

平成 30 年度に福井県において検出された ノロウイルスの遺伝子解析

酒井妙子・佐藤かおり・五十嵐映子・東方美保

Genetic analysis of noroviruses detected in Fukui Prefecture in 2018/2019

Taeko SAKAI, Kaori SATO, Eiko IGARASHI, Miho TOHO

1. はじめに

ノロウイルス（以下 NoV）は、カリシウイルス科に属し、ノーウォークウイルス種を唯一の種として持つ¹⁾エンベロープを持たない約 7,600 塩基のプラス 1 本鎖 RNA ウイルスである²⁾。また、NoV は主に糞口感染により、嘔吐、下痢、腹痛および発熱等を発症する。さらに、感染経路が多種多様で、汚染食品の喫食や、調理従事者を介した食中毒およびヒト-ヒト感染による感染症の集団発生原因となることが知られている^{3),4)}。

NoV には 5 つ（I～V）の Genogroup があり、その中の Genogroup I（以下 GI）、Genogroup II（以下 GII）および Genogroup IV がヒトを宿主とすることが知られているが、GI、GI、GI による感染が主である³⁾。さらに、GI は 9、GII は 22 の遺伝子型が報告されている^{5),6)}。中でも遺伝子型 GII.4 の検出率は、世界的に高いことが報告されており、胃腸炎の大流行に関与することがある⁷⁾⁹⁾。過去に胃腸炎が大流行した平成 18 年度冬期（平成 18 年 10 月～19 年 1 月）および平成 24 年度冬期（平成 24 年 10 月～25 年 1 月）には GII.4 の変異株が出現しており、その関連性が指摘されている^{10),11)}。福井県においても、GII.4 変異株出現時には胃腸炎が大流行した^{12),13)}。一方、平成 26 年 12 月には神奈川県川崎市において GII.17 におけるキメラウイルスが検出され¹⁴⁾、それ以降全国的に検出されるようになった¹⁵⁾。このように、NoV の流行動態の把握は、公衆衛生において非常に重要であり、当センターではこれまでも NoV の検査および遺伝子解析を実施してきた^{12),13)}。

本報では、平成 30 年度に福井県内で発生した集団発生事例および県外での関連調査事例を含め当センターにおいて検査を実施した事例から検出された NoV について報告する。

2. 方法

2. 1 検査材料

平成 30 年度（平成 30 年 4 月～31 年 3 月）に当センターへ行政検査依頼があった急性胃腸炎集団発生 13 事例 183 検体、小児散発例 71 検体を対象とした。集団発生事例における検体の種類は、有症者由来の糞便または吐物 87 検体、調理従事者および施設職員等由来糞便 46 検体、ふきとり 16 検体、食品 34 検体であった。

2. 2 検査方法

糞便および吐物は滅菌水で 10% 乳剤とし、8,500×g、10 分間冷却遠心後の上清を試料とした。ふきとり検体についてはふきとりした綿棒を滅菌水 1mL で洗い出し、8,500×g、10 分間冷却遠心後の上清を試料とした。前処理後の試料から厚生労働省通知¹⁶⁾に準じ、RNA 抽出、DNase 処理および逆転写反応を実施し、cDNA を合成した。その後、糞便・吐物はリアルタイム PCR 法で、ふきとりは PCR 産物を用いた nested リアルタイム PCR 法を実施した。食品については厚生労働省通知¹⁶⁾に準じパンソルビントラップ法を実施した。リアルタイム PCR 装置は、Step One Plus Real-Time PCR System（Applied Biosystems）を使用した。

NoV 陽性と判定した検体については、Kojima ら¹⁷⁾の方法に準じダイレクトシーケンス法により Capsid 領域（GI：295nt、GII：282nt）の塩基配列を決定し、相同性解析および系統解析を実施した。シーケンス装置は、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer（Applied Biosystems）を使用した。データの解析は、MEGA（Molecular Evolutionary Gene Analysis）ver. 6.0 プログラム¹⁸⁾を使用し、最尤法（ML 法）により系統樹を作成した。系統樹評価のため 1,000 回のブートストラップを実施した。各遺伝子型の標準株は、ノロウイルスサイエンティフィックコミッティー（以下 NoV S.C.）が推奨する株を使用した^{5),6)}。

3. 結果

3. 1 集団発生事例

調査対象の集団発生 13 事例 183 検体のうち、表 1 のとおり 7 事例 65 検体（有症者 55 検体、従事者 5 検体、ふきとり 2 検体、食品 3 検体）で GII が検出された。

Capsid 領域の遺伝子解析において、検出塩基配列を比較したところ、各事例ごとに 99.3～100% の相同性を示した。福井県内に発生施設があり食中毒事件となった事例 5 では有症者と食品由来の配列が 100% 一致し、事例 6、7 は相互に関連した事例であり、有症者と調理従事者、食品由来の配列が 100% 一致していた。発生施設は旅館（2 事例）、仕出し屋（2 事例）が多かった（表 1）。

検出された NoV の塩基配列について、各事例の代表株を用いて系統樹解析を実施したところ、GII.2、GII.4 の 2 種類の遺伝子型が確認された（図 1、2）。遺伝子型別の検出頻度を比較すると、GII.2 が 5 事例（71.4%）で最も多く、次いで GII.4 が 2 事例（28.6%）であった（図 1）。

平成 30 年度に複数回検出された遺伝子型の Capsid 領域における塩基配列の相同性は、GII.2 は 98.6%、GII.4 は 99.3% であり、非常に高い相同性を示した（図 2）。

表1 NoVが陽性となった事例

事例番号	初発患者 発生年月日	発生地域	発生施設	推定感染経路	有症者	調理従事者等	食品	ふきとりその他	検出した 遺伝子型
					陽性数/検査数	陽性数/検査数	陽性数/検査数	陽性数/検査数	
1	2018.4.8	丹南	家庭	ヒト-ヒト感染	2 / 2	/	/	/	NV(G II.4)
2	2018.11.18	県外	旅館	食中毒 (事件報告)	1 / 1	/	/	/	NV(G II.2)
3	2018.12.23	福井	飲食店	不明	8 / 9	0 / 10	/	/	NV(G II.2)
4	2018.12.31	坂井	不明	不明	2 / 2	/	/	/	NV(G II.2)
5	2019.2.12	二州	仕出屋	食中毒 (事件報告)	23 / 24	0 / 5	1 / 20	0 / 7	NV(G II.4)
6	2019.3.4	坂井	旅館	食中毒 (事件報告)	12 / 12	3 / 22	0 / 8	1 / 1	NV(G II.2)
7	2019.3.4	坂井	仕出屋	食中毒 (事件報告)	7 / 8	2 / 3	2 / 6	1 / 8	NV(G II.2)

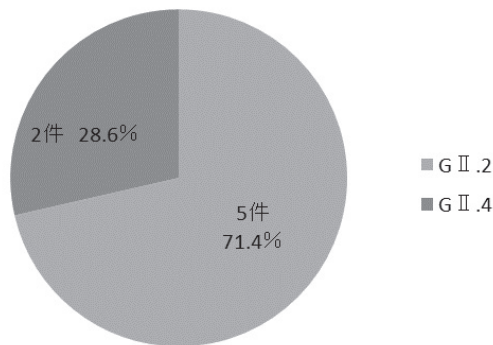


図1 集団発生事例において検出されたNoVの遺伝子型

発生月別では、12月、3月（それぞれ2事例）が最も多く、2月（1事例）などNoV流行期にあたる冬季に多かった（表1、図3）。

遺伝子型別にみると、平成30年4月には平成30年1月に引き続き1事例からG II.4が検出された。しかし平成30年11月から平成31年3月にかけて5事例からG II.2が検出され、G II.4は平成31年2月の1事例のみであった。G II.2は平成28年12月から平成29年3月に流行の主流であり、2年ぶりの検出となった。

3.2 小児散発例

調査対象の小児散発例71検体のうち、表2のとおり19検体でG IIが検出された。

表2 小児散発例においてNoVが陽性となった検体

検体番号	発病月	年齢	検出した 遺伝子型
1	2018年5月	1	G II.2
2	2018年6月	1	G II.6
3	2018年7月	不明	G II.4
4	2018年8月	不明	G II.4
5	2018年11月	0	G II.3
6	2018年11月	3	G II.2
7	2018年12月	2	G II.4
8	2018年12月	2	G II.4
9	2018年12月	0	G II.4
10	2018年12月	0	G II.4
11	2018年12月	0	G II.2
12	2018年12月	2	G II.4
13	2018年12月	1	G II.4
14	2019年1月	1	G II.4
15	2019年1月	2	G II.4
16	2019年1月	3	G II.6
17	2019年2月	1	G II.4
18	2019年2月	不明	G II.4
19	2019年3月	1	G II.4

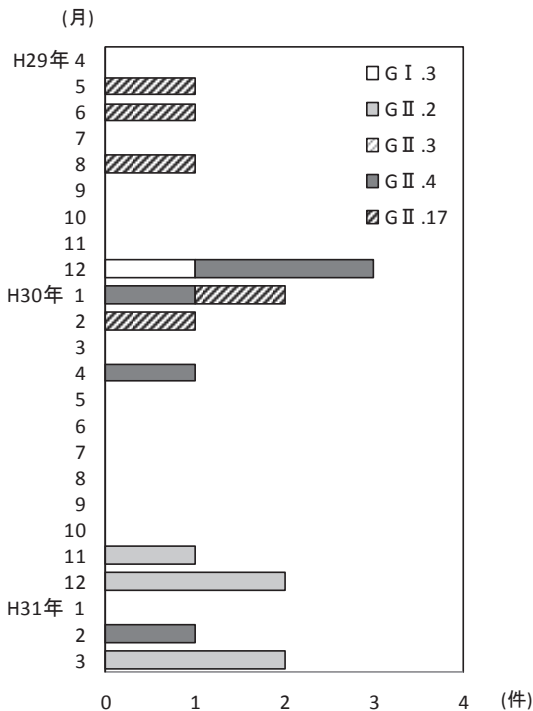


図3 集団発生事例の月別NoV検出事例数

検出されたNoVのうち、系統樹解析が可能であったの

は16検体で、GⅡ.2、GⅡ.3、GⅡ.4、GⅡ.6の4種類の遺伝子型が確認された(図2、5)。遺伝子型別の検出頻度を比較すると、GⅡ.4が13検体(68.4%)で最も多く、次いでGⅡ.2が3検体(15.8%)であった(図5)。

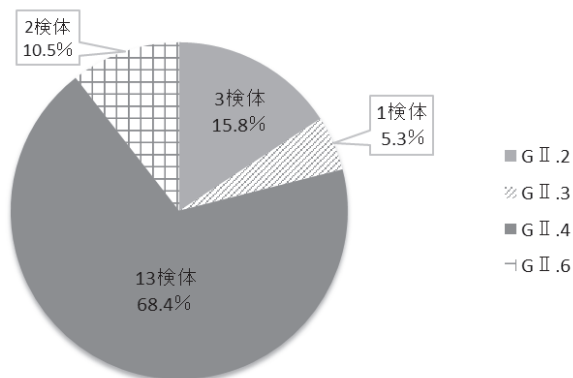


図5 小児散発例において検出されたNoVの遺伝子型

平成30年度に複数回検出された遺伝子型のCapsid領域における塩基配列の相同性は、GⅡ.2は100%、GⅡ.4は94.7%、GⅡ.6は98.9%であり、高い相同性を示した(図2)。

発生月別では、12月(7検体)が最も多く、1月(3検体)などNoV流行期にあたる冬季に多かった(表2、図6)。

遺伝子型別にみると、平成30年4月から11月にはGⅡ.2、GⅡ.4などの4種類の遺伝子型が検出された。しかし平成30年12月から平成31年3月にかけて11検体からGⅡ.4が検出され、その他の遺伝子型についてはGⅡ.2、GⅡ.6が1検体ずつ検出された。

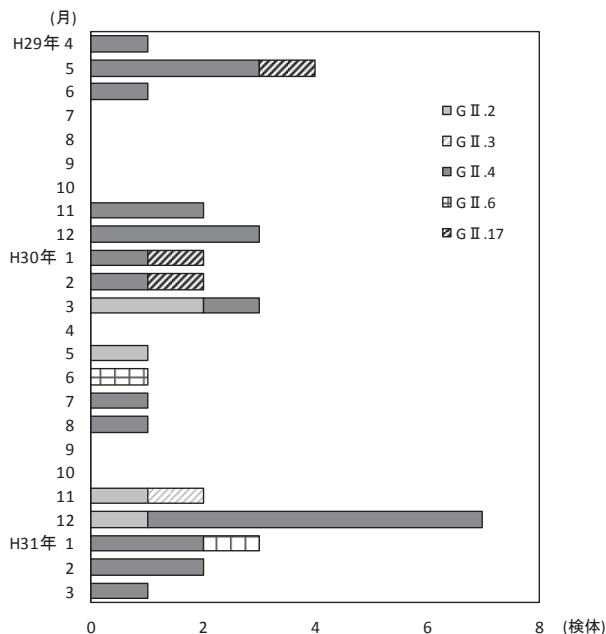


図6 小児散発例の発病月別NoV検出数

4. 考察

NoVの感染経路は多種多様であり、集団発生の原因になることも報告されている^{3),4)}。集団発生事例として検査依頼のあった13事例のうち7事例からNoVが検出され、そのうちの4事例が食中毒事件となった(事例2, 5, 6, 7)。

また食中毒事件にはならなかったが、ヒト-ヒト感染が感染経路と推定された事例も1事例あり、NoVの予防対策は重要であると考えられる。

Capsid領域における遺伝子解析の結果、平成30年度は集団発生事例において、GⅡ.2、GⅡ.4の2種類の遺伝子型が検出された。また小児散発事例においてはGⅡ.2、GⅡ.3、GⅡ.4、GⅡ.6の4種類の遺伝子型が検出された。

GⅡ.2は集団発生事例について平成30年11月から平成31年3月にかけて5事例から検出された。平成28年度において全国でも流行し¹⁹⁾、福井県においても最も多く検出された遺伝子型であったが²⁰⁾、平成29年度の集団発生事例からは検出されていなかった。一方散発事例からはGⅡが検出された19検体のうち、平成30年5月から平成30年12月にかけて3検体から検出されたのみであり、集団発生事例と小児散発例で異なる傾向が見られた。

GⅡ.4は平成30年4月から平成31年2月にかけて2事例から検出された。胃腸炎の小児散発例においてGⅡ.4は常に主要な遺伝子型であり¹⁹⁾、本県でも2018/19シーズンにおける小児散発例からのNoV検出割合はGⅡ.4が最も多かった。事例1では、家庭内において小児が先行発症していたとの情報もあり、小児感染事例との関連も考えられる。

5. まとめ

平成30年度に検査した急性胃腸炎集団発生13事例183検体のうち、7事例65検体からNoVを検出した。遺伝子解析を実施したところ、2種類の遺伝子型(GⅡ.2、GⅡ.4)が検出され、遺伝子型の変遷が見られた。

また小児散発事例については71検体のうち、19検体からNoVを検出した。遺伝子解析を実施したところ、4種類の遺伝子型(GⅡ.2、GⅡ.3、GⅡ.4、GⅡ.6)が検出された。

NoVに対する防御反応は遺伝子型特異的であるため²²⁾、今後もNoVの遺伝子型の変遷に注視する必要があると考えられる。

謝辞

疫学等の情報収集および検体の搬入を御担当された健康福祉センター、福井県健康福祉部医薬食品・衛生課、健康増進課の関係各位に深謝いたします。

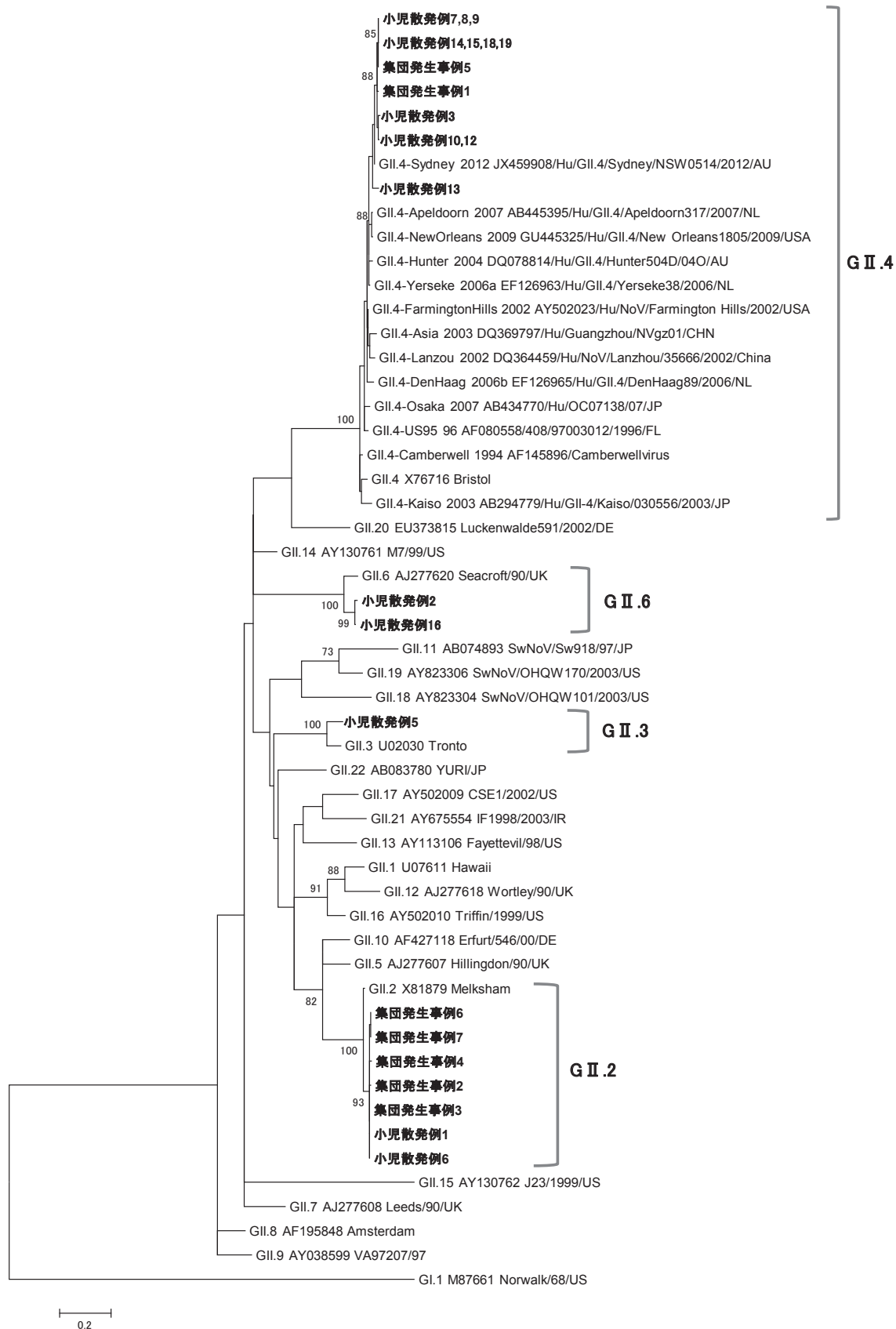


図2 Genogroup II の系統樹解析 (Capsid 領域 282nt, ML 法)

参考文献

- 1) 武田直和 他：カリシウイルスの命名変更について, IASR., **24**, 311-312(2003)
- 2) 片山和彦：胃腸炎関連カリシウイルス（ノロウイルス、サボウイルス）総論, IASR., **24**, 312-314(2003)
- 3) 田代真人 他：ウイルス感染症の検査・診断スタンダード, 羊土社 (2011)
- 4) 丸山務 他：つけない・うつさない・持ち込まない ノロウイルス現場対策 その感染症と食中毒, 幸書房 (2006)
- 5) 片山和彦：ノーウォークウイルス（ノロウイルス）の遺伝子型 2014 年版., IASR., **35**, 173-175(2014)
- 6) Kroneman A. et al. : Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping., Arch. Virol., **158**, 2059-2068(2013)
- 7) Siebenga J.J. et al. : Epochal Evolution of GGII.4 Norovirus Capsid Proteins from 1995 to 2006., J. Virol., **81**, 9932-9941(2007)
- 8) Vega E. et al. : Novel surveillance network for norovirus gastroenteritis outbreaks, United States., Emerg. Infect. Dis., **17**, 1389-1395(2011).
- 9) J. van Beek et al. : Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012., Eurosurveillance., **18**, 03 Jan(2013).
- 10) 本村和嗣 他：ノロウイルスのゲノム解析と流行発生のしくみ, 感染症誌, **86**, 563-568(2012)
- 11) 田村務 他：ノロウイルス GII/4 の新しい変異株の遺伝子解析と全国における検出状況, IASR., **33**, 333-334(2012)
- 12) 東方美保 他：平成 14～18 年度に福井県で検出されたノロウイルスの遺伝子解析, 福井県衛生環境研究センター年報, **5**, 60-72(2006)
- 13) 小和田和誠 他：平成 22～24 年度に福井県の集団発生事例から検出されたノロウイルスの遺伝子解析, 福井県衛生環境研究センター年報, **11**, 58-62(2012)
- 14) Matsushima Y. et al. : Genetic analyses of GII.17 norovirus strains in diarrheal disease outbreaks from December 2014 to March 2015 in Japan reveal a novel polymerase sequence and amino acid substitutions in the capsid region., Eurosurveillance, **20**, 02 Jul (2015).
- 15) 国立感染症研究所感染症疫学センター：都道府県別ノロウイルス GII 遺伝子型検出状況報告 2015/16&2016/17 シーズン
https://www.niid.go.jp/niid/images/iasr/rapid/noro/160920/noro201617_170126.gif
- 16) 厚生労働省医薬局食品安全部監視安全課長通知：「ノロウイルスの検出法について」の一部改正について, 食安監発第 1022 第 1 号, 平成 25 年 10 月 22 日
- 17) Kojima S. et al. : Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses, J. Virol. Methods., **100**, 107-114(2002)
- 18) Tamura K. et al. : Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0., Mol. Biol. Evol. **30**, 2725-2729 (2013)
- 19) 国立感染症研究所感染症疫学センター：都道府県別ノロウイルス GII 遺伝子型検出状況報告 2016/17&2017/18 シーズン(6 月 13 日現在)
https://www.niid.go.jp/niid/images/iasr/rapid/noro/160920/norogm1617_180613.gif
- 20) 酒井妙子 他：平成 28 年度に福井県の集団発生事例から検出されたノロウイルスの遺伝子解析, 福井県衛生環境研究センター年報, **15**, 63-67(2016)
- 21) 左近直美 他：ノロウイルスの流行と遺伝子型, 日本食品微生物学会雑誌, **33**, 97-106(2016)
- 22) Ryder R. W. et al. : Evidence of immunity induced by naturally acquired rotavirus and Norwalk virus infection on two remote Panamanian islands., J. Infect. Dis., **151**, 99-105(1985)