

短報

神奈川県域で検出された ノロウイルスの解析

片山 丘, 宮原香代子, 古屋由美子

Analysis of norovirus in Kanagawa Prefecture.

Takashi KATAYAMA, Kayoko MIYAHARA
and Yumiko FURUYA

はじめに

ウイルスを原因とする感染性胃腸炎は、ノロウイルスやロタウイルスによる胃腸炎が一般的に知られている。神奈川県域（川崎市、横浜市、横須賀市、相模原市、藤沢市を除いた地域）ではこれらのウイルスの他にアデノウイルス、サポウイルス、アストロウイルスによる胃腸炎も見られている^{1, 2)}。このなかでもノロウイルスを原因とした食中毒や感染性胃腸炎が毎年多数発生しており^{3, 4)}、社会的問題となっている^{5, 7)}。

そこで県域でのノロウイルスの流行状況と流行株との関連および発生地域とノロウイルス流行株との関連を調べるため感染性胃腸炎患者検体から検出されたノロウイルスについて遺伝子の解析を行った。

材料および方法

1. 検査材料

ノロウイルスの流行状況の把握には、平成17年4月から平成20年3月までに小児科定点医療機関から得られた感染性胃腸炎患者便489検体を用いた。また遺伝子解析のためには、定点医療機関からの検体でノロウイルスが検出された142検体の中から33検体とさらに平成17年5月にノロウイルスgenogroup I (G I) が検出された感染性胃腸炎集団発生の2事例から6検体（患者便および調理従事者便）を用いた（表1）。

2. RNAの抽出

便を滅菌リン酸緩衝液で10%乳剤とし、15,000rpm、5分間遠心分離後の上清140 μ lから、QIAamp Viral RNA mini Kit (QIAGEN) を用いて、キット添付のプ

ロトコールに従いRNAを抽出した。

3. ノロウイルスの遺伝子検出

RNA抽出液とDNase I（タカラバイオ）を37°C、30分間反応させた後、Random Hexamer (Amersham) およびSuperScript II RT (Invitrogen) を用いて42°C、1時間の逆転写反応を行いcDNAを作製した。

定量PCRは影山らの方法⁸⁾に従ってTaqMan Universal PCR Master Mix (ABI) を用い、G IはプライマーにCOG1F, COG1R, プロープにRING1-TP(A), RING1-TP(B), genogroup II (G II)はプライマーにCOG2F, ALPF, COG2R, プロープにRING2AL-TPを使用し、G I, G IIについてそれぞれウイルス遺伝子の定量を行った。

4. ノロウイルスのキャプシドタンパク質遺伝子の解析

定量PCRによってノロウイルス遺伝子が検出された検体についてG IはプライマーにCOG1F, G1-SKR, G IIはプライマーにCOG2F, G2-SKRを用いてさらにPCRを行った。得られたPCR産物から1.5%アガロースゲル電気泳動により380bp付近（G I:381bp, G II:387bp）の目的バンドを切り出し、BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit(ABI)を用いて、キット添付のプロトコールに従い、ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer(ABI)により塩基配列の決定を行った。

遺伝子の塩基配列が決定された検体についてはそれぞれG I/1からG I/15, G II/1からG II/18の塩基配列⁹⁾を基にその分布状況をGENETYX-MAC（ゼネティックス）を用いて解析した。

結 果

神奈川県域における感染性胃腸炎患者からの3年間のノロウイルス検出状況は、平成17年度患者100例中23例（鎌倉地域2例、厚木地域1例、小田原地域19例、藤沢地域1例）、平成18年度患者186例中71例（茅ヶ崎地域2例、厚木地域8例、小田原地域61例）、平成19年度患者203例中48例（茅ヶ崎地域3例、厚木地域19例、小田原地域26例）であった（表2）。またgenogroup別検出状況は、平成17年度はG Iが2例、G IIが20例、G IとG IIの混合が1例、平成18年度はG Iが2例、G IIが69例、平成19年度はG Iが5例、G IIが43例であった。各年ともにG IIの流行が起こり、その最後の頃にG Iが散発的に検出された（表3）。

キャプシドタンパク質遺伝子塩基配列から、平成17年度に小田原地域より検出されたG IはG I/8であり、平成17年5月に秦野保健所管内でおこった食中毒事例の患者および調理従事者から検出されたG Iと同時期に厚木保健所管内でおこった集団発生の感染性胃腸炎患者か

ら検出されたG IはともにG I /3であった(図1)。また、平成17年度に鎌倉地域、藤沢地域、厚木地域および小田原地域より検出されたG IIは共にG II /4であった(図2-4)。平成18年度では、小田原地域より検出されたG IはG I /7(図1)、茅ヶ崎地域と厚木地域より検出されたG IIは共にG II /4、小田原地域より検出されたG IIは平成18年5月がG II /2、11月がG II /10であった(図2-4)。平成19年度では、小田原地域より検出されたG Iは平成20年2月の1例がG I /14でその他はG I /4(図1)、茅ヶ崎地域より検出されたG IIは共にG II /4、厚木地域より検出されたG II 3例は平成19年6月がG II /2、7月がG II /13でその他の月はG II /4、小田原地域より検出されたG IIは平成19年4月、20年3月がG II /13でその他はG II /4であった(図2-4)。

考 察

ノロウイルスの検出率(検出数/検査数)は、平成17年度、19年度が共に23%程度であったのに対し、平成18年度は38.2%と増加しており、ノロウイルスの大流行が起こっていたことが伺われる。また、複数年でノロウイルスが検出されている地域を比較すると、茅ヶ崎地域では平成18年度が40.0%、19年度が13.6%であり、小田原地域では平成17年度20.6%、18年度39.9%、19年度19.3%と両地域とも全国的に流行のあった平成18年度⁷⁾に流行があったことが示唆された。また、厚木地域では平成17年度14.3%に比べ18年度32.0%、19年度41.3%と全国的な流行年の後もノロウイルスの流行があったことが示唆された。これらのことからノロウイルスの流行やその動向を把握する上で、小児科定点医療機関からのウイルス検索は大変有意義なものであると考えられる。

今回我々は、県域での流行状況を把握するため感染性胃腸炎患者検体を中心に、各年度の定点地域で検出された全てのノロウイルスG I 検出検体および年度最初に検出されたノロウイルスG II 検出検体、さらに平成19年度に関しては、各定点地域で各月最初にノロウイルスG II が検出された検体を選択し、キャプシドタンパク質遺伝子の解析を行った。晩秋から冬期のノロウイルスG II の流行は各定点地域ともにそのほとんどがG II /4のグループに属する株によるものであり、これらの株が継続的に流行を引き起こし、さらに、春や初夏の散发例はG II /2、G II /10およびG II /13のグループに属する株によるものであることが明らかとなった。ノロウイルスG II は、流行期にはそのほとんどがG II /4に属する株によるもので、流行期以外では他のグループに属する株によるものが、これら遺伝子の解析により見られたことは興味深いことである。

日本国内で全国的に発生しているノロウイルス感染症の流行のほとんどがG II /4のグループに属している株によるものであり⁷⁾、神奈川県域におけるノロウイルスの流行もこれらと同様にG II /4に属するウイルスによるものであることが示唆された。

近年の神奈川県域における感染性胃腸炎集団発生事例を見ると、秋から春にかけてのノロウイルスG II による事例が大問題となるなか、平成17年度のように5月に冬期の流行期とは別のノロウイルスG I による食中毒や感染性胃腸炎の集団発生が散発的に確認されており(表1)、秦野の食中毒事例および厚木の胃腸炎集団発生事例ではG I /3であった。しかしながら県域における定点医療機関からの検体では、ノロウイルスG I の検出は小田原地域のみで、平成17年度はG I /8であった。このことより、県域で少なくとも2種類のノロウイルスG I が散発的に活動していたことが確認された。さらに平成18年度はG I /7、19年度は平成20年2月のG I /14検出を除きG I /4であり、ノロウイルスG I は各年度で同じ株か同じグループに属する株であることがわかった。ノロウイルスG I はノロウイルスG II とは異なり発生年度、発生地域共に共通して継続的に検出されているグループの存在が無く、発生年度や発生地域により散発的に一つの株が発生する傾向が見られ、ノロウイルスG I とノロウイルスG II の流行性の違いであると示唆された。

秦野の食中毒患者2例と調理従事者2例から検出されたノロウイルスG I の遺伝子は同一であったが、厚木の感染性胃腸炎集団発生事例の患者2例とは、340番目の塩基がCとTとで異なるものであった。今回我々が行った塩基配列決定は、クローニングを行っていないPCR産物のダイレクトシーケンスであり、その領域も381bpと短いものであるため、この僅かに一ヶ所の違いで秦野の事例と厚木の事例からの検出株に変異があるとは言い切れず、さらに多くの遺伝子の領域について詳細な検討を行う必要があると考えられた。

今後は解析を行う検体数を増やすとともに他の領域の遺伝子の検討も加えることにより、県域におけるノロウイルスの動向をさらに詳しく探ることが可能であると考えられる。

謝 辞

最後になりましたが、検体および患者情報の収集にご協力いただきました小児科定点医療機関の先生方々に深謝いたします。さらに検体搬入や情報提供にご尽力いただきました各保健福祉事務所、県健康増進課および生活衛生課の方々に深謝いたします。

(平成20年7月28日受理)

文 献

- 1) 伊達佳美, 片山 丘, 古屋由美子: 地域の感染性胃腸炎患者からの原因ウイルス検出状況 (平成16年度, 17年度), 神奈川衛研報告, 36, 51-52 (2006)
- 2) 片山 丘, 宮原香代子, 古屋由美子: 感染性胃腸炎患者からの原因ウイルス検出状況 (平成18年度), 神奈川衛研報告, 37, 75-77 (2007)
- 3) 宮原香代子, 片山 丘, 古屋由美子: 神奈川県におけるウイルス性集団胃腸炎の発生状況 (平成17年度), 神奈川衛研報告, 36, 48-50 (2006)
- 4) 宮原香代子, 片山 丘, 古屋由美子: 神奈川県におけるウイルス性集団胃腸炎の発生状況 (平成18年度), 神奈川衛研報告, 37, 72-74 (2007)
- 5) 食品衛生専門監視班編: 食中毒, かながわの食品衛生, 12, 9 (2008)
- 6) 食品衛生専門監視班編: ノロウイルスを知って防ごう食中毒, かながわの食品衛生, 12, 10-12 (2008)

- 7) ノロウイルスの流行 2006/07シーズン, 病原微生物検出情報, 28, 1-2 (2007)
- 8) 影山努, 小嶋慈之, 福土秀悦, 片山和彦: 蛍光プローブを用いたNorwalk virus (NV) の高感度検出法の開発, Vita, 18, 14-17 (2001)
- 9) Okada, K., Ogawa, T., Kaiho, I. and Shinozaki, K.: Genetic analysis of norovirus in Chiba Prefecture, Japan, between 1999 and 2004. J. clin. Microbiol., 43, 4391-4401 (2005)

表 2 感染症発生動向調査定点からの年度別ノロウイルス検出状況

	定点地域	検体数	ノロウイルス		
			GI	GII	GI&GII
平成17年度	鎌倉	6	0	2	0
	平塚	2	0	0	0
	厚木	7	0	1	0
	小田原	84	2	16	1
	藤沢	1	0	1	0
	年度合計	100	2	20	1
18年度	茅ヶ崎	5	0	2	0
	平塚	3	0	0	0
	厚木	25	0	8	0
	小田原	153	2	59	0
	年度合計	186	2	69	0
19年度	茅ヶ崎	22	0	3	0
	厚木	46	0	19	0
	小田原	135	5	21	0
	年度合計	203	5	43	0
	検査合計	489	9	132	1

表 1 キャプシドタンパク質の塩基配列決定に用いた検体

1-1 定点医療機関症例

検体番号	検体情報				検査結果		
	定点地域	発病年月日	年齢		性別	定量PCR	
			歳	ヶ月		G1	G2
H17-5-Odawara1	小田原	H17.5.21	9		男	+	
H17-5-Odawara2	小田原	H17.5.23	5		女	+	
H17-10-Odawara3	小田原	H17.10.31	32		女		+
H17-12-Atsugi1	厚木	H17.12.15		10	女		+
H17-12-Kamakura1	鎌倉	H17.12.28	1	2	男		+
H18-2-Fujisawa1	藤沢	H18.2.6	1	1	男		+
H18-6-Odawara1	小田原	H18.5.6	13		女		+
H18-11-Atsugi1	厚木	H18.11.4		8	男		+
H18-11-Odawara2	小田原	H18.11.6	31		女		+
H18-11-Chigasaki1	茅ヶ崎	H18.11.22	1		男		+
H19-1-Odawara3	小田原	H19.1.25		10	女	+	
H19-2-Odawara4	小田原	H19.2.22	6	6	女	+	
H19-4-Atsugi1	厚木	H19.4.11	1	8	男		+
H19-4-Chigasaki1	茅ヶ崎	H19.4.17		11	女		+
H19-4-Odawara1	小田原	H19.4.23	1	10	男		+
H19-5-Odawara2	小田原	H19.5.11	0	5	女	+	
H19-6-Odawara3	小田原	H19.6.4	12		女	+	
H19-6-Atsugi2	厚木	H19.6.11	35		男		+
H19-7-Atsugi3	厚木	H19.7.5	2	1	女		+
H19-10-Odawara4	小田原	H19.10.26	1	5	男		+
H19-11-Chigasaki2	茅ヶ崎	H19.11.20	1	9	女		+
H19-11-Atsugi4	厚木	H19.11.25	1	2	女		+
H19-11-Odawara5	小田原	H19.11.29	1	4	女		+
H19-12-Odawara6	小田原	H19.12.1		7	女		+
H19-12-Chigasaki3	茅ヶ崎	H19.12.4		10	男		+
H19-12-Atsugi5	厚木	H19.12.7	2	1	女		+
H20-1-Odawara7	小田原	H20.1.5	72		女		+
H20-2-Atsugi6	厚木	H20.2.3	3	3	女		+
H20-2-Odawara8	小田原	H20.2.4	34		男	+	
H20-2-Odawara9	小田原	H20.2.4	12		女	+	
H20-2-Odawara10	小田原	H20.2.6	4	6	女		+
H20-3-Odawara11	小田原	H20.3.3	8	3	男	+	
H20-3-Odawara12	小田原	H20.3.3	7	7	女		+

1-2 集団事例

検体番号	検体情報				検査結果	
	発生地域	発生年月	発生施設	種別	定量PCR	
					G1	G2
H17-5-Hadano1	秦野	H17.5	飲食店	従事者	+	
H17-5-Hadano2				従事者	+	
H17-5-Hadano3				患者	+	
H17-5-Hadano4				患者	+	
H17-5-Atsugi1	厚木	H17.5	小学校	患者	+	
H17-5-Atsugi2				患者	+	

表 3 茅ヶ崎・厚木・小田原地域3定点からの月別ノロウイルス検出状況

	茅ヶ崎地域		厚木地域		小田原地域		
	GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI&GII
H17.4							
5					2		
6							
7							
8							
9							
10							1
11							
12				1		7	
H18.1						7	1
2						1	
3							
4							
5						1	
6							
7							
8							
9							
10							
11			1		5		8
12					2		22
H19.1		1				1	14
2						1	10
3					1		4
4		1			2		1
5						1	
6					2		1
7					1		
8							
9							
10							1
11		1			2		1
12		1			10		5
H20.1							3
2					2	2	2
3						1	8

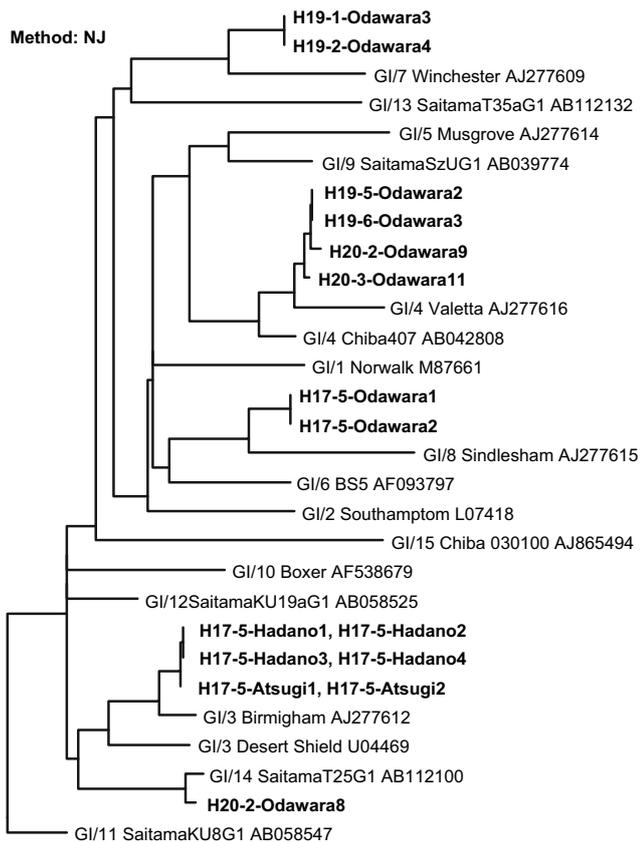


図1 ノロウイルスG I の系統樹

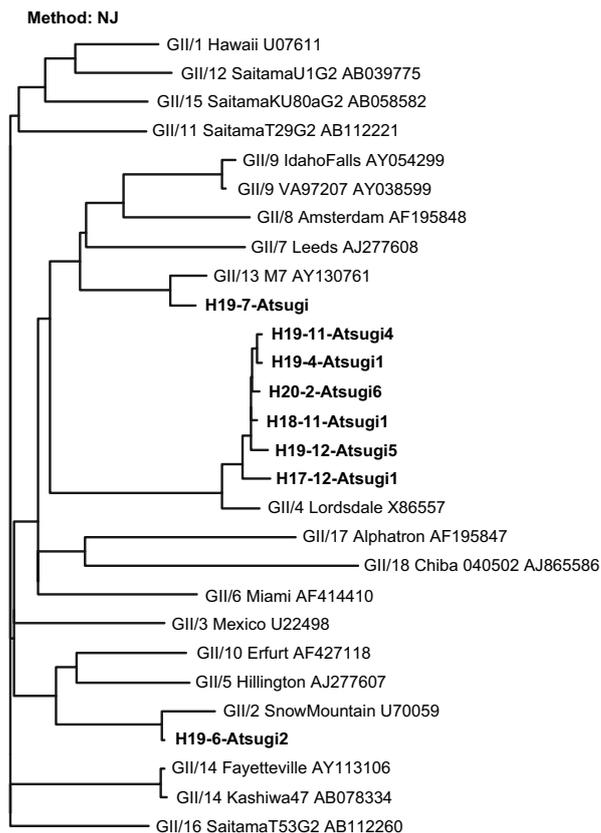


図3 ノロウイルスG II の系統樹 (厚木地域)

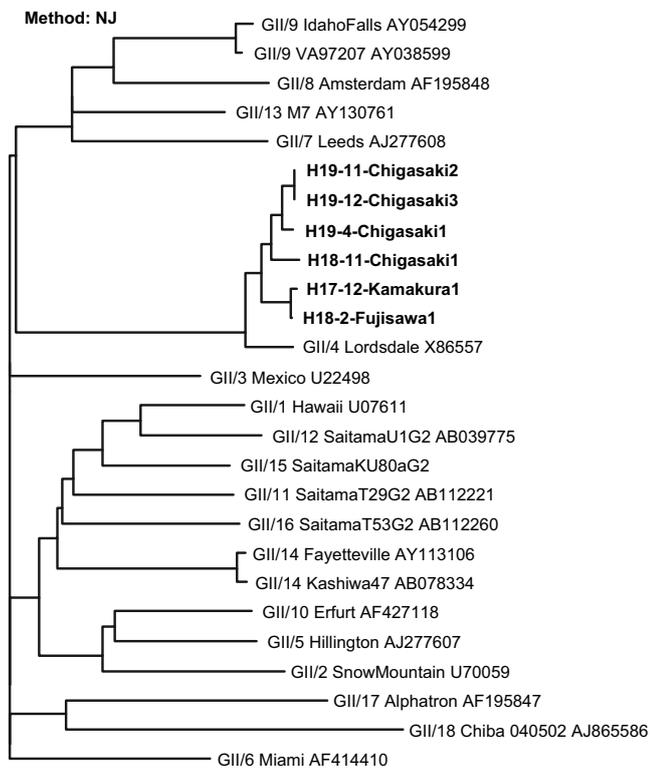


図2 ノロウイルスG II の系統樹 (茅ヶ崎・鎌倉・藤沢地域)

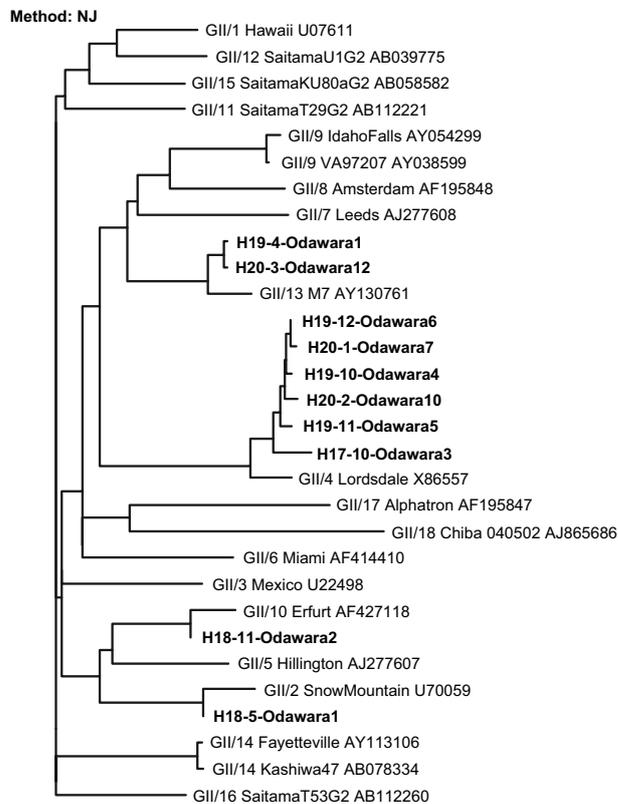


図4 ノロウイルスG II の系統樹 (小田原地域)