

の仕出し料理は6月6日から下ごしらえ等の準備がなされていた。これらのことからA、B、Cのグループは加熱不足のむき身アサリの直接摂取、Dグループは調理器具等の施設や手指等を介しての二次汚染を原因とする食中毒が疑われた。

2) 検査材料

6月6日の2グループと6月7日の1グループ計24名(発症者23名、非発症者1名)、調理従事者10名(健康者)から採取された糞便34検体および原因食材と推定された冷凍むき身アサリ3検体(1Kg入り9袋を同時期に購入した残り3袋について各袋20個の中腸腺を1検体とした)、20個分のアサリに付着していた氷の溶解液40ml(アサリ保存液)3検体を検査材料とした。6月6日の1グループ(C)については臨床症状の聞き取り調査のみ行った。

2. 検査方法

患者等のふん便はPBSで10%乳剤とし15000rpmで10分遠心上清した液140 μ lから、アサリ保存液は超遠心法で濃縮した液560 μ lから、アサリは20個分の中腸腺(約2.0g)をプールしたうちの1.0gを用い、細胞破砕法にアミラーゼ処理を導入したアミラーゼ処理-細胞破砕法で得た遠心上清560 μ lから、それぞれQIAamp Viral RNA Mini Kitを用いて添付の用法に従ってRNA抽出を行った。抽出RNAからSuperscript II RTとrandom hexamer、oligo(dT)₁₂₋₁₈を用いてcDNAを合成し、PCR反応の鋳型とした。ウイルス性下痢症診断マニュアル第3版(衛生微生物技術協議会レファレンス委員会)、Okadaらの方法(Arch

Virol,2006,151:2503-2509)を基本として、SaV遺伝子の検出はnested RT-PCR(アサリは増幅サイクルを50回に変更)およびreal time RT-PCR(国立感染症研究所岡博士に依頼)、NV遺伝子の検出はnested RT-PCRおよびreal time RT-PCR(アサリはnested real time RT-PCRも実施)によった。アサリ中腸腺および保存液は抽出RNAのDNase処理、未処理、両方についてcDNAを合成し、SaV、NVの検出を試みた。

4. 塩基配列の決定および分子系統樹の作成

国立感染症研究所岡博士に依頼した。方法はSaVはF22/R2プライマー、NVG IはCOG1F/G1SKRプライマー、NVG IIはCOG2F/G2SKRプライマーの増幅産物をpCR2.1ベクターにクローニング後、大腸菌を形質転換した。その後、M13-RVおよびM13-20プライマーでそれぞれについてコロニーPCRを行い、目的サイズのインサートが増幅された4クローンについて塩基配列を決定し、CLUSTAL W ver1.83によって塩基配列のアライメントを行い、Njplotソフトウェアを用いて系統樹を作成した。

C. 研究結果

1. 患者、調理従事者からのウイルス検出状況

患者24名中12名からSaV、9名からNVG I、4名からNVG IIを検出した(表2)。ふん便1g当たりのコピー数はSaVが $10^5 \sim 10^{10}$ 、NVG Iが $10^6 \sim 10^7$ 、NVG IIが $10^6 \sim 10^9$ であり、Aグループの非発症者1名からも発症者と同程度のコピー数

(2.09×10^{10})の SaV が検出された。SaV、NVG I で RT-PCR 法でのみ陽性となった検体が1例ずつ認められた。調理従事者では10名中1名から NVG II が検出された。グループ間の検出状況に差異は認められなかった(表3)。A 群ロタウイルス、C 群ロタウイルス、エンテリックアデノウイルス、アストロウイルスおよび食中毒原因菌は検出されなかった。

検出ウイルスと臨床症状および潜伏時間との間に関連は認められなかった。(表4、図1)

2. 食材等からのウイルス検出状況(表5)

冷凍庫に保管されていた3袋のむき身アサリから SaV、NVG I、NVG II のいずれかが検出された。このうち real time RT-PCR で検出されたのは1検体の NVG II で 5.8×10^3 コピー/g であった。保存液は2検体から SaV、NVG I が検出された。SaV が検出されたのは DNase 未処理の RNA を用いた場合であった。

3. 塩基配列の決定および系統樹解析

ヒト由来株とアサリ由来株の間の相同性は SaV の G I /5、G I /3 は 100%、G II /5 は 99.3~99.8%、NVG I /1 は 98.6~99.7%、G II /6 は 99.3%であり、同一もしくは極めて類似の配列を持つ株が検出された。なお、調理従事者由来株は NVG II /4 であり、患者およびアサリ由来とは全く異なる株であった(図2)

D. 考察

従来乳児の感染性胃腸炎の原因ウイルスの一つと認識されていた SaV を原因

とする食中毒事例、福祉施設での集団発生、地域流行が 2007 年に国内でも報告され、大人を含む集団感染の原因ウイルスとなることが明らかとなった。また、シジミ中腸腺からの検出報告(Hansman GS, et al., Emerg Infect Dis, 2007, 13:620-622)、流入下水からの検出報告(小林ら、第 55 回日本ウイルス学会学術集会抄録集)等から二枚貝摂取による SaV 感染事例の可能性が示唆されていた。今回、患者と患者が摂取したアサリと同一ロットと考えられるアサリから塩基配列が同一か極めて近い SaV が検出され、二枚貝による SaV の食中毒が初めて証明された。アサリおよびアサリ保存液から検出された SaV は nested PCR でのみ検出可能なほど微量であり、さらに本事例の D グループのように微量ウイルスの二次汚染を原因とする発症から、NV 同様、SaV も少量のウイルスで感染が成立するものと考えられる。

SaV と他のウイルスの複合感染事例は group A rotavirus との感染症事例、NV、rotavirus との食中毒事例等散見されるが、本事例のように一人が複数種のウイルスに感染した multiple infection 症例の報告は稀である。そして、このような症例でも潜伏時間や臨床症状は単独感染例と変わらず、臨床症状等から両ウイルスの感染を識別するのは困難と考えられた。

今回の事例ではアサリ中腸腺および保存液からの SaV の検出は DNase 未処理の RNA を用いた方がよい結果となった。食品等微量汚染検体からの SaV や NV の検出に及ぼす DNase 処理の影響につ

いては今後検討が必要あろう。

E. 結論

1. 患者と食材の中国産冷凍むき身アサリから塩基配列が同一もしくは極めて近い SaV が検出され、二枚貝による SaV の食中毒が発生することを証明した。
2. 患者から SaV、NVG I、NVG II が単独あるいは複数種で検出されたが、検出ウイルスと臨床症状および潜伏時間との間に関連性は認められなかった。
3. 本事例は最初に実施した NV 検査で陽性率が低かったこと、潜伏時間に幅があったことから他の病原体の関与を疑い検査をして確認された SaV、NV 混合感染事例である。食中毒事例の原因ウイルスとして NV だけでなく SaV も念頭に入れる必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 知的財産権の出願、登録状況

なし

H. 研究発表

1) 論文発表

なし

2) 学会発表

飯塚節子、岡智一郎、片山和彦、武田直和、野田衛: サポウイルスとノロウイルスが検出された食中毒事例. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会 2008 年 10 月 岡山

表1 患者発生状況

グループ	喫食者数	発症者数	発症率
A	28名	21名	75.0%
B	8名	7名	87.5%
C	3名	2名	67.0%
D	11名	8名	72.7%
計	50名	38名	76.0%

表2. 患者、調理従事者からのウイルス検出状況

サンプルNo.	区分	SaV	NVG I	NVG II
D1710	A患者	—	—	—
D1711	A患者	1.90x10 ⁸	—	—
D1712	A患者	—	1.2x10 ⁷	9.6x10 ⁶
D1713	A患者	—	—	—
D1729	A非発症者	2.09x10 ¹⁰	—	—
D1730	A患者	—	2.5x10 ⁶	—
D1731	A患者	—	9.6x10 ⁶	—
D1732	A患者	1.23x10 ⁷	—	—
D1735	A患者	—	—	—
D1736	A患者	6.70x10 ⁹	—	—
D1737	A患者	1.21x10 ¹⁰	—	—
D1738	A患者	7.42x10 ⁸	—	—
D1739	A患者	2.44x10 ⁸	1.2x10 ⁷	—
D1740	A患者	—	—	—
D1714	B患者	+*	—	1.3x10 ⁸
D1715	B患者	—	2.0x10 ⁷	—
D1716	B患者	—	2.0x10 ⁷	—
D1717	B患者	—	—	—
D1718	B患者	3.50x10 ⁸	—	—
D1733	D患者	—	—	—
D1734	D患者	3.24x10 ⁸	2.0x10 ⁷	—
D1741	D患者	3.87x10 ⁷	+*	3.9x10 ⁸
D1742	D患者	—	4.4x10 ⁶	—
D1743	D患者	3.46x10 ⁵	—	1.5x10 ⁹
D1719	調理者	—	—	—
D1720	調理者	—	—	—
D1721	調理者	—	—	—
D1722	調理者	—	—	—
D1723	調理者	—	—	—
D1724	調理者	—	—	—
D1725	調理者	—	—	1.4x10 ⁶
D1726	調理者	—	—	—
D1727	調理者	—	—	—
D1728	調理者	—	—	—

数値はcopies/g stool、* : RT-PCR法のみで陽性

表3. グループ別ウイルス検出状況

	A	B	D
SaV	6	1	
NVG I	2	2	1
NVG II			
SaV,NVG I	1		1
SaV,NVG II		1	1
NVG I ,NVG II	1		
SaV、 NVG I ,NVG II			1
検出せず	4	1	1

表4. 検出ウイルスと臨床症状

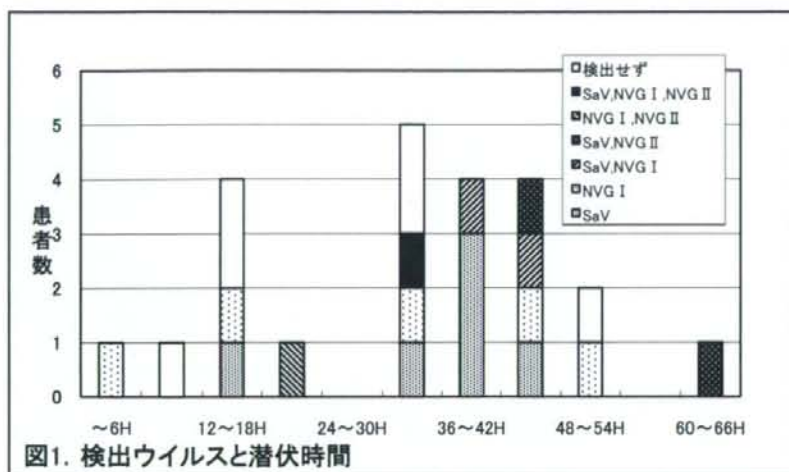
	検出数	下痢	嘔気、嘔吐	腹痛	発熱(>37.5°C)	頭痛
SaV	7(1)	5	3	5	1	1
NVG I	5	4	3	5	1	1
NVG II	1(1)					
SaV,NVG I	2	1	2			
SaV,NVG II	2	1	1		2	2
NVG I ,NVG II	1	1	1	1	1	1
SaV、NVG I ,NVG II	1	1	1	1		1

():非発症者を再掲

表5. DNase処理の有無による検出状況

	DNase処理	SaV	NV	G I	NV G II
アサリ1 中腸腺	有り	—	—	—	5.8x10 ³
	無し	+	—	—	+
アサリ1 保存液	有り	—	—	+	—
	無し	+	—	+	—
アサリ2 中腸腺	有り	—	—	—	++
	無し	—	—	—	—
アサリ2 保存液	有り	—	—	—	—
	無し	+	—	—	—
アサリ3 中腸腺	有り	—	—	+	—
	無し	—	—	+	—
アサリ3 保存液	有り	—	—	—	—
	無し	—	—	—	—

* : nested real time RT-PCRのみで陽性



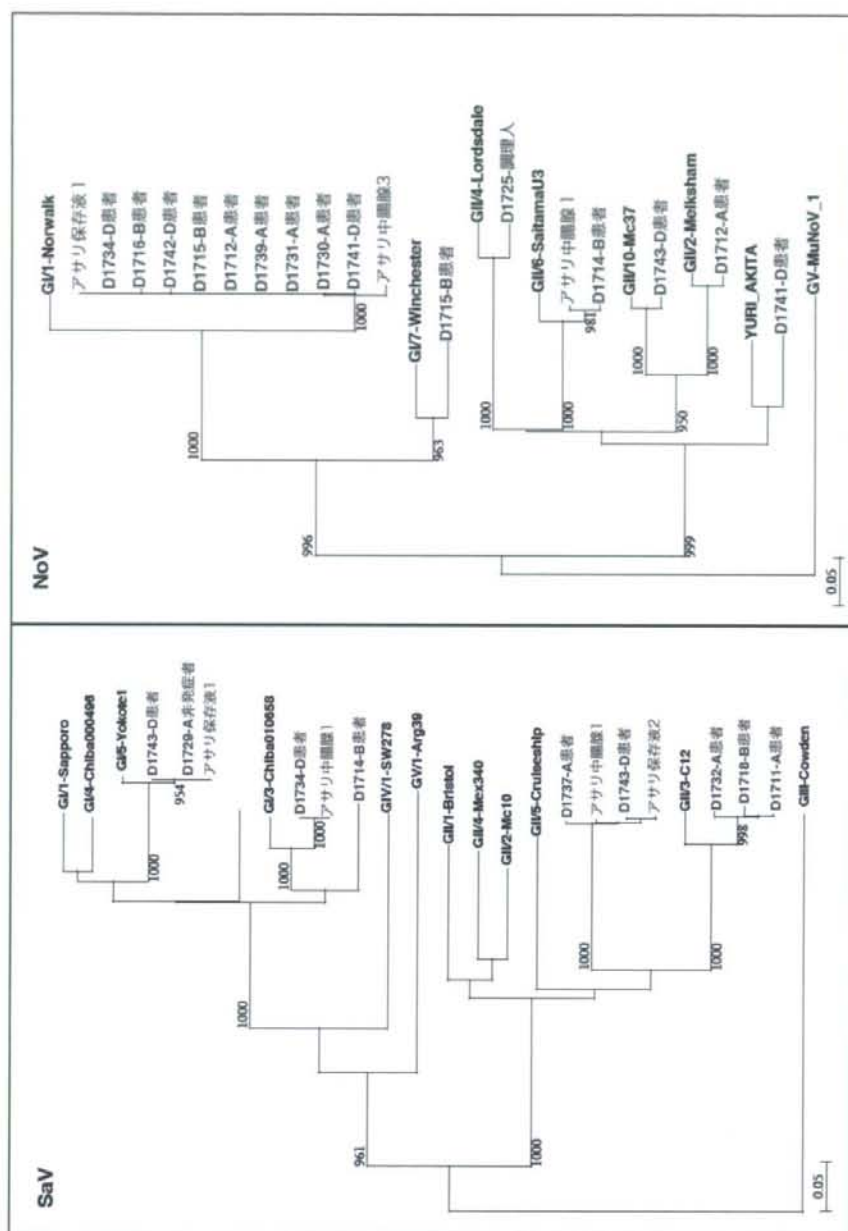


図2. SaV、NVの系統樹解析

平成 20 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
「食品中のウイルス制御に関する研究」
協力研究報告書

ローカルエリア(広島県)におけるノロウイルス集団感染事例に関与した遺伝子型の変遷

研究協力者 福田伸治(広島県立総合技術研究所保健環境センター)
分担研究者 田中智之(堺市衛生研究所)

研究要旨:

ローカルエリアにおいても、ノロウイルス集団感染事例の原因となった遺伝子型(流行型)に明らかな経時変化が認められ、ポピュレーションの免疫感受性の変化が推察された。特に、近年主流の遺伝子型 GII.4 はカプシドの最も外側に位置する P2 ドメインに集中してアミノ酸残基変異が認められ、抗原性、感染効率などに影響を及ぼしている可能性が示唆された。また、最近発生したノロウイルス集団感染事例は、そのほとんどが遺伝子型 GII.4 変異型 2006b を原因としていることが明らかとなった。

A. 研究目的

ノロウイルス(NoV)には多くの遺伝子型あるいは変異型が存在し、NoV 食中毒などの集団感染事例に関与する遺伝子型も年々変化していることが報告されている。ここでは、ローカルエリアにおける NoV の流行の特徴を明らかにすることを目的に、広島県をモデルとして、NoV 集団感染事例に関与した遺伝子型(流行型)の変化について解析した。

B. 研究材料と方法

1. 研究材料

2000/01 年から 2007/08 年の 8 シーズンに発生した NoV 集団感染事例 102 事例を対象にした。厚生労働省通知の方法(平成 19 年 5 月 14 日最終改正食安監発第 0514004 号)に準じて患者糞便から RT-PCR 法により NoV 遺伝子を増幅した。

2. 研究方法

増幅した NoV 遺伝子についてダイレクトシーケンスを行い塩基配列を決定し、Kageyama ら(JCM, 42, 2988-2995, 2004)のスキームに従い遺伝子型別を行った。また、一部の遺伝子型 GII.4 についてはクローニング後シーケンスを行い、構造蛋白質をコードする VP1 領域のアミノ酸変異について観察した。なお、GII.4 の変異型別は Norovirus database, Quicktyping Region C 280b (https://hypocrates.rivm.nl/bnwww/Divine-Event/Quick_typingregion_C280b.HTM)により行った。

C. 研究結果

1. ノロウイルス遺伝子型の経年変化

NoV 集団感染事例 102 事例中 34 事例(33.3%)は食中毒、68 事例(66.7%)はヒト-ヒト感染事例であった。89 事例(87.3%)は単独の遺伝子型により発生しており、13 事例(12.7%)は複数の遺伝子型が関与した事例(二枚貝関連の

事例)であった。関与した遺伝子型は Genogroup I(GI)で7型(GI.1, GI.2, GI.4, GI.7, GI.8, GI.11, GI.14), GIIで11型(GII.1, GII.2, GII.3, GII.4, GII.5, GII.6, GII.8, GII.12, GII.13, GII.14, GII.ut)であり, 次のような特徴が認められた(表1, 図1)。(1)GII.4は2004/05年シーズン以降主要な流行型であった。(2)GII.5は2001/02~2002/03年シーズンに, GII.12は2000/01~2001/02年シーズンの主流な原因遺伝子型であったが, その後は集団感染事例に関与していない。(3)GII.3は2000/01, 2003/04, 2005/06および2007/08年シーズンに検出されているが, 単シーズンの流行であり, 流行しては消える傾向を示した。(4)GI/4の関与した事例数は少ないが, 2005/06および2006/07年シーズンを除き検出された。(5)2007/08年シーズンは例年に比べGI関与事例が多い傾向を示した。

2. 遺伝子型 GII.4 の変異

遺伝子型 GII.4 は 1996, 2002, 2004 および 2006b の 4 変異型が認められた。VP1 領域のアミノ酸残基変異は 47 ヶ所において認められ, P2 ドメインに集中していた。このアミノ酸残基変異は 1996, 2002, 2004 と 2006b 間で大きいことが認められた。最近の事例はすべて変異型 2006b であったが, 2006b の中でもシーズンによりアミノ酸配列に差異が認められた。特に, 最近の事例の株 (Case110, 115, 151, 154) は Shell ドメインのアミノ酸残基 No.45 のアミノ酸がグルタミン (Q) からトレオニン (T) に変異していた。また, ウイルス粒子上で糖鎖と結合すると考えられているほとんどのアミノ酸残基には変異が認められなかったが, 唯一, 2006b 変異型はアミノ酸残基 No.378 の

アミノ酸がグリシン (G) からヒスチジン (H) への変異が観察された。

D. 考察

6 シーズン前の流行型と現在の流行型は大きく異なっていることが認められ, ローカルエリアにおいても NoV の流行型が経時変化していることが推察された。これはポピュレーションの免疫感受性の変化が一因となっている可能性が示唆される。特に最近主流の遺伝子型 GII.4 はカプシドの最も外側に位置する P2 ドメインに集中して変異が認められ, 抗原性, 感染効率などに影響を及ぼしている可能性が示唆される。広島県では 2004/05 年シーズン以降 GII.4 が主流な遺伝子型になっており, 世界中で GII.4 が優勢な遺伝子型になっていることの一つの理由と考えられる。一方で, ウイルス粒子上で糖鎖と結合すると考えられているアミノ酸残基には 1 ヶ所を除き変異が認められず, 同じ遺伝子型に属する株間で保存されていることが多い事実を裏付けていた。

最近では GII.4 の新しい変異型も報告されており, 今後とも GII.4 が主流な遺伝子型として継続するのに興味のあるところである。さらに最近では GI による集団感染事例も多く報告されるようになり, GI の動向にも注意する必要があると考えられる。

E. 結論

今回の研究によって次のことを明らかにした。

1. ローカルエリアにおいても流行型に経時変化が認められ, ポピュレーションの免疫感受性の変化が推察された。
2. 最近では遺伝子型 GII.4 が主流の遺伝

子型であったが, GII.4 の中でもアミノ酸残基変異が認められ, 特に変異はカプシドの最も外側に位置する P2ドメインに集中しており, 抗原性, 感染効率に影響を及ぼしていることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 誌上発表

1) Fukuda S., Sasaki Y., Takao S., Seno M.: Recombinant norovirus implicated in gastroenteritis outbreaks in Hiroshima Prefecture, Japan. *J. Med. Virol.*, 80, 921-928, 2008.

2) Fukuda S., Sasaki Y., Seno M.: Rapid and sensitive detection of norovirus genomes in oysters by a two-step isothermal amplification assay system combining nucleic acid sequence-based amplification and reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assays. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 3912-3914, 2008.

2. 学会発表

1) 福田伸治, 佐々木由枝, 重本直樹, 高尾信一: ローカルエリアにおけるノロウイルス集団感染事例から検出された遺伝子型. 日本ウイルス学会第56回学術集会 2007年10月 岡山

H. 知的財産権の出願, 登録状況

なし

表 1 発生様式別 NoV 遺伝子型の推移

Season	Transmission			
	Person-to-person		Foodborne	
	Genogroup I	Genogroup II	Genogroup I	Genogroup II
00/01		GII.4-1996(1) GII.12(1)	GI.4(1) GI.8(1)	GII.1(1) GII.3(3)
01/02		GII.4-1996(1) GII.12(1)	GI.2(2) GI.14(1)	GII.5(4) GII.12(4) GII.14(1)
02/03		GII.8(1)	GI.2(2) GI.4(1) GI.7(1)	GII.5(2) GII.14(1)
03/04		GII.4-2002(1)	GI.1(2) GI.4(1) GI.11(1) GI.14(1)	GII.3(3) GII.4-2002(1)
04/05	GI.4(1)	GII.4-2002(6) GII.4-2004(2) GII.6(2)	GI.1(1) GI.8(1)	GII.2(1) GII.4-2002(3) GII.6(1) GII.12(1) GII.4-2002(1)
05/06		GII.3(1) GII.4-2002(3) GII.ut(1)		
06/07		GII.4-2006b(28) GII.13(1)		GII.4-2006b(9)
07/08	GI.4(1)	GII.3(2) GII.4-2006b(11)	GI.4(1) GI.8(1)	GII.4-2006b(1)

Capsid N/S region に基づく遺伝子型

()内は検出数

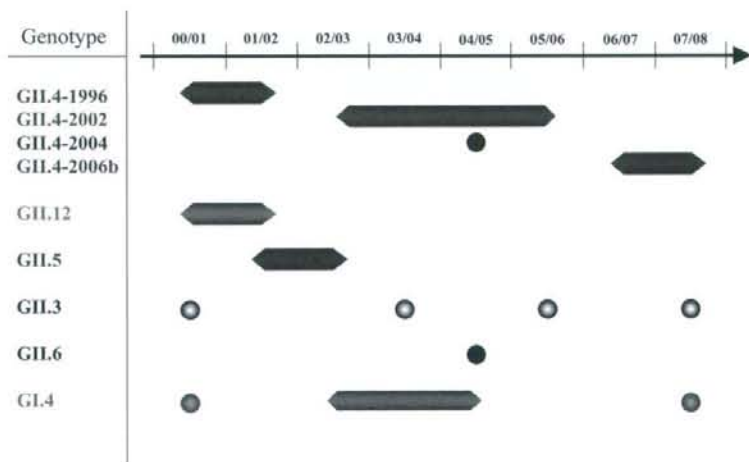


図 1 主な NoV 遺伝子型の推移

Type	Residue No.	
	9 15 45 193 228 239 250 255 280 294 296 297 298 300 306 333 339 340 346 352 356 357 367 368 372 376 378 382 389 393 394 395 397 407 412 413 414 448 465 468 475 485 494 504 534 539	
2006b	Case129	N A Q E T T N F S P A S R R N I L V K G G G Y A P F S E E H K I G T T R S N V H D A A L V S Q T A
	Case134	N A Q E T T N F S P A S R R N I L V K G G G Y A P F S E E H K I G T T R S N V H D A A L V S Q T V
	Case139	N A Q E T T N F S P A S R R N I L V K G G G Y A P F S E E H K I G T T R S N V H D A A L V S Q T A
	Case69	N A Q E T T N F S P A S R R N I L V K G G G Y A P F S E E H K I G T T R S N V H D A A L V S Q T A
	Case108	N A Q E T T N F S P A S R R N I L V K G G G Y A P F S E E H K I G T T R S N V H D A A L V S Q T A
	Case109	N A Q E T T N F S P A S R R N I L V K G G G Y A P F S E E H K I G T T R S N V H D A A L V S Q T A
	Case110	N A Q E T T N F S P A S R R N I L V K G G G Y A P F S E E H K I G T T R S N V H D A A L V S Q T A
	Case154	N A Q E T T N F S P A S R R N I L V K G G G Y A P F S E E H K I G T T R S N V H D A A L V S Q T A
	Case115	N A Q E T T N F S P A S R R N I L V K G G G Y A P F S E E H K I G T T R S N V H D A A L V S Q T A
	Case151	N A Q E T T N F S P A S R R N I L V K G G G Y A P F S E E H K I G T T R S N V H D A A L V S Q T A
	Case91	N A Q E T T N F S P A S R R N I L V K G G G Y A P F S E E H K I G T T R S N V H D A A L V S Q T A
	Case92	N A Q E T T N F S P A S R R N I L V K G G G Y A P F S E E H K I G T T R S N V H D A A L V S Q T A
	Case74	N A Q E T T N F S P A S R R N I L V K G G G Y A P F S E E H K I G T T R S N V H D A A L V S Q T A
	Case68	N A Q E T T N F S P A S R R N I L V K G G G Y A P F S E E H K I G T T R S N V H D A A L V S Q T A
2004	Case56	T T Q D S T N F S P A T Q N T Q V R R G S V H F S S E G R V S T T Q N D S H N S A L V S Q A A
	Case571	T T Q D S T N F S P A T Q N T Q V R R G S V H F S S E G R V S T T Q N D S H N S A L V S Q A A
2002	Case42	S T Q D T T N F S P P T R T R Q M K G G S V D F A D E G R I S S A R D T V H D A A L V T Q A A
	Case44	S T Q D T T N F S P P T R T R Q M K G G S V D F A D E G R I S S A R D T V H D A A L V T Q A A
	Case55	S T Q D T T N F S P P T R T R Q M K G G S V D F A D E G R I S S A R D T V H D A A L V T Q A A
	Case48	S T Q D T T N F S P P T R T R Q M K G G S V D F A D E G R I S S A R D T V H D A A L V T Q A A
	Case58	S T Q D T T N F S P P T R T R Q M K G G S V D F A D E G R I S S A R D T V H D A A L V T Q A A
	Case63	S T Q D T T N F S P P T R T R Q M K G G S V D F A D E G R I S S A R D T V H D A A L V T Q A A
	Case67	S T Q D T T N F S P P T R T R Q M K G G S V D F A D E G R I S S A R D T V H D A A L V T Q A A
1996	Case19	N T Q D T S K Y S V A S H D T Q M R E A S V H Y T N Q G K I H N - Q N T G H N A A L F S P A V
	VX387	S T Q D T S N Y S A A S H D I Q M R E A S V H Y T N Q G K I H N - Q N T G H N A A L V S P A A
Domain		N S P1 P2 P1 C

図2 VP1領域におけるアミノ酸残基変異

平成 20 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)
「食品中のウイルスの制御に関する研究」
研究協力報告書

急性胃腸炎の散発例及び集団発生例から検出されたノロウイルスの遺伝子型

協力研究者 山下 育孝(愛媛県立衛生環境研究所)
協力研究者 大塚 有加(愛媛県立衛生環境研究所)
分担研究者 田中 智之(堺市衛生研究所)

研究要旨:

2008年3月から2009年1月の間に、急性胃腸炎の散発例及び集団発生例から検出されたノロウイルス(NV)について分子疫学的解析を行い、愛媛県におけるNVの流行状況を明らかにすると共にNVによる集団発生との関連性について検討した。調査期間中に散発例から検出されたNVは、88例(検出率26.4%)で、GenogroupII/Genotype4(GII/4)、GII/1、GII/3、GII/13及びGenogroupI/4(GI/4)が多く検出された。一方、集団発生例ではGII/4が3事例、GII/1、GII/13、GI/8が各1事例から検出された。集団発生例から検出された株と塩基配列がほぼ100%一致する株が、同時期に地域内で流行していたことから、地域社会でのノロウイルスの流行が食中毒や胃腸炎集団発生と密接な関係を持っていることが示唆された。また、期間中に最も多く検出されたGII/4は、すべて昨シーズン同様2006/2007シーズンから流行の主流となっている2006bタイプであった。

A. 研究目的

近年、ウイルスによる食中毒や施設内での胃腸炎集団発生の報告が増加傾向にある。胃腸炎の起因ウイルスには、ノロウイルス(NV)、サポウイルス(SV)、アストロウイルス、腸管アデノウイルス等が知られているが、集団発生事例の原因ウイルスの大半がNVによるものであり、衛生行政上NVが最も重要視されている。

最近、カキ等の二枚貝を原因とする食中毒事例は、減少する傾向がみられている。一方、非カキ関連の食中毒や、施設内におけるヒト-ヒト感染による事例が増加している。いずれも調理従事者を介した食品の2次汚染あるいはヒトを介した2次感染によって生じた集団発生で

あると推定される。これらの集団発生の背景には、地域内で流行しているウイルスの関与が大きな要因となっていると考えられる。

そこで、愛媛県内での散発性胃腸炎の流行状況を明らかにし、県内で発生した食中毒等集団発生事例の原因ウイルスとの関連性について検討した。

B. 研究材料と方法

1. 材料

2008年3月から2009年1月の間の、感染症発生動向調査病原体検査用の散発性感染性胃腸炎患者糞便333検体及び集団発生12事例から得られた169検体(糞便126検体、食品12検体、拭き取り31検体)を用いた。糞便は検査実施まで-20℃

で冷凍保存した。

感染症胃腸炎患者数は、感染症発生動向調査における定点当たり週別患者報告数を使用した。

2. 方法

糞便からのウイルス検索は、電子顕微鏡法(EM)、リアルタイムPCR法またはRT-PCR法で行った。EMは常法により粗精製した糞便材料を、2%PTA染色後4万倍で観察し、胃腸炎起因ウイルスの検索を行った。ロタウイルス、アデノウイルスは主にEMで検出されたものについて、ELISAやイムノクロマト法によって型別した。NV遺伝子の検出は、影山らのCOGF/R系プライマーとRINGTaqManプローブを用いたリアルタイムPCRで行った。SV遺伝子の検出は、岡田らの方法に準じ、カプシド領域を増幅するSV系プライマーを用いたnested-PCRで行った。

NVの遺伝子解析は、PCR産物のダイレクトシーケンシスにより塩基配列を決定し、Katayamaらが提唱する方法で、カプシド領域の系統樹解析により遺伝子型別を行った。NV遺伝子のシーケンシスの一部は国立感染症研究所の西尾博士に依頼して行った。

拭き取り調査は、綿棒式キット(栄研器材)またはWHIRL-PAK(NASCO)を用いて採取し搬入された検体について実施した。拭き取り検体は超遠心(38000rpm 2hr)沈査を、食品は10%乳剤として3000rpm、20分遠心後の上清の超遠心沈査をそれぞれRNA抽出し使用した。

C. 研究結果

1. 散発性胃腸炎患者からのウイルス検出状況

2008年3月から2009年1月の間の、愛媛県における散発性胃腸炎患者333名からのウイルス検出状況を表1に示した。NVが88例と最も多

く、次いでロタウイルスが30例、SVが16例、アデノウイルスが11例であった。検出されたNV88株のGenogroup別内訳は、GIIが圧倒的に多く82例(93.2%)で、GIは6例(6.8%)と非常に少なかった。

期間中の週別の患者報告数と散発性胃腸炎からのウイルスの検出数を図1に示した。2008/2009シーズンは、患者報告数が、11月末(第48週)から増加し始め、12月末にピークとなった。NVは11月末から検出され始め、12月、1月の検出率は約60%と高率であった。SVは10月から1月に12例検出されており、この時期の感染性胃腸炎の流行にNVとともに関与していたことが示された。また、非流行期である7月にNVが1例検出された。感染性胃腸炎の患者報告数とウイルス検出数の推移は、よく一致していた。

2. 集団発生事例から検出されたNVの遺伝子型

調査期間中に愛媛県内で報告された集団発生事例のうちNVが検出された7事例を表1に示した。食中毒事例は3事例で、カキ等二枚貝の摂食が原因と推定された事例はなく、飲食店、結婚式場の料理、介護老人福祉施設の食事が原因であった。事例①は、患者、調理従事者から検出された遺伝子型が一致しており、事例⑦は、患者、調理従事者、食品からNVGIIが検出された。事例⑤は、患者、食品、拭き取りから検出された黄色ブドウ球菌による食中毒と断定されたが、施設内で同時にNVGIIも流行していたことが判明した。集団発生では、GII/4が3事例、GI/8、GII/1、GII/13がそれぞれ1事例から検出された。

3. 散発例及び集団発生例から検出された遺伝子型

散発例から検出されたNVの遺伝子

型は GII が 6 種類、GI が 2 種類であった。GII では GII/4 が最も多く検出され、次いで GII/1、GII/3、GII/13 であった。GI は検出数が少なかったが、6 例中 5 例は 2008 年 3 月に検出され、その内 4 例が GI/4 であった。検出された NV の 90% 以上を占めた GII 型の月別の遺伝子型別検出状況を図 2 に示した。GII/4 は散发例から 3 月、5 月、12 月～1 月に検出されていた。一方、集団発生は、3 月に 1 事例、12 月～1 月に 2 事例発生している。同様に GII/13 は 3 月～6 月、GII/1 は 11 月～1 月に地域流行が見られたが、同時期に集団発生からも検出されていた。

4. NV 遺伝子の系統樹解析

散发例及び集団発生例から検出された NV の系統樹解析の結果を図 3、4 に示した。系統樹解析で 100% 同一株が複数見られた場合は、同じ集団発生事例あるいは、流行時期毎に検体番号の後ろに検出時期と検出株数を表示した。

集団発生から検出された株は、事例毎に遺伝子塩基配列が 100% 一致していた。さらに、遺伝子解析を行った 6 事例中 5 事例は、集団発生株と同一の株が散发例からも、ほぼ同時期に検出されていた。また、1 事例は、散发例から検出された株と 1 塩基異なっていたがアミノ酸配列は、100% 一致していた。

5. NVGII/4 の分類

GII/4 が検出された集団発生 3 事例の代表 3 株、散发例から検出された 20 株及び 2002 年～2008 年 3 月の間に検出された GII/4 代表株について系統樹解析を行った結果を図 5 に示した。調査期間中に検出された NVGII/4 は、すべて昨シーズン愛媛県で検出された株と同じクラスターに属し、2006b variant と近縁であった。2006/2007 シーズンに 2006a

variant が少数例検出されたが、2007 年以降は、2006b variant タイプが愛媛県で流行している GII/4 の主流となっていることが示された。

D. 考察

感染性胃腸炎は、毎年冬季を中心に流行し、その患者数はインフルエンザに次いで多く、他の先進諸国と同様公衆衛生上重要な疾患とされている。

これらの疾患に関与している胃腸炎関連ウイルスのうち NV が最も多くの感染性胃腸炎の発症原因となっており、しかも、食中毒や学校及び施設等において胃腸炎集団発生を引き起こし、衛生行政上の課題となっている。これらの集団発生の制御のためには、地域におけるこれらのウイルスの流行状況を把握することが重要と考えられる。

今回は、2008 年 3 月～2009 年 1 月の間に検出された NV のカブシド領域について遺伝子型別を行った。調査期間中に散发例及び集団発生例から検出された NV の遺伝子型は、GII が 6 種類、GI が 4 種類で短期間に多様な遺伝子型の株が地域内で流行していたことが示された。また、1 つの遺伝子型が 2～3 ヶ月あるいは、それ以上地域で流行し、時として複数の遺伝子型の NV が同時期に流行していることが示された。

散发例と集団発生事例から検出された NV の遺伝子型の分布及びそれらの塩基配列が極めて良く一致していたことから、地域で散発的に見られているウイルスと集団発生の原因ウイルスとの間には強い関連性が示唆された。このことは、地域の流行ウイルスが、調理従事者等を介して調理中の食品を 2 次汚染し、食中毒の原因となったり、学校、病院及び老人福祉施設等に持ち込まれて、施設内においてヒト→ヒト感染で集団発生を引き起こしている

ことを強く示唆するものである。

調査期間中に食中毒等集団発生例3事例及び散发性胃腸炎から最も多く検出された GII/4 は、すべて 2006b タイプに属していた。2006/2007 シーズンの主流行型であったこのタイプは、その後も愛媛県において NV の主流となっていることが明らかとなった。2008 年 10 月から 2009 年 1 月までの 2008/2009 シーズンをみると、散发例の 45% から GII/1 が検出され、GII/4 の検出数を若干上回っている。全国的にも多数検出されている GII/4 の 2006b variant が、今後も NV の主流行型となるのか、新たな GII/4 の変異株があるいは、別の遺伝子型が出現し流行するのか、今後の動向が注目される。

E. 結 論

1. 2008 年 3 月から 2009 年 1 月の間に、散发性胃腸炎から EM、RT-PCR 及びリアルタイム PCR で NV が 88 例 (26.4%)、ロタウイルスが 30 例 (9.0%)、SV が 16 例 (4.8%)、アデノウイルスが 11 例 (3.3%) 検出された。
2. 検出された NV の Genogroup は、GII が 82 例 (93.2%)、GI が 6 例 (6.8%) であった。遺伝子型は、GII が 6 種類、GI が 2 種類検出された。散发例からは、GII/4、GII/1、GII/3、GII/13 及び GI/4 が多く検出された。
3. 集団発生例からは、GII/4 が 3 事例、GII/1、GII/13、GI/8 が各 1 事例から検出された。集団発生例から検出された株と 100% 塩基配列が一致した株が、同じ地域の散发例からも検出され、地域で流行している NV が集団発生の原因と関連していることが示唆された。
4. 2008 年 3 月から 2009 年 1 月の間に検出された GII/4 は、すべて

2006b variant に属し、2007 年以降この型が GII/4 の主流行タイプとなっていることが示された。

F. 健康危険情報

な し

G. 研究発表

な し

H. 知的財産権の出願・登録状況

な し

表1 散発性胃腸炎患者からの
ウイルス検出状況

(2008.3~2009.1)

ウイルス	検出数	検出率(%)
ノロウイルス	88	26.4
ロタウイルス	30	9.0
サボウイルス	16	4.8
アデノウイルス	11	3.3
検出数	145	43.5

検査数 333例



図1 感染性胃腸炎の患者数と週別ウイルス検出状況