

近年の長崎県におけるノロウイルスの検出状況

山下 綾香、三浦 佳奈、松本 文昭、吉川 亮、田栗 利紹

ノロウイルスは、主に感染性胃腸炎や食中毒の原因となる病原体として本邦で最も報告数の多いウイルスのひとつである。平成 26 年 3 月に、これまで世界的に流行していたウイルス株と遺伝子型が異なる新型 GII.P17-GII.17 の流行が神奈川県川崎市で発見されたことを受けて、過去 5 年間に長崎県で発生したノロウイルスの遺伝子型を調査したので、その結果を報告する。過去に検出保存されていた流行株の再検査を実施した結果、新型ノロウイルスに分類される株が長崎県でも確認され、神奈川県での発見から数ヶ月遅れで侵入していたことが明らかとなった。したがって、今後は、ノロウイルスの変異にも注目しながら、流行状況を監視していくことが重要であることがわかった。

キーワード：食中毒、感染性胃腸炎、遺伝子型別、ノロウイルス GII.17

はじめに

近年、これまで世界的に流行していたノロウイルスと遺伝子型が異なる新型が神奈川県で発見されたことを受けて、長崎県で過去 5 年間に検出保存されていたノロウイルス検体の再検査を実施することにより、本県で流行しているノロウイルス株の遺伝子型を調査した。その結果、新型ノロウイルスに分類される株が本県でも確認され、神奈川県での発見から数ヶ月遅れで侵入していたことが明らかとなったので報告する。

ノロウイルスは冬季に多発する感染性胃腸炎の主要な病原体の一つとして知られているが、平成 26 年 3 月にはこれまで世界的に流行していたウイルス株と遺伝子型が異なる新型が神奈川県で発見された。この新型ノロウイルスに対しては、一般的には免疫を持たないヒトが多いことから大きな流行につながる懸念されている。

ノロウイルスは、当初、カキに代表される二枚貝との関係が強かったことから、食品衛生法において、平成 9 年から食中毒の原因物質として追加・集計されてきた。過去 10 年間の食中毒統計において他の病因物質と比較すると、事件数はカンピロバクターと首位を争っており、患者数はその他の病因物質と大きく差をつけて第 1 位である(図 1)。また、本ウイルスは感染性胃腸炎の病原体としても知られており、感染症法において 5 類感染症という疾患に分類されている。本疾患は全国約 3,000 か所の医療機関から報告されており、その患者数の動向はノロウイルスによる食中毒患者数の動向とよく一致することが知られている。そのためノロ

ウイルスを予防するためには、食中毒だけでなく感染性胃腸炎の発生動向を把握しておく必要がある。感染性胃腸炎の患者数は、10 月から増加しはじめ、11 月に急増し、12 月をピークとして 3 月頃まで多発し、1 年をとおして発生している(図 2)。

ノロウイルスはエンベロープを持たない正 20 面体構造をもち、直径 35~40 nm と非常に小さい。遺伝子として 1 本鎖 RNA をもち、そのまわりはカプシドと呼ばれる構造タンパク質で覆われて多くの小突起が認められる(図 3)。本ウイルスの RNA 合成酵素(図 3, RNA dependent RNA polymerase: RdRp)は遺伝子複製の校正機能をもたないことから、特に変異がおこりやすいと考えられており²⁾、場合によっては、その遺伝子からつくられるアミノ酸までもが置換してしまうことから、ウイルスの構造や性質が変化する。前述した新型ノロウイルスは構造タンパク質に加えてこの RdRp に変異が認められており、本ウイルスと特定するためには構造タンパク質の遺伝子(図 3, P ドメイン)だけでなく RdRp を支配する遺伝子の塩基配列を決定しなければならない。

さらに、平成 28 年 4 月 1 日には、厚生労働省より、患者、調理従事者、食品等から検出されたノロウイルスについて、これまで PCR 検査により判定が可能であった遺伝子群の区別(GI, GII 等)だけではなく、遺伝子の塩基配列を決定する遺伝子型(GII.4 等)の検査まで行い、食品衛生法に基づく報告を行う旨の通知があった。

以上のことから、今回、長崎県内のノロウイルスを原因とする食中毒および感染性胃腸炎について、最近 5

年間の発生状況を調査した。加えて、ノロウイルスと同等された検体のうち新型が疑われたウイルス株については、新型ノロウイルス遺伝子の検査方法を新たに導入し、本ウイルスの長崎県への侵淫状況を調査した。新型ノロウイルスは危険性が懸念されていることから、本検査体制の整備および県内流行状況の把握は県民生活における安全な暮らしを守ることに直結し、食品衛生監視などの行政施策とあわせて、ノロウイルス予防への有効な情報として公衆衛生の向上に貢献できる。

調査方法

1 供試したノロウイルス株

平成 23 年 4 月から平成 28 年 3 月までに、ノロウイルスによる食中毒および感染症胃腸炎の疑いで環境保健研究センターに検査依頼された事例を調査した。搬入された便、嘔吐物および食品について、標準法³⁾により RNA を抽出し、RT-PCR を行った。さらに、ノロウイルス陽性と判定された 213 株を用いて、増幅核酸領域の塩基配列を決定し、ノロウイルス型の解析を行った。

2 検体からの RNA 抽出方法、RT-PCR およびシーケンシング

検体を PBS (-) で約 10% 懸濁液とし、10,000 rpm で 15 分間遠心分離した上清から RNA 抽出キット (QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAGEN) を用いてウイルス RNA の抽出を行った。抽出した RNA は DNA 分解酵素で処理した後、RNA 用 PCR 検査キット (QIAGEN OneStep RT-PCR Kit, QIAGEN) を用いてノロウイルス遺伝子の構造タンパク質遺伝子 (図 3, P ドメイン) を増幅した。PCR 増幅用のプライマーとして、GI 群ノロウイルスの検出には GI 検出用プライマー対 (COG1F/G1SKR, 標準法で指定) を GII 群ノロウイルスの検出には GII 検出用プライマー対 (COG2F/G2SKR, 標準法で指定) を用いた。食品検体に関しては超遠心法を用いて濃縮し RNA 抽出後、DNA 分解酵素処理、および RNA 用 PCR 検査を行った。PCR を行った後、アガロースゲル電気泳動により増幅バンドが確認されたものについてダイレクトシーケンスを行い、ノロウイルス型別決定用ソフト (Norovirus genotyping tool) を用いて遺伝子型別した。

ノロウイルスの型別標記方法はノロウイルス専門委員会により開発された新たな遺伝子型分類法によった。

新規分類法はノロウイルスの流行様式の探求のために、これまで一般的であった構造タンパク質の遺伝子配列に基づいて型別するだけでなく、ウイルス染色体上に位置する非構造タンパク質の遺伝子配列を反映させたことに特徴がある。このことにより、本方法は、これまで型別が不能であったノロウイルスの遺伝子組換えによる変異にも対応することができ、H18/H19 シーズンと H24/H25 シーズンに大流行したノロウイルス GII.4 の亜型株を分別することができる。この遺伝子型分類方法は、国際ノロウイルスワーキンググループに継承され、Koopmans らのノロウイルス遺伝子型別用ソフトによって Web 上で提供されている。なお、本分類法によるウイルス型の標記はグループごとの RNA 酵素遺伝子型を前に頭文字 P をつけて記載し、グループごとの P ドメイン遺伝子型を後につけてハイフンでつなぐ。例えば新型ノロウイルスは GII グループの RdRp が 17 型、GII グループの P ドメインが 17 型と同等され、GII.P17-GII.17 のように標記する (図 3)。

3 RNA 合成酵素の遺伝子型別解析

今回、GII.17 と同等された検体に関してはより詳細に解析した。抽出 RNA を相補的 DNA (cDNA) に置換し、DNA ポリメラーゼ (Ex Taq Hot Start Version, TaKaRa) を用いてノロウイルス遺伝子の RNA 合成酵素 (RdRp) 遺伝子を増幅した。PCR 増幅用のプライマーとして Yuri22F/G2SKR を用いた³⁾。PCR を行った後、アガロースゲル電気泳動により増幅バンドが確認されたものについてダイレクトシーケンスを行い、ノロウイルス遺伝子型別用ソフトを用いて遺伝子型別したのち系統樹解析を実施した。系統樹推定は近隣結合法 (NJ 法) で行った。

結果及び考察

1 ノロウイルスの流行状況

平成 23 年から平成 27 年にわたるノロウイルスの遺伝子型別ごとの発生動向を図 4 に示す。長崎県において平成 26 年までは GII.4 が主に検出されていたが、同年末から翌年にかけて GII.17 が検出されはじめた。平成 27 年には GII.17 の占める割合が増えていたが、GII.4 の検出もやや減少傾向にあるものの続いており、全国と比較において大きな違いは認められなかった (図 4)。

2 新型ノロウイルスの流行状況

新分類法に基づくノロウイルスの遺伝子型別解析を行ったところ、標準法により構造蛋白質の遺伝子型が GII.17 に分類された株は全て新型ノロウイルス GII.P17-GII.17 に分類された。また、事例ごとに 1 検体選出し、系統樹を作成したものを図 5 に示した。拡大図は、長崎県において検出された新型ノロウイルスが属しているグループを示すが、これらのウイルスは、全て、川崎市にて平成 26 年と平成 27 年に検出された新型ノロウイルスと同じグループを形成していたことが明らかとなった(図 5 拡大図)。

国内では、H26/H27 シーズンに長野県、埼玉県、栃木県など関東近隣で新型ノロウイルスが流行していたことが確認されたほか⁴⁾、三重県でも検出されており⁵⁾、全国的に流行していることが推察される。また、世界的な動向を見ても、平成 26 年 12 月まで世界の主流であった GII.4 が減少に転じ、GII.17 は、我国だけでなく、中国の広東省⁶⁾、欧州や米国でも散発的に検出されており⁷⁾、世界的な広がりを見せている。

今後、本ウイルスが国内において主要な流行株となる可能性があることから、来シーズン以降においても新型ノロウイルスの動向には十分な注意が必要と考えられる。

謝 辞

本調査を遂行するにあたり、種々の情報を提供していただいた長崎県生活衛生課、長崎市保健環境試験所、長崎市、佐世保市及び長崎県立各保健所の関係

各位に深謝する。

参 考 文 献

- 1) 牛島廣治ら, カリシウイルス. ウイルス, 61, 193-204, 2011.
- 2) 野田衛, ノロウイルス食中毒・感染症からまもる, 公益社団法人日本食品衛生協会.
- 3) 厚生労働省通知, ノロウイルスの検出法について, 平成 19 年 5 月 14 日食安監発第 0514004 号.
- 4) 新規遺伝子型ノロウイルス GII.P17-GII.17 の流行, IASR, 36, 175-178, 2015.
- 5) ノロウイルス GII.17 型の流行とその特徴について - 三重県, IASR, 36, 91-92, 2015.
- 6) Jing Lu *et al* : Gastroenteritis Outbreaks Caused by Norovirus GII.17, Guangdong Province, China, 2014-2015, Emerg Infect Dis, 21, 1240-1242, 2015.
- 7) Gabriel I Parra *et al* : Genome of Emerging Norovirus GII.17, United States, 2014, Emerg Infect Dis, 21, 1477-1479, 2015.
- 8) M de Graaf *et al* : Emergence of a novel GII.17 norovirus - End of the GII.4 era? Eurosurveillance, 20, Issue 26, 2015.

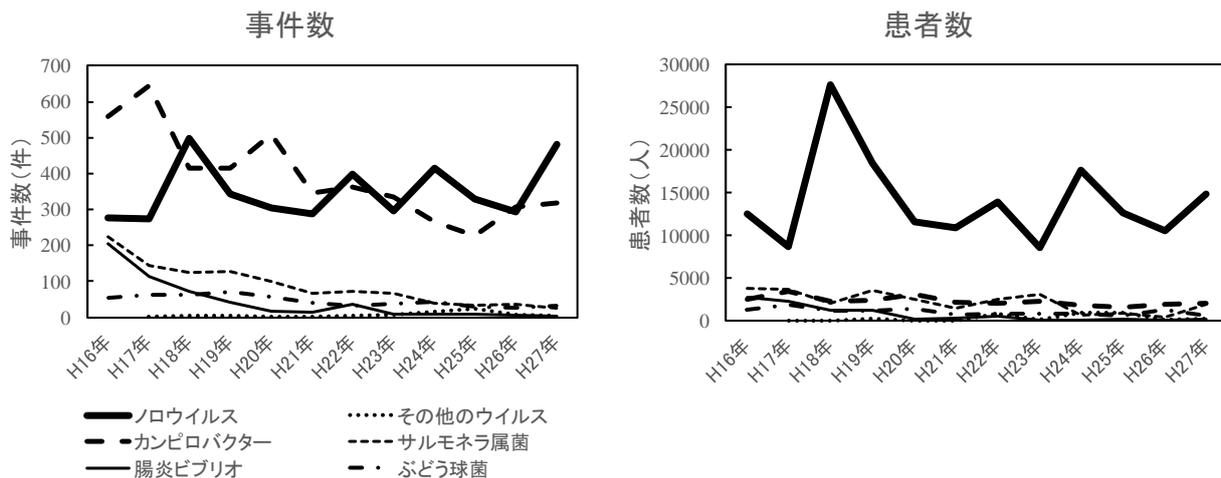


図1 病因物質別食中毒事件の年次別の事件数と患者数
厚生労働省食中毒統計を基に集計。

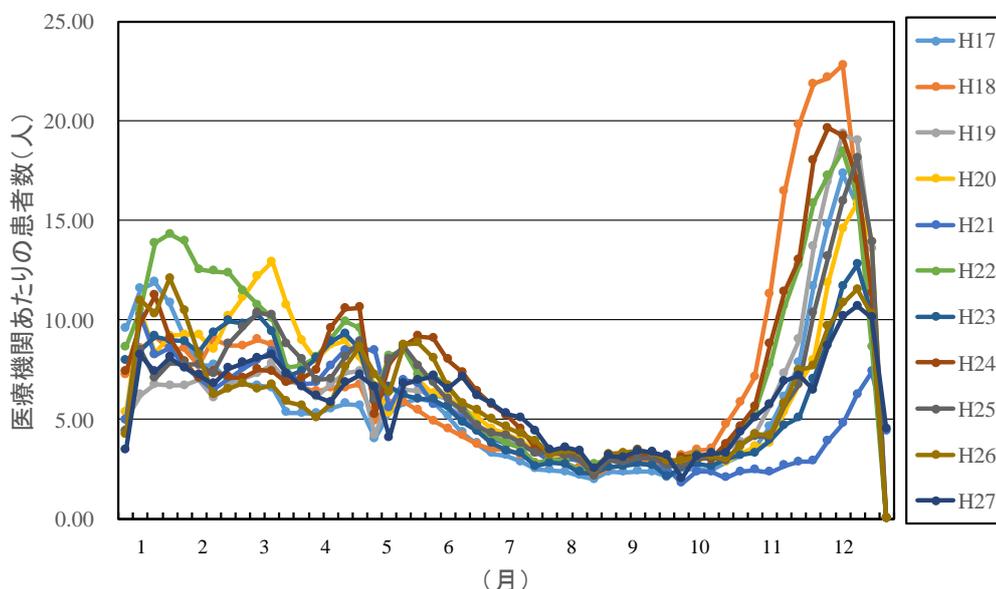


図2 感染性胃腸炎の発生動向
全国約 3000 の医療機関から得られた感染性胃腸炎患者数の推移。
感染症発生動向調査のデータを一部改変。

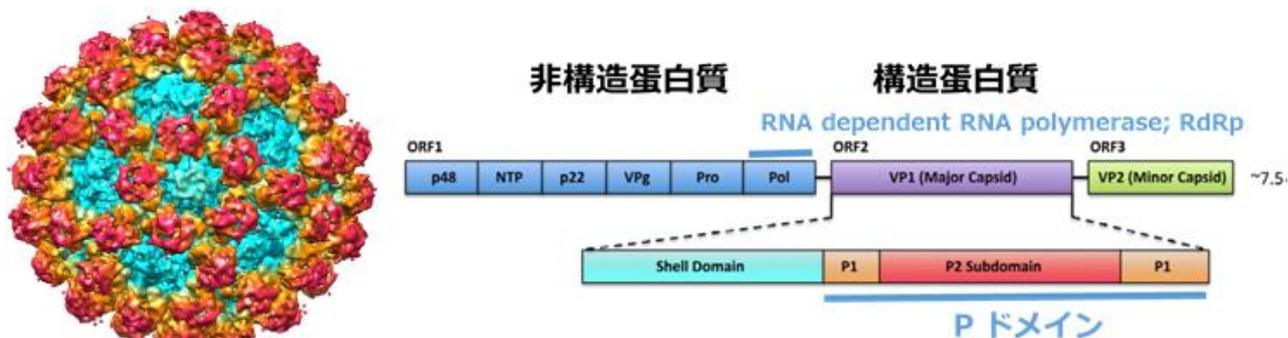


図3 ノロウイルス カプシドの構造と遺伝子地図

カプシドは非構造タンパク質(S)と構造タンパク質(P1、P2)の 3 つの領域から構成されている。右図は対応する遺伝子地図を示す。新型ノロウイルスを同定するためには、構造タンパク質の遺伝子配列(P1、P2)だけでなく非構造タンパク質に含まれる RNA ポリメラーゼ (RdRp) の遺伝子配列を決定する必要がある。牛島らの論文から引用。¹⁾

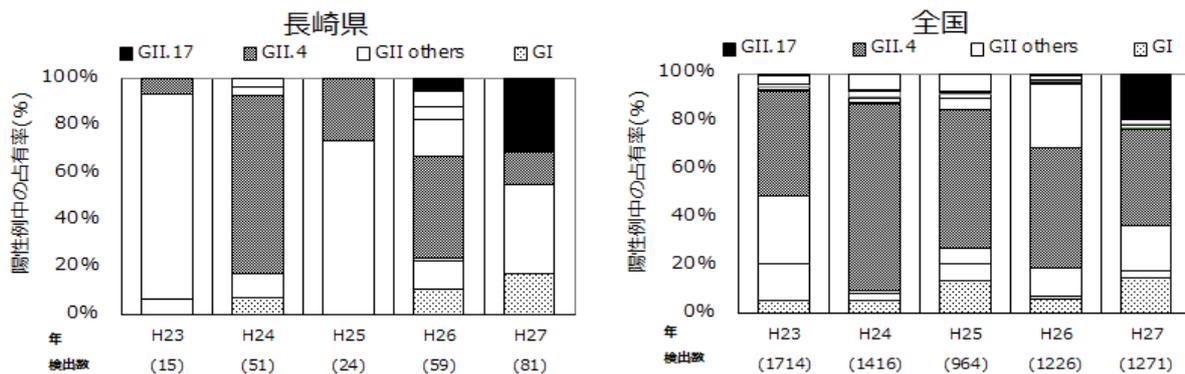


図4 ノロウイルスの遺伝子型別の推移

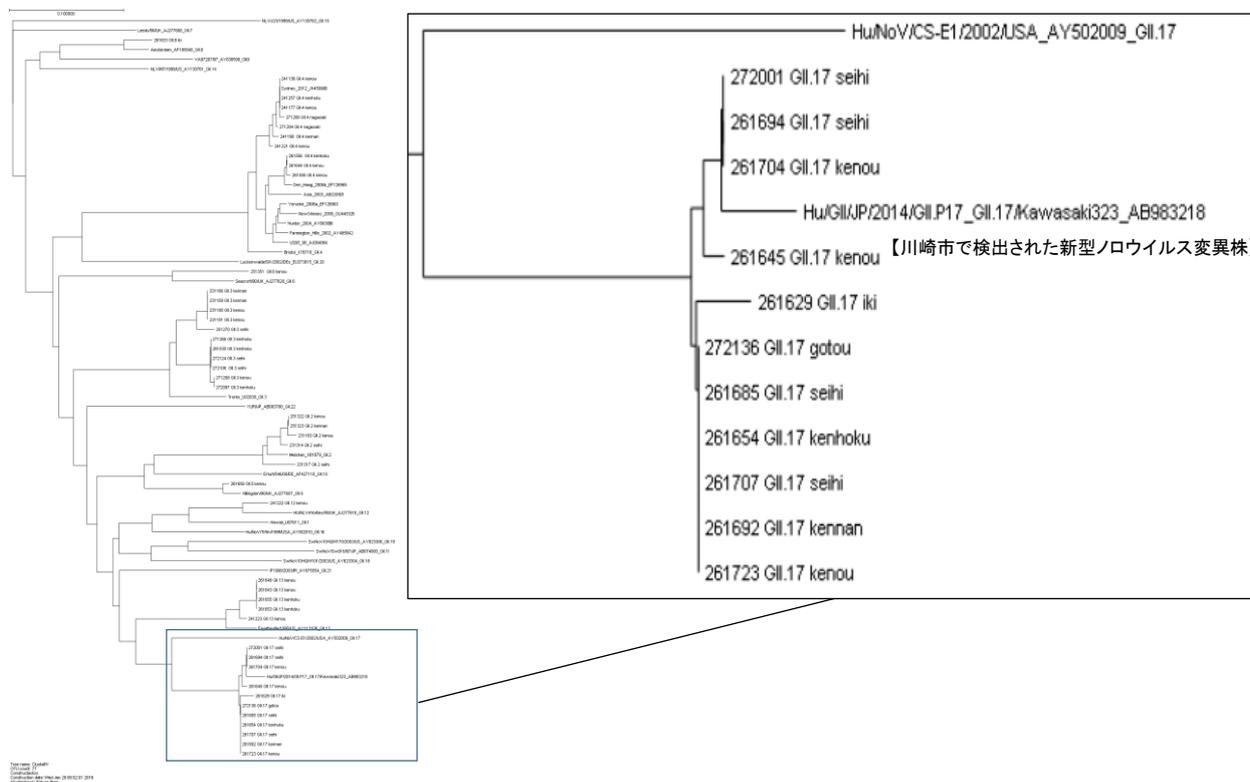


図5 長崎県内で検出されたノロウイルスの系統樹解析
 拡大図は新型ノロウイルス(GII.P17- GI.17)に分類される部分, 近隣結合法(NJ法)

Detection and Molecular Characterization of Norovirus during Past Five Years in Nagasaki, Japan

Ayaka YAMASHITA, Kana MIURA, Fumiaki MATSUMOTO, Akira YOSHIKAWA and
Toshitsugu TAGURI

Norovirus is one of the most commonly reported viruses causing food poisoning or infectious gastroenteritis in Japan. In March 2014, the emergence of new strains of Norovirus GII.P17-GII.17 was reported in Kawasaki, Kanagawa prefecture. Therefore, we investigated genotype of the Norovirus strains detected in Nagasaki prefecture during the past 5 years. As a result of the retrospective study, the Norovirus GII.P17-GII.17 strains were also emerged and identified in Nagasaki, and it suggests that the new type Norovirus invaded Nagasaki prefecture in a few months after occurrence in Kanagawa. Therefore, we found out that it is important to be monitoring the epidemic situation while also focusing on norovirus mutation from now on.

Key words: Food poisoning, Infectious gastroenteritis, Genotyping, Norovirus GII.17