

ノート

## 2009/10年シーズンのノロウイルス感染症・食中毒事例から 検出された遺伝子型について

重本 直樹, 谷澤 由枝, 福田 伸治

### Norovirus Genotypes Detected in Gastroenteritis Outbreaks during the 2009/10 Season

NAOKI SHIGEMOTO, YUKIE TANIZAWA and SHINJI FUKUDA

(Received September 30, 2010)

In the 2009/10 season, 23 norovirus associated gastroenteritis outbreaks were observed in Hiroshima prefecture. Of these outbreaks, NoV GI, NoV GII, and redundancy of NoV GI and GII were detected in 19, 1, and 3 outbreaks, respectively. Features of these outbreaks in the 2009/10 season were as follows: 1) NoV GII.2, which had been a minor causative agent during the 2004/05 and 2008/09 seasons, was a predominant genotype in the 2009/10 season; and 2) A new GII.4 variant similar to the New Orleans 1805/09/US strain was detected and observed as much as 2006b, a predominant variant before the 2009/10 season.

This is the first report of the emergence and circulation of a new GII.4 variant in Hiroshima prefecture and may indicate the beginning of a transition in the prevalent variant of norovirus in Hiroshima prefecture.

Key words : Norovirus, 2009/10 season, Genotype, GII.2, GII.4, New variant

#### 緒 言

ノロウイルス (NoV) は急性胃腸炎の起因ウイルスとして世界的に流行しているウイルスである [1-3]. 現在 NoV の遺伝子型には遺伝子グループ I で14, 遺伝子グループ II で21の遺伝子型が知られている [4] (病原体検出情報, <http://idsc.nih.gov/pathogen/refer/norokaisetu1.html>). その中でも特に GII.4 が主要な流行遺伝子型として, 変異型 (サブタイプ) の変遷を繰り返しながら毎シーズン流行を繰り返している [5-8]. 本県においても GII.4 を中心にさまざまな遺伝子型が検出されているが, その流行状況はシーズンによって少しずつ異なる [9]. そこで今回, 2009/10シーズンに感染症・食中毒事例から検出された NoV の特徴について過去 5 シーズンと比較しながら流行遺伝子型の推移を検討した.

#### 材料と方法

##### 1 供試サンプル

2009/10年シーズンに当センターへ検査依頼のあった NoV の感染症・食中毒23事例の糞便検体130検体を用いた. 地域対象として, 2004/05年から2008/09年の過去 5 シーズンの81事例を用いた.

##### 2 RT-PCR 法によるノロウイルス遺伝子の検出

NoV の検出は10%糞便乳剤から QIAamp Viral RNA mini Kit (キアゲン) により RNA 抽出を行った後, RT-PCR 法により行った. 逆転写反応は 5 × buffer 4 μl, 10mM dNTPs 4 μl, 50mM Random primer pd(N)<sub>9</sub> (タカラバイオ) 1 μl, RNase inhibitor (40U/μl) (TOYOBO) 0.5μl, ReverTra Ace (100U/μl) (TOYOBO) 1 μl を含む反応液に抽出 RNA 9.5μl を加え, 30°C, 10分, 42°C, 60分, 99°C, 5分の条件で反応を行った. PCR 反応は, 10 × buffer 5 μl, 10mM dNTPs 4 μl, 10mM のセンスおよびアンチセンスプライマー 各 1 μl, Ex Taq (5 U/μl) (タカラバイオ) 1 μl と cDNA 3 μl を加えた 50μl の反応液で, 94°C, 3分の熱変性の後, 94°C, 45秒, 55°C, 45秒, 72°C, 1分を40 サイクル行い, 最後に72°C, 15分の最終伸長を行った. NoV 検出プライマーには GI 用に GISKF/GISKR, GII 用に GIISKF/GIISKR・GIIALSKR を用いた [10,11].

##### 3 PCR 産物のシーケンスと系統樹解析

PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit (キアゲン) により精製した後, SequiThermEXCEL II DNA Sequencing Kit-LC (EPICENTRE Biotechnologies) および LI-COR 4200 series sequencer (LI-COR) を用いたダイレクトシーケンスによりカプシドの 5' 端領域の塩基配列を決定した. 翻訳開始点から 264bp の塩

基配列を ClustalW プログラム (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) を用いて解析し, Tree explorer (<http://evolgen.biol.metro-u.ac.jp/TE/>) で系統樹を作成した. 遺伝子型の分類は Kageyama ら [4] および病原体検出情報 (<http://idsc.nih.go.jp/pathogen/refer/noro-kaisetu1.html>) に示された分類に従った.

## 結 果

### 1 ノロウイルスを原因とする感染症・食中毒事例の概要

2009/10シーズンの NoV 感染症・食中毒事例の概要を Table 1 に示した. 2009/10シーズンは12月下旬に初発があったのち, 2月にピークを迎え, 5月まで続いた. 23事例の NoV 検出結果は, 19事例から NoV GII を, 1事例から NoV GI を, 3事例から NoV GI, GII 両方を

検出した. NoV GI, GII 両方を検出した3事例のうち2事例は二枚貝も提供されている食中毒事例であった.

### 2 塩基配列の解析

系統樹解析の結果, NoV GII の遺伝子型は, GII.4 が10事例, GII.2 が9事例, GII.3 が2事例, GII.7, GII.12, GII.14 が各1事例であった (Table 1). 一方, NoV GI の遺伝子型は, GI.8 が2事例, GI.1, GI.2, GI.4 が各1事例であった (Table 1). 2009/10シーズンと過去5シーズンに見られた遺伝子型を Table 2 および3に示した. 2009/10シーズンはそれ以前にはほとんど認められなかった GII.2 が過去5シーズンの優勢ゲノタイプである GII.4 と同程度認められた. 2009/10シーズンに検出された GII.2 は, 本県で2004/05シーズンに検出された株や2004年に大阪市で流行した株とは異なり, オランダで05年, 韓国で06年, 島根で08年に検出され

Table 1 Characteristics of the 23 norovirus outbreaks in the 2009/10 season

Outbreak no.	Month/year	Setting	Epidemiology (transmission)	Genotype
219	May/10	School	Person to person	GII.12
218	Apr./10	Caterer	Food borne	GII.4
217	Mar./10	Sports event	Person to person	GII.4
216	Mar./10	Restaurant	Food borne	GII.4
215	Mar./10	Festival	Food borne	GI.1, GII.2
214	Mar./10	Nursery school	Person to person	GII.2
213	Feb./10	School	Person to person	GII.3
212	Feb./10	Restaurant	Food borne	GII.4
210	Feb./10	Restaurant	Food borne	GII.4
208	Feb./10	School	Person to person	GI.4
207	Feb./10	Dormitory	Person to person	GII.2
206	Feb./10	Festival	Food borne	GI.2, GI.8, GII.2, GII.14
205	Feb./10	Nursery school	Person to person	GII.2
204	Feb./10	Hospital	Person to person	GI.8, GII.2
202	Feb./10	Nursing home	Person to person	GII.4
201	Feb./10	Hospital	Food borne	GII.4
200	Jan./10	Hotel	unknown	GII.4
199	Jan./10	Restaurant	Person to person	GII.2
197	Jan./10	Nursery school	Person to person	GII.2, GII.3
196	Jan./10	Nursing home	Person to person	GII.4
195	Jan./10	Nursing home	Person to person	GII.4
194	Jan./10	Caterer	Person to person	GII.7
192	Dec./09	Hotel	Person to person	GII.2

Table 2 NoV GII genotype detected in 6 epidemic seasons

Season	Genotype										Total
	GI.1	GII.2	GII.3	GII.4	GII.6	GII.7	GII.12	GII.13	GII.14	GII.19	
2009/2010		9	2	10		1	1		1		24
2008/2009				5			1	1			7
2007/2008			3	15							18
2006/2007				36				1			37
2005/2006			1	4						1	6
2004/2005	1	1		8	2		1				13
2004-2010	1	10	6	78	2	1	3	2	1	1	105

ている株と同じクラスターに分類された (Fig.1 A). 2009/10シーズンの GII.4 は昨シーズンと比べると事例数が倍増したが, 大流行した2006/07シーズンほどではなかった (Table 2). 検出された GII.4 の系統樹解析の結果, 2006/07から2008/09シーズンまではほとんどがサブタイプ 2006b 型であったが, 2009/10シーズンは New Orleans 1805/09/US 様の株が検出され1つのクラスターを形成し, その数は2006b とほぼ同じ割合であった (Fig. 1B). GII.3 は最近6シーズンにおいて2009/10, 2007/08, 2005/06シーズンの隔年ごとに検

出された. 2009/10シーズンの GII.3 検出株は, 前回の2007/08シーズンに検出した株や前々回の2005/06シーズンに検出した株とも別のクラスターに分類された (Fig. 1C). NoV GI については GI.4 と GI.8 がこの6シーズンでは比較的良く検出されていた (Table 3). 2009/10シーズンの GI 検出株について系統樹解析を行った結果, 各遺伝子型ともそれ以前の検出株と同じクラスターに分類された (data not shown).

Table 3 NoV GI genotype detected in 6 epidemic seasons

Season	Genotype					Total
	GI.1	GI.2	GI.4	GI.7	GI.8	
2009/2010	1	1	1		2	5
2008/2009			1	1	1	3
2007/2008			3		2	5
2006/2007						
2005/2006						
2004/2005	1		1		1	3
2004-2010	2	1	6	1	6	16

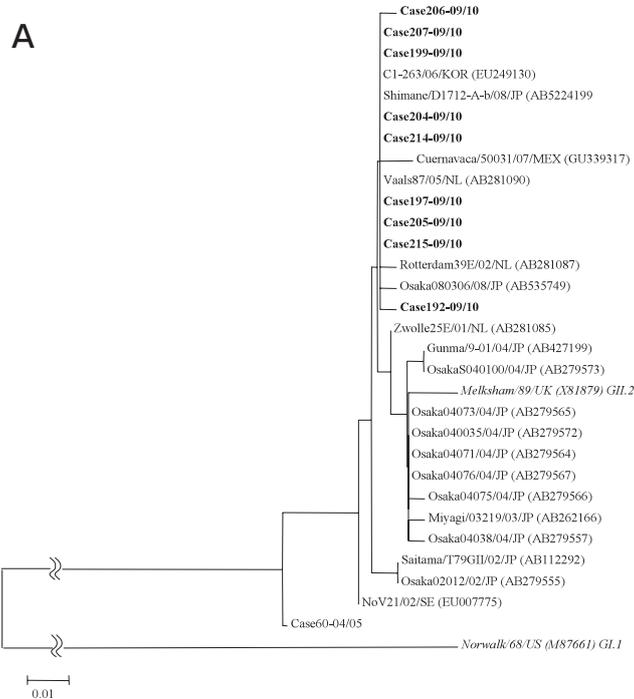


Fig.1 Neighbor-joining trees of the nucleotide sequences of the 5'-capsid region (264bp) of NoV GII. 2 (A), GII.4 (B), and GII.3 (C). Italic letters indicate reference strains. Accession numbers of the reference strains indicate in parentheses. The strain name obtained from the outbreaks in Hiroshima prefecture indicates the outbreak number and season. Boldface letters indicate the strains observed in the 2009/10 season.

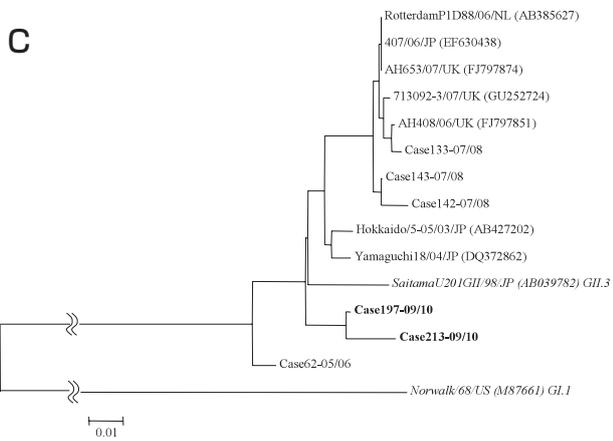
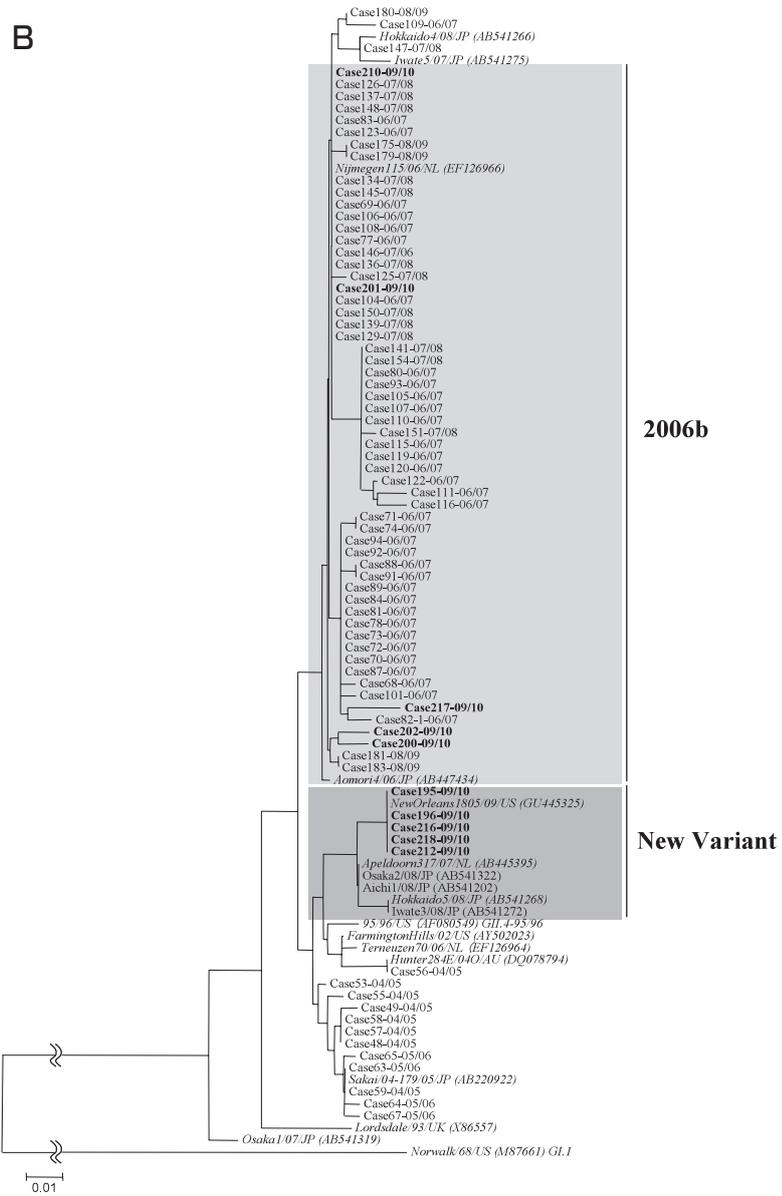


Fig.1-Continued.

## 考 察

感染症・食中毒事例の主流の遺伝子型は例年 GII.4 であるが、今シーズンについてはこれまでほとんど認められなかった GII.2 が GII.4 と同程度確認された。これは全国的にも同様の傾向であった（病原微生物検出情報, <http://idsc.nih.go.jp/iasr/index-j.html>）。2004年には大阪市で GII.2 が流行したが [12]、今回の流行株はこれらとは異なり、2002年と2005年にオランダ、2006年に韓国で報告された株と同じクラスターに分類された。また、2008年に鳥根県や大阪市でも同様な株が報告されている。GII.4 は大流行を繰り返していくうちにサブタイプが変化することが言われている [6]。Iritani らは GII.2 の capsid 遺伝子の詳細な解析を行ったところ、P2ドメインに変異が蓄積し、GII.2 も GII.4 と同様に capsid の表面アミノ酸が変化することや、流行サブタイプが存在することを報告している [13]。このことから、今回の GII.2 の流行を解明する上で、検出株の capsid 領域の変異部位特定および来シーズン以降の動向についても注視していく必要がある。

GII.4 については、2006/07シーズン以降に主流であったサブタイプ 2006b 型と同じ割合で New Orleans 1805/09/US 様の新しいサブタイプが認められた。この新しいサブタイプは2007/08シーズンから世界各地で報告されているサブタイプと同じと思われる [8,14]。広島県においては新しいサブタイプを今回初めて検出したが、一部他県では既に報告されつつあり [15]、DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html>) にもいくつか塩基配列が登録されている。他県同様に広島県でも GII.4 の流行タイプがこれまでの 2006b 型から New Orleans 1805/09/US 様の新しいサブタイプへ変遷しつつあることが示唆される。ヒトの免疫系を逃れるために、GII.4 は積極的に capsid の表面アミノ酸を少しずつ変化してきていると言われている [16,17]。また、これまでのところ新しいサブタイプの出現に際しては NoV の大流行を伴っていることから [6]、来シーズン以降に New Orleans 1805/09/US 様の新しいサブタイプが大流行する可能性がある。今後のこの新しいサブタイプによる感染性胃腸炎の発生動向について注視する必要がある。

GII.3 は広島県では隔年で数例検出されている。この理由は明確ではないが、今回の検出株は前回検出された 2007/08シーズンの検出株や前々回の 2005/06シーズンの検出した株とも異なる。今後もさらに検出例について遺伝子解析をすることにより、GII.3 独自の流行傾向が見出せるかもしれない。

GI は最近 6 シーズンでも比較的検出例の多い GI.4、

GI.8 が今シーズンも検出された。この状況は全国的にも同様であることが、病原体検出情報 (<http://idsc.nih.go.jp/pathogen/refer/noro-kaisetu1.html>) の結果からも知ることができる。また、今回 GI.4、GI.8 以外に GI.1 および GI.2 が検出されたが、これらの事例はいずれも食材に二枚貝も含まれる事例からであった。

2009/10シーズンの NoV の流行遺伝子型は、過去 5 シーズンとは少し異なる状況となった。このことから、来シーズンは GII.2 と GII.4 のどちらが優勢となるのか、また GII.4 の New Orleans 1805/09/US 様サブタイプがこれまでの主流であった 2006b 型に置き換わるのか、2010/11シーズンについても引き続き NoV の遺伝子型を特定し、動向を把握する必要がある。

## ま と め

2009/10年の NoV 流行状況の特徴は、原因遺伝子型が毎シーズン流行する GII.4 と過去流行が認められなかった GII.2 が同程度に検出され、例年とは異なる流行状況を示した。また、GII.4 のサブタイプについては、これまで広島県では確認されていなかった New Orleans 1805/09/US 様のサブタイプが昨シーズンまでの主流であった 2006b 型と同程度認められ、GII.4 の流行サブタイプが変遷しつつあることが示唆された。GII.3 は今シーズンも隔年での検出となり、前回の 2007/08シーズンの検出株、前々回の 2005/06シーズンの検出株とは別のクラスターに分類された。GI は過去 5 シーズンでも比較的多く検出された GI.4、GI.8 が今シーズンも検出された。

## 文 献

- [1] Svraka S, Duizer E, Vennema H, de Bruin E, van der Veer B, Dorresteyin B, Koopmans M. Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in the Netherlands from 1994 through 2005. *J Clin Microbiol.* 2007;45(5):1389-1394.
- [2] Blanton LH, Adams SM, Beard RS, Wei G, Bulens SN, Widdowson M-A, Glass RI, Monroe SS. Molecular and epidemiologic trends of caliciviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in United States, 2000-2004. *J Infect Dis.* 2005;193(3):413-421.
- [3] Lopman BA, Reacher MH, van Duynhoven Y, Hanson F-X, Brown D, Koopmans M. Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(1):90-96.

- [ 4 ] Kageyama T, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Kojima S, Takai R, Oka T, Takeda N, Katayama K. Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to norovirus in Japan. *J Clin Microbiol.* 2004;42(7):2988-2995.
- [ 5 ] Motomura K, Oka T, Yokoyama M, Nakamura H, Mori H, Ode H, Hansman GS, Katayama K, Kanda T, Tanaka T et al. Identification of monomorphic and divergent haplotypes in the 2006-2007 norovirus GII/4 epidemic population by genomewide tracing of evolutionary history. *J Virol.* 2008;82(22):11247-11262.
- [ 6 ] Zheng D-P, Widdowson M-A, Glass RI, Vinjé J. Molecular epidemiology of genogroup II-genotype 4 noroviruses in the United States between 1994 and 2006. *J Clin Microbiol.* 2010;48(1):168-177.
- [ 7 ] Siebenga JJ, Vennema H, Zheng D-P, Vinjé J, Lee BE, Pang X-L, Ho ECM, Lim W, Choudekar A, Broor S et al. Norovirus illness is a global problem: Emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007. *J Infect Dis.* 2009;200(5):802-812.
- [ 8 ] Pang XL, Preiksaitis JK, Wong S, Li V, Lee BE. Influence of novel norovirus GII.4 variants on gastroenteritis outbreak dynamics in Alberta and the northern territories, Canada between 2000 and 2008. *PloS One.* 2010;5(7):e11599.
- [ 9 ] Fukuda S, Takao S, Shigemoto N, Tanizawa Y, Seno M. Transition of genotypes associated with norovirus gastroenteritis outbreaks in limited area of Japan, Hiroshima Prefecture, during eight epidemic seasons. *Arch Virol.* 2010;155(1):111-115.
- [10] Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K, Natori K, Takeda N, Katayama K. *J Virol Methods.* 2002;100(1-2):107-114.
- [11] Nishida T, Nishio O, Kato M, Chuma T, Kato H, Iwata H, Kimura H. Genotyping and quantitation of noroviruses in oysters from two distinct sea areas in Japan. *Microbiol Immunol.* 2007;51(2):177-184.
- [12] Iritani N, Kaida A, Kubo H, Abe N, Murakami T, Vennema H, Koopmans M, Takeda N, Ogura H, Seto Y. Epidemic of genotype GII.2 norovirus during spring 2004 in Osaka city, Japan. *J Clin Microbiol.* 2008;46(7):2406-2409.
- [13] Iritani N, Vennema H, Siebenga JJ, Siezen RJ, Renckens B, Seto Y, Kaida A, Koopmans M. Genetic analysis of the capsid gene of genotype GII.2 norovirus. *J Virol.* 2008;82(15):7336-7345.
- [14] Belliot G, Kamel AH, Estienney M, Ambert-Balay K, Pothier P. Evidence of emergence of new GGII.4 norovirus variants from gastroenteritis outbreak survey in France during the 2007-to-2008 and 2008-to-2009 winter seasons. *J Clin Microbiol.* 2010;48(3):994-998.
- [15] 吉澄志磨, 三好正浩, 石田勢津子: 2008/09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. 北海道立衛生研究所報. 2010;59:79-83.
- [16] Siebenga JJ, Vennema H, Renckens B, de Bruin E, van der Veer B, Siezen RJ, Koopmans M. Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J Virol.* 2007;81(18):9932-9941.
- [17] Allen DJ, Noad R, Samuel D, Gray JJ, Roy P, Iturriza-Gómara M. Characterisation of a GII-4 norovirus variant-specific surface-exposed site involved in antibody binding. *Virol J.* 2009;6(9):150.