

長崎県におけるノロウイルスの検出状況(2015)

三浦 佳奈、松本 文昭、吉川 亮、田栗 利紹

Detection and Molecular Characterisation of Norovirus causing Food-borne Diseases or Infectious Gastroenteritis in Nagasaki (2015)

Kana MIURA, Fumiaki MATSUMOTO, Akira YOSHIKAWA and Toshitsugu TAGURI

key words: Food poisoning, Norovirus

キーワード: 食中毒, ノロウイルス

はじめに

ノロウイルスは食品衛生法上では、1997年にはじめて食中毒の原因物質として追加された。本ウイルスは、感染性胃腸炎による集団発生原因の主要ウイルスの1つであり、小児から成人に至る幅広い年齢層にわたって、さまざまな規模の急性胃腸炎を引き起こす。感染様式も様々で、食品を介して食中毒と特定される事例もあれば、ヒト-ヒト感染や無症状保菌者を介する感染事例もあり、社会的にも重要なウイルスの一つである。ノロウイルスはGIからGVまでの遺伝子グループに分類されており、その中で主に人に感染するのはGIとGIIである。さらにGIには9種類、GIIには22種類の遺伝子型が存在する。

2015年は、全国的にノロウイルスの主要流行株に大きな動きがあった。2014年12月まで主要流行株を占めていたGII.4が減少に転じ、新たに新規遺伝子型であるGII.P17-GII.17が検出されはじめた。

今回、長崎県内で発生したノロウイルスを原因とする食中毒事例等について塩基配列を解析したので報告する。

調査方法

①材料

2011年4月～2016年3月上旬までに長崎県で発生した食中毒事例、有症苦情事例等の健康被害事例により採取された便、嘔吐物、食品計241検体を検査した。各事例において検出された主な遺伝子型の配列を整理し、解析を行った。

②方法

検査方法及び患者材料等は、「ノロウイルスの検査法」²⁾に準じて行った。検体をPBS(-)で約10%懸濁液とし、

10,000 rpm で15分間遠心分離した上清からQIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を用いてウイルスRNAの抽出を行った。抽出したRNAはDNase処理した後、QIAGEN OneStep RT-PCR Kitを用いてノロウイルス遺伝子のN/S領域を増幅した。PCR増幅用のプライマーとして、ノロウイルスGIにはCOG1F/G1SKRをノロウイルスGIIにはCOG2F/G2SKRを用いた。食品に関しては超遠心法を用いて濃縮しRNA抽出後、DNase処理、OneStep RT-PCRを行った。PCRを行った後、アガロースゲル電気泳動により増幅バンドが確認されたものについてダイレクトシーケンスを行い、Norovirus genotyping toolを用いて遺伝子型別した。

GII.17と同定された検体に関してはより詳細に解析するために、抽出RNAをSuperScriptTMIII RT (Thermo Fisher)を用いてcDNAを合成し、Ex Taq Hot Start Version (TaKaRa)を用いてノロウイルス遺伝子のRdRp, N/S領域を増幅した。PCR増幅用のプライマーとして、Yuri22F/G2SKRを用いた。PCRを行った後、アガロースゲル電気泳動により増幅バンドが確認されたものについてダイレクトシーケンスを行い、Norovirus genotyping toolを用いて遺伝子型別したのち系統樹解析を実施した。

結果及び考察

2015年4月～2016年3月上旬までに長崎県で発生した食中毒事例、有症苦情事例等の健康被害事例の検査により検出したノロウイルスの塩基配列を解析した結果を表1に示す。検体数144検体に対して陽性検体数54検体であり、そのうちGI.3が12検体、GII.3が16検体、GII.17が25検体、1検体に関しては遺伝子型別困難であった。

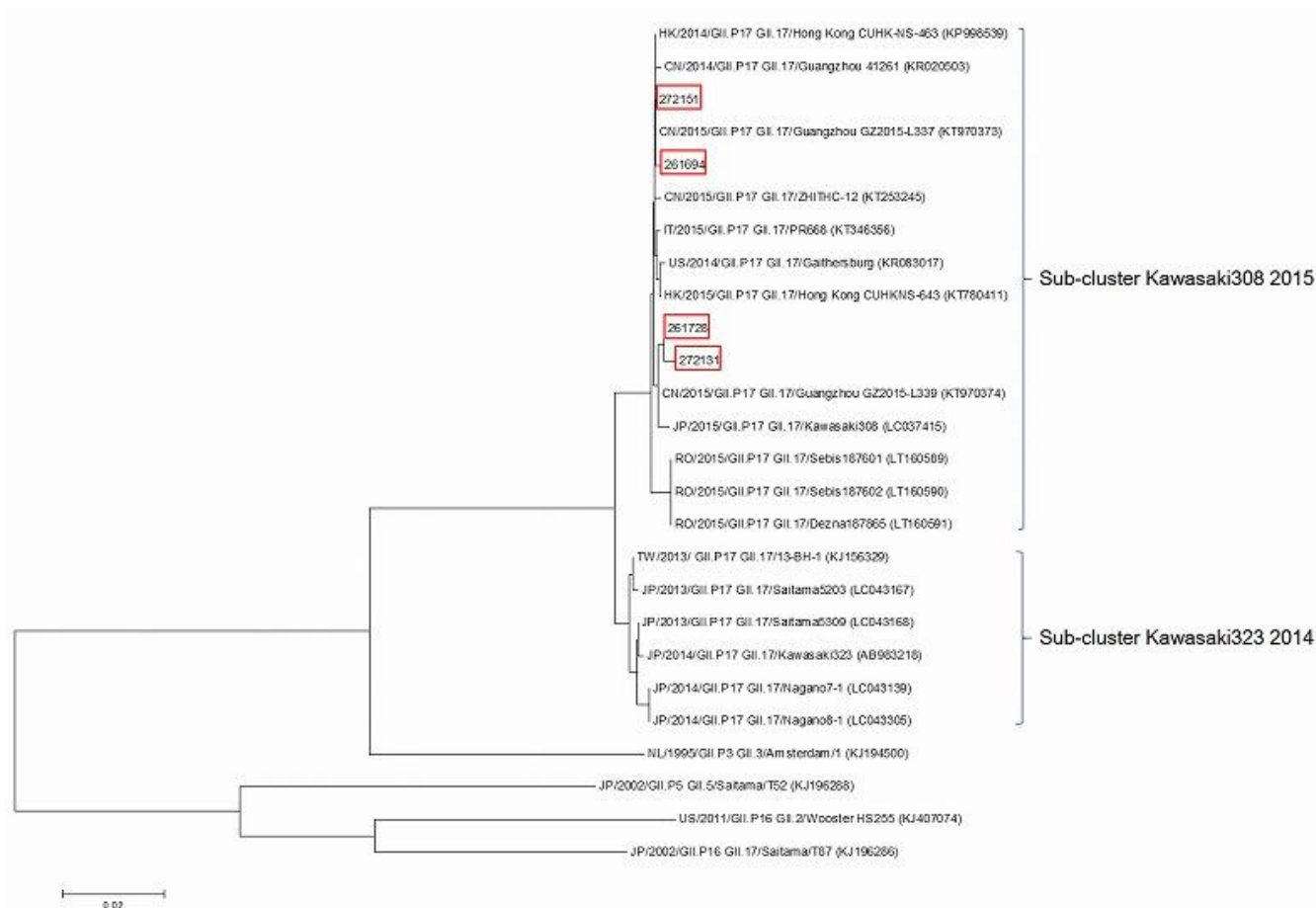


図1 ノロウイルス GII.P17-GII.17 系統樹解析

また、過去5年間に於いて検出されたノロウイルスの遺伝子型を表2に示す。長崎県において2014年まではGII.4が検出されていたが、2014年末から2015年にかけてGII.17が検出しはじめている。

今回GII.17が検出された検体に関して、ダイレクトシーケンスを行い塩基配列を解析し、遺伝子型を決定したところ、GII.P17-GII.17に分類された。また、事例ごとに1検体選出し、系統樹を作成したものを図1に示す³⁾。川崎市にて2014年に検出されたGII.P17-GII.17、2015年に検出されたGII.P17-GII.17とサブクラスタを形成しており、今回長崎県にて検出された検体は2015年のサブクラスタに分類された。

今後、本ウイルスが国内において主要な流行株となる可能性があるため、来シーズン以降におけるGII.17変異株の動向には十分注意が必要である。

また、ノロウイルスの遺伝子解析を継続していくことで、シーズンごとの流行の傾向等を監視し、感染症や食中毒等の感染拡大を防止することが重要であると考えられる。

謝辞

本調査を遂行するにあたり、種々の情報を提供していただいた長崎県生活衛生課、長崎市保健環境試験所、長崎市、佐世保市及び長崎県立各保健所の関係各位に感謝する。

参考文献

- 1) Matsushima, *et al.*, Genetic analyses of GII.17 norovirus strains in diarrheal disease outbreaks from December 2014 to March 2015 in Japan reveal a novel polymerase sequence and amino acid substitutions in the capsid region 2015
- 2) ノロウイルスの検出法について(食品衛生法の一部改正)、厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知食安監発第1105001号、(2003)
- 3) S Dinu, *et al.*, Molecular identification of emergent GII.P17-GII.17 norovirus genotype, Romania, 2015

表 1. 2015 年 ノロウイルスの検出状況

	依頼件数	検体数	陽性検体数	geno-group
西彼地区	5	33	21	GII.3 , G II.17
県央地区	4	69	12	G I.3
県南地区				
県北地区	3	15	3	G II.3
五島地区	1	12	7	G II.17
上五島地区				
壱岐地区	1	15	11	G II.17
対馬地区				
合 計	14	144	54	

表 2. 過去 5 年間に於いて検出されたノロウイルスの遺伝子型

	GI			GII								
	GI.3	GI.6	型不明	GII.2	GII.3	GII.4	GII.5	GII.6	GII.8	GII.13	GII.17	型不明
2011			1		6							22
2012			1			30						23
2013				7	14			1				
2014	1	1	1		1	25	1	8	3	4	25	2
2015	12				30	11					25	1