

東京都の感染症発生動向調査事業における感染性胃腸炎のウイルス検出状況 (2019年度～2021年度)

永野 美由紀^a, 浅倉 弘幸^a, 矢尾板 優^a, 鈴木 愛^a, 磯貝 まや^a, 藤原 卓士^a, 根岸 あかね^a
河上 麻美代^a, 伊藤 仁^a, 黒木 絢士郎^a, 横田 翔太^a, 北村 有里恵^a, 加来 英美子^a, 長谷川 道弥^a
三宅 啓文^b, 千葉 隆司^c, 鈴木 淳^d, 長島 真美^a, 貞升 健志^b

2019年度から2021年度に東京都感染症発生動向調査における病原体定点医療機関で感染性胃腸炎と診断され、搬入された患者検体についてウイルス検査を実施した。その結果、168検体中84検体から胃腸炎起因ウイルスが検出された。その内訳はノロウイルスが最も多く、遺伝子型はGII.4やGII.2が大半を占めていた。次に多かったA群ロタウイルスは、2019年度は春から夏にかけて検出数のピークが見られ、遺伝子型はG8P[8]が最も多く検出された。2020年度と2021年度の検体搬入数は少なかったが、ノロウイルスはほぼ継続して検出された。

キーワード：感染症発生動向調査，感染性胃腸炎，東京都，ノロウイルス，ロタウイルス，サポウイルス，アデノウイルス，アストロウイルス

はじめに

感染性胃腸炎は、感染症発生動向調査で五類感染症の定点把握疾患に指定されている。東京都では小児科定点および基幹定点の病原体医療機関において感染性胃腸炎と診断された患者検体について、病原体の検索を行っている。

感染性胃腸炎とは、細菌やウイルスなどの病原体を原因とする急性胃腸炎の総称であり、嘔吐、下痢、腹痛、発熱を主な症状とする。その多くがウイルス感染によるものであり、例年秋から冬にかけて流行がみられる。原因となるウイルスとして、ノロウイルスやロタウイルスなどが挙げられる。

ノロウイルスは、乳幼児から高齢者まで広い年齢層で感染し、食中毒、小児の感染性胃腸炎の原因となり、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。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。ノロウイルスはVP1のアミノ酸配列によりGI～GXの遺伝子群（genogroup）に分類され、このうち、ヒトに病原性を示すのはGI、GII、GIV、GVIIIおよびGIXである¹⁾。さらに、GIは9種類、GIIは27種類の遺伝子型（genotype）に細分類されている¹⁾。また、ORF1とORF2のジャンクション領域を基点に生じた遺伝子組換えによるキメラウイルスも検出されており、ORF2（VP1領域）の遺伝子型 [ORF1（RdRp領域）の遺伝子型] の表記で分類することが提唱されている¹⁾。新たな遺伝子型やキメラウイルスの出現に

よって、ノロウイルスによる大きな流行が引き起こされる可能性があり、遺伝子の変化を継続的に監視していくことが重要である。

ロタウイルスは主に乳幼児における急性胃腸炎の原因ウイルスとして知られており、5歳までにはほぼ100%の人が感染すると考えられている。ゲノムは11分節の2本鎖RNAで構成されており、6種の構造蛋白質（VP1～4, 6, 7）と6種の非構造蛋白質（NSP1～6）をコードしている。VP6の血清型に基づきAからIの9群に分類されているが、人への感染が報告されているのはA群、B群およびC群であり、大きな流行を引き起こすのはA群ロタウイルスである。各遺伝子分節には、それぞれの塩基配列の相同性に基づいて分類された多数の遺伝子型が存在しており、疫学調査では中和抗原を有するVP7（G型）とVP4（P型）の遺伝子型で分類することが多い。また、A群ロタウイルスはワクチンが開発されており、2種類のロタウイルスワクチンRotarixとRotaTeqが世界100か国以上で認可されている^{2,3)}。日本でもRotarixは2011年11月から、RotaTeqは2012年7月から任意接種が開始され、2020年10月から定期接種化された⁴⁾。ワクチンの導入により、主流株が変化するかどうか注視していく必要がある。

今回、2019年4月より2022年3月まで都内の感染性胃腸炎におけるウイルスの検出状況について、ノロウイルスとA群ロタウイルスを中心にまとめたので報告する。

材料と方法

1. 検査材料

^a 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

^b 東京都健康安全研究センター微生物部

^c 東京都健康安全研究センター企画調整部健康危機管理情報課

^d 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科

2019年4月から2022年3月までの間に、感染症発生动向調査事業において、小児科定点医療機関および基幹定点医療機関より搬入された患者検体（ふん便または直腸ぬぐい液）168検体（2019年度が85検体、2020年度が32検体、2021年度が51検体）を検査材料とした。

2. 検査項目

小児科定点医療機関の検体は、ノロウイルス、サポウイルス、A群ロタウイルス、アデノウイルスおよびアストロウイルスの5項目、基幹定点医療機関の検体は、A群ロタウイルスおよびC群ロタウイルスの2項目について検査を行った。また、ノロウイルスおよびA群ロタウイルスが陽性となった場合には、さらに遺伝子型別を実施した。

3. 検査方法

1) 核酸抽出

ふん便材料は、PBS(-) (pH7.4: 日水製薬) を加えて10%混濁液を作製し、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10,000 rpm、20分、4°Cで遠心分離を行い、上清140 µLを核酸抽出に供した。直腸ぬぐい液は、ウイルス輸送液を、10,000 rpm、20分、4°Cで遠心分離を行い、上清140 µLを核酸抽出に供した。核酸抽出は、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて行った。

2) リアルタイムRT-PCR

抽出した核酸を鋳型とし、QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN) を用いて、QuantStudio 12K (Applied Biosystems) によるリアルタイムRT-PCRを行った。反応条件は、50°C 30分、95°C 15分の後、94°C 15秒および56°C 1分15秒を45回繰り返した。プライマーおよびプロブは、表1に示すものを使用した。

3) ノロウイルスの遺伝子型別

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を行った (表2)。すなわち、1st PCRのプライマーはGI用にMON432/G1SKRまたはCOG1F/G1SKR、GII用にMON431/G2SKRまたはCOG2F/G2SKRを用いて増幅し、反応条件は94°C 3分の後、94°C 1分、55°C 1分、72°C 1分を40回繰り返す、最終伸長反応は72°C 15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°C 3分の後、94°C 1分、55°C 1分、72°C 1分を35回繰り返す、最終伸長反応を72°C 15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 X Terminator (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、遺伝子型を決定した。

4) A群ロタウイルスの遺伝子型別

抽出した核酸を鋳型とし、PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kit (TaKaRa) を用いてRT-PCRを行った。プライマーは表2のものを使用した。核酸とプライマーの混合物を94°C 5分の熱処理の後に氷冷し、他の試薬を混合しRT-PCRを行った。反応条件は、45°C 10分、94°C 2分の後、98°C 10秒、55°C 15秒、68°C 45秒を45回繰り返した。PCR産物の精製以降は3-3)のノロウイルスと同様に行った。

得られた塩基配列をもとに、米国NCBI (国立生物工学情報センター) のサイトのBLAST

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) を用いて、遺伝子型を決定した。

結果と考察

1. ウイルスの検出状況

リアルタイムRT-PCRの結果、168検体中84検体 (50.0%) から胃腸炎起因ウイルスが検出された。検出年度ごとに比較すると、2019年度は85検体中52検体 (61.2%)、2020年度は32検体中12検体 (37.5%)、2021年度は51検体中20検体 (39.2%) であった。

検出されたウイルスの内訳は、ノロウイルスが40検体 (47.2%) で約半数を占め、次いでA群ロタウイルスが19検体 (22.6%)、サポウイルスが9検体 (10.7%)、アストロウイルスが8検体 (9.5%)、アデノウイルスが4検体 (4.8%)、A群ロタウイルスとサポウイルスの混合感染が2検体 (2.4%)、ノロウイルスとA群ロタウイルスの混合感染とノロウイルスとアストロウイルスの混合感染がそれぞれ1検体 (1.2%) ずつであった。

2019年度の検体数および陽性数は、ほぼ例年通りであったが、2020年度は前年の半数以下であり、全国的にも同様の傾向を示した^{11,12)}。これは、新型コロナウイルス感染症の流行に伴う保育所や学校等の登園・登校自粛や衛生管理への意識向上による感染者数の減少と推察された。2021年度の検体数は、2020年度よりも増加したものの例年の6割程度であり、新型コロナウイルスの流行が引き続き影響していると考えられた。

2. 検出時期ごとの比較

四半期ごとのウイルス検出状況を図1に示した。

検出数の最も多かったノロウイルスは、年間を通して確認されたが、冬季において特に多く検出された。サポウイルス、アストロウイルス、アデノウイルスについても、検出数は少ないものの同様の傾向が見られた。

表1. リアルタイムRT-PCRで使したプライマーおよびプローブ配列

対象ウイルス	プライマー /プローブ名	配列 (5'-3')	引用
ノロウイルスGI	COG1F	CGY TGG ATG CGN TTY CAT GA	文献 5
	COG1R	CTT AGA CGC CAT CAT CAT TYA C	
	RING1-TP (a)	FAM-AGA TYG CGA TCY CCT GTC CA-TAMRA	
ノロウイルスGII	COG2F	CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG	文献 6
	COG2R	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA	
	RING2-TP	FAM-TGG GAG GGC GAT CGC AAT CT-TAMRA	
サポウイルス	SaV124F	GAY CAS GCT CTC GCY ACC TAC	文献 6
	SaV1F	TTG GCC CTC GCC ACC TAC	
	SaV5F	TTT GAA CAA GCT GTG GCA TGC TAC	
	SaV1245R	CCC TCC ATY TCA AAC ACT A	
	SaV124TP	VIC-CCR CCT ATR AAC CA-MGB	
	SaV5TP	VIC-TGC CAC CAA TGT ACC A-MGB	
A群ロタウイルス	JVKF	CAG TGG TTG ATG CTC AAG ATG GA	文献 7
	JVKR	TCA TTG TAA TCA TAT TGA ATA CCC A	
	JVKP	FAM-ACA ACT GCA GCT TCA AAA GAA GWG T-MGB	
C群ロタウイルス	CRV7F	GCT GCA TTT GGT AGT GAC TGY GA	文献 8
	CRV7R	AGT TTC TGT ACT AGC CGG TGA ACA	
	CRV7	FAM-TCT GTC TGT CCA TTA GAT ACT ACA AGT AAT GGA ATY GG-TAMRA	
アデノウイルス	AdhF	CAG GAC GCC TCG GAG TAA	文献 8
	AdhFR	CCA GCG TAA AGC GCA CTT	
	Adh	VIC-TTY GCC CGY GCC AC-MGB	
アストロウイルス	AstF	CAT GGG AAG CTC CTR TGC TAY CA	文献 8
	AstR	GAB AGG CAG TGY TCY ACA	
	Ast	TET-TGC TYG CTG CRT TYA TGG CAG ARG-TAMRA	

表2. RT-PCRまたはRT-nested PCRで使したプライマー

対象ウイルス	領域	プライマー名	配列 (5'-3')	引用
ノロウイルスGI		MON432	TGG ACI CGY GGI CCY AAY CA	文献 5
		COG1F	CGY TGG ATG CGN TTY CAT GA	
		G1SKF	CTG CCC GAA TTY GTA AAT GA	
		G1SKR	CCA ACC CAR CCA TTR TAC A	
ノロウイルスGII		MON431	TGG ACI AGR GGI CCY AAY CA	文献 5
		COG2F	CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG	
		G2SKF	CNT GGG AGG GCG ATC GCA A	
		G2SKR	CCR CCN GCA TRH CCR TTR TAC AT	
A群ロタウイルス	VP7	VP7 F	GGC TTT AAA AGM GAG AAT TTC C	文献 9
		VP7 R	GGG GGT CAC ATC ATA CAA TTC T	
	VP4	con 3	TGG CTT CGC CAT TTT ATA GAC A	文献 10
		con 2	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC	

(検体数)

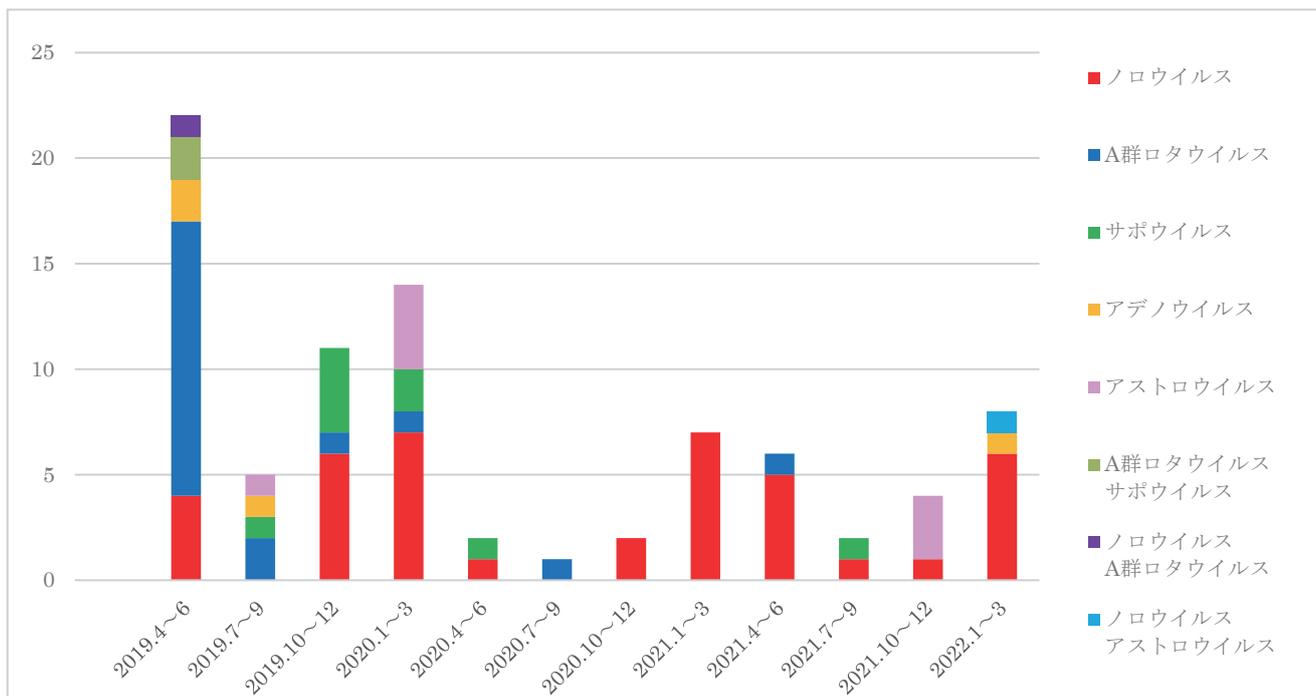


図1. 感染症発生动向調査で検出された胃腸炎起因ウイルスの四半期別の検出状況（2019年度～2021年度），東京都

(検体数)

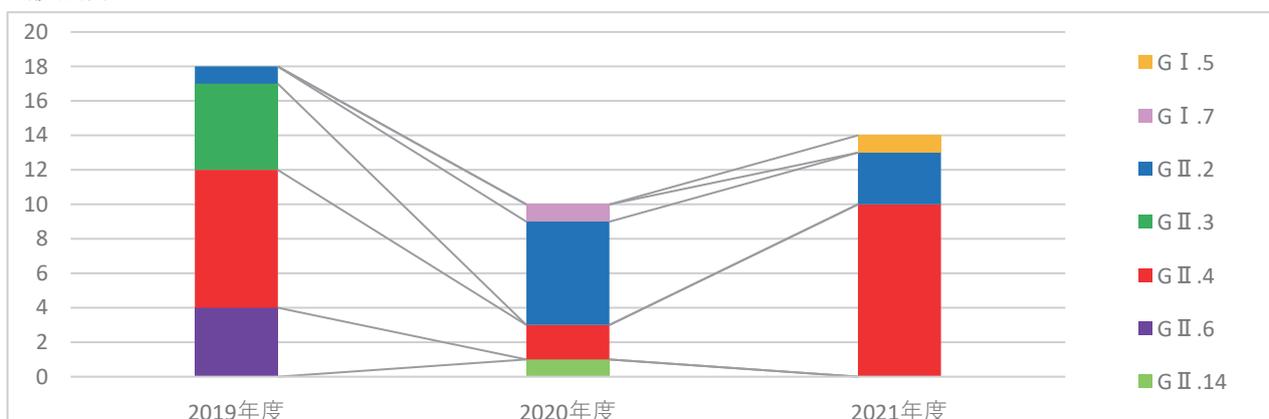


図2. 感染症発生动向調査におけるノロウイルスの遺伝子型別検出状況（2019年度～2021年度），東京都

表3. 感染症発生动向調査で検出されたA群ロタウイルスの遺伝子型別（2019年度～2021年度），東京都

	G1P[8]	G2P[4]	G3P[8]	G4P[5]	G8P[8]	G9P[8]
2019年度	1	1	1	1	10※1	6※2
2020年度	1					
2021年度			1			

※1 混合感染1検体を含む

※2 混合感染2検体を含む

2番目に検出数の多かったA群ロタウイルスは、2019年度については、春から夏に検出数のピークを迎えるという例年通りの傾向を示した¹²⁾。しかしながら、2020年度および2021年度は、1検体ずつのみの検出数であった。A群ロタウイルスの検出数が激減した理由としては、新型コロナウイルス感染症の影響以外に、2020年10月に開始したA群ロタウイルスのワクチンの定期接種化も一因と考えられた。

3. ノロウイルスの遺伝型

ノロウイルスが陽性となった42検体（他のウイルスとの混合感染であった2検体を含む）について、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2つの型（GI.5および7）、GIIは5つの型（GII.2, 3, 4, 6および14）に分類された（図2）。その内訳は、検体数が多い順にGII.4が20検体（47.6%）、GII.2が10検体（23.8%）、GII.3が5検体（11.9%）、GII.6が4検体（9.5%）、GI.5, GI.7およびGII.14が1検体（2.4%）ずつであった。

最も多く検出された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^{13,14)}。今回検出されたGII.4については、すべてGII.4_Sydney_2012に亜型分類された。また、RdRp領域については、20検体中17検体について解析可能であり、すべてGII.4_Sydney [P31]に分類された。

次に多く検出されたGII.2は、2016年後半に全国的なノロウイルス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^{15,16,17)}。GII.2は2016年以降、GII.4と共にノロウイルスの遺伝子型の主流となっている。今回検出された遺伝子型についても、GII.2とGII.4が大半を占めており、ノロウイルスの遺伝子型の流行に大きな変化はみられなかった。

4. A群ロタウイルスの遺伝型

A群ロタウイルスが陽性となった22検体（他のウイルスとの混合感染であった3検体を含む）について、VP7とVP4領域の遺伝子型別を実施したところ、6つの遺伝子型に分類された（表3）。その内訳は、検出数が多い順にG8P[8]が10検体（45.5%）、G9P[8]が6検体（27.3%）、G1P[8]およびG3P[8]がそれぞれ2検体（4.5%）、G2P[4]およびG4P[5]が1検体ずつであった。

A群ロタウイルスの流行株は、国や地域によって異なり、年によっても変化することが知られている¹⁸⁾。ワクチンの導入以前において、世界中で検出される遺伝子型の大半はG1P[8]、G2P[4]、G3P[8]、G4P[8]、G9P[8]の5種類が占めていた¹⁹⁾。しかしながら、近年では、以前は検出数の少なかった遺伝子型や、動物由来と考えられる遺伝子を持つ株などの流行が国内外で報告されている²⁰⁾。また、

2014年以降、従来の流行株とは異なるG8P[8]が日本各地で散発的に報告されている^{21,22)}。今回の報告でもG8P[8]が最も多く検出されており、2011年から導入されたワクチンが影響している可能性がある。今後、ワクチンの普及に伴い、A群ロタウイルスの流行株はさらに変化していくことが予測される。国内外の流行状況と合わせて、引き続き監視していく必要があると考えられた。

まとめ

2019年度から2021年度の東京都感染症発生動向調査において、病原体定点医療機関にて感染性胃腸炎と診断され、当センターに搬入された患者検体についてウイルス検査を実施した。その結果、168検体中84検体から胃腸炎ウイルスが検出された。2020年度以降の検体数および陽性数は、新型コロナウイルス感染症の流行により例年と比較して半減した。検出されたウイルスの内訳は、ノロウイルスが最も多く、冬季を中心に年間を通して検出された。遺伝子型はGII.4やGII.2が大半を占めており、近年におけるノロウイルスの遺伝子型の流行に大きな変化はみられないことが明らかとなった。2番目に多かったA群ロタウイルスは、2019年度は春から夏にかけて検出数のピークが見られたが、2020年度と2021年度は1検体ずつのみの検出数であった。その原因としては、新型コロナウイルス感染症の影響以外に、A群ロタウイルスのワクチンの定期接種化も一因であると考えられた。また、従来の流行株とは異なるG8P[8]が最も多く検出されたことから、A群ロタウイルスの検出状況や遺伝子型の流行の変化について、監視していく必要がある。

文献

- 1) Chhabra, P., de Graaf, M., Parra, G.I., et al.: *J. Gen Virol.*, **100**, 1393–1406, 2019.
- 2) Ruiz-Palacios, G. M., Pérez-Schael, I., Velázquez, F. R., et al.: *N. Engl. J. Med.*, **354**, 11–22, 2006.
- 3) Vesikari, T., Matson, D. O., Dennehy, P., et al.: *N. Engl. J. Med.*, **354**, 23–33, 2006.
- 4) 厚生労働省健康局長：健発0204第5号、「予防接種法第5条第1項の規定による予防接種の実施について」の一部改正について（通知），令和2年2月4日
- 5) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル ノロウイルス（第1版），令和元年6月，<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/Norovirus20190611.pdf>（2022年8月9日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性がある）
- 6) Oka, T., Katayama, K., Hansman, G.S., et al.: *J. Med. Virol.*, **78**, 1347–1353, 2006.
- 7) Jothikumar, N., Kang, G., Hill, V.R., et al.: *J. Virol. Methods.*, **155**, 126–131, 2009.
- 8) Mori, K., Hayashi, Y., Akiba, T., et al.: *Virol. Methods.*, **191**, 141–147, 2013.

- 9) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル ロタウイルス（第2版），令和元年6月，
<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/Rotavirus20190619.pdf>（2022年8月9日現在．なお本URLは変更または抹消の可能性がある）
- 10) Gentsch, J. R., GLASS, R. I., Woods, P., *et al.* : *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 1365–1373, 1992.
- 11) 厚生労働省，国立感染症研究所：感染症週報，**22**，第52・53合併号 令和3年1月18日，
<https://www.niid.go.jp/niid/images/idsc/idwr/IDWR2020/idwr2020-52-53.pdf>（2022年8月9日現在．なお本URLは変更または抹消の可能性がある）
- 12) 浅倉弘幸，永野美由紀，長島真美，他：東京健安研七年報，**70**，57–61, 2019.
- 13) Siebenga, J. J., Vennema, H., Renckens, B., *et al.* : *J. Virol.*, **81**, 9932–41, 2007.
- 14) Eden, J. S., Tanaka, M. M., Boni, M. F., *et al.* : *J. Virol.*, **87**, 6270–6282, 2013.
- 15) 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.
- 16) 植木 洋，小泉 光，菅原直子，他：病原微生物検出情報，**38**，17–18, 2017.
- 17) Hata, M., Nakamura, N., Kobayashi, S., *et al.* : *Jpn. J. Infect. Dis.*, **71**, 319–322, 2018.
- 18) 小林宣道：病原微生物検出情報，**32**，64–66, 2011.
- 19) Santos, N., Hoshino, Y. : *Rev. Med. Virol.*, **15**, 29–56, 2005.
- 20) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報，**40**，202–203, 2019.
- 21) Kondo, K., Tsugawa, T., Ono, M., *et al.* : *Emerg. Infect. Dis.*, **23**, 968–972, 2017.
- 22) 前畑高明，岡村 創，浅沼理子，他：病原微生物検出情報，**40**，207，2019.

**Surveillance of Viral Gastroenteritis in the National Epidemiological Surveillance of Infectious Diseases
Conducted from April 2019 to March 2022 in Tokyo**

Miyuki NAGANO^a, Hiroyuki ASAKURA^a, Yu YAOITA^a, Ai SUZUKI^a, Maya ISOGAI^a, Takushi FUJIWARA^a,
Akane NEGISHI^a, Mamiyo KAWAKAMI^a, Hitoshi ITO^a, Kenshiro KUROKI^a, Shota YOKOTA^a, Yurie KITAMURA^a,
Emiko KAKU^a, Michiya HASEGAWA^a, Hirofumi MIAKE^a, Takashi CHIBA^a, Jun SUZUKI^a,
Mami NAGASHIMA^a, and Kenji SADAMASU^a

Virological tests were performed on the samples obtained from patients with infectious gastroenteritis. Norovirus was the most frequently detected virus and the most commonly detected genotypes were GII.4 and GII.2. Group A rotavirus, particularly the G8P [8] genotype, was frequently detected from spring to summer in 2019. Although the sample size was small, norovirus was regularly detected in April 2020–March 2021.

Keywords: National Epidemiological Surveillance of Infectious Diseases, infectious gastroenteritis, Tokyo, Norovirus, Rotavirus, Sapovirus, Adenovirus, Astrovirus

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan