

- monomorphic and divergent haplotypes in the 2006-2007 norovirus GII/4 epidemic population by genomewide tracing of evolutionary history. *J Virol* 82: 11247-62. 2008.
2. 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.
  3. 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.
  4. 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, and Oka T. Surveillance of pathogens in outpatients with gastroenteritis 1 and characterization of sapovirus strains between 2002 and 2007 in Kumamoto Prefecture, Japan. *J Med Virol.* 81(6):1117-27. 2009.
  5. 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.
  6. 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.
  7. 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.* 82(4):720-6, 2010.
  8. 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.* 76(8):2461-7, 2010.
  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.* 82(7):1247-54, 2010.
  10. 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.* 54(8):483-6, 2010.
11. Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Nakamura H, Mori H, Kanda T, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T, Takeda N, Sato H, and the Norovirus Surveillance Group of Japan. Divergent Evolution of Norovirus GII/4 by Genome Recombination over 2006-2009 in Japan. *J. Virol.* 84(16): 8085-97, 2010.
  12. 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.
  13. 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.
  14. 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.
  15. 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.
  16. 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.
  17. 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.
  18. 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.
  19. 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

20. 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.

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

研究分担者 染谷 雄一（国立感染症研究所・ウイルス第二部）

要旨：ノロウイルスによる嘔吐下痢症の分子レベルでの理解と治療薬、ワクチンによるノロウイルス感染症の征圧を最終目標とし、極めて多種多様な遺伝子型を有するノロウイルスの普遍的な性状、感染機構及び複製機構の原理を導くべく、以下の研究に取り組んだ。ノロウイルスタンパク質の成熟化に必須であるは、これがなければ宿主細胞においてウイルス粒子が複製されなくなることから、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との見地に立ち、本酵素の性状について変異体解析を行い、既知の三次元立体構造とともにその結果を考察した。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が、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いるという現状を打破すべく、種々の遺伝子型のウイルス粒子の立体構造解明に部分的に成功した。

#### 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。さらに、ウイルス粒子の表面構造にも注目し、VLP を用いた構造解析を行った。

#### B. 研究結果、考察

##### 3C 様プロテアーゼの研究について

###### (1) Glu54 残基の役割、意義

3C 様プロテアーゼの活性中心は Cys139-His30-Glu54 の三残基から成るが、Glu54 の負電荷は必須ではない。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するを見いだした。

###### (2) 重要アミノ酸残基の探索とその意義

すでに重要であると示されている荷電アミノ酸残基（Arg8, His30, Lys88, Arg89, Asp138, His157）に加えて、いくつかの重要なアミノ酸残基の探索を行ったところ、Trp6, Trp19, Thr27, Leu86, Leu95, Leu97, Met101, Gln117, Leu121, Thr134, Tyr143, Val144, Val167 を見いだした。これらの多くはプロテアーゼの立体構造上互いに近傍に位置し、立体構造の形成と安定性に寄与することが示唆された。

##### ノロウイルス粒子の研究について

###### (1) チバ株（GI/4）VLP の性状

HighFive 細胞より得られる野生型チバ株 VLP には大小 2 つの粒子（直径 38 nm と 23 nm）が混在し、2 種のタンパク質（分子量 57 kDa と 50 kDa）から成る。それぞれの N 末端は、Ala4, Thr45 残基であった。Leu43-Ala44-Thr45 を Ala-Pro-Val に置換した三重変異体から粒子径 38 nm に均一化された VLP を得ることに成功した。

###### (2) 三重変異チバ株 VLP の結晶化

Leu43-Ala44-Thr45 を Ala-Pro-Val に

置換した三重変異 VLP を HighFive 細胞培地より得、CsCl 密度勾配遠心後の VLP を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、結晶化条件の検索を行ったところ、分解能 7 Å 程度の X 線回折データを得たが、詳細な構造の決定には至っていない。

### (3) GII 株 VLP の調製

ハワイ株 (GII/1)、ナリタ株 (GII/4)、ウエノ株 (GII/6) の VLP を調製し、結晶化、立体構造解明を目指している。

### C. 研究発表

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. Y. Someya, and N. Takeda. (2011) Functional consequences of mutational analysis of norovirus protease. *FEBS Lett.* 585(2), 369-374.
3. 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.
4. Yuichi Someya. (2012) From head to toe of the norovirus 3C-like protease. *BioMol. Concepts* (in press)

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」

平成 21-23 年度分担研究総合報告書

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  
研究分担者 村上 耕介（最終年度） 国立感染症研究所 ウイルス第 2 部

要旨：本研究で SaV に関する以下の成果が得られた。多摩川の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以上に、多様な SaV が検出されることを明らかにした。さらに SaV 検出率向上に有用な新規 RT-PCR も構築した。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、国内で検出された SaV のうち、従来報告されている SaV 株と遺伝的クラスターが異なると考えられる株を含めた合計 21 株を選択し、構造タンパク質全長領域の塩基配列を決定した。SaV の遺伝子タイピング法を確立した。本方法は、世界標準として採用され、Fields Virology 第 6 版にも成果が記載される (in press)。

A. 研究目的

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。本研究は、以下を目的として行った。(1) SaV の環境水中の動態の解析を行う。(2) 高精度なサポウイルス (Sapovirus; SaV) 核酸検出系の確立にともない、SaV が急性胃腸炎患者の重要な病原因子であること、SaV の構造タンパク質コード領域の塩基配列が極めて多様であることが明らかになった。RT-PCR のターゲット領

域でもある構造タンパク質領域の塩基配列を決定し、SaV の genotyping 法を構築する。(3) 最終的に、構造タンパク質領域の塩基配列に基づいた SaV の genotyping 法を構築する。

B. 研究方法

東京都の多摩川流域を SaV の調査対象地域として設定し、毎月、5 カ所の定点（源流直下から多摩川河口に向かって定めた）より、河川水を採取した。河川水中における SaV の存在状況は、河川水に含まれるウイルスを陰電荷膜濃縮法によって濃縮し、RNA を抽出した

後、RT-PCR 法により SaV の検出を行った。ゲノム末端の poly A 配列を起点に RT-PCR によって構造タンパク質領域約 2.5 kb を増幅し、塩基配列を決定した。構造タンパク質全長の塩基配列が明らかな 107 株のサポウイルス株を用いて、Kimura 2 parameter method, NJ tree を用いた解析を行った。SaV の Genotype クラスターは、クラスター間 distance の中央値から  $\pm 2SD$  と定義した。SaV 感染者糞便サンプルより RNA を抽出し、上記手法によって SaV の構造タンパク質全長の塩基配列を解析し、genotyping 法の検討に用いた。本研究で構築しつつある CaliciWeb 上の SaV サブデータベースから、SaV 構造タンパク質全長の塩基配列を選択し、genotyping 法の検討に用いた。

### C. 研究結果

多摩川流域の河川水を用いた SaV の調査では、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。環境水中から検出される SaV は、SaV 感染患者から検出される SaV よりも多様性に富んでいた。本研究により明らかにした SaV の塩基配列データを用いて作製したアライメントより、検出率向上に有用な新規プライマーセットのデザインに成功した。新規プライマーセットを用いた RT-PCR は、SaV 検出率を向上させた。

国内で検出された SaV のうち、従来報告されている SaV 株と遺伝的クラスターが異なる

と考えられる株を含めた合計 21 株を選択し、構造タンパク質全長領域の塩基配列を決定することに成功した。ヒト由来の SaV は、4 つの遺伝子群 GI, II, IV, V、16 の遺伝子型に分類できることが明らかになった。16 の各遺伝子型に対応する reference 株を選択し、genotyping の際にアライメントに用いることのできる reference sequence set を設定した。本研究で確立した構造タンパク質領域全長の塩基配列を用いた SaV の genotyping 法、および各遺伝子型の reference sequence set は SaV サーベイランスの基盤となる。SaV の genotyping 法は、論文としてまとめ、平成 24 年 2 月に、Archives of Virology にアクセプトされ、in press となった。Fields Virology 第 6 版にも成果が記載される (in press)。

NoV は、数年ごとに主要流行株が異なる genotype に置き換わることにより、流行を繰り返していることが知られている。SaV の流行は、NoV と異なり、主要流行株が、異なる genogroup に置き換わる傾向があることが明らかになった。この、劇的な group の入れ替わりがなぜ起きるのか、不明である。今後、SaV の分子疫学を新規 genotyping 法に基づいて、世界的な規模で継続して分子疫学解析を行う必要がある。

### D. 結論

本研究により、構築した超高感度 RT-PCR 法、genotyping 法、各遺伝子型の reference sequence set は、今後の SaV 分子疫学の推進

と、SaV 感染症の研究に有用である。今後、NoV と同様に、経時的かつ継続的分液学を推進し、SaV の流行機構の解明、流行予測、予防衛生に貢献できる可能性がある。

E 研究発表（英文論文のみ）

21. Motomura K, Oka T, Yokoyama M, Nakamura H, Mori H, Ode H, Hansman GS, Katayama K, Kanda T, Tanaka T, Takeda N, Sato H, 2008. Identification of monomorphic and divergent haplotypes in the 2006-2007 norovirus GII/4 epidemic population by genomewide tracing of evolutionary history. *J Virol* 82: 11247-62. 2008.
22. 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.
23. 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.
24. 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, and Oka T. Surveillance of pathogens in outpatients with gastroenteritis 1 and characterization of sapovirus strains between 2002 and 2007 in Kumamoto Prefecture, Japan. *J Med Virol.* 81(6):1117-27. 2009.
25. 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.
26. 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.
27. 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.* 82(4):720-6, 2010.
28. 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. 76(8):2461-7, 2010.
29. 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.* 82(7):1247-54, 2010.
  30. 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.* 54(8):483-6, 2010.
  31. Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Nakamura H, Mori H, Kanda T, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T, Takeda N, Sato H, and the Norovirus Surveillance Group of Japan. Divergent Evolution of Norovirus GII/4 by Genome Recombination over 2006-2009 in Japan. *J. Virol.* 84(16): 8085-97, 2010.
  32. 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.
  33. 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.
  34. 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.
  35. 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.
  36. 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.
  37. 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.
  38. 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.

39. 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

40. 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.

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

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的手法に関する研究」

平成 21-23 年度分担研究総合報告書

サポウイルス Immunochromatography (IC) 診断法の開発

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 )

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 )

要旨：ノロウイルス (NoV) およびサポウイルス (SaV) は消化管感染症の 2 大原因ウイルスである。本研究では、SaV のイムノクロマトグラフィー (IC) を用いた迅速診断法の構築を試みた。SaV の構造タンパク質領域をバキュロウイルスベクターに組み込み、ウイルス様中空粒子 (VLP) の作製に成功した。VLP を用いてモノクローナル抗体 (MoAb) を作製し、すべての genogroup に対してブロードに反応する MoAb の作製に成功した。これらの MoAb を用いた IC キットの検討を行い、プロトタイプの開発に成功した。今後、既成のノロウイルス IC キットに現在のサポウイルス IC キットを融合したノロウイルス・サポウイルス同時検出 IC キットを目指す。

診断法の構築を試みる。

## A. 研究目的

ノロウイルス (NoV) およびサポウイルス (SaV) は消化管感染症の 2 大原因ウイルスである。食中毒を含めた感染症 (拡大) 予防対策は、臨床検体から早期の正確かつ迅速な診断が基本であり、この結果をもと細菌感染症との鑑別診断を行うことができれば、ウイルス性急性胃腸炎の治療に大いに貢献できる。NoV は、既に免疫クロマトグラフィー (IC) キットの開発、精度向上が行われ、ほぼ実用化されている。本研究では、SaV の IC を用いた迅速

## 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) で国立感染症研にて作製された。

## 2. 方法

### 1) Latex 粒子標識

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  $0.394\mu\text{m}$  (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  $50\mu\text{l}$  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:  $1.3\mu\text{l}$ 、#616 標識抗体:  $1.2\mu\text{l}$ 、#819 標識抗体:  $4.7\mu\text{l}$ )。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。

### (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

本研究では、細胞培養で増やすことのできないヒトに感染する SaV を免疫源とするため、昆虫細胞で発現させた SaV の VLP の作製を行った。SaV 感染者の便検体か

ら、SaV の RNA を抽出し、RT-PCR によって構造タンパク質領域を増幅し、バキュロウイルスベクターにクローニングしたのち、VLP を昆虫細胞で発現した。Genogroup I, II, IV, V それぞれにおいて、複数株の VLP の作出に成功した。これらを免疫源として、マウスに免役し、MoAb を作製したところ、genogroup 特異的な MoAb と、複数の genogroup を検出可能な MoAb が得られた。IC キットに使用した MoAb#616 をプロトタイプ IC キットに採用した。本抗体は 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。本抗体を使用したプロトタイプ IC は、特異的に SaV GI を検出することができた。MoAb#819 は genogroup IV に homology な反応を示す抗体である。本抗体を用いた IC キットは SaV GIV を得的に検出し、他の genogroup や、SaV 以外の下痢症ウイルスに反応しなかった。MoAb#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に交差反応性を示す抗体である。この抗体を用いて、ブロードレンジに SaV を検出可能な IC キットの改良を行ったが、検出には  $10^9$ /グラム糞便以上の粒子がみつようであり、感度の面で問題があった。

#### 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。我々は、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、本研究で、これらを用いた IC 法を構築・開発を試みた。IC キットを用いて SaV の検出が可能となったが、感度は極めて低く診断キットとしての実用性は評価に値しないものであった。IC キットが低感度であったのは、広範囲に交差反応する単一の抗体をキャプチャーと検出の両方に用いていることが考えられた。NoV の様に、各遺伝子グループに特異的に反応する抗体を標識し、標識抗体

カクテルとして IC に用いれば、NoV と同程度の感度を示した可能性がある。本研究において、低感度ではあるが、IC 法に基づく迅速検査法の構築に成功した。

## E. 結論

MoAb を用いた迅速抗原検出 IC 法の構築

に成功した。しかし、検出感度が低く MoAb の改良、group 特異的に反応する MoAb を標識抗体として使用するなど、より一層の高感度化を行う必要がある。今後、ノロウイルス・サポウイルス同時検出 IC キットの開発に向け、改良を急ぐ必要がある。

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」

平成 21-23 年度分担研究総合報告書

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

分担研究者 片山和彦：国立感染症研究所ウイルス第二部

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、CaliciWeb (<http://teine.cc.sapmed.ac.jp/~calici/ddbj/>) の全面改訂作業を行った。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、オートパイロット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。デザインも一新し、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（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」を展開し、時系列 NoV 分子系統解析を行うことを可能とした。最終年度には、ロタウイルスのサブデータベースを作製し、CaliciWeb のデータベースに統合した。数年内に国際的 NoV データベース、NoroNet と相互乗り入れを開始する。

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。本研究では、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 の構築およびデータベースの構築と運用を検討する。

B. 方法

B-1. CaliciWeb のリニューアル：2004 年にテストランとして公開した CaliciWeb 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。SNS に熟達したウェブ作成会社に依頼して、CaliciWeb 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. CaliciWeb 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、ラゴイウスル、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 CaliciWeb 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、ラゴイウスル、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 言語で記述した。

B-3. 系統樹作成サービス「楽しカリシ」の開始：

CaliciWeb 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。CaliciWeb

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。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。将来的に CaliciWeb をできるだけオープンな SNS として公開し、其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可能性も加味した。

## C. 結果と考察

C-1. CaliciWeb のリニューアル：

これまで CaliciWeb においては、ハードウェア以外はすべてフリーウェアのシステムを用いてきた。OS には Debian Linux を使い、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 を使用していた。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、加工しにくく、高度な検索機能などを搭載することは困難であった。つまり、学術的な SNS としては不向きな構造であった。本研究では、ウェブ作成会社に委託してのシステム構築を試みた。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を行ったため、登録ボタンのデザインや大きさ、画面上における場所につい



ても、ユーザーの意見が反映されたユーザーフレンドリーなインターフェース構築に成功した。学術情報 SNS として、格段の使いやすさを実現した。新たな機能が要求された場合であっても、昨日の追加が容易にできるようになった。一般的な原語で Web site が構築されているため、今後の web における新技術を取り入れることも容易である。

#### B-2. CaliciWeb 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になってしまう。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。

また、CaliciWeb とのデザインの統合も行った。CaliciWeb 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、下記の要望が提出された。(1) 配列の登録日をデータとし

て表示して欲しい。(2) ロタウイルスでも同様なデータベースを作成してもらいたい。(3) 検索データのソートに対応し、結果の一括ダウンロードができるようにしてもらいたい。と言った要望であった。CaliciWeb は、最終年度において、これらすべての要望に対応し、下痢症ウイルス全体を対象とした総合情報サイトとして構築を進めることができるようになった。

#### 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、CaliciWeb 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。

今後できるだけ CaliciWeb 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

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、世界的遺伝子データベースである国立 DNA データバンク (DDBJ) から提供される更新ファイルを用いて行った。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、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。データ更新プログラムを全面的に改善し、約 5 倍の高速化に成功した。これにより、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て一新した。カリシウイルスとは別種であるが、要望が多かったロタウイルスのデータベースを構築し、カリシウイルスと同様に検索可能にした。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 件である。平成 20 年 8 月末からの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 8000 回である。CaliciWeb トップページへのアクセス数は年間平均約 5600 回である。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報告件数は、93 件となった。平成 23 年 12 月 4 日現在の登録者数は 76 名である。今後、さらなるユーザー数の増加が見込まれる。

研究成果の刊行に関する一覧表 (平成 21-23 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
<p><u>Masakado</u> <u>Matsumoto,</u> Masahiro Suzuki, Kaoru Hirose, Reiji Hiramatsu, Hiroko Minagawa, Masaaki Minami, Ichiro Tatsuno, Akira Okamoto, Michio Ohta, Tadao Hasegawa.</p>	<p>Variation in M protein production among <i>Streptococcus</i> <i>pyogenes</i> strains according to <i>emm</i> genotype.</p>	<p>Microbiol Immunol.</p>	<p>55</p>	<p>379-387</p>	<p>2011</p>
<p>Masaaki Minami, Mariko Ichikawa, Hideyuki Matsui, Nanako Hata, Naoki Wakiyama, <u>Masakado</u> <u>Matsumoto,</u> Michio Ohta, Tadao Hasegawa</p>	<p>Prevalence of a Streptococcal Inhibitor of a Complement-Mediated Cell lysis-like Gene (sicG) in <i>Streptococcus Dysgalactiae</i> <i>subsp. Equisimilis</i>.</p>	<p>Current Microbiology</p>	<p>62</p>	<p>884-887</p>	<p>2011</p>
<p>Masahiro Suzuki, Kazuhiro Yamada, Miki Nagao, Etsuko Aoki, <u>Masakado</u> <u>Matsumoto,</u> Tatsuya Hirayama, Satoshi Ichiyama, Yoshitsugu Yamamoto, Reiji Hiramatsu, Hiroaki Iinuma.</p>	<p>Antimicrobial ointments and methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> USA300.</p>	<p>Emerg Infect Dis.</p>	<p>17</p>	<p>1917-20</p>	<p>2011</p>

Kanki M, <u>Seto K</u> , Harada T, Yonogi S, Kumeda Y	Comparison of four enrichment broths for the detection of non-O157 Shiga-toxin-producing <i>Escherichia coli</i> O91, O103, O111, O119, O121, O145 and O165 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 O157-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
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	108-114	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