

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 27-29 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。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、RV 流行株を広範かつ簡便に調査するシステムを構築した。最終年度には、完成し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  $\beta$  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。本研究では、マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA を用いたバンドパターンを利用し、株判別を行うシステムの総合的な開発を目指した。最終年度には、完成したマイクロチップ電気泳動装置 MultiNA を用いた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

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。

最終年度のβテストは、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。

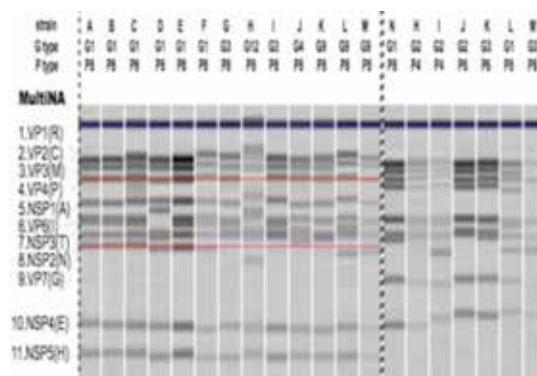
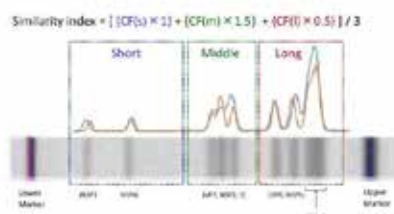
### C. 研究結果および考察

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

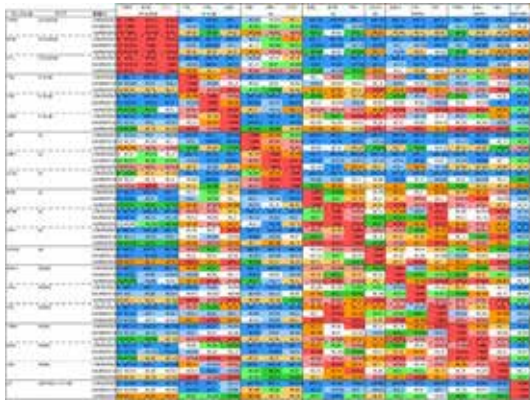
bp)、NSP5 (665 or 820 bp) は下部に互いに独立した 2 本のバンドとして検出された（図 1）。そこで、この特長を生かし、上部、中部、下部の 3 箇所に分けて、相対移動度だけでは無く、画像と electrophoregram（泳動波形とピーク位置が示されたグラフ）の蓄積を行った（図 2-1, -2）。

#### 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.



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有り、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	116	73 (73%)	78 (78%)
G1[Wa]	34	27 (79%)	29 (85%)
G3[PS-1]	29	18 (64%)	20 (73%)
G3	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。

以下、最終年度に実施した  $\beta$  テストの結果と考察を示す。

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

遺伝子型別の正答率			
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	3	0 (0.0%)	全てG2判定
Total	34	20 (58.8%)	

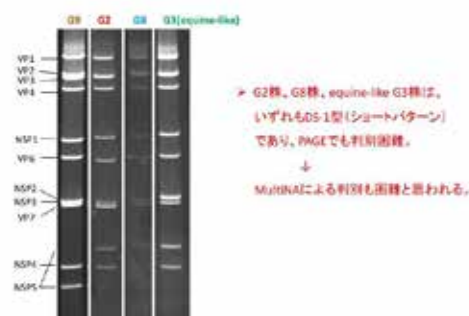
- ▶ 従来のG3(Wa型)は標準株の再検討で対応可能かもしれない。
- ▶ 近年流行し始めたequine-like G3(DS-1型)は全てG2判定となる。
- ▶ G3(DS-1型)も標準株が存在せず全てG2判定となる。

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  $\beta$  テストを続け小規模な改良を加え、来年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**.
10. Akagami M, Ito M, Niira K, Kuroda M, Masuda T, Haga K, Tsuchiaka S, Naoi Y, Kishimoto M, Sano K, Omatsu T, Aoki H, Katayama Y, Oba M, Oka T, Ichimaru T, Yamasato H, Ouchi Y, Shirai J,

- Katayama K**, Mizutani T, Nagai M. Complete genome analysis of porcine kobuviruses from the feces of pigs in Japan. *Virus Genes*. 2017 May 8. doi: 10.1007/s11262-017-1464-9. [Epub ahead of print]
11. Sato H, Yokoyama M, Nakamura H, Oka T, **Katayama K**, Takeda N, Noda M, Tanaka T, Motomura K. Evolutionary Constraints on the Norovirus Pandemic Variant GII.4\_2006b over the Five-Year Persistence in Japan. *Front Microbiol*. 2017 Mar 13;8:410. doi: 10.3389/fmicb.2017.00410. eCollection 2017.
  12. Ito M, Kuroda M, Masuda T, Akagami M, Haga K, Tsuchiaka S, Kishimoto M, Naoi Y, Sano K, Omatsu T, Katayama Y, Oba M, Aoki H, Ichimaru T, Mukono I, Ouchi Y, Yamasato H, Shirai J, **Katayama K**, Mizutani T, Nagai M. Whole genome analysis of porcine astroviruses detected in Japanese pigs reveals genetic diversity and possible intra-genotypic recombination. *Infect Genet Evol*. 2017 Jun;50:38-48. doi: 10.1016/j.meegid.2017.02.008. Epub 2017 Feb 9.
  13. Hayashi-Miyamoto M, Murakami T, Minami-Fukuda F, Tsuchiaka S, Kishimoto M, Sano K, Naoi Y, Asano K, Ichimaru T, Haga K, Omatsu T, Katayama Y, Oba M, Aoki H, Shirai J, Ishida M, **Katayama K**, Mizutani T, Nagai M. Diversity in VP3, NSP3, and NSP4 of rotavirus B detected from Japanese cattle. *Infect Genet Evol*. 2017 Apr;49:97-103. doi: 10.1016/j.meegid.2017.01.003. Epub 2017 Jan 4.
  14. Matsushima Y, Shimizu T, Ishikawa M, Komane A, Okabe N, Ryo A, Kimura H, **Katayama K**, Shimizu H. Complete Genome Sequence of a Recombinant GII.P16-GII.4 Norovirus Detected in Kawasaki City, Japan, in 2016. *Genome Announc*. 2016 Oct 6;4(5). pii: e01099-16. doi: 10.1128/genomeA.01099-16.
  15. Sano K, Naoi Y, Kishimoto M, Masuda T, Tanabe H, Ito M, Niira K, Haga K, Asano K, Tsuchiaka S, Omatsu T, Furuya T, Katayama Y, Oba M, Ouchi Y, Yamasato H, Ishida M, Shirai J, **Katayama K**, Mizutani T, Nagai M. Identification of further diversity among posaviruses. *Arch*



- Viol. 2016 Dec;161(12):3541-3548.  
Epub 2016 Sep 12.
16. 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.
  17. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 11;113(41):E6248-E6255., 2016.
  18. 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.
  19. 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] impact factor 1.14
  20. 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.
  21. 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]

22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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]
26. 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 Mar 15;185:62-7. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.02.005. Epub 2016 Feb 10.
27. 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.
28. 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]
29. 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]
30. 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]
31. 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.
32. 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]
33. 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.

#### 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 27-29 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、開発を行った。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  $\beta$  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。三年間にわたる研究の最終目標として、世界三大データベースのオートパイロットシステムと、速度アップと、GatVirusWebの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。)とのリンク作成、などによる、作業効率アップを目標とした。最終年度には、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サーバー依存性であった検索速度を改善することも目的とした。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て上げに挑んだ。

## C. 研究結果および考察

### 【新サーバーへの移行】

- 仮想サーバーの導入により、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。

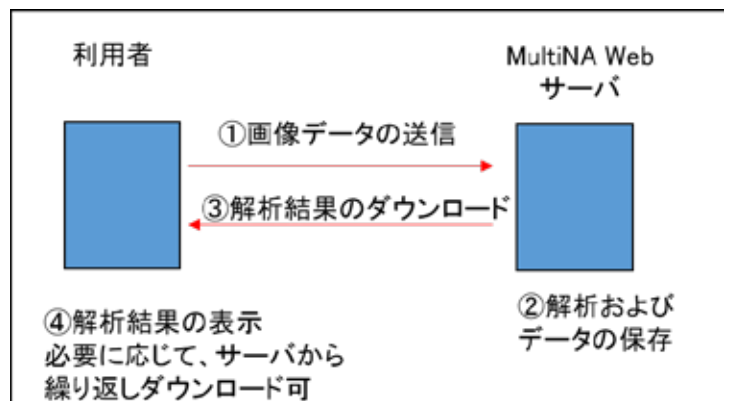
### 【ウイルスデータベース登録数】

	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）の最適化を行った。

### 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

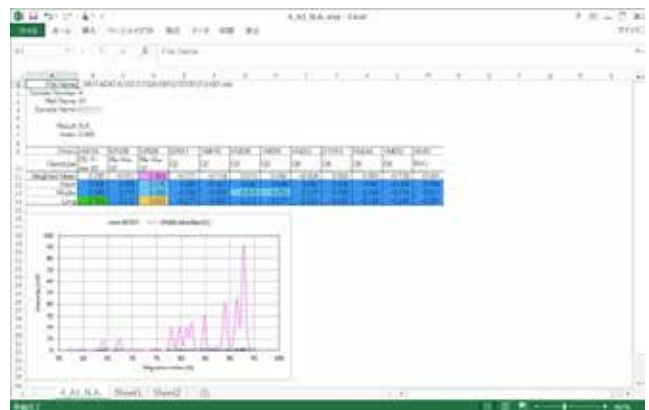


(zip 形式でダウンロード)

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。さらに、データキャパシティの大幅なアップも達成した。NoroNet とのリンクにより、国際標準法として認識されている 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パブリック  $\beta$  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