

図1 ノロウイルスの月別・遺伝子型別の検出状況 (2012/13~2014/15 シーズン)

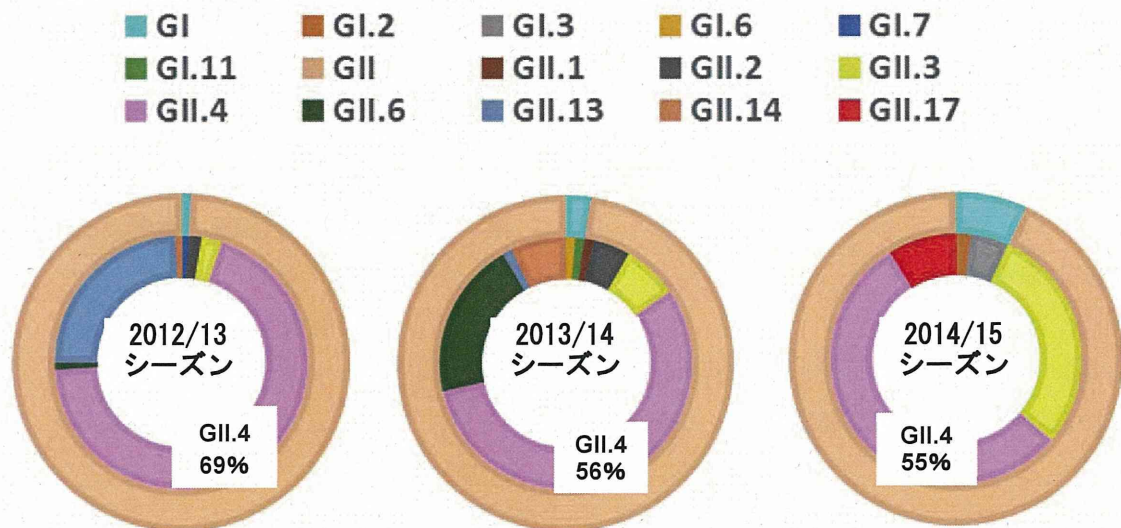


図2 愛知県の散発胃腸炎患者からのノロウイルスのシーズン別・遺伝子型別の検出状況

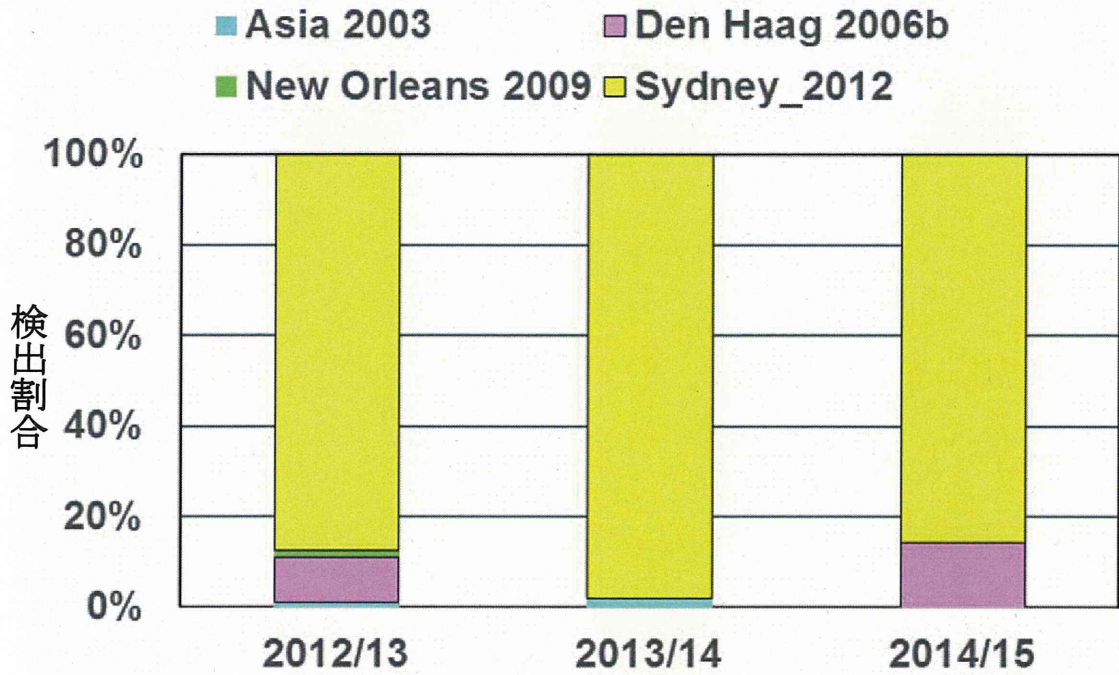


図3 GII.4 変異型のシーズン別検出状況

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

「食品中の病原ウイルスの検出法に関する研究」

総合研究協力報告(平成 25～27 年度)

集団胃腸炎事例から検出されたノロウイルスの分子疫学的解析 および国産市販生カキのウイルス汚染調査

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	山元 誠司	大阪市立環境科学研究所
研究協力者	改田 厚	大阪市立環境科学研究所
研究協力者	阿部 仁一郎	大阪市立環境科学研究所
研究協力者	上林 大起	大阪市立環境科学研究所
研究協力者	久保 英幸	大阪市立環境科学研究所
研究分担者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

2013年9月から2015年12月までの3シーズンにおけるノロウイルス(NV)流行について分子疫学的解析を行ったところ、4種類の遺伝子型(GII.3、GII.4、GII.6 および GII.17)が異なる時期に流行していたことが確認された。GII.4株以外の3種類の流行株はRNA-dependent RNA polymerase領域が異なる遺伝子型のキメラウイルスであった。また、非常に稀な遺伝子型であるGII.17は、同時期に国内だけでなくアジアで広く流行していたことが示唆された。

2012-2013～2015-2016シーズンの期間に国内で市販されていた生カキ31ロットについてNV、サポウイルス(SV)、A型肝炎ウイルス(HAV)およびE型肝炎ウイルス(HEV)の検索を行った。生食用カキの16.0%、加熱調理用カキの66.7%にNV汚染が認められた。SVは12.0%の生食用カキに汚染が認められ、NVと同様にカキ喫食による食中毒の原因ウイルスとして注意する必要があると考えられた。HAVおよびHEVは検出されなかった。

A. 研究目的

ノロウイルス(NV)には多くの種類の遺伝子型が存在しており、近年では遺伝子型の一つであるGII.4が世界的に大きく流行している。NVの流行はGII.4等の変異株出現と関連していることが指摘されており、NV流行状況の把握や分子疫学

的解析はNV胃腸炎の流行予測や予防対策に重要である。本研究ではNV流行を把握し、新たな変異ウイルスの出現を監視するために、集団胃腸炎事例の患者糞便についてNVの検索および遺伝子型別を行った。

カキはウイルス性食中毒の主な原因食

品の一つとして知られている。カキの NV 汚染については、これまで継続した調査が実施されてきた。しかし、他のウイルスについては情報が多くない。そこで、国産市販生カキのウイルス汚染実態を明らかにするために生食用および加熱調理用の生カキについて NV、サポウイルス (SV)、A 型肝炎ウイルス (HAV) および E 型肝炎ウイルス (HEV) の検索を行った。

B. 研究方法

1. 材料

2013 年 9 月から 2015 年 12 月までの 3 シーズン (1 シーズン: 9 月から翌年 8 月までの期間) に当研究所へ検査依頼のあった集団胃腸炎 272 事例、患者糞便 1,065 検体 (2013-2014 シーズン 119 事例 471 検体、2014-2015 シーズン 121 事例 472 検体、2015-2016 シーズン (2015 年 12 月までの集計) 32 事例 122 検体) を用いた。

国産生カキは 2013 年 2 月 (2012-2013 シーズン)、2013 年 12 月および 2014 年 2 月 (2013-2014 シーズン)、2014 年 12 月、2015 年 1 月および 2 月 (2014-2015 シーズン)、2015 年 11 月 (2015-2016 シーズン) に市販されていた国産生カキを月に 2~9 ロットずつ、合計 31 ロット (生食用 25 ロット、加熱調理用 6 ロット) を NV、SV、HAV および HEV の検索に用いた。市販生カキは 1 ロットにつき、カキ 3 個をまとめて検査した。31 ロットは 4 県 15 海域から採取されものであり、D 県産 12 ロット、C 県産 9 ロット、A 県産 7 ロット、B 県産 3 ロットであった。

2. 患者糞便材料からの NV 検出

ウイルス RNA は、10~20% 糞便乳剤から QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) を用いて抽出した。cDNA は Random hexamer (Amersham) および逆転写酵素 AMV XL (Life Science) を用いて作製した。NV の検出は、Kageyama ら (JCM 41, 1548-57, 2003) のリアルタイム RT-PCR 法に従って行った。

3. カキからのウイルス検出

カキの前処理には、野田ら (広島市衛生研究所年報 25, 35-43, 2006) のアミラーゼ処理・PEG 法を用いた。即ち、むき身カキから中腸腺を摘出し、フィルター付滅菌バッグ (GSI クレオス) に入れて破碎した後、9 倍量の PBS (-) および 25mg/ml の α -アミラーゼ/PBS 溶液を加え、37°C で 60 分間攪拌した。アミラーゼ処理後、フィルターろ液 12ml を 10,000rpm 20 分間遠心した。遠心上清 10ml に PEG 6000 および NaCl を加え (最終濃度 12% PEG および 1M NaCl)、4°C で 2 時間~一夜放置した。さらに 4°C 10,000rpm 30 分間遠心した沈渣に 0.3ml の 0.5% Zwittergent 加 PBS (-) を加え、RNA 抽出用試料とした。

ウイルス RNA は、High Pure Viral RNA kit (Roche) を用いて抽出した。DNase 処理は、DNase I recombinant, RNase Free (Roche) を用いて、RNA 抽出時にカラム上で行った。cDNA は、High-Capacity cDNA RT Kit with RNase Inhibitor (Life Technologies) および Random hexamer を用いて作製した。NV は糞便と同じ方法、SV は Kitajima ら (AEM 76, 2461-7, 2010) の方法、HAV は野田らの方法 (平成 23 年度 総括・分担研究報告書「食品中の病原

ウイルスのリスク管理に関する研究」)、HEV は国立感染症研究所病原体検査マニュアル(平成17年4月)に従って検査した。

4. ウイルスの遺伝子型別

NV が陽性となった場合は、Capsid N/S 領域遺伝子を増幅し、塩基配列を決定した。検出された NV 株に変異ウイルスの疑いがある場合、RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) 領域を増幅し (JCM 46, 2406-9, 2008)、塩基配列を決定して解析を行った。Capsid N/S および RdRp 領域の遺伝子型別は、Norovirus Genotyping Tool ver. 1.0 (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool#/>) を用いて行った。

他のウイルスについては、PCR 産物をダイレクトシーケンスし、SV の遺伝子型別は Oka らの方法 (Arch Virol 157, 349-352, 2012) に従った。

(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

1. NV 胃腸炎事例の発生状況

図1にNV事例の月別発生状況を示した。2013-2014 シーズンは87事例(73.1%)、291検体(61.8%)がNV陽性であった。9月から事例発生が認められ、2013年12月に急増し(19事例)、5月まで多発した。カキ関連事例は2事例(2月および3月)であった。

2014-2015 シーズンは92事例(76.0%)、

301検体(63.8%)がNV陽性であった。2014年11月(23事例)と2015年1月(18事例)に発生数が急増した。カキ関連事例は10事例と多く、特に1月の発生が7事例と多かった。

2015-2016 シーズンは28事例(87.5%)、89検体(73.0%)がNV陽性であり、11月(12事例)および12月(9事例)に多く発生していた。カキ関連事例は1事例(11月)であった。

2. 市販生カキのウイルス汚染状況

表1~2にウイルス検出結果を示した。NV汚染は生食用カキの16.0%(4/25ロット)、加熱料理用カキの66.7%(4/6ロット)に認められた。中腸腺1gあたりのNV汚染量(NV RNA コピー数)は、生食用で62~504コピー、加熱調理用で45~1,472コピーであった。NVが陽性となった8ロット中5ロットはリアルタイムRT-PCRの判定基準値である実測値10コピーよりも低い値であった。今回検査した4県の中では、A県産カキが71.4%(生食用1/2ロット、加熱調理用4/5ロット)とNV汚染率が最も高かった。次いでD県産カキ33.3%(生食用2/5ロット、加熱調理用0/1ロット)、C県産カキ11.1%(生食用1/9ロット)であった。B県産カキからNVは検出されなかった。

SV汚染は生食用カキの12.0%(3/25ロット)に認められた。検査したすべてのカキからHAVおよびHEVは検出されなかった。

3. 検出されたウイルスの遺伝子型

胃腸炎事例から検出されたNVの中で遺

伝子型別できたものは、少なくとも13種類 (GI:5種類、GII:8種類) であった。最も多く検出されたのは、複数の遺伝子型が検出された事例を含めて66事例 (31.9%) から検出されたGII.4であり、次いでGII.3 (21.3%、44事例)、GII.6 (20.8%、43事例)、GII.17 (15.0%、31事例) であった。

2013-2014シーズンで最も多く検出された遺伝子型はGII.6 (49.4%、43/87事例) であり、次いでGII.4 (33.3%、29/87事例) であった。NV GII.6が検出された事例は11月から発生が認められ、3月～5月の期間に多く (69.8%、30/43事例)、7月まで認められた (図1)。主な推定原因はヒトからヒトへの感染 (PP感染) 39事例であり、主な発生施設は保育所 (28事例)、小学校 (6事例) であった (図2A)。食中毒疑事例は3事例あり、うち1事例はカキ関連事例であった。NV GII.4が検出された事例は12月から3月まで認められ、12月 (11事例) が最も多かった (図1)。主な推定原因はPP感染 (21事例) および食品 (8事例) であった (図2B)。PP感染では、保育所 (10事例) および高齢者施設 (7事例) での発生が多かった。GII.4株の亜型はすべてSydney2012であった。

2014-2015シーズンで最も多く検出された遺伝子型はGII.3 (44.9%、40/89事例) であり、次いでGII.17 (31.5%、28/89事例) であった。NV GII.3が検出された事例の97.5% (39/40事例) は2014年9月から12月の期間に集中して発生し、11月 (22事例) が最も多かった (図1)。主な推定原因はPP感染 (87.5%、35/40事例)

であり、主に保育所 (31事例)、小学校 (2事例) における発生であった (図2C)。GII.17については2014年12月にシーズンで最初の事例が市内高齢者施設で発生した。その後、NV GII.17が検出された事例は2015年1月から3月の期間に集中して発生し (85.7%、24/28事例)、1月 (15事例) が最も多かった。GII.17が検出された事例の中で、PP事例が11事例、カキ関連事例が9事例、カキ以外の食品疑事例が8事例であった (図2D)。PP事例の主な発生施設は市内の高齢者施設 (6事例) であった。

2015-2016シーズンは2015年12月までの集計では、最も多く検出された遺伝子型はGII.4 (78.6%、22/28事例) であり、11月 (10事例) および12月 (8事例) に集中していた。検出されたGII.4株はすべてSydney 2012亜型に分類された。NV GII.17が検出された事例は2事例のみであり、11月 (カキ関連事例) と12月 (保育所) であった。

市販生カキから検出されたNVの遺伝子型については、2012-2013シーズンはGII.4 (Sydney 2012亜型) (2013年2月)、2013-2014シーズンはGII.6 (2013年12月)、GII.17 (2014年2月) およびGI.4 (2014年2月)、2014-2015シーズンはGII.3 (2015年1月および2月) およびGII.13 (2015年2月)、2015-2016シーズンはGII.3 (2015年11月) であった。SVの遺伝子型はGII.1 (2013年12月)、GI.1 (2015年1月)、GI.3 (2015年2月) であった。

4. GII.6株 (2013-2014シーズン) の遺

伝子解析

2013-2014 シーズンに 41 事例中 38 事例から検出された GII. 6 株は Capsid N/S 領域において互いに非常に近縁（塩基配列相同性 $\geq 97.6\%$ ）であり、1 種類の遺伝的グループを形成し、過去に大阪市で検出された株とは異なっていた（入谷ら、平成 26 年度研究協力報告書）。4 事例の RdRp 遺伝子を比較したところ、すべて互いに近縁な GII. P7 型に分類された。

5. GII. 3 株（2014-2015 シーズン）の遺伝子解析

9 月から 12 月に発生した 39 事例から検出された GII. 3 株は Capsid N/S 領域において互いに非常に近縁（塩基配列相同性 $\geq 98.9\%$ ）であり、1 種類の遺伝的グループを形成していた。3 事例の RdRp 遺伝子を比較したところ、すべて互いに近縁な GII. P12 型に分類された。

6. GII. 17 株（2014-2015 シーズン）の遺伝子解析

2014-2015 シーズンに検出されたすべての GII. 17 株は Capsid N/S 領域において互いに近縁（塩基配列相同性 $\geq 98.2\%$ ）であった。同時期に国内地域で検出された株（Kawasaki308/JP/2015, GenBank 番号 LC037415）や中国で流行していた株（14F1502/GZ/GD/CHN/2014, GenBank 番号 KP718638）とも互いに近縁であり（ $\geq 98.5\%$ ）、1 種類の遺伝的グループを形成した。27 事例の GII. 17 株について RdRp 遺伝子を比較したところ、すべて互いに近縁であり、Kawasaki308/JP/2015 と同様に GII. P17 であった。

D. 考察

3 シーズンの NV 流行について分子疫学的解析を行ったところ、時期によって流行する NV の遺伝子型が異なり、4 種類の遺伝子型（GII. 3、GII. 4、GII. 6 および GII. 17）の流行が確認された。それらの流行株は、それぞれ非常に近縁な株であり、推定原因や主に流行していた年齢層に特徴が認められ、遺伝子型によって感染経路や流行する年齢層が異なることが示唆された。また、GII. 4 株以外の 3 種類の流行株は RdRp 領域の遺伝子型が異なるキメラウイルスであり、少なくとも GII. 6 株と GII. 17 株は過去の株とは異なる新しい変異株であった。GII. 3 株については、さらに長い遺伝子領域での解析が必要であるが、新しい変異株の出現は NV の流行規模に大きく影響していると考えられた。さらに非常に稀な遺伝子型である GII. 17 については、国内だけでなくアジアで広く流行していたことが示唆された。今後は新しい GII. 4 亜型に加えて稀な遺伝子型の出現や流行する遺伝子型の変化についても早期に探知することが NV 感染症の流行予測や予防対策に重要であると考えられた。継続した流行の監視と遺伝子型別による解析が必要である。

カキの NV 汚染は、ヒトから排出された NV が下水から河川・海に至り、養殖場を汚染することが最大の要因と考えられている。カキが販売されていた時期によって異なる遺伝子型の NV が検出されたことは、同時期のヒトにおける流行が反映されたものと考えられた。また、非常に珍しい遺伝子型である GII. 17 が流行前のシーズンにカキから検出されたことはカキ

中のウイルス汚染の監視が、NV の流行予測につながる可能性を示唆している。NV 以外に SV が検出されたことから、カキ喫食による食中毒の原因ウイルスとして NV だけでなく SV も考慮する必要がある。HAV および HEV は検出されなかったが、HAV はカキからの検出やカキ喫食による食中毒も報告されており、市販生カキ中の汚染監視は重要である。HEV については、カキにおける汚染実態が明らかにされておらず、今後の継続した調査が必要である。

E. 結論

1. 時期によって流行する NV の遺伝子型が異なり、GII.4 以外の流行株は RdRp 領域の遺伝子型が異なるキメラウイルスであった。
2. 国産市販生カキには NV および SV の汚染が認められ、食中毒の感染源として注意する必要がある。
3. 今回の調査から国産市販生カキに HAV および HEV の汚染は認められなかったが、HAV はカキ喫食に伴う食中毒の原因ウイルスとして重要と考えられ、継続した監視が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 入谷展弘, 改田 厚, 阿部仁一郎, 山元誠司, 久保英幸, 平井有紀, 後藤薫, 長谷 篤: 2012-2013 シーズンに大阪市で認められたノロウイルス流行, 大阪市立環境科学研究所報告 調査・研究年報 平成 24 年度版 第 75 集, 18-22

(2013)

2) N Iritani, A Kaida, N Abe, H Kubo, J Sekiguchi, SP Yamamoto, K Goto, T Tanaka, M Noda: Detection and genetic characterization of human enteric viruses in oyster-associated gastroenteritis outbreaks during 2001-2012 in Osaka City, Japan, Journal of Medical Virology 86, 2019-2025 (2014)

3) 山元誠司, 入谷展弘, 改田 厚, 久保英幸, 長谷 篤, 藤森良子, 森 宏美, 伯井紀隆, 辻本光広, 半羽宏之: 大阪市におけるロタウイルス感染症集団事例発生状況と流行株の特徴 (2009~2013 年), 病原微生物検出情報 月報 35(No. 409), 67-68 (2014)

3) 入谷展弘, 山元誠司, 改田 厚, 阿部仁一郎, 久保英幸, 西尾孝之, 伯井紀隆, 大平真由, 安井典子, 榊田晴美, 細井舞子, 松本珠美, 坂本徳裕, 廣川秀徹, 半羽宏之, 野田 衛: 2014 年 9~11 月に発生したノロウイルスによる胃腸炎集団事例について—大阪市, 病原微生物検出情報 月報 36(No. 420), 26-27(2015)

4) Miranda de Graaf, Janko van Beek, Harry Vennema, Alexander T. Podkolzin, Joanne Hewitt, Filemon Bucardo-Rivera, Kate Templeton, Janet Mans, Johan Nordgren, Reuter Gabor, Maureen Lynch, Lasse Dam Rasmussen, Nobuhiro Iritani, Martin C. Chan, Vito Martella, Katia

Balay, Jan Vinjé, Peter A. White, Marion P. Koopmans: Emergence of a novel GII.17 norovirus - End of the GII.4 era?, *Eurosurveillance* 20(26), pii=21178 (2015)

5) 上林大起, 改田 厚, 阿部仁一郎, 久保英幸, 山元誠司, 入谷展弘, 西尾孝之, 伯井紀隆, 森 宏美, 西 貴美, 安井典子, 榊田晴美, 細井舞子, 青木理恵, 坂本徳裕, 廣川秀徹, 半羽宏之, 松本健二, 吉村高尚: コクサッキーウイルス B4型が検出された集団胃腸炎について—大阪市, 病原微生物検出情報 月報 36(No. 428), 197-198 (2015)

6) 入谷展弘, 山元誠司, 改田 厚, 上林大起, 久保英幸, 野田 衛: 2014~2015 シーズンに流行したノロウイルス GII.17 について, *食品衛生研究* 65(10), 7-15 (2015)

7) 入谷展弘, 山元誠司, 改田 厚, 阿部仁一郎, 久保英幸, 平井有紀, 上林大起, 野田 衛, 西尾孝之: 2014-2015 シーズンに大阪市内で認められたノロウイルス流行, *大阪市立環境科学研究所報告調査・研究年報* 77, 13-16 (2015)

8) 上林大起, 左近直美, 入谷展弘, 三好龍也, 改田 厚, 阿部仁一郎, 山元誠司, 久保英幸, 平井有紀, 内野清子, 吉田永祥, 岡山文香, 芝田有理, 塚田和宏, 駒野淳, 弓指孝博, 西尾孝之, 加瀬哲男, 田中智之, 高橋和郎: 大阪府内におけるノロウイルスの流行状況 (2010-2013),

大阪府立公衆衛生研究所報告 53, 15-21 (2015)

2. 学会発表

1) 山元誠司, 入谷展弘, 改田 厚, 久保英幸, 長谷 篤: 感染性胃腸炎患者からのパレコウイルスの検出, 平成 25 年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部ウイルス部会総会, 大津 (2013. 9. 20)

2) 入谷展弘, 改田 厚, 阿部仁一郎, 山元誠司, 久保英幸, 平井有紀, 後藤薫, 長谷 篤: 2012-2013 シーズンに大阪市内で認められたノロウイルス流行について, 第 25 回ウイルス性下痢症研究会学術集会, 神戸 (2013. 11. 9)

3) 入谷展弘, 山元誠司, 改田 厚, 岡智一郎, 久保英幸: 2012/13 シーズンに大阪市内で多発したサポウイルス集団胃腸炎事例, 第 61 回日本ウイルス学会, 神戸 (2013. 11. 10-12)

4) 山元誠司, 入谷展弘, 改田 厚, 久保英幸: 2013 年 4~5 月に大阪市内で流行したロタウイルス (G1-P[8]-I2) の遺伝子解析, 第 61 回日本ウイルス学会, 神戸 (2013. 11. 10-12)

5) 山元誠司, 入谷展弘, 改田 厚, 久保英幸, 西尾孝之: 大阪市内におけるロタウイルス遺伝子構成の変遷: Wa から DS-1, 平成 26 年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部ウイルス部会総会, 神戸 (2014. 10. 3)

6) 入谷展弘, 山元誠司, 改田 厚, 久保英幸, 野田 衛: 2013/14 シーズンに大阪市において集団胃腸炎事例から検出されたノロウイルス GII.6 株の分子疫学的解析, 第62回日本ウイルス学会, 横浜 (2014. 11. 10-12)

7) 山元誠司, 改田 厚, 久保英幸, 入谷展弘: ユニークな G3 型 VP7 遺伝子を有するロタウイルス DS-1 様 G3P[8]株の遺伝子解析, 第62回日本ウイルス学会, 横浜 (2014. 11. 10-12)

8) 入谷展弘, 山元誠司, 改田 厚, 阿部仁一郎, 上林大起, 久保英幸, 野田衛: 大阪市におけるノロウイルス GII.17 の流行状況, 第 63 回日本ウイルス学会, 福岡 (2015. 11. 22-24)

G. 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 国産市販生カキからのウイルス検出結果 (2012-2013~2013-2014 シーズン) ¹⁾

シーズン	年月	検体 番号	採取海域・産地 種類	NV ²⁾ (コピー/g)	SV	HAV	HEV
2012 -2013	2013年2月	N13-1	C2 生食用	-	-	-	-
		N13-2	A10 加熱調理用	GII.4 (45*) [Sydney 2012]	-	-	-
2013 -2014	2013年12月	OY13-1	D2 生食用	-	-	-	-
		OY13-2	A11 生食用	GII.6 (220*)	GII.1	-	-
		OY13-3	D2 生食用	-	-	-	-
		OY13-4	D2 生食用	-	-	-	-
		OY13-5	D3 生食用	-	-	-	-
		OY13-6	C3 生食用	-	-	-	-
		OY13-7	B4 生食用	-	-	-	-
		OY13-8	A10 生食用	-	-	-	-
		OY13-9	B4 生食用	-	-	-	-
	2014年2月	N14-1	D99-1 生食用	-	-	-	-
		N14-2	A10 加熱調理用	GI.4 (62*) GII.17 mix (1,472)	-	-	-

1) - : 陰性

2) 中腸腺 1g あたりの NV RNA コピー数

* 実測値 10 コピー/tube 未満

表2 国産市販生カキからのウイルス検出結果 (2014-2015~2015-2016 シーズン) ¹⁾

シーズン	年月	検体 番号	採取海域・産地 種類	NV ²⁾ (コピー/g)	SV	HAV	HEV
2014 -2015	2014年12月	OY14-1	D1 生食用	—	—	—	—
		OY14-2	B9 生食用	—	—	—	—
		OY14-3	C2 生食用	—	—	—	—
		OY14-4	C1 生食用	—	—	—	—
		OY14-5	C2 生食用	—	—	—	—
	2015年1月	OY14-6	C2 生食用	—	GL1	—	—
		OY14-7	D99-1 生食用	—	—	—	—
		OY14-8	D99-1 生食用	GI.3 (504)	—	—	—
		OY14-9	C1 生食用	GI.3 (185*)	—	—	—
		OY14-10	C99 生食用	—	—	—	—
	2015年2月	N15-1	C2 生食用	—	GL3	—	—
		N15-2	D99-1 加熱調理用	—	—	—	—
		N15-3	A10 加熱調理用	GI.13 mix (787)	—	—	—
		N15-4	A21 加熱調理用	—	—	—	—
		N15-5	A10 加熱調理用	GI.3 (803)	—	—	—
2015 -2016	2015年11月	OY15-1	D1 生食用	—	—	—	—
		OY15-2	D99-2 生食用	GI.3 (62*)	—	—	—
		OY15-3	D99-3 生食用	—	—	—	—

1) — : 陰性

2) 中腸腺 1g あたりの NV RNA コピー数

* 実測値 10 コピー/tube 未満

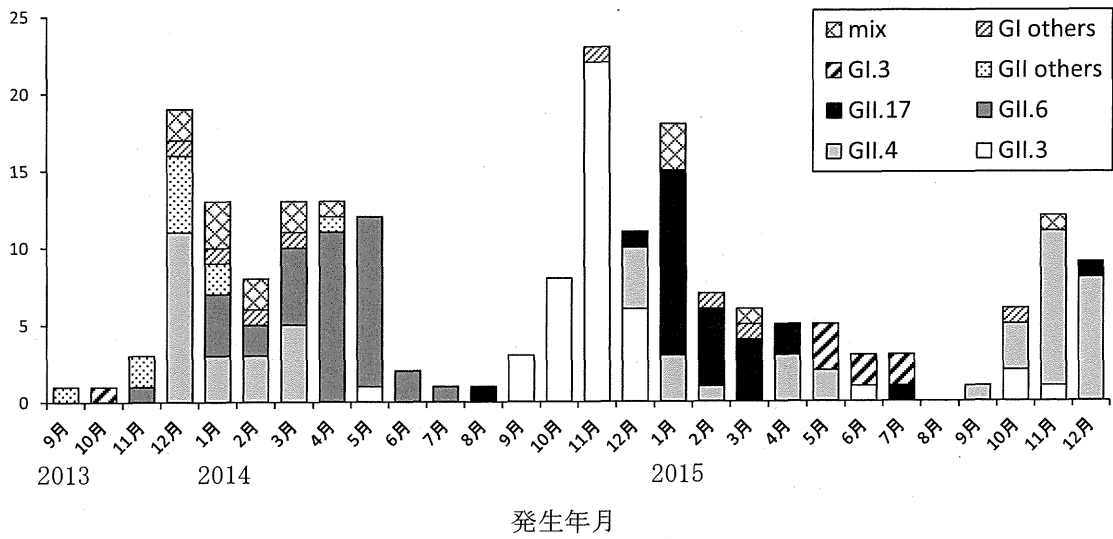


図1 大阪市における月別ノロウイルス事例発生状況

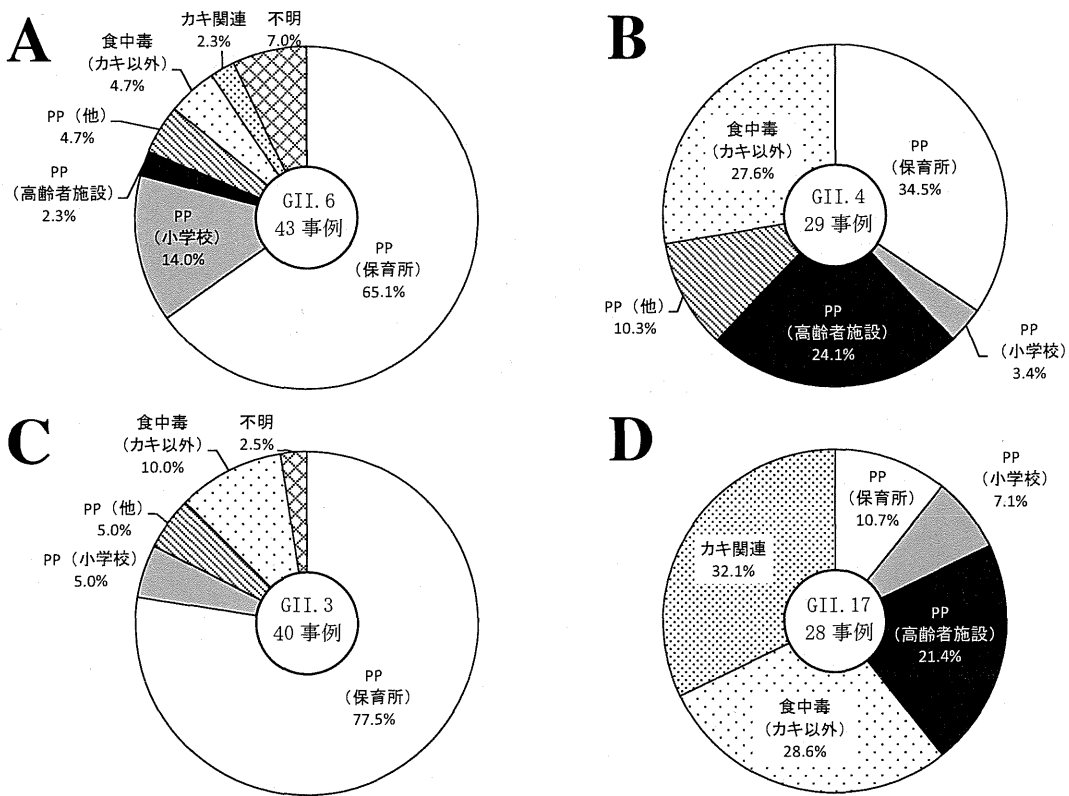


図2 GII.3 (2014-2015)、GII.4 (2013-2014)、GII.6 (2013-2014)、GII.17 (2014-2015) が検出された事例の推定原因

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

「食品中の病原ウイルスの検出法に関する研究」

総合研究協力報告(平成 25～27 年度)

下水サンプルを用いた A 型肝炎ウイルス及び 下痢症ウイルスの流行解析

研究協力者	三好 龍也	堺市衛生研究所
研究協力者	内野 清子	堺市衛生研究所
研究協力者	中谷 誠宏	堺市衛生研究所
研究協力者	岡山 文香	堺市衛生研究所
研究協力者	芝田 有理	堺市衛生研究所
研究協力者	吉田 永祥	堺市衛生研究所
研究協力者	小林 和夫	堺市衛生研究所
研究協力者	田中 智之	国保日高総合病院
研究分担者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

堺市内における下痢症ウイルス及び A 型肝炎ウイルス (HAV) の流行状況を解析するため、散発・集団感染事例の胃腸炎患者及び A 型肝炎患者由来の臨床サンプルと下水サンプルを用いてウイルスの分子疫学的解析を行った。

ノロウイルス (NoV) は、下水中の遺伝子量が NoV による胃腸炎の流行期である冬季に増加し、臨床サンプルから検出された遺伝子型のほとんどが下水中からも検出された。サポウイルス、アストロウイルス、アイチウイルスについては、臨床サンプルからの検出は少数であったが、下水サンプルからは高頻度で検出された。これらのウイルスについては、不顕性感染など顕在化しないウイルス感染の多いことが示唆された。

下水流入水 3 検体 (2013 年 12 月、2014 年 2、3 月) から HAV 遺伝子を検出した。同時期に当該下処理場の地域では患者発生はなかったが、この地域に HAV 感染者が存在していたと推測された。

下水中のウイルス遺伝子検出では、広域的な感染状況は把握することができる。さらに感染源や経路を解明する上で有用な情報を提供すると考えられる。この調査から得られた結果は、下痢症ウイルス、HAV 感染症の理解や対策に寄与することが期待される。

A. 研究目的

ノロウイルス (NoV) による感染性胃腸炎の散発・集団感染事例及び食中毒は、毎年冬季を中心に多数発生している。しかし、NoV 感染は不顕性感染も多数存在するため全体像を捕らえることは難しく、低流行下での地域における流行状況などを把握することも難しい。

散発・集団感染事例の胃腸炎患者由来の臨床サンプルと下水由来の環境サンプルの両面から NoV 遺伝子検出・解析を行い、NoV 流行について考察する。加えて、患者発生の頻度は低いが生食中毒の起因ウイルスとなり得る NoV 以外の下痢症ウイルスの遺伝子検出も実施し、感染性胃腸炎の全体像を把握する一助とする。

一方、2014 年 1 月から 4 月までに国内で A 型肝炎患者報告が 305 例あり、過去 3 年間 (2011 年 176 例、2012 年 157 例、2013 年 128 例) に比し、大きく増加した。堺市内でも 2013 年 10 月～2014 年 5 月までに 4 例と例年 (2011 年 0 例、2012 年 1 例、2013 年 10 月まで 0 例) より多い報告数であった。

そこで、下水流入水及び A 型肝炎患者等から A 型肝炎ウイルス (HAV) 遺伝子検出を行い、堺市内における HAV 流行状況の解析を試みた。

B. 研究方法

1. 材料

環境サンプルとして、2013 年 1 月から 2015 年 12 月までに堺市内の 3 つの下水処理場で毎月 1 回採水された流入水 108 検体及び放流水 108 検体、計 216 検体を調査対象とした。臨床サンプルとして、胃

腸炎については、同期間に発生した食中毒及び集団感染事例 7 事例、散発事例 (感染症発生動向調査における感染性胃腸炎患者等) 51 例から得られた糞便を調査対象とした。A 型肝炎については、2014 年 1 月に発生した家族内感染事例の患者 3 名からの血清 3 検体及び糞便 1 検体を調査対象とした。

1. 下水サンプルの濃縮法

これまでの報告書に準じて行った。すなわち、流入水及び放流水を遠心後 (3,400xg 30min、13,000xg 45min)、上清 1,000ml を分取し、最終濃度 0.05M の MgCl₂ を添加後、HCl で pH3.5 に調整した。調整済み液を HA フィルター (0.45 μm) でろ過し、ウイルスをフィルターに吸着させた。フィルターを細断し、pH10.5 グリシン buffer (流入水 : 5.0ml、放流水 : 2.0ml) で溶出後、HCl で pH6.5 に再調整し、11,000xg 20min 遠心した上清を RNA 抽出用のサンプルとした。

2. ウイルス遺伝子検出法

臨床サンプルについては、RNA 抽出後、HAV については、nested RT-PCR (primers: JCT-2F/1R-A/2R) により遺伝子検出を行い、NoV、サポウイルス (SaV)、アストロウイルス (AsV)、アイチウイルス (AiV) については、ウイルス性下痢症診断マニュアルに準じてそれぞれウイルス遺伝子検出を行った。陽性検体については、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、系統樹解析により遺伝子型を判定した。

下水サンプル (流入水) については、濃縮処理後、臨床サンプルと同様にウイ

ルス遺伝子検出を行った。下痢症ウイルスについては、TA クローニングを行い、塩基配列を決定した。遺伝子型は系統樹解析により判定した。NoV の遺伝子型番号は、Norovirus Genotyping Tool Version 1.0 (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>) に従った。また、流入水及び放流水を用いて NoV リアルタイム PCR を実施し、採取水 1ml 当たりのコピー数を算出した。

(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

1. NoV 遺伝子検出結果

臨床サンプルでは GI で 4 種類 (GI. 2, 4, 6, 7)、GII で 4 種類 (GII. 4, 6, 14, 17) 計 8 遺伝子型の NoV が検出され、GII. 4 型が最も高頻度に検出された (図 1)。

下水サンプルでは、GI で 7 種類 (GI. 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9)、GII で 9 種類 (GII. 2, 3, 4, 6, 12, 13, 14, 17)、GIV で 1 種類計 17 遺伝子型が検出された。下水サンプルでも GII. 4 型が 3 年間を通して、高頻度に検出された (表 1)。

この結果から当市全体では少なくとも 18 種類の遺伝子型 NoV の感染、流行が推測され、その中で GII. 4 が主流行遺伝子型であったと考えられた。

2. 下水中の NoV 遺伝子定量測定結果

下水中の NoV 遺伝子量は、小児の感染性胃腸炎が増加する 10 月から増加し、翌年の 7、8 月に減少する傾向がみられた。しかし、2015 年は、下水中の NoV 遺伝子

量が過去 2 年間と比べ低値であった (図 2, 3)。

3. NoV 以外の下痢症ウイルス遺伝子検出結果

SaV については、臨床サンプルでは、2013 年に 2 例、2014 年に 1 例と少数の検出であったが、下水サンプルでは、年間を通じてほとんどの月で検出され (GI. 1, 2, GII. 1, GV)、GI. 1, 2, GII. 1 型が多く検出された (表 2)。

AsV については、2013 年は、散発事例から 5 例検出され、他の年より多く検出された。下水サンプルでは、年間を通じてほとんどの月で検出された。

AiV については、2015 年は、4 月に散発事例から 1 例検出されたが、下水サンプルからは、全ての月で検出された。

3. HAV 遺伝子検出結果

2013 年 12 月に C 処理場にて、2014 年 2、3 月に B 処理場にて採水した流入水から HAV 遺伝子を検出した。遺伝子型は、2013 年 12 月 : IIIA 型、2014 年 2 月 : IA 型、2014 年 3 月 : IIIA 型であった (図 1)。

家族内感染事例では、肝炎を発症した患者 3 名から HAV 遺伝子を検出し、遺伝子型は 3 名とも IA 型であった (表 2、図 4)。

D. 考察

1. 下痢症ウイルスについて

下水の NoV 遺伝子の定量値は、NoV による小児の感染性胃腸炎が増加する冬季に増加した。臨床サンプルから検出された遺伝子型のほとんどが下水中からも検出された。下水中の NoV 遺伝子を調査することにより、NoV 流行を解析することが可

能と考えられる。流行期前の下水中の NoV を解析することにより、その後の NoV 流行や変異株の出現などを早期に探知することが可能と考える。

SaV、AsV、AiV については、臨床サンプルからの検出は少数であったが、下水サンプルからは高頻度で検出された。これらのウイルスについては、臨床症状が NoV に比べて軽症又は不顕性感染が多い、成人での感染が多いなどが考えられ、感染症発生動向調査の感染性胃腸炎として顕在化しないウイルス感染、流行があることが示唆された。

下水中のウイルス遺伝子検出では、病原性等を解析することはできないが、広域的な感染状況は把握できると考えられた。

2. HAV について

下水および家族内感染事例の患者から I A 型 HAV が検出されたが、系統樹解析結果では異なる系統のウイルスであり、また、患者の居住地も HAV が検出された下水処理場の地域ではなく両者の疫学的関連はないものと考えられた。

B 及び C 下水処理場の流入水から HAV I A、III A 型が検出された。同時期に当該下水処理場の地域では患者発生はなかったが、この地域に HAV 感染者が存在していたと推測された。

A 型肝炎については、不顕性感染が多く、また、潜伏期間が約 1 カ月と長期である。したがって、疫学調査において感染源の特定や感染実態の把握をすることが一般的に困難な事例が多い。今回、下水から検出した HAV は感染者糞便由来と推定され、下水中の HAV 遺伝子を解析すること

により、流入地域における不顕性感染を含めたウイルスの浸淫状況を把握することが可能と考えられた。

E. 結論

臨床サンプルと下水サンプルを用いて下痢症ウイルス及び HAV 遺伝子を検出・解析を行った。この結果により、流入地域におけるウイルスの流行状況の包括的把握が可能と考えられる。さらに感染源や経路を解明する上で有用な情報を提供すると考えられる。

F. 研究発表

論文発表

(1) 三好龍也 内野清子：下水中ノロウイルス検出情報と流行解析、臨床とウイルス、42:237-241、2014

(2) 三好龍也 内野清子 岡山文香 芝田有理 吉田永祥 小林和夫 左近直美 土生川洋 田中智之 野田 衛：臨床検体および下水検体を用いた堺市内の A 型肝炎の流行解析、病原体検出情報 (IASR) 36:6-7、2015

2. 学会発表

(1) 三好龍也 内野清子 岡山文香 芝田有理 左近直美 田中智之 野田 衛 小林和夫：堺市内における下水サンプルを用いた A 型肝炎ウイルスの流行解析、第 62 日本ウイルス学会学術集会、横浜市 2014.11

G. 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

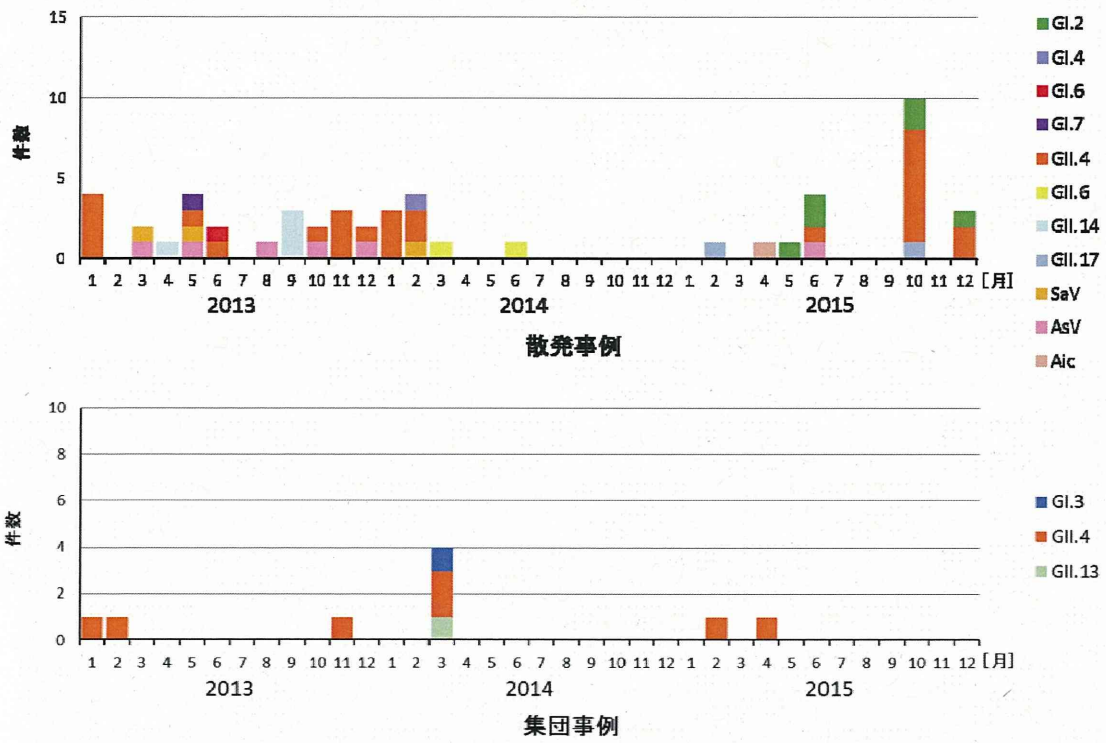


図 1 臨床検体からの下痢症ウイルス検出状況

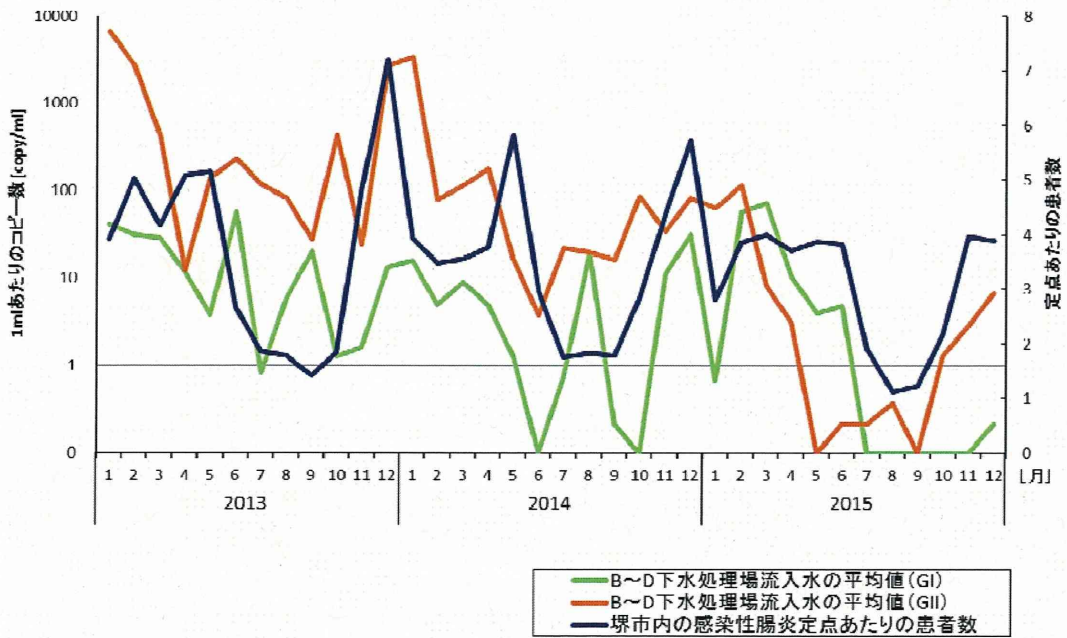


表 2 SaV AsV AiV HAV 検出状況

検体由来	検出 virus	2013年												2014年												2015年																									
		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月														
集団事例	HAV																																																		
散発事例	SaV	GI.1																																																	
		GI.2																																																	
		GII.1																																																	
	AsV																																																		
	AiV																																																		
	下水	SaV	GI.1																																																
			GI.2																																																
			GI.3																																																
		GV	GI.1																																																
			GI.3																																																
			GV																																																
			SaV																																																
AsV																																																			
AiV																																																			
HAV																																																			

型別実施中