

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

小和田和誠・平野映子・山本 希・大村勝彦

Genetic Analysis of Noroviruses in Fukui Prefecture, 2010-2013

Kazuaki KOWADA, Eiko HIRANO, Nozomi YAMAMOTO, Katsuhiko OMURA

1. はじめに

小児の感染性胃腸炎（散发例）の発生要因の一つであるノロウイルス（以下 NV）は、NV 汚染食品の摂取や調理従事者を介しての食中毒およびヒト-ヒト感染による感染症などの集団発生の原因となることが知られている¹⁾。近年では、平成 18 年度冬期（平成 18 年 10 月～19 年 1 月）に感染性胃腸炎患者報告数が過去最高のレベルで推移し²⁾、平成 24 年度冬期（平成 24 年 10 月～25 年 1 月）もそれに次ぐ全国的な大流行^{3),4)}となっており、NV の流行動態の把握は、保健衛生上重要である。

本報では、平成 22～24 年度に福井県内で発生した集団発生事例から検出された NV について遺伝子解析を行い、近年の NV の遺伝子型の変遷について調査した内容について報告する。

2. 方法

2.1 検査材料

平成 22～24 年度（平成 22 年 4 月～25 年 3 月）に福井県内で発生し、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 44 事例 518 検体を対象とした。内訳は、有症者 269 検体、調理従事者および施設職員 178 検体、その他（拭き取り等）71 検体であった。また、各年度の期間は 4 月～翌年 3 月とした。

2.2 検査方法

糞便および嘔吐物は滅菌水で 10%乳剤とし、8,500G、10 分間冷却遠心後の上清を試料とし、直腸拭い液は粗遠心後の上清を試料とした。カキは中腸腺摘出後、滅菌水で 10%乳剤とし、30%ショ糖を用いた超遠心（36,000rpm、2hr）で濃縮したものを試料とした。試料から、厚生労働省通知⁵⁾のリアルタイム PCR 法に準じて、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 で、拭き取りは 1st PCR 産物を用いた nested リアルタイム PCR で、NV が陽性であるか判定をした。リアルタイム PCR 装置は、StepOne Plus [Life technologies]を使用した。

NV 陽性と判定した検体については、Kojima ら⁶⁾のプライマー(G1-SKF/G1-SKR もしくは G2-SKF/G2-SKR)を用いて Capsid 領域を増幅し、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。そして、プライマー配列を除いた領域 (Genogroup I : 295nt、Genogroup II : 282nt) について、相同性解析および系統解析を実施した。解析ソフトは MEGA5 を使用し、最尤法 (ML 法) により系統樹を

作製した。遺伝子型別および遺伝子型番号は Kageyama ら⁷⁾の方法に従った。GII/4 の変異株は、オランダ国立公衆衛生環境研究所 (RIVM) が運営する Noro net に掲載⁸⁾されている呼称に従った。

3. 結果

検査対象とした集団発生 44 事例のうち、NV が検出されたのは 29 事例であった。この 29 事例の詳細について、表 1 にまとめた。全ての事例において、Genogroup II (以下 GII) が検出され、GII だけでなく Genogroup I (以下 GI) も同一事例から検出されたのは 5 事例(17.2%)であった。その中の 2 事例は、二枚貝のカキ (牡蠣)を喫食した食中毒事例であった。GI が検出されたのは 6 検体で、その全てから GII も検出されており、GI が単独で検出された検体はなかった。

発生施設別では、飲食店 (11 事例)、仕出し店 (7 事例)、中学校・小学校・保育園 (6 事例) が多かった。特に、飲食店および仕出し店において、従業員を介した食中毒事例 (10 事例) と推定された事例が多かった。また、発生地域別では福井地区 (9 事例)、若狭地区 (7 事例)、坂井地区 (5 事例) が比較的多かった。

検出された NV の塩基配列について、表 1 に示す各事例の代表株を用いて、ML 法で系統樹を作成し、Genogroup ごとに遺伝子型別を実施した (図 1、2)。その結果、GI として、GI/1、GI/3、GI/4、GI/6、GI/9、GI/14 の 6 種類の遺伝子型が確認された。同様に GII では GII/2、GII/3、GII/4、GII/11、GII/12、GII/13 の 6 種類の遺伝子型が確認された。遺伝子型ごとの検出頻度を比較すると、GII/4 : 18 事例 (62.1%)、GII/13 : 6 事例 (20.1%)、GII/2 : 4 事例 (13.8%) などが高かった。

最も検出頻度が高かった GII/4 に分類された代表株について、詳細に系統樹解析を実施した結果、3つのクラスター (クラスター内の相同性は塩基配列で 98%以上) に分類された (図 3)。クラスターごとの検出頻度を比較すると、Sydney2012 (2012 変異型) : 10 事例 (55.6%)、DenHaag2006b (2006b 変異型) : 6 事例 (33.3%)、NewOrleans2009 (2009 変異型) : 2 事例 (11.1%) であった。平成 22～23 年度は全て DenHaag2006b で、平成 24 年度の 4～5 月頃は NewOrleans2009、平成 24 年度 11 月以降は全て Sydney2012 と、検出される遺伝子型が変遷していることが判明した。また、平成 24 年度に NV の全国的な大流行が社会的問題となった時期と、福井県内で Sydney2012 が多く検出されるようになった時期が重なっていた。

GII/4 以外の遺伝子型は、単発的な発生もしくは限定された地域での流行として確認されている場合がほとんど

表1 平成22～24年度胃腸炎集団発生事例のノロウイルス検出状況

事例番号	初発患者発生年月日	発生施設	発生地域	推定感染経路	有症者	調理従事者・施設職員	その他の検体	検出した遺伝子型	代表株名
					陽性数 / 検査数	陽性数 / 検査数	(陽性数/検査数)		
22-1	2010.4.13	小学校	奥越	不明	14 / 15	3 / 3	拭き取り(0/10)	G II /12	Fukui/22201O01/H22-1
22-2	2010.11.3	保育園	福井	ヒト-ヒト感染	2 / 3			G II /2	Fukui/22204F03/H22-2
22-3	2010.11.22	小学校	坂井	不明	3 / 6			G I /3、 G II /2、G II /3	Fukui/22206S01/H22-3 Fukui/22206S05a/H22-3 Fukui/22206S05b/H22-3
22-4	2010.12.20	飲食店	奥越	従業員を介した感染	9 / 9	3 / 3	拭き取り(0/10)	G II /4	Fukui/22208O22/H22-4
22-5	2011.1.6	飲食店	二州	カキ喫食	4 / 5	0 / 2		G I /9、 G II /2、G II /13	Fukui/22209N04a/H22-5 Fukui/22209N04b/H22-5 Fukui/22209N05/H22-5
22-6	2011.1.11	仕出し店	坂井	従業員を介した感染	8 / 8	4 / 6	拭き取り(0/10) 無症者(1/2)	G II /4	Fukui/22210S27/H22-6
22-7	2011.1.24	仕出し店	丹南	従業員を介した感染	6 / 6	3 / 3	拭き取り(3/10)	G II /4	Fukui/22211T16/H22-7
22-8	2011.3.8	保育園	若狭	不明	1 / 1	0 / 5		G II /13	Fukui/22215W41/H22-8
23-1	2011.5.23	小学校	若狭	ヒト-ヒト感染	5 / 5	0 / 3		G II /3	Fukui/22301W07/H23-1
23-2	2011.5.22	中学校 小学校 保育園	福井	ヒト-ヒト感染	5 / 10			G II /13	Fukui/22302F01/H23-2
23-3	2011.12.13	高齢者施設	若狭	ヒト-ヒト感染	5 / 5	3 / 7		G II /4	Fukui/22308W02/H23-3
23-4	2011.12.23	仕出し店	若狭	従業員を介した感染	12 / 12	1 / 4		G II /4	Fukui/22309W01/H23-4
23-5	2012.2.11	飲食店	福井	不明	1 / 1			G II /13	Fukui/22311F01/H23-5
23-6	2012.2.21	社員食堂	坂井	ヒト-ヒト感染	4 / 5	2 / 3		G I /1、G II /11	Fukui/22312S13a/H23-6 Fukui/22312S15/H23-6
23-7	2012.3.19	旅館	坂井	カキ喫食	4 / 4	0 / 4	カキ(0/2) 無症者(0/1)	G I /4、G I /14、 G II /4、G II /13	Fukui/22314N01a/H23-7 Fukui/22314N01b/H23-7 Fukui/22314N02a/H23-7 Fukui/22314S24/H23-7
24-1	2012.4.21	飲食店	奥越	従業員を介した感染	9 / 12	2 / 2	拭き取り(0/10)	G II /4	Fukui/22402O11/H24-1
24-2	2012.5.6	イベント会場	二州	ヒト-ヒト感染	6 / 8			G II /13	Fukui/22403N01/H24-2
24-3	2012.5.4	仕出し店	福井	従業員を介した感染	8 / 9	1 / 6		G II /4	Fukui/22404F01/H24-3
24-4	2012.11.5	仕出し店	坂井	不明	6 / 6	3 / 3	拭き取り(0/6)	G II /4	Fukui/22405S07/H24-4
24-5	2012.11.20	飲食店	丹南	ヒト-ヒト感染	9 / 10	0 / 7		G II /4	Fukui/22406T12/H24-5
24-6	2012.12.31	飲食店	丹南	従業員を介した感染	5 / 5	1 / 3	拭き取り(0/10)	G II /4	Fukui/22407T14/H24-6
24-7	2013.1.19	飲食店	福井	不明	4 / 4	2 / 13		G II /4	Fukui/22409F01/H24-7
24-8	2013.1.19	飲食店	福井	従業員を介した感染	11 / 11	2 / 6		G II /4	Fukui/22410F01/H24-8
24-9	2013.3.6	仕出し店	若狭	従業員を介した感染	16 / 17	1 / 3		G II /4	Fukui/22412W01/H24-9
24-10	2013.3.12	仕出し店	若狭	不明	3 / 3	0 / 2		G I /6、G II /4	Fukui/22413W03/H24-10 Fukui/22413W05a/H24-10
24-11	2013.3.9	飲食店	福井	従業員を介した感染	9 / 10	7 / 10		G II /4	Fukui/22414F02/H24-11
24-12	2013.3.18	イベント会場	若狭	ヒト-ヒト感染	6 / 6	0 / 9		G II /2	Fukui/22415W02/H24-12
24-13	2013.3.25	飲食店	福井	不明	7 / 9	1 / 13		G II /4	Fukui/22416F01/H24-13
24-14	2013.3.26	飲食店	福井	不明	6 / 6	6 / 9		G II /4	Fukui/22417O01/H24-14

だった。G II/2 および G II/13 については、G II/4 に次いで多く検出され、複数の地域でも確認されており、G II/4 と並んで広範囲に流行している可能性が示唆された。

4. 考察

NV は、カキなどの二枚貝の喫食による食中毒や、食品取扱者の食品汚染による食中毒、NV 感染者の糞便・吐物に含まれる NV が、手指や環境を介してヒトからヒトへ感染、処理不徹底な吐物等汚染物の飛散による塵埃感染⁹⁾など、多様な感染経路を持つことが明らかにされている^{1)、10)}。今回の調査において、二枚貝喫食事例(2 事例)よりも、食品取扱者の食品汚染による食中毒(10 事例)および集

団生活施設でのヒト-ヒト感染疑い(8 事例)が比較的多い結果となった。二枚貝などの食品の加工処理は、衛生面で徹底されてきており、近年の二枚貝喫食事例の減少に貢献していると思われた。今後は、食品取扱者、感染者の糞便・吐物を処理する施設職員の予防意識の向上を促す等、いまだに多い食品取扱者の食品汚染や、ヒト-ヒト感染事例の削減を中心に NV 予防対策を立てることが重要になると考えられた。

ウイルスゲノムの Capsid 領域における塩基配列解析による遺伝子型別により、ウイルスの流行状況を解析した。G I で 9 種類以上、G II で 22 種類以上の遺伝子型が存在するとされている。その中でも G II/4 の検出率は、国内だけでなく世界的に高いことが報告されている¹¹⁾⁻¹³⁾。

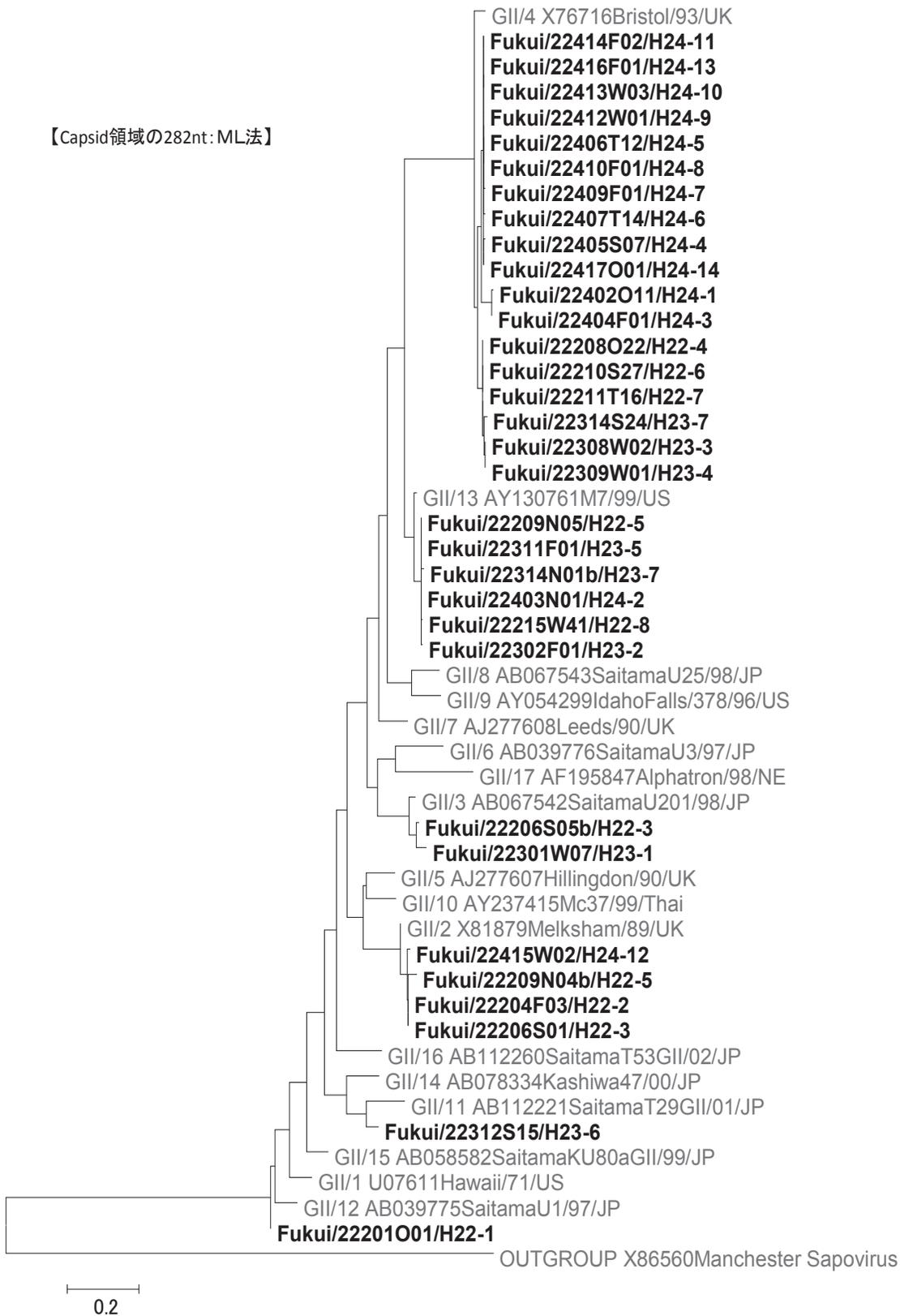


図1 福井県内で検出されたノロウイルス Genogroup II の系統樹解析

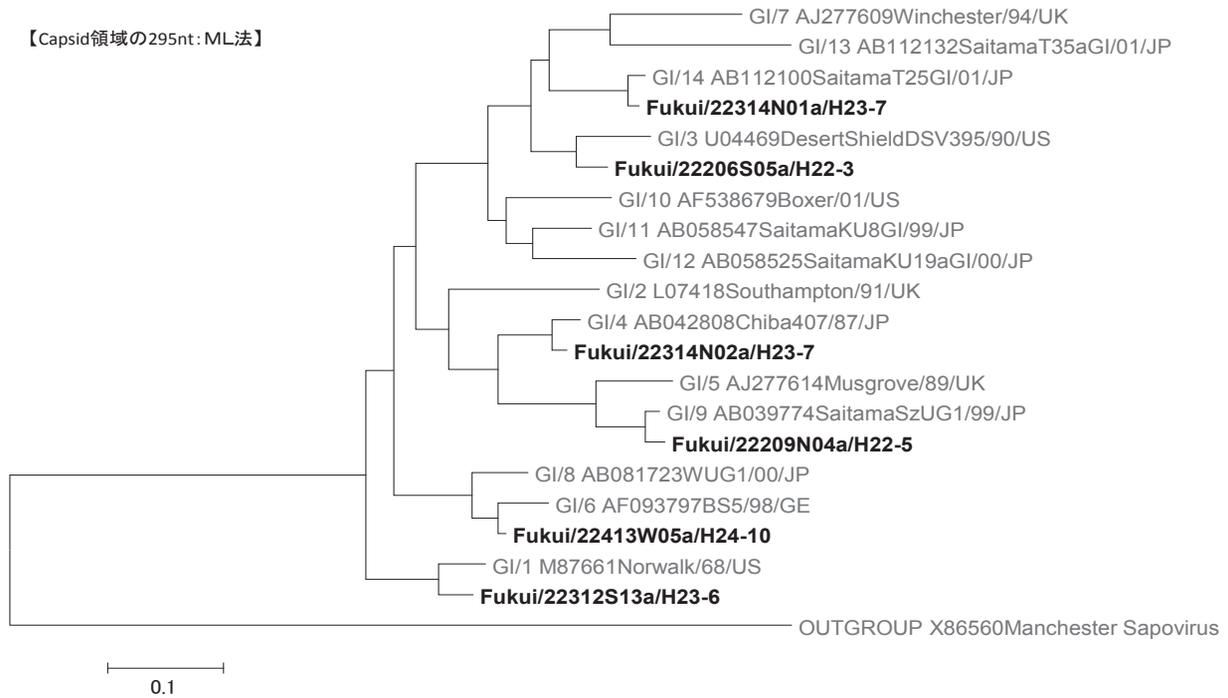


図2 福井県内で検出されたノロウイルス Genogroup I の系統樹解析

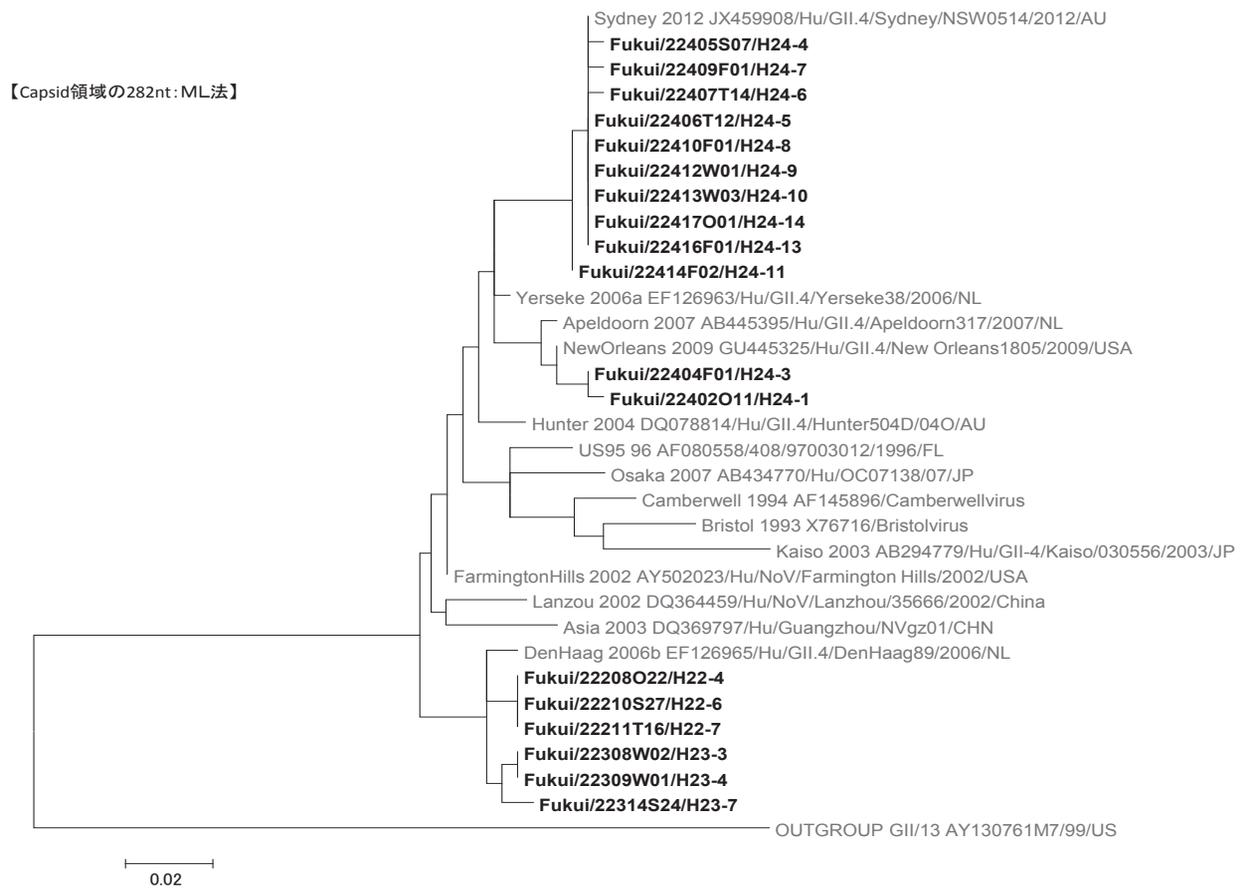


図3 福井県内で検出されたノロウイルス (GII/4) の系統樹解析

この GII/4 流行の一因として、変異型の出現が指摘されている⁴⁾。近年では、ヨーロッパやアメリカ、オーストラリアなどで新しく検出された変異型として、DenHaag2006b¹¹⁾、NewOrleans2009¹²⁾、Sydney2012¹³⁾などが報告されている。福井県内の検出株のクラスターは、それぞれ近年に流行した Sydney2012、DenHaag2006b、NewOrleans2009 の各変異型に分類された。平成 23 年度までは、平成 18 年度に大流行した DenHaag2006b が多く検出されていた。この頃は、他にも GII/2 や GII/13 も検出されており、勢力図は混沌としていた。

しかし、平成 24 年 11 月以降に Sydney2012 が検出されるようになると、急速に NV 検出事例数が増加し、検出される NV の多くが Sydney2012 となり、流行の主役となった。Sydney2012 の出現時期が全国的な流行の時期と重なっていることから、NV の遺伝子型の変遷は、免疫を持たない人の間で NV の感染を促進させ、大流行を誘発している可能性が示唆された。

5. まとめ

平成 22～24 年度に検査した集団発生 44 事例 518 検体のうち、29 事例 237 検体から NV を検出した。そして、事例ごとに発生状況を調査し、代表株について遺伝子情報を解析した。

その結果、12 種類 (GI : 6 種類、GII : 6 種類) の遺伝子型の NV が検出され、特に GII/4 が多数 (18 事例 : 62.1%) を占めた。検出された GII/4 は系統樹解析で 3 種類のクラスターを形成した。

各クラスターに属する NV には変遷が見られ、NV の大流行が社会問題となった平成 24 年度の流行期には、これまでにない新しいクラスターに属するウイルスが、広い地域にわたり感染を拡大して大流行の発生要因となったことが示唆された。

謝辞

検体の採取、搬入および疫学等の情報収集を担当された健康福祉センター、医療機関、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。

参考文献

- 1) 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)
- 2) 国立感染症研究所 感染症情報センター事務局他, ノロウイルス食中毒 2011 年現在, 病原微生物検出情報月報 ,32,12(2011)
- 3) 国立感染症研究所 感染症情報センター事務局他, 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, 病原微生物検出情報月報 ,33,12(2012)
- 4) 国立感染症研究所 感染症情報センター事務局他, ノロウイルス遺伝子型 GII.4 変異型の急速な拡大, 病原微生物検出情報月報 ,34,2(2012)
- 5) 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, 食安監発第 1105001 号, 平成 15 年 11 月 5 日
- 6) Kojima S et al., Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses., J Virol Methods. 100(1-2), 107-14 (2002)
- 7) Kageyama T et al., Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan, J.Clin.Microbiol. , 42, 2988-2995(2004)
- 8) オランダ国立公衆衛生環境研究所 (RIVM) ホームページ (2013) [http://www.rivm.nl/en/Topics/Topics/N/NoroNet/Databases/Sequence_typing_tool?sp=cml2bXE9ZmFsc2U7c2VhcmNoYmFzZT02Mzg3MDtYaXZtcT1mYWxzZTs=&pagenr=6388]
- 9) 吉田徹也他, 塵埃感染の疑われたノロウイルスによる 集団感染性胃腸炎事例, 感染症学雑誌 , 84(6), 702-707(2010)
- 10) 国立感染症研究所 感染症情報センター事務局, ノロウイルスの感染経路, 感染症情報センターホームページ (2007) [<http://idsc.nih.go.jp/disease/norovirus/0702keiro.html>]
- 11) Siebenga JJ et al., Epochal Evolution of GGII.4 Norovirus Capsid Proteins from 1995 to 2006., J Virol. ,81(18),9932-41 (2007)
- 12) Vega E et al., Novel surveillance network for norovirus gastroenteritis outbreaks, United States., Emerg Infect Dis. 17(8):1389-95 (2011).
- 13) 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(1), 03 Jan (2013).