

資 料

鹿児島県内で検出されたノロウイルスの遺伝子解析（2023年度）

Genetic Analysis of Norovirus Detected in Kagoshima Prefecture（FY2023）

佛 淵 悠 大 山 口 奈 央¹ 久 保 妃未佳
園 田 大 敬 穂 積 和 佳 金 森 浩 三
石 谷 完 二² 新 川 奈緒美³ 濱 田 結 花

1 はじめに

ノロウイルス（以下「NoV」という。）は、主に冬季に発生する嘔吐や下痢などの急性胃腸炎症状の原因の一つである。ヒトへの感染経路は、主に経口感染で、感染者の糞便・吐物及びこれらに直接または間接的に汚染された物品類、そして食中毒としての食品類が感染源の代表的なものとしてあげられる¹⁾。

NoVは、カリシウイルス科に分類され、エンベロープはなく、約7500塩基のプラス一本鎖RNAをゲノムに持つウイルスである。ゲノムは3つの蛋白質コード領域（open reading frame、以下「ORF」という。）で構成されており、ORF1はポリメラーゼ領域を含む非構造タンパク質、ORF2は構造タンパク質1（以下「VP1」という。）、ORF3は構造タンパク質2（以下「VP2」という。）をコードしている²⁾。従来はVP1領域による遺伝子型の決定がされてきた。しかし、現在はORF1とORF2のジャンクション領域を基点とする遺伝子の組換えが頻発することが明らかになっている³⁾。ORF1とORF2の組み換えによる変化がウイルスの流行に影響することが示唆されているため⁴⁾、ポリメラーゼ領域とVP1領域の両方の遺伝子型解析が推奨されている⁵⁾。

NoVはGIからGXの10種類の遺伝子群に分類され、主にGIとGIIがヒトに感染する。現在は、GIはさらに10種類、GIIIは27種類の遺伝子型に細分化されている⁶⁾。

今回、鹿児島県内で2023年度（2023年4月から2024年3月）にNoVが検出された食中毒疑い事例について、ポリメラーゼ領域とVP1領域を含む接合領域の分子系統樹解析を

行ったので、その結果を報告する。

2 方法

2. 1 検査対象

2023年4月から2024年3月までに、食中毒疑い事例（他県依頼分を含む）として当センターに搬入された16事例（検体163件）のうち、NoV陽性の10事例（66検体）を対象とした。

2. 2 検査方法

2. 2. 1 検体前処理

搬入された糞便検体にPBS（-）を加えて10%懸濁液を作成し、チューブを攪拌後、5000rpmで30分間冷却遠心した。遠心上清を1.5mLチューブへ分注し、12000rpmで5分間冷却遠心を行った。その後、上清をRNA抽出に用いた⁷⁾。

2. 2. 2 RNA抽出

QIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN）を用いてRNAを抽出した。

2. 2. 3 逆転写反応・PCR反応

PrimeScriptTM RT reagent Kit（タカラバイオ）を用い、37℃15分、85℃5秒の条件下で逆転写反応を行った。その後、得られたcDNA 5μLとKOD-Multi&Epi-TM（東洋紡）を用いてPCR反応を行った。PCRの反応条件は、94℃2分の反応後、98℃10秒、50℃15秒、68℃30秒を40サイクル行った。プライマーはGI: Mon432/G1SKR（遺伝子産物579bp）、

1 大隅地域振興局保健福祉環境部

2 退職（2024年3月）

3 始良・伊佐地域振興局保健福祉環境部

〒893-0011 鹿屋市打馬二丁目16-6

〒899-5112 霧島市隼人町松永3220-16

GII : Mon431/G2SKR (遺伝子産物570bp) を用いた。

2. 2. 4 シークエンス反応

得られたPCR産物をAmicon Ultra-0.5mL遠心式フィルター（メルクミリポア）で精製を行い、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Thermo Fisher Scientific）によるシークエンス反応を行った。反応産物は、BigDye XTerminato Purification Kit（Thermo Fisher Scientific）を用いて精製し、遺伝子解析装置：Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer（Thermo Fisher Scientific）により遺伝子配列を決定した。

2. 2. 5 遺伝子型の決定と分子系統樹解析

得られた塩基配列について、NoroNet (<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus/>) を用いて遺伝子型を決定し、遺伝子解析用ソフトウェアMEGA-Xを用いてMaximum-likelihoodによる分子系統樹解析を行った⁸⁾。

3 結果

3. 1 遺伝子型検出状況

ポリメラーゼ領域とVP1領域を含む遺伝子解析の結果、10事例（66検体）のうち、10事例（58検体）の遺伝子型を決定することができた。検出された遺伝子型はGII.4[P16]が6事例（31検体）と最も多く、GI.3[P13]（13検体）、GII.7[P7]（10検体）、GI.1[P1]（3検体）が各1事例、また、GI.6[P11]、GII.3が1事例（1検体）から同時に検出された。GII.3については、ポリメラーゼ領域の解析はできず、VP1領域のみの解析結果である（表1）。

今回の検査で検出数が最も多かったGII.4は世界中で循環している主要な遺伝子型である。定期的に新しい変異体が出現し、VP1の抗原部位での変異が連続的に蓄積することで集団免疫から逃れやすくなっており⁹⁾、2006年以降、NoVによる胃腸炎感染症の大半から検出されている¹⁰⁾。今回の検査においては、2012年以降流行しているGII.4 Sydney 2012[P16]や2016年ごろから注目されているGII.4 Sydney 2012[P31]等の変異型は検出されなかった。

表1 食中毒疑い事例と検出された遺伝子型

事例番号	検査依頼日	原因施設	検体数	検体番号	遺伝子型
①	2023/12/11	飲食店	10	23-F7～23-F21	GII.7[P7]
②	2024/1/16	飲食店	5	23-F26～23-F33	GII.4[P16]
③	2024/1/18	給食施設	8	23-F40～23-F49	GII.4[P16]
④	2024/1/17	飲食店	13	23-F54～23-F68	GI.3[P13]
⑤	2024/1/18	飲食店	3	23-F70～23-F75	GII.4[P16]
⑥	2024/1/19	宿泊施設	3	23-F77～23-F80	GII.4[P16]
⑦	2024/2/5	飲食店	1	23-F90	GI.6[P11]
					GII.3
⑧	2024/2/7	イベント会場	3	23-F91～23-F93	GI.1[P1]
⑨	2024/3/1	給食施設	11	23-F94～23-F110	GII.4[P16]
⑩	2024/3/25	宿泊施設	1	23-F154	GII.4[P16]

（注）検体数は遺伝子型が確定した数を示す。

3. 2 ポリメラーゼ領域とVP1領域を含む分子系統樹解析

ポリメラーゼ領域とVP1領域での分子系統樹解析の結果を図1に示す。また、最も検出数が多かったGII.4[P16]株のみをピックアップし、分子系統樹解析を行った結果を図2に示す。

事例①を23-F7～23-F21、事例②を23-F26～23-F33、事例③を23-F40～23-F49、事例④を23-F54～23-F68、事例⑤を23-F70～23-F75、事例⑥を23-F77～23-F80、事例⑦を23-F90、事例⑧を23-F91～23-F93、事例⑨を23-F94～23-F110、事例⑩を23-F154とした（表1）。事例②と事例⑤

については同一飲食店からの検出であった。

図1より事例①は2022年の中国株（PQ044540）、2024年のロシア株（PP406498）と同じ系統群に属しており、事例④は2019年の台湾株（MN922742）、2019年の韓国株（MZ021896）と同じ系統群に属していた。

その他、事例⑦においてGII.3は2022年の日本株（LC726065）、GI.6[P11]は2022年の中国株（PP389374）、事例⑧は2020年のスペイン株（MT492000）と同じ系統群に属していた。

また、図2のとおり、GII.4[P16]は大きく分けて2つのクラスターに分類された。2023年度に鹿児島県で検出され

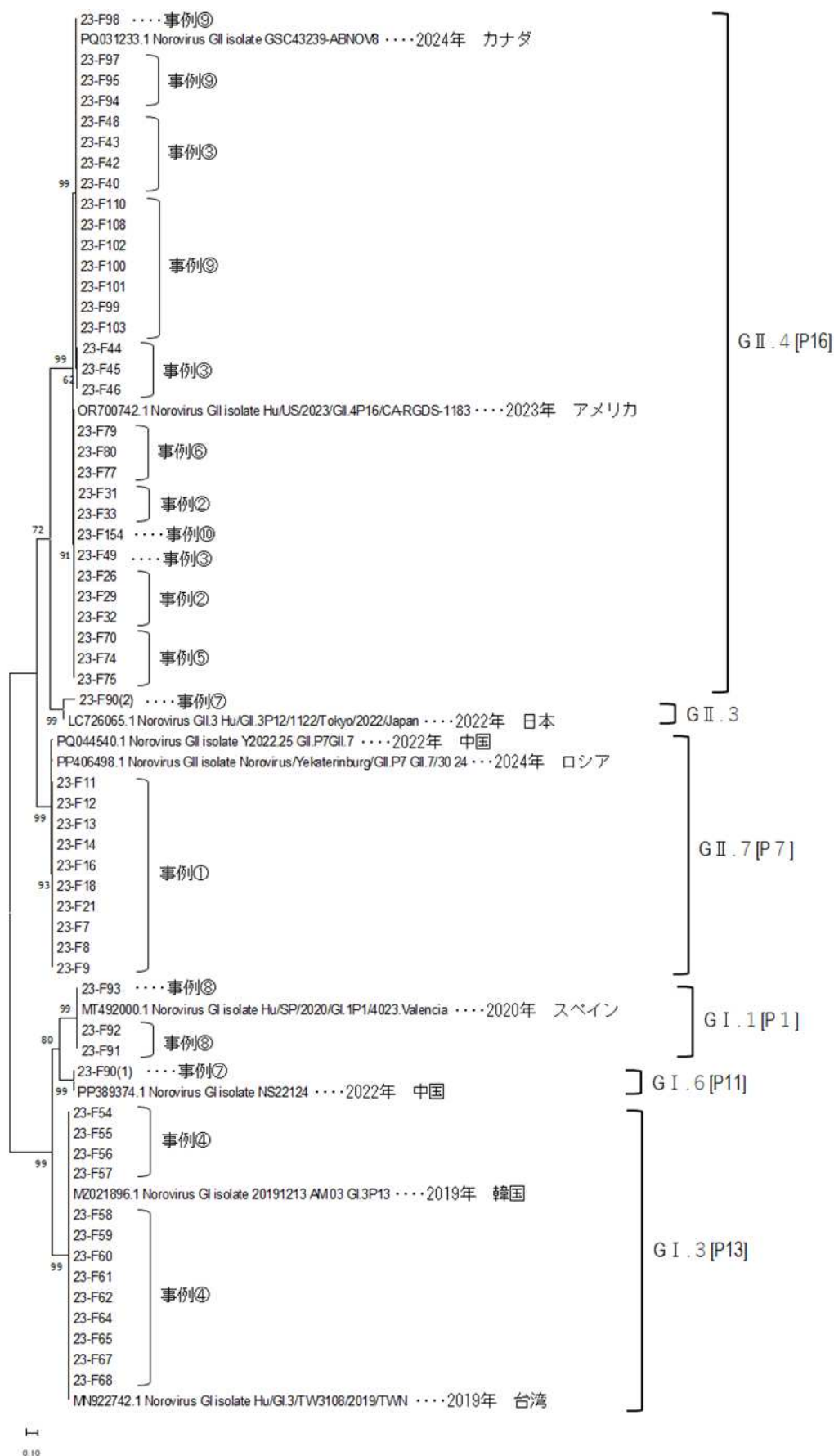


図1 2023年度に鹿児島県で検出されたNoVの分子系統樹解析
(Maximum-likelihood) <ポリメラーゼ領域-VP1領域>

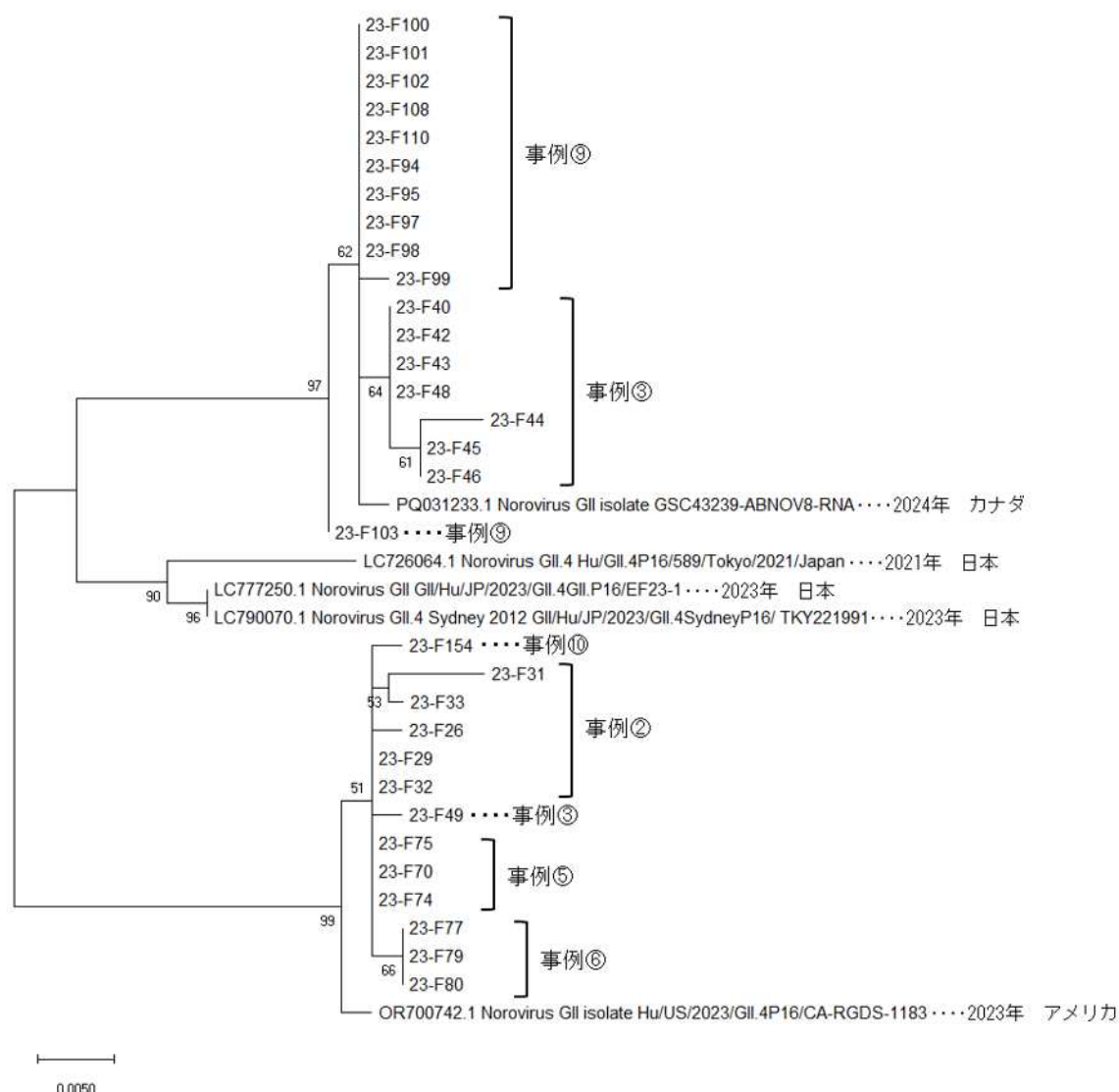


図2 2023年度に鹿児島県で検出されたNoV GII.4[P16]の分子系統樹解析
(Maximum-likelihood) <ポリメラーゼ領域-VP1領域>

表2 日本のNoVによる食中毒発生状況¹⁰⁾

年度	2019年	2020年	2021年	2022年	2023年
事件数 (件)	212	99	72	68	163
患者数 (人)	6889	3660	4733	2175	5502

表3 鹿児島県におけるNoV検出状況

年度	2019年	2020年	2021年	2022年	2023年
事例数 (件)	10	1	2	2	10
検体数 (件)	68	6	5	2	66

(注) 食中毒疑い事例を含む。

たGII.4[P16]株は、2021年、2023年に日本で検出された株（LC726064, LC777250, LC790070）とは異なる系統群であった。

4 考察

図2より、事例②、⑤、⑥、⑨について、検出された株は各事例ごとにそれぞれ近い系統群に位置していることが分かった。これは、それぞれの集団内でNoV感染が広まったことを示唆している。一方、事例③について、23-F49のみ集団とは異なる系統群に属していることが分かった。このことから、23-F49は集団とは異なる感染源からのNoV感染である可能性が考えられる。

また、23-F49は分子系統樹解析の結果より、事例②と⑤の近縁であることが分かった。23-F49と事例②、⑤は同時期に依頼された検体であるが、鹿児島県内においても事

例発生地域は離れており、関連性は不明であった。同様に事例⑥及び事例⑩についても事例②と⑤の近縁であるが、発生地域が離れていた事例であり、事例⑩については依頼時期が事例②と⑤の3ヶ月後であるため、関連性は不明であった。

日本では、2020年度から2022年度にかけて2019年度と比較してNoVの患者数と事件数が大幅に減少した(表2)。同様に鹿児島県においても2020年度から2022年度にかけて事例数と検体数に大幅な減少がみられた(表3)。2020年は新型コロナウイルス感染症(以下「COVID-19」という。)の流行が始まった年であり、NoVをはじめとしたCOVID-19以外の感染症の減少が報告されている¹¹⁾。これらの理由として、2020年度以降に発令された緊急事態宣言による外出自粛、飲食店の時短営業・営業自粛などにより、感染の機会が減少したためと考えられる。また、2023年度で増加した理由としてはCOVID-19が感染症法の2類相当から5類に位置づけられたことによる外食や会食などの増加によるものと考えられる。

5 まとめ

- 1) 2023年4月から2024年3月までに、食中毒疑い事例として当センターに搬入された検体のうち、NoV陽性であった10事例(66検体)を検査対象とした。遺伝子型が決定することができたのは10事例(58検体)であった。
- 2) 10事例(58検体)について、ポリメラーゼ領域とVP1領域を含む遺伝子解析を行ったところ、GII.4[P16]が6事例(31検体)と、事例数・検体数ともに全体の約6割を占めていた。
- 3) 分子系統樹解析ではGII.4[P16]において2つのクラスター形成が見られた。今回検出された株はCOVID-19流行期(2021年)やCOVID-19が感染症法上の5類に移行された時期(2023年)に日本で検出された株と異なる系統であったことがわかった。

おわりに、NoVの流行の要因として、ORF1とORF2の組み換えによる変化が影響していると示唆されているので、今後、同様にNoVの分子系統樹解析や新たに次世代シーケンサー(NGS)によるゲノム解析を行い、変異の有無や動向について注視していきたい。

参考文献

- 1) 片山和彦；ノロウイルス感染症とは，
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/452-norovirus-intro.html> (2024/8/21アクセス)

- 2) 矢尾板優，長谷川道弥，他；東京都内で検出されたノロウイルスの遺伝子解析(2021年度)，東京都健康安全研究センター年報，**73**，123～130(2022)
- 3) Bull RA, Hansman GS, 他；Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerging Infectious Diseases*, **11** (7), 1079～1085 (2005)
- 4) Eden JS, Tanaka MM, 他；Recombination within the pandemic norovirus GII.4 lineage. *Journal of Virology*, **87** (11), 6270～6282 (2013)
- 5) Chhabra P, de Graaf M, 他；Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *Journal of General Virology*, **100** (10), 1393～1406 (2019)
- 6) Kakakhel S, Khan H, 他；Genomic stratification and differential natural selection signatures among human norovirus genogroup II isolates. *Archives of Virology*, **167** (5), 1235～1245 (2022)
- 7) 国立感染症研究所；病原体検出マニュアル，ノロウイルス(第一版，2019年6月)
- 8) 国立感染症研究所感染症情報センター；病原微生物検出情報(IASR)，
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/452-norovirus-intro.html> (2024/8/21アクセス)
- 9) Kendra, JA, Tohma K, 他；Antigenic cartography reveals complexities of genetic determinants that lead to antigenic differences among pandemic GII.4 noroviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **118** (11), e2015874118 (2021)
- 10) 厚生労働省；ノロウイルスに関するQ&A，
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/kanren/yobou/040204-1.html (2024/8/21アクセス)
- 11) 日本感染症学会；新型コロナウイルス感染症パンデミック下における感染症の現況，
https://www.kansensho.or.jp/ref/2107_covid-19.html (2024/8/21アクセス)