

平成 28 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)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究分担報告

富山県におけるノロウイルス・サポウイルス検出状況及び
メタゲノム解析による下水からのノロウイルス・サポウイルスの検出

研究分担者	滝澤 剛則	富山県衛生研究所
研究協力者	稲崎 倫子	富山県衛生研究所
研究協力者	名古屋 真弓	富山県衛生研究所
研究協力者	板持 雅恵	富山県衛生研究所

研究要旨

富山県におけるノロウイルス (NoV)、サポウイルス (SaV) の浸淫状況を調査するため、2016 年の感染性胃腸炎患者、下水流入水からウイルスを検出した。患者からは NoV GII. 4、GII. 17、GII. 2、SaV GI. 1 などが検出された。下水からは NoV GII. 4、GII. 17、GI. 6 などが検出された。1 月～8 月には集団発生事例、小児散発例、下水からは NoV GII. 4 が、集団発生事例と下水流から NoV GII. 17 が共通して検出された。11 月～12 月には NoV GII. 2 が主流であった。2011 年から 2013 年に採取した下水流入水について次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析を行い、NoV と SaV の検出を試みたところ、NoV GI、GII、GIV、SaV GI、GII、GIV、GV の配列が得られた。ダイレクトシーケンス法では検出されなかった遺伝子群や遺伝子型についても検出された一方で、ダイレクトシーケンス法よりも検出感度が低い場合もあった。メタゲノム解析は、下水検体に含まれる複数種類の NoV、SaV を幅広く検出するには有用であった。

A. 研究目的

2016 年の 1 年間に、胃腸炎患者や下水流入水からノロウイルス (NoV)・サポウイルス (SaV) を検出し、患者での流行型、不顕性感染を含めた地域の流行状況を把握することを目的とした。

また、下水流入水には、流入域に存在する患者から排泄された複数の遺伝子群や遺伝子型の NoV、SaV が含まれると考え

られる。しかしながら、PCR 産物のダイレクトシーケンス法 (常法) による解析では、多数を占める種類しか検出できない。そこで、次世代シーケンサー (NGS) を用いたメタゲノム解析によりウイルスを網羅的に検出することで、下水に存在する複数種類の NoV、SaV を明らかにできるか検討した。

B. 研究方法

1. 2016年の患者検体

富山県において2016年1月から12月に発生した食中毒、感染性胃腸炎（集団発生例及び小児散発例）から得られた糞便を用いた。検体採取は管轄の厚生センター、保健所が行った。

糞便検体の10%乳剤上清から、厚生労働省通知（食安監発1105001号）に基づきRNAを抽出し、DNase処理、逆転写反応及びPCRを行った。NoVの検出には、リアルタイムPCRを用い、PCRには、ポリメラーゼ領域3'末端からカプシド領域を対象としたG1-SKF/G1-SKR、G2-SKF/G2-SKRもしくはORF1/ORF2ジャンクション領域を対象としたプライマー1421f/G1-SKR及び1364f/G1-SKR（GI用）、1421f/NV2oR及び1364f/G2-SKR（GII用）（Nakamura et al., Jpn. J. Infect. Dis., 62: 394-398, 2009）を用いたnested PCRを行った。SaVの検出には、カプシド領域を対象としたプライマーSV-F11/SV-R1及びSV-F2/SV-R2によるnested-PCR（Okada et al., Arch. Virol., 147: 1445-1451, 2002）を用いた。PCR産物から、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。NoVの型別判定にはカプシド領域を対象としたG1-SKF/G1-SKR、G2-SKF/G2-SKRの部分を用いて、Norovirus Genotyping Tool（URL: <http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>）及び基準配列を用いた近接接合法による系統樹解析により行い、遺伝子型番号は、新しい遺伝子型分類法（国立感染症研究所, IASR 病原微生物検出情報, 35(7), 173-175, 2014）により表記した。SaVの型別判定には基準

配列を用いた近接接合法による系統樹解析を行った。

2. 下水流入水

県西部に位置する下水処理場において、2016年1月から12月の毎月1回下水流入水1リットルを採取した。

下水流入水を3,000rpmで30分遠心して得られた上清に、最終濃度0.05Mになるように塩化マグネシウムを添加し、0.5規定の塩酸を用いてpH3.5に調整した。この液を陰電荷膜にろ過した後、細切した陰電荷膜を3% beef extract 液10mlに浸漬し、Vortex処理により吸着分子を溶出した。溶出液を遠心し、回収した上清を100倍濃縮下水検体とした。濃縮下水検体から、患者検体と同様にRNA抽出、DNase処理、逆転写反応、PCR法及びダイレクトシーケンス法による塩基配列の決定を行った。PCR法におけるプライマーは、NoV GIの検出にはG1-SKF/G1SKR、NoV GIIの検出にはG2SKF/G2SKR、SaVの検出にはSV-F11/SV-R1を用いた。

3. メタゲノム解析による下水からのNoV・SaVの検出

2011年1月から2013年12月に、研究方法2と同様に得た下水流入水の100倍濃縮液から、キャリアフリーの抽出液を用いてRNA抽出を行い、ScriptSeq v2 RNA-Seq Library Preparation kit (Epicentre)を用いてRNA-Seqライブラリを作製した。この検体を、NGS（MiSeq; Illumina）を用いて、MiSeq Reagent Kit v3 (150 cycle)により塩基配列を解読した。

解読結果は、国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターのMetagenomic

Pathogen Identification for Clinical specimens (MePIC) ソフト (Takeuchi, F., et al. Jpn. J. Infect. Dis., 2014, 67:62) によりヒト遺伝子配列を除いて megablast 解析を行った。MePIC により分類された塩基配列は MEtaGenome Analyzer (MEGAN) 5 (Universität Tübingen) により閲覧を行い、NoV 及び SaV の配列を抽出した。得られた基準配列を元に Norovirus Genotyping Tool (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>) により NoV 遺伝子型 (ORF2) 及び SaV 遺伝子群の推定を行った。

同一の下水検体について、常法として 2016 年の下水検体と同様に RNA 抽出、DNase 処理、逆転写反応、PCR 法及びダイレクトシーケンス法による塩基配列の決定を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1. 患者からの NoV、SaV 検出状況

ウイルス性感染性胃腸炎及び食中毒等の集団発生は 20 事例あり (表 1)、事例数としては 2015 年の 19 事例と同程度であり、2014 年の 13 事例と比較してやや多かった。20 事例全てから NoV が検出された。うち食中毒事例は 5 事例であり、2015 年の 2 事例より多かった。

小児散発例として検査を実施した 18 例中 7 例から NoV が、4 例から SaV が検出された。(表 2)

2. 患者、下水流入水から検出された NoV

及び SaV の遺伝子型

集団発生の患者から検出されたウイルスは NoV GII. 17、GII. 2、GII. 4 の順に多かった (表 1)。散発例の患者では SaV GI. 1、NoV GII. 4 の順に多かった (表 2)。下水流入水からは、NoV については患者から検出された遺伝子型が GII. 6 を除いて検出されたほか、患者から検出されなかった GI. 2 も検出された。SaV は下水流入水からは検出されなかった (表 3)。

2015/16 シーズンにあたる 1 月～8 月には、NoV GII. 4 が集団発生、散発例、下水から、GII. 17 が集団発生、下水から多く検出される傾向にあった。GII. 2 は、11 月～12 月に集団発生・散発例・下水の全てから最も多く検出された。

3. 検出された NoV 及び SaV の比較

検出された NoV 及び SaV の塩基配列を用いた系統樹を図 1～3 に示す。NoV GI については、集団発生事例と下水から検出された株のうち、4 月の下水と 5 月の集団発生事例から検出された GI. 3 株が互いに近縁であった (相同性 100%)。NoV GII については、検出された GII. 4 株の亜型は、患者と下水ともに Sydney_2012 亜型 (Sydney/NSW0514/2012/AU と近縁) が主流であった。特に 1 月と 3 月の小児散発例、4 月と 6 月の集団発生事例、7 月の下水から検出された株が互いに近縁であった (相同性 99.7～100%)。集団発生事例 6 事例から検出された GII. 17 株はいずれも、2014/15 シーズンに国内で検出された Kawasaki308/2015/JP 株に近縁であった。SaV については、散発例から検出された GII. 1 株のうち、6 月から 12 月に検出された 3 株が互いに近縁であった (相

同性 99.7~100%)。

4. メタゲノム解析による下水からの NoV・SaV の検出

各検体のメタゲノム解析により検出された NoV 及び SaV のリード数を、推定遺伝子型及び遺伝子群別に表 4 に示す。3 年間の 36 検体のうち、25 検体から NoV の配列 (最大 107 リード) が、24 検体から SaV の配列 (最大 57 リード) が検出された。

NoV は GI、GII、GIV の 3 つの遺伝子群に分けられ、GI と GII はさらにそれぞれ 8 種類と 10 種類の遺伝子型に分けられた。得られたリードが多い順に、GI では GI. 6、GI. 4、GII では GII. 4、GII. 14 であり、常法で最も多く検出された GI. 4、GII. 4 と概ね一致していた。SaV は、常法では GI のみが検出されたのに対し、メタゲノム解析では GI、GII、GIV、GV の 4 つの遺伝子群が得られ、GI のリード数が最も多かった (図 4)。

メタゲノム解析により、常法では検出されなかった NoV の遺伝子型 (GI. 8、GI. 9、GII. 6、GII. 7、GII. 13、GII. 16、GII. 22、GIV) 及び SaV の遺伝子群 (GII、GIV、GV) が得られた一方、常法では各 1 検体より検出された NoV GI. 2、GII. 17 についてはメタゲノム解析では検出されなかった (図 4)。NoV GI については、2011 年は常法で検出された GI. 2、GI. 4 がメタゲノム法では検出されなかった (表 4-A)。また、2012 年においては、常法では GI. 1、GI. 3、GI. 4、GI. 6 が検出されたのに対し、メタゲノム解析では GI のリードは検出されなかった (表 4-B)。

D. 考察

2015/16 シーズンにあたる 1 月~8 月には NoV GII. 4 が小児散発例、集団事例、下水から検出されており、2015 年までと同様にこの型が流行していたと考えられた。GII. 4 の亜型は 2015 年に引き続き Sydney_2012 亜型が中心であったと考えられた。NoV GII. 17 は特に 3 月に集団発生事例から最も多く検出され、この傾向は 3 月~5 月に集団発生から GII. 17 が検出された 2015 年と同様であった。GII. 17 の検出株は 2015 年と同様に Kawasaki308/2015/JP 近縁株が最も多く、2014/15 シーズンと 2015/16 シーズンともにこのタイプが県内における流行の中心であったと推定された。2016/17 シーズンにあたる 11 月~12 月は GII. 2 が集団発生、散発例、下水の全てにおいて検出数が最も多かったことから、この期間は GII. 2 が流行の中心であったと考えられた。

NoV GI については、集団発生事例と下水から遺伝子型 GI. 3、GI. 4、GI. 6 が共通して検出された。例年 NoV GI は下水からは高い頻度で検出されるものの、患者からの検出数は少ない傾向にあった。本研究において、複数の遺伝子型が患者と下水の両方から検出されたことにより、下水から検出される NoV GI の遺伝子型が患者の発生と関連していることが改めて示唆された。

集団発生事例と小児散発例の患者から検出された NoV の遺伝子型は、GII. 6 を除いて下水からも検出された。また、一部の遺伝子型においては、患者と下水から近縁な株が検出された。このことから、

下水中には NoV の患者発生状況が反映されていると考えられる。

SaV については、散発例から検出された株はいずれも GI.1 であり、この遺伝子型が小児で流行していたと考えられた。

下水中の NoV 及び SaV の遺伝子群及び遺伝子型の検出法としてメタゲノム法を検討した。その結果、多数を占める遺伝子型のみ検出されると考えられる常法と比較して、より多くの種類の遺伝子型が検出された。NoV GI、GII、SaV それぞれにおいてメタゲノム解析により最も多くリードが得られた遺伝子群、遺伝子型は、概ね常法で検出率の高い遺伝子群、遺伝子型に対応しており、検体中のウイルス量が常法及びメタゲノム解析の結果に反映されていると考えられた。これに加えて、メタゲノム解析では、常法では検出されなかった遺伝子群及び遺伝子型の配列も検出された。これより、メタゲノム解析は下水検体に含まれる複数種類の NoV、SaV を幅広く検出するには有用であると考えられた。さらに、メタゲノム解析でのみ検出された NoV GIV と SaV GV は、常法で用いるプライマーの結合部位に塩基配列のミスマッチが存在しており、PCR 法で検出されにくい可能性があることから、従来の検出法で検出感度が低い遺伝子型の検出においても、プライマーに依存しないメタゲノム解析は有用であると考えられた。

その一方で、NoV GI については、常法よりも検出率が低い場合があった。この原因として、検査対象とした下水検体では NoV GI のウイルス量が NoV GII や SaV と比較して少なく、メタゲノム解析にお

ける検出率が低くなった可能性が考えられる。このように、検体中の存在比が低いと考えられる特定のウイルスを検出する場合には、特異的プライマーを用いたダイレクトシーケンス法や、NGS を用いたディープシーケンス法の併用も考慮する必要があると考えられた。

E. 結論

2016 年のノロウイルスは、2015/16 シーズンにあたる 1 月～8 月には、例年流行している GII.4 のほか、2015 年と同様に集団発生を中心に GII.17 の流行がみられた。GII.4 の亜型は Sydney 2012 が主流であった。2016/17 シーズンにあたる 11 月～12 月には、患者及び下水からの検出株は GII.2 が主流であった。

メタゲノム解析により下水流入水から NoV 及び SaV のリードを検出し、遺伝子群及び遺伝子型の推定を行ったところ、常法で検出された多数を占める遺伝子以外の遺伝子群、遺伝子型も検出できた。常法では検出されにくい可能性がある遺伝子型も検出された一方で、常法よりも検出率が低い場合もあった。メタゲノム解析は、下水検体に含まれる複数種類の NoV、SaV を幅広く検出するには有用であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

名古屋真弓、板持雅恵、稲崎倫子、稲畑良、佐賀由美子、米田哲也、野田衛、滝澤剛則、小淵正次：メタゲノム解析による下水からのノロウイルス・サポウイ

ルス検索. 第 64 回日本ウイルス学会学術
集会, 札幌市, 平成 28 年 10 月 24 日

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

表 1. 集団発生事例からのノロウイルス及びサポウイルス検出状況

ウイルス		2016年												計
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
NoV	GI.3					1								1
	GI.4								1 ^b					1
	GI.6					1								1
	GII.2										2	3		5
	GII.3				1									1
	GII.4	2	1		1		1							5
	GII.6						1 ^a				1			2
	GII.17			4			1 ^a			1 ^b				6
合計		2	1	4	2	2	3	0	0	2	0	3	3	22

(数値：のべ事例数)

a, b：それぞれ同一事例

表 2. 小児散発例からのノロウイルス及びサポウイルス検出状況

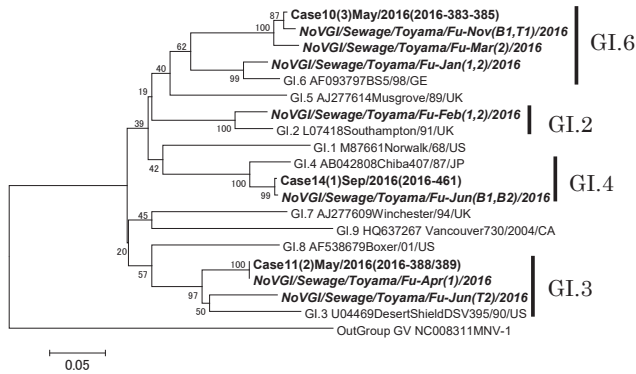
ウイルス		2016年												計
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
NoV	GII.2											2		2
	GII.3				1		1							2
	GII.4	1		1		1								3
SaV	GI.1	1					1				1	1		4
合計		2	0	1	1	1	2	0	0	0	0	1	3	11

表 3. 下水流入水におけるノロウイルス及びサポウイルス検出状況

ウイルス		2016年												計
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
NoV	GI.2													1
	GI.3													2
	GI.4													1
	GI.6													3
	GII.2													1
	GII.3													1
	GII.4													3
	GII.17													3

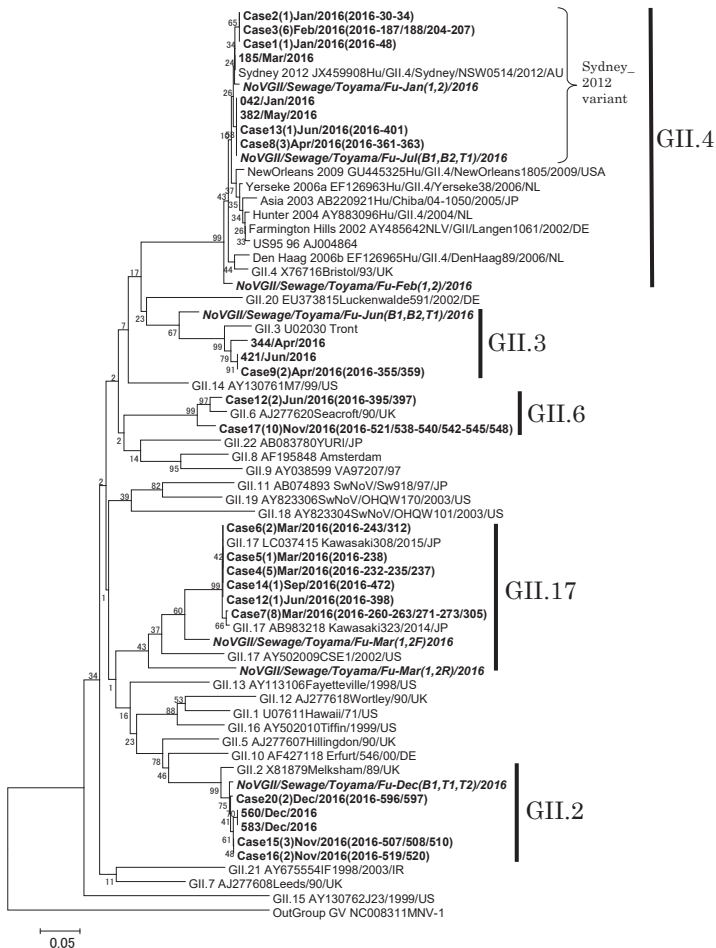
サポウイルスは非検出

図 1. ノロウイルス GI の系統樹



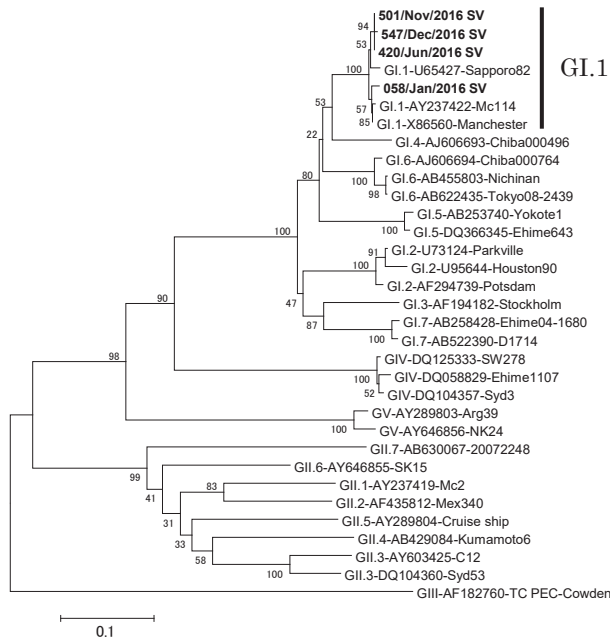
太字のうち斜体は下水流入水から、それ以外は患者から検出されたウイルスを示す。その他の場合は参考株（型別 accession no./株名）を示す。

図 2. ノロウイルス GII の系統樹



株名については図 1 と同じ。GII. 4 参考株については（亜型 accession no./株名）で示す。

図 3. サポウイルスの系統樹



株名については図 1 と同じ。

表 4. 下水流入水からメタゲノム解析により得られたノロウイルス及びサポウイルスのリード数

A. 2011 年

月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	
総リード数	2,360,642	3,076,464	2,524,770	4,103,576	2,941,728	2,868,358	2,409,804	2,441,216	3,069,784	2,651,710	2,260,094	2,575,002	
Norovirus	リード数	20	16	21	24	14	4	1	0	2	0	10	3
Sapovirus	リード数	8	9	6	22	38	50	0	0	0	0	2	1
NoV GI	GI.1			2	2								
	GI.2												
	GI.4												
	GI.7			10	2								1
	GI.8								2				
	GI.9							1					
	GI不明					2	2						
NoV GII	GII.2		4		3	4							
	GII.3		3		3	1	2						
	GII.4	18	5	4	4	4	2					2	
	GII.6			2									
	GII.7					1							
	GII.12	2	2	1	4								
	GII.13		2										
	GII.14			2	3	2							
GII.16					1								
NoV GIV											10		
SaV GI	2	6		2	14	33							
SaV GII	2	3	4	4	6	2							
SaV GIV			2	14	6	4						1	
SaV GV	4			2	12	11					2		

網掛けで示した遺伝子型または遺伝子群：常法で得られた遺伝子型または遺伝子群

B. 2012 年

月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
総リード数	1,001,086	1,342,590	1,803,852	1,185,640	1,353,902	1,804,918	1,497,468	4,050,046	1,242,226	1,544,364	2,070,858	1,774,586
Norovirus リード数	2	4	17	0	2	0	0	0	0	0	2	4
Sapovirus リード数	0	6	0	10	2	0	2	0	0	0	2	0
NoV GI	GI.1											
	GI.3											
	GI.4											
	GI.6											
NoV GII	GI.2											4
	GI.3		2									
	GI.4	2	2	4		2					2	
	GI.12											
	GI.14			13								
	GI.17											
SaV GI		6		10	2							
SaV GII							2					
SaV GIV												2

C. 2013 年

月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
総リード数	4,172,478	3,982,550	3,798,780	5,670,066	3,847,610	3,360,356	3,725,864	4,630,814	3,286,584	4,115,612	3,703,622	4,216,554
Norovirus リード数	45	3	36	23	22	12	0	2	0	0	6	107
Sapovirus リード数	19	19	25	56	16	2	22	0	4	1	2	33
NoV GI	GI.3		1			2						
	GI.4	2		16		1		2				
	GI.6					1					3	19
	GI不明										1	1
	GI.12											
NoV GII	GI.2	4				2						
	GI.4	37	2	18	17	8						50
	GI.6					2	2					32
	GI.7											4
	GI.12					2						
	GI.14	2			6	4	10					2
	GI.22			2								
	GI不明											
SaV GI	18	19	24	43	14		6		4	1	2	33
SaV GII			1				2	3				
SaV GIV	1			13				13				
SaV GV					2							

図 4. メタゲノム法と常法におけるノロウイルス、サポウイルスの遺伝子群・遺伝子型別検出数 (2011~2013 年合計)

