

## 22. 神戸市内で検出されたノロウイルス流行株の次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析

○有川 健太郎（神戸市環境保健研究所）

### 【研究の目的】

ノロウイルス（NoV）の遺伝子は非常に変異しやすく、新型や変異型 NoV のアウトブレイクが懸念されている。2016/2017 冬季シーズンは国内で GII.P16-GII.2 遺伝子型 NoV が大流行した。しかし、神戸市内では、国内で報告例の無い GII.Pe-GII.2 遺伝子型 NoV が主要な流行遺伝子型であった。そこで、本研究では神戸市内で検出された NoV 株について次世代シーケンサーを用いたゲノム全長解析を行い、神戸市内流行変異株の実態や変異過程を明らかにすることを試みた。

### 【材料と方法】

#### 1) 調査対象

2015-2019 年度に、神戸市内食中毒疑い事例および神戸市感染症発生動向調査で搬入された感染性胃腸炎患者便検体のうち、qPCR Norovirus (GI/GII) Typing Kit (TaKaRa) で NoV が陽性と判断された事例の異なる 24 検体を調査対象に用いた（表）。

#### 2) サンガー法による NoV 遺伝子型決定

PBS で懸濁した便乳剤から QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出し、厚労省から通知されている「ノロウイルスの検出法」<sup>1)</sup>に基づき nested RT-PCR を行い、1st および 2nd の増幅産物からダイレクトシーケンス法でカプシド領域 (G2-SKF、G2-SKR プライマーセット)、およびポリメラーゼ領域 (P1、P3 プライマーセット) の部分塩基配列を決定し、Norovirus genotyping tool により遺伝子型を確認した。

#### 3) NGS による全塩基配列の解読と遺伝子解析

NGS 解析には 2) より得られた RNA を使用した。RNA 濃度は Qubit RNA HS アッセイキット (ThermoFisher) で測定した。ライブラリー調製は NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit for Illumina® (New England Biolabs) で行い、ビーズによる DNA 精製時の手間削減や、試薬の節約のため、今回はマニュアルの半分量で行った。1 検体につき 5ng の Total RNA を使用し (RNA 濃度が検出下限値以下の試料については RNA 原液を使用した)、Index Primers Set1 と Set2 (New England Biolabs) の 24 種のインデックスを用いてライブラリーを作製した。24 種のライブラリーを 5 μL ずつ等量混合し、合計 120 μL を 1% アガロースゲルで 2 から 3 レーンに分け、電気泳動を行った。各々のレーンの 500~550bp 付近のアガロースを切り出し、Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) で DNA を抽出後、

Qubit DNA HS アッセイキット (ThermoFisher) で濃度を測定し、Miseq v3 (300bp x 2) (Illumina) を用いて 24 試料を同時に解析した。得られたデータの解析には、国立感染症研究所が提供する GenEpid-J の VirusTAP<sup>2)</sup> を用いた。

## 【実施内容・結果】

### 1) サンガー法による遺伝子型決定

2016 年/2017 年冬季シーズンは GII.P16\_GII.2 と呼ばれる遺伝子型の NoV が全国で流行していた。サンガー法で同年度の神戸市内流行株の遺伝子型を決定した結果、GII.2 が 17 事例、GII.4 が 6 事例、GII.6 が 6 事例、GII.3 が 1 事例から分離され、神戸市でも GII.2 の流行が認められた。検出された GII.2 遺伝子型 NoV の詳細な遺伝子解析の結果、キャプシド領域の遺伝子型が GII.2 で、RdRp 領域が報告事例の無い GII.Pe や GII.P17 の NoV を複数検出した(表)。

表 神戸市で検出されたノロウイルス流行株のNGS解析リスト

サンプルID	検体番号	qPCR Ct値	RNA濃度 (ng/μL)	受付日	事例	サンガー法による解析			NGSによる解析				サンガー法とNGSの比較	
						キャプシド遺伝子型	RdRp遺伝子型	遺伝子型	最長コンティグ長	カバレッジ	VirusTAP 相同性Top hit	遺伝子型	キャプシド領域	RdRp領域
1	15-176	20.1	2.3	2015/12/15	サーベイ	GII.4	GII.Pe	GII.Pe_GII.4	7393 nt	472 x	Norovirus GII strain Hu/GII.4/Jinan/JN010/2017/CHN, partial genomeMG214988.1	GII.Pe_GII.4	一致	一致
2	16-075	18	<2	2016/06/10	サーベイ	GII.4	GII.Pe	GII.Pe_GII.4	7377 nt	3616 x	Norovirus GII strain Hu/GII.4/Jinan/JN010/2017/CHN, partial genomeMG214988.1	GII.Pe_GII.4	一致	一致
3*	16-142	26.3	<2	2016/11/17	食中毒疑い事例	GII.2	GII.Pe	GII.Pe_GII.2**	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	16-151	17.5	2.6	2016/11/19	集団感染事例	GII.2	GII.P16	GII.P16_GII.2	6227 nt, 919 nt, 1152 x, 1361 x		Norovirus GII strain Hu/GII.P16_GII.2/Brisbane/QLD8512/2016/AU, partial genomeK905337.1	GII.P16_GII.2	一致	一致
5*	16-162	23.8	2.3	2016/11/24	サーベイ	GII.2	GII.Pe	GII.Pe_GII.2**	7323 nt	31 x	Norovirus GII strain Hu/GII.P16_GII.2/Brisbane/QLD8512/2016/AU, partial genomeK905337.1	ND	ND	ND
6	16-164	20.1	<2	2016/12/02	サーベイ	GII.2	GII.Pe	GII.Pe_GII.2**	7394 nt	384 x	Norovirus GII strain Hu/GII.P16_GII.2/Brisbane/QLD8512/2016/AU, partial genomeK905337.1	GII.P16_GII.2	一致	不一致
7	16-170	19.1	2	2016/12/07	集団感染事例	GII.2	GII.Pe	GII.Pe_GII.2**	7364 nt	648 x	Norovirus GII strain Hu/GII.P16_GII.2/Brisbane/QLD8512/2016/AU, partial genomeK905337.1	GII.P16_GII.2	一致	不一致
8	16-193	18.2	3.79	2016/12/16	食中毒疑い事例	GII.2	GII.Pe	GII.Pe_GII.2**	7414 nt	650 x	Norovirus GII strain Hu/GII.P16_GII.2/Brisbane/QLD8512/2016/AU, partial genomeK905337.1	GII.P16_GII.2	一致	不一致
9	16-197	16.6	2.1	2016/12/16	サーベイ	GII.4	ND	GII.Pe_GII.4	595 nt, 1894 nt, 258 nt, 324 x, 464 x, 1048 x		Norovirus Hu/GII.4/GII4-NG1242/2011/JP RNA, complete sequenceAB972502.1	GII.Pe_GII.4	不一致	ND
10	16-198	19.1	7.1	2016/12/16	サーベイ	GII.2	GII.Pe	GII.Pe_GII.2**	7423 nt	267 x	Norovirus Hu/GII.2/PP2015/GII.P2_GII.2/Salerno-169 RNA, nearly complete genomeL209440.1	GII.P2_GII.2	一致	不一致
11*	16-199	27.7	7.7	2016/12/16	サーベイ	GII.2	GII.Pe	GII.Pe_GII.2**	590 nt	7 x	Norovirus GII isolate GZ22113 VP1 gene, partial cdsMG746119.1	ND	ND	ND
12	16-212	19.9	3.85	2016/12/21	食中毒疑い事例	GII.2	ND	GII.2	7421 nt	160 x	Norovirus GII strain Hu/GII.P16_GII.2/Brisbane/QLD8512/2016/AU, partial genomeK905337.1	GII.P16_GII.2	不一致	ND
13*	16-236	22.8	12.3	2016/12/28	食中毒疑い事例	GII.2	GII.P16	GII.P16_GII.2	3224 nt	14 x	Norovirus GII isolate GZ24890, complete genomeMG746014.1	ND	ND	ND
14	16-244	18.6	4.37	2017/01/13	食中毒疑い事例	GII.2	ND	GII.2	7389 nt	284 x	Norovirus GII strain Hu/GII.P16_GII.2/Brisbane/QLD8512/2016/AU, partial genomeK905337.1	GII.P16_GII.2	一致	ND
15	16-267	17.6	<2	2017/02/02	食中毒疑い事例	GII.2	GII.P17	GII.P17_GII.2**	7324 nt	3818 x	Norovirus GII strain Hu/GII.P16_GII.2/Brisbane/QLD8512/2016/AU, partial genomeK905337.1	GII.P16_GII.2	一致	不一致
16	17-071	19.55	2	2017/05/26	サーベイ	GII.4	GII.Pe	GII.Pe_GII.4	7381 nt	578 x	Norovirus Hu/GII.4/GII4-NG1242/2011/JP RNA, complete sequenceAB972502.1	GII.Pe_GII.4	一致	一致
17	17-088	17.25	2.69	2017/06/19	集団感染事例	GII.2	GII.P16	GII.P16_GII.2	7214 nt	586 x	Norovirus GII strain Hu/GII.P16_GII.2/Brisbane/QLD8512/2016/AU, partial genomeK905337.1	GII.P16_GII.2	一致	一致
18	17-149	18.25	2.9	2017/09/11	集団感染事例	GII.2	GII.P16	GII.P16_GII.2	7378 nt	710 x	Norovirus Hu/JSWX201703-10/CHN complete cdsMF167652.1	GII.P16_GII.2	一致	一致
19	17-244	18.8	3.17	2017/12/14	サーベイ	GII.4	GII.Pe	GII.Pe_GII.4	7480 nt	811 x	Norovirus GII strain Hu/GII.4/Jinan/JN010/2017/CHN, partial genomeMG214988.1	GII.Pe_GII.4	不一致	一致
20	18-121	15	4.99	2018/11/30	サーベイ	GII.4	GII.Pe	GII.4	7478 nt	6456 x	Norovirus GII strain Hu/GII.4/Jinan/JN010/2017/CHN, partial genomeMG214988.1	GII.Pe_GII.4	一致	一致
21	18-171	19.82	4.02	2019/02/15	サーベイ	GII.2	ND	GII.2	7475 nt	196 x	Norovirus GII isolate JNCH8, complete genomeMG746019.1	GII.P16_GII.2	一致	ND
22	18-209	15.8	4.29	2019/03/08	サーベイ	GII.2	GII.P16	GII.P16_GII.2	7424 nt	1150 x	Norovirus GII isolate JNCH8, complete genomeMG746019.1	GII.P16_GII.2	一致	一致
23	18-245	18.7	<2	2019/03/27	集団感染事例	GII.2	ND	GII.2	7420 nt	992 x	Norovirus GII isolate JNCH8, complete genomeMG746019.1	GII.P16_GII.2	一致	一致
24	19-021	18.1	<2	2019/04/16	食中毒疑い事例	GII.2	ND	GII.2	7378 nt	3570 x	Norovirus GII isolate JN-I18, complete genomeMG746020.1	GII.P16_GII.2	一致	一致

ND : not-determined  
\* :NGSで解析できなかった検体  
\*\* :未報告の遺伝子型

### 2) NGS による全塩基配列の解読と遺伝子解析

Miseq の解析結果を表に示す。24 検体中 4 検体(③16-142、⑤16-162、⑪16-199、⑬16-236) は読み取り深度(カバレッジ)が浅く、解析困難であった。これら 4 検体の CT 値は、他の検体と比べて高い数値を示しており、20 より大きい CT 値の検体は NoV の全長解析が困難な傾向が見られた。また、RNA 濃度が検出下限値以下や少なかった検体(②16-075、⑥16-164、⑦16-170、⑨16-197、⑮16-267、⑯17-071、⑳18-245、㉑19-021)のカバレッジは十分であり、NoV の NGS 解析には RNA 濃度より CT 値が影響すると推察できた。

### 3) データ解析

#### i) NGS とサンガー法で得られた NoV 解析結果の比較

NGS とサンガー法で得られたシーケンス結果を比較した結果、キャプシド領域で 3 株 (16-197、16-212、17-244) で NGS の結果と不一致が認められた。サンガー法の配列データを再確認したところ、ピークが重複して読み取りが不十分であったため、NGS の解析結果と齟齬が生じたものと思われた。一方、RdRp 領域は 2016 年度の 5 検体 (16-164、16-170、16-193、16-198、16-267) で完全に不一致な結果となった。コンタミや検体の取り違いを疑った結果、16-267 と 17-267 (NGS 解析対象外検体) の RdRp 領域の配列がほぼ一致しており、サンガー法で解析に用いた cDNA 試料の取り間違いが推察された。

#### ii) NGS で得られたコンティグ配列の比較解析

NGS で得られた最長コンティグについてアライメント解析を実施し、NJ 法により系統樹を作成した (図)。GII.P16\_GII.2 遺伝子型 NoV に着目すると、2016/2017 冬季シーズンに分離された NoV 株は相同性が高く、感染力の強い遺伝子型株が一気に蔓延した事が示唆された。2017/2018 冬季シーズンにはこの遺伝子型による流行は認められず、1 シーズンだけの流行であった。2018/2019 冬季シーズンにも GII.P16\_GII.2 遺伝子型 NoV が検出されているが、2016/2017 冬季シーズンの遺伝子型とは異なる GII.P2\_GII.2 遺伝子型 NoV の流行であった。GII.Pe\_GII.4 は毎年のように全国や神戸市内で検出されている遺伝子型 NoV であるが、詳細な遺伝子解析の結果、全く同じ遺伝子型の NoV が年度をまたいで流行しているわけではなく、従来の遺伝子配列とは異なる新たな GII.Pe\_GII.4 遺伝子型 NoV が年度ごとに流行している傾向が認められた。

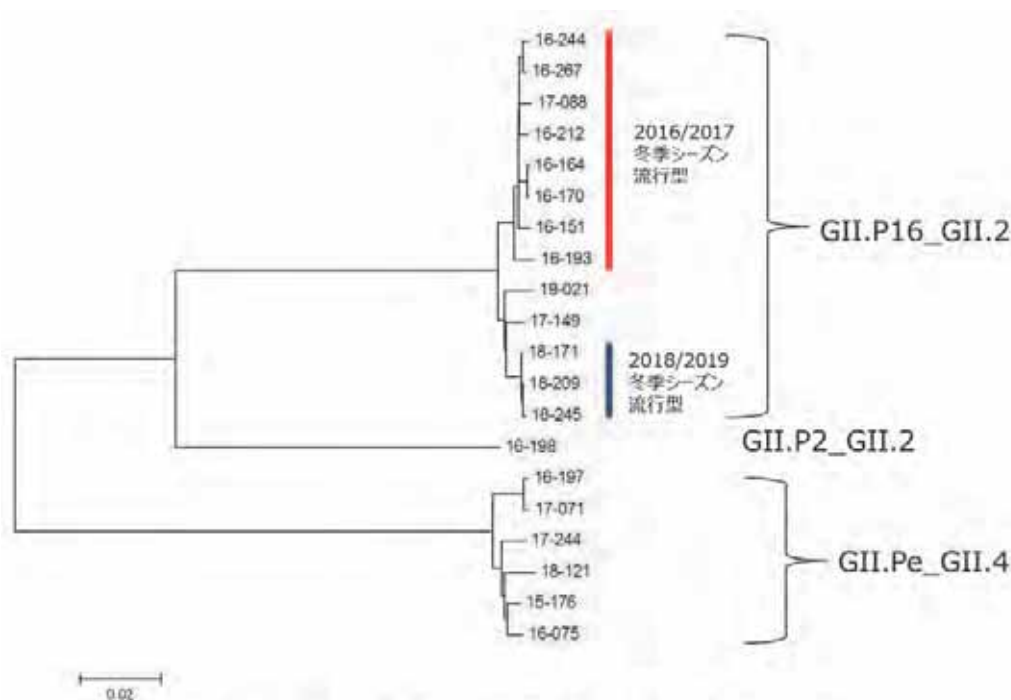


図 NGSで得られた最長コンティグのアライメント解析(7273bp)

## 【考察・今後の課題】

本研究課題は、神戸市内で検出された新型 NoV について NGS 解析を実施し、キメラ構造を明らかにすることを目的に実施した。NGS 解析の結果、新型と考えられた NoV 検体の遺伝子型はいわゆる全国流行遺伝子型であり、誤った cDNA 検体を解析したための結果と考えられた。NGS 解析より得られた NoV 全長配列の比較解析結果より、2016/2017 冬季シーズンに分離された NoV は相同性が高く、これらは 1 シーズンに急速に蔓延拡大したクローンであると考えられた。一方、2017/2018 冬季シーズン以降では流行株と相同性の高い NoV は検出されておらず、異なる塩基配列を有する新たな GII.P16\_GII.2 のクラスターによる市内蔓延が確認することができた。これらの知見は NoV の全長配塩基列解析結果により得られた成果である。サンガー法を使用しても NoV の全長解析は可能であるが、1 検体あたりにかかる労力が非常に多く、1 週間以内で 24 検体の NoV のほぼ全長配列を得ることができない NGS は非常に強力なツールである。便検体からの NoV の NGS 解析は少量の RNA からでも良好な結果を得ることができた。また、NGS 解析結果は qPCR の CT 値が重要な指標になる事が分かった。つまり、シュレッシュホールド値を 0.2 に固定した時、CT 値が 20 以下の検体は良好な解析結果を得る傾向があり、この情報は NGS 解析に適用する検体の選別指標になる。本研究では 24 検体の解析に 13Gb~15Gb データ量入手できる Miseq v3 試薬キット（定価 277,000 円）を使用した。古い検体や RNA 濃度の少ない検体でもカバレッジを十分量得ることができた。今後、24 検体について解析データ量が 10 分の 1 である 1.2Gb データ量の MiseqV2 試薬キット Micro(定価 81,400 円)を使用し再度解析を試みる。MiseqV2 試薬キット Micro でも十分な解析結果が得られれば、1 検体当たりのコストを大幅に削減できるため、流行株の解析をタイムリーに実施し、詳細な発生状況を把握することが可能になるであろう。本研究では NoV 流行株の推移を、NGS を活用した全長塩基配列という科学的根拠に基づいて明らかにすることができた。今後、これらの研究成果はノロウイルスを含む様々な衛生対策に寄与するものと思われる。

## 【謝辞】

本研究を実施するに当たり、研究助成をいただきました公益財団法人大同生命事業団に、心より深謝いたします。

## 【参考文献】

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知 食安監発第 0514004 号「ノロウイルスの検出法について」
- 2) Yamashita A, et al., Front Microbiol Feb 2;7:32. doi: 10.3389/fmicb.2016.00032. eCollection 2016

【経費使途明細】

使 途	金 額
NEBNext Ultrara II RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB E7770S)	119,610 円
Index Primers Set1 x2 ケ (NEB E7335S)	27,216 円
Index Primers Set2 (NEB E7500S)	13,608 円
Miseq v2 試薬キット Micro (Illumina MS-103-1002)	81,000 円
Nikon COOLPIX A100RED (アズワン 63-2579-40)	12,420 円
16GB マイクロ SDHC メモリーカード(アズワン 63-2579-40)	3,024 円
BigDye Xterminator Purification Kit (Applied Biosystems 4376486)	30,240 円
ピペットマンスタンド (Watson NT-STD)	12,126 円
振込手数料	756 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円