

表1 散発性急性胃腸炎患者からの病原体検出状況(1997年11月-1998年12月)

年. 月	電子顕微鏡検査					PCR検査(YURI nested)	
	検査数	SRSV	Rota	Adeno	Astro	検査数	陽性数
1997.11	33				1	10	1
12	31		2	3	3	21	4
1998.1	47	9				44	21
2	22	2				17	4
3	21		3	2		11	1
4	36	2	10			0	
5	27		9	1		0	
6	38		3		1	0	
7	38		1	1		0	
8	44	1	1			0	
9	36					0	
10	47	1				40	5
11	29					25	3
12	38	9			1	32	10
Total	487	24	29	7	6	200	49

表2 散発性カリシウイルスのプローブ型の月別分布

年次	月	PCR陽性数	P1A	P1B	P2A	P2B	型別不能
1997	10						
	11	1				1	
	12	4				3	1
1998	1	21			14	6	1
	2	4			4		
	3	1		1			
1998	10	5				5	
	11	3				3	
	12	10		6		4	
合計		49	0	7	18	22	2
	(%)		0.0	14.3	36.7	44.9	4.1

表3 集団発生事例のプローブ型別

事例no	発生年月日	患者数/摂食者数	原因食品	検査数	陽性数	P1A	P1B	P2A	P2B	型別不能
1	H10.10.??		カキフライ	10	8	3				5
2	H10.11.25	34/53	赤貝ヌタアエ	12	6		6			
3	H10.12.12	10/11	生カキ	10	6		2		4	
4	H11.2.20	11/19	すし	7	3	3				
計				39	23	6	8		4	5

## カキ養殖海域における小型球形ウイルスの分布に関する研究

分担研究者 石川 幸 広島県保健環境センター

研究協力者 福田伸治 高尾信一 徳本静代 広島県保健環境センター微生物第二部

### 研究要旨

カキ 32 検体, 海水 28 検体, 汽水 60 検体および他県産の市販生食用カキ 15 検体について, 小型球形ウイルス (NLV) の分布を調査した。カキおよび汽水についてはポリエチレングリコールを, 海水については陽電荷フィルターおよびポリエチレングリコールを用いて回収・濃縮を行った。NLV 遺伝子はカキの 9.4%, 汽水の 1.7% から検出されたが, 海水および市販生食用カキからは検出されなかった。1998/99 年シーズン (本シーズン) の検出率は 1997/98 年シーズン (昨シーズン) に比し低かった。検出された検体は 11 月下旬から 2 月上旬に採取したものであり, 細菌学的汚染度の最も高い地点からであった。検出された NLV は Mexico, Yuri および Norwalk タイプと数種であった。

#### A. 研究目的

広島湾のカキ養殖海域におけるカキおよび海水中の小型球形ウイルス (NLV) の分布を調査し, NLV 対策の基礎データを得る。

#### B. 研究方法

##### 1 検査地点

図 1 に示す 11 地点から検体を採取した。カキおよび海水は 1998 年 11 月から 1999 年 2 月の間に 8 地点から

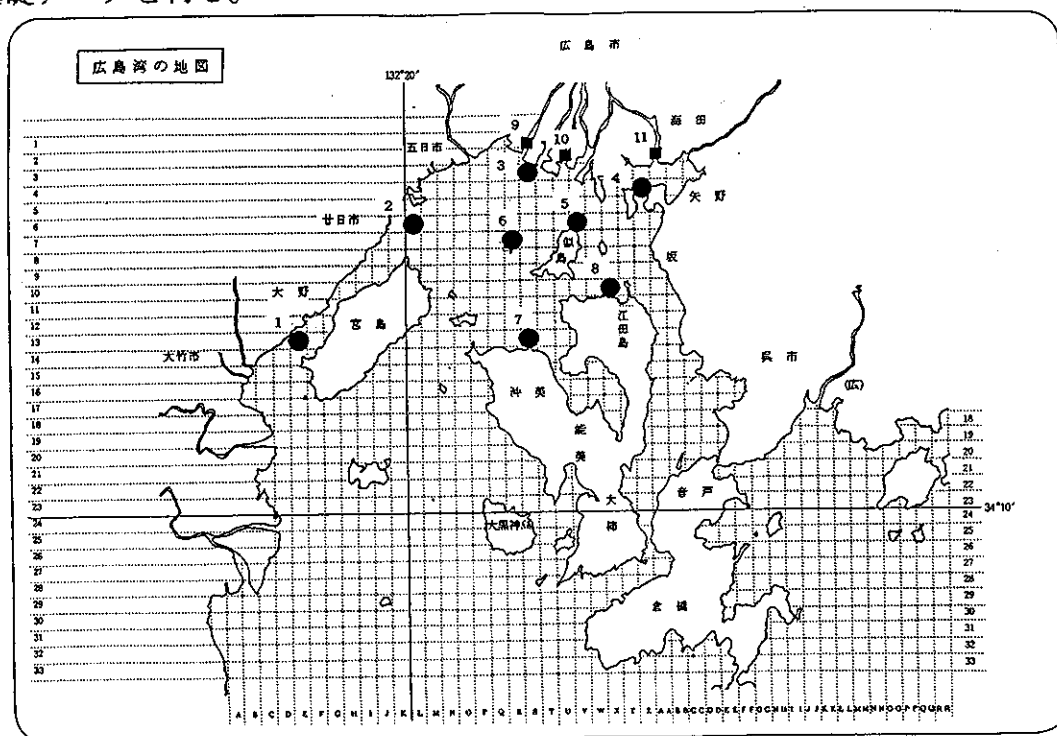


図 1 検査地点

● : カキおよび海水, ■ : 汽水

毎月採取した。また、汽水は1998年5月から1999年2月の間に3地点から1週間間隔で採取した。

## 2 カキ中のNLV遺伝子の検出

養殖筏から採取した32検体のカキの中腸腺を検査材料とし、平成9年5月30日付け衛食第156号厚生省生活衛生局食品保健課長および乳肉衛生課長通知の方法に準じてポリエチレングリコール(6,000)による沈澱・濃縮を行い、CTAB法[1]によりRNAを抽出した。

PCRは衛食第156号に基づく条件に準じて行った。ただし、逆転写酵素はMMLV由来の酵素(ReverTra Ace, TOYOBO, 最終濃度10u/ $\mu$ l)を使用

した。プライマーはNV35/36 $\rightarrow$ NV81/82, SM82 および Yuri52F/R, MR3/4 $\rightarrow$ Yuri22F/Rの2系統プライマーセットを使用した。

## 3 海水中のNLV遺伝子の検出

海水28検体について検査を実施した。NLV粒子の回収は、①20リットルの海水を陽電荷フィルター(約140mm径, Cuno社, USA)でろ過し吸着・回収後、ポリエチレングリコールで濃縮する方法、②180mlの海水からポリエチレングリコール(6,000)沈澱法によりNLV粒子を回収・沈澱する方法の2方法により行った(図2)。RNAの抽出はCTAB法により行った。また、PCRはカキと同様の方法により行っ

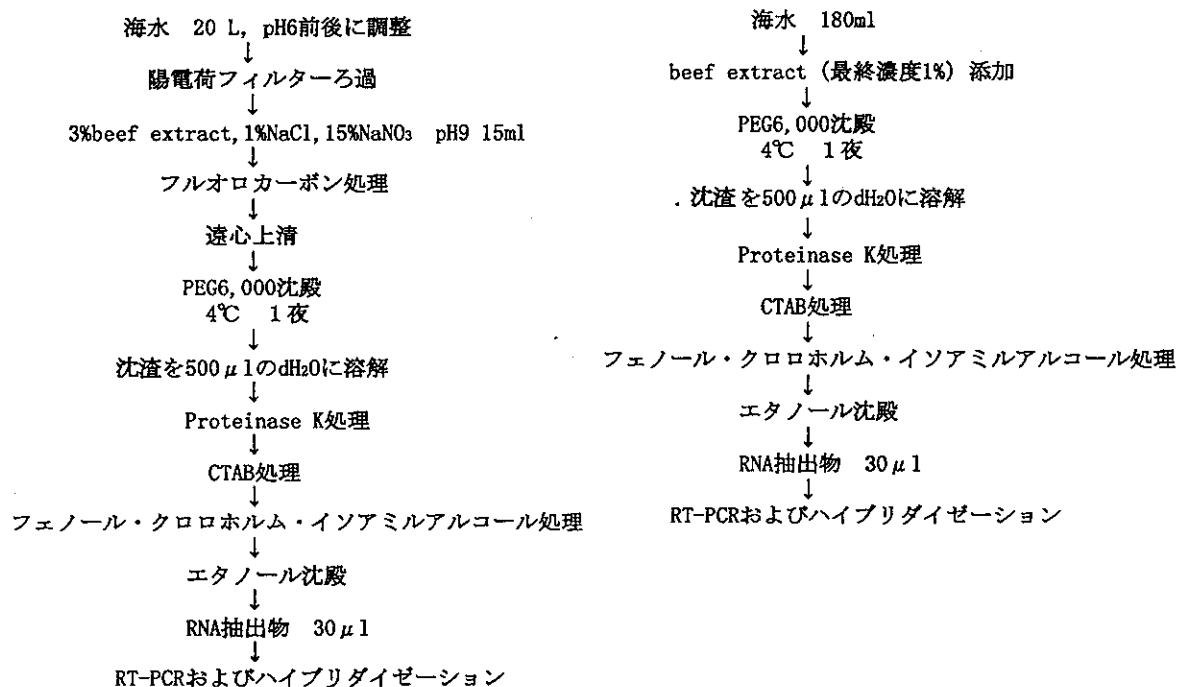


図2 海水からのRNA抽出

た。

#### 4 汽水中の NLV 遺伝子の検出

汽水 60 検体について、海水と同様に 180ml を用いポリエチレングリコール (6,000) 沈殿法により濃縮後、CTAB 法により RNA を抽出した。PCR はカキと同様の方法で行った。

#### 5 市販生食用カキからの NLV 遺伝子の検出

1998 年 10 月から 1999 年 1 月の間に M 県産生食用カキ 15 検体について前述 2 と同様の方法で行った。

#### 6 NLV 遺伝子の確認

PCR で陽性を示したサンプルは、Ando ら [2] のプローブセットを用いてサザンハイブリダイゼーションにより確認を行うとともに、PCR 産物のダイレクトシーケンスを行った。

### C. 研究結果

#### 1 NLV 遺伝子の検出

カキ 32 検体中 1 地点 3 検体 (9.4%) から NLV 遺伝子が検出された。NLV 遺伝子が検出された 3 検体は、広島県が定める指定外海域 (生食用として出荷できない海域) から採取されたカキであり、広島湾内で細菌学的に最も汚染度の高い地点であった。NLV 遺伝子は 11 月下旬、1 月中旬および 2 月上旬に採取したカキから検出された。NLV 遺伝子は Yuri 系プライマーで 3 検体中 3 検体、NV 系プライマーで 3 検体中 2 検体から検出された。

汽水 60 検体中 1998 年 12 月下旬に採取した 1 検体 (1.7%) から 2 系統のプライマーセットで検出された。

海水 28 検体および市販生食用カキ 15 検体からは NLV 遺伝子は検出されなかった。

#### 2 1998/99 年と 1997/98 年との検出率の比較

図 1 に示す養殖海域 8 地点について、1997/98 年シーズン (昨シーズン) と 1998/99 年シーズン (本シーズン) とのカキからの NLV 遺伝子の検出率を比較した。昨シーズンの検出率は 13.8% (8 地点中 6 地点から検出) であったが、本シーズンは 9.4% (8 地点中 1 地点、図 1 に示す地点 4) であり、検出率が低下した。また、海水においても同様に 18.8% (8 地点中 5 地点) から 0.0% に低下した。

#### 3 遺伝子型に関する検討

検出した 4 株について、サザンハイブリダイゼーションを実施した。カキから検出した 3 株中 2 株は P2-A プローブセットと反応し、genogroup II に属することが認められたが、1 株はどのプローブセットとも反応しなかった。汽水から検出した 1 株は P1-A プローブセットと反応し、genogroup I に属することが認められた。

また、図 3 に示したように、昨シーズンに検出された NLV 遺伝子はすべて Mexico タイプであったが、本シーズンはカキから検出した 3 株中 2 株が Mexico タイプであり、1 株は Yuri 株と高い相同性を示した。汽水から検出した 1 株は Norwalk タイプであり、KY-89 株と高い相同性を示した。

### D. 考察

本シーズンのカキおよび海水からの NLV の検出率は昨シーズンに比較して低く、年変動が存在することが示唆された。年変動の要因については今後ともデータを集積し検討する必要があると思われる。

昨シーズンに検出された NLV は Mexico タイプであったのに対し、本シーズンは Mexico, Yuri および Norwalk タイプと検出される株も年々変化していることが示唆された。

NLV 遺伝子が検出された地点は広島湾内では最も細菌学的汚染度の高い地点である。昨シーズンの結果からも、NLV 遺伝子の検出と汚染指標菌との間には強い相関があることが認められており、食品衛生法で加工基準として定められている大腸菌群は NLV の汚染指標にもなると思われる。

NLV 遺伝子の検出時期は 11 月下旬から 2 月上旬であり、下痢症の多発時期に一致して検出される傾向が認められた。

#### E. 結論

NLV 遺伝子はカキの 9.4%(3/32) から、汽水の 1.7%(1/60) から検出されたが、海水および他県産の市販生食用カキからは検出されなかった。NLV の検出されたカキはすべて同一地点で、最も細菌学的汚染の高い地点から採取されており、検出された時期は 11 月下旬から 2 月上旬の間であった。検出率は昨シーズンに比し、カキで 13.8%から 9.4%に、海水で 18.8%から 0.0%に減少した。検出された NLV は Mexico, Yuri および Norwalk タイプと数種に及んだ。

#### F. 参考文献

- [1] Jiang X., Wang J., Graham D. Y. and Estes M. K. :Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2529-2534, 1992.
- [2] Ando T., Monreo S. S., Gentsch J. R., Jin Q., Lewis D. C. and Glass R. I. :Detection and differentiation of antigenically distinct small round-structured viruses (Norwalk-like viruses) by reverse transcription-PCR and southern hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 33, 64-71, 1995.

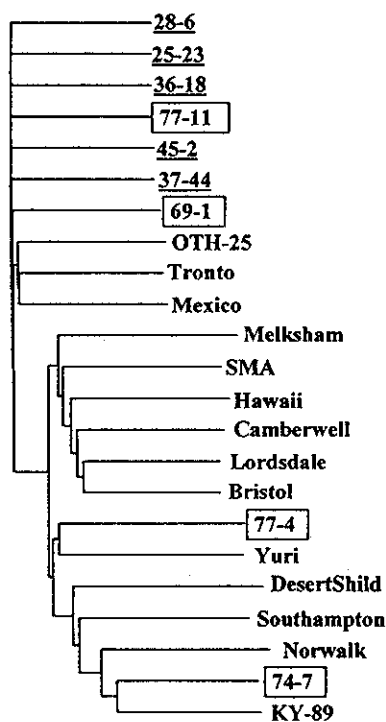


図3 系統図

下線：1997/98年，枠：1998/99年

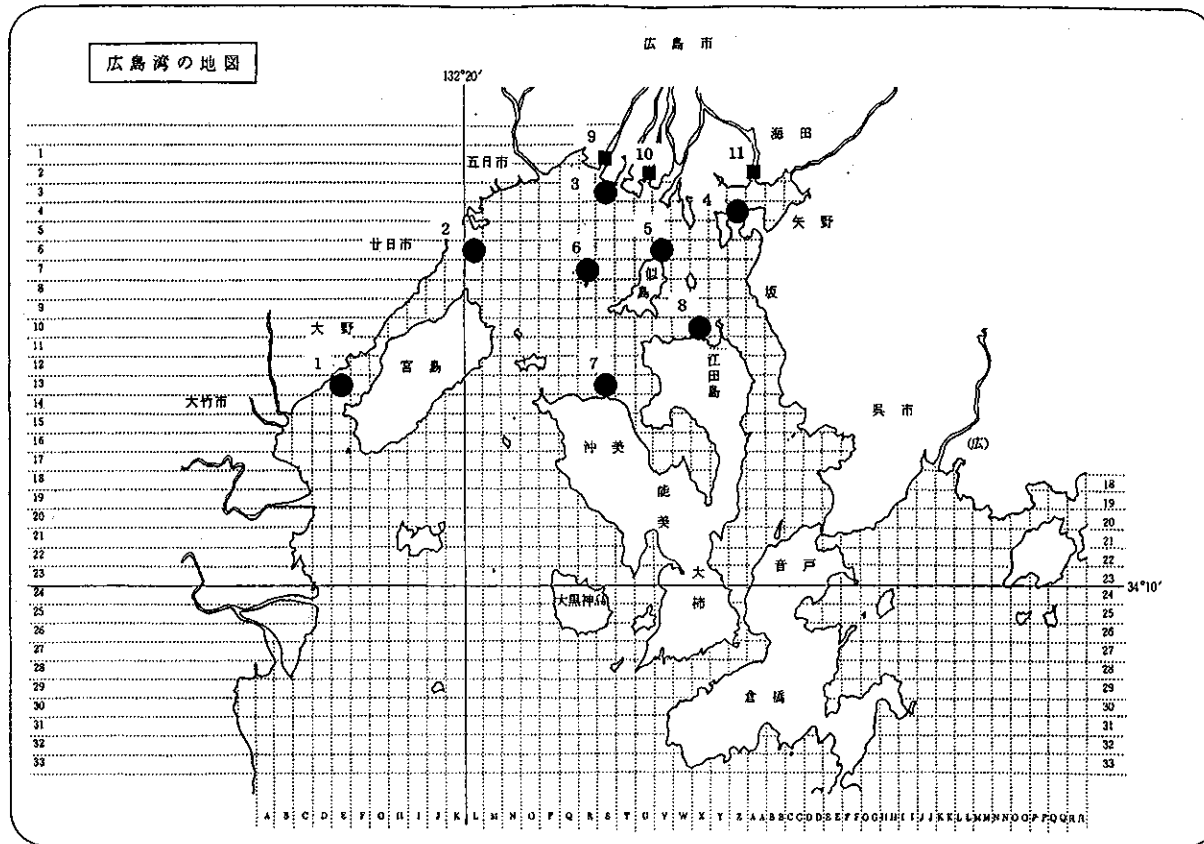


図1 検査地点

● : カキおよび海水, ■ : 汽水

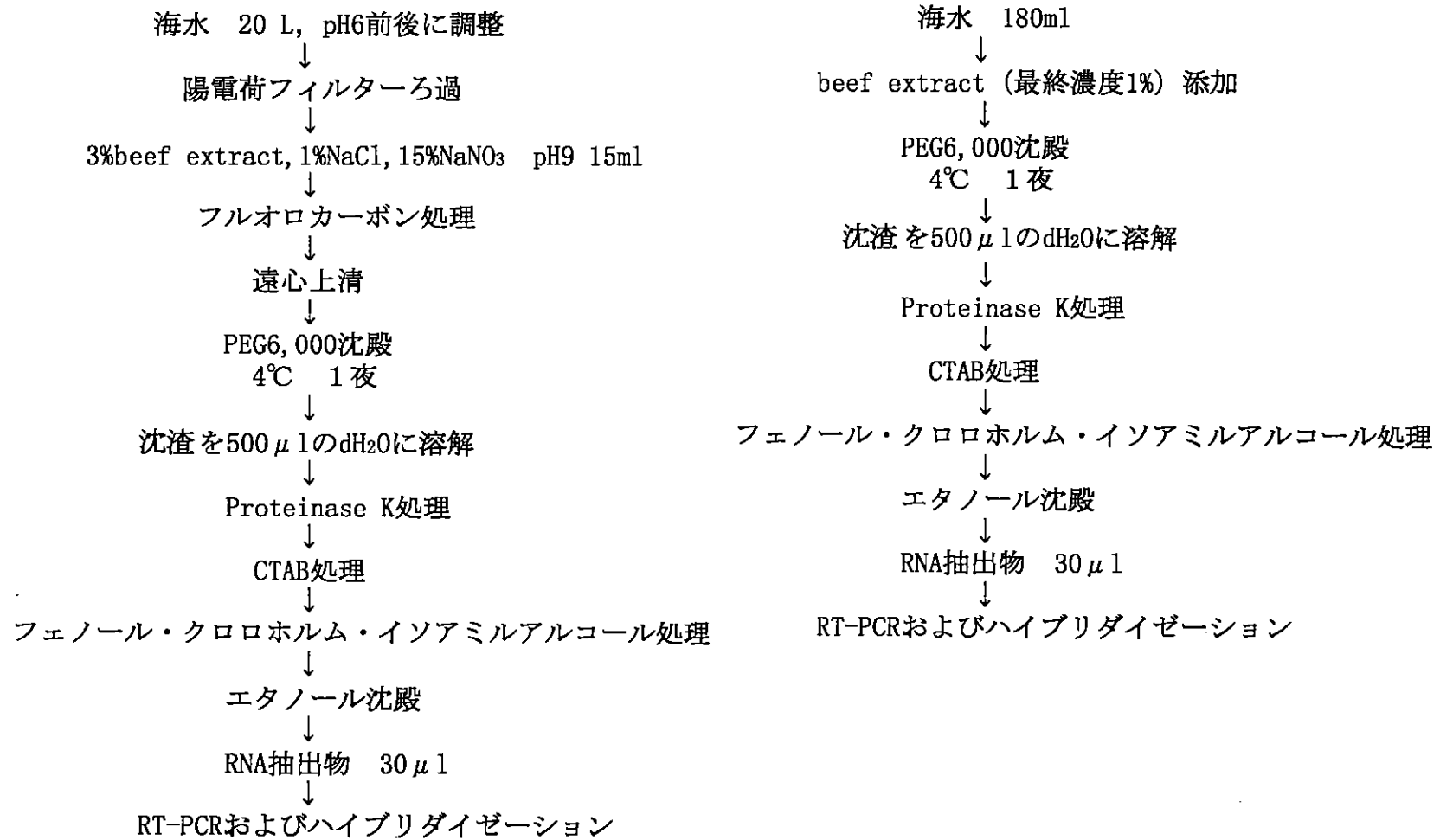


図2 海水からの RNA 抽出

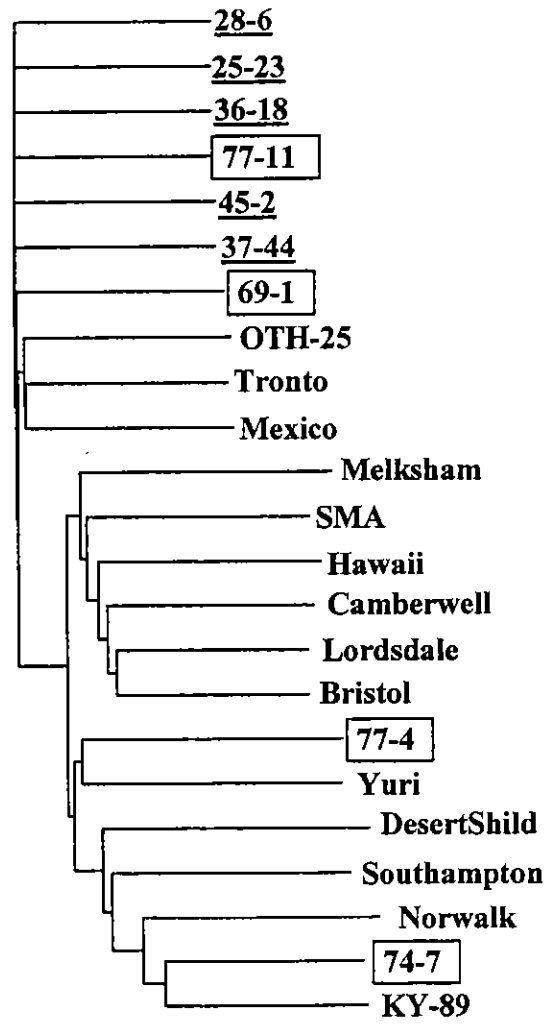


図3 系統図

下線：1997/98年，枠：1998/99年



## 分担研究報告書

### カキ養殖海域の衛生評価指標としての F 特異大腸菌ファージに関する研究

分担研究者 大垣眞一郎 東京大学大学院工学系研究科教授

#### 研究要旨

カキ養殖場における *E.coli*、大腸菌群、F 特異大腸菌ファージの存在状況調査を 5 ヶ月間行い、F 特異大腸菌ファージの持つ衛生評価指標としての特性を、現況の微生物指標と比較検討を行った。

#### A. 研究目的

カキ養殖場における *E.coli*、大腸菌群、F 特異大腸菌ファージの存在状況調査を 5 ヶ月間行い、F 特異大腸菌ファージの持つ衛生評価指標としての特性を、現況の微生物指標と比較検討を行うのが本研究の目的である。

#### B. 研究方法

広島湾沿岸のカキ養殖場および東京湾（付録）において、1998 年 11 月～1999 年 3 月に月 1 回採取された海水の *E.coli* 数、大腸菌群数、F 特異大腸菌ファージ数を測定した。同時に採取したマガキに含まれる大腸菌群数、F 特異大腸菌ファージ数を測定した。海水は同時に pH、電気伝導度、SS を測定した。

*E.coli* 数：クロモカルトコリフォーム寒天（MERCK）による混釈法により、試料 10ml もしくは 1ml を測定した。培地凝固後 36 ±1°C で 20～24 時間培養し、得られたコロニーのうち濃青色から紫色に発色したものを測定しその合計を *E.coli* 数とした。

大腸菌群数：デソキシコレート培地（栄研社製）を用いて測定を行った（上水試験方法、1993）。供試液量は、海水は 10ml もしくは 1ml、カキは 1ml とした。

#### F 特異大腸菌ファージ：宿主菌としては

*Salmonella typhimurium* WG49 と *Salmonella typhimurium* WG45 を用いた。海水は試料 100ml を単層寒天法で、カキは前処理で得られた上澄み液 1ml を重層寒天法でそれぞれ測定した。海水は得られた溶菌斑数の合計を海水 100ml 中のファージ数とし、カキは得られた溶菌斑総数を測定に用いたカキの体積で除した値をファージ濃度とした。

カキの前処理：殻を剥いたカキを家庭用ミキサーで 1 分間攪拌し、抽出液 30ml 加えて再び 1 分間攪拌した。大腸菌群数測定には攪拌後の乳液を用いた。更に乳液に当量クロロホルムを混合後 1 日冷蔵保存し、遠心分離（14000rpm、4°C、10 分間）をかけた。F 特異大腸菌ファージ数測定にはそこで得られた上澄み液を用いた。

#### C. 研究結果

pH は、すべての海水が 7.0～8.4 の範囲にあった。電気伝導度は、広島湾で 54～65 (mS/cm)、台場で 45～53 (mS/cm)、葛西で 35～39 (mS/cm) の範囲の値を示した。SS は 16～108 (mg/l) の範囲にあり、場所による違いは認められなかった。

海水中の *E.coli*、大腸菌群、F 特異大腸菌ファージの濃度分布を図 1～図 3 にそれ

それ示した。なお、図中の点の色はそれぞれ、白色が生カキ捕獲許可区域の、灰色が生カキ捕獲禁止区域の、黒色がカキ捕獲禁止区域の値を表している（付録参照）。図中のそれぞれの微生物濃度は 3~4 ヶ月の平均値で比較した。

*E. coli*、大腸菌群は生食用カキ捕獲許可区域（広島湾）で濃度が低く、カキ捕獲禁止区域（東京湾）で濃度が高い傾向が見られた。F 特異大腸菌ファージは広島湾の海水からはほとんど検出されなかった。

海水中の電気伝導度と微生物濃度との関係を図 4 に示した。海水の電気伝導度と塩化物イオン濃度の相関から、電気伝導度が低いほど海水中の淡水の割合が多いと考えられる。

海水中の微生物濃度とカキ中の微生物濃度の関係を図 5~図 6 に示した。大腸菌群および F 特異大腸菌ファージともに、カキ中の濃度は海水中よりも高かった（カキの単位重量あたりの体積を 1 とした場合）。特に F 特異大腸菌ファージは、100ml の海水中から検出されない海域のカキからも高い濃度（10000PFU/100ml）で検出されることがあった。

#### D. 考察

東京および広島の河川水中の微生物濃度は下水処理水が大きく影響していると考えられる。図 4 から、電気伝導度が低くなると大腸菌群濃度が高くなる傾向があり、河川水が多く含まれている海水からは微生物が高い濃度で検出されていることが分かる。また、すべての微生物濃度が東京湾でもっとも高く、生カキ捕獲禁止区域、生カキ捕獲許可区域となるにつれて低くなっていた。

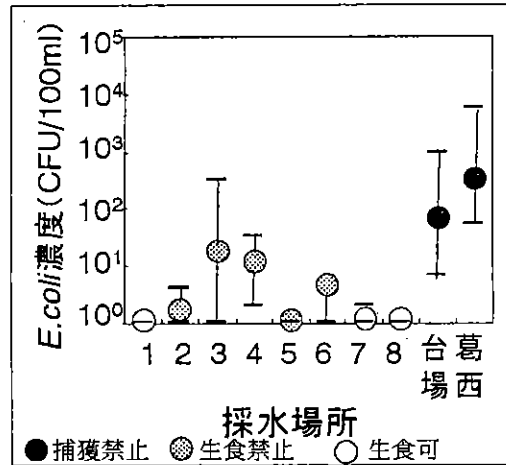


図 1 海水中の *E. coli* 濃度

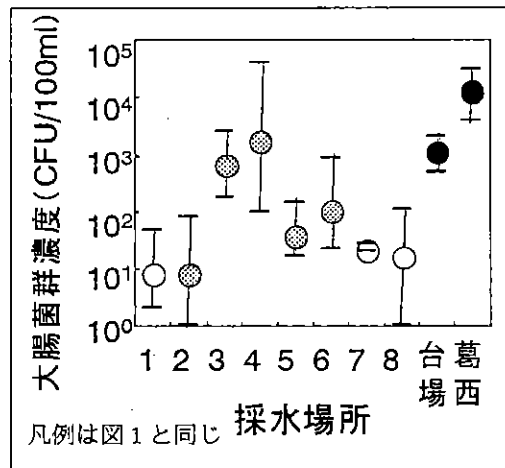


図 2 海水中の大腸菌群濃度

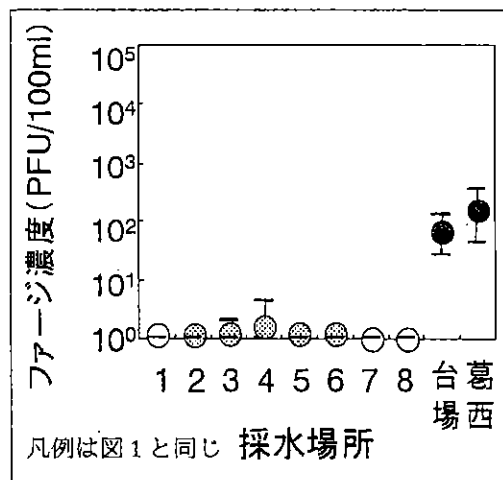


図 3 海水中の F 特異大腸菌ファージ濃度

このことから、地理的に河口域から遠ざかるにつれてすべての微生物濃度も低くなることが分かった。

一方、カキに含まれる微生物濃度は海水中の濃度と比較して、大腸菌群で 1000 倍～10000 倍、F 特異大腸菌ファージで 100 倍～10000 倍であった。このことから、カキは大腸菌群及び F 特異大腸菌ファージを蓄積する能力が高いことが分かった。

今回の調査結果によって、河川に由来する微生物の挙動を定量化することができた。その結果、河川水中に高濃度で存在していた大腸菌群及び F 特異大腸菌ファージは、海水の希釈効果によって濃度が減少するが、カキによって濃縮されカキの体内で再び高濃度で存在することが分かった。特に F 特異大腸菌ファージは、形状と大きさが病原ウイルスに似ていることから、ウイルス汚染の代替指標として期待される微生物である。

しかしながら、この F 特異大腸菌ファージをカキ養殖場におけるウイルス汚染の指標として適用するには、まだ様々な問題が残る。第一に、日本の海域で F 特異大腸菌ファージが実際に病原ウイルスと相関があるかどうかを確かめる必要がある。

また、カキ養殖場の海水 100ml ではほとんど検出されないことから、測定する海水を 100ml 以上にする必要があると考えられる。しかしながら 100ml 以上の海水を直接測定するには実際に不可能であり、濃縮技術の開発が望まれる。

以上のことを改善した上で、定量化が困難な病原ウイルスの環境中での挙動を推定することが可能となると考えられる。

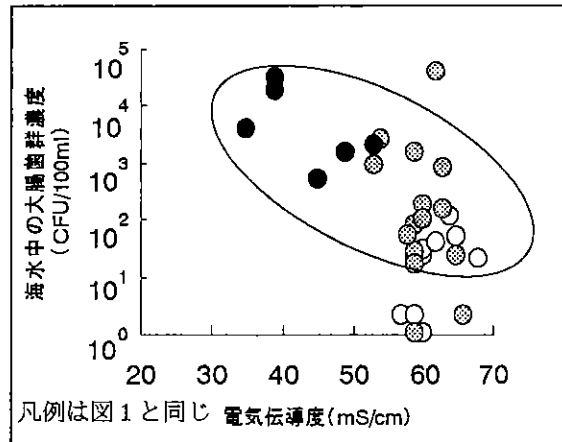


図4 海水中の電気伝導度と大腸菌群濃度との関係

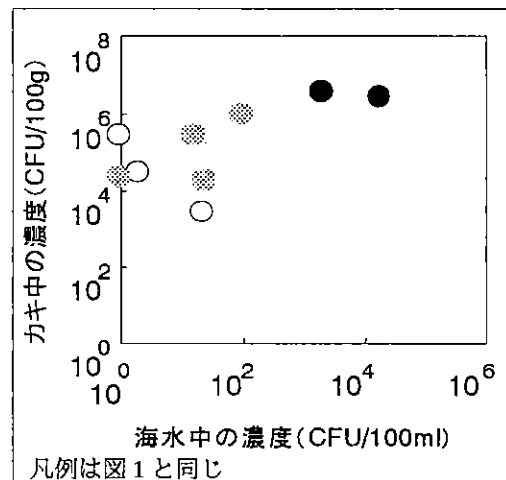


図5 海水中の大腸菌群濃度とカキ中濃度の関係

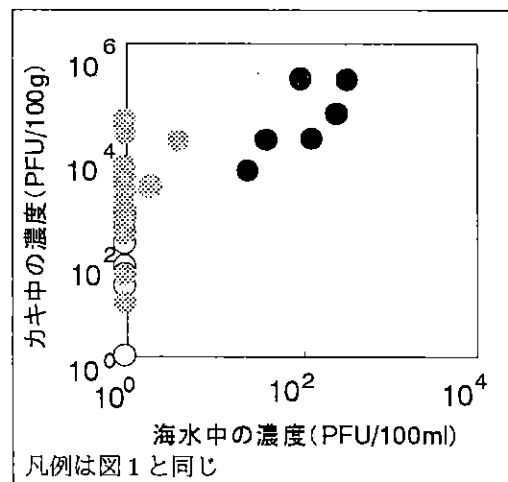


図6 海水中の F 特異大腸菌ファージ濃度とカキ中の濃度との関係

## 分担研究報告書

### E. 結論

カキ養殖場における *E.coli*、大腸菌群、F 特異大腸菌ファージの存在状況調査を 5 ヶ月間行った。その結果、カキの体内では、海水中に比べて 100 倍～10000 倍の高濃度で存在していることが分かった。特に F 特異大腸菌ファージは、100ml の海水から検出されなかった海域でも、カキからは検出された。

今後は F 特異大腸菌ファージと病原ウイルスとの相関などの研究を進める必要がある。

### F. 研究発表

#### 学会発表

- 1) 久山哲雄、大垣眞一郎、大瀧雅寛、片山浩之 (1998) マガキによる大腸菌ファージ Q $\beta$  の蓄積に関する研究、土木学会第 53 回年次学術講演会講演概要集
- 2) KUYAMA Tetsuo, KATAYAMA Hiroyuki and OHGAKI Shinichiro (1999) F-specific coliphages and bacteria as viral indicators for monitoring viral pollution in oysters harvesting marine waters, the 7th IAWQ Asia-Pacific regional Conference (投稿中)

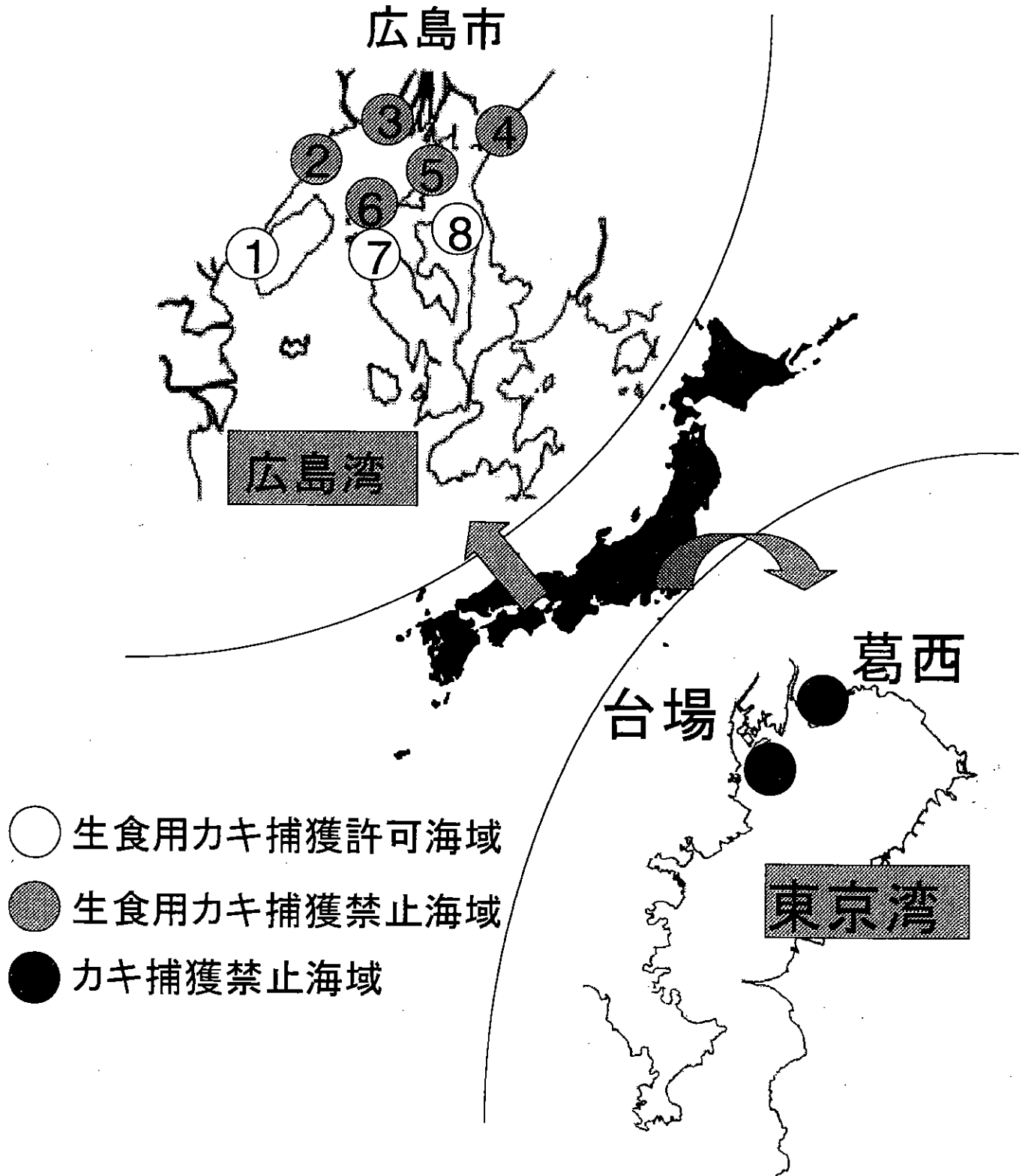
#### 参考

- 3) 中村みやこ、片山浩之、大垣眞一郎 (1999) 塩素消毒における大腸菌 RNA ファージの損傷の測定、第 33 回日本水環境学会年会講演集 (予定)
- 4) 片山浩之、大垣眞一郎 (1999) 陰電荷膜を用いたファージ遺伝子の濃縮法の開発、第 33 回日本水環境学会年会講演集 (予定)

### 参考文献

- 1) 日本水道協会 (1993) 上水試験法
- 2) Mark D. Sobsey, David A Battigelli, Thomas R. Handzel, and Kellogg J. Schwab (1995) Male-specific coliphages as indicators of viral contamination of drinking water, AWWA Research Foundation and American Water Works Association
- 3) F Chung, L-A jaykus, G Lovelace, and Mark D. Sobsey (1998) Bacteriophages and bacteria as indicator of enteric viruses in oyster and their harvest waters, IAWQ 19th Biennial International Conference, Preprint Vol 10, pp185-192
- 4) Ultan F. Power and John K. Collins (1989) Differential depuration of poliovirus, *Escherichia coli*, and a coliphage by the common mussel, *Mytilus edulis*, Applied and Environmental Microbiology Vol.55, No.6, pp1386-1390

付録 採水場所



## 日本の各地から検出されたヒトカリシウイルスの遺伝子配列について

分担研究者

西尾 治

(国立公衆衛生院 衛生微生物学部)

要旨：日本で牡蠣関連下痢症および乳幼児下痢症患者から検出されたヒトカリシウイルスおよび二枚貝からの計 64 株の遺伝子配列を決め、分子疫学的解析を行った。現在の日本におけるヒトカリシウイルスは G1,G2 共に少なくとも 5 つに分けられ、遺伝子配列が多様であった。また、ヒトおよび二枚貝からのヒトカリシウイルスは G2 の Mexico 型が多く、ヒトと二枚貝からのものと全く同一の遺伝子配列も認められ、ヒトと食品との相関関係にあることが強く示唆された。ヒトカリシウイルスの遺伝子配列を今後も調べウイルスの変異に伴い、対応できる検査法にしていくことが肝要と思われる。これらヒトカリシウイルスについてヒトの下痢症および食品との関連性を監視することが必要と考えられた。

### はじめに

ヒトカリシウイルスは遺伝子配列が多様に富み、そのために遺伝子診断を行う上においても困難をきたすことが多い。現実 PCR で増幅された DNA の確認試験にハイブリダイゼーション法を行うことにしているが、時としてハイブリダイゼーションで反応しないものも見られる。これはヒトカリシウイルスの遺伝子の配列とプローブの配列が合わない事によると考えられる。そこで、日本および近隣国での現在の流行しているヒトカリシウイルスの遺伝子配列を調べる事は遺伝子診断の確実性の向上および感染経路を明らかにする分子疫学調査を行う上で極めて重要であると考えられる。そこで今回は日本の各地から牡蠣関連下痢症、乳幼児下痢症および感染源として注目されている二枚貝からのカリシウイルスの遺伝子配列を調べる事とした。

### 材料と方法

検査材料：ヒトカリシウイルス陽性糞便材料は札幌市 1 件、新潟県 1 件、栃木県 2 件、

群馬県 1 件、埼玉県 5 件、千葉県 4 件、横浜市 1 件、山梨県 2 件、長野県 2 件、静岡県 2 件、愛知県 2 件、岐阜県 3 件、三重県 1 件、滋賀県 1 件、和歌山県 3 件、鳥取県 1 件、岡山県 1 件、広島県 3 件、香川県 3 件、愛媛県 6 件、福岡県 1 件、北九州市 2 件、佐賀県 1 件、鹿児島県 1 件、計 50 件およびヒトカリシウイルス陽性の二枚貝は牡蠣 11 件およびムール貝 3 件を用いた。PCR 法

RNA の抽出：二枚貝は中腸腺を、エビ類は腸管（いわゆる背腸の部分）を摘出し、PBS で 10 から 20% 乳剤としたのち、10,000rpm . 20 min 遠心し、その上清を 30 % シュークローズに重層、35,000 rpm. 180 min 遠心し、その pellet を PBS で再浮遊させた。それを RNA の抽出およびウイルス分離に用いた。

ウイルス RNA の抽出は SV Total RNA isolation system (Promega, USA) を用いた。cDNA の作製には {Oligo (dT) (12-18)}、3' のプライマーを用い M-MLV RT で作製した。

Nested PCR : NV81/82/SM82, Yuri22R/F, の2組を用い、PCR反応は1st PCRと同じ条件で行ったが、サイクル数は35回とした。

PCR産物は電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色しバンドの確認を行った。

#### 遺伝子配列の決定

PCR法で遺伝子が増幅されたものの一部は大腸菌に組み込んだ後ダイターミネーター法で遺伝子配列を決定した。また多くのものはPCR産物から直接遺伝子配列を決定した。

#### 成績

##### 1. 地区別のG1,G2の分布状況

全国の各地から得られたカリシウイルス(HCV)についてポリメラーゼ領域のpositin 4,561 ~ 4,861 の301bpについてUPGMA法による解析を行った。患者からのHCVは50件でそのうちgenotype 1(G1)が10件(22%)で、G2は40件(78%)であった。

表1. 地区別のG1,G2の分布状況

地 区	HCV 数	G1	G2
北海道・東北・新潟	2	1	1
関東・甲・信・静	19	0	19
東海・北陸	6	4	2
近 畿	4	0	4
中国・四国	14	5	9
九州	5	1	4
-----			
牡蠣	11	1	10
ムール貝	3	2	1
-----			
計	64	14	50

東海・北陸地区がG1が多く、北海道・東

北・新潟は例数が少ないものの、G1とG2が同数であった。その他の地区はいずれもG2が多く、特に関東・甲・信・静および近畿地区は全てG2であった。

また牡蠣は11件中1件がG1で、10件がG2、ムール貝は3件中2件がG1、1件がG2であった。

##### 2. G1の遺伝子配列について

検出されたHCV系統樹を図1に示した。なお、輸入二枚貝から検出されたものも分子疫学的解析のための参考に示した。系統樹からは5つに分けられた。すなわちG1であったものは14株で、Ky-89/89/Jに近縁なもの(新潟、韓国赤貝、愛媛県での検出株)、KY-89/89/JとNorwalkとの中間に属するもの、日本の牡蠣、ムール貝、中国シジミでヒトからは検出されていない。

表2. G1の subgroup の地区別分布

地 区	G1#	NV	S	O
北海道・東北・新潟	1	1		
関東・甲・信・静	0			
東海・北陸	4		2	2
近 畿	0			
中国・四国	5	1		4
九州	1			1
-----				
牡蠣	1	1		
ムール貝	2	2		
-----				
計	14	5	7	2

#NV;Norwalk, S;Southampton, O;その他

Southampton と少し異なるもの、鳥取、三重、岡山、佐賀、愛知県)、Southampton に近縁なもの(愛媛県) およびそれらと少

し異なっていたものである（岐阜県）。表 2 にはこれらを大きく Norwalk、Southampton に類似のもの、それ以外の 3 つにわけた。Norwalk に近いものは 5 件でそのうち 3 件は二枚貝からであった。Southampton は 7 件でいずれもヒトからで、東海地区から南の地方で見られている。

### 3. G2 の遺伝子配列について

表 3. G2 の subgroup 地区別分布

地 区	G2#	Ca	Lo	HA	MX	Me
北海道・東北・新潟	1				1	
関東・甲・信・静	19		1	3	12	3
東海・北陸	2			1	1	
近 畿	4				4	
中国・四国	9	3		1	5	
九州	4		2		1	1
-----						
牡蠣	10				9	1
ムール貝	1				1	
-----						
計	50	3	3	5	34	5

#Ca; Camberwell, Lo; Lordale, HA, Hawaii

MX; Mexico, Me; Melkesham

G2 の系統樹は図 2、3 に示した。なお、Mexico に近縁の株数が多いため、それだけを図 3 に示した。

G2 の系統樹から、5 つに分けることができた（図 2）。すなわち、Camberwell に近縁なもの（愛媛県）、Lorsdale に近いもの（福岡、北九州、群馬県）、Hawaii（千葉、岐阜県）、SM（静岡県）、Mexico（MX）、Melkesham（静岡、横浜、山梨、北九州市）である。地域別では Camberwell が中国で

のみ、Lorsdale が関東と九州地区、Hawaii が関東、東海で、SM が四国でのみ見られている（図 2）。MX は図 3 にしめしたが全国的に見られている。二枚貝は 11 例中 10 例は MX で、1 例が Melkesham であった

### 考察

ヒトカリシウイルスは遺伝子配列が多様性に富むことが知られているが、今回日本の近年のウイルスについて比較的安定であるとされているポリメラーゼ領域について遺伝子配列を解析した結果 G1 は 14 株で、G2 は 50 株で、系統樹から共に 5 つに分けられヒトカリシウイルスの遺伝子配列が多様であることが裏付けられた。このことはヒトカリシウイルスの確認診断においてもこれらに対応するプローブを用意する必要があり、現時点でも少なくとも 10 種類を用いなければならないと考えられ、未だ 5 種類についてはふくまれていないので、これらのプローブを作製しより検査精度を上げる必要がある。

さらに、極最近になり愛媛県での G1 の southampton、岐阜県の Desert Shield および愛媛での G2 の Camberwell に属するものが見られてきているので、これらウイルスの今後の動向を観察しなければならないと考えている。

遺伝子配列を解析した結果 G1 は 14 株で、G2 は 50 株でこのうちヒトでは 50 株中 34 株、2 枚貝では 14 株中 11 株が MX であった。ここ数年ヒトから検出されたカリシウイルスは G2 が主流で、MX が多いと言う報告と一致する。同様にヒトおよび二枚貝から検出されたものの、その殆どが MX で分子疫学的にも牡蠣とヒトとの関連性が強く示唆される。このことは牡蠣とヒトからのと全く同一の遺伝子配列のものが埼玉、神奈川、香川、山梨、静岡県で見ら



れていることから推察される。

さらに、中国あるいは韓国から輸入された二枚貝から検出されたウイルスとわが国のウイルスと全く同一の遺伝子配列を持つものが見られている。例えば G1 の韓国赤貝と新潟の株、G2 の、中国のシジミと埼玉、神奈川、香川、山梨、静岡県長野の下痢患者の株と同一であり、今後輸入二枚貝からのウイルスとの関連性についても継続して監視する必要があると考えられる。

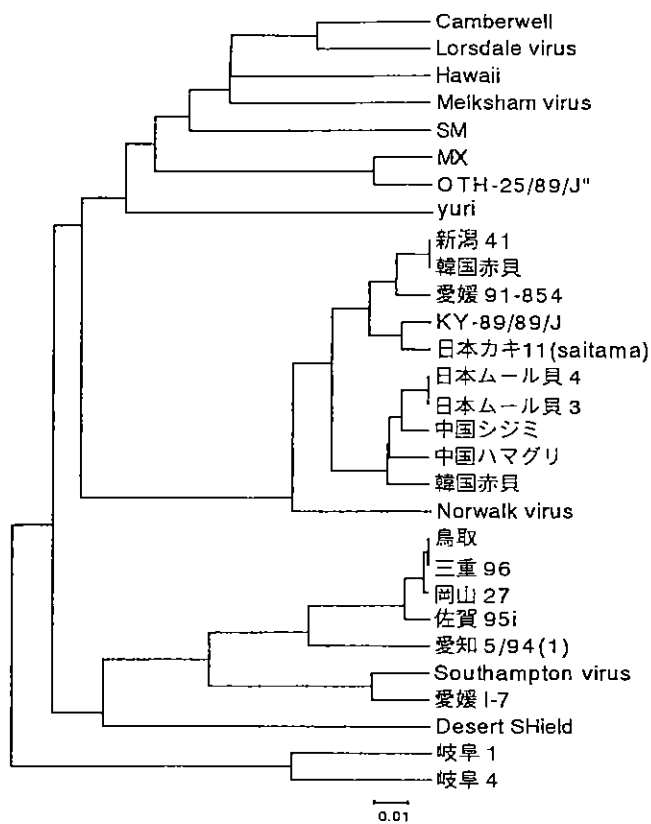


図1 全国のカリシウイルスG1の系統樹

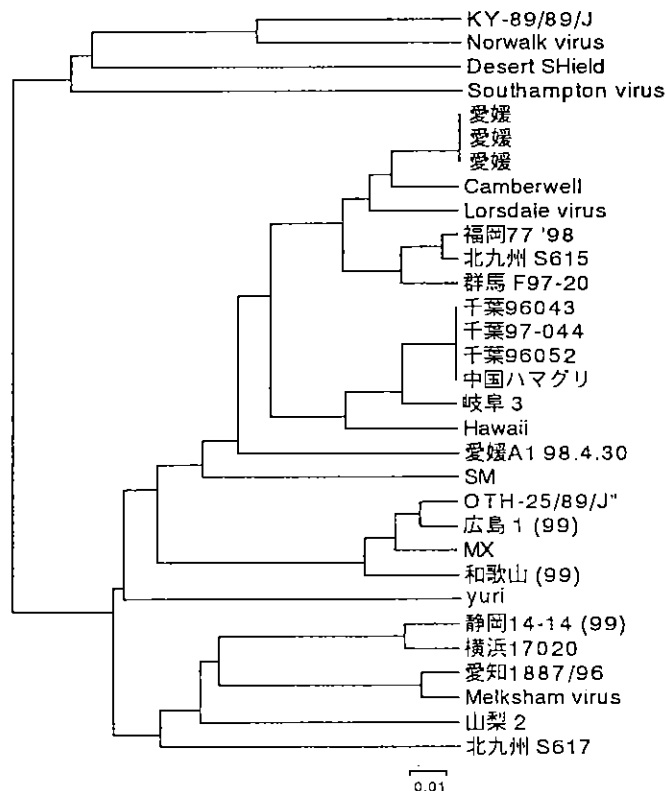


図2 全国カリシウイルスG2の系統樹

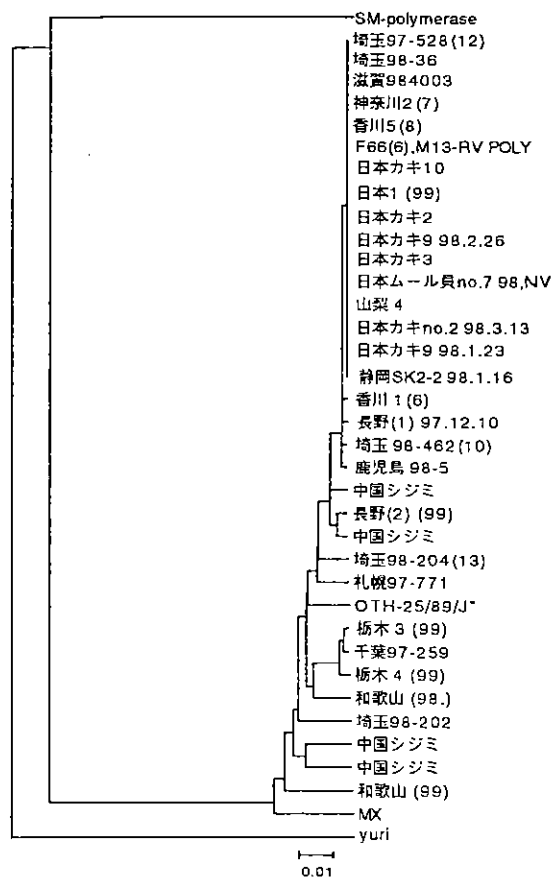


図3 全国カリシウイルスG2のMXの系統樹