

III 論文投稿・学会発表

■ 論文 1

水環境学会誌, 39(A), 178~182(2016).

大村湾における底層溶存酸素量の変遷と改善に向けた取り組み

粕谷智之

長崎県環境保健研究センター

大村湾は長崎県本土のほぼ中央に位置し、佐世保湾を介して狭い針尾瀬戸と早岐瀬戸だけで外海と通じている閉鎖性の強い湾である。形上湾や津水湾などの支湾があり、平均水深は14.8m、面積はおよそ320km²で琵琶湖の約1/2である。主要な漁業資源としては真珠養殖やナマコ漁業などが挙げられる。しかし、近年、底魚などの底生水産物の漁獲量が減少しており、2001年度に海洋シンクタンク事業の一環として行われた海の健康診断において、生物の生息空間や底質などに問題がある可能性が指摘されている¹⁾。2007年には津水湾で大規模な青潮が発生し、対策が急務となっている。本稿では大村湾における水質の推移について述べ、次に底層が貧酸素化するメカニズムについて概説した後、大村湾における水環境改善の取り組みについて事例を紹介する。

■ 論文 2

Oncotarget. 2017 Feb 4. doi: 10.18632/oncotarget.15096.

Independent and joint effects of tea and milk consumption on oral cancer among non-smokers and non-drinkers: a case-control study in China

Fa Chen^{1,2}, Yu Qiu³, Guoxi Cai⁴, Kiyoshi Aoyagi⁵ and Baochang He^{1,2}

¹ Department of Epidemiology and Health Statistics, School of Public Health, Fujian Medical University, Fujian, China.,

² Key Laboratory of Ministry of Education for Gastrointestinal Cancer, Fujian Medical University, Fujian, China,

³ Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fujian, China,

⁴ Nagasaki Prefectural Institute of Environmental Research and Public Health, Nagasaki, Japan,

⁵ Okayama Department of Public Health, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki, Japan.

This study aims to evaluate the independent and joint effects of tea and milk consumption on oral cancer risk among non-smokers and non-drinkers (NS/ND). A hospital-based case-control study was performed in Fujian, China. 421 cases and frequency-matched 1398 controls were included without tobacco smoking and alcohol drinking habits. Unconditional logistic regression model was used to assess the relationship of tea and milk consumption with oral cancer risk. Tea and milk consumption

were significantly associated with decreased risk of oral cancer, the adjusted odds ratios (aORs) were 0.73 (95% CI: 0.54-0.97) and 0.69 (95% CI: 0.55-0.88), respectively. According to subgroup analysis, the inverse associations between tea consumption and oral cancer risk were only observed among the elders (>60 years) and urban residents. While the protect effect of milk drinking was more obvious in males, normal body mass index population (18.5-23.9), urban residents and those age \leq 60 years. Additionally, a significantly multiplicative interaction between tea and milk consumption was observed for oral cancer risk ($P = 0.001$). The present study is the first to simultaneously assess the association of tea consumption and milk drinking with oral cancer risk. The results suggest that tea and milk consumption are independent protective factors for oral cancer among NS/ND, with a joint effect between them.

■ 学会発表 1

日本ウォーターズ株式会社主催 地域産業活性化支援フォーラム[長崎・佐賀]
平成 28 年 9 月 17 日 長崎大学文教キャンパス(長崎市)

いわゆる『健康食品』中の違法成分分析

辻村和也

健康志向食品(いわゆる健康食品)は、健康・美容意識の高まりやインターネットによる通信販売の普及により、市場増加が見込まれる製品のひとつである。しかしながら、その中には、意図的に医薬品成分やその類縁体を混入した違法な製品があり、健康被害の報告事例もある。本フォーラムで長崎県における LC-MS/MS による違法成分検出事例及び LC-QTOF/MS での分析手法の検討の取り組みを示す。

■ 学会発表 2

日本防菌防黴学会 第 43 回年次大会 2016 年 9 月 26 日～27 日 きゅりあん(東京都)

携帯型フローサイトメトリー測定器によるレジオネラリスクの現地評価の有効性

田栗利紹¹、高木由美香¹、川野みどり¹、蔡 国喜¹、下田貴宗²、小田康雅³

¹長崎県環境保健研究センター、²(株)シモダアメニティ、³シスメックス(株)

【目的】レジオネラ属菌(レ菌)は市中肺炎の起因菌の一つであり、環境中至る所に生息しているが、アメーバ類との共生関係やバイオフィルム(BF)との複雑な相互関係のために、その実態はよくわかっていない。入浴施設等でレ菌の汚染問題が発覚して以降、我国では浴槽水の塩素消毒管理が義務付けられてきたが、循環ろ過器等の複雑な設備構造はもとより、泉質、ろ過の規模、入浴者数、時間、および消毒状況等によって時々刻々と変化する BF の影響、さらには衛生管理体制や経営状況など、いわば現地でしかわからない個々の問題のためにレ菌が再発を繰返して深刻な事態に発展している事例も少なくない。今回、我々は、これまでに卓上型フローサイトメトリー(FCM)測定器を用いて開発してきた浴槽水中レジオネラリスクの迅速細菌計数法(RDM)¹⁾を、重さ 6 kg 程度の携帯型 FCM 測定器に適用した結果、有効性が認められたので報告する。

【方法】添加回収実験:*Escherichia coli* NBRC 3972 と *Legionella pneumophila* ATCC 33152 を用いて 1～7 log CFU/mL の菌液を調製し、卓上型 FCM、携帯型 FCM および培養法にて添加回収実験を行い、結果を比較した。携帯型 FCM(CyFlow miniPOC, Sysmex)の測定では、0.6 mL 浴槽水に等量の希釈液¹⁾と 4 μL 染色液(propidium iodide)を加えたものを 5 mL ディスポジシングに吸い上げて機器にセットし、核酸量と側方散乱光(SSC)を指標とする特定領域の細胞数を測定した。卓上型 FCM の試薬及び操作方法と標準菌の培養法については既報のとおり処理した¹⁾。施設調査:平成 27 年 12 月～28 年 3 月に、N 県内の入浴施設 3 浴槽および 4 社会福祉施設の 5 浴槽(1 つは配管なし)を調査した。各浴槽は配管洗浄剤(モノクロラミンまたは過炭酸ナトリウム製剤)を用いて洗浄し、処理前と処理後の浴槽水を採水するとともに、ろ過器および配管排水もサンプリングして検査に供した。

【結果】標準菌株を用いた添加回収実験では、卓上型 FCM が培養法に対して直線性を示した範囲は約 3.4～7.4 log CFU/mL であったが、携帯型 FCM は約 4.4～7.2 log CFU/mL であった。しかし、浴槽水やろ過器等排水を用いた培養検査結果(30 検体中陽性 10、陰性 20)との比較では、卓上型 FCM の +/- 判定結果が 27 検体の

一致であったのに対して携帯型 FCM の判定結果は 28 検体が一致した。偽陰性と判定したサンプルは洗浄後のすすぎ水であり、過剰に残留した中和剤の影響が考えられ、偽陽性と判定したサンプルは掛流し式の排水で、レ菌自体の汚染が認められないか、または VBNC 化していると考えられた。

【結論】塩素管理下における浴槽水中のレジオネラリスクを迅速に評価する RDM 法において、若干の感度の差は認められたものの携帯型 FCM は卓上型と同程度の判定能を期待できる。データの視覚化が可能な本方法は、現地で BF の状況を施設衛生管理者に直接示すことで管理者の自発的な衛生管理を促すコーチングアイテムとしての効用が期待され、衛生管理者との現地での対話を通じてレジオネラ属菌予防に大きく寄与することができると考えられた。本研究は、平成 27 年度長崎県環境部 研究成果普及推進事業として実施された。

1) Taguri, T. *et al.*, J. Microbiol. Method, 2011

■ 学会発表 3

第 42 回九州衛生環境技術協議会 2016 年 10 月 13~14 日、都久志会館(福岡市中央区)

長崎県で発生したコクサッキーウイルス B5 型による乳児無菌性髄膜炎事例について

松本 文昭

【目的】エンテロウイルスによる感染症は、主に夏季に小児において流行し、その主因となる血清型は年により異なっている。その臨床像は幅広く多彩であり、手足口病やヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎等は感染症発生動向調査における 5 類定点把握疾患として、患者発生動向に加えその病原体情報も一部報告されている。

今回、臨床医から情報提供を受け、県内で散発的に発生していた新生児における無菌性髄膜炎事例に対する調査を実施したところ、コクサッキーウイルス B5 型(CB5)を相次いで検出したので報告する。

【方法】材料は、2016 年 3 月から 2016 年 7 月にかけて本県で発生した無菌性髄膜炎の新生児症例 19 例から採取された臨床検体(髄液、血清、咽頭拭い液、便等) 70 検体を用いた。

方法は、これらの検体に対し、エンテロウイルス属の遺伝子を網羅的に検出する CODEHOP VP1 RT-sn PCR を実施し、遺伝子検出を試みた。特異的増幅産物が得られたものについて、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、検出マニュアルに基づきウイルス型別を実施した。

【結果】調査した 19 症例のうち、9 症例 28 検体から CB5 の遺伝子を検出した。そのほか 1 症例から Echo9 を検出したが、残る 9 症例からはエンテロウイルスに由来する遺伝子は検出されなかった。CB5 検出事例のうち 2 症例では、子の発症前に母親に感冒症状が認められ、母親からの感染も疑われた。

【結論】搬入された症例の約半数から CB5 が検出された。コクサッキーウイルス B 群は、新生児期の感染では心筋炎や髄膜炎を起すウイルスとして知られており、2013 年には本県において CB2 による劇症型心筋炎による新生児死亡例も発生している。しかしながら、本県における通常の病原体サーベイランスでは、手足口病やヘルパンギーナなどの検体からコクサッキーウイルス A 群の流行は探知出来るものの、コクサッキーウイルス B 群の流行状況は十分に把握できていない。髄膜炎に限らず、エンテロウイルスの流行は年によってその血清型が異なるため、今後も通常のサーベイランスを継続するとともに、臨床医との情報共有を図ることで地域流行の早期探知につなげていくことが重要である。

■ 学会発表 4

平成 28 年度日本獣医三学会(獣医学術九州地区学会) 平成 28 年 10 月 16 日 千草ホテル(北九州市)

長崎県で分離された日本脳炎ウイルスの性状解析

吉川亮、斎藤佳子

【はじめに】日本脳炎は日本脳炎ウイルス(JEV)を病原体としたコガタアカイエカを主な媒介動物とするアルボウイルス感染症である。多くの場合が不顕性感染であるが、発症した場合、20～40%が死亡に至る公衆衛生上最も留意すべき急性ウイルス性脳炎である。現在、日本脳炎患者は 1990 年半ばから 10 名以下の報告数を推移し、長崎県においても 2001～2009 年まで患者報告がなかった。しかしながら、2010 年、2011 年および 2013 年に重篤な患者発生があったことに加え、演者らは長崎大学熱帯医学研究所との共同研究から長崎県では JEV 株の入れ替わりが頻繁にあり、大陸から JEV が飛来している可能性を強く示唆する結果をえたことから、長崎県で分離された JEV 株の性状を明らかにすることは患者発生要因を探索するうえで重要と考えた。そこで当所にて保管された 2007～2014 年の JEV 分離株について性状解析を行った。

【材料および方法】材料は 2007～2014 年までに長崎県で飼育された豚の血清から分離された JEV17 株および長崎県で捕集された蚊から分離された JEV9 株の計 26 株を用いた。方法は JEV のエンベロープ領域(1,500 塩基)を用いた分子疫学解析およびプラーク形成能、抗原性等のウイルス性状の比較解析を行った。

【結果】2007～2014 年までに長崎県で分離された JEV はすべて遺伝子型 1 型であり、系統樹解析の結果、3 つのグループに分類された。このうち 2 つのグループは中国で近年多く報告のある JEV 株を含むものであった。2007～2014 年までの JEV 分離株は ϕ 2 mm 前後のプラークを形成し、分離株間での差はみられなかった。マウスの抗 JEV 血清を用いた中和試験の結果、すべての株が抗 JEV 血清で中和された。

【まとめ】長崎県は種々の面で大陸の影響を受けているが、JEV についても分子疫学解析の結果から大陸からの影響が強くみられた。長崎県の分離株はすべて遺伝子型 1 型であるが、患者の多いインドや中国では 1 型 3 型ともに患者発生しており、遺伝子型は発生要因ではないと考えられる。また、ウイルス性状の比較解析の結果から長崎県で分離された JEV はプラーク形成能や抗原性において患者発生を誘発する要因はみつからなかった。今回、ウイルス側からの患者発生要因は明らかにできなかったが、引き続き病原因子の探索を続けていきたい。

■ 学会発表 5

日本食品衛生学会 平成 28 年 10 月 27- 28 日 函館国際ホテル(北海道函館市)

キンシバイ(巻貝)食中毒事例における生体試料中テトロドトキシン濃度推移と毒成分に関する考察

辻村和也¹、吉村裕紀¹、坂本真樹子²、池田由紀¹、山之内公子³、本村秀章¹

1長崎県環境保健研究センター、2長崎県県央保健所、3元長崎県環境保健研究センター

【目的】平成 27 年 11 月長崎県県北エリアで巻貝(キンシバイ)による食中毒が発生し、主要原因物質としてテトロドトキシン(TTX)が検出された。TTX に起因するキンシバイ食中毒は、過去 1 件長崎県で発生しているが、今回を含め全国で 3 例しかない。そのため、キンシバイによる食中毒に関する知見は少ない。

そこで、県生活衛生課、医療機関等の協力のもと、治療・検査の過程で経日的に採取された患者生体試料(血清及び尿)中の TTX 濃度推移と当該巻貝中の毒成分解析を行った。

【方法】

食品検体は、入手した巻貝(十数個)のうち、可食部の残っていた 2 検体(検体 1、2)を分析した。血清検体は、食中毒発生時「Day 0」～「Day 13」の検体を、また、尿は「Day 0-1」及び「Day 2-3」蓄積尿を入手、分析した。食品及び血清の LC-MS/MS による TTX 定量分析は、当センターで確立した方法により分析を行った。尿検体についても血清と同じ方法で測定した。また、食品検体中の TTX 類縁体探索のために LC-QTOF/MS 分析を行い、マウスバイオアッセイによる食品検体の総合的毒力(MU)も算出した。

【結果】

巻貝残品 2 検体とも高濃度 TTX が検出された。特に検体 2 は、1 個体で致死量の TTX を含有していた。また、血清中 TTX 量推移及び尿排泄の結果より、患者は致死量を超える TTX を摂取していたと推察された。

LC-Q/TOF/MS 及びマウスバイオアッセイの結果、11-oxo-TTX 等 TTX 類縁体の存在が示唆された。

【考察】

今回長崎県で発生したキンシバイの喫食による食中毒事例は、過去の事例と同じく、食品残品、血清及び尿から TTX が確認された。また、食品残品中 TTX 濃度は極めて高濃度であると共に、毒性能を有する類縁体の存在が示唆された。一方、生体内 TTX 推移の結果、臨床症状と相関するように、キンシバイ喫食直後の TTX 血清中濃度は急速に上昇、喫食後翌日が最高濃度であり、数日かけて緩やかに減少がみられた。しかし、意識回復まで 6 日間と長く、実際喫食したキンシバイも食品残品同様に高濃度の TTX が蓄積していたことが推察された。以上のことから、キンシバイは、食品衛生上極めて危険な種であると結論づけられた。

■ 学会発表 6

第 57 回日本熱帯医学会大会 2016 年 11 月 4～6 日、東京

A survey on health status among farmers in a local county of southeastern China

蔡 国喜¹、塗 饒萍²、張 文昌²、黄 萌²、陳 潔²、何 斐²、矢澤 亜季³、市川 智生⁴、山本 太郎⁴、門司 和彦⁵

¹長崎県環境保健研究センター、²福建医科大学、³東京大学大学院医学系研究科、⁴長崎大学熱帯医学研究所

⁵長崎大学大学院熱帯医学・グローバルヘルス研究科

【背景】1980 年代後半に改革開放政策が導入されて以降、中国の急速な市場経済化は人びとの生活環境に大きな変化をもたらし、彼らの持続的な健康は脅かされている。たとえば、食生活が欧米化し身体活動量が低下することによる肥満・慢性疾患の増加や、社会格差の拡大・人びとの関係性の希薄化がもたらす心理的健康影響などが挙げられる。日本の農村部でも過疎化、高齢化の進行に伴う成人病・孤独感問題が深刻化している。

【調査方法】2015 年 5 月 2 日より F 省 S 県において予備調査を行った。予備調査では現地の生活の様子に関する聞き取りを行なったほか、健康調査を行うにあたって必要となる設備や医療スタッフの準備・状況確認を実施した。2015 年 7 月末からの本調査では、7 つのコミュニティに暮らす 797 名を対象として生活環境や心理ストレスに関する質問紙調査、採血、身体計測(身長・体重・腹囲・臀囲)、血圧測定を実施した。質問紙調査には家族構成、出稼ぎの経験、家族との離別の経験、ソーシャルキャピタル、食生活、飲酒、喫煙、ストレス尺度等に関する質問が含まれている。

【結果】2015 年 8 月に、S 県の地方衛生局、郷衛生院などの協力の下で本調査を実施した。調査参加者 790 名のうち男性の割合は 39.1%で、平均年齢は 59.5 歳(男性が 61.9 歳、女性が 58.0 歳)であった。また 38.1%が教育を受けておらず、39.4%が小学校卒業、22.5%が中学校卒業以上の学歴であった。婚姻状況については 78.9%が婚姻状態にあった。過体重(BMI \geq 25)は男性で 23.0%、女性で 31.7%であった。高血圧は 36.7%の男性、48.4%の女性で見られた。本研究は中国農村部で肥満や高血圧をはじめとした慢性疾患の拡大状況を明らかにし、生活様式や環境変化との関連性が示唆された。

■ 学会発表 7

平成 28 年度日本水産学会九州支部総会 2016 年 12 月 10 日 長崎大学水産学部

ヒスタミン産生菌 *M.morganii* 食中毒分離株からの HDC 遺伝子のクローニング及びその発現系の構築

高 禎俐¹・蔡 国喜²・田栗 利紹²・本多 隆²・吉田朝美¹・長富 潔¹

¹長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科

²長崎県環境保健研究センター

【目的】ヒスタミンによるアレルギー様食中毒は、ヒスタミン産生菌のもつヒスチジン脱炭酸酵素 (Histidine decarboxylase: HDC) により引き起こされることである。取扱い菌は長崎県で 2008 年に発生した食中毒の原因食品から分離・同定された *Morganella morganii*、*Raoultella planticola* で、そのうち *M. morganii* の食中毒分離株と標準株について低温での増殖活性を比べると、分離株の方が増殖活性が高い傾向が見られた。そこで本研究では、ヒスタミン産生菌 *M. morganii* 食中毒分離菌からの HDC 遺伝子のクローニング及びその発現系の構築を行い、食中毒分離菌 HDC の性状解明を目的とした。

【方法】*M. morganii* 食中毒分離株より染色体 DNA を抽出し、PCR 法により HDC 遺伝子を増幅し、TA クローニングした。同遺伝子を pCold I DNA vector に挿入し、大腸菌による大量発現系の構築を試みた。

【結果】*M. morganii* の食中毒分離株より HDC 遺伝子のクローニングを行った上に、そのコード領域の塩基配列 1,137 bp (378 アミノ酸推定) を決定し、標準株と比べると、34 箇所の塩基置換が認められ、5 箇所のアミノ酸置換が認められた。さらに、本酵素遺伝子を発現ベクターに挿入し、大量発現系の構築を試みているところである。

■ 学会発表 8

平成 28 年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会 (日本獣医公衆衛生学会) 平成 29 年 2 月 24 日～26 日 ホテル金沢 (石川県)

長崎県で分離された日本脳炎ウイルスの性状解析

吉川亮、斎藤佳子

【はじめに】日本脳炎は日本脳炎ウイルス (JEV) を病原体としたコガタアカイエカを主な媒介動物とするアルボウイルス感染症である。多くの場合が不顕性感染であるが、発症した場合、20～40% が死亡に至る公衆衛生上最も留意すべき急性ウイルス性脳炎である。現在、日本脳炎患者は 1990 年半ばから 10 名以下の報告数を推移し、長崎県においても 2001～2009 年まで患者報告がなかった。しかしながら、2010 年、2011 年および 2013 年に重篤な患者発生があったことに加え、演者らは長崎大学熱帯医学研究所との共同研究から長崎県では JEV 株の入れ替わりが頻繁にあり、大陸から JEV が飛来している可能性を強く示唆する結果をえたことから、長崎県で分離された JEV 株の性状を明らかにすることは患者発生要因を探索するうえで重要と考えた。そこで当所にて保管された 2007～2014 年の JEV 分離株について性状解析を行った。

【材料および方法】材料は 2007～2014 年までに長崎県で飼育された豚の血清から分離された JEV17 株および長崎県で捕集された蚊から分離された JEV9 株の計 26 株を用いた。方法は JEV のエンベロープ領域 (1,500 塩基) を用いた分子疫学解析およびプラーク形成能、抗原性等のウイルス性状の比較解析を行った。

【結果】2007～2014 年までに長崎県で分離された JEV はすべて遺伝子型 1 型であり、系統樹解析の結果、3 つのグループに分類された。このうち 2 つのグループは中国で近年多く報告のある JEV 株を含むものであった。

2007～2014年までの JEV 分離株は ϕ 2 mm 前後のプラークを形成し、分離株間での差はみられなかった。マウスの抗 JEV 血清を用いた中和試験の結果、すべての株が抗 JEV 血清で中和された。

【まとめ】長崎県は種々の面で大陸の影響を受けているが、JEV についても分子疫学解析の結果から大陸からの影響が強くみられた。長崎県の分離株はすべて遺伝子型 1 型であるが、患者の多いインドや中国では 1 型 3 型ともに患者発生しており、遺伝子型は発生要因ではないと考えられる。また、ウイルス性状の比較解析の結果から長崎県で分離された JEV はプラーク形成能や抗原性において患者発生を誘発する要因はみつからなかった。今回、ウイルス側からの患者発生要因は明らかにできなかったが、引き続き病原因子の探索を続けていきたい。

■ 学会発表 9

第53回長崎県総合公衆衛生研究会 2017年3月3日 長崎大学医学部ポンペ会館

長崎県におけるノロウイルスの検出状況

山下綾香¹、三浦佳奈¹、松本文昭¹、吉川亮¹、田栗利紹¹

¹長崎県環境保健研究センター

【はじめに】ノロウイルスは食中毒や感染性胃腸炎の原因となる主要な病原体の一つとして知られている。本ウイルスは GI から GV までの遺伝子グループに分類されており、その中で主にヒトに感染するのは 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が、平成 26 年 3 月にはこれまで世界的に流行していたウイルス株と遺伝子型が異なる新規遺伝子型の GII.P17- GII.17 が神奈川県川崎市で発見された¹⁾。新規遺伝子型のウイルスに対しては、一般的には免疫を持たないヒトが多いことから大きな流行に繋がることが懸念されている。このことを受けて、今回、長崎県内のノロウイルスを原因とする食中毒および感染性胃腸炎について、過去 5 年間に長崎県で発生したノロウイルスの分子疫学解析を行い、本ウイルスの長崎県への侵淫状況を調査した。

【対象と方法】2-1. 供試したノロウイルス株 平成 23 年 4 月から平成 28 年 3 月までに、ノロウイルスによる食中毒および感染症胃腸炎の疑いで長崎県環境保健研究センターに検査依頼された事例により搬入された便、嘔吐物および食品について、ノロウイルス陽性と判定された 213 株を用いた。2-2. 検体からの RNA 抽出方法、RT-PCR および遺伝子型別 厚生労働省からの通知に基づいて 2)、便検体を 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 RNA 抽出キット (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 DNA 分解酵素で処理した後、RT-PCR 検査キット (QIAGEN OneStep RT-PCR Kit, QIAGEN) を用いてノロウイルス遺伝子の構造タンパク質遺伝子を増幅した。PCR 増幅用のプライマーセット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。食品検体に関しては超遠心法²⁾を用いて濃縮し RNA 抽出後、DNA 分解酵素処理、RT-PCR 検査、及び Semi Nested PCR を行った。Semi Nested PCR 増幅用のプライマーセットとしてノロウイルス GI には G1SKF/G1SKR を、ノロウイルス GII には G2SKF/G2SKR を用いた。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、塩基配列を決定後、ノロウイルス遺伝子型分類ツール (Norovirus genotyping tool) を用いて遺伝子型別した。2-3. GII.17 の分子疫学解析 今回、GII.17 と同定された検体に関してはより詳細に解析した。逆転写反応キット (SuperScriptIII™ Reverse Transcriptase, invitrogen) を用いて抽出 RNA の相補的 DNA を合成し、DNA ポリメラーゼ (Ex Taq Hot Start Version, TaKaRa) を用いてノロウイルスの RNA 合成酵素 (RdRp) 遺伝子を増幅した。PCR 増幅用のプライマーセットとして 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、塩基配列を決定後、ノロウイルス遺伝子型分類ツールを用いて遺伝子型別したのち系統樹解析を実施した。系統樹解析は GENETYX ver.12 を用いて、近隣結合法 (NJ 法)³⁾で行った。

【結果及び考察】3-1. 長崎県において平成 26 年までは GII.4 が主に検出されていたが、同年末から翌年にかけて GII.17 が検出されはじめた。平成 27 年には GII.17 の占める割合が増えていたが、GII.4 の検出もやや減少傾向にあるものの続いており、全国との比較において大きな違いは認められなかった。3-2. 新型ノロウイルスの流行状況 新分類法に基づくノロウイルスの遺伝子型別解析を行ったところ、通知法 2)により構造蛋白質の遺伝子型が GII.17 に分類された株は全てノロウイルス GII.P17- GII.17 に分類された。また、事例ごとに 1 検体選出し、系統樹を作成したところ、川崎市にて平成 26 年と平成 27 年に検出されたノロウイルス GII.P17- GII.17 と全て同じグループを形成しており、川崎市での発見から数ヶ月遅れで長崎県に侵入していたことが明らかとなった。今後もノロウイルス GII.P17- GII.17 の動向には十分な注意が必要と考えられる。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していきたい。また、今シーズンは GII.2 の流行についても注目されている。本県も、それらを含めた調査を引き続き実施する予定である。

1) 新規遺伝子型ノロウイルス GII.P17-GII.17 の流行, IASR, 36, 175-178, 2015

2) 厚生労働省通知, ノロウイルスの検出法について, 平成 19 年 5 月 14 日食安監発第 0514004 号, <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/kanren/kanshi/031105-1.html>

3) Saitou N & Nei M., The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, Mol Biol Evol 4,406-425, 1987