

19. ノロウイルス胃腸炎集団発生事例の分子疫学解析 手法の確立と岐阜県の流行状況調査

○水野 卓也 (岐阜県保健環境研究所)

【研究目的】

ノロウイルスの分子疫学解析には遺伝子検査に用いる Capsid N/S 領域が主として利用されている¹⁾。この領域は遺伝子の変異が少なく、検出感度は高いが、株の由来識別能が低いため、現状では株の異同についてまで評価することはできない。本研究では、ノロウイルス集団発生事例の検体を用い、株レベルで識別するために必要な領域を選定することを目的とした。

【研究の必要性】

ノロウイルス胃腸炎集団発生事例の原因究明には、分子疫学解析が利用されている。遺伝子検出および解析には Kageyama¹⁾らが示す遺伝子領域が主として利用されており、岐阜県でも同領域を使用した解析を実施している。しかしながら、発生時期や場所も異なる複数の集団発生事例にも関わらず、同一遺伝子型のノロウイルスが原因となることがある。そのような場合、疫学的な関連性を調べるために、異なる由来の株を詳細に解析する必要がある。従来の方法は、検出感度を高めることを目的に、塩基配列の多様性が小さい領域を選定しているため、解析領域内の塩基配列が完全一致していても株レベルで関連性を判断することは困難となっている。分類上、遺伝子型よりも下位である株の異同を判断するためには、変異に富む領域を含んだ解析が必要となる。

本研究では、集団発生事例から検出されたノロウイルスの株を詳細に識別する手法を検討することで、Capsid N/S 領域で近縁である株を識別することができるようになる。また、ノロウイルス胃腸炎集団発生事例原因究明の解析方法の 1 つとして提案することにより、広域的な食品媒介性ノロウイルス食中毒発生時の原因解明という地域保健対策の推進に、寄与することが可能と考える。

【研究計画】

1. 岐阜県のノロウイルス検出状況
 - 1) Capsid N/S 領域による遺伝子型別

2014 年 4 月から 2018 年 3 月までに岐阜県（岐阜市を除く）が調査を行った食中毒等集団発生事例のうちノロウイルス遺伝子が検出された 75 事例 338 検体を対象とした。

遺伝子型の決定は、ノロウイルス遺伝子検出検体を用い、ノロウイルス Capsid N/S 領域

を増幅後、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、Norovirus genotyping tool により行った。

2) RNA-dependent RNA polymerase 領域および VP1 領域全長による遺伝子型別

ノロウイルス GII 遺伝子が検出された事例のうち RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) 領域および VP1 領域全長の増幅産物が得られた 58 事例 99 検体について、プライマーウォーキング法により塩基配列を決定し、Norovirus genotyping tool により遺伝子型を決定した。

2. 解析領域による塩基配列相同性評価および系統解析

RdRp 領域および VP1 領域全長の塩基配列が決定できた事例のうち、GII.P16-GII.2、GII.Pe-GII.4_Sydney2012、GII.P17-GII.17 の 3 遺伝子型が検出された 48 事例 83 検体を対象とした。一部の事例は事例内（同一由来株）の相同性を評価するため、複数の検体を対象とした（表 1）。

1) 塩基配列相同性評価

従来解析領域（RdRp 領域：Yuri22F/R、VP1 領域：G2-SKF/R）および領域全長の検体間の塩基置換数を解析し、遺伝子型ごとに事例内および事例間の塩基配列相同性を評価した。

2) 系統解析

各領域の全長塩基配列について MEGA 6 を用いて塩基置換の進化モデルを決定した後、最尤法にて系統樹を作成した。

【結果】

1. 岐阜県のノロウイルス検出状況

検出した遺伝子型について、シーズンごとに表 2 に示した。ノロウイルス GII の検出が多い傾向は例年同じであるが、遺伝子型別まで実施することで、シーズンごとに検出される遺伝子型に差が認められた。また、事例内で検出されるノロウイルスが同一遺伝子群であっても複数の遺伝子型が検出される事例も認められた。GII.17 は岐阜県では 2015 年 1 月に初めて検出され、2014/15 シーズンで最も検出数が多い遺伝子型であった。しかし、2015/16 シーズン以降は検出されるものの、検出事例は減少傾向であった。また、GII.2 は岐阜県では解析期間中、2016 年 12 月に初めて検出されて以降、最も検出数が多い遺伝子

表1. 事例ごとの解析検体数内訳

事例内 解析検体数	事例数		
	GII.P16- GII.2 (18検体)	GII.Pe- GII.4_Sydney2012 (44検体)	GII.P17- GII.17 (21検体)
1	5	15	12
2	—	—	1
3	3	7	1
4	1	2	1
Total	9	24	15

表2. ノロウイルス遺伝子型検出事例数

	NT	シーズン				
		2013/14	2014/15	2015/16	2016/17	2017/18
GI	NT	4	3	1		
	GII.9		1			
	GII.8		1			
	GII.7		2			
	GII.6				1	
	GII.3		5			
GII	GII.2			1		4
	GII.17		14	6	3	3
	GII.13	1	1	1		
	GII.10		1			
	GII.7				1	
	GII.6	1			2	
	GII.5		1			
	GII.4	3	6	10	4	4
	GII.3		3	2	1	
	GII.2				8	7
	NT : not typed	単位：事例				
	事例内で複数の遺伝子型が検出された事例あり					

NT : not typed 単位：事例

事例内で複数の遺伝子型が検出された事例あり

型であった。GII.4 の亜型は Sydney2012 であり、解析したすべてのシーズンで検出された。

RdRp 領域および VP1 領域全長による遺伝子型別の結果を表 3 に示した。GII.Pe および GII.P7 は下流の約 1300 nt の決定にとどまった。Capsid N/S 領域による遺伝子型別と VP1 領域全長による遺伝子型別の結果は一致していた。一方で、VP1 領域の遺伝子型が同一でも、RdRp 領域による遺伝子型別では、異なる遺伝子型が検出される事例も認められた。

表 3. Capsid N/S 領域および領域全長配列に基づく遺伝子

Capsid N/S 領域	領域全長		
	事例数	RdRp 領域	VP1 領域
GII.17	15	GII.P17	GII.17
GII.13	2	GII.P16	GII.13
GII.10	1	GII.P16	GII.10
GII.7	1	GII.P7	GII.7
GII.6	2	GII.P7	GII.6
GII.5	1	GII.P22	GII.5
GII.4_Sydney2012	24	GII.Pe	GII.4_Sydney2012
		1	GII.P12
GII.3	4	GII.P12	GII.3
GII.2	9	GII.P16	GII.2

58 事例中 2 事例は 2 つの遺伝子型を検出

2. 解析領域による塩基配列相同性評価

従来解析領域では、事例内の塩基配列は一致したが、事例間でも一致する検体が認められた（表 4）。一方、領域全長解析では、事例内で塩基配列が一致する確率は RdRp 領域では 93% (51/55)、VP1 領域では 84% (46/55) であり、VP1 領域の 1 事例 (GII.P16-GII.2) を除くと塩基置換は 1 nt 以内であった。また、事例間では遺伝子型により塩基置換の程度が異なっており、GII.P16-GII.2 では RdRp 領域は 7.91 nt (4.20 nt)（平均 (標準偏差)）、VP1 領域は 8.32 nt (3.00 nt)、GII.Pe-GII.4 では RdRp 領域は 17.37 nt (9.90 nt)、VP1 領域は 25.75 nt (12.43 nt)、GII.P17-GII.17 では RdRp 領域は 4.48 nt (1.96 nt)、VP1 領域は 5.48 nt (2.87 nt) であった。同じ遺伝子型の事例間で 1 nt 以上の塩基置換が認められる確率は、RdRp 領域では 99% (412/417)、VP1 領域では 100% (417/417) であった（表 4）。

表 4. 解析領域および塩基置換数ごとの事例識別信頼度

塩基置換数 (nt)	RdRp 領域						VP1 領域						
	GII.P16-GII.2		GII.Pe-GII.4_Sydney2012		GII.P17-GII.17		GII.P16-GII.2		GII.Pe-GII.4_Sydney2012		GII.P17-GII.17		
	Yur22F/R	全長	Yur22F/R	全長	Yur22F/R	全長	G2-SKF/R	全長	G2-SKF/R	全長	G2-SKF/R	全長	
塩基置換数 (nt)	0 <	94.44	100	94.57	99.28	76.19	97.14	69.44	100	95.29	100	54.29	100
	1 <	86.11	97.22	92.03	98.91	37.14	93.33	55.56	100	84.00	99.64	41.90	97.14
	2 <	63.89	91.67	83.33	97.46	8.57	86.67	13.89	97.22	72.83	99.28	13.33	90.48
	3 <	55.56	86.11	71.01	96.74	0.00	76.19	5.56	94.44	53.26	99.28	0.95	75.24
	4 <	44.44	86.11	65.58	96.01	0.00	62.86	0.00	94.44	29.35	98.55	0.00	58.10
	5 <	38.89	80.56	56.52	95.65	0.00	42.86	0.00	91.67	12.32	98.55	0.00	47.62

単位 : %

事例識別信頼度=定義を満たす事例間データ数/事例間データ数×100

事例識別信頼度は疫学情報にて別事例として判断した事例のうち分子疫学的解析にて塩基置換数の定義を満たすデータを別事例とした場合の信頼度を示している

3. 全長領域の系統解析

VP1 領域全長塩基配列での系統樹を図 1 に示す (RdRp 領域は未記載)。検体間の塩基置換数が 1 nt の場合、事例内では同一クラスターを形成したのに対し、事例間では異なるクラスターの形成が認められるものも存在した。また、岐阜県検出株と国内検出株との系統関係では、GII.P16-GII.2、GII.Pe-GII.4_Sydney2012 は岐阜県もしくは東海地方でサブクラスを作っていたが、GII.P17-GII.17 は地域、シーズンに特徴は認められなかった。

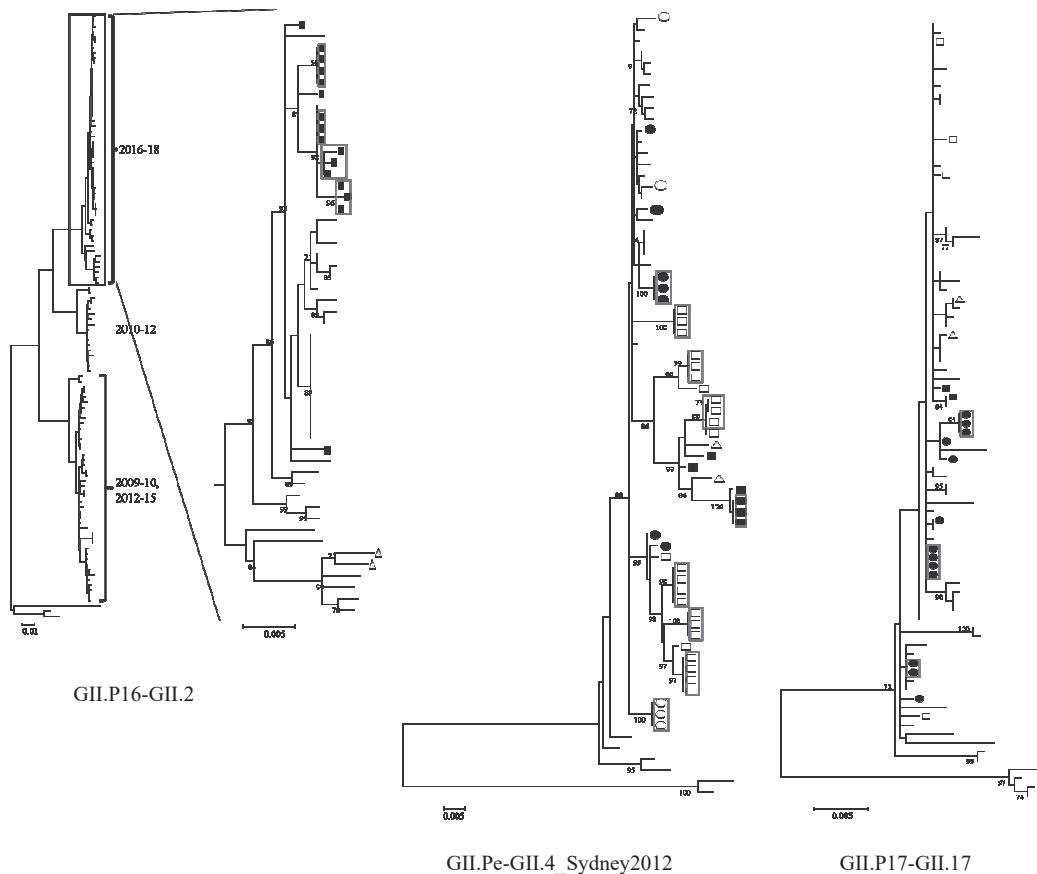


図 1 . VP1 全長塩基配列に基づく各遺伝子型の系統樹

進化モデルの設定 ; GII.P16-GII.2; Tamura-Nei, 93 + Γ , GII.Pe-GII.4_Sydney; Kimura 2-parameter + Γ ,

GII.P17-GII.17; Kimura 2-parameter + Γ

記号は各シーズンに岐阜県で検出した株を示す,

○ : 2013/14, ● : 2014/15, □ : 2015/16, ■ : 2016/17, △ : 2017/18

同一事例検出株は赤枠で示した。Bootstrap value は 70%以上を表記した

【考察と今後の課題】

岐阜県の流行と国内ノロウイルス流行状況^{2,3)}と比較すると、GII.P17-GII.17 および GII.P16-GII.2 の流行開始時期は同様の傾向が見られた。一方、報告数は、GII.P17-GII.17 では 2015/16 シーズン以降、全国同様岐阜県も減少傾向であるが、2015/16 シーズンに流行した GII.2 は 2017/18 シーズン全国的には大幅に減少したのに対し、岐阜県では両シーズンに大きな差は無かった。このことは、流行に地域差がある可能性を示しており、地方ごとのノロウイルスの流行を把握する必要性が高いと考える。さらに、本研究において ORF1-2 ジャンクション領域の組み換えが起こったと考えられるウイルス株が 1 事例で認められており、詳細に解析するためには RdRp および VP1 の両領域による遺伝子型決定が必要である。年齢層により検出されるノロウイルスの遺伝子型に異なる傾向があると報告されているが⁴⁾、本研究では、倫理面から個人情報を収集していないため、比較はできていない。詳細な流行状況を把握するためには、疫学情報と検出株との結びつけが必要であり、今後の課題

である。

近年、きざみのりによるノロウイルス集団発生事例の原因追究に分子疫学的解析が有用であったことが報告されている⁵⁾。解析により進化速度の推定がされているが⁶⁾、実際に国内検出株で事例内と事例間の塩基置換数を比較した報告は少ない。本研究では、国内で流行した3遺伝子型を対象として、RdRp領域、VP1領域全長を解析することで、由来の識別が可能であることを示した。しかし、塩基置換数の程度は遺伝子型で異なっており、実際に対象とする遺伝子型で検出株の類似度を評価する必要性がある。また、系統解析の結果、同じ遺伝子型でも検出される株に地域差がある可能性が示唆され、由来解析には、同じ地域で検出された株と比較することも重要と考える。

全国的にRdRp領域およびVP1領域全長塩基配列のデータが蓄積されれば、将来的には分子疫学的解析の情報から、広域的な食品媒介性ノロウイルス食中毒を早期に見出し、感染拡大防止につながることが期待される。

【参考文献】

- 1) Kageyama T, et al., J Clin Microbiol. 42: 2988-2995, 2004.
- 2) 国立感染症研究所：ノロウイルス等検出状況月別ノロウイルス GII 遺伝子型検出報告状況、2015/16-2017/18 シーズン (<https://www.niid.go.jp/niid/ja/iasr-noro>) .
- 3) Matsushima, Y., et al., Euro Surveill 20, pii=21173, 2015.
- 4) Sakon, N., et al., J Infect Dis. 211: 879-888, 2015.
- 5) Sakon, N., et al., Emerg Infect Dis. 24: 920-923, 2018.
- 6) Nagasawa, K., et al., Front Microbiol. 18, doi: 10.3389/fmicb.2018.00001.

【経費使途明細】

使 途	金 額
消耗品費（プライマー）	66,921 円
消耗品費（PrimeScript™ II High Fidelity One Step RT-PCR Kit）	43,200 円
消耗品費（BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit）	153,014 円
消耗品費（POP-7™ Polymer for 3500/3500xL Genetic Analyzers）	33,782 円
消耗品費（エチプロ除去カラム）	3,083 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円