

厚生労働科学研究費 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業  
アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進と  
共同研究体制の強化に関する研究 (H23 - 新興 指定 020 )

下痢症ウイルスの高感度検出法の確立と分子疫学に関する共同研究

分担研究者 片山 和彦 国立感染症研究所ウイルス第二部  
研究協力者 朴 英斌 国立感染症研究所ウイルス第二部  
研究協力者 戸高 玲子 国立感染症研究所ウイルス第二部

カウンターパート : Taiwan CDC, Ms. Fang-tzy Wu.

研究要旨： 台湾における 2010 年から 2012 年の Norovirus 感染患者便検体約 300 検体より検出された GII.4, GII.2, GII.3 流行株の ORF1 から genome end にかけての塩基配列解析を行い、ノロウイルスサイエンティフィックコミッティーによって提唱された新規 genotyping を行うため、本タイピングに適合した Universal primer RT-PCR システムを構築した。TCDC の有する同一個体から時系列でサンプリングしたノロウイルス陽性検体を用い、ノロウイルスの個体内進化について NGS を用いて研究したところ、0.48nt/0.24aa/day/genome の進化速度（負の淘汰）であり、これまでに報告された速度の約 1/4 の進化速度であることが示唆された。

Abstract:

We established universal primer set and long RT-PCR system to analyze norovirus genotype according to a unified norovirus nomenclature and genotyping. New long distance RT-PCR system with UniKY primer set could detect all of the norovirus genotypes that were included previously reported norovirus positive stool panel. To study norovirus evolution in human body, norovirus positive stool samples that were serially sampled from same patient were analyzed with next generation sequencing system (NGS). Norovirus evolution speed that showed 0.48 nt /day/genome was one fourth slower than previously reported.

A. 研究目的

台湾における 2010 年から 2012 年の台湾に

おける 2010 年から 2012 年の Norovirus 感染患者便検体約 300 検体より検出された GII.4, GII.2, GII.3 流行株の ORF1 から genome end にかけての塩基配列解析を行い、ノロウイルスサイエンティフィックコミッティーによって提唱された新規 genotyping を行うため、本タイピングに適合した Universal primer RT-PCR システムを構築する。また、TCDC の有する同一個体から時系列でサンプリングしたノロウイルス陽性検体を用い、ノロウイルスの個体内進化について NGS を用いて研究する。

## B. 研究方法

### 1. 材料と方法

#### <NoV 陽性検体>

台湾 CDC (TCDC) によって 2010 年から 2011 年にかけて収集された、ウイルス性下痢症患者検体を NoV、SaV のコンベンショナルな RT-PCR (Kojima et al. JVM, 2002. NoV: G1SKF & R, G2SKF & R, SaV Okada et al primer sets) によって検査し、NoV 陽性を呈した糞便検体 169 検体を用いた。

また、埼玉県衛生研究所によって検査された、1990 年から 2000 年にかけて埼玉県近傍で発生した集団食中毒事例の糞便検体 132 検体を新手法の評価用レファレンス NoV 陽性糞便パネルとして用いた。これらの検体は、埼玉県衛生研究所より国立感染症研究所ウイルス第二部第一室が分与を受け、すべての genotype の約 90% をカバーする糞便レファレンスパネルとして管理運用している。

さらに、NoV の個体内進化を調べるため、NoV 感染患者 A - P の 15 名から経時的にサンプリングされた便検体を、次世代シーケンスシステム：NGS (イルミナ MiSeq) による解析に用いた。

#### <コンベンショナル RT-PCR>

NoV の検出には、Kojima et al. JVM, 2002. によって報告された G1SKF & R, G2SKF & R プライマーセットを用いた RT-PCR を行った。

#### <Real-time RT-PCR>

NoV の RNA ゲノム定量には、Kageyama et al. JCM, 2004 によって報告され、現在も世界のゴールドスタンダードとして位置づけられている COG primer set と RING probe を用いた real-time RT-PCR を用いた。本方法で得られた RNA 定量値を基準として、Super rapid RT-PCR, BLEIA を評価した。

#### <Universal primer RT-PCR>

ノロウイルスサイエンティフィックコミッティーによって提唱された新規 genotyping を行うため、本タイピングに必要とする領域を増幅可能な全ての NoV に適合した第 3 世代 Universal primer set をデザインした。HuNoV 全長塩基配列のアライメントを用いて、高度に保存された領域を検索し、ORF1 にコードされたプロテアーゼ切断モチーフ付近に、新規 Universal primer set (Uni3KY primers) を設計した。設計した新規 primer set と、Takara PrimeStar GXL を用いて約 4.5 kb の long distance RT-PCR を実施し、PCR amplicons が得られなかった場合、Uni1KY primers を

用いた nested PCR を実施した。1<sup>st</sup> step RT-PCR amplicon, 2<sup>nd</sup> step amplicon 共に、完全長の polymerase region (RdRp) から Capsid N/S region をカバーし、ORF2(VP1) 全長をカバーする。

#### <塩基配列解析>

NoV の塩基配列解析は、RT-PCR で得られた PCR アンプリコンを鋳型としたダイレクトシーケンスとプライマーウォーキングによって行った。ゲノム量末端の塩基配列解析は、5' RACE および 3' RACE を用いて決定した。

#### <NGS による塩基配列解析>

便検体から抽出した RNA より、NEB 社の NEBnext Ultra キットを用いて、cDNA ライブラリーを調整し、MiSeq に用いた。得られた塩基配列は、CLC 社 Genomics work bench によって De Novo assemble および standard sequence に対する Mapping を行い NoV genome 上の核酸変異、アミノ酸変異を検出した。

#### <分子系統解析>

得られた NoV ゲノムシーケンスは、Clustal W version 1.8 でアライメントし、kimura の 2 パラメーターによって genetic distance を算出した。その後、NJ 法によって分子系統樹を作成し、解析した。

### C. 研究結果・考察

#### 1. 各種 NoV 検出法と Universal primer RT-PCR の比較

TCDC の検体 169 検体の内訳は、GI 単独感染 39 検体、GII 単独感染 123 検体、GI, GII

混合感染 7 検体であった。これを基準に Super rapid RT-PCR の陽性率を検討したところ、GII 単独感染に関しては完全にコンベンショナル RT-PCR, standard real-time RT-PCR と同様であった。第 3 世代 UniKY series primer set を用いた場合も、同等の結果であった。しかし、GI 単独感染検体に対する陽性率は、7/39 (18%) と極めて低かった。陰性を示した検体は、10<sup>4</sup> copies /uL 以下の RNA titer であった。第 3 世代 UniKY series primer set を用いた場合も、同等の結果となり、今回 TCDC より持ち込まれた GI サンプルは、何らかの原因でウイルス粒子が壊れ、ウイルス RNA が分解したか、10<sup>4</sup> copies /uL 以下の RNA titer を示す低濃度の検体であったことが明らかになった。

TCDC の GI 陽性サンプルを除き、他の全てのサンプルにおいて、Super rapid RT-PCR と BLEIA は良い相関関係を示した。BLEIA の定量値である COI は、ELISA における OD value に相当する。Standard real-time RT-PCR と BLEIA の COI の相関関係は 1 に近く、非常に強い相関関係が認められた。加えて、Super rapid RT-PCR で検出可能であった検体は、Universal primer RT-PCR 検出系で 100% 検出可能であった。つまり、Super rapid RT-PCR にて陽性を示した検体は、Universal primer RT-PCR で増幅し、ノロウイルスサイエンティフィックコミッティーによって提唱された新規 genotyping が可能であることが明らかとなった。

NoV 陽性糞便レファレンスパネル検体を用いた比較検討において、Universal

primer RT-PCR は、全ての genotype を検出可能であり、全ての既報の genotype において、提唱された新規 genotyping が可能であった。

5. TCDC より提供を受けた NoV 感染患者の時系列サンプルは、全例が GII.4 感染者であった。これらのサンプルを NGS にかけて、全塩基配列を決定したところ、患者 A, D, F, G, H, I, J, K において 2 ポイントの全塩基配列比較データを得ることに成功した。ゲノム全長に渡る塩基およびアミノ酸残基の時系列変異を比較検討したところ、下表に示した結果が得られた。

Patient	Sample ID	Interval	Nucleotide	Amino acid	dS/dN ratio
A	120,121	5 days	16	8	0.5
D	126,127	13 days	2	1	0.5
F	131,132	8 days	2	1	0.5
G	135,136	8 days	4	2	0.5
H	137,138	8 days	8	4	0.5
I	140,141	3 days	2	1	0.5
J	143,144	8 days	4	2	0.5
K	146,147	6 days	4	2	0.5

患者 A は GII.4 2006b variant と GII.4 2009 variant の混合感染であった。他の患者は GII.4 2006b variant の単独感染であった。患者 A を除外し、遺伝子変位速度を算出したところ、0.48nt/0.24aa/day/genome の変異速度であった。この速度は、これまでに通常の PCR sequence で得られた報告の 1/4 程度の速度であった。同義置換/非同義置換 (dS/dN ratio) を計算すると、A を除く全ての患者で負の淘汰が起きていたことが明らかになった。つまり、患者体内で発生した塩基配

列変化が NoV の生存に不利であったため除外される負の淘汰が繰り返されることにより、NoV が進化していると考えられた。

#### D. 結論

Universal primer RT-PCR システムは、 $10^4$  copies /uL 以下の RNA titer を示す低濃度の検体に対しては、増幅成功率が低かったが、それ以上の RNA titer を示した検体は遺伝子型にかかわらず 100%増幅、塩基配列決定が可能であった。本システムは、ノロウイルスサイエンティフィックコミッティーによって提唱された新規 genotyping が実施できるため、今後の TCDC とのデータ共有のみならず、グローバルな配列データ共有に有用である。

TCDC の有する同一個体から時系列でサンプリングしたノロウイルス陽性検体を用い、ノロウイルスの個体内進化について NGS を用いて研究したところ、

0.48nt/0.24aa/day/genome の進化速度 (負の淘汰) であり、これまでに報告された速度の約 1/4 の進化速度であることが示唆された。ノロウイルスの個体内進化は宿主による強い選択圧に依存することが明らかになった。

#### 健康危険情報

なし

#### F. 論文発表

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  
Virology. 2013 Oct;158(10):2059-68.  
doi: 10.1007/s00705-013-1708-5.  
Epub 2013 Apr 25.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし