

2020年度の東京都内食中毒事例におけるノロウイルスの遺伝子解析

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, 林 真輝^a, 山崎 貴子^a, 北村 有里恵^a, 加来 英美子^a, 藤原 卓士^a, 三宅 啓文^a, 長島 真美^a,
千葉 隆司^a, 鈴木 淳^a, 貞升 健志^b

2020年度に、東京都内で食中毒疑い事例として搬入され、ノロウイルス（NoV）が検出された19事例の糞便検体を対象に、VP1領域とポリメラーゼ領域の2領域を含むNoVの分子疫学解析を行った。その結果、GIが6事例、GIIが12事例、GIとGIIどちらも検出されたのは1事例であった。検出されたNoVの遺伝子型は、事例数の多い順に、GII.2[P16]が8事例、GII.17[P17]が4事例、GI.6[P11]が4事例、GI.7[P7]が2事例、GI.4[P4]とGII.4Sydney[P31]が1事例ずつであった。今回の解析結果を2019年度と比較したところ、検体搬入数は52.9%減少し、新型コロナウイルス感染症流行下であった2020年度のNoVの検出状況は、2019年度とは異なる傾向を見せた。また、GII.2[P16]、GII.17[P17]、GII.4Sydney[P31]、GI.6[P11]、GI.7[P7]に分類された検体のうちそれぞれ1~2検体について次世代シーケンサー（NGS）による解析を行ったところ、98.0%以上の相同性を示す株が国内または海外で検出されていた。

キーワード：東京都、ノロウイルス、食中毒、遺伝子型、ポリメラーゼ領域、次世代シーケンサー、NGS

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、主に冬季に発生する嘔吐や下痢などの急性胃腸炎症状の主要な原因である。主な感染経路は経口感染で、NoVが蓄積した二枚貝の喫食や発症者の吐物の飛散による感染も知られているが、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、3つの蛋白質コード領域（Open reading frame：ORF）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は構造蛋白質VP1（カプシド領域）、ORF3は構造蛋白質VP2をコードしている。特にVP1は抗原性に深く関与していると報告²⁾されており、従来よりこの領域の塩基配列によって遺伝子型が決定されてきた。しかし近年、ORF1とORF2のジャンクション領域で遺伝子組み換え（リコンビネーション）が頻繁に起こることが明らかとなっている³⁾。2016年度にはリコンビネーションによって生じた可能性のあるGII.2[P16]が、国内で小児を中心とした大流行を引き起こした例もあり⁴⁾、このような変異株の出現が、大規模な集団食中毒事件の原因となることが危惧されている。

2019年にNoVの遺伝子群はGIからGXの10種類に分類され、その中でヒト感染の主流となっているものはGIとGIIであるが、リコンビネーションを踏まえてGIはさらに10種類、GIIは27種類の遺伝子型に細分化された⁵⁾。

今回、東京都内で2020年度（2020年4月から2021年3

月）にNoVが検出された食中毒疑い事例についてVP1領域とポリメラーゼ領域の接合領域を含む領域について系統樹解析を行い、2019年度の結果⁶⁾とそれぞれ比較した。さらに、今回の解析でGII.2[P16]、GII.17[P17]、GII.4Sydney[P31]、GI.6[P11]、GI.7[P7]に分類された検体のうち1~2検体について次世代シーケンサー（NGS）による全長解析を行い、相同性検索を行ったのでその結果を報告する。

実験方法

1. 供試材料

2020年4月から2021年3月までに、食中毒疑い事例で当センターに搬入された141事例（1,825検体）の糞便検体のうち、NoV陽性となった全19事例（161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検体を解析対象とした。

2. 検査方法

1) VP1領域とポリメラーゼ領域を含む遺伝子型別と分子系統樹解析

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℃で10,000rpm、20分間遠心し、上清を核酸抽出に用いた。QIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN）で核酸抽出を行い、Random hexamer（Amersham Biosciences）およびSuperScript II（Invitrogen）を用いて逆転写反応を行った。得られたcDNA 5 µLを用いて、

^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

ExTaq (TaKaRa) にてnested PCR反応を次の通り行った。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のサイクルを40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1364f (5'-YTC YTTCTATGGYGATGATGA-3') /G1SKR (遺伝子産物約700bp) またはMon432/G1SKR (遺伝子産物579bp)、GII用に1421f (5'-ATACCACTATGATGCAGAYTA-3') /NV2oR (5'-GTRAACGCRTTYCCMGC-3') またはMon431/G2SKR (遺伝子産物570bp) を用いた⁸⁾。GIIで1421f /NV2oRを用いたものについては、1364f/G2SKRのプライマー (遺伝子産物約700bp)^{8,9)}を用いた2nd PCR反応を、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。PCR産物はQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) で精製を行い、Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequence Kit (Applied Biosystems) によるシーケンス反応を行った。反応産物は、Big Dye X Terminator (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、遺伝子解析用ソフトウェアMEGA ver.7¹⁰⁾を用いて近隣結合法 (NJ法) による分子系統樹解析を行った。なお、ポリメラーゼ領域を含む遺伝子型の表記については、Chhabraらの報告⁵⁾に従い、VP1領域による型別の後に[]内にポリメラーゼ領域による型別を記載した。

2) 次世代シーケンサー (NGS) 解析

ポリメラーゼ領域を含む遺伝子解析により、GII.2[P16]、GII.17[P17]、GII.4Sydney [P31]、GI.6[P11]、GI.7[P7]に分類されたものの中からそれぞれ1~2検体を抽出し、次世代シーケンサー (NGS) による解析を行った。ライブラリー作成には臨床検体のRNAを用い、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) にて抽出した。NGSのライブラリー作成にはNEB Next Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB) を用い、MiSeq (Illumina) を使用してデータを取得した。得られた遺伝子配列は、NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) にて相同性検索を行った。

結 果 と 考 察

1. 遺伝型検出状況

2020年度の検体搬入数は1,825検体で、2019年度の3,875検体と比較して、検体搬入数は52.9%、NoVの検出事例数は82.1%減少した。また、2020年度にNoVが検出された食中毒事例では、数十人規模のイベントや宴会などでの感染事例はみられず、10人以下の少人数での会食や旅行、テイクアウト等の小規模な感染事例であった。この間に食中毒疑い事例として搬入された141事例中、NoVが検出された

のは19事例 (13.5%) であり、その内訳は、GIが6事例 (31.6%)、GIIが12事例 (63.2%)、GIとGII両方検出された事例は1事例 (カキの喫食によるもの) であった。

VP1領域とポリメラーゼ領域を含む遺伝子解析の結果、GII.2[P16]が8事例 (42.1%)、GII.17[P17]とGI.6[P11]が各4事例 (21.1%)、GI.7[P7]が2事例 (10.5%)、GI.4[P4]とGII.4Sydney[P31]が各1事例 (5.3%) であった (図1A, B)。

GII.2[P16]が検出された事例では、8事例中、保育園や児童福祉施設での感染が4事例、それ以外の4事例は旅行、ケータリング、デリバリーでの感染事例であった。GII.2[P16]は2016年度に小児を中心に全国的な流行が見られた遺伝子型であった⁵⁾が、ポリメラーゼ領域とVP1領域での系統樹解析 (NJ法) によると、今年度検出されたGII.2[P16]は2016/2017年シーズンに東京都で検出された株と同じクレードに属した (図1A)。また、2020年のGII.2[P16]は、2016年のアメリカで検出された株 (KY865306) と高い相同性が認められた (表1)。

次に多く検出されたGII.17[P17]は、2014/2015年シーズン以降全国的に流行を続けている株の1つであり^{11,12)}、2020年度の東京都ではテイクアウト、仕出し弁当を含む飲食店での事例で検出されていた。NJ法による系統樹解析の結果、2020年度に検出された株は2016年度流行株と同じクレードに属し、2019年度と同様で大きな変異は見られなかった。また、都内でテイクアウトの事例にて検出されたGII.17[P17]の株は、NGS解析の結果、2016年度に東京都、刻みのりによる食中毒事件¹³⁾で検出された株 (LC258403) と99.5%の相同性を示した (表1)。

2019年度は、96事例中30事例からGII.4が検出され、GII.4Sydney[P31]とGII.4Sydney[P16]の2種類の遺伝子型に分類されていたが⁹⁾、2020年度は19事例中1事例からのみ検出され、遺伝子型はGII.4Sydney[P31]であった。今回小規模の宴会で検出されたGII.4Sydney[P31]は、2015年に大阪で検出された株 (LC066046) のほか、2012年に秋田県や広島県で検出された株 (秋田: AB972470, 広島: AB972494) とともに全ゲノム解析で98%以上の相同性を示した (表1)。GII.4Sydneyは、2012年に出現して以来、毎年検出される主流株の1つである¹⁴⁾。GII.4は、2002年以降、新しい亜型を2~3年ごとに出現させ、世界的大流行を引き起こしてきた¹⁴⁻¹⁷⁾。このため、いつ新たな亜型が出現してもおかしくない状態と考えられており、近年ではGII.4 Hong Kong型という新しい亜型が、アジアやヨーロッパで確認されている¹⁸⁾。すべてのGII.4の亜型が世界的大流行を引き起こすとは限らないが、今後このGII.4 Hong Kong型が、あるいはGII.4が変異することで新たに生じた亜型が、世界的大流行を引き起こす原因となることが懸念される。GII.4が今後どのように変異していくのかについて、東京都においても監視を続けていく必要がある。

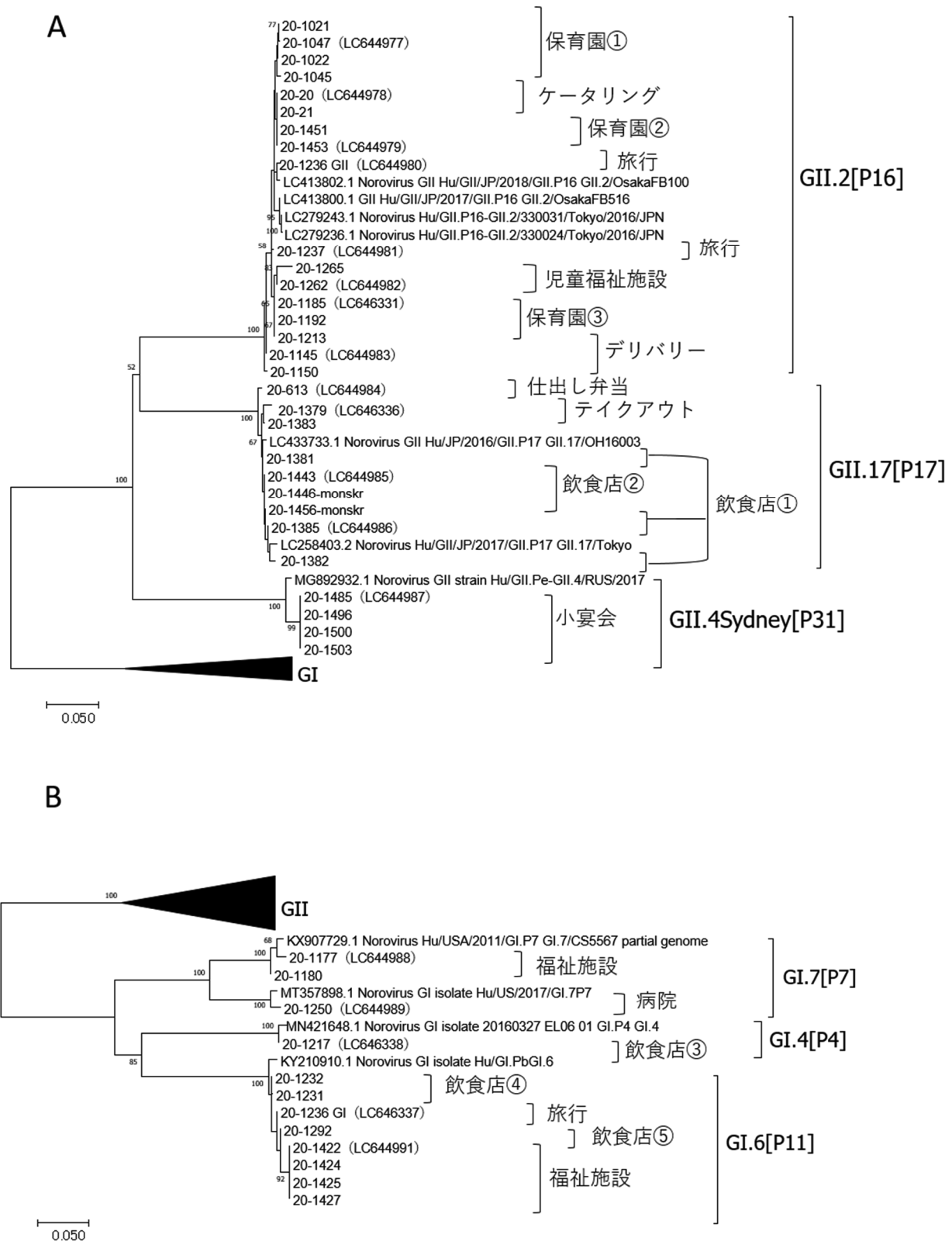


図1. 2020年度に東京都内で検出されたノロウイルスの系統樹解析 (NJ法)

表1. 2020年度に東京都内で検出されたノロウイルスのゲノムデータと相同性の高い登録株

	東京都で検出された事例 (Accession No)	相同性 (%)	高い塩基一致率を示した株 (検出地域、年)
GII.2[P16]	保育園① (LC646333)	99.1	KY865306 (USA 2016年)
	保育園③ (LC646332)	98.9	
GII.17[P17]	テイクアウト (LC644992)	99.5	LC258403 (東京 2017年)
GII.4Sydney[P31]	宴会 (LC644993)	98.4	LC066046 (大阪 2015年)
		98.1	AB972470 (秋田 2012年)
		98.1	AB972494 (広島 2012年)
GI.6[P11]	飲食店④ (LC646339)	98.0	MT357996 (USA 2018年)
GI.7[P7]	福祉施設 (LC646334)	99.0	MT008459 (中国 2018年)
		98.7	KX907729 (USA 2011年)
	病院 (LC646335)	98.6	MT357898 (USA 2017年)

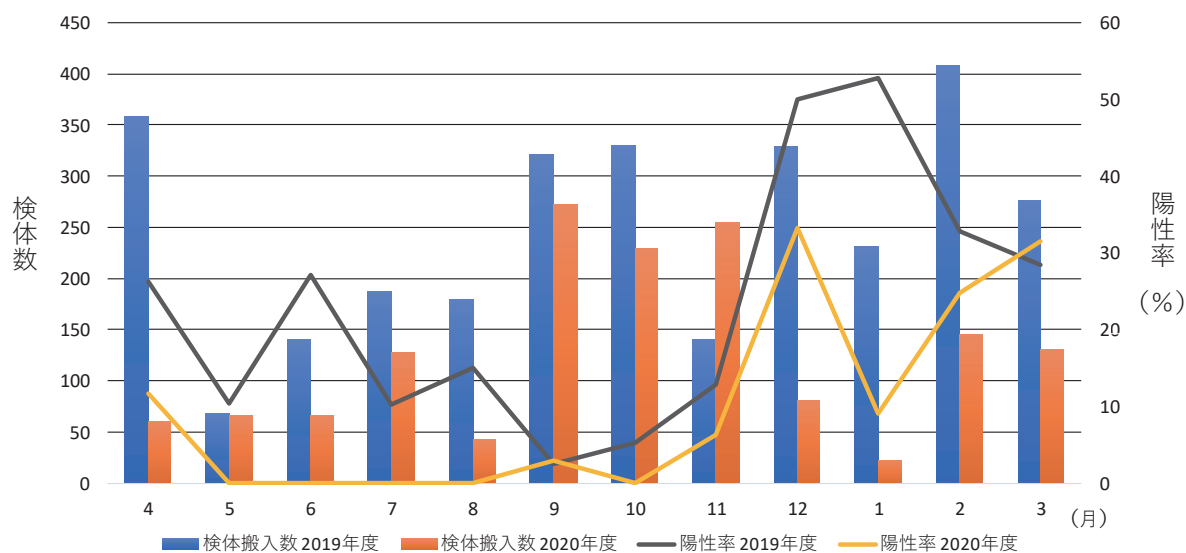


図2. 東京都に搬入されたノロウイルス検査検体数と陽性率 (2019～2020年度)

GI.6[P11]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.6[Pb]と分類されていたもので、少数ではあるが日本でも既に報告されている^{19,20)}。2020年度の東京都では、福祉施設や飲食店等の事例で検出された。

GI.7[P7]は、2020年度には2事例から検出されたが、NGS解析の結果、うち1事例は2011年のアメリカで検出された株(KX907729)と、もう1事例は2017年に、同じくアメリカで検出された株(MT357898)と高い相同性を示し、これらは別のクレードに属した(図1, 表1)。

2. 月ごとのNoV検出事例数

2020年度と2019年度に食中毒疑い事例として当センターに搬入された検体数と、NoVの陽性率を比較したものを図2に示す。2019年度は、4月と、12月から3月にかけてNoVが多く検出され、特に12月と1月は陽性率が一番高くなっていた。しかし2020年度は、5月から8月までNoVは全く検出されず、11月以降になって徐々に検出されるようになったものの、2020年度の陽性率が2019年度を上回った月は9月と3月のみであった。また、2019年度と2020年度を比較すると、特に4月と年末年始には検体搬入数の差が大きくなっていたが(図2)、2020年度は新型コロナウイルス感染症の流行により、4月と年明けの1月に緊急事態宣言が発令され、外出自粛や飲食店の営業時間短縮が行われた。これにより、宴会やイベント等の開催が例年と比べて少なかったことが、検体数と陽性率が減少した原因の1つと考えられる。2020年度にNoVが検出された事例が、少人数での会食や旅行、テイクアウトによるものであった理由も、外出自粛等が影響している可能性がある。一方で、緊急事態宣言の影響を受けにくい福祉施設や病院での感染事例や、保育園の事例は少ないながらも2020年度にも起きていた。

ま と め

2020年度にNoVが陽性となった全ての事例についてポリメラーゼ領域とVP1領域の2領域での分子疫学解析を行った。その結果、一番多く検出されたのはGII.2[P16]で、従来の主流株であったGII.4が検出された事例は1事例のみであった。また、今回の解析でGII.2[P16]、GII.17[P17]、GII.4Sydney[P31]、GI.6[P11]、GI.7[P7]に分類された検体のうちそれぞれ1~2検体についてNGSによる解析を行ったところ、過去に日本、または海外で検出された株と98.0~99.5%の高い相同性を示していたことが判明した。

2020年度は、2019年度と比較してNoVが検出された事例数は82.1%、検体搬入数は52.9%減少した。これは、2020年度の新型コロナウイルス流行による緊急事態宣言の影響でNoVの感染の機会が減少したものと考えられた。しかしながら、コロナ禍の緊急事態宣言の影響を受けにくい福祉施設や保育園等での感染事例は発生していたことから、福祉施設や保育園などの高リスク施設でのNoV感染予防には十分な注意が求められる。

新たな亜型の出現に備え、国内のみならず、海外での流

行状況の把握や、ポリメラーゼ領域とVP1領域の2領域での解析を引き続き継続する必要がある。

文 献

- 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.
- 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.
- Bull, R.A., Hasman, G.S., Clancy, L.E., *et al.*: *Emerg. Infect. Dis.*, **11**, 1079-1085, 2005.
- 植木 洋, 小泉 光, 菅原直子, 他：病原微生物検出状況, **38**, 17-18, 2017.
- Chhabra, P., de Graaf, M., Parra, G.I., *et al.*: *J. Gen Virol.*, **100**, 1393-1406, 2019.
- 矢尾板 優, 長谷川道弥, 浅倉弘幸, 他：東京健安研セ年報, **71**, 91-96.
- 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長：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.
- Nakamura, K., Iwai, M., Zhang, J., *et al.*: *J. Infect. Dis.*, **62**, 394-398, 2009.
- Cannon, J.L., Barclay, L., Collins, N.R., *et al.*: *J. Microbiol.*, **62**, 394-398, 2009.
- Kumer, S., Stecher, G., Tamura, K.: *Mol. Biol. Evol.*, **33**, 1870-1875, 2016.
- Fu, J., J, Ail., M., Jin., *et al.*: *Euro. Surveill.*, **20**, 21157, 2015.
- Matsushima Y., Ishikawa M., Shimizu T., *et al.*: *Euro Surveill.*, **20**, 21173, 2015.
- 宗村佳子, 木本佳那, 小田真悠子, 他：食衛誌, **38**, 260-267, 2017.
- 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.
- Siebenga, J.J., Vennema, H., Zheng, D.P., *et al.*: *J. Virol.*, **20**, 802-812, 2009.
- Siebenga, J.J., Vennema, H., Renckens, B., *et al.*: *J. Virol.*, **81**, 9932-9941, 2007.
- Eden, J.S., Tanaka, M.M., Boni, M.F., *et al.*: *J. Virol.*, **87**, 6270-6282, 2013.
- Chan, C.C., Roy, S., Bonifacio, J., *et al.*: *Emerg. Infect. Dis.*, **27**, 289-293, 2021.
- 峯岸俊貴, 富岡恭子, 鈴木典子, 他：埼衛研所報, **51**, 92-95, 2017.
- 吉澄志磨, 後藤明子, 山口博美, 他：道衛研報, **66**, 69-75, 2016.

A Genetic Analysis of Norovirus Food Poisoning Cases Detected in Tokyo (April 2020–March 2021)

Yu YAOITA^a, Michiya HASEGAWA^a, Hiroyuki ASAKURA^a, Miyuki NAGANO^a

Yukinao HAYASHI^a, Akane NEGISHI^a, Ryota KUMAGAI^a, Mamiyo KAWAKAMI^a, Masaki HAYASHI^a,
Takako YAMAZAKI^a, Yurie KITAMURA^a, Emiko KAKU^a, Takushi FUJIWARA^a, Hirofumi MIYAKE^a, Mami NAGASHIMA^a,
Takashi CHIBA^a, Jun SUZUKI^a and Kenji SADAMASU^a

We conducted a molecular epidemiological analysis of 19 cases in which norovirus (NoV) was detected in the fecal samples of individuals with suspected food poisoning in Tokyo from April 2020 to March 2021. Sequencing analysis was performed in VP1 and the polymerase region of NoV.

GI was detected in 6 cases, GII in 12 cases, and both GI and GII were detected in 1 case. The genotypes of NoV GI and GII were GII.2 [P16] in 8 cases, GII.17 [P17] in 4 cases, and GI.6 [P11] in 4 cases; GI.7 [P7], GI.4 [P4], and GII.4Sydney [P31] were in 1 case each. GII.4 was the Sydney_2012 type that was most frequently detected in the previous season (April 2019–March 2020). The detection status of NoV from April 2020 to March 2021 under the COVID-19 pandemic showed a different trend from that of the previous season. The number of specimens of suspected food poisoning also decreased by 52.9% from the previous season.

In addition, one or two samples classified as GII.2 [P16], GII.17 [P17], GII.4 Sydney[P31], GI.6 [P11], and GI.7 [P7] were analyzed using next-generation sequencing (NGS), which revealed that these genotypes showed an homology of 98.0% or greater to previously detected strains in Japan or overseas.

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

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