

図 3.臨床検体から得られた NV 遺伝子型別検出状況

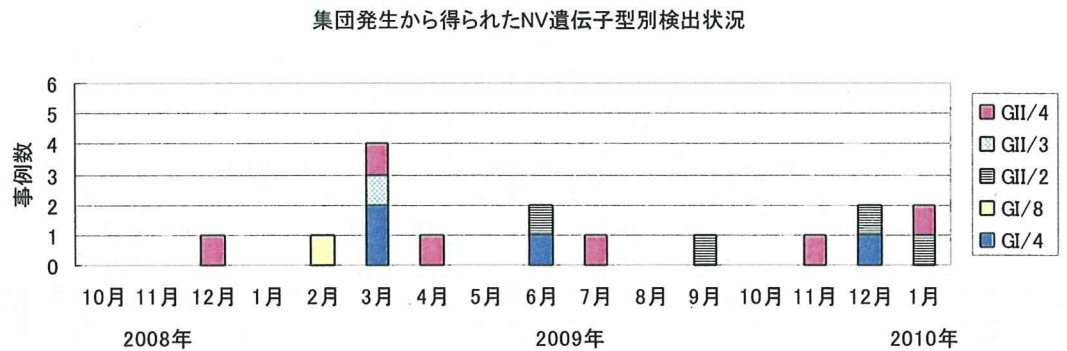
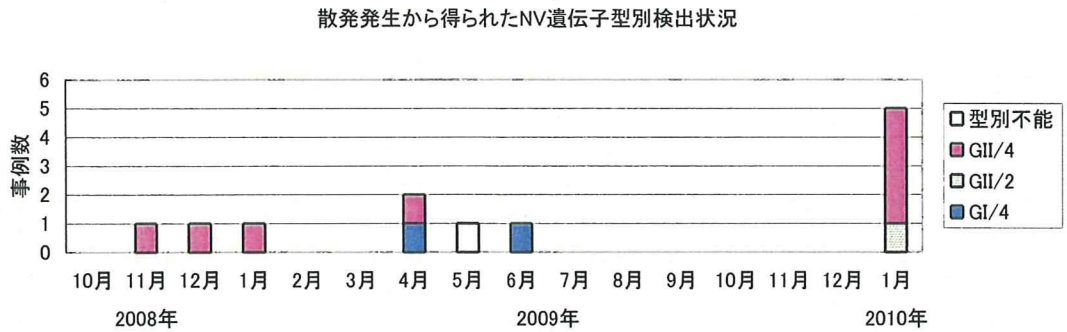


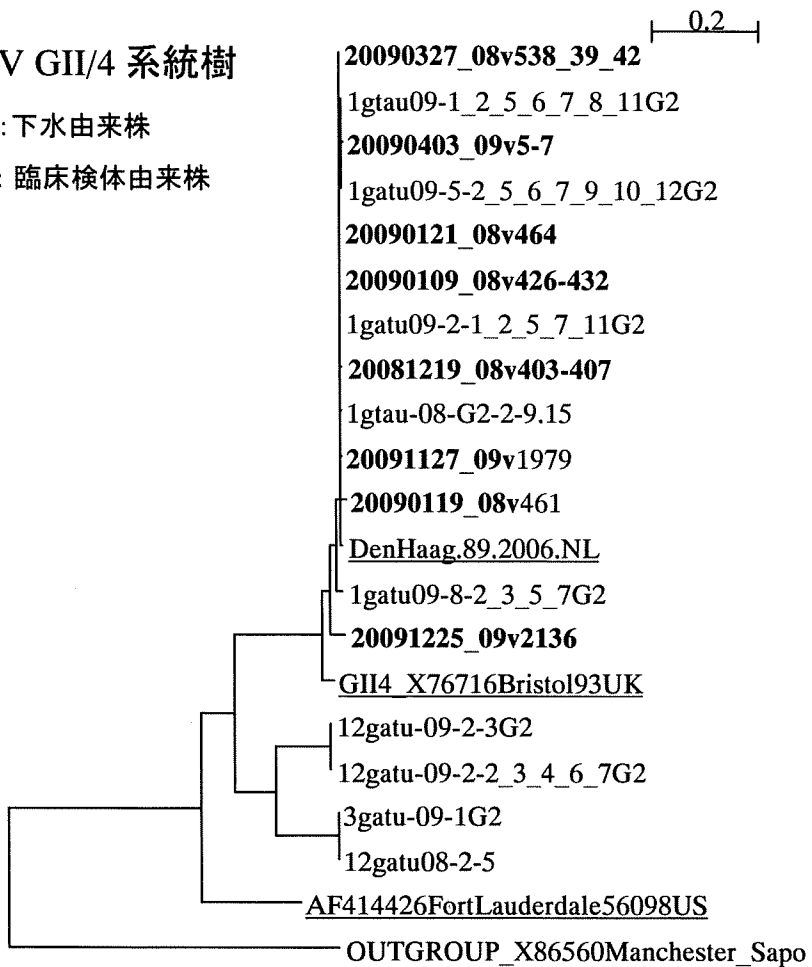
表 1. 環境検体から検出された NV 遺伝子型

検出時期	A下水	B下水処理場	C下水処理場	D下水処理場
2008年12月		GII/4	GI/4	GI/8 GII/4
2009年 1月	GII/4	GII/4	GII/4	GII/4
3月	GII/12			
12月		GII/2 GII/4		

図4. NV GII/4 系統樹

普通字:下水由来株

太字:臨床検体由来株



平成 21 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」

研究協力報告書

二枚貝関連事例におけるウイルス検査の問題点

研究協力者 飯塚節子 (島根県保健環境科学研究所)

研究分担者 田中智之 (堺市衛生研究所)

研究協力者 岡 智一郎 (国立感染症研究所)

研究代表者 野田 衛 (国立医薬品食品衛生研究所)

研究要旨: 二枚貝関連事例の検体について使用する PCR 酵素による増幅の違いおよび DNase 処理の有無がノロウイルス、サポウイルス検出に及ぼす影響を検討した。その結果、3 種類の PCR 酵素は増幅効率に差が認められた。また、PCR 増幅産物をクローニングし塩基配列を解析したところ、塩基配列パターン数は PCR 酵素の種類により異なり、配列が一致しない場合があった。DNase 処理については食品等ウイルス量の少ない検体からノロウイルス、サポウイルス遺伝子を検出する場合、DNase 処理操作により検出率が低下する場合があります、低下の程度は試薬により差があることが明らかとなった。

A. 研究目的

食中毒事例において検出されたウイルスの遺伝子解析によってウイルス株の異同を判断することが行政的にも求められるようになった。しかし、塩基配列の比較は一般に PCR 産物を用いて行われるが、使用する試薬 (PCR 酵素) は考慮されることが少ない。また、昨年度の研究結果からアサリ中腸腺からのノロウイルスやサポウイルスの検出において DNase 処理により検出率が低下した。

そこでこれらのことが実際の検体検査でどの程度影響があるのかを明らかにすることを目的に検討を行った。

B. 材料と方法

1. 材料

2008 年 6 月に発生した冷凍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混合感染事例の患者検体および冷凍むき身アサリの中腸腺 (H20 年度本班報告書に記載) を用いた。アサリ中腸腺は冷凍むき身 1kg 入り 3 袋 (アサリ 1、アサリ 2、アサリ 3) について各袋 20 個のむき身から中腸腺を取り出した 1/2 量 (約 0.05g) を用い、ノロウイルス、サポウイルスのウイルス検出をおこなった。

2. 方法

1) Polymerase による増幅の違い

急性胃腸炎患者糞便検体 cDNA から TaKaRa Ex Taq (TaKaRa)、Expand High Fidelity^{PLUS} (Roche)、KOD-PLUS-(TOYOBO) の 3 種類の PCR 酵素を用いてノロウイルス、サポウイルスの capsid コード領域を

増幅した。その後、PCR 増幅産物を pCR2.1 ベクターにクローニングし、各サンプル 4 クローンについて塩基配列を決定した。一部の検体についてはダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。

2) アサリ中腸腺からのウイルス検出における DNase I 処理の影響

中腸腺から抽出した RNA を DNase I (RNase-free) (TaKaRa)、TURBO DNA-free Kit (Ambion) を用いて DNase 処理をおこなった後、cDNA 合成、ノロウイルス、サポウイルスの検出をおこない、DNase 未処理の場合と検出率を比較した。DNase 処理の方法は DNase I の場合は「ノロウイルスの検出法」(食安監発第 0514004 号平成 19 年 5 月 14 日付け) に準じ、DNase 処理混合液を作成後 37°C15 分、75°C5 分、4°C の反応をおこなった。TURBO DNA-free Kit の場合は添付のプロトコールに従った。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1) Polymerase による増幅の違い

SaV は 10 検体、NV は G I、G II 各 4 検体について比較した結果、サポウイルス検出系、ノロウイルス検出系とも検出率は ExTaq が最も高く、次いで KOD Plus⁻、Expand High Fidelity^{PLUS} の順であった(表 1)。

複数の酵素で陽性となった検体の PCR 増幅産物 4 クローンの塩基配列パターン数は ExTaq で増幅した場合の配列パターン数が多い傾向が認められた(表 2)。3 種類の酵素すべてで増幅可能であり、ダイレクトシーケンスも可能であった 6 サンプル(サ

ポウイルス D1734, D1737, ノロウイルス D1716, D1734, D1741, D1725) は酵素間での配列の違いはなかった。

2) アサリ中腸腺からのウイルス検出における DNase I 処理の影響

サポウイルス、ノロウイルスいずれの検出率とも TaKaRa の DNase I 処理をしない場合の方が高く、サポウイルスの場合 3~4 倍、ノロウイルスの場合 1.6~2.8 倍の差がみられた(表 3)。しかし、DNase 未処理の場合、PCR 増幅産物を電気泳動すると非特異バンドが認められる頻度が DNase 処理検体より高く、シーケンス解析が煩雑あるいは困難となる例が認められた。

そこで、DNase I の不活化に加温操作を伴わないキット TURBO DNA-free Kit を加え検討した。予備実験としてノロウイルス G II 陽性患者便から RNA 抽出をおこない、2 種類の DNase 試薬で DNase 処理をおこなった後、リアルタイム RT-PCR で RNA 定量値を測定し、未処理の場合と比較した結果、DNase I 処理は未処理の 1/2 程度の RNA 定量値となったが、TURBO DNA-free Kit 処理は未処理と同程度の定量値であった(図?)。

次に TURBO DNA-free Kit を用いてアサリ 3 の検体についてウイルス検出をおこなった結果、DNase 未処理に近い検出率となった(表 4)。さらに DNase I、TURBO DNA-free Kit、未処理のいずれでも陽性となった 4 検体(ノロウイルス G I、G II 各 2 検体)についてリアルタイム PCR をおこなったところ、リアルタイム PCR の実測値はいずれの検体でも TURBO DNA-free Kit が最も高値となった(表 5)。

D. 考察

二枚貝関連事例のように複数のウイルス(型)が検出される場合、PCR 増幅産物をクローニング後、何クローンかについて遺伝子解析を行い検出ウイルス間の関連性を考察するが、使用する PCR 酵素の影響を調べた報告は少ない。今回、同一検体を 3 種類の Polymerase で増幅した産物をシーケンスしたところ、ダイレクトシーケンスでは塩基配列に違いが認められなかったにもかかわらず、4 クローンの配列パターン数に差があった。このことは PCR 酵素の特性を反映した結果と考えられる。地研での検査に多用されている ExTaq は今回検討した 3 種類の酵素の中では検出効率が高く、原因ウイルスの検出には適した酵素であるが、クローンの塩基配列パターン数が多くなるという特性があることを念頭に遺伝子解析結果を解釈する必要がある。

DNase 処理はふん便や食品からの RNA ウイルス遺伝子の検出に常用されている操作である。厚労省の通知法に記載されている試薬を用いた場合、RNA の定量値が 1/2 程度に低下した。検体中のコピー数が多い患者ふん便等の場合はこの程度の低下は検出率の低下につながらないが、食品や環境由来検体のようにウイルス量がリアルタイム PCR での検出限界値レベル(10 コピー前後)の場合は検出率の低下を引き起こす可能性がある。アサリ中腸腺からのウイルス検出において DNase 未処理の検出率が高かったのはこのためと考えられた。しかし、PCR 法における非特異反応の軽減をはかるには DNase 処理は有効である。今回、比較検討した TURBO DNA-free Kit は RNA 定量値の低下がほとんど認められず、中腸腺からのウイルス検出率の低下も少なかった。さらに、

リアルタイム PCR の実測値が高かったことから阻害物質も除去されていることが推察された。

したがって、ウイルス量の少ない検体からノロウイルスやサポウイルスを検出する際は DNase 処理が検出率に影響を与え得ることも考慮する必要がある。

E. 結論

1. TaKaRa Ex Taq (TaKaRa)、Expand High Fidelity ^{PLUS} (Roche)、KOD-PLUS-(TOYOBO) の 3 種類の Polymerase を使用して患者ふん便からの SaV、NV 検出をおこなった結果、ExTaq が最も検出効率が高かった。
2. 同一検体の PCR 増幅産物をクローニングし塩基配列を決定した場合、酵素間で配列が一致しない場合があったので、酵素の特性を加味して結果を解釈する必要がある。
3. 食品等ウイルス量の少ない検体から RNA ウイルスを検出する場合、DNase 処理操作によって検出率が低下する可能性があることが明らかとなった。ただし、加温によらない酵素の不活化をおこなう DNase 試薬は RNA 定量値の低下がほとんど認められず、中腸腺からのウイルス検出率も DNase 未処理と同等であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 1) 紙上発表

Setsuko Iizuka, Tomoichiro Oka,

Kenji Tabara , Tamaki Omura,
Kazuhiko Katayama, Naokazu Takeda
and Mamoru Noda : Detection of
sapoviruses and noroviruses in an
outbreak of gastroenteritis linked
genetically to
shellfish. (J. Med. Virol. in press.)

2) 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 各種酵素による検出結果

SaV

酵素名	ExTaq	Expand High Fidelity PLUS	KOD-Plus-
プライマー	F22/R2	F22/R2	F22/R2
D1711	+	-	-
D1718	+	-	+
D1729	+	+	+
D1732	+	-	+
D1734	+	+	+
D1737	+	+	+
D1743	+	-	+
D1736	+	+	+
D1738	+	+	+
D1739	+	+	+
D1741	+	+	+

NV GI

酵素名	ExTaq	Expand High Fidelity		KOD-Plus-	
プライマー	COG1/G1SKR	COG1/G1SKR	G1SKF/R	COG1/G1SKR	G1SKF/R
D1716	+	+	+	+	+
D1734	+	+	+	+	+
D1741	+	-	+	+	+
D1742	+	+	+	+	+

NV GII

酵素名	ExTaq	Expand High Fidelity		KOD-Plus-	
プライマー	COG2/G2SKR	COG2/G2SKR	G2SKF/R	COG2/G2SKR	G2SKF/R
D1712	+	-	+	+	+
D1714	+	-	+	+	+
D1725	+	-	+	-	+
D1743	+	+	+	+	+

表2. クローニング後のシーケンスパターン数

検体No.	使用primer	Polymerase		
		ExTaq	Expand High Fidelity PLUS	KOD-PLUS
D1718	SVF22/R2	3	-	2
D1729	SVF22/R2	2	-	1
D1732	SVF22/R2	1	-	1
D1734	SVF22/R2	2	2	1
D1737	SVF22/R2	3	2	1
D1738	SVF22/R2	4	-	1
D1716	COG1F/SKR	2	1	1
D1734	COG1F/SKR	2	2	1
D1741	COG1F/SKR	2	-	-
D1741	G1SKF/SKR	-	1	1
D1712	COG2F/SKR	2	-	1
D1743	COG2F/SKR	2	-	2
D1725	COG2F/SKR	2	-	-
D1725	G2SKF/SKR	-	2	1

表3.アサリ中腸腺からのサポウイルスとノロウイルスの検出状況

	DNase処理	SaV	NV G I	NV G II
アサリ1 プール	DNase I	—	—	5.8x10 ³
	無	+	—	+
アサリ2 プール	DNase I	—	—	+
	無	—	—	+
アサリ3 プール	DNase I	—	+	—
	無	—	+	—

	DNase処理	SaV	NV G I	NV G II
アサリ1 個々	DNase I	3/20	6/20	9/20
	無	11/20	14/20	15/20
アサリ2 個々	DNase I	2/21	5/21	5/21
	無	8/21	11/21	12/21
アサリ3 個々	DNase I	3/20	6/20	8/20
	無	9/20	17/20	16/20

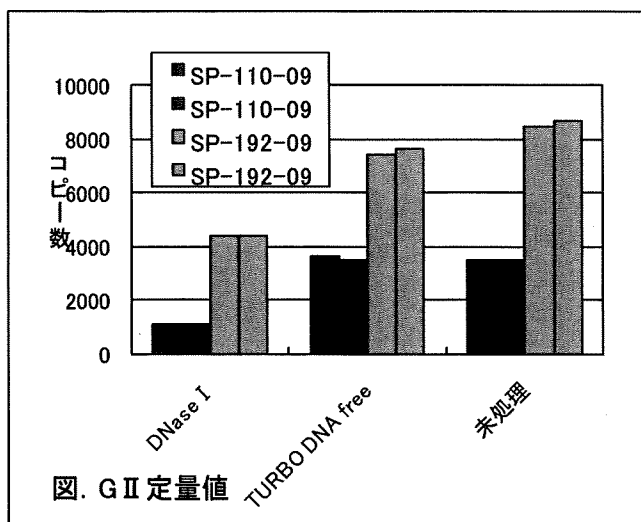


図. GII 定量値

表4. conventional RT-PCR(nested)による陽性数

	DNase処理	SaV	NV G I	NV G II
アサリ3 個々	DNase I	3/20	6/20	8/20
	無	9/20	17/20	16/20
	TURBO DNA free	7/20	15/20	13/20

表5. real-time RT-PCRによる検出

検体名-検出系	DNase処理	実測値
3-2-NVG I	DNase I	NT
	無	NT
	TURBO DNA free	1.89
3-12-NVG I	DNase I	NT
	無	1.78
	TURBO DNA free	1.89
3-7-NVG II	DNase I	0.301
	無	1.72
	TURBO DNA free	2.31
3-18-NVG II	DNase I	0.264
	無	0.451
	TURBO DNA free	0.912

ノロウイルス遺伝子型 GII.4 の遺伝子学的変化と特徴

研究協力者: 福田 伸治 (広島県立総合技術研究所保健環境センター)

研究分担者: 田中 智之 (堺市衛生研究所)

研究要旨:

ノロウイルス集団感染事例などの優勢な流行型である GII.4 にはウイルス粒子の最も外側に位置する P2 サブドメインを中心に年代順に遺伝子学的特徴および変化が観察された。特にアミノ酸残基 296-298, 393-395 および 412-414 番目は variant-specific エピトープと推定され、年代順に特徴的な変化が観察された。また、変異の比較的少ないとされる N/S ドメインにも年代順の特徴および変化が観察された。これらの年代順の変化は抗原性、感染効率などに影響していると考えられ、GII.4 が NoV 感染症の主流の遺伝子型になっている 1 つの原因であることを示唆していた。

また、患者糞便中に排泄されるノロウイルス遺伝子量は遺伝子型による差が認められ、最近のノロウイルス感染性胃腸炎の主要な原因である GII.4 は他の遺伝子型に比し、排泄量が多い傾向を示した。さらに、吐物中への排泄量は糞便よりは少ないものの、感染性胃腸炎を発症させるのに十分なノロウイルスが排泄されていることが確認された。

A. 研究目的

ノロウイルス (NoV) には多くの遺伝子型あるいは変異型が存在し、NoV 食中毒などの集団感染事例には種々の遺伝子型が関与しているが、近年は遺伝子型 GII.4 が原因の主流となっている。ここでは NoV 遺伝子型 GII.4 の遺伝子学的変化と特徴を明らかにすることを目的に、広島県をモデルとして、NoV 集団感染事例に関与した遺伝子型 GII.4 について解析を行った。

B. 研究方法

1. 材料

2001/02 年から 2008/09 年の 8 流行シーズンに広島県内で発生した NoV 遺伝子型 GII.4 集団感染事例 77 事例の患者糞便を対象にした。

2. 方法 1

厚生労働省通知の方法 (平成 19 年 5 月 14 日最終改正食安監発第 0514004 号) に準じて 77 事例の患者糞便から RT-PCR 法により NoV 遺伝子 (カプシド 5' 側) を増幅した。また、25 事例についてはプライマー G2SKF および LVCAPEND

(CCAAGGACATCAGAYGCCA) を用いて、VP1 全領域を RT-PCR 法により増幅した。そして、増幅した NoV 遺伝子についてダイレ

クトシーケンスあるいはクローニング後塩基配列を決定し、年代順の遺伝子変化を観察した。また、PAML 3.14プログラムパッケージ

(<http://abacus.gene.ucl.ac.uk/software/paml0LD>)を用いて、dN/dS比

(synonymous/non-synonymous ratio)を推定し、有意なアミノ酸の変異部位を抽出した。

3. 方法2

遺伝子型 GII.4 50 患者糞便を含む131 患者糞便について、糞便 1g 中に排泄される NoV コピー数を遺伝子型別に測定し、比較検討を行った。また、遺伝子型 GII.4 の 10 吐物についてもコピー数を測定し、糞便中に排泄される量と比較検討を行った。コピー数は LightCycler480 システム、COG1F/R および COG2F/R プライマー、RING1-TP および RING2-TP TaqMan プローブを用いて測定した。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1. 結果1 (図1, 表1, 表2)

遺伝子型 GII.4 の VP1 領域について、PAML プログラムにより解析した結果、positively selected site は P2 ドメインに集中して観察された。

N/S ドメインにおいては、アミノ酸残基位置 9 および 45 番目が positively selected site として推定された。他の研究において positively selected site として推定されている 6 および 15 番目を加えた、6, 9, 15 および 45 番目のアミノ酸

変化を観察することにより、遺伝子型 GII.4 の年代順の遺伝子学的変化を容易に抽出することが可能であった。また、遺伝子型 GII.4 の N/S ドメインにおけるアミノ酸モチーフは 2 および 3 年毎に変化していることも観察された。この変化は年代順に NNTQ→NSTQ→NNAT/NNAQ であった。

P2 ドメインにおける positively selected site は特にアミノ酸残基 296-298 番目, 393-395 番目および 412-414 番目に観察された。この位置は variant-specific エピトープと推定され、アミノ酸モチーフの年代順に遺伝子学的変化が観察された。この位置のアミノ酸モチーフを観察することにより、遺伝子型 GII.4 の変異 (変異型) を簡易に検出することが可能であった。

上記の有意なアミノ酸変化とともに、アミノ酸残基 255, 280, 300, 333, 339, 340, 352, 357, 368, 372, 378, 382, 407, 494 および 539 番目も positively selected site として推定された。

2. 結果2 (図2)

糞便中に排泄される NoV 遺伝子量は遺伝子型による差異が認められた。統計学的に有意な差は認められないものの、遺伝子型 GII.4 は他の遺伝子型に比し排泄量が多い傾向を示した。遺伝子型 GII.4 の排泄コピー数は中央値 1.7×10^9 /g, 最大値 1.2×10^{12} /g で、最大値は他の遺伝子型より大きいことが認められた。また、遺伝子グループ別ではグループ1に比し、グループ2の排泄量が多いことが認められた。

さらに、遺伝子型 GII.4 の吐物中に排

泄される遺伝子量は糞便と比較し 1 オーダー程度少ないことが認められたが、その中央値（最小値，最大値）は $3.4 \times 10^8/g$ ($8.8 \times 10^4/g$, $8.0 \times 10^{10}/g$) であった。

D. 考察

遺伝子型 GII.4 においては、ウイルス粒子の最も外側に位置する P2 ドメインを中心に年代順のアミノ酸変異が観察され、免疫回避のため遺伝子変化が起こっていることが推察される。また、変異の比較的少ないとされる N/S ドメインにも年代順の特徴および変化が観察された。これらの年代順の変化は抗原性、感染効率などに影響していると考えられ、GII.4 が NoV 感染症の主流の遺伝子型になっている 1 つの原因であることを示唆している。

VP1 領域の N/S ドメインにおけるアミノ酸残基 6, 9, 15 および 45 番目, P2 ドメインにおける 296-298, 393-395 および 412-414 番目のアミノ酸モチーフを観察することにより、遺伝子型 GII.4 の遺伝子変異を容易に検出できることが示唆された。N/S ドメインの 6, 9, 15 および 45 番目のアミノ酸残基は通常 NoV 検出に用いられている遺伝子の範囲内にあり、また、P2 ドメインにおけるアミノ酸残基 296 から 414 番目を増幅するプライマー [例えば、GII.4cap_5898-5918 (CTTRGGYACYACCCAAC TRTC),

GII.4cap_6415-6394 (TACCCRCRTRCAYCCRGG CATAG)]

を用い、その範囲の遺伝子を増幅し部分的に遺伝子解析を行うことで、簡易に GII.4 の変異型を検出することが可能であると考えられる。なお、2009/10 年シー

ズンに検出した遺伝子型 GII.4 には上記のアミノ酸位置に変化が認められた株も検出され、新しい GII.4 変異型の流行が観察された。新しい変異型のアミノ酸残基 6, 9, 15 および 45, 296-298, 393-395 および 412-414 番目のモチーフは SNTQ, SRN, STT および NIH であった。

これらの遺伝子変異を伴う環境への適応順化が近年の GII.4 の優勢の主たる原因となっていると考えられるが、糞便中に排泄される遺伝子量は他の遺伝子型に比し多い傾向が認められた。また、遺伝子型 GII.4 は不顕性感染が他の遺伝子型に比し多い傾向も報告されている。これらのことはウイルスの抗原変異と同時に、患者のみならず不顕性感染者が糞便中に大量の NoV を排泄し、NoV を拡散させていることも僅かながら関係していると考えられる。さらに、吐物中にも多くの遺伝子量が排泄されており、糞便と同様に感染源として重要であると考えられる。

E. 結論

NoV 遺伝子型 GII.4 の変異は 2~3 年毎に発生し、特に有意な変化 (positively selected site) はウイルス粒子の最も外側に位置する P2 ドメインに集中していることが確認された。特に、アミノ酸残基 296-298, 393-395 および 412-414 番目に GII.4 変異型に特徴的な変化が観察された。また、変異の比較的少ないとされる N/S ドメインにも有意なアミノ酸変化 (6, 9, 15 および 45 番目) が認められた。

さらに、遺伝子型 GII.4 は他の遺伝子型に比し大量のウイルスが排泄される傾向が認められると同時に、吐物にも多量

のウイルスが排泄されることが確認された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fukuda S., Takao S., Shigemoto N., Tanizawa Y., Seno M.: Transition of genotypes associated with norovirus gastroenteritis outbreaks in a limited area of Japan, Hiroshima Prefecture, during eight epidemic seasons. Arch. Virol., 155, 111-115, 2010.

2. 学会発表

- 1) 福田伸治, 重本直樹, 谷澤由枝, 高尾信一: 8 流行シーズンにノロウイルス集団感染事例から検出した遺伝子型 GII.4. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会 2009 年 10 月 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

図1 VP1 領域における positively selected site

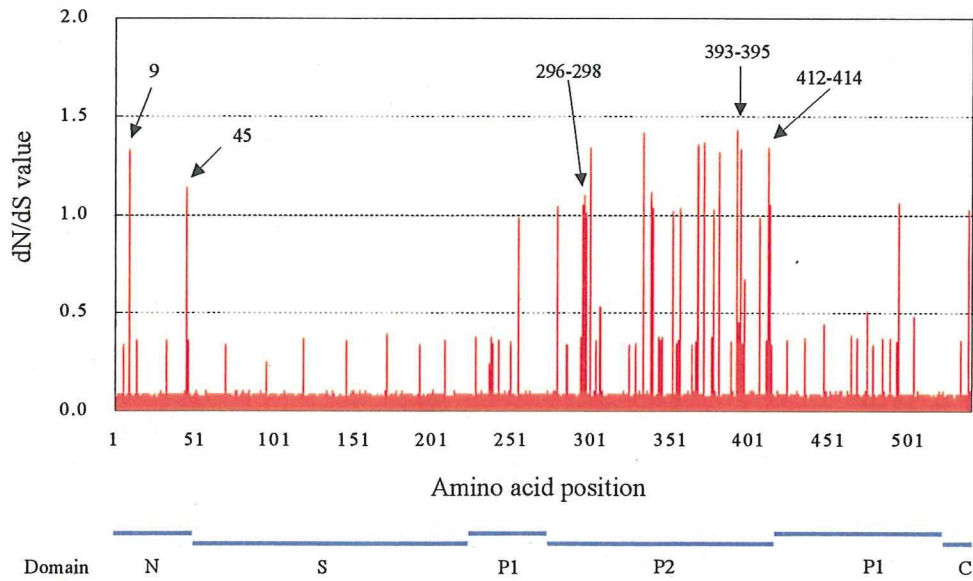


表1 N/S ドメインにおけるアミノ酸モチーフの年代順の変化

モチーフ	流行シーズン							
	2001/02	2002/03	2003/04	2004/05	2005/06	2006/07	2007/08	2008/09
NNTQ	2							
NSTQ			3	8	4			
NTTQ				2				
NNAT						10	3	
SNAQ						1	1	
NSAQ						1		
NNAQ						28	9	5

モチーフは6, 9, 15および45番目のアミノ酸残基を示す。
数字は事例数を示す。

表2 VP1 領域 296-298, 393-395 および 412-414 番目のアミノ酸モチーフの年代順の変化

変異型	アミノ酸残基位置・モチーフ		
	296-298	393-395	412-414
95/96	SHD	N-N	TGH
2004/JP/CHN	TRT	SS(A/T)	TVH
2004/NL/AU	TQN	STT	DSH
2006a ^a	TQE	STT	DSH
2006b	(S/T)RN	(G/S)TT	NV(H/P)
2007/JP ^b	SRN	STT	TGH
2007/NL ^c	SRN	DTA	NNH

^aHu/GII.4/Terneuzen70/2006/NL (GenBank accession number EF126964)

^bHu/OC07138/07/JP (AB434770)

^cHu/GII.4/Apeldoorn317/2007/NL(AB445395)

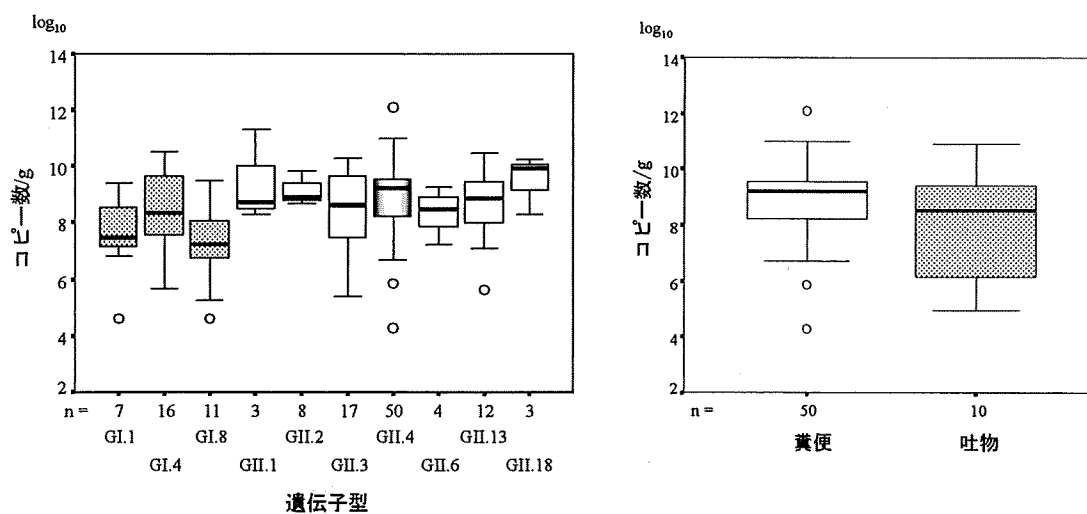


図2 糞便および吐物中に排泄される遺伝子量

研究協力報告書

急性胃腸炎の散発例及び集団発生例から検出された ノロウイルス、サポウイルスの遺伝子型

研究協力者 山下育孝（愛媛県立衛生環境研究所）

研究分担者 田中智之（堺市衛生研究所）

研究協力者 青木紀子、青木里美（愛媛県立衛生環境研究所）

研究要旨：

2009 年 1 月から 12 月の間に、急性胃腸炎の散発例及び集団発生例から検出されたノロウイルス (NV) 及びサポウイルス (SV) について分子疫学的解析を行い、愛媛県における NV 及び SV の流行状況を明らかにすると共に集団発生との関連性について検討した。調査期間中に散発例から NV が 82 例（検出率 28.4%）、SV が 37 例（12.8%）検出され、散発例における SV の関与が比較的高いことが示された。また、散発例から検出された NV の遺伝子型は、GenogroupII/Genotype4 (GII/4)、GII/6、GII/1、及び GenogroupI/8 (GI/8) が多かった。一方、集団発生例では GI/4 が 2 事例、GII/6、GI/4 と GI/16 の混合例及び GI/4、6、GI/8 の混合例が各 1 事例から検出され、SV が関与した事例はなかった。集団発生例から検出された NV 株と塩基配列が 100%一致する株が、同時期に地域内で流行していたことから、地域社会での NV の流行が食中毒や胃腸炎集団発生と密接な関係を持っていることが示唆された。また、期間中に最も多く検出された GI/4 は、すべて昨シーズン同様 2006/2007 シーズンから流行の主流となっている EU2006b タイプであった。1 月～6 月に GI/6 の地域流行が見られたが、この間に検出された株の大部分は、今までに検出された株とは異なる新しいクラスターに属していた。

A. 研究目的

近年、ウイルスによる食中毒や施設内での胃腸炎集団発生の報告が増加傾向にある。胃腸炎の起因ウイルスには、ノロウイルス (NV)、サポウイルス (SV)、ロタウイルス、アストロウイルス、腸

管アデノウイルス等が知られているが、集団発生事例の原因ウイルスの大半が NV によるものであり、衛生行政上 NV が最も重要視されている。しかし、2007 年以降は、SV を原因とする集団発生事例も報告されるようになってきた。

最近、カキ等の二枚貝を原因とする食中毒事例は、減少する傾向がみられている。一方、非カキ関連の食中毒や、施設内におけるヒト-ヒト感染による事例が増加している。いずれも調理従事者を介した食品の2次汚染あるいはヒトを介した2次感染によって生じた集団発生であると推定される。これらの集団発生の制御のためには、地域における食中毒起因ウイルスの流行状況を把握することが重要と考えられる。

そこで、散発性胃腸炎及び食中毒等集団発生事例から検出された NV 及び SV について分子疫学的解析を行った。

B. 研究方法

1. 材料

2009年1月から12月の間に、感染症発生動向調査病原体検査のために採取された散発性胃腸炎患者糞便289検体及び集団発生6事例から得られた93検体（患者糞便44検体、従事者糞便26検体、食品14検体、拭き取り9検体）を用いた。糞便は検査実施まで-20℃で冷凍保存した。

感染症胃腸炎患者数は、感染症発生動向調査における定点当たり週別患者報告数を使用した。

2. 方法

糞便からのウイルス検索は、電子顕微鏡法(EM)、リアルタイムPCR法またはRT-PCR法で行った。EMは常法により粗精製した糞便材料を、2%PTA染色後4万倍で観察し、胃腸炎起因ウイルスの検索を行った。ロタウイルス、アデノウイルスは主にEMで検出された

ものについて、ELISAやイムノクロマト法によって型別した。NV遺伝子の検出は、影山らのCOGF/R系プライマーとRINGTaqManプローブを用いたリアルタイムPCRで行った。SV遺伝子の検出は、岡田らの方法に準じ、カプシド領域を増幅するSV系プライマーを用いたnested-PCRで行った。

NV及びSVの遺伝子解析は、カプシド領域の塩基配列をダイレクトシークエンス法により決定し、NVは片山ら、SVは岡田らが提唱する方法で、系統樹解析を実施し遺伝子型別を行った。

拭き取り調査は、綿棒式キット（栄研器材）またはWHIRL-PAK（NASCO）を用いて採取し搬入された検体について実施した。拭き取り検体は超遠心（38000rpm 2hr）沈査を、食品は10%乳剤として3000rpm、20分遠心後の上清の超遠心沈査をそれぞれRNA抽出し使用した。

（倫理面への配慮）

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1. 散発性胃腸炎患者からのウイルス検出状況

散発性胃腸炎患者289名からのウイルス検出状況を表1、図1に示した。NVが82例と最も多く、次いでSVが37例、A群ロタウイルスが31例、C群ロタウイルス及びアデノウイルスが各11例であった。検出されたNV82例のGenogroup別内訳は、GIIが圧倒的に多く75例(91.5%)で、GIは7例(8.5%)

と非常に少なかった。

期間中の週別の患者報告数と散発性胃腸炎からのウイルスの検出数を図 2 に示した。1 月に検出ウイルスの約 80%を占めていた NV は、その後 5 月頃までゆるやかに減少し、6 月に再び検出数が増加した。SV は、6 月をピークに 3 月～6 月に比較的多く検出された。また、A 群ロタウイルスが例年同様 2 月～4 月に検出され、3 月～5 月には C 群ロタウイルスも検出された。NV の検出率が低下した 3 月～6 月に SV、A 群及び C 群ロタウイルスが検出され、1 月から徐々に減少していた患者報告数が 2 月中旬以降再び増加した推移とよく一致していた。例年 11 月頃から検出される NV が今年も 12 月になってもほとんど検出されなかった。

2. 集団発生事例から検出された NV の遺伝子型

2009 年に発生した NV による集団発生事例の概要を表 2 に示した。食中毒事例は 4 事例で、その内 2 事例がカキの摂食が原因と推定された。これらの事例(④と⑤)では、患者から GI、GII 両方が検出され、遺伝子型は、それぞれ 2 種類あるいは、3 種類含まれていた。カキ等二枚貝が関連しない食中毒は 2 事例有り、③は介護老人福祉施設の食事が原因で、患者糞便、調理従事者糞便及び食品から NVGII/4 が検出され、⑥は飲食店の弁当が原因で、患者糞便、調理従事者糞便から NVGII/6 が検出された。また、ヒト～ヒト感染が疑われる施設内での集団発生が 2 事例あり、①の特別養護老人施設では、

NVGII/4 が検出された。

3. 散発例及び集団発生例から検出された遺伝子型

散発例から検出された NV の遺伝子型は GII が 7 種類、GI が 1 種類(GI/8)であった。GII では GII/4 が最も多く検出され、次いで GII/6、GII/1、GII/3、GII/13、GII/7 であった。

検出数の大部分を占めた GII 型の月別の遺伝子型別検出状況を図 3 に示した。GII/4 は 1 月～3 月に散発例から検出された。一方、集団発生は、1 月に 2 事例、2 月に 1 事例発生していた。同様に GII/6 は 1 月～6 月の間に散発例から検出され、同時期に集団発生(2 事例)からも検出されていた。

4. NV 遺伝子の系統樹解析

散発例及び集団発生例から検出された NVGI 及び GII の系統樹解析の結果を図 4、5 に示した。カキ関連事例を除き、集団発生から検出された株は、事例毎に遺伝子塩基配列が 100%一致していた。さらに、遺伝子解析を行ったすべての事例で、集団発生株と同一の株が散発例からも、ほぼ同時期に検出されていた。また、事例⑤(カキ関連)から検出された GI/8 及び GII/4 株と塩基配列が一致している株が集団発生以降に散発例から検出された。

5. NVGII/4 の分類

GII/4 が検出された集団発生 2 事例から各 1 株、散発例から検出された代表 5 株及び 2003 年～2008 年の間に検出された GII/4 代表株について系統樹解析を行った結果を図 5 に示した。調査期間中に検出された NVGII/4 は、す

べて昨シーズン愛媛県で検出された株と同じクラスターに属し、EU2006b タイプであった。2006年にEU2006a variantが少数例検出されたが、2007年以降は、EU2006b variantタイプが愛媛県で流行しているGII/4の主流となっていることが示された。

6. NVGII/6の系統樹解析

1月～6月の間に集団発生及び散发例から検出されたGII/6と2001年以降に検出されたGII/6について系統樹解析を行った結果を図6に示した。今までに検出されたGII/6は、3つのクラスターに分かれた。2009年に検出されたGII/6の大部分は、98～100%の相同性を示し、これまで愛媛県で検出された株とは異なる新しいクラスターを形成した。

7. SVの系統樹解析

2007年～2009年の間に検出されたSVについて、系統樹解析を行った結果を図7に示した。調査期間中に検出されたSVは、GI、GII、GIV、GVの4つのGenogroupを構成していた。2009年に検出されたSV株はGIとGIIの2つのグループに分かれた。同様に2008年、2007年の流行株もそれぞれ3つのグループに分かれた。流行時期が同じものは、ほぼ同じグループに属す傾向が見られ、SVにおいても経時的に流行株が変遷していた。

D. 考察

散发性胃腸炎の原因ウイルスの約50%はNVであった。SVは、検出されたウイルスの約22%を占めており、散

発例におけるSVの関与が比較的高いことが示された。

2009年に散发例及び集団発生例から検出されたNVの遺伝子型は、GIIが7種類、GIが2種類で短期間に多様な遺伝子型の株が地域内で流行していたことが示された。また、1つの遺伝子型が2～3ヶ月あるいは、それ以上地域で流行し、時として複数の遺伝子型のNVが同時期に流行していることが示された。

散发例と集団発生事例から検出されたNVの遺伝子型の分布及びそれらの塩基配列が極めて良く一致していたことから、地域で散發的に見られているウイルスと集団発生の原因ウイルスとの間には強い関連性が示唆された。このことは、地域の流行ウイルスが、調理従事者等を介して調理中の食品を2次汚染し、食中毒の原因となり、また、学校、病院及び老人福祉施設等に持ち込まれて、施設内においてヒト→ヒト感染で集団発生を引き起こしていることを強く示唆するものである。食中毒等集団発生の予防には、調理従事者への更なる衛生指導の徹底と入所者、職員等への日常の手洗いの指導が重要である。

調査期間中に食中毒等集団発生例3事例及び散发性胃腸炎から最も多く検出されたGII/4は、すべてEU2006bタイプに属していた。2006/2007シーズンの主流型であったこのタイプは、その後も愛媛県においてNVの主流となっていることが明らかとなった。しかし、最近、北海道、新潟、愛知、大