

資料

2014/15 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, 谷澤 由枝, 池田 周平, 島津 幸枝, 高尾 信一

Genotype analysis of norovirus associated with gastroenteritis outbreaks in 2014/15 season

NAOKI SHIGEMOTO, YUKIE TANIZAWA, SYUHEI IKEDA, YUKIE SHIMAZU, and SHINICHI TAKAO

(Received October 1, 2015)

2014/15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, GI.3が2事例, GII.3, GII.4, GII.17がそれぞれ, 5, 4, 5事例で検出され, その他 (GI.2, GII.13+GII.21) が1事例ずつであった. また, GII.4については2012/13シーズンに流行した亜型Sydney 2012が3事例, 以前に流行した亜型Den Haag 2006bが1事例であった.

検出時期別では, 11月から1月にGII.3, GII.4が, 2月から3月にGII.17が多く検出された. また, GII.17について詳細な解析を行ったところ, 今回検出したGII.17は世界的に流行しつつあるGII.P17-GII.17 Kawasaki 2014タイプの亜型であることが判明した.

Key words: norovirus, genotype, GII.3, GII.4, GII.17, 2014/15 season

緒 言

下痢症を引き起こすウイルスは種々知られており [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]. 最近においては, 2012/13シーズンに新たな亜型GII.4 Sydney 2012が出現し, 全国的にノロウイルスが大流行した [9-13]. しかしながら翌シーズン (2013/14シーズン) については, GII.4 Sydney 2012が引き続き検出されているものの, GII.4の検出割合は2012/13シーズンほど高くなく, シーズン後半にはGII.6による事例が多く見られた [14]. このことから, 2014/15シーズンにおいても引き続き流行遺伝子型の動向を調べるため, ノロウイルスを原因とする集発事例での検出遺伝子型について調査した.

材料および方法

1 供試サンプル

2014年11月から2015年6月までに当センターに搬入されてきたノロウイルスを原因とする集発事例18件の糞便検体を用いた.

2 RT-PCR法によるノロウイルスのVP1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 μ l, 2mM dNTPs 4 μ l, 50mM Random primer pd(N)₉ (タカラバイオ) 1 μ l, RNase inhibitor (40U/ μ l) (TOYOBO) 0.5 μ l, ReverTra Ace (100U/ μ l) (TOYOBO) 1 μ lを含む反応液に抽出RNA 9.5 μ lを加え, 30 $^{\circ}$ C・10分, 42 $^{\circ}$ C・60分, 99 $^{\circ}$ C・5分の条件で行った. PCR反応は, 10×buffer 5 μ l, 10mM dNTPs 4 μ l, 10 μ Mのセンスおよびアンチセンスプライマー各1 μ l, Ex Taq (5U/ μ l) (タカラバイオ) 0.25 μ lとcDNA 3 μ lを加えた50 μ lの反応液で, 94 $^{\circ}$ C・3分の熱変性の後, 94 $^{\circ}$ C・45秒, 55 $^{\circ}$ C・45秒, 72 $^{\circ}$ C・1分を40サイクル行い, 最後に72 $^{\circ}$ C・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 [15, 16].

3 GII.17のRdRp及びVP1全長域の遺伝子増幅

GII.17についてはRNA dependent RNA polymerase (RdRp) 領域の一部及び, VP1全長域の遺伝子増幅を行った. 逆転写反応には, High Capacity cDNA Transcription Kit (Applied biosystems) を使用し, 10×buffer 2 μ l, 100mM dNTPs 0.8 μ l, 10 μ M primer

N235Rex [17] 0.5 μ l, MultiScribe RTase (50U/ μ l) 1 μ l, DW 5.7 μ lを含む反応液に抽出RNA 10 μ lを加え, 25 $^{\circ}$ C・10分, 37 $^{\circ}$ C・2時間, 85 $^{\circ}$ C・5分の条件で行った. PCR反応は, 10 \times buffer 5 μ l, 10mM dNTPs 4 μ l, それぞれの増幅領域に対し表1に示す10 μ Mのセンス及びアンチセンスプライマー [15, 17, 18] 各1 μ l, Ex Taq (5 U/ μ l) 0.25 μ lとcDNA 2 μ lを加えた50 μ lの反応液で, 94 $^{\circ}$ C・3分の熱変性の後, 94 $^{\circ}$ C・45秒, 55 $^{\circ}$ C・45秒, 72 $^{\circ}$ C・1分を40サイクル行い,最後に72 $^{\circ}$ C・15分の最終伸長を行った.

4 シークエンスと遺伝子解析

RT-PCR法での増幅産物をアガロースゲルで電気泳動後に, QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて精製した. その後, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems) 及びApplied Biosystem 3500 Genetic Analyzer (Applied biosystems) を用いたダイレクトシークエンス法により塩基配列を決定した. VP1上流域の遺伝子型別にはNorovirus Genotyping Tool Version 1.0 (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>) を用い, RdRp及びVP1全長領域の解析については, MEGA 5 (<http://www.megasoftware.net/index.php>) による系統樹解析 (Maximum-Likelihood法) を行った.

結 果

2014/15シーズンに検出されたノロウイルスのVP1上流域の塩基配列を解読, Norovirus Genotyping Tool Version 1.0により遺伝子型を特定した (図1). 遺伝子グループ別ではGIが2種 (GI.2, GI.3), GIIが5種 (GII.3, GII.4, GII.13, GII.17, GII.21) の遺伝子型を検出した. 事例ごとの検出遺伝子型ではGII.3とGII.17が共に5事例と最も多く, 続いてGII.4の4事例であった. 時期別の検出数では11月から1月にかけてGII.3とGII.4が, 2月から3月にGII.17の事例が多く, シーズンの途中で流行遺伝子型が切り替わった. また, 今回検出したGII.4はGII.4 Sydney 2012が3事例でGII.4 Den Haag 2006bが1事例であった.

GII.17の検出事例のうち4事例についてRdRpの3'側の領域とVP1全長の塩基配列を解読し, 系統樹解析を行った (図2, 3). その結果, 今回検出したGII.17のRdRp領域の遺伝子型はGII.17であり, VP1遺伝子は2013年以降に日本, 中国, 香港, 台湾, アメリカにおいて検出されているGII.17と同じクラスターに分類された. これらのことから, 当県で検出された株はいずれもGII.17-GII.17 Kawasaki 2014 [19] タイプの亜型であることが判明した. また, VP1全長領域の系統樹解析の結果 (図3) とGII.17のエピトープと推察される領域のアミ

表1 GII.17のRdRp及びVP1領域解析用プライマー

領域	プライマー	方向	配列 (5' to 3')	引用
RdRp-VP1 junction	P289IUB-PGII.17	+	GATTACTCCCCTGGGACTCCAC	[18]
	G2SKR	-	CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT	(slightly modified) [15]
VP1	G2SKF	+	CNTGGGAGGGCGATCGCAA	[15]
	N235 Rex-tac	-	GCAATGAAAGCTCCAGCCATTAC	[17] (slightly modified)

(事例数)

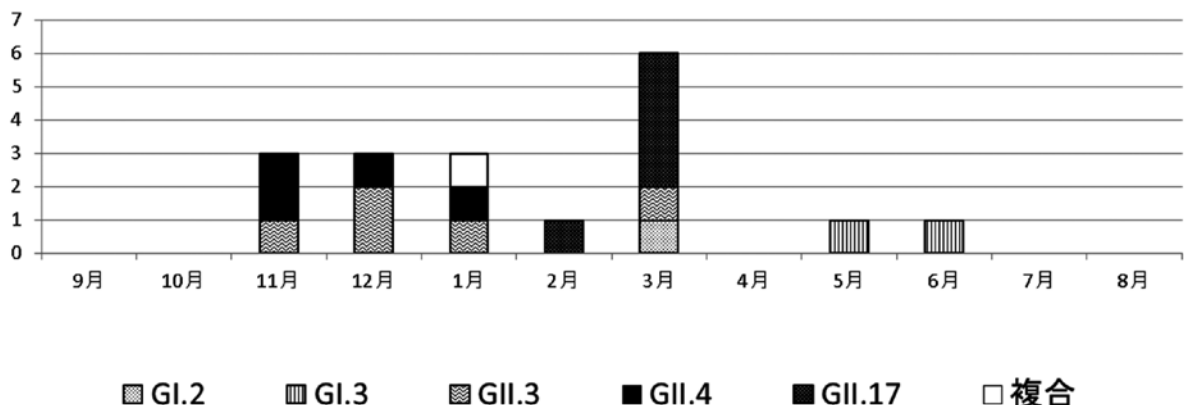


図1 2014/15シーズン集発事例における月別の遺伝子型検出状況

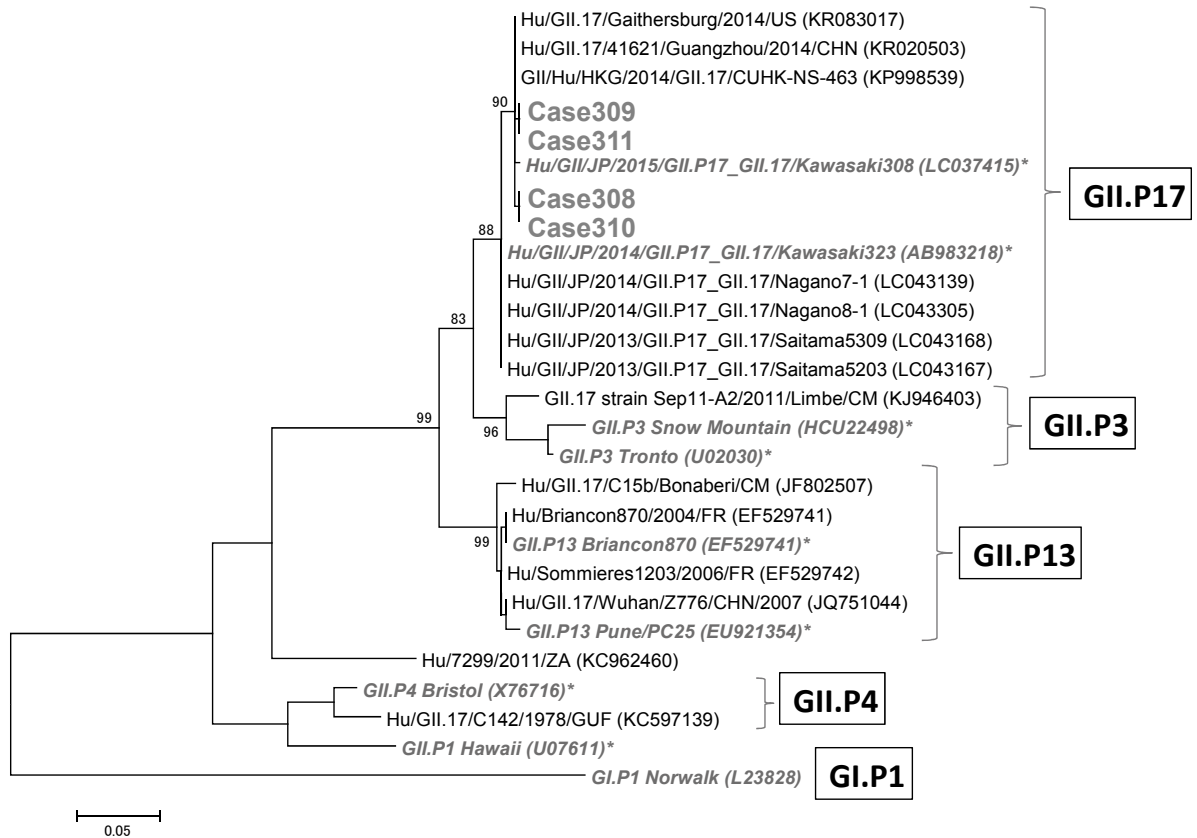


図2 2014/15シーズンに検出したGII.17の系統樹解析 (RdRp領域)
Case308-311 : 2014/15シーズン検出株, 斜体: レファレンス株

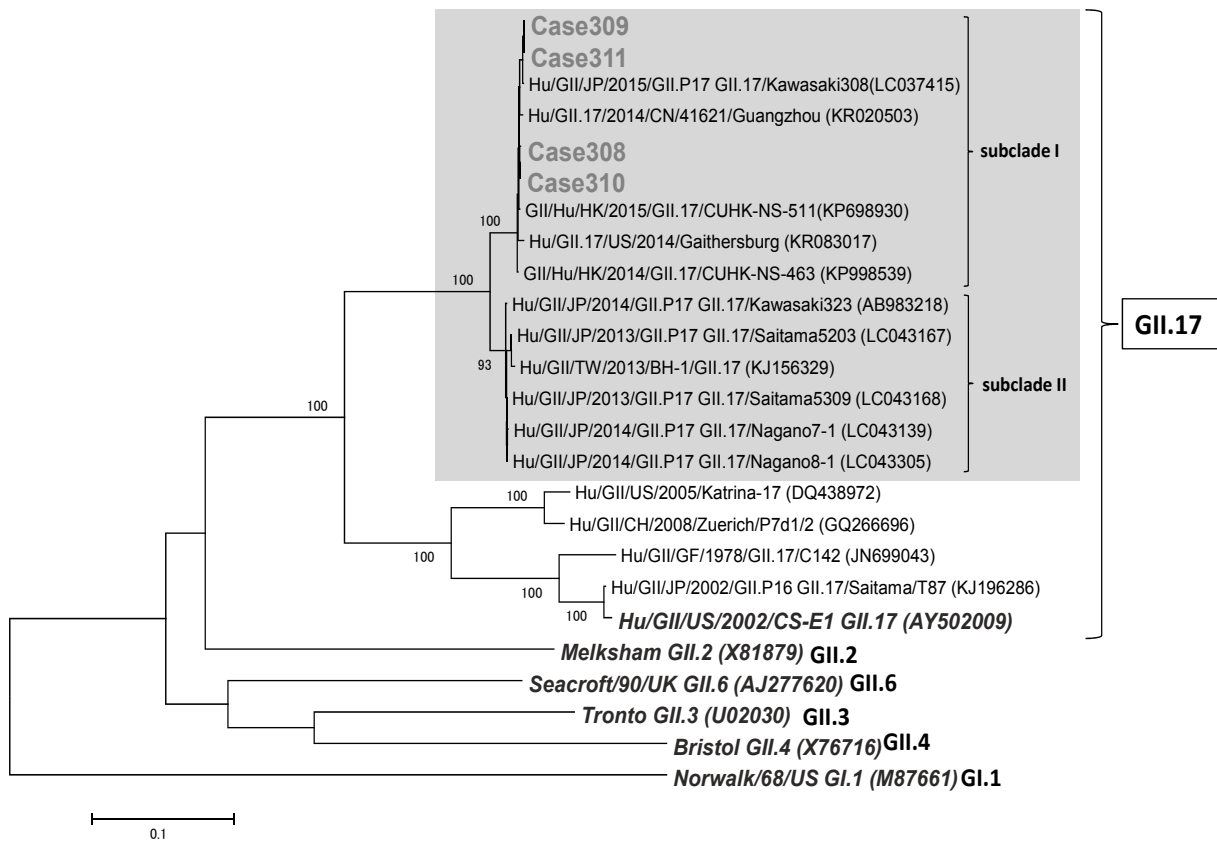


図3 2014/15シーズンに検出したGII.17の系統樹解析 (VP1領域)
Case308-311 : 2014/15シーズン検出株, 斜体: レファレンス株, 網掛け: GII.P17-GII.17 Kawasaki 2014

株名	アミノ酸番号 (major epitopes)*																																															
	217-225 (I)					291-298 (II)					359-363 (III)					371-379 (IV)					390-396 (V)																											
C142/1978 (JN699043)	P	P	S	V	E	S	K	T	K	T	A	D	V	H	Q	S	H	D	D	S	S	Q	F	V	F	G	S	T	D	-	D	F	Q	I	K	V	E	S	G	-	H							
CS-E1/2002 (AY502009)	D	G	T	-	I			
Saitama T87/2002 (KJ196286)	D	G	T	-	I			
Katrina-17/2005 (DQ438972)	S	Q	N	E	E	-	I	.	.	T				
BH-1/2013 (KJ156329)	E	T	-	-	D	.	R	R	N	N	-	N	D	D	G	D	.	.	.				
Saitama5203/2013 (LC043167)	E	T	-	-	D	.	R	R	N	N	-	N	D	D	G	D	.	.	.				
Saitama5309/2013 (LC043168)	E	T	-	-	D	.	R	R	N	N	-	N	D	D	G	D	.	.	.				
Kawasaki323/2014 (AB983218)	E	T	-	-	D	.	R	R	N	N	-	N	D	D	G	D	.	.	.				
Nagano7-1/2014 (LC043139)	E	T	-	-	D	.	R	R	N	N	-	N	D	D	G	D	.	.	.				
Nagano8-1/2014 (LC043305)	E	T	-	-	D	.	R	R	N	N	-	N	D	D	G	D	.	.	.				
CUHK-NS-463/2014 (KP998539)	Q	I	-	-	N	Q	R	P	V	N	D	D	D	D	G	.	.			
Guangzhou41621/2014 (KR020503)	Q	I	-	-	N	Q	R	V	N	D	D	D	D	G	.		
Gaithersburg/2014 (KR083017)	Q	I	-	-	N	Q	R	V	N	D	D	D	D	G	.	
Kawasaki308/2015 (LC037415)	Q	I	-	-	N	Q	R	V	N	D	D	D	D	G	.	
CUHK-NS-511/2015 (KP698930)	Q	I	-	-	N	Q	R	V	N	D	D	D	D	G	.
Case308	Q	I	-	-	N	Q	R	V	N	D	D	D	D	G	.
Case309	Q	I	-	-	N	Q	R	V	N	D	D	D	D	G	.
Case310	Q	I	-	-	N	Q	R	V	N	D	D	D	D	G	.
Case311	Q	I	-	-	N	Q	R	V	N	D	D	D	D	G	.

図4 GII.17のエピトープ推定領域におけるアミノ酸変異
Case308-311: 2014/15シーズン検出株, 網掛け: GII.P17-GII.17 Kawasaki 2014
*アミノ酸配列番号はKawasaki323株に準拠

ノ酸配列 (図4) から, 2013年以降のGII.17は2つのサブクレードに分かれるが, 今回検出した株はKawasaki308株 (LC037415) が属するサブクレードに分類された。

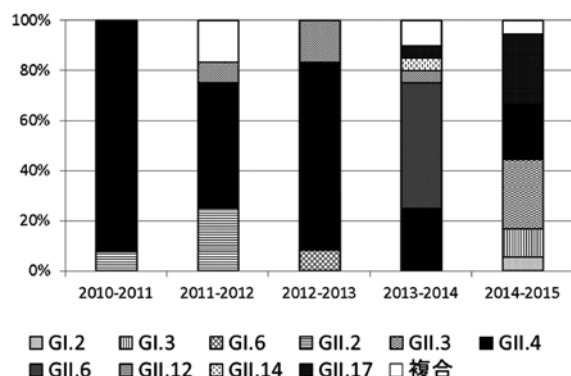


図5 過去5シーズンの集発事例における検出遺伝子型の割合

考 察

2012/13シーズンに新しい亜型GII.4 Sydney 2012が出現して以降, GII.4についてはDen Haag 2006b, NewOrleans 2009の亜型が検出されなくなり, GII.4亜型の構成に大きな変化が生じている。しかしながら, 2013/14シーズンの集発事例におけるGII.4の割合は, 春先にGII.6が流行したこともあり以前と比べて少なくなっていた (図5)。このことからノロウイルスの流行遺伝子型の主流がどのように推移するのか注視する必要があった。

今回, 2014/15シーズンに発生したノロウイルスを原因とする集発事例から, ウイルスの遺伝子型の流行状況を調べた。2014/15シーズンは, 11月から1月にかけてGII.3, GII.4が検出されたが, 2月から3月にかけてはGII.17による流行が顕著となった。この状況は当県

のみならず他県でも見受けられ, GII.17による全国的な流行があったことがわかっている [20]。今回流行したGII.17については, 詳細な解析がMatsushimaら [19]により行われ, 新規亜型GII.P17-GII.17 Kawasaki 2014として認知された。この新規亜型の特徴は, ①それまでのGII.17では, RdRp領域がGII.P3, GII.P4またはGII.P13であるのに対し, 新規亜型はGII.P17であること, ②VP1タンパク質のエピトープと推察される部位のアミノ酸配列が変異していること, が挙げられる [19]。当県で検出したGII.17についてもRdRp領域はGII.P17であり (図2), VP1のエピトープと推察される部位のアミノ酸配列にも同じ変異が認められていることから (図4), GII.P17-GII.17 Kawasaki 2014タイプの亜型であることが確認された。本亜型は日本以外にも中国, 台湾, 香港, アメリカなどでも検出されており, 世界的な流行につながる恐れがあると危惧されている [21-24]。また, GII.P17-GII.17 Kawasaki 2014タイプの亜型は2013年以降から報告例があるが, VP1領域の系統樹解析の結果からもわかるように2つのサブクレードから構成されており (図3), VP1のエピトープと想定される部位のアミノ酸配列にも変異が認められる (図4)。このことは, GII.P17-GII.17 Kawasaki 2014タイプの亜型が短期間で変異していることを示唆しており [19], 来シーズンの動向には, より一層の注意が必要であると言える。また, 今回のGII.17がイムノクロマトの検出キットで検出されにくいことが報告されており [25, 26], 医療機関における診断での懸念となっている。また, 2014/15シーズンは2月以降からGII.4が検出されることもなく, 前シーズンに引き続きGII.4の割合が低くなっている (図5)。GII.17の台頭とGII.4の衰退傾向から, 今後の主流がGII.4からGII.17へ切り替わるのかもしれない [24]。

以上のことから, 2014/15シーズンはGII.17の新規亜型が台頭し, これまでの主流であったGII.4の割合が低

下した。GII.17の今後の動向, 特に2015/16シーズンのノロウイルスの流行始めについては引き続き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, Vinje 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, Vinje 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, Hindba 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, Wikswo M, Barclay L, Brandt E, Storm W, Salehi E, Desalvo T, Davis T, Saupé 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, Vinje 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, Vinje J. Genotypic and epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the United States, 2009 to 2013. *J Clin Microbiol.* 2014;52(1):147-155.
- [14] 重本直樹, 久常有里, 谷澤由枝, 島津幸枝, 高尾信一. 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. 広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告. 2014;22:15-20.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] Iritani N, Kaida A, Kubo H, Abe N, Maurakami T, Vennema H, Koopmans M, Takeda N, Ogura H, Seto Y. Epidemic of genotype GII.2 noroviruses during spring 2004 in Osaka city, Japan. *J Clin Microbiol.* 2008;46(7):2406-2409.
- [18] Puustinen L, Blazevic V, Huhti L, Szakal ED, Halkosalo A, Salminen M, Vesikari T. Norovirus genotypes in epidemic acute gastroenteritis of infants and children in Finland between 1994 and 2007. *Epidemiol Infect.* 2012;140:268-275.
- [19] Matsushima Y, Ishikawa M, Shimizu T, Komane A, Kasuo S, Shinohara M, Nagasawa K, Kimura H, Ryo A, Okabe N, Haga K, et al. Genetic analyses of GII.17 norovirus strains in diarrheal disease

- outbreaks from December 2014 to March 2015 in Japan reveal a novel polymerase sequence and amino acid substitutions in the capsid region. *Euro Surveill.* 2015;20(26):pii=21173.
- [20] 松島勇紀, 石川真理子, 清水智美, 駒根綾子, 清水英明, 松尾千秋, 三崎貴子, 岡部信彦, 篠原美千子, 峯岸俊貴, 他. 新規遺伝子型ノロウイルス GII. P17-GII.17の流行. *IASR* [Internet]. 2015 Sep 2 [cited 2015 Sep 28];36(9):11-14. Available from: <http://www.nih.go.jp/niid/ja/id/778-disease-based/na/norovirus/idsc/iasr-news/5903-pr4273.html>.
- [21] Fu J, Ai J, Jin M, Jiang C, Zhang J, Shi C, Lin Q, Yuan Z, Qi X, Bao C, et al. Emergence of a new GII.17 norovirus variant in patients with acute gastroenteritis in Jiangsu, China, September 2014 to March 2015. *Euro Surveill* 2015;20(24):pii=21157.
- [22] Lu J, Sun L, Fang L, Yang F, Mo Y, Lao J, Zheng H, Tan X, Lin H, Rutherford S, et al. Gastroenteritis outbreaks caused by norovirus GII.17, Guangdong province, China, 2014-2015. *Emerg Infect Dis.*2015;21(7):1240-1242.
- [23] Genome of emerging norovirus GII.17, United States, 2014. Parra GI, Green KY. *Emerg Infect Dis.*2015;21(8):1477-1479.
- [24] de Graaf M, van Beek J, Vennema H, Podkolzin AT, Hewitt J, Bucardo F, Templeton K, Mans J, Nordgren J, Reuter G, et al. Emergence of novel GII.17 norovirus - End of the GII.17 era?. *Euro Surveill* 2015;20(26):pii=21178.
- [25] 楠原一, 赤地重宏, 小林隆司, 西中隆道, 小林真美, 山口江里, 岩出義人, 田沼正路, 野田衛. ノロウイルスGII.17型の流行とその特徴について-三重県. *病原体検出情報.* 2015;36(5):91-92.
- [26] Khamrin P, Thongprachum A, Takahashi S, Okitsu S, Maneekarn N, Hayakawa S, Ushijima H. Evaluation of immunochromatography tests for detection of novel GII.17 norovirus in stool samples. *Euro Surveill* 2015;20(28):pii=21185.