

ノロウイルスの主要抗原遺伝子（VP1遺伝子）の分子進化および
分子疫学に関する研究

本谷 匠

平成 29 年度

Studies on the molecular evolution and molecular epidemiology of
the *VP1* gene in norovirus

Takumi Motoya

2017

I. 緒論	1
II. 第一章	10
1. 緒言	11
2. 材料および方法	
2-1. ノロウイルスの塩基配列データセットの作成	13
2-2. Bayesian Markov chain Monte Carlo 法を用いて 構築した時系列系統解析による進化系統樹の作成	13
2-3. Similarity 解析	15
2-4. 系統間距離の解析	15
2-5. 選択的圧力の推定	15
2-6. 立体配座 B 細胞エピトープ予測	16
2-7. VP1 蛋白質の立体構造上の正の選択部位、 エピトープ、アミノ酸置換のマッピング	16
2-8. Bayesian Skyline Plot 解析	17
2-9. 統計分析	17
3. 結果	
3-1. 世界的に収集されたノロウイルス GII.4 の 時系列的進化解析結果	20
3-2. <i>VP1</i> 遺伝子の Similarity 解析	25
3-3. GII.4 および GII.4 variant の系統間距離の解析	27
3-4. VP1 構造上の立体配座エピトープ、 選択圧解析、アミノ酸置換のマッピング	29
3-5. Bayesian Skyline Plot 法による NoV <i>VP1</i> 遺伝子の ゲノムポピュレーション解析結果	39
4. 考察	43

III. 第二章	50
1. 緒言	51
2. 材料および方法	
2-1. 検体の収集	53
2-2. ノロウイルスの検査	53
2-3. ウイルス遺伝子のシーケンスと解析	54
2-4. 疫学データの解析	54
2-5. 分子系統解析	55
2-6. 統計分析	55
3. 結果	
3-1. ノロウイルス検査結果と遺伝子型別	56
3-2. 各遺伝子型における事例発生数の推移	56
3-3. 各遺伝子型における流行時期の比較	59
3-4. 各遺伝子型における患者の年齢分布	61
3-5. 各遺伝子型における感染場所の比較	62
3-6. 分子系統解析	
3-6-1. GII.2	65
3-6-2. GII.4	67
3-6-3. GII.6	69
3-6-4. GII.17	71
4. 考察	73
IV. 謝辞	77
V. 引用文献	78
VI. 補助図表	107

I. 緒論

ノロウイルス (NoV) は、アメリカのオハイオ州、Norwalkにおいて、1968年に発生した小学校の感染性胃腸炎集団事例から、米国 National Institutes of Health (NIH) の Kapikian博士により、電子顕微鏡下で初めて発見された[55]。その後の研究により、NoVは感染性が極めて高く、本邦だけでなく、アメリカ、イギリス、ニュージーランド、オーストラリアならびにフランスなど、世界各国でウイルス性急性胃腸炎の主要な原因であることが示唆されている[44, 112, 136]。また、本邦においては過去数年間、食中毒の病因物質の中で、NoVが事件数・患者数ともに第1位となっている[63]。さらに、アメリカでは、NoVによる胃腸炎により、年間2,000万人を超える胃腸炎患者が発生し、5.6-7.1万人の入院患者、570-800人の死亡者を出しており[47]、アウトブレイクにより一つの病院が被る被害額としてUSD40,000-650,000と莫大な費用の試算報告がある[53, 157]。このように、NoV感染症は、大きな疾病負荷を世界各国に与えていると思われる[112]。

NoVは、カリシウイルス科 (*Caliciviridae*)、ノロウイルス属 (*Norovirus*) に属し、直径27-40nm、正20面体構造で、エンベロープを持たないウイルスである[44]。ウイルスゲノムの構造は、一本鎖プラスセンスRNAである[44]。現在、NoVは、遺伝学的解析により7遺伝子群 (Genogroup) GI-GVIIに分類されている[145] (図1)。このうち、ヒトに感染可能なNoVはGI、GIIおよびGIVであると推定されるが、検出頻度が高いのは、GIおよびGIIである[80]。また、GIは9種類 (GI.1-GI.9)、GIIは22種類 (GII.1-GII.22) の遺伝子型 (Genotype) に分類可能である[66]。さらに、これらの遺伝

子型のNoVは、系統学的に独立しているだけでなく、遺伝的に極めて多様であることが示唆されている[44, 112, 145]。

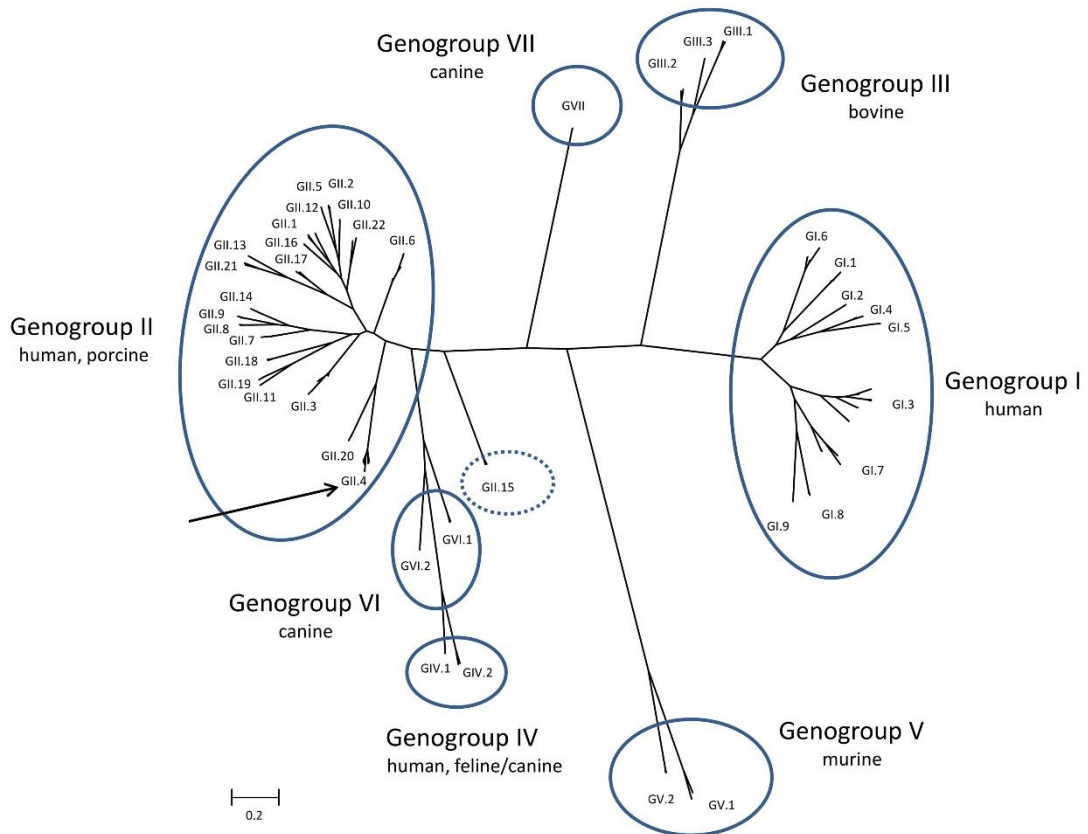


図1. ノロウイルスの系統樹 (Vinjé. 2015. Figure 1より抜粋)

NoVゲノムの長さは7.5–7.7kbで、3つのOpen Reading Frame (ORF1、ORF2およびORF3)を有する。ORF1は、7つの非構造蛋白質 (NS1–NS7)をコードし、翻訳された後に切断されウイルス複製に関与するポリ蛋白質を産生する。ORF1のコード配列は、N末端からC末端にかけて、p48、NTPase、p22、VPg、3C-Like protease (3CL^{PRO})、RNA dependent RNA polymerase (RdRp)である[49, 125] (図2)。



図2. ノロウイルスの遺伝子地図 (Subba-Reddy et al. 2011. Figure 1Aより抜粋)

次に、ORF2は、約60kDaの主要構造蛋白質 (VP1) をコードし、さらにORF3は、別の構造蛋白質 (VP2) をコードしている[44]。現在、クライオ電子顕微鏡による詳細な構造解析により、NoV粒子は90分子のVP1蛋白質 (2量体) と数個のVP2により capsid 表面に空洞状・カップ状構造を形成していることが示唆されている[112] (図3)。

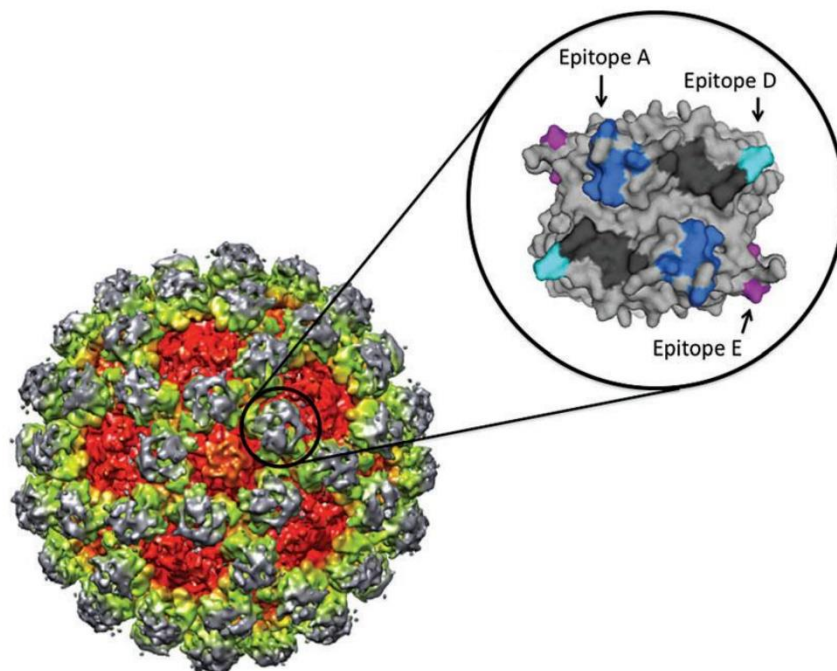


図3. ノロウイルス capsid の立体構造と構成する2量体構造の P2ドメイン (Debbink et al. 2014. Figure 2より抜粋)

また、Norwalkウイルス様粒子を用いたX線結晶構造解析により、VP1はシェルドメイン (shell domain) および突起状ドメイン (protruding domain、Pドメイン) を有することが明らかとなった [107]。また、VP1遺伝子はNoVの主要抗原であるキャプシド蛋白をコードしており、このウイルスの感染性や抗原性と密接に関連していると考えられる [23]。シェルドメインはウイルスRNAを取り囲み、可撓性ヒンジを介してシェルドメインに連結されたPドメインはVP1のC末端部分に対応することが推定されている [107]。さらに、Pドメインは、P1サブドメインと、推定上の中和抗体結合部位を含み、血液型物質の一種である Histo-blood group antigens (HBGA) と相互作用する、超可変領域 (P2サブドメイン) に区分することができる [49] (図4)。一方、VP2の機能については不明な点が多いが、ウイルス粒子の内部に位置し、キャプシドの集合およびゲノムキャプシド形成に関与することが示唆されている [146]。NoV VP1遺伝子は急速に進化し、抗原性の大きな発散をもたらすことが示唆されている [2, 9, 23, 151, 154]。

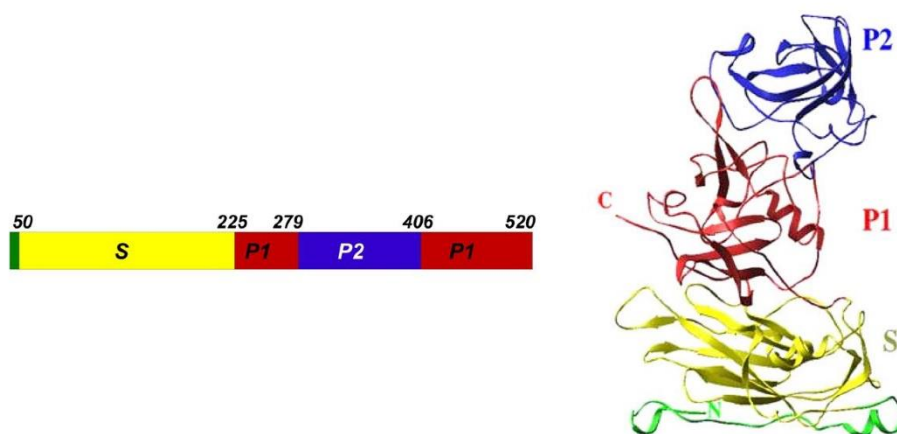


図4. ノロウイルスのVP1遺伝子の各ドメインと3次元立体構造 (Hardy. 2005. Figure 2より抜粋)

NoVは、まず宿主細胞のHBGAとVP1の相互作用により細胞表面に付着・侵入する。次に、宿主細胞質内で遺伝子が翻訳される。翻訳はゲノムの5'末端に共有結合する非構造蛋白質のVPgが宿主細胞に翻訳開始因子として認識されることで開始する。その後、ORF1にコードされたポリ蛋白質が翻訳後ウイルスにコードされたプロテアーゼによって個々の蛋白質に切断され、ゲノム複製中、センス鎖RNAは転写されアンチセンス鎖RNAが合成され、新しいセンス鎖RNAやサブゲノムセンス鎖RNAを増幅するための鋳型として使用される。サブゲノムセンス鎖RNAはORF2とORF3のみを含み、構造蛋白質の産生に使用される。キャプシド形成の間に、ゲノムは新しいビリオンに包まれ、感染宿主細胞から放出されると推定されるが、今のところその機構には不明点が多い[25, 58] (図5)。

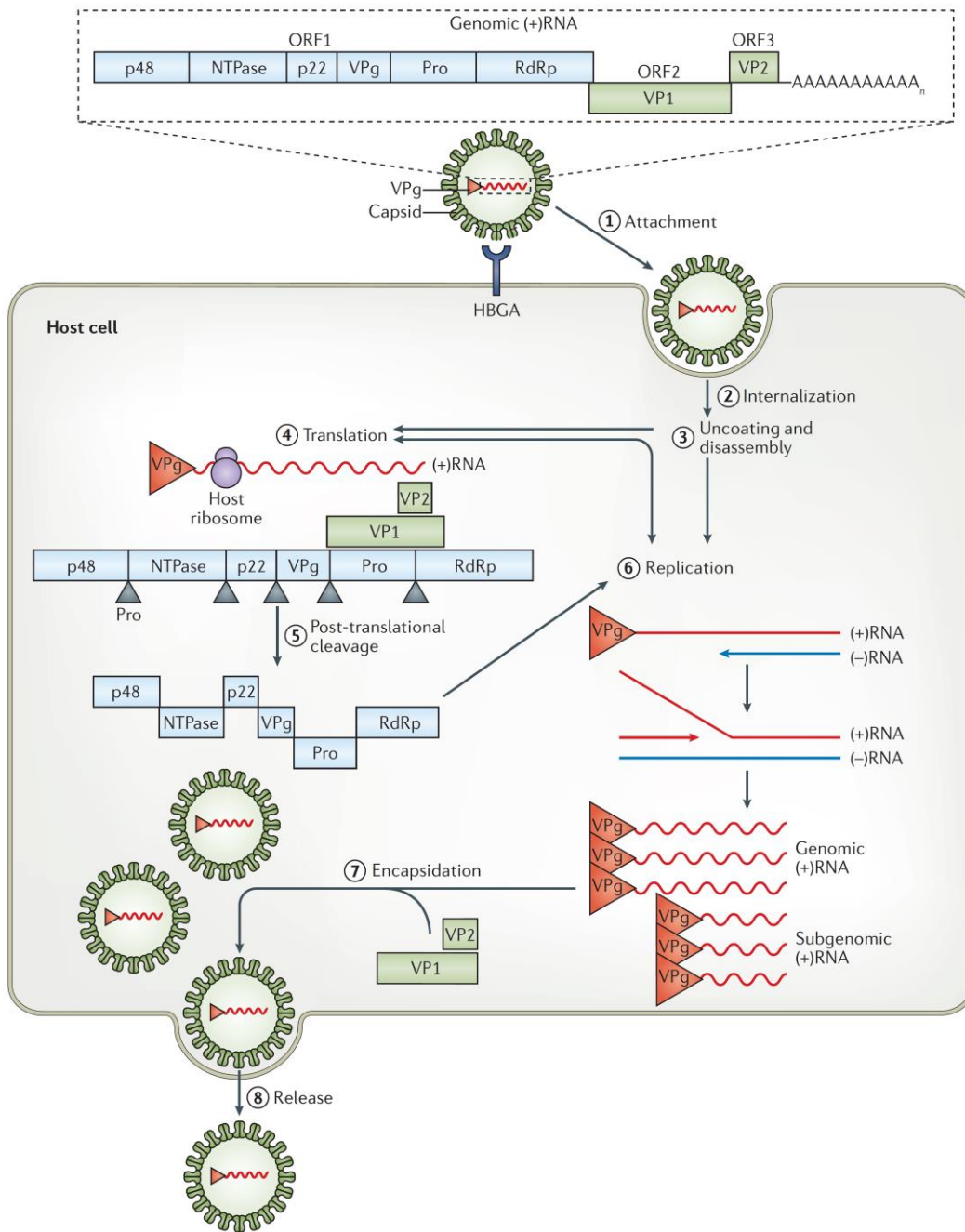


図 5. ノロウイルスのゲノムとライフサイクル (de Graaf. 2016. Figure 1 より抜粋)

これまでの疫学研究で、NoVGIIは、様々な国のあらゆる年齢層の人々に急性胃腸炎の流行を引き起こしており、過去10年以上に

わたり当該ウイルスによる急性胃腸炎に関する多数の研究結果が報告されている[15, 112, 120]。また、これらの研究と最近の研究により、世界的に検出されている遺伝子型（流行遺伝子型）は、GI.3、GII.2、GII.3、GII.4、GII.6、GII.12およびGII.17であったことが明らかになっている[50, 70, 88, 134, 141]。これらの遺伝子型のうち、GII.4は特に発生頻度が高く[29]、中でもGII.4のvariant（GII.4v）であるDen Haag 2006bが2006/2007シーズンに突然出現し、これまでにない規模の世界的な胃腸炎の大流行（パンデミック）を引き起こした[73, 94, 120, 137, 138]。また、このGII.4vは、それから数シーズン流行後[50, 70, 117]、さらなるGII.4v（New Orleans 2009やSydney 2012など）を次々と生み出し、持続的な胃腸炎流行を引き起こした[1, 70, 101, 120, 141, 145]（図6）。このような流行は、他のNoV遺伝子型と比較して極めて独特である[145]。しかし、「なぜGII.4が長期にわたり、ウイルス性胃腸炎のパンデミックを引き起こしたのか？」については不明な点が多い。

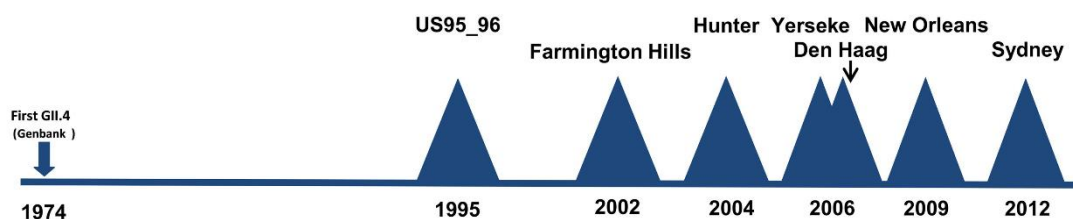


図6. 世界的な流行を起こしたノロウイルスGII.4のvariantとその初発シーズン（Vinjé. 2015. Figure2より抜粋）

生物進化学は、生物の多様性を理解するうえで極めて重要な学問であることは言うまでもない[115]。この学問は、18世紀、カー

ル・フォン・リンネ (Carl von Linné) により、博物学的知見を基にした分類学から始まったといわれている [115]。当時の生物の分類は、各時代の地層から得られた化石による生物の形態をベースにしており、19世紀にはヘッケル (Ernst Haeckel) がいろいろな生物の進化とその道筋を同一起源の系統樹として表現した [20, 71]。一方、遺伝学は、19世紀後半に、メンデル (Gregor J. Mendel) がエンドウ豆を用いて行った形質伝搬の実験によって幕が開いたとされる [115]。これらの学問が融合し、発展し始めたのは20世紀後半である。この時期は、分子生物学をはじめとする分子レベルでの生物学的研究が勃興し、急速に進展した時期である。また、この時期には、種々の数理統計解析を用い、生物情報を解析するための学問「バイオインフォマティクス」の基盤となる計算生物学 (computational biology) も急速に進展した。そして、21世紀になり、これらの学問が融合し、さらに発展し続けている [60]。そして、現在では、様々なバイオインフォマティクス技術を用いて NoV を含む種々のウイルスゲノムの進化に関する研究が急速に進み、ウイルスの起源解明、抗原構造解析ならびに抗ウイルス薬・ワクチン探索などの重要領域において、パラダイムシフトを引き起こしている [60]。

このような背景から、本研究においては、過去に胃腸炎のパンデミックを引き起こした NoV GII.4v に関し、種々のバイオインフォマティクス技術を駆使し、主要抗原をコードしている *VP1* 遺伝子に焦点を当て、この遺伝子と翻訳蛋白質 *VP1* に関する網羅的な分子進化に関する研究を行った。また、茨城県内で発生した胃腸炎事例の主要な原因となった NoV GII に関する分子疫学解析も併

せて行った。

II. 第一章

1974年から2015年に発生したノロウイルス GII.4 variantにおける
VP1遺伝子の分子進化

1. 緒言

既報によれば、地球上には約870万種の生命体が存在することが示唆されている[93]。いうまでもなく、これらの生命体の多様性は、遺伝学的多様性により生み出されている[93]。生命体の進化学的解析は、種の起源の解明を含む根源的な生命科学の進歩に寄与するために、極めて重要であると思われる。

生命情報科学、バイオインフォマティクス(Bioinformatics)は、核酸の塩基配列や蛋白質のアミノ酸配列などの生命情報に数理統計解析を加え、生命現象を解き明かしていく学問である[16]。最近、バイオインフォマティクスに関連した技術は、種々の生物体の進化学的解析を行うための種々の手法論が開発され、ウイルス学の領域においても、これらの技術を用いたウイルスゲノムの進化学的解析が行われている[12, 32–34]。実際、いくつかのウイルス抗原の進化学的知見を基盤としたウイルスの種の起源解明、ワクチン開発ならびに抗ウイルス薬の開発に拍車がかかっている[60]。したがって、ノロウイルス(NoV)においても、種々のバイオインフォマティクス技術により、抗原遺伝子などの進化学的解明をおこなうことにより、各遺伝子型の起源解明やワクチン開発に結びつく情報を得ることができる可能性がある[31, 60, 74, 122]。これらの手法の中で特に、Drummondらによって開発されたBayesian Markov chain Monte Carlo(MCMC)法を用いた解析手法はウイルスゲノムの時系列的進化解析に極めて有用と思われる[34]。本方法は、進化速度の速いRNAウイルスの進化学的解析にも応用可能であり[4, 5, 59, 95, 127, 144, 149]、NoVゲノムの進化解析に関する報告も多い[42, 60, 61, 85, 101, 123, 135]。

また、ウイルス遺伝子の塩基配列を用いた Bayesian Skyline Plot 解析は、ウイルスゲノムのポピュレーションサイズについて、時系列的な変動の推定を可能にする [33, 48]。また、*in silico* アプローチを用いたコンフォメーションナルエピトープ解析・マッピングは、主要抗原蛋白質の三次元構造に対する宿主抗体の結合部位を推定可能にする [106]。GII.4 の進化的解析は、すでにある程度報告されているが、最近発見された株を含むすべての GII.4 variant (GII.4v) の進化的特徴は完全に解明されていない [9, 109, 119]。さらに、以前の研究は、GII.4 VP1 構造内の P2 ドメインのブロッキングエピトープを断片的に推定しているが [21, 24, 42, 77, 78, 99]、これらの研究は、主に P2 ドメインに焦点を当てており、経時的に起こった P2 ドメイン内の外面上のアミノ酸置換のみを解析しているが、数学的方法を用いた GII.4v の VP1 構造全体の立体配座エピトープ解析は、いまだに行われていない。さらに、以前に同定されたエピトープとは異なる位置における抗原性に関連する抗体は、宿主における B 細胞応答によって産生され得る。そのような背景を持つ GII.4 について、過去 10 シーズン以上の長期にわたる流行を引き起こした原因を進化学的レベルで解明することは重要である。本研究においては、これらの背景を総合的に考慮し、上述した様々なバイオインフォマティクス技術を駆使し、NoV GII.4 VP1 遺伝子の全長配列における網羅的分子進化学的解析を行った。

2. 材料および方法

2-1. ノロウイルスの塩基配列データセットの作成

National Center for Biotechnology Information (NCBI) が管理する GenBank から ノロウイルス GII の全ての塩基配列を収集し、Norovirus Genotyping Tool [67] を用いて遺伝子型を分類後、GII.4 の塩基配列のみを抽出した。これらのうち、混合塩基を含む株および検体収集年が不明な株を除外した。この時点で、約 2,000 株の GII.4 VP1 全長配列を選抜した。しかしながら、500 株以上を含むデータセットを用いて選択圧解析を実施することができなかつたため、98.9% 以上の一致率を有する *VP1* 配列を除外した。さらに、VP1 遺伝子内で組換えを引き起こしている株を除くために RDP4.95 を用いて、7 つの主要な探索的組換えシグナル検出法 (RDP、GENECONV、BOOTSCAN / RECSCAN、MAXCHI、CHIMAERA、SISCAN、3SEQ) に従い、データセット内の組換え株の有無を判定した [87]。 p 値の閾値は 0.001 に設定し、上記の検出法のうち 4 種類以上で結果が一致した場合に組換え株とする判定基準を設けたが、本データセットには組換え配列株は含まれていないことが判明した。本過程を経て、最終的に 466 株の塩基配列データセットを作成した (表 S1 および図 S1)。これら配列は MAFFT ソフトウェアを用いてマルチプルアライメントし [57]、以下に示すバイオインフォマティクス解析に使用した。

2-2. Bayesian Markov chain Monte Carlo 法を用いて構築した時系列系統解析による進化系統樹の作成

時系列系統樹解析は、BEAST v2.4.6ソフトウェアを用いて Bayesian Markov chain Monte Carlo法 (MCMC) に従って行った[12, 32, 34, 126]。上記2-1に示すデータセットにブタ由来のノロウイルスGII遺伝子型 (GII.11、GII.18およびGII.19)、GII.4以外のヒト由来のノロウイルスGII遺伝子型 (GII.1-GII.3、GII.5-GII.10、GII.12-GII.17ならびにGII.20-GII.22)、そして、アウトグループとしてノロウイルスのプロトタイプ株であり Norwalk virusとして知られるノロウイルスGI遺伝子型 (GI.1) のVP1配列を加えた (合計488株)。まず、jModelTest2ソフトウェアを用いて適切な塩基置換モデルを選択した[19, 46]。次に、path-sampling/stepping stone-sampling法に従い、4種類のclockモデル (Strict clock、Exponential relaxed clock、Relaxed clock log normal、Random local clock) と2種類のtree priorモデル (Coalescent constant population、Coalescent exponential population) からそれぞれ適切なモデルを検索し、Strict clockとConstant tree priorのモデルを解析に使用した。Bayesian MCMC法による時系列系統解析の計算は、GPU [Tesla K20c、グローバルメモリ：5,061MB、クロック速度：0.71GHz、コア数：2,496] を搭載した高性能コンピュータ [システム：x3850X6、CPU：Intel (R) Xeon (R) CPU E7-8890 v3 @ 2.50GHz、メモリ：1TB] を使用し、300,000,000回の計算のうち20,000回ごとに1回の系統樹解析を実施した。解析データはTracerを使用したEffective Sample Size (ESS) の値によって評価し[111]、すべての項目が200以上のESSを満たすようにした。また、TreeAnnotator v2.4.6を使用して、信頼性の低い計算開始時点から10%または15%分の解析結果を削除後、最適な系統樹を選定した。系統樹の図示ならびに編集は

FigTree v1.4.0を用いて行った。推定分岐年代の信頼区間は、95% highest posterior densities (HPDs) により示した。さらに、ノロウイルス GII.4の全株、10株以上を含む各 GII.4v(US95_96、Farmington Hills 2002、Asia 2003、Hunter 2004、Yerseke 2006a、Den Haag 2006b、Osaka 2007、Apeldoorn 2007、New Orleans 2009、Sydney 2012)、そしてVP1の各ドメイン領域 (Shell、P1、P2) について上記の通り最適なモデルを選択し進化速度を計算した (表1)。

2-3. Similarity解析

Bristol 1993 (X76716とFJ537137の2株) の variantとそれ以外の各 GII.4vのVP1遺伝子配列間の相同性をSimPlotソフトウェアにより解析した[82]。解析幅は200塩基長 (nt) のウィンドウ・サイズと20塩基長のステップ・サイズを使用した。

2-4. 系統間距離の解析

適切な塩基置換モデルをjModelTest2ソフトウェアにより選定した後、GII.4全株を対象にしたデータセットおよび各 GII.4変異型ごとに分けたデータセットそれぞれについて最尤法に従いMEGA6ソフトウェアを用いて系統樹を作成した。また、作成した系統樹からGII.4の各塩基配列間の遺伝学的距離を、Patristicソフトウェアを用いて計算した[39]。

2-5. 選択的圧力の推定

Datamonkeyサーバーにより、塩基配列上の各コドンにおける非同義置換率 (dN) および同義置換率 (dS) を計算し、全株を対象

にしたノロウイルス GII.4 および各 GII.4 変異型の VP1 遺伝子における正ならびに負の選択圧を推定した [27, 105]。有意水準は $p < 0.05$ に設定し、SLAC、FEL および IFEL の 3 種類の方法を用いて解析した。SLAC については、両側拡張二項分布を用いて p 値の有意性を評価した。FEL および IFEL は、単一自由度尤度比検定（カイ二乗漸近分布が用いられた）に基づき選択圧を推定した。

2-6. 立体配座 B 細胞エピトープ予測

ノロウイルス GII.4 変異型の標準株（Bristol 1993 : X76716、Camberwell 1994 : AF145896、US95_96 : AF080558、Kaiso 2003 : AB303929、Farmington Hills 2002 : AY485642、Lanzou 2002 : EU310927、Asia 2003 : AB220921、Hunter 2004 : AY883096、Yerseke 2006a : EF126963、Den Haag 2006b : EF126965、Osaka 2007 : AB434770、Apeldoorn 2007 : GU270580、New Orleans 2009 : GU445325、Sydney 2012 : JX459908）における VP1 タンパク質上の立体配座エピトープを DiscoTope 2.0 [65]、BEPro [130]、EPCES [75] ならびに EPSVR [76] を用いて予測した。エピトープ推定のカットオフ値は、-3.7（DiscoTope 2.0）、1.3（BEPro）および 70（EPCES、EPSVR）に設定した。4 種類の解析法のすべてでエピトープとして推定され、かつ VP1 二量体構造上の近接した位置に 2 アミノ酸以上のエピトープ推定残基があった部位を立体配座エピトープとして決定した。

2-7. VP1 蛋白質の立体構造上の正の選択部位、エピトープ、アミノ酸置換のマッピング

各 GII.4v の VP1 二量体構造モデルは、MODELLER v9.15 [148] を用

いて構築した。相同性モデリングのための鋳型は、4株（PDB ID：1IHM、4X07、4OP7および4OPS）の結晶構造に基づいた。GIのキャプシド構造（PDB ID：1IHM）をVP1構造全体のシェルドメインの構築のための鋳型として用いた。鋳型のアミノ酸配列および標準化された株の5つは、MAFFTashによってアライメントした[56, 124]。構築されたモデルは、Swiss PDB Viewer v4.1[45]に実装されたGROMOS96に基づいて最小化し[140]、RAMPAGEサーバーを介してRamachandranプロットによって構造の信頼性を評価した[84]。最終的なモデルは、Chimera v1.11.2によってアミノ酸表示に修正した[103]。各GII.4vの立体配座エピトープを赤色、正の選択部位を青色、およびBristol 1993からのアミノ酸置換部位を緑色に、構造上にマッピングした。

2-8. Bayesian Skyline Plot解析

BEAST v2.4.6を用いたBayesian Skyline Plot（BSP）解析によってノロウイルスGII.4株のVP1遺伝子における感染母集団の大きさを推定した。最適な塩基置換モデルおよびclockモデルは上記2-2で示すとおりに選定した（表1）。解析結果はTracerを用いて中央値を黒線で、95%HPDsを青線で図示した。

2-9. 統計分析

統計解析はEZRソフトウェアを用いて行った[54]。すなわち進化速度と遺伝学的距離の計算に関する統計解析としてKruskal-Wallis検定を行った後、Holmの多重比較検定を実施した。VP1遺伝子の各ドメインにおける負の選択圧割合に関する統計解析とし

てFisherの正確検定を用いた。進化速度の解析では18,000個から135,000個の進化速度推定値が得られ、これらをサンプルサイズとして利用した。遺伝学的距離の解析では、データセットに含まれる各GII.4変異型内の株間における対の組み合わせの数をサンプルサイズとし、3個から11,440個のデータを取得した[92]。詳細な統計解析結果は表S2、S3、S4に示した。各群のサンプルサイズは図8と図10に示した。

表1. Beast2解析のパラメーター

Datasets	Number of strains	Substitution models	Clock models	Demographic models	Chain length of MCMC	Log parameter
GII.4 all variants (Complete <i>VP1</i> gene)	466	GTR+ Γ +I	Relaxed clock log Normal	Coalescent Exponential population	300,000,000	2,000
			Strict clock	Coalescent Bayesian skyline	220,000,000	8,000
GII.4 all variants (Shell domain)	466	HKY+ Γ +I	Strict clock	Coalescent Exponential population	200,000,000	5,000
GII.4 all variants (P1 domain)	466	SYM+ Γ	Relaxed clock log Normal	Coalescent Exponential population	210,000,000	2,000
GII.4 all variants (P2 domain)	466	GTR+ Γ +I	Relaxed clock exponential	Coalescent Constant population	150,000,000	5,000
US95_96	33	SYM+ Γ +I	Relaxed clock exponential	Coalescent Exponential population	250,000,000	2,000
			Relaxed clock exponential	Coalescent Bayesian skyline	100,000,000	2,000
Farmington Hills 2002	18	K80+ Γ	Relaxed clock exponential	Coalescent Exponential population	1,400,000,000	10,000
			Relaxed clock exponential	Coalescent Bayesian skyline	100,000,000	5,000
Asia 2003	17	K80+ Γ	Relaxed clock log Normal	Coalescent Exponential population	550,000,000	4,000
			Strict clock	Coalescent Bayesian skyline	100,000,000	2,000
Hunter 2004	22	K80+ Γ	Relaxed clock exponential	Coalescent Exponential population	550,000,000	4,000
			Relaxed clock exponential	Coalescent Bayesian skyline	100,000,000	2,000
Yerseke 2006a	13	TrNef+ Γ	Relaxed clock exponential	Coalescent Exponential population	1,160,000,000	10,000
			Relaxed clock exponential	Coalescent Bayesian skyline	100,000,000	2,000
Den Haag 2006b	145	HKY+ Γ +I	Relaxed clock exponential	Coalescent Exponential population	300,000,000	10,000
			Relaxed clock exponential	Coalescent Bayesian skyline	300,000,000	10,000
Osaka 2007	11	TrNef+ Γ	Relaxed clock exponential	Coalescent Exponential population	100,000,000	2,000
			Relaxed clock exponential	Coalescent Bayesian skyline	100,000,000	2,000
Apeldoorn 2007	25	TrNef+ Γ	Relaxed clock exponential	Coalescent Exponential population	300,000,000	10,000
			Relaxed clock exponential	Coalescent Bayesian skyline	100,000,000	5,000
New Orleans 2009	86	HKY+ Γ +I	Random local clock	Coalescent Exponential population	200,000,000	2,000
			Random local clock	Coalescent Bayesian skyline	300,000,000	6,000
Sydney 2012	68	TPM2+ Γ +I	Relaxed clock log Normal	Coalescent Exponential population	100,000,000	5,000
			Random local clock	Coalescent Bayesian skyline	100,000,000	5,000

3. 結果

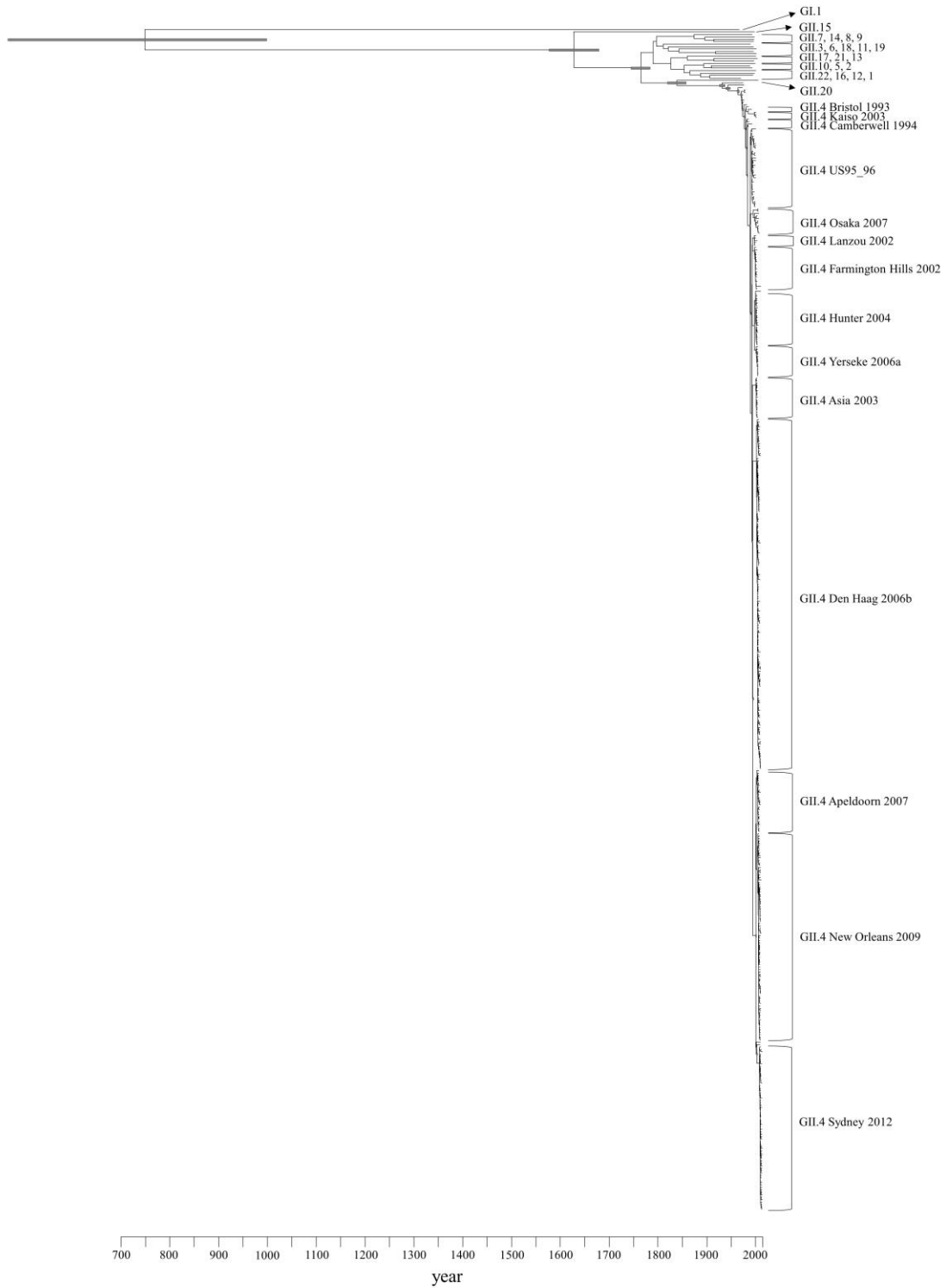
3-1. 世界的に収集されたノロウイルス GII.4の時系列的進化解析結果

NoV GII.4について、分岐年代の推定と流行の疫学情報を照らし合わせることは進化の過程を明らかにするための重要な情報となりうる。今回、1974年から2015年まで、最近の株を含む Genbank に登録されているすべての GII.4をもとに、多数の配列を用いて MCMC法を用いた時系列系統樹を構築した（図7）。まず、GII.4の共通祖先は、1840年に GII.20から分岐したことが推定された（95% HPDs、1820–1858年）。その後、GII.4の共通始祖ウイルスは、1932年（95% HPDs、1926–1938年）に出現し、1980年（95% HPDs、1979–1981年）以降、次々に14種類の variant（GII.4v）、7つのクラスターを形成した。特に、Den Haag 2006bと Sydney 2012という世界的に大きなパンデミックを形成した2種類の GII.4vの共通始祖ウイルスは、Asia 2003と1994年（95% HPDs、1993–1995年）に分岐した。その後、Apeldoorn 2007、New Orleans 2009、Sydney 2012の共通始祖ウイルスが2001年に分岐した（95% HPDs、2000–2002年）。さらに、この2種類の GII.4v（Den Haag 2006bおよび Sydney 2012）は、独自のクラスターを形成した。くわえて、GII.4クラスターのすべての分岐年を図7Bに示した。これらの結果は、GII.4が過去35から40年で急速に進化し、複数のクラスター、複数の GII.4vを形成してきたことを示唆している。

また、GII.4の完全長 *VPI* 遺伝子の進化速度を MCMC法により解析した結果、 7.68×10^{-3} substitutions/site/year（95% HPDs）：

$6.69 \times 10^{-3} - 8.59 \times 10^{-3}$) であることが推定された (図 8A)。さらに、進化速度は各 GII.4v の間で有意に異なっていた (Kruskal-Wallis 検定; $p < 0.001$)。特に、Osaka 2007 は、GII.4v の中で最も進化速度が速かった (図 8B および表 S3)。さらに、P2 ドメイン (9.15×10^{-3} substitutions/site/year) の進化速度は、他のドメインの速度 (Shell: 6.97×10^{-3} 、P1: 5.79×10^{-3} substitutions/site/year) と比較して、有意に速かった (Kruskal-Wallis 検定; $p < 0.001$) (図 8A および表 S2)。

(A)



(B)

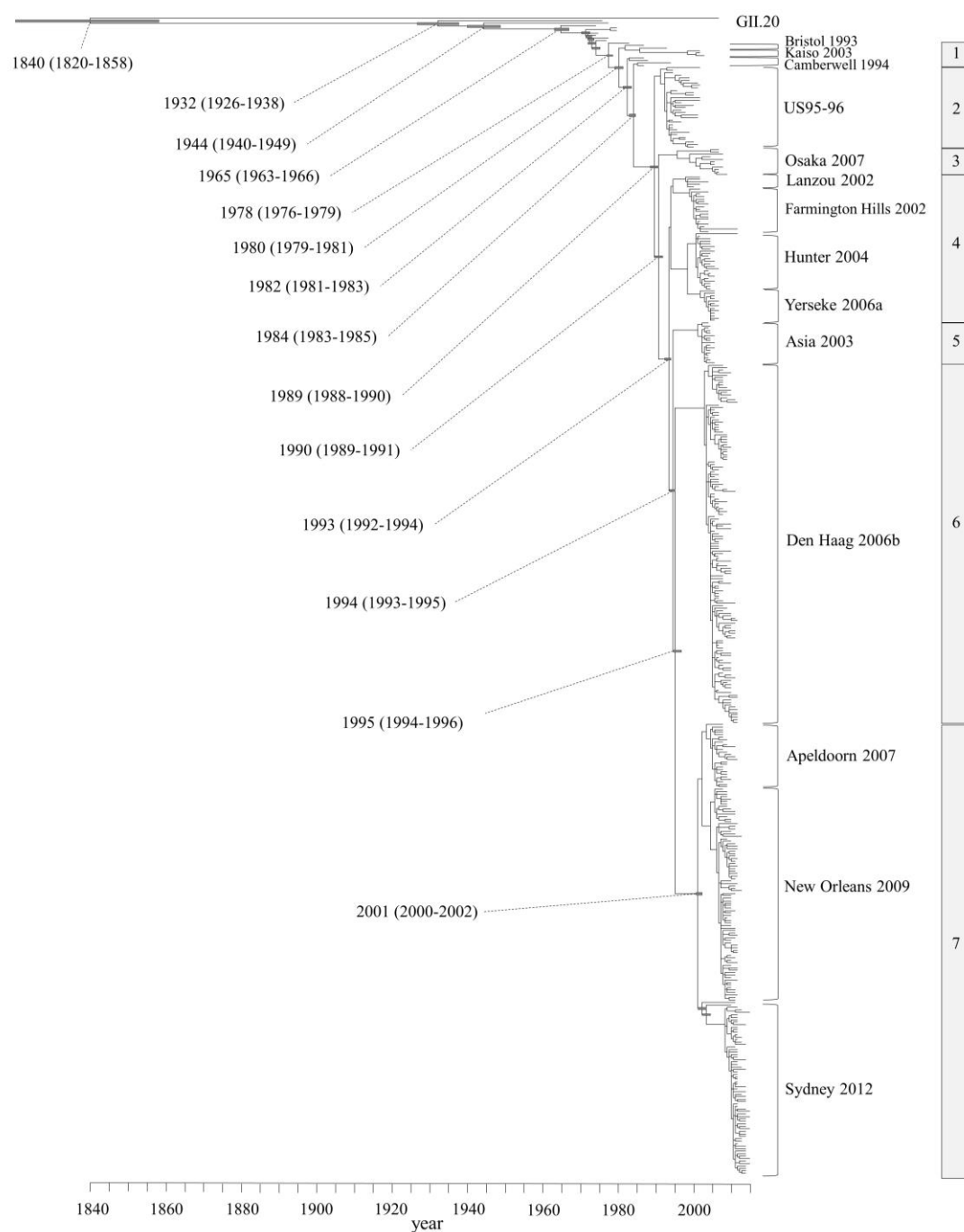
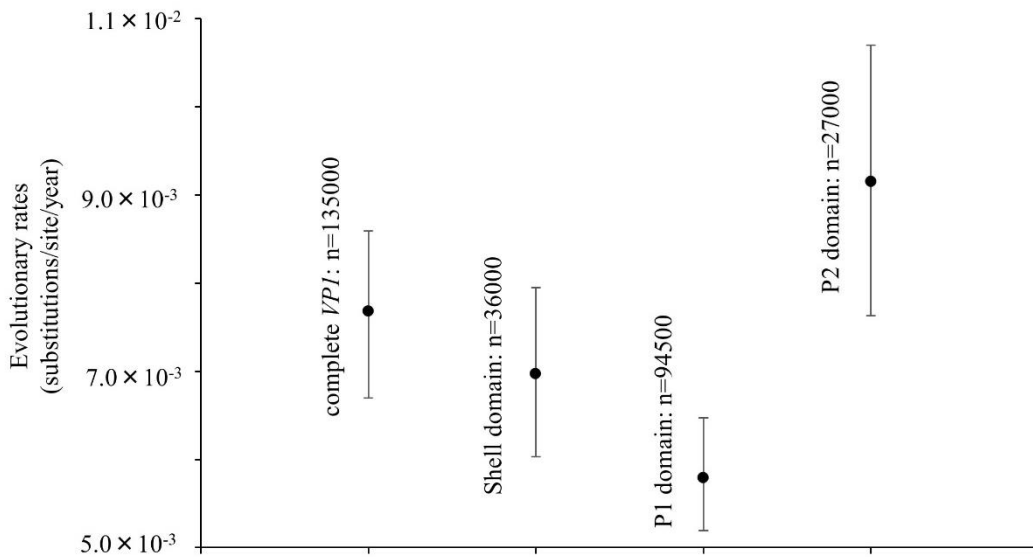


図7. ノロウイルス GII.4 VPI 遺伝子の時系列系統樹解析結果

(A) データセットには GI.1 とすべての GII 遺伝子型の標準株を含む。(B) GII.4 を中心に拡大した。グレーのバーは 95% highest posterior densities を示し、各クラスターの分岐年代を示した。

(A) Domains in the GII.4 *VPI* gene (466 strains)



(B) GII.4 variant

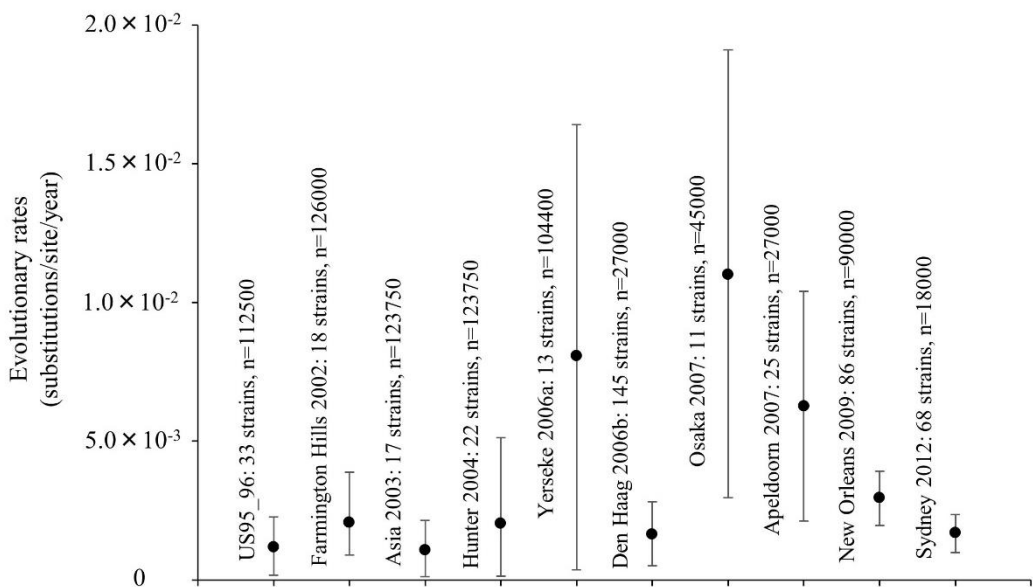


図 8. ノロウイルス GII.4 および GII.4 variant の進化速度

縦軸に進化速度を substitutions/site/year の単位で示した。(A) GII.4 *VPI* 遺伝子全体の進化速度を示し、Shell、P1、P2 の各ドメインの進化速度を比較した。(B) GII.4 に含まれる各 variant の進化速度を比較した。

3-2. *VPI* 遺伝子の Similarity 解析

NoV GII.4 の全長 *VPI* 遺伝子配列を基盤とした相同性 (similarity) を SimPlot プログラムにより解析した。基準となる配列と比較して、それぞれの領域における相同性を示すことにより、どの部位に変異が多いのかを視覚的に認識できる。図 9 に示すように、シェルドメインで 85-100% の相同性が見出されたのに対し、P1 ドメインおよび P2 ドメインは低い相同性 (75-95%) にとどまった。これらの結果は、GII.4v における *VPI* 遺伝子の多様性がドメイン間で異なっていることを示唆している。

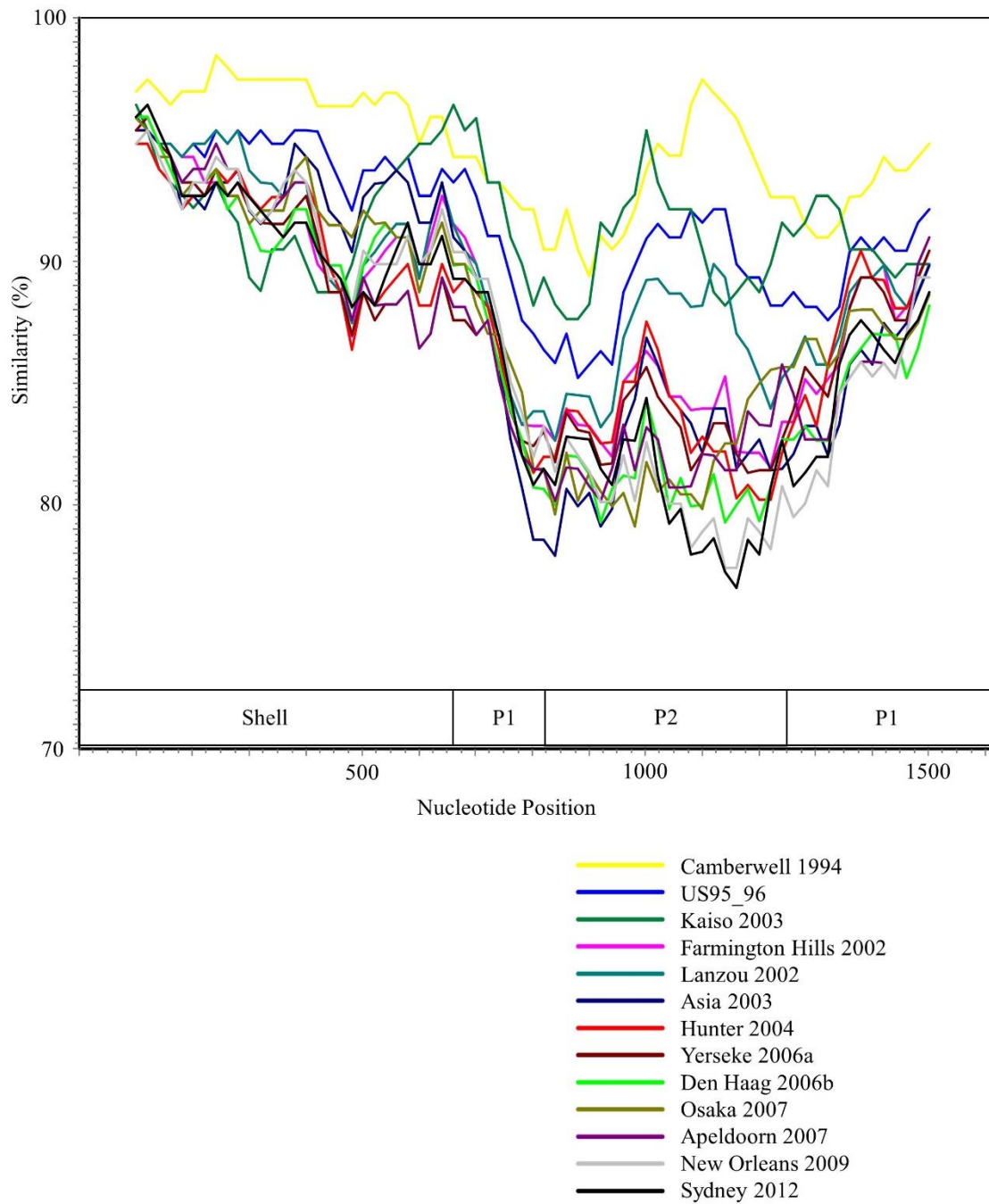


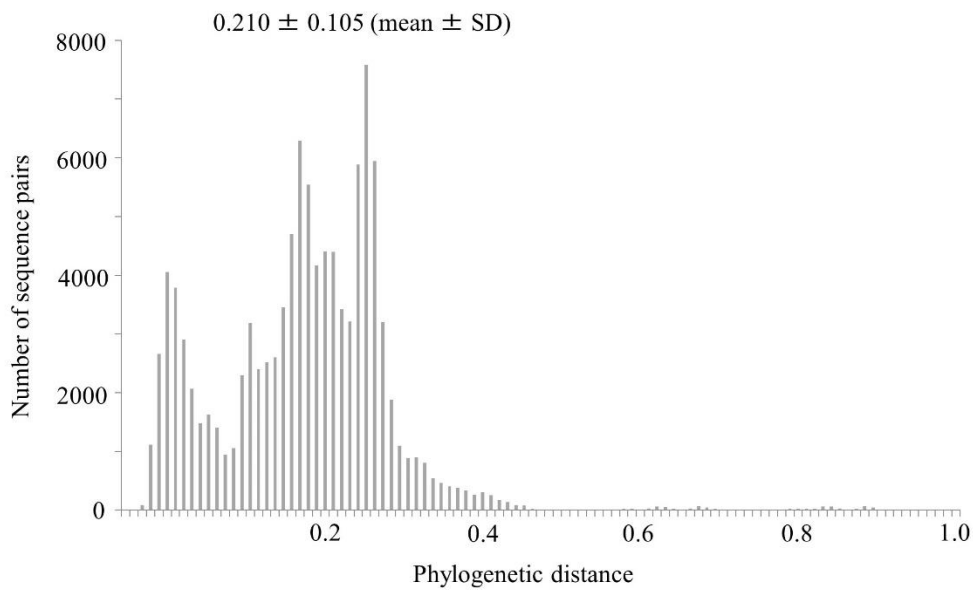
図9. *VPI* 遺伝子の相同性 (Similarity) 解析結果

各 NoV GII.4 variant と Bristol 1993 と比較したときの相同性を示した。グラフの下に Shell、P1、P2 各ドメインの位置を示した。

3-3. GII.4および GII.4 variantの系統間距離の解析

各 GII.4vの系統間の距離（**phylogenetic distance**）を解析することは、**GI.4**遺伝子型および**variant**の進化の範囲を推測するために有用であると思われる。そこで、本研究では、すべての解析株における**VPI**遺伝子の系統間距離を算出した（図10）。まず、すべての**GI.4**株の間の距離は 0.210 ± 0.105 （平均 \pm 標準偏差）であった（図10A）。各 GII.4vの平均値は 0.0163 – 0.0698 の範囲内であり、各々の系統間の距離は GII.4vの間で有意に異なっていた。特に、**Osaka 2007**は、最も距離が長く、多くの解析部位において塩基置換を含んでおり、逆に**Asia 2003**は、他の GII.4vよりも距離が短かった（**Kruskal-Wallis**検定； $p < 0.001$ ）（図10Bおよび表S4）。

(A) GII.4 All strains (466 strains)



(B) GII.4 variant (13 variants)

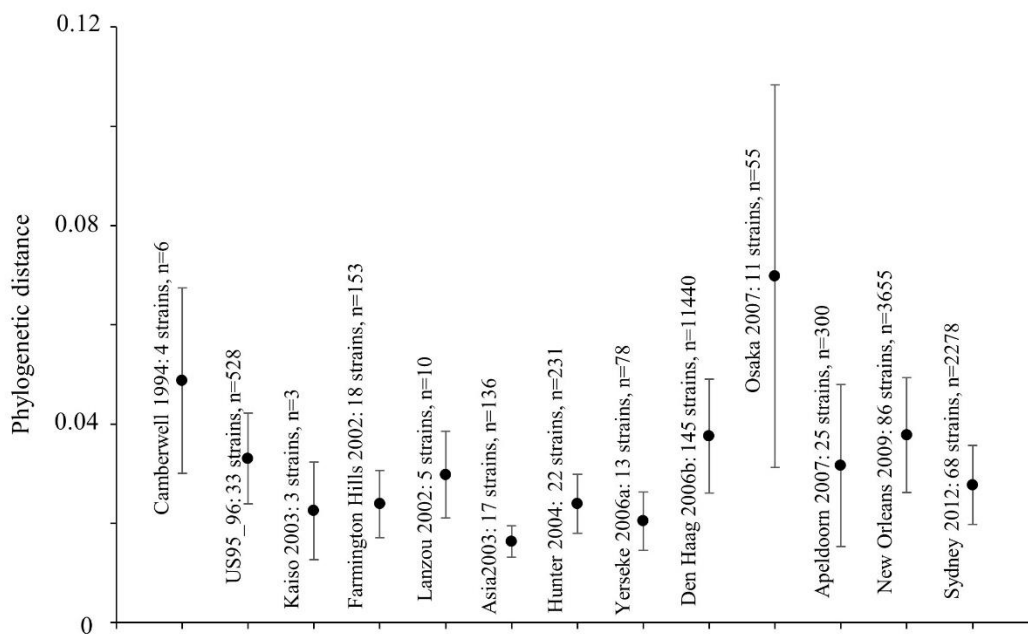


図 10. GII.4全体およびGII.4 variantの系統間距離の解析

GII.4VPI塩基配列の全長を使用した。(A) 縦軸にペア数を、横軸は0.01ごとに区切り、GII.4内の系統間の距離を示した。(B) 縦軸にGII.4v内の系統間距離を、横軸に各variantを分けて示した。データは平均値±標準偏差とした。

3-4. VP1構造上の立体配座エピトープ、選択圧解析、アミノ酸置換のマッピング

本研究においては、*in silico*解析により推定されたGII.4vのVP1蛋白質の立体配座エピトープを包括的に予測し、GII.4の構造上のB-cellエピトープ、正の選択（positive selection）部位およびアミノ酸置換をマッピングして、それらの関連性を詳細に明らかにした。[11、152]。現在のところ、B-cellエピトープ解析はリニアエピトープ（linear epitope）解析と立体配座エピトープ（conformational epitope）解析の2種類の解析法が主に用いられる[60]。リニアエピトープは一次アミノ酸配列によって定義・表現され、立体配座エピトープは蛋白質の立体構造のアミノ酸によって定義・表現される。

まず、本研究における解析株のVP1蛋白には、5領域で立体配座エピトープの存在が推定され、そのうちの4領域はP2ドメインの外面に位置し、既報によって推定された領域とほぼ重複・同一であった。しかし、残る1つはシェルドメインに位置していた。さらに、多数のアミノ酸置換が推定されたエピトープ上またはその周辺に見出された（表2、図11）。すべてのGII.4株の正の選択部位は、アミノ酸（aa）6（Asn6Ser、Ser6Asn）、aa9（Asn9Ser、Asn9Thr、Asn9His、Asn9Lys、Ser9Asn）およびaa534（Thr534Ala、Thr534Ser、Ala534Val、Ala534Thr）であり、P2ドメイン上に見出されなかった（表3）。さらに、合計369残基が負の選択（negative selection）部位と推定され、その割合は、P1ドメインが最も高く（80.2%）、シェルドメインおよびP2ドメインよりも有意に高かった（ $p < 0.001$ ）（表5）。

さらに、GII.4vのそれぞれで選択圧解析を実施した結果、Den Haag 2006bにおいて、aa393 (Ser393Gly、Ser393Asn、Gly393Ser) およびaa412 (Asn412Asp、Asn412Ser、Asp412Gly)、New Orleans 2009において、aa294 (Pro294Ser、Pro294Thr、Ser294Ala、Ser294Pro、Ala294Thr) およびaa376 (Glu376Asp、Glu376Val、Glu376Gln、Asp376Val、Asp376Glu、Val376Asp、Val376Glu、Val376Ile)、Sydney 2012において、aa393 (Ser393Gly、Ser393Asn、Ser393Thr、Gly393Ser) が正の選択部位であると推定された (表4)。Den Haag 2006bは、最も多くの負の選択部位 (59カ所) を含むのに対し、7種類のGII.4v (Camberwell 1994、Kaiso 2003、Farmington Hills 2002、Lanzou 2002、Asia 2003、Hunter 2004、Yerseke 2006a) は負の選択部位を含まなかった (表5)

表2. GII.4VP1蛋白質の立体配座エピトープ解析結果

	Region1			Region2										Region3						Region4						Region5													
	129	171	172	291	293	294	295	296	297	298	368	372	373	374	338	339	340	341	342	343	376	377	378	391	392	393	394	395	396	397	398	443	444	407	411	412	413	414	
Epitope†				A	A	A	A	A	A	A	A	A	A		C					C					D	D	D							E	E	E			
Bristol 1993	P	A	N	T	I	A	G	S	H	D	T	N	N	D	T	R	A	D	G	S	Q	A	G	D	G	D	-	H	H	Q	N	G	Y	N	R	T	G	H	
Camberwell 1994	.	S	H	.	.	V	T	
US95_96	.	.	H	G	T	-	N	
Kaiso 2003	.	S	R	N	S	D	P	-	R	D	.	.	.
Farmington Hills 2002	.	S	T	.	N	N	G	E	T	.	.	.	N	G	T	S	
Lanzou 2002	.	S	T	G	.	.	E	T	N	S	A	N		
Asia 2003	.	S	.	I	.	P	.	T	R	T	A	D	.	.	K	G	.	.	E	T	.	.	.	S	S	A	.	R	.	.	.	D	.	V	.	.			
Hunter 2004	.	S	T	Q	N	S	S	.	.	.	R	.	.	.	E	T	.	.	.	S	T	T	D	.	D	S	.		
Yerseke 2006a	.	S	T	Q	E	S	S	.	.	.	R	.	.	E	T	.	.	.	S	T	T	D	.	D	S	.			
Den Haag 2006b	.	S	R	N	S	E	.	.	K	G	.	.	E	T	H	.	.	S	T	T	.	R	.	.	.	S	.	N	V	.			
Osaka 2007	.	S	R	N	A	D	.	.	.	S	.	.	E	S	.	.	.	S	T	T	.	R		
Apeldoorn 2007	.	S	R	N	A	D	D	.	N	.	.	N	T	A	.	R	.	.	.	S	.	N	S	.		
New Orleans 2009	.	S	.	.	.	P	.	.	R	N	A	D	.	.	.	T	N	.	E	T	N	.	.	S	T	T	P	R	.	.	.	S	.	N	I	.			
Sydney 2012	.	S	.	.	.	T	.	.	R	N	E	D	R	.	.	T	.	.	E	.	N	.	.	G	T	T	.	R	.	.	.	S	.	N	T	.			

本研究で推定されたGII.4のエピトープを赤色で示した。

†Lindesmith et al. (2012a) によって示されたエピトープの領域を示す。

表 3. GII.4 全体の正の選択部位の解析結果

Amino acid changes	SLAC	FEL	IFEL
Asn6Ser Ser6Asn	○	○	○
Asn9Ser, Thr, His, Lys Ser9Asn	○	○	○
Asn17Ser, His, Thr		○	
Ala294Val, Thr, Pro, Gly Val294Gly, Ala Thr294Ala, Ile, Ser Pro294Ser, Thr Ser294Pro, Ala Gly294Arg	○		
Tyr352Ser, Arg, Phe, Leu Ser352Tyr, Leu Leu352Phe			○
Thr368Ser, Ala, Asn Ala368Val, Ser, Thr, Asp Ser368Gly, Asn, Arg Gly368Ala, Ser Asn368Glu, Asp, Ser Glu368Ala, Gly Val368Phe			○
Glu376Gln, Asp, Val Gln376Glu, Asn Asp376Glu, Val, Gly Val376Glu, Ile			○
Gly393Ser, Asn, Asp Asn393Asp, Ser, Gly Ser393Asn, Gly, Thr, Ala Asp393Asn, Gly, Glu		○	○
Thr395Asn, Ala Asn395His, Thr His395Arg, Asp, Pro Ala395Thr		○	○
Val413Gly, Ala, Ile Gly413Ser, Val, Asn Ser413Thr, Asn, Gly Thr413Ser, Ile, Ala Ile413Thr, Val			○
Ser494Thr, Pro, Ala Thr494Ala	○		
Thr534Ala, Ser Ala534Val, Thr	○	○	○
Total	5	6	9

Mean $dN/dS = 0.130$ (95%CI = 0.124–0.136)

p -value < 0.05

表 4. GII.4 variant ごとの正の選択部位の解析結果

Variants	Amino acid changes	SLAC	FEL	IFEL
Farmington Hills 2002	Asn9His, Thr		○	
	Thr395Ala			○
	Ala395Thr			○
Lanzou 2002	Gly255Ser			○
Asia 2003	Val413Ala			○
Hunter 2004	Arg340Gly		○	
Yerseke 2006a	Ser98Gly			○
Den Haag 2006b	Asn9Ser, Thr, His		○	○
	Pro357Asp			○
	Ser393Gly, Asn	○	○	○
	Gly393Ser			○
	Asn412Asp, Ser	○	○	○
	Asp412Gly			○
Osaka 2007	His414Gln, Pro			○
	Pro414His			○
	Leu352Tyr, Phe			○
	Ser393Asn			○
Apeldoorn 2007	Asn407Gly, Ser			○
	Thr412Asp			○
	Ala359Thr, Ser		○	
New Orleans 2009	Pro294Ser, Thr			
	Ser294Ala, Pro	○	○	○
	Ala294Thr			
	Asn341Asp			○
	Asp341Asn			○
	Glu376Asp, Val, Gln	○	○	○
Asp376Val, Glu			○	
Val376Asp, Glu, Ile			○	
Sydney 2012	Ile413Thr, Val			○
	Thr413Ile			○
	Ile293Thr		○	
	Ser309Asn		○	○
	Asn309Ser		○	○
	His373Arg, Asn		○	
Ser393Gly, Asn, Thr	○	○	○	
Gly393Ser			○	
Tyr460His			○	

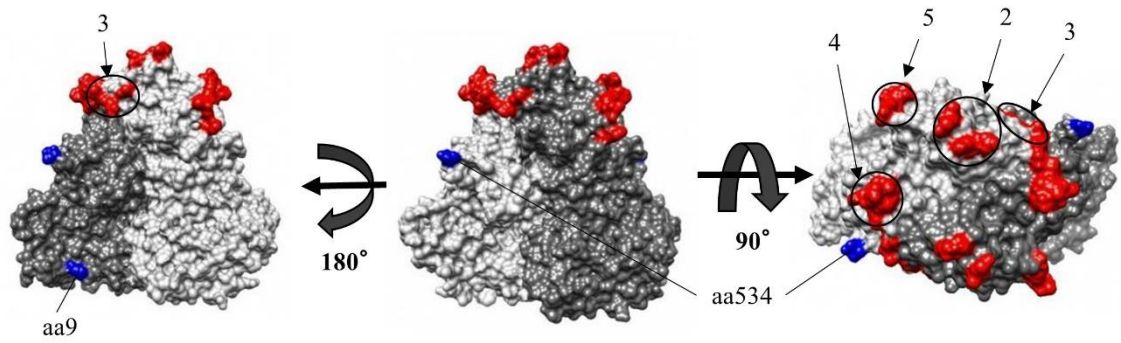
Camberwell 1994、US95_96、Kaiso 2003の GII.4 variant では正の選択部位は検出されなかった。

表 5. 負の選択部位の解析結果

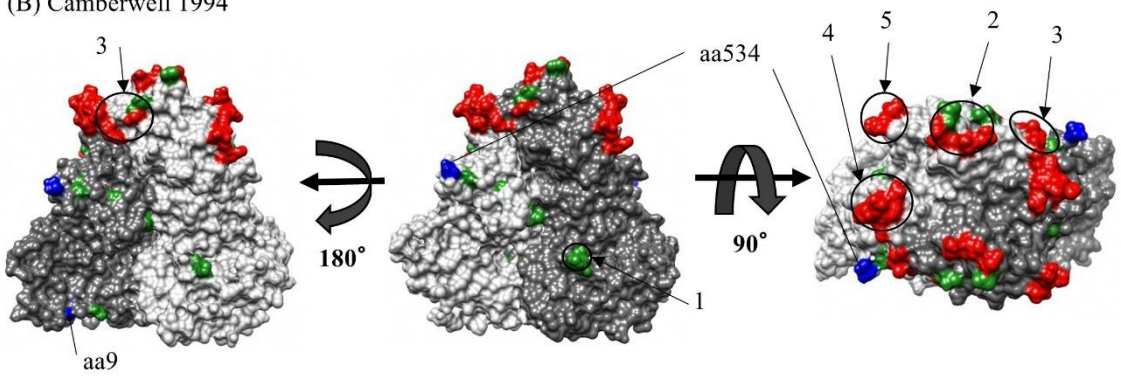
Variants	Domains†			Total†
	Shell	P1	P2	
Camberwell 1994	0	0	0	0
US95_96	4 (1.8%)	1 (0.5%)	1 (0.6%)	6 (1.1%)
Kaiso 2003	0	0	0	0
Farmington Hills 2002	0	0	0	0
Lanzou 2002	0	0	0	0
Asia 2003	0	0	0	0
Hunter 2004	0	0	0	0
Yerseke 2006a	0	0	0	0
Den Haag 2006b	34 (15.4%)	16 (9.0%)	9 (6.2%)	59 (10.9%)
Osaka 2007	4 (1.8%)	3 (1.6%)	4 (2.7%)	11 (2.03%)
Apeldoorn 2007	2 (0.9%)	0	0	2 (0.3%)
New Orleans 2009	10 (4.5%)	12 (6.7%)	3 (2.0%)	25 (4.6%)
Sydney 2012	3 (1.3%)	0	0	3 (0.5%)
All GII.4	140 (63.6%)	142 (80.2%)	87 (60.8%)	369 (68.3%)

†SLAC、FEL、IFELすべてで選択された負の選択部位の数を示した。

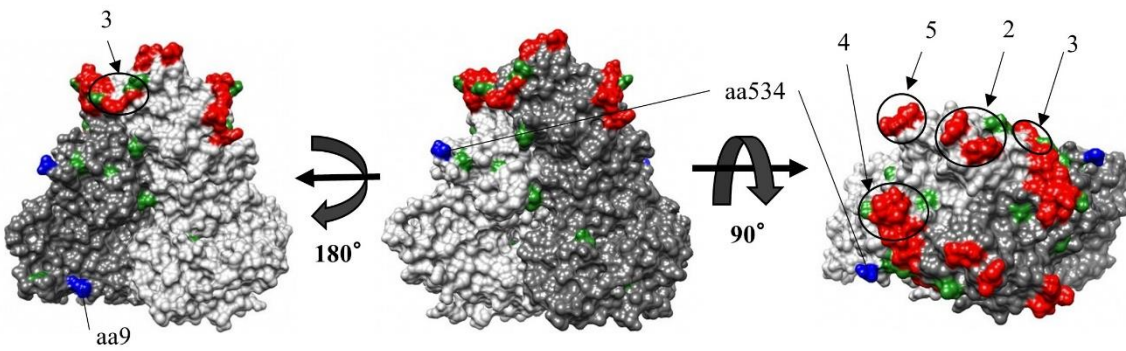
(A) Bristol 1993



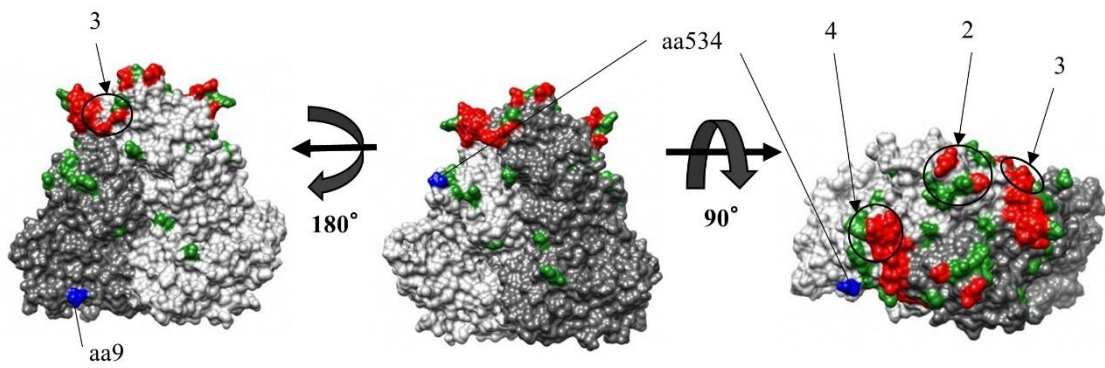
(B) Camberwell 1994



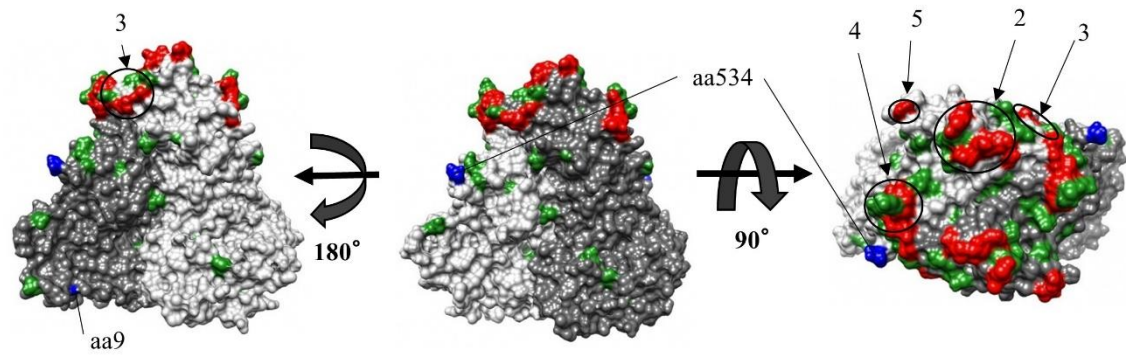
(C) US95_96



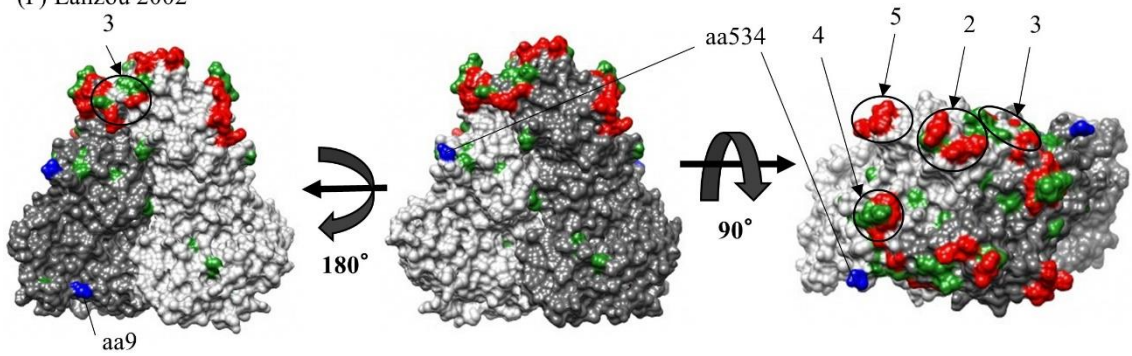
(D) Kaiso 2003



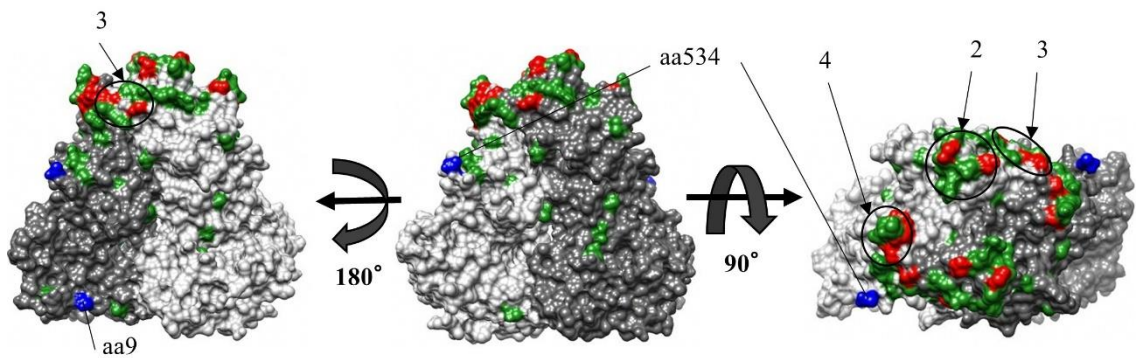
(E) Farmington Hills 2002



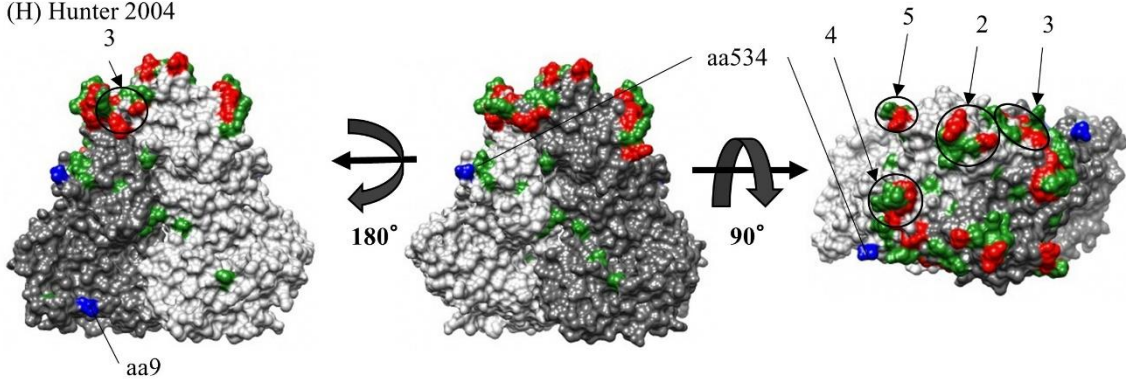
(F) Lanzou 2002



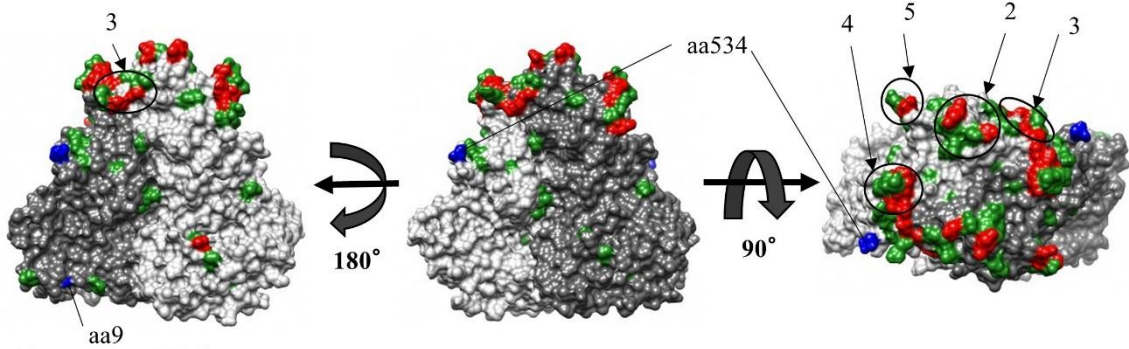
(G) Asia 2003



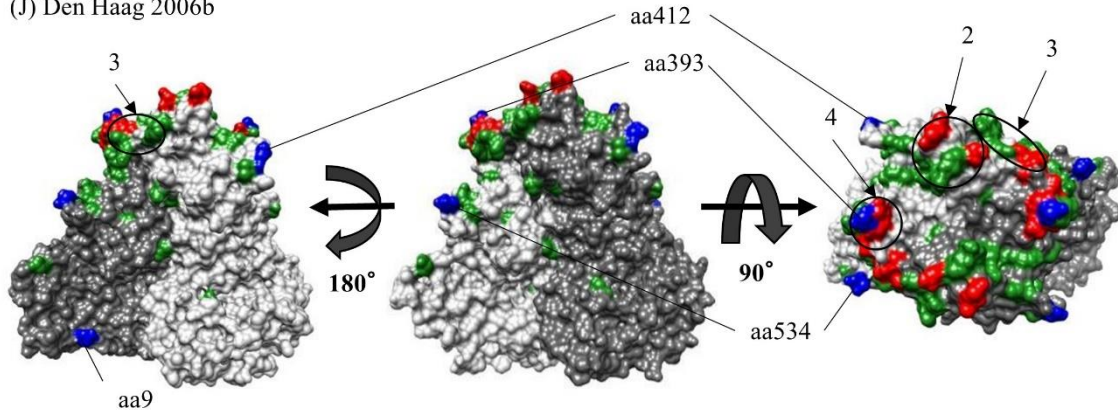
(H) Hunter 2004



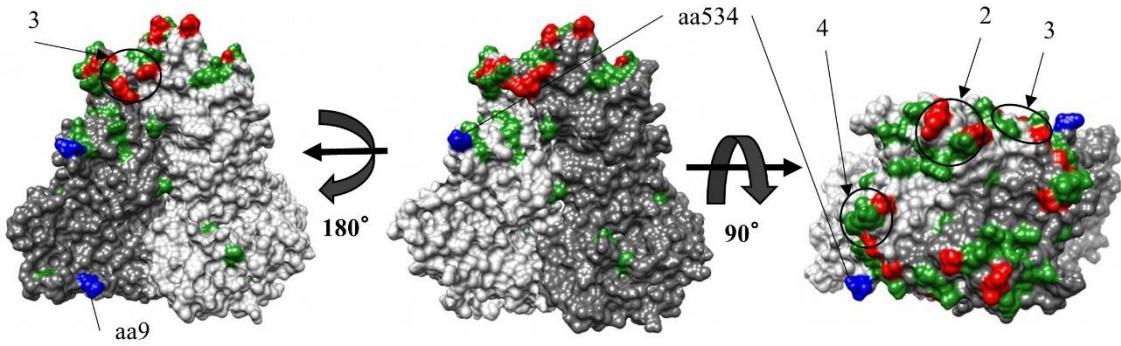
(I) Yerseke 2006a



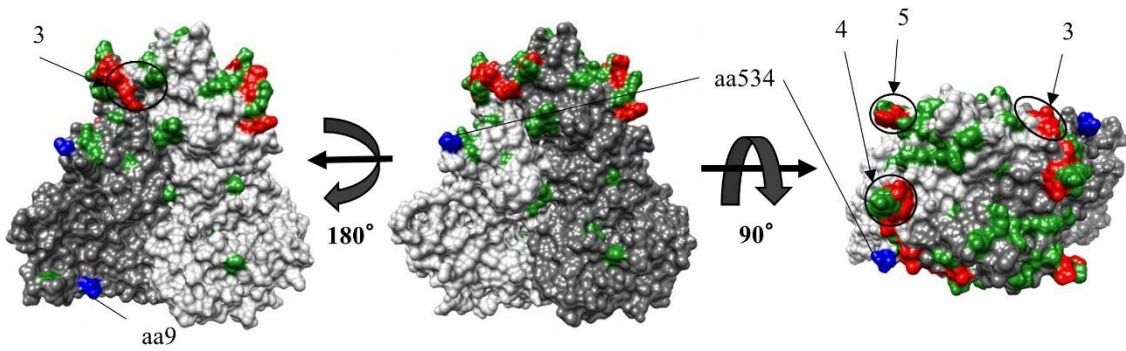
(J) Den Haag 2006b



(K) Osaka 2007



(L) Apeldoorn 2007



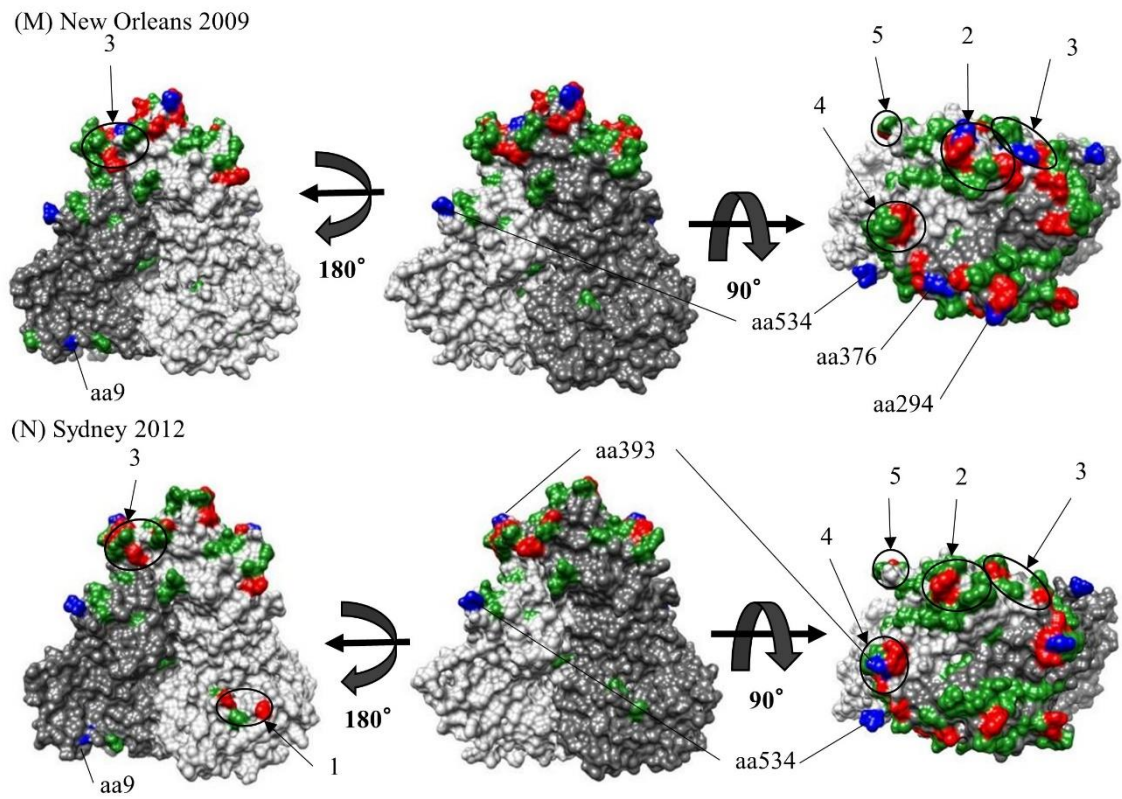


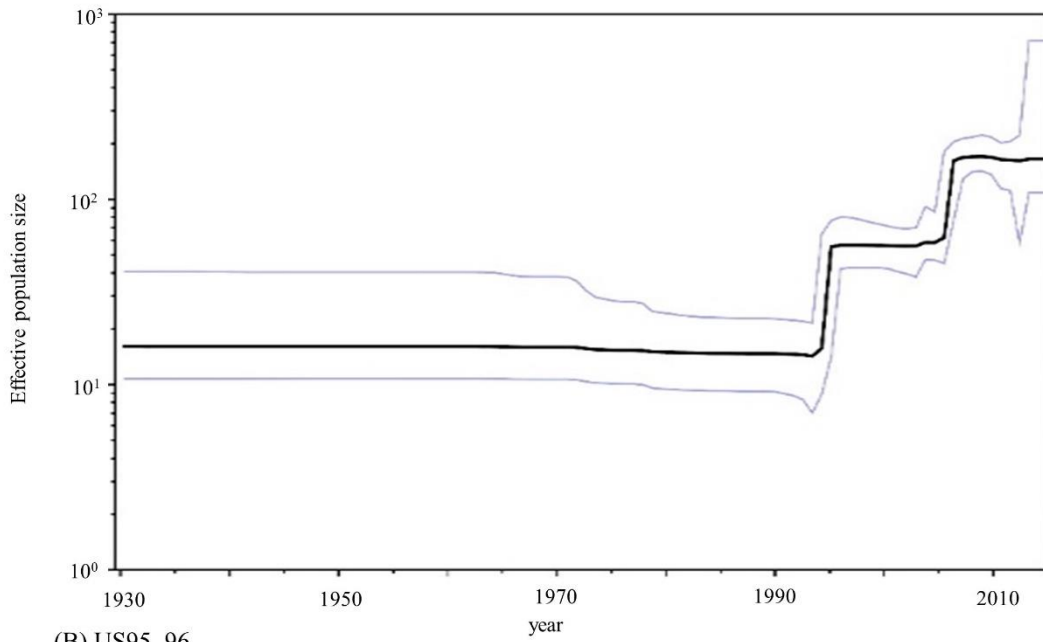
図 11. 各 GII.4 variant の VP1 蛋白質二量体の三次元立体構造解析
 Bristol 1993 (A)、Camberwell 1994 (B)、US95_96 (C)、Kaiso 2003
 (D)、Farmington Hills 2002 (E)、Lanzou 2002 (F)、Asia 2003 (G)、
 Hunter 2004 (H)、Yerseke 2006a (I)、Den Haag 2006 (J)、Osaka
 2007 (K)、Apeldoorn 2007 (L)、New Orleans 2009 (M) および Sydney
 2012 (N) の GII.4 variant を示した。構造は二量体で描き、A鎖を
 グレー、B鎖を濃いグレーで色付けした。さらに、本研究でエピト
 ープに推定されたアミノ酸を赤で示し、構造上の位置を丸で囲っ
 た。なお、aa6は構造を描くうえで、N-ターミナルの末端に位置し
 たため表示できなかった。また、Bristol 1993と比較したときのア
 ミノ酸変異を緑色で示した。

3-5. Bayesian Skyline Plot法によるNoV VP1遺伝子の

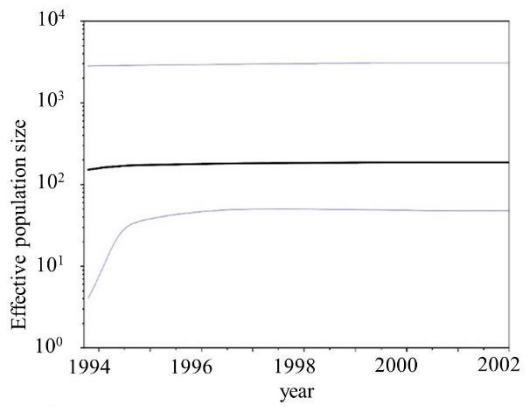
ゲノムポピュレーション解析結果

Bayesian Skyline Plot (BSP) は、過去に起こったゲノムポピュレーションの動態推移を遺伝子配列の変化から時系列で明らかにする手法論である。本法により、疫学調査などだけでは明らかにできないNoVの各遺伝子型の流行推移を時系列的なゲノムポピュレーションサイズとして推定可能になる。図12に示すように、NoV GII.4のゲノムポピュレーションサイズはおよそ1995年まで一定であり、1994-1996年および2005-2006年頃に二段階で急激に増加していた(図12A)。各々のGII.4vでは、Den Haag 2006b、New Orleans 2009、Sydney 2012のゲノムポピュレーションサイズがそれぞれ2005-2007年、2004-2010年、2006-2011年の間で増加したが、他のGII.4vにおいては有意な変化は認められなかった(図12B-K)。さらに、すべてのNoV GII.4の有効なゲノムポピュレーションサイズは、現在まで約10年間にわたって 10^2 であると推定された(図12A)。これらの結果は、複数の独立した系統のGII.4vが、約10年の間に次々急速にヒトに適応(Adaptation)し、ゲノムポピュレーションサイズを増加させてきたことを示している。

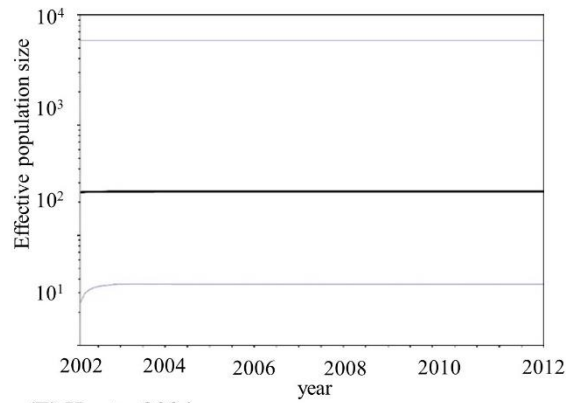
(A) GII.4 All strains



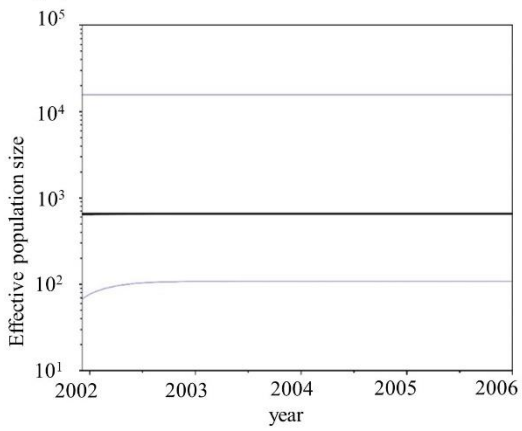
(B) US95_96



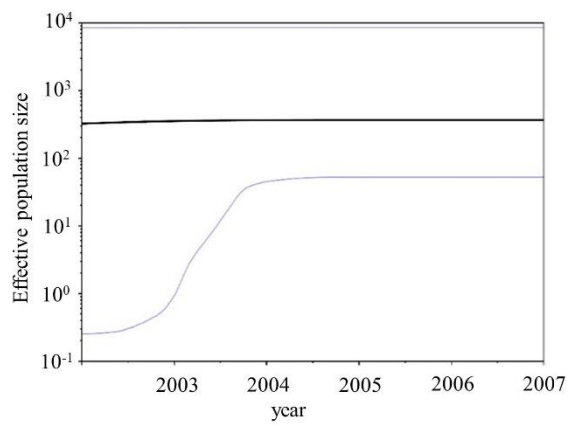
(C) Farmington Hills 2002



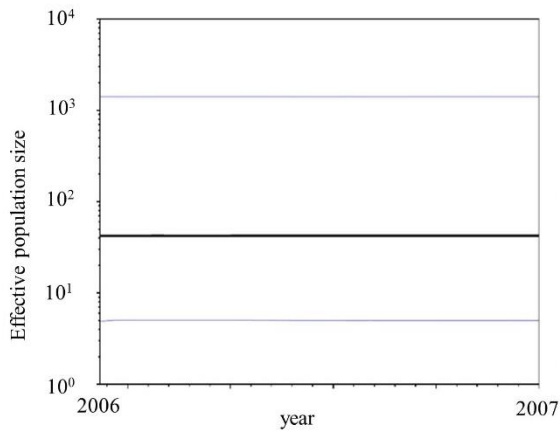
(D) Asia 2003



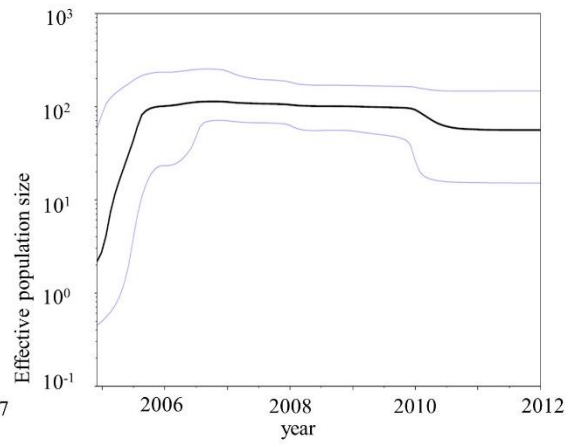
(E) Hunter 2004



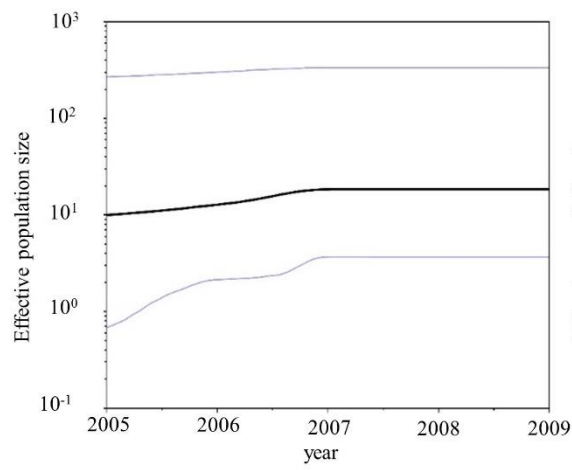
(F) Yerseke 2006a



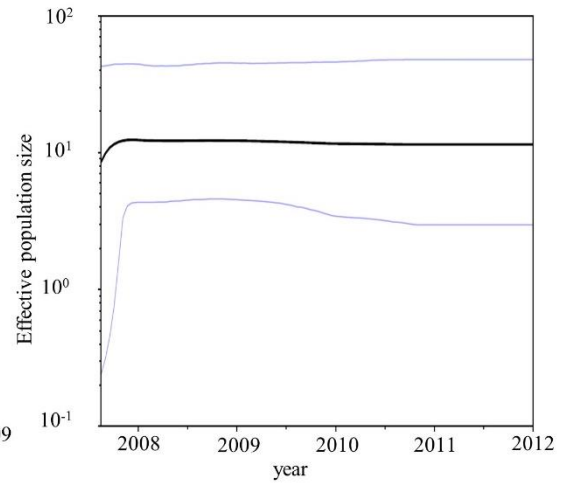
(G) Den Haag 2006b



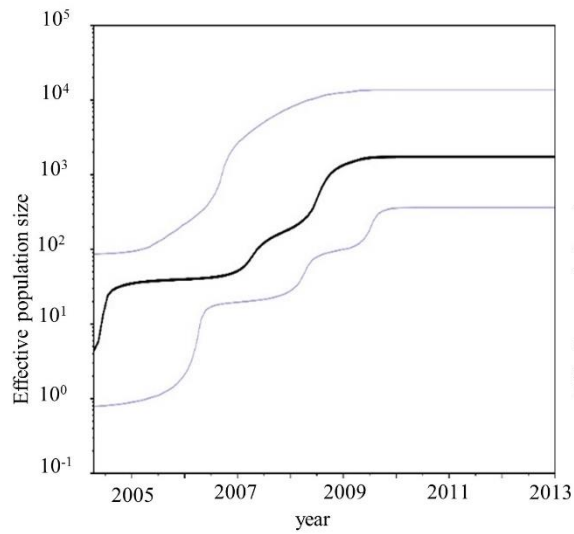
(H) Osaka 2007



(I) Apeldoorn 2007



(J) New Orleans 2009



(K) Sydney 2012

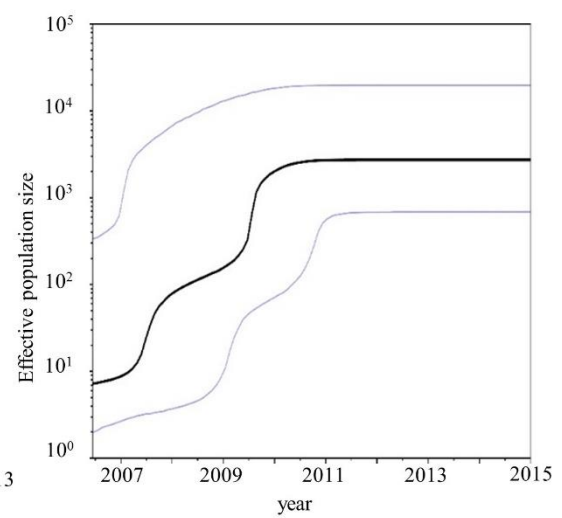


図12. Bayesian Skyline Plot法によるゲノムポピュレーション解析
すべてのGII.4株 (A)、US95_96 (B)、Farmington Hills 2002 (C)、
Asia 2003 (D)、Hunter 2004 (E)、Yerseke 2006a (F)、Den Haag
2006 (G)、Osaka 2007 (H)、Apeldoorn 2007 (I)、New Orleans 2009
(J)、およびSydney 2012 (K) のBayesian Skyline Plotを示した。
縦軸に人口動態サイズを示し、横軸に年代を示した。黒色実線で
中央値を示し、青色実線で95% highest posterior densitiesを示した。

4. 考察

本研究では、世界各地で採取された NoV GII.4v の capsid 蛋白質遺伝子 (VP1 遺伝子) の網羅的分子進化的解析を実施した。その結果、1) GII.4v の進化速度、系統間距離およびゲノムポピュレーションサイズを含む進化パターンは、GII.4v ごとに異なる可能性がある。2) GII.4 VP1 ドメイン間で、進化速度およびアミノ酸変異に関する制約が異なる可能性が示唆される。3) P2 ドメイン上の位置以外の VP1 蛋白質構造の外表面上にエピトープはほとんど存在しない可能性がある。4) GII.4v は、宿主の免疫系を逃れることができる新しい variant につながる選択的な圧力を特異的に受ける。これらのことから、GII.4 は新たな variant を生み出すことにより、それまで流行した variant が受けた特異的な圧力から逃れられるような異なる抗原性を得るだけでなく、ウイルス capsid の持つ構造的制約をも変化させることで P2 ドメイン上の広範囲なアミノ酸に変異を蓄積させていったことが推察される。

図 7 に示すように、時系列系統解析による解析結果は、GII.4 および GII.20 の共通の祖先が約 175 年前に分岐したことを推定した。さらに、過去 40 年間 GII.4 は分岐を続け、14 種類の variant を含む 7 つのクラスターを系統樹上に形成した (図 7B)。また、GII.4 全体の VP1 遺伝子の進化速度は 7.68×10^{-3} substitutions/site/year と推定された。既報では、各遺伝子型のポリメラーゼの忠実度 (Fidelity) と宿主の生体防御の圧力の差異に応じて、遺伝子型間で異なる速度でウイルスが進化する可能性が示されている [14, 92]。この方法を用いた進化速度の推定は、NoV 遺伝子型に対する以前に獲得された宿主特異的免疫から

逃れることが可能な変異株 (Escape mutant) の出現頻度を予測するのに寄与し得る [14, 109]。ただし、この方法の結果は、データセットに含まれる株の影響を受ける可能性がある [143]。また、GII.4は、他の遺伝子型、例えばGII.7 (2.3×10^{-3} substitutions/site/year)、GII.3 (4.16×10^{-3} substitutions/site/year) あるいはGII.2 (1.31×10^{-3} substitutions/site/year) などよりも速い進化速度を有することが推察された [9, 10, 14, 38, 92, 101, 109, 119]。このことから、本研究ではさらに、各GII.4vの異なる進化速度を推定した。その結果、GII.4v間においても進化速度が変化する可能性があることが推測された。また、VP1遺伝子の各ドメイン (シェル、P1、P2ドメイン) の進化速度もまた異なることも推定された (図8)。

また、GII.4vの相同性解析を行った結果、シェルドメインの相同性が比較的高く (85–100%)、P1ドメインとP2ドメインの相同性は低い (75–95%) ことが示された (図9)。この結果は、VP1遺伝子の変異がPドメインに集積・局在することを示唆している。以前の報告では、シェル、P1およびP2ドメインの相同性がそれぞれ85%以上、80%以上ならびに75%以上であったことから [30, 36]、この知見は以前の報告の結果と一致している。次に、GII.4株間で系統学的な距離を解析したが、各GII.4v内において距離が異なっていたことも示した。そのうち、Osaka 2007は他のGII.4vよりも塩基置換部位が多く、Asia 2003は塩基置換部位が少ないことが明らかになった (図10)。これらの結果は、GII.4vがそれぞれ独自に進化したことを示唆している。

次に、各GII.4vの立体配座エピトープを予測し、VP1のP2ドメイ

ンに多数の共通エピトープが存在することを明らかにした。さらに、アミノ酸置換の多くが立体配座エピトープ付近において検出された（表2）。以前の分子生物学的および生物情報学的研究は、GII.4 VP1構造内のP2ドメイン中のブロッキングエピトープを同定または推定した[21, 24, 42, 77, 78, 99]。これらの研究は、主にP2ドメインに焦点を当てており、経時的に生じたドメイン内の外面上のアミノ酸変化に基づいている。しかしながら、他の立体配座エピトープもまた、シェルおよびP1ドメインに含まれ得る。シェルおよびP1ドメインのアミノ酸配列はP2ドメインのアミノ酸配列よりも保存されていると推察されるので、免疫クロマトグラフィーキットのようなNoV感染を診断するためのツールを開発において、シェルおよびP1ドメインのエピトープを使用することは、検出感度上昇につながるかもしれない。さらに、以前に同定されたエピトープとは異なる位置における抗原性に関連する抗体は、宿主におけるB細胞応答によって産生され得ると推定されている。既報を調査した限りでは、数学的方法を用いた種々のGII.4vのシェルおよびP1ドメインを含むVP1構造全体の構造的エピトープ解析はまだ報告されていない。当研究のデータから予測されたエピトープは、VLPおよびモノクローナル抗体を用いた以前の*in vitro*実験によって同定された位置に近いかまたは重複していた[77]。さらに、本研究の結果により以前報告された位置以外のシェルドメインにもエピトープが存在することを予測した（表2、図11）。しかしながら、このエピトープに宿主が応答する可能性は低いと考えられ、宿主の生体防御（免疫）から逃れるために変異を重ねるGII.4vに広く応答する抗体を獲得する可能性は

低いと考えられる。既報を網羅的に調べた結果、これらの知見は最初の報告であると思われる。しかし、この研究結果は*in silico*のみの知見であり、GII.4 VP1を実際に用いた*in vitro*による追加試験が必要であろう。これらのことを総括すると、NoVの分子生物学に対する適切な理解を得るためにも、宿主によって産生される抗体の*in vitro*エピトープマッピング実験を含むさらなる研究を行う必要がある。また、既報ではNoV GII.4 VLPを用いる他の*in vitro*研究は、GII.4の抗原性変化がGII.4 VP1蛋白質のP2ドメインにおけるアミノ酸置換と関連していることを見出している[150]。さらに、以前の*in vitro*およびバイオインフォマティクス研究では、エピトープA(aa294-298、aa362、368)、B(aa333、aa382)、C(aa340、aa376)、D(aa393-395) E(aa407、aa412-413)における抗体に特異的な接触残基を予測した。エピトープAは抗原性領域であるが、エピトープDはHBGA結合性部位と関連していることが確認されている。さらに、エピトープCは極めて特異的なモノクローナル抗体で確認されている。エピトープEは、Farmington Hills 2002の潜在的なブロッキングに関連している。しかしながら、*in vitro*実験に基づいたエピトープBに関する報告はない。以前のバイオインフォマティクス研究は、5つのエピトープが、P2ドメインの外面上の様々なGII.4株に対する抗体産生と関連することを示唆した[21, 24, 41, 42, 77, 78, 99]。したがって、本結果および他の研究者の結果に基づいて、以前から同定されていたエピトープがNoV GII.4の抗原性と強く関連していることが示唆された。

また、本研究においては、GII.4 VP1遺伝子における選択圧を推定した。SLAC、FEL、IFEL法によって得られた結果は、すべての

GII.4において正の選択部位が、それぞれシェルおよびP1ドメイン上に位置するaa6、aa9、aa534であり、P2ドメインにおいて正の選択部位は推定されなかった(表3)。さらに、GII.4vごとに選択圧を推定すると、3つのGII.4vにおいて正の選択部位がP2ドメイン(Den Haag 2006bはaa393とaa412、New Orleans 2009はaa294とaa376、Sydney 2012はaa393)で予測された(表4)。これらの当研究で予測した部位は、以前の*in vitro*研究(表2)によって同定されたエピトープと主に重複していた。正の選択は、宿主の免疫応答から逃れるなど、生物の生存を促進する有利な置換を意味する[69]。さらに、以前の報告は、RNAの二次構造を介した効率的なRNAの翻訳における正の選択部位との関連性を予測した[119]。したがって、これらの結果は、GII.4vが、集団選択免疫を有する多数の感染性集団のためにEscape mutantを産生する可能性のある強い選択的な圧力を特異的に受けることを示す。しかしながら、将来、*in vitro*研究によって、シェルおよびP1ドメインにおける正の選択の重要性をさらに検討する必要がある。これまでの報告では、GII.4 VPI遺伝子の正の選択部位も推定した[9, 80, 119, 142]。例えば、SLAC法を用いて、Bokら(2009)は6つの正の選択部位(aa6、aa9、aa15、aa47、aa395およびaa534)を予測した。しかし、その研究における有意水準の限界は、本研究のそれよりも高かった($p < 0.25$)。Siebengaら(2010)は、FELとIFELを用いて8つの正の選択部位(aa6、aa9、aa47、aa352、aa372、aa395、aa407およびaa534)を同定した。本研究のデータと以前の報告との間の部分的な不一致は、研究間のデータセットの違いに起因する可能性がある。さらに、本研究の結果は、負の選択の下で多くのサイトを明らかにした。各ドメ

インにおいて、負の選択部位は約60-80%を占めた。負の選択部位の割合は、*VPI*遺伝子のドメイン間で異なっており、P1ドメインに最も存在する割合が高かった（表5）。負の選択部位は、生物の生存にとって重要なアミノ酸残基を保存する機能的部位である[128]。これらの結果は、NoV *VPI*遺伝子の多数の突然変異が負の選択および自然選択の下にある可能性があり、その中でもP1ドメインに機能的な部位が存在する可能性が高いことを示唆している。

次に、GII.4vのVP1構造上に立体配座エピトープ、正の選択およびアミノ酸置換をマッピングした。ほとんどの推定上のエピトープおよび置換は、全てのGII.4vにおいてP2ドメインの外面に位置していた。エピトープは、置換部位に重複していたか、または近位にあった。さらに、これまでの報告から予想されたエピトープより遠位の構造の外側表面に、シェルドメインおよびP1ドメインの正の選択部位が存在した。しかしながら、Den Haag 2006b、New Orleans 2009、Sydney 2012の正の選択部位は、既報のエピトープと重複した外表面上に位置していた（図11）。これらの結果は、NoV GII.4が抗原性の頻繁な変化と共に進化したことを示している。さらに、GII.4の流行は、免疫逃避以外のメカニズムと関連している可能性も否定できない。

さらに、NoV GII.4における感染集団規模の変動を推定した。ゲノムポピュレーションサイズは1994-1996年と、2005-2006年ごろに急激に増加した。さらに、Den Haag 2006b、New Orleans 2009、Sydney 2012のGII.4vは、2005-2007年、2004-2010年、2006-2011年にそれぞれ感染集団規模を増加させた（図12）。これ

らの結果は、GII.4が高度に流行する variant を繰り返し生産する能力を有することを示唆している。以前の報告では、Den Haag 2006bにおける広範なHBGA型に対する親和性が他の変異型と比較してより高いという証拠が示された[28]。したがって、NoV GI.4の発症率は、宿主受容体への結合能および免疫回避などの複数の因子と関連している可能性がある。

結論として、本研究で示したデータは、GII.4の進化的パターンが variant の間で様々に異なっている可能性を示している。さらに、本研究のエピトープ解析を含むデータは、近い将来NoV GI.4に対する効率的なワクチンの開発および現在使用されているNoVの流行予測システム（NOROCAS）の正確性を向上させることに貢献する可能性がある。以上のことから、今後もさらなるNoVゲノムに対する継続的な分子進化学的研究を実施する必要がある。

III. 第二章

茨城県内で検出されたノロウイルス GII の遺伝子型と疫学解析

1. 緒言

ノロウイルス（NoV）は急性冬季下痢症を引き起こすウイルスとして知られており、毎年繰り返し発生している[97]。NoVは感染力が強く、汚染された食物や水、ヒトからヒトへと感染する[102]。水を介する感染はNoV GIによるものが多いのに対して、NoV GII(GII)は食品やヒトを介する感染が多く[91]、NoV GIが水中において安定的である可能性が示唆されている[110]。しかし、胃腸炎症状を呈したヒトの糞便から採取されるNoVは主にGIIである[37, 51, 68, 108]。

NoVの感染は、世界中の医療施設、学校、飲食店などの多くの場所で発生する[43]。疫学的に、乳幼児や老人は免疫が弱いことから重症化しやすいとされており、特に乳幼児は発症割合も高いことからその危険性が高い[8, 83, 104]。幼児の集団においては大人と比較して多様な遺伝子型が検出されることが報告されている[116]。また、近年世界的な規模でパンデミックを起こしたGII.4 variantであるNew Orleans 2009とSydney 2012は、それぞれその始祖ウイルス株が検出されていることから、疫学調査の重要性が示されている[3, 35]。しかし、地域社会をベースとしたサーベイランスに基づくNoVの詳細な疫学調査に関する報告は少ない[52]。

一方、現在NoVのワクチン開発に向けて多数の研究がなされ、GI.1とGII.4のVLPワクチンを接種したヒトに交差反応性IgGの上昇がGII.2、GII.3、GII.14に認められるなど成果がみられており[81]、実現に向けて各社が製品化へ向けた試験を進めている[22, 132]。また、日本においてNOROCASトと呼ばれるNoVの流行予測システムが稼働し、公開されている[129]。

NoVに感染したヒトの年齢や感染場所を含めて、NoVの疫学情報を詳細に解析し、流行の特徴を明らかにすることは、被害を最小限にとどめるとともに、ワクチン株の選定や流行予測の精度向上にも寄与すると考えられる。そのため、茨城県内のサーベイランスに基づき探知された集団感染事例を中心に、5シーズンにわたるGIIの分子疫学的解析を実施した。

2. 材料および方法

2-1. 検体の収集

糞便検体および患者情報は茨城県において以下に示す3種類のサーベイランスシステムにおいて収集された：1) 病院からの散发事例における検体、2) ヒト-ヒト感染を疑う集団事例における検体、3) 食品を介する感染を疑う事例における検体である。1) においては病院が検体および患者の情報を収集し、2) および3) においては管轄保健所の職員が検体および患者の情報を収集した。

特に、2) の流行では保育園、老人施設を含む社会福祉施設等において、10名の発症者を超えた時点で保健所へ報告するように厚生労働省から通知が出されている。さらに茨城県では、幼稚園を含む学校等において欠席者の数とその症状を毎日報告する学校等欠席者・感染症情報システムが稼働しており、積極的に活用されていることから[147]、迅速に集団発生をとらえることができる。

今回、2012年9月から2017年8月までの5シーズンにおけるサーベイランスから、5,275検体が収集された。

2-2. ノロウイルスの検査

糞便検体は Phosphate Buffered Saline で 10wt% 乳剤に調整し、10,000×g で 10 分間遠心分離した。その上清から QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) を使用して RNA を抽出した。その後、PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Takara Bio) を使用して complementary DNA (cDNA) を作成し、Real-time PCR に供した。プライマーは COG2F/ALPF/COG2R、プローブは RING2AL-TP を用

いた [64]。

2-3. ウイルス遺伝子のシーケンスと解析

Real-time PCR法でGIIが陽性と判定されたすべての検体について、RNAからG2SKF/G2SKRプライマーとPrimeScript™ II High Fidelity One Step RT-PCR Kit (Takara Bio) を使用し、Reverse Transcription PCR法によって遺伝子を増幅した。PCR産物はBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitを使用してダイレクトシーケンス法によって遺伝子配列を決定した。得られた配列はNorovirus Genotyping Toolを使用して遺伝子型を決定した [67]。同一事例で収集された検体の中で遺伝子型が同一であれば1検体を選定して遺伝子配列のデータセットを作成した。

2-4. 疫学データの解析

GIIが陽性となった検体の疫学データを取りまとめて流行時期、遺伝子型、年齢層、感染場所など様々な項目に着目して比較検討を行った。なお、患者の年齢、感染様式などを加味して感染事例を以下の6つの群に分類した。1) 幼稚園、保育園などの幼児施設 (Kindergarten/Nursery school: K/N)、2) 小学校 (Primary School: PS)、3) 老人福祉施設 (Nursing Home: NS)、4) 病院 (Hospital: H)、5) 食中毒疑い事例 (Food Poisoning: FP)、6) その他 (Other: O)。遺伝子型は5シーズンで50事例以上発生したGII.2、GII.4、GII.6、GII.17についてまとめた。

2-5. 分子系統解析

得られた塩基配列を遺伝子型ごとにまとめ、標準株を加えてデータセットとした。KAKUSAN4で塩基置換モデルを明らかにし[133]、そのモデルを使用してMEGA6を用いて最尤法で分子系統樹を作成した[131]。100%一致した配列が同一シーズンに4株以上あった場合には名前に検出数を明記して太字で示し、1株だけ残してほかの配列をデータセットから除いた。

2-6. 統計分析

統計解析はEZRソフトウェアを用いて行った[54]。各遺伝子型における患者の年齢分布に関する統計解析としてKruskal-Wallis検定を行った後、Holm多重比較検定を実施した。

3. 結果

3-1. ノロウイルス検査結果と遺伝子型別

2012年9月から2017年8月の5シーズンにかけて5,275検体の検査を実施し、2,243検体からGIIが検出された。事例発生数はGII.2が171事例、GII.4が248事例、GII.6が63事例、GII.17が77事例、その他のGII遺伝子型が39事例で合計は598事例であった（表6）。

表6. 各シーズンにおけるノロウイルスGII遺伝子型の事例発生数

	2012/2013	2013/2014	2014/2015	2015/2016	2016/2017	合計
GII.2	10	1	1	7	152	171
GII.4	87	70	45	31	15	248
GII.6	4	49	4	2	4	63
GII.17	2	1	30	33	11	77
Other	3	2	17	10	7	39
Total	106	123	97	83	189	598

3-2. 各遺伝子型における事例発生数の推移

流行を形成したGIIの遺伝子型である4遺伝子型（GII.2、GII.4、GII.6およびGII.17）の各シーズンにおける事例発生数から（表6）、GII.4の事例数は2012/2013シーズンに単一の遺伝子型による流行で87事例の発生を観察してから、2013/2014シーズンに70事例、2014/2015シーズンに45事例、2015/2016シーズンに31事例、そして2016/2017シーズンに15事例と、減少の一途をたどった。2015/2016シーズンにはGII.4の事例は減少したものの、GII.17は件数、流行

時期を大きく変化させないまま流行した（図13）。2016/2017シーズンには11月からGII.2が多くの事例で検出され、過去5シーズンにおいて、すべての遺伝子型を含めて1シーズンに起こった最大の事例数の発生があった。

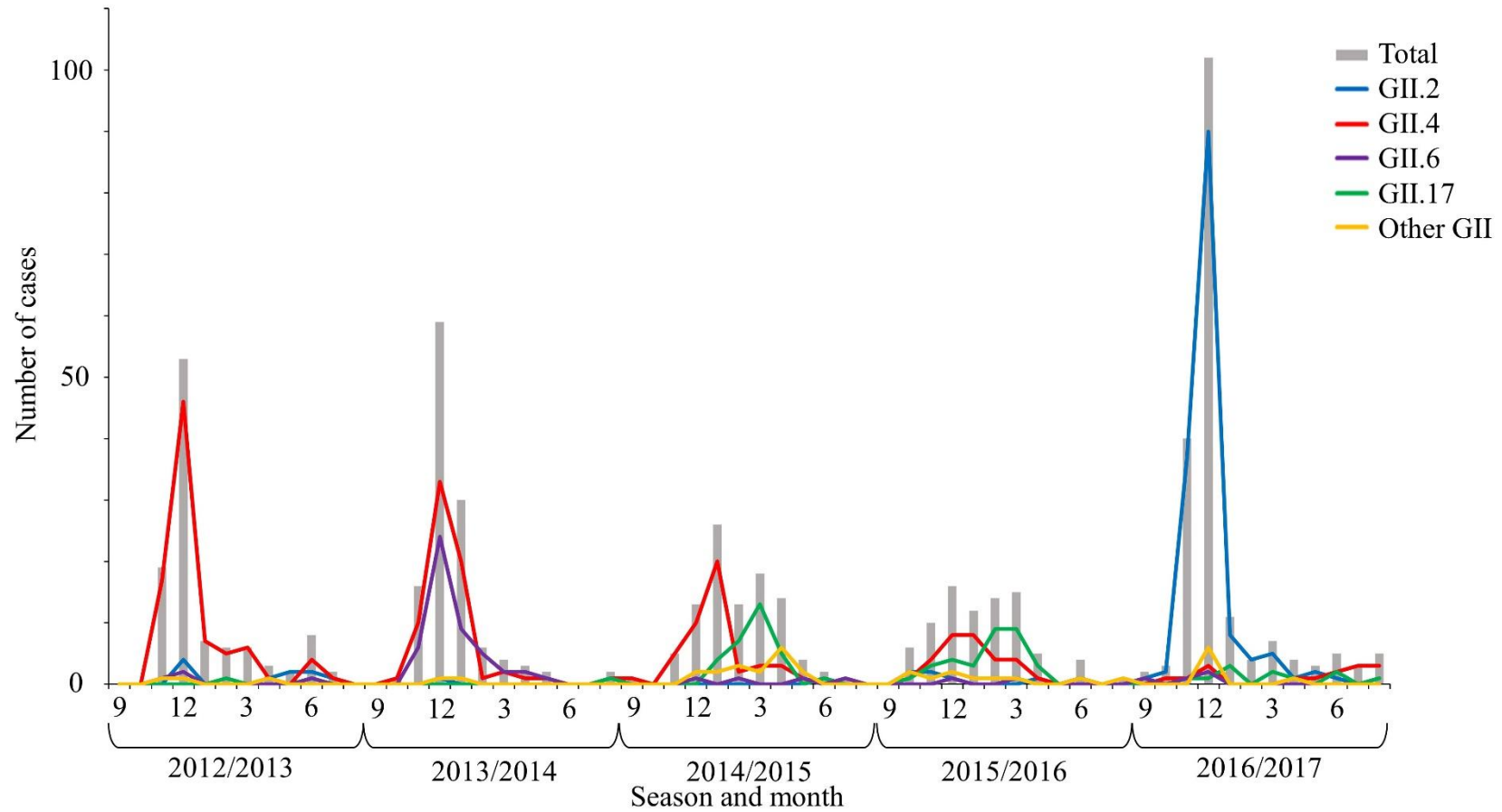


図13. ノロウイルスGIIの各遺伝子型における事例発生数の推移

各遺伝子型を色別に折れ線グラフで、すべてのGII検出事例数を棒グラフで示した。縦軸に検出事例数、横軸に発生時期を示した。

3-3. 各遺伝子型における流行時期の比較

各遺伝子型について流行時期を比較した（図14）。GII.2、GII.4およびGII.6はともに12月を流行のピークとしていた。一方で、GII.17は2月から3月に流行のピークがあり、流行する時期は異なっていた。

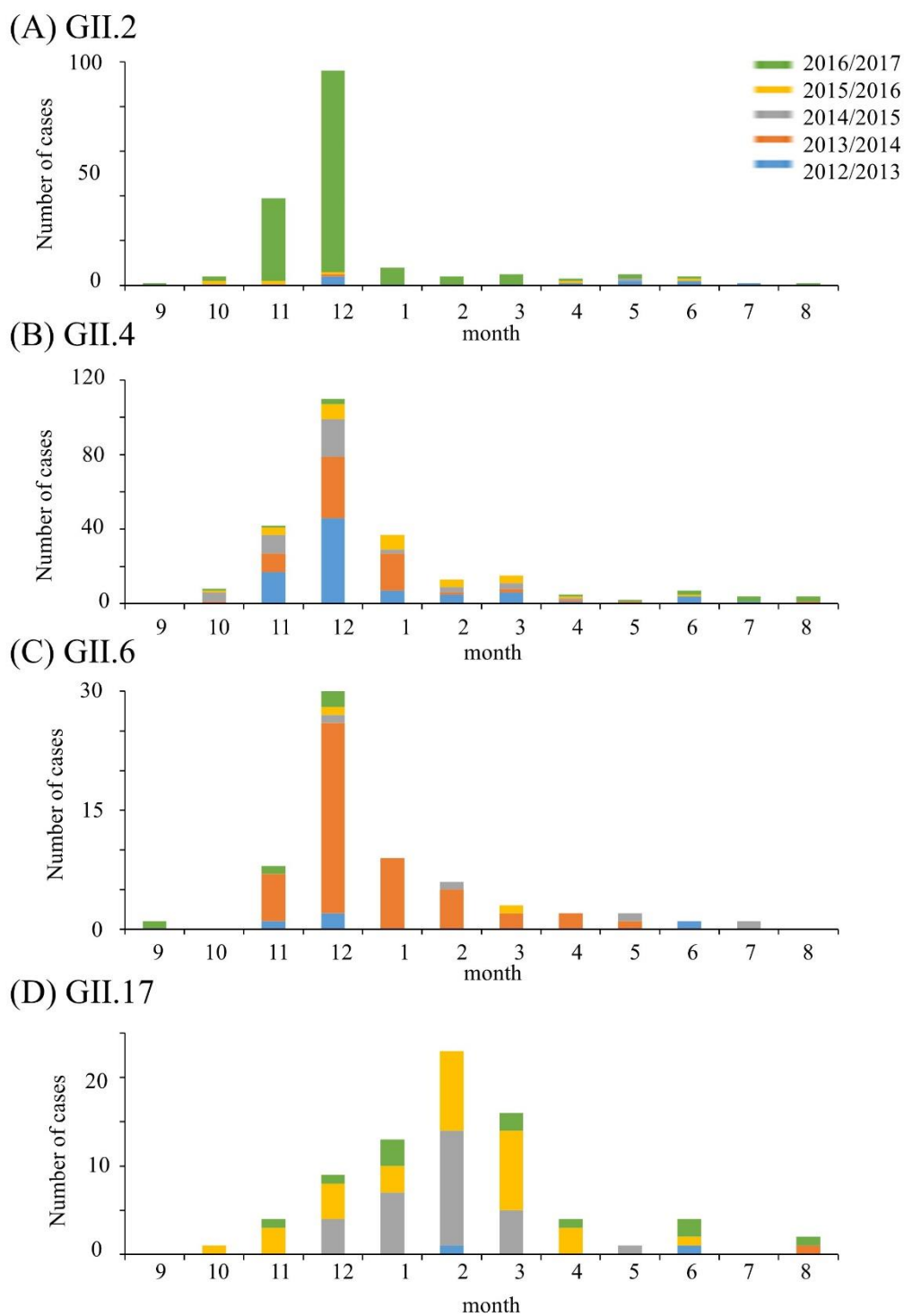


図14. ノロウイルスGIIの各遺伝子型における流行時期の比較
 遺伝子型ごとに (A) GII.2、(B) GII.4、(C) GII.6、(D) GII.17で
 分け、各シーズンを色別して月別に積み上げ棒グラフで示した。

3-4. 各遺伝子型における患者の年齢分布

GII.2、GII.4、GII.6およびGII.17のそれぞれについて患者の年齢を箱ひげ図で示した（図15）。4種類の遺伝子型はKruskal-Wallis検定により有意差を認め（ $p < 0.001$ ）、Holm多重比較検定によりGII.2とGII.4、GII.2とGII.17、GII.6とGII.4およびGII.6とGII.17の間に有意差を認めた（ $p < 0.001$ ）。

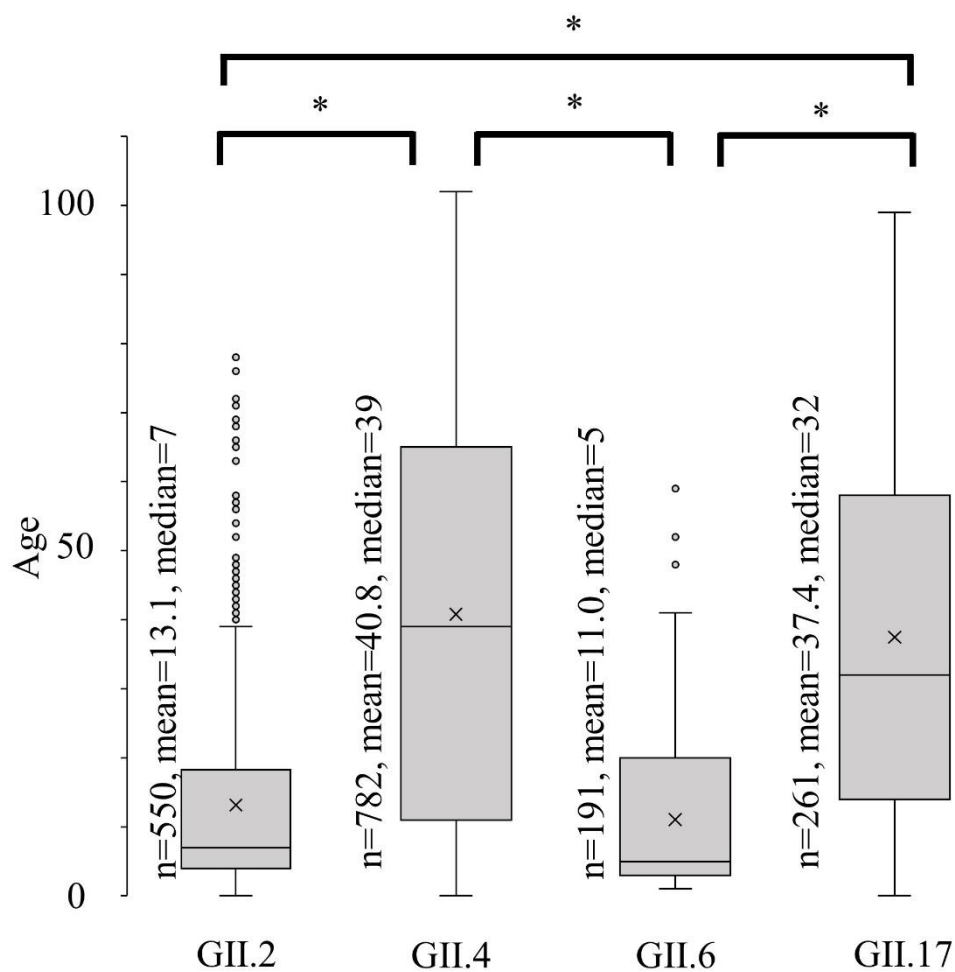


図15. ノロウイルスGII各遺伝子型の患者年齢分布

×は平均値、—は中央値を示し、箱は±25%を示した。○は外れ値、左にデータを示した。

* $p < 0.001$

3-5. 各遺伝子型における感染場所の比較

それぞれの遺伝子型を感染場所ごとに100%積み上げ棒グラフで示した(図16)。GII.2とGII.6は小児施設(K/NおよびPS)の事例が70%以上を占め、特にGII.6では80%を超えた。GII.4はK/N、NHおよびFPがほぼ均一の事例数であった。GII.17はFPが過半数を占め、感染症事例は少なかった。また、4つの遺伝子型について感染場所ごとの発生数を時系列でまとめた(図17)。GII.2検出事例は、2016/2017シーズンの11月から12月に小児施設(K/NおよびPS)で急激に増加し、12月にはFPがともに増加した。GII.4は毎年K/N、NHおよびFPが主な流行を形成したが、シーズンごとにいずれの感染場所でも発生数が減少していった。GII.6は2013/2014シーズンに小児施設(K/NおよびPS)で一過性に流行した。GII.17は2014/2015および2015/2016シーズンに流行したが、その内容はほとんどがFPであった。また、GII.2、GII.4およびGII.6は毎シーズン冬の流行時期にはK/Nが先行して事例数を増加させた。

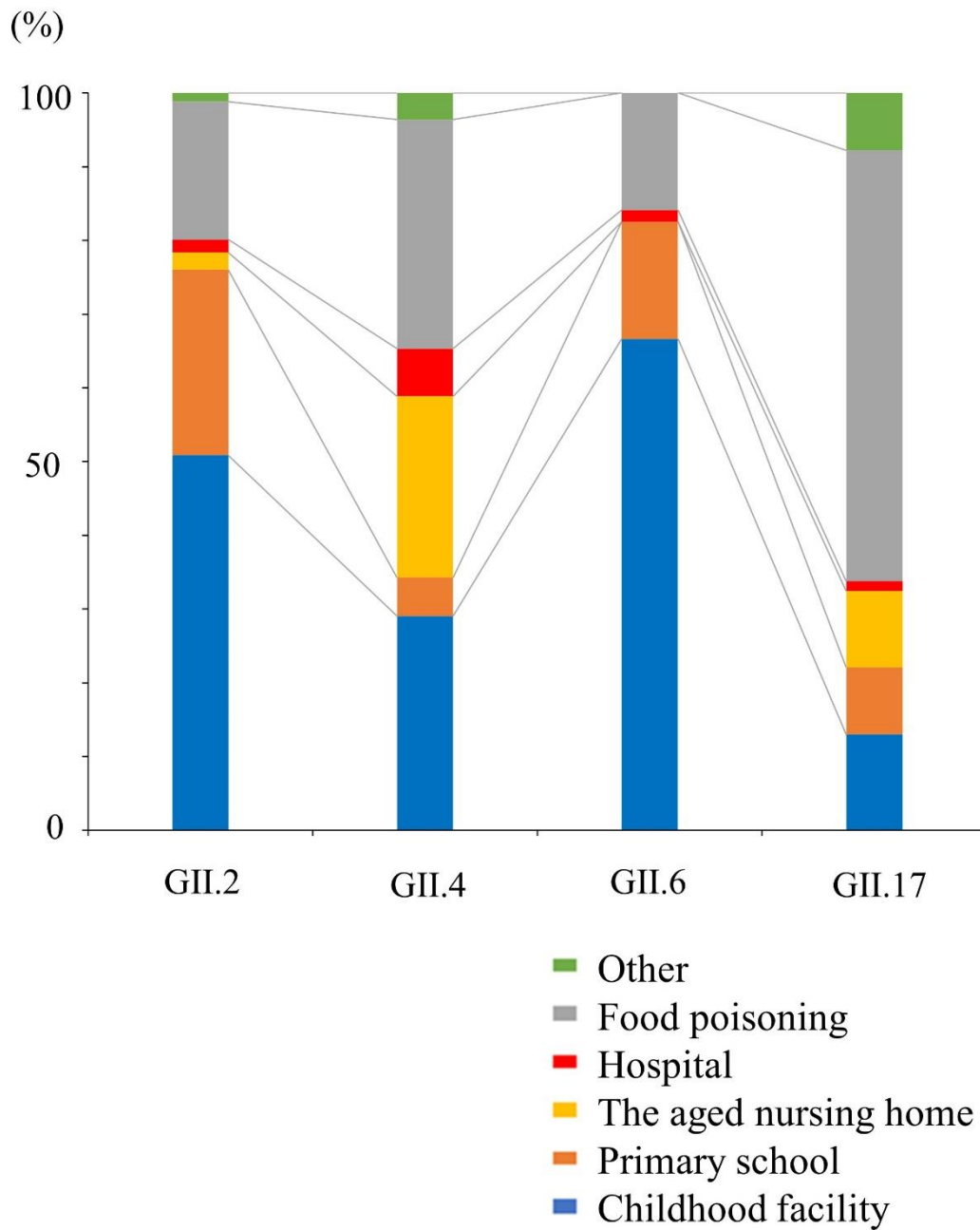


図 16. ノロウイルス GII の各遺伝子型における感染場所の比較
 遺伝子型別に、感染場所を色別して 100% 積み上げ棒グラフで示した。

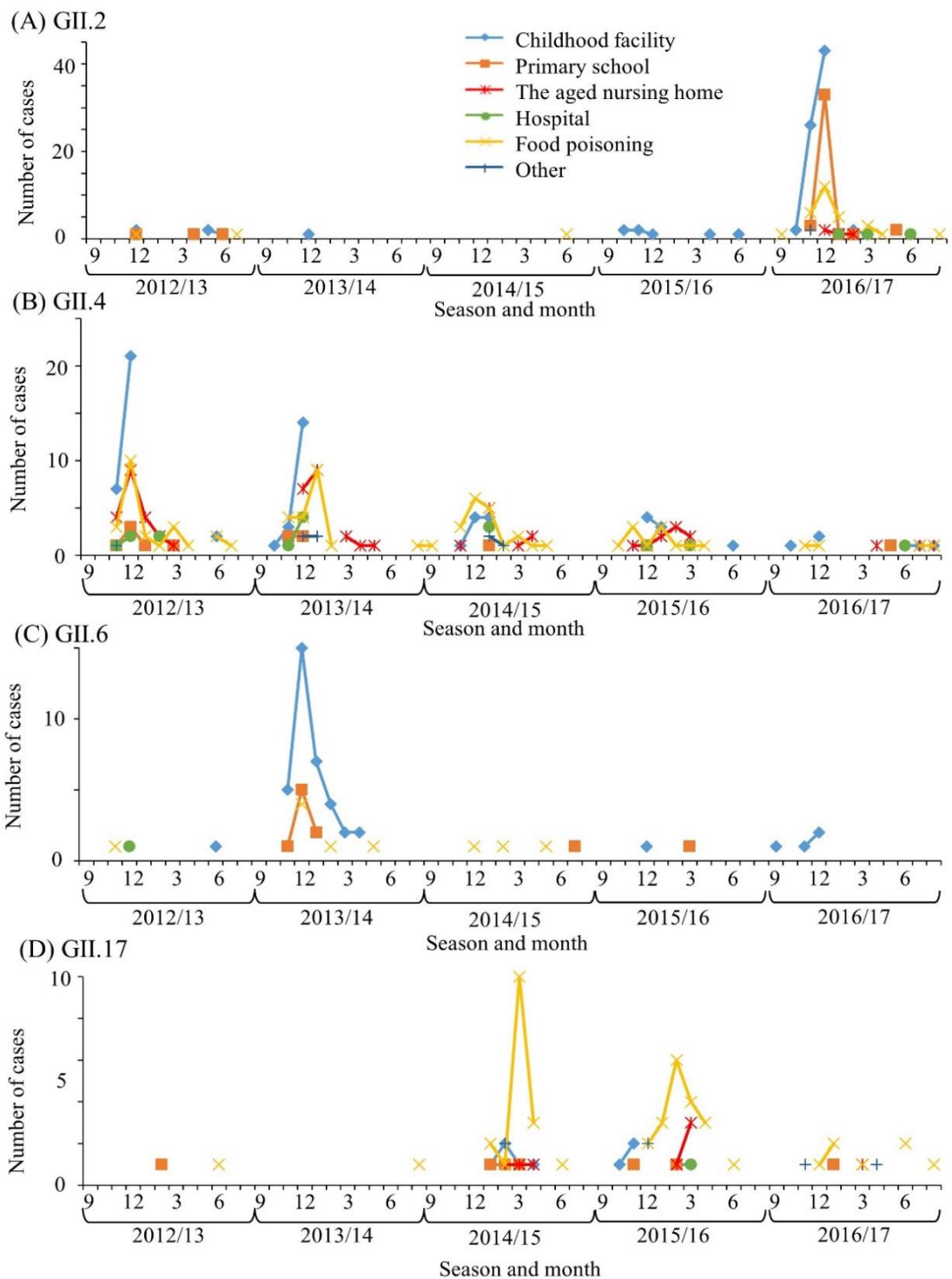


図 17. 各遺伝子型における感染場所別発生数と発生時期の関係
 (A)GII.2、(B)GII.4、(C)GII.6および(D)GII.17の事例数を感染場所別に時系列で示した。縦軸に事例数、横軸に発生時期を示した。

3-6. 分子系統解析

3-6-1. GII.2

GII.2のデータセットは塩基置換モデルをTN93+Gamma、VPIの5'末端から282塩基で分子系統樹を作成した(図18)。GII.2の分子系統樹から、過去5シーズンに流行したGII.2は大きく2つのクラスターに分かれた。クラスター1には2012/2013シーズンから継続して発生している株が含まれた。クラスター2には2016/2017シーズンに急激な流行を形成した株が含まれた。特に、クラスター2の2016/2017シーズンに95事例から検出されたウイルス株は塩基配列が100%一致しており、主要流行株と考えられた。また、2015年に検出された4株が大きく離れていた。

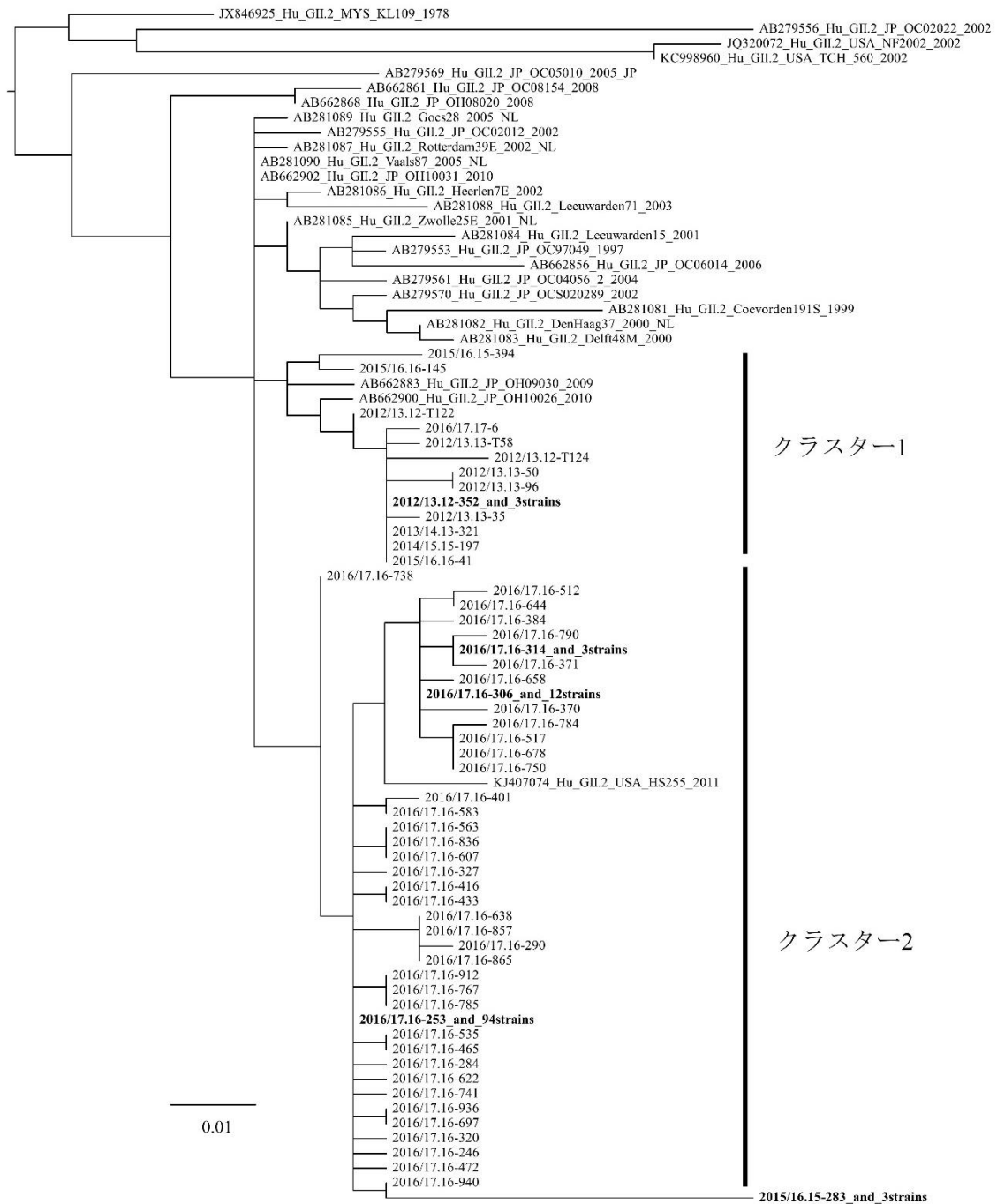


図 18. GII.2 の分子系統樹

塩基置換モデルを TN93 + Gamma、VPI の 5' 末端から 282 塩基で最尤法により分子系統樹を作成した。

3-6-2. GII.4

GII.4のデータセットは塩基置換モデルをHKY85+Gamma、*VPI*の5'末端から282塩基で分子系統樹を作成した(図19)。GII.4の分子系統樹から、GII.4 variantのうち、2014/2015シーズンにGII.4 Den Haag 2006bが3事例、2015/2016および2016/2017シーズンに1事例ずつGII.4 Osaka 2016が検出された他は、すべてGII.4 Sydney 2012に分類された。GII.4 Sydney 2012は、大きく3つのクラスターを形成した。クラスター1には2015/2016シーズンに発生した6株が含まれた。クラスター2には2015/2016シーズン以降検出された株が含まれた。クラスター3には2012/2013から2015/2016シーズンまでに検出された株が多く含まれ、特に2012/2013シーズンに39事例、2013/2014シーズンに36事例、2014/2015シーズンに14事例、合計89事例から検出されたウイルス株は標準株 JX459908|Hu/GII.4/Sydney2012/Sydney/NSW0514/2012/AUと塩基配列が100%一致しており、主要流行株と考えられた。

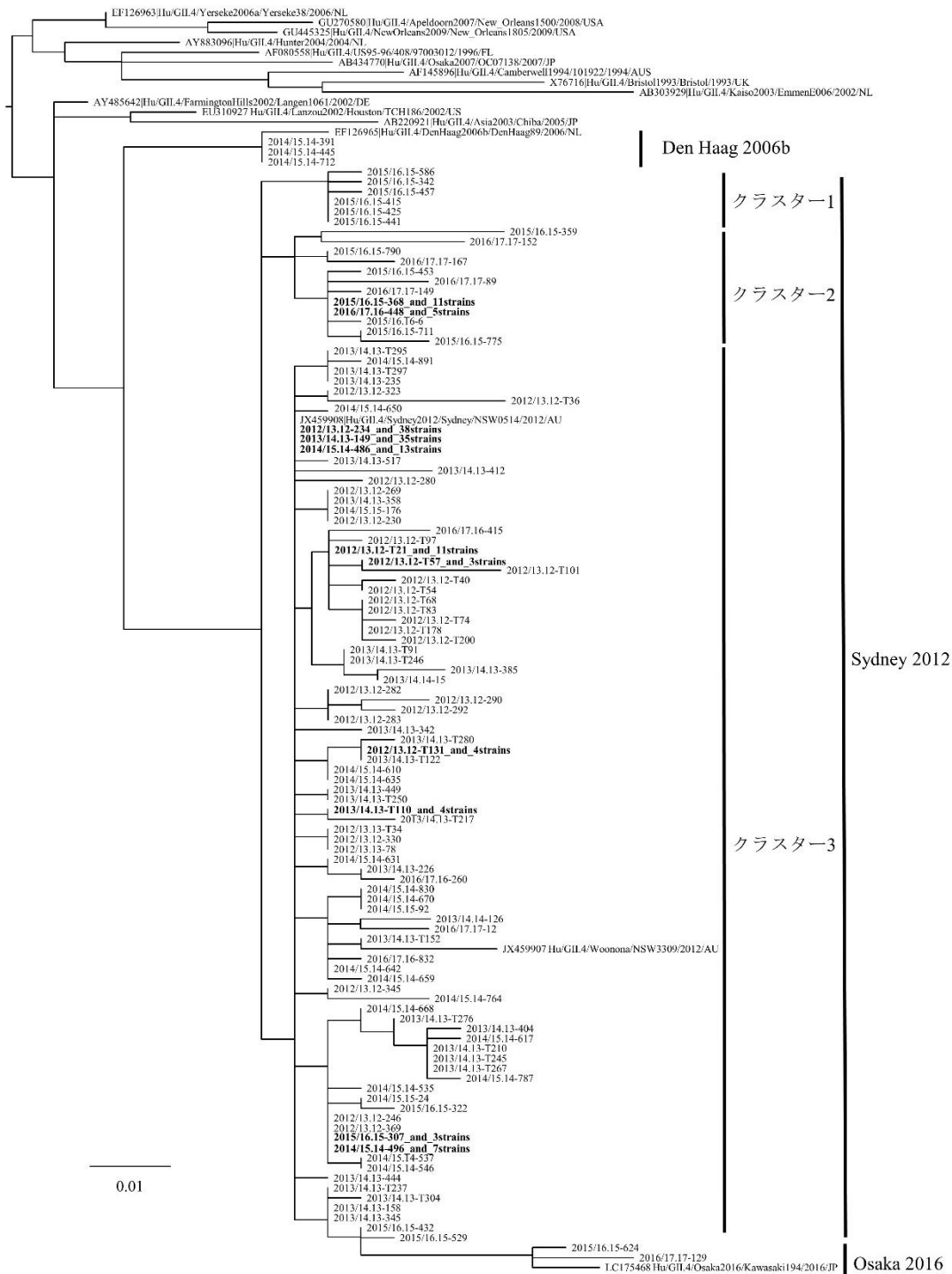


図 19. GII.4 の分子系統樹

塩基置換モデルを HKY85+Gamma、*VPI* の 5' 末端から 282 塩基で最尤法により分子系統樹を作成した。

3-6-3. GII.6

GII.6のデータセットは塩基置換モデルをGTR+Gamma、*VP1*の5'末端から282塩基で分子系統樹を作成した(図20)。GII.6は2013/2014シーズンの大きな流行が同一のクラスターを形成した。特に、2013/2014シーズンに34事例から検出されたウイルス株は標準株KM267740_1_Hu/GII_P7/GII_6/Kaohsoing/13-BP-2/2013と塩基配列が100%一致しており、主要流行株と考えられた。また、大きな流行がないシーズンには頻繁に異なるクラスターに属する株が検出された。

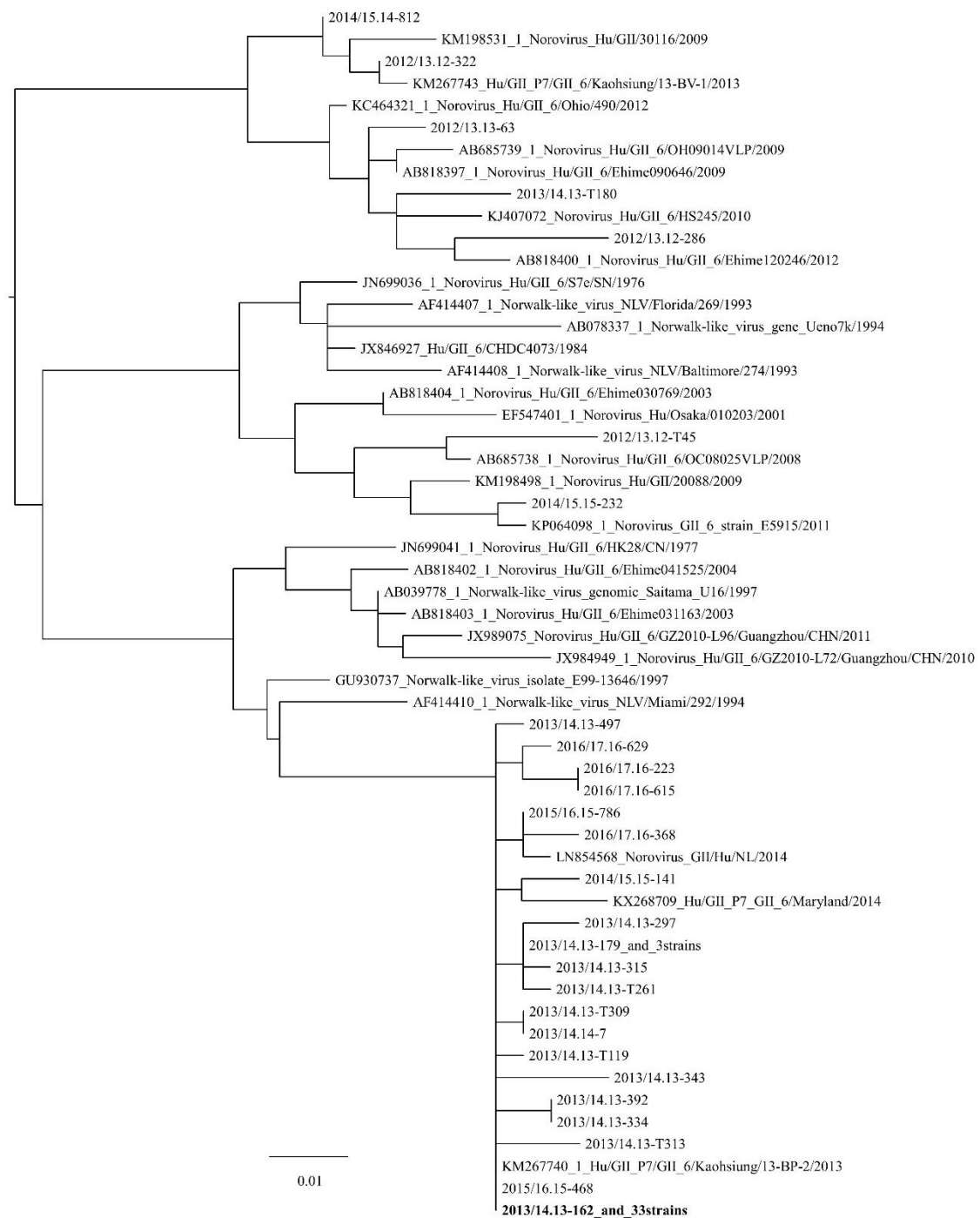


図 20. GII.6 の分子系統樹

塩基置換モデルを GTR+Gamma、*VPI* の 5' 末端から 282 塩基で最尤法により分子系統樹を作成した。

3-6-4. GII.17

GII.17のデータセットは塩基置換モデルをTN93+Gamma、*VPI*の5'末端から282塩基で分子系統樹を作成した(図21)。GII.17の分子系統樹から、5シーズン中に検出されたすべての株は2005年までに採取された標準株とは異なるクラスターに属した。

2014/2015シーズンにおける流行の前後において、標準株

AB983218.1|HuNoV/GII/JP/2014/GII.P17_GII.17/Kawasaki323と近縁の群から標準株

LC037415.1|HuNoV/GII/JP/2015/GII.P17_GII.17/Kawasaki308と近縁の群まで幅広く配列の異なる株が採取された。特に2014/2015

シーズンに17事例、2015/2016シーズンに17事例、2016/2017シーズンに4事例で合計38事例から検出されたウイルス株は標準株

Kawasaki308と塩基配列が100%一致しており、主要流行株と考えられた。

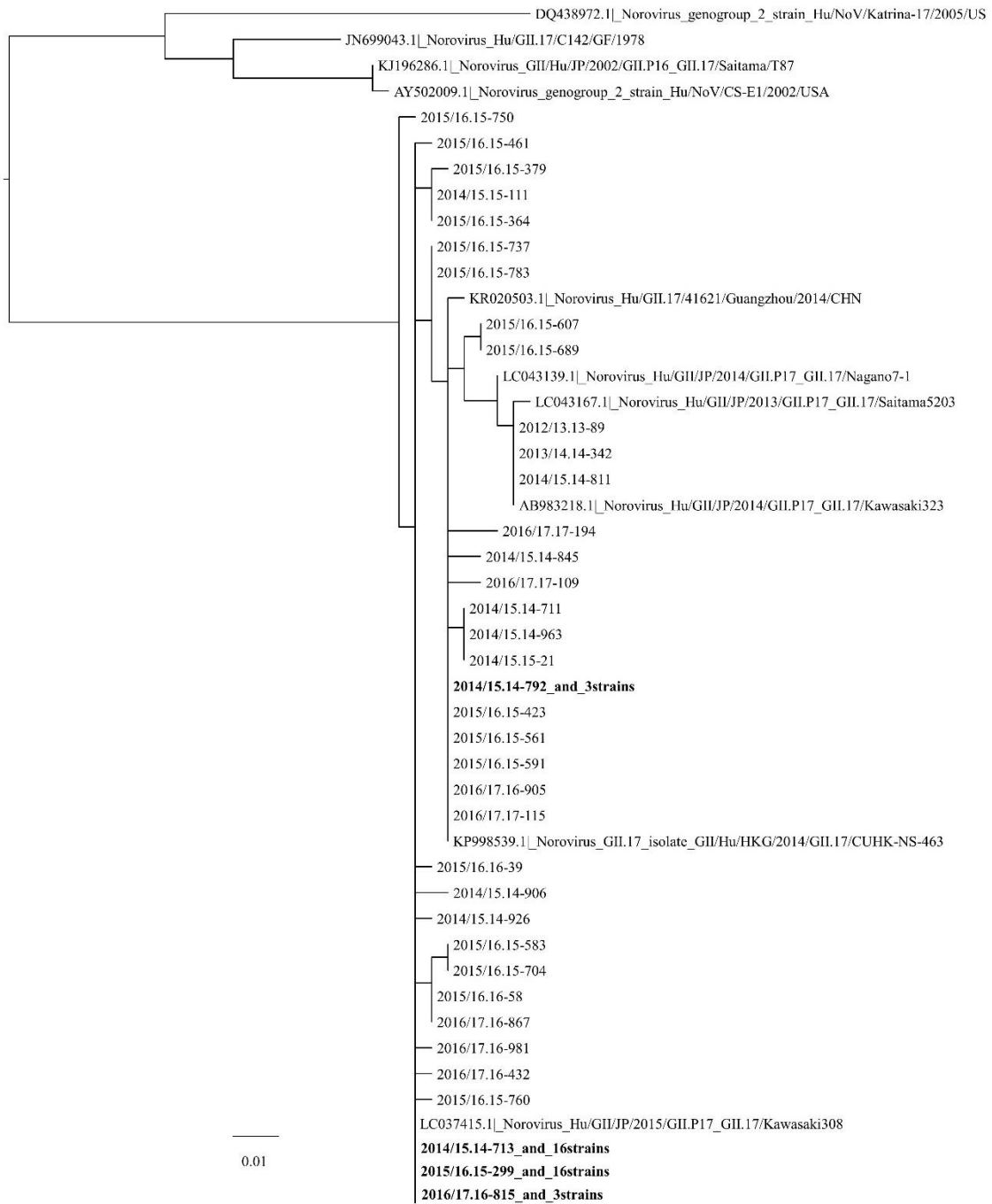


図 21. GII.17 の分子系統樹

塩基置換モデルを TN93+Gamma、*VP1* の 5' 末端から 282 塩基で最尤法により分子系統樹を作成した。

4. 考察

本研究では、茨城県におけるGIIの流行状況を詳細に解析することにより、以下のとおり遺伝子型ごとに疫学的な特徴を見出すことができた。(1)GII.4はシーズンごとに事例数を減少させた。(2)GII.2、GII.4、GII.6は流行ピークが12月にみられた一方で、GII.17は2月から3月に流行ピークがみられた。(3) 遺伝子型ごとに主要な患者年齢層、感染場所が異なった。

まず、2012/2013シーズンに世界的規模で観察されたGII.4 Sydney 2012の流行 [1, 139]、2013年冬季の上海におけるGII.6の流行 [86]、そして2016/2017シーズンに観察されたGII.2の流行は日本各地、また、アジア、ヨーロッパにおいても観察されたことから [7, 72, 98]、NoVの流行において茨城県内で観察された疫学的傾向は世界的な規模の流行と関連していることが示唆される。

GII.4はシーズンごとに減少の一途をたどった(表6、図13、17)。この理由として、大きく以下の3つが考えられた。1) 集団免疫の関与、2) 他の流行遺伝子型の関与、3) 不顕性感染者の存在。1) NoVは交差免疫性が弱く、遺伝子型間だけでなく [18]、GII.4のvariant間でも成立しにくい組み合わせがある [80]。さらに、交差反応を示す抗体を誘導するような部位がウイルス表面にあることはまれであり [62]、NoVの免疫は4年以上持続することなどから [121]、GII.4 Sydney2012に特異的な免疫の影響により減少していた可能性が高いことが推察された [24, 79]。2) 2012/2013シーズン以外は、他の遺伝子型も同時に流行しており(図13)、変異の少ない遺伝子型よりも変異の多い遺伝子型が感染しやすいことから [101]、2013/2014シーズンはGII.6が、2016/2017シーズンは

GII.2がGII.4と同時期に感染を拡大したことによりGII.4の集団が減少した可能性が考えられた。3) GII.4の中でも、Den Haag 2006bとSydney 2012では症状の重篤度に差があることから[153]、各遺伝子型により症状に差があることが推察される。また、NoVは交差免疫が弱いものの、同一遺伝子群内での再感染はまれであり、再感染したとしても症状は軽減することが報告されている[6, 17]。今回の調査結果は主に有症者から検出された結果であり、複数回の感染により不顕性感染の形で維持されている可能性も考えられる。以上3つの理由が関与して、今回のGII.4事例の減少として観察されたことが推察される。

GII.17は、2014/2015シーズンに初めて流行し[89]、それに伴うGII.4の減少により[40]、GII.4時代の終焉が予察された[26]。しかし、本研究結果からもわかるようにGII.17は流行時期が遅く(図14)、事例内容が食中毒事例に偏るなど(図16)、GII.4と異なる点が多く(図17)、GII.4とGII.17が置き換わることはなかった(図13)。複数の疫学的研究でも同様にGII.17の流行時期が遅く、成人での感染が多いことを示している[40, 155]。

本研究により遺伝子型ごとに主要な患者年齢層に違いがあることが観察され、2013/2014シーズンのGII.6と2016/2017シーズンのGII.2は小児の集団で流行した(図15、16、17)。これまでの疫学的研究は、広範な遺伝子型のNoVが小児を中心に胃腸炎を起こし[116, 156]、7-12カ月齢の小児集団において最も高い罹患率であることを示している[13]。また、小児集団では広範な免疫が獲得されていないため様々な遺伝子型に複数回感染する可能性がある[100, 114]。今回検出されたGII.2およびGII.6は小児集団では流

行を拡大できたが、大人の集団では広範な免疫が獲得されており、幅広く流行することが出来なかった可能性が推察された。一方、GII.17は主に食中毒事例から検出され、GII.4は小児、高齢者、食中毒の事例で検出された（図16、17）。2つの遺伝子型は広範な年齢層に対して感染可能であることが推察される。しかし、前述のとおりGII.17は流行時期が他の遺伝子型と比較して遅いために（図14、17）、小児などの易感染集団において大きな流行を形成できなかったことが、GII.4との違いに現れたことが推察される。そのため、遺伝子型ごとに年齢層や感染場所、感染時期で感受性や病原性に違いがあることが推察された。

分子系統解析から、GII.2は、2016/2017シーズンにおけるGII.2がクラスター2に集中した（図18）。2016/2017シーズンのGII.2はそれまで発生していたGII.2と比較して変異があり[135]、さらに2010-2012年にかけて流行したGII.2から分岐したことが明らかになっており[96]、今研究結果のクラスター2がこれにあたりと推察された。また、GII.4は、2015/2016シーズンからクラスター1および2の発生があり、2014/2015シーズンまで流行したクラスター3から遺伝的変異があったことが推察された（図19）。GII.6は、2013/2014シーズンに発生した流行事例はすべて同一クラスターに属したが、散発的に異なるクラスターに属する株が検出された（図20）。このことにより、2013/2014シーズンの流行株が他のクラスターに属するウイルス株と異なる抗原性を持っていたことが推察された。また、GII.17は、2005年までに検出された標準株とは大きく異なるクラスターを形成し、Kawasaki308やKawasaki323と塩基配列が類似する株が多く検出された（図21）。GII.17は2005

年以前に検出された株と2014/2015以降に流行した株との間だけでなく、近年発生があったKawasaki308とKawasaki323の間でもB-cellエピトープに複数のアミノ酸変異があることから[89]、過去に流行した株とは抗原性の異なるGII.17が2014/2015シーズン以降に流行した可能性が考えられた。

近年、GII.P16-GII.4というORF1が組み換えを起こした新しいGII.4が検出されていることが報告された[90, 113]。そしてそのGII.P16がGII.2と組み換えを起こした結果、2016/2017シーズンのGII.2の流行に至った可能性があることから[7]、組み換えが頻繁に発生していることが推察される。NoVのキャプシドは強い構造的制約を持ちながら進化できる数少ないコドンを感染の優位性を持つように変化させて進化するが[101]、一方でPドメインが以前考えられていたよりも柔軟性があることも示されていることから[62]、組み換えや変異によってウイルスの抗原性が大きく変化することが推察される。Sydney 2012に対しては過去に得た抗体のHBGAブロッキング力価が欠如していることから[118]、GII.4のみならず他の遺伝子型においても免疫回避能力の獲得により急速で世界的な拡散へとつながる新たな変異株が生まれることが危惧される。特に小児に関しては免疫が十分ではないため、いずれの遺伝子型においても流行の可能性があり、過去に流行して事例数が減少した遺伝子型が再流行する可能性も考えられる。そのため、NoVの進化の解明と将来の疫学解析およびワクチン候補の選定に寄与するためにも、今後も継続的なモニタリングと疫学データの蓄積が重要となる。

IV. 謝辞

本研究論文を作成するにあたり、格別なる御指導を賜るとともに、学位取得の機会をいただきました北里大学獣医学部実験動物学研究室 佐々木宣哉教授に心より深謝いたします。

本研究の企画・遂行だけでなく、研究者としてのありかた・考え方に至るまで、厳しく熱心に御指導いただいた群馬パーズ大学保健科学部検査技術学科 木村博一教授に深謝いたします。

本研究の遂行にあたり、御指導いただきました北里大学北里生命科学研究所大学院感染制御科学府ウイルス感染制御学I 片山和彦教授に深謝いたします。

また、本研究論文をまとめるにあたり、細部にわたり御教示いただいた川崎市健康安全研究所 松島勇紀博士、千葉大学附属病院 長澤耕男博士に感謝申し上げます。

さらに、学位取得ならびに本研究の遂行に対して、格別の御支援、御協力を賜りました現勤務先である茨城県衛生研究所 永田紀子研究調整監兼企画情報部長、ウイルス部 深谷節子部長、土井育子主任、後藤慶子技師、梅澤昌弘技師、黒澤美穂技師ならびに齋藤葵技師を含め、所内関係者の皆様に御礼申し上げます。

最後に、家族の支えにも感謝します。

V. 引用文献

1. Allen, D.J., Adams, N.L., Aladin, F., Harris, J.P. and Brown, D.W. 2014. Emergence of the GII-4 Norovirus Sydney2012 Strain in England, Winter. 2012-2013. *PLoS One*. **9**: e88978. doi: 10.1371/journal.pone.0088978
2. Allen, D.J., Gray, J.J., Gallimore, C.I., Xerry, J. and Iturriza-Gómara, M. 2008. Analysis of amino acid variation in the P2 domain of the GII-4 norovirus VP1 protein reveals putative variant-specific epitopes. *PLoS One*. **3**: e1485. doi: 10.1371/journal.pone.0001485.
3. Allen, D.J., Trainor, E., Callaghan, A., O'Brien, S.J., Cunliffe, N.A. and Iturriza-Gómara, M. 2016. Early detection of epidemic GII-4 norovirus strains in UK and Malawi: Role of surveillance of sporadic acute gastroenteritis in anticipating global epidemics. *PLoS One*. **11**: e0146972. doi: 10.1371/journal.pone.0146972
4. Andernach, I. E., Hunewald, O.E. and Muller, C.P. 2013. Bayesian inference of the evolution of HBV/E. *PLoS One*. **8**: e81690. doi: 10.1371/journal.pone.0081690.
5. Añez, G., Grinev, A., Chancey, C., Ball, C., Akolkar, N., Land, K.J., Winkelman, V., Stramer, S.L., Kramer, L.D. and Rios, M. 2013. Evolutionary dynamics of West Nile virus in the United States, 1999-2011: phylogeny, selection pressure and evolutionary time-scale analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**: e2245. doi: 10.1371/journal.pntd.0002245

6. Ayukekbong, J.A., Fobisong, C., Tah, F., Lindh, M., Nkuo-Akenji, T. and Bergström, T. 2014. Pattern of circulation of norovirus GII strains during natural infection. *J Clin Microbiol.* **52**: 4253-4259. doi: 10.1128/JCM.01896-14.
7. Bidalot, M., Théry, L., Kaplon, J., De Rougemont, A. and Ambert-Balay, K. 2017. Emergence of new recombinant noroviruses GII.p16-GII.4 and GII.p16-GII.2, France, winter 2016 to 2017. *Euro Surveill.* **22**: pii: 30508. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.15.30508.
8. Blazevic, V., Malm, M., Honkanen, H., Knip, M., Hyöty, H. and Vesikari, T. 2016. Development and maturation of norovirus antibodies in childhood. *Microbes Infect.* **18**: 263-269. doi: 10.1016/j.micinf.2015.12.004. Epub 2015 Dec 25.
9. Bok, K., Abente, E.J., Realpe-Quintero, M., Mitra, T., Sosnovtsev, S.V., Kapikian, A.Z. and Green, K.Y. 2009. Evolutionary dynamics of GII.4 noroviruses over a 34-year period. *J. Virol.* **83**: 11890-11901. doi: 10.1128/JVI.00864-09
10. Boon, D., Mahar, J.E., Abente, E.J., Kirkwood, C.D., Purcell, R.H., Kapikian, A.Z., Green, K.Y. and Bok, K. 2011. Comparative evolution of GII.3 and GII.4 norovirus over a 31-year period. *J. Virol.* **85**: 8656-8666. doi: 10.1128/JVI.00472-11
11. Borley, D.W., Mahapatra, M., Paton, D.J., Esnouf, R.M., Stuart, D.I. and Fry, E.E. 2013. Evaluation and use of in-silico structure-based epitope prediction with foot-and-mouth disease

- virus. *PLoS One*. **8**: e61122. doi: 10.1371/journal.pone.0061122
12. Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C.H., Xie, D., Suchard, M.A., Rambaut, A. and Drummond, A.J. 2014. BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Comput. Biol.* **10**: e1003537. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003537.
 13. Bucardo, F., Reyes, Y., Becker-Dreps, S., Bowman, N., Gruber, J.F., Vinjé, J., Espinoza, F., Paniagua, M., Balmaseda, A., Svensson, L. and Nordgren, J. 2017. Pediatric norovirus GII.4 infections in Nicaragua, 1999-2015. *Infect Genet Evol.* **55**: 305-312. doi: 10.1016/j.meegid.2017.10.001.
 14. Bull, R.A., Eden, J.S., Rawlinson, W.D. and White, P.A. 2010. Rapid evolution of pandemic noroviruses of the GII.4 lineage. *PLoS Pathog.* **6**: e1000831. doi: 10.1371/journal.ppat.1000831.
 15. Bull, R.A., Tu, E.T., McIver, C.J., Rawlinson, W.D. and White, P.A. 2006. Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 327-333. doi: 10.1128/JCM.44.2.327-333.2006
 16. Choudhuri, S. 2014. “*Bioinformatics for Beginners: Genes, Genomes, Molecular Evolution, Databases and Analytical Tools*”. Amsterdam: Elsevier/Academic Press
 17. Cortes-Penfield, N.W., Ramani, S., Estes, M.K. and Atmar, R.L. 2017. Prospects and Challenges in the Development of a Norovirus Vaccine. *Clin Ther.* **39**: 1537-1549. doi: 10.1016/j.clinthera.2017.07.002

18. Dai, Y.C., Xia, M., Huang, Q., Tan, M., Qin, L., Zhuang, Y.L., Long, Y., Li, J.D., Jiang, X. and Zhang, X.F. 2017. Characterization of antigenic relatedness between GII.4 and GII.17 noroviruses using serum samples from norovirus-infected patients. *J Clin Microbiol.* **55**: 3366-3373. doi: 10.1128/JCM.00865-17.
19. Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R. and Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* **9**:772. doi: 10.1038/nmeth.2109
20. Dayrat, B. 2003. The Roots of Phylogeny: How Did Haeckel Build His Trees? *Syst. Biol.* **52**: 515-527. doi:<https://doi.org/10.1080/10635150390218277>
21. Debbink, K., Donaldson, E.F., Lindesmith, L.C. and Baric, R.S. 2012b. Genetic mapping of a highly variable norovirus GII.4 blockade epitope: potential role in escape from human herd immunity. *J. Virol.* **86**: 1214-1226. doi: 10.1128/JVI.06189-11
22. Debbink, K., Lindesmith, L.C. and Baric, R.S. 2014. The state of norovirus vaccines. *Clin Infect Dis.* **58**: 1746-1752. doi: 10.1093/cid/ciu120. Epub 2014 Feb 27.
23. Debbink, K., Lindesmith, L.C., Donaldson, E.F. and Baric, R.S. 2012a. Norovirus immunity and the great escape. *PLoS Pathog.* **8**: e1002921. doi: 10.1371/journal.ppat.1002921
24. Debbink, K., Lindesmith, L.C., Donaldson, E.F., Costantini, V., Beltramello, M., Corti, D., Swanstrom, J., Lanzavecchia, A., Vinjé, J. and Baric, R.S. 2013. Emergence of new pandemic

- GII.4 Sydney norovirus strain correlates with escape from herd immunity. *J Infect Dis.* **208**: 1877-1887. doi: 10.1093/infdis/jit370
25. de Graaf, M., van Beek, J. and Koopmans, M.P. 2016. Human norovirus transmission and evolution in a changing world. *Nat Rev Microbiol.* **14**: 421-33. doi: 10.1038/nrmicro.2016.48.
26. de Graaf, M., van Beek, J., Vennema, H., Podkolzin, A.T., Hewitt, J., Bucardo, F., Templeton, K., Mans, J., Nordgren, J., Reuter, G., Lynch, M., Rasmussen, L.D., Iritani, N., Chan, M.C., Martella, V., Ambert-Balay, K., Vinjé, J., White, P.A. and Koopmans, M.P. 2015. Emergence of a novel GII.17 norovirus – End of the GII.4 era? *Euro Surveill.* **20**: pii: 21178.
27. Delport, W., Poon, A.F., Frost, S.D. and Kosakovsky Pond, S.L. 2010. Datamonkey 2010: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. *Bioinformatics.* **26**: 2455-2457. doi: 10.1093/bioinformatics/btq429
28. de Rougemont, A., Ruvoen-Clouet, N., Simon, B., Estienney, M., Elie-Caille, C., Aho, S., Pothier, P., Le Pendu, J., Boireau, W. and Belliot, G. 2011. Qualitative and quantitative analysis of the binding of GII.4 norovirus variants onto human blood group antigens. *J. Virol.* **85**: 4057-4070. doi: 10.1128/JVI.02077-10
29. Desai, R., Hembree, C.D., Handel, A., Matthews, J.E., Dickey, B.W., McDonald, S., Hall, A.J., Parashar, U.D., Leon, J.S. and Lopman, B. 2012. Severe outcomes are associated with

- genogroup 2 genotype 4 norovirus outbreaks: a systematic literature review. *Clin Infect Dis.* **55**: 189-193. doi: 10.1093/cid/cis372.
30. Doerflinger, S.Y., Weichert, S., Koromyslova, A., Chan, M., Schwerk, C., Adam, R., Jennewein, S., Hansman, G.S. and Schrotten, H. 2017. Human norovirus evolution in a chronically infected host. *mSphere.* **2**: e00352-16. doi: 10.1128/mSphere.00352-16
31. Dovrolis, N., Kolios, G., Spyrou, G.M. and Maroulakou, I. 2017. Computational profiling of the gut-brain axis: microflora dysbiosis insights to neurological disorders. *Brief Bioinform.* **bbx154**. doi: 10.1093/bib/bbx154
32. Drummond, A.J. and Rambaut, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* **7**: 214. doi: 10.1186/1471-2148-7-214
33. Drummond, A.J., Rambaut, A., Shapiro, B. and Pybus, O.G. 2005. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol Biol Evol.* **22**: 1185-1192.
34. Drummond A. J. and Bouckaert R. R. 2015. “*Bayesian evolutionary analysis with BEAST*”, Cambridge University Press.
35. Eden, J.S., Hewitt, J., Lim, K.L., Boni, M.F., Merif, J., Greening, G., Ratcliff, R.M., Holmes, E.C., Tanaka, M.M., Rawlinson, W.D. and White, P.A. 2014. The emergence and

- evolution of the novel epidemic norovirus GII.4 variant Sydney 2012. *Virology*. **450-451**: 106-113. doi: 10.1016/j.virol.2013.12.005. Epub 2013 Dec 25.
36. Eden, J.S., Tanaka, M.M., Boni, M.F., Rawlinson, W.D. and White, P.A. 2013. Recombination within the pandemic norovirus GII.4 lineage. *J. Virol.* **87**: 6270-6282. doi: 10.1128/JVI.03464-12
37. Fankhauser, R.L., Monroe, S.S., Noel, J.S., Humphrey, C.D., Bresee, J.S., Parashar, U.D., Ando, T. and Glass, R.I. 2002. Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis.* **186**: 1-7. Epub 2002 Jun 10.
38. Fioretti, J.M., Bello, G., Rocha, M.S., Victoria, M., Leite, J.P. and Miagostovich, M.P. 2014. Temporal dynamics of norovirus GII.4 variants in Brazil between 2004 and 2012. *PLoS One.* **9**: e92988. doi: 10.1371/journal.pone.0092988
39. Fourment, M. and Gibbs, M.J. 2006. PATRISTIC: a program for calculating patristic distances and graphically comparing the components of genetic change. *BMC Evol. Biol.* **6**: 1. doi: 10.1186/1471-2148-6-1
40. Gao, Z., Liu, B., Huo, D., Yan, H., Jia, L., Du, Y., Qian, H., Yang, Y., Wang, X., Li, J. and Wang, Q. 2015. Increased norovirus activity was associated with a novel norovirus GII.17 variant in Beijing, China during winter 2014-2015. *BMC Infect Dis.* **15**: 574. doi: 10.1186/s12879-015-1315-z.

41. Garaicoechea, L., Aguilar, A., Parra, G.I., Bok, M., Sosnovtsev, S.V., Canziani, G., Green, K.Y., Bok, K. and Parreño, V. 2015. Llama Nanoantibodies with Therapeutic Potential against Human Norovirus Diarrhea. *PLoS One*. **10**: e0133665. doi: 10.1371/journal.pone.0133665
42. Giammanco, G.M., De Grazia, S., Terio, V., Lanave, G., Catella, C., Bonura, F., Saporito, L., Medici, M.C., Tummolo, F, Calderaro, A., Bányai, K., Hansman, G. and Martella, V. 2014. Analysis of early strains of the norovirus pandemic variant GII.4 Sydney 2012 identifies mutations in adaptive sites of the capsid protein. *Virology*. **450-451**: 355-358. doi: 10.1016/j.virol.2013.12.007.
43. Glass, R.I., Parashar, U.D. and Estes, M.K. 2009. Norovirus gastroenteritis. *N Engl J Med*. **29**: 1776–1785. doi: 10.1056/NEJMra0804575.
44. Green, K.Y. “Caliciviridae: The Noroviruses”. 2013. in *Fields Virology sixth edition*: eds. Knipe, D.M., and Howley, P.M., Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins Press. Vol. 1, **Ch.20**, 582-608
45. Guex, N. and Peitsch, M.C. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*. **18**: 2714-2723. doi: 10.1002/elps.1150181505
46. Guindon, S. and Gascuel, O. 2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood.

Syst. Biol. **52**: 696-704.

47. Hall, A.J., Lopman, B.A., Payne, D.C., Patel, M.M., Gastañaduy, P.A., Vinjé, J. and Parashar, U.D. 2013. Norovirus disease in the United States. *Emerg Infect Dis.* **19**: 1198-1205. doi: 10.3201/eid1908.130465.
48. Hall, M.D., Woolhouse, M.E. and Rambaut, A. 2016. The effects of sampling strategy on the quality of reconstruction of viral population dynamics using Bayesian skyline family coalescent methods: A simulation study. *Virus Evol.* **2**: vew003.
49. Hardy, M.E. 2005. Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol Lett.* **253**: 1-8.
50. Hoa-Tran, T.N., Trainor, E., Nakagomi, T., Cunliffe, N.A. and Nakagomi, O. 2013. Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants. *J. Clin. Virol.* **56**: 185-193. doi: 10.1016/j.jcv.2012.11.011.
51. Huhti, L., Szakal, E.D., Puustinen, L., Salminen, M., Huhtala, H., Valve, O., Blazevic, V. and Vesikari, T. 2011. Norovirus GII-4 causes a more severe gastroenteritis than other noroviruses in young children. *J Infect Dis.* **203**: 1442-1444. doi: 10.1093/infdis/jir039. Epub 2011 Mar 16.
52. Inns, T., Harris, J., Vivancos, R., Iturriza-Gomara, M. and O'Brien, S. 2017. Community-based surveillance of norovirus disease: a systematic review. *BMC Infect Dis.* **17**: 657. doi:

10.1186/s12879-017-2758-1.

53. Johnston, C.P., Qiu, H., Ticehurst, J.R., Dickson, C., Rosenbaum, P., Lawson, P., Stokes, A.B., Lowenstein, C.J., Kaminsky, M., Cosgrove, S.E., Green, K.Y. and Perl, T.M. 2007. Outbreak management and implications of a nosocomial norovirus outbreak. *Clin Infect Dis.* **45**: 534-540.
54. Kanda, Y. 2013. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.* **48**: 452-458. doi: 10.1038/bmt.2012.244.
55. Kapikian, A.Z., Wyatt, R.G., Dolin, R., Thornhill, T.S., Kalica, A.R. and Chanock, R.M. 1972. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol.* **10**: 1075-1081.
56. Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. and Miyata, T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* **30**: 3059-3066.
57. Katoh, K. and Standley, D.M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol.* **30**: 772-780. doi: 10.1093/molbev/mst010
58. Kim, Y., Galasiti Kankanamalage, A.C., Chang, K.O., and Groutas, W.C. 2015. Recent Advances in the Discovery of Norovirus Therapeutics. *J Med Chem.* **58**: 9438-9450. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00762.
59. Kimura, H., Saitoh, M., Kobayashi, M., Ishii, H., Saraya, T.,

- Kurai, D., Tsukagoshi, H., Shirabe, K., Nishina, A., Kozawa, K., Kuroda, M., Takeuchi, F., Sekizuka, T., Minakami, H., Ryo, A. and Takeda, M. 2015. Molecular evolution of haemagglutinin (H) gene in measles virus. *Sci Rep.* **5**: 11648. doi: 10.1038/srep11648.
60. Kobayashi, M., Matsushima, Y., Motoya, T., Sakon, N., Shigemoto, N., Okamoto-Nakagawa, R., Nishimura, K., Yamashita, Y., Kuroda, M., Saruki, N., Ryo, A., Saraya, T., Morita, Y., Shirabe, K., Ishikawa, M., Takahashi, T., Shinomiya, H., Okabe, N., Nagasawa, K., Suzuki, Y., Katayama, K. and Kimura, H. 2016. Molecular evolution of the capsid gene in human norovirus genogroupII. *Sci Rep.* **6**: 29400. doi: 10.1038/srep29400.
61. Kobayashi, M., Yoshizumi, S., Kogawa, S., Takahashi, T., Ueki, Y., Shinohara, M., Mizukoshi, F., Tsukagoshi, H., Sasaki, Y., Suzuki, R., Shimizu, H., Iwakiri, A., Okabe, N., Shirabe, K., Shinomiya, H., Kozawa, K., Kusunoki, H., Ryo, A., Kuroda, M., Katayama, K. and Kimura, H. 2015. Molecular Evolution of the Capsid Gene in Norovirus Genogroup I. *Sci Rep.* **5**: 13806. doi: 10.1038/srep13806.
62. Kolawole, A.O., Smith, H.Q., Svoboda, S.A., Lewis, M.S., Sherman, M.B., Lynch, G.C., Pettitt, B.M., Smith, T.J. and Wobus, C.E. 2017. Norovirus Escape from Broadly Neutralizing Antibodies Is Limited to Allosteric-Like Mechanisms. *mSphere.***2**: pii: e00334-17. doi: 10.1128/mSphere.00334-17.

63. 厚生労働省. ノロウイルスの関するQ&A. (作成:平成16年2月4日 最終改定:平成28年11月18日), available at:http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryoku/shokuhin/syokuchu/kanren/yobou/040204-1.html
64. 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長. 2013. “「ノロウイルスの検出法について」の一部改正について”.食安監発1022 第1号
65. Kringelum, J.V., Lundegaard, C., Lund, O. and Nielsen, M. 2012. Reliable B cell epitope predictions: Impacts of method development and improved benchmarking. *PLoS Comput. Biol.* **8**: e1002829. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002829
66. Kroneman, A., Vega, E., Vennema, H., Vinjé, J., White, P.A., Hansman, G., Green, K., Martella, V., Katayama, K. and Koopmans, M. 2013. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch Virol.* **158**: 2059-2068. doi: 10.1007/s00705-013-1708-5. Epub 2013 Apr 25.
67. Kroneman, A., Vennema, H., Deforche, K., v d Avoort, H., Peñaranda, S., Oberste, M.S., Vinjé, J. and Koopmans, M. 2011. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *J. Clin. Virol.* **51**: 121-125. doi: 10.1016/j.jcv.2011.03.006.
68. Kroneman, A., Verhoef, L., Harris, J., Vennema, H., Duizer, E., van Duynhoven, Y., Gray, J., Iturriza, M., Böttiger, B., Falkenhorst, G., Johnsen, C., von Bonsdorff, C.H., Maunula,

L., Kuusi, M., Pothier, P., Gallay, A., Schreier, E., Höhne, M., Koch, J., Szücs, G., Reuter, G., Krisztalovics, K., Lynch, M., McKeown, P., Foley, B., Coughlan, S., Ruggeri, F.M., Di Bartolo, I., Vainio, K., Isakbaeva, E., Poljsak-Prijatelj, M., Grom, A.H., Mijovski, J.Z., Bosch, A., Buesa, J., Fauquier, A.S., Hernández-Pezzi, G., Hedlund, K.O. and Koopmans, M. 2008. Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks collected within the Foodborne Viruses in Europe network from 1 July 2001 to 30 June 2006. *J Clin Microbiol.* **46**: 2959-2965. doi: 10.1128/JCM.00499-08. Epub 2008 Jul 23.

69. Kryazhimskiy, S. and Plotkin, J.B. 2008. The population genetics of dN/dS. *PLoS Genet.* **4**: e1000304. doi: 10.1371/journal.pgen.1000304.
70. Kumazaki, M. and Usuku, S. 2015. Genetic analysis of norovirus GII.4 variant strains detected in outbreaks of gastroenteritis in Yokohama, Japan, from the 2006-2007 to the 2013-2014 Seasons. *PLoS One.* **10**: e0142568. doi: 10.1371/journal.pone.0142568.
71. Kutschera, U. 2011. From the scala naturae to the symbiogenetic and dynamic tree of life. *Biol Direct.* **6**: 33. doi: 10.1186/1745-6150-6-33.
72. Kwok, K., Niendorf, S., Lee, N., Hung, T. N., Chan, L. Y., Jacobsen, S., Nelson, E. A. S., Leung, T. F., Lai, R. W. M., Chan, P. K. S. and Chan, M. C. W. 2017. Increased Detection of

- Emergent Recombinant Norovirus GII.P16-GII.2 Strains in Young Adults, Hong Kong, China, 2016-2017. *Emerg Infect Dis.* **23**: 1852-1855. doi: 10.3201/eid2311.170561.
73. Lam, T.T., Zhu, H., Smith, D.K., Guan, Y., Holmes, E.C. and Pybus, O.G. 2012. The recombinant origin of emerging human norovirus GII.4/2008: intra-genotypic exchange of the capsid P2 domain. *J. Gen. Virol.* **93**: 817-822. doi: 10.1099/vir.0.039057-0.
74. Lee, J.H., Chung, M.S. and Kim, K.H. 2017. Structure and Function of Caliciviral RNA Polymerases. *Viruses.* **9**: pii: E329. doi: 10.3390/v9110329.
75. Liang, S., Liu, S., Zhang, C. and Zhou, Y. 2007. A simple reference state makes a significant improvement in near-native selections from structurally refined docking decoys. *Proteins.* **69**: 244-253. doi: 10.1002/prot.21498
76. Liang, S., Zheng, D., Standley, D.M., Yao, B., Zacharias, M. and Zhang, C. 2010. EPSVR and EPMeta: prediction of antigenic epitopes using support vector regression and multiple server results. *BMC Bioinformatics.* **11**: 381. doi: 10.1186/1471-2105-11-381.
77. Lindesmith, L.C., Beltramello, M., Donaldson, E.F., Corti, D., Swanstrom, J., Debbink, K., Lanzavecchia, A. and Baric, R.S. 2012a. Immunogenetic mechanisms driving norovirus GII.4 antigenic variation. *PLoS Pathog.* **8**: e1002705. doi: 10.1371/journal.ppat.1002705.

78. Lindesmith, L.C., Debbink, K., Swanstrom, J., Vinjé, J., Costantini, V., Baric, R.S. and Donaldson, E.F. 2012b. Monoclonal antibody-based antigenic mapping of norovirus GII.4-2002. *J. Virol.* **86**: 873-883. doi: 10.1128/JVI.06200-11.
79. Lindesmith, L.C., Donaldson, E.F., Beltramello, M., Pintus, S., Corti, D., Swanstrom, J., Debbink, K., Jones, T.A., Lanzavecchia, A. and Baric, R.S. 2014. Particle Conformation Regulates Antibody Access to a Conserved GII.4 Norovirus Blockade Epitope. *J Virol.* **88**: 8826-8842. doi: 10.1128/JVI.01192-14.
80. Lindesmith, L.C., Donaldson, E.F., Lobue, A.D., Cannon, J.L., Zheng, D.P., Vinje, J. and Baric, R.S. 2008. Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med.* **5**: e31. doi: 10.1371/journal.pmed.0050031.
81. Lindesmith, L. C., Ferris, M. T., Mullan, C. W., Ferreira, J., Debbink, K., Swanstrom, J., Richardson, C., Goodwin, R. R., Baehner, F., Mendelman, P. M., Bargatze, R. F. and Baric, R. S. 2015. Broad blockade antibody responses in human volunteers after immunization with a multivalent norovirus VLP candidate vaccine: immunological analyses from a phase I clinical trial. *PLoS Med.* **12**: e1001807. doi: 10.1371/journal.pmed.1001807.
82. Lole, K.S., Bollinger, R.C., Paranjape, R.S., Gadkari, D., Kulkarni, S.S., Novak, N.G., Ingersoll, R., Sheppard, H.W. and Ray, S.C. 1999. Full-length human immunodeficiency virus

- type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J. Virol.* **73**: 152-160.
83. Lopman, B.A., Steele, D., Kirkwood, C.D. and Parashar, U.D. 2016. The Vast and Varied Global Burden of Norovirus: Prospects for Prevention and Control. *PLoS Med.* **13**: e1001999. doi: 10.1371/journal.pmed.1001999.
84. Lovell, S.C., Davis, I.W., Arendall, W.B. 3rd., de Bakker, P.I., Word, J.M., Prisant, M.G., Richardson, J.S. and Richardson, D.C. 2003. Structure validation by Calpha geometry: phi, psi and Cbeta deviation. *Proteins.* **50**: 437-450. doi: 10.1002/prot.10286
85. Lu, J., Fang, L., Zheng, H., Lao, J., Yang, F., Sun, L., Xiao, J., Lin, J., Song, T., Ni, T., Raghwani, J., Ke, C., Faria, N.R., Bowden, T.A., Pybus, O.G. and Li, H. 2016. The Evolution and Transmission of Epidemic GII.17 Noroviruses. *J Infect Dis.* **214**: 556-564. doi: 10.1093/infdis/jiw208
86. Luo, L.F., Qiao, K., Wang, X.G., Ding, K.Y., Su, H.L., Li, C.Z. and Yan, H.J. 2015. Acute gastroenteritis outbreak caused by a GII.6 norovirus. *World J Gastroenterol.* **21**: 5295-5302. doi: 10.3748/wjg.v21.i17.5295.
87. Martin, D.P., Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A. and Muhire, B. 2015. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evol.* **1**: vev003. doi: 10.1093/ve/vev003

88. Mathijs, E., Denayer, S., Palmeira, L., Botteldoorn, N., Scipioni, A., Vanderplasschen, A., Thiry, E. and Dierick, K. 2011. Novel norovirus recombinants and of GII.4 sub-lineages associated with outbreaks between 2006 and 2010 in Belgium. *Virologica J.* **8**: 310. doi: 10.1186/1743-422X-8-310.
89. Matsushima, Y., Ishikawa, M., Shimizu, T., Komane, A., Kasuo, S., Shinohara, M., Nagasawa, K., Kimura, H., Ryo, A., Okabe, N., Haga, K., Doan, Y. H., Katayama, K. and Shimizu, H. 2015. Genetic analyses of GII.17 norovirus strains in diarrheal disease outbreaks from December 2014 to March 2015 in Japan reveal a novel polymerase sequence and amino acid substitutions in the capsid region. *Euro Surveill.* **20**: pii: 21173.
90. Matsushima, Y., Shimizu, T., Ishikawa, M., Komane, A., Okabe, N., Ryo, A., Kimura, H., Katayama, K. and Shimizu, H. 2016. Complete Genome Sequence of a Recombinant GII.P16-GII.4 Norovirus Detected in Kawasaki City, Japan, in 2016. *Genome Announc.* **4**: pii: e01099-01116. doi: 10.1128/genomeA.01099-16.
91. Matthews, J. E., Dickey, B. W., Miller, R. D., Felzer, J. R., Dawson, B. P., Lee, A. S., Rocks, J. J., Kiel, J., Montes, J. S., Moe, C. L., Eisenberg, J. N. S. and Leon, J. S. 2012. The epidemiology of published norovirus outbreaks: a systematic review of risk factors associated with attack rate and genogroup. *Epidemiol Infect.* **140**: 1161–1172. doi:

10.1017/S0950268812000234

92. Mizukoshi, F., Nagasawa, K., Doan, Y.H., Haga, K., Yoshizumi, S., Ueki, Y., Shinohara, M., Ishikawa, M., Sakon, N., Shigemoto, N., Okamoto-Nakagawa, R., Ochi, A., Murakami, K., Ryo, A., Suzuki, Y., Katayama, K. and Kimura, H. 2017. Molecular evolution of the RNA-dependent RNA polymerase and capsid genes of human norovirus genotype GII.2 in Japan during 2004-2015. *Front. Microbiol.* **8**: 705. doi: 10.3389/fmicb.2017.00705
93. Mora, C., Tittensor, D.P., Adl, S., Simpson, A.G. and Worm, B. 2011. How many species are there on Earth and in the ocean? *PLoS Biol.* **9**: e1001127. doi: 10.1371/journal.pbio.1001127. Epub 2011 Aug 23.
94. Motomura, K., Oka, T., Yokoyama, M., Nakamura, H., Mori, H., Ode, H., Hansman, G.S., Katayama, K., Kanda, T., Tanaka, T., Takeda, N. and Sato, H. 2008. Identification of monomorphic and divergent haplotypes in the 2006-2007 norovirus GII/4 epidemic population by genomewide tracing of evolutionary history. *J. Virol.* **82**: 11247-11262. doi: 10.1128/JVI.00897-08
95. Muniraju, M., Munir, M., Parthiban, A.R., Banyard, A.C., Bao, J., Wang, Z., Ayebazibwe, C., Ayelet, G., El Harrak, M., Mahapatra, M., Libeau, G., Batten, C. and Parida, S. Molecular evolution of peste des petits ruminants virus. 2014. *Emerg Infect Dis.* **20**: 2023-33. doi: 10.3201/eid2012.140684.

96. Nagasawa, K., Matsushima, Y., Motoya, T., Mizukoshi, F., Ueki, Y., Sakon, N., Murakami, K., Shimizu, T., Okabe, N., Nagata, N., Shirabe, K., Shinomiya, H., Suzuki, W., Kuroda, M., Sekizuka, T., Ryo, A., Fujita, K., Oishi, K., Katayama, K. and Kimura, H. 2018. Phylogeny and Immunoreactivity of Norovirus GII.P16-GII.2, Japan, Winter 2016–17. *Emerging Infectious Diseases*. **24**: 144-149. DOI: 10.3201/eid2401.170284
97. National Institute of Infectious Diseases. Japan. Infectious gastroenteritis, 2017 [in Japanese] [cited 2017 December 30] <http://www.nih.go.jp/niid/ja/10/2096-weeklygraph/1647-04gastro.html>
98. Niendorf, S., Jacobsen, S., Faber, M., Eis-Hübinger, A.M., Hofmann, J., Zimmermann, O., Höhne, M. and Bock, C.T. 2016. Steep rise in norovirus cases and emergence of a new recombinant strain GII.P16-GII.2, Germany, winter 2016. *Euro Surveill*. **22**: 30447. doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.4.30447
99. Parra, G.I., Abente, E.J., Sandoval-Jaime, C., Sosnovtsev, S.V., Bok, K. and Green, K.Y. 2012. Multiple antigenic sites are involved in blocking the interaction of GII.4 norovirus capsid with ABH histo-blood group antigens. *J Virol*. **86**: 7414-7426. doi: 10.1128/JVI.06729-11.
100. Parra, G.I. and Green, K.Y. 2014. Sequential Gastroenteritis Episodes Caused by 2 Norovirus Genotypes. *Emerg Infect Dis*.

- 20: 1016–1018. doi: 10.3201/eid2006.131627
101. Parra, G.I., Squires, R.B., Karangwa, C.K., Johnson, J.A., Lepore, C.J., Sosnovtsev, S.V. and Green, K.Y. 2017. Static and evolving norovirus genotypes: Implications for epidemiology and immunity. *PLoS Pathog.* **13**: e1006136. doi: 10.1371/journal.ppat.1006136.
102. Patel, M.M., Hall, A.J., Vinjé, J. and Parashar, U.D. 2009. Noroviruses: a comprehensive review. *J Clin Virol.* **44**: 1-8. doi: 10.1016/j.jcv.2008.10.009.
103. Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C. and Ferrin, T.E. 2004. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**: 1605-1612. doi: 10.1002/jcc.20084
104. Phillips, G., Tam, C.C., Conti, S., Rodrigues, L.C., Brown, D., Iturriza-Gomara, M., Gray, J. and Lopman, B. 2010. Community incidence of norovirus-associated infectious intestinal disease in England: improved estimates using viral load for norovirus diagnosis. *Am J Epidemiol.* **171**: 1014-1022. doi: 10.1093/aje/kwq021.
105. Pond, S.L. and Frost, S.D. 2005. Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. *Bioinformatics.* **21**: 2531-2533. doi: 10.1093/bioinformatics/bti320
106. Potocnakova, L., Bhide, M. and Pulzova, L.B. 2016. An

- Introduction to B-Cell Epitope Mapping and In Silico Epitope Prediction. *J Immunol Res.* **2016**: 6760830. doi: 10.1155/2016/6760830.
107. Prasad, B.V., Hardy, M. E., Dokland, T., Bella, J., Rossmann, M. G. and Estes, M. K. 1999. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science.* **286**: 287–290.
108. Puustinen, L., Blazevic, V., Huhti, L., Szakal, E.D., Halkosalo, A., Salminen, M. and Vesikari, T. 2012. Norovirus genotypes in endemic acute gastroenteritis of infants and children in Finland between 1994 and 2007. *Epidemiol Infect.* **140**: 268-275. doi: 10.1017/S0950268811000549.
109. Qiao, N., Wang, X.Y. and Liu, L. 2016. Temporal evolutionary dynamics of norovirus GII.4 variants in China between 2004 and 2015. *PLoS One.* **11**: e0163166. doi: 10.1371/journal.pone.0163166.
110. Ramani, S., Atmar, R.L. and Estes, M.K. 2014. Epidemiology of human noroviruses and updates on vaccine development. *Curr Opin Gastroenterol.* **30**: 25-33. doi: 10.1097/MOG.0000000000000022.
111. Rambaut, A., Suchard, M. and Drummond, A. 2013. *Tracer*. Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer>.
112. Robilotti, E., Deresinski, S. and Pinsky, B.A. 2015. Norovirus. *Clin. Microbiol. Rev.* **28**: 134-164. doi: 10.1128/CMR.00075-14.
113. Ruis, C., Roy, S., Brown, J.R., Allen, D.J., Goldstein, R.A. and

- Breuer, J. 2017. The emerging GII.P16-GII.4 Sydney 2012 norovirus lineage is circulating worldwide, arose by late-2014 and contains polymerase changes that may increase virus transmission. *PLoS One*. **12**: e0179572. doi: 10.1371/journal.pone.0179572.
114. Saito, M., Goel-Apaza, S., Espetia, S., Velasquez, D., Cabrera, L., Loli, S., Crabtree, J.E., Black, R.E., Kosek, M., Checkley, W., Zimic, M., Bern, C., Cama, V., Gilman, R.H. and Norovirus Working Group in Peru. 2014. Multiple norovirus infections in a birth cohort in a Peruvian Periurban community. *Clin Infect Dis*. **58**: 483-491. doi: 10.1093/cid/cit763. Epub 2013 Dec 2.
115. 齊藤成也. 2007. “ゲノム進化学入門”. 共立出版
116. Sakon, N., Yamazaki, K., Nakata, K., Kanbayashi, D., Yoda, T., Mantani, M., Kase, T., Takahashi, K. and Komano, J. 2016. Impact of genotype-specific herd immunity on the circulatory dynamism of norovirus: a 10-year longitudinal study of viral acute gastroenteritis. *J Infect Dis*. **211**: 879–888.
117. Sato, H., Yokoyama, M., Nakamura, H., Oka, T., Katayama, K., Takeda, N., Noda, M., Tanaka, T. and Motomura, K. 2017. Evolutionary constraints on the norovirus pandemic variant GII.4_2006b over the five-year persistence in Japan. *Front. Microbiol*. **8**: 410. doi: 10.3389/fmicb.2017.00410.
118. Sharma, S., Carlsson, B., Czako, R., Vene, S., Haglund, M., Ludvigsson, J., Larson, G., Hammarström, L., Sosnovtsev, S.V., Atmar, R.L., Green, K.Y., Estes, M.K. and Svensson, L.

2017. Human Sera Collected between 1979 and 2010 Possess Blocking-Antibody Titers to Pandemic GII.4 Noroviruses Isolated over Three Decades. *J Virol.* **91**: pii: e00567-17. doi: 10.1128/JVI.00567-17.
119. Siebenga, J.J., Lemey, P., Kosakovsky, P., Rambaut, A., Vennema, H. and Koopmans, M. 2010. Phylodynamic reconstruction reveals norovirus GII.4 epidemic expansions and their molecular determinants. *PLoS Pathog.* **6**; e1000884. doi: 10.1371/journal.ppat.1000884.
120. Siebenga, J.J., Vennema, H., Zheng, D.P., Vinjé, J., Lee, B.E., Pang, X.L., Ho, E.C., Lim, W., Choudekar, A., Broor, S., Halperin, T., Rasool, N.B., Hewitt, J., Greening, G.E., Jin, M., Duan, Z.J., Lucero, Y., O'Ryan, M., Hoehne, M., Schreier, E., Ratcliff, R.M., White, P.A., Iritani, N., Reuter, G. and Koopmans, M. 2009. Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007. *J. Infect. Dis.* **200**: 802-812. doi: 10.1086/605127
121. Simmons, K., Gambhir, M., Leon, J. and Lopman, B. 2013. Duration of immunity to norovirus gastroenteritis. *Emerging Infect Dis.* **19**: 1260-1267
122. Singh, Y. 2017. Machine Learning to Improve the Effectiveness of ANRS in Predicting HIV Drug Resistance. *Healthc Inform Res.* **23**: 271-276. doi: 10.4258/hir.2017.23.4.271.
123. Siqueira, JAM., Bandeira, RDS., Oliveira, DS., Dos Santos, LFP. and Gabbay, YB. 2017. Genotype diversity and molecular

- evolution of noroviruses: A 30-year (1982-2011) comprehensive study with children from Northern Brazil. *PLoS One*. **12**: e0178909. doi: 10.1371/journal.pone.0178909.
124. Standley, D.M., Toh, H. and Nakamura, H. 2007. ASH structure alignment package: sensitivity and selectivity in domain classification. *BMC Bioinformatics*. **8**: 116. doi: 10.1186/1471-2105-8-116
125. Subba-Reddy, C.V., Goodfellow, I. and Kao, C.C. 2011. VPg-primed RNA synthesis of norovirus RNA-dependent RNA polymerases by using a novel cell-based assay. *J Virol*. **85**: 13027-13037. doi: 10.1128/JVI.06191-11.
126. Suchard, M.A., Weiss, R.E. and Sinsheimer, J.S. 2001. Bayesian selection of continuous-time Markov chain evolutionary models. *Mol. Biol. Evol.* **18**: 1001-1013. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a003872
127. Sun, J., Wu., D, Zhong. H., Guan, D., Zhang, H., Tan, Q., Zhou, H., Zhang, M., Ning, D., Zhang, B., Ke, C., Song, T., Lin, J., Zhang, Y., Koopmans, M. and Gao, G.F. 2017. Returning ex-patriot Chinese to Guangdong, China, increase the risk for local transmission of Zika virus. *J Infect*. **S0163-4453**: 30231-1. doi: 10.1016/j.jinf.2017.07.001.
128. Suzuki, Y. 2004. Negative selection on neutralization epitopes of poliovirus surface proteins: implications for prediction of candidate epitopes for immunization. *Gene*. **328**: 127-133. doi: 10.1016/j.gene.2003.11.020

129. Suzuki, Y., Doan, Y.H., Kimura, H., Shinomiya, H., Shirabe, K. and Katayama, K. 2016. Predicting genotype compositions in norovirus seasons in Japan. *Microbiol Immunol.* **60**: 418-26. doi: 10.1111/1348-0421.12384.
130. Sweredoski, M.J. and Baldi, P. 2008. PEPITO: improved discontinuous B-cell epitope prediction using multiple distance thresholds and half sphere exposure. *Bioinformatics.* **24**: 1459-1460. doi: 10.1093/bioinformatics/btn199.
131. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* **30**: 2725-2729. doi: 10.1093/molbev/mst197. Epub 2013 Oct 16.
132. Tan, M. and Jiang, X. 2014. Vaccine against norovirus. *Hum Vaccin Immunother.* **10**:1449-1456. doi: 10.4161/hv.28626. Epub 2014 May 5.
133. Tanabe, A.S. 2011. Kakusan4 and Aminosan: two programs for comparing nonpartitioned, proportional and separate models for combined molecular phylogenetic analyses of multilocus sequence data. *Mol. Ecol. Resour.* **11**: 914-921. doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.03021.x. Epub 2011 May 19.
134. Thongprachum, A., Khamrin, P., Maneekarn, N., Hayakawa, S. and Ushijima, H. 2016. Epidemiology of gastroenteritis viruses in Japan: Prevalence, seasonality, and outbreak. *J. Med. Virol.* **88**: 551-570. doi: 10.1002/jmv.24387.

135. Tohma, K., Lepore, C.J., Ford-Siltz, L.A. and Parra, G.I. 2017. Phylogenetic Analyses Suggest that Factors Other Than the Capsid Protein Play a Role in the Epidemic Potential of GII.2 Norovirus. *mSphere*. **2**: e00187-17. doi: 10.1128/mSphereDirect.00187-17.
136. Trainor, E., Lopman, B., Iturriza-Gomara, M., Dove, W., Ngwira, B., Nakagomi, O., Nakagomi, T., Parashar, U. and Cunliffe, N. 2013. Detection and molecular characterisation of noroviruses in hospitalised children in Malawi, 1997-2007. *J Med Virol*. **85**: 1299-1306. doi: 10.1002/jmv.23589.
137. Tu, E.T., Nguyen, T., Lee, P., Bull, R.A., Musto, J., Hansman, G., White, P.A., Rawlinson, W.D. and McIver, C.J. 2007. Norovirus GII.4 strains and outbreaks, Australia. *Emerg Infect Dis*. **13**: 1128-1130. doi: 10.3201/eid1307.060999
138. 梅田悦生. 2007. ノロウイルスによる感染症. *耳鼻咽喉科臨床*. **100**: 497-504.
139. van Beek, J., Ambert-Balay, K., Botteldoorn, N., Eden, J.S., Fonager, J., Hewitt, J., Iritani, N., Kroneman, A., Vennema, H., Vinjé, J., White, P.A. and Koopmans, M. and NoroNet. 2013. Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012. *Euro Surveill*. **18**: 8-9.
140. van Gunsteren, W.F., Billeter, S.R., Eising, A.A., Hünenberger, P.H., Krüger, P. and Mark, A.E. 1996. “*Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide*”. Vdf

Hochschulverlag AG, an der ETH Zürich Press.

141. Vega, E., Barclay, L., Gregoricus, N., Shirley, S.H., Lee, D. and Vinjé, J. 2014a. Genotypic and epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the United States, 2009 to 2013. *J. Clin. Microbiol.* **52**: 147-155. doi: 10.1128/JCM.02680-13
142. Vega, E., Donaldson, E., Huynh, J., Barclay, L., Lopman, B., Baric, R., Chen, L.F. and Vinjé, J. 2014b. RNA populations in immunocompromised patients as reservoirs for novel norovirus variants. *J. Virol.* **88**: 14184-14196. doi: 10.1128/JVI.02494-14
143. Victoria, M., Miagostovich, M.P., Ferreira, M.S., Vieira, C.B., Fioretti, J.M., Leite, J.P., Colina, R. and Cristina, J. 2009. Bayesian coalescent inference reveals high evolutionary rates and expansion of Norovirus populations. *Infect Genet Evol.* **9**: 927-932. doi: 10.1016/j.meegid.2009.06.014. Epub 2009 Jun 24.
144. Vijaykrishna, D., Holmes, E.C., Joseph, U., Fourment, M., Su, Y.C., Halpin, R., Lee, R.T., Deng, Y.M., Gunalan, V., Lin, X., Stockwell, T.B., Fedorova, N.B., Zhou, B., Spirason, N., Kühnert, D., Bošková, V., Stadler, T., Costa, A.M., Dwyer, D.E., Huang, Q.S., Jennings, L.C., Rawlinson, W., Sullivan, S.G., Hurt, A.C., Maurer-Stroh, S., Wentworth, D.E., Smith, G.J. and Barr, I.G. 2015. The contrasting phylodynamics of human influenza B viruses. *Elife.* **4**: e05055. doi: 10.7554/eLife.05055.
145. Vinjé, J. 2015. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *J. Clin. Microbiol.* **53**: 373-381. doi:

10.1128/JCM.01535-14

146. Vongpunsawad, S., Venkataram, P. B. V. and Estes, M. K. 2013. Norwalk virus minor capsid protein VP2 associates within the VP1 shell domain. *J Virol.* **87**:4818–4825. doi:10.1128/JVI.03508-12.
147. 渡邊美樹, 栗田順子, 高木英, 永田紀子, 長洲奈月, 菅原民枝, 大日康史. 2016. 学校欠席者情報収集システムを活用した麻しんおよび風しん早期探知・早期対応. *日本公衆衛生雑誌.* **63**: 209-214. Doi: 10.11236/jph.63.4_209
148. Webb, B. and Sali, A. 2014. Protein structure modeling with MODELLER. *Methods Mol. Biol.* **1137**: 1-15. doi: 10.1007/978-1-4939-0366-5_1
149. Wei, K. and Li, Y. 2017. Global evolutionary history and spatio-temporal dynamics of dengue virus type 2. *Sci Rep.* **7**: 45505. doi: 10.1038/srep45505
150. White, P.A. 2014. Evolution of norovirus. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**: 741-745. doi: 10.1111/1469-0691.12746
151. Yang, Y., Xia, M., Tan, M., Huang, P., Zhong, W., Pang, X.L., Lee, B.E., Meller, J., Wang, T. and Jiang, X. 2010. Genetic and phenotypic characterization of GII-4 noroviruses that circulated during 1987 to 2008. *J. Virol.* **84**: 9595-9607. doi: 10.1128/JVI.02614-09
152. Yao, B., Zheng, D., Liang, S. and Zhang, C. 2013. Conformational B-cell epitope prediction on antigen protein structures: a review of current algorithms and comparison with

- common binding site prediction methods. *PLoS One*. **8**: e62249.
doi: 10.1371/journal.pone.0062249
153. Yu, W.J., Chen, S.Y., Tsai, C.N., Chao, H.C., Kong, M.S., Chang, Y.J. and Chiu, C.H. 2017. Long-term impact of suboptimal rotavirus vaccines on acute gastroenteritis in hospitalized children in Northern Taiwan. *J Formos Med Assoc.* pii: **S0929-6646**:30360-1. doi: 10.1016/j.jfma.2017.09.009.
154. Zakikhany, K., Allen, D.J., Brown, D. and Iturriza-Gómara, M. 2012. Molecular evolution of GII-4 Norovirus strains. *PLoS One*. **7**: e41625. doi: 10.1371/journal.pone.0041625.
155. Zhang, P., Chen, L., Fu, Y., Ji, L., Wu, X., Xu, D. and Han, J. 2016. Clinical and molecular analyses of norovirus-associated sporadic acute gastroenteritis: the emergence of GII.17 over GII.4, Huzhou, China, 2016. *BMC Infect Dis*. **16**:717. doi: 10.1186/s12879-016-2033-x
156. Zhirakovskaia, E.V., Tikunov, A.Y. Bodnev, S.A., Klemesheva, V.V., Netesov, S.V. and Tikunova, N.V. 2015. Molecular epidemiology of noroviruses associated with sporadic gastroenteritis in children in Novosibirsk, Russia, 2003-2012. *J Med Virol*. **87**:740-753. doi: 10.1002/jmv.24068.
157. Zingg, W., Colombo, C., Jucker, T., Bossart, W. and Ruef, C. 2005. Impact of an outbreak of norovirus infection on hospital resources. *Infect Control Hosp Epidemiol*. **26**: 263-267.

VI. 補助図表

表 S1. 解析に使用した配列 (GII.4以外)

GenBank Accession No.	Genotypes	Names
M87661	GI.1	Hu/GI.1/Norwalk/1968/US
U07611	GII.1	Hu/GII.1/Hawaii/1971/US
X81879	GII.2	Hu/GII.2/Melksham/1994/UK
U02030	GII.3	Hu/GII.3/Toronto24/1991/CA
AJ277607	GII.5	Hu/GII.5/Hillingdon/1990/UK
AB039778	GII.6	Hu/GII.6/Saitama/U16/1997/JP
AF414409	GII.7	Hu/GII.7/Gwynedd/273/1994/US
AB039780	GII.8	Hu/GII.8/Saitama/U25/1998/JP
AY038599	GII.9	Hu/GII.9/VA97207/1997/USA
AF427118	GII.10	Hu/GII.10/Erfurt/546/2000/DE
AB074893	GII.11	Sw/GII.11/Sw918/1997/JP
AB032758	GII.12	Hu/GII.12/Aichi/1996/JP
AY113106	GII.13	Hu/GII.13/Fayetteville/1998/US
AY130761	GII.14	Hu/GII.14/M7/1999/US
AY130762	GII.15	Hu/GII.15/J23/1999/US
AY502010	GII.16	Hu/GII.16/Tiffin/1999/USA
AY502009	GII.17	Hu/GII.17/CS-E1/2002/USA
AY823304	GII.18	Sw/GII.18/OH-QW101/2003/US
AY823306	GII.19	Sw/GII.19/OH-QW170/2003/US
AB542917	GII.20	Hu/GII.20/OC07118/2007/JP
AB542915	GII.21	Hu/GII.21/OC05024/2005/JP
AB083780	GII.22	Hu/GII.22/YURI/2002/JP

表 S1 (continued) . 解析に使用した配列 (GII.4)

GenBank Accession No.	GII.4 variants	Names
FJ537137	Bristol1993	Hu/GII.4/Bristol1993/CHDC4108/1987/US
X76716	Bristol1993	Hu/GII.4/Bristol1993/Bristol/1993/UK
AF145896	Camberwell1994	Hu/GII.4/Camberwell1994/101922/1994/AUS
AY030098	Camberwell1994	Hu/GII.4/Camberwell1994/MD134-7/1987/US
FJ537136	Camberwell1994	Hu/GII.4/Camberwell1994/CHDC3967/1988/US
JX289821	Camberwell1994	Hu/GII.4/Camberwell1994/MD120-12/1987/USA
AB078336	US95-96	Hu/GII.4/US95-96/Narita104/2002/JP
AB083781	US95-96	Hu/GII.4/US95-96/YURI/Akita/32073/2002/JP
AB294778	US95-96	Hu/GII.4/US95-96/Matsudo/021071/2002/JP
AB303922	US95-96	Hu/GII.4/US95-96/Tiel001/1995/NL
AB303924	US95-96	Hu/GII.4/US95-96/Waddinxveen016/2000/NL
AB303925	US95-96	Hu/GII.4/US95-96/Leeuwarden043/2000/NL
AB303926	US95-96	Hu/GII.4/US95-96/Schiedam018/2001/NL
AB504306	US95-96	Hu/GII.4/US95-96/Hiroshima/19/2001/JPN
AF080552	US95-96	Hu/GII.4/US95-96/358/96015107/1996/FL
AF080554	US95-96	Hu/GII.4/US95-96/366/96019554/1996/ID
AF406793	US95-96	Hu/GII.4/US95-96/DOUG4770/2001/AUS
AF414424	US95-96	Hu/GII.4/US95-96/Miami_Beach/326/1995/US
AF414425	US95-96	Hu/GII.4/US95-96/Burwash_Landing/331/1995/US
AF425763	US95-96	Hu/GII.4/US95-96/Berlin/159/1998/DE
AF425764	US95-96	Hu/GII.4/US95-96/Berlin/238/1998/DE
AF425766	US95-96	Hu/GII.4/US95-96/Dillingen_259/2001/DE
AF427113	US95-96	Hu/GII.4/US95-96/Oberschleissheim/112/1999/DE
AF427114	US95-96	Hu/GII.4/US95-96/Frankfurt/170/1999/DE
AF427115	US95-96	Hu/GII.4/US95-96/Ludwigslust/218/1999/DE
AF427120	US95-96	Hu/GII.4/US95-96/Beeskow/124/2000/DE
AF427121	US95-96	Hu/GII.4/US95-96/Koenigswusterhausen/130/2000/DE
AF427122	US95-96	Hu/GII.4/US95-96/Berlin/491/2000/DE
AF472623	US95-96	Hu/GII.4/US95-96/DIJON171/1996/FR
AJ277619	US95-96	Hu/GII.4/US95-96/Symgreen/1995/UK
AY038600	US95-96	Hu/GII.4/US95-96/VA98387/1998/USA
AY081134	US95-96	Hu/GII.4/US95-96/Mora/1997/SE
AY741811	US95-96	Hu/GII.4/US95-96/Dresden174/1997/GE
DQ078829	US95-96	Hu/GII.4/US95-96/Sydney348/1997/AU
DQ975270	US95-96	Hu/GII.4/US95-96/Osaka/1998/JPN
EU078410	US95-96	Hu/GII.4/US95-96/GCanyon/2002/USA
EU105469	US95-96	Hu/GII.4/US95-96/HS66/2001/US
FJ411169	US95-96	Hu/GII.4/US95-96/Wellington/1995/USA
JQ478407	US95-96	Hu/GII.4/US95-96/1997/USA
AB186065	Kaiso2003	Hu/GII.4/Kaiso2003/Osaka/OC02202/2002/JP
AB294779	Kaiso2003	Hu/GII.4/Kaiso2003/Chiba/030556/2003/JP
AB303929	Kaiso2003	Hu/GII.4/Kaiso2003/EmmenE006/2002/NL
AB294780	FarmingtonHills2002	Hu/GII.4/FarmingtonHills2002/Chiba/040095/2003/JP
AB303928	FarmingtonHills2002	Hu/GII.4/FarmingtonHills2002/WeertE022/2002/NL
AB303930	FarmingtonHills2002	Hu/GII.4/FarmingtonHills2002/Heerlen003/2003/NL
AB303931	FarmingtonHills2002	Hu/GII.4/FarmingtonHills2002/ApelDoorn023/2003/NL
AB303932	FarmingtonHills2002	Hu/GII.4/FarmingtonHills2002/DenHaag001/2003/NL
AB303934	FarmingtonHills2002	Hu/GII.4/FarmingtonHills2002/DenHelder003/2004/NL
AB303935	FarmingtonHills2002	Hu/GII.4/FarmingtonHills2002/Middelburg007/2004/NL
AB303936	FarmingtonHills2002	Hu/GII.4/FarmingtonHills2002/Elsloo012/2004/NL
AY502019	FarmingtonHills2002	Hu/GII.4/FarmingtonHills2002/Anchorage/2002/USA
AY588018	FarmingtonHills2002	Hu/GII.4/FarmingtonHills2002/Oxford/B5S13/2002/UK
AY588021	FarmingtonHills2002	Hu/GII.4/FarmingtonHills2002/Oxford/B6S6/2003/UK
EU078413	FarmingtonHills2002	Hu/GII.4/FarmingtonHills2002/GA04/2004/USA
FJ538900	FarmingtonHills2002	Hu/GII.4/FarmingtonHills2002/Dijon/E872/2002/FRA
JQ478408	FarmingtonHills2002	Hu/GII.4/FarmingtonHills2002/Farmington_Hills/2004/USA
JQ798158	FarmingtonHills2002	Hu/GII.4/FarmingtonHills2002/5M/2004/USA
JX126912	FarmingtonHills2002	Hu/GII.4/FarmingtonHills2002/Ohio/71/2012/USA
JX445152	FarmingtonHills2002	Hu/GII.4/FarmingtonHills2002/AlbertaEI131/2004/CA
JX459596	FarmingtonHills2002	Hu/GII.4/FarmingtonHills2002/SG4016-09/2004/SG
DQ078820	Lanzou2002	Hu/GII.4/Lanzou2002/Sydney917J/2002/AU
DQ364459	Lanzou2002	Hu/GII.4/Lanzou2002/35666/2002/China
EU078412	Lanzou2002	Hu/GII.4/Lanzou2002/FL04/2004/USA
EU310927	Lanzou2002	Hu/GII.4/Lanzou2002/Houston/TCH186/2002/US
FJ411170	Lanzou2002	Hu/GII.4/Lanzou2002/Henry/2000/USA
AB220921	Asia2003	Hu/GII.4/Asia2003/Chiba/2005/JP
AB220922	Asia2003	Hu/GII.4/Asia2003/Sakai/2005/JP
AB220923	Asia2003	Hu/GII.4/Asia2003/Ehime/2005/JP
AB294782	Asia2003	Hu/GII.4/Asia2003/Chiba/2004/JP
AB294787	Asia2003	Hu/GII.4/Asia2003/Ichikawa/2005/JP
AB294791	Asia2003	Hu/GII.4/Asia2003/Inba/2006/JP
AB447448	Asia2003	Hu/GII.4/Asia2003/Sakai2/2006/JP
AB504307	Asia2003	Hu/GII.4/Asia2003/Hiroshima/2004/JPN
AB504313	Asia2003	Hu/GII.4/Asia2003/Hiroshima/2005/JPN

表 (continued) . 解析に使用した配列 (GII.4)

GenBank Accession No.	GII.4 variants	Names
AB504314	Asia2003	Hu/GII.4/Asia2003/Hiroshima/2005/JPN
DQ369797	Asia2003	Hu/GII.4/Asia2003/Guangzhou/NVgz01/2006/CHN
EF535854	Asia2003	Hu/GII.4/Asia2003/Guangzhou/2006/China
EU839581	Asia2003	Hu/GII.4/Asia2003/Beijing/2004/CHN
EU839586	Asia2003	Hu/GII.4/Asia2003/Beijing/2005/CHN
EU839587	Asia2003	Hu/GII.4/Asia2003/Beijing/2005/CHN
HM802548	Asia2003	Hu/GII.4/Asia2003/Hong_Kong/2005/CHN
HM802551	Asia2003	Hu/GII.4/Asia2003/Hong_Kong/2004/CHN
AB294785	Hunter2004	Hu/GII.4/Hunter2004/Inba/050590/2005/JP
AB294788	Hunter2004	Hu/GII.4/Hunter2004/Sanbu/050878/2006/JP
AB385629	Hunter2004	Hu/GII.4/Hunter2004/RotterdamP2D182/2005/NL
AB385635	Hunter2004	Hu/GII.4/Hunter2004/RotterdamP5D36/2005/NL
DQ078794	Hunter2004	Hu/GII.4/Hunter2004/Sydney284E/2004/AU
EF126962	Hunter2004	Hu/GII.4/Hunter2004/DenHaag54/2006/NL
EF202568	Hunter2004	Hu/GII.4/Hunter2004/Toronto/SK/2005/CAN
EU078415	Hunter2004	Hu/GII.4/Hunter2004/Ryndam/2005/USA
EU839584	Hunter2004	Hu/GII.4/Hunter2004/Beijing/221/2005/CHN
EU876890	Hunter2004	Hu/GII.4/Hunter2004/Dijon-E1057/2002/FRA
EU916956	Hunter2004	Hu/GII.4/Hunter2004/Monastir_8655/2007/TUN
EU921338	Hunter2004	Hu/GII.4/Hunter2004/Pune-PC09/2005/IN
EU921344	Hunter2004	Hu/GII.4/Hunter2004/Pune/PC15/2006/India
HM802543	Hunter2004	Hu/GII.4/Hunter2004/Hong_Kong/CU050106/2005/CHN
HM802544	Hunter2004	Hu/GII.4/Hunter2004/Hong_Kong/CU051146/2005/CHN
HQ456320	Hunter2004	Hu/GII.4/Hunter2004/04R-2/2004/TW
JF827296	Hunter2004	Hu/GII.4/Hunter2004/Houston/TCH492/2005/US
JN400599	Hunter2004	Hu/GII.4/Hunter2004/CGMH01/2006/TW
JX445153	Hunter2004	Hu/GII.4/Hunter2004/AlbertaE1142/2006/CA
JX459595	Hunter2004	Hu/GII.4/Hunter2004/SG4013-09/2004/SG
JX459597	Hunter2004	Hu/GII.4/Hunter2004/SG4033-01/2005/SG
KC715794	Hunter2004	Hu/GII.4/Hunter2004/DF-01/2006/Brazil
AB385632	Yerseke2006a	Hu/GII.4/Yerseke2006a/RotterdamP4D0/2006/NL
AB385638	Yerseke2006a	Hu/GII.4/Yerseke2006a/RotterdamP6D33/2006/NL
AB385640	Yerseke2006a	Hu/GII.4/Yerseke2006a/RotterdamP7D119/2007/NL
AB447458	Yerseke2006a	Hu/GII.4/Yerseke2006a/Saga5/2006/JP
AB541267	Yerseke2006a	Hu/GII.4/Yerseke2006a/Hokkaido5/2007/JP
EF126963	Yerseke2006a	Hu/GII.4/Yerseke2006a/Yerseke38/2006/NL
EF187497	Yerseke2006a	Hu/GII.4/Yerseke2006a/Kenepuru/NZ327/2006/NZL
EU876886	Yerseke2006a	Hu/GII.4/Yerseke2006a/Cairo6/2006/EGY
EU876894	Yerseke2006a	Hu/GII.4/Yerseke2006a/Dijon-E1501/2006/FRA
JQ613511	Yerseke2006a	Hu/GII.4/Yerseke2006a/WA223N/2007/AU
JQ613517	Yerseke2006a	Hu/GII.4/Yerseke2006a/WA210Z/2007/AU
JX459607	Yerseke2006a	Hu/GII.4/Yerseke2006a/SG4061-10/2006/SG
JX459612	Yerseke2006a	Hu/GII.4/Yerseke2006a/SG4058-12/2006/SG
AB291542	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Kobe034/2006/JP
AB294794	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Narashino/2006/JP
AB447449	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Sakai3/2006/JP
AB447454	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Ehime2/2006/JP
AB504323	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Hiroshima/2007/JPN
AB541204	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Aichi2/2008/JP
AB541212	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Akita1/2008/JP
AB541215	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Akita3/2008/JP
AB541219	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Aomori1/2008/JP
AB541225	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Aomori4/2008/JP
AB541227	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Aomori5/2008/JP
AB541231	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Chiba2/2008/JP
AB541234	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Chiba5/2007/JP
AB541240	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Ehime3/2008/JP
AB541241	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Ehime4/2007/JP
AB541244	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Fukui1/2008/JP
AB541248	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Fukui4/2008/JP
AB541250	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Fukui5/2008/JP
AB541253	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Hiroshima2/2007/JP
AB541254	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Hiroshima2/2008/JP
AB541260	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Hokkaido1/2007/JP
AB541262	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Hokkaido2/2007/JP
AB541263	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Hokkaido2/2008/JP
AB541264	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Hokkaido3/2008/JP
AB541265	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Hokkaido4/2007/JP
AB541271	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Iwate3/2007/JP
AB541290	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Miyazaki2/2007/JP
AB541306	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Nagano3/2008/JP
AB541308	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Nagano5/2007/JP
AB541314	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Niigata3/2008/JP
AB541315	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Niigata4/2007/JP

表 S1 (continued) . 解析に使用した配列 (GII.4)

GenBank Accession No.	GII.4 variants	Names
AB541337	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Saga5/2007/JP
AB541339	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Sakai1/2007/JP
AB541340	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Sakai1/2008/JP
AB541345	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Sakai4/2008/JP
AB541348	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Shimane2/2008/JP
AB541355	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Toyama2/2007/JP
AB541358	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Toyama3/2008/JP
AB629942	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Tokyo/2010/JPN
AB663685	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Wakayama/T162/2010/JP
AB663686	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Wakayama/T164/2010/JP
AB933646	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Shimane1/2009/JP
AB933664	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Nagano1/2010/JP
AB933666	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Osaka2/2010/JP
AB933668	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Osaka4/2010/JP
AB933672	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Hiroshima4/2010/JP
AB933675	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Hokkaido4/2010/JP
AB933682	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Nagano3/2010/JP
AB933685	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Ehime3/2010/JP
AB933690	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Miyazaki4/2010/JP
AB933698	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Hiroshimacity2/2011/JP
AB933705	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Ehime2/2011/JP
AB933717	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Toyama5/2011/JP
AB933727	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Chiba10/2011/JP
EF684915	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Shellharbour/NSW696T/2006/AUS
EU078418	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Mississip/2006/USA
EU078420	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/MT01/2006/USA
EU839588	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Beijing/2006/CHN
EU839589	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Beijing/2006/CHN
EU839593	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Beijing/2007/CHN
EU921386	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Pune-PC49/2007/IN
GQ246799	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Dijon/2009/FRA
GU845024	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Rathmines/NSW287R/2007/AUS
GQ845322	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/VIC3863/2007/AU
GQ845329	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/NSW523R/2007/AU
GQ845341	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/NSW587V/2007/AU
GQ845366	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Westmead/NSW3639/2008/AUS
GQ856448	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Beijing/2007/CHN
GQ856449	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Beijing/2007/CHN
GQ856451	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Beijing/2007/CHN
GQ856452	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Beijing/2007/CHN
GQ856455	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Beijing/2007/CHN
GQ856456	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Beijing/2007/CHN
GQ856457	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Beijing/2008/CHN
GU325839	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/HS194/2009/US
GU390900	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Chungnam/2008/Kor
HQ456332	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/08-E/2006/TW
HQ456344	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/09-N-1/2009/TW
JN400603	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/CGMH05/2006/TW
JN400613	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/CGMH15/2007/TW
JN400617	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/CGMH19/2009/TW
JQ613508	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/NSW7211/2007/AU
JQ613510	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/NSW833M/2007/AU
JQ613512	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/WA145Y/2007/AU
JQ613519	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/NSW3912/2008/AU
JQ613522	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/NSW764Q/2008/AU
JQ613525	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/NSW8190/2009/AU
JQ613562	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/NSW827D/2010/AU
JQ613572	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/StVincent/NSW2171/2010/AU
JX155737	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Xian/P19/2010/CHN
JX155739	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Xian/P49/2010/CHN
JX155742	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Xian/P143/2010/CHN
JX155743	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Xian/P152/2010/CHN
JX155745	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Xian/P158/2010/CHN
JX155746	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Xian/P185/2010/CHN
JX155747	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Xian/C6/2010/CHN
JX155748	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Xian/C12/2010/CHN
JX155750	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Xian/C21/2010/CHN
JX155752	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Xian/C31/2010/CHN
JX439841	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Seoul1321/2010/KOR
JX439842	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Seoul1351/2010/KOR
JX439843	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Seoul1431/2010/KOR
JX445160	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/AlbertaE1102/2008/CA
JX445162	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/AlbertaE1425/2008/CA
JX445163	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/AlbertaE1109/2009/CA

表 S1 (continued) . 解析に使用した配列 (GII.4)

GenBank Accession No.	GII.4 variants	Names
JX459603	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/SG4019-09/2006/SG
JX459622	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/SG4052-08/2007/SG
JX459629	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/SG4069-01/2008/SG
JX459632	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/SG4092-11/2008/SG
JX459639	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/SG4028-07/2009/SG
JX459648	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/SG4058-10/2009/SG
JX459905	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Randwick/NSW938K/2011/AU
JX984946	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/GZ2010-L26/Guangzhou/2010/CHN
JX984947	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/GZ2010-L32/Guangzhou/2010/CHN
JX984951	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/GZ2010-L88/Guangzhou/2011/CHN
KC175342	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Norwalk/10034/2009/VNM
KC175357	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Norwalk/10148/2009/VNM
KC175372	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Norwalk/10204/2009/VNM
KC175374	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Norwalk/10223/2009/VNM
KC175378	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Norwalk/10247/2009/VNM
KC409255	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Ho_Chi_Minh/20154/2009/VNM
KC409271	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Ho_Chi_Minh/20190/2009/VNM
KC409278	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Ho_Chi_Minh/20208/2009/VNM
KC409289	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Ho_Chi_Minh/20302/2009/VNM
KC409298	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Ho_Chi_Minh/20448/2010/VNM
KC517360	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/New_Taipei/CGMH50/2011/TW
KC517366	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/New_Taipei/CGMH56/2012/TW
KC517368	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/New_Taipei/CGMH58/2012/TW
KC517372	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/New_Taipei/CGMH62/2012/TW
KC517373	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Taoyuan/CGMH63/2012/TW
KC576912	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/NIHIC4.1/2011/USA
KC990829	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/092895/2008/USA
KF429777	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/NIHIC27.1/2012/USA
KJ196287	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/Shimada/ASC96/2010/JP
KJ541743	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/SGU-110421/2011/KOR
KM198485	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/10148/2009/VNM
KM198533	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/30241/2009/VNM
KM198539	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/C2H-36/2011/VNM
KM198570	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/20146/2009/VNM
KT033904	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/SPHC1134/2012/CHN
KT033905	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/SPHC1183/2012/CHN
LC005707	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/y07-V203-1/2008/JP
LC005716	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/y11-V664-1/2012/JP
LC005718	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/y12-V758-3/2012/JP
LC005719	DenHaag2006b	Hu/GII.4/DenHaag2006b/y12-V836-3/2012/JP
AB434770	Osaka2007	Hu/GII.4/Osaka2007/OC07138/2007/JP
AB541321	Osaka2007	Hu/GII.4/Osaka2007/Osaka2/2007/JP
EU876882	Osaka2007	Hu/GII.4/Osaka2007/Cairo2/2006/EGY
EU876884	Osaka2007	Hu/GII.4/Osaka2007/Cairo4/2006/EGY
EU876888	Osaka2007	Hu/GII.4/Osaka2007/Cairo8/2007/EGY
FJ411171	Osaka2007	Hu/GII.4/Osaka2007/SSCS/2005/USA
GQ246791	Osaka2007	Hu/GII.4/Osaka2007/Dijon/E3020/2008/FRA
GQ246800	Osaka2007	Hu/GII.4/Osaka2007/Dijon/E3880/2009/FRA
GQ413969	Osaka2007	Hu/GII.4/Osaka2007/Riviera1635/2008/US
GQ845368	Osaka2007	Hu/GII.4/Osaka2007/Sutherland/NSW505G/2007/AUS
GQ850882	Osaka2007	Hu/GII.4/Osaka2007/Riviera1590/2008/US
AB492092	Apeldoorn2007	Hu/GII.4/Apeldoorn2007/Stockholm/19865/2008/SE
AB541310	Apeldoorn2007	Hu/GII.4/Apeldoorn2007/Niigata1/2008/JP
AB541320	Apeldoorn2007	Hu/GII.4/Apeldoorn2007/Osaka1/2008/JP
AB933730	Apeldoorn2007	Hu/GII.4/Apeldoorn2007/Ehime1/2009/JP
GQ246792	Apeldoorn2007	Hu/GII.4/Apeldoorn2007/Dijon/2008/FRA
GQ246794	Apeldoorn2007	Hu/GII.4/Apeldoorn2007/Dijon/2008/FRA
GQ246798	Apeldoorn2007	Hu/GII.4/Apeldoorn2007/Dijon/2009/FRA
GQ303445	Apeldoorn2007	Hu/GII.4/Apeldoorn2007/Mannheim131/2009/DE
GU270580	Apeldoorn2007	Hu/GII.4/Apeldoorn2007/New_Orleans1500/2008/USA
GU390901	Apeldoorn2007	Hu/GII.4/Apeldoorn2007/Chungnam/2008/KOR
HM635100	Apeldoorn2007	Hu/GII.4/Apeldoorn2007/Seoul/2009/KOR
HM635101	Apeldoorn2007	Hu/GII.4/Apeldoorn2007/Seoul/2009/KOR
HM635155	Apeldoorn2007	Hu/GII.4/Apeldoorn2007/Seoul/2009/KOR
HQ005292	Apeldoorn2007	Hu/GII.4/Apeldoorn2007/2221223/2009/HK
HQ009513	Apeldoorn2007	Hu/GII.4/Apeldoorn2007/JB-15/2008/KOR
JX613529	Apeldoorn2007	Hu/GII.4/Apeldoorn2007/NSW963U/2009/AU
JX445161	Apeldoorn2007	Hu/GII.4/Apeldoorn2007/AlbertaEI210/2008/CA
JX448566	Apeldoorn2007	Hu/GII.4/Apeldoorn2007/Seoul/2010/KOR
JX459630	Apeldoorn2007	Hu/GII.4/Apeldoorn2007/SG4079-07/2008/SG
JX459638	Apeldoorn2007	Hu/GII.4/Apeldoorn2007/SG4023-05/2009/SG
JX459903	Apeldoorn2007	Hu/GII.4/Apeldoorn2007/Jannali/2011/AU
KC409311	Apeldoorn2007	Hu/GII.4/Apeldoorn2007/30199/2009/VNM
KF429782	Apeldoorn2007	Hu/GII.4/Apeldoorn2007/NIHIC1.3/2010/USA

表 S1 (continued) . 解析に使用した配列 (GII.4)

GenBank Accession No.	GII.4 variants	Names
KF429791	Apeldoorn2007	Hu/GII.4/Apeldoorn2007/NIHIC1.5/2011/USA
KF712507	Apeldoorn2007	Hu/GII.4/Apeldoorn2007/NIHIC1.11/2012/USA
AB629944	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/Tokyo/10-1443/2010/JPN
AB933741	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/Chiba4/2009/JP
AB933745	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/Aichi3/2010/JP
AB933746	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/Osaka1/2009/JP
AB933748	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/Ehime5/2011/JP
AB933753	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/Ehime4/2009/JP
AB933754	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/Saga1/2009/JP
AB933755	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/Saga2/2009/JP
AB933769	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/Nagano4/2011/JP
AB933771	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/Hiroshimacity1/2011/JP
GQ845345	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/NSW806J/2008/AU
HF952120	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/C00007876/2011/UK
HF952122	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/C00007880/2011/UK
HF952134	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/C00007941/2011/UK
HM191773	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/2200661/2010/HK
HM625866	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/Pecs/HUN4322/2010/HUN
JN400622	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/CGMH24/2010/TW
JN595867	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/New_Orleans/2010/USA
JQ613539	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/NSW447T/2009/AU
JQ613543	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/NSW0159/2010/AU
JQ613553	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/NSW186M/2010/AU
JQ613559	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/NSW2004/2010/AU
JQ613561	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/NSW234D/2010/AU
JQ613564	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/NSW944J/2010/AU
JQ613573	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/Helensburgh/NSW295E/2010/AU
JX439821	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/Seoul1086/2010/KOR
JX439833	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/Seoul1409/2010/KOR
JX445166	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/AlbertaEI204/2010/CA
JX459653	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/SG4014-04/2010/SG
JX459654	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/SG4051-08/2010/SG
JX459656	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/SG4054-08/2010/SG
JX459659	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/SG4010-01/2011/SG
JX644038	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/N100/2011/HuZhou
JX846928	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/NIHIC9/2011/USA
JX984950	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/GZ2010-L87/Guangzhou/2011/CHN
KC175385	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/10368/2010/VNM
KC409241	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/10405/2010/VNM
KC463910	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/Ohio/684/2012/USA
KC577174	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/Jiangsu1/2011/CHN
KC792279	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/kaohsiung/12-AY-1/2010/TW
KF059996	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/ACT0675/2012/AU
KF060006	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/NSW097K/2012/AU
KF060013	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/NSW1560/2011/AU
KF060014	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/NSW1627/2012/AU
KF060016	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/NSW1749/2011/AU
KF060018	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/NSW2024/2012/AU
KF060025	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/NSW270F/2012/AU
KF060048	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/NSW4276/2011/AU
KF060049	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/NSW431D/2011/AU
KF060055	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/NSW468J/2011/AU
KF060071	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/NSW590J/2012/AU
KF060072	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/NSW596M/2011/AU
KF060078	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/NSW619D/2012/AU
KF060079	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/NSW623B/2011/AU
KF060093	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/NSW7117/2012/AU
KF060099	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/NSW7831/2011/AU
KF060115	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/NSW906P/2012/AU
KF060119	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/NSW9393/2012/AU
KF429778	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/NIHIC18.1/2012/USA
KF768471	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/P3/Gothenburg/2012/Sweden
KJ407073	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/HS292/2012/USA
KJ685403	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/BG1C0204/2011/BGD
KJ685405	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/BG1C0282/2011/BGD
KJ685408	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/BG1C0066/2011/BGD
KM198544	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/C2418/2010/VNM
KP244314	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/PR11471/2011/ITA
KP244315	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/PR7841/2011/ITA
KP244316	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/PR9474/2011/ITA
KP244317	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/PR328/2013/ITA
KP244318	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/PA288/2011/ITA
KP244320	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/PA330/2011/ITA
KP244322	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/PA99/2012/ITA

表 S1 (continued) . 解析に使用した配列 (GII.4)

GenBank Accession No.	GII.4 variants	Names
KR904207	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/Johannesburg_3440/2009/ZA
KR904209	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/Johannesburg_3611/2009/ZA
KR904210	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/Johannesburg_4019/2009/ZA
KR904212	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/Bushbuckridge_5246/2010/ZA
KR904213	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/Johannesburg_5454/2010/ZA
KR904216	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/Johannesburg_6298/2010/ZA
KR904217	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/Empangeni_6336/2010/ZA
KR904218	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/Pietermaritzburg_6370/2010/ZA
KR904220	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/Cape_Town_10103/2012/ZA
KR904225	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/Johannesburg_12232/2013/ZA
KR904234	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/Empangeni_7470/2011/ZA
KR904235	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/Bushbuckridge_8108/2011/ZA
KT033903	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009/SPHC2715/2012/CHN
LN854571	NewOrleans2009	Hu/GII.4/NewOrleans2009//Nijmegen01/2012/NL
KC456070	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/VP1172/Shanghai/2012/CHN
KC456071	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/VP1214/Shanghai/2012/CHN
KC456072	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/VP1281/Shanghai/2012/CHN
KC517362	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/Taoyuan/CGMH52/2012/TW
KC517370	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/Taoyuan/CGMH60/2012/TW
KF008241	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/Paris-E8509/2012/FRA
KF008242	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/Cuers-E8549/2012/FRA
KF060009	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/NSW114H/2012/AU
KF060041	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/NSW369N/2012/AU
KF060046	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/NSW426E/2012/AU
KF060062	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/NSW558V/2012/AU
KF060080	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/NSW628G/2012/AU
KF060112	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/NSW8632/2012/AU
KF060129	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/NLV-12-308/2012/NZ
KF145148	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/JP10909/2012/JPN
KF177440	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/32973745/2012/AUS
KF177446	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/90186710/2012/AUS
KF177448	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/35408489/2012/AUS
KF306214	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/Jingzhou/2013/CHN
KF378731	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/PA13/2013/ITA
KF668568	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/PA48/2012/ITA
KJ433968	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/12-AS-1/2012/Taiwan
KJ678141	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/Beijing/PKUPH-02-08/2013/CHN
KJ678152	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/Beijing/PKUPH-07-03/2013/CHN
KJ685402	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012//BG1C0434/2012/BGD
KJ710247	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/Johannesburg9814/2012/ZA
KJ716358	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/Beijing/PKUPH-40/2012/CHN
KJ955493	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/JB031230049/Nanshan/OB/2012/SZ/CHN
KM268097	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/Hong_Kong/CUHK-NS-295/2014/CHN
KM268101	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/Hong_Kong/CUHK-NS-299/2014/CHN
KM396961	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/CUHK-NS-339/2014/HKG
KM514064	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/CUHK-NS-319/2014/HKG
KM514075	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/CUHK-NS-332/2014/HKG
KM982955	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/CUHK-NS-369/2014/HKG
KP096330	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/CUHK-NS-377/2014/HKG
KP096335	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/CUHK-NS-385/2014/HKG
KP096338	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/CUHK-NS-389/2014/HKG
KP096339	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/CUHK-NS-393/2014/HKG
KP096342	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/CUHK-NS-396/2014/HKG
KP096346	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/CUHK-NS-402/2014/HKG
KP096348	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/CUHK-NS-406/2014/HKG
KP176403	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/CUHK-NS-416/2014/HKG
KP176411	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/CUHK-NS-433/2014/HKG
KP241905	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/CUHK-NS-436/2014/HKG
KP241906	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/CUHK-NS-437/2014/HKG
KP241907	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/CUHK-NS-439/2014/HKG
KP241911	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/CUHK-NS-445/2014/HKG
KP241914	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/CUHK-NS-453/2014/HKG
KP698923	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/CUHK-NS-474/2014/HKG
KP698924	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/CUHK-NS-485/2014/HKG
KP698926	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/CUHK-NS-490/2014/HKG
KP864105	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/142696/Shanghai/2014/CHN
KP864107	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/152624/Shanghai/2015/CHN
KR904221	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/Empangeni_11939/2013/ZA
KR904237	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/Empangeni_8598/2012/ZA
KR904238	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/Cape_Town_10917/2013/ZA
KT780375	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/CUHK-NS-525/2015/HKG
KT780381	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/CUHK-NS-554/2015/HKG
KT780388	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/CUHK-NS-618/2015/HKG
KT780389	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/CUHK-NS-651/2015/HKG

表 S1 (continued) . 解析に使用した配列 (GII.4)

GenBank Accession No.	GII.4 variants	Names
KT780392	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/CUHK-NS-661/2015/HKG
LC005720	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/y11-V615-5/2011/JP
LC005727	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/y12-V780-1/2012/JP
LC005730	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/y12-V849-2/2013/JP
LC018706	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/Aichi368-14/2014/JP
LC018709	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/Aichi352-14/2014/JP
LN854566	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/Groningen01/2014/NL
LN854567	Sydney2012	Hu/GII.4/Sydney2012/Groningen02/2014/NL
AB684675	Not typed	Hu/GII.4/21-5/Tokyo/1975/JPN
AB684704	Not typed	Hu/GII.4/52-2/Tokyo/1980/JPN
AB684705	Not typed	Hu/GII.4/53-1/Tokyo/1980/JPN
AB684720	Not typed	Hu/GII.4/64-3/Tokyo/1983/JPN
FJ537135	Not typed	Hu/GII.4/CHDC2094/1974/US
FJ537138	Not typed	Hu/GII.4/CHDC4871/1977/US
HQ008055	Not typed	Hu/GII.4/8483/2008/ZAF
JX023286	Not typed	Hu/GII.4/CHDC5191/1974/USA
JX401279	Not typed	Hu/GII.4/C127/1978/GF
JX401280	Not typed	Hu/GII.4/KL45/1978/MY
JX401281	Not typed	Hu/GII.4/T091/1976/TN
KC962453	Not typed	Hu/GII.4/Bushbuckridge/5928/2010/ZAF
KF429760	Not typed	Hu/GII.4/NIHIC28.4/2012/USA
KJ710245	Not typed	Hu/GII.4/6745/CapeTown/2011/ZAF

表 S2. 進化速度の統計学的解析

Domains	Shell	P1	P2
Shell		< 2E-16	< 2E-16
P1	***		< 2E-16
P2	***	***	

p -values を上に，有意差の有無を下に示した。

*** $p < 0.001$

表S3. GII.4 variantごとの進化速度における統計学的解析結果

GII.4 variants	US95_96	Farmington Hills 2002	Asia 2003	Hunter 2004	Yerseke 2006a	Den Haag 2006b	Osaka 2007	Apeldoorn 2007	New Orleans 2009	Sydney 2012
US95_96		< 2E-16	< 2E-16	< 2E-16	< 2E-16	< 2E-16	< 2E-16	< 2E-16	< 2E-16	< 2E-16
Farmington Hills 2002	***		< 2E-16	< 2E-16	< 2E-16	< 2E-16	< 2E-16	< 2E-16	< 2E-16	< 2E-16
Asia 2003	***	***		< 2E-16	< 2E-16	< 2E-16	< 2E-16	< 2E-16	< 2E-16	< 2E-16
Hunter 2004	***	***	***		< 2E-16	< 2E-16	< 2E-16	< 2E-16	< 2E-16	< 2E-16
Yerseke 2006a	***	***	***	***		< 2E-16	< 2E-16	< 2E-16	< 2E-16	< 2E-16
Den Haag 2006b	***	***	***	***	***		< 2E-16	< 2E-16	< 2E-16	< 2E-16
Osaka 2007	***	***	***	***	***	***		< 2E-16	< 2E-16	< 2E-16
Apeldoorn 2007	***	***	***	***	***	***	***		< 2E-16	< 2E-16
New Orleans 2009	***	***	***	***	***	***	***	***		< 2E-16
Sydney 2012	***	***	***	***	***	***	***	***	***	

p-values を上に, 有意差の有無を下に示した。

*** $p < 0.001$

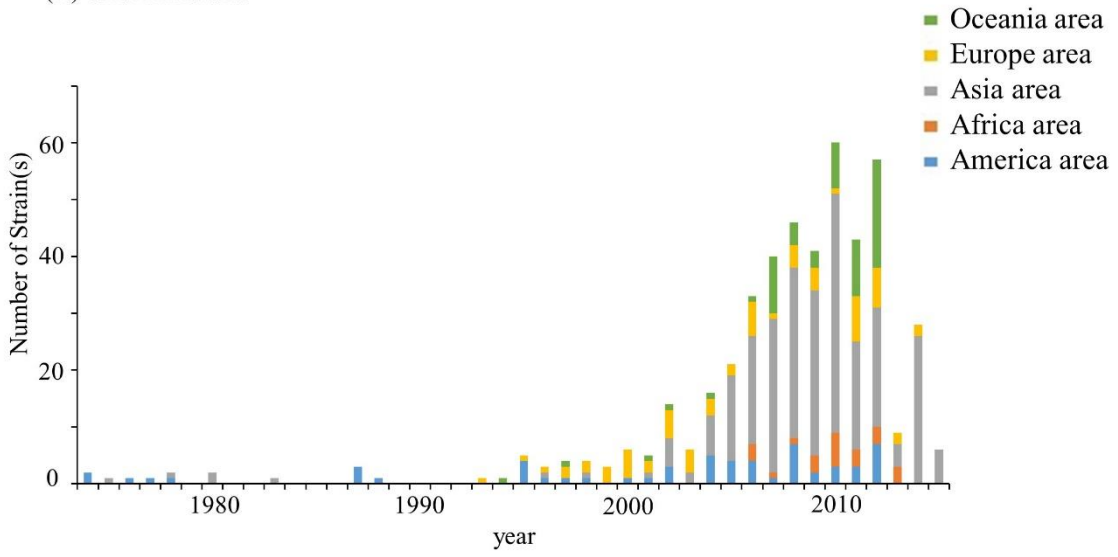
表S4. GII.4 variantにおける系統間距離の統計学的解析結果

GII.4 variants	Camberwell	US95_96	Kaiso 2003	Farmington	Lanzou	Asia	Hunter	Yerseke	Den Haag	Osaka	Apeldoorn	New Orleans	Sydney
	1994		Hills 2002	2002	2003	2004	2006a	2006b	2007	2007	2009	2012	
Camberwell 1994		6.7E-1	6.1E-1	3.5E-3	7.5E-1	1.2E-3	1.8E-3	1.9E-3	1	1	1.2E-1	1	2.7E-2
US95_96			1	< 2E-16	1	< 2E-16	< 2E-16	< 2E-16	7.1E-15	4.7E-11	2.1E-8	6.3E-14	< 2E-16
Kaiso 2003				1	1	1	1	1	6.9E-1	5.5E-1	1	6.7E-1	1
Farmington Hills 2002	**	***			6.9E-1	< 2E-16	1	4.0E-3	< 2E-16	1.9E-14	1.5E-4	< 2E-16	8.0E-7
Lanzou 2002						1.8E-4	6.5E-1	4.5E-2	6.9E-1	3.0E-2	1	6.9E-1	1
Asia 2003	**	***		***	***		< 2E-16	6.0E-6	< 2E-16	< 2E-16	< 2E-16	< 2E-16	< 2E-16
Hunter 2004	**	***				***		1.1E-4	< 2E-16	7.7E-16	2.8E-5	< 2E-16	2.9E-9
Yerseke 2006a	**	***		**	*	***	***		< 2E-16	4.4E-13	7.8E-11	< 2E-16	1.1E-14
Den Haag 2006b		***		***		***	***	***		1.2E-8	< 2E-16	1	< 2E-16
Osaka 2007		***		***	*	***	***	***	***		4.8E-11	1.3E-8	4.5E-16
Apeldoorn 2007		***		***		***	***	***	***	***		< 2E-16	1
New Orleans 2009		***		***		***	***	***		***	***		< 2E-16
Sydney 2012	*	***		***		***	***	***	***	***		***	

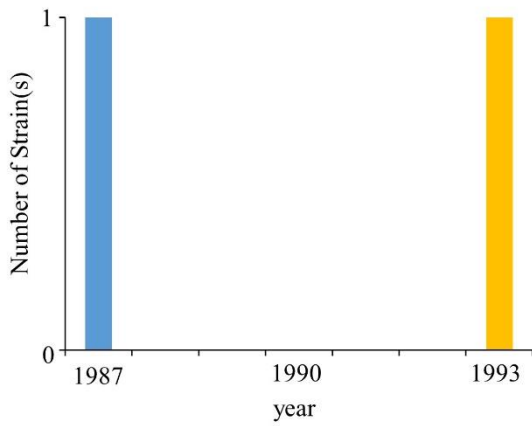
p-values を上に, 有意差の有無を下に示した。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

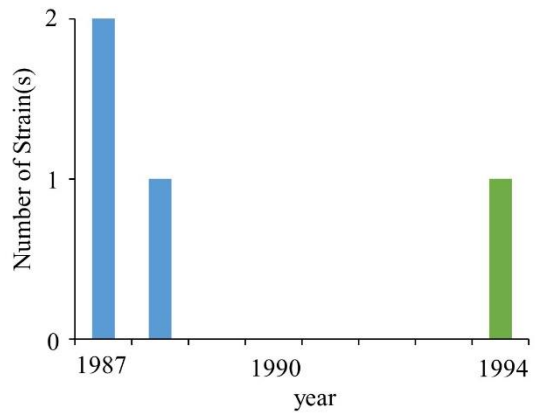
(A) GII.4 All strains



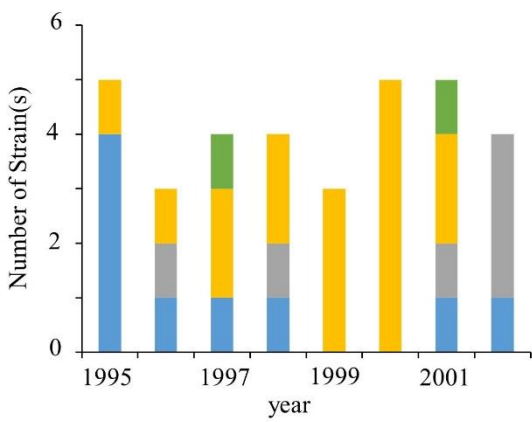
(B) Bristol 1993



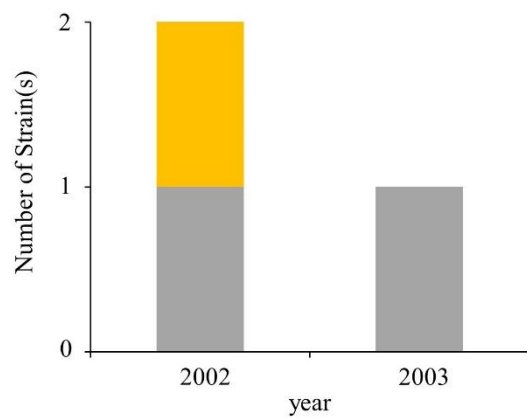
(C) Camberwell 1994



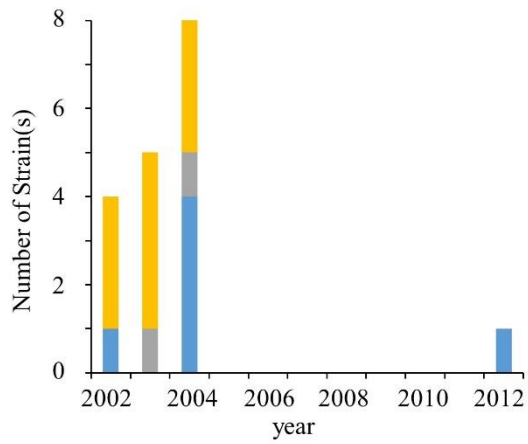
(D) US95_96



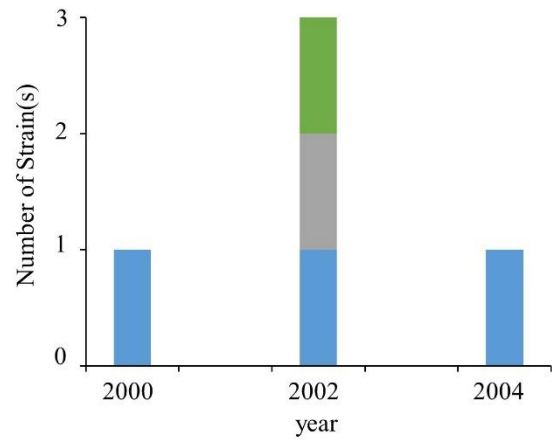
(E) Kaiso 2003



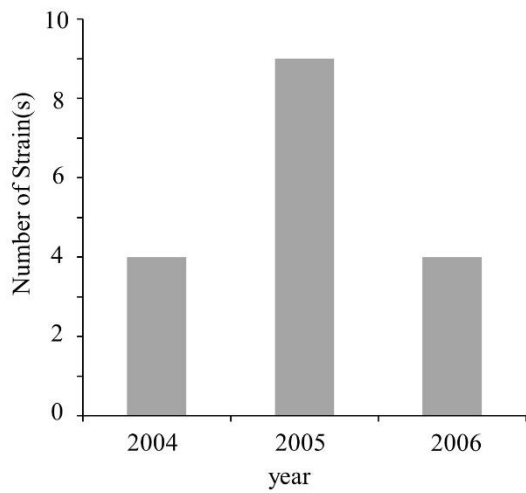
(F) Farmington Hills 2002



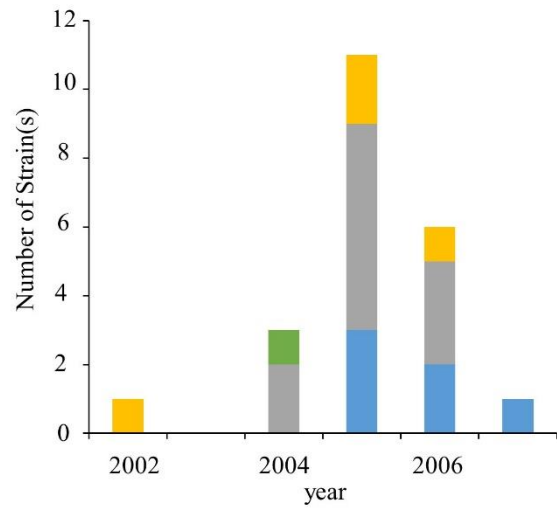
(G) Lanzou 2002



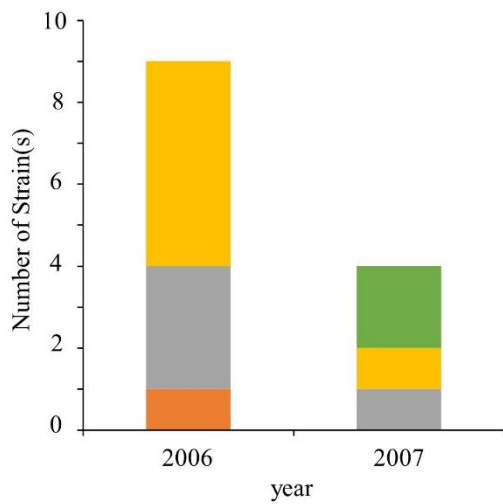
(H) Asia 2003



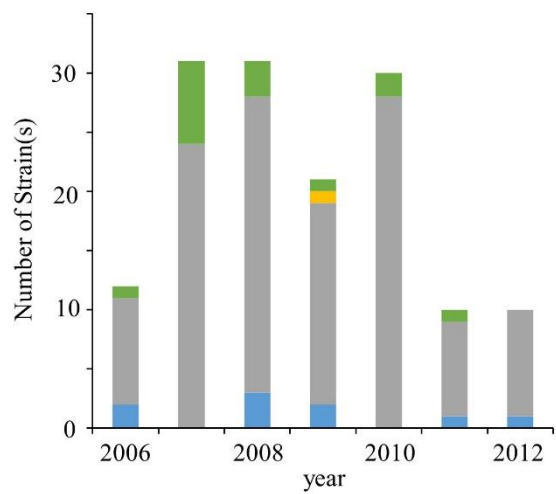
(I) Hunter 2004



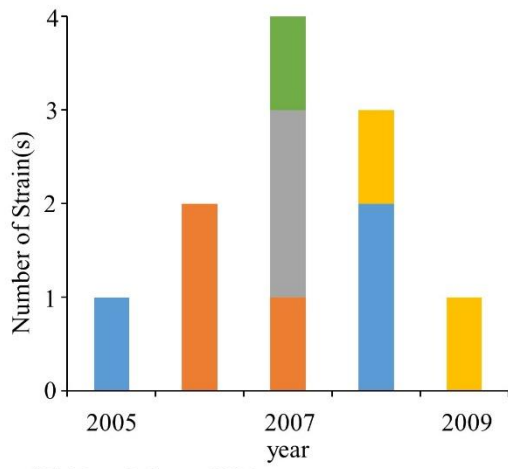
(J) Yerseke 2006a



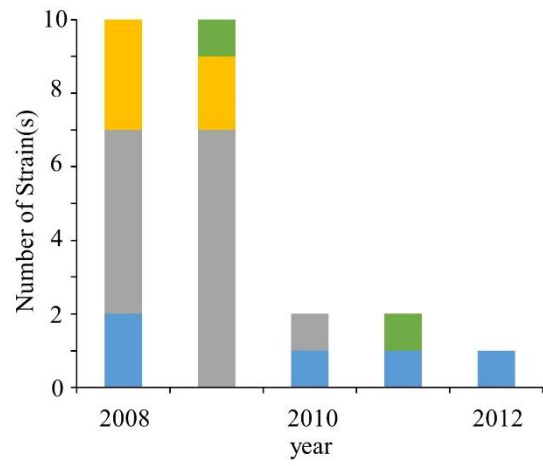
(K) Den Haag 2006b



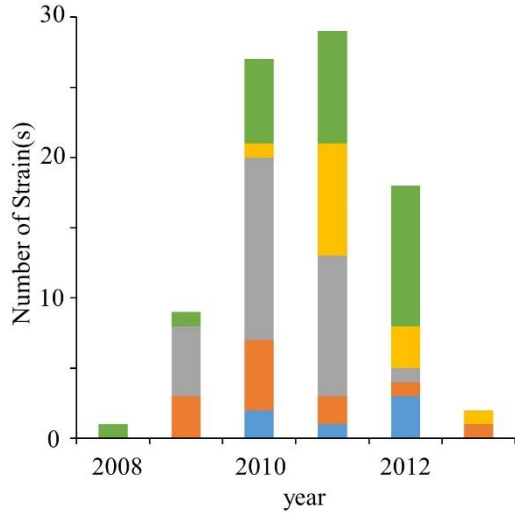
(L) Osaka 2007



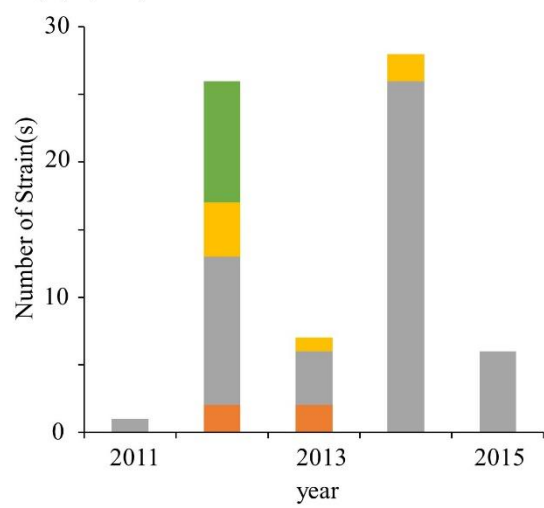
(M) Apeldoorn 2007



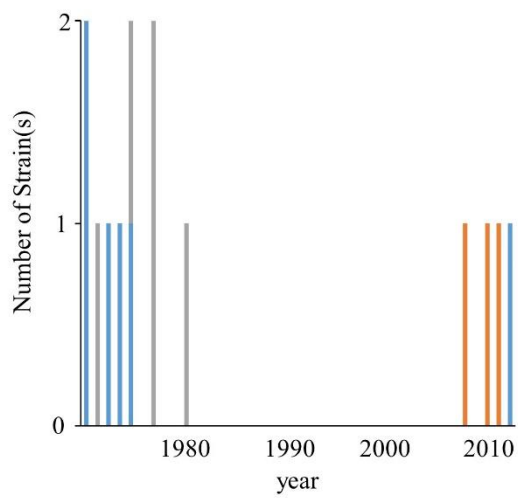
(N) New Orleans 2009



(O) Sydney 2012



(P) Not typed



図S1. 研究に使用した株の採取地域および採取年のデータ (A) GII.4 all strains; (B) Bristol 1993 variant strains; (C) Camberwell 1994 variant strains; (D) US95_96 variant strains; (E) Kaiso 2003 variant strains; (F) Farmington Hills 2002 variant strains; (G) Lanzou 2002 variant strains; (H) Asia 2003 variant strains; (I) Hunter 2004 variant strains; (J) Yerseke 2006a variant strains; (K) Den Haag 2006 variant strains; (L) Osaka 2007 variant strains; (M) Apeldoorn 2007 variant strains; (N) New Orleans 2009 variant strains; (O) Sydney 2012 variant strains; (P) Non-typed GII.4 strains. 縦軸は株数, 横軸は採取年を示した。