

表3. ノロウイルスの月別遺伝子型別検出状況

遺伝子型	2003												2004												2005												計
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
GII/4 (Lordsdale)	2	1									3	3	3	3	2	1								10	3	1	1							3	10	49	
GII/2 (Melksham)												1		8	9	3											1										22
GII/6 (Miami/292)		1	2	2	2	1	1	1	2	1	1	1										3	0	2	1	1				3						30	
GII/3 (Mexico)	1					1					2	8	4	4																						26	
GII/12 (SaitamaU1)		1	2																			1	2	1	1											8	
GII/1 (Hawaii)																								3	1											5	
GII/8 (Amsterdam)				1							4				1																					6	
GII/5 (Hillingdon)		1	1										1														1									4	
GII/7 (Leeds)																									1	1										2	
GII/15 (SaitamaKU80a)											1	1																								2	
GII/14 (Kashiwa47)																																				0	
GI/3 (DesertShield)				1																			3		2	3	4					1	6		20		
GI/1 (Norwalk)												1	1																							2	
GI/4 (Chiba407)		1	1										2																							4	
GI/11 (SaitamaKU8)												1													1											2	
GI/14 (SaitamaT25)																						1														1	
GI/7 (Winchester)		2																							1											3	
GI/5 (Musgrove)																											1									1	
GI/2 (Southampton)																																				0	
GI/12 (SaitamaKU19a)																																				0	
GI/8 (Sindlesham)				1																																1	
GI/13 (SaitamaT35a)																																				0	

カキによる食中毒以外の集団発生例の発生月を示す。

カキによる食中毒の発生月。 (2003年1月、2004年12月には、1事件でそれぞれ5及び6遺伝子型が検出された。)

表4 NV遺伝子型別の電子顕微鏡法陽性率及び検出コピー数

NV遺伝子型	EM			Real Time PCR コピー数GMT 10 ⁿ
	+	-	陽性率(%)	
G II TOTAL	146	109	57.3	
G II /6 Miami	16	5	76.2	5.62
G II /15 SaitamaKU80a	2	0	100.0	6.00
G II /8 Amsterdam	4	1	80.0	5.60
G II /3 Mexico	17	9	65.4	5.35
G II /4 Lordsdale	37	10	78.7	5.60
G II /2 Melksham	14	8	63.6	5.45
G II /11 SaitamaU1	2	3	40.0	4.40
G II /1 Hawaii	4	1	80.0	5.20
G II /7 Leeds	1	1	50.0	5.50
G II /5 Hillingdon	1	1	50.0	4.50
G I TOTAL	20	17	54.1	
G I /1 Norwalk	2	0	100.0	4.50
G I /4 Chiba	3	0	100.0	5.67
G I /3 DesertShield	11	8	57.9	4.12
G I /7 Winchester	1	0	100.0	5.00
G I /11 SaitamaKU8	1	1	50.0	2.50
G I /14 SaitamaT25	0	1	0.0	1.00
G I /5 Musgrove	0	1	0.0	4.00

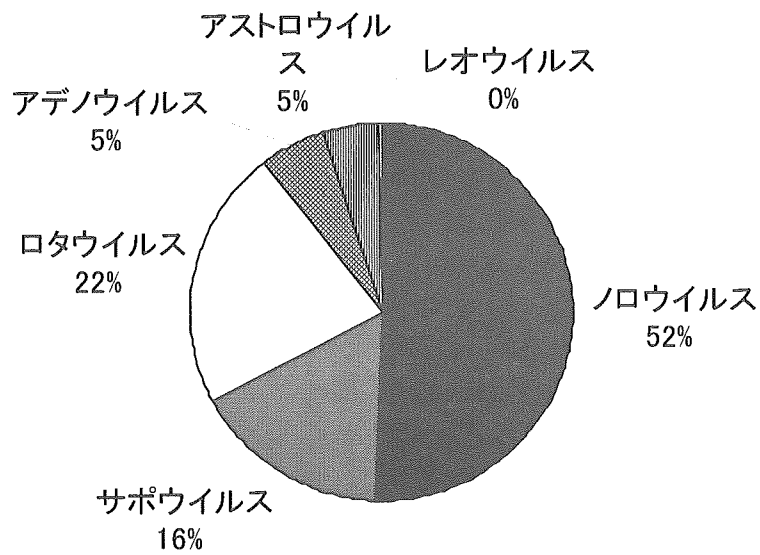


図1 散発性胃腸炎から検出されたウイルス

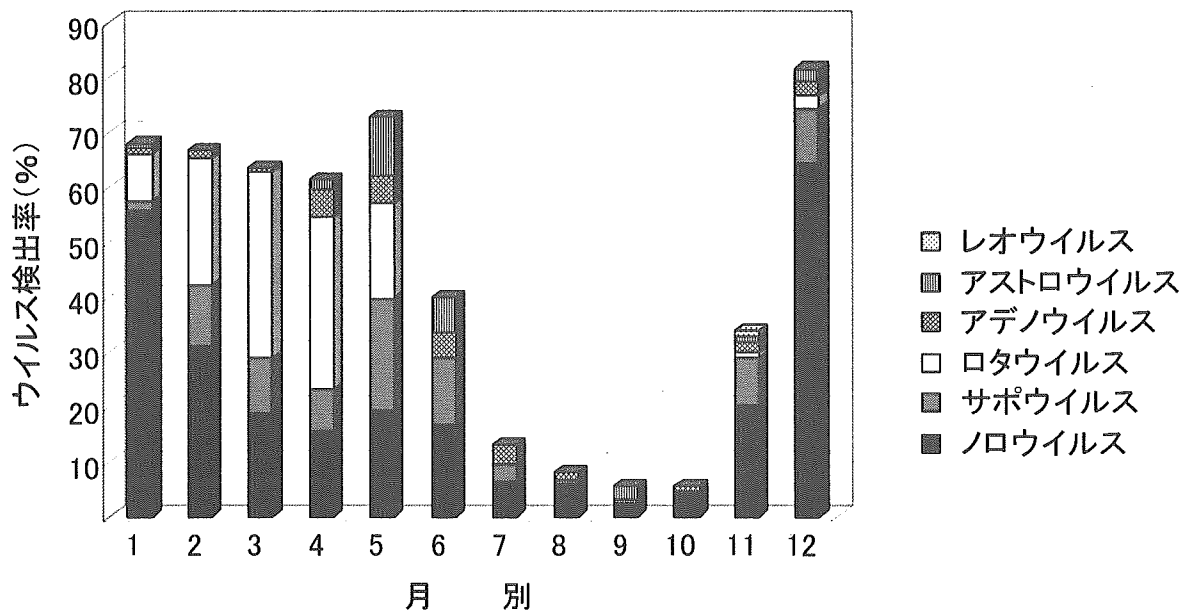
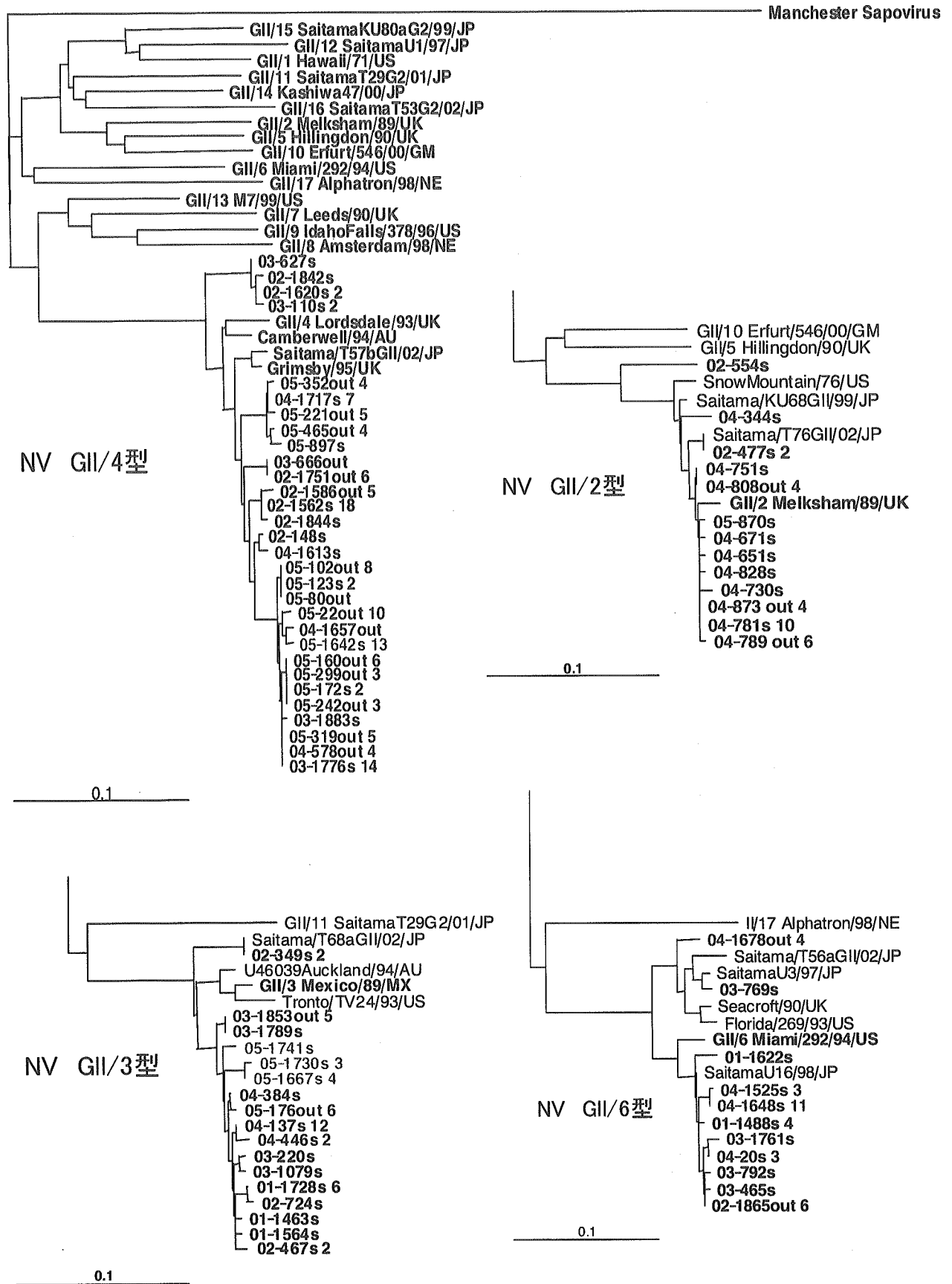


図2 散発性胃腸炎ウイルスの季節消長(2003年～2005年)

図3 NV GII株の塩基配列系統樹解析(NJ法)



(s:散発例 out:集団発生例 s, outに続く数字:株数)

図4 NV GI株(GI/3)の塩基配列系統樹解析(NJ法)

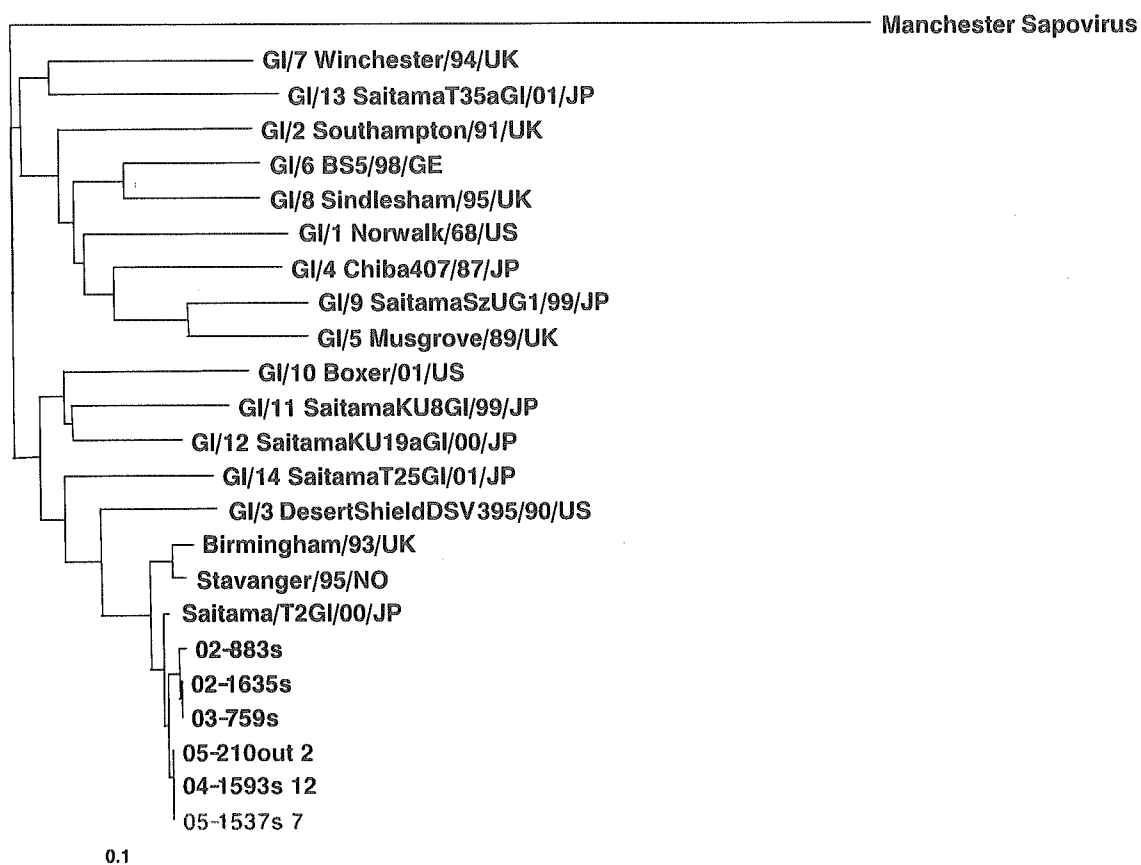
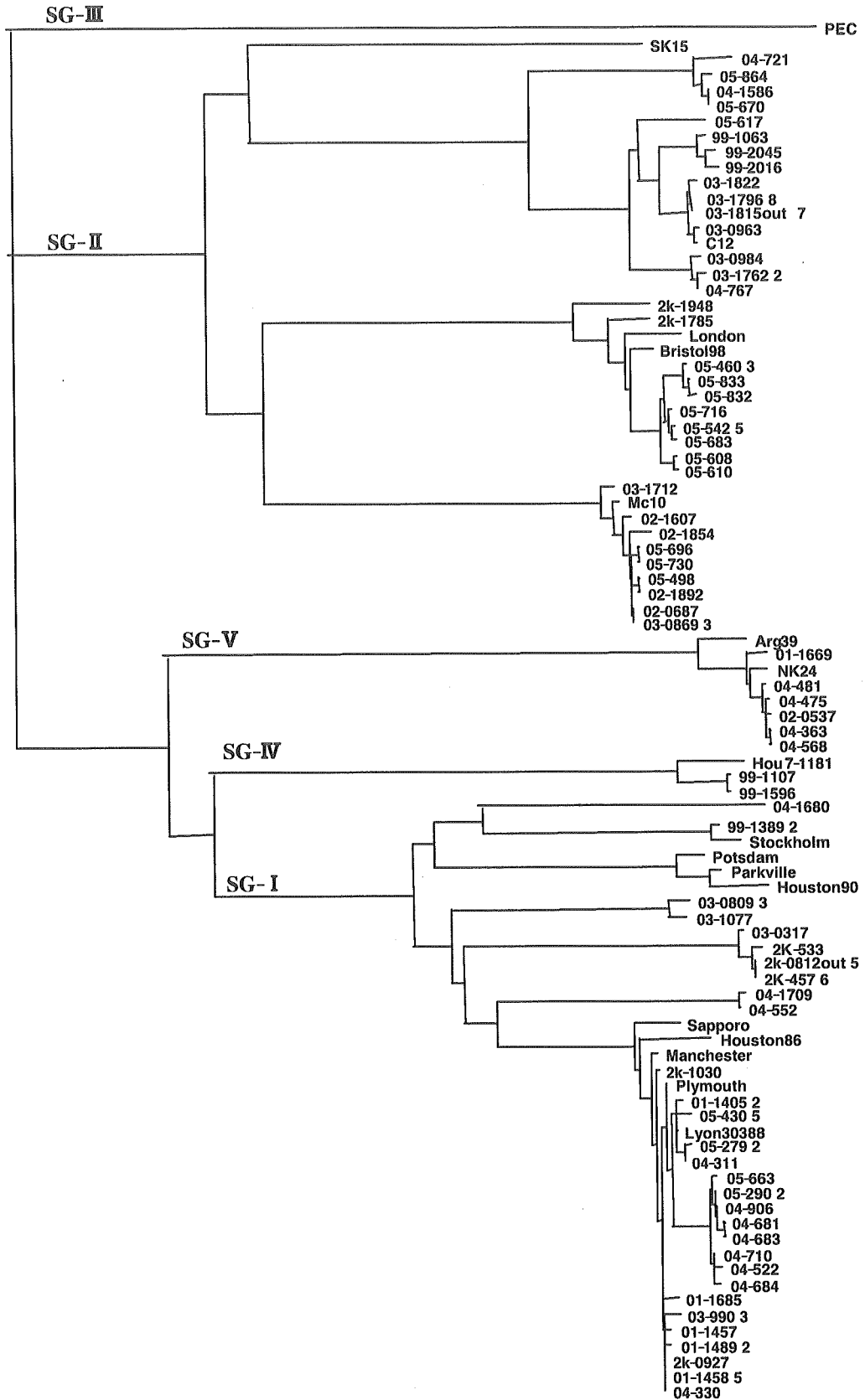


図5 SVの塩基配列分子系統樹解析(NJ法)



(out: 集団発生例 検体番号に続く数字は株数を示す。)

分 担 研 究 報 告 書

集団発生および散発例から検出したサポウイルスについて

分担研究者 篠崎邦子 千葉県衛生研究所室長
協力研究者 岡田峰幸 千葉県衛生研究所研究員

研究要旨：2005 年 2 月下旬、成人の知的障害者厚生施設においてサポウイルスの集団発生がみられた。患者発生は一峰性を示したが、疫学調査からヒトーヒト感染によるものと思われた。臨床症状は、下痢（80%）と嘔吐（50%）が高頻度であった。検出したサポウイルスは、これまで国内でほとんど検出されていない G I の Parkville 型であった。また、2003 年 9 月～2005 年 8 月の小児急性胃腸炎散発例では、サポウイルスは、ロタウイルス、ノロウイルスに次ぐ検出率を示した。散発例の遺伝子型は、G I の Sapporo 型、G II の London 型等で集団発生の株とは異なっていた。

A. 研究目的

サポウイルス (SV) は、ノロウイルスと同じカリシウイルス科の属し、小児に急性胃腸炎を引き起すウイルスである。集団発生は、これまで乳児園等の施設での事例が報告されてきた。近年 SV の感度の高い検査法の開発により、住出し弁当や学校の給食を原因とする食中毒の報告がされており、公衆衛生上重要性が増してきている。

SV は NV と同様に遺伝的に多様であり、多くの遺伝子群、遺伝子型の存在が明らかになってきている。今回、千葉県で発生した集団発生および散発から検出された SV の遺伝子型の検討を行った。

B. 研究方法

2005 年 2 月下旬、当所に行政検査の依頼のあった集団発生 1 事例の患者から採取した 5 検体と、2003 年 9 月から 2005 年 8 月までの期間に、感染症発生動向調査事業小児科定点から搬入された急性胃腸炎患者 88 検体を検査材料とした。

ウイルス検査は、RT-PCR 法、電子顕微鏡法 (EM) で行った。SV のプライマーは、構造蛋白領域に設定したものを¹⁾を改変したものを用いた。ノロウイルスのプライマーは構造蛋白領域に設定した武田らの Genogroup I (G I)、Genogroup II (G II) に特異的なものと、Alphatron、Amsterdam 検出用に G II プ

ライマーを別途設定したもの²⁾を用いた。PCR 陽性検体は、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し系統解析を行った。

C. 研究結果

1. 集団発生の概要

2005年2月下旬、知的障害者厚生施設で急性胃腸炎の集団発生の届出がされた。当該施設は入所者50名(19才~56才;男性35名、女性15名)職員30名で、そのうち入所者17名(発病率34%)、職員5名(発病率17%)が発症した。患者の発生は、2月17日に1名の発生があった後、20日7名、21日6名をピークとし26日まで続いた(図1)。20日、21日の一峰性の山は食中毒などの単一暴露が考えられた。施設の建物は2階建てになっており全ての部屋は2人用で1階に16室、2階に12室であった。入所者は同じ食事をとっているにもかかわらず、患者発生は1階の部屋に限られており、このことから食中毒との関連性は薄いと考えられた。施設で行っている作業工程と患者発生に関連性もみられず感染源を特定できなかった。また、22日から26日の患者発生は二次感染と思われた。

臨床症状の発現頻度は、下痢は80%と最も高く、その8割は水様便で下痢の程度は重かった。嘔吐は50%と比較的高頻度にみられた。37℃以上の発熱が20%、嘔気、腹痛が10%にみられた。予後は良好で、ほとんどが2、3日で回復した。

2. 集団発生の検査結果

患者便5名(入所者3名、職員2名)のウイルス検査結果を表1に示した。NVのRT-PCRは全て陰性であった。EMでは3名からSRSVを検出した。SVのRT-PCRは全て陽性であった。

3. 散発例の検査結果

2年間のウイルス検出状況を表2に示した。SVは、2003/2004シーズンは5検体(検出率11%)から、2004/2005シーズンは6検体(検出率14%)から検出され、ロタウイルス、ノロウイルスに次ぐ検出率であった。検出された月は、主に4~5月であった。

4. SVの遺伝子型発生状況

SVはこれまでI~VのGenogroupが報告されている。また、我々はGIに6遺伝子型、GIIに4遺伝子型を検出した(図3)。今回検出されたSVの系統解析の結果を図4に示した。集団発生から検出したSVは全て同一の塩基配列であり、GI/2(Parkville型)であった。このGIのParkville型は、これまで国内で検出された報告がほとんどなかった。2005年5月に発生した宮崎県の集団発生から検出したSV³⁾は、今回の事例のウイルスに類似していた。散発例から検出したSVは、2003/2004シーズンでは、GI/1(Sapporo型)が3株、GII/3が2株、2004/2005シーズンでは、GI/1が2株、GII/1(London型)が4株であり、集団発生のウイルスとは異なっていた。

D. 考察

SVは乳幼児を主体とした急性胃腸炎の原因ウイルスとして知られてい

る。集団発生は乳幼児施設での発生が報告されてきた。しかし、SVの検査はほとんど行われてこなかったため、成人の感染はないのか食中毒に関与しているのかどうかなど、その実態は不明であった。近年、国内において仕出し弁当や学校の給食を原因とする食中毒の報告がされており、公衆衛生上重要性が増してきている。

今回、成人の知的障害者厚生施設においてSVの集団発生がみられた。集団発生の感染経路は明らかでないが、施設の特異性から汚物により環境が汚染され施設内に広まったと推測された。SVは、成人においてもヒト-ヒト感染を起こすことが示唆された。今後SVの動向を監視することが必要である。

SVは、現在5つのGenogroupに分けられており、ヒトからはGIIIを除く4つのGenogroupが検出されている。今回の集団発生から検出したSVは、GIのParkville型であった。しかし、散发例から同じ遺伝子型は検出されず、地域での流行は確認できなかった。この遺伝子型は、米国の成人の集団発生から初めて検出された⁴⁾が、国内での検出はこれまでほとんどなかった。本事例の2か月後、宮崎県の中学、高校生の知的障害者施設においてSVの集団発生がみられ、検出されたウイルスは、千葉県の事例のウイルスに類似したParkville型であった。これらのことから、Parkville型は集団発生を起こす頻度が高いことが推測されるが、今後さらに検討が必要と思われる。

E. 結論

1. 2005年2月下旬、成人の施設においてSVによる集団発生がみられた。
2. 集団発生から検出したSVはこれまで国内でほとんど検出されていないGIのParkville型であった。
3. 散发例から検出したSVは集団発生のウイルスと異なっていた。地域での流行は確認できなかった。

参考文献

- 1) Okada M et al.; Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of Sapporo-like viruses. Arch. Virol. 2002;147 (7), 1445-1451
- 2) Okada M et al.: Genetic analysis of noroviruses in Chiba Prefecture, Japan, between 1999 and 2004. J. Clin. Microbiol. 2005;43 (9), 4391-4401
- 3) 岩切章ら：サポウイルスによる感染性胃腸炎集団発生の2事例、病原微生物検出情報、Vol. 26 No. 11 338-339
- 4) Noel J. S. et al.: Parkville virus A novel genetic variant of human calicivirus in Sapporo virus clade, associated with an outbreak of gastroenteritis in adult. J. Med. Virol. 1997; 52 (2), 173-178

图1 日別患者発生状況

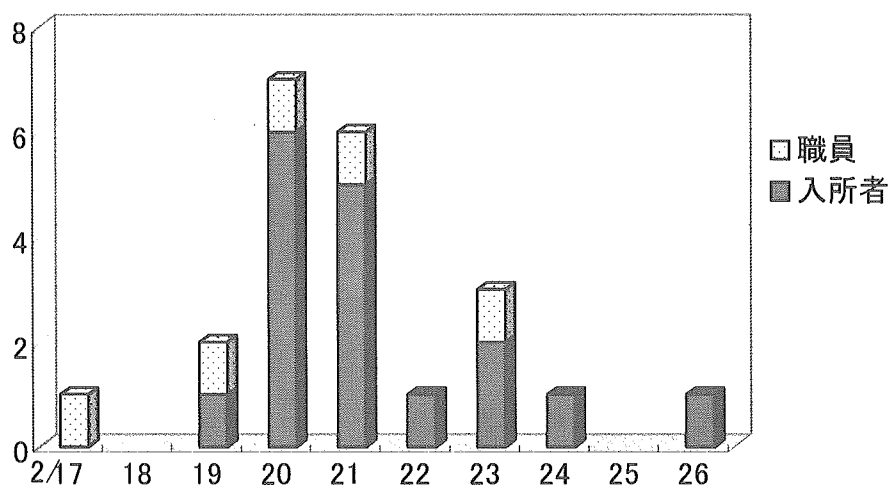


图2 臨床症状

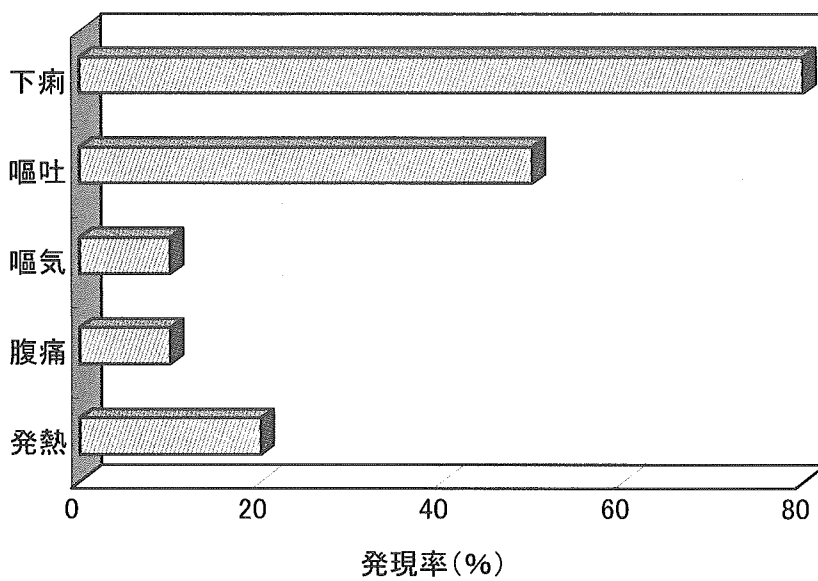


表1 集団発生の検査結果

検査法	陽性数／検査数
RT-PCR	
NV	0／5
SV	5／5
電子顕微鏡法	3／5

表2 散発例のウイルス検出状況

検出ウイルス	2003/2004*		2004/2005*	
	検出数	%	検出数	%
Rota	14	30	12	29
NV	12	26	11	26
SV	<u>5</u>	<u>11</u>	<u>6</u>	<u>14</u>
Adeno	6	13	2	5
Astro	2	4	0	0
検査数	46		42	

* 9月～8月

図3 SVの分子系統樹

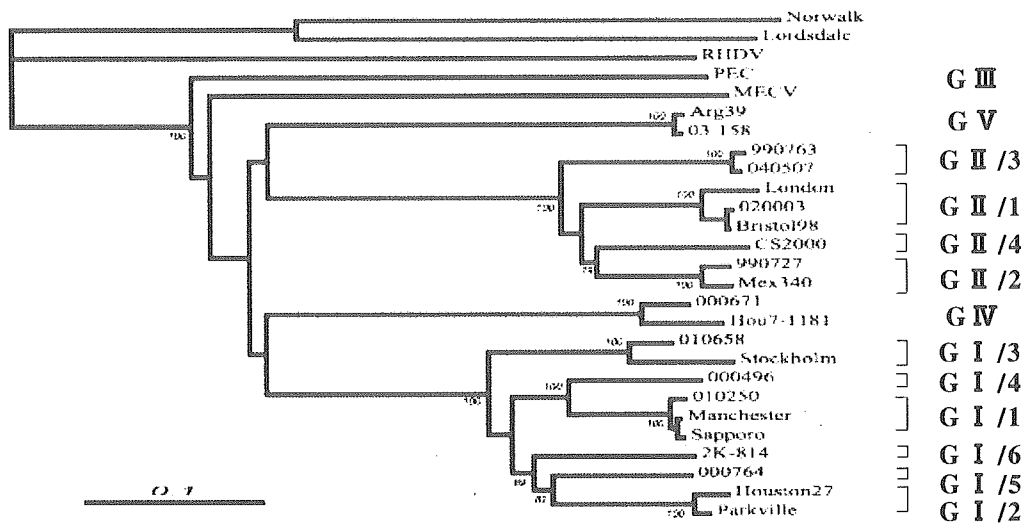
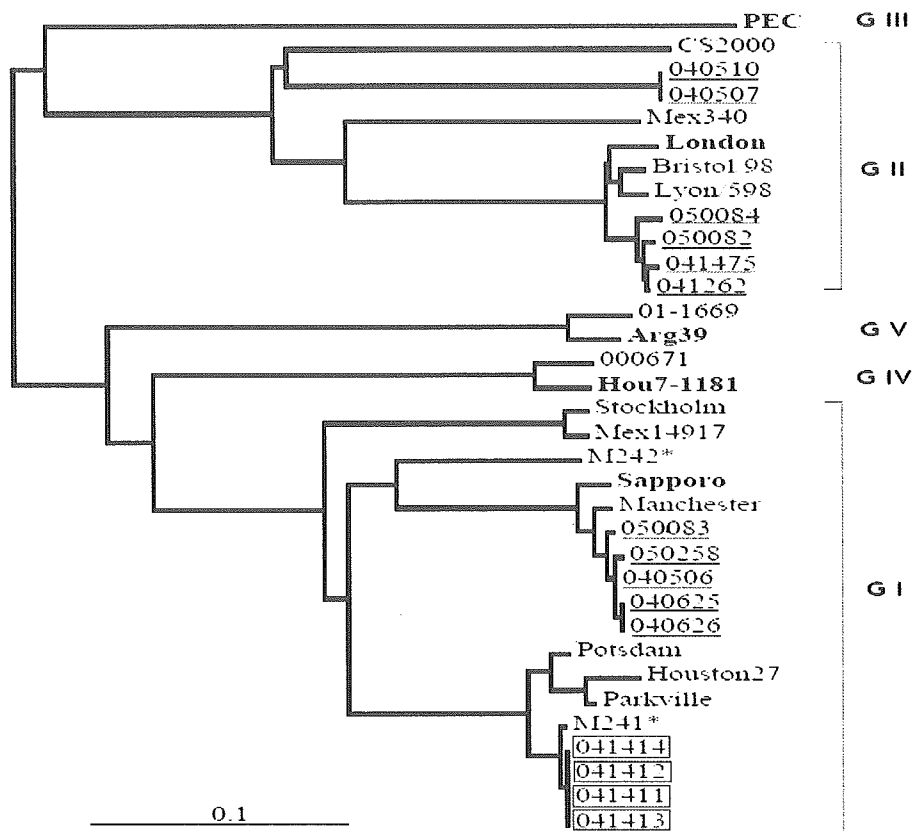


図4 SVの分子系統樹



- ・ □の番号は集団発生、下線の番号は散発例
- ・ *は宮崎県の集団発生

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

分担研究報告書

食品由来のウイルス性感染症の検出法の高度化、実用化に関する研究

分担研究者 斎藤博之 秋田県衛生科学研究所主任研究員

研究要旨 食中毒の主要な原因病原体であり、それ以外にも多様な感染ルートをもつノロウイルスの集団発生局面において、行政判断に役立つ情報を早期に把握するためにSSCP解析の導入を検討した。今年度は、複数の機関で行ったSSCP解析データをネットワーク上で照合するシミュレーションを行うとともに、実際の流行局面での実用試験を行った。後者については、食中毒や施設等での集団発生に加えて、簡易水道にウイルスが混入して迅速な対応が求められたケースを経験したので詳細を報告する。

研究協力者

東方美保 福井県衛生環境研究センター

飯塚節子 島根県保健環境科学研究所

A. 研究目的

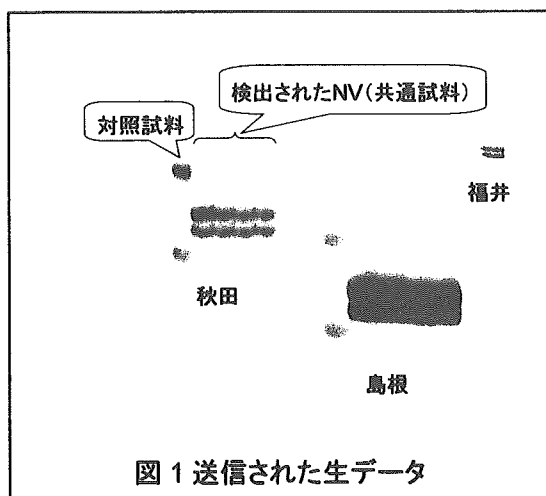
食品由来ウイルスの中でもノロウイルス(NV)による健康被害は、食中毒だけを例にとっても原因病原体(細菌も含む)の4割以上を占めており、2001～2004年は首位となっている。さらに、NVの感染ルートは食品媒介以外にも地域流行や人から人への感染、施設汚染による集団発生など複数が存在する。今年度は、老人施設における死亡例を含む集団発生が報じられたことにより国民の関心も一気に高まった。NVによる胃腸炎の最近の特徴として大規模化、広域化、複雑化があげられるが、社会的な関心の高まりとともに迅速な対応が求められるようになってきた。NVの検査体制としてはすでにRT-PCR法が全国的に普及しているため飲食店等での単純な食中毒事例ならば行政上の対応に不備をきたすことは少ない。しかし、人から人への感染を伴ったり、複数の自治体や施設にまたがって患者が発生したりする

ような複雑なケースでは、流行の全体像を把握するためにPCR増幅産物の塩基配列を比較する手法が必要となってくる。一般には塩基配列の比較とはシーケンスの決定を意味しており時間をかけて疫学的データを蓄積して将来の対策に生かすという観点から語られることが多い。一方で、何らかの事例が発生して行政上の対応が必要となる局面では迅速性が必要となり、シーケンスの決定は時間軸が異なるため有効な手法にはなりにくい。特に遺伝子解析が必要となるようなケースでは検体数そのものが膨大となることが想定されるため、多数のPCR増幅産物の塩基配列の異同をシーケンスの決定作業無しに判定できるような手法を取り入れることが望ましい。本研究で用いている一本鎖高次構造多型解析(Single Strand Conformation Polymorphism: SSCP解析)は、1塩基の違いでも鋭敏にパターンが変動し、異同判定に有効と考えられる

ため、流行局面での行政対応に有用な情報を提供できるものと考えられる。SSCP 解析は、流行局面において迅速に対応できるという長所を生かすために、原則として各担当機関にて行うことが望ましく、当研究班初年度の事業として確実な技術の普及を目的とした技術検討会を開催した。一方、各機関が実施したSSCP 解析のデータを迅速に照合する手法についても検討しておく必要があるため、昨年度の事業として、SSCP 解析のパターンをネットワーク上で照合するシミュレーションを行った。今年度は、別の試料を用いて再度シミュレーションを実施した。また、実際の流行局面での実用試験も継続して行った。その過程で簡易水道に NV が混入して住民に被害が及んだケースに遭遇したため詳細をまとめた。

B. 研究方法

SSCP 解析の技術的な内容については平成 15 年度の本研究事業報告書を参照されたい。各事例に関する研究材料としては平成 17 年度に発生した集団感染事例の糞便を用いた。シミュレーションにおいては、各機関で別々に実施して画像ファイル化した SSCP データを比較するための指標となる「対照試料」と、実際に起こった事例を想定した「共通試料」をあ

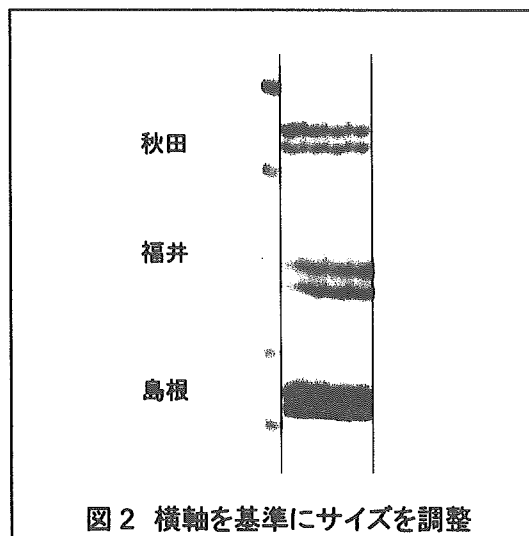


らかじめ協力機関に配布した。各機関で行った SSCP 解析のデータは適当な手段(デジタルカメラ、スキャナーなど)で画像ファイル化して、E-mail 添付で秋田県衛生科学研究所に送信し、到着したファイルを対照試料のバンドを基に加工してパターンを照合した。

C. 研究結果

1) 広域流行局面を想定したシミュレーション

図 1 に示したのは対照試料と、広域にわたって発生した食中毒を想定した共通試料について各機関で SSCP 解析を行った生データである。これらを比較照合するために障害となるのは次の 2 点である。1 つ目は、画像ファイルを作成するための機器(デジタルカメラやスキャナー)が各機関によって異なるため、送信されたファイルサイズそのものが異なることである。2 つ目は、SSCP 解析の条件(温度、バッファ組成、電気泳動時間など)が微妙に異なるため、同じ試料であってもゲル間でパターンが食い違う可能性が存在することである。照合可能な画像ファイルとして加工するために最初に行ったのがサイズの統一である。図 2 に示すとおり、各画像の横軸(レーン間の距離)をそろえるようにして、サイズを合わせた。これは、電



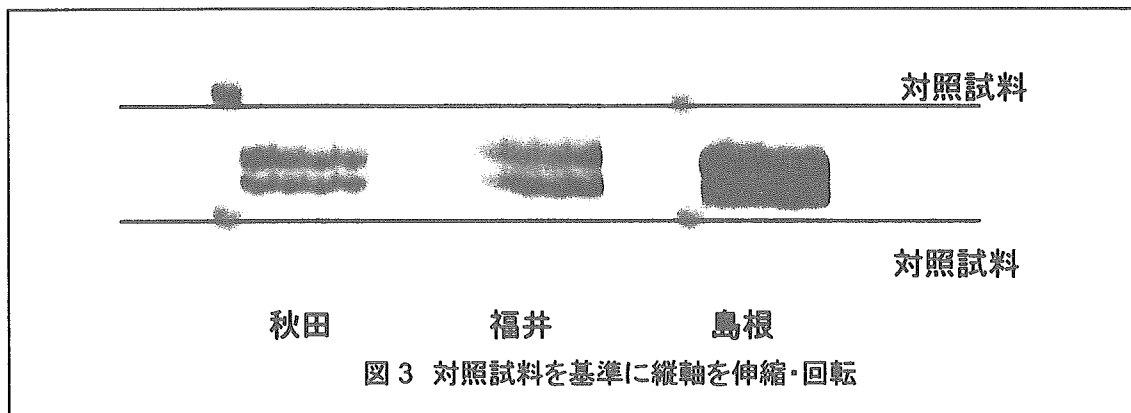


図3 対照試料を基準に縦軸を伸縮・回転

気泳動装置や泳動条件に関わらず、用いたシヤークコート(普通は規格品)のサイズが同じならば共通した指標となり得るからである。次に、図3に示すとおり、あらかじめ配布してあった対照試料の位置をそろえるようにして、画像の上下方向に関して変形を行った。これは、泳動条件が多少異なっても、対照試料のバンドをそろえることで易動度を画像レベルで補正できるものと考えたからである。図3にお

いて実際に行ってみると、対照試料のバンドの位置をそろえた3つのゲルにおける共通試料のバンドは完全に一致し、比較照合可能であることがわかった。

2) 流行局面での実用試験

図4は島根県の中学女子バスケットボールの合宿で発生した食中毒におけるNVのSSCPパターンである。患者と弁当を製造した飲食店の従業員からNVが検出され、両者の

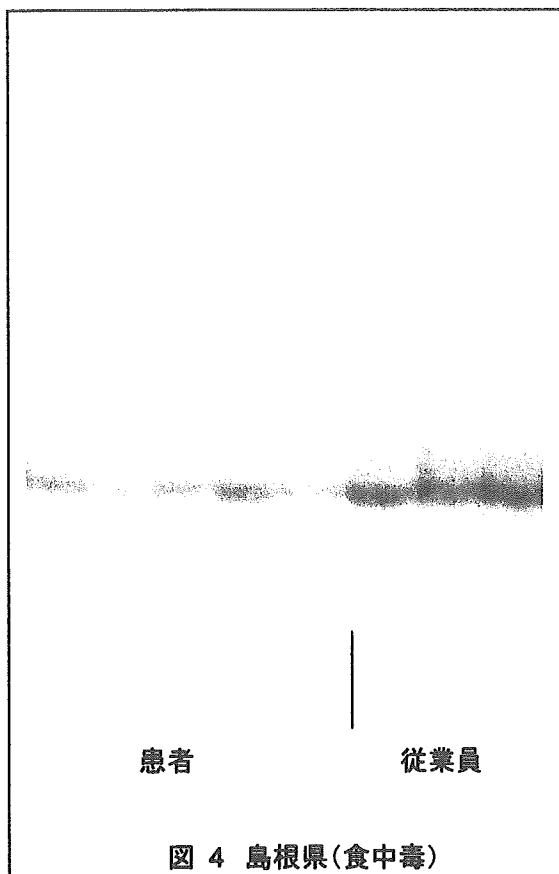


図4 島根県(食中毒)

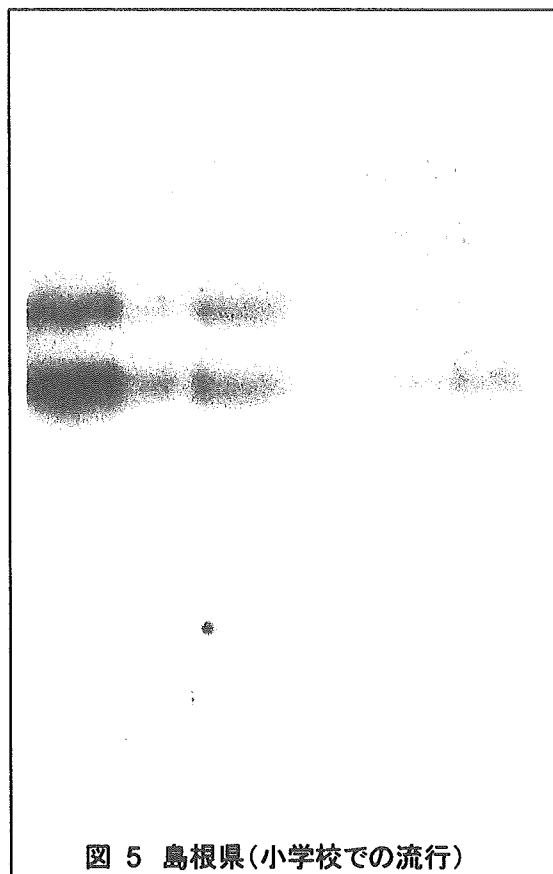


図5 島根県(小学校での流行)

SSCP パターンは同一であった。図 5 は島根県の小学校での感染性胃腸炎事例で、発症者は3年生のみ12人であったが、SSCP パターンが同一であることから同じウイルスが流行していたことがわかる。

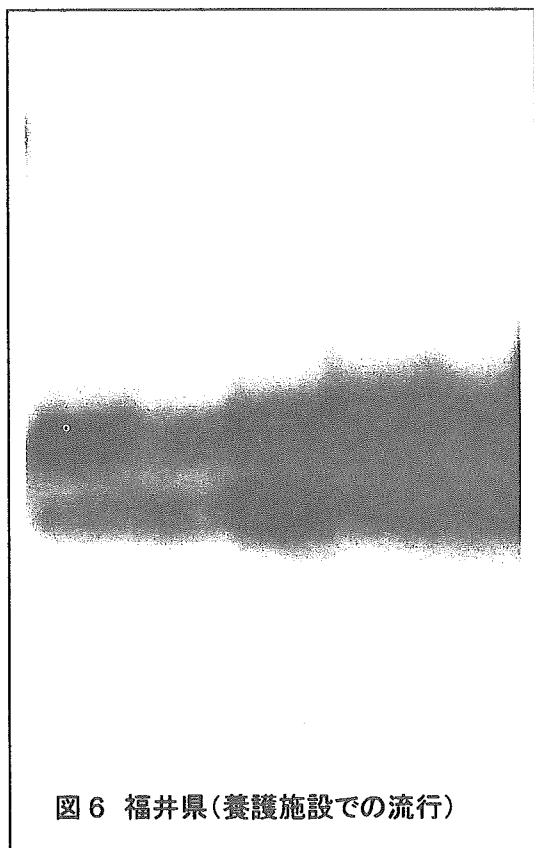


図 6 福井県(養護施設での流行)

図 6 は福井県における養護施設における集団発生事例で同一ウイルスが、おそらくはヒトヒト感染で施設内に広がったことがわかる。図 7 は福井県の公民館における懇親会で発生した食中毒事例だが、写真右端のサンプルは同一の食品を食べていない小児のもので、一部はヒトヒト感染の経路が考えられる。

図 8 は秋田県の山間部の集落で発生した簡易水道が原因と考えられた NV の流行情形である。患者は集落内に分散しており、集会などで共通の食品を食べる機会がなかったことから 94 世帯 256 人に飲用水を供給している簡易水道が原因として浮上し、水源として用いている井戸水から NV が検出された。患者から検

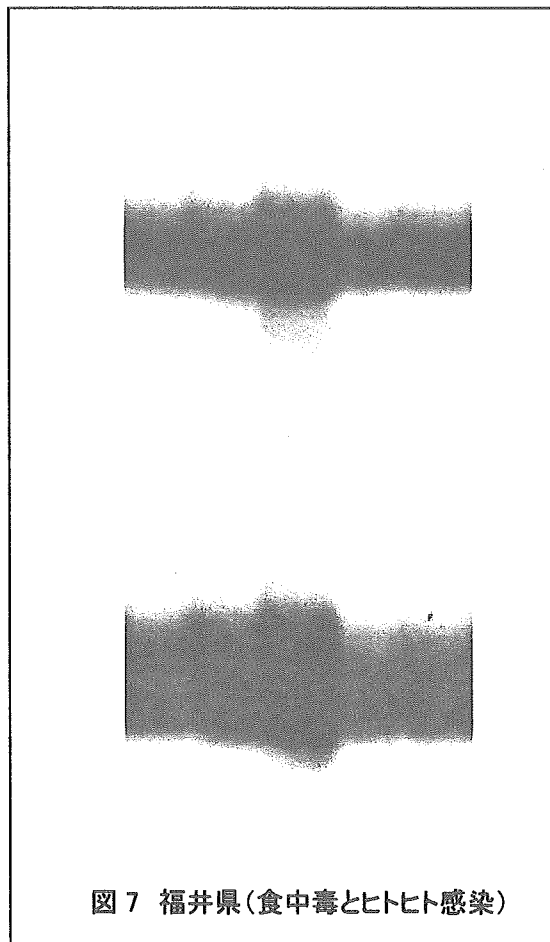
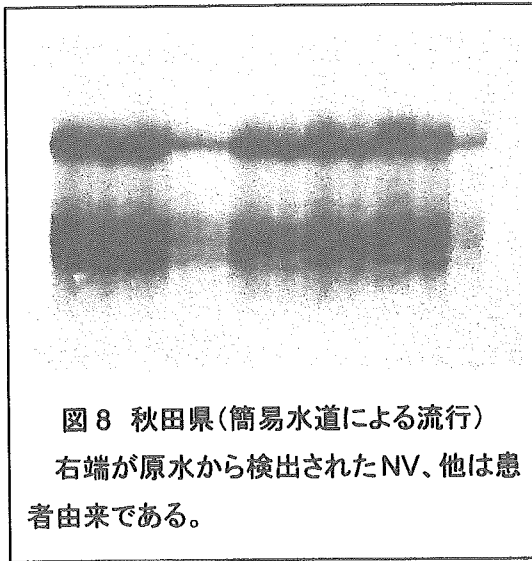


図 7 福井県(食中毒とヒトヒト感染)

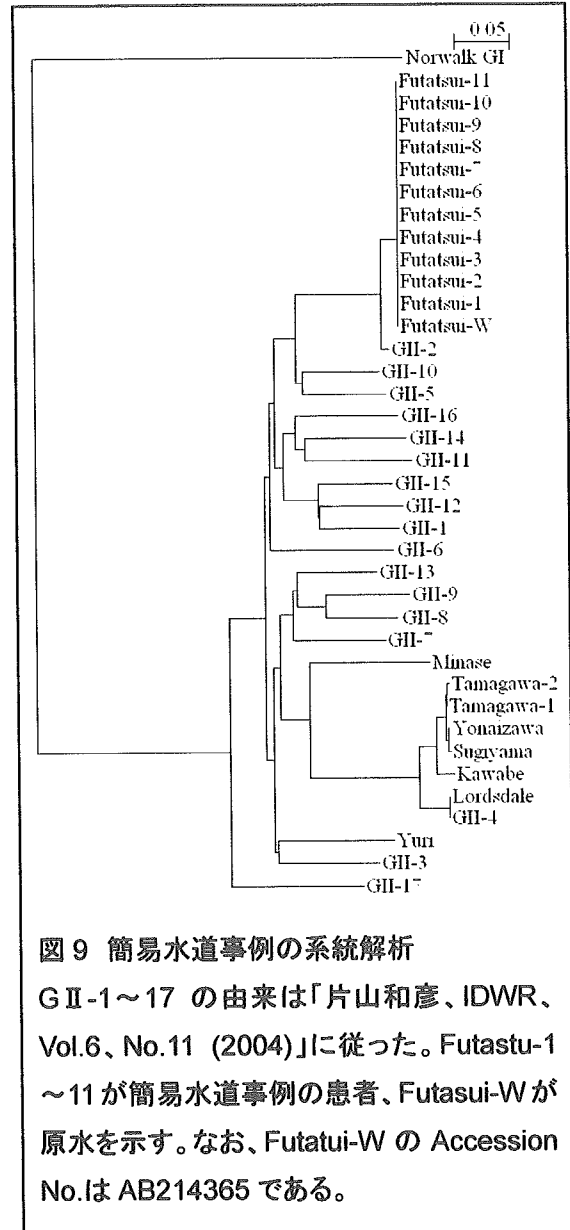
出された NV と SSCP パターンを照合したところ両者は一致し、流行拡大に簡易水道が関与していることがわかった。直ちに水道を停止し、給水車による対応に切り替えたため、流行は収束した。簡易水道の設備と周辺状況を調査したところ、原水を採取する井戸の深さは 6m と浅く、井戸から 2m のところに川が流れていた。その川には住民の生活排水が流れ込むようになっており、この集落のトイレは浄化槽、または汲み取り式であった。したがって、生活排水が川から井戸を通じて混入しやすい構造の簡易水道が使われていたことから、今回の流行が引き起こされたと考えられた。この事例で検出された NV 遺伝子をシーケンスしたところ配列は完全に一致し、SSCP パターンが同一であったことを裏付けた。図 9 に示すとおり、

遺伝子型としては Melksham 型 (GII-2) に近い位置に分類された。



D. 考察

本研究では NV の流行局面、あるいは集団感染などの危機管理局面において行政対応に直接役立つ情報を素早く把握する手法として SSCP 解析を検討した。本研究では初年度から行政対応のためにより精密な情報を迅速に求められるようなケースを想定して、検出されたウイルスの遺伝子の異同をシークエンスせずに短期間に比較する手法の導入について検討を進めてきた。SSCP 解析は通常の RTPCR による検査を行った後の残った PCR 産物を専用のバッファーで希釈して熱変性するだけの簡単な処理で済むため、その後の電気泳動とパターンの検出まで 1 日半で終了する。また、50 検体を同時に比較できるため大規模事例であっても十分に対応可能である。塩基配列そのものを知ることはできないが、行政判断で重要なのは複数の NV 遺伝子が「同じかどうか」であり、その情報を迅速に把握する手法として SSCP 解析を用いることは意義があるものと考えられた。本年度は平成 17 年度に



発生した大小さまざまな事例について SSCP 解析を用いて有用性を確認したが、16 年度から継続して行っている試みとして、患者が複数の自治体に分散した場合、それぞれの検査担当機関が行った SSCP 解析のデータを比較照合できるかのシミュレーションを実施した。異なるゲル間の微妙なバンドのズレを補正するためにあらかじめ対照試料を配布しておき、実際の検体と同時に泳動することで目的を達することができた。SSCP 解析はその迅速性を最大

限に生かすためにも各機関が自ら実施することが原則であるが、あらかじめ対照試料を配布しておけば、広域化した事例であっても画像ファイルを E-mail で交換するだけでパターンを比較照合できるようになるため対応の幅は広がるものと考えられた。ゲル間のバンドの比較は 16 年度と17年度で試料を替えて実施し、いずれも良好な結果を得た。今後は実用段階として、希望する機関に対照試料を配布する体制作りが必要となろう。多くの事例において SSCP 解析を実施したが、簡易水道事例においては、被害拡大防止のための給水停止措置にかかる科学的根拠を提示する手法として有用であった。法定の水質基準項目にはウイルスは含まれていないため、こうした事例の場合はケースごとに判断せざるを得ず、いかに迅速に科学的根拠を示せるかがその後の行政対応を円滑に行うため重要なポイントとなる。また、現在の水道は塩素注入によって安全性を確保することになっているが、法定基準である0.1ppm程度の濃度ではウイルスに対しては効果を期待できないため、抜本的なシステムの見直しが必要と思われる。

E. 結論

本研究で検討したSSCP解析は最大50検体のPCR産物の遺伝子配列の異同を1日半で比較することができるため、集団感染等の危機管理局面での行政判断に必要な情報の早期把握に役立つものと考えられた。また、あらかじめ対照試料を配布しておくことで異なる機関で行ったSSCP解析のデータをネットワーク

上で照合できるようになるため、広域にわたる事例であっても対応可能になる可能性が開けた。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1) 論文発表

1. 斎藤博之 他、簡易水道が原因と考えられたノロウイルスの流行、病原微生物検出情報、Vol.26、No.6、14-15、(2005)
2. 斎藤博之 他、エンテロウイルスの血清型別同定における一本鎖高次構造多型(SSCP)解析の応用、臨床とウイルス 33、No.4、220-227 (2005)
3. 斎藤博之、ノロウイルス胃腸炎の疫学調査における一本鎖高次構造多型(SSCP)解析の利用、食中毒検査と診療の落とし穴、第2章、中山書店 (2006)
4. 斎藤博之、ノロウイルス胃腸炎の流行拡大防止、食中毒検査と診療の落とし穴、第5章、中山書店 (2006)

2) 学会発表

1. 斎藤博之、他 簡易水道が原因と考えられたノロウイルスの流行 第53回日本ウイルス学会学術集会、東京、(2005)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症事業）
分担研究報告書
食品由来のウイルス性感染症の検出法の高度化、実用化に関する研究

分担研究項目

九州 3 地研で検出されたノロウイルス（NV）の遺伝子型別について

分担研究者 松岡 由美子 熊本市環境総合研究所
協力研究者 新屋 拓郎、森田 美加、（熊本市環境総合研究所）
平野 敬之 （佐賀県衛生薬業センター）
小河 正雄 （大分県衛生環境研究センター）
勢戸 祥介 （大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科）
秋山 美穂、愛木 智香子、西尾 治 （国立感染症研究所 感染症情報センター）

研究要旨

2003 年 1 月から 2006 年 1 月までに九州の 3 地研で検出された NV について Capsid N terminal /shell domain (N/S) 領域の遺伝子型別をおこなった。3 地研で検出された遺伝子型は G I が 11 種類、G II が 9 種類検出された。その内訳は、G II /4 が全体の 37.5%、G II /2、G II /3 および G II /6 の 4 種類の遺伝子型で全体の 68.5%であった。その他に検出された遺伝子型は G I /1、G I /8 及び G I /17 などがあったがいずれも集団発生事例または食品から検出された。

2003 年に検出されていた G II /3 型は 2004 年シーズンには検出されなかったが、2005 年 3 月、10-12 月に検出された。また 2005 年 3 月 G I /3 が佐賀県、熊本市で初めて検出された遺伝子型であるため、よくシーズンに流行株と予測したが、現在まで大きな流行は発生していない。これらの事から流行型の予測は困難であると考えられた。

2004-2005 シーズンは G I /1、G II /2、G II /3、G II /4 株の検出が多かった。G II /4 型については 2003 年 11 月から検出が増加した。しかし、2005-2006 シーズンでは検出はあるが、昨年のように大きな流行とはなっていない。また、G II /6 が佐賀県、大分県で今シーズン検出が多くなっている。

G II /4 の SM82/G II SKR 増幅産物で解析をおこなったところ、Hu/G II. 4/Hunter 532D/040/AU 類似株と Hu/G II /Nagano/2004/H/JP 類似株の 2 つのクラスターに分けられた。前者は現在世界中に分布している G II /4 バリエント株の 1 つと考えられると報告がある。

A 研究目的

ノロウイルス（NV）による感染性胃腸炎の集団発生事例は、近年の検査法の進歩と、一般の人への認知度があがるとともに、食中毒、家族内感染、施設内感染など多様な事例が探知されるようになった。多様な事例の探知は、事例数や患者数の増加として、食中毒統計に現れている。また、2004 年 12 月に広島県の老人福祉施設で死亡者が出たことから、大きな問題となった。2004-2005 シーズンには G II /4 (Lordsdale 型) の検出株が全体的に増加し、

G II /4 型株は遺伝子の変異による感染力の変化が言われており、九州内 3 地方（図 1）で検出された株について変異の可能性があるのか調査を行った。また、従来 N/S 領域での比較もおこない、3 年間の遺伝子型の流行をまとめた。また、3 地域の流行差の指標となる疫学情報について検討した。

B 研究方法

1) 検査材料

2003 年 1 月～2006 年 1 月までに各施設に搬入された、発生動向調査病原体検査のために採取された感染性胃腸炎患者便検体、行政検査

依頼のあった胃腸炎患者便検体及び行政依頼のあった食品検体から検出された NV 232 検出株を対象とした。NV の検出された内訳および事例数は、発生動向調査検体由来 69 検体、集団事例 104 事例、および食品 22 検体であった(表 1)。

2) 検出方法

検査は各施設で行った。RNA の抽出は、便は 10 % 乳剤を QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) を用いて RNA 抽出を行った。食品は、10 % 乳剤を超遠心後その沈さに DNase RNase Free の DW を加え再浮遊させ、その 138 μ l について QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) を用いて食品衛生法に示してある方法に従って抽出した。抽出した RNA は、DNase 処理後 Random Primer (6mer) を用い Super Script II RT で逆転写反応を行い cDNA を作製した。その後 Kojima らの SK プライマーを用いて Capsid N terminal /shell domain (N/S) 領域の PCR をおこなった。尚、便検体は G I は G1SK-F/R、G II は G2SK-F/R の 1stPCR のみ行った。食品は、1stG I プライマーに COG1F/G1-SKR を 1stG II プライマーに COG2F/G2-SKR を用いた。Nested PCR は、便検体の PCR で用いた組み合わせのプライマーで行った。

G II/4 の変異株の検索をおこなうためにポリメラーゼ領域からキャプシド領域までを増幅した。使用したプライマーは、食品衛生法 NV 検査法資料にある SM82 を Forward プライマーとして、G2SKR を Reverse プライマーとして用いた。

3) NV 遺伝子型別

増幅産物の得られた検体について各施設で、ダイレクトシーケンスを実施した。得られた塩基配列について、各施設で比較後、同一事例で同じ塩基配列なら 1 株として、違うものについては、すべての株を対象とした。こうして選んだ 232 株について、N/S 領域を DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html>) の clustalW を用いてアラインメントした。分岐点検定のためのブートストラップ検定は 1000 回行い、950 以上を統計的に優位な分岐点とした。系統樹は clustalW の値に基き Njplot (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/njplot.html>) で作成した。遺伝子型別およ

び型番号は、片山らの方法 (IDWR6, 14-19, 2004) に基づいて行った。

G II/4 株の SM82/G2SKR 増幅産物については、DDBJ の FASTA を用いて相同性の高い NV 株を検索した。また、検索の結果類似株とわかったものの中から増幅産物とほぼ同じ領域を得られる株及び Bull らが解析に使用した株を標準株として、clustalW を用いてアラインメントした。分岐点検定のためのブートストラップ検定は 1000 回行い、950 以上を統計的に優位な分岐点とした。系統樹は clustalW の値に基づき Njplot で作成した。

4) 疫学情報の検討

感染症発生動向調査の感染性胃腸炎患者の発生状況について、3 地域の情報を比較した。また、牡蠣などの流通についても情報を収集した。

C 研究結果

3 地研から得られた NV の遺伝子型は表 2 のとおり、G I が 11 種類、G II が 9 種類であった。3 地方すべてで検出された G I 遺伝子型は G I /1 (NV/68) 、 G I /3 (Desertshield) G I /8 (WUG1/00/JP) の 3 種類で、G II 遺伝子型は、G II /2 (Melkshan) 、 G II /3 (SaitamaU201G II /Mexico) 、 G II /4 (Bristol/Lordsdale) 及び G II /6 (SaitamaU3/97/JP) の 4 種類であった(図 2, 3)。発生動向調査検体からは、G II /3 と G II /4 が共通に検出された。また、G I 型は検出されなかった。食品検体については、7 種類の遺伝子型のものが検出され、集団発生事例検体由来の遺伝子型と同じものであった。4 月～翌年 3 月を 1 シーズンとして集団事例の遺伝子型の変遷を見ると、2004. 4-2005. 1 には、前シーズンに検出された G II /3 が検出されなかったが、2005. 10-12 にはまた検出されている。(表 3)。2004-2005 シーズンは G II /4 が群を抜いて多かったが、2005-2006 シーズンは現在まで検出数があまり多くない。また、G II /2 や G II /6 が検出されている(表 3)。

SM82/G2SKR 産物 35 株について、2 種類のクラスターに分けることが出来た。1 つは Bull ら示している Hunter' 04 クラスタ-DQ078801 Hu/G II. 4/Hunter 532D/04/AU 類似株であり、もう 1 つは、DQ095875 Hu/G II/Nagano/2004/H/JP に類似した株のクラスターであった。(図 4) 3 地域の感染症

発生動向調査の感染性胃腸炎患者数及び定点あたりの患者数について比較をおこなった。患者数は2003-2005年とも大分県が一番多く、次いで佐賀県であった。定点あたりの患者数も大分県が2003年12月は40を越えるなど患者発生の多さが目立っていた。(表4、5)。牡蛎の流通については、今回調査では、佐賀県では牡蛎の養殖をおこなっており、1998-2003年の間で毎年340-540トンの漁獲量がある。また、熊本市については、2003、2004年は9月に殻つき牡蛎の流通から始まり、翌年3月までそれぞれの年で生食用牡蛎63、75トン、加熱調理用牡蛎が241、141トン。地牡蛎が27トン殻つき牡蛎は、少なくとも30-40万個流通していた。

食中毒事例数については表6のとおりであるが、2006年1月に入り大分県、熊本市ともNVの食中毒が発生している(今回データは示していない)。

D 考察

今回のわれわれが行った遺伝子型別調査により、九州の3地研で検出されたNVはG11種類G119種類の遺伝子型に分類された。内訳は国内でも報告の多いG11/4が全体の37.5%(87/232)検出され、2004年3-6月に大阪府域で流行したG11/2が7.8%(18/232)を占めた。また、G11/6が増加傾向にあり、10.9%(20/183)であった。G11/3も同じく8.6%を占め、これら4種類の遺伝子型で全体の68.5%を占めた。今回調査を行ったのは同じ期間であるが、3地研で検出されたNV遺伝子型にはG1/8やG1/17など違うものもあり、それぞれの地方での流行があると考えられた。2005-2006シーズンは熊本市ではG11/3型及びG11/4型のみしか検出されていない(図5)。佐賀県、大分県では集団発生事例由来株に遺伝子型の種類のばらつきがあった(図2、3)。また、大分県、熊本市とも食中毒の原因食品ではないが、食品からのNVの検出で患者で分離の多い遺伝子型と同じ型の検出が多かった。これは従来言われている人→環境→人のウイルス循環によるものと考えられた。

G11/3Mexico型は、2003年長崎市の広域食中毒事例で検出された遺伝子型であるが、2004年には検出がなく、2005年になりまた検出されている。また、2005年1-3月にG1/3

が佐賀県、熊本市で検出され、流行株になると予測したがまだ検出佐賀県、熊本市では検出がなく、大分県での検出が1事例あったのみである。前年に新しく検出された株がすぐ次の年に流行する訳ではないことがわかった。

2003-2004年のNVの全体的な流行は、表3を見ると解るようにいくつかの遺伝子型が混在していたが、2004-2005年は、G11/4が多かった。2005-2006年は昨シーズンほど検査件数が増加しておらず、また検出数も少なかった。昨シーズン多かったG11/4は今シーズンも検出はされているが、昨年のように突出はしておらず、この遺伝子型による流行は少し落ち着いたのではないかと考えられた。

G11/4に分類されたNV株をSM82/G2SKRで増幅した産物は2つのクラスターに分けられ、大部分はBullら示しているHunter'04クラスター(DQ078801 Hu/G11.4/Hunter532D/040/AU)でありこの株類似のものが九州でも流行していたと考えられた。もう1つのクラスターはDQ095875 Hu/G11/Nagano/2004/H/JPに類似したクラスターであり、これも2004年に長野で検出されていることから、この遺伝子型についても流行しているのだと考えられた。

発生動向調査の感染性胃腸炎患者数は乳児、小児のデータであり、必ずしもNV患者数を反映するものではないが、NV検出件数の多い大分、佐賀での定点あたり患者数が多く、熊本市では少ないことからNV感染者についての指標の可能性が考えられた。

牡蛎の流通情報からそれぞれの地方で検出されるNV遺伝子型の違いについて解析するため情報を収集した。産地の明記をするように食品衛生法は変わったが、牡蛎の流通については、まとまったデータがなく、今回は十分に検討をすることが出来なかった。しかし調査の結果、佐賀県で養殖がおこなわれているということ。熊本市で殻つき牡蛎や地牡蛎の流通量が以外に多かったことが判明した。今後とも牡蛎についての情報は収集していく必要があると考えられた。

E 結論

- ・ 2003年1月～2006年1月に九州3地研で検出されたNVは、20種類(G1 11種類、