

近年の福井県におけるノロウイルスの検出状況 (平成22～26年度)

小和田和誠・平野映子・野田 希・大村勝彦

Detection of noroviruses from Fukui Prefecture in recent years

Kazuaki KOWADA, Eiko HIRANO, Nozomi NODA, Katsuhiko OMURA

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するウイルス属の一つであり、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 ウィルスである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、感染経路が多様で、汚染食品の喫食や、調理従事者を介しての摂取による食中毒およびヒト-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 I～V の Genogroup があり、その中の Genogroup I（以下 GI）、Genogroup II（以下 GII）、Genogroup IV がヒトを宿主とすることが知られている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 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)}。そのため、NoV の検出および遺伝子解析による流行動態の把握は、公衆衛生において非常に重要であり、これまでに NoV の検出および遺伝子解析を実施してきた^{12),13)}。平成 25 年には NoV の遺伝子型分類法が、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.）より報告^{5),6)}されたことを受けて、従来の調査法¹⁴⁾で定めた遺伝子型番号とは異なる場合については、新分類法で統一するなどの対応が必要となった。

本報では、近年 5 ヶ年に福井県内で発生した集団発生事例から検出された NoV について、遺伝子型の変遷を調査した結果について報告する。

2. 方法

2.1 検査材料

平成 22～26 年度（平成 22 年 4 月～27 年 3 月）に福井県内で発生した急性胃腸炎のうち、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 67 事例 839 検体を対象とした。検体の由来の内訳は、有症者由来 407 検体、調理従事者および施設職員由来 331 検体、その他（拭き取り等）101 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、8,500 G、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¹⁵⁾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、NoV 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。

NoV 陽性と判定した検体については、Kojima ら¹⁶⁾のプライマー（G1-SKF/G1-SKR もしくは G2-SKF/G2-SKR）を用いて Capsid NS 領域を増幅し、ダイレクトシーケンシング法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（GI : 295nt、GII : 282nt）について、相同性解析および系統解析を実施した。シーケンシング装置は、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer [Life technologies] を使用した。データの解析は、MEGA (Molecular Evolutionary Gene Analysis) ver. 5.0 プログラム¹⁷⁾を使用し、最尤法 (ML 法) により系統樹を作製した。その際に、系統樹評価のため 1000 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、NoV S.C. が推奨する株を使用した^{5),6)}。また、同一事例内で同一の塩基配列が得られた検体については、塩基配列を一つ選出し、その事例の代表株とした。

3. 結果および考察

調査対象の集団発生 67 事例のうち、NoV が検出されたのは 46 事例であった。全ての事例において、GII が検出され、GII だけでなく GI も同一事例から検出されたのは 6 事例 (13.0%) であった。GI は計 7 検体から検出され、GII は計 374 検体から検出された。GI が検出された検体は、いずれの検体も GII が検出されており、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 (21 事例) が最も多く、他には仕出し店 (10 事例)、小・中学校・保育所 (6 事例) が多かった (表 1)。食中毒の原因施設になるケースが含まれる飲食店および仕出し店における事例については、GII.4 の検出が半数以上 (飲食店 12 事例、仕出し店 9 事例) を占めた。それに対し、食中毒ではなくヒト-ヒト感染などの感染症が推定された小・中学校・保育所の 6 事例においては、GII.4 の検出は無く、GII.2、GII.3、GII.14 等が主に検出された。

表1. 胃腸炎集団発生事例の発生(原因)施設

発生施設	件数	(%)
飲食店	21	45.7
仕出店	10	21.7
学校・保育所	6	13.0
社員食堂	2	4.3
イベント会場	2	4.3
公共施設	2	4.3
高齢者施設	1	2.2
旅館	1	2.2
病院	1	2.2

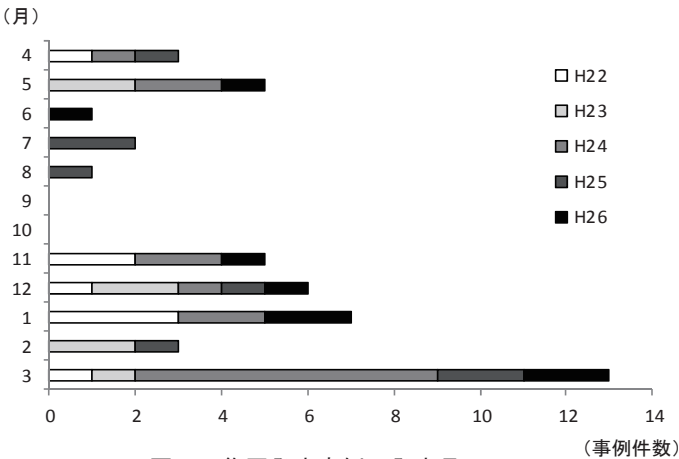


図1 集団発生事例の発生月

表2. 検出されたノロウイルスの遺伝子型

遺伝子型	検出年度(件数)					合計	
	H22	H23	H24	H25	H26	件数	(%)
G I .1		1				1	2.2
G I .2					1	1	2.2
G I .3	1	1				2	4.3
G I .4		1				1	2.2
G I .5	1					1	2.2
G I .6			1			1	2.2
G II .2	3		1	1		5	10.9
G II .3	1	1			4	6	13.0
G II .4	3	3	12	6		24	52.2
G II .6				2	2	4	8.7
G II .12	1					1	2.2
G II .13					1	1	2.2
G II .14	2	3	1			6	13.0
G II .17		1			2	3	6.5

※ 複数の遺伝子型を検出した事例は、当該遺伝子型の全てに数える。

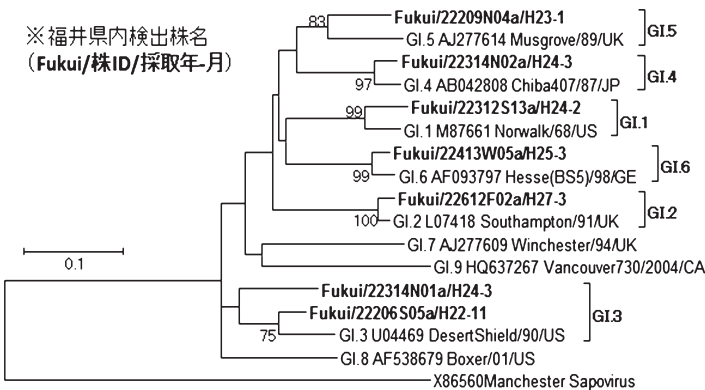


図2 Genogroup I の系統樹解析

また、発生月別では、3月(13事例)が最も多く、5年連続でNoVが検出された(図1)。他には、1月(7事例)、12月(6事例)などNoV流行期にあたる冬季に多かった。一方で、5月(5事例)や7月(2事例)のような春から夏にかけてもNoVが検出される年もあった。全国的には、1月にNoV食中毒のピークが見られることが多い¹⁸⁾が、本県では春にかけて発生が継続または増加しており、全国よりやや遅れて流行する傾向が見られた。そのため、冬のピークをすぎた後もNoVの予防対策は重要であると考えられた。

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、Genogroupごとに系統樹解析を実施した(図2、3)。その結果、GIでは、GI.1、GI.2、GI.3、GI.4、GI.5、GI.6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.6、GII.12、GII.13、GII.14、GII.17の8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が24事例(52.2%)で突出して多く、次点のGII.3およびGII.14の各6事例(13.0%)の約4倍であった(表2)。

検出された各遺伝子型について、発生時期との関連性について調査した。

まずGII.2については、平成22年11月から翌年1月までに検出された株(3事例)と、平成25年3月から4月までに検出された株(2事例)では異なるクラスターに分かれていた。同様に、GII.3についても平成22年11月から翌年3月までに検出された株(2事例)と平成26年11月から翌年1月までに検出された株(4事例)では異なるクラスターに分かれていた。両者とも検出の無かった3~4年の間に変異したために、再び流行するようになったと考えられた。

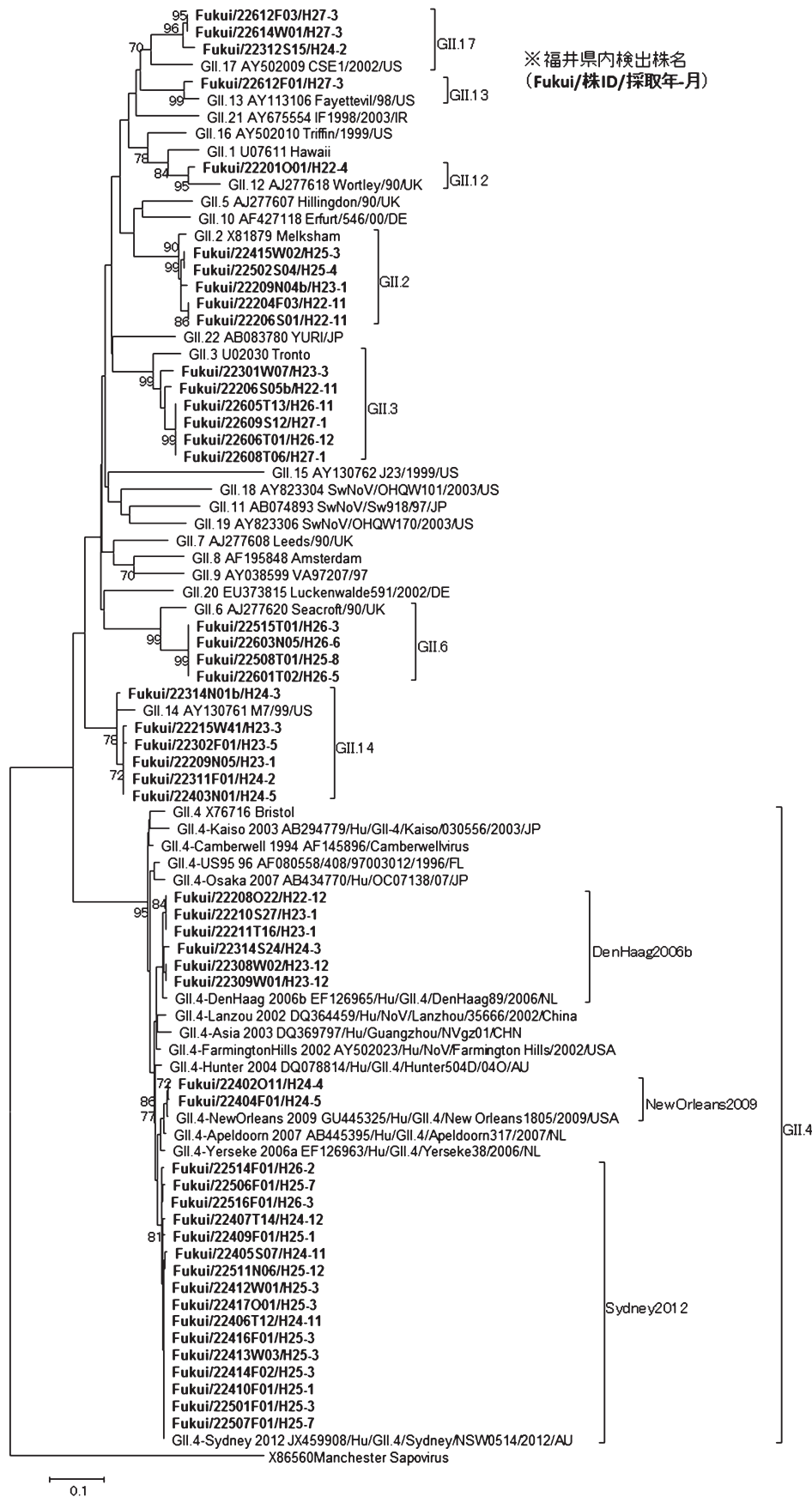


図3 Genogroup II の系統樹解析

一方で、GⅡ.6 および GⅡ.14 については検出年度の違いによるクラスターの違いは見られなかった。GⅡ.6 は平成 25 年 8 月から平成 26 年 6 月の間に検出され、GⅡ.14 は平成 23 年 1 月から平成 24 年 5 月の間に検出された。両者とも検出期間が 1～2 年以内と、GⅡ.2 等と比べて検出期間が短く、大きな変異を起こすには至っていない可能性があり、数年後にはクラスターの異なる変異株が検出される可能性が考えられた。

検出頻度が最も高かった GⅡ.4 について、NoV S.C.が推奨する GⅡ.4 変異株の標準株を用いて系統樹解析を実施した。その結果、平成 22～23 年度に発生した 6 事例は全て Den Haag2006b、平成 24 年度の 4～5 月頃に発生した 2 事例は New Orleans2009、平成 24～25 年度に発生した 16 事例は全て Sydney2012 に分類され、検出されるクラスターが変遷していた。以前検出された変異型が再び検出されるということもなく、新しい変異型に移行していると考えられた。今後の変異の行方が注目される GⅡ.4 であるが、例年最も多く検出されているにもかかわらず、平成 26 年度の集団発生事例からは検出されなかった。このことから、Sydney2012 に対する免疫が獲得された可能性が考えられた。その一方で、免疫逃避のために新たな変異が起きている可能性も考えられた。

GⅡ.4 が検出されない中で、GⅡ.3 や GⅡ.17 が平成 26 年度に数年ぶりに検出されるようになった。今後も検出される遺伝子型が変遷していくと推定されるため、その動向に注視する必要があると考えられた。

4. まとめ

近年 5 ヶ年（平成 22～26 年度）に検査した集団発生 67 事例 839 検体のうち、46 事例 374 検体から NoV 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解析を実施した。その結果、14 種類（GⅠ：6 種類、GⅡ：8 種類）の遺伝子型に分類され、特に GⅡ.4 が多数（24 事例：52.2%）を占めた。検出された GⅡ.2、GⅡ.3、GⅡ.4 は、集団発生時期により主要流行株が異なっており、遺伝子変異を繰り返しながら胃腸炎の流行に関与していることが示唆された。

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) 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、サポウイルス）総論, IASR., **24**, 312-314 (2003)
- 3) 田代眞人他：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 JJ 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**(12),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) 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)
- 15) 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
- 16) Kojima S et al.: Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses, J Virol Methods., **100**, 107-114 (2002)
- 17) Tamra K, et al.: MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods., Mol. Biol. Evol. **28**, 2731-2739 (2011)
- 18) 厚生労働省 食中毒統計資料, 公式 HP http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryou/shokuhin/syokuchu/04.html