

ノロウイルス集団食中毒事例におけるウイルス亜集団の包括的遺伝系統解析

担当責任者 氏名:本村 和嗣 所属:大阪大学微生物病研究所 日本—タイ新興再興感染症共同
研究センター 役職:特任准教授(常勤)

研究要旨

ノロウイルスは、河川や水中生物などの自然環境、汚染食材などの生活環境中に、多様な遺伝子型が混在している。我々は、ヒト集団における優位なノロウイルスの特徴を抽出するため、集団食中毒が発生した4集団を対象にした。次世代シーケンサーを用いて、ノロウイルス配列を包括的に収集し、遺伝子型および亜株の比較を行った。本解析で優位に検出されたGII.4 2006b亜株は、どの集団でもウイルスコピー数が高く、複製能・増殖能に優れたウイルスである可能性が示唆された。これらの解析をもとに流行発生のしくみを検討し、流行株の検出、サーベイランス、リスク評価、創薬やワクチン開発等に幅広く役立つ重要な科学基盤を提供したい。

A. 研究目的

ノロウイルスは、河川や水中生物などの自然環境、汚染食材などの生活環境中に、多様な遺伝子型が混在している。飯塚らは、第60回本学会にて、2012年3月に発生した集団食中毒事例の原因汚染食材よりパンソルピントラップ法を用い、原因微生物として、ノロウイルスGII.2とGII.4を検出したと報告した。本研究では、本集団食中毒発生事例のノロウイルス感染者体内におけるウイルス亜集団の実態を明らかにすることを目的とする。次世代シーケンサーを用いて、ノロウイルスカプシド遺伝子シェル領域(330bps, 24検体)の配列情報を収集し、感染者体内に存在する亜株、遺伝子型の種類と頻度を解析した。

ヒト集団におけるノロウイルス感染伝播、拡大の解明となる基盤情報が得られる。

個体内における遺伝子型や亜株の種類、分布、動態を明らかにする。これらの解析をもとに流行発生のしくみを検討し、流行株の検出、サーベイランス、リスク評価、創薬やワクチン開発等に幅広く役立つ重

要な科学基盤を提供すると考えている。

B. 研究方法

2012年3月に島根県で発生した集団食中毒事例を対象に解析した。原因施設調理従事者(n=7)から、汚染食材を介して、原因施設弁当喫食者(n=9)、関連他施設A料理喫食者(n=3)、関連他施設B料理喫食者(n=6)と感染拡大した集団食中毒事例を対象とした。糞便試料を出発材料とし、糞便にPBSを加え10%懸濁液を作成し、11000×g、20分間遠心の後、その上清をRNA抽出液とした。このRNA抽出液より、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を使って、ノロウイルスRNAを抽出した後、G2SKR (Katayama K et. al; Virology. 2002 Aug 1;299(2):225-239.)を用いてcDNAを合成した。cDNAをtemplateにして、カプシド遺伝子シェル領域をPCRで増幅した。ION TORRENT (Life technologies)を用いて、遺伝子増幅産物の配列情報を取得した。配列集団の系統関係の解析は最尤法により解析した。in-houseの配列解析プログラムで亜株、遺伝子型の頻度を調べ比

較した。

(倫理面からの配慮について)

ヒト由来臨床材料を使う研究は、関連機関の倫理審査会の承認を得て、提供者本人に十分な説明を行い、承諾を得た上で行った。

C. 研究結果

(i) カプシド遺伝子シエル領域の配列情報 (1503418 配列: 約 5.0×10^8 塩基 / 25 検体) を取得した。(ii) シエル領域の遺伝系統が異なるウイルス亜集団の重感染は、25 検体中 23 検体で検出された。(iii) 食中毒事例では原因施設調理従事者群 ($n=7$) は 7 種、原因施設弁当喫食者群 ($n=9$) は 7 種、関連他施設 A 料理喫食者群 ($n=3$) は 4 種、関連他施設 B 料理喫食者群 ($n=6$) は 5 種の、異なる遺伝子型と亜株が検出された。(iv) 2012 年秋冬期に大流行した GII.4 2012 Sydney は、個体内に微小集団 (0.1 - 22.0 %) として、13 例で検出された。(v) 2006b は、調理従事員発症者群で 7 名中 6 名検出され、平均ウイルスコピー数は 4.2×10^9 copies/g であった。弁当喫食者で 9 名中 9 名検出され、平均ウイルスコピー数は 6.4×10^9 copies/g であった。関連他施設 A 料理喫食者群は、3 名中 3 名検出され、平均ウイルスコピー数は 4.4×10^9 copies/g であった。関連他施設 B 料理喫食者群は、6 名中 6 名検出され、平均ウイルスコピー数は 1.8×10^9 copies/g であった。

D. 考案

集団食中毒事例では、シエル領域の遺伝系統が異なるウイルス亜集団の重感染が多いことがわかった (23/25 例)。2006b 亜株は、原因施設調理従事者群 ($n=7$) 種、原因施設弁当喫食者群 ($n=9$)、関連他施設 A 料理喫食者群 ($n=3$)、関連他施設 B 料理喫食者群 ($n=6$)、以上、4 群で、平均ウイルスコピー数が、 10^9 copies/g で極めて高かった。このことにより、集団内で、ウイルス粒子の安定性、複製能、集団免疫からの逃避能に優れたものが選択され、感染伝播の際に、遺伝的に多様な集団から一部のウイ

ルス亜集団が抽出されるボトルネックが生じている可能性が示唆された。2012-2013 秋冬期に日本国内で流行した GII.4 2012 Sydney が、ヒト個体内で、微小集団として、2012 年 3 月に存在していることが判明した。今後、先端技術を用いたゲノム情報収集および情報科学的手法による解析は、ノロウイルスの流行監視、および、流行予測の基盤情報となることが期待される。ウイルス遺伝情報の包括的収集および情報科学的手法による解析は、ノロウイルスの流行予測の基盤情報となることが期待される。

E. 結論

今年度は、次世代シーケンサーを用いて、個体内における遺伝子型や亜株の種類、分布、動態を明らかにした。次年度は、集団内で、ウイルス粒子の安定性、複製能、集団免疫からの逃避能に優れたものが選択され、感染伝播の際に、遺伝的に多様な集団から一部のウイルスが流行形成するという作業仮説を証明するために、VLP を作成して、温度変化、pH 変化への安定性の比較、VLP を用いた IgA 抗体価の動態を加えて、検証を続けていきたい。

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。

飯塚節子先生 (島根県保健環境科学研究所)

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Endo Y., Noguchi S., Hara Y., Hayashi Y., **Motomura K.**, Murakami N., Tanaka S., Yamashita S., Goto Y., Matsumoto N., Nonaka I., Nishino I. Dominant mutations in ORAI1 cause tubular aggregate myopathy with hypocalcemia by constitutive activation of store-operated Ca^{2+} channel Hum Mol Genet. Vol.9 2014 p1-p12

2 . 学会発表

国際学会

1. **Motomura, K.**, Ode, H. , Yokoyama, M., Oka, T., Katayama, K., Noda, M., Tanaka, T., Takeda N., Sato, H., Norovirus Surveillance Group of Japan. Deep Sequencing-based analysis of norovirus populations in individuals with acute gastroenteritis. Asian-African research forum on emerging and reemerging infections. :2014; Sendai
2. **Motomura K.**, Introduction of application study on NGS. Asian-African research forum on emerging and reemerging infections. :2014; Sendai
3. **Motomura K.**, Yokoyama M., Ode H., Oka T., Katayama K., Noda, M., Tanaka, T., Sato, H., Takeda N., Norovirus Surveillance Group of Japan. Dynamic Aspect of Norovirus GII.4 Genome in Nature. Asian-African research forum on emerging and reemerging infections. :2014; Sendai
4. Saeng-aroon S., Locket R., Plipat T., Sangkitporn S., Kondo M., Takebe Y., Nakayama E., Takeda N., **Motomura K.**, Shioda T., Distribution of HIV-1 subtypes in female sex workers recently infected with HIV-1 in Thailand. Asian-African research forum on emerging and reemerging infections. :2014; Sendai
5. **Motomura K.**, Takeda N., Distribution of Norovirus Genotypes through Genomic Analysis in Japan and Thailand. JGRID Vietnam-Thailand seminar :2014; Hanoi
6. **Motomura, K.**, Ode, H., Yokoyama, M., Oka, T., Katayama, K., Noda, M., Tanaka, T., Takeda N., Sato, H., Norovirus Surveillance Group of Japan. Deep Sequencing-based analysis of norovirus populations in individuals with acute gastroenteritis IUMS :2014; Montreal
7. Sato H., Yokoyama M., Nakamura H., **Motomura, K.**, Strong constraints on changes in capsid protein of norovirus pandemic lineage GII.4_2006b after the onset of outbreaks IUMS :2014; Montreal

8. **Motomura, K.**, Norovirus Surveillance Group of Japan. Genetic evolution of norovirus for survival in human population as a strategy DASAN Conference :2014; Kyongju

9. Endo Y., Noguchi S., Hara Y., Hayashi Y., **Motomura K.**, Murakami N., Tanaka S., Yamashita S., Goto Y., Matsumoto N., Nonaka I., Nishino I. Dominant mutations in ORAI1 cause tubular aggregate myopathy with hypocalcemia by constitutive activation of store-operated Ca²⁺ channel World Muscle Society ;2014; Berlin

国内学会

10. **本村和嗣**, 横山勝、大出裕高、中村浩美、岡智一郎、片山和彦、野田衛、田中智之、武田直和、佐藤裕徳、Norovirus Surveillance Group of Japan. ノロウイルス感染者体内における混合感染の解析 第88回日本感染症学会学術集会 ;2014; 福岡
11. **本村和嗣**, 飯塚節子、中村昇太、元岡大祐、大出裕高、杉浦互、佐藤裕徳、田中智之、武田直和、ノロウイルス集団食中毒事例におけるウイルス亜集団遺伝系統の包括的解析 第62回日本ウイルス学会学術集会. ;2014; 横浜
12. 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、Norovirus Surveillance Group of Japan ヒト集団におけるノロウイルス流行株の多様性と進化 第62回日本ウイルス学会学術集会. ;2014; 横浜
13. Saeng-aroon S., Locket R., Plipat T., Sangkitporn S., Kondo M., Takebe Y., Nakayama E., Takeda N., **Motomura K.**, Shioda T., Distribution of HIV-1 subtypes in female sex workers recently infected with HIV-1 in Thailand. 第62回日本ウイルス学会学術集会. ;2014; 横浜
14. 佐藤裕徳、**本村和嗣**、横山勝 ノロウイルスの多様性と進化の制約 第37回日本分子生物学会. ;2014; 横浜

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図 1



