

図1 し尿処理工程

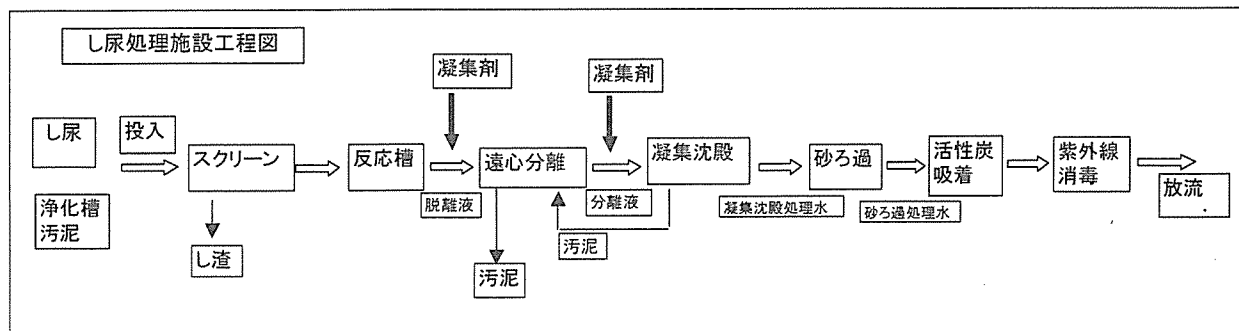


表1 汚水処理施設のNV検出状況

採材年月日	2005		2006						2007				
	11.24		1.15		2.22		9.12		12.12		1.16		
geno group	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2	
公共下水道終末処理施設	流入水	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
	放流水	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
漁業集落排水処理施設	流入水	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+
	放流水	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
し尿処理施設	流入水	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	放流水	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表2 し尿処理場の処理工程毎NV検出状況

採材年月日	2005		2006						2007			
	11.24		1.15		2.22		9.12		12.12		12.12	
genogroup	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2
検体の種類												
処理前 し尿	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
脱離液	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+
分離液	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
凝集沈殿処理水	-	-	-	-	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT
砂ろ過処理水	-	-	-	-	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT
放流水	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

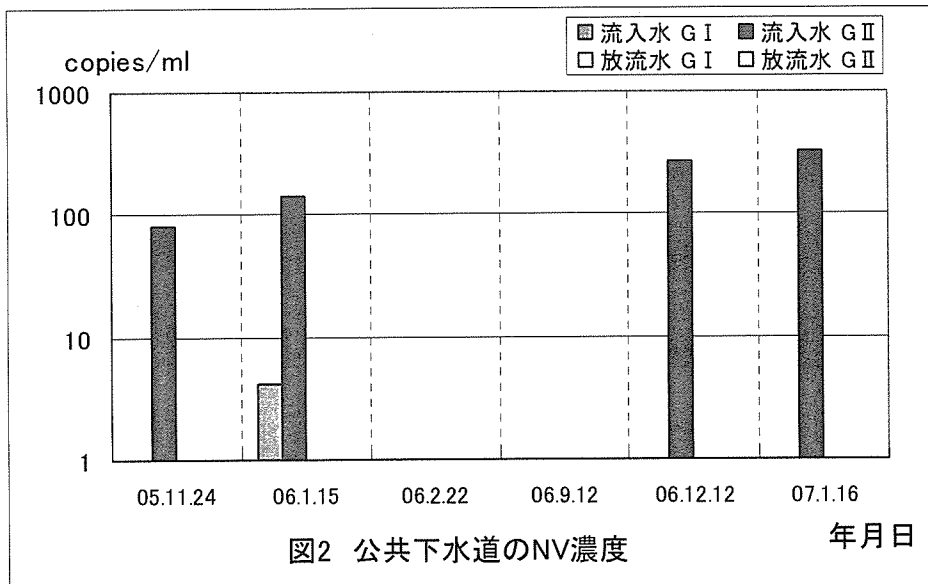
※NT: not tested

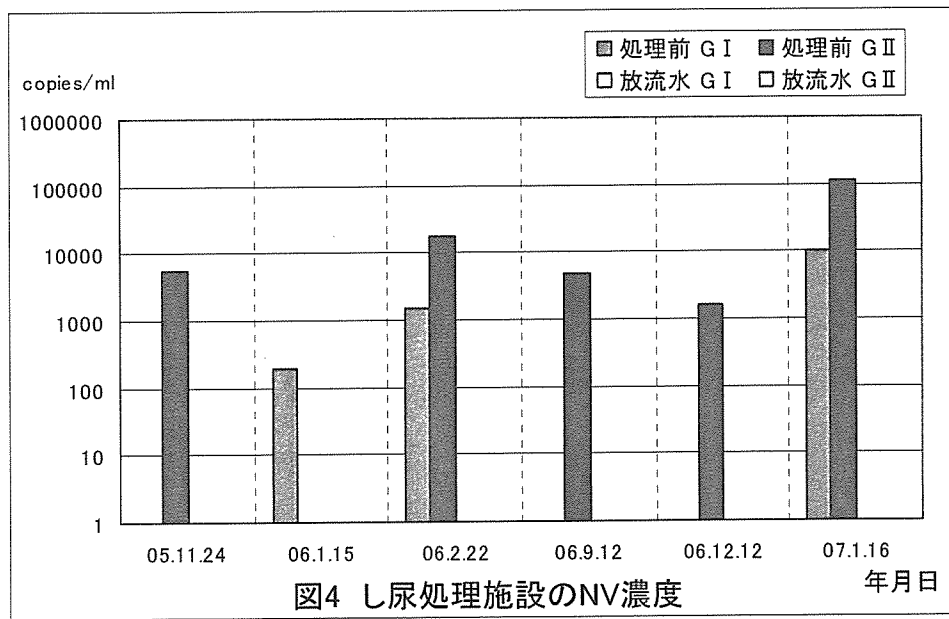
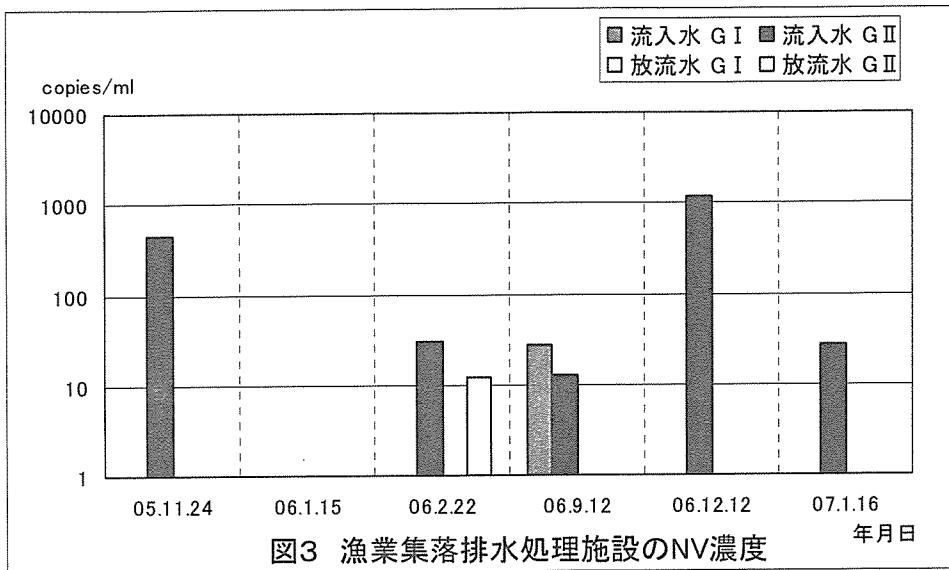
表3 カキからのNV検出状況

採材年月日	2005		2006						2007			
	11.24		1.15		2.22		9.12		12.12		1.16	
geno group	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2
Nested PCR (陽性カキ個数/ 検査カキ個数)	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/10	0/10	1/10	0/10	6/10	6/10
Realtime PCR (copies/個)	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	0~163	0~64
genotype									G1/7		G1/4	G2/4

表4 海水からのNV検出状況

採水年月日	2005		2006						2007			
	11.24		1.15		2.22		9.12		12.12		1.16	
geno group	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2
定点A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
定点B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-





平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金 (食品の安心・安全確保推進研究事業)
「ウイルス性食中毒の予防に関する研究」
協力研究報告書

ノロウイルス (NoV) による感染性胃腸炎の宮城県内での流行に関する考察

研究協力者 植木 洋 (宮城県保健環境センター)
分担研究者 田中 智之 (堺市衛生研究所)

研究要旨: 2006 年のシーズンに県内で流行したノロウイルス (NV) による感染性胃腸炎患者から検出された遺伝子を対象に分子疫学解析を行った。その結果 2006 年 11 月, 12 月に検出された NV 遺伝子はすべて GII/4 の変異株で, 県内で 2003 年から 2005 年に検出された GII/4 近縁株とは異なったクラスターを形成した。

A. 研究目的

今シーズンに流行したノロウイルス (NV) による感染性胃腸炎について, 感染症発生動向調査のデータをもとに過去の流行との比較を行い, 流行実態を明らかにする。さらに, 患者から検出された NV 遺伝子を分子疫学的に解析し, 流行の原因の解明を行うことを目的とした。

B. 研究材料と方法

1. 材料

(1) 流行の実態把握

過去 3 年間の宮城県感染症発生動向調査の定点医療機関からの感染性胃腸炎患者報告数をもとに, 週毎の定点当たりの患者数を調査した。

(2) NV 遺伝子の分子疫学的解析

定量 PCR 法によって NV 遺伝子が検出された以下の検体を対象とした。

①2006 年 11 月から 12 月にかけて, 県内で発生した感染性胃腸炎集団発生事例 20 事例中 8 事例 12 件。

②2006 年に県内で発生した食中毒事例 12 事例中 5 事例 13 件。

③他県で発生した食中毒連事例 1 事例 2 件。

④宮城県感染症発生動向調査で採取した胃腸炎患者便 1 件。

なお, これらの検体から検出された遺伝子群はすべて Genogroup II (GII) 群であった。

2. 方法

検体から抽出したウイルス RNA を用いて, One Step RT-PCR キット (QIAGEN) で遺伝子の増幅を行った。なお, プライマーはウイルス遺伝子の ORF2 の一部の領域増幅用である COG2F と G2SKR を用いた。増幅産物は ABI 310 でシークエンスを実施した。塩基配列を決定後, Clustal X でアライメント後, 系統樹を作成し分子疫学的解析を行った。

C. 研究結果と考察

1. 流行の実態把握

図 1 に過去 3 年間の定点医療機関あたりの感染性胃腸炎患者報告数を示した。今シーズン県内では, 第 47 週から定点当たりの患者報告数が急増し第 50 週にピークに達した。ピーク時の報告数は 33.74 人で,

2004年と2005年のピーク時の16.34人と21.51人と比較すると、それぞれ2.1倍と1.6倍であった。このことより、今シーズンの県内での感染性胃腸炎の流行は、少なくとも過去3年間では最も規模が大きいことが明らかになった。

2. NV 遺伝子の分子疫学的解析

ORF2 の一部の 249nt について塩基配列を決定できた。図 2 に NJ 法で作成した系統樹を示す。系統解析の結果、今シーズンの流行期に検出された NV 遺伝子は、すべて G II/4 の近縁株であることが明らかになった。これらの株は、株間での相同性が塩基配列のレベルでは 98.8%、アミノ酸レベルでは 97.6%で、同一の遺伝子型であると推測された。今シーズンの流行期に検出されたこれらの株は、2003年から2005年の期間に県内の感染性胃腸炎事例や食中毒事例で検出された G II/4 近縁株とは異なったクラスターを形成した。さらに 1995年から1996年にアメリカで流行しその後世界各地で流行した G II/4 の変異株 US95/96 (accession No. AF080549) と同クラスターを異にした。また、2002年にアメリカとイギリスで流行した G II/4 変異株の Farmington b4s6 (accession No. AY587985) や

Hill (accession No. AY502023) のクラスターにも属さなかった。

D. 結論

1. 2006年シーズンに県内で流行した NV による感染性胃腸炎事例、食中毒事例で検出された NV 遺伝子を分子疫学的に解析した。検出された株は、ORF2 の一部の領域の 249nt についてアライメントした結果、高いホモロジーが確認され同一の遺伝子型であることが強く示唆された。
2. 2003年から2005年に県内で検出された G II/4 近縁株と2006年シーズンの NV は異なったクラスターを形成した。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願、登録状況

なし

図 1. 過去3年間の定点あたりの感染性胃腸炎患者報告数

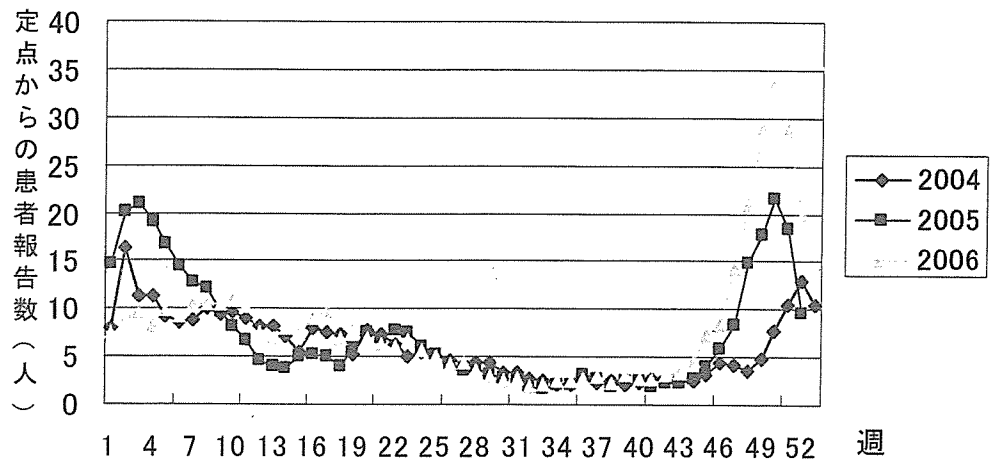
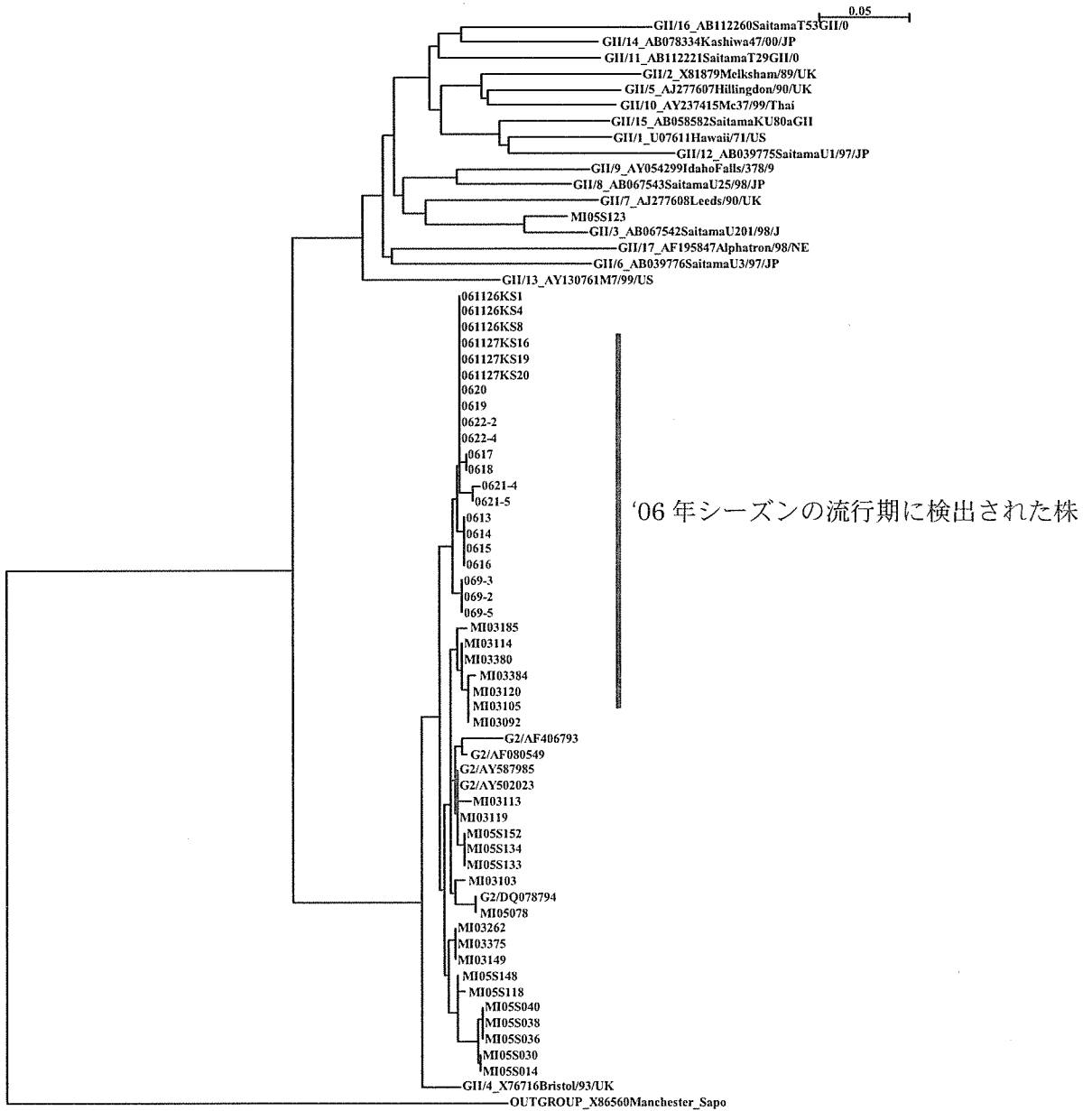


図2. 宮城県内で検出されたG II 群NoV遺伝子の系統樹 (NJ法)

(MI03とMI05は県内で2003年から2005年の期間中に検出された株)



富山県における感染性胃腸炎の事例について

研究協力者 滝澤 剛則 (富山県衛生研究所)

分担研究者 田中 智之 (堺市衛生研究所)

研究協力者 小原真弓、長谷川澄代、岩井雅恵、堀元栄詞、倉田 毅
(富山県衛生研究所)

研究要旨: 富山県における平成 18 年度のノロウイルスによる感染性胃腸炎の事例について、ノロウイルス遺伝子の検索を行った。平成 19 年 1 月末現在までに 26 事例が発生し、そのうち施設での発生が 17 事例と多数を占めた。カキの喫食が直接関連した事例は無かった。遺伝子型は、4 月の 1 例が GI/8 であった以外は全て GII/4 であった。一方、2 ヶ月間糞便中にウイルス遺伝子が検出され、その経過中にカプシド領域の開始コドンから数えて 50 番目の塩基が、A から G に変化した例が存在した。RT-PCR 産物をクローニングして検討したところ、クローンの割合が A を持つものから G を持つものへと変化していることが判明した。この塩基変化は、カプシドタンパク質の 17 番目のアスパラギン酸をセリンに変化させることがわかった。長期ウイルス排泄例では、遺伝子が経過中に変化する可能性があることが推測された。

A. 研究目的

富山県におけるウイルス性胃腸炎の事例を検討することにより、それらの特徴を把握し、今後のウイルス性食中毒の予防に資することを目的とする。

B. 研究材料と方法

1. 材料

2006 年 4 月から 2007 年 1 月末現在までに、富山県で集団発生したウイルス性胃腸炎の患者等のうち、遺伝子検出でノロウイルスが検出された糞便を対象とした。検体採取と疫学的調査は管轄厚生センターで実施した。

2. 方法

糞便の処理およびリアルタイム PCR、RT-PCR によるノロウイルス遺伝子検出は、厚生労働省通知に準じて行った。PCR 産物のクローニングは、TOPO-TA クローニングキット(インビトロジェン)を用いて、添付のマニュアルに従って行った。組換え DNA の取扱いは、当衛生研究所安全委員会の承認を得て、実験計画書に従って行った。

C. 研究成果

1) 事例のまとめ

2006 年 4 月から 2007 年 1 月末現在までに、富山県で集団発生したウイルス性胃腸

炎の事例で、遺伝子検出でノロウイルスが検出されたものは、26 事例あった(表 1)。それらの内、20 事例が 11 月以降に発生した。また、食品関連が 9 事例であったのに対して、ヒト-ヒト感染が 17 事例あり、施設での発生が多数を占めた。カキの喫食が直接関連した事例は無かった。遺伝子型は、4 月の 1 例が GI/8 であった以外は全て GII/4 であった。

2) 経過中にカプシド遺伝子に 1 塩基の変化が認められた 1 例

5 月 11 日の事例内で、無症状にもかかわらず 2 ヶ月にわたって糞便中にウイルス遺伝子が検出された例が存在した(図 1)。この例において、経過中に 6 回検便を行い(280-2~6)、RT-PCR によりウイルス遺伝子を検査したところ、カプシド領域の開始コドンから数えて 50 番目の塩基が、280-2, 3 では A であったのに対して、280-4, 5, 6 では G に変化していることが判明した

(図 2)。ウイルス遺伝子のクローンの割合が、経過中に A から G に変化した可能性が考えられたため、RT-PCR 産物をプラスミドにクローン化して、それぞれ約 25 クローンずつ同部位の塩基配列を検討した。その結果、配列が得られた範囲で、280-2, 3 では全てのクローンが A 配列を持っていたのに対して、280-4 では 24 クローン中 A が 9、G が 15、280-5 では A が 1、G が 24 個、280-6 では全て G であった。このように、経過中に A を持つクローンから G を持つクローンへと割合が変化していることが判明した。また、この塩基の変化は、カプシドタンパク質の 17 番目のアスパラギンをセリンに変化させることがわかった。

D. 考察

2006 年 4 月から 2007 年 1 月末現在の間

では、特に 2006 年 11 月以降に GII/4 による事例が多発したことが判明した。また、食品による事例よりも、ヒト-ヒト感染事例が多発していたことも判明した。これらの特徴は、全国的にも認められており、富山県においても全国的なノロウイルス感染の影響下にあったことが明らかとなった。このような GII/4 の多発の原因が解明されるためには、GII/4 ウイルスの性質が詳細に解析される必要があるだろう。

今回観察された経過中に 1 塩基変化した例では、経過中にウイルス遺伝子に変異が起きた、同部位に G を持つウイルスが再感染した、もともと混在していたうち G 塩基を持つウイルスが優勢になったなど、いくつかの原因が考えられる。また、同塩基の変化によりアスパラギンからセリンにアミノ酸変化を伴うことから、カプシドの抗原性が変化した可能性も考えられる。長期のウイルス遺伝子排泄例では、遺伝子が経過中に変化する可能性を考えて、今後検討を重ねていく必要があるだろう。

E. 結論

1. 2006 年 4 月から 2007 年 1 月末現在まで、富山県において特に 11 月以降に GII/4 ノロウイルスによる感染性胃腸炎のヒト-ヒト事例が多発した。
2. 経過中にカプシド領域の塩基およびアミノ酸が変化したノロウイルスの長期排泄例が存在した。
3. 上記の例では、経過中に A から G の塩基を持つ配列へとクローンの割合が変化した。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

(1) 長谷川澄代、小原真弓、岩井雅恵、滝澤剛則、倉田 毅：富山県におけるウイルス性胃腸炎の集団発生について（平成 16－17 年度）、日本公衆衛生雑誌、53、889、2006.

2) 学会発表

1) 小原真弓、大矢英紀、尾西 一、東方美保、猿渡正子、青木 聡、田中保和、柴田伸一郎、中野陽子、杉山 明、小林慎一、長谷川晶子、長谷川澄代：平成 17 年度の東海北陸地区におけるノロウイルス検出状況について、日本ウイルス学会第 57 回学術集会プログラム・抄録集、p. 237、2006.

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

表1 2006年4月から2007年1月末現在までの富山県におけるノロウイルスによる感染性胃腸炎の事例のまとめ

事例No.	発生日	発生施設 原因施設	感染源(推定) 原因食品(推定)	陽性数/検査数	有症者*1		無症状者*2		検出ウイルス (遺伝子型)
					陽性数/検査数	陽性数/検査数	陽性数/検査数	陽性数/検査数	
1	2006年4月15日	小学校	ヒト-ヒト	5/6	5/6			GI/8	
2	2006年5月11日	飲食店	食品	14/30	2/3	12/27		GII/4	
3	2006年5月15日	飲食店	食品	5/6	1/1	4/5		GII/4	
4	2006年5月21日	老人保健施設	ヒト-ヒト	5/5	5/5			GII/4	
5	2006年8月1日	宿泊施設	食品	12/33	10/20	2/13		GII/4	
6	2006年8月12日	宿泊施設	ヒト-ヒト	4/4	4/4			GII/4	
7	2006年11月7日	保育園	ヒト-ヒト	5/8	5/5	0/3		GII/4	
8	2006年11月1日	老人保健施設	ヒト-ヒト	5/7	5/7			GII/4	
9	2006年11月4日	老人保健施設	ヒト-ヒト	8/9	8/9			GII/4	
10	2006年11月6日	老人保健施設	ヒト-ヒト	4/6	4/6			GII/4	
11	2006年11月10日	温泉旅館	食品	1/2	1/2			GII/4	
12	2006年11月11日	旅館	ヒト-ヒト	3/3	3/3			GII/4	
13	2006年11月16日	飲食店(弁当屋)	食品	31/39	23/27	8/12		GII/4	
14	2006年11月12日	老人保健病院	ヒト-ヒト	5/5	5/5			GII/4	
15	2006年11月19日	旅行(岐阜県)	ヒト-ヒト	4/5	4/5			GII/4	
16	2006年11月19日	病院	ヒト-ヒト	6/8	6/8			GII/4	
17	2006年11月10日	老人保健施設	ヒト-ヒト	4/8	4/8			GII/4	
18	2006年12月7日	宿泊施設	食品	10/15	8/8	2/7		GII/4	
19	2006年12月6日	老人保健施設	ヒト-ヒト	5/5	5/5			GII/4	
20	2006年12月10日	飲食店	食品	13/17	11/11	2/6		GII/4	
21	2006年12月27日	老人保健施設	ヒト-ヒト	4/4	4/4			GII/4	
22	2006年12月31日	飲食店	食品	6/15	4/4	2/11		GII/4	
23	2007年1月9日	知的障害者施設	ヒト-ヒト	4/4	4/4			GII/4	
24	2007年1月11日	飲食店	食品	1/7	1/1	0/6		GII/4	
25	2007年1月11日	小学校	ヒト-ヒト	2/3	2/3			GII/4	
26	2007年1月30日	老人保健施設	ヒト-ヒト	6/6	6/6			GII/4	

図1 経過中にノロウイルスの長期排泄をみた例 (グラフ中の数字は検体番号を示す)

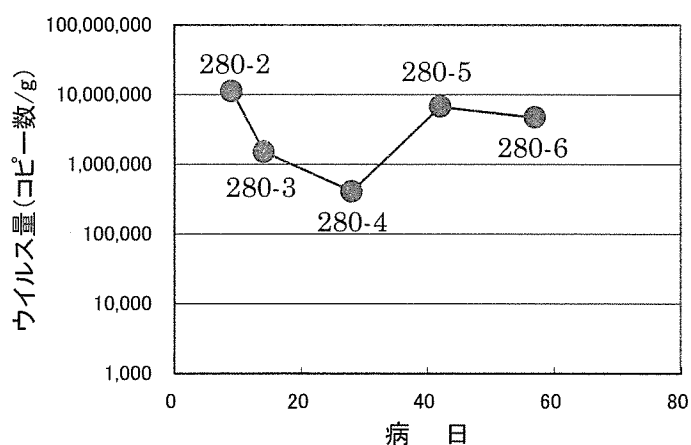


図2 経過中に変異した塩基

2006/280-2,280-3

TCTGGCTCCCAGTTTTGTGAATGAAGATGGCGTCGAATGACGCCAACCCATCTGATGGGTCCGCAG
CCAACCTCGTCCCAGAGGTCAACAATGAGGTTATGGCTTTGGAGCCCGTTGTCGGTG

2006/280-4,280-5,280-6

TCTGGCTCCCAGTTTTGTGAATGAAGATGGCGTCGAATGACGCCAACCCATCTGATGGGTCCGCAG
CCAGCCTCGTCCCAGAGGTCAACAATGAGGTTATGGCTTTGGAGCCCGTTGTCGGTG

図1の検体280-2～280-6のカプシド領域の塩基配列の一部を示した。ATGはカプシド遺伝子の開始コドン、TGAはポリメラーゼ遺伝子の終止コドン、AACとAGCは変化した塩基を含むコドンを示す。

平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金 (食品の安心・安全確保推進研究事業)
「ウイルス性食中毒の予防に関する研究」
協力研究報告書

2006 年 4 月～12 月の福井県内におけるノロウイルス検出状況

研究協力者 東方 美保 (福井県衛生環境研究センター)
分担研究者 田中 智之 (堺市衛生研究所)

研究要旨: 2006 年 4 月～12 月に、集団発生 30 事例・小児散発例 49 検体のうち集団発生 22 事例・小児散発例 31 検体からノロウイルス (NV) を検出した。遺伝子型としては Genogroup II/4 が大多数 (集団発生 86.4%・小児散発例 100%) を占めた。特に感染性胃腸炎患者が急激に増え始めた 10 月末以降の流行株は、過去の流行株とは異なるクラスターを形成する、遺伝的に同一または近縁な株であった。

A. 研究目的

急性胃腸炎の主要原因ウイルスの一つであるノロウイルス (NV) は、小児の感染性胃腸炎 (散発例) だけでなく、食中毒や不明感染症などの集団発生をも引き起こすことが知られている。特に 2006 年秋から年末にかけては、NV の大流行が全国的に報じられ、関心を集めた。

当センターは福井県内における流行状況を明らかにするため検出された NV について遺伝子解析を行っているが、実際に 2006 年 10 月下旬以降福井県内において NV の流行が捉えられた。そこで今回、2006 年 4～12 月に集団発生および小児散発例から検出された NV について、検出状況や遺伝子解析などを研究目的とした。

B. 研究材料と方法

1. 検査材料

2006 年 4 月～12 月の期間に、当センターへ行政検査依頼があった急性胃腸炎集団発生 30 事例に関連して採取した 221 検体 (糞便 189 検体・吐物 3 検体・拭き取り

29 検体) と、小児の感染性胃腸炎患者から採取した糞便 47 検体・吐物 2 検体を検査材料とした。また福井県で平成 14 年度以降に集団発生および小児散発例で検出された GII/4NV の遺伝子配列を系統解析に用いた。

2. 検査方法

「ノロウイルスの検出法」(平成 15 年 11 月 5 日厚生労働省食安監発第 1105001 号) に準じて、前処理・核酸抽出・逆転写を行い、糞便・吐物はリアルタイム PCR で、拭き取りは Nested PCR 産物を用いたサザンハイブリダイゼーションで判定した。NV 陽性となった検体については、5' 末端をビオチン化した Kojima らのプライマーを用いて Capsid 領域を増幅し、得られた PCR 産物を斎藤らの方法で SSCP 解析してグループ分けした。各グループの代表株 (集団発生では各事例 1 株以上) 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。遺伝子型別および遺伝子型番号は片山らの方法に従った。

C. 研究結果

1. NV 検出状況、NV 遺伝子型別および時期的分布

2006 年 4 月～12 月に行政検査依頼があった 30 事例の急性胃腸炎集団発生(表 1)のうち、22 事例が NV Genogroup II (GII) 陽性となった。小児散発例は 49 検体中 31 検体 (63.3%) が NV GI 陽性であった。NV Genogroup I (GI) は集団発生と小児散発例のいずれにおいても検出されなかった。複数の検体が NV 陽性を示した集団発生 15 事例について、SSCP 解析で事例ごとの検出株が一致するかどうかを確認したところ、13 事例は一致したが、2 事例(表 1 での事例 No. 21824, 21826) は 2 種類の株が混在していた。

NV 遺伝子検出配列 (G2-SKF/G2-SKR による増幅産物よりプライマー配列を除いた 282nt) は、GII/3、GII/4、GII/6 に型別された。小児散発例は NV GI 陽性となった 31 検体全てが GI/4 で、集団発生でも GI/4 が 19 事例 (86.4%) と高い割合を占めたほかには GI/3 が 2 事例 (9.1%)、GII/6 が 1 事例 (4.5%) で検出されている。

集団発生の発生時期については、GII/6、GII/3 は 4 月～6 月に限られたが、GII/4 は、特に 10 月末～12 月初めにかけての 7 週間 (第 44～50 週) に 14 事例が集中して発生していた (図 1)。この傾向は小児散発例でさらに顕著で、GII/4 NV が検出された 31 検体中 30 検体が第 44～49 週の 6 週間に採取されていた。

2. NV 検出遺伝子パターンの遺伝子解析

NV GI 陽性となった集団発生 22 事例 (76 検体) および小児散発例 31 検体より増幅された PCR 産物は、SSCP 解析もしくは塩基配列比較により 21 パターンに分類された。内訳としては、1 パターンが GI/6、2

パターンが GI/3、18 パターンが GI/4 で、これらの遺伝子配列に、過去に福井県内で検出された GI/4 遺伝子配列を比較対象として加え、分子系統解析を行った (図 2)。その結果、GI/4-H18-1 (4 月の集団発生 21802 に由来) と GI/4-H18-3 (6 月の集団発生 21813 に由来し県外からの持ち込みが疑われる) の 2 パターンは、平成 17 年度に検出されていた GI/4 配列と近縁であったが、残りの 16 パターンは新たなクラスターを 2 つ形成した。GI/4-H18-2, 9, 13 の 3 パターンから成るクラスター A (クラスター内の相同性は塩基配列で 99.7%以上、アミノ酸配列で 98.9%以上) と、GI/4-H18-4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 18 の 13 パターンから成るクラスター B (クラスター内の相同性は塩基配列で 98.6%以上、アミノ酸配列で 97.3%以上) である。今回の GI/4 検出例でこれらのクラスターに属するパターンが検出された割合は、クラスター A で集団発生:4/19 事例 (21.0%)・小児散発例:5/31 検体 (16.1%)、クラスター B で集団発生:14/19 事例 (73.7%)・小児散発例:26/31 検体 (83.9%)、合わせて集団発生:17/19 事例 (89.5%)・小児散発例:31/31 検体 (100%) ときわめて高く、8 月以降の検出例が全てクラスター A・B に含まれた。

D. 考察

今回検査対象とした集団発生には、食中毒疑いでの検査依頼で、原因食品 (疑) 喫食時刻から類推される潜伏時間が数時間と短く、ウイルスが病因とは考えにくい事例も含まれている。そのような事例での従事者検便から NV が検出されたケースが 3 事例存在した。うち 2 事例は喫食有症者が NV 陰性、1 事例 (事例 No. 21824) では喫食

有症者も NV GⅡ 陽性を示したが、SSCP 解析により喫食有症者と従事者で検出株が異なると判明し、いずれも集団発生とは関連しない従事者の散発的感染と考えられた。したがって検出された NV が集団発生の病因物質と推定されたのは 20 事例であり、ウイルス関与の疑いが低い事例を除いた場合の NV 陽性率は 87.0% (20/23 事例) であった。

推定感染経路では、各事例での検出株が SSCP 解析で一致する事例がほとんどで、従事者による食品汚染、ヒト-ヒト感染が各 8 事例となった。なお二枚貝の喫食が関係した事例は全くなかったが、そもそも汚染二枚貝に起因する食中毒が起こりやすい時期はさらに後 (2~3 月) と考えられる。

また、今回検出された NV 遺伝子配列パターンを由来別検出頻度でみると、小児散発例の場合 GⅡ/4-H18-5, 6, 7, 13 などの特定の配列パターンに偏りが見られるのに対し、集団発生で検出された配列パターンが重複することは少なかった。その中で例外的に、複数の集団発生で共通して検出された配列パターン (GⅡ/4-H18-5) の株は、感染力などの面で勝る可能性も考えられる。

福井県における感染症発生動向調査での感染性胃腸炎患者報告数の推移では、第 45 週以降多数の胃腸炎患者発生が認められたが、同時期に検出されている NV は、分子系統解析で新たなクラスター A・B に属する株ばかりであった。すなわち、夏前まで流行していた GⅡ/4 とは遺伝的に異なる、新たなタイプの GⅡ/4 が出現し、感染を急激に拡大した現象が、2006 年秋以降の NV 大流行としてあらわれたと考えられる。

E. 結論

1. 2006 年 4 月~12 月の福井県内における NV 検出例は、集団発生が 20 事例、小児散発例が 31 検体であった。
2. 4 月~6 月には GⅡ/3 や GⅡ/6 の検出例もみられたがほとんどは GⅡ/4 であり、特に感染性胃腸炎患者報告数が急激に増加しはじめた第 45 週以降には過去の流行株とは異なるクラスターを形成する新たなタイプの GⅡ/4 が主要流行株として流行を急速に拡大したと考えられる。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

なし

2) 学会発表

(1) 東方美保、松本和男、木村吉延：
平成 14~17 年度に福井県で検出されたノロウイルスについて
第 54 回日本ウイルス学会学術集会
名古屋、2006 年 11 月

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

表1. 2006年4~12月に福井県で行政検査を行った急性胃腸炎集団発生のノロウイルス検出状況

事例No.	発生日	発生施設 原因施設	感染源 原因食品	発症者 数	曝露可能者数 喫食者数	NV陽性数 /検査数	増幅された PCR産物の SSCPパターン	遺伝子型- 配列パターン名	推定感染経路
21801	2006.4.9	宴会場	4/8の会食	26	181	7 / 10	1種類	G II /6-H18-1	従事者による 食品汚染(食中毒)
21802	2006.4.9	高齢者施設		20	93	1 / 1		G II /4-H18-1	ヒト-ヒト(感染症)
21803	2006.4.16	飲食店	4/14の会食	11	22	4 / 12	1種類	G II /3-H18-1	従事者による 食品汚染(食中毒)
21804	2006.4.18	養護施設		24	361	0 / 17			
21805	2006.4.26	ホテル		15	70	0 / 6			
21806	2006.5.21	高校部活		30	40	0 / 11			
21807	2006.5.28	旅館	5/27-29に 提供された 食品	8	10	8 / 13	1種類	G II /4-H18-2	従事者による 食品汚染(食中毒)
21808	2006.5.30	ホテル		12	89	0 / 9			
21809	2006.6.6	飲食店		5	21	1 / 9		G II /3-H18-2	
21810	2006.6.15	寮		5	16	0 / 5			
21811	2006.6.17	飲食店		18	31	0 / 10			
21812	2006.6.23	飲食店		13	19	0 / 6			
21813	2006.6.26	旅館	宿泊者の 持ち込み	4	11	3 / 5	1種類	G II /4-H18-3	ヒト-ヒト(感染症)
21814	2006.6.27	飲食店		14	53	0 / 18			
21815	2006.10.30	家庭	幼児から 感染拡大?	4	5	2 / 4	1種類	G II /4-H18-5	
21816	2006.11.4	高齢者施設		23	130	3 / 6	1種類	G II /4-H18-5	ヒト-ヒト(感染症)
21817	2006.11.11	宴会場	出席者が 会場で嘔吐	135	264	1 / 1		G II /4-H18-9	ヒト-ヒト(感染症)
21818	2006.11.19	宴会場		9	30	7 / 7	1種類	G II /4-H18-10	
21819	2006.11.19	ホテル	11/18夕食	100	137	11 / 30	1種類	G II /4-H18-5	従事者による 食品汚染(食中毒)
21820	2006.11.21	ホテル	11/17夕食・ 18朝食	80	249	1 / 1		G II /4-H18-11	従事者による 食品汚染(食中毒)
21821	2006.11.29	飲食店		2	2	2 / 2	1種類	G II /4-H18-5	
21822	2006.11.26	宴会場		22	29	1 / 1		G II /4-H18-12	
21823	2006.11.22	高齢者施設		?	?	2 / 4	1種類	G II /4-H18-13	ヒト-ヒト(感染症)
21824	2006.12.7	飲食店	喫食者 グループ での 感染?	5	9	2 / 3	2種類 (喫食者と 調理従事者で 異なる)	G II /4-H18-10, G II /4-H18-13	
21825	2006.12.9	飲食店		8	12	1 / 5		G II /4-H18-10	
21826	2006.12.12	視覚障害者 施設		39	181	4 / 5	2種類 (有症者1人 のみ異なる)	G II /4-H18-16, G II /4-H18-7	ヒト-ヒト(感染症)
21827	2006.12.13	身体障害者 施設		31	145	3 / 3	1種類	G II /4-H18-17	ヒト-ヒト(感染症)
21828	2006.11.27	知的障害者 施設		53	186	4 / 5	1種類	G II /4-H18-5	ヒト-ヒト(感染症)
21829	2006.12.25	飲食店	12/22の 仕出し弁当	22	26	7 / 11	1種類	G II /4-H18-7	従事者による 食品汚染(食中毒)
21830	2006.12.25	飲食店	喫食者 グループ での 感染?	10	24	1 / 1		G II /4-H18-18	

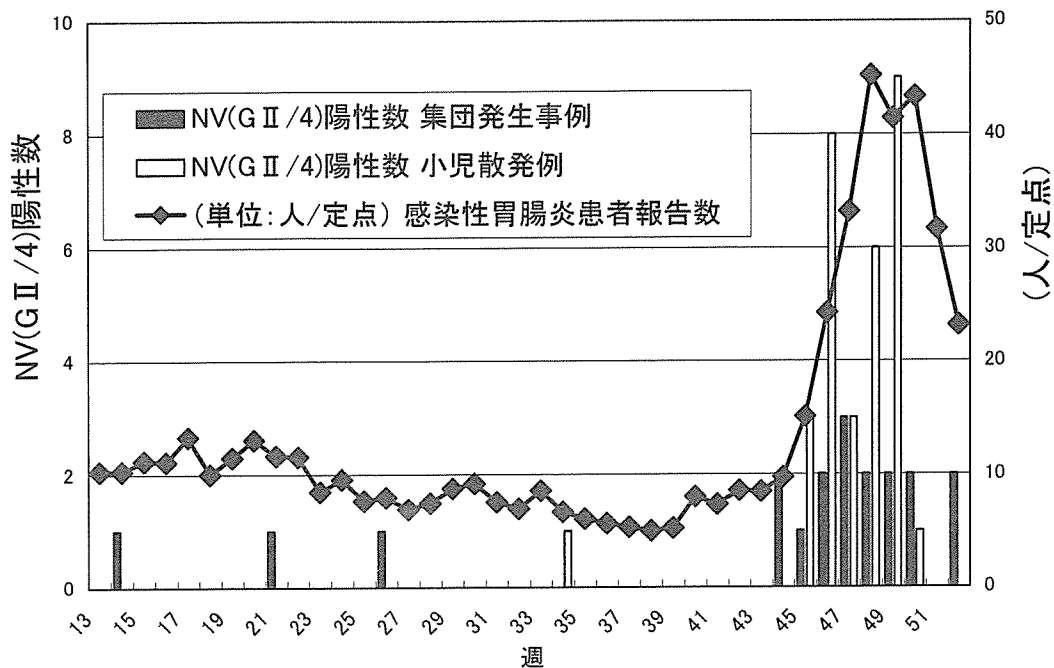


図1.G II/4型NVが検出された集団発生事例・小児散発例の発生時期 および福井県内での感染性胃腸炎患者定点あたり報告数の推移

表2. 2006年4～12月に福井県で検出されたノロウイルス遺伝子配列パターンの由来別検出頻度

遺伝子型- 配列パターン名	集団発生(推定感染経路別)					散発例			備考
	計	二枚貝 喫食	従事者 による 食品汚染	ヒト-ヒト 感染	不明	計	小児	従事者*	
G II/6-H18-1	1		1						県外由来?
G II/3-H18-1	1		1						
G II/3-H18-2						1		1	
G II/4-H18-1	1			1					
G II/4-H18-2	1		1						
G II/4-H18-3	1			1					県外由来?
G II/4-H18-4						1	1		
G II/4-H18-5	5		1	2	2	5	5		
G II/4-H18-6						6	6		
G II/4-H18-7	2		1	1		5	5		
G II/4-H18-8						7	7		
G II/4-H18-9	1			1					県外由来?
G II/4-H18-10	2		1		1	1		1	
G II/4-H18-11	1		1						県外由来?
G II/4-H18-12	1		1						県外由来?
G II/4-H18-13	1			1		6	5	1	
G II/4-H18-14						1	1		
G II/4-H18-15						1	1		
G II/4-H18-16	1			1					
G II/4-H18-17	1			1					
G II/4-H18-18	1				1				
計	21	0	8	9	4	34	31	3	

*集団発生の感染源ではなく、独立した散発的感染と推定された例

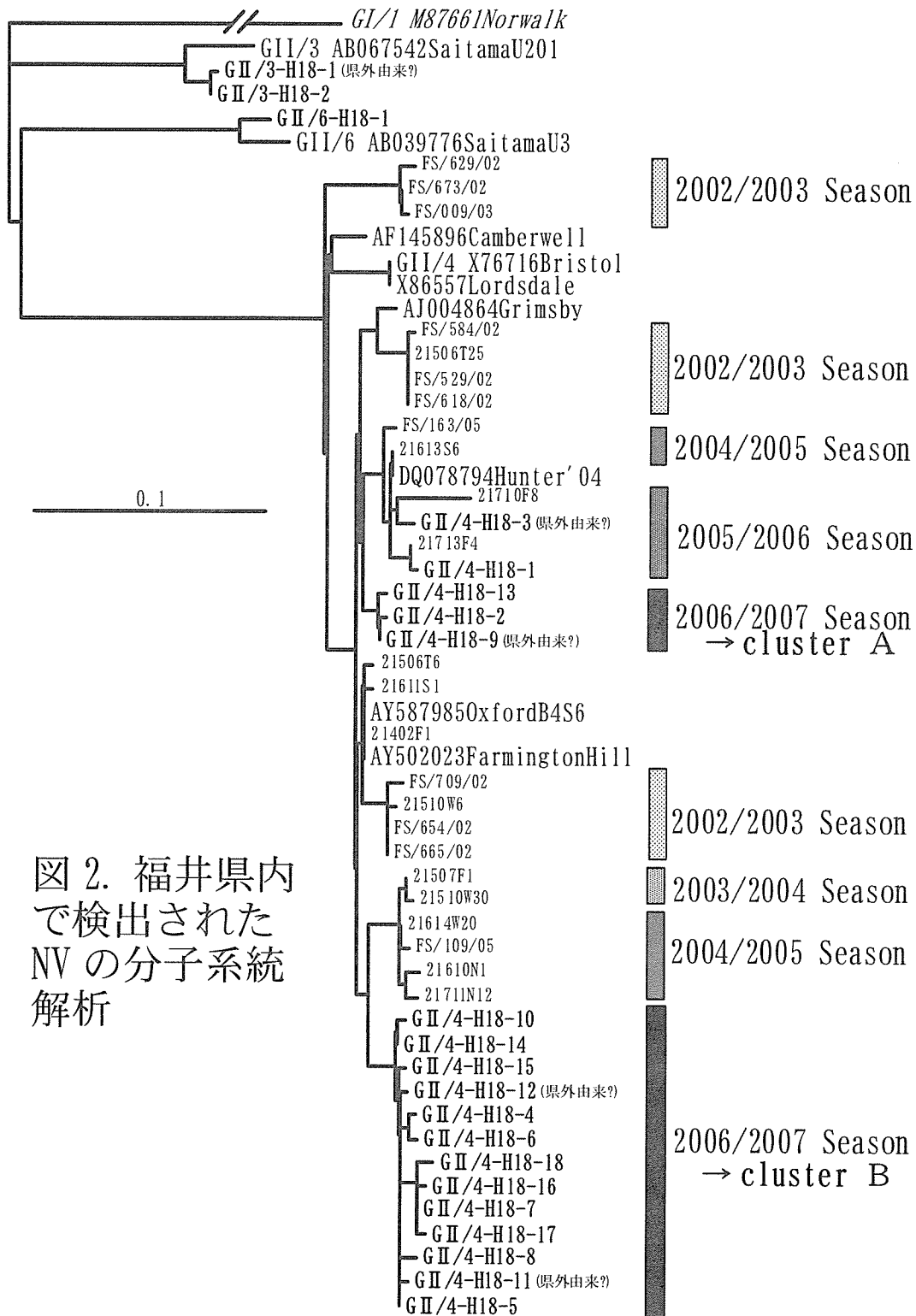


図 2. 福井県内で検出された NV の分子系統解析

平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)
「ウイルス性食中毒の予防に関する研究」
協力研究報告書

市販生カキからのノロウイルス遺伝子検出状況

研究協力者 内野 清子 (堺市衛生研究所)
分担研究者 田中 智之 (堺市衛生研究所)

研究要旨: 2006 年 10 月から堺市内で市販された生カキの NV 汚染状況と食中毒や NV 感染症との関連性を調査した。

2006 年 10 月～2007 年 2 月に市販された生カキ 20 パックの NV 遺伝子検出率は陽性率 10%であった。12 月市販された 1 パックでは GI/2 遺伝子型で、遺伝子量は 197copy/g であった。2 月市販 1 パックでは GI が 452copy/g、GII が 564copy/g 検出され、遺伝子型は GI/2、GI/4、GII/4 であった。

2006 年 4 月～2007 年 2 月の散発事例では、GII/4 遺伝子型が 93%を占め、その他の遺伝子型では GI/1、GI/8、GII/2 がそれぞれ 2%であった。

2006 年 4 月～2007 年 2 月の食中毒事例では、カキが原因食品であった事例がなかった。しかし、11 月～12 月に多く検出された NV GII/4 が、カキでは 2 月に検出された。これは NV 感染患者数の増加に伴い、環境中へ排出された NV が一要因と推定された。

A. 研究目的

2006 年/2007 年シーズンには、例年になく早くしかも過去に類のないノロウイルスによる感染性胃腸炎の集団感染症事例が全国で多発した。感染性胃腸炎の一要因として、これまで、カキの生食や不十分な加熱調理が主なものであった。今回、今シーズンの感染性胃腸炎の原因がカキによるものかを調査する目的で、同時期の市販されていた生カキの NV 汚染状況を調査した。

B. 研究材料と方法

1. 材料

(1) 市販生カキ

2006 年 10 月に市販された生カキ 4 パック (No. 1～4)、12 月は 10 パック (No. 5～14)、2007 年 1 月は 4 パック (No. 15～18)、2 月は 2 パック (No. 19～20) 計 20 パック

を材料とした。それぞれ、1 パック当たり 3 個のカキについて、摘出したそれぞれの中腸腺を NV 遺伝子検出検体とした。

(2) 食中毒事例および散発発生患者由来の NV 遺伝子

2006 年 4 月～2007 年 2 月、堺市内で発生した食中毒事例から検出され、遺伝子型別解析なされたそれぞれの事例からの代表 3 株、感染症発生動向調査に基づいた調査から得られた NV 陽性検体で NV 遺伝子型別解析がなされた 42 株を用いた。

2. 方法

(1) カキ中腸腺からの NV の RNA 抽出および cDNA 合成

カキの中腸腺を摘出し、PBS で 10%乳剤を作製後、超遠心法にて濃縮した。200 μ l の PBS にて再浮遊し、遠心後上清をサンプルとした。得られたサンプルから、QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いて RNA を抽出

した。抽出 RNA は DNase I 処理を行った後、random hexamer を用いて Super Script II RT で逆転写し、cDNA 合成を行った。

(2) NV 遺伝子検出

PCR 法による NV 遺伝子検出では、1st PCR は COG1F/G1-SKR、COG2F/G2-SKR を、2ndPCR には G1-SKF/G1-SKR、G2-SKF/G2-SKR プライマーを用い Capsid 領域を増幅した。得られた PCR 産物は TA クローニングベクターに挿入し、NV 遺伝子型別を行った。また、系統樹は近隣結合法によって作製した。

リアルタイム PCR 法による NV 定量では、プライマーは COG1F/COG1R と COG2F/COG2R、プローブはそれぞれ RING1-TPa および RING1-TPb、RING2AL-TP を用い、ABI PRISM 7900 でコピー数を測定し、カキ 1 個当たりのコピー数に換算した。

C. 研究結果

2006 年 4 月～2007 年 2 月に発生した食中毒 3 事例を示す (表 1)。遺伝子型はすべて GII/4 であった。カキが関連した事例はなく、調理人の手指等を介した感染であった。散発発生を検出状況を見ると、NV 遺伝子は 11 月、12 月に多く検出されていた (図 1)。遺伝子型別では 41 株のうち 38 株が GII/4 で、93% を占め、他の遺伝子型では GI/1、GI/8、GII/2、でそれぞれ 1 株 (各々 2%) であった。

表 3 には PCR 法とリアルタイム PCR 法による結果を示す。計 20 パックの生カキから 12 月と 2 月に市販された 2 パックが陽性となった。陽性パックの内訳を見ると、2006 年 12 月の No. 6-3 から GI. 2 が 197copy/g 検出された。2007 年 2 月の No. 20-3 から GI が 452copy/g、GII が 564copy/g 検出され遺伝子型は GI/2、GI/4、GII/4 であった。

生カキと食中毒事例および散発例から得られた GII. 4 の Capsid 領域の系統樹解

析では、生カキ由来の GII/4 と相同性の高い食中毒事例および散発例由来の GII/4 が検出された (図 2.)。

D. 考察

2006 年 4 月～2007 年 2 月に、堺市で発生した NV による食中毒事例でカキの喫食を原因とする事例はみられなかった。一方、散発例から NV 遺伝子は 11 月～12 月の事例から多く検出された。しかし、市販生カキから、NV 遺伝子の検出は 12 月以降であったことから、今シーズンにみられた感染性胃腸炎の流行は、カキが保有する NV に影響されていないことが推測された。

散発性 NV 感染事例で 11 月～12 月に多く検出された GII. 4 遺伝子は、カキでは 2 月になって検出され始め、これらの遺伝子は相互に高い相同性を有していることが判明した。当市はカキの一消費地であるが、散発例から検出

された遺伝子と生産地の生カキから検出された GII/4 の塩基配列との相同が高いことから、この時期の全国的な感染性胃腸炎大流行は、高い相同性のある GII/4 によるものであった可能性が考えられた。

E. 結論

生カキの喫食は感染性胃腸炎の一要因ではあるが、2006 年/2007 年シーズンにおける感染性胃腸炎の流行の大きな原因ではないことが示唆された。NV 感染症の自然史を知る上で、カキから NV 遺伝子の検出は感染防止の一つの手段として重要であり、同時に環境汚染状況を把握し、かつ対策を講じる上でも重要である。

F. 知的財産権の出願、登録状況

なし