

## 2006年5月～2008年4月に広島市で流行した ノロウイルスG /4の分子疫学について

阿部 勝彦 国寄 勝也 島本 琢士\*1 国井 悦子 山本美和子  
伊藤 文明 野田 衛\*2 池田 義文 笠間 良雄

2006年5月～2008年4月に発生した食中毒,有症苦情事例,集団感染症事例等52事例からノロウイルス(以下「NV」)が検出され,そのうちG /4は45件であった。NVの遺伝子解析にはこれまで厚労省通知<sup>1)</sup>にあるORF2上流の保存領域での解析を行ってきた。今回、ORF2の可変領域の解析を行ったところ、保存領域では同一配列株と思われたG /4が可変領域では異なるクラスターに分類される株であることがわかった。また、流行株は3～4ヶ月の間で移り変わっていた。

キーワード： 2006/07シーズン, 2007/08シーズン, ノロウイルス, GII/4

### はじめに

NVは小児散発性感染性胃腸炎の主要原因ウイルスであるとともに,集団感染症・食中毒等の胃腸炎集団事例の最も重要な原因ウイルスである。2006年10月からNVがわが国で大流行し,遺伝子解析の結果,原因NVの多くがGII/4であったことが明らかにされている<sup>2),3)</sup>。

一方,広島市においては,2006年5月から10月の非流行期にNVによる集団感染症や食中毒が継続的に発生し,検出NVのG2-SKF/G2-SKRで増幅されるORF2上流の保存領域(以下「保存領域」)について遺伝子解析を行ったところ,ほぼ同一のGII/4が検出され,3群のクラスターに分類された<sup>4)</sup>。しかし,そのうちの2つのクラスターをアミノ酸配列で比較すると100%同一であった。そこで今回,NV株間の違いをより詳しくみる目的でNV遺伝子の中で最も異なっているとされる<sup>5)</sup>ORF2のP2ドメイン領域(以下「可変領域」)の遺伝子解析を行った。

### 方法

#### 1 調査対象事例

2006年5月～2008年4月に当所において,食中毒,有症苦情,集団感染症等の原因究明のため,患者および従事者等の糞便・嘔吐物のウイルス検査を実施し,NVが検出された52事例を対象とした。

#### 2 NVの検出と遺伝子型別

NV検出は,Ka gyamaら<sup>6)</sup>のリアルタイムPCR法で行い,陽性検体について保存領域の増幅産物(282bp)をダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し,Katayamaら<sup>7)</sup>の参照株を用いたクラスター分類を行った。

#### 3 G /4株の可変領域での遺伝子解析

検出されたNVがG /4に分類された事例から1～2検体を可変領域プライマー(G -5a / G -2Ra<sup>8)</sup>)を用いてPCRを実施後,増幅産物(571bp)をダイレクトシーケンス法により解析した。

### 結果

#### 1 NV集団発生事例発生状況

2006年5月～2008年4月に発生した食中毒,有症苦情,集団感染症等52事例からNVが検出され,クラスター分類の結果,G /4が45件,G /2が1件,G /3が1件,G /9が1件,G /13が1件,G /4が1件,G /8が2件であった(表1)。

#### 2 G /4の系統樹解析とその検出状況

##### (1) 保存領域

保存領域の解析の結果,アミノ酸配列で大きく3つのクラスターに分類され,塩基配列で1塩基の違いまで見ると,9つに細分類された(図1:アミノ酸配列が同じものを1～3,その中で塩基配列の違いがあるものは発生順にa～eと示した)。図3に発生年月順に1a～1e,2a～2b,3と塩基配列型別に事例を示した。1bは2006年6月から2008年2月まで継続して流行し,1cは2006年9月から

\*1: 現 水道局水質管理課

\*2: 現 国立医薬品食品衛生研究所

表 1 NV 集団発生事例の保存領域、可変領域での解析結果

事例名	初発日	保存領域			可変領域	
		確認数	遺伝子型	塩基配列型	確認数	塩基配列型
20616/ 富山旅行	06/5/11	患者3		1a	患者1	1A
20618/ 小学校	06/5/17	患者3	G /9	NT	NT	
20620/ 高齢者施設	06/5/20	患者2		2a	患者1	2A
20622/ 運動会	06/6/3	患者4	G /2	NT	NT	
20623/ 高齢者施設	06/6/9	患者3		1b	患者1	3
20624/ 高齢者施設	06/6/22	患者3		1b	患者1	3
20625/ 葬儀場会食(食中毒)	06/7/1	患者3,従事者2		1b	患者1	3
20626/ 高齢者施設	06/7/6	患者3		1b	患者1	3
20627/ 学習塾の寮(食中毒)	06/7/22	患者4,従事者1		2b	患者1	2B
20629/ 病院	06/9/15	患者3		1c	患者1	4A
20630/ 家庭内	06/9/25	患者3		1c	患者1	4A
20631/ 高齢者施設	06/9/29	患者4		1c	患者1	4A
20632/ 高校の寮	06/9/30	患者3		1c	患者1	4A
20633/ 高齢者施設	06/10/1	患者3		1c	患者1	4B
20634/ 弁当屋(食中毒)	06/10/6	患者3,従事者1		1c	患者1	5
20634-2		従事者1		1b	-	
20635/ 家庭内	06/10/11	患者1		1b	患者1	5
20636/ ホテル	06/10/13	患者5,従事者1		1c	患者1	4C
20638/ 病院	06/10/17	患者1		1c	患者1	4D
20639/ 病院	06/10/25	患者1		1c	患者1	4A
20640/ 病院	06/11/4	患者2		1c	患者1	4E
20641/ 高齢者施設	06/11/10	患者1		1c	患者1	6A
20642/ 病院	06/11/7	患者1		1c	患者1	6B
20643/ 高齢者施設	06/11/12	患者1		1d	患者1	4A
20644/ 高齢者施設	06/11/9	患者1		1c	患者1	4C
20646/ 病院	06/11/9	患者1		1c	患者1	6B
20647/ 高齢者施設	06/11/14	患者1		1c	患者1	4E
20648/ 高齢者施設	06/11/22	患者1		1c	患者1	4F
20650/ 病院	06/11/21	患者1		1c	患者1	4F
20655/ 高齢者施設	06/12/1	患者1		1c	患者1	4G
20658/ 小学校	06/12/5	患者1	G /13	NT	NT	
20660/ 高齢者施設	06/12/15	患者1		1b	患者1	1B
20709/ 高齢者施設	07/3/9	患者2		1e	患者1	7
20712/ 結婚式場	07/3/31	患者2		1b	患者1	8
20725/ 家庭内	07/8/26	患者2	G /3	NT	NT	
20727/ ホテル	07/9/30	患者5,従事者1		1b	患者1	9A
20728/ 病院	07/10/3	患者2		1b	患者1	9A
20738/ ホテル	07/12/16	患者6		1a	患者1	9B
20740/ 高齢者施設	07/12/23	NT		NT	患者1	10
20801/ 弁当屋(食中毒)	08/1/9	患者7,従事者2		1b	患者1	11A
20801-2		従事者1		1b'	従事者1	11A
20802/ 病院	08/1/3	患者2		1b	患者1	11B
20804/ 高齢者施設	08/1/8	NT		NT	患者1	11A
20805/ 東京依頼	08/1/13	NT		NT	患者1	12A
20807/ 有症苦情	08/1/28	患者1	G /4	NT	NT	
20808/ 高齢者施設	08/2/1	NT		NT	患者1	13
20809/ 東京依頼	08/1/30	NT		NT	患者1	12B
20810/ サッカー大会	08/2/11	患者2		1b	患者1	11A
20814/ 少年野球	08/2/25	患者2	G /8	NT	NT	
20815/ ホテル(食中毒)	08/3/5	NT		NT	患者1	12C
20816/ 飲食店(食中毒)	08/3/4	NT		NT	患者1	1C
20817/ 高齢者施設	08/3/15	NT		NT	患者1	14
20819/ 広島県依頼	08/3/24	患者1	G /8	NT	NT	
20823/ 高齢者施設(食中毒)	08/4/25	患者1		3	患者4,従事者2	1D

\*07年12月以降は保存領域での解析を実施していない事例がある。遺伝子型欄の空白部分は G / 4。

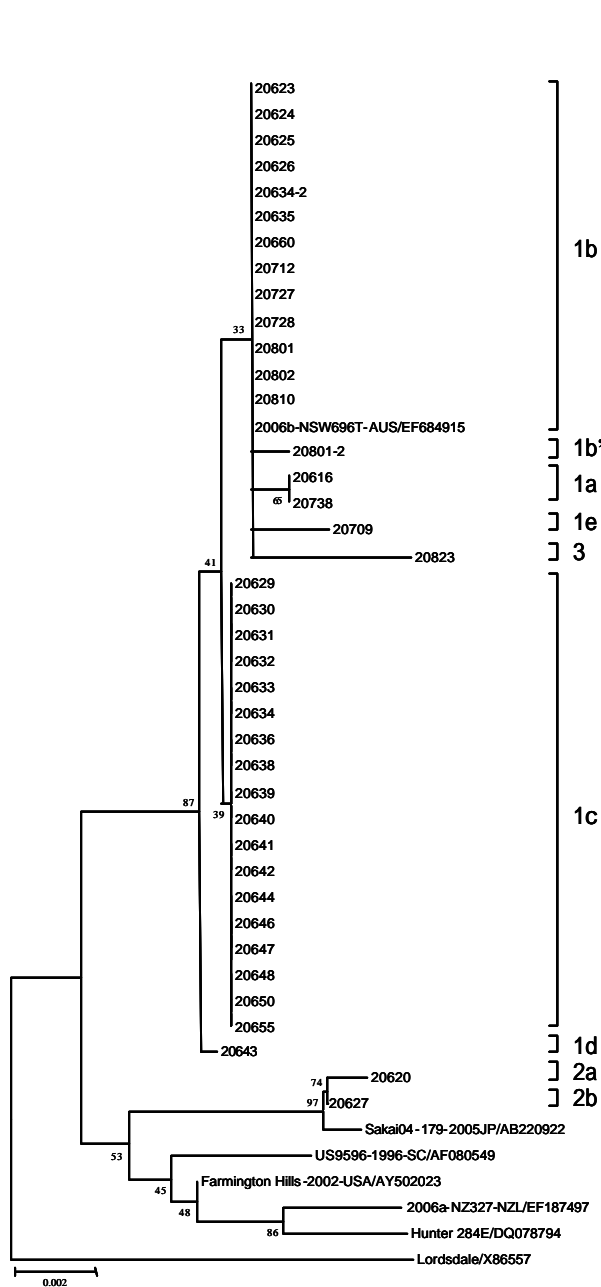


図1 保存領域の塩基配列での系統樹

12月までの一時期に大流行しているように見えた。しかし、アミノ酸配列では1a~1eは100%同じ配列であった。

(2) 可変領域

可変領域の解析を行った結果、アミノ酸配列で大きく2006bとSakai04の2つのクラスターに分類された。アミノ酸配列でさらに細かく14のサブタイプに分かれ、塩基配列ではさらに細分類された(図2:アミノ酸配列が同じものをサブタイプとして1~14とした)。アミノ酸配列での14のサブタイプ別に発生年月順に事例を図4に示した。1型を除く2~14サブタイプはいずれも1~4ヶ月の

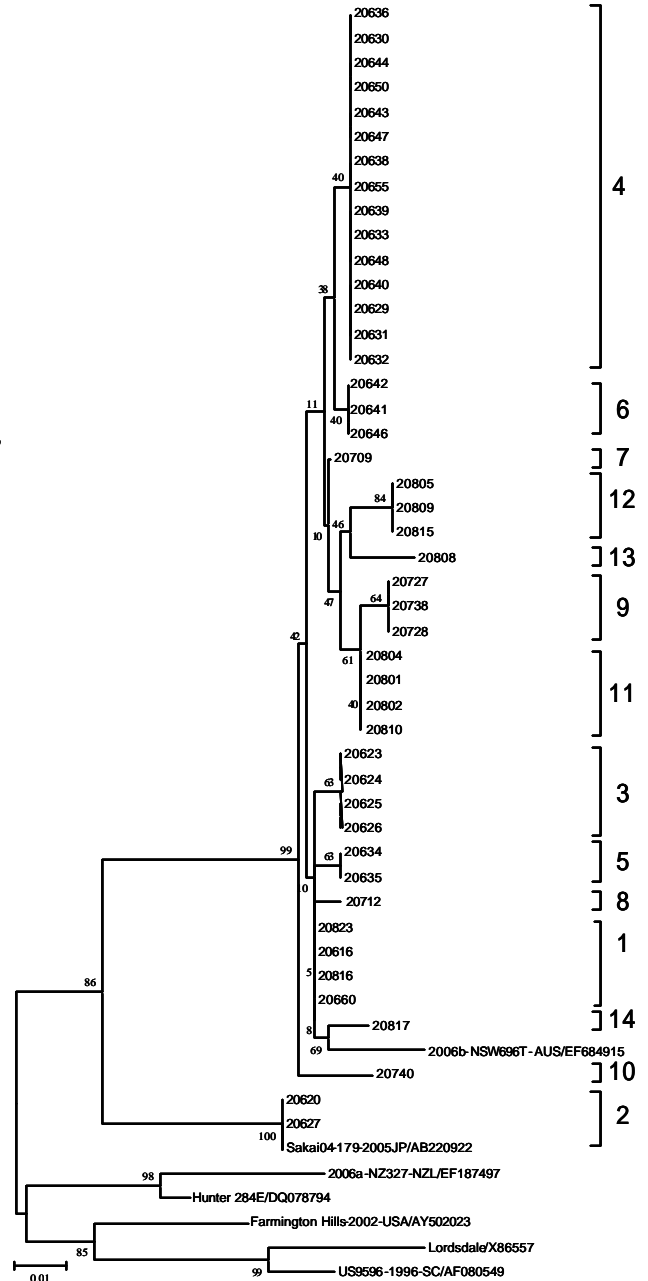


図2 可変領域のアミノ酸配列での系統樹

発生で終わり、別のサブタイプと入れ替わっていた。保存領域での塩基配列型と、可変領域でのアミノ酸配列に基づくサブタイプとを比較したところ、保存領域で100%同一の塩基配列であった株が可変領域では異なるアミノ酸配列、塩基配列をもつことが分かった(図5)。具体的には保存領域1aは可変領域では1と9に、保存領域1bは可変領域では1,3,5,8,9,11の6種に、1cは4,5,6,に分類された。また、保存領域1a,1b,3は可変領域では全て1であった。同様に2a,2bは2に、1cの一部と1dは4に、1bの一部と1cの一部は5に、1aの一部と1bの一部が9に、1bの一部と1b'は

塩基配列型	2006年												2007												2008					
	5月	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4						
1a	20616																							20738						
1b		20623	20625			20634-2				20660					20712										20801					
		20624	20626			20635												20727	20728						20802	20810				
1b'																									20801-2					
1c												20440																		
												20441																		
												20442																		
												20443																		
												20444																		
												20445																		
												20446																		
												20447																		
1d																														
1e																														
2a	20620																													
2b																														
3																													20823	

図3 保存領域での分類に基づく月別事例発生状況

塩基配列型	2006年												2007												2008				
	5月	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4					
1	20616																												
2	20620																												
3																													
4																													
5																													
6																													
7																													
8																													
9																													
10																													
11																													
12																													
13																													
14																													

図4 可変領域での分類に基づく月別事例発生状況

		可変領域 (アミノ酸配列型)											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
保存領域(塩基配列型)	1a	1										1	
	1b	1		4		1			1	2		3	
	1b'												1
	1c				14	1	3						
	1d				1								
	1e							1					
	2a			1									
	2b			1									
	3	1											

図5 保存領域での塩基配列型と、可変領域でのアミノ酸サブタイプとの比較

11に分類された。

一事例で複数の検体を解析した 20801 弁当屋食中毒事例の患者便と従事者便由来の NV は保存領域では 1b と 1b' と 1 塩基異なる配列であったが、可変領域では同じ塩基配列 11A であった(表 1)。また、20823 の高齢者施設での食中毒事例は 6 人の患者便由来の NV を解析したが塩基配列は全て 1D であった。

塩基配列の異なる株をアミノ酸配列のサブタイプでまとめ異なる塩基の site だけを抜き出して

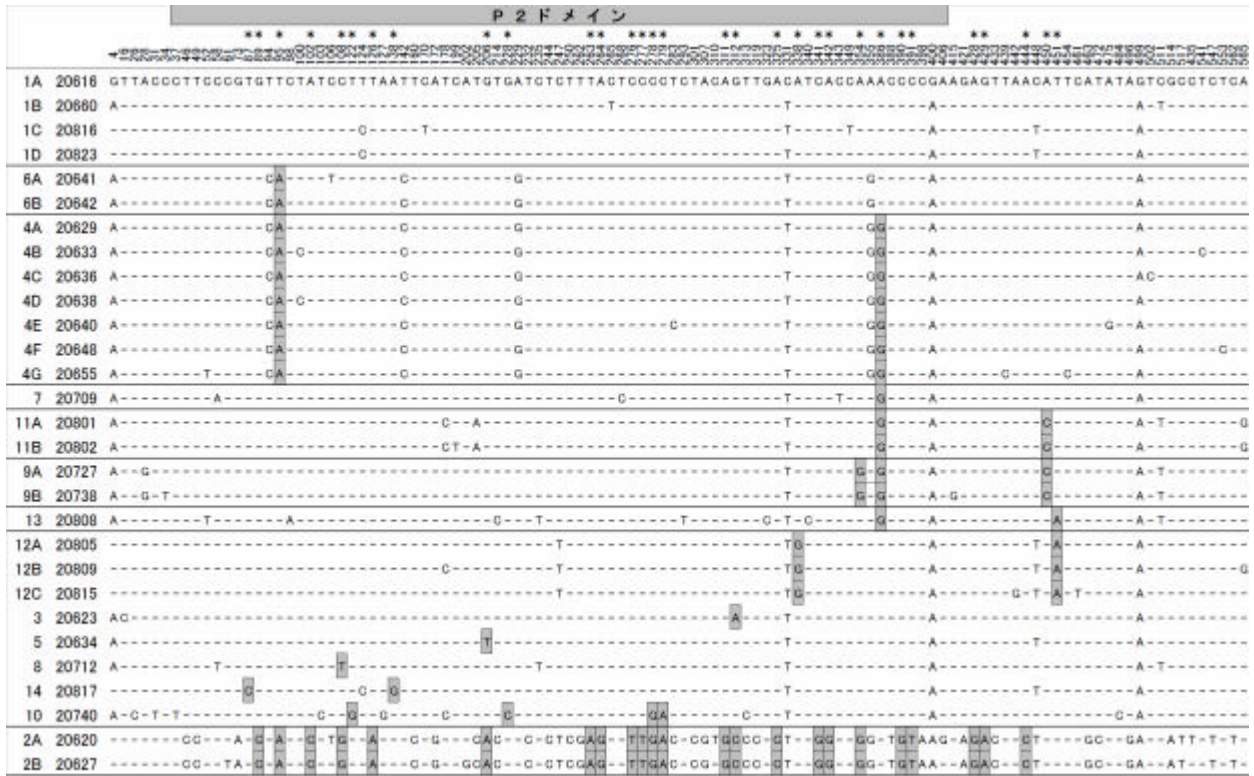


図 6 可変領域塩基配列の比較

上段の数字は Forward Primer からの塩基数, \* は非同義変異の site を示す。20616 株と比較して, 同じ塩基は「-」, 非同義変異は四角で囲んだ。

比較した(図 6)。20616 株と比較して, 同義変異と非同義変異を示した。この図から, サブタイプ 4 と 6 は発生時期が近く, 配列もよく似ており, 大きな違いは塩基 386 番目の G から A への非同義変異であった。サブタイプ 1 は 2006 年 5 月, 同年 12 月, 2008 年 3 月, 4 月と 3 シーズンに渡り発生が起きており(図 4), その違いをみると, 塩基配列の同義変異は何ヶ所も起きているが, アミノ酸配列は同じであった(図 6)。

考 察

これまで当所では NV 事例の際に, 保存領域の塩基配列を解析し, 疫学解析の補助的手段として利用してきた。保存領域でのリアルタイム PCR やダイレクトシーケンスは, これまでわかっているほぼ全ての G と G を検出し, 配列決定できるメリットがあると考えられる。しかし, G /4 が事例の大半を占める事態が続いている現在は, 保存領域でのシーケンスにはあまり意味がないようであった。例えば, 保存領域では 100% 同一の塩基配列の NV(図 3 の 1b) が 3 年間にわたり, 流行が続いていると判断していた。しかし, 変異がほとん

どなく, アミノ酸レベルでは変わらない NV がいつまでも流行していることが不思議であった。また, 同一事例内でたった 1 塩基異なる配列をもつ NV が従事者から出たときは事例との関連性について判断に苦慮した。

今回, 疫学解析のために, 最も変異に富むといわれる P2 ドメインを含む可変領域で解析を行った。その結果, アミノ酸配列で 14 のサブタイプに分けることができた。それらのサブタイプは発生時期により別のサブタイプに変わっていき, 同じサブタイプが再び現れることはサブタイプ 1 を除いてはなかった。

また, 同一事例内で保存領域では 1 塩基異なる塩基配列であった株が可変領域では 100% 同じ塩基配列であり, 保存領域での 1 塩基の違いはあまり意味を持たないのかもしれない。

同一事例内で 6 人の糞便由来 NV の可変領域解析を行った(表 1: 20823 高齢者施設食中毒事例)結果, 6 株とも同じ塩基配列であったことから, 短い日数では変異しない, または変異があったとしても多数派の配列を読むというダイレクトシーケンス法では無視し得ることが推察された。

20647 と 20660 は同一施設で 2 ヶ月連続して NV 集団発生がみられた事例である。当初は保存領域を解析し、2 つの事例の NV は 1 塩基のみ異なる株であることがわかっていった。しかし、可変領域解析の結果、20647 はサブタイプ 4 で、1 ヶ月後の 20660 はサブタイプ 1 が原因であることが判明した。通常、同じ遺伝子型の NV に対する免疫は、数ヶ月間は保たれると考えられるが、同じ G /4 であっても、抗原性を担うと考えられている P2 ドメイン領域で 2 ヶ所のアミノ酸が異なると、新たなアウトブレイクを引き起こすことをこの事例は示しているのかもしれない。

Nilsson ら<sup>5)</sup>は、免疫抑制剤を服用しているために、NV 感染が 1 年以上続いた患者由来 NV の 1 か月ごとの変異を解析した結果、P2 ドメイン領域を中心にアミノ酸変異が少しずつ起き、その変異が蓄積していくことを報告した。そのことから、今回の解析結果をみると 2006b クラスタに属する株はもとは一つで持続感染等によりアミノ酸変異に至る株が現われ、次の事例につながっていることも推測できる。

今回、G /4 には可変領域を解析する必要性があることが明らかとなった。今後は保存領域でのリアルタイム PCR でスクリーニング後、保存領域と G /4 可変領域両方の PCR を行い、G /4 可変領域陽性であれば、G /4 と判定してその配列を読み、G /4 可変領域陰性であれば、保存領域を読み解析を行うという方針で、事例内、事例間の NV の異同を調べ、疫学解析の一助としたい。

## 文 献

- 1) ノロウイルスの検出法について、厚生労働省医薬品食品保健監視安全課長通知(2003)、食安監発第 1105001 号
- 2) ノロウイルス感染集団発生 2006/07 シーズン、感染症情報センターホームページ <http://idsc.nih.go.jp/iasr/noro.html>
- 3) 野田 衛：集団感染症・食中毒 ノロウイルスはなぜ多発したのか？、食と健康、604(4)、6～17(2007)
- 4) 野田 衛 他：2006 年非流行期に広島市で継続したノロウイルス集団事例の発生要因分析、広島市衛研年報、26、35～40(2007)
- 5) Nilsson M et al: Evolution of Human Calicivirus RNA In Vivo: Accumulation of Mutations in Protruding P2 Domain of the Capsid Leads to Structural Changes and Possibly a New Phenotype, J Virol, 77(24), 13117～13124(2003)
- 6) Kageyama T et al: Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR, J Clin Microbiol, 41, 1548～1557(2003)
- 7) Katayama K et al: Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses, Virol, 299, 225～239(2002)
- 8) 吉澄志磨 他：2005/06 及び 2006/07 シーズンのノロウイルスによる胃腸炎集団発生について、北海道衛研所報、57、91～95(2007)