

同一事例で検出されたノロウイルス G II /4 の N/S 領域における塩基配列差についての検討

広島市衛生研究所 生物科学部

○藤井慶樹 田中寛子* 瀧口由佳理* 山本美和子 京塚明美 石村勝之

(*現 広島市衛生研究所 環境科学部)

1 目的と意義

ノロウイルス(NV)による食中毒・有症苦情事例等において、最も検出頻度の高い NV G II /4 を対象として、カプシド N/S 領域における塩基配列を比較した結果、調理従事者からウイルスが検出された食中毒事例に比べて、二枚貝を喫食している食中毒・有症苦情事例では同一事例内の患者間で同領域の塩基配列に 1~2 塩基程度の差が認められることが多い傾向が分かった。しかしながら、N/S 領域は遺伝子的な多様性に乏しく、このような 1~2 塩基程度の差が患者体内でのウイルスの変異により生じたのか、異なるウイルスの感染により生じたのかを判断することはできない。

そこで、今回、遺伝子的な多様性に富むカプシド P2 ドメイン領域の解析を追加することで、N/S 領域に認められた塩基配列差の解釈について、新たな知見が得られたので報告する。

2 材料と方法

(1) 調査対象事例

2012/13 シーズンに発生した食中毒・有症苦情事例及び散発の胃腸炎事例の中から、NV G II /4 Sydney 2012 亜型(以下、G II /4 Sydney 2012 と略す。)が検出された事例を選択し、N/S 領域非一致事例と N/S 領域一致事例の 2 つの区分に分けて調査対象とした。詳細については表 1 に示した。

(2) カプシド P2 ドメイン領域の解析

P2 ドメイン領域を nested PCR により増幅し、増幅産物を精製後、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。混合感染が疑われた場合には増幅産物をクローニングし、個々のクローンの塩基配列を決定した。

表 1 調査対象事例一覧

N/S 領域	N/S 領域の相同性	事例区分	事例番号	検体番号	患者／従事者	二枚貝の喫食
非一致	280/282(99.2%)	食中毒	21305	04F、07F、16F	患者	あり
	281/282(99.6%)	食中毒	21309	02F、04F、12F	患者	あり
	281/282(99.6%)	有症苦情	21314	03F、04F	患者	あり
	281/282(99.6%)	食中毒	21361	17F 21F、23F、27F	従事者 患者	なし
一致	277/277(100%)	有症苦情	21307	07F、08F、09F	患者	あり
	282/282(100%)	食中毒	21251	01F 10F	患者 従事者	なし
	282/282(100%)	食中毒	21261	26F 56F	患者 従事者	なし
	282/282(100%)	食中毒	21262	13F 24F	従事者 患者	なし
	282/282(100%)	散発 (感染症発生動向調査)		1120534F	患者	
				1120536F	患者	
			1120570F	患者	不明	
			1130045F	患者		

3 結果及び考察

調査対象事例で検出された G II /4 Sydney 2012 の P2 ドメイン領域における塩基配列解析に基づく系統樹を図 1~3 に示した。P2 ドメイン領域の解析を進めるにあたり、ふたつの比較対照を設定した。ひとつは調理従事者からウイルスが検出された食中毒事例であり、当事例では、調理従事者を介した同一ウイルスによる感染の疑いが強く、患者と調理従事者から検出されたウイルスは N/S 領域だけでなく、遺伝子的な多様性に富む P2 ドメイン領域においても塩基配列はほぼ一致するものと推測した。もうひとつは、感染症発生動向調査事業における散発の胃腸炎事例であり、当事例では、患者から検出されたウイルスの N/S 領域の塩基配列は 100% 一致したが、発生時期や地域等から患者間に接点はないと思われ、由来の異なる別のウイルスの感染によると考えられたため、遺伝子的な多様性に富む P2 ドメイン領域の塩基配列には差があるものと推測した。

図 1 に示すように、実際に、調理従事者からウイルスが検出された 21251、21261、21262、21361 の食中毒事例では、

各事例とも、患者と調理従事者から検出されたウイルスの P2 ドメイン領域の塩基配列は 100%一致し、同一の枝に分岐した。一方、図2に示すように、散発の胃腸炎事例では、患者から検出されたウイルスの P2 ドメイン領域の塩基配列には違いがあり、それぞれ異なる枝に分岐した。

以上の結果を比較対照として捉え、二枚貝を喫食している食中毒・有症苦情事例における同一事例内の患者間で認められた N/S 領域の塩基配列差についての解釈を P2 ドメイン領域の解析から検討した。二枚貝喫食事例では、患者から検出されたウイルスの P2 ドメイン領域の PCR 増幅産物を用いて、ダイレクトシーケンスを行った結果、複数カ所で波形の重複が認められ、塩基配列の異なるウイルスの混合感染が疑われることが特徴的であった。そこで、適宜クローニングを行い、系統樹解析を行った結果、N/S 領域の塩基配列に 1~2 塩基差が認められた事例(21305、21309、21314)、N/S 領域の塩基配列が 100%一致した事例(21307)双方において、P2 ドメイン領域の塩基配列が異なり、様々な枝に分岐する多様な株が検出された(図 3)。

食中毒事例等で検出された NV の N/S 領域を利用した遺伝子型解析を行う際、特に、二枚貝喫食事例では同一事例内の患者間で当領域に 1~2 塩基程度の配列差があるウイルスが検出されることが多く、それが何を意味しているのか判断に苦慮していた。P2 ドメイン領域の解析を追加することで、これらの現象は、遺伝子型は同じ G II /4 Sydney 2012 でありながらも、塩基配列を微妙に異にする複数のウイルスの混合感染が関与している可能性が高いことが考えられた。

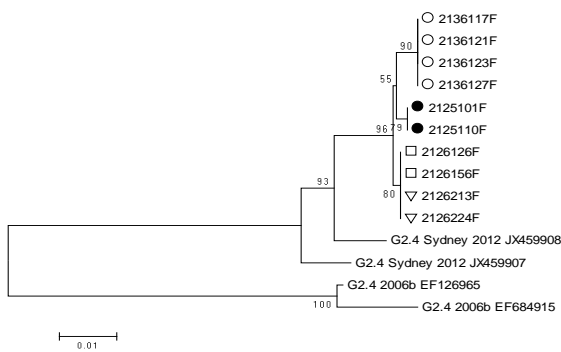


図1 P2ドメイン領域系統樹
(調理従事者を介した汚染が疑われる食中毒事例)

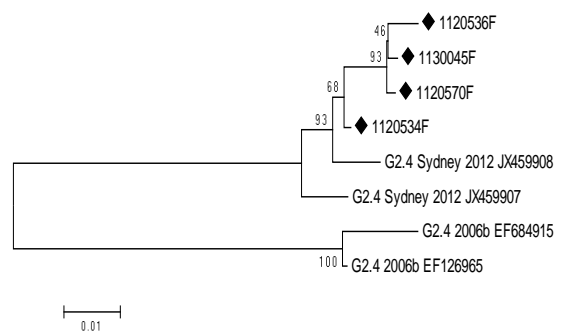


図2 P2ドメイン領域系統樹
(感染症発生動向調査散発胃腸炎事例)

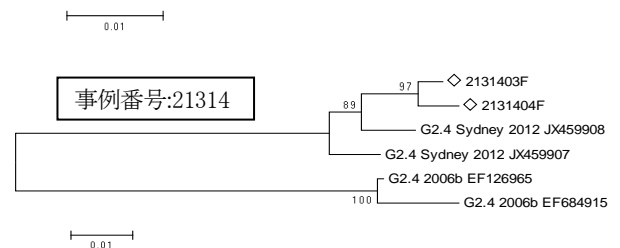
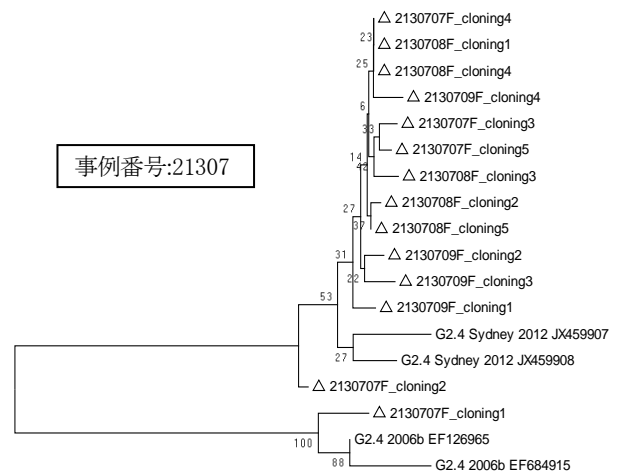
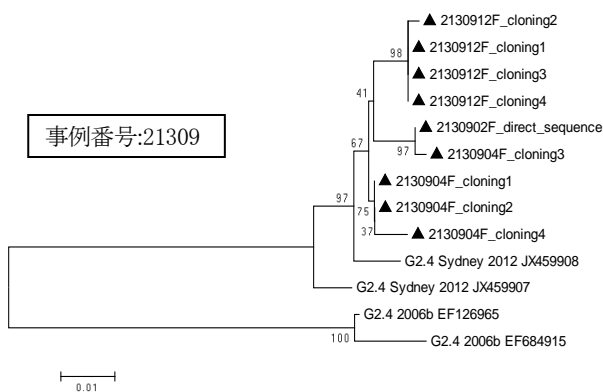
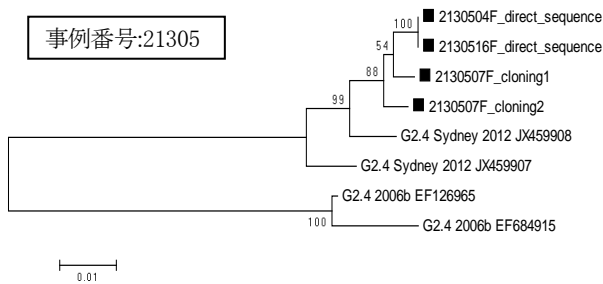


図3 P2ドメイン領域系統樹(二枚貝喫食事例)