

2009/10 シーズンに兵庫県で流行したノロウイルスの 分子疫学による流行実態調査

高井 伝仕* 榎本 美貴 近平 雅嗣

Molecular Epidemiological Analysis of Norovirus Detected from Mass Infection with Gastroenteritis between April 2009 and March 2010 in Hyogo Prefecture

Denshi TAKAI*, Miki ENOMOTO and 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 (NV) is the most common causative agent of outbreaks with gastroenteritis. In this study, a total of 845 samples collected from 97 group infection cases in Hyogo prefecture, between April 2009 and March 2010, were used for NV gene detection. PCR amplified DNA of capsid N terminal/Shell domain (N/S) region was sequenced and utilized for the analysis of molecular epidemiology.

NVs were detected from 66 of 97 group infection cases (positive rate 68%). Genogroup II/genotype 2 (GII/2) and Genogroup II/genotype 4 (GII/4) NV strains were detected from 25 (45%) and 26 (46%) cases respectively from 56 cases of GII group infection.

Detected GII/4 strains were similar to the two kinds of sub-genotype, 2006b and 2008a. 2006b strains were continuously detected from the first epidemic year, and have been still main causative agents in 2009/10 NV season. On the other hand, 2008a may become the main epidemic strain in place of 2006b, because mass outbreaks caused by this strain rapidly increased from the first detection.

Continuous monitoring of the genetic diversity of NVs such as predominant genotype, sub-genotype and recombinant strains is needed for the control of NV infection.

I はじめに

ノロウイルス (NV) は乳幼児から成人まで幅広い年齢層が罹患し、下痢や嘔吐を主症状とする急性胃腸炎を起こすウイルスで、主に冬期に流行する。カキなどの二枚貝を主要な原因食品とするとともに、感染した調理従

事者等からの二次汚染等によって食中毒を起こすウイルスで、毎年多くの事例が報告されている。2010年の食中毒総患者数は全国で25,972人、そのうちNVによる患者数は13,904人で¹⁾、全食中毒患者数の53.5%を占めている。またNVは糞便および吐物中に大量に排出されるため、老人施設や学校などでの集団施設等において、手指や環境を介してヒトからヒトへ伝播する感染症としての側面も大きな問題となっている。

NVは大きく遺伝子群 (Genogroup) I ~ V に分類され、このうち主に Genogroup I (GI) と Genogroup II (GII) の遺伝子群がヒトに感染することが知られてい

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 Number of detected norovirus from group infection cases in Hyogo prefecture (2007/08-2009/10 season)

Type of samples	2007/08 season		2008/09 season		2009/10 season		Total	
	Samples	NV-positive (%)	Samples	NV-positive (%)	Samples	NV-positive (%)	Samples	NV-positive (%)
Stool samples	641	320(50)	474	234(49)	692	303(44)	1807	857(47)
Vomit samples	6	2(33)	0	0	7	1(14)	13	3(23)
Foods	86	4(5)	42	0	32	1(3)	160	5(3)
Wiped samples	107	8(7)	74	1(1)	114	2(2)	295	11(4)
Total	840	334(40)	590	235(40)	845	307(36)	2275	876(39)

る。このG Iはさらに15種、G IIは19種の遺伝子型(genotype)に細分される²⁾。

NVの2006/07流行シーズンは、全国的に集団嘔吐下痢症の大流行がみられ、兵庫県でも食中毒や集団感染事例が多発し、その流行の主体となったNVはG II/4型に分類される遺伝子型であった^{3,4)}。その後の2007/08~2008/09シーズンもG II/4型が流行の主体となっており、我々は兵庫県でも集団嘔吐下痢症事例から検出されたNVは、G II/4型が主流遺伝子型であったことを報告した⁴⁾。

そこで今回、本県におけるNVによる集団嘔吐下痢症の流行実態を把握して、NV対策の一助とすることを目的に、2009年4月から2010年3月の間に検出されたNVの分子疫学的解析を行ったので報告する。

II 材料と方法

1. 調査対象

2009年4月~2010年3月に県内健康福祉事務所から食中毒および集団感染症の原因究明のために当研究所に搬入された、97事例由来の糞便 692 検体、嘔吐物 7 検体、食品 32 検体および拭き取り 114 検体の合計 845 検体から NV の検出を行った。

2. NV 遺伝子の検出

滅菌蒸留水で 10%乳剤とした糞便および嘔吐物の高速遠心上清あるいは食品洗浄液の高速遠心上清を超高速度遠心した沈渣から、厚生労働省通知⁶⁾に準じて 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. NV 遺伝子の塩基配列の解析

リアルタイム PCR で NV 遺伝子が検出された検体から一部を選定して、NV の構造蛋白 (Capsid) 領域の一部を増幅させるプライマー (G I : G1-SKF/G1-SKR および G II : G2-SKF/G2-SKR) を用いて、nested-PCR

法で増幅した標的 DNA をカラム (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN) 精製した。これを、ダイレク トシークエンス反応 (BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequence Kit, Applied Biosystems) を行い、スピнкаラムゲルろ過法で精製後に塩基配列を決定した (ABI 3500 Genetic Analyzer)。得られた塩基配列は、2007/08 および 2008/09 シーズンに行った解析結果と併せて、遺伝子解析ソフトウェアを用いて近隣接合法で分子系統樹を作成、遺伝子型別を行った^{3,4,7)}。

III 結果および考察

1. NV 検出状況

Table 1 に 2007/08~2009/10 流行シーズンの NV 検出状況を示した。

2009/10 シーズンは、糞便、吐物、食品および拭き取りあわせて 845 検体のうち 307 検体 (検出率 36%) から NV が検出された。糞便 692 検体中 303 検体 (44%)、吐物は 7 検体中 1 検体 (14%)、食品は 32 検体中 1 検体 (3%) および拭き取りは 114 検体中 2 検体 (2%) から NV が検出された。

Table 2 に 2007/08~2009/10 シーズンの NV 集団発症数を Genogroup 別に示した。2009/10 シーズンは、NV 感染が疑われた 97 事例のうち、66 事例 (68%) で NV が検出された。2007/08 および 2008/09 シーズンに NV 感染が確認されたのは各々 54 および 43 事例であったが、2009/10 シーズンは 66 事例となり、NV による集団嘔吐下痢症事例が 3 年間で最も多かった。NV 陽性となった

Table 2 Number of norovirus genogroup detected from group infection cases in Hyogo prefecture (2007/08-2009/10 season)

Season	Group infection cases	NV-positive cases	Genogroup		
			G I	G II	G I & G II
2007/08	77	54	4	44	6
2008/09	67	43	4	36	3
2009/10	97	66	5	57	4
Total	241	163	13	137	13

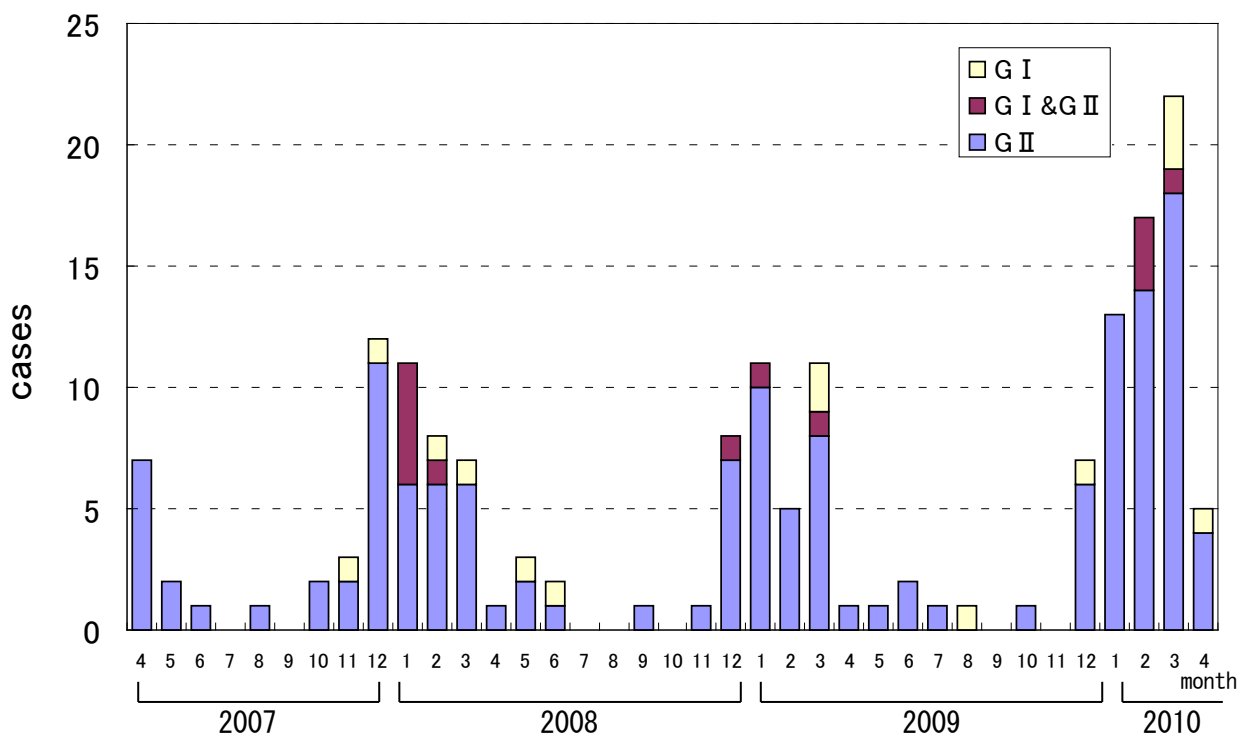


Fig.1 Monthly cases of norovirus group infections in Hyogo prefecture (2007/08-2009/10season)

66 事例のうち G I 単独で検出されたのは 5 事例 (8%), G II 単独は 57 事例 (86%), G I と G II が同時に検出されたのは 4 事例 (6%) であった。

2007~2010 年の NV 検出事例の月別推移を Fig.1 に示した。2009/10 シーズンは 12 月頃から陽性事例が増加し、3 月にピークとなった後急激に減少した。2007/08 および 2008/09 シーズンは、12 月あるいは 1 月が発生のピークになったことに比べると、2009/10 シーズンはやや遅い月にあらわれた。

2009 年は新型インフルエンザ (インフルエンザ (H1N1) 2009) が出現し、6 月~12 月にかけて大きく流行しており、NV 流行はこのインフルエンザの感染者数の減少に反比例する形で流行が始まった。これはインフルエンザ対策として行った頻繁な手洗い等が NV 流行の抑制に効果があったのか、あるいは他の要因が関与したのか今後検討する必要がある。

2. NV 遺伝子の塩基配列の解析

Table 3 に 2007/08 シーズン~2009/10 シーズンで遺伝子型を同定した集団発生数の月別推移を示した。2009/10 シーズンに検出した G I で、塩基配列を解析した 8 事例では、G I /4 型が 6 事例 (75%), G I /7 型が 1 事例 (13%), G I /14 型が 1 事例 (13%) であった。

G I /4 型は 2007/08 シーズンに 3 事例から検出され、2008/09 シーズンには検出されなかったが、2009/10 シ

ーズンでは再び 6 事例から検出された。G I /8 型は 2007/08 シーズンに 1 事例、2008/09 シーズンに 2 事例から検出されたが、2009/10 シーズンは検出されなかった。また、2007/08 シーズン、2008/09 シーズンに検出されなかった G I /7 型および G I /14 型が 2009/10 シーズンでは 1 事例ずつ検出された。

2009/10 シーズンの G II 陽性事例で、塩基配列を決定した 56 事例中、G II /4 型は 26 事例 (46%), G II /2 型は 25 事例 (45%), G II /3 型は 3 事例 (5%), G II /7 型は 1 事例 (2%), G II /13 型は 1 事例 (2%) であった。

2009/10 シーズンも 2007/08~2008/09 シーズン同様、G II /4 型による集団発生が多くを占めた。その一方で、過去 2 シーズンで合計 2 事例しか検出されなかった G II /2 型が、2009/10 シーズンでは 25 事例と急増した。全国のノロウイルス検出状況でも、2009/10 シーズンは G II /2 型の検出数が急増しており²⁾、G II /4 型とともに G II /2 型による流行が新たに全国的な広がりを見せていると考えられた。

兵庫県では 2009/10 シーズンは過去 2 シーズンより NV の集団発生数が多かったが、これは G II /4 型に加えて新たに G II /2 型が流行に加わってきたことがその一因と思われる。G II /2 型および G II /4 型以外では、散発的な地域流行として複数の遺伝子型が認められたものの、継続した流行株とはなり得ていない。ただし、今回の G

Table 3 Monthly transition of norovirus group infection cases clarified genotypes in Hyogo prefecture (2007/08-2009/10 season)

Genotype	2007/08 season										2008/09 season														
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	total	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
GI/1																								1	1
GI/3														1									1	1	3
GI/4									1	2		3													
GI/7																									
GI/8											1	1			1								1	2	
GI/14																									
GII/2														1									1	2	
GII/3										2	2	1	5												
GII/4	5	1	1			2	1	9	7	3	2	31		1				1	1	3	5	4	3	18	
GII/6																						1	2	3	
GII/7																									
GII/13	1	2										3													

Genotype	2009/10 season												
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	total
GI/1													
GI/3													
GI/4					1				1	2	2	6	
GI/7											1	1	
GI/8													
GI/14												1	1
GII/2			1	1					3	4	12	4	25
GII/3		1	1						1				3
GII/4						1		1	8	4	12	26	
GII/6													
GII/7									1			1	
GII/13												1	1

II/2型の流行状況を見ても、これらが来シーズン以降の流行株の主体を占めることも考えられ、注視する必要がある。

2009/10シーズンに26事例から検出したGII/4株について、Capsid領域の一部の領域についての系統解析を行った(Fig.2)。26事例中17事例は、GII/4 2006b亜株(2006b)との相同性が高かった。2006b株は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GII/4亜株であり⁸⁾、兵庫県において2007/08~2008/09シーズンにGII/4型に分類されたすべての株は、この2006b近縁株であった⁹⁾。2009/10シーズンも2006b近縁株による集団発生が多く見られ、依然としてこの株の浸潤・拡散が継続していることが確認された。2006b株が長期にわたって流行株の主体を占める要因として、この株と感受性細胞との親和性の高さが関与していることなども考えられ、その原因究明のために詳細な検討が必要である。

一方、これら以外の9事例は2006b株とは異なるクラスターを形成し、2007年12月にオランダでGII/4型の新亜株として報告されたApeldoorn317/2007/NL(AB445395)と相同性が高かった(98.4%~99.2%)。この株に近縁なGII/4亜株はMotomuraらにより2008a



Fig.2 Phylogenetic analysis of capsid N/S region of NV GII/4 strains in Hyogo prefecture (2009/10 season)

GII/4 subtype(2008a)として報告されており⁹⁾、これらの9事例は2008a株と相同性が高いことが明らかになった。

今回検出された2008a近縁株は、NV感染症の流行シーズンである12月~3月の各月で検出が確認され、発生地域に偏りは見られなかった。これらのことから、北海道、大阪府、愛知県など国内各地において存在が確認されている²⁾2008a近縁株が、兵庫県においても広く浸潤していることが示唆された。今後この株が2006bに変わ

る新たな流行株となるか、もしくは新たな変異を付加した株となって流行するのか注視する必要がある。このような新たに出現する株の流行動態を把握するためにも、継続した分子疫学的調査による監視が必要である。

今後詳細な遺伝子解析によって新たな流行株の出現を把握することは、NVによる下痢症の予防に重要な情報になると考えられる。

IV 要旨

2009年4月から2010年3月の間に、兵庫県においてNV感染が疑われた97集団嘔吐下痢症事例由来の845検体について調査し、66事例(68%)がNV陽性であった。

県下のNV流行の主流遺伝子型はGII/2型およびGII/4型で、それぞれ25事例および26事例から検出された。GII/4型26事例中9事例は、GII/4型の新亜株として報告された2008a株の類似株であった。

継続的なNVの遺伝子解析によって、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) 厚生労働省ホームページ (URL <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html>), 平成22年病因物質別月別食中毒発生状況より抜粋
- 2) 国立感染症研究所感染症情報センター: IASR 病原体微生物検出情報 (月報), **31**, 第11号, 312~322 (2010)
- 3) 国立感染症研究所: IDWR 感染症発生動向調査週報, **6**, 第11号, 14-19 (2004)
- 4) 国立感染症研究所感染症情報センター: IASR 病原体微生物検出情報 (月報), **28**, 第10号, 277~285 (2007)
- 5) 高井伝仕, 榎本美貴, 近平雅嗣: 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). 兵庫県立健康生活科学研究所健康科学研究センター研究報告, 第1号, 9~12 (2010)
- 6) 厚生労働省医薬食品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. 平成15年11月5日, 食安監発1105001号 (2003)
- 7) Katayama, K., Shirato-Horikoshi, H., Kojima, S., Kageyama, T. and Oka, T.: Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. *Virology*, **299** (2), 225~239 (2002)
- 8) Siebenga, J. J., Vennema, H., Renckens, B., de Bruin, E., van der Veer, B., Siezen, R, J. and Koopmans, M.: Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J Virol*, **81**, 9932~9941 (2007)
- 9) Motomura, K., Yokoyama, M., Ode, H., Nakamura, H., Mori, H., Kanda, T., Oka, T. and Katayama, K.: Divergent evolution of norovirus GII/4 by genome recombination from May 2006 to February 2009 in Japan. *J Virol*, **84**, 8085~8097 (2010)