

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）
「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 29 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・北里大学北里生命科学研究所・感染制御科学府ウイルス感染
制御学、ウイルス感染制御学 I
研究協力者 藤井克樹・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、昨年度に完成を見たマイクロチップ電気泳動装置 MultiNA によるロタウイルス遺伝子型判定プログラムの β テストを実施した。

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マイクロチップ電気泳動装置MultiNAと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が完了した。本年度は型判別システムのパブリックβテストを行い、システムの稼働とその精度の確認を行った。

B. 研究方法

研究協力者の所有するロタウイルス陽性便検体を用いてMultiNAとバンドパターンによる流行株分類法を検証した。検体は、A地域より22検体、B地域より9検体、C地域より20検体の合計51検体を用いてβテストランを行った。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を昨年度構築したソフトウェアに転送し、型判別を行った。

C. 研究結果および考察

A 地域の 22 検体中 16 検体からロタウイルスの遺伝子パターンが検出され、検出率は 72.7%であった。そのうち、シーケンスで確認された遺伝子型の正答率は 62.5%であった。B 地域の 9 検体中 6 検体からロタウイルスの遺伝子パターンが検出され、検出率は 66.7% 正答率 100%であった。以下同様に C 地域の 20 検体中検出されたのは 12 検体、検出率 60%、遺伝子型の正答率 33.3%であった。この 3 地域をまとめると、総検体数 51 検体の 34 検体からロタウイルスを検出し、検出率は 66.7%、遺伝子型の正答率は 58.8%であった。以下に正答率のばらつきの理由を調べるため、シーケンスによって確認した遺伝子型別の正答率をまとめた。

MultiNA タイピング法のテスト

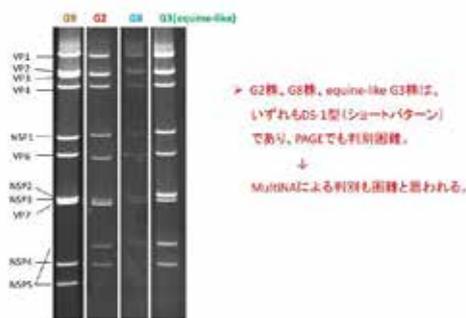
遺伝子型	検体数	正答数	(正答率)	備考
G1	7	6	(85.7%)	
G2	9	9	(100.0%)	
G9	4	4	(100.0%)	
G3(Wa)	8	1	(12.5%)	ハズレは全て G9 判定
G3(DS-1)	3	0	(0.0%)	全て G2 判定
G8	2	0	(0.0%)	全て G2 判定
Total	34	20	(58.8%)	

- ▶ 従来型の G3(Wa 型)は標準株の再検討で対応可能かもしれない。
- ▶ 近年流行し始めた equine-like G3(DS-1 型)は全て G2 判定となる。
- ▶ G8(DS-1 型)も標準株が存在せず全て G2 判定となる。

G1, G2, G9 など、基準泳動パターンのある遺伝子型の正答率は高かった。しかし、G3 セグメントを有する Wa ベースの遺伝子型は 8 例中 7 例が G9 型と判定されていた。G3 セグメントを有する DS-1 ベースの遺伝子型 3 例と、G8 セグメントを有する 3 例は、全て G2 と判定されていた。これらのうち、G3 セグメントを有する Wa ベースの遺伝子型は、基準泳動パターンが薄く不明瞭であったため、基準泳動パターン供給に用いる株（つまり、レファレンス株）を再検討することで対応が可能だと思われた。また、G8(DS-1 ベース)は、基準泳動パターンが無かったため、パターンの類似した G2 と判定されたと思われた。従って、G8(DS-1 ベース)株のレファレンス株を設定し、基準泳動パターンを供給することで、正しい判定ができるようになると思われた。

しかし、2 年ほど前から流行しはじめた G3 セグメントを有する DS-1 ベースの遺伝子型は、高解像度の RNA-PAGE を行った場合でも、バンドパターンで判別することが困難であった（一番右のレーン G3(equine like)株）。そのため、MultiNa を用いた本システムで型判定はできないと考えられた。

PAGEバンドパターンの比較



各地域のユーザーのコメントからは、全ゲノムセグメントを対象とした遺伝子型分類が、自動電気泳動後に、泳動パターンをウェブページ上のソフトウェアに送るだけである程度の精度をもって可能とする本システムについて、実用性はありそうとの回答を得ることができた。

現在、地方衛生研究所には MultiNa システムを有する研究所が多く、特殊な知識や技術が無くても、ロタウイルスの全ゲノムセグメントを対象とした簡易的な遺伝子型分類が可能

なウェブサイトは、ロタウイルスの疫学調査の底上げに十分対応可能だと考えられた。

E. 結論

MultiNA の 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、流行しているロタウイルスが、他の地域で流行しているロタウイルスと同じなのか、異なるのかをパターンをサーバーに送るだけである程度判別可能な本ウェブサイトは、ハードルの高かったロタウイルスの全ゲノムセグメントを対象とした分子疫学の底上げにつながる。また、今まで検出不可能であった食中毒事件の原因に成り得る C 群ロタウイルスの検出と鑑別にも対応可能な本システムの有用性は高い。引き続き β テストを続け小規模な改良を加え、来年度終了前には一般公開に踏み切りたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表 (英文)

1. Nagasawa K, Matsushima Y, Motoya T, Mizukoshi F, Ueki Y, Sakon N, Murakami K, Shimizu T, Okabe N, Nagata N, Shirabe K, Shinomiya H, Suzuki W, Kuroda M, Sekizuka T, Suzuki Y, Ryo A, Fujita K, Onishi K, **Katayama K**, Kimura H. Genetic Analysis of Human Norovirus Strains in Japan in 2016–

2017. *Front. Microbiol.*, 18 January 2018 doi: 10.3389/fmicb.2018.00001. eCollection 2018.

2. Motoya T, Nagasawa K, Matsushima Y, Nagata N, Ryo A, Sekizuka T, Yamashita A, Kuroda M, Morita Y, Suzuki Y, Sasaki N, **Katayama K**, Kimura H. Molecular Evolution of the *VP1* Gene in Human Norovirus GII.4 Variants in 1974-2015. *Front Microbiol.* 2017 Dec 5;8:2399. doi: 10.3389/fmicb.2017.02399. eCollection 2017.
3. Nagasawa K, Matsushima Y, Motoya T, Mizukoshi F, Ueki Y, Sakon N, Murakami K, Shimizu T, Okabe N, Nagata N, Shirabe K, Shinomiya H, Suzuki W, Kuroda M, Sekizuka T, Ryo A, Fujita K, Oishi K, **Katayama K**, Kimura H. Phylogeny and Immunoreactivity of Norovirus GII.P16-GII.2, Japan, Winter 2016-17. *Emerg Infect Dis.* 2018 Jan;24(1):144-148. doi: 10.3201/eid2401.170284.
4. Kuroda M, Masuda T, Ito M, Naoi Y, Doan YH, Haga K, Tsuchiaka S, Kishimoto M, Sano K, Omatsu T, Katayama Y, Oba M, Aoki H,

- Ichimaru T, Sunaga F, Mukono I, Yamasato H, Shirai J, **Katayama K**, Mizutani T, Oka T, Nagai M. Genetic diversity and intergenogroup recombination events of sapoviruses detected from feces of pigs in Japan. *Infect Genet Evol.* **2017** Nov;*55*:209-217. doi: 10.1016/j.meegid.**2017**.09.013. Epub **2017** Sep 18.
5. Utsumi T, Lusida MI, Dinana Z, Wahyuni RM, Yamani LN, Juniastuti, Soetjipto, Matsui C, Deng L, Abe T, Doan YH, Fujii Y, Kimura H, **Katayama K**, Shoji I. Occurrence of norovirus infection in an asymptomatic population in Indonesia. *Infect Genet Evol.* **2017** Nov;*55*:1-7. doi: 10.1016/j.meegid.**2017**.08.020. Epub **2017** Aug 24.
6. Doan YH, Suzuki Y, Fujii Y, Haga K, Fujimoto A, Takai-Todaka R, Someya Y, Nayak MK, Mukherjee A, Imamura D, Shinoda S, Chawla-Sarkar M, **Katayama K**. Complex reassortment events of unusual G9P[4] rotavirus strains in India between 2011 and 2013. *Infect Genet Evol.* **2017** Oct;*54*:417-428. doi:10.1016/j.meegid.**2017**.07.025. Epub **2017** Jul 25.
7. Kitamoto T, Takai-Todaka R, Kato A, Kanamori K, Takagi H, Yoshida K, **Katayama K**, Nakanishi A. Viral population changes during murine norovirus propagation in RAW 264.7 cells *Front Microbiol.* **2017** Jun *15*:8:1091. doi: 10.3389/fmicb.2017.01091. eCollection **2017**.
8. Kondo K, Tsugawa T, Ono M, Ohara T, Fujibayashi S, Tahara Y, Kubo N, Nakata S, Higashidate Y, Fujii Y, **Katayama K**, Yoto Y, Tsutsumi H. Clinical and Molecular Characteristics of Human Rotavirus G8P[8] Outbreak Strain, Japan, 2014. *Emerg Infect Dis.* **2017** Jun;*23*(6):968-972. doi: 10.3201/eid2306.160038.
9. Mizukoshi F, Nagasawa K, Doan YH, Haga K, Yoshizumi S, Ueki Y, Shinohara M, Ishikawa M, Sakon N, Shigemoto N, Okamoto-Nakagawa R, Ochi A, Murakami K, Ryo A, Suzuki Y, **Katayama K**, Kimura H. Molecular Evolution of the RNA-Dependent RNA Polymerase and Capsid Genes of

Human Norovirus Genotype GII.2
in Japan during 2004-2015.
Front Microbiol. 2017 Apr
25;8:705. doi:
10.3389/fmicb.2017.00705.
eCollection 2017.

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 29 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&配列検索システムを新サーバーシステムに移行した。これにより、NoroNet norovirus genotyping system へのリンク追加後の、データ量の急増と操作速度向上を実現した。さらにロタウイルスでは、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ソフトの搭載を実現し、本システムの β テストを開始した。

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のは難しい。昨年実装した、オートパイロットシステムの速度アップと、インターフェースの改良、NoroNet(国際標準のノロウイルスタイプングツールを搭載するウェブサイト・ノロウイルスの遺伝子型はここで決定されている。新規遺伝子型の報告、承認、遺伝子番号交付を行っている。)とのリンク、インターフェースの改良は、作業効率を大幅にアップさせた。今年度は、サブデータバンクをサーバー内部に構築し、これを毎日自動更新することで、DDBJサーバー依存であった検索速度を改善することを目的として、OSの見直しを図った。さらに、新規に開発されるロタウイルス遺伝子型分類ソフトウェアを搭載し、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立ち上げを目的として活動した。

C. 研究結果および考察

【新サーバへの移行】

- 仮想サーバの導入により、データ保護、悪意のあるハッキングなどへの対応が可能となった。

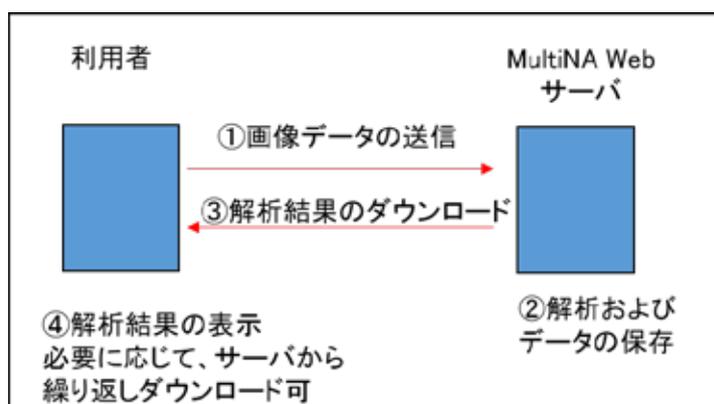
【ウイルスデータベース登録数】

	2017年 12月3 日現在	2017 年 1月 10日	2014 年 6月2 日
総登録数	107,953	97,035	62,648
Norovirus	35,472	31,272	20,192
Sapovirus	4,157	3,911	3,094
Lagovirus	1,824	1,557	1,154
Vesivirus	1,747	1,672	1,485
Rotavirus	65,987	58,623	38,023

【MultiNAWeb サーバの構築】

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、現在、デザインを含む公開用 WEB サーバ（仮称：MultiNAWeb サーバ）の最適化を検討中。2018年3月までに終了予定。

MultiNAWeb サーバの概念図



MultiNAWeb サーバの画面例

ログイン画面



ユーザー利用画面



解析結果ダウンロード画面

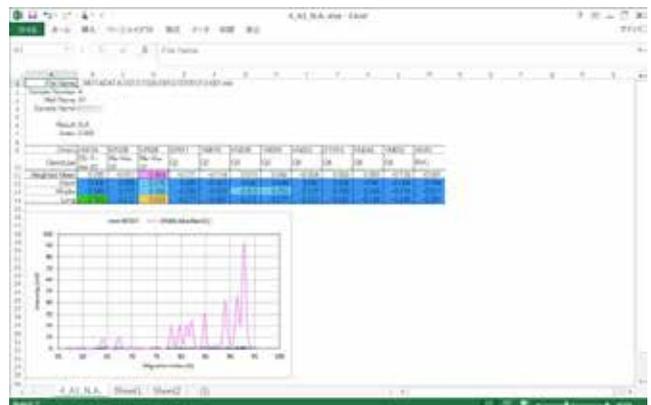


(zip 形式でダウンロード)

ダウンロードしたサンプル解析結果



データを Excel 形式に変換



①

E. 結論

ここから画像データをアップロードする

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

なし