

ORF1 にコードされる RdRp 領域の YGDD モチーフ上流の塩基配列のアライメントが可能となり、そこから Capsid N/S 領域の RT-PCR による増幅が可能となった。本研究により構築された、キメラウイルス解析に対応したプライマーセットと新規分子疫学解析手法は、NoV の抗原性変化、病原性変化を追跡し、流行予測をする上で有用である。今後、本方法をノロウイルスの分子疫学手法として広く普及させる必要がある。

E. 研究発表

英文論文発表のみ

1. Murakami K, Suzuki S, Aoki N, Okajima T, Nadano D, Uchida K, Yamashita K, Oka T, Katayama K, Takeda N, Matsuda T. Binding of Norovirus virus-like particles (VLPs) to human intestinal Caco-2 cells and the suppressive effect of pasteurized bovine colostrum on this VLP binding. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 74(3): 541-547. 2010.
2. Sharp, T. M., Guix, S., Katayama K., 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(10) e13130, 2010.
3. 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 Res.* vol. 90, 9-16, 2011.
4. Oka, T., Murakami, K., Wakita, T., Katayama, K. Comparative site-directed mutagenesis in the catalytic amino acid triad in calicivirus proteases. *Microbiol Immunol*. Vol. 55, 108-14. 2011.
5. Kitajima, M., Oka, T., Haramoto, E., Phanuwat, C., Takeda, N., Katayama, K., Katayama, H. Genetic diversity of genogroup IV noroviruses in wastewater in Japan. *Letters in applied microbiology*. Vol. 52, 181-4, 2011.

6. Hansman, G. S., Biertumpfel, C., Georgiev, I., McLellan, J. S., Chen, L., Zhou, T., Katayama, K., Kwong, P. D. Crystal structures of GII.10 and GII.12 norovirus protruding domains in complex with histo-blood group antigens reveal details for a potential site of vulnerability. *Journal of virology* vol. 85, 6687-701, 2011.
7. Hansman, G. S., Shahzad-Ul-Hussan, S., McLellan, J. S., Chuang, G. Y., Georgiev, I., Shimoike, T., Katayama, K., Bewley, C. A., Kwong, P. D. Structural basis for norovirus inhibition and fucose mimicry by citrate. *J of Virol*. Vol. 86, 284-92, 2012.
8. Matsuhira, T. Kaji, C. Murakami, S. Maebashi, K. Oka, T. Takeda, N. Katayama, K. Evaluation of four antiseptics using a novel murine norovirus. *Exp Anim*. Vol. 61, 35-40, 2012
9. Hansman G. S., Taylor D. W., McLellan J. S., Smith T. J., Georgiev I., Tame J. R. H., Park Sam-Yong., Yamazaki M., Gondaira F., Miki M., Katayama K., Murata K., Kwong P. D. Structural basis for broad detection of genogroup II noroviruses by a monoclonal antibody that binds to a site occluded in the viral particle. *J. Virol.* published ahead of print 25 Jan. 2012.

G. 知的所有権の出願・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・ウイルス第二部）

研究要旨：ノロウイルス粒子と組織血液型抗原（糖鎖）との相互作用が感染初期に重要であることが示唆されている。しかし、相互作用に関する生化学的、構造生物学的情報は極一部の遺伝子型の株に限られており、ノロウイルス全般に普遍的であるかが不明である。本研究では、この相互作用に関する構造情報を得ることを目的に、いくつかの株のウイルス様中空粒子を調製し、結晶化を試みている。

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、ノロウイルスワクチンや抗ノロウイルス薬は存在せず、その開発が待たれている。近年、ノロウイルス粒子と組織血液型抗原（糖鎖）との相互作用が注目され、感染初期に重要であることが示唆されている。非常に多くの遺伝子型を含むノロウイルスは、その遺伝子型により糖鎖結合パターンが異なる。しかしながら、これらの生化学的データを裏付ける構造生物学的データは極一部の株（ノーウォーク株；Genogroup I, genotype 1、および、VA387株；Genogroup II, genotype 4）に限られており、普遍性の理解にはほど遠い。本研究では、ウイルス粒子と糖鎖との相互作用に関する構造情報を得る目的で、いくつかの遺伝子型の株からウイルス様中空粒子（VLP）を調製し、結晶化を試みた。

B. 研究方法

ノロウイルスチバ株（GI/4）、ハワイ株

（GII/1）、ナリタ株（GII/4）、ウエノ株（GII/6）の VP1 タンパク質をコードする遺伝子領域をバキュロウイルストランスファクターに組み込み、Sf9 細胞において組換えバキュロウイルスを調製した後、それらを HighFive 細胞に感染させ、培地中より細胞外へ放出された VLP を回収した。

C. 研究結果と考察

1. 三重変異チバ株 VLP の結晶化

昨年度報告したように、チバ株 VP1 タンパク質の Leu43-Ala44-Thr45 を Ala-Pro-Val に三重置換すると、組換えバキュロウイルスを感染させた HighFive 細胞から均一な粒子径の VLP が得られる。VLP は培地から超遠心により沈殿させた後、30 % (w/w) CsCl を含む Grace's Insect Medium に懸濁して 20 時間超遠心し、粗精製した後、更にショ糖密度勾配に重層して超遠心分離し、精製した。これを結晶化のサンプルとし、結晶化条件の検索、精密化を行っている。現在、分解能 7 Å 程度の X

線回折データを得ているが、詳細な構造の決定には至っていない。

2. ハワイ株、ナリタ株、ウエノ株の VLP 調製

ナリタ株、ウエノ株の VP1 遺伝子は当研究室で以前にクローニングされた遺伝子を用いた。ハワイ株は全遺伝子を合成した。いずれの場合もチバ株 VLP の発現と同様に、HighFive 細胞で発現させ、VLP の精製を行った。今後、これら三種の VLP は三次元結晶化を目指す。

野生型チバ株 VLP で認められたように、この三種の VLP も SDS-PAGE 上で大小 2 種の成分 (分子量 57 kDa と 50 kDa) から成ることが確認された。57 kDa タンパク質はほぼ正常な VP1 と考えられるが、50 kDa タンパク質は N 末端もしくは C 末端が昆虫細胞内で切断を受けた産物と考えられる。切断部位は決定されていない。

D. 結論

ノロウイルス VLP 並びにその糖鎖複合体の X 線結晶構造解析による三次元理解構造の解明により、糖鎖結合阻害を標的とした阻害薬の創出が可能になるものと期待される。

E. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Y. Someya, H. Shirato, K. Hasegawa, T. Kumasaka and N. Takeda. (2011) Assembly of Homogeneous Norovirus-like Particles Accomplished by Amino Acid

Substitution. *J. Gen. Virol.* 92(10), 2320-2323.

- (2) Yuichi Someya. (2012) From head to toe of the norovirus 3C-like protease. *BioMol. Concepts* (in press)

2. 学会発表

- (1) Y. Someya, H. Shirato, A. Kumagai, H. Ito, S. Furukawa, T. Wakita, K. Ishii, H. Narimatsu, and T. Kubota "Structural Basis for recognition of Lewis a antigen by Norovirus" The IUMS 2011 Sapporo Congress, XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan 2011 年 9 月 11-16 日
- (2) K. Higo-Moriguchi, H. Horikoshi-Shirato, Y. Someya, Y. Okuno, Y. Kurosawa, and K. Taniguchi "Isolation of cross-reactive human monoclonal antibodies against human noroviruses" The IUMS 2011 Sapporo Congress, XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan 2011 年 9 月 11-16 日

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 国立感染症研究所 ウイルス第2部

研究協力者

岡 智一郎	国立感染症研究所 ウイルス第2部
三瀬 敬治	札幌医科大学
森 功次	東京都健康安全研究センター
入谷 展弘	大阪市立環境科学研究所
植木 洋	宮城県保健環境センター
飯塚 節子	島根県保健環境科学研究所
原田 誠也	熊本県保健環境科学研究所
片山 和彦	国立感染症研究所 ウイルス第2部

研究要旨

急性胃腸炎の原因ウイルスであるサポウイルスは塩基配列の多様性に富む。国内外におけるサポウイルスの検出例増加に伴い、検出されたサポウイルス株のタイピング手法確立の重要性がクローズアップされてきた。本研究では構造タンパク質全長の塩基配列が明らかでない 107 株のサポウイルス株を用いて、サポウイルスの遺伝子タイピング法を確立した。ヒト由来のサポウイルスは4つの遺伝子群、16の遺伝子型に分類された。

A. 研究目的

サポウイルスは急性胃腸炎の原因ウイルスである。近年、高精度なサポウイルス核酸検出系を用いたスクリーニング検査によって、サポウイルスが従来

考えられていたよりも高頻度に急性胃腸炎を引き起こしていることが明らかになってきた。サポウイルスによる急性腸炎は年齢に関わらず発生している。散发事例の解析ではノロウイルスと同様、冬期に

検出数が増加するものの、集団感染事例は季節を問わずに発生している実態が明らかになってきた。主な感染ルートはヒト-ヒト感染と考えられているものの、大規模な食中毒事例も報告されており、ノロウイルス同様、サポウイルスの全国レベルでのサーベイランス体制の構築とともに、検出株のタイピング手法確立の重要性がクローズアップされてきた。サポウイルスのゲノムはプラス1本鎖の RNA で、ゲノム上にプロテアーゼ、ポリメラーゼといった非構造タンパク質と、構造タンパク質をコードしている。

ヒト由来のサポウイルス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、サポウイルスの検出は主に 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。

2006 年に高精度なサポウイルス核酸検出系が構築され、さらに分担研究者が所属する研究室と小児科医院、衛生研究所の約 6 年間におよぶ継続的な解析によってサポウイルスは年によって異なる遺伝的クラスターに属する株が検出されるという実態が明らかになっている(Harada et al., J. Med. Virol. 81: 1117-1127, 2009)。これは特定の遺伝的クラスターに属するウイルス株が 10 年以上主流でありつづけているノロウイルスとは異なる特徴である。

これまでに複数のサポウイルスタイピング法が報告されているが、分類に使用しているゲノム領域(ポリメラーゼ領域もしくは構造タンパク質領域)、解析に使用する長さ(部分配列か全長配列)が異なり、解析も塩基配列で行うものとアミノ酸配列を用いるものがある。さらに系統樹解析のための reference 株も統一されていない。現時点では、少なくともゲ

ノム全長もしくは構造タンパク質コード領域を用いた場合に、いずれの手法でもヒト由来のサポウイルスが4つの遺伝子群 (genogroup)に分類される点については世界的に見解が一致しているものの、それより詳細なタイピングについては明確な基準のないまま、異なるタイピング法が複数提唱されているのが現状である。そのため、研究グループ間で検出された株の比較が困難な状況にある。

このような状態から、2010年10月に、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、これらのウイルスの分類には、少なくとも構造タンパク質全長の塩基配列が決定されている株を用いることが提唱された。

本研究では国際ルールに従い、解析時点で入手可能であった構造タンパク質全長塩基配列が明らかでないサポウイルス株を用い、それらを用いた genotyping 法を構築することを目的とした。

B. 研究方法

1. サポウイルス構造タンパク質コード領域全長塩基配列の収集

本研究班の分担研究者: 三瀬 敬治氏によって構築、運用されているカリシウイルスのリアルタイム塩基配列データベースである「カリシウェブ」(<http://teine.cc.sapmed.ac.jp/~calici/ddbj/>)を用いて Genbank/EMBL/DDBJ に登録されているサポウイルス核酸のち、構造タンパク質コード領域全長を含む 90 株を収集した。衛生研究所との共同研究により、本研究班で新たに決定した 16 株、合計 106 株、さらに GIII 株の代表株としてブタ由来のサポウイルス 1 株の塩基配列データを用いた (表参照)。

2. 遺伝的距離の算出

国立遺伝学研究所が運用するオンラインサーバー (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) を利用して、合計107株のサポウイルス株の構造タンパク質全長塩基配列 (約1700塩基) を用いて、ClustalW (version 1.83) にてアライメントを行い、Kimura's two parameter 法で遺伝距離を算出し、その相対頻度のヒストグラムを作成した。

C. 研究結果

106株のヒト由来サポウイルス、1株のブタ由来サポウイルス、合計107株のサポウイルスの株間の遺伝的距離を算出し、その頻度分布をヒストグラム解析した結果、3つの独立した対称形のピークにわかれることが明らかになった(図1)。これらのピークの平均値±3SD を算出したところ、0-0.127, 0.201-0.379, 0.562-0.803となった(図1)。これらは遺伝的距離の大きな方から遺伝子群 genogroup、遺伝子型 (genotype)、intra-genotype に相当すると判断した。

遺伝子群 genogroup、遺伝子型 (genotype) のカットオフ値は、それぞれ、0.561未満、0.200未満とした。

この遺伝距離の基準に従ってクラスタリングを行ったところ、サポウイルスは5つの genogroup にわかれ、これまでの世界共通のナンバリングシステムに従って、ヒト由来株を GI, GII, GIV, GV とし、ブタ由来株を GIII とした。さらに各株の遺伝的距離を統計解析することにより、GI および GII はそれぞれ7つの genotype に、GIV および GV はそれぞれ1つの genotype に分類されることが示された。現時点ではヒト由来のサポウ

ルスは16の genotype に分類されることになる。

D. 考察

サポウイルスの 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。我々のこれまでの検討では、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。さらに、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。

検出率の高さと遺伝的多様性の大きさ、さらに抗原性との関連性という観点から、サポウイルス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。

サポウイルスは1977年に札幌で検出されたことから、この名前がついている。その後、世界各地でサポウイルスに属する株が検出されているが、本研究に用いた106株のヒト由来サポウイルスのうち、84%の株が我が国の研究者、および研究グループ(研究機関)が解析しデータベースに登録したもので、日本の研究者がサポウイルスの解析に果たした役割は非常に大きい。このような解析には衛生研究所、国立感染症研究所とのネットワーク、海外研究機関との共同研究体制に加え、高精度なサポウイルス核酸スクリーニング系、さらに新規に開発したサポウイルス構造タンパク質コード領域からゲノム末端までのゲノム増幅法を組み合わせることで達成された。

また、本研究班で構築されたカリシウェブを用い

ることで、そのほとんどが数百塩基の登録情報であるサポウイルスの塩基配列データの中から構造タンパク質コード領域の全長塩基配列を含むデータベース公開株を効率的に収集することができた。

ヨーロッパでは決定したノロウイルスの塩基配列を入力すると、ウェブ経由で genotyping を自動解析するシステム (Norovirus Genotyping Tool: <http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>) が運用されている。

今後、サポウイルスについてもこのようなシステムが導入できれば、サーベイランスのための有力なツールになると考えられる。

E. 結論

サポウイルスの分子疫学解析を行う上で必須となる遺伝子タイピング法を確立した。本研究で確立した遺伝子型分類法、および各遺伝子型の reference 株のセットは国内だけでなく、世界レベルでのサポウイルス検出株のサーベイランスの基盤となる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Human sapovirus classification based on complete capsid nucleotide sequences.

Oka T, Mori K, Iritani N, Harada S, Ueki Y, Iizuka S, Mise K, Murakami K, Wakita T, Katayama K. Arch Virol. 2011 Nov 11. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

Oka T, Hansman GS, Murakami K, Todaka R, Wakita T, Katayama K, sapovirus study group of Japan.

Human sapovirus classification scheme based on pairwise distance analysis of complete capsid nucleotide sequences.

IUMS 2011、2011年9月、札幌

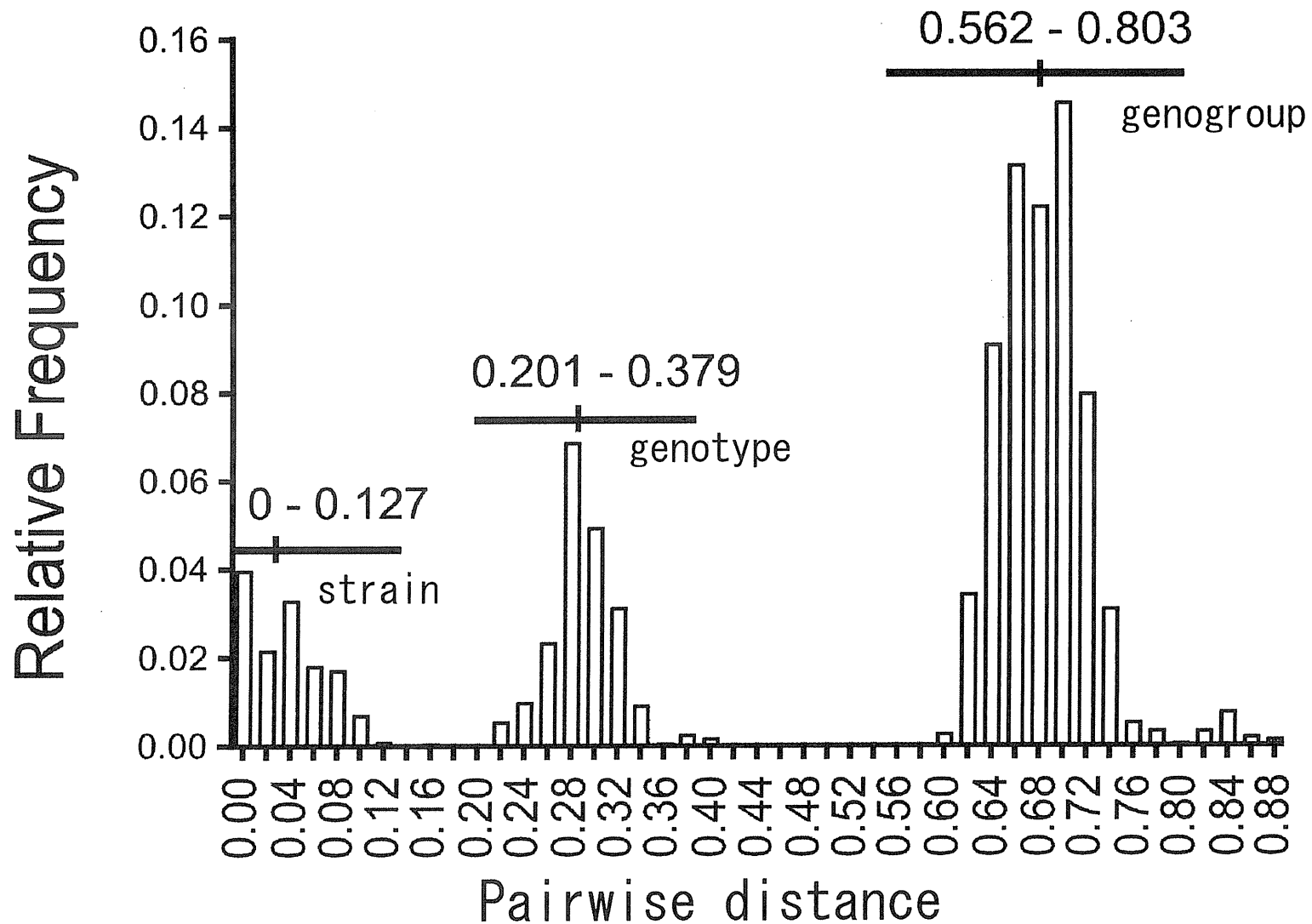
G. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得: なし。
2. 実用新案登録: なし。
3. その他: なし。

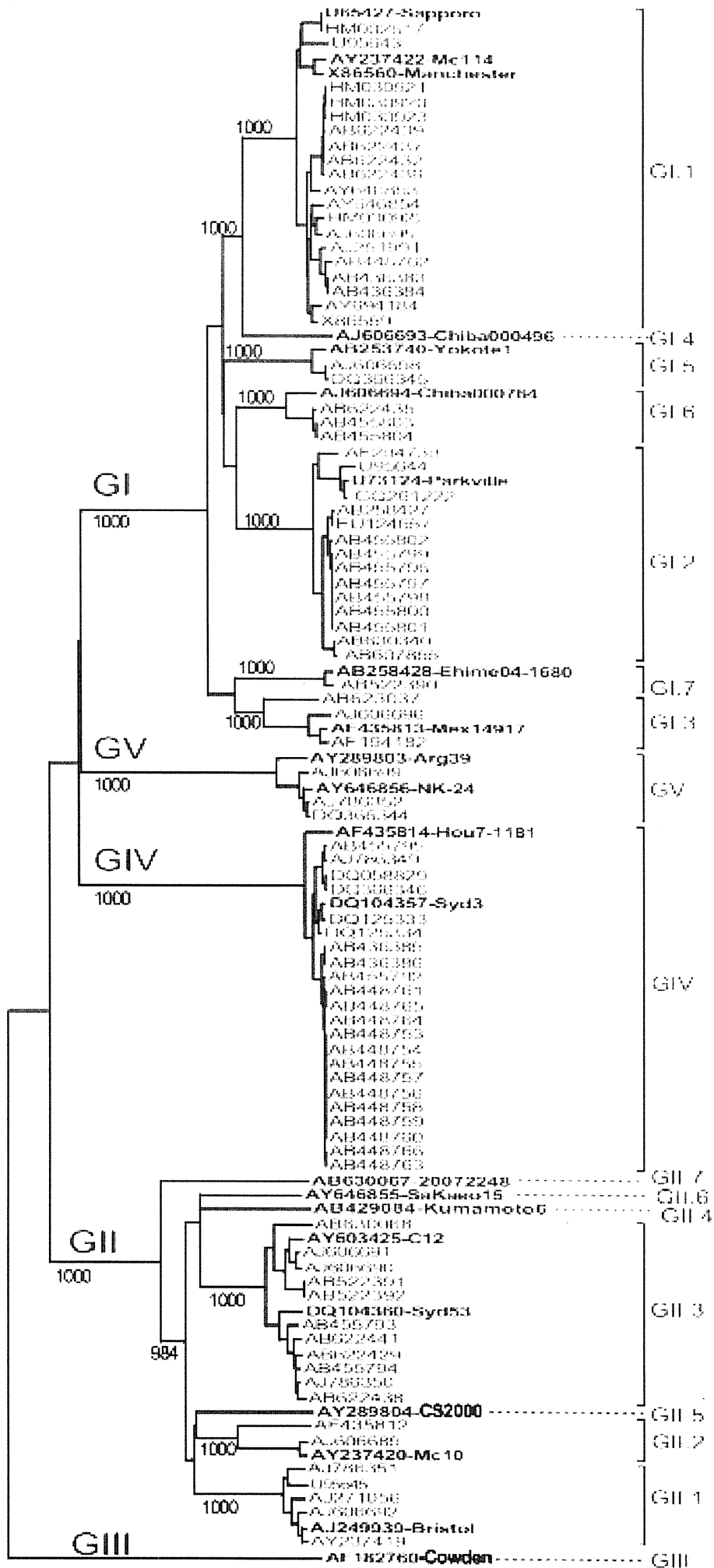
表. 本研究で使したサポウイルス株(107株)

Genogrou	Genotype	Genbank Accession no.	Strain	Country	Reference	
G1	1	U65427	Sapporo82	Japan	Numata et al. Arch Virol (1997) 142: 15	
	1	HM002617	MT-2010	Japan	Nakanishi et al. Microbiology and Immu	
	1	U95643	Houston86	U.S.A.	Jiang et al. Arch. Virol. 142 (9), 1813-1	
	1	AY237422	Mc114	Thailand	Hansman et al., J. Clin. Microbiol. 42 (3	
	1	X86560	Manchester	UK	Liu et al. Arch. Virol. 140 (8), 1345-135	
	1	HM030921	Maizuru8734	Japan	Direct submission	
	1	HM030920	Maizuru8711	Japan	Direct submission	
	1	HM030923	Osaka8894	Japan	Direct submission	
	1	AB622439	Tokyo08-3992	Japan	Oka et al., Arch Virol. 2011 Nov 11. [E	
	1	AB622437	Tokyo08-3677	Japan	Oka et al., Arch Virol. 2011 Nov 11. [E	
	1	AB622432	Tokyo08-1337	Japan	Oka et al., Arch Virol. 2011 Nov 11. [E	
	1	AB622436	Tokyo08-2932	Japan	Oka et al., Arch Virol. 2011 Nov 11. [E	
	1	AY646853	Nongkhai-50	Thailand	Guntapong et al. Jpn. J. Infect. Dis. 57	
	1	AY646854	Chanthaburi-74	Thailand	Guntapong et al. Jpn. J. Infect. Dis. 57	
	1	HM030922	Maizuru8743	Japan	Direct submission	
	1	AJ606695	Chiba010250	Japan	Okada et al. Virus Genes 33(2), 157-16	
	1	AJ251991	Lyon-30388	France	Schuffenecker et al., Arch. Virol. 146(1	
	1	AB448762	Ehime742S	Japan	Ootsuka et al., Jpn. J. Infect. Dis. 62 (3	
	1	AB436383	Nagano18-4	Japan	Yoshida et al., J. Clin. Virol. 45 (1), 67-	
	1	AB436384	Nagano18-9	Japan	Yoshida et al., J. Clin. Virol. 45 (1), 67-	
	1	AY694184	Dresden	Germany	Fullerton et al., J. Virol. 81 (4), 1858-18	
	1	X86559	Plymouth	UK	Liu et al. Arch. Virol. 140 (8), 1345-135	
	2	AF294739	Potsdam	Germany	Direct submission	
	2	U95644	Houston90	U.S.A.	Jiang et al. Arch. Virol. 142 (9), 1813-1	
	2	U73124	Parkville	U.S.A.	Noel et al., J. Med. Virol. 52 (2), 173-17	
	2	GQ261222	BD697	Bangladesh	Direct submission	
	2	AB258427	Chiba041413	Japan	Okada et al., Arch. Virol. 151 (12), 250:	
	2	EU124657	Taipei9-5	Taiwan	Wu et al., Emerging Infect. Dis. 14 (7),	
	2	AB455802	Nobeoka1-3-day28	Japan	Iwakiri et al., Arch. Virol. 154 (4), 689-6	
	2	AB455799	Nobeoka1-2-day25	Japan	Iwakiri et al., Arch. Virol. 154 (4), 689-6	
	2	AB455796	Nobeoka1-1-day3	Japan	Iwakiri et al., Arch. Virol. 154 (4), 689-6	
	2	AB455797	Nobeoka-1-2-day11	Japan	Iwakiri et al., Arch. Virol. 154 (4), 689-6	
	2	AB455798	Nobeoka-1-2-day15	Japan	Iwakiri et al., Arch. Virol. 154 (4), 689-6	
	2	AB455800	Nobeoka1-3-day6	Japan	Iwakiri et al., Arch. Virol. 154 (4), 689-6	
	2	AB455801	Nobeoka-1-3-day14	Japan	Iwakiri et al., Arch. Virol. 154 (4), 689-6	
	2	AB630340	Miyagi-Ge-038	Japan	Oka et al., Arch Virol. 2011 Nov 11. [E	
	2	AB607855	Aichi	Japan	Direct submission	
	3	AB623037	OH08021	Japan	Oka et al., Arch Virol. 2011 Nov 11. [E	
	3	AJ606696	Chiba010658	Japan	Okada et al. Virus Genes 33(2), 157-16	
	3	AF435813	Mex14197	Mexico	Farkas et al. Arch. Virol. 149 (7), 1309-	
	3	AF194182	Stockholm	Sweden	Vinje et al., J. Clin. Microbiol. 38 (2), 5:	
	4	AJ606693	Chiba000496	Japan	Okada et al. Virus Genes 33(2), 157-16	
	5	AB253740	Yokote1	Japan	Hansman et al., J. Clin. Microbiol. 45 (4	
	5	AJ606698	Ehime2K-814	Japan	Okada et al. Virus Genes 33(2), 157-16	
	5	DQ366345	Ehime643	Japan	Oka et al., J. Med. Virol. 78 (10), 1347-	
	6	AJ606694	Chiba000764	Japan	Okada et al. Virus Genes 33(2), 157-16	
	6	AB622435	Tokyo08-2439	Japan	Oka et al., Arch Virol. 2011 Nov 11. [E	
	6	AB455803	Nichinan-2-1-day3	Japan	Iwakiri et al., Arch. Virol. 154 (4), 689-6	
	6	AB455804	Nichinan-2-1-day12	Japan	Iwakiri et al., Arch. Virol. 154 (4), 689-6	
	7	AB258428	Ehime04-1680	Japan	Okada et al., Arch. Virol. 151 (12), 250:	
	7	AB522390	D1714	Japan	Oka et al., Arch Virol. 2011 Nov 11. [E	
	GII	1	AJ786351	Ehime2K-1948	Japan	Okada et al. Virus Genes 33(2), 157-16
		1	U95645	London-29845	UK	Jiang et al. Arch. Virol. 142 (9), 1813-1
		1	AJ271056	Lyon-598	France	Schuffenecker et al., Arch. Virol. 146(1
		1	AJ606692	Chiba020003	Japan	Okada et al. Virus Genes 33(2), 157-16
		1	AJ249939	Bristol	UK	Robinson et al., J. Med. Virol. 67(2), 28
		1	AY237419	Mc2	Thailand	Hansman et al., J. Clin. Microbiol. 42 (3
		2	AF435812	Mex340	Mexico	Farkas et al. Arch. Virol. 149 (7), 1309-
		2	AJ606689	Chiba990727	Japan	Okada et al. Virus Genes 33(2), 157-16
		2	AY237420	Mc10	Thailand	Oka et al., J. Virol. 79 (12), 7283-7290
3		AB630068	20082029	Japan	Oka et al., Arch Virol. 2011 Nov 11. [E	
3		AY603425	C12	Japan	Katayama et al., Emerging Infect. Dis. 1	
3		AJ606691	Chiba991172	Japan	Okada et al. Virus Genes 33(2), 157-16	
3		AJ606690	Chiba990763	Japan	Okada et al. Virus Genes 33(2), 157-16	
3		AB522391	D1711	Japan	Oka et al., Arch Virol. 2011 Nov 11. [E	
3		AB522392	D1718	Japan	Oka et al., Arch Virol. 2011 Nov 11. [E	
3		DQ104360	Syd53	Australia	Hansman et al., Emerging Infect. Dis. 1	
3		AB455793	Kushiro5	Japan	Ishida et al., Jpn. J. Infect. Dis. 61 (6), 5	
3		AB622441	Tokyo08-5148	Japan	Oka et al., Arch Virol. 2011 Nov 11. [E	
3		AB622429	Tokyo08-762	Japan	Oka et al., Arch Virol. 2011 Nov 11. [E	
3		AB455794	Nayoro4	Japan	Ishida et al., Jpn. J. Infect. Dis. 61 (6), 5	
3		AJ786350	Chiba040507	Japan	Okada et al. Virus Genes 33(2), 157-16	
3		AB622438	Tokyo08-3959	Japan	Oka et al., Arch Virol. 2011 Nov 11. [E	
4		AB429084	Kumamoto6	Japan	Oka et al., Arch Virol. 2011 Nov 11. [E	
5		AY289804	CS2000	U.S.A.	Farkas et al. Arch. Virol. 149 (7), 1309-	

Capsid全長塩基配列の Pairwise distance valueの頻度分布



0.001



平成 23 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
「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」
分担研究報告書

サポウイルス Immunochromatography(IC)診断法の開発に生じた課題

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)
岡 智一郎、片山 和彦 (国立感染症研究所 ウイルスⅡ部)
三好 龍也、内野 清子、吉田 永祥 (堺市衛生研究所)

研究要旨:

平成 21 年度、平成 22 年度に亘り、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 Genogroup I、II、IV、V に対するウイルス様粒子 (VLPs) の再調整、各 Genogroup に対する広範囲反応性モノクローナル抗体の作製にも成功した。しかし、3 種の広範囲反応性モノクローナル抗体の 9 種類の組み合わせによる検出キットの作製を試みたが、VLPs のみならず臨床検体のウイルスについても検出できなかった。現在、その原因については解明を試みている。

A. 研究目的

カリシウイルス科に属するサポウイルスはノロウイルスと同様に冬季乳幼児下痢症の原因ウイルスである。感染症発生動向調査報告によると通年的に 10% 内外の頻度で報告されている。その中には散発感染事例のみならず集団食中毒事例の報告も含まれている (図 1)。

サポウイルスの遺伝子学的な特徴はノロウイルスと同様に、遺伝子群、Genogroup、が I ~ V まで存在すること、各 Genogroup にはいくつかの Genotype が存在することである。ブタ由来の Genogroup III 以外は感染事例から検出されている。

サポウイルスの検出法は RT-PCR 法による遺伝子検査が中心で、少数の地方衛生研究所で電子顕微鏡によるウイルス粒子の確認・検出が行われている。RT-PCR 法が普遍的に普及しているが、

高価な機器や試薬、技術の習得が必要、さらに短縮されつつあるとはいえ、半日以上以上の検査時間が必要である。感染の初期対応や感染拡大防止の迅速な対応には難がある。

平成 21 年度から本研究班ではサポウイルス迅速診断を研究目的としたイムノクロマトグラフィー法 (IC 法) の開発を試みてきた。21 年度はバキュロウイルスを用いたサポウイルスカプシドタンパク、ウイルス様粒子 (VLPs)、に対するモノクローナル抗体の作成と IC 法構築の可能性について研究し、その結果、臨床検体から高原検出ができる IC 法を構築した。22 年度は、遺伝子グループと広域に反応するモノクローナル抗体の作成を試み、IC 法に用いた。しかし、IC 法の検出率は I 型、II 型、IV 型でそれぞれ 60%、14%、17% と極めて低く、また、V 型での反応性は低く実用的でなか

った。そこで、全遺伝子グループを検出する IC 法の構築のために広範囲反応性のモノクローナル抗体の作成が再課題となった。

今年度は、広範囲交差反応性のモノクローナル抗体の作成とそれを用いた IC 法の構築を研究目的とした。

B. 研究材料と方法

1. 材料

1) モノクローナル抗体

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い、IgG 精製を行った。

免疫源として用いた VLPs は GI、GII、GIV および GV で、国立感染症研究所にて作製された。

2. 方法

1) Latex 粒子標識方法

IC 法の構築は昨年度と同様の方法で行った。すなわち、ラテックス粒子のモノクローナル抗体への標識は以下のとおりである。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 μm (JSR 社製) により標識した。

用いた抗サポウイルス(SV)モノクローナル抗体には、サポウイルス Genogroup に広範囲な交差反応性を示した三種類の抗体、5C9, 1A1 および、5C1 を使用した。これらの IgG isotype は全て IgG1 である(表 1)。

3) IC 法の測定手順

まず、GI, GII, GIV SV-VLPs を 1:10, 1:100 に、また、便検体は検体浮遊液で 10% 乳剤に調整した。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。続いて、50ul をデバイスに滴下し吸収・反応、20 分後にバンドを確認した。

4) 検出系の反応性の確認

検出系には、テストライン部に上記の三種類の抗体をストリップに固層し、また三種類の抗体にラテックス粒子を標識した 9 組の組み合わせを作成し反応性を検討した(表 2)。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. 結果

1. 作製されたモノクローナル抗体

多数のモノクローナル抗体が作成されたが本研究の目的とする 3 種類の交差反応性をもつ抗体を使用した(表 1)。これらの抗体の交差反応性は VLPs を用いた Western-blotting 法および VLPs 固相 ELISA 法にて確認された(北元ら Under submission)。

2. モノクローナル抗体、標識抗体の 9 種の組み合わせパネルを用いて GI, GII, GIV VLPs と反応させたが、いずれの組み合わせにおいても陽性反応は得られなかった(表 2)。また、3 例の臨床検体、いずれも遺伝子型 GI/1、との反応性も見られなかった。

D. 考察

サポウイルスは、感染性胃腸炎ウイルスとしてはノロウイルス、ロタウイルスに次いで高頻度に検出されるウイルスであるが、食中毒事例ではノロウイルスに次いで多い原因ウイルスである。我々はすでにノロウイルス IC 法による迅速診断の構築を行い、これらは多くの医療現場で活用されている。しかし、サポウイルスの IC 法は、未だに構築されておらず、この研究班で構築を試みてきた。過去二年間の成績では、個々の Genogroup 間では感度は低いが反応性を持つ IC 検出法が構築された。しかし、多くの Genogroup を持つサポウイルスを一回のテストで結果を得るだけには至らなかった。そこで優れた広範囲反応

性のモノクローナル抗体の作成を試み、3種の抗体が選定された。しかし、過去に用いたと同じ方法で作成したIC法は臨床検体のみならずVLPsとの反応性も見られなかった。臨床検体の場合は、検体中に含まれるウイルス量が反応系に大きく左右する重要な要因である。しかし、VLPsは多量の抗原量を含み、10倍、100倍希釈では抗原量を危惧するには至らないと考える。

過去二年間の研究内容或いはこれまでのノロウイルスに対して行ったIC法構築の成績と比較して、今回の不本意な結果に対し、現在その原因は不明である。

この成績を真摯に受け止め早急にサポウイルスIC法の再構築に進む決意である。

E. 結論

各遺伝子型に高い効率で発現されたサポウイルスVLPsに対し、異なった遺伝子型を網羅的に広範囲な交差性を持つ優れたモノクローナルモノクローナル抗体が作製された。しかし、この抗体を用いて構築された迅速抗原検出IC法は、VLPsのみならず臨床検体とも反応性を示さなかった。原因究明が急務であり、IC法の再構築を目指さなければならないと考えている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 誌上発表

(1) 田中智之. 消化器症候群 ノロウイルス ウイルス感染症の検査・診断スタンダード 羊土社発行 P129-133, 2011

2) 学会発表

(1) Tomoyuki Tanaka, Noritoshi Kitamoto, Tomoichiro Oka, Tomoko Nishiguchi, Tatsuya Miyoshi, Kiyoko Uchino, Hisaaki Yoshida, Setsuko Iizuka, Yoshiharu Morino, Yasutaka Yamashita, Seiya Harada, Naokazu Takeda and Kazuhiko Katayama:

Rapid Detection kit For Norovirus and Sapovirus With Specific Monoclonal Antibodies.

The 5th China Medicinal Biotech Forum 2011. 11. 7-9, Beijing, China

(2) 内野清子、三好龍也、田中智之。感染性胃腸炎 2 症例から分離された Saffold Coronavirus.

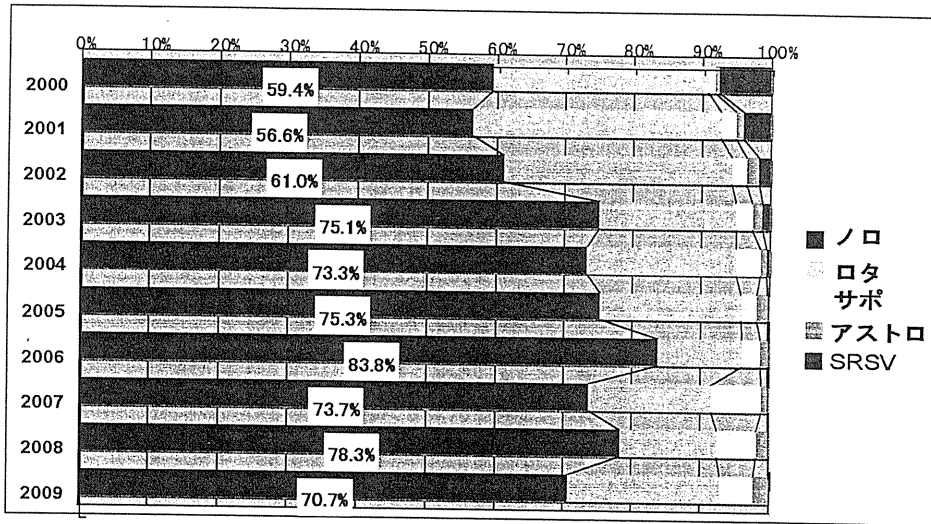
第 52 回日本臨床ウイルス学会、2011. 6.12-13, 津市

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図 1 過去 10 年間に於ける急性胃腸炎原因ウイルスに於けるサポウイルスの頻度

急性胃腸炎(食中毒)原因ウイルス



small round-structured virus : SRSV

表 1 IC 法構築に於いた 3 種の広範囲交差性モノクローナル抗体の反応性

		Antigen(VLPs)												
		GI				GII					GIV		GV	
MAbs	Isotype	Nichinan	Mc114	D1711	2029	Mc10	C12	2248-P	kumamo	kushiro	Nayoro	Syd3	Yakumo	NK24
5C9	IgG1	2.467	1.894	1.632	2.28	1.776	2.206	2.224	1.791	2.226	2.004	2.276	2.22	2.17
5C1	IgG1	1.944	1.936	1.878	1.874	2.002	1.961	1.805	1.903	1.952	1.933	1.885	1.923	1.746
1A1	IgG1	2.182	2.17	2.14	2.045	2.217	2.12	2.047	2.167	2.175	2.054	1.936	2.109	2.101

(数字は ELISA OD 値)

表 2. IC 法に用いた広範囲交差性サポウイルスモノクローナル抗体の検出系チェックボード

メンブレン固層 MAbs vs. SV-VLPs

ラテックス凝集MAbs vs. SV-VLPs		5C9	1A1	5C1
	5C9	—	—	—
	1A1	—	—	—
	5C1	—	—	—

平成 23 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

CaliciWeb の運用とリニューアル

研究分担者 三瀬敬治：札幌医科大学医療人育成センター

研究要旨

本研究は、下痢症ウイルスとして知られているノロウイルス (NoV)、サポウイルス (SaV) を中心として、これらのウイルスが属するウイルスファミリーであるカリシウイルスの情報交換、分子疫学情報サイト” CaliciWeb” の構築と運用を目的とする。平成 22 年度にインターネット上に公開した CaliciWeb は、従来のデザインを一新し、シンプルかつ、使い勝手の向上を目指した。これにより、CaliciWeb 上に搭載している Calicivirus 核酸データ数は、16683 件に到達し、国内ばかりでなく、海外からの利用者も多く、利便性の高いサブデータベースとして成長した。

A. 研究目的

下痢症ウイルスとして知られているノロウイルス (NoV)、サポウイルス (SaV) を中心として、これらのウイルスが属するウイルスファミリーであるカリシウイルスの情報交換、分子疫学情報サイト” CaliciWeb” の構築と運用を目的とする。平成 22 年度にインターネット上に公開した CaliciWeb は、従来のデザインを一新し、シンプルかつ、使い勝手の向上を目指す。

B. 研究方法

CaliciWeb 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。CaliciWeb 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 倍の高速化を達成した。この改良により、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 CaliciWeb との統一性を持つものとした。また、CaliciWeb 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。本年度は、ユーザーより、バグに関する情報を募り、細かなバグの修復を行った。今年度末には、来期に備え、カリシウイルスとは別種であるが、以前より要望の多かったロタウイルスに特化した遺伝子データベースを構築し、カリシウイルスデータベースに組み込み、自由に検索できるよう公開した。すべてのプログラムは Perl 言語で記述した。

C. 研究結果、考察

過去1年における CaliciWeb トップページへのアクセス数は約 5600 回、カリシウイルスおよびロタウイルスデータベースへのアクセス数は約 2400 回であった。CaliciWeb 内のセキュリティ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 24 年 12 月 4 日現在の登録者数 76 名、解析データ数 93 となった。平成 23 年 12 月 4 日現在登録データ数 37228 件、うちカリシウイルス 16683 件、ロタウイルス 20545 件となった。現在、CaliciWeb の主要メンバーとさらに意見交換を行いながら、以下の改善作業中である。

1. CaliciWeb サイトの英語版メニュー対応
2. フォーラムの機能改修
 - ・ 記事タイトルのツリー表示時に、折りたたみ表示が出来る機能の追加
 - ・ フォーラムの書き込みストップ機能
 - ・ クローズドフォーラムへのメンバー登録時に、管理者と本人に登録完了メールを自動送信する。
 - ・ クローズドフォーラムのタイトルをログイン前ユーザーでも見えるようにする。
3. 管理画面の機能改修
 - ・ 登録ユーザー一覧画面の名前順・登録日順でのソート機能・検索機能
4. その他
 - ・ フォーラム・ダウンロードの検索機能

英語版ページの構築、メニュー対応が行われると、ヨーロッパの NoroNet との連結が可能となり、さらにアクセス数の増加が見込まれる。ロタウイルスを加えたことで、下痢症ウイルス全般のサブデータベース、情報交換サイトとしてさらなる発展が期待される。また、現在、分子系統解析は、系統樹作成サービス「楽しカリシ」において、研究者の手によって行われている。今後、分子系統解析プログラムをホームページ上に搭載する予定である。

D. 結論

本年度の研究により、CaliciWeb 上の細かなバグ、たとえば、フォーラムのツリー表示の不具合などが修復され、使い勝手は格段に向上した。ロタウイルスのサブデータベースを搭載したことで、CaliciWeb (カリシウイルスに特化したウェブサイト) から、下痢症ウイルス全体を対象とする GatVirusWeb へ発展すると思われる。分子系統解析ツールを搭載し、英語ページを構築すれば、アクセス数は飛躍的に上昇することが考えられる。

E. 研究発表

なし

F. 知的所有権の出願・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

研究成果の刊行に関する一覧表 (平成 23 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
Masakado Matsumoto, Masahiro Suzuki, Kaoru Hirose, Reiji Hiramatsu, Hiroko Minagawa, Masaaki Minami, Ichiro Tatsuno, Akira Okamoto, Michio Ohta, Tadao Hasegawa.	Variation in M protein production among <i>Streptococcus</i> <i>pyogenes</i> strains according to <i>emm</i> genotype.	Microbiol Immunol.	55	379-387	2011
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 (sicG) in <i>Streptococcus Dysgalactiae</i> <i>subsp. Equisimilis</i> .	Current Microbiology	62	884-887	2011
Masahiro Suzuki, Kazuhiro Yamada, Miki Nagao, Etsuko Aoki, Masakado Matsumoto, Tatsuya Hirayama, Satoshi Ichiyama, Yoshitsugu Yamamoto, Reiji Hiramatsu, Hiroaki Iinuma.	Antimicrobial ointments and methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> USA300.	Emerg Infect Dis.	17	1917-20	2011

Kanki M, <u>Seto K</u> , Harada T, Yonogi S, Kumeda Y	Comparison of four enrichment broths for the detection of non-0157 Shiga-toxin-producing <i>Escherichia coli</i> 091, 0103, 0111, 0119, 0121, 0145 and 0165 from pure culture and food samples.	Lett. Appl. Microbiol.	53	167-173	2011
Harada T, Sakata J, Kanki M, <u>Seto K</u> , Taguchi M, Kumeda Y	Molecular epidemiological investigation of a diffuse outbreak caused by <i>Salmonella enterica</i> serotype Montevideo isolated in Osaka prefecture, Japan.	Foodborne Pathog. Dis.	8	1083-1088	2011
Iguchi A, Shirai H, <u>Seto K</u> , Ooka T, Ogura Y, Hayashi T, Osawa K, Osawa R	Wide distribution of 0157-antigen biosynthesis gene clusters in <i>Escherichia coli</i> .	PLoS ONE	6	e23250	2011
Iguchi A, Iyoda S, <u>Seto K</u> , Ohnishi M	Emergence of a Novel Shiga Toxin-producing <i>Escherichia coli</i> O-serogroup Cross-reacting with <i>Shigella boydii</i> Type 10.	J. Clin. Microbiol.	49	3678-3680	2011
Murakami K, Suzuki S, Aoki N, Okajima T, Nadano D, Uchida K, Yamashita K, Oka T, Katayama K, Takeda N, Matsuda T.	Binding of Norovirus virus-like particles (VLPs) to human intestinal Caco-2 cells and the suppressive effect of pasteurized bovine colostrum on this VLP binding.	Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.	74	541-547	2010
Sharp, T. M., Guix, S., Katayama K., 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., 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 Res.	90	9-16	2011
Oka, T., Murakami, K., Wakita, T., Katayama, K.	Comparative site-directed mutagenesis in the catalytic amino acid triad in calicivirus proteases.	Microbiol Immunol.	55	108-14	2011
Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Phanuwat 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
Hansman, G. S., Biertumpfel, C., Georgiev, I., McLellan, J. S., Chen, L., Zhou, T., Katayama, K., Kwong, P. D.	Crystal structures of GII.10 and GII.12 norovirus protruding domains in complex with histo-blood group antigens reveal details for a potential site of vulnerability.	J of Virol.	85	6687-701	2011
Hansman, G. S., Shahzad-Ul-Hussan, S., McLellan, J. S., Chuang, G. Y., Georgiev, I., Shimoike, T., Katayama, K., Bewley, C. A., Kwong, P. D.	Structural basis for norovirus inhibition and fucose mimicry by citrate.	J of Virol.	86	284-92	2012
Matsuhira, T. Kaji, C. Murakami, S. Maebashi, K. Oka, T. Takeda, N. Katayama, K.	Evaluation of four antiseptics using a novel murine norovirus.	Exp Anim.	61	35-40	2012