

胃腸炎ウイルスの疫学的研究

岡山県の散発性胃腸炎患者におけるノロウイルス、サポウイルスおよびアストロウイルスの流行疫学
(2008/2009 シーズン～2009/2010 シーズン)

濱野雅子, 藤井理津志, 葛谷光隆, 木田浩司, 榎原幸二*, 濃野 信**, 金谷誠久*** (ウイルス科)

*岡山赤十字病院小児科

**のうの小児科

***(独)国立病院機構 岡山医療センター小児科

【調査研究】

胃腸炎ウイルスの疫学的研究

岡山県の散発性胃腸炎患者におけるノロウイルス, サポウイルスおよびアストロウイルスの流行疫学
(2008/2009 シーズン～2009/2010 シーズン)

Epidemiological Studies on Noroviruses, Sapoviruses and Astroviruses from Sporadic cases of
Gastroenteritis in Okayama (2008-2010)

濱野雅子, 藤井理津志, 葛谷光隆, 木田浩司, 楯原幸二*, 濃野 信**, 金谷誠久*** (ウイルス科)

Masako Hamano, Ritsushi Fujii, Mitsutaka Kuzuya, Kouji Kida,

Kouji Narahara, Shin Nouno and Tomohisa Kanadani

*岡山赤十字病院小児科

**のうの小児科

*** (独)国立病院機構 岡山医療センター小児科

要 旨

2008/2009年シーズンおよび2009/2010年シーズン(2008年9月～2010年8月)の散発性胃腸炎患者糞便1,024件のうち,電子顕微鏡検索(EM)法で小型球形ウイルス(SRSV)様粒子が観察された84件について,逆転写PCR法によりノロウイルス(NoV),サポウイルス(SaV)およびアストロウイルス(AstV)を検索した。また,EM法でロタウイルス(RV)様粒子またはアデノウイルス(ADV)様粒子が観察された196件について,それぞれ,酵素抗体(ELISA)法によるA群ロタウイルス(ARV)とC群ロタウイルス検索,イムノクロマト(IC)法によるADVの検索を実施した。その結果,NoVが41件,SaVが11件,AstVが10件,ARVが182件,ADVが14件から検出された。シーズンごとの検出数では,ARV,ADVは変化がなかったのに対して,NoV,SaV,AstVは,ともに,2009/2010年シーズンは2008/2009年シーズンの1/2～1/4にとどまった。また,検出時期についてもNoV,SaV,AstVともに2009/2010年シーズンは前シーズンに比べて遅くなる傾向が見られた。検出ウイルスの一部について遺伝子解析を行ったところ,NoVではGII/4が大部分を占め,GII/3,GII/6も検出された。検出されたGII/4株は,両シーズンともにGII/4 2006b類似株であった。一方AstVでは,1型が主流であったが,3型,4型も検出された。

[キーワード:ノロウイルス,サポウイルス,アストロウイルス,分子疫学,PCR法]

[Key words:Norovirus,Sapovirus,Astrovirus,Molecular epidemiology,Gastroenteritis]

1 はじめに

ウイルス性胃腸炎の主要な原因の1つである小型球形ウイルス(SRSV)は,細胞・実験動物により人工的に増殖させる技術が確立されていないウイルス群であるが,このうちCalicivirus科に属するNorovirus属のNorwalkvirus(以下NoV),Sapovirus属のSapporovirus(以下SaV),Astrovirus科のAstorovirus(以下AstV)についてはその遺伝子情報¹⁾に基づいた逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(以下逆転写PCR)法での検出が可能となった。これに伴い,

感染症対策と食品衛生対策の両面で最も行政ニーズの高いNoVについては,①ヒト由来のNoVは,大きく2つの遺伝子群Genogroup I:GIとGenogroup II:GIIに分かれ,ウイルス表面蛋白をコードするcapsid領域の遺伝子配列により,GI,GIIともに多数の遺伝子型:genotypeに分かれる²⁾ことや②同一検体中に複数の遺伝子型のNoVが存在する場合があること^{3)～5)},③異なる2つの遺伝子型の遺伝子が部分的に組みかわったと考えられる「キメラ株」^{6),7)}や,同一の遺伝子型内で遺伝子

が部分的に大きく変異した「同一遺伝子型内変異株」⁸⁾が存在すること等が明らかになってきた。このようにNoVはきわめて多様であるため、その流行状況を予測して対策をとるためには、継続的な監視と事例解析が不可欠である。また、NoV以外のSRSVであるSaV、AstVについても、SaVは5つの遺伝子群GI(以下SaV-GI)～GV(SaV-GV)⁹⁾、AstVは8血清型(以下AstV-1～AstV-8)に分かれ¹⁰⁾、それぞれの血清型に対応する遺伝子型が存在する¹¹⁾等NoV同様多様なウイルスの存在が明らかになっているが、その流行疫学については不明な点が多く、解明していく必要がある。

2010年度は、感染性胃腸炎におけるNoV、SaVおよびAstVのトータルな流行状況をあきらかにするため、2008/2009と2009/2010の2シーズンの散発胃腸炎患者検体でウイルス検索を行い、検出状況を総合的に解析するとともに、検出されたNoV、SaVおよびAstVについて遺伝子解析を行った。

2 材料と方法

(1) 対象

2008年9月～2009年8月(2008/2009年シーズン)および2009年9月～2010年8月(2009/2010年シーズン)に県内で採取された散発胃腸炎患者糞便1,024件のうち、ウイルス様粒子が観察された280件(感染症発生動向調査検体49件を含む)を用いた。

(2) 方法

電子顕微鏡検索によりSRSV様粒子が観察された糞便について、既報¹²⁾と同様に前処理、RNA抽出を行った。抽出されたRNAは、oligo-dT primer(Invitrogen社)とpd(N)6 random hexamer(Takara Bio社)により逆転写を行い、c-DNAを合成した。

NoVの検出は、Step One Plus(ライフテクノロジー社)とGene Expression Master Mix(同)でTaqMan-MGB Probeを用いて、厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知に準拠したリアルタイム法¹³⁾で実施し、10コピー以上と判定されたものをPCR陽性とした。陽性検体は、GSK系の従来法PCRで増幅したDNAを鋳型にpolymerase/capsid junction領域約300塩基の配列を決定し、遺伝子型を判定した。

SaVは、NoVと同様の機器・試薬でOkaらのTaqMan-MGB Probeリアルタイム法¹⁴⁾で検索した。陽性検体は、

Okadaらの従来法PCR¹⁵⁾によりORF1領域の一部約430塩基を増幅し、得られた産物約390塩基の配列を決定し、遺伝子型を判定した。

AstVもまた、NoVと同様の機器・試薬で横井らのTaqMan-MGB Probeリアルタイム法¹⁶⁾で検索した。陽性検体については、NoelらのRT-PCR法¹⁷⁾によりORF2領域の一部約410塩基を増幅し、得られた産物約370塩基の配列を決定して遺伝子型を判定、系統解析を行った。

電子顕微鏡検索によりロタウイルス(RV)様粒子が観察された糞便については、市販ELISAキット(ロタクロン：TFB社)により、A群ロタウイルス(ARV)とFujiiらのELISA法¹⁸⁾によりC群ロタウイルス検索を実施した。また、電子顕微鏡検索によりアデノウイルス(ADV)様粒子が観察された糞便については、市販キット(ラビッドテスト ロタアデノ：第一化学薬品)をもちいたイムノクロマト法により、ADV検索を実施した。

月別定点あたり感染性胃腸炎患者数は、感染症発生動向調査の報告週対応表に基づき、毎週の報告数を4週または5週加算したものを対応する月の患者報告数とし、小児科定点数54で除して算出した。

3 結果

(1) ウイルス検出状況

EM法でウイルス様粒子が観察された検体の内訳は、SRSV様粒子が84件、RV様粒子が182件、ADV様粒子が14件であった。

SRSV様粒子が観察された84件から、NoVが41株、SaVが11株、AstVが10株検出された。このうち、同一検体からNoVとSaVが検出された例が2件みられた。また、NoV、SaV、AstVいずれのPCRでも陰性であった「その他のSRSV」が24株みられた。RV様粒子が観察された182件は、すべてARVと同定された。また、ADV様粒子が観察された14件は、すべてADVであることが確認された(表1)。

シーズンごとのウイルス検出数を比較すると、NoV、SaV、AstVでは、2008/2009年シーズンがそれぞれ33株、8株、8株であったのに対して、2009/2010年シーズンは8株、3株、2株で、前シーズンの1/2～1/4にとどまった。一方、ARVとADVについては、2008/2009年シー

ズンがそれぞれ 87 株, 6 株, 2009/2010 年シーズンは 95 株, 8 株と大きな変化はみられなかった。検出時期についても, NoV, SaV, AstV では, 2008/2009 年シーズンがそれぞれ 11 月～3 月, 12 月～2 月, 2 月～5 月であったのに対して, 2009/2010 年シーズンは 1 月～3 月, 1 月～5 月, 6 月～8 月と, 前シーズンより遅くなる傾向が見られた。感染症発生動向調査における感染性胃腸炎の患者数を表 2 に, 定点あたり患者数とウイルス検出状況を図 1 に示す。ウイルス性胃腸炎の主流行期である 11 月～3 月の定点あたり患者数は,

2008/2009 年シーズンが 22.3～58.6 人, ピークが 12 月から 1 月であったのに対して, 2009/2010 年シーズンは 16.4 人～74.6 人, ピークが 2 月で, NoV, SaV, AstV における 2009/2010 年シーズンの検出数の減少と検出時期の遅れは, 同シーズンの患者数の推移とよく一致していた。

(2) NoV, SaV および AstV の遺伝子解析

NoV19 株についての遺伝子解析の結果, すべて GII に属しており, GII/3:2 株, GII/4:15 株, GII/6:2 株であった(図 2)。GII/3 および GII/4 は両シーズン

表 1 ウイルス検出状況

ウイルス		NoV	SaV	AstV	その他の SRSV*	RotaA	ADV	総計
2008/2009 シーズン	9月						1	1
	10月							0
	11月	1			3			4
	12月	21	2**		7	5		35
	1月	8	3		1	5	3	20
	2月	1	3	1	2	22	2	31
	3月	2		2	2	28		34
	4月			3		19		22
	5月			2		8		10
	6月				1			1
7月							0	
8月							0	
	小計	33	8	8	16	87	6	158
2009/2010 シーズン	9月				3			3
	10月				2			2
	11月							0
	12月				1		1	2
	1月	5	1		1	5	1	13
	2月	2	1**			13		16
	3月	1				24	1	26
	4月					28	2	30
	5月		1		1	18	2	22
	6月			1		7		8
7月						1	1	
8月			1				1	
	小計	8	3	2	8	95	8	124
総計		41	11	10	24	182	14	282

* NoV, SaV, AstV の PCR がいずれも陰性であったもの
 ** NoV と同一検体からの検出 1 件を含む

表 2 感染性胃腸炎 月別患者数

		9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月
2008/2009 シーズン	患者数(人)	1131	898	1203	2898	3163	2034	2172	1651	1664	1640	1122	1160
	定点あたり 患者数(人)	20.9	16.6	22.3	53.7	58.6	37.7	40.2	30.6	30.8	30.4	20.8	21.5
2009/2010 シーズン	患者数(人)	792	754	885	951	3178	4030	2738	1737	1889	1443	1145	1336
	定点あたり 患者数(人)	14.7	14.0	16.4	17.6	58.9	74.6	50.7	32.2	35.0	26.7	21.2	24.7

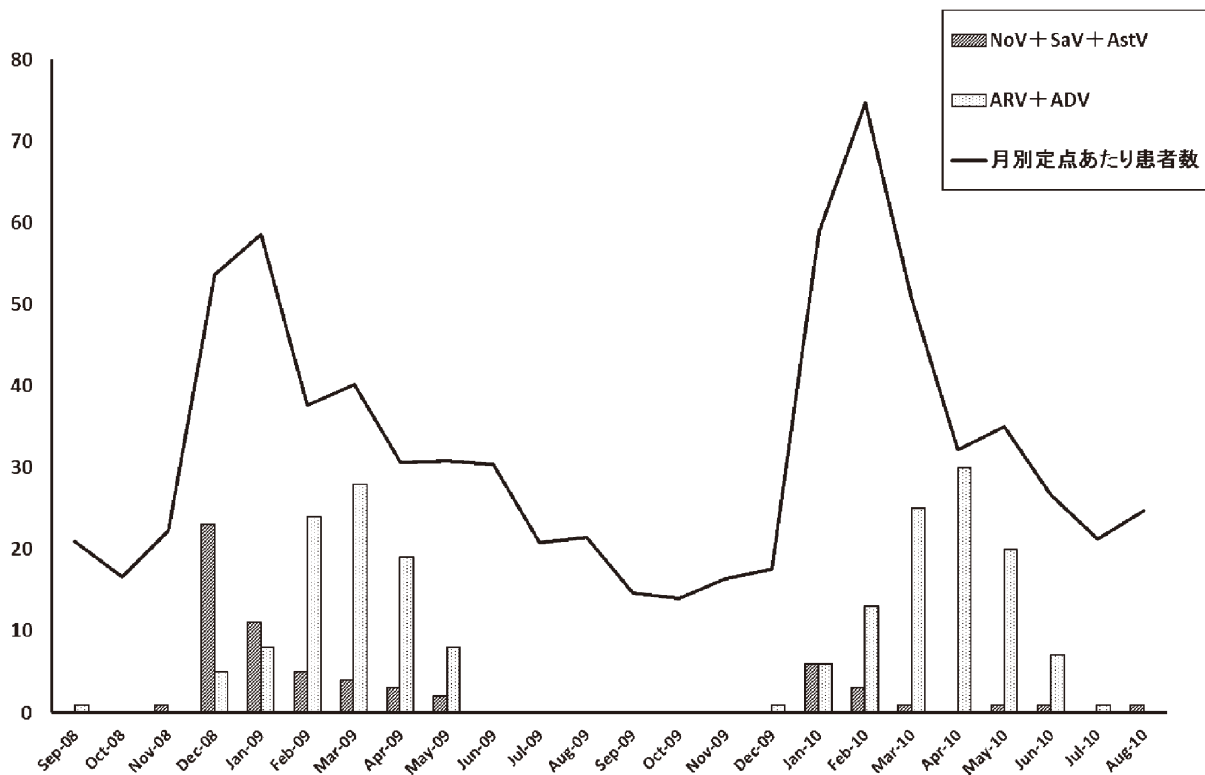


図1 感染性胃腸炎月別定点あたり患者数とウイルス検出状況
(2008年9月～2010年8月)

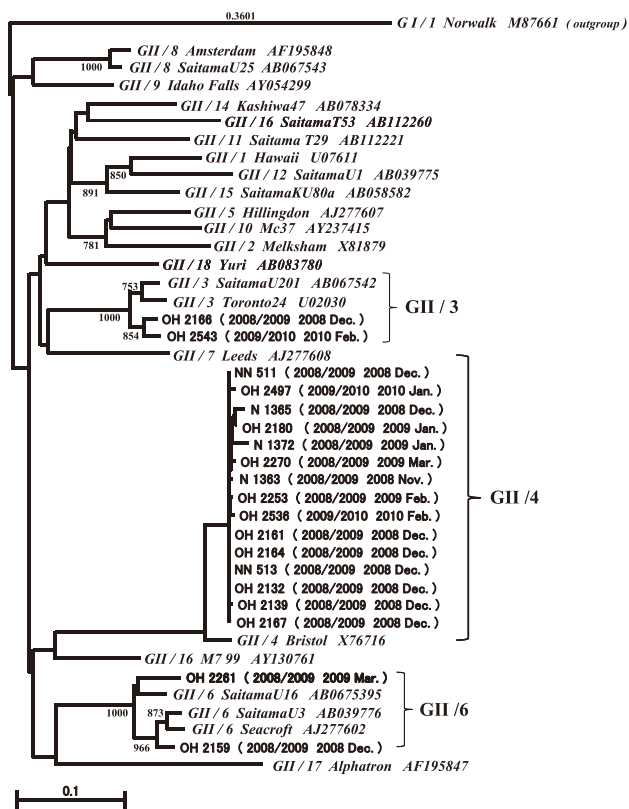


図2 検出NoVのpolymerase/capsid junction領域の系統樹
Lordsdale株5102-5366相当の265bp, NJ法, Bootstrap1000回,
斜字:レファレンス株, 末尾にAccession No.を記載

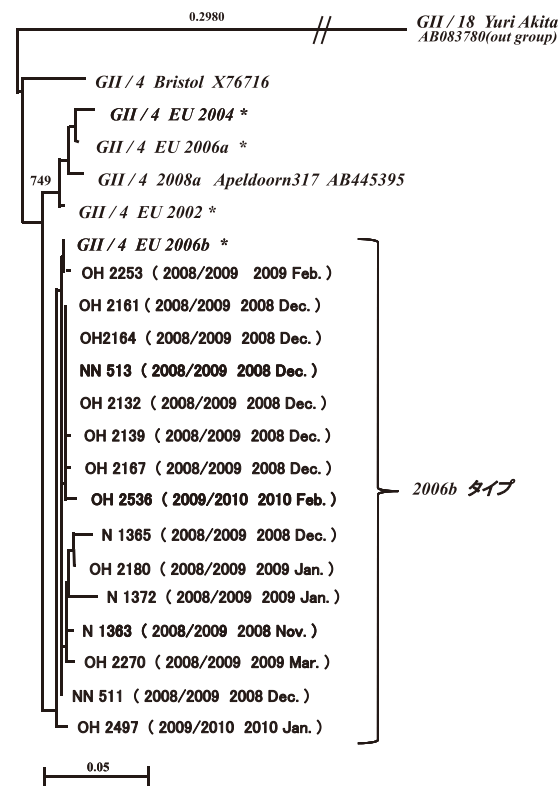


図3 検出NoV GII/4のpolymerase/capsid junction領域の系統樹
Lordsdale株5102-5366相当の265bp, NJ法, Bootstrap1000回,
斜字:レファレンス株, 末尾にAccession No.を記載,
*:Eurosurveillance databaseより引用

にわたって検出されたが、遺伝的に大きな隔たりはみられなかった。これに対してGII/6は2008/2009年シーズンにのみ検出されたが、OH 2159株がレファレンス株であるGII/6 SaitamaU3株やGII/6 Seacroft株と同一クラスターを形成したのに対し、OH 2261株は別のレファレンス株であるGII/6 SaitamaU16とクラスターを形成し、遺伝的にやや異なる株であった。GII/4に属する15株と遺伝子型内レファレンス株の系統樹を、図3に示す。遺伝子型内変異株が知られているGII/4については、15株すべてが2006bタイプであった。

SaVは2009年1月に採取されたOH 2196株1株の塩基配列が決定され、SaV-GI/1であった。

8株のAstVについての遺伝子解析の結果、1型:6株、3型:1株、4型:1株であった(図4)。1型は両シーズンとも検出されたが、2008/2009年シーズン検出株5株がレファレンス株であるDresden株と同一クラスターを形成したのに対し、2009/2010年シーズンに検出されたOH 2817株(2010年8月採取)は、Dresden

株と相同性が89.8%で、別のレファレンス株であるOxford株(相同性96.0%)とクラスターを形成し、遺伝的にやや異なる株であった。

4 考察

2008/2009年シーズンおよび2009/2010年シーズンの散発胃腸炎患者からのウイルス検出状況は、シーズンによりNoV、SaVおよびAstVの検出数と検出時期が大きく異なっており、2009/2010年シーズンは、ともに前シーズンに比べて検出数が減少し、検出時期も遅くなる傾向であった。われわれは、2007年度の報告¹⁹⁾で、各ウイルスの検出時期に関する解析から、NoV、SaV、AstVがそれぞれ時期をずらして流行していると推定したが、検出時期の遅れは、この推定を裏付けると考えられる。また、特に11月から12月にかけてのNoVの検出数減少と患者数の減少から、同時期の感染性胃腸炎の原因ウイルスはNoVであることが改めて明らかになった。2009/2010シーズンは、新型インフルエンザの流行したシーズンであり、とくに10月～12月にかけてはもっとも患者が多発した時期であった。したがって手洗い等の感染防止策がきわめて長期間にわたって通常より厳重に実践されていたと考えられ、こうした社会的状況がNoVの検出数減少に関与した可能性がある。検出されたNoVの遺伝子型は、両シーズンともGII/4 2006b類似株が大部分を占めた。GII/4は、2006/2007シーズン以降、全国の地方衛生研究所からの病原体検出報告でも常に最も多く報告されており²⁰⁾、このシーズン以降全国的に胃腸炎の多発を引き起こしたGII/4 2006bの流行は、2009/2010シーズンまで継続していたものと推察され、4シーズンにわたって県内の主流型であったことになり、こうした長期にわたる流行による感受性者の減少が検出数の減少につながった可能性も考えられた。なお、2008年11月以降国内で流行しているGII/4 2008a²¹⁾は、今回は確認されなかった。また、GII/4のほかGII/3とGII/6も検出された。これらの遺伝子型は、2008年4月～2009年3月の集団事例でみられた株と同じであり、GII/6が2系統流行していた点も一致していた²²⁾。AstVは、検出時期が3月～6月に集中しており、1型が大部分を占める点は以前の報告²⁰⁾と同様であったが、2010年8月に採取された1株がOxford類似株で、同じ1型ながら前シーズンまでのDresden類似株とかなり異

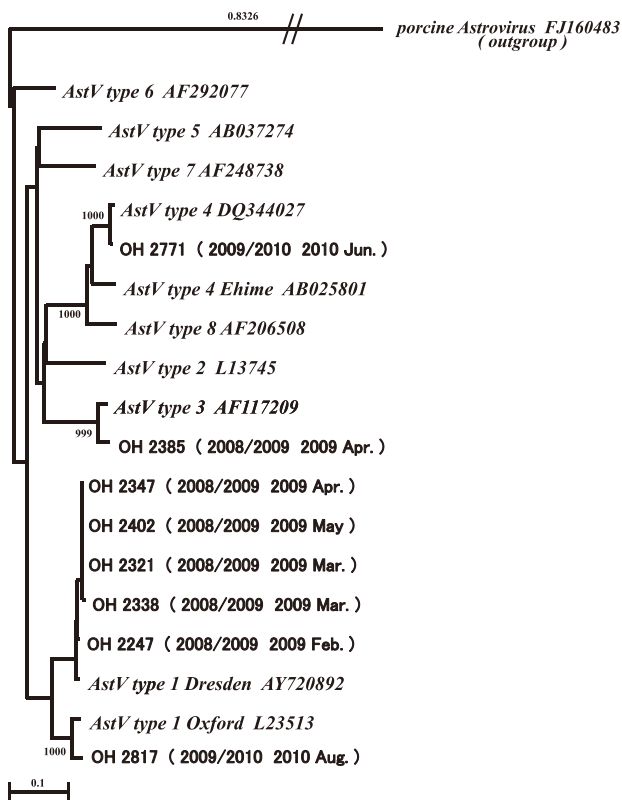


図4 検出AstVのORF2の部分領域の系統樹
AstV type2 レファレンス株 4561-4933 相当の373bp, NJ法,
Bootstrap 1000回, 斜字: レファレンス株, 末尾に Accession
No. を記載

なっており、今後この系統のウイルスが主流となるのか、今後とも監視していく必要があると考えられる。

文 献

- 1) Jiang,X.,Wang,M.,Wang,K.and Estes, M.K. : Sequence and genomic organization of Norwalk virus, *Virology*, 195, 51-61, 1993
- 2) 片山和彦：胃腸炎関連カリシウイルス（ノロウイルス，サポウイルス）総論，病原微生物検出情報（IASR），24，312-314，2003
- 3) Hamano,M.,Kuzuya,M.,Fujii,R.,Ogura,H.,Yamada M., : Epidemiology of acute gastroenteritis outbreaks caused by Noroviruses in Okayama, Japan, *J. Med. Virol.*, 282-289, 2005
- 4) Sugieda,M.,Nakajima,K.,Nakajima,S. : Outbreak of Norwalk-like virus associated gastroenteritis traced to shellfish, Coexistence of two ge-notypes in one specimen, *Epidemiol.Infect.*, 116, 339-346, 1996
- 5) Kageyama T, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Kojima S, Takai R, Oka T, Takeda N, Katayama K. : Coexistence of plural genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan, *J Clin Microbiol*, 42, 2988-2995, 2004.
- 6) Reuter,G.,Krisztalovics,K.,Vennema,H.,Koopmans, M.,Szucs,G. : Evidence of the etiological predominance of Norovirus in gastroenteritis outbreaks—Emerging new-variant and recombinant Noroviruses in Hungary, *J.Med.Viol.*,76, 598-607, 2005
- 7) Bull,R.A.,Tu,E.T.V.,McIver,C.J.,Rawlinson,W. D.,White,P.A. : Emergence of a new Norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis, *J.Clin.Microbiol.*, 327-333, 2006
- 8) Kroneman,A.,Vennema,H.,Harris,J.,Reuter,G.,Bonsdorff,C-H.von, Hedlund,K-O.,Vainio,K.,Jackson,V.,Pothier,P.,Koch,J.,Schreier,E.,Böttiger,B.,Koopmans,M. : Increase in norovirus activity reported in Europe *Eurosurveillance Weekly*, 11, 12, 2006
- 9) Hansman, GS., Takeda, N., Oka, T., Oseto, M., Hedlund, KO.,katayama, K. : Intergenogroup recombination in Sapoviruses, *Emerging Infect. Dis.*,11, 1916-1920, 2005
- 10) Sakon, N., Yamazaki, K., Utagawa, E., Okubo, Y., Oishi, I. : Genomic characterization of human astrovirus type6 Katano virus and the establishment of rapid and effective reverse transcription-polymerase chain reaction to detect all serotypes of human astrovirus, *J.Med.Virol.*,61, 125-131, 2000
- 11) Mèndez-Toss,M.,Griffin,D.D.,Galva,J.,Contreras,J. F.,Puerto,F.I.,Mota,F.,Guiscafrè,H., Cedillo,R.,Muñoz, O.,Herrera,I.,López,S.,Arias,C.F.:prevalence and Genetic Diversity of Human Astroviruses in Mexican Children with Symptomatic and Asymptomatic Infections, *J.Clin.Micobiol.*,42, 151-157, 2004
- 12) 濱野雅子，藤井理津志，葛谷光隆：胃腸炎ウイルスの研究（平成14年度），岡山県環境保健センター年報，27，45-61，2003
- 13) 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，食安監発第1105001号，平成15年11月5日
- 14) Oka T., Katayama K., Hansman G.S., Kageyama T.,Ogawa S., Wu F.T., White P.A., Takeda N. : Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction, *J.Med. Virol.* 78, 1347-1353, 2006
- 15) Okada M., Yamashita Y., Oseto M., and Shinozaki K. : The detection of human sapoviruses with universal and genogroup-specific primers, *Arch. Virol.* 151, 2503-2509, 2006
- 16) 横井一，北橋智子：Real-time RT-PCR法によるアストロウイルス遺伝子の検出，感染症雑誌，83(2)，120-126，2009
- 17) Noel,J.S., Lee,T.W., Kurtz,J.B., Glass,R.I., Monroe,S. S. : Typing of Human Astroviruses from Clinical Isolates by Enzyme Immunoassay and Nucleotide Sequencing, *J.Clin.Microbiol.*,33, 797-801, 1995
- 18) Fujii, R., Kuzuya, M., Hamano, M., Yamada, M.,Yamazaki, S. : Detection of human group

- Crotaviruses by an enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies, J.Clin. Microbiol., 31 (5), 1307-1311, 1992
- 19) 濱野雅子, 藤井理津志, 葛谷光隆, 西島倫子, 榎原幸二, 濃野 信, 金谷誠久: 胃腸炎ウイルスの研究 (2007年度), 岡山県環境保健センター年報, 32, 115-127, 2008
- 20) 国立感染症研究所感染症情報センター: 病原体検出情報システム データベース, 感染症サーベイランスシステム (一般には非公開)
- 21) 田村 務, 田澤 崇, 渡邊香奈子, 渡部 香, 昆美也子, 三好龍也, 内野清子, 吉田永祥, 松尾光子, 西口智子, 田中智之, 北元憲利, 本村和嗣, 佐藤裕徳: ノロウイルス GII/4 の 2008a 亜株の動向とイムノクロマト法の改良, 病原微生物検出情報 Vol.31, 316-317, 2010
- 22) 濱野雅子, 藤井理津志, 葛谷光隆, 西島倫子, 榎原幸二, 濃野 信, 金谷誠久: 胃腸炎ウイルスの研究 (2008年度), 岡山県環境保健センター年報, 33, 113-125, 2009