

表3. 糞便1g当たりのサポウイルス(SV)量および遺伝子型

事例No.	株名	発症の有無	SV量(copies/g)	遺伝子型
1	Nagano18-4/Jun2004/JPN	有	8.20E+09	G I
	Nagano18-6/Jun2004/JPN	有	1.05E+11	G I
	Nagano18-8/Jun2004/JPN	有	1.85E+08	G I
	Nagano18-9/Jun2004/JPN	有	8.04E+10	G I ^a
	Nagano18-10/Jun2004/JPN	有	1.21E+08	G I
	Nagano18-11/Jun2004/JPN	有	5.98E+09	G I
	Nagano18-12/Jun2004/JPN	有	1.36E+07	G I
2	Nagano10-1/Jul2007/JPN	有	1.06E+10	GIV ^b
	Nagano10-2/Jul2007/JPN	有	1.22E+10	GIV ^b
	Nagano10-3/Jul2007/JPN	無(従事者 ^d)	8.04E+07	GIV ^c
	Nagano10-6/Jul2007/JPN	無(従事者 ^e)	1.27E+10	GIV ^c

a: 事例1の他の6株と比較すると、1カ所C-T変異が認められた。

b: 相同性100%

c: 相同性100%

bとcは、塩基配列で3カ所変異が認められた。

d: 調理も嘔吐物等の処理も実施した。

e: 嘔吐物等の処理は行ったが、調理は行っていない。

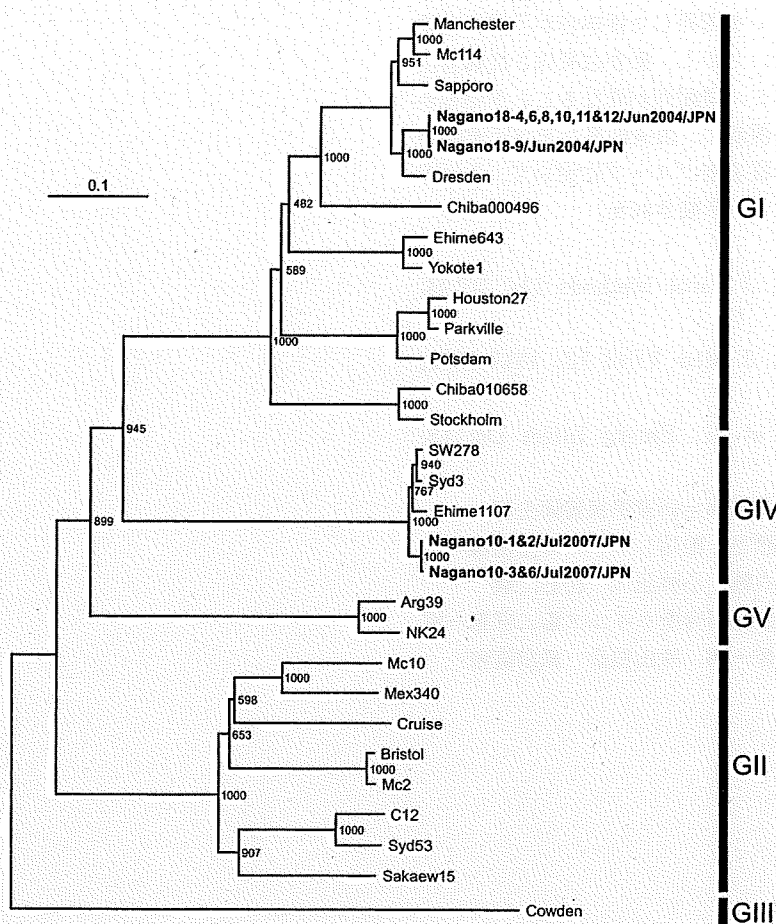


図4. サポウイルスの分子系統樹

ていた生徒に患者が集中していたことが判明した。以上から、合宿前に発症した初発患者から他の生徒達に感染が広がったものと考えられた。

SVの検査結果: SVはYanら¹⁾の方法に準じ、SV5317およびSV5749プライマーを用いてRT-PCR法で検出した。さらに、一部の陽性検体についてはOkara²⁾の報告したReal-Time RT-PCR法により定

量を試みた。その結果、事例1のケースでは糞便1g当たりSVが $1.36 \times 10^7 \sim 1.05 \times 10^{11}$ copiesの範囲に分布し、事例2のケースでは糞便1g当たり $8.04 \times 10^7 \sim 1.27 \times 10^{10}$ copiesの範囲に分布した(表3)。

SVの遺伝子解析: 事例1の7株および事例2の4株について、ダイレクトシーケンス法を用いゲノム3'側約2,260塩基(サブゲノム全長領域に対応)を決

定し、Hansman ら³⁾の参照株を用いNJ法による系統樹解析を実施した。その結果、事例1由来株はHu/Dresden/pJG-Sap01/DE (AY694184)に類似し、遺伝子型GIに、事例2由来株はHu/Angelholm/SW278/2004/SE (DQ125333)に類似し、遺伝子型GIVに分類された(前ページ図4, 表3)。

事例1の7株の相同性を検討したところ、1株のみC-T変異が1カ所認められたが、アミノ酸配列の変異を伴っていないことから、すべて同一由来の感染と考えられた。

事例2の患者由来2株と非発症調理従事者由来2株は、塩基配列が完全に一致していた。患者由来株と従事者由来株の塩基配列には3カ所の変異が認められた。これらのうち2カ所についてはアミノ酸配列変異を伴っており、由来が異なると考えられた。当初本事例は、患者グループの排出した嘔吐物および下痢便によって汚れた洗面所やトイレを清掃した従事者が不顕性感染したと推察していた。しかし、患者由来株と従事者由来株のカプシドのアミノ酸配列が異なることが明らかとなったことから、偶然に、由来の異なるSVが同時期に患者グループと従事者グループにおいて、それぞれ別々に流行したことが示唆された。

参考文献

- 1) Yan H, *et al.*, J Virol Methods 114: 37-44, 2003
- 2) Oka T, *et al.*, J Med Virol 78: 1347-1353, 2006
- 3) Hansman GS, *et al.*, Emerg Infect Dis 13: 1519-1525, 2007

長野県環境保全研究所保健衛生部
吉田徹也 粕尾しず子 畔上由佳
宮澤衣鶴 小林正人 白石 崇
国立感染症研究所ウイルス第二部第一室
岡 智一郎 片山和彦 武田直和

<国内情報>

アストロウイルス血清型 8 型の検出——長野県

過去に食中毒を疑った集団胃腸炎事例において、ノロウイルス等の検査のために採取・保管されていた糞便試料を用い、アストロウイルス (AstV) の検索を行ったところ、血清型 8 型の AstV が分離されたので、その概要について報告する。

AstV の検索を行ったのは、2008年 2 月および 3 月に長野県内の同一地区の 2 施設において採取された従事者糞便とした。これら 2 事例は、少なくともノロウイルスあるいはサポウイルス、もしくはその両者が関与していたと考えられた (表 1)。まず、糞便 9 検体の乳剤上清から RNA を抽出し、Sakon ら¹⁾の報告した RT-PCR 法 (プライマーセット AC1/AC230) による AstV 遺伝子の検出を行ったところ、5 検体が 230bp 付近に増幅産物を認めたことから (図 1-A, 表 1), AstV 陽性と判定した。そこで、ウイルス性下痢症診断マニュアル (第 3 版)²⁾に準じ、CaCo-2 細胞を用いてウイルス分離を行ったところ、いずれも継代第 2 代までに細胞変性が認められた (表 1)。分離株は、Sakamoto ら³⁾の報告した RT-PCR 法 (プライマーセット AST-S1~AST-A8/END) により血清型別を行った結果、5 検体とも 600bp 付近に増幅産物を認めたので、血清型 8 型と同定した (図 1-B)。さらに、検体 No. 19-48-4, 20-1-1 および 20-1-5 から分離された AstV 株は、AST-S8/END プライマーセットで PCR 増幅し、その増幅された ORF2 の 3' 末端付近の一部領域をダイレクトシーケンシング法により、塩基配列の決定をした。3 株の塩基配列は 100% 一致しており、BLAST 検索の結果、中国で分離された血清型 8 型の AstV (accession no. EU091262) と最も高い相同性 (98%) が認められた。また、この株を含む血清型 8 型株を用い系統樹解析を行ったところ、長野県分離株は前述の中国分離株の他に、ハンガリー分離株 (HUN-8) あるいはアメリカ分離株 (Hu/HAstV_8/2701/1999/OH, USA, Hu/HAstV_8/3383/1999/OH, USA) と近縁であった (次ページ図 2)。一方、同じ血清型 8 型であっても、

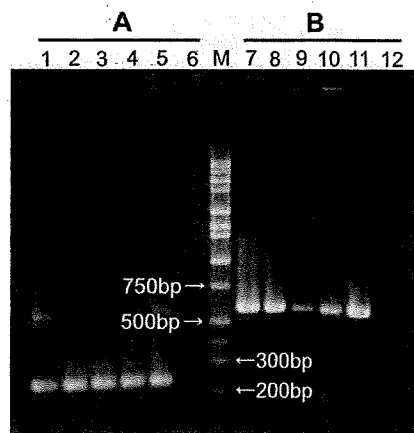


図 1. RT-PCR 法を用いた Astrovirus 遺伝子の検出 (A) および血清型別 (B)

M: DNA Marker; Lane 1, 7: No.19-48-4; Lane 2, 8: No.20-1-1; Lane 3, 9: No.20-1-2; Lane 4, 10: No.20-1-4; Lane 5, 11: No.20-1-5; Lane 6, 12: Negative control

イギリス分離株 (hav8001), 南アフリカ分離株 (AS20) およびメキシコ分離株 (Yuc-8) とは、遺伝学的に離れた位置に存在した (次ページ図 2)。

AstV は一般的に小児、特に 1 歳未満の下痢症の原因ウイルスとして知られており、大人から検出されることは稀である⁴⁾。また、過去 (1997 年以降) の病原微生物検出情報の集計では、分離される AstV の主な血清型は 1 型, 4 型, 5 型で、8 型が検出されたのは今回が初めてのことであった。また、海外においても、分離された AstV の血清型は 1 型が最も多く、わが国の成績と同様の傾向を示している⁵⁻⁸⁾。血清型 8 型の検出割合は、Guix ら⁷⁾の報告では 10.7% と比較的高かったものの、それ以外では 0.0%~2.5% と低率であった^{5,6,8)}。今回分離された AstV 5 株はいずれも分離された場所や時期も似かよっており、また、異なる事例から分離された株の ORF2 の一部領域の配列が同じであったことから、分離株の由来は同一であった可能性が強く示唆された。さらに、同一由来の AstV 株が非常に狭い地区内において、地域的な流行を継続して起こしていた可能性も推察された。AstV が分離された従事者 5 名中 4 名は、聞き取り調査の結果、過去 1

表 1. Astrovirus 等ウイルス検索結果

事例 (発生年月)	検体No.	検体種類	発症/ 非発症	Astrovirus			Norovirus	Sapovirus	参 考
				RT-PCR		CaCo-2 細胞変性	real time RT-PCR ^c	RT-PCR ^d	
				検出 ^a	血清型別 ^b				
No.1 (Feb. 2008)	19-48-1	従事者糞便	発	-	nt ^e	nt	-	+ (GIV)	患者糞便検査結果 ^f 2/4 (SaV 陽性)、 1/11 (NV 陽性)
	19-48-2	"	発	-	nt	nt	-	+ (GIV)	
	19-48-3	"	発	-	nt	nt	+ (GII)	+ (GIV)	
	19-48-4	"	非	+	8 型	+	-	+ (GIV)	
No.2 (Mar. 2008)	20-1-1	従事者糞便	非	+	8 型	+	-	-	患者糞便検査結果 ^f 5/14 (SaV 陽性)、 4/16 (NV 陽性)
	20-1-2	"	非	+	8 型	+	-	-	
	20-1-3	"	非	-	nt	nt	-	-	
	20-1-4	"	非	+	8 型	+	-	-	
	20-1-5	"	発	+	8 型	+	-	-	

a: Sakon ら¹⁾の方法; b: Sakamoto ら³⁾の方法; c: Kageyama ら¹⁰⁾の方法; d: Okada ら¹¹⁾の方法; e: 検査なし; f: 他の自治体における検査結果

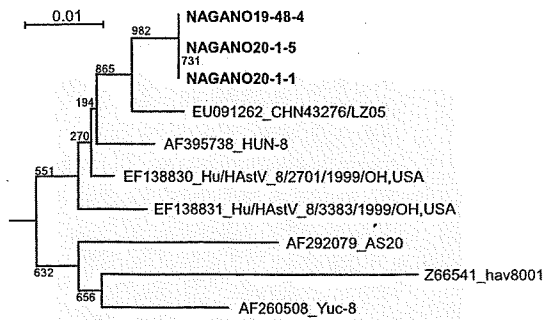


図2. Astrovirus血清型8型株の系統樹解析

系統樹はNJ法を用い作成し、1000回ブートストラップを行った。また、図には示していないが、out groupとしてAstrovirus血清型5型株 (accession no. U15136) を用いた。

週間遡っても下痢等の胃腸炎症状を認めず、不顕性感染者であったと考えられた。5歳未満の小児においても、不顕性感染者が2.6%存在したとの報告があり⁹⁾、いずれも重要な感染源の一つと考えられた。

AstV血清型8型における疫学的データは非常に少ないことから、今後もその発生動向等に注視する必要があると思われる。

貴重な疫学データ等を提供いただいた、保健所の関係各位に深謝いたします。

文 献

- 1) Sakon N, *et al.*, J Med Virol 61: 125-131, 2000
- 2) ウイルス性下痢症診断マニュアル (第3版), 国立感染症研究所ウイルス第二部・衛生微生物技術協議会レファレンス委員会, 2003
- 3) Sakamoto T, *et al.*, J Med Virol 61: 326-331, 2000
- 4) Bini JC, *et al.*, Bull Soc Pathol Exot 100: 243-245, 2007
- 5) Noel JS, *et al.*, J Clin Microbiol 33: 797-801, 1995
- 6) Mustafa H, *et al.*, J Clin Microbiol 38: 1058-1062, 2000
- 7) Guix S, *et al.*, J Clin Microbiol 40: 133-139, 2002
- 8) Chun-yan L, *et al.*, Chin Med J 117: 353-356, 2004
- 9) Mendez-Toss M, *et al.*, J Clin Microbiol 42: 151-157, 2004

- 10) Kageyama T, *et al.*, J Clin Microbiol 41: 1548-1557, 2003
- 11) Okada M, *et al.*, Arch Virol 151: 2503-2509, 2006

長野県環境保全研究所

吉田徹也 粕尾しず子 畔上由佳

内山友里恵 薩摩林一代 白石 崇

表. ノロウイルスおよびサポウイルス検査結果

検体の種類	カキの喫食	検査結果		
		NV		SV
		GI	GII	
患者便	A 有	-	+	-
	B 有	+	+	-
	C 有	+	+	-
	D 不明	-	+	-
非発症者便	E 無	+	-	-
調理従事者便	F 無	-	-	-
	G ^a 有	+	+	+
	H 無	-	-	-
冷凍カキ ^b		1 ^c		

a: カキを喫食し、発症した調理従事者

b: 1~2粒を1検体とし、計4検体検査を実施した。

c: 陽性数を記載した。

より NV 検査¹⁾およびサポウイルス (SV) 検査²⁾を実施した。カキからのウイルス検査方法としては、野田ら³⁾のアミラーゼ処理直接法を用いた。

患者便4検体はいずれもNV陽性で、その内訳はGI・GII陽性が2検体(B, C), GIIのみ陽性が2検体(A, D)であった。非発症者便(E)はNV(GI)陽性であった。調理従事者便3検体中1検体がNV(GI・GII)およびSV陽性で、この陽性者はカキを喫食し発症した従事者(G)であった(表)。なお、同一ロットのカキ4検体中1検体がNV(GII)陽性であった(表)。本事例は、患者から検出されたNV遺伝子群のパターンが、いくつか存在したケースであった(表)。一つの可能性として、感染源はNV等を非特異的に蓄積する、カキ等二枚貝であったことが推定された。しかしながら、喫食調査の結果、非発症者Eはカキのソテーを食べていないにもかかわらずNV(GI)陽性であり(表)、またカキを喫食し発症した調理従事者がNV(GI・GII)およびSV陽性であったことから、この従事者が感染源になった可能性も否定できなかった。これを明らかにするには、さらに詳細な遺伝子型別等を行う必要がある。

最近、アサリを原因食品とするSVおよびNVによる食中毒も報告されている⁴⁾ことから、原因食品として二枚貝が疑われるようなケースは、NVだけでなくSVの検索が必要であると考えられる。

文 献

- 1) Kageyama T, *et al.*, J Clin Microbiol 41: 1548-1557, 2003
- 2) Oka T, *et al.*, J Med Virol 78: 1347-1353, 2006
- 3) 野田 衛他, カキからの高感度ノロウイルス検出法の開発に関する研究 I 検査法の改良・開発の検討, 生食用カキに起因するノロウイルスリスクに関する研究, 平成18~20年度研究報告書: 13-25, 2009
- 4) 飯塚節子他, 第56回ウイルス学会学術集会抄録集: 281, 2008

長野県環境保全研究所感染症部

吉田徹也 粕尾しず子 畔上由佳

内山友里恵 笠原ひとみ 上田ひろみ

<速報>

加熱調理不足のカキが原因の一つとして疑われたノロウイルス等による食中毒事例——長野県

2009年10月に長野県内の飲食店において、加熱調理不足で提供された「カキのソテー」が原因食品の一つとして疑われた、ノロウイルス(NV)等を原因とする食中毒事例が発生したので、その概要を報告する。

2009年10月20日、伊那保健所管内の飲食店で18日午後6時から会食した1グループ8名中2名が、嘔吐、下痢等の症状を呈している旨の連絡が医療機関から保健所に入った。保健所で調査を行ったところ、当該グループ8名中7名および調理従事者3名中1名が、下痢、嘔吐などの症状を呈していた。日時別の発症状況は、まず調理従事者1名が18日正午に発症した後、患者グループは19日午後8時~20日午前8時にかけて発症していた(図)。なお、発症した調理従事者は、18日午前2時頃に客に提供したものと同一ロットのカキを自ら調理して食べていた(図)。

患者便等を検体とし、リアルタイム RT-PCR 法に

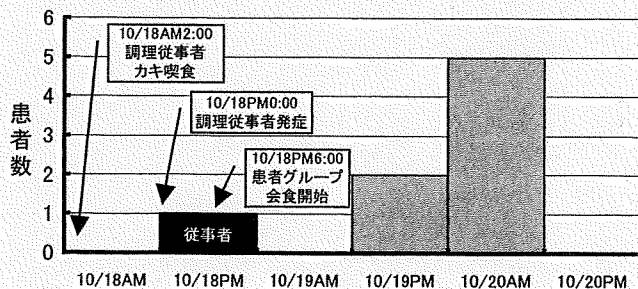


図. 日別患者発生数

長瀬 博 藤田 暁
長野県伊那保健所食品・生活衛生課
山川 晋 園田春美 中村安満

疾患を有し、免疫能低下が考えられた。ノロウイルス排出が長期にわたっていたのは、このような背景によるのかもしれない。遺伝子型で排出量、排出期間に差は見られなかった。

Rockx ら³⁾は、22日後でも患児の糞便の約3割からノロウイルス遺伝子が検出されたと報告している。杉枝ら⁴⁾は無症状の調理従事者では13~15日の間にわたってノロウイルス遺伝子が 10^4 ~ 10^7 コピーも検出されたと報告している。健康成人においても1カ月以上ノロウイルス遺伝子が検出された症例もあり、小児、成人ともにノロウイルスの長期排出要因の特定は困難である。

ノロウイルスは強い感染力を有し、10~100個のウイルス粒子でも感染が成立するとされている⁵⁾。症状が消失しても長期間にわたり排出されているウイルスは、新たな感染源となり得る可能性が高い。

今回のノロウイルス排出期間の長期追跡調査の結果は、ノロウイルス感染後の調理従事者などの食品取扱者が職場復帰する際の判定基準や、食品汚染による感染予防対策を考える上で有用である。2006/07シーズンにおけるノロウイルス感染事例では、調理従事者によって汚染された食材からの集団食中毒事例が多く報告されている⁶⁾。本情報が感染源対策の最も基本的な予防指針の一助となれば幸いである。

参考文献

- 1) Cuthbert JA, Clin Microbiol Rev 14: 38-58, 2001
- 2) 三好龍也, 他, 食品衛生研究 56: 9-15, 2006
- 3) Rockx B, et al., Clin Infect Dis 35: 246-253, 2002

- 4) 杉枝正明, 他, 臨床とウイルス 32: 189-194, 2004
- 5) CDC, MMWR 50 (RR09): 1-18, 2001
- 6) 厚生労働科学研究：食品の安心・安全確保推進研究事業「ウイルス性食中毒の予防に関する研究」平成18年度報告書（主任研究者・武田直和）

堺市衛生研究所

田中智之 三好龍也 内野清子 吉田永祥
 大阪府立急性期・総合医療センター
 田尻 仁
 大阪府立母子保健総合医療センター
 萱谷 太 位田 忍

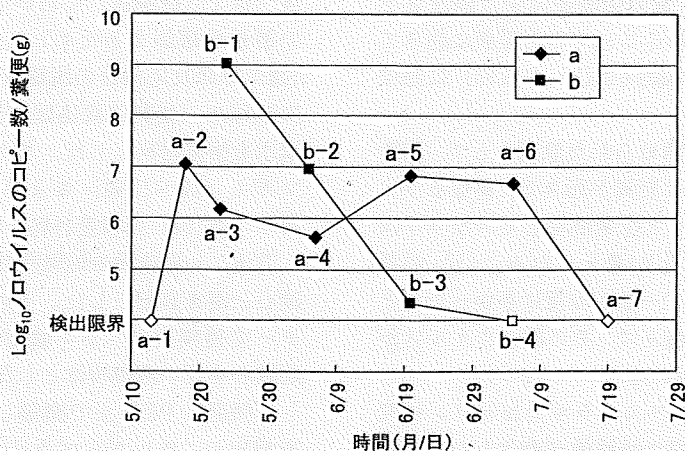
<特集関連情報>

長期ノロウイルス排泄中に認められた遺伝子変化

2006年4月~2007年3月末までに、富山県で集団発生したウイルス性胃腸炎の事例で、ノロウイルスが検出されたものは28事例あった。遺伝子型は、1例がGI/8であった以外はすべてGII/4であった。これらのGII/4による事例のなかで、約2カ月間糞便中にウイルス遺伝子が検出され、構造蛋白領域の塩基配列に経時変化が認められた事例を経験した。

同事例において、2名の糞便から2カ月あまりにわたってウイルス遺伝子が検出された。1名(a)では7回検便を行い、リアルタイムPCRによりウイルスのコピー数を測定したところ、2峰性の経時変化を示した(図)。もう一例(b)では4回検便を行い、同様に検討したところ、ウイルスのコピー数は感染初期に非常に多く、その後急激に減少する経過を示した(図)。RT-PCR、およびダイレクトシーケンスによりウイ

図. 長期ノロウイルス排泄者の糞便中におけるウイルスコピー数、および塩基の経時変化



(-:RT-PCR陰性)

		a-1	a-2	a-3	a-4	a-5	a-6	a-7
(a)	構造蛋白領域 50番目	A	A	A	G	G	G	-
	279番目	C	T	T	T	T	T	-
		b-1		b-2	b-3	b-4		
(b)	構造蛋白領域 50番目	A		G	-	-		
	279番目	T		T	-	-		

ルス遺伝子の塩基配列を解析した結果、構造蛋白領域の開始コドンから数えて50番目の塩基が、(a) では、3回目と4回目の検体の間でAからGに変化していることが判明した(図)。(b)でも、1回目と2回目の検体の間で、同様にAからGに変化していた(図)。経過中にウイルス遺伝子に変異した可能性が考えられたため、PCR産物をクローニングして、個々のクローンの塩基配列を検討した。その結果、a-1~a-3ではすべてのクローンがA配列を持っていたのに対して、a-4では24クローン中Aが9、Gが15、a-5ではAが1、Gが24、a-6ではすべてGであった。また、b-1では、28クローンすべてがAだったのに対して、b-2では、29クローン中Aが1、Gが28クローンだった。このように、Aを持つウイルスからGを持つウイルスへと割合が変化していることが判明した。この塩基の変化により、構造蛋白の17番目のアスパラギン(CAA)がセリン(CAG)に変化することがわかった。上記の変化に加えて(a)では、構造蛋白領域の開始コドンから数えて279番目の塩基も、1回目と2回目の検体の間でCからTに変化していることが判明した(図)。同様にPCR産物をクローニングして割合を求めたところ、a-1ではすべてがC、a-2ではすべてがTと、この間に同部位の塩基が一変していることがわかった。(b)ではすべてTで変化は認められなかった。このCからTへの変化は、アミノ酸の変化を伴わないことがわかった。個々のクローンには、上記2カ所以外の部位での塩基の変化も散見されたが、いずれも固定化することはなかった。

(a)、(b)2例で、同じ変異が同時に起きる可能性は極めて低いと考えられるため、一方で生じた塩基変化をもつウイルスが他方に感染した可能性が高いと考えられる。(a)のウイルス量の経時変化が2峰性を示し、塩基の割合変化もこれらピークの上昇前に起きていることから、それぞれの直前に(b)から(a)に感染した可能性が考えられる。

経過中に遺伝子変化が認められた原因として、腸管でウイルスが増殖する間に変異が起きた、異なるウイルスが再感染した、もともと少量混在していたウイルスが優勢になったことなどが考えられる。(b)の感染初期にはウイルスのコピー数が非常に多かったことから、ウイルスの増殖が盛んで、その間にウイルスが変異した可能性も考えられる。

AからGの変化によりアスパラギンがセリンに変化することから、構造蛋白の抗原性が変化した可能性も考えられるが、同部位には明確な抗原決定部位は報告されていない。また、CからTへの変化はアミノ酸変化を伴わない。したがって、抗体の影響によりこれらの変化が(a)で優勢になり固定化したとは考えにくい。ウイルス遺伝子の他の領域に生じた変異による影響の可能性も考えられ、今後の検討が必要である。

本事例により、長期ノロウイルス排泄者中におけるウイルス変異の可能性が示唆された。長期排泄例では、遺伝子が経過中に変化する可能性を考えて、今後検討を重ねていく必要があるだろう。

富山県衛生研究所ウイルス部

小原真弓 長谷川澄代 中村一哉 岩井雅恵

堀元栄詞 倉田 毅 滝澤剛則

高岡厚生センター 齊藤尚仁

新川厚生センター 大江 浩

<特集関連情報>

汚水処理施設におけるノロウイルスの消長—岩手県

はじめに：ノロウイルス(以下NV)の感染者から糞便中に排出された大量のウイルスは、下水処理で十分に処理できない場合に河川に放流され、海域に達し、最終的にカキ等の二枚貝に蓄積されると考えられている。岩手県の下水道普及率は46.6%と、全国平均69.3%(平成17年度末)よりも低く、糞便処理は下水道や浄化槽の他、汲み取りによるし尿処理施設で行われている。それらのNV除去効果は、処理施設や処理方法によっても異なることが予想されるが、その実態はわかっていない。このような背景の下、カキの養殖を行っている閉鎖湾周辺の3箇所の汚水処理施設におけるNVの消長と、その海域で養殖されたマガキと海水のNV検出状況について調査した。

材料：2005年11月~2007年3月の秋期から冬期の計7回、以下の検体を採取した。カキを養殖しているA閉鎖湾周辺の公共下水道処理施設(以下下水道)、漁業集落排水処理施設(以下漁集施設)における処理前の流入水と処理後放流水を検液とした。し尿処理施設(以下し尿施設)においては、処理工程ごとのNVの消長を確認するために、処理前し尿、一次処理水(嫌気好気反応槽後の脱離液、遠心分離の分離液)、二次処理水(凝集沈殿処理水および砂ろ過処理水)、放流水を検査材料とした。また、A湾内で養殖しているマガキ(10~15個)およびカキ棚周辺定点2箇所の海水(各10L)を検査材料とした。

方法：し尿施設の処理前のし尿および一次処理水は、遠心上清を試料とした。その他の汚水検体は、フィルターで捕集後グリシン緩衝液(pH 11.5)で溶出し、超遠心を行い濃縮検体とした。マガキは中腸線を摘出し、個別にPEG法で濃縮した。各濃縮検体のRNAを抽出し、ランダムプライマーを用いてcDNAを合成した。すべての検体についてNVのnested-PCR(1st PCR:COG1F/G1-SKR, COG2F/G2-SKR, nested-PCR:G1-SKF/G1-SKR, G2-SKF/G2-SKR)を行った。増幅産物が確認された検体は、景山らの方法によるリアルタイムPCR法で1st PCR産物の確認を行った。NV陽性検体は、リアルタイムPCR法を用いて、

