

特定の地域において同時期に多発した EHEC（O157）感染症事例について

研究協力者 福司山郁恵 古川真斗 原田誠也 熊本県保健環境科学研究所

### 要 旨

2013年7月4日から16日にかけて、熊本県内の特定の地域で同時期に、腸管出血性大腸菌（EHEC）O157：H7（VT1 + VT2）感染症が4事例発生した。これらの4事例間に疫学的な共通事項は確認されなかったが、各事例の分離株について、IS-printing System 及びパルスフィールドゲル電気泳動法による分子疫学解析を行ったところ、それぞれの解析法で同一のバンドパターンが示された。また、併せて、生化学性状試験及び薬剤感受性試験を実施したところ、分離株は全て同様の性状であった。これらより、今回の4事例には何らかの共通感染源があると考えられたが、詳細な調査を行ったにもかかわらず、その特定には至らなかった。

#### A. 事例の探知

##### 1) 事例1（A町のB保育園関連集団事例）

2013年7月4日、医療機関より保健所に、A町の小学校に通う8歳の男児から腸管出血性大腸菌（EHEC）O157（VT1 + VT2）が検出されたと連絡があった。そこで、保健所が患者家族5名の糞便を採取し、本所で検査を行ったところ、患者の妹（B保育園児）からO157:H7（VT1 + VT2）が検出された。また、同時期に別の医療機関からも、B保育園に通う園児からO157（VT1 + VT2）が検出されたとの連絡があったことから、保健所は、園児、職員及びO157が検出された園児の家族計119名の糞便検査を実施した。

また、我が国初のO157集団感染事例である埼玉県浦和市の幼稚園の事例<sup>1)</sup>は井戸

水が原因であったことから、本事例についても地下水の糞便汚染を疑い、O157が検出された2名の園児宅の井戸水について検査を行った。

##### 2) 事例2（A町の散発事例1）

2013年7月5日、医療機関より保健所に、A町に住む84歳の女性からO157（VT1 + VT2）が検出されたと連絡があり、患者家族1名について糞便検査を実施した。

この事例も事例1と同じA町で、かつ同時期の発生であったため、地下水汚染を疑い、患者宅の井戸水について検査を行った。

##### 3) 事例3（C村の散発事例）

2013年7月9日、医療機関より保健所に、C村に住む8歳の男子からO157（VT1 + VT2）が検出されたと連絡があった。C村はA町の隣村であり、患者家族4名について

表1 各事例の検体数及び O157:H7(VT1+VT2)陽性数

事例 No.	発生地域	糞便 (井戸水)	陽性数：糞便 (井戸水)
1	A 町	119 (2)	5(0)
2	A 町	1 (1)	0(0)
3	C 村	4 (0)	1(0)
4	A 町	3 (0)	0(0)
合計		127 (3)	6(0)

糞便検査を実施した。

#### 4) 事例4 (A町の散発事例2)

2013年7月16日、医療機関より保健所に、A町に住む56歳の男性からO157 (VT1 + VT2) が検出されたと連絡があったため、患者家族3名について糞便検査を実施した。

#### B. 検査材料

今回発生した4事例について、糞便127検体、井戸水3検体の検査を実施した(表1)。

#### C. 検査方法

##### 1) 直接培養法

糞便をDHL及びCT-SMAC 培地に塗抹後、37°C で18 時間培養した。培地上に発育したコロニーについて、スィープPCR法でVT遺伝子のスクリーニングを行った。その後、VT遺伝子が陽性となった平板上の個々のコロニーからVT遺伝子保有株を単離し、常法により生化学性状試験及び血清型別を実施した。

##### 2) 免疫磁気ビーズ法

糞便をノボバイオシン加mEC培地に接種し、37°Cで18時間増菌培養後、免疫磁気ビーズ法によりO157を吸着濃縮し、DHL及びCT-SMAC培地に塗抹した。これを、37°C で18 時間培養後、培地上に発育した

コロニーについて、直接培養法と同様の方法で検査を行った。

##### 3) 井戸水の検査

井戸水500mLを0.45µmのメンブランフィルターで100倍濃縮し、乳糖ブイヨン培地で37°C、48時間培養後、ガス産生及びVT遺伝子の確認を行った。

##### 4) 薬剤感受性試験

B Dセンシ・ディスク(日本ベクトン・ディッキンソン)を使用し、KBディスク法に従い実施した。検査対象は、ホスホマイシン(FOM)、セフォタキシム(CTX)、セファロチン(CET)、アンピシリン(ABPC)、テトラサイクリン(TC)、ナリジクス酸(NA)、オフロキサシン(OFLX)、ノルフロキサシン(NFLR)、シプロフロキサシン(CPLX)、カナマイシン(KM)、クロラムフェニコール(CP)の11薬剤とした。

##### 5) IS-printing System (IS)

IS-printing System (東洋紡)を使用し、添付マニュアルに従い実施した。

##### 6) パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)

常法に従い、制限酵素Xba I 切断によるPFGEを行った。

#### D. 検査結果

検査結果を表1に併記した。

#### 1) 事例1

糞便119検体について検査を行ったところ、初発患者の妹を含む園児3名及び園児の家族2名の糞便からO157:H7 (VT1 + VT2) が検出された。医療機関で検出された園児2名分を合わせると4家族7名がO157:H7 (VT1 + VT2) 陽性となった。なお、井戸水2検体からは不検出であった。

#### 2) 事例2

患者家族の糞便1検体及び井戸水1検体は共に不検出であった。

#### 3) 事例3

患者家族の糞便4検体中1検体から、O157:H7 (VT1 + VT2) が検出された。

#### 4) 事例4

患者家族の糞便3検体からは、不検出であった。

#### 5) 生化学的性状試験

今回分離された全ての株は、同一の生化学性状を示した(表2)。

#### 6) 薬剤感受性試験

今回分離された全ての株は、今回使用した11剤に感性であった。

#### 7) IS

今回分離された全ての株は同一のバンドパターン(図1、2)を示した。IS 2nd setにおいて、スタンダードの上から7番目のバンドの下(約550bp付近)の位置にエキストラバンドが1本確認された(図3)。

#### 8) PFGE

今回分離された全ての株は、ほぼ同一の泳動パターンを示した(図4)。

### E. 考察

今回の事例は、特定の地域内で同時期に連続して発生したことに加え、IS及び

PFGE解析でのバンドパターンがそれぞれ同一で、かつ生化学性状試験及び薬剤感受性試験の結果についても同様の性状を示したことから、共通の感染源が存在する可能性が考えられた。パルスネット九州ブロックでは、ISデータの共有化が行われている。そこで、データベースを検索したところ、平成23年度にC村で検出された散発事例由来株と同一のISコードであることが判明した。ISによる解析では、エキストラバンドの情報は、備考欄に記載されることがある。今回の分離株の特徴は、IS 2nd setの約550bp付近にエキストラバンドが出現することであるが、平成23年度にC村で検出された散発事例由来株の情報泳動像を確認したところ、本事例と同様のエキストラバンドが確認された(図4)。また、PFGEのバンドパターン、生化学性状試験及び薬剤感受性試験の結果についても同様の性状を示したことから、平成23年度にC村で検出された散発事例由来株と本事例株は、同一クローンの菌株による感染と考えられた。

本県では、原因不明の集団感染事例等が発生した場合、現地に実地疫学調査チーム(FEIT)が派遣され、疫学調査を実施している。今回の事例においても、現地にFEITが派遣され、精力的な調査が行われたが、原因究明には至らなかった。保健所管内では、平成20年度にもO157によるディフューズアウトブレイクが発生している。その際にもFEITによる調査が行われたが、原因を特定することはできなかった。しかしながら、特定の地域で、同時期に発生した同一クローンのO157によるディフューズアウトブレイ

クであることから、何らかの共通感染源が考えられる。ディフューズアウトブレイク発生時の感染源の特定は非常に困難であるが、IS や PFGE が有効であることは論ずるまでもない。したがって、今後とも IS や PFGE で、同様のバンドパター

ンを示す株の発生動向を監視していく必要があると考える。

F. 参考文献

- 1) 埼玉県衛生研究所報、25、12 (1991).

表2 4事例から分離された株及び平成 23 年度に発生した散発事例株 O157:H7(VT1+VT2)の生化学性状

項 目		結 果	項 目		結 果
1	インドール	+	19	乳糖	+
2	メチルレッド	+	20	白糖	+
3	Voges-Proskauer	-	21	ズルシット	-
4	クエン酸(Simmons)	-	22	サリシン	-
5	硫化水素(TSI)	-	23	アドニット	-
6	ウレアーゼ(Christensen)	-	24	イノシット	-
7	リシンデカルボキシラーゼ	+	25	ソルビット	-
8	アルギニンジヒドラーゼ	-	26	アラビノース	-
9	オルニチンデカルボキシラーゼ	+	27	ラフィノース	+
10	運動性	+	28	ラムノース	+
11	α-酒石酸	-	29	麦芽糖	+
12	ゼラチン	-	30	キシロース	+
13	β-グルクロニターゼ	-	31	トレハロース	+
14	β-ガラクトシターゼ	+	32	セロビオース	-
15	エスクリン加水分解	-	33	α-メチル-D-グルコシド	-
16	シトクロムオキシターゼ	-	34	メリビオース	+
17	ブドウ糖からのガス産生	+	35	マンノース	+
18	ブドウ糖	+			

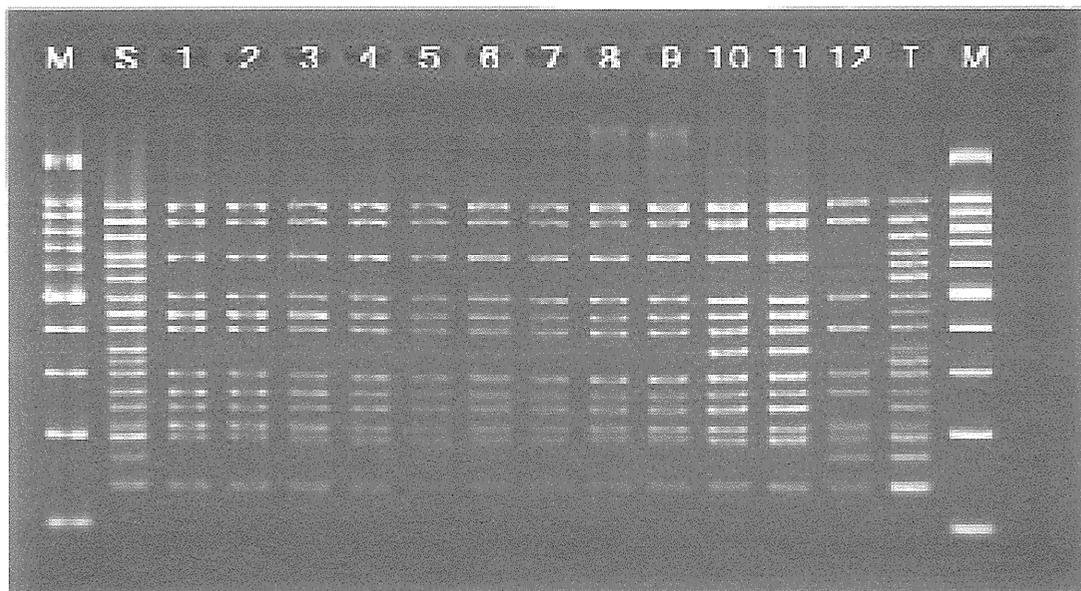


図1 各事例から分離されたO157のIS 1st setによる泳動パターン

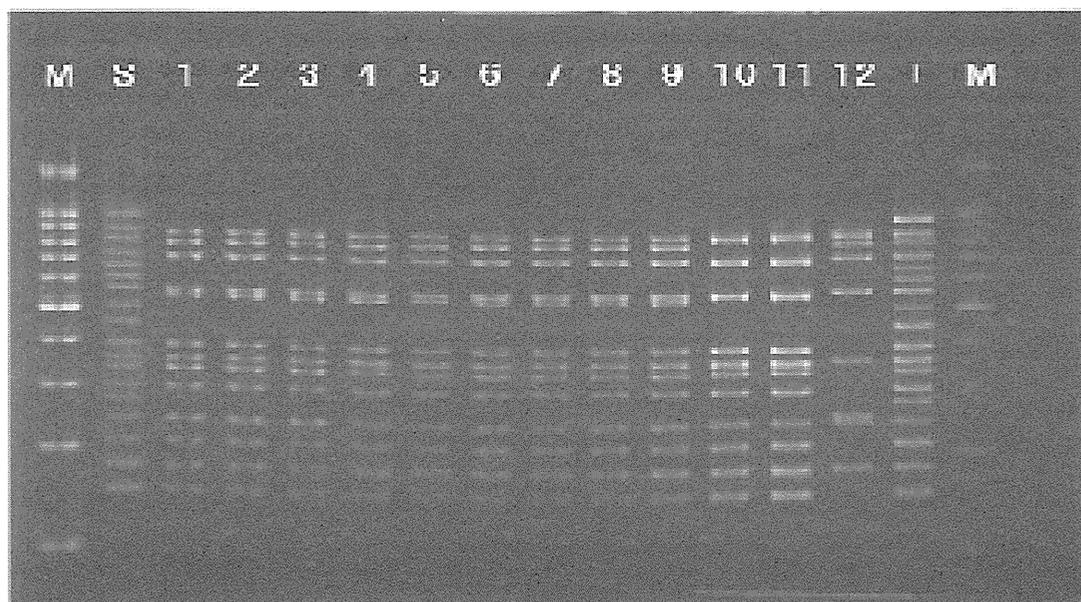


図2 各事例から分離されたO157のIS 2nd setによる泳動パターン

M：マーカー、S：各setのスタンダード、1：事例1の初発患者株、2：事例1の初発患者の妹株、3：事例2由来株、4：事例1の園児D由来株、5：4の父由来株、6：4の母由来株、7：事例3由来株、8：事例1の園児E由来株、9：事例4由来株、10、11、12：別の地域で発生した事例由来株、T：各setのテンプレート

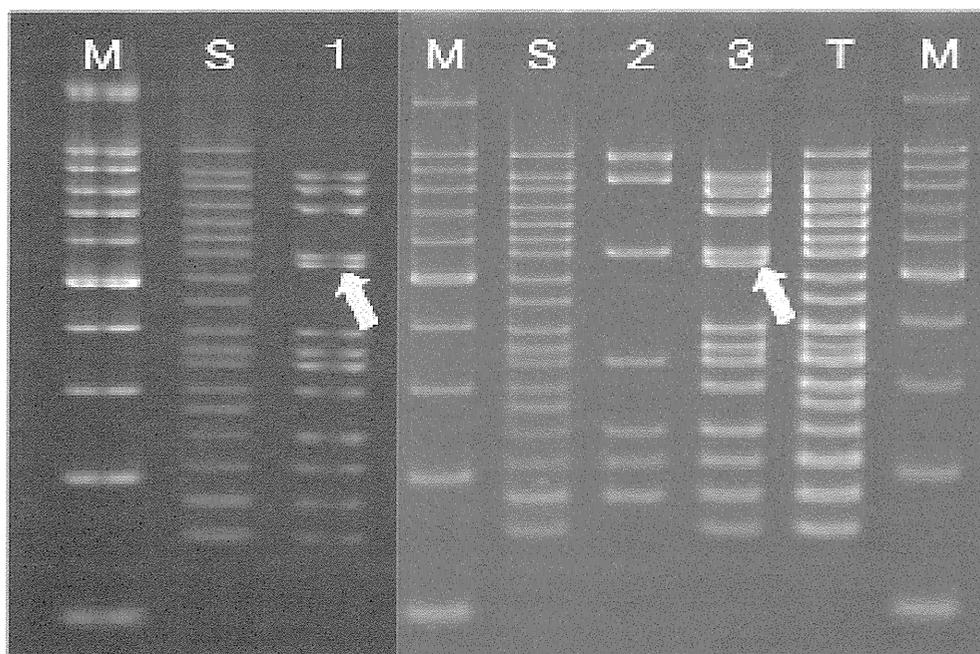


図3 各事例から分離されたO157のIS 2nd setによる泳動パターン

M：マーカー、S：スタンダード、1：事例1の初発患者由来株、2：別事例由来株、3：H23年度C村で発生した散発事例由来株、T：テンプレート、※白矢印はエキストラバンドを示す。

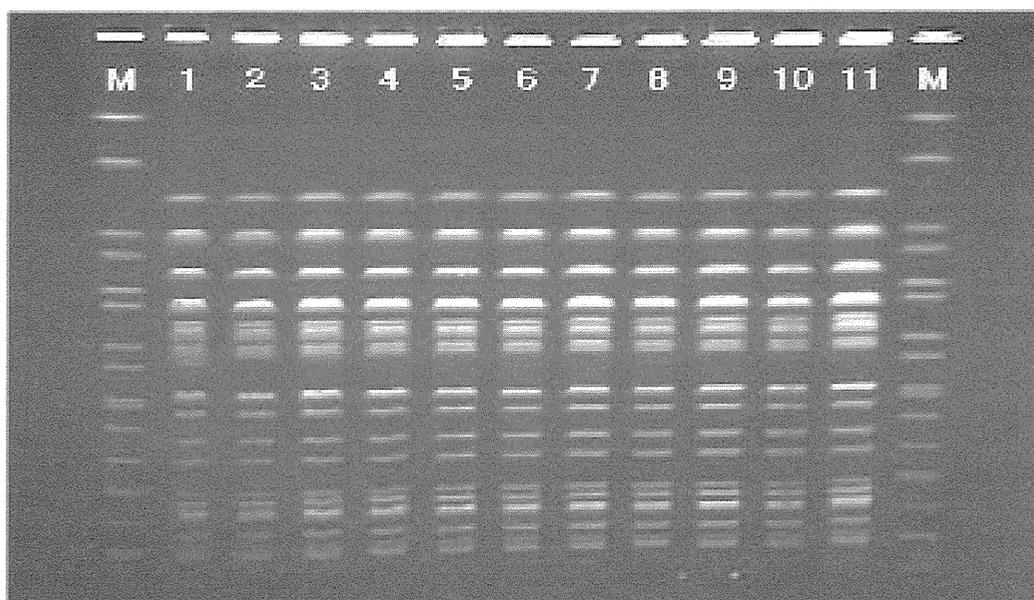


図4 各事例から分離されたO157のXba IによるPFGEパターン

M：マーカー、1：H23年度散発事例由来株、2：事例1の初発患者由来株、3：事例1の初発患者の妹由来株、4：事例2由来株、5：事例1の園児D由来株、6：5の父由来株、7：5の母由来株、8：事例3由来株、9：事例1の園児E由来株、10：事例4由来株、11：事例1の園児F由来株

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）  
「病原体解析手法の高度化による効率的な食品由来感染症探知システムの構築に関する研究」

平成 25 年度研究分担報告書

下痢症ウイルスの総合データベース構築総括

研究分担者 片山 和彦 国立感染症研究所ウイルス第二部第一室 室長

研究分担者 鈴木 善幸 名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科 教授

研究分担者 三瀬 敬治 札幌医科大学医学部衛生学人材育成センター 講師

研究協力者 芳賀 慧 国立感染症研究所ウイルス第二部第一室 任期付き研究員

研究協力者 デニス フランシス・エコー ガーナ野口研究所 研究員

## 研究要旨

CaliciWeb では、NoV、SaV などヒト腸管感性カリシウイルスを対象とした、ゲノム情報を疫学情報と共に蓄積し、構造タンパク質領域を標的としたバイオインフォマティクスによる解析を行った。また、グローバル NoV net work の NoroNet とのコラボレーションも実現しつつある。CaliciWeb の活動により提案された NoV の病原性変化を対象とした非構造タンパク質領域をターゲットとした、NoV の新規分類方法が提案された。本研究で構築を目指す GatVirusWeb は、構造生物学的とウイルスタンパク質の機能解析と分子疫学を融合させ、単なる直鎖状の配列ばかりでなく、立体構造のデータ、タンパク質の機能も加味した分子疫学ツールの構築を目指す。またリコンビネーション、リアソートによる加速度的分子進化を反映可能な分子疫学ツールの開発と、それらを搭載した CaliciWeb の進化型下痢症ウイルス遺伝子の網羅的分子疫学用データベース、GatVirusWeb 構築により、下痢症ウイルスの効果的な感染防御に貢献する。本年度は、ノロウイルスの多機能タンパク質 VPg, VP2 に加え RNA dependent RNA polymerase (RdRp) の発現、結晶解析へのアプローチを開始した、また、ロタウイルスの分子疫学基盤構築のため、RNA-PAGE による簡便かつ網羅的スクリーニング手法の確立を開始した。さらにセグメントウイルスのゲノムリアソートメントを計算し、進化を予測可能な新たなアルゴリズムの開発にも着手した。CaliciWeb は、ロタウイルスの遺伝子情報を加え、GatVirusWeb としてリスタートした。本年度は、ノロウイルスの分子疫学プログラム、時系列系統解析への取り組みを行った。

## A. 研究目的

下痢症を引き起こすウイルス感染症は、毎年、世界的規模で数十～数百万人規模の流行を引き起こす。特にノーウォークウイルス（ノロウイルス、NoV）感染症は、我が国においても、大規模なウイルス性食中毒を引き起こすことが知られている。また、ロタウイルス（RV）は乳幼児の深刻な下痢症の原因ウイルスとして知られていたが、近年、脳炎の遠因となることも疑われている。さらに、成人に感染し、重篤な嘔吐下痢症を引き起こすなどの新たな問題点も報告されている。

我が国において、これらのウイルス感染症は、平成 18 年度から平成 23 年度まで、申請者の継続した NoV 等のヒトに感染するカリシウイルスの構造タンパク質領域（ウイルス粒子を形成するタンパク質）の遺伝子配列の解析と蓄積、それを利用した分子疫学の推進によって、流行のメカニズムの研究、感染予防法の開発が行われてきた。特に、NoV 等のヒトに感染するカリシウイルス遺伝子データ蓄積に特化した CaliciWeb は、我が国のみならず、国外からも広く利用され、感染経路の特定やワクチン開発等に活用されてきた。しかし、CaoliciWeb では、近年爆発的に流行した NoV GII.4 や、脳炎を起こす RV など、ウイルスの病原性の変化に対応することが困難である。これらウイルスの病原性に関わるタンパク質を特定し、さらに高度な分子疫学的手法を構築するためには、臨床データとリンクした網羅的な遺伝子配列解

析に加え、ウイルスタンパク質の機能を構造生物学的に解析し、これらの研究成果を反映させることのできる新たな分子進化遺伝学的分子疫学を構築する必要がある。さらにこれらのウイルスでは、遺伝子の組み換えや（リコンビネーション）、入れ替え（リアソート）が高頻度で起きる。本研究班ウイルス分野においては、上記要素を加味したウイルスの病原性変化が予測可能な分子疫学解析ツールの開発と、それを搭載した下痢症ウイルス遺伝子の網羅的分子疫学用データベース、GatVirusWeb の構築を目指す。

## B. 研究方法、結果及び考察

・ノロウイルスタンパク質の構造解析（朴英斌、朴三用ら）

本研究で構築を目指す GatVirusWeb は、構造生物学的とウイルスタンパク質の機能解析と分子疫学を融合させ、から単なる直鎖状の配列ばかりでなく、立体構造のデータ、タンパク質の機能も加味した分子疫学ツールの構築を目指す。ノロウイルスにおいて、ORF1 にコードされる VPg, ORF3 にコードされる VP2 は、構造タンパク質と非構造タンパク質の性質を併せ持つことが予測されている興味深い多機能タンパク質である。昨年度は、分子構造の明らかにされていないこれら 2 種類のタンパク質の X 線結晶構造解析を行うため、大腸菌で発現させ、結晶化することを試みた。しかし、単独の発現は、難しく、困難が予想された。今年度は、可溶性タンパク質とし

て発現しやすい RNA dependent RNA polymerase (RdRp) の結晶化と、構造解析に取り組んだ。

リバースジェネティクスシステムが稼働しているヒトノロウイルス GII.3 U201 株の RdRp 領域を大腸菌へのコドン最適化を行った後、pCold 発現ベクターに組み込み、大量発現を行った。U201-RdRp は、可溶性画分に大量に発現され、mg オーダーで調整することが可能であった。結晶化の条件を最適化し、安定した RdRp の結晶を得ることに成功した。得られた結晶は、筑波のシンクロトロンを用いて X 線を照射し、リフレクションパターンを取得した。リフレクションパターンより、コンピューターにより 3D 構造を構築した。現在、構築に成功した構造と、データベース上に報告されている他の遺伝子型に由来する構造を比較し、共通構造部分の検出を行っている。

培養細胞で増殖させることが可能なマウスノロウイルス (MNV) の S7 株についても、本年度のプロジェクトとして取り組み、RdRp の発現と結晶化に成功した。しかし、MNV の RdRp の結晶は、ヒトノロウイルス U201 株の結晶よりも脆く、リフレクションパターンに乱れが生じるため、10 Å を若干下回る程度の解像度しか得られなかった。現在、さらに大量かつ高純度の RdRp を作製し、ラージスケールでの結晶化を進めている。この結晶構造を解くことができると、リバースジェネティクスの技術により作出できる感染性ウイルスの RdRp を

エンジニアリングすることが可能となり、ウイルス増殖効率を左右する変異の部位、つまり病原性を考慮に入れた分子疫学ターゲット領域の候補を見いだすことに繋がる。

さらに、最終年度に向け、protease 等結晶構造が解析された安定した構造を持つタンパク質と組み合わせた融合タンパク質として発現させ、可溶化と結晶化する試みも続けている。

・PAGE によるロタウイルスゲノムのバンドパターン解析、ロタウイルス RNA-PAGE の分子疫学への応用 (村上、藤井)

ロタウイルスは、主に乳幼児が罹患する急性胃腸炎の原因ウイルスのひとつで、幼稚園や小中学校だけでなく病院、老人介護施設などの施設でも集団感染を引き起こす。また、ロタウイルスで汚染された食品の摂取による食中毒事例も散見される。ロタウイルスのゲノムは 11 本の分節二本鎖 RNA (double-stranded RNA: dsRNA) で、ポリアクリルアミドゲル電気泳動

(RNA-PAGE) により分節ごとに分離される。RNA-PAGE の泳動パターンは、群および遺伝子型ごとに特徴があることから、泳動パターンから大まかな分類が可能である。RNA-PAGE は安価で多検体を処理できる方法として有用であるが、泳動条件の違いにより泳動パターンに差が生じることから、異なる施設間での比較が容易でない。この問題点を解決するため、本分担研究では、施設間誤差の小さいマイクロチップ電気泳動装置 (MultiNA) に着目し、この手法に

よるロタウイルス dsRNA の分離を検討した。施設間誤差を検証するため、NT-9 を 3 台の装置で測定した。装置 1 台につき 4 枚のマイクロチップをセットし、各チップ 3 回ずつの測定を行った。合計 36 回の試験について各セグメントの移動度を比較したところ、標準偏差は 0.5 以下であり、測定値間で大きな誤差が認められなかった。しかし、セグメント 1-4 はお互いに距離が近く、各セグメントのエラーバーが重複していた。今年度は、これを解決する方法として、泳動の電圧調整、ポリマーの選択を行い、再現性の高い手法を確立した。互いに異なる塩基配列を有するサンプルの RNA-PAGE data と MultiNA のデータを蓄積することで、MultiNA がより高精度に群・遺伝子型を分類できることが明らかとなった。

キアゲン社のキャピラリー電気泳動装置” QIAexcel” との比較検討を行った結果、QIAexcel は、アッセイ間変動とゲルカセット間変動により生じる RNA のバンドパターン変化が大きく、ゲルカセット間比較、施設間比較ができず、株特異的パターン分別もできないことが明らかとなった。最終年度は、MultiNA に機種を絞り込み、自動パターン認識、識別プログラムの開発に着手する予定である。

・ロタウイルスにおける遺伝子再集合による進化機構の解明（鈴木、片山）

ロタウイルスのゲノムは 11 本の分節に分かれているため進化の過程で遺伝子再集合により新たな流行株が産生されるこ

とがあり、遺伝子再集合による進化を予測・制御することは医学的に重要と考えられる。そこで本研究課題においては、ロタウイルスの遺伝子再集合による進化機構を解明することを目的とする。本研究課題を遂行するにあたり、ロタウイルスと同様に分節型のゲノムを持ち同様の遺伝子再集合による進化機構を有すると考えられ、ロタウイルスよりも国際塩基配列データベースに登録されている配列数が多いインフルエンザウイルスについても並行して解析を行うことは有用であると考えられる。昨年度、インフルエンザウイルスのゲノム分節において 5' 末端と 3' 末端が塩基対を形成しているのか、またどのように塩基対を形成しているのかを検討することを目的として解析を行ったところ、それぞれのゲノム分節の両末端は塩基対を形成していることが確かめられ、株間で遺伝子組換えが生じている可能性が示唆された。本年度、ロタウイルスのリアソータント解析に本方法の応用を試みるため、本研究プロジェクトで蓄積を開始したロタウイルスの種々の遺伝子型の次世代シーケンス（NGS）データ（約 300 株分）より 5' , 3' 近傍の塩基配列を抽出し、ゲノムセグメントごとにアライメントした。また、データベース上に報告のある塩基配列とも比較検討を行った。

ロタウイルスの遺伝子セグメントは、VP7 - VP4 - VP6 - VP1 - VP2 - VP3 - NSP1 - NSP2 - NSP3 - NSP4 - NSP5 である。これらをそれぞれ NGS データとデータベー

ス上のシーケンスをアライメントしたところ、NGS データに数～数十塩基に及ぶオーバーハングがある可能性が見いだされた。仮に、オーバーハングが実在するとした場合、インフルエンザとは異なる機序で遺伝子セグメントの組み合わせが決まり、リアソータントが生じている可能性がある。現在、遺伝子セグメントの5'側、3'側の末端の構造ならびに塩基配列を、RACE法を用いて決定している。

・ GatVirusWeb の構築と維持 (三瀬敬治)

前研究班で構築された CaliciWeb は、ノーウォークウイルス (ノロウイルス、NoV)、サッポロウイルス (サポウイルス、SaV) 等のカリシウイルスを対象としたデータベース、疫学情報サイト CaliciWeb は、本年度観察された NoV GII.4 2012 変異株の大流行を捕らえ、注意喚起を行うなど、NoV の流行制御、予防衛生に多大な貢献を果たした。本ウェブサイトには構築された NoV, SaV 等の Calici virus に特化したサブデータベースは、国内外を問わず、利用者数も多く、研究者の間で重要な位置を占めている。本研究班では、CaliciWeb を引き継ぐだけでなく、ロタウイルスなどの下痢症ウイルスを新たに加えて GatVirusWeb を中心として拡大整備し、流行予測プログラムの開発・ページへの組み込みを行いつつさらなる充実を図る。昨年度は、ロタウイルスの分子疫学の基盤構築のため、データベースにロタウイルスの情報を掲載し、利用できるようにした。今年度は、英語でのフォーラム運用を行い、

GatVirusWeb を国際的情報交換の場として運用する予定し、外部リンクへのリンク申請など順調に研究が推移していたが、突然の外部からのサイバー攻撃により、server が壊され、Web site の復旧と新規立ち上げを行った。しかし、pdf のダウンロードができないなど、細かな不具合が続いている。来年度は、細かな不具合を解消すると共に、セキュリティーを向上させる予定である。

C. 健康危険情報

なし

D. 研究発表

1. 論文発表

(英文)

1. Harada S, Tokuoka E, Kiyota N, Katayama K, Oka T. Phylogenetic analysis of the nonstructural and structural protein encoding region sequences, indicating successive appearance of genomically diverse sapovirus strains from gastroenteritis patients. *Jpn J Infect Dis.* 2013;66(5):454-7
2. Minami-Fukuda F, Nagai M, Takai H, Murakami T, Ozawa T, Tsuchiaka S, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Nishiura N, Sassa Y, Omatsu T, Furuya T, Koyama S, Shirai J, Tsunemitsu H, Fujii Y, Katayama K,

- Mizutani T. Detection of Bovine Group A Rotavirus Using Rapid Antigen Detection Kits, RT-PCR and Next-Generation DNA Sequencing. *J Vet Med Sci.* 2013 Dec 30;75(12):1651-5. Epub 2013 Aug 2.
3. Murakami K, Kurihara C, Oka T, Shimoike T, Fujii Y, Takai-Todaka R, Park Y, Wakita T, Matsuda T, Hokari R, Miura S, Katayama K. Norovirus binding to intestinal epithelial cells is independent of histo-blood group antigens. *PLoS One.* 2013 Jun 14;8(6):e66534. doi: 10.1371/journal.pone.0066534. Print 2013.
  4. Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinjé J, White PA, Hansman G, Green K, Martella V, Katayama K, Koopmans M. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch Virol.* 2013 Oct;158(10):2059-68. doi: 10.1007/s00705-013-1708-5. Epub 2013 Apr 25.
  5. Iizuka S, Takai-Todaka R, Ohshiro H, Kitajima M, Wang Q, Saif LJ, Wakita T, Noda M, Katayama K, Oka T. Detection of multiple human sapoviruses from imported frozen individual clams. *Food Environ Virol.* 2013 Jun;5(2):119-25. doi: 10.1007/s12560-013-9109-1. Epub 2013 Mar 23.
  6. Suzuki Y, Kobayashi Y. Evolution of complementary nucleotides in 5' and 3' untranslated regions of influenza A virus genomic segments. *Infect Genet Evol.* 2013 Jan;13:175-9. doi: 10.1016/j.meegid.2012.10.007. Epub 2012 Nov 9.
  7. Suzuki Y. Detection of positive selection eliminating effects of structural constraints in hemagglutinin of H3N2 human influenza A virus. *Infect Genet Evol.* 2013 Jun;16:93-8. doi: 10.1016/j.meegid.2013.01.017. Epub 2013 Feb 9.
  8. Suzuki Y. Detecting natural selection from the comparison of synonymous and nonsynonymous substitutions. *NIG Workshop: Evolution of Junk DNAs*, National Institute of Genetics, Mishima, Japan, June, 2013.
- (邦文)
1. 片山和彦 ノロウイルスについて 健康教室 vol.710 p74-79, 2010
  2. 片山和彦 ノーウォークウイルスの特徴と予防対策 食品機械装置 vol.50, p52-59, 2013.
  3. 片山和彦 ノロウイルス感染症、ノロウイルスの流行のメカニズム 感

- 染症 vol. 253, p12-13, p19-21, 2013.
4. 片山和彦 ノロウイルス感染のメカニズム 食と健康 10月号 p9-17, 2013.
  5. 片山和彦 増加傾向にあるサポウイルス食中毒 食と健康 11月号 p16-19, 2013.
  6. 片山和彦 ノロウイルスの感染予防 小学保険ニュース p1, 2014年1月18日号
2. 学会発表  
(国際学会)
1. YoungBin Park, Reiko Takai-Todaka, Kosuke Murakami, Kazuhiko Katayama. Development of a novel norovirus RT-PCR amplification system corresponding to a consensus norovirus nomenclature 2013. Japan-Taiwan joint meeting. Shinjuku, Tokyo, JAPAN.
  2. Sato H, Yokoyama M, Motomura K, Nakamura H, Oka T, Katayama K, Takeda N, Noda M, Tanaka T, and the Norovirus Surveillance Group of Japan. Selective constraints on changes of a norovirus pandemic lineage GII.4\_2006b. The Fifth International Calicivirus Conference, October 12- 15, 2013, Beijing, China.
  3. Motomura K, Ode H, Yokoyama M, Nakamura H, Sato A, Katayama K, Noda M, Takeda N, Tanaka T, Sato H and the Norovirus Surveillance Group of Japan. Deep Sequencing-based analysis of minor variants in norovirus infection cases with acute gastroenteritis. The Fifth International Calicivirus Conference, October 12- 15, 2013, Beijing, China.
  4. Yokoyama M, Oka T, Katayama K, Sato H. Structural basis of substrate specificity in murine norovirus protease suggested by molecular dynamics simulation. The Fifth International Calicivirus Conference, October 12- 15, 2013, Beijing, China.
  5. Kazuhiko Katayama<sup>1,2</sup>, Reiko Takai-Todaka<sup>2</sup>, Akira Nakanishi<sup>3</sup>, Kosuke Murakami<sup>1,2</sup>, Tomoichiro Oka<sup>2</sup>, Susana Guix<sup>1</sup>, Tyler M. Sharp<sup>1</sup>, Robert L. Atmar<sup>1</sup>, Sue E. Crawford<sup>1</sup>, and Mary K. Estes<sup>1</sup> A plasmid based reverse genetics system can drive human and murine norovirus genome replication and produce progeny virus containing reporter tagged infectious genomic RNA. The Fifth International Calicivirus Conference, October 12- 15, 2013, Beijing, China.

6. Kosuke Murakami<sup>1</sup>, YoungBin Park<sup>1</sup>, Chie Kurihara<sup>2</sup>, Tomoichiro Oka<sup>1</sup>, Takashi Shimoike<sup>1</sup>, Reiko Takai-Todaka<sup>1</sup>, Takaji Wakita<sup>1</sup>, Tsukasa Matsuda<sup>3</sup>, Ryota Hokari<sup>2</sup> and Katayama Kazuhiko<sup>1</sup> Study of histo-blood group antigen-independent mechanism of norovirus-cell binding. The Fifth International Calicivirus Conference, October 12- 15, 2013, Beijing, China.
  7. YoungBin Park, Reiko Takai-Todaka, Kosuke Murakami, Kazuhiko Katayama. Development of a novel norovirus RT-PCR amplification system corresponding to a consensus norovirus nomenclature 2013. The Fifth International Calicivirus Conference, October 12- 15, 2013, Beijing, China.
- (国内)
1. 藤井克樹<sup>1</sup>、村上耕介<sup>1</sup>、戸高玲子<sup>1</sup>、中込とよ子<sup>2</sup>、中込治<sup>2</sup>、片山和彦<sup>1</sup> ゲノム遺伝子型構成解析による網羅的ロタウイルス分子疫学基盤構築 第54回日本臨床ウイルス学会 平成25年6月7日 岡山県倉敷市
  2. 村上耕介、藤井克樹、戸高玲子、片山和彦 ノロウイルスの小腸上皮細胞への結合メカニズムの解析 第54回日本臨床ウイルス学会 平成25年6月7日 岡山県倉敷市
  3. 佐藤裕徳、横山勝、本村和嗣、中村浩美、岡智一郎、片山和彦、武田直和、野田衛、田中智之. ノロウイルスGII.4\_2006bのカプシドと酵素に働くアミノ酸変化の制約. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 2013年11月10-12日(火-木)、神戸.
  4. 横山 勝、岡 智一郎、片山和彦、佐藤裕徳. 分子動力学法によるマウスノロウイルスプロテアーゼの基質認識機構の解析. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 2013年11月10-12日(火-木)、神戸.
  5. 本村和嗣、横山勝、大出裕高、中村浩美、佐藤彩、岡智一郎、片山和彦、野田衛、武田直和、田中智之、佐藤裕徳. ノロウイルス感染者体内における混合感染の実態. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 2013年11月10-12日(火-木)、神戸.
  6. 下池貴志、高木弘隆、岡智一郎、村上耕介、戸高玲子、朴英斌、藤井克樹、脇田隆字、片山和彦 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月、神戸
  7. 村上耕介、戸高玲子、朴英斌、藤井克樹、下池貴志、脇田隆字、栗原千枝、穂苅量太、松田幹、片山和彦 ノロウイルスの小腸上皮細胞への結合メカニズム 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月、神戸

8. 藤井克樹、下池貴志、戸高玲子、片山和彦 ゲノム遺伝子型構成解析による網羅的ロタウイルス分子疫学研究 (2012年) 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年
  9. 戸高玲子、村上耕介、岡智一郎、高木弘隆、朴英斌、下池貴志、藤井克樹、脇田隆字、中西章、片山和彦 カリシウイルスのリバースジェネティックスシステムを用いた感染性粒子の研究 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月、神戸1月、神戸
  10. Youngbin Park, Kazuhiko Katayama. Development of a novel norovirus RT-PCR amplification system corresponding to a consensus norovirus nomenclature 2013, 2013. 61th annual meeting of the Japanese society for virology. Kobe, Japan, 2013
  11. 長井 誠、南-福田 藤子、小原潤子、小池新平、赤松裕久、土赤 忍、片山幸枝、大場真己、佐々悠木子、大松 勉、古谷哲也、片山和彦、白井淳資、水谷哲也、糞便を材料とした次世代シーケンシングによるウシA群ロタウイルスの遺伝子型別、第156回日本獣医学会学術集会、2013年9月、岐阜
  12. 片山和彦 レファレンスセンター会議 ノロウイルス 衛生微生物技術協議会 平成25年7月11日、12日
  13. 鈴木善幸：教育講演「病原体の遺伝子解析-解析からわかること-」. 衛生微生物技術協議会第34回研究会、名古屋市中心企業振興会館（吹上ホール）、名古屋、2013.7.
  14. 鈴木善幸：How can we predict the future? 国立遺伝学研究所研究会「新機能獲得の分子進化」、三島、2013.8.
3. その他  
(講演会・シンポジウムなど)
1. 片山和彦 平成25年12月9日 曜日 第42回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー「新しい作用機構の抗ウイルス薬開発への取り組み-ウイルス感染症に挑む-」ノロウイルスたんぱく質構造と抗ウイルス薬
  2. 片山和彦 平成26年1月18日 土曜日 第13回東北臨床感染症研究会 勝山館4階「貴賓室」 宮城県仙台市青葉区上杉2丁目1-50 「腸管感染症」“ノロウイルス”
  3. 片山和彦 平成25年5月23日 日本食品工業クラブ講演会 ノロウイルス感染症
  4. 片山和彦 平成25年6月4日 関東労災病院主催 講演会(川崎市) ノロウイルス感染症
  5. 片山和彦 平成25年6月18日 シラバス・知の広場(感染研戸山庁舎 共用第一会議室) ウイルス性食中毒
  6. 片山和彦 平成25年7月6日 武田薬品工業主催 ノロウイルスセミナー (東京メトロポリタン丸の内)

- ノロウイルスの基礎
7. 片山和彦 平成 25 年 7 月 13 日 北里セミナー（北里大学白金キャンパス薬学部コンベンションホール）  
ノロウイルス感染症
  8. 片山和彦 平成 25 年 10 月 18 日  
「地域保健総合推進事業」地方衛生研究所地域専門家会議の講師（秋田県秋田市中通 6-1-3 イヤタカ）  
下痢症ウイルスの基礎と分子疫学
  9. 片山和彦 平成 25 年 11 月 5 日 郡山市主催講演会 ノロウイルス食中毒発生防止対策及び感染症発生防止対策について（福島県産業交流館ビッグパレットふくしま）
  10. 片山和彦 平成 25 年 12 月 4 日 社団法人福島県食品衛生協会主催 講習会 ノロウイルス食中毒の予防と対策（福島県福島市三河南町 1-20 コラッセ福島 4 階ホール）
- (新聞) 指導、監修**
1. 週間 ホテルレストラン 猛威をふるったノロウイルスを検証p57-60, 2月8日号, 2013.
  2. 日経メディカル ニュース追跡 ノロウイルス変異株が猛威 p33, 1月号, 2013.
  3. 片山和彦 冬の食中毒、ノロウイルスの感染予防対策 健康ふしぎ発見 ニュース からだの不思議 12月号, p12-6, 2013. 健学社.
  4. 片山和彦 しっかり手洗いで防ぐノロウイルス 健康の広場 第1775号 平成24年1月11日号 4面 株式会社法研
  5. 片山和彦 ノロウイルス対策 心と体 保険総合大百科 保険ニュース・心の健康ニュース 縮刷活用版 2011年 少年写真新聞社  
ISBN978-4-87981-361-9
  6. 医薬品の品質管理とウイルス安全性 第7章 新しいウイルス検出法、ウイルス診断法、ウイルス試験 総論（執筆；片山和彦） 日本医薬品等ウイルス安全性研究会  
ISBN978-4-8306-0331-0
  7. 朝日新聞 2014年2月22日土曜日 夕刊 1面「ノロ感染まだ要警戒・寒い首都圏 続く発生」
  8. 朝日小学生新聞 2013年12月20日金曜日 日刊 1面「手洗いで予防ノロウイルス」
  9. 朝日新聞 2013年11月27日水曜日 日刊 37面 「ノロウイルス流行の兆し」
  10. 読売新聞 2014年1月22日水曜日 日刊 25面 ノロウイルス食中毒 全国流行 トイレで飛散、感染に注意
  11. 朝日新聞 2013年12月1日日曜日 日刊 16面 ノロウイルス手洗いで撃退

12. 少年写真新聞社 ほけん通信 2014年1月18日号 ノロウイルスの性質を知って、流行の広がりを防ごう
  13. 少年写真新聞 2014年1月18日号 知っていますか？ノロウイルスの通り道
  14. 朝日小学生新聞 2014年1月18日土曜日 日刊 1面「ノロウイルス？905人欠席・静岡・浜松の14項 下痢やはき気」
  15. AERA 2014年2月3日 #5 ノロウイルスを無自覚でまき散らす脅威「激しい突然変異で拡散」p58-59
  16. 朝日新聞 2014年1月28日火曜日 夕刊 10面 ノロ流行続く
  17. 共同通信社 2014年2月4日 あなたも感染源に？ ノロウイルス、意識変えて 経路多く、症状ない人も
  18. 時事通信社 ノロウイルス流行拡大＝自覚症状無くても感染源に-手洗い徹底を
  19. 日本経済新聞 2014年2月25日火曜日 日刊 18面 ノロウイルス攻略に道
  20. (テレビ放送) 出演、指導、監修
  21. 2013年11月25日 ワイド！スクランブル
  22. 2014年1月28日 NHK ニュースセブン ノロウイルス見えない感染を防げ
  23. 2014年1月17日 NHK ノロ対策「塩素系漂白剤で消毒を」
  24. 2013年12月6日 日本テレビ ニュースエブリイ
  25. 2014年1月14日 読売テレビ 朝生ワイドす・またん！
  26. 2014年1月20日 日本テレビ NEWS ZERO
  27. 2014年1月20日 NHK NEWSWEB
  28. 2014年1月23日 日本テレビ スッキリ！！
  29. 2014年1月28日 NHK ニュースセブン ノロウイルスの流行状況
  30. (ラジオ番組) 出演
  31. 2014年1月23日 垣花正あなたとハッピー “ノロウイルスの流行について”
  32. 2014年1月28日 NHKラジオ第一 NHKジャーナル
- (その他)
1. 厚生労働省ロタウイルスワクチンファクトシート著述
  2. 厚生労働省ロタウイルスワクチン作業チームメンバー・報告書作成
  3. WHO poliovirus meeting in Beijing, China. Dec17, 2013
  4. WHO poliovirus meeting in Geneva, Switzerland May14-16, 2013
- E. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

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）  
「病原体解析手法の高度化による効率的な食品由来感染症探知システムの構築に関する研究」

平成 25 年度研究分担報告書

ノロウイルスタンパク質の構造解析

研究分担者 朴 三用 横浜市立大学  
研究分担者 朴 英斌 国立感染症研究所ウイルス第二部第一室

本研究は、発現タンパク質のデザイン、結晶化、X線構造解析など全てのステップにおいてX線による構造解析の高度な技術・知識を有する横浜市立大学の朴三用教授の指導の下、実施された。本報告書は、連名とする。

研究要旨

本研究で構築を目指す GatVirusWeb は、構造生物学的とウイルスタンパク質の機能解析と分子疫学を融合させ、単なる直鎖状の配列ばかりでなく、立体構造のデータ、タンパク質の機能も加味した分子疫学ツールの構築を目指す。ノロウイルスにおいて、ORF1 にコードされる VPg, ORF3 にコードされる VP2 は、構造タンパク質と非構造タンパク質の性質を併せ持つことが予測されている興味深い多機能タンパク質である。本分担研究では、分子構造の明らかにされていないこれら 2 種類のタンパク質に加え、RNA dependent RNA polymerase (RdRp) の X 線結晶構造解析を行うため、大腸菌やバキュロウイルスを用いて昆虫細胞でこれらの蛋白質を発現させ、結晶化することを試みた。ヒトノロウイルス (HuNoV) GII.3 U201 株の VPg, VP2, RdRp、マウスノロウイルス (MNV) S7 株の VPg, VP2, RdRp のコドンで大腸菌もしくは、昆虫細胞に最適化して遺伝子人工合成を行った。人工合成フラグメントは、pCold ベクターにクローニングしコーールドショックによる大量発現をおこなった。HuNoV と MNV の RdRp の結晶化に成功した。X 線結晶構造解析の結果 HuNoV の RdRp を 2.2 Å の精度で構造を解くことに成功した。

A. 研究目的

前研究班の研究活動では、CaliciWeb では、NoV, SaV などヒト腸管感性カリシウイルスを対象とした、ゲノム情報を疫学情報と共に蓄積し、構造タンパク質領域を標的としたバイオインフォマティクスによる解析を行った。CaliciWeb は現在、グローバル

NoV net work の NoroNet とのコラボレーションも実現しつつある。さらに、本研究活動により提案された NoV の病原性変化を対象とした非構造タンパク質領域をターゲットとした、NoV の新規分類方法が提案されている。本研究では、構築を目指す GatVirus Net は、構造生物学的とウイルスタンパク質

の機能解析と分子疫学を融合させ、から単なる直鎖状の配列ばかりでなく、立体構造のデータ、タンパク質の機能も加味した分子疫学ツールの構築を目指す。昨年度より、本分担研究では、分子構造の明らかにされていない VPg, VP2 の 2 種類のタンパク質の X 線結晶構造解析を行うため、大腸菌で発現させ、結晶化を試みたが、構造解析には至らなかった。これらの蛋白質発現は、モノクローナル抗体との共結晶化、GFP との融合蛋白質としてバキュロウイルスを用いて発現するなど、安定した結晶を得るため検討が続いている。本年度は、ヒトノロウイルス (HuNoV) GII.3 U201 株のポリメラーゼ (RdRp), マウスノロウイルス (MNV) S7 株のポリメラーゼ (RdRp) の結晶化、並びに X 線結晶構造解析を行った。

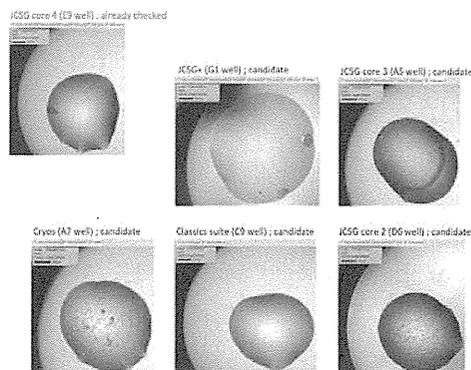
## B. 研究方法

HuNoV U201 株の RdRp, MNV-S7 株の RdRp コード領域を大腸菌のコドンに最適化して、人工合成し、pCold-TF, pCold に InFusion cloning system によってクローニングした。これら大腸菌 BL-21 に transformation して、HisTag タンパク質の発現を行った。コールドショックによる大量発現は、30°C にて 6 時間から 8 時間の増殖の後、IPTG を添加し、12°C にて一晩発現させた。大腸菌は、超音波処理し、細胞を破碎した後、上清を分取してタロンビーズに結合させて精製した。溶出にはイミダゾールを用いた。

## C. 研究結果および考察

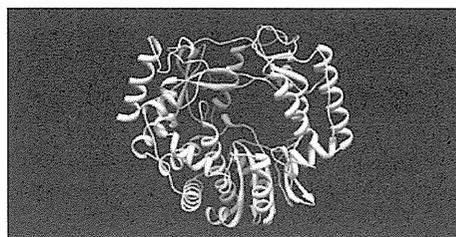
HuNoV U201 の HisTag-RdRp は、65 kDa の Band として可溶性画分に発現し、タロン

ビーズによる精製の結果、58kDa のメインバンドを精製可能であった。約 100mg の RdRp を精製し、結晶化を試みたところ、幾つかの結晶を得た。



これらの結晶の内、最も大型かつ安定したリフレクションパターンを持つものを、小型のビーム装置によりテストし、質の良いリフレクションを取得可能な結晶を選択した。得られた結晶化条件に基づき、再度 50 - 100mg の精製 RdRp を結晶化し、筑波のビームラインに持ち込み、リフレクションパターンを取った。

得られたリフレクションパターンは構造再構築に用い、2.2Å の構造を得た。



Norovirus genotype GII.3 の RdRp の構造を初めて解くことに成功した。詳細な比較検討はこれからだが、MNV の RdRp, HuNoV GII.4 の RdRp と構造が類似していた。今後既報の RdRp と詳細に構造を解析することで、

in silico での観察を進め、全ての RdRp に共通する構造を見つけ出し、抗ウイルス薬開発の基盤情報として提供が可能かもしれない。

## E. 結論

ヒトノロウイルス (HuNoV) GII.3 U201 株の可溶化と結晶化を試み、成功した。結晶より、X 線のリフレクションパターンの作製に成功した。現在、アミノ酸レベルでの HuNoV と MuNoV RdRp の比較が進行中である。さらに、ホモロジーモデリングにより、立体構造を 1 次構造に反映させ、RdRp 活性とのアミノ酸配列変化の関係を確認する予定である。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Murakami K, Kurihara C, Oka T, Shimoike T, Fujii Y, Takai-Todaka R, Park Y, Wakita T, Matsuda T, Hokari R, Miura S and Katayama K: Norovirus binding to intestinal epithelial cells is independent of histo-blood group antigens. PLoS ONE 2013, 8(6): e66534.

### 2. 学会発表

1) 藤井克樹、村上耕介、戸高玲子、中込とよ子、中込治、片山和彦: ゲノム遺伝子型構成解析による網羅的ロタウイルス分子疫学基盤構築 第 54 回日本臨床ウイルス学会、2013 年 6 月、倉敷

2) 西村直子、野口篤子、伊藤陽里、辰巳正純、大場邦弘、中込治、中込とよ子、藤井克樹、片山和彦: 我が国で流行したロタウイルスの遺伝子型の全国分布 (2012 年) 第 54 回日本臨床ウイルス学会、2013 年 6 月、倉敷

3) 伊藤陽里、中込とよ子、中込治、藤井克樹、片山和彦: 京都府南丹地区におけるロタウイルス胃腸炎入院率 第 54 回日本臨床ウイルス学会、2013 年 6 月、倉敷

4) 三浦忍、野口篤子、藤井克樹、中込治、片山和彦、中込とよ子、高橋勉: 秋田県由利地区におけるロタウイルス胃腸炎による入院率 第 54 回日本臨床ウイルス学会、2013 年 6 月、倉敷

5) 村上耕介、藤井克樹、戸高玲子、片山和彦: ノロウイルス小腸上皮細胞への結合メカニズムの解析 第 54 回日本臨床ウイルス学会、2013 年 6 月、倉敷

6) 藤井克樹: ロタウイルスの新知見ウイルス性下痢症研究会第 25 回学術集会、2013 年 11 月、神戸

7) 藤井克樹、下池貴志、戸高玲子、片山和彦: ゲノム遺伝子型構成解析による網羅的ロタウイルス分子疫学研究 (2012 年) 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月、神戸

8) 高木弘隆、藤井克樹、小林宣道、棚林清、片山和彦: 多様な A 群ロタウイルス株に対応する感受性 MA104 細胞クローン樹立の試み 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月、神戸

9) 戸高玲子、村上耕介、岡智一郎、高木