

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 9 月 7 日現在

機関番号：84407

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19874

研究課題名(和文) 包括的ゲノム解析によるノロウイルス新変異株の河川水と患者における早期検出系の構築

研究課題名(英文) Retrospective surveillance of wastewater to examine seasonal dynamics of norovirus infection

研究代表者

本村 和嗣 (MOTOMURA, KAZUSHI)

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・微生物部・課長

研究者番号：60450558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：自然環境(下水)および自然環境周辺に位置するヒト集団における集団食中毒事例について、ノロウイルスのゲノム解析情報を収集し、遺伝子型の分布状況や動態について解析した。初年度は、迅速かつ簡便な解析プログラムを作成し、2009年に発生したノロウイルスGII陽性食中毒事例の準種解析を行った。二年度は、ノロウイルスGI陽性食中毒事例を対象にし、GIもGII同様、個体内で複数の遺伝子型が混合感染していることがわかった。最終年度は、食中毒事例が発生した近くにある下水処理場から採取された下水試料の解析を行い、下水環境中の遺伝子型分布と一致し、ほぼ同時期にヒト集団内に存在していることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自然環境(下水)の解析について関係当局と調整していたが協力を得られ、食中毒事例が発生した時期に採取され、場所が近い下水検体を用いて解析した。2009年11月から2011年5月までに採取された、GI 10検体、Group I I(GII) 15検体、計25検体について、MiSeq (illumina社)を用いて、網羅的に塩基配列を収集した。しかし、最終年度(昨年度)は、新型コロナウイルス感染症の検査対応のため、2009年12月、2010年1月、3月のGIの解析のみしか準種解析をできなかった。早急に、残りの検体の準種解析を実施し、自然環境、ヒト個体、ヒト集団内に存在する遺伝子型の動態を解析する。

研究成果の概要(英文)：Multiple norovirus (NoV) genotypes are widespread in the natural environment. To understand the dynamics of NoV genotypes in sewage water and single patient in Osaka, we conducted a genome analysis using a new generation sequencer. The high-throughput data from 10,000 to 77,000 reads per specimen were analyzed, and their phylogenies were analyzed using the capsid N-terminal/shell coding region containing 300bps. First year, we constructed a rapid program for analysis of quasispecies. We analyzed the food-borne cases caused by GII norovirus in the first year, and GI norovirus in the second year. The final year we analyzed the sewage water and compared with the dynamics of genotypes, indicating that the distribution of genotypes are consistent with patients and sewage water collected at same time and close place.

研究分野：感染症学

キーワード：ノロウイルス 準種解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ノロウイルスの実験動物モデルや細胞増殖系の開発は進んでいるが費用が高く、ウイルス学的研究は制約を受けて進んでいない。ウイルスの生活環の理解のためには、先端のゲノム解析技術、計算科学的手法、情報生物学を用いて、科学的知見に基づく配列情報を蓄積し解析が重要である。ノロウイルスは、2006-2007年、2012-2013年に、世界中で大流行を引き起こした<sup>(1-3)</sup>。自然環境、生活環境中に普遍的に存在し、物理的に安定性が高く、大変、感染力が強い。よって、人の密集する閉鎖空間で集団食中毒が頻繁に発生し、その結果、甚大な被害をもたらす。現代社会は、航空機、車、電車などの輸送網や経済網が高度に発達している。ヒトノロウイルスに汚染された物資やヒトが移動することで、国内はもとより大陸を超えて感染拡大が示唆される。我々は、日本における新型変異株ノロウイルスの出現による流行への注意監視のため、臨床検体や下水などの環境検体より、ノロウイルス感染症の新型変異株の早期検出を試みたい。本研究では、レトロスペクティブな視点から、食中毒事例の患者糞便試料の解析、および、同地域にある下水試料の解析を実施した。

## 2. 研究の目的

ノロウイルス流行株予測のため、次世代型ゲノム解析装置を用いて、自然環境(河川、下水)および、自然環境周辺に位置するヒト集団の(集団食中毒事例や無症候感染事例)ノロウイルスのゲノム解析情報を収集する。自然環境、ヒト個体、ヒト集団内に存在する新変異株の検出を行う。これらの情報は、ノロウイルスのヒト集団における集団発生予測の基盤情報になることが期待される。最終的に、この基盤的研究を進展させることにより、流行監視、制御法(ワクチン)開発への応用が期待される。

## 3. 研究の方法

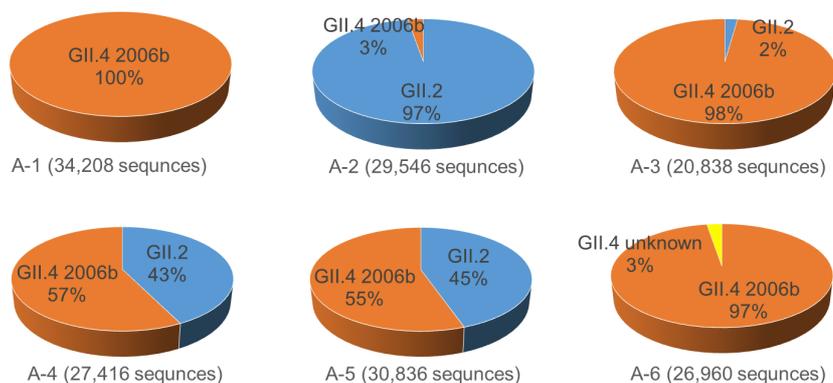
大阪府内で発生した2件の食中毒事例(2010年1月と2012年3月)を対象とした。糞便試料からのウイルスRNAの抽出については、糞便試料にPBS(-)を加え10%懸濁液を作成し、11,000×g、20分間遠心の後、その上清をRNA抽出用検体とした。この遠心上清より、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を用いて、ノロウイルスRNAを抽出する。処理前の下水試料は、濃縮後、上記と同様に、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を用いてノロウイルスRNA抽出する。逆転写反応後、ノロウイルス Group I (GI)と Group II (GII)、各々、カプシド遺伝子シエル領域(300bps)をPCRで増幅した。次世代型ゲノム解析装置は、MiSeq (illumina社)を用いて、遺伝子増幅産物の配列情報を取得した。準種解析には、当初、既存の配列解析プログラムを用いて亜株、遺伝子型の頻度を調べたが<sup>(4)</sup>、新しく改良化された配列解析プログラムも用いた。下水試料の解析は、2009年11月から2011年6月までに採取された処理前の下水試料(15回分)を対象とした。クローニング法を用いて、遺伝子増幅産物をプラスミドに組み込んだ後、大腸菌よりプラスミドDNAを抽出し、サンガー法シーケンスにて塩基配列を解析した。

## 4. 研究成果

(1) 配列解析プログラムの改良とGIIノロウイルス食中毒事例の解析：  
2010年1月に大阪府内で発生した集団食中毒事例を対象として、様々な遺伝子型を検出する。汚染食材を介して、料理喫食者(n=6)と感染拡大した集団食中毒事例を対象とした。糞便試料を出発材料とし、ウイルスRNA抽出、逆転写反応後、カプシド遺伝子シエル領域(300bps)をPCR

で増幅した。今回は、MiSeq (illumina 社) を用いて、遺伝子増幅産物の配列情報を取得した。既存の配列解析プログラムと新しく簡便化した配列解析プログラムで亜株、遺伝子型の頻度を調べ比較した。(i) カプシド遺伝子シェル領域の配列情報(約  $8.0 \times 10^7$  塩基 / 6 検体)を取得した。(ii) シェル領域の遺伝系統が異なるウイルス亜集団の重感染は、6 検体中 4 検体で検出された。これは、両方のプログラムで同数であった。(iii) 本事例では、GII.4 2006b 株と GII.2 が検出されていた。(iv) 既存のプログラムでは、GII.2 は、個体内に集団(2.2- 97.3%)として、4 例で検出された(図 1)。新規のプログラムでは、個体内に集団(3.0- 97.0%)で、ほぼ、既存のプログラムと同数であることがわかった。

図 1 遺伝子型頻度解析結果(2009年\_事例A)

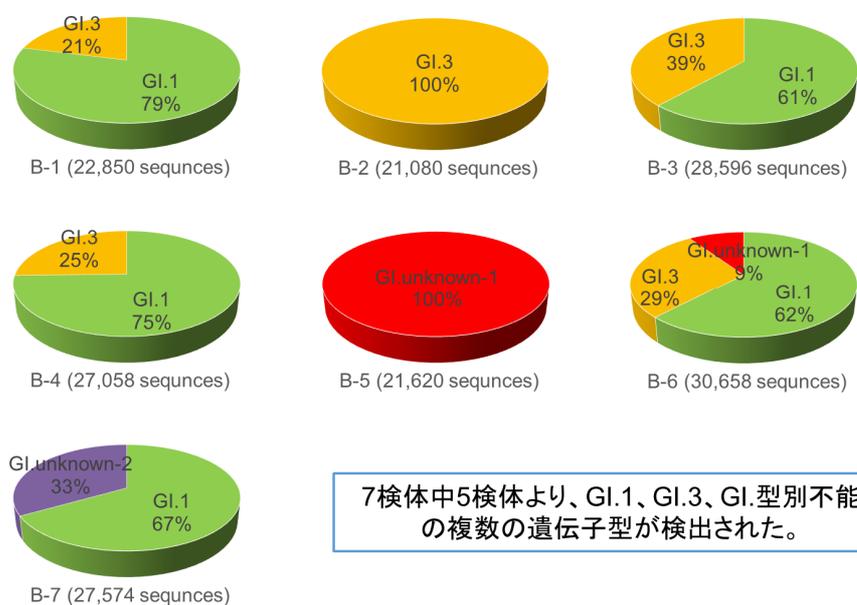


6検体中5検体より、GII.2とGII.4の複数の遺伝子型が検出された。

(2) 配列解析プログラムの改良と Group I (GI) ノロウイルス食中毒事例の解析:

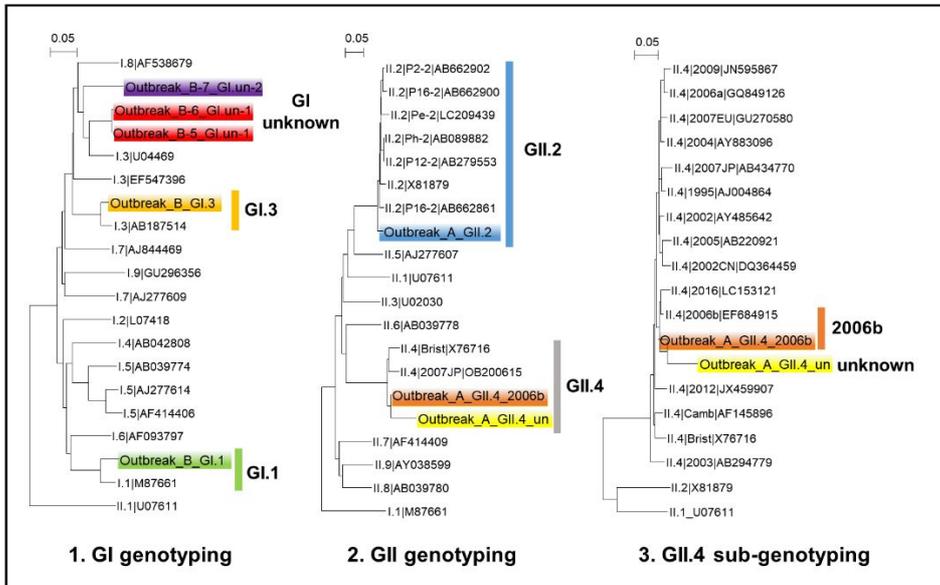
2012年3月に大阪府内で発生したノロウイルスGI陽性食中毒事例を対象に{料理喫食者(n=7)}とその解析プログラムを使用して調査した。糞便試料を出発材料とし、ウイルスRNA抽出、逆転写反応後、カプシド遺伝子シェル領域(300bps)をPCRで増幅した。今回は、MiSeq (illumina 社)を用いて、遺伝子増幅産物の配列情報を取得した。(i) 220,622 配列(約  $6.0 \times 10^7$  塩基)を対象とした。(ii)本事例では、7 検体中 5 検体より、GI.1、GI.3、GI.型別不能の複数の遺伝子型が検出された(図 2、図 3)。(iii)カキ等の二枚貝の喫食は確認されなかった。

図 2 遺伝子型頻度解析結果(2011年\_事例B)



7検体中5検体より、GI.1、GI.3、GI.型別不能の複数の遺伝子型が検出された。

1. NoV遺伝子系統樹解析(NJ法)



(3) クローニング法を用いた下水試料のノロウイルス GII の解析：

2009年11月、12月、2010年1月、2月、3月、4月、5月、11月、12月、2011年1月、2月、3月、4月、5月、6月に、食中毒事例が発生した近くにある下水処理場から採取された下水試料の解析を行った。濃縮された下水試料を出発材料とし、ウイルス RNA 抽出、逆転写反応後、GI と GII のカプシド遺伝子シエル領域 (300bps) を PCR で増幅した。クローニング法にて、サンガーシークエンス法を用いて、遺伝子型を決定した (表)。今回、次世代型ゲノム解析装置で解析した2010年1月の GII ノロウイルス食中毒事例 (図 1) の前に採取された下水試料 (2009年11月、12月) には、すでに GII.2 と GII.4 が存在していることがわかった。

表. クローニング法を用いた下水試料のノロウイルス GII 遺伝子型の推移

2009年		2010年						
11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	11月	12月
Norovirus Group II (GII)								
GII.2, 4	GII.2, 4, 6, 12	GII.2, 4, 12	GII.2, 6, 13	GII.1, 4	GII.4	GII.2, 4	GII.4	GII.4, 6

2011年					
1月	2月	3月	4月	5月	6月
Norovirus Group II (GII)					
GII.2, 4, 12, 14	GII.2, 5, 12	GII.2, 4, 12, 14, 17	GII.3, 6	GII.4, 6	GII.4, 7

本研究では、ノロウイルス GI と GII 陽性食中毒事例、および、下水試料の準種解析を行った。食中毒事例の遺伝子型の比率は、頻度が様々であった。喫食した食品汚染の度合い依存する可能性、また、宿主側の NoV 既感染歴に影響されると考えられる。ノロウイルス GI 陽性食中毒事例では、感染源が特定されなかったが、GI と GII で複数の遺伝子型が検出されており、NoV は遺伝子型群に関係なく、混合感染することが示唆された。NoV は、異なった遺伝子型の共感染により、キメラウイルスが新生すると考えられている。新流行株の新生の機序を考える上で、次世代型

ゲノム解析装置は有用であると考えている。下水試料には、2010年1月の食中毒事例(図1)より、2か月前の2009年11月にGII2とGII4が検出されており(表)、ヒト集団内ですでに存在していることがわかった。下水試料を経時的に追跡調査すると、ヒト集団で感染拡大しつつある流行株や新変異株の早期検出できる可能性が示唆された。現在、次世代型ゲノム解析装置で配列情報の収集は終了し、各遺伝子型の詳細な頻度、動向を解析するために、下水試料の準種解析を進めている。

## 引用文献

- (1) Motomura K., Oka T., Yokoyama M., et al. Identification of monomorphic and divergent haplotypes in the 2006-2007 norovirus GII/4 epidemic population by genomewide tracing of evolutionary history. *Journal of Virology* 82:11247-62 2008
- (2) Motomura K., Yokoyama M., Ode H., et al. Divergent evolution of Norovirus GII/4 by genome recombination over 2006-2009 in Japan. *Journal of Virology* 84:8085-97 2010
- (3) Motomura K., Boonchan M., Noda M., Tanaka T., Takeda N., and the Norovirus Surveillance Group of Japan. Norovirus epidemics caused by new GII.2 chimera viruses in 2012-2014 in Japan. *Infection, Genetics and Evolution* 42:49-52 2016
- (4) Boonchan M., Motomura K., Inoue K., et al. Distribution of norovirus genotypes and subtypes in river water by ultra-deep sequencing-based analysis. *Letters in Applied Microbiology* 65, 98-104. 2017

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kanbayashi Daiki, Kurata Takako, Nishino Yuka, Orii Fumi, Takii Yuki, Kinoshita Masaru, Ohara Toshitake, Motomura Kazushi, Yumisashi Takahiro	4. 巻 24
2. 論文標題 Rubella Virus Genotype 1E in Travelers Returning to Japan from Indonesia, 2017	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Emerging Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 1763 ~ 1765
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3201/eid2409.180621	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tacharoenmuang Ratana, Komoto Satoshi, Guntapong Ratigorn, Ide Tomihiko, Singchai Phakapun, Upachai Sompong, Fukuda Saori, Yoshida Yumika, Murata Takayuki, Yoshikawa Tetsushi, Ruchusatsawat Kriangsak, Motomura Kazushi, Takeda Naokazu, Sangkitporn Somchai, Taniguchi Koki	4. 巻 63
2. 論文標題 Characterization of a G10P[14] rotavirus strain from a diarrheic child in Thailand: Evidence for bovine-to-human zoonotic transmission	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Infection, Genetics and Evolution	6. 最初と最後の頁 43 ~ 57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.meegid.2018.05.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Boonchan Michitra, Guntapong Ratigorn, Sripirom Napas, Ruchusatsawat Kriangsak, Singchai Phakapun, Rungnobbakhun Pimpha, Tacharoenmuang Ratana, Mizushima Hiroto, Tatsumi Masashi, Takeda Naokazu, Sangkitporn Somchai, Mekmullica Jutarat, Motomura Kazushi	4. 巻 60
2. 論文標題 The dynamics of norovirus genotypes and genetic analysis of a novel recombinant GII.P12-GII.3 among infants and children in Bangkok, Thailand between 2014 and 2016	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Infection, Genetics and Evolution	6. 最初と最後の頁 133 ~ 139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.meegid.2018.02.028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamaguchi Takahiro, Kawahara Ryuji, Katsukawa Chihiro, Kanki Masashi, Harada Tetsuya, Yonogi Shinya, Iwasaki Satomi, Uehara Hirokazu, Okajima Saori, Nishimura Hiroshi, Motomura Kazushi, Miyazono Masaya, Kumeda Yuko, Kawatsu Kentaro	4. 巻 56
2. 論文標題 Foodborne Outbreak of Group G Streptococcal Pharyngitis in a School Dormitory in Osaka, Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Microbiology	6. 最初と最後の頁 23 ~ 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JCM.01884-17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mori Kohji, Motomura Kazushi, Somura Yoshiko, Kimoto Kana, Akiba Tetsuya, Sadamasu Kenji	4. 巻 89
2. 論文標題 Comparison of genetic characteristics in the evolution of Norovirus GII.4 and GII.17	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Medical Virology	6. 最初と最後の頁 1480 ~ 1484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jmv.24791	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Hironori, Yokoyama Masaru, Nakamura Hiromi, Oka Tomoichiro, Katayama Kazuhiko, Takeda Naokazu, Noda Mamoru, Tanaka Tomoyuki, Motomura Kazushi	4. 巻 8
2. 論文標題 Evolutionary Constraints on the Norovirus Pandemic Variant GII.4_2006b over the Five-Year Persistence in Japan	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 410 ~ 420
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2017.00410	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Boonchan M., Motomura K., Inoue K., Ode H., Chu P.Y., Lin M., Iwatani Y., Ruchusatsawat K., Guntapong R., Tacharoenmuang R., Chantaroj S., Tatsumi M., Takeda N., Sangkitporn S.	4. 巻 65
2. 論文標題 Distribution of norovirus genotypes and subtypes in river water by ultra-deep sequencing-based analysis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Letters in Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 98 ~ 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/lam.12750	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Guntapong R, Ruchusatsawat K, Suwannakan B, Panthasri N, Kittiwongsunthorn W, Chaichitwanitkul V, Chumpon K, Tacharoenmuang R, Singchai P, Upachai S, Boonchan M, Takeda N, Sangkitporn S, Motomura K	4. 巻 11
2. 論文標題 Molecular epidemiological study on norovirus infection in two distinct hospitals in northeastern Thailand, 2013-2015	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Southeastern Asian journal of tropical medicine and public health	6. 最初と最後の頁 1 ~ 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tacharoenmuang Ratana, Komoto Satoshi, Guntapong Ratigorn, Upachai Sompong, Singchai Phakapun, Ide Tomihiko, Fukuda Saori, Ruchusatsawast Kriangsak, Sriwantana Busarawan, Tatsumi Masashi, Motomura Kazushi, Takeda Naokazu, Murata Takayuki, Sangkitporn Somchai, Taniguchi Koki, Yoshikawa Tetsushi	4. 巻 92
2. 論文標題 High prevalence of equine like G3P[8] rotavirus in children and adults with acute gastroenteritis in Thailand	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Medical Virology	6. 最初と最後の頁 174 ~ 186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jmv.25591	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ueda Shuhei, Witaningrum Adiana Mutamsari, Khairunisa Siti Qamariyah, Kotaki Tomohiro, Motomura Kazushi, Nasronudin, Kameoka Masanori	4. 巻 9
2. 論文標題 Transmission dynamics of HIV-1 subtype B strains in Indonesia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13986
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-50491-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawahata Takuya, Kojima Yoko, Furubayashi Keiichi, Shinohara Koh, Shimizu Tsunehiro, Komano Jun, Mori Haruyo, Motomura Kazushi	4. 巻 25
2. 論文標題 Bejel, a Nonvenereal Treponematosi, among Men Who Have Sex with Men, Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Emerging Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 1581 ~ 1583
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3201/eid2508.181690	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saeng-aroon Siriphan, Saipradit Nonglak, Loret Ruangchai, Klamkhai Nattapong, Boonmuang Ratra-wee, Kaewprommal Pavita, Prommajan Korrakot, Takeda Naokazu, Sungkanuparph Somnuek, Shioda Tatsuo, Sangkitporn Somchai, Motomura Kazushi	4. 巻 34
2. 論文標題 External Quality Assessment Scheme for HIV-1 Drug-Resistance Genotyping in Thailand	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 AIDS Research and Human Retroviruses	6. 最初と最後の頁 1028 ~ 1035
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/AID.2017.0299	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakayama Emi E., Saito Akatsuki, Sultana Tahmina, Jin Zhuan, Nohata Kyotaro, Shibata Masato, Hosoi Miho, Motomura Kazushi, Shioda Tatsuo, Sangkitporn Somchai, Loket Ruangchai, Saeng-aroon Siriphan	4. 巻 34
2. 論文標題 Naturally Occurring Mutations in HIV-1 CRF01_AE Capsid Affect Viral Sensitivity to Restriction Factors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 AIDS Research and Human Retroviruses	6. 最初と最後の頁 382 ~ 392
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/AID.2017.0212	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 4.三好龍也, 内野清子, 元岡大裕, 中村昇太, 大出裕高, 岩谷靖雄, 小林和夫, 本村和嗣
2. 発表標題 Next-generation sequencerを用いた複数の遺伝子型ウイルスが関与したNorovirus集団感染事例の解析
3. 学会等名 第66回 日本ウイルス学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本村和嗣、高田利香、左近直美、弓指孝行
2. 発表標題 2013-2016年における大阪で検出されたG11.4 Sydney 2012株のカプシドタンパク質の経時変化
3. 学会等名 第91回 日本感染症学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----