

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

調理従事者および患者から検出されたノロウイルスの遺伝子解析、
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
および生食用カキのノロウイルス汚染調査

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	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	山元 誠司	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

調理従事者からノロウイルス (NoV) が検出された食中毒を対象に、調理従事者と患者に由来する NoV の遺伝子解析を実施したところ、すべての事例において両者由来 NoV の遺伝子型、塩基配列が一致した。特に食中毒か否かの判断が困難な NoV 集団事例において、調理従事者由来 NoV の遺伝子解析はその判断を行う際の科学的根拠として有用であった。

大阪市で発生した 2 事例の集団胃腸炎事例から、これまで報告のないキメラウイルス GII. P16-GII. 4 Sydney_2012 が確認された。今のところ、その発生は 2 事例のみであり、胃腸炎発生数に影響していないものと考えられた。また、2016 年 11 月および 12 月に大阪市内の保育園や小学校において NoV GII. 2 事例が多発した。

2016 年 12 月に購入した市販の生食用カキに NoV 汚染 (33. 3%) が認められ、その遺伝子型は同時期にヒトで全国的な流行が認められた GII. 2 であった。

A. 研究目的

ノロウイルス (NoV) 食中毒の中で、調理従事者から食品等への二次汚染が原因であることは多い。今回、感染経路究明における調理従事者由来ウイルス遺伝子解析の有用性について検討した。

また、ヒトの NoV 流行状況や食品中の NoV 汚染状況を把握することは NoV による胃腸炎の流行予測や食中毒や集団感染の予防対策に重要である。本研究では NoV 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

患者糞便および市販生食用カキについて NoV の検索および遺伝子型別を行った。

B. 研究方法

1. 材料

1) 調理従事者由来 NoV の遺伝子解析

患者便および原因施設調理従事者から NoV が検出された食中毒 16 事例を対象とした。

2) 胃腸炎事例から検出された NoV の分子疫学的解析

2016 年 1 月および 3 月に発生した集団胃腸炎 2 事例から検出された NoV GII.4 株 (OH16002、OC16023)、および 2016 年 4 ~12 月に当研究所へ検査依頼のあった集団胃腸炎 132 事例を対象とした。

3) 生食用カキの NoV 汚染調査

2016 年 12 月に市販されていた 3 ロットを NoV の検索に用いた。3 ロットはそれぞれ異なる県・海域から採取されたものであった。

2. 患者糞便材料からの NoV 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) を用いて合成した。NoV 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 NoV 検出

生カキは 1 ロットにつき、カキ 3 個を

まとめて検査した。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 (Wako) /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 を用いて合成した。NoV の検出は糞便と同じ方法で行った。

4. NoV の遺伝子型別

NoV 陽性検体は Capsid N/S 領域遺伝子を増幅し、塩基配列を決定した。2016 年 1 月および 3 月に発生した 2 事例から検出された NoV GII.4 株は RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) 領域を増幅し (JCM 46, 2406-9, 2008)、塩基配列を決定した。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。

(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. 調理従事者由来 NoV の遺伝子解析

16 事例それぞれについて調理従事者および患者由来 NoV の遺伝子型および塩基配列を比較したところ、同一事例の両者はすべて一致した (表)。

2. GII.4 株の遺伝子解析

Capsid N/S 領域で Norovirus Genotyping Tool による GII.4 亜型の分類を行ったところ、OH16002 株は GII.4 亜型不明、OC16023 株は GII.4 Sydney_2012 であった。近隣接合法による分子系統樹解析では 2 株ともこれまで報告されていた Sydney_2012 とは少し異なる遺伝的グループを形成した (図 1)。RdRp 領域は 2 株ともに GII.P16 に分類された (図 2)。両株の塩基配列を比較したところ、互いに非常に近縁であった (塩基配列相同性 RdRp 領域 720 塩基において 98.9%、Capsid N/S 領域 282 塩基において 98.9%)。

3. NoV 胃腸炎事例の発生状況

113 事例 (85.6%) から NoV が検出され、ヒトからヒトへ感染が拡がった事例 (PP 事例) は 92 事例、食中毒疑事例は 21 事例であった。PP 事例のうち、77 事例 (83.7%) が 11 月および 12 月に集中して発生していた (図 3A)。主な原因施設は保育園 (75.0%、69/92 事例) および小学校 (22.8%、21/92 事例) であった。食中毒疑事例は 12 月にもっとも多く発生してい

た (10 事例) (図 3B)。カキの喫食が関連していたのは 12 月に発生した 1 事例のみであった。

胃腸炎事例から検出された NoV の中で遺伝子型別できたものは、8 種類 (GI : 2 種類、GII : 6 種類) であった。最も多く検出されたのは 79 事例 (69.9%) から検出された GII.2 であり、次いで GII.6 (10 事例、8.8%) であった。

NoV GII.2 が検出された事例は 10~12 月に発生し、11 月および 12 月に集中していた (図 3A, 3B)。GII.2 事例の中で、PP 事例が 71 事例 (89.9%) であり、ほとんどが保育園と小学校での発生であった。

NoV GII.4 が検出された事例は 7 事例と少なかった。GII.4 の亜型はすべて Sydney_2012 であった。

4. 生食用カキの NoV 汚染状況

1 ロットから NoV GII.2 が検出され、中腸腺 1g あたりの NoV 汚染量 (NoV RNA コピー数) は 31 コピーであった。

D. 考察

病原体や感染経路の特定は、食中毒の判断を行う上で非常に重要な根拠となる。また、調理従事者からの汚染が原因として疑われる場合、調理従事者と患者から検出された病原体の遺伝子型等が一致することは有力な判断材料になる。今回、解析したすべての事例において調理従事者と患者の両者由来 NoV の遺伝子型、塩基配列が一致していたことは調理従事者からの二次汚染が原因であったことを強く示唆している。特に事例番号 15 (表) については、患者グループ内に喫食時に

胃腸炎症状を呈していたヒトが存在したため判断が困難であった事例であり、実際に調理従事者由来 NoV の遺伝子解析結果が有力な判断材料になった。しかし、患者等からの検出検査を実施している中で、遺伝子解析を並行して行うことには作業場所、人員、コンタミネーション、コスト等の多くの課題があるため容易ではない。事例ごとに状況を考慮して遺伝子解析実施を判断する必要があると考えられた。

近年では NoV の遺伝子型の一つである GII.4 が主に流行しており、GII.4 の新しい亜型の出現が周期的な大流行をもたらしている。最近の GII.4 亜型出現は 2012 年の Sydney_2012 である。現在、GII.4 Sydney_2012 には 2 種類 (GII.Pe および GII.P4) の RdRp 領域遺伝子型が確認されている。今回、2 事例から確認された NoV GII.P16-GII.4 Sydney_2012 はこれまで報告例がなく、GenBank においても同キメラウイルス遺伝子の登録を確認することができなかった。また、GII.P16 には多様な Capsid 領域の遺伝子型との組み合わせがあり、GII.4 では NoV GII.P16-GII.4 NewOrleans_2009 が GenBank に登録されている。NoV 事例の発生状況と検出された NoV の遺伝子解析結果から、本キメラウイルスは子どもから成人までの幅広い年齢層に感染を起こしていたが、今のところ 2 事例からの検出のみであり、胃腸炎の発生数に影響していないと考えられた。GII.4 亜型の主流である Sydney_2012 は出現から約 5 年が経過しており、新たな亜型の出現が危惧されている。今回認められたキメラウイルスも NoV GII.4 の変

化の一つであり、本株を含めて GII.4 亜型の変化や動向を注意深く監視していく必要がある。

2016-2017 シーズンは大阪府の感染性胃腸炎の定点あたり患者報告数が第 50 週でピーク (21.2) になり、大阪府では 10 年ぶりに警報レベル開始基準値 20 を超え、過去 10 年間で最も多くなった。大阪市内での集団事例の発生状況も同様に 11 月と 12 月に集中しており、主に NoV GII.2 が検出された。集団事例の発生施設のほとんどが保育園や小学校であったことから、NoV GII.2 は主に低年齢層においてヒトからヒトへ直接感染が拡大したものと推測された。他の地域においても同様の状況が報告 (IASR 2017, vol. 38, 17-20) されており、NoV GII.2 は全国的に流行していたと考えられた。NoV GII.2 の流行原因については今のところ不明であり、今後遺伝子変異等の要因について詳細に解析する予定である。

NoV 食中毒の原因食品のひとつである生カキ中の NoV 汚染状況を監視することは NoV 感染リスクを評価する上で重要であり、ヒトにおける NoV 流行予測にもつながる可能性がある。今回は 1 つの県・海域で採取された生食用カキから NoV GII.2 が検出された。全国的に同時期に NoV GII.2 が流行していた時期でもあり、ヒトで流行していた NoV が反映されたものと考えられた。

E. 結論

1. 判断困難な NoV 食中毒において、調理従事者由来 NoV の遺伝子解析は非常に有用であった。

2. 大阪市で発生した2事例の集団胃腸炎事例から、これまで報告のないキメラウイルス GII.P16-GII.4 Sydney_2012 が確認された。

3. 2016年11月および12月に大阪市内の保育園や小学校において NoV GII.2 事例が多発した。

4. 12月市販の生食用カキに NoV 汚染(33.3%)が認められ、その遺伝子型は同時期にヒトで全国的な流行が認められた GII.2 であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 入谷展弘, 上林大起, 改田 厚, 阿部仁一郎, 中村寛海, 山元誠司, 久保英幸, 小笠原 準, 伯井紀隆, 森 宏美, 坂本徳裕, 廣川秀徹, 松本健二, 吉村高尚, 土見日出夫, 喜多直哉, 伊藤大樹, 野田 衛: 集団胃腸炎事例からのノロウイルス GII.P16-GII.4 Sydney_2012 の検出—大阪市, 病原微生物検出情報 月報 37(No. 437), 18-20 (2016)

2) 山元誠司, 上林大起, 改田 厚, 久保英幸, 入谷展弘, 小笠原 準, 伯井紀隆, 森 宏美, 藤森良子, 廣川秀徹, 松本健二, 吉村高尚: G2型のA群ロタウイ

ルスによる感染性胃腸炎集団事例, 2016年—大阪市, 病原微生物検出情報 月報 37(No. 437), 21-22 (2016)

3) 入谷展弘, 改田 厚, 山元誠司, 上林大起, 阿部仁一郎, 久保英幸, 野田 衛, 西尾孝之, 小笠原 準: 市販生カキにおけるウイルス汚染調査(2010-2011~2015-2016シーズン), 大阪市立環境科学研究所報告 調査・研究年報 78, 1-6 (2016)

2. 学会発表

1) 山元誠司, 改田 厚, 上林大起, 久保英幸, 入谷展弘: 2015/16シーズンに大阪市内で流行したロタウイルス A(G2P[4]株)の遺伝子解析, 第64回日本ウイルス学会, 札幌(2016.10.23-25)

2) 上林大起, 改田 厚, 山元誠司, 久保英幸, 入谷展弘: 手足口病流行へのコクサッキーウイルス A6の関与, 第64回日本ウイルス学会, 札幌(2016.10.23-25)

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 調理従事者および患者から検出された NoV 遺伝子の比較

事例 番号	年	発生 場所	推定 原因	患者 数	患者			調理従事者			
					検査 数	陽性 数	遺伝子型	検査 数	陽性 数	患者由来NoVとの比較*	
										遺伝子型	塩基配列
1	2014	飲食店	不明	7	7	6	GII.6	2	1	○	○
2	2014	飲食店	食品	4	3	3	GII.6	3	3	○	○
3	2014	飲食店	食品	30	7	5	GII.4	7	4	○	○
4	2015	飲食店	食品	18	18	10	GII.17	3	2	○	○
5	2015	飲食店	食品	30	11	10	GII.17	2	1	○	○
6	2015	飲食店	食品	35	29	19	GII.17	3	2	○	○
7	2015	結婚式	不明	27	2	1	GII.4	9	1	○	○
8	2015	飲食店	食品	9	5	5	GII.4	2	1	○	○
9	2016	飲食店	食品	9	6	6	GII.17	4	1	○	○
10	2016	飲食店	食品	8	1	1	GII.4	5	2	○	○
11	2016	ホテル	食品	23	9	7	GII.4	4	1	○	○
12	2016	飲食店	食品	10	4	3	GII.17	4	2	○	○
13	2016	飲食店	食品	19	2	1	GII.7	10	1	○	○
14	2016	飲食店	食品	21	7	6	GII.17	2	1	○	○
15	2016	飲食店	食品	29	13	10	GII.6	4	1	○	○
16	2016	飲食店	食品	10	9	5	GII.2	3	1	○	○

* ○: 患者由来株と同一

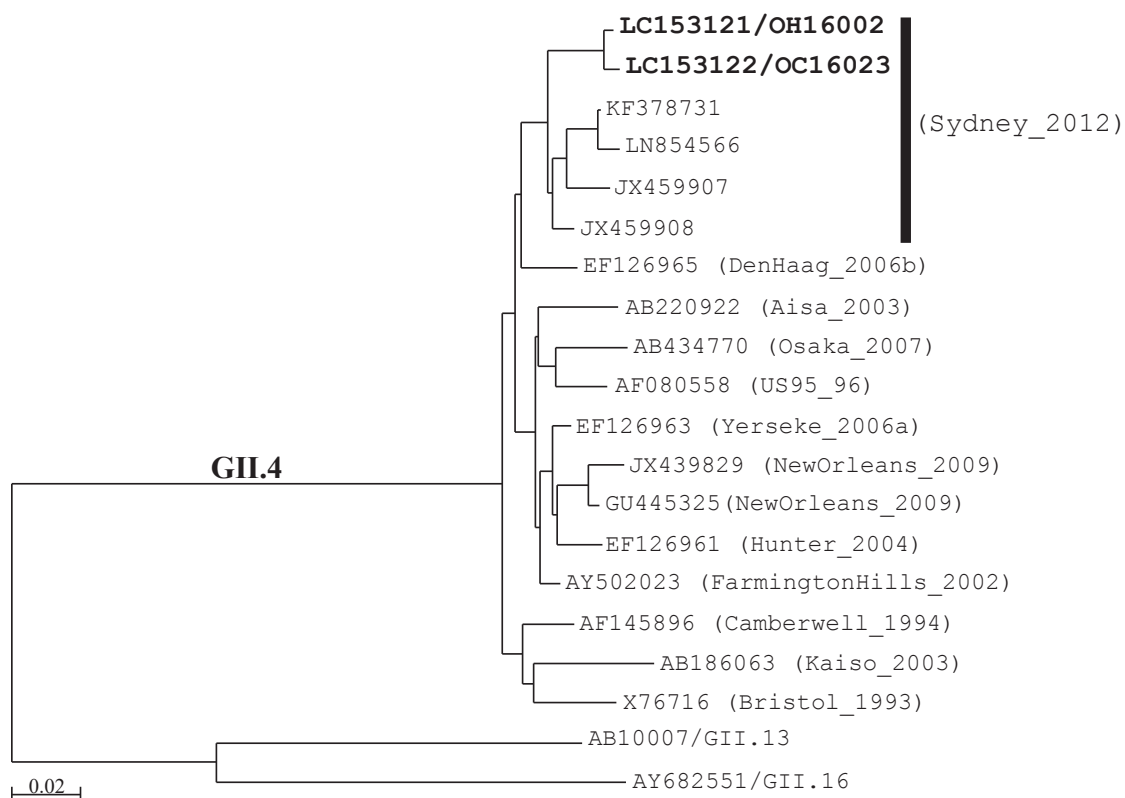


図1 NoV Capsid N/S 領域 (282 塩基) における分子系統樹

分子系統樹は近隣接合 (neighbor-joining) 法で作成した。

太字： 大阪市で検出された GII.P16-GII.4 Sydney_2012 株

他： NoV 参考株

()： GII.4 亜型

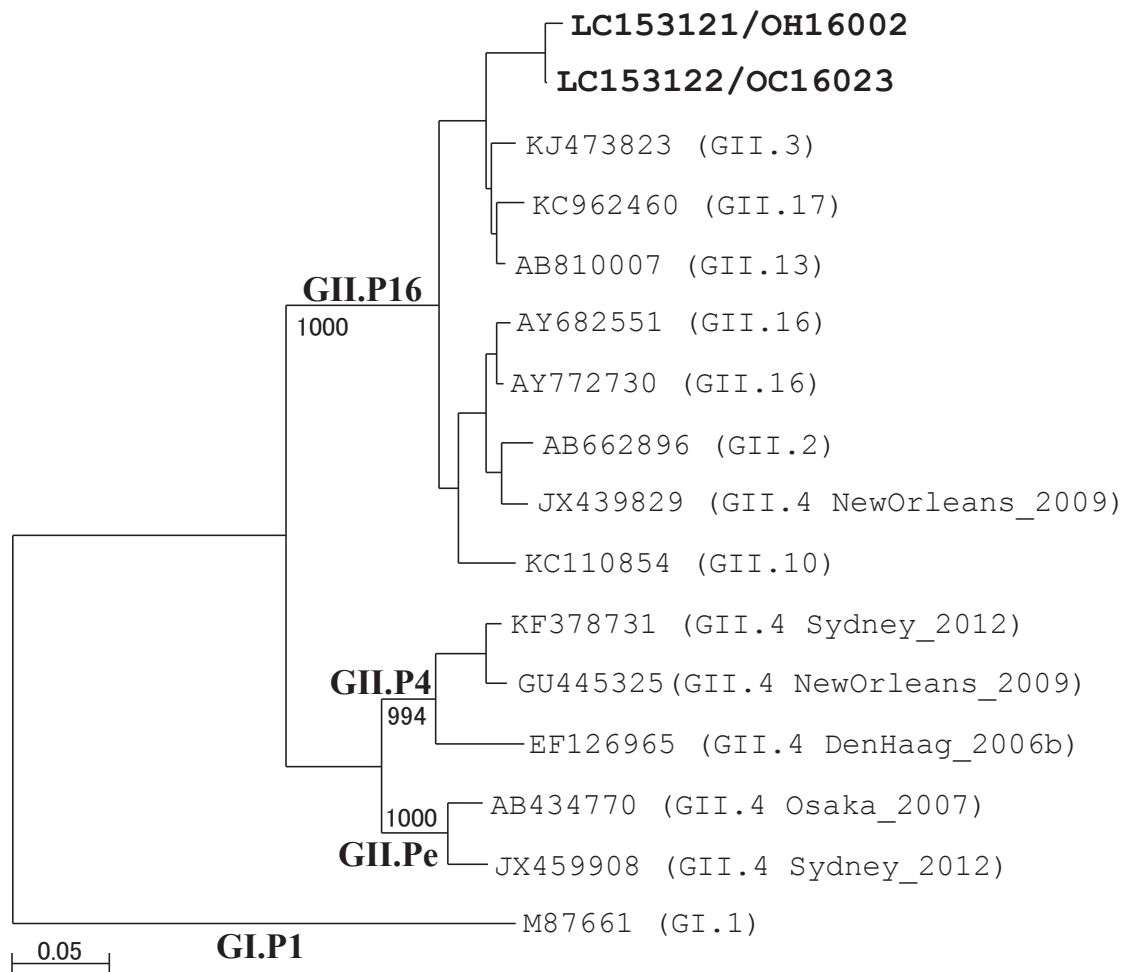


図2 NoV RdRp 領域 (720 塩基) における分子系統樹

分子系統樹は近隣接合 (neighbor-joining) 法で作成した。ブートストラップ値は遺伝的グループを支持する枝にそれぞれ示した。

太字： 大阪府で検出された GII.P16-GII.4 Sydney _2012 株

他： NoV 参考株

()： Capsid 領域における遺伝子型

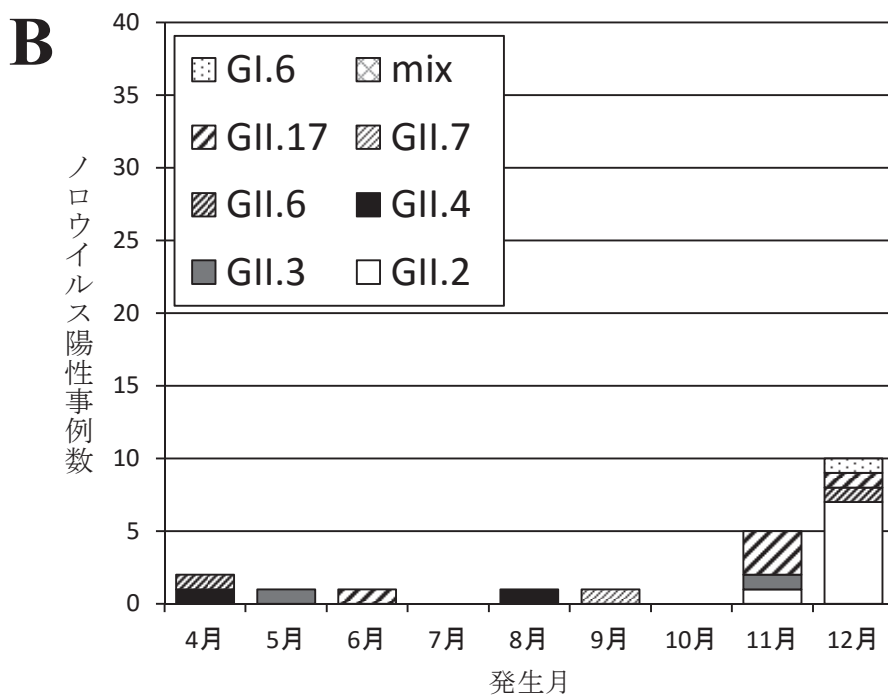
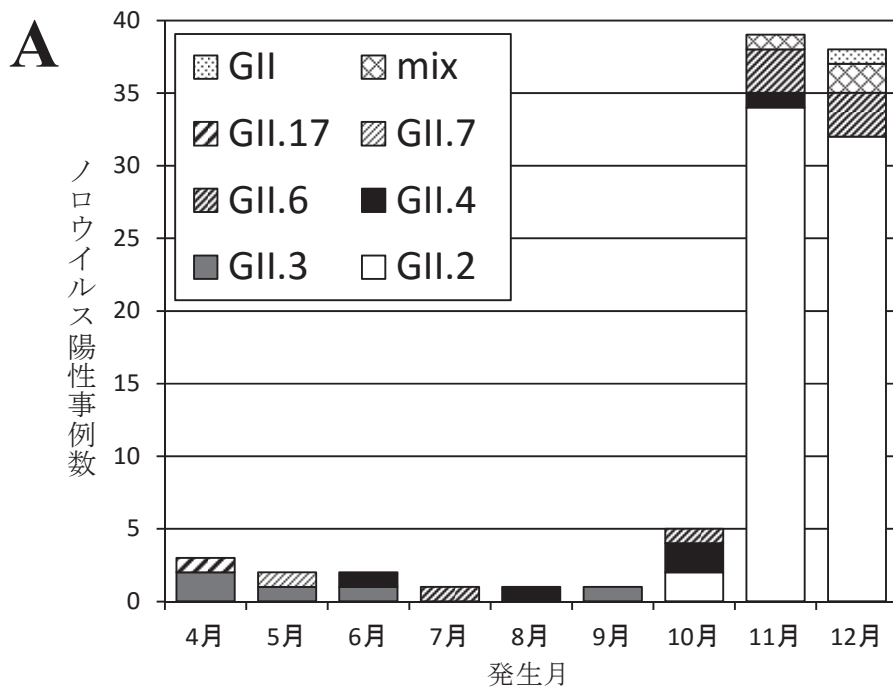


図3 大阪市におけるNoV事例発生状況（2016年）

A, ヒトからヒトへの感染疑事例

B, 食中毒疑事例

mix: 複数の遺伝子型が検出された事例