

資料

## 広島県におけるノロウイルス遺伝子型 GII.4 の変異

福田 伸治, 重本 直樹, 谷澤 由枝

### Norovirus GII.4 Subtypes in Hiroshima Prefecture, Japan

SHINJI FUKUDA, NAOKI SHIGEMOTO, and YUKIE TANIZAWA

(Received September 14, 2010)

構造タンパク質 VP1 領域の部分的なアミノ酸 (6, 9, 15, 45, 296-298, 393-395 および 412-414 番目) の変化を観察することにより, ノロウイルス遺伝子型 GII.4 変異型 (サブタイプ) を簡易に抽出することが可能であった。また, シーズンにより流行する GII.4 のサブタイプも変化していることが確認された。

Key Words : ノロウイルス, GII.4, サブタイプ, VP1, アミノ酸変異

#### 緒言

ノロウイルス (NoV) は世界中の下痢症の主要な原因であり, わが国における食中毒の病因物質の主体を占めている (<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html#4-2>)。NoV には 5 遺伝子グループと多くの遺伝子型が存在するが [1], 世界的にも近年のノロウイルス下痢症の多くは遺伝子型 GII.4 を原因としている [2]。特に, わが国においては 2006/07 年シーズンに爆発的なノロウイルスの流行を経験し, その原因の大部分を GII.4 が占めていたことが確認されている [3]。GII.4 のように数年にわたり流行の主流となる遺伝子型は他に認められておらず, その要因は不明な点が多い。これまでの研究から, GII.4 流行の要因としては他の遺伝子型に比べて発症率が低く [4], 糞便中に排泄されるウイルス量が多いため [5-7], 不顕性感染者がウイルスをより拡散しやすいことと併せ, ウイルス粒子を構成する VP1 タンパク質の最も外側に位置する P2 ドメインにアミノ酸変異が集中していることから [3, 8-12], 抗原性や感染効率が変化していることが推定されている。また, 不明な点が多いが, アミノ酸変異が比較的少ないとされる S ドメインにおいても有意なアミノ酸変異部位が認められている [13-16]。GII.4 変異型 (サブタイプ) の VP1 における特徴的なエピトープ (variant-specific epitope) は P2 ドメインのアミノ酸 296-298 番目, 393-395 番目および 412-414 番目にあり [9, 11, 12], S ドメインにおいても 6, 9, 15, 45 あるいは 47 番目が有意なアミノ酸変異を伴っていること [13-16] が報告されている。

ここでは, 広島県内で検出した GII.4 において特徴的なアミノ酸変異が認められる VP1 領域の 6, 9, 15, 45, 296-298, 393-395 および 412-414 番目のアミノ酸 [12, 16] に注目し, 広島県内の食中毒などの集団感染症事例に関与した GII.4 サブタイプの変遷について検討した。

#### 材料および方法

2001 年 3 月から 2010 年 4 月に発生したノロウイルス集団感染事例 43 事例の原因となった 43 株の遺伝子型 GII.4 を用いた。

アミノ酸 6, 9, 15 および 45 番目を含む S ドメインをコードする領域の核酸増幅は Kojima ら [17] のプライマーを, 296-298, 393-395 および 412-414 番目を含む P2 ドメインをコードする領域の核酸増幅は GII.4 cap\_5898-5918 (5'-CTTRGGYACYACCCAACTRTC-3') および GII.4 cap\_6415-6394 (5'-TACCCRCRTRCAYCCRGGCATAG) プライマーを用いて行った。そして, DNA gel extraction kit (Millipore, Bedford, MA, USA) を用いて 1.5% アガロースゲルから PCR 増幅産物を精製後, SequiTherm EXCEL II DNA sequencing kit LC for 25- and 41- cm gels (EPICENTRE Technologies, Madison, WI, USA) および LI-COR 4200 series sequencer (LI-COR, Lincoln, NE, USA) を用いてダイレクトシーケンスを行った。アミノ酸配列は BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioEdit.html>) を用いて DNA 配列から変換した。系統解析は NJ 法 (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) によ

りを行い、系統樹は Tree Explorer (<http://evolgen.biol.metro-u.ac.jp/TE/>) を用いて作成した。

## 結 果

VP1 領域の 6, 9, 15, 45, 296-298, 393-395 および 412-414 番目のアミノ酸の配列から作成した系統樹を図 1 に、アミノ酸配列パターンのその流行シーズンに占める割合を表 1 に示した。2002/03 年シーズンには GII.4 の関与した事例は認められなかったが、GII.4 は年代順に変化していることが認められた。アミノ酸配列パターンは 16 種類が確認されたが、各流行シーズンにおける主たるアミノ酸配列パターンは、2001/02 年シーズンでは  $N_6N_9T_{15}Q_{45}S_{296}H_{297}D_{298}N_{393-394}N_{395}T_{412}G_{413}H_{414}$ 、2003/04 年では NSTQTRTSSATVH、2004/05 年では NSTQTRTSSATVH および NTTQTQNSTTTVH、2005/06 年は NSTQTRTSSTTVH、2006/07 年では NNAQTRNGTTNVH、NNAQSRNSTTNVH および NNATSRNSTTNVH、2007/08 年では NNAQSRNGTTNVP、2008/09 年では NNAQSRNSTTNVH および NNAQSRNGTTNVH、2009/10 年では NNAQSRNGTTNVP および SNTQSRNSTTNIH であり、流行シーズンにより特徴が認められた。特に、2006/07 年から 2008/09 年シーズンは複数のタイプの GII.4 が流行していたことが認められた。

一方で、対象とした期間内には、諸外国で比較的多く検出されている Farmington Hills (GenBank accession no. AY502023) および Terneuzen70 (EF126964) クラスタに属する GII.4 サブタイプの集団発生例への関与は認められなかった。

2003/04 年から 2005/06 年シーズンの流行株 (図 1 の 2 および 3 のクラスタ) は 2001/02 年流行株 (図 1 の 1 のクラスタ) からは大きく変異し、9, 296-298, 393-395 および 412-414 番目のアミノ酸の変化が確認された。2006/07 年から 2008/09 年シーズンの流行株 (図 1 の 4 のクラスタ) は 2005/06 年シーズンの流行株に比較し、9, 15, 45 および 296-298 番目のアミノ酸に変化が認められた。同様に、2006/07 年から 2009/10 年シーズンの流行株 (図 1 の 5 のクラスタ) は 2005/06 年シーズンの流行株に比較し、9, 296-298, 393-395 番目のアミノ酸変化に加え、414 番目のアミノ酸に変化を伴った株が流行していることが認められた。また、2009/10 年に流行したもう 1 つの株 (図 1 の 6 のクラスタ) は 2006/07 年から 2008/09 年シーズンに流行した株と比較し、9, 15, および 413 番目のアミノ酸に変化が認められた。図 1 の 1 から 6 のクラスタに属する株は Motomura ら [3] のクラスタ分類に従うと、1 のクラスタは 95/96, 2 は 04/05/AU/NL, 3 は 04/05/JP/CHN, 4 および 5 は 2006b であり、6 は New Orleans 1805/09/US 様 (GU445325) の株であった。

表 1 各流行シーズンにおけるノロウイルス遺伝子型 GII.4 変異型 (%)

アミノ酸配列	流行シーズン									
	2001/02	2002/03	2003/04	2004/05	2005/06	2006/07	2007/08	2008/09	2009/10	
NNTQSHDN-NTGH	100									
NSTQTRTSSATVH			100	67						
NTTQTQNSTTTVH				33						
NSTQTRTSSTTVH					100					
NNAQTRNGTTNVH						36				
NNAQSRNSTTNVH						27	17	60		
NNATSRNSTTNVH						18	17			
NSAQSRNSTTNVH						9				
SNAQSRNSTTNVH						9				
NNAQSRNGTTNVP							33		33	
NNATSRNSTTNAQ							17			
NNATSRNGTTNVH							17			
NNAQSRNGTTNVH								40		
NNAQSHNGTTNVQ									11	
SNTQSRNSTTNIH									44	
SNTQSRNSTTNIH									11	

アミノ酸配列：VP1 領域の 6, 9, 15, 45, 296-298, 393-395 および 412-414 番目のアミノ酸を示す。  
 数字は各流行シーズンに占める割合を示す。  
 網掛けは各流行シーズンにおいて複数事例から検出したサブタイプを示す。

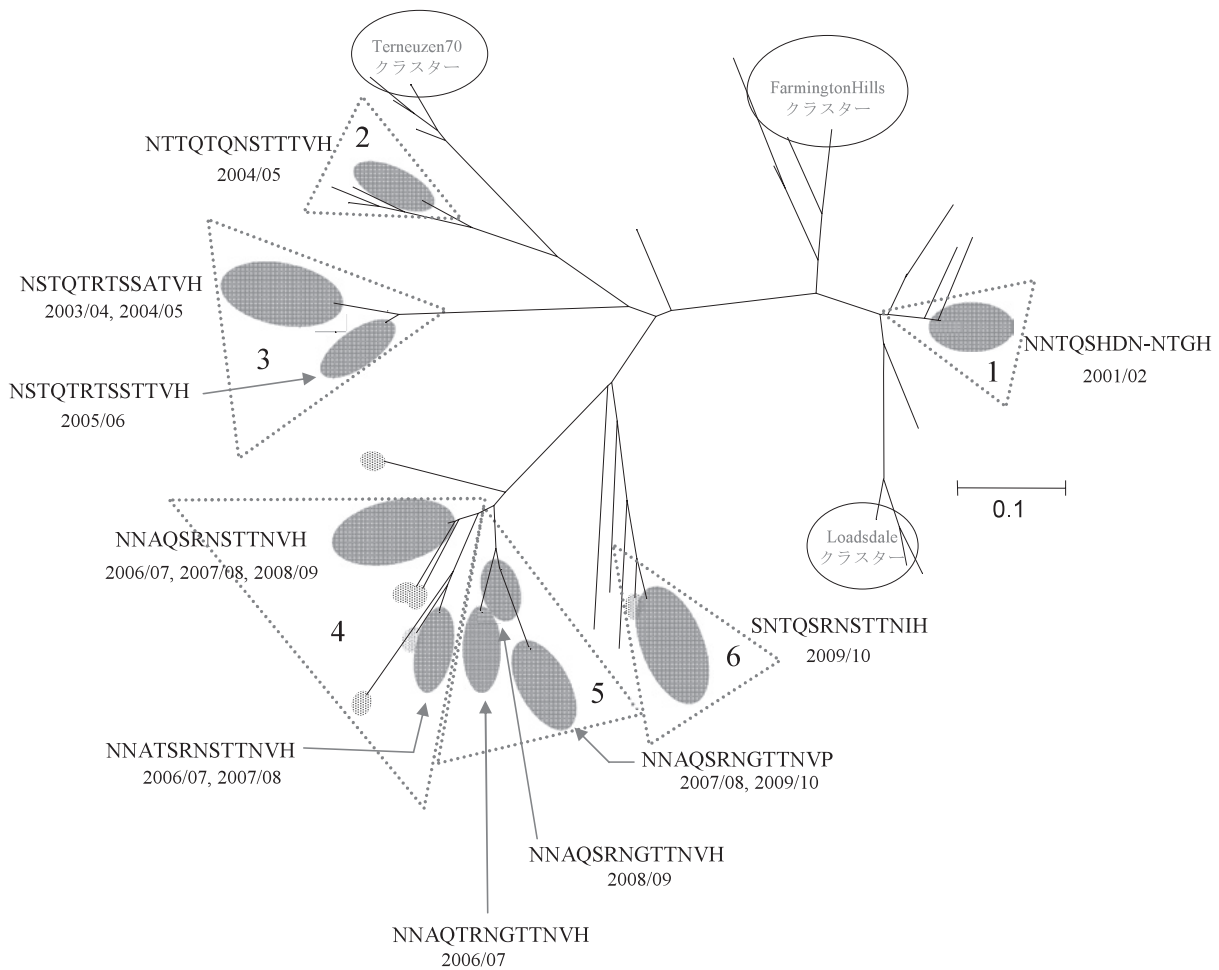


図1 集団感染事例に関与したノロウイルス遺伝子型 GII.4 サブタイプの系統樹  
 系統樹は VP1 領域の 6, 9, 15, 45, 296-298, 393-395 および 412-414 番目のアミノ酸配列から作成した。Lordsdale, Farmington Hills および Terneuzen70 の GenBank accession no. はそれぞれ X86557, AY502023 および EF126964 である。

## 考 察

遺伝子型 GII.4 は他の遺伝子型には見られない長期にわたる流行を繰り返している。これはアミノ酸変異を繰り返し、集団免疫から逃れているのではないかと推定されている [8, 10, 18]。実際に適応進化部位 (positively selected site) はウイルス粒子の最も外側に位置する P2 ドメインに多いことが認められている [3, 10, 12]。一方で、ウイルス粒子複製のための保存領域 (コドン) が存在することも推定されている [19]。このように、自己を保存・複製しながら、適応進化を遂げていることが推察される。また、GII.4 は塩基置換速度が早いことが報告され [15, 20]、集団免疫を逃避するための抗原変異が GII.4 の進化に影響していること [8, 10, 18] と併せ、

新しい GII.4 サブタイプの出現と GII.4 の継続した流行を後押ししていると考えられる。

広島県においても例外ではなく、GII.4 は集団感染事例の大部分を占める遺伝子型であり [12]、流行する GII.4 も経年変化を伴い、流行を繰り返していることが確認された。2004/05 年シーズンには欧米で主流の 04/05/AU/NL (アミノ酸配列パターン、NTTQTQNSTTTVH) も流行したが、全国と同様 [3] に、広島県においても 04/05/JP/CHN (NSTQTRTSSATVH) が主流であり、欧米とは異なったサブタイプが流行していたことが確認された。また、2006/07 年から 2009/10 年シーズンにはサブタイプ 2006b が主流であったが、詳細に観察すると、アミノ酸配列パターンが異なる種々の 2006b が流行していたことが確認された。このことは他のサブタイプと異なり、

2006b が長期にわたり流行しているさらなる理由であると推定される。しかしながら、2009/10年シーズンには 2006b とは異なったサブタイプの流行 (New Orleans 1805/09/US 様) も確認された。この株が 2006b に代わり流行の主流になるか否かについては今後の解析が必要となるが、興味深い状況である。

## 結 語

以上のように、シーズンにより流行する GII.4 に変化が確認され、VP1 領域の 6, 9, 15, 45, 296-298, 393-395 および 412-414 番目のアミノ酸変化を観察することで、簡易に GII.4 サブタイプを抽出可能であることが確認された。

## 文 献

[1] Zheng D-P, Ando T, Frankhauser, RL, Beard S, Glass RI, Monroe SS. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*. 2006;346(2):312-232.

[2] Siebenga JJ, Vennema H, Zheng D-P, Vinjé 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.

[3] 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):11247-22262.

[4] Noda M, Fukuda S, Nishio O. Statistical analysis of attack rate in norovirus foodborne outbreaks. *Int J Food Microbiol*. 2008;122(1-2):216-220.

[5] Ozawa K, Oka T, Takeda N, Hansman GS. Norovirus infections in symptomatic and asymptomatic food handlers in Japan. *J Clin Microbiol*. 2007;45(12):3996-4005.

[6] Bucardo F, Nordgren J, Carlsson B, Paniagua M, Lindgren P-E, Espinoza F, Svensson L. Pediatric norovirus diarrhea in Nicaragua. *J Clin Microbiol*. 2008;46(8):2573-2580.

[7] 福田伸治, 重本直樹, 谷澤由枝, 妹尾正登. 患者糞便中に排泄されるノロウイルス遺伝子量の遺伝子型による差異と吐物中に排泄される遺伝子量. 広

島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告. 2009;17:11-14.

[8] Siebenga JJ, Vennema JH, Renckens B, de Bruin E, van der Veer B, Siezen RJ, Koopmans M. Epochal evolution of GII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J Virol*. 2007;81(18):9932-9941.

[9] Allen DJ, Gray JJ, Gallimore CI, Xerry J, Iturriza-Gómara M. Analysis of amino acid variation in the P2 domain of the GII-4 norovirus VP1 protein reveals putative variant-specific epitopes. *PLoS ONE*. 2008;3(1):e1485.

[10] Lindersmith LC, Donaldson EF, LoBue AD, Cannon JC, Zheng D-J, Vinjé J. Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med*. 2008;5(2):e31.

[11] Allen DJ, Noad R, Samuel D, Gray JJ, Roy P, Iturriza-Gómara M. Characterisation of a GII-4 norovirus variant-specific surface-exposed site involved in antibody binding. *Virol J*. 2009;6:150.

[12] Fukuda S, Takao S, Shigemoto N, Tanizawa Y, Seno M. Transition of genotypes associated with norovirus gastroenteritis outbreaks in a limited area of Japan, Hiroshima Prefecture, during eight epidemic seasons. *Arch Virol*. 2010;155(1):11-115.

[13] Adamson WE, Gunson RN, Maclean A, Carman WF. Emergence of a new norovirus variant in Scotland in 2006. *J Clin Microbiol*. 2007;45(12):4058-4060.

[14] Gallimore CI, Iturriza-Gómara M, Xerry J, Adigwe J, Gray JJ. Inter-seasonal diversity of norovirus genotypes: Emergence and selection of virus variants. *Arch Virol*. 2007;152(7):1295-1303.

[15] Bok K, Abente EJ, Realpe-Quintero M, Mitra T, Sosnovtsev SV, Kapikian AZ, Green KY. Evolutionary dynamics of GII.4 noroviruses over a 34-year period. *J Virol*. 2009;83(22):11890-11901.

[16] Fukuda S, Shigemoto N, Tanizawa Y, Takao S, Seno M. Chronological observation of shell domain of norovirus GII.4 major structural protein VP1. *Jpn J Infect Dis*. 2010;63(5):376-378.

[17] Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K, Notori K, Takeda N, Katayama K. Genogroup-specific PCR Primers for detection of norowalk-like viruses. *J Virol Methods*. 2002;100(1-2):107-114.

[18] Cannon JL, Lindersmith LC, Donaldson EF, Saxe L, Baric RS, Vinjé J. Herd immunity to GII.

- 4 noroviruses is supported by outbreak patient sera. *J Virol.* 2009;83(11):5363-5374.
- [19] Siebenga JJ, Lemey P, Pond SLK, Rambaut A, Vennema H, Koopmans M. Phylodynamic reconstruction reveals norovirus GII.4 epidemic expansions and their molecular determinants. *PLoS Pathog.* 2010;6(5):e1000884.
- [20] Bull RA, Eden J-S, Rawlinson WD, White PA. Rapid evolution of pandemic noroviruses of the GII.4 lineage. *PLoS Pathog.* 2009;6(3):e1000831.

