

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

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 (2012/13～2016/17 シーズン)

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
研究協力者	筒井 理華	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

2012 年 9 月～2017 年 8 月 (2012/13～2016/17 シーズン) に青森県内で発生した集団胃腸炎事例の内、調理従事者からノロウイルスが検出された食中毒 14 事例の遺伝子解析を行った。その結果、11 事例 (事例番号 2、8 および 12 を除く) の調理従事者由来株と発症者等由来株の塩基配列の相同性は 100% であった。事例番号 2 では、GI.6 が検出された 2 株は 7 塩基異なり、GII.4 Sydney\_2012 が検出された 6 株のうち 1 株が 1 塩基異なっていた。GII.17 が検出された事例番号 8 では 21 株のうち 4 株、事例番号 12 では 23 株のうち 2 株が 1 塩基ずつ異なり、事例番号 12 ではアミノ酸置換が見られた。遺伝学的な変異かどうかの解釈については、より長い領域の遺伝子解析や更なるデータの蓄積が必要である。

### 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として重要である。過去の NoV 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くを占めている。一方、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<sup>1)</sup>。

調理従事者が関与する食中毒事例にお

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科学的根拠となる<sup>1)</sup>。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、同じ遺伝子型の NoV が検出される場合、多くの事例では塩基配列が一致するが、一部の事例で塩基配列が一致しない事例が認められる場合がある。

今回、2012/13～2016/17 シーズンに青森県内で発生した NoV による集団胃腸炎事例の内、調理従事者から NoV が検出さ

れた食中毒事例について、分子疫学的に検討したので報告する。

## B. 研究方法

### 1. 材料

2012/13～2016/17 シーズンに青森県内で発生した集団胃腸炎事例の内、調理従事者から NoV が検出された食中毒 14 事例 520 検体(ふん便 332、吐物 6、拭取り 155、食品 27) を用いた (表 1)。

なお、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(Qiagen) で精製し、BigDye Terminator Kit (Thermo) でシーケンス反応後、DNA シークエンサー ABI PRISM310 (Applied Biosystems)、Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用い DNA ダイレクトシーケンス解析法により NoV Capsid N/S 領域の塩基配列を決定した (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) version6<sup>2)</sup> 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<sup>3)</sup>に記載された株を使用した。

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

2012/13～2016/17 シーズンに青森県内で発生し、調理従事者から NoV が検出された食中毒 14 事例の概要を表 1 に示した。行政的には、14 事例すべて NoV GII による食中毒と判断された。14 事例において、調理従事者、発症者および非発症者等から採取された糞便 (陽性数/検体数 : 203/332)、吐物 (2/6)、拭取り (6/155) から NoV 遺伝子が検出されたが、食品 (0/27) からは検出されなかった。遺伝子群別で見ると、事例番号 2 は GI および GII の両遺伝子群が検出され、それ以外の 13 事例は GII のみが検出された。

14 事例について NoV 陽性検体の遺伝子解析を行った(表 2)。GI は 260nt、GII は 279nt の領域について、事例ごとに同じ遺伝子型の調理従事者から検出された NoV とそれ以外の検体から検出された NoV の塩基配列を比較した。その結果、11 事例 (事例番号 2、8 および 12 を除く) において、同一事例のうち同じ遺伝子型の NoV 遺伝子の相同性は 100%であった。事例番号 2 において、GI. 6 が調理従事者から 1 株、発症者から 1 株検出されたが、両者の配列は 7 塩基異なり (C98T、A107G、A131C、G137A、C188T、C230T、A251G)、相同性は 97.3%であった。GI. 6 のアミノ酸配列 (85aa) を比較した結果、①と②の間にアミノ酸置換は見られなかった。また、

GII.4 Sydney\_2012 が調理従事者から 1 株、発症者から 6 株検出されたが、発症者由来の 1 株は 1 塩基異なり (A135G)、相同性は 99.6%であった。GII.4 Sydney\_2012 のアミノ酸配列 (93aa) を比較した結果、①と②の間にアミノ酸置換は見られなかった。事例番号 8 において、GII.17 が調理従事者から 2 株、発症者から 18 株、吐物から 1 株検出されたが、発症者由来の 4 株は 1 塩基異なり (C138T)、相同性は 99.6%であった。GII.17 のアミノ酸配列を比較した結果、①と②の間にアミノ酸置換は見られなかった。事例番号 12 において、GII.17 が調理従事者から 4 株、発症者から 19 株検出されたが、発症者由来の 2 株は異なる箇所 1 塩基ずつ異なり (② : T183A、③ : T234C)、相同性は 99.6%であった。GII.17 のアミノ酸配列を比較した結果、①と③の間にアミノ酸置換は見られなかったが、②は 61 番目のアスパラギンがリシンに置換していた (N61K)。

14 事例から検出された NoV の遺伝子の capsid N/S 領域の ML 法による系統樹を図 1 (GI)、図 2 (GII) に示した。配列名には、事例番号、遺伝子型の他に、調理従事者・発症者・吐物・拭取りの塩基配列が一致した株数を記載した。系統樹解析の結果、事例番号 1、2、3、5、6、7、10 および 11 で検出された GII.4 は、すべて Sydney\_2012 と同じクラスターに分類された。また、事例番号 4、8、9 および 12 から検出された GII.17 は、2014 年以降の川崎類似株であったが、事例番号 5 から検出された GII.17 は、それ以前に検出されていた別系統のものであった。

#### D. 考察

2012/13～2016/17 シーズンに青森県内で発生した集団胃腸炎事例の内、調理従事者から NoV が検出された食中毒事例は 14 事例であり、すべて NoV GII による食中毒と判断されていた。事例番号 2、8 および 12 を除く 11 事例において、発症者等由来株はすべて調理従事者由来株と塩基配列 (279nt) が一致したため、食中毒と判断するための有力な根拠であったと推察された。

事例番号 2 は、調理従事者由来 1 株と発症者由来 5 株 (GII.4 Sydney\_2012①) の相同性が 100%であり、行政判断に有用なデータであったと推察された。一方、発症者由来 1 株 (GII.4 Sydney\_2012②) は、135 番目の A が C になっていた。①と②の間にアミノ酸置換は見られず、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考えられる。また、調理従事者のみから検出された遺伝子型 (GI.6①、GI.7、GII.2)、発症者のみから検出された遺伝子型 (GI.6②、GI.9) もあり、様々な病原体が関与した事例であった。GI.6①と②の間にアミノ酸置換はなかったため、宿主側による影響か感染源による影響、また遺伝子の増幅過程で増幅しやすい遺伝子による影響か明らかにできなかった。

事例番号 8 は、調理従事者由来 2 株と発症者由来 14 株と吐物由来 1 株 (GII.17 ①) の相同性が 100%であり、行政判断に有用なデータであったと推察された。一方、発症者由来 4 株 (GII.17②) は、138 番目の C が T になっていた。①と②の間

にアミノ酸置換は見られず、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考えられる。

事例番号 12 は、調理従事者由来 4 株と発症者由来 17 株 (GII. 17①) の相同性が 100% であり、行政判断に有用なデータであったと推察された。一方、発症者由来 1 株 GII. 17② は 183 番目の T が A、発症者由来 1 株 GII. 17③ は 234 番目の T が C になっていた。①と③の間にアミノ酸置換は見られなかったが、②では置換が見られた。②のシーケンス解析データを詳細に解析したところ、わずかではあるが、A の波形の下に T の波形があり、宿主側の影響や遺伝子の増幅過程で A の方が増幅しやすかった可能性もある。遺伝学的な変異について断言するには、今後もデータを蓄積し、解析していく必要がある。

同一事例内で、同じ遺伝子型でも数塩基異なる検体が見られた。異なる病原体が感染した場合、感染後に遺伝学的な変異が発生した場合、PCR やシーケンス反応において塩基の読み違いを起こした場合など、様々な可能性があるため、食中毒の判断・詳細な把握のためには、今後も引き続きデータを蓄積し、解析していく必要がある。また、今回は Capsid 領域の 300 塩基程度の解析であるため、NoV の詳細な動向の把握には、ポリメラーゼ領域も含めたより長い領域の解析が必要となる。

## E. 結論

1. 調理従事者から NoV が検出された食中毒事例は 14 事例であった。
2. 11 事例 (事例番号 2、8 および 12 を

除く) の調理従事者由来株と発症者等由来株の塩基配列の相同性は 100% であった。

3. 事例番号 2 では、7 塩基異なる GI. 6、1 塩基異なる GII. 4 Sydney\_2012 が検出された。
4. 事例番号 8 および 12 では、1 塩基ずつ異なる GII. 17 が検出された。

## 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

## 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., Filipski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30, 2725-2729.
- 3) 片山和彦：ノーウォークウイルス (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>)

表1 青森県内における調理従事者から NoV が検出された食中毒事例  
(2012/13～2016/17 シーズン)

シーズン	事例番号	発生日	原因施設	摂食場所	遺伝子群	遺伝子型	ふん便				吐物		拭取り		食品	
							調理従事者 陽性数	検査数	発症者ほか 陽性数	検査数	陽性数	検査数	陽性数	検査数	陽性数	検査数
2012/13	1	H25.1.18	飲食店	飲食店	NoV GII	GII.4	2	7	8	8			0	10		
	2	H25.1.24	飲食店	飲食店	NoV GI	GI.6、GI.7、GI.9	3	7	10	11			0	13		
	3	H25.3.25	ホテル	ホテル	NoV GII	GII.4	1	4	12	12			0	14	0	6
	4	H25.4.11	飲食店	事業所	NoV GII	GII.17	2	2	3	3			0	10		
2013/14	5	H25.12.14	ホテル	ホテル	NoV GII	GII.4、GII.17	3	28	22	25			4	17		
	6	H26.1.15	飲食店	事業所	NoV GII	GII.4	1	6	25	26	1	5	1	13		
	7	H26.5.15	給食施設	給食施設	NoV GII	GII.4	3	9	4	4			0	5	0	7
2014/15	8	H26.12.31	飲食店	家庭	NoV GII	GII.17	2	3	18	21	1	1	0	13		
	9	H27.2.9	飲食店	学校	NoV GII	GII.13、GII.17	3	16	13	14			0	6		
	10	H27.2.12	給食施設	給食施設	NoV GII	GII.4	3	4	7	7			0	6	0	9
2015/16	11	H28.2.6	飲食店	飲食店	NoV GII	GII.4	1	2	6	6			0	11		
	12	H28.3.19	飲食店	飲食店	NoV GII	GII.17	4	13	19	30			0	5	0	1
2016/17	13	H28.12.10	飲食店	飲食店	NoV GII	GII NT、GII.2	1	6	20	30			1	13		
	14	H28.12.19	飲食店	飲食店	NoV GII	GII.2	1	22	6	6			0	19	0	4
計							30	129	173	203	2	6	6	155	0	27

表2 食中毒事例において検出された NoV 遺伝子型の内訳

シーズン	事例番号	発生日	遺伝子型	ふん便		吐物	拭取り	相同性
				調理従事者	発症者ほか			
2012/13	1	H25.1.18	GII NT		1			-
			GII.4 Sydney_2012	2	7		100%	
	2	H25.1.24	GI.6	①	1			97.3%
			GI.7	②	1			-
			GI.9		1			-
			GII NT		2			-
			GII.2		1			-
GII.4 Sydney_2012	①	1	5			99.6%		
②		1						
3	H25.3.25	GII.4 Sydney_2012		1	12		100%	
4	H25.4.11	GII.17		2	3		100%	
2013/14	5	H25.12.14	GII.4 Sydney_2012		2	22	4	100%
			GII.17		1			-
	6	H26.1.15	GII.4 Sydney_2012		1	25	1	1
7	H26.5.15	GII NT			1			-
		GII.4 Sydney_2012		3	3			100%
2014/15	8	H26.12.31	GII.17	①	2	14	1	99.6%
				②		4		
	9	H27.2.9	GII.13		2	13		100%
			GII.17		1			-
2015/16	11	H28.2.6	GII.4 Sydney_2012		1	6		100%
	12	H28.3.19	GII.17	①	4	17		
②					1			99.6%
③					1			
2016/17	13	H28.12.10	GII NT			1		-
			GII.2		1	19	1	100%
14	H28.12.19	GII.2		1	6		100%	

※表1において1つの検体から複数の遺伝子型が検出されたものについては、表2において別々にカウントしているため、表1の陽性数と表2の数は必ずしも一致しない。

※同じ遺伝子型であっても、1塩基でも異なるものは、①、②、③と区別した。

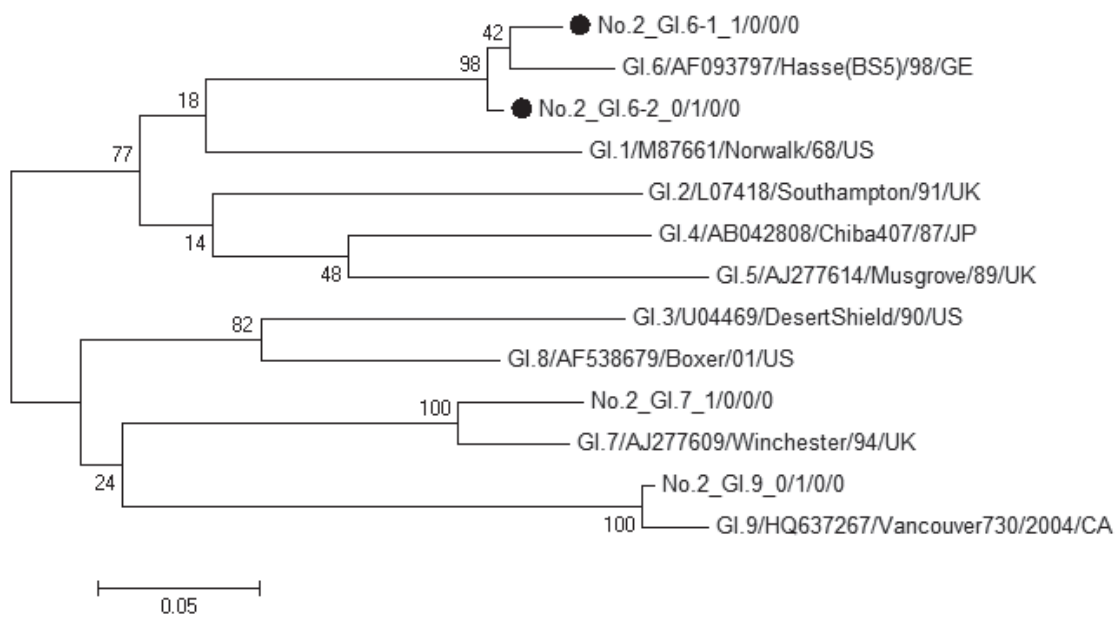


図1 食中毒事例から検出された NoV GI の系統樹 (260nt)

配列名：事例番号\_遺伝子型\_調理従事者数/発症者数/吐物数/拭取り数



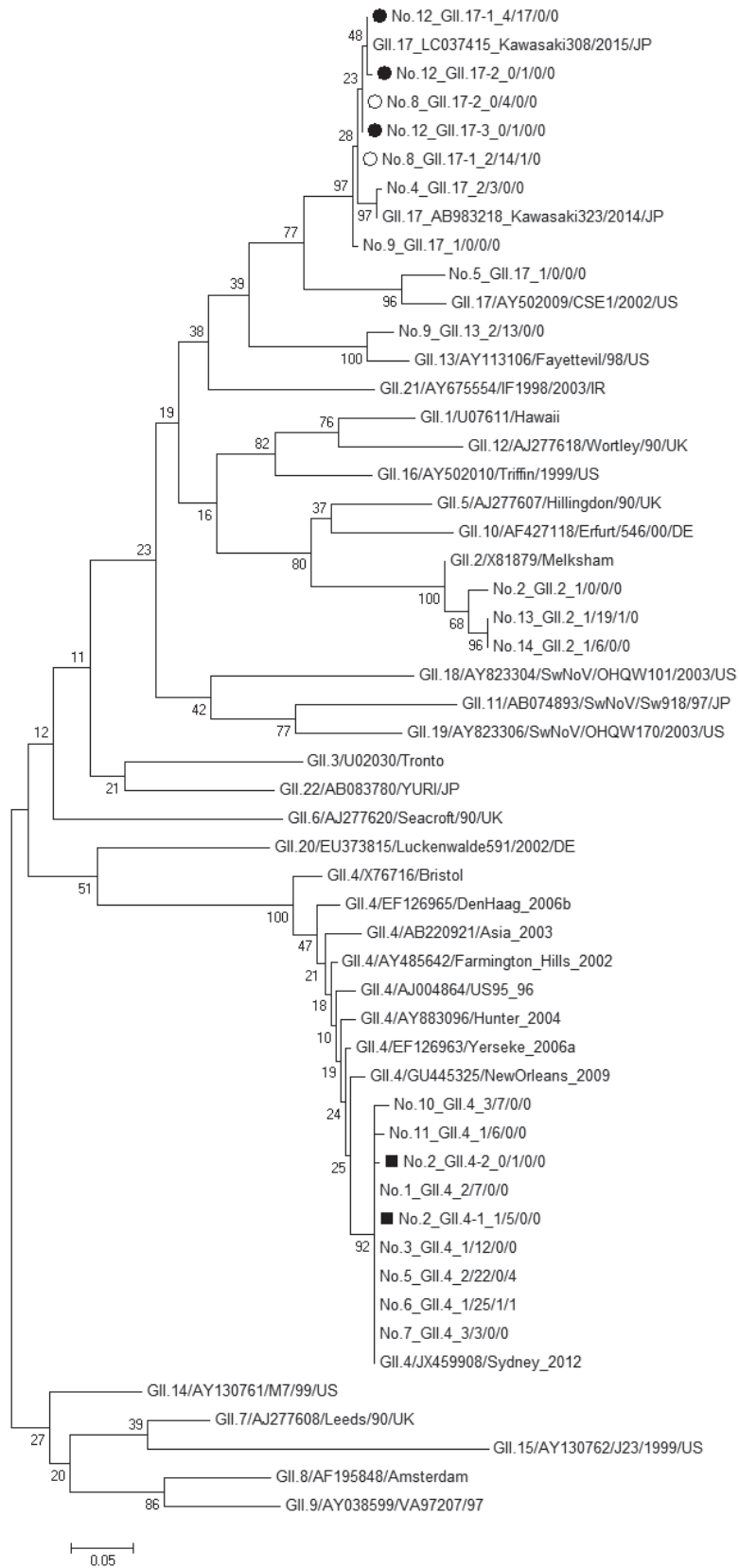


図 2 食中毒事例から検出された NoV GII の系統樹 (279nt)