

## 感染性胃腸炎におけるウイルス検出と分子疫学的検討 (2008年4月～2010年3月)

微生物課 増本久人 平野敬之 吉武俊一 南 亮仁  
江口正宏 船津丸貞幸 武田裕二 吉川信治

キーワード：感染性胃腸炎 ウイルス性胃腸炎 遺伝子型解析 ノロウイルス GII/4型

### 1 はじめに

感染性胃腸炎とは、細菌、ウイルスなどの病原微生物に感染し下痢症状を呈す胃腸炎疾患のことである。ウイルス性の感染性胃腸炎は、冬季を中心としたノロウイルスやロタウイルスの流行があり、夏季にはエンテロウイルス属も検出される。また、年間を通してアデノウイルスやサポウイルスなども下痢症患者から検出される。その中でも、特にノロウイルスを感染原因とする胃腸炎疾患が世界的に流行している状況である。

国内でも2004/05年シーズンには、各地の老健施設でノロウイルスの集団感染が流行していた時期の一部の高齢者施設から死者発生の報告がマスコミに報道され社会的に注目された。これら事件などを契機としてノロウイルスによる食中毒・感染症予防対策の取組みが盛んに行われているが、依然として散発事例および集団発生事例からの検出報告が多く、減少傾向に至っていないのが現況である。

今回、2008年4月から2010年3月までの2年間に佐賀県内で感染性胃腸炎例の散発事例（感染症発生動向調査事業：サーベイランス）および感染症・食中毒集団発生事例から検出したウイルスの分子疫学的解析などを行ったので報告する。

### 2 材料と方法

#### 1) 材 料

2008年4月から2010年3月の2年間に佐賀県内で発生した感染性胃腸炎疑いによる散発事例（サーベイランス）20事例中12例、感染症・食中毒集団事例33事例312例中117例を遺伝子検査によりウイルスを検出し分枝系統樹解析などを行った。

#### 2) 方 法（表1）

##### ① RNA抽出～PCR法

便、吐物、食品などの検体から QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)を用いて RNA 抽出し、DNase 処理の後、RT 反応にて cDNA 合成を行った。ノロウイルス (NV) については厚生労働省通知の食安監 1105001 号に準じて RT-PCR 法およびリアルタイム PCR 法を行い、食品やふき取り検体については Nested PCR 法にて増幅・検出を試みた。ノロウイルス以外の A 群ロタウイルス、C 群ロタウイルスなどの下痢症病原体については、表 1 のとおりの方法に準じて病原ウイルスの遺伝子検出を行った。

##### ② 遺伝子解析法

①の操作法でウイルス遺伝子を確認したものについては、PCR 増幅産物を MiniElute Gel Extraction Kit(QIAGEN)および BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit(ABI)を用い ABI PRISM310 Genetic

Analyzer (ABI)にて塩基を測定し各遺伝子型 (G) 別等の分子疫学的解析を行った。

ノロウイルス遺伝子はキャプシド領域について既知のGI群14種、GII群17種のレファレンス株を標準株として各系統樹解析と型別分類の他に塩基配列およびアミノ酸配列による相同性などについて分子疫学的な検索を行った。

また、A群およびC群ロタウイルスはVP7領域、アデノウイルスはヘキソン領域、エンテロウイルス属のエコーウイルスはVP1領域について遺伝子型別と相同性などの解析を行った。

さらに、NCBI-BLAST 検索およびDDBJ-CLUSTAL W 解析による遺伝子型別や相同性についても比較検討を試みた。

### 3 結果

#### 1) 散発事例 (表2)

2008年4月から2010年3月までの2年間に佐賀県内の感染症発生動向調査事業における定点医療機関から感染性胃腸炎と診断され提供のあった便検体20件中12件(60%)からウイルス遺伝子を検出した。その12件の内訳は、ノロウイルス6件(50%)、A群ロタウイルス5件(41%)、エンテロウイルス属1件(8%)であった。その内の1件は、ノロウイルスとアデノウイルスによる2種類のウイルスが混在した“重複例”であった。

ノロウイルスについては、例年より定点からの提供検体数は少ない状況であった。ノロウイルス(NV)の検出は2008年4月にGII/13型1件、12月にGII/4型4件を検出した後は、2010年3月にGII/4型3件で、全て秋季から冬季に検出されたものであった。

A群ロタウイルスについては、2009年2月にG血清3型1件、3月にG血清3型3件、2010年2月にG血清1型1件を検出した。このG血清1型や3型は国内で多く検出されている型で、ノロウイルスの終息後に乳幼児下痢症を引き起こす注意すべき病原体ウイルスである。

エンテロウイルス属については、感染性胃腸炎疑いとして2008年7月に持ち込まれた検体であったが、RT-PCR法の結果、A群コクサッキーウイルス(CA)4型と判明した。通常、4歳児以下の乳幼児が6~7月頃に感染し発病することが多く、経口感染により咽頭、腸管で増殖し咽頭分泌液や糞便に排出され病像は多様を示す病原体ウイルスである。

その他、2008年4月に0歳10ヶ月の乳児の便検体からノロウイルスG1/4型とアデノウイルス6型の遺伝子を重複検出した。これは偶然に下痢症ウイルス感染と主に上気道症状を示すウイルスに同時期に感染し便から検出されたものと考えられる。

#### 2) 集団事例 (表3、4、5)

2008年4月から2010年3月までの2年間に佐賀県内で感染症・食中毒疑いの感染性胃腸炎による集団事例33事例中29事例(87%)から病原性ウイルスを検出した。また、病原体ウイルスを検出した事例29事例中、感染症事例は27事例で優勢を占め、2事例が食中毒事例であった。

月別発生を春季から夏季シーズンの4月~8月と秋季から冬季シーズンの9月~3月の2シーズン別に見ると、33事例中、4月~8月に8事例(24%)、9月~3月は25事例(76%)で秋季から冬季シーズンの9月~3月に感染性胃腸炎の集団事例が集中して発生していた。

検出ウイルスは、検体312件中、117件(37.5%)から下痢症の病原体ウイルスの遺伝子を検出した。その内訳は、117件中、101件(86.3%)がノロウイルスで最も多く、C群ロタウイルス6件(5.1%)、A群ロタウイルス4件(3.4%)の他、重複型6件(5.1%)の検出状況であった。

発生施設と月別状況については、33事例中、飲食店10事例(30.3%)、福祉施設8事例(24.2%)、宿泊施設4事例(12.1%)、老健施設3事例(9.1%)、食品・弁当販売施設2事例(6.1%)、小学校から高校までの教育施設3事例(9.1)、その他として保育施設、県外旅行先、県外からの修学旅行生が関与した各1事例などであった。この中の飲食店と弁当販売店で発生した各1事例は食中毒事例と確認された。

発生施設とウイルス型については、ノロウイルスGII/4型が検出された発生施設が最も多く、飲食店4事例で、次いで宿泊施設3事例、老健施設3事例、福祉施設3事例、食品製造施設1事例、保育施設1事例などであった。食中毒発生施設は2事例で、1事例目は弁当販売施設の従業員と弁当摂食者21名中10名からノロウイルスGI/2型を検出し、従業員1名からノロウイルスGI/7型+GII/13型の重複型を確認した事例であった。2事例目は飲食店で従業員と弁当摂食者10名中、4名からノロウイルスG1/8型+GII/2型の重複型を検出し、従業員1名からノロウイルスGI/8型、摂食者1名からノロウイルスGII/2型などが検出され、重複・複合型の感染事例であった。

### 3) 遺伝子解析 (図1、2、3)

2008年4月から2010年3月の期間に検出した病原体ウイルスの塩基配列を測定し、各ウイルス型別に分類し系統樹解析を行った。ノロウイルスについてはキャプシド領域の塩基をアミノ酸に変換し系統樹を作成後、標準株および同一株間の相同性やアミノ酸変異などについて分析を行った。

ノロウイルスGI型については、G1/3型1株、G1/4型4株、G1/7型1株、G1/8型3株の4種の株型に分類し各解析を行った。G1/4型の集団事例3株との検体間のアミノ酸配列(96aa)は100%完全一致を示し、G1/4型標準株とも完全一致を示していた。散发事例1株はI55Vの1ヶ所に変異が見られ相同性は99%を示していた。G1/8型3株との検体間の相同性は100%完全一致し、G1/8型標準株とも100%一致していた。G1/7型1株は標準株とは4ヶ所ほど異なり96%の相同性を示していた。G1/3型1株と標準株との相同性は79%ほどを示し、多くのアミノ酸変異部位を認めた。

ノロウイルスGII型については、GII/4型23株、GII/2型5株、GII/7型1株、GII/13型2株、GII/14型1株の5種の株に分類された。さらに、GII/4型は2006a亜型5株、2006b亜型17株と2006x亜型2株に区分し各解析を行った。GII/4型2006a亜型5株の集団事例3株と散发事例2株の検体間(94aa)は100%完全一致を示し、株の全ては2010年に検出した事例であった。GII/4型の標準株Lordsdaleとの相同性は97%でN6S、A15T、S93Aにアミノ酸変異部位を確認した。GII/4型2006b亜型17株中、集団事例の計13株と散发事例4株について分析を行った結果、16株は2006b亜型株に100%完全一致を示していた。また、2006b亜型と完全一致を示さなかった集団事例の1株は、G82Dにアミノ酸変異が見られ99%の相同性を示した。2006b亜型とGII/4型のLordsdale標準株との相同性(94aa)は99%でS93Aにアミノ酸置換の違いが見られた。2006x亜型に近縁を示した散发事例1株と集団事例1株はGII/4型Lordsdale標準株に近縁で98%の相同性を示し、N9S、S93Aにアミノ酸の違いが見られた。GII/8型5株は、食中毒事例1例を含む、株間の相同性は100%完全一致を示し、GII/8型のMelksham標準株(94aa)とも完全一致を示していた。GII/7型1株とLeeds標準株とは100%一致していた。GII/13型2株は散发事例1株と集団事例1株で、GII/13型のM7標準株との相同性は散发事例は98%でN24S、I37Lにアミノ酸変異を認めた。集団事例1株とM7標準株(94aa)との相同性は99%でN24Sのアミノ酸変異が見られた。GII/14型1株は高校生の修学旅行事例でKashiwa標準株との相同性は99%でG22Aにアミノ酸変異を認めた。C群ロタウイルスの集団事例を2008年5月に2事例の検出を認め、各塩基

配列 (308bp) の BLAST 検索を行った結果、岡山県で分離された株や中国の株に 100% の相同性を認めた。A 群ロタウイルスについては、散发事例から G 血清 3 型 4 株、集団事例は 1 事例で G 血清 1 型 4 株は国内で主流の G 血清型で、各型別による株の塩基配列は 97~100% (G1 型 710bp、G3 型:334bp) の相同性を示していた。

#### 4 考察

2008 年 4 月から 2010 年 3 月の 2 年間に佐賀県内で感染性胃腸炎と診断された散发事例 20 事例中 12 例、感染症・食中毒による集団事例 33 事例 312 例中 117 例からウイルス遺伝子を検出した。しかし、2006 年 4 月から 2008 年 3 月までの調査事例および検体数に比較して少ない状況であった。特に、2006 年から 2007 年にかけてノロウイルスによる爆発的な流行と発生により、他県では高齢者の入所施設において死亡者の報告がマスコミに報道され社会的に注目された調査時期であった。国立感染症研究所感染症情報センター HP 集計によるシーズン別胃腸炎ウイルス検出状況一覧でも 2006 年/07 年シーズンのノロウイルス検出数は 4,618 件と最も多い検出状況を示していた。2007/08 年には 2,976 件、2008/09 年は 2,399 件とやや減少傾向を示し、2009/10 年は 2,622 件とやや増加する検出状況を示している。また、ノロウイルスの型別検出状況については、2000/01 年シーズンの調査から連続してノロウイルスは GII グループが 90% 以上の高い検出率を維持している。その中でも GII/4 型が圧倒的に多く、全国で最も多く検出および報告されている。この検出状況は佐賀県内でもノロウイルス GII グループが優勢を占め、さらに GII/4 型が多く検出される状況と類似している。

最近、ノロウイルスはポリメラーゼ領域と VP1 領域間で遺伝子の組換えによるリコンビナント株の確認によりノロウイルスの塩基測定部位やゲノムのタイピングの見直しなどが国際的にも議論されている状況である。しかし、地方の研究所においては、これまでにノロウイルス検出マニュアルに準じ検出し、蓄積した遺伝子解析データを直ちに、再測定することは難しく、今回も従来どおりキャプシド領域の塩基配列およびアミノ酸変換による分子疫学的な検討を行った。ノロウイルス GI グループは GI/3 型、GI/4 型、GI/7 型、GI/8 型の 4 種の株型を分類し、GII グループは GII/2 型、GII/7 型、GII/13 型、GII/14 型、GII/4 型の 5 種の株型を分類した。さらに、GII/4 型は 2006a 型と 2006b 型の他に、系統樹上で分枝のやや異なる株 (2006x 型) も認められた。

この様な変異株の出現やノロウイルス感染者が増加する背景には、さらなる大流行の可能性も懸念される。今後の流行には注意が必要であると共に、県内における感染症発生動向調査および感染性胃腸炎による集団発生事例などで得られた病原体の積極的な遺伝子解析は重要で分子疫学的な情報還元は必要不可欠なものであると考える。また、ノロウイルスの流行期の感染者が減少しない背景には不顕性感染者の存在も推測されることから、十分な感染予防対策を継続することが最も重要である。

#### 5 まとめ

1) 散发事例 (感染症発生動向調査) の感染性胃腸炎検体 20 件中、12 件からウイルス遺伝子を検出。

##### ①各検出ウイルスの遺伝子型

- ・ノロウイルス GII : 4 型、13 型、重複型 : G1/4 型+アデノウイルス 6 型
- ・A 群ロタウイルス : G 血清 1 型、G 血清 3 型
- ・エンテロウイルス属 : コクサッキーウイルス (CA) 4 型

2) 食中毒・感染症による集団事例 33 事例 312 件中、117 件からウイルス遺伝子を検出。

①病原体ウイルス検出事例：感染症集団事例 27 例、食中毒事例 2 例。

②感染症発生施設：飲食店 9 例、福祉施設 8 例、宿泊施設 4 例、老健施設 3 例、  
その他 7 例。

③食中毒発生施設：飲食店 1 例、弁当販売 1 例。

④検出遺伝子型

- ・ ノロウイルス G1：3 型、4 型、8 型
- ・ ノロウイルス GII：2 型、4 型、7 型、14 型、型不明
- ・ 特殊型（重複型）：G1/8 型+GII2、G1/7 型+GII/13、GII/2+C 群ロタウイルス
- ・ その他のウイルス：A 群ロタウイルス：G 血清 1 型、C 群ロタウイルス

3) ノロウイルス GII/4 型の検出例 24 株において標準株 (Lordsgale/93/UK) と系統樹およびアミノ酸配列 (主に N6、A15、V47、S93) などについて分析した結果、下記の 3 型に別けられた。

- ・ 2006a 型：5 株は、N6S、A15T、S93A に変異を認めた。
- ・ 2006b 型：17 株中、16 株は S93A に変異を認め、残りの 1 株は G82D に変異を認めた。
- ・ 2006x 型：2 株中、1 株は N9S、S93S に変異を認め、残り 1 株は Q45T、S93S に変異を認めた。

以上、GII/4 型亜型においても、僅かなアミノ酸配列の変化であるが、遺伝子型の変異が進行してことも推測される。他の型でも勿論、新たな変異型をキャッチすることにより、流行や発生を未然に防止するための遺伝子情報になる可能性も推察されることから継続した遺伝子解析調査による病原体の監視が重要と思われる。

## 謝 辞

この検索をするにあたり、御協力を頂きました医療機関および各保健福祉事務所の皆様に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 国立感染症研究所、地方衛生研究所全国衛生微生物協議会編：病原体検出マニュアル
- 2) 国立感染症研究所ウイルス第二部、衛生微生物協議会レファレンス委員会編：ウイルス性下痢症診断マニュアル (第 3 版) , 2003
- 3) 厚生労働省医薬品食品局食品安全部監視安全課長通知安監発第 1105001 号, 2003
- 4) 九州衛生環境技術協議会共同研究マニュアル Ver. 3
- 5) 葛谷光孝ほか：教育研修施設で発生した C 群ロタウイルスによる集団胃腸事例 感染症学雑誌, 77(2), 53-59, 2003
- 6) Nix WA, et al., J Clin Microbiol 44:2698-2704, 2006
- 7) Katayama, K., Shirato-Horikoshi, H., Kojima, S., et al.: Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses, Virology, 299, 225-239, 2002
- 8) Kopman B, Vennema H, Kohli E et al.: Increase in Viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. Lancet 363:682-688, 2004
- 9) 愛木智香子、秋山美穂、岡部信彦、西尾治ほか：欧米で流行しているノロウイルス

- GⅡ/4変異株の国内での検出状況. 病原微生物検出情報 Vol.26(12):3-5,2005
- 10) 国立感染症研究所感染症情報センター 病原微生物検出情報 HP, (IASR) ノロウイルス遺伝子型について、2010
- 11) 国立感染症研究所感染症情報センター 病原微生物検出情報, (IASR) <参考>ノロウイルス集団発生 2007/08 シーズン (2009年3月26日現在報告数)、2009
- 12) 国立感染症研究所感染症情報センター 病原微生物検出情報, (IASR) ノロウイルス集団発生 2007/08 シーズン (2010年4月1日現在報告数)、2010
- 13) Kroneman et. : Increase in norovirus activity reported in Eurosurveillance Weekly, 11(12), 2006
- 14) 佐賀県衛生薬業センター所報: 佐賀県における感染症胃腸炎のウイルス遺伝子型解析、29、126-136 2006
- 15) 佐賀県衛生薬業センター所報: 感染症胃腸炎におけるウイルス検出と遺伝子型解析状況、30、112-125、2008

表1 ウイルス検出法一覧

ノロウイルス	RT-PCR法	ノロウイルスの検出法 (食安監発第1105001号、平成15年11月5日)
	リアルタイムPCR法	
A群ロタウイルス	IC法	ラピッドテスト ロタ・アデノ (第一化学薬品)
	RT-PCR法	ウイルス性下痢症診断マニュアル 第3版 (感染症研、Gouveaらの方法)
C群ロタウイルス	R-PHA法	C群ロタウイルス検出用試薬 (デンカ生研)
	RT-PCR法	葛谷らの方法 (感染症学雑誌 77(2), 53-59, 2003)
アデノウイルス	IC法	ラピッドテスト ロタ・アデノ (第一化学薬品)
	PCR法	マルチプレックスPCR法による検査法 (病原体検出マニュアル、感染症研)
アストロ・アイチ・サポウイルス	RT-PCR法	九州衛生環境技術協議会共同研究マニュアルVer. 3
エンテロウイルス	RT-PCR法	Nix WA, et al., J Clin Microbiol 44:2698-2704, 2006

表2 散発事例のウイルス検出一覧 (2008年4月～2010年3月)

年度 月	区分	検体数	型別 検出数	NV GII		重複ウイルス	A群ロタ(ARV)		エンテロウイルス属
				4型	13型	NVG1/4型 +AD6型	G血清1型	G血清3型	CA4型
08年4月		3	2		1	1			
5月		2							
6月									
7月		1	1						1
8月		1							
9月									
10月									
11月		1							
12月		5	4	4					
09年1月		1							
2月		1	1					1	
3月		4	3					3	
09年4月									
5月									
6月									
7月									
8月									
9月									
10月									
11月									
12月									
10年1月									
2月		1	1				1		
3月		4	3	3					
2008年度計		15	8	4	1	1		1	1
2009年度計		5	4				1	3	
総合計		20	12	4	1	1	1	4	1

表3 集団事例のウイルス検出一覧 (2008年4月～2010年3月)

年度 月	区分	発生 事例数	検体数	型別 検出数	NV GI			NV GII				重複ウイルス			A群ロタ (ARV)	C群ロタ (CRV)	
					3型	4型	8型	2型	4型	7型	14型	型不明	NV GII/2 + CRV	NV GI/8 + NV GI/2	NV GI/7 + NV GI/13	G1型	
08年4月		2	30	8		5				3							
5月		2	11	7									1				6
6月		2	2	1				1									
7月		1	12														
8月																	
9月																	
10月		1	1														
11月		2	30	10						10							
12月		8	99	27	1					25	1						
09年1月		1	2	2						2							
2月																	
3月		1	4	4						4							
09年4月																	
5月		1	4	4												4	
6月																	
7月																	
8月																	
9月																	
10月																	
11月		1	6														
12月		1	2	1				1									
10年1月		1	2	1		1											
2月		5	37	15				1	11						2[食1]		
3月		4	70	37		7	11[食1]	1	9		5	1			2	1	
2008年度計		20	191	59	1	5		1	44	1			1				6
2009年度計		13	121	58		8	11	3	20		5	2		4	1	4	
総合計		33	312	117	1	13	11	4	64	1	5	2	1	4	1	4	6

表4 集団事例の発生施設とウイルス検出月別一覧 (2008年4月～2010年3月)

年月	区分	老健施設	福祉施設	飲食店	食品製造・弁当販売	宿泊施設	修学旅行 県外旅行者	旅行(県外)	幼児・保育施設	教育施設 小学校	教育施設 中学校	教育施設 高校	計	
														08年4月
5月		1								1				2
6月		1				1								2
7月		1												1
8月														
9月														
10月				1										1
11月				1		1								2
12月			2	3		2			1					8
09年1月	1													1
2月														
3月	1													1
09年4月														
5月		1												1
6月														
7月														
8月														
9月														
10月														
11月								1						1
12月											1			1
10年1月												1		1
2月			2	3[食1]										5
3月	1		1	1	1[食1]		1							4
2008年度計		2	5	6	1	4			1	1				20
2009年度計		1	3	4	1		1	1			1	1		13
総合計		3	8	10	2	4	1	1	1	1	1	1		33

表5 集団事例の発生施設とウイルス型別一覧 (2008年4月～2010年3月)

年度月	区分	NV G1			NV G2				重複型			A群ロタ (ARV) G血清1型	C群ロタ (CRV)	計 (%)	
		3型	4型	8型	2型	4型	7型	14型	型不明	NVG1/8 +NVG2/2	NVG1/7+ NVG2/13				NVG2/2+ ORV
	老健施設					3									3 (8.6)
	福祉施設				2	3							1	1	7 (20.0)
	飲食店		2	1 <sup>A</sup>	1 <sup>A</sup>	4		2	1 <sup>A</sup> [食1]						11 (31.4)
	食品製造・仕出			1 <sup>B</sup> [食1]		1				1 <sup>B</sup>					3 (8.6)
	宿泊施設	1 <sup>D</sup>				3 <sup>C,D</sup>	1 <sup>C</sup>								5 (14.3)
	修学旅行 県外旅行者							1							1 (2.9)
	幼児・保育 施設					1									1 (2.9)
	教育施設 小学校										1 <sup>E</sup>		1 <sup>E</sup>		2 (5.7)
	教育施設 中学校				1										1 (2.9)
	教育施設 高校		1												1 (2.9)
	計 (%)	1 (2.9)	3 (8.6)	2 (5.7)	4 (11.4)	15 (42.9)	1 (2.9)	1 (2.9)	2 (5.7)	1 (2.9)	1 (2.9)	1 (2.9)	1 (2.9)	2 (5.7)	35

\* 1A~E: 複数型検出例数。  
\* [食]: 食中毒事例数。



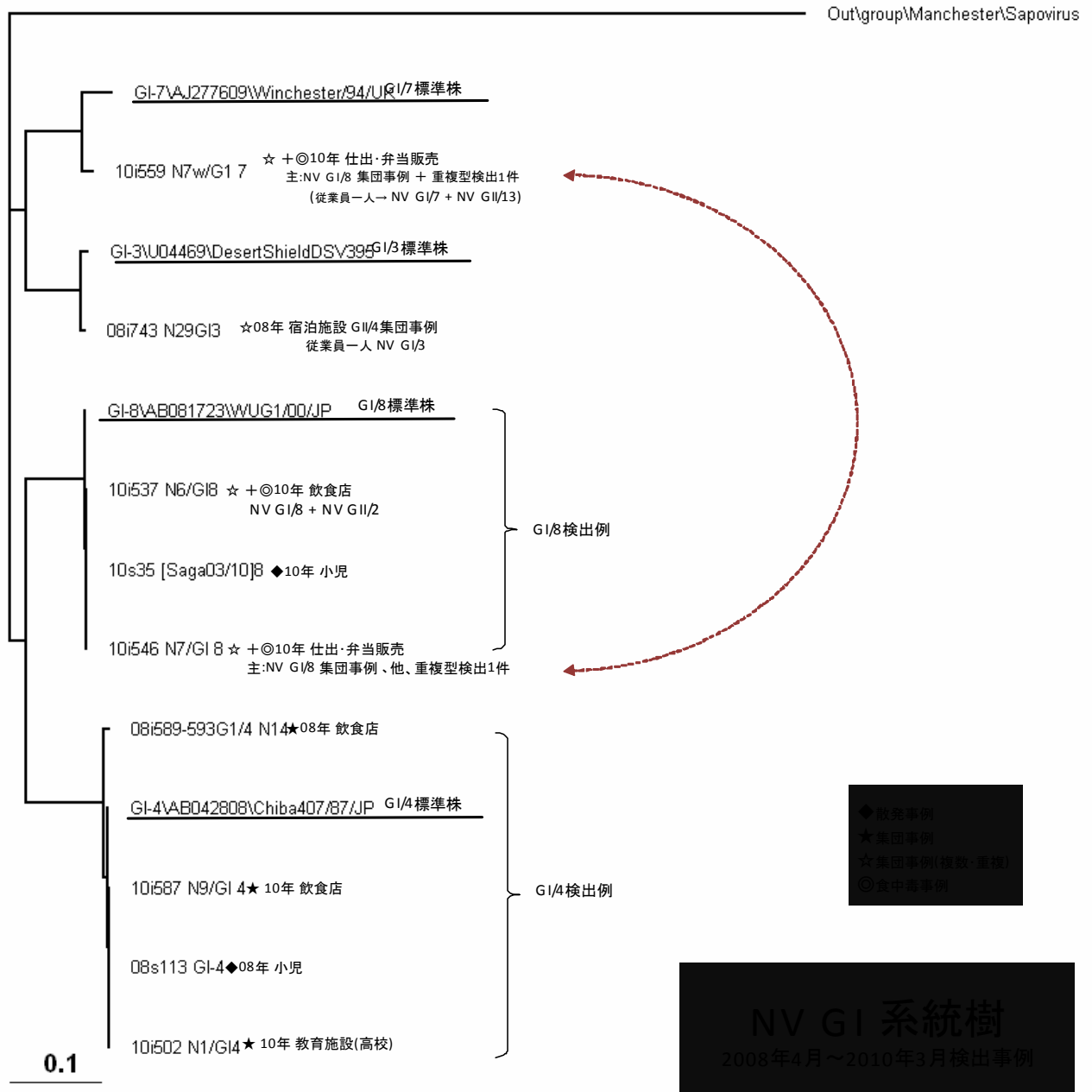


図1 ノロウイルス GI 系統樹 (2008年4月～2010年3月)

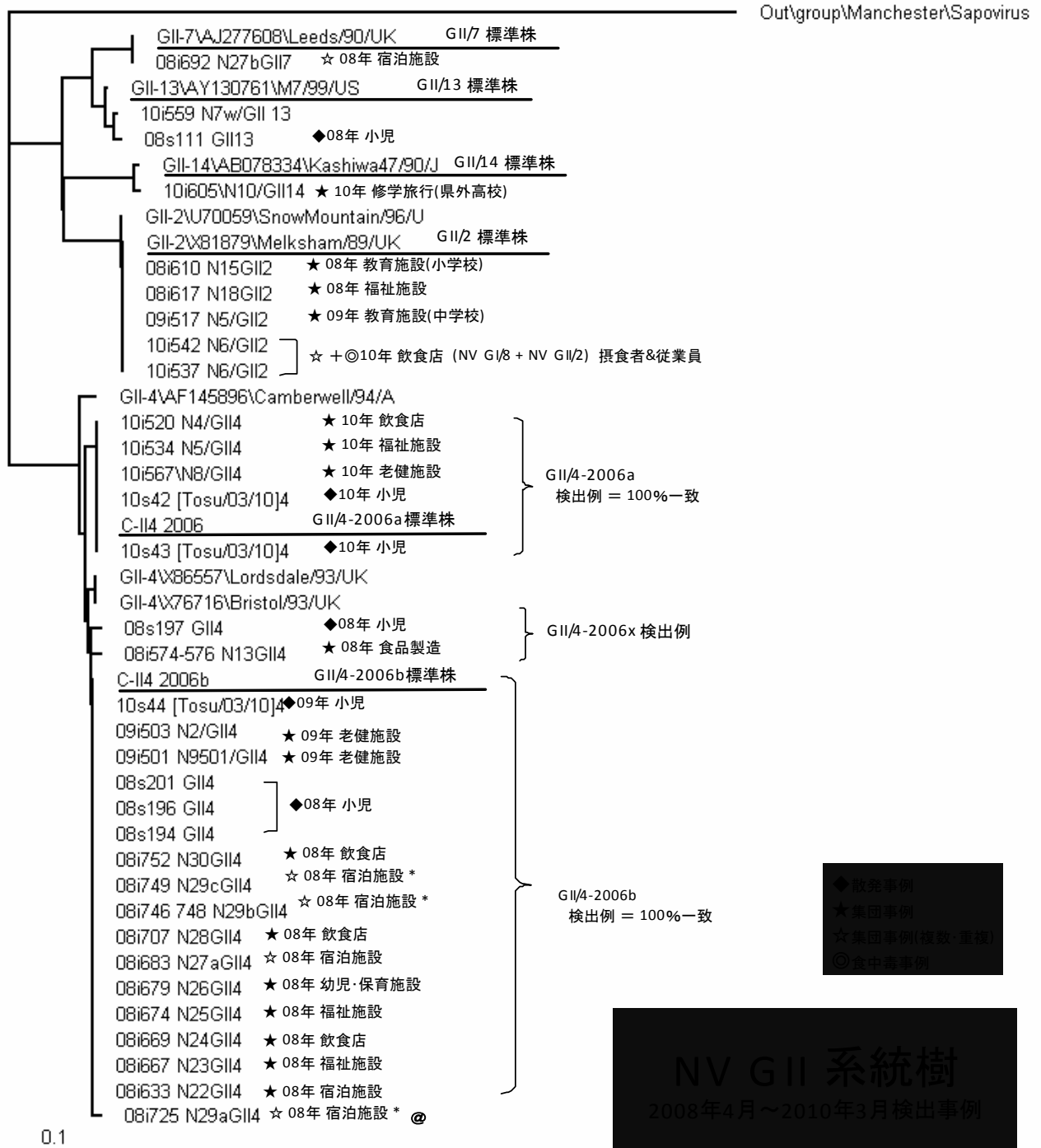


図2 ノロウイルス GII 系統樹 (2008年4月～2010年3月)