

短報

2015年2月の市販カキから検出されたノロウイルスGII. 17の分子疫学解析

吉富秀亮・芦塚由紀・野田衛*

2015年2月の市販カキからノロウイルスGII. 17の検出を行い、ポリメラーゼ遺伝子およびカプシドVP1遺伝子を解析し、2013年および2015年の食中毒由来GII. 17と比較した。遺伝子増幅およびシーケンス解析は独自に設計したGII. 17特異的プライマーにより行った。その結果、カキから検出されたGII. 17のアミノ酸配列は2015年の食中毒由来GII. 17と99%一致した。一方、2013年の食中毒由来GII. 17と比較すると、カプシドVP1遺伝子のP2ドメインにアミノ酸変異が認められた。このことから、カキ中のGII. 17は2014/15シーズンの市中で検出されたGII. 17と関連があり、2015年のGII. 17の流行拡大は2013年以降のカプシドVP1領域の変異が一因であることが示唆された。

[キーワード：カキ、ノロウイルスGII.17、分子疫学解析]

1 はじめに

ノロウイルスGII. 17は2014年12月から2015年5月の期間に日本国内において流行した¹⁾²⁾。2015年2月に川崎市において検出されたGII. 17 (Kawasaki308株)の解析により、2014/15シーズンのGII. 17は新たな変異株であったことが松島ら³⁾によって報告された。しかし、食中毒の一因とされるカキ中のGII. 17の浸淫状況はこれまで報告されていない。さらに、カキ中には複数の遺伝子型のノロウイルスが混在する可能性があるため、クローニング法による解析が汎用されるが⁴⁾、この方法はダイレクトシーケンス法と比較して煩雑である。そこで、本研究ではGII. 17のカキへの浸淫状況の把握を目的として、GII. 17特異的増幅プライマーの設計および分子疫学解析を行ったので報告する。

2 方法

2・1 材料

カキは2015年2月に県内で購入した市販カキ6ロット(生食用4ロット、加熱用2ロット、全て県外産)を検査材料とした。カキ1個あたり中腸腺を1g~2.5g採取し、9倍量のPBS(-)を加え、粉碎処理した後、 α -アミラーゼ(Wako)を10mL当たり25mg添加し、よく混和した後、37°Cで1時間静置した。フィルター付き滅菌バッグを用いて濾過し、濾過液10mLを10,000rpm、20分間、4°Cで遠心分離し、上清を35,000rpm、2時間、4°Cで超遠心分離した。上清を取り除き、沈渣を0.5% Zwittergent (Merk) 400 μ Lで再浮遊させた。RNA抽出およびDNase処理はHigh Pure Viral RNA Kit

(Roche)を用い、cDNAの合成はHigh Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いた。

糞便検体は2013年および2015年の食中毒事例の5検体を材料とした。糞便のRNA抽出はQIAamp Viral RNA mini Kit(QIAGEN)、cDNA合成はSuperScript III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific)を用いた。

2・2 遺伝子増幅

GII. 17のポリメラーゼ領域およびカプシドVP1領域を特異的に増幅するプライマーは、G2SKFプライマーを除き、独自に設計した(表1)。これらのプライマーを用いてNested PCR法により各遺伝子領域を増幅した。1stPCR反応はPrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kit (Takara Bio)を用い、45°C 15分、94°C 2分(1サイクル)→98°C 10秒、60°C 15秒、68°C 2分(40サイクル)→68°C 7分(1サイクル)の反応条件で行った。2ndPCR反応はPrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara Bio)を用い、98°C 10秒、60°C 15秒、68°C 2分(40サイクル)→68°C 7分(1サイクル)の反応条件で行った。

2・3 分子疫学解析

PCR増幅産物は精製後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)によりダイレクトシーケンスを行い、3500xlジェネティックアナライザ(Applied Biosystems)を用いて塩基配列を決定した。決定した塩基配列はGenBank/EMBL/DDBJ データベースに登録し、アクセッション番号を取得した(LC101778-LC101788)。また、比較する参照配列は松島らの報告³⁾を参考に、GenBank/EMBL/DDBJ データベースから入手した。系統解析

福岡県保健環境研究所 (〒818-0135 太宰府市大字向佐野 39)

* 国立医薬品食品衛生研究所

(〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1)

表 1 GII.17 特異的増幅プライマーおよびシーケンスプライマー

Primers	Polarity*	Sequence (5'-3')	Method	Amplicon size (bp)	Nucleotide position**	Authors
Polymerase region						
GII.17 POL-386F	+	CACCACGTCCGGGAAGAATGA	1st PCR	1671	3941-3960	This study
GII.17 POL-276F	+	AGTTTACACCGCAGCACTCA	2nd PCR	1561	4051-4070	This study
GII.17 Cap517R	-	CGGCTGTTAGGCTGGTTACT	1st, 2nd PCR		5611-5592	This study
GII.17 Pol343F	+	ATGGCCTTAAACCCACTCGG	Sequencing		4668-4687	This study
GII.17 Pol397R	-	TCACTAATCACCAACGGCCC	Sequencing		4722-4703	This study
GII.17 Pol563R	-	CACAGGTCTYGTGCGTGTG	Sequencing		4888-4869	This study
Capsid VP1region						
G2SKF	+	CNTGGGAGGGCGATCGCAA	1st, 2nd PCR		5049-5067	Kojima et al. (2002) ⁵⁾
GII.17 Cap1889R	-	ACCAATGGATCCCCTTGCTG	1st PCR	1934	6982-6963	This study
GII.17 Cap1543R	-	AGTGTCATTAGCCGGAACA	2nd PCR	1582	6630-6611	This study
GII.17 Cap13F	+	GACGCCGCTCCATCTAATGA	Sequencing		5106-5125	This study
GII.17 Cap517R	-	CGGCTGTTAGGCTGGTTACT	Sequencing		5611-5592	This study
GII.17 Cap612R	-	AGGCCTAGTCAAACCGTGC	Sequencing		5705-5686	This study
GII.17 Cap1433F	+	CCGATACGGGACGTACTG	Sequencing		6526-6545	This study
GII.17 Pol589F	+	CCTCCGTACATGGACCCTCA	Sequencing		4914-4933	This study

* +; Forward primer, -; Reverse primer

** 塩基配列番号は Kawasaki308 株 (Accession No: LC037415) に準拠した

はMEGA5ソフトウェアを用いて最尤法により行った。

3 結果

本研究において設計した GII. 17 特異的プライマーにより、カキは 6 ロット中 5 ロット、糞便検体は 5 検体全てについて、ポリメラーゼ領域 759bp (253aa) およびカプシド VP1 領域 1488bp (496aa) を決定することができた。

ポリメラーゼ領域 253aa について、カキ中の GII. 17 と 2013 年および 2015 年の糞便由来 GII. 17 を比較した結果、それぞれ 99% (252aa/253aa) および 100% 一致し、同じクラスターに分類された (図 1)。

カプシド VP1 領域 496aa について、カキ中の GII. 17 と 2015 年の糞便由来 GII. 17 を比較した結果、99% (494aa/496aa) 一致し、同じクラスターに分類された。一方、2013 年の糞便由来 GII. 17 と比較した結果、アミノ酸配列は 95% (471aa/496aa) 一致し、異なるクラスターに分類された (図 2)。25 個のアミノ酸変異のうち 23 個は P2 ドメイン内に位置し、さらにそのうち 10 個はエピトープ推定領域内に位置していた (図 3)。

4 考察

本研究では、GII. 17 に対する特異的なプライマーを設計することによって、クローニング法を用いず、ダイレクトシーケンス法によりカキ中の GII. 17 を解析することができた。このことから、複数種類のノロウイルスが混在することが想定されるカキのような検体において、特定の遺伝子型のみを解析する場合は、特異的プライマーの設計が有用であることが示された。

2015 年 2 月のカキから検出された GII. 17 と 2015 年の糞便由来 GII. 17 についてアミノ酸配列を比較した結果、ポリメラーゼ領域およびカプシド VP1 領域ともに相同性が高く、

同一のクラスターに分類された。このことから、カキ中の GII. 17 は市中の流行と関連があることが示唆された。また、カキに含まれるノロウイルスの解析により、そのシーズンの流行遺伝子型の推測が可能であり、食中毒の発生予防の基礎資料となることが示された。一方、IASR 集計¹⁾による GII. 17 の検出割合は 2014 年 12 月が 0.6% (3/476)、2015 年 1 月が 2.2% (11/495) であり、同時期の主流行株である GII. 4 および GII. 3 と比較して検出割合は小さい。このことから、GII. 17 は不顕性感染率が他の遺伝子型と比較して高い可能性がある。GII. 17 による感染症または食中毒事例との関連については今後の検討課題である。

2015 年 2 月のカキ中の GII. 17 と 2013 年の糞便由来 GII. 17 の比較を行った結果、ポリメラーゼ領域のアミノ酸配列は 99% 一致し、同じクラスターに分類された (図 1)。このことから、2013 年以降の GII. 17 の増幅性は変化がないことが示唆された。一方、カプシド VP1 領域のアミノ酸配列は 5% 程度変異しており異なるクラスターに分類された (図 2)。変異は P2 ドメインに集中し、さらにエピトープ推定領域内に変異が認められた (図 3)。このことから、2015 年に GII. 17 が流行拡大は、2013 年以降にカプシド VP1 領域 P2 ドメインの変異によって抗原性が変化し、ホストの免疫を回避できるようになったことが一因であることが示唆された。

ノロウイルスの解析は従来、N/S 領域約 350 塩基を解析してきた。GII. 17 の N/S 領域について 2013 年と 2015 年の検出株を比較すると、塩基配列の変異は認められるが、全て同義置換であった。このことから、GII. 17 のアミノ酸変異を捉えるためには、本研究で解析したように、カプシド VP1 全領域を解析する必要がある。今後も、食中毒発生予防を目的とし、市販カキを活用したノロウイルスの調査を継続して実施することにより、ポリメラーゼ領域およびカプシド VP1 領域の変異を早期に捉える必要がある。

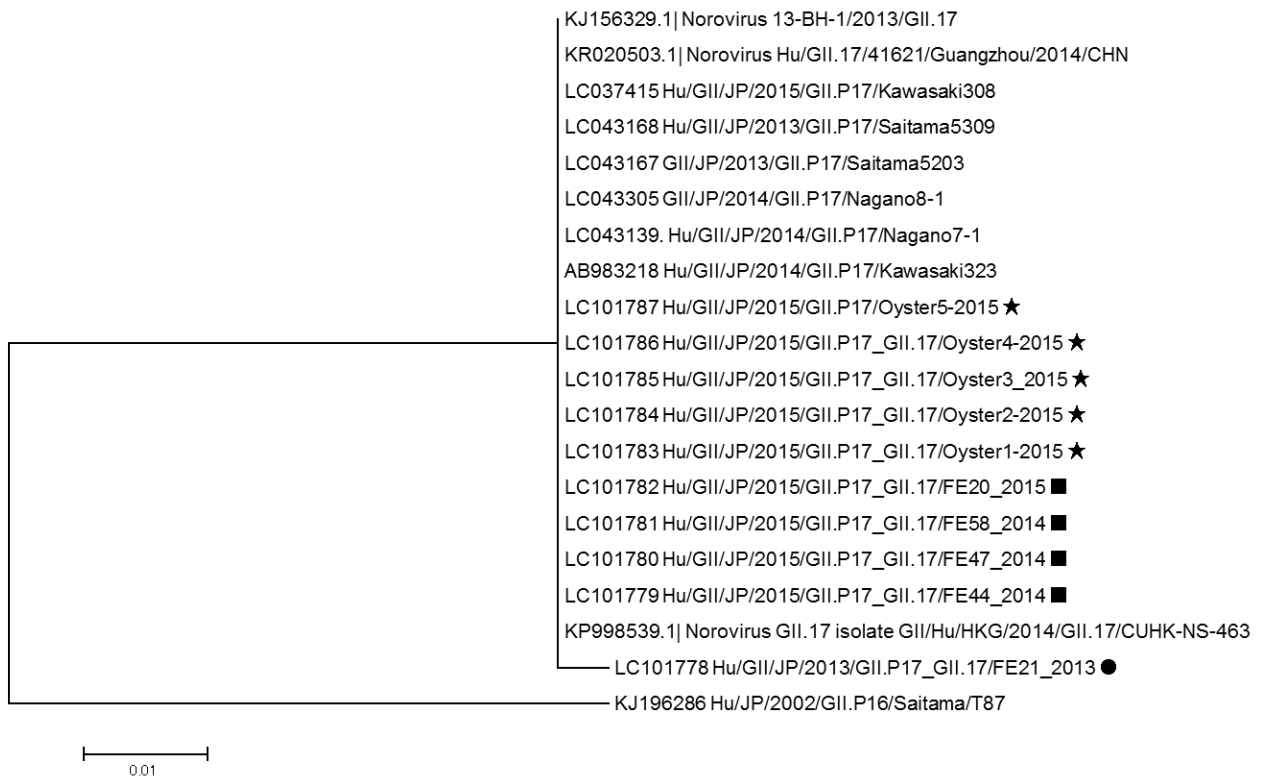


図1 ポリメラーゼ領域 (253aa)の系統解析結果

- ★ : カキから検出されたノロウイルス GII.17, ■ : 2015年の糞便から検出されたノロウイルス GII.17
- : 2013年の糞便から検出されたノロウイルス GII.17

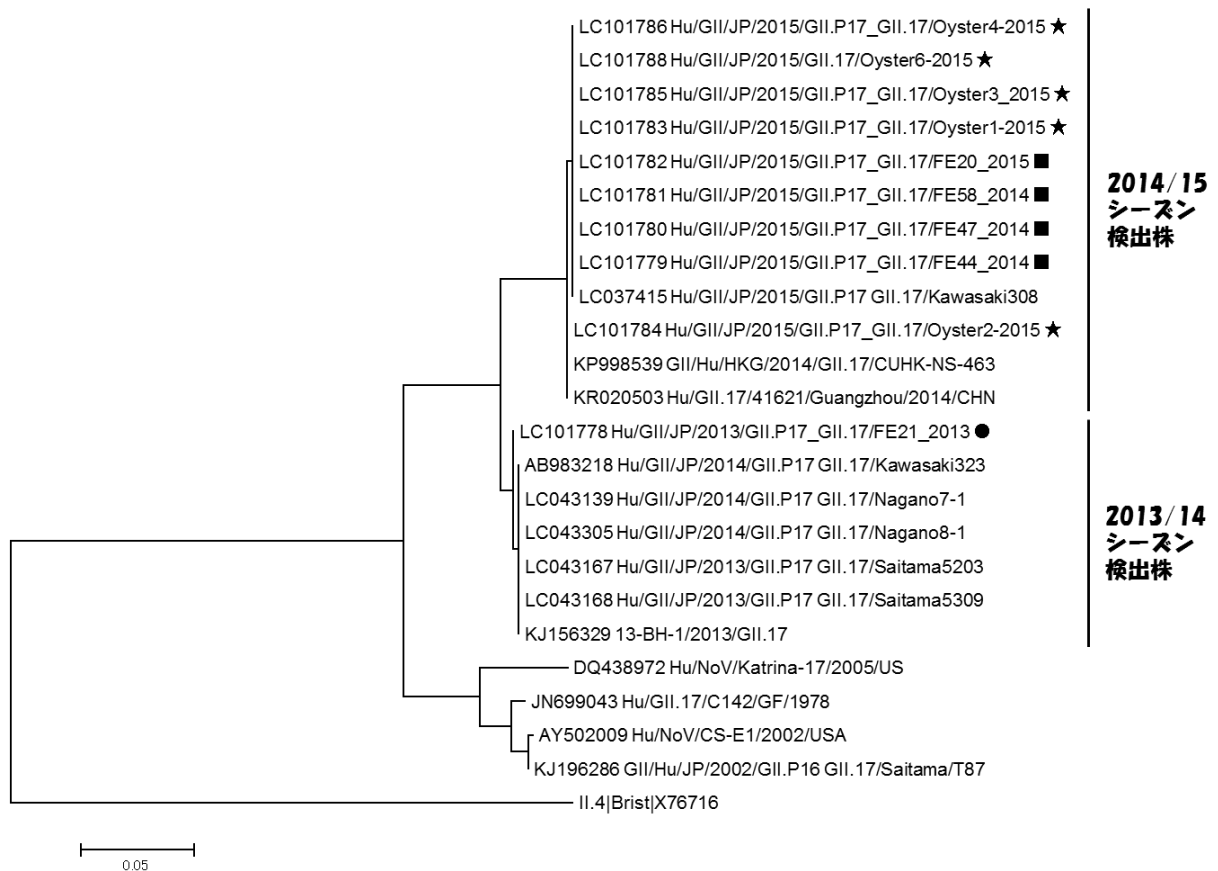


図2 カプシド VP1 領域 (496aa)の系統解析結果

- ★ : カキから検出されたノロウイルス GII.17, ■ : 2015年の糞便から検出されたノロウイルス GII.17
- : 2013年の糞便から検出されたノロウイルス GII.17

Name of Strain	Amino acid number (major epitopes)																																								
	217-225 (I)					291-298 (II)					359-363 (III)					371-379 (IV)					390-396 (V)																				
	P	P	S	V	E	S	K	T	K	T	A	E	T	D	H	R	D	S	P	Q	F	V	F	R	S	N	D	N	D	D	F	Q	I	N	D	D	G	D	-	H	
FE21 2013	Q	I	N	Q	L	.	I	S	V	D	.	G	.
FE44 2014	Q	I	N	Q	L	.	I	S	V	D	.	G	.
FE47 2014	Q	I	N	Q	L	.	I	S	V	D	.	G	.
FE58 2014	Q	I	N	Q	L	.	I	S	V	D	.	G	.
FE20 2015	Q	I	N	Q	L	.	I	S	V	D	.	G	.
Oyster1-2015	Q	I	N	Q	L	.	I	S	V	D	.	G	.
Oyster2-2015	Q	I	N	Q	L	.	I	S	V	D	.	G	.
Oyster3-2015	Q	I	N	Q	L	.	I	S	V	D	.	G	.
Oyster4-2015	Q	I	N	Q	L	.	I	S	V	D	.	G	.
Oyster6-2015	Q	I	N	Q	L	.	I	S	V	D	.	G	.

図3 GII.17 のカプシド VP1 領域 P2 ドメイン内のエピトープ推定領域におけるアミノ酸変異

*アミノ酸配列番号は Kawasaki323 株 (Accession No: AB983218) に準拠した

5 まとめ

・ GII.17 特異的増幅プライマーの設計により、カキ中の GII.17 のポリメラーゼ全領域およびカプシド VP1 全領域を増幅が可能であり、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を解析することができた。

・ アミノ酸配列比較の結果、カキ中の GII.17 は 2015 年糞便由来 GII.17 と 99% 一致し、市中で検出された GII.17 と関連があることが示唆された。

・ 2013 年および 2015 年に検出された GII.17 のアミノ酸配列を比較した結果、カプシド VP1 の P2 ドメイン内のアミノ酸が変異していたことが明らかになり、2015 年の流行は抗原性が変化したことが原因の一つであると考えられた。

謝辞

本研究は、平成 27 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)「食品中の病原ウイルスの検出法に関する研究」班(研究代表者:野田衛)において実施

(英文要旨)

Detection and Genetic Analysis of Norovirus GII.17 in Oysters

Hideaki YOSHITOMI, Yuki ASHIZUKA and Mamoru NODA*

Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences,

Mukaizano 39, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan

** National Institute of Health Sciences,*

Kami-yoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

The norovirus polymerase gene and capsid gene were amplified by reverse transcription polymerase chain reaction with GII.17 specific primers designed for detection and phylogenetic analysis of the norovirus genome. Purified concentrates were prepared from the stomachs and digestive diverticula of oysters collected in February 2015. In phylogenetic analysis, the amino acid sequences of GII.17 in oysters showed high degrees of identity with the GII.17 that was detected in gastroenteritis outbreaks in January and April 2015. By contrast, the P2 domain in the capsid VP1 region of GII.17 from the oysters showed amino acid substitution differences when it was compared to GII.17 from a 2013 gastroenteritis outbreak. These results suggest that the GII.17 strain found in the oysters could have caused the 2015 gastroenteritis outbreaks, and that mutations in the capsid VP1 region of this strain compared to the 2013 strain are a defining characteristic.

[Key words ; Oysters , norovirus GII.17, Phylogenetic analysis]