

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月14日現在

機関番号：83201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591117

研究課題名（和文） ノロウイルスの地域内浸潤の分子的背景の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the molecular basis of the permeation of norovirus in an area

研究代表者

滝澤 剛則（TAKIZAWA TAKENORI）

富山県衛生研究所・ウイルス部・部長

研究者番号：40192158

研究成果の概要（和文）：ノロウイルス（NoV）には多数の遺伝子型があり、高頻度に変異を起こして流行を繰り返す。本研究では、患者、下水流入水から検出される NoV 遺伝子を比較し、地域における流行の分子的背景を明らかにすることを目的とした。遺伝子型 GI.4 は主に下水流入水のみから長期にわたり検出され、変異も少なかったのに対して、顕性感染の多い GII.2、3、4 は、シーズンごとに異なる組換え変異や亜型が消長した。後者の様に、宿主との顕性の相互作用を起こす遺伝子型は、多様な遺伝的変化を示すことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：There are many genotypes in norovirus (NoV), and NoV causes outbreak repeatedly with high frequency of mutation. In this research, NoV genes detected from patients and sewer influents were compared to understand the molecular basis of the outbreak in an area. While genotype GI.4 was mainly detected from sewer influents for long period with less frequency of mutation, different recombinant variants or subtypes of GII.2, 3, or 4, respectively appeared rise and fall in outbreaks for every season. It was suggested that the genotypes causing an apparent interaction with a host show higher genetic variations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：ノロウイルス、疫学、感染性胃腸炎、遺伝子変異

## 1. 研究開始当初の背景

ノロウイルス（NoV）は、冬季に集団発生する感染性胃腸炎や食中毒の主たる原因ウイルスであり、このウイルスによる集団感染が及ぼす社会的、経済的損失は極めて大きい。NoVは、ヒトおよびヒト以外の動物に感染するものを含めて遺伝子群 I～V（GI～

GV）に分類され、遺伝子群はさらに25以上の遺伝子型に細分される。ヒトには主にGIとGIIが感染する。感染性胃腸炎の集団発生や食中毒の患者数の実に7割近くをNoVの感染者が占めている。感染経路は食品媒介よりも、ヒト→ヒト感染事例が増加している。これまで主に検出されるNoVは、ヨーロッパ

パで報告されたものと近縁の GII.4 遺伝子型 4(GII.4) であったが、GII.4 以外の遺伝子型も徐々に増加している。NoV は治癒後も便中に長期にわたり排出されることがあり、また、健常者の便からも数%の割合でウイルスが検出されることから、多発する感染症の背景には、多数の不顕性感染者が存在するものと予想される。これらの感染者、あるいは長期排出者の中でウイルスが複製を繰り返す間に、遺伝子変異が蓄積することが考えられる。

研究代表者らは、これまで富山県で発生した事例の NoV の遺伝子解析を行い、最近では、GII.4 以外に、GI.4、GI.8 や GII.6、GII.13 などの遺伝子型も検出されること、また、下水流入水からは、毎月多様な遺伝子型の NoV が検出されることを報告した。このことは、地域には GII.4 に限らず様々な遺伝子型による多数の不顕性感染者が存在し、それらのごく一部が発症していることを示唆している。さらに、患者の中には治癒後も長期にわたりウイルスを便中に排出し、その間に遺伝子の一部が変異し、それが個人の中で主な遺伝子型となる例が存在することを報告した。この事例は、ウイルスが個体の中で変異を繰り返す中で、特定の変異が固定化されることを示している。

一方、研究代表者らは、2007 年 9 月の下水から検出された GII.13 のひとつが、カプシド領域は GII.13 であるのに対して、ポリメラーゼ領域が GII.7 由来である新たな組換え体であることを明らかにした。この下水の採取時期とほぼ同時期の 2007 年 12 月に発生した集団事例から検出された GII.13 も、組み換え体であることが判明した。さらに、同年 1 月に採取した健常乳幼児便からは、GII.7 と GII.13 が多数検出されたことから、この頃に GII.7 と GII.13 による不顕性感染が多発し、地域内で同時感染を繰り返す間に組換え体が生じ、発症した可能性が考えられた。同様に GI.4、GI.8、GII.6 などの遺伝子型も、下水のみならず近年は事例からも検出される例が増えている。この原因として、新たな変異を持つウイルスが外部から侵入したか、あるいは地域内でウイルス遺伝子に変異したかすることにより、不顕性感染から顕性感染に変化した可能性が示唆される。このように、事例と下水、あるいは健常者便から検出される NoV の遺伝子型、及び検出時期を詳細に比較検討することにより、地域において発生した遺伝子変化と発症との関わりを明らかにすることができるものと考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、県内で発生する集団発生事例から検出される NoV (顕性感染)、下水流入水から検出される NoV (顕性と不顕性感染とを含む) の遺伝子型や、遺伝子変異の

有無を比較検討することにより、地域における NoV の遺伝的多様性を網羅的に把握し、ノロウイルスの地域における流行の分子的背景を明らかにし、感染予防に資することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 検体採取及び処理

#### ① 下水流入水

県西部に位置する下水処理場において、毎月 1 回下水流入水 1 リットルを採取し、既報に従って (Iwai M. *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* 75:1264-1270, 2009)、以下の 2 つの方法により濃縮下水検体を調製した。即ち、下水流入水を 3,000rpm で 30 分遠心して得られた上清に、最終濃度 0.05M になるように塩化マグネシウムを添加し、0.5 規定の塩酸を用いて pH3.5 に調整した。この液を陰電荷膜にろ過吸着させた後、陰電荷膜を 3% beef extract 液 10ml に浸漬し、超音波処理により吸着分子を溶出した。溶出液を再度遠心後、回収される上清を 100 倍濃縮下水検体とした。また、ポリエチレングリコール (PEG) 沈殿法により 250 倍濃縮下水検体を調整した。得られた濃縮下水検体から RNA 抽出を行った。

#### ② 集団発生事例

感染性胃腸炎の集団発生事例、及び食中毒事例からの検便は、各発生地を管轄する厚生センター (保健所) の職員が行った。便検体の 10% 乳剤上清から、厚生労働省通知 (食安監発 115001 号) に基づき RNA を抽出した。

### (2) NoV 遺伝子解析

各検体からは、厚生労働省通知 (食安監発 115001 号) に基づいて、NoV 遺伝子の抽出を行った。即ち、各検体から得られた RNA 抽出液を 37°C で 30 分間 DNase 処理した後、逆転写酵素及びランダムプライマーを用いて 42°C、60 分間逆転写反応を行った。各検体から得られた cDNA は、カプシド領域を対象としたプライマー G1-SKF/G1-SKR (GI 用)、G2-SKF/G2-SKR (GII 用) を用いて遺伝子増幅反応 (PCR) を行った。ポリメラーゼ領域とカプシド領域との間における組換え NoV の検出には、両者の境界領域 (翻訳領域 I(ORF1)と ORF2) を増幅対象としたプライマー 1421f/G1-SKR (1st 用) 及び 1364f/G1-SKR (nested 用) (以上 GI 用)、あるいは 1421f/NV2oR (1st 用) 及び 1364f/G2-SKR (nested 用) (以上 GII 用) (Nakamura K. *et al.*, *Jpn. J. Infect. Dis.*, 62: 394-398, 2009) を用いた nested PCR を行った。

上記により得られた PCR 産物から、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。ポリメラーゼ領域 (ORF1 の 3' 末端

側、GI : 496bp、GII : 499bp) とカプシド領域 (ORF2 の 5' 末端側、GI : 295bp、GII : 282bp) の各塩基配列を、Norovirus Genotyping Tool (URL : <http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool#>) を用いて、それぞれ型別判定を行った。また、レファレンス株を基にして CLUSTAL W ソフトウェアにより系統樹解析を行い、遺伝的距離を推定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 結果

① 2010~12 年の間に患者、下水流入水から検出された NoV の遺伝子型

集団発生の患者からは GII. 4、GII. 13、GII. 2 などが冬季から春季にかけて検出され、散发例の患者からは GII. 4、GII. 2、GII. 3 などが同様の時期に検出された。下水流入水からは、GI. 1、GI. 4、GI. 6、GII. 2、GII. 4、GII. 12、GII. 13 などが同様の時期に検出された。GI. 4 は、下水から 2010 年 6 月まで継続して検出されたが、その後減少し、2012 年 9 月以降に再び検出される傾向を示した (表 1)。

GI は、患者あるいは下水流入水から検出された 12 種類の遺伝子型のうち、GI. 4、GI. 7、GI. 8、GI. 11 の 4 種類のみが両者から共通に検出された。また、GI. 4 以外は両者からの検出時期が異なっていた。GII では、患者あるいは下水流入水から検出された 8 種類の遺伝子型のうち、GII. 2、GII. 3、GII. 4、GII. 12、GII. 13 の 5 種類が両者から共通に検出された。特に GII. 2、GII. 4 は、両者からの検出時期がおおむね一致していた。参考として示した SaV は、GI. 1、GI. 2、GII. 1 が患者と下水から共通に検出された。また、GI. 1 は検出時期がおおむね一致していた (表 1)。

③ 患者及び下水流入水から検出された NoV の比較

系統樹解析により、患者及び下水流入水から得られた NoV を比較した (データ非表示)。GI. 4 は、下水流入水と、患者とから検出された株は近縁であった。2010~2011 年には患者と下水流入水から検出された GII. 2 も近縁であった。これらは、参考として示した 2011 年 5~6 月に岩ガキから検出された GII. 2 と同種性が高かった。

GII. 4 については、2006b 亜型が 2010/11 シーズンと 2011/12 シーズンに患者と下水流入水から検出されていたが、2012/13 シーズンには両者から検出されなかった。2008a、2009a 亜型は、2010 年には患者のみから検出され、さらに 2010/11 と 2011/12 シーズンには、2009a 亜型が患者と下水流入水の両者から検出された。一方、2012/13 シーズンには、それまで検出されていなかった 2012 亜型が、患者と下水流入水とから検出されるように

なり、これ以外の亜型は検出されなかった。このように、GII. 4 は、短期間の間に亜型の発生傾向が変化した。

GI、GII ともに遺伝子型の判別ができない株が、患者、下水流入水からそれぞれ 1 株ずつ検出された。

③ 組換えウイルスの解析

2003~2011 年に富山県で得られた NoV 陽性の患者糞便検体 cDNA 435 検体を対象として、ポリメラーゼ領域とカプシド領域との境界領域の PCR を行ったところ、387 検体 (GI : 27 検体、GII : 360 検体) で塩基配列が得られた。Norovirus Genotyping Tool を用いてそれらのポリメラーゼ領域とカプシド領域の遺伝子型別を行ったところ、GI の 13 検体、GII の 112 検体で両者の遺伝子型が異なることが判明した (表 2)。特に、カプシド領域が GII. 2 と GII. 3 は、複数年にわたり検出され、ポリメラーゼ領域の遺伝子型が年により異なる傾向を示した。GII. 2 は、2002/2003 シーズンにポリメラーゼ領域が GII. 12 との組換えウイルスが 1 例検出され、2009/10 と 20010/11 シーズンには GII. 16 との組換えウイルスが多数検出された。一方、非組換え型も同時に検出されている (図 1)。

GII. 3 は、2005/06 にはポリメラーゼ領域が GII. 12 とのキメラが多数検出され、また、2009/10 シーズンには GII. b との組換え型が増加していた。非組み換え型と分類されたのは 2004 年の 1 例のみであった (図 2)。このように、シーズンにより組換え型の発生頻度が大きく変化する傾向を示した。

(2) 考察

GI. 4 は、過去の調査 (Iwai et al., Appl Environ Microbiol 75:1264-1270, 2009) と同様、下水から比較的高頻度に検出されたのに対して、患者からの検出は 1 例のみであった。したがって、GI は病原性が低く不顕性感染が多いと考えられる。下水と患者とから検出された株の遺伝子を比較したところ、両者の相同性が極めて高かったことから、GI による発症の有無は、ウイルスの遺伝子変異による病原性の変化よりは、宿主の状態の違いに依存している可能性が高いと考えられた。GI のように、不顕性感染が多く宿主との相互作用も少ない遺伝子型は、地域で安定して存続している可能性が考えられた。

GII. 4 は複数の亜型の消長が観察された。2009a 亜型は、2010 年は患者のみから、2011 年以降は患者と下水の両者から検出された。このことから、2011 年前後に 2009a 型が本地域に侵入した可能性が示唆される。同様に、2012 亜型も 2012 年以降に初めて患者及び下水から検出されているため、2012 年以降本地域に侵入したものと考えられる。上記 2 つの

亜型は、いずれも下水から先行して検出されることはなかったため、GII.4のように顕性感染を起こしやすい遺伝子型は、まず患者から検出され、地域にある程度の感染者が蓄積して初めて下水から検出されると予想される。

GIとGIIには、ポリメラーゼとカプシド領域間での組換えウイルスが患者検体から多数検出された。特に、GII.2とGII.3には、複数シーズンにわたってポリメラーゼ遺伝子型の異なる複数種類の組換えウイルスが消長していることが判明した。

GII.2では、非組換えウイルスが2003/4の患者から検出され、2010/11シーズンまで断続して検出されたのに対して、ポリメラーゼがGII.16との組換えウイルスは、2009/10シーズンの患者から初めて検出され、翌シーズンに検出数が増加した。GII.16との組換えウイルスは、遺伝子バンクに既に登録されているため、2009/10シーズンより以前に本地域に侵入したものと考えられる。

GII.2とGII.3が2006/07から2008/09シーズンの間に検出されていないのは、同時期にGII.4が大きく流行していた影響を受けているものと思われる。同時期の下水から、ほぼ毎月GII.4が検出されていることからこのことが裏付けられる。しかしながら、GII.2は2008年、GII.3は2006～09年の下水の一部から検出されているため、この間もこれらの株は地域に存続していたと推定される。このことは、地域には複数の遺伝子型が、同時に、また同程度に顕性感染としては流行しない疫学的な背景が存在することを示唆している。

GII.2、GII.3やGII.4のように顕性感染の多い遺伝子型は、組換え変異を起こしたり、亜型を形成したりして、遺伝子を大きく変化させながら消長を繰り返していると思われる。したがって、変異により宿主との相互作用を回避した株が、流行を引き起こす可能性が考えられる。以上から、宿主の免疫系などとの相互作用の程度が顕性と不顕性との違いを生じ、遺伝子型の流行と変異の程度にも影響しているものと推定される。

GI、GIIともに遺伝子型の判別ができない株が、患者、下水流入水から1株ずつ検出されている。これらは、本地域で発生した可能性も考えられるため、今後の解析が必要である。また、2007年1月に採取した健常乳幼児便から検出されたGII.7とGII.13の組換え変異の有無の解析は、PCRによる増幅産物が得られなかったため、本調査では結論を得るにいたらなかった。今後も、継続して解析する予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文] (計8件)

- ① 名古屋(小原)真弓、森岡誠二、堀元栄詞、板持(岩井)雅恵、小渕正次、滝澤剛則、ウイルス性胃腸炎の集団発生事例及び散发例について(2011年度)、富山県衛生研究所年報、査読無、35巻、2012、74-79.
- ② Masae Iwai, Eiji Horimoto, Mayumi Obara, Masatsugu Obuchi, Takeshi Kurata, Kumiko Kawagoshi, Sumika Nakamura, Hiroyuki Shimizu, Hiromu Yoshida, and Takenori Takizawa, Endemic transmission of echovirus 30 in Toyama, 2010 verified by environmental surveillance. Japanese Journal of Infectious Diseases, 査読有, Vol. 64, 2011, 163-167.
- ③ 小原真弓、森岡誠二、小渕正次、岩井雅恵、堀元栄詞、滝澤剛則、ウイルス性胃腸炎の集団発生事例及び散发例について(2010年度)、富山県衛生研究所年報、査読無、34巻、2011、74-79.
- ④ Nakamura K, Saga Y, Iwai M, Obara M, Horimoto E, Hasegawa S, Kurata T, Okumura H, Nagoshi M and Takizawa T, Frequent Detection of Noroviruses and Sapoviruses in Swine Population and High Genetic Diversity of Porcine Sapovirus in Japan, during fiscal year 2008. Journal of Clinical Microbiology, 査読有, Vol. 48, 2010, 1215-1222.
- ⑤ Masae Iwai, Eiji Horimoto, Mayumi Obara, Masatsugu Obuchi, Takeshi Kurata, Kumiko Kawagoshi, Sumika Nakamura, Hiroyuki Shimizu, Hiromu Yoshida, and Takenori Takizawa, High prevalence of echovirus type 13 in Toyama, Japan in 2002 confirmed by seroepidemiological study. Clinical and Vaccine Immunology, 査読有, Vol. 17, 2010, 764-770.
- ⑥ Kazushi Motomura, Masaru Yokoyama, Hirotaka Ode, Hiromi Nakamura, Hiromi Mori, Tadahito Kanda, Tomoichiro Oka, Kazuhiko Katayama, Mamoru Noda, Tomoyuki Tanaka, Naokazu Takeda, Hironori Sato, and the Norovirus Surveillance Group of Japan (Takenori Takizawa), Divergent Evolution of Norovirus GII/4 by Genome Recombination from May 2006 to February 2009 in Japan. Journal of Virology, 査読有, Vol. 84, 2010, 8085-8097.
- ⑦ 宗玄俊一、小原真弓、長谷川澄代、岩井雅恵、滝澤剛則、当院における小児ウイ

ルス性下痢症の臨床的及びウイルス学的検討(2002年～2008年). 小児感染免疫、査読有、22巻、2010、23-28.

- ⑧ 小原真弓、長谷川澄代、森岡誠二、中村一哉、岩井雅恵、堀元栄詞、倉田毅、滝澤剛則、ウイルス性胃腸炎の集団発生事例及び散発例について(2009年度)、富山県衛生研究所年報、査読無、33巻、2010、97-102.

[学会発表] (計7件)

- ① 稲崎倫子、名古屋(小原)真弓、堀元栄詞、嶋一世、小渕正次、佐多徹太郎、滝澤剛則、富山県における2011/2012シーズンのウイルス性胃腸炎発生状況、第47回富山県公衆衛生学会 平25.2.7、富山市
- ② 名古屋(小原)真弓、板持(岩井)雅恵、稲崎倫子、堀元栄詞、小渕正次、佐多徹太郎、滝澤剛則、ノロウイルスにおけるキメラウイルスが感染性胃腸炎の流行に与える影響、第60回日本ウイルス学会学術集会、平24.11.14-15、大阪市
- ③ 佐多徹太郎、名古屋(小原)真弓、滝澤剛則：ノロウイルス組換え株が感染性胃腸炎の流行に与える影響. 平成24年度北陸腸内細菌研究会研究発表会、平24.7.14、金沢市
- ④ 名古屋(小原)真弓、富山県における胃腸炎ウイルス検出状況、平成23年度地方衛生研究所全国協議会 東海北陸支部微生物部会 平24.3.1-2、岐阜市
- ⑤ 名古屋(小原)真弓、板持(岩井)雅恵、堀元栄詞、小渕正次、佐多徹太郎、滝澤剛則、富山県における過去3年間のウイルス性胃腸炎発生状況、第46回富山県公衆衛生学会 平24.2.9、富山市
- ⑥ Mayumi Obara、Masae Iwai、Masatsugu Obuchi、Eiji Horimoto、Takeshi Kurata、Takenori Takizawa、Recombinant noroviruses of GII.3 prevalent from 2003 to 2010 in Toyama prefecture, Japan. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011.9.11-16, Sapporo City
- ⑦ 滝澤剛則、小原真弓、富山県における集団発生事例からのノロウイルス検出状況(平成22年度)、平成22年度地方衛生研究所全国協議会 東海北陸支部微生物部会 平23.3.3-4、福井市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

滝澤 剛則 (TAKIZAWA TAKENORI)  
富山県衛生研究所・ウイルス部・部長  
研究者番号：40192158

### (2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

板持(岩井) 雅恵 (ITAMOCI-IWAI MASAE)  
富山県衛生研究所・ウイルス部・主任研究員

研究者番号：70393080

名古屋(小原) 真弓 (NAGOYA-OBARA MAYUMI)  
富山県衛生研究所・ウイルス部・主任研究員

研究者番号：80393081

図1. ノロウイルス GII.2 のシーズンごとの変化

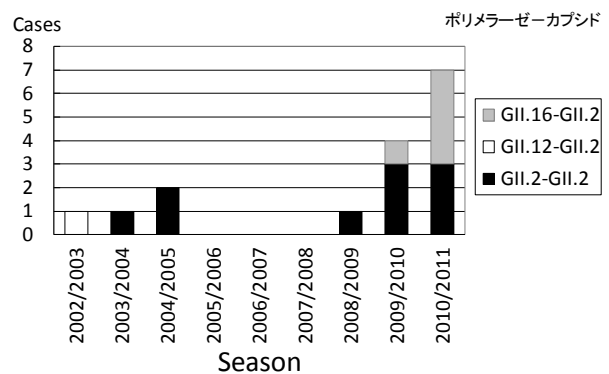


図2. ノロウイルス GII.3 のシーズンごとの変化

