

※ 番号（記入不要）： _____

(14) EHEC 感染者(疑いを含む)を診察した場合に、家族や保育施設・学校など周囲での発生状況について情報収集を行うことは重要だと思う。

- ① () とても思う
- ② () 思う
- ③ () どちらでもない
- ④ () あまり思わない
- ⑤ () 全く思わない

(15) EHEC 感染症の発生動向のデータを行政が医療機関に対して還元することは重要だと思う。

- ① () とても思う
- ② () 思う
- ③ () どちらでもない
- ④ () あまり思わない
- ⑤ () 全く思わない

● 回答していただいた先生に関する質問です。

(16) 先生のおおよその年齢をお教えてください。() 歳台

(17) 臨床医としての経験年数 () 年間

(18) 主の診療科をお教えてください。

- ① () 小児科
- ② () 内科
- ③ () 上記以外 ()

(19) 勤務されている医療機関をお教えてください。

- ① () 病院
- ② () 診療所
- ③ () 上記以外 ()

(20) さしつかえなければ、勤務されている医療機関の所在地をお教えてください。

鹿児島県 () 市・郡 () 町・村

● 日常診療の中で、診断・治療・報告などでお困りのことや、感染症サーベイランスに対する要望、県の EHEC 感染症対策への要望など、ご意見がございましたらご自由にお書きください。

アンケートにご協力いただきまして、まことに有難うございました。

平成 21 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)
「食中毒調査の精度向上のための手法等に関する調査研究」
平成 21 年度分担研究報告書

ノロウイルス食中毒事例調査の精度向上に関する研究
I ノロウイルスシークエンスデータ共有化の試み

研究分担者	野田 衛(国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部)
研究協力者	片山 和彦(国立感染症研究所・ウイルス第二部)
研究協力者	岡 智一郎(国立感染症研究所・ウイルス第二部)
研究協力者	山下 和予(国立感染症研究所・感染症情報センター)
研究協力者	三瀬 敬治(札幌医科大学・医療人育成センター)
研究協力者	吉澄 志磨(北海道立衛生研究所)
研究協力者	植木 洋(宮城県保健環境センター)
研究協力者	林 志直、秋葉 哲哉、森 功次、永野美由紀(東京都健康安全研究センター)
研究協力者	山崎 匠子(杉並衛生試験所)
研究協力者	滝澤 剛則、小原 真弓(富山県衛生研究所)
研究協力者	吉田 徹也(長野県環境保全研究所)
研究協力者	小林 慎一(愛知県衛生研究所)
研究協力者	中田 恵子(大阪府立公衆衛生研究所)
研究協力者	入谷 展弘(大阪市立環境科学研究所)
研究協力者	三好 龍也(堺市衛生研究所)
研究協力者	阿部 勝彦(広島市衛生研究所)
研究協力者	山下 育孝(愛媛県衛生研究所)
研究協力者	糸数 清正(沖縄県衛生環境研究所)

研究要旨：ノロウイルス広域食中毒事例の探知に有効と考えられるシークエンスデータの共有化の実行性や問題点等を把握することを目的として、12 の地方衛生研究所の協力の下、各地のノロウイルスのシークエンスデータをタイムリーに収集し、還元することを試行的に実施した。シークエンスデータは、CaliciWeb上に設置したクローズ環境のプライベートフォーラムに FASTA 形式で登録することにより収集し、感染研ウイルス第二部において定期的に系統樹解析を行い、得られた系統樹を PDF ファイルで同サイト上のオープン環境であるダウンロードページに登録することで還元した。報告番号(株名)は疫学情報の把握や病原体検出情報とのリンクを可能とするため、統一の規則に従ったものとした。また、メーリングリストを開設し、疫学情報の共有化やデータの登録・還元の連絡を行った。その結果、ノロウイルスの広域集団食中毒事例と考えられる事例を探知することができた。メーリングリストは情報共有に有効な手段であった。一方、迅速な登録例は少なかったが、新型インフルエンザの影響等で地研の業務は混乱していたことなどが影響していると考えられ、本試行の評価にはさらなる研究の継続が必要である。

A. 研究目的

食品流通の国際化、大規模化、広域化に伴いノロウイルスの原材料汚染による広域散発食中毒事例の発生も危惧されている。その探知に有効な実験室内解析手法は塩基配列の比較であると考えられるが、現在、全国で検出されたノロウイルスの塩基配列データを迅速に収集し、比較・解析するシステムはない。昨年度の本研究班の研究の一環として、全国の地方衛生研究所(地研)に対して、ノロウイルスのシークエンズ検査の導入状況及びシークエンデータのデータベース化等に関するアンケート調査を実施した。その結果、ノロウイルスのシークエンズのデータベース化は多くの地研が望んではいないものの、データ登録に伴う業務の増大化、既存のDDBJ等との役割分担などの問題点が指摘された。

そこで、今年度は、全国のノロウイルスデータの共有の有用性、実行性、問題点等を把握することを目的として、12の地研の協力の下、全国のノロウイルスのシークエンズを疫学情報とリンクさせ、タイムリーに収集し、還元することを試行的に実施した。

B. 研究方法

1. 登録対象ウイルスと解析部位

ノロウイルスに加え、近年、食中毒事例の原因となっているサポウイルスを登録対象ウイルスとし、原則として2009年1月1日～2010年3月31日に採取された検体から検出されたものを収集した。ウイルスの由来は、病原微生物検出情報(NESID)に集団発生病原体票として報告した集団発生から検出された株を優先し、散発例や環境由来

のものや、NESIDに報告されていない株も含めた。

解析部位はカプシッド上流の部分シークエンズ(Cap)を主な対象とし、それ以外のポリメラーゼ(Pol)、P2ドメイン等高度可変領域等(その他)など、いずれの部位にも対応した。

2. データ収集方法

平成21年度厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)食品由来感染症調査における分子遺伝学的手法に関する研究(分担研究者 片山和彦)によって管理されているCaliciWeb(<http://teine.cc.sapmed.ac.jp/~calici/modules/news/>)のフォーラムに研究班メンバーのみがアクセスできるプライベートフォーラム(研究班2009)を設置し、そのフォーラムの中でFASTA形式のシークエンズデータをコピー&ペーストすることで、データを収集した(図1)。

3. 登録データの命名方法

登録データはその報告番号(株名)からある程度の疫学情報の把握を可能とするため、また、報告番号と病原体検出情報をリンクするために、株名は表1に示す規則に従って報告することとした。

4. 登録データの還元

報告されたシークエンズデータは、国立感染症研究所(感染研)ウイルス第二部において定期的に系統樹解析を行い、得られた系統樹はPDFファイルとしてCaliciWebのダウンロードページにアップロードされた(図1)。アップロードされた分子系統樹ファイルは、任意にダウンロードすることにより、タイムリーに協力地研から登録された分離株の系統樹解

析結果を得ることができる。また、必要に応じて、その株名から NESID に報告された疫学データを参照することが可能である。還元された系統樹解析結果は、基本的に誰でも参照することが可能である (CaliciWeb へのメンバー登録が必要)。

5. シークエンスデータの取り扱い

シークエンスの生データは、研究班のメンバーはフォーラムにアクセスすることで参照することが可能であるため、その利用に関しては、制限を設けた。

6. データ登録・還元の連絡と疫学データの情報交換

地方衛生研究所全国協議会疫学部会が管理するサーバー上に本研究班のメーリングリスト(メーリンググループ名: 楽しカリシ)を作成し、データの登録・還元などの連絡や疫学情報や検査法などの情報交換が行える体制を構築した。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果と考察

1. シークエンスデータ登録状況

2010年2月15日までに504例のシークエンスデータの登録が行われた(表2)。ウイルス別ではノロウイルスが470例(93.3%)で大半を占め、サポウイルスは34例(6.7%)であった。領域別ではCapが356例(70.6%)、以下、Po191例(18.1%)、その他57例(11.3%)であった。由来別では食品非媒介集団発生由来が387例(76.8%)、以下、食品媒介集団発生由来65例(12.9%)、散発例由来52例(10.3%)であった。また、報告番号に NESID の報告番号が記載され

ていたものは210例(41.7%)、記載されていないものは294例(58.3%)であった。データの登録は21回行われた(表3)。

データの登録時期(表3)をみると、シークエンス解析後かなりの時間の経過後、データをまとめて登録される例が多かった。シークエンスデータの共有には、流行ウイルスの監視、新型ウイルスの探知など種々の目的があるが、ノロウイルスの広域食中毒事例の探知を目的とする場合は感染源の追求など行政対応に生かすために迅速なデータ登録が求められる。今年度は、新型インフルエンザの発生により地研のウイルス検査担当者は多忙を極め、業務は異例の状態が継続していた。そのため、ノロウイルスのシークエンス解析およびそのデータの登録は通常行われている状態とは異なり、かなり遅れていた地研も少なくない。また、ノロウイルスの流行が例年より遅く年明けに始まり、流行のピークは1月後半から2月であり、本報告に解析が間に合わない事例も多い。このことから、本試行の評価には、さらなる研究の継続が必要である。

2. 系統樹解析結果

2月20日までに延べ17回の解析が行われた。解析はデータが登録された日から概ね2週間以内に実施された(表3)。直近に還元された各系統樹解析結果を図2～図6に示した。

3. ノロウイルスの広域食中毒事例の探知

大阪府から2009年8月に、大阪市から2009年9月に登録された食品媒介集団発生に由来するGI.4のCapの塩基配列は同一であった。このことから、疫学状況などを詳細に聴取するとともに、関係自治

体から検体等の提供を受けウイルス学的に詳細に分析した結果、ノロウイルスの広域食中毒事例である可能性が示唆された(詳細は、「II 関西で同時多発的に発生したノロウイルス食中毒事例の解析」を参照)。

本事例を探知する際、有効であったのは報告番号(株名)に、採取年月、自治体番号及び食品媒介事例由来等の株の由来が分かるコード番号を付したことが挙げられる。今回の事例は試行開始直後に報告を受けたが、シークエンスデータが蓄積されるにつれ、その有効性は益々高くなるものと考えられる。

4. メーリングリストでの情報交換

メーリングリストを開設した2009年7月17日から2010年18日までに計115回のメール交換を行った。その内容の多くはシークエンスデータの登録・還元に関するものであったが、報告されたデータの疫学的背景や特定の遺伝子型の検出状況、サポウイルスの検査法に関することなどの情報交換も行った。

メーリングリストは、簡便かつ迅速に情報交換を行うことができ、疫学情報の共有化の有用なツールになると考えられた。一方、上記の関西の連続ノロウイルス食中毒事例を探知した際には、特定の業者名など、取り扱いに配慮が必要な情報の交換を行う必要性が生じることが予想されたため、メーリングリストは使用せず、関連する自治体間のみで情報交換を行った。メーリングリストはクローズ環境とは言え、実際に運用する場合には、一定の規則を設ける必要であると考えられた。

D. 結論

ノロウイルス広域食中毒事例の探知に有効と考えられるシークエンスデータの共有化の有用性や問題点等を把握することを目的として、地研の協力の下、各地のノロウイルスのシークエンスデータを疫学情報とリンクさせ、タイムリーに収集し、還元することを試行的に実施した。その結果、ノロウイルスの広域食中毒事例と考えられる事例を探知できた。メーリングリストは情報共有に有効な手段であった。迅速なデータ登録例は少なかった。本試行の評価にはさらなる研究の継続が必要である。

E. 研究発表

1. 論文発表

Nakagawa-Okamoto R, Arita-Nishida T, Toda S, Kato H, Iwata H, Akiyama M, Nishio O, Kimura H, Noda M, Takeda N, Oka T. : Detection of multiple sapovirus genotypes and genogroups in oyster-associated outbreaks, *Jpn J Infect Dis*, 62(1):63-66 (2009)

Setsuko Iizuka, Tomoichiro Oka, Kenji Tabara, Tamaki Omura, Kazuhiko Katayama Naokazu Takeda and Mamoru Noda: Detection of sapoviruses and noroviruses in an outbreak of gastroenteritis linked genetically to shellfish, *J Med Virol*, in press

2. 学会発表

東方 美保、斎藤 博之、白土 東子、田中 智之、野田 衛: パンソルビン・トラップ法により汚染食品から濃縮回収したノロウイルスの遺伝子検出条件の検討, 第57回日本ウイルス学会学術総会,

東京都, 10/25-27 (2009)

斎藤 博之、東方 美保、白土 東子、
田中 智之、野田 衛: 食品のノロウイルス検査に向けたパンソルビン・トラップ法の実用化の検討, 第57回日本ウイルス学会学術総会, 東京都, 10/25-27 (2009)

野田 衛, 阿部勝彦, 伊藤文明, 山本美和子, 吉澄志磨, 植木 洋, 庄司美加, 大金映子, 坂野智恵子, 古屋由美子, 足立 聡, 滝澤剛則, 中村一哉, 左近(田中)直美, 中田恵子, 入谷展弘, 福田伸治, 松本知美, 中川(岡本)玲子, 大塚有加, 山下育孝, 西尾 治: カキからのウイルス検出法のコラポスタディによる評価と課題, 第98回日本食品衛生学会学術講演会, 函館市, 10/08-09 (2009)

Ueki Y, Shoji M, Okimura Y, Masago Y, Miura T, Omura T, Oka T, Katayama K, Takeda N, Noda M, Miyota Y: Prevalence and genotypes of sapovirus in wastewater, oysters and gastroenteritis patients in Japan, 15th International Symposium on the Health-Related Water Microbiology, 5/31(2009)

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

表1 報告番号(株名)の命名方法等

株名:株名は検体採取年月、地研コード、由来区分と報告区分、報告番号、(その他)を半角のハイフン「-」でつなげたものとする。

採取年月:西暦の下二+月をそれぞれ2ケタの数字で連続して記載

例 2009年6月=0906

(注意) 集団発生の場合は、発生月または最も早い検体採取月

地研コード:病原微生物検出情報の地研コード(3桁)

由来区分と報告区分:

由来区分は、食品媒介集団発生(ヒト)、食品非媒介集団発生(ヒト)、散发例(ヒト)、食品・環境由来(食中毒原因食品を含む)の区分を示し、報告区分は、NESIDの報告区分、すなわち、集団発生病原体報告、病原体個票、ヒト以外からの病原体検出票の区分を示し、それぞれ以下のイニシャルとする。

由来区分

食品媒介(疑いを含む)集団発生ヒト由来=F

食品非媒介(疑い、感染経路不明を含む)集団発生ヒト由来=O(大文字の"オー")

散发例ヒト由来=S

環境・食品由来(食中毒原因食品を含む)=E

報告区分

集団発生病原体報告=O(大文字の"オー")

病原体個票=S

ヒト以外からの病原体検出票=E

未報告=N

(例) 食品媒介集団発生由来で、集団発生報告に登録したもの=F0

散发例で、個票に登録したもの=SS

環境由来で、未報告のもの=EN

報告番号: NESIDに報告した次に示す番号です。

集団発生病原体報告⇒「問い合わせ番号」

病原体個票⇒「検体提供者番号」

ヒト以外からの病原体検出票⇒「問い合わせ番号」

NESIDに未報告の場合は「00」(ゼロゼロ)を記入する。

その他

その他には、同一集団事例（事例番号が同じ）で異なる場合の区別番号あるいは、貴所における株番号など

（株名の例）

0904-342-F0-0020904-1

2009年4月（0904）に広島市（342）で発生した、食品媒介集団発生（F）から検出され、集団発生報告（0）に事例番号「0020904」で報告された1番目の株。

0907-342-SS-002090412

2009年7月（0907）に広島市（342）で、散发例（S）から検出され、個票（S）に問い合わせ番号「002090412」と報告された株。

0905-342-ON-00-09-4201

2009年5月（0905）に広島市で食品非媒介集団発生（0）から検出され、NESIDには未報告（N-00）で、内部の株番号が09-4201の株。

備考

ClustalWの制限から、株名は半角30文字までで、半角英数字の他、半角ハイフン「-」、半角のアンダーバー「_」、半角のスラッシュ「/」が使用可能。

表2 登録データの内訳

区分	項目	登録件数		
		ノロウイルス	サポウイルス	計
ウイルス別		470	34	504
領域別	カプシッド領域上流	328	28	356
	ポリメラーゼ領域	85	6	91
	その他	57	0	57
由来別	食品媒介集団発生由来	63	2	65
	食品非媒介集団発生由来	368	19	387
	散发例由来	39	13	52
報告の有無	病原体検出情報に報告	204	6	210
	病原体検出情報に未報告	266	28	294

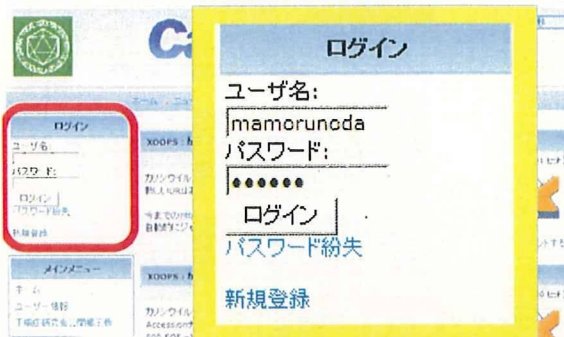
表3 シークエンスデータの登録及び解析状況

No	自治体	登録日	採取年月*	ノロウイルス				サポウイルス							
				登録件数	解析日	登録件数	解析日	登録件数	解析日						
				Cap	Pol	その他	計	Cap	Pol	その他	計				
1	東京都	7月21日	0804-0902				0				8	6	14	7/27	7/27
2	大阪府	8月31日	0908	2			2	9/6					0		
3	大阪市	9月25日	0908-0909	2			2	9/28					0		
4	北海道	9月30日	0901-0909	57	30	57	144	9/30	10/13	10/13			0		
5	大阪府	9月30日	0909	2			2	9/30					0		
6	東京都	10月8日	0805-0905				0				9		9	10/14	
7	北海道	10月8日	0903				0				2		2	10/19	
8	富山	10月9日	0901-0905	7			7	10/13					0		
9	杉並区	10月9日	0811-0902	14			14	10/13					0		
10	堺市	10月21日	0901-0909	13			13	10/22					0		
11	沖縄	12月14日	0911	3			3	12/25					0		
12	富山	1月14日	0904-0912	6			6	1/21					0		
13	広島市	2月5日	0812-0903		27		27						0		
14	愛知	2月10日	0905-0912	7			7						0		
15	大阪府	2月12日	0901-1001	146			146				4		4	2/15	
16	富山	2月12日	1001	1			1						0		
17	愛媛	2月13日	0901-0906	17			17				5		5	2/15	
18	北海道	2月14日	0909-1002	28		28	56						0		
19	堺市	2月14日	0912-1002	15			15						0		
20	宮城	2月14日	0912-1001	3			3						0		
21	沖縄	2月15日	0904-1001	5			5						0		
合計				328	85	57	470				28	6	34		

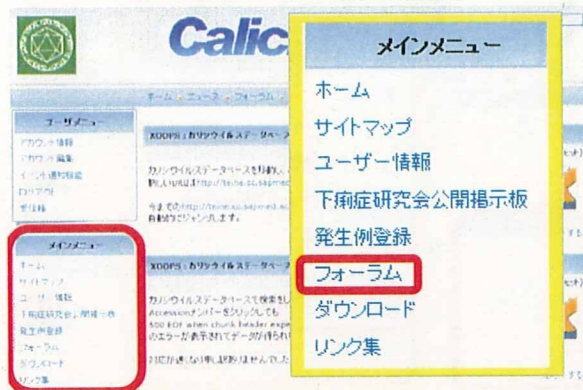
*: 採取年月は西暦下二桁と月で示した(例0804は2008年4月)

CaliciWebのログインとデータの登録方法

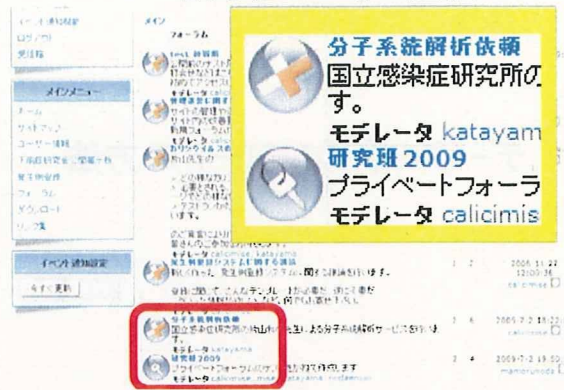
1: CaliciWebにログイン



2: 「フォーラム」の選択



3: 「研究班2009」の選択



4: 解析部位の選択



5: 「返信」をクリック

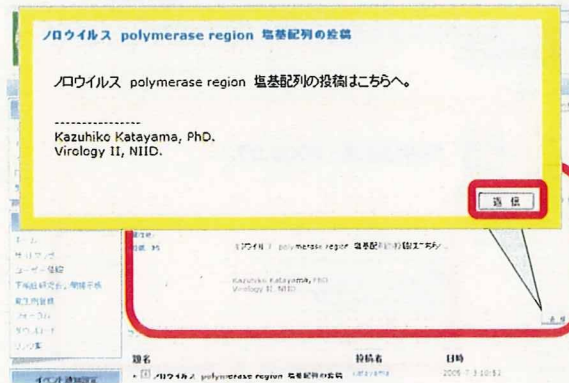
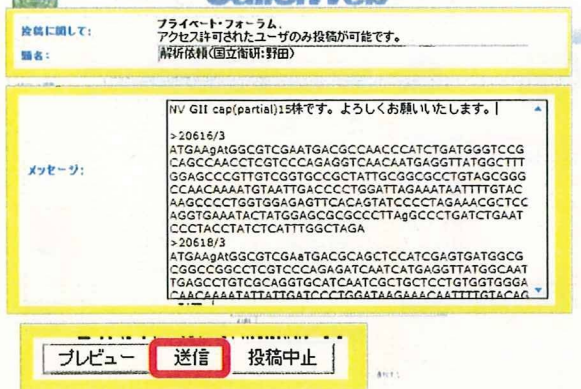
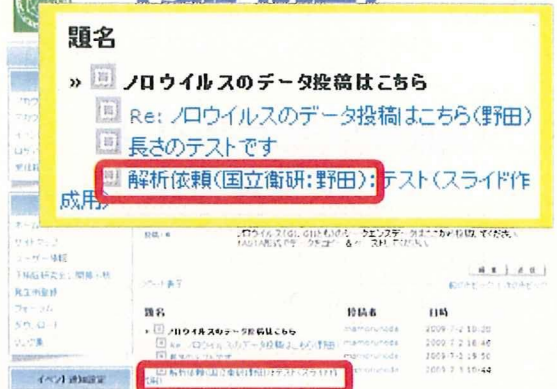


図1 シークエンスデータの登録と解析結果のダウンロードの方法

6: 配列をCopy&Paste

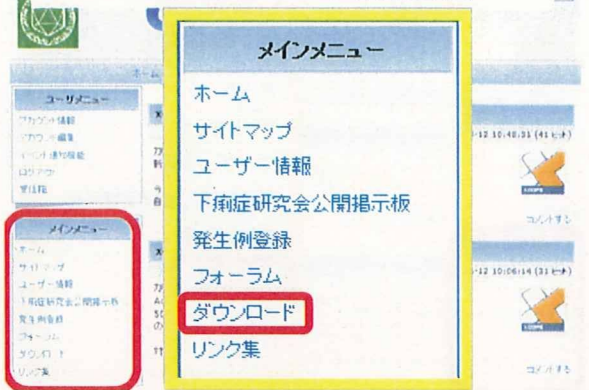


7: 登録される

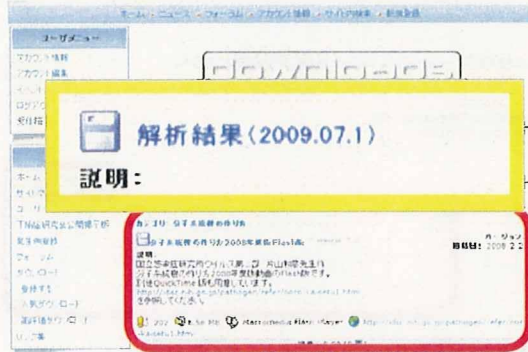


データのダウンロードの方法

1: 「ダウンロード」を選択



2: 解析データファイルを選択



3: PDFファイルが開く

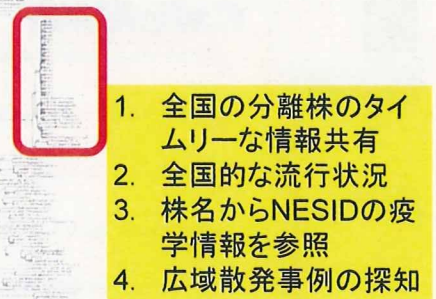


図1 シークエンスデータの登録と解析結果のダウンロードの方法(続き)



図2 ノロウイルス・カプシッド領域上流部分シーケンスの系統樹解析結果

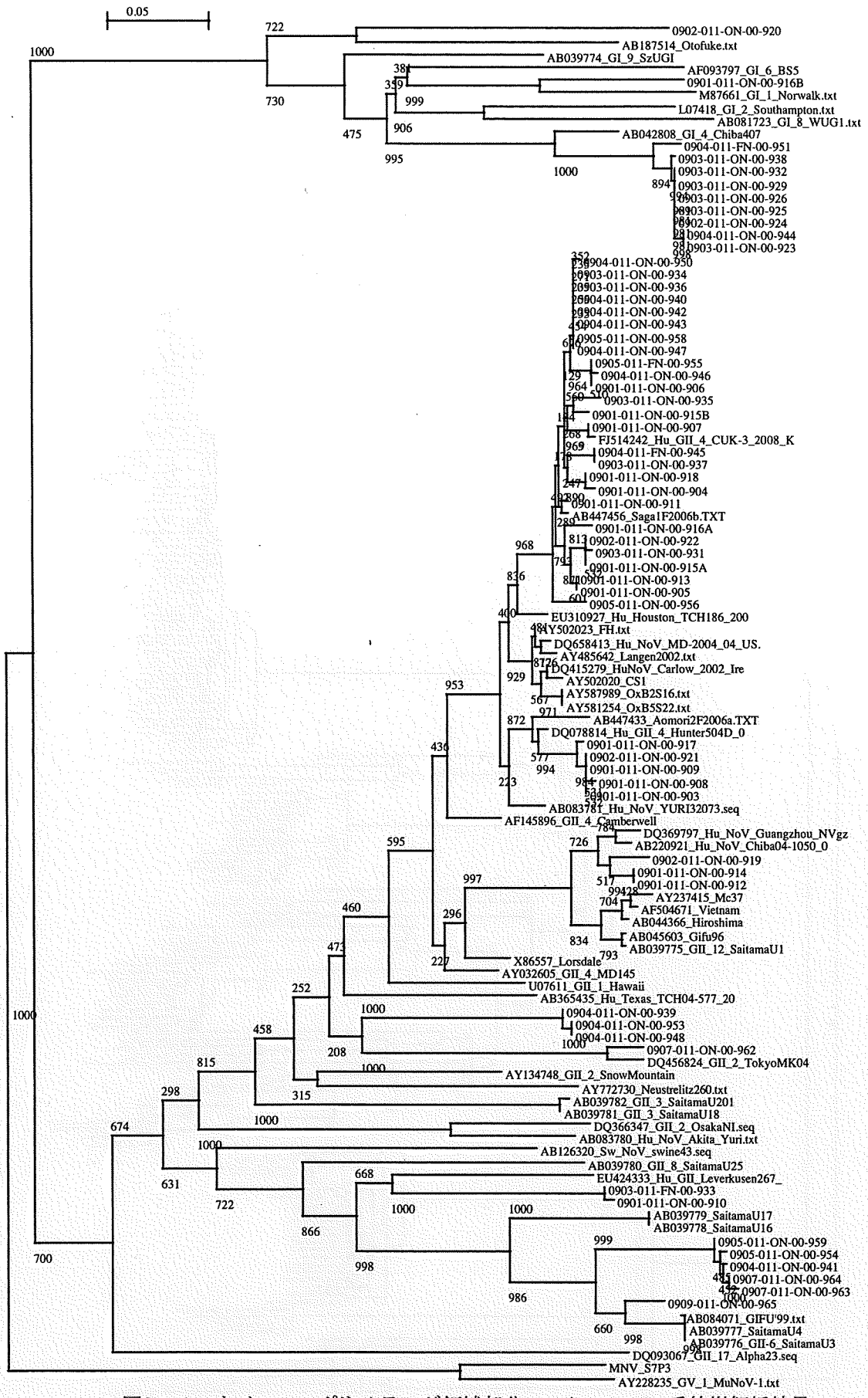
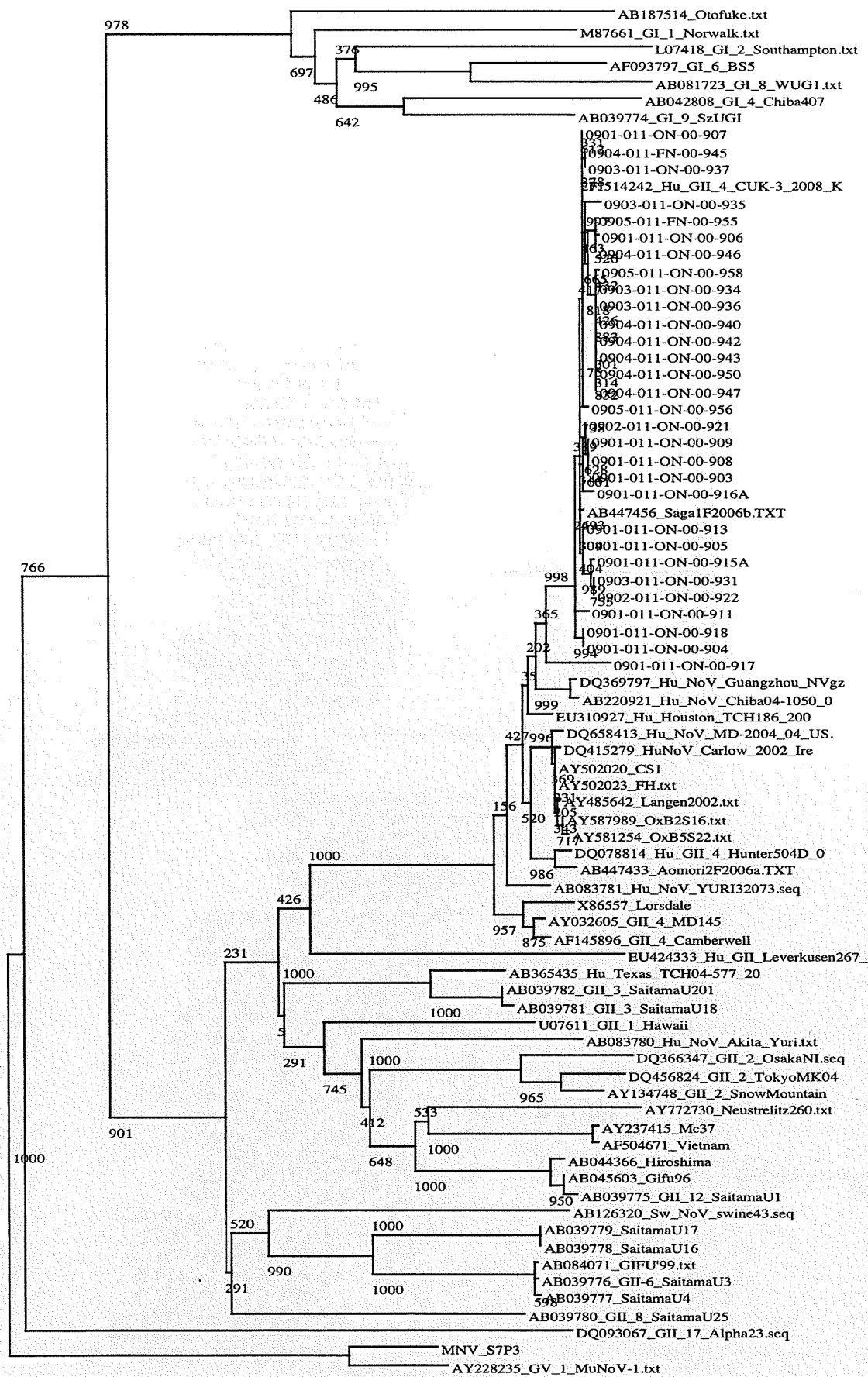


図3 ノロウイルス・ポリメラーゼ領域部分シーケンスの系統樹解析結果



0.1 図4 ノロウイルス・P2ドメイン領域シーケンスの系統樹解析結果

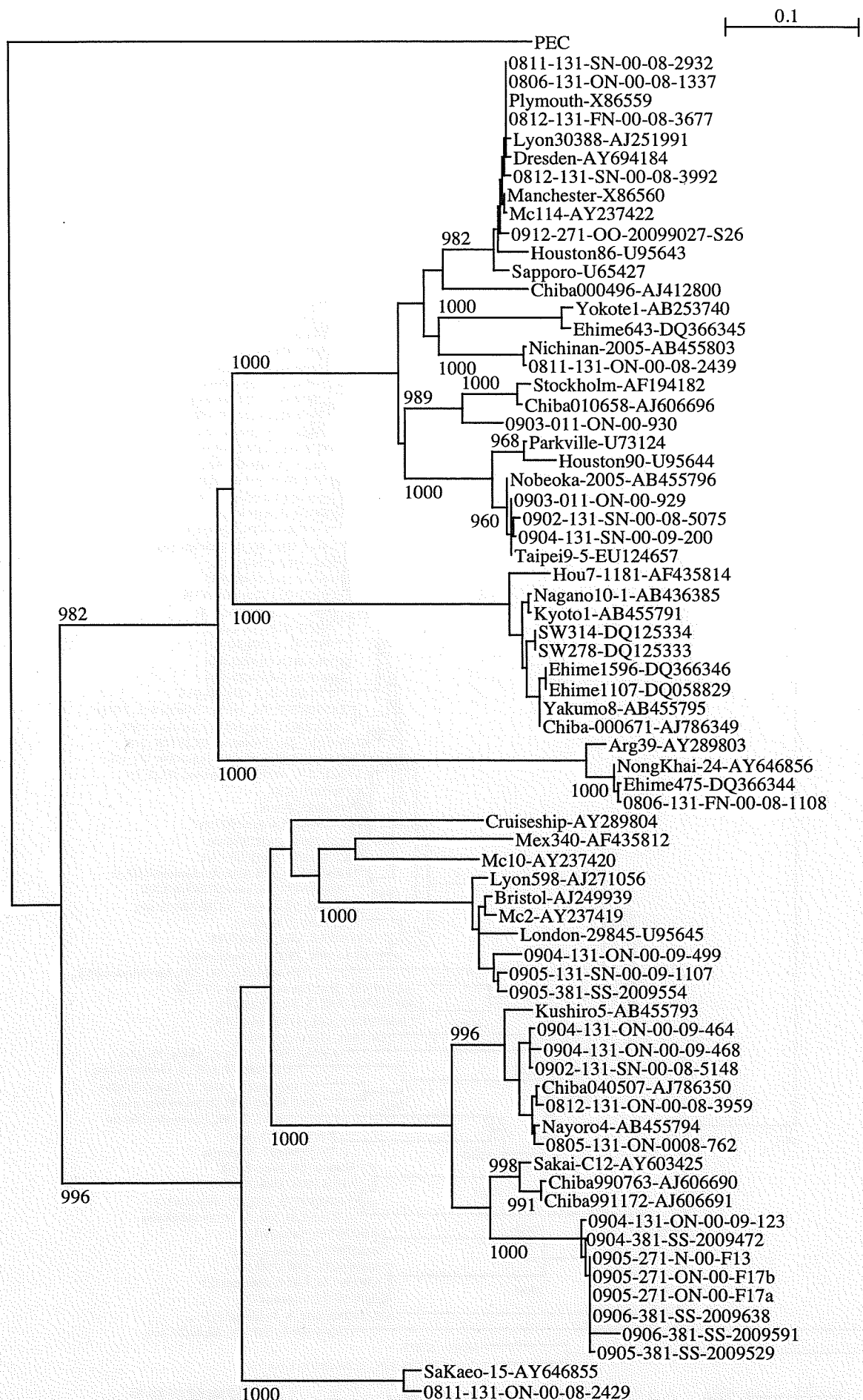


図5 サポウイルス・カプシッド領域上流部分シークエンスの系統樹解析結果

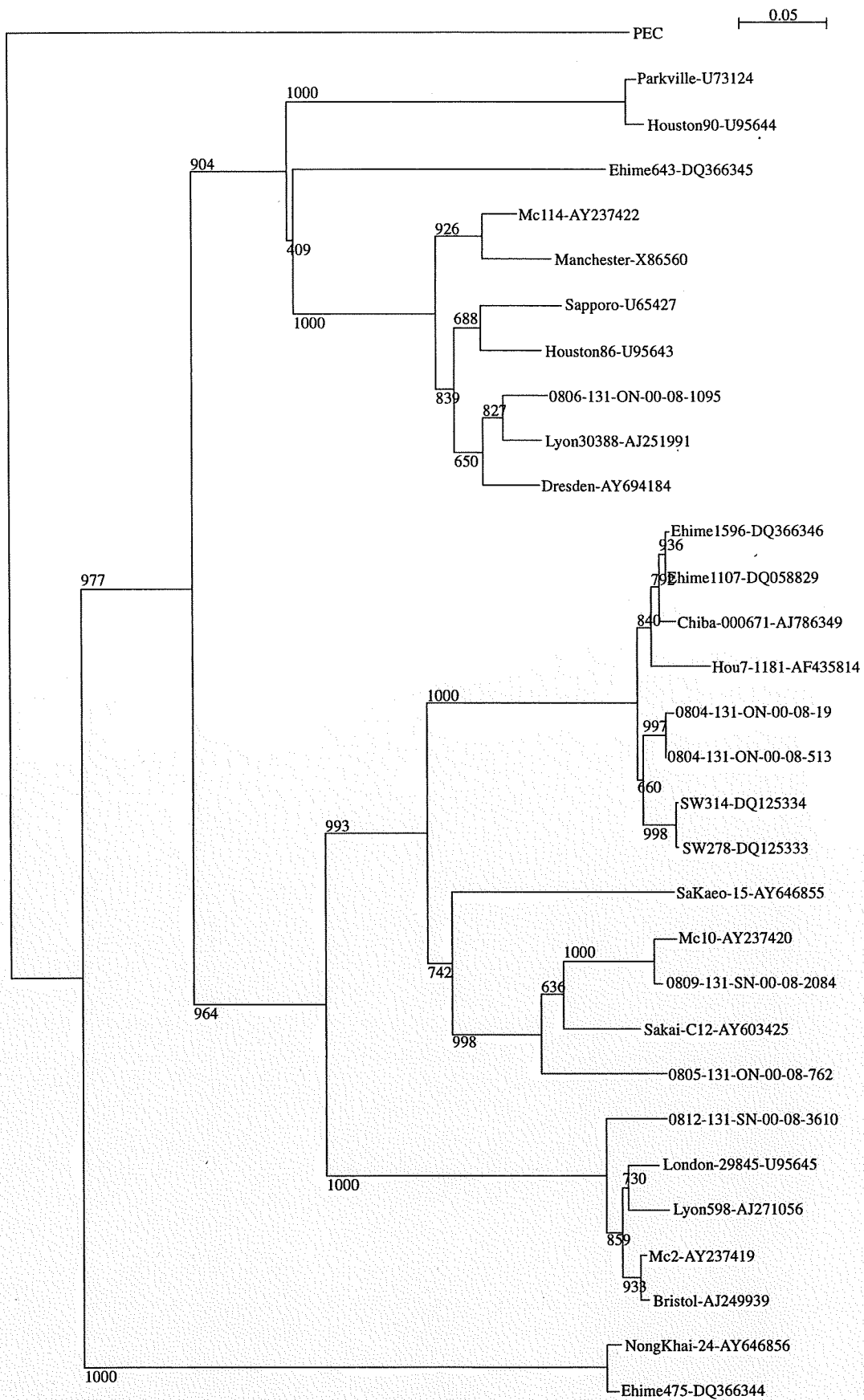


図6 サポウイルス・ポリメラーゼ領域部分シーケンスの系統樹解析結果

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)
「食中毒調査の精度向上のための手法等に関する調査研究」
平成 21 年度分担研究報告書

ノロウイルス食中毒事例調査の精度向上に関する研究
II 関西で同時多発的に発生したノロウイルス食中毒事例の解析

研究分担者 野田 衛(国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部)
研究協力者 入谷 展弘(大阪市立環境科学研究所)
研究協力者 中田 恵子(大阪府立公衆衛生研究所)
研究協力者 斎藤 博之(秋田県環境保健研究センター)
研究協力者 片山 和彦(国立感染症研究所・ウイルス第二部)
研究協力者 岡 智一郎(国立感染症研究所・ウイルス第二部)
研究協力者 山下 和予(国立感染症研究所・感染症情報センター)
研究協力者 田中 忍(神戸市環境保健研究所)
研究協力者 西川 篤(奈良市保健所)
研究協力者 北堀 吉映(奈良県保健環境研究センター)
研究協力者 三谷 亜里子(京都府山城北保健所)

研究要旨

ノロウイルス (NoV) の広域食中毒事例の早期探知に有効と考えられるシークエンスデータの共有化を試行的に実施する中で、同一塩基配列を持つ NoV 遺伝子型 GI.4 3 株の大阪府および大阪市からの登録から、8 月初旬に奈良市、大阪市および神戸市の同一居酒屋チェーン店 3 店舗で同時多発的に発生した食中毒事例を探知した。そこで、これら 3 事例の疫学的関連性を明らかにすることを目的として、患者等から検出した NoV のカプシッド領域およびポリメラーゼ領域の塩基配列の比較およびパンソルビン・トラップ法による食品からのウイルス検出を実施した。その結果、患者由来 19 株および調理従事者由来 2 株のポリメラーゼ領域(782bp) およびカプシッド領域(342bp) の塩基配列は 100%一致した。保存食材計 27 検体についてウイルス検出を試みた結果、神戸市事例に関連するタコガリアルタイム PCR 法で GI 陽性(26~43 コピー数/g)となったが、分離株の塩基配列を基に新たに設計した 3 組の nested PCR 増幅系では陰性であった。以上の検討結果および本事例の発生状況や疫学調査結果等から、当該 3 事例は共通の汚染食品による NoV の広域食中毒事例であると考えられた。

A. 研究目的

ノロウイルス (NoV) の原材料汚染に伴う広域食中毒事例を早期に探知する手段としての有用性を評価するために、シーケンスデータの共有化を試行的開始した(「I ノロウイルスのシーケンスデータ共有化の試み」参照)。その中で、大阪府から 2009 年 8 月に登録された 2 株、大阪市から 2009 年 9 月に登録された 1 株は食品媒介集団発生に由来する遺伝子型 GI. 4 の NoV であり、そのカプシッド領域の塩基配列は同一であった。このことから、これらの株の由来について問合せたところ、2009 年 8 月、奈良市、大阪市、神戸市において同一居酒屋チェーン店の 3 店舗で発生した食中毒事例のうちの 2 事例に由来することが判明した。これらの事例は患者から GI NoV が検出され、いずれも NoV を原因ウイルスとする食中毒と断定されたが、食品からウイルスが検出されず、3 事例の疫学的関連性や汚染源の解明には至らなかった。そこで、今回これらの事例の疫学的関連性を明らかにするために、患者・調理従事者由来 NoV の遺伝子解析、保存食品からのウイルスの検出およびそれらの結果に基づく疫学情報の再分析を実施した。

B. 研究方法

1. 患者および調理従事者由来 NoV の遺伝子解析

当該 3 つの食中毒事例の発生時の調査に関わった奈良市、奈良県、京都府、大阪府、大阪市および神戸市の検査で NoV 陽性となった患者 19 名および調理従事者 3 名(奈良市事例に関連)の糞便から得られた cDNA および RNA について、ポリメラーゼ領域およ

びカプシッド領域の PCR を行い、得られた PCR 産物についてダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、ウイルス株間の相同性を比較した。

2. 保存食材からのウイルス検出

各自治体の食中毒調査で採取され、検査担当機関に保存されていた食材 27 検体について、抗 GI. 4 NoV 抗血清を用いたパンソルビントラップ法により、NoV の回収を試みた。NoV の検出は、DNase 処理後、PCR に使用するプライマーで逆転写反応を行い、リアルタイム PCR 法で実施した。リアルタイム PCR 法で陽性となった検体については、抽出 RNA から再度 DNase 処理、逆転写反応を行い、リアルタイム PCR 法を実施するとともに、NV82 プライマーと GI-SKR プライマーに挟まれた領域に、当該事例の患者から検出された NoV 分離株の塩基配列を基に設計した 3 組の nested PCR 増幅系で検出を試みた。

3. 散発例由来 GI. 4 NoV の流行状況と遺伝子解析

大阪地域における散発例、集団発生、食中毒からの GI. 4 の検出を取りまとめるとともに、大阪市内で散発例から検出した GI. 4 1 株について、カプシッド領域、ポリメラーゼ領域の塩基配列を調べ、当該事例由来株と比較した。

4. 疫学情報の収集と分析

各自治体から食中毒の調査概要について入手するとともに、本調査結果を踏まえて汚経路等について再分析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の事業者に不利益が生じないように、その表現には十分に配慮した。

C. 研究結果

1. 3つの食中毒事例の概要

食中毒発生に対応した各自治体の調査結果に基づく各食中毒事例の概要および厚生労働省に連絡された速報の概要はそれぞれ表1、表2のとおりである。

3つの事例は奈良市、大阪市、神戸市にあるA水産のチェーン店で発生した。推定される喫食日時は奈良市事例が8月6日、7日、大阪市事例が8月7日、神戸市事例が8月7日、11日、12日で、連続して発生した。

奈良市事例では喫食者20名のうち14名が発症し、発症者の糞便について検査した結果、8名からGI NoVが検出された。また、調理従事者12名中3名からGI NoVが検出され、NoV陽性の2名は体調不良を訴えていた。参考食品としてボタンエビ他6検体について検査したがすべて陰性であった。原因食品の χ^2 乗検定では、疑わしい食品は特定されなかった。

大阪市事例は喫食者23名中11名が発症し、発症者6名の糞便について検査した結果、2名からNoVが検出された。検出された2株のカプシッド領域上流のシークエンスによりGI.4と型別され、両者の配列は一致した。調理従事者6名はNoV陰性であった。 χ^2 乗検定で95%の有意差が認められた厚焼き玉子および有意ではないが係数1以上を示したタコ、ドンタコス、サラダ、海鮮お好み焼きなど14検体の別ロットの保存検体について検査したが、すべて陰性であった。

神戸市の8月7日喫食例は25名中15名が発症し、15名全員からGI NoVが検出された。8月11日喫食例は35名中29名が発

症し、発症者23名および非発症の3名からGI NoVが検出された。8月12日喫食例は12名中7名が発症し、7名全員からGI NoVが検出された。12日喫食例において χ^2 乗検定でボタンエビが95%の有意差で原因食品として疑われた。ボタンエビ以外では11日の食事ではボタンエビ、トマト、厚焼き玉子、小エビてんぷら、12日の食事ではサーモン、トマト、スペアリブ、ほっけが有意ではないが係数1以上を示した。原因食品として関連性の高いボタンエビ他10検体について検査したが、すべて陰性であった。

これら3つの事例はいずれもA水産のチェーン店が原因施設として特定され、発生状況や患者からGI NoVが検出されたことなどから、共通の感染源が疑われたものの、食品からウイルスが検出されず、3事例の疫学的関連性や汚染源経路の解明には至らなかった。

2. 患者および調理従事者由来 NoV の遺伝子解析

供試した患者由来19検体すべておよび調理従事者3検体中2検体からポリメラーゼ領域およびカプシッド領域のPCR法で増幅産物が得られた(表3)。得られたPCR産物についてポリメラーゼ領域(782bp)およびカプシッド領域(342bp)の塩基配列を比較した結果、奈良市事例関連患者8例、調理従事者2例、大阪市事例関連患者2名および神戸市関連患者9名から検出されたNoVの塩基配列は100%一致した(図1、2)。

3. 保存食材からのウイルス検出

奈良市、大阪市および神戸市の事例に関連する食材それぞれ6検体、13検体、8検体、計27検体についてウイルス検出を試み

た(表 4)。その結果、神戸市事例に関連するタコがリアルタイム PCR 法で GI 陽性(43 コピー数/g)となった。陽性結果を確認するために、再度、抽出 RNA 検体から DNase 処理、逆転写反応を行い、リアルタイム PCR を実施した結果、同様に GI 陽性(26 コピー数/g)となった。一方、タコ由来 NoV のシーケンスを患者由来株と比較するために、NV82 プライマーと G1SKR プライマーに挟まれた領域に設定した 3 組の nested PCR 増幅系で検出を試みたが、増幅産物は得られなかった。

4. 大阪地域における GI. 4 流行状況

大阪地域において GI. 4 は 2009 年 2 月から 5 月にかけて食中毒事例、小学校等における集団感染症、散発例から検出されていたが、当該食中毒事例が発生した 8 月には大阪地域で GI. 4 の流行は確認されていない。大阪市で 2009 年 3 月に散発例から検出された GI. 4 株はカプシッド領域の配列は当該事例の株の配列と一致したが、ポリメラーゼ領域 783 塩基の比較では 8 塩基異なる配列を示した。

D. 考察

今回、奈良市、大阪市、神戸市にある同一居酒屋チェーン店 3 店舗で発生した食中毒の患者 19 例から検出された GI. 4 のポリメラーゼ領域 782bp およびカプシッド領域 342bp の塩基配列を比較した結果、100%一致した。この結果に加え、当該 3 事例のうち 2 事例は調理従事者から NoV が検出されていないこと、3 施設間で調理従事者の行き来がないことなどの調査結果、発生時期かほぼ同一時期であることの食中毒の発生状況、および大阪地

域では同時期に GI. 4 の流行が確認されていないことの疫学状況を考慮すると、この 3 事例(少なくとも、大阪市、神戸市の 2 事例)は調理従事者からの食品汚染を原因とする事例ではなく、共通の汚染食品による NoV の広域食中毒事例である可能性が高いと考えられる。

一方、奈良市の調理従事者 2 例からも患者と同一の塩基配列を持つ GI. 4 が検出された。このことから、奈良市事例はこれらの調理従事者から二次汚染した食品が原因となった可能性を否定できない。しかし、他の 2 事例とほぼ同じ日に発生していることに加え、調理従事者のうち体調不良を訴えていた 2 名は共に 8 月 8 日 5 時あるいは 7 時の早朝に発症しており、食中毒事例に先んじて発症していないことから、調理従事者からの二次汚染の可能性は低いものと考えられた。この場合、調理従事者自体も原材料汚染した食品から感染したものと推定され、事実、体調不良を訴えた 2 名は「まかない食」として、店舗で提供されているメニューを喫食している。

一方、パンソルビン・トラップ法で食品残品からの NoV 検出を試みた結果、神戸市事例に関連するタコおよびその貯留液から 2 度のリアルタイム PCR 法で 43 コピー数/g、26 コピー/g と低定量値ながら陽性となった。患者由来株とのシーケンスの比較を行うために、分離株の塩基配列を基に新たに設計したポリメラーゼ領域からカプシッド領域の間を増幅する 3 組の nested PCR 増幅系で検出を試みたが、増幅産物は得られなかった。このことから、リアルタイム PCR 法の陽性結果は、偽陽性の可能性があるものの、タコは 3 店で共通の食材として使用