

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

食中毒及び感染症事例で検出されたノロウイルスの分子疫学解析

研究協力者	清水 智美	川崎市健康安全研究所
研究協力者	清水 英明	川崎市健康安全研究所
研究分担者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

ノロウイルス食中毒予防の基礎資料とするために、2014 年 9 月から 2017 年 1 月の期間に行政検査依頼により搬入された糞便検体から検出されたノロウイルスについて、流行状況を把握し、検出された遺伝子型の推移を調査した。

2014/15 シーズンでは GII. 4 による事例が最も多く 23 事例発生した。次いで GII. 17 (16 事例)、GI. 2 (8 事例) の順で事例数が多かった。2015/16 シーズンには、GII. 17 (14 事例) が流行の主流となり、GII. 4 (11 事例) を上回った。2016/17 シーズンは現在のところ、GII. 2 が 13 事例と、大きな流行により大半を占め、1 事例のみ GII. 17 が発生した。

GII. 4 は数年おきに亜型が出現することが知られているが、検出事例が減少傾向にあることや、Sydney2012 株が未だに検出され続けていること、ここ数年 Capsid N/S 領域におけるアミノ酸配列に変異がみられないことを考えると、近いうちに新たな亜型が出現する可能性もある。また、GII. 17 は変異株の出現によって大きな流行を引き起こしたが、2016/17 シーズンは現在のところ検出事例が少ない。しかしながら、GII. 17 はここ 2 シーズン連続して年明けに事例数のピークを迎える傾向があり、引き続き注視する必要がある。

ノロウイルスはシーズンごとに流行する遺伝子型が異なるため、今後も GII. 4 や GII. 17、GII. 2 など近年流行の主流となっている遺伝子型の発生状況について、注意深く監視することが重要である。

A. 研究目的

ノロウイルスによる食中毒は主に冬季に発生し、全国での食中毒事件事数は全細菌性食中毒と比べると少ないものの、1 事例あたりの患者数が多く、ほぼ毎年ノロウイルスが日本における食中毒の患者

数の最上位を占めている。また、ノロウイルスは冬季の感染性胃腸炎の主要な原因ウイルスであり、小児から高齢者まで幅広い年齢層に感染し、保育園・高齢者福祉施設において集団感染が多くみられる。流行する遺伝子型が年によって変動

するうえ、最近では GII. 17 変異株が新たに検出されている。ノロウイルスによる食中毒はこれらの感染症としての流行を背景として発生することから、本ウイルスの流行状況や遺伝子型を分析することは、予防対策上重要である。そこで今回、2014/15 シーズン、2015/16 シーズン及び 2016/17 シーズン（9 月から 1 月まで）のノロウイルス遺伝子型検出状況を把握し、検出される遺伝子型の特徴について調査した。

B. 研究方法

1. 材料

2014 年 9 月から 2017 年 1 月の期間に、食中毒事例及び保育園等における集団発生事例（感染症事例）でノロウイルス検査の行政依頼を受けて当所に搬入された糞便等を検査材料とした。

なお、後述する C. 研究結果の 2. 及び 3. については、倫理面に配慮し、検査検体の調査研究事業に関する同意を得られた 130 検体 60 事例のみを用いた。

2. ノロウイルスの遺伝子型同定

糞便を PBS(-) で 10% 乳剤としたのち、10,000rpm 10 分間遠心した上清を RNA 抽出用検体とした。QIAamp Viral RNA mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出した RNA は、DNase 処理、逆転写反応を行ったのち、Capsid N/S 領域についてコンベンショナル PCR を実施し、陽性であったものについてダイレクトシーケンスを行い、解読した塩基配列を Norovirus Genotyping Tool Version 1.0 (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>) を用いて遺伝子型を同定した。

3. 検出されたノロウイルス (GII) の系統樹解析

2. の方法で解読した塩基配列を、MEGA5 を用いてアミノ酸に置換し、代表株及びデータベースから得られた標準株を使用して、最尤法によって系統樹を作成した。

(倫理面への配慮)

本研究の実施については、当所倫理審査委員会にて承認済みである（28 川健安研第 1411 号）。

C. 研究結果

1. ノロウイルス検出状況

川崎市においてノロウイルス検出事例は、2014 年 9 月から 2017 年 1 月までに 106 事例発生しており、そのうち最も多かったのは GII. 4 による事例であった。次いで GII. 17 による事例が多く、この 2 種類の遺伝子型による事例が半数以上を占めた（図 1）。

シーズン別にみると、2014/15 シーズンでは GII. 4 が 23 事例と最も多く、次いで GII. 17（16 事例）、GI. 2（8 事例）の順で多かった。2015/16 シーズンでは GII. 17（14 事例）が GII. 4（11 事例）を上回り、次いで GII. 3（4 事例）が多かった。2016/17 シーズンは、2016 年 9 月から 2017 年 1 月までの 5 ヶ月間のみであるが、GII. 2 が 13 事例と大半を占めており、1 事例のみ GII. 17 が検出された（図 2）。

月別に検出状況をみると、GII. 4 は 12 月や 1 月に検出事例数のピークがくることが多く、GII. 17 は年明けから事例が増加し、2 月や 3 月にピークを迎えており、GII. 17 が GII. 4 を追うように流行する傾

向が2シーズン連続してみられた(図3)。

2. 食中毒事例と感染症事例の比較

食品を介して発生する食中毒事例と、主にヒト-ヒト感染によって引き起こされる感染症事例について、感染経路の違いによって検出される遺伝子型に特徴がないか、比較を行った(図4)。

食中毒事例では、GII.17(19事例)とGII.4(14事例)の2つの遺伝子型が3分の2を占めており、全体の検出状況と同様の傾向がみられた。一方、保育園や幼稚園、小学校等の低年齢層での集団発生事例では、流行のみられたGII.4及びGII.17だけではなくGII.3等、多様な遺伝子型が検出された。

3. 系統樹解析

検出されたノロウイルスGIIについてアミノ酸の系統樹解析を行った(図5)。塩基配列の異なる株でも、アミノ酸に置換すると100%相同性が一致する株が多かった。GII.17については2014/15シーズン以降に検出された株は全てkawasaki323株またはkawasaki308株と同一クラスターに属した。

D. 考察

2014/15シーズンに最も事例数の多かったGII.4は、2015/16シーズンではGII.17の事例数を下回った。2016/17シーズンでは現在のところ1事例も検出されていないことから、GII.4に対する免疫を多くの人々が獲得したため、流行が抑えられている可能性が考えられる。現在までに検出されている株のCapsid N/S領域をみると、アミノ酸の変異がみられないことから、大きな変異は起こっていない

と考えられるが、GII.4は数年おきに亜型が出現し、大きな流行を引き起こすことが知られており、今後も注視していく必要がある。

2014/15シーズンから流行がみられたGII.17変異株は、Capsid N/S領域のみでも既知のGII.17から大きく変異していることがわかり、このように抗原性を変えたことで人々の免疫を回避し、流行に繋がったことが示唆された。また、2シーズン続けてGII.4の流行が収まった年明け頃からGII.17の事例数が増加していることから、GII.4と何らかの干渉作用が起こっている可能性が考えられるが、原因については解明されておらず、Capsid全長やRNA依存性RNAポリメラーゼ(RdRp)領域等、より詳細な解析が必要である。

感染経路による検出遺伝子型の比較では、食中毒事例においては検出される遺伝子型に偏りがあり、獲得免疫によって感染が抑制されていることが示唆された。一方で、保育園等における集団発生事例では、多様な遺伝子型が検出された。低年齢層においては獲得免疫が不十分であるため、流行遺伝子型に関わらず感染し、集団の中で蔓延したことが推測される。

2016/17シーズンでは、GII.2の大きな流行があり、川崎市においてはGII.4は検出されておらず、GII.17も1事例のみとなっている。GII.17については2シーズンと同様に、2月に事例数が増加する可能性もあるため、今後の動向を注意深く監視することが重要である。

E. 結論

2014年9月から2017年1月にかけて川

崎市におけるノロウイルスの流行状況を調査したところ、GII. 4、GII. 17 及びGII. 2 が近年の主流となっていることがわかった。

GII. 4 は数年おきに亜型が出現することが知られているが、近年大きな変異はみられていない。また、GII. 17 変異株は年明けから検出事例数のピークを迎える傾向がみられ、今シーズンも同様にこれから増加する可能性があるため、今後も流行状況を注視していくことが重要である。

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

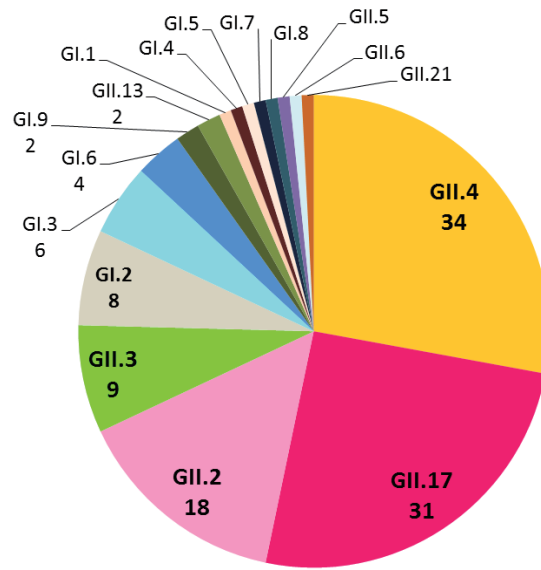


図1 検出遺伝子型別事例数 (2014.9～2017.1)

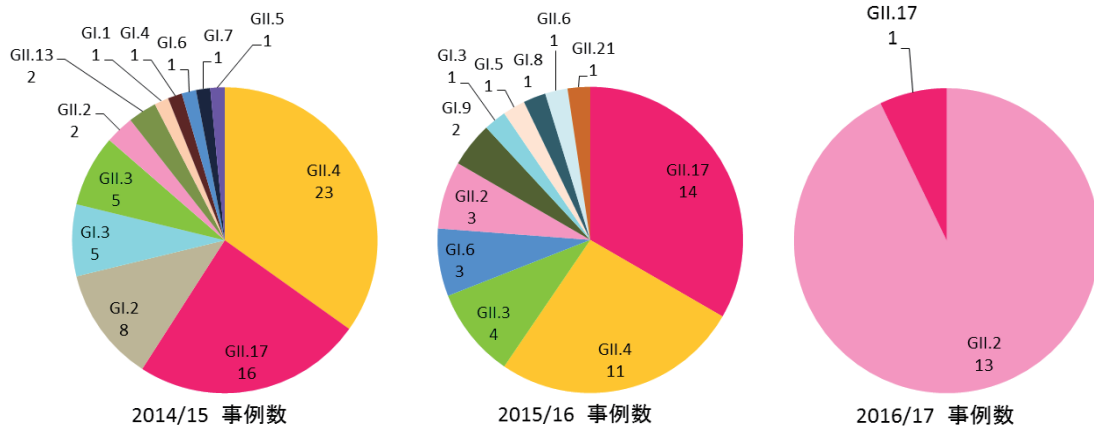


図2 シーズン別検出遺伝子型別事例数

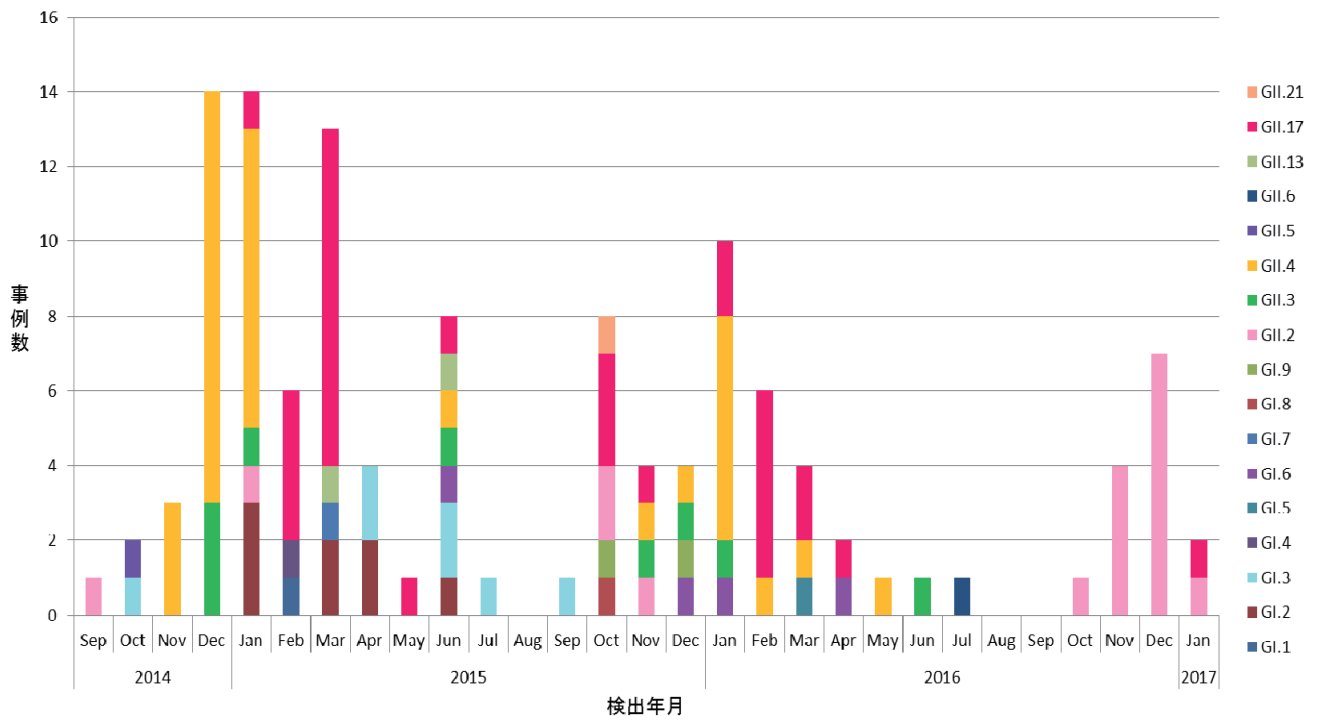


図3 月別検出遺伝子型別事例数

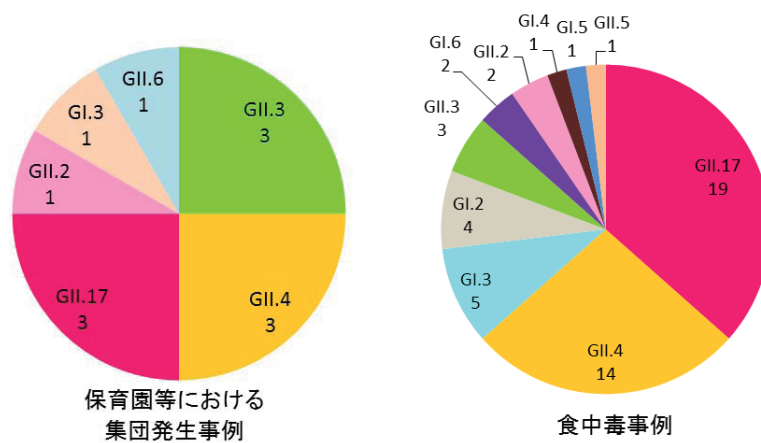


図4 感染経路別遺伝子型別事例数 (2014.9~2017.1)

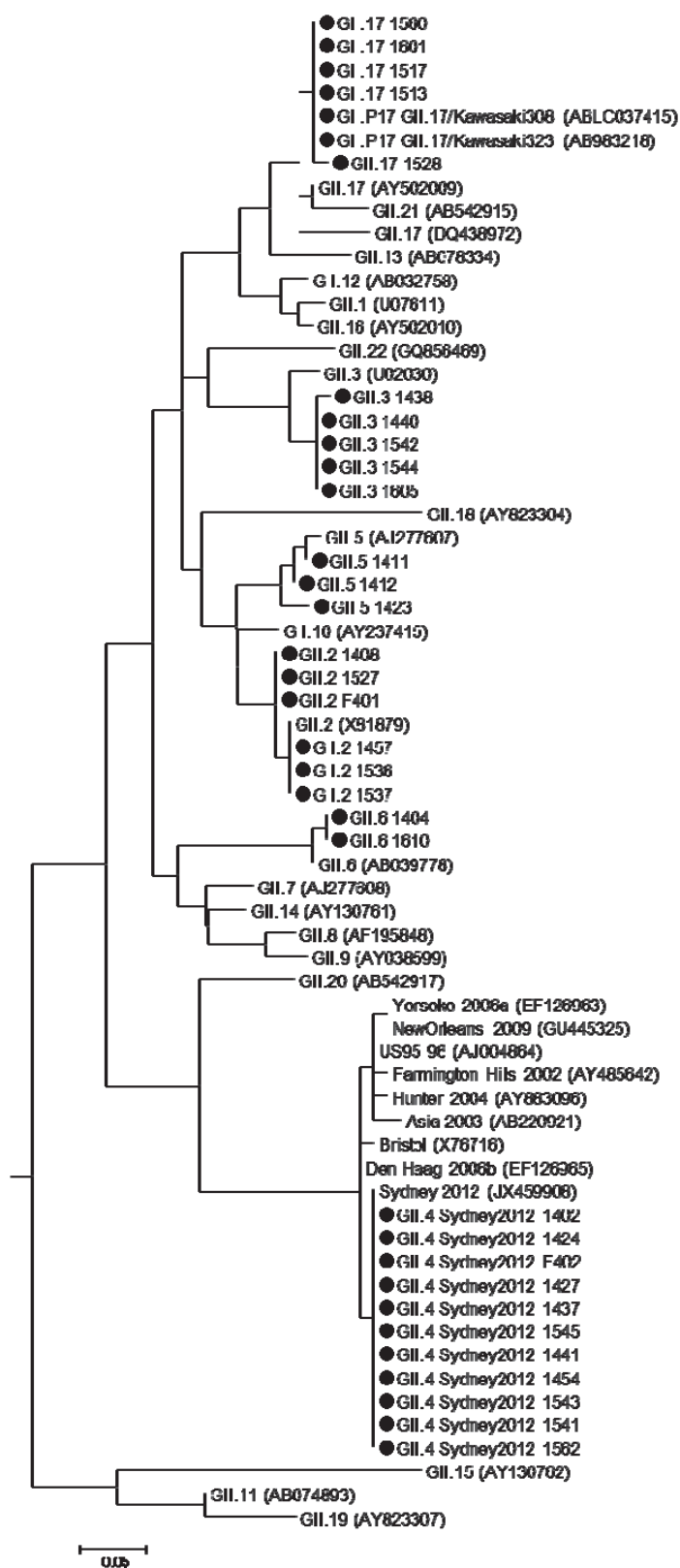


図5 ノロウイルス GII Capsid N/S 領域 (アミノ酸) の系統樹