

2014/15 シーズンにおけるノロウイルス GⅡ/11 の流行

藤井 慶樹 則常 浩太 加藤 寛子*¹ 瀧口 由佳理*¹
 八島 加八 山本 美和子 京塚 明美 石村 勝之
 野田 衛*²

2014/15 シーズンに広島市で発生した食中毒や有症苦情事例の患者便から検出されたノロウイルス (NoV) GⅡ の遺伝子型を解析した結果、本市では過去に検出例のない NoV GⅡ/11 が多数を占めた。また、生カキから検出された NoV GⅡ の遺伝子型を調べた結果、2015 年 1 月以降に採取された生カキから NoV GⅡ/11 が多く検出された。これらのことから、市中での NoV GⅡ/11 の流行とカキにおける同ウイルスの汚染との関連が示唆された。患者便由来 NoV GⅡ/11 4 株について、オランダ国立公衆衛生環境研究所 (RIVM) が提供する遺伝子型分類ツールを用いて型別を行った結果、ORF1 領域、ORF2 領域ともに GⅡ.17 と分類された。

キーワード： NoV GⅡ/11 (GⅡ.17), 食中毒, 有症苦情, 生カキ, 遺伝子型分類ツール

はじめに

2014/15 シーズンの広島市におけるノロウイルス (NoV) 流行の特徴として、2012/13 及び 2013/14 シーズンの 2 シーズンにおいて大流行した NoV GⅡ/4 Sydney2012 亜型はほとんど検出されず、過去に本市では検出例のない NoV GⅡ/11 が食中毒や有症苦情事例等から多数検出されたことが挙げられる。

NoV は下水等を介して海域に流入し、カキ等の二枚貝に蓄積されると考えられている¹⁾⁻⁴⁾。今回、市中での NoV GⅡ/11 の流行と生カキからの NoV 検出状況に相関性が認められるかを調べた。また、検出された NoV GⅡ/11 の遺伝子解析結果についても併せて報告する。

ポリエチレングリコール (PEG) 沈殿法による濃縮を行った。沈渣に精製水 500 μ l を加え再浮遊させた後、再浮遊液 140 μ l から QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いてウイルス RNA を抽出し、得られた RNA 液から High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ABI) を用いて逆転写を行い、cDNA を合成した。semi-nested PCR は、1st : COG2F/G2SKR, 2nd : G2SKF/G2SKR のプライマー組を用いて行い、得られた PCR 産物を 2% アガロースゲルにより電気泳動し、約 350bp の明瞭な増幅バンドが認められた場合を NoV GⅡ 陽性と判定した。

カキは複数の異なる遺伝子型の NoV に汚染されていることが多いため⁵⁾⁻⁷⁾、PCR 増幅産物を ExoSAP-IT (Affymetrix) により精製後、Mighty TA

方 法

1 生カキからの NoV GⅡ 検出

2014 年 11 月から 2015 年 3 月までの期間に、厚生労働科学研究の一環として購入した生カキ 10 検体を検査材料とした。検査に供試した生カキの詳細を表 1 に示した。

カキの中腸腺を剥き出し、PBS(-) 及び α -アミラーゼ粉末を加え、ストマッカー処理により 10% 乳剤を作成後、37℃ で 1 時間消化した。その後、10000rpm, 20 分の粗遠心を行い、上清を採取後、

表 1 供試した生カキ

購入年	加工 月日	用途	検体番号
2014	11/26	加熱調理用	3140010oy2
	12/10		3140011oy2
	1/14		3150001oy2
2015	1/21		3150002oy2
	2/4		3150003oy2
	2/18		3150004oy2
	2/25		3150005oy2
	3/4		3150006oy2
	3/11		3150007oy2
	3/16		3150008oy2

*1：現 衛生研究所環境科学部

*2：国立医薬品食品衛生研究所

-cloning Kit (TaKaRa) を用いた TA クローニングを実施した。カキ 1 検体につき、3~4 クローンを単離し、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI) を用いて、サイクルシーケンスを行い、BigDye XTerminator Purification Kit (ABI) で精製後、3500 Genetic Analyzer (ABI) により、個々のクローンの塩基配列を決定した。塩基配列の解析はフリーソフトの MEGA5 を使い、ClustalW によるアライメント後、Neighbor-joining 法による系統樹解析により、NoV GII の遺伝子型分類を行った。

2 NoV GII/11 の遺伝子解析

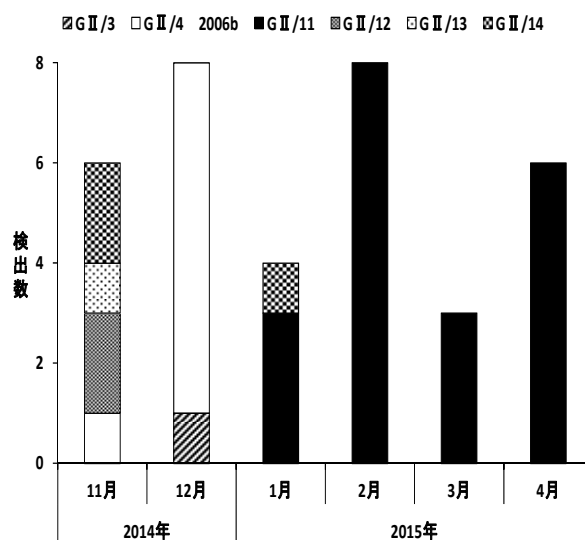
2014/15 シーズンに広島市で発生した食中毒、有症苦情事例において、患者便から検出された NoV GII/11 4 株について、詳細な遺伝子解析を行った。すなわち、P1⁸⁾/G2SKR プライマーを用いて、ORF1 のポリメラーゼ領域から ORF2 の S 領域にかけての遺伝子領域を増幅し、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。得られた塩基配列をオランダ国立公衆衛生環境研究所 (RIVM) が提供する遺伝子型分類ツール (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>) にアップロードし、新規遺伝子型別分類に基づいた ORF1 及び ORF2 領域それぞれの遺伝子型を決定するとともに、系統樹解析を実施した。

なお、検体に含まれる NoV の RNA 量が少ない場合は、P1/G2SKR プライマーを用いた ORF1~ORF2 にかけての遺伝子領域の増幅が良好でないため、カキから検出された NoV GII/11 については実施していない。

結 果

1 2014/15 シーズンの食中毒、有症苦情、散発の胃腸炎からの NoV GII 検出状況

2014/15 シーズンに広島市で発生した食中毒事例、有症苦情事例、散発の胃腸炎事例において、患者便 34 検体から NoV GII が検出された。最も多く検出された遺伝子型は GII/11 の 20 株で全体の 58.8% を占めた。以下、GII/4 2006b 8 株、GII/14 3 株、GII/12 2 株、GII/3 と GII/13 が各 1 株であった。遺伝子型別検出状況をみると (図 1)、NoV GII は 2014 年 11 月から検出され始めたが、11 月は特定の遺伝子型に偏ることなく、GII/4 2006b、GII/12、GII/13、GII/14 の 4 種類の遺伝子型が検出された。12 月には、GII/4 2006b 亜型による集団食中毒が発生し、検出 GII の多くを占めた。2015 年 1 月以降は、1 月の GII/14 の 1 例を除き、GII



*複数の遺伝子型の重複検出例も含む

図1 患者便からのNoV GII の遺伝子型別検出状況 (2014/15 シーズン, 広島市)

/11 のみが検出される状況 (21 例中 20 例) となり、4 月まで検出が続いた。

2 カキから検出された NoV 遺伝子型

カキから検出された NoV GII の遺伝子型の内訳とそれらの系統樹解析の結果をそれぞれ表 2、図 2 に示した。2014 年に購入した 2 検体 (3140010oy2, 3140011oy2) については、PCR の結果、増幅バンドが薄かったため、クローニングは実施していないが、その他の 8 検体については、各検体につき、3~4 クローンを単離し、遺伝子型を決定した。2015 年 1 月中旬に加工されたカキ (3150001oy2) において、3 クローン中 1 クローンから GII/11 が検出され、これ以降に加工されたカキ (3150002~8oy2)

表 2 カキから検出された NoV GII の遺伝子型

検体番号	クローン数	遺伝子型		
		GII/11	GII/3	GII/4 Sydney2012
3150001oy2	3	1	1	1
3150002oy2	4	4		
3150003oy2	4	4		
3150004oy2	4	4		
3150005oy2	4	3		1
3150006oy2	4	4		
3150007oy2	4	4		
3150008oy2	4	4		

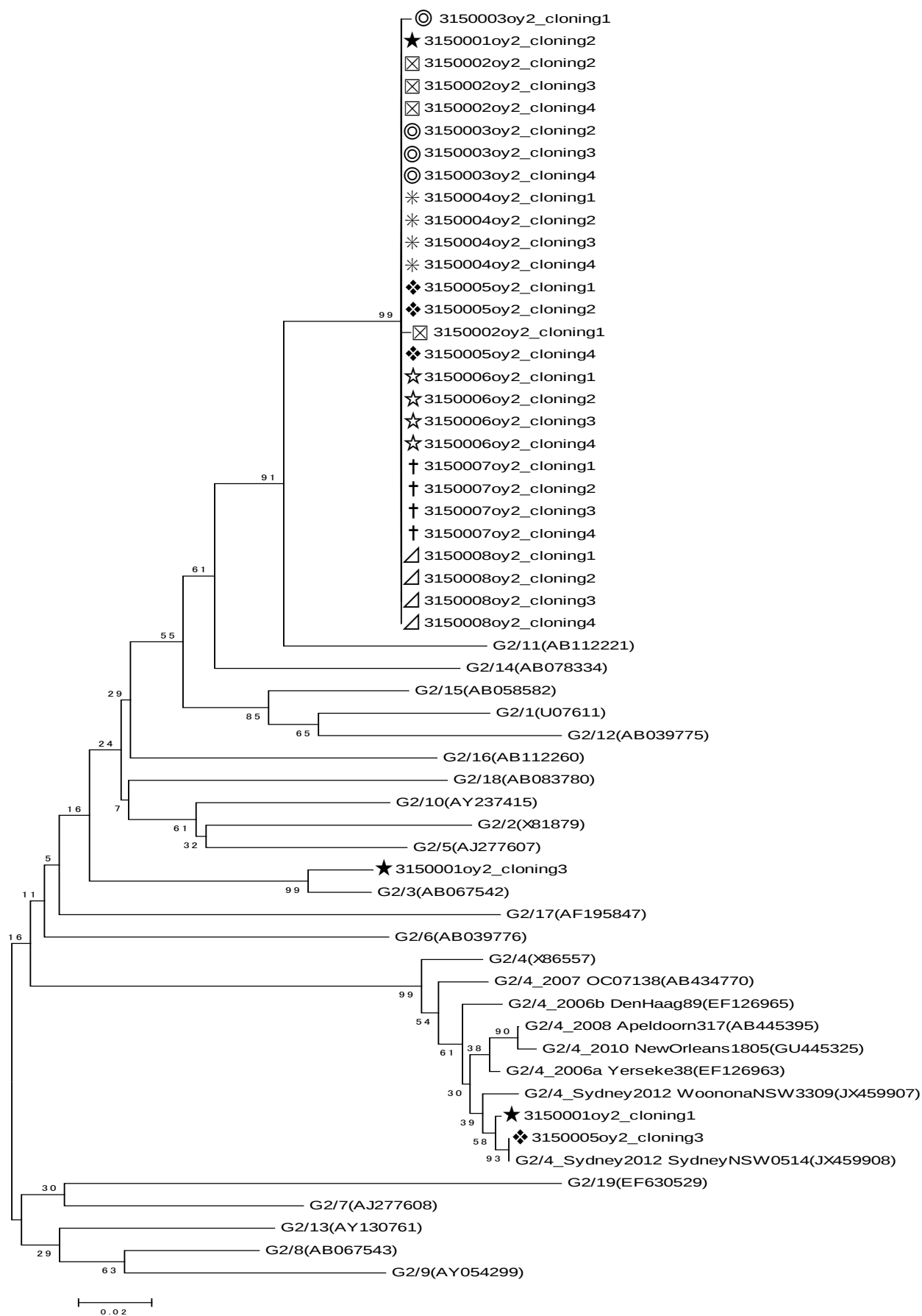


図2 カキから検出された NoV GII の系統樹 (N/S 領域 264nt)

においては、28 クローン中 27 クローンから GⅡ/11 が検出された。系統樹解析では、検出された 28 株の GⅡ/11 クローンのうち、2 株で N/S 領域に 1 塩基の違いが認められたが、それ以外の 26 株では N/S 領域の塩基配列は 100% 一致した。

3 患者便由来 GⅡ/11 とカキ由来 GⅡ/11 の比較

カキから検出された NoV GⅡ/11 と食中毒、有症苦情、散発の胃腸炎事例で患者便から検出された同遺伝子型の NoV との比較を系統樹解析により行った。患者便由来 GⅡ/11 20 株のうち 8 株の N/S 領域における塩基配列は、カキから検出された GⅡ/11 クローンの中で最も検出数の多かった 26 株の塩基配列と 100% 一致した(図 3)。

4 ポリメラーゼ領域からカプシド領域にかけての遺伝子解析と遺伝子型分類ツールを用いた型別結果

患者便から検出された 4 株の NoV GⅡ/11 (2150218F, 2150220F, 2150704F, 2150705F) について、ORF1 (ポリメラーゼ領域)～ORF2 (N/S 領域) 約 930bp の領域を PCR 増幅し、塩基配列を決定した。得られた塩基配列について、RIVM が提供する遺伝子型分類ツールを用いて、新規遺伝子型別分類を行った。その結果、ORF1 のポリメラーゼ領域、ORF2 の N/S 領域ともに GⅡ.17 と分類された。これらの 4 株について、遺伝子型分類ツールによる新規遺伝子型別法で使用されている参照株の塩基配列を用いて、ポリメラーゼ領域、N/S 領域における系統樹解析を行った。解析した 4 株は、ポリメラーゼ領域(図 4)では、GⅡ.17 の参照株 (Acc No. AB983218 及び LC037415) との相同性は 98.0～99.7% であった。一方、N/S 領域(図 5)では、GⅡ.17 の参照株 (Acc No. AY502009 及び DQ438972) との相同性は 88.2～89.4%、参照株 (Acc No. AB983218 及び LC037415) との相同性は 99.0～99.5% であった。

考 察

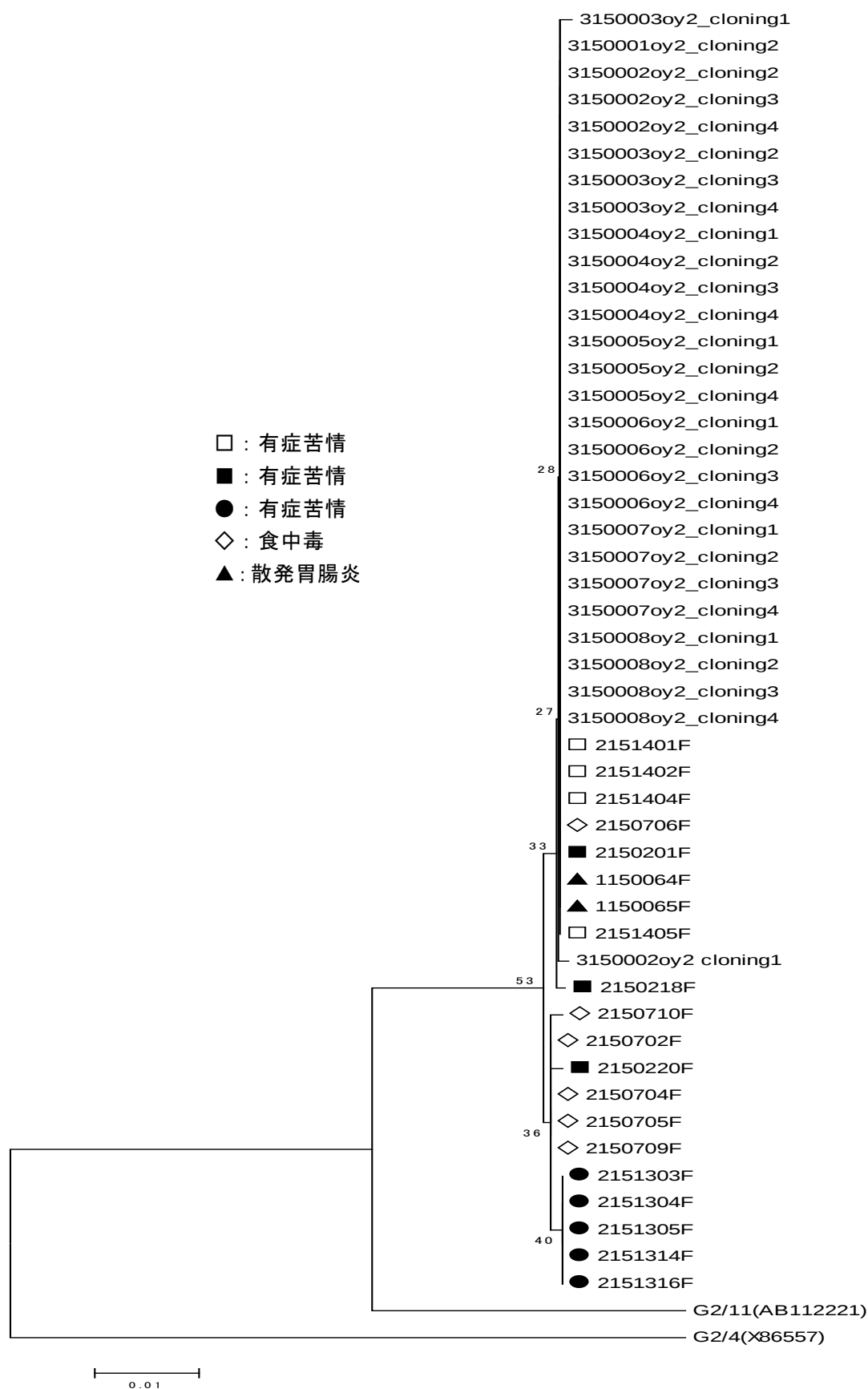
2014/15 シーズンの広島市における NoV 流行の特徴は、過去に本市では検出例のない NoV GⅡ/11 が突如として出現し、2015 年の 1 月から 4 月にかけて多数検出されたことである。NoV GⅡ/11 による食中毒や有症苦情等の事例が多発した背景には、市中での潜在的な NoV GⅡ/11 の蔓延があったものと推察された。一方、NoV は下水等を介して海域に流入し、カキ等の二枚貝に蓄積されると考えられていることから、生カキから検出される NoV GⅡの遺伝子型の推移を調査した。カキは複数の遺

伝子型の NoV による汚染が想定されることから、PCR 産物のクローニングを行い、遺伝子型別の検出状況を調べたところ、31 クローン中 28 クローン (90%) から NoV GⅡ/11 が検出された。2014 年の 11 月、12 月に加工されたカキでは NoV GⅡの PCR 増幅バンドが薄く、解析はできなかったが、食中毒、有症苦情事例等からの NoV GⅡ/11 の検出が増加した 2015 年 1 月以降、それと密接に関連するように同時期に加工されたカキからもほぼ NoV GⅡ/11 のみが検出された。このことから、2014 年の年末頃にはすでに NoV GⅡ/11 が流行していた可能性が示唆された。

従来、我が国では、NoV の遺伝子型別は Capsid N/S 領域の約 300 塩基の配列を用いた分類(従来法)が主に行われてきた。従来法で利用される遺伝子領域は PCR による増幅も良好で、簡便に遺伝子型分類を行うことができるため、汎用性は優れている。しかし、比較的多様性の低い領域であることから、点変異の情報が得られにくいこと、ORF2 領域の解析のみとなるため、キメラウイルスの検出には対応できないことなどの欠点も存在する。特に、NoV では ORF1/ORF2 ジャンクション領域を基点として、頻繁に遺伝子の組換えが起こるため、これらの ORF1, ORF2 の遺伝子組換えにより誕生したキメラウイルスによる流行のメカニズムも視野に入れた解析の必要性が提唱されている⁹⁾。

そこで、より詳細な遺伝子解析を行うために、患者便から検出された 4 株の NoV GⅡ/11 について、ORF1 のポリメラーゼ領域から ORF2 の S 領域にかけての一連の遺伝子領域を増幅し、RIVM が提供する遺伝子型分類ツールを用いて、新規遺伝子型別分類を行った。その結果、ORF1 領域、ORF2 領域ともに GⅡ.17 と分類され、同分類に基づき、ORF1 と ORF2 領域の遺伝子型を併記すると、NoV GⅡ/11 は NoV GⅡ.P17-GⅡ.17 と表記される。

本市では 2015 年 1 月に発生した有症苦情事例において、患者便から NoV GⅡ/11 が初めて検出された。当初、これらの 4 株は遺伝子型分類ツールを用いた型別分類の結果、ORF2 の N/S 領域では GⅡ.17 と分類されたが、ORF1 のポリメラーゼ領域では could not assign (型別不明, N.A.) と判定されたため、ORF1 領域については、これまでに報告のない新しい遺伝子型の NoV GⅡである可能性が高いと考えられた。その後、同様の株が日本各地で相次いで検出され、現在では、ORF1 領域における新しい遺伝子型の NoV GⅡとしてのコンセンサ



*散発胃腸炎事例を除き，マーカーが同じものは，同一事例の患者便から検出された株である

図3 患者便及びカキから検出された NoV G2/11 の系統樹(N/S 領域 282nt)

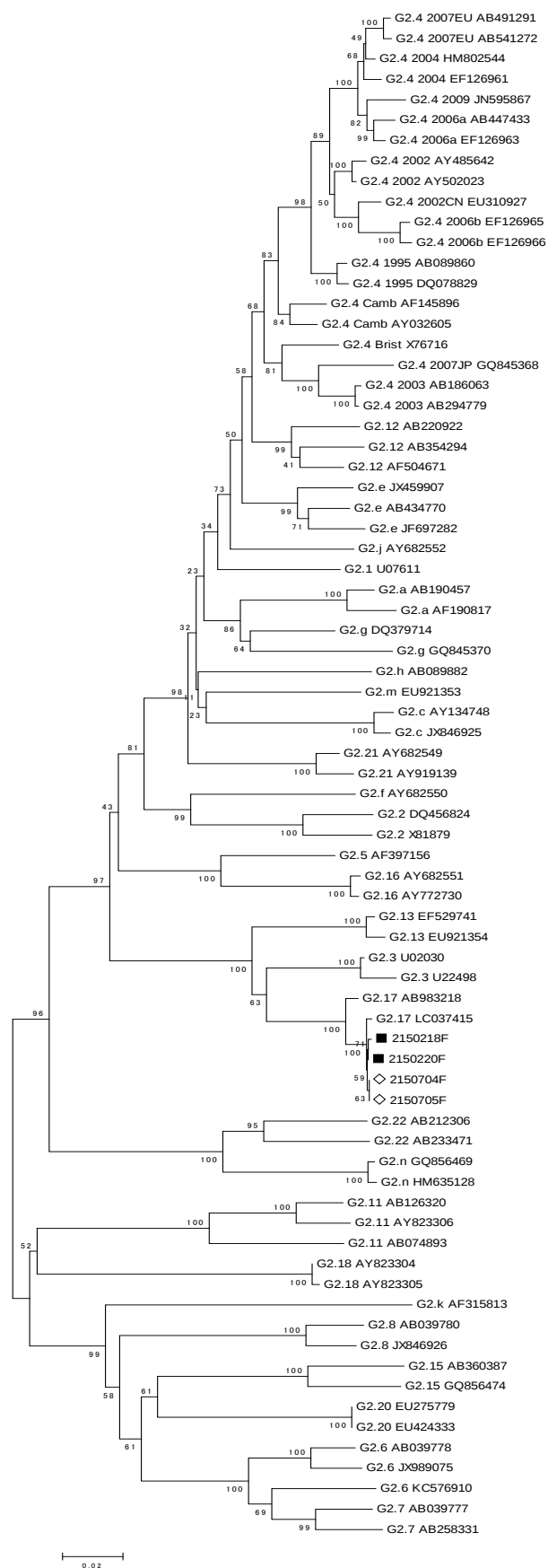


図4 ORF1のポリメラーゼ領域における系統樹 (597nt)

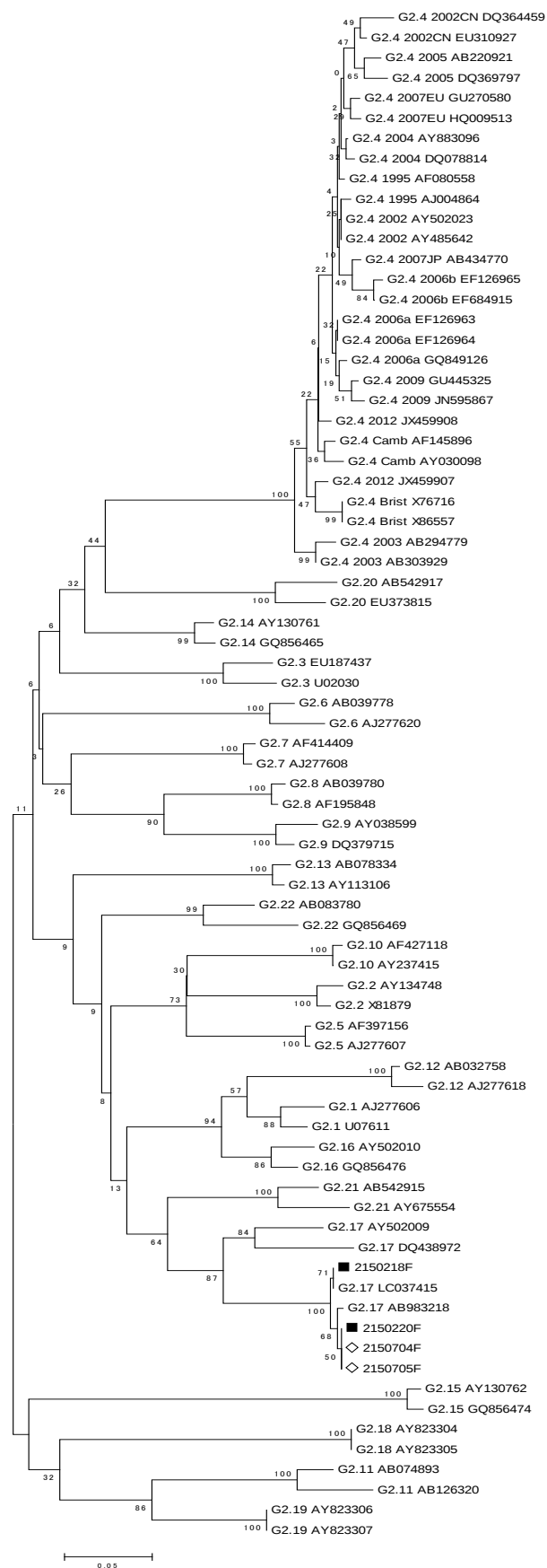


図5 ORF2のN/S領域における系統樹 (189nt)

スが得られ、神奈川県川崎市で検出された株が ORF1 領域の新規遺伝子型 GⅡ.17 として登録されたため、直近の状況では、本市で検出された 4 株も遺伝子型分類ツールにおいて、ORF1 領域は型別不明ではなく、GⅡ.17 と分類される。

2014/15 シーズンに突如として出現した NoV GⅡ/11 については、いつ、どこで、どのような機序で誕生したのかなど、不明な点が多いが、今後の動向も含め、注視していきたい。

文 献

- 1) 齋藤幸一 他：カキのノロウイルス汚染経路に関する検討，感染症学雑誌，80(4)，399～404(2006)
- 2) 佐藤直人 他：下水および養殖カキからのノロウイルス検出，厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)食品中の病原ウイルスの検出法に関する研究 平成 25 年度総括・研究分担報告書，167～170(2014)
- 3) 三好龍也 他：下水サンプルを用いた A 型肝炎ウイルス及び下痢症ウイルスの流行解析，厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)食品中の病原ウイルスの検出法に関する研究 平成 26 年度総括・研究分担報告書，157～164(2015)
- 4) 吉富秀亮 他：終末処理場流入水および市販カキからのノロウイルス検出，厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)食品中の病原ウイルスの検出法に関する研究 平成 26 年度総括・研究分担報告書，195～200(2015)
- 5) 西尾 治 他：ノロウイルスによる食中毒について，食品衛生学雑誌，46(6)，235～245(2005)
- 6) 吉澄志磨 他：市販カキからの腸管系ウイルスの検出，厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)食品中の病原ウイルスの検出法に関する研究 平成 26 年度総括・研究分担報告書，97～102(2015)
- 7) 山本美和子 他：市販生カキからの胃腸炎ウイルス検出状況，厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)食品中の病原ウイルスの検出法に関する研究 平成 26 年度総括・研究分担報告書，177～185(2015)
- 8) 山崎謙治 他：1989～1998 年に日本国内で検出された Norwalk-like viruses(NLVs)の遺伝的特徴および統一プライマーの検討，感染症学雑誌，74(5)，470～475(2000)
- 9) 片山和彦：ノーウォークウイルス(ノロウイルス)の遺伝子型 2014 年版，病原微生物検出情報，35(7)，173～175(2014)