

[ノート]

兵庫県における胃腸炎ウイルス検出状況と遺伝子解析

(2011/12～2012/13 シーズン)

高井 伝仕* 荻 美貴 押部 智宏 近平 雅嗣 三村 昌司

Prevalence and Genetic Analysis of Gastroenteritis Viruses in Hyogo Prefecture during 2011/12 and 2012/13 Epidemic Seasons

Denshi TAKAI*, Miki OGI, Tomohiro OSHIBE, Masatsugu CHIKAHIRA and Masashi MIMURA

Infectious Disease Research Division, Public Health Science Research Center, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Consumer Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan

We investigated the incidence of gastroenteritis viruses such as norovirus (NoV), sapovirus (SaV), human astrovirus (HAstV), group A and C rotaviruses (ARV and CRV), and enteric adenovirus (EAdV) among the pediatric population in Hyogo prefecture during the 2011/12 and 2012/13 epidemic seasons. Of 415 stool samples examined, gastroenteritis viruses were detected 161 (38.8%). NoV (44.1%) was predominant, followed by ARV (33.5%), EAdV (9.3%), SaV (8.1%), HAstV (3.7%) and CRV (1.2%). NoV G II and ARV were the leading agents of infant gastroenteritis in Hyogo prefecture among this two epidemic seasons. The seasonal variability was observed in the detected viruses. Notably, prevalence of new NoV G II/4 variant was observed in 2012/13 season.

Continuous monitoring of gastroenteritis viruses by detailed genetic analysis is useful for designing preventive strategies of these viruses in Hyogo prefecture.

I はじめに

ウイルスや細菌などにより下痢、嘔吐、腹痛、発熱などを発症する感染性胃腸炎は、毎年全国で多発しており、患者は乳幼児から成人まで幅広い年齢層に渡っている¹⁾。年間を通じて発生するが、感染症発生動向調査によると、例年晩秋から冬季にかけて流行のピークが形成されており、この冬季の流行はウイルスが主原因とされている。感染性胃腸炎の主たる原因ウイルスにはノロウイルス (NoV)、サポウイルス (SaV)、A群およびC群ロタウイルス (ARV・CRV)、アストロウイルス (HAstV)、腸

管アデノウイルス (EAdV) などが知られているが、その中でもNoVやARVによるものが多くを占める。

それぞれの胃腸炎ウイルスには多くの型が存在しており、流行シーズンによって主流となる血清型や遺伝子型が異なることや、地域的な偏りが見られることも報告されている^{2,3)}。

さらに、感染性胃腸炎患者から検出されるウイルスは食中毒や集団感染を引き起こすことから、病原体を特定して適切に対応することが感染拡大を防止する上で重要となる。

そこで本稿では2011年9月から2013年8月までの2年間の兵庫県における小児の散発性感染性胃腸炎患者について、原因ウイルスを特定してその動態を把握するとともに、検出されたウイルスについて分子遺伝学的手法で解析したので報告する。

感染症部

*別刷請求先:〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29
兵庫県立健康生活科学研究所 健康科学研究センター
感染症部 高井 伝仕

II 材料と方法

1. 調査対象

2011年9月から2013年8月までに兵庫県感染症発生動向調査事業の病原体定点で採取された、感染性胃腸炎患者の糞便415検体を検査材料とした。なお、本研究ではウイルス性下痢症の発生ピークが冬季であるため、9月から翌年8月までを1流行シーズンとして集計した。

2. ウイルス遺伝子の検出と遺伝子型別

滅菌蒸留水で10%乳剤とした糞便の遠心上清からウイルスDNAおよびRNAを抽出した。RNAウイルスはランダムプライマーによって抽出RNAからcDNAを作成したのち、PCR法によりウイルス遺伝子を検出した。

NoVは厚生労働省通知⁴⁾に記載されたプライマーおよびTaqManプローブを用いて、リアルタイムPCR法でNoV遺伝子を検出した。陽性となった検体は、コンベンショナルRT-PCR法でポリメラーゼ領域C末端〜カプシド領域Sドメインを増幅した。このPCR増幅産物を、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、MEGA5ソフトウェアを用いて近隣結合法で系統樹解析した。遺伝子型別には、Kageyamaらの方法⁵⁾およびノロウイルスの遺伝子型(Capsid N/S regionに基づく遺伝子型, <http://idsc.nih.gov/pathogen/refer/norokaisetu1.html>)に従って遺伝子型を分類した。

ARVの遺伝子検出およびVP7(G)領域の遺伝子型別は、ウイルス性下痢症診断マニュアル⁶⁾に準じたRT-PCR法により行った。VP4(P)領域の遺伝子型別はGomaraらの方法⁷⁾に従った。

SaVの遺伝子検出および型別は、Okadaらの方法⁸⁾に従ってカプシド遺伝子を増幅後、塩基配列を決定し遺伝子型別した。

CRVの遺伝子検出は、葛谷らの方法⁹⁾に従った。

HAstVの遺伝子検出はSakonらの方法¹⁰⁾に従った。遺伝子型別にはSakamotoらの型別用プライマー¹¹⁾を用いた。

EAdVは病原体検出マニュアルに従い、ヘキソンC4

領域の一部を増幅するプライマー¹²⁾を用いてウイルス遺伝子を検出した。

III 結果および考察

1. 胃腸炎ウイルス検出状況

2011/12～2012/13シーズンの2シーズンにおける各ウイルスの検出状況をTable1に示した。患者糞便415検体中161検体(38.8%)から胃腸炎ウイルスが検出された。原因ウイルスとして最も多く検出されたのはNoVで、陽性検体中44.1%(71検体)を占めた。なお、NoVは遺伝子群がI群(G I)とII群(G II)に分類されるが、今回の小児を主体とした検体からはG Iは検出されなかった。

NoVに次いでARVが33.5%(54検体)、EAdVが9.3%(15検体)、SaVが8.1%(13検体)、HAstVが3.7%(6検体)、CRVが1.2%(2検体)の順に多く検出された。重複感染は9検体(5.6%)で認められた。患者からの胃腸炎ウイルス検出率は2011/12シーズンが33.5%、2012/13シーズンが44.8%で、両シーズンともNoV G IIが最も多く検出された。

Fig. 1に胃腸炎ウイルスの月別検出状況を示した。両シーズンともシーズン初期にNoV G IIの検出数が増加し、2011/12シーズンは1月～2月、2012/13シーズンは10月～12月が検出のピークとなった。また、NoVの検出は10月から3月の秋期から冬期に集中しており、NoVの90.1%がこの時期に検出された。両シーズンともNoVの減少に伴ってARVが増加しており、NoVとARVの流行に季節性が認められた。

EAdVやSaV等は検出数が少なく季節の変動を捉えるには至らなかったが、感染症サーベイランスにおける全国の病原体検出情報によれば、EAdVは年間を通じて検出されている一方で、SaVはARVと同様にNoV流行の減少に伴って増加する傾向がみられた。

2. 胃腸炎ウイルスの流行型解析

最も多く検出されたNoV G IIの遺伝子型別検出状況

Table 1 Number of gastroenteritis viruses detected in Hyogo prefecture (2011/12-2012/13 season)

	Samples	Gastroenteritis viruses-Positive (%)	Number of detection (%)					
			NoV G II	SaV	HAstV	ARV	CRV	EAdV
2011/12	221	74 (33.5)	27 (36.5)	7 (9.5)	2 (2.7)	25 (33.8)	2 (2.7)	11 (14.9)
2012/13	194	87 (44.8)	44 (50.6)	6 (6.9)	4 (4.6)	29 (33.3)		4 (4.6)
Total	415	161 (38.8)	71 (44.1)	13 (8.1)	6 (3.7)	54 (33.5)	2 (1.2)	15 (9.3)

NoV G II : norovirus G II SaV : sapovirus HAstV : human astrovirus ARV : group A rotavirus
CRV : group C rotavirus EAdV : enteric adenovirus

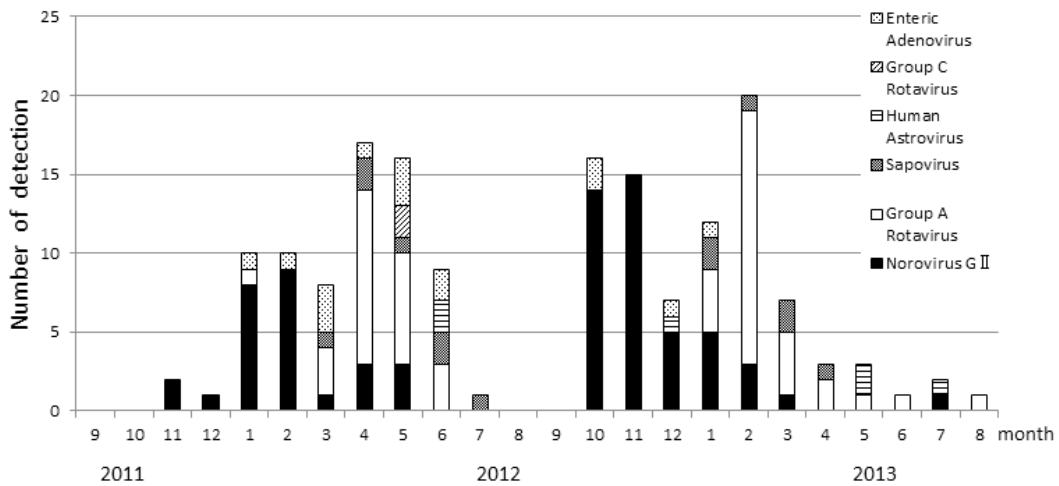


Fig. 1 Monthly detection of gastroenteritis viruses in Hyogo prefecture (2011/12-2012/13 season)

Table 2 NoV genotypes detected from clinical specimens of infectious gastroenteritis (2011/12-2012/13 season)

	Genotype					Total
	G II/2	G II/3	G II/4	G II/12	G II/13	
2011/12	4	2	18		3	27
2012/13	1		42	1		44
Total	5	2	60	1	3	71

を Table 2 に示した. NoV G II 71 検体について遺伝子型別を行ったところ, G II/2, G II/3, G II/4, G II/12 および G II/13 の 5 遺伝子型が検出された. このうち G II/4 は, 2011/12 シーズンに検出された NoV G II のうち 66.7% (18/27) を, また 2012/13 シーズンの 95.4% (42/44) を占めており, 小児における NoV 感染の主体となっていた.

60 株の G II/4 について系統樹解析を行った結果, 3 つのクレードに分類された (Fig. 2). すなわち, 2006b 類似株が 19 株, 2009a 類似株が 2 株および Sydney/NSW0514/2012/AU (JX459908) 類似株が 39 株であった. Sydney/NSW0514/2012/AU (JX459908) は 2012 年 3 月にオーストラリアで検出された G II/4 の変異株で, G II/4 2012 変異株と仮称されている^{13,14)}. G II/4 2012 変異株はそのうち 2012 年 8 月に香港, 9 月にアメリカでも検出され, 世界的な拡大が考えられていた. この変異株は県内では 2012 年 10 月に初めて検出されたのち急速に増加して, 2012/13 シーズンには G II/4 の 92.9% (39/42) を占めるに至った. このことから県内では 2012/13 シーズン当初からこの変異株が急速に拡大し, 流行の主体となったと考えられた.

G II/4 は 2006/07 シーズンに 2006b 型に分類される新たな変異株が出現し, 短期間で世界中に拡大して大流行

を引き起こした¹⁵⁾. そのうち, 2008a, 2008b, 2009a 型等の新たな変異株が出現したものの, いずれも大きな流行を引き起こすことは無かった. しかし, 2012 変異株が侵入した 2012/13 シーズンは, シーズン当初に NoV 感染症関連の死者が発生したほか, 1000 人を超える規模の食中毒事例が発生するなど, NoV 流行が社会問題化した. これは 2012 変異株に免疫を持たない感受性者が多かったことが一因と考えられた. 2012 変異株の出現時期や地域は不明であるが, 最初の発見から国内への侵入が短期間で起きていることから, 今後の新たな変異株の拡大も短期間で起こるものと思われ, 県内での変異株出現に対する監視が必要である.

ARV は表面抗原である VP7 蛋白 (G 血清型) および VP4 蛋白 (P 血清型) の 2 種の抗原の組み合わせで分類されており, これらの領域を標的とした RT-PCR 法で遺伝子型別を行った (Table 3). 検出された 54 検体は G1P[8], G2P[4], G3P[8] および G9P[8] の 4 遺伝子型に分類された. 2011/12 シーズンは, G1P[8] が 60.0% (15/25) と最も多く検出され, 次いで G9P[8] (32.0%) および G3P[8] (8.0%) の順に多かった. 一方, 2012/13 シーズンは G9P[8] が 65.5% と最も多く, 次いで G1P[8] (27.6%) および G2P[4] (6.9%) の順に多かった. 世界中で検出されている野生株の大部分は, G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] の 5 種類で占められ¹⁶⁾, 県内でも同様の傾向が示された. 流行株の遺伝子型は地域や時期によって変化するが, 県内では 2 シーズンとも G1P[8] および G9P[8] が多くを占め, これら 2 つの型が主要な流行株と考えられた.

2012/13 シーズンに検出された G1P[8] 株の VP7 をコードする全領域 (1062bp) および VP4 の一部領域の塩基配列について, DDBJ データベースの BLAST による

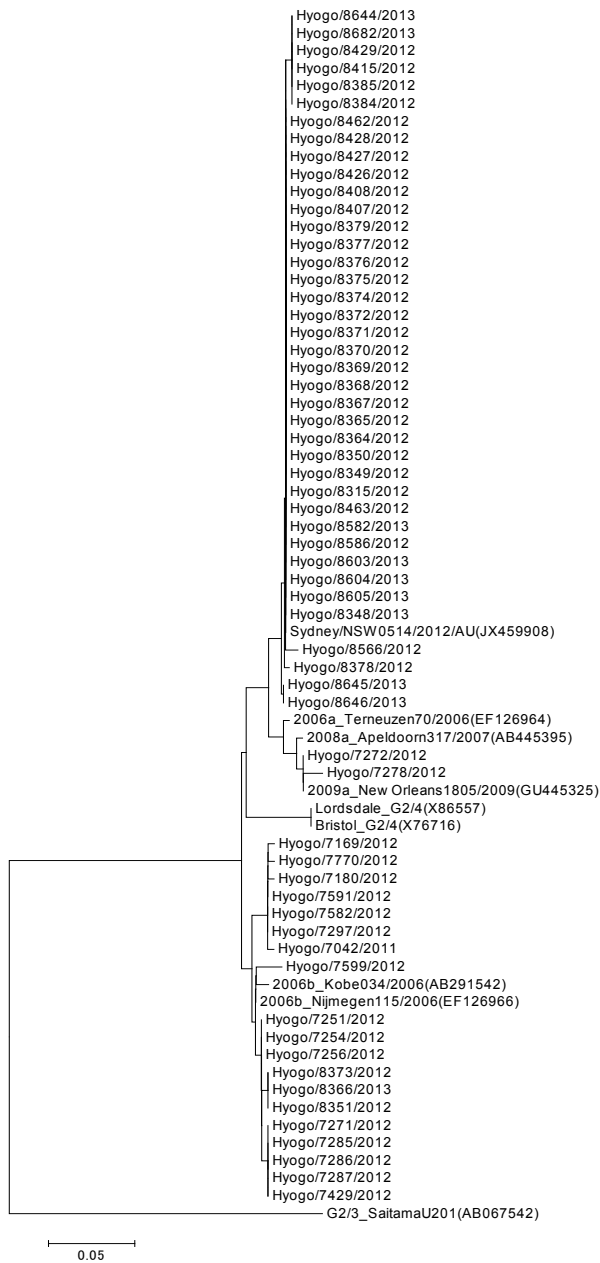


Fig. 2 Phylogenetic tree of NoV GII/4 based on capsid N/S region in Hyogo prefecture

相同性検索を行った。現在国内では単価ワクチンのロタリックス®と、5価ワクチンのロタテック®が任意接種で使用されているが、解析した1株はロタリックス®と100%塩基配列が一致していたことから、ワクチン由来株であると考えられた。なお、この下痢症患者からはNoV GIIも検出されたため、発症がワクチン接種によるかについては不明である。

2011年から国内ではARVワクチン接種が開始されており、現在承認されている2種のワクチン株と野生株間の遺伝子組換え(再集合)ウイルスの監視や、ワクチン接種による発症予防や重症例の減少の把握を目的としたサーベイランスが重要である。

Table 3 ARV genotypes detected from clinical specimens of infectious gastroenteritis (2011/12-2012/13 season)

	Genotype				Total
	G1P[8]	G2P[4]	G3P[8]	G9P[8]	
2011/12	15		2	8	25
2012/13	8	2		19	29
Total	23	2	2	27	54

SaVが検出された13検体について遺伝子型別を行ったところ、GI/2が4検体と最も多く、次いでGIV/1が3検体、GI/1が2検体、GI/3、GII/1、GII/2およびGII/3がそれぞれ1検体ずつ検出された。県内ではこの2シーズンの間に遺伝子型GI/2による成人の食中毒事例が3事例発生している。このことから、従来小児の胃腸炎ウイルスと考えられてきたSaVは¹⁷⁾、成人間でも流行することが明らかになった。近年、愛知県¹⁸⁾や川崎市¹⁹⁾等からもGI/2による食中毒事例が報告されており、今後の食中毒検査において注目すべきウイルスと思われる。

AstVが検出された6検体の遺伝子型は、1型が4検体、4型が2検体であった。検出されるAstVは胃腸炎ウイルス全体に占める比率は少ないものの、高齢者施設における集団感染²⁰⁾や、千葉県の小学校や保育所における4型および5型による大規模な集団感染も報告されている²¹⁾。従来、稀にしか検出されなかったNoVが現在のような大規模感染を起こすに至った現状を考えると、今後もNoVやARV以外の検出例の少ない胃腸炎ウイルスについても動向に注視する必要があると考えられる。

IV 要 旨

2011年9月から2013年8月までに病原体定点で採取された散发性感染性胃腸炎患者の糞便415検体について胃腸炎ウイルス探索を行い、161検体(38.8%)から胃腸炎ウイルスを検出した。その内訳は、NoV GIIが71検体(検出率44.1%)、ARVが54検体(33.5%)、EAdVが15検体(9.3%)、SaVが13検体(8.1%)、HAstVが6検体(3.7%)、CRVが2検体(1.2%)で、NoV GIIとARVが主要な原因であった。NoV GII/4の系統樹解析では、2012/13シーズンにGII/4の新たな変異株の県内への侵入や流行が確認され、シーズン毎の流行株の特性が明らかになった。

胃腸炎ウイルスの継続的な流行株の把握や解析は、大規模な感染症や食中毒予防に有用な情報になると考えられる。

謝 辞

感染症発生動向調査にご協力いただいた兵庫県健康福祉部健康局疾病対策課および検体採取にご協力いただいた関係機関の皆様方に深謝いたします。

文 献

- 1) 国立感染症研究所：IDWR 感染症発生動向調査週報, **5**, 第 11 号, 14-16 (2003)
- 2) 高井伝仕, 榎本美貴, 近平雅嗣：2009/10 シーズンに兵庫県で流行したノロウイルスの分子疫学による流行実態調査. 兵庫県立健康生活科学研究所健康科学研究センター研究報告, 第 2 号, 10-14 (2011)
- 3) Zhou, Y., Nakayama, M., Hasegawa, A., Kim, B., Nishio, O., Ushijima, H.: Serotypes of human rotaviruses in 7 regions of Japan from 1984 to 1997. 感染症学雑誌, **73** (1), 35-42 (1999)
- 4) 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)
- 5) Kageyama, T., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Katayama, K.: Coexistence of multiple Genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, **42** (7), 2988-2995 (2004)
- 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) Iturriza-Gomara, M., Kang, G., Gray, J.: Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses. *J. Clin. Virol.*, **31** (4), 259-265 (2004)
- 8) Okada, M., Yamashita, Y., Oseto, M., Shinozaki, K.: The detection of human sapoviruses with universal and genogroup-specific primers. *Arch. Virol.*, **151** (12), 2503-2509 (2006)
- 9) 葛谷光隆, 藤井理津志, 濱野雅子, 小倉肇：教育研修施設で発生したヒト C 群ロタウイルスによる集団胃腸炎事例. 感染症学雑誌, **77**, 53-59 (2003)
- 10) Sakamoto, T., Negishi, H., Wang, Q. H., Akihara, S., Kim, B., Nishimura, S., Kaneshi, K., Nishimura, T., Ushijima, H.: Molecular epidemiology of astroviruses in Japan from 1995 to 1998 by reverse transcription-polymerase chain reaction with serotype-specific primers (1 to 8). *J. Med. Virol.*, **61**, 326-331 (2000)
- 11) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル 咽頭結膜熱・流行性角結膜炎検査, 診断マニュアル(第 2 版) (2012)
- 12) 国立感染症研究所感染症情報センター：IASR 病原微生物検出情報(月報), **33**, 第 12 号, 333-334(2012)
- 13) 国立感染症研究所感染症情報センター：IASR 病原微生物検出情報(月報), **34**, 第 2 号, 45-49 (2013)
- 14) Siebenga J J, Vennema H, Renckens B, de Bruin E, van der Veer B, Siezen R J, Koopmans M : Epochal evolution of GG II.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J Virol*, **81**, 9932-9941 (2007)
- 15) 国立感染症研究所感染症情報センター：IASR 病原微生物検出情報(月報), **32**, 第 3 号, 61-66 (2011)
- 16) Chiba, S., Nakata, S., Numata-Kinoshita, K., Honma, S.: Sapporo virus: history and recent findings. *J. Infect. Dis.*, **181**, 303-308 (2000)
- 17) 国立感染症研究所感染症情報センター：IASR 病原微生物検出情報(月報), **31**, 第 11 号, 322-323 (2010)
- 18) 国立感染症研究所感染症情報センター：IASR 病原微生物検出情報(月報), **31**, 第 11 号, 323-324 (2010)
- 19) Marshall, J. A., Bruggink, L. D., Sturge, K., Subasinghe, N., Tan, A., Hogg, G. G.: Molecular features of astrovirus associated with a gastroenteritis outbreak in an aged-care centre. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **26** (1), 67-71 (2007)
- 20) 国立感染症研究所感染症情報センター：IASR 病原微生物検出情報(月報), **34**, 第 7 号, 205-206 (2013)

[平成 26 年 4 月 1 日受理]