

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

施設フキトリ、調理従事者および患者等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	大阪健康安全基盤研究所
研究協力者	山元 誠司	大阪健康安全基盤研究所
研究協力者	改田 厚	大阪健康安全基盤研究所
研究協力者	阿部 仁一郎	大阪健康安全基盤研究所
研究協力者	久保 英幸	大阪健康安全基盤研究所
研究分担者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

施設フキトリまたは調理従事者からノロウイルス (NoV) が検出された食中毒 (疑いを含む) を対象に、患者由来 NoV と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。特に食品が汚染されてから約 2 か月後に起こった広域発生の食中毒では、施設フキトリ由来 NoV の遺伝子解析結果が汚染経路の解明につながる科学的根拠となった。

2017 年 (1~12 月) は大阪市において集団胃腸炎 46 事例が NoV 陽性となった。最も多く検出された遺伝子型は GII.4 (17 事例、37.0%) であり、すべて Sydney_2012 亜型であった。次いで GII.2 (16 事例、34.8%) であった。GII.4 事例のほとんどは 5 月以降の発生であり、GII.2 事例は主に 1~3 月の期間に発生していた (12 事例、75.0%)。

2017 年 12 月に購入した市販の生食用カキに NoV 汚染は認められなかった。

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施設フキトリおよび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・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) 施設フキトリ由来 NoV の遺伝子解析

NoV 食中毒推定原因食品の加工を行った一施設のフキトリ 25 か所を対象とした。

2) 調理従事者由来 NoV の遺伝子解析

2017 年 1 月～2018 年 1 月の期間に、患者および原因施設調理従事者から NoV が検出された食中毒 (疑いを含む) 6 事例を対象とした。

3) 胃腸炎事例から検出された NoV の分子疫学的解析

2017 年 1～12 月に当研究所へ検査依頼のあった集団胃腸炎 73 事例を対象とした。

4) 生食用カキの NoV 汚染調査

2017 年 12 月に市販されていた生食用カキ 3 ロットを NoV の検索に用いた。3 ロットは 2 県 3 海域から採取されたものであった。

2. 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 (TaKaRa) を用いて合成した。NoV 遺伝子の検出は、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. フキトリからの NoV 検出

フキトリ水は全量約 9ml を 50,000rpm 60 分間遠心した沈渣に 0.2ml の 0.5% Zwittergent 加 PBS(-)を加え、RNA 抽出用試料とした。

ウイルス RNA は、QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いて抽出した。cDNA は Random hexamer および SuperScript III 逆転写酵素 (Thermo Fisher Scientific) を用いて合成した。

NoV 遺伝子の検出は糞便と同じ方法で行った。

4. 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 (Thermo Fisher

Scientific)および Random hexamer を用いて合成した。

NoV 遺伝子の検出は糞便と同じ方法で行った。

5. 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。遺伝子型別は、Norovirus Genotyping Tool ver. 2.0 (<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. 施設フキトリ由来 NoV の遺伝子解析

8 か所から NoV が検出され、うち 6 か所はトイレ周辺であった (表 1)。フキトリ由来株と患者および食品由来株の遺伝子型および塩基配列を比較したところ、すべて一致した。1 か所 (裁断機入口) では患者および食品由来株と同じ塩基配列以外に、1 塩基異なる塩基配列も認められた。フキトリ検体採取場所の NoV 汚染量 (NoV RNA コピー数/検体) はトイレ取手 (外) が最も高く、次いでトイレレバー、トイレ取手 (内) であった。トイレ周辺以外の 2 か所では微量な汚染であった。

2. 調理従事者由来 NoV の遺伝子解析

6 事例それぞれについて調理従事者および患者由来株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)。

3. NoV 胃腸炎事例の発生状況

46 事例 (63.0%) 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 25 事例、食中毒疑事例は 21 事例であった。PP 事例の主な原因施設は保育園 (21/25 事例、84.0%) であった。食中毒疑事例は 1~3 月に多く発生していた (16 事例、76.2%) (図 B)。カキの喫食が関連していた事例は 1 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 は 6 種類 (GI : 2 種類、GII : 4 種類) に遺伝子型別された。最も多く検出されたのは 17 事例 (37.0%) から検出された GII.4 であり、すべて Sydney_2012 亜型であった。次いで GII.2 (複数の遺伝子型が検出された事例を含めて 16 事例、34.8%) であった。GII.4 事例のほとんどは 5 月以降の発生であり、GII.2 事例は主に 1~3 月の期間に発生していた (12 事例、75.0%) (図 A, B)。

4. 生食用カキの NoV 汚染状況

検査したすべてのカキから NoV は検出されなかった。

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、施設フキトリや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、食品が加工される際に汚

染されてから約 2 か月後に起こった広域発生¹⁾の食中毒において、施設フキトリ検体から NoV を検出することができた。本事例では患者や食品由来株との遺伝子解析結果が汚染経路の解明につながる科学的根拠となった。施設フキトリ検査は汚染経路の解明や原因施設の特定に有効な手段となりうることが示された。また、調理従事者由来 NoV の遺伝子解析において、すべての事例で患者由来株と遺伝子型、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。事例番号 6 (表 2) については、施設内で嘔吐の報告があり、判断が困難な事例であった。調理従事者と患者に由来する NoV の塩基配列は一致していたが、疫学的に嘔吐場所からの感染も否定できなかった。結果として、本事例では食中毒の判断には至らなかったが、検出された NoV の遺伝子解析結果は原因を特定する上で必要とされた。しかし、患者等からの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。

2017/18 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 51 週でピーク (7.6) になり、大阪府では過去 10 年で最も低い値であった。大阪市内での集団事例の発生状況も同様に例年と比較して少なく、今のところ、NoV 流行は小規模である。検出される遺伝子型の割合は 2017 年 5 月以降 GII.4 Sydney_2012 が増

加している。GII.4 の新しい亜型や稀な遺伝子型の検出は大流行につながる可能性があり、NoV 遺伝子型の変化や動向を引き続いて注意深く監視していく必要がある。

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。今回はすべての生食用カキから NoV は検出されなかった。今のところ、2017/18 シーズンは全国的に感染性胃腸炎の流行が低調であり、NoV の流行も同様であると考えられる。例年、この時期の市販生カキに NoV 汚染が認められることは多いが、今シーズンの NoV 流行状況がカキの NoV 検査結果に反映されたものと考えられた。

E. 結論

1. 食品が汚染されてから約 2 か月後に起こった広域発生¹⁾の食中毒において、施設フキトリ由来 NoV の遺伝子解析結果が汚染経路の解明につながる重要な科学的根拠となった。
2. 2017/18 シーズンの大阪市における NoV 流行状況は、今のところ例年と比較して小規模である。
3. 12 月市販の生食用カキに NoV 汚染は認められなかった。

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, 山元誠司, 久保英幸, 平井有

紀, 野田 衛, 小笠原 準: 2016-2017 シーズンに大阪市で認められたノロウイルス流行, 大阪市立環境科学研究所報告調査・研究年報 79, 1-4 (2017)

2. 学会発表

1) 入谷展弘, 上林大起, 改田 厚, 阿部仁一郎, 山元誠司, 久保英幸, 野田衛: 2016/17 シーズンに大阪市で認められ

たノロウイルス GII.2 流行, 第 65 回日本ウイルス学会, 大阪 (2017. 10. 24-26)

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 一施設のフキトリから検出されたNoVの遺伝子解析

検出箇所	遺伝子型	ウイルス量 (NoV RNA コピー数/検体)	患者・食品由来株 との比較*	
			遺伝子型	塩基配列
トイレ取手 (外)	GII.17	1.4x10 ⁵	○	○
トイレ取手 (内)	GII.17	3.2x10 ³	○	○
便器内側	GII.17	3.5x10 ²	○	○
トイレ便座	GII.17	4.7x10 ²	○	○
トイレレバー	GII.17	3.9x10 ³	○	○
トイレ床	GII.17	7.7x10 ²	○	○
裁断機入口	GII.17	11	○	○**
作業場電話子機	GII.17	5	○	○

* ○：患者・食品由来株と同一

** 2種類のNoV遺伝子が検出された。一つは患者・食品由来株と同一であり、
もう一つは1塩基の相違が認められた(99.7%の塩基配列相同性)

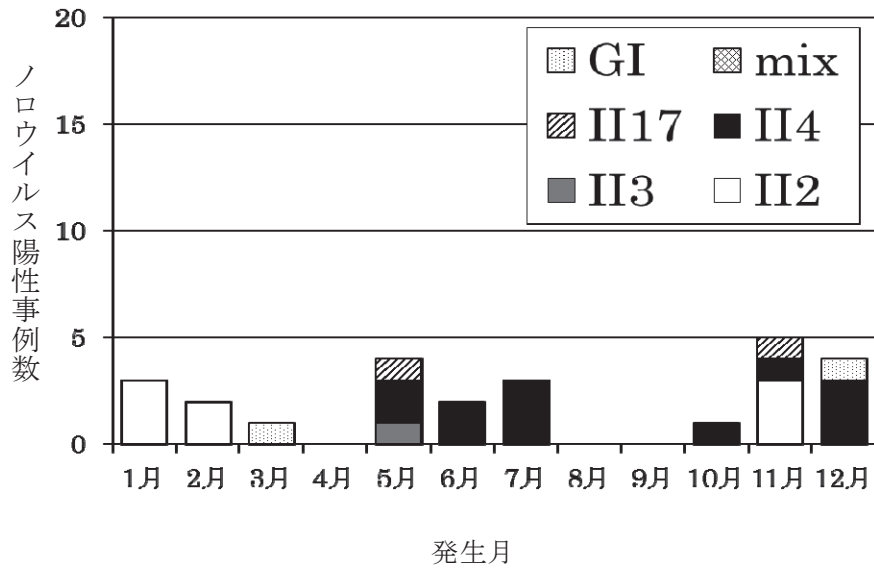
表2 調理従事者および患者から検出されたNoV遺伝子の比較

事件 番号	発生 場所	推定 原因	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	飲食店	食品	3**	3**	GII.4	3	1	○	○
2	飲食店	食品	3	3	GII.2	4	4	○	○
3	飲食店	食品	3	3	GII.17	2	1	○	○
4	飲食店	食品	12	5	GII.17	5	1	○	○
5	飲食店	食品	4	4	GII.4	6	1	○	○
6	飲食店	不明	25**	15**	GII.2	9	1	○	○

* ○：患者由来株と同一

** 他自治体の検査結果を含む

A



B

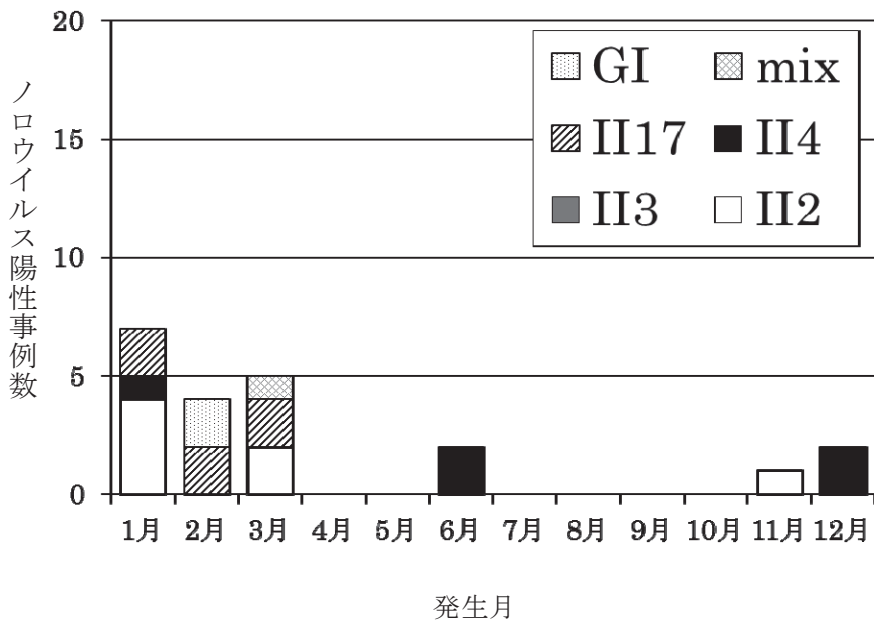


図 大阪市における NoV 事例発生状況 (2017 年)

A, ヒトからヒトへの感染疑事例

B, 食中毒事例 (疑いを含む)

mix: 複数の遺伝子型が検出された事例