101-105	2010
Oka T, Takagi H, Tohya Y, Murakami K, Takeda N, Wakita T, <u>Katayama K.</u>	Bioluminescence technologies to detect calicivirus protease activity in cell-free system and in infected cells.	Antiviral Research.	Epub ahead of print		2010
Bull RA, Hyde J, Mackenzie JM, Hansman GS, <u>Oka T</u> , Takeda N, White PA.	Comparison of the replication properties of murine and human calicivirus RNA-dependent RNA polymerases.	Virus Genes.	Epub ahead of print		2010
Sharp, T. M., Guix, S., <u>Katayama K.</u> , Crawford, S. E., Estes, M. K.	Inhibition of Cellular Protein Secretion by Norwalk Virus Nonstructural Protein p22 Requires a Mimic of an Endoplasmic Reticulum Export Signal.	PLoS ONE	5	e13130	2010
Oka T, Murakami K, Wakita T, <u>Katayama</u> <u>K.</u>	Comparative site-directed mutagenesis in the catalytic amino acid triad in calicivirus proteases	Microbiol Immunol.	55	108-114	2011
Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Phanuwan C, Takeda N, <u>Katayama K</u> , Katayama H.	Genetic Diversity of Genogroup IV Noroviruses in Wastewater in Japan.	Lett Appl Microbiol.	52	181-184	2011