

## 資料

## 広島県における 2015/16 シーズンのノロウイルス流行状況について

谷澤 由枝, 重本 直樹, 池田 周平, 島津 幸枝, 高尾 信一

## Epidemic of Norovirus in Hiroshima prefecture, 2015-2016 season.

YUKIE TANIZAWA, NAOKI SHIGEMOTO, SYUHEI IKEDA, YUKIE SHIMAZU, and SHINICHI TAKAO

(Received October 14, 2016)

2014/15シーズン末から全国的に、これまでに報告されたことのないノロウイルスGII.17 Kawasaki 2014 variant (以下GII.17 Kawasaki 2014と略す。)の検出が相次いだ。そのため2015/16シーズンは、GII.17 Kawasaki 2014の大きな流行が起こる可能性が危惧された。そこで2015/16シーズンの流行状況を把握するため遺伝子型について調べたところ、集団感染事例、小児散発事例共にGII.4が最も多く検出された。GII.17 Kawasaki 2014については集団感染事例ではGII.4と同程度検出されたが、小児散発事例ではその検出数は少なく、小児散発事例と集団感染事例では遺伝子型検出内訳が大きく異なるという特徴が認められた。また、遺伝子型別のスクリーニング法として市販のGII.17 Kawasaki 2014特異的検出キットについて検討を行ったところ、その有用性が確認された。

Key words : norovirus, genotype, GII.4, GII.17, 2015/16 season

## 緒 言

ノロウイルスは、人に対し嘔吐・下痢などの症状を引き起こすウイルスで、特に冬季に流行し感染性胃腸炎や集団食中毒等を引き起こすことでも知られている[1-2]。2014/2015シーズンには広島県のみならず全国的にもノロウイルスの主要流行株に変化があり、それまで多く検出されていたGII.4が減少し、新規遺伝子型ノロウイルス、GII.17 Kawasaki 2014 がシーズン終わりから非常に多く検出された[3-5]。このGII.17 Kawasaki 2014 は2013/14 冬季シーズンに川崎市内で発生した感染性胃腸炎患者から検出された遺伝子型で[6]、2014/15 冬季シーズンの1月以降に全国的な流行を引き起こしていたことが明らかになっている[6, 7]。これを受けて、2015年9月30日付け食安監発0930第2号厚生労働省通知「ノロウイルスによる食中毒の予防について」によりGII.17 Kawasaki 2014が2015/16シーズンに大流行する可能性があるため、流行の立ち上がりに厳重な監視が必要であるとして注意が呼びかけられた。また、GII.17 Kawasaki 2014は市販のイムノクロマト簡易検査キットの検出感度が低いとの報告があったことから[7, 8]、キット偽陰性による感染症対策の遅れも懸念された。

そこで今回我々は、2015/16シーズンの広島県におけ

る流行遺伝子型の動向を調べることを目的とし、ノロウイルスを原因とする小児散発事例および集団感染事例での検出遺伝子型について調査した。加えて、GII.17 Kawasaki 2014を特異的に検出できるとして、市販されているリアルタイムPCRキット(プライマー&プローブ)の有用性についても検討を行った。

## 材料および方法

## 1 供試検体

2015/16シーズンにおける流行状況把握のための遺伝子型別には、2015年10月から2016年7月までに採取された検体を対象とした。すなわち、小児散発事例の検体については、県内の小児科定点病院より検査依頼のあった感染性胃腸炎の検体のうち、ノロウイルスの遺伝子が検出された糞便検体で、かつ遺伝子解析可能であった49検体を対象とした。また、集団感染事例からの検体については、ノロウイルス起因の18事例から得られた糞便のうち59検体を対象とし解析を行った。

GII.17 Kawasaki 2014特異的検出キットを用いた遺伝子型別法の有用性の検討には、2014から2016年に得られた検体のうち、遺伝子型決定済みのノロウイルス陽性糞便検体38件及び、アデノウイルス、アストロウイルス、サポウイルス、パレコウイルスの遺伝子がそれぞれ検

出された糞便検体各1件から得られた保存cDNAを用いた。

## 2 塩基配列の決定と遺伝子型別

ノロウイルス検出プライマーとしてGI用にはG1SKF, G1SKRを, GII用にはG2SKF, G2SKRとG2ALSKRを用いた [3, 9]。これらのプライマーを用いて増幅した特異的増幅断片は, QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) またはQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) により精製した後, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems) 及びApplied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Applied biosystems) を用いたダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。決定した塩基配列はWeb上のノロウイルス遺伝子型分類ツールであるNorovirus Genotyping Tool Version 1.0 (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>) を用いてVP1上流域の遺伝子型別を行った。

## 3 GII.17 Kawasaki 2014特異的検出キットを用いた遺伝子型別法の有用性の検討

リアルタイムPCR法にてノロウイルス GII.17を特異的に検出するキット「Hypercool テクノロジー™による新型ノロウイルス検出用プライマー&プローブ」(日本遺伝子研究所) を使用し, その有用性について検討を行った。リアルタイムPCR反応はLight Cycler 480システム II (Roche), Light Cycler 480 Probes Master (Roche)

表1 2015/16シーズンの小児散発事例におけるノロウイルスGIIの年齢別検出状況

年齢	遺伝子型			
	GII.3	GII.4	GII.6	GII.17
<12ヶ月	1	5	0	0
1歳	1	20	1	1
2歳	2	6	0	1
3-5歳	2	5	2	2

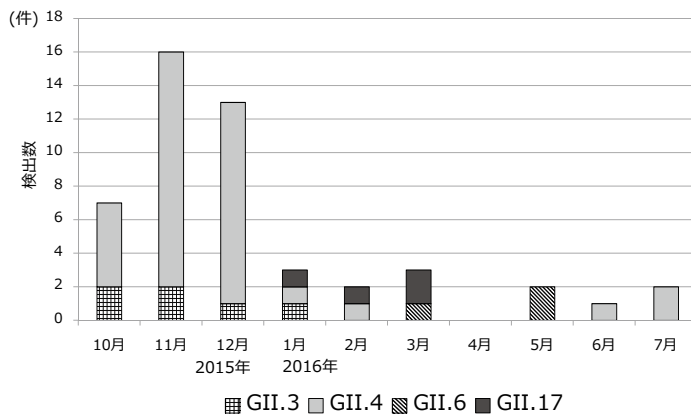


図1 2015/16シーズンの小児散発事例における月別の遺伝子型検出状況

を用い, 25µlの反応系でcDNA 2.5µlを供試した。反応条件は95℃で10分間初期変性後, 95℃で15秒間, 60℃で1分間を45サイクル行った。CP (Crossing Point) 値が36未満のものを陽性と判断した。

## 結 果

### 1 小児散発事例から検出されたノロウイルスGIIの遺伝子型

小児散発事例から検出されたノロウイルスGIIの月別遺伝子型検出状況を図1に, 遺伝子型別の内訳を図2に示した。2015/16シーズンでは10月にノロウイルスが初めて検出され11月が検出のピーク(16件)であった。検出されたノロウイルスの遺伝子型検出割合はGII.4が36件(74%)と大多数を占めたが, それらは, いずれもGII.4 Sydney 2012であった。GII.4以外ではGII.3が6件(12%), GII.17 Kawasaki 2014が4件(8%), GII.6が3件(6%)検出された。なお, GII.17 Kawasaki 2014については, 2015年中には検出されず, 2016年1月に初めて検出され, 3月まで検出が続いた。

小児散発事例におけるノロウイルスGIIの年齢別にみた検出遺伝子型を表1に示した。GII.3, GII.6, およびGII.17 Kawasaki 2014については, 2歳以上の児から多く検出される傾向が見られたが, GII.4については2歳未満の児から多く検出されていた。

### 2 集団感染事例から検出されたノロウイルスGIIの遺伝子型

集団感染事例から検出されたノロウイルスGIIの概要を図3及び図4に示した。

シーズン初のノロウイルスによる集団感染事例は2015年11月に保育園で発生し, その後の12月及び1月が集団感染事例におけるノロウイルス検出のピークであった。

GII.17 Kawasaki 2014は2015年12月に初めて検出され, 1月が3件と最も多かった。それらノロウイルス

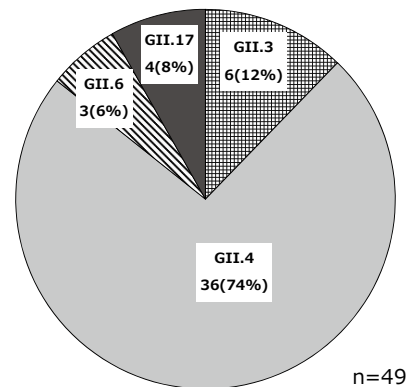


図2 2015/16シーズンの小児散発事例における遺伝子型別内訳

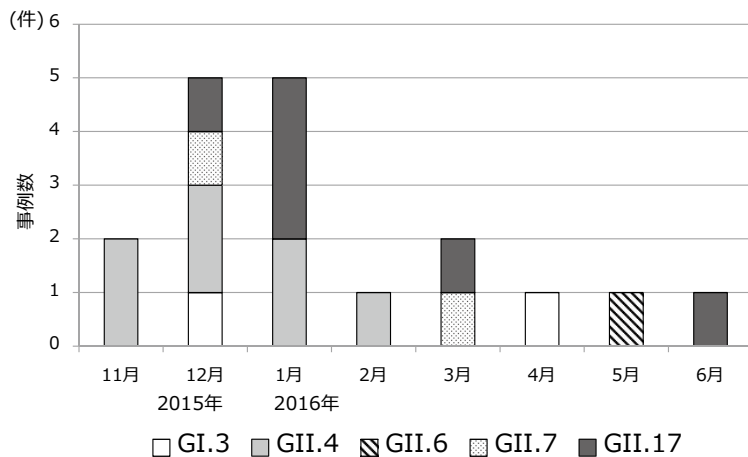


図3 2015/16シーズンの集団感染事例における月別の遺伝子型検出状況

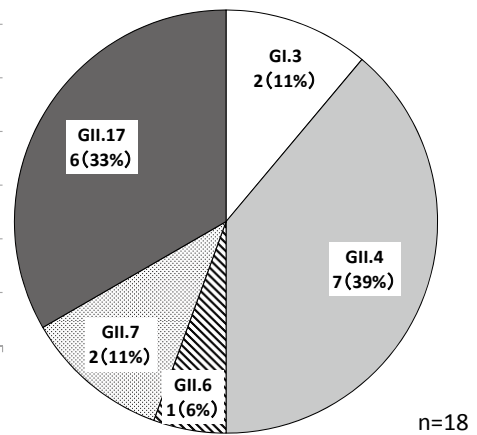


図4 2015/16シーズンの集団感染事例における遺伝子型別内訳

表2 2015/16シーズンの集団感染事例における発生施設別ノロウイルスの遺伝子型

発生施設	遺伝子型				
	GI.3	II.4	II.6	II.7	II.17
保育園		2	1	1	1
高等学校	1			1	
病院等 (18歳以上)		1			2
飲食店 (食中毒) (18歳以上)		2			2
高齢者施設		2			1

(数字は事例数)

の遺伝子型の割合は、II.4が7件(39%)と、II.17 Kawasaki 2014が6件(33%)とほぼ同程度で、検出された遺伝子型の大半を占め、次いでGI.3、とII.7、II.6も少数ながら検出された。なお、II.4については小児散発事例と同様に全てII.4 Sydney 2012であった。

発生施設別にみたノロウイルスの検出遺伝子型を表2に示した。施設別に見ると、保育園の事例では、検出されたウイルスはII.4、II.6、II.7、II.17 Kawasaki 2014と多彩な遺伝子型であったが、18歳以上の成人層における集団感染事例においては、II.4及びII.17 Kawasaki 2014が集中して検出された。

### 3 GII.17 Kawasaki 2014特異的検出キットを用いた遺伝子型別法の有用性の検討

リアルタイムPCR法を原理とする市販のII.17 Kawasaki 2014特異的検出キットの検査結果を表3に示した。ダイレクトシークエンス法にて、II.17と確認している25検体については、本キットにおいても、全てノロウイルスII.17 Kawasaki 2014陽性と判定された。一方、II.17 Kawasaki 2014以外のノロウイルス遺伝子型(GI.3, II.4, II.6, II.7)が含まれる検体や、アデノウイルスやアストロウイルスといった、その他の下痢症ウイルスが陽性であった検体については本キットではい

表3 GII.17特異的検出キットの特異性の確認

供試ウイルス	遺伝子型	陽性数/検体数
ノロウイルス	II.17 Kawasaki 2014	25 / 25
	II.3	0 / 2
	II.4 Sydney 2012	0 / 6
	II.6	0 / 3
	II.7	0 / 2
アデノウイルス		0 / 1
アストロウイルス		0 / 2
サポウイルス		0 / 3
パレコウイルス		0 / 4

れも陰性と判定され、非特異反応は認められなかった。

## 考 察

2015/16シーズンは2013/14シーズンに初めて報告された新規遺伝子型II.17 Kawasaki 2014の出現により、このII.17 Kawasaki 2014がこれまで長く主流であったII.4に代わり大流行を引き起こす可能性があるとして非常に注目されたシーズンであった。そこで我々は2015/2016シーズンの流行を監視することを目的に、県内で発生したノロウイルス起因の小児散発事例および集団感染事例における遺伝子型について調べた。

本県の小児散発事例の遺伝子型内訳を全国(IASR)の報告[10]と比較すると(図5)、2015/16シーズンはII.4が主要流行株で次にII.17 Kawasaki 2014、II.3が多い点は共通であった。一方で本県のII.4の検出率は、全国の49%よりも高い74%を占めた点と、II.6が多く検出された点で全国の報告とは異なっており、遺伝子型によっては流行に地域差があると考えられた[11]。

小児散発事例では10月に、集団感染事例では11月にノロウイルスがシーズンで始めて検出された。ピークは小児散発事例では11月、集団感染事例では12月及び1月であり、集団感染事例は小児散発事例よりも1か月程度

遅れていた。この発生のピークが小児散発事例よりも集団感染事例の方が遅れる傾向は、他県でも報告されている [12]。

GII.17 Kawasaki 2014については小児散発事例でピークが過ぎた2016年1月以降に検出され、集団感染事例では2015年12月に最初の事例が発生した後、1月に最も多く検出された。2014/15シーズンにおいては、県内で発生した集団感染事例におけるGII.17 Kawasaki 2014の検出ピークは3月であった。更に国内の他地域においてもGII.17 Kawasaki 2014の発生は年明け後にピークを迎える傾向が認められており [4, 6, 7, 12, 13], 2015/16シーズンの当県の検出状況からもGII.17は、GII.4より遅れて検出される傾向が確認された。

2015/16シーズンの県内での小児散発事例、集団感染事例のいずれもGII.4 Sydney 2012が最も多く検出された。このGII.4 Sydney 2012は、2012/13シーズンにアメリカ、ヨーロッパ、アジアなど全世界的にほぼ同じ時期に流行が確認され [14], 広島県においても2012/13の主流株となった。GII.4 Sydney 2012が感染を拡大した理由の1つは、カプシド蛋白の可変領域にアミノ酸配列の変異があり [15], これにより抗原性が乖離し免疫から逃れることができたためと言われている [16]。入谷らは2016年1月及び同年3月に発生した集団感染事例2件から検出したノロウイルスが、capsid領域はGII.4 Sydney 2012で、RdRp領域はGII.P16に分類されるこれまでに報告の無いキメラウイルスNoV GII.P16-GII.4 Sydney 2012であった事を報告している [17]。また、GII.4はこれまで周期的に変異を起こすことで、全世界的に流行を引き起こしてきたことも知られている [16, 18]。現在、GII.4亜型の主流であるSydney 2012は出現から4年経過していることから、今後も新たな亜型やキメラウイルスの出現も考慮し、注意深い監視が必要である。

小児散発事例で72%を占めたGII.4であるが、年齢別に見ると0-2歳ではGII.4の検出率が高いことが確認できた。一方で、小児の集団感染事例ではGII.4, GII.6, GII.7及びGII.17 Kawasaki 2014と多彩な遺伝子型が検出された。Sakonらは、大阪府における10年間のノロウイルス遺伝子解析結果から小児の散発事例、食中毒事例及び高齢者施設の事例ではGII.4が大多数を占めること。保育施設および学校での集団感染症事例では、様々な遺伝子型が検出され、その遺伝子型はシーズンによって変化することを確認しており、年齢層によりノロウイルス遺伝子型感受性に差があると報告している [19]。また、他地域においてもGII.17 Kawasaki 2014流行の主体は食中毒や高齢者施設における集団感染事例で、成人層での流行であったと報告されており [7, 12], 本県の2015/16シーズンにおいても同様の傾向にあると考えられた [17, 19]。

今回その有効性の検討を行った市販のGII.17 Kawasaki

2014特異的検出キットは、糞便検体では非特異反応等も認められず、GII.17 Kawasaki 2014を特異的に検出可能であった。今シーズンは、GII.17の注目度が高く、病院や行政から遺伝子群だけでなく、遺伝子型までの早急な報告が求められた。更に、平成28年4月1日付け厚生労働省通知、生食監発0401第1号「食中毒対策の推進について」では、これまでの遺伝子群だけでなく、遺伝子型までの報告が必要となった。しかし従来の方法で遺伝子型別を行うには、PCR産物を用いてシーケンス反応を実施した後、塩基配列を決定して型別を行う必要があり、遺伝子型の判明までに手間を要する。そのため、流行のピーク時などにおいて、全ての事案の遺伝子型別を迅速に行うことは容易ではない。今回検討を行なったリアルタイムPCR法を用いた検出法の場合、逆転写反応済のcDNA検体からであれば数時間でGII.17 Kawasaki 2014かどうかの判定が可能である。さらに、リアルタイムPCR法の場合、シーケンス法に比べPCR産物の取り扱いによって起こるコンタミネーションの危険性が少ないというメリットもある。今回は検討を行っていないが、GII.17 Kawasaki 2014以外には、GII.4 Sydney 2012の特異的検出試薬として「ノロウイルスGII/4 2012変異株検出用プライマーセット」(日本遺伝子研究所)が販売されている。この2つの亜型特異的検出試薬用いれば、2015/16シーズンの集団発生事例の72% (GII.17 Kawasaki 2014: 33%, GII.4: 39%) 小児散発事例の82% (GII.17 Kawasaki 2014: 8%, GII.4: 74%) について型別可能であったと言える。この方法はあくまでもスクリーニング検査であり、詳細な検討や研究には別途ダイレクトシーケンスによる遺伝子型別が必要ではあるが、2015/16シーズンの様に遺伝子型別の報告が早急に求められる場合に関しては、結果報告の迅速化および省力化の点からも非常に有用であると言える。

以上のことから、2015/16シーズンは集団感染症事例では、これまでの主流であったGII.4とGII.17 Kawasaki

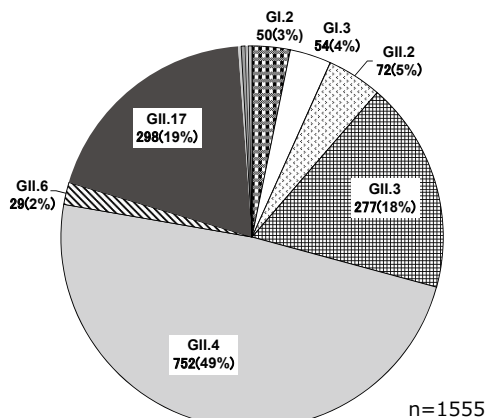


図5 2015/16シーズンの全国の地方衛生研究所から報告されたノロウイルス遺伝子型の内訳 (IASR)

2014の2つが多く検出され, 小児散発事例ではGII.4が大多数を占めた. 今後も新たなGII.4の亜型や稀な遺伝子型の出現等に備え, 継続的・積極的な流行状況の把握が必要である.

## 文 献

- [ 1 ] Manish M. Patel a, Aron J. Hall, Jan Vinjé, Umesh D. Parashar. *Noroviruses: A comprehensive review*. *J Clin Microbiol.* 2009;44:1-8
- [ 2 ] Glass RI, Parashar UD, Estes MK. *Norovirus gastroenteritis*. *N Engl J.* 2009; 361 (18): 1776 -1785
- [ 3 ] 重本直樹, 久常有里, 谷澤由枝, 島津幸枝, 高尾信一. 2013/14シーズンにおけるノロウイルスの遺伝子型検出状況. 広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告. 2014;22:15-20.
- [ 4 ] 重本直樹, 谷澤由枝, 池田周平, 島津幸枝, 高尾信一. 2014/15シーズンにおけるノロウイルスの遺伝子型検出状況. 広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告. 2015;23:15-20.
- [ 5 ] Fu J, Ai J, Jin M, Jiang C, Zhang J, Shi C, Lin Q, Yuan Z, Qi X, Bao C, Tang F, Zhu Y. *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.
- [ 6 ] Matsushima Y, Ishikawa M, Shimizu T, Komane A, Kasuo S, Shinohara M, Nagasawa K, Kimura H, Ryo A, Okabe N, Haga K, Doan YH, Katayama K, Shimizu H. *Genetic analyses 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=2173
- [ 7 ] 楠原一, 赤地重宏, 小林隆司, 西中隆道, 小林真美, 山口江里, 岩出義人, 田沼正路, 野田衛. ノロウイルスGII.17の流行型とその特徴について -三重県. 病原微生物検出情報. 2015;36(5):91-92
- [ 8 ] Khamrin P, Thongprachum A, Takahashi S, Okitsu S, Maneekarn N, Hayakawa S, Ushijima H. *Evaluation of immunochromatography tests for detection of novel GII.17 norovirus in stool samples.* *Euro Surveill* 2015;20(28):pii=21185
- [ 9 ] 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.* *J Virol Methods.* 2002;100(1-2):107-114.
- [10] 国立感染症研究所, IASR, [Internet], [cited 2016 Aug 22]. Available from: <http://www.nih.go.jp/niid/ja/typhi-m/iasr-reference/230-iasr-data/5492-iasr-table-v-p.html>
- [11] 調恒明, 岡本玲子, 村田祥子, 戸田昌一, 左近直美, 上林大起, 重本直樹, 福田伸治, 久常有里, 谷澤由枝 他. 西日本におけるノロウイルスの分子疫学. 病原微生物検出情報. 2014;35:169-170
- [12] 梅澤昌弘, 黒澤美穂, 後藤慶子, 土井育子, 本谷匠, 永田紀子, 小林雅枝, 木村博一, 片山和彦, 茨城県で過去4シーズンに検出されたノロウイルス遺伝子型GII.17の分子疫学. 病原微生物検出情報. 2016;37:182-183
- [13] 入谷展弘, 山本誠司, 改田厚, 阿部仁一郎, 久保英幸, 上林大起, 平井有紀, 後藤薫, 野田衛, 西尾孝之. 2014-15シーズンに大阪市で認められたノロウイルスの流行. 大阪市立環境科学研究所報告. 2015;77:13-16
- [14] van Beek J, Ambert-Balay K, Botteldoorn N, Eden JS, Fonager J, Hewitt J, Iritani N, Kroneman A, Vennema H, Vinjé J, et al. *Indication 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] Thongprachum A, Chan-it W, Khamrin P, Saparpakorn P, Okitsu S, Takanashi S, Mizuguchi M, Hayakawa S, Maneekarn N, Ushijima H. *Molecular epidemiology of norovirus associated with gastroenteritis and emergence of norovirus GII.4 variant 2012 in Japanese pediatric patients.* *Infect Genet Evol.* 2014;23:65-73.
- [16] Debbink K, Lindesmith LC, Donaldson EF, Costantini V, Beltramello M, Corti D, Swanstrom J, Lanzavecchia A, Vinjé J, Baric RS. *Emergence of new pandemic GII.4 Sydney norovirus strain correlates with escape from herd immunity.* *J Infect Dis.* 2013;208(11):1877-1887.
- [17] 入谷展弘, 上林大起, 改田厚, 阿部仁一郎, 中村寛海, 山元誠司, 久保英幸, 小笠原準, 伯井紀隆, 森宏美 他. 集団胃腸炎事例からのノロウイルスGII.P16-GII.4 Sydney\_2012の検出 - 大阪市. 病原微生物検出情報. 2016;37:136-138
- [18] Siebenga JJ, Vennema H, Zheng DP, Vinjé J, Lee BE, Pang XL, Ho EC, Lim W, Choudekar A, Broor S, et al. *Norovirus illness is a global problem: Emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007.* *J Infect Dis.* 2009; 200(5):802-812.

- [19] Sakon N, Yamazaki K, Nakata K, Kanbayashi D, Yoda T, Mantani M, Kase T, Takahashi K, Komano J. Impact of genotype-specific herd immunity on the circulatory dynamism of norovirus: a 10-year longitudinal study of viral acute gastroenteritis. *J Infect Dis.* 2015;211(6):879-888.