

東京都内で検出されたノロウイルスの遺伝子解析 (2019年度)

矢尾板 優^a, 長谷川 道弥^a, 浅倉 弘幸^a, 永野 美由紀^a, 林 志直^a, 根岸 あかね^a, 熊谷 遼太^a
河上 麻美代^a, 北村 有里恵^a, 加來 英美子^a, 長島 真美^a, 千葉 隆司^a, 貞升 健志^b

2019年度に東京都内の食中毒疑い事例でノロウイルス (NoV) が検出された96事例を対象にVP1領域における分子疫学解析を行った。解析の結果、最も多く検出されたのはGII.4Sydney_2012で、続いてGII.2, GII.17が約8割を占めていた。検出された遺伝子型のうち、GII.12, GII.21, GI.3が検出された全事例と、それ以外の遺伝子型が検出された38事例についてポリメラーゼ領域を含む解析を行ったところ、GII.12とGII.21はそれぞれGII.12[P16], GII.21[P21], GI.3はGI.3[P3]とGI.3[P13]に分類され、GII.4はGII.4[P31]とGII.4[P16]の2つのクレードに分かれていたことが判明した。

キーワード: ノロウイルス, 食中毒, 遺伝子型, VP1, ポリメラーゼ領域

はじめに

ノロウイルス (Norovirus, NoV) は、カリシウイルス科に属する一本鎖 RNA ウイルスで、冬季に発生するおう吐や下痢などの急性胃腸炎症状の主要な原因となっている。主な感染経路は経口感染で、NoV に汚染された二枚貝の喫食や、発症者の吐物の飛散による感染が知られているが、実際には感染した調理従事者の手指からの食品を介した感染が大きな割合を占めており、手洗いや消毒などの対策が求められている¹⁾。

NoVのゲノムは、ORF1, ORF2, ORF3の3つの蛋白領域で構成されている。ORF1はポリメラーゼ領域を含む非構造蛋白質、ORF2とORF3は構造蛋白質VP1とVP2をそれぞれコードしているが、VP1は抗原性に深く関与している²⁾ため、従来よりこの部位の塩基配列によって遺伝子型が決定されていた。NoVの遺伝子群はGIからGXの10種類に分類されるが、ヒト感染の主流となっているものはGIとGIIで、さらにGIは9種類、GIIは27種類の遺伝子型に細分化されている³⁾。しかし近年、ポリメラーゼ領域とVP1領域間でゲノムの組み換え (リコンビネーション) が頻繁に起こることが判明している⁴⁾。また、2014/2015シーズンにおけるGII.17のような変異株の発生は、大規模な集団食中毒事件の原因となりうるということが明らかとなっている^{5,6)}。

そのため、VP1領域における遺伝子型の解析に加えポリメラーゼ領域を含んだ分子疫学解析を行うことは、都内のノロウイルス株の流行状況の把握や、変異株の早期発見等、新たな分子疫学情報の蓄積が期待できると思われる。

そこで、2019年4月から2020年3月 (2019年度) までの間に東京都で検出されたNoVについて、VP1領域における分類と、ポリメラーゼ領域を含んだ分子疫学解析を行った結果について報告する。

実験方法

1. 供試材料

2019年4月から2020年3月までに、食中毒疑い事例として当センターに搬入された糞便検体のうち、NoV陽性となった検体を対象とした。なお、1つの事例につき陽性が複数名から検出された場合は、そのうちの2~3検体を対象とし、遺伝子増幅が見られた96事例について遺伝子解析を行った。

2. 検査方法

1) VP1領域を対象とした解析方法

糞便検体の処理については、厚生労働省通知⁷⁾に準じて行った。すなわち、検査材料にPBS (日水製薬) を加えて10%混濁液を作成、激しく混和後、3,000rpmで5分遠心を行った。その上清を採取し、4°Cで10,000rpm、20分間遠心し、上清を核酸抽出に用いた。抽出はQIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用い、抽出した核酸は、Random hexamer (Amersham Biosciences) およびSuperScript II (Invitrogen) を用いて逆転写反応を行い、cDNAを得た。PCR反応ではcDNA5 µLを用いて、ExTaq (TaKaRa) でnested PCR反応を行った。

1st PCR反応の反応条件は、94°C3分の反応後、94°C1分、55°C1分、72°Cを40回繰り返し行い、最終伸長反応は72°C15分で行った。プライマーは、GI用にCOG1F/G1SKR, GII用にCOG2F/G2SKRを用いた^{8,9)}。2nd PCRの反応条件は、94°C3分の後、94°C1分、55°C1分、72°C1分の反応を35回繰り返し、最終伸長反応は72°C15分で行った。プライマーは、GI用にG1SKF/G1SKR, GII用にG2SKF/G2SKRを用いた^{8,9)} (図1)。PCR産物はQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) で精製を行い、Big Dye X Terminator v 3.1 Cycle Sequence Kit (Applied Biosystems) によるシー

^a 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター微生物部

ケンス反応を行った。反応産物は、Big Dye XTerminator (Applied Biosystems) を用いて精製し、3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により遺伝子配列を決定した。

得られた塩基配列について、オランダ国立公衆衛生環境研究所が提供する遺伝子型分析ツールNorovirus Typing Tool Version 2.0 (<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus>) を用いて遺伝子型を決定した。

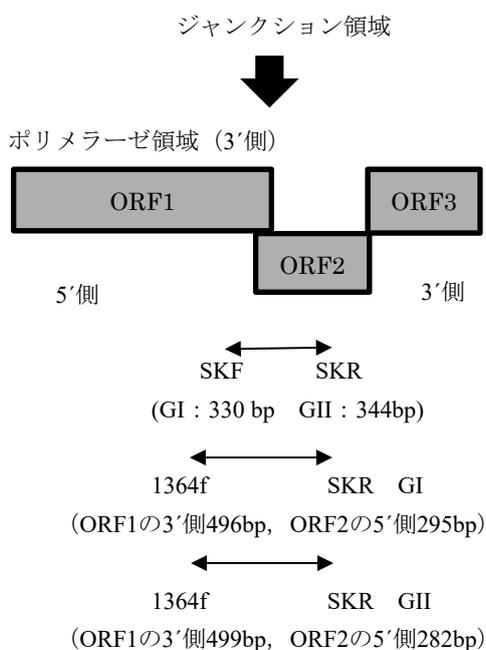


図1. ノロウイルスのシーケンス領域

2) ポリメラーゼ領域を対象とした解析方法

VP1領域を対象とした解析により型別が判明した後、都内で検出例の少ないGII.12, GII.21, GI.3が検出された全事例と、それ以外の遺伝子型が検出された38事例を対象にポリメラーゼ領域を含む遺伝子型の解析を行った。

糞便検体からの核酸抽出から遺伝子配列を得るまでの工程はVP1領域による解析と同じ方法で行い、プライマーのみ異なるものを用いた。1st PCRと2nd PCRの反応条件はVP1による解析と同じ条件で行った。プライマーは、GI用に1364f (5'-YTCYTTCTATGGYGATGATGA-3') /GISKR, GII用に1421f (5'-ATACCACTATGATGCAGAYTA-3') /NV2oR (5'-GTRAACGCRTTYCCMGC-3') を用いた¹⁰⁾。GIは1st PCR, GIIについては2nd PCRまで行い、遺伝子増幅のバンドが確認できたものを対象とした。2nd PCRのプライマーは、1364f/G2SKRを用いた¹⁰⁾(図1)。塩基配列を決定した後、Molecular Evolutionary Gene Analysis (MEGA) ver.7¹¹⁾を用いて近隣結合法による分子系統樹解析を行い、遺伝子型を決定した。

結果と考察

1. 遺伝子型検出状況 (VP1領域)

2019年4月から2020年3月までに検出されたGIとGIIそれぞれの月別の遺伝子型を表1に示す。1事例につき複数の遺伝子型が検出されたものについては、それぞれの遺伝子型に1事例ずつカウントした。複数の遺伝子型が検出された事例は8事例で、うち7事例ではカキを中心とした二枚貝の喫食が認められ、1事例については原因食が不明であったが、飲食店で海鮮料理の喫食歴があった。カキなどの二枚貝は消化管である中腸腺にノロウイルスが蓄積されていくことが知られており¹²⁾、カキによる食中毒については、複数の遺伝子型を考慮する必要がある。

1) GIIの検出状況

GIIは96事例中93事例 (96.9%) から検出され、中でも多く検出された遺伝子型は、GII.4が30事例、GII.2が24事例、GII.17が22事例で、この3つの遺伝子型だけで約8割を占めた。また、2019年度に東京都で検出されたGII.4の亜型は全てSydney_2012であった。

GII.2は、2016年度において全国的な流行が見られた型であるが¹³⁾、系統樹解析によると今回東京都で検出されたGII.2は全て2016年度流行株と高い塩基一致率 (99%) を示した。また、2016年度においては全国的に低年齢層を中心とした流行が見られたが、本年度においては一番検出数が多かった病院関連の事例を含む宴会、披露宴、修学旅行など、幅広い年齢層から検出されていた。

GII.17は全国的にも主流な株の1つであり、都内でも96事例中22事例 (約23%) 検出されたが、変異は確認されなかった。

それ以外に検出された遺伝子型は、事例数が多い順にGII.3は9事例、GII.6は6事例、GII.12とGII.21は1事例ずつであった。

GIIの陽性事例が多かった月は、年明けから年度末にかけての1月から3月の間で、宴会を含む飲食店での発生が多く見られた。また、12月の下旬には保育園など低年齢層を中心とした事例や飲食店での集団感染が多発したことにより、GII.4やGII.2をはじめとした様々な遺伝子型が検出された月となった。

2) GIの検出状況

GIはGIIに比べて検出数が少なく、14事例 (14.6%) から検出された。検出された遺伝子型は、多い順にGI.3が5事例、GI.2が3事例、GI.5とGI.7が2事例、GI.6とGI.4が1事例であった。二枚貝によるGIIとの複合感染は5事例含まれていたが、GI.3が検出された事例のうち2事例は高齢者施設における感染事例であった。

2. ポリメラーゼ領域の解析

ポリメラーゼ領域を含む遺伝子型の表記については、近年の遺伝子群と遺伝子型の分類が更新されたことに伴い、VP1領域による型別の後に[]でポリメラーゼ領域による型別を記載するように表記が変更になった³⁾。例えば、

VP1領域による型別がGII.2でポリメラーゼ領域による型別が16であった場合, **GII.2[P16]**というように表記する。

ポリメラーゼ領域を含む解析の結果, **GII.12**は**GII.12[P16]** (LC579431), **GII.21**は**GII.21[P21]** (LC578495)であった。また, **GI.3**は5事例中1事例が**GI.3[P3]** (LC576687), 4事例が**GI.3[P13]** (LC577862)であることが判明した。その他の遺伝子型は, **GII.2**が**GII.2[P16]**, **GII.17**が**GII.17[P17]**, **GII.3**が**GII.3[P12]**, **GII.6**が**GII.6[P7]**, **GI.2**が**GI.2[P2]**, **GI.5**が**GI.5[P4]**, **GI.7**が**GI.7[P7]**であった。**GII.4**については, **GII.4[P31]**と**GII.4[P16]**の2種類の遺伝子型に分類された(図2)。

GII.12[P16]が検出された事例では, 他県の関連調査として搬入され, 中華料理を喫食して発症している。この遺伝子型は, カナダのアルバータ州で2018年3月から2019年2月の間に検出され, 新規組み換え株として報告されている。

¹⁴⁾ 東京都で検出された株を系統樹による解析を行ったところ, カナダのアルバータ州で検出された株と同じクレードに属していることが分かった。新規組み換え株として報告されてからまだあまり年月が経っておらず, 日本での大流行も見られていないが, さらに変異を起こすことにより主流株に転じる可能性も否定できないことから, 今後も引き続き警戒が必要である。

今回, **GII.21[P21]**が検出された事例では, 都内の飲食店でカキを喫食して発症しており, **GI.3**や**GII.2**との複合感染が確認されている。この遺伝子型は韓国では珍しい遺伝

子型として報告されており¹⁵⁾, 日本ではこれまで埼玉県, 神奈川県川崎市で検出されている^{16,17)}。また, 愛媛県では, **ORF1**が**GII.21[P21]**と高い塩基一致率を示した新規キメラウイルス**GII.1[P21]**の検出が確認されている¹⁸⁾。2012/13シーズンの**GII.4Sydney_2012**¹⁹⁾や, 2014/15シーズンの**GII.17[P17]**^{5,6)}の出現のように, 今まで流行の主要な遺伝子型でないものが突然多く検出された場合, 組み換えによるキメラウイルスの可能性を考慮する必要がある。それらを早急に察知するためには, VP1領域に加えジャンクション領域を対象としたゲノム解析による流行状況の把握を日ごろから行っていく必要があると考えられる。

VP1領域による解析で**GI.3**に分類されたものは, **GI.3[P3]**と**GI.3[P13]**であった。**GI.3[P13]**は, ポリメラーゼ領域を含む遺伝子型の表記が変更になる前は**GI.3[Pd]**と分類されていたものであり, **GI.3[P3]**と**GI.3[P13]**のどちらの遺伝子型も少数ではあるが既に日本でも検出されている。**GI.3[P3]**は過去に2015/2016年シーズンに北海道で小学校や保育園などの低年齢層を中心に流行したことがある²⁰⁾。2014/2015年シーズンに福岡でも検出されており²¹⁾, オーストラリアやニュージーランドでは主流な遺伝子型の一つであると報告されている²²⁾。今回東京都で検出された**GI.3[P3]**は, 2014/2015年シーズンの福岡県で検出された株と同じクレードに属していたことから, ここ数年変異は起きていないと言える。

表 1. ノロウイルスの遺伝子型 (2019 年度)

遺伝子型	月												事例	ポリメラーゼ領域
	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月		
GII	4	2	1	1			1		6	7	9	3	30	P31 P16
	2	3	1	2	1	2	1	1	3	2	4	4	24	P16
	17	4			1	3	1		2	3	4	4	22	P17
	3		2	2	1				2	1	1		9	P12
	6	2		1	1	1						1	6	P7
	12								1				1	P16
	21							1					1	P21
総計	11	4	6	4	4	2	4	1	14	13	18	12	93	
遺伝子型	月												事例	ポリメラーゼ領域
	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月		
GI	3				1		1	1			1	1	5	P3 P13
	2	2		1									3	P2
	5		1								1		2	P4
	7					1					1		2	P7
	6											1	1	
	4			1									1	
総計	2		2	1	1	1	1	1			3	2	14	

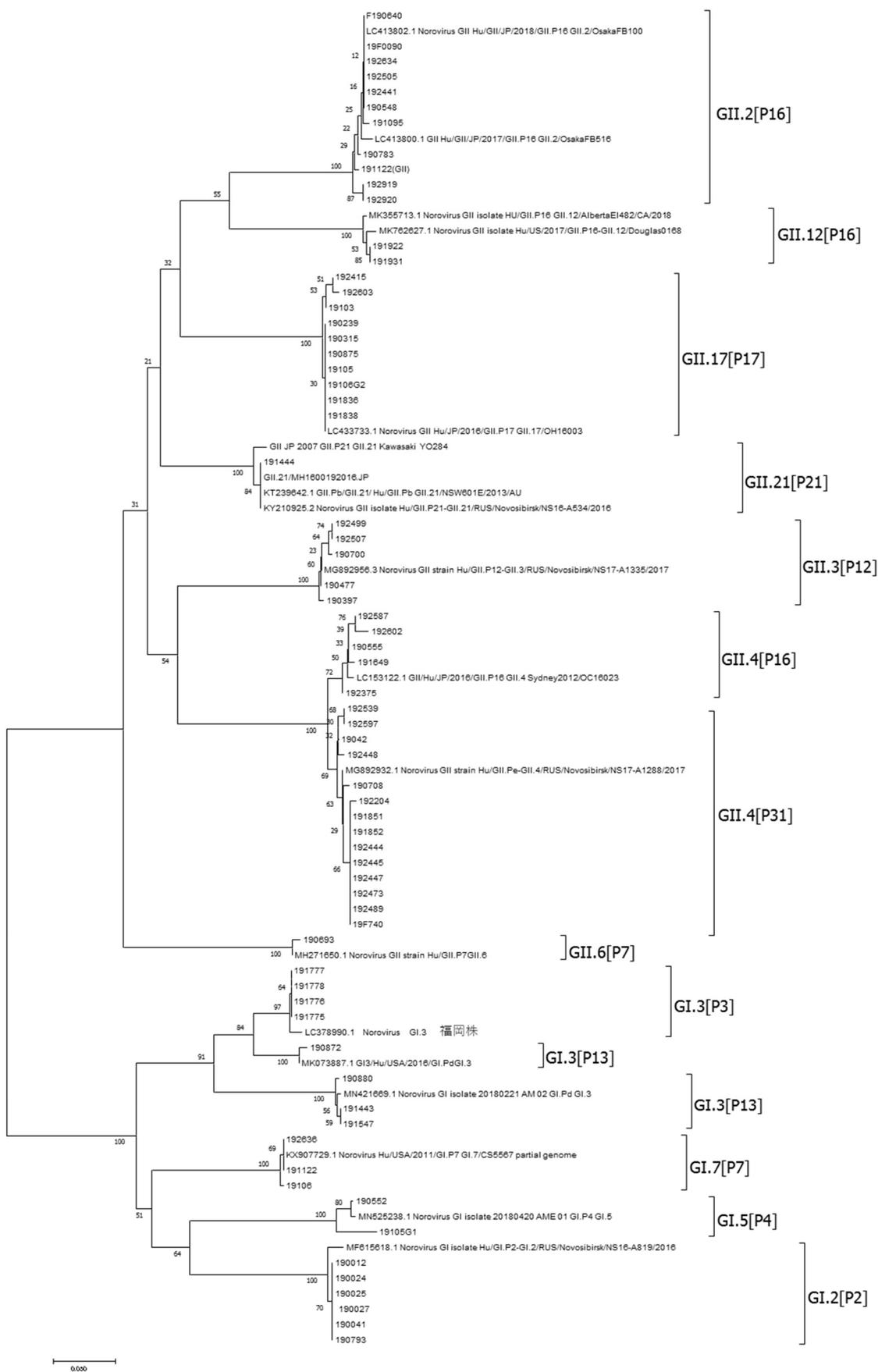


図 2. 2019 年度に検出されたノロウイルスの系統樹

ま と め

2019年度に検出されたノロウイルスの遺伝子型は、GII.4, GII.2, GII.17といった主流行株が大半を占めており、ポリメラーゼ領域の解析では、GII.12はGII.12[P16], GII.21はGII.21[P21], GI.3はGI.3[P3]とGI.3[P13]に分類された。近年では国際交流が進んだことに伴って、輸入感染症やキメラウイルスなどの変異株の発生が懸念される。新型や変異株が発生した場合、免疫が不十分な小児だけでなく、成人の間での大流行が予想されるため、流行状況を正確に把握する必要がある。ポリメラーゼ領域を含んだ解析を今後も引き続き行い、流行状況の把握に努めなければならない。

文 献

- 1) 厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生・食品安全部長：生食発0616 第1号「大量調理施設衛生管理マニュアル」の改訂について、平成29年6月16日、2017.
- 2) 木村博一, 石岡大成, 大石和徳, 他：病原微生物検出状況, **35**, 170-171, 2014.
- 3) Chhabra, P., de Graaf, M., Parra, G.I., *et al.*: *J Gen Virol.*, **100**, 1393-1406. 2019.
- 4) Bull, R.A., Hasman, G.S., Clancy, L.E., *et al.*: *Emerg Infect Dis*, **11**, 1079-1085, 2005.
- 5) 松島勇紀, 石川真理子, 清水智美, 他：病原微生物検出状況, **36**, 175-178, 2015.
- 6) Fu, J., J, Ai1., M, Jin., *et al.*: *Euro. Surveill.*, **0**, pii = 21157, 2015.
- 7) 厚生労働省医薬食品局食品全部監視安全課長：食安監発第0514004号ノロウイルスの検出法について（通知），平成19年5月14日，2007.
- 8) Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M. *et al.*: *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 1548-1557, 2003.
- 9) Kojima, S., Kageyama, T., Fukushi, S., *et al.*: *J. Virol. Methods*, **100**, 107-114, 2002.
- 10) Nakamura, K., Iwai, M., Zhang, J., *et al.*: *J Infect Dis*, **62**, 394-398, 2009.
- 11) Kumer, S., Stecher, G., Tamura, K.: *Mol. Biol. Evol.*, **33**, 1870-1875, 2016.
- 12) 野田 衛, 村田 務：食品微生物学会雑誌, **31**, 153-159, 2014.
- 13) 植木 洋, 小泉 光, 菅原直子, 他：病原微生物検出状況, **38**, 17-18, 2017.
- 14) Pabbaraju K, Wong, A.A., Tipples, G.A., *et al.*: *Emerg Infect Dis*, **25**, 1556-1559, 2019.
- 15) Lee, J.W., Lee, S.G., Cho, H.G., *et al.*: *Epidemiol Infect*, **145**, 2231-2240, 2017.
- 16) 峯岸俊貴, 富岡恭子, 鈴木典子, 他：埼衛研所報, **51**, 2017.
- 17) 松島勇紀, 石川真理子, 清水智美, 他：病原微生物検出状況, **38**, 6-8, 2017.
- 18) 山下育孝, 溝田文美, 山下まゆみ, 他：病原微生物検出状況, **38**, 9-10, 2017.
- 19) 田村 務, 渡邊香奈子, 田澤 崇, 他：病原微生物検出状況, **33**, 333-334, 2012.
- 20) 吉澄志磨, 後藤明子, 山口博美, 他：道衛研報, **66**, 69-75, 2016.
- 21) 吉富秀亮, 中村麻子, 小林孝行, 他：福岡県保健環境研究所年報, **45**, 76-79, 2018.
- 22) Lun, J.H., Hewitt, J., Sitabkhan, A., *et al.*: *Emerging Microbes Infect*, **7**, 1-14, 2018.

A Genetic Analysis of Norovirus Cases Detected in Tokyo (April 2019–March 2020)

Yu YAOITA^a, Michiya HASEGAWA^a, Hiroyuki ASAKURA^a, Miyuki NAGANO^a
Yukinao HAYASHI^a, Akane NEGISHI^a, Ryota KUMAGAI^a, Mamiyo KAWAKAMI^a, Yurie KITAMURA^a
Emiko KAKU^a, Mami NAGASHIMA^a, Takashi CHIBA^a, and Kenji SADAMASU^a

We conducted a molecular epidemiology analysis of the VP1 region in norovirus (NoV) in 96 cases of suspected food poisoning with norovirus detection in Tokyo between April 2019 and March 2020.

During the analysis, GII.4Sydney_2012 was the most frequently detected genotype, followed by GII.2 and GII.17. These three genotypes accounted for about 80% of all cases. The polymerase region in the viral genome of the cases with identified GII.12, GII.21, or GI.3 genotype and 38 cases with other genotypes were analyzed. The GII.12 and GII.21 cases were classified into clade GII.12[P16] and GII.21[P21]. The GI.3 cases were classified into clades GI.3[P3] and GI.3[P13]. And GII.4 was divided into clades GII.4 [P31] and GII.4 [P16].

Keywords: norovirus, food poisoning, genotype, VP1, polymerase region

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjyuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan