

[ノート]

兵庫県で流行した集団嘔吐下痢症事例から検出されたノロウイルスの 遺伝子解析 (2007/08~2008/09 シーズン)

高井 伝仕* 榎本 美貴 近平 雅嗣

Genetic Analysis of Norovirus Detected from Mass Infection with Gastroenteritis in Hyogo Prefecture. (2007/08-2008/09 Season)

Denshi TAKAI*, Miki ENOMOTO, Masatsugu CHIKAHIRA

*Infectious Disease Research Division, Public Health Science Research Center, Hyogo Prefectural
Institute of Public Health and Consumer Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032,
Japan*

Norovirus (NoV) is the most common causative agent of outbreaks with gastroenteritis. In this study, a total of 1,430 samples collected from 144 group infection cases with gastroenteritis in Hyogo prefecture, between April 2007 and March 2009, were used for NoV gene detection. PCR amplified DNA of core region was sequenced and utilized for the analysis of molecular epidemiology. Of 144 group infection cases, NoVs were detected 97 (67.4%) and G II/4 were detected in 49 (79.0%) of 62 G II group infection cases that were determined the base sequence. All the strains identified as G II/4 belonged to the sub-genotype of 2006b variants. Only small mutations were recognized in the G II/4 strains, primary epidemic genotype in these seasons. The decrease of the group infection of two seasons, after the outbreak of 2006/07 season, might be due to the fact that homogeneous viruses occupied the most cases of the group infection. As a result, it is needed to monitor the NoV mutations by detailed genetic analysis.

I はじめに

ノロウイルスは乳幼児から成人まで幅広い年齢層が罹患し、下痢、嘔吐を主症状とする急性胃腸炎を起こす主要なウイルスの一つで、主に冬期に流行を起こす。カキを主要な原因食品とする食中毒起因ウイルスであるとともに、老人施設、学校などでの集団施設においてヒトからヒトへ伝播する感染症としての側面も重要となっている。

ノロウイルスは、Genogroup I~Vに分類され、このうちヒトには Genogroup I (G I), Genogroup II (G II) の二つの遺伝子グループが感染することが知られている。この G I はさらに 14 種、G II は 17 種の遺伝子型 (genotype) に細分される^{1,2)}。

2006/07 シーズンは、全国的に G II/4 を主体とした施設等における集団感染症が多発し、兵庫県においてもその感染防止対策は急務となった。

そこで今回、本県におけるノロウイルスの各遺伝子型の流行状況と流行株との関連を調べるため、2007 年 4 月から 2009 年 3 月の間に検出されたノロウイルスの遺伝子解析を行ったので報告する。

感染症部

*別刷請求先: 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町 2-1-29
兵庫県立健康生活科学研究所 健康科学研究センター
感染症部 高井 伝仕

Table 1 Numbers of samples from NoV group infection cases in Hyogo prefecture (2007/08-2008/09 season)

Type of samples	2007/08 season		2008/09 season		Total	
	Samples	NoV-positive	Samples	NoV-positive	Samples	NoV-positive
Stool samples	641	320 (49.9%)	474	234 (49.4%)	1115	554 (49.7%)
Vomit samples	6	2 (33.3)	0	0	6	2 (33.3)
Foods	86	4 (4.7)	42	0	128	4 (3.1)
Wiped samples	107	8 (7.5)	74	1 (1.4)	181	9 (5.0)
Total	840	334 (39.8)	590	235 (39.8)	1430	569 (39.8)

II 材料と方法

1. 調査対象

2007年4月～2009年3月に県内健康福祉事務所（保健所）から食中毒および集団感染症で搬入された144事例由来の糞便1,115検体、嘔吐物6検体、食品128検体、拭き取り181検体の合計1,430検体を検査材料とした。

2. ノロウイルス遺伝子の検出

糞便を滅菌蒸留水で10%乳剤とし、この高速遠心上清からRNAを抽出した。ランダムプライマーによって抽出RNAからcDNAを作成し、一部改変したCOG1F/R、COG2F/R、ALFPプライマーおよびTaqManプローブを用いてリアルタイムPCR法によりウイルス遺伝子を検出した。

3. ノロウイルス遺伝子の塩基配列の解析

リアルタイムPCRでノロウイルス遺伝子が検出された検体の一部について、構造蛋白（Capsid）領域のプライマー（G I :G1-SKF/G1-SKR G II :G2-SKF/G2-SKR）によるnested-PCR法で増幅、電気泳動により標的DNAの増幅を確認し、その反応液をQIAquick PCR Purification Kit（QIAGEN社）により精製した。

その後BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequence Kit（Applied Biosystems）を用いてダイレクトシーケンシング反応を行った。反応産物はスピンカラムゲルろ過法で精製し、ABI PRISM 310 Genetic Analyzerにより塩基配列を決定したのち、Clustal Wソフトウェアにより解析し、ノロウイルスの遺伝子型別を行った^{1,2,3}。

III 結果および考察

1. ノロウイルスの検出状況

糞便、吐物、食品および拭き取り検体の計1,430検体

のうち569検体（検出率39.8%）からノロウイルスが検出された（Table 1）。糞便検体1,115検体のうち554検体（同49.7%）がノロウイルス陽性、吐物検体においては6検体中2検体（同33.3%）、食品検体では128検体中4検体（同3.1%）が、拭き取り検体では、181検体中9検体（同5.0%）からノロウイルスが検出された。

また、2007/08シーズンにノロウイルス感染が疑われた77集団嘔吐下痢症事例のうち、54事例（70.1%）でノロウイルスを検出した（Table 2）。ノロウイルス陰性の1事例からA群ロタウイルスが検出された。陽性となった54事例のうち遺伝子グループI（G I）が単独で検出されたのは4事例（7.4%）、G II単独は44事例（81.5%）、G IとG IIが同時に検出されたのは6事例（11.1%）であった。

2008/09シーズンにおいては、ノロウイルス感染が疑われた67集団嘔吐下痢症事例のうち、43事例（64.2%）でノロウイルスを検出した。2007/08シーズンと比較すると、ノロウイルスが検出された事例数は減少していた。また、43陽性事例のうちG Iが単独で検出されたのは4事例（9.3%）、G II単独は36事例（83.7%）、G IとG IIが同時に検出されたのは3事例（7.0%）であった。

Table 2 Numbers of NoV G I, G II, G I & G II group infection cases in Hyogo prefecture (2007/08-2008/09 season)

Genogroup	2007/08 season	2008/09 season
G I	4	4
G II	44	36
G I & G II	6	3
Total	54	43

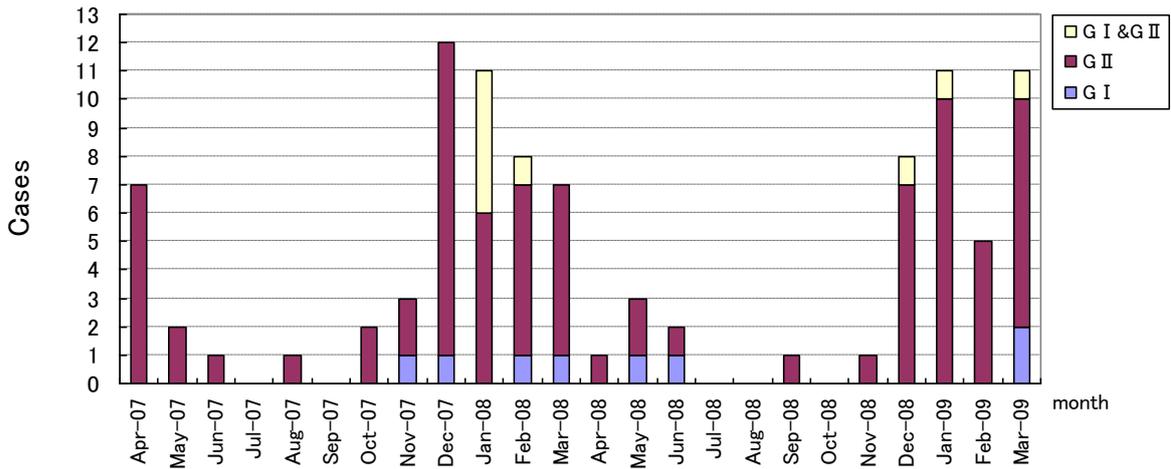


Fig.1 Monthly cases of NoV group infections in Hyogo prefecture (2007/08-2008/09season)

ノロウイルスが検出された事例数について、月別の推移を Fig.1 に示した。

2007/08 シーズンは 11 月頃から事例数が増加し、12 月がピークとなり、その後減少しながら 3 月頃まで発生が見られた。一方、2008/09 シーズンは 12 月から事例数の上昇がみられ、1 月がピークとなった。2 月に発生数が急減したものの、3 月に再び事例数が増加しており、2008/09 シーズンのノロウイルス集団発生事例数のピークは 2007/08 シーズンよりやや遅い月にあらわれた。これは、兵庫県感染症発生動向調査における、定点あたりの感染性胃腸炎患者発生数の推移と一致していた。兵庫県におけるノロウイルス感染の流行は、2007/08 シーズンと比較して 2008/09 シーズンはやや遅い時期に流行がみられたと考えられる。

2. ノロウイルス遺伝子の塩基配列の解析

G I 検出株の中で、ダイレクトシーケンスにより塩基配列が決定できた 10 事例は、G I /4 型が 3 事例 (30%)、G I /8 型が 3 事例 (30%)、型別不明が 4 事例 (40%) であった (Table 3)。G I /4 型は 2007/08 シーズンに 3 事例検出されたが、2008/09 シーズンは検出されなかった。また、G I /8 型は 2007/08 シーズンに 1 事例、2008/09

シーズンに 2 事例検出された。型別不明株については、2007/08 シーズンはなかったが、2008/09 シーズンは 4 事例であった。

G II が陽性となった事例のうち、塩基配列が決定できたのは 62 事例で、G II /4 型が 49 事例 (79.0%)、G II /3 型が 5 事例 (8.1%)、G II /13 型が 3 事例 (4.8%)、G II /6 型が 3 事例 (4.8%)、G II /2 型が 2 事例 (3.3%) であった。

G II /4 型は 2006/07 シーズンの大流行時に急増した遺伝子型であり、2007/08、2008/09 シーズンも G II /4 型による集団発生が多くを占めた。

G II /4 型以外に検出された遺伝子型はシーズンごとに異なる傾向が見られ、2007/08 シーズン初期に、G II /13 型が 3 事例、シーズン終期には G II /3 型による集団発生が 5 事例で見られたが、2008/09 シーズンにはこれらの遺伝子型は検出されなかった。また、2008/09 シーズンでは G II /2 型、G II /6 型による集団発生がそれぞれ 3 事例で検出されたが、これらは 2007/08 シーズンには検出されなかった。G II /4 以外の遺伝子型についても、地域的な流行の可能性が示唆されるものの、継続した流行株とはなり得ていない。

Table 3 Monthly numbers of NoV group infection cases in Hyogo prefecture (2007/08-2008/09 season)

Genotype	2007/08 season												2008/09 season												total
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	
G I /4									1	2														3	
G I /8											1												1	3	
G I /unknown														1		1					1		2	4	
G II /2														1									1	2	
G II /3									2		2	1												5	
G II /4	5		1		1		2	1	9	7	3	2		1			1		1	3	5	4	3	49	
G II /6																					1		2	3	
G II /13	1	2																						3	

Capsid 領域の遺伝子タイピングで G II/4 型に分類された検出株のすべては、2006 年初頭からヨーロッパをはじめとする世界各地で流行した 2006b^{2, 4} 型の塩基配列に 98~100%一致しており、2006b 型に類似した株であった。このことから、本県における過去 2 年間のノロウイルス感染症のうちの多くは、依然としてこの株の浸潤・拡散によるものであると考えられた。

2007/08 シーズンと比較して 2008/09 シーズンは、G II による集団発生件数が減少しており、これは、G II による集団発生の大部分を占める G II/4 型に、過去 2 年間を通して大きな変異が見られなかったことから、流行が比較的小規模に推移したためと考えられた。

今後も遺伝子解析を継続することで新たな流行株を把握して、流行を予測することは、ノロウイルスを原因とする下痢症の解析の一助になると考えられる。

IV 要 旨

ノロウイルスは下痢、嘔吐を主症状とする集団急性胃腸炎を起こす主要なウイルスの一つである。2007 年 4

月から 2009 年 3 月の間に、兵庫県においてノロウイルス感染が疑われた 144 集団嘔吐下痢症事例由来の 1,430 検体についてノロウイルス遺伝子を検出したところ、97 事例 (67.4%) がノロウイルス陽性であった。

検出されたノロウイルスの主流遺伝子型は G II/4 型であった。塩基配列が決定できた G II/4 型のすべては、世界的な流行が見られた 2006b 型に類似した株であった。

今後も継続的にノロウイルスの遺伝子解析を進め、その流行状況を把握することは、大規模な食中毒や感染症予防に有用な情報になると思われる。

文 献

- 1) IDWR 感染症発生動向調査週報, 国立感染症研究所, **6**, 第 11 号, 14-19 (2004)
- 2) IASR 病原体微生物検出情報 (月報), **28**, 第 10 号, 277~285 (2007)
- 3) Katayama K et al., Virology, **299** (2), 225~239 (2002)
- 4) Siebenga J J, et al., J Virol, **81**, 9932~9941 (2007)