

## 同一事例で検出されたノロウイルス GII/4 2012 変異株の N/S 領域における塩基配列差についての検討

藤井 慶樹 田中 寛子 山本 美和子 京塚 明美  
石村 勝之

### はじめに

ノロウイルス (NV) はカリシウイルス科に分類されるプラス一本鎖の RNA ウイルスであり、そのゲノムは約 7500 塩基からなり、ORF1~3 の 3 つの翻訳領域が存在する。ORF2 はウイルス粒子を構成するカプシド蛋白質 (VP1) をコードしており、現在、NV の遺伝子型分類には ORF2 の 5' 末端約 300 塩基 (カプシド N/S 領域) の解析を行う方法が主流となっている。

2012/13 シーズンは NV GII/4 の新しい変異株 (GII/4 2012 変異株, 仮称) が出現し、2006/07 シーズン以来、6 年ぶりに全国的に大流行した。本市においても、2012 年 10 月以降、食中毒・有症苦情事例や散発の胃腸炎事例等から相次いで NV が検出され、上述の方法により遺伝子型を解析した結果、多くが GII/4 2012 変異株に分類されている。これらの GII/4 2012 変異株のカプシド N/S 領域の塩基配列を詳細に比較した結果、従事者からウイルスが検出された食中毒事例においては、患者と従事者から検出されたウイルスの本領域の塩基配列が 100% 一致しているのに対して、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 1~2 塩基程度の差が認められることが多い傾向が見られた。

このような塩基差が生じる要因について、体内でのウイルスの変異によるものなのか、異なるウイルスの感染によるものなのかを探るために、カプシド蛋白質 (VP1) の中で最も外側の突出した領域に位置し、遺伝子的な多様性に富む P2 ドメイン領域の解析を行ったので報告する。

### 方 法

#### 1 調査対象事例

2012/13 シーズンに発生し、COG2F/G2SKR プライマーで増幅したカプシド N/S 領域による遺伝子型解析の結果、GII/4 2012 変異株が検出された食中毒・有症苦情事例および散発の胃腸炎事例の中から、次の 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。

#### (1) N/S 領域非一致事例

喫食メニューに二枚貝 (加熱・非加熱を問わず) があり、同一事例内の患者間で検出されたウイルスの N/S 領域の塩基配列に 1~2 塩基程度の差が認められた 3 事例。

#### (2) N/S 領域一致事例

喫食メニューに二枚貝 (加熱・非加熱を問わず) があり、同一事例内の患者間で検出されたウイルスの N/S 領域の塩基配列が 100% 一致した 1 事例、従事者からウイルスが検出され、かつ、患者と従事者から検出されたウイルスの N/S 領域の塩基配列が 100% 一致した 3 事例および感染症発生動向調査事業における散発の胃腸炎事例で患者から検出されたウイルスの N/S 領域の塩基配列が 100% 一致した 4 事例。

### 2 カプシド P2 ドメイン領域の解析

P2 ドメイン領域の増幅は 1st L1F/L7R<sup>1)</sup>, 2nd GII-5a/ GII-2Ra<sup>2)</sup> プライマーを用いた nested PCR により実施した。増幅産物を精製後、ダイレクトシーケンシスにより塩基配列を決定した。

### 結 果 と 考 察

調査対象事例で検出された GII/4 2012 変異株の N/S 領域の塩基配列を図 1 に示した。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であっても患者から検出されるウイルスの N/S 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かった。

次に、P2 ドメイン領域の塩基配列を図 2 に示した。P2 ドメイン領域の解析を進めるにあたり、従事者からウイルスが検出された食中毒事例については、従事者を介した同一ウイルスによる感染の可能性があり、患者と従事者から検出されたウイルスは N/S 領域だけでなく、P2 ドメイン領域の塩基配列も一致するものと推測した。一方、感染症発生動向調査事業における散発の胃腸炎事例については、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% 一致していたが、発生時期や地域等から患者間に接点はないと推察し、異なる

表 1 調査対象事例

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	患者	あり
				07F	患者	
				16F	患者	
	281/282 (99.6%)	食中毒	21309	02F	患者	あり
				04F	患者	
				12F	患者	
281/282 (99.6%)	有症苦情	21314	03F	患者	あり	
			04F	患者		
一致	277/277 (100%)	有症苦情	21307	07F	患者	あり
				08F	患者	
				09F	患者	
	282/282 (100%)	食中毒	21251	01F	患者	なし
				10F	従事者	
	282/282 (100%)	食中毒	21261	26F	患者	なし
				56F	従事者	
	282/282 (100%)	食中毒	21262	13F	従事者	なし
				24F	患者	
				1120534F	患者	
1120536F				患者		
282/282 (100%)	散発		1120570F	患者	不明	
			1130045F	患者		

ウイルスの感染と考えられるため、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 2 に示すように、実際に、従事者からウイルスが検出された 21251, 21261, 21262 の食中毒事例では、各事例において、患者と従事者から検出されたウイルスの塩基配列は N/S 領域だけでなく、P2 ドメイン領域においても 100%一致したが、散発の胃腸炎事例では、N/S 領域の塩基配列が 100%一致した 4 人の患者間において、P2 ドメイン領域の塩基配列に数カ所の差が認められた。すなわち、前者の事例では同一ウイルスの感染による可能性が高いと考えられ、後者の事例では N/S 領域は同じ配列をもつが、P2 ドメイン領域の配列が異なる別のウイルスに感染したものと考えられた。

そこで、これらの事例を比較対照として、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 領域の塩基差についての解釈を P2 ドメイン領域の解析から検討することにした。同一事例内の患者間で検出されたウイルスの 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 では、各事例において、患者間で P2 ドメイン領域の塩基

配列に数カ所の差が認められた。また、患者間で検出されたウイルスの N/S 領域の塩基配列が 100%一致した事例 21307 においても、P2 ドメイン領域の塩基配列に数カ所の差が認められた。さらに、21314 を除く事例では、個々の患者から検出されたウイルスの塩基配列にミックス塩基部位が数カ所認められた。この点については、感染症発生動向調査事業における散発の胃腸炎患者から検出されたウイルスでは、P2 ドメイン領域の塩基配列にミックス塩基部位が認められなかったことと対照的であった。

NV は変異速度が速いウイルスとして知られている<sup>3)</sup>が、単一の事例の発生期間中に患者体内でこのような複数カ所の変異が起こる可能性は低いと思われる。したがって、二枚貝の喫食がある事例において、同一事例内の患者から検出されたウイルスの N/S 領域の塩基配列に 1~2 塩基差が認められたのは、患者体内でのウイルスの変異によるものではなく、P2 ドメイン領域の配列も異なる別のウイルスの感染による結果と考えることもできる。その要因として、二枚貝を含めた食事が原因と断定された食中毒事例では、次のような汚染経路も考察される。背景には、GII/4 2012 変異株に

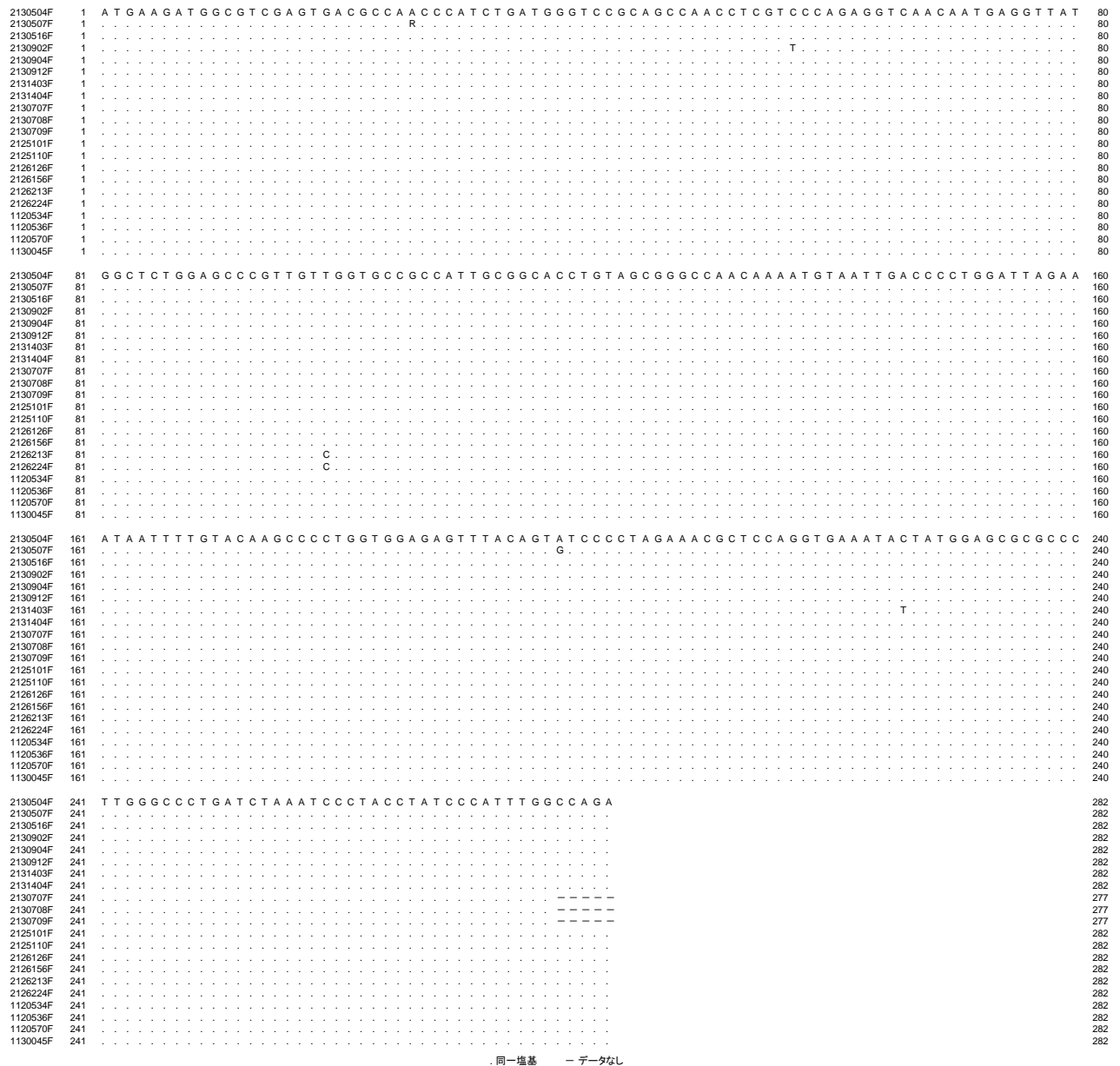


図1 N/S領域の塩基配列

感染した不特定多数の感染性胃腸炎患者が存在し、人への感染を繰り返す間に、N/S領域は比較的保存された領域であるので大きな差はないが、超可変領域であるP2ドメイン領域には変異が蓄積されていき、P2ドメイン領域の配列が異なるウイルスが誕生する。これらの様々なウイルスが二枚貝を汚染し、二枚貝体内には遺伝子型は同じGII/4 2012変異株でありながらも、微妙に塩基配列を異にするウイルスが蓄積する。そして、二枚貝を喫食した患者では、それぞれの患者体内で最も効率よく増殖できるウイルスが増殖し、微妙に塩基配列の異なるウイルスとして検出されたものと推察された。さらに、個々の患者から検出されたウイ

ルスの塩基配列を見てもミックス塩基部位が数カ所認められたことから、一人の患者体内でも塩基配列の異なる複数種類のGII/4 2012変異株が増殖していることが推察された。一方、有症苦情として処理された事例では、二枚貝を含めた食事が原因とは断定されていないので、散発の感染症として、それぞれの患者がたまたま異なるウイルスに感染したとの解釈もできる。

二枚貝から検出されるNVは多様であり<sup>4)</sup>、また、二枚貝による食中毒事件では同一事件の患者から遺伝子型の異なるNVが検出される割合が高いことが特徴として挙げられている<sup>5), 6)</sup>が、今回の検討事例から、同じ遺伝子型であっても、微妙に塩



基配列の異なる複数種類のウイルスが検出されることも、ひとつの特徴と考えられた。いずれにせよ、遺伝子型解析は同一の遺伝子型に分類されたからといっても、解析しているのはウイルスゲノムの一部の領域であり、全領域の解析を行っているわけではないので、その結果の解釈には十分に注意しなければならない。

#### 文 献

- 1) 吉澄志磨 他：2005/06 及び 2006/07 シーズンのノロウイルスによる胃腸炎集団発生について，北海道立衛生研究所報，57，91～95(2007)
- 2) 埼玉県衛生研究所：「ウイルス性食中毒の効率的な原因究明及び行政支援に関する研究」，地域保健推進特別事業報告書，10～20(平成 18 年 3 月)
- 3) 佐藤裕徳：4. ヒトノロウイルスの生存戦略，ウイルス，60(1)，21～32(2010)
- 4) 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)
- 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) 野田衛 他：食中毒統計，NESFD 情報および遺伝子型別結果を利用したノロウイルス食中毒事例の原因食品におけるカキの寄与率の推定，食中毒調査の精度向上のための手法等に関する調査研究分担研究報告書，137～144(平成 24 年度)