

2009/2010～2015/2016 シーズンに栃木県内で検出された

下痢症ウイルスの分子疫学的解析

微生物部

水越 文徳 鈴木 尚子 渡邊 裕子
 榎渕 泉美 船渡川 圭次

1 はじめに

ウイルス性胃腸炎の原因として、ノロウイルス (Norovirus; NoV)、サポウイルス (Sapovirus; SaV)、ロタウイルス、アデノウイルスなどがある。特に、冬季にはNoVを主な原因とするウイルス性胃腸炎が流行する。NoV 感染症の症状は、下痢、嘔吐、発熱で、特に新生児や高齢者などでは重症化し、脱水症状を引き起こす場合がある。この感染症に対する効果的な治療薬やワクチンがないため、一度発症してしまうとその対応は対症療法のみである。したがって、NoV 感染症には感染源の遮断が最も有効な予防法となり、そのためには正確な疫学情報や流行予測が必要となる。それ故に、その発生状況の詳細を解析して、それらの結果をフィードバックすることは地方衛生研究所の重要な役割の一つである。そこで、2009/2010～2015/2016の7シーズンに栃木県内で検出されたNoV、SaVを対象とした分子疫学的解析の結果を報告する。

2 材料と方法

2.1 材料

2009年(平成21年)9月から2016(平成28年)3月までに栃木県内で検出されたNoVとSaVを対象とした。本研究では、ウイルス性胃腸炎の発生ピークが冬季であることから、1シーズンを9月から翌年8月までとした。

2.2 ウイルスの検出と分子疫学的解析

下痢症ウイルス (NoV、SaV) の検出は、RT-PCR、またはリアルタイム定量PCRによって実施した^{1), 2), 3)}。

ウイルスが検出された検体について、PCR増幅産物を

用いたダイレクトシーケンシング法により塩基配列を解読した。このうち、ORF2のCapsid領域の塩基配列を解読できた株を対象に、分子疫学的な解析を実施した。さらに、2015/16シーズンでは、ORF1のRdRp領域も塩基配列の解読も行った。遺伝子型および亜型の決定、塩基配列の比較解析には、Norovirus Genotyping Tool Version 1.0⁴⁾、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)⁵⁾、Molecular Evolutionary Genetics Analysis 6 (MEGA6)⁶⁾を用いた。解析にあたり、同一事例内において、同一の塩基配列であった場合、一つの株を選出して代表株とした。

さらに、2013/2014～2015/16の3シーズンにおいて、十分な長さのCapsid領域を解読できたNoV GII株について、系統樹をMEGA6で最尤法(Maximum likelihood method; ML法)により作成した⁶⁾。

3 結果

3.1 2009/2010～2015/16 (7シーズン)におけるウイルス検出状況

過去7シーズンに検出された下痢症ウイルスのうち、解析可能だった検体は252株で、内訳はNoV GI群が18株(7.1%)、NoV GII群が217株(86.1%)、SaVが17株(6.7%)だった(表1)。いずれのシーズンもNoV GII群が検出株の殆どを占めていた。

また、シーズン毎の遺伝子型、および亜型の検出状況について、図1に示した。2009/2010シーズンでは、GII.4 Den Haag株、次いでGII.4 New Orleans株、GII.3遺伝子型が最も検出された。2012/2013シーズン以降は、

表1. シーズン毎の検出数とウイルスの内訳

シーズン	小計	ウイルスの内訳 (%)					
		NoV GI 群		NoV GII 群		SaV	
2009/2010	57	2	(3.5)	53	(93.0)	2	(3.5)
2010/2011	19	2	(10.5)	14	(73.7)	3	(15.8)
2011/2012	21	4	(19.0)	13	(61.9)	4	(19.0)
2012/2013	56	4	(7.1)	48	(85.7)	4	(7.1)
2013/2014	38	1	(2.6)	36	(94.7)	1	(2.6)
2014/2015	35	4	(11.4)	29	(82.9)	2	(5.7)
2015/2016	26	1	(3.8)	24	(92.3)	1	(3.8)
合計	252	18	(7.1)	217	(86.1)	17	(6.7)

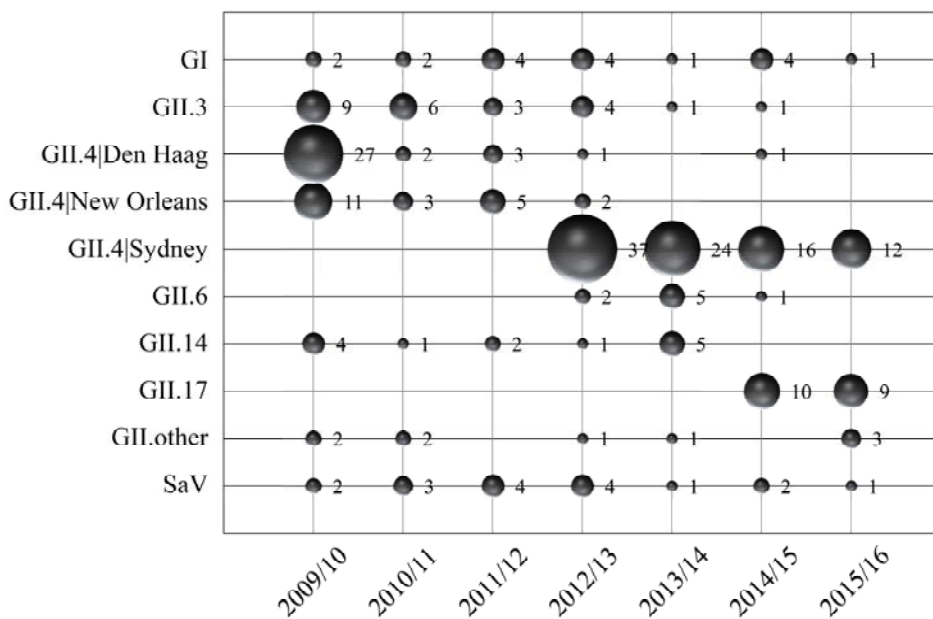


図1. 2009/2010～2015/2016 におけるシーズン毎の検出状況
(丸の大きさが検出数の程度を表し、グラフ内の数字が検出数を示す)

GII. 4 Sydney 株が主に検出された。さらに、2014/2015 シーズン以降は、GII. 17 遺伝子型が多く検出された。

3.2 2013/2014～2015/16 (3 シーズン) における月毎のウイルス検出状況

2013/2014～2015/16 (3 シーズン) について、月毎のウイルス検出状況を図2に、検出されたNoV GII群 *Capsid* 領域のML 系統樹を図3に示した。2013/2014 では、シーズンを通して主に GII. 4 Sydney 株が検出された(図2)。一方、2014/2015、2015/16 では、流行期の前半では主に GII. 4 Sydney 株が検出され、後半に GII. 17 遺伝子型の割合が増加する傾向だった(図2)。 *Capsid* 領域のML 系統樹より、これらの GII. 17 株は、Kawasaki308 株(LC037415) と近縁で、2005 年以前に検出された GII. 17 のCS-E1 株 (AY502009) やKatrina-17 株 (DQ438972) とは遺伝学的に異なるクラスターに分類された(図3)。また、ORF1 の *RdRp* 領域の一部を比較解析した結果、栃木県内で検出された GII. 17 株は、Kawasaki308 株と同様に新規遺伝子型 GII. P17 であった。さらに、 *RdRp* 領域の解

析は 2015/16 シーズンのみの実施であるが、GII. P12-GII. 3やGII. P7-GII. 6などの組替えキメラウイルスが検出された。

4 考察

1995 年に GII. 4 US95_96 株のパンデミックが発生して以来、GII. 4 遺伝子型は主流の遺伝子型として検出されてきた⁷⁾。さらに、この GII. 4 遺伝子型は約2～3年ごとに新たな変異株を出現させて、置き換わるように流行している⁷⁾。2006 年には GII. 4 Den Haag 株が、2009 年には GII. 4 New Orleans 株が、2012 年には GII. 4 Sydney 株が、日本だけではなく、世界的な大流行を引き起こした^{8), 9)}。栃木県においても、2009/2010 シーズンは GII. 4 Den Haag 株、および GII. 4 New Orleans 株が主流の検出株であった。また、2012/2013 シーズン以降は、世界的な動向と同様に、GII. 4 Sydney 株が主流となった。

GII. 4 Sydney 株の出現した2012/2013 は、全国的に NoV の大流行が生じた。栃木県においても NoV の検出数

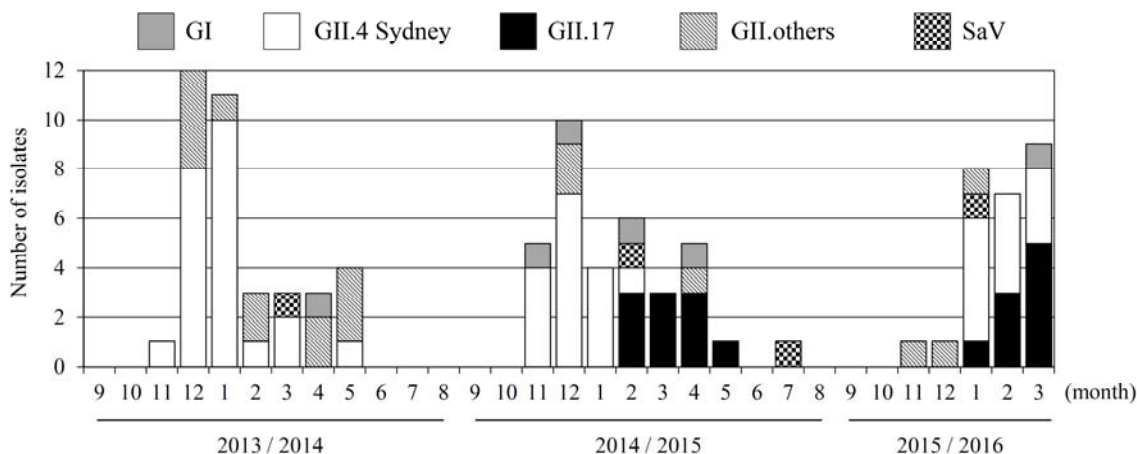


図2. 2013/2014～2015/2016 における月毎の検出状況

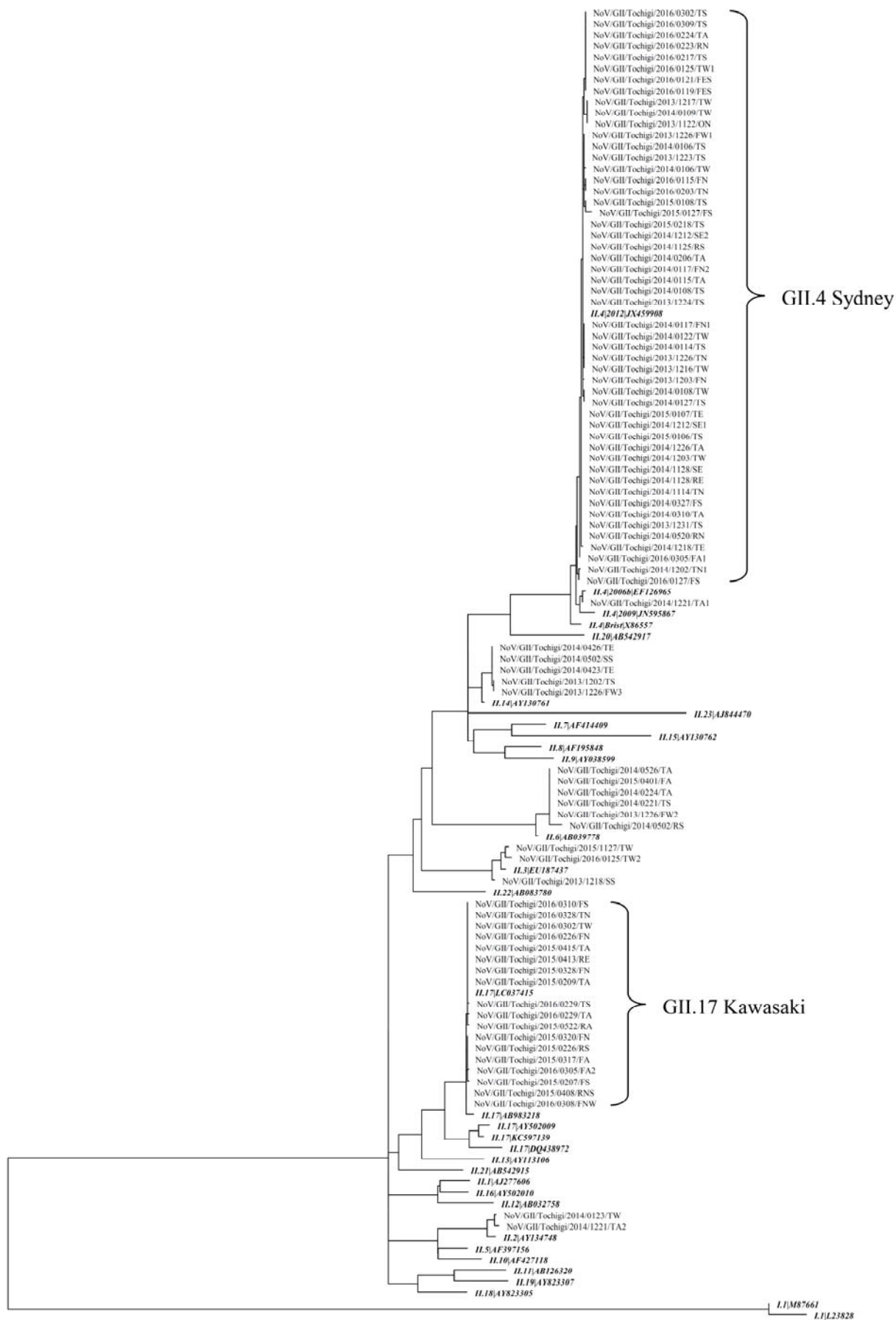


図3. 2013/2014～2015/2016 シーズンに検出された NoV GII 群 *Capsid* 領域の系統樹解析 (ML 法; 228 塩基)
 イタリアック体; 参照株

は前シーズンよりも増加し、その検出株の約 66.1%が GII.4 Sydney 株だった。なお、本邦では、前シーズンの 2012 年 1 月に北海道と大阪で検出され、5 月まで発生が数件ほど認められた¹⁰⁾。その後、ウイルス性胃腸炎の非流行期では殆ど検出されていなかったが、2012 年 10 月以降、日本各地で胃腸炎事例から検出され、検出地域が急増し、全国的に GII.4 Sydney 株による集団胃腸炎が多発した¹⁰⁾。GII.4 Sydney 株の抗原性が異なるため、大流行したのではないかと推測されている。このように GII.4 変異株の出現が、その後のシーズンに影響を及ぼす。したがって、遺伝子解読によって NoV の性状を迅速に把握し、その動向を注意深く監視して、流行よりも前に変異型の出現を探知することが感染拡大の予防にとって重要である。

2014/2015 に突如として出現した GII.17 Kawasaki 株は、日本のみならず世界各地で流行した^{11), 12)}。栃木県内においては 2015 年 2 月に初めて検出され、Kawasaki308 株と同様に新規遺伝子型 GII.P17 を有する GII.17 変異型であった¹¹⁾。その後、2014/2015 のシーズン後半では、これまで優位株だった GII.4 Sydney 株と入れ替わるように、GII.17 Kawasaki 株が主流株となった。そのため、翌シーズンの 2015/2016 に GII.17 Kawasaki 株が大流行すると推測され、メディア等でも大きく取り上げられた。しかしながら、2015/2016 では従来通りに GII.4 Sydney 株が先行的に流行し、そのシーズン後半に GII.17 Kawasaki 株が増加する傾向だった。これまでの NoV の流行株は、GII.4 遺伝子型の変異株が入れ替わりながら流行を繰り返してきた。今後、この GII.17 遺伝子型が GII.4 遺伝子型に代わって主要流行株となるのか、もしくは両方の株が主流株として流行するのか、その動向には細心の注意を払う必要がある。

NoV は、ORF1/ORF2 ジャンクション領域で組替えを起こすことが知られている¹³⁾。そのため、一般的に用いられる ORF2 の塩基配列をベースとした遺伝子型の分類に加え、解析領域を広めて ORF1 の遺伝子型の解読も求められるようになった¹⁴⁾。一部の検出株について ORF1 領域の解析を行った結果、栃木県でも組替えキメラウイルスの出現を確認した。さらには、ORF2 の変異株である GII.4 Sydney 株や GII.17 Kawasaki 株も、ORF1 が組替えを起こしたキメラウイルスであることが報告されている^{11), 12)}。NoV 大流行を事前に察知するためには、*Capsid* 領域の変異株だけでなく、組替えキメラウイルスも監視する必要がある。このように、NoV の流行状況を正確に把握するためには、解読する遺伝子領域を拡大してより詳細な分子疫学的な解析を行い、データを蓄積していく必要がある。

NoV は遺伝子型の変異・組替えを起こし、しばしば世界的な大流行を発生させている。このようなウイルスの遺伝子型を解読して、その発生状況の詳細を解析し、その分子疫学的情報をフィードバックすることは地方衛生

研究所の重要な役割の一つである。このような疫学研究の情報が NoV 感染拡大の予防や流行予測に必要な不可欠であり、詳細なウイルスのサーベイランスを継続していくことが重要である。

5 参考文献

- 1) 国立感染症研究所ウイルス 2 部 ウイルス下痢症診断マニュアル第 3 版 (平成 15 年 7 月)
- 2) Okada M et al., The detection of human sapoviruses with universal and genogroup-specific primers, Arch Virol, 151, 2503-2509, 2006.
- 3) Okada M et al., Detection of Human Sapovirus by Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, J Med Virol, 78, 1347-1353, 2006.
- 4) Norovirus Genotyping Tool Version 1.0 (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>)
- 5) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- 6) Tamura K et al., MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0, Molecular Biology and Evolution, 30 2725-2729, 2013.
- 7) Vinjé J et al., Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus, J Clin Microbiol, 53, 373-381, 2015.
- 8) Motomura K et al., Divergent Evolution of Norovirus GII/4 by Genome Recombination from May 2006 to February 2009 in Japan, J Virol, 84, 8085-8097, 2010.
- 9) Kumazaki M et al., Genetic Analysis of Norovirus GII.4 Variant Strains Detected in Outbreaks of Gastroenteritis in Yokohama, Japan, from the 2006-2007 to the 2013-2014 Seasons, PLoS One, 10, e0142568, 2015.
- 10) 田村務他, <速報> ノロウイルス GII/4 の新しい変異株の遺伝子解析と全国における検出状況, IRSR, 2012/11/28 掲載
- 11) Matsushima Y et al., Genetic analyses of GII.17 norovirus strains in diarrheal disease outbreaks from December 2014 to March 2015 in Japan reveal a novel polymerase sequence and amino acid substitutions in the capsid region, Euro Surveill, 2;20(26), pii:21173, 2015
- 12) de Graaf M. et al., Emergence of a novel GII.17 norovirus - End of the GII.4 era?, Euro Surveill, 2;20(26), pii:21178, 2015.
- 13) Eden JS et al., Recombination within the pandemic norovirus GII.4 lineage, J Virol, 87, 6270-6282, 2013.
- 14) 片山和彦, ノーウォークウイルス (ノロウイルス) の遺伝子型 2014 年版, IASR, 35 173-175, 2014.