

表1 アミラーゼ-混合法と混合法の比較

検体 番号	採取日	回 収 液 量 (μ l) *1	G1							G2						
			混合法				アミラーゼ-混合法			混合法		アミラーゼ- 混合法				
			2nd Real- Time PCR *2	定量 値 (A)*3	PC 添 加後 の定 量値 (B) *4	PC の 定量 値 (B-A)	2nd Real- Time PCR	定量 値(A)	PC 添 加後 の定 量値 (B)	PC の 定量 値 (B-A)	2nd Real- Time PCR	定量 値(A)	2nd Real- Time PCR	定量 値(A)		
1	05.03.01	400	-	NT*5	NT			+	NT	NT			-	NT	+	NT
2	05.03.01	400	-	NT	NT			-	NT	NT			-	NT	-	NT
3	05.03.01	400	-	NT	NT			-	NT	NT			-	NT	-	NT
4	05.03.01	400	-	NT	NT			-	NT	NT			-	NT	-	NT
5	05.03.01	400	-	NT	NT			-	NT	NT			-	NT	-	NT
6	05.03.14	400	+	NT	NT			+	NT	NT			-	NT	+	NT
7	05.03.14	400	-	NT	NT			+	NT	NT			-	NT	+	NT
8	05.03.14	400	+	NT	NT			+	NT	NT			-	NT	+	NT
9	05.03.23	400	+	NT	NT			+	NT	NT			+	NT	+	NT
10	05.03.23	400	+	NT	NT			+	NT	NT			+	NT	+	NT
11	05.04.12	400	+	4.92	NT			+	3.44	NT			-	1.26	-	0.43
12	05.04.12	400	-	1.34	NT			-	1.84	NT			-	0.86	-	0.72
13	05.04.12	400	-	0	NT			-	0	NT			-	0	-	0
14	05.05.10	400	-	0	NT			+	0.3	NT			-	0	-	0
15	05.05.10	400	-	0	NT			-	0.97	NT			-	0	-	0
16	05.05.10	400	+	0	NT			-	0	NT			-	0	-	0
17	05.10.18	400	-	0	NT			-	0	NT			-	0.2	-	0
18	05.10.18	400	-	0	NT			-	0	NT			-	0	-	0
19	05.10.18	400	-	0	NT			-	0	NT			-	0	-	0
20	05.11.15	400	-	0	6.29	6.29		-	0	6.54	6.54		+	0.96	+	1.74
21	05.11.15	400	-	0	7.59	7.59		-	0	11.25	11.25		+	0	-	1.35
22	05.11.15	400	-	0	4.01	4.01		-	0	9.27	9.27		-	0.73	+	1.06
23	05.12.05	400	-	0	5.64	5.64		+	0	8.62	8.62		+	0.77	+	1.54
24	05.12.05	400	-	0	8.43	8.43		-	0	5.85	5.85		-	0	+	1.5
25	05.12.05	400	-	0	6.72	6.72		-	0	8.26	8.26		-	0	-	0.63
26	05.12.06	400	-	0	9.68	9.68		-	0	5.56	5.56		-	0.11	+	1.32
27	05.12.06	400	-	0	3.61	3.61		-	0	4.37	4.37		-	0	-	0
28	05.12.06	400	-	0	5.85	5.85		-	0	11.13	11.13		+	0.24	+	0.44
29	05.12.19	400	-	0	5.2	5.2		-	0	11.81	11.81		+	1.62	+	2.68
30	05.12.19	400	-	0	7.2	7.2		-	0	6.7	6.7		-	0	-	0
31	06.01.11	400	-	0.866	12.11	11.24		+	0.593	14.22	13.627		-	2.27	+	5.26
32	06.01.11	400	-	1.43	10.41	8.98		+	2.93	10.56	7.63		+	3.3	+	9.72
33	06.01.11	400	-	0.222	11.22	11		-	0	9	9		+	0	-	0.26
34	06.01.17	400	+	0.686	11.38	10.69		+	0.73	11.15	10.42		+	21.95	+	17.53
35	06.01.17	400	-	2.34	12.67	10.33		+	5.16	20.13	14.97		+	19.54	+	34.94
36	06.01.17	400	-	0.653	10.1	9.447		+	1.34	13.9	12.56		-	10.01	+	22.23
37*6	06.01.18	400	-	0	4.98	4.98		+	1.16	8.55	7.39		+	2.26	+	5.7
38*6	06.01.19	400	-	0.734	9.08	8.346		+	1.8	11.23	9.43		+	2.65	+	13.57
39	06.01.24	400	-	0	8.29	8.29		+	0.608	10.02	9.412		+	3.27	-	0.509
40	06.01.24	400	-	0	5.88	5.88		-	0	9.69	9.69		-	0.486	+	0.636
41	06.01.24	400	+	0.44	8.28	7.84		+	0.492	8.18	7.688		+	1.63	+	1.78
42	06.01.31	400	-	0	10.89	10.89		-	0	14.24	14.24		+	0.412	-	0.29
43	06.01.31	400	+	2.64	14.43	11.79		-	1.06	5.6	4.54		+	2.64	+	1.06
44	06.01.31	400	-	0	10.75	10.75		-	0	11.44	11.44		-	0	-	0.553
45	06.02.14	400	+	0	4.95	4.95		+	0.148	4.61	4.462		-	0.677	-	0.994
46	06.02.14	400	-	0	7.11	7.11		-	0	8.73	8.73		-	0	-	0.217
47	06.02.14	400	-	0.286	2.89	2.604		-	0.893	7.58	6.687		+	0.2	+	0.296

*1: 超遠心分離により濃縮したカキ材料を再浮遊した蒸留水の液量。

*2: COG1F/G1SKR(COG2F/G2SKR)で増幅した PCR 産物を COG1F/COG1R(COG2F/COG2R)でリアルタイム PCR 増幅した。結果。-は陰性、+は陽性を示す。

*3: 実測値を示す。

*4: 検体 5 μ l に陽性コントロール(PC)16 コピー/ μ l を 1 μ l 添加してリアルタイム PCR で定量した結果。

*5: 検査せず。

*6: 食中毒事例の原因カキと同一日に加工されたカキ(凍結保存品)。採取日は加工日を示す。

表2 アミラーゼ-混合法と個別法の比較

検体番号	回収 液量 (μ l) *1	G1				G2		備考
		2nd Real- Time PCR *2	定量値 (A)*3	PC 添加後 の 定量値 (B)*4	PC の定 量値 (B-A)	2nd Real- Time PCR	定量値	
1-AM 混合*5	1000	+	1.85	17.51	15.66	+	9.13	
1-1	100	-	0	1.42	1.42	-	0	
1-2	100	-	0	1.36	1.36	-	0.721	
1-3	100	-	0	1.97	1.97	-	0	
1-4	100	-	0	3.88	3.88	-	0	
1-5	100	-	0	3.26	3.26	-	0	凍結保 存品
1-6	100	-	0	0.949	0.949	-	0	
1-7	100	-	0	1.45	1.45	-	0	
1-8	100	-	0	2.1	2.1	-	0	
1-9	100	-	0	2.76	2.76	-	0	
1-10	100	-	0	1.83	1.83	-	0	
個別法の平均値			0	2.0979	2.0979		0.0721	
2-AM 混合	1000	+	6.18	20.99	14.81	+	16.66	
2-1	100	-	0	2.87	2.87	-	0	
2-2	100	-	0	1.36	1.36	-	0	
2-3	100	-	0	1.49	1.49	-	0	
2-4	100	-	0	3.31	3.31	-	0	
2-5	100	-	0	3.13	3.13	-	0	凍結保 存品
2-6	100	-	0	6.04	6.04	+	0	
2-7	100	-	0	8.86	8.86	-	1.04	
2-8	100	-	0	1.87	1.87	-	0	
2-9	100	-	0	4.07	4.07	-	1.32	
2-10	100	-	0.357	4.58	4.223	-	0.915	
個別法の平均値			0.0357	3.758	3.722		0.3275	
3-AM 混合	1000	+	8.665	19.955	11.29	+	24.68	
3-1	100	-	0	9.43	9.43	-	0	
3-2	100	-	0	7.11	7.11	-	0	
3-3	100	-	0.0506	7.91	7.8594	-	1.03	
3-4	100	-	0	4.21	4.21	-	0	
3-5	100	-	0	12.79	12.79	-	0	凍結保 存品
3-6	100	-	0	5.48	5.48	-	0.206	
3-7	100	-	0	11.42	11.42	-	1	
3-8	100	-	0	1.32	1.32	-	0.604	
3-9	100	-	0	13.68	13.68	-	0	
3-10	100	-	0	1.64	1.64	-	0	
個別法の平均値			0.00506	7.499	7.494		0.284	
4-AM 混合	200	+	0.587(0.098)	9.6	9.013	+	7.48(1.25)	
4-1	200	-	0	4.09	4.09	-	0	
4-2	200	-	0	7.85	7.85	-	0	
4-3	200	-	0	5.95	5.95	-	0	06.01.31 採取
4-4	200	-	0	5.35	5.35	-	0	
4-5	200	+	0	5.63	5.63	-	0	
4-6	200	-	0.165	1.3	1.135	-	0	
個別法の平均値 (次項に続く)			0.0275	5.028	5.001		0	

で10倍希釈した 10^5 コピー/ 5μ l, 10^3 コピー/ 5μ l, 10^1 コピー/ 5μ lのDNA希釈液をスタンダードとして使用した。

検体中のPCR阻害物質の影響を調べるために、

AM-混合法,混合法あるいは個別法で得たcDNA検体 5μ lにG1 PC DNA(100 コピー/ 5μ l) 1μ lを加えたものを鋳型DNAとして定量PCR法を行った。PC添加時の定量値から未添加時の定量値(検体中

(表 2 の続き)

5	5-AM 混合	400	+	0.202(0.040)	6.8	6.598	+	3.69(0.738)	
	5-1	200	-	0	5.16	5.16	-	1.75	
	5-2	200	-	0	2.36	2.36	-	0.395	
	5-3	200	-	0	5.09	5.09	-	0	
	5-4	200	-	0	7.18	7.18	-	0.351	
	5-5	200	-	0	1.44	1.44	-	0	06.02.09
	5-6	200	-	0	0.568	0.568	-	0	採取
	5-7	200	-	0	2.09	2.09	-	0	
	5-8	200	-	0	7.66	7.66	-	0	
	5-9	200	-	0	8.26	8.26	-	0.113	
	5-10	200	-	0	8.92	8.92	-	0	
個別法の平均値				0	4.873	4.873		0.2609	
6	6-AM 混合	400	-	0.00438 (0.001)	6.39	6.38562	+	0.555(0.111)	
	6-1	200	-	0	6.22	6.22	-	0.222	
	6-2	200	-	0	6.49	6.49	-	0	
	6-3	200	-	0	7.49	7.49	-	0	
	6-4	200	-	0	4.35	4.35	-	0.865	
	6-5	200	-	0	14.76	14.76	-	0	06.02.09
	6-6	200	-	0	9.25	9.25	-	0	採取
	6-7	200	-	0	6.68	6.68	-	0	
	6-8	200	-	0	10.5	10.5	-	0	
	6-9	200	-	0	6.51	6.51	-	0	
	6-10	200	-	0	7.43	7.43	-	0.447	
個別法の平均値				0	7.968	7.968		0.1534	
7	7-AM 混合	400	-	0.21(0.042)	16.17	15.96	+	1.35(0.27)	
	7-1	200	-	0	6.08	6.08	+	0	
	7-2	200	-	0	6.68	6.68	-	0	
	7-3	200	-	0	6.39	6.39	-	0	
	7-4	200	-	0	5.61	5.61	-	0	
	7-5	200	-	0	4.26	4.26	-	0	06.02.09
	7-6	200	-	0	3.6	3.6	-	0	採取
	7-7	200	-	0	9.86	9.86	-	0	
	7-8	200	-	0	7.49	7.49	-	0	
	7-9	200	-	0	0.699	0.699	-	0	
	7-10	200	-	0	7.41	7.41	-	1.07	
個別法の平均値				0	5.808	5.808		0.107	

*1: 超遠心分離により濃縮したカキ材料を再浮遊した蒸留水の液量。

*2: COG1F/G1SKR(COG2F/G2SKR)で増幅したPCR産物をCOG1F/COG1R(COG2F/COG2R)でリアルタイムPCR増幅した結果。-は陰性, +は陽性を示す。

*3: 実測値を示す。()内は個別法の1反応系当たりの実測値に相当する値。

*4: 検体5 μ lに陽性コントロール16コピー/ μ lを1 μ l添加してリアルタイムPCRで定量した結果。

*5: AM混合はアミラーゼ混合法, 1-1~7-10は個別法を示す。

のG1定量値)を引いた値を各cDNA検体における添加PCの定量値(コピー数)とした。また、逆転写反応液5 μ lに標準DNA1 μ lを加えたものを鋳型DNAとして定量PCRを行い、得られた定量値を実際の添加PCのコピー数とした。

結 果

1 AM-混合法と混合法の比較

47検体について定性PCR法でNV検出を行い(表1), 検出率を比較した(表3)。G1検出率はAM-混合法40.4%(19/47), 混合法21.3%(10/47), G2

検出率はAM混合法51.1%(24/47), 混合法38.3%(18/47)で, G1, G2ともAM-混合法の検出率が高かった。

37検体について定量PCR法でG1, G2別の定量を行った(表1)。定量値0コピー/反応系を超える値(>0)を示したものは, G1がAM-混合法16検体, 混合法12検体, G2がAM-混合法26検体, 混合法23検体であり, AM-混合法が>0の定量値を示したものが多かった。また, >0の定量値を示したものの平均値はG1がAM-混合法1.47, 混合法1.38, G2がAM-混合法4.96, 混合法3.39で,

表3 アミラーゼ-混合法と混合法との比較のまとめ

比較項目		アミラーゼ-混合法	混合法		
2ndRealTimePCR の結果 N=47	G1	陽性	19	10	
		陰性	28	37	
		陽性率(%)	40.4	21.3	
	G2	陽性	24	18	
		陰性	23	29	
		陽性率(%)	51.1	38.3	
定量値の分布 (実測値)	G1	0	21	25	
		>0~<1	8	7	
		1~<10	8	5	
		10~<100	0	0	
	G2	0	11	14	
		>0~<1	12	11	
		1~<10	11	9	
		10~<100	3	3	
		定量値>0 の平均値 (実測値)	G1	1.47(N=16)	1.38(N=12)
			G2	4.96(N=26)	3.39(N=23)
AM-混合法または混合法で2ndRealTimePCR 陽性となった検体の定量値の平均値 (実測値)	G1 N=14	1.41	1.05		
	G2 N=21	5.91	3.57		
PC 添加実験(添加量 16) (実測値) N=28	平均値±SD	8.97±2.92	7.69±2.56		
	最大値	14.97	11.79		
	最小値	4.37	2.60		

G1, G2 とも AM-混合法の定量値が高かった。AM-混合法あるいは混合法の少なくとも一方が定性 PCR法で陽性となったものについて定量値をみると、G1(N=14)が AM-混合法 1.41, 混合法 1.05, G2(N=21)が AM-混合法 5.91, 混合法 3.57 で、G1, G2 とも AM-混合法が高い定量値を示した(表 3)。

AM-混合法あるいは混合法で得られた cDNA 検体中の PCR 阻害効果を調べるために、28 検体について G1 PC を添加し、その定量値を調べた(表 1)。PC の添加量は 16 コピー/反応系であった。PC 定量値の平均値±標準偏差、最大値、最小値は、AM-混合法では 8.97±2.92, 14.97, 4.37, 混合法では 7.69±2.56, 11.79, 2.60 で、AM-混合法で得た cDNA 検体が PCR 阻害作用が少なく、実際の添加量に近い定量値を示した(表 3)。

2 AM-混合法と個別法の比較

10 個を 1 プールとした 6 検体(60 個体), 6 個を 1 プールとした 1 検体(6 個体), 計 7 検体(66 個体)について AM-混合法と個別法を比較した(表 2)。なお、カキから超遠心分離で濃縮した検体を再浮遊した蒸留水の液量の違いから、AM-混合法の検体番号 4 は 10 倍、検体番号 5~7 は 5 倍濃縮され

ているため、それぞれ得られた定量値を 10 あるいは 5 で除した値を定量値の平均値(1 個体当たり)とした。

定性 PCR 法による検出率は(表 4)、G1 が AM-混合法 71.4%(5/7), 個別法 14.3%(1/7), G2 が AM-混合法 100%(7/7), 個別法 28.6%(2/7)であり、G1, G2 とも AM-混合法の検出率が高かった。個別法において個体別の検出率をみると、G1 は 1.5%(1/66), G2 は 3.0%(2/66)で、検出率は極めて低かった。

カキ 1 個体当たりの平均定量値(表 4)は、AM-混合法では G1 が 0.001~8.665, G2 が 0.111~24.68 であり、G1, G2 ともすべて>0 の定量値を示した。一方、個別法の平均定量値は、G1 では 4 検体が 0, 他の 3 検体は 0.00506~0.035766, G2 では 1 検体が 0, 他の 6 検体が 0.0721~0.3275 であった。平均定量値を比較すると、7 検体すべてで AM-混合法が高い値を示した。個別法の定量値を個体別にみると、63 個体は定量値 0 を示し、>0 の定量値を示した 3 個体の定量値はいずれも 1 以下であった。

cDNA 検体の PCR 阻害効果を比較するために、AM-混合法の 7 検体、個別法の 66 検体に G1 PC を

表4 アミラーゼ 混合法と個別法との比較のまとめ

比較項目		アミラーゼ混合法	個別法	
2ndRealTimePCR の結果	G1	陽性	5	1[1]*1
		陰性	2	6[65]
		陽性率(%)	71.4	14.3[1.5]
	G2	陽性	7	2[2]
		陰性	0	5[64]
		陽性率(%)	100	28.6[3.0]
1 個体当たりの平均定量値 (実測値)*2	G1	検体 1	1.85	0
		検体 2	6.18	0.0357
		検体 3	8.665	0.00506
		検体 4	0.098	0.0275
		検体 5	0.04	0
		検体 6	0.001	0
		検体 7	0.042	0
	G2	検体 1	9.13	0.0721
		検体 2	16.66	0.3275
		検体 3	24.68	0.284
		検体 4	1.25	0
		検体 5	0.738	0.2609
		検体 6	0.111	0.1534
		検体 7	0.27	0.107
定量値の分布 (実測値)*2	G1	0	0	[63]
		>0~<1	4	[3]
		1~<10	3	[0]
		10~<100	0	[0]
	G2	0	0	[51]
		>0~<1	3	[10]
		1~<10	2	[5]
		10~<100	2	[0]
PC 添加実験(添加量 16) (実測値) N=7(AM-混合法), N=66(個別法)	平均値±SD	11.39±4.08	5.30±3.34	
	最大値	15.96	14.76	
	最小値	6.39	0.70	

*1:[]内は個別別の結果

*2:アミラーゼ混合法は 1 個当たりの値に計算して示した。

添加(16 コピー/反応系)し, G1 を定量した(表 4)。PC 定量値の平均値±標準偏差, 最大値, 最小値は, AM-混合法では 11.39±4.08, 15.96, 6.39, 個別法では 5.30±3.34, 14.76, 0.70 で, AM-混合法で得た cDNA 検体が PCR 阻害作用を受けにくく, 実際の添加量に近い定量値を示した(表 4)。

3 定性 PCR 法の結果と定量値の関連性

AM-混合法, 混合法, 個別法において定性 PCR 法の結果と定量 PCR 法での定量値の関連を調べた(表 5)。定量値 0 を陰性, >0 を陽性とした場合, 定性 PCR 法と定量 PCR 法の結果の一致率(両法で陰性あるいは両法で陽性になった検体数の全検体数の割合)は, AM-混合法 80.7%, 混合法 71.6%,

個別法 83.3%, 全体では 79.6%であった。個別法は大半が陰性の結果であり, 両法で陽性となった検体はなかった。

定量値を 0, >0~<1, 1~<10, 10~<100 に区分し, それぞれの定量値区分での両法での結果を比較した。定量値 0 での陰性一致率(両法で陰性となった検体数の当該定量値区分の検体数に対する割合)は, AM-混合法 96.7%, 混合法 89.7%, 個別法 97.3%, 全体で 95.6%であった。定量値>0 について両法の陽性一致率をみると, 定量値>0~<1 では AM-混合法 48.0%, 混合法 38.9%, 個別法 0%, 全体で 33.9%, 定量値>1~<10 では AM-混合法 88.9%, 混合法 64.3%, 個別法 0%, 全体で 70.2%,

表5 各濃縮法における2ndRealTimePCR法とRealTimePCR法の比較と両法の一一致率

区分	2ndRealTime PCR 結果	アミラーゼ 混合法		混合法		個別法		全体	
		-	+	-	+	-	+	-	+
定量値	0	29	1	35	4	110	3	174	8
	>0	16	42	17	18	19	0	52	60
>0の定量 値の分布	>0~<1	13	12	11	7	13	0	37	19
	1~<10	3	24	5	9	6	0	14	33
	10~<100	0	6	1	2	0	0	1	8
0を陰性、>0を陽性とした場合の全体の一一致率(%)*1		80.7 (N=88)		71.6 (N=74)		83.3 (N=132)		79.6 (N=294)	
定量値0の陰性一一致率(%)*2		96.7 (N=30)		89.7 (N=39)		97.3 (N=113)		95.6 (N=182)	
定量値>0~<1の陽性一一致率(%)*3		48.0 (N=25)		38.9 (N=18)		0 (N=13)		33.9 (N=56)	
定量値1~<10の陽性一一致率(%)*3		88.9 (N=27)		64.3 (N=14)		0 (N=6)		70.2 (N=47)	
定量値10~<100の陽性一一致率(%)*3		100 (N=6)		66.7 (N=3)		-		88.9 (N=9)	

*1: 両法で陰性あるいは陽性となった検体数の全検体数に対する割合。

*2: 定量値0を示した検体のうち、2ndRealTimePCR法で陰性となった検体数の割合。

*3: それぞれの定量値を示した検体のうち、2ndRealTimePCR法で陽性となった検体数の割合。

定量値 10~<100 では AM-混合法 100%、混合法 66.7%、全体で 88.9%であった。これらの結果から、定量 PCR 法と定性 PCR 法の結果は AM-混合法が最もよく一致した。また、定量値>0 の場合、定量値が高くなるに従い両法の一一致率が高くなるのが AM-混合法、混合法で認められたが、いずれの定量値区分においても、AM-混合法の一一致率が高かった。

考 察

現在、厚生労働省の NV 検査指針¹⁾には「貝 1 ロットに付き 3 検体から 10 検体(中腸腺としての合計 12g から 24g 程度を目途とする。)の検査を行う。」と記載されている。3 個の検査と 10 個の検査ではコストのまた労力的に大きく異なり、実際には、3 個程度の個体についての検査が一般的であると推測される。カキを個別別に検査するのは、多くのカキ個体を混合して検査を行った場合、PCR 反応を阻害する物質の混入が増えることなどから検査結果の信頼性が下がることが最大の理由とされている。一方、同一ロットに含まれるカキ

には、その中に含まれる NV の有無およびその定量値に個体差があり、3 個程度の検査では検出率が低いことが指摘されている³⁾。そのため、10 個程度のカキを混合した検体のインヒビターの影響を受けない簡便な濃縮法の開発が望まれている。今回我々は、カキ混合検体の濃縮時に、カキの主成分であるグリコーゲン AM によって消化する操作を導入し、その有用性を AM 処理を行わない場合あるいは個別別に検査する場合と比較検討した。その結果、AM-混合法は、他の 2 法と比較して、定性 PCR 法による NV 検出率が高く、定量 PCR 法で PCR 阻害作用を受けにくく実際のコピー数に近い定量値を示し、定量 PCR 法と定性 PCR 法の結果の一一致率が高かった。また、AM 消化は PEG 沈殿操作と同時に実施できることから、従来の混合法と比較してもほぼ同様の操作で実施可能であった。以上のことから、AM-混合法は混合したカキ検体からの NV 濃縮に有用な方法であると考えられた。さらに、一部の検体に凍結保存されていたものを使用し冷蔵品と同様の結果が得られたことから、食中毒原因究明などの凍結保存品に

対しても使用できると考えられる。

今回我々は NV 検出に定量 PCR 法と通常の PCR 産物を鋳型 DNA としてリアルタイム PCR 法で nestedPCR を行うセカンドリアルタイム PCR 法による定性 PCR 法を併用した。その結果、厚生労働省の NV 検査指針で陰性と判定される 10 コピー/系未満の定量値でも定性 PCR 法陽性となる例が多く認められ、特に定量値 1~10 では 70%(AM-混合法濃縮検体では約 90%)が定性 PCR 法で陽性であった。また、定性 PCR 法と定量 PCR 法の一致率をみると、定量 PCR 法における定量値が低いほど両法の結果が一致せず、定量値が高くなるにつれ一致率が増加した。このことは、検体に含まれるコピー数が少なくなるにつれ PCR 反応液に NV cDNA が入る確率が減少することによる必然的な結果として理解することができる。さらに今回の結果からも示されたようにカキから精製した cDNA 検体には PCR 阻害物質が含まれ、定量 PCR 法で実際のコピー数より少なく定量されるため、実際には得られた定量値より多くの NV が含まれていると考えられる。以上のことから、定量 PCR 法で実測値 >0~<10 コピーの定量値の場合、実際に NV が含まれる可能性が極めて高いと考えられる。さらに今回の食中毒事例の原因と推定されるカキと同一日に加工された 2 検体についても、実測値 10 コピー以下であり陰性と判断される汚染量であった。これらのことから、現在、厚生労働省の検査指針の基準では定量 PCR 法の実用性が極めて低く、陽性限界値の見直しが早急に必要と考えられる。当面の対応策として、検査結果を(陽性、陰性と記載せず)定量値で示すことが有効であると考えられ、少なくとも実測値 10 コピー以下の場合には「陰性」と表記するのではなく、「10 コピー/系以下」と表記し必ずしも NV 陰性でないことを示す必要がある。一方、定性 PCR 法陽性・定量 PCR 法陰性の検体より、定性 PCR 法陰性・定量 PCR 法陽性の検体が多い傾向にあった。この理由として、定性 PCR 法の 1 回目の PCR に使用している GISFR(G2SKR)プライマーのミスマッチにより増幅されない場合がある(偽陰性)可能性のほか、定量 PCR 法が偽陽性を示した可能性も否定できず、今後詳細に検討する必要がある。

今回我々は、AM 消化を PEG 沈殿時に、室温で

一夜、スターラーで攪拌することにより行った。これは、当所においては検体搬入が午後になることが多く PEG 沈殿を一夜行っていたことから、検査の簡便化のためその工程に合わせたことによる。反応温度については、予備実験において 37℃、室温、4℃で比較した結果、37℃の消化が最も効率的であったが、細菌の繁殖および PEG 沈殿によるウイルス濃縮に対する影響が不明であったことから室温での反応とした。短時間で行う場合は、37℃での AM 消化後、PEG 沈殿を 4℃で行うことが考えられるがその条件は改めて設定する必要がある。

本研究の一部は厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 ウイルス性食中毒の予防に関する研究(主任研究者 武田和直)によって行われた。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、検体採取にご協力いただきました広島市社会局保健部食品保健課の関係各位に深謝します。

文 献

- 1) 厚生労働省ホームページ: ノロウイルスの検出法について、<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/kanren/kanshi/031105-1.html>
- 2) 西尾 治: 厚生労働科学研究費補助金生活安全総合研究事業 食品中の微生物汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究 平成 14 年度総括・分担研究報告書(2003)
- 3) 野田 衛 他: ノロウイルス検出率の及ぼすカキ検査個数の影響, 広島市衛研年報, 23, 70~73(2004)
- 4) Kageyama T et al: Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR, J Clin Microbiol, 41, 1548~1557(2003)
- 5) 篠原美千代 他: リアルタイム PCR 法で得られた低い値の信頼性について, 厚生労働科学研究費補助金生活安全総合研究事業 食品中の微生物汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究 平成 14 年度総括・分担研究報告書, 56~59(2003)

資料

神奈川県における ウイルス性集団胃腸炎の発生状況 (平成17年度)

宮原香代子, 片山 丘, 古屋由美子

Occurrence of Viral Gastroenteritis in Kanagawa Prefecture (2005)

Kayoko MIYAHARA, Takashi KATAYAMA
and Yumiko FURUYA

ウイルスによる集団胃腸炎は、主に食品を介する食中毒やヒトからヒトへ伝播する感染性胃腸炎として発生している。その原因ウイルスには、ノロウイルスをはじめサポウイルス、ロタウイルス、アデノウイルスなどがある。特にノロウイルスは、平成16年の全国食中毒発生状況をみると、病因物質別食中毒事件数が277件でカンピロバクターの558件に次いで第2位でありながら、患者数は12,537名で第2位のサルモネラ属菌3,788名に比べ3倍以上で第1位となっている。さらに平成16年度冬季には高齢者施設における集団感染の急増など、大規模な集団発生が問題となっている。我々は集団発生時の感染拡大を防止するために、原因ウイルスや感染源の早期解明を目的とした検査および調査を実施している。そこで平成17年4月から平成18年3月にかけて、神奈川県域で発生した集団胃腸炎事例の原因ウイルス検出状況について報告する。

平成17年度にウイルス検査を行った集団胃腸炎事例は72事例で、検体数は便606検体、吐物4検体、食品15検体の625検体であった。検査方法について、ノロウイルスは定量PCR、サポウイルスとC群ロタウイルスは逆転写PCR、A群ロタウイルスは酵素抗体法を用いた。電子顕微鏡観察は、原因ウイルスを広く迅速に検索するため有症者の検体を中心に行った。72事例のうち45事例の便257検体および吐物1検体からウイルスが検出され、食品からは検出されなかった。そのうち食中毒と判定されたものが8事例(表1)、感染性胃腸炎と判定されたものが

17事例(表2)であった。その他の20事例は、有症苦情が10事例、他の自治体からの関連調査が10事例であり、検出されたウイルスは有症苦情の1事例がA群ロタウイルスで、それ以外は全てノロウイルスであった。

食中毒事例で検出された原因ウイルスは全てノロウイルスであり、電子顕微鏡観察においても、これらの事例の患者便26検体および調理従事者便3検体から小型球形ウイルス粒子を検出することができた(表1, 図1)。

食中毒8事例から原因として検出されたノロウイルスのgenogroupはGⅡが5事例(62.5%)で半数以上を占め、次いでGⅠが2事例(25.0%)、GⅠとGⅡの両方が検出された事例は1事例(12.5%)であった。事例番号7では患者便からGⅡのみが検出されGⅡによる食中毒と推定されたが、調理従事者便からはGⅠのみ、GⅠとGⅡの重複、GⅡのみが検出された。聞き取り調査の結果、調理従事者は1週間ほど前に生カキを摂食していたためにGⅠとGⅡが混在して検出され、患者便と調理従事者便のgenogroupに不一致が生じたと考えられた。また、事例番号8では患者便からGⅠのみ、GⅠとGⅡの重複、GⅡのみが検出され、疫学調査より原因食品が生カキと推定された。このように事例番号7, 8では、生カキを摂食した調理従事者や患者より複数のgenogroupが検出されたことから、摂食した生カキが数種類のノロウイルスに汚染されていたと推測された。

食中毒の原因食品については、生カキと推定されたこの1事例以外不明であった。しかし、原因食品が不明であった7事例全てにおいて、調理従事者便よりノロウイルスが検出されたことから、調理従事者による二次汚染が原因で食中毒が発生した可能性も考えられた。これら調理従事者の大部分は聞き取り調査で「症状がない」と回答しており、不顕性感染の可能性も含め、自己の健康管理および手洗いの励行や調理用手袋着用など食中毒予防に対するさらなる注意が必要である。また、事例番号7にみられるように、調理従事者は生カキの摂食を控える等の対策も重要であると考えられた。

感染性胃腸炎17事例で検出された原因ウイルスは、ノロウイルスが12事例、サポウイルスが2事例、A群ロタウイルスが2事例、C群ロタウイルスが1事例であった(表2, 図2, 3)。事例番号1はサポウイルスが原因であったが、調理従事者便1検体からノロウイルスGⅠが検出された。また、事例番号16ではノロウイルスGⅡが原因であったが、症状のある施設職員便1検体からA群ロタウイルスが検出された。この2事例からそれぞれ検出されたノロウイルス、A群ロタウイルスは疫学調査の結果、今回発生した集団胃腸炎とは関連がないものと考えられた。ノロウイルスが検出された12事例のgenogroupは

GIIが11事例で大部分を占め、GIは事例番号5の小学校で発生した1事例のみであった。

感染性胃腸炎の発生施設は、小学校が5事例、高齢者

施設が5事例、福祉施設と病院がそれぞれ2事例、高校、児童養護施設および宿泊施設がそれぞれ1事例であった。

特に小学校で発生した5事例は、サポウイルスが2事例

表1 平成17年度食中毒事例

事例番号	発生年月	管轄保健福祉事務所	原因施設	原因食品	検体	ノロウイルス定量PCR			電子顕微鏡観察	
						検体数	陽性数	genogroup	検体数	陽性数
1	H 17.5	秦野	飲食店	不明	患者便	14	6	GI	7	4
					調理従事者便	15	2	GI	2	2
2	H 17.11	小田原	旅館	不明	患者便	6	6	GII	4	4
					調理従事者便	13	2	GII	N.T.	
3	H 17.11	大和	飲食店	不明	患者便	8	6	GI	5	2
					調理従事者便	3	1	GI	3	0
4	H 17.12	小田原	飲食店	不明	患者便	2	2	GII	2	2
					調理従事者便	2	1	GII	1	1
5	H 17.12	平塚	飲食店	不明	患者便	10	8	GII	1	1
					調理従事者便	4	2	GII	N.T.	
6	H 18.1	藤沢	飲食店	不明	患者便	18	17	GII	12	6
					調理従事者便	7	1	GII	N.T.	
7	H 18.1	小田原	飲食店	不明	患者便・吐物	43	33	GII	3	3
					調理従事者便	31	3	GI,GI&II,GII	N.T.	
8	H 18.2	厚木	飲食店	生カキ*	患者便	5	5	GI,GI&II,GII	4	4
					調理従事者便	4	0		N.T.	

N.T.: 検査せず * : 疫学調査より推定

表2 平成17年度感染性胃腸炎事例

事例番号	発生年月	管轄保健福祉事務所	発生施設	検体	検体数	陽性数	検出ウイルス	電子顕微鏡観察	
								検体数	陽性数
1	H 17.5	小田原	小学校	発症者便	40	36	サポウイルス	40	21
				職員	1	1		1	1
				職員	2	2		2	2
				非発症者便	15*	0		15	0
2	H 17.5	鎌倉	高齢者施設	発症者便	8	5	A群ロタウイルス	8	5
3	H 17.5	平塚	小学校	発症者便	12	11	サポウイルス	9	7
4	H 17.5	茅ヶ崎	小学校	発症者便	11	11	C群ロタウイルス	11	8
5	H 17.5	厚木	小学校	発症者便・吐物	5	5	ノロウイルス(GI)	4	4
6	H 17.6	秦野	高校	発症者便	9	6	ノロウイルス(GII)	6	4
				非発症者便	5	1		1	1
7	H 17.11	平塚	高齢者施設	発症者便	4	2	ノロウイルス(GII)	1	1
				入所者	2	2		2	2
				職員	2	2		2	2
				非発症者便	5	0		N.T.	
8	H 17.12	津久井	福祉施設	発症者便	3	3	ノロウイルス(GII)	3	2
				職員	2	2		2	1
				非発症者便	5	0		N.T.	
9	H 17.12	平塚	病院	発症者便	3	2	ノロウイルス(GII)	N.T.	
10	H 17.12	足柄上	福祉施設	発症者便	7	3	ノロウイルス(GII)	7	1
11	H 18.1	小田原	宿泊施設	発症者便	3	3	ノロウイルス(GII)	N.T.	
				非発症者便	7	0		N.T.	
12	H 18.1	藤沢	病院	発症者便	4	2	ノロウイルス(GII)	3	2
				職員	2	1		1	0
13	H 18.1	鎌倉	小学校	発症者便	2	2	ノロウイルス(GII)	2	1
14	H 18.1	藤沢	高齢者施設	発症者便	4	4	ノロウイルス(GII)	3	2
				入所者	1	1		N.T.	
				職員	4	1		N.T.	
15	H 18.2	茅ヶ崎	高齢者施設	発症者便・吐物	3	1	ノロウイルス(GII)	2	1
16	H 18.3	鎌倉	児童養護施設	発症者便	3	3	ノロウイルス(GII)	2	2
				入所者	1**	0		1	1**
				職員	11	1		N.T.	
				調理従事者	12	0		N.T.	
17	H 18.3	足柄上	高齢者施設	発症者便	11	9	A群ロタウイルス	5	4
				非発症者便	13	2		N.T.	

N.T.: 検査せず * : 1検体よりノロウイルスGIを検出 ** : A群ロタウイルスを検出

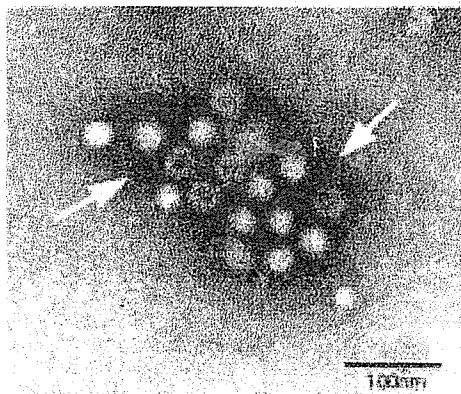


図1 食中毒事例で検出されたノロウイルスの電子顕微鏡像(16万倍)

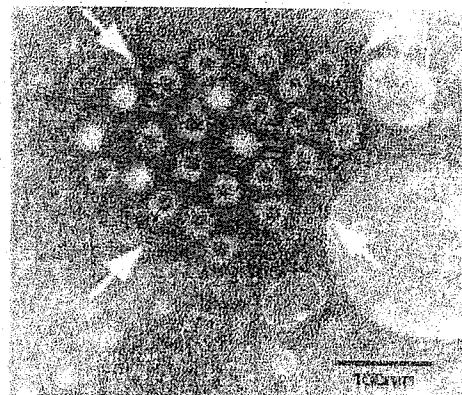


図2 感染性胃腸炎事例で検出されたサボウイルスの電子顕微鏡像(16万倍)

(事例番号1, 3), C群ロタウイルス(事例番号4), ノロウイルスGⅠ(事例番号5), およびノロウイルスGⅡ(事例番号13)がそれぞれ1事例と原因ウイルスが多岐にわたっていたが、発生時期はノロウイルスGⅡの事例以外は全て5月に集中していた。サボウイルスおよびC群ロタウイルスによる事例は、神奈川県で初めて確認された集団発生であり、事例番号1では当該小学校と同じ給食が供給された他2校に集団胃腸炎の発生がなかったこと、事例番号3および4では発症者が一学年に限られていたことなどの疫学調査から、食中毒ではなく感染性胃腸炎と判定された。この3事例では定量的PCRでノロウイルスは検出されず、同時に進めていた電子顕微鏡観察により小型球形ウイルス粒子、ロタウイルス粒子を検出することができたため、それぞれのウイルスの確認検査を早期に進めることが可能であった。このようにノロウイルスが検出されない場合には、多種類のウイルスが同時に検索できる電子顕微鏡観察が有用であった。

聞き取り調査から感染性胃腸炎の多くの事例では、施設の利用者とともに職員にも発症がみられた。特に高齢者・福祉施設などで便や吐物の処理を行う介護職員は、感染の危険性が高いと考えられた。また今回、症状のない施設職員からもウイルスが検出された事例があり、不顕性感染の可能性も考えられた。施設内が再染されると利用者の中で感染が広がるだけでなく、利用者と職員および職員と職員の間でも感染が拡大すると推測された。このことから感染拡大を防止するためには、施設職員における日常的な衛生意識の再確認をすることが重要であると考えられた。

このようにひとたび施設内でウイルスによる胃腸炎が起ると、容易に感染が拡大し大規模な集団発生となる。その集団発生の原因ウイルスはほとんどがノロウイルスであったが、今回のようにサボウイルスやロタウイルスが原因となる集団発生も確認されたことから、今後はノ

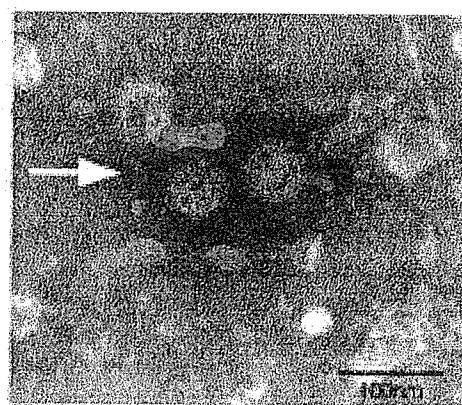


図3 感染性胃腸炎事例で検出されたC群ロタウイルスの電子顕微鏡像(16万倍)

ロウイルス同様これらのウイルスの動向についても監視する必要があると考えられた。

平成17年度の結果を当所で実施した前年度の結果と比較すると食中毒による集団発生事例はやや減少し、発生時期は冬季に集中していた。一方、感染性胃腸炎による集団発生事例は前年度に引き続き増加傾向にあり、発生時期は冬季に加え春季にもピークがみられたことから、冬季に限らず施設内における対策が必要であると考えられた。施設内で集団発生が疑われた場合は、調理従事者や職員を含めた施設全体の発症者を把握し原因ウイルスの検出を速やかに行うことで、感染源および感染経路の推測ができ、集団発生を早期に終息させる事が可能になると考えられた。

最後に、衛生研究所への検体搬入や情報提供にご尽力いただいた各保健福祉事務所、県生活衛生課および健康増進課の方々に感謝いたします。

(平成18年7月20日受理)

新しい遺伝子増幅技術によるノロウイルスの検出方法の比較

¹⁾ 東京大学大学院医学系研究科発達医科学教室, ²⁾ 栄研化学株式会社生物化学研究所柳生 文宏¹⁾ 砂田亜津子²⁾ 小島 禎²⁾
池戸 正成²⁾ 沖津 祥子¹⁾ 牛島 廣治¹⁾

(平成 18 年 1 月 31 日受付)

(平成 18 年 3 月 30 日受理)

Key words: Norovirus, reverse transcriptase-polymerase chain reaction,
reverse transcriptase-loop-mediated isothermal amplification

序 文

ノロウイルスは主に冬期において感染性胃腸炎の原因となり、嘔吐、腹痛、下痢などの症状を引き起こす。また高齢者施設において死亡者が出るなど、集団感染や食中毒が問題となっている。従来 RT-PCR により診断を行うが、検体から抽出精製済みの RNA から始めても cDNA 合成反応、PCR、電気泳動による確認を行うため判定まで 7 時間程度かかる。また 2 時間ほどで判定まで行える Realtime RT-PCR もあるが、より迅速で簡便なかつ経済的な方法が求められている。そこで、同一検体に対し Reverse Transcription-Loop-mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) 法¹⁾を用いて RT-PCR 法と比較した。

材料と方法

サンプルは 2004~2005 年のシーズン冬期に札幌、東京、大阪、舞鶴で小児下痢症患者から採取された。102 サンプルの便から QIAamp Viral RNA kit (QIAGEN) により RNA を抽出し、実験に用いた。RT-LAMP 法は、栄研化学の「Loopamp ノロウイルス GI 検出試薬キット」「Loopamp ノロウイルス GII 検出試薬キット」を用いプロトコールにしたがってリアルタイム濁度測定装置 LA-320C を用いて 63°C 60 分の反応で実験を行った。また、RT-PCR は Capsid 領域を GI 用プライマー G1-SKF (5'-CTGCCCGAA-TTYGTAATGA-3'), G2-SKR (5'-CCAACCCAR-CCATTRTACA-3'), GII 用プライマー COG2F (5'-CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG-3'), G2-SKR (5'-CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT-3') を用いて 94°C 30 秒, 55°C 30 秒, 72°C 60 秒で 35 サイク

Table Detection of Norovirus GI and GII by RT-LAMP method

		GI-LAMP ^a		GII-LAMP ^b	
		+	-	+	-
sequence	GI	10	6	4	0
	GII	92	0	92	0
Total		102			

^a Result by Loopamp Norovirus GI Detection Kit^b Result by Loopamp Norovirus GII Detection Kit

ル増幅²⁾³⁾、電気泳動により判定後、陽性サンプルはシーケンスを行って genogroup を決定した。

結果及び考察

RT-PCR、シーケンスによる結果 GI と判定されたものは 10 サンプルあった。それらのサンプルは RT-LAMP 法では、6 サンプルが GI (+) GII (-) で、4 サンプルは GI (-) GII (-) であった。また RT-PCR、シーケンスにより GII と判定されたものは 92 サンプル有り、RT-LAMP 法で 92 サンプルすべてが GI (-) GII (+) となり、GI (-) GII (-) もしくは GI (+) GII (-) となったものはなかった (Table)。よって、RT-PCR をスタンダードとしてみたときの「Loopamp ノロウイルス GI 検出試薬キット」の感度・特異度はそれぞれ 60%・100%、「Loopamp ノロウイルス GII 検出試薬キット」の感度、特異度はそれぞれ 100%・100% であった。RT-LAMP 法は迅速簡便な診断法で、現在日本でのノロウイルス感染のほとんどを占める GII については非常に高い感度と特異度で検出が可能である。また、RT-LAMP 法は RT 反応と増幅反応から判定までを 1 ステップで行うことができるため、操作は非常に簡便であり、かつ、所要時間、試薬、測定装置を含めたトータルコストを経済的な

別刷請求先: (〒113-0033) 文京区本郷7-3-1

東京大学大学院医学系研究科発達医科学教室

柳生 文宏

PCR と同等で低く抑えることが可能である。さらに6つの領域を含む4種類のプライマーを使うので特異性が高く、RT-PCR のようにプロダクトをゲルで泳動する必要がない。よってエチジウムブロマイドのような蛍光インターカレート剤を使う必要がなく、安全性も高い。また、GI RT-PCR 陽性/GI RT-LAMP 陰性成績は、GI-LAMP 試薬の感度やサンプルの塩基配列とプライマーとのホモロジーに原因があると考えられた。

(共同研究者：兼次邦男，山本あつ子，西村忠史，杉田久美子，西村修一，上田勇一，中谷茂和，Phan Gia Tung, Pattara Khamrin)

文 献

- 1) Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, *et al.* : Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 2000 ; 28 : e63.
- 2) Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K, *et al.* : Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods* 2002 ; 100 : 07—14.
- 3) Shinohara M, Kageyama T : Rapid and efficient detection method of Norwalk virus. *Nippon Rinsyo* 2002 ; 60 : 1181—7.

Detection of Norovirus by Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Method

Fumihiko YAGYU¹⁾, Atsuko SUNADA²⁾, Tadashi KOJIMA²⁾, Masanari IKEDO²⁾,
Shoko OKITSU-NEGISHI¹⁾ & Hiroshi USHIJIMA¹⁾

¹⁾Department of Developmental Medical Sciences, Graduate School of Medicine,
The University of Tokyo, ²⁾EIKEN CHEMICAL CO., LTD

[J.J.A. Inf. D. 80 : 275~276, 2006]

Genotyping and Quantitation of Noroviruses in Oysters from Two Distinct Sea Areas in Japan

Tomoko Nishida^{*,1,5}, Osamu Nishio², Masahiko Kato³, Takehisa Chuma⁴, Hiroto Kato⁵, Hiroyuki Iwata⁵, and Hirokazu Kimura²

¹Yamaguchi Prefectural Research Institute of Public Health, Yamaguchi, Yamaguchi 753–0821, Japan, ²Infectious Diseases Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases, Musashimurayama, Tokyo 201–0011, Japan, ³Gunma Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, Maebashi, Gunma 371–0052, Japan, ⁴Department of Veterinary Hygiene, Kagoshima University, Kagoshima, Kagoshima 890–0065, Japan, and ⁵Department of Veterinary Hygiene, Yamaguchi University, Yamaguchi, Yamaguchi 753–8511, Japan

Received June 20, 2006; in revised form, October 10, 2006. Accepted October 31, 2006

Abstract: Norovirus (NV) is a causative agent of acute gastroenteritis in humans, and shellfishes including oysters act as major vehicles of the virus. To investigate the genetic characteristics of NVs, we collected 1,512 oysters for raw consumption between October 2002 and March 2005 from two distinct areas (area A: the Sanriku Sea area; area B: the Setouchi Sea area). We detected the capsid gene and subjected it to phylogenetic analysis. By further quantification of the copy number of the genome by using real-time PCR, the NV capsid gene was detected in approximately 5% of the oysters, and they showed wide diversity. Two percent of the oysters from area B showed relatively large number of NVs, i.e., over 100 copies of capsid gene/oyster, whereas this was not observed in area A. Most of the detected NVs from oysters and humans were genetically related when the capsid region was compared. These results suggested that NVs obtained from humans and those obtained from oysters showed a potential relationship to each other and that some populations of Japanese oysters accumulated a relatively large number of NVs.

Key words: Oyster, Norovirus, Phylogenetic analysis, Real-time PCR

Introduction

Norovirus (NV) is a member of the *Caliciviridae* family (1, 11) and a major causative pathogen of acute nonbacterial gastroenteritis worldwide (4, 6, 8, 11). NV causes fecal-oral infection and is highly infectious (4). According to the data from 2002 to 2004 in Japan, NV is the most common viral agent of food poisoning, and this virus accounted for approximately 30% to 45% of all food poisoning cases (<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu>). The prevalence of NV in other developed countries including the U.S.A. and France is even higher (2, 5). In 1994, Wang et al. showed that NVs isolated from humans are classified into two major genogroups—genogroup I (GI; Norwalk-type viruses) and genogroup II (GII; Snow mountain-type viruses) (26). Each genogroup is further subdivided into many genotypes; thus NVs exhibit wide genetic diversity (10,

12). It is suggested that NVs expelled from patients with gastroenteritis are condensed in shellfishes such as oysters and clams (3, 22, 25). The Japanese and other Asians consume large amounts of raw shellfish, and Europeans and North Americans are also eating increasing amounts of raw shellfish. Raw consumption of shellfishes causes large outbreaks of food poisoning and infectious gastroenteritis (14, 16, 23). Previous epidemiological studies showed a linkage between gastroenteritis due to NV and the oyster-harvesting season (<http://idsc.nih.go.jp/iasr>) (8). In several studies, NVs were detected in approximately 5% to 20% of oysters and clams (7, 15, 19). Thus, these shellfishes are one of the sources of NV infections (4, 18). Person-to-person infection is another common mode of NV infection (4, 18). In our previous study, we used reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and showed that the NV capsid gene was detected in approximately 10% of the oysters for raw consumption (20). Furthermore, most of the oysters had relatively large amounts

*Address correspondence to Dr. Tomoko Nishida, Yamaguchi Prefectural Research Institute of Public Health, 2–5–67 Aoi, Yamaguchi, Yamaguchi 753–0821, Japan. Fax: +81–83–922–7632. E-mail: nishida.tomoko@pref.yamaguchi.lg.jp

Abbreviations: GI, genogroup I; GII, genogroup II; N-J, neighbor-joining; NV, norovirus; PCR, polymerase chain reaction; RT-PCR, reverse transcription-PCR.

of NV viral genomes with more than 100 copies of the capsid gene (20). However, the molecular study on NVs in oysters is not well known in Japan. In this study, we performed genetic analysis of NVs obtained from 1,512 Japanese oysters for raw consumption which were harvested from two distinct sea areas (Sanriku Sea and Setouchi Sea areas) from October 2002 to March 2005.

Materials and Methods

Samples and preparation of viral suspension. A total of 1,512 Japanese oysters (*Crassostrea gigas*) were collected from the fish distributors that manage harvesting in the Sanriku Sea (483 oysters; Area A) and Setouchi Sea (1,029 oysters; Area B). The distance between these areas is approximately 1,000 km. The Sanriku and Setouchi Seas are located in the northeastern and western parts of the Honshu Island, respectively. The number of samples and the months during which the oysters were harvested in these areas are listed in Table 1. All of the oysters harvested had been approved for raw consumption according to the Food Sanitation Law Enforcement Regulations (in which the standard plate count of bacteria in 1 g of an oyster should be <50,000 with <230 coliforms). The fresh

oysters were shucked, and their stomachs and digestive tracts were removed by dissection and then weighed and homogenized in 10 mM phosphate-buffered saline, pH 7.4 without magnesium or calcium to prepare a 10% suspension. The suspension received 0.1 ml antifoam B (Sigma, St. Louis, Mo., U.S.A.) and then was homogenized twice at a 30 sec interval at the maximum speed by using an Omni-mixer (OCI Instruments, Waterbury, Conn., U.S.A.). Six milliliters of chloroform:butanol (1:1 vol) was added to the homogenate. The mixture was then homogenized for an additional 30 sec and 170 μ l Cat-Floc T (Calgon, Elwood, Pa., U.S.A.) was added to the homogenate (14). In addition, to monitor for efficiency of the RNA extraction, we added echovirus type 9 to the homogenate samples. After the homogenate samples were centrifuged at 3,000 $\times g$ for 30 min at 4 C, their supernatants were layered onto 1 ml of 30% sucrose solution and ultracentrifuged at 154,000 $\times g$ for 3 hr at 4 C. Subsequently, the pellet was resuspended in 138 μ l of double distilled water (DDW) and stored at -80 C until use.

RNA extraction, RT-PCR, sequencing, and real-time PCR. Viral RNA was extracted with the QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) from 138 μ l of the viral suspension. Two microliters of echovirus type 9 (Hill strain; corresponding to approxi-

Table 1. Sample numbers and positive rate of capsid gene of noroviruses in oysters in this study

Month/year	Area A		Area B	
	Sample No.	Positive for RT-PCR (%)	Sample no.	Positive for RT-PCR (%)
Oct/2002	12		6	
Nov/2002	27	1 (3.7)	39	
Dec/2002	45	1 (2.2)	138	6 (4.3)
Jan/2003	48	6 (12.5)	93	12 (12.9)
Feb/2003	39		36	2 (5.6)
Mar/2003	18		12	
Subtotal	189	8 (4.2)	324	20 (6.2)
Oct/2003	15		12	
Nov/2003	18		45	
Dec/2003	81	17 (21)	147	7 (4.8)
Jan/2004	60	7 (11.7)	126	1 (0.8)
Feb/2004	45		78	2 (2.6)
Mar/2004	9		21	1 (4.8)
Subtotal	228	24 (10.5)	429	11 (2.6)
Oct/2004	12		12	
Nov/2004	6	1 (16.7)	51	1 (2)
Dec/2004	12		57	
Jan/2005	9		84	3 (3.6)
Feb/2005	15		48	7 (14.6)
Mar/2005	12		24	
Subtotal	66	1 (1.5)	276	11 (4)
Total	483	33 (6.8)	1,029	42 (4.1)
75/1,512 (5.0)				

mately 10^4 viral genes) was used to test the adequacy of RNA extraction using the QIAamp Viral RNA Mini kit, and samples were finally suspended in 30 μ l of DNase- or RNase-free water. In order to prevent carryover contamination by NV cDNA and to reduce the nonspecific amplicon, the RNA solution was treated with 2 U of RNase-free DNase I (TaKaRa, Tokyo) for 30 min at 37 C followed by inactivation of the enzyme at 75 C for 5 min. RT-PCR was performed in 15 μ l of DNase I-treated RNA solution and 15 μ l of the RT solution that contained 1 mM dNTP mixture, 10 mM dithiothreitol, 0.75 μ g random hexamers (TaKaRa), 33 U RNase inhibitor (TaKaRa), 300 U reverse transcriptase (Superscript II, RNaseH(-); Invitrogen, San Diego, Calif., U.S.A.) and 4.5 μ l Superscript II buffer. The RT mixture was incubated at 42 C for 75 min and subsequently at 99 C for 5 min. Five microliters of cDNA was added to 45 μ l of the PCR mixture containing 5 μ l of $10\times$ Ex *Taq* buffer; 2.5 mM MgCl₂ and 20 μ M of dATP, dGTP, dTTP and dCTP. The PCR was carried out using 2.5 U of TaKaRa Ex *Taq* (TaKaRa) with GI, antisense primer (G1-SKR): 5'-CCA ACC CAR CCA TTR TAC A-3' and sense primer (COG1F): 5'-CGY TGG ATG CGN TTY CAT GA-3'; GII, antisense primer (G2-SKR): 5'-CCR CCN GCA TRH CCR TTR TAC AT-3' and sense primer (COG2F): 5'-CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG-3' (13). For the Alphasat-type strains, the antisense primer (G2AL-SKR) 5'-CCA CCA GCA TAT GAA TTG TAC AT-3' and the sense primer (ALPF) 5'-TTT GAG TCC ATG TAC AAG TGG ATG CG-3' were used.

The amplification was performed under the following conditions: initial denaturation at 94 C for 3 min, 40 cycles of denaturation at 94 C for 1 min, annealing at 50 C for 1 min, extension at 72 C for 2 min and final extension at 72 C for 15 min. Seminested PCR was performed under identical conditions by using the following primers: GI antisense primer: G1-SKR and sense primer (G1-SKF): 5'-CTG CCC GAA TTY GTA AAT GA-3'; GII antisense primer: G2-SKR and sense primer (G2-SKF): 5'-CNT GGG AGG GCG ATC GCA A-3', and Alphasat-type antisense primer: G2AL-SKR and sense primer: ALPF. PCR was performed for 35 cycles at 94 C for 3 min followed by a 15-min incubation at 72 C. Each amplicon was analyzed on 1.5% agarose gels. The products were visualized by 0.5 μ g per ml of ethidium bromide staining. The amplicons were purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen) and the nucleotide sequence was determined by an automated DNA sequencer (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer; Applied Biosystems, Foster City, Calif., U.S.A.) by using the Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems).

We also quantified the NV capsid genes by real-time PCR as described previously (9). The real-time PCR mixture contained 5 μ l of cDNA, 2 μ l of the LightCycler master mix (Roche, Penzberg, Germany), 0.7 mM of each primer and fluorogenic probes (probes for GI, 2 pmol of RING1(a)-TP and 2 pmol of RING1(b)-TP; probe for GII, 4 pmol of RING2-TP). The fluorogenic probes used for real-time PCR were as follows: 5'-AGA TYG CGA TCY CCT GTC CA-3' (RING1(a)-TP) and 5'-AGA TCG CGG TCT CCT GTC CA-3' (RING1(b)-TP) and 5'-TGG GAG GGC GAT CGC AAT CT-3' (RING2-TP) (9). The amplification was performed by using a LightCycler (Roche). The following PCR protocol was employed: 10 min at 95 C followed by 50 cycles at 95 C for 10 sec, 60 C for 25 sec and 40 C for 30 sec. The data were corrected using internal standards as described previously (9).

Phylogenetic analysis. The capsid sequences were compared with those of the strains detected in gastroenteritis patients living near oyster farms and the reference strains from GenBank. The strains and accession numbers of these sequences have been provided in the legend for Fig. 1. Phylogenetic analysis was performed as described previously (12). In brief, all of the NV capsid region sequences (nt 244 to 313) were aligned using Clustal W (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/clustalw-j.html>). A phylogenetic tree was constructed by the neighbor-joining (N-J) technique, Kimura's two-parameter method, by using the Tree Explorer software (ver. 2.12). The reliability of the tree was estimated using 1,000 bootstrap replications.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using Fisher's exact test. A P value of <0.05 was considered significant.

Results

Detection of NV Capsid Gene and Determination of Copy Number in Oysters

We detected the NV capsid gene from a total of 1,512 oysters that were for raw consumption and harvested from the Sanriku (483 oysters) and Setouchi Seas (1,029 oysters). Detailed data regarding these oysters have been listed in Table 1. In total, for 33 of the 483 oysters from area A (6.8%) and 42 of the 1,029 oysters from area B (4.1%), the NV capsid genome was detected during the entire investigation periods. During the 2003–2004 harvesting season, a higher number of NVs was detected in the oysters from area A than in those from area B ($P < 0.05$). However, during the 2002–2003 and the 2004–2005 harvesting seasons, the detection of NVs in oysters from area B was higher than that from area A ($P < 0.05$). In both areas, most of

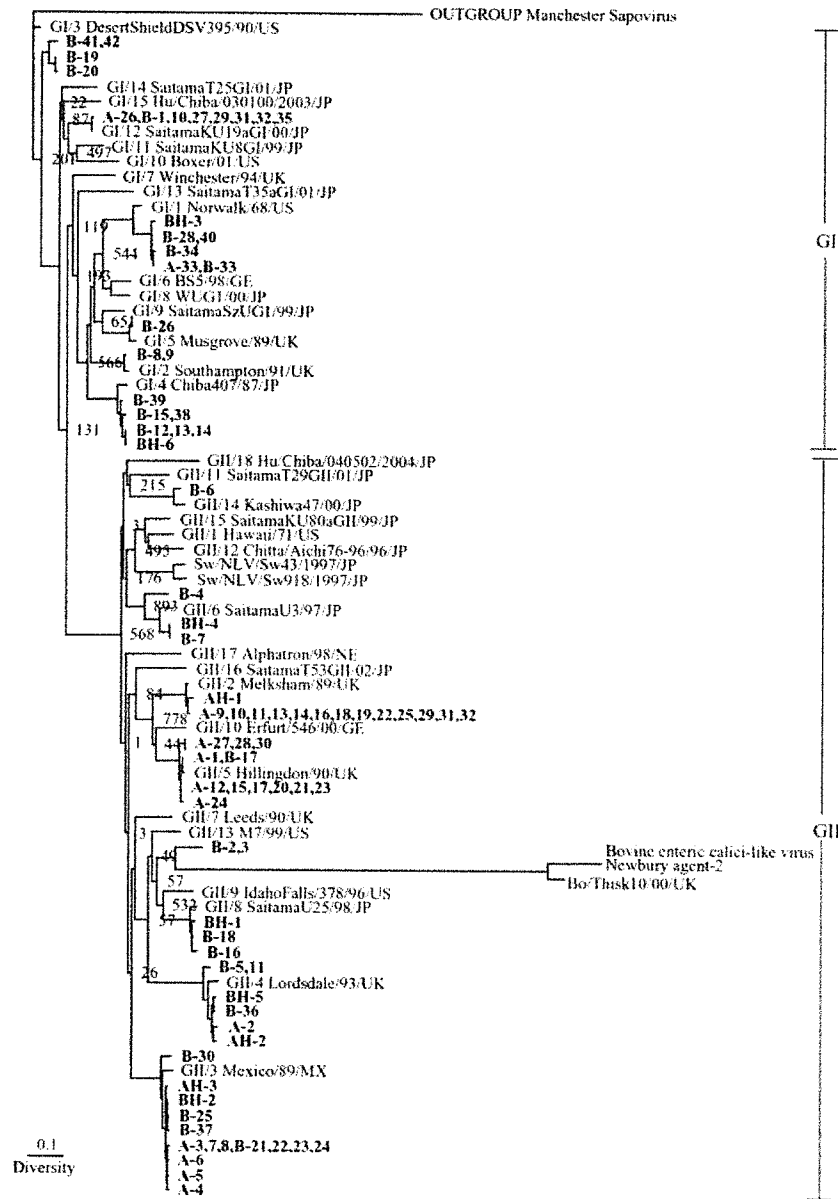


Fig. 1. Phylogenetic tree constructed on the basis of the partial sequences of the Norovirus (NV) capsid gene. The distance was calculated using Kimura's two-parameter method, and the tree was plotted using the neighbor-joining (N-J) method. The numbers at each branch indicate the bootstrap values for the clusters supported by that branch. As an outgroup, the sapovirus strain Manchester: X86560 was used. A and B indicate the harvest areas, and positive samples in this study are designated in bold face. AH and BH refer to human NV strains detected in gastroenteritis patients living near areas A and B. GI: genogroup I; GII: genogroup II. The GenBank accession numbers of the reference strains are as follows: GI/1 Norwalk/68/US (M87661), GI/2 Southampton/91/UK (L07418), GI/3 DesertShieldDSV395/90/US (U04469), GI/4 Chiba407/87/JP (AB042808), GI/5 Musgrove/89/UK (AJ277614), GI/6 BS5/98/GE (AF093797), GI/7 Winchester/94/UK (AJ277609), GI/8 WUG1/00/JP (AB081723), GI/9 SaitamaSzUG1/99/JP (AB039774), GI/10 Boxer/01/US (AF538679), GI/11 SaitamaKU8GI/99/JP (AB058547), GI/12 SaitamaKU19aGI/00/JP (AB058525), GI/13 SaitamaT35aGI/01/JP (AB112132), GI/14 SaitamaT25GI/01/JP (AB112100), GI/15 Hu/Chiba/030100/2003/JP (AJ865494), GII/1 Hawaii/71/US (U07611), GII/2 Melksham/89/UK (X81879), GII/3 Mexico/89/MX (U22498), GII/4 Lordsdale/93/UK (X86557), GII/5 Hillingdon/90/UK (AJ277607), GII/6 SaitamaU3/97/JP (AB039776), GII/7 Leeds/90/UK (AJ277608), GII/8 SaitamaU25/98/JP (AB067543), GII/9 Idaho Falls/378/96/US (AY054299), GII/10 Erfurt/546/00/GE (AF427118), GII/11 SaitamaT29GII/01/JP (AB112221), GII/12 Chitta/Aichi76-96/96/JP (AB032758), GII/13 M7/99/US (AY130761), GII/14 Kashiwa47/00/JP (AB078334), GII/15 SaitamaKU80aGII/99/JP (AB058582), GII/16 SaitamaT53GII/02/JP (AB112260), GII/17 Alphatron/98/NE (AF195847), GII/18 Hu/Chiba/040502/2004/JP (AJ865586), AH-1 (AB262166), AH-2 (AB262167), AH-3 (AB262168), BH-1 (AB262169), BH-2 (AB262170), BH-3 (AB262171), BH-4 (AB262172), BH-5 (AB262173), BH-6 (AB262174), Bovine enteric calici-like virus Newbury agent-2 (AF097917), Bo/Thisk10/00/UK (AY126468), and OUTGROUP Manchester Sapovirus (X86560).

Table 2. Genotypes and copy numbers of NVs in Japanese oysters

Month/year	Area	Amplicons ^{a)}	Genogroup/genotype	NV genome copy number	GenBank accession No.	
Nov/2002	A	A-1	II/5	ND ^{b)}	AB262091	
Dec/2002	A	A-2	II/4	ND	AB262092	
	B	B-1	I/12	5.0×10^2	AB262093	
	B	B-2	II/untypable	9.1×10^2	AB262094	
	B	B-3	II/untypable	8.3×10^2	AB262095	
	B	B-4	II/6	3.8×10^2	AB262096	
	B	B-5	II/4	2.1×10^3	AB262097	
Jan/2003	B	B-6	II/14	5.8×10^2	AB262098	
	A	A-3	II/3	ND	AB262099	
	A	A-4	II/3	ND	AB262100	
	A	A-5	II/3	ND	AB262101	
	A	A-6	II/3	ND	AB262102	
	A	A-7	II/3	ND	AB262103	
	A	A-8	II/3	ND	AB262104	
	B	B-7	II/6	1.7×10^3	AB262105	
	B	B-8	I/2	1.4×10^2	AB262106	
	B	B-9	I/2	2.0×10^2	AB262107	
	B	B-10	I/12	1.8×10^3	AB262108	
	B	B-11	II/4	1.8×10^3	AB262109	
	B	B-12	I/4	4.1×10^2	AB262110	
	B	B-13	I/4	ND	AB262111	
	B	B-14	I/4	ND	AB262112	
	B	B-15	I/4	ND	AB262113	
	B	B-16	II/8	ND	AB262114	
	B	B-17	II/5	ND	AB262115	
B	B-18	II/8	ND	AB262116		
Feb/2003	B	B-19	I/3	4.8×10^2	AB262117	
	B	B-20	I/3	ND	AB262118	
Dec/2003	A	A-9	II/2	ND	AB262119	
	A	A-10	II/2	ND	AB262120	
	A	A-11	II/2	ND	AB262121	
	A	A-12	II/5	ND	AB262122	
	A	A-13	II/2	ND	AB262123	
	A	A-14	II/2	ND	AB262124	
	A	A-15	II/5	ND	AB262125	
	A	A-16	II/2	ND	AB262126	
	A	A-17	II/5	ND	AB262127	
	A	A-18	II/2	ND	AB262128	
	A	A-19	II/2	ND	AB262129	
	A	A-20	II/5	ND	AB262130	
	A	A-21	II/5	ND	AB262131	
	A	A-22	II/2	ND	AB262132	
	A	A-23	II/5	ND	AB262133	
	A	A-24	II/5	ND	AB262134	
	A	A-25	II/2	ND	AB262135	
	B	B-21	II/3	1.4×10^2	AB262136	
	B	B-22	II/3	4.0×10^2	AB262137	
	B	B-23	II/3	9.6×10^2	AB262138	
	B	B-24	II/3	1.0×10^3	AB262139	
	B	B-25	II/3	9.9×10^2	AB262140	
	B	B-26	I/5	ND	AB262141	
	B	B-27	I/12	ND	AB262142	
	Jan/2004	A	A-26	I/12	ND	AB262143
		A	A-27	II/5	ND	AB262144
		A	A-28	II/5	ND	AB262145
A		A-29	II/2	ND	AB262146	
A		A-30	II/5	ND	AB262147	
A		A-31	II/2	ND	AB262148	
A		A-32	II/2	ND	AB262149	
B		B-28	I/1	ND	AB262150	
Feb/2004	B	B-29	I/12	ND	AB262151	
	B	B-30	II/3	ND	AB262152	
Mar/2004	B	B-31	I/12	ND	AB262153	
Nov/2004	A	A-33	I/1	ND	AB262154	
	B	B-32	I/12	ND	AB262155	
Jan/2005	B	B-33	I/1	ND	AB262156	
	B	B-34	I/1	ND	AB262157	
	B	B-35	I/12	ND	AB262158	
Feb/2005	B	B-36	II/4	9.9×10^2	AB262159	
	B	B-37	II/3	4.1×10^2	AB262160	
	B	B-38	I/4	3.1×10^2	AB262161	
	B	B-39	I/4	ND	AB262162	
	B	B-40	I/1	ND	AB262163	
	B	B-41	I/3	ND	AB262164	
	B	B-42	I/3	ND	AB262165	

^{a)} Amplicon; A and B refer to the areas of harvest.

^{b)} ND; not detected (<100 copies/oyster).

the NVs were detected during the December to January investigation periods. We also quantitated the copy number of the NV capsid gene in all oysters by real-time PCR (Table 2). The sensitivity (limit of detection) for this method is more than 100 copies of the NV genomes/oyster (20). Interestingly, the number of oysters from area A, which harbored the NVs genome, was significantly greater than that from area B. Oysters harvested from area B had a relatively large number of capsid genomes with more than 100 copies/oyster, while those harvested from area A had less than 100 copies of the NV genome (Table 2).

Phylogenetic Analysis of NVs from Oysters

We sequenced all the amplicons of the NV capsid genes in oysters by using the direct sequencing method. In the direct sequencing method, if the shellfishes have accumulated several kinds of viruses, there are cases where the peaks of the nucleotide sequences in the chromatogram overlap and determination of the sequence is impossible. In this study, the main fluorescence peak of each nucleotide sequence was observed without overlapping in all the sequence data (data not shown). The capsid gene amplicon was considered to have been amplified from homogeneous NVs in the samples. Based on these sequences, we performed a phylogenetic analysis of the NV capsid gene by using the N-J method (Fig. 1). The genetic distance between the clusters of GI and GII in the phylogenetic tree was observed to be 0.35 and 0.27, respectively. Of 75 amplicons, 26 were classified as GI and the remaining 49 as GII. The GI amplicons were further classified into 6 genotypes and those of GII into 8 genotypes (Fig. 1). In GI, there were 8, 6, and 5 amplicons in the GI/12 (SaitamaKU19a-type), GI/4 (Chiba407-type) and GI/1 (Norwalk-type), respectively. In GII, there were 13 amplicons each in the GII/3 (Mexico-type) and GII/2 (Melksham-type), and 12 amplicons in the GII/5 (Hillingdon-type). We also characterized the geographical and seasonal features of the genotypes. Throughout the investigation period, 12 amplicons in the oysters from area A were classified under GII/2 (Melksham-type). In area B, 6 amplicons were classified under GI/4 (Chiba407-type). In this study, many NV genotypes were detected in oysters, but only 5 genotypes, GI/1, GI/12, GII/3, GII/4 (Lordsdale-type) and GII/5 were common to both areas.

Very recently, all the GI and GII genogroups were classified into 15 and 18 genotypes, respectively (21). This classification method was based on the range of genetic distance (10). However, our 2 amplicons, i.e., B-2 and B-3, were not included in any genotype because the genetic distances exceeded the range for a

single cluster, suggesting that these strains may be new NV genotypes (Fig. 1). In addition, the sequences of some amplicons matched each other completely, although most of these were detected in different seasons and different areas. The sequences of some amplicons detected in oysters and humans showed high similarity. Moreover, the sequences from oysters (cf. B-6 in Fig. 1) and animals (cf. Sw/NLV/Sw43/1997/JP and Sw/NLV/Sw918/1997/JP in Fig. 1) were closely related, indicating that the NV capsid genes in oysters exhibit wide genetic diversity but some of them were genetically related to swine NVs (24).

Discussion

In this study, we demonstrated that the NV capsid gene was detected in approximately 5% of the Japanese oysters for raw consumption. Of the oysters from area B, 50% carried relatively large amounts of the NV genomes which were not observed in oysters from area A. In addition, the capsid gene exhibited wide genetic diversity in both genogroups, GI and GII. The nucleotide sequences of the capsid gene of some strains from both areas matched completely, suggesting that some strains of oysters were genetically related to a considerable extent although the oysters were harvested far apart.

Recent studies in some countries showed that approximately 0% to 20% of oysters contained NVs and these viruses are associated with gastroenteritis in humans (16, 17, 19). For example, Le Guyader et al. showed that the polymerase gene of NVs was detected in approximately 20% of French oysters and showed wide genetic diversity (16). Myrmel et al. demonstrated approximately 7% of the shellfishes from the Norwegian coast contained the NV gene (19). In addition, we demonstrated that 10% of Japanese oysters contain the NV capsid genomes and show wide genetic diversity, although these oysters were harvested in areas different from those used in this study (20). On the other hand, Lodder-Verschoor et al. demonstrated that NV genes were not detected in Dutch oysters although the enterovirus genes were detected in these oysters, suggesting that NV does not always contaminate oysters (17). The genetic characteristics of NVs contaminating shellfishes are poorly understood. Therefore, we conducted a molecular typing study on NVs in oysters obtained from two distinct sea areas in Japan, in order to make an accurate comparison of the prevalence patterns of NVs in Japanese oysters. The present data indicates that the NVs detected in Japanese oysters from different sea areas showed wide genetic diversity. This is consistent with the results of earlier reports (16, 17, 19).

Recent data suggested that the infectivity of NVs is relatively strong and less than 100 particles of NVs can easily cause gastroenteritis in humans (4). Our previous data showed that approximately 5% of the oysters for raw consumption from two distinct areas in the Setouchi Sea contained more than 100 copies of the NV genomes in each oyster (20). In contrast, we found that only 1.4% of the oysters had more than 100 copies of NVs in this study. In addition, the oysters from area A had less than 100 copies of NVs. During our investigation periods, 34,000–37,000 tons of oysters were harvested per year (<http://www.maff.go.jp/www/info/bun08.html>). More than 70% of the oysters were harvested from these two areas. We detected NVs in approximately 5% of the oysters for raw consumption; however, this rate did not directly reflect the possibilities of NV infection. In order to prevent food poisoning caused by microorganisms present in raw oysters, the Japanese government regulates the oyster industry via the Enforcement Regulation of the Food Sanitation Law. However, this regulation mainly focuses on bacteriology. To our knowledge, there is no universal risk assessment of viruses, such as NVs or the hepatitis A virus, which are contained in shellfishes. Ensuring the virological safety of oysters would have an enormous effect. If we can control outbreaks of oyster-related gastroenteritis, the number of patients with gastroenteritis may be reduced. Accurate risk assessment of raw oysters with regard to NVs infections and regulation based on viral sanitation is needed.

It is suggested that various genotypes of NVs in oysters are associated with the outbreaks of gastroenteritis in humans (25). Therefore, it is important to clarify the genetic characteristics of NVs detected from both shellfishes and humans, to gain a better understanding of the epidemiology of NV infection (10). Our data indicated that most GI and GII strains detected in oysters and humans were genetically related to a considerable extent (Fig. 1).

Interestingly, some NVs that are usually detected in swine are also genetically related to the NVs in oysters. Therefore, we could not exclude the possibility that some NV strains detected in oysters were derived from other animals such as swine. In conclusion, further molecular studies of NVs and quantitative real-time PCR methods are needed for a better understanding of the NV infection, which may provide more accurate assessment of the risk factors for shellfish-associated diseases.

We thank Drs. Mitsuaki Oseto (Ehime Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science), Toshiyuki Mikami (Aomori Prefectural Institute of Public Health and Environ-

ment), Shinji Fukuda (Hiroshima Prefectural Institute of Public Health and Environment), Mamoru Noda (Hiroshima City Institute of Public Health), Michiyo Shinohara (Saitama Prefectural Institute of Public Health), Yo Ueki (Miyagi Prefectural Institute of Public Health and Environment), Nobuhiro Iritani (Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences), and Miho Akiyama (National Institute of Public Health) for their constructive discussions. This work was supported by Research on Food and Chemical Safety for Health, Labour and Welfare Programs from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.

References

- 1) Atmar, R.L., and Estes, M.K. 2001. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**: 15–37.
- 2) Bon, F., Ambert-Balay, K., Giraudon, H., Kaplon, J., Le Guyader, S., Pommepuy, M., Gallay, A., Vaillant, V., de Valk, H., Chikhi-Brachet, R., Flahaut, A., Pothier, P., and Kohli, E. 2005. Molecular epidemiology of caliciviruses detected in sporadic and outbreak cases of gastroenteritis in France from December 1998 to February 2004. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 4659–4664.
- 3) Burkhardt, W., III, and Calki, K.R. 2000. Selective accumulation may account for shellfish-associated viral illness. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1375–1378.
- 4) Centers for Disease Control and Prevention. 2001. “Norwalk-like viruses.” Public health consequences and outbreak management. *MMWR* **50**: 1–18.
- 5) Fankhauser, R.L., Noel, J.S., Monroe, S.S., Ando, T., and Glass, R.I. 1998. Molecular epidemiology of “Norwalk-like viruses” in outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J. Infect. Dis.* **178**: 1571–1578.
- 6) Fankhauser, R.L., Monroe, S.S., Noel, J.S., Humphrey, C.D., Bresee, J.S., Parashar, U.D., Ando, T., and Glass, R.I. 2002. Epidemiologic and molecular trends of “Norovirus” associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J. Infect. Dis.* **186**: 1–7.
- 7) Formiga-Cruz, M., Tofino-Quesada, G., Bofill-Mas, S., Lees, D.N., Henshilwood, K., Allard, A.K., Conden-Hansson, A.C., Herrroth, B.E., Vantarakis, A., Tsibouxi, A., Papapetropoulou, M., Furones, M.D., and Girones, R. 2002. Distribution of human virus contamination in shellfish from different growing areas in Greece, Spain, Sweden, and the United Kingdom. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 5990–5998.
- 8) Inouye, S., Yamashita, K., Yamadera, S., Yoshikawa, M., Kato, N., and Okabe, N. 2000. Surveillance of viral gastroenteritis in Japan: pediatric cases and outbreak incidents. *J. Infect. Dis.* **181**: S270–S274.
- 9) Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Takeda, N., and Katayama, K. 2003. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 1548–1557.
- 10) Kageyama, T., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Kojima, S., Takai, R., Oka, T., Takeda, N., and Katayama, K. 2004. Coexistence of multiple geno-

- types, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to norovirus in Japan. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 2988–2995.
- 11) Kapikian, A.Z., Estes, M.K., and Chanock, R.M. 1996. Norwalk group of viruses, p. 783–810. *In* Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. et al. (eds), *Fields virology*, 3rd edition, Lippincott-Raven, Philadelphia.
 - 12) Katayama, K., Shirato-Horikoshi, H., Kojima, S., Kageyama, T., Oka, T., Hoshino, F., Fukushi, S., Shinohara, M., Uchida, K., Suzuki, Y., Gojobori, T., and Takeda, N. 2002. Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. *Virology* **299**: 225–239.
 - 13) Kojima, S., Kageyama, T., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Shinohara, M., Uchida, K., Natori, K., Takeda, N., and Katayama, K. 2002. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J. Virol. Methods* **100**: 107–114.
 - 14) Le Guyader, F., Neill, F.H., Estes, M.K., Monroe, S.S., Ando, T., and Atmer, R.L. 1996. Detection and analysis of a small round-structured virus strain in oysters implicated in an outbreak of acute gastroenteritis. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4268–4272.
 - 15) Le Guyader, F., Haugarreau, L., Miossec, L., Dubois, E., and Pommepuy, M. 2000. Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3241–3248.
 - 16) Le Guyader, F., Neill, F.H., Dubois, E., Bon, F., Loisy, F., Kholi, E., Pommepuy, M., and Atmer, R.L. 2003. A semi-quantitative approach to estimate Norwalk-like virus contamination of oyster implicated in an outbreak. *Int. J. Food Microbiol.* **87**: 107–112.
 - 17) Lodder-Verschoor, F., de Roda Husman, A.M., van den Berg, H.H.J.L., Stein, A., van Pelt-Heerschap, H.M.L., and van der Poel, W.H.M. 2005. Year-round screening of non-commercial and commercial oysters for the presence of human pathogenic viruses. *J. Food Prot.* **68**: 1853–1859.
 - 18) Metcalf, T.G., Melnick, J.L., and Estes, M.K. 1995. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology—a trip of over 50 years. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 461–487.
 - 19) Myrmel, M., Berg, E.M.M., Rimstad, E., and Grinde, B. 2004. Detection of enteric viruses in shellfish from the Norwegian coast. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 2678–2684.
 - 20) Nishida, T., Kimura, H., Saito, M., Shinohara, M., Kato, M., Fukuda, S., Munemura, T., Mikami, T., Kawamoto, A., Akiyama, M., Kato, Y., Nishi, K., Kozawa, K., and Nishio, O. 2003. Detection, quantitation, and phylogenetic analysis of Noroviruses in Japanese oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 5782–5786.
 - 21) Okada, M., Ogawa, T., Kaiho, I., and Shinozaki, K. 2005. Genetic analysis of Noroviruses in Chiba Prefecture, Japan, between 1999 to 2004. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 4391–4401.
 - 22) Schwab, K.J., Neill, F.H., and Estes, M.K. 1998. Distribution of Norwalk virus within shellfish following bioaccumulation and subsequent depuration by detection using RT-PCR. *J. Food Prot.* **61**: 1674–1680.
 - 23) Shieh, Y., Monroe, S.S., Fankhauser, R.L., Langlois, G.W., Burkhardt, W., III, and Baric, R.S. Detection of Norwalk-like virus in shellfish implicated in illness. *J. Infect. Dis.* **181**: S360–S366.
 - 24) Sugieda, M., Nagaoka, H., Kakishima, Y., Ohshita, T., Nakamura, S., and Nakajima, S. 1998. Detection of Norwalk-like virus genes in the caecum contents of pigs. *Arch. Virol.* **143**: 1215–1221.
 - 25) Ueki, Y., Sano, D., Watanabe, T., Akiyama, K., and Omura, T. 2005. Norovirus pathway in water environment estimated by genetic analysis of strains from patients of gastroenteritis, sewage, treated wastewater, river water and oysters. *Water Res.* **39**: 4271–4280.
 - 26) Wang, J., Jiang, X., Madore, H.P., Gray, J., Desselberger, U., Ando, T., Seto, Y., Oishi, I., Lew, J.F., and Green, K.Y. 1994. Sequence diversity of small, round-structured viruses in the Norwalk virus group. *J. Virol.* **68**: 5982–5990.