

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 28 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法の検討

研究分担者 片山和彦・藤井克樹 北里大学生命科学研究所・国立感染症研究所

### 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。我々の保有する検体を用いて、RNA-PAGE のバンドパターンとそれらの遺伝子型との関連性について検討を行ったところ、VP2、VP3、VP6、VP7、NSP1、NSP2、NSP3、NSP5 の各遺伝子分節において遺伝子型とバンドパターンに明確な関連性が認められた。本研究では、島津社製マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA の RNA-PAGE によるパターン分類プログラムを開発して、RV 流行株を広範かつ簡便に調査するシステムを構築する。本年度は、マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA による標準株泳動パターンを蓄積し、RNA-PAGE 泳動パターンを標準株と相関係数を用いて比較し、判定するプログラム構築を行った。

## 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。これまでの研究により、RNA-PAGE とマイクロチップ電気泳動装置 MultiNA の比較検討を行い、MultiNA による株判別が可能であることを示した。本年度は、MultiNA による標準 RV 株の RNA-PAGE パターン蓄積を実施するとともに、検体のバンドパターンを標準株のバンドパターンの相関値を算出し、それを用いて株判別を行うプログラムの開発を行った。

## 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の画像と 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。相関値の算出は、泳動パターンの長鎖部分（上部）、中鎖部分（中部）、短鎖部分（下部）に分け、electrophoregram のフィッティング処理を行った後、その相関係数をそれぞれ算出した。

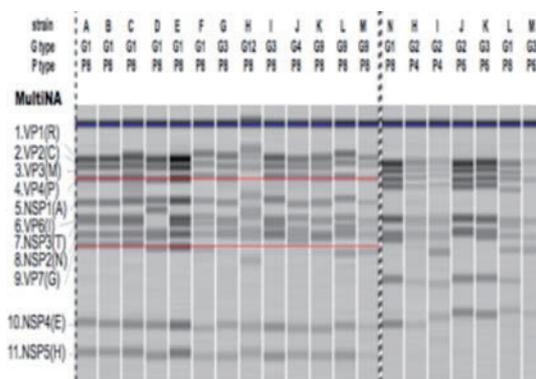
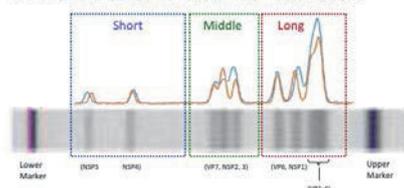
### C. 研究結果および考察

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（図 1）。そこで、この特長を生かし、上部、中部、下部の 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（図 2-1, -2）。

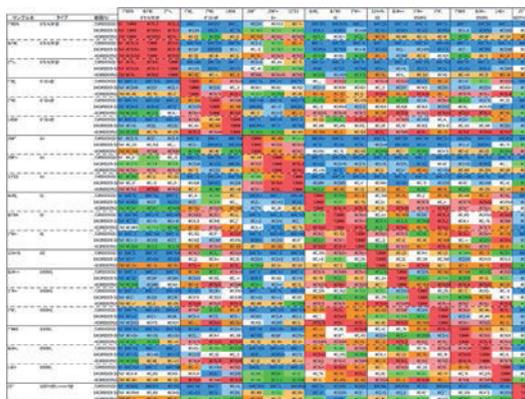
#### Fitting Process

- The wave is divided into three regions (short, middle and long regions).
- The weighted average of correlation factors of three regions is calculated and used as the **similarity index**.

$$\text{Similarity index} = [(\text{CF}(s) \times 1) + (\text{CF}(m) \times 1.5) + (\text{CF}(l) \times 0.5)] / 3$$



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、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。



上記表（図 3）には、一致度が高い法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。左上部から右下部にかけての対角線上に暖色系（特に赤の頻度が高い）ことが分かる。つまり、同じサンプルは、アッセイ間変動が多少存在しても高い相関係数を示した。逆に、異なる株は寒色系（青色）の頻度が高くなる。

次に、実際の疫学調査で得られた検体をこの解析方法で解析し、蓄積した標準株と照合することでタイピングを行った(図 4)。

#### Trial of rotavirus typing system using MultiNA

- MultiNAおよびPAGEの遺伝子型別検出率

Genotype	No. of Samples	Detection rates	
		MultiNA	PAGE
Total	100	73 (73%)	78 (78%)
G1(Wa)	34	27 (79%)	29 (85%)
G1(D5-1)	28	18 (64%)	20 (71%)
G2	10	8 (80%)	8 (80%)
G3	3	3 (100%)	2 (67%)
G9	25	17 (68%)	19 (76%)

- MultiNAの検出感度はPAGEと同程度

全 100 検体のロタウイルス陽性サンプルは、全ゲノム塩基配列を次世代シーケンサーによってあらかじめ決定した。このシーケンスデータの基づきあらかじめ遺伝子型を決定した。MultiNA と PAGE の検出率は、シーケンスデータに基づいて決定された遺伝子型との一致率を示す。図 4 の結果から、MultiNA による遺伝子型分類正解率は、RNA-PAGE よりも若干劣っていた。しかし、RNA-PAGE では、PAGE のアッセイ間比較が非常に困難である事、ラボ間比較はほぼ不可能に近いことを考慮すると、これらを全て On line で可能とする MultiNA を用いた株判定システムの正解率は、十分に実用化できるレベルであると評価できる。特に、GP タイピングで G1P[8]と判定される DS-1 like G1P[8]の判定的中率が 60%を超えて

いるのは、高く評価できる。また、本システムの場合、標準株、既報の株に一致しないパターン、つまり新しい遺伝子型の可能性がある場合、Not assigned (NA) と表示されるため、新型の流行をいち早く感知できるメリットがある。また、A 群ロタウイルスだけではなく、それ以外の B 群、C 群と他ウイルスに対しても、理論上判定が可能であるというメリットがある。

このようにして、MultiNA による electrophoregram データを用いて、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、株分けを行うソフトウェア開発に成功した。来年度は、ベータバージョンを GatVirusWeb に搭載し、関西地区の MultiNA を保有する衛生研究所の協力を受け、プレランテストを実行する予定である。

## E. 結論

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生じず、RNA-PAGE との比較においても、良好な成績を示した。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、異なる施設間における結果も安定しており、ベータバージョンでのプレランに値する。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表 (英文)

1. Sato J, Miki M, Kubota H, Hitomi J, Tokuda H, Takai-Todaka R and Katayama K. Effects of disinfectants against norovirus virus-like particles predict norovirus inactivation. *Microbiol Immunol* 60, 609-616, 2016.
2. Matsushima Y, Shimizu T, Ishikawa M, Komane A, Okabe N, Ryo A, Kimura H, Katayama K, and Shimizu H. Complete Genome Sequence of a Recombinant GII.P16-GII.4 Norovirus Detected in Kawasaki City, Japan, 2016. *Genome Announcements*, vol. 4 (5) e01099-16, 2016.
3. Haga K, Fujimoto A, Takai-Todaka R, Miki M, Doan Y. H, Murakami K, Yokoyama M, Murata M, Nakanishi A, and Katayama K. Functional receptor molecules CD300lf and CD300ld enable murine norovirus to internalize into host cells. *PNAS* 2016 Oct 11;113(41):E6248-E6255.
4. Kobayashi M, Matsushima Y, Motoya T, Sakon N, Shigemoto N, Okamoto-Nakagawa R, Nishimura K, Yamashita Y, Kuroda M, Saruki N, Ryo A, Saraya T, Morita Y, Shirabe K, Ishikawa M, Takahashi T, Shinomiya H, Okabe N, Nawasawa K, Suzuki Y, Katayama K, Kimura H. Molecular evolution of the capsid gene in human norovirus genogroup II. *Sci Rep.* 2016 Jul 7;6:29400. doi: 10.1038/srep29400.
5. Noguchi A, Ito H, Miura S, Fujii Y, Katayama K, Nakagomi T, Nakagomi O, Takahashi T. Regional variations in the incidence of rotavirus hospitalizations between children living in defined regions of Akita and Kyoto prefectures, Japan. DOI; 10.7883/yoken. *Jpn J Infect Dis.* 2016 Jun 30. [Epub ahead of print]
6. Suzuki Y, Doan H. Y., Kimura H, Shinomiya H, Shirabe K, Katayama K. Predicting genotype compositions in norovirus seasons in Japan. *Microbiol and Immunol.* 60, 418-426, 2016.
7. Doan HY, Haga K, Fujimoto A, Fujii Y, Takai-Todaka R, Oka T, Kimura H, Yoshizumi S, Shigemoto N, Okamoto-Nakagawa R, Shirabe K, Shinomiya H, Sakon-Tanaka N, and Katayama K. Genetic analysis of human rotavirus C: the appearance of Indian-Bangladeshi strain in Far East Asian countries. *Infect Genet Evol.* 2016 Apr 9;41:160-173. doi: 10.1016/j.meegid.2016.03.027. [Epub ahead of print]
8. 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.

9. 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.

#### 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 28 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。本年度は過去三年間で倍増したデータに対応し、今後搭載されるロタウイルスのパターンフィッティングソフトウェアへの対応へも対応するため、サーバー環境の刷新を行った。

## 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ロードしつつ、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を構築することを目的とする。本年度は過去三年間で倍増したデータに対応し、今後搭載されるロタウイルスのパターンフィッティングソフトウェアへの対応へも対応するため、サーバー環境の刷新を行う。

## 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搭載を行い、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、

登録	総	数
	46,216	
	62,648	97,035
Norovirus	16,696	
	20,192	31,272
Sapovirus	2,543	
	3,094	3,911
Lagovirus	994	
	1,154	1,557
Vesivirus	1,442	
	1,485	1,672
Rotavirus	25,891	
	38,023	58,623
	2013年1月29日	2014年6月2日
	2016年1月10日	

- ・ 3年間で約2倍に増加。
- ・ 登録されたデータのうち、重複するものがあつたため、確認の上削除。重複登録データは約2000（重複の原因はDDBJの不具合によるものも含む）

### ② OS (Ubuntu Linux) の大幅バージョンアップによる GatVirusWeb 不具合への対応（新サーバへの移行を含む）

- ・ 2016年7月にサーバのOSとして

利用している Ubuntu Linux のバージョンアップにより、GatVirusWeb のシステムに大幅な不具合、一部データーの消失などに対応

- ・ GatVirusWeb 上で電気泳動画像の解析の可能性を図るため、Linux のみではなく Windows サーバ同時に稼働する仮想複数サーバ導入に向け作業中（現在作業中）

③ リンク集に NoroNet (<http://www.rivm.nl/en/Topics/N/NoroNet>) とのリンクを作成。これによって GatVirusWeb と情報の国際的相互利用が可能となった。

④ 系統樹作成支援サービスの動作安定性を確認、インターフェースなどを整備し、公開した。

1. 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変更。これまで 0～、100～、250～、500～、1000～、2000～、3000～、5000bp～の大ざっぱな検索条件であったものを、0～、50～、100～、200～、、、と 100bp 単位で、1000bp 以上のデータも 1000bp 単位で絞り込みを可能とした。

2. ウイルスデータベースのデータ保存方法の変更

これまでは、データベースへ登録されるデータは、accession ナンバー、塩基配列数など、最小限にとどめ、実際の塩基配列データを

表示するには、その都度 DDBJ からデータをダウンロードしてきた。これによって、サーバの CPU、ディスク容量負荷の減少を可能としていた。今年度から、登録データはすべて GatVirusWeb のサーバにダウンロードして保存したものを利用する方式に変更した。新しく登録されたデータのダウンロードは、毎日、新規登録データをチェックする際、同時にダウンロードおよび保存されるようにプログラムを変更した。この変更によって塩基配列データ表示のためのデータ転送のボトルネックが解消され、④-3 に示す、大量のデータ表示も可能となった。

3. ウイルスデータベースの検索結果から一度に複数の塩基配列を表示されるシステムを実装、公開した。

これまでウイルスデータベースの検索結果では、個々の accession ナンバーをクリックすることによって、DDBJ に登録されたデータを表示することが可能であった。実際にこのデータは複数の標準とされる塩基配列と比較することによってはじめて意味のあるものとなる。このため、Select のチェックボックスで複数選択し、続けて Get\_sequences ボタンをクリックすることで、必

要な塩基配列を同時にすべて入手可能となるようにプログラムを変更した。これは④-2の「ウイルスデータベースのデータ保存方法の変更」によってはじめて可能となったものである。

なし

- ⑤ ロタウイルスの MultiNA チップ型自動電気泳動装置を用いた全ゲノムセグメント遺伝子型分別システムを構築に成功し、プログラムソフトウェアのウェブ搭載、地研とのネットワークシステムによる簡便な遺伝子型分別のテストランを開始した。
- ⑥ 電気泳動画像データのオンライン解析の可能性を検討開始。

#### E. 結論

下痢症ウイルス塩基配列データベースの環境整備とサーバー環境の大幅な改良により、操作性が増したとともに、データキャパシティの大幅なアップを達成した。NoroNet とのリンクにより、Norovirus typing tool の利用が可能となった。ロタウイルスの MultiNA チップ型自動電気泳動装置を用いた全ゲノムセグメント遺伝子型分別システムを構築に成功し、プログラムソフトウェアのウェブ搭載、地研とのネットワークシステムによる簡便な遺伝子型分別のテストランを開始した。

#### 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