

東京都におけるノーウォーク様ウイルス (NLV) の遺伝子解析

佐々木 由紀子*, 林 志直*, 野口 やよい*, 森 功次*
平田 一郎*, 関根 大正**, 諸角 聖**

Molecular analysis of Norwalk-like Virus (NLV) in Tokyo

Yukiko SASAKI*, Yukinao HAYASHI*, Yayoi NOGUCHI*, Koji MORI*
Ichiro HIRATA*, Hiromasa SEKINE**, Satoshi MOROZUMI**

Keywords: ノーウォーク様ウイルス: Norwalk-like virus (NLV), 急性胃腸炎: acute gastroenteritis, 遺伝子の多様性: genetic diversities

緒言

ノーウォーク様ウイルス (以下NLV) は、嘔吐あるいは下痢を主訴とする急性胃腸炎の代表的な起因ウイルスであり、1997年5月に食品衛生法の一部改正により食中毒の病因物質として新たに認定された。1999年に東京都内で発生した食中毒の病因物質別統計では94事例中11事例にNLVが検出され、患者数で下痢原性大腸菌に次いで第2位の位置を占めている。また、統計上食中毒として計上されない有症苦情事例を加えた非細菌性胃腸炎の集団発生事例では115事例にNLVが検出された。さらに東京都衛生局が実施している感染症発生動向調査では感染性胃腸炎の約20%からNLVが検出されている。

ウイルス検査に分子遺伝学的診断法が導入されて以来、NLVの遺伝子検査が世界各地で行われるようになり、NLVに関する多くの遺伝子情報が集積されてきている。そしてこれまでに、NLV遺伝子は大きく2つのゲノムタイプ (G1群とG2群) に分類され、さらに多くのサブタイプ (亜型) の存在することが報告されている。

東京都においては1994年よりNLV遺伝子検査法を検討し、1997年から食中毒および有症苦情事例の行政検査としてNLV遺伝子検査を導入、その検査成績について報告し

てきた^{1,2)}。今回、1999年5月から2000年4月にNLVが検出された胃腸炎集団発生事例の中から発生状況等の疫学情報が得られた61事例について、検出されたNLV遺伝子の解析を行いNLV遺伝子のサブタイプを明らかにするとともに、種々の発生要因との関連性について検討を行ったので報告する。

材料と方法

調査は1999年5月から2000年4月までに発生した食中毒関連集団事例の中から、nested reverse transcribed polymerase chain reaction法 (以下nested RT-PCR法と略) でNLVが検出され、発生状況等の疫学情報が得られた61事例を対象とした。NLV検査における糞便材料の調製、RNAの抽出およびRT-PCR法はこれまでに報告した方法^{1,2)}に従った。検出されたNLV遺伝子はポリメラーゼ領域の3'側末端とキャプシド領域5'側末端を含む領域 (612塩基) について改めてPCRを行い、シーケンスに十分な産物量が得られた69株の1st PCR産物についてダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定した (表1)。

シーケンスはABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Kitを用いてABI PRISM 310 GENETIC

表1 プライマーの塩基配列と位置

対象領域	名称	塩基配列 (5' 3')							極性
ポリメラーゼ	Yuri22F	ATG	AAT	GAG	GAT	GGA	CCC	AT	(+)
	SR46F	TGG	AAT	TCC	ATC	GCC	CAC	TGG	(+)
	NV3	GCA	CCA	TAT	GAG	ATG	GAT	GT	(+)
キャプシド	G2R1R	TGC	ATA	ACC	ATT	GTA	CAT	TCT	(-)
	G2F3R	GTG	AAT	GAA	GAT	GGC	GTC	GA	(-)
	G1R1R	CCA	ACC	CAG	CCA	TTA	TAC	ATT T	(-)
	G1F2R	AAT	GAT	GAT	GGC	GTC	TAA	GGA	(-)

* 東京都立衛生研究所微生物部ウイルス研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

** 東京都立衛生研究所微生物部

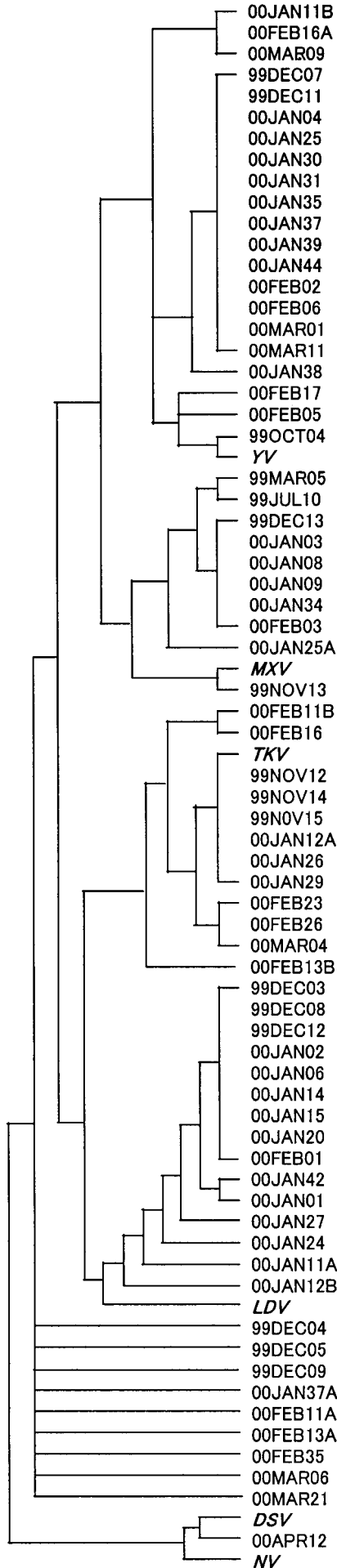
表2 NLV集団発生事例の疫学データ(1999年~2000年4月)

事例 ID 番号	発症年月	発症率		発生原因	分離されたNLV	
		発症者 / 喫食者	発生場所		群	サブタイプ
99MAR05	1999.5	8/22	幼稚園	不明	G2	MXV
99JUL10	1999.7	8/34	小学校	不明	G2	MXV
99OCT04	1999.1	26/37	レストラン	不明	G2	YV
99NOV12	1999.11	1/3	家庭	不明	G2	TKV
99NOV13	1999.11	46/225	幼稚園	不明	G2	MXV
99NOV14	1999.11	161/不明	小学校	不明	G2	TKV
99NOV13	1999.11	104/不明	幼稚園	不明	G2	TKV
99DEC03	1999.12	1/1	レストラン	カキ	G2	LDV
99DEC04	1999.12	2/2	レストラン	不明	G2	Others
99DEC05	1999.12	36/104	高齢者施設	不明	G2	Others
99DEC07	1999.12	36/不明	学校行事	不明	G2	YV
99DEC08	1999.12	2/3	レストラン	不明	G2	LDV
99DEC09	1999.12	43/59	幼稚園	不明	G2	Others
99DEC11	1999.12	16/27	レストラン	不明	G2	YV
99DEC12	1999.12	6/8	家庭	不明	G2	LDV
99DEC13	1999.12	4/6	家庭	不明	G2	MXV
00JAN01	2000.1	2/2	レストラン	不明	G2	LDV
00JAN02	2000.1	48/795	高齢者施設	不明	G2	LDV
00JAN03	2000.1	2/2	レストラン	カキ	G2	MXV
00JAN04	2000.1	6/6	レストラン	不明	G2	YV
00JAN06	2000.1	1/4	レストラン	不明	G2	LDV
00JAN08	2000.1	不明/48	レストラン	不明	G2	MXV
00JAN09	2000.1	不明	レストラン	不明	G2	MXV
00JAN11	2000.1	不明(多数)	レストラン	カキ	G2	* LDV & YV
00JAN12	2000.1	19/43	レストラン	不明	G2	* TKV & LDV
00JAN14	2000.1	14/73	高齢者施設	不明	G2	LDV
00JAN15	2000.1	不明(多数)	レストラン	カキ	G2	LDV
00JAN20	2000.1	15/261	レストラン	不明	G2	LDV
00JAN24	2000.1	6/14	家庭	カキ	G2	LDV
00JAN25	2000.1	7/14	レストラン	カキ	G2	* MXV & YV
00JAN26	2000.1	3/3	レストラン	カキ	G2	TKV
00JAN27	2000.1	20/40	レストラン	カキ	G2	LDV
00JAN29	2000.1	23/47	レストラン	カキ	G2	TKV
00JAN30	2000.1	6/14	レストラン	不明	G2	YV
00JAN31	2000.1	6/7	レストラン	カキ	G2	YV
00JAN34	2000.1	15/20	レストラン	カキ	G2	MXV
00JAN35	2000.1	2/2	レストラン	不明	G2	YV
00JAN37	2000.1	20/31	レストラン	カキ	G2	* Others & YV
00JAN38	2000.1	2/3	家庭	カキ	G2	YV
00JAN39	2000.1	3/3	レストラン	不明	G2	YV
00JAN42	2000.1	2/2	レストラン	カキ	G2	LDV
00JAN44	2000.1	14/25	レストラン	カキ	G2	YV
00FEB01	2000.2	13/30	レストラン	不明	G2	LDV
00FEB02	2000.1	11/18	レストラン	不明	G2	YV
00FEB03	2000.2	4/6	家庭	カキ	G2	MXV
00FEB05	2000.2	3/5	家庭	カキ	G2	YV
00FEB06	2000.2	19/26	レストラン	不明	G2	YV
00FEB11	2000.2	11/18	レストラン	カキ	G2	* Others & TKV
00FEB13	2000.2	17/61	レストラン	カキ	G2	* Others & Others
00FEB16	2000.2	3/3	レストラン	カキ	G2	* YV & TKV
00FEB17	2000.2	20/343	小学校	不明	G2	YV
00FEB23	2000.2	5/6	レストラン	カキ	G2	TKV
00FEB26	2000.2	8/18	レストラン	カキ	G2	TKV
00FEB35	2000.2	2/2	レストラン	カキ	G2	Others
00MAR01	2000.3	15/51	小学校	不明	G2	YV
00MAR04	2000.3	7/35	家庭	カキ	G2	TKV
00MAR06	2000.3	3/4	家庭	カキ	G2	Others
00MAR09	2000.3	6/6	レストラン	カキ	G2	YV
00MAR11	2000.3	2/不明	レストラン	不明	G2	YV
00MAR21	2000.3	8/47	レストラン	不明	G2	Others
00APR12	2000.4	7/不明	レストラン	不明	G1	DSV

MXV : Mexico/89, LDV : Lordsdale/93, YV : Yuri/95,

TKV : Tokyo/99, DSV : Desert Sield/90

* : 同一事例中に複数のサブタイプが検出された事例



ANALYZERで行った。サブタイプの分類は、UPGMA法による系統樹解析および既知NLVと被検株とのホモロジー解析結果から行った。各サブタイプの代表とした既知NLVは、ノーウォーク/68株（以下NLV）、デザートシールド/90株（以下DSV）、メキシコ/89株（以下MXV）、ローズデール/93株（以下LDV）、由利/95株（以下YV）、および1999年11月に都内で検出された東京/99株（以下TKV）である。

結 果

1. 検出されたNLVの遺伝子解析結果

1999年5月から2000年4月までに発生したNLVによる集団発生事例の中から、612塩基のNLV遺伝子が検出された61事例について、事例の概要とNLV遺伝子のサブタイプを表2に示した。61事例中7事例では複数のNLV株が検出されたので対象とした株数は総計68株となった。複数株が検出された7事例中6事例は、原因食品として「カキ」が疑われた事例であった。

NLVのサブタイプはUPGMA法による系統樹解析および既知NLVと被検株とのホモロジー解析結果より分類したが、68株中もっとも多く分類されたサブタイプは、G2群のYVタイプ（21株：31%）であり、次いでLDVタイプ（15株：22%）、TKVタイプ（11株：16%）、MXVタイプ（10株：15%）の順となり、これらの主要4サブタイプが全体の8割を占めた。G1群は1株認められ、DSVタイプであった。なお、残りの10株はG2群に分類されたものの、既知NLVの代表4サブタイプとはホモロジーが低いものであった（以下「その他のG2群」と略す）。61事例総計68株の全体の系統樹は図1に模式的に表現した。

2. NLV遺伝子サブタイプと胃腸炎発生時期との関連性

発生月別にみたNLVの遺伝子サブタイプを表3に示した。1999年5月および7月のオフシーズン期にMXVタイプが検出され、2000年4月にはG1群のDSVタイプが出現していた。しかし、NLV流行最盛期（1月～2月）にはG2群の主要4サブタイプが全て出現しており、1999年5月から2000年4月の合計を見ても、東京都内におけるNLVの胃腸炎集団発生は特定のサブタイプが極端に集中して出現したものではなかったことが明らかになった。

3. NLV遺伝子サブタイプと胃腸炎発生場所との関連性

発生場所と分離されたNLVのサブタイプの関係と比較しても、特定のサブタイプが集中して発生した場所はみられなかった（表4）。高齢者施設で発生した3事例は、LDVタイプ2事例とその他のG2群が1事例であった。学校施設では、YVタイプとMXVタイプが各3事例、TKV株2事例、その他のG2群が1事例であった。飲食店を発生

図1 NLV遺伝子サブタイプの系統樹模式図
 YV: Yuri/95, MXV: Mexico/89, LDV: Lordsdale/93
 TKV: Tokyo/99, DSV: Desert Sield/90, NV: Norwalk/68

表3 NLV集団事例の月別発生状況と分離されたNLVの遺伝子サブタイプ
(1999年5月~2000年4月)

発生年月	G2群					G1群
	YV	MXV	TKV	LDV	Others	DSV
1999年5月		1				
6月						
7月		1				
8月						
9月						
10月	1					
11月		1	3			
12月	2	1		3	3	
2000年1月	11	5	3	11	1	
2月	4	1	4	1	4	
3月	3		1		2	
4月						1
合計	21	10	11	15	10	1

表4 NLV集団発生事例の発生場所とNLV遺伝子サブタイプ
(1999年5月~2000年4月)

発生場所	G2群					G1群
	YV	MXV	TKV	LDV	Others	DSV
高齢者施設				2	1	
学校施設	3	3	2		1	
飲食店	16	5	7	11	7	1
家庭	2	2	2	2	1	
合計	21	10	11	15	10	1

表5 NLV集団発生事例の発生要因とNLV遺伝子サブタイプ
(1999年5月~2000年4月)

発生要因	G2群					G1群
	YV	MXV	TKV	LDV	Others	DSV
カキ関連	9	4	7	6	6	0
カキ非関連	12	6	4	9	4	1
合計	21	10	11	15	10	1

場所とする47事例はYVタイプが最も多く16事例、次いでLDVタイプが11事例、TKV7事例、MXV5事例となり、全てのタイプが検出された。その他のG2群7事例中3事例から既知NLVのいずれともホモロジーが低く新株と推定される3株が検出された。家庭で発生した事例でも主要4サブタイプが同様に検出された。

4. NLV遺伝子サブタイプとカキ喫食との関連性

カキの喫食の有無と、検出されるNLVサブタイプの出現の関係を検討した結果、表5に示すようにカキ関連、非関連事例とも主要4サブタイプとその他のG2群は同様の傾向で検出されており、特定サブタイプの集中発生はみられなかった。

5. NLV遺伝子サブタイプと集団発生規模および潜伏時間

発症規模と潜伏時間についてもNLVサブタイプとの関連性を検討したが、発生規模・潜伏時間のいずれの場合も

NLVサブタイプの出現傾向に偏りはみられなかった(図2, 図3)。

考 察

NLVは急性胃腸炎の主要な病因物質であり、東京都におけるNLVによる胃腸炎集団発生事例は増加を続けている。CDCの報告によると、アメリカではNLVによる死亡者数が年間約300人いるとされている³⁾。日本ではNLVによる死亡例の報告はないが、激しい嘔吐と下痢を呈するので、幼児や高齢者などで脱水症状を引き起こし重篤な状態に陥る危険性があり十分な注意が必要である。

NLVは他のウイルスと異なり培養ができないことからその検査は困難を極めたが、1993年、NLVのプロトタイプであるノーウォークウイルスの全塩基配列が報告されたことにより、NLVにおいても遺伝子検査による検出が可能となった。

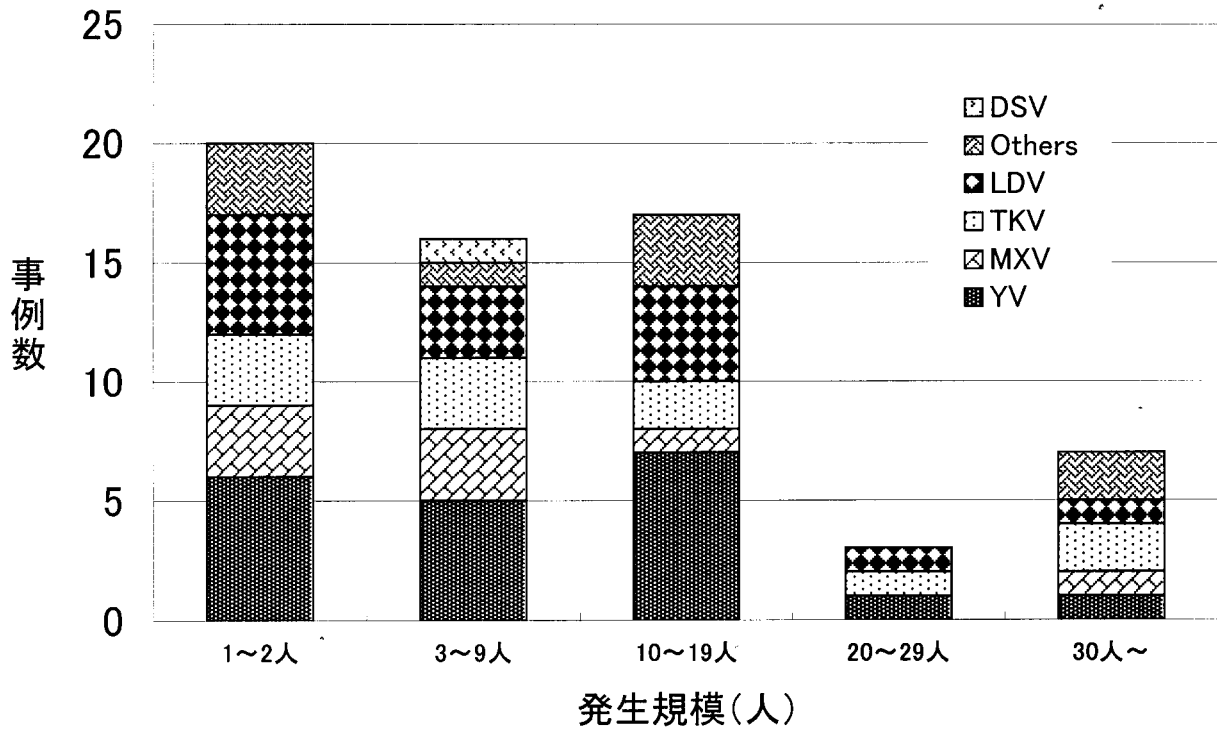


図2 NLV集団発生事例の発生規模とNLV遺伝子サブタイプ (1999年5月~2000年4月)

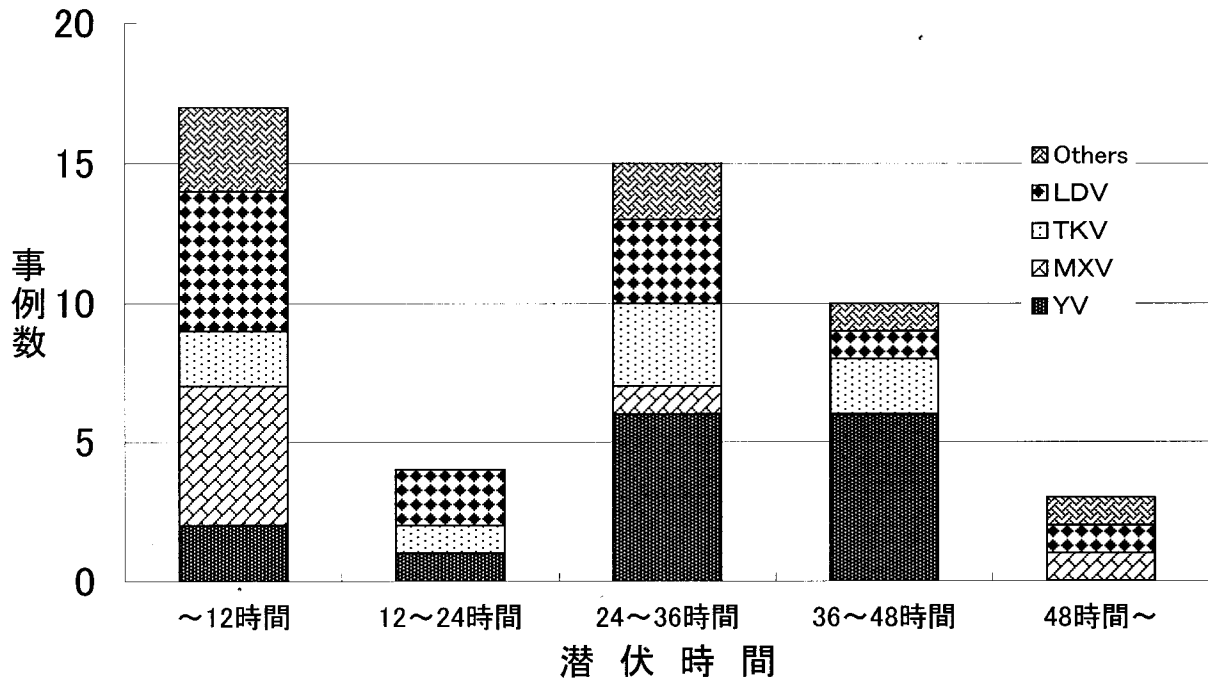


図3 NLV集団発生事例の潜伏時間とNLV遺伝子サブタイプ (1999年5月~2000年4月)

NLVの遺伝子は大きく2つのゲノムタイプ(G1群, G2群)に分類され, さらに多くのサブタイプが存在することが知られている. 諸外国や国内各地域から数多くのNLV遺伝子が報告され, その数はG1タイプで十数種, G2タイプで数十種に及ぶ. しかしこれらの報告は, 調査対象事例数が少なかったり, RT-PCR法のプライマーが調査ごとに異なっているなどの理から, NLV遺伝子の多様性の分子疫学を明らかにするには十分でなかった.

東京都では, 1997年よりNLVの遺伝子検査を行い, これまでにドットプロット・ハイブリダイゼーション法によるNLV遺伝子のゲノム分類(G1群とG2群)を報告してきた^{1,2)}. 今回, さらに詳細な疫学的解析を行うためにNLV遺伝子の塩基配列によるサブタイプ分類を1999年5月から2000年4月に都内で発生したNLV集団発生事例で試みた結果, G2群のYV株, LDV株, TKV株とMXV株の4サブタイプを主流としてさまざまなNLVが検出されており, 都

内におけるNLVの胃腸炎集団発生は特定のサブタイプのみで流行して出現したものではなかったことが明らかになった。さらに、原因物質、発生場所、潜伏時間、発生規模の4点についてNLV遺伝子のサブタイプ分類との相関性を検討したが特徴的な相関は見当らなかった。

このようにNLV遺伝子サブタイプにより胃腸炎集団発生の程度に違いが見られないことから、NLVは遺伝子組成が違って胃腸炎病因物質として質的な差はもたらさない性質を持つと考えられた。この知見は今後、NLVによる食中毒や胃腸炎集団発生が起きた場合の検査体制や防御策を決定する上で重要な指針を示すものと考えられる。

これまでに報告された多くのNLVの系統樹解析によれば、NLVサブタイプはシーズンごとに特定の株の流行があるとされている⁴⁻⁶⁾。たとえば、大阪府は1997年からG2群のMXV株が突然出現し多数発生したこと、1998年12月からG1群が優勢を示したことなどを報告している⁵⁾。東京都においてもドットプロット・ハイブリダイゼーションの検査結果をみると、G1群のNLVが1999年4月から2000年3月において7事例検出されており（未発表）、またG2群のサブタイプに変遷があることが認められている（未発表）。今後、過去の事例も含めて長期間に亘るNLVの遺伝子解析を進めて、サブタイプ出現のメカニズムを解明していきたい。

今回、単一年内においても食中毒や胃腸炎集団発生を引き起こすNLV遺伝子には多様性があることが明らかになったことから、NLVの遺伝子検査法で使用するプライマ

ーの選択は常に検討しておく必要がある。NLV遺伝子検査の普及に伴い多くのプライマーが設計され報告されているが、このような多様性を考えると、ある特定のプライマーのみでNLV胃腸炎の検査を行うことは難しいと判断せざるを得ない。東京都のNLV検査では、複数プライマーの使用によるnested RT-PCR法によってNLV検査を実施しているが、これらのプライマーに合致していないために検出できない株が存在している可能性は十分考えられる。NLV遺伝子にはどのくらいの種類があり、どのように変遷しているのかというNLVの全貌を早急に捉えることは、今後のNLV検査を行う上で重要な課題である。

文 献

- 1) 佐々木由紀子, 中村敦子, 門間公夫, 他: 東京衛研年報, 49, 12-16, 1998
- 2) 佐々木由紀子, 門間公夫, 中村敦子, 他: 東京衛研年報, 48, 23-29, 1997
- 3) Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., et. al: *Epi. Infect. Dis.* 5, 607-625, 1999
- 4) Koopmans, M., Vinje, J., de Wit, M., et. al: *J. Infect. Dis.*, 181 (Suppl 2) S262-S269, 2000
- 5) Iritani, N., Seto, Y., Haruki, K.: *J. Clin. Microbiol.*, 38, 2649-2654, 2000
- 6) Hale, A., Mattick, K., Lewis, D., et. al: *J. Med. Virology* 62, 99-103, 2000