

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

研究要旨： ノロウイルス (NoV)、サポウイルス (SaV) は、非細菌性胃腸炎の原因ウイルスである。NoV, SaV には、それぞれ抗原性の異なる 30 種類以上の genotype が存在しており、宿主免疫機構から逃れた genotype が、新たな流行を起こすと考えられている。Genotype の変遷を経時的、地域別に追跡し、分子疫学的解析を行うことは、流行メカニズムを解明する上で重要である。本研究では、台湾 CDC (TCDC) と、両国における 2010 年以降 2012 年度末までの 3 年間で得られた NoV 陽性を呈した臨床検体を用いて、初年度：簡便かつ高精度なウイルス genome 検出法の検討、評価、次年度：実検体の解析、最終年度：Universal RT-PCR system によるノロウイルスサイエンティフィックコミッティー推奨法に適合した genotyping と、NoV の固体内進化の解析を行った。

A. 研究目的

ノロウイルス (NoV)、サポウイルス (SaV) は、非細菌性胃腸炎の原因ウイルスである。NoV, SaV には、それぞれ抗原性の異なる 30 種類以上の genotype が存在しており、宿主免疫機構から逃れた genotype が、毎年新たな流行を繰り返すと考えられている。Genotype の全世界的変遷を経時的、地域別に追跡し、分子疫学的解析を行うことは、両ウイルスの流行メカニズムを解明する上で重要である。本研究では、台湾 CDC と、両

国における 2010 年以降 2012 年度末まで、3 年間、両ウイルスの流行状況、流行株の変遷を経時的に解析し、ウイルス流行のメカニズムを研究することに取り組んだ。また、簡便かつ高精度なウイルス genome 検出法と、分子疫学解析手法の開発も開始した。本研究のカウンターパートは、TCDC: Director, Research & Diagnostic Center Director, National Influenza Center Centers for Disease Control, DOH, Taiwan, Ho-Sheng Wu, Ph.D. (吳 和生), Head, Viral Enteric

& Emerging Disease Lab Research & Diagnostic Center, Fang-Tzy Wu, Ms.(呉 芳姿) の2名である。

具体的には、新規迅速診断システムとして、Super rapid real-time RT-PCR, multiplex RT-PCR, long distance RT-PCRの構築、ELISA, イムノクロマトグラフィー(IC)を用いた抗原検出システムの評価、応用、NoV, SaVのキメラに対応した新規genotyping system構築と評価を行う。疫学調査として、台湾における流行の把握、genotype, 流行の経時的变化を日本と比較検討する。これらの検討を、TCDC職員を長期研修として感染研に受け入れ、技術の共同開発、共同研究を行う。

B. 研究方法

1. 材料と方法

< NoV 陽性検体 >

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。

NoVの固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ータ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。1st step RT-PCR amplicon, 2nd 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

1. Super rapid RT-PCR は、10%糞便乳剤からの RNA 抽出が、試薬添加と 1min

の加熱だけで修了する。これに加え、逆転写反応、PCR まで、試薬を加えることで実施可能であった。従来法では、RNA の抽出操作に約 1 時間半の操作が必要であったが、本法では、試薬準備時間も含め、約 10 分で実施可能であった。

2. レファレンス 132 検体は、すべてコンベンショナルな RT-PCR を施行し、得られた PCR 産物を用いて、塩基配列を決定後、genotyping が明らかにされた NoV 陽性検体である。その内訳は、GI 単独感染 16 検体、GII 単独感染 78 検体、GI, GII の混合感染 37 検体であった。これらの値を基準に、Super rapid RT-PCR の陽性率を検討したところ、GI 単独感染検体に対する陽性率は、14 / 16 (87.5%)、GII 単独感染検体に対する陽性率は、67 / 79 (85.9%)、混合感染検体の陽性率は、32 / 37 (86.5%) であった。検出不能であった検体の genotype に特筆すべき特徴はなかった。
3. 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、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、そのほとんどが 10⁴ copies / uL を示した。GII 単独感染検体に対する陽性率は、93 / 123 (75.6%) であったが、

結果 2 に示したレファレンスパネル試験で示した 85.9% に比較して、約 10% 程度低い値を示した。混合感染検体の陽性率は、0/7 (0%) であった。

4. レファレンス 132 検体は、すべてコンベンショナルな RT-PCR を施行し、得られた PCR 産物を用いて、塩基配列を決定後、genotyping が明らかにされた NoV 陽性検体である。その内訳は、GI 単独感染 18 検体、GII 単独感染 76 検体、GI, GII の混合感染 38 検体であった。これらの値を基準に、Super rapid RT-PCR の陽性率を検討したところ、GI 単独感染検体に対する陽性率は、17/18 (94.4%)、GII 単独感染検体に対する陽性率は、72/76 (94.7%)、混合感染検体の陽性率は、GI 18/38 (47.4%)、GII 37/38 (97.4%) であった。
5. 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。
6. 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、全ての genotype を検出可能で有り、全ての genotype において、その COI は RNA titer と強い相関関係を保っていた。
7. TCDC より持ち込まれた GII.4 の 2011/12 シーズンの流行株 4 株の全塩基配列を決定したところ、TCDC#5, 6 は 2012 年に日本で大規模な流行を示した GII.4 2012 変異株と同じクラスターに属することが明らかになった。しかし、TCDC#8, 9 は互いに 100% 同じ配列を有しており、さらに GII.4 2008 クラスタに属していた。2012/13 シーズンにおいて台湾では GII.4 2012 年変異株と従来の変異株の混合流行が認められた。この傾向は、2012 年変異株が流行の 9 割を占める日本、ヨーロッパ、USA と異なる傾向であり、GII.4 のバリエーションの流行は、日本よりも遅れる傾向にあることが明らかになった。
8. 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。
9. 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 を検出可能で有り、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。
10. 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 に向け、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

従来のコンベンショナルな RT-PCR 法に変わる Super rapid RT-PCR を確立し、簡便かつ高感度に NoV, SaV の分子疫学に用いることのできる検出法を開発、構築した。本検出法の感度は、1990 年代にサンプリングされた GI, GII レファレンス検体を用いた場合、両者ともに 85%以上を示し、十分な感度を有していた。テストあたりに含まれる 10%糞便懸濁液量は、コンベンショナル RT-PCR が 1.7 μ L であるのに対し、Super rapid 法は、1 μ L と、約 40%持ち込む NoV RNA 量が異なると思われる。この条件下で、15%の感度低下にとどまっていたのは、評価に値する。

2010 年から 2011 年に台湾でサンプリングされた検体で比較検討した場合、GI の検出率が極めて低い値を示した。レファレンスには、多種多様な GI genotype が認められるとともに、多様な GI genotype の混合感染も認められた。しかし、2010 年から 2011 年にサンプリングされた台湾 CDC の検体では、GI.1, GI.4, GI.8 などの単一 genotype の感染事例であった。

Super rapid RT-PCR は、抽出操作が簡便で、操作性が高く大規模なスクリーニングには、適していると思われる。しかし、増幅領域がコンベンショナルな RT-PCR とは異なる、COG primer set のターゲット領域 (ORF1-2 ジャンクション領域) であり、genotyping を行うには、陽性検体について、改めてコンベンショナルな RT-PCR を施行し、PCR 増幅産物を得て、塩基配列を決定

する必要がある。また、検出感度においても、改良が必要である。

RNA titer が 10^4 copies/uL と低値を示したことから、Super rapid RT-PCR は、 10^5 copies/uL 以下の検体は検出が困難であると考えられた。しかし、Super rapid RT-PCR は、抽出操作が簡便で、操作性が高く、大規模なスクリーニングを施行し、素早く結果を得るなど、迅速な NoV 流行解析に適していると思われる。

TCDC の GII.4 変異株解析の結果、日本や Europe, USA で観察された GII.4 2012 年変異株の流行は、まだ始まったばかりで有り、従来型 2008 年変異株と勢力を分かち状態である事が明らかになった。台湾での NoV 流行は、日本、Europe, USA, Australia よりも遅れて始まる事が示唆された。

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、 $0.48\text{nt}/0.24\text{aa}/\text{day}/\text{genome}$ 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ホスト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 Virol. 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