

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

分担研究項目 輸入生鮮魚介類のウイルス汚染状況について

研究分担者 足立 聡（静岡県環境衛生科学研究所）

研究協力者 田中俊光（千葉市保健所）

山田俊博（静岡県環境衛生科学研究所）

研究要旨

輸入食品のウイルス汚染状況を把握するため、輸入生鮮魚介類についてノロウイルス（NV）、A 型肝炎ウイルス（HAV）の汚染状況を調べた。2008 年度は韓国、中国、フィリピン、ロシアから輸入された計 40 検体について調査したところ、3 検体（7.5%）から NV が検出された。HAV は検出されなかった。また、2006～2008 年度の 3 年間の成績では 120 検体中 20 検体（16.7%）から NV が検出された。種類別ではアカガイから最も高率（19.8%）に検出され、産地別では韓国産から最も高率（23.0%）に検出された。月別の陽性率は 5 月（41.7%）、2 月（33.3%）の順で高かった。なお、HAV は全て検出されなかった。

A. 研究目的

我が国には、毎年多くの食品が輸入されており、これら輸入食品によってウイルスが国内に持ち込まれる危険性があるが、その実態は十分把握できていない。そこでウイルス汚染が懸念される輸入生鮮魚介類について、3 年間にわたってウイルスサーベイランスを実施し、汚染リスク評価のためのデータを蓄積することを目的とした。

B. 研究方法

検査材料：2006 年度から 2008 年度までの各年度において、5 月から 2 月までの期間に、愛知県内の市場（2006 年）、千葉市内の市場（2007 年、2008 年）にて毎月 3～5 検体ずつ買上げた輸入生鮮魚介類計 120 検体を検査材料とした。内訳は韓国産二枚貝 61 検体、中国産二枚貝 50 検体、ロシア産二枚貝 3 検体、台湾産二枚貝 1 検体、フィリピン産ブラックタイガー 5 検体である。なお、各材料 1 検体につき 3 検査分の試料を調整し、各々検査に供した。

検査方法：二枚貝は中腸腺、ブラックタイガーは背腸を摘出して約 1g 秤量し、それらを PBS（-）で希釈、粉碎して 10% 乳剤を調整した。これを 10,000rpm、20 分冷却遠心した上清について、2006 年度は超遠心法（40,000rpm、2 時間）により濃縮・精製し、RNA 抽出用試料とした。一方、2007、2008 年度は、上清にポリエチレングリコール 6,000 を終濃度 12%、NaCl を終濃度 1M となるように加え、さらに α アミラーゼ約 25mg を加えて攪拌し、一晚放置した後、10,000rpm、20 分遠心し、沈渣を滅菌蒸留水 200 μ l で再浮遊させた。浮遊液はさらに 12,000rpm、5 分遠心し、上清を RNA 抽出用試料とした。RNA 抽出は QIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN）を使用し、抽出 RNA は DNase I（Takara）処理後、Random Hexamer（Amersham）および Super Script II（Invitrogen）を用いて逆転写、cDNA を合成した。この合成 cDNA をもとに NV、HAV の TaqMan リアルタイム PCR および Nested PCR を実施

した。NVのリアルタイムPCRは、GⅠ検出系としてプライマーはCOG1F/COG1R、プローブはRING1-TP(a)およびRING1-TP(b)を使用、GⅡ検出系としてプライマーはCOG2F/COG2R、プローブはRING2AL-TPを使用した。Nested PCRは、1st PCR用プライマーとしてCOG1F/G1-SKR、COG2F/G2SKR、2nd用としてG1SKF/R、G2SKF/Rを使用した。HAVのリアルタイムPCRはプライマーにHAV449/HAV557、Taq Man プローブにHA+482-P-FAMを使用、Nested PCRは1st PCR用プライマーとしてHAV+2799/HAV-3273、2nd用としてHAV+2907/HAV-3162を使用した。

なお、リアルタイムPCRでは実測値が10コピー以上のものを陽性とした。また、Nested PCR増幅産物についてはダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、片山らの方法に基づいて系統樹解析を行い遺伝子型を決定した。

C. 研究結果

2008年度の検査実施状況について、種類別、月別、産地別にそれぞれ表1～3に示した。リアルタイムPCRではNV、HAVともに全て陰性であったが、Nested PCRでは韓国産アカガイ、中国産ハマグリ、フィリピン産ブラックタイガー各1検体ずつ計3検体(7.5%)からNV GⅡが検出された。それら検出株の遺伝子型は、韓国産アカガイ検出株がGⅡ/16、中国産ハマグリ検出株がGⅡ/6、フィリピン産ブラックタイガー検出株がGⅡ/4であった。

次に過去3年間の成績を、種類別、月別、産地別にそれぞれ表4～6に示した。リアルタイムPCRでは12検体(10.0%)が陽性、Nested PCRでは20検体(16.7%)が陽性であり、検出されたウイルスは全てNV GⅡであった。NV GⅠ、HAVは全く検出されなかった。種類別では、検査数の多かったアカガイで86検体中17検体(19.8%)が陽性となり、最も陽性数が多かった。そ

の他ではハマグリで17検体中2検体(11.8%)、ブラックタイガーで5検体中1検体(20.0%)が陽性であった。月別では5月に採取(買上げ)したものから最も多く検出(41.7%)されており、次いで2月(33.3%)の順であった。7月および1月に採取した検体からは全く検出されなかった。また、産地別では韓国産が61検体中14検体(23.0%)と最も陽性数が多く、中国産の陽性数は50検体中5検体(10%)であった。決定された遺伝子型で最も多かったのはGⅡ/4の14検体であり、あとはGⅡ/6、GⅡ/16が各1検体ずつであった。

D. 考察

3年間にわたって輸入生鮮魚介類のウイルスサーベイランスを実施したところ、2006年度はウイルスは全く検出されず、2007年度はNV GⅡが42.5%、2008年度はNV GⅡが7.5%から検出された。2007、2008年度は、試料調整法にアミラーゼ処理を施したことから、その有用性が示唆された。また、2007年度は著しく高い陽性率であり、決定された検出遺伝子型はすべてGⅡ/4であった。これは2006/2007シーズンに、NV GⅡ/4が世界規模で大流行したことから、アジアでもこの流行株によって自然界が汚染されたことが反映された結果と考えられた。一方、2008年度はGⅡ/4以外にGⅡ/6、GⅡ/16が検出されたことから、アジアからの輸入生鮮魚介類が引き続き多様な遺伝子型のNVで汚染されていることが示唆された。したがって、これら生鮮魚介類のウイルス汚染を制御することは現実的に困難であると考えられることから、喫食にあたっては十分に加熱すること、中腸腺を完全に除去することが重要である。さらに、今後も定期的な調査を実施することによって汚染状況の把握に努めていく必要があると思われた。

E. まとめ

2006年度から2008年度の3年間にわた

って、輸入生鮮魚介類の NV、HAV 汚染調査を実施した。調査数 120 検体中 NV が 20 検体 (16.7%) から検出された。HAV は検出されなかった。また、検出された NV の多くが G II/4 であった。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産の出願・登録状況

なし

表1 種類別検査実施状況(2008年)

検体名	検体数	陽性数	陽性率 (%)	ノロウイルス						HAV										
				リアルタイムPCR			RT-PCR			遺伝子型 (件数)	リアルタイムPCR	RT-PCR								
				G I		G II		G I + G II	G I				G II	G I + G II						
				>1~<10	≤10	>1~<10	≤10													
アカガイ	15	1	6.7			1				1										
タイラギ	10																			
ハマグリ	10	1	10																	
ブラックタイガー	5	1	20																	
計	40	3	7.5	0	0	1	0	0	0	0	3	0							0	0

表2 月別検査実施状況(2008年)

検体採取年月	検体数	陽性数	陽性率 (%)	ノロウイルス						HAV											
				リアルタイムPCR			RT-PCR			遺伝子型 (件数)	リアルタイムPCR	RT-PCR									
				G I		G II		G I + G II	G I				G II	G I + G II							
				>1~<10	≤10	>1~<10	≤10														
2008年5月	4	1	25																		
2008年6月	4	1	25																		
2008年7月	4																				
2008年8月	4																				
2008年9月	4																				
2008年10月	4																				
2008年11月	4																				
2008年12月	4																				
2009年1月	4																				
2009年2月	4	1	25			1															
計	40	3	7.5	0	0	1	0	0	0	0	3	0								0	0

表3 産地別検査実施状況(2008年)

産地	検体数	陽性数	陽性率 (%)	ノロウイルス						HAV											
				リアルタイムPCR			RT-PCR			遺伝子型 (件数)	リアルタイムPCR	RT-PCR									
				G I		G II		G I + G II	G I				G II	G I + G II							
				>1~<10	≤10	>1~<10	≤10														
韓国	14	1	7.1			1															
中国	20	1	5																		
フィリピン	5	1	20																		
ロシア	1																				
計	40	3	7.5	0	0	1	0	0	0	0	3	0								0	0

表4 種類別検査実施状況(2006~2008年)

検体名	検体数	陽性数	陽性率(%)	ノロウイルス							HAV			
				リアルタイムPCR				RT-PCR			遺伝子型(件数)	リアルタイムPCR	RT-PCR	
				G I		G II		G I+G II	G I	G II				G I+G II
				>1~<10	≤10	>1~<10	≤10							
アカガイ	86	17	19.8			1	11			17		G II/4(12) G II/16(1) NT(4)		
ハマグリ	17	2	11.8				1			2		G II/4(1) G II/6(1)		
カキ	1													
トコブシ	1													
タイラギ	10													
ブラックタイガー	5	1	20							1		G II/4(1) G II/4(14) G II/6(1) G II/16(1) NT(4)		
計	120	20	16.7	0	0	1	12	0	0	20	0		0	0

*NT: not tested

表5 月別検査実施状況(2006~2008年)

検体採取月	検体数	陽性数	陽性率(%)	ノロウイルス							HAV			
				リアルタイムPCR				RT-PCR			遺伝子型(件数)	リアルタイムPCR	RT-PCR	
				G I		G II		G I+G II	G I	G II				G I+G II
				>1~<10	≤10	>1~<10	≤10							
5月	12	5	41.7			2				5		G II/4(4) NT(1)		
6月	12	2	16.7							2		G II/4(1) G II/6(1)		
7月	12													
8月	11	1	9.1							1		G II/4(1)		
9月	13	1	7.7							1		G II/4(1)		
10月	12	3	25				3			3		G II/4(3)		
11月	12	3	25				3			3		G II/4(3)		
12月	12	1	8.3				1			1		G II/4(1)		
1月	12													
2月	12	4	33.3			1	3			4		G II/16(1) NT(3) G II/4(14) G II/6(1) G II/16(1) NT(4)		
計	120	20	16.7	0	0	1	12	0	0	20	0		0	0

*NT: not tested

表6 産地別検査実施状況(2006~2008年)

産地	検体数	陽性数	陽性率(%)	ノロウイルス							HAV			
				リアルタイムPCR				RT-PCR			遺伝子型(件数)	リアルタイムPCR	RT-PCR	
				G I		G II		G I+G II	G I	G II				G I+G II
				>1~<10	≤10	>1~<10	≤10							
韓国	61	14	23.0			1	8			14		G II/4(10) G II/16(1) NT(3)		
中国	50	5	10				4			5		G II/4(3) G II/6(1) NT(1)		
ロシア	3													
台湾	1													
フィリピン	5	1	20							1		G II/4(1) G II/4(14) G II/6(1) G II/16(1) NT(4)		
計	120	20	16.7	0	0	1	12	0	0	20	0		0	0

*NT: not tested

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

研究分担者：牛島廣治（藍野大学藍野健康科学センター）
研究協力者：沖津祥子（藍野学院短期大学藍野健康科学センター）
Pattara Khamrin（藍野大学藍野健康科学センター）
Thongprachum Aksara（東京大学大学院医学系研究科）
Leera Kittigul（マヒドン大学公衆衛生学）

I. タイ国における糞便検体、カキ、環境水からのノロウイルスの検出

研究要旨：タイ国において、急性胃腸炎患者下痢便検体、カキ、環境水からノロウイルスの検出および分子疫学を行った。その結果、44.7%(患者検体)、38.1%(カキ)、13.2%(環境水)からノロウイルスが検出された。検出ウイルスの遺伝子解析を行ったところ、患者検体ではGIIが多く、特にGII/4とGII/16が多かった。一方、カキおよび環境水からはGI/2とGI/8が検出された。

A 研究目的：タイ国において、非細菌性と判断された急性胃腸炎患者検体、カキ、環境水中のノロウイルスの検出を行った。

B 研究方法：2005年12月から2007年2月までにLupburi Hospitalに入院し、非細菌性の急性胃腸炎と診断された患者275名より下痢便検体を得た。一方、カキ118個(65個はバンコックのマーケットで購入、53個は産地で採取)、114カ所の環境水(59カ所の河川、55カ所の灌漑用水)を採取した。糞便検体は希釈し、遠心操作の後、上清を使用した。カキは中腸腺部分をホモゲネートし、酸、アルカリ、PEGで順に処理した。環境水は電荷膜で濃縮した。ウイルスRNAをQiagenのキットを用いて抽出した。RT-nested PCR法によりウイルスを検出し、陽性検体では遺伝子解析により、ゲノグループ、ゲノタイプを決定した。さらに系統樹解析を行った。

C 結果：表1に示すように、患者検体、カ

キ、環境水のそれぞれ44.7%、38.1%、13.2%からウイルスが検出された。ヒトの糞便検体からはGIIがGIの2倍検出されたが、カキ、環境水からは逆にGIがGIIの2倍認められた(表1)。遺伝子解析を行った結果、糞便検体ではGII/4、GII/16が大多数を占め、その次にGII/3、GII/6、GII/11、GII/2がみられた。GIではGI/2、GI/8が見られ、特にGI/2は共通して検出された。GIとGIIの混合感染は2検体で見られ、GI/8とGII/4、およびGI/2とGII/16であった。この結果からタイでは患者検体、環境中にGI、GIIの様々なゲノタイプが混在していることがわかった(表2)。

D 考察：タイのノロウイルス感染者にはGII、特にGII/4とGII/16が多く認められた。我が国ではGII/4とGII/3の多いことがわかっている。一方、カキや環境水中にはGIIのみならずGIも多いことは我が国での結果と一致する。このことはGIとGIIのヒトに対する

抗原性の相違、ヒトのノロウイルスに対する免疫能が近年変化してきたことを示しているのかもしれない。これらの研究は、経年的に、各地域において細かく継続的に行うことが必要である。

E 研究発表：後述

F. 知的財産の出願・登録状況：特になし

表 1. タイにおける下痢便検体、カキ、環境水から検出されたノロウイルス

Norovirus	Stool samples (n=275) %	Oyster samples (n=118) %	Water samples (n=114) %
GI	10.2	25.4	7.9
GII	29.1	5.9	1.8
GI + GII	5.4	6.8	3.5
Total	44.7	38.1	13.2

表 2. タイにおいて便検体、カキ、環境水より検出されたノロウイルスのゲノタイプ

Norovirus	Stool samples	Oyster samples	Water samples
GI	GI/2 (1) GI/8 (1)	GI/2 (2)	GI/2 (5) GI/8 (1)
GII	GII/4 (22) GII/16 (21) GII/3 (4) GII/6 (3) GII/2 (2) GII/11 (2) GII/12 (1)	-	-
GI + GII	GI-8, GII-4 (1)	-	GI-2, GII-16 (1)
Total (sample numbers)	58	2	7

II. 中国産および日本産カキからのノロウイルス、ノロウイルス、サポウイルス抽出法の比較 —アミラーゼ処理直接法と凍結融解法の比較—

研究要旨：2008年2月と3月に市場で購入した中国産及び日本産カキの中腸腺からアミラーゼ処理直接法と凍結融解法でウイルスの抽出を行い、RT-nested-PCR法、real-time PCR法でゲノム検出を行った。ノロウイルスが中国産カキで43.8%、日本産カキで8.3%検出された。ロタウイルス、サポウイルスは検出されなかった。両方法の比較は一致率が悪く、再度1検体あたりの中腸腺の数を増やして検討する必要があると思われる。

A. 研究目的：生食用カキに起因するノロウイルスの正確なリスク評価を行うためには、カキからの迅速・簡便・正確なノロウイルス検出定量法の確立が前提となる。そこで野田らはカキの中腸腺乳剤作製時にアミラーゼ処理を行い、カキに含まれるグリコーゲンを消化させることが、ノロウイルス回収量を大幅に増加させることを報告した。一方、我々は簡便な処理方法として、従来抽出した中腸腺を凍結融解させる方法をとってきた。今年度はこれら二つの方法の比較を行った。

B. 研究方法：1. カキは2008年2月及び3月に中国福建省産及び日本産を市場で購入した(表1)。中国産16個、日本産12個のカキについて中腸腺を抽出後、1つの中腸腺を2つに分けてそれぞれの方法でウイルスの抽出を行った。2. 表2のようにアミラーゼ処理直接法では中腸腺を激しくホモゲネートした後、25mg/2mlのアミラーゼで1時間処理した後、遠心分離によりウイルスを回収した。凍結融解法では中腸腺を細かく切断した後、-80℃の冷凍庫に1時間保存し凍結した後、解凍してからホモゲネートした。ウイルスの回収は遠心分離により行った。3. 両法ともにQIAgenのQIAamp Viral RNA mini kitでウイルスゲノムの抽出を行った。3. ノロウイルス、サポウイルス、ロタウイルスゲノムの検出はRT-nested PCR法で行い、ノロウイルスゲノムはreal time PCR法によりコピー数を測定した。ウイルスが検出された場合には遺伝子解析を行った(図)。

C. 結果：1. Nested-PCR法によるノロウイルスの検出結果を表1に示す。中国産のカキからは16検体中7検体(43.8%)、日本産のカキからは12検体中1検体(8.3%)でノロウイルスが検出された。ロタウイルス、サポウイルスは検出されなかった。2. そのゲノムグループはGIが中国のカキで1検体(GI/10:6.3%)、日本産のカキでは検出されなかった。GIIは中国産のカキで7検体(43.8%)、日本産では1検体(8.3%)であった。このGIが検出された中国産カキはGIIも検出された。ゲノタイプは中国産で2月購入のものがGII/6(3検体)、3月購入がGII/4(4検体)であり、日本産の1検体はGII/3であった(表2)。3. アミラーゼ処理直接法と凍結融解法の比較結果を表3に示す。1検体(F4)のGIIで両方法とも陽性となったが、残りの検体では一方のみが陽性となり一致しなかった。いずれにしてもコピー数は100コピー以下と大変少なかった。

D. 考察：中国産及び日本産のカキからノロウイルスがそれぞれ43.8%と8.3%検出された。1個からGIとGIIが検出されたカキが1検体、残り7検体ではGIIのみが検出された。ロタウイルス、サポウイルスは検出されなかった。アミラーゼ処理直接法と凍結融解法との比較は一致率が悪かった。一つの理由として1個のカキを2つに分けて行ったため、ウイルス量が少なかったことが考えられる。再度複数の中腸腺を一つとして行い、確認する必要があると考えられる。

E. 研究発表 :

1. 論文発表

1. Chan-It W, Khamrin P, Saekhow P, Pantip C, Thongprachum A, Peerakome S, Ushijima H, Maneekarn N. Multiple combinations of P[13]-like genotype with G3, G4, and G5 in porcine rotaviruses. *J Clin Microbiol*. 2008 Apr;46(4):1169-73. Epub 2008 Jan 30.
2. Yan H, Koyano S, Inami Y, Yamamoto Y, Suzutani T, Mizuguchi M, Ushijima H, Kurane I, Inoue N. Genetic variations in the gB, UL144 and UL149 genes of human cytomegalovirus strains collected from congenitally and postnatally infected Japanese children. *Arch Virol*. 2008;153(4):667-74. Epub 2008 Feb 14.
3. Khamrin P, Okitsu S, Ushijima H, Maneekarn N. Novel nonstructural protein 4 genetic group in rotavirus of porcine origin. *Emerg Infect Dis*, 14(4): 686-688, 2008.
4. Nguyen TA, Hoang L, Pham LD, Hoang KT, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. Norovirus and sapovirus infections among children with acute gastroenteritis in Ho Chi Minh City during 2005-2006. *J Trop Pediatr*. 2008 Apr;54(2):102-13. Epub 2008 Mar 4.
5. Pham NTK, Trinh, QD, Khamrin P, Nguyen TA, Dey SK, Phan TG, Hoang LP, Maneekarn N, Okitsu S, Ushijima H. Sequence analysis of the capsid gene of Aichi viruses detected from Japan, Bangladesh, Thailand, and Vietnam. *J Med Virol* 2008 Jul; 80(7):1222-1227.
6. Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. Bovine Kobuviruses from Cattle with Diarrheic. *Emerg Infect Dis*, 14(6): 985-986, 2008.
7. Schröder HC, Wang X, Tremel W, Ushijima H, Müller WE. Biofabrication of biosilica-glass by living organisms. *Nat Prod Res*. 2008 Jun; 25(3):455-474. Epub 2008 Apr 8.
8. Dey SK, Islam A, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H. Epidemiological and molecular analysis of astrovirus gastroenteritis in Dhaka City, Bangladesh. *J Trop Pediatr* 2008 Dec, 54(6):423-425. Epub 2008 Jul 9.
9. Khamrin P, Peerakome S, Malasao R, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H, Maneekarn N. Genetic characterization of group C rotavirus isolated from a child hospitalized with acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *Virus Genes*. 2008 Aug 12; 37: 314-321. [Epub ahead of print]
10. Malasao R, Maneekarn N, Khamrin P, Pantip C, Tonusin S, Ushijima H, Peerakome S. Genetic diversity of norovirus, sapovirus, and astrovirus isolated from children hospitalized with acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *J Med Virol*, 2008 Aug 19; 80(10):1749-1755. [Epub ahead of print]
11. Yan H, Koyano S, Inami Y, Yamamoto Y, Suzutani T, Mizuguchi M, Ushijima H, Kurane I, Inoue N. Genetic linkage among human cytomegalovirus glycoprotein N (gN) and gO genes, with evidence for recombination from congenitally and post-natally infected Japanese infants. *J Gen Virol* 89(pt 9): 2275-2279, 2008.
12. Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Malasao R, Thongprachum A, Chan-It W, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H. Molecular characterization of VP4, VP6, VP7, NSP4, and NSP5/6 genes identifies an unusual G3P[10] human rotavirus strain. *J Med Virol* 2008 Nov 21; 81(1): 176-182.
13. Thongprachum A, Khamrin P, Saekhow P, Pantip C, Peerakome S, Ushijima H, Maneekarn N. Analysis of the VP6 gene of human and porcine

- group A rotavirus strains with unusual subgroup specificities. *J Med Virol* Nov 21; 81(1): 183-191.
14. Pham NT, Trinh QD, Nguyen TA, Dey SK, Phan TG, Hoang LP, Khamrin P, Maneekarn N, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. Development of genotype-specific primers for differentiation of genotypes A and B of Aichi viruses. *J Virol Method*, 2009 Feb; 156:107-110. Epub 2008, Dec 4.
 15. Kittigul L, Pombubpa K, Taweekate Y, Yeepho T, Khamrin P, Ushijima H. Molecular characterization of rotaviruses, noroviruses, sapovirus, and adenoviruses in patients with acute gastroenteritis in Thailand. *J Med Virol* 2009 Feb; 81(2): 345-353.
 16. Dey SK, Hayakawa Y, Rhaman M, Islam R, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H. G2 strain of rotavirus among infants and children, Bangladesh. *Emerg Infect Dis*, 2009 Jan; 15(1): 91-94.
 17. Takanashi S, Hashira S, Matsunaga T, Yoshida A, Shiota T, Phan TG, Khamrin P, Okitsu S, Mizuguchi M, Igarashi T, Ushijima H. Detection, genetic characterization, and quantification of Norovirus RNA from sera of children with gastroenteritis. *J Clin Virol* 2009; 44: 161-163. Epub 2009 Jan 6.
 18. Khamrin P, Takanashi S, Chan-It W, Kobayashi M, Nishimura S, Katsumata N, Okitsu S, Maneekarn N, Nishio O, Ushijima H. Immunochromatography test for rapid detection of norovirus in fecal specimens. *J Virol Methods* 2009 Jan 9. [Epub ahead of print]
 19. Usami M, Trinh QD, Yagyu F, Hayakawa Y, Inaba N, Okitsu S, Phan TG, Ushijima H. Throughput expression of multiple G-protein coupled receptors for HIV infection in choriocarcinoma cells, trophoblasts, and breast milk cells. *Clin Lab*, in press.
2. 学会発表
 1. 牛島廣治, 沖津祥子, 西尾治. 小児急性胃腸炎におけるノロウイルスのイムノクロマト法による迅速診断の評価. 第49回日本臨床ウイルス学会 (2008.6.14-15) 大山
 2. Takanashi S, Phan TG, Katusmata N, Okitsu S, Mizuguchi M, Igarashi T, Ushijima H. Development and evaluation of immunochromatography of Norovirus: A novel rapid detection test for a highly communicable disease. 11th annual Scientific Congress 2008 of the Sri Lanka college of Paediatricians. June 20 to 22, 2008, Kandy, Sri Lanka.
 3. Ushijima H, Phan TG, Dey SK, Nguyen TA, Khamrin P, Takanashi S, Okitsu S, Maneekarn N. Molecular epidemiology of Norovirus and sapovirus in Asia. IUMS 2008 (Meetings of the three divisions of the international union of Microbiological Societies 2008), XIV. International Congress of Virology, 10-15 August, Istanbul.
 4. Okitsu S, Nguyen TA, Khamrin P, Dey SK, Ushijima H. Evaluation of the immunochromatography test for rapid detection of Norovirus antigen in stool samples. IUMS 2008 (Meetings of the three divisions of the international union of Microbiological Societies 2008), XIV. International Congress of Virology, 10-15 August, Istanbul.
 5. Khamrin P, Pham NTK, Maneekarn N, Okitsu S, Ushijima H. Associations of bovine kobuvirus with diarrhea in cattle and Aichi virus with acute gastroenteritis in children. IUMS 2008 (Meetings of the three divisions of the international union of Microbiological Societies 2008), XIV. International Congress of Virology, 10-15 August,

- Istanbul.
6. 牛島廣治, 早川有子, 清水優子, 沖津祥子, 山本直彦. HIV 陽性母乳の加熱不活性化についての研究. 第 23 回日本母乳哺育学会学術集会(2008.10.4-5) 岡山
 7. 牛島廣治, 早川有子, Phengxay Manilay, 清水優子, 沖津祥子, 山本直彦. どこでも出来る固形アルコール燃料と飲料アルミ缶を用いた HIV 陽性母乳の加熱不活性化について. 第 23 回日本国際保健医療学会学術集会 (2008.10.25-26) 東京
 8. カムリン・パタラ, 石田眞一, 沖津祥子, 牛島廣治. Immunochromatography test for rapid detection of Norovirus in stool samples. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会(2008.10.26-28) 岡山
 9. カムリン・パタラ, 沖津祥子, 牛島廣治. Molecular characterization of VP4, VP6, VP7, NSP4, and NSP5/6 genes of a novel combination of G3P[10] rotavirus stain. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会(2008.10.26-28) 岡山
 10. トンブラチュム・アクサラ, チャンイット・ウイスート, カムリン・パタラ, 沖津祥子, 牛島廣治. Detection of group A rotavirus and norovirus among children hospitalized with acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand 2006. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会(2008.10.26-28) 岡山
 11. チャンイット・ウイスート, トンブラチュム・アクサラ, カムリン・パタラ, 沖津祥子, 牛島廣治. Genetic characterization of diarrheal viruses circulation among children with acute gastroenteritis in Japan in 2007-2008. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会(2008.10.26-28) 岡山
 12. 牛島廣治, 西村修一, 菊田英明, 山本あつ子, 杉田久美子, 馬場常嘉, 沖津祥子. イムノクロマト法によるノロウイルスの迅速診断. 第 40 回日本小児感染症学会総会・学術集会 (2008.11.15-16) 名古屋
 13. Ushijima H, Khamrin P, Phan TG, Dey SK, Chan-It, W, Nguyen TA, Thongprachum A, Takanashi S, Okitsu S, Maneekarn N. Molecular epidemiology of rotavirus in Asia. The 3rd International Workshop on Rotavirus Vaccine in China. 2-3 Dec. Kunming, China.
 14. Khamrin P, Ushijima H, PhanTG, Dey SK, Chan-It W, Nguyen TA, Thongprachum A, Takanashi S, Okitsu S, Maneekarn N. Animal-origin of unusual rotavirus strains circulating in Asia. The 3rd International Workshop on Rotavirus Vaccine in China. 2-3 Dec. Kunming, China.
 15. 勝又紀子, 岩附慧二, 田口了示, 藤原優, 小林正明, 西村修一, 沖津祥子, 牛島廣治. ノロウイルス抗原検出試薬「イムノサーチ NV」の基礎的及び臨床的検討. 第 47 回イムノアッセイ研究会 (2009.1.10) 東京
 16. Ngan Thi Kim Pham, Pattara Khamrin, Manilay Phengxay, 沖津祥子, 水口雅, 牛島廣治. 日本, バングラデッシュ, タイ, ベトナムより検出されたアイチウイルスのキャプシド領域の遺伝子解析. 第 5 回日本小児消化器感染症研究会(2009, 2, 14)大阪
 17. Quang Duy Trinh, Pattara Khamrin, 清水英明, Manilay Phengxay, 沖津祥子, 水口雅, 牛島廣治. 日本及びタイの急性胃腸炎患児の便検体からのヒトパレコウイルスの検出と遺伝子解析. 第 5 回日本小児消化器感染症研究会(2009, 2, 14)大阪
- F 知的財産の出願・登録状況：特になし。

α - Amylase method

Freeze and thaw method

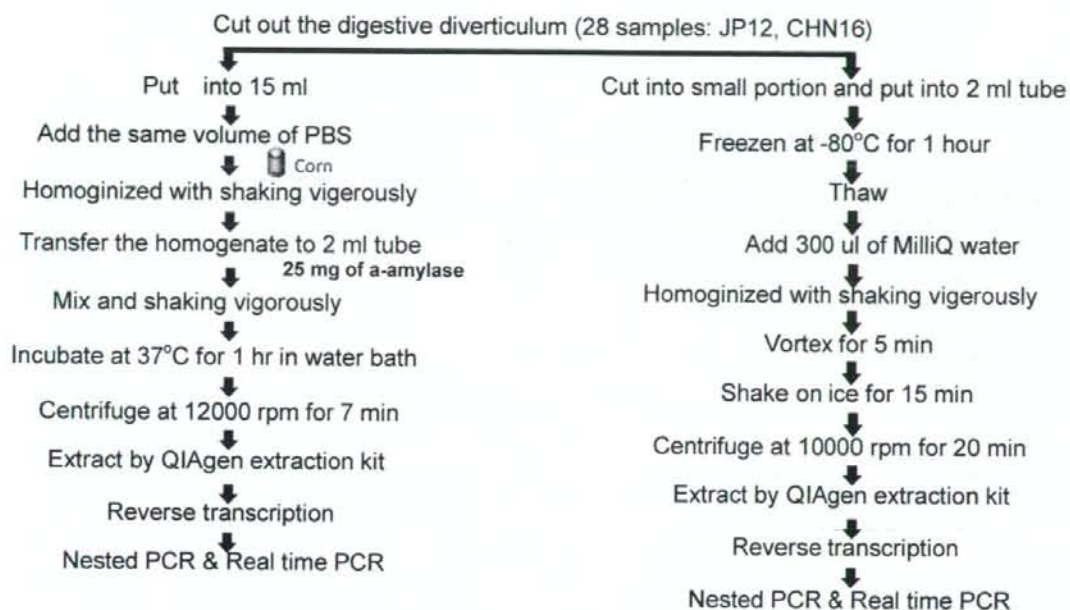


図: アミラーゼ処理直接法と凍結融解法

表1. 中国産及び日本産カキからのノロウイルス検出結果

購入日	ノロウイルス陽性カキの数/検討したカキの数			総数
	2008年2月28日	2008年3月6日	2008年3月28日	
中国産	3/6	3/5	1/5	7/16
日本産	0/2	0/5	1/5	1/12

表2. 中国産及び日本産のカキから検出されたノロウイルスのゲノタイプ

検体番号	国名	検出された Norovirus GI	検出された norovirus GII
F4	中国	GI/10	GI/6
F5	中国	-	GI/6
F8	中国	-	GI/6
M6	中国	-	GI/4
M8	中国	-	GI/4
M9	中国	-	GI/4
M15	日本	-	GI/3
M17	中国	-	GI/4

表3. リアル・タイム PCR 法によるアミラーゼ処理直接法と凍結融解法の比較

ノロウイルス	検体番号	国名	ノロウイルスのコピー数/中腸腺半分	
			アミラーゼ処理直接法	凍結融解法
GI	F4	中国	-	61.3
GI	F4	中国	4.5	84.7
GI	F5	中国	-	6.4
GI	F8	中国	-	12.5
GI	M6	中国	6.2	-
GI	M8	中国	-	13.6
GI	M9	中国	15.8	-
GI	M15	日本	2.2	-
GI	M17	中国	-	2.8

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（平成18～20年度）

研究分担者：牛島廣治（藍野大学藍野健康科学センター）
研究協力者：沖津祥子（藍野学院短期大学藍野健康科学センター）
Pattara Khamrin（藍野大学藍野健康科学センター）
Phan Gia Tung（元東京大学大学院医学系研究科）
Thongprachum Aksara（東京大学大学院医学系研究科）
Leera Kittigul（マヒドン大学公衆衛生学）

I. 中国産および国産カキからのノロウイルスの検出
およびウイルス抽出法（アミラーゼ処理直接法と凍結融解法）の比較

研究要旨：中国福建省および日本国内（宮城、岩手、茨城、千葉、三重、愛知）産の加熱用生カキを購入し、RT-nested PCR 法にてノロウイルスゲノムの検出を行った。さらに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17.3%、国産カキでは20.5%にノロウイルスが検出された。ノロウイルスの genotype として中国産では2006年、2007年にGII/4が多く、2008年にはGII/6やGIも検出された。国産ではGII/3とGII/4が同数であった。GII/4の cluster は集団感染に報告される株が、自然界にも広く存在していることが確認された。2008年度に行った二つの抽出法の比較では一致率が悪く、再度1検体あたりの中腸腺数を増やして検討する必要があると思われた。

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知られており、散発性胃腸炎とともに様々な状況下で広範囲の年齢層に対して、急性胃腸炎の集団感染を引き起こす。二枚貝等に存在しているウイルスが原因の食中毒が問題となっていることから、この研究では中国産輸入ガ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. カキに起因するノロウイルスの正確なリスク評価を行うためには、カキからの迅速・簡便・正確なノロウイルス検出定量法の確立が前提となる。そこで野田らはカキの中腸腺乳剤作成時にアミラーゼ処理を行い、カキに含まれるグリコーゲンを消化させることがノロウイルス回収量を大幅に増

加させることを報告した。一方、我々は簡便な処理方法として従来より抽出した中腸腺を凍結融解させる方法をとってきた。そこで2008年度はこれら二つの方法を比較した。

B 研究方法：1. 中国福建省産と日本産（産地：宮城県、岩手県、茨城県、千葉県、三重県、愛知県）の加熱用カキを東京都台東区内の商店で2005年12月から2008年3月までの間に表1のように購入した。日本産のカキは夏季（6月から）には出荷量が減少し、8月後半と9月には購入できなかった。1回に1パック購入し、-30℃で保存し、分析時に解凍して用いた。各パックから5個を取り出し、1個から中腸腺を抽出し、1検体とした。2. 2008年のカキについてはウイルス抽出法の比較を

行うため、1検体を2つに分け、各方法を検討した(図)。凍結融解法はホモゲネートを作製してウイルスの抽出を行い、ウイルスゲノム抽出は QIAgen 社の QIAamp viral RNA mini kit によった。得られた RNA より cDNA を作製し、semi-nested PCR 法によりノロウイルス GI と GII を検出した。陽性検体については遺伝子解析により genotype を決定した。さらに real-time PCR 法を用いて、含まれるウイルスコピー数を測定した。

C 結果：1. 中国産および国産の加熱用カキからはノロウイルスがそれぞれ 17.3% (156 個中 27 個)、20.5%(127 個中 26 個)検出された。中国産のカキからのノロウイルス検出は春(4 月から 6 月)には少なく、一方日本産のカキでは出荷量の少ない夏季(8, 9 月)を除くとほぼ 1 年中検出された。検出されたノロウイルスの genotype を表 2 に示す。中国産では 2006 年、2007 年では GII/4 が多く、全体では 70%以上となったが、2008 年には GII/6 や GI/10 も検出され、多様性のあることが明らかとなった。国産のカキでは GII/3 と GII/4 が同数ずつ検出された。興味深いことに、GII/4 の cluster を調べると、どちらの国でも 2006 年の GII/4 は Farmington Hills variant と Hunter variant として知られる cluster に属す株であった。2007 年のどちらの国の GII/4 も、また、2008 年の中国の GII/4 も 2006b variant に属する株であった(表 3)。

2. ノロウイルス回収法としてアミラーゼ処理直接法と凍結融解法の比較結果を表 4 に示す。結果として 1 つの中腸腺を二つに切断して二つの方法で回収したところ、両方で同じ株のウイルスが回収された検体は 1 検体(F4)のみで、GII/6 が両方法ともに陽性となった。しかし、この検体も凍結融解法で検出された GI はアミラーゼ処理直接法では検出されず、残りの陽性検体では一方のみが陽性となった。いずれも検出されたコピー数は 100 コピー以下と低かった。

D 考察：1. 加熱用の国産のカキではノロウイルスが検出されることが知られていたが、中国産のカキからも検出された。今回の研究で検出された株は急性胃腸炎の原因ウイルスとして頻度の高い GII/4 genotype であった。さらに配列を詳しく調べると近年実際に集団感染が報告された variant virus (Farmington Hills 株と Hunter 株)が検出された。2007 年の検出株は前年度の株から 2006b 株へと変化していた。この 2006b 株は前年に世界中で集団感染が報告された株であった。このことは流行株が急速に自然界に広がっていることを示している。

なお、これらの商店で購入したカキはすべて生であり、冷凍保存はしていないこと、購入した日付と採取した日付に大きな差がないことを確認した。

2. 今回の結果からはアミラーゼ処理直接法と凍結融解法との一致率は悪く、比較をすることは出来なかった。この理由として 1 個のカキを二つに分けたため、ウイルス量が少なくなったことが考えられる。再度中腸腺を蓄積して再検討する必要がある。

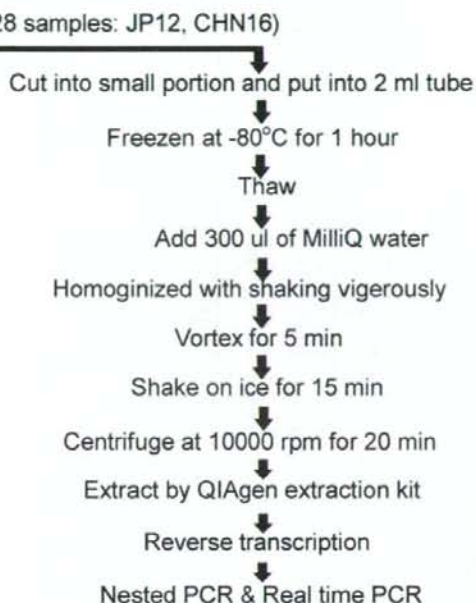
E 研究発表
後述

F. 知的財産の出願・登録状況
特になし。

α -Amylase method



Freeze and thaw method



図： アミラーゼ処理直接法と凍結融解法

表 1. 中国産および国産カキから検出されたノロウイルスの月別分布

国名	ノロウイルス陽性のカキの数/検討したカキの数												総数 (%)						
	2005年			2006年			2007年			2008年									
	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	
中国	4/10	2/10	1/10	1/10	0/10	0/10	0/15	0/10	0/10	3/10	4/10	1/15	0/5	1/5	3/6	4/10			27/156 (17.3)
日本	5/10	2/10	2/10	2/10	2/10	5/10	1/5	2/15	1/5	2/5	0/5	0/0	0/10	0/10	1/10	0/2	1/10		26/127 (20.5)

表 2. 中国および日本産のカキから検出されたノロウイルスの genotype

Countries	Norovirus genotypes			
	GI/10	GI/3	GI/4	GI/6
China	1*(3.7%, 1/27)	4(14.8%, 4/27)	20(74.1%, 20/27)	3*(11.1%, 3/27)
Japan	0	13(50%)	13(50%)	0

*: 中国の 1 検体で GI/10 と GI/6 の両 genotype が検出された。

表 3. 中国および日本産のカキから検出されたノロウイルス

Number	Strain	Place	Collection date	Genogroup	Genotype	Variant	Genome copy per oyster
1	1/oyster/CN	China	October 2005	II	4	Farmington Hills	1.2×10^3
2	4/oyster/CN	China	October 2005	II	4	Hunter	4.1×10^2
3	7/oyster/JP	Japan	October 2005	II	4	Hunter	3.3×10^2
4	9/oyster/JP	Japan	October 2005	II	3	-	7.8×10^5
5	16/oyster/CN	China	October 2005	II	3	-	2.5×10^3
6	18/oyster/CN	China	October 2005	II	3	-	9×10^4
7	22/oyster/JP	Japan	October 2005	II	3	-	2.1×10^3
8	24/oyster/JP	Japan	October 2005	II	3	-	8×10^2
9	25/oyster/JP	Japan	October 2005	II	3	-	4.2×10^2
10	26/oyster/CN	China	November 2005	II	3	-	1.1×10^3
11	27/oyster/CN	China	November 2005	II	3	-	1.1×10^5
12	31/oyster/JP	Japan	November 2005	II	4	Hunter	2.6×10^3
13	38/oyster/CN	China	November 2005	II	4	Hunter	1.3×10^3
14	40/oyster/CN	China	November 2005	II	4	Hunter	1.2×10^2
15	45/oyster/JP	Japan	November 2005	II	4	Hunter	3.8×10^2
16	51/oyster/JP	Japan	December 2005	II	4	Farmington Hills	4.2×10^3
17	55/oyster/JP	Japan	December 2005	II	4	Hunter	6×10^1
18	56/oyster/CN	China	December 2005	II	4	Farmington Hills	4.1×10^3
19	72/oyster/JP	Japan	January 2006	II	4	Hunter	2.6×10^2
20	76/oyster/CN	China	January 2006	II	4	Farmington Hills	3×10^3
21	84/oyster/JP	Japan	January 2006	II	4	Farmington Hills	2×10^5

22	89/oyster/CN	China	February 2006	II	4	Farmington Hills	2.5×10^2
23	91/oyster/JP	Japan	February 2006	II	4	Farmington Hills	5.7×10^2
24	104/oyster/JP	Japan	February 2006	II	4	Hunter	3.5×10^2
25	111/oyster/JP	Japan	March 2006	II	4	Hunter	1.7×10^2
26	121/oyster/JP	Japan	March 2006	II	3	-	7.5×10^3
27	122/oyster/JP	Japan	March 2006	II	3	-	3.5×10^3
28	123/oyster/JP	Japan	March 2006	II	3	-	7.3×10^5
29	125/oyster/JP	Japan	April 2006	II	3	-	5×10^3
30	139/oyster/JP	Japan	May 2006	II	3	-	6.6×10^2
31	146/oyster/JP	Japan	May 2006	II	3	-	6×10^2
32	168/oyster/JP	Japan	June 2006	II	3	-	2.9×10^3
33	177/oyster/JP	Japan	July 2006	II	3	-	6.7×10^2
34	186/oyster/CN	China	July 2006	II	4	Hunter	4.4×10^2
35	187/oyster/CN	China	July 2006	II	4	Hunter	1.5×10^3
36	189/oyster/CN	China	July 2006	II	4	Hunter	5.5×10^2
37	191/oyster/JP	Japan	July 2006	II	4	Hunter	1.5×10^2
38	192/oyster/JP	Japan	August 2006	II	4	Hunter	2.2×10^2
39	201/oyster/CN	China	August 2006	II	4	Farmington Hills	3×10^2
40	202/oyster/CN	China	August 2006	II	4	Hunter	1×10^1
41	203/oyster/CN	China	August 2006	II	4	Farmington Hills	6.4×10^2
42	205/oyster/CN	China	August 2006	II	4	Farmington Hills	2.3×10^2
43	216/oyster/CN	China	September 2006	II	4	Farmington Hills	3.4×10^2
44	16/oyster/JP	Japan	November 2007	II	4	2006b	-
45	30/oyster/CN	China	November 2007	II	4	2006b	-

46	F4F/CHIN-GI/ 10	China	February 2008	I	10	-	-
47	F4A/CHIN	China	February 2008	II	6	-	-
48	F4F/CHIN-GII/ 6	China	February 2008	II	6	-	-
49	F5F/CHIN	China	February 2008	II	6	-	-
50	F8F/CHIN	China	February 2008	II	6	-	-
51	M6A/CHIN	China	March 2008	II	4	2006b	-
52	M8F/CHIN	China	March 2008	II	4	2006b	-
53	M9A/CHIN	China	March 2008	II	4	2006b	-
54	M15A/Japa	Japan	March 2008	II	3	-	-
55	M17F/CHIN	China	March 2008	II	4	2006b	-

表4. リアル・タイム PCR 法によるアミラーゼ処理直接法と凍結融解法の比較

ノロウイルス	検体番号	国名	ノロウイルスのコピー数/中腸腺半分	
			アミラーゼ処理直接法	凍結融解法
GI	F4	中国	-	61.3
GII	F4	中国	4.5	84.7
GII	F5	中国	-	6.4
GII	F8	中国	-	12.5
GII	M6	中国	6.2	-
GII	M8	中国	-	13.6
GII	M9	中国	15.8	-
GII	M15	日本	2.2	-
GII	M17	中国	-	2.8