

46. 奈良県で発生したノロウイルス散発事例の 遺伝子学的解析調査

○米田正樹（奈良県保健環境研究センター）

【はじめに】

我が国ではノロウイルスを原因とする感染性胃腸炎が、特別養護老人ホーム、介護老人施設および学校施設等の集団生活の場で急増している。体力や免疫力の低下した高齢者にとってこのウイルス感染は死亡の危険性を増加させることから社会的に関心の高い問題となっている。奈良県においても、ノロウイルスを原因とする集団感染症が増加傾向にあり、感染症発生時の危機管理対策の充実が急がれる。

本研究は、2009/2010 シーズンに奈良県の感染症発生動向調査事業で検出されたノロウイルスの分子生物学的解析を実施し、患者年齢および検体採取地域等の情報とあわせて疫学的調査を行うことで流行状況を明らかにした。さらに、全国的に大流行した 2006/2007 シーズン以降のデータと併せて、4シーズンにおける奈良県内のノロウイルス遺伝子型の変遷を把握し、感染症健康危機管理対策の一助となる新しい情報を提供することを目的とする。

【材料および方法】

材料は、奈良県感染症発生動向調査事業によって県内病原体定点医療機関で 2009 年 9 月から 2010 年 8 月に感染性胃腸炎患者の糞便検体から検出されたノロウイルス株 40 株（G I 型 4 株、G II 型 36 株）を対象とした。QIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN）を用い添付のプロトコールに従って 10%糞便懸濁上清 140 μ l からウイルス RNA を抽出し、キャプシド領域についてプライマー（G I 型:COG I F、G I -SKR、G II 型:COG II F、G II -SKR）¹⁾を用いて得られた DNA 断片についてダイレクトシーケンス（BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems）で塩基配列を決定した後、NJ 法によりウイルス遺伝子型の識別を行った。患者情報と遺伝子型から、流行期、年齢分布、医療圏別発生状況の解析を行った。また G II/4 に分類された株については P2 ドメインをプライマー（G II -5a、G II -2Ra）²⁾で増幅し、決定した塩基配列について NJ 法によりクラスター解析を実施した。

【結果】

1) 流行期

検索対象としたノロウイルスの検体採取時期は、11 月が 1 例（2.5%）、12 月が 10 例（25%）、1 月が 13 例（32.5%）、2 月が 7 例（17.5%）、3 月が 5 例（12.5%）、5 月が 1 例（2.5%）および 6 月が 3 例（7.5%）で 1 月をピークとする緩やかな一峰性を示した。

2) 年齢分布および遺伝子型解析

年齢別の遺伝子型発生頻度を表 1 に示す。40 例の年齢分布は、0 歳から 2 歳が 24 例 (60%)、3 歳から 6 歳が 10 例 (25%) および 7 歳以上が 6 例 (15%) で、0 歳から 6 歳までの乳幼児が全体の 85% を占めた。遺伝子型解析結果は、G I /4 が 2 例 (5%)、G I /8 が 2 例 (5%)、G II /2 が 13 例 (32.5%)、G II /3 が 1 例 (2.5%) および G II /4 が 19 例 (47.5%)、G II /3 が 3 例 (7.5%) であった。

調査対象期間中の流行の主体は G II /2 および G II /4 で、患者年齢分布においては G II /4 は 0 歳から 2 歳で 19 例中 16 例 (84.2%) であったのに対し、G II /2 は 2 歳から 4 歳で 13 例中 7 例 (53.8%) と年齢分布に差が見られた。

3) 医療圏別発生状況

奈良県の医療圏は北和、中和および南和に区分される。各医療圏での遺伝子型別発生数は、北和医療圏では 3 例のうち G II /2 が 1 例 (33%)、G II /4 が 2 例 (67%)、中和医療圏では 28 例中 G I /4 が 2 例 (7%)、G I /8 が 2 例 (7%)、G II /2 が 10 例 (36%)、G II /3 が 1 例 (4%)、G II /4 が 12 例 (43%)、G II /13 が 1 例 (4%)、そして南和医療圏では 8 例中 G II /2 が 2 例 (25%)、G II /4 が 4 例 (50%)、G II /13 が 2 例 (25%) であった (表 2)。また県外在住の患者から G II /4 が 1 例あった。

4) G II /4 の系統樹解析

検出数の最も多い G II /4 についてキャプシド領域の塩基配列による系統樹解析を行った結果を図 1 に示した。解析が可能であった 16 株のうち 12 株 (□で囲った) が 2006/2007 シーズンに大流行した 2006b 変異類似株であったが、4 株 (←で示した) については 2006b 変異株とは異なる部位にクラスターを形成した。そこで、最も変異に富むといわれる P2 領域を含む可変領域について塩基配列を決定し (解析不可能であった 1 株を除く) 同様に系統樹解析を行ったところ、この 4 株は NSW001P/2008/AU 株と同じクラスターに分類された (図 2)。

表 1. 患者年齢別ノロウイルスの遺伝子型別発生頻度

年齢 (歳)	G I		G II				合計	
	4	8	2	3	4	13		
0				1	4		5	6%
1		1	1		11	2	15	
2			3		1		4	
3			1				1	25%
4			4		2		6	
5		1					1	
6			1			1	2	
7					1		1	15%
8			1				1	
9							0	
10			1				1	
11							0	
12	1						1	
13-	1		1				2	
合計	2	2	13	1	19	3	40	

表 2. 医療圏別遺伝子型発生頻度

医療圏	G I		G II				合計
	4	8	2	3	4	13	
北和			1		2		3
中和	2	2	10	1	12	1	28
南和			2		4	2	8
県外					1		1
合計	2	2	13	1	19	3	40

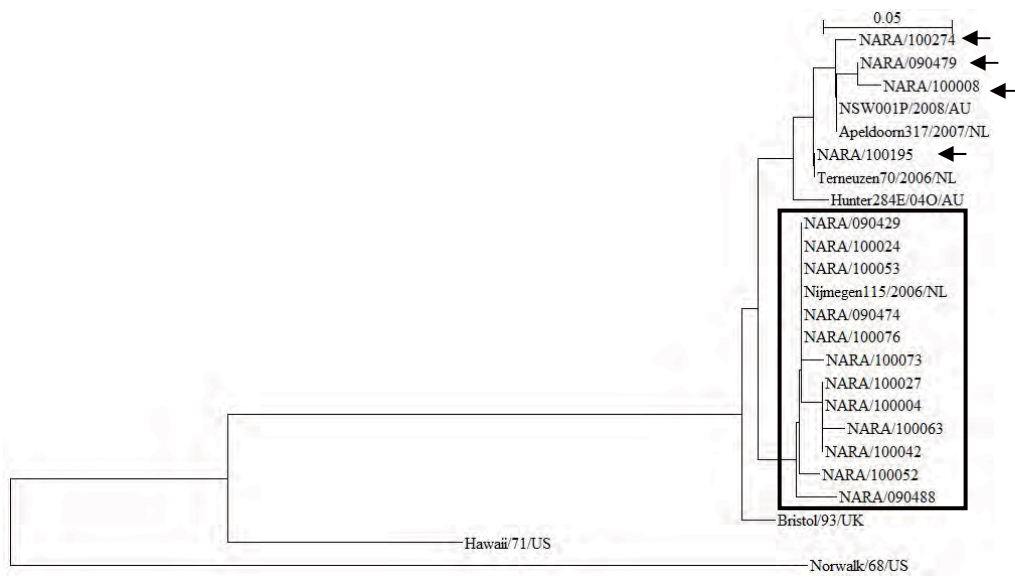


図 1. 奈良県で検出された GII/4 の capsid 領域の塩基配列による系統樹

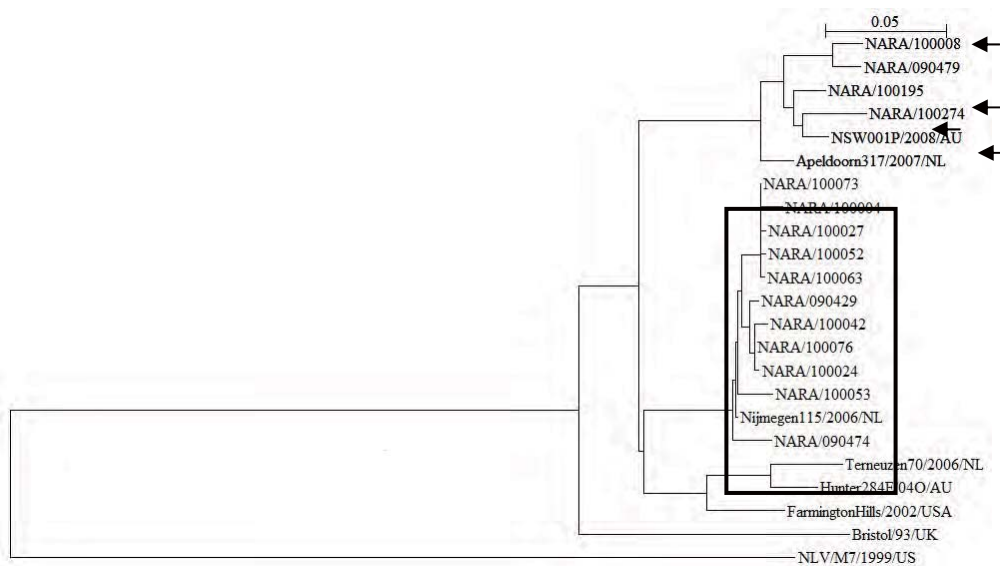


図 2. 奈良県で検出された GII/4 の P2 領域の塩基配列による系統樹

[考察]

集団感染を誘発させるノロウイルスの遺伝子学的特徴を捉えるため、比較対照として乳幼児・小児を中心とした感染症発生動向調査事例から、分子疫学的解析により奈良県内におけるノロウイルス散発事例の流行状況を明らかにした。

当センターにおけるこれまでの調査から、2006/2007 シーズン以降本県で流行したノロウイルスの流行の主体は全国と同様で GⅡ/4 であることが判明している^{3),4)}。GⅡ/4 の発生頻度をシーズン毎に観察すると、2006/2007 シーズンは 92.9%、2007/2008 シーズンは 84.6%と 80%以上の高頻度であったが、その後 2008/2009 シーズンは 64.0%と減少し、今回の調査で新たに 47.5%と、減少傾向が顕著になっていることが明らかとなった。2007 年 12 月にオランダで GⅡ/4 の新亜株として報告された Apeldoorn317/2007/NL に近縁な GⅡ/4 亜株が、2008 年 11 月に新潟県内で発生した集団胃腸炎患者から検出され、Motomura らによって 2008a 変異株と命名されている^{5),6)}。キャブシド領域における 2009/2010 シーズンに検出された GⅡ/4 の系統樹(図 1) から 2006b 変異類似株が否定された株が観察されたことから、今回本県で初めて P2 領域の系統樹解析を実施した(図 2)。その結果、2006b 変異類似株が否定された株は全て NSW001P/2008/AU と同じクレードを形成し、本県においても 2006b 変異類似株以外の亜株の流行が確認された。このことから本県における GⅡ/4 の流行は、2006/2007 シーズンの 2006b 類似株の大流行以降 2008/2009 シーズンまでの 3 シーズンは 2006b 変異類似株ほぼ一色であったのが、2009/2010 シーズンになって新たな変異類似株との混合流行に移行したと推察される。今後、今回確認された変異類似株を含め新たな変異株の発生動向には注意が必要であると考えている。

一方、2009/2010 シーズンでは GⅡ/4 が減少傾向にある中、GⅡ/2 の発生頻度が 32.5%(40 例中 13 例)と急上昇していた。同シーズンの全国データでも GⅡ/2 が 36%、GⅡ/4 が 42%と報告されている⁷⁾。また今回の調査では、患者情報から GⅡ/4 は 0 歳から 2 歳で 84.2%であったのに対し、GⅡ/2 は 2 歳から 4 歳で 53.8%と年齢分布に差が見られた。全国では GⅡ/2 検出例は GⅡ/4 検出例に比べて 3~19 歳の割合が大きいと報告されている⁷⁾ことから、2009/2010 シーズンの本県における散発事例は、全国とほぼ同じ比率で GⅡ/2 と GⅡ/4 が混合流行するとともに、GⅡ/2 型と GⅡ/4 の患者年齢分布についても、全国とほぼ同様の傾向にあったと示唆される。

県内で発生したノロウイルス散発事例の流行状況を医療圏別に見ると、2009/2010 シーズンについては北和、中和、南和医療圏においてそれぞれ GⅡ/2 および GⅡ/4 が検出されており医療圏別では遺伝子型の偏りはないと考えられた(表 2)。また過去 4 シーズンにわたる遺伝子型の変遷は、いずれの医療圏においても 2008/2009 シーズンまでは GⅡ/4 が高頻度で発生していることをこれまでの調査で確認しており、2009/2010 シーズンは GⅡ/2 と GⅡ/4 の混合流行であったことから、過去 4 シーズン県下全域で一様な変遷をたどっていることが確認された。

本報告は、分子疫学的手法を用いて本県で発生したノロウイルス散発事例の流行状況を詳細に解析したものである。GⅡ/4 の遺伝子型が占める割合の減少とともに、GⅡ/4 に占める 2006b 変異類似株以外に新しく変異類似株が出現したことから、今後は、検索例数を増やし、かつ患者情報を併せた総合的な解析を行い、ノロウイルス遺伝子型の発生動向に注意を払う必要があると考

える。

【謝辞】

本研究をとりまとめるにあたり、研究助成を頂きました財団法人大同生命厚生事業団に心より感謝申し上げます。

参考文献

- (1) 厚生労働省医薬食安全部監視安全課長通知食安監発第 1105001 号,平成 15 年 11 月 5 日
- (2) 吉澄志磨, 他: 北海道立衛生研究所所報, 57, 91-95, 2007
- (3) Kitahori Y, et al: Jpn. J. Infect. Dis., 61, 89-90, 2008
- (4) Kitahori Y, et al: Jpn. J. Infect. Dis., 62, 82-83, 2009
- (5) Motomura K, et al: J. Virol. Aug., 84, 8085-8097, 2010
- (6) 田村務, 他: 病原微生物検出情報, 31(11), 369, 2010
- (7) 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局結核感染症課: 病原微生物検出情報, 31(11), 369, 2010

経費使途明細

QIAamp Viral RNA Mini Kit	26,328
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	114,954
PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2	37,485
NucleoSpin Extract II	36,582
PCR プライマー	43,383
ピペットチップ	36,750
文房具等	4,556
(利息)	(38)
合 計 (円)	300,038