

2016/17 シーズンに広島市で流行したノロウイルス GⅡ.2 の遺伝子解析

藤井 慶樹 則常 浩太 兼重 泰弘 八島 加八*
山本 美和子 松室 信宏

2016/17 シーズンは全国的にノロウイルス (NoV) GⅡ.2 を原因とする感染性胃腸炎が多発し、広島市においても散発胃腸炎や食中毒等の集団事例から GⅡ.2 が検出された。本市で検出された GⅡ.2 の遺伝子解析を実施したところ、ORF1 の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (*RdRp*) 領域と ORF2 の N/S 領域の遺伝子型が異なるキメラウイルス (GⅡ.P16-GⅡ.2) であった。さらに、*RdRp* 領域のアミノ酸配列に基づく系統樹解析の結果、過去に本市で検出された同組合せのキメラウイルスとは異なり、2016 年に大阪市で検出された新しいキメラウイルスである GⅡ.P16-GⅡ.4 Sydney 2012 と同一のクラスターを形成することが明らかとなった。また、カプシド VP1 領域全長の塩基配列に基づく系統樹解析においても、2016/17 シーズンに検出された GⅡ.P16-GⅡ.2 は過去の検出株とは異なるクラスターを形成し、遺伝子的に異なる変異株であることが示唆された。

2016/17 シーズンは、過去に曝露を受けたことがなく、免疫のない低年齢層の患者から GⅡ.2 が多く検出されているが、それに加えて、組換え等による遺伝学的変化がウイルスの性状に多大な影響をもたらし、大流行を引き起こした可能性が推察された。今後も GⅡ.2 の動向に注視していく必要がある。

キーワード： 2016/17 シーズン, NoV GⅡ.P16-GⅡ.2, キメラウイルス, *RdRp* 領域, VP1 領域全長, 系統樹解析

は じ め に

広島市では、2016 年第 42 週以降、感染性胃腸炎の定点当たり報告数が増加し、第 46 週に 24.63 人/週とピークに達した。過去 5 シーズンと比較すると、最も流行の立ち上がりが早く、流行規模では 2012/13 シーズンに次いだ¹⁾。

2016/17 シーズンは全国的に感染性胃腸炎の報告が多く、主要起因ウイルスとして NoV GⅡ.2 が推定されており²⁾、本市においても散発胃腸炎や食中毒等の集団事例から GⅡ.2 が検出された。そこで、本市で検出された GⅡ.2 の遺伝子解析を行い、流行状況との関連性について検討したので報告する。

方 法

1 供試検体

2016/17 シーズンに広島市で発生した集団 2 事例及び散発 3 事例の患者便計 7 検体を用いた。また、過去の事例との比較を行うため、2009/10～

2015/16 シーズンに発生した事例の患者便 12 検体を用いた。

2 遺伝子解析

(1) キメラウイルス解析

a 検体からの RNA 抽出

QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて、糞便 10% 乳剤の遠心上清 140 μ l から RNA を抽出した。

b 逆転写反応

High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ABI) 及び Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer (Invitrogen) を用いて、25°C 10 分、37°C 60 分、85°C 5 分、4°C で保存の条件で逆転写反応を行い、cDNA を作製した。

c PCR

ORF1 の *RdRp* 領域から ORF2 の N/S 領域にかけての約 1,100bp の遺伝子を増幅した。1st PCR は cDNA 5 μ l を用いて、TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (TaKaRa) により、94°C 3 分を 1 回、94°C 30 秒、50°C 30 秒、72°C 90 秒を 40 回、72°C 7 分を 1 回、10°C で保存の反応条件で実施した。電気泳動

*：現 環境局環境保全課

により PCR 産物を確認後、バンドが薄い場合には、さらに 1st PCR 産物 $2\mu\text{l}$ を用いて、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (TaKaRa) により、 98°C 10 秒、 50°C 15 秒、 68°C 1 分を 35 回、 10°C で保存の反応条件で 2nd PCR を実施した。1st 及び 2nd PCR に使用したプライマーは表 1 のとおりである。

d 塩基配列解析

PCR 産物を ExoSAP-IT (Affymetrix) により精製した後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI) を用いて、サイクルシーケンスを行った。シーケンス用プライマーは P1, COG2F, COG2R, G2SKR を用いた。その後、BigDye Xterminator Purification Kit (ABI) で精製後、3500 Genetic Analyzer (ABI) により塩基配列を決定した。*RdRp* 領域に該当する 660 塩基をアミノ酸に変換後、近隣結合法による系統樹解析を実施し、株間の比較を行った。

(2) VP1 全長解析

a 検体からの RNA 抽出及び濃縮

QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて、糞便 10% 乳剤の遠心上清 $140\mu\text{l}$ から RNA を抽出した。この際、キットに添付の Carrier RNA は使用せず、代わりに Yeast tRNA (Ambion) を用いた。抽出した $60\mu\text{l}$ の RNA を NucleoSpin RNA Clean-up XS (TaKaRa) を用いて、 $5\mu\text{l}$ に濃縮した。

b 逆転写反応

SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) 及び TX30SXN Primer ($5'$ -GACTAGTTCTAGATCG

CGAGCGGCCGCCCT₃₀- $3'$) を用いて、 50°C 60 分、 70°C 15 分、 4°C で保存の条件で逆転写反応を行った。反応には濃縮した RNA $5\mu\text{l}$ 全量を使用し、計 $20\mu\text{l}$ の cDNA を作製した。

c PCR

ORF2 がコードする VP1 領域全長 1,626bp を増幅した。1st PCR は cDNA $5\mu\text{l}$ を用いて、2nd PCR は 1st PCR 産物 $2\mu\text{l}$ を用いて、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (TaKaRa) により、 98°C 10 秒、 55°C 15 秒、 68°C 2 分を 30 回、 10°C で保存の反応条件で実施した。1st 及び 2nd PCR に使用したプライマーは表 2 のとおりである。

d 塩基配列解析

前述と同様に、PCR 産物を精製後、サイクルシーケンスを行った。使用したプライマーは表 3 のとおりである。得られた 1,625 塩基について、近隣結合法による系統樹解析を実施した。

結 果

1 キメラウイルス解析と *RdRp* 領域のアミノ酸配列に基づく系統樹解析

2016/17 シーズンに本市で発生した集団及び散发事例の患者便から検出された 7 株の G II.2 は、ORF1 の *RdRp* 領域及び ORF2 の N/S 領域の遺伝子型別分類の結果、G II.P16-G II.2 に分類されるキメラウイルスであった。同組合せのキメラウイルスは過去に本市においても検出されており⁴⁾、また、P16 型に分類される *RdRp* 領域を有するほかのキメ

表 1 キメラウイルス解析用プライマー

	プライマー	極性	配列 ($5' \rightarrow 3'$)
1st	P1 ³⁾	sense	GCTGATTACTCTSGSTGGGA
	G2-SKR	anti-sense	CCRCCNGCATRHCCRTTTRACAT
2nd	P1-BamH1-FuF	sense	CGGTACCCGGGATCGCTGATTACTCTSGSTGG
	G2SKR-BamH1-FuR	anti-sense	CGACTCTAGAGGATCCCRCCNGCATRHCCRTTTRT

表 2 VP1 全長解析用プライマー

	プライマー	極性	配列 ($5' \rightarrow 3'$)
1st	COG2F	sense	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG
	G II.2_VP1R [†]	anti-sense	GCTACAAAAGCTCCAGCCATTAT
2nd	G2-SKF	sense	CNTGGGAGGGCGATCGCAA
	G II.2_VP1R	anti-sense	GCTACAAAAGCTCCAGCCATTAT

[†]Primer Express 3.0 (ABI) により設計。

表 3 サイクルシーケンス用プライマー

プライマー	極性	配列 (5' → 3')
G2-SKF	sense	CNTGGGAGGGCGATCGCAA
GⅡ.2_inner-F [†]	sense	AAATYACYATGTTYCCYCAT
GⅡ.2_inner-shF [†]	sense	AATTCACCCCAGTYGGWCTYA
GⅡ.2_inner-R [†]	anti-sense	ARACYCTTCCTGAAAGTCAGG
G2-SKR	anti-sense	CCRCCNGCATRHCCRTTTRTACAT
GⅡ.2_VP1R	anti-sense	GCTACAAAAGCTCCAGCCATTAT

[†]Primer Express 3.0 (ABI) により設計。

ラウウイルスも検出されていることから、これらの株も含めた *RdRp* 領域の系統樹解析を実施し、株間の比較を行った (図 1)。その結果、2016/17 シーズン検出株は過去の検出株とは異なり、2016 年に大阪市で検出が報告⁵⁾された新しいキメラウイルスである GⅡ.P16-GⅡ.4 Sydney 2012 と同一のクラスターを形成した。これらの株間のアミノ酸配列での相同性は 98.2~100% であった。

2 VP1 領域の系統樹解析及びアミノ酸変異の解析

GⅡ.2 の VP1 領域全長の塩基配列に基づく系統樹解析結果を図 2 に示した。2016/17 シーズンに本市で検出された株及び同シーズンに中国や香港で検出された株は過去の検出株とは異なるクラスターを形成した。

2016/17 シーズン検出株と過去の検出株とを比

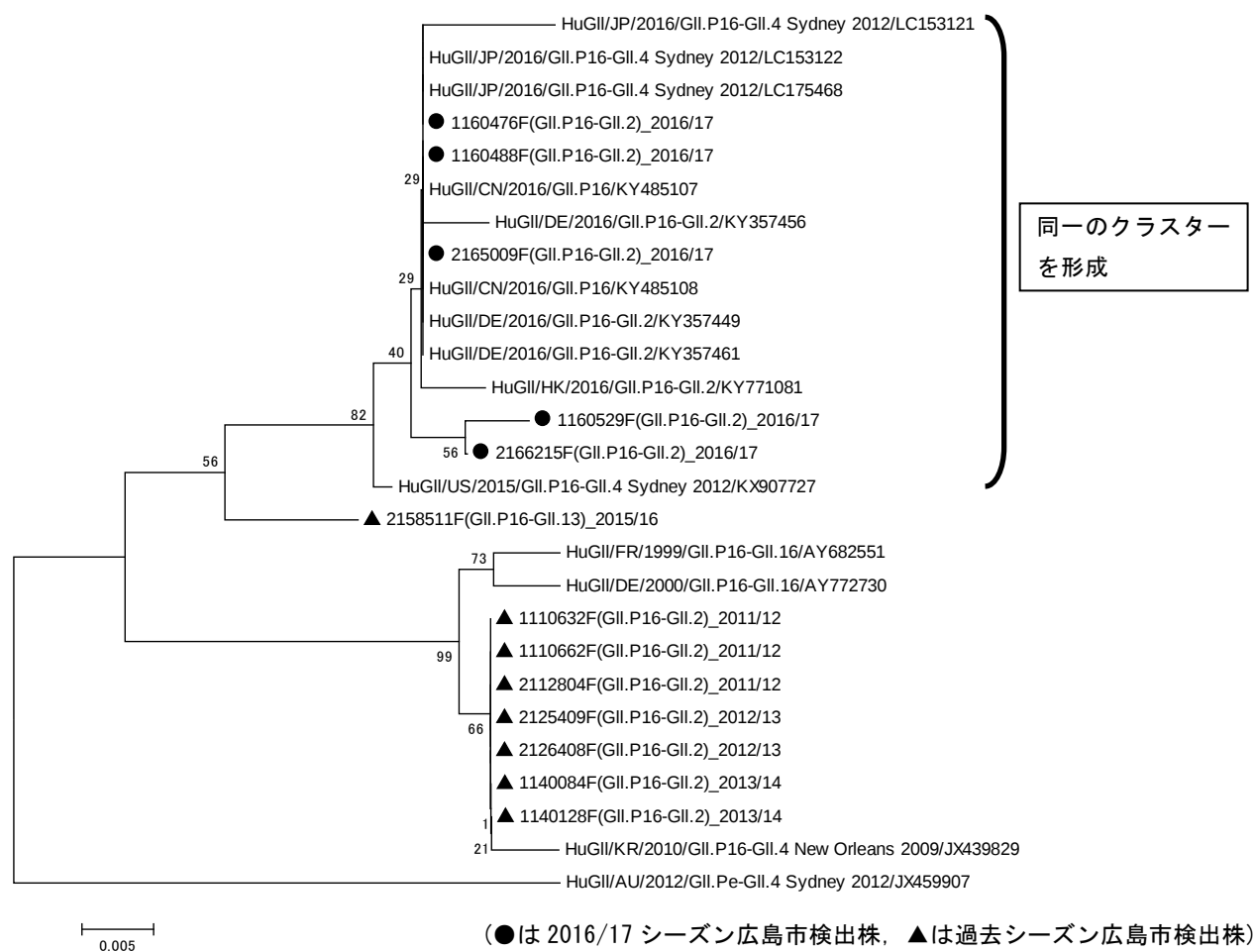


図 1 *RdRp* 領域のアミノ酸配列に基づく系統樹 (219aa)

較し, VP1 領域においてアミノ酸変異が確認された部位を図 3 に示した。2016/17 シーズン検出株

(中国の検出株も含めて)では, 18 部位のアミノ酸で置換(変異の獲得及び消失)が認められた。

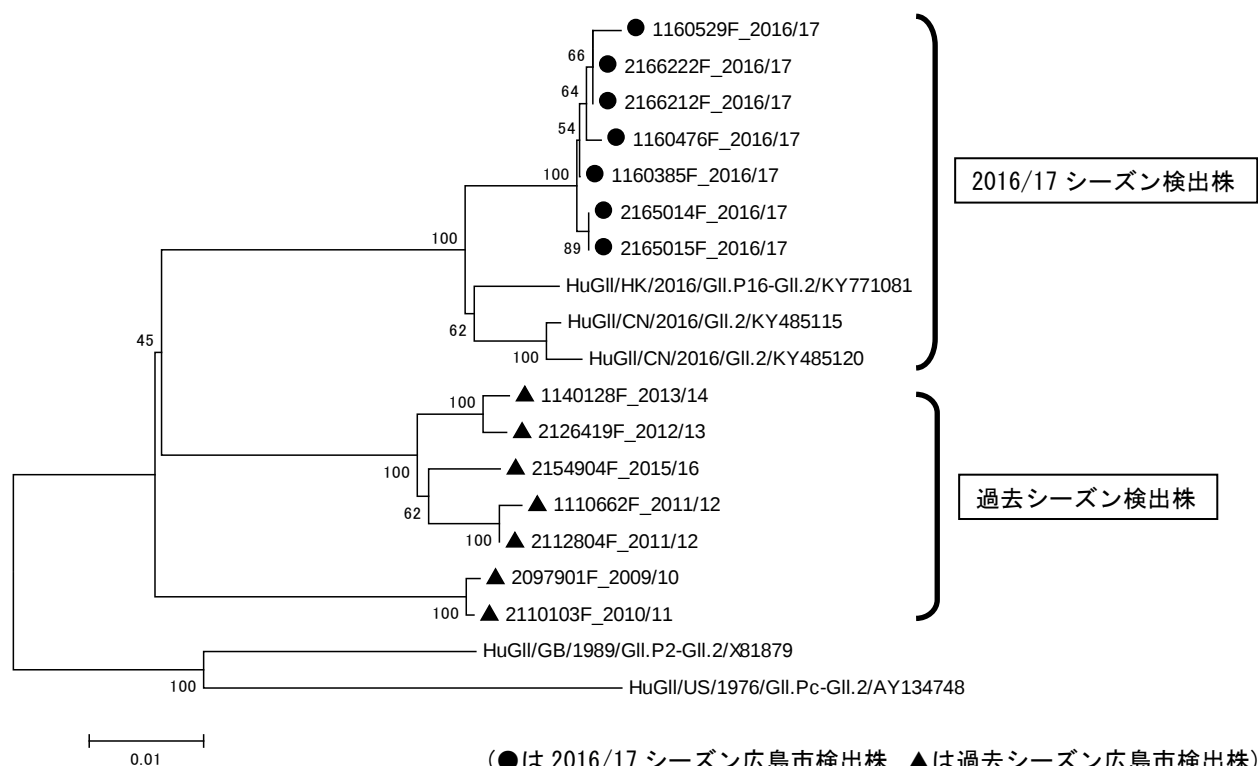


図 2 VP1 領域全長の塩基配列に基づく系統樹(1625nt)

	ORF2開始コドンからの位置																	
	24	71	78	130	256	303	335	341	354	384	386	400	418	448	461	506	513	541
2097901F_2009/10	N	A	N	I	V	I	I	K	G	T	S	E	T	N	Q	S	A	V
2110103F_2010/11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
1110662F_2011/12	.	S	.	V	.	V	V	.	A	.	N	D	.	T	.	.	V	I
2112804F_2011/12	.	S	.	V	.	V	V	.	A	.	N	D	.	T	.	.	V	I
2126419F_2012/13	.	S	.	V	.	V	V	.	A	.	N	D	.	T	.	.	.	I
1140128F_2013/14	S	S	.	V	.	V	V	.	A	A	N	D	.	T	.	.	.	I
2154904F_2015/16	T	S	.	V	.	V	V	.	A	.	N	D	.	T	K	.	.	I
1160385F_2016/17	.	.	.	V	.	V	.	R	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.
1160476F_2016/17	.	.	S	V	.	V	.	R	.	.	N	.	.	.	.	G	.	.
1160529F_2016/17	.	.	.	V	.	V	.	R	.	.	N	.	.	.	.	G	.	.
2165014F_2016/17	.	.	.	V	.	V	.	R	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.
2165015F_2016/17	.	.	.	V	.	V	.	R	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.
2166212F_2016/17	.	.	.	V	.	V	.	R	.	.	N	.	.	.	.	G	.	.
2166222F_2016/17	.	.	.	V	.	V	.	R	.	.	N	.	.	.	.	G	.	.
HuGⅡ-CN-2016-GⅡ.2 KY485115	.	.	.	V	I	V	.	.	.	.	N	.	I	.	.	.	.	.
HuGⅡ-CN-2016-GⅡ.2 KY485120	.	.	.	V	I	V	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.
HuGⅡ-HK-2016-GⅡ.P16-GⅡ.2 KY771081	.	.	.	V	.	V	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.

■ Positive selection site

図 3 VP1 領域において確認されたアミノ酸変異

考 察

2016/17 シーズンに本市で検出された GⅡ.P16-GⅡ.2 は, *RdRp* 領域のアミノ酸配列に基づく系統樹解析結果から, GⅡ.P16-GⅡ.4 Sydney 2012 との間で遺伝子組換えが生じている可能性も考えられ, *RdRp* 領域の由来を異にする新たに出現したキメラウイルスと推察された。

さらに, 2016 年 11 月以降, 日本だけでなく, 中国やドイツにおいても, GⅡ.P16-GⅡ.2 を原因とする急性胃腸炎患者の増加が報告されており^{6), 7)}, これらの株も同様に, *RdRp* 領域の系統樹解析において GⅡ.P16-GⅡ.4 Sydney 2012 と同一のクラスターを形成していた。すなわち, この新たに出現した GⅡ.2 のキメラウイルスが世界各地でほぼ同時期に大きな流行を引き起こしたと考えられた。

VP1 領域全長の塩基配列に基づく系統樹解析では, 2016/17 シーズンに本市で検出された GⅡ.P16-GⅡ.2 は過去の検出株とは異なるクラスターを形成した。松島らの報告と同様に⁸⁾, 2016/17 シーズンの本市検出株も過去の検出株とは遺伝子的に異なる変異株であることが示唆された。

GⅡ.2 のカプシド VP1 の性状に影響を及ぼす選択部位として, 24, 78, 99, 275, 344, 345, 354, 384, 385, 397 番目のアミノ酸が重要であることが指摘されている⁹⁾。そこで, 2016/17 シーズンに本市で検出された株について, アミノ酸配列を確認した結果, 24, 78, 354, 384 番目のアミノ酸で過去の検出株とは異なる変異の獲得や消失等のアミノ酸置換が認められた。一方で, 2016/17 シーズンに検出された GⅡ.2 の VP1 は過去の株と比べて, 主要な変化は認められず, VP1 の性状以外の要因が流行状況に影響を及ぼした可能性があることが報告されている⁹⁾。したがって, 図 3 に示した VP1 領域において確認されたアミノ酸変異は VP1 の性状に影響を与えるものではないのかもしれない。

2016/17 シーズンにおける GⅡ.2 の流行では幼稚園や保育園等での集団感染事例などが多く, 過去に曝露を受けたことがない, 免疫のない低年齢層での発生が多いことが報告されている^{10), 11)}。それに加えて, 組換え等による遺伝学的変化がウイルスの複製効率等の性状に多大な影響をもたらし, 大流行を引き起こした可能性が推察された。

GⅡ.2 が流行した 2016/17 シーズンは, GⅡ.17

が流行した 2014/15 シーズンと同じく, これまで流行の主流を担ってきた GⅡ.4 ではない遺伝子型の NoV が優勢を占めたシーズンとなった。NoV の流行状況の監視においては, GⅡ.4 の動向だけに注目するのではなく, それ以外の遺伝子型の動向についても注視していく必要がある。また, 食中毒や感染症発生時の NoV 遺伝子解析に当たっては, VP1 領域だけでなく, *RdRp* 領域も含めた統合的な解析を行っていくことが今後さらに重要になってくると考えられた。

文 献

- 1) 広島市感染症情報センター：最近の動向/感染性胃腸炎, <http://www.city.hiroshima.lg.jp/www/contents/1268263712429/index.html>
- 2) 国立感染症研究所:注目すべき感染症<感染性胃腸炎>, 感染症週報, 19(1), 7~8(2017)
- 3) 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)
- 4) 藤井慶樹 他:2005/06 シーズンから 2015/16 シーズンまでに検出されたノロウイルス GⅡの遺伝子型解析と流行状況の分析, 広島市衛生研究所年報, 35, 52~60(2016)
- 5) 入谷展弘 他:集団胃腸炎事例からのノロウイルス GⅡ.P16-GⅡ.4 Sydney_2012 の検出ー大阪市, 病原微生物検出情報, 37(7), 136~138(2016)
- 6) Lu J et al.: Association of GⅡ.P16-GⅡ.2 recombinant norovirus strain with increased norovirus outbreaks, Guangdong, China, 2016, Emerging Infectious Diseases, 23(7), 1188~1190(2017)
- 7) Niendorf S et al.: Steep rise in norovirus cases and emergence of a new recombinant strain GⅡ.P16-GⅡ.2, Germany, winter 2016, Eurosurveillance, 22(4), 1~4(2017)
- 8) 松島勇紀 他:茨城県と川崎市における 2016/17 シーズンに検出されたヒトノロウイルス GⅡ.P16-GⅡ.2 の分子疫学, 病原微生物検出情報, 38(1), 19~20(2017)
- 9) Tohma K et al.: Phylogenetic analyses suggest that factors other than the capsid

- protein play a role in the epidemic potential of GⅡ.2 norovirus, Clinical Science and Epidemiology, 2(3), 1～13(2017)
- 10) 植木 洋 他:宮城県内で流行しているノロウイルス(NoV)の遺伝子型について, 病原微生物検出情報, 38(1), 17～18(2017)
- 11) 坂本美砂子 他:2016年9～11月のノロウイルス感染集団発生事例についてー千葉市, 病原微生物検出情報, 38(1), 18～19(2017)