

図3.4 各地衛研のPFGEの結果

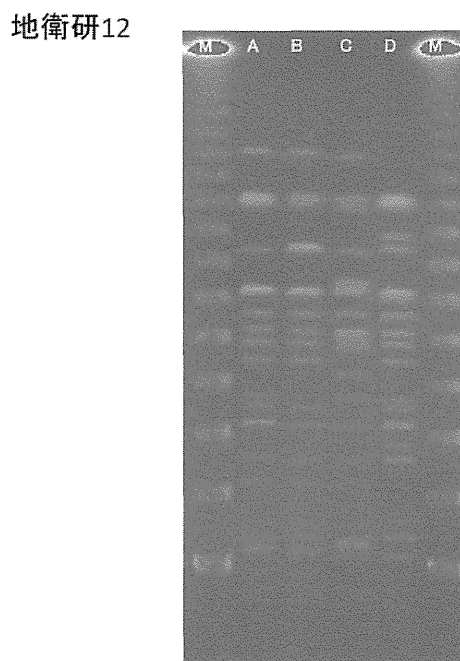
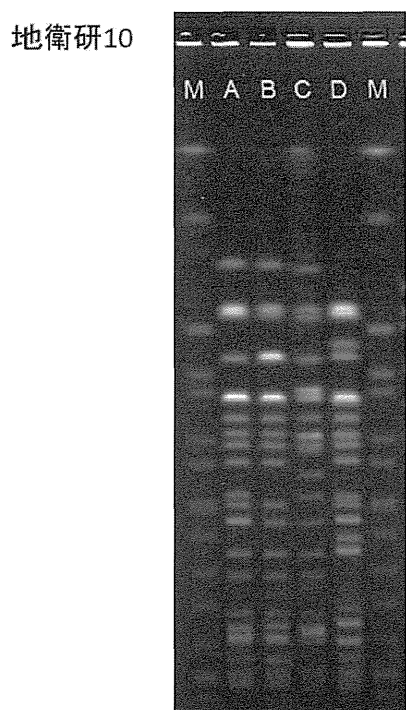


図3.5 各地衛研のPFGEの結果

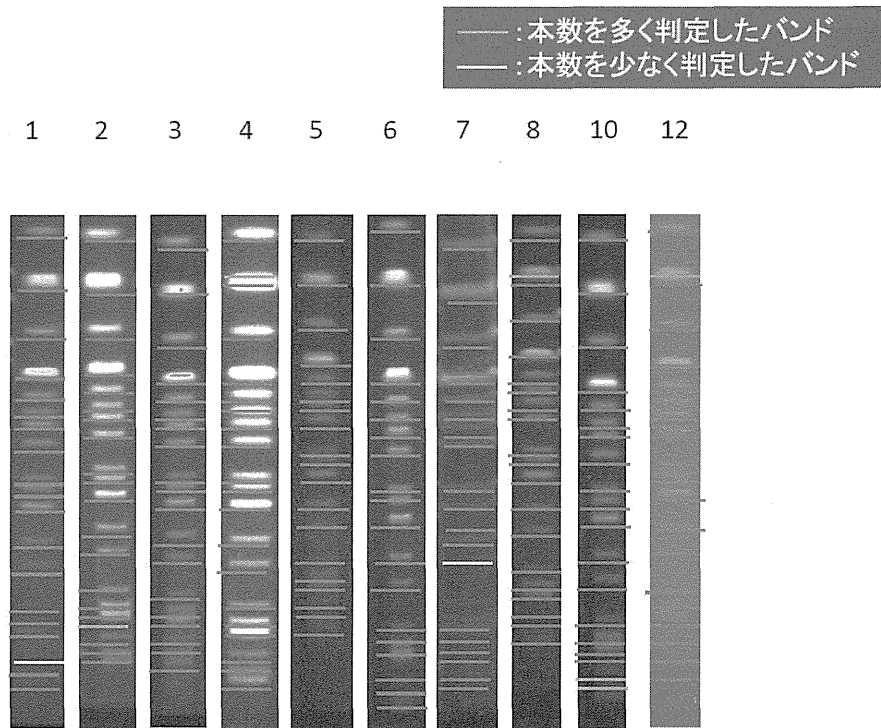


図4.1 PFGEの結果(菌株A)

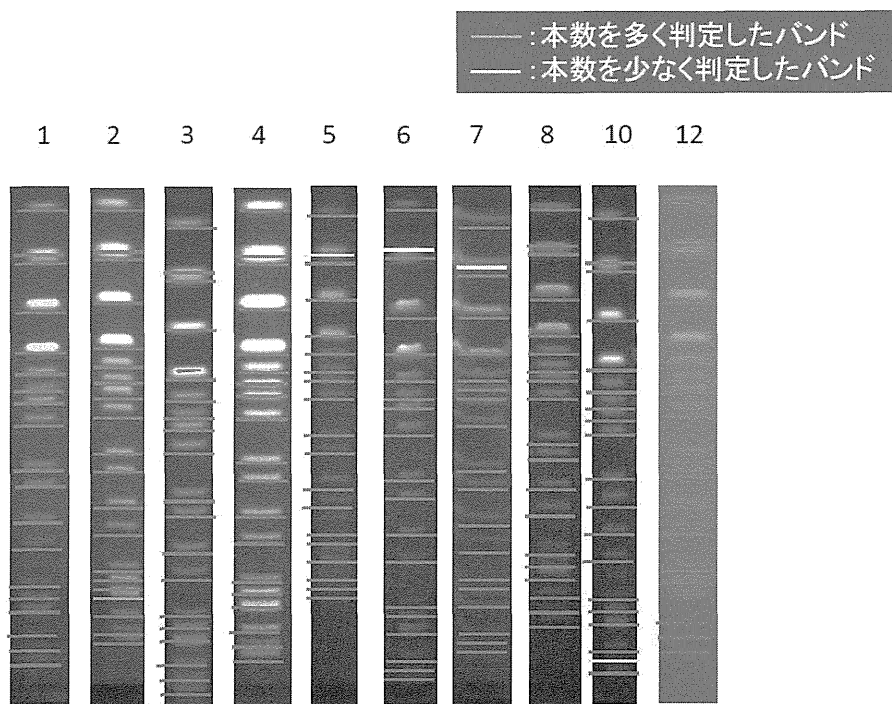


図4.2 PFGEの結果(菌株B)

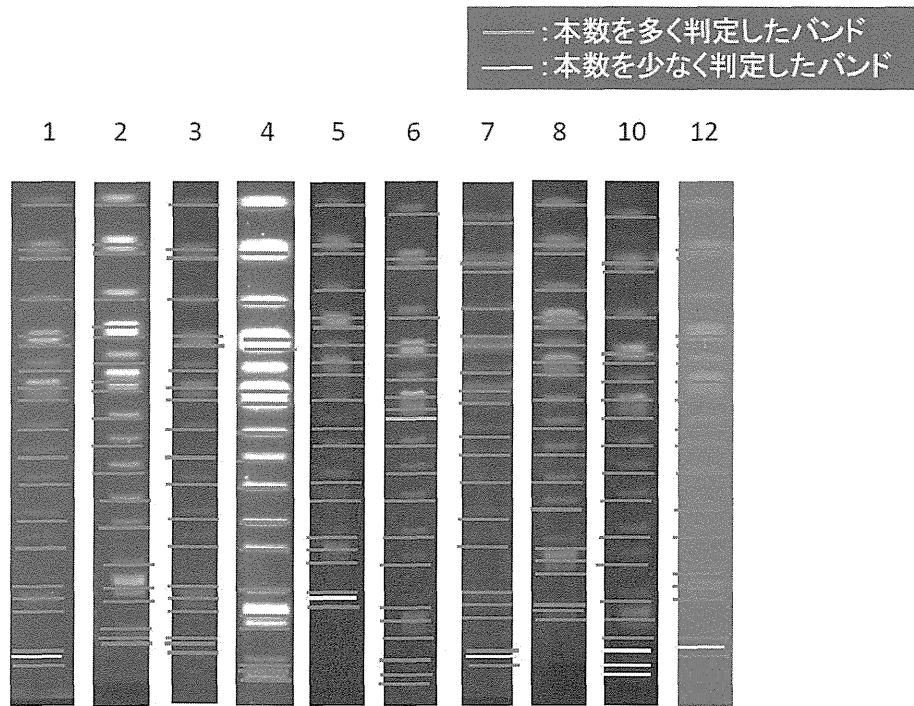


図4.3 PFGEの結果(菌株C)

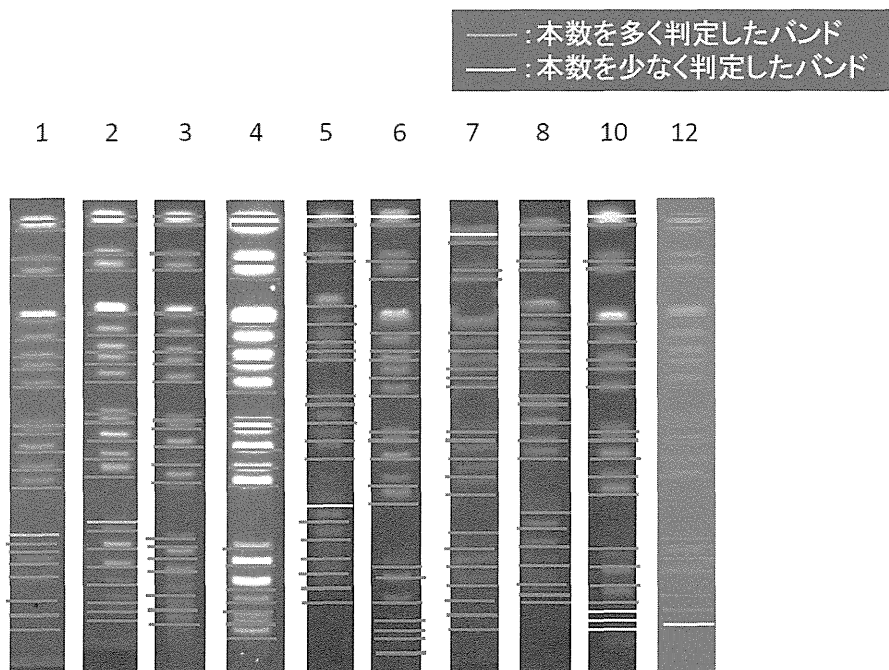


図4.4 PFGEの結果(菌株D)

表6.1 PFGEの結果(バンド数)H27年度 ( )は正解目安

地衛研	菌株				正解数 (0~3本相違)
	A (19)	B (19)	C (20)	D (21)	
1	18	19	19	22	4/4
2	20	20	20	22	4/4
3	19	20	20	21	4/4
4	20	19	20	21	4/4
5	19	18	19	19	4/4
6	19	18	21	20	4/4
7	18	18	19	20	4/4
8	20	19	20	21	4/4
10	17	18	17	17	3/4
12	20	19	19	20	4/4

表6.2 PFGEの結果(バンド数)H26年度 ( )は正解目安

地衛研	菌株				正解数 (0~3本相違)
	A (19)	B (19)	C (20)	D (20)	
1	19	20	21	18	4/4
2	21	20	22	21	4/4
3	19	17	18	19	4/4
4	18	17	18	19	4/4
5	19	18	19	20	4/4
6	22	21	22	21	4/4
7	20	20	22	21	4/4
8	20	19	20	21	4/4
10	19	18	19	19	3/4
12	24	23	24	23	1/4

平成 27 年度分担研究報告書

炙り鶏レバーが原因と疑われた食中毒事例

長崎市保健環境試験所

江原裕子、植木信介、貞光恵子、森本コヤノ、島崎裕子、飯田國洋

長崎市保健所生活衛生課

島田美香、松下明嗣

要旨

2015 年 4 月、鶏料理を主として提供している飲食店を原因とする食中毒が発生した。団体客 19 人中 15 人が下痢、腹痛、発熱等の症状を呈し、有症者便から、*Campylobacter coli*、*Campylobacter jejuni*、*Salmonella schwarzengrund* が、まかない料理を頻繁に食していた調理従事者から、*C.coli* と *S.schwarzengrund* が検出された。

有症者と調理従事者便から検出したカンピロバクターについて、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) による分子疫学的解析も実施した。*C.coli* については、2 種類の PFGE パターンが認められた。

A. 事例の概要

2015 年 4 月 30 日、長崎市内の飲食店で喫食した団体客から食中毒様症状を呈したとの届け出があり探知した。調査の結果、4 月 24 日に催された送別会に参加した 19 人中 15 人が 25 日から 30 日にかけて、下痢、腹痛、発熱等の症状を呈していることが判明した。

有症者便 12 検体、調理従事者便 3 検体、飲食店のふきとり 10 検体、参考食品 2 検体の細菌検査を実施した。当日提供された炙り鶏レバーは、表面を 1~2 分軽く炙ったもので中心部まで十分加熱されていないため、

原因食品と疑われたが、当日提供された食品が入手できなかったため、別の日に仕入れた鶏レバー、鶏ささみを参考食品として検査した。

B. 検査方法

1. 分離培養検査

0.5% 塩化ナトリウム加 1% ペプトン水にスワブで採取された糞便を洗い出したものを試料とし、プレストン増菌培地、プレストン寒天培地を使用しカンピロバクターの分離を行った。同定検査として、グラム染色、位相差顕微鏡による運動性確認、ラテックス凝集試験などを実施した。また、緩衝ペプトン水、セレナ

イト・シスチン培地、SSS培地を使用しサルモネラの分離を行い、鑑別試験には、TSI培地、LIM培地、アピを用いた。

参考食品は、10g採取したものにPBS90 mlを加え、ホモジナイズして試料とした。

#### 2.カンピロバクター型別試験

馬尿酸試験とPCR検査(HIP400F/HIP1134R CC18F/CC519R)により *jejuni* と *coli* の鑑別を行った。

#### 3.サルモネラ型別試験

サルモネラ免疫血清「生研」を用い、サルモネラO型別、H型別試験を実施した。

#### 4.PFGEによる遺伝子解析

*Campylobacter* PFGEは、平成18年度九州ブロックマニュアルに沿って実施した。TSAで培養した菌をPBSにMc5程度に懸濁させ、1%Seakem Gold Agaroseを加えてアガロースブロックを作成した。ProteinaseKで処理後、PefablocSCで不活化し、制限酵素Sma Iで30℃、16時間酵素処理を行った。電圧 6.0V/cm, Intial 6.8 秒, Final 38.4 秒, 19時間の条件で泳動した。

#### C.検査結果

有症者便から、*C.coli*、*C.jejuni*、*S.schwarzengrund* の3種の菌を検出した。(表1)当日の調理従事者から健康異常は申告されていなかったが、レバーを好み、頻繁にまかない料理を食していた調理従事者便から、*C.coli*と*S.schwarzengrund*が検出された。当日提供された食品が無く、厨房内のふき取り検査からも病原細菌は検出されなかったため、感染経路の特定には至らなかったが、別の日に納入された鶏レバーは*C.jejuni*に汚染されていた。

有症者、調理従事者から検出された*C.coli*と*C.jejuni*についてPFGEを実施した。

*C.jejuni*のPFGEパターンは同一であったが、*C.coli*は2つのPFGEパターンを示した。(写真1)

#### D.結論

本事例では、*C.coli*、*C.jejuni*、*S.schwarzengrund*が混在して検便から検出された。PFGEの結果から、*C.coli*は2種類に型別され、原因と疑われた鶏レバーが多様な菌に汚染されていることが推察された。鶏肉については、サルモネラ及びカンピロバクターの汚染率が高いことが知られているが、それを窺わせるものであった。

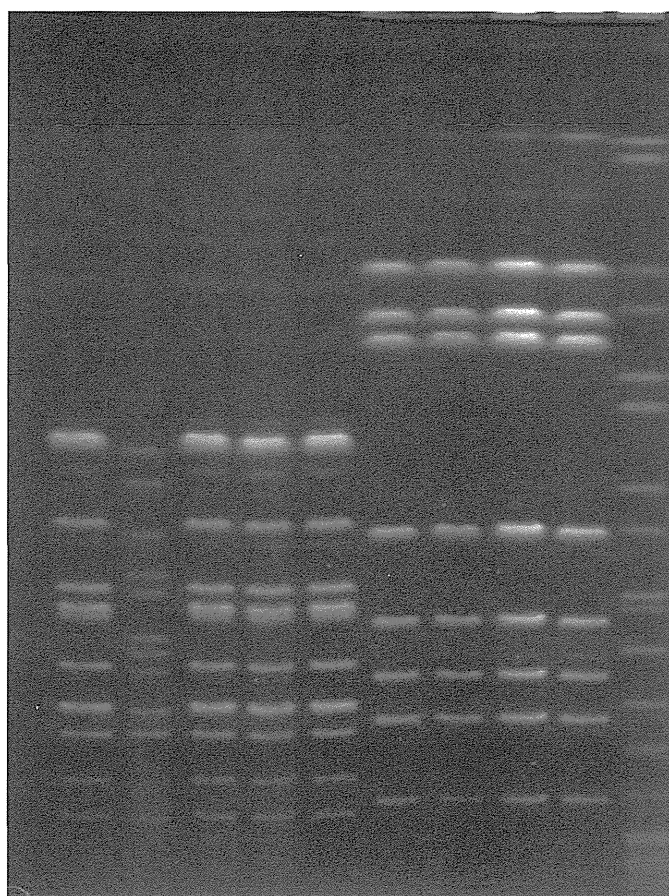
平成24年7月牛レバーを生食用として販売および提供することが禁止され、平成27年6月には、豚レバーの生食の提供も禁止されたが、鶏レバーについては、法的規制はまだ行われていない。

飲食店の営業者は、炙り鶏レバーに関して炙ったことで、加熱済みとの認識を持っていた。食肉の生食あるいは加熱不十分な食肉の危険性についてより一層の注意喚起が必要である。

(表 1) 検便・参考食品の細菌検査結果

	Campylobacter coli	Campylobacter jejuni	Salmonella schwarzengrund
有症者a (スワブ便)	○		
有症者b (スワブ便)		○	
有症者c (スワブ便)		○	
有症者d (スワブ便)		○	
有症者e (スワブ便)			○
有症者f (スワブ便)	○		
有症者g (スワブ便)	○		
有症者h (スワブ便)	○		○
有症者i (スワブ便)		○	
調理従事者 (スワブ便)	○		○
鶏レバー(参考食品)		○	

(写真 1) カンピロバクターPFGE



1 2 3 4 5 6 7 8 9 M

- 1 有症者 a (C.coli)
- 2 有症者 f (C.coli)
- 3 有症者 g (C.coli)
- 4 有症者 h (C.coli)
- 5 調理従事者 (C.coli)
- 6 有症者 b (C.jejuni)
- 7 有症者 c (C.jejuni)
- 8 有症者 d (C.jejuni)
- 9 有症者 i (C.jejuni)
- M S.BraenderupH9812

(泳動条件)  
 電圧 6.0V/cm  
 Intial 6.8 秒 Final 38.4 秒  
 泳動時間 19 時間  
 制限酵素 Sma I

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）

「食品由来感染症の病原体情報の解析及び共有化システムの構築に関する研究」

平成 27 年度研究分担報告書

## ロタウイルスの RNA-PAGE 泳動パターンによる流行株分類ウェブサイトの構築

研究分担者 片山和彦

国立感染症研究所 ウイルス第二部

### 研究要旨

ロタウイルス（RV）は二本鎖 RNA で構成される 11 本の遺伝子分節をゲノムとして有する。RV 感染患者の便検体から抽出した RNA をポリアクリルアミドゲルで電気泳動（RNA-PAGE）すると、その分子量や二次構造の違いにより各分節を分離・検出することが可能である。この泳動パターンは遺伝子型や株によって異なるため、検体間のウイルスの類似性を推定する事も可能である。我々は、RNA-PAGE によるパターン分類をマイクロチップ電気泳動装置 MultiNA に適応させ、MultiNA 泳動パターンフィッティング解析によって算出される相関係数を用いた株分類法の開発を進めている。本研究班では、このパターンフィッティングソフトウェアと標準株のパターンをウェブページ上に公開し、全国の地方衛生研究所からアクセスしてオンラインでロタウイルスの遺伝子型分類、株分類が可能なシステム構築を行う。



## A. 研究目的

ロタウイルス (RV) は乳幼児の重症胃腸炎の最大の原因であり、我が国における年間の患者数は 70-80 万人、入院数は 7-8 万人におよぶと推定されている。時に腎炎や腸重積、脳炎・脳症などの重篤な合併症を引き起こすこともあり、年間数人から 10 人前後の患者が、RV が原因で命を落としている。また、RV は教育施設や老人施設などで集団感染を引き起こす事も多く、食中毒の原因として検出される事例も散見されており、公衆衛生上も問題視されている。

RV はコア、内殻、外殻の三層構造を有するウイルスであり、そのゲノムは 11 分節からなる二本鎖 RNA (double-stranded RNA : dsRNA) で構成されている。RV のゲノムは非常に多様性が高く、11 本の遺伝子分節それぞれに多数の遺伝子型が存在している。実際にヒトの間で流行している RV 株も地域や時期によって大きく異なる事があり、非常に多彩な様相を呈している。ウイルス株の遺伝子型を記載する場合には、11 分節の遺伝子型を VP7 - VP4 - VP6 - VP1 - VP2 - VP3 - NSP1 - NSP2 - NSP3 - NSP4 - NSP5 (Gx - P[x] - Ix - Rx - Cx - Mx - Ax - Nx - Tx - Ex - Hx) の順に羅列する方法が取られているが、それぞれの株の遺伝子型を全て決定するには多大な労力と時間を要する。従って、RV の流行株を詳細に幅広く把握するのは容易ではない。

地研などの検査室では、RV の検出法としては ELISA 法や RT-PCR 法およびシーケンス解析を行うことが通例となっているが、RV 研究者の間では、ポリアクリルアミドゲル電気

泳動 (RNA-PAGE) によりウイルスゲノムを直接検出できる事がよく知られている。RV 感染患者の便 1g には 10 の 10 乗~12 乗もの大量のウイルス粒子が存在している為、便検体から抽出した RNA について RNA-PAGE を行うと 11 本の遺伝子分節に由来するバンドを容易に検出できる。しかも、そのバンドパターンは遺伝子型の違い或いは僅かな塩基配列の違いにより泳動度が異なって現れる。昨年までに、マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA による RNA-PAGE の相対移動度の蓄積を行ってきた。さらに、全塩基配列を解析済みの様々な遺伝子型の RV のバンドパターンも蓄積した。

本研究班では、このパターンフィッティングソフトウェアと標準株のパターン蓄積をさらに進め、それらをウェブページ上に公開し、全国の地方衛生研究所からアクセスしてオンラインでロタウイルスの遺伝子型分類、株分類が可能なウェブサイトの構築を目指す。本年度は、標準パターンライブラリの充実と、ソフトウェアの型判定アルゴリズムの開発を行った。

## B. 研究方法

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

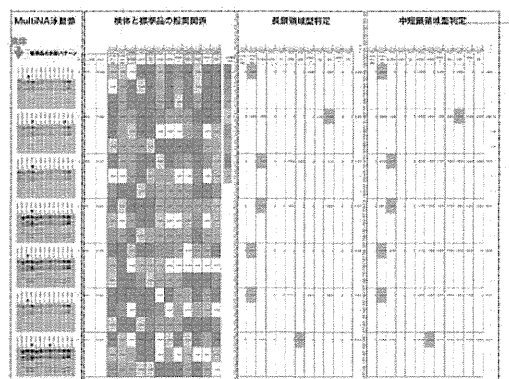
無く、画像と electrophoregram (泳動波形とピーク位置が示されたグラフ) の蓄積を行った。すべての検体について、次世代シーケンスシステムを用いたウイルスゲノムの塩基配列解析を行い、遺伝子型を決定してパターンライブラリーに蓄積した。

### C. 研究結果および考察

RV のゲノムはサイズの大きいものから順に VP1 (3300 bp)、VP2 (2700 bp)、VP3 (2600 bp)、VP4 (2350 bp)、NSP1 (1550 bp)、VP6 (1350 bp)、NSP3 (1070 bp)、VP7 (1062 bp)、NSP2 (1059 bp)、NSP4 (740 bp)、NSP5 (665 or 820 bp) の順番で MultiNA によるパターンとして検出された (サイズは株により異なるため、およその値で示した)。MultiNA では、VP1 (3300 bp)、VP2 (2700 bp)、VP3 (2600 bp)、VP4 (2350 bp) は上部に近接したバンド群として、NSP1 (1550 bp)、VP6 (1350 bp)、NSP3 (1070 bp)、VP7 (1062 bp)、NSP2 (1059 bp) は中部に近接したバンド群として、NSP4 (740 bp)、NSP5 (665 or 820 bp) は下部に互いに独立した 2 本のバンドとして検出された。そこで、この特長を生かし、長鎖部、中鎖部、短鎖部の 3 箇所に分けて、相対移動度だけでは無く、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。

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あり、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、長鎖部、中鎖部、短鎖部の 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。



自動判定プログラムのプロトタイプによる型判定結果を上部の図に示した。最も左側のカラムは、MultiNA の電気泳動像である。左端に検体の泳動像、右側に標準品 12 種類の泳動像が表示されている。左から 2 番目のカラムには、検体と標準品の相関具合を、右端に表示した凡例に従って、一致度が高い方から低い方に赤色から青色へのグラデーションでカラーリングを施した。最上段が長鎖領域、中段が中鎖領域、下段が短鎖領域を示す。3 領域全てを合計して最も相関の高い標準品が、検体の型として判定される。判定結果は、長鎖領域と中短鎖領域をそれぞれ右のカラムに表した。ピンク色のインジケータが示す標準が型を表す。人の目で確認する場合、煩雑に見えるが、コンピューター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迅速な遺伝子型判定や、比較が容易となる。

MultiNA は、アッセイ間変動、チップ間変動、施設間変動がわずかしかなかったが、相

対移動度で分別できないウイルス株も存在していた。Electrophoregram のフィッティングと、相関係数を指標にする株分別法は、その弱点を克服した。来年度以降にウェブ上のツールとして使用可能なインターフェース構築、デザインを行うと共に、アルゴリズムのブラッシュアップを行う。

## E. 結論

ウェブ上のツールデザインは来年度を予定しているが、ツールの基本は完成した。まとめると、ロタウイルス陽性検体から、RNA をロタウイルス検出マニュアル 2014 年版に従って抽出し、MultiNA を使用して泳動する。得られたパターンをウェブサイトにサブミットし、解析ボタンを押すと、図に示したパターン比較結果が表示され、型判定結果が表示される。検体の泳動パターンの入力ウィンドウのデザインを行っていく必要があるが、基盤構築は完成した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表 (英文)

1. Ito M, Tsuchiaka S, Naoi Y, Otomaru K, Sato M, Masuda T, Haga K, Oka T, Yamasato H, Omatsu T, Sugimura S, Aoki H, Furuya T, Katayama Y, Oba M, Shirai J, Katayama K, Mizutani T, Nagai M. Infect Genet Evol. 2016 Mar;38:90-5. doi:

10.1016/j.meegid.2015.12.013. Epub 2015 Dec 18.

2. Komoto S, Tacharoenmuang R, Guntapong R, Ide T, Haga K, Katayama K, Kato T, Ouchi Y, Kurahashi H, Tsuji T, Sangkitporn S, Taniguchi K. Emergence and Characterization of Unusual DS-1-Like G1P[8] Rotavirus Strains in Children with Diarrhea in Thailand. PLoS One. 2015 Nov 5;10(11):e0141739. doi: 10.1371/journal.pone.0141739. eCollection 2015.
3. Tacharoenmuang R, Komoto S, Guntapong R, Ide T, Haga K, Katayama K, Kato T, Ouchi Y, Kurahashi H, Tsuji T, Sangkitporn S, Taniguchi K. Whole Genomic Analysis of an Unusual Human G6P[14] Rotavirus Strain Isolated from a Child with Diarrhea in Thailand: Evidence for Bovine-To-Human Interspecies Transmission and Reassortment Events. PLoS One. 2015 Sep 30;10(9):e0139381. doi: 10.1371/journal.pone.0139381. eCollection 2015.
4. Otomaru K, Naoi Y, Haga K, Omatsu T, Uto T, Koizumi M, Masuda T, Yamasato H, Takai H, Aoki H, Tsuchiaka S, Sano K, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Furuya T, Shirai J, Katayama K, Mizutani T, Nagai M. Detection of novel kobu-like viruses in Japanese

- black cattle in Japan. *J Vet Med Sci.* 2015 Sep 11. [Epub ahead of print]
5. Yumiketa Y, Narita T, Inoue Y, Sato G, Kamitani W, Oka T, Katayama K, Sakaguchi T and Tohya Y. Nonstructural protein p39 of feline calicivirus suppresses host innate immune response by preventing IRF-3 activation. *Veterinary Microbiology.* 2016 In press.
  6. Kobayashi M, Yoshizumi S, Kogawa S, Takahashi T, Ueki Y, Shinohara M, Mizukoshi F, Tsukagoshi H, Sasaki Y, Suzuki R, Shimizu H, Iwakiri A, Okabe N, Shirabe K, Shinomiya H, Kozawa K, Kusunoki H, Ryo A, Kuroda M, Katayama K, Kimura H. Molecular Evolution of the Capsid Gene in Norovirus Genogroup I. *Sci Rep.* 2015 Sep 4;5:13806. doi: 10.1038/srep13806.
  7. Chapellier B, Tange S, Tasaki H, Yoshida K, Zhou Y, Sakon N, Katayama K, Nakanishi A. Examination of a plasmid-based reverse genetics system for human astrovirus. *Microbiol Immunol.* 2015 Aug 14. doi: 10.1111/1348-0421.12317. [Epub ahead of print]
  8. Nagai M, Omatsu T, Aoki H, Kaku Y, Belsham GJ, Haga K, Naoi Y, Sano K, Umetsu M, Shiokawa M, Tsuchiaka S, Furuya T, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Shirai J, Katayama K, Mizutani T. Identification and complete genome analysis of a novel bovine picornavirus in Japan. *Virus Res.* 2015 Aug 7;210:205-212. doi:10.1016/j.virusres.2015.08.001. [Epub ahead of print]
  9. Otomaru K, Naoi Y, Haga K, Omatsu T, Uto T, Koizumi M, Masuda T, Yamasato H, Takai H, Aoki H, Tsuchiaka S, Sano K, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Furuya T, Shirai J, Katayama K, Mizutani T, Nagai M. Detection of novel kobu-like viruses in Japanese black cattle in Japan. *J Vet Med Sci.* 2015 Sep 11. [Epub ahead of print]
  10. Matsushima Y, Ishikawa M, Shimizu T, Komane A, Kasuo S, Shinohara M, Nagasawa K, Kimura H, Ryo A, Okabe N, Haga K, Doan HY, Katayama K, Shimizu H. Genetic analyses of GII.17 norovirus strains in diarrheal disease outbreaks from December 2014 to March 2015 in Japan reveal a novel polymerase sequence and amino acid substitutions in the capsid region. *Eurosurveillance* July 2, 1-6, 2015.
  11. Wu FT, Chen HC, Yen C, Wu CY, Katayama K, Park Y, Hall AJ, Vinjé J, Huang JC, Wu HS. Epidemiology and molecular characteristics of norovirus GII.4 Sydney outbreaks in Taiwan,

- January 2012-December 2013. *J Med Virol.* 2015 May 6. doi: 10.1002/jmv.24208. [Epub ahead of print]
12. Ide T, Komoto S, Higo-Moriguchi K, Htun KW, Myint YY, Myat TW, Thant KZ, Thu HM, Win MM, Oo HN, Htut T, Wakuda M, Dennis FE, Haga K, Fujii Y, Katayama K, Rahman S, Nguyen SV, Umeda K, Oguma K, Tsuji T, Taniguchi K. Whole Genomic Analysis of Human G12P[6] and G12P[8] Rotavirus Strains that Have Emerged in Myanmar. *PLoS One.* 2015 May 4;10(5):e0124965. doi: 10.1371/journal.pone.0124965. eCollection 2015.
  13. Oka T, Wang Q, Katayama K, Saif LJ. Comprehensive review of human sapoviruses. *Clin Microbiol Rev.* 2015 Jan;28(1):32-53. doi: 10.1128/CMR.00011-14. PMID: 25567221.
  14. Shibata S, Sekizuka T, Kodaira A, Kuroda M, Haga K, Doan YH, Takai-Todaka R, Katayama K, Wakita T, Oka T, Hirata H. Complete Genome Sequence of a Novel GV.2 Sapovirus Strain, NGY-1, Detected from a Suspected Foodborne Gastroenteritis Outbreak. *Genome Announc.* 2015 Feb 12;3(1). pii: e01553-14. doi: 10.1128/genomeA.01553-14.
  15. Sato A, Kameyama K, Nagai M, Tateishi K, Ohmori K, Todaka R, Katayama K, Mizutani T, Yamakawa M, Shirai J. Complete Genome Sequence of Bovine Viral Diarrhea Virus 2 Japanese Reference and Vaccine Strain KZ-91CP. *Genome Announc.* 2015 Feb 12;3(1). pii: e01573-14. doi: 10.1128/genomeA.01573-14.
  16. Nemoto M, Nagai M, Tsunemitsu H, Omatsu T, Furuya T, Shirai J, Kondo T, Fujii Y, Todaka R, Katayama K, Mizutani T. Whole-genome sequence analysis of G3 and G14 equine group A rotaviruses isolated in the late 1990s and 2009-2010. *Arch Virol.* 2015 Feb 25. [Epub ahead of print]
  17. Nagai M, Shimada S, Fujii Y, Moriyama H, Oba M, Katayama Y, Tsuchiaka S, Okazaki S, Omatsu T, Furuya T, Koyama S, Shirai J, Katayama K, Mizutani T. H2 genotypes of G4P[6], G5P[7], and G9[23] porcine rotaviruses show super-short RNA electropherotypes. *Vet Microbiol.* 2015 Feb 9. pii: S0378-1135(15)00055-3. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.02.002. [Epub ahead of print]

(邦文)

1. 片山和彦 木村博一 ノーウォーク  
ウイルス（ノロウイルス）の遺伝子  
型 2015年改訂版 IASR ノロウイル  
ス特集号 Sep 8, 2015.
2. 松島勇紀 石川真理子 清水智美  
駒根綾子 清水英明 松尾千秋  
三崎貴子 岡部信彦 篠原美千代  
峯岸俊貴 小川泰卓 粕尾しず子  
中沢春幸 水越文徳 鈴木尚子 船  
渡川圭次 梁 明秀 木村博一 長  
澤耕男 芳賀 慧 Doan Hai Yen  
片山和彦 新規遺伝子型ノロウイ  
ルス GII.P17-GII.17 の流行 IASR  
Vol. 36, No.9 (No. 427) Sep 2015.
3. 片山和彦 Medical Practice ノロ  
ウイルス vol. 33, no.1 p41-46,  
2016
4. 片山和彦 メディカル朝日 ノロウ  
イルス Jan p24-25, 2016
5. 片山和彦 キューピーニュース ノ  
ロウイルス予防と対策 499号 9月  
2015
6. 片山和彦 月刊HACCP ノロウイル  
ス予防と対策 12月 vol. 21 p20-  
27, 2015
7. 片山和彦 BIO Clinica 新興・再興  
感染症-感染予防ワクチン ノロウ  
イルス最新の研究動向
8. 三木元博、片山和彦 臨床とウイル  
ス ディープシーケンス方を用いた  
ノロウイルスの分子疫学、進化の研  
究 vol. 43, 3 p92-99, 2015
9. 片山和彦 最新医学 ノロウイルス  
のウイルス学的基礎研究・最近のト  
ピックス vol. 70., 11月号増刊号  
p88-96, 2015
10. 片山和彦 ウイルス性胃腸炎 SRL  
社 宝函 vol. 35, No. 4, p23-34,  
2015.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）

「食品由来感染症の病原体情報の解析及び共有化システムの構築に関する研究」

平成 27 年度研究分担報告書

## “GatVirusWeb” ウェブサイトの構築

研究分担者 三瀬敬治 札幌医科大学

### 研究要旨

ロタウイルス遺伝子データベースおよび遺伝子型判定システムを CaliciWeb に加え、新たに GatVirusWeb として運用するべく Web site の構築、維持、開発を行う。具体的には、これまで運用してきたカリシウイルスデータベース&配列検索システムに、NoroNet norovirus genotyping system へのリンクを加え、さらにロタウイルスでは、RNA-PAGE によるパターン分類をマイクロチップ電気泳動装置 MultiNA に適応させ、MultiNA 泳動パターンフィッティング解析によって算出される相関係数を用いた株分類法の搭載準備を進めた。本研究班では、このパターンフィッティングソフトウェアと標準株のパターンをウェブページ上に公開し、全国の地方衛生研究所からアクセスしてオンラインでロタウイルスの遺伝子型分類、株分類が可能なシステム構築の準備を行う。

## A. 研究目的

世界 3 大データベース上に登録された下痢症ウイルス（ノロウイルス、サポウイルス、ロタウイルスなど）の塩基配列データは膨大な数に上り、ユーザーが研究目的に応じて必要な配列を見つけ出すために、かなりの努力を要する。そこで、オートパイロットシステムにより、毎日登録される下痢症ウイルスの塩基配列データをアップデートしつつ、我が国内部から自由にアクセス可能な下痢症ウイルスに特化したサブデータベースを構築し、インターフェースの改良を行いつつ維持管理を行う。さらに、新規に開発される下痢症ウイルス遺伝子型分類ツールを搭載し、我が国の研究者が自由に使用して型分類を行い、ワクチン導入後の疫学調査に資することのできるウェブサイト構築することを目的とする。

## B. 研究方法

ウイルス第二部第一室の分担研究者より提案された案件のウェブサイトへの掲載を行い、テストドライブにてパブリックベータ版をユーザーに評価させる。実際のユーザーからのリクエストをウェブサイトに併設している掲示板を通じて入手し、リクエストを反映させつつウェブサイトの充実を図る。さらに、現状のユーザーを把握するため、アクセスモニターを施行し、利用状況に応じたウェブ管理、改変を実施する。

## C. 研究結果および考察

今年度の活動結果を以下に箇条書きにまとめた。

(1) ウイルスデータベース登録数、

Norovirus 25,806、Sapovirus 3,657、Lagovirus 1,532、Vesivirus 1,623 Rotavirus 51,678 であった。次世代シーケンサー、ハイスループットシーケンステクノロジーの登場により、年間の下痢症ウイルス塩基配列登録数は指数関数的増加傾向を示していた。オートパイロットプログラムでピックアップしたデータを収納するためには、データストレージシステムの増強が必須となった。

(2) 最新 OS (Windows および Macintosh) による GatVirusWeb のモニタリング体制の整備を実施した。新型のモニタ専用パソコンを購入し、今後の GatVirusWeb の汎用性を継続的にモニタリングできるようにした。

(3) リンク集に NoroNet (<http://www.rivm.nl/en/Topics/N/NoroNet>) とのリンクを作成した。GatVirusWeb と Norovirus の国際的な型分類機関との情報の国際的相互利用が可能となった。

(4) 検索条件での最小塩基配列数と最大塩基配列数による絞り込み条件の検討を実施した。さらに、系統樹作成支援サービスの検討を実施した。下記に実例を示した。

これまでのウイルスデータベース検索結果  
(検索条件:Norovirus、最小塩基配列数 1000、最大塩基配列数 2000)



accession	length	taxonomy
AB009879	1001	Viruses, ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage, Caliciviridae, Norovirus
AB028245	1576	Viruses, ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage, Caliciviridae, Norovirus
AB031013	1593	Viruses, ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage, Caliciviridae, Norovirus
AB032798	1609	Viruses, ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage, Caliciviridae, Norovirus
AB063325	1594	Viruses, ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage, Caliciviridae, Norovirus
AB070956	1022	Viruses, ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage, Caliciviridae, Norovirus
AB070967	1018	Viruses, ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage, Caliciviridae, Norovirus
AB070968	1057	Viruses, ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage, Caliciviridae, Norovirus
AB070969	1015	Viruses, ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage, Caliciviridae, Norovirus

検索結果 2706 件であり、情報量が非常に多く、データにアクセスしにくい。最小塩基配列数 1000、最大塩基配列数 1100 に条件を変更すると検索結果が 515 件になり、必要なデータにアクセスしやすくなった。

SELECT	accession	length	taxonomy
<input checked="" type="checkbox"/>	AB009879	1001	Viruses, ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage, Caliciviridae, Norovirus
<input type="checkbox"/>	AB028245	1576	Viruses, ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage, Caliciviridae, Norovirus
<input checked="" type="checkbox"/>	AB031013	1593	Viruses, ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage, Caliciviridae, Norovirus
<input type="checkbox"/>	AB032798	1609	Viruses, ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage, Caliciviridae, Norovirus
<input type="checkbox"/>	AB063325	1594	Viruses, ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage, Caliciviridae, Norovirus
<input type="checkbox"/>	AB070956	1022	Viruses, ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage, Caliciviridae, Norovirus
<input type="checkbox"/>	AB070967	1018	Viruses, ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage, Caliciviridae, Norovirus
<input type="checkbox"/>	AB070968	1057	Viruses, ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage, Caliciviridae, Norovirus
<input type="checkbox"/>	AB070969	1015	Viruses, ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage, Caliciviridae, Norovirus

ウイルスデータベースの検索結果に、新たに SELECT ボタンと送信ボタンを作成。必要なデータを選択して、送信ボタンをクリックすると、必要なデータの塩基配列が一覧として表示され、系統樹作成などの比較研究が容易になる。

```

1 >AB033644.
2 ataaatgagctctaacgacgttcgcctaccctgttactaacgacgacgaccc
3 gcaaatcttcaastgacaaatatttctagcatgcttactttaaagacccctc
4 agggccgcttaaacagccccccccaggaataccgaaagcttcaaacccctc
5 actcgaactgtcaaaaatccccctccccccacgagagatgaatgta
6 gttcttatagctcaaaatgaccttccgcttaccgaccttccacctcagcga
7
8 >AB033645.
9 ataaatgagctctaacgacgttcgcctaccctgttactaacgacgacgaccc
10 gcaaatcttcaastgacaaatatttctagcatgcttactttaaagacccctc
11 agggccgcttaaacagccccccccaggaataccgaaagcttcaaacccctc
12 actcgaactgtcaaaaatccccctccccccacgagagatgaatgta
13 gttcttatagctcaaaatgaccttccgcttaccgaccttccacctcagcga
14
15 >AB033646.
16 ataaatgagctctaacgacgttcgcctaccctgttactaacgacgacgaccc
17 gcaaatcttcaastgacaaatatttctagcatgcttactttaaagacccctc
18 agggccgcttaaacagccccccccaggaataccgaaagcttcaaacccctc
19 actcgaactgtcaaaaatccccctccccccacgagagatgaatgta
20 gttcttatagctcaaaatgaccttccgcttaccgaccttccacctcagcga
21 [LF]

```

### E. 結論

ウェブ上のロタウイルス遺伝子型分類ツールデザインが完成したが、ウェブサイトへの掲載は、来年度を予定している。下痢症ウイルス塩基配列データベースの環境整備と改良により、操作性が増した。NoroNet とのリンクにより、Norovirus typing tool の利用が可能となった。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

なし

### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表 (平成 27 年度)

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nguyen VH, Pham HT, Diep TT, Phan CD, Nguyen TQ, Nguyen NT, Ngo TC, Nguyen TV, DO QK, Phan HC, Nguyen BM, Ehara M, Ohnishi M, Yamashiro T, Nguyen LT, Izumiya H.	<i>Vibrio cholerae</i> O1 El Tor from southern Vietnam in 2010 was molecularly distinct from that present from 1999 to 2004. Epidemiol Infect.	Epidemiol Infect.	Epub ahead of print		2015
Kayali AY, Escalante-Maldonado O, Vuddhakul V, Seto K, Nakaguchi Y, Nishibuchi M	Development of a method for detection of Shigatoxin-producing <i>Escherichia coli</i> belonging to clinically important twelve O serotypes based on the combination of PickPen-assisted immunomagnetic separation and loop-mediated isothermal amplification.	Int. J. Immunol. Immunother.	2	1	2015
Harada T, Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Taguchi M, Kumeda Y	Multiplex real-time PCR assays for screening of Shiga toxin 1 and 2 genes, including all known subtypes, and <i>Escherichia coli</i> O26-, O111-, and O157-specific genes in beef and sprout enrichment cultures.	J. Food Prot.	78	1800-1811	2015
Kawahara R, Seto K, Taguchi M, Nakajima C, Kumeda Y, Suzuki Y	Characterization of third-generation-cephalosporin-resistant Shiga toxin-producing strains of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 in Japan.	J. Clin. Microbiol.	53	3035-3038	2015

Ito M, Tsuchiaka S, Naoi Y, Otomaru K, Sato M, Masuda T, Haga K, Oka T, Yamasato H, Omatsu T, Sugimura S, Aoki H, Furuya T, Katayama Y, Oba M, Shirai J, Katayama K, Mizutani T, Nagai M.	Whole genome analysis of Japanese bovine toroviruses reveals natural recombination between porcine and bovine toroviruses.	Infect Genet Evol	38	90-95	2016
Komoto S, Tacharoenmuang R, Guntapong R, Ide T, Haga K, Katayama K, Kato T, Ouchi Y, Kurahashi H, Tsuji T, Sangkitporn S, Taniguchi K.	Emergence and Characterization of Unusual DS-1-Like G1P[8] Rotavirus Strains in Children with Diarrhea in Thailand.	PLoS One	10	e0141739	2015
Tacharoenmuang R, Komoto S, Guntapong R, Ide T, Haga K, Katayama K, Kato T, Ouchi Y, Kurahashi H, Tsuji T, Sangkitporn S, Taniguchi K.	Whole Genomic Analysis of an Unusual Human G6P[14] Rotavirus Strain Isolated from a Child with Diarrhea in Thailand: Evidence for Bovine-To-Human Interspecies Transmission and Reassortment Events.	PLoS One	10	e0139381	2015
Otomaru K, Naoi Y, Haga K, Omatsu T, Uto T, Koizumi M, Masuda T, Yamasato H, Takai H, Aoki H, Tsuchiaka S, Sano K, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Furuya T, Shirai J, Katayama K, Mizutani T, Nagai M.	Detection of novel kobu-like viruses in Japanese black cattle in Japan.	J Vet Med Sci	Epub ahead of print		2015

Yumiketa Y, Narita T, Inoue Y, Sato G, Kamitani W, Oka T, Katayama K, Sakaguchi T and Tohya Y.	Nonstructural protein p39 of feline calicivirus suppresses host innate immune response by preventing IRF-3 activation.	Veterinary Microbiology.	in press		2016
Kobayashi M, Yoshizumi S, Kogawa S, Takahashi T, Ueki Y, Shinohara M, Mizukoshi F, Tsukagoshi H, Sasaki Y, Suzuki R, Shimizu H, Iwakiri A, Okabe N, Shirabe K, Shinomiya H, Kozawa K, Kusunoki H, Ryo A, Kuroda M, Katayama K, Kimura H.	Molecular Evolution of the Capsid Gene in Norovirus Genogroup I.	Sci Rep.	5	13806	2015
Chapellier B, Tange S, Tasaki H, Yoshida K, Zhou Y, Sakon N, Katayama K, Nakanishi A.	Examination of a plasmid-based reverse genetics system for human astrovirus.	Microbiol Immunol.	Epub ahead of print		2015
Nagai M, Omatsu T, Aoki H, Kaku Y, Belsham GJ, Haga K, Naoi Y, Sano K, Umetsu M, Shiokawa M, Tsuchiaka S, Furuya T, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Shirai J, Katayama K, Mizutani T.	Identification and complete genome analysis of a novel bovine picornavirus in Japan.	Virus Res.	210	205-212	2015