

資料

## 2013/14 シーズンにおけるノロウイルスの遺伝子型検出状況

重本 直樹, 久常 有里\*, 谷澤 由枝, 島津 幸枝, 高尾 信一

### Norovirus genotypes detected in 2013/14 season

NAOKI SHIGEMOTO, YURI HISATSUNE\*, YUKIE TANIZAWA, YUKIE SHIMAZU, and SHINICHI TAKAO

(Received October 1, 2014)

GII/4-Sydney 2012 が大流行した翌シーズン (2013/14 シーズン) のノロウイルスの流行遺伝子型を調べたところ, GII/4, GII/6 が特に多く検出された。GII/4 については 2012/13 シーズンに流行した亜型 Sydney 2012 にすべて置き換わり, 以前に流行した亜型 Den Haag 2006b や NewOrleans 2009 は検出されなかった。また, これまで流行していなかった GII/6 が多く検出され, 特に 3 月から 6 月にかけて GII/6 による集団事例が多発した。

Key words : norovirus, genotype, GII/4, GII/6, 2013/14 season

## 緒 言

下痢症を引き起こすウイルスは種々知られているが [1-4], その中でもノロウイルスを原因とする割合が高く, 新しい亜型の出現等により 3~4 年周期で大流行を繰り返している [5-8]. 特に 2012/13 シーズンは新たな亜型 GII/4-Sydney 2012 の出現により, 全国的にノロウイルスが大流行したシーズンであったが [9-13], この亜型 Sydney 2012 が今後どのように推移していくかは不明である。そこで, 大流行の翌シーズン (2013/14 シーズン) に検出されたノロウイルスの遺伝子型を明らかにするとともに, GII/4 の亜型である Sydney 2012 及び, それ以前の亜型である Den Haag 2006b, NewOrleans 2009 がどのように推移したかを調べた。

## 材料および方法

### 1 供試サンプル

2013 年 11 月から 2014 年 6 月までに広島県内で発生したノロウイルスを原因とする集団事例 19 例, 及び小児の散発事例 39 例の糞便検体を用いた。

### 2 RT-PCR 法によるノロウイルスのカプシド上流域の遺伝子検出

10% 糞便乳剤から QIAamp Viral RNA mini Kit (QIAGEN) により RNA 抽出を行った。

逆転写反応は 5 × buffer 4 μl, 10mM dNTPs 4 μl, 50mM Random primer pd (N)<sub>9</sub> (タカラバイオ) 1 μl, RNase inhibitor (40U/μl) (TOYOBO) 0.5 μl, ReverTra Ace (100U/μl) (TOYOBO) 1 μl を含む反応液に抽出 RNA 9.5 μl を加え, 30℃・10 分, 42℃・60 分, 99℃・5 分の条件で行った。PCR 反応は, 10 × buffer 5 μl, 10mM dNTPs 4 μl, 10 μM のセンスおよびアンチセンスプライマー 各 1 μl, Ex Taq (5 U/μl) (タカラバイオ) 0.25 μl と cDNA 3 μl を加えた 50 μl の反応液で, 94℃・3 分の熱変性の後, 94℃・45 秒, 55℃・45 秒, 72℃・1 分を 40 サイクル行い, 最後に 72℃・15 分の最終伸長を行った。NoV 検出プライマーには GI 用に G1SKF, G1SKR, GII 用に G2SKF, G2SKR と G2ALSKR を用いた [14, 15]. また, 遺伝子型別で GII/4 と判別された株については VP 1 遺伝子の P 2 ドメイン領域を増幅するプライマーとして, GII4cap\_5898-5918 と GII4cap\_6415-6394 を用いた [16].

### 3 カプシド上流領域のシーケンスと遺伝子解析

RT-PCR 法での増幅産物を 2% アガロースゲルで電気泳動後に, QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)

\*現酒類総合研究所 : National Research Institute of Brewing

を用いて精製した。その後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life technologies) 及び Applied Biosystem 3500 Genetic Analyzer (Life technologies) を用いたダイレクトシークエンスにより塩基配列を決定した。遺伝子型別にはGI, GIIそれぞれ翻訳開始点から264bpの塩基配列を用い、MEGA5 (<http://www.megasoftware.net/index.php>) で系統樹解析を行った。遺伝子型の分類はKageyamaら [17] および病原微生物検出情報に示された分類 [18] に従った。また、遺

伝子型がGII/4と判明した株については、カプシドVP1遺伝子のSドメイン上の6, 9, 15, 45番目、及びP2ドメイン上のエピトープと思われる部位 [19-23] である294, 296-298, 333, 340, 342-347, 355-356, 365, 368, 372, 374, 390-395, 407, 412-414番目のアミノ酸を決定し、2012/13シーズン検出株、及び2013/14シーズン検出株間で比較を行った。



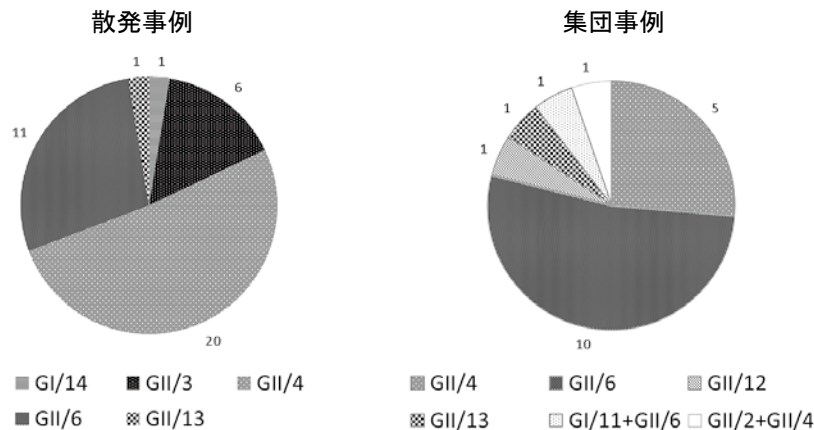


図2 2013/14年シーズンの検出遺伝子型別の発生事例数

表 月別の遺伝子型別検出事例数 (2013/14 シーズン集団事例)

遺伝子型	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月
GI/11	1							
GI/2			1					
GI/4	2		2	1		1		
GI/6	1	1			2	2	3	2
GI/12			1					
GI/13				1				

## 結 果

2013/14シーズンに検出されたノロウイルスのカプシド上流域の塩基配列を解読し、系統樹解析による遺伝子型別を行った(図1)。2013/14シーズンに当県で検出されたノロウイルスの遺伝子型は、GIが2種(GI/11, GI/14)、GIIが6種(GII/2, GII/3, GII/4, GII/6, GII/12, GII/13)であった。

散発事例では39例のうち、GII/4によるものが約半数の20例を占め、以下GII/6が11例、GII/3が6例の順で多かった(図2)。一方、集団事例では19例のうちGII/6によるものが10例、次いでGII/4によるものが5例あった。また、2つの型が同時に検出された事例が2例あり、これらはそれぞれGI/11とGII/6、GII/2とGII/4によるものであった(図2)。また、集団事例における月別の検出遺伝子型を調べたところ、特に3月から6月にかけてGII/6による集団事例が多発していた(表)。

2013/14シーズンに検出されたGII/4の亜型は、系統樹解析の結果、2012/13シーズンに出現し大流行したSydney 2012のみで、それ以前に流行したDen Haag 2006b, NewOrleans 2009様の亜型は認められなかった(図1)。

Sydney 2012について、2013/14シーズンに検出した21株と2012/13シーズン検出株のカプシドVP1遺伝子のSドメインの特定部位、及びP2ドメインのエピ

トープと思われる部位のアミノ酸配列を比較した(図3)。393番目のアミノ酸がセリン(S)からグリシン(G)に変異した株が2株見つかったが、その2株以外は2012/13シーズンに検出された株と同じアミノ酸構成であった。

## 考 察

2012/13シーズンは新しい亜型GII/4-Sydney 2012の出現によりノロウイルスが大流行し、検出された遺伝子型やGII/4亜型の構成に大きな変化のあったシーズンであった。2013/14シーズンは、この流行した亜型GII/4-Sydney 2012が今後の主流になり、これまでの亜型は淘汰されていくのか、また、GII/4以外の遺伝子型の動向に変化があるかなど、今後のノロウイルスの流行を探るうえで重要なシーズンであると言える。そこで我々は、2013/14シーズンに検出されたノロウイルスについて遺伝子型別を行い、検出状況を明らかにした。

2013/14シーズンに当県で検出されたノロウイルスの遺伝子型は、GIがGI/11, GI/14, GIIがGII/2, GII/3, GII/4, GII/6, GII/12, GII/13で、特にGII/4, GII/6, GII/3が多く検出されたシーズンとなった。GII/3については散発事例のみであったが、GII/4, GII/6は集団事例、散発事例ともに多く検出された。特に当県では春先に立て続けて集団事例が多発したが、そのほとんどがGII/6によるものであった。ここ数年シーズン当県で

図3 ノロウイルス遺伝子型 GII/4 の Capsid 領域のアミノ酸変異

株名	Amino Acid Position																																							
	Sドメイン										P2ドメイン																													
Den Haag 2006b	N	N	A	Q	A	S	R	N	V	G	G	S	T	R	G	H	S	A	V	S	E	D	Q	D	G	S	T	S	N	V	H									
NewOrleans 2009	S	N	T	Q	P	S	R	N	V	T	G	S	T	R	G	H	S	A	V	A	D	D	Q	D	G	S	T	S	N	I	H									
Sydney 2012	S	N	A	Q	T	S	R	N	V	T	G	S	T	R	G	H	S	A	V	E	D	D	Q	D	G	T	S	N	T	H										
2012/13 シーズン検出株	S	N	A	Q	T	S	R	N	V	T	G	S	T	R	G	H	S	A	V	E	D	D	Q	D	G	T	S	N	T	P										
Case272	S	N	A	Q	T	S	R	N	V	T	G	S	T	R	G	H	S	A	V	E	D	D	Q	D	G	T	S	N	T	P										
Case273	S	N	A	Q	T	S	R	N	V	T	G	S	T	R	G	H	S	A	V	E	D	D	Q	D	G	T	S	N	T	P										
Case276	S	N	A	Q	T	S	R	N	V	T	G	S	T	R	G	H	S	A	V	E	D	D	Q	D	G	T	S	N	T	P										
Case279	S	N	A	Q	T	S	R	N	V	T	G	S	T	R	G	H	S	A	V	E	D	D	Q	D	G	T	S	N	T	P										
Case280	S	N	A	Q	T	S	R	N	V	T	G	S	T	R	G	H	S	A	V	E	D	D	Q	D	G	T	S	N	T	P										
1477	S	N	A	Q	T	S	R	N	V	T	G	S	T	R	G	H	S	A	V	E	D	D	Q	D	G	T	S	N	T	P										
1483	S	N	A	Q	T	S	R	N	V	T	G	S	T	R	G	H	S	A	V	E	D	D	Q	D	G	T	S	N	T	P										
1487	S	N	A	Q	T	S	R	N	V	T	G	S	T	R	G	H	S	A	V	E	D	D	Q	D	G	T	S	N	T	P										
1488	S	N	A	Q	T	S	R	N	V	T	G	S	T	R	G	H	S	A	V	E	D	D	Q	D	G	T	S	N	T	P										
HA13-80516	S	N	A	Q	T	S	R	N	V	T	G	S	T	R	G	H	S	A	V	E	D	D	Q	D	G	T	S	N	T	P										
HA13-80517	S	N	A	Q	T	S	R	N	V	T	G	S	T	R	G	H	S	A	V	E	D	D	Q	D	G	T	S	N	T	P										
HA13-80522	S	N	A	Q	T	S	R	N	V	T	G	S	T	R	G	H	S	A	V	E	D	D	Q	D	G	T	S	N	T	P										
HA13-80525	S	N	A	Q	T	S	R	N	V	T	G	S	T	R	G	H	S	A	V	E	D	D	Q	D	G	T	S	N	T	P										
Hat13-7	S	N	A	Q	T	S	R	N	V	T	G	S	T	R	G	H	S	A	V	E	D	D	Q	D	G	T	S	N	T	P										
Hat13-9	S	N	A	Q	T	S	R	N	V	T	G	S	T	R	G	H	S	A	V	E	D	D	Q	D	G	T	S	N	T	P										
Hat13-10	S	N	A	Q	T	S	R	N	V	T	G	S	T	R	G	H	S	A	V	E	D	D	Q	D	G	T	S	N	T	P										
Hat14-12	S	N	A	Q	T	S	R	N	V	T	G	S	T	R	G	H	S	A	V	E	D	D	Q	D	G	T	S	N	T	P										
Hat14-13	S	N	A	Q	T	S	R	N	V	T	G	S	T	R	G	H	S	A	V	E	D	D	Q	D	G	T	S	N	T	P										
Ka13-99215	S	N	A	Q	T	S	R	N	V	T	G	S	T	R	G	H	S	A	V	E	D	D	Q	D	G	T	S	N	T	P										
Ka13-99260	S	N	A	Q	T	S	R	N	V	T	G	S	T	R	G	H	S	A	V	E	D	D	Q	D	G	T	S	N	T	P										
Ka13-99264	S	N	A	Q	T	S	R	N	V	T	G	S	T	R	G	H	S	A	V	E	D	D	Q	D	G	T	S	N	T	P										

亜型標準株配列情報の引用元 accession number : EF126965 (Den Haag 2006b), GU445325 (NewOrleans 2009), JX459908 (Sydney 2012)

亜型標準株間の変異を網掛け, 2012/13 シーズン検出株のアミノ酸配列を太字, 2013/14 シーズン検出株間の変異を白抜きで示す

は GII/6 の検出がないなかでの流行であったが、この GII/6 の検出事例増加は病原微生物検出情報の集計にも表れており [24]、当県だけの状況ではないと思われる。また、系統樹解析において検出された GII/6 は、2つのクレードに分かれることから (図1)、由来の異なる株が同時に流行していた可能性がある。このことについては、より広い領域のウイルスゲノム塩基配列を解読することで、この2つのクレードの詳細な違いを明らかにできると思われ、今後の解析が必要である。

一方、GII/4 については、検出された亜型がすべて Sydney 2012 となっており、以前に主流であった Den Haag 2006b, New Orleans 2009 様の亜型は当県では全く検出されなかった。このことから、GII/4 の主流が 2012/13 シーズンから完全に Sydney 2012 へ移行していることが示唆された。全国的にも同様な傾向が示されており [16, 25-28]、今後は本亜型が GII/4 の流行の中心になると思われる。また、GII/4 Sydney 2012 についてカプシドを構成する VP 1 遺伝子の S ドメインの特定部位及び、P 2 ドメインのエピトープと思われる部位のアミノ酸配列を調べ、2012/13 シーズンの検出株と比較したところ、一部の部位でアミノ酸に変異は認められたものの、ほとんどの株が同じであり、2013/14 シーズンも引き続き前シーズンからの株が流行しているものと考えられた。流行していた株が前シーズンと同様な株であったことから、2013/14 シーズンにおける GII/4 の検出数は前シーズンほど多くなく、病原微生物検出情報での報告数も半数以下になったものと思われる [18]。

以上のことから、大流行の翌シーズンの GII/4 の状況として、主要な亜型が Sydney 2012 へ移行したことが鮮明となった。また、当県ではこれまで流行したことのない GII/6 の検出数が伸びており、春先に集団事例が連続しておこったことから、引き続きこの遺伝子型の動向について注視しておく必要があると考えている。

## 文 献

- [1] Mitchell DK, Matson DO, Jiang X, Berke T, Monroe SS, Carter MJ, Willcocks MM, Pickering LK. Molecular epidemiology of childhood astrovirus infection in child care centers. *J Infect Dis.* 1999;180:514-517.
- [2] Nakata S, Honma S, Kinoshita-Numata K, Kogawa K, Ukae S, Morita Y, Adachi N, Chiba S. Member of the family Caliciviridae (Norwalk virus and Sapporo virus) are the most prevalent cause of gastroenteritis outbreaks among infant in Japan. *J Infect Dis.* 2000;181:2029-2032.
- [3] Okada M, Shinozaki K, Ogawa T, Kaiho I. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of Sapporo-like viruses. *Arch Virol.* 2002;147:1445-1451.
- [4] Pang XL, Honma S, Nakata, Vesikari T. Human caliciviruses in acute gastroenteritis of young children in the community. *J Infect Dis.* 2000;181:S228-S294.
- [5] Motomura K, Oka T, Yokoyama M, Nakamura H, Mori H, Ode H, Hansman GS, Katayama K, Kanda T, Tanaka T, et al. Identification of monomorphic and divergent haplotypes in the 2006-2007 norovirus GII/4 epidemic population by genomewide tracing of evolutionary history. *J Virol.* 2008;82(22):11247-11262.
- [6] Zheng D-P, Widdowson M-A, Glass RI, Vinjé J. Molecular epidemiology of genogroup II-genotype 4 noroviruses in the United States between 1994 and 2006. *J Clin Microbiol.* 2010;48(1):168-177.
- [7] Siebenga JJ, Vennema H, Zheng D-P, Vinjé J, Lee BE, Pang X-L, Ho ECM, Lim W, Choudekar A, Broor S, et al. Norovirus illness is a global problem: Emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007. *J Infect Dis.* 2009;200(5):802-812.
- [8] Pang XL, Preiksaitis JK, Wong S, Li V, Lee BE. Influence of novel norovirus GII.4 variants on gastroenteritis outbreak dynamics in Alberta and the northern territories, Canada between 2000 and 2008. *PloS One.* 2010;5(7):e11599.
- [9] CDC. Emergence of new norovirus strain GII.4 Sydney-United States, 2012. *Morb Mortal Wkly Rep.* 2013;62(3):55.
- [10] Fonager J, Hindbæ LS, Fischer TK. Rapid emergence and antigenic diversification of the norovirus 2012 Sydney variant in Denmark, October to December, 2012. *Euro Surveill.* 2013;18(9):pii=20413.
- [11] Leshem E, Wikswø M, Barclay L, Brandt E, Storm W, Salehi E, Desalvo T, Davis T, Saupe A, Dobbins G, et al. Effects and clinical significance of GII.4 Sydney norovirus, United State, 2012-2013. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(8):1231-1238.
- [12] van Beek J, Ambert-Balay K, Botteldoorn N, Eden JS, Fonager J, Hewitt J, Iritani N, Kroneman A, Vennema H, Vinjé J, et al. Indication for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype

- II.4, late 2012. *Euro Surveill.* 2013;18( 1 );pii=20345.
- [13] Vega E, Barclay L, Gregoricus N, Shirley SH, Lee D, Vinjé J. Genotypic and epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the United States, 2009 to 2013. *J Clin Microbiol.*2014;52(1):147-155.
- [14] Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Natori K, Takeda N, Katayama K. J. Virol. Methods. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods.* 2002;100(1-2):107-114.
- [15] Nishida T, Nishio O, Kato M, Chuma T, Kato H, Iwata H, Kimura H. Genotyping and quantitation of noroviruses in oysters from distinct sea areas in Japan. *Microbiol Immunol.* 2007;51(2):177-184.
- [16] 福田伸治, 重本直樹, 谷澤由枝. 広島県におけるノロウイルス遺伝子型 GII.4 の変異. 広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告. 2010;18:15-19.
- [17] Kageyama T, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Kojima S, Takai R, Oka T, Takeda N, Katayama K. Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to norovirus in Japan. *J Clin Microbiol.* 2004;42(7):2988-2995.
- [18] 片山和彦. ノロウイルスの遺伝子型. 病原微生物検出情報. 2011;32(12) :365-366.
- [19] Allen DJ, Gray JJ, Gallimore CI, Xerry J, Iturriza-Gómara M. Analysis of amino acid variation in the P2 domain of the GII-4 norovirus VP1 protein reveals putative variant-specific epitopes. *PLoS One.* 2008;3(1):e1485.
- [20] Debbink K, Donaldson EF, Lindesmith LC, Baric RS. Genetic mapping of a highly variable norovirus GII.4 blockade epitope: Potential role in escape from human herd immunity. *J Virol.* 2012;86(2):1214-1226.
- [21] Lindesmith LC, Donaldson EF, Lobue AD, Cannon JL, Zheng DP, Vinje J, Baric RS. Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med.* 2008; 5 (2):e31.
- [22] Shanker S, Choi JM, Sankaran B, Atmar RL, Estes MK, Prasad BV. Structural analysis of histo-blood group antigen binding specificity in a norovirus GII.4 epidemic variant: implications for epochal evolution. *J Virol.* 2011;85(17):8635-8645.
- [23] Siebenga JJ, Vennema H, Renckens B, de Bruin E, van der Veer B, Siezen RJ, Koopmans M. Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J Virol.* 2007;81(18):9932-9941.
- [24] 国立感染症研究所感染症疫学センター. ノロウイルス検出状況・シーズン別ウイルス検出状況：胃腸炎ウイルス 2004/05～2014/15. [Internet] <https://nesid3g.mhlw.go.jp/Byogentai/Pdf/data96j.pdf>[2014.9]
- [25] 吉澄志磨, 後藤明子, 石田勢津子, 山口博美. 北海道におけるノロウイルスの分子疫学. 病原微生物検出情報. 2014;35(7):165-167.
- [26] 植木洋, 木村俊介, 鈴木優子, 阿部美和, 菅原直子, 渡邊節, 木村博一, 片山和彦. 過去4シーズンに宮城県内で検出されたノロウイルス遺伝子の分子疫学. 病原微生物検出情報. 2014;35 (7) :167-168.
- [27] 水越文徳, 鈴木尚子, 船渡川圭次, 塚越博之, 丹羽祥一, 小澤邦壽, 小川泰卓, 富岡恭子, 篠原美千子, 鈴木理恵子, 他. 2010～2013年に関東地域で検出されたノロウイルスの分子疫学解析. 病原微生物検出情報. 2014;35(7):168.
- [28] 調恒明, 岡本(中川)玲子, 村田祥子, 戸田昌一, 左近直美, 上林大起, 重本直樹, 福田伸治, 久常有里, 谷澤由枝, 他. 西日本におけるノロウイルスの分子疫学. 病原微生物検出情報. 2014;35(7):169-170.