

厚生労働科学研究委託費 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

担当責任者 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, Dr. Fang-tzy Wu.

India NICED, Dr. Mamta Chawla Sarkar

研究要旨： 台湾 CDC が 2012 年から 2013 年の Norovirus 感染患者便検体約 250 検体より検出されたノロウイルスの内訳は GII.4 が約 70%、GII.4 以外の GII が 20%、GI が 0.5%、GI, GII の共感染事例が 9.5%であった。台湾における GII.4 sydney 2012 亜株の大流行は、日本とほぼ同時に観察された。GII.4 sydney 2012 亜株は、2011 年に北海道で検出され、その後北半球のオーストラリアで大流行を引き起こし、2012/13 シーズンにアジアの冬に大流行を引き起こしたことが明らかになった。本年度は、ロタウイルスの全ゲノム配列解析をインド NICED と共同で行うことが決定した。ロタウイルス陽性サンプル約 120 検体が搬入され、次世代シーケンサーによる解析が始まった。

Abstract：

Taiwan CDC and we were analyzed approximately 250 Norovirus infected patient stool samples from 2012 through 2013. The norovirus GII was detected 9.5%, the norovirus GII.4 sydney 2012 variant was detected about 70%, the non Sydney variant norovirus GII .4 was also detected about 20%, and norovirus GI was only detected 0.5% of the stool samples. Nine point five % of stool samples were showed norovirus GI, GII mixed infection. The outbreak of GII.4 sydney 2012 variant in Taiwan was observed at the same time with Japan. It was detected in Hokkaido in 2011 first, and then this variant caused an outbreak subsequently in Australia of the Northern Hemisphere, and

it was found to have caused an outbreak in Asian winter in 2012/13 season.

In this year, it was determined to conduct all genomic sequence analysis of the rotavirus in cooperation with Indian NICED. One hundred and twenty rotavirus positive specimens were carried in NIID. Now we are analyzing them using a next-generation sequencer MiSeq.

A. 研究目的

ヒトに感染するノロウイルス (HuNoV)、サポウイルス、ロタウイルス等の下痢症ウイルスは、毎年、我が国のみならず全世界的な流行を引き起こし、問題となっている。上記ウイルス感染症は、交通機関の発達によるヒトの移動がウイルスを運び、流行を引き起こすと考えられている。本研究は、我が国の近隣諸国における上記ウイルスの流行動向を調べ、アジア地域の分子疫学を推進することで、アジア地域における上記ウイルスの流行動向を把握して、予測プログラム構築に役立てる。さらに、ワクチンや、抗ウイルス薬の開発を通じて下痢症ウイルスの感染制御に貢献する。

今年度は、台湾CDCとノロウイルス感染者数の年齢別時系列統計を用いて、ノロウイルス流行のメカニズム解析を行う。インドNICEDとロタウイルスの現地における流行株の時系列解析ゲノム解析を開始し、現地における流行状況を把握する。

B. 研究方法

1. 材料と方法

<NoV 陽性検体>

台湾 CDQ (TCDC)によって2012年から2013年にかけて収集された、ウイルス性下痢症

患者検体を NoV 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 250 検体を用いた。

<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。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。

<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。

<ロタウイルス陽性検体>

インド国立コレラ研究所 (NICED) によって収集された、ロタウイルス下痢症患者検体を対象とした。J_GRID 岡山大学コルカタ拠点の篠田教授、今村准教授とカウンターパートの Dr. Mamta Chawla Sarkar によっ

て、2011 年から 2014 年までのロタウイルス陽性患者便を 120 検体選択し、10%PBS 懸濁液を作製した。140uL の懸濁液上清を 560uL の Trizol RNA 抽出液に入れ、攪拌した後、凍結状態で NIID に輸送した。NIID 到着後、RNA 抽出を行い、マイクロチップ RNA-PAGE, MiSeq によるゲノム全長塩基配列解析を進行させている。

C. 研究結果・考察

1.

(1) 台湾における 2012/13 年シーズンの HuNoV 流行調査

台湾 CDC が 2012 年から 2013 年の Norovirus 感染患者便検体約 250 検体より検出されたノロウイルスの内訳は GII.4 が約 70%、GII.4 以外の GII が 20%、GI が 0.5%、GI, GII の共感染事例が 9.5%であった。台湾における GII.4 sydney 2012 亜株の大流行は、2012 年 6 月から徐々に流行が立ち上がり、12 月にピークを迎えた。その後 2013 年 3 月までに急激に減少し、6 月には消失した。この流行パターンは日本とほぼ同様であった。我が国においては、GII.4 sydney 2012 亜株は、2011 年に北海道で検出され、2012/13 シーズンに 2006/7 年シーズンに次ぐ史上第二番目の流行を記録した。これらの事から、GII.4 sydney 2012 亜株は、最初に北海道で検出され、その後北半球のオーストラリアで大流行を引き起こし、その後再びアジアに戻って、2012/13 シーズン冬の大流行を引き起こしたことが明らかになった。今後、タイやベトナムな

ど、台湾よりも南に位置するアジアの国々の時系列疫学データが明らかにされれば、ノロウイルス流行の仕組みが解明されるかもしれない。

(2) インドにおける 2011/14 年シーズンの HuNoV 流行調査

インドコルカタでは、先進諸国で導入されているロタウイルスワクチンの著効率が非常に低く、現行のロタウイルスワクチンであるロタリックス、ロタテックの評判が悪い。我々は、J-GRID 岡山大学インド拠点の篠田教授、今村准教授、及び NICODE の Dr. Mamta Chawla Sarkar と打ち合わせ、コルカタにおける流行株の変遷に関するデータを 2011 年から 2015、6 年に向けて蓄積させていくこととした。

現在、インドより RNA サンプルが搬入され、マイクロチップ型 RNA-PAGE による 11 セグメントの genome RNA の泳動が進行中である。

D. 結論

台湾 CDC が 2012 年から 2013 年の Norovirus 感染患者便検体約 250 検体を調べたところ、GII.4 sydney 2012 亜株の大流行は、日本とほぼ同時であることが示唆された。GII.4 sydney 2012 亜株は、2011 年に北海道で検出され、その後北半球のオーストラリアで大流行を引き起こし、2012/13 シーズンにアジアの冬に大流行を

引き起こしたことが明らかになった。

ロタウイルスについては、現在解析中である。今年度の成果として、J-GRID インド拠点の活動により、ワクチンの著効率の極めて低いインドのロタウイルス陽性便検体を入手することができた。検体は 2011 年以降 2014 年までの検体がまんべんなく含まれており、これからの解析結果が楽しみである。

健康危険情報

なし

F. 論文発表

Fang-TzyWu, MS^{1,2}, Hsieh-Cheng Chen, MS¹, Catherine Yen, MD MPH³, Ching-Yi Wu, MS¹, Kazuhiko Katayama, Ph D⁴, Jason C. Huang, PhD^{2,#}, Ho-Sheng WuPhD^{1,#}. Epidemiology and Molecular Characteristics of Norovirus GII.4 Sydney 2012 Gastroenteritis Outbreaks in Taiwan, January 2012–December 2013. Arch Virol. In press.

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