

秋田県で2005年12月から2006年3月に検出された*Norovirus*の遺伝子型—東北食中毒研究会*Norovirus*研究班活動

八柳 潤 齊藤志保子 今野貴之

東北食中毒研究会の NV 研究班活動の一環として、秋田県で検出された NV の分子疫学的性状について解析した。平成 17 年 12 月から平成 18 年 3 月までに得られた散発下痢症および集団下痢症患者の糞便 83 検体を供試した。NV の検出は SK プライマーを使用した RT-PCR により実施した。PCR 増幅断片の塩基配列をダイレクトシーケンスにより決定し、Clustal W の値に基づき NJplot により系統樹を作成した。シーケンスを実施した 25 検体中 2 株が GI (GI/11、GI/14) であった。GII 23 株の内訳は GI/4 が 13 株と最も多く、GII/6 が 4 株、GII/5 が 2 株、GII/2、GII/3、GII/9、GII/10 がそれぞれ一株であった。GII/4 13 株には同一シーケンスから成る 2 つのクラスターが認められた。秋田県内で検出された NV のシーケンスデータに基づく分子疫学的性状に関する知見が初めて得られた。NV の分子疫学的性状に関する知見は NV 感染予防策の構築のための基盤となることが期待される。一方、県内で発生する集団下痢症の解析にこの分子疫学的解析手法を応用することにより効果的な行政支援を実施できるものと考えられる。

1. はじめに

Norovirus (NV) は *Sapovirus* (SV)、*Logovirus*、*Vesivirus* と共に *Caliciviridae* に属し¹⁾、幼児から成人に至る全年齢層に胃腸炎を惹起²⁾するウイルスである。NV 胃腸炎は冬季に流行し、吐気、嘔吐、腹痛、下痢を主な症状とし、臨床的には比較的軽症な疾患である。しかし、NV は感染力が強く少数のウイルス粒子により感染が成立する³⁾ことからしばしば集団感染が発生する。NV の集団感染は食品媒介(食中毒)、ヒト-ヒト感染、あるいは両者が複合して発生する。近年、病原体の感染源や感染ルートを特定する際、種々の分子疫学的解析⁴⁾手法が応用されており、病原細菌の分子疫学的解析手法としては Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) が Gold Standard ともなっている。NV の分子疫学解析手法としては種々の方法がこれまでに提唱・試行されてきたが、現在は片山ら⁵⁾のキャプシド領域の塩基配列に基づく遺伝子型別と NJ 法による系統樹解析が国内で汎用されている。NV は 2 つの Genogroup、GI と GII に大別され、この方法では GI が 14、GII が 17 の遺伝子型に分類される。PFGE など、画像アナログデータに基づく分子疫学解析においては、異なる実験により得られたデータを比較する際にデータの標準化に精度的な限界を伴うことが不可避である。これに対して、シーケンスデータに基づく分子

疫学的解析では扱うデータが塩基配列というデジタル的なデータであるために、異なる実験により得られたデータを容易に比較・解析可能であるという利点がある。このことは、NV の分子疫学解析においては、異なる県の地方衛生研究所で得られたシーケンスデータを集積・解析することが容易に実施可能であることを示している。NV 胃腸炎の疫学解析については、これまで感染症サーベイランスにおける小児科定点における患者発生数の把握や、一つの地方自治体において発生した集団事例の解析に留まってきた。しかし、現在はヒトや食品が広域にわたり流通していることから NV 胃腸炎の疫学について検討する際にも異なる自治体を含む広い地域で得られた情報を収集・解析する必要があるものと考えられる。

東北地方の地方衛生研究所などで構成する東北食中毒研究会では平成 17 年 8 月に NV 研究班を組織し、東北地方で検出された NV のシーケンスデータ、由来検査材料等に関する情報の解析を実施し、東北地方における NV の疫学の解明と NV 胃腸炎発生予防策の検討を目的とする活動を開始した。今回、東北食中毒研究会 NV 研究班活動の一環として実施した、平成 17 年 12 月から平成 18 年 3 月までに秋田県で検出された NV の分子疫学的性状の解析結果について報告する。

2. 材料と方法

2.1 供試検体

平成 17 年 12 月から平成 18 年 3 月までに得られた散発下痢症および集団下痢症患者の糞便 83 検体を供試した。

2.2 NV の検出とシーケンス・系統樹解析

NV の検出は厚生労働省通知に従い、SK プライマーを使用した RT-PCR により実施した。陽性検体から得られた PCR 増幅断片について SK プライマーを使用したダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。塩基配列の解析には DNAsis ソフトウエア (Hitachi) を使用し、系統樹は Clustal W の値に基づき NJplot により作成した。

2.3 NV P2 Region のシーケンス・系統樹解析

SK プライマー増幅断片の解析により GII/4 と特定され、且つ断片のシーケンスが同一であった NV No. 21 と NV No.24、ならびにこれらと SK プライマー増幅断片のシーケンスに違いがみとめられる GII/4 株である NV No.18 の P2 Region のシーケンスについて、既報⁶⁾に従い検討した。Outgroup には Camberwell 株の P2 Region のシーケンスを使用した。P2 region は Okada ら⁷⁾が報告した範囲とした。

2.4 Sapovirus の検出と確認試験、シーケンス・系統樹解析

NV が検出されなかった一事例については Okada らの方法⁸⁾に従い *Sapovirus* (SV) の検出を試みた。なお、SV に由来する遺伝子はインナープライマーを使用した 1 回の PCR により検出可能であり、原報に示された Nested-PCR による必要は無かった。得られた増幅断片のシーケンスをダイレクトシーケンスにより決定し、Updated version of the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program at the National Center for Biotechnology Information server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) online search により SV に由来する遺伝子であるかどうか確認した後、Farkas ら⁹⁾が報告した基準株を使用した系統樹解析により遺伝子型を決定した。

3. 結果と考察

3.1 検出された NV の遺伝子型と GII/4 の系統樹解

析

供試験した 83 検体のうち 36 検体が NV 陽性となり、それらのうち 25 検体についてシーケンスを実施して遺伝子型を決定した。その結果は表 1 に示すとおりである。25 検体中 2 株が GI であり、遺伝子型は GI/11 と GI/14 であった。GII 23 株の内訳は GII/4 が 13 株と最も多く、GII/6 が 4 株、GII/5 が 2 株、GII/2、GII/3、GII/9、GII/10 がそれぞれ一株であった。GII/4 13 株の SK プライマー増幅断片シーケンスに基づく系統樹を図 1 に示す。13 株の系統樹には同一シーケンスから成る 2 つのクラスターが認められた (NV No.9; No.18; No.45; No.51 と No.74、NV No.8; No.16; No.21; No.24; No.26; No.30)。

3.2 GII/4 株の P2 Region シーケンス

GII/4 株のうち SK プライマー増幅断片シーケンスの比較で同一クラスターの属する NV No. 21 と NV No.24、ならびにこれらとは違うクラスターに属する NV No.18 の P2 Region のシーケンスを比較した。NV No. 21 と NV No.24 の SK プライマー増幅断片シーケンスは同一である一方、図 3 に示すように、P2 Region のシーケンスには 2 カ所の違いが認められた。また、SK プライマー増幅断片シーケンス解析で NV No. 21、NV No.24 とは異なるクラスターに属することが示された NV No.18 の P2 Region のシーケンスは図 2、図 3 に示すとおり、NV No. 21、NV No.24 の P2 Region のシーケンスとは明らかに異なっていた。

3.3 SV の遺伝子型

2006 年 3 月に発生し、NV が検出されず、腸管凝集付着性大腸菌 (EAggEC) O126 が検出された事例では NV の他に RT-PCR によりアイチウイルス、アストロウイルス、C 群ロタウイルス、SV の検出を試みたところ、SV が検出された。供試した SV4 株の RT-PCR 増幅断片のシーケンスは全て同一であり、その遺伝子型は図 4 に示すとおり GI に属し、亜型については GI/1-GI/3 のいずれともやや異なるものの GI/1 に最も近縁であった。

今回、東北食中毒研究会 NV 研究班の活動の一環として実施した検討により、秋田県内で検出された NV のシーケンスデータに基づく分子疫学的性状に関する知見が初めて得られた。GII/4 (Bristol virus-like genotype) は世界的¹⁰⁾に

も遺伝子に変異を伴いながら¹¹⁾流行しており、秋田県においても GII/4 が主流行遺伝子型であることが今回の検討により初めて確認された。今回の検討では 2005 年 12 月から 2006 年 1 月中旬まで GII/4 が主として検出され、2006 年 1 月中旬以降は多様な遺伝子型の NV が検出される傾向がみられた。この遺伝子型の経時推移に毎年観察される現象であるかどうか、また、その推移が患者の発生にどのような影響を及ぼしているのかどうかなどを明らかにするためには今後のさらなる検討が必要である。

SK プライマー¹²⁾は NV genome の ORF1、ORF2 Junction に存在する Highly Conserved Region^{13, 14)}を標的としている。このため、NV の検出には優れた精度を示すものの、SK プライマーにより得られた増幅断片には分子疫学的解析能を決定する上で重要なシーケンスの多様性が乏しいことが指摘⁶⁾されている。一方、P2 Region は Hyper Variable Region に該当し、分子疫学的解析のための標的として適切であることが指摘⁶⁾されている。今回、我々も NV No. 21 と NV No.24 について SK プライマー増幅断片と P2 Region のシーケンス解析を実施し、両株の SK プライマー増幅断片のシーケンスが同一であるにもかかわらず、P2 Region のシーケンスには 2 塩基の違いが認められることを確認した。わずか 3 株を使用した検討成績ではあるが、今回の結果は NV の分子疫学的解析の標的としての P2 Region の有用性を示すものと考えられ、今後 SK プライマー増幅断片のシーケンスが同一である株について、さらに P2 Region の解析を実施してデータを蓄積する必要があると考えられた。また、データは示さないが、東北地方で得られたデータの解析により、複数の県で同一シーケンスの SK プライマー増幅断片が得られた GII/4 株が検出されており、これらの株についても P2 Region のシーケンスを比較・解析することにより、より詳細な株間の関連に関する知見が得られることが期待される。

今回の研究班活動を実施する過程で、EAggEC O126 と SV の混合感染事例が発生した。この事例は NV 陰性であると共に、ウイルス性下痢症診断マニュアル等に従い RT-PCR で検出を試みたアイチウイルス、アストロウイルス、C 群ロタウイルスも陰性であった。保健所で実施した

疫学調査の結果は本事例が食中毒ではなく、感染性胃腸炎を示唆していたことから本事例の病因物質は SV とされた。この事例は、これまでも指摘されているとおり¹⁵⁾、集団下痢症においては予測される病原体のみに意識を囚われることなく、広汎な病原体を視野にいたした病因物質の検索を実施する必要があることをあらためて浮き彫りにした。国内における SV の検出状況の詳細は不明であるが、Phan らは¹⁶⁾2004 年 7 月から 2005 年 6 月までの 1 年間に大阪市の小児科における急性胃腸炎の糞便 125 検体について NV、SV、ロタウイルス、アストロウイルス、アデノウイルスの検索を実施し、検出率がそれぞれ NV 19.2%、SV 17.6%、A 群ロタウイルス 18.4%、アストロウイルス 1.6 %、アデノウイルス 0.8%であることを明らかにし、小児急性胃腸炎の原因病原体として SV が重要であることを指摘している。RT-PCR だけではなく、Real-Time RT-PCR による SV の検出方法も既に確立^{17, 18)}されていることから、今後は SV 検出に関しても NV と同様に通常の RT-PCR と共に Real-Time RT-PCR が広く実施され、国内における SV による感染性胃腸炎の発生実態がより明確になっていくものと推察される。

今回、東北食中毒研究会 NV 研究班活動の一環として実施した研究により得られた知見は、秋田県に侵淫した NV の分子疫学的性状を解明する上での端緒となるものである。今後も県内で検出された NV の分子疫学的性状に関するデータを蓄積することにより、秋田県における NV の感染疫学および東北地方で検出された NV と秋田県で検出された NV の関連に関する情報が蓄積され、それらの知見は NV 感染予防策の構築のための基盤となることが期待される。一方、県内で発生する集団下痢症の解析にこの分子疫学的解析手法を応用することにより得られる情報は、従来の疫学調査により得られた知見を支持すると考えられ、感染源や感染ルートの解明に際して効果的な行政支援を実施できるものと考えられた。

4. まとめ

・東北食中毒研究会の NV 研究班活動の一環として、平成 17 年 12 月から平成 18 年 3 月までに

秋田県で検出された NV の分子疫学的性状について解析した。

・平成 17 年 12 月から平成 18 年 3 月までに得られた散発下痢症および集団下痢症患者の糞便 83 検体を供試し、シーケンスを実施した 25 検体中 2 株が GI (GI/11、GI/14) であった。GII 23 株の内訳は GI/4 が 13 株と最も多く、GII/6 が 4 株、GII/5 が 2 株、GII/2、GII/3、GII/9、GII/10 がそれぞれ一株であった。GII/4 13 株には同一シーケンスから成る 2 つのクラスターが認められた。

・NV の分子疫学的解析の標的として P2 Region が有用であることが示され、今後 SK プライマー増幅断片のシーケンスが同一である株について、さらに P2 Region の解析を実施してデータを蓄積する必要がある。

・Sapovirus GI/1 近縁株と EAggEC O126 の混合感染事例が確認され、集団下痢症事例においては広汎な病原体を視野にいたした病因物質の検索を実施する必要があることがあらためて浮き彫りになった。

・NV の分子疫学的性状に関する知見は NV 感染予防策の構築のための基盤となることが期待され、県内で発生する集団下痢症の解析にこの分子疫学的解析手法を応用することにより効果的な行政支援を実施できるものと考えられた。

5. 文献

- 1) Green, K.Y. et al. Taxonomy of the caliciviruses. *J. Infect. Dis.* 2000 ; 181 : S322-330.
- 2) de Wit, M.A. et al. Sensor, a population-based cohort study on gastroenteritis in the Netherlands: incidence and etiology. *Am. J. Epidemiol.* 2001 ; 154 : 666-667.
- 3) Kuusi, M. et al. A prolonged outbreak of Norwalk-like calicivirus (NLV) gastroenteritis in a rehabilitation centre due to environmental contamination. *Epidemiol. Infect.* 2002 ; 129 : 133-138.
- 4) Riley, L.W. Molecular epidemiology of infectious diseases: principles and practices. 2004. ASM Press, Washington, DC., USA.
- 5) 片山和彦. ノロウイルス感染症. IDWR. 2004 ; 6 : 14-19.

6) ウイルス性食中毒の効率的な原因究明及び行政支援に関する研究. 地域保健推進特別推進事業報告書. 2006、埼玉県衛生研究所.

7) Okada, M. et al. Genetic Analysis of Noroviruses in Chiba Prefecture, Japan, between 1999 and 2004. *J. Clin. Microbiol.* 2005 ; 43 : 4391-4401.

8) Okada, M. et al. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of Sapporo-like viruses. *Arch. Virol.* 2002 ; 147 : 1445-1451.

9) Farkas, T. et al. Genetic diversity among sapoviruses. *Arch. Virol.* 2004 ; 149 : 1309-1323.

10) Lopman, B. et al. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet.* 2004 ; 363 : 682-688.

11) Dingle, K.E. et al. Mutation in a Lordsdale norovirus epidemic strain as a potential indicator of transmission route. *J. Clin. Microbiol.* 2004 ; 42 : 3950-3957.

12) Kojima, S. et al. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J. Virol. Method.* 2002 ; 100 : 107-114.

13) Kageyama, T. et al., Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-Like Viruses Based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2003 ; 41 : 1548-1557.

14) Katayama, K. et al. Phylogenetic Analysis of the Complete Genome of 18 Norwalk-like Viruses. *Virology* 2002 ; 299 : 225-239.

15) 特集ノロウイルス集団発生 2003 年 9 月～2005 年 10 月. 病原微生物検出情報. 2005 ; 12 : 323-341.

16) Phan, T.G. et al. Outbreak of Sapovirus Infection Among Infants and Children With Acute Gastroenteritis in Osaka City, Japan During 2004-2005. *J. Med. Virol.* 2006 ; 78 : 839-846.

17) Chan, M.C.W. et al. Sapovirus detection by quantitative real-time RT-PCR in clinical stool specimens. *J. Virol. Method.* 2006. on-line www.sciencedirect.com

18) Oka, T. et al. Detection of Human Sapovirus by Real-Time Reverse Transcription-polymerase Chain Reaction. *J. Med. Virol.* 2006 ; 78 : 1347-1353.

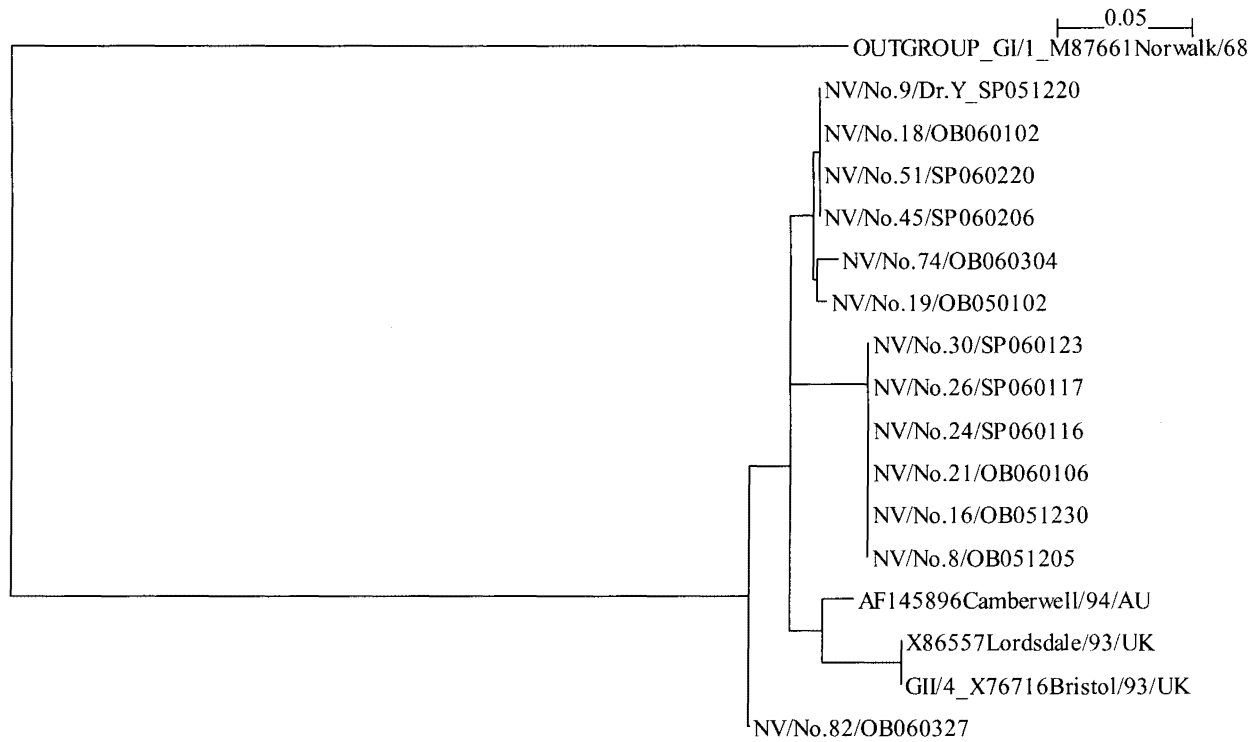


図1 検出されたNV GII/4 25株のSKプライマー増幅断片シーケンスに基づく系統樹

NVNo21P2_OB060106 NVNo24P2_Nosocomial060116 NVNo18P2_OB2060102 Camberwell_P2_region	AGCACTACCCAAGTGTCCCCCGTCAACATCTGCACCTTCAGAGGAGATGT GGCACTACCCAAGTGTCCCCCGTCAACATCTGTACCTTCAGAGGAGATGT GGTACTACCCAAGTGTCTCCTGTCAACATCTGCACCTTCAGAGGGGATGT GGCACTACCCAGCTGTCTAGCTGTCAACATCTGCAACTTTAGGGGGGATGT * * * * *
NVNo21P2_OB060106 NVNo24P2_Nosocomial060116 NVNo18P2_OB2060102 Camberwell_P2_region	CACCCACATTCCAGGTACTCGTACTTACAGAATGAATTTGGCTTCTCAAA CACCCACATTCCAGGTACTCGTACTTACAGAATGAATTTGGCTTCTCAAA CACCCACATTGCAGGTACTCAAGAATACACAATGAATCTGGCCTCCCAAA CACCCATATTGTGGGCAGCCATGATTATACAATGAACTTGGCTTCCCAAA *****
NVNo21P2_OB060106 NVNo24P2_Nosocomial060116 NVNo18P2_OB2060102 Camberwell_P2_region	ATTGGAACAATTATGACCCAACAGAAGAAACCCAGCCCCTCTGGGAAGT ATTGGAACAATTATGACCCAACAGAAGAAATCCAGCCCCTCTGGGAAGT ACTGGAACAATTATGACCCAACAGAAGAAATCCAGCCCCTCTGGGAAGT ATTGGAGCAATTATGACCCAACAGAAGAAATCCAGCCCCCTCTGGGAACA * * * * *
NVNo21P2_OB060106 NVNo24P2_Nosocomial060116 NVNo18P2_OB2060102 Camberwell_P2_region	CCAGATTTCTGTGGGAAAGATCCAAGGCATGCTCACCCAAACCACAAAGGG CCAGATTTCTGTGGGAAAGATCCAAGGCATGCTCACCCAAACCACAAAGGG CCAGATTTCTGTGGGTAAGATCCAAGGCATGCTCACCCAAACCACAAAGGAG CCAGATTTGTGGGGAAGATCCAAGGTCTGCTCACCCAAACCACAAGAGC *****
NVNo21P2_OB060106 NVNo24P2_Nosocomial060116 NVNo18P2_OB2060102 Camberwell_P2_region	AGACGGCTCGACCCGCGGTACAAAAGCTACAGTGAGCACTGGGAGTGTG AGACGGCTCGACCCGCGGTACAAAAGCTACAGTGAGCACTGGGAGTGTG GGATGGCTCGACCCGCGGTACAAAAGCCACAGTGAGCACTGGAAGTGTCC AGATGGCTCGACCCGTGCCACAAAAGCTACAGTGAGCACTGGGAGTGTCC * * * * *
NVNo21P2_OB060106 NVNo24P2_Nosocomial060116 NVNo18P2_OB2060102 Camberwell_P2_region	ACTTCACTCCAAAGCTGGGCAGCGTTCAGTTCGCCACTGACACAGACAAT ACTTCACTCCAAAGCTGGGCAGCGTTCAGTTCGCCACTGACACAGACAAT ACTTCACTCCAAAGCTGGGCAGAAATTCATTTTCACTGATACAAGCAAT ACTTCACTCCAAAGCTGGGTAGTGTCAATTCACCACTGACACAAACAAT *****
NVNo21P2_OB060106 NVNo24P2_Nosocomial060116 NVNo18P2_OB2060102 Camberwell_P2_region	GATTTTGAAACTGGCCAAAACACAAGGTTACCCCAAGTCGGTGTCTATCCA GATTTTGAAACTGGCCAAAACACAAGGTTACCCCAAGTCGGTGTCTATCCA GATTTTGAAACTGGCCAAAACACGAGATTACCCCAAGTCGGTGTCTATCCA GATTTCCAAACTGGCCAAAACACGAAATTCACCCCAAGTTGGTGTCTATCCA *****
NVNo21P2_OB060106 NVNo24P2_Nosocomial060116 NVNo18P2_OB2060102 Camberwell_P2_region	GGATGGTAGTAGTACCCACAGAAATGAACCCCAACAATGGGTACTCCCA GGATGGTAGTAGTACCCACAGAAATGAACCCCAACAATGGGTACTCCCA GGATGGTAGTACCCACCCACCAAAATGAACCCCAACAATGGGTACTCCCA AGACGGTG--ACCACC--ACCAGAATGAGCCCCAACAATGGGTACTCCCGA * * * * *
NVNo21P2_OB060106 NVNo24P2_Nosocomial060116 NVNo18P2_OB2060102 Camberwell_P2_region	ATTACTCAGGTAGAACTGTTTATAATGTACACCTG ATTACTCAGGTAGAACTGTTTATAATGTACACCTG ATTATTCAGGTAGAGATAGTACCAATGTGCATCTA ATTATTCAGGTAGAACTGGTATAATGTGCACCTG *****

図2 NV18、NV21、NV24、Camberwell VirusのP2 Region DNAシーケンスの比較結果

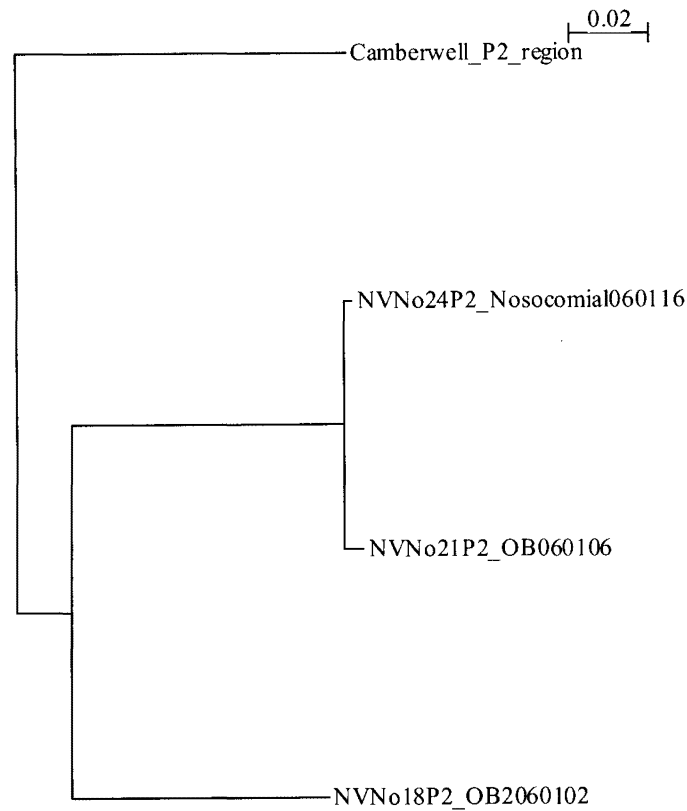


図3 NV No.18、NV No.21、NV No.24のP2 Region DNAシーケンスから作成した系統樹

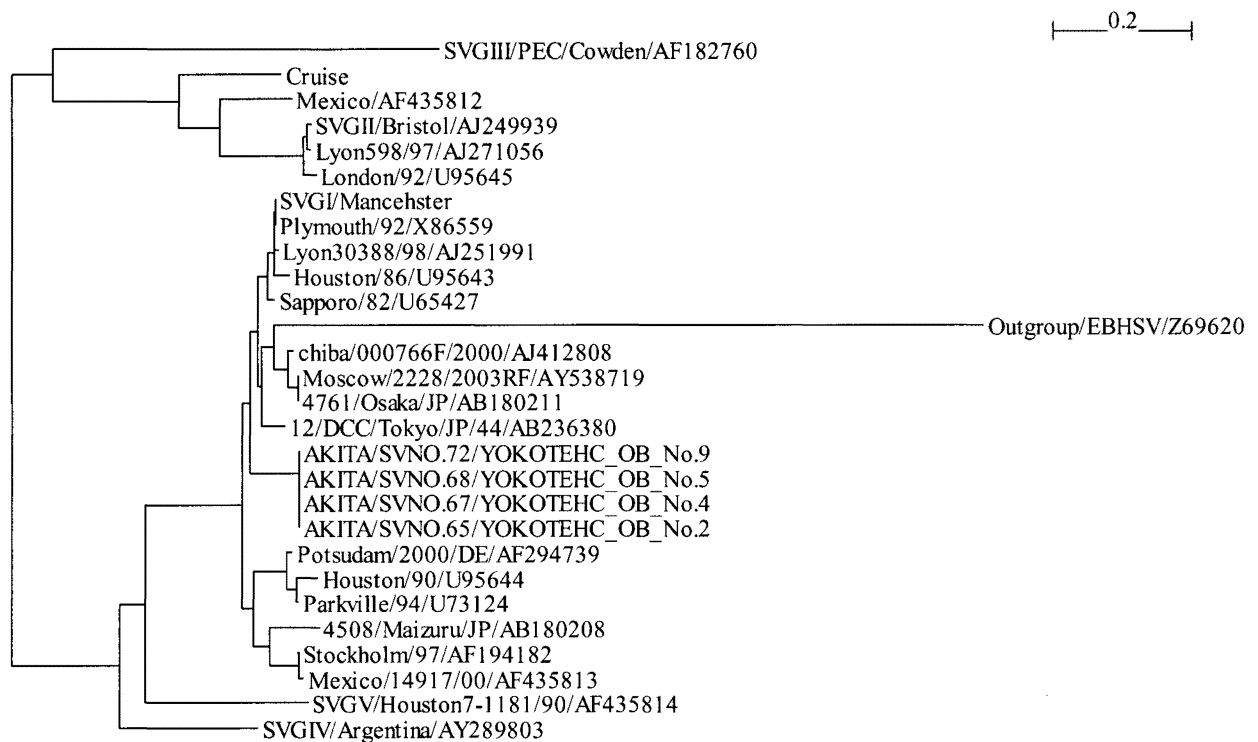


図4 集団事例由来Sapo Virusの遺伝子型を示す系統樹

表1 検出されたNVのGenotype

株番号	採取年月	事例種別	Genotype
NV No.8	2005.12	集団	GII/4
NV No.9	2005.12	散発	GII/4
NV No.16	2005.12	集団	GII/4
NV No.18	2006.1	集団	GII/4
NV No.19	2006.1	集団	GII/4
NV No.21	2006.1	集団	GII/4
NV No.24	2006.1	散発	GII/4
NV No.26	2006.1	散発	GII/4
NV No.27	2006.1	散発	GII/6
NV No.29	2006.1	散発	GII/10
NV No.30	2006.1	散発	GII/4
NV No.33	2006.1	散発	GII/5
NV No.34	2006.1	集団	GII/2
NV No.36	2006.1	集団	GII/6
NV No.42	2006.1	散発	GI/14
NV No.43	2006.2	散発	GII/6
NV No.45	2006.2	散発	GII/4
NV No.51	2006.2	散発	GII/4
NV No.53	2006.2	集団	GII/9
NV No.56	2006.2	集団	GII/6
NV No.59	2006.2	集団	GII/3
NV No.62	2006.3	散発	GI/11
NV No.74	2006.3	集団	GII/4
NV No.79	2006.3	集団	GII/5
NV No.82	2006.3	集団	GII/4