

平成 28 年度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)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究協力報告

北海道で発生した食中毒事例の分子疫学的解析

研究協力者	吉澄 志磨	北海道立衛生研究所
	後藤 明子	北海道立衛生研究所
	大久保 和洋	北海道立衛生研究所
	石田 勢津子	北海道立衛生研究所
研究分担者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

ノロウイルス (NoV) の流行状況を把握するため、平成 28 年度に北海道で発生した集団胃腸炎について、検出された NoV の遺伝子型別を行った。4~6 月の優勢遺伝子型は GII.Pe_GII.4 Sydney 2012 であったが、11 月以降は GII.P16_GII.2 が優勢となった。GII.P16_GII.2 の検出は、感染症事例では主に低年齢層の事例(保育所・幼稚園、小学校)で認められた。12 月以降は、食中毒事例からの検出も GII.P16_GII.2 のみであった。

北海道では、食中毒疑い事例の患者、調理従事者、食品等から検出された NoV 遺伝子の塩基配列を比較し、一致するかどうかを確認している。比較には RT-PCR の検出用プライマー内の配列(RdRp 領域:約 290nt、RdRp-VP1 領域:約 340nt)を用いているが、この領域の配列の一致が同一感染源によるとの判断を裏付ける情報として十分なものかどうかを確認するため、より長い配列(RdRp 領域:793nt、VP1 領域全長:1,623-1,629nt)を用いて比較を行った。その結果、食中毒の同一事例内では、RT-PCR の検出プライマー内の配列が一致する検体は、より長い配列を用いて比較してもほぼ一致することが示された。

A. 研究目的

ノロウイルス (NoV) はヒトに急性胃腸炎を引き起こす代表的なウイルスであり、食中毒の病因物質としても重要視されている。今回は、平成 28 年度に北海道で発生した NoV による食中毒事例を対象として、以下の調査を実施した。

1. NoV 感染は主にヒト-ヒト感染により

拡大する。NoV 感染者の数が多くなるほど、二枚貝の NoV 汚染や調理従事者を介した食品汚染のリスクが高くなると考えられることから、NoV の流行状況の把握は食中毒予防の観点からも重要である。そこで、北海道で発生した NoV による食中毒および感染症事例について、検出された NoV の分子疫学的解析を行い、NoV の流行と食

中毒への関与について検討を行った。

2. 北海道における食中毒事例の NoV 検査では、患者、調理従事者、食品等から検出された NoV 遺伝子について塩基配列を決定し、配列が一致するかどうかの確認を行っている。この一致・不一致の情報、疫学的解析による同一感染源かどうかの判断の裏付けとして使用される。しかし、ここで比較しているのは RT-PCR の検出用プライマー内の配列であり、これは RdRp 領域の一部（約 290bp）と RdRp-VP1 領域の一部（約 340bp）の配列情報に過ぎない。そこで、この領域における配列の一致が同一感染源によるもの判断を裏付ける情報として十分なものであったかどうかを確認するため、食中毒と判断された事例の調理従事者および患者由来の NoV について、それぞれの領域のより長い配列を決定し、比較検討を行った。

B. 研究方法

1. 材料

1) NoV の流行状況の把握

北海道において 2016 年 4 月から 2017 年 1 月の間に発生した食中毒 7 事例（表 1）と感染症およびその他（食中毒とも感染症とも判断されなかった感染経路不明の事例）の 45 事例を対象とした。

2) 調理従事者および患者由来 NoV の塩基配列の比較

北海道において 2016 年 4 月から 2017 年 1 月の間に発生した食中毒 7 事例のうち、表 1 に示す No. 3, 4 の 2 事例は道立保健所管轄外で発生したものであり、当所での検査は患者についてのみであった。

今回の調査では、当所において調理従事者と患者の検査を実施した 4 事例（表 1、事例 No. 1, 2, 5, 6）を対象とし、それぞれの事例について、すべての NoV 陽性検体を用いた。

2. 方法

1) 検出された NoV の遺伝子型別

厚生労働省通知の方法に準じて NoV 遺伝子の増幅を行った。増幅プライマーには、RdRp 領域の P1/P3 および NV82・SM82/NV81、RdRp-VP1 領域の COG1F/G1-SKR および COG2F/G2-SKR の 4 セットを使用した。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た。RdRp 領域の遺伝子型別は Norovirus Genotyping Tool (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>) を、VP1 領域の遺伝子型別は Norovirus Genotyping Tool と近隣結合法による系統樹解析を併用した。

2) 調理従事者および患者由来 NoV の塩基配列の決定

ORF3 の VP2 領域に設定したプライマーを用いて cDNA を合成した。これを鋳型として、RdRp 領域に設定された NV82 改変プライマー (1st) および P1 改変プライマー (nested) と、VP2 領域に設定した 2 種類のプライマーを用いて Nested PCR を行った。Nested PCR の増幅産物について、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。今回の検討に使用する塩基配列は、P1 プライマーより下流の RdRp 領域 (793nt) と VP1 領域全長 (1,623-1,629nt) とした。

(倫理面への配慮)

本研究については、北海道立衛生研究所倫理審査委員会の審査を受け、承認を得た。

C. 研究結果

1. 北海道における NoV の検出状況

表 2 に、集団胃腸炎事例からの NoV 検出状況を、食中毒と感染症・その他の事例とに分けて示した。

検出 NoV の VP1 遺伝子型は、感染症・その他の事例では、2015/16 シーズンにあたる 4~6 月は GII. 4 が優勢であり、他に GII. 2 と GII. 17 が検出された。2016/17 シーズンは 11 月に入って事例が急増し、優勢遺伝子型は GII. 2 であった。次いで GII. 6 が多く検出され、その他、GII. 4 と GII. 17 の検出がみられた。食中毒は 10 月から毎月発生しており、10 月の 1 事例からは GII. 17、11 月の 2 事例からはそれぞれ GII. 4、GII. 17 が検出された。12 月以降は 4 事例の発生があり、すべての事例から GII. 2 が検出された。

GII. 2 の RdRp 遺伝子型は、6 月までに検出された株は GII. P2 であったが、11 月以降の株は GII. P16 であった。GII. 4 の亜型はすべて Sydney 2012 であり、RdRp 遺伝子型はほとんどが GII. Pe であったが、5 月に高齢者施設において検出された 1 株が GII. P16 であった。

表 3 に、原因または発生施設別の NoV 検出状況を、2015/16 シーズン (4~8 月) と 2016/17 シーズン (9 月~翌年 1 月) に分けて示した。2015/16 シーズン (4~8 月) は、保育所・幼稚園、病院・高齢者施設ともに GII. 4 が優勢遺伝子型であった。2016/17 シーズン (9 月~翌年 1 月)

の優勢遺伝子型は GII. 2 であり、主に低年齢層 (保育所・幼稚園、小学校) の感染症事例から検出され、食中毒事例からの検出頻度も高かった。

2. 調理従事者および患者由来 NoV の塩基配列の一致・不一致についての検証

食中毒 4 事例について、調理従事者と患者から検出された NoV の塩基配列の比較結果を図 1 に示した。今回の検証に用いた塩基配列は図 1 の太矢印で示した領域のものであり、GII. 17 は 2, 396nt (RdRp 領域の一部 : 793nt、VP1 領域全長 : 1, 623nt)、GII. 2 は 2, 402nt (RdRp 領域の一部 : 793nt、VP1 領域全長 : 1, 629nt) である。また、行政検査時の比較は P1/P3 および COG2F/G2-SKR のプライマー内の配列であり (それぞれ 286nt、338nt)、これらの領域を細矢印で示した。

事例 No. 1 は、行政検査時の比較領域では、すべての検体で塩基配列が 100%一致した。一方 VP1 全長の比較では、患者 1 検体で 1 カ所、A→R (A と G の混合) への置換がみられた。A→G の置換は、非同義置換であった。

事例 No. 2 も、行政検査時の比較領域は、すべての検体で塩基配列が 100%一致した。NoV 陽性 4 検体のうち、調理従事者 2 は今回の検証用の比較領域についてシーケンスに十分な量の増幅ができなかったため、今回は調理従事者 1 検体と患者 2 検体についての比較とした。VP1 全長の比較において、患者 1 で 1 カ所、A→R (A と G の混合) への置換があり、患者 2 でも 1 カ所、T→Y (T と C の混合) への置換がみられた。どちらも非同義置換であった。

事例 No. 5 の行政検査時の塩基配列の比較では、VP1 領域はすべての検体で塩基配列が 100%一致したが、RdRp 領域は患者 1 検体で 1 カ所、A→R (A と G の混合) への置換があった。この他、VP1 全長を比較すると、別の患者 1 検体で 1 カ所、G→A への置換がみられた。これらはどちらも同義置換であった。

事例 No. 6 は、行政検査時の比較領域では、すべての検体で塩基配列が 100%一致した。RdRp 領域のより長い配列と VP1 全長を比較した場合でも、塩基配列は全ての検体で 100%一致した。

D. 考察

1. 北海道における NoV の検出状況

食中毒事例において検出された NoV の遺伝子型は、2016 年 12 月および 2017 年 1 月に発生した 4 事例すべてで GII.P16_GII.2 であった。この GII.P16_GII.2 は、食中毒以外の事例では主に低年齢層の事例の優勢遺伝子型であった。北海道における食中毒事例からの検出遺伝子型は、同時期の低年齢層主体の流行遺伝子型と一致することは少なく、食中毒事例では GII.4 や、最近では GII.P17_GII.17 が主に関与する傾向がみられていた。そのため、2016/17 シーズンの食中毒発生に GII.P16_GII.2 が大きく関与していることは興味深く、成人における病原性（不顕性感染の多さなど）や感受性（免疫状況）の情報を含めた解析が必要と考えられた。

II.P16_GII.2 に次いで多く検出された遺伝子型は GII.P7_GII.6 であったが、II.P16_GII.2 が道内全域で検出されて

いるのに対し、II.P7_GII.6 の検出は 1 保健所管内のみであった。また平成 28 年度に検出された GII.4 Sydney 2012 株の RdRp 遺伝子型は、1 株のみ GII.P16 であった。このタイプは、北海道では同年 3 月にも検出されており、検出はこの 2 事例のみである。

2. 調理従事者および患者由来 NoV の塩基配列の一致・不一致についての検証

今回対象とした食中毒 4 事例は、行政検査時に、調理従事者および患者から検出された NoV の塩基配列が一致すること（100%一致と 1 塩基違いの混合も含む）を確認していた事例である。これらの事例では、長い配列の比較でも、検体の多くが 100%一致した。3 事例において一部患者検体に配列の違いが確認されたが、違いは 1 検体につき 1 カ所であり、その多くは他の検体と同じ塩基と異なる塩基との混合であった。このことから、食中毒事例内の検体の比較においては、RT-PCR の検出用プライマー内の短い配列情報（RdRp および VP1 領域の一部）を用いた結果が、その領域全体の一致・不一致の状況から大きくは逸脱しないと考えられた。今後は、食中毒事例内の比較データをさらに蓄積するとともに、同時期発生の同遺伝子型検出事例間の比較を行い、感染源の異なる事例間の比較ではどの程度の配列の不一致がみられるかについて情報を収集する予定である。

E. 結論

平成 28 年度の北海道における NoV 検出は、6 月までは GII.4 優勢、11 月以降は GII.2 優勢であった。II.2 の RdRp 遺伝

子型は、6月まではすべて GII.P2、11月以降はすべて GII.P16 であった。 GII.P16_GII.2 は、11月から保育所・幼稚園・小学校を中心に流行がみられ、また、12月以降に発生した食中毒事例はすべて GII.P16_GII.2 によるものであった。

食中毒事例の調理従事者および患者から検出された NoV の塩基配列を比較すると、RT-PCR の検出プライマー内の配列が一致する同一事例内の検体は、VP1 全長など、より長い配列を用いて比較してもほぼ一致した。

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

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

表 1 食中毒事例の概要

事例 No.	発生年月	原因施設	原因食品	検査結果 (NoV陽性数/検査数)			検出NoV VP1遺伝子型
				原因施設		患者	
				調理従事者	その他		
1	2016/10	飲食店	提供された食品	1/4	1/1	7/8	GII.17
2	2016/11	飲食店	提供された食品	2/5	-	2/2	GII.17
3	2016/11	飲食店	提供された食品	-	-	14/16	GII.4.2012
4	2016/12	飲食店	提供された食品	-	-	1/1	GII.2
5	2017/ 1	飲食店	提供された弁当	2/4	1/1	8/8	GII.2
6	2017/ 1	飲食店	提供された食品	1/12	0/1	6/6	GII.2
7	2017/ 1	パン製造所	パン	4/11	-	8/8	GII.2

表2 北海道で発生した集団胃腸炎事例からの NoV 検出状況

A. 食中毒

検出遺伝子型		事例発生月									
VP1	RdRp	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月
GII.2	GII.P16	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3
GII.4_2012	GII.Pe	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
GII.17	GII.P17	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-

B. 感染症・その他

検出遺伝子型		事例発生月									
VP1	RdRp	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月
GII.2	GII.P2	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-
	GII.P16	-	-	-	-	-	-	-	12	2	2
GII.4_2012	GII.Pe	1	4	2 ^{※1}	-	-	-	1	2	1	1
	GII.P16	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
GII.6	GII.P7	-	-	-	-	-	-	-	6 ^{※2}	1	-
GII.17	GII.P17	2	-	-	-	-	-	1	3	-	-

※1 このうち1事例は、1検体から GII.P2_GII.2 検出

※2 このうち1事例は、1検体から GII.P16_GII.2 検出

表3 原因または発生施設別にみた NoV 検出状況

検出遺伝子型		2016年4月～8月					2016年9月～2017年1月				
		食中毒	感染症・その他				食中毒	感染症・その他			
RdRp	保育所 幼稚園		小学校	病院 高齢者施設	その他	保育所 幼稚園		小学校	病院 高齢者施設	その他	
GII.2	GII.P2	-	1	-	-	2	-	-	-	-	-
	GII.P16	-	-	-	-	-	4	11	2	1	2
GII.4_2012	GII.Pe	-	5 ^{※1}	-	2	-	1	3	-	1	1
	GII.P16	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
GII.6	GII.P7	-	-	-	-	-	-	4 ^{※2}	-	-	3
GII.17	GII.P17	-	-	-	2	-	2	-	1	1	2

※1 このうち1事例は、1検体から GII.P2_GII.2 検出

※2 このうち1事例は、1検体から GII.P16_GII.2 検出

図1 調理従事者と患者から検出されたNoVの塩基配列の比較

