

## 下水サンプルを用いた下痢症ウイルスの分子疫学的解析

研究協力者	三好 龍也	堺市衛生研究所
研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所
研究協力者	内野 清子	堺市衛生研究所
研究協力者	岡山 文香	堺市衛生研究所
研究協力者	芝田 有理	堺市衛生研究所
研究協力者	吉田 永祥	堺市衛生研究所

### 研究要旨

下痢症ウイルスの流行状況を把握するため、散発・集団感染事例の胃腸炎患者由来の臨床検体と下水由来の環境検体の両面から下痢症ウイルスの遺伝子検出を行い、下痢症ウイルスの分子疫学的解析を行った。

ノロウイルス (NoV) は、下水中の遺伝子量が流行期である冬季に増加し、臨床検体から検出された遺伝子型のほとんどが下水中からも検出された。下水中の NoV 遺伝子を調査することにより、NoV 流行を解析することが可能と考えられる。サポウイルス、アストロウイルス、アイチウイルスについては、臨床検体からの検出は少数であったが、下水検体からは高頻度で検出された。これらのウイルスについては、感染性胃腸炎として顕在化しないウイルス感染、流行があることが示唆された。

下水中のウイルス遺伝子検出では、病原性を解析することはできないが、広域的な感染状況は把握することができる。臨床と環境の両面から下痢症ウイルス遺伝子を検出・解析することによって、下痢症起因ウイルスの市内での浸淫状況の全体像の把握ができると考える。

### A. 研究目的

ノロウイルス (NoV) による感染性胃腸炎の散発・集団感染事例及び食中毒は、毎年冬季を中心に多数発生している。しかし、NoV 感染は不顕性感染も多数存在するため全体像を捕らえることは難しい。

また、低流行下での地域における流行状況などを把握することも難しい。

今回、散発・集団感染事例の胃腸炎患者由来の臨床検体と下水由来の環境検体の両面から NoV 遺伝子検出・解析を行い、NoV 流行について考察する。加えて、患者

発生の頻度は低いですが食中毒の起因ウイルスとなり得る NoV 以外の下痢症ウイルスの遺伝子検出も実施し、感染性胃腸炎の全体像を把握する一助とする。

## B. 研究方法

### 1. 材料

環境検体として、2011年1月から2013年12月までに堺市内の3つの下水処理場で毎月1回採水された流入水108検体及び放流水108検体、計216検体を調査対象とした。臨床検体として、同期間に発生した食中毒及び集団感染事例から得られた23検体、散発事例（感染症発生動向調査における感染性胃腸炎患者等）から得られた92検体を調査対象とした。

### 2. 下水の濃縮法

これまでの報告書に準じて行った。すなわち、流入水及び放流水を遠心後（3,400xg 30min、13,000xg 45min）、上清1,000mlを分取し、最終濃度0.05MのMgCl<sub>2</sub>を添加後、HClでpH3.5に調整した。調整済み液をHAフィルター（0.45μm）でろ過し、ウイルスをフィルターに吸着させた。フィルターを細断し、pH10.5グリシン buffer（流入水：5.0ml、放流水：2.0ml）で溶出後、HClでpH6.5に再調整し、11,000xg 20min 遠心した上清をRNA抽出用のサンプルとした。

### 3. ウイルス遺伝子検出法

臨床検体については、RNA抽出後、ウイルス性下痢症診断マニュアルに準じ、NoV、サポウイルス（SaV）、アストロウイルス（AsV）、アイチウイルス（AiV）のウイルス遺伝子をそれぞれ検出した。陽性検体

については、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、系統樹解析にて遺伝子型を判定した。

下水検体については、濃縮処理後、臨床検体と同様にウイルス遺伝子検出を行った。クローニングを行い塩基配列を決定し、系統樹解析により遺伝子型を判定した。また、NoVリアルタイムPCRを実施し、採取水1ml当たりのコピー数を算出した。

（倫理面への配慮）

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

## C. 研究結果

### 1. NoV 遺伝子検出結果

臨床検体ではGIで5種類（GI.2, 4, 6, 7, 8）、GIIで5種類（GII.2, 3, 4, 12, 13）計10遺伝子型のNoVが検出された。集団事例23例中11例、散発事例98例中76例からGII.4型が検出され、最も高頻度に検出された（図1）。

下水検体では、GIで10種類（GI.1, 2, 3, 4, 7, 10, 11, 12, 13, 14）、GIIで10種類（GII.2, 3, 4, 6, 10, 11, 12, 13, 14, 17）計20遺伝子型が検出された。下水検体でもGII.4型が最も高頻度に検出された（表1）。

以上の結果から当市では少なくとも21種類の遺伝子型NoVの感染、流行が推測され、その中でGII.4が主流行遺伝子型であったと考えられた。

### 2. 下水中のNoV 遺伝子定量測定結果

GIおよびGIIともに調査期間のほとんどの月で検出され、NV遺伝子コピー数は、

GI よりも GII の方が高値であった(図 2、3)。下水中の NoV 遺伝子量は、小児の感染性胃腸炎が増加する 10 月から増加し、翌年の 7、8 月に減少する傾向がみられた。感染性胃腸炎が減少後も高いコピー数の NoV 遺伝子が検出された(図 4)。

### 3. SaV、AsV、AiV 遺伝子検出結果

SaV については、臨床検体からの遺伝子検出は少数で、遺伝子型は GI. 1, 2, GII. 1 型が検出された。しかし、下水検体では、年間を通じてほとんどの月で検出され (GI. 1, 2, 3, GII. 1, 2, 3, GV)、GI. 1, 2, GII. 1 型が多く検出された(表 2)。

AsV については、臨床検体では、2013 年に散发事例から 5 例検出された。下水検体では、年間を通じてほとんどの月で検出された。

AiV についても、臨床検体からの検出はなかったが、下水検体からは、2012 年 11 月を除く全ての月で検出された。

## D. 考察

小児の感染性胃腸炎患者数の増加する 10 月以降に下水の NoV 遺伝子の定量値は増加した。また臨床検体から検出された遺伝子型のほとんどが下水中からも検出された。下水中の NoV 遺伝子を調査することにより、retrospective ではあるが NoV 流行を解析することができる。一方、流行期前の下水中の NoV を解析することにより、その後の NoV 流行や変異株の出現などを早期に探知することが可能と考える。

SaV、AsV、AiV については、臨床検体からの検出は少数であったが、下水検体からは高頻度で検出された。これらのウイ

ルスについては、臨床症状が NoV に比べて軽症又は不顕性感染が多い、成人での感染の可能性などが考えられ、感染症発生動向調査の感染性胃腸炎として顕在化しないウイルス感染、流行があることが示唆された。

下水中のウイルス遺伝子検出では、病原性を解析することはできないが、広域的な感染状況は把握することができる。臨床と環境の両面から下痢症ウイルス遺伝子を検出・解析することによって、下痢症起因ウイルスの市内での浸淫状況の全体像の把握ができると考える。

採水時期、回数等について検討を行い、今後も継続して調査を実施し、下痢症ウイルスの流行予測の可能性についても考察していく予定である。同様のサーベイランスを行っている他の全国地方衛生研究所との情報共有システムを立ち上げるなど、前向きな発展が期待できる取り組みが必要と考える。

## E. 結論

臨床検体及び下水サンプルを用いた下痢症ウイルスの分子疫学的解析を行った。

下水から検出される NoV 遺伝子型や遺伝子量は、NoV の流行と関連がみられ、下水中の NoV 遺伝子を調査することにより、NoV 流行を解析することが可能と考えられた。

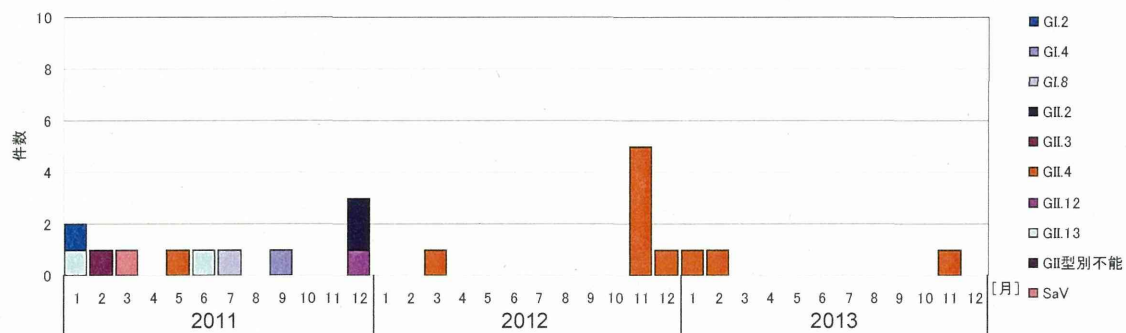
SaV、AsV、AiV については、臨床検体からの検出は少数であったが、下水検体からは高頻度で検出された。これらのウイルスについては、感染性胃腸炎として顕在化しないウイルス感染、流行があることが示唆された。

F. 研究発表

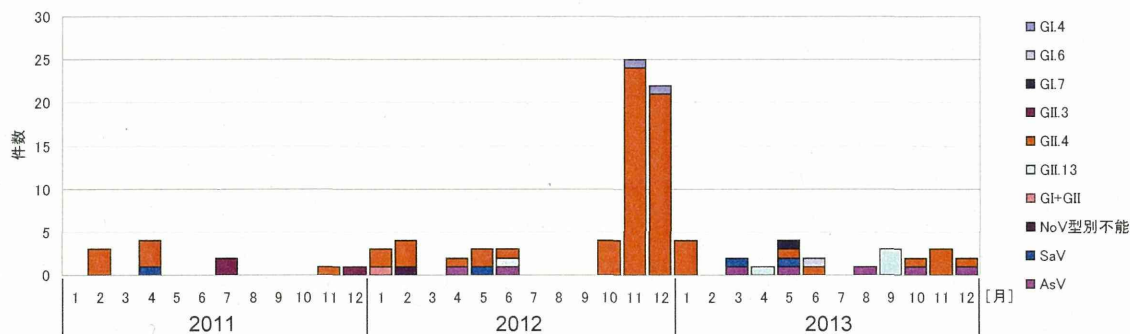
1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし



集団感染事例



散発事例

図1 臨床検体からのウイルス検出状況

表1 下水中NoV検出状況(遺伝子型)

検出 virus	2011年												2012年												2013年											
	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
NoV	GI.1	B											B												B											
	GI.2	B											B												B											
	GI.3	B											B												B											
	GI.4	B											B												B											
	GI.7	B											B												B											
	GI.10	B											B												B											
	GI.11	B											B												B											
	GI.12	B											B												B											
	GI.13	B											B												B											
	GI.14	B											B												B											
	GI.2	B											B												B											
	GI.3	B											B												B											
	GI.4	B											B												B											
	GI.6	B											B												B											
	GI.10	B											B												B											
	GI.11	B											B												B											
	GI.12	B											B												B											
GI.13	B											B												B												
GI.14	B											B												B												
GI.17	B											B												B												

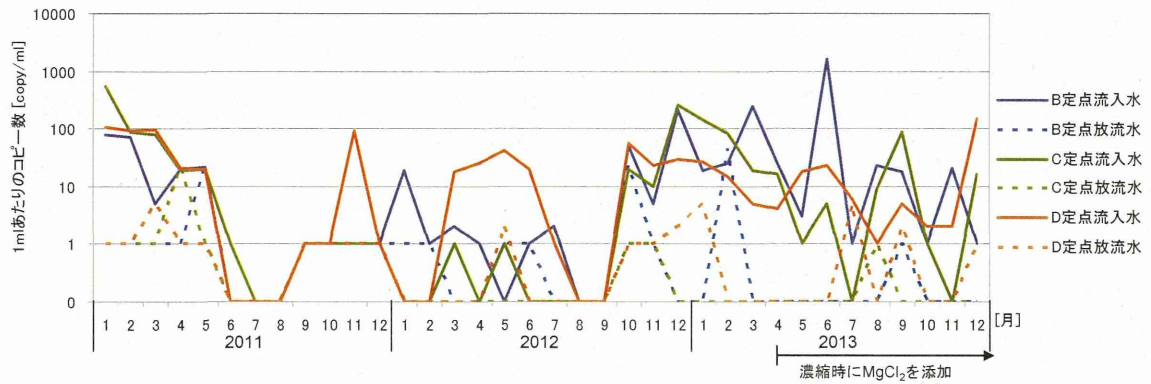


図2 下水中NoV GI リアルタイムPCR測定結果

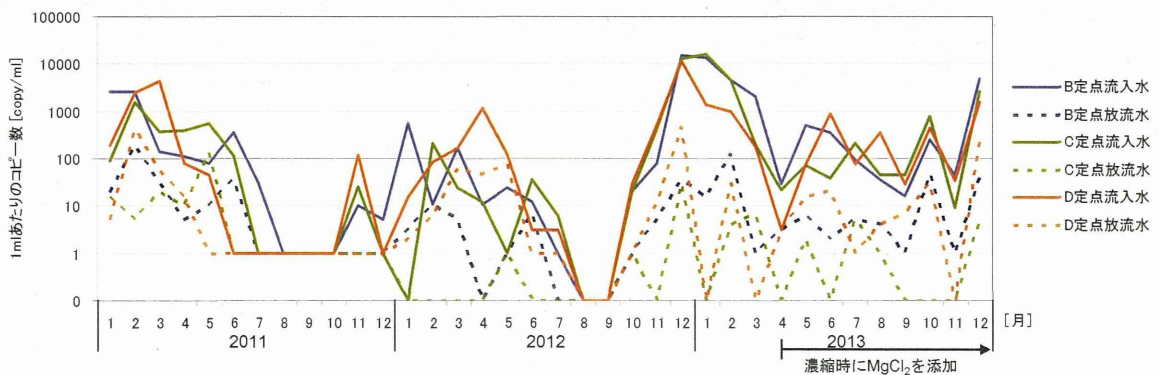


図3 下水中NoV GII リアルタイムPCR測定結果

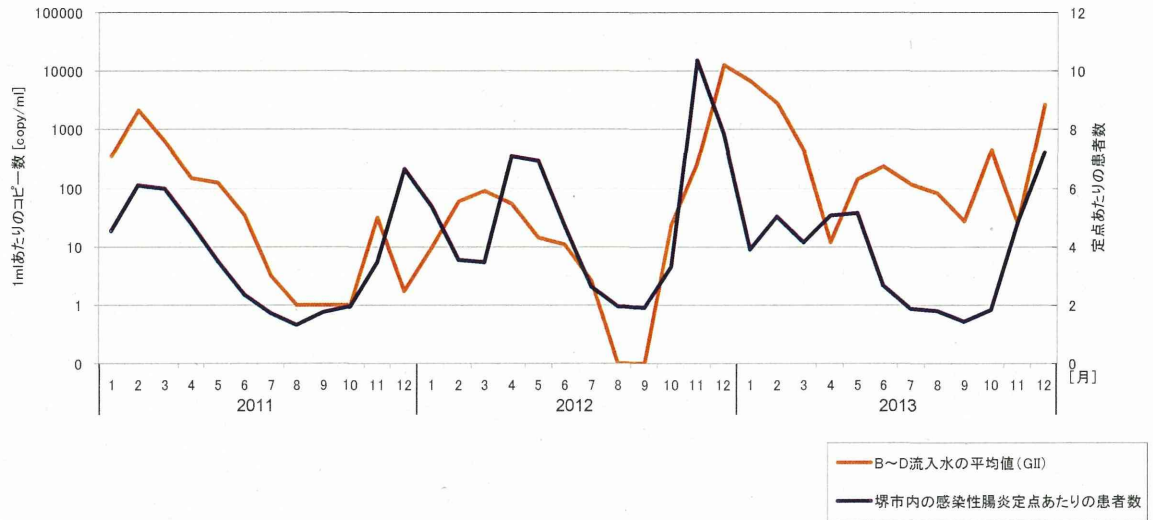


図4 堺市内の感染性胃腸炎患者数と下水中のNoV GI I 遺伝子定量値

表2 SaV AsV AiV検出状況

検体由来	検出 virus	2011年												2012年												2013年												
		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	
集団事例	SaV	[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												
	AsV	[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												
	AiV	[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												
散発事例	SaV GI.1	[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												
	SaV GI.2	[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												
	SaV GI.1	[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												
	AsV	[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												
下水	AiV	[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												
	SaV GI.1	B	[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												[Detection Matrix]											
		C	[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												[Detection Matrix]											
		D	[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												[Detection Matrix]											
	SaV GI.2	B	[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												[Detection Matrix]											
		C	[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												[Detection Matrix]											
		D	[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												[Detection Matrix]											
	SaV GI.3	B	[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												[Detection Matrix]											
		C	[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												[Detection Matrix]											
		D	[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												[Detection Matrix]											
	SaV GI.1	B	[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												[Detection Matrix]											
		C	[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												[Detection Matrix]											
		D	[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												[Detection Matrix]											
SaV GI.2	B	[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												
	C	[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												
	D	[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												
SaV GI.3	B	[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												
	C	[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												
	D	[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												
GV	B	[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												
	C	[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												
	D	[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												
SaV	B	[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												
	C	[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												
	D	[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												
AsV	B	[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												
	C	[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												
	D	[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												
AiV	B	[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												
	C	[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												
	D	[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												[Detection Matrix]												

## 愛媛県におけるノロウイルス、サポウイルスの分子疫学的解析

協力研究者	山下育孝	愛媛県立衛生環境研究所
分担研究者	田中智之	堺市衛生研究所
協力研究者	青木里美	愛媛県立衛生環境研究所
	菅 美樹	愛媛県立衛生環境研究所
	四宮博人	愛媛県立衛生環境研究所

### 研究要旨

2013年1月～12月の間に、散発性胃腸炎からノロウイルス(NoV)が110例(検出ウイルスの55.3%)、サポウイルス(SaV)が56例(28.1%)検出され、散発性胃腸炎におけるSaVの関与が比較的高いことが示された。検出されたNoVの遺伝子型は、GII.2(54例)が最も多く、次いで、GI.6(16例)、GII.4(8例)、GII.6(7例)、GII.13(7例)等であった。1月～3月はGII.4、GII.2、GII.6等が検出され、6月～7月を中心に4月～8月にGI.6が検出された。8月以降はほとんどがGII.2(94%)であった。SaVは、5種類の遺伝子型が検出されたが、1月～5月はGI.2、11月～12月はGI.1の検出数が多く、両遺伝子型とも検出されたウイルスは近縁であった。集団発生例(18事例)では、11事例からNoVが検出された。そのうち、食中毒と確定された9事例中7事例からはGII.4が検出され、検出時期は1月～3月が多かった。また、調理従事者に胃腸炎症状が見られた1事例を除き、すべて不顕性感染の調理従事者による食品汚染が原因と考えられた。

調査期間中に散発性胃腸炎や食中毒から検出されたNoV GII.2は、2010年～2012年の流行株と同様、カプシド(Cap)領域とポリメラーゼ(Pol)領域の間で遺伝子組換えを起こしたキメラウイルスであった。また、GII.4は、2012年11月～12月に全国的に流行がみられたGII.4/Sydney/NSW0514/2012/AUと高い相同性を示すGII.4変異株であった。

### A. 研究目的

胃腸炎の起因ウイルスには、ノロウイルス(NoV)、サポウイルス(SaV)、ロタウイルス、アストロウイルス、腸管アデノウイルス等が知られているが、全国の地

方衛生研究所からの病原微生物検出報告によると、NoVの検出報告数が最も多い。また、集団発生事例の原因ウイルスの大半がNoVによるものであり、衛生行政上NoVが最も重要である。また、2012年



以降は、SaV を原因とする食中毒や感染症の報告も全国的に増加している。

食中毒等集団発生の予防及び食品の安全を確保するためには、地域における NoV や SaV の流行状況の把握と感染経路の解明が重要と考えられる。そこで、愛媛県において、散発性胃腸炎及び食中毒等集団発生事例から検出された NoV 及び SaV について分子疫学的解析を行った。

## B. 研究方法

### 1. 材料

2013 年 1 月～12 月の間に採取された感染症発生動向調査用の散発性胃腸炎患者糞便 446 検体及び食中毒等集団発生 18 事例から得られた 336 検体（患者糞便 137 検体、従事者糞便 89 検体、食品 40 検体、ふき取り 70 検体）を用いた。糞便は検査実施まで -20℃ で冷凍保存した。

感染性胃腸炎患者数は、感染症発生動向調査における定点当たり週別患者報告数を使用した。

### 2. 方法

糞便からのウイルス検索は、電子顕微鏡法(EM)、リアルタイム PCR 法または RT-PCR 法で行った。EM は常法により粗精製した糞便材料を、2%PTA 染色後 4 万倍で観察し、胃腸炎起因ウイルスの検索を行った。ロタウイルス、アデノウイルスは主に EM で検出されたものについて、ELISA 法やイムノクロマト法によって型別した。NoV 遺伝子の検出は、影山ら (J.Clin.Microbiol 41, 2003) の COGF/R 系プライマーと RINGTaqMan プロブを用いたリアルタイム PCR 法で行った。サポウイルス遺伝子の検出は、

岡田ら (Arch.Virol 151, 2006) の方法に準じ、Cap 領域を増幅するプライマーを用いた nested-PCR 法で行った。一部の検体については、岡ら (J.Med.Virol 78,2006) のリアルタイム PCR 法を併用して実施した。

NoV 陽性例については、Cap N/S 領域の塩基配列をダイレクトシーケンス法により決定し、影山ら (J.Clin.Microbiol 42,2004) の分類方法に基づいて遺伝子型別を行った。さらに、型別株の一部については、Pol 領域及び Cap P1/P2 領域の塩基配列を決定し系統樹解析を実施した。また、SaV の遺伝子型別は岡ら (Arch.Virol 157,2012) の分類方法に基づいて行い、検出された GI.1 及び GI.2 株の一部については、さらに、Pol 領域の遺伝子解析を実施した。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

## C. 研究結果

### 1. 感染性胃腸炎患者の週別発生状況

愛媛県における 2004 年～2013 年の定点当たりの患者報告数の推移を図 1 に示す。2012/2013 シーズンにあたる 1 月～5 月は、例年に比べ患者報告数が少なく、6 月中旬から 9 月の夏季に例年よりも患者報告数が若干多くなった。2013/2014 シーズンは、10 月下旬(第 43 週)から患者報告数が増加し、12 月中旬(第 50 週)にピークを迎えたが、ピーク時の定点当たりの患者報告数は、2004 年以降で 3 番目に少なかった。

### 2. 散発性胃腸炎患者からのウイルス検出状況



散発性胃腸炎患者446名からのウイルス検出状況を表1、2に示す。446検体中、42.8%にあたる191検体からウイルスが検出され、そのうち、8検体からは2種類のウイルス(NoVとSaVが4検体、SaVとA群ロタウイルスが4検体)が検出された。検出ウイルス199例の内訳は、NoVが110例(55.3%)で最も多く、次いでSaVが56例(28.1%)、A群ロタウイルスが29例(14.6%)、アデノウイルスが4例(2.0%)であった。検出されたNoVはGIIが93例(84.5%)、GIが17例(15.5%)で、例年に比べるとGIの検出数が多かった。NoVは年間を通して検出され、特に、GIIは1月、5月、10月～12月、GIは6月～7月の検出率が高かった。SaVは1月～5月と11月～12月に多く検出され、A群ロタウイルスは1月～6月に検出された。

### 3. NoVが検出された食中毒等集団発生例

2013年に当所に搬入された集団発生例のうち、ウイルスが検出された11事例の概要を表3に示す。11事例のうち9事例(1～6、8～10)は、施設が提供した食事を原因とする食中毒と確定され、検出されたNoVの遺伝子型はGII.4が7事例で最も多かった。事例1、5、6、10では、糞便中に排泄されたウイルス量は、患者と無症状の調理従事者で大差はなかった。また、調理従事者に胃腸症状が認められた1事例(事例3)を除き、食中毒事例はすべて不顕性感染の調理従事者による食品汚染が原因と考えられた。その他、ヒト-ヒト感染が疑われる施設内での集団発生が2事例(事例7、11)あった。

### 4. 検出されたNoV及びSaVの遺伝子型と月別検出状況

散発性胃腸炎から検出されたNoV

110株のうち解析が可能であった96株(GI 16株、GII 80株)について遺伝子型別を行った。その結果、GIは2種類、GIIは7種類の遺伝子型が確認された。内訳はGI.6が15株、GI.8が1株、GIIでは、GII.2が54株で最も多く検出され、次いでGII.4が8株、GII.6及びGII.13が各7株、GII.12が2株、GI.7及びGII.14が各1株であった。

検出されたNoVの月別検出状況を図2に示す。6月～7月を中心に4月～8月にGI.6が多数検出された。GIIでは、1月～6月(2011/2012シーズン)は7種類の遺伝子型が検出され、GII.4、GII.13、GII.2が多かった。8月～12月は、GII.6の3株を除き、すべてGII.2(43株)であった。一方、NoVが検出された集団発生事例は、1月～3月、5月及び11月～12月に見られたが、1月～3月はGII.4による事例が多かった。

SaVの月別遺伝子型別検出状況を図3に示す。検出されたSaVの遺伝子型は5種類で、GI.1が最も多く28株、次いでGI.2が21株、GII.3が4株、GI.3が2株、GIVが1株であった。1月～5月にGI.2が多く検出され、11月～12月には、GI.1が高率に検出された。

### 5. NoVのCap領域の遺伝子解析

Cap領域の系統樹解析を行った結果を図4～6に示す。GI.6は、同一のクラスターを形成し、塩基配列の相同性が97.3～100%で、近縁であった(図4)。検出数が最も多かったGII.2は、相同性が99.3～100%で非常に近縁であった。GII.4も検出された株は近縁で、食中毒事例の患者と調理従事者から検出された株の塩基配列は100%一致した(図5)。GII.4については、さらにP1/P2領域の解析を行っ

た。その結果、調査期間中に検出されたウイルスは、同一の遺伝子型クラスターを形成し、株間の塩基配列の相同性は98.4～100%で、GII.4/Sydney/NSW0514/2012/AUと高い相同性(P1/P2領域が97.8～98.4%)を示す2012年11月～12月に全国的に大流行したGII.4の2012変異株であった(図6)。

#### 6. GII.2、GII.6、GII.13等の遺伝子解析

N/S領域による遺伝子解析でGII.2、GII.6、GII.13に型別された株のポリメラーゼ領域の系統樹解析の結果を図7に示す。N/S領域でGII.2と型別された株は、Pol領域の塩基配列をみると、いずれもGII.15(Neustrelitz260/2000/DE)に分類され、キメラウイルスであることが明らかになった。また、GII.6、GII.13の株は、Pol領域が両者ともGII.6(SaitamaU3/97/JP)であった。

#### 7. SaVの遺伝子解析

検出されたSaVのCap領域の系統樹解析の結果を図8に、検出数の多かったGI.1及びGI.2のPol領域の解析結果を図9～10に示す。調査期間中に検出されたGI.2に型別された株の塩基配列の相同性は、Cap領域が99.3～100%、Pol領域が98.8～100%で、これらの株は非常に近縁であった。同様に、GI.1に分類された株は、塩基配列の相同性がカプシド領域は99.5～100%、Pol領域は95.8～100%で、近縁であった。

### D. 考察

散发性胃腸炎の原因ウイルスの55.3%はNoVであった。例年NoVに占めるGIの割合は約5%と少なかったが、今年は15.5%を占めた。そのうち94%がGI.6で、4月～8月に多数検出された。

GI.6は4月～5月に北海道で発生した集団事例や大阪等で散发例から検出されていることから、本県だけでなく、いくつかの地域でGI.6の地域流行があったものと推察された。愛媛県においては8月～12月にGII.2が多数検出された。例年ウイルスがほとんど検出されない夏季に、GI.6やGII.2のNoVが検出されており、このことが、6月～9月の感染性胃腸炎患者数が例年よりも若干多くなっている原因の一つと考えられた。夏季から冬季に地域流行が見られたGII.2は、遺伝子解析の結果、2010年～2012年に流行が見られた株と同様、Pol/Cap領域がGII.15/GII.2のキメラウイルスであることが示された。

最近、カキ等の二枚貝を原因とする食中毒事例が減少し、調理従事者による食品汚染が原因と推定される事例が多くなっている。調査期間中に食中毒と確定された事例は、調理従事者に胃腸症状が見られた1事例を除き、すべて不顕性感染の調理従事者が原因と推定された。そのうち3事例は、糞便中に排泄されるウイルス量が、患者と不顕性感染の調理従事者で大差はなかった。これらのことから、食中毒等集団発生の予防には、調理従事者への更なる衛生指導の徹底と日常の手洗いの指導が重要である。

SaVは、調査期間中に5種類の遺伝子型が検出された。1月～5月は、検出されたSaVの約81%(21例)がGI.2で、11月～12月は、約93%(26例)がGI.1であった。両遺伝子型とも型別された株間の塩基配列の相同性が高く、それぞれ、近縁なSaVによる地域流行があったことが示唆された。

2013/2014シーズンの感染性胃腸炎患

者数は、10月下旬から増加し始め12月中旬にピークとなった。同時期に、患者から NoV の GII.15/GII.2 キメラウイルスと SaV GI.1 が高率に検出されたことから、両者がこの時期の感染性胃腸炎の主要な病原体であったと考えられた。

NoV は、遺伝子型内での変異や異なった遺伝子型間の組換えによる新しい変異株の出現等を繰り返し、サポウイルスにおいても多様な遺伝子型の株が地域流行を起こしていることから、今後も NoV 及び SaV の詳細な遺伝子解析と発生動向の把握が必要である。

#### E. 結論

1. 2013年1月～12月に散発性胃腸炎から検出された NoV は110例(検出ウイルスの55.3%)、SaV は56例(28.1%)で、SaV の検出数が比較的多いことが示された。
2. NoV の遺伝子型は GI が2種類、GII が7種類で、夏季を中心に GI.6、8月～12月に GII.2 の検出数が多かった。SaV は、5種類の遺伝子型が検出されたが、1月～5月は GI.2、11月～12月は GI.1 の検出数が多かった。また、検出株は両者とも近縁であった。
3. 食中毒事例は、調理従事者に胃腸症状が見られた1事例を除き、すべて不顕性感染の調理従事者による食品汚染が原因と考えられた。そのうち4事例は、糞便中に排泄される NoV 量が患者と不顕性感染者で大差はなかった。
4. 散発性胃腸炎、集団発生例から検出された NoV GII.4 は、2012年11月～12月に全国的に流行がみられた GII.4/Sydney/NSW0514/2012/AU と近縁であった。また、GII.2 は、2010年～2012

年に流行した株と同様、Pol 領域と Cap 領域との間で遺伝子組換えを起こしたキメラウイルスであった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 青木里美、菅美樹、山下育孝、服部昌志、大倉敏裕、四宮博人：ノロウイルスによる食中毒－愛媛県。病原微生物検出情報月報, 34(9)13-16, 2013

##### 2. 学会発表

- 1) 青木里美、山下育孝、菅美樹、服部昌志、大倉敏裕、野田衛、四宮博人：2012/2013 シーズンに検出されたノロウイルス GII.4 の分子疫学的解析。第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸市、2013年11月
- 2) 山下育孝、青木里美、菅美樹、服部昌志、大倉敏裕、野田衛、岡智一郎、四宮博人：愛媛県におけるサポウイルス GI.2 株の流行。第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸市、2013年11月

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

感染性胃腸炎(2004~2013年)

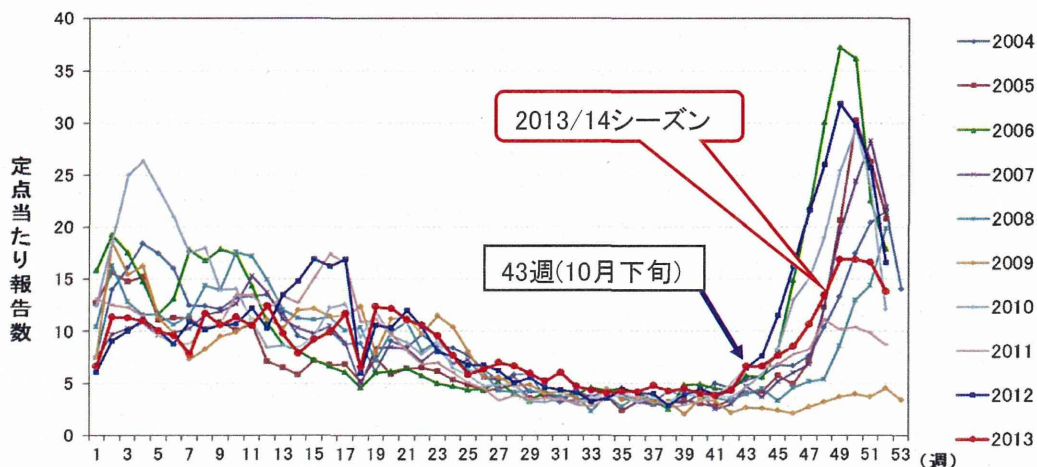


図1 感染性胃腸炎患者の週別発生状況

表1 散発性胃腸炎患者からの月別ウイルス検出状況

月	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	計
ノロウイルス	10	5	7	2	12	8	6	6	9	12	19	14	110
〔 G I G II 〕	1		1	2	2	4	6	1					〕
	9	5	6		10	4	5	9	12	19	14		
サポウイルス	5	5	3	8	5			1	1		10	18	56
ロタウイルス	5	4	7	7	4	2							29
アデノウイルス	1					1			1	1			4
検査数	40	34	24	29	46	31	31	39	36	40	47	49	446

表2 ノロウイルスが検出された食中毒等集団発生事

事例No.	発生日	原因施設等	原因食品(感染経路)	喫食者数(入所者数)	患者数	ノロウイルス陽性数/検査数			遺伝子型
						患者便吐物	従事者便	ふき取り(食品)	
①	1/5	飲食店	仕出弁当	65	34	6/6	3/4	1/11	GII.4
②	1/8	飲食店	昼食	61	23	5/6	1/8	0/10	GII.4
③	1/24	飲食店	サンドイッチ	27	22	12/12	1/10	0/12(0/2)	GII.4
④	1/24	飲食店	昼食弁当	25	17	8/10	1/3	0/10	GII.4
⑤	2/5	社会福祉施設	施設の給食	71	26	5/8	2/6	(0/10)	GII.4
⑥	3/11	児童養護施設	ポテトサラダ*	18	6	4/5	1/7	0/10	GII.2
7	3/11	特別養護老人ホーム	感染症	(80)	14	3/3	職員1/5 調理6/11	(0/12)	GII.4
⑧	3/25	飲食店	会席料理	8	7	4/4	2/2		GI.4 GI.11 GII.13
⑨	5/25	ホテル	食事・弁当	222	110	16/19	8/21		GII.4
⑩	11/30	社会福祉施設	施設の給食	60	13	7/7	職員0/1 調理3/6	0/5(0/9)	GII.4
11	12/22	クリスマス会	感染症	68	37	12/12			GII.6

事例Noが丸数字:食中毒事例

\*:推定

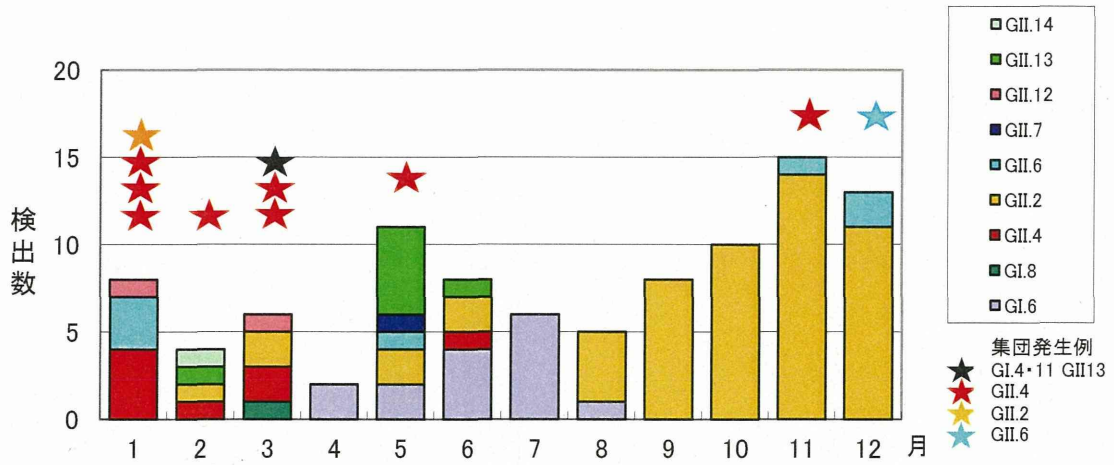


図2 ノロウイルスの月別遺伝子型別検出状況

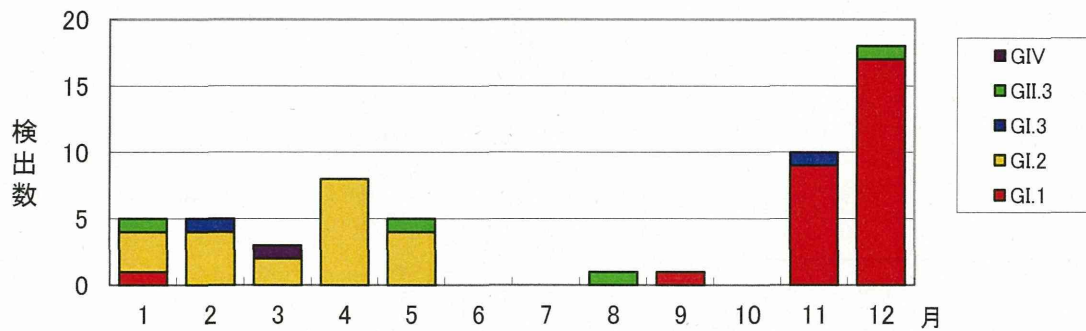


図3 サポウイルスの月別遺伝子型別検出状況

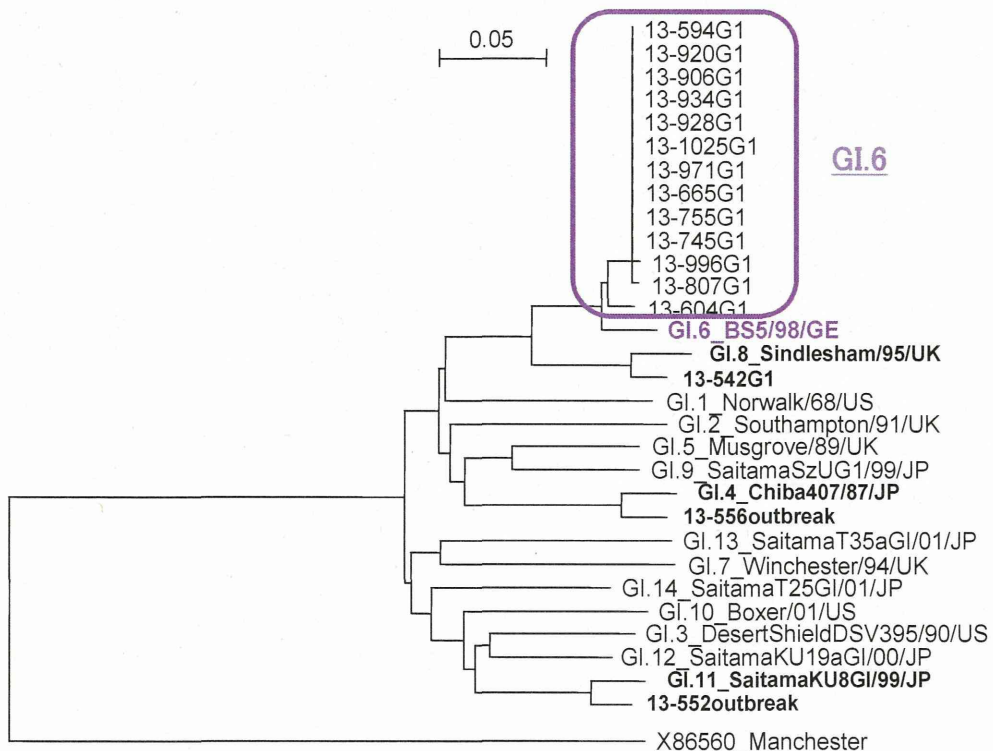


図4 ノロウイルスGIのカプシドN/S領域の系統樹(295bp)

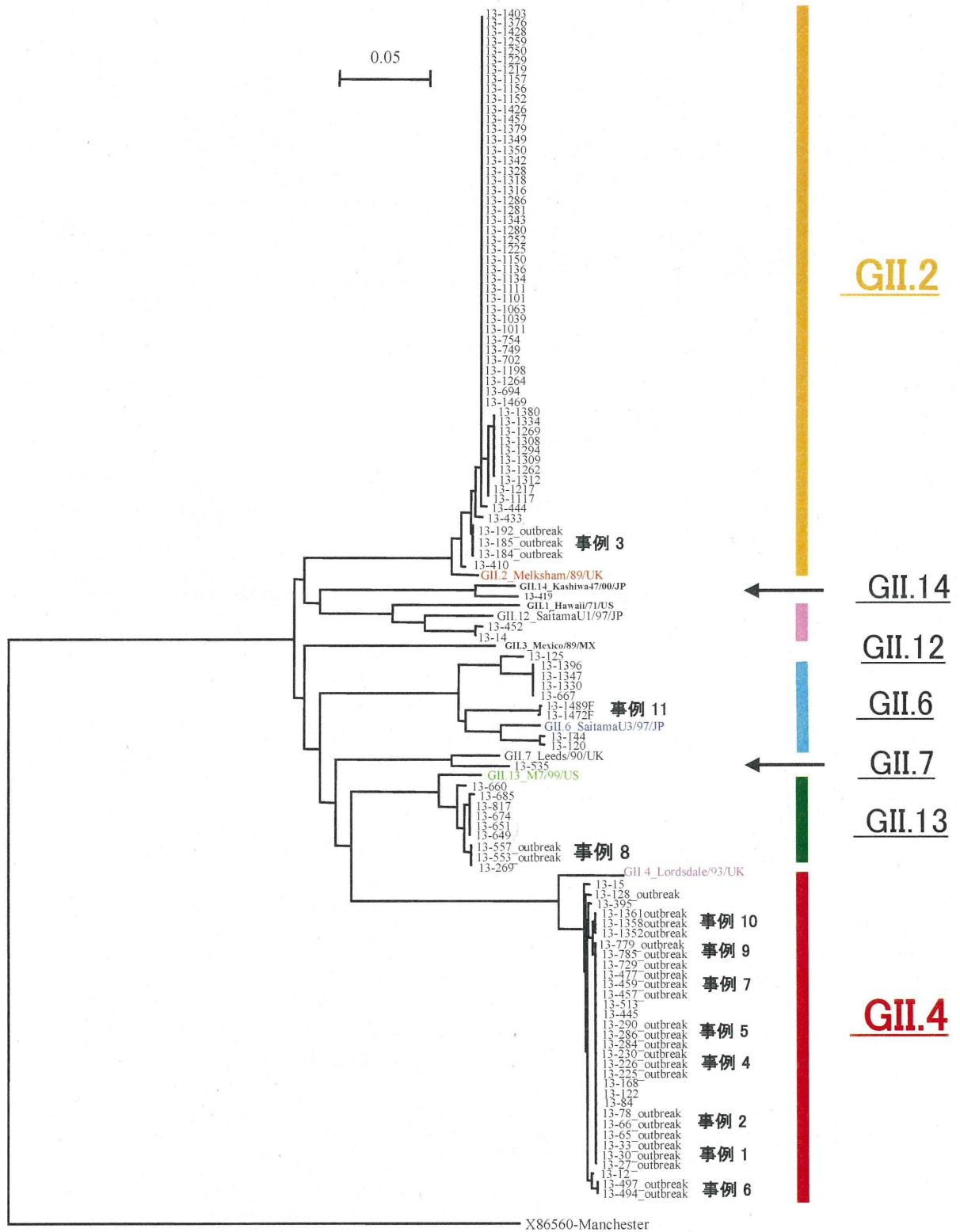


図5 ノロウイルス GII のカプシド N/S 領域の系統樹 (282bp)



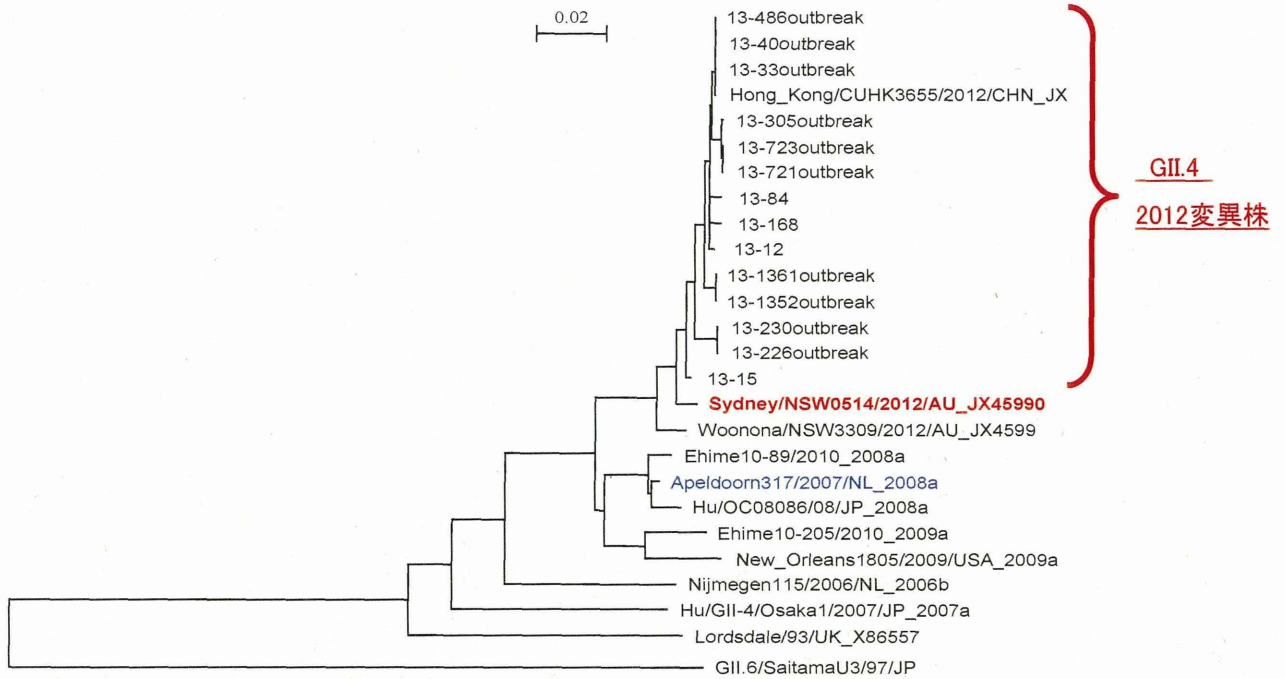


図6 ノロウイルス GII.4 のカプシド P1/P2 領域の系統樹 (621bp)

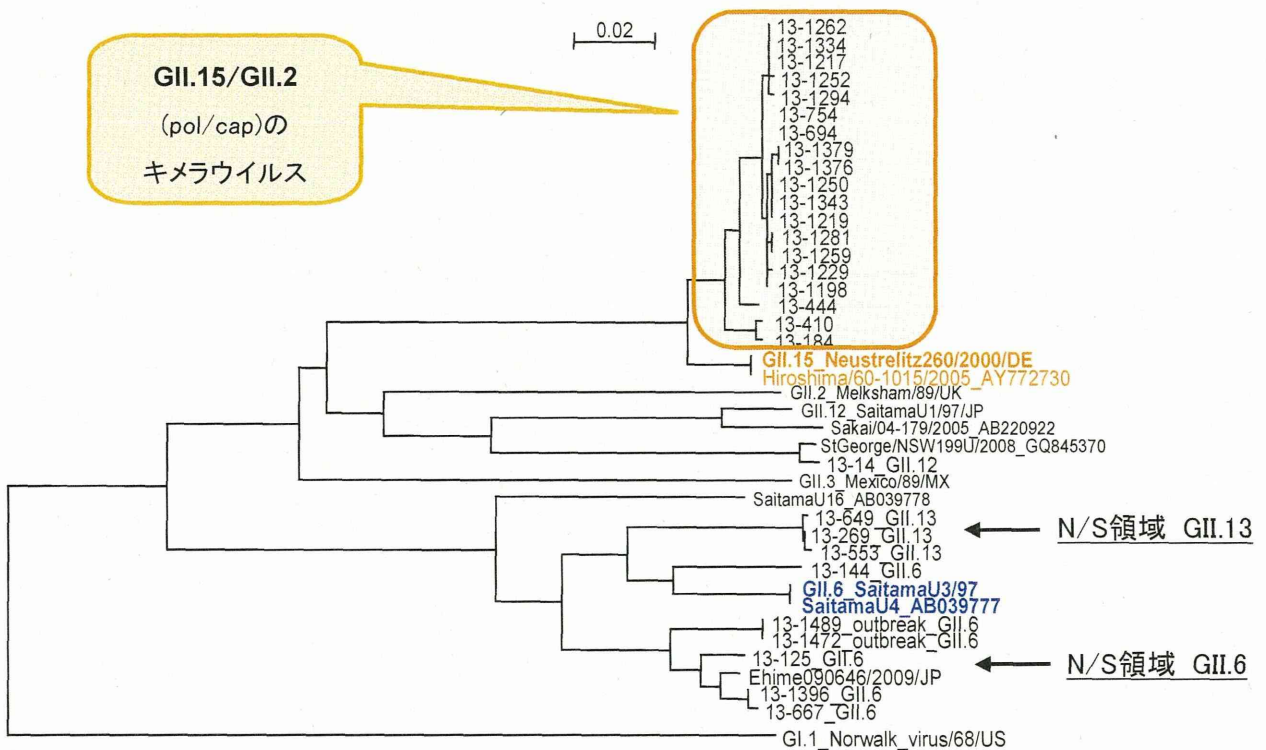


図7 ノロウイルス GII.2、GII.6、GII.13 のポリメラーゼ領域の系統樹 (660bp)



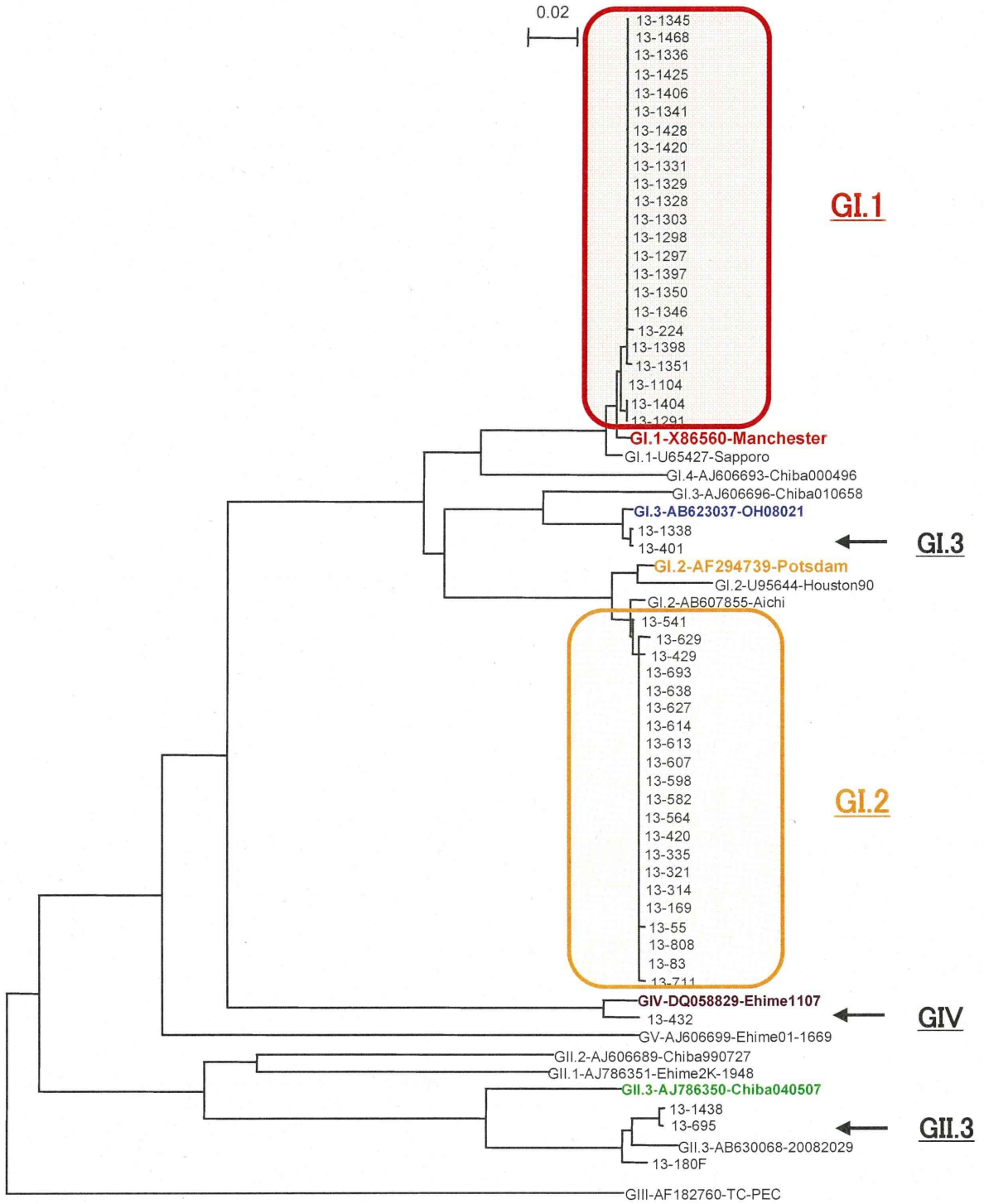


図8 サポウイルスのカプシド領域の系統樹(402bp)

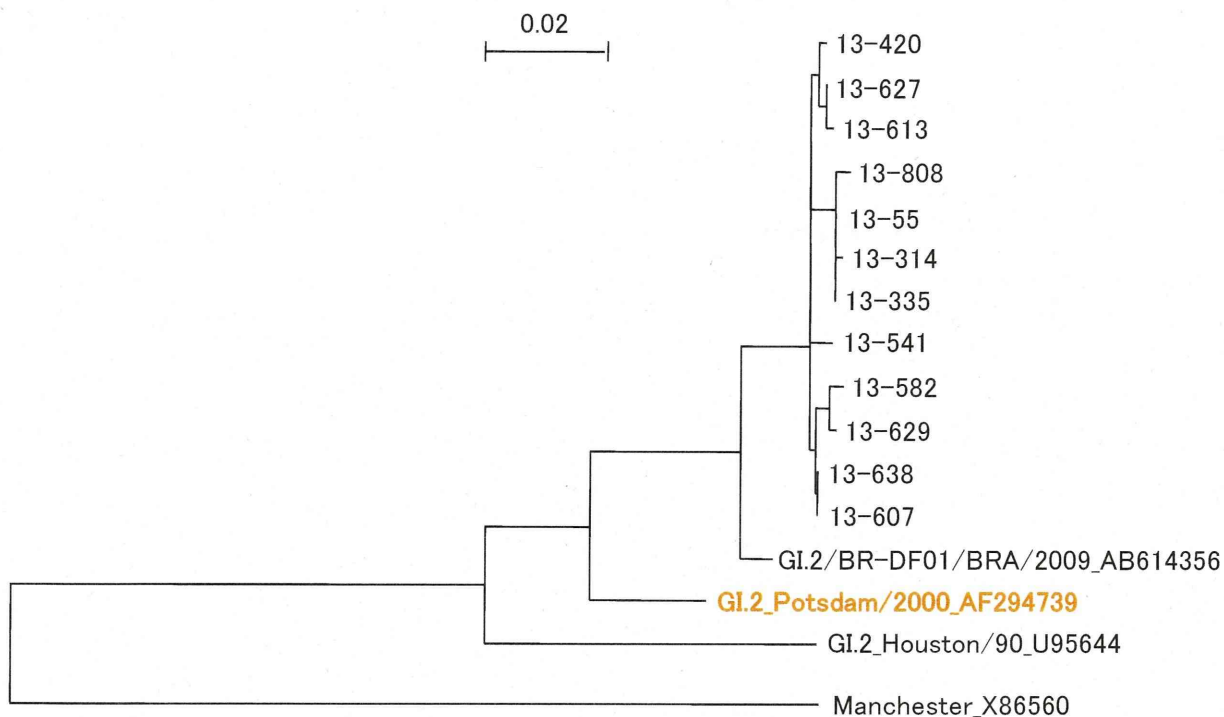


図9 サポウイルス GI.2 のポリメラーゼ領域の系統樹 (780bp)

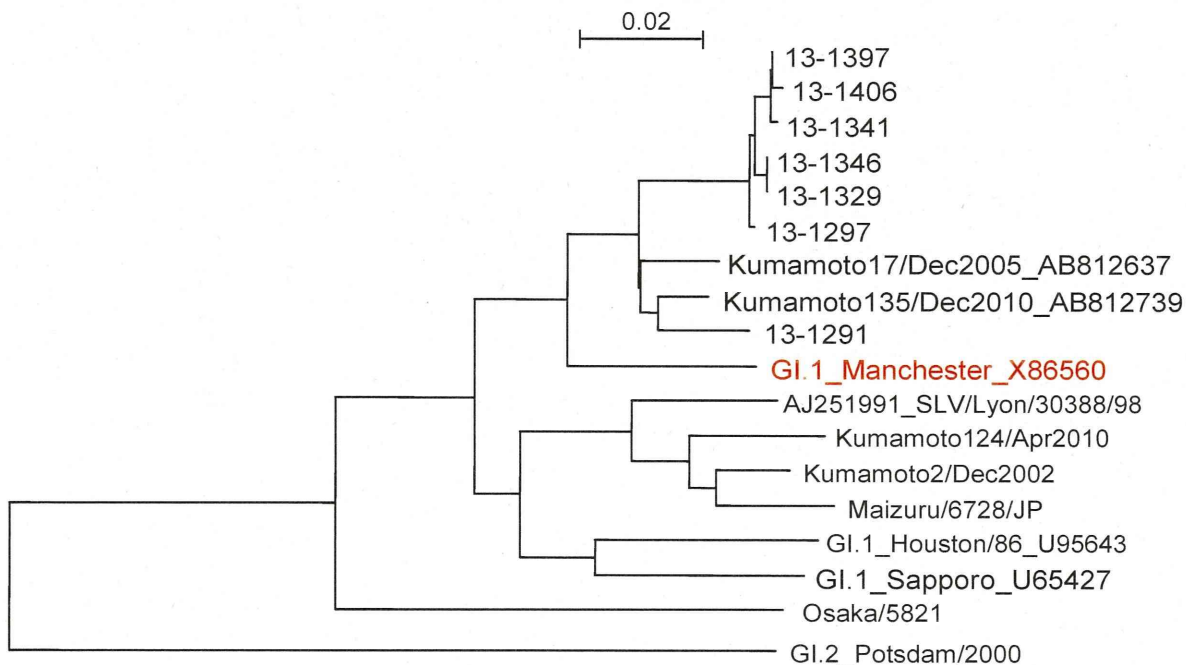


図10 サポウイルス GI.1 のポリメラーゼ領域の系統樹 (618bp)

## 熊本県における集団及び散発下痢症由来ノロウイルスの疫学解析

研究協力者	原田 誠也	熊本県保健環境科学研究所
研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所
研究協力者	吉岡 健太	熊本県保健環境科学研究所

### 研究要旨

2012 年 9 月から 2013 年 12 月にかけて、熊本県内で発生した集団及び散発下痢症事例から下痢症ウイルスの検索を行ったところ、集団事例 30 件中 23 件、及び散発事例 185 件中 113 件からいずれかの下痢症ウイルスが検出された。最も多く検出されたウイルスはノロウイルス (NoV) で、原因が判明した集団事例の 91.7%、及び散発下痢症の 56.3%を占めた。

そこで、熊本県における NoV の流行遺伝子型を把握するためシーケンス解析を行ったところ、集団事例由来株の遺伝子型は、GI/6 (2 件)、GI/NT (1 件)、GII/2 (1 件)、GII/4 (11 件)、GII/11 (2 件)、及び GII/NT (5 件) であった。一方、散発事例由来株の遺伝子型は、GI/6 (4 件)、GII/2 (5 件)、GII/3 (1 件)、GII/4 (31 件)、GII/7 (12 件)、GII/13 (1 件)、及び GII/NT (9 件) で、集団及び散発事例ともに GII/4 の検出率が高かった。また、検出された GII/4 の 92.8%が 2012 Sydney タイプであった。

以上のことから、熊本県における 2013/2014 シーズンの NoV 流行は現在のところ小規模ではあるが、流行遺伝子型の主役は、2012/2013 シーズンに引き続き、GII/4 2012 Sydney タイプであることが明らかとなった。

### A. 研究目的

ノロウイルス (NoV) は、冬季に発生する集団及び散発下痢症の主要な原因ウイルスである。2006/2007 シーズンには、NoV GII/4 が世界的に大流行を起こした。NoV GII/4 はその後も変異を重ねながら毎シーズン流行を繰り返し、2012/2013 シーズンには、組換えを起こしたキメラウイルスである GII/4 2012 Sydney 変異

株が、再度大流行を起こした。

そこで本研究では、熊本県における NoV の流行遺伝子型を把握するため、2012 年 9 月から 2013 年 12 月にかけて発生した集団及び散発事例の下痢症患者から検出された NoV の分子疫学解析を行った。

### B. 研究方法

## 1. 材料

2012年9月から2013年12月にかけて、熊本県内で発生した集団事例32件の患者糞便、拭き取り44検体、食品66検体及び散発事例の患者糞便187検体の計555検体を検査材料とした。

## 2. 下痢症ウイルス検査法

ウイルスゲノムの抽出とcDNA合成は厚生労働省通知（平成19年5月14日付け食安監発第0514004号）に従った。以後、糞便及び拭き取り検体のNoVは、この通知に従い、リアルタイムPCR法で検査した。

また、食品検体のNoVは齋藤の報告によるパンソルビン・トラップ法（日食微誌：29, 32-37, 2012）で検査した。

その他の下痢症ウイルスの検索は、原田らのマルチプレックスRT-PCR法（熊本県保環研報；36, 5-30, 2006）を改変して実施した。すなわち、サポウイルス（SaV）、アストロウイルス（AstV）、アイチウイルス（AiV）、及びエンテロウイルス（EntV）は、プライマーとして、SaVはSR80/JV33（Vinje et al：J.Clin.Microbiol.,38,530-536,2000.）、AstVはMon269/Mon270（Noel et al：J.Clin.Microbiol.,33,797-801,1995.）、AiVはC6261/C6779（Yamashita：J.Clin.Microbiol.,38,2955-2961,2000.）、EntVはEVP4/OL68-1（Ishiko et al：J.Infect.Disi.,185,744-754,2002.）を用いたマルチプレックスPCR法で検査した。また、アデノウイルス（AdV）、A群ロタウイルス（RVA）及びC群RV（RVC）は、YanらのマルチプレックスPCR法（感染症誌,78,699-709,2004.）を改変して使用

した。さらに、SaVのポリメラーゼ/カプシドジャンクション領域をターゲットとするOkaらのプライマー（J. Med. Virol.；78,1347-1353,2006.）とボカウイルス（BoV）のNP1領域をターゲットとするAllanderらのプライマー（Proc Natl Acad Sci；102,12891-12896,2005.）によるRT-PCR法を新たに追加した。

## 3. NoVの遺伝子型解析

集団事例由来の代表株及び散発事例由来株について、カプシドN/S領域（Cap領域）はSKF/R系プライマー、ポリメラーゼ領域（Pol領域）はYuri22F/RプライマーによるPCR産物をQIAquick PCR purification Kit（QIAGEN）で精製し、ダイレクトシーケンスを行った。その後、MEGA5.2を用い、NJ法で作成した系統樹により遺伝子型を決定した。

## （倫理面への配慮）

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

## C. 研究結果

### 1. 集団事例のウイルス検査結果

集団事例30件/糞便258検体中24件/糞便100検体から原因ウイルスが検出された。内訳はNoV GI（3件、13株）、NoV GII（19件、82株）、SaV（1件、2株）及びRVA（1件、3株）であった（表1）。なお、拭き取り及び食品検体から原因ウイルスを検出することはできなかった。

### 2. 散発事例のウイルス検査結果

糞便187検体中113検体（60.4%）からいずれかのウイルスが検出された。検出されたウイルスの延べ数の内訳はNoV

GI(4株、3.5%)、NoV GII(59株、52.2%)、EntV(25株、22.1%)、SaV(17株、15.0%)、AdV(12株、10.6%)、RVA(9株、8.0%)、BoV(3株、2.7%)、及びAstVとAiV(各々2株、1.8%)であった(表2)。なお、ウイルスが検出され113検体中16検体から2種、2検体から3種のウイルスが検出された(表3)。

### 3. NoVの遺伝子型解析

集団発生由来NoVの遺伝子型は、GI/6(2件)、GI/NT(1件)、GII/2(1件)、GII/4(11件)、GII/11(2件)、及びGII/NT(2件)であった(表4)。

2012/2013シーズン及び2013/2014シーズンともに、最も多く検出された遺伝子型はGII/4で、Cap領域及びPol領域のシーケンス解析結果から、GII/4 2012 Sydneyタイプと判定された。また、Cap領域でGII/11と判定した2事例のうち、1事例由来の4株と他の1事例由来1株のPol領域は、ともにGII/13と判定されたことからキメラウイルスである可能性が示唆された。

一方、散発事例由来NoVのCap領域による遺伝子型は、GI/6(4株)、GII/2(5株)、GII/3(1株)、GII/4(31株)、GII/7(12株)、GII/13(1株)、GII/NT(9株)で、半数がGII/4であった(表5)。

GII/4のCap領域及びPol領域によるシーケンス解析では、42株中39株(92.8%)がGII/4 2012 Sydneyタイプ、3株(0.7%)がGII/4 2006bタイプと判定された(図1、図2、図3、図4、図5)。

また、GII/4以外の遺伝子型には、Pol領域のPCR増幅ができない株が多数存在した(図4、図5)。

NoV流行遺伝子型の推移を月別にみると、2012/2013シーズンは、11月から12月にかけてピークがあり、GII/4を中心にGII/7などの遺伝子型が検出された。その他、少数ながらGI/6が長期間検出された。2013/2014シーズンもGII/4 2012 Sydneyタイプが主流ではあるが、前シーズンより流行規模が小さく、流行開始時期も1カ月以上遅かった(表6)。

### D. 考察

2012/2013シーズン及び2013/2014シーズンに発生した集団及び散発下痢症事例の検体から下痢症ウイルスの検索を行った結果、NoV、EntV、SaVなど様々なウイルスが検出された。最も多く検出されたNoVについて、Cap領域及びPol領域のシーケンス解析を行ったところ、熊本県内では2012/2013シーズン以降、GII/4 2012 Sydneyタイプが流行の主役であることが確認された。さらに、2013/2014シーズンのGII/4 2012 Sydneyタイプを2012/2013シーズンに流行した同タイプの株と比較すると、Pol領域において若干ではあるが変異が認められた(図3)。

NoVは多様な遺伝子変異を起こしながら、今後も流行の主流であり続けると考えられる。したがって、大流行を起こす株の出現を予測するためには、今後も国と地方の衛生研究機関が連携を強化し、病原体サーベイランス体制を継続していくことが重要である。

また、本研究期間中に不特定多数の人が出入りする施設の2階と3階で発生した集団事例由来株について、Cap領域及