

資料

2009/10年から2012/13年シーズンにおける食中毒・ 感染症事例から検出されたノロウイルスの遺伝子型について

久常 有里, 重本 直樹, 東久保 靖, 山田 裕子,
高津 幸枝, 谷澤 由枝, 福田 伸治*, 高尾 信一

Norovirus Genotypes Detected in Gastroenteritis Outbreaks from the 2009/10 Season to the 2012/13 Season

YURI HISATSUNE, NAOKI SHIGEMOTO, YASUSHI TOUKUBO, HIROKO YAMADA,
YUKIE SHIMAZU, YUKIE TANIZAWA, SHINJI FUKUDA* and SHINICHI TAKAO

2009/10年から2012/13年の4シーズンにおいて、広島県立総合技術研究所保健環境センターに検査依頼のあった食中毒(疑い事例も含む)・感染症事例から検出されたノロウイルスの遺伝子解析を行った。GIは、特に優勢なサブタイプは認められず、全国的に検出されている遺伝子型が確認された。一方GIIに関しては、シーズンによってはGII.2やGII.12などの遺伝子型が多く検出されたシーズンもあったが、流行の主流はGII.4であった。解析を行った4シーズンにおいて、広島県ではGII.4の3つのサブタイプが検出された。特に2012/13年シーズンは、GII.4の新しいサブタイプSydney 2012型が主流となったことから、ノロウイルスの流行が拡大したと考えられた。

Key words : Norovirus, Genotype, GII.4, Sydney 2012, 2012/13 season,

緒 言

ノロウイルスは冬季における食中毒・感染性胃腸炎発生の主要な原因ウイルスとして知られている。厚生労働省発表の平成24年食中毒発生状況によると、食中毒病因物質の判明した1070件のうち、ノロウイルスを病因物質とした件数は416件で、病因物質別にみた発生件数の割合が一番多い [1]。ノロウイルスには5つの遺伝子グループ(GI - GV)があり、それらはさらに複数の遺伝子型に分けられている [2]。特にヒトに感染するノロウイルスは、その大半が遺伝子グループI (GI) と遺伝子グループII (GII) に属し [2]、それぞれ15種類と19種類の遺伝子型が確認されている [3]。多くの遺伝子型の中でも特に、GII.4に属する株がヒトの間で流行の中心となっており、1995年以来、2~3年ごとにGII.4の変異型が出現し、流行を繰り返していることが報告されている [4]。広島県においても、GII.4を中心に毎シーズン(9月から翌年8月までを同じシーズンとする)様々な遺伝子型が検出されており [5]、シーズンごとにノロウイルスの遺伝子型を解析し、流行株の動向を把握することは重要である。そこで、今回我々は

2009/10年から2012/13年の4シーズンにおいて、食中毒(疑い事例も含む)・感染症事例から検出されたノロウイルスについて遺伝子解析を行ったので、その概要を報告する。

材料および方法

1 供試サンプル

2009/10年から2012/13年の4シーズンに、広島県立総合技術研究所保健環境センター(以下、当センターとする)へ検査依頼のあったノロウイルス関連の食中毒(疑い事例も含む)・感染症60事例から採取された糞便259検体を用いた。

2 RT-PCR法によるノロウイルス遺伝子の検出

糞便検体にPBSを加え10%乳剤を作成した後、QIAamp Viral RNA mini Kit (QIAGEN) を用いてRNA抽出を行った。逆転写反応は、5×buffer 4μL, 2mM dNTPs 4μL, 50μM Random primer pd(N)₉ (タカラバイオ) 1μL, RNase inhibitor (40U/μL) (TOYOBO) 0.5μL, ReverTra Ace (100U/μL) (TOYOBO) 1μLを含む反応液に抽出RNA 9.5μLを

*現広島文教女子大学: Hiroshima Bunkyo Women's University

加え、30℃・10分、42℃・60分、99℃・5分の条件で反応を行い、cDNAを作成した。PCR反応は、10×buffer 5μL、2.5mM dNTPs 4μL、10μMのセンスおよびアンチセンスプライマー各1μL、Ex Taq (5U/μL) (タカラバイオ) 0.25μLとcDNA 3μLを加えた50μLの反応液で、94℃・3分の酵素初期活性化後、94℃・45秒、55℃・45秒、72℃・1分を40サイクル、最後に72℃・15分の最終伸長を行った。プライマーは、GI用にG1SKFとG1SKR、GII用にG2SKF、G2SKRとG2ALSKRを用いた [6,7]。

3 PCR産物のシーケンスと系統樹解析

PCR産物をQIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN)あるいはQIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN)により精製した後、SequiThermEXCEL II DNA Sequencing Kit-LC (EPICENTRE Biotechnologies) およびLICOR 4200 series sequencer (LI-COR)を用いたダイレクトシーケンスによりカプシドの5'末端領域の塩基配列を決定した。翻訳開始点から264bpの塩基配列をClustalWプログラム (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>)を用いて解析し、MEGA5 (<http://www.megasoftware.net/index.php>)で系統樹を作成した。遺伝子型の分類はKageyamaら [8] および病原微生物検出情報に示された分類 [9] に従った。

結 果

1 ノロウイルス関連の食中毒・感染症事例

ノロウイルス関連の食中毒および感染症の集団発生事例については表1に示した。2009/10年から2012/13年

の間の4シーズンで合計60事例であり、各シーズン別の事例数は、2009/10年は23事例、2010/11年は13事例、2011/12年と2012/13年は12事例であった。2009/10年と2011/12年には、1事例から遺伝子グループGIとGIIがともに検出された事例、および同じ遺伝子グループの複数の遺伝子型が検出された事例があった。

表1 2009/10年から2012/13年シーズンにおける食中毒・感染症発生事例

シーズン	内訳		事例数
	食中毒事例	感染症事例	
2009/2010	9	14	23
2010/2011	4	9	13
2011/2012	5	7	12
2012/2013	4	8	12
計	22	38	60

2 2009/10年から2012/13年に検出されたノロウイルスの遺伝子型

遺伝子解析の結果より、2009/10年から2012/13年までの4シーズンに検出された遺伝子型を示した。表2に示したように、遺伝子グループGIについては、2009/10年に発生した4事例で4つの遺伝子型が検出されたが、その後のシーズンではGIが検出された事例は0~2事例と少なかった。

遺伝子グループGIIでは、2009/10年に検出された遺伝子型に特徴が認められた。すなわち従来、広島県を含む日本国内で検出されるノロウイルスGIIの遺伝子型はGII.4が最も多かったが [3]、2009/10年では、それまではほとんど見られなかったGII.2が9事例検出され

表2 2009/10年から2012/13年シーズンに検出されたノロウイルスGIの遺伝子型

シーズン	GI 検出事例数	遺伝子型				
		GI.1	GI.2	GI.4	GI.8	NT
2009/2010	4 (3)	1	1	1	2	
2010/2011	0					
2011/2012	2 (2)	1				1
2012/2013	1				1	

() 内の数は、GIとGIIがともに検出された事例およびGIの遺伝子型が複数検出された事例数

表3 2009/10年から2012/13年シーズンに検出されたノロウイルスGIIの遺伝子型

シーズン	GII 検出事例数	遺伝子型							
		GII.2	GII.3	GII.4	GII.7	GII.8	GII.12	GII.13	GII.14
2009/2010	22 (4)	9	2	10	1		1		1
2010/2011	13	1		12					
2011/2012	12 (3)	3		6		1	3	2	
2012/2013	11			9			2		

() 内の数は、GIとGIIがともに検出された事例およびGIIの遺伝子型が複数検出された事例数

(表3), その数はGII.4の10事例と同程度であった。しかしGII.2の検出数は, 2010/11年では1事例, 2011/12年では3事例と減少し, 2012/13年においては検出されなくなった。なお, 本県で2009/10年から2012/13年までの4シーズンを通じて最も多く検出された遺伝子型はGII.4であった。

3 ノロウイルスGII.4の系統樹解析

2009/10年以降, 広島県におけるノロウイルスに関しては, GII.4が主として流行している。そこで, このGII.4の詳しい遺伝子型のサブタイプを調べるために系統樹解析を行い, 結果を図1に示した。2009/10年に広島県で検出されたGII.4は, 2006/07年から2007/08年

まで多く検出されていた2006b型と, このシーズンに新しく検出された2009a型が, それぞれ5事例 (Case No. 200, 201, 202, 210, 217 および Case No. 195, 196, 212, 216, 218) から検出された。しかし2010/11年には, 2009a型の検出は2事例 (Case No.237, 240) に減少し, 再び2006b型の株が10事例 (Case No.227, 228, 229, 231, 232, 233, 234, 235, 238, 239) と多数検出された。2011/12年では, 2009a型は検出されず, 2006b型のみが検出された。一方, 2012/13年に検出されたGII.4については, 2006b型あるいは2009a型のどちらとも異なり, 2012年3月にオーストラリアで最初に報告されたSydney/NSW0514/2012/AU [10] 株に属する新しいクラスター (Sydney 2012型) を形成した。

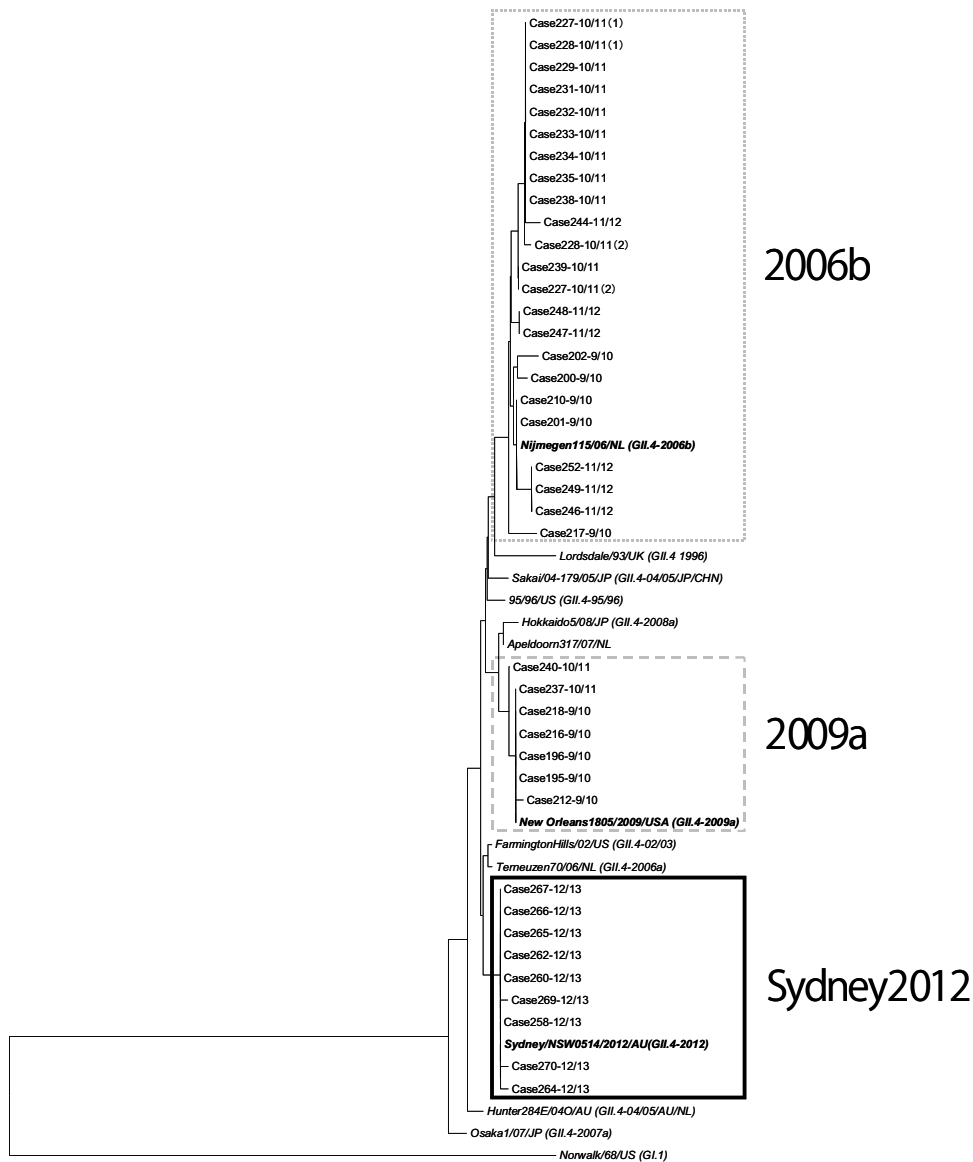


図1

図1 2009/10年から2012/13年シーズンに検出されたノロウイルスGII.4の系統樹 (NJ法)
株名: 事案 No. - 検出シーズン イタリックはレファレンス株を示す

考 察

今回我々は、広島県内で発生した食中毒（疑い事例を含む）あるいは集団発生事例から検出されたノロウイルスについて、それらの遺伝子型を調べた。

ノロウイルス GI に関しては、2009/10 年から 2012/13 年の 4 シーズンに検出された遺伝子型は GI.1, GI.2, GI.4, GI.8 及び型不明の 5 種類であった。それらは、流行シーズンによって特に優勢な遺伝子型は無く、また全国的な傾向と一致したものであった [11]。

GII に関しては、4 シーズンを通して遺伝子型は GII.4 が最も多く、GII.4 の優勢状態が続いていた。しかし 2009/10 年に関しては、それまでほとんど認められなかった GII.2 が GII.4 と同程度確認されたという点で特徴的なシーズンであった [5]。同様の傾向は他県でも確認されており、静岡県では 2010 年上半期に検出された GII のうち、GII.2 が最も多く、全国的な流行遺伝子型の多様化が報告されている [12]。しかしその後、広島県では 2010/11 年、2011/12 年と GII.2 の検出数は減少し、2012/13 年では検出されなくなった。このことは、全国的な傾向と一致しており、国立感染症研究所感染症疫学センターでの全国集計 [11] によると、2009/10 年は前シーズンの 10 倍以上の 345 件まで GII.2 の検出数は急増したが、その後シーズン毎に減少し、2012/13 年は流行前の 2008/09 年以前と同程度の検出件数であったことが報告されている。

過去 4 シーズンにおける GII.4 の系統樹解析の結果（図 1）から、本県における GII.4 のサブタイプはこの数年の間に大きく変動していたことが明らかとなった。すなわち、2009/10 年は、2006/07 年にノロウイルスの大流行を引き起こし [5,13]、それ以後の流行の主流となっていた 2006b 型に加えて、New Orleans 1805/09/US 様の新しいサブタイプ 2009a 型がほぼ同じ割合で検出されていたが、2010/11 年になると、前シーズンに多く検出されていた 2009a 型が減少し、再び 2006b 型の検出が増大した。2011/12 年では、2009a 型が認められず 2006b 型のみが検出されるようになった。ところが、2012/13 年になると、それまでの 2006b 型、2009a 型とは全く異なる Sydney/NSW0514/2012/AU [10] と同じクラスターに分類される新しいサブタイプの Sydney 2012 型が出現した。2012 年後半からイギリスやオランダでもノロウイルスの流行拡大が明らかになっているが [4]、それらの流行には、いずれも Sydney 2012 型の出現が関与していることが示唆されている [4]。日本においても、2012/13 年に新潟県で発生した集団発生事例において Sydney 2012 型が検出されたが [14]、その後の調査により 2011/12 年シーズン中からすでに大阪、北

海道で検出されていたことが確認されている [14]。当センターで検出された 2012/13 年シーズンの GII.4 は、全て Sydney 2012 型に分類され、広島県におけるノロウイルスの流行も Sydney 2012 型が大きく関わっていることが明らかとなった。少なくとも広島県内においては、2009/10 年から 2012/13 年の間の 4 シーズンの間に、GII.4 のサブタイプ 2009a 型の出現、衰退、消失と、新たな Sydney 2012 型の出現という現象が起こっていたと推察される。こうしたノロウイルスのサブタイプが経年で変化していく現象については、これまでに報告があり [15]、アメリカでは過去 10 年間で 2～3 年おきに新しい GII.4 のサブタイプが出現し、それまでの優勢 GII.4 サブタイプと置き換わっていたことが報告されている [15]。その理由として、GII.4 はカプシドのアミノ酸変異を繰り返すことで集団免疫から逃れ、長期にわたって流行を続けているためと推測されている [4,16]。

一方、2012/13 年に検出された GII.4 以外の 2 事例は GII.12 であり、2009/10 年と 2011/12 年に検出された株と同じクラスターに分類された（データ非掲載）。GII.3 については、本県では 2009/10 年まで隔年で数件検出されてきた [5]。しかし、2010/11 年以降、当センターでは GII.3 は検出されていない。

今後のノロウイルスの流行を予測し、食中毒対策や感染症対策に資するためには、2012/13 年に新しく検出された Sydney 2012 型がどのように変化していくのか、また他の遺伝子グループ、遺伝子型についても変化が見られるのか、引き続きノロウイルスの遺伝子解析を進めることが重要であると考えている。

文 献

- [1] 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課. 平成 24 年食中毒発生状況. 食品衛生研究. 2013;63(9):75-162.
- [2] Zakikhany K, Allen DJ, Brown D, Iturriza-Gomara M. Molecular Evolution of GII-4 Norovirus Strains. *PLoS ONE*. 2012;7(7):e41625.
- [3] 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 2006/07～2009/10 シーズン. 病原微生物検出情報. 2010;31(11):321-314.
- [4] Beek J, Ambert-Balay K, Botteldoorn N, Hden JS, Fonager J, Hewitt J, Lritani N, Kroneman A, Vennema H, Vinje J, et al. Indications for Worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012. *Euro Surveill*. 2013;18(1):pii20345.
- [5] 重本直樹, 谷澤由枝, 福田伸治. 2009/10 年シーズンのノロウイルス感染症・食中毒事例から検出さ

- れた遺伝子型について. 広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告. 2010;18:1-6.
- [6] Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Natori K, Takeda N, Katayama K. J Virol Methods. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. 2002;100(1-2):107-114.
- [7] Nishida T, Nishio O, Kato M, Chuma T, Kato H, Iwata H, Kimura H. Genotyping and quantitation of noroviruses in oysters from two distinct sea areas in Japan. Microbiol Immunol. 2007;51(2):177-184.
- [8] Kageyama T, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Kojima S, Takai R, Oka T, Takeda N, Katayama K. Coexistence of Multiple Genotypes, Including Newly Identified Genotypes, in Outbreaks of Gastroenteritis Due to Norovirus in Japan. J. Clin Microbiol. 2004;42(7):2988-2995.
- [9] 片山和彦. ノロウイルスの遺伝子型. 病原微生物検出情報. 2011;32(12):365-366.
- [10] Leshem E, Wikswo M, Barclay L, Brandt E, Storm W, Salehi E, DeSalvo T, Davis T, Saue A, Dobbins G, et al. Effects and Clinical Significance GII.4 Sydney Norovirus, United States, 2012-2013. Emerg. Infect. Dis. 2013;19(8):1231-1238.
- [11] 国立感染症研究所感染症疫学センター. ノロウイルス検出状況・シーズン別ウイルス検出状況: 胃腸炎ウイルス 2003/04 ~ 2013/14. [Internet] <https://nesid3g.mhlw.go.jp/Byogentai/Pdf/data96j.pdf> [2013.10].
- [12] 長岡宏美, 湊千壽, 山田俊博, 川森文彦, 杉山寛治, 野田衛. 2009 ~ 2010 年に静岡県で発生したノロウイルス集団胃腸炎事例について. 病原微生物検出情報. 2010;31(11):320-321.
- [13] 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 2006/07 シーズン. 病原微生物検出情報. 2007;28(10):277-278.
- [14] 田村務, 渡邊香奈子, 田澤崇, 渡部香, 広川智香, 吉澄志磨, 横井一, 森攻次, 入谷展弘, 藤井慶樹, 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. 病原体微生物検出情報, 2012;33(12):333-334.
- [15] CDC. Emergence of New Norovirus Strain GII.4 Sydney-United States, 2012. MMWR. 2013;62(3):55.
- [16] 福田伸治, 重本直樹, 谷澤由枝. 広島県におけるノロウイルスの遺伝子型 GII.4 の変異. 広島県総合技術研究所保健環境センター研究報告. 2010;18: 5-19.