

26. 成人を含めた散発性胃腸炎患者における 下痢症ウイルスの動向調査

足立 聡 (旧所属 静岡県環境衛生科学研究所)
(現所属 静岡県西部食肉衛生検査所)
山田俊博 (静岡県環境衛生科学研究所)
長岡宏美 (静岡県環境衛生科学研究所)
栗田 泉 (静岡県島田市立島田市民病院)

【 目 的 】

ウイルス性胃腸炎は主に冬季に流行し、特にノロウイルスによる胃腸炎集団発生は近年社会的にも注目され、その予防対策が緊急な課題となっている。現状では、ウイルスの流行規模を予測することは難しいが、シーズン末期あるいは非流行期の患者から検出されるウイルス株が、次期シーズンの流行ウイルスとなっている可能性が指摘されている。さらに、これまで散発性胃腸炎の原因ウイルスとされていたサポウイルスやC群ロタウイルスによる集団発生もしばしば報告されていることから、これらによる県内の散発性患者の発生動向を監視する必要がある。しかし、静岡県内の感染症発生動向調査事業における「感染性胃腸炎」の病原体サーベイランス情報は、現状では十分と言えない。したがって、成人を含めた散発性胃腸炎患者からの下痢症ウイルスの検索を積極的に行い、県内のウイルス検出動向およびその流行疫学について解析し、今後のウイルス性胃腸炎の流行予測に資することを目的とする。

【 方 法 】

- 1 検査材料：2008年5月～2009年5月に、県内のS市民病院に来院した感染性胃腸炎患者由来の糞便（または直腸スワブ）乳剤のうち、病院の臨床検査室にて細菌学的検査が陰性であったもの計371検体を対象とした。
- 2 検査方法：検索対象としたウイルスは、ノロウイルス（NoV G₁、G₂）、サポウイルス（SaV）、アストロウイルス（AstV）、A群ロタウイルス（ARV）、C群ロタウイルス（CRV）、アデノウイルス（AdV）で、これらすべてを遺伝子学的に検索した。ウイルスRNAおよびDNAの抽出にはQIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN）を使用し、抽出RNAはDNase I（Takara）処理後、Random Hexamer（Amersham）およびSuper Script（invitrogen）を用いて逆転写、cDNAを合成した。NoV G₁、G₂は「ノロウイルスの検出法について」（平成15年11月5日付け食安監発第1105001号）に準じて

TaqMan リアルタイム PCR 法にて検査を行い、SaV および AstV は H.Yan らの方法 (J.Virol.Meth.114:37-44,2003) に準じて Duplex PCR により検査し、さらに、ARV、CRV、AdV は H.Yan らの方法 (J.J.A.Inf.D.78:699-709,2004) に準じてマルチプレックス PCR 法により検査を実施した。リアルタイム PCR 法により陽性となった NoV G₁、G₂ の一部は、RT-PCR 法によりキャプシド領域を増幅し、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定後、片山らの方法により系統樹解析を行い、Genotype を決定した。また、SaV についても同様に PCR 産物をダイレクトシーケンスし、Genogroup を決定した。さらに NoV については、2008 年 1 月から 2009 年 2 月までの間に環境衛生科学研究所にて検出された集団発生事例株と遺伝子学的に比較検討した。

【 結果及び考察 】

計 371 検体のうち、73 検体 (19.7%) からウイルス遺伝子が検出された。最も多く検出されたのが NoV G₂ で 29 検体、次に AdV で 24 検体であり、続いて ARV、NoV G₁ の順であった。SaV や AstV はほとんど検出されず、CRV は全く検出されなかったことから、これらのウイルスが感染性胃腸炎の原因物質として占める割合は低いものと考えられた。また、NoV G₂ と AdV との混合感染、NoV G₂ と ARV の混合感染がそれぞれ 1 検体ずつ見られた。

次に、ウイルスの月別検出状況を見ると、最も多く検出されたのが 12 月の 17 検体であり、その半数は NoV G₂ であった。NoV G₂ の検出時期は 12 月から 2 月に集中していた。ARV は 12 月に 3 検体から検出されたが、4 月や 5 月にも比較的検出されてくる傾向が見られ、NoV G₂ に遅れて流行していたように見受けられた。一方、AdV は 6 月と 7 月の初夏に多く検出されており、NoV や ARV とは流行時期が明らかに異なっていた (表 1)。これらのことから、各ウイルスの流行には季節的特徴があるように推察された。

表 1 ウイルスの月別検出状況

| 採取年月 | 2008 | | | | | | | | 2009 | | | | | 計 |
|---------------------|------|------|------|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| 検体数 | 27 | 81 | 42 | 33 | 42 | 32 | 12 | 36 | 20 | 22 | 5 | 10 | 9 | 371 |
| NoV G ₁ | 2 | 1 | | | | | | 1 | 1 | 1 | | | | 6 |
| NoV G ₂ | 1 | | | | | 1 | 2 | 9 | 6 | 8 | 1 | 1 | | 29 |
| SaV | | 1 | | | | | | | | | | | | 1 |
| AstV | 1 | | | | | | | 1 | | | | | | 2 |
| ARV | | | | | | | | 3 | | 1 | 1 | 2 | 2 | 9 |
| CRV | | | | | | | | | | | | | | 0 |
| AdV | 1 | 8 | 5 | 2 | 4 | 1 | | 2 | | | | 1 | | 24 |
| G ₂ +AdV | | | | | | | | 1 | | | | | | 1 |
| G ₂ +ARV | | | | | | | | | | 1 | | | | 1 |
| 計 | 5 | 10 | 5 | 2 | 4 | 2 | 2 | 17 | 7 | 11 | 2 | 4 | 2 | 73 |
| % | 18.5 | 12.3 | 11.9 | 6.1 | 9.5 | 6.3 | 16.7 | 47.2 | 35.0 | 50.0 | 40.0 | 40.0 | 22.2 | 19.7 |

ウイルスの年齢区分別検出状況では、検体数の最も多かった1 - 10歳未満で52検体と最も多く検出され、検出率は28.6%であった。続いて検出率が高かったのが20 - 40歳未満で18.0%であり、1歳未満、40 - 60歳未満および60歳以上では検出率は同程度であった。10 - 20歳未満では全く検出されなかった。また、1 - 10歳未満ではNoV G とAdVが多く検出され、その比率は同程度であり、他の年齢ではNoV G が最も多く検出されていた。なお、AdVやARVは主に小児における感染性胃腸炎の原因物質とされているが、今回、成人からも検出されていたことから、食中毒あるいは老人ホーム等における胃腸炎集団発生時の原因物質検索の際には、これらも念頭に置く必要があると考えられた(表2)。

表2 ウイルスの年齢区分別検出状況

| 年齢区分 | <1 | 1-10 | 10-20 | 20-40 | 40-60 | 60< |
|-----------|------|------|-------|-------|-------|------|
| 検体数 | 47 | 182 | 26 | 50 | 21 | 45 |
| NoV G I | 1 | 2 | | 2 | 1 | |
| NoV G II | 2 | 18 | | 5 | 1 | 3 |
| SaV | | 1 | | | | |
| AstV | | 2 | | | | |
| ARV | | 8 | | | | 1 |
| CRV | | | | | | |
| AdV | 1 | 21 | | 1 | | 1 |
| G II +AdV | | | | 1 | | |
| G II +ARV | 1 | | | | | |
| 計 | 5 | 52 | 0 | 9 | 2 | 5 |
| % | 10.6 | 28.6 | 0.0 | 18.0 | 9.5 | 11.1 |

今回検出されたNoVのうち、これまでに部分カプシド領域の塩基配列を決定し、系統解析によりGenotypeを決定しているものはNoV G 3株、NoV G 5株の計8株である(表3)。NoV G は全てG /4であり、さらに決定した部分塩基配列は3株とも完全に一致していた。NoV G はG /4が3株、G /6が2株であった。また、2008年6月に1歳の患者から検出されたSaVのGenogroupは1型であった。本県ではSaVによる食中毒事件が2007年12月に初めて確認され、さらに2008年3月から4月にかけてF保健所管

表3 NoVのGenotype検出状況

| No. | 採取年月 | 年齢(歳) | Genotype |
|-----|--------|-------|----------|
| 1 | 2008/5 | 46 | G I /4 |
| 2 | 2008/5 | 4 | G I /4 |
| 3 | 2008/6 | 35 | G I /4 |
| 4 | 2009/1 | 1 | G II /4 |
| 5 | 2009/2 | 31 | G II /6 |
| 6 | 2009/2 | 8 | G II /6 |
| 7 | 2009/2 | 1 | G II /4 |
| 8 | 2009/2 | 76 | G II /4 |

内で3件の施設内集団発生があり、これら検出株について遺伝子解析による疫学的検討を行ったところ、Genogroupはすべて4型であり、決定した部分塩基配列も完全に一致していた。SaVは今回1件検出されたのみであり、さらに2008/2009シーズンは集団発生も確認されていないことから、Genogroup 1型による感染は散発的発生にとどまり、また4型によるさらなる感染の拡がりは起きていないことが示唆された。

次に、県内における NoV の集団発生状況について月別・施設別にまとめた。2008 年 1 月から 2009 年 2 月までに NoV の集団発生件数は 74 件あり、最も多かったのが 2008 年 1 月の 15 件であった。2008 年前期は老人ホーム、飲食店等における発生が多かったが、2008 年後期は保育園や学校における発生が多く、2009 年になって老人ホームにおける発生が増加した（図 1）。

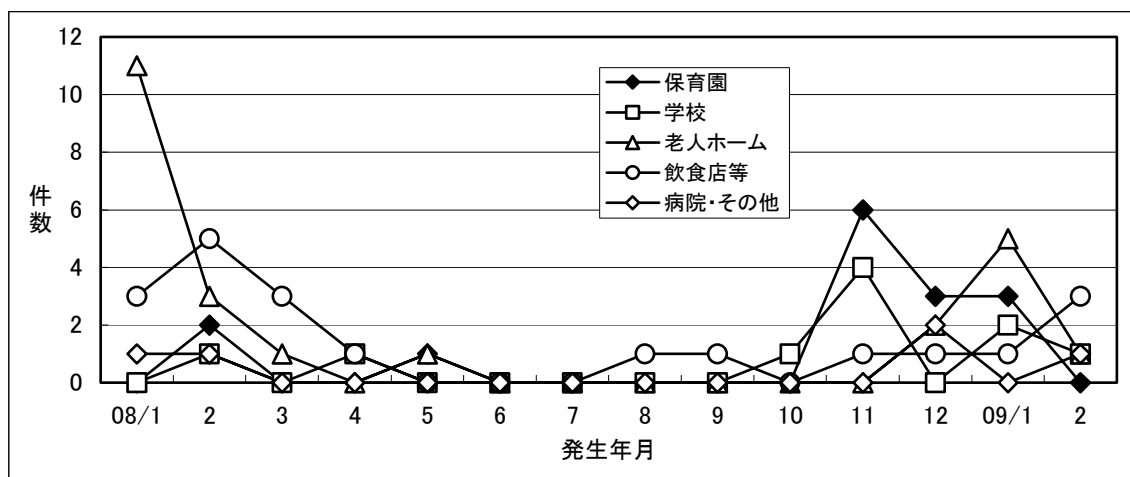


図 1 月別・施設別 NoV 集団発生状況

また、集団発生事例 74 件のうち、これまでに 53 件について Genotype を決定した（表 4）。2008 年前期は G I /4 による発生が多く見られ、後期は G I /3 による発生が多くなり、2009 年になって再び G I /4 による発生が増加した。これは老人ホームにおける発生が G I /4 に起因したものがほとんどであったが、保育園や学校では G I /3 や G I /6 による発生であったことが関連していた。また、このことから各 Genotype に対する感受性は年齢により異なっている可能性が示唆された。

表 4 NoV 集団発生事例における月別 Genotype 検出状況

| Genotype | 2008 | | | | | | | | | | | | 2009 | | 計 | |
|----------|------|----|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|------|---|---|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 1 | 2 | | |
| G I /3 | | | 1 | | | | | | | | | | | | | 1 |
| G I /4 | | 1 | | 2 | | | | | | | | | | | | 3 |
| G I /8 | | 1 | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| G II /3 | | 1 | | | | | | | | 6 | 4 | | | | | 11 |
| G II /4 | 10 | 7 | 3 | | 1 | | | | | | | 2 | 7 | 1 | | 31 |
| G II /6 | | | | | | | | | | 3 | 1 | | 1 | | | 5 |
| G II /13 | | | | | | | | | | | 1 | | | | | 1 |
| 計 | 10 | 10 | 4 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 7 | 8 | 1 | | 53 |

さらに、各 Genotype の散発事例検出株と集団発生事例検出株との塩基配列を比較した

ところ、G /4 は散発事例 3 株と集団発生事例株との相同性が 99%以上であった。G /6 の散発事例 2 株も集団発生事例株と 99%以上の相同性を示した。G /4 の集団発生事例株は 2008 年前期における検出株、2009 年になって多く検出されてきた株のいずれも 06/07 シーズンに大流行した G /4 の変異型 2006 b と近縁であり、それらに大きな変異は認められなかった。さらに散発事例 3 株のいずれも変異型 2006 b と近縁で、集団発生事例株と極めて類似していた。

08/09 シーズンは、2009 年 2 月までに県内で発生したウイルス性集団胃腸炎の原因ウイルスの全てが NoV G であり、その発生件数は例年と比較して少なかった。また、その Genotype は全て G /4 の変異型 2006 b と近縁であり、年間を通して大きな変異が見られていなかったことから、流行が比較的小規模に推移したと考えられた。さらに、08/09 シーズン流行前に、散発性患者からウイルスが際立って検出されていなかったことも併せて考えれば、流行シーズン前の散発性患者の発生動向・病原体サーベイランスに重点を置くことにより、流行の規模をある程度推測することは可能であると思われた。

【 経費使途明細 】

| | |
|--------------------------------|-----------|
| PCR 反应用酵素 (Takara) | 22,050 円 |
| リアルタイム PCR 反応試薬 (ABI、インビトロジェン) | 170,957 円 |
| ウイルス RNA 抽出キット (QIAGEN) | 110,670 円 |
| 逆転写酵素試薬 (インビトロジェン) | 109,809 円 |
| TaqMan プローブ (ABI) | 47,250 円 |
| クライオチューブ (NUNC) | 19,278 円 |
| データ印刷機 (EPSON) | 17,829 円 |
| 振込み手数料 | 2,205 円 |
| 合 計 | 500,048 円 |