

2006/07年シーズンに検出されたノロウイルス遺伝子型についての検討

Norovirus GII/4 variants observed in outbreak of gastroenteritis between November of 2006 and January of 2007 in Miyagi prefecture

庄司 美加 植木 洋 佐藤千鶴子
佐藤 由紀 沖村 容子 谷津 壽郎
齋藤 紀行Mika SHOJI, Yo UEKI, Chizuko SATO
Yuki SATO, Yoko OKIMURA, Juro YATSU
Noriyuki SAITO

2006/07年シーズンの、国内でのノロウイルス（Norovirus:NoV）による感染性胃腸炎患者数は、過去10年間で最も多く、大規模な流行であった。宮城県でも全国と同じ傾向が認められた。流行の原因の解明を目的に、県内で発生した食中毒事例、感染性胃腸炎集団発生事例から検出されたNoV遺伝子の分子疫学的解析を行った結果、他県の食中毒関連事例も含めて、全てGII/4の近縁株であった。これらの株は、過去に県内で検出されたGII/4変異株とは異なったクラスターを形成し、国外での流行が報告されているGII/4の変異株にも属さなかった。

キーワード：ノロウイルス；感染性胃腸炎；分子疫学；GII/4変異株

Key words : Norovirus ; gastroenteritis ; molecular epidemiology ; variant of GII/4-type

1 はじめに

感染症発生動向調査によれば、2006/07年シーズンの、全国での感染性胃腸炎の定点医療機関当たりの患者報告数は、過去10年間で最も多かった。県内でも定点医療機関当たりの患者報告数は、2006/07年シーズンは過去3年間で最も多く、例年より早い時期から増加が確認された。特にピーク時の定点医療機関当たりの患者報告数は、2005/06年シーズンが21.51人であったのに対し、2006/07年シーズンは33.74人と昨年度の1.5倍の値であった。また県内の各保健所管内での、感染性胃腸炎による定点医療機関当たりの患者報告数は、第49週から51週にかけて、全ての地域で警報値を超えており、特定の地域ではなく県内全域で流行が確認された。

NoVによる感染性胃腸炎の流行は、近年、アメリカやヨーロッパ、オーストラリア等でも報告されている^{1) 2)}。これらの流行ではGII/4変異株が検出されており、強毒株の出現が危惧される。一方、NoVは培養系が確立されていないことなどから、遺伝子型と病原性の関連については不明な点が多く、その解明には分子疫学的解析が最も有効と考える。そこで、分子疫学的データの蓄積を目的とし、2006/07年シーズンに県内で発生したNoVによる食中毒事例や感染性胃腸炎集団発生事例で患者から検出したNoV遺伝子について、分子疫学的解析を行ったので報告する。

2 方法

2.1 対象材料

2006年11月から2007年1月の期間に、県内で発生した感染性胃腸炎集団発生事例のうち16事例21件、同

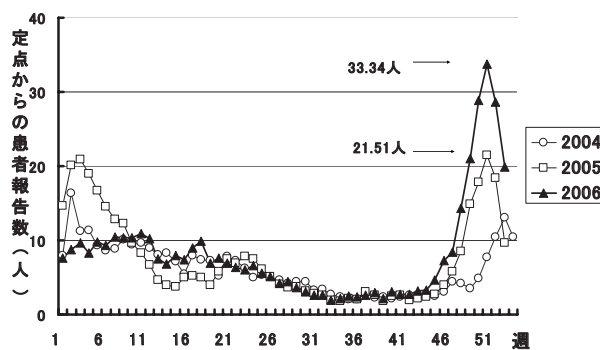


図1 過去3年間の県内の感染性胃腸炎患者報告数

じく食中毒事例のうち3事例13件、他県で発生した食中毒の関連事例である1事例2件、さらに、感染症発生動向調査で採取した感染性胃腸炎患者検体9件を対象材料とした。検体はいずれも糞便とした。

2.2 検体処理及び定量

糞便は、厚生労働省通知³⁾に準じて滅菌蒸留水(和光純薬)で10%乳剤とし、10,000rpm, 10分間冷却遠心後、遠心上清140μlをQIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN)により、RNAを抽出した。DNase(Invitrogen)処理後,Super Script II(Invitrogen)で逆転写反応を行い、cDNAを作製した。さらに影山等の方法⁴⁾でPRISM 7900 (Applied Biosystems)を用いて定量PCR法を実施した。

2.3 NoVの分子疫学的解析

定量PCR法でNoVが検出された検体について、Capsid蛋白をコードしている領域増幅用プライマーのCOG2F⁵⁾/G2SKR⁶⁾を用いてRT-PCRを行った。また、RT-PCRで増幅が確認されない検体はG2SKF⁶⁾/G2SKR⁶⁾

のプライマーを用いた nested PCR を実施した。PCR 産物を MicrospinTM S-300HR カラム (GE Healthcare) で精製後、BigDye Terminator Kit (Applied Biosystems) を用いてシーケンス用 PCR を行い、ABI 310 (Applied Biosystems) でダイレクトシーケンスを実施して塩基配列の決定を行った。その後、Clustal X (フリーソフト) を用いてアライメントし、Neighbor-Joining Method⁷⁾ (NJ 法) で系統樹を作成した。

3 結果および考察

今回対象材料とした全ての検体から、定量 PCR 法で NoV 遺伝子が検出された。また、NoV G I 群と G II 群の両方の遺伝子群に陽性であった検体が 1 件検出された以外は全て G II 群を検出した。G II 群が検出されたウイルス遺伝子の、Capsid 蛋白をコードしている領域の一部の 249nt について、塩基配列を決定し系統解析を行った結果を図 2 に示した。検出された NoV の遺伝子型は、全て G II /4 (accession No.X76716 Bristol/93/UK) の近縁株であった。検出された株は一つのクラスターを形成し、クラスター内での相同性は塩基配列のレベルでは 98.8%、アミノ酸レベルでは 97.6% で、同一の遺伝子型と考えられた。これらの株は 2003 年～2005 年に県内の感染性胃腸炎集団発生事例や食中毒事例で検出された G II /4 近縁株とは異なったクラスターであった。また、1995 年～1996 年にアメリカ、ブラジル、カナダ、中国、ドイツ、オランダ、イギリスで流行し、1997 年～2000 年にオーストラリアで流行した G II /4 の変異株 (accession No.AF080549 US95/96) のクラスターにも属さなかった。さらに 2002 年にアメリカとイギリスで流行した G II /4 変異株 (accession No.AY502023 Farmington Hill) や、別の G II /4 変異株 (accession No.AY587985 b4s6) のクラスターにも属さなかった。

今回検出された株がこれらのクラスターに属さなかったことにより、2006/07 年シーズンに県内で流行した NoV は、これまでに報告例のない新たな G II /4 変異株であることが明らかになった。さらに、他県で発生した食中毒の関連事例から検出された株 (0621-4, 0621-5) も、2006/07 年シーズンの県内の流行で検出された G II /4 変異株のクラスターに属していることから、この変異株は、県内はもとより他県での流行に関与している可能性も示唆された。このことは 2006/07 年シーズンの全国的

な大流行を解明する上で重要であり、さらに詳細な分子疫学的解析を行った上で、全国規模での情報交換が必要と考える。

4 まとめ

2006/07 年シーズンに県内の食中毒事例または感染性胃腸炎集団発生事例から検出された NoV 遺伝子は、2003 年～2005 年に県内で検出された株とは異なったクラスターを形成した。さらに近年に国外で流行が報告されている G II /4 変異株にも属さなかった。今後は、宮城県で検出されたこの変異株と全国で流行した株の遺伝子型について他県との情報交換が必要であり、今回の大規模な流行との関係についても検討していく必要があると考える。

参考文献

- 1) EuroSurveillance Weekly 2004 (52) : 23/12/2004
- 2) 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, 26, 3 (2005)
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知 “ノロウイルスの検出法について” 平成 15 年 11 月 5 日, 食安監発 1105001 号 (2003)
- 4) T.kageyama,S.Kojima,M.Shinohara,K.Uchida,S.Fukushi,F.B.Hoshino,N.Takeda,K.Katayama : *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 1548 (2003)
- 5) Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F. B., Takeda, N., katayama, K., 2003. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *Journal of clinical Microbiology* 41, 1548-1557
- 6) Kojima, S., Kageyama, T., Fukuda, S., Hoshino, FB., Shinohara, M., Uchida, K, Natori, K., Takeda, N., Kageyama, T., 2002. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J. Virol. Methods* 100, 107-114.
- 7) Saitou N. and Nei M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, vol.4, no.4, pp.406-425

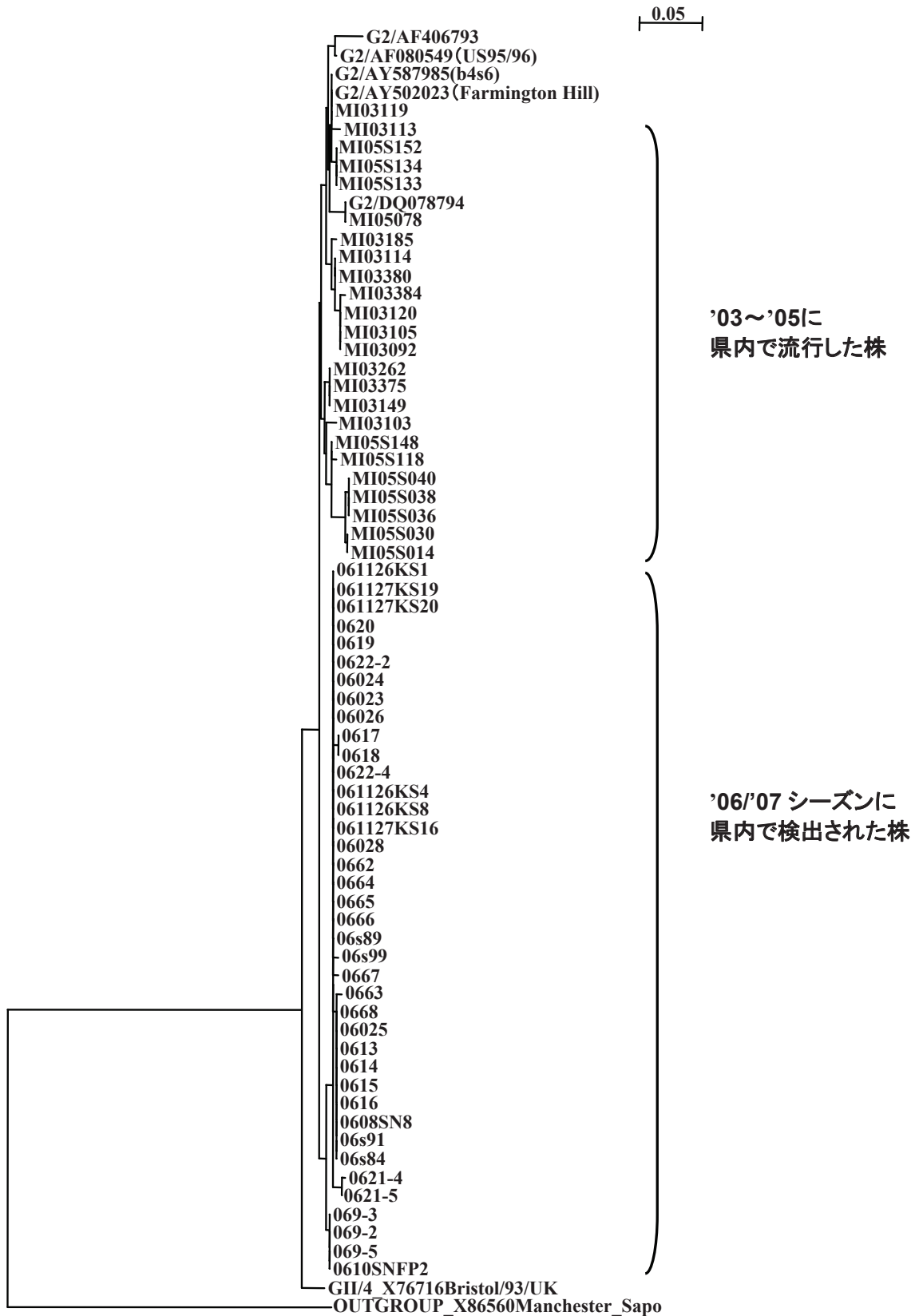


図2 Capsidに基づく NoV G II /4 近縁株の系統樹 (NJ 法)