

資料

広島県における感染性胃腸炎の小児患者から検出されたサポウイルスの遺伝子型検出状況(2015/2016-2021/2022 シーズン)

伊藤 彩乃, 末井 真菜, 重本 直樹

Genetic diversity of sapoviruses among pediatric patients with infectious gastroenteritis in Hiroshima Prefecture, Japan, between 2015/2016 to 2021/2022 seasons.

ITO Ayano, SUEI Mana and SHIGEMOTO Naoki

(Received : October 4, 2022)

当センターが開発した下痢症ウイルスを対象とした蛍光マルチプレックス RT-PCR 法のアップデート版である Ver. 2.2 の検査系で、過去の感染性胃腸炎の小児患者検体を用いてサポウイルスの廻り調査を行い、検出ウイルスの遺伝子型を決定し、感染性胃腸炎の小児患者におけるサポウイルス感染の実態について明らかにした。

Key words : 下痢症ウイルス, サポウイルス, 蛍光マルチプレックス RT-PCR 法, 感染症発生動向調査事業

緒 言

日本国内におけるウイルス性食中毒および胃腸炎の大半がノロウイルスの感染によるものであるが、他にもサポウイルス (SaV) やロタウイルスが毎年検出されている。SaV は、1977 年に札幌市の児童福祉施設における胃腸炎の集団発生において初めて報告されたものであり [1]、主に保育施設や幼稚園、小学校等の幼・若齢者の散発性下痢症の起因ウイルスとして知られている [2-4]。本県では、行政検査として実施する食中毒および集団胃腸炎事例や、感染症発生動向調査事業における小児の感染性胃腸炎の検査において、当センターが開発した蛍光マルチプレックス RT-PCR 法 [5-8] を導入することにより 10 種類のウイルスを包括的に検査している。しかしながら、過去に SaV の地域流行があったにも関わらず、本ウイルスの特定の遺伝子型が検出されず原因不明となっていたケースがあることが判明した [9]。そこで、従来の検査法では検出できない遺伝子型 (例: GII. 1, GII. 3) に対応するべく改良を行った蛍光マルチプレックス RT-PCR 法 Ver. 2.2 (Ver. 2.2) [10] を用いて、過去 7 シーズン (2015/2016-2021/2022 シーズン、シーズンは前年 9 月から翌年 8 月まで) の間に原因不明となった感染症発生動向調査事業における感染性胃腸炎検体を対象に廻

り調査を行い、検出された SaV の遺伝子型を特定することで感染性胃腸炎の小児患者における SaV の感染実態を把握し、その傾向について考察を行ったので報告する。

方 法

1 供試検体

SaV の廻り調査には、感染症発生動向調査事業において県内の医療機関より 2015 年 10 月から 2022 年 8 月までに搬入され、原因不明となった糞便 195 検体および SaV と判定されていたが遺伝子型が不明であった糞便 21 検体の合計 216 検体を用いた。本研究は、広島県立総合技術研究所保健環境センター倫理審査委員会の審査を経て実施した。

2 RNA 抽出と逆転写反応

10% 糞便乳剤から QIAamp Viral RNA mini Kit (QIAGEN) により RNA 抽出を行った。抽出した RNA は使用まで -80°C で保管した。逆転写反応は 5 × buffer 4 μL , 2mM dNTPs 4 μL , 50 μM Random primer pd (N)₉ (タカラバイオ) 1 μL , RNase Inhibitor (40U/ μL) (TOYOBO) 0.5 μL , ReverTra Ace (100U/ μL) 1 μL を含む反応液に抽出 RNA 9.5 μL を加え、 30°C / 10 分, 42°C / 30 分, 99°C / 5 分の条件で反応を行った。

表1 蛍光マルチプレックスRT-PCR Ver.2.2 A セットプライマー

プライマーセット	検出対象	プライマー	Sequence (5' -3')	標識蛍光	濃度 (μM)	増幅産物 (bp)	出典
A	ノロウイルス G I	GISKFm	CTGCCGAWTWYGTAAATGA		0.4	330	Kojima et al. (2002)
		GISKR	CCAAACCCARCCATRTACA	Alexa488 (緑)	0.4		(slightly modified)
	ノロウイルス G II	G2SKF	CNTGGGAGGGCGATCGCAA	Alexa594 (赤)	0.4	344	Kojima et al. (2002)
		G2SKR	CCRCNGCATRHCCRTTRTACAT		0.4		
	サボウウイルス	G2ALSKR	CCACCAAGCATATGAAATGTACAT		0.2		Nishida et al. (2007)
		HuSaV-5159F	TAGTGTGTTGARA TGGARGG		0.4	340	Oka et al. (2020)
	アストロウイルス	HuSaV-5498R	CCCCANCCNGCVHACAT	Alexa594 (黄)	0.4		
		ACI'	ATGGCTAGCAAGTCTGACAAG	Alexa350 (青)	0.2	230	Sakon et al. (2000)
		AC230	GGTTTGGTCTCTGACACC		0.2		

3 蛍光マルチプレックスPCR Ver. 2. 2

マルチプレックスPCR反応には Multiplex PCR Assay Kit Ver. 2 (タカラバイオ) と Ver.2.2 の A セット (表1) のプライマーを用い、反応液48μLにcDNAを2μL加えた。PCR反応は、94℃ / 1分の熱変性後、94℃ /30秒、57℃ /30秒、72℃ /30秒を40サイクル行い、最後に72℃ /10分の最終伸長を行った。

4 電気泳動

電気泳動には2%アガロースゲルを用い、PCR反応済みの液10μLをアプライした。サイズマーカーには100bpラダー (MAESTROGEN) 10μLに1μLのEzVISION (Amresco) を混合したのを用いた。電気泳動後のゲルは、UVトランスイルミネーター上で増幅産物の蛍光バンドの色と増幅長を確認した後、エチジウムブロマイド染色を行って再度増幅産物の確認を行った。

5 SaVの遺伝子型別

SaV陽性検体のcDNAをテンプレートに、PCR試薬はAmpliTaq Gold Fast PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用い、プライマーとしてHuSaV-5159F (終濃度0.5μM)、HuSaV-5498R (終濃度0.5μM) を使用して、95℃ /10分、(96℃ / 3秒・57℃ /30秒・68℃ / 5秒) × 40サイクル、72℃ /10分の条件でPCR反応を行った。増幅産物はQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を使用して精製し、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) にてシーケンス反応後、Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) にて塩基配列を解読した。次に、得られた塩基配列データをHuman Calicivirus Typing Tool [11] および遺伝子解析ソフトMEGA X [12] を用いて解析し、遺伝子型を特定した。

結 果

1 感染性胃腸炎の小児患者から検出されたSaVの概要

感染性胃腸炎の小児患者から検出されたSaVの概要を表2に示す。原因不明となった糞便195検体中20検体、SaVと判定されていたが遺伝子型が不明であった糞便21検体中21検体、合計41検体からSaVが検出された。検出されたSaVの遺伝子型は、GIが3種 (GI. 1, GI. 2, GI. 7)、GIIが1種 (GII. 3)、GIVが1種 (GIV. 1) であった。遺伝子型毎の検体数は、GI. 1 (12検体)、GI. 2 (11検体)、GI. 7 (1検体)、GII. 3 (4検体)、GIV. 1 (13検体) であった。

表2 感染性胃腸炎の小児患者から検出されたサポウイルスの概要

Sample No.	検体採取日	検出ウイルス	SaV 遺伝子型
2104	2022/08/10	SaV	GI. 1
2091	7/06	SaV	GI. 1
2081	3/23	SaV	GII. 3
1989	2019/11/27	SaV	GI. 1
1929	1/30	SaV	GI. 1
1881	2018/06/29	SaV, EV	GI. 1
1862	3/24	SaV	GI. 2
1861	3/24	SaV	GI. 2
1859	3/15	SaV, RVA	GI. 2
1858	3/15	SaV	GI. 2
1857	3/14	SaV	GI. 2
1856	3/09	SaV	GI. 1
1853	3/05	SaV, RVA	GI. 2
1838	2/19	SaV, RVA, EV	GI. 1
1836	2/13	NoVGI, SaV	GI. 2
1818	2017/12/09	SaV	GI. 2
1798	9/12	SaV	GII. 3
1797	9/05	SaV	GII. 3
1791	7/10	SaV	GI. 1
1778	5/22	SaV	GII. 3
1773	5/06	SaV, AdV	GI. 2
1764	4/05	SaV	GI. 1
1743	2016/12/20	SaV, HPeV	GI. 1
1739	12/06	SaV	GI. 1
1736	12/02	SaV, EV	GI. 2
1726	11/08	SaV	GI. 1
1697	9/23	SaV	GI. 2
1627	2015/12/10	SaV	GIV. 1
1586	11/20	SaV	GIV. 1
1575	11/20	SaV	GIV. 1
1574	11/09	SaV	GIV. 1
1564	11/02	SaV	GIV. 1
1562	11/16	SaV	GIV. 1
1560	11/13	SaV	GI. 7
1552	11/13	SaV	GIV. 1
1547	11/09	SaV	GIV. 1
1535	10/27	SaV	GIV. 1
1534	10/26	SaV	GIV. 1
1533	10/26	SaV	GIV. 1
1530	10/23	SaV	GIV. 1
1529	10/23	SaV	GIV. 1

2 月別のSaV検出状況

検出されたSaVの月別の検出状況を図1に示す。月別では、SaVは3月、10-12月に多く検出されていた。また、3月のピークは2017/2018シーズン、11月のピークは2015/2016シーズンの検出結果を反映していた。

3 シーズン毎のSaV原因遺伝子型と検体数

シーズン毎のSaV遺伝子型と検体数を図2に示す。シーズン別では、2015/2016シーズンが14検体と最も多く、主な遺伝子型はGIV. 1であった。次いで、2017/2018シーズンが13検体、2016/2017シーズンが9検体であり、いずれも遺伝子型はGI. 1, GI. 2, GII. 3であった。また、GI. 1は遡り調査の対象とした7シーズンのうち6シーズンで検出されていた。

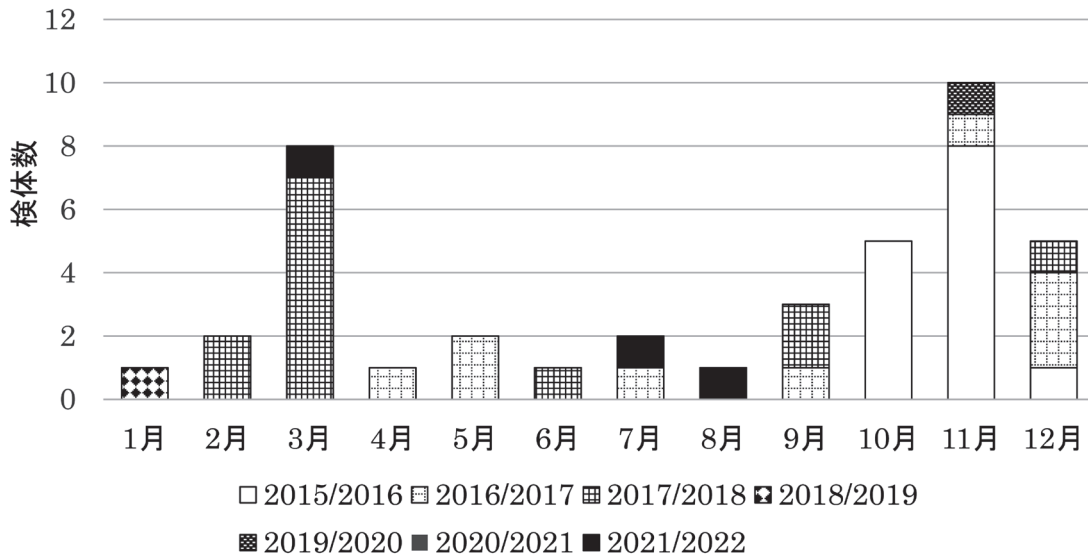


図1 月別のSaV検出状況

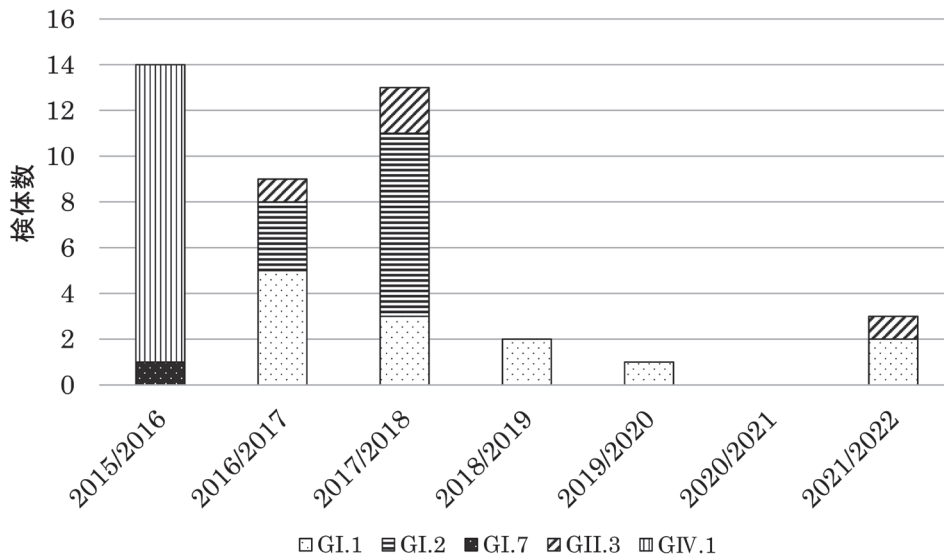


図2 シーズン毎のSaV原因遺伝子型と検体数

考 察

ヒトのSaVは構造タンパク質 (VP1) 領域の塩基配列に基づきGI, GII, GIVおよびGVの4つの遺伝子グループに分類される。このうちGIは7種(GI. 1-GI. 7), GIIは9種(GII. 1-GII. 8, GII. NA 1), GIVは1種(GIV. 1), GVは2種(GV. 1, GV. 2)の合計19種類の遺伝子型が確認されている [13, 14]。今回の廻り調査では, GIが3種(GI. 1, GI. 2, GI. 7), GIIが1種(GII. 3),

GIVが1種(GIV. 1)検出され, 多様な遺伝子型が小児の間で流行していることが判明した。

また, シーズン毎の流行に着目すると, 2015/2016シーズンは多くの医療機関から搬入があったにもかかわらず, 主な遺伝子型はGIV. 1であったこと, また, 10月下旬から12月上旬に集中的に検出されていることから, この時期にGIV. 1の地域流行があったことが明らかとなった。病原微生物検出情報 (IASR) ノロウイルス等検出速報 [15] においても, 2015/2016シーズンは, SaVの遺伝子グループGIVの検出数が21と,

例年(10以下)と比べ多い傾向にあったことから、当シーズンは、SaVの遺伝子グループGⅣの全国的な流行があったと思われる。次いで、2016/2017シーズン、2017/2018シーズンは、ともに検出された遺伝子型がGI.1, GI.2, GII.3であったことから、2シーズンに渡りこれらの遺伝子型の地域流行が継続したことが想定される。特に2017/2018シーズンは、2月中旬から3月下旬に集中してGI.2が検出されており、この時期にGI.2による地域流行があったことが伺えた(表2)。IASRノロウイルス等検出速報においても、2016/2017シーズン、2017/2018シーズンともに、SaVの遺伝子グループGI, GIIが多く検出されていた。一方、2018/2019-2019/2020シーズンはSaVの検出が非常に少ないレベルで推移している。これは、新型コロナウイルス感染拡大に伴い、全国的に感染対策が実施されたこと、緊急事態宣言等による人同士の接触が減少したことに由来すると考えられる。しかし、2021/2022シーズンでは、全国的に減少した[16, 17]と考えられたSaVの検出数が、春から初夏にかけ増加傾向にあった。県内のSaVの流行は、全国的なSaVの流行と同様の傾向を示すことから、2022/2023シーズンについては、改めて監視体制を強化する必要があると思われる。

文 献

- [1] Chiba S, Sakuma Y, et al. Fecal shedding of virus in relation to the days of illness in infantile gastroenteritis due to calicivirus. *J Infect Dis.* 1980, 142, 247-249.
- [2] 辰己智香, 三田哲朗, 他. 自校調理施設を有する中学校でのサポウイルス食中毒事例 - 島根県. *IASR 病原微生物検出情報月報.* 2019, 40 (5), 90-91.
- [3] 林慎一. 給食弁当を原因としたサポウイルスによる大規模食中毒事例 - 愛知県. *IASR 病原微生物検出情報月報.* 2010, 31 (11), 322-323.
- [4] 原稔美, 酒井悠希子, 他. 小学校で発生したサポウイルスによる集団感染性胃腸炎事例 - 静岡県. *IASR 病原微生物検出情報月報.* 2019, 40, 108-109.
- [5] Shigemoto N, Fukuda S, et al. Detection of norovirus, sapovirus, and human astrovirus in fecal specimens using a multiplex reverse transcription-PCR with fluorescent dye-labeled primers. *Microbiol Immunol.* 2011, 55, 369-372.
- [6] Shigemoto N, Hisatune Y, et al. Detection of gastroenteritis viruses among pediatric patients in Hiroshima Prefecture, Japan, between 2006 and 2013 using multiplex reverse transcription PCR-based assays involving fluorescent dye-labeled primers. *J Med Virol.* 2017, 89, 791-800.
- [7] 重本直樹, 久常有里, 他. 下痢症ウイルス検出用蛍光マルチプレックスRT-PCR法のアップデート Ver.2.0. 広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告. 2017, 25, 1-7.
- [8] 重本直樹, 谷澤由枝. 下痢症ウイルス検出用蛍光マルチプレックスRT-PCR法 Ver.2.1へのアップデート - 広島県の急性胃腸炎患者から検出されるエンテロウイルスの特徴 -. 広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告. 2021, 29, 7-16.
- [9] 鈴藤和, 谷澤由枝, 他. 原因不明の集団胃腸炎事案および食中毒事案におけるサポウイルスのブロードリアクティブ・リアルタイムPCRを用いた廻り調査. 広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告. 2020, 28, 1-5.
- [10] 末井真菜, 伊藤彩乃, 他. 多様なサポウイルスを検出するための下痢症ウイルス検出用蛍光マルチプレックスRT-PCR法 Ver.2.2へのアップデート. 広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告. 2022, 30, 7-13.
- [11] Tatusov RL, Chhabra P, et al. Human calicivirus typing tool : A web-based tool for genotyping human norovirus and sapovirus sequences. *J Clin Virol.* 2021, 134, 104718.
- [12] Kumar S, Stecher G, et al. MEGA X : Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Bio Evol.* 2018, 35, 1547-1549.
- [13] Oka T, Wang Q, et al. Comprehensive review of human sapoviruses. *Clin Microbiol Rev.* 2015, 28, 32-35.
- [14] Diez-Valcarce M, Castro CJ, et al. Genetic diversity of human sapovirus across the Americas. *J Clin Virol.* 2018, 104, 65-72.
- [15] 国立感染症研究所感染症学センター. “シーズン別ウイルス検出状況, 由来ヒト : 胃腸炎ウイルス, 2011/12 ~ 2022/23”. 2022-09-22. <https://nesid4g.mhlw.go.jp/Byogentai/Pdf/data96j.pdf>, 参照 2022-09-23.
- [16] 国立感染症研究所感染症学センター. “検出されたSRSVの内訳, 2018/19 ~ 2022/23シーズン(病原微生物検出情報”. 2022-09-22.

<https://nesid4g.mhlw.go.jp/Byogentai/Pdf/data11j.pdf>, 参照 2022-09-23.

- [17] 千葉県. “2022 CHIBA WEEKLY REPORT 千葉県結核・感染症週報 2022年第23週(令和4年6月6日～令和4年6月12日)”. <https://www.pref.chiba.lg.jp/eiken/c-idsc/documents/wr202223.pdf>, 参照 2022-09-23.