

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：83201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461530

研究課題名(和文) 網羅的解析による地域におけるノロウイルスの遺伝子変化の把握と病態との関連

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of norovirus genetic alterations in a region in relation to the pathogenicity

研究代表者

滝澤 剛則 (Takizawa, Takenori)

富山県衛生研究所・その他部局等・部長

研究者番号：40192158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：次世代シーケンサー(NGS)を用いて、胃腸炎事例のメタゲノム解析を行った。定法ではノロウイルス(NoV)陰性だった検体からもNoVが検出され、因果関係の推定可能事例が存在した。PCR産物のディープシーケンス解析では、単一遺伝子型暴露と考えられた事例でも、複数の遺伝子型の感染が推定された。カキ喫食事例では、複数のNoV遺伝子型やNoV以外のウイルスが検出され、カキに含まれる複数種のウイルス暴露が推定された。メタゲノム解析により、遺伝子型と病因との関連を推定できることが判明したが、十分なNoVのリード数を得ることが困難であったため、塩基配列の多様性と病因との関連は議論できなかった。

研究成果の概要(英文)：Metagenome analysis using next-generation sequencer (NGS) was applied to gastroenteritis cases. Etiology could be estimated by NGS since several genotypes of NoV were detected even from NoV-negative specimens by conventional method. The deep sequence analysis of the PCR products revealed infection with multiple genotypes of NoV in some cases of putative single genotype infection. Exposure to multiple viruses contaminated in the oyster was considered when plural genotypes of NoV and other viruses than NoV were detected by NGS in the cases where oysters have been provided. Thus metagenome analysis was found to be able to estimate the relation between genotype and etiology. However, sufficient number of NoV reads was not obtained by the metagenome analysis in this study to discuss the significance of variations in the nucleotide sequences generated in each genotype.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ノロウイルス 環境水 発生動向調査 サーベイランス メタゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

ノロウイルス (NoV)には 5 つの遺伝子群 (Genogroupe I~V)(GI~V)が存在し、ヒトに感染するのは主に GI と GII である。遺伝子群は、さらに 30 以上の遺伝子型 (Genotype)に細分される。2006 年に主にヨーロッパを中心に大流行した GII、遺伝子型 4 (GII.4) が国内に侵入して以来、全国的にもこの GII.4 が主に集団感染を中心に流行を繰り返してきたが、GII.3、GII.13 などによる他の遺伝子群・型による感染事例も増加している。また、GII.4 の中にも新たな変異が蓄積されている。一方、下水流入水からは、季節にかかわらずほぼ毎月のように NoV が検出され、事例からはあまり検出されないことのない GI なども高頻度に検出される。これらのウイルスは、地域に不顕性感染により広まっているものと推定される。このように、NoV は遺伝子群・型により、顕性と不顕性感染の頻度にかなり違いがあり、不顕性感染者も相当数地域に存続しているものと推定される。

当研究部でこれまで解析してきたヒト感染事例や下水流入水から検出される NoV を比較すると、同じ遺伝子群・型が時を変えて不顕性あるいは顕性として検出される例が認められる。また、同じ遺伝子群同士での組み換えも高頻度に発生していることが判明し、遺伝子型に反映されないような遺伝的多様性も進行しているものと推定される。

しかしながら、従来の PCR 産物のダイレクトシーケンスでは、主要な遺伝子型のみが解読され、少数の遺伝子型や遺伝子変異を捉えることが困難であった。そこで、本研究課題では、当研究部でこれまで解析した NoV 遺伝子群・型の遺伝子配列を次世代シーケンサー (NGS) を用いて網羅的に再解析することにより、少数の遺伝子型や変異を把握し、それらの特徴や経時的な変化を捉えることにより、病態との関連を検討することを考えた。

## 2. 研究の目的

NoV は冬季に多発する感染性胃腸炎、食中毒の主な原因ウイルスである。遺伝的多様性に富み、また現在も変異を蓄積させている。動物実験系や培養系が確立されておらず、病原性に関わる遺伝子や遺伝的多様性が蓄積する原因など、その病態はほとんど解明されていない。そのため、有効な感染予防策が確立されていない。本研究課題では、当研究室でこれまで解析してきた顕性、不顕性を含むヒト感染事例、下水流入水、カキから検出された NoV の遺伝子の多様性を網羅的に検索し、顕性と不顕性との違い、遺伝子変異の経時的変化等を検討することにより、遺伝的多様性が急速に進行する分子的背景や、病態に關与する遺伝子を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 検体

当研究部で解析を行ったヒト感染事例 (2013-15 年)、下水流入水 (2011-13 年、2013-15 年)、岩カキ (2013-14 年) を用いた。NGS 解析には、8 感染事例 (2010-11 年、24 検体) を用いた。

### (2) 検体からの定法による NoV 検出

便乳剤からの検出は、厚生労働省通知法 (食安監発 110500) に従った。下水流入水からの検出は、厚生労働省科学研究費補助金: 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業「ウイルス感染症のためのサーベイランスシステムの検討」(平成 23 年度分担研究報告書、pp23-28) に従った。岩カキからの検出は、同研究費補助金: 食品の安心安全確保推進事業「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」(平成 23 年度総括・分担研究報告書、pp201-207) に従った。

### (3) メタゲノム解析

検体よりキャリアフリーの抽出液を用いて RNA 抽出を行い、ScriptSeq v2 RNA-Seq Library Preparation kit (Epicentre) を用いて RNA-Seq ライブラリを作製した後、NGS (Illumina 社 MiSeq) により、MiSeq Reagent Kit v2 (500 cycle)、MiSeq Reagent Kit Micro v2 (300 cycle) または MiSeq Reagent Kit v3 (150 cycle) を用いて塩基配列を解読した。解読結果は、国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターの Metagenomic Pathogen Identification for Clinical specimens (MePIC) ソフト (Takeuchi, F., et al. Jpn. J. Infect. Dis., 2014, 67:62) によりヒト遺伝子配列を除いて megablast 解析を行った。MePIC により分類された塩基配列は MEtaGenomeANalyzer (MEGAN) 4 または 5 (Universität Tübingen) により閲覧を行い、NoV の配列を抽出した。CLC Genomics Workbench (ver. 6) を用いて抽出した NoV のリードを整列して Contig を作成し、再度 BLAST 検索を行った。得られた基準配列を元に Norovirus Genotyping Tool により NoV 遺伝子型の推定を行った。

### (4) ディープシーケンス解析

NoV GII の翻訳枠 1/2 接合領域を対象としたプライマー 1421f/NV2oR 領域の PCR 産物より、Nextera DNA Sample Preparation Kits (Epicentre) により DNA ライブラリを作成した後、MiSeq Reagent Kit (50 Cycle) を用いて塩基配列を解読した。

### (5) 倫理的配慮

臨床検体を扱うにあたり、「網羅的遺伝子解析法を用いた食中毒事例の原因ウイルス解析」(受付番号 3) として、平成 25 年度富山県衛生研究所倫理審査委員会の承認を得た。

## 4. 研究成果

(1) 患者、下水流入水、岩カキから検出された NoV 及び SaV の型別比較

集団発生の患者からは NoV GII.4 が最も多く検出され、2015 年 3~5 月には NoVGII.17 も多く検出された。散発例の患者からは NoV GII.4、GII.3、SaV GI.1 などが検出された。下水流入水からは、NoV GII.4、GI.4、GI.6 が多く検出された。下水中の NoV GI.4 は 2013 年 1 月から 6 月まで、GI.6 は 2013 年 11 月から 2014 年 6 月まで継続して検出された。岩ガキは、2013 年の検体から NoV GI.4、NoV GII.4、GII.14 が、2014 年の検体から NoV GII.6 が検出された。患者、下水、岩ガキから検出された NoV 及び SaV についてまとめた (表 1)。NoV GI では、下水から高頻度で検出された GI.4 や GI.6 は患者からは各 1 例と少なかった。NoV GII では、GII.3、GII.4、GII.14、GII.17 が患者と下水から検出され、特に NoV GII.4 は患者と下水の検出時期がおおむね一致していた。患者から検出された GII.6 および GII.12 は下水からは検出されなかった。SaV は、GI.1、GI.2、GII.1 が患者からも下水からも検出された。GII.1 は検出時期がいずれも 2014/15 シーズン中心であり、おおむね一致していた。カキから NoV が検出された時期の前後には、下水と患者のいずれかから同じ遺伝子型の NoV が検出された。

得られた NoV の塩基配列を用いて系統樹解析を行ったところ、同時期に複数種の検体から共通に検出される遺伝子型は、いずれも近縁であった。NoV GII.4 については、2013~15 年の患者、下水、カキのいずれにおいても Sydney 2012 亜型が主要であった。NoV GII.17 については、2013 年に患者から検出された株は 2013/14 シーズンに国内で検出された Kawasaki323/2014/JP 株と、2015 年に患者と下水から検出された株はいずれも 2014/15 シーズンに国内で検出された Kawasaki308/2015/JP 株とそれぞれ近縁であった。

以上から、下水や岩ガキからは同時期の患者及び不顕性感染者に感染していた遺伝子型が検出されると考えられた。したがって、下水流入水から検出される遺伝子型の塩基の多様性が検出できると、それは感染者の遺伝子型の多様性も反映していると推定された。

#### (2) 胃腸炎集団発生事例の NGS による解析

事例 1~4 (検体 1~5) の PCR 産物からディープシーケンスにより検出された NoV 配列の遺伝子型の内訳を表 2 に示す。検体 1 では、ダイレクトシーケンスで検出された GII.12 のリードが全リード中 60.9%、GII.2 が 36.0%を占めた。検体 2、3、4 は、ダイレクトシーケンスで検出された遺伝子型のリードが全体の 99.9%以上を占めた。検体 5 においては、ダイレクトシーケンスで検出された GII.12 が 99.5%を占め、GII.4 が 0.4%であった。以上から、ディープシーケンスにより得られる配列は、ダイレクトシーケンスで得られる配列を反映している

と考えられた。一方、ごく少数の割合でその他の遺伝子型も検出された。これらはそれぞれ異なる遺伝子型に分類されたことから、同じ遺伝子型内での多様性ではないと考えられた。

メタゲノム解析により検出された NoV 配列の遺伝子型と NoV の胃腸炎ウイルスの内訳を表 3 に示す。全ての検体より、NoV のリードが検出され、SaV のリードが 2 検体より、アイチウイルス (AiV) のリードが 17 検体より検出された。事例 4 では、ダイレクトシーケンスで GII.12 (検体 5) あるいは、GII.4 が検出された従業員 (検体 6) からは、NGS でもそれぞれダイレクトシーケンスと同じ遺伝子型のみが検出された。検体 5 では、ディープシーケンスでは複数の遺伝子型が検出されていた (表 2)。ダイレクトシーケンスで GII.4 が検出された患者 2 名 (検体 7、8) のうち 1 名から GII.4 のリードが検出され、2 名から GII.12 のリードが検出された。また、リアルタイム PCR で NoV 陰性であった 3 名 (検体 9、10、11) からは GII.12 のリードが検出された。事例 5 において、患者 3 名 (検体 12、13、14) はそれぞれダイレクトシーケンスと同じ遺伝子型のリードが検出されたが、検体 12 は検体 13、14 と同じ遺伝子型 GII.4 のリードも検出された。従業員からは患者とは異なる遺伝子型が検出された。カキ関連事例である事例 6、7、8 のいずれの検体も、ダイレクトシーケンスで検出された遺伝子型だけでなく、多種の遺伝子型が検出された。事例 8 では、リアルタイム PCR で NoV 陰性であった 2 検体 (検体 23、24) からも NoV のリードが検出され、2 検体 (検体 18、19) からは SaV のリードも検出された。一方、ダイレクトシーケンスで SaV GI.2 が検出されていた検体 24 からは SaV のリードが検出されなかった。ダイレクトシーケンスで混合波形を示し、遺伝子型が判定できなかった検体 (検体 19) から、複数の遺伝子型が検出された。また、アイチウイルス (AiV) が事例 8 の全ての検体から検出された。

以上から、メタゲノム解析では定法によって検出されない遺伝子型も検出されることから、定法では原因が特定困難な事例の原因推定に有用であることが判明した。一方、事例発生との関連が不明な遺伝子型やウイルスも複数検出されていることから、先のディープシーケンスの結果と合わせて、発症の有無に関わらず、感染者は多種のウイルスに暴露している可能性が考えられた。

#### (3) 下水流入水の NGS による解析

メタゲノム解析により、3 年間 36 検体のうち、25 検体から NoV の配列が、24 検体から SaV の配列が検出された。NoV は GI、GII、GIV の 3 つの遺伝子群に分けられ、GI と GII はさらにそれぞれ 8 種類、10 種類の遺伝子型が検出された。得られたリード数が多い順に、GI では GI.6、GI.4、GII では GII.4、GII.14 で

あり、常法で最も多く検出された G1.4、G11.4 と概ね一致した。検出時期は、NoVGII については定法とメタゲノム解析とでほぼ一致した。NoVGI については、定法で検出された月でも、メタゲノム解析では検出されない場合が多く認められた。SaV は、常法では G1 のみが検出されていたが、メタゲノム解析では G1、G11、G1V、GV の 4 つの遺伝子群が得られた。

メタゲノム解析により、NoV と SaV いずれも多種類の遺伝子型・遺伝子群が検出され、地域には多種の遺伝子型が存在することが確認された。一方、常法で検出されてもメタゲノム解析では検出されなかった遺伝子型も存在したため、メタゲノム解析の感度をさらに上げる必要があると考えられた。

#### (4) まとめ

定法では単一遺伝子型の暴露と考えられた患者検体でも、NGS 解析では、主要な遺伝子型以外にごく少数の遺伝子型あるいは NoV 以外のウイルスが複数検出される傾向を示したことから、感染者は、発症の有無に関わらず多数のウイルスに暴露している可能性が考えられた。下水流入水や特に岩ガキからは、NGS ではウイルスが検出されない場合が多かったため、今後 NGS による検出感度を向上する必要があると考えられた。遺伝子型内の多様性を検討するためには、多数のリード配列を同時に比較できる方法の導入が必要と考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### [雑誌論文](計3件)

稲崎倫子、森岡誠二、稲畑 良、小淵正次、嶋 一世、長谷川澄代、板持雅恵、滝澤剛則. ウイルス性胃腸炎の集団発生事例及び散発例について(平成 26 年度). 富山県衛生研究所年報(査読無) 38,49-54, 2015.

稲崎倫子、名古屋真弓、石田徹、堀元栄詞、小淵正次、嶋 一世、板持雅恵、滝澤剛則. ウイルス性胃腸炎の集団発生事例及び散発例について(平成 25 年度). 富山県衛生研究所年報(査読無) 37, 53-59, 2014.

名古屋真弓、稲崎倫子、石田徹、堀元栄詞、小淵正次、嶋 一世、板持雅恵、滝澤剛則, ウイルス性胃腸炎の集団発生事例及び散発例について(平成 24 年度). 富山県衛生研究所年報(査読無) 36,51-57, 2013.

##### [学会発表](計4件)

名古屋真弓、稲崎倫子、嶋一世、板持雅恵、稲畑良、小淵正次、野田衛、佐多徹太郎、滝澤剛則、胃腸炎集団発生事例のメタゲノム解析によるノロウイルスの検索、第 63 回日本ウイルス学会学術集会、

2015 年 11 月 22 日、福岡国際会議場(福岡市)

Noriko Inasaki, Mayumi Nagoya, Masae Itamochi, Ichiyo Shima, Masatugu Obuchi, Ryo Inahata, Sumiyo Hasegawa, Makoto Kuroda, Tetsutaro Sata, Takenori Takizawa, Detection of sapovirus GV.2 by the next generation sequencer in the stool specimens of patients of gastroenteritis outbreak from which pathogen had not been identified, The 6th Congress of European Microbiologists, 2015 年 6 月 7 ~ 11, マーストリヒト市(オランダ王国)

稲崎倫子、名古屋真弓、板持雅恵、嶋一世、小淵正次、稲畑良、長谷川澄代、黒田誠、佐多徹太郎、滝澤剛則、次世代シーケンサーによる感染性胃腸炎集団発生事例患者検体からのサポウイルス GV.2 の検出、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月 10 日、パシフィコ横浜(横浜市)

名古屋真弓、稲崎倫子、板持雅恵、嶋一世、堀本栄詞、小淵正次、野田衛、佐多徹太郎、滝澤剛則、患者・下水・岩ガキからのノロウイルス・サポウイルスの検出、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 12 日、神戸国際会議場(神戸市)

[図書](計0件)

[産業財産権]  
出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

滝澤 剛則 (TAKIZAWA Takenori)  
富山県衛生研究所・ウイルス部・部長



表 3. メタゲノム解析により検出された胃腸炎ウイルス遺伝子の内訳

事例番号	検体番号	患者・従業員	NoV型別		その他の胃腸炎ウイルス メタゲノム解析 (リード数の多い順)	用いたMiSeq Reagent Kit
			ダイレクトシーケンス	メタゲノム解析 (リード数の多い順)		
4	5 <sup>(*)</sup>	従業員 (無症状)	GII.12	GII.12	-	Micro v2 (300 cycles)
	6	従業員 (無症状)	GII.4	GII.4	AiV	Micro v2 (300 cycles)
	7	患者	GII.4	GII.4,GII.12,GI.3	AiV	v3 (150 cycles)
	8	患者	GII.4	GII.12 他	AiV	v3 (150 cycles)
	9	患者	ND	GII.12,GI.3	AiV	v3 (150 cycles)
	10	患者	ND	GII.12,GI.3	AiV	v3 (150 cycles)
5	11	患者	ND	GII.12,GI.3 他	AiV	v3 (150 cycles)
	12	患者	GII.17	GII.17,GII.4	AiV	Micro v2 (300 cycles)
	13	患者	GII.4	GII.4	AiV	Micro v2 (300 cycles)
	14	患者	GI.6,GII.4	GII.4,GI.6	AiV	Micro v2 (300 cycles)
6	15	従業員 (無症状)	ND	GII.12,GI.3 他	AiV	v3 (150 cycles)
	16	患者	GI.7	GI.7,GI.3,GI.9 他	-	v2 (500 cycles)
7	17	患者	GII.2	GII.2,GI.3	-	v2 (500 cycles)
8	18	患者	GII.14	GII.14,GII.7	AiV,SaV	Micro v2 (300 cycles)
	19	患者	GII型不明 (混合配列)	GII.14,GII.7,GII.6	SaV,AiV	Micro v2 (300 cycles)
	20	患者	GI.3	GI.3,GII.12	AiV	v3 (150 cycles)
	21	患者	GII.14	GII.14,GII.12	AiV	v3 (150 cycles)
	22	患者	GII.14	GII.14,GII.12	AiV	v3 (150 cycles)
	23	患者	ND	GI.3,GII.12	AiV	v3 (150 cycles)
	24	患者	ND (SaV GI.2検出)	GII.12,GII.1	AiV	v3 (150 cycles)

ND：検体番号 15 はリアルタイム PCR で GII 陽性、PCR 陰性。その他はリアルタイム PCR で検出されず。AiV：アイチウイルス  
 (\*)：表 2 検体番号 5 と同一検体