

## 東京都内で検出されたノロウイルスの分子疫学解析 (2017年度～2018年度)

永野 美由紀<sup>a</sup>, 浅倉 弘幸<sup>a</sup>, 長島 真美<sup>a</sup>, 矢尾板 優<sup>a</sup>, 林 志直<sup>a</sup>, 長谷川 道弥<sup>a</sup>, 根岸 あかね<sup>a</sup>, 熊谷 遼太<sup>a</sup>, 河上 麻美代<sup>a</sup>, 北村 有里恵<sup>a</sup>, 加來 英美子<sup>a</sup>, 小田 真悠子<sup>b</sup>, 宗村 佳子<sup>c</sup>, 新開 敬行<sup>c</sup>, 千葉 隆司<sup>a</sup>, 貞升 健志<sup>d</sup>

2017年度および2018年度に東京都内で検出したノロウイルス (NoV) について, ORF2のVP1領域 (N/S領域) の遺伝子配列を解析し, 遺伝子型別による分子疫学解析を実施した. NoVが陽性となった305事例を対象に解析した結果, GII.2とGII.4が多数を占めていた. 事例を集団別で比較すると, GII.2が小学生以上の学生層で大半を占めており, GII.4は低年齢層から高齢者まで幅広い年齢層から検出された. また, 今回検出されたGII.4の亜型は, すべて Sydney\_2012であった.

**キーワード:** ノロウイルス, 食中毒, 感染性胃腸炎, 分子疫学解析

### はじめに

ノロウイルス (Norovirus: NoV) は, 冬季を中心に発生するウイルス性胃腸炎の主な原因の一つである. NoVは世界中に分布しており, 乳幼児から高齢者まで広い年齢層に感染し, 食中毒や小児の感染性胃腸炎, 病院や高齢者施設における胃腸炎集団発生を引き起こす.

NoVのゲノムは約7,500塩基のプラス一本鎖RNAであり, 3つの蛋白質コード領域 (Open reading frame: ORF) が存在する. ORF1は非構造蛋白質 (RdRp領域を含む), ORF2とORF3は構造蛋白質のVP1, および VP2をコードしている. NoVは, VP1のアミノ酸配列によりGI~GVIIの遺伝子群 (genogroup) に分類される<sup>1)</sup>. このうち, ヒトに病原性を示すのはGI, GII, GIVである. さらに, GIIは9種類, GIIIは22種類, あるいはそれ以上の遺伝子型 (genotype) に細分類されている<sup>2)</sup>. 近年では, ORF1とORF2のジャンクション領域を基点に遺伝子組換えが生じたことによるキメラウイルスも検出されており, ORF1 (RdRp領域) \_ORF2 (VP1領域) の遺伝子型の表記で分類されている<sup>3)</sup>.

今回は, NoVの遺伝子型の流行状況を把握するため, 2017年度および2018年度に東京都内で検出したNoVを対象にVP1領域 (N/S領域) の分子疫学解析を実施したので報告する.

### 材料と方法

#### 1. 供試材料

2017年4月から2019年3月までに, 東京都内で発生した食中毒事例 (有症苦情を含む), 保育園等の施設内で発生した集団胃腸炎事例および感染症発生動向調査でNoVが陽性となった305事例 (2017年度148事例, 2018年度157事例) の患者糞便を供試材料とした. なお, 集団事例については

各事例から1検体を選出した.

#### 2. 検査方法

厚生労働省通知<sup>4)</sup>に準じて, NoVの遺伝子解析を実施した. すなわち, 検査材料にPBS (-) (pH7.4: 日水製薬) を加えて10%混濁液を作成し, 激しく攪拌した後, 3,000 rpm, 5分の遠心分離を行った. その上清を4°C, 10,000 rpm, 20分の遠心分離を行い, 上清を核酸抽出に供した. 核酸抽出はQIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて行い, 抽出した核酸からRandom hexamer (Amersham Biosciences) およびSuperScript II (Invitrogen) を用いて逆転写反応を行い, cDNAを得た. PCRにはExTaq (TaKaRa) を用い, VP1領域 (N/S領域) を対象としたnested-PCR反応を行った. 1st PCRのプライマーはGI用にCOG1F/G1SKR, GII用にCOG2F/G2SKRを用いて増幅し, 反応条件は94°C3分の後, 94°C1分, 55°C1分, 72°C1分を40回繰り返す, 最終伸長反応は72°C15分とした. 2nd PCRのプライマーはGI用にG1SKF/G1SKR, GII用にG2SKF/G2SKRを用いて, 反応条件は94°C3分の後, 94°C1分, 55°C1分, 72°C1分を35回繰り返す, 最終伸長反応を72°C15分とした. PCR産物はQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製し, Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequence Kit (Applied Biosystems) によるシーケンス反応を行った. 反応産物は, BigDye XTerminator (Applied Biosystems) を用いて精製し, 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により塩基配列を決定した.

得られた塩基配列について, オランダ国立公衆衛生環境研究所が提供する遺伝子型分類ツールNorovirus Typing Tool Version 2.0

(<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus/>) を用いて,

<sup>a</sup> 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

<sup>b</sup> 東京都健康安全研究センター精度管理室

<sup>c</sup> 東京都健康安全研究センター企画調整部

<sup>d</sup> 東京都健康安全研究センター微生物部

遺伝子型を決定した。また、Molecular Evolutionary Gene Analysis (MEGA) ver. 7<sup>5)</sup>を用いた近隣結合法による分子系統樹解析を実施した。

## 結果と考察

### 1. 遺伝子型の検出状況

事例ごとにVP1領域 (N/S領域) における遺伝子型別を実施したところ、GIは8つの型 (GI.1から7および9) , GIIは6つの型 (GII.2から4, 6, 8および17) の合計14つの型に分類された。その内訳は、事例数が多い順にGII.2が305事例中98事例 (32.1%) , GII.4が96事例 (31.5%) , GII.17が38事例 (12.5%) , GII.3が16事例 (5.2%) , GI.2が14事例 (4.6%) , GI.7が8事例 (2.6%) , GI.3が5事例 (1.6%) , GII.6が4事例 (1.3%) , GI.4が3事例 (1.0%) , GI.5, GI.6およびGII.8が各2事例 (0.2%) , GI.1およびGI.9が各1事例 (0.3%) であった。また、15事例 (4.9%) については、同一事例もしくは同一検体から複数の遺伝子群または遺伝子型が検出された。

今回、最も検出数の多かったGII.2は、2016年後半に全国的なNoVの大流行を引き起こした主要起因ウイルスとして報告されている<sup>6,7,8)</sup>。東京でも2016年度に流行がみられ、2017年度および2018年度についても高い比率で推移していた (図1) 。しかしながら、年度別に見ると2017年度および2018年度のNoVの流行は2016年度と比較すると穏やかであった。その理由としては、多くの人々が2016年度にGII.2による暴露を受けたことでGII.2に対する免疫を獲得していたことが推察され、GII.2の感染事例が減少したことにより2017年度および2018年度におけるNoV全体の流行が抑えられた可能性が考えられた。

次いで検出数の多かったGII.4は、2016年度と比較して2017年度は2倍以上に増加した。また、GII.17は、2016年度および2017年度の検出数はほぼ同じであったが、2018年度は減少した。ノロウイルス遺伝子型頻度予測システム (NOROCAS) によると、2017年度の大半年を占める2017/2018シーズンは、GII.2, GII.4およびGII.17は前シーズンよりも減少すると予測されたが<sup>9)</sup>、都内における検出状況とは一部異なる傾向を示したことが明らかとなった。

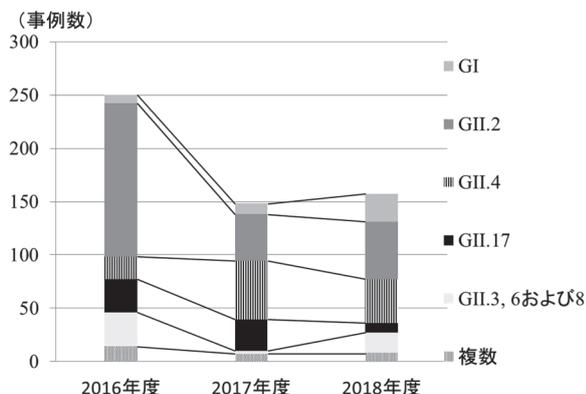


図1. ノロウイルスの検出状況 (2016~2018年度) 東京都

### 2. 四半期別の遺伝子型

四半期ごとの各遺伝子型の検出状況を、図2に示した。検出数の多かったGII.2とGII.4はほぼ年間を通して確認されたが、流行期である冬季において特に多く検出された。次いで、検出数の多かったGII.17は2017年度および2018年度ともに1-3月に増加がみられた。GII.17は新規遺伝子型GII.P17-GII.17として2013/14シーズンに探知され、2014/15シーズンには日本を含むアジア各地で流行を引き起こした<sup>10,11)</sup>。2016/2017シーズンには、GII.17の検出数のピークの時期が他の遺伝子型と比較して遅いことが明らかにされており<sup>12)</sup>、2017年度および2018年度も同様の傾向が見られた。

### 3. 集団別の遺伝子型

胃腸炎事例が発生した集団ごとの遺伝子型検出状況を、図3に示した。NoVによる胃腸炎事例の発生が最も多かった集団は飲食店の143事例であり、今回検出された14型全ての遺伝子型が確認された。また、複数の遺伝子群または遺伝子型が検出された15事例中14事例が飲食店で発生しており、10事例はカキやアサリの喫食が確認されている。NoV食中毒の原因としては、近年ではNoVに感染している調理従事者による食品汚染の割合が増加しており、調理施設における従業員の衛生管理の重要性が示されている<sup>13)</sup>。しかしながら、依然として二枚貝を原因とした食中毒事例も確認されており、引き続き監視して行く必要性が示唆された。

低年齢層 (幼稚園や保育園など) におけるNoVの集団感染は、76事例で確認された。以前から、小児より検出されるNoV遺伝子型についてはGII.6が多く、GII.17が少ないことが報告されている<sup>14,15)</sup>。今回の調査でも、GII.6は全体では4事例から確認されたが、そのうち3事例が低年齢層からの検出であり、GII.17の低年齢層からの検出は1事例のみであった。また、学生層 (小学校・中学校・高校・大学) においては10事例からNoVが検出され、そのうちGII.2が9事例と大きな割合を占めた。NoVに対する人の免疫については、幼少期から様々な遺伝子型のNoVに感染することで免疫を獲得し、年齢が上がるにつれて免疫が増強されることが報告されている<sup>16)</sup>。小児から多く検出されたGII.6は、成人層においては多くが過去の感染によって流行が抑えられた可能性も考えられる。一方、GII.2については、2016年度の大流行の際には低年齢層を中心に感染の広がりが見られたが<sup>6,7)</sup>、2017年度および2018年度は学生層で大半を占めており、全体数での減少は見られるものの、特定の年齢層での減少は認められなかった。また、GII.4については過去に2~3年おきに変異株が出現し、大流行を起こしている<sup>17)</sup>。今回も、低年齢層から高齢者まで幅広い年齢層からGII.4が検出された。

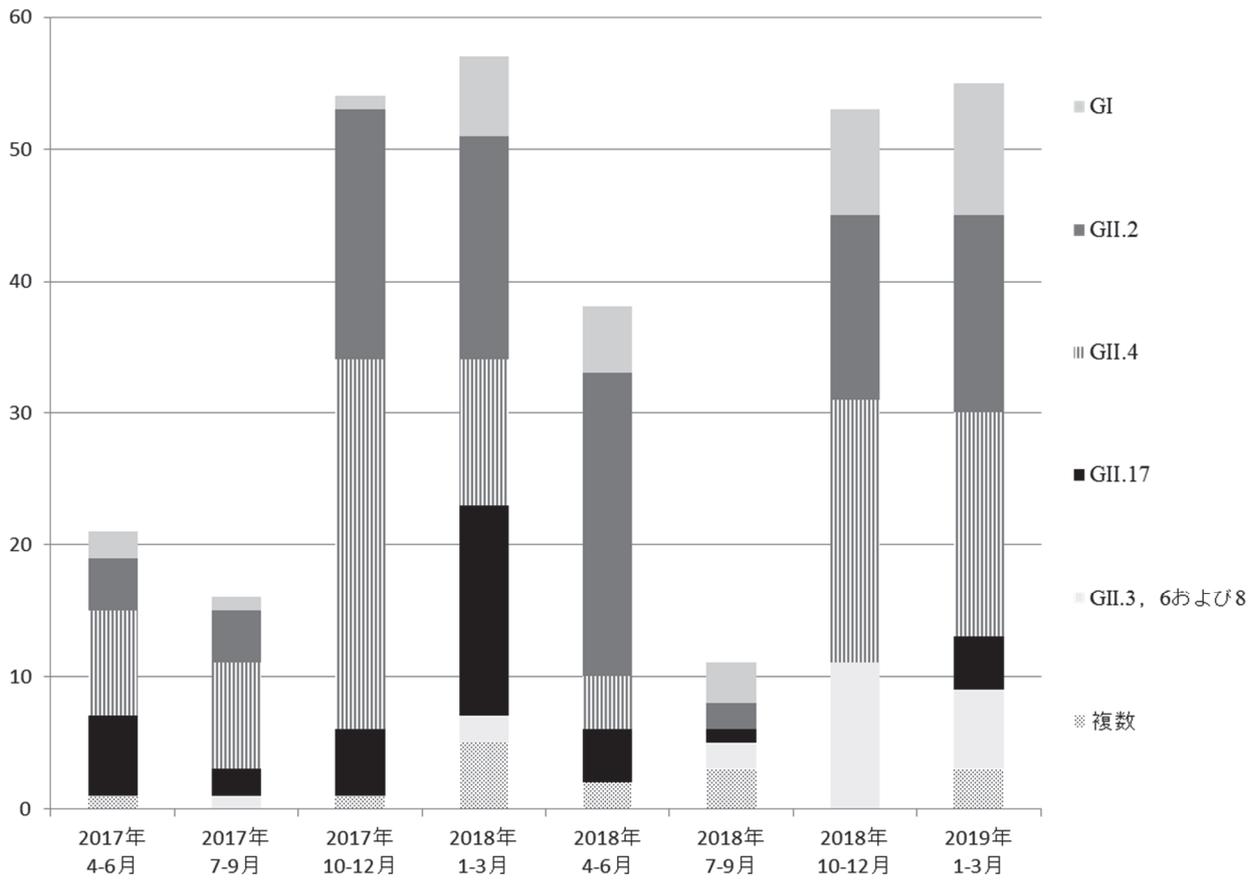


図2. 四半期別に見たノロウイルス遺伝子型 (2017年度~2018年度), 東京都

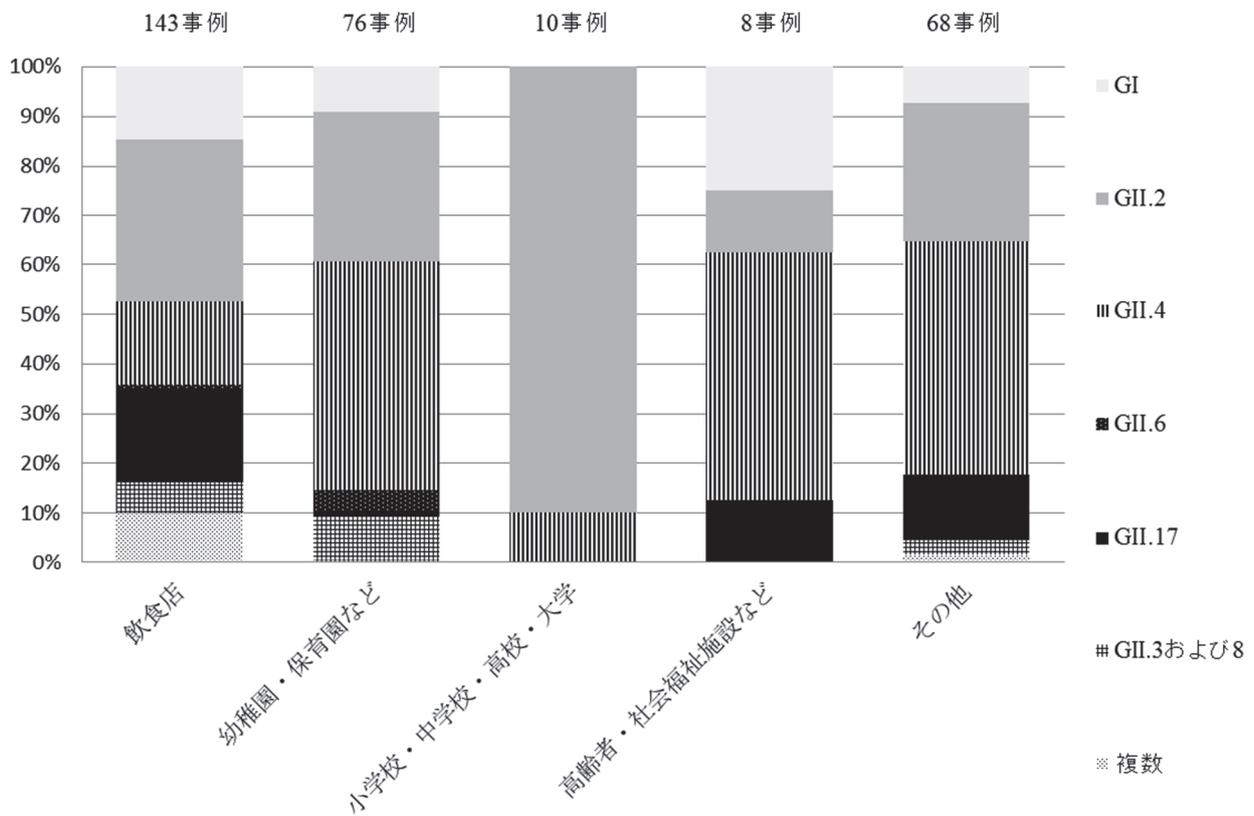


図3. 発生集団別のノロウイルス遺伝子型 (2017年度~2018年度), 東京都

#### 4. GII.4の亜型分類

GII.4は、1990年後半から増加し始め、周期的に大流行を引き起こしてきた。その流行には、新亜株の出現が関与し、過去にはDen Hagg\_2006b亜株、New Orleans\_2009亜株、Sydney\_2012亜株の出現がある<sup>18,19)</sup>。今回検出されたGII.4について系統樹解析を行ったところ、全てGII.4\_Sydney\_2012に亜型分類された。一方で、2017年12月には、ORF1とORF2のジャンクション領域で遺伝子組み換えを起こしたキメラウイルス

(GII.P12\_GII.4\_Sydney\_2012) が都内で発生した食中毒事例においては初めて検出されている<sup>20)</sup>。また、同時期

(2017年9月～2018年2月)に確認されたGII.4の事例において、GII.P12\_GII.4\_Sydney\_2012は40事例中7事例(17.5%)から検出された。NoVの遺伝子組み換えには、複数のウイルス株に汚染された二枚貝や水を介した高齢者や免疫不全患者における感染が一因とも考えられている<sup>21)</sup>。遺伝子学的に離れたNoV間の組み換えにより、病原性の変化したウイルスが生成される可能性があり、GII.4の新たな亜株やキメラウイルスの出現などの遺伝子変異を注意深く監視していくことの必要性が示唆された。また、NoVは変異株が最初に確認されてから2-7カ月経過したのちに大流行するという報告があり<sup>22)</sup>、春季や夏季に発生したNoV胃腸炎事例における遺伝子解析も重要であると考えられた。

#### ま と め

2017年度から2018年度に検出されたNoVの遺伝子型別を実施したところ、GII.2とGII.4が大半を占めた。

四半期別および集団別に比較すると、GII.2は小学生以上の学生層で検出割合が高く、GII.4は幅広い年齢層において検出された。また、GII.17は低年齢層からの検出率が低く、検出数のピークが他の遺伝子型と比較して遅い傾向にあり、過去の報告と同様の結果となった。

GII.4の亜型は、全てGII.4\_Sydney2012に分類された。

NoVの大流行の要因としては、GII.4の新しい亜株の出現や、新たなキメラウイルスの出現が推察されており、今後もNoV遺伝子の変化や流行株の動向について、継続的に監視してゆく必要があると考えられた。

#### 文 献

- 1) Vinjé, J. : *J. Clin. Microbiol.*, **53**, 373-381, 2015.
- 2) Kroneman, A. : *Arch Virol.* **158**, 2059-2068, 2013.
- 3) 片山和彦 : 病原微生物検出情報, **30**, 173-175, 2014.
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長 : 食安監発第0514004号ノロウイルスの検出法について(通知), 平成19年5月14日, 2007.
- 5) Kumar S., Stecher G., Tamura K., : *Mol. Biol. Evol.*, **33**(7), 1870-1875, 2016.
- 6) 坂本美砂子, 山崎恵美, 西山和佳子, 他 : 病原微生物検出情報, **38**, 18-20, 2017.
- 7) 植木 洋, 小泉 光, 菅原直子, 他 : 病原体微生物検出情報, **38**, 17-18, 2017.
- 8) Hata M., Nakamura N., Kobayashi S., et al. : *Jpn J Infect Dis.*, **71**(4), 319-322, 2018.
- 9) 鈴木義幸 : 病原微生物検出情報, **38**, 14-15, 2017.
- 10) Hoa, T. T., Trainor, E., Nakagomi T., et al. : *J Clin Virol.*, **56**, 185-193, 2013.
- 11) Matsushima Y., Ishikawa M., Shimizu T., et al. : *Euro Surveill.*, **20**, pii=21173, 2015.
- 12) 宗村佳子, 木本佳那, 小田真悠子, 他 : 病原微生物検出情報, **38**, 5-6, 2017.
- 13) 厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生・食品安全部長 : 生食発0616 第1号「大量調理施設衛生管理マニュアル」の改正について, 平成29年6月16日, 2017.
- 14) 楠原 一, 赤池重宏, 小林隆司, 他 : 病原微生物検出情報, **36**, 91-92, 2015.
- 15) 永野美由紀, 林 志直, 秋場 哲哉, 他 : 東京健安研七周年報, **60**, 55-59, 2009.
- 16) Sakon N., Yamazaki K., Nakata K., et al. : *J Infect Dis.*, **211**(6), 879-888, 2015.
- 17) 左近直美, 駒野 淳 : 日食微誌, **33**(3), 97-106, 2016.
- 18) Siebenga J. J., Vennema H., Renckens B., et al. : *J Virol.*, **81**, 9932-41, 2007.
- 19) Eden J. S., Tanaka M. M., Boni M. F., et al. : *J Virol.*, **87**, 6270-6282, 2013.
- 20) 永野美由紀, 宗村佳子, 浅倉弘幸, 他 : 病原微生物検出情報, **39**, 146-147, 2018.
- 21) Ludwig-Begall L. F., Mauroy A., Thiry E., : *J Gen Virol.*, **99**(8), 970-988, 2018.
- 22) Bruggink L., Catton M., Marshall J. : *Euro Surveill.*, **21**(39), pii=30353, 2016.

**Molecular Epidemiological Analysis of Norovirus in Tokyo, April 2017—March 2019**

Miyuki NAGANO<sup>a</sup>, Hiroyuki ASAKURA<sup>a</sup>, Mami NAGASHIMA<sup>a</sup>, Yu YAOITA<sup>a</sup>, Yukinao HAYASHI<sup>a</sup>  
Michiya HASEGAWA<sup>a</sup>, Akane NEGISHI<sup>a</sup>, Ryota KUMAGAI<sup>a</sup>, Mamiyo KAWAKAMI<sup>a</sup>, Yurie KITAMURA<sup>a</sup>, Emiko KAKU<sup>a</sup>  
Mayuko ODA<sup>a</sup>, Yoshiko SOMURA<sup>a</sup>, Takayuki SHINKAI<sup>a</sup>, Takashi CHIBA<sup>a</sup>, and Kenji SADAMASU<sup>a</sup>

We conducted genotyping and molecular epidemiological analysis of Norovirus detected in Tokyo between April 2017 and March 2019. Noroviruses were detected in 305 cases, with the GII.2 and GII.4 strains being the majority. A case group comparison showed that the majority of the groups in which the GII.2 strain was detected were elementary school students or older adults. However, the GII.4 strain was detected in a wide range of age groups, from the young to the elderly. The GII.4 strains detected in this study were classified into the Sydney\_2012 type.

**Keywords:** Norovirus, food poisoning, infectious gastroenteritis, molecular epidemiological analysis

---

<sup>a</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

