

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19784

研究課題名(和文)ノロウイルスの遺伝子多様性調査のための診断技術開発

研究課題名(英文)Development of a diagnostic technique for intra-host genetic diversity of norovirus

研究代表者

斉藤 繭子(SAITO, MAYUKO)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：20598031

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：ノロウイルス遺伝子の異なる遺伝子型の混合感染や組換え型ウイルスを検出する新たな遺伝子解析方法の開発を目的として、カプシド領域とポリメラーゼ領域双方を増幅可能な比較的感度の高いプライマーセットを開発した。この増幅産物を1分子リアルタイムシーケンサーを用いて遺伝子配列の解析を行うことで、組み換えが起こりやすい領域とその両側のポリメラーゼ・カプシド領域の一部を同じリード上で検出することが可能になった。変異解析については増幅領域が短く劣るものの、遺伝子型の変化については増幅しやすい短い領域を用いており、コミュニティにおけるノロウイルスの遺伝子変化のモニタリングに有用な方法であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年のノロウイルスによる下痢症の流行には、部分的な遺伝子変異の他に、組み換え遺伝子を持つノロウイルスがきっかけと考えられるものが多く報告されており、本研究によりウイルスのカプシド領域とポリメラーゼ領域双方の遺伝子型を決定する領域を含んだ遺伝子配列の解析が比較的簡便になり、遺伝子型の異なるノロウイルスが一個体に含まれる混合感染の検出も可能となった。増幅しやすい短い領域を用いており、感度が高く、コミュニティにおいてノロウイルス流行時に遺伝子型や組み換えや遺伝子型の変化をモニタリングする上で対応しやすい方法の開発に至った。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop a new method that can simultaneously detect mixed infections of different genotypes of norovirus and recombinant viruses. We developed a relatively sensitive primer set that can amplify a part of regions for genotyping both the capsid and polymerase regions of the norovirus gene. Using a single-molecule real-time sequencer to analyze and the segments amplified with this primer set, we were able to sequence the target regions including the junction region, where recombination frequently occurs within single read. Although the amplified region was short for the detailed mutation analysis, this method, amplifying relatively short regions, was highly sensitive and useful for monitoring the genomic changes in the community.

研究分野：感染症疫学

キーワード：ノロウイルス 遺伝子型 組み換え遺伝子 国際保健 一分子リアルタイムシーケンシング 混合感染

## 1. 研究開始当初の背景

下痢症は発展途上国における5才未満の小児の死因の第二位であり、ノロウイルスによる死亡者数は世界で年間20万人と推定されている(Patel, EID, 2009)。また、国内では食中毒の件数、症例数ともに最も高い頻度で検出される病原体である(厚生省, 2016)。そのため、ノロウイルスに対するワクチンの重要性は認識され開発が進んでいるが、培養系が確立していないため病原性や免疫原性等の研究が容易でない。一方、低・中所得国ではノロウイルスの診断や予防対策は普及しておらず、先進国に比べてノロウイルス感染が蔓延しており、無症候感染の割合も高いと報告されている(Lopman, Am J Epidemiol, 2014)。これまでに申請者らは、途上国で下痢症の疫学研究を遂行し、多様な遺伝子型が蔓延している状況やノロウイルス感染が乳幼児に頻回に起こり感染持続期間も従来言われているよりも長いこと(1カ月以上)を明らかにしてきた(Saito, CID, 2014)。さらに、日本国内症例に比べ、ペルーで検出された検体には組換え型が多いことや、第2世代シーケンサーによる解析でペルーの同一家族内の混合感染と反復感染の検出に成功しており、このような個体内での混合感染や反復感染が新型ウイルスを作り出している可能性があると考えた。

ノロウイルスはウイルス性下痢症の原因として年齢層を問わず最も高い頻度で検出されるウイルスであり、人々が免疫をもたない新しい遺伝子型のウイルスによる大規模な流行が数年おきに認められる(Hasing, JCM, 2013)。この原因のひとつとして、複数のウイルスが一個体内に混合感染した際に別々のウイルス間で部分的な“遺伝子の組換え”が起こり(Bull, 2007)これにより生じた新型ウイルスが集団免疫を逃れアウトブレイクや持続感染につながる可能性が指摘されている(Whilte, CMI, 2014)。ノロウイルスに感染する機会の多い途上国では先進国に比べて多様な遺伝子型が検出され、ウイルス遺伝子の排出期間も長いことがわかっている。このため、途上国では一個体内に感染するノロウイルスも先進国のそれに比べて多様で、長い感染期間の間に混合感染と遺伝子組換えが起こる確率が高く新型ノロウイルスが出現しやすい状況にあるのではないかと考えている。

一般に行われている遺伝子配列の解読方法(サンガーシーケンス法:第1世代シーケンス)では、一検体に含まれる遺伝子配列のうち、主要な1つの配列しか解読できないため同じ検体にふくまれる混合感染を読み取ることはできない。近年最も使用されている次世代(第2世代)シーケンサーを用いたメタゲノム解析では、多数の遺伝子配列を並列に解読することができ、個体内に感染した複数のウイルス遺伝子を検出でき、混合感染の詳細を解析することができる。しかし、一度に遺伝子配列を解読できる遺伝子断片の長さが短いため(~300bp)検査前の試料作製において解析の対象となる遺伝子を短く断片化し、解析時には断片化された試料から得た配列のデータを再構築して解析する必要がある。そのため組換え型ウイルスの配列解読の精度が低い。そこで、近年実用化され普及が進んできた一分子リアルタイムシーケンス法(第3世代シーケンサー)では、より長い(~4000bp)配列の解読ができ、混合感染や組換え遺伝子の接合部分とその両端の遺伝子型を決定する領域も含めた検出が可能になり、ウイルス多様性の解析をより向上させることができると考えらえる。

## 2. 研究の目的

本研究ではノロウイルス感染者の一個体内における多様な遺伝子型を特定するため、1分子リアルタイムシーケンサーを用い、ノロウイルスの混合感染や組換え型ウイルスを同時に検出できる新たな診断法の開発を目的とする。さらに、この技術を用い先進国と途上国における一個体内のノロウイルスの遺伝子的多様性を比較し、社会的背景と個体内のノロウイルス多様性の関

連について検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) プライマーセットの評価

ノロウイルス遺伝子グループ I (GI) におけるポリメラーゼとカプシドの遺伝子型 (P タイプ, C タイプ) の解析を行った組み替えウイルスを検出するため、従来カプシド領域の遺伝子型の解析のためにサンガー法で広く使われているプライマーに、同じセグメント上にポリメラーゼ領域の一部が増幅されるように設計したプライマーを組み合わせたプライマーセットを作成した (GI: 4871F/GISKR)。国内、フィリピン、ペルーで行われた症例研究、疫学研究で収集された便検体のうち、リアルタイム PCR 法 (プライマー名: COG、プローブ: RIN) で陽性であった 175 検体と陰性であった 141 検体を用いて、感度と特異度をリアルタイム PCR 法の結果を基準として評価した。同様に、一般に遺伝子型の同定に広く用いられているプライマーセット (GISKF/GISKR) を用いて PCR 法を行い、比較対照とした。サンガー法による遺伝子型の同定には NoroNet (RITM, <https://www.rivm.nl/en/noronet>) を用いた。

#### (2) 一分子リアルタイムシーケンシングによるノロウイルス遺伝子配列の解析

ノロウイルスの遺伝子グループ II (GII) のカプシド領域とポリメラーゼ領域双方の遺伝子型の解析が可能であることが確認できたプライマーセット 4766F/GIISKR を用いて、53 検体のノロウイルス GII 陽性検体から増幅した相補的 DNA を MinION (Oxford Nanopore Technologies) でシーケンシングを行った。(本研究の申請時には一分子シーケンサーとして PacBio を想定していたが、利便性と費用の観点から、近年精度が高まっている MinION で行った。) 得られた遺伝子配列の解析を CLC Genomics Workbench Ver20.0.4 で行った (QIAGEN)。

### 4. 研究成果

ノロウイルス GI の遺伝子型の検出を目的としてデザインしたプライマー、4871F とカプシド領域の遺伝子型の解析に広く使われている GISKR を組み合わせたプライマーセット 4871F/GISK (801nt) を用いた PCR 法の感度は 81.1%、特異度は 98.6% であった。一方、GISKF/GISKR の検体全体での感度は 91.3%、特異度は 100% で 4871F/GISKR よりもやや高かった。プライマーセット 4871F/GISKR は、GISKF/GISKR に比べて感度がやや低いものの、入手可能であったカプシド領域に基づいたノロウイルス GI の 9 種類の遺伝子型を全て検出することができ、カプシド領域とポリメラーゼ領域双方の遺伝子型が 87.3% (124/175) で同定され、組み換えが起こりやすい領域の増幅に利用できることが確認された。さらにカプシド領域とポリメラーゼ領域双方の遺伝子型は 87.3% で同定でき、カプシド領域とポリメラーゼ領域の遺伝子型を一度にタイピングできるという特性を持ち、組み替えウイルスの検出に有用なプライマーセットであると考えられた。

また、同様の特性を持つノロウイルス GII の遺伝子型解析を目的としたプライマーセット 4766F/GIISKR を用いた MinION によるシーケンシングでは、組み換えが起こりやすいポリメラーゼ領域とカプシド領域の境界部分 (junction) を挟んだポリメラーゼ領域の一部 (355bp)、カプシド領域の一部 (304bp) の検出が一検体当たり数万~数十万リード検出され、同じ検体中の同領域に見られる変異解析が可能になった。

これらの結果より、ノロウイルス遺伝子 GI と GII のカプシド領域とポリメラーゼ領域双方の遺伝子型を決定する領域を含んだ断片の増幅は 1 回の PCR で可能となり、一分子リアルタイムシーケンス法での遺伝子解析に応用することが可能となった。本法では、PCR による増幅過程を含むため、定量的 PCR で推定されたウイルス濃度が低い検体においても遺伝子型、組み換え、混

合感染の検出が可能である。先行研究で発表されたノロウイルスの全ゲノムを増幅するプライマーを用いた解析と比較して、変異解析については領域が短い点では劣るが、遺伝子型の変化については増幅しやすい短い領域を用いており、感度が高く、遺伝子型や組み換えレベルの変化に対応可能な感度の高い方法であると考えられた。しかし、増幅過程を含むため遺伝子配列により増幅効率が異なる可能性もあり、リード数による割合が必ずしも実際の検体内の混合割合とは言えない等の限界がある。得られる配列が短く多用であるため、変異を伴う遺伝子型の同定については基準を作り、解析方法を改良していく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 喜多浩士、当広謙太郎、Joseph Bonifacio、川村和久、野口光徳、阿部智美、岡本道子、Robert H. Gilman、斉藤繭子、押谷仁
2. 発表標題 ノロウイルスGIのポリメラーゼ領域とカプシド領域を含んだPCRの検出系の開発と検査特性の評価
3. 学会等名 日本細菌学会東北支部総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 斉藤繭子
2. 発表標題 Household transmission of norovirus, rotavirus and sapovirus - Tarlac cohort study
3. 学会等名 Annual Research Forum RITM-TOHOKU Collaborating Research Center for Emerging and Reemerging Infectious Diseases
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 斉藤繭子、Joseph Bonifacio、Maria Carmen Corpuz、齊藤麻理子、岡本道子、Edelwisa Segubre-Mercado、押谷仁
2. 発表標題 A longitudinal study of norovirus and sapovirus infection using molecular typing in household clusters in the Philippines
3. 学会等名 Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2019
4. 発表年 2019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
研究協力者	古瀬 祐気  (Furuse Yuki)		

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	齊藤（小畑） 麻理子  (Saito-Obata Mariko)		
研究協力者	当广 謙太郎  (Tohma Kentaro)		
研究協力者	タンドック アマド  (Tandoc III Amado)		
研究協力者	ギルマン H. ロバート  (Gilman H. Robart)		
研究協力者	パラ ガブリエル I.  (Parra Gabriel I.)		