

## 愛媛県における急性胃腸炎の散発例および集団発生例からのノロウイルスの検出状況と遺伝子型別分類(2009/2010シーズン)

青木紀子 青木里美 山下育孝 田中 博 岡 裕三  
土井光徳 本村和嗣\*<sup>1</sup> 野田 衛\*<sup>2</sup>

### Detection and Genotyping of Norovirus in Sporadic Cases and Outbreaks of Infectious Gastroenteritis in 2009/2010 Season in Ehime Prefecture

Noriko AOKI, Satomi AOKI, Yasutaka YAMASHITA, Hiroshi TANAKA  
Yuzo OKA, Mitsunori DOI, Kazushi MOTOMURA, Mamoru NODA

A purpose of our research is to study NoV types in specimens of sporadic cases and outbreaks of infectious gastroenteritis in Ehime prefecture during the period from October 2009 to September 2010. Viruses were detected in 135(43.7%) out of 309 fecal specimens of sporadic cases, which were sent from sentinel pediatric clinics to Ehime Prefectural Research Center of Hygiene and Environment . Out of these 134 specimens, Norovirus (NoV) in 65 cases (21.0%), Rotavirus in 40 cases (12.9%), Sapovirus in 28 cases (9.1%), Adenovirus in 26 cases (8.4%), and Astrovirus in one case (0.3%) were detected. Seven genotypes were identified (two in genogroup I (GI.4, GI.7), five in genogroup II (GII.2, GII.3, GII.4, GII.12, GII.13)) among 61 NoV-genotype-identified specimens out of 65 cases. GII.4 was the most prevalent genotype (52.5%), followed by GII.3(18.0%) and GII.2(14.8%). In 7 out of 8 outbreaks, NoV in the fecal specimens of the patients was detected. In these seven outbreaks, GII.4 in five outbreaks, GII.2 in three outbreaks, GII.3 in two outbreaks, GII.12 in one outbreak, GI.2 in one outbreak and GI.7 in two outbreaks were detected. GII.4 was the most prevalent genotype (71.4%), followed by GII.2 (42.8%), GII.3 and GI.7 (both are 28.6%) in outbreaks. GII.4 was detected from the specimens in outbreaks and sporadic cases.

We determined the nucleotide sequence of NoV in sporadic cases and outbreaks. By phylogenetic analysis, NoV GII.4 had three different genetic clusters: 2006 b type, 2008a type and New Orleans 2009 type. New Orleans2009 is a new variant type of GII.4. In Ehime prefecture, 2008a type and New Orleans 2009 type were detected for the first time in 2009/2010 season. 2006 b type and New Orleans 2009 type were detected in both of sporadic cases and outbreaks.

Keywords : infectious gastroenteritis , Norovirus, genotype

#### はじめに

感染性胃腸炎は、ウイルスや細菌、寄生虫等が病因となり、多様な症状を示す疾患であり、「感染症の予防および

愛媛県立衛生環境研究所 松山市三番町8丁目234番地

\*1 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター

\*2 国立医薬品食品衛生研究所

(平成22年度の所属による)

び感染症の患者に対する医療に関する法律」(感染症法)にもとづく感染症発生動向調査における五類感染症の定点把握対象疾患に定められている<sup>1)</sup>。胃腸炎起因ウイルスとして、ロタウイルス(HRV)、アデノウイルス(AdV)、ノロウイルス(NoV)、サポウイルス(SaV)、アストロウイルス(AsV)等があげられるが<sup>2)</sup>、全国の地方衛生研究所からの病原微生物検出報告によると、NoVの検出報告数が

最も多い<sup>3)</sup>。愛媛県においても「愛媛県感染症発生動向調査事業実施要綱」に基づき、病原体定点等から搬入される患者検体を用いて、起因病原体の検索を実施しており、感染性胃腸炎患者からのNoVの検出数はウイルス検出数の約半数を占めている<sup>4)~8)</sup>。また、厚生労働省の食中毒統計資料では、NoVは原因物質別発生状況の事件数において2004年以降1~2位を占め、患者数では2001年以降常に1位であり、特に2006年には27,000人もの患者が報告され<sup>9)</sup>、愛媛県でもNoVによる食中毒が多数発生した<sup>4)</sup>。

このように、散发事例、食中毒等集団発生事例共に重要な起因ウイルスとなるNoVには、GIは15、GIIは19の遺伝子型が存在しており、シーズンによって流行する遺伝子型の検出状況は変化している<sup>10)</sup>。さらに2008/2009シーズンにはNoV GII.4の新しい亜株である2008aが検出された<sup>11)~13)</sup>。そこで、今回、感染性胃腸炎原因ウイルスの検出と、検出されたNoVの流行状況を把握し、NoVの地域流行と集団発生との関連性を明らかにするため、分子疫学的解析を行ったので報告する。

## 材料と方法

### 1 試料

2009年10月~2010年9月に、愛媛県感染症発生動向調査病原体定点の医療機関等において、感染性胃腸炎患者から採取された糞便309検体と、同時期に発生した食中毒等の集団発生事例の57検体(患者糞便45検体、吐物1検体、調理従事者等糞便3検体、食品袋1検体、拭取り7検体)を用いた。

### 2 方法

糞便からのウイルス検索は電子顕微鏡法(EM)、リアルタイムPCR法またはRT-PCR法を実施した。

EMは、常法<sup>14)</sup>により行った。EMで検出されたHRVは、イムノクロマト法(BD社)および、RPHA法(デンカ生研)でA群・C群に群別し、どちらにも群別出来なかったものを型別不能(NT)とした。

拭き取り検体は、綿棒式キット(栄研器材)またはWHIRL-PAK (NASCO)を用いて採取し搬入された検体について実施した。拭き取り検体は超遠心(38000 rpm 2hr)沈渣をRNA抽出し、ウイルス遺伝子の検出に用いた。

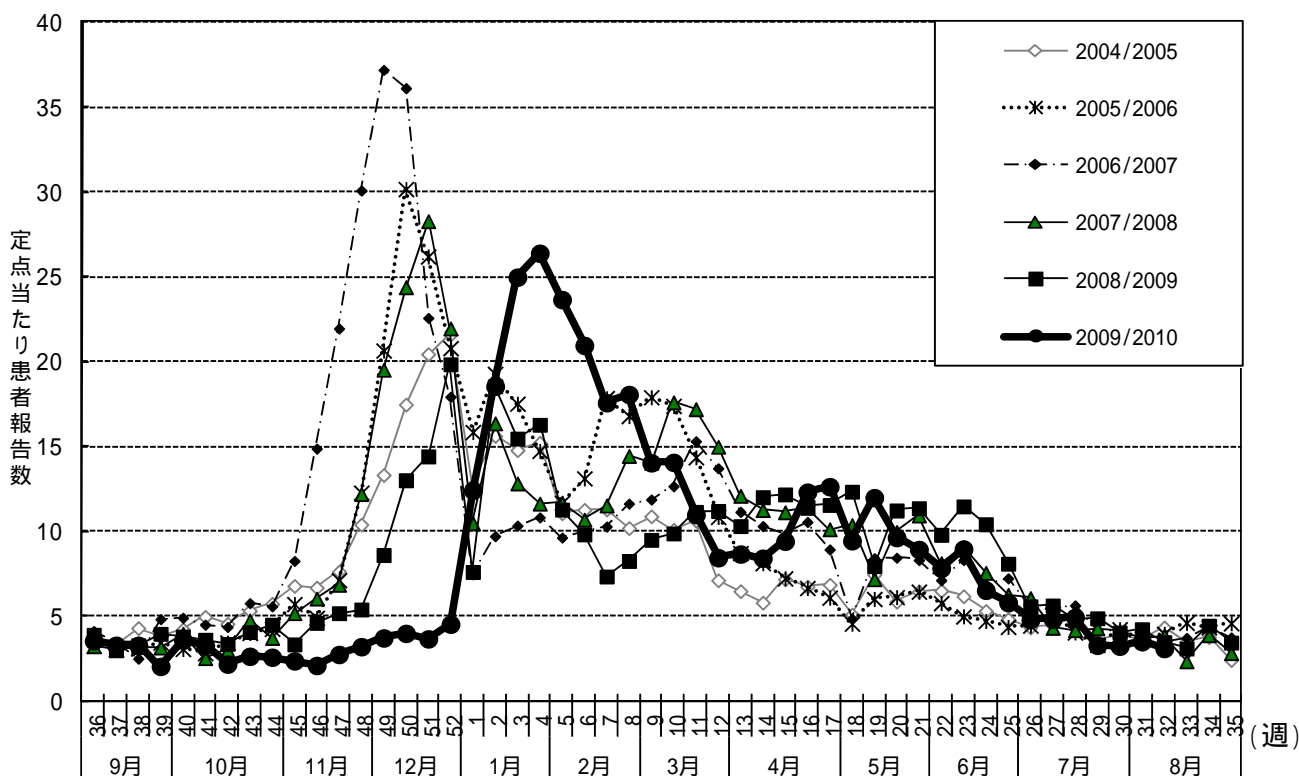


図1 感染性胃腸炎患者の定点当たり報告数

遺伝子検査に用いるRNAは、試料の10%乳剤からHigh Pure Viral RNA kit (Roche社製)を用いて抽出した。その後、DNaseIで処理し、random hexamerおよびSuperScriptII 逆転写酵素を用いてcDNA合成を行った。NoV遺伝子の検出はCOGF/R系プライマーとRINGTaqManプローブを用いた影山ら<sup>15)</sup>のリアルタイムPCR法で行った。NoV陽性検体については、COG1F/G1-SKRおよびCOG2F/G2-SKRプライマーを用いたRT-PCR法により、NoV遺伝子のカプシド(VP1

NS) 領域を増幅後、そのPCR産物についてダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、影山ら<sup>16)</sup>の推奨する方法で遺伝子型別を行い、遺伝子型番号は片山の方法<sup>17)</sup>に従った。さらに、GII.4型別株の一部については、VP1 NS領域に加え、VP1全長およびポリメラーゼ領域の系統樹解析を実施した。SaV遺伝子の検出は、岡田ら<sup>18)</sup>の方法に準じ、カプシド領域を増幅するSV系プライマーを用いたnested-PCR法で実施した。その後、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。

表1 月別ウイルス検出数

月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	計
NoV GI	1 (12.5)			2 (7.7)		1 (4.3)	1 (3.0)						5 (1.6)
NoV GII			1 (11.1)	19 (73.1)	19 (73.1)	12 (52.2)	3 (9.1)	5 (14.3)	1 (2.6)				60 (19.4)
SaV			1 (11.1)	4 (15.4)		3 (13.3)	7 (21.2)	2 (5.7)	6 (15.8)	3 (7.5)	2 (6.3)		28 (9.1)
HRV(A)				1 (3.8)	1 (3.8)	2 (8.7)	20 (60.6)	10 (28.6)	1 (2.6)				35 (11.3)
HRV(NT)						1 (4.3)	3 (9.1)	1 (2.9)					5 (1.6)
AdV	1 (12.5)	3 (37.5)	1 (11.1)	5 (19.2)	4 (15.4)	4 (17.4)	3 (9.1)		1 (2.6)	3 (7.5)	1 (3.1)		26 (8.4)
AsV									1 (2.6)				1 (0.3)
陽性検体数	2 (25.0)	3 (37.5)	2 (22.2)	23 (88.5)	21 (80.8)	19 (82.6)	28 (84.8)	18 (51.4)	10 (26.3)	6 (15.0)	2 (6.3)	0	135 (43.7)
検査数	8	8	9	26	26	23	33	35	38	40	32	31	309

( ):検出率

表2 NoV が検出された集団発生事例

事例No.	発生日	原因施設	原因食品	喫食者数	患者数	ノロウイルス陽性数/検査数					遺伝子型(例数)
						患者便	患者吐物	従事者便	食材の袋	ふきとり	
1	1/18	飲食店	会席料理	60	31	6/6					GII.4(6)
2	1/23	飲食店	会席料理*	不明	7	2/3					GII. 2(1) GII. 4(1)
3	1/28	飲食店	会席料理*	6	5	3/3					GII. 3(3)
4	2/14	飲食店		10	6	3/3					GI. 7(1) GII. 2(1)
5	2/15	宿泊施設	合宿中食事*	37	13	6/13					GII. 4(6)
6	2/14	結婚式場	宴会料理*	不明	不明	4/5					GII. 3(2) GII. 4(1)
7	2/19	飲食店	酢かき	10	8	7/8	0/1	0/3	0/1	0/7	GI. 2(2) GI. 7(1) GII. 2(1) GII. 4(1) GII. 12(1)

\*推定

## 結果

### 1 感染性胃腸炎患者の週別発生動向

図1に2004/2005シーズンから2009/2010シーズンの、感染症発生動向調査事業における感染性胃腸炎の患者報告数を示した。2009/2010シーズンは、過去のシーズンに比べて患者報告数のピークが1~2カ月遅れ、第4週(1月下旬)にみられたが、報告数は例年並みであった。

### 2 散発性胃腸炎患者からの月別ウイルス検出状況

散発性胃腸炎患者309名からの月別ウイルス検出状況を表1に示した。309検体中、43.7%にあたる135検体からウイルスが検出された。そのうち、24検体からは2種類のウイルスが検出され、1検体は3種類のウイルスが検出された。最も多く検出されたのは、NoV 65例(21.0%)であり、次いでHRVが40例(12.9%)、SaVが28例(9.1%)、AdVが26例(8.4%)、AsVが1例(0.3%)であった。検出されたNoVのGenogroup別内訳は 60例がGIIであり、GIは5例と非常に少なかった。NoVは1月から3月にかけて、HRVは4月から5月にかけて高率に検出された。SaVは12月から8月にかけて検出され、特に4月の検出率が高かった。AdVは年間を通じて検出された。

### 3 集団発生事例のウイルス検出状況

調査期間中に当所が検査を実施した集団発生事例は8事例であり、そのうち、NoVが検出された7事例の一覧を表2に示した。残り1事例からウイルスは検出されなかった。7事例のうち2事例(事例1と7)が食中毒と断定され、事例7を含む4事例からは複数の遺伝子型が検出された。カキの喫食が原因とされる事例7の患者から検出されたNoVはGIが2種類、GIIが3種類と多数の遺伝子型が含まれていた。

### 4 検出NoVの遺伝子型別

散発事例および集団発生事例から検出されたNoVの遺伝子型別の結果を表3に示す。散発事例から検出されたNoV 65株のうち61株(GI 3株、GII 58株)について遺伝子型別を実施した結果、GI.7が2株、GI.4が1株、GII.4が32株、GII.3が11株、GII.2が9株、GII.13が5株、GII.12が1株であった。集団発生事例では7事例中5事例からGII.4が検出された。その他にGII.2が3事例、GII.3が2事例、GII.12が1事例、GI.7が2事例、GI.2が1事例から検出された。

### 5 GII. 4株の系統樹解析

NoV GII.4 に型別された株のVP1 NS領域における系統樹解析の結果を図2に示した。散発例では、愛媛県において2006年から2009年まで主流型であった

2006bタイプが55%、2006bとは異なるクラスターに属する株が45%検出された。これらの一部の株についてVP1全長を解析した結果、2006bとは異なるクラスターに属していた株が2つのクラスターに分かれ、GII.4は大きく3つのクラスターに分類された(図3)。従来から流行していた2006bタイプとApeldoorn317/2007/NL 株およびOC08086/08/JP株に近縁であり、これらの株と98.8%の相同性を示した2008aタイプ、そして新たな変異株であるNewOrleans/1805/2009/USA株やNSW001P/2008/AU株に近縁であり、これらの株と97.4~98.5%の相同性を示したNewOrleans2009タイプであった。さらに、ポリメラーゼ領域においてもVP1全長と同様に3つのクラスターを形成し、NewOrleans2009タイプはクラスター内の株間の相同性が97~100%で、NSW001P/2008/AU株とは98.0~98.6%の相同性を示し、2008aタイプではOC08086/08/JP株と99.7%の相同性を示した(図4)。2008aおよびNewOrleans2009タイプの株は愛媛県において過去に検出例はなく、2009/2010シーズンに初めて確認された。

系統樹解析により分類されたこれら3タイプの株は、検出時期に若干の違いが認められた。散発事例においては、NewOrleans2009タイプが1月から3月にかけて検出された。2006bは1月から5月まで検出数に差があるものの毎月検出されていたが、2008aは1月に6株検出されたのみであった。一方、集団発生事例ではNewOrleans2009タイプが2月に1事例から、2006bは1月と2月にそれぞれ2事例から検出されたが、2008aは検出されなかった(図5)。

表3 NoV 遺伝子型別検出

	散発性(61件) (件数)	集団発生(7事例) (事例数)
GI.2		1
GI.4	1	
GI.7	2	2
GII.2	9	3
GII.3	11	2
GII.4	32	5
GII.12	1	1
GII.13	5	

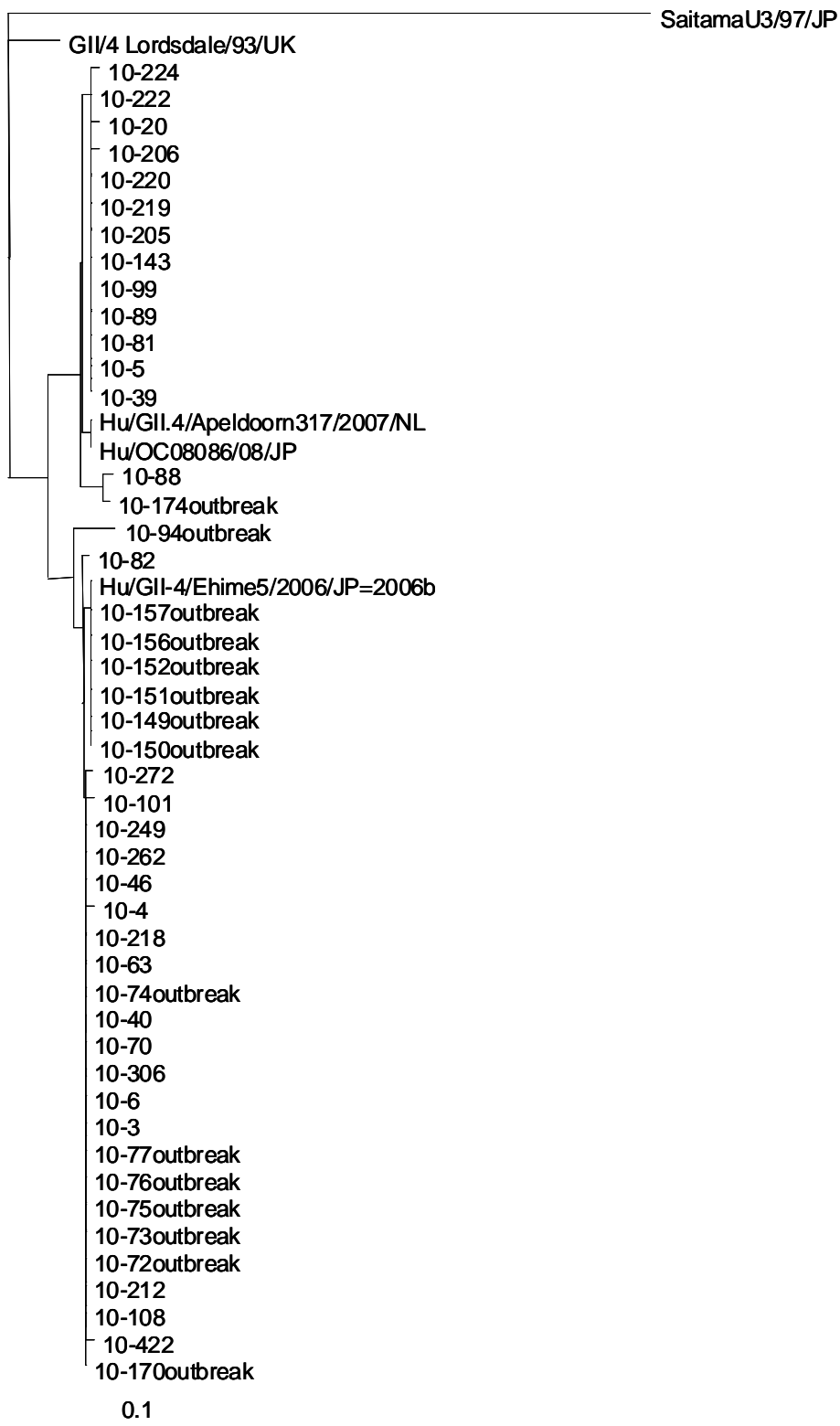


図2 NoV GII.4 の系統樹[VP1 N/S 領域] (2009/2010)

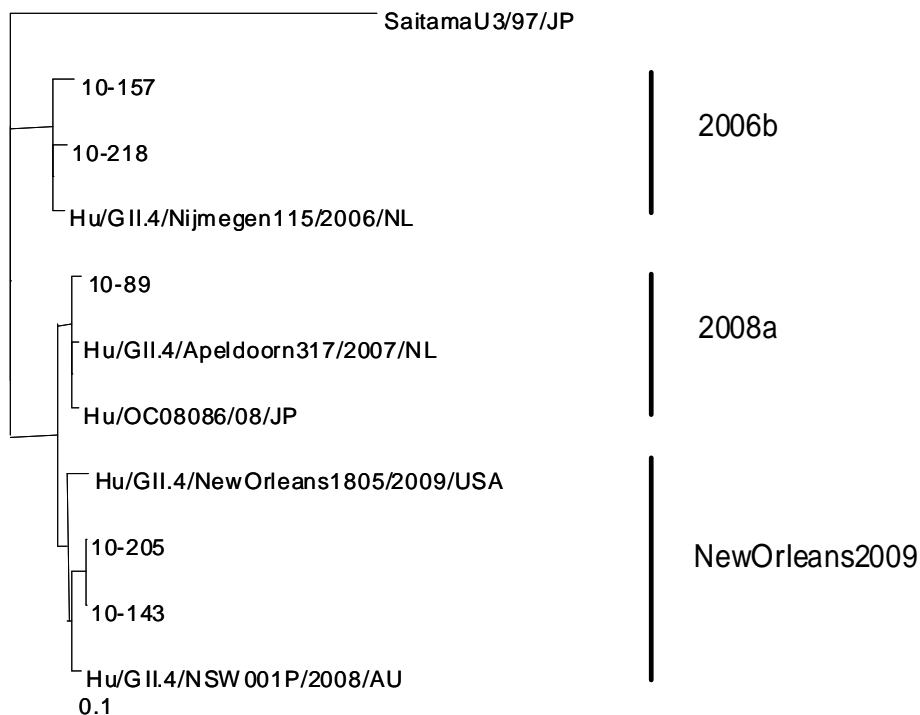


図3 NoV GII.4 の系統樹[VP1 全長](2009/2010)

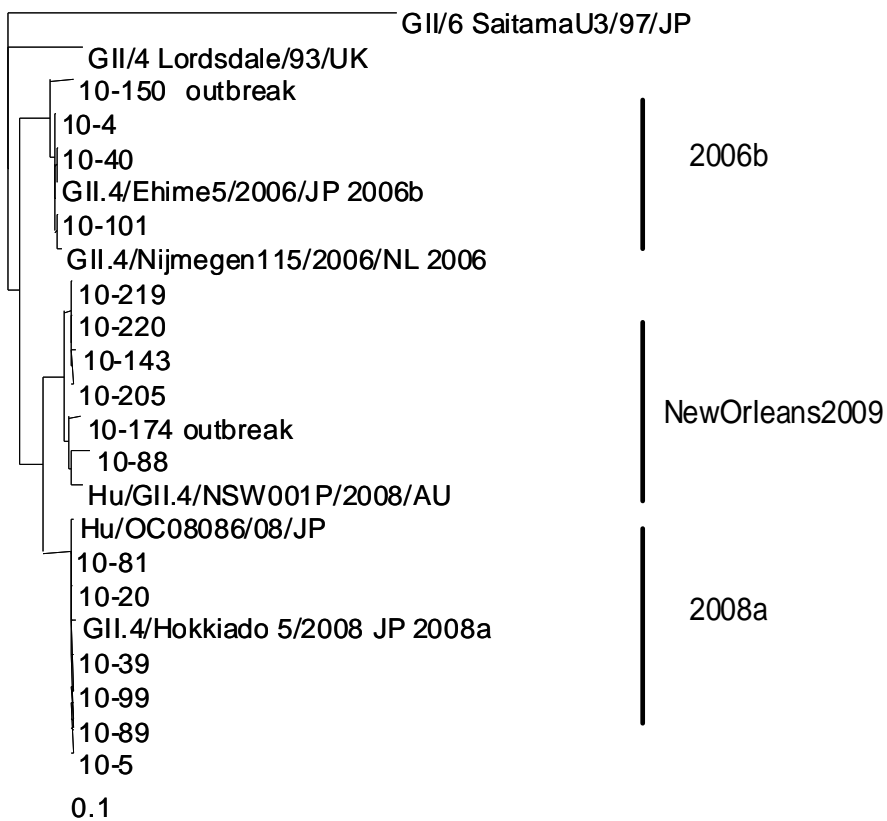


図4 NoV GII.4 の系統樹[ポリメラーゼ領域](2009/2010)

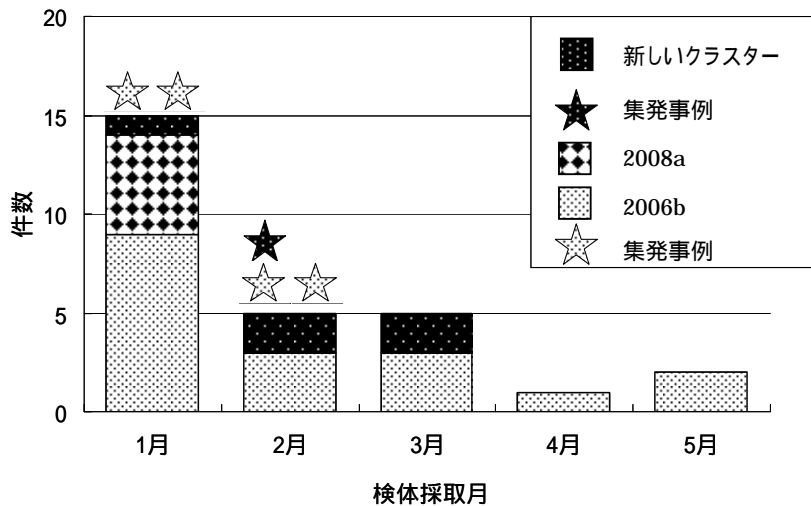


図5 NoVGII.4 の月別遺伝子型別検出状況

### 考 察

2009/2010 シーズンの感染性胃腸炎の患者発生数は例年より1~2 カ月遅れ、1 月下旬(第 4 週)にピークを迎えた。これは全国的にも同様の傾向が見られた<sup>1)</sup>。集団発生事例も例年 10 月から 12 月に多発しているが<sup>5)</sup>、2009/2010 シーズンは 1 月と 2 月に集中しており、散发性の感染性胃腸炎患者の発生動向と関連すると考えられる。月別のウイルスの検出状況は、10 月から 12 月にかけて NoV の検出数が非常に少なかったことを除けば例年とほぼ同じ傾向であり、感染性胃腸炎の原因が 1 月から 3 月にかけては NoV、3 月から 4 月にかけては HRV であることが推測された。当所では従来より EM によるウイルスの検索を実施しているが、EM は、遺伝子検査法に比べ検出感度が低い。しかし、検出できるウイルスの種類が多いため多種類のウイルスによる重複感染例も検出できる。また、EM で小型球形ウイルスが観察されるが、現行の遺伝子検査法では検出されない事例も報告されていることから<sup>19)</sup>、EM と遺伝子検査法を併用することによって、EM の利点が活用でき、また、精度の高い検査を実施することが出来ると考えられる。

散发性胃腸炎患者および集団発生事例から検出された NoV の遺伝子型別の結果、GI は 3 種類、GII は 5 種類の遺伝子型に型別された。このことから、地域内において短期間に多様な遺伝子型の株が流行していたことが示唆された。また、散发例および集団発生事例から検出された NoV の遺伝子型の分布状況や塩基配列が一致している株が認められたことから、地域で散発的に流行して

いるウイルスと集団発生の原因ウイルスの間には強い関連性が示唆された。2009/2010 シーズンは、散发例において GII.3 の検出数が増加し、GII.4 に次いで多かった。GII.2 は集団発生の 3 事例から検出された。また、GII.12 は北米やヨーロッパ等において流行拡大の兆候が認められ、国内でも検出数がわずかながら増加しており<sup>10)</sup>、愛媛県でも散发例、集団発生事例共に検出された。GII.4 は愛媛県において 2003 年以降、優位的に検出されている遺伝子型である<sup>4)・5)・20)・21)</sup>。2009/2010 シーズンも散发性では GII の 52.5%、集団発生事例では 7 事例中 5 事例から GII.4 が検出されるなど、同様の傾向が見られた。しかし、GII.4 の検出割合は全国的に減少の傾向が見られ<sup>10)</sup>、愛媛県でも 2006/2007 シーズンの 68.8%<sup>5)</sup>と比較すると若干減少していた。さらに、過去 2 シーズンにおいて検出された GII.4 はすべて 2006b であったが、2009/2010 シーズンは 2006b とは異なる株が 45% 検出された。これらの変異株は、これまで愛媛県で検出されたことのない 2008a タイプ<sup>11)</sup> と New Orleans 2009 タイプであった。2008a タイプは 2008/2009 シーズンに北海道、新潟県、岩手県、愛知県、大阪府等で検出されていたことから<sup>10)~13)</sup>、これらのウイルスが本県を含め各地に広がったものと思われる。また、New Orleans 2009 タイプの新しい変異株は 2009/2010 シーズンに初めて検出されている。今後も新たな変異株の出現とともに、GII.4 以外の遺伝子型の検出状況にも注意を払い、継続的な分子疫学的解析が重要であると思われる。

## まとめ

- 1 2009年10月～2010年9月に、散発性胃腸炎患者糞便309検体から、NoVが65例(21.0%)、HRVが40例(12.9%)、SaVが28例(9.1%)、AdVが26例(8.4%)、AsVが1例(0.3%)検出された。
- 2 検出されたNoVのGenogroupはGIが5例、GIIが60例であった。遺伝子型はGIがGI.7およびGI.2の2種類、GIIではGII.4、GII.3、GII.2、GII.13、GII.12の5種類であった。
- 3 集団発生事例では8事例中7事例からNoVが検出された。そのうち、GIはGI.7が2事例、GI.2が2事例から、また、GIIはGII.4が5事例、GII.2が3事例、GII.3が2事例、GII.12が1事例から検出された。
- 4 散発例および集団発生事例から検出されたGII.4は、従来からの主流株である2006bタイプと、新しい変異株である2008aタイプならびにNewOrleans2009タイプの3つのクラスターに分類され、これらの新しい変異株は愛媛県で初めて確認された。

本研究の一部は、平成22年度厚生労働科学研究食品の安心・安全確保推進研究事業「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究(主任研究員 野田 衛)」の支援を受けて実施した。また、本報告の一部は、第58回日本ウイルス学会学術集会(徳島市)において発表した。

## 文献

- 1) 中込治: 化学療法の領域, 27, 678-682 (2011)
- 2) 牛島廣治: ウイルス, 59, 75-90 (2009)
- 3) 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 <https://hasseidoko.mhlw.go.jp/Byogentai/Pdf/data63j.pdf>
- 4) 近藤玲子ほか: 愛媛衛環研年報, 5, 1-8 (2002)
- 5) 大塚有加ほか: 愛媛衛環研年報, 9, 16-20 (2006)
- 6) 愛媛県感染症発生動向調査事業報告書平成19年, 愛媛県感染症情報センター (2007)
- 7) 愛媛県感染症発生動向調査事業報告書平成20年, 96-98 愛媛県感染症情報センター (2008)
- 8) 愛媛県感染症発生動向調査事業報告書平成21年, 100-102 愛媛県感染症情報センター (2009)
- 9) 厚生労働省食中毒統計資料 (2)過去の食中毒発生状況 <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html>
- 10) 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, 31, 312-314(2010)
- 11) Motomura K, et al. : J Virol, 84, 8085-8097 (2010)
- 12) 吉澄志磨ほか: 道衛研所報, 59, 79-83 (2009)
- 13) 田村勉ほか: 新潟県保健環境科学研究所年報, 25, 78-82 (2010)
- 14) 山下育孝: 臨床と微生物, 37, 394-398 (2010)
- 15) Kageyama T, et al. : J.Clin.Microbiol, 41, 1548-1557 (2003)
- 16) Kageyama T, et al. : J.Clin.Microbiol, 84, 2988-2995 (2004)
- 17) 片山和彦: 国立感染症研究所感染症情報センターホームページ <http://idsc.nih.go.jp/pathogen/refer/noro-kaisetu1.html>
- 18) Okada M, et al. : Arch Virol, 151, 2503-2509 (2006)
- 19) 葛谷光隆ほか: 衛生微生物技術協議会第32回協議会講演抄録集, 34 (2011)
- 20) 山下育孝ほか: 病原微生物検出情報, 26, 327-329 (2005)
- 21) 近藤玲子 病原微生物検出情報, 28, 285-286, (2007)