

3 調査研究

3・1 報文

1) 過去 10 年間の熊本県内における下痢症ウイルス検出状況について

笠 純華 原田誠也 八尋俊輔*1 酒井 崇*2 徳岡英亮

要 旨

下痢症の原因となるウイルスは、ノロウイルス、サポウイルス、アデノウイルスなど様々である。熊本県内において、過去 10 年間に感染症発生動向調査（小児科定点）では全部で 9 種類、集団発生（有症苦情・食中毒）事例では全部で 4 種類の下痢症ウイルスが検出されたが、ともに最も多かったのはノロウイルスであった。また、ノロウイルス及びサポウイルスについては遺伝子型の同定を行い、その動向を調査した結果、小児科定点と有症苦情・食中毒事例で異なる傾向がみられた。

キーワード：ウイルス性下痢症、感染症発生動向調査、食中毒、有症苦情、遺伝子型

はじめに

下痢症の原因となるウイルスには様々なものがあり、当所で行っている感染症発生動向調査においてはノロウイルス (NV)、サポウイルス (SV)、アデノウイルス (AdV)、ロタウイルス (RV)、エンテロウイルス (EntV)、アストロウイルス (AstV) など多様なウイルスが検出されている。さらに、集団食中毒や保育施設・社会福祉施設等における下痢症の集団発生事例においても、NV をはじめとするいくつかの種類のウイルスが検出されている。これらの検査では NV が多く検出されているが、実際の検出割合は不明である上、その遺伝子型も様々であると予想される。

また、NV と同じカリシウイルス科の SV も複数の検出例がある。2007 年にはそれまで熊本県内で検出されていなかった GIV が大規模に発生した例があり¹⁾、遺伝子型の動向を継続して調査することは重要であると考えられる。

本研究は、過去 10 年間の感染症発生動向調査（小児科定点）及び集団発生（有症苦情・食中毒）事例をまとめ、熊本県内で発生した下痢症ウイルスの発生動向の特徴をつかむことを目的として行った。なお、下痢症発生事例において、当所では細菌検査も同時に行うことがあるが、本研究はウイルスのみに焦点を当てて行った。

材 料

2014 年 1 月から 2023 年 12 月までに、熊本県内の小児科定点医療機関を受診した急性胃腸炎患者の糞便 409 検体

と、集団発生（有症苦情・食中毒）事例のうちウイルス検査を行った 204 事例の糞便、吐物、ふき取り及び食品材料 2,425 検体を対象として検査を行った。

方 法

1. 検体の前処理

糞便及び吐物検体は、PBS (-) で 10% 乳剤を作製し、10,000 rpm で 10 分間遠心後の上清を試料液とした。拭き取り検体は、検液 4 mL に 7.5% Beef Extract 水溶液 0.5 mL を加えたものを、食品検体は、食品 10 g に PBS (-) 50 mL 加えて 15 分間超音波処理を行い、 α -アミラーゼ溶液を 1 mL 添加し、37°C で 1 時間消化した後 10,000 rpm で 20 分間遠心した上清を用いて、厚生労働省通知²⁾ に準じた方法で試料液を作製した。

2. 遺伝子抽出と cDNA 作製

RNA の抽出には、QIAamp Viral RNA キット (QIAGEN) を用いた。その後、糞便、吐物、拭き取り検体由来の RNA に対して、PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) (TaKaRa) を使用して cDNA を合成した。食品検体由来の RNA に対しては、Recombinant DNase I (RNase-free) (TaKaRa) を使用して DNase 処理を行った後、糞便検体等由来 RNA と同様の方法で cDNA を合成した。

3. リアルタイム PCR 法による NV の検出

NV の検査は、既報³⁾ の方法を使用した。ただし、PCR の機械は LightCycler 480 II (Roche) を使用した。

*1 現健康福祉部健康局薬務衛生課 *2 現県北広域本部保健福祉環境部

4. リアルタイム PCR 法による SV, AstV, AdV, RV 及び EntV の検出

SV 及び AstV は単独でそれぞれ検査を行った。PCR 反応液は Premix Ex Taq (Perfect Real Time) (TaKaRa) : 10 µL, 各 4 µM に調製したプライマー・プローブミックス溶液 : 2 µL, Nuclease Free Water : 3 µL に cDNA : 5 µL を加え, 全量を 20 µL とした。

AdV と A 群 RV, EntV と C 群 RV は, それぞれ同時に検出可能な系を構築し, 検査を行った。PCR 反応液は Premix Ex Taq (Perfect Real Time) (TaKaRa) : 10 µL, 各 4 µM に調製したプライマー・プローブミックス溶液 : 各 2 µL, Nuclease Free Water : 2 µL に cDNA : 4 µL を加え, 全量を 20 µL とした。

使用したプライマー, プローブは表 1 のとおりである。反応条件は, 95°C, 30 秒加熱後, 熱変性 (95°C, 5 秒) とアニーリング・伸長反応 (60°C, 30 秒) を 45 サイクル行い, 最後に 40°C, 30 秒で冷却した。

5. コンベンショナル PCR 法によるパレコウイルス, ボカウイルス, アイチウイルスの検出

パレコウイルス (PeV), ボカウイルス (BoV) 及びアイチウイルス (AiV) は, 表 2 に示すプライマーを用いた PCR によりそれぞれ検出した。PCR の反応液は 10 × PCR Buffer (TaKaRa) : 2.5 µL, dNTPs (2.5 mM) : 2 µL, 20 µM に調製した目的ウイルスのプライマー: 各 0.5 µL, Ex Taq enzyme (2.5 U/µL) : 0.125 µL, Nuclease Free Water : 16.875 µL に cDNA : 2.5 µL を加え, 全量を 25 µL とした。PeV のみ追加で Nested PCR を行い, 反応液は 10 × PCR Buffer (TaKaRa) : 2.5 µL, dNTPs (2.5 mM) : 2 µL, 20 µM に

調製した目的ウイルスのプライマー: 各 0.5 µL, Ex Taq enzyme (2.5 U/µL) : 0.125 µL, Nuclease Free Water : 18.375 µL に 1st PCR 産物 : 1 µL を加え, 全量を 25 µL とした。反応条件は, 94°C, 3 分加熱後, 熱変性 (94°C, 30 秒), アニーリング (50°C, 30 秒), 伸長反応 (72°C, 1 分) を 40 サイクル行い, 最後に 72°C, 7 分反応後, 4°C で保存した。

6. ダイレクトシーケンス法による NV 及び SV の遺伝子型決定

前述のリアルタイム PCR で NV あるいは SV が陽性となった検体について, シークエンス解析を行い, 遺伝子型を決定した。

初めに, 病原体検出マニュアル^{4, 5)} 記載のコンベンショナル PCR で NV は VP1 領域もしくは RdRp-VP1 領域を, SV は VP1 領域を増幅し, その産物を Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) または ExoSAP-IT (ThermoFisher Scientific) を使用して精製した。次に, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher Scientific) を使用しシーケンス反応を行った後, BigDye Xterminator Purification Kit (ThermoFisher Scientific) で Dye と塩を除去精製し, 3500 ジェネティックアナライザ (Applied Biosystems) または SeqStudio 8 Flex ジェネリックアナライザ (Applied Biosystems) で塩基配列を決定した。最後に MEGA 11 (<https://www.megasoftware.net/>) で配列を整え, Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) あるいは Norovirus Genotyping Tool (<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus/>) を用いて Capsid 領域の遺伝子型を判定した。

表 1 SV, AstV, AdV, RV 及び EntV の検出に用いたプライマー・プローブ

ウイルス	プライマー (F)	プライマー (R)	プローブ
SV ⁶⁾	SaV124F, SaV1F, SaV5F	SaV1245R	SaV5TP, SaV124TP
AstV ⁷⁾	HuAstV2140, HuAstV2240, HuAstVf2239T4	HuAstVr4123	HuAstV1-8/TP
AdV ⁸⁾	AdV-F	AdV-R	AdV-P
A 群 RV ⁹⁾	NVP3F	NVP3R	NVP3P
EntV ¹⁰⁾	EnteroPrimer1F	EnteroPrimer1R	EnteroTaqman1
C 群 RV ⁹⁾	VP6F	VP6R	VP6P

表 2 PeV, BoV 及び AiV の検出に用いたプライマー

ウイルス	プライマー (F)	プライマー (R)
PeV ¹¹⁾	1 st) HPeV253 2 nd) HPeV313	1 st) HPeV583 2 nd) HPeV556
BoV ¹²⁾	188F	542R
AiV ¹³⁾	C6261	C6779

結 果

1. 小児科定点由来検体の検査結果

表 3 に, 小児科定点由来検体から病原体が検出された数を年次ごとに示す。搬入された全 409 検体の 61.4% を占める 251 検体から何らかの病原体が検出された。検出されたウイルスの種類は, NV, SV, AstV, AiV, RV, AdV, EntV, PeV, BoV の 9 種類であり, 最も検出数が多かったのは NV (GII) であった。

次に, 表 4 に, 月別の検出数を示す。NV (GII) は冬季に検出数が増加していた一方で, 同じカリシウイルス科の SV は明確な季節性が無く, 7 月や 8 月といった夏季にも検出された。また, A 群 RV は春季に, EntV は夏季から秋季にかけて検出されやすい特徴があった。

続いて, 1 検体から 2 種類以上の病原体が検出された混合感染の検体数を表 5 にまとめた。NV (GII) とほかのウイルスの混合感染が多くみられたが, 単独感染事例と比べて異なる特徴は認められなかった。

最後に, NV と SV 陽性検体について, Capsid 領域に基づく遺伝子型の検出状況を表 6 にまとめた。NV (GI) は GI.3, NV (GII) は GII.4, SV は GI.1 が最も多く検出された。

2. 集団発生 (有症苦情・食中毒) 事例検体の検査結果

表 7 に, 集団発生事例のうちウイルス検査の依頼があ

った事例件数と, その中でウイルスが検出された事例を年次ごとに示す。事例件数は全部で 204 件であり, その中の 52.9% にあたる 108 件でウイルスが検出された。検出されたウイルスの種類は, NV, SV, A 群 RV, EntV の 4 種類と少なく, 特に NV (GII) が 96 件と大部分を占めていた。また, 2 種類のウイルスが検出された事例が 4 例存在した。

次に, 月別の事例件数を表 8 に示す。NV (GII) の件数が 11 月から 2 月の冬季に多かったため, 全体の陽性件数も冬季に増加した。一方で, 陽性事例が発生しなかった月はなく, 件数は少ないものの夏季にもウイルスの集団感染が発生している。

最後に, NV と SV 陽性事例について, 遺伝子型の検出状況を表 9 にまとめた。NV (GI) については事例数が少なく傾向をつかむことはできなかったが, GI.2, GI.3, GI.5, GI.7 の 4 種類の遺伝子型が検出された。NV (GII) は GII.2, GII.3, GII.4, GII.6, GII.13, GII.17 の 6 種類の遺伝子型が検出され, 特に GII.2, GII.4, GII.17 が多く検出された。また, GII.4 は毎年検出されているのに対して, GII.2 は 2016 年から 20 年にかけて, GII.17 は 2015 年から 16 年, 2018 年から 19 年にかけて特に集中して検出されていた。SV については, 小児科定点では検出されなかった GI.2 が集団発生事例では検出された。

表 3 下痢症ウイルス年次検出数 (小児科定点)

年	検体数	陽性数	NV (GI)	NV (GII)	SV	AstV	AiV	RV (A)	RV (C)	AdV	EntV	PeV	BoV	細菌	陰性
2014	68	36		12	3	3		7	1	1	7		3	3	32
2015	52	31	5	17			1	2		2	3	1		7	21
2016	65	42	3	14	8	1		11		5	2			2	23
2017	46	24	1	17	2			1		2	1			1	22
2018	40	34		10	12	4		1		6	2			6	6
2019	76	53	1	33	4	4		2		4	7	6	1	2	23
2020	29	19	1	12	1					1		5			10
2021	12	7		3						1		4			5
2022	10	4			2					2					6
2023	11	1		1											10
合計	409	251	11	119	32	12	1	24	1	24	22	16	4	21	158

表 4 下痢症ウイルス月別検出数 (小児科定点)

月	検体数	陽性数	NV (GI)	NV (GII)	SV	AstV	AiV	RV (A)	RV (C)	AdV	EntV	PeV	BoV	細菌	陰性
Jan	59	42	4	32	4	2		2				2	1	1	17
Feb	43	23		16				4		4		2			20
Mar	36	24		11		3		8	1	1			2	1	12
Apr	25	13		3		2		7		1		1			12
May	25	16	2	8	4			1		4				3	9
Jun	38	20	3	6	2	1	1	2		2	2		1	2	18
Jul	23	7			2	1					4			1	16
Aug	18	9			1					1	4	1		3	9
Sep	26	12		1	4					3	5				14
Oct	17	14		4						2	3	3		4	3
Nov	44	27		11	4	3				2	4	2		3	17
Dec	55	44	2	27	11					4		5		3	11
合計	409	251	11	119	32	12	1	24	1	24	22	16	4	21	158

表 5 下痢症ウイルス混合感染検出数 (小児科定点)

	NV (GI)	NV (GI)	NV (GI)	NV (GII)	SV	SV	SV	RV (A)	RV (A)	AstV	AdV							
	RV (A)	AstV	PeV	SV	AdV	AstV	RV (A)	PeV	PeV	細菌	細菌	AdV	EntV	PeV	BoV	細菌	細菌	AiV
2014				1	1								1		1			
2015	1				1					4								1
2016		1					1						1			1		
2017												1						
2018					2					2	1	1						
2019				2	1		1	2	1				1	1			1	
2020			1															
2021								1										
2022																		
2023																		
合計	1	1	1	2	5	1	2	3	1	6	1	2	3	1	1	1	1	1

表6 NV, SV 遺伝子型別検出数 (小児科定点)

年	(a) NV (GI)					(b) NV (GII)								
	NV (GI)	GI.2	GI.3	GI.4	GI.6	NV (GII)	GII.2	GII.3	GII.4	GII.6	GII.12	GII.13	GII.17	NT
2014						12		3	1	6	1	1		
2015	5		5			17		8	5	1			3	
2016	3	1	2			14			5	6			3	
2017	1				1	17	5		8					4
2018						10	4	1		3				2
2019	1			1		33	10		14	3				6
2020	1			1		12	2		5					5
2021						3			3					
2022														
2023						1			1					
合計	11	1	7	2	1	119	21	12	42	19	1	1	6	17

(c) SV

年	SV	GI.1	GI.3	GII.1	GII.3	GV.1
2014	3			1	2	
2015						
2016	8	6			2	
2017	2		2			
2018	12	9		2		1
2019	4	2		1		1
2020	1	1				
2021						
2022	2	2				
2023						
合計	32	20	2	4	4	2

表7 下痢症ウイルス年次事例件数 (集団発生)

年	事例件数	陽性件数	2種類のウイルスが検出された事例				
			NV (GI)	NV (GII)	SV	RV (A)	EntV
2014	15	7		5	1	1	1
2015	17	9	2	6		1	
2016	27	15		15	1		
2017	20	11		11			
2018	29	17	1	16		1	
2019	45	23	3	19	2		
2020	13	8	1	7			
2021	17	9		8	1		
2022	8	2		2			
2023	13	7		7			
合計	204	108	7	96	5	3	1

表 8 下痢症ウイルス月別事例件数 (集団発生)

年	事例件数	陽性件数	NV (GI)	NV (GII)	SV	RV (A)	EntV
Jan	30	22	1	22			
Feb	19	17	2	15			
Mar	21	10	1	9			
Apr	12	6	1	5			
May	16	9	1	6		2	1
Jun	13	4	1	3			
Jul	9	1			1		
Aug	12	1		1			
Sep	10	2		2			
Oct	12	4		4	1		
Nov	23	12		11	1		
Dec	27	21		18	2	1	
合計	204	108	7	96	5	3	1

表 9 NV, SV 遺伝子型別検出事例数 (集団発生)

年	(a) NV (GI)						(b) NV (GII)							
	NV (GI)	GI.2	GI.3	GI.5	GI.7	NT	NV (GII)	GII.2	GII.3	GII.4	GII.6	GII.13	GII.17	NT
2014							5			3	2	1		
2015	2		2				6			1			5	
2016							15	4		2	2		7	
2017							11	6		5				
2018	1				1		16	6		1	1		7	1
2019	3	1		1		1	19	9		3			5	2
2020	1			1			7	3		2				2
2021							8	1		7				
2022							2			1				
2023							7	1	2	4				
合計	7	1	2	2	1	1	96	30	2	29	5	1	25	5

(c) SV

年	SV	GI.2	GII.1	NT
2014	1			1
2015				
2016	1	1		
2017				
2018				
2019	2	1	1	
2020				
2021	1			1
2022				
2023				
合計	5	2	1	2

考 察

過去 10 年間に熊本県内で最も多く検出された下痢症ウイルスは、小児科定点・集団発生事例ともに NV (GII) であった。しかしながら、小児科定点と集団発生事例ではそれぞれの検出状況に異なる特徴がみられた。散発事例である小児科定点で NV (GII) が検出されたのは陽性検体 251 件中 119 件 (47.4%) にとどまり、その他にも NV (GI), SV, AstV, AiV, RV, AdV, EntV, PeV, BoV と様々なウイルスが検出された。一方で、集団発生事例では全 108 事例中 96 件 (88.9%) で NV (GII) が検出され、他に検出されたのは NV (GI), SV, RV, EntV のみであった上、それぞれのウイルスが検出された事例数は 10 年間で 10 件未満であった。このことから、NV (GII) は特に集団感染につながりやすく、遺伝子型の動向を把握していく必要があると考えられる。

また、小児科定点と集団発生事例で検出された NV, SV の遺伝子型を比較すると、異なる傾向がみられた。例えば、NV (GII) は、小児科定点と集団発生事例で検出される型に大きな違いは無く、どちらも GII.4 や GII.2 が多く検出されていた。一方、小児科定点では 119 件中 6 件 (5.0%) しか検出されなかった GII.17 が集団発生事例では 96 件中 25 件 (26.0%) を占めていた。今回、本県で検出された GII.17 は 2014 年に神奈川県川崎市が初めて検知したが¹⁴⁾、本県でも 2015 年以降に検出が増加した。ヒトは小児のうちに様々な遺伝子型の NV に感染しながら免疫を獲得していくため、成長するにつれて NV に感染しにくくなるとされているが¹⁵⁾、新型の GII.17 は当時感染の経験が無い人が多数であった。そのため全国的に成人にも感染が拡大し¹⁴⁾、本県でも同様であったと考えられる。

SV についても、小児科定点では全 32 件中 20 件が GI.1 であったが、集団発生事例では GI.1 は検出されず、GI.2 や GII.1 が検出された。横山らの研究¹⁶⁾によると、GI.1 の VP1 領域の配列は 40 年以上保持されているため、GI.1 は一度感染して獲得した免疫が長年機能でき、再度感染を起こしづらくなっていると考えられる。そのため、GI.1 は免疫を獲得していない小児に多く見られた可能性がある。

ま と め

今回の調査によって、散発事例は多様なウイルスが下痢症の原因となる一方で、集団発生事例では限られた種類のウイルス（主に NV）が下痢症を引き起こしていたことが明らかになった。また、散発事例と集団発生事例どちらも NV (GII) が最も多く発生していたが、その型別には異なる特徴があることも判明した。

本調査を行うためには小児科病原体定点医療機関からの検体提供が不可欠である。しかしながら、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の感染拡大を境にその数が大幅に減少しており、2020 年度から 2023 年度の感染症発生動向調

査で、下痢症検体の平均受付数は 15.5 検体であった。今年度より急性呼吸器感染症 (ARI) サーベイランスが始まり、呼吸器感染症については医療機関から多くの検体を提供いただいているが、下痢症についても、検体の輸送方法等を再検討し、ご協力頂くことができるような工夫が必要である。

文 献

- 1) 原田誠也, 八尋俊輔, 松尾 繁, 宮坂次郎, 中島龍一, 島田 康, 上野剛彦, 池澤 滋 : IASR, 29, 46-48, 2008.
- 2) 厚生労働省 : 「ノロウイルスの検出方法について」 (平成 15 年 11 月 5 日, 食安監発第 1105001 号厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知) (平成 19 年 5 月 14 日, 一部改正, 食安監発第 0514004 号)
- 3) 原田誠也, 松尾 繁, 濱洲大輔, 中島龍一 : 熊本県保健環境科学研究所報, 36, 25-30, 2006.
- 4) NIID 国立感染症研究所 : 「病原体検出マニュアル ノロウイルス (第 1 版) 令和元年 6 月」
- 5) NIID 国立感染症研究所 : 「病原体検出マニュアル サポウイルス (第 1 版) 2021 年 7 月」
- 6) Oka T, Katayama K, Hansman GS, Kageyama T, Ogawa S, Wu FT, White PA, Takeda N. : J Med Virol, 78, 1347-1353, 2006.
- 7) 横井 一, 北橋智子 : 感染症学雑誌, 83, 120-126, 2009.
- 8) Damen M, Minnaar R, Glasius P, van der Ham A, Koen G, Wertheim P, Beld M : J Clin Microbiol 46, 3997-4003, 2008.
- 9) 田所健一, 山口敏和, 篠原美千代 : 臨床と微生物, 36, 251-256, 2009.
- 10) Nijhuis M, van Maarseveen N, Schuurman R, Verkuijlen S, de Vos M, Hendriksen K, van Loon AM. : J Clin Microbiol, 40, 3666-3670, 2002.
- 11) Harvala H, Robertson I, McWilliam Leitch EC, Benschop K, Wolthers KC, Templeton K, Simmonds P. : J Clin Microbiol 46, 3446-3453, 2008.
- 12) Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. : Proc Natl Acad Sci USA 102, 12891-12896, 2005.
- 13) Yamashita T, Sugiyama M, Tsuzuki H, Sakae K, Suzuki Y, Miyazaki Y : J Clin Microbiol, 38, 2955, 2000.
- 14) Matsushima Y, Ishikawa M, Shimizu T, Komane A, Kasuo S, Shinohara M, Nagasawa K, Kimura H, Ryo A, Okabe N, Haga K, Doan Y H, Katayama K, Shimizu H : Euro Surveill, 20, 21173, 2015.
- 15) 左近直美, 駒野 淳 : 日本食品微生物学会雑誌, 33, 97-106, 2016.
- 16) Yokoyama M, Doan YH, Motomura K, Sato H, Oka T : Biochem Biophys Res Commun, 710, 149878, 2024.