

ノロウイルス（下痢症ウイルス） レファレンスセンター会議報告

世話人：染谷 雄一

国立感染症研究所 ウイルス第二部

令和4（2022）年 7月 4日 13:30～

Zoom会議室



地方衛生研究所担当者の皆さま

- 日頃よりノロウイルス（下痢症ウイルス）レファレンスセンター活動にご協力頂き、ありがとうございます。
- ノロウイルスレファレンスセンター地区担当者変更の際は、ウイルス第二部 染谷 (someya@niid.go.jp) までご一報をお願いします。
- 新型コロナウイルス感染症の流行に伴い、下痢症ウイルスの流行が抑えられています。これにより、下痢症ウイルス感染症に対して免疫力のない、あるいは、低下した人たちが蓄積されていると考えられますので、今後大流行の発生が懸念されます。継続的な注意喚起が必要と考えます。

標準プラスミド（陽性コントロール）請求先

- ノロウイルス

国立感染症研究所 感染症危機管理研究センター

第七室 岡本 貴世子（k-okmt@niid.go.jp）

- ロタウイルス、サポウイルス

国立感染症研究所 ウイルス第二部

第一室 染谷 雄一（someya@niid.go.jp）

報告事項

- ノロウイルス分類法について（村上主任研究官）
- ロタウイルス検査法について（藤井主任研究官）

令和4年7月4日 (月)
ノロウイルスレファレンスセンター

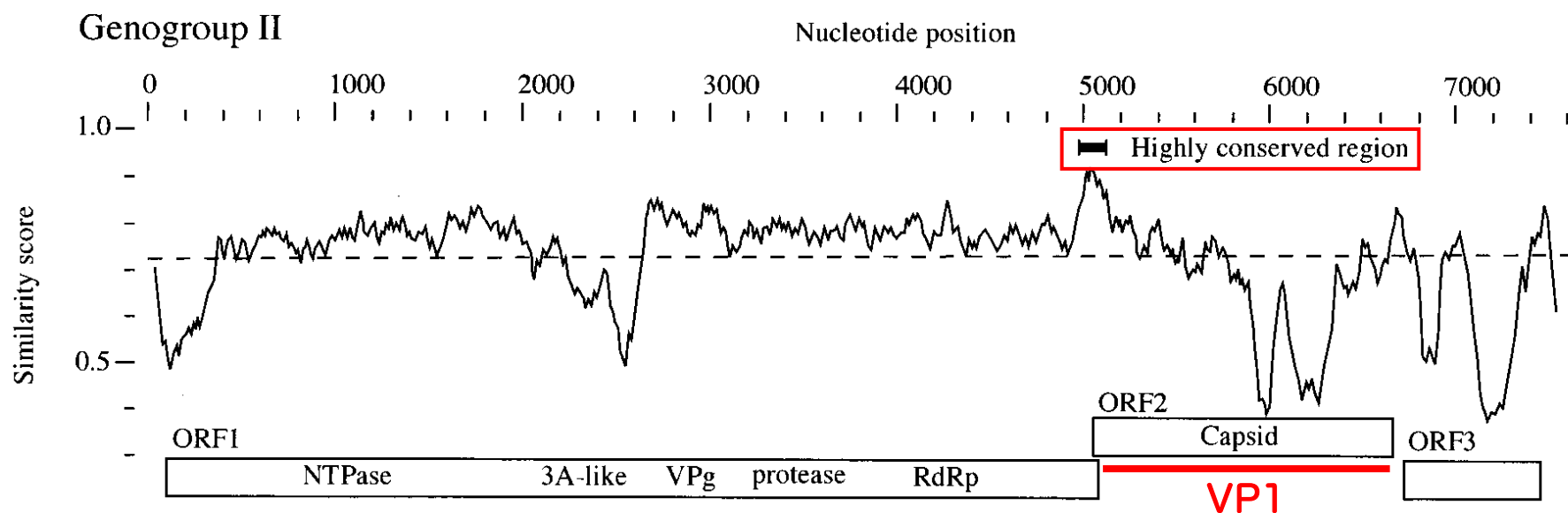
～ノロウイルス～

ノロウイルスの分類法について

国立感染症研究所
ウイルス第二部第一室
村上耕介



ノロウイルスの遺伝子構造と 遺伝子型内の類似度



抗原性に関するカプシド (VP1) により分類された

遺伝子型の再分類 (2013年当時)

Genogroup I

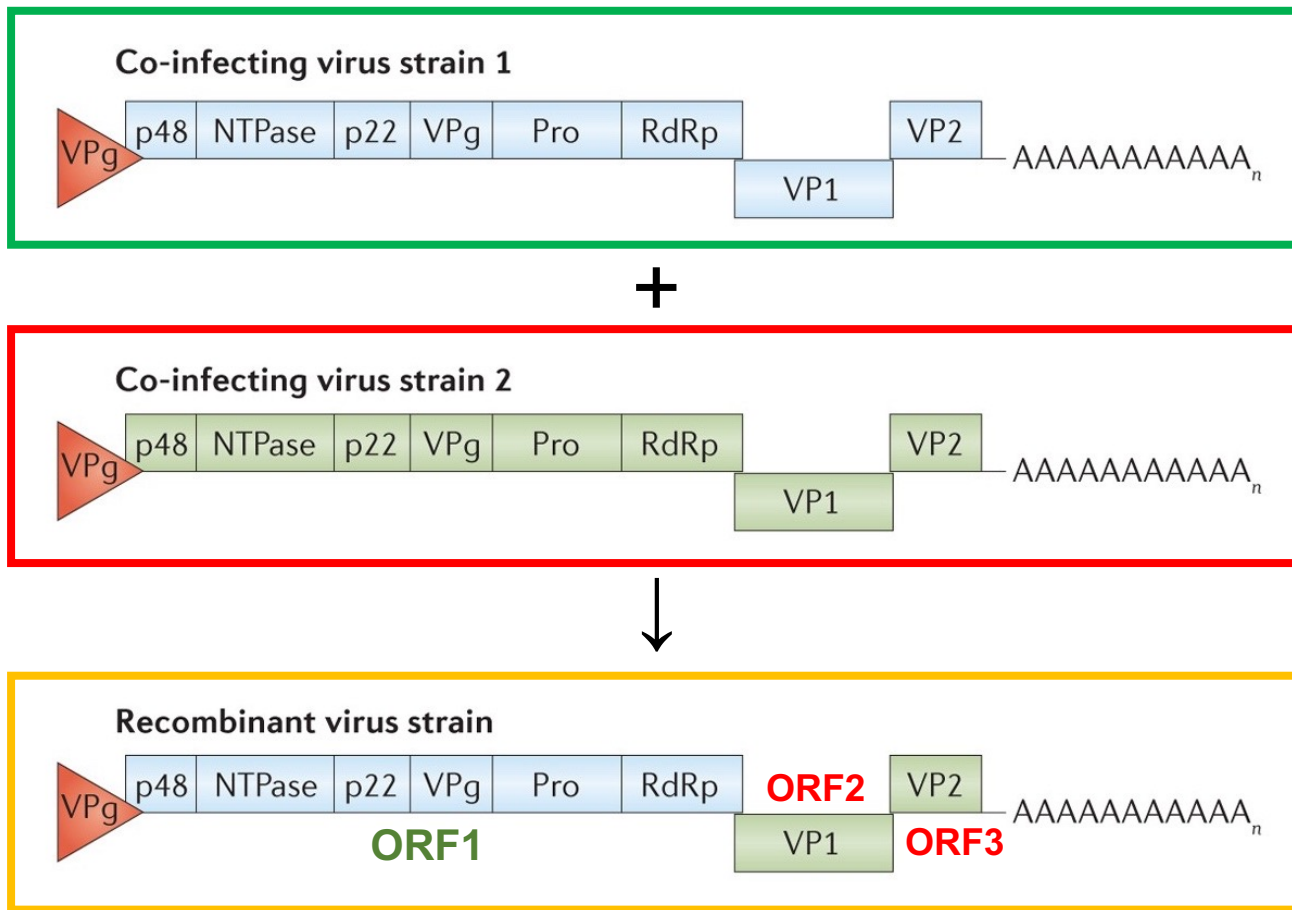
旧表記	新表記
GI/1	GI.1
GI/2	GI.2
GI/3	GI.3
GI/4	GI.4
GI/5	GI.5
GI/6	GI.6
GI/7	GI.7
GI/8	GI.6
GI/9	GI.5
GI/10	GI.8
GI/11	GI.3
GI/12	未定NA
GI/13	GI.9
GI/14	GI.3

Genogroup II

旧表記	新表記
GII/1	GII.1
GII/2	GII.2
GII/3	GII.3
GII/4	GII.4
GII/5	GII.5
GII/6	GII.6
GII/7	GII.7
GII/8	GII.8
GII/9	GII.9
GII/10	GII.10
GII/11	GII.17
GII/12	GII.12
GII/13	GII.14
GII/14	GII.13
GII/15	GII.16
GII/16	GII.21
(GII/17=GIV)	-
GII/18	GII.22
GII/19	GII.15
-	GII.11
-	GII.18
-	GII.19
-	GII.20

2013年の再分類で
GII/17がGIVに変更された

リコンビナント株の登場 (発見)



ORF1とORF2-3が入れ替わっている
→ VP1だけでなくORF (RdRp)による分類も必要

新しい分類法の提案

JOURNAL OF
GENERAL VIROLOGY

RESEARCH ARTICLE

Chhabra *et al.*, *Journal of General Virology* 2019;100:1393–1406
DOI 10.1099/jgv.0.001318



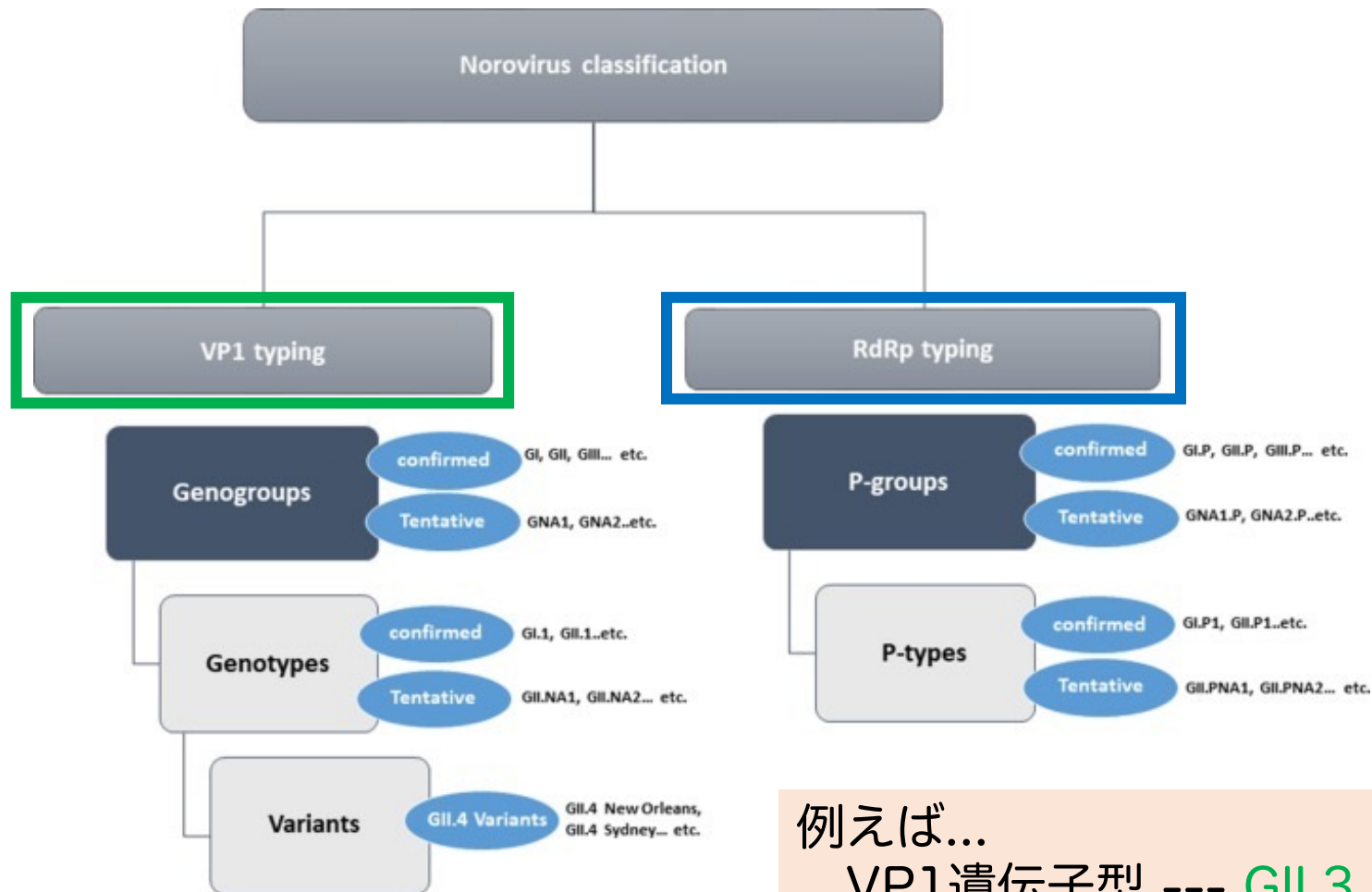
Updated classification of norovirus genogroups and genotypes

Preeti Chhabra^{1*}, Miranda de Graaf², Gabriel I. Parra³, Martin Chi-Wai Chan⁴, Kim Green⁵, Vito Martella⁶, Qihong Wang⁷, Peter A. White⁸, Kazuhiko Katayama⁹, Harry Vennema¹⁰, Marion P. G. Koopmans² and Jan Vinjé¹

Abstract

Noroviruses are genetically diverse RNA viruses associated with acute gastroenteritis in mammalian hosts. Phylogenetically, they can be segregated into different genogroups as well as P (polymerase)-groups and further into genotypes and P-types based on amino acid diversity of the complete VP1 gene and nucleotide diversity of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) region of ORF1, respectively. In recent years, several new noroviruses have been reported that warrant an update of the existing classification scheme. Using previously described 2× standard deviation (sd) criteria to group sequences into separate clusters, we expanded the number of genogroups to 10 (GI–GX) and the number of genotypes to 49 (9 GI, 27 GII, 3 GIII, 2 GIV, 2 GV, 2 GVI and 1 genotype each for GVII, GVIII, GIX [formerly GII.15] and GX). Viruses for which currently only one sequence is available in public databases were classified into tentative new genogroups (GNA1 and GNA2) and genotypes (GII.NA1, GII.NA2 and GIV.NA1) with their definitive assignment awaiting additional related sequences. Based on nucleotide diversity in the RdRp region, noroviruses can be divided into 60 P-types (14 GI, 37 GII, 2 GIII, 1 GIV, 2 GV, 2 GVI, 1 GVII and 1 GX), 2 tentative P-groups and 14 tentative P-types. Future classification and nomenclature updates will be based on complete genome sequences and will be coordinated and disseminated by the international norovirus classification-working group.

ORF1/ORF2による分類



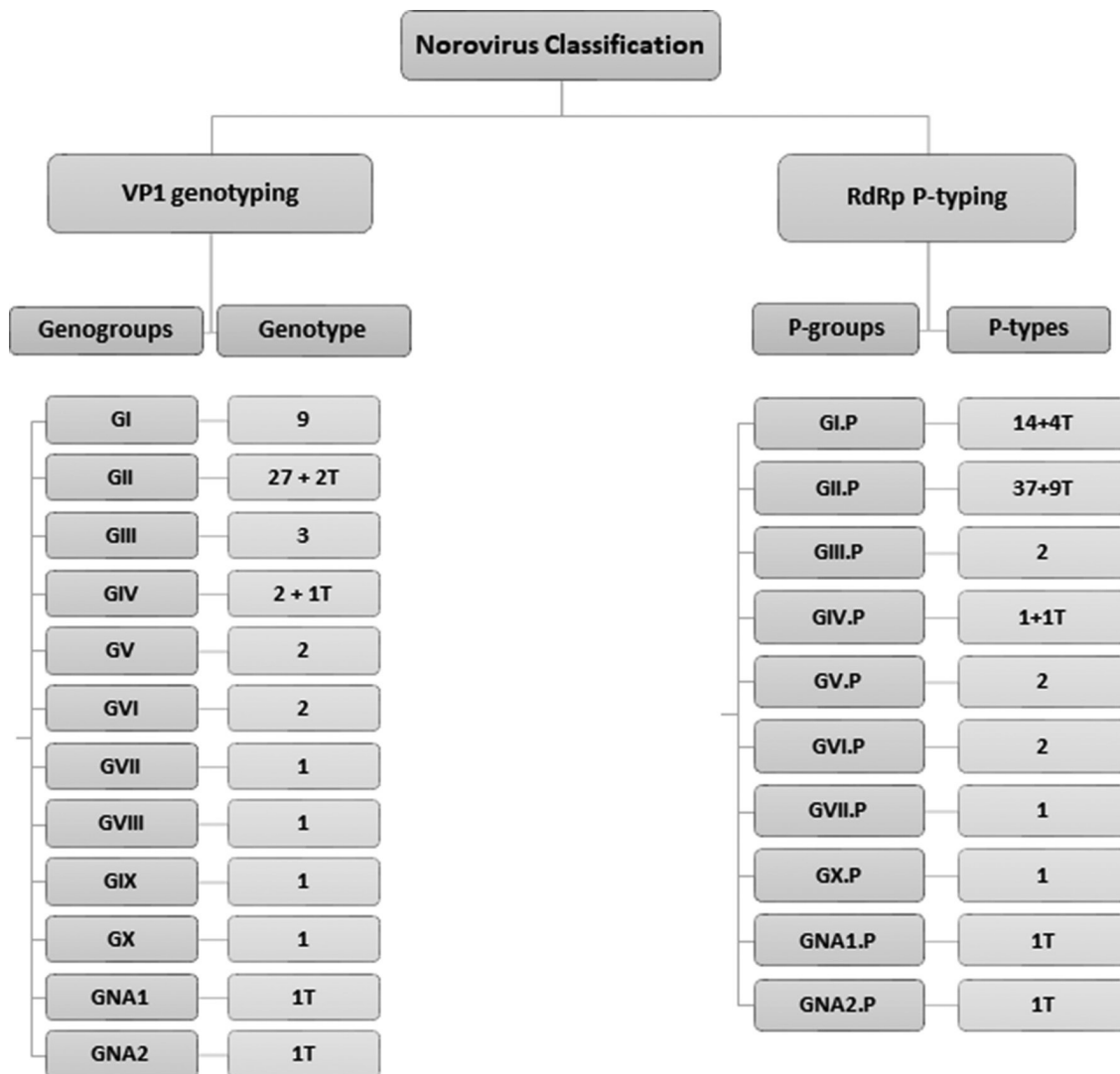
例えば...

VP1遺伝子型 --- GII.3

RdRp遺伝子型 --- GII.P12

→ GII.3[P12]

遺伝子群/遺伝子型の新しい分類



Dual typing法に用いるプライマー

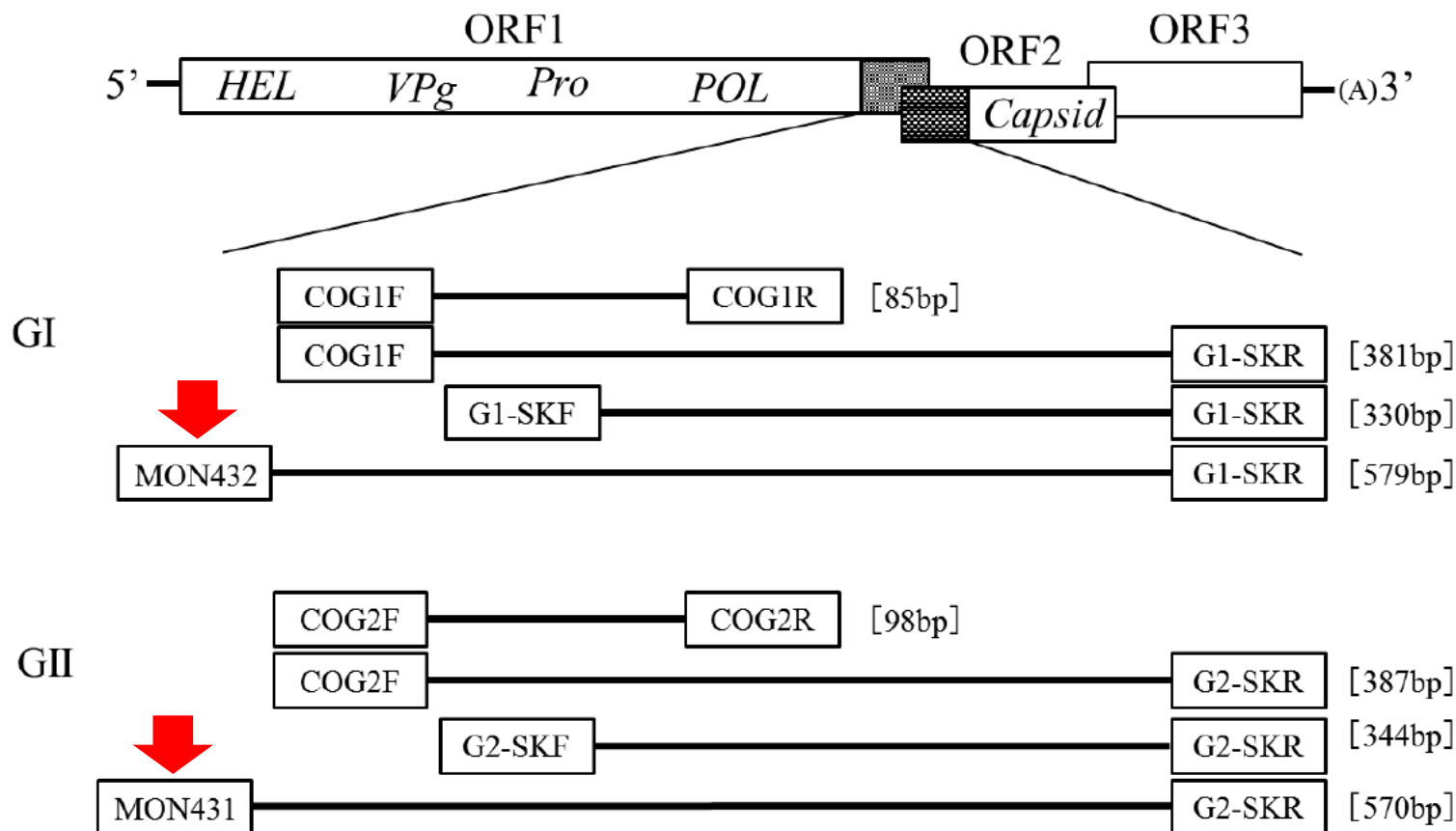
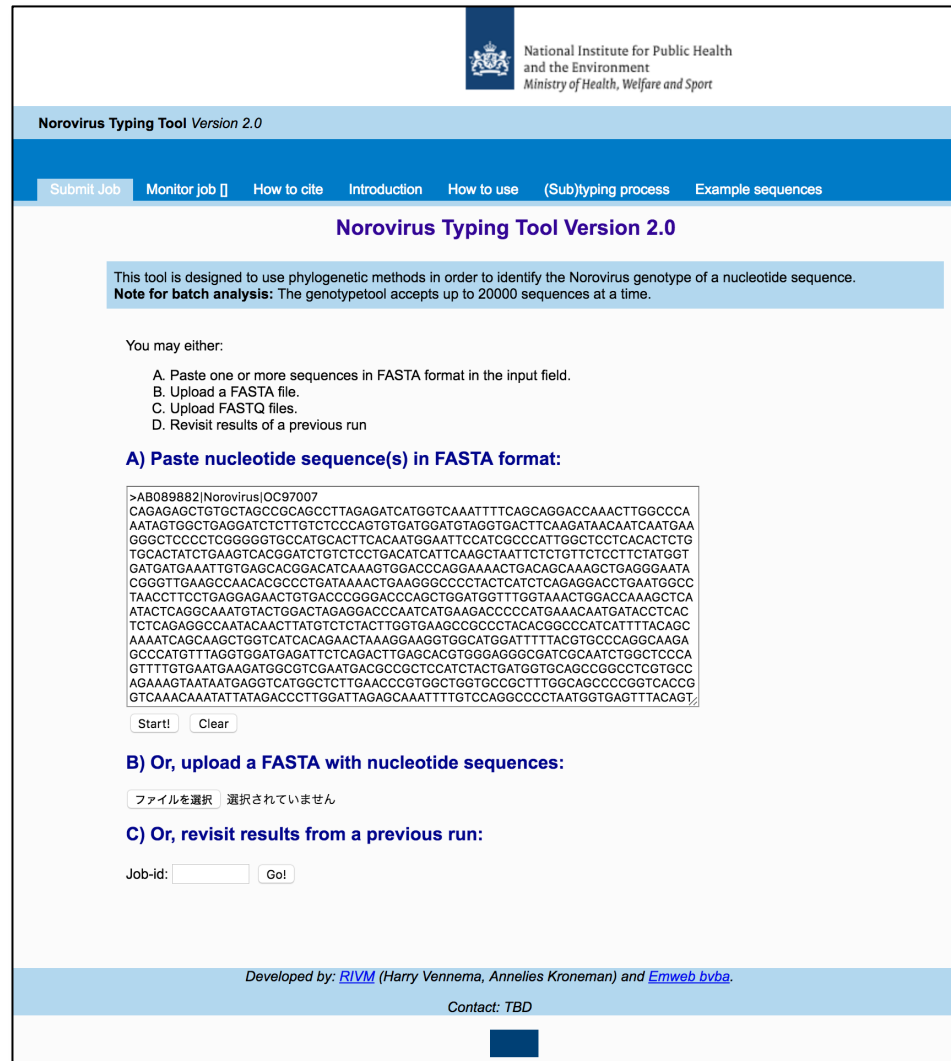


図 2. NoV 検査に使用するプライマーとプローブの位置

ノロウイルス遺伝子型判定ツール

オランダ国立公衆衛生環境研究所による提供
<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus/>



The screenshot shows the web interface for the Norovirus Typing Tool Version 2.0. At the top right, it identifies the National Institute for Public Health and the Environment, Ministry of Health, Welfare and Sport. The main navigation bar includes links for Submit Job, Monitor job, How to cite, Introduction, How to use, (Sub)typing process, and Example sequences. The tool's purpose is explained: it uses phylogenetic methods to identify the Norovirus genotype of a nucleotide sequence. A note for batch analysis states it accepts up to 20000 sequences at a time. Users are given four options: A) Paste one or more sequences in FASTA format in the input field, B) Upload a FASTA file, C) Upload FASTQ files, and D) Revisit results of a previous run. Option A is selected, and a sample FASTA sequence is provided in a text area. Below the text area are 'Start!' and 'Clear' buttons. Option B is also presented with a file selection button that currently shows 'ファイルを選択 選択されていません'. Option C includes a 'Job-id:' input field and a 'Go!' button. The footer credits the developers: RIVM (Harry Vennema, Annelies Kroneman) and Emweb bvba, and lists the contact as TBD.

病原体検出マニュアルの改訂 (再周知)



こちら研究部
画像・映像アーカイブ
感染研年報
国際協力

サーベイランス

感染症発生動向調査週報 (IDWR)
病原微生物検出情報 (IASR)
感染症流行予測調査 (NESVPD)
院内感染 (JANIS)
実地疫学専門家養成コース (FETP-J)

刊行・マニュアル・基準

JJID 感染研究の国際学術雑誌
病原体検出マニュアル
病原体安全管理規程等
生物学的製剤基準
感染研・学会出版書籍

更新情報
記事一覧

感染症の話
JJID ACCESS
IDSC 感染症疫学センター
IDWR 感染症発生動向調査週報

IASR Infectious Agents Surveillance Report
感染症流行予測調査 NESVPD
JANIS
公開講座 研修のお知らせ

抗生物質標準品
国際協力 International Cooperation
感染症検体パネル
検定合格情報 国立感染症研究所

きた。診断した医師には全数届出が義務...
続きを読む

研究トピックス

新型コロナウイルスの新規抗体はウイルスの弱点を攻撃することでSARS類縁ウイルスや変...
A SARS-CoV-2 Antibody Broadly Neutralizes SARS-related Coronaviruses and Variants by Coordinated Recognition of a Virus Vulnerable Site Taishi Onodera, Shunsuke Kita, Yu Adachi, Saya Moriyama, Akihiko Sato, Takao Nomura, Shuhei Sakakibara, Takeshi Inoue, Takashi Tadokoro, Yuki Anraku, Kohei Yumoto...

ハイスループットな中和試験法によるタイのフラビウイルス中和抗体の血清疫学調査：201...
Seroprevalence of Flavivirus Neutralizing Antibodies in Thailand by High-Throughput Neutralization Assay: Endemic Circulation of Zika Virus before 2012 Atsushi Yamanaka, Mami Matsuda, Tamaki Okabayashi, Pannamthip Pitaksajikul, Pongrama Ramasoota, Kyoko Saito, Masayoshi Fukasawa, Kentaro Hanada...

IDWR 2021年第41号<注目すべき感染症> 梅毒
2021年10月29日

IDWR 2021年第41週 (第41号)
2021年10月29日

更新履歴

アクセスの多い記事

インフルエンザ流行レベルマップ 第9週 (3/12更新)

コロナウイルスとは
新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 関連情報について

マイコプラズマ肺炎とは
日本の予防接種スケジュール

SARS (重症急性呼吸器症候群) とは
風疹Q&A (2018年1月30日改訂)
風疹とは
IDWRトップ
ヘルパンギーナとは

病原体検出マニュアル
ノロウイルス (第1版)
平成31年6月

1

新しい分類に対応したシーケンス方法等が収録されています

ノロウイルス(下痢症ウイルス) レファレンスセンター報告

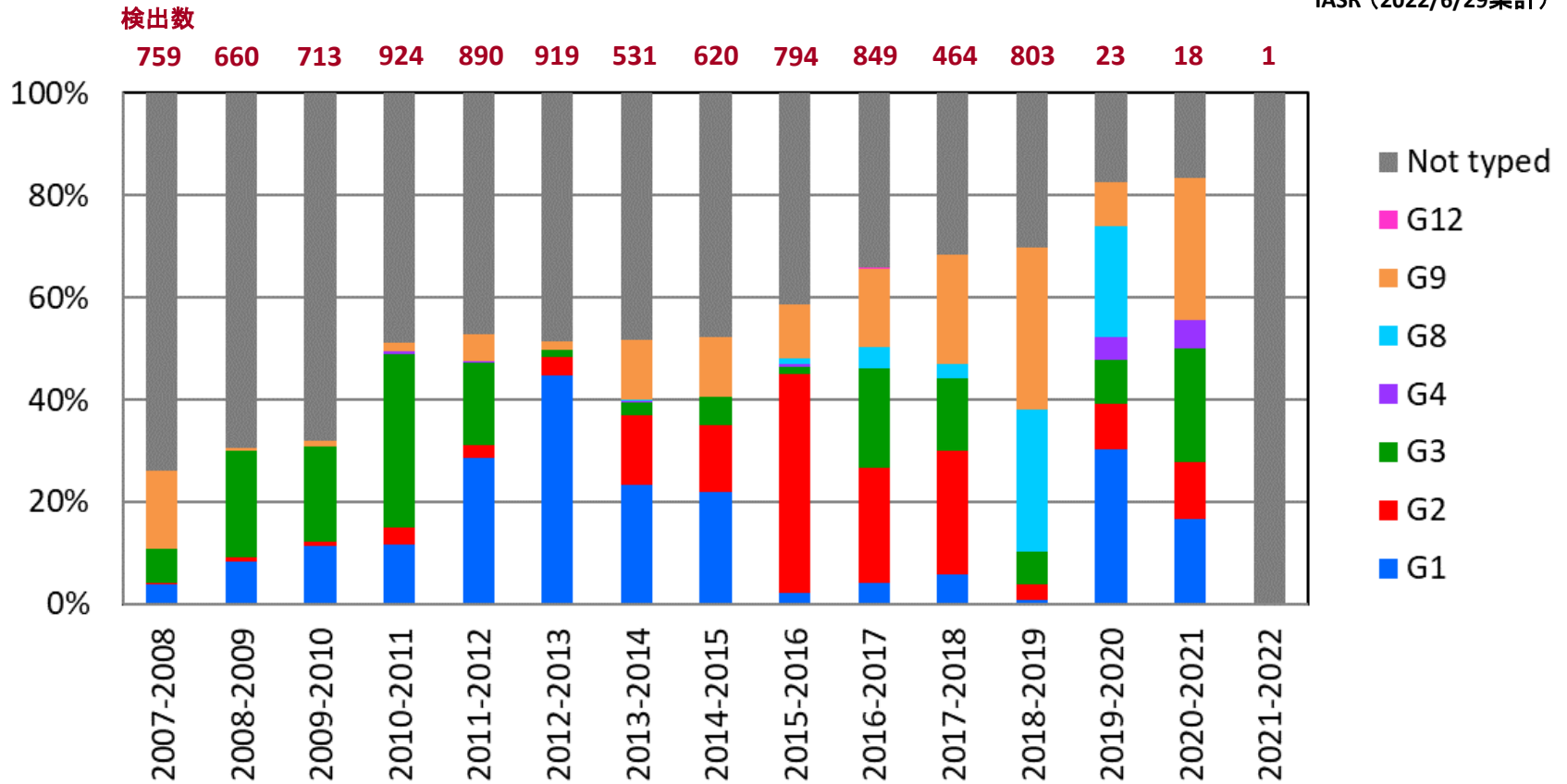
～ ロタウイルスについて ～

国立感染症研究所 ウイルス第二部

2022年7月4日

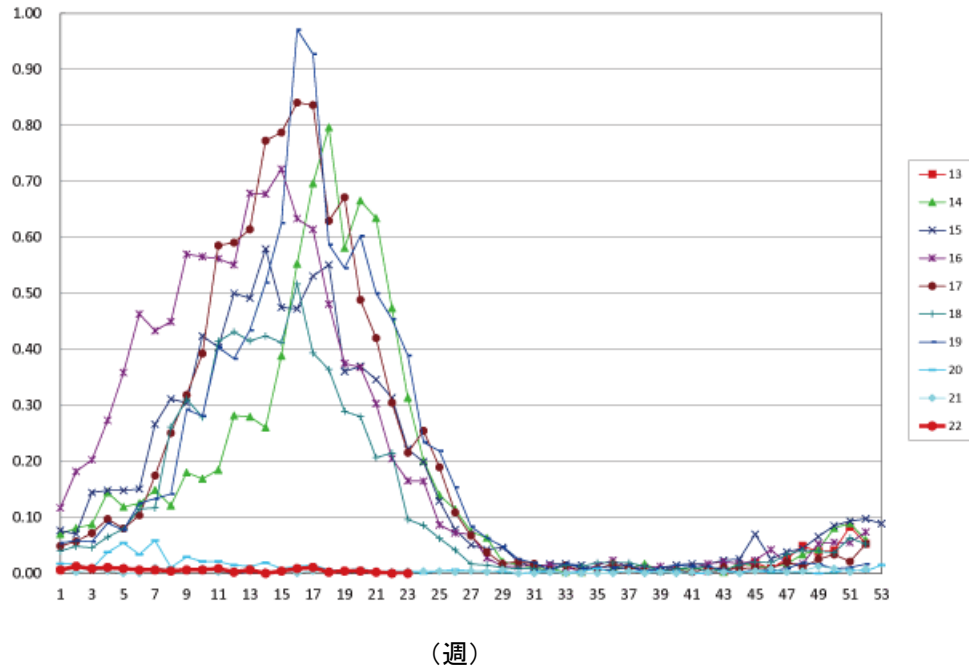
ロタウイルスの検出状況 (IASR)

IASR (2022/6/29集計)



- ◆ 2020年以降、ロタウイルスの検査報告数は非常に少ない。
- ◆ 遺伝子型の特定は年々積極的にされている傾向にある。

ロタウイルスの流行状況(発生動向調査、IDWR)



和暦	西暦	報告数	定点あたり
平成26年	2014年	4030	8.48
平成27年	2015年	4068	9.16
平成28年	2016年	5266	11.04
平成29年	2017年	4991	10.46
平成30年	2018年	3234	6.74
令和元年	2019年	4693	9.82
令和2年	2020年	250	0.52
令和3年	2021年	91	0.19
令和4年	2022年	62	0.13

- 2020年以降、ロタウイルスの検出報告数は非常に少ない。
- 定期接種化は2020年10月からだが、2020年春の流行はほとんど無かった。

新型コロナウイルス流行に伴い、保育所・学校等の登園・登校自粛等の行動変容や、衛生管理の意識が格段に向上した影響と思われる。

病原体検出マニュアル

病原体検出マニュアルは、感染症法に基づいて感染症の報告がなされる際の検査の標準化のために、国立感染症研究所と全国地方衛生研究所の共同作業で作成されたものであり、感染症対策に係る行政対応における大きな根拠となっております。本マニュアルを使用し、常に評価し、科学の進歩にあったものに改善していくことが常に求められています。

5類感染症 定点把握

- [RSウイルス感染症](#) 2020年6月版
- [咽頭結膜熱](#) 2017年3月版
- [A群溶血性レンサ球菌咽頭炎](#) 2013年8月版
- [感染性胃腸炎](#)
- [ロタウイルス](#) 2019年6月版
- [ノロウイルス](#) 2019年6月版
- [サボウイルス](#) 2021年7月版
- [アデノウイルス下痢症](#) 2022年5月版

- [水痘](#) 2011年10月版
- [手足口病](#) 2018年2月版
- [伝染性紅斑](#)
- [突発性発しん](#) 2015年8月版
- [ヘルパンギーナ](#) 2018年2月版
- [流行性耳下腺炎](#) 2015年1月版

ロタウイルス検出マニュアル

目次

I. ロタウイルスの概説

- I-1. 病原体
- I-2. 分類
- I-3. 疫学
- I-4. 臨床症状
- I-5. ワクチン

II. 検査準備

- II-1. 検査材料の取り扱い
- II-2. 検査の進め方
- II-3. 検査材料の採取
- II-4. 10%懸濁液の作製

III. 検査方法

- III-1. イムノクロマト法
 - III-2. ELISA法
 - III-3. RNA抽出
 - III-4. PAGEによるウイルスRNAの検出
 - III-5. リアルタイムPCR
 - III-6. マルチプレックスPCR(VP7の遺伝子型決定法)
 - III-7. RT-PCR
 - III-8. シークエンス解析
- ※ワクチン株との鑑別について

ロタウイルスのリアルタイムPCR用プライマー・プローブセットについて

- 現在、2種類のプライマー・プローブセットが広く利用されている。
(ターゲットはいずれもNSP3遺伝子だが、位置が異なる)
- セット①、②とも、主要流行株(T1型、T2型)は概ね検出可能。

セット①(Jothikumar *et al.*)

Journal of Virological Methods 155 (2009) 126–131

Target	Primer name	5' - sequence -3'	Product size	Position
NSP3	JVKF	CAGTGGTTGATGCTCAAGATGGA	131	17–39
	JVKR	TCATTGTAATCATATTGAATACCCA		123–147
	JVKP	ACAACCTGCAGCTTCAAAAAGAAGWGT		72–96

セット②(Freeman *et al.*)

Journal of Medical virology 80 (2008) 1489–1496

Target	Primer name	5' - sequence -3'	Product size	Position
NSP3	NVP3-FDeg	ACCATCTWCACRTRACCCTC	87	988–1007
	NVP3-R1	GGTCACATAACGCCCTATA		1055–1074
	NVP3-Probe	ATGAGCACAAATAGTTAAAAGCTAACACTGTCAA		1009–1041

※Integrated DNA Technologies (IDT)社のダブルクエンチャープローブ(5'-FAM/ZEN/3'-IBFQ)の使用を推奨。

セット①の問題点（検出可能な遺伝子型が限定的）

セット① (Jothikumar *et al.*)

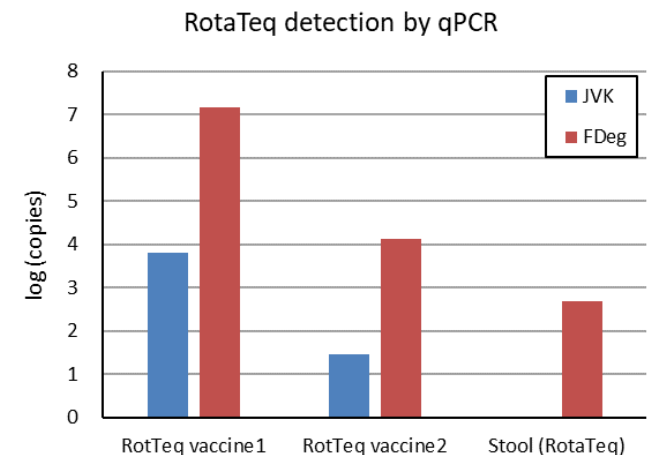
Journal of Virological Methods 155 (2009) 126-131

Target	Primer name	5' - sequence -3'	Product size	Position
NSP3	JVKF	CAGTGGTTGATGCTCAAGATGGA	131	17-39
	JVKR	TCATTGTAATCATATTGAATACCCA		123-147
	JVKP	ACAAC TGCAGCTTCAA AAGAAGWGT		72-96

- 主要流行株 (T1型、T2型) は検出可能だが、AU-1型株 (T3型) を検出できない。
- ワクチン株のうち、ロタリックス (T1型) は検出可能だが、
ロタテック (T6型) は検出感度が大幅に落ちる。(1/1000程度)
→ セット①は非推奨。

注意!

- 次回のマニュアル更新で削除する予定。



セット②の問題点（非特異反応の発生）

セット② (Freeman *et al.*)

Journal of Medical virology 80 (2008) 1489–1496

Target	Primer name	5' - sequence -3'	Product size	Position
NSP3	NVP3-FDeg	ACCATCTWCACRTRACCGCTC		988–1007
	NVP3-R1	GGTCACATAACGCCCTATA	87	1055–1074
	NVP3-Probe	ATGAGCACAATAGTTAAAAGCTAACACTGTCAA		1009–1041

※Integrated DNA Technologies (IDT)社のダブルクエンチャープローブ (5'-FAM/ZEN/3'-IBFQ)の使用を推奨。

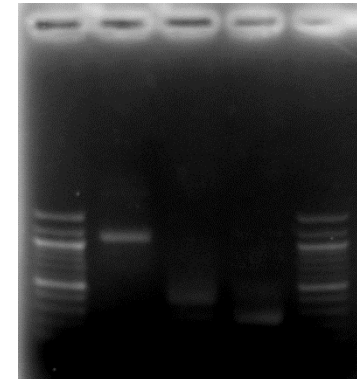
- セット②は幅広いロタウイルス株を検出可能。

ただし、便検体ではしばしば非特異反応が見られ、

陰性検体でも10～100 copies/uL前後の増幅が見られ偽陽性となる場合がある。

100 copies/uL以上を陽性として判定するのが無難。

- ヒトゲノム、腸内細菌、アストロウイルス等、様々な要因で非特異反応が起こっている。
- 低コピー ($10^2 \sim 10^3$ 程度未満) の場合はRT-PCRによる確認を推奨。



セット②の反応条件の改良

セット② (Freeman *et al.*)

Primer name	5'- sequence -3'	終濃度 (μM)	
		従来	改良
NVP3-FDeg	ACCATCTWCACRTRACCCTC	0.25	0.4
NVP3-R1	GGTCACATAACGCCCTATA	0.25	0.2
NVP3-Probe	ATGAGCACAAATAGTTAAAAGCTAACACTGTCAA	0.25	0.2



プライマーの濃度を変更することにより、非特異反応が軽減される可能性あり。
(検証用の手持ちサンプルセットで、非特異発生率20-25% → 12%程度)

- 追加の検証をして頂ける方、募集中。
- 次回のマニュアル更新で反映させる予定。

ロタウイルス遺伝子型判定ツール

- ◆ ロタウイルスの塩基配列データから、どの遺伝子で、どの型か判定してくれるツール。



ViPR Home > Reoviridae Home > Rotavirus A Genotype Determination

Rotavirus A Genotype Determination

This annotation pipeline is for genotyping Rotavirus A viruses. This tool is based on software written by Dan Katzel at the J. Craig Venter Institute that is a Jillion @ optimized reimplementation of RotaC^{2.0} @. (SOP)

ANALYSIS NAME

INPUT SEQUENCES

Analyze my custom sequences only.
Upload a file containing my sequences in FASTA @ format.

Paste sequences in FASTA @ format.

```
>sequence
ggcttcaaaagagaaattccgtctggct
aaaggttagctctttaaagtagaact
gaatataccacaattctaatctctgata
tcaatctctctcctcaactatcttataa
tcagtgcccgaaatagagctcaatata
catagattctctcaattcttagcatta
cttgccctaactaaagctcagaactatgga
ctcaatataccaaatagagatcaatggat
aacatctatccaaatctctctccaaagaa
```

Analyze my custom sequences and associated metadata with ViPR sequences.

Clear Run



Rotavirus A Genotyping Report (SOP)

Download Raw Result

Results of Genotyped Sequences

Sequence Identifier	Segment Number	Gene Name	Genotype	Closest Strain	Query Coverage %	Ident %	E Value
sequence	9	VP7	G1	RVA/Human-wt/BGD/Dhaka16/2003/G1P8	93.88	96.84	0E0

Results of Non-Genotyped Sequences

No Sequences in the input fasta cannot be genotyped

- 以前の「RotaC」は閉鎖。
- 現在はViPR (Virus Pathogen Resource) サイト内にRotaCの後継ツール「Rotavirus A Genotype Determination」があり、同様の解析が可能。

感染症流行予測調査

National Epidemiological Surveillance of Vaccine-Preventable Diseases (NESVPD)

令和3年度感染症流行予測調査実施要領

目次

- ワクチンの定期接種化に伴い、
2020年度（令和2年度）から
ロタウイルスの流行予測調査
（感染源調査）を実施しています。

ご参加お待ちしております。

（ご相談は疫学センターまで）

疾病別実施地区数及び対象数	1
第1 感染症流行予測調査の概要	2
第2 ポリオ	
1 感受性調査（1型・3型ポリオウイルス）	6
2 感受性調査（2型ポリオウイルス）	6
3 感染源調査（環境水からのポリオウイルス分離・同定）	7
資料1 環境水からのポリオウイルス分離（採水・濃縮・分離方法）	9
第3 インフルエンザ	
1 感受性調査	10
2 新型インフルエンザウイルスの出現監視を目的とした感染源調査	11
資料2 インフルエンザウイルス分離のための検体の採取	13
資料3 インフルエンザウイルス分離のためのフローチャート	14
第4 日本脳炎	
1 感受性調査	15
2 感染源調査	15
3 確認患者調査	17
第5 風しん	
感受性調査	18
第6 麻疹	
感受性調査	20
第7 ヒトパピローマウイルス感染症	
感受性調査	21
第8 水痘	
感受性調査	22
第9 B型肝炎	
感受性調査	23
第10 インフルエンザ菌感染症	
感染源調査	24
第11 肺炎球菌感染症	
感染源調査	25
第12 ロタウイルス感染症	
感染源調査	26
第13 新型コロナウイルス感染症	
感受性調査	27
第14 血清取扱要領	28

今後の検討事項

- RNAコントロールの検討
 - RNAウイルスの検査にDNAコントロールを用いるのでよいのか
- 病原体検出マニュアルの作成、更新
 - アストロウイルスは作成に向け、準備中
 - 既出のものは必要があれば更新
- 新規検査法の検証
 - 特筆なし
- 既存の検査法の精度向上、簡素化に向けた検討
 - マルチプレックスPCR法の位置付け

そのほか

- 検査法の提案、検査法の検証、改善点の指摘、検出マニュアルの作成、など
ご意見、ご要望は、染谷 (someya@niid.go.jp) までお寄せください
- 直接でも結構ですし、地区担当者に取りまとめてお送り頂いても構いません
- 今後もお協力をお願いいたします