

胃腸炎集団発生から検出されたノロウイルスの遺伝子解析(平成 16-17 年)

林 志直*, 森 功次*, 野口 やよい*, 秋場 哲哉*, 吉田 靖子*, 山田 澄夫**

Genetic Epidemiology of *Norovirus* Detected from Gastroenteritis Outbreak in Tokyo, 2004-2005

Yukinao HAYASHI*, Kouji MORI*, Yayoi NOGUCHI*, Tetsuya AKIBA*,
Yasuko YOSHIDA* and Sumio YAMADA**

Keywords : ノロウイルス *Norovirus*, 遺伝子疫学 genetic epidemiology, 胃腸炎 gastroenteritis, 集団発生 outbreak

はじめに

ノロウイルス(*Norovirus*:NV)は乳幼児から成人まで幅広い年齢層が罹患し、嘔吐・下痢を主徴とした急性胃腸炎を起こすウイルスである。1968年に、米国オハイオ州の小学校で発生した非細菌性胃腸炎集団事例から検出されたウイルス様粒子が最初の報告例¹⁾である。当初は電子顕微鏡観察による形態的特徴から、小型球形ウイルス(small round structured virus:SRSV)あるいはノーウォーク様ウイルスと呼ばれていた。

1990年にノーウォークウイルスの全塩基配列が報告²⁾されると、RT-PCR(reverse transcription- polymerase chain reaction)法によるSRSV検索が行われるようになった。これを契機として厚生省は1997年、「小型球形ウイルス」および「その他のウイルス」を食品衛生法の食中毒病因物質に加えた。2002年の国際ウイルス命名委員会で「ノーウォーク様ウイルス」が「ノロウイルス属」に分類・命名されると、厚生労働省は2003年に食品衛生法の食中毒病因物質「小型球形ウイルス」を「ノロウイルス」に変更し、現在に至っている。

東京都内では毎年約100事例の食中毒が発生している。病因物質別の食中毒事件数は、2001年以降、NVに起因する事例が最も多い状況が続いている³⁾。NV性食中毒はカキ等の二枚貝を原因食品とする事例が過半数を占めていたが、2003年以降その割合は20%程度まで減少している。これに代わって、調理従事者によってウイルス汚染された食品に起因する集団事例が増加している。このようなNV性胃腸炎の発生状況の変化と、検出されたNV遺伝子型の関連性を明らかにするために遺伝子解析を行った。

材料と方法

1. 供試材料

2004年1月から2005年12月までに、東京都内で発生した胃腸炎集団発生868事例から得られた患者・非発症者・調理従事者のふん便9,071件を検査材料とした。

2. 検査方法

1) 検査材料の前処理

ふん便材料は、超遠心により粗精製と濃縮を行った。その概要は、ふん便約1gをPBS(pH7.4:日水製薬)により10%乳剤を調整し、低速遠心を3,000 rpm 15分(himac CF8DL, 日立)、冷却遠心を8,000 rpm 30分(himac CR21E, 日立)後の上清について超遠心を27,000 rpm 180分(himac CP80β, 日立)の条件で行った。得られた沈殿を400 μLのTN緩衝液(0.01 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 1 mM CaCl₂, 5 μM MgCl₂, pH7.5)で再浮遊し、核酸抽出材料とした。

2) 核酸抽出

核酸の抽出はCTAB法⁴⁾により行った。核酸抽出材料100 μLに10%SDS(和光純薬)10 μL, 20 mg/mL proteinase K (和光純薬) 2.5 μLを加えて混和し、37°C15分間水浴で加熱した。10%セチル-トリメチル-アンモニウム-ブロマイド(和光純薬) 25 μLと4 M NaCl (和光純薬) 25 μLを加えて混和し、56°C15分間水浴で加熱した。フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール(25:24:1, ナカライテスク)を150 μL加えて核酸抽出し、14,000 rpm15分間の遠心分離によって水層を回収した。これをエタノール沈殿し、得られた核酸材料を蒸留水50 μLにより溶解してRT-PCR法に用いた。

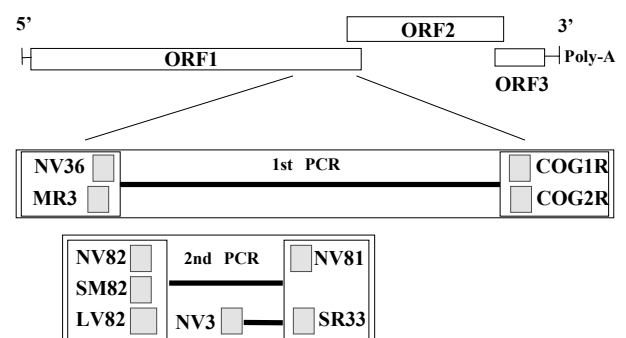


図 1. NVポリメラーゼ領域のプライマー

* 東京都健康安全研究センター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

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

** 東京都健康安全研究センター微生物部

表1. プライマーの塩基配列

プライマー	配列 (5'-3')	極性	文献番号
COG1R	CTT AGA CGC CAT CAT CAT TYA C	-	5)
COG2R	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA	-	5)
MR3	CCG TCA GAG TGG GTA TGA A	+	6)
NV36	ATA AAA GTT GGC ATG AAC A	+	4)
NV82	TCA TTT TGA TGC AGA TTA	+	
SM82	CCA CTA TGA TGC AGA TTA	+	
LV82	TCA CTA TGA TGC TGA CTA CTC	+	
NV	GCA CCA TCT GAG ATG GAT GT	+	4)
NV81	ACA ATC TCA TCA TCA CCA TA	-	
SR33	TGT CAC GAT CTC ATC ATC ACC	-	4)

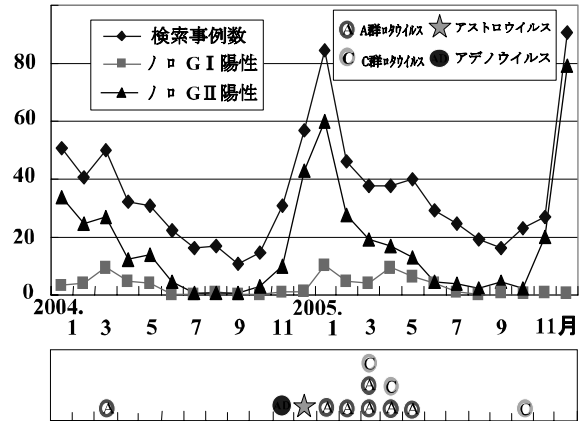


図2. 月別ウイルス検出状況

3) RT-PCR法によるノロウイルス遺伝子の検出

NV遺伝子の検出は、ORF1のポリメラーゼ領域を増幅して行った(図1)。逆転写反応に用いたプライマーはCOG1R・COG2R⁵⁾、1st PCRの5'側にはNV36・MR3⁶⁾、2nd PCRにはNV82・SM82・LV82・NV3/NV81・SR33⁷⁾である(表1)。PCR産物は2%アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイド染色し、UV照射により増幅バンドを確認した。

4) ノロウイルス遺伝子の塩基配列の決定

得られたPCR産物はMontage-PCR(Millipore)による精製後、BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequence Kit(ABI)を用いてサイクルシーケンス反応(PE 9700:ABI)を行った。反応産物をCENTRI CEP Spin Columns(ABI)により精製し、ABI PRISMTM Genetic Analyzer(ABI)により塩基配列を決定した。遺伝子解析はGENETYX Mac Ver.11を用いて行った。

5) ノロウイルス以外の胃腸炎起因ウイルスの検索

サポウイルスは、本間らの方法⁸⁾に準じてRT-PCR法により検査を行った。A群ロタウイルスはロタクロン(TFB)、腸管アデノウイルスはアデノクロンE(TFB)、アストロウイルスはAmplified IDEIA Astrovirusキット(DAKO)を用いた酵素抗体法、C群ロタウイルスはRPHA法によるC群ロタウイルス検出用試薬(デンカ生研)を用いて検査した。各市販キットによるウイルス検索は、添付書類の術式に準じて行った。

結果と考察

1. 胃腸炎集団事例からのウイルス検出状況

調査期間中に868事例(2004年379事例と2005年489事例)の胃腸炎集団発生からふん便材料9,071件が得られた。胃腸炎ウイルス検索の結果、2004年は379事例中197事例(52.0%)、2005年は489事例中290事例(59.3%)から病原因子が検出された(表2)。各調査年次ともにNVの検出例が大多数を占め、その割合は2004年が194/197事例(98.5%)、2005年が281/290事例(96.9%)であった。その他のウイルス検出例は、2004年がロタウイルス、腸管アデノウイルス、アストロウイルスがそれぞれ1事例ずつ、2005年はロタウイルスが9事例であった。

検出されたNV、ロタウイルスの月別検出状況を図2に示した。NVはGII検出例が圧倒的に多く、12月・1月に集中していた。GI検出例は、GII検出例がピークを迎えた後の2004年3月、2005年1月・4月に検出例が多かった。ロタウイルスは、2004年は検出例が少なく、3月にA群が1事例検出されたのみであった。しかし、2005年は1月から5月にかけてA群が6事例、3月、4月、10月にC群ロタウイルスがそれぞれ1事例ずつ検出された。

材料由来別にノロウイルス検出状況を表3に示した。糞便材料を患者・非発症者・調理従事者にわけると、2004

表2. 胃腸炎集団発生事例からの月別ウイルス検出状況

		2004.1	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	合計
検査事例数		51	41	50	32	31	22	16	17	11	15	31	62	379
陽性事例数	ノロ	36	25	33	17	17	5	1	2	1	3	11	43	194
	ロタ	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	腸管アデノ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	アストロ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	合計	36	25	34	17	17	5	1	2	1	3	12	44	197
		2005.1	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	合計
検査事例数		85	47	42	41	43	29	25	19	16	23	28	91	489
陽性事例数	ノロ	64	31	24	24	17	9	4	2	5	2	20	79	281
	ロタ	1	1	2	3	1	0	0	0	0	1	0	0	9
	腸管アデノ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	アストロ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
合計	65	32	26	27	18	9	4	2	5	3	20	79	290	

表3. 材料由来別のノロウイルス検出成績

年	検査材料	検査件数	陽性件数	陽性率 (%)
2004年	患者ふん便	2,291	1,144	49.9
	非発症者ふん便	162	40	24.7
	調理者ふん便	1,195	79	6.6
	計	3,648	1,263	34.6
2005年	患者ふん便	3,031	1,635	53.9
	非発症者ふん便	389	85	21.9
	調理者ふん便	2,003	235	11.7
	計	5,423	1,955	36.1
合計	患者ふん便	5,322	2,779	52.2
	非発症者ふん便	551	125	22.7
	調理者ふん便	3,198	314	9.8
	計	9,071	3,218	35.5

年は順に 1,144/2,291 件(49.9%)・40/162 件(24.7%)・79/1,195 件(6.6%), 2005 年は順に 1,635/3,031 件(53.9%)・85/389 件(21.9%), 235/2,003 件(11.7%)が NV 陽性となった。2 年間で平均すると、患者 52.2%, 非発症者 22.7%, 調理従事者 9.8%が NV をふん便中に排出していた。食中毒防止対策を進める上で、患者のみならず調理従事者や非発症者によるウイルス汚染にも十分注意をする必要があると考えられた。

2. 施設別のウイルス検出状況

疫学調査成績が得られた849事例の施設別ウイルス検出状況を表4に示した。その内訳は、飲食店において330事例(38.9%)が発生し、次いで家庭内171事例(20.1%), 保育園・小学校86事例(10.1%), 福祉施設83事例(9.8%), 会食料理66事例, 宿泊施設61事例, 病院等49事例の順であった。NV が検出された474事例のうち、408事例(86.1%)がGII 単独, 43事例(9.1%)がGI 単独, 23事例(4.9%)がGI +GII の混合事例であった。GI +GII の混合事例のうち、飲食店における19事例中13事例は、カキ・シジミ等の二枚貝を推定原因食品とした事例であった。

表4. 発生施設別のウイルス検出状況

事例数	飲食店	家庭内	会食料理	宿泊施設	福祉施設	保育園 小学校	病院 その他	合計
検索対象	330	171	66	61	83	86	49	849
NVG I	17	8	4	2		12		43
NVG II	117	51	40	37	71	56	36	408
GI +GII	19		1	1		2		23
GARV	4	1	1		1	3	1	11
GCRV						3		3
AD						1		1
Ast					1			1
合計	157	60	46	40	73	77	37	490

NVG I・NVG II : ノロウイルス G I 型・G II 型、GARV : A 群ロタウイルス
GCRV : C 群ロタウイルス、AD : 腸管アデノウイルス、Ast : アストロウイルス

福祉施設からは、83事例のうち71事例からNVG II が検出され、GI 検出例は認められなかった。しかし、保育園・小学校からは、77事例のうち56事例からGII, 12事例からGI が検出された。調査期間が2年間で短期間ではあるが、遺伝子群別により好発年齢層に差が認められ、GI は低年齢層からの検出例が多かった。

また、保育園・小学校においてはNVの他、A群・C群ロタウイルス、腸管アデノウイルスも検出され、胃腸炎ウイルス検索は幅広く実施することが重要であることが示された。

3. 検出されたノロウイルスの遺伝子解析

NV が検出された 475 事例のうち、推定原因食品がカキであった 3 事例、調理者による食品汚染に起因したもの 40 事例、ヒト-ヒト感染 35 事例、合計 78 事例について PCR 産物の塩基配列を決定し、遺伝子系統樹解析結果を図 3 に示した。

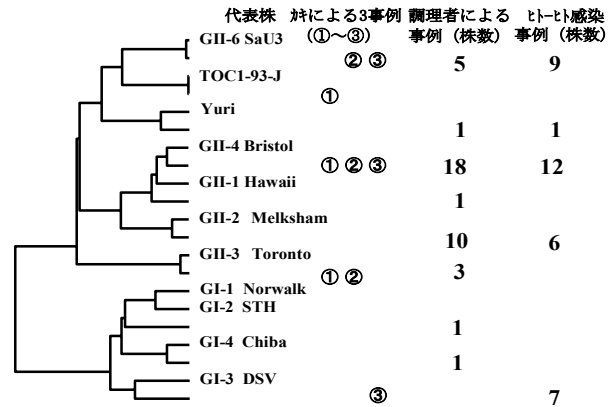


図3. ノロウイルスの遺伝子解析

カキを推定原因食品とする事例では、1 事例の患者から多種類の遺伝子型が検出され、検出された遺伝子型は(GII -3・GII -4・TOC1-93 類似株), (GII -3・GII -4・GII -6 型), (GI -3・GII -4・GII -6 型)の組み合わせがそれぞれ 1 事例ずつであった。

調理従事者による食品汚染に起因する事例では、GII -4 型が最も多く 18 事例、次いで GII -2 型が 10 事例、GII -6 型 5 事例、GII -3 型 3 事例、Yuri 類似株・GI -1・GI -3・GII -1 型がそれぞれ 1 事例であった。高齢者施設から検出された NV のほとんどは、GII -4 型であった。

ヒト-ヒト感染事例では、GII -4 型 12 事例が最も多く、次いで GII -6 型 9 事例、GI -3 型 7 事例、GII -2 型 6 事例、Yuri 類似株 1 事例であった。なお、GI -3 型が検出された 7 事例は施設別ウイルス検出状況で述べたように、いずれも保育園・小学校において発生した事例であった。

以上のように、胃腸炎集団事例の発生原因別に検出遺伝子型を比較したが、いずれの発生原因においても主に検出されたのは GII -2 型、GII -4 型、GII -6 型であった。

まとめ

- 2004 年 1 月から 2005 年 12 月の間に 868 事例の胃腸炎集団発生について調査し、NV が 475 事例(54.7%), ロタウイルスが 14 事例、腸管アデノウイルスとアストロウイルスが 1 事例ずつから検出された。
- 検出された NV の遺伝子型は、GII -4 型が主流型であったが、その他に GII -2, GII -6, GI -3 型など検出ウイルスの遺伝子型に多様性が認められた。
- カキを推定原因食品とする事例では、1 集団事例から複数の遺伝子型が検出された。ヒト-ヒト感染事例では、保育園等の低年齢層から GI -3 型、高齢者からは GII -4 型が多数検出された。

文献

1) Kapikian, Z., Wyatt, G., Dolin, R., et al.: *J. Virol.*, **10**, 1075-1081, 1972.
2) Jiang, X., Graham, Y., Wang, K. et al.: *Science*, **250**, 1580-1583, 1990.

- 3) 東京都福祉保健局健康安全室：東京都の食中毒概要, 2001, 2002, 2003, 2004.
- 4) Wang, J., Jiang, X., Madore, P. *et al.*: *J. Virol.*, **68**, 5982-5990, 1994.
- 5) Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M. *et al.*: *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 1548-1557, 2003.
- 6) Lew, F., Petric, M., Kapikian, Z., *et al.*: *J. Virol.*, **68**, 3391-3396, 1994.
- 7) Ando, T., Monroe, S., Gentsch, R., *et al.*: *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 64-71, 1995.
- 8) Honma, S., Nakata, S., Kinoshita-Numata, K. *et al.*: *Microbiol. Immunol.*, **44**, 411-419, 2000.