

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

酒井妙子・佐藤かおり・平野映子・小木圭子

Genetic Analysis of Noroviruses Detected from Outbreaks in Fukui Prefecture in 2016/2017

Taeko SAKAI, Kaori SATO, Eiko HIRANO, Keiko KOGI

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 G I）、Genogroup II（以下 G II）、Genogroup IV がヒトを宿主とすることが知られているが、G I、G II による感染が主である³⁾。さらに、G I は 9、G II は 22 の遺伝子型が報告されている^{5),6)}。中でも遺伝子型 G II.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 G II.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、G II.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 G II.17 におけるキメラウイルスが検出され¹⁴⁾、それ以降全国的にも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、これまでに 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 28 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 28 年度（平成 28 年 4 月～29 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 27 事例 417 検体を対象とした。検体の種類は、有症者由来の糞便または吐物 143 検体、調理従事者および施設職員由来糞便 114 検体、ふきとり 145 検体、食品 15 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（G I：295nt、G II：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

調査対象の集団発生 27 事例 417 検体のうち、表 1 のとおり 21 事例 138 検体（有症者 113 検体、従事者 20 検体、ふきとり 5 検体）で G II が検出されたが、G I は検出されなかった。NoVG II が陽性となったふきとりの箇所はトイレ便器内側、炊飯器周辺作業台、水切台であった。また食品 15 検体からは NoV は検出されなかった。

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 99.7～100%の相同性を示した。特に、事例番号 22802、22804、22815、22817、22820、22821、22823、22826 の 8 事例については、有症者と調理従事者やふきとり由来の配列が 99%以上一致していた。発生施設は飲食店（10 事例）が最も多く、次いで学校・保育所（4 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、G II.2、G II.3、G II.4、G II.17 の 4 種類の遺伝子型が確認された（図 1、2）。平成 28 年度に検出された NoV の Capsid 領域における塩基配列の相同性は、G II.2 は 97.2%、G II.17 は 99.3%であり、非常に高い相同性を示した（図 2）。

遺伝子型別の検出頻度を比較すると、G II.2 が 14 事例（66.7%）で突出して多く、次いで G II.17 が 5 事例（23.8%）であった（図 1）。

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	食品	ふきとり	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	陽性数/検査数		
22801	2016.4.19	二州 (丹南)	保育園	ヒト-ヒト感染	8 / 10	0 / 2			G II.17	Fukui/22801N17/H28-4
22802	2016.4.19	福井 坂井	飲食店	従事者を介する 食中毒	11 / 11	6 / 24		0 / 8	G II.17	Fukui/22802F9/H28-4
22804	2016.5.21	二州	給食センター	従事者を介する 食中毒	7 / 9	3 / 11	0 / 8		G II.17	Fukui/22804N4/H28-5
22805	2016.6.13	福井	結婚式場	ヒト-ヒト感染	6 / 10	0 / 11			G II.4	Fukui/22805F10/H28-6
22809	2016.11.22	県外	飲食店	不明	2 / 2				G II.3	Fukui/22809F2/H28-12
22810	2016.12.5	二州	飲食店	不明	4 / 5				G II.2	Fukui/22810N2/H28-12
22811	2016.12.6	二州	小学校	ヒト-ヒト感染	3 / 4			0 / 30	G II.2	Fukui/22811N1/H28-12
22812	2016.12.12	県外	飲食店	不明	2 / 2				G II.2	Fukui/22812F1/H28-12
22813	2016.12.11	福井	飲食店	不明	8 / 9	0 / 6		0 / 10	G II.2	Fukui/22813F12/H28-12
22814	2016.12.11	県外	飲食店	不明	1 / 1				G II.2	Fukui/22814N1/H28-12
22815	2016.12.9	若狭	仕出店	ヒト-ヒト感染	12 / 12	3 / 4		0 / 15	G II.2	Fukui/22815W16/H28-12
22816	2016.12.19	二州	小学校 保育園	ヒト-ヒト感染	5 / 5	0 / 3	0 / 7		G II.2	Fukui/22816N12/H28-12
22817	2016.12.21	福井	飲食店	従事者を介する 食中毒	5 / 5	3 / 8		2 / 10	G II.2	Fukui/22817F11/H28-12
22818	2016.12.28	福井	飲食店	ヒト-ヒト感染	4 / 5	0 / 7		0 / 10	G II.2	Fukui/22818S1/H28-12
22819	2017.1.4	二州	旅館	ヒト-ヒト感染	7 / 7	0 / 4		0 / 4	G II.2	Fukui/22819N11/H29-1
22820	2017.1.10	福井	飲食店	不明	3 / 4	1 / 15		0 / 18	G II.2	Fukui/22820F14/H29-1
22821	2017.1.30	福井	飲食店	従事者を介する 食中毒	1 / 2	3 / 6		1 / 10	G II.2	Fukui/22821F1/H29-2
22823	2017.3.1	若狭	社員寮	従事者を介する 食中毒	13 / 15	0 / 0		2 / 10	G II.17	Fukui/22823W4/H29-3
22824	2017.3.20	県外	旅館	不明	1 / 1	0 / 0		0 / 0	G II.2	Fukui/22824F1/H29-3
22826	2017.3.24	丹南	飲食店	従事者を介する 食中毒	4 / 4	1 / 3		0 / 3	G II.17	Fukui/22826T7/H29-3
22827	2017.3.29	福井	中学校	ヒト-ヒト感染	6 / 9	0 / 2		0 / 7	G II.2	Fukui/22827F11/H29-3

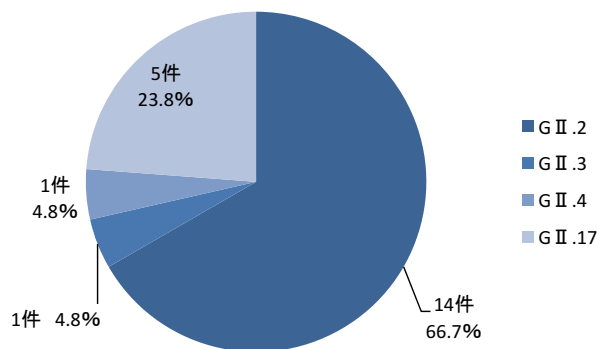


図1 検出されたNoVの遺伝子型

発生月別では、12月（9事例）が最も多く、3月（4事例）、1月（2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28年4月から5月には平成28年1月から3月に引き続き3事例からG II.17が検出された。平成28年6月には1事例からG II.4、11月には関連調査の1事例からG II.3が検出された。平成28年12月から翌年3月には14事例からG II.2、3月には2事例からG II.17が検出された。

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27事例のうち21事例からNoVが検出され、そのうちの6事例が食中毒事件となった(事例番号:22802、22804、22817、22821、22823、22826)。

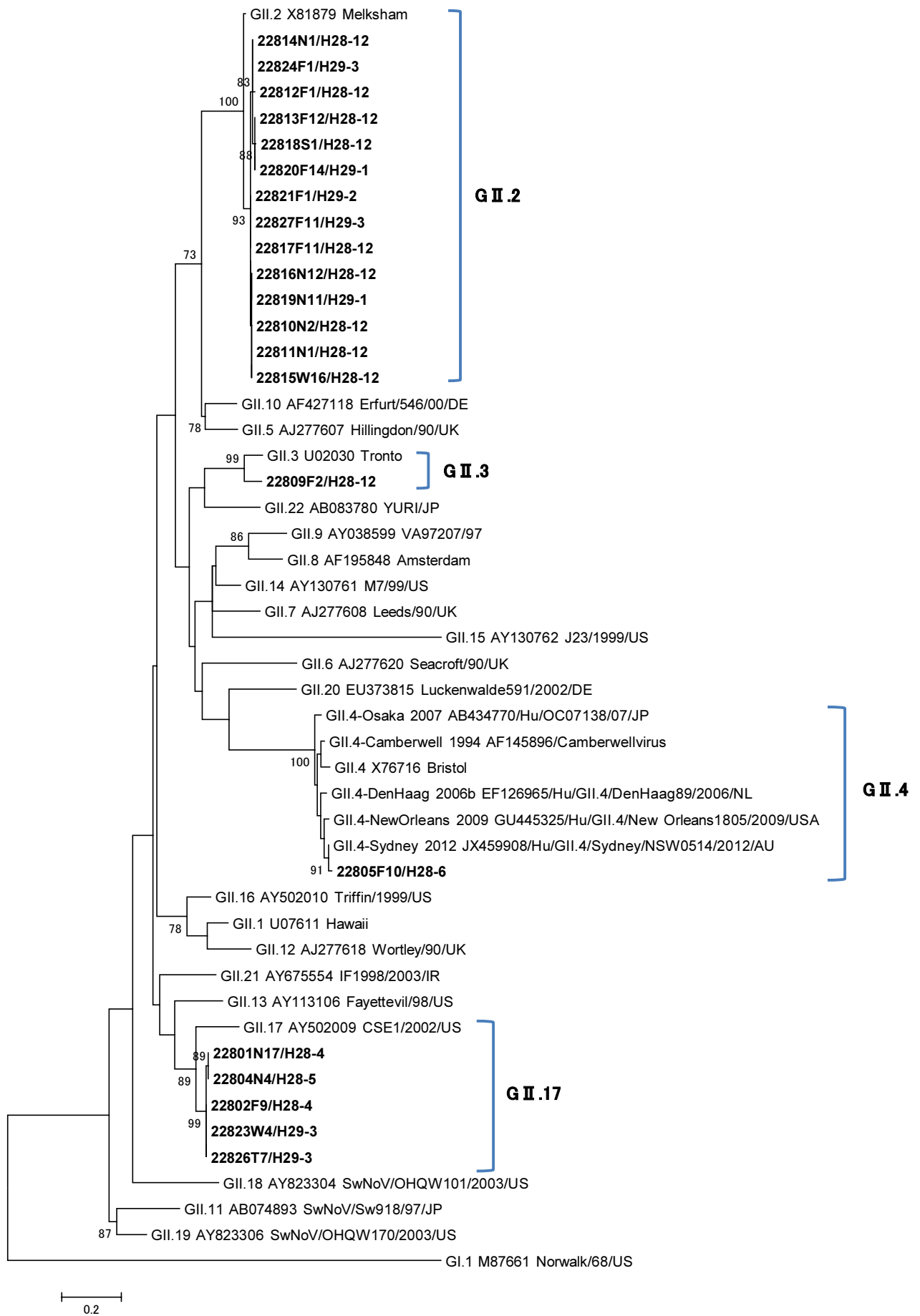
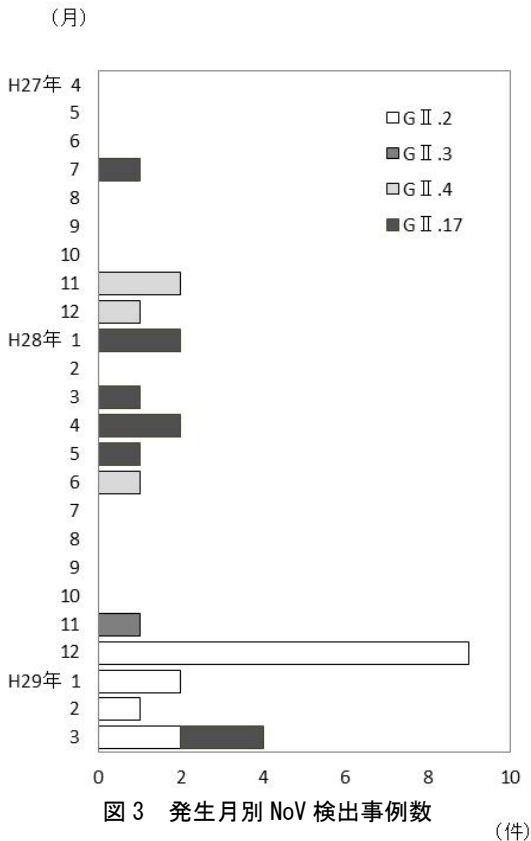


図2 Genogroup II の系統樹解析



このことから、当県においても NoV は集団発生に大きく関与していることが示唆された。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多く、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 28 年度は GII.17、GII.4、GII.3、GII.2 の 4 種類の遺伝子型が検出された。

GII.17 は平成 28 年 4 月から 5 月までの 3 事例と平成 29 年 3 月の 2 事例で検出されており、Capsid 領域における相同性は高かった (99.3%)。川崎市では平成 26 年 3 月の糞便検体より、Hu/GII/JP/2014/GII.P17-GII.17 (以下 GII.17 Kawasaki 2014) の検出が報告され、GII.P17 が新規遺伝子型と認定された。以降、平成 26 年 12 月から平成 27 年 3 月にかけて全国の食中毒事例から類似株の検出が相次いだ。GII.17 Kawasaki 2014 は以前に検出された GII.17 や GII.4 と抗原性が大きく異なることが示唆されている¹⁴⁾。福井県内でも同時期に GII.17 が検出されたことから、県内で流行した GII.17 も GII.17 Kawasaki 2014 類似株であった可能性がある。

GII.4 は平成 28 年 6 月に 1 事例から検出された。小児の散発胃腸炎症例において GII.4 は常に主要な遺伝子型であり¹⁹⁾、2015/16 シーズンにおける小児の散発例胃腸炎患者からの NoV 検出割合は GII 型別不明 (38%) を除くと、GII.4 (31%) が最も多かったとの報告がある²⁰⁾。当センターで検出された 1 事例 (22805) では、式典参加者である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。

GII.2 は平成 28 年 12 月から翌年 3 月までの 14 事例か

ら検出され、平成 28 年度において最も多く検出された遺伝子型であった。県内では平成 26 年以來の検出となった²¹⁾。国内では 2016 年内に宮城県、千葉市において GII.2 による集団発生事例の多発について報告があった^{22),23)}。また、同時期に茨城県と川崎市において検出された GII.2 について詳細な分子疫学解析が行われ、過去に検出された GII.2 株とは遺伝学的性状が異なる変異株 (GII.P16-GII.2) であることが示された²⁴⁾。よってこの遺伝子型に対する感受性者が多く存在し、流行の主流となることが予想された。2016/17 シーズンに検出されている NoV の約半数は GII.2 となっており¹⁵⁾、全国と同様に県内でも GII.2 が流行の主流であった。

平成 28 年度は県内で検出された NoV の遺伝子型に変遷が見られた。NoV 感染により遺伝子型特異的な防御反応が誘導されるが、異なる遺伝子型の NoV 感染は防御できないとの報告もあることから²⁵⁾、今後も検出される遺伝子型の変遷に注視する必要があると考えられる。

5. まとめ

平成 28 年度に検査した集団発生 27 事例 417 検体のうち、21 事例 138 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.17) が検出され、特に GII.2 が多数 (14 事例: 66.7%) を占めた。

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。

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) 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)
- 20) ノロウイルス感染症 2015/16 シーズン, *IASR.*, **38**, 1-3(2017)
- 21) 小和田和誠 他：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), 福井県衛生環境研究センター年報, **13**, 70-73(2014)
- 22) 宮城県内で流行しているノロウイルス (NoV) の遺伝子型について, *IASR.*, **38**, 17-18(2017)
- 23) 2016 年 9～11 月のノロウイルス感染集団発生事例について - 千葉市, *IASR.*, **38**, 18-19(2017)
- 24) 茨城県と川崎市における 2016/17 シーズンに検出されたヒトノロウイルス GII .P16-GII.2 の分子疫学, *IASR.*, **38**, 19-20(2017)
- 25) 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)