

図2.4 PFGEの結果(菌株D)

表6 PFGEの結果(バンド数)

地衛研	菌株			
	A	B	C	D
1	19	20	21	18
2	21	20	22	21
3	19	17	18	19
4	18	17	18	19
5	19	18	19	20
6	22	21	22	21
7	20	20	22	21
8	20	19	20	21
10	19	18	19	19
12	24	23	24	23

要旨

2014 年 10 月市内 A・B 区で細菌性赤痢が散発した。うち A 区にある幼稚園で本菌による集団発生が継続して起こった。分離された菌株は全て D 群赤痢菌(*Shigella sonnei*)であった。PFGE 法による分子疫学的解析の結果、全ての菌株が同一のパターンを示し共通の感染原因が示唆された。また、MLVA 法（国立感染症研究所に依頼）では本分離菌株のパターンは国内では分離されたことのないパターンと判明したが、患者、患者家族および園関係者の中に近々の海外渡航者はおらず、保健所および国立感染症研究所感染症疫学センターFETP チームの疫学調査からも共通の感染原因を確定するには至らなかった。

A はじめに

細菌性赤痢は全国で毎年 200 例程度届出のある 3 類感染症である。その多くが海外渡航者由来のものであるが、国内集団発生事例も数件報告がある。血清型では D 群赤痢菌が細菌性赤痢の中では届出の大半を占め、他の血清型に比べ比較的軽微な症状とされている。

本市では、2014 年 2 件（本論文事例は除く）、2011 年 2 件、2008 年 3 件の届出を受けたが、いずれも散発事例で、集団発生事例は 2001 年韓国産カキによる西日本を中心とした広域集団食中毒事件のみである。

B 研究目的

2014 年 9 月下旬～10 月上旬に B 区小学校児童およびその家族内で細菌性赤痢が発生し 3 人から菌株が分離された。また、10 月初旬に A 区幼稚園園児 2 家族 4 人から細菌性赤痢菌株が分離された。この散発事例は終息することなく、同幼稚園の 10 月 19 日の運動会開催後から同月 25 日にかけて園児および園児家族 9 人が発症し菌株が分離された。また、患者園児

の家族 1 人からも無症状で菌株を分離している。そこで、市内 A・B 区の散発事例および同一幼稚園における集団発生事例の細菌性赤痢の疫学的な関連を究明するために、表現型別分類である血清型および薬剤感受性試験と遺伝子型別分類である病原性遺伝子の保有状況や PFGE 法および MLVA 法（国立感染症研究所に依頼）の検査解析を実施した。

C 研究方法

1. 供試菌株

9 月 27 日から 10 月 25 日に発症した患者、あるいは患者家族の無症状病原体保有者から分離した D 群赤痢菌 17 菌株が保健所から搬入された。菌株の詳細を表 1 に示す。また、有症者 21 名の症状比率は下痢 95%、発熱 71%、腹痛 48%、嘔吐 38%、膿粘血便 19%、頭痛 10%、しぶり便 5%および痙攣 5%であった。

2. 方法

（1）表現型別分類

赤痢菌の血清型は赤痢菌免疫血清「生研」(テノ生研)を用いて生菌試料で使用説明書に従い

凝集試験を実施した。

薬剤感受性試験は、KB ディスク法によるセンシディスク（日本 BD）¹² 薬剤を用い CLSI(Clinical and Laboratory Standards Institute)の抗菌薬ディスク感受性試験実施基準に従い実施した。¹² 薬剤はアンピシリン(ABPC)、テトラサイクリン(TC)、カナマイシン(KM)、ゲンタマイシン(GM)、ストレプトマイシン(SM)、ナリジクス酸(NA)、クロラムフェニコール(CP)、ノルフロキサシン(NFLX)、シプロフロキサシン(CPFX)、セフトキシム(CTX)、ホスホマイシン(FOM)、スロフォメトキサゾール/トリメトプリム(SXT)を用いた。

(2) 遺伝子型別分類

赤痢菌細胞侵入因子である ipaH 遺伝子およびプラスミド性の invE 遺伝子の検出には、タカラバイオの市販プライマーを用いて使用説明書に従い PCR 反応を実施した。

PFGE 法は CDC（米国疾病管理予防センター、U.S.Centers for Disease Control and Prevention）のプロトコールに基づいて実施した。すなわち制限酵素 Xba I 消化後、泳動条件は 6.0V/cm、パルスタイム 2.2–54.2 秒、泳動時間 19 時間、バッファー温度 14°C の条件で実施した。

MLVA 法は 10 月 16 日に最初の届出のあった 3 菌株を国立感染症研究所細菌第一部第二室に送付し、分子疫学的解析を依頼した。

D 研究結果

(1) 表現型別分類

D 群 I 相の単一血清型は 12 菌株、II 相の単一血清型は 2 菌株、I・II 相混合血清型は 3 菌株認めた。散発および集団発生の違いによる相の違いは認めなかった。

薬剤耐性型は、1 菌株が SM の 1 薬剤耐性型であった。残り 16 菌株は全て SM・TC・SXT

の 3 薬剤耐性型であった。1 薬剤耐性型の 1 菌株は患者園児由来であり、他の患者との症状の違いは認めなかった。

(2) 遺伝子型別分類

赤痢菌の病原性遺伝子保有状況を PCR 法で分類したところ、ipaH 遺伝子および invE 遺伝子ともに保有する株が 15 株あった。残り 2 株はともにプラスミド性の invE 遺伝子を保有せず、ipaH 遺伝子のみを保有していた。

PFGE 法による分子疫学的解析の結果は、B 区在住の小学校児童および同家族由来菌株 3 菌株と A 区幼稚園集団発生事例由来菌株 14 菌株中 13 菌株の泳動パターンが全て一致した。また、残り 1 菌株（A 区幼稚園園児患者由来）も 1 バンドだけ異なる類似性の高い泳動パターンであった。

MLVA 法による解析では 3 菌株ともパターンが一致した。また、この MLVA パターンは国立感染症研究所が 2009 年より国内で分離収集した他の赤痢菌株とは一致しなかった。

E 考察

分子疫学的解析での PFGE の泳動パターンは通常、一致する場合は「区別できない」、2～3 バンド異なる場合は、「極めて関連性が高い」と解釈される。A・B 区にまたがって発生した細菌性赤痢菌株の関連性は極めて高く共通の感染原因があると推測できた。また、D 群赤痢菌は相変異を起こしやすく、I 相から II 相に変異した過程で病原性が脱落すると考えられている。今回、2 菌株が赤痢菌細胞侵入因子であるプラスミド性の invE 遺伝子が陰性であったが、この 2 菌株は本因子が相変異と同様に脱落したものと推測された。

薬剤感受性試験については、17 菌株中 16 菌株が 3 薬剤（SM・TC・SXT）耐性の同一パターンを示した。この 3 薬剤耐性の頻度は近年の分離株では非常に高く、分離菌株の 80% 程度

が同薬剤に耐性という報告もある。また、1人の園児より分離した1菌株は1薬剤(SM)耐性であり、他の菌株の耐性パターンと異なった。これはこの菌株だけが感染原因の由来が異なっていたためなのか、あるいは耐性遺伝子の脱落がこの菌株にのみ起こったためなのか不明であった。

今回散発および集団発生した細菌性赤痢事例は、積極的な疫学調査が行われたが、感染原因の解明には至らなかった。D群赤痢菌は無症状で病原体を保有することも多く、二次汚染防止のため積極的な消毒を行うことが感染拡大防止につながる。しかし、幼稚園など高リスクグループにおいては、迅速な消毒等の衛生対策が措置されない場合には重篤な感染拡大が危惧される。今後迅速な疫学対策を推進する上でさらに当研究所においてもより一層の協働に努めたい。

謝辞

最後に、疫学調査およびMLVA解析を実施していただきました国立感染症研究所感染症疫学センターFETP チームならびに細菌第一部第二室の皆様に感謝申し上げます。

表1 細菌性赤痢患者および保菌者一覧表

区	家族略号	年齢	内訳	発病日	10/19運動会参加	園児クラス	菌分離
A	1-1	32	園児家族	10月8日		A	○
	1-2	4	園児	なし		A	○
	1-3	1	園児家族	10/初		A	○
	1-4	42	園児家族	10月8日		A	—
	2-1	6	園児	10月9日		T	○
	2-2	—	園児家族	10月5日		T	—
	2-3	31	園児家族	10月14日		T	—
	2-4	27	園児家族	10月15日		T	—
	2-5	—	園児家族	10月12日		T	—
	3	4	園児	10月19日	○	P	○
	4	4	園児	10月23日		P	○
	5-1	5	園児	10月23日	○	P	○
	5-2	2	園児家族	10月25日		P	—
	6	5	園児	10月23日	○	P	○
	7	5	園児	10月24日		P	○
	8-1	5	園児	10月24日		P	○
	8-2	39	園児家族	なし		P	○
	9	34	園児家族	10月24日	○	P	○
	10-1	5	園児	10月25日	○	T	○
	10-2	43	園児家族	10月25日	○	T	○
B	11-1	7	学童	10月10日			○
	11-2	5	学童家族	9月27日			○
	11-3	40	学童家族	10月4日			○

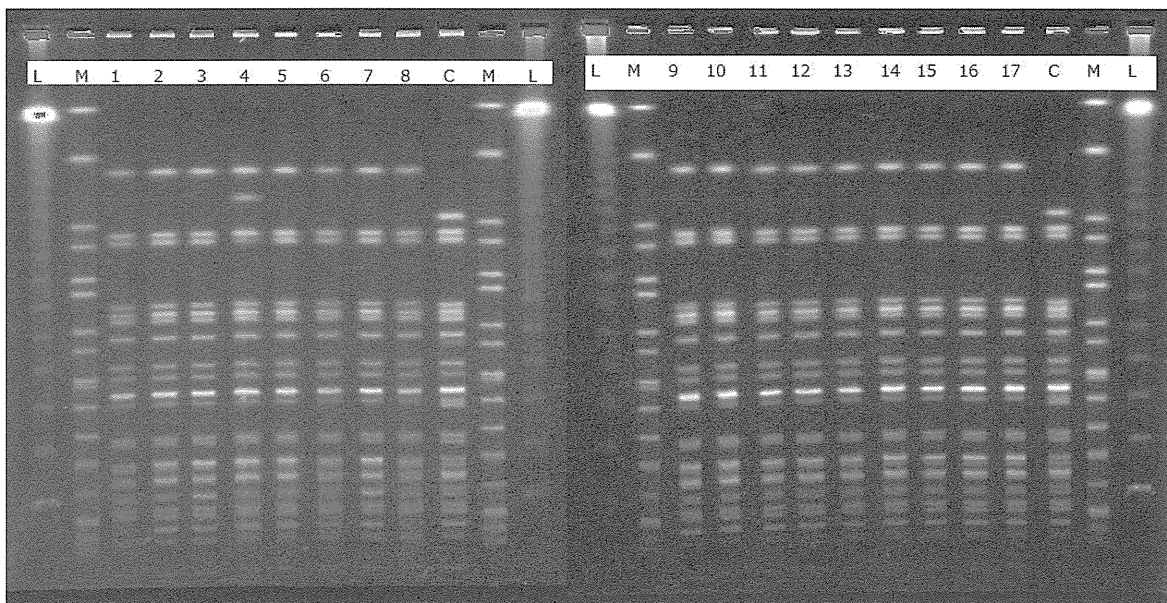


図1 赤痢菌の PFGE 写真 (下表 レーン番号および表1 家族略号)

1	1-1	7	11-3	13	8-1	L	λラガー
2	2-1	8	3	14	9	M	<i>Sal Braenderup</i> H9812
3	11-1	9	4	15	10-1	C	2008年市内分離株 (<i>S sonnei</i>)
4	1-2	10	5-1	16	10-2		
5	1-3	11	6	17	8-2		
6	11-2	12	7				

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）
（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
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 26 年度 分担研究報告書

非典型的な生化学的性状を示す腸管出血性大腸菌 O111 の集団感染事例

沖縄県衛生環境研究所 衛生科学班

高良武俊、岡野祥、新垣絵理、久高潤

沖縄県八重山保健所 健康推進班

池田勉、宮城雄一、大屋記子

要旨

2014 年 8 月、八重山保健所管内の A 保育園において 1 名の腸管出血性大腸菌（EHEC）O111（VT1）患者が発生した。管轄保健所による保育園の園児、職員及び陽性者の家族を対象にした接触者調査の結果、31 名中 4 名から O111 が分離された。本事例において分離された 5 株についてパルスフィールド電気泳動法（PFGE）による分子疫学解析を行ったところ、同一のバンドパターンであった。また、生化学的性状試験を行ったところ CLIG において MUG 陰性、LIM においてリジンデカルボキシラーゼ陰性、インドール陰性、運動性陰性という非典型的な生化学的性状を示した。病原因子遺伝子検査を行ったところ VT1 及び *eae* 陽性であった。以上の結果から、本事例は同一保育園における非典型的な生化学的性状を示す O111 集団感染事例であることが明らかとなった。

A. 事例の概要

2014 年 8 月 11 日、八重山保健所管内の B 医療機関より O111（VT1）患者（1 歳女児）の感染症発生届出が保健所にあった。同保健所により接触者調査として届出患者の家族 3 名、同患者が通園する A 保育園の 1 歳児クラスの園児 17 名及び職員 4 名の計 24 名の検便検査を実施した

結果、園児 4 名から O111 が分離された。なお、陽性者の家族 7 名の検便検査も実施されたが全員陰性であった。当所では初発患者株及び接触者調査で分離された 4 株について、生化学的性状試験、ベロ毒素を含む各種病原因子遺伝子検査、PFGE による分子疫学解析を実施した。同年 9 月 2 日、便検査において O111 感

染者全員の連続 2 回の陰性が確認され、本事例は終息した。

B. 検査方法

1) 生化学的性状試験

分離株を DHL、マッコンキー寒天培地、CT-SMAC、CT-RMAC、CT-SBMAC、クロモアガーSTEC に塗抹し、37°C で 18 時間培養しコロニー性状を確認した。CLIG、TSI、LIM、シモンズクエン酸寒天培地に塗抹し、37°C で 18 時間培養し鑑別性状試験を行った。また、API20E、API50CH を用いて同定結果の確認を行った。

2) 血清型別試験

O 群別試験、H 型別試験は病原大腸菌免疫血清「生研」を用いて行った。また、病原体検出マニュアル「腸管出血性大腸菌 (EHEC) 検査・診断マニュアル」¹⁾ に示された O111 の O 抗原合成遺伝子のプライマー配列²⁾に従って検出を行った。

3) 病原因子遺伝子検査

下痢原性大腸菌の病原因子である VT1、VT2、LT、ST、*ipaH*、*eae*、*aggR*、*astA*、*afa* について PCR 法を行った。

4) PFGE による分子疫学解析

被検菌及び *Salmonella* Braenderup H9812 を血液寒天培地に塗抹し、37°C で 17 時間培養した。九州ブロックマニュアル³⁾を参照して検体の調整を行った。CHEF DR-III を用いて電圧 6 V/cm、Initial Switch time 6.8 s、Final Switch time 35.4 s、Included Angle 120°、18.1 時間の条件で泳動した。

C. 研究結果

分離株 5 株すべて DHL、マッコンキー寒天培地、CT-SMAC、CT-RMAC、CT-SBMAC、クロモアガーSTEC 平板培地上で典型的な O111 のコロニー性状を示した。CLIG、TSI、LIM、シモンズクエン酸寒天培地においても同一の生化学的性状を示したが、一般的な大腸菌と異なり CLIG において MUG 陰性、LIM においてリジンデカルボキシラーゼ陰性、インドール陰性、運動性陰性という非典型的な生化学的性状を示した。API20E では *Citrobacter freundii* (%ID 82.7、T 0.84、非典型反応 CIT 75%、H₂S 75%)、API50CH では *Escherichia coli* 1 (%ID 99.6、T 0.78、非典型反応 IND 93%) と判定された。

O 群別試験では分離株 5 株とも O111 と確認され、O111 の O 抗原合成遺伝子も検出された。また、H 型別試験は運動性陰性であった。

病原因子遺伝子検査では分離株 5 株とも下痢原性病原因子は VT1 及び *eae* が検出された。

PFGE による分子疫学解析の結果、分離株 5 株とも同一パターンを示した (図 1)。Tenover らの判断基準⁴⁾から本事例は、症例間に疫学的な関連があり、かつ PFGE 型が同一であるため、同一の集団感染事例と判断された。

D. 結論

本事例は、保健所での検便検査において、O 群別試験では O111 と確認されたものの、LIM においてリジンデカルボキシラーゼ陰性、インドール陰性、運動性陰性を示し、典型的な O111 の性状に合

致しないという報告を受けた分離株が搬入された。当所では、LIMにおいてリジンデカルボキシラーゼ陰性、運動性陰性の大腸菌株の分離事例はあるが、インドール陰性は初めてであったため各種追加試験を行い、確認を行った。その結果、非典型的な *E. coli* inactive O111 と判断した。Manual of clinical Microbiology⁵⁾によると *E. coli* のインドール産生能は *E. coli* は 98%陽性であるが、*E. coli* inactive は 80%陽性である。今後 LIMにおいて、リジンデカルボキシラーゼ陰性、インドール陰性、運動性陰性の大腸菌も視野に入れて分離を進める必要があると考えられる。

本事例は、感染源は不明であるが、PFGE による分子疫学解析の結果も含めて非典型的な生化学的性状を示す O111 による集団感染事例であることが明らかとなった。

E. 参考文献

- 1) 国立感染症研究所:病原体検出マニュアル「腸管出血性大腸菌 (EHEC) 検査・診断マニュアル」
 - 2) Paton AW *et al.*: Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. J Clin Microbiol 36: 598-602, 1998.
 - 3) 堀川和美 他 (2003): 食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究 平成 15 年度総括・分担研究報告書,154-163.
 - 4) Tenover FC *et al.*: Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulse-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 33: 2233-2239, 1995.
 - 5) Patrick R. Murray *et al.*: Manual of Clinical Microbiology 9th Edition
- 1) 国立感染症研究所:病原体検出マニュアル「腸管出血性大腸菌 (EHEC) 検

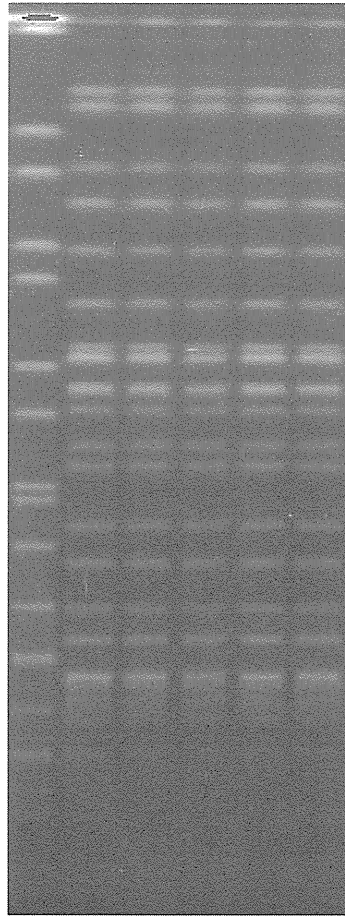


図1 分離株 O111 の PFGE 泳動像 (XbaI 消化)

レーン 1: マーカー (*Salmonella* Braenderup H9812) レーン 2: 園児 A (初発患者)
レーン 3: 園児 B レーン 4: 園児 C レーン 5: 園児 D レーン 6: 園児 E

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 26 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てきた。CaliciWeb の活動により、NoV の病原性変化を加味するため、従来の構造タンパク質領域だけではなく、非構造タンパク質領域をもターゲットとした NoV の新規分類方法が提案された。本研究で構築を試みる 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。さらに、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、ロタウイルス、ノロウイルスの次世代シーケンサーを用いた配列解析プラットフォームの構築も目指した。

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化生物学的に解析し、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。今年度は、次世代シーケンサーを用いた配列解析プラットフォームの構築を目指した。

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、構造化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ッ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。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たところ全ての RdRp はクロズドフォーム（核酸などを抱き込んでいない）であることが明らかとなった。RdRp の構造の類似性は極めて高く、微細な構造の違いが RNA 合成効率に影響するか否かは、インビトロで二重鎖 RNA の合成活性を調べるなど、生化学的検討を行って比較する必要があると思われた。

結晶構造解析に用いた RdRp は、ヒトノロウイルスのゲノム 5' 末端にタイプを超えて保存されている RNA モチーフ：GUGAAUGAAGAUG のコンプリメンタリー鎖 CAUCUUCAUUCAC に反応し、プライマー無し

で de novo RNA 合成をスタートする特性があることが判明した。現在、CAUCUUCAUUCAC との共結晶化、GUGAAUGAAGAUG との共結晶化、この部分の完全二重鎖との共結晶化を進め、RNA を抱き込んだオープンフォームの RdRp の結晶の作製を試みている。

昨年度は、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 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たため、10 Å を若干下回る程度の解像度しか得られなかった。今年度は、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た結果、U201 株と同様の結晶構造を解くことができた。しかし、その構造は驚くほど U201 や既報のヒトノロウイルス、マウスノロウイルスの RdRp を類似性が高かった。さらに、ヒトノロウイルスのゲノム 5' 末端にタイプを超えて保存されている RNA モチーフを認識可能である事が明らかになった。

以上から、ヒトノロウイルスのリバースジェネティッ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った。ウイルス増殖効率を左右する微細な構造変異の部位、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成果が得られた。

昨年度より試みた、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は失敗した。現在、VP2 は eIF4E, G との共結晶化、VPg は VP1 との共結晶化を試みている。

・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。

今年度 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した。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[®] 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。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は、相対移動度だけではなく、画像と electrophoregram (泳動波形とピーク位置が示されたグラフ) の蓄積を行った。すべての検体について、次世代シーケンス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パターンライブラリーに蓄積した。

MultiNA による相対移動度は、時にアッセ

イ間差が株間差を上回る場合が有り、RV 株の中には相対移動度で分別できない株を経験した。そこで、画像と electrophoregram (泳動波形とピーク位置が示されたグラフ) の蓄積データを基盤として、上部、中部、下部の electrophoregram を互いにフィッティングさせることで、その相関係数を算出した。electrophoregram を互いにフィッティングを行い、相関係数を指標にすることで、株分けが可能であると思われた。コンピュータ上での計算速度は極めて速く、本方法により、地理的に離れたラボ間でのデータ比較が容易になり、今後展開されるであろうロタウイルスの流行株把握に対して極めて有用なツールとなり得る。現在、この方法に基づく自動判定プログラムのスクリプト開発を行っている。

・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。本年度、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 法ならびに次世代シーケンスを用いて決定したところ、データベース上に報告

されているように5'側、3'側ともに高度に保存された配列モチーフが存在していた。

・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収載し、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

いていた。今年度の対応により、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た。

・健康危険情報

なし

D. 研究発表

1. 論文発表

(英文)

- (1) Fujii Y, Nakagomi T, Nishimura N, Noguchi A, Miura S, Ito H, Doan Y.H, Takahashi T, Ozaki T, Katayama K, Nakagomi O. Spread and predominance in Japan of novel G1P[8] double-reassortant rotavirus strains possessing a DS-1-like genotype constellation typical of G2P[4] strains. *Infect Genet Evol.* Vol. 28:426-33. doi: 10.1016/j.meegid.2014.08.001. Epub Aug 8, 2014.
- (2) Mizukoshi F, Kuroda M, Tsukagoshi H, Sekizuka T, Funatogawa K, Morita Y, Noda M, Katayama K, Kimura H. A food-borne outbreak of gastroenteritis due to genotype G1P[8] rotavirus among adolescents in Japan. *Microbiol Immunol.* doi:

- 10.1111/1348-0421.12176. 58(9): 536-9. Sep, 2014.
- (3) Nagai M, Aoki H, Sakoda Y, Kozasa T, Tominaga-Teshima K, Mine J, Abe Y, Tamura T, Kobayashi T, Nishine K, Tateishi K, Suzuki Y, Fukuhara M, Ohmori K, Todaka R, Katayama K, Mizutani T, Nakamura S, Kida H, Shirai J. Molecular, biological, and antigenic characterization of a Border disease virus isolated from a pig during classical swine fever surveillance in Japan. *J Vet Diagn Invest.* 26(4): 547-552. [Epub ahead of print] Jul 15, 2014.
- (4) Dennis FE, Fujii Y, Haga K, Damanka S, Lartey B, Agbemabiese CA, Ohta N, Armah GE, Katayama K. Identification of novel Ghanaian G8P[6] human-bovine reassortant rotavirus strain by next generation sequencing. *PLoS One.* 2014 Jun 27; 9 (6):e100699. doi: 10.1371/journal.pone.0100699. eCollection 2014.
- (5) Masuda T, Nagai M, Yamasato H, Tsuchiaka S, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Nishiura N, Sassa Y, Omatsu T, Furuya T, Koyama S, Shirai J, Taniguchi K, Fujii Y, Todaka R, Katayama K, Mizutani T. Identification of novel bovine group A rotavirus G15P[14] strain from epizootic diarrhea of adult cows by de novo sequencing using a next-generation sequencer. *Vet Microbiol.* 2014 Jun 25; 171(1-2):66-73. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.03.009. Epub. Mar 18, 2014.
- (6) Katayama K, Murakami K, Sharp TM, Guix S, Oka T, Takai-Todaka R, Nakanishi A, Crawford SE, Atmar RL, Estes MK. Plasmid-based human norovirus reverse genetics system produces reporter-tagged progeny virus containing infectious genomic RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 23 ; 111 (38) ; E4043-52, Epub Sep 5, 2014 .
- (7) Komoto S, Pongsuwanna Y, Ide T, Wakuda M, Guntapong R, Dennis FE, Haga K, Fujii Y, Katayama K, Taniguti K. Whole genomic analysis of porcine G10P[5] rotavirus strain P343 provides evidence for bovine-to-porcine interspecies

transmission. Veterinary
Microbiology 174, 577-583, 2014.

(邦文)

- (1) 片山和彦 ロタウイルス概要
IASR ロタウイルス特集号 vol. 35
No. 3 Mar. 2014.
- (2) 片山和彦 ノーウォークウイ
ルス(ノロウイルス)の遺伝子型2014
年版 IASR ノロウイルス特集号
vol. 35 No. 7 July 2014.
- (3) 片山和彦 ノロウイルス感染
症とその対策 救命救急 vol. 17
No. 1 12-15, 2014.
- (4) 片山和彦 質疑応答臨床一般
夏場にノロウイルスによる胃腸炎や
食中毒が発生する可能性 日本医事
新報 No. 4723, 59-60, 2014.
- (5) 片山和彦 特集 ノロウイル
ス感染症 ノロウイルスとは 調剤
と情報 vol. 20 No. 12, 10-12, 2014
- (6) 片山和彦 特集 ノロウイル
ス感染症 ノロウイルスの感染拡大
を防ぐには 調剤と情報 vol. 20
No. 12, 14-19, 2014
- (7) 片山和彦 備えて立ち向かう
感染性胃腸炎 ノロウイルス・ロタ
ウイルス ノロウイルス感染症とは
-ウイルスの特徴・流行変遷・臨床病
態 感染症対策ICTジャーナル
vol. 9 No. 4 2014.

- (8) 片山和彦 少年写真新聞社
中学保健ニュース ノロウイルスの
感染予防 Dec. 18, 2014.
- (9) 片山和彦 少年写真新聞社
高校保健ニュース ノロウイルスの
感染予防 Dec. 18, 2014.
- (10) 片山和彦 ウイルス性胃腸炎
SRL社 宝函 vol. 35,
No. 4, p23-34, 2015.
- (11) 片山和彦 Luncheon Seminar
Report No. 1 ノロウイルス -感染
制御を目指した研究の歩みと最新の
成果- デンカ生研, p1-4, リーフレ
ット、2015/02/24
- (12) 片山和彦 ヒトに感染するノ
ロウイルスの感染様式の研究 黎明
vol23, pi-ii, 2014.

2. 学会発表

(国際学会)

- (1) Katayama K, Park YB,
Takai-Todaka R, Haga K.
Investigation of Human Norovirus
evolution in human body.
Japan-Taiwan joint meeting.
Taipei, Taiwan. Sep 11, 2014.
- (2) Katayama K and Park YB. A
plasmid based human norovirus
reverse genetics system.
International meeting of the
federation of Korean
microbiological societies (MSK)
symposium Oct 29-31, 2014.

- (3) Miki M, Park YB, Haga K, Doan HY, Suzuki Y and Katayama K., Investigation of human norovirus shedding and genome evolution in a single infection cycle in infant. 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases. Taipei Taiwan., Jan 29, 2015.
- (4) Yoshida K., Zhou Y., Takai-Todaka R, Katayama K and Nakanishi A. Functional complementation of VP2 in murine norovirus. 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases. Taipei Taiwan., Jan 29, 2015.
- (5) Katayama K. Takai-Todaka R, Nakanishi A, Murakami K, Oka t. Guix S, Sharp TM., Atmer RL., Crawford SE and Estes MK. Reverse genetics system of Human and Murine Norovirus. 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases. Taipei Taiwan., Jan 29, 2015.

(国内)

- (1) 片山和彦 衛生微生物技術協議会 ノロウイルスレファレンスセンター報告 平成 26 年 6 月 26-27 日 船堀

- (2) 戸高玲子、村上耕介、岡智一郎、朴英斌、中西章、脇田隆字、片山和彦 レポーター遺伝子を内包したノロウイルス感染性粒子作製の試み 第62回日本ウイルス学会学術集会 平成26年11月11日
- (3) 下池貴志、朴英斌、戸高玲子、脇田隆字、片山和彦 ノロウイルス RNA 依存的 RNA ポリメラーゼの in vitro 転写活性 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 平成 26 年 11 月 11 日

3. その他

(講演会・シンポジウムなど)

- (1) 片山和彦 平成 26 年 6 月 13 日 戸山学習館研修 ノロウイルスなんてこわくない! 感染研 戸山庁舎
- (2) 片山和彦、藤井克樹 平成 26 年 6 月 19 日 ロタウイルス感染症とロタウイルスワクチン 講義対象：横浜市立大学医学部社会予防医学教室 感染研村山庁舎
- (3) 片山和彦 平成 26 年 6 月 24 日 ノロウイルスなんて怖くない 知の広場・シラバス 感染研戸山庁舎
- (4) 片山和彦 平成 26 年 6 月 26 日 衛生微生物技術協議会 第 35 回研究会 ノロウイルス・ロタウイルス レファレンスセンター会議、報告

- (5) 片山和彦 平成 26 年 7 月 12 日 日本ウイルス学会北海道支部 第 48 回夏季シンポジウム “ウイルス研究の基礎から応用への橋渡し” (北海道上川郡美瑛町白金温泉 国立大説青少年交流の家) 特別講演 ノロウイルス研究のトピックス
- (6) 片山和彦 平成 26 年 7 月 28 日 メディア意見交換会 “知っているようで知らないノロウイルス” 感染研戸山庁舎
- (7) 片山和彦 平成 26 年 8 月 23 日 ノロウイルス感染症の高齢者施設における実態と対策 ノロウイルスの最近の流行状況 第 6 回 J 感染制御ネットワークフォーラム 教育セミナー10 宮城県仙台市
- (8) 片山和彦 平成 26 年 8 月 1 日 第 39 回食品衛生懇話会 “食品安全行政の現状と最近の諸問題について・ノロウイルスの最近の知見について” 日本食品衛生協会 渋谷区神宮前
- (9) 片山和彦 平成 26 年 8 月 18 日 愛知県感染症予防指導者セミナー ノロウイルスの最近の知見について 愛知県名古屋市
- (10) 片山和彦 平成 26 年 9 月 8 日 小金井市医師会講演会 “知っているようで知らないノロウイルス” 東京都小金井市
- (11) 片山和彦 平成 26 年 10 月 4 日 感染研公開 クイズ・これであなともノロ博士 感染研戸山庁舎
- (12) 片山和彦 平成 26 年 10 月 19 日 小児感染症学会 ランチョンセミナー ノロウイルスの最近の知見 東京都京王プラザホテル
- (13) 片山和彦 平成 26 年 10 月 21 日 ノロウイルス 郡山市保健課・日本食品衛生協会 福島県郡山市
- (14) 片山和彦 平成 26 年 10 月 22 日 医師卒後研修会 下痢症ウイルスについて 感染研戸山庁舎
- (15) 片山和彦・染谷雄一 IPV 検定について WHO 研修 マレーシア 研修生受け入れ、講義 感染研村山庁舎
- (16) 片山和彦 平成 26 年 11 月 25 日 第 15 回北多摩北部感染対策研究会 ノロウイルス感染症 国立療養所東京病院講義室
- (17) 片山和彦 平成 26 年 11 月 9 日 ウイルス学会サテライトセミナー 横浜市民講座 “ノロウイルス” 日本ウイルス学会・神奈川県横浜市
- (18) 片山和彦 平成 26 年 11 月 15 日 “知っているようで知らないノロウイルス” 健康公開講座 NHK 横浜放送局共催横浜市民講座・神奈川県横浜市
- (19) 片山和彦 平成 26 年 11 月 27

- 日 特定非営利活動法人食の安全
を確保するための微生物検査協議
会 知っているようで知らないノ
ロウイルス 日本橋
- (20) 片山和彦 平成 27 年 2 月 7 日
第 11 回日本小児消化管感染症研究
会 教育講演 大阪大学中之島セン
ター・大阪市

(新聞) 指導、監修

- (1) 北海新聞 ノロウイルス 相
次ぐ胃腸炎の集団発生 2014年1
月28日
- (2) 西日本新聞 ノロ感染源あな
たかも 2014年1月28日 夕刊
- (3) 新潟新聞 ノロ誰でも感染源
に 2014年1月27日
- (4) 秋田さきがけ 誰もが感染源
に ノロウイルス相次ぐ集団発生
2014年1月30日
- (5) 岐阜新聞 あなたもノロ感染
源? 2014年2月3日
- (6) 京都新聞 ヒトからヒトへノ
ロウイルス 2014年2月4日
- (7) 山梨新聞 ノロウイルス感染
防げ 2014年2月3日
- (8) 四国新聞 ノロウイルス意識
変えて 2014年1月31日
- (9) 千葉日報 あなたも感染源
に? 2014年2月7日
- (10) 毎日新聞 封じ込め難しいノ
ロ 2014年3月15日

- (11) 少年写真新聞 中学保健ニュ
ース ノロウイルスの感染経路を
知ろう 2014年12月18日

- (12) 少年写真新聞 高校保健ニュ
ース ノロウイルスの感染経路を
知ろう 2014年12月18日

(その他)

- (1) ロタウイルス検出マニュアル

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし