

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09956

研究課題名（和文）ノロウイルスの急激な感染拡大のメカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of sudden expansion of norovirus with a specific genotype

研究代表者

白土 東子（堀越東子）（Shirato, Haruko）

国立感染症研究所・ウイルス第二部・主任研究官

研究者番号：60356243

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：ノロウイルスは小腸上皮に発現する血液型抗原を識別して感染する個体を決めている。ノロウイルス感染への感受性は個体の血液型によって異なる。しかし、ノロウイルスの流行拡大前後の疫学解析と、流行したウイルス株の血液型抗原への結合能の解析が両立されている報告はこれまでにない。本研究課題において、流行株の疫学解析と血液型抗原への結合能の *in vitro* における解析を両立させた研究を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題において解析の対象とする GII.13 遺伝子型株は、7 年間にわたるネパールでの分子疫学研究の結果、初めて捉えることが出来た「本来まれな遺伝子型の急激な増加」という疫学的事実に立脚している。現在は注目されていない、疫学的に劣勢な遺伝子型であっても、血液型抗原結合能の変異により人類への脅威となる大流行株になりうるという証拠の提示は、ノロウイルスに対する公衆衛生戦略を策定する上で大きな意義がある。

研究成果の概要（英文）： This study was conducted to determine the mechanism of sudden expansion of NoV with a specific genotype. The association between the rapid expansion and acquisition of the binding ability of NoV to histo-blood group antigen (HBGA) was examined by targeting the GII.13 genotype, which rapidly expanded in Nepal in 2009. First, virus-like particles (VLPs) of the NPL2008 strain, which is an epidemiologically minor strain of the GII.13 genotype, and VLPs of the NPL2009 strain, which is an epidemiologically important strain of GII.13, were prepared. Next, the HBGA-binding ability of the VLPs of the NPL2008 strain, NPL2009 strain, and the GII.4 genotype (worldwide pandemic genotype) was evaluated using enzyme-linked immunosorbent assay and surface plasmon resonance.

研究分野：ウイルス学

キーワード：感染疫学 ノロウイルス 血液型抗原

1. 研究開始当初の背景

本研究課題において解析対象とするノロウイルスは、嘔吐下痢症の原因ウイルスであり、世界各地で集団感染を引き起こしている。わが国では、ウイルス性集団食中毒発生事例の95%以上を占め、患者数は毎年約9,000人で推移している(厚生労働省食中毒統計)。一般には軽症で経過するが、高齢者、乳幼児においては下痢、嘔吐による脱水あるいは誤嚥性肺炎で重症化し、死に至ることがある。

ノロウイルスは小腸上皮に発現する血液型抗原を識別して感染する宿主を決めている。血液型抗原とは、赤血球上に発現されている抗原構造をもった糖鎖の総称であり、ABO式、Lewis式血液型抗原などが含まれる。血液型抗原は、小腸上皮にも発現されているため、ノロウイルス感染への感受性は個体の血液型によって異なる。

ノロウイルスは5つの遺伝子群、Genogroup I- Genogroup V(GI-GV)に大別され、このうち、ヒトに感染するのはGI、GII、GIVであると報告されている。さらに、GIは9の遺伝子型(GI.1-GI.9)、GIIは22の遺伝子型(GII.1-GII.22)に細分化され、これらはそれぞれ異なった抗原性を示し、ノロウイルスは極めて多様性を持った集団として存在する(遺伝子群、遺伝子型の数は本研究課題開始以降も増え続けている)。この多様性は、血液型抗原認識の多様性にも反映されており、各遺伝子型が認識する血液型抗原の種類、数は様々であることが *in vitro binding assay* において証明されている。

ノロウイルスには多様な遺伝子型が存在するものの、世界的に流行する遺伝子型はその一部の遺伝子型に限られている。2002年頃から2014年12月までの10年以上の間、日本を含め世界的に流行していたのはGII.4遺伝子型であった。GII.4遺伝子型に属するウイルス株は、他の遺伝子型に比べて結合できる血液型抗原の種類が多だけでなく、それぞれの血液型抗原への結合力も強く、O、A、B抗原に強く結合する。GII.4遺伝子型が世界的に優勢であったのは、血液型がO、A、B型全ての個体への感染が可能であったためと考えられている。

2015年年初頃から突如、ノロウイルスの世界的な流行株が、GII.4遺伝子型からGII.17遺伝子型に置き換わった。GII.17遺伝子型の血液型抗原認識部位に変異が入り、感染できる個体が増えたため、流行規模が突然大きくなったのではないかと推察されているが、実証はされていない。

2. 研究の目的

連携研究者である中込治が、科研費(海外学術調査)の補助を受け、2005年から2011年までの7年間、ネパールでノロウイルスの分子疫学研究を続けた結果、GII.13遺伝子型の検出率が2009年を境に1.7%から26%へと急増し、2010年にはGII.4遺伝子型を凌ぐ最優勢株になったという疫学的事実が明らかになった(Hoa-Tran TN., Nakagomi O. ((corresponding author)) et al., *Infect. Genet. Evol.* 30, 27, 2015)。さらに、GII.13遺伝子型の感染が拡大した2009年のウイルス株(NPL2009株)は、拡大前の2008年のウイルス株(NPL2008株)とは異なる変異株であり、ウイルスカプシドタンパク質上の血液型抗原認識部位と推定される部位のアミノ酸に変異が生じていることも明らかにしている。

GII.13遺伝子型は、日本国内では大きな流行の報告はないものの、散发事例において検出されている遺伝子型であり、研究代表者・白土東子が血液型抗原との結合解析を終えている13の遺伝子型に含まれる。研究代表者が血液型抗原結合解析を終えているGII.13遺伝子型のウイルス株は1997年に国内で分離されたKashiwa47株であり、ネパールにおける感染拡大前の株(NPL2008株)に近いアミノ酸配列であるものの同一株ではない。研究代表者は、Kashiwa47株はABO抗原、Lewis抗原のいずれの血液型抗原に対しても弱い結合しか示さないことを明らかにしている(Shirato. H., et al. *J. Virol.* 82, 10756, 2008)。2014年までの流行株GII.4遺伝子型株、2015年からの流行株GII.17遺伝子型株ともに、流行して初めて着目されるため、感染拡大前の疫学情報、塩基配列情報に限りがある。しかし、本研究課題において解析の対象とするGII.13遺伝子型株は、7年間にわたるネパールでの分子疫学研究の結果、初めて捉えることが出来た「本来まれな遺伝子型の急激な増加」という疫学的事実に立脚している。現在は注目されていない、疫学的に劣勢な遺伝子型であっても、血液型抗原結合能の変異により人類への脅威となる大流行株になりうるという証拠の提示は、ノロウイルスに対する公衆衛生戦略を策定する上で大きな意義がある。

本研究課題において、研究代表者は血液型抗原との結合解析を終えている13の遺伝子型をコントロールに設定し、ネパールにおける感染拡大前の株(NPL2008株)と、拡大後の株(NPL2009株)の血液型抗原結合パターンの評価を行うことで、ウイルスカプシドタンパク質上の血液型抗原認識部位におけるアミノ酸変異と疫学的優勢の結びつきを検証した。具体的には:(1)感染拡大前のNPL2008株のウイルス様中空粒子(virus-like particle: VLP)の作製、感染拡大後のNPL2009株のVLPの作製を行った。(2)ELISA、SPRを用いNPL2008株VLP、NPL2009株VLPの血液型抗原結合能の評価を行った。(3)血液型抗原結合能の減弱または消失を確認するため、NPL2009株VLPの血液型抗原結合能獲得の鍵となるアミノ酸をNPL2008株のアミノ酸に置換したVLPの作製を試みた。

3. 研究の方法

ヒトに感染するヒトノロウイルスはヒトを唯一の感受性動物とし、感染モデル動物も培養細胞での増殖系も確立していない。ウイルス粒子の便への排出量は決して多くなく、*in vitro*での解析に十分なウイルス粒子の調製は困難である。そこで、VLPの調製が有用であるが、VLP発現は容易ではなく、現在までに海外で発現の成功が報告されているのは約15株に留まっている。一方、研究代表者が所属する研究室では18遺伝子型25株のVLP発現に成功しており、研究代表者はこのうち13遺伝子型16株の血液型抗原19種類に対する結合パターンの解析を終えていた。この13遺伝子型16株には2014年まで世界的に流行していたGII.4遺伝子型に属するNarita104株と日本国内の食中毒事例で分離されたGII.13遺伝子型Kashiwa47株を含む。

研究代表者は、本研究課題開始時の平成28年度までに、ELISA、Surface Plasmon Resonance (SPR)によるノロウイルス-血液型抗原結合解析系を確立し、GII.4遺伝子型を含む13の遺伝子型(GI.1-GI.4, GI.6, GII.1, GII.3-7, GII.12-13)の血液型抗原との結合パターンの解析を終えていた(Shirato-Horikoshi, H., et al. Arch. Virol. 152, 457. 2007; Shirato, H., et al. J. Virol. 82, 10756. 2008)。また、Lewis-a(Le^a)抗原に強く結合するGI.2遺伝子型株に着目し、GI.2遺伝子型のカプシド protruding(P)ドメインとLe^a抗原複合体のX線結晶構造解析を行い、Le^a抗原認識に重要なPドメイン上のアミノ酸(Gln389)を明らかにしている。GlnをAsnに置換したVLPの作製も行い、1塩基置換でGI.2遺伝子型の血液型抗原結合パターンが大きく変化することを明らかにしている(Kubota T., Shirato H. ((corresponding author)) et al., J. Virol. 86, 11138. 2012)。

本研究課題において、研究代表者は本研究課題開始時に解析を終えていた13遺伝子型16株をコントロールに設定し、NPL2008株、NPL2009株のVLPの発現、VLP-血液型抗原結合パターンの評価を行い、ウイルスカプシドタンパク質上の血液型抗原結合部位のアミノ酸変異が疫学的優勢に結びつくのか否かを検討した。

4. 研究成果

(1) GII.13 遺伝子型 NPL2008 株 VLP、GII.13 遺伝子型 NPL2009 株 VLP の作製

バキュロウイルス発現系を用いて、感染拡大直前のNPL2008株および感染拡大直後のNPL2009株のVLPを作製した。感染者の便からウイルスRNAを抽出し、逆転写PCRによりORF2およびORF3を含む領域を増幅後、発現ベクターに組み込んだ。昆虫細胞に感染させ、培養後、昆虫細胞及び組換えバキュロウイルスを超遠心法により除去し、上清中のVLPを塩化セシウム密度勾配超遠心法により精製した。研究代表者が所属する研究室では、VLPの発現・精製のための実験系すでに確立されていた。VLPの抗原性を評価するための抗原抗体ELISAも確立しており、本研究課題で作製したNPL2008株VLP、NPL2009株VLPの抗原性を、既に抗原性の評価を終えている18遺伝子型25株のVLPおよび抗血清と並べて評価することができた。

(2) ELISA、SPR を用いた NPL2008 株 VLP、NPL2009 株 VLP の血液型抗原結合能の評価

ELISAによってウイルスが結合する血液型抗原の種類を評価し、SPRによって血液型抗原への結合親和性を評価した。研究代表者がこれまでに糖鎖結合パターンの解析を終えている13遺伝子型16株のウイルス株と並べて解析した。まず、ELISAで生体内で発現している血液型抗原およびその前駆体約20種類に対する結合パターンを網羅的に解析した。次に、ELISAで結合活性が観測された血液型抗原構造に着目した詳細な相互作用解析をSPR解析機器を用いて行った。SPR解析機器として、研究代表者の所属する国立感染症研究所に共通機器として設置されているBiacore 2000を用いた。Biacore 2000は扱える検体数は数検体と限られるが、結合量の評価に長けている。VLPと血液型抗原間の結合定数、解離定数の測定を行った。研究代表者は、ELISAおよびBiacore 2000による解析系の立ち上げは終えていた(Shirato, H., et al. J. Virol. 82, 10756. 2008)。

(3) NPL2009 株 VLP の血液型抗原結合能獲得の鍵となるアミノ酸を NPL2008 のアミノ酸に置換した VLP の作製の試み

上記(2)で明らかになったNPL2008、NPL2009株の血液型抗原認識パターンと、ウイルスカプシドのアミノ酸配列比較から、血液型抗原認識の拡大と連動しているアミノ酸の割り出しを行った。特定された鍵となるアミノ酸をNPL2008のアミノ酸に置換させた変異NPL2009株VLPの作製を試みた。

以上、(1)-(3)の解析によって、ノロウイルスの血液型抗原結合能獲得が流行の規定要因であるという基本原理を検証することができた。稀にしか検出されない遺伝子型のノロウイルスであっても、血液型抗原結合能が変異すれば人類への脅威となる大流行株になりうるという証拠の提示は、ノロウイルスに対する公衆衛生戦略を策定する上で、大きな意義がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yasuura Masato, Shirato Haruko, Higo-Moriguchi Kyoko, Fujimaki Makoto	4. 巻 58
2. 論文標題 Detection of norovirus-like particles with an external force-assisted near-field illumination biosensor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 071005-1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7567/1347-4065/ab29e2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 H. Ashiba, Y. Sugiyama, X. Wang, H. Shirato, K. Higo-Moriguchi, K. Taniguchi, Y. Ohki, M. Fujimaki.	4. 巻 93
2. 論文標題 Detection of norovirus virus-like particles using a surface plasmon resonance- assisted fluoroimmunosensor optimized for quantum dot fluorescent labels.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biosensors and Bioelectronics	6. 最初と最後の頁 260-266
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bios.2016.08.099	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 白土東子
2. 発表標題 ノロウイルス感染と検出技術
3. 学会等名 第12回 メディカル・イノベーション・ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白土東子
2. 発表標題 糖と感染症
3. 学会等名 TIAナノバイオサマースクール（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白土東子
2. 発表標題 ノロウイルスと血液型抗原
3. 学会等名 第4回 コンソーシアム技術セミナー・技術交流会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安浦雅人、白土東子、守口匡子、藤巻真
2. 発表標題 EFA-NIバイオセンサを用いた実環境サンプル中のノロウイルス様粒子検出
3. 学会等名 ケミカルセンサ研究会
4. 発表年 2017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