

平成 29 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

食中毒事例における調理従事者および患者由来ノロウイルスの 遺伝子学的解析

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

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ノロウイルス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・不一致の情報を疫学調査による感染源等の判断の裏付けとして使用することが妥当であるかどうかを検証するため、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、食中毒事例内の検体の比較において、多くの事例では検出用プライマー内の配列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が、一部の事例において、検出用プライマー内の配列の比較結果では見えなかった不一致が多く検出された。また、検出用プライマー内の配列において 2 検体にそれぞれ異なる 1 塩基の不一致が確認されていた事例では、RdRp-VP1 全長の比較において 12 検体中 11 検体で合計 8 箇所の一一致が確認され、感染源のノロウイルスが単一ではなかった可能性が示唆された。

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。北海道における食中毒疑い事例の 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、その一致・不一致の情報を感染源推定などに対する科学的根拠 (疫学調査による判断の裏付け) として使用している。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、この領域の配列における一致・不一致情報の科学的根拠としての妥当性を検証するため、食中毒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

表 1 に示すとおり、北海道において 2013 年 4 月から 2017 年 12 月の間に発生した食中毒 11 事例を今回の調査の対象とした。これらの事例において、NoV 陽性となったすべての糞便検体を調査に用いた。二枚貝の喫食としては、事例 No. 1, 4, 10 でホタテの刺身、事例 No. 3 でホタテとホッキの寿司が提供されていた。いずれの事例も検出された NoV の遺伝子型は 1 種類であり、GII. Pe_GII. 4 Sydney 2012 (以下、GII. 4) が 7 事例、GII. P17_GII. 17 (GII. 17) が 2 事例、GII. P16_GII. 2 (GII. 2) が 2 事例であった。

2. 方法

NoV 陽性の 108 検体について、10% 便乳剤から RNA を抽出し、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 改変プライマーより下流の RdRp 領域から VP1 領域全長(以下、RdRp-VP1 全長)の 2,396nt

(GII. 4, GII. 17) または 2,402nt (GII. 2) とした。事例内で塩基配列を比較した際に不一致がみられた検体については、増幅過程でのエラーを考慮して再度 RNA 抽出からシーケンスまでを行い、不一致の再現を確認した上で結果を示した。

(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

調査に用いた 108 検体のうち、事例 No. 5 の調理従事者(事後発症)および患者それぞれ 1 検体と事例 No. 8 の調理従事者(事前発症) 1 検体を除く 105 検体について、RdRp-VP1 全長の塩基配列情報を得ることができた。それぞれの事例内で検体間の配列を比較し、その結果を表 2 に示した。今回調査を実施した 11 事例のうち事例 No. 10 を除く 10 事例は、食中毒調査の行政検査時に、調理従事者および患者から検出された NoV の塩基配列(検出プライマー内)がすべて一致することを確認していた。この 10 事例のうち 4 事例(事例 No. 1, 2, 8, 11) は、RdRp-VP1 全長と比較しても塩基配列は 100%一致した。残る 6 事例と事例 No. 10 では、配列の不一致が確認された。

塩基配列の不一致がみられた 7 事例について、配列の比較結果の詳細を図 1 に示した。今回の比較に用いた RdRp-VP1 全長の塩基配列は、図 1 の太矢印で示した領域のものである。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）、これらの領域は細矢印で示した。

事例 No. 3, 4, 6, 9 の 4 事例は、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%一致したが、RdRp-VP1 全長の比較ではそれぞれ 1 検体に 1 塩基の不一致がみられた。不一致のみられた位置は、事例 No. 3, 6, 9 は VP1 領域、事例 No. 4 は RdRp 領域であった。これらの塩基の置換は、事例 No. 4, 6 は同義置換、事例 No. 3, 9 は非同義置換であった。

事例 No. 7 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%一致したが、RdRp-VP1 全長の比較では 2 検体において VP1 領域にそれぞれ 1 塩基の不一致がみられた。患者 2 は C→T（同義）、患者 3 は C→T（非同義）の置換であった。

事例 No. 5 も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%一致したが、RdRp-VP1 全長の比較では 3 検体において VP1 領域に合計 6 箇所（6 塩基）の不一致が示された。調理従事者 2 は 3 塩基の不一致（T→Y、G→R、T→Y）であり、いずれも同義置換であった。患者 1 は 2 塩基の不一致（G→A、T→Y）であり、いずれも非同義置換であった。患者 2 は 1 塩基の不一致（A→G）であり、同義置換であった。

事例 No. 10 は、行政検査時の比較領域において、P1/P3 間（RdRp 領域）で患者 4 に 1 塩基、COG2F/G2-SKR 間（VP1 領域）で患者 8 に 1 塩基の不一致が確認されていた。RdRp-VP1 全長の比較では不一致箇所がさらに増加し、11 検体により合計 8 箇所の不一致が示された。患者 4 は P1/P3 間（RdRp 領域）の 1 塩基（T→C）の不一致

のほか、VP1 領域にも 1 塩基（T→C）の不一致が確認された。患者 8 は COG2F/G2-SKR 間（VP1 領域）の 1 塩基（C→T）の不一致のみであった。行政検査時の比較領域では他の検体と 100%一致していた 10 検体のうち、RdRp-VP1 全長の比較では 9 検体において 1 または 2 塩基の不一致が確認された。調理従事者 1、患者 1, 2, 3, 11 の 5 検体は RdRp 領域の同じ場所の 1 塩基に不一致（A→G または R）がみられた。患者 6, 7 の 2 検体も VP1 領域の同じ場所の 1 塩基に不一致（C→T または Y）がみられた。患者 5 は、患者 6, 7 と同じ場所（C→T）に加え、VP1 領域の別の 1 箇所に A→R の不一致が見られた。患者 9 は、VP1 領域に 2 塩基（A→G、C→M）の不一致が確認された。

D. 考察

行政検査時の検出用プライマー内の塩基配列の比較において全検体で配列が一致することを確認していた 10 事例のうち、4 事例は RdRp-VP1 全長の配列も全検体で 100%一致し、4 事例は 1 検体で 1 箇所の不一致が確認されたのみであった。このことから、食中毒事例内の検体の比較において、多くの事例では 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。その一方で、事例 No. 5 では、検出用プライマー内の配列は全検体で 100%一致するものの、RdRp-VP1 領域のより長い配列の比較では 3 検体により合計 6 箇所の不一致が示された。このように、検出用プライマ

一内の配列の比較結果では見えなかった不一致が多く検出される事例もあることから、食中毒検査におけるウイルス遺伝子解析の解釈および利用方法について検討するため、今後もデータの集積が必要である。

また、行政検査時の検出用プライマー内の配列の比較により 2 検体にそれぞれ 1 塩基の不一致が確認されていた事例 No. 10 では、RdRp-VP1 全長の比較においてさらに多くの不一致が確認され、感染源の NoV が単一ではなかった可能性が示唆された。図 1 に示すように、塩基配列の不一致がみられる位置は偏りがなく不規則であることから、感染後の変異が解析長の短い行政検査時の検出用プライマー内の位置で生じる確率はあまり高くないと考えられる。そのため、検出プライマー内の配列において複数検体または複数箇所では不一致が認められる事例では、感染源が単一ではない可能性を考慮して疫学調査における確認を行い、場合によってはより長い配列の比較を検討する必

要があると考えられた。

E. 結論

NoV による食中毒事例において、多くの事例では NoV 検出用プライマー内の短い塩基配列情報を用いた比較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ていないと考えられたが、一部、検出用プライマー内の配列の比較結果では見えなかった不一致が多く検出された事例もあったことから、さらにデータを集積し比較検討を行う。

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 対象とした食中毒事例と NoV 陽性検体の内訳

事例 No.	発生 年/月	原因施設	PCR検査結果 (NoV陽性数/検査数)					患者	検出NoVの遺伝子型
			原因施設			配膳など	患者		
			調理従事者						
			事前発症 ^{※1}	事後発症 ^{※2}	症状なし				
1	2013/ 4	飲食店	-	1/1	2/2	-	9/10	GII.Pe_GII.4 Sydney 2012	
2	2013/ 5	食堂	1/1	-	1/2	-	9/11	GII.Pe_GII.4 Sydney 2012	
3	2013/12	飲食店	1/1	-	2/6	-	10/11	GII.Pe_GII.4 Sydney 2012	
4	2014/ 3	飲食店	1/1	1/2	1/4	0/5	6/7	GII.Pe_GII.4 Sydney 2012	
5	2014/ 3	飲食店	1/1	3/3	0/1	-	5/6	GII.Pe_GII.4 Sydney 2012	
6	2015/ 3	飲食店	1/1	-	0/4	0/3	10/10	GII.P17_GII.17	
7	2015/ 4	飲食店	-	-	2/3	-	6/6	GII.Pe_GII.4 Sydney 2012	
8	2016/ 3	飲食店	2/2	-	1/2	-	7/9	GII.Pe_GII.4 Sydney 2012	
9	2017/ 2	飲食店	-	-	1/1	0/1	4/4	GII.P16_GII.2	
10	2017/ 3	飲食店	-	-	1/4	-	11/12	GII.P16_GII.2	
11	2017/ 12	飲食店	-	2/2	1/1	-	5/5	GII.P17_GII.17	

※ 1 : 原因となった食事の調理日以前に発症

※ 2 : 原因となった食事の調理日より後に発症

表 2 各事例における塩基配列の一致・不一致状況

事例 No.	塩基配列の比較を行った検体数				塩基配列の一致・不一致状況 (不一致のみられた検体)
	調理従事者			患者	
	事前発症	事後発症	症状なし		
1		1	2	9	すべて一致
2	1		1	9	すべて一致
3	1		2	10	1箇所的一致 (調理/症状なし; 1検体)
4	1	1	1	6	1箇所的一致 (調理/症状なし; 1検体)
5	1	2		4	6箇所的一致 (調理/事後発症; 1検体、患者; 2検体)
6	1			10	1箇所的一致 (患者; 1検体)
7			2	6	2箇所的一致 (患者; 2検体)
8	1		1	7	すべて一致
9			1	4	1箇所的一致 (調理/症状なし; 1検体)
10			1	11	8箇所的一致 (調理/症状なし; 1検体、患者; 10検体)
11		2	1	5	すべて一致

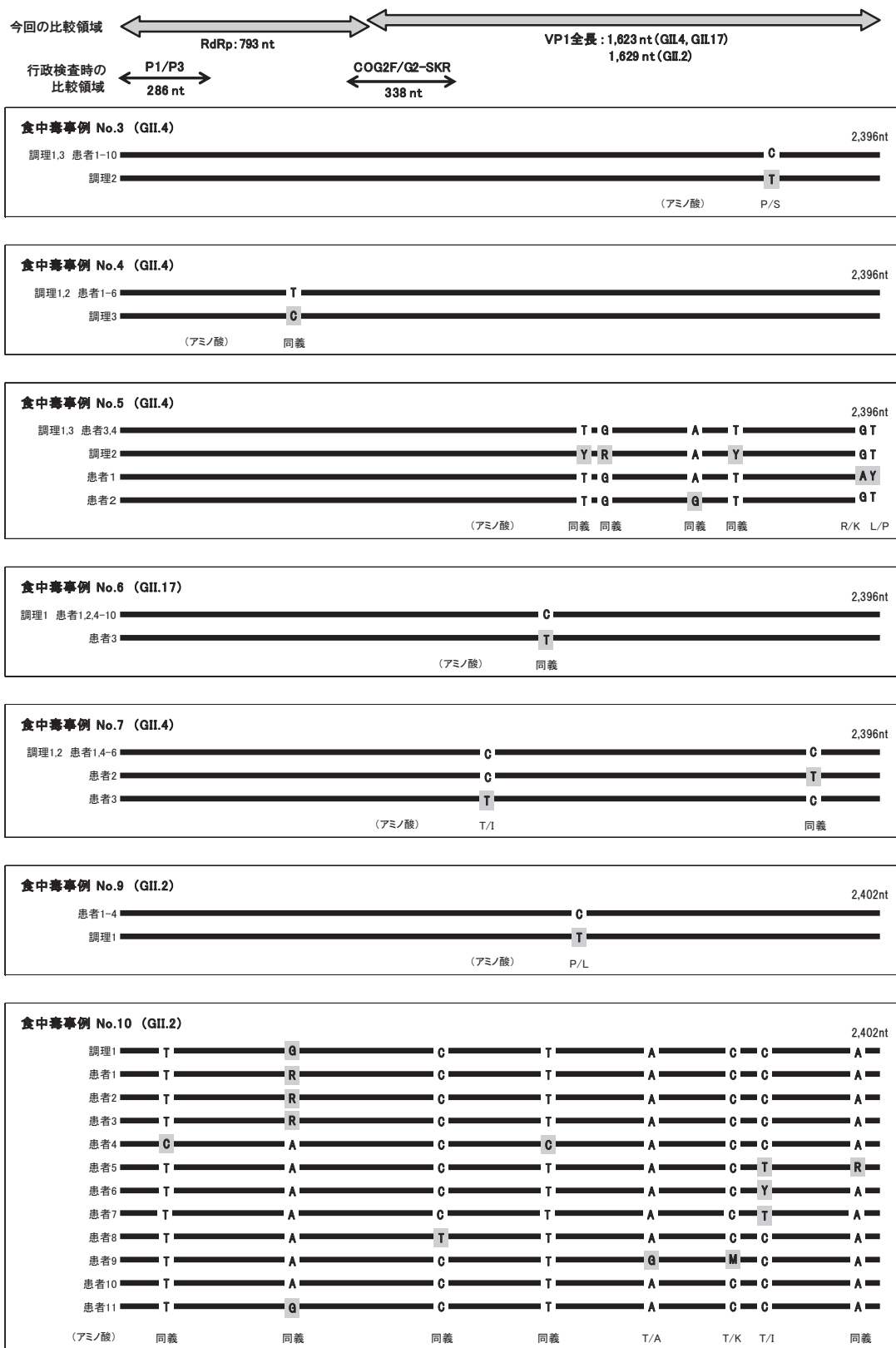


図1. 塩基配列の不一致がみられた事例についての比較結果の詳細