

表3 リアルタイムPCRで得られたNV遺伝子のコピー数の分布

種類	コピー数/2 μ l	NVG I	NVG II	HAV
アカガイ	<10	117	98	117
	10~100	0	18	0
ハマグリ	<10	3	2	3
	10~100	0	1	0
計		120	120	120

表4 遺伝子解析の結果

種類	検査数	遺伝子解析		
		GII/4	解析不能	未実施
アカガイ	20	13	4	3
ハマグリ	1	1	0	0
計	21	14	4	3

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）
分担研究報告書

輸入生鮮魚介類および動物生肉のウイルス汚染の
サーベイランスに関する研究

分担研究者：牛島廣治（鹿児島国際大学）
研究協力者：沖津祥子（藍野学院短期大学）
Leera Kittigul（マヒドン大学）
Phan Gia Tung（東京大学）
Pattara Khamrin（東京大学）

研究要旨： 1. 中国福建省および日本国内（千葉、岩手、宮城県）産の加熱用生カキを購入した。RT-nested-PCR 法にてノロウイルスゲノムの検出を行い、検出されたウイルスの遺伝子解析を行った。中国産カキでは 10%、日本産では 5%のカキからノロウイルスが検出された。ノロウイルスの配列は 100%一致し、報告されている GII/4 2006b と 99%一致した。2. カキからの新しいロタウイルス濃縮・溶出法を開発し、ロタウイルス検出を行った。この酸吸着-アルカリ溶出法と RT-nested PCR 法を組み合わせた方法は従来法に比べて、高感度であった。タイの市場またはカキ養殖場から購入した 120 個のカキのうち 4 サンプルから A 群ロタウイルス（G9:2、G3:1、G1:1）を検出した。

A 研究目的： 1. ノロウイルスは腸管感染症を引き起こす病原体として世界的に認知されており、乳幼児の散発性胃腸炎やさまざまな状況において広範囲の年齢層に対して非細菌性胃腸炎の集団感染を引き起こす。この研究では昨年に引き続き、中国産輸入カキと日本産カキに対するノロウイルスのサーベイランスを行った。2. カキからのウイルス検出はそのウイルス量が少ないことと、カキの組織中に検出法である PCR 反応に対する natural inhibitor が含まれていることから困難を伴う。そこでカキ中のウイルスを濃縮・溶出する方法を考案し、RT-nested PCR を用いて、A 群ロタウイルスの検出を行った。

B 研究方法： 1. 中国福建省産地の加熱用生カキと日本国内 3 カ所（宮城県、千葉県、岩手県）を産地とする加熱用生カキを東京都台東区の商店で 2007 年 10 月と 11 月に購入した。中国産のカキ 10 個（各月 5 個ずつ）、日本産のカキ 20 個（各月 10 個ずつ）を調べた。-20℃で保存後、分析時に解凍して用いた。中腸腺を取り出し、爪楊枝でよくつぶした後、

凍結融解にて組織を破壊し蒸留水 140 μl を加えて、10 分間ボルテックスした。20 分間シェーキングした後、10 分間氷中に保存し、その後 6000×g で 20 分遠心し、上清 140 μl を中腸腺抽出液とした。QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen)にて RNA を抽出し、得られた RNA から cDNA を作製し、semi-nested PCR 法にてノロウイルス GI と GII を検出した。陽性検体については配列決定を行い、genotype を決定した。2. 2005 年 8 月から 2006 年 2 月に、バンコック市内の様々な市場およびタイ南部の 10 カ所のカキ養殖場から合計 120 個のカキを購入した。貝柱を除いてカキ肉を細切し、1 サンプル 25 g とした。溶出法の検討のためには既知量のロタウイルスを 25g のサンプルに加えて室温で 60 分おいた。溶出法として①直接アルカリ溶出法、②酸吸着-中性溶出法、③酸吸着-アルカリ溶出法を検討した。溶出液から RNA を抽出し、RT-nested PCR 法にてロタウイルスの検出を行った。この際、one-step RT-PCR 法と RT 後 PCR を行う方法を比較した。

C 結果： 1. 中国および日本産の加熱用カキからはそれぞれ5% (20個中1個)、10% (10個中1個)の検出率でノロウイルスが検出された。これはともに11月に購入したカキであった。検出されたノロウイルスの遺伝子解析の結果、対象配列は100%一致し、報告されているGII/4 2006bと99%一致した(図1)。
2. One-step RT-PCR法はRT後PCRを行う方法に比べ、高感度であることがわかったのでこれを今後採用した。3種類の溶出法を比較すると③酸吸着-アルカリ溶出法が最も低濃度までロタウイルスを検出した(表1)。上記の方法を用いて120個のカキからロタウイルスの検出を行ったところ、4個のカキがロタウイルス陽性となった(表2)。そのGタイプはG9が2検体、G3が1検体、G1が1検体であった。

D 考察： 1. 昨年に引き続き、加熱用の中国産カキでも日本産のカキと同様にノロウイルスが検出された。今回の研究で検出された株は前年集団発生が報告されたvariant ノロウイルス GII/4 2006bであった。このことはこれらの株が自然界で広がっていることを示している。2. カキを汚染しているロタウイルスを検出する方法を開発した。低いウイルス量で感染が成立するため、高感度の濃縮・検出法が期待され、今後この方法は公衆衛生の管理に有益と思われる。

E 研究発表

1. 論文発表

- 1) Phan TG, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H, Duan ZJ. Possible misidentification of G5P[6] rotavirus as a novel strain detected in humans for the first time. *J Clin Microbiol*, 45(6):2098-2099, 2007.
- 2) Phan TG, Khamrin P, Trinh DQ, Dey SK, Takanashi S, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Emergence of intragenotype recombinant sapovirus in Japan. *Infection, Genetics and Evolution*, 7(4):542-546, 2007.
- 3) Okame M, Shiota T, Hansman G, Takagi M, Yagyu F, Takanashi S, Phan TG, Shimizu Y, Kohno H, Okitsu S, Ushijima H. Anti-norovirus polyclonal antibody and its potential for development of an antigen-ELISA. *J Med Virol*, 79(8): 1180-1186, 2007.
- 4) Phan TG, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Yamamoto A, Sugita K, Takanashi S, Okitsu S, Ushijima H. Genetic heterogeneity, evolution and recombination in norovirus. *J Med Virol*, 79(8): 1388-1400, 2007.
- 5) Pham NT, Khamrin P, Nguyen TA, Dey SK, Phan TG, Okitsu S, Ushijima H. Isolation and molecular characterization of Aichi viruses from fecal specimens collected in Japan, Bangladesh, Thailand and Vietnam. *J Clin Microbiol*, 45(7) : 2287-2288, 2007.
- 6) Trinh QD, Pham NTK, Nguyen TA, Phan TG, Khamrin P, Yan H, Hoang PL, Maneekarn N, Li Y, Kozlov A, Okitsu S, Ushijima H. Amino acid substitutions in the VP7 protein of human rotavirus G3 isolated in China, Russia, Thailand, and Vietnam during 2001-2004. *J Med Virol*, 79(10): 1611-1616, 2007.
- 7) Honma S, Chizhilov V, Santos N, Tatsumi M, Timenetsky MD, Linhares AC, Mascarenhas JD, Ushijima H, Amah GE, Gentsch JR, Hoshino Y. Development and validation of DNA microarray for genotyping group A rotavirus VP4 (P[4] P[6], P[8], P[9] and P[14]) and VP7 (G1-G6, G8-G10 and G12) genes. *J Clin Microbiol*, 45(8):2641-2648, 2007.
- 8) Phan TG, Khamrin P, Akiyama M, Yagyu F, Okitsu S, Maneekarn N, Nishio O, Ushijima H. Detection and genetic characterization of Norovirus in oyster from China and Japan. *Clin Lab*, 53 (7, 8): 405-412, 2007.
- 9) Sang XJ, Ushijima H, Okitsu S, Sugihara S, Yagyu F, Maneekarn N. Photocatalytic inactivation of diarrheal viruses by visible-light-catalytic titanium dioxide. *Clin Lab*, 53(7, 8):413-421, 2007.

- 10) Phan TG, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Evidence of intragenic recombination in G1 rotavirus VP7 genes. *J Virol*, 81(18):10188-10194, 2007.
- 11) Phan TG, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Genetic heterogeneity, evolution and recombination in emerging G9 rotaviruses. *Infect, Genet Evol*, 7 (5) : 656-663, 2007.
- 12) Nguyen TA, Khamrin P, Takanashi S; Hoang PL, Pham LD, Hoang KT, Satou K, Masuoka Y, Okitsu S, Ushijima H. Evaluation of immunochromatography test for detection of rotavirus and norovirus among Vietnamese children with acute gastroenteritis and the emergence of a novel norovirus GII.4 variant. *J Tropical Pediatrics*, 53(4): 264-269, 2007.
- 13) Khamrin P, Peerakome S, Tonusin S, Malasao R, Okitsu S, Ushijima H, Maneekarn N. Changing pattern of rotavirus G genotype distribution in Chiang Mai, Thailand from 2002 to 2004: Decline of G9 and reemergence of G1 and G2. *J Med Virol*, 79(11): 1775-1782, 2007.
- 14) Dey SK, Nguyen TA, Phan TG, Nishio O, Salim AFM, Rahman M, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Molecular and epidemiological trend of norovirus associated gastroenteritis in Dhaka City, Bangladesh. *J Clin Virol*, 40 : 218-223, 2007.
- 15) Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Tonusin S, Malasao R, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H. Genetic diversity of noroviruses and sapoviruses in children hospitalized with acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *J Med Virol*, 79: 1921-1926, 2007.
- 16) Nguyen TA, Khamrin P, Trinh QD, Phan TG, Pham LD, Hoang LP, Hoang KT, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Sequence analysis of Vietnamese P[6] rotavirus strains suggests evidence of interspecies transmission. *J Med Virol* 79: 1959-1965, 2007.
- 17) Phan TG, Nishimura S, Sugita K, Nishimura T, Okitsu S, Ushijima H. Multiple recombinant noroviruses in Japan. *Clin Lab*.53:567-70, 2007.
- 18) Fujimoto T, Shinohara M, Ito M, Okafuji T, Okafuji T, Nishio O, Yoshida H, Shimizu H, Chikahira M, Phan TG, Ushijima H. Detection of dual-infected cases of adenoviruses and coxsackieviruses type B by real-time PCR but not by the conventional viral culture technique. *Clin Lab*, 53(9-12): 605-609, 2007.
- 19) Nguyen TA, Hoang LP, Pham LD, Hoang KT, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H. Identification of human astrovirus infections among children with acute gastroenteritis in the Southern Part of Vietnam during 2005-2006. *J Med Virol*, 80(2):298-305, 2008.
- 20) Khamrin P, Nguyen TA, Phan TG, Satou K, Masuoka Y, Okitsu S, Maneekarn N, Nishio O, Ushijima H. Evaluation of immunochromatography and commercial enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of norovirus antigen in stool samples. *J Virol Methods*, 147:360-363, 2007.
- 21) Shiota T, Okame M, Takanashi S, Khamrin P, Takagi M, Satou K, Masuoka Y, Yagyu F, Shimizu Y, Kohno H, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H. Characterization of broad reactive monoclonal antibody against Norovirus genogroup I and II: Recognition of a novel conformational epitope. *J Virol* 81(22): 12298-12306, 2007.
- 22) Takanashi S, Okame M, Shiota T, Takagi M, Yagyu F, Phan TG, Nishimura S, Katsumata N, Igarashi T, Okitsu S, Ushijima H. Development of a rapid immunochromatographic test for noroviruses genogroup I and II. *J Virol Method*, 148(1-2):1-8, 2008.

- 23) Santos N, Honma S, Timenetsky MD, Linhares AC, Ushijima H, Armah GE, Gentsch JR, Hoshino Y. Development of a microtiter plate hybridization-based PCR-enzyme-linked immnosorbent assay (PCR-ELISA) for identification of clinically relevant human group A rotavirus G and P genotypes. *J Clin Microbiol*, 46(2):462-469, 2007.
- 24) Kittigul L, Pombubpa K, Rattanatham T, Dirapha P, Ultrarachkij F, Pungchitton S, Khamrin P, Ushijima H. Development of a method for concentrating and detecting rotavirus in oysters. *Int J Food Microbiol*, 122(1-2): 204-210, 2007.
- 25) Nguyen TA, Hoang LP, Phan LD, Hoang KT, Okitsu S, Muzuguchi M, Ushijima H. Use of sequence analysis of the VP4 gene to classify recent Vietnamese rotavirus isolates. *Clin Microbiol Infect*, 14(3): 235-241, 2008.
- 26) Chan-It W, Khamrin P, Saekhow P, Pantip C, Thongprachum A, Peerakome S, Ushijima H, Maneekarm N. Multiple combinations of P[13]-like genotype with G3, G4, and G5 in porcine rotaviruses. *J Clin Microbiol*, 2008 Jan 30; [Epub ahead of print]
- 27) Yan H, Koyano S, Inami Y, Yamamoto Y, Suzutani T, Mizuguchi M, Ushijima H, Kurane I, Inoue N. Genetic variations in the gB, UL144, UL149 genes of human cytomegalovirus strains collected from congenitally and postnatally infected Japanese children. *Arch Virol* 2008 Feb 14; [Epub ahead of print]
2. 学会発表
- 1) Phan TG, Takanashi S, Okitsu S, Ushijima H. Genetic diversity of Norovirus infection in Japan, 2002-2007. 第48回日本臨床ウイルス学会(2007.6.2-3, 富山)
- 2) 早川有子、伊藤千恵、横田佳昌、沖津祥子、牛島廣治. 母乳中の風疹 IgA 抗体量と褥婦の予防接種・罹患率に関する研究
- <第2報> 第22回日本母乳哺育学会学術集会(2007.9.29-30, 浜松)
- 3) Dey Shuvra Kanti、清水英明、沖津祥子、牛島廣治. Molecular epidemiology of adenovirus infection of among hospitalized infants and children with acute gastroenteritis in Dhaka City, Bangradesh. 第55回日本ウイルス学会学術集会 (2007.10.21-23、札幌)
- 4) ファム・ニヤン、カムリン・パタラ、グエン・トウアン、シュブラ・デイ、ファン・トゥン、沖津祥子、牛島廣治. Isolation and molecular characterization of Aichi viruses from fecal specimens collected in Japan, Bangladesh, Thailand and Vietnam. 第55回日本ウイルス学会学術集会 (2007.10.21-23、札幌)
- 5) カムリン・パタラ、沖津祥子、牛島廣治. Detection and molecular characterization of bovine kobuviruses from diarrheic cattle. 第55回日本ウイルス学会学術集会 (2007.10.21-23、札幌)
- 6) 高梨さやか、Phan Tung、沖津祥子、水口雅、五十嵐隆、牛島廣治. スリランカ・ペラデニヤ大学病院における小児ウイルス性胃腸炎の分子疫学的検討. 第39回日本小児感染症学会学術集会 (2007.11.9-11、横浜)
- 7) Phan Tung、沖津祥子、牛島廣治. Viral infection in associated with acute gastroenteritis in Japanese children. 第39回日本小児感染症学会学術集会 (2007.11.9-11、横浜)
- 8) Ushijima H, Phan YG, Dey SK, Nguyen AT, Khamrin P, Takanashi S, Okitsu-Negishi S. Molecular epidemiology of Norovirus and sapovirus infection in Asia. Third International Calicivirus Conference, Nov 10-13, 2007, Cancun, Mexico.
- 9) Khamrin P, Nguyen AT, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H. Evaluation of the immunochromatography test for rapid detection of Norovirus antigen in stool samples. Third International Calicivirus Conference, Nov 10-13,

- 2007, Cancun, Mexico.
- 10) Okitsu-Negishi S, Shiota T, Okame M, Takanashi S, Khamrin P, Sato K, Masuoka Y, Shimizu Y, Ushijima H. Characterization of newly identified monoclonal antibody reacted with Norovirus GI and GII: Recognition of novel conformational epitope. Third International Calicivirus Conference, Nov 10-13, 2007, Cancun, Mexico.
 - 11) Nguyen TA, Khamrin P, Phan TG,

Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H. Evaluation of the immunochromatography test for rapid detection of norovirus antigen in stool samples. 第4回日本小児消化管感染症研究会 (2008.2.16、新宿)

F 知的財産の出願・登録状況
特になし。

Norovirus GII/4

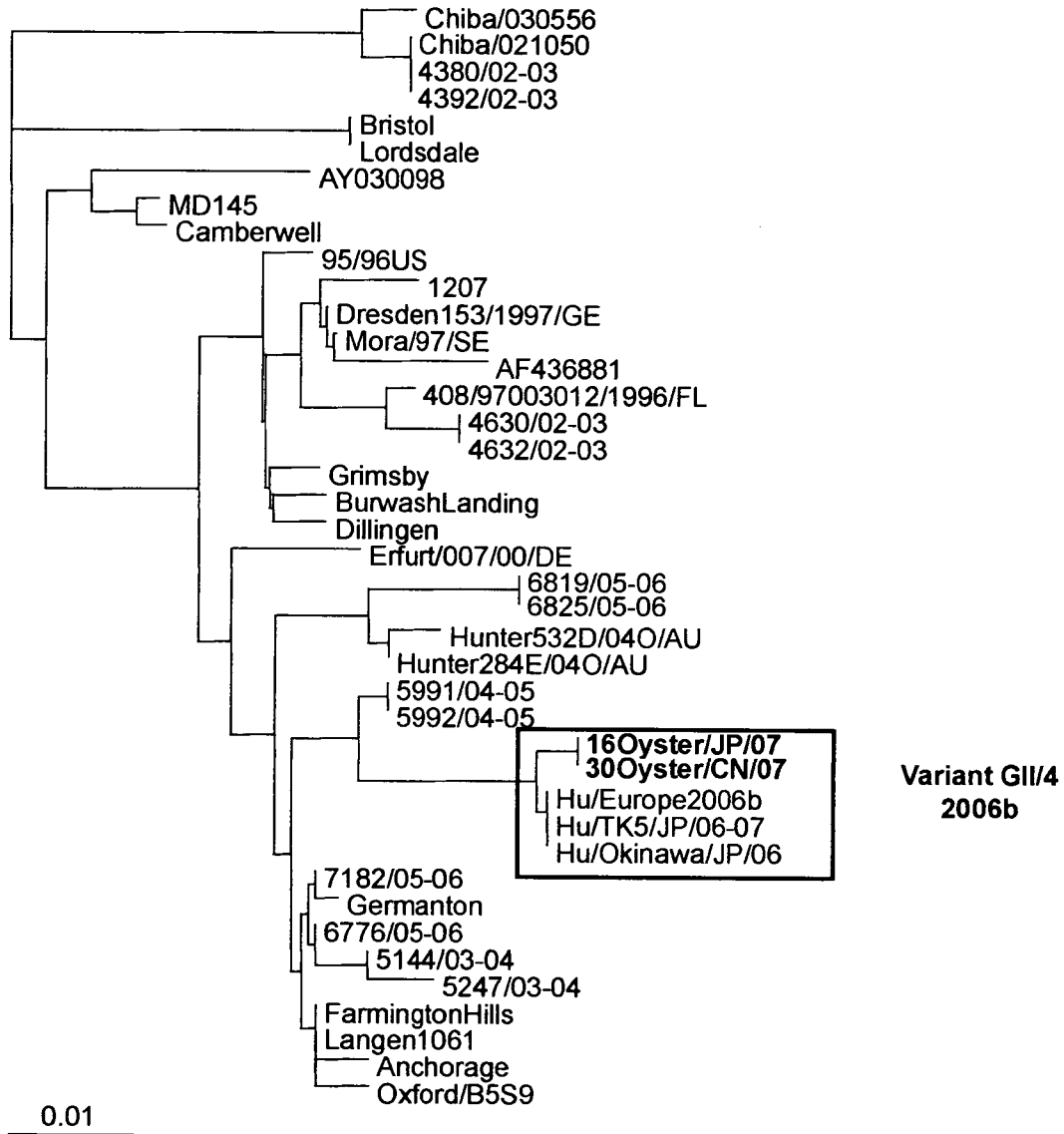


図1: カキから検出されたノロウイルスの系統樹

表 1: Detection limits of three concentration methods for rotavirus seeded in oyster samples and determined using RT-nested PCR

Rotavirus (PFU/25 g ^a)	Acid adsorption-alkaline elution	Acid adsorption-neutral elution	Direct alkaline elution
5×10^4	4+ ^b	3+	2+
2.50×10^4	4+	3+	2+
1.25×10^4	3+	2+	—
6.25×10^3	2+	—	—
3.12×10^3	1+	—	—
1.56×10^3	— ^c	nd	nd

nd, not done.

^a Twenty five grams of oyster tissues were inoculated with various concentrations of rotavirus, homogenized, and concentrated by acid adsorption-alkaline elution, acid adsorption-neutral elution, or direct alkaline elution method.

^b 1+, 2+, 3+, 4+, degree of intensity of DNA bands from weak to strong positive results.

^c —, negative result.

表2： Characteristics of the oyster samples where rotavirus was detected

Oyster sample	Date of collection	Source of collection	Rotavirus genotype	Fecal coliforms MPN/g ^a	<i>E. coli</i> MPN/g ^a
THOYS019	19 Sep 05	Oyster farm A	G9	230	230
THOYS020	19 Sep 05	Oyster farm B	G9	210	210
THOYS068	7 Nov 05	Oyster farm C	G3	35	35
THOYS108	12 Dec 05	Local market	G1	93	3.6

^a The oyster samples were examined for fecal coliforms and *E. coli* by multiple fermentation tube method. The acceptable level of fecal coliforms present in raw shellfish was < 20 MPN/g.

厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進 研究費事業)
分担研究報告書

輸入生鮮魚介類および動物生肉のウイルス汚染のサーベイランスに関する研究
研究協力項目:輸入食肉の E 型肝炎ウイルス汚染状況調査に関する研究および
群馬県における野生イノシシおよび野生シカの E 型肝炎ウイルス感染状況

分担研究者	木村博一	国立感染症研究所
研究協力者	坂野智恵子 信澤敏夫	群馬県食肉衛生検査所
	森田幸雄 塩野雅孝 小澤邦壽	群馬県衛生環境研究所
	壁谷英則 丸山総一	日本大学

研究要旨

輸入生肉のウイルス汚染サーベイランスを目的として、輸入生肉(豚肉 82 検体、牛肉 8 検体、羊肉 7 検体、鹿肉 6 検体、馬肉 1 検体:合計 104 検体)の E 型肝炎ウイルス(HEV)汚染状況の調査を行った。供試検体から RNA を抽出後、RT-PCR 法で HEV 遺伝子の検索を行ったところ、すべての検体から HEV 遺伝子は検出することはできなかった。さらに、我が国の野生イノシシおよび野生シカの HEV の浸潤状況を把握する目的で、これらの動物の血清を用いて、抗 HEV IgG 抗体検査を実施した。抗 HEV IgG 抗体は 4%(7/176)の野生イノシシおよび、17%(18/106)の野生シカが保有していた。

A. 研究目的

我が国の輸入食肉について E 型肝炎ウイルス(HEV)に対するリスクを明らかにするために、平成18年度から輸入生肉の HEV の汚染状況調査を実施してきたところである。昨年度は、輸入生肉(豚肉 11 検体、牛肉 6 検体、羊肉 2 検体、鹿肉 5 検体、馬肉 2 検体:合計 26 検体)の HEV 汚染状況の調査を行ったところ、すべての検体から HEV 遺伝子は検出することはできなかった。今年度は、さらに輸入食肉の検体数を増やして、HEV 汚染状況調査を実施した。また、わが国では野生イノシシ肉やシカ肉からヒトへの E 型肝炎の感染が確認されており、ヒトの本症の感染源として、ゲームミートが注目されている。そこで、野生イノシシおよび野生シカの抗 HEV 抗体検査を実施した。

B. 研究方法

1. 輸入生肉の HEV 汚染状況

平成19年7月から12月にかけて、群馬県内の食肉小売店より、豚肉82検体(アメリカ43検体、カナダ29検体、デンマーク6検体、メキシコ4検体)、牛肉8検体(オーストラリア7検体、カナダ1検体)、羊肉7検体(オーストラリア4検体、ニュージーランド3検体)、鹿肉6検体(ニュージーランド)、馬肉1検体(中国)の合計104検体を購入し、検査に供した(表1-1、表1-2)。

検体からのウイルス RNA の抽出は RNeasy Fibrous Mini Kit(QIAGEN)で、HEV の RNA 検出は、Takahashi ら(2003)の方法で実施した。

2. 群馬県における野生イノシシおよび野生シカの E 型肝炎感染状況

平成16年11月から平成20年6月に群馬県内猟

友会等によって捕獲された野生イノシシ 176 頭および平成16年11月から平成17年5月に捕獲された野生シカ106頭の血清を供試検体とした。

(1)抗体の保有状況:HEV 構造蛋白(ORF2)を組みかえバキュロウイルスにより発現させ、それを抗原としたELISA法でIgG抗体の検出を行った。

C. 研究結果

1. 輸入生肉の HEV 汚染状況

豚肉 82 検体(アメリカ 43 検体、カナダ 29 検体、デンマーク 6 検体、メキシコ 4 検体)、牛肉 8 検体(オーストラリア 7 検体、カナダ 1 検体)、羊肉 7 検体(オーストラリア 4 検体、ニュージーランド 3 検体)、シカ肉 6 検体(ニュージーランド)、馬肉 1 検体(中国)、合計 104 検体について調査を行ったところ、HEV 遺伝子はすべての検体から検出することはできなかった。

2. 群馬県における野生イノシシおよび野生シカの HEV 抗体保有状況(表 2)

抗 HEV IgG 抗体は、4%(7/176)の野生イノシシおよび 17%(18/106)の野生シカが陽性であった。

D. 考察

1. 輸入生肉の HEV 汚染状況

輸入生肉104検体の調査を実施したが HEV 遺伝子を検出することはできなかった。市場に流通している輸入食肉を介した HEV 感染リスクは低いと考えられた。

E 型肝炎の流行地域はアジアの開発途上国が多く、これらの国ではときとして HEV に汚染された飲料水等を介して大規模な流行を引き起こすことが報告されている。昨年度の調査結果をふまえて、今回の調査では、E 型肝炎の流行地域や比較的衛生状況が好ましくないと考えられる地域から輸入された食肉について検査を実施することを考慮に入れたが、豚肉はアメリカ、カナダ、デンマーク、メキシコからの輸入、牛肉はカナダ、オース

トラリアからの輸入、羊肉はオーストラリア、ニュージーランドからの輸入、シカ肉ニュージーランドからの輸入されたものであり、家畜伝染病予防法等の関係から、E 型肝炎流行地域からの食肉の輸入は少なく、HEV に関しては比較的衛生状態の高い国々から輸入していることが、昨年度および今年度の検査結果(HEV 遺伝子検出無し)に由来すると思われた。

2. 群馬県における野生イノシシおよび野生シカの HEV 抗体保有状況

4%(7/176)の野生イノシシおよび 17%(18/106)の野生シカが陽性であった。群馬県の野生イノシシの抗体陽性率は、Sonoda ら(2004)が報告した 9%(3/35)に近い値であった。

引用文献

Takahashi K, Kang JH, Ohnishi S, Hino K, Miyakawa H, Miyakawa Y, Maekubo H, Mishiro S. Full-length sequences of six hepatitis E virus isolates of genotypes III and IV from patients with sporadic acute or fulminant hepatitis in Japan. Intervirology 2003, 46(5): 308-318.

Sonoda H, Abe M, Sugimoto T, Sato Y, Bando M, Fukui E, Mizuo H, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H. Prevalence of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars and deer and genetic identification of a genotype 3 HEV from a boar in Japan. J Clin Microbiol. 2004, 42(11):5371-4.

E. 結論

今年度は、昨年度より検体数を増加して、輸入生肉 104 検体の調査を実施したが、HEV 遺伝子を検出することはできなかった。平成 17~18 年に、県産肥育豚における HEV 感染状況の調査を

行った。その結果、本県の食肉処理場に搬入された肥育豚の HEV 抗体陽性率は 67.5%(114/169)であるのに対し、HEV 遺伝子陽性率は 1.8%(3/169)であった。これは、肥育豚の多くに抗体上昇が見られるが、遺伝子が検出されるのはわずかであることを示唆している。以上のことから、輸入食肉を介した HEV 感染のリスクを把握するためには、食肉自体の検査は言うまでもなく、輸入国の HEV 浸潤状況についての情報収集も必要であろう。

わが国の 4%(7/176)の野生イノシシおよび 17%(18/106)の野生シカが抗 HEV IgG 抗体を保有していたことから、野生イノシシや野生シカのでは HEV の感染暴露の機会があることが再確認された。これらの生肉の喫食にあつては、HEV 感染リスクについて考慮し、確実な加熱などの対策を講ずることが必須であると思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表

投稿中

Sakano c, Morita Y, Shiono M, Yokota Y, Mokudai T, Motoi Y, Noda A, Nobusawa T, Sakaniwa H, Nagai A, Kabeya H, Maruyama S, Kimura H. Prevalence of Hepatitis E virus(HEV)infection in swine and wild boar in Gunma Prefecture, Japan.

Nishida T, Nishio O, Kato M, Chuma T, Kato H, Iwata H, Kimura H. Genotyping and quantitation of noroviruses in oysters from two distinct sea areas in Japan. *Microbiol Immunol*, 51(2):177-184, 2007.

Saitoh M, Kimura H, Kozawa K, Nishio O, Shoji A. Detection and phylogenetic analysis of norovirus in *Corbicula fluminea* in a freshwater river in Japan. *Microbiol Immunol*, 51(9):815-822, 2007.

Nishida T, Nishio O, Kato M, Chuma T, Kato H, Iwata H, Kimura H. Genotyping and quantitation of noroviruses in oysters from two distinct sea areas in Japan. *Microbiol Immunol*, 51(2): 177-184, 2007.

隈下祐一, 加藤由美, 高本一夫, 古田太郎, 西尾治, 木村博一. ノロウイルス代替のネコカリシウイルスおよび各種微生物に有効なエタノール製剤の開発. *防菌防黴誌*, 35(11):725-732, 2007.

宮原香代子, 片山丘, 古屋由美子. 神奈川県におけるウイルス性集団胃腸炎の発生状況について(平成 18 年度). *神奈川県衛生研究所報告*, 37:72-74, 2007.

森田幸雄, 藤田雅弘, 斎藤美香, 塚越博之, 星野利得, 加藤政彦, 小澤邦寿, 西尾治, 木村博一. LightCycler®を用いたノロウイルス遺伝子検出法の検討. *食品微生物学会誌*, 24(4):183-188, 2007.

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1-1 供試検体(輸入国)

輸入国	豚肉	牛肉	羊肉	シカ肉	馬肉	合計
アメリカ	43	0	0	0	0	43
カナダ	29	1	0	0	0	30
オーストラリア	0	7	4	0	0	11
ニュージーランド	0	0	3	6	0	9
デンマーク	6	0	0	0	0	6
メキシコ	4	0	0	0	0	4
中国	0	0	0	0	1	1
合計	82	8	7	6	1	104

表1-2 供試検体(採取月)

採取月	検体数
7月	14
8月	21
9月	22
10月	28
11月	8
12月	11
合計	104

表2 野生動物の抗 IgG 抗体保有状況

動物種	抗体陽性率 (陽性数/検体数)
野生イノシシ血清	4% (7/176)
野生シカ血清	17% (18/106)

動物種	陽性数/検体数 (%)
野生イノシシ血清	7/176 (4)
野生シカ血清	18/106 (17)

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）

輸入生鮮魚介類及び動物精肉のウイルス汚染のサーベイランスに関する研究
(H18-食品-一般-014)

ーベトナムの小児急性下痢症患者における胃腸炎ウイルスの疫学的研究(2)ー

分担研究者：鈴木 宏（新潟大学医歯学総合研究科国際感染医学講座公衆衛生学分野）

研究協力者：西川 眞、田村 務（新潟県保健環境科学研究所ウイルス科）

研究要旨

1. ノロウイルス：183名中12名(6.6%)からノロウイルスを検出し、全てゲノグループGIIであり、主要なものとしてGII-12とGII-4はそれぞれ6株、4株であった。更には、GIIの新型、GII-12ではポリメラーゼ領域はGII-4、カプシド領域はGII-12の recombinant 株であった。今回検出した株では、タイ、オーストラリア、オランダ、中国、日本と関連した株が多く見られ、多くの国でのサーベイランスの重要性が確認された。GISにより、患者発生を検討したが、地域の偏在は認められなかった。
2. ロタウイルス：183名中86名(47.0%)からA群ロタウイルスを検出した。G型別ではG2型が日本やアジアと同様に44%と主流を占め、次いでG1とG2がそれぞれ33.3%、7.1%であった。

A. 研究目的

海外から海産物が大量に輸入され、その際にウイルスに汚染された食品からの下痢症発生が危惧される。しかし、熱帯、亜熱帯における小児急性胃腸炎患者の病因ウイルスの挙動調査は不十分である。更には、これらの国においてロタウイルスへのワクチン投与が検討され、その効果判定にも大きな影響が懸念される。

本研究では、海産物輸入が増加しているベトナムとの関連を探る目的で、ベト

ナム中部ニャチャン市の小児急性胃腸炎患者から検出されたノロウイルス及びロタウイルスについて、分子疫学的手法を用いて解析を行い、国内検出株と比較した。

B. 研究方法

1. 材料

ベトナムのハノイ市内の病院に受診した、183人の乳幼児の便を検体とした。採取期間は、2005年12月23日から2006年6

月 6 日までの期間で、患者の年齢幅は 1 ヶ月齢から 47 ヶ月齢であった。

2. 方法

主要な胃腸炎起因ウイルスであるノロウイルス、ロタウイルスについて、収集した患者便から、ウイルス遺伝子検出を行った。

便は、PBS (-) pH7.2 で、約 10%濃度に溶解し、9000rpm 20 分遠心した上清を DNA/RNA 抽出用サンプルとした。DNA/RNA の抽出には、Extragen II (TOSOH) を使用した。

ノロウイルスについては、G I 用プライマーに G1SKF/G1SKR を、G II 用プライマーに COG2F/G2SKR を用いて検索した。更に、VP1 の p2 領域の遺伝子解析のため、篠原らの L1F/L7R プライマーを使用して当該部位の増幅を行った。

ロタウイルスは、Gouvea ら Gentsch らの方法に準じて RT-PCR 法により検索し、G 型別と P 型別を実施した。

ノロウイルスの遺伝子解析は ORF2 の N 末端により型別を行い、G II-4 型のノロウイルスについては、VP1 の p2 領域を含む遺伝子を使用して解析した。ロタウイルスは、G3 型と型別された一部の株について、VP7 遺伝子について解析した。いずれも、PCR 増幅産物のダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、Mega3.1 を用いて解析を行った。

C. 研究結果

1. ノロウイルス

183 人中 12 人からノロウイルスが検出され、全てジェノグループ G II に含まれる型であった。G II 型別は、G II-12 が 6 株、G

II-4 が 4 株でこの 2 つが多かった (図 1、表 1)。

G II-New が 1 株検出され、Zheng D.らの型別の G II-15、片山らの分類の G II-19 に一致した希少な型のノロウイルスであった。このクラスターでは 1999 年 NLV/J23/1999/US 株が最初に登録されたもので、以後もデータベースへの登録が少ないノロウイルスで、日本で常用されている、COG2F/G2SKR 増幅部位中に、GGC 配列の挿入があるのが特徴である (図 2)。2001 年のタイで採取されたサンプル (EU363866 Hu/CMH148/01/2001/THA) から、2005 年から 2006 年にかけて、北海道 (EF630529 Hu/GII/299/JPN)、広島 (AB360387 Hu/Hiroshima/66-1110/2006/JP) で検出された株と近縁であった。ベトナム検出株とこれらの参照株とは、ORF2 の N 末端の 267 塩基中、1 から 6 塩基の違いがあったが、アミノ酸配列では一致した。

G II-12 に型別された株が 6 株あり、カプシド領域だけをみると、オーストラリアで 2006 年に検出された株 EF187578 Hu/NSW330F/2006/AUS と塩基配列が一致した (図 3)。これらの G II 12 に型別された株は、SaitamaU1 と類似の recombinant で、ポリメラーゼ領域は G II-4 型で、カプシド領域は G II-12 型であった。

ベトナムで検出された G II-4 に型別されたノロウイルス 4 株は、ORF2 の N 末端のアミノ酸配列で比較すると、2005-06 シーズンに日本で検出された株に近縁で、ORF2 の N 末端の 270 塩基中、2 から 3 塩基の違いがあったが、アミノ酸配列では一致した。 (図 4)

一方、可変領域の VP1 遺伝子の p2 領域を含

む遺伝子について Siebenga らの系統樹を参考に、新潟県検出株を入れてアミノ酸配列による系統樹を作成した (図 5)。ベトナムで検出された GII-4 型の株は、2004 年に千葉県で検出された株 (AJ844477) と 200 アミノ酸中 2 アミノ酸の相違があり、別の小クラスターを形成した。新潟県で 2003 年 12 月に集団胃腸炎事例及び小児患者事例、並びに 2005 年 1 月に集団胃腸炎事例で検出された株は、千葉県検出株と同じクラスターに属し、このクラスターにはオランダ検出株は含まれなかった。

2 A群ロタウイルス

183 人中 86 人 (47.0%) から A 群ロタウイルスが検出された。

ロタウイルスの G 型別では、G3 型が最も多く 44% を占め、次いで G1 型 33.3%、G2 型 7.1% であった。P 型別では、P[8] 型が最も多く、67.9% を占め、次いで P[4] 型が 13.1% であった (表 2)。

Trinh らのロタウイルス VP7 の遺伝子に基づく系統樹に、今回採取されたベトナム株及び新潟県での採取株を入れて解析した。

中国、タイ、ハバロフスク、日本、新潟の検出株は近縁で、同じクラスターに属した (図 6)。

D. 考察

1 ノロウイルス

ベトナムの小児から検出された稀少な型であり、Zheng D. らの分類の GII-15、片山らの分類の GII-19 に一致した型のノロウイルスは、同時期に近縁な株が北海道、広島でも検出されていたことがわかった。

GII-12 株が 6 株検出され、ニャチャン市

で小流行があったと考えられた。これらの 2006 年ベトナム検出株は、2006 年にオーストラリアで検出された株と一致したことから、何らかのつながりがあったと考えられる。

2006 年に、ベトナムで検出された GII-4 は、保存性の高い ORF2 の N 末端でみた場合、2005-06 に日本で検出された株と相同性が高かった。一方、可変性の高い VP1 領域で比較した場合、2003 年から 2005 年に日本で流行があった株に近縁であったが、国内検出株と一致することはなかった。また、オランダ検出株はこのクラスターに含まれず、中国の株が見つまっていることから、これらのクラスターの株によるアジアでの流行があったと考えられた。

VP1 領域の検索については、事例数が少ないことから、さらに検索が必要である。

2 A群ロタウイルス

ベトナムで検出された、過去の A 群ロタウイルスの G 型別状況をみると、G1 型が優勢であったが、今回の検索では、G3 型が優勢となった。近年、中国で G3 型の増加が報告されており、VP7 遺伝子も今回検出株と中国、タイ、ハバロフスク、日本、新潟の検出株で相同性が高いことから、アジア地域で近縁の G3 型が増加していることが推測された。

近年、GII-4 型ノロウイルスが、世界的に流行することがわかってきている。ノロウイルスやロタウイルスなどの胃腸炎ウイルスの国際的な運搬は、人の移動の他、大量の食品の輸出入によって行われている可能性がある。

輸入生鮮食品における胃腸炎ウイルス

の検索に併せて、現地での流行ウイルスの型を検索する等、国際的な分子疫学的解析は、今後の日本や世界における流行を予測するうえで重要であると考えられる。

E. 結論

希少な型のノロウイルスがベトナムの小児から検出され、類似の株が日本でも検出されていた。また、ベトナムで検出されたGII-12型は、オーストラリアで検出された株と一致した。一方、A群ロタウイルスは、ベトナムでも、日本を含むアジア地域と同様に、G3型の流行があることがわかった。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 検出されたノロウイルスの型別

Type	Positive
Noro G II -4	4
Noro G II -6	1
Noro G II -12	6
Noro G II -New*	1
Total	12/183

※G II -New :

Zheng ら G II -15
片山ら G II -19

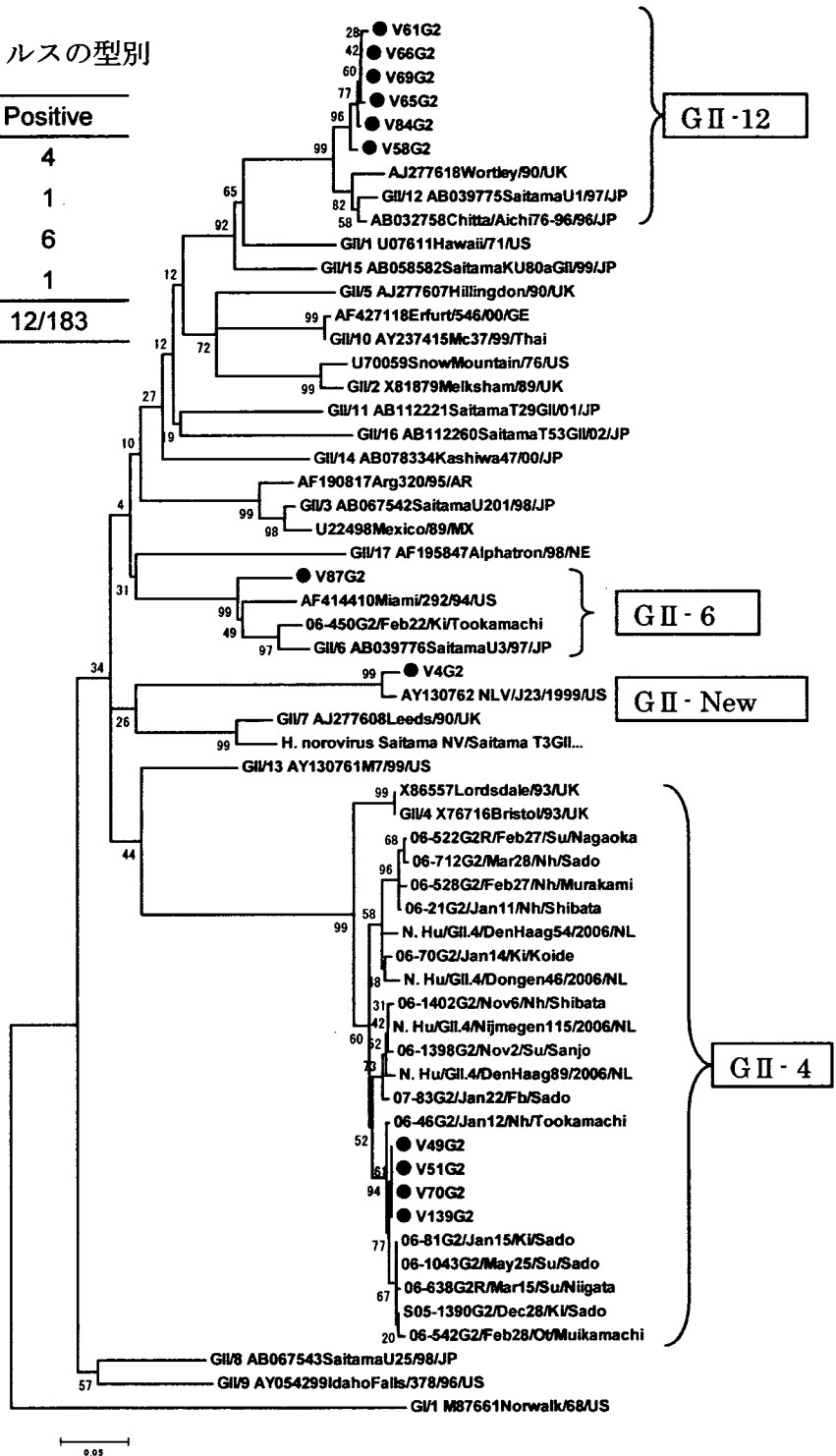


図 1 G II ノロウイルスの系統樹による型別 NJ 法による。ORF2 N 末端 271bp。
●がベトナム検出株

		10	20	30	40	50
GII/4 X76716Bristol/93/UK	ATGAAGATGG	CGTCGAATGA	CGCCAACCCA	TCTGGATG	GGTCCGCAGC	
GII/7 AJ277608Leeds/90/UK	ATGAAGATGG	CGTCGAATGA	CGCAGCTCCA	TCTAAATG	ATGGTGCAGC	
05-V4/Dec26/2005	ATGAGGATGG	CGTCGAGTGA	CGCGCCCGTT	TCTGGCACCG	ATGGTGCAGC	
AB360387 Hiroshima/66-1110/06/	ATGAGGATGG	CGTCGAGTGA	CGCGCCCGTT	TCTGGCACCG	ATGGTGCAGC	
EU138848 Shaibah-2/2007/IRQ	ATGAGGATGG	CGTCGAGTGA	CGCGCCCGTT	TCTGGCACCG	ATGGTGCAGC	
EU363866 CMH148/01/2001/THA	ATGAGGATGG	CGTCGAGTGA	CGCGCCCGTT	TCTGGCACCG	ATGGTGCAGC	
EF630529 299/JPN NoVGII/299	ATGAGGATGG	CGTCGAGTGA	CGCGCCCGTT	TCTGGCACCG	ATGGTGCAGC	
AY130762 NLV/J23/1999/US	ATGAGGATGG	CGTCGAGTGA	CGCGCCCGTT	TCTGGCACCG	ATGGTGCAGC	

		80	90	100	110	120
GII/4 X76716Bristol/93/UK	ATAATGAGGT	TATGGCTCTG	GAGCCCGTTG	TTGGTGCCGC	TATTGCGGCA	
GII/7 AJ277608Leeds/90/UK	ACAATGAGGT	CATGCCCTTT	GAGCCCGTGG	CTGGTGCAATC	GCTGGCGACA	
05-V4/Dec26/2005	AACAAGAAGT	CTTGCCTTTA	GAGCCCGTCG	CGGGAGTTCA	GCTGGCTGCT	
AB360387 Hiroshima/66-1110/06/	AACAAGAAGT	CTTGCCTTTA	GAGCCCGTCG	CGGGAGTTCA	GCTGGCTGCT	
EU138848 Shaibah-2/2007/IRQ	AACAAGAAGT	CTTGCCTTTA	GAGCCCGTCG	CGGGAGTTCA	GCTGGCTGCT	
EU363866 CMH148/01/2001/THA	AACAAGAAGT	CTTGCCTTTA	GAGCCCGTCG	CGGGAGTTCA	GCTGGCTGCT	
EF630529 299/JPN NoVGII/299	AACAAGAAGT	CTTGCCTTTA	GAGCCCGTCG	CGGGAGTTCA	GCTGGCTGCT	
AY130762 NLV/J23/1999/US	AACAAGAAGT	CTTGCCTTTA	GAGCCCGTCG	CGGGAGTTCA	GCTGGCTGCT	

		150	160	170	180	190
GII/4 X76716Bristol/93/UK	CGTAATTGAC	CCCTGGATTA	GAAACAATTT	TGTACAAGCC	CCTGGTGGAG	
GII/7 AJ277608Leeds/90/UK	CATAATTGAT	CCCTGGATAA	GAAATAATTT	TGTGCAAGCC	CCTGCAAGGTG	
05-V4/Dec26/2005	TATAATTGAC	CCCTGGATTA	GAATGAATTT	TGTGCAAGCC	CCGGCCGGTG	
AB360387 Hiroshima/66-1110/06/	CATAATTGAC	CCCTGGATTA	GAATGAATTT	TGTGCAAGCC	CCGGCCGGTG	
EU138848 Shaibah-2/2007/IRQ	TATAATTGAC	CCCTGGATTA	GAATGAATTT	TGTGCAAGCC	CCGGCCGGTG	
EU363866 CMH148/01/2001/THA	TATAATTGAC	CCCTGGATTA	GAATGAATTT	TGTGCAAGCC	CCGGCCGGTG	
EF630529 299/JPN NoVGII/299	CATAATTGAC	CCCTGGATTA	GAATGAATTT	TGTGCAAGCC	CCGGCCGGTG	
AY130762 NLV/J23/1999/US	TATAATTGAC	CCCTGGATTA	GAATGAATTT	TGTACAAGCT	CCGGCCGGTG	

図2 GII-New ノロウイルスに型別されたV4株及び近縁株のORF2 N末端の塩基配列

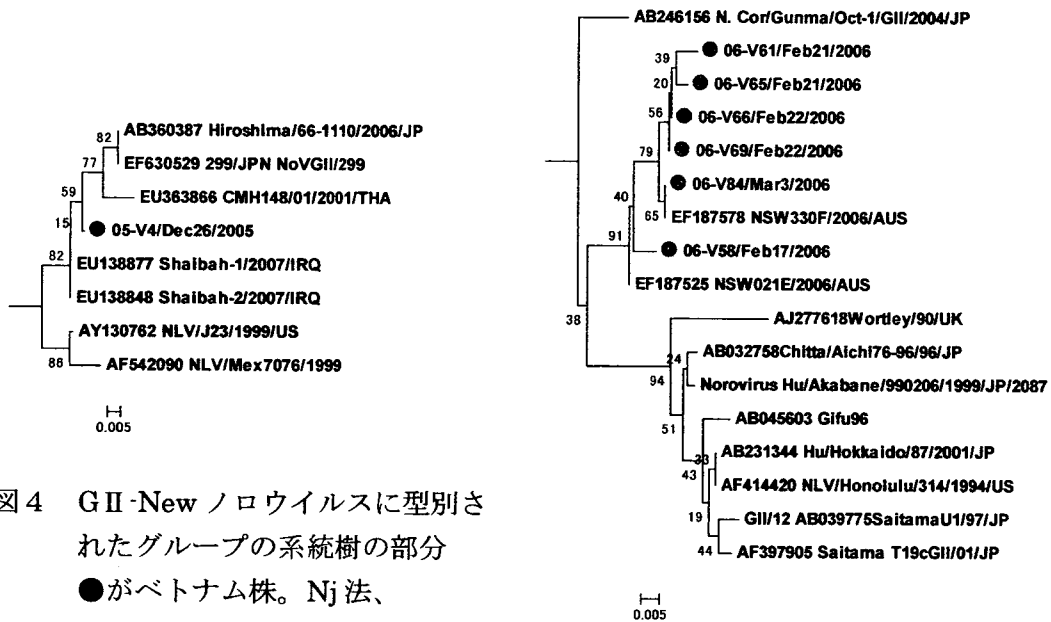


図4 GII-New ノロウイルスに型別されたグループの系統樹の部分
●がベトナム株。Nj法、ORF2 N末端 252bp。

図3 GII-12 ノロウイルスの部位の系統樹
●がベトナム株。V84は2006年のオーストラリアのNSW330株と一致。
Nj法、ORF2 N末端 252bp。

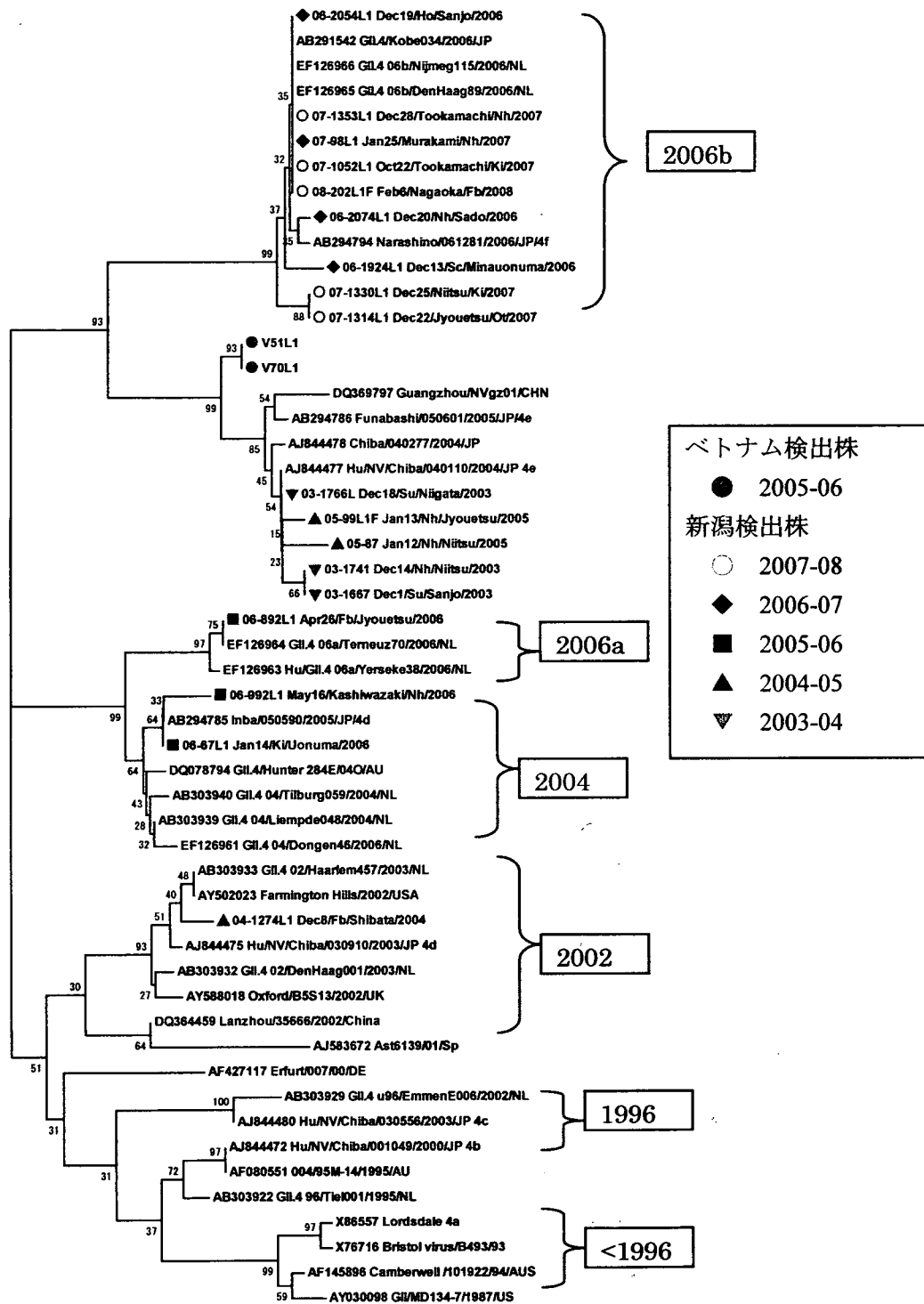


図5 ノロウイルス GII-4 の p2 領域を含む VP1 のアミノ酸配列による系統樹
 Nj 法、200aa。