

Fig. 5. Correlation analysis between copy numbers of the LC One-Step and LC cDNA assays.

Step 法は NVGI, GII を迅速に検出するための方法として有効であると思われた。特に LC One-Step 法は検体搬入から約 3 時間で結果が判明することから、有益な方法であると思われた。

#### 謝 辞

本研究の一部は、(独)科学技術振興機構、平成 17 年度 群馬県地域研究開発促進拠点支援 (RSP) 事業: 研究成果育成型の「食品と水に含まれる有害微生物の迅速高感度遺伝子検出法の確立」により実施されたものである。さらに、本研究を実施するにあたり、有益な助言を頂いた新美真一先生 ((株)日本遺伝子研究所)、宮崎 愛先生、山城 亮先生、宮壽春香先生 (以上、ロッシュ・ダイアグノスティックス(株)) に深謝する。

#### 文 献

- 1) Goodgame, R.: Norovirus gastroenteritis. *Curr. Gastroenterol. Rep.*, **8**, 401-408 (2006).
- 2) Kapikian, A. Z., Wyatt, R. G., Dolin, R., Thornhill, T. S., Kalica, A. R. and Chanock, R. M.: Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J. Virol.*, **10**, 1075-1081(1972).
- 3) Kojima, S., Kageyama, T., Fukushi, S., Hoshino, F. B., Shinohara, M., Uchida, K., Natori, K., Takeda, N. and Katayama, K.: Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J. Virol. Methods*, **100**, 107-114 (2002).
- 4) 厚生労働省医薬品食品局食品安全部監視安全課長: ノロウイルス検出法について。平成 15 年 11 月 5 日, 食安監発第 1105001 号 (2003).
- 5) 西尾 治, 秋山美穂, 愛木智香子, 杉枝正明, 福田伸治, 西田知子, 植木 洋, 入谷展弘, 篠原美千代, 木村博一: ノロウイルスによる食中毒について。日食衛誌, **46**, 235-245 (2005).
- 6) Siebenga, J. J., Vennema, H., Duizer, E. and Koopmans, M. P.: Gastroenteritis caused by norovirus GGII. 4. The Netherlands, 1994-2005. *Emerg. Infect. Dis.*, **13**, 144-146 (2007).

表1. 愛媛県内で発生した食中毒事例(2004.1~2006.12)

年 別	2004	2005	2006	計
全事例数	23	27	20	70
NVによる 事例数	カキ関連	1	—	1
	非カキ関連	4	3	10
			10	17

関与が大きな発生要因となっている。今回、愛媛県内で発生したウイルス性食中毒事例のウイルス検索の結果、患者糞便と併せて調理従事者糞便、一部の食品およびふきとり調査検体から NV を検出した事例について、感染経路の究明および発生要因の推測のため、検出ウイルスの遺伝子解析を行った。また県内の散発性胃腸炎からの検出ウイルスと、食中毒事例の原因ウイルスとの関連性を検討した。

ウイルス検索は、電子顕微鏡と PCR を併用し、NV の検出にはリアルタイム PCR<sup>1)</sup>を用いた。NV 陽性例は、ダイレクトシークエンスで構造蛋白領域の塩基配列を決定し、遺伝子型別を行った<sup>2)</sup>。一部の NV のシークエンスは、国立感染症研究所の西尾博士、木村博士に依頼して行った。糞便材料は、2004年1月~2006年12月の間の、散発性胃腸炎患者1,396名、胃腸炎集団発生の患者563名の便を用いた。

愛媛県内で、調査期間中に発生した食中毒事例数を表1に示した。全国の発生状況と同様の傾向で、NVによる発生が急増し、2006年には全事例数20のうち半数の10事例が NV を原因とするものであった。18事例のうち、カキ関連の食中毒は2004年に飲食店で発生の1事例のみで、発生施設は飲食店8、旅館・ホテル等4、福祉施設、学生寮、家庭での発生が各2事例であった。これらのうち、調理従事者便からもノロウイルスが検出された11事例を次ページ表2に示した。規模の大きかったのは事例4、6、10、11で、それぞれ74人、100人、63人、246人の発症者がいた。調理従事者の中で、発症者が確認されたのは事例3、4、9、11の4事例(表2の括弧内はその人数)で、残り7事例ではいずれも症状を示さない不顕性感染者のみであった。また、調理従事者便から検出された NV の量は、患者便からの NV 量に比較してほとんどの事例で大差はなく、非発症者であっても患者と同等量のウイルスを排泄していた。事例1においては、非発症の調理従事者 A、B、C の3名について NV の追跡調査を実施した。A (初回 NV 量  $2.0 \times 10^8$  copies/g) は、7日経過後の便からは NV は検出されなかった。しかし B ( $1.6 \times 10^8$  copies/g)、C ( $3.0 \times 10^8$  copies/g) では9日経過後にもそれぞれ  $4.2 \times 10^5$  copies/g、 $7.6 \times 10^4$  copies/g の NV が検出され、不顕性感染者も患者と同様に、大量のウイルスを一定期間排泄していることが確認された。調理従事者が高率に NV を保有している事例が多い理由として、食中毒発生の原因食品を随い食として喫

#### <特集関連情報>

#### 調理従事者からノロウイルスが検出された食中毒事例—愛媛県

近年、ウイルス性胃腸炎の集団発生は増加傾向にあり、食中毒では非カキ関連の事例や、施設内における人→人感染による事例が増大している。これらの事例は、ノロウイルス (NV) 感染による発生が大半を占めており、食中毒事例の多くが食品の二次汚染によって生じた集団発生と推定される。事例ごとの、現場における感染経路の究明と発生要因の特定は、その後の感染拡大の防止あるいは発生予防を図る上で、極めて重要であると思われる。また、集団発生の背景には、地域内の散発性胃腸炎の流行があり、流行ウイルスの

表2. 調理従事者からノロウイルスが検出された食中毒事例(2004.1~2006.12)

事例No.	発生時期	発生施設	原因食品	NV陽性数/検査数			遺伝子型	
				患者	調理従事者 (有症者)	食品		ふきとり
1	2004.2	福祉施設	給食	9/12	5/8	3/9	GI/4	
2	2004.4	学生寮	給食	1/2	3/3		GI/4	
3	2004.11	国民宿舎	不明	2/2	3(3)/7(6)		GI/1	
4	2004.12	飲食店	不明	14/16	1(1)/4(1)		GI/6	
5	2005.1	飲食店	弁当	11/11	5/6	0/5	GI/4	
6	2005.12	旅館	会席料理	13/15	8/20		GI/8	
7	2005.12	飲食店	弁当	4/6	2/2		GI/4	
8	2006.10	飲食店	会食	6/6	1/3		GI/4	
9	2006.11	福祉施設	給食	9/9	1(1)/2(1)	2/10	GI/4	
10	2006.12	飲食店	弁当	10/11	3/6		GI/4	
11	2006.12	飲食店	食堂・弁当	10/11	14(1)/15(1)	3/12	1/11	GI/4

食したか否かは不明確で、人→人あるいは施設などを介しての感染も考えられた。特に事例9および事例11においては、ふきとり調査でそれぞれの従事者専用トイレの手洗いカラン、取っ手、便器からNVが検出されており、施設を介して調理従事者間に感染が拡大したことが推察された。事例1および事例11では、原因食と想定された食品(付け合せ野菜、マカロニサラダ、卵とじ、スパゲッティ、切干煮物、もやし和え物)からNVが検出され、それらのNV量は $6.3 \times 10^1 \sim 1.1 \times 10^4$  copies/gの範囲(平均 $3.5 \times 10^3$  copies/g)であり、ヒトに感染を起こすのに十分なウイルス量の汚染が認められた。11事例から検出されたNVの遺伝子解析により患者、調理従事者、食品、ふきとり検体からのNVの塩基配列は、それぞれ事例ごとに相互に高い相同性を示し、食中毒発生における調理従事者の関与が推察された。

散発性胃腸炎からは、3年間にNVが397例検出され、GIとGIIの比率はおよそ1:9であった。食中毒発生と同時期の散発例から得られたNVには、食中毒事例のNVの塩基配列と100%一致または、非常に高い相同性を示すウイルスが存在し、集団発生との密接な関連性が示唆された。

2006年に、県内の食中毒事例および散発性胃腸炎から検出されたNVの遺伝子型は、その大部分がGII/4型であり、これらはさらに3つのサブグループに解析されたが、集団例・散発例双方のNVとともに、一部を除いてほとんどが、欧米で流行しているGII/4 2006変異株<sup>3)</sup>と類似のウイルスであったと考えられた。このウイルスが地域内の散発性胃腸炎の大流行や、相次ぐ集団発生の要因となった可能性が大きいと思われた。

食中毒事例の原因食品は、2003年以降非カキ関連の食品が多くを占めるようになり、原因食品の特定が難しく原因不明事例が増えている。また、ヒト由来NV

による食品の二次汚染の事例では、感染者数が多く大規模な事件になる傾向が強い。これらの原因究明や感染拡大の防止のために、食品中など少量のウイルスを感度良く検出できる検査法の開発が待たれる。

## 参考文献

- 1) Kageyama T *et al.*, J Clin Microbiol 41: 1548-1557, 2003
- 2) 片山和彦, IDWR 6 (11): 14-19, 2004
- 3) CDC, MMWR 56 (33): 842-846, 2007

愛媛県立衛生環境研究所

近藤玲子 市川高子 大塚有加

大瀬戸光明 井上博雄

西条保健所 山下育孝

食肉衛生検査センター 豊嶋千俊

国立感染症研究所

秋山美穂 木村博一 西尾 治

## 2006年度に大阪府で認められたノロウイルス流行

入谷展弘、久保英幸、改田 厚、阿部仁一郎、後藤 薫、石井啓次

Epidemic of norovirus in Osaka City, Japan between April 2006 and March 2007

Nobuhiro IRITANI, Hideyuki KUBO, Atsushi KAIDA,

Niichiro ABE, Kaoru Goto, Eiji ISHII

## Abstract

In the 2006/07 season, there was a marked increase in norovirus (NV) infections in Japan including Osaka city. In the genotyping of NV strains in Osaka City between April 2006 and March 2007, GII/4 genotype strains were detected in 89.1% of NV-positive outbreaks. These GII/4 strains were closely related to each other and could be classified into three clusters. One of the three clusters was predominant in the 2006/07 season and differed genetically from past epidemic GII/4 strains.

Keywords: Norovirus, Outbreak, Genotype, GII/4, 2006/07 season

## はじめに

ノロウイルス (NV) は、乳幼児から成人までの幅広い年齢層のヒトに感染し、嘔吐や下痢を主症状とした急性胃腸炎を引き起こす<sup>1)</sup>。NVは、全長7.5-7.7 kbのプラス1本鎖RNAウイルスであり、カリシウイルス科に分類される。NVの分類・型別はウイルスゲノムの遺伝子解析によって行われており、ヒトNVは主に Genogroup I (GI) と Genogroup II (GII) に分類される<sup>2-4)</sup>。さらにそれぞれには複数の遺伝子型が存在し、合計30種類以上の遺伝子型が報告されている<sup>5)</sup>。

大阪市においても、検出されたNV株の遺伝子型別による流行解析を実施し、同時期に複数の遺伝子型のNVが流行していることを報告している<sup>6,7)</sup>。最近では、GII/4型NVが変異を起こし、世界的に大きく流行を繰り返していることが報告され、公衆衛生上大きな問題となっていた<sup>8,9)</sup>。

2006年秋頃から、大阪市だけでなく全国的にNVによる胃腸炎事例が多発し始め、結果的に2006/07シーズンはNVの記録的な大流行となった。今回、2006年度に大阪府で検出されたNV株について、遺伝子型別を実施し、過去もしくは同時期に他の国や地域で検出されたNV株と遺伝子の比較を行い、大阪市におけ

る2006/07シーズンのNV流行について解析した。

## 材料と方法

2006年4月～2007年3月までの期間に大阪市立環境科学研究所に搬入された非細菌性胃腸炎117事例(患者糞便540検体)を対象とした。

糞便材料の処理は既報の方法に準じて行った<sup>10)</sup>。ウイルスRNAはQIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN) を用いて、それぞれの添付説明書にしたがって抽出した。NV遺伝子の検出にはKageyamaらの報告したリアルタイムPCR法<sup>11)</sup>に従い、ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems) を用いて行った<sup>7)</sup>。

リアルタイムPCR法でNV陽性となった検体については、Capsid N terminal/Shell (N/S) 領域におけるPCRを行い、既報の方法に準じて遺伝子型別を実施した<sup>6,7)</sup>。同じ事例で複数のNV陽性検体があった場合は、少なくとも2検体以上について、遺伝子型別を実施した。即ち、NV株の塩基配列は、ダイレクトシーケンス法により、オートシーケンサー (ABI PRISM 310, Applied Biosystems) を用いて決定した。遺伝子型別の対象領域はGI/290塩基およびGII/278塩基とした。得られたシーケンスデータは、Sequencher V4.7 (Hitachi Software Engineering Co., Ltd.) を用いて編集した。塩基配列のアライメント (DNA weight

大阪市立環境科学研究所

〒543-0026 大阪市天王寺区東上町8-34

Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences,

8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan

matrix: Clustal W 1.6) は、BioEdit (version 7.0.5, <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html>)<sup>12)</sup> または Clustal X (version 1.81, <http://www-igbmc.ustrasbg.fr/BioInfo/ClustalX/>)<sup>13)</sup> を用いて行い、Kimuraの2パラメータ法<sup>14)</sup> で遺伝的距離 (Genetic distance) を計算した。NVの遺伝子型別は、Katayamaらの分類<sup>9)</sup> に基づいて、近隣接合 (Neighbor joining) 法<sup>15)</sup> により分子系統樹を作成して行った。分子系統樹の樹型はブートストラップを1,000回行い検定した<sup>16)</sup>。NVの遺伝子型番号は、Kageyamaら<sup>5)</sup> の分類に従った。

## 結 果

NVは117事例中92事例 (78.6%)、患者糞便材料540検体中412検体 (76.3%) から検出され、2006年度は大阪市においてNVが検出された胃腸炎事例数が最も多かった (図1)。NVが検出された胃腸炎事例の発生月は7月および8月を除くすべての月で認められた (図2)。2006/07シーズンのNV流行は、9月から始まり、11月および12月に集中していた。推定原因として最も多かったのはカキ以外の食品 (45.7%)

であり、寿司、弁当、魚介類、調理パン、菓子パンなどが原因食品として疑われた。またカキの喫食が疑われた事例は少なかった (2.2%) (図3)。ヒトからヒトへ感染が拡がった事例 (ヒト-ヒト感染事例) は、少なくとも22事例 (23.9%) 認められ、主な原因施設は特別養護老人施設、保育園、小学校などであった。

検出したNVの遺伝子型は、GIではGI/8型 (Sindleshams/95/UK) が2事例 (2.2%) のみであった。GIIではGII/4型 (Bristol/93/UK) が81事例 (88.0%)、GII/6型 (Seacroft/90/UK) が3事例 (3.3%)、GII/2型 (Melksham/94/UK)、GII/5型 (Hillingdon/90/UK)、GII/7型 (Leeds/90/UK)、GII/13型 (M7/99/US)、GII/16型 (SaitamaT53/GII/02/JP) がそれぞれ1事例ずつであった。複数の遺伝子型が混在していた事例は1事例であり、GI/4型 (Chiba 407/87/JP) およびGII/4型のNVが含まれていたため、2006年度にGII/4型NVが検出された事例は、合計82事例 (89.1%) であった (表1)。特に2006年9月から2007年3月の流行期に発生した76事例においては、1事例を除いたすべてからGII/4型

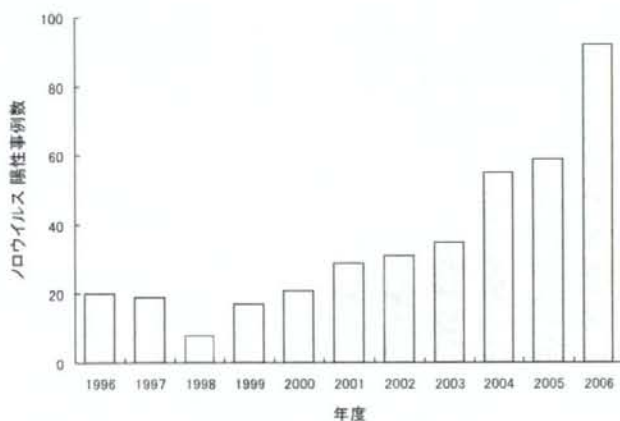


図1 年度別ノロウイルス陽性事例数

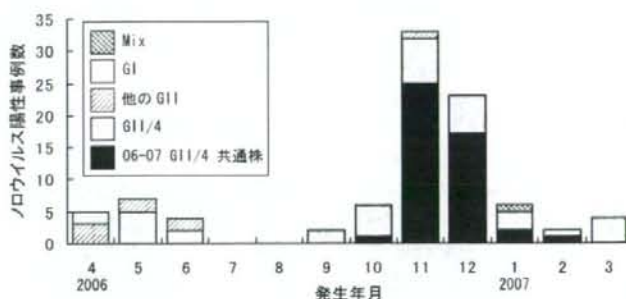


図2 月別ノロウイルス陽性事例数

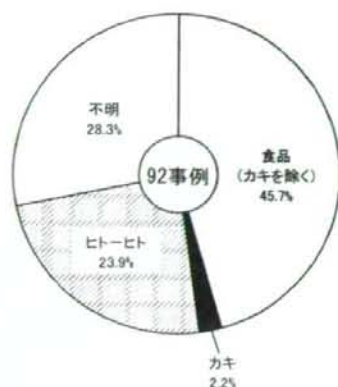


図3 2006年度ノロウイルス陽性事例の推定原因および感染経路

NVが検出された(図2)。

検出されたGII/4型NV株の遺伝子を比較するために、塩基配列を決定した合計84株のGII/4型NVの系統樹を作成した(図4)。これら84株は、同じ事例内で異なる2種類の塩基配列が認められた場合が2事例あり、他の80事例においては同じ事例内で同じ塩基配列のみが認められた。84株のGII/4型NVは、Capsid N/S領域において、塩基配列で94.9%以上、推定アミノ酸配列で95.6%以上の相同性が認められ、3つのクラスター(図4: A, B, C)に分類された。またGII/4型の過去の代表的な流行株として報告されている95/96-US株<sup>17)</sup>、FarmingtonHills/02/US株<sup>8)</sup>およびHunter284E/04O/AU株<sup>10)</sup>とは異なっていた。クラスターAには、2006年変異株と報告されている281/06/HKG株<sup>18)</sup>に近縁な76株(90.5%)が分類された(塩基配列97.4%以上および推定アミノ酸配列96.7%以上の相同性)。本クラスターには香港(281/06/HKG)、オランダ(Nijmegen 115/06/NL、Den Haag 89/06/NL)、日本・神戸市(Kobe 034/06/JP)で検出された株が含まれ、国際塩基配列データベース(DDBJ/EMBL/GenBank)上で日本の他地域から同時期に検出された近縁なNV株の塩基配列も登録されていた(data not shown)。さらに76株中47株(図4: 06-07 GII/4共通株)は、同じ塩基配列を有していた。本06-07 GII/4共通株は、2006/07シーズンの流行前(4-6月)には検出されず、2006年10月末から2007年2月の期間に検出され(図2)、2006/07シーズンのNV流行の優勢株であった。クラスターBには、2006年12月に検出された1株(06195)のみが分類された。クラスターCには、2006年5月から11月に検出された7株が分類され(塩基配列98.9%以上および推定アミノ酸配列100%の相同性)、Hokkaido 231/04/JP株と最も近縁であった。Hokkaido 231/04/JP類似株は主に2003/04および2004/05シ

表1 2006年度に検出されたノロウイルスの遺伝子型

遺伝子型		事例数 (%)
GI	GI/8	2 (2.2)
GII	GII/2	1 (1.1)
	GII/4	81 (88.0)
	GII/5	1 (1.1)
	GII/6	3 (3.3)
	GII/7	1 (1.1)
	GII/13	1 (1.1)
	GII/16	1 (1.1)
Mix	GI/4, GII/4	1 (1.1)
合計		92

ーズンに日本の各地域において流行していたことが報告されている<sup>20, 21)</sup>。

## 考 察

2006/07シーズンは、全国的にNVの記録的な大流行が認められたシーズンであった。2006年の全国食中毒統計(速報)によると、病因物質別食中毒時点数および患者数で、NVは、それぞれ499事例および27,616人で第1位となっている(<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/index.html>)。これは、ウイルスによる食中毒が報告されはじめた平成10年以降で、最も多い報告数である。また、国立感染症情報センターの病原微生物検出情報・速報(2007年6月14日現在報告数)によると2006/07シーズンのNV感染集団発生の中で、食品媒介疑いが20.2%に対して、ヒト-ヒト感染事例が57.6%であり、検出されたNVの95.5%がGII/4型であったと報告されている(<http://idsc.nih.gov/jp/iasr/noro.html>)。したがって、2006/07シーズンは、全国的にGII/4型NVを中心とした大きな流行であり、食中毒だけでなくヒト-ヒト感染事例も多発していたことが特徴的であったといえる。本傾向は、大阪府においても同様であった。また今回のように、1種類の遺伝子型のみによる大流行は、大阪府において、これまでとは異なったNVの流行像であった。

GII/4型NVは、Bristol/93/UK株に代表される遺伝子型で、これまで遺伝子変異を起こしながら、世界的に流行してきたことが報告されている<sup>8, 17)</sup>。さらに最近では、香港<sup>18)</sup>およびヨーロッパ<sup>22)</sup>で過去のGII/4型NV流行株とは異なる新たな変異株の出現・流行が報告された。香港では、非流行期である5-6月に2006変異株が出現・流行しており<sup>18)</sup>、同時期に大阪府においても同じ塩基配列を有する株(図4: 06057, 06059, 06066)が検出されていた。ヨーロッパでも、

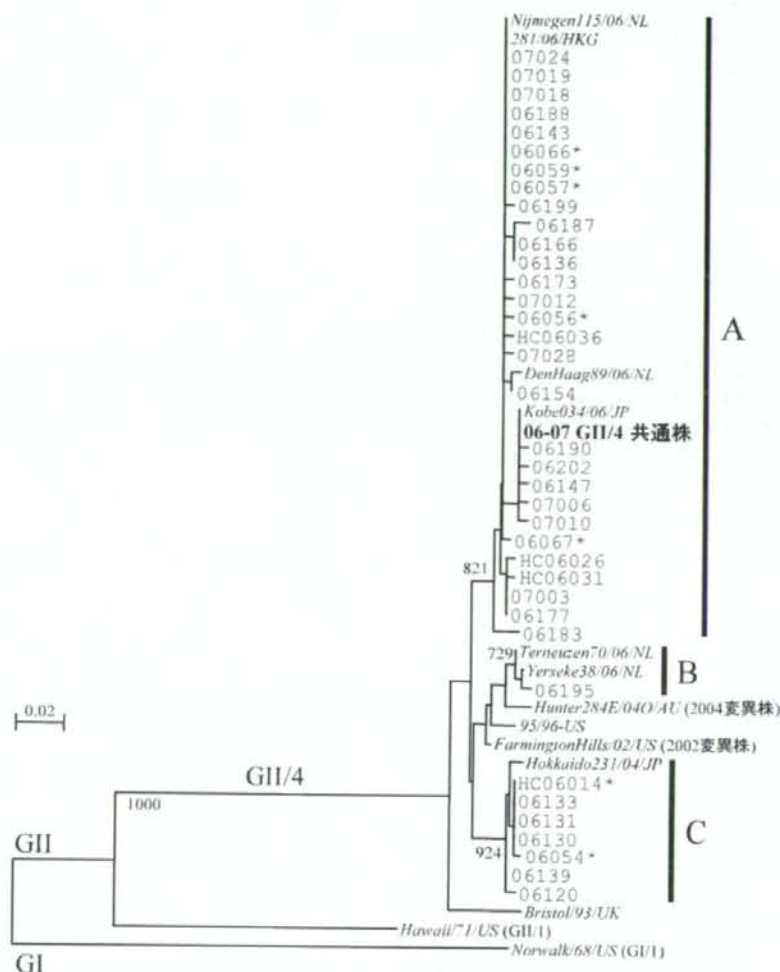


図4 2006年度に検出されたGII/4型ノロウイルス株の分子系統樹

分子系統樹はCapsid N/S領域 (GI:290塩基, GII:278塩基) においてNJ法で作成した。ブートストラップ値は、クラスターを支持する枝にそれぞれ数字で示した。斜体はNV参考株、太字は同じ塩基配列を有していた株 (06-07 GII/4 共通株)、その他の番号は大阪府で検出されたGII/4型NV株を示す。2006年5-6月に検出された株はアスタリスク(\*)で示した。NV参考株のGenBank accession numberは以下のとおりである: 281/06/HKG, EF121839; 95/96-US (345/96002726/1996/SC), AF080549; Bristol/93/US, X76716; DenHaag89/06/NL, EF126965; Farmington Hills/02/US, AY502023; Hawaii/71/US, U07611; Hokkaido231/04/JP, AB240183; Hunter284E/04O/AU, DQ078794; Kobe034/06/JP, AB291542; Nijmegen115/06/NL, EF126966; Norwalk/68/US, M87661; Terneuzen70/06/NL, EF126964; Yerseke38/06/NL, EF126963

非流行期である春・夏季に2006変異株が出現・流行していることが報告されている<sup>2)</sup>。ヨーロッパにおいては、2006aおよび2006bの2種類の変異株が報告されており、Terneuzen 70/06/NL株やYerseke 38/06/NL株が2006aに、Nijmegen 115/06/NL株やDenHaag 89/06/NL株が2006bに分類される。したがって、今回の系統解析において2006a株はクラスターBに、2006b株はクラスターAに分類される。大阪

市では、クラスターAに分類された株、特に06-07 GII/4共通株が2006/07シーズンの主流であった。同時期に日本の他地域で検出されたクラスターA類似株の塩基配列が、遺伝子データベース上に登録されていたことから、全国的に本類似株が流行していたことが示唆された。また同じ塩基配列を有する株による流行は、1997/98シーズンに大阪府で認められており、GII/3 (P2-A) 型NV共通株に汚染されたカキの喫食

が主な原因であった<sup>10)</sup>。しかし、今回の06-07 GII/4共通株については、各事例で共通する要因が認められず、株の由来や感染が拡大した原因を特定することができなかった。

クラスターCに分類された株は、2006年11月初旬まで検出されたが、それ以降は検出されなかった。本類似株は、過去に日本で流行を起こしたGII/4型NV変異株のひとつとして報告されており<sup>20, 21)</sup>、大阪市においても同時期に流行していた可能性がある。GII/4型NVの変異株が、出現・流行・消失を繰り返している原因は明らかにされておらず、過去に検出されたGII/4型NV株について遺伝子変異などの詳細な解析が必要であると考えられた。また、今回検出されたNV株の遺伝子型別と、その結果に基づいた詳細な遺伝子解析は、流行状況の把握や解析に非常に有用であった。大阪市におけるNVの胃腸炎事例は毎年増加しているため、今後も継続したNV流行の監視と遺伝子型別による解析を継続していく必要があると考えられた。

### まとめ

- ・2006/07シーズンは、大阪市だけでなく全国的にGII/4型NVの記録的な大流行が認められた。
- ・大阪市で流行していた主な株は、非常に近縁であり、過去に報告されていたGII/4型NV変異株と異なっていた。
- ・検出されたNV株の遺伝子型別は、NV流行の解析に有用であった。

### 謝 辞

本研究において、疫学情報の収集にご協力いただいた健康福祉局生活衛生担当、保健所感染症対策担当および食品衛生監視員の方々、および研究遂行にご協力いただいた環境科学研究所企画担当 養城昇次氏、白井雄也氏、松岡秀明氏、西田利一氏に深謝いたします。

### 付 記

本研究の概要は、平成19年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部ウイルス部会（2007年9月大阪）および第23回地方衛生研究全国協議会近畿支部疫学情報部会（2007年11月和歌山）において発表した。

### 参考文献

- 1) Green KY, Chanock RM, and Kapikian AZ. Human Caliciviruses, "Fields Virology", 4th ed. (Knipe DM, et al., ed). Philadelphia, Pa: Lippincott-Raven; 2001. p841-74.
- 2) Ando T, Noel JS, and Fankhauser RL. Genetic classification of "Norwalk-like viruses". J Infect

Dis 2000; 181 (Suppl 2): 336-48.

- 3) Vinje J, Green J, Lewis DC, Gallimore CI, Brown DWG, and Koopmans MPG. Genetic polymorphism across regions of the three open reading frames of "Norwalk-like viruses". Arch Virol 2000; 145: 223-41.
- 4) Katayama K, Shirato-Horikoshi H, Kojima S, Kageyama T, Oka T, Hoshino FB, et al. Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. Virology 2002; 299: 225-39.
- 5) Kageyama T, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Kojima S, et al. Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan. J Clin Microbiol 2004; 42: 2988-95.
- 6) 入谷展弘, 久保英幸, 勢戸祥介, 春木孝祐, 西尾治, 武田直和, 他. 平成14年度に大阪市で検出されたノロウイルスの遺伝子型別. 大阪市立環境科学研究 調査・研究年報 2003; 65: 29-37.
- 7) Seto Y, Iritani N, Kubo H, Kaida A, Murakami T, Haruki K, et al. Genotyping of Norovirus strains detected in outbreaks between April 2002 and March 2003 in Osaka City, Japan. Microbiol Immunol. 2005; 49: 275-83.
- 8) Lopman B, Vennema H, Kohli E, Pothier P, Sanchez A, Negredo A, et al. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. Lancet 2004; 363: 682-8.
- 9) Bull RA, Tu ETV, McIver CJ, Rawlinson WD, and White PA. Emergence of a new norovirus genotype IL.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. J Clin Microbiol 2006; 44: 327-33.
- 10) Iritani N, Seto Y, Haruki K, Kimura M, Ayata M, and Ogura H. Major change in the predominant type of Norwalk-like viruses" in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis in Osaka City, Japan, between April 1996 and March 1999. J Clin Microbiol 2000; 38: 2649-54.
- 11) Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. J Clin Microbiol 2003; 41: 1548-57.
- 12) Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological



- sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl Acids Symp Ser 1999; 41: 95-8.
- 13) Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, and Higgins DG. The CLUSTAL X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 4876-82.
  - 14) Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of bases substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980; 16: 111-20.
  - 15) Saitou N, and Nei M. The neighbor joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987; 4: 406-25.
  - 16) Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985; 39: 783-91.
  - 17) Noel JS, Fankhauser RL, Ando T, Monroe SS, and Glass RI. Identification of a distinct common strain of Norwalk-like viruses" having a global distribution. *J Infect Dis* 1999; 179: 1334-44.
  - 18) Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, and Monroe SS. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *J Infect Dis* 2006; 346: 312-23.
  - 19) Ho EC, Cheng PK, Lau AW, Wong AH, and Lim WW. Atypical norovirus epidemic in Hong Kong during summer of 2006 was caused by a new genogroup II/4 variant. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2205-11.
  - 20) 愛木智香子, 秋山美穂, 岡部信彦, 西尾 治, 杉枝正明, 山下育孝, 他. 欧米で流行しているノロウイルス GII/4変異型の国内での検出状況. *病原微生物検出情報 月報* 2005; 26: 325-7.
  - 21) 吉澄志磨, 三好正浩, 池田徹也, 石田勢津子, 奥井登代, 岡野素彦, 他. 高齢者施設におけるノロウイルス集団感染事例の発生状況—北海道. *病原微生物検出情報 月報* 2005; 26: 331-2.
  - 22) Kroneman A, Vennema H, Harris J, Reuter G, von Bonsdorff CH, Hedlund Ko, et al. Increase in norovirus activity reported in Europe. *Eurosurveillance Weekly releases* 2006; 11: 14 /Dec/2006. <http://www.eurosurveillance.org/ew/2006/061214.asp# 1>

# ノロウイルスの食中毒対策

NISHIO OSAMU

西尾 治

◎国立感染症研究所感染症情報センター

## はじめに

ノロウイルスによる急性胃腸炎が、高齢者特別養護施設で2004年末から2005年の初めにかけて全国的に集団発生し、亡くなられた人もみられた。このことからノロウイルスによる集団発生が社会的にも大問題となり、ノロウイルスは広く知られることとなった。

ノロウイルスは一般的に聞きなれないウイルス名で、殺人ウイルスであるがごとき誤解も生じ、社会的に大きな不安をもたらした。実際には、このウイルスは古くからあるウイルスで、決して殺人ウイルスでもない。

また、2004年に厚生労働省に届けられた食中毒の原因物質別事件数は全体の第2位であり、患者数は45%を占め、今や食中毒患者の半数を占める勢いである<sup>1)</sup>。

今日、ノロウイルスは最も患者数の多い感染症といっても過言でない。ノロウイルス対策は厄介なことに食中毒と感染症を起こし、しかも両者は表裏一体であり、両面から対策を行わなければならない。

## ■ノロウイルスの概要

ノロウイルスの構造は、表面が蛋白質で覆われ、エンベロープを有さず、その中にプラス鎖RNAが1本入っているだけの、きわめて単純な構造である。大きさは直径約38nmである。ノロウイルス

は小さく、球形で表面に構造物質が認められることから小型球形ウイルスと呼称されていた。

ノロウイルスは遺伝子型が多く存在し、genogroup (G) がGIとGIIのグループに分けられ、それぞれに15以上の遺伝子型が存在している。遺伝子型が多様なことが簡便かつ信頼性の高い検査法の開発を困難にしている。

ノロウイルスの増殖系は、組織培養、実験動物でいまだに見出されていないので、正確な意味での血清型、感染性が不明である。

なお、食中毒原因物質における本ウイルスの名称は1997年5月に厚生省の食中毒原因物質に「小型球形ウイルス」(現在のノロウイルス)、「その他のウイルス」が加えられ、2002年8月に「小型球形ウイルス」は国際ウイルス命名委員会で「ノロウイルス」と命名されたことを受けて、2003年に厚生労働省は「小型球形ウイルス」から「ノロウイルス」に改めた。

## ■ノロウイルス感染症の臨床

ノロウイルスによる食中毒は細菌による事件の少ない12月から2月に多発する。

潜伏期間は通常12~72時間で、感染部位は小腸上皮細胞である。主症状は下痢、嘔吐、嘔気、腹痛で、特に嘔吐は突然、急激に、強烈に起こるのが本症の特徴である。ところ構わず嘔吐することが感染拡大の大きな要因となっている。

これらの症状が1~2日続いた後、治癒する。しかし抵抗力の弱い高齢者や乳幼児では脱水症状が強く、重症となることがあるので注意を要する。1997~2004年にノロウイルスによる食中毒を起こした患者は56,969名で、死亡例はみられていない。

## ■ウイルスによる食中毒の発生状況

2004年に厚生労働省に届けられた食中毒事件は279事件で、原因物質別件数ではカンピロバクターに次いで2位である。原因物質別の患者数は第1位の12,000余名で、全体の45%を占め過去最大となっている。2003年および2004年のノロウイルス以外のウイルスではロタウイルスが2事件（原因食材は不明と冷却水）、A型肝炎（食材不明）および鹿肉の生食によるE型肝炎が各1事件であった。すなわち、ウイルス性食中毒のほとんどはノロウイルスが起因となっている。ウイルス性食中毒発生の予防が完全に遂行されれば、食中毒患者の半数程度を減少させることが可能で、特にノロウイルスの予防が最重要といえる。

## ■ノロウイルスによる食中毒の発生要因

ノロウイルスによる食中毒には3つの様式がある。

### 1. 汚染されたカキ等の二枚貝を介するもの

2004年のノロウイルスによる食中毒事件のうち二枚貝による事件数は14%を占め、患者数は5%程度となっている。2001年に比べると、事件数および患者数ともに半数以下に減少している。本事件はカキが主な原因食材で、その他にウチムラサキガイ、ハマグリ、アカガイ、シジミなどの二枚貝でも発生している。

カキなどの二枚貝がノロウイルスに汚染される様式は、乳幼児でのノロウイルスによる感染性胃腸炎が11月末頃から多発し、それに伴い糞便・吐物から膨大な量のウイルスが排出され、そのまま便器に流すので、ウイルスは下水処理場へいく。

そこで大部分のウイルスは除去されるものの、一部が河川水、海域を汚染する。カキは活発な時期には1日でプランクトン10億個程度を食するため、海水を1時間に10L以上吸引する。海水とともにカキに取り込まれたノロウイルスは中腸腺に濃縮・蓄積する。特に、カキは乳幼児の流行に約1カ月遅れてノロウイルスに汚染される。シジミ、アサリ、ハマグリなどの二枚貝も同様に汚染される。ウイルスに汚染された二枚貝（カキなど）を生あるいは加熱不足で食することにより食中毒となる。食中毒事件は主に飲食店、旅館、家庭で発生し、発生規模は多くが20人以下で起きている。

環境をノロウイルスで汚染させないために、ノロウイルス感染者の糞便・吐物は高濃度の次亜塩素酸ナトリウム液などで不活化した後、便器に流すように努めるようにしないとウイルスが人に戻ってくる。

### 2. 食品取扱者・調理者による食中毒事件

ノロウイルスに感染している食品取扱者・調理者がノロウイルスに汚染された糞便・吐物を食品に付着させることにより食中毒となる。例えば、食品を提供する直前にウイルスが付着した手で直接サラダ、パン、和え物、刺身などを取り扱ったことにより事件が起きている。近年はこの食中毒事件が多発しており、事件数は全体の約70%を、患者数は約80%以上を占めている。しばしば施設、学校等において患者数が100人以上で発生しているのがこの事例の特徴である。食品に糞便・吐物をつけないことが肝要である。

### 3. 飲料水による食中毒

近年、飲料水（井戸水、簡易水道）による事件が、長野<sup>2)</sup>、秋田<sup>3)</sup>、新潟<sup>4)</sup>で発生している。特に料理店、旅館、ホテルでは毎日、提供される料理が変わり、喫食者も異なるが、患者発生は連続的にみられ、原因食材の特定が困難なことが多い。食中毒事件に際しては飲料水も考慮しなければな

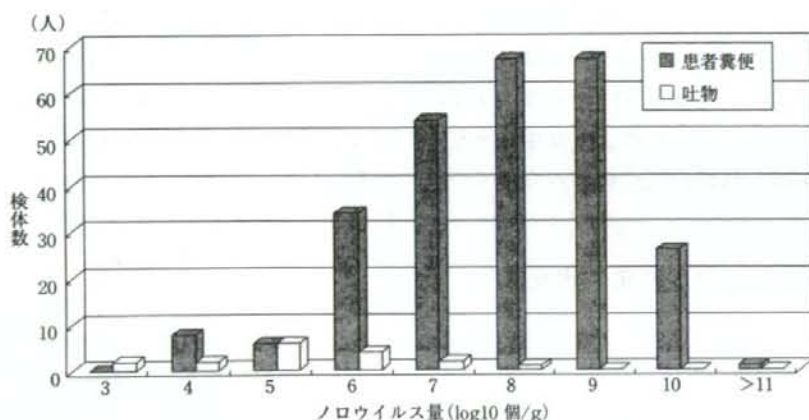


図1 患者糞便および排出吐物のウイルス量

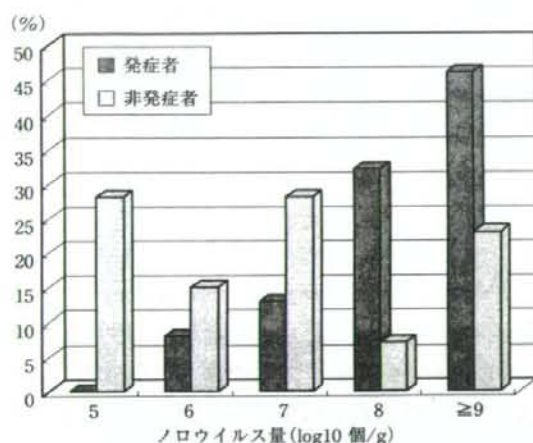


図2 発症者および非発症者の糞便中のノロウイルス量

らない。飲料水による食中毒事件の特徴は井戸水、簡易水道水がノロウイルスに汚染されると、汚染が数日間継続するので、患者発生も連日みられる。飲料水に塩素消毒が適正（残留塩素 0.1ppm）に行われていれば大腸菌は検出されないが、ノロウイルスはこの濃度で不活化されないため食中毒となる。

適正な塩素消毒が行われていないときには先に小さいノロウイルスが飲料水中に漏出し、遅れて大きい大腸菌が検出され、飲料水が糞便に汚染されたことが明白となる。

近年発生した事件はいずれも井戸の深さが10m以内であり、浅井戸は特に注意が必要である。水源では排便、嘔吐をさせない環境対策が必要で、人は環境を守る義務がある。

#### ■ノロウイルスによる食中毒事件が多発する要因

ノロウイルスの特徴として感染力が非常に強く、ノロウイルスは10個程度で感染・発病させるのに対し、多くの患者の糞便1g中に1億個以上、吐物では1g中に100万個以上のウイルスが存在する（図1）。したがって、ごく微量の糞便・吐物が手に付着しても、大量のウイルスが存在する。そのような手で食品を汚染することにより、大規模な事件となる。症状が消えても10日間程度、長いときには1カ月ほどウイルスの排出が続くので、この間は食品を直接取り扱わないなどの注意を要する<sup>5,6)</sup>。

何ら下痢などの症状がなくてもウイルスを糞便から排出することがあり（不顕性感染）、患者と同様にウイルスを大量に排出する人もみられる（図2）。人は常にノロウイルスを排出している危険性を持っている。家族、職場などで下痢をしている人がいるときには、自身も感染する危険性が高いので、健康管理に特に注意する。

このウイルスは4℃では数カ月間、室温では2

週間程度は不活化しない。一旦食品に付着したウイルスは長期間感染性を保持することから食中毒となる。さらに物理化学的抵抗性に強い<sup>7,8)</sup>。例えば、消毒用アルコールに強く、細菌が死滅する温度、塩素濃度および強酸性水では容易に不活化しない。酸に強く容易に小腸に達する。不活化は容易ではなく食中毒を起こしうる。

ノロウイルスには遺伝子型が多く(30以上存在する)、1つの遺伝子型に感染しても、他の多くの遺伝子型に感染する。ノロウイルス感染防御抗体は腸管局所のIgA抗体で、IgA抗体は持続が短いので同じ遺伝子型に再感染することがある。したがって乳幼児から高齢者に至るまで何度でも感染する

## ■ノロウイルスによる食中毒の予防対策

食中毒の予防の基本は「持ち込ませない、付着させない、うつさない」である。

### 1. 加熱処理

ウイルス汚染の危険を有する二枚貝は内臓(中心部)が汚染されており、外部を洗っても除去できない。二枚貝、その他の食品、布巾、食器類などの加熱できるものは85℃で1分以上の加熱を行う。

### 2. 洗 浄

患者の下痢便、嘔吐物ともに液状で、手につきやすい。ウイルスは大きさが細菌に比べ、1/30~1/100であり、手のしわの奥に入り込み、除去が容易でない。料理する前の手洗いは入念に行わなければならない。手指は石鹸を十分泡立て、ブラシなどを使い、流水による温水で洗浄を10秒間以上行う。なお、この操作を2回行うとよい。特に指先、指の間、親指と小指の外側は洗わないことが多いので、この部分も洗う。野菜などの生食する食品は流通段階でウイルス汚染の可能性があるので流水で洗浄する。

### 3. 糞便・吐物の処理

糞便・吐物をただちに処理しないと感染が拡大する。処理するときはマスクとゴム手袋を着用し、自身と周りを汚染させないように注意する。糞便・吐物の処理は新聞紙などで拭き取り、次いで市販の次亜塩素酸ナトリウム液(塩素濃度1,000ppm)に5~10分間浸し、その後、次亜塩素酸ナトリウム液(200ppm)で拭く。

### 4. 調理器具・床の消毒

次亜塩素酸ナトリウム液(塩素濃度200ppm)で拭く。

### 5. 設備の改善

飲食店、旅館、施設、病院などでの水道およびドアの開閉は、自動あるいは足で操作できるものに改善する。外部からのウイルス侵入の防止を目的として、従業員専用のトイレを設置することが望ましい。トイレ内に手洗い場を設置する。

## ■患者の管理等

ノロウイルスによる食中毒患者の糞便・吐物から大量にウイルスが排出されることから、個室での管理が望ましい。患者が多数のときには集団管理とする。患者の部屋には手洗い場を設置し、入退室のときには必ず手洗いを励行する。

次亜塩素酸ナトリウムは刺激が強く、居室、病室の消毒には使えないので、70%消毒用アルコールで3回湿すように拭く。

身の周りの消毒(ドアノブ、手すり、机、電話など)は次亜塩素酸ナトリウム液(200ppm)で湿すように拭く。ただし、金属部分は塩素で腐食するので、10分後によく水に湿したペーパータオルなどで次亜塩素酸ナトリウムを拭き取る。

ノロウイルスの患者にはデイスポの食器を使用するのが望ましい。

患者の使用するトイレは固定し、使用ごとにトイレのふた、ドアノブなど、触れたところはすべて次亜塩素酸ナトリウム液(塩素濃度200ppm)

で拭く。未発症者は使用しない。

汚物処理室、洗濯室へは許可された者のみ入室として、他の人は入室禁止とする。

患者は休憩室あるいはプレイルームの使用を禁止、制限する。プレイルームの本、玩具など不特定多数の人が触れるものは撤去する。

#### おわりに

ウイルスによる食中毒の防止に特別な手段はなく、手洗いと汚染の危険性のあるものは加熱あるいは洗浄を行う。感染源はウイルス学的に安全に処理することである。

#### 文 献

- 1) 厚生労働省：食中毒統計より、<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/index.html>
- 2) 徳竹由美, 小林正人, 秋山美穂ほか：井戸水からノロ

ウイルスが検出された食中毒事例。感染症学雑誌：印刷中

- 3) 齋藤博之, 佐藤寛子, 阿部真理子ほか：簡易水道が原因と考えられたノロウイルスの流行—秋田県。病原微生物検出情報 26：150-151, 2005.
- 4) 田村 務, 西川 真, 飯田和久ほか：飲料水が原因のノロウイルスによる食中毒事例—新潟県。病原微生物検出情報 26：330-331, 2005.
- 5) 西尾 治, 新川奈緒美：ノーウォーク様ウイルスによる集団発生。日本医事新報 4105：5-9, 2002.
- 6) 西尾 治, 秋山美穂, 愛木智香子ほか：ノロウイルスによる食中毒について。食品衛生学雑誌 46：235-245, 2005.
- 7) Doultree JC, Duruce JD, Brich DS *et al.* : Inactivation of feline calicivirus, a Norwalk virus surrogate. *J Hospital Infect* 41：51-57, 1999.
- 8) Duizer E, Bijkerk P, De Groot A *et al.* : Inactivation of caliciviruses. *Appl Environ Microbiol* 70：4538-4543, 2004.

\* \* \*

# 医学ウイルス学 MEDICAL VIROLOGY FOURTH EDITION 〈第四版〉

D. O. White F. J. Fenner 著 北村 敬 訳

B5判560頁 定価13,650円 (本体13,000円+税5%)

主な内容

## 第I部 動物ウイルス学総論

構造と組成/分類と命名/複製/遺伝と進化/細胞の変化/生体内のウイルス感染と拡散の機序/毒力と宿主の抵抗性の決定要因/免疫応答/疾患発生の機序/持続感染/発癌の機序/実験室内診断/予防接種/疫学/予防, 制圧, 根絶/化学療法

## 第II部 ヒトの病原ウイルス

パルボウイルス科/パポーパウイルス科/アデノウイルス科/ヘルペスウイルス科/ポックスウイルス科/ヘパドナウイルス科とデルタウイルス/ピコルナウイルス科/カリシウイルス科とアストロウイルス科/トガウイルス科/フラビウイルス科/コロナウイルス科/パラミクソウイルス科/ラブドウイルス科/フィロウイルス科/オルソミクソウイルス科/アレナウイルス科/ブニアウイルス科/レオウイルス科/レトロウイルス科/ウイルスで起こる症候群



近代出版

〒150-0002 東京都渋谷区渋谷2-10-9  
TEL 03-3499-5191 FAX 03-3499-5204  
<http://www.aya.or.jp/~kindai-s>

## 混合カキ検体からのノロウイルス濃縮操作における アミラーゼ処理の有用性

野田 衛 西尾 治\*1 山本美和子 伊藤 文明  
池田 義文 松本 勝 萩野 武雄\*2

カキ混合検体からのノロウイルス(NV)濃縮操作におけるアミラーゼ(AM)によるグリコーゲンの消化の有用性を、AM 消化を行わない場合およびカキを個別に検査する場合(個別法)と比較し検討した。AM 消化は、ポリエチレングリコールによる沈殿操作時に、1 混合検体当り 50mg の  $\alpha$  AM を加え、スターラーで攪拌して室温にて一夜行い、他の工程はこれまで当所で実施しているカキ混合検体からの濃縮操作(混合法)に準じた(AM-混合法)。AM-混合法は他の 2 法と比較して、セカンドリアルタイム PCR 法で高い NV 検出率を示し、各濃縮法で得られた cDNA 検体に G1 陽性コントロール cDNA を添加してリアルタイム PCR 法で定量した結果、検体の PCR 阻害作用を受けにくく、添加量に近い定量値を示した。さらに、 $>0$  コピー/系を陽性としたリアルタイム PCR 法の結果とセカンドリアルタイム PCR 法の結果の一致率は AM-混合法が最も高かった。以上の結果から、AM-混合法は混合法、個別法と比較し、検体の PCR 阻害作用が少なく実際のコピー数に近い定量値が得られ、検出率も高い上、従来の操作とほぼ同じ手順で実施できることから、カキ混合検体からの NV 濃縮法として有用と考えられた。

キーワード： ノロウイルス、カキ、アミラーゼ処理、PCR 法、定量 PCR 法

### はじめに

ノロウイルス(NV)による食中毒および食中毒様胃腸炎集団発生はカキを原因食品とする事例が多くを占めることから、本ウイルスによる食中毒の予防にはカキの対策が極めて重要であり、そのためには、カキからの迅速・簡便・確実な NV 検出・定量法の確立が前提となる。カキからの NV 検出には現在 nested PCR 法(定性 PCR 法)による定性遺伝子検査およびリアルタイム PCR 法(定量 PCR 法)による定量的遺伝子検査が行われている<sup>1)</sup>が、定性 PCR 法と定量 PCR 法との検査結果の乖離、前処理法の違いによる定量値のバラツキ、インヒビターによる定量値の信頼性、定量 PCR 法における陽性(陰性)限界値の問題など幾つかの問題点が指摘されている<sup>2)</sup>。これらに加え、厚生労働省の NV 検査指針でカキの個別別の検査が推奨されている一方、同一ロットのカキの NV 定量値に個体差があることから個別別の検査では検出率が低くロットの安全性確保ができない場合があり<sup>3)</sup>、複

数のカキを混合した検体からの簡便・確実な濃縮法の開発が望まれている。

一方、カキの検査には中腸腺の切り出しが行われるが、この操作は NV が含まれる中腸腺部分(黒色部分)のみを取り出す目的以外に、検体中に含まれる PCR 阻害物質の混入を極力減らすために不要部分(白色部分)を物理的に取り除く目的を持っている。しかし、白色部分を完全に除去することは不可能であり、また、カキを混合した場合、その混入量が増加し定量 PCR 法による定量値への影響が多いと考えられている。この白色部分の主成分であるグリコーゲンは分子量 100 万~1000 万の多糖類で、アミラーゼ(AM)によってオリゴ糖やデキストランに分解される。従って、AM 消化により化学的にグリコーゲンを除去することで、濃縮検体の精製度が増加し、PCR 阻害物質の混入が減少する可能性が考えられる。そこで今回我々はカキ混合検体からの NV 濃縮操作における AM の有用性を AM 処理を行わない場合およびカキを個別に検査する場合と比較した。その結果、AM 処理を行うと検出率が増加するとともに、検体の PCR 阻害作用が減少し定量値の信頼性が増加する

\*1: 国立感染症研究所

\*2: 退職

ことを認めたので報告する

## 方 法

### 1 供試カキ

カキ加工業者等から採取された原料用カキおよび NV の食中毒原因究明等のため搬入されたカキを検査材料とした。多くのカキ検体は保冷下で搬入され、直接検査に供した。一部のカキ検体は $-30^{\circ}\text{C}$ 以下に凍結保存されたものを用いた。

### 2 カキ中腸腺からのウイルスの濃縮

#### (1) AM-混合法

1 検体について 10 個体程度のカキから中腸腺部分(10g~25g 程度)を切り出し、ストマッキングにより PBS(-)で 10% 乳剤にした後、10,000rpm、30 分、 $4^{\circ}\text{C}$ で遠心分離を行った。その遠心上清に 1/4 量の $\times 5$  ポリエチレングルコール(PEG)溶液(40% PEG6000, 2.5M NaCl)と 50mg の $\alpha$ -AM(和光純薬)を添加し、室温にて一夜スターラーで攪拌し PEG による沈殿と AM による消化を行った。その後、3,000rpm、15 分粗遠心分離を行った上清を 40% ショ糖液 3ml に重層し、27,000rpm、3 時間、 $4^{\circ}\text{C}$ で超遠心分離を行い、沈渣を少量の蒸留水に再浮遊した。

なお、混合法との比較実験では中腸腺 10% 乳剤の遠心分離後の上清を 2 等分し、個別法との比較実験では切り出した各中腸腺を 2 等分し、それぞれの試験に供した。

#### (2) 混合法

AM-混合法の PEG 沈殿操作において、AM の添加を行わず、 $4^{\circ}\text{C}$ で一夜静置したことを除き、すべて AM-混合法と同じ操作で実施した。

#### (3) 個別法

各カキから切り出した中腸腺の半分を個別別に検査した。1/2 量の中腸腺が 1g に満たない場合は 2 個体を混合し 1 検体とした。各中腸腺を PBS(-)10ml でストマッキングにより乳剤を作製し、10,000rpm、30 分、 $4^{\circ}\text{C}$ で遠心分離を行った。その遠心上清を 40% ショ糖液 3ml に重層し、27,000rpm、3 時間、 $4^{\circ}\text{C}$ で超遠心分離を行い、沈渣を少量の蒸留水に再浮遊した。

### 3 濃縮材料からのウイルス RNA 抽出と cDNA 合成

濃縮材料からのウイルス RNA 抽出・DNase 処理は、100  $\mu\text{l}$  を抽出材料とし SV total RNA Isolation System(Promega)を用いて行った。Lysis buffer は 1  $\mu\text{g}$  のキャリア RNA(Qiagen)を添加したものを使

用し、精製 RNA は 40  $\mu\text{l}$  の溶出液に回収した。逆転写反応は厚生労働省の NV 検査指針<sup>1)</sup>に準じ、精製 RNA 液 30  $\mu\text{l}$  を Superscript II (GibcoBRL)を用いて、50  $\mu\text{l}$  の反応液量で  $42^{\circ}\text{C}$ 、60 分反応し、cDNA を合成した。プライマーはランダムヘキサマー (Amersham Pharmacia) と オリゴ dT (Amersham Pharmacia) を用いた。

### 4 NV 検出定量 PCR 法

NV 検出定量 PCR 法は cDNA 検体 5  $\mu\text{l}$  を鋳型として Kageyama らの方法<sup>2)</sup>によるリアルタイム PCR 法で NV 遺伝子 1 群(G1)および NV 遺伝子 2 群(G2)に属するウイルスをそれぞれ特異的に増幅し、検出・定量した。すなわち、G1 は COG1F/COG1R のプライマー組と、RING1-TP(a)、RING1-TP(b) のプローブ、G2 は COG2F/COG2R のプライマー組と RING2AL-TP のプローブを用い、 $54^{\circ}\text{C}$ 、15 分の初期反応後、 $94^{\circ}\text{C}$ 、30 分、 $56^{\circ}\text{C}$ 、1 分のシャトル PCR 反応を 45 回繰り返した。定量値は原則として実測値(cDNA 検体 5  $\mu\text{l}$  に含まれるコピー数)で示した。

### 5 NV 検出定性 PCR 法(セカンドリアルタイム PCR 法)

NV 検出定性 PCR 法は nested PCR 法の 2 回目の PCR 反応をリアルタイム PCR 法で検出するセカンドリアルタイム PCR 法<sup>3)</sup>で行った。すなわち、cDNA 検体 5  $\mu\text{l}$  を鋳型として COG1F/G1SKR あるいは COG2F/G2SKR のプライマー組で ExTaqR(宝酒造)を用い PCR 反応(反応条件は、初期変性反応  $95^{\circ}\text{C}$ 、5 分、PCR 反応  $95^{\circ}\text{C}$ 、30 秒、 $50^{\circ}\text{C}$ 、30 秒、 $72^{\circ}\text{C}$ 、1 分を 35 回、最終伸長反応  $72^{\circ}\text{C}$ 、10 分)を行った後、それぞれの PCR 産物 1  $\mu\text{l}$  を鋳型 DNA として上述のリアルタイム PCR 法を行い、G1、G2 を特異的に検出した。

### 6 陽性コントロールおよび陽性コントロール添加実験

西尾によって作製された G1 あるいは G2 の NV 遺伝子挿入プラスミド(COG1F/G1SKR で増幅した G1 株 DNA 断片あるいは COG2F/G2SKR で増幅した G2 株 DNA 断片)を TA クローニング法により導入したのを持つ大腸菌から、プラスミドを抽出し、OD 値からコピー数を算出後、DW で 10 倍段階希釈し、 $10^8$  コピー/ $5 \mu\text{l}$  ~  $10^0$  コピー/ $5 \mu\text{l}$  の標準 DNA を得た(検量線は  $R=0.99$  以上)。定量 PCR 法には、 $10^8$  コピー/ $5 \mu\text{l}$ 、 $10^4$  コピー/ $5 \mu\text{l}$ 、 $10^2$  コピー/ $5 \mu\text{l}$  の希釈標準 DNA を逆転写反応液(逆転写酵素以外の試薬類を至適濃度含む緩衝液)



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 ( $\mu$ 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)		
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  $\mu$ l に陽性コントロール(PC)16 コピー/ $\mu$ l を 1  $\mu$ 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(μl)*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	
1-6	100	-	0	0.949	0.949	-	0	凍結保存品
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	
2-6	100	-	0	6.04	6.04	+	0	凍結保存品
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
4-4	200	-	0	5.35	5.35	-	0	採取
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			0.0275	5.028	5.001		0	

(次項に続く)

で10倍希釈した $10^5$ コピー/ $5\mu\text{l}$ ,  $10^3$ コピー/ $5\mu\text{l}$ ,  $10^1$ コピー/ $5\mu\text{l}$ 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 $5\mu\text{l}$ にG1 PC DNA( $100$ コピー/ $5\mu\text{l}$ ) $1\mu\text{l}$ 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-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	5-5	200	-	0	1.44	1.44	-	0	06.02.09 採取
	5-6	200	-	0	0.568	0.568	-	0	
	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-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	06.02.09 採取
6	6-5	200	-	0	14.76	14.76	-	0	
	6-6	200	-	0	9.25	9.25	-	0	
	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-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 採取
7	7-6	200	-	0	3.6	3.6	-	0	
	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 $\mu$ lに陽性コントロール16コピー/ $\mu$ lを1 $\mu$ 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 $\mu$ lに標準DNA1 $\mu$ 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 ブールとした 6 検体(60 個体)、6 個を 1 ブールとした 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