

鳥取県のウイルス性下痢症

【保健衛生室】

浅野 康子、山本 香織、白井 僚一

要旨

感染性下痢症は、多くの細菌、ウイルスや寄生虫などの多種多様の原因で生じる疾患である。今回、感染性下痢症の中でもノロウイルスやロタウイルスなどのウイルス性の下痢症について、ELISA、PCR 法やリアルタイム PCR 法を用い、県内での近年の発生傾向を調べ、原因ウイルスの同定と解析を行った。便検体 359 件のウイルス同定を行ったところ、57%から何らかのウイルスが検出された。ノロウイルスについて、Genogroup I (GI) と Genogroup II (GII) の検出頻度を比較したところ、GI に比べて圧倒的に GII の検出頻度が高かった。一方、これらのノロウイルスの検出数と月平均気温の間に相関関係は認められなかった。さらに、アストロウイルスのうち 9 検体について、シーケンスデータを用いて相同性解析を行ったところ、2 つの異なる遺伝子配列が検出された。これらの結果から、鳥取県内の感染性下痢症は、さまざまなウイルスが原因となって引き起こされていることが明らかとなった。また、下痢症の原因となるウイルスの流行は、季節によって変化すると考えられる。

1 序論

急性感染性下痢症は全国的に発生が多い疾患であり、毎年 80～120 万人の発生が推定されている。急性感染性下痢症は、鳥取県でもいわゆる『かぜ』に次ぐ高頻度で発生する感染症である。この疾患の感染様式としては、地域での散発の他、感染患者からの感染、汚染された水や食品からの感染があげられ、時として学校や施設等での大流行を生じ、社会的な問題にもなっている。感染性下痢症の原因は、多くの細菌、ウイルス、原虫などの寄生虫など多種多様であり、症状での鑑別は困難である。

今回、急性感染性下痢症の中でも小児に頻発するウイルス性の下痢症について、県内における近年の発生傾向を調べ、原因ウイルスの同定と解析を行ったので、その概要について報告する。

2 調査方法

1) 調査対象

2004 年 5 月から 2011 年 5 月まで、感染症発生動向調査事業において感染性胃腸炎および乳児嘔吐下痢症と診断された検体、さらに同事業において下痢を主症状とする症例について、便検体を調査対象とした。

2) 方法

① A 群ロタウイルス、アデノウイルス 40/41 型の ELISA による検出

抗原検出用キットであるロタクロンおよびアデノクロン E (TFB 社) を使用した。

② エンテロウイルス、アストロウイルス、サポウイルスの RT-PCR 法による検出およびシーケンスによる同定

a) ウイルス RNA の抽出と逆転写反応による相補的 DNA (cDNA) の作製

便検体からのウイルス RNA 抽出には QIAGEN の抽出キットを用いた。抽出された RNA から、Superscript II (Invitrogen) を用いた逆転写反応により相補的 DNA を作製した。

b) PCR に用いた各プライマー配列

エンテロウイルスの検出には EVP4 (CTACTTTGGGTGTCCGTGTT) と OL68-1 (GGTAAYTCCACCACCANCC)、アストロウイルスには Mon269 (CAACTCAGG AAACAGGGTGT) と Mon270 (TCAGATGCATTGTCATTGGT)、サポウイルスには SR80 (TGGGATTCTACACAAAACCC) と JV33 (GTGTAN ATGGARTCATCACC) を用いた。

c) シークエンサーによる塩基配列の決定とウイルスの同定

PCR により、それぞれのウイルス陽性だったものに

ついて、ダイレクトシーケンスを行い、DNA シークエンサーにより塩基配列を決定した。次いで、得られた配列について DDBJ (DNA Data Bank of Japan) の BLAST 検索により、検出されたウイルスの同定を行った。

d) アストロウイルスの系統樹解析

系統樹の作成のため、シーケンスデータの Alignment 解析を、フリーソフトウェアの CLUSTALW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) を用いて行った。その解析データを基に、FigTree v1.3.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) によって系統樹を作成した。

③ リアルタイム PCR によるノロウイルスの検出
得られた相補的 DNA について、TaqMan プローブ法によるリアルタイム PCR を用い、GenogroupI (GI) と GenogroupII (GII) それぞれ別に定量的検出を行った。

3 結果

1) 県内における感染性胃腸炎の発生状況

過去 13 年間の感染性胃腸炎の発生状況には、各年による差はほとんど見られなかった。傾向としては、11 月から年をまたいで 2 月頃まで流行がみられ、その後 4 月をピークとして再び流行していた。気温の上昇する 6 月には減少に転じ、9 月までは減少傾向が続いた (図 1)。

2) ウイルス検出状況と検出割合

2010 年 6 月から 2011 年 5 月までの直近 1 年間に、感染症発生動向調査事業における便検体 359 件のウイルス同定を行ったところ、57% から何らかのウイルスが検出された (図 2)。ウイルス別では、ノロウイルスが約半数と圧倒的に多く、次いで A 群ロタウイルスが 20% 検出された。A 群ロタウイルスは、遺伝子解析を使用する他のウイルスよりも、ELISA 測定法の検出感度が低いのに関わらず、ウイルスの検出率が高かった。また、同期間における各月の未同定検体数を調べたところ、2010 年、2011 年ともに 4 月をピークとして同定出来なかった検体数が多かった (図 3)。これらのことから、検出感度には満たないが A 群ロタウイルスに感染していると予想される検体が、3~5 月にかけて多く存在したものと考えられる。

ウイルス別の検出割合では、アストロウイルスが、県内では 2006 年 7 月以降 4 年ぶりに比較的高い割合で検出された。その他、エンテロウイルス、サポウイルス、

アデノウイルスなどが検出された (図 2)。エンテロウイルスに分類されるポリオウイルスについては、胃腸炎の原因となるウイルスが全てワクチン由来株だったことから、その他として分類を行っている。

次いで、2010 年 1 月から 2011 年 5 月までの各ウイルスの検出数を月別に比較した (図 4)。その結果、同時期に多種のウイルスが検出されるわけでは無く、少しずつずれが生じていることが明らかとなった。

3) A 群ロタウイルスとノロウイルスの過去 6 年間の検出状況

鳥取県では、ノロウイルスは冬季に増加し夏季には減少していた。一方、A 群ロタウイルスはノロウイルスが流行している時期にはほとんど検出されず、ノロウイルスの減少と同時に検出数が増加していた。2006 年は、ノロウイルスの検出ピークが 11 月と早期であったが、A 群ロタウイルスの検出ピークも 2 月であり、全体的に前倒し傾向がみられた (表 1)。さらに、2010 年 1 月から 2011 年 5 月までに検出されたノロウイルスについて、GenogroupI (GI) と GenogroupII (GII) の検出頻度を比較したところ、GI が 3 件 (2.2%) だったのに対し、GII が 111 件 (82.2%) であり、圧倒的に GII の検出頻度が高かった (図 5)。したがって、2010 年度 4 月以降に小児で流行したノロウイルスはほとんどのケースで GII が感染源であったと推察される。

4) 月平均気温とノロウイルス検出数の相関

一般的に『ノロウイルスは寒い時期に注意』と言われていることから、2004 年以降の月別のノロウイルス検出数と平均気温について、相関の有無を調べた。その結果、平均気温が 18℃ を下回ると検出数が一気に増加するが、気温と検出数の間に相関関係は認められなかった (図 6)。

5) 2010 年に県内で検出されたアストロウイルスの遺伝子解析

県内で 4 年ぶりに検出されたアストロウイルスのうち 9 検体について、シーケンスデータを用いて相同性解析を行った。その結果、全ての検体は 1 型アストロウイルスの血清型に分類された。さらに詳細を調べると、9 検体中 7 検体が 01_12_2010_Tottori、2 検体が 02_12_2010_Tottori という、2 つの異なる遺伝子配列が検出されていた (図 7)。この 2 つの配列、01_12_2010_Tottori および 02_12_2010_Tottori について、このシーケンス領域がコードする capsid

protein 遺伝子 (348bp) について、すでに NCBI (National Center for Biotechnology Information) の Nucleotide Database に登録されている 18 株と共に系統樹を用いた解析を行った。その結果、01_12_2010_Tottori は、2010 年ハンガリー株 (Accession:HQ398856) に相同性が高く、02_12_2010_Tottori は 2009 年ロシア株 (Accession:FJ866761) や 2004 年ドイツドレスデン株 (Accession:AY720892) に近縁であることが明らかとなった (図 8)。したがって 2 つの異なる系統のアストロウイルスが、同年同時期に鳥取県内で流行したものと考えられる。

4 考察

鳥取県内の感染性胃腸炎は、大きく分けて秋シーズン以降に始まり 12~1 月にピークとなる流行と、3~4 月にピークとなる 2 峰性の流行が認められた。このうち秋から冬の流行はノロウイルス感染、2 番目の早春からの流行は A 群ロタウイルスの感染が主たる原因であると考えられる。

また、アストロウイルスが、2010 年 11~12 月に流行していたことが確認されたことから、ウイルスの流行には、年単位の周期があることが示唆される。

以上のことから、ウイルスの流行は季節による変化があり、2010 年には 1 月からノロウイルス → A 群ロタウイルス → エンテロウイルス → サポウイルス → アストロウイルス → ノロウイルスと推移していた。一方、平均気温とノロウイルス検出数には相関が見られなかったことから、気温に関係無く年間通じてノロウイルス感染のリスクがあると考えられる。

5 参考文献

- 1) 国立感染症研究所 病原体診断マニュアル, 2003
- 2) 国立感染症研究所 ウイルス性下痢症診断マニュアル (第 3 版), 2003
- 3) 原田誠也他: サポウイルス、アストロウイルス及びアイチウイルス同時検出 RT-multiplex PCR 法の構築と下痢症起因ウイルスの検査成績、熊本県保健環境科学研究所報 第 34 号, 31-36 (2004)
- 4) 濱田雅子: 岡山県における胃腸炎ウイルスの流行状況、第 65 回地方衛生研究所全国協議会中国四国支部会議 会長表彰者記念講演 (2011)

Viral Genetic Characterization of Infectious Diarrhea in Tottori Prefecture

Yasuko ASANO, Kaori YAMAMOTO, Ryoichi SHIRAI

Abstract

Infectious diarrheas are caused by various factors such as viruses, bacteria, parasites. To explore the viral genetic characterization of infectious diarrhea in Tottori, we detected and analyzed the virus which induces diarrhea such as Norwalk virus (Norovirus), Rotavirus by using ELISA, PCR and real-time PCR technique. Various kinds of viruses were detected from 359 stool samples (positive; 57%, negative; 43%). In Norwalk virus, the majority of the cases were identified as Genotype II (GII), rather than Genotype I (GI). These were not correlated with the average monthly temperature. In addition, nine sequence data obtained from Astrovirus showed that these viruses classified into two kinds of genetic type. In conclusion, it is cleared that the infectious diarrhea caused by various viruses in Tottori. And then, these observations indicate that the viruses detected from diarrhea have considerable variations in each season.

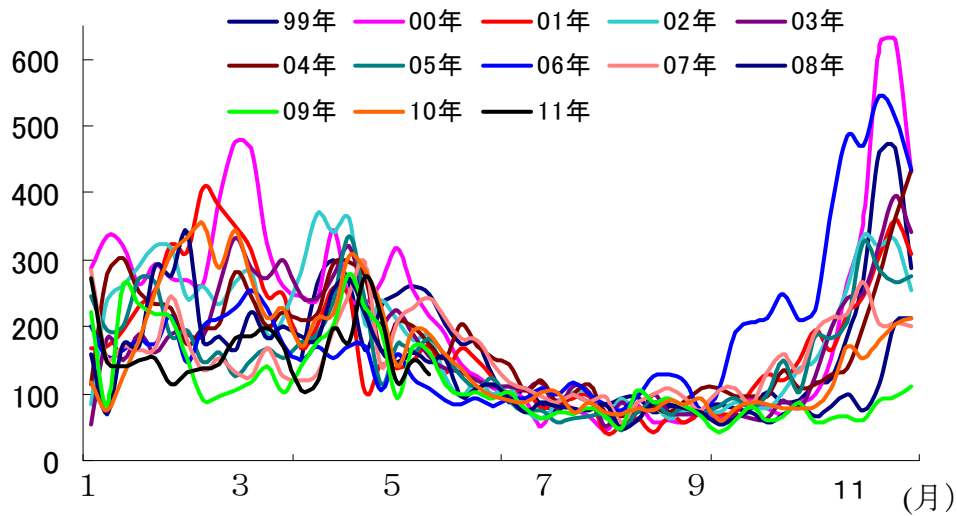


図1 県内の感染性胃腸炎発生状況

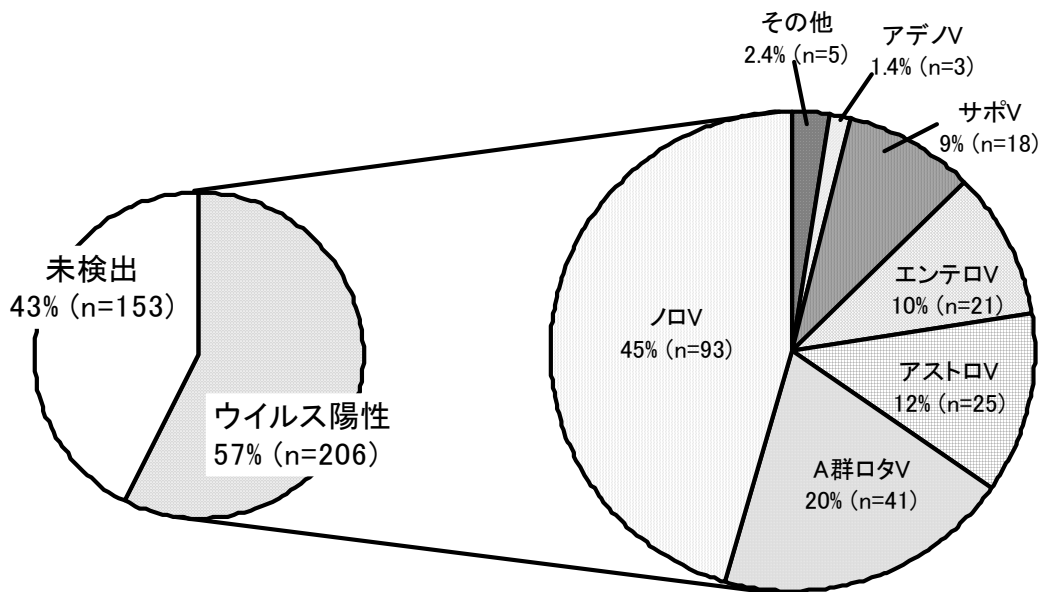


図2 直近1年間の下痢症ウイルス検出状況

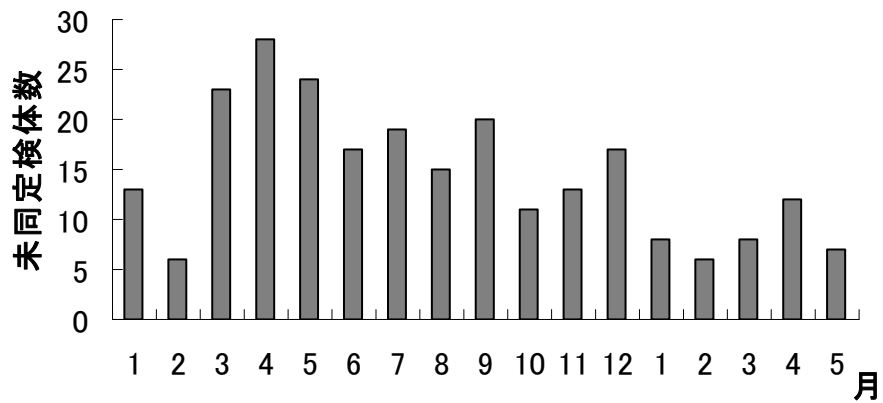


図3 月別の未同定検体数

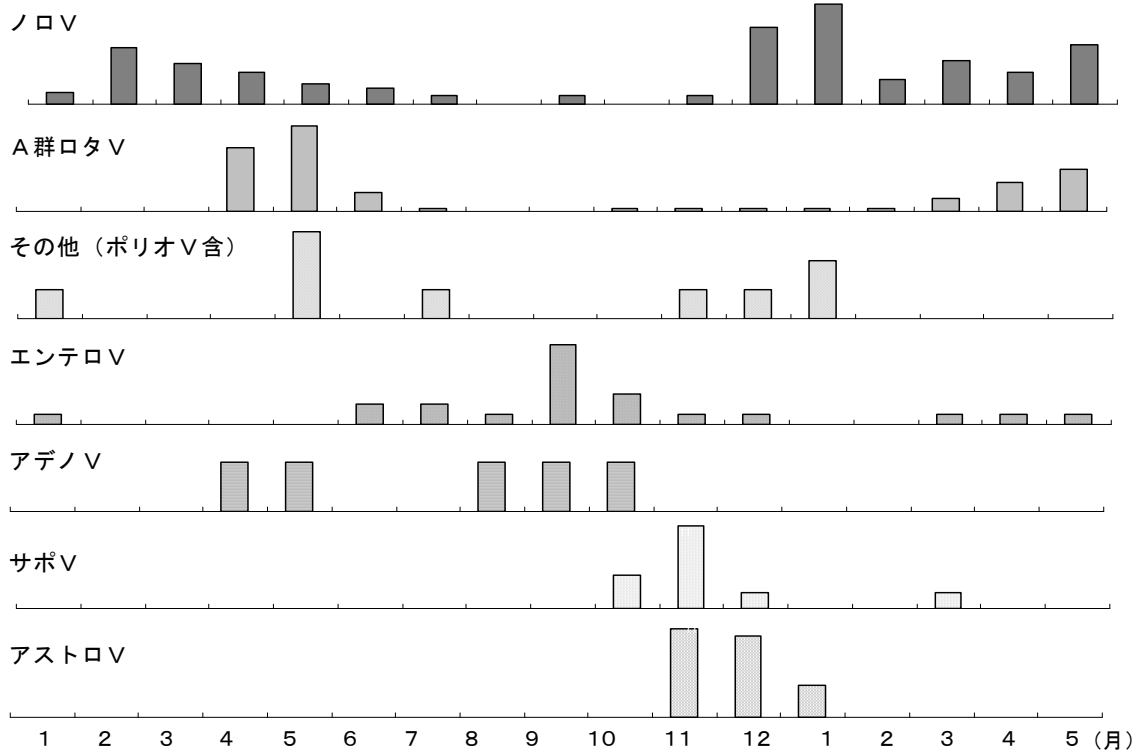


図4 各ウイルスの検出時期の比較

ノロウイルスの2004～2011年までの月別検出状況												
年\月	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2004	6	2	2	3	2	0	0	0	0	0	1	1
2005	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	10
2006	3	3	0	1	2	0	0	0	0	9	21	7
2007	4	0	1	4	0	0	0	0	0	14	8	9
2008	11	4	4	9	2	2	0	0	0	0	0	7
2009	29	9	3	3	0	1	0	0	0	0	0	1
2010	9	13	5	9	6	3	1	2	0	0	2	19
2011	25	6	11	8	15	-	-	-	-	-	-	-

ノロウイルスの2004～2011年までの月別検出状況												
年\月	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2004	6	2	2	3	2	0	0	0	0	0	1	1
2005	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	10
2006	3	3	0	1	2	0	0	0	0	9	21	7
2007	4	0	1	4	0	0	0	0	0	14	8	9
2008	11	4	4	9	2	2	0	0	0	0	0	7
2009	29	9	3	3	0	1	0	0	0	0	0	1
2010	9	13	5	9	6	3	1	2	0	0	2	19
2011	25	6	11	8	15	-	-	-	-	-	-	-

表1 ノロウイルス・A群ロタウイルスの月別検出数

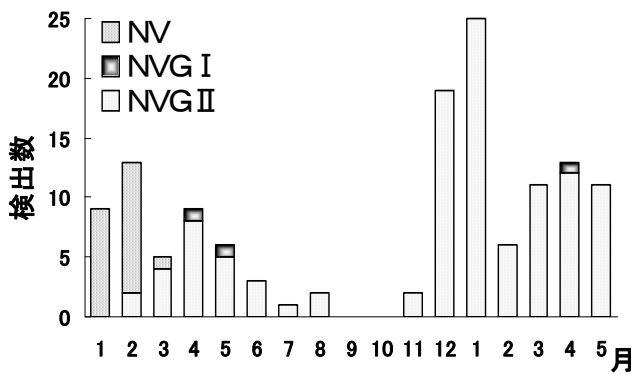


図5 ノロウイルスの GI、GII の検出数

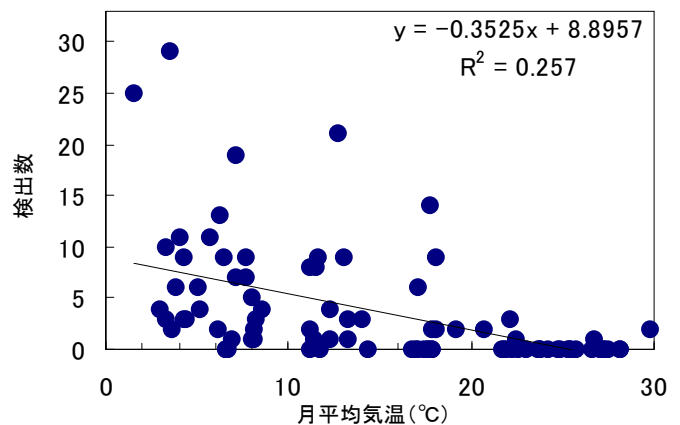


図6 月平均気温とノロウイルスの検出数

1st Sequence : 01_12_2010_Tottori (402bp)
 2nd Sequence : 02_12_2010_Tottori (403bp)

```

1' CTGCAATTT GTCAGAGAGC ACAGCAACCC TTGGGACAGT CGGGTCAAAC ACCAGTGGCA
   **** * * * ***** ***** ***** * * ***** *****
1'' ACTGCGATAT GTCAGAGAGC ACAGC-ACCC TTGGGACGGT CGGGTCAAAC ACCAGTGGCA

60' CCACTGAGAT TGAGGCGTGT ATTCTCCTCA ACCCTGTCCT CGTTAAGGAC GCTACTGGAA
   **** * * * ***** ***** ***** ***** ***** * *
60'' CCACCGAGAT CGAGGCGTGT ATTCTCCTCA ACCCTGTCCT TGTTAAGGAC GCTACTGGGA

120' GTA CTGAGTT TGGCCCTGTG CAGGCGCTAG GTGCACAGTA CTCCATGTGG AAGTTAAAGT
   ***** ***** ***** ***** ***** ***** * * * *
120'' G TACTCAGTT TGGCCCTGTG CAGGCGCTAG GTGCTCAGTA TTCCATGTGG AACTGAAGT

180' ATTTGAATGT CAAATTGACC TCTATGGTTG GTGCATCTGC CGTTAATGGT ACTGTTCTCA
   * * ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * *
180'' ATCTGAATGT CAAACTGACT TCTATGGTCG GTGCGTCTGC CGTCAATGGC ACTGTCCTA

240' GGGTCTCACT TAACCCACA TCTACGCCAT CTTCCACTAG TTGGTCAGGA TTAGGCGCAC
   * ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
240'' GAGTCTCACT TAACCCTACA TCTACACCGT CATCCACTAG TTGGTCAGGG TTGGGTGCAC

300' GTAAACATCT TGATGTTACG GTTGGTAAGA ATGCAACATT TAAATTGAAA CCTTCTGACC
   **** * * * ***** * * * * * * * * * * * * * * * *
300'' GTAAGCACCT TGATGTTACA GTGGGAAAAA ATGCAACATT TAAATTGAAA CCCTCTGACC

360' TTGGTGGACC TAGGGATGGT TGGTGGCTTA CTAACACCAA TG
   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
360'' TAGTGGGCC TAGAGATGGC TGGTGGCTCA CGAACACCAA TG
  
```

図7 2010年に県内で検出されたアストロウイルスの相同性解析

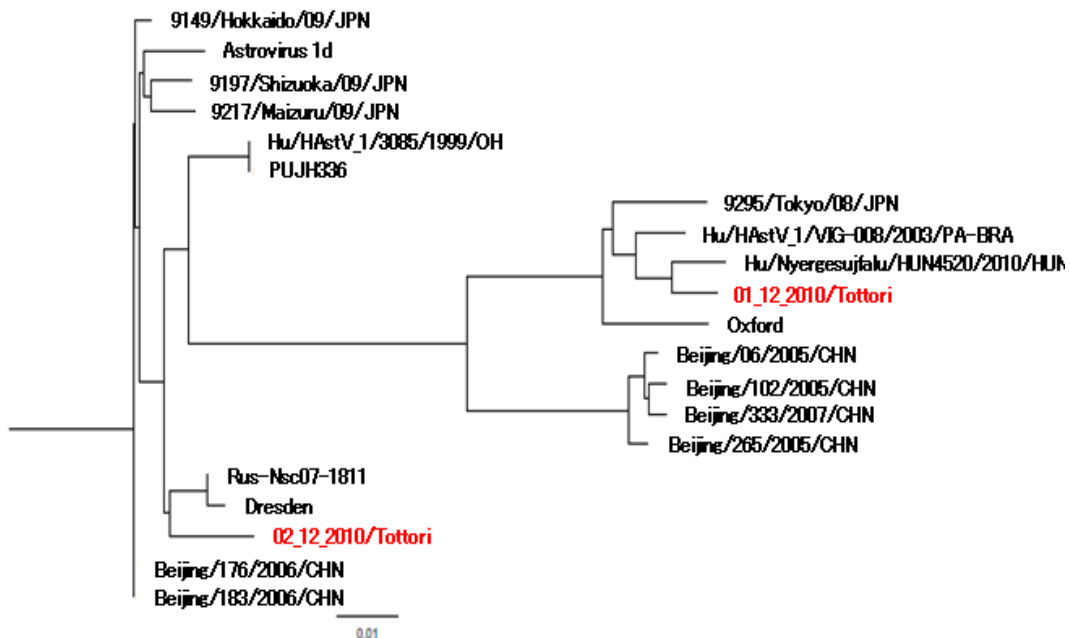


図8 県内で検出されたアストロウイルスの系統樹解析