

図 3. ナポリタンからのNV回収実験における逆転写時 primer による増幅曲線の違い(1000 倍希釈液で汚染後パントラ法 Ver.1 により濃縮)

表 2. 汚染用NV液希釈濃度別でのNV測定値(パントラ法 Ver.1、PEG沈殿法)

食品	汚染用NV液希釈濃度	バンソルビン・トラップ法 Ver.1 (TRIZOL-LS +RNeasyカラム精製)			PEG沈殿法 (TRIZOL-LS +RNeasyカラム精製)			PEG沈殿法を1としたときの効率(倍)	
		random primer 使用 (測定値*)	特異的 primer 使用 (測定値*)	random primer を1としたときの効率(倍)	random primer 使用 (測定値*)	特異的 primer 使用 (測定値*)	random primer を1としたときの効率(倍)	random primer 使用	特異的 primer 使用
ナポリタン	原液**	3.9E+05	2.5E+07	64.0	1.5E+05	1.5E+06	10.0	2.7	17.0
	10倍希釈	9.9E+03	6.6E+05	67.0	2.3E+03	2.7E+04	12.0	4.3	24.0
	100倍希釈	1.4E+03	1.5E+05	110.0	9.6E+01	1.4E+03	15.0	15.0	110.0
	1,000倍希釈	1.2E+02	1.8E+04	160.0	2.1E+01	1.1E+02	5.5	5.7	160.0
マカロニサラダ	原液**	8.9E+05	4.0E+06	4.5	2.5E+03	1.7E+04	6.9	360.0	240.0
	10倍希釈	1.7E+05	9.6E+05	5.7	7.2E+02	5.3E+03	7.4	230.0	180.0
	100倍希釈	4.9E+03	2.7E+04	5.6	2.0E+01	2.4E+01	1.2	250.0	1100.0
	1,000倍希釈	1.3E+02	9.1E+02	7.1	7.1E+00	1.2E+02	17.0	18.0	7.6
食品なし	原液**	2.4E+06	7.1E+07	30.0	1.3E+04	4.3E+04	3.4	190.0	1600.0
	10倍希釈	2.4E+05	3.8E+06	16.0	7.0E+02	2.1E+03	3.0	340.0	1800.0
	100倍希釈	2.3E+04	2.8E+05	12.0	1.1E+02	1.3E+02	1.1	200.0	2100.0
	1,000倍希釈	1.3E+03	1.8E+04	13.0	1.7E+00	N.D.***	-	750.0	-

*抽出RNA1 μLあたりのコピー数

**表1の再掲

***検出できず

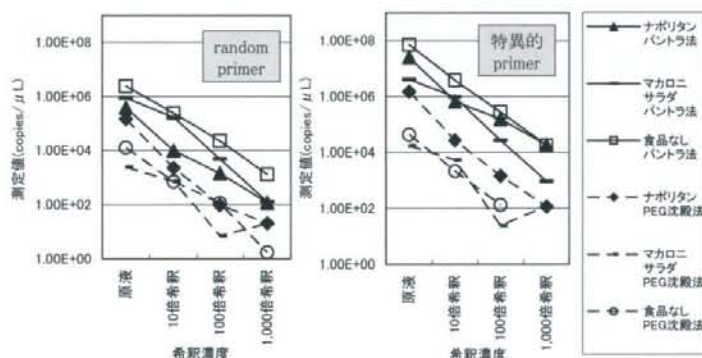


図 4. 段階希釈的に汚染したモデル食品からの NV 回収実験における逆転写 primer による測定値の違い(パントラ法 Ver.1、PEG 沈殿法)

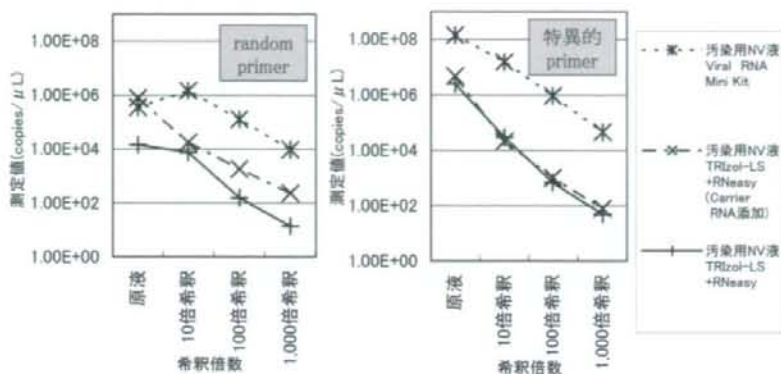


図 5. 汚染用 NV 液(糞便検体)からの RNA 抽出法の比較

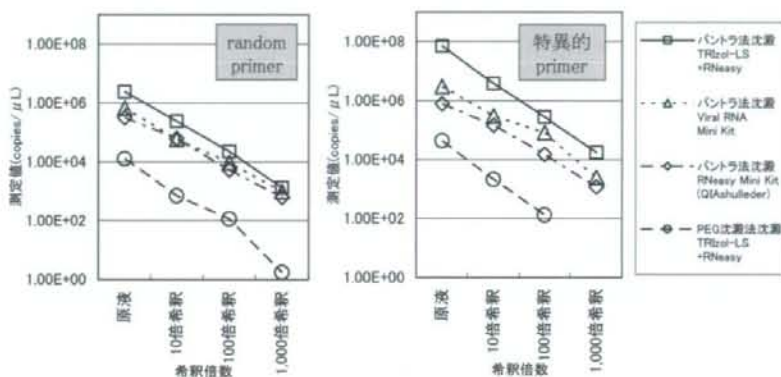


図 6. 濃縮沈澱(食品なし, パントラ法 Ver.1、PEG 沈澱法)からの RNA 抽出法の比較

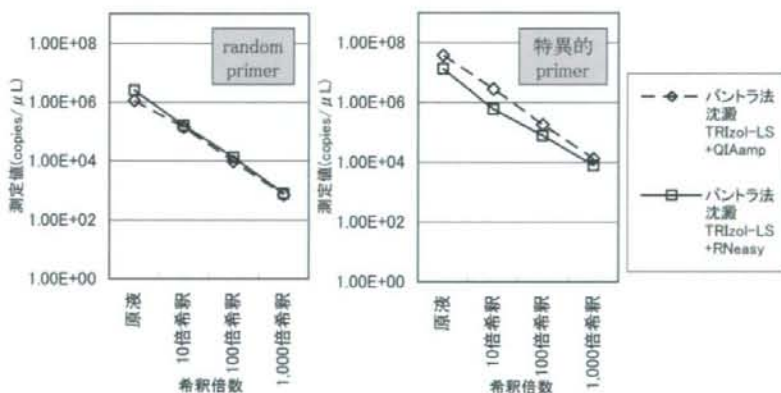


図 7. パントラ法沈澱(食品なし, Ver.2)からの RNA 抽出法(特に精製カラム)の比較

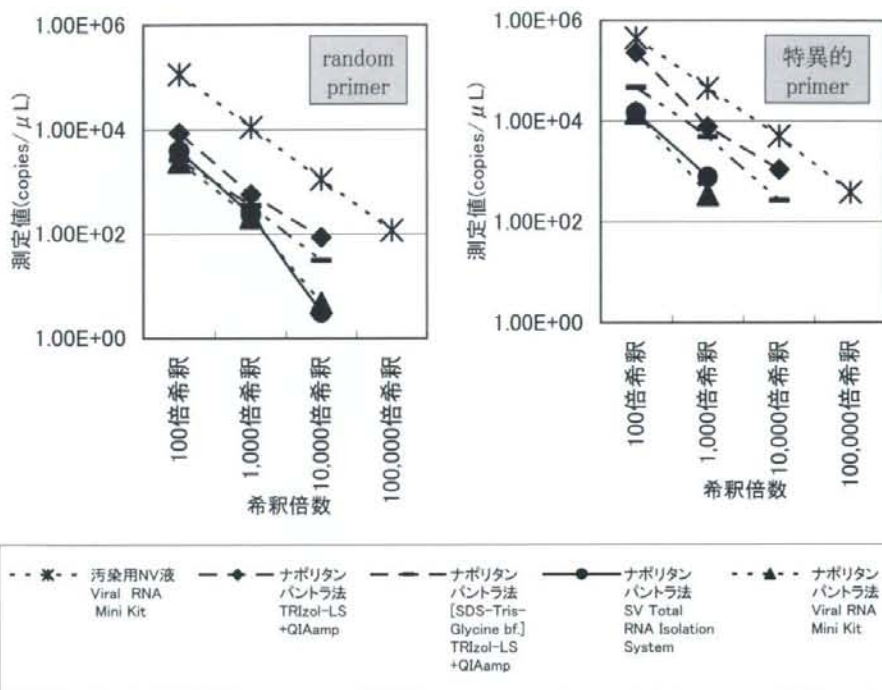


図 8. パントラ法沈殿(ナポリタン,Ver.2)からの RNA 抽出法、食品洗滌液の比較

平成 20 年度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）

「食品中のウイルス制御に関する研究」

研究協力報告書

嘔吐物中のノロウイルス定量および遺伝子解析

研究協力者： 入谷展弘（大阪市立環境科学研究所 微生物保健担当）

研究協力者： 改田 厚、阿部仁一郎、久保英幸

（大阪市立環境科学研究所 微生物保健担当）

分担研究者： 田中智之（堺市衛生研究所）

研究要旨：

昨年度に引き続いて、ノロウイルス患者から採取された嘔吐物に含まれるウイルスの定量および遺伝子解析を実施した。その結果、嘔吐物中には糞便中と同一と考えられるウイルスが多量に排出されていることが示されたが、年齢や遺伝子型によって嘔吐物中に排出されるウイルス量に差は認められなかった。

A. 研究目的

ノロウイルス（NV）は、糞便や嘔吐物中に排出され、一般に糞口感染によって伝播することが知られている。最近では、幼稚園、小学校、ホテルなどの施設内において嘔吐物を介して感染・発生したと考えられる NV 胃腸炎事例の報告も少なくない。しかし、嘔吐物検体の採取が困難なことから、嘔吐物に関するデータは十分とはいえない。NV の感染予防対策には、糞便だけでなく、嘔吐物中の NV についてウイルス量や遺伝子型との関連などを調査し、情報を蓄積することも重要である。昨年度は、大阪市内で過去 7 年間に採取された嘔吐物検体について調査を実施したが、検体数が不十分であり、さら

に調査を継続する必要があった。

そこで、今回も、昨年度と同様に嘔吐物検体について NV の調査を実施し、嘔吐物中の NV についてウイルス量や遺伝子型との関係を明らかにすることを目的とした。

B. 研究材料と方法

1. 材料

2007 年 12 月から 2009 年 1 月の期間に大阪市内で発生した NV 陽性胃腸炎事例の中で、患者嘔吐物が採取された 10 事例患者嘔吐物 27 検体）を対象とした（表 1）。

2. 方法

嘔吐物の NV 検査は、糞便と同様に 10-20% 乳剤から QIAamp Viral RNA mini

kit を用いてウイルス RNA を抽出し、ランダムプライマーで cDNA を作製した。NV の検出および定量は Kageyama らのリアルタイム PCR 法 (JCM 2003, 41, 1548-1557) を用いて行った。NV の遺伝子型別は、Capsid N terminal/S domain 領域において、Katayama らの方法 (Virology 2002, 299, 225-239) に準じて行った。

C. 研究結果

嘔吐物検体が採取された 10 事例のうち、7 事例は集団事例であり、3 事例は散发例であった (表 1)。患者糞便が採取されたのは 8 事例であり、糞便から検出された NV 株は 3 事例が GII. 4 型、2 事例が GI. 4 型であり、GII. 2 型、GII. 3 型および GII. 13 型がそれぞれ 1 事例であり、すべて 1 種類の遺伝子型のみが検出された事例であった。散发例である 08-19 および 08-24 については、同一患者から糞便が採取されず、嘔吐物のみの検査であった。嘔吐物の NV 検査では、4 事例 5 検体 (18.5%) から NV が検出され、糞便の場合 (64.7%) と比較して陽性率は低かった。特に多数 (18 検体) の嘔吐物検体が採取された事例 08-79 においては、NV 陽性となったのが 2 検体 (同一患者の糞便検体なし) のみであった。本事例において同一患者から糞便および嘔吐物の両方が採取されたのは 2 名であり、うち 1 名の糞便のみが NV 陽性であった。したがって、嘔吐物検体のみが採取された患者のほと

んどの NV 感染については不明であり、患者の NV 感染状況が NV 検査結果に影響したのかもしれない。

表 2 に、嘔吐物が採取された 27 例のうち、NV 陰性で同一患者から糞便が採取されなかった 19 例 (事例番号 HC07-14/1 例、08-24/1 例、08-79/16 例、HC08-24/1 例) を除く 8 例のウイルス量を示した。嘔吐物から検出された NV のウイルス量は、 $1.9 \times 10^4 \sim 3.0 \times 10^8$ コピー数/g の範囲で認められ、同患者から採取された糞便中のウイルス量よりも少なかった。2 例の同一患者糞便および嘔吐物から検出された NV 株の塩基配列は、それぞれ一致した (事例番号 07-129、08-37)。また同一患者から糞便が採取されなかった 2 例 (事例番号 08-79) においても、同一事例内の他の患者糞便から検出された NV 株の塩基配列と一致していた。

昨年度の結果も含めて嘔吐物中に含まれるウイルス量について、年齢別 (表 3) および遺伝子型別 (表 4) に比較した。年齢別では、それぞれの年齢層における検体数は少ないものの乳幼児から老人まで幅広い年齢層における嘔吐物中のウイルス量を比較することができた。遺伝子型別では、3 種類の遺伝子型 (GI. 4、GII. 2 および GII. 4) であったが、GI および GII NV におけるウイルス量を比較することができた。その結果、年齢および遺伝子型によって嘔吐物中のウイルス量には、特に差は認められなかった。

D. 考察

今年度得られた結果は、昨年度とほぼ同様であり、嘔吐物中には糞便中と同一と考えられるウイルスが、多量に排出されていることが示された。嘔吐は時間や場所に関係なく起こるため、嘔吐物の適切な処理・消毒が、感染拡大を防止するために重要となる。

約8年間に採取された嘔吐物検体について実施した今回の調査から、幅広い年齢層や複数の遺伝子型別の比較を行うことができた。その結果、嘔吐物中に排出されるウイルス量に差は認められなかったが、得られた検体数は少ないため、今後もデータを蓄積していく必要があると考えられた。

E. 結論 (H19 および H20 年度)

1. NV 患者の嘔吐物中に含まれるウイルス量は、 $1.9 \times 10^4 \sim 3.0 \times 10^8$ (平均 4.7×10^7) コピー数/g の範囲で認められた。
2. 同一患者もしくは同一事例内において、糞便から検出された NV 株と嘔吐物から検出された NV 株の塩基配列は一致していた。
3. 年齢や遺伝子型 (GI 1 種類、GII 2 種類) によって嘔吐物中に排出されるウイルス量に差は認められなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) N Iritani, A Kaida, H Kubo, N Abe, T Murakami, H Venemema, M Koopmans, N Takeda, H Ogura, and Y Seto: Epidemic of genotype GII.2 noroviruses during spring 2004 in Osaka City, Japan. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 2406-2409 (2008)
- 2) N Iritani, H Vennema, JJ Siebenga, RJ Siezen, B Renckens, Y Seto, A Kaida, and M Koopmans: Genetic analysis of the capsid gene of genotype GII.2 Noroviruses, *Journal of Virology* 82, 7336-7345 (2008)
- 3) 入谷展弘, 改田 厚, 阿部仁一郎, 久保英幸, 後藤 薫, 長谷 篤, 仁科展子, 齊藤武志, 森 登志子, 穴瀬文也, 吉田英樹: 2008年11月に保育園で認められたサポウイルスによる胃腸炎の集団発生事例 - 大阪市 -, 病原微生物検出情報 月報 30, 13 (2009)

2. 学会発表

- 1) 入谷展弘, 改田 厚, 久保英幸, 阿部仁一郎, 後藤 薫, 小倉 壽, 勢戸祥介: 1996/97~2007/08 シーズンに大阪市で非細菌性胃腸炎事例から検出されたノロウイルスの分子疫学, 第 56 回日本ウイルス学会, 岡山 (2008. 11. 26-28)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1.患者糞便および嘔吐物からの NV 検査および遺伝子型別結果

事例 番号	発生 年月	発生 場所	推定 原因	患者 数	糞便			嘔吐物		
					検査数	NV 陽性数	遺伝子 型	検査数	NV 陽性数	遺伝子 型
07-129	2007.12	飲食店	食品	19	13	10	GII.4	1	1	GII.4
07-134	2007.12	不明	不明	5	5	2	GII.3	1	0	
HC07-14	2007.12	障害者施設	ヒト→ヒト	23	4	4	GII.4	1	0	
HC08-2	2008.1	幼稚園	ヒト→ヒト	34	3	3	GI.4	1	0	
08-19	2008.1	散発例	不明	-	0	0		1	1	GII.4
08-24	2008.1	散発例	不明	-	0	0		1	0	
08-29	2008.2	不明	不明	24	8	3	GII.13	1	0	
08-37	2008.2	散発例	不明	-	1	1	GI.4	1	1	GI.4
08-79	2008.5	障害者施設	ヒト→ヒト	53	12	7	GII.2	18	2	GII.2
HC08-24	2008.11	保育園	ヒト→ヒト	24	5	3	GII.4	1	0	
合 計					51	33 (64.7%)		27	5 (18.5%)	

表2. 患者糞便および嘔吐物から検出された NV のウイルス量

事例番号	検出された NV 株の遺伝子型	患者年齢	ウイルス量 ^a (コピー数/g)	
			糞便	嘔吐物
07-129	GII.4	成人 ^b	1.4×10^6	1.9×10^4
07-134	GII.3	3 歳	2.9×10^8	NV 陰性
HC08-2	GI.4	幼稚園児	5.7×10^8	NV 陰性
08-19	GII.4	成人 (散発例)	検体なし	3.0×10^8
08-29	GII.13	14 歳	4.6×10^5	NV 陰性
08-37	GI.4	12 歳 (散発例) ^b	4.9×10^9	1.4×10^6
08-79	GII.2	15 歳 ^c	検体なし	8.4×10^4
		17 歳 ^c	検体なし	3.3×10^4

a: 糞便または嘔吐物 1g 中に含まれる NV 遺伝子コピー数

b: 同一患者における糞便および嘔吐物由来 NV 株の塩基配列が一致

c: 同一患者から糞便は採取されなかったが、同一事例内の他の患者糞便から検出された NV 株と塩基配列が一致

表3. 嘔吐物中に含まれるウイルス量(年齢別)

年 齢	陽 性 数	ウイルス量 (平均)
1 歳	2	$1.3 - 1.7 \times 10^7$ (1.5×10^7)
10 代	5	$3.3 \times 10^4 - 1.4 \times 10^6$ (1.1×10^6)
20-60 代	2	$1.9 \times 10^4 - 3.0 \times 10^8$ (1.5×10^8)
70 代	5	$1.0 \times 10^6 - 1.9 \times 10^8$ (7.4×10^7)
不明	1	6.2×10^5
合 計	15	

表4. 嘔吐物中に含まれるウイルス量(遺伝子型別)

遺伝子型	検 査 数	陽 性 数	ウイルス量 (平均)
GI.4	2	1	1.4×10^6
GII.2	22	3	$3.3 \times 10^4 - 8.0 \times 10^5$ (3.1×10^5)
GII.4	19	11	$1.9 \times 10^4 - 3.0 \times 10^8$ (6.4×10^7)
GII.3, GII.13	2	0	
合 計	45	15	

平成 20 年度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)
「食品中のウイルスの制御に関する研究」
分担研究報告

堺市内下水におけるノロウイルスの動態—第 2 報—

研究協力者 内野 清子 (堺市衛生研究所)
分担研究者 田中 智之 (堺市衛生研究所)

研究要旨:

2006 年 4 月から 2008 年 12 月にかけて、堺市内におけるノロウイルス(NV)集団発生及び散発発生から得られた NV 遺伝子 100 株の解析を行った。また、同時期に、堺市内の下水 4 定点から毎月 1 回採水した下水 33 検体、下水処理場の流入水 33 および放流水 33 検体の計 99 検体から得られた NV 遺伝子の解析を行った。

堺市内の NV 遺伝子型別検出状況から GI/1,4,8,10,12,14、GII/2,3,4,5,6,11,13,16 の計 14 種類の多様な NV の浸入・暴露が考えられた。2006/2007 シーズン(06/07)に引き続き 07/08 においても GII/4 が流行の主流であることが推測されたが、その関与割合は減少し、GI 事例が増加する傾向であった。

臨床および環境の両面から NV をみると、感染性胃腸炎の発生に呼応して環境水の NV 遺伝子量は増減していたが、06/07 よりも 07/08 の方が明らかに遺伝子検出量が多く、臨床面での感染性胃腸炎患者の減少と相反した結果であった。感染性胃腸炎患者の減少にも拘らず、環境水での NV 遺伝子量増加をみたことは、NV の遺伝子型によって病原性に差異があることや、発症に至らない不顕性感染者の拡大が考えられた。

また、同時期に集団発生から検出された NV 遺伝子と相同性の高いウイルスが環境中からも検出され、環境汚染と NV 感染症には密接な関連性があることが示唆された。

A. 研究目的:

堺市では、散発・集団発生の感染性胃腸炎患者由来の臨床検体および下水由来の環境検体の両面からノロウイルスの(NV)検出を行っている。2006 年 4 月から 2008 年 12 月にかけて、臨床および環境の両面から検出した NV 浸淫状況から、堺市内における NV 流行の全体像を把握する。

B. 研究材料と方法

1. 材料

1) 集団発生事例および散発発生検体 (2006 年 4 月～2008 年 12 月)

集団発生 40 事例から得られた RT-PCR 法陽性 40 株、散発発生として感染症発生動向調査および小児臨床検体から得られた RT-PCR 法陽性 60 株、合計 100 株を用いた。

2) 環境検体(2006 年 4 月～2008 年 12 月)

堺市内の下水 1 定点(A)と、下水処理場 3 定点(B～D)を示す(図 1)。計 4 定点から毎月 1 回、2000ml 採水した。下水

33 検体、下水処理場の流入水 33 および放流水 33 検体、合計 99 検体を検査対象とした。

2. 方法

1) 集団発生および散发発生臨床検体

NV 陽性株は、NV 遺伝子 Capsid 領域の 5' 側約 280bp の塩基配列を決定し、系統樹解析により遺伝子型を判定した。

2) 環境検体

採取した 2,000ml の水は粗遠心後、上清 1,000ml を分取し、HCl で pH3.5 に調整し、HA フィルター(450 μ l) でウイルスを吸着濾過し、フィルターを細断後、2.0ml の pH10.5 グリシン buffer で溶出を行い、HCl で pH6.5 に調整しサンプルとした。サンプルから QIAamp viral mini RNA キットにて RNA 抽出を行い、DNase I 処理を行った後、random hexamer を用いて Super Script II RT で逆転写し、cDNA 合成を行った。リアルタイム PCR 法による NV 定量では、プライマーは COG1F/COG1R と COG2F/COG2R、プローブはそれぞれ RING1-TPa および RING1-TPb、RING2AL-TP を使い、ABI PRISM 7900 で G I および G II それぞれの NV を測定後、採取水 1ml 当たりのコピー数を算出した。

NV 遺伝子型別検査では、1st PCR は COG1F/G1-SKR、COG2F/G2-SKR を、2ndPCR には G1-SKF/G1-SKR、G2-SKF/G2-SKR を使い、G I および G II それぞれの Capsid 領域を増幅し、十分な遺伝子産物が得られた PCR 産物を TA クローニングベクターに挿入して Capsid 領域 5' 側約 280bp の塩基配列を決定した。

また、系統樹は近隣結合法によって

作製した。

C. 研究結果

1) 2006 年 4 月から 2008 年 12 月の臨床検体からの NV 遺伝子型別検出状況を示す。

集団発生状況をみると、遺伝子型は GI/4,8,12、GII/3,4,6,13 の 7 種類の関与がみられた(図 2)。06/07 は 24 事例中 22 事例が GII/4 で 92%と殆どを占め、GI 事例はなかったが、07/08 は 15 事例中 9 事例が GII/4 で 60%と減少し、次いで 3 事例が GI/4、2 事例が GI/8 で GI 事例が計 5 事例 33%と増加した。08/09 は 1 事例の発生のみで GII/4 事例であった。

散发発生状況をみると、遺伝子型は GI/1,8,12、GII/2,3,4,13 の 7 種類が関与していた(図 3)。06/07 では検出総数は 43 あり、GII/4 検出例が 39 で 91%を占めたが、07/08 では検出総数 16 と減少し、GII/4 検出例が 11 で 69%であった。

2) 採取した下水の NV GI リアルタイム

PCR 測定結果を示す(図 4)。

ほぼ感染性胃腸炎流行に呼応して増加がみられた。06/08 に比べ、07/08 シーズンの遺伝子量がどの定点においても増加していた。最も高い遺伝子量を検出したのは 2008 年 3 月 A 定点の下水で 161 copy/ml であった。また、流入水と塩素処理後水を比べると、塩素処理後水の方が約 1/5 から 1/10 以下に低減していた。

3) 採取した下水の NV GII リアルタイム

PCR 測定結果を示す(図 5)。

ほぼ感染性胃腸炎流行に呼応して増加がみられた。NV の全体的な推移をみると、06/08 に比べ 07/08 の遺伝子量がどの定点においても増加していた。最も

遺伝子量が高かったのは、06/07では12月C定点の流入水で730copy/ml、07/08では12月B定点の流入水で10,931copy/mlであった。流入水と放流水を比較すると、概ね、1/5から1/100に減少していたが、2008年5月では殆ど変化せず放流していた。

4) 下水定点におけるNV遺伝子型別検出状況を示す(図5)。

06/07ではGI/1, GII/2,3,4,5,6の6種類が検出され、最も頻度高く検出されたのはGII/4であった。07/08ではGI/1,4,10,14, GII/2,3,4,6,11,13,16の計11種類の多様なNVが検出された。最も頻度が高かったのはGII/4であったが、GI/4, GII/3, GII/6も頻度高く検出されていた。

5) 臨床および環境検体からのGI/4, GII/3, GII/4系統樹を示す(図7~9)。

それぞれの遺伝子塩基配列を解析すると、同時期に集団発生から検出されたNV遺伝子と相同性の高いウイルスが環境中からも検出されていた。

D. 考察

2006年4月から2008年12月にかけて、堺市内のNV遺伝子型別検出状況をみると、臨床検体ではGI/1,4,8,12, GII/2,3,4,6,13の計9種類が関与し、環境検体ではGI/1,4,10,14, GII/2,3,4,5,6,11,13,16の12種類が検出された。この結果から市全体としては少なくとも、14種類の多様なNVの浸入・暴露が考えられた。臨床面では、06/07はGII/4が約9割を占めていたが、07/08では事例数が減少し、GII/4の割合も約6割と減少したしかし、他の遺伝子型NV

の関与例が増加し、特にGI事例の増加がみられた。環境水のNVリアルタイムPCR測定結果では、GIおよびGIIともに、ほぼ感染性胃腸炎流行に呼応して増加がみられ、NV遺伝子のコピー数は、GIよりもGIIの方が高かった。しかし、06/07よりも07/08のほうが、遺伝子検出量が多く、臨床面の感染性胃腸炎患者減少と相反した結果であった。環境面のNV遺伝子型別検出状況では、06/07では6種類のNVが検出され、特に、GII/4は全域から検出された。07/08では11種類と多様な遺伝子型が検出され、GII/4も全域から検出されたが、GI/4, GII/3, GII/6なども高頻度で検出された。これらのことから、GII/4は依然として流行の主流であることが推測された。感染性胃腸炎患者の減少にも拘らず、環境水ではNV遺伝子量が増加しており、NV遺伝子型によって、病原性に差異があることや、発症に至らない、不顕性感染者の拡大が考えられた。

環境水由来のNV遺伝子塩基配列を解析すると、同時期に集団発生から検出されたNV遺伝子と相同性の高いウイルスが環境中からも検出され、環境汚染とNV感染症には密接な関連性があることが示唆された。

E. 結論

臨床と環境の両面から堺市内のNV流行の全体像、その関連性について検討した。今回の調査から、2006年以来、流行の主流であったGII/4は依然として優位であったが、その割合は低下した反面、多種のNVが関与する頻度が増加していることが環境NV調査から推定された。

NV感染状況と地域社会でのNV汚染度とは必ずしも一致しない可能性が考え

られるが、低流行であっても、環境NV検査を一つのモニタリングとして予防対策に万全をとることが必要と思われる。感染の全体像を把握し、感染防止に役立つよう今後も調査を継続する予定である。

謝辞

本研究班に研究協力者として参加できる機会を与えていただきました本研究主任者 国立感染症研究所 ウイルスII部 武田直和先生に深謝いたします。本調査研究にご協力頂きました堺市下水道部、当所微生物グループの皆様に深謝致します。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 誌上発表

- (1) Kazushi Motomura, Tomoichiro Oka, Masaru Yokoyama, Hiromi Nakamura, Hiromi Mori Hiroataka Ode, Grant S.Hansman, Kazuhiro Katayama, Tadahito Kanda, Tomoyuki Tanaka, Naokazu Takeda, Hironori Sato and the Norovirus Surveillance Group of Janan include Shima Yoshizumi, Toshiyuki Mikami, Hiroyuki Saito, You Ueki, Takenori Takizawa, Kiyoko Uchino, Mamoru Noda, Reiko Kondo, Yumiko Matsuoka, Sadayuki Funatsumaru and Shinichi Kobayashi.

Identification of monomorphic divergent haplotypes in the 2006-2007 norovirus GII/4 epidemic population by genomewide tracing of evolution history. *J.Virol.*200 8; 82(222), 11247-11262

2) 学会発表

- (1) Tomoyuki TANAKA¹⁾, Daisuke KATO²⁾, Kunio KAMATA²⁾, Tatsuya MIYOSHI¹⁾, Kiyoko UCHINO¹⁾, Hisaaki YOSHIDA¹⁾, Hitoshi TAJIRI³⁾, Masumi OKUDA⁴⁾, Yoshiko NAKAYAMA⁵⁾, Yoshiro HIRAYAMA²⁾, Noritoshi KITAMOTO⁶⁾, Grant S. Hansman⁷⁾ and Naokazu TAKEDA⁷⁾

A First Authorized Immunochromatography Kit for Rapid Norovirus Diagnosis

The 7th China Japan International Conference of Virology 2008, Tokyo

- (2) 高橋幸三、三好龍也、内野清子、田中智之

自動核酸抽出機を用いたノロウイルス遺伝子検出の試み

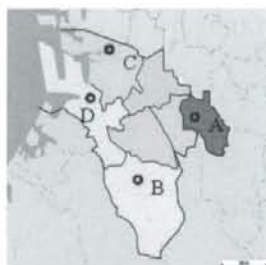
第56回日本ウイルス学会学術集会 2008年10月 岡山市

- (3) 加藤大介、三好龍也、内野清子

鎌田公仁夫、高橋幸三、武田直和、
田中智之
改良 Immunochemistry 法に
よるノロウイルス抗原検出
第 56 回日本ウイルス学会学術集会
2008 年 10 月 岡山市

H. 知的財産権の出願・登録状況
出願中

図 1. 堺市内 下水採水定点



A : 下水採取地点 (マンホール)
B~D : 下水採取定点 (下水処理場)

図 2. NV遺伝子型別集団発生状

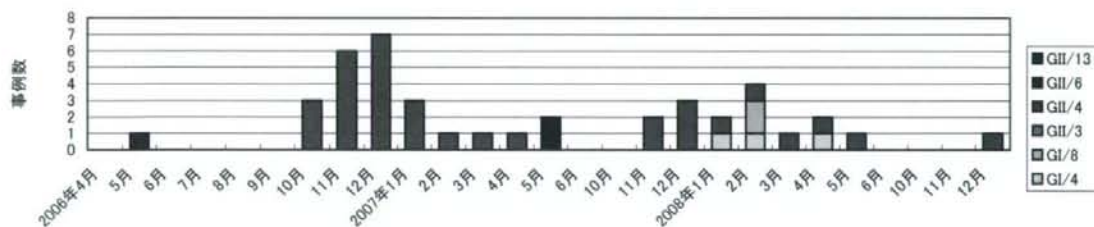


図 3. NV遺伝子型別散発発生状況

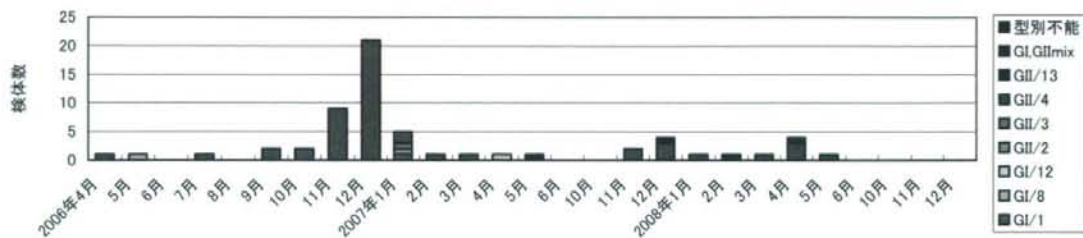


図 4. NV GI リアルタイム PCR 測定結果

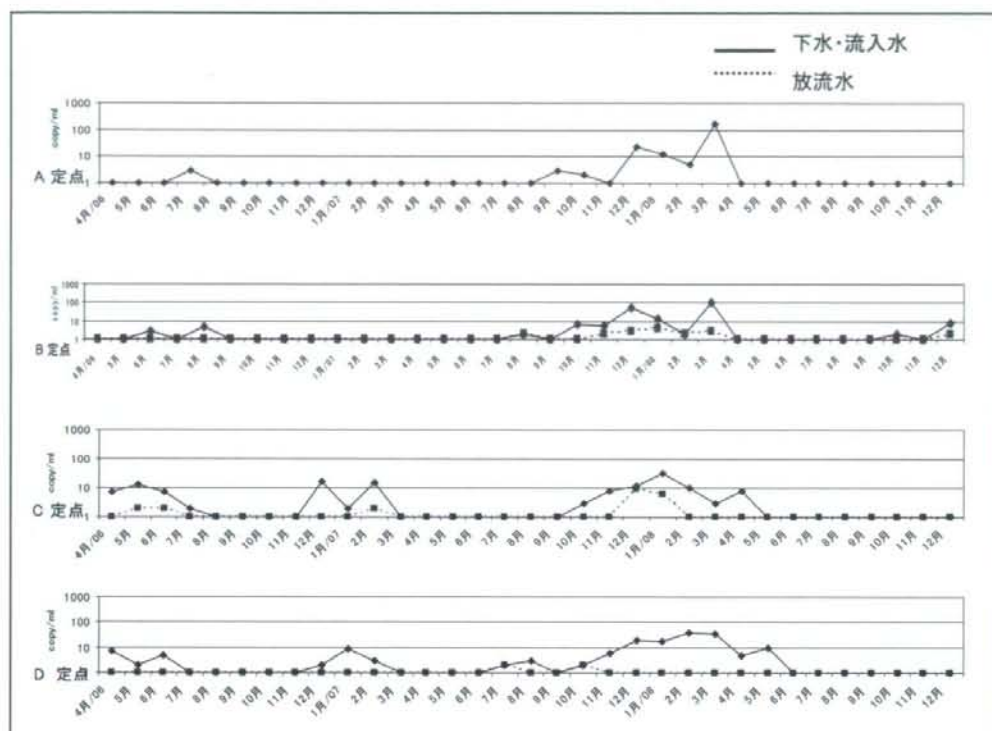


図 5. NV GII リアルタイム PCR 測定結果

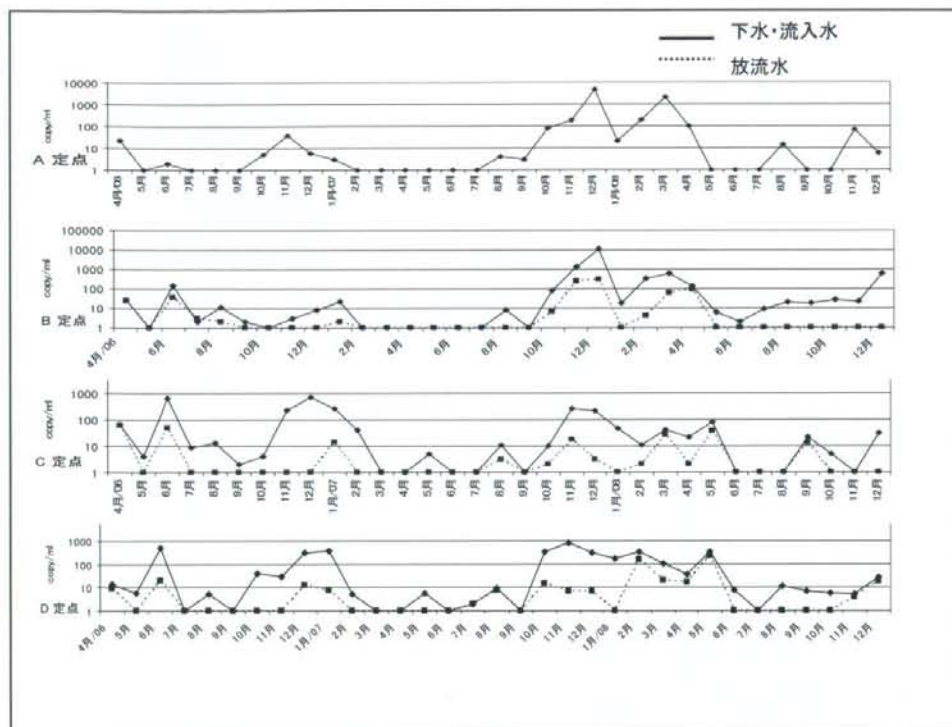


図 6. 環境定点における NV 遺伝子型別検出状況

	A 下水	B 下水処理場	C 下水処理場	D 下水処理場
2006年 4月	GI/3 GI/4	GI/3 GI/4	GI/4 GI/6	GI/4 GI/5 GI/6
2006年 6月	GI/4	GI/4 GI/5	GI/2 GI/3 GI/4	GI/4
2006年 11月			GI/1 GI/4	GI/1 GI/4
2006年 12月			GI/4	GI/4
2007年 1月			GI/4	GI/4
2007年 2月			GI/1 GI/4	
2007年 10月		GI/1 GI/4 GI/10	GI/4 GI/6	GI/3 GI/4 GI/6 GI/13
2007年 11月	GI/3	GI/10 GI/14 GI/3 GI/4	GI/4 GI/3 GI/4	GI/4 GI/10 GI/4
2007年 12月	GI/1 GI/4	GI/4 GI/3 GI/4	GI/4 GI/10 GI/3 GI/4 GI/6	GI/4 GI/4 GI/6
2008年 1月	GI/1 GI/4 GI/4	GI/4 GI/3 GI/4 GI/6	GI/4 GI/6	GI/4 GI/6
2008年 2月	GI/4 GI/13	GI/1 GI/4 GI/4 GI/16	GI/1 GI/4 GI/3 GI/4 GI/13 GI/16	GI/4 GI/4 GI/11 GI/16
2008年 3月	GI/4	GI/4 GI/10	GI/4 GI/4	GI/1 GI/4 GI/10 GI/14 GI/4 GI/16
2008年 4月	GI/4	GI/2 GI/4 GI/13	GI/3	GI/2 GI/4 GI/13
2008年 5月			GI/2 GI/3 GI/4 GI/6	GI/4 GI/2 GI/4 GI/16

図 7. GI/4 系統樹

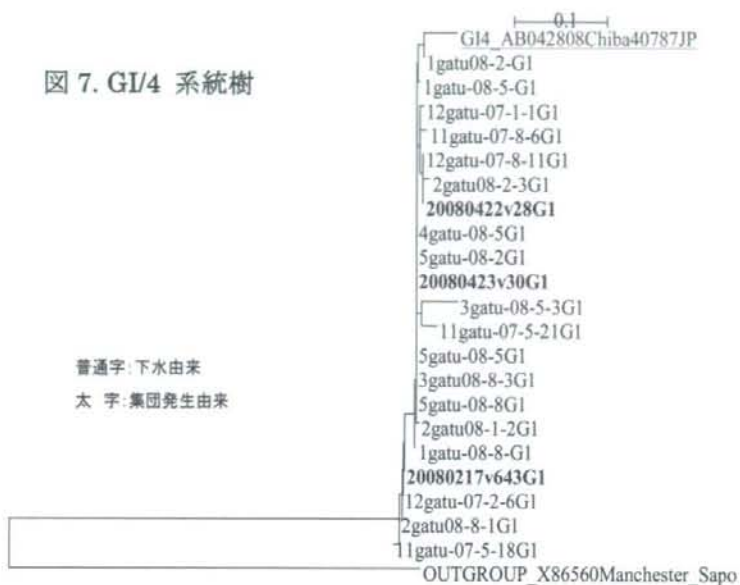
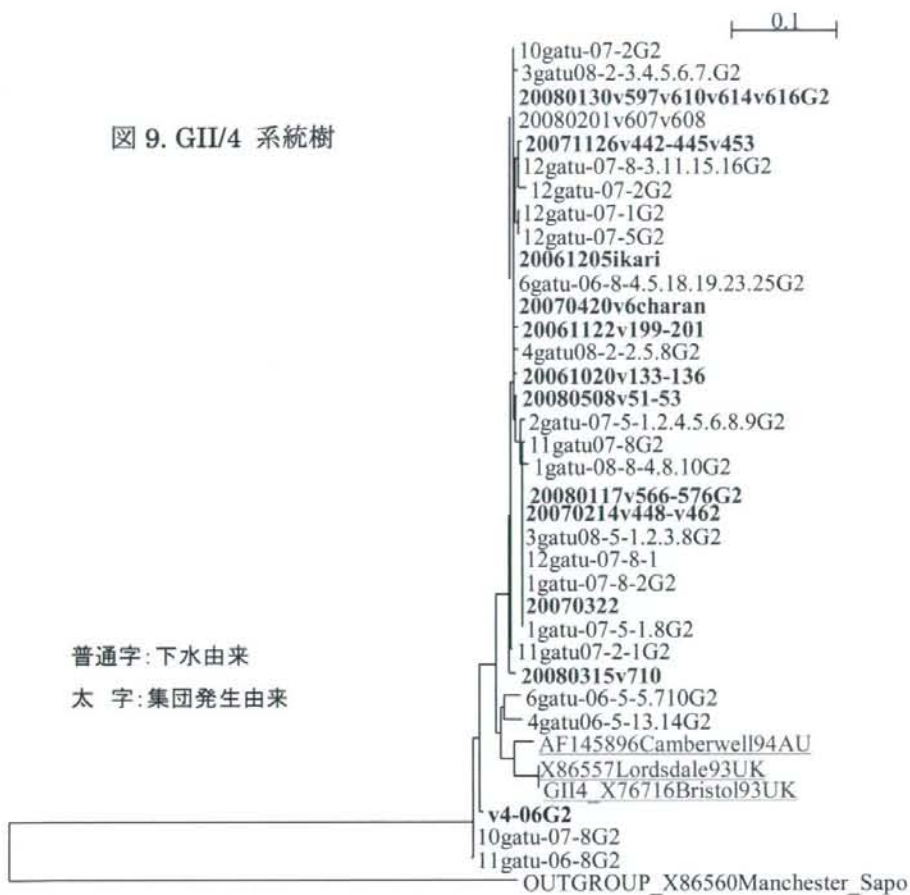


図 8. GII/3 系統樹



図 9. GII/4 系統樹



平成 20 年度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)
「食品中のウイルスの制御に関する研究」
協力研究報告書

むき身アサリを原因とするサポウイルスとノロウイルスの複合食中毒事例

研究協力者 飯塚節子(島根県保健環境科学研究所)
分担研究者 田中智之(堺市衛生研究所)
研究協力者 小村珠喜、田原研司(島根県保健環境科学研究所)

研究要旨: 2008 年6月、A 飲食店で食事をした3グループと翌日 A 飲食店の仕出し料理を自宅で食べた1グループで胃腸炎の集団発生が起こった。喫食者 50 名中 38 名が発症し、喫食者 24 名(発症者 23 名、非発症者1名)中 18 名(発症者 17 名、非発症者1名)と飲食店の料理に使われた中国産冷凍むき身アサリの中腸腺と保存液から RT-PCR 法やリアルタイム RT-PCR 法でサポウイルス(SaV)、ノロウイルス(NV)Genogroup I (G I)、NVG II が単独あるいは複合で検出された。増幅産物の塩基配列を決定し比較したところ、ヒト由来とアサリ関連由来との相同性は SaV で 99.3~100%、NVG I で 98.6~99.7%、NVG II で 99.3%と同一もしくは極めて類似の配列を持つ株が検出された。

遺伝子解析から二枚貝を原因とする SaV と NV の食中毒を証明した。

A. 研究目的

SaV は従来乳児の感染性胃腸炎の原因ウイルスの一つと認識されていたが、遺伝子検査法の開発で検出スペクトル、感度の向上と共に 2007 年には国内でも SaV を原因とする集団発生報告が散見されるようになった。しかし、感染源、感染経路に関しては不明な点が多い。今回、2008 年6月に発生した SaV と NV の複合食中毒事例について感染源の究明を目的に推定原因食材からのウイルス検出を試み、遺伝子解析を行った。

B. 研究材料と方法

1. 材料

1) 事件の概要

2008 年6月6日に飲食店 A で喫食した3グループ(A,B,C)39 名中 30 名、6月7日に A が料理した仕出しを自宅で喫食した1グループ(D)11 名中 8 名が6月6日から6月9日の間に胃腸炎症状(水様性下痢・腹痛・嘔吐嘔気・発熱・頭痛)を呈した(表1)。6月6日に発症したグループはいずれも冷凍むき身アサリを使用した料理(サーモンあさりのグラタン)を供されており、喫食者の情報からグラタンにはいっていたタマネギが生であったことが明らかとなった。また、6月7日