

短報

福岡県で2015年に検出されたノロウイルスGI. 3の系統樹解析

吉富秀亮・中村麻子・小林孝行・芦塚由紀

福岡県で2015年3月から7月に感染性胃腸炎及び食中毒疑い事例の糞便検体からノロウイルスGI. 3が検出された。従来、ノロウイルスの検出はN/S領域約350bpの塩基配列に基づく解析結果であり、ノロウイルスGI. 3の詳細な性状解析は未実施であった。そこで本研究では、ノロウイルスGI. 3の遺伝子学的特徴を明らかにすることを目的に、ポリメラーゼ領域及びカプシドVP1領域の配列を決定し系統樹解析を行ったので報告する。検体は感染性胃腸炎及び食中毒疑い事例由来の糞便10検体を用いた。ポリメラーゼ領域及びカプシドVP1領域は、独自に設計したプライマーを用いて遺伝子増幅し、それぞれの領域について最尤法を用いて系統樹解析を行った。この結果、ノロウイルスGI. 3の2539bpを決定し、遺伝子型はすべてGI. P3_GI. 3bに分類された。また、2015年に福岡県で検出されたノロウイルスGI. P3_GI. 3bは、同時期に中国において検出された0304-19株が最も近縁であることが示唆された。

[キーワード：ノロウイルスGI. 3、2015年、系統樹解析]

1 はじめに

ノロウイルスは感染性胃腸炎の主要な原因である。ノロウイルスはカリシウイルス科ノロウイルス属に属し、7つの遺伝子群 (GI~GVII) に分類される。そのうち、特にヒトに感染し胃腸炎を引き起こす遺伝子群はGI及びGIIであり、それぞれ9種 (GI. 1~GI. 9) 及び22種 (GII. 1~GII. 22) の遺伝子型に分類される¹⁾。ノロウイルスは約7500bpの塩基からなる一本鎖RNAを遺伝子として持ち、3つの蛋白質コード領域 (open reading frame; ORF) が存在し、ORF1; 非構造蛋白質、ORF2; 構造蛋白質 (カプシド蛋白質; VP1)、ORF3; 構造蛋白質 (VP2) をコードしている。現在、ORF1がコードするポリメラーゼ領域とORF2がコードするカプシドVP1領域の塩基配列に基づく遺伝子型分類が推奨されている²⁾。

福岡県において、2015年3月から7月にかけてノロウイルスGI. 3が感染症発生動向調査事業及び食中毒事例から複数検出された。従来、ノロウイルスの検出法はN/S領域約350bpの塩基配列に基づく解析結果であり、詳細な解析は未実施であった。J. Vinjeら³⁾によると、ノロウイルスGI. 3はさらに4つのポリメラーゼ (GI. P3, GI. P4, GI. P5, GI. P6) と4つのカプシドVP1 (GI. 3a, GI. 3b, GI. 3c, GI. 3d) のサブタイプの組み合わせに分類される。そこで、本研究では、2015年に福岡県において検出されたノロウイルスGI. 3の遺伝子学的な特徴を明らかにすることを目的に、ポリメラーゼ領域及びカプシドVP1領域の塩基配列を決定し、系統樹解析を行ったので報告する。

2 方法

検体は2015年3月から7月にかけて、ノロウイルスGI. 3が検出された糞便検体10検体を用いた (表1)。

検体処理及びRNA抽出は常法⁴⁾に従った。ORF1及びORF2を増幅するプライマーは独自に設計した (表2)。1st PCR反応はPrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kit (タカラバイオ) を用い、45°C15分逆転写反応後、94°C2分初期変性を行い、98°C10秒変性、60°C15秒アニーリング、68°C2分伸長を40サイクル繰り返した後、68°C7分伸長反応を行った。2nd PCR反応はPrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara Bio) を用い、98°C10秒変性、60°C15秒アニーリング、68°C2分伸長を40サイクル繰り返した後、68°C7分伸長反応を行った。明瞭な陽性バンドが確認されたPCR産物について、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。決定した塩基配列はGenBankデータベースに登録し、アクセッション番号を取得した (LC378984-LC378993)。

系統樹解析はMEGAソフトウェアver. 7を用いて最適なモデルを算出し、ポリメラーゼ領域、カプシドVP1領域ともにKimura 2-parameter model (+I) を用いて最尤法により系統樹を作成した。得られた分子系統樹評価のため、ブートストラップは1000回実施した。

3 結果及び考察

2015年3月から7月に検出されたノロウイルスGI. 3陽性10検体についてORF1/ORF2領域の増幅を行った結果、2539bpを決定した。10検体の塩基配列を比較した結果、2539bpの相同性は97.5%~100%、ポリメラーゼ領域904bp

表 1 検体一覧

検体名	事例番号	採取年月日	Accession No.	
1	FE49_2014	食中毒-1	2015/3/3	LC378984
2	FS421_2014	発生动向-1	2015/3/6	LC378985
3	FE2_2015	食中毒-2	2015/4/14	LC378986
4	FE8_2015	食中毒-2	2015/4/14	LC378987
5	FE29_2015	食中毒-3	2015/4/25	LC378988
6	FE47_2015	食中毒-4	2015/5/13	LC378989
7	FE59_2015	食中毒-5	2015/6/4	LC378990
8	FE61_2015	食中毒-6	2015/6/13	LC378991
9	FS114_2015	発生动向-2	2015/7/6	LC378992
10	FS118_2015	発生动向-3	2015/7/8	LC378993

表 2 ノロウイルス GI.3 解析プライマー一覧

プライマー名	配列 (5'-3')*	
ORF1 region		
GI3-ORF1-+536F	TTGTGAGGGAATTGGGCGAC	1st PCR
GI3-ORF2-931R	AGCCGTGAAGGCATTACCAG	1st PCR
GI3-ORF1-+382F	AGACCTTGGCACCCTCATTC	2nd PCR
GI3-ORF2-893R	TCATATTGCCAACCCAGCCA	2nd PCR
GI3-ORF1-+126F	ACAGCTTGGGACTCAACACA	Sequencing
GI3-ORF1-295F	AGACAGCTTTGGTGGACTCG	Sequencing
GI3-ORF1-314R	CGAGTCCACCAAAGCTGTCT	Sequencing
GI3-ORF2-602R	TTGTGGGGCGTCTTAGAC	Sequencing
ORF2 region		
GI3-ORF1-326F	ACGAGGACCCATITGAGACG	1st PCR
GI3-ORF3-2764R	ACCCAGGTGGAGTAACCCAT	1st PCR
GI3-ORF1-396F	AGCAGCACTCCATGGTGA	2nd PCR
GI3-ORF3-2557R	ACCTAAGTGTCTGCGGTT	2nd PCR
GI3-ORF2-1103F	ACCATGAGGTTGGTGTGCAT	Sequencing
GI3-ORF2-2106R	ATTGGGAGGGTTTGTGGACC	Sequencing
GI3-ORF2-1405R	TTGCAGTTGCCATCTAGGG	Sequencing
GI3-ORF2-1572R	GCCAAATCACACTCACCCAGA	Sequencing
GI3-ORF2-1779R	ACCCACGGATCGACATTTC	Sequencing
GI3-CAP-1528R	GAGTTTGTGGCCAGTGCCA	Sequencing
GI3-CAP-1815R	AAGCCTCCACCTGTAAGCCC	Sequencing
GI3-CAP-607F	ATTGCTGGGCGTGTITGAC	Sequencing
GI3-CAP-775F	GACCATGGGCGAGTGGTICA	Sequencing
GI3-CAP-1168F	CCCGTCAGTGATGGACACAA	Sequencing

の相同性は 97.3%~100%、カプシド VP1 領域 1635bp の相同性は 97.7%~100%であった。10 検体のアミノ酸配列を比較した結果、ポリメラーゼ領域の相同性は 99.3%~100%、カプシド VP1 領域の相同性は 98.7%~100%であった。

次に、最尤法を用いてサブタイプ分類が可能な参照株を含めて系統樹解析を行った。ポリメラーゼ領域の比較可能な 267bp を用いて系統樹解析を行った結果、すべて GI. P3 に分類された (図 1)。同様に、カプシド VP1 領域の比較可能な 1635bp について系統樹解析を行った結果、すべて GI. 3b に分類された (図 2)。これらの結果から、2015 年に福岡県で検出されたノロウイルス GI. 3 はすべて GI. P3_GI. 3b に分類されることが明らかとなった。

GenBank データベース検索の結果、2015 年に福岡県で検出された株と最も近縁な株は、2015 年 3 月に中国で検出された 0304-19 株 (Accession No. KY934262) であった。これらの株の塩基配列を比較した結果、ポリメラーゼ領域の相同性は 96.2%~97.6%、カプシド VP1 領域の相同性は 95.7%~96.3%であった。同時期に日本国内で検出された株

は GenBank に登録されていなかった。本研究では、抗原性の変化を検討していないため、2015 年に GI. P3_GI. 3b が複数検出された要因は不明である。今後、カプシド VP1 領域の塩基配列及びアミノ酸配列の変化について解析し、抗原性の変化について解析を行う。

4 まとめ

2015年3月から7月に福岡県において検出されたノロウイルスGI. 3はすべてGI. P3_GI. 3bに分類された。また、同時期に中国において検出された0304-19株が最も近縁であることが示唆された。

文献

1. Kroneman, A. et al., Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. Arch Virol, 158, 10, 2013
2. 病原微生物検出情報, 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), 2015年9月
3. Vinjé, J., Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. Journal of clinical microbiology, 2015, 53.2: 373-381.
4. 厚生労働省通知法 (平成19年5月14日付け食安監発第0514004号)

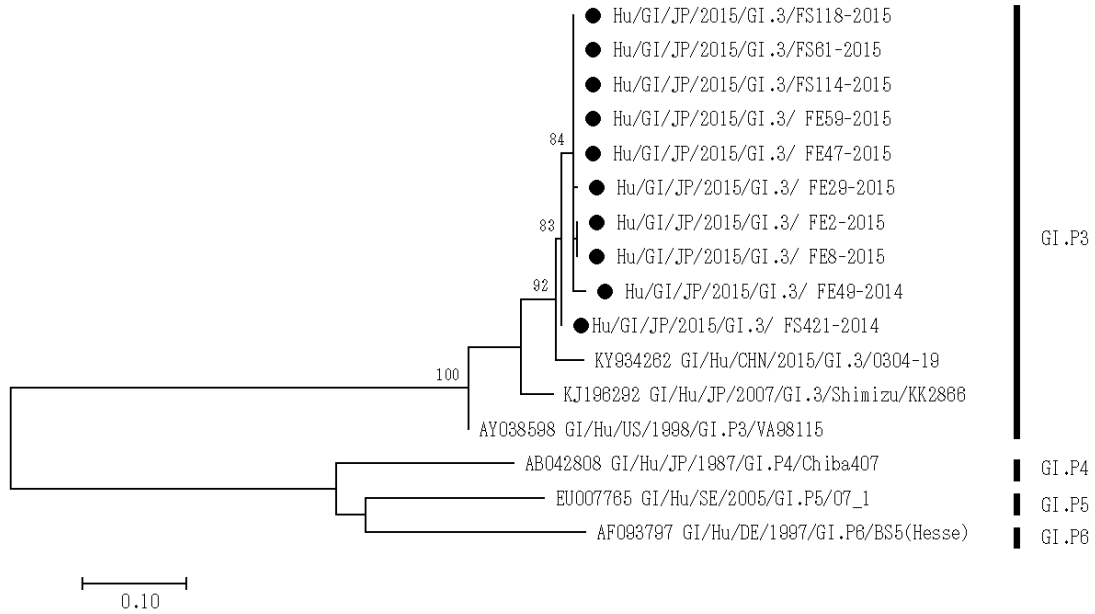


図1 ノロウイルス GI.3 のポリメラーゼ領域の系統樹解析結果

系統樹はポリメラーゼ領域 267bp において最尤法で作成した。ブートストラップ値は、クラスターを支持する枝にそれぞれ数字で示した。●は 2015 年に福岡県で検出された株を示す。

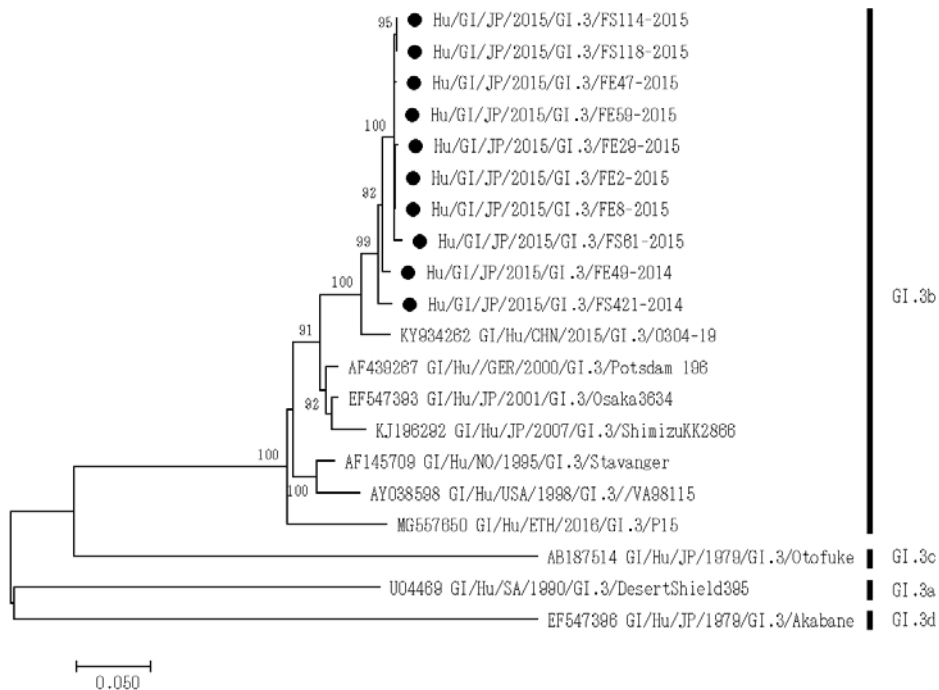


図2 ノロウイルス GI.3 のカプシド VP1 領域の系統樹解析結果

系統樹はカプシド VP1 領域 1635bp において最尤法で作成した。ブートストラップ値は、クラスターを支持する枝にそれぞれ数字で示した。●は 2015 年に福岡県で検出された株を示す。

(英文要旨)

Phylogenetic analysis of norovirus GI.3 detected in 2015 in Fukuoka

**Hideaki YOSHITOMI, Asako NAKAMURA, Takayuki KOBAYASHI,
and Yuki ASHIZUKA**

*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences,
Mukaizano 39, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan*

From March to July 2015, Norovirus GI.3 was detected from fecal specimens of infectious gastroenteritis and foodborne suspected outbreaks in Fukuoka. The present study determined the entire polymerase genes and capsid genes of ten norovirus GI.3 isolates from these fecal specimens. In addition, a phylogenetic analysis of each gene region was conducted using the maximum likelihood method to classify the sub-genotypes of the norovirus GI.3 isolates. The 2,539-bp PCR product covering the entire polymerase- and capsid-encoding region sequences of norovirus GI.3 was amplified using original designed primers. Based on the results, all ten norovirus GI.3 strains were classified as GI.P3_GI.3. Unfortunately, norovirus strains from the same season in Japan could not be compared with the isolates from this study because they were not registered in the GenBank database; however, it was clear that the norovirus strains detected in 2015 in Fukuoka were closely related to the 0304-19 strain detected in China in March 2015. Therefore, the norovirus GI.P3_GI.3b detected in 2015 in Fukuoka was likely widely prevalent in Asia.

[Key words; norovirus GI.3, 2015, phylogenetic analysis]