

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

青森県における集団胃腸炎事例から検出されたノロウイルスの
分子疫学解析 (2013/14～2015/16 シーズン)

研究協力者	筒井 理華	青森県環境保健センター
研究協力者	坂 恭平	青森県環境保健センター
研究協力者	菩提寺 誉子	青森県環境保健センター
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～2016 年 8 月 (2013/14～2015/16 シーズン) までに青森県内 (青森市を除く) で発生した集団胃腸炎事例のうち、ノロウイルスが検出された 49 事例の遺伝子解析を行った。調理従事者が関与した食中毒事例は 6 事例であり、そのうち 5 事例 (事例番号 23 を除く) の発症者便と調理従事者便等の塩基配列の相同性は 100%であった。事例番号 23 は、塩基配列が 1 塩基異なる検体が見られたが、アミノ酸置換が見られなかったことや系統樹解析の結果から遺伝学的な変異は見られなかったと推測された。

A. 研究目的

ノロウイルス (Norovirus、以下 NoV) は、冬季の胃腸炎や食中毒の原因ウイルスの 1 つとして知られている。過去のノロウイルス食中毒の調査結果から、ウイルスに感染した調理従事者等を介して食品が汚染されたことが原因となっているケースが多いが、食品から直接ウイルスを検出することは難しいため、食中毒事例のうち約 70%で原因食品が特定できていない¹⁾。

調理従事者の関与が疑われる事例において、発症者と調理従事者等から同一の病原体を検出することは、食中毒と断定するための有力な根拠となる¹⁾。一方、発

症者と調理従事者等から検出された NoV のシーケンス解析の結果、シーケンサーによる塩基配列の読み違いあるいはウイルスの変異により 1 ヲ所の塩基に 2 種類の塩基のピークが見えたり、塩基配列に変異が認められる場合がある。

今回、2013/14～2015/16 シーズンに青森県内 (青森市を除く) で発生した NoV による集団胃腸炎事例について、分子疫学的に検討したので報告する。

B. 研究方法

1. 材料

2013/14～2015/16 シーズンに青森県内 (青森市を除く) で発生した NoV による

集団胃腸炎事例 49 事例のうち青森県環境保健センターが検査した 1,377 検体（糞便 798、吐物 7、拭き取り 393、食品 179）を用いた（表 1）。感染地が県外であると推定される事例は除いた。

2. ウイルス RNA の抽出・cDNA 合成・NoV 遺伝子の検出（リアルタイム PCR および nested PCR）

「ノロウイルスの検出法について」（平成 15 年 11 月 5 日付食安監発第 1105001 号）に準じて行った。

3. 遺伝子解析

Nested PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit で精製し、BigDye Terminator Kit (ABI PRISM) で BigDye 反応後、DNA ダイレクトシークエンサー ABI PRISM310 (Applied Biosystems) または Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて遺伝子解析を行った。DNA ダイレクトシークエンス解析法により NoV Capsid 領域の塩基配列を決定し (GI : 260nt、GII : 279nt)、得られた塩基配列を塩基配列解析ソフトウェア Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version6²⁾ を用い、Kimura 2-parameter model を用いた ML (Maximum-Likelihood) 法で系統樹を作成した。系統樹の信頼性の評価には bootstrap 法 (反復回数 1000) を用いた。標準株は文献³⁾に記載の株を使用した。

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

2013/14～2015/16 シーズンに発生し、

NoV が検出された集団胃腸炎事例の概要を表 1 に示した。全 49 事例中食中毒として行政的に断定された事例は、表 1 に黄色およびオレンジ色で示した 14 事例であった（事例番号 2、3、5、7、14、17、21、23、25、28、29、34、40、46）。食中毒と断定された 14 事例のうち調理従事者が関与した事例は、表 1 にオレンジ色で示した 6 事例であった（事例番号 2、7、17、23、28、29）。

調理従事者が関与した 6 事例は、発症者、非発症者及び調理従事者等便（陽性数/検体数：104/163 検体）、吐物（1/5 検体）、拭取り（5/60 検体）から NoV 遺伝子が検出されたが、食品（0/7 検体）からは検出されなかった。

調理従事者が関与した 6 事例について、NoV 陽性検体の遺伝子解析を行ったところ、発症者便・発症者吐物・調理従事者等便 94 検体、拭取り 5 検体について NoV 遺伝子型を同定することができた（表 1）。遺伝子群別では、6 事例全てが GII であった。この 6 事例の NoV の ML 法による系統樹を図 1 に示した。事例の配列名には各事例内で遺伝子配列が同じである検体数を記載した。備考として発症者便、発症者吐物、調理従事者、拭取りの検出数を記載した。

系統樹解析の結果、NoV GII. 4 は 4 事例（事例番号 2 の一部、7、17、29）で、全て GII. 4 Sydney/2012 と同じクラスターに分類された（図 1）。また、NoV GII. 13 は 1 事例（事例番号 28 の一部）、NoV GII. 17 は 3 事例（事例番号 2 の一部、23、28 の一部）であった。

これら 6 事例から検出された NoV の塩

塩基配列を事例ごとに比較した（解析塩基 279nt）。事例番号 2 では NoV GII. 4（27 検体）と GII. 17（1 検体）が検出され、発症者便（21 検体）、調理従事者便（2 検体）および拭取り（4 検体）から検出された NoV GII. 4 の塩基配列は 100%一致した。事例番号 7 では発症者便（18 検体）、発症者吐物（1 検体）、調理従事者便（1 検体）および拭取り（1 検体）から NoV GII. 4（21 検体）が検出され、それらの塩基配列は 100%一致した。事例番号 17 では発症者便（4 検体）および調理従事者便（2 検体）から NoV GII. 4（6 検体）が検出され、それらの塩基配列は 100%一致した。事例番号 23 では NoV GII. 17（18 検体）が検出され、その塩基配列は 2 つ、すなわち、①発症者便（14 検体）および調理従事者便（2 検体）、②発症者便（2 検体）に分けられた。①の 138 番目の塩基配列（aa138）はシトシン（C）、②の aa138 はチミン（T）で、①と②は 1 塩基異なり相同性は 99.6%であった。①と②にアミノ酸置換は見られなかった。事例番号 28 では NoV GII. 13（15 検体）と GII. 17（1 検体）が検出され、発症者便（13 検体）および調理従事者便（2 検体）から検出された NoV GII. 13 の塩基配列は 100%一致した。事例番号 29 では、発症者便（7 検体）および調理従事者便（3 検体）から NoV GII. 4（10 検体）が検出され、それらの塩基配列は 100%一致した。

一方、異なる事例から検出された NoV の塩基配列を比較すると、事例番号 2、7、17、29 から NoV GII. 4/sydney/2012 株に属する株が検出されたが、事例番号 2、7、17 に由来する株の塩基配列は一致し、事

例番号 29 に由来する株とは 3 塩基異なった。

D. 考察

2013/14～2015/16 シーズンに発生した NoV が検出された集団胃腸炎事例は 49 事例あり、そのうち食中毒と断定された事例は 14 事例であった。そのうち、調理従事者が関与した食中毒事例は 6 事例であった。

事例番号 2、7、17、28、29 は、遺伝子解析の結果、それぞれの事例において、検出された同じ遺伝子型の NoV の塩基配列は全て一致したため、食中毒と断定するための有力な根拠であったと推察された。

事例番号 23 は NoV の遺伝子解析ができた全ての株が NoV GII. 17 と型別されたが、塩基配列が 1 ヶ所異なる 2 種類（①、②；aa138 : C ⇔ T）の塩基配列が見られた。①の発症者便 14 検体と調理従事者便 2 検体の塩基配列（279nt）は完全に一致し、②の発症者便 2 検体の塩基配列（279nt）は完全に一致した。①でシークエンスによって得られた波形データを解析したところ、①では主として C が検出され、若干ではあるが T が含まれていた検体が見られた。一方、②では主として T が検出され、1 検体は若干ではあるが C が含まれていた。他の 1 検体は T と C が同程度の波形が見られた。2 種類の波形が見られた数検体は、シークエンサーが塩基配列の読み違いを起こす程度の塩基のピークは見られず、塩基配列は 1 ヶ所異なっていたが、アミノ酸置換が見られなかったことや系統樹解析の結果から遺伝学的な変

異は見られなかったと推測された。②の1検体の結果からシーケンサーが塩基配列の読み違いを起こす可能性が示唆された。

今回は同一事例内で異なる塩基配列が検出されたのは1事例のみであったが、シーケンサーが塩基配列の読み違いを起こす場合や遺伝学的な変異が発生する場合など、塩基配列が1塩基異なる可能性があるため、今後も引き続きデータを蓄積し、解析する必要がある。

E. 結論

1. 食中毒事例49事例中、調理従事者が関与した食中毒事例は6事例であった。
2. 5事例（事例番号23を除く）の発症者便と調理従事者便等の塩基配列の相同性は100%であった。
3. 事例番号23は、塩基配列が1塩基異なる検体が見られた。

F. 文献

- 1) 国立感染症研究所感染症疫学センター：ノロウイルス等検出状況。
(<http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr-noro.html>)
- 2) Tamura, K., Stecher, G., Peterson,

D., Filipowski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30, 2725-2729.

- 3) 片山和彦：ノロウイルス（ノロウイルス）の遺伝子型（2015年改訂版）。病原微生物検出情報,
(<http://www.nih.go.jp/niid/ja/norovirus-m/norovirus-iasrs/5913-pr4274.html>)

G. 健康危害情報

なし

H. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

J. 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 青森県内(青森市を除く)で発生した NoV による集団胃腸炎事例
(2013/14~2015/16 シーズン)

シーズン	事例No.	施設分類	発生日	検出病原体	遺伝子型	ふん便		吐物		拭き取り		食品		
						陽性数	検査数	陽性数	検査数	陽性数	検査数	陽性数	検査数	
2013/14	H25													
	1	ツアー旅行	H25.9.6	NoVGII	GII.4	1	2							
	2	宿泊施設	H25.12.15	NoVGII	GII.4 (発症者22名のうち解析に用いたのは21名、調理従事者2名、拭取り4)、GII.17 (調理従事者1名)	25	53			4	17			
	3	小学校	H25.12.8	NoVGII	GII.4	16	22			0	16	0	7	
	4	飲食店	H25.12.20	NoVGII	GII.4 (発症者2名、調理従事者1名)	3	5			0	8			
	5	飲食店	H25.12.20	NoVGI・NoVGII	G1解析不能(発症者3名)、GI.13(発症者2名)、GII解析不能(発症者3名、従業員1名)、GII.4(発症者4名)、GII.8(発症者3名)、GII.17(発症者5名)、GII.13(発症者2名)、G1解析不能・GII.8(発症者1名)	24	38			0	11	0	3	
	6	飲食店	H25.12.29	NoVGII	GII.4	6	11			1	9			
	7	飲食店	H26.1.15	NoVGII	GII.4 (発症者25名のうち解析に用いたのは18名、発症者吐物1名、調理従事者1名、拭取り1)	26	32	1	5	1	13			
	8	宿泊施設	H26.1.29	NoVGII	GII.4	1	9			1	12			
	9	保育所	H26.1.25	NoVGII	GII.4 (先生1名、園児2名)、GII.6 (園児6名)	9	13			0	10	0	12	
	10	家庭	H26.1.23	NoVGII	GII.4	4	7			0	11			
	11	保育所	H26.2.21	NoVGII	GII.2	4	7			0	4	0	13	
12	小学校	H26.3.6	NoVGII	GII.6	5	5								
2014/15	H26													
	13	老人福祉施設	H26.4.12	NoVGII	GII.4	6	11			0	8			
	14	飲食店	H26.4.12	NoVGI	GII.4、大腸菌	1	27							
	15	老人福祉施設	H26.5.10	NoVGII	GII.4	2	2							
	16	宿泊施設	H26.5.16	NoVGI	GII.2	1	31			0	4	0	7	
	17	給食施設	H26.5.15	NoVGII	GII.4 (発症者4名、調理従事者2名)、GII解析不能(発症者1名)	7	13			0	5	0	7	
	18	披露宴	H26.5.28	NoVGII	GII.6	17	31			1	41	0	1	
	19	家庭	H26.6.19	NoVGI	GII.4	4	4							
	20	飲食店	H26.9.17	NoVGI	GII.7	1	10							
	21	飲食店	H26.12.8	NoVGII	GII.17	3	9			0	8			
	22	仕出し店	H26.12.21	NoVGII	GII.4(調理従事者1名)、GII.17(発症者5名)	6	35			0	14	0	2	
	23	飲食店	H26.12.31	NoVGII	GII.17(発症者16名、調理従事者4名のうち解析に用いたのは2名)	20	24			0	13			
24	老人福祉施設	H27.1.6	NoVGII	GII.4	1	2								
25	飲食店	H27.1.11	NoVGII	GII.17	17	28			0	19				
26	老人福祉施設	H27.1.27	NoVGII	GII.4	5	10			0	9				
27	高校	H27.2.9	NoVGII	GII.4	4	5								
28	高校	H27.2.9	NoVGII	GII.13(発症者13名、調理従事者2名)、GII.17(調理従事者1名)	16	30			0	6				
29	老人福祉施設	H27.2.12	NoVGII	GII.4(発症者7名、調理従事者3名)	10	11			0	6				
30	宿泊施設	H27.3.12	NoVGII	GII.17、GII.13	3	12			1	23				
31	飲食店	H27.3.12	NoVGII	GII.17、GII.13	3	25								
2015/16	H27													
	32	老人福祉施設	H27.5.1	NoVGII	GII.17	4	4							
	33	飲食店?	H27.6.3	NoVGI	GII.3	7	8							
	34	保育園	H27.10.17	NoVGII	GII.3	10	13			0	3	0	24	
	35	老人福祉施設	H27.12.14	NoVGII	GII.3	1	1	0	1	0	4			
	36	宿泊施設	H27.12.18	NoVGII	GII.3	10	32			0	5	0	4	
	37	保育園	H28.1.19	NoVGII	GII.4(発症者7名、調理従事者1名)	8	11			0	5	0	12	
	38	葬儀会社	H28.2.1	NoVGII	GII.3	5	28	0	1	0	10	0	2	
	39	飲食店	H28.1.31	NoVGI・NoVGII	GII.7、GII.17	1	3			0	15	0	2	
	40	飲食店	H28.2.6	NoVGII	GII.4	7	8			0	11			
	41	幼稚園	H28.2.16	NoVGII	GII.17(発症者11名、調理従事者1名)	12	16			0	14	0	8	
	42	飲食店	H28.2.19	NoVGII	GII.17	1	1						1	
43	老人福祉施設	H28.2.16	NoVGII	GII.17	2	15			0	8	0	9		
44	老人福祉施設	H28.2.21	NoVGII	GII.17(発症者5名、調理従事者2名)	7	23			0	10	0	33		
45	老人福祉施設	H28.3.7	NoVGII	GII.17	3	5			0	8	0	9		
46	飲食店	H28.3.19	NoVGII	GII.17	23	43			0	5	0	1		
H28														
47	障害者支援施設	H28.4.12	NoVGII	GII.17	5	18			0	9	0	3		
48	馬肉販売店	H28.4.26	NoVGII	GII.17	4	9								
49	自衛隊施設	H28.7.2	NoVGII	GII.3、GII.17	6	36			0	19	0	19		
検体合計						367	798	1	7	9	393	0	179	
調理従事者が関与した食中毒6事例の検体数						104	163	1	5	5	60	0	7	

表中の ■ は食中毒事例を、■ は調理従事者が関与した食中毒事例を示す。

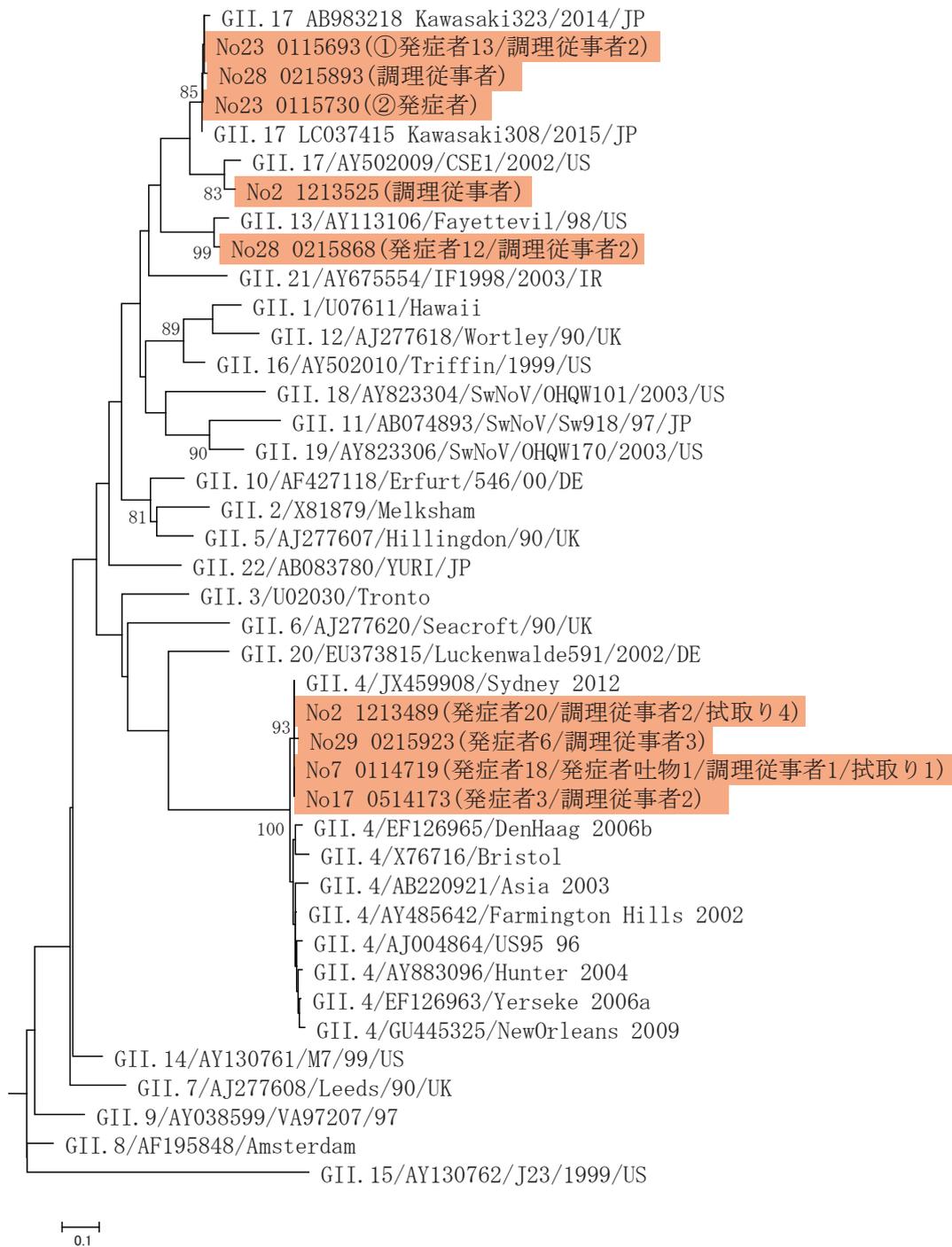


図 1 2013/14 ～2015/16 シーズン集団胃腸炎事例のうち調理従事者が関与した食中毒事例から検出された NoVG II の系統樹(279nt)

配列名:表 1 の事例番号。 は調理従事者が関与した食中毒事例を示す。