

図 8A 蒸留水中の NoV RNA 量に及ぼす DNase 処理の影響

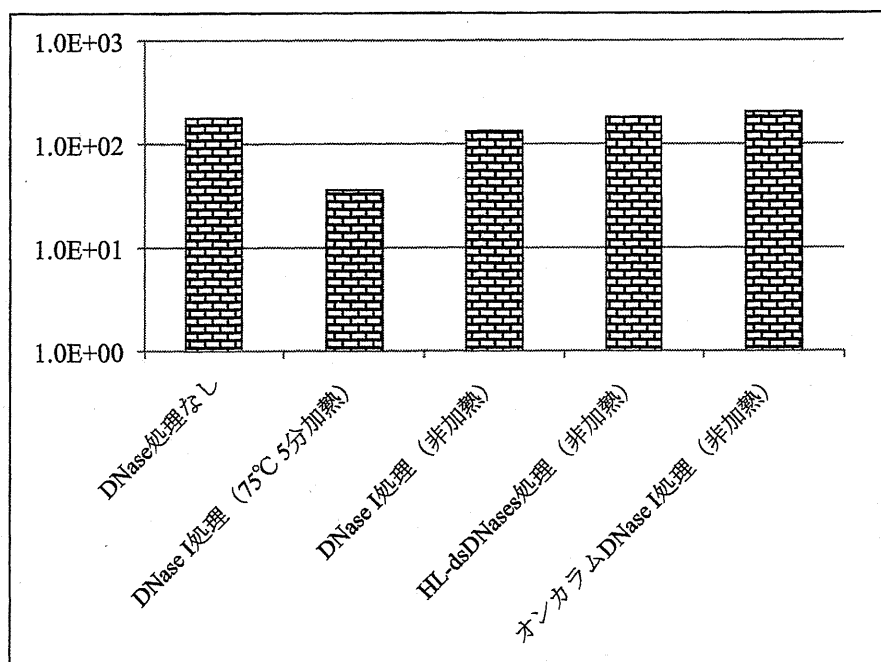


図 8B パントラ抽出物中の NoV RNA 量に及ぼす DNase 処理の影響

NoV RNA を含んだ蒸留水，またはパントラ抽出物に対して上記の DNase 処理を行い，先に最適化を済ませた高温逆転写反応(表 2 の No.4)によって cDNA を合成した後，real-time PCR でコピー数を測定した結果を図 8A と図 8B に示した。DNase 処理を行わなかった場合と比較して，75°C 5 分の加熱を伴う DNase I 処理ではコピー数が 1/5～1/10 に減少した。単純に加熱を省い

た場合でも減少が見られた。一方，HL-dsDNase 処理とオンカラム DNase I 処理ではいずれもコピー数の減少は認められなかった。

### 3.4 α-Amylase 粉末の不溶性成分の残留に関する検討

食品中に多く含まれる炭水化物は物理化学的挙動が核酸(ポリリボース)と類似しているこ

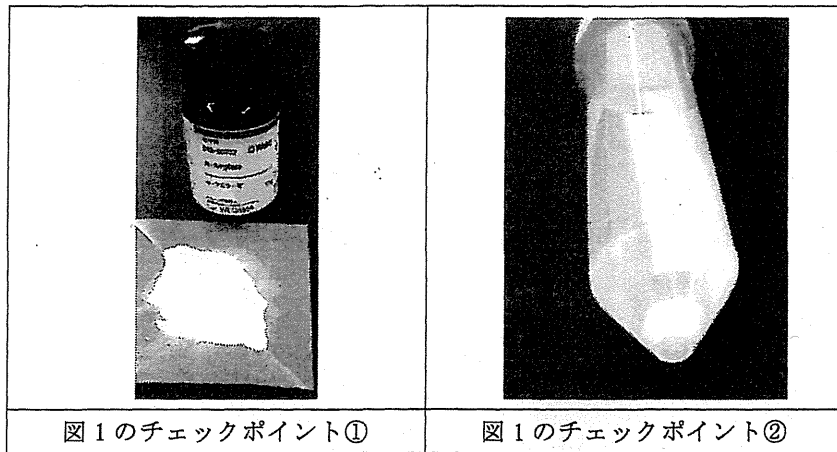


図1のチェックポイント①

図1のチェックポイント②

図9  $\alpha$ -Amylase 粉末の不溶性成分

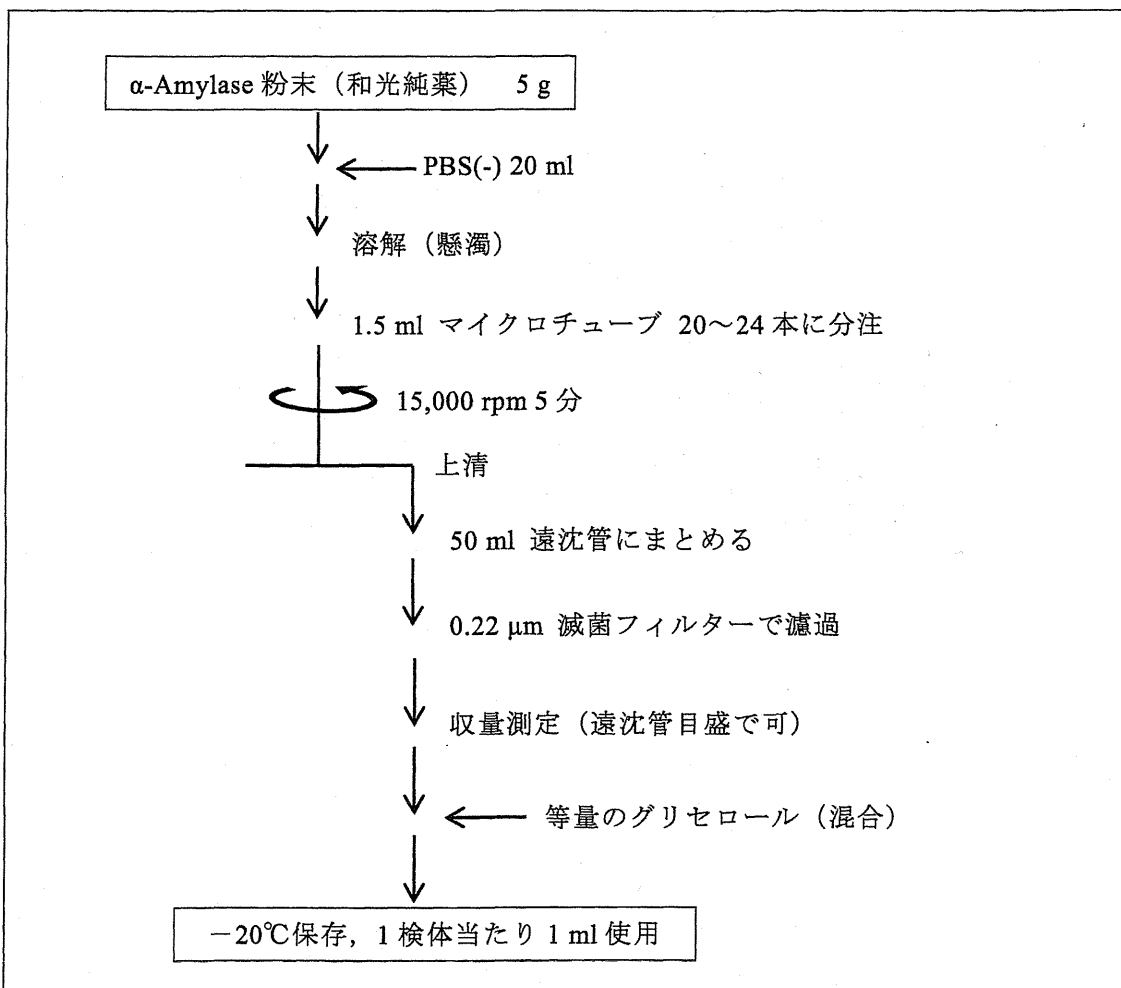


図10  $\alpha$ -Amylase 粉末の液化調製手順

とから、PCRの阻害物質とされている。カキの検査法においても、混入しているグリコーゲンを分解するために $\alpha$ -Amylase粉末が用いられている。パントラ法では、図1に示すとおり $\alpha$ -Amylase粉末を添加するプロセスがある。しかし、この粉末には不溶性成分が含まれており、

図9に示したとおり遠心によって沈澱してくる。メーカーに問い合わせたところ、不溶性成分は錠剤などの製造に使う賦形剤ということであった。具体的な成分は非公開であったが、一般的にメチルセルロースや無水ケイ酸などが用いられることが多い。遠心後に上清を丁寧に別チ

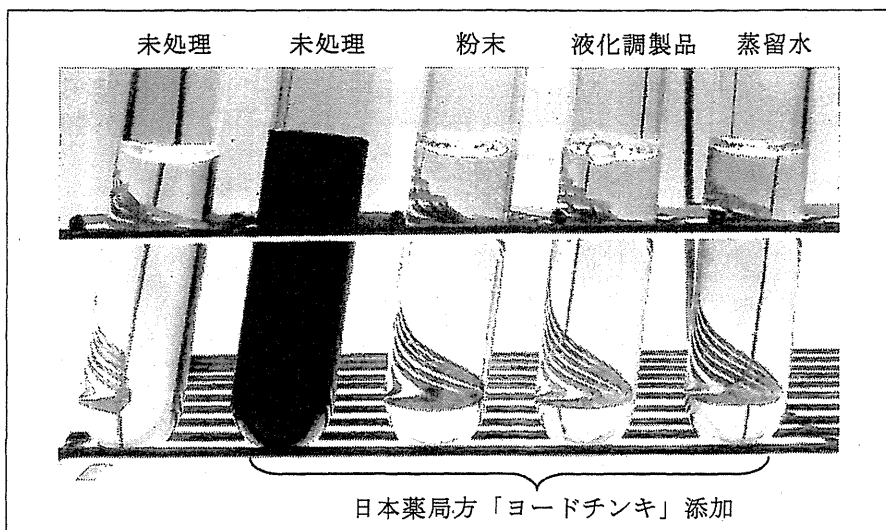


図 11A  $\alpha$ -Amylase 液化調製品の効果の確認 (ヨウ素デンプン反応・デンプン液)

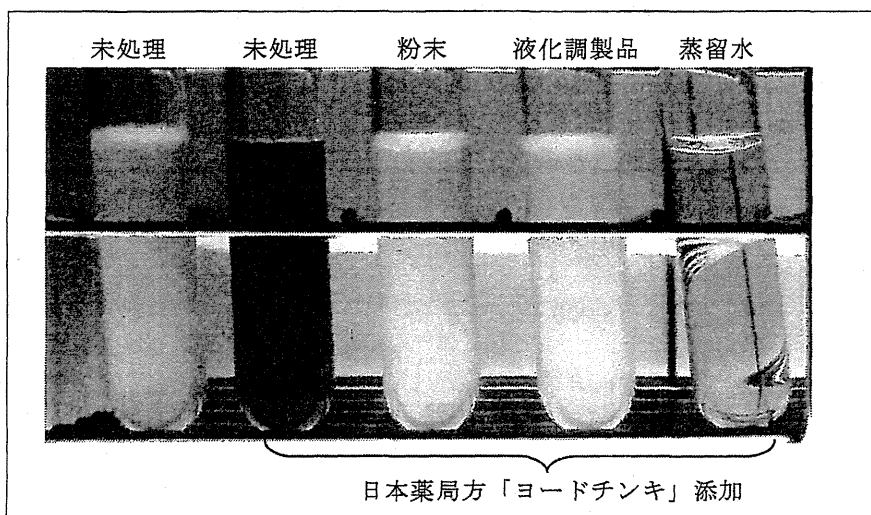


図 11B  $\alpha$ -Amylase 液化調製品の効果の確認 (ヨウ素デンプン反応・ポテトサラダ)

ューブに移し、不溶性成分を完全に除去するようにすれば問題は起こらないが、手間がかかることからデカントで済ませるケースも想定されるこの場合、 $\alpha$ -Amylase の不溶性成分が以後の工程に残留することになり、最終的な検出精度に影響を及ぼすことがわかったため、その解決策を検討した。 $\alpha$ -Amylase をグリセロール溶液とした液体酵素製品もあるが、20  $\mu$ L 程度の反応系を想定しているため、50 mL のパントラ法のプロトコルで用いるにはコスト面において現実的ではない。そこで、 $\alpha$ -Amylase 粉末を液化調製する方法を考案した(図 10)。この  $\alpha$ -Amylase 液化調製品を  $-20^{\circ}\text{C}$  に 2 ヶ月保存した後、デンプンの分解効果を観察した。デンプン液(図 11A)とポテトサラダ(図 11B)のい

ずれにおいても、液化調製品を添加することによってヨウ素デンプン反応が消失した。

次にパントラ法のプロトコルにおいて、不溶性成分が残留した場合と、あらかじめ不溶性成分を取り除いた液化調製品を用いた場合とで検出結果への影響を比較した。図 12A の No.2 と No.3 は不溶性成分が認められた。TRIzol 抽出後の水層(図 1 のチェックポイント③)は無色透明であったが、カラムにアプライする直前にエタノールを添加したところ(図 1 のチェックポイント④)、不溶性成分に由来する白濁が生じた(図 12A)。一方、 $\alpha$ -Amylase 液化調製品を添加した場合にはこのような白濁は生じず、円滑に RNA 抽出工程を終えることができた。抽出した RNA を鋳型として、先に最適化を済ませた高

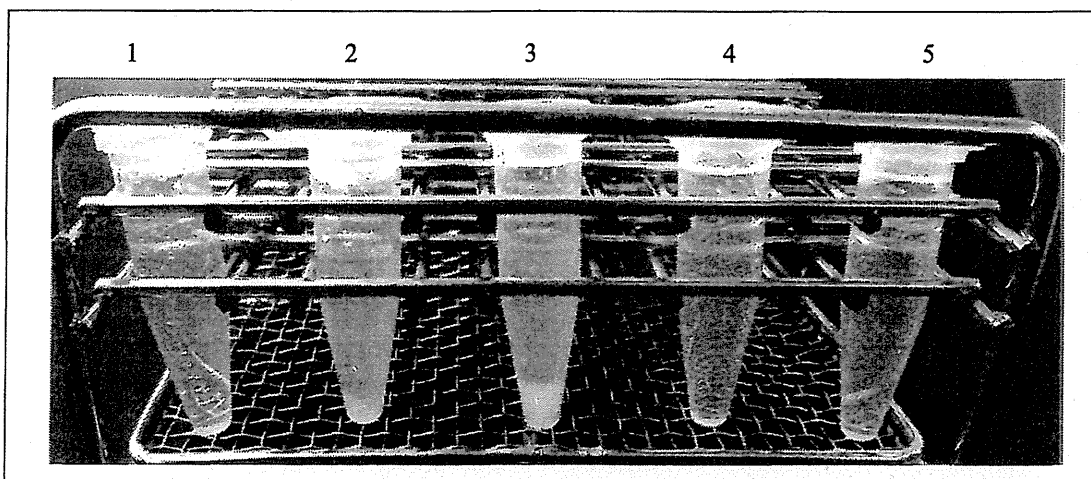


図 12A  $\alpha$ -Amylase 液化調製品の効果の確認 (RNA 精製カラムへのアプライ時)

- 1: 図 1 のチェックポイント①で  $\alpha$ -Amylase 粉末を加え、チェックポイント②において、スポイトを用いて上清を別チューブに丁寧に分取したもの
- 2: 図 1 のチェックポイント①で  $\alpha$ -Amylase 粉末を加え、チェックポイント②において、上清をデカントにより別チューブに移したもの
- 3: 図 1 のチェックポイント①で  $\alpha$ -Amylase 粉末を加え、その後の遠心を行わなかったもの
- 4: 図 1 のチェックポイント①で  $\alpha$ -Amylase 液化調製品を加え、チェックポイント②において、上清をデカントにより別チューブに移したもの
- 5: 蒸留水

温逆転写反応により cDNA を合成し、real-time PCR で検出を試みた結果を図 12B に示した。不溶性成分が残留した状態では、図 12A で白濁を生じただけでなく、PCR も阻害された。不溶性成分をあらかじめ除去した液化調製品を用いることで、こうした不都合がなくなり、検出結果を正常化することができた。

#### 4. 考察

##### 4.1 結果のバラつきが起りやすい箇所

本法はすでに複数の実事例において食品からの NoV の検出に成功していることから、プロトコルとしては完成の域にあるものと考えられる。しかし、実施する機関が増えるにつれて、検出精度にバラつきを生じることになるため、あらかじめ対策を講じておくことが必要である。当初、結果のバラつきを生じやすい箇所として、パンソルビンの輸送中の凍結や、RNA 精製カラムにアプライする際に添加するエタノールの量についても想定していた。前者については、意図的に凍結融解を繰り返したパンソルビンを用いても結果に影響しないことが確認された。後者については、添加するエタノールの量を段階的に変えても結

果は同じであった。そこで本研究では、結果に影響を及ぼすと考えられる箇所を次の 4 点に絞り、それぞれにおいて最適化を図った。

- (1)  $\alpha$ -Amylase 粉末の不溶性成分の混入
- (2) DNase 処理にともなう RNA 分解
- (3) 逆転写反応系の最適化
- (4) PCR 反応系の最適化

最適化は結果を逐次観察しながら行う必要があるため。検討の順番はプロトコルとは逆に (4) → (1) とした ((1) → (4) の検討では、最適化されていないプロセスを経た結果を見ることになり不正確)。

##### 4.2 PCR 反応系の検討

Real-time PCR に用いる試薬の比較検討は平成 24 年度に行っていることから、本研究では conventional PCR の試薬選定と反応条件の最適化について検討した。検討にあたっては、PCR を行う直前の段階である cDNA 合成までは問題がないことを前提としなければならなかった。そこで、結果に影響が及ぶ要因を排除するために、ウイルスを含まない食品から調製したパントラ抽出物をベースとし、そこに NoV の遺伝子

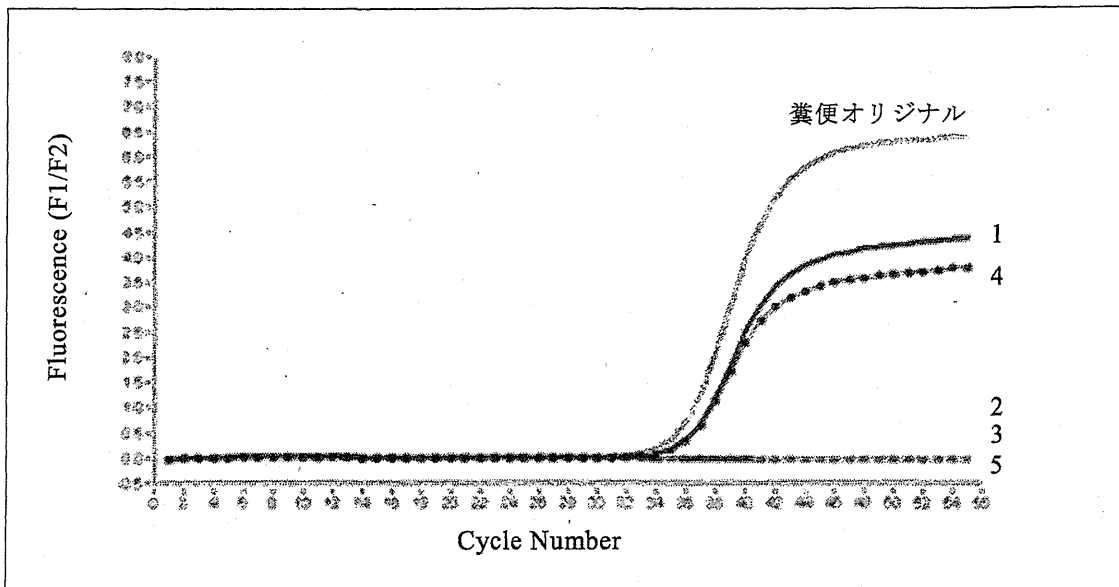


図 12B  $\alpha$ -Amylase 液化調製品の効果の確認 (増幅曲線)

※サンプル 1~5 の内容は図 12A を参照

配列由来の DNA 断片を加えた被検体を用いた。検出感度の検討のために段階希釈試験が一般的に行われているが、ここでは蒸留水で希釈する代わりにパントラ抽出物を使うことで、大量の黄色ブドウ球菌遺伝子の存在下という負荷的条件を設定している。また、将来的に偽陽性対策も視野に入れる必要があり、偽陽性の最大のリスク要因である遺伝子解析作業（電気泳動やゲルからの切り出し精製）と両立させるために、基質として dUTP を使えるように検討を進めた。PCR で用いる酵素（DNA polymerase）は、由来によってファミリー A とファミリー B に大別される。後者には、反応中に間違っただけ塩基が取り込まれた場合にやり直すという校正活性があるが、前者にはない。しかし、同時にファミリー B に属する酵素には dUTP を取り込めないという性質もある。図 2A に示したとおり、dUTP を基質として用いることができる酵素はファミリー A に属するものだけであった。ファミリー A には校正活性がないため、塩基の読み間違いが発生（数万塩基に 1 つ）し、遺伝子解析の正確さが損なわれる懸念もある。しかし、通常行われている PCR 産物のダイレクトシーケンシングでは、こうしたエラーはバックグラウンドノイズに包含されて顕在化しないため問題はないと考えられる。表 1 の反応系から dUTP を取り込んだものを抜き出し、さらにパントラ抽出物で負荷をかけた条件で検討したところ、図 2B

に示したとおり、ホットスタート仕様が必須であった。これは、大量に存在する黄色ブドウ球菌への非特異反応を抑えることが重要であることを示している。また、基質として dUTP を使用する場合には  $Mg^{2+}$  濃度を増やす必要があることも示された。dUTP は本来の塩基である dTTP よりも取り込み率が落ちることから、反応系に 3 倍量を加えることで対応している（dTTP:200  $\mu$ M, dUTP:600  $\mu$ M）。ヌクレオチドには弱いながらもキレート効果があるため、 $Mg^{2+}$  の実効濃度が低下する分だけ増量する必要があるものと考えられる。dUTP を用いた上で、蒸留水による段階希釈結果と同等の感度を有する反応系として、最終的に図 2C に示す 3 つが選択された。さらに利便性を考慮し、表 1 の No.12 を第一選択とした。dUTP を取り込んだ増幅断片は、Uracil-N-Glycosylase を作用させることで選択的に分解除去が可能であるため、偽陽性の防止に有効であるものと考えられる。

#### 4.3 逆転写反応系の検討

PCR 反応系の最適化の場合と同様に、逆転写反応直前の段階までは問題がないことを前提として検討を行う必要があることから、NoV RNA をパントラ抽出物で段階希釈した被検体を用いた。表 2 に示した酵素を用いて逆転写反応を行った後は、最適化の済んだ real-time PCR、または conventional PCR で結果を比較検討した。表

2 に示した逆転写酵素は、至適反応温度によって3つに分けられる。M-MLV (モロニー・マウス・白血病ウイルス) 由来の逆転写酵素は、37℃で反応が行われる(表2のNo.1)が、これを改変して、反応温度を42℃に高めたものがNo.2, No.3, No.5である。一方、もともと至適反応温度が高い AMV (トリ骨髄芽球症ウイルス) 由来の逆転写酵素を改変して、さらに高温反応を行えるようにしたものがNo.4とNo.6である。図3A, 図3B, 図3Cでは、RNAが低濃度であるほど、高温逆転写反応が有効であることが示されている。横軸からの立ち上がりサイクルに大きな違いはないものの、縦軸の蛍光強度に差が見られることから、高温になるほど増幅効率が高くなっているといえる。図3Aのように高濃度のRNAを増幅して検体中の初期コピー数(横軸に依存)を算定しても違いが現れないが、蛍光強度が低い(増幅効率が低い)反応系では検出限界において不利となる(図3B, 図3C)。次に高温逆転写反応の最適化を行ったところ58℃による反応が最も増幅効率が高かった(図4A, 図4B)。高温になるほど非特異反応は減るものの、プライマーのアニーリング効率も下がるため、総合的な増幅効率は両者のバランスの上に成り立っているものと考えられるが、高温逆転写反応が可能な酵素同士(表2のNo.4とNo.6)を比較したところNo.4の増幅効率が高かった(図5A, 図5B)。No.4の酵素にはRNaseH活性が残存しており、No.6の酵素では除去されているという違いがある。cDNA合成後は、鋳型となったRNA鎖は不要となり、むしろPCRの効率を悪くすることからRNaseH活性が残存している方が有利であるものと考えられる。

続いて、real-time PCRを用いて行った検討内容をconventional PCRにて行い、非特異反応の程度を比較した(図6)。37℃による逆転写反応系では増幅バンドが認められないが、これは図3A~図3Cにおいて蛍光強度が低かった結果と一致している。42℃の反応系では、高濃度のNoV RNAに対しては正しく増幅できるものの、低濃度では黄色ブドウ球菌の非特異増幅が優位となっている。このことは、図3B, 図3C, 図5A, 図5Bにおいて蛍光強度が低かった理由と

なる。このような黄色ブドウ球菌に対する非特異反応は55℃では若干残るものの、58℃では完全になくなり、NoV遺伝子だけが効率的に増幅できている。すなわち、real-time PCRにおいて蛍光強度が高かった結果を裏付けているものと考えられる。

#### 4.4 DNase 処理法の検討

これまでにカキ等のウイルス検査において、カキ本体由来のDNAを除去するために逆転写反応の前にDNase処理を行うことが推奨されてきた。パントラ法で抽出されたRNAにも大量の黄色ブドウ球菌由来のDNAが混入することから、非特異反応を抑制するためにもDNase処理は有効な手法と考えられる。しかし一方で、DNase処理で一般的に用いられる酵素であるDNase Iは、反応後の失活に75℃5分の加熱を必要とすることから、肝心のウイルスRNAが分解・減少してしまうという難点があった(図8A, 図8B)。極微量のウイルスRNAを扱う食品検査において、この問題は看過し得ないものと考えられる。また、単純に加熱を省いただけでは、残存するDNase Iによって、合成されたcDNAも損傷を受けるため根本的な解決にはなり得ない。そこで、50℃で活性がなくなり、55℃で不可逆的に失活する易熱性DNase (HL-dsDNase)を用いることで、75℃5分の加熱を行わずに逆転写反応に移行することができた。このプロセスを実行するためには、先に最適化を済ませた58℃の高温逆転写反応と組み合わせることが必須であり、42℃の逆転写反応は、活性を発現させたDNaseによってcDNAが損傷を受けるため不相当である。なお、この酵素は我が国で流通していないため、ノルウェーから直接取り寄せる必要がある。そこで一般的に用いられているDNase Iを用いた方法として、図7に示したオンカラム処理法を考案した。パントラ法のRNA抽出工程に組み入れることができるため、最も利便性が高いが、DNAウイルスであるアデノウイルスが想定されるケースでは使用できない。易熱性DNase処理とオンカラムDNase I処理のいずれにおいてもウイルスRNAの減少は認められなかった(図8A, 図8B)ことから、各機関の実状に合わせて選択することが可能である。

#### 4.5 $\alpha$ -Amylase の不溶性成分の影響に関する検討

パントラ法では食品中の炭水化物を分解除去するために  $\alpha$ -Amylase 粉末を添加しているが、この粉末には賦形剤が含まれているため完全には溶解しない (図 9)。その後の工程において、3,000 rpm 30 分の遠心によって食品残渣を沈澱除去する際に、この不溶性成分も一緒に取り除くことが可能であるが、そのためにはスポイトで上清を丁寧に別チューブに分離する必要がある。検体数が多い場合には、この操作はかなりの負担となり得る。しかし、デカントによって簡便に上清を分離した場合には、不溶性成分の残留は避けられず、精製カラムにアプライする直前にエタノールを添加した際に白濁を生じ (図 12A の No.2, No.3)、検出結果にも影響する (図 12B の No.2, No.3)。そこで、本研究では  $\alpha$ -Amylase 粉末から不溶性成分を除去して液化調製 (図 10) することで問題解決を図った。液化調製した  $\alpha$ -Amylase は、粉末と同様に炭水化物を分解できることが確認された (図 11A, 図 11B)。また、精製カラムにアプライする工程において白濁せず (図 12A)、検出結果もこれまでの粉末を添加する方法と同等であった (図 12B)。これらの結果は、 $-20^{\circ}\text{C}$  で 2 ヶ月間保存した後の液化調製品を用いて得られたものであり、あらかじめ十分量を調製しておいても不都合はないことを示している。カキのウイルス検査の工程にも  $\alpha$ -Amylase 粉末が用いられているが、液化調製品に置き換えることで簡便化が図られるものと考えられる。

#### 4.6 今後の課題

本法は実際の食中毒事例に適用され、食品からのウイルス検出に成功しており<sup>22-25)</sup>、厚生労働省通知<sup>26)</sup>や食品衛生検査指針<sup>27)</sup>に記載されたことから、今後の普及が見込まれる。その一方で、実験室内汚染による偽陽性の問題が浮上してくることが想定される。本研究により効率的に遺伝子解析可能な DNA 断片を得ることができるようになったが、それは両刃の剣であることに留意する必要がある。すなわち、遺伝子解析を積極的に実施すれば、それだけ作業環境中の PCR 増幅産物汚染が蓄積されて、新規の食品検査において悪影響を及ぼすというジレンマである。これまでは、作業する実験室を分けて、

器具や試薬を分別使用するなど、実験操作を慎重に行うということ以外に積極的な偽陽性対策は取られてこなかった。しかし、食品のウイルス検査が現実的なものとなった段階では、その社会的な影響に鑑みて、一層の偽陽性対策を講じる必要があるものと考えられる。本研究により最終的に得られる DNA 断片にウラシルが含まれるようにデザインすることができたため、Uracil-N-Glycosylase 処理による偽陽性防止策を取ることが可能である。その方法の評価は今後の課題とする。

さらに、本法が有効に活用されるためには、適切な食品サンプルの確保が重要である。具体的には、実際に食卓に供せられる段階の検食 (調理から盛り付けのプロセスを経たもの) を保存するという原則を、事業者に周知する必要がある。また、ウイルスは食品中では増えず付着するのみであることから、分取した食品サンプルに付着していなければ陰性となってしまう。そのため、サンプリングプランや、スケールアップの方法についても検討する余地が残されている。

#### 5. まとめ

本研究で得られた知見を総括すると次の 4 点に集約される。

第一に、パントラ法に添加する  $\alpha$ -Amylase はあらかじめ液化調製したものをを用いる方が簡便で、その後のトラブルを防止できる。

第二に、黄色ブドウ球菌の DNA を除去するためには RNA 抽出時にオンカラム DNase I 処理を行うか、抽出後に易熱性 DNase 処理を行うことが有効である。いずれの方法も非加熱であるため、RNA の分解・減少は起こらない。

第三に、 $58^{\circ}\text{C}$  の高温逆転写反応を行うことで、黄色ブドウ球菌由来の RNA (16s リボソーム) に対する非特異反応を抑制できる。

第四に、PCR の反応系を適切に選択 (酵素の種類、ホットスタート仕様、Mg 濃度) することで、増幅効率を最適化でき、将来的な偽陽性対策の布石として dUTP を用いることができる。

#### 参考文献

- 1) 国立感染症研究所感染症情報センター, 国立感染症研究所ウイルス第二部: ノロウイルス

- 集団発生事例に対して感染症および食品部局が共同で実施する初期実地疫学調査および微生物学的検査のポイント(第1版:平成19年11月18日付け), 2007, 16-17.
- 2) 丸山務(監修): 改訂 ノロウイルス現場対策, 2007, 35-36.
  - 3) 薬事・食品衛生審議会 食品衛生分科会食中毒部会: ノロウイルス食中毒対策について(提言), 2007, 1-2.
  - 4) 斎藤博之, 他: パンソルビン・トラップ法による食品検体からのノロウイルスの回収, 厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 食品中のウイルスの制御に関する研究 平成19年度 総括・分担研究報告書, 2008, 103-111.
  - 5) 東方美保, 他: パンソルビン・トラップ法による食品検体からのノロウイルスの回収(検討2), 厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 食品中のウイルスの制御に関する研究 平成19年度 総括・分担研究報告書, 2008, 125-133.
  - 6) 斎藤博之, 他: 食品検体のノロウイルス検査に向けたパンソルビン・トラップ法の開発, 秋田県健康環境センター年報, 4, 2008, 75-81.
  - 7) 東方美保, 他: パンソルビン・トラップ法による食品検体からのノロウイルスの回収検討(第1報), 福井県衛生環境研究センター年報, 7, 2008, 69-72.
  - 8) 斎藤博之, 他: パンソルビン・トラップ法の実用化に向けた改良(検討1), 厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 食品中のウイルスの制御に関する研究 平成20年度 総括・分担研究報告書, 2009, 27-38.
  - 9) 東方美保, 他: パンソルビン・トラップ法の実用化に向けた改良(検討2), 厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 食品中のウイルスの制御に関する研究 平成20年度 総括・分担研究報告書, 2009, 181-190.
  - 10) 斎藤博之, 他: 食品検体のノロウイルス検査に向けたパンソルビン・トラップ法の実用性向上に関する研究, 秋田県健康環境センター年報, 5, 2009, 54-62.
  - 11) 斎藤博之, 他: パンソルビン・トラップ法による食品検査法の構築(検討1), 厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 食品中のウイルスの制御に関する研究 平成21年度 総括・分担研究報告書, 2010, 45-60.
  - 12) 東方美保, 他: パンソルビン・トラップ法による食品検査法の構築(検討2), 厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 食品中のウイルスの制御に関する研究 平成21年度 総括・分担研究報告書, 2010, 187-197.
  - 13) 斎藤博之, 他: パンソルビン・トラップ法による食品中のノロウイルス検査法の構築, 秋田県健康環境センター年報, 6, 2010, 59-69.
  - 14) 斎藤博之, 他: 食品検体の病原ウイルス検出を可能にした汎用型パンソルビン・トラップ法の開発, 秋田県健康環境センター年報, 7, 2011, 43-53.
  - 15) 斎藤博之, 他: パンソルビン・トラップ法による食品からのウイルス検出法, 病原微生物検出情報, 32, 12, 2011, 4-5.
  - 16) 斎藤博之, 他: 食品中のウイルス検査に向けてのパンソルビントラップ法の汎用化, 厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業 食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究 平成22年度 総括・分担研究報告書, 2011, 45-57.
  - 17) 斎藤博之: 食品のノロウイルス検査の汎用化を目指したパンソルビン・トラップ法の開発, 日本食品微生物学会雑誌, 29, 1, 2012, 32-37.
  - 18) 斎藤博之, 他: パンソルビン・トラップ法によって食品検体から検出されたノロウイルスの遺伝子解析法の開発, 厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業 食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究 平成24年度 総括・分担研究報告書, 2013, 35-48.
  - 19) 野田衛, 他: パンソルビン・トラップ法の多機関評価試験結果, 厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業 食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究 平成24年度 総括・分担研究報告書, 2013, 77-110.
  - 20) Kojima S., et. al.: Genogroup-specific PCR



- primers for detection of Norwalk-like viruses. J. Virol. Method, **100**, 2002, 107-114.
- 21) Kageyama T., et. al.: Broady reactive and highly sensitive assay for Norwalk-lile viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. J. Clin. Microbiol., **41**, 2003, 1548-1577.
- 22) 三好龍也, 他: 食品中からノロウイルス遺伝子が検出された食中毒事例, 病原微生物検出情報, **32**, 12, 2011, 13-14.
- 23) 飯塚節子, 他: パンソルビン・トラップ法による食品からのノロウイルス遺伝子の検出ー弁当屋を原因施設としたノロウイルス集団食中毒事例ー, 厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業 食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究 平成 24 年度 総括・分担研究報告書, 2013, 175-180.
- 24) 古田敏彦, 他: 浜松市内におけるノロウイルス集団食中毒事例, 病原微生物検出情報, **35**, 7, 2014, 4-5.
- 25) 土屋祐司, 他: パンと原因としたノロウイルス集団食中毒事例, 日本食品微生物学会雑誌, **32**, 3, 2015, 153-158.
- 26) 厚生労働省通知: 「ノロウイルスの検出法について」の一部改正について, 食安監発 1022 第1号, 平成 25 年 10 月 22 日.
- 27) 斎藤博之, 他: 食品・臨床材料・拭き取りの前処理法, 食品衛生検査指針 2015 (微生物編), 2015, 607-617.

## 2012-2013シーズンに大阪市で認められたノロウイルス流行

入谷展弘、改田 厚、阿部仁一郎、山元誠司、久保英幸、平井有紀、後藤 薫、長谷 篤

## Epidemic of norovirus in Osaka City, Japan during the 2012-2013 season

Nobuhiro IRITANI, Atsushi KAIDA, Niichiro ABE, Seiji P YAMAMOTO,  
Hideyuki KUBO, Yuki HIRAI, Kaoru GOTO, Atsushi HASE

## Abstract

In 2012-2013 season, norovirus (NV) infections remarkably increased in Japan including Osaka City. From the genotyping of NV strains in Osaka City, between April 2012 and March 2013, GII.4 genotype strains were detected in 89.0% of NV-positive outbreaks. Furthermore, these GII.4 strains were classified into three subtypes (Den\_Haag\_2006b, New\_Orleans\_2009, and Sydney\_2012). GII.4 Sydney\_2012 was predominant in 2012-2013 season and genetically different from past epidemic GII.4 strains.

**Keywords:** Norovirus, Outbreak, GII.4 Sydney\_2012, 2012-2013 season

## I 緒言

ノロウイルス(NV)は、乳幼児から高齢者まで幅広い年齢層のヒトに感染し、急性胃腸炎を引き起こす。NV胃腸炎は年間を通じて認められ、毎年秋から冬に大きく流行している。ゲノムの遺伝子配列の解析から、ヒトNVはGenogroup I (GI)、GIIおよびGIVの3種類の遺伝子グループに分類され、GIおよびGIIが毎年流行している[1,2]。GIとGIIには、さらに複数の遺伝子型が存在している[3]。

当研究所では、大阪市におけるNV流行実態を把握するために検出されたNV株の遺伝子型別を行い、流行解析を実施している[4-6]。最近では、GII.4型に分類されるNVが世界的な感染拡大と流行を周期的に起こしていることが明らかにされた[7]。特に2006年秋から2007年冬には、GII.4型の新しい変異株(Den\_Haag\_2006b)が世界的に大きく流行し、大阪市を含めて日本においても記録的な大流行となった[6,8,9]。

2012年11月から12月の期間に大阪市においてNVによる胃腸炎事例が多発した。全国的にも同様であり、2012-2013シーズンはNVが大きく流行したシーズンとなった。今回、2012-2013シーズンに大阪市で検出されたNV株について分子疫学的解析を実施した。

## II 材料と方法

## 1) 検査材料

2012年4月~2013年3月までの期間に大阪市立環境科学研究所に搬入された非細菌性胃腸炎166事例(患者糞便650検体)を対象とした。

## 2) NVの検出および遺伝子型別

糞便材料の処理は既報の方法に準じて行った[10]。ウイルスRNAの抽出はQIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN)を用いてQIAcube (QIAGEN)で行った。NV遺伝子の検出は、リアルタイムRT-PCR法を用いてABI PRISM7700 (Life Technologies)で行った[5, 11]。

リアルタイムRT-PCR法で陽性となった検体は、既報[12]のプライマーペアを用いて、GeneAmp PCRシステム9700 (Life Technologies)でCapsid N/S領域の遺伝子を増幅した。特異的遺伝子断片の増幅が認められた検体は、ダイレクトシーケンス法により、Applied Biosystems 3130 ジェネティックアナライザ (Life Technologies)を用いて、塩基配列を決定した。NVの遺伝子型別は、既報[5, 8]に従って分類し、遺伝子型番号はKageyamaら[3]に従った。検出されたGII.4型NVの亜型は、Norovirus Genotyping Tool Version 1.0

(<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool#/>)を用いて分類した。

### Ⅲ 結果

NVは、166 事例中 118 事例 (71.1%)、患者糞便材料 650 検体中 377 検体 (58.0%) から検出された。9 月から翌年 8 月までの期間を 1 シーズンとして NV 事例発生数を比較したところ、2012-2013 シーズン (2012 年 9 月～2013 年 3 月) の発生数は 107 事例であり、過去最多であった (図 1)。NV が検出された胃腸炎事例の発生は 9 月を除くすべての月で認められた (図 2)。2012-2013 シーズンの NV 流行は、10 月から始まり、11 月 (51 事例) および 12 月 (22 事例) に集中していた。NV 陽性事例のうち、ヒトからヒトへ感染が疑われた (PP) 事例は、少なく

とも 94 事例 (79.7%) 認められ、主な原因施設は保育園、小学校、高齢者施設、社会福祉施設などであった。カキなどの二枚貝以外の食品が原因であった事例は 12 事例 (10.2%) であった。二枚貝の喫食が関連していた事例は 4 事例 (3.4%) であった。

検出された NV の遺伝子型は、少なくとも 7 種類 (GI: 2 種類、GII: 5 種類) 認められた。GII.4 型が最も多く、複数の遺伝子型が検出された 3 事例を含めて合計 105 事例 (89.0%) であった (表 1)。さらに GII.4 型 NV 株は、3 種類の亜型 (Den\_Haag\_2006b、New\_Orleans\_2009、Sydney\_2012) に分類され、95 事例 (90.5%) から検出された GII.4 Sydney\_2012 が最も多かった (表 2)。Capsid N/S 領域の塩基配列 (338 塩基) の比較から、大阪府で検出された GII.4 Sydney\_2012 株は、98.8% 以上の

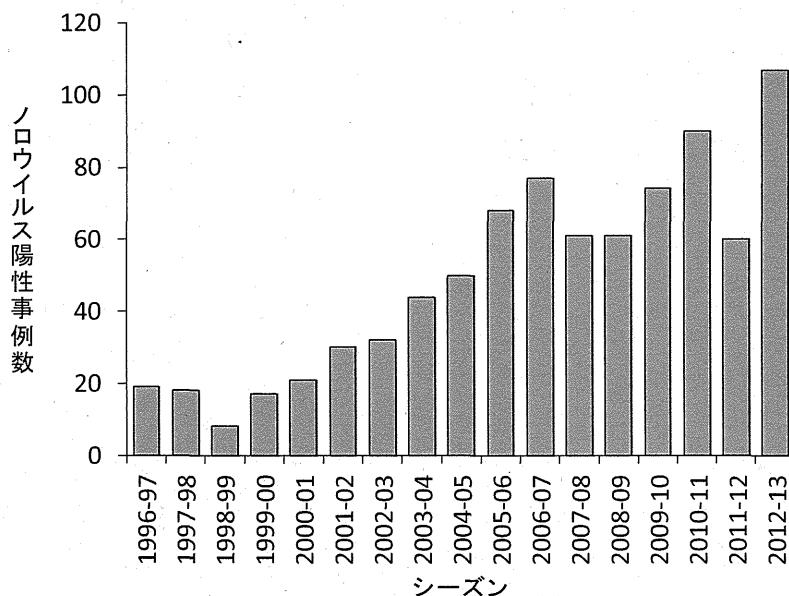


図1 シーズン別ノロウイルス陽性事例数

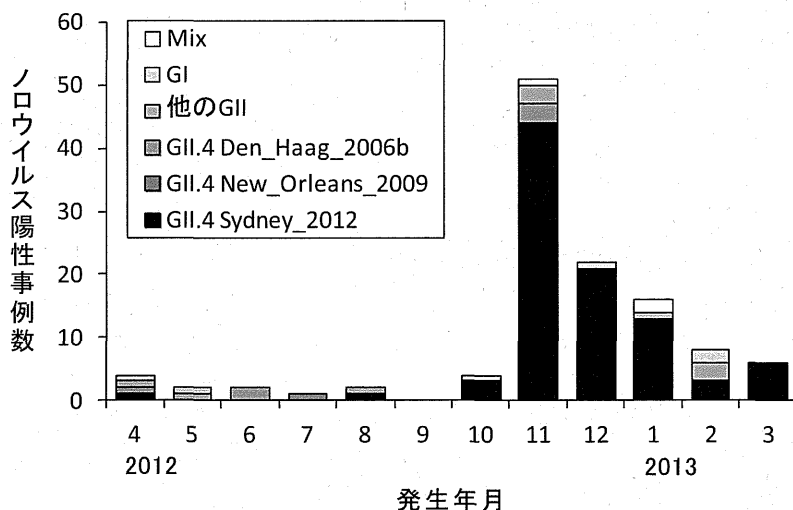


図2 月別ノロウイルス陽性事例数

表1 大阪市で検出されたノロウイルスの遺伝子型  
(2012年4月～2013年3月)

Genogroup	遺伝子型	事例数
GI	GI.4	2
	GI.6	1
GII	GII.2	3
	GII.4	102
	GII.6	4
	GII.12	1
	GII.13	1
	GII.NA*	1
Mix**	GI.6/GII.4	3
合計		118

\*: NA, not assigned

\*\* : 複数の遺伝子型が検出された事例

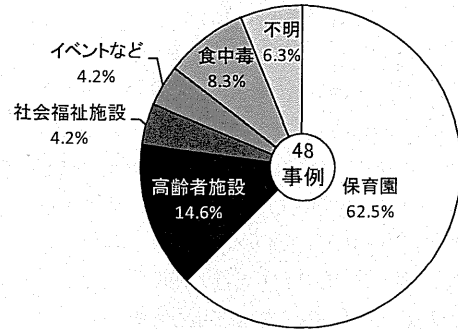
表2 大阪市で検出された GII.4 型ノロウイルス株の亜型  
(2012年4月～2013年3月)

GII.4 亜型	事例数 (%)
Sydney_2012	95 (90.5)
Den_Haag_2006b	8 (7.6)
New_Orleans_2009	2 (1.9)
合計	105

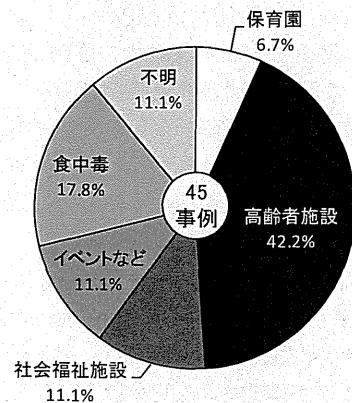
相同性があり、非常に近縁であった。本株による事例は2012年11月に急増し(45事例)、12月以降に発生したGII.4型NV事例のすべてがSydney\_2012であった(図2)。また、GII.4 Sydney\_2012陽性事例はPP事例が75事例(78.9%)と多く、2012年10月～11月の期間には保育所(62.5%)で主に発生していたが(図3A)、2012年12月以降は成人が関連している高齢者施設(42.2%)や社会福祉施設(11.1%)などでの発生が多くなった(図3B)。

#### IV 考察

2012年大阪府の定点あたりの感染性胃腸炎患者数は第42週から第46週にかけて急増しており、第51週まで定点あたりの患者報告数が10を超えていた(<http://www.iph.pref.osaka.jp/infection/noro/noro.html#head3>)。この第46週までの患者発生状況は、ノロウイルスが大流行した2006年の患者発生状況とほぼ同じであった。全国的にも第49週をピークとした患者発生状況は2006年に次ぐものであった(<http://www.nih.go.jp/niid/ja/idwr-dl.html>)。厚生労働省の全国食中毒統計(<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html>)から、



A (2012年10月～11月)



B (2012年12月～2013年3月)

図3 GII.4 Sydney\_2012 が検出された事例の発生施設

2012年の病因物質別食中毒発生件数において、NVは416事例であり、2006年の499事例に次いで多い報告数であった。病原微生物検出情報・NV検出速報(2013年5月9日現在報告数)(<http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr-noro.html>)によると、2012-2013シーズンは感染性胃腸炎患者および集団胃腸炎事例から検出されたウイルスの中でNVの報告数が最も多く、報告された遺伝子型の中ではGII.4型が最も多かった。以上のことから、2012-2013シーズンは大阪市だけでなく全国的にGII.4型NVが大きく流行したシーズンであったといえる。さらに今回の調査結果および田村らの報告[13]から、本シーズンに日本で流行していた主なGII.4型NVは、遺伝的に非常に近縁であり、過去のGII.4流行株とは異なる新しい亜型(GII.4 Sydney\_2012)であったことが明らかになった。

GII.4型NVは、これまで遺伝子の変異を起こしながら世界的に流行してきたことが報告されている[7]。2012-2013シーズンに大阪市で検出されたGII.4 Sydney\_2012株は、日本の他の地域だけでなく、オーストラリア、アメリカ、ヨーロッパなど世界の多くの国々から検出されており[14]、過去のGII.4変異株と同様に、同

時期に世界中で流行していたと考えられた。また、2011年に上海(9月)[15]、イタリア(11月)[16]、バングラデシュ(12月)[17]において、散発性胃腸炎患者から検出されており、2011年9月～12月にはGII.4 Sydney\_2012株が世界各地に存在していたことが判明している。

大阪府において本流行株による集団事例が初めて確認されたのは2012年1月であり[13]、北海道においても1月に確認されていることから[13]、本流行株の日本への侵入時期は2012年1月以前であったと考えられた。その後、日本の各地域で散発的に発生が認められ、10月に入ってから検出地域が急増した[13]。大阪府における本流行株の事例発生は、2012年1月に社会福祉施設で最初に認められ、4月および8月に1事例ずつ保育所で認められた。事例が急増した10月から11月は主に保育所での発生が続き、その後は高齢者施設や社会福祉施設など成人の関連した施設へと変わっていった。これは、本流行株の感染年齢層が、乳幼児から高齢者へと時間と共に変化したことを示している。

今回流行したGII.4 Sydney\_2012株は、NVのCapsidタンパクをコードするOpen reading frame 2に存在する可変領域アミノ酸配列の比較から、エピトープにおけるアミノ酸変異が確認されている[13,14]。これは、本流行株の抗原性に変異していることを示唆しており、大きく流行した原因の一つであると考えられた。今のところ、本流行株の感染が全国や世界中に拡大した経路や要因などは明らかにされておらず、今後のより詳細な調査・解析が必要である。また、当研究所で実施しているNV株の遺伝子型別と、その結果に基づいた詳細な遺伝子解析は、NV流行状況の把握に非常に有用であった。大阪府におけるNV胃腸炎事例の発生は依然として多く、継続した流行の監視と遺伝子型別による解析が必要であると考えられた。

## V まとめ

- ・2012-2013シーズンは、大阪府だけでなく全国的にGII.4型NVの大きな流行が認められ、特に2012年11月～12月の期間にNV胃腸炎事例の発生が集中していた。
- ・大阪府および他の地域で主に流行していたGII.4株は、遺伝的に非常に近縁であった。また、過去に報告されていたGII.4型NV流行株とは異なる新しい亜型に分類された。
- ・検出されたNV株の遺伝子型別および遺伝子解析は、NV流行の解析に有用であった。

**謝辞** 本研究に御協力いただいた健康局生活衛生課、保健所感染症対策課および食品衛生監視員の方々に深謝いたします。

## 参考文献

- 1) Ando T, Noel JS, Fankhauser RL. Genetic classification of "Norwalk-like viruses". *J Infect Dis* 2000; 181 (Suppl 2): 336-348.
- 2) Katayama K, Shirato-Horikoshi H, Kojima S, Kageyama T, Oka T, Hoshino FB, et al. Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. *Virology* 2002; 299: 225-239.
- 3) Kageyama T, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Kojima S, et al. Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2988-2995.
- 4) 入谷展弘, 久保英幸, 勢戸祥介, 春木孝祐, 西尾治, 武田直和, 他. 平成14年度に大阪府で検出されたノーウォークウイルスの遺伝子型別. *大阪府環科研所報 調査・研究年報* 2003; 65: 29-37.
- 5) Seto Y, Iritani N, Kubo H, Kaida A, Murakami T, Haruki K, et al. Genotyping of Norovirus strains detected in outbreaks between April 2002 and March 2003 in Osaka City, Japan. *Microbiol Immunol* 2005; 49: 275-283.
- 6) Iritani N, Kaida A, Kubo H, Abe N, Goto K, Ogura H, et al. Molecular epidemiology of noroviruses detected in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis in Osaka City, Japan, from 1996-1997 through 2008-2009. *J Med Virol* 2010; 82: 2097-2105.
- 7) Siebenga JJ, Vennema H, Zheng DP, Vinje J, Lee BE, Pang XL, et al. Norovirus illness is a global problem: Emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007. *J Infect Dis* 2009; 200: 802-812.
- 8) 入谷展弘, 久保英幸, 改田厚, 阿部仁一郎, 後藤薫, 石井營次. 2006年度に大阪府で認められたノロウイルス流行. *大阪府環科研所報 調査・研究年報* 2007; 69: 7-12.
- 9) 国立感染症研究所 感染症疫学センター. ノロウイルスの流行2006/2007シーズン. *病原微生物検出情報 (IASR)* 2007; 28: 277-278.
- 10) Iritani N, Seto Y, Haruki K, Kimura M, Ayata M, and Ogura H. Major change in the predominant type of "Norwalk-like viruses" in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis in Osaka City, Japan, between April 1996 and March 1999. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2649-2654.
- 11) Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, 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.
- 12) 入谷展弘, 改田厚, 久保英幸, 阿部仁一郎, 西尾治, 後藤薫, 他. 市販生食用カキにおけるノロウイルスおよびA型肝炎ウイルス汚染調査(2006-2007~2009-2010シーズン). 大阪市環科研所報 調査・研究年報 2010; 72: 7-12.
  - 13) 田村務, 渡邊香奈子, 田澤崇, 渡部香, 広川智香, 吉澄志磨, 他. ノロウイルスGII/4の新しい変異株の遺伝子解析と全国における検出状況. 病原微生物検出情報 月報 2012; 33: 333-334.
  - 14) van Beek J, Ambert-Balay K, Botteldoorn N, Eden JS, Fonager J, Hewitt J, et al. Identifications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012. *Euro Surveill* 2013;18(1):pii=20345.
  - 15) Shen Z, Qian F, Li Y, Hu Y, Yuan Z, Zhang J. Novel norovirus GII.4 variant, Shanghai, China, 2012. *Emerg Infect Dis* 2013; 19: 1337-1339.
  - 16) Giammanco GM, De Grazia S, Tummolo F, Bonura F, Calderaro A, Buonavoglia A, et al. Norovirus GII.4/Sydney/2012 in Italy, winter 2012-2013. *Emerg Infect Dis* 2013; 19: 1348-1349.
  - 17) Rahman M, Nahar S, Afrad MH, Faruque ASG, Azim T. Norovirus variant GII.4/Sydney/2012, Bangladesh. *Emerg Infect Dis* 2013; 19: 1347-1348.

## 2014-2015 シーズンに大阪市で認められたノロウイルス流行

入谷展弘<sup>1</sup>、山元誠司<sup>1,2</sup>、改田 厚<sup>1</sup>、阿部仁一郎<sup>1</sup>、久保英幸<sup>1</sup>、  
上林大起<sup>1,2</sup>、平井有紀<sup>1</sup>、後藤 薫<sup>1</sup>、野田 衛<sup>3</sup>、西尾孝之<sup>1</sup>

## Epidemic of norovirus in Osaka City, Japan during the 2014-2015 season

Nobuhiro IRITANI, Seiji P. YAMAMOTO, Atsushi KAIDA, Niichiro ABE, Hideyuki KUBO,  
Daiki KANBAYASHI, Yuki HIRAI, Kaoru GOTO, Mamoru NODA, Takayuki NISHIO

## Abstract

During the period from September 2014 to June 2015 (2014-2015 season), norovirus was detected as the cause of 89 gastroenteritis outbreaks (76.1%) in Osaka City, Japan. The most common genotype in that season was GII.3 (44.9%), followed by GII.17 (30.3%), which was rare genotype. The incidences of GII.3 outbreaks and GII.17 outbreaks were highest during September-December 2014, and January-March 2015, respectively.

**Key words:** Norovirus, outbreak, GII.3, GII.17, 2014-2015 season

## I 緒言

ノロウイルス (NoV) はウイルス性胃腸炎の主な原因ウイルスであり、乳幼児から高齢者まで幅広い年齢層のヒトに感染する。NoV による胃腸炎は秋から冬に大きく流行し、食中毒や保育所、小学校、高齢者施設などの施設における集団胃腸炎事例も多発する。ゲノム遺伝子配列の解析から、ヒト NoV は Genogroup I (GI)、GII および GIV の 3 種類の遺伝子グループに分類され、GI および GII が毎年流行している[1, 2]。GI と GII には、さらに複数の遺伝子型が存在している[3]。最近では、GII.4 に分類される NoV の新しい亜型が世界的な感染拡大と流行を周期的に起こしていることが明らかにされた[4]。一方で、他の遺伝子型が流行することも報告されている[5-8]。

このように多くの種類の遺伝子型の NoV が流行している現状を踏まえ、当研究所では、大阪市における NoV 流行実態を把握するために検出された NoV 株の遺伝子型別を行い、流行解析を実施している[5, 9, 10]。今回、2014-2015 シーズンに大阪市で検出された NoV 株について分子疫学的解析を実施した。

## II 材料と方法

## 1) 検査材料

2014 年 9 月~2015 年 6 月までの期間(2014-2015 シーズン)に大阪市立環境科学研究所に搬入された非細菌性胃腸炎 117 事例(患者糞便 470 検体)を対象とした。

## 2) NoV の検出および遺伝子型別

糞便材料の処理は既報の方法に準じて行った[11]。ウイルス RNA の抽出は QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN) を用いて QIAcube (QIAGEN) で行った。NoV 遺伝子の検出は、リアルタイム RT-PCR 法を用いて Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (サーモフィッシャーサイエンティフィック) で行った [10, 12]。

リアルタイム RT-PCR 法で陽性となった検体は、既報[13]のプライマーペアを用いて、GeneAmp PCR System 9700 (サーモフィッシャーサイエンティフィック) または Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (サーモフィッシャーサイエンティフィック) で Capsid N/S 領域の遺伝子を増幅した。特異的遺伝子断片の増幅が認められた検体は、ダイレクトシーケンス法により、Applied Biosystems 3130 ジェネティックアナライザ (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いて、塩基配列を決定した。NoV の遺伝子型別および GII.4 の亜型は、

1) 大阪市立環境科学研究所

〒543-0026 大阪市天王寺区東上町 8-34

Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences, 8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan

2) 大阪府立公衆衛生研究所

〒537-0025 大阪市東成区中道 1-3-69

Osaka Prefectural Institute of Public Health, 1-3-69 Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan

3) 国立医薬品食品衛生研究所

〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

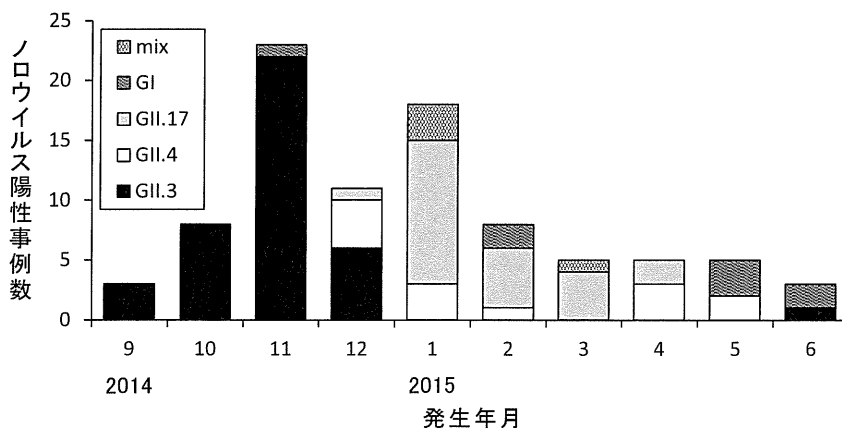


図1 月別ノロウイルス陽性事例数

Norovirus Genotyping Tool Version 1.0 (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool/>)を用いて分類した。遺伝子型番号は、新しい表記法による番号を用いた[3]。

### III 結果

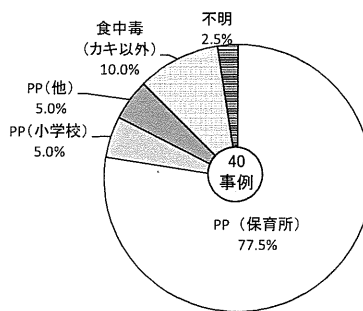
NoVは117事例中89事例(76.1%)、患者糞便材料470検体中295検体(62.8%)から検出された。NoV事例は11月(23事例)に最も多く、次いで1月(18事例)に多く発生していた(図1)。NoV陽性89事例のうち、ヒトからヒトへ感染が疑われた(PP)事例は、少なくとも58事例(65.2%)認められた。主な原因施設は保育所(43事例)であり、他は高齢者施設(7事例)、小学校(7事例)、社会福祉施設(1事例)であった。カキ以外の食品が原因として疑われた事例は17事例(19.1%)であった、カキの喫食が関連していた事例は10事例(11.2%)あり、11月、1月~3月に発生し、特に1月(7事例)に集中していた。

検出されたNoVの遺伝子型は少なくとも8種類(GI: 4種類、GII: 4種類)認められた。GII.3(40事例、44.9%)が最も多く、次いでGII.17(複数検出事例を含めて27

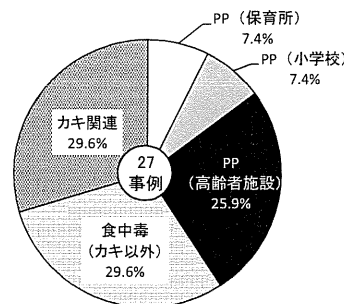
事例、30.3%)、GII.4(複数検出事例を含めて15事例、16.9%)であった(表1)。

NoV GII.3による事例の97.5%(39/40事例)は2014年9月から12月の期間に集中して発生し、11月(22事例)が最も多かった。NoV GII.3による事例の中で、87.5%(35/40事例)がPP事例であり、保育所(31事例)、小学校(2事例)、中学校(1事例)、専門学校(1事例)における発生であった(図2)。発生施設は大阪市24区中17区にわたり、1区あたり1~4施設の発生であり、地理的・時間的な偏りはなかった。疫学調査においても各事例間の関連性は認められなかった。

GII.17については2014年12月にシーズンで最初の事例が市内高齢者施設で発生した。その後、NoV GII.17による事例は2015年1月から3月の期間に集



A (NoV GII.3による事例)



B (NoV GII.17による事例)

表1 大阪市内で検出されたノロウイルスの遺伝子型(2014年9月~2015年6月)

Genogroup	遺伝子型	事例数
GI	GI.2	2
	GI.3	4
	GI.4	1
	GI未型別	1
GII	GII.3	40
	GII.4	13
	GII.17	24
Mix*		4
合計		89

\*: 複数の遺伝子型が検出された事例 (GI.3/GII.17、GII.4/GII.17、GII.13/GII.17、GI.7/GII.4)

図2 ノロウイルス GII.3(A)および GII.17(B)による事例の推定原因および発生施設



中して発生し(88.9%、24/27 事例)、1 月(12 事例)が最も多かった。NoV GII.17 による事例の中で、PP 事例が 11 事例、カキの喫食関連事例が 8 事例、カキ以外の食品疑い事例が 8 事例であった(図 2)。PP 事例の主な発生施設は市内の高齢者施設(7 事例)であった。

Capsid N/S 領域の塩基配列(282 塩基)の比較から、2014 年 9 月から 12 月に発生した 39 事例から検出された GII.3 株は互いに近縁であった(塩基配列相同性  $\geq$  98.9%)。また、今回検出されたすべての GII.17 株も互いに近縁であり( $\geq$ 98.5%)、同時期に国内他地域で検出された株(Kawasaki308/JP/2015、GenBank 番号 LC037415) [14] や中国で流行していた株(14F1502/GZ/GD/CHN/2014、GenBank 番号 KP718638) [15] とともに非常に近縁であった( $\geq$ 98.5%)。GII.4 株は 2 種類の亜型(Den\_Haag\_2006b および Sydney\_2012) に分類され、ほとんどが GII.4 Sydney\_2012 であった(14/15 事例)。

#### IV 考察

大阪市では 2014 年春季に保育所や小学校で NoV GII.6 による集団胃腸炎事例が多発した[16]。2014 年 7 月から 8 月には事例発生はほとんどなくなったが、9 月に再び増加し始め、11 月に急増した。遺伝子型別の結果、秋季に流行した NoV は GII.3 であり、春季に流行したウイルスとは異なっていた。この流行株の変化が、春季に続いて秋季にも同じ低年齢層で大きく流行したことに関連している可能性がある[17]。

冬季に流行した NoV GII.17 は大阪市において過去にほとんど検出されることがなく、非常に稀な遺伝子型であった[5, 11]。大阪市では 2014 年 12 月にシーズンで最初の NoV GII.17 による事例が発生した後、1 月に急増した。国内の他地域においても同時期に同様の現象が認められており[14, 18]、NoV GII.17 は全国的に流行していたと考えられた。また、大阪市で認められた NoV GII.17 による事例の多くは食中毒や高齢者施設における集団事例であり、主に成人層における流行であった。他の地域からも成人での流行が報告されている[18]。

NoV GII.17 は 1978 年フランス領ギアナからの報告[19]が最も古く、以降、世界中で散発的に検出されていた[20]。しかし、大阪市での流行とはほぼ同時期に中国、香港、台湾においても GII.17 の流行が認められた[15, 20, 21]。流行株の遺伝子を比較したところ、大阪市、国内他地域および中国の株は非常に近縁であったことから、本株は国内だけでなくアジアで広く流行していたことが示唆された。さらに、本株には Capsid の可変領域である P2 domain にアミノ酸変異が確認されている[14, 21, 22]。これは、本株の抗原性に変異していることを示唆しており、今回流行した原因の一つであると考えられ

た。今のところ、本株の感染が国内だけでなく国を越えて拡大した経路や要因などは明らかにされておらず、詳細な調査・解析が必要である。

NoV GII.4 は、これまで遺伝子の変異を起こしながら、世界的に流行しており[4]、新しい GII.4 亜型の出現は大きな流行の主な原因になる可能性が高い。大阪市では 2015 年 6 月までに検出された GII.4 はすべて既知の亜型に分類されている。しかし、最近出現した GII.4 亜型は 2012 年の Sydney\_2012 株であり [23]、既に 3 年が経過しているため、新たな亜型の出現が危惧される。

2014-2015 シーズンの NoV 流行解析結果から、今後は新しい GII.4 亜型に加えて稀な遺伝子型の出現や流行する遺伝子型の変化についても早期に探知することが NoV 感染症の流行予測と予防対策に重要であると考えられた。継続した流行の監視と遺伝子型別による解析が必要である。

#### V 結論

- 2014-2015 シーズンは 2014 年 9 月~12 月に GII.3、2015 年 1 月~3 月に GII.17 が主に検出され、時期によって流行する NoV の遺伝子型が異なっていた。
- NoV GII.3 は主に低年齢層におけるヒトからヒトへの感染拡大であった。
- NoV GII.17 の流行は大阪市において初めて認められ、主に成人層で流行していた。

**謝辞** 本研究に御協力いただいた健康局生活衛生課、保健所感染症対策課、各保健センターおよび食品衛生監視員の方々に深謝いたします。

#### 参考文献

- 1) Ando T, Noel JS, and Fankhauser RL. Genetic classification of "Norwalk-like viruses". J Infect Dis. 2000; 181 (Suppl 2): 336-348.
- 2) Katayama K, Shirato-Horikoshi H, Kojima S, Kageyama T, Oka T, and Hoshino FB, et al. Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. Virology 2002; 299: 225-239.
- 3) 片山和彦. ノーウォークウイルス(ノロウイルス)の遺伝子型. 病原微生物検出情報 月報 2014; 35: 173-175.
- 4) Siebenga JJ, Vennema H, Zheng DP, Vinje J, Lee BE, and Pang XL, et al. Norovirus illness is a global problem: Emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007. J Infect Dis. 2009; 200: 802-812.
- 5) Iritani N, Kaida A, Kubo H, Abe N, Goto K, and Ogura H, et al. Molecular epidemiology of noroviruses detected in outbreaks of acute

- nonbacterial gastroenteritis in Osaka City, Japan, from 1996-1997 through 2008-2009. *J Med Virol*. 2010; 82: 2097-2105.
- 6) Iritani N, Seto Y, Haruki K, Kimura M, Ayata M, and Ogura H. Major change in the predominant type of "Norwalk-like viruses" in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis in Osaka City, Japan, between April 1996 and March 1999. *J Clin Microbiol*. 2000; 38: 2649-2654.
  - 7) Koopmans M, Vinjé J, de Wit M, Leenen I, van der Poel W, and van Duynhoven Y. Molecular epidemiology of human enteric caliciviruses in The Netherlands. *J Infect Dis*. 2000; 181 (Suppl 2): S262-269.
  - 8) Lewis DC, Hale A, Jiang X, Eglin R, and Brown DW. Epidemiology of Mexico virus, a small round-structured virus in Yorkshire, United Kingdom, between January 1992 and March 1995. *J Infect Dis*. 1997; 175: 951-954.
  - 9) 入谷展弘, 久保英幸, 勢戸祥介, 春木孝祐, 西尾治, 武田直和, 他. 平成 14 年度に大阪市で検出されたノーウォークウイルスの遺伝子型別. 大阪市環科研所報 調査・研究年報 2003; 65: 29-37.
  - 10) Seto Y, Iritani N, Kubo H, Kaida A, Murakami T, and Haruki K, et al. Genotyping of Norovirus strains detected in outbreaks between April 2002 and March 2003 in Osaka City, Japan. *Microbiol Immunol*. 2005; 49: 275-283.
  - 11) Iritani N, Kaida A, Abe N, Sekiguchi J, Kubo H, and Takakura K, et al. Increase of GII.2 norovirus infections during the 2009-2010 season in Osaka City, Japan. *J Med Virol*. 2012; 84: 517-525.
  - 12) Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, and Hoshino FB, 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.
  - 13) 入谷展弘, 改田 厚, 久保英幸, 阿部仁一郎, 西尾治, 後藤 薫, 他. 市販生食用カキにおけるノロウイルスおよび A 型肝炎ウイルス汚染調査(2006-2007~2009-2010 シーズン). 大阪市環科研所報 調査・研究年報 2010; 72: 7-12.
  - 14) Matsushima Y, Ishikawa M, Shimizu T, Komane A, Kasuo S, and Shinohara M, et al. Genetic analysis of GII.17 norovirus strains in diarrheal disease outbreaks from December 2014 to March 2015 in Japan reveal a novel polymerase sequence and amino acid substitutions in the capsid region. *Euro Surveill*. 2015; 20(26): pii=21173.
  - 15) Lu J, Sun L, Fang L, Yang F, Mo Y, and Lao J, et al. Gastroenteritis outbreaks caused by norovirus GII.17, Guangdong Province, China. *Emerg Infect Dis*. 2015; 21: 1240-1242.
  - 16) 入谷展弘, 山元誠司, 改田 厚, 阿部仁一郎, 久保英幸, 野田 衛. 2013/14 シーズンに大阪市において集団胃腸炎事例から検出されたノロウイルス GII.6 株の分子疫学的解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会プログラム・抄録集 2014: 316.
  - 17) 入谷展弘, 山元誠司, 改田 厚, 阿部仁一郎, 久保英幸, 西尾孝之, 他. 2014 年 9~11 月に発生したノロウイルスによる胃腸炎集団事例について一大阪市. 病原微生物検出情報 月報 2015; 36: 26-27.
  - 18) 楠原 一, 赤地重宏, 小林隆司, 西中隆道, 小林真美, 山口江里, 他. ノロウイルス GII.17 型の流行とその特徴について—三重県. 病原微生物検出情報 月報 2015; 36: 91-92.
  - 19) Rackoff LA, Bok K, Green KY, and Kapikian AZ. Epidemiology and evolution of rotaviruses and noroviruses from an archival WHO global study in children (1976-79) with implications for vaccine design. *PLoS One* 2013; 8(3): e59394.
  - 20) de Graaf M, va Beek J, Vennema H, Podkzin AT, Hewitt J, and Bucardo F, et al. Emergence of a novel GII.17 norovirus – End of the GII.4 era? *Euro Surveill*. 2015; 20(26): pii=21178.
  - 21) Fu J, Ai J, Jin M, Jiang C, Zhang J, and Shi C, et al. Emergence of a new GII.17 norovirus variant in patients with acute gastroenteritis in Jiangsu, China, September 2014 to March 2015. *Euro Surveill*. 2015; 20(24): pii=21157.
  - 22) Parra GI, and Green KY. Genome of emerging norovirus GII.17, United States, 2014. *Emerg Infect Dis*. 2015; 21: 1479-1479.
  - 23) van Beek J, Ambert-Balay K, Botteldoorn N, Eden JS, Fonager J, and Hewitt J, et al. Identifications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012. *Euro Surveill*. 2013; 18(1): pii=20345.

## 大阪府内におけるノロウイルスの流行状況 (2010-2013)

上林大起<sup>\*1,2</sup> 左近直美<sup>\*1</sup> 入谷展弘<sup>\*2</sup> 三好龍也<sup>\*3</sup> 改田厚<sup>\*2</sup> 阿部仁一郎<sup>\*2</sup>  
山元誠司<sup>\*1,2</sup> 久保英幸<sup>\*2</sup> 平井有紀<sup>\*2</sup> 内野清子<sup>\*3</sup> 吉田永祥<sup>\*3</sup> 岡山文香<sup>\*3</sup> 芝田有理<sup>\*3</sup>  
塚田和宏<sup>\*1</sup> 駒野淳<sup>\*1,4</sup> 弓指孝博<sup>\*1</sup> 西尾孝之<sup>\*2</sup> 加瀬哲男<sup>\*1</sup> 田中智之<sup>\*3,5</sup> 高橋和郎<sup>\*1,6</sup>

2012年度に大阪府内で発生したノロウイルス (*Norovirus*: NoV) に起因する胃腸炎集団感染事例数は226事例と、前年度と比較し約2.2倍増加した。NoVに起因する胃腸炎集団感染事例の中でGII.4の占める割合を年度別に算出すると、2011年度43.3% (45/104)、2012年度79.2% (179/226)であった。さらに、GII.4亜型に焦点を当て解析すると、2011年度は、Den\_Haag\_2006b (28.9%, 13/45)、New\_Orleans\_2009 (44.4%, 20/45)、2012年度はDen\_Haag\_2006b (7.6%, 14/184)、New\_Orleans\_2009 (3.3%, 6/184)、Sydney\_2012 (87.0%, 160/184)が検出された。2012年度のNoV流行は、Sydney\_2012の出現により引き起こされたと考えられた。

キーワード: ノロウイルス、感染性胃腸炎、集団感染、変異株

Key words: Norovirus, Gastroenteritis, Outbreak, Variant

### 諸言

ノロウイルス (*Norovirus*: NoV) は全ての年齢層における非細菌性急性胃腸炎の主な原因ウイルスであり、全世界の急性胃腸炎の20%はNoVが原因と考えられる [1-2]。NoVは、感染したヒトの糞便や嘔吐物、カキなどの食品を通して感染する [3-6]。世界各地で高齢者施設、社会福祉施設、保育所などにおける集団感染事例が報告されており、毎年秋から冬にかけて報告数は増加する [7-8]。

NoVは、カリシウイルス科に分類される(+)センス

\*<sup>1</sup>大阪府立公衆衛生研究所感染症部ウイルス課

\*<sup>2</sup>大阪市立環境科学研究所微生物保健グループ

\*<sup>3</sup>堺市衛生研究所ウイルス検査担当

\*<sup>4</sup>国立病院機構名古屋医療センター

\*<sup>5</sup>国保日高総合病院

\*<sup>6</sup>国際医療福祉大学

Epidemic of Norovirus in Osaka (2010-2013) by Daiki Kanbayashi,  
Naomi Sakon, Nobuhiro Iritani, Tatsuya Miyoshi, Atsushi Kaida, Niichiro  
Abe, Seiji P Yamamoto, Hideyuki Kubo, Yuki Hirai, Kiyoko Uchino,  
Hisayoshi Yoshida, Fumika Okayama, Yuri Shibata, Kazuhiro Tsukada,  
Jun Komano, Takahiro Yumisashi, Takayuki Nishio, Tetsuo Kase,  
Tomoyuki Tanaka and Kazuo Takahashi

の一本鎖 RNA ウイルスである。NoV のゲノムは約7,500塩基、3つのORFs (Open Reading Frames)から構成されている [9]。NoV のゲノム塩基配列は多様性に富んでおり、カプシドの塩基配列の相同性に基づきGenogroup I-Vの5つの遺伝子グループに分類される [10]。

ヒトから主に検出されるNoVはGenogroup I (GI)およびGenogroup II (GII)であり、GIは9、GIIは21の遺伝子型に細分される [10]。世界各地で主に検出されているのはGenogroup II genotype 4 (GII.4)である。これまでNoV GII.4は、ヒトの抗体によって認識されるカプシド領域に変異が入ることにより、新たな亜型を出現させ周期的に流行を引き起こしてきた。近年では、2006年にDen\_Haag\_2006b、2009年にNew\_Orleans\_2009という新たな亜型が出現し、日本国内を含めて世界的なNoVの流行が確認された [11]。

大阪府立公衆衛生研究所、大阪市立環境科学研究所、堺市衛生研究所では、共同研究「大阪府全域におけるノロウイルス流行調査」を実施し、行政区画の枠組みを超えてNoVの流行実態を解析している。本稿では、2010年12月から2013年3月までの28ヶ月にわたって大阪府内で発生したNoVに起因する胃腸炎集団感

染事例の遺伝子型別を実施し、発生時期と発生施設について流行解析を行ったので報告する。

## 調査方法

### 1. 検査材料

2010年12月1日から2013年3月31日までの期間に同一施設内において患者数10人以上の胃腸炎集団感染が疑われ、大阪府立公衆衛生研究所、大阪市立環境科学研究所、堺市衛生研究所で検査を実施した非細菌性胃腸炎集団感染433事例を対象とした。

### 2. 検体からのウイルスの検出及び遺伝子型別

糞便検体よりRNAを抽出し、リアルタイムRT-PCR法 [12] もしくは市販の検出キットを使用した RT-LAMP 法により NoV 遺伝子を検出した。NoV 遺伝子が検出された事例について、その中から2-3検体を選択後、カプシド領域の塩基配列をダイレクトシーケンス法にて決定し、NoV の遺伝子型別を行った [13]。遺伝子型については Kageyama らの報告に従った [14]。GII.4 亜型の分類は、Norovirus Genotyping Tool Version 1.0 (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>) に従って行った [15]。その他の下痢症ウイルス (A 群ロタウイルス、C 群ロタウイルス、サポウイルス、アストロウイルス、腸管アデノウイルス) については ELISA、リアルタイム RT-PCR 法等を用いて検出した [16]。

## 結果

### I. ノロウイルスの検出と遺伝子型別分類

2010年12月から2013年3月の期間に大阪府内で発生した胃腸炎集団感染事例から検出されたウイルスは、ノロウイルス 94.2% (408/433)、A 群ロタウイルス 3.5% (15/433)、サポウイルス 1.2% (5/433)、アストロウイルス 0.5% (2/433)、C 群ロタウイルス 0.2% (1/433)、腸管アデノウイルス 0.2% (1/433)、サポウイルスとアストロウイルスの混合事例 0.2% (1/433) であり、NoV が原因ウイルスとして最も高い割合を示した (表 1)。NoV に起因する胃腸炎集団感染事例数を年度別において解析すると、2011年度は104事例であったのに対して、2012年度は226事例と NoV に起因する胃腸炎集団感染事例数の増加が確認された。

表1. 2010年12月から2013年3月までの間に大阪府内で発生した非細菌性感染性胃腸炎集団感染の原因ウイルス

	2010.12- 2011.3	2011年度	2012年度	事例数
ノロウイルス	78 (92.9)	104 (99.0)	226 (92.6)	408 (94.2)
A群ロタウイルス	6 (7.1)	0 (0)	9 (3.7)	15 (3.5)
サポウイルス	0 (0)	1 (1.0)	4 (1.6)	5 (1.2)
アストロウイルス	0 (0)	0 (0)	2 (0.8)	2 (0.5)
C群ロタウイルス	0 (0)	0 (0)	1 (0.4)	1 (0.2)
アデノウイルス	0 (0)	0 (0)	1 (0.4)	1 (0.2)
サポウイルス/ アストロウイルス	0 (0)	0 (0)	1 (0.4)	1 (0.2)
合計	84	105	244	433

( ): %

検出された NoV をカプシド領域の塩基配列に基づき分類すると、GI が 3.4% (14/408)、GII が 94.6% (386/408)、GI と GII 混合事例が 0.98% (4/408) であった。遺伝子型別においては、2010年12月から2013年3月の間に少なくともGIが4種類、GIIが8種類検出された。GIは、GI.3 (7.1%, 1/14)、GI.4 (21.4%, 3/14)、GI.6 (50.0%, 7/14)、GI.14 (7.1%, 1/14)、GI Not Typed (NT) (14.3%, 2/14)、GIIはGII.2 (12.4%, 48/386)、GII.3 (3.6%, 14/386)、GII.4 (66.6%, 257/386)、GII.6 (3.1%, 12/386)、GII.7 (0.5%, 2/386)、GII.11 (0.3%, 1/386)、GII.12 (2.6%, 10/386)、GII.13 (6.0%, 23/386)、GII NT (4.9%, 19/386) に分類される NoV が検出された。また、GII.2/GII.13、GI.14/GII.13、GII.2/GII.3 の混合事例がそれぞれ1事例、GI.6/GII.4、GII.3/GII.4 の混合事例がそれぞれ2事例、GII.4/GII.6/GI.4 の混合事例も1事例認められた。NoV による集団感染408事例中GII.4が63.0% (257/408) を占めていた (図 1)。

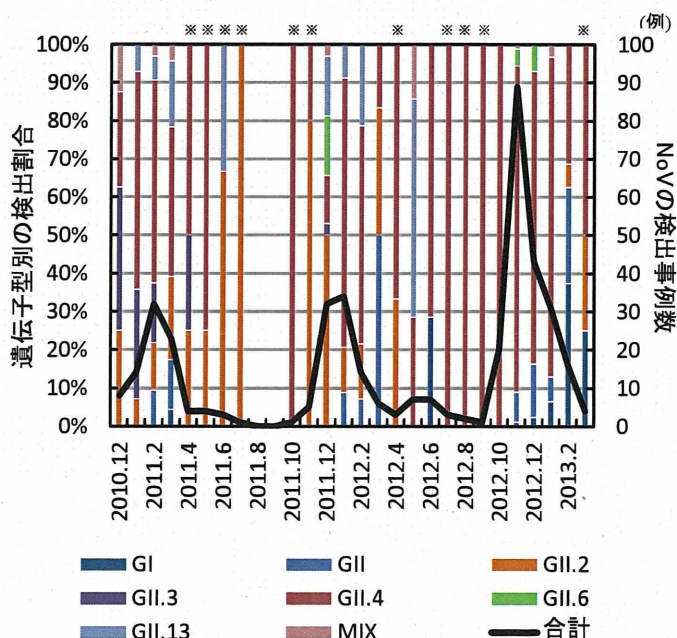


図1. 大阪府内におけるNoVの月別検出状況 ※は5事例未満を示す。