

栃木県内で検出されたノロウイルスの分子疫学 (2009/2010~2016/2017 シーズン)

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 桐谷 礼子

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NoVは冬季に流行し、毎年、社会的・経済的な損失を与えている。NoV 感染症の症状は、下痢、嘔吐、発熱が主で、重症化して脱水症状等を引き起こす場合がある。この NoV 感染症に対する効果的な治療薬やワクチンがないため、一度発症すると、その対応は対症療法のみである。ゆえに正確な疫学情報や流行状況の把握を行い、周知することが予防対策の上で重要となる。特に、変異型が出現すると、ヒトの集団免疫から逃れるため、しばしば大流行の原因となっている。そのような理由で、変異株の出現や遺伝子型の推移の情報を臨床や感染症予防対策へ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、2009/2010~2016/2017 の8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を実施したので、その結果を報告する。

2 材料と方法

2.1 材料

2009年(平成21年)9月から2017(平成29年)5月上旬までに栃木県内(宇都宮市を除く)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ス法で塩基配列を解読した。遺伝子型および亜型の決定は、ORF2 の VP1 領域の塩基配列をもとに、web tool の Norovirus Genotyping Tool Version 1.0 で実施した^{4), 5)}。さらに、2015/2016 シーズン以降では、ORF1 の RdRp 領域も塩基配列の解読を行った。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、2016/2017 シーズンに検出された GII.2 の5株について VP1 領域と RdRp 領域の全長を Primer walking 法により解読し、Molecular Evolutionary Genetics Analysis 6 (MEGA6) を用いて最尤法 (Maximum likelihood method; ML 法) の系統樹を作成した⁷⁾。

3 結果

3.1 2009/2010~2016/2017 (8 シーズン) におけるウイルス検出状況

2009/2010~2016/2017 の過去8シーズンに検出された下痢症ウイルスは304株で、その内訳はNoV GI 群が16株 (5.3%)、NoV GII 群が269株 (88.5%)、SaV が19株 (6.3%) 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 (VP1 領域) 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 亜株、次いでGII.2、GII.4 New Orleans 亜株が主に検出された。2012/2013 シーズン以降は、GII.4 Sydney 亜株が主に検出され、主な流行株となった。さらに、2014/2015 シーズン以降は、GII.17 が多く検出された。2016/2017 シーズンでは、GII.2 が殆どをしめた。NoV と同じカリシウイルス科に属するSaVは、少ないながらもほぼ毎シーズン1~4株が検出されていた。

表1. シーズン毎の内訳

シーズン	小計	NoV GI 群	NoV GII 群	SaV
2009/2010	56	2 (3.6%)	52 (92.9%)	2 (3.6%)
2010/2011	18	2 (11.1%)	13 (72.2%)	3 (16.7%)
2011/2012	20	2 (10.0%)	13 (65.0%)	5 (25.0%)
2012/2013	56	4 (7.1%)	48 (85.7%)	4 (7.1%)
2013/2014	36	1 (2.8%)	35 (97.2%)	0 (0.0%)
2014/2015	35	4 (11.4%)	29 (82.9%)	2 (5.7%)
2015/2016	30	1 (3.3%)	27 (90.0%)	2 (6.7%)
2016/2017	53	0 (0.0%)	52 (98.1%)	1 (1.9%)
合計	304	16 (5.3%)	269 (88.5%)	19 (6.3%)

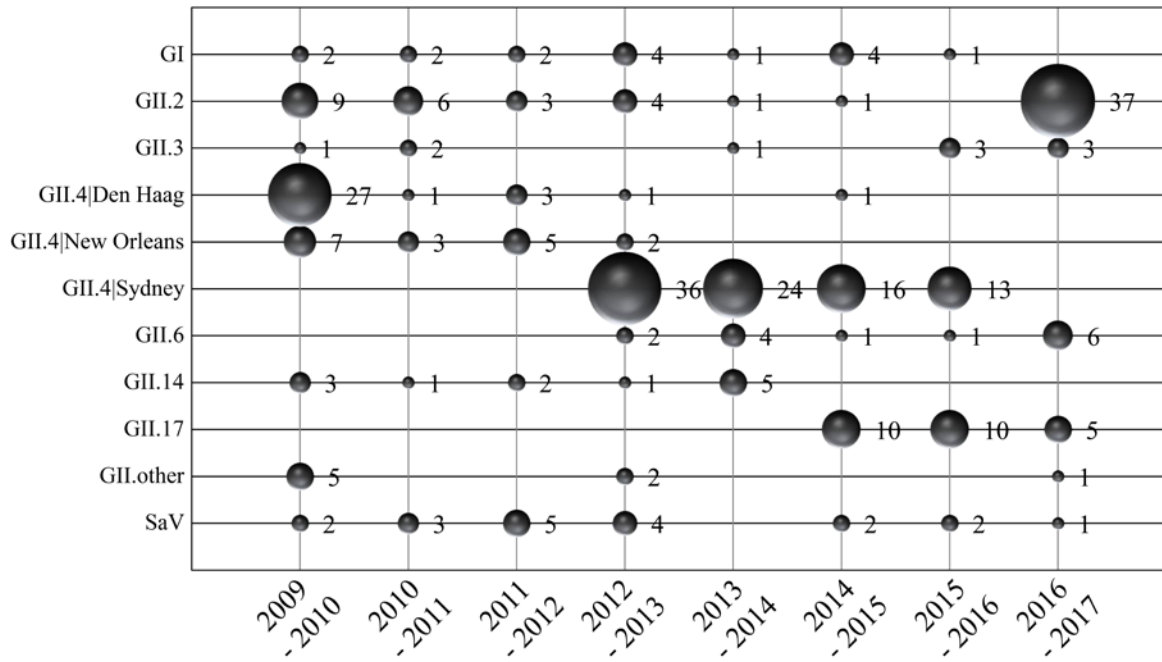


図1. 2009/2010～2015/2016におけるシーズン毎の検出状況
(丸の大きさが検出数の程度を表し、グラフ内の数字が検出数を示す)

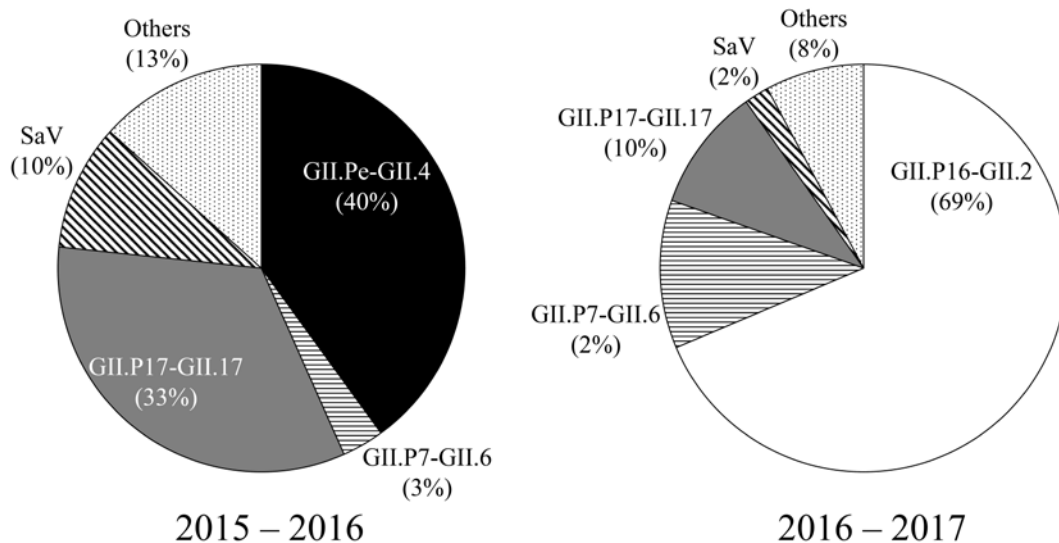


図2. RdRp領域とVP1領域の遺伝子型の分類、及び検出状況

3.2 2015/2016～2016/17 (2シーズン)におけるVP1領域とRdRp領域の遺伝子型の分類

2015/2016と2016/2017シーズンについて、VP1領域とRdRp領域の両方の遺伝子型の分類が可能だったNoV、及びSaVについて、その検出状況を図2に示した。2015/2016シーズンでは、GII.Pe-GII.4 Sydney 亜株とGII.P17-GII.17 Kawasaki 変異株が主流の検出株であった。一方、2016/2017シーズンの検出されたGII.2株はRdRp領域の解析からGII.P16-GII.2に分類され、主流の株となった。また、2016/2017シーズンでは、これまで

の流行株であったGII.Pe-GII.4 Sydney 亜株は検出されなかった。

さらに、2016/2017シーズンに検出されたGII.P16-GII.2の5株について、VP1領域とRdRp領域の全長による系統樹解析を図3、図4に示した。これらの株は、2010～2012年に国内で検出された同じGII.P16-GII.2と共通の祖先を持ち、独自のクラスターを形成していた。2012～2014年までに流行していたGII.P16-GII.2とは、系統が異なっていた。

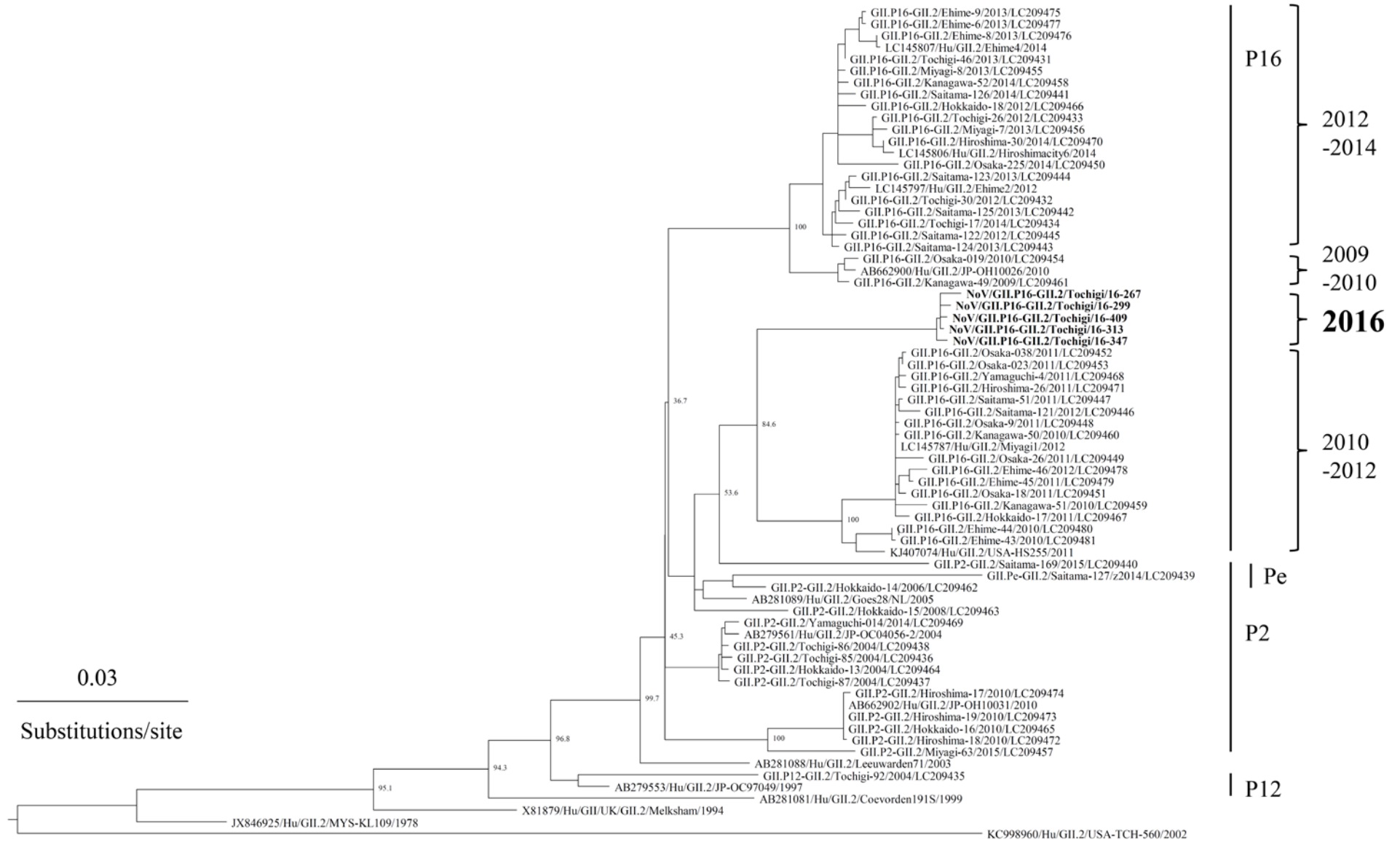


図3. 2016/2017に栃木県内で検出されたNoV GII.P16-GII.2 (5株)のML法による系統樹解析 (VP1 遺伝子)
(太文字の検体が栃木県内の検出株)

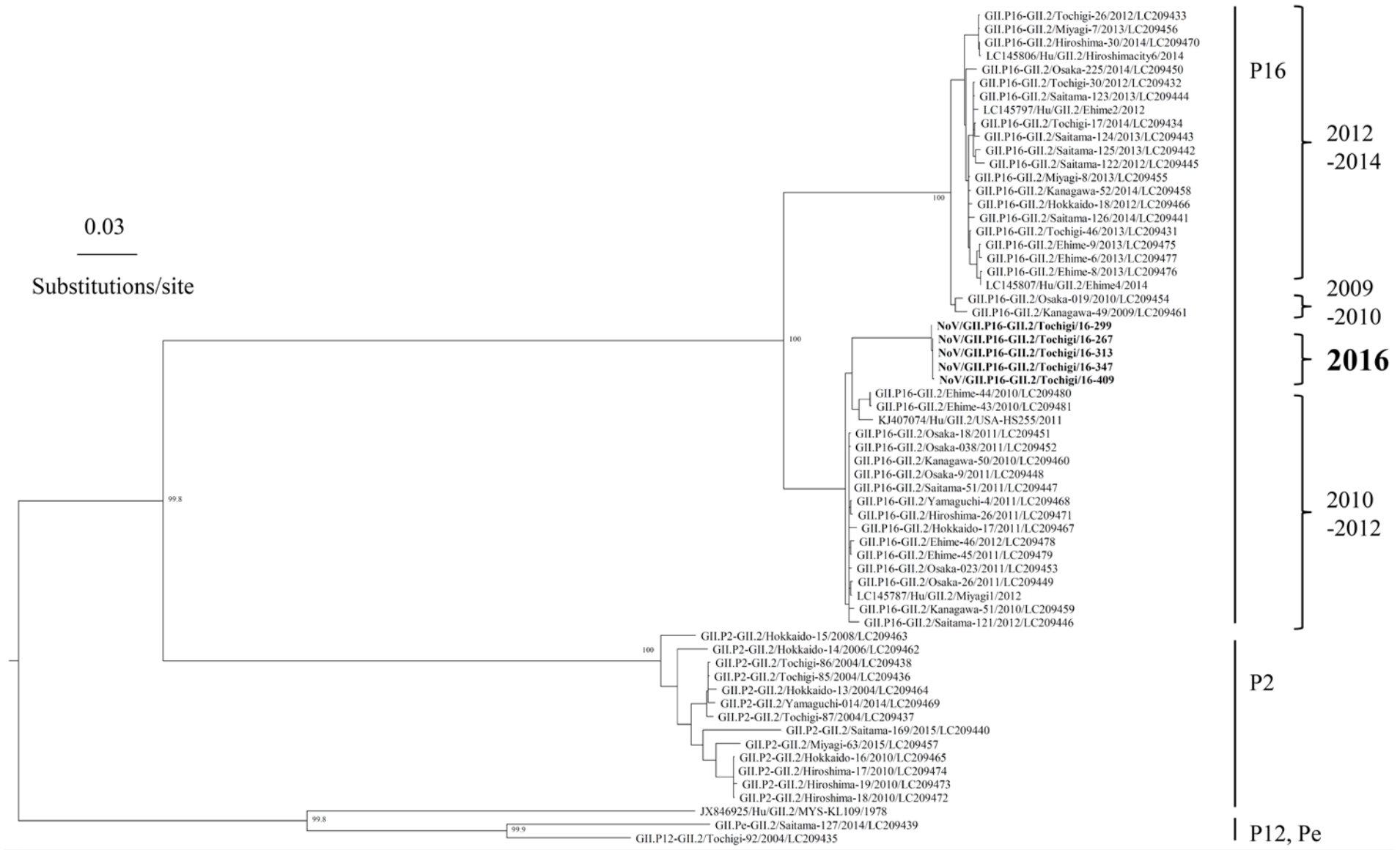


図3. 2016/2017に栃木県内で検出されたNoV GII.16-GII.2 (5株)のML法による系統樹解析 (RdRp 遺伝子)
 (太文字の検体が栃木県内の検出株)

4 考察

1995年にGII.4 US95_96 亜株のパンデミックが発生して以来、GII.4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), 8)}。2006年にはGII.4 Den Haag 亜株が、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^{9), 10)}。栃木県においても、2009/2010シーズンはGII.4 Den Haag 亜株、およびGII.4 New Orleans 亜株が主流の検出株であった。一方、2012/2013シーズン以降は、世界的な動向と同様に、GII.4 Sydney 亜株が主流となった。また、2014/2015に突如として出現したGII.17 Kawasaki 変異株は、新規遺伝子型GII.P17を有し、日本のみならず世界各地で流行した¹¹⁾。栃木県内においては2015年2月に初めてGII.17 Kawasaki 変異株が検出された。GII.17 Kawasaki 変異株の出現までは、GII.4は亜型を変化させながら主流株として流行してきた。このように、NoVは様々な遺伝子型が大流行の原因となる可能性がある。

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¹²⁾。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、ORF1の遺伝子型の解読も求められるようになった。VP1領域の変異株であるGII.4 Sydney 亜株やGII.17 Kawasaki 変異株も、ORF1の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⁾。このように、NoVの流行状況を正確に把握するためには、VP1領域の変異株だけでなく、組替えキメラウイルスも監視していく必要がある。

2016/2017シーズンに大流行したGII.P16-GII.2は、これまでの同遺伝子型と遺伝学的性状が異なる変異株であることが明らかになった¹³⁾。全国と同様に、栃木県でも集団発生や散発の事例の大半から検出された。このような変異株は、抗原性を乖離することによりヒトの集団免疫を回避して感染を拡大させている可能性が示唆されている¹⁴⁾。

SaVは、NoVと同じカリシウイルス属に属するウイルスである。その検出数があまり多くないため、病原性や疫学的な情報は乏しい。このSaVについては、今後、全国の地方衛生研究所が協力して情報を蓄積して、調査・分析していく必要がある。

このようにNoVは遺伝子の組替え・変異を起こし、しばしば世界的な大流行を発生させている。NoVの遺伝子型を解読して、発生状況の詳細を解析し、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。本研究のような疫学研究の情報から大流行の兆候を感知することも可能である。したがって、NoV感染拡大の予防にするためには、遺伝子型の解析等の詳細な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) Kroneman A, et al., An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses, *J Clin Virol*, 51, 121-125, 2011.
- 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) White PA, Evolution of norovirus. *Clin Microbiol Infect*, 20, 741-745, 2014
- 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) 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.
- 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) Bull RA et al., Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerg Infect Dis*, 11 1079-1085, 2005.
- 13) 国立感染症研究所. 病原微生物検出情報 Infectious Agents Surveillance Report (IASR) 38(11) 2017. <https://www0.niid.go.jp/niid/idsc/iasr/38/443.pdf>
- 14) Sakon N. et al., Impact of genotype-specific herd immunity on the circulatory dynamism of norovirus: a 10-year longitudinal study of viral acute gastroenteritis. *J Infect Dis*, 211, 879-888, 2015.