

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

10) 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、穂刈量太、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

11) 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：マウスノロウイルス感染細胞内のウイルス蛋白質間とそのゲノ

ムRNAとの相互作用 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月、神戸

12) Youngbin Park, Kazuhiko Katayama. Development of a novel norovirus RT-PCR amplification system corresponding to a consensus norovirus nomenclature 2013, 2013. 5th international conference caliciviruses. Beijing, China, 2013

13) 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

#### H. 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 24 年度研究分担報告書

## PAGE によるロタウイルスゲノムのバンドパターン解析

研究分担者 村上 耕介

国立感染症研究所ウイルス第二部第一室

### 研究要旨

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。本分担研究では、施設間誤差の小さい島津社の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。今年度は、キアゲン社のゲルカートリッジ式電気泳動装置 QIAxcel と MultiNA の比較検討を行った。

## A. 研究目的

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、年明けから春先に流行のピークが見られる。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。

ロタウイルスは、コア、内殻、外殻の3層で構成され、コア内に11本の分節二本鎖RNA (double-stranded RNA : dsRNA) を有する。内殻を構成するVP6の抗原性によりA-G群に分類され、このうちA-C群がヒトに感染する。さらにA群は、スパイクを構成するVP4、外殻を構成するVP7の遺伝子型によって、それぞれP[1]-P[35]、G1-G26に分類される。

ロタウイルスは便中へ多量に排出され、糞便1gに含まれるウイルスは $10^{10-11}$ 個にも及ぶ。そのため、糞便中の抗原を検出するイムノクロマト法が、ロタウイルスの検出法として広く使われており、現在までに多数の迅速診断キットが市販されている。しかし、これらの多くはA群ロタウイルスを対象として開発されているため、A群以外のウイルスを検出することができない。そのため、全てのロタウイルスを検出する方法としてPCR法が用いられる。PCR法は、ロタウイルスを高感度に検出できることから、糞便のみならず血液、髄液からの検出にも使用される。しかし、群、遺伝子型ごとにプライマーを用意する必要があるため作業が煩雑で、多検体の処理に適していない。

前述のように、ロタウイルスは便中に大量

に存在することから、患者便検体から抽出したゲノムRNAをアクリルアミドゲルで電気泳動すると、エチジウムブロマイドあるいは銀染色により11本の分節を可視化することができる(RNA-PAGE)。RNA-PAGEの泳動パターンは群および遺伝子型によって特徴があり、泳動パターンによる大まかな群、遺伝子型分類が可能である。RNA-PAGEは、安価で一度に多数の検体を処理できるため、分子疫学的手法として古くから用いられている。

このように、ゲノムの泳動パターンから種を分類するシステムは、食品由来感染症起因菌を解析する「パルスネット」として実用化されている。しかしロタウイルスは、RNA-PAGEの泳動条件が統一されておらず、また施設ごとの泳動パターンが異なることから、各遺伝子型の泳動パターンを網羅したデータが存在していない。日本では2011年からロタウイルスワクチンが導入されており、分子疫学を強力に推進させるためにも、ロタウイルスを迅速かつ簡便に分類するシステムが求められる。

RNA-PAGEは、泳動条件が異なると泳動パターンに差が生じるため、施設間で簡単に比較することができない。近年、微小基板上に作製した微細な流路内で電気泳動を行う島津社の「マイクロチップ電気泳動」MultiNAが実用化され、DNAやRNAを分離することが可能となった。この手法で使用されるマイクロチップや試薬は高精度で管理されているため、施設間誤差が小さいという特徴があり、各施設で得られた泳動パターンを容易に比較可能である。一方、キアゲン社のゲルカートリッジ式電気泳動装置QIAxcelは、RNA-PAGEをカ

ートリッジ型ゲルで行う装置であり、ロタウイルスの11本のRNAセグメントを高精度に分離することが可能である。

本年度は、どちらがロタウイルス RNA-PAGE パターン解析に適しているかを検討した。

## B. 研究方法

### 1. ロタウイルス RNA-PAGE

ロタウイルス患者の便検体 (KN-6、NT-9) から、TRIzol LS Reagent (Invitrogen) と Direct-zol RNA MiniPrep キット (ZYMO Research) を用いてゲノム dsRNA を抽出した。

### 2. RNA-PAGE

抽出した RNA は、DEPC 処理した DW にて懸濁し、RNA-PAGE dye を添加した後、10%アクリルアミドゲル (ATTO)、Tris/Glycine SDS buffer にて SDS-PAGE を行った。泳動後、ゲルは SYBR-Gold (Invitrogen) で染色し、トランスイルミネーターにて、RNA のバンドを検出した。

### 3. QIAxcel による電気泳動

抽出した RNA は、DEPC 処理した DW にて懸濁し、RNA-PAGE dye を添加した後、OM500, OM800, OM1200, OM1600 の4種類のゲルカセットを用いて分離能力を測定した。装置の操作は取扱説明書に準じて行った。アッセイ間誤差の検証実験では、ゲルカセットを交換するとともに泳動レーンもシャッフルしてレーン間誤差も検討した。

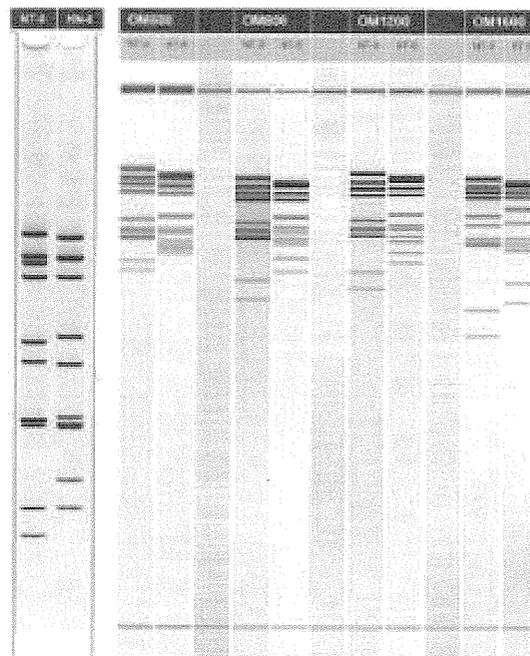
(倫理面への配慮)

本研究は、ヒト由来の便材料を用いた研究であるため、倫理委員会に研究内容を申請し、

承認を受けた後に検体採取並びに解析を行った。

## C. 研究結果

OTM500<OTM800<1200<1600 と OTM の数字が多きゲルカセットほど RNA の分離が良く、NT-9 は OM1600 での泳動像のみ小さいサイズからみて4番目と5番目のバンドが分離可能であった。KN-6 に関しても OTM1600 のみ10本のバンドの間隔が開き、容易に分別することが可能であった (図1)。バンドパターンはチップ型電気泳動装置 MultiNA に比べて、小さいサイズから見て4-6番目のバンドの分離が良く、それぞれのバンドを独立したバンドとして確認可能であった。



(図1)

次にゲル間、レーン間再現性を確認するため、OM1600 で KN-6, NT-9 の泳動を行った。



(図 4)

### C. 考察

マイクロチップ電気泳動は主に DNA および ssRNA を対象としており、ロタウイルスゲノムのような dsRNA の検討は行われていない。これは、QIAxcel でも同様である。ロタウイルスの dsRNA を安定して電気泳動し、10~11 本のバンドパターンに分離するため、DNA 泳動条件の 2 分の 1 に電圧を下げ、OTM1600 で電気泳動を行った。10 本のバンド分離能力は、優れており、この条件下で完全に 10 本に分離可能であった。泳動工程が MultiNA に比べて約 2 倍以上長いことも一因であると考えられた。

施設間誤差、アッセイ間誤差、カセット間誤差を検証するため、ゲルカセットを交換して泳動パターンを比較したところ、NT-9 では、同一パターンと判別不可能なパターン変化が観察された。同じゲルカセットを用いた 2 回目のランでは、パターン変化が生じなかった。この結果は、ゲルカセット交換により補正不可能な泳動パターン変化が生じる異を示していると考えられた。KN-6 の場合、異なる現象が観察された。KN-6 には、大きなパターン変化は観察されず、わずかなパターン変化のみが観察された。しかし、アッセイ間変動が泳動パターンに影響を与えており、アッセイ間の微妙な変化に一定の傾向を認めなかった。

以上の結果をまとめると、QIAxcel は、dsRNA の分離能力には優れているが、アッセイ間変動、ゲルカセット間変動を制御できない可能性が強い。このような不安定さは、昨年度検討した MultiNA では、認められなかった。

今後は MultiNA を用いて、さらなる分離能力向上、高精度に群・遺伝子型を分類するための泳動条件の検討を行う。

### E. 結論

マイクロチップ電気泳動装置 (MultiNA) とカセット型電気泳動装置 (QIAxcel) を比較検討した結果、QIAxcel のアッセイ間変動、カセット間変動は、施設間パターン比較に適していなかった。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Fujii Y, Kitaura K, Matsutani T, Shirai K, Suzuki S, Takasaki T, Kumagai K, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, Hamada Y, Kurane I, Suzuki R: Immune-Related Gene Expression Profile in Laboratory Common Marmosets Assessed by an Accurate Quantitative Real-Time PCR Using Selected Reference Genes. PLoS ONE 2013, 8(2): e56296.
- 2) 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.
- 3) 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, 75(12): 1651-5
1. 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
- 10) 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、穂刈量太、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
- 11) 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：マウスノロウイルス感染

細胞内のウイルス蛋白質間とそのゲノム  
RNA との相互作用 第 61 回日本ウイルス学  
会学術集会、2013 年 11 月、神戸

H. 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 24 年度研究分担報告書

## ロタウイルスの RNA-PAGE 泳動パターンによる流行株分類法の検討

研究分担者 藤井 克樹 国立感染症研究所 ウイルス第二部

### 研究要旨

ロタウイルス（RV）は二本鎖 RNA で構成される 11 本の遺伝子分節をゲノムとして有する。RV 感染患者の便検体から抽出した RNA をポリアクリルアミドゲルで電気泳動（RNA-PAGE）すると、その分子量や二次構造の違いにより各分節を分離・検出することが可能である。この泳動パターンは遺伝子型や株によって異なるため、検体間のウイルスの類似性を推定する事も可能である。我々の保有する検体を用いて、RNA-PAGE のバンドパターンとそれらの遺伝子型との関連性について検討を行ったところ、VP2、VP3、VP6、VP7、NSP1、NSP2、NSP3、NSP5 の各遺伝子分節において遺伝子型とバンドパターンに明確な関連性が認められた。この結果から、RNA-PAGE によるパターン分類法を利用して、RV 流行株を広範かつ簡便に調査するシステムを構築できる可能性が示唆された。本年度は、マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA と、RNA-PAGE パターンの相関関係について解析を行った。

## A. 研究目的

ロタウイルス (RV) は乳幼児の重症胃腸炎の最大の原因であり、我が国における年間の患者数は 70-80 万人、入院数は 7-8 万人におよぶと推定されている。時に腎炎や腸重積、脳炎・脳症などの重篤な合併症を引き起こすこともあり、年間数人から 10 人前後の患者が、RV が原因で命を落としている。また、RV は教育施設や老人施設などで集団感染を引き起こす事も多く、食中毒の原因として検出される事例も散見されており、公衆衛生上も問題視されている。

RV はコア、内殻、外殻の三層構造を有するウイルスであり、そのゲノムは 11 分節からなる二本鎖 RNA (double-stranded RNA : dsRNA) で構成されている。RV のゲノムは非常に多様性が高く、11 本の遺伝子分節それぞれに多数の遺伝子型が存在している。実際にヒトの間で流行している RV 株も地域や時期によって大きく異なる事があり、非常に多彩な様相を呈している。ウイルス株の遺伝子型を記載する場合には、11 分節の遺伝子型を VP7 - VP4 - VP6 - VP1 - VP2 - VP3 - NSP1 - NSP2 - NSP3 - NSP4 - NSP5 (Gx - P[x] - Ix - Rx - Cx - Mx - Ax - Nx - Tx - Ex - Hx) の順に羅列する方法が取られているが、それぞれの株の遺伝子型を全て決定するには多大な労力と時間を要する。従って、RV の流行株を詳細に幅広く把握するのは容易ではない。

地研などの検査室では、RV の検出法としては ELISA 法や RT-PCR 法およびシーケンス解析を行うことが通例となっているが、RV 研究者の間では、ポリアクリルアミドゲル電気泳

動 (RNA-PAGE) によりウイルスゲノムを直接検出できる事がよく知られている。RV 感染患者の便 1g には 10 の 10 乗~12 乗もの大量のウイルス粒子が存在している為、便検体から抽出した RNA について RNA-PAGE を行うと 11 本の遺伝子分節に由来するバンドを容易に検出できる。しかも、そのバンドパターンは遺伝子型の違い或いは僅かな塩基配列の違いにより泳動度が異なって現れる。この性質を利用し、RV の流行株を容易に把握するシステムを構築するため、RNA-PAGE の各種条件および検体間のバンドパターンとマイクロチップ電気泳動装置 MultiNA におけるバンドパターンの相関関係について解析を行った。

## B. 研究方法

本実験には、共同研究者より提供されたユニークな RNA-PAGE パターンを示したロタウイルス陽性便検体を用いた。便検体から 10% PBS 懸濁液を調製し、TRIzol<sup>®</sup> LS Reagent (Life technologies) および Direct-zol RNA MiniPrep Kit (ZYMO Research) を使用してウイルス RNA の抽出を行った。RNA-PAGE には、10% ポリアクリルアミドゲル (アトー) を使い、Tris/Glycine buffer にて 30 mA、100 min 電気泳動を行った。泳動後、ゲルを 10000 倍希釈した SYBR-Gold (Life technologies) で 60 min 染色し、トランスイルミネーターにて RNA のバンドを検出した。また、マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA における泳動は、DNA500 ポリマーキットを用いて行った。得られたバンドパターンの相関関係について解析した。一部の検体については次世代シーケン

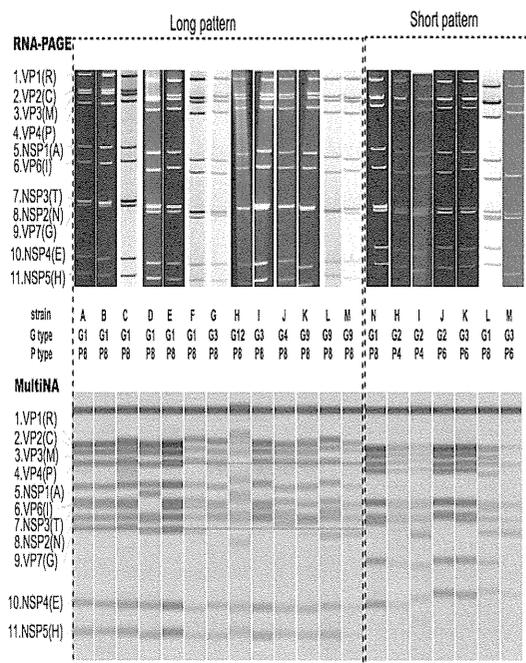
システムを用いたウイルスゲノムの塩基配列解析を行い、遺伝子型を決定してRNA-PAGEパターンとの関連性を検討した。

### C. 研究結果および考察

RNA-PAGE では、RV のゲノムはサイズの大きいものから順に VP1 (3300 bp)、VP2 (2700 bp)、VP3 (2600 bp)、VP4 (2350 bp)、NSP1 (1550 bp)、VP6 (1350 bp)、NSP3 (1070 bp)、VP7 (1062 bp)、NSP2 (1059 bp)、NSP4 (740 bp)、NSP5 (665 or 820 bp) の順番で検出された (サイズは株により異なるため、およその値で示している)。VP2 と VP3 のバンドは近接しているため、株によっては 1 本のバンドとして検出された。概ね C1-M1 タイプは 2 本の分離したバンドとして検出できるが、C2-M2 タイプは分離できずに 1 本のバンドであるかのように見える傾向があった。NSP1 と VP6 のバンド間隔についても遺伝子型による違いが見られ、I1-A1 タイプは I2-A2 タイプと比較して明らかに間隔が狭かった。VP7、NSP2、NSP3 のバンドも近接しているため、バンドの数が実際より少なく見える事が多かった。おおよその傾向としては、N1-T1 タイプはバンドが 1 本+2 本 (1 本目と後の 2 本の間と比較的大きな隙間がある) に分かれ、N2-T2 タイプは 2 本+1 本に分かれていた。VP7 遺伝子型の傾向で見ると G1 タイプは比較的バンドの間隔が広く、G1 > G9 > G3 の順に間隔が狭くなっていた。また、G9 には比較的間隔の広い株と、間隔が狭く 3 本のバンドがほぼ 1 本に重なっている株の 2 種類が認められた。NSP5 については H2 タイプ

のみ 820 bp 前後のサイズがあるため、他のタイプと容易に区別することができた。G12P[8] は、RNA-PAGE では G9P[8] の long パターンと区別ができなかった (図 1)。

MultiNA によるパターンは、塩基配列の差を反映しており、G9P[8] を含め、株特異的パターンを示し、MultiNA パターンによって株分類が可能であった。



(図 1)

### E. 結論

MultiNA は、RNA-PAGE に比べ band #1 - 9 (VP1, 2, 3, 4, NSP1, VP6, NSP3, 2, VP7) が近接しているが、アッセイ間変動、チップ間変動、施設間変動がほとんど無く、微細なバンドパターン変化も再現可能である。現在までの解析では、塩基配列が 1 塩基でも異なるとパターン変化が起きており、株単位での特異性を示すことが明らかになった。RNA-PAGE との相関関係は G12P[8] を除いて、

良好であった。

Med Sci. 2013, 75(12): 1651-5

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Fujii Y, Kitaura K, Matsutani T, Shirai K, Suzuki S, Takasaki T, Kumagai K, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, Hamada Y, Kurane I, Suzuki R: Immune-Related Gene Expression Profile in Laboratory Common Marmosets Assessed by an Accurate Quantitative Real-Time PCR Using Selected Reference Genes. PLoS ONE 2013, 8(2): e56296.
- 2) 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.
- 3) 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

##### 1. 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

10) 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、穂刈量太、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

11) 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：マウスノロウイルス感染細胞内のウイルス蛋白質間とそのゲノム RNA との相互作用 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月、神戸

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## ノロウイルス全長ゲノムの進化と流行のメカニズム解析

研究分担者 佐藤裕徳（国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター 室長）

研究協力者 本村和嗣（大阪大学微生物病研究所 日本・タイ 感染症共同研究センター）

### 研究要旨

本研究では、ノロウイルス流行株の遺伝情報を収集し、ゲノムと蛋白質の構造と変化に関わる情報を抽出し、流行株の特徴の理解と制御に役立てることを目的とする。本年度は、国内サーベイランス組織と共同で、2012/13 秋冬季に流行した GII.4 と GII.2 の ORF2-3 全長の塩基配列情報を収集した (N=62)。また、パンデミック株 GII.4\_2006b について、2006-2011 年の間に収集したゲノム全長配列 (N=251) の多様性を解析した。その結果、ゲノム配列は年々多様性が増大する一方で、一般には高度可変とされるカプシド蛋白質は流行の間にほとんど変化しないことを見出した。全国規模で流行するノロウイルスは、その高い適応度を維持するために固有のカプシド構造を変えないと考えられる。この新知見は、ノロウイルスの基礎と対策の双方に重要な意味をもつ。

### A. 研究目的

ノロウイルス (NoV) 感染症の集団発生は公衆衛生や食産業に深刻な被害を与える。NoV対策は社会的に重要な課題で、流行株の発生を早期に検知して備えることが重要となる。しかしNoVには効率的な培養細胞増殖系や動物モデルが無い。このため、実験室レベルでのウイルスのリスク評価が難しい。そこで分離ウイルスを用いずにリスクを評価する必要がある。

ウイルスゲノムには、ウイルス蛋白質の構造と変化に関する情報が格納されている。これらの情報を抽出できれば、リスク評価に役立つ。そこで本研究では、国内の NoV 流行株の全長ゲノム配列情報の収集と解析を進め、流行株の構造と変化に関わる新知見を得ることとした。本年度はパンデミック株の変化に関する新知見を報告する。

### B. 研究方法

#### (1) NoV 全長ゲノム配列収集

NoVの全長ゲノム配列は、地方衛生研究所と国立感染症研究所を主体とする国内サーベイランス組織 (Norovirus Surveillance Group of Japan) と共同で収集した。NoV 感染者糞便中のウイルスRNAのPCR増幅産物は、本村和嗣博士 (日本・タイ 感染症共同研究センター) より提供された。ABI3730 (Applied Biosystems) を用い、direct sequencingにより、NoVゲノム全長の塩基配列を取得した。

#### (2) NoV 全長ゲノム配列解析

2006-2011 年の間に収集したノロウイルスパンデミック株 GII.4\_2006b の全長ゲノム (n=251) を解析した。配列の多様度は、配列の平均遺伝距離、ハミング距離、エントロピーを算出して定量的に評価した。

(倫理面への配慮)  
該当する事項は無い。

## C. 研究結果

### (1) NoV 全長ゲノム配列収集

平成 24 年 4 月～平成 25 年 7 月の間に衛生研究所が収集した糞便試料より、本村博士の助力を得て計 62 株の NoVORF2-3 全長配列の情報を取得した。

### (2) NoV 全長ゲノム配列解析

配列間の平均遺伝距離を指標とした場合、GII.4\_2006b のゲノムの多様性は年々増大した。活発に増殖を続けたことを示唆する。しかし興味深いことに、この間、カプシド蛋白質のアミノ酸配列は高度に保存されていることを見出した。GII.4\_2006b 流行株は、カプシド/VP1 蛋白質は、ウイルスの酵素 (3Cpro、3Dpol、NTPase) と同程度のレベルの均一性を保ちつつ毎年流行を繰り返した。2006 年 5 月の株を基準とした時のハミング距離の増大に強い抑制が生じており、2010/2011 秋冬季シーズンにおいても、カプシドの変異集団は 2006 年 5 月の株と高い相同性をもつ配列の周辺に分布していた。

## D. 考察

NoV のカプシド蛋白質は、NoV の進化や流行の理解、並びにウイルスのリスク評価やワクチン開発において以下の点から重要である。カプシド蛋白質は粒子表面に存在し、①ウイルスの集団免疫感受性を決めることで、流行規模を左右する可能性がある、②ウイルスの感染力や宿主指向性を変え、流行規模を左右する可能性がある、③検査法開発やワクチン抗原開発の主要な標的分子となっている。本研究により、NoV パンデミック株のカプシド蛋白質について、極めて興味深い進化上の特徴 (変化の制約) が明らかになった。この特徴は、NoV の基礎と対策の双方に重要な意味をもつ。

まず第一に、パンデミック株の進化の理解に貢献する。一般に、NoV のカプシド蛋白質は高度可変性とされ、実際に突端の P ドメインは変異を許容しうるループ構造に富む。しかし、本研究により GII.4\_2006b が全国に広がり、長期的に維持される過程において、酵素と同程度に保存されることがわかった。この発見は、全国規模で流行した GII.4\_2006b の適応度が、流行開始時にはほぼ最大に達していたことを示唆する。また、その高い適応度を維持するためにカプシドアミノ酸変化が強く抑制されたと考えられる。

第二に、本知見 (変化の制約) はパンデミック株の流行の動態を理解するのに貢献する。一般に流行株が全国で流行することにより、流行株への集団免疫が強化されると考えられている。GII.4\_2006b 流行株のカプシド蛋白質が流行している間に変化できないと、集団免疫の強化によって流行規模は年々縮小することが予測される。実際に 5 年間の追跡調査の結果から、GII.4\_2006b の流行規模は年々減少していることがわかった。例えば、これまで収集した NoV ゲノムの内訳を調べてみると、GII.4\_2006b 流行株の検出頻度は、2006/2007 秋冬季と 2007/08 秋冬季をピークにその後は年々低下していた。以上から、パンデミック株の流行の動態のシナリオとして、以下が考えられる；流行株のカプシド蛋白質は、高い適応度を維持するためにその構造を大きく変化できない、このため、流行に伴って強化される集団免疫により徐々に淘汰される。

第三に、本知見 (変化の制約) はパンデミック株の検出とワクチン開発など、NoV 対策を適切に進めるための論理基盤を提供する。パンデミック株の流行時のカプシドの変化が強く抑制されるのであれば、流行株の検出法の有効性は、流行の間、保証さ

れることになる。また、流行初期の株を基にワクチンを開発することに、一定の正当性を与える。流行している間は、有効性の持続も期待できる。

以上のように、本研究で得られた知見はNoVの基礎と対策の双方に重要な意味をもつ。一方で、この知見はまだNoVパンデミック株の一つで得られたものに過ぎない。一般性については今後の課題として残されている。特に、カプシドの変化の制約が、他のパンデミック株にも見られるのかは流行の理解と制御に重要なポイントとなる。

変化の制約の一般性の検証については、別のパンデミック株を対象とした研究が必要となる。この点について、2012/13 秋冬季に GII.4\_2006b に代わって全世界的に流行し始めた新たな GII.4 パンデミック株 (GII.4 2012 シドニー株) の解析が重要となる。この亜株の全ゲノム配列を経時的に収集し、解析することで、GII.4\_2006b の進化の特徴が 2006b に固有なのか、それともパンデミック株一般に適用されるのかが判明して行くと期待される。

## E. 結論

引き続き国内のNoV流行株のORF2-3全長配列情報を収集した (N=62)。また、これまでに収集した NoV パンデミック株 GII.4 2006b の全長ゲノム配列 (N=251) を解析した。その結果、高度可変とされるカプシド蛋白質は、実は流行を繰り返してもほとんど変化しないことを見出した。この知見は、流行株の進化と流行のしくみを理解し、NoV の検出、監視、制御を適切に実施する上で重要な基盤情報となる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Sato H, Yokoyama M, Toh H. Genomics and computational science for virus research. *Front*

*Microbiol.* 4:42,2013.

### 2. 学会発表

1) 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.

2) 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.

3) 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.

4) 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.

5) 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.

6) 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.

### 謝辞

糞便試料の収集に、以下の先生にご協力いただきました。厚く御礼申し上げます。

田中智之先生(堺市衛生研究所)、野田衛先生(国立医薬品食品衛生研究所)、吉澄志磨先生(北海道立衛生研究所)、三上稔之先生(青森県環境保健センター)、斉藤博之先生(秋田県健康環境センター)、蛇口哲夫先生、高橋朱実先生、高橋知子先生、佐藤直人先生(岩手県環境保健研究センター)、植木洋先生(宮城県保健環境センター)、田村務先生(新潟県保健環境科学研究所)、滝澤剛則先生、名古屋真弓先生(富山県衛生研究所)、篠原美千代先生(埼玉県衛生研究所)、篠崎邦子先生(千葉県衛生研究所)、吉田徹也先生(長野県環境保全研究所)、小林慎一先生(愛知県衛生研究所)、東方美保先生、小和田和誠先生(福井県衛生環境研究センター)、内野清子先生、三好龍也先生(堺市衛生研究所)、入谷展弘先生(大阪市

立環境科学研究所)、福田伸治先生、重本直樹先生(広島県立総合技術研究所保健環境センター)、伊藤文明先生、阿部勝彦先生、山本美知子先生(広島市衛生研究所生物科学部)、飯塚節子先生(島根県保健環境科学研究所)、近藤玲子先生、山下育孝先生(愛媛県立衛生環境研究所)、船津丸貞幸先生、増本久人先生(佐賀県衛生薬業センター)、原田誠也先生(熊本県保健環境科学研究所)、松岡由美子先生(熊本市環境総合研究所)、岩切章先生(宮崎県衛生環境研究所)

### 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

### 研究成果の刊行に関する一覧表

#### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

#### 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
Sato H, Yokoyama M, Toh H.	Genomics and computational science for virus research.	Frontiers in Microbiology	4	42	2013

研究成果の刊行に関する一覧表 (平成 25 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
Larsson JT, Torpdahl M; MLVA working group ( <u>Izumiya H</u> ), Møller Nielsen E.	Proof-of-concept study for successful inter-laboratory comparison of MLVA results.	Euro Surveill.	18	20566	2013
Nadon CA, Trees E, Ng LK, Møller Nielsen E, Reimer A, Maxwell N, Kubota KA, Gerner-Smidt P; MLVA Harmonization Working Group ( <u>Izumiya H</u> ).	Development and application of MLVA methods as a tool for inter-laboratory surveillance.	Euro Surveill.	18	20565	2013
Osawa K, Shigematsu K, Iguchi A, Shirai H, Imayama T, <u>Seto K</u> , Raharjo D, Fujisawa M, Osawa R, Shirakawa T	Modulation of O-antigen chain length by the <i>wzz</i> gene in <i>Escherichia coli</i> 0157 influences its sensitivities to serum complement.	Microbiol. Immunol.	57	616-623	2013
Harada T, Hirai Y, Itou T, Hayashida M, <u>Seto K</u> , Taguchi M, Kumeda Y	Laboratory investigation of an <i>Escherichia coli</i> 0157:H7 strain possessing a <i>vtx2c</i> gene with an <i>IS1203</i> variant insertion sequence isolated from an asymptomatic food handler in Japan.	Diagn. Microbiol. Infect. Dis.	77	176-178	2013
Harada T, Itoh K, Yamaguchi Y, Hirai Y, Kanki M, Kawatsu K, <u>Seto K</u> , Taguchi M, Kumeda Y.	A foodborne outbreak of Gastrointestinal illness caused by enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> serotype 0169: H41 in Osaka, Japan.	Jpn. J. Infect. Dis.	66	530-533	2013

Kanki M, <u>Seto K</u> , Kumeda Y	Simultaneous immunomagnetic separation method for the detection of <i>Escherichia coli</i> 026, 0111, and 0157 from food samples.	J. Food Protect.	77	15-22	2014
Fujii Y, Kitaura K, Matsutani T, Shirai K, Suzuki S, Takasaki T, Kumagai K, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Kato H, Hamada Y, Kurane I, Suzuki R.	Immune-Related Gene Expression Profile in Laboratory Common Marmosets Assessed by an Accurate Quantitative Real-Time PCR Using Selected Reference Genes.	PLoS ONE	8	e56296	2013
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	8	e66534	2013
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.	75	1651-1655	2013
<u>Sato H</u> , Yokoyama M, Toh H.	Genomics and computational science for virus research.	Front Microbiol.	4	42	2013

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.	66	454-457	2013
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.	158	2059-2068	2013
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.	5	119-125	2013
Suzuki Y, Kobayashi Y.	Evolution of complementary nucleotides in 5' and 3' untranslated regions of influenza A virus genomic segments.	Infect Genet Evol.	13	175-179	2013
Suzuki Y.	Detection of positive selection eliminating effects of structural constraints in hemagglutinin of H3N2 human influenza A virus.	Infect Genet Evol.	16	93-98	2013
川津健太郎, 勢戸和子, 久米田裕子	食中毒細菌の簡易迅速検査法.	微生物の簡易迅速検査法 (株式会社 テクノシステム)		521-530	2013