

資料

2013年から2022年までに広島県で検出された ノロウイルスGII.2及びGII.4 Sydneyの遺伝子解析

末井 真菜, 伊藤 彩乃, 重本 直樹

Genetic Analysis of Norovirus GII.2 and GII.4 Sydney Genotypes detected in Hiroshima Prefecture between 2013 and 2022.

SUEI Mana, ITO Ayano and SHIGEMOTO Naoki

(Received: October 13, 2023)

ノロウイルスの遺伝子型別法は、Capsid領域の配列によって行われていたが、本ウイルスは以前からORF1とORF2の間のジャンクション領域で遺伝子の組み換えが頻発することが知られており、ORF1のRdRp領域とORF2のCapsid領域の両方を用いて遺伝子型別を行うDual Typing法が推奨されている。今回、2013年から2022年までに当センターで検査を実施した急性胃腸炎患者のノロウイルス陽性検体のうち、検出数の多かったノロウイルスGII.2とGII.4 SydneyについてDual Typing法で遺伝子型別を行い、系統樹解析を行った。その結果、当該期間においては、GII.2はGII.2[P16]のみ、GII.4 SydneyはGII.4 Sydney[P16]とGII.4 Sydney[P31]の2つの遺伝子型が存在していたことが判明した。

Key words : ノロウイルス, Dual Typing法, GII.2, GII.4 Sydney

結 言

ノロウイルスは下痢症を引き起こす主要な原因ウイルスの一つであり、わが国では主に11月から2月にかけて食中毒や集団発生を引き起こす病原物質として知られている[1]。

ノロウイルスのゲノムは、3つのOpen reading frame (ORF) によって構成されており[2]、以前はノロウイルスの遺伝子型別は、Capsid領域の配列によって行われていた。しかし、ORF1とORF2の間のジャンクション領域において遺伝子の組み換えが頻発することが知られており[3]、大きな流行を引き起こすと考えられている。このことから、現在はノロウイルスの遺伝子型を正確に把握するため、ORF1のRNA依存性RNAポリメラーゼ (RdRp) 領域とORF2のCapsid領域の両方を用いて遺伝子型別を行うDual Typing法が推奨されている[4]。

今回我々は、2013年から2022年に検出されたノロウイルスのうち、検出頻度が高かったGII.2とGII.4 Sydneyについて、改めてDual Typing法を用いて遺伝子型

別を行い、多少の知見を得たので報告する。

方 法

1 供試サンプル

2013年1月から2022年12月までに感染症発生動向調査事業により、県内医療機関より提出された感染性胃腸炎患者の便検体から検出したGII.2 17検体、GII.4 Sydney 102検体、感染性胃腸炎集団事例で検出したGII.2 34検体、GII.4 Sydney 31検体のcDNAを用いた。なお、これらcDNAは、10%糞便乳剤からQIAamp Viral RNA mini Kit(QIAGEN)により抽出したRNA 9.5 µlに5×buffer 4 µl, 2 mM dNTPs 4 µl, 50 µM Random primer pd(N)₉ (タカラバイオ) 1 µl, RNase inhibitor(40U/ µl) (TOYOBO) 0.5 µl, ReverTra Ace (100U/ µl) (TOYOBO) 1 µlを加え、30℃・10分、42℃・30分、99℃・5分の条件で逆転写反応を行ったものである。

2 PCR法によるRdRp-Capsid領域の増幅

PCR反応は、AmpliTaq Gold Fast PCR Master

Mix UP (Applied Bio systems) 10 µl, 10 µMのセンス及びアンチセンスプライマー各1 µlとcDNA 3 µlを加えた20 µlの反応液で、95°C・10分の熱変性の後、96°C・3秒、57°C・30秒、68°C・5秒を40サイクル行い、最後に72°C・10分の最終伸長を行った。プライマーにはNoVGIIのRdRpの3'端領域とCapsidのN/S領域をカバーするMON431とG2SKRを用いた[5]。

3 遺伝子型別と系統樹の作成

PCR増幅産物を2%アガロースゲルで電気泳動し、増幅産物を確認後に、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製した。その後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher Scientific) によりシーケンス反応を行い、BigDye X Terminator Purification Kit (ThermoFisher Scientific) で精製後、Applied Biosystem 3500 Genetic Analyzer (ThermoFisher Scientific) を用いたダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。MEGA X[6]及びCalicivirus typing tool (<https://calicivirustypingtool.cdc.gov/>) [7]にて遺伝子型を決定し、系統樹の作成はMEGA Xを使用し、Maximum-likelihood法にて行った。

結 果

Dual Typing法を用いて、2013年から2022年に検出されたノロウイルスGII.2とGII.4 SydneyのCapsidのN/S領域とRdRpの3'端領域における遺伝子型別を実施し、系統樹を作成した。

GII.2の遺伝子型は、51株全てがGII.2[P16]だった。Capsid領域の系統樹を図1a、RdRp領域の系統樹を図1bに示した。Capsid領域の系統樹では、2016/2017シーズン（シーズンは9月から翌年の8月まで）の流行株24株と2020/2021シーズンの流行株12株はそれぞれ一塊のクラスターを形成した。一方、RdRp領域の系統樹では、2020/2021シーズンの流行株は2016/2017シーズンの流行株とは株間で若干の変異があり、同じ枝の下流にそれぞれのクラスターを形成した。

GII.4 Sydneyの遺伝子型は、GII.4 Sydney[P16]が15株、GII.4 Sydney[P31]が118株であった。Capsid領域の系統樹を図2a、RdRp領域の系統樹を図2bに示した。Capsid領域の系統樹では、RdRp領域がP16であった株とP31であった株で大きく2つに分かれた。RdRp領域がP31であった株については2015/2016シーズンの30株及び13株を主としたクラスターが2つ認められ

たが、その他のシーズンの株は系統樹内に分散して認められた。RdRp領域の系統樹では、P16とP31の2つのグループに分類され、P16のグループは2016/2017シーズン～2019/2020シーズンの株が含まれ、P31のグループは2013/2014～2021/2022シーズンの株が含まれており、特定のシーズンの株のみで構成される大きなクラスターは見当たらなかった。

考 察

2013/2014シーズンから2021/2022シーズンにかけて感染症発生動向調査事業及び感染性胃腸炎集団事例の検査で検出が多かったノロウイルスGII.2とGII.4 SydneyのCapsid領域及びRdRp領域の系統樹解析を行った。

GII.2は2016/2017シーズン及び2020/2021シーズンにおいて全国的に主要流行株であり[8, 9]、広島県においても同様で [10]、検出されたノロウイルスの主要遺伝子型であった。系統樹解析の結果においてもCapsid領域とRdRp領域ともに2016/2017シーズンと2020/2021シーズンの株はそれぞれクラスターを形成しており、2つのシーズンで遺伝子レベルはやや異なる株が流行したことが示唆された（図1a, 1b）。

一方、GII.4 Sydneyは、2013/2014シーズンから2020/2021シーズンにおいて、コンスタントに検出され続けている遺伝子型であり、広島県においては2015/2016、2017/2018、2019/2020の3シーズンにおいて主要遺伝子型であった[9]。GII.4 Sydneyの系統樹解析ではRdRp領域にP16とP31を持つ2つの遺伝子型のグループ（GII.4 Sydney[P16]、GII.4 Sydney[P31]）が認められ（図2b）、これらのグループはCapsid領域の系統樹でも明確に区別された（図2a）。GII.4 Sydney[P16]の検出シーズンは、2016/2017シーズン以降であり、一方GII.4 Sydney[P31]は2013/2014シーズンから現在まで検出され続けていることから、GII.4 Sydney[P16]は、GII.4 Sydney[P31]の後に出現し、少なくとも2016/2017シーズン以降は2つの異なる遺伝子型のGII.4 Sydneyが混在していたことが明らかとなった。

GII.4 Sydney[P31]のグループについては、2015/2016シーズンに流行した株はCapsid領域とRdRp領域ともに、このシーズンの株を主とするクラスターを形成したが、それ以外のシーズンの株は系統樹内で分散しており、多様なGII.4 Sydneyが長期間

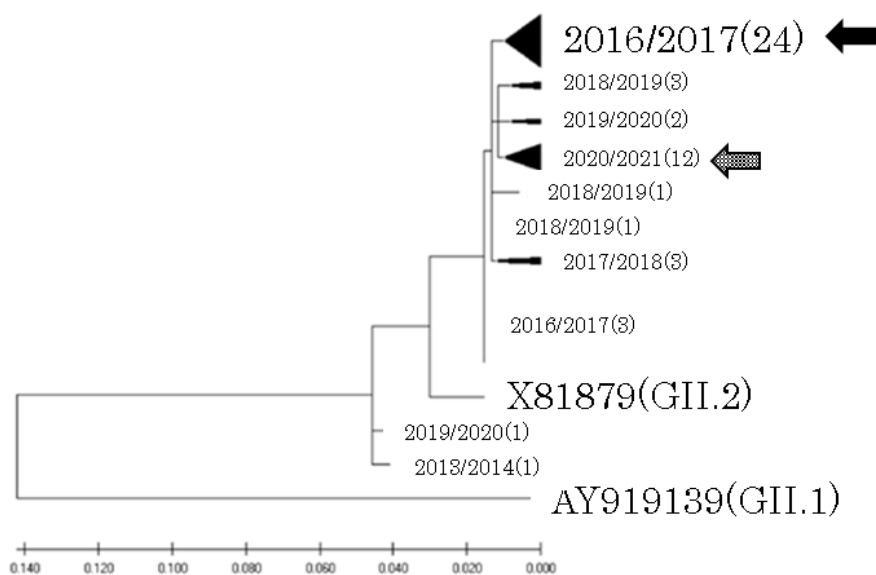


図1a ノロウイルスGII.2の系統樹 (Capsid領域)
() 内は検体数

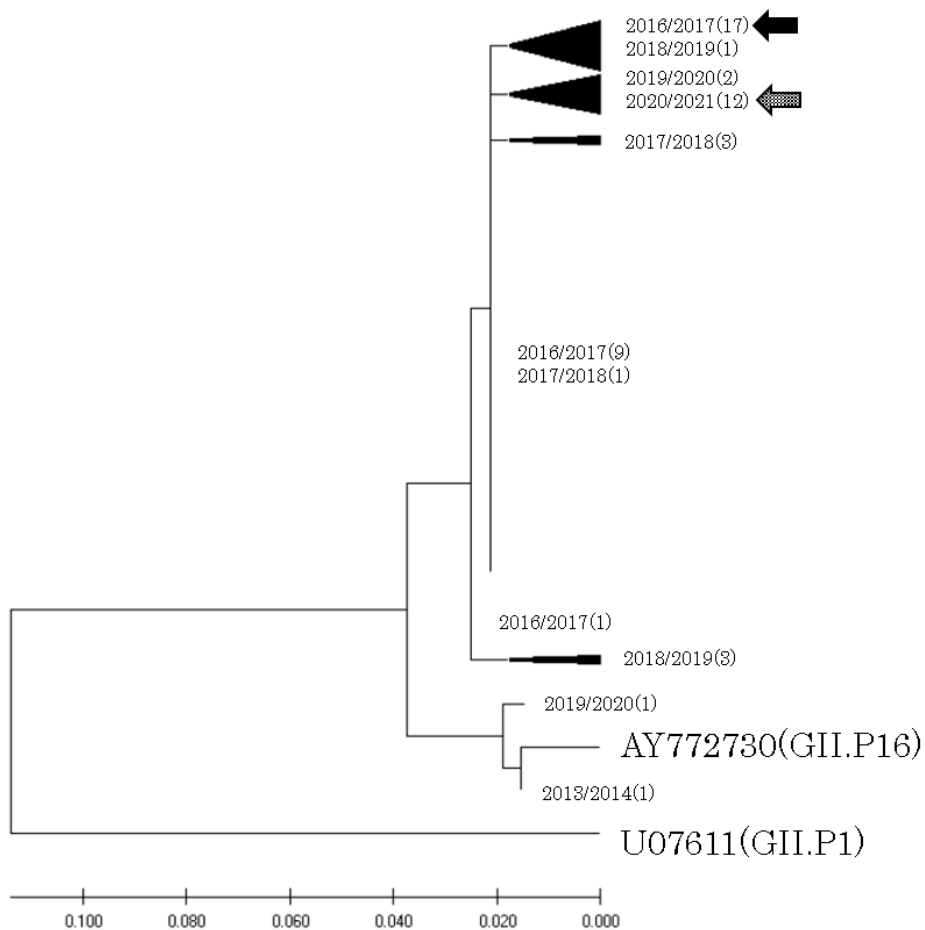


図1b ノロウイルスGII.2の系統樹 (RdRp領域)
() 内は検体数

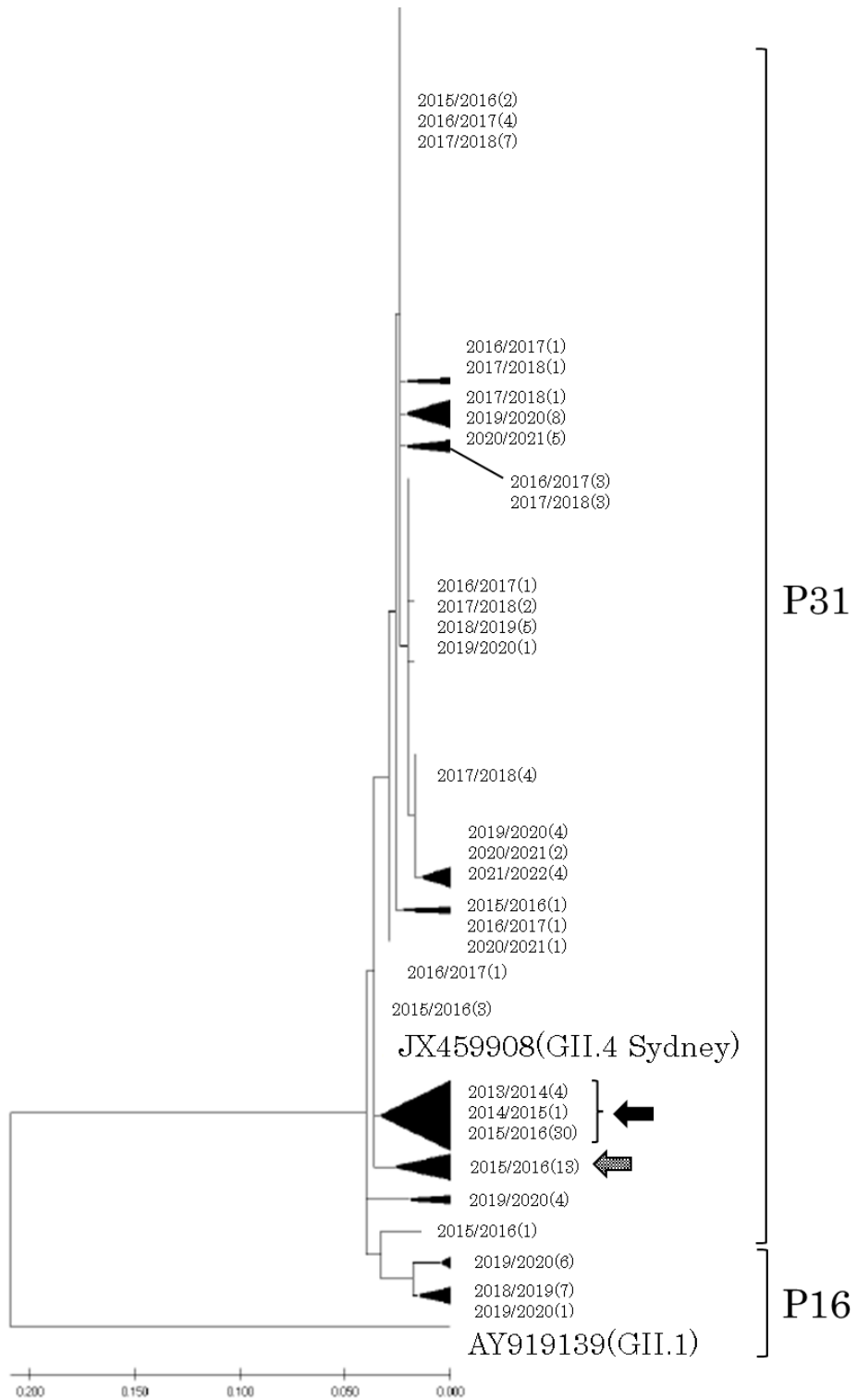


図2a ノロウイルスGII.4 Sydneyの系統樹 (Capsid領域)
() 内は検体数

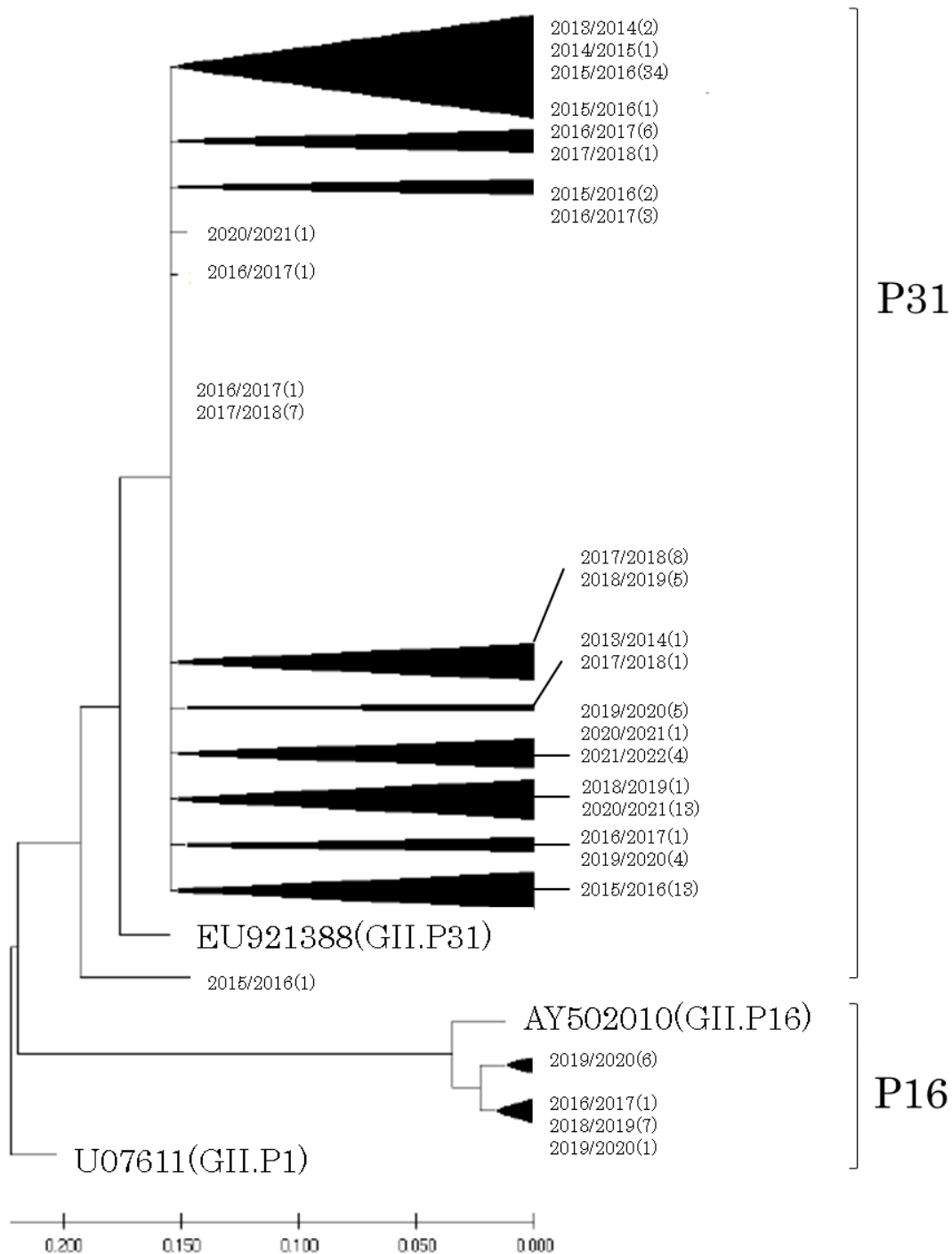


図2b ノロウイルスGII.4 Sydneyの系統樹 (RdRp領域)
() 内は検体数

に渡って出現していることが示唆された(図2a, 2b)。

2019/2020シーズン以降は、新型コロナウイルスの流行下にあり、手洗いなどの対策や、人同士の接触が減少したことで、ノロウイルス全体の検出数が減少した。2023年5月以降、新型コロナウイルス感染症が5類感染症に変わり、現在、人の活動や感染症の動向が活発化している。このため、パンデミック以降のノロウイルスの動向については関心を持って注視しているところである。今のところ広島県においては、2016/2017シーズン～2019/2020までは混在していたGII.4 Sydney[P16]とGII.4 Sydney[P31]のうち、GII.4 Sydney[P16]については、2020/2021シーズン以降は認められていない状況である。まだ、ノロウイルスの流行そのものが低調であるため、見解を述べるにはまだ情報が少なく、継続的な調査が必要である。

結 語

ノロウイルスのゲノムでは、ORF1とORF2の間のジャンクション領域での組み換えが起こることにより、キメラウイルスが生成される可能性があり、このような変異ウイルスにより大きな流行を引き起こす恐れがある。このため、ノロウイルスの変異をより詳細に監視するために、Capsid領域とRdRp領域の両方を用いて遺伝子型別を行うDual Typing法が必要であると考えた。2013年1月から2022年12月までの急性胃腸炎患者検体から検出されたノロウイルスのうち、GII.2とGII.4 Sydneyを対象に調査を行った結果、GII.2はGII.2[P16]のみで、GII.4 SydneyはGII.4 Sydney[P16]とGII.4 Sydney[P31]の2つの遺伝子型が存在していたことが判明した。

文 献

- [1] Shigemoto N, Hisatsune Y, et al. Detection of gastroenteritis viruses among pediatric patients in Hiroshima prefecture, Japan, between 2006 and 2013 using multiplex reverse transcription PCR-based assays involving fluorescent dye-labeled primers. *J Virol Methods*. 2017, 89, 791-800.
- [2] Katayama K, Shirato-Horikoshi H, et al. Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. *Virology*. 2002, 299, 225-239
- [3] Bull R, Hansman G, et al. Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerg Infect Dis*. 2005, 11, 1079-1085.
- [4] 片山和彦, 木村博一. ノーウォークウイルス(ノロウイルス)の遺伝子型(2015年改訂版). IA SR. 2015-09-08. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/norovirus-m/norovirusiasrs/5913-pr4274.html>, 参照 2023-09-20.
- [5] Cannon JL, Barclay L, et al. Genetic and Epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the United States from 2013 to 2016 demonstrated emergence of novel GII.4 recombinant viruses. *J Clin Microbiol*. 2017, 55, 2208-2221.
- [6] Kumer S, Stecher G, et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Bio Evol*. 2018, 35,1547-1549.
- [7] Tatusov RL, Chhabra P, et al. Human calicivirus typing tool: A web-based tool for genotyping human norovirus and sapovirus sequences. *J Clin Virol*. 2021, 134, 104718.
- [8] 国立感染症研究所疫学センター. シーズン別ウイルス検出状況, 由来ヒト: 胃腸炎ウイルス, 2013/14～2023/24. 2023-09-19. <https://kansen-levelmap.mhlw.go.jp/Byogentai/Pdf/data96j.pdf>, 参照 2023-09-20.
- [9] 小泉光, 菅原直子, 他. 2016/2017 シーズンに流行したノロウイルスの遺伝子型について. 宮城県保健環境センター年報. 2017, 35, 36-39.
- [10] 末井真菜, 伊藤彩乃, 他. 広島県における2020/2021シーズンのノロウイルス流行状況について. 広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告. 2021, 29, 17-20.