

18. 愛知県におけるノロウイルス流行状況調査と 分子疫学的解析

○中村 範子、小林 慎一、秦 眞美、安達 啓一、安井 善宏、松本 昌門、
皆川 洋子（愛知県衛生研究所）

【研究目的】

ノロウイルス（NoV）は食中毒や感染性胃腸炎の原因として、世界中で公衆衛生上重要なウイルスである。NoV 感染症は日本でも年間を通じて発生しているが、毎年冬季に NoV に起因する食中毒事件の発生や感染性胃腸炎患者の急増が認められている。NoV は遺伝子配列に基づいて少なくとも 5 つの遺伝子群（Genogroup ; G、GI～GV）に分類され、ヒトからは主に GI 及び GII が検出される¹⁾。NoV GII には 22 の遺伝子型（Genotype）があり²⁾、中でも近年の流行の主体である Genotype 4（NoV GII. 4）は世界中で高頻度に検出されている。NoV GII. 4 は更に亜型（変異型）に分類されるが、数年ごとに出現する新たな亜型は世界的流行の原因となる可能性があり、2006/07 シーズン及び 2012/13 シーズンにはそれぞれ Den Haag_2006b 亜型、Sydney_2012 亜型に起因する NoV の大流行が起こった³⁻⁵⁾。

日本における感染性胃腸炎の発生動向には NoV の流行状況が大きく関与すること、また、感染性胃腸炎患者から検出される NoV は食中毒や集団感染事例の原因ウイルスともなり得ることから、NoV の防疫対策や流行予測には NoV の流行動態の実態把握が重要である。本研究では県内の NoV 流行状況把握を目的として、愛知県感染症発生動向調査事業において収集された感染性胃腸炎患者検体より検出した NoV の遺伝子型別、NoV GII. 4 亜型のクラースタ解析を実施した。

【材料と方法】

1. 材料

2014 年 9 月から 2016 年 8 月までの 2 シーズン（2014/15 及び 2015/16 シーズン）に愛知県内（名古屋市を除き中核市を含む）の感染症発生動向調査病原体定点医療機関 31 箇所から採取された、主に小児散発性感染性胃腸炎患者由来の 600 検体（2014/15 シーズン：286 検体（糞便 262 検体及び吐物 24 検体）、2015/16 シーズン：314 検体（糞便 280 検体及び吐物 34 検体））を用いた。

2. NoV 検出及び解析法

Veal infusion broth で糞便検体を 10%乳剤、吐物検体を 50%乳剤にした後、10,000xg で 20 分遠心分離した。遠心上清 200 μ L から、High Pure Viral RNA Kit (Roche) を用いて最終溶出量 50 μ L でウイルス RNA を抽出した。NoV 遺伝子検出は、ウイルス性下痢症診断マニュアル⁶⁾ に記載されたプライマーを用いた RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction: 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応) 法により実施した。NoV の遺伝子型は、構造タンパク遺伝子の PCR 増幅産物を Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) で精製し、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) と DNA シーケンサー 3130 (Applied Biosystems) を用いたダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定し、Katayama らの方法⁷⁾ に従い遺伝子型別した。NoV GII.4 陽性検体については、さらに GII.4 のクラスター分類を目的として既知の GII.4 亜型との相同性を解析し、ClustalW を用いた近隣結合 (NJ) 法で系統樹解析した。これらの解析には MEGA (version 6.06) を使用した。

【結果及び考察】

1. NoV 検出状況

600 検体中 287 検体 (287/600: 47.8%) から 315 の NoV 遺伝子が検出された。検出された NoV の内訳は NoV GI が 39 (2014/15 シーズン: 8、2015/16 シーズン: 31)、NoV GII が 276 (2014/15 シーズン: 101、2015/16 シーズン: 175) であった。NoV GI と比較して、GII が高率に検出された。両シーズンとも、検査検体数及び NoV GII 検出数のピークは 12 月であった (図 1)。

2015 年 11 月に 19 の NoV GI が検出された。2015/16 シーズンの NoV GI 検出数及び検出率は近年最多であり、同時期に県内で発生した複数の食中毒事例や保育所の集団発生事例からも NoV GI が検出された。全国においても NoV GI 検出報告数は 2014/15 シーズン後半例年になく多く⁸⁾、愛知県の NoV GI 流行は全国的な流行を反映した結果と考えられた。

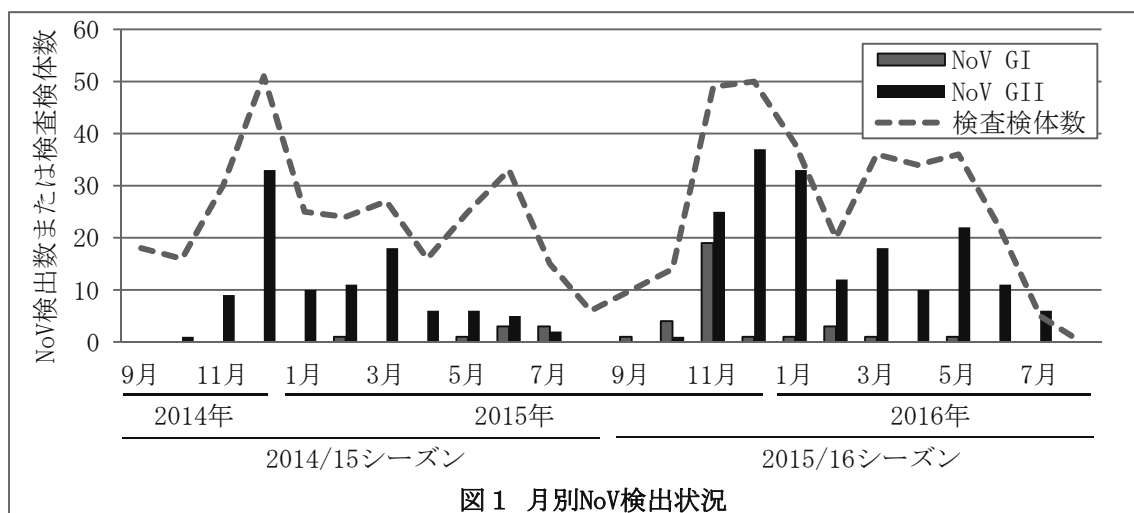


図 1 月別NoV検出状況

2. NoV 遺伝子型別

遺伝子検出陽性であった 39 の NoV GI 及び 276 の NoV GII について遺伝子解析を行った結果、NoV GI は GI. 2 及び GI. 3 の 2 遺伝子型に、NoV GII は GII. 3、GII. 4、GII. 13、GII. 17 の 4 遺伝子型に分類された (表 1)。NoV GI で主に検出されたのは GI. 3 であった (30/39 : 76.9%)。NoV GII では両シーズンともに GII. 4 が検出数最多であったが、続いて GII. 3 も高率に検出された。また、近年愛知県では検出のなかった GII. 17 が 2014/15 から 2 シーズン連続で検出された。これらの GII. 17 はすべて、2015 年に川崎市で初めて報告された GII. P17-GII. 17⁹⁾ に分類された。GII. 17 は小児を中心とする本調査の検査検体では GII. 4 を大きく下回る検出数であったが、同時期の主に成人由来の食中毒事例検体からは多数検出された (すべて GII. P17-GII. 17)。現在のところ GII. 17 は成人を中心とした流行が主体のように思われるが、今後小児の間でも GII. 17 による大流行が起こる可能性も考えられるため注意が必要である。

表 1 シーズン別 NoV 遺伝子型検出状況

NoV 遺伝子型	2014/15 シーズン	2015/16 シーズン	合計
GI. 2	3 (2.8)	6 (2.9)	9 (2.9)
GI. 3	5 (4.6)	25 (12.1)	30 (9.5)
GII. 3	30 (27.5)	71 (34.5)	101 (32.1)
GII. 4	59 (54.1)	76 (36.9)	135 (42.9)
GII. 13	0 (0.0)	6 (2.9)	6 (1.9)
GII. 17	12 (11.0)	22 (10.7)	34 (10.8)
合計	109	206	315

() : %

3. NoV GII. 4 の亜型解析

2006/07 シーズンの Den Haag_2006b 亜型、また 2012/13 シーズンの Sydney_2012 亜型が新たに出現した際に、NoV 感染症は世界的に大流行した。そこで GII. 4 亜型の動向把握を目的として、今回検出された 135 の NoV GII. 4 についてクラスター解析を行った (図 2 : 代表的な配列のみ示す)。2014/15 シーズンの NoV GII. 4 は、8 の Den Haag_2006b 亜型 (8/59 : 13.6%、図 2 左下 o290-14) 及び 51 の Sydney_2012 亜型 (51/59 : 86.4%) に分類された。2015/16 シーズンは 71 すべてが Sydney_2012 亜型であった。71 のうち 4 の Sydney_2012 亜型 (図 2 右下 545-15 から 12-16) は、2016 年に大阪市が初めて報告した NoV GII. P16-GII. 4 Sydney_2012 (LC153121- LC153122)¹⁰⁾ と同じクラスターに属した (RdRp 領域については現在解析中)。現在の GII. 4 亜型の主流は依然として Sydney_2012 亜型であり、出現から 3 シーズンが経過しているが、2015/16 シーズン終了時点で、世界的にも新たな GII. 4 亜型出現は報告されていない。

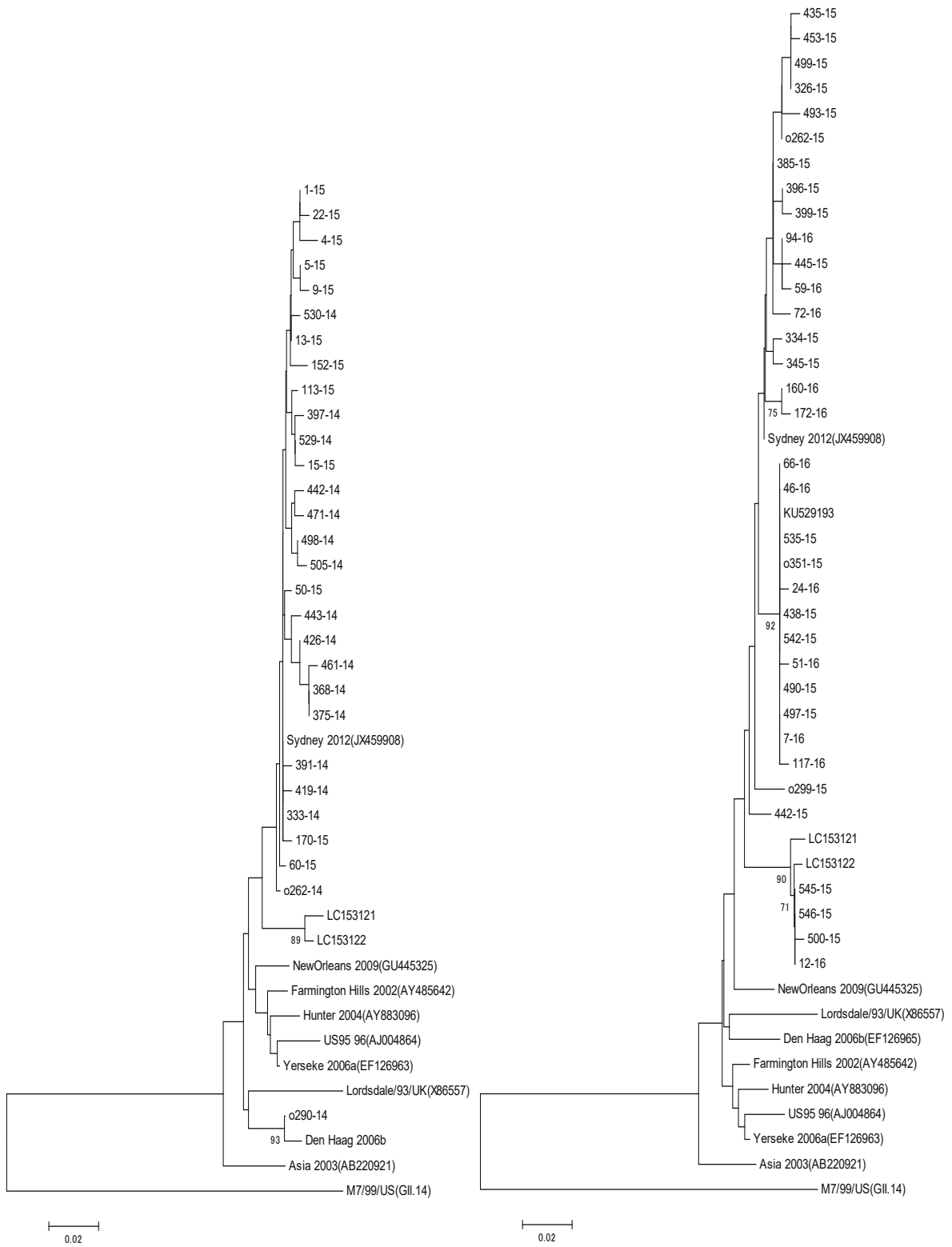


図2 NoV GII.4 クラスター解析 (左: 2014/15 シーズン、右: 2015/16 シーズン)

【まとめ】

愛知県において 2012/13 シーズン以降、主に検出される NoV は GII.4 Sydney_2012 亜型であるが、NoV 全体における検出率は年々低下傾向にある。今後も GII.4 に代って主流となる遺伝子型や新たな GII.4 亜型の出現を継続的に監視し、NoV の流行予測や防疫対策に役立てたい。

【引用文献】

- 1) Robilotti E, et al. Clin Microbiol Rev, 28:134-164. 2015.
- 2) Kroneman A, et al. Arch Virol, 158:2059-2068. 2013.
- 3) Motomura K, et al. J Virol. 82:11247-11262. 2008.
- 4) Centers for Disease Control and Prevention (CDC). MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 62:55. 2013.
- 5) van Beek J, et al. Euro Surveill, 18:8-9. 2013.
- 6) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル ウイルス性下痢症検査マニュアル（第 3 版），2003.
- 7) Katayama K, et al. Virology, 299:225-239, 2002.
- 8) 国立感染症研究所：ノロウイルス等検出状況 2015/16& 2014/15 シーズン（2016 年 7 月 31 日現在報告数）； <http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr-noro.html>
- 9) Matsushima Y, et al. Euro Surveill, 20:pii=21173, 2015.
- 10) 入谷展弘, 他, IASR 37:136-138, 2016.

【謝辞】

本研究に研究助成をして頂きました公益財団法人 大同生命厚生事業団に深謝致します。

【経費使途明細】

使途	金額
プレート遠心機	209,088 円
マルチスクリーンカラムローダー	55,728 円
試薬及び実験消耗品	34,212 円
振込手数料	972 円
合計	300,000 円