

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⁵⁾⁻⁷⁾ため、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°C 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		
1/21	3150002oy2		
2/4	3150003oy2		
2015	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を用い、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 G IIの遺伝子型分類を行った。

2 NoV G II/11の遺伝子解析

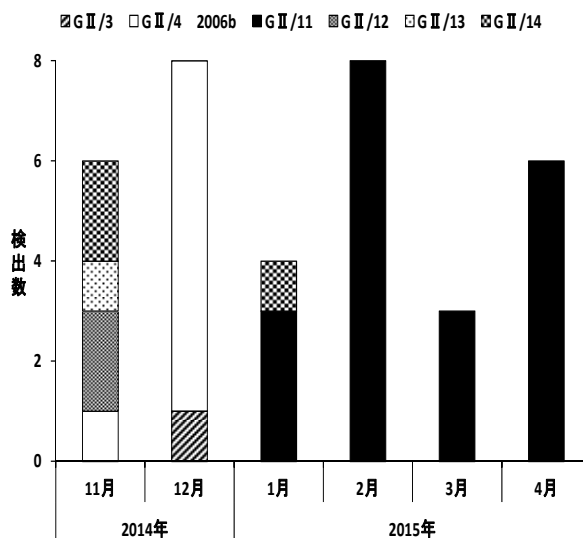
2014/15シーズンに広島市で発生した食中毒、有症苦情事例において、患者便から検出されたNoV G II/11 4株について、詳細な遺伝子解析を行った。すなわち、P1⁸⁾/G2SKRプライマーを用いて、ORF1のポリメラーゼ領域からORF2のS領域にかけての遺伝子領域を増幅し、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。得られた塩基配列をオランダ国立公衆衛生環境研究所(RIVM)が提供する遺伝子型分類ツール(<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>)にアップロードし、新規遺伝子型別分類に基づいたORF1及びORF2領域それぞれの遺伝子型を決定するとともに、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 G II/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 G II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 G IIが検出された。最も多く検出された遺伝子型はG II/11の20株で全体の58.8%を占めた。以下、G II/4 2006b 8株、G II/14 3株、G II/12 2株、G II/3とG II/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 G II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、G II/4 2006b、G II/12、G II/13、G II/14の4種類の遺伝子型が検出された。12月には、G II/4 2006b 亜型による集団食中毒が発生し、検出G IIの多くを占めた。2015年1月以降は、1月のG II/14の1例を除き、G II



*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 G II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 G II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G II/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 G IIの遺伝子型

検体番号	クローン数	遺伝子型		
		G II/11	G II/3	G II/4 Sydney2012
3150001oy2	3	1	1	1
3150002oy2	4	4	0	0
3150003oy2	4	4	0	0
3150004oy2	4	4	0	0
3150005oy2	4	3	0	1
3150006oy2	4	4	0	0
3150007oy2	4	4	0	0
3150008oy2	4	4	0	0

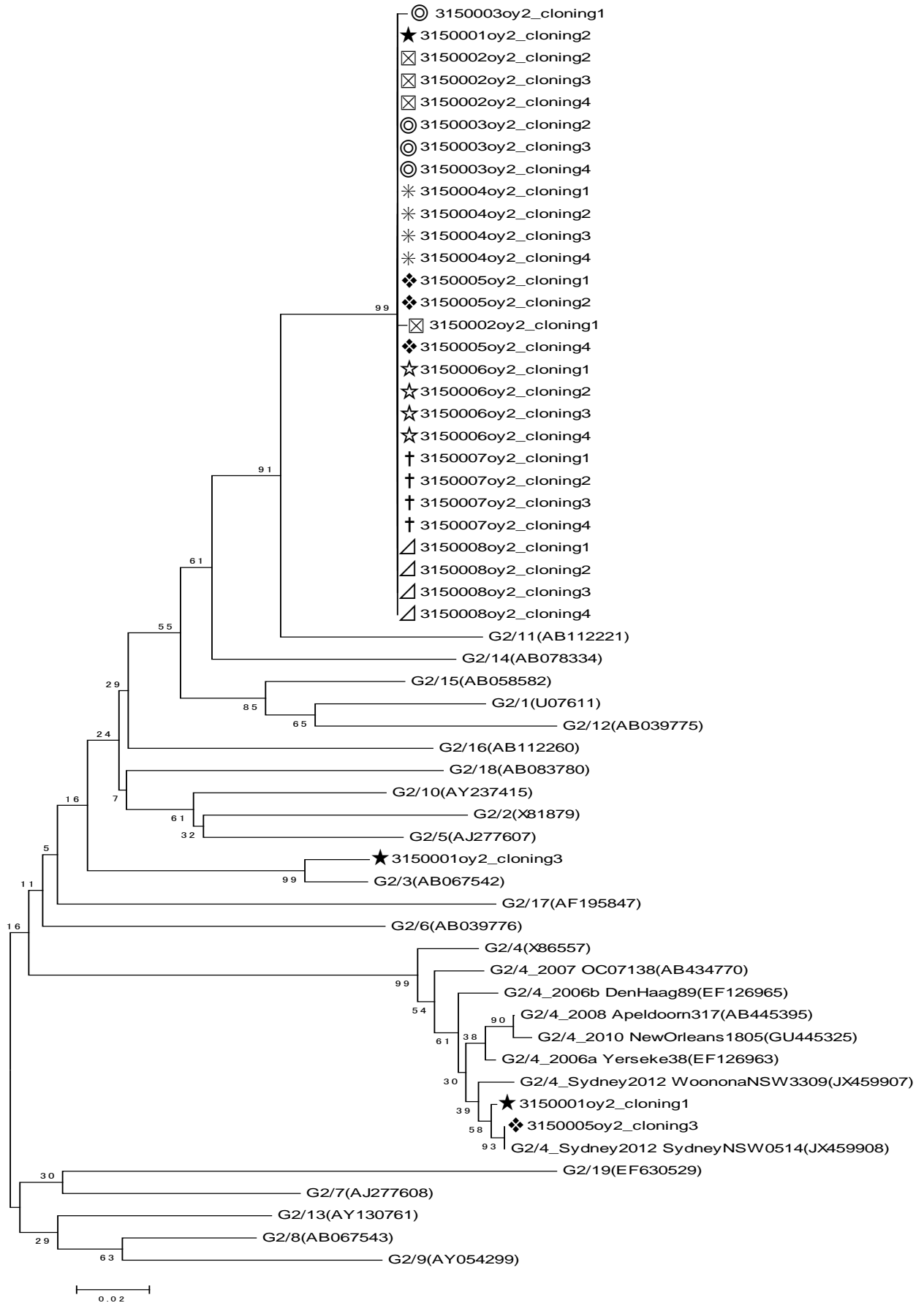


図2 カキから検出されたNoV GIIの系統樹(N/S領域 264nt)

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

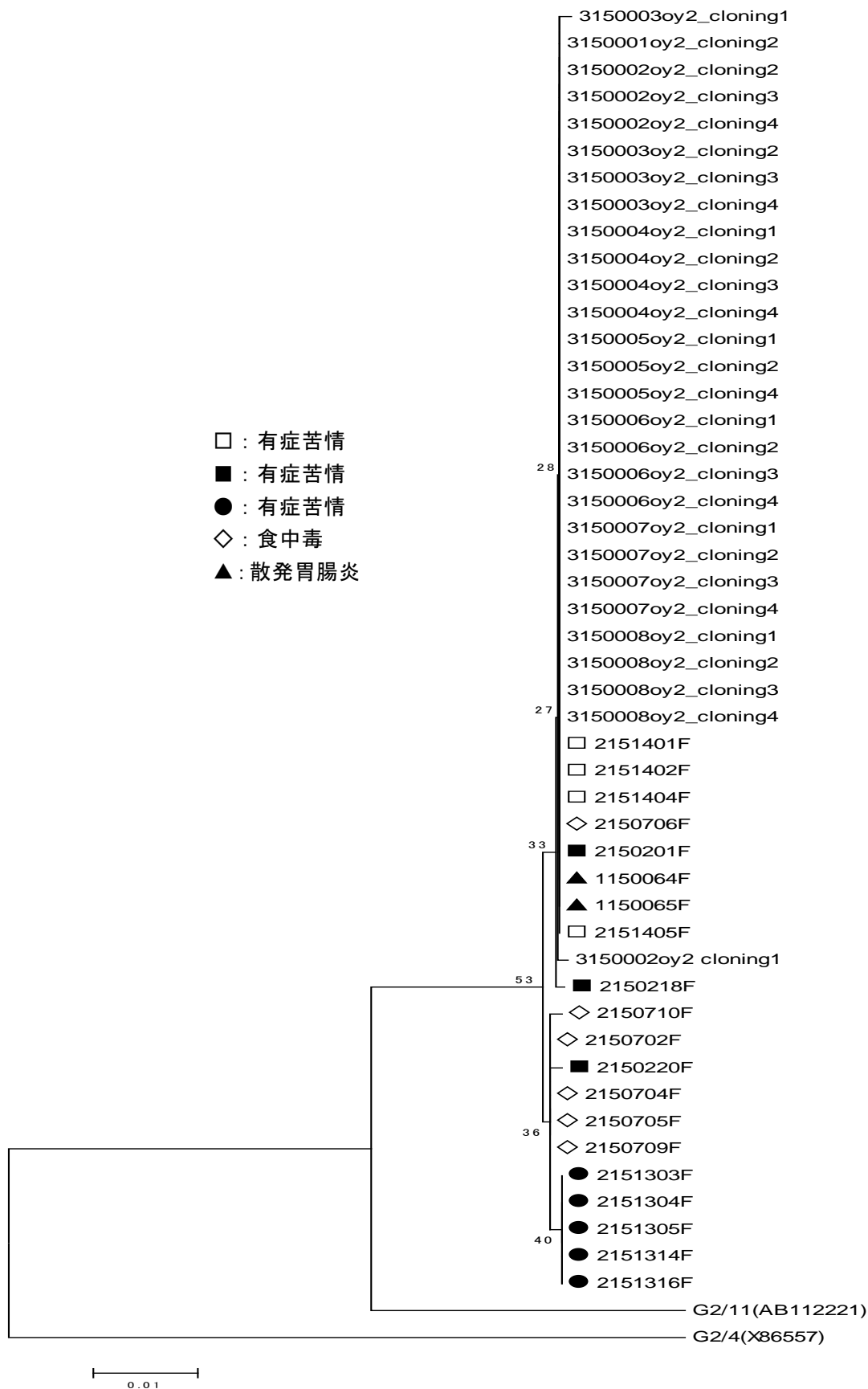
2014/15シーズンの広島市におけるNoV流行の特徴は、過去に本市では検出例のないNoV GⅡ/11が突如として出現し、2015年の1月から4月にかけて多数検出されたことである。NoV GⅡ/11による食中毒や有症苦情等の事例が多発した背景には、市中での潜在的なNoV GⅡ/11の蔓延があったものと推察された。一方、NoVは下水等を介して海域に流入し、カキ等の二枚貝に蓄積されると考えられていることから、生カキから検出されるNoV GⅡの遺伝子型の推移を調査した。カキは複数の遺

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)

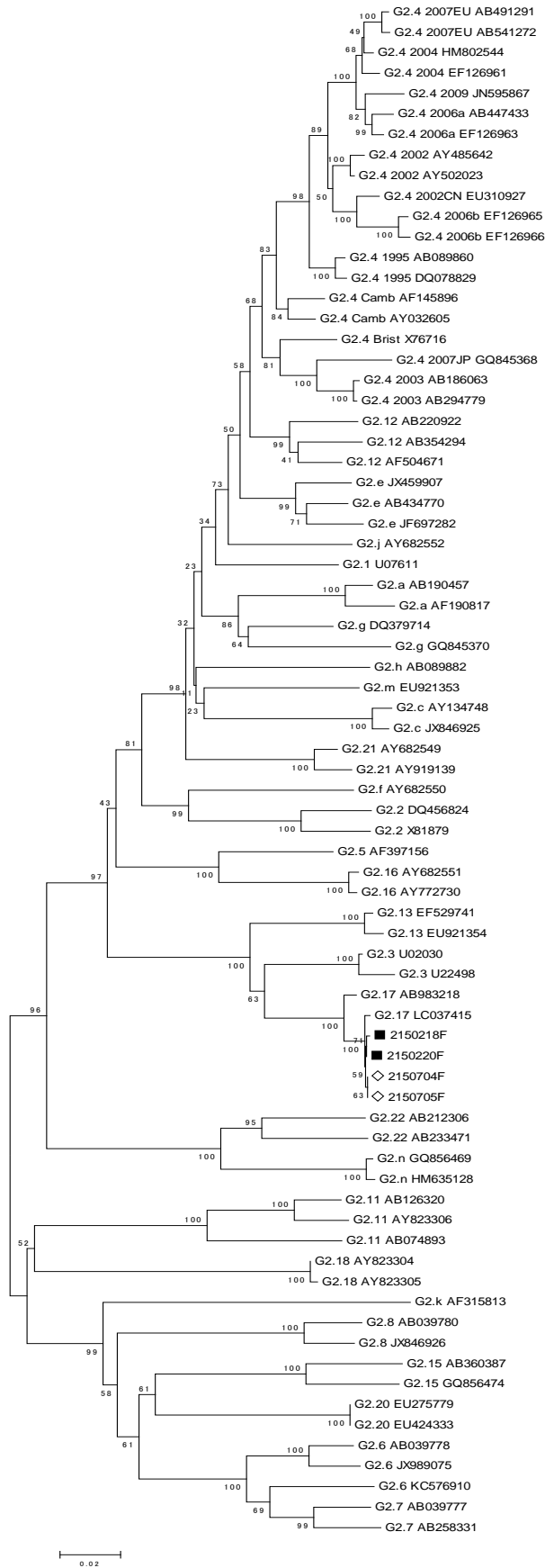


図4 ORF1のポリメラーゼ領域における系統樹 (597nt)

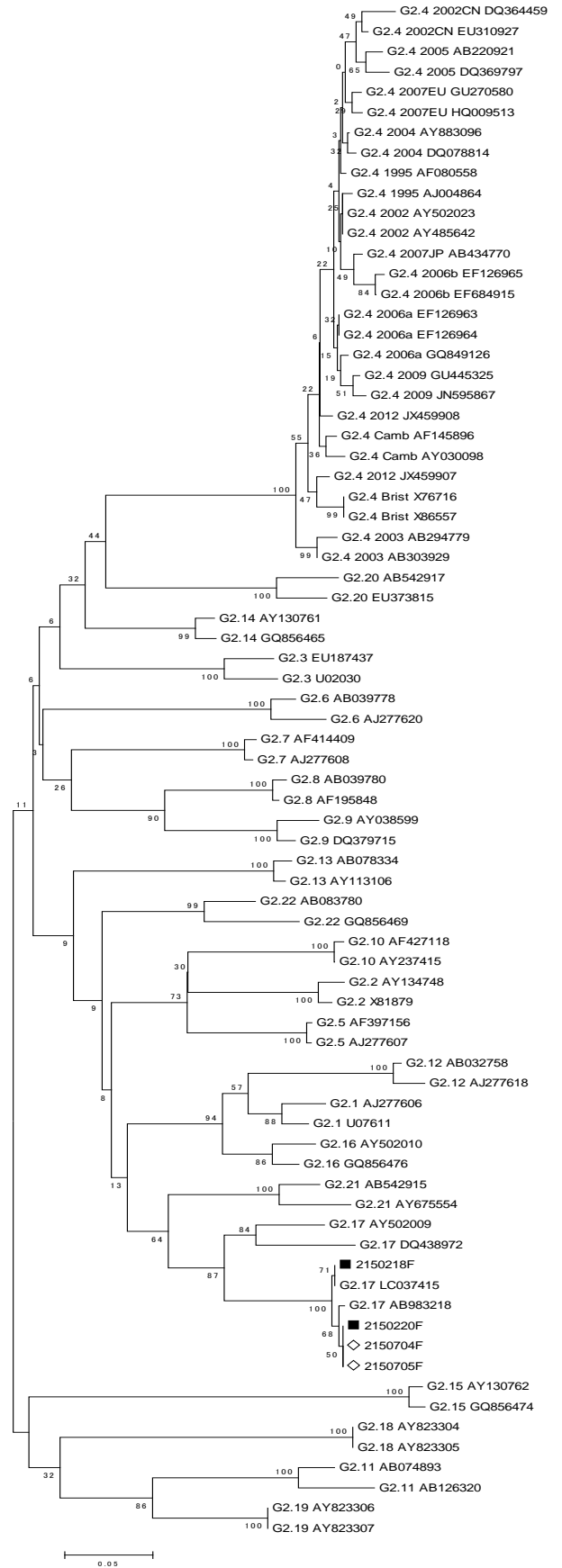


図5 ORF2のN/S領域における系統樹 (189nt)

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)