

図6 検出されたアストロウイルスの系統樹

表5 サポウイルス陽性患者糞便中のサポウイルス及びノロウイルスコピー数

事例 No.	検体 No.	発症から採便までの日数	コピー数 (copies/g 糞便)			PCR法により検出された腸管系ウイルス
			サポ	ノロ (GI)	ノロ (GII)	
42	1	3日	3.3E+07	2.4E+09	1.8E+11	ノロ (GI, GII)、サポ、アイチ
	4	2日	3.5E+05	-	1.6E+08	ノロ (GII)、サポ
	5	不明	9.5E+08	-	-	ノロ (GI)、サポ
54	4	不明	2.1E+05	7.9E+04	1.3E+09	ノロ (GI, GII)、サポ
98	1	1日	1.3E+05	-	1.2E+10	ノロ (GII)、サポ、アイチ
	3	1日	9.1E+05	-	1.8E+07	ノロ (GII)、サポ、アイチ
	5	1日	1.3E+05	1.2E+06	2.1E+09	ノロ (GI, GII)、サポ、アイチ
	11	2日	2.3E+05	2.3E+07	5.2E+09	ノロ (GI, GII)、サポ、アイチ
	12	2日	1.9E+10	-	-	サポ、アイチ
	16	3日	1.3E+07	-	1.4E+09	ノロ (GII)、サポ、アイチ
137	1	3日	4.6E+09	-	-	サポ
138	6	1日	-	-	4.3E+07	ノロ (GII)、サポ
	9	不明	3.1E+06	2.6E+07	4.0E+09	ノロ (GI, GII)、サポ
142	2	当日	-	1.2E+07	4.8E+08	ノロ (GI, GII)、サポ、アイチ
	3	1日	3.5E+05	5.1E+04	7.2E+10	ノロ (GI, GII)、サポ、アイチ、アストロ
	4	2日	-	1.2E+08	2.2E+09	ノロ (GI, GII)、サポ、アイチ
	5	2日	-	8.2E+08	1.9E+10	ノロ (GI, GII)、サポ、アイチ、アストロ、エンテロ
145	4	5日	1.2E+10	1.3E+08	-	ノロ (GI)、サポ、アストロ
	5	6日	5.4E+05	-	6.0E+06	ノロ (GII)、サポ、アイチ
	6	4日	-	-	8.6E+09	ノロ (GII)、サポ、アイチ、アストロ
	9	3日	-	2.1E+08	6.4E+06	ノロ (GI, GII)、サポ、アストロ
149	9	8日	3.6E+09	-	-	サポ
	12	8日	1.6E+10	-	-	サポ
150	4	2日	1.3E+05	-	-	サポ
	7	2日	2.2E+09	-	-	サポ
234	2	1日	-	1.8E+09	1.3E+09	ノロ (GI, GII)、サポ
	8	3日	8.7E+04	6.3E+09	4.7E+09	ノロ (GI, GII)、サポ、アストロ
	14	3日	-	6.1E+06	4.4E+08	ノロ (GI, GII)、サポ、アストロ
643	1	3日	4.0E+04	-	1.3E+08	ノロ (GII)、サポ、アイチ
	3	2日	7.6E+06	-	4.2E+09	ノロ (GII)、サポ
	4	3日	3.8E+07	-	2.0E+09	ノロ (GII)、サポ
	5	3日	7.4E+05	5.0E+07	3.8E+06	ノロ (GI, GII)、サポ
1050	2	4日	-	1.0E+08	3.5E+08	ノロ (GI, GII)、サポ、アイチ

※-: 定量限界値未満

## 食品の関与が推定される集団胃腸炎におけるウイルス検索

研究協力者	森 功次	東京都健康安全研究センター
	秋場 哲哉	東京都健康安全研究センター
	永野 美由紀	東京都健康安全研究センター
	林 志直	東京都健康安全研究センター
研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所

### 研究要旨

集団胃腸炎発生時にノロウイルス(NV)以外の胃腸炎起因ウイルスについて検索を行い、それらの発生状況についてデータの集積はかった。2010年4月～12月にかけて得られた431件の胃腸炎事例についてウイルス検索を実施したところ、ウイルス検出事例数は213事例(49.4%)であった。内訳はノロウイルスが検出された事例が195事例と多くを占めていたが、17事例(8.0%)はその他のウイルスが関与したと考えられた。これらNV以外のウイルスが検出された事例のうち、食品の関与が推定される集団胃腸炎はサポウイルスによるものが2事例、A群ロタウイルスによるものが1事例であった。これらの結果からNV以外の胃腸炎ウイルスが小児など低年齢層の施設内で発生する集団胃腸炎のみでなく、成人年齢層における食中毒および食中毒疑い事例にも関与していることが確認できた。

### A. 研究目的

ウイルス性胃腸炎集団事例の発生は12～1月に発生のピークがみられるのが例年の傾向である。集団事例において、その主な病因ウイルスはノロウイルス(Norovirus:NV)であり、食品や調理従事者の関与が推定される食中毒事例および、幼稚園や小学校などのほか高齢者施設内でみられる、食品を介さないと考えられる施設内流行においてもその傾向は

同様である。

しかし、ウイルス性胃腸炎の起因ウイルスはNVのほか、サポウイルス(Sapovirus:SV)、ロタウイルス(Rotavirus:RV)、アストロウイルス(Astrovirus:AstV)、アデノウイルス(Adenovirus:AdV)が知られており、食品を介しないと推定される事例も含まれるが、東京都では過去にこれらウイルスによる集団胃腸炎事例をいずれも経験し

ている。

そこで、食品の関与が推定される集団胃腸炎発生時に、原因物質の確定される率を向上させることを目的としてNV以外のウイルスについて集団胃腸炎の起因ウイルスであるかを検討し、それらの発生状況についてデータの集積をはかった。

## B. 研究方法

### 1. 材料

2010年4月～12月にかけて得られた、431件の胃腸炎事例に関連した糞便を主体に検査材料とした。

### 2. 胃腸炎ウイルスの検索

Kageyamaら(J Clin Microbiol, 2003)のreal-time PCR法によるNV検索の結果が陰性の場合にSV、RV (GARV および GCRV)、AstV、AdVについてreal-time PCR法を用いて検索した。SV検索にはOkaら(J Med Virol, 2006)、GARV検索にはJothikumarら(J Virol Method, 2009)の検出系を用いた。GCRV、AstV、AdV検索には表1のプライマーおよびプローブを用いた。

### 3. 塩基配列の解析

real-time PCR 陽性の場合 conventional PCR を実施し、明瞭なバンドの得られた事例についてはダイレクトシーケンスにより塩基配列解析を試みた。

(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. 胃腸炎ウイルス検出状況

ウイルス検索を実施した431事例のう

ち、検索対象としたウイルスが検出された事例数は213事例(49.4%)であった。内訳はNVが検出された事例が195事例(91.5%)と多くを占めていたが、SVが9事例(4.2%)、GARVが6事例(2.8%)、SV+GARVおよびAstV+AdVが各1事例(0.5%)で検出され、NV以外のウイルスが関与したと考えられる事例は17事例(8.0%)であった(表2)。検出数に大きな差はあるが、NVの次に多く検出されたウイルスはSVであった。SVの検出時期は4月、6月、7月、8月、11月および12月と季節的な特徴はみられなかった(図1)。

これらNV以外のウイルスが検出された事例のうち、食品の関与が推定される集団胃腸炎はSVによるものが2事例、GARVによるものが1事例であった。この3事例はいずれも他県市が関連し、調理従事者からウイルスが検出された事例であった。

### 2. 二枚貝類の関与した事例におけるウイルス検索

今回の調査期間に二枚貝類を喫食した17事例の発症者46件について、NV以外の対象ウイルスについても検索を実施したところ、3事例(17.6%)の3件(6.3%)からSVが検出された(表3)。

### 3. 塩基配列の解析

検出されたウイルスの塩基配列による遺伝子型を表4に示した。SVの関与が推定される10事例のうち4事例はGI、6事例はGIIであった。また、食品の関与が推定されたSV胃腸炎において検出されたSVの遺伝子型はGIがOshima2009類似株、GIIがcruiseship類似株であった。GARVの関与が推定される7事例はGIが2事

例、G3が2事例、G9が1事例、明瞭なバンドが得られず型別不能であった事例が2事例であった(SVとGARVの同時検出事例はそれぞれ再掲)。また、AstVとAdVの同時検出事例からはAstV type1 およびAdV type41 がそれぞれ検出された。

#### D. 考察

ウイルス性胃腸炎の起因ウイルスとして、NV が大きな割合を占めていることは例年の流行と同様であった。しかし2010年4月から12月にかけて発生したウイルス性胃腸炎の1割弱(8.0%)からその他のウイルスが検出された。そのうち食品の関与が推定される事例においてはSVやGARVが検出された。これらウイルスが小児など低年齢層の施設内で発生する集団胃腸炎でなく成人年齢層における食中毒および食中毒疑い事例が発生していることも確認できた。

二枚貝類関連事例からのSV検出率はNVの15事例(85.2%)36件(75.0%)に比較すると低率であった。SVが検出された3件はいずれもNVが同時に検出されていた。二枚貝類からのSV検出が報告されていることから、今後も二枚貝類の関連した胃腸炎事例についてSVの関与を引き続き探索していく必要があると考えられた。

食品の関与が推定されたSV胃腸炎において検出されたSVの遺伝子型はGIがOshima2009類似株、GIIがcruiseship類似株であった。これら2つの型以外のSVは本調査期間中に食品の関与していない事例から検出されており(図2)、さまざまな型のSVが分布しているものと推察された。

#### E. 結論

NV以外の胃腸炎ウイルスが小児など低年齢層の施設内で発生する集団胃腸炎のみでなく、成人年齢層における食中毒および食中毒疑い事例が発生していることが確認できた。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
準備中

#### 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

表1 ウイルス検索に用いたprimerおよびprobe

対象 ウイルス	primer およびprobe	sequence	position
GCRV	CRV7F	gctgcATTTggTAGTgACTgYgA	616 - 638
	CRV7R	AgTTTCTgTACTAgCCggTgAACA	682 - 705
	CRV7 (FAM-TAMRA)	TCTgTCTgTCCATTAgATACTAC AAgTAATggAATYgg	642 - 680 (preston : X77258)
Astrovirus	AstF	CATgggAAgCTCCTRTgCTAYCA	4144 - 4167
	AstR	gABAaggCAgTgYTCYACA	4213 - 4230
	Ast (TET-TAMRA)	TgCTYgCTgCRTTYATggCAgARg	4169 - 4193 (OX1 : ATPOLY6A)
Adenovirus	AdhF	CAggACgCCTCggAgTAA	17649 - 17666
	AdFhR	CCAgCgTAAAgCgCACTT	17839 - 17856
	Adh (VIC-MGB)	TTYgCCCgYgCCAC	17688 - 17701 (Tak : DQ315364)

表2 東京都における胃腸炎ウイルス検出状況 (2010年4月～12月)

検査事例数	431	(検出事例における割合)
ウイルス検出事例数	213	(100%)
NVG I	9	(4.2%)
NVG II	180	(84.5%)
NVG I +G II	6	(2.8%)
SV	9	(4.2%)
GARV	6	(2.8%)
その他	2*	(0.9%)

\* : SV+GARV1事例、Astro+Adeno1事例

図1 東京都における胃腸炎ウイルス検出状況（月別、2010年4月～12月）

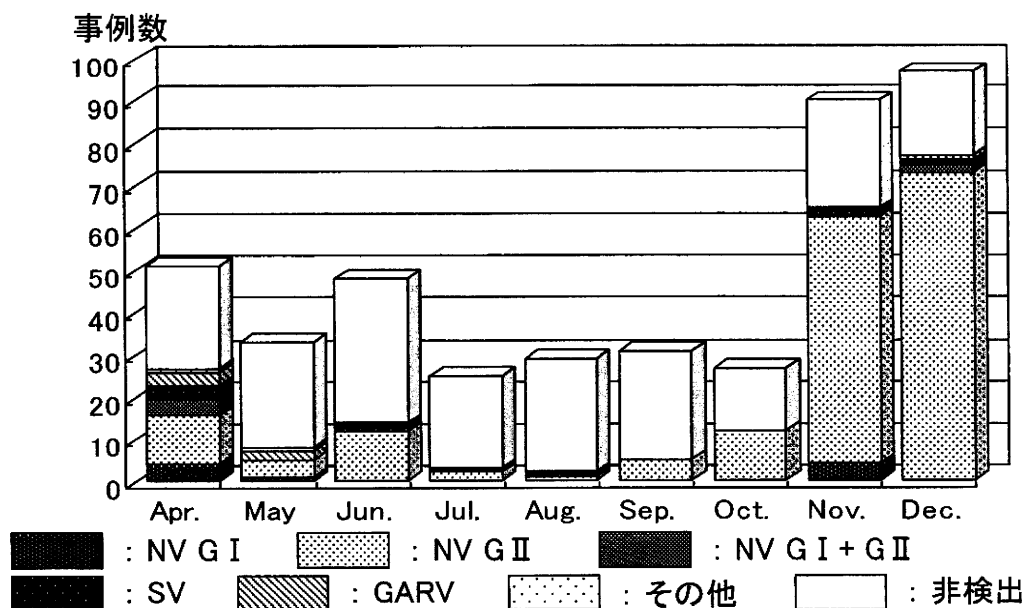


表3 二枚貝類の関与した事例の発症者における胃腸炎ウイルス検索  
(東京都、2009年4月～12月)

事例	検査数	NV検出数	SV検出数
A	1	1	0
B	3	0	0
C	1	1	0
D	2	2	0
E	10	5	1
F	3	2	0
G	1	1	0
H	1	1	0
I	2	0	0
J	1	1	0
K	1	1	0
L	3	3	0
M	3	3	0
N	2	2	0
O	7	7	1
P	5	5	1
Q	1	1	0

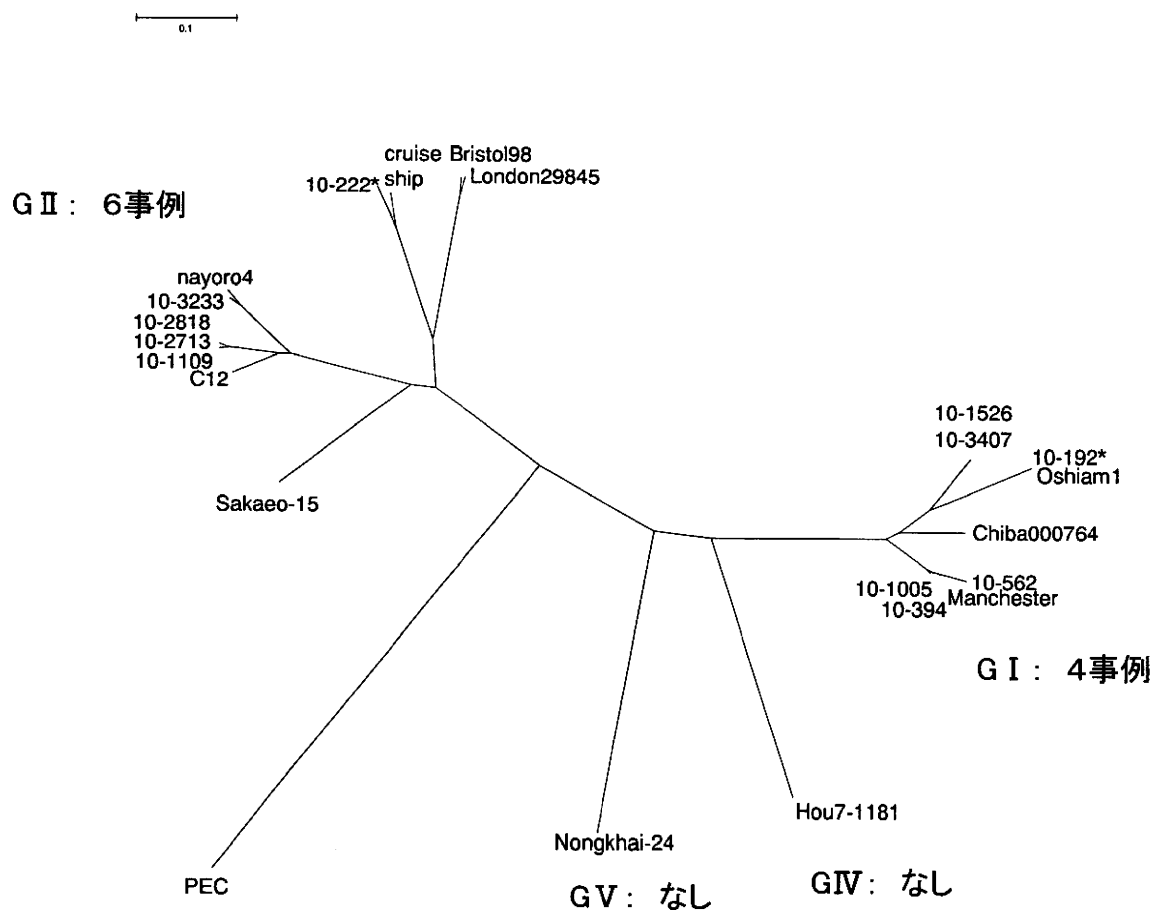
表4 : 検出ウイルスの型別状況 (東京都、2010年4月～12月)

検出事例数		
SV	10*	G I : 4、G II : 6
GARV	7*	G1:2、G3:2、G9:1、UT:2
AstrV	1**	type1:1
AdV	1**	type41:1

\*: SVとGARV同時検出の1事例再掲

\*\* : AstVよAdV同時検出の1事例再掲

図2 東京都で検出されたSVの分布 (2010年4月～12月、\*は食品関連事例)





## カキ関連食中毒事例からの胃腸炎ウイルスの検出 および国産生食用カキのノロウイルス汚染調査

研究協力者	入谷 展弘	大阪市立環境科学研究所
	改田 厚	大阪市立環境科学研究所
	阿部 仁一郎	大阪市立環境科学研究所
	関口 純一郎	大阪市立環境科学研究所
	久保 英幸	大阪市立環境科学研究所
研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所

### 研究要旨

2004 年 12 月以降に発生したカキ関連食中毒事例についてノロウイルス以外の胃腸炎ウイルスの検索を行った。その結果、アイチウイルスが 5 事例(17.2%) 7 検体 (9.5%)、サポウイルスが 3 事例 (10.3%) 3 検体 (4.1%) から検出され、ノロウイルス以外の胃腸炎ウイルスもカキ関連食中毒の原因の一つになっている可能性が示された。

2010 年 12 月初旬に市販されていた国産生食用カキについて、ノロウイルスの検索を行ったところ、77.8%からノロウイルスが検出された。2010-2011 シーズンは、大阪市においてカキ関連食中毒事例の発生がほとんど認められなかったが、国産市販生食用カキにノロウイルス汚染が高率に認められたことから、今後もノロウイルス食中毒の感染源として注意が必要であると考えられた。

### A. 研究目的

ウイルス性食中毒の主な病因は、ノロウイルスであることが知られている。しかし、サポウイルスなど他の胃腸炎ウイルスと食中毒との関連については不明な点が多い。

今回、ノロウイルス以外の胃腸炎原因ウイルスと食中毒の関連性を明らかにすることを目的とした。また、生食用カキにおけるノロウイルスの

汚染状況把握とカキからのノロウイルス検査方法の確立を目的に市販生食用カキのノロウイルス検査を実施した。

### B. 研究方法

#### 1. 材料

2004 年 12 月以降に当研究所に搬入されたカキ関連食中毒 29 事例の患者糞便 74 検体 (すべてノロウイルス検

査済)について、サポウイルス、アストロウイルス、アイチウイルス、腸管アデノウイルス、A群ロタウイルスの検査を実施した。

国産生食用カキは、2010年12月初旬に市販されていた9ロットについて、1ロットにつきカキ3個をまとめて、ノロウイルスの検査に用いた。9ロットの産地は、広島県産3ロット、岡山県産2ロット、兵庫県産2ロット、三重県産1ロット、宮城県産1ロットであった。

## 2. カキ関連食中毒患者からのウイルス検出

サポウイルスは Oka らのリアルタイム RT-PCR 法 (JMV78, 1347-53, 2006)、アストロウイルスは Sakon らの RT-PCR 法 (JMV61, 125-131, 2000)、アイチウイルスは Yamashita らの RT-PCR 法 (JCM38, 2955-61, 2000)、A群ロタウイルスおよび腸管アデノウイルスは市販の ELISA キット (ロタクロンおよびアデノクロン E、TFB) を用いて検査を実施した。

## 3. カキからのノロウイルス検出

カキは、むき身カキから中腸腺を摘出し、凍結融解により粉碎した後、PBS(-)で30-40%乳剤を作製し、野田ら(広島市衛生研究所年報 25, 35-43, 2006)のアミラーゼ処理・PEG法を用いて前処理を実施した。即ち、上記カキ乳剤に25mgの $\alpha$ -アミラーゼを加えて、37℃で60分間攪拌し、グリコーゲンの消化を行った。アミラーゼ処理後、10,000rpm 20分間遠心した上清にPEG溶液(最終濃度12%PEG#6000および1M NaCl)を加え、4℃で2-3時間放置した。さらに4℃ 10,000rpm 20分間遠心した沈渣に0.4mlのDEPC処理水を加

え、RNA抽出用試料とした。

ウイルス RNA の抽出には High Pure Viral RNA kit (Roche)、抽出した RNA の DNase 処理には Turbo DNA-free kit (ABI)、cDNA の作製には High-Capacity cDNA RT kit (ABI)、ノロウイルス検査には Kageyama らのリアルタイム RT-PCR (JCM41, 1548-57, 2003) を用いた。さらにノロウイルスが検出された検体については、Capsid N/S 領域の遺伝子を増幅し、遺伝子型別した。

## (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. カキ関連食中毒事例からのウイルス検出状況

表1に各ウイルスの検出結果を示した。アイチウイルスが最も多く検出され、5事例(17.2%)7検体(9.5%)が陽性であった。次いでサポウイルスが多く、3事例(10.3%)3検体(4.1%)から検出された。アイチウイルス陽性7検体のうち5検体(71.4%)、サポウイルス陽性3検体のうち2検体(66.7%)はノロウイルスとの共検出であった(表2)。1検体は(表2検体番号05-26-1)は、同じ患者から、3種類のウイルスが検出された。他のウイルスはすべて陰性であった。

### 2. 生食用かきのノロウイルス汚染状況

2010年12月に収去された9ロット中7ロット(77.8%)からノロウイルスが検出された(表3)。産地別では、岡山県産

2ロット、兵庫県産2ロット、広島県産1ロット、三重県産1ロット、宮城県産1ロットと今回検査したすべての産地において陽性となった。カキ1個あたりのウイルス量（RNAコピー数）は80～1333コピーであり、検体番号0Y10-4を除いたすべての陽性検体においてリアルタイムRT-PCR法の判定基準値である実測値10コピー以上であった。

生食用カキから検出されたノロウイルスの遺伝子型は、GII.4型が2ロット（検体番号0Y10-2および0Y10-4）、GII.2型が2ロット（検体番号0Y10-5および0Y10-9）、GII.6型が1ロット（検体番号0Y10-8）であった。検体番号0Y10-3および0Y10-6については、リアルタイムRT-PCRでノロウイルス陽性と判定されたが、Capsid N/S領域の遺伝子は増幅されなかったため、遺伝子型は不明である。GII.4型に分類された2株のノロウイルスについては、検体番号0Y10-2がNewOrleans1805/2009/US株（GenBank accession number GU445325）に、0Y10-4が2006b株に近縁であった。

#### D. 考察

今回対象としたカキ関連食中毒事例の患者糞便材料より、アイチウイルスとサポウイルスが検出されたことから、ノロウイルス以外の胃腸炎ウイルスがカキ関連食中毒の原因の一つになっている可能性が示された。しかしながら、検出率がノロウイルスと比べて低いことや混合感染の割合が高かったことから、これらのウイルスと食中毒との関連性を明らかにするためには、さらに調査を継続する必

要がある。食中毒様症状を呈した患者から、単独で検出された3例（表2 検体番号08-5-1、08-28-1 および4）については、他の胃腸炎ウイルスや食中毒起因細菌が陰性であったことから、食中毒の原因となっていたことが示唆された。カキには様々なウイルスが蓄積されていることが予想され、今回の結果からも、カキの生食にはノロウイルス以外のウイルス感染のリスクがあることが示された。

ノロウイルス陽性事例の推定原因として、最近ではカキ以外の食品やヒトからヒトへ直接感染が拡がった場合が増加してきており、カキが原因となる事例は減少傾向にある。2010-2011シーズンの大阪市におけるカキ関連事例は、現時点では1事例のみである。今回、2010年12月初旬のみに市販されていた生食用カキであったが、高率にノロウイルスが検出されたことから、今後もノロウイルス食中毒の感染源として十分な注意が必要であると考えられた。

ウイルス性食中毒の原因究明や汚染経路の解明には、カキや他の食品からの信頼性の高いウイルス検査法を確立する必要がある。カキの前処理過程においてはアミラーゼ処理法が有用であることが既に確認されており、実際の検査に導入されている。さらに今回は、RNA抽出、DNase処理およびcDNAの作製において有用とされる方法を導入して検査を実施したところ、1ロットを除いたすべての陽性検体においてはリアルタイムRT-PCRの判定基準値以上という良好な結果が得られた。新しく導入した方法は、カキからのウイルス検査において有用であると考えられた。

## E. 結論

・ノロウイルス以外の胃腸炎ウイルスがカキ関連食中毒の原因の一つになっている可能性が示された。

・アイチウイルスまたはサポウイルスが単独で検出された検体については、それぞれが食中毒の原因ウイルスであったことが示唆された。

・カキの生食にはノロウイルス以外のウイルス感染リスクがあることが示された。

・生食用カキには依然としてノロウイルス汚染が認められ、今後もノロウイルス食中毒の感染源として注意する必要がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) N. Iritani, A. Kaida, H. Kubo, N. Abe, K. Goto, H. Ogura, and Y. Seto: Molecular epidemiology of noroviruses detected in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis in Osaka City, Japan, in seasons from 1996-1997 through 2008-2009, *Journal of Medical Virology* 82, 2097-2105 (2010)
- 2) 入谷展弘, 改田厚, 久保英幸, 阿部仁一郎, 西尾治, 後藤薫, 長谷篤: 市販生食用カキにおけるノロウイルスおよび A 型肝炎ウイルス汚染調査 (2006-2007~2009-2010 シーズン),

大阪市立環境科学研究所報告 調査・研究年報 平成 21 年度版 第 72 集, 7-12 (2010)

- 3) 入谷展弘, 久保英幸, 改田厚, 関口純一郎, 後藤薫, 長谷篤, 齊藤武志, 石黒正博, 鎌倉和哉, 吉田英樹, 清原知子, 石井孝司, 野田衛: 大阪市で認められた A 型肝炎 3 症例について, *IASR* 31 (No. 368), 296-297 (2010)
  - 4) 石井孝司, 清原知子, 吉崎佐矢香, 佐藤知子, 脇田隆字, 中村奈緒美, 島田智恵, 中島一敏, 多田有希, 野田衛, 三上稔之, 齊藤哲也, 山崎彰美, 埼玉県衛生研究所, 清水英明, 宇宿秀三, 長岡宏美, 吉田徹也, 岡村雄一郎, 小原真弓, 柴田伸一郎, 楠原一, 近野真由美, 入谷展弘, 奴久妻聡一, 川西伸也, 榊原啓子, 榎本義正, 岡本玲子, 世良暢之, 川本大輔, 増本久人, 上村晃秀: 2010 年春季に日本で多発した A 型肝炎の分子疫学的解析, *IASR* 31 (No. 368), 287-289 (2010)
  - 5) 井川久史, 大賀康弘, 中山敬子, 大西慎司, 入谷展弘, 改田厚, 阿部仁一郎, 久保英幸, 関口純一郎, 小笠原準, 長谷篤, 中田恵子, 山崎謙治, 左近(田中)直美, 依田知子, 久米田裕子, 吉田徹也: 夏季に結婚式場で発生したノロウイルスによる集団胃腸炎事例—大阪市, 病原微生物検出情報 月報 31 (No. 369), 321-322 (2010)
- ### 2. 学会発表
- 1) T. Sankata, T. Nakano, K. Taniguchi, A. Yui, N. Iritani, N. Hurelbaatar, G. Batbaatar, C. Batsuren, G. Adya,

and G. Choijants: Detection of rotavirus, norovirus, sapovirus and astrovirus from patient with acute gastroenteritis in infant in Mongolia, 2nd International Conference "Current Advances in Immunology, Microbiology and Allergology", Ulaanbaatar Mogolia (2010.6.24-26)

- 2) 入谷展弘, 改田厚, 久保英幸, 阿部仁一郎, 西尾治, 後藤薫, 長谷篤: 市販生食用カキにおけるノロウイルスおよび A 型肝炎ウイルス汚染調査 (2006-2007~2009-2010 シーズン), 平成 22 年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部ウイルス部会総会, 奈良 (2010.9.17)
- 3) 入谷展弘, 改田厚, 久保英幸, 関口純一郎, 小倉壽, 勢戸祥介: 2009/10 シーズンに大阪市で認められた GII.2 型ノロウイルス流行, 第 58 回日本ウイルス学会, 徳島 (2010.11.7-9)
- 4) 野田衛, 入谷展弘, 中田恵子, 斎藤博之, 田中忍, 西川 篤, 北堀吉映, 三谷亜里子, 三瀬敬治, 山下和予, 岡智一郎, 片山和彦, 岡部信彦: 関

西で同時多発的に発生したノロウイルス食中毒事例の解析, 第 58 回日本ウイルス学会, 徳島 (2010.11.7-9)

- 5) 實方剛, 中野俊也, 谷口孝喜, 油井晶子, 入谷展弘, H. Nyamdavaa, B. Gunchin, B. Choijants, G. Choijants: モンゴル国の急性胃腸炎患者から検出された胃腸炎ウイルス, 第 58 回日本ウイルス学会, 徳島 (2010.11.7-9)
- 6) 野田衛, 片山和彦, 石井孝司, 岡智一郎, 多田有希, 山下和予, 三瀬敬治, 吉澄志摩, 植木洋, 林志直, 山崎匠子, 小原真弓, 吉田徹也, 小林慎一, 中田恵子, 入谷展弘, 三好龍也, 阿部勝彦, 山下育孝, 糸数清正, 岡部信彦: 塩基配列情報共有化の食品媒介ウイルス感染症の疫学調査への応用, 第 31 回日本食品微生物学会, 大津 (2010.11.11-12)

#### 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

表1 カキ関連食中毒事例からのウイルス検出状況

ウイルス	陽性事例数 (%)	陽性検体数 (%)
アイチウイルス	5 (17.2)	7 (9.5)
サポウイルス	3 (10.3)	3 (4.1)
アストロウイルス	0	0
A群ロタウイルス	0	0
腸管アデノウイルス	0	0
ノロウイルス	26 (89.7)	53 (71.6)

表2 アイチウイルスおよびサポウイルスが検出されたカキ関連食中毒事例

事例番号	検体番号	ノロウイルス	アイチウイルス	サポウイルス
04-169	1	GI, GII	-	-
	2	-	-	-
	3	-	-	-
	4	-	-	-
	5	GII	+	-
	6	GI	+	-
	7	GI, GII	-	-
	8	-	-	-
	9	GI	-	-
	10	GI, GII	-	-
05-26	1	GII	+	GI
	2	GI	-	-
	3	GI	-	-
08-5	1	-	-	GIV
08-8	1	GII	+	-
08-28	1	GI	-	-
	2	-	+	-
	3	GII	-	-
	4	-	+	-
10-38	1	GI, GII	-	-
	2	GI	-	GI
10-40	1	GII	+	-

表3 国産市販生食用カキからのノロウイルスの検出結果<sup>1)</sup>

検体 番号	採取海域・産地	採取年月	ノロウイルス検査			
			リアルタイム RT-PCR <sup>2)</sup> (コピー/個)		PCR	遺伝子型
			GI	GII		
OY10-1	広島県中部呉湾	2010年12月	-	-	NT	
OY10-2	岡山県虫明海域	2010年12月	-	1333	+	GII.4mix
OY10-3 <sup>3)</sup>	三重県鳥羽海域浦村	2010年12月	-	693	-	
OY10-4	広島県中部呉湾	2010年12月	-	80	+	GII.4
OY10-5	兵庫県相生海域	2010年12月	-	253	+	GII.2
OY10-6 <sup>3)</sup>	岡山県虫明海域	2010年12月	-	547	-	
OY10-7	広島県広島湾	2010年12月	-	-	NT	
OY10-8	宮城県海域	2010年12月	-	133	+	GII.6
OY10-9	兵庫県坂越海域	2010年12月	-	787	+	GII.2

1) -は陰性、+は陽性、NTは“not tested”

2) カキ1個あたりのNV RNA コピー数

3) PCR 陰性だが、リアルタイム RT-PCR の実測値が10<sup>3</sup>以上のため、ノロウイルス陽性と判定

## 二枚貝関連食中毒事例からの下痢症ウイルスの検索および疫学解析

研究協力者	吉田 徹也	長野県環境保全研究所
研究協力者	宮坂たつ子	長野県環境保全研究所
研究協力者	畔上 由佳	長野県環境保全研究所
研究協力者	内山友里恵	長野県環境保全研究所
研究協力者	笠原ひとみ	長野県環境保全研究所
研究協力者	上田ひろみ	長野県環境保全研究所
研究協力者	長瀬 博	長野県環境保全研究所
研究協力者	藤田 暁	長野県環境保全研究所
研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所

### 研究要旨

二枚貝(カキ)関連食中毒事例における、ノロウイルス(NoV)を含む下痢症ウイルスの疫学を明らかにし、食品衛生上のリスクを把握するため、患者糞便、食品残品等を試料としてNoV、サポウイルス(SaV)、アイチウイルス(AiV)、アストロウイルス(AstV)、A群ロタウイルス(ARotV)およびC群ロタウイルス(CRotV)遺伝子の検索を行った。その結果、患者等糞便からはNoV(G I・G II)以外にSaVが17.1%(6/35)およびAiVが14.3%(5/35)の割合で検出された。また、食中毒の原因食品として疑われた加熱調理用カキの同一ロット品についてウイルス遺伝子検索を行ったところ、NoV(G I・G II)以外にAiV(4/10)およびAstV(4/10)が高率に検出された。

以上のことから、二枚貝(カキ)関連食中毒事例については、NoV以外にSaVおよびAiVが食品衛生上のリスクになっていると推察された。

### A. 研究目的

カキ等二枚貝を生あるいは加熱調理不足で喫食することによる、ノロウイルス(NoV)が原因の食品媒介感染症(食中毒)が発生することは良く知られている。しかしながら、NoV以外の下痢症ウイルスの検出報告は、少ないのが現状で

ある。そこで、NoV以外の下痢症ウイルスの疫学を明らかにするため、長野県内で発生した二枚貝(カキ)が原因食品と推定された食中毒事例について、ウイルス遺伝子検索を行った。

### B. 研究方法



## 1. 調査対象事例

2006年から2010年の間に長野県内で発生した二枚貝（カキ）関連食中毒4事例を調査対象事例とした。

## 2. 材料

二枚貝（カキ）関連食中毒事例の患者および推定原因食品の二枚貝（カキ）喫食者（施設利用者および調理従事者含む）の糞便を検査材料とした。糞便はPBS(-)で10%程度の乳剤とし、4℃で10,000rpm、20分間遠心分離し、その上清をRNA抽出試料として用いた。

また、検食あるいは推定原因食品と同一ロットの食材（冷凍加熱調理用カキ）についても検査材料とした。カキは、「超遠心沈殿法（平成15年11月5日厚生労働省通知）」あるいは野田ら（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））の「アミラーゼ処理直接法」のいずれかの方法で前処理を行った。

「超遠心沈殿法」は、中腸腺をPBS(-)で10%乳剤にし、4℃で10,000rpm、20分間遠心分離後、その上清を30%Sucroseに重層し4℃で40,000rpm、120分間超遠心濃縮を行った。沈渣に200 $\mu$ lの滅菌蒸留水を加え、RNA抽出用試料とした。

「アミラーゼ処理直接法」は、中腸腺に等量のPBS(-)を加え乳剤にし、その乳剤1mlに対し $\alpha$ -アミラーゼを12.5mgの割合に添加後、35℃で1時間グリコーゲンを消化した。消化後の乳剤を室温で12,000rpm、7分間遠心分離し、その上清をRNA抽出用試料とした。なお、2個の中腸腺を1検体として、検査を実施した。

## 3. RNA抽出、DNase処理およびRT反応

RNAの抽出はQIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)により行った。抽出したRNA溶液はDNase (Takara)によって処理され、さらにSuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) およびRandom hexamerを用いてcDNAを合成した。

## 4. 下痢症ウイルス遺伝子検索方法

今回遺伝子検索を行ったのは、NoV、サポウイルス (SaV)、アイチウイルス (AiV)、アストロウイルス (AstV)、A群ロタウイルス (ARotV) およびC群ロタウイルス (CRotV) である。

NoV 遺伝子の検出はKageyamaら (J Clin Microbiol, 41, 2003)、SaVはOkaら (J Med Virol, 78, 2002) のリアルタイムRT-PCR法に準じて行った。

AiV 遺伝子の検出はYamashitaら (J Clin Microbiol, 38, 2000)、AstV 遺伝子の検出はSakonら (J Med Virol, 61, 2000)、ARotVはUshijimaら (J Med Virol, 38, 1992)、CRotVはKuzuyaら (感染症誌, 77, 2003) の報告したRT-PCR法にそれぞれ準じて行った。

## 4. 遺伝子解析方法

遺伝子解析はNoV以外の検出されたウイルスについて実施した。

SaVの遺伝子解析は、Okadaら (Arch Virol, 151, 2002) の報告したF22/R2プライマーによりカプシド領域の一部を増幅し、そのPCR産物をダイレクトシーケンス法またはTAクローニングにより約390ntの塩基配列の決定を行った。その後、Hansmanら (Emerg Infect Dis, 13, 2007) の参照株を用い、遺伝子型別

および分子系統樹解析を行った。

AiV の遺伝子解析は、Yamashita らの報告した C6261/C6779 プライマーにより 3C の C 末端から 3D の N 末端領域の一部を増幅し、その PCR 産物をダイレクトシーケンス法により約 480nt の塩基配列の決定を行った。その後、Pham ら (J Clin Microbiol, 45, 2007) の参照株を用い、遺伝子型別および分子系統樹解析を行った。

AstV 遺伝子は、Sakon らの報告した AC1/AC230 プライマーによりカプシド 3' 末端領域の一部を増幅し、その PCR 産物をダイレクトシーケンス法により約 190nt の塩基配列の決定を行い、遺伝子型別および分子系統樹解析を行った。

#### (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. 二枚貝 (カキ) 関連食中毒事例からの各種下痢症ウイルス遺伝子検索結果

2006 年 12 月から 2010 年 1 月の間に発生した 4 事例について、各種下痢症ウイルスの検索を実施した。その結果、患者等糞便 35 検体中 NoVGI および NoVGII はいずれも 19 検体 (54.3%)、SaV は 6 検体 (17.1%) および AiV は 5 検体 (14.3%) が検出された (表 1 および 2)。一方、同一ロット等カキについては、10 検体中 NoVGI は 2 検体 (20.0%)、NoVGII は 3 検体 (30.0%) および AiV ならびに AstV はそれぞれ 4 検体 (40.0%) が検出された (表 1)。

SaV はヒト糞便からは検出されたもののカキからは検出されず (表 1 および 2)、逆に AstV はヒト糞便からは検出されなかったがカキからは高率に検出された (表 1、2 および 4)。

#### 2. 患者等糞便からの下痢症ウイルス遺伝子検索結果

患者等糞便からの下痢症ウイルス遺伝子の検索結果詳細を表 2 に、下痢症ウイルス遺伝子検出パターンを表 3 に示した。

患者等糞便から各種下痢症ウイルス遺伝子を検索したところ、1 種類のみ検出されたのは 35 検体中 16 検体 (45.7%) で、内訳は NoVGI のみが 9 検体、次いで NoVGII のみが 5 検体 (41.7%) であった。残り 2 検体は、SaV あるいは AiV のいずれかが検出された。

2 種類の下痢症ウイルス遺伝子が検出されたのは 12 検体 (34.3%) で、内訳は NoVGI + NoVGII が 7 検体、NoVGII + AiV が 3 検体および NoVGII + SaV が 2 検体であった。3 種類の下痢症ウイルス遺伝子が検出されたのは 2 検体 (5.7%) で、内訳は NoVGI + SaV (GII) + SaV (GIV) と NoVGI + NoVGII + SaV であった。

最も多くの下痢症ウイルス遺伝子が検出されたのは検体 No. 21-17-7 で、内訳は NoVGI + NoVGII + SaV + AiV の 4 種の下痢症ウイルスであった。本検体は、カキを喫食し発症した調理従事者から採取された。

一方、何らかの胃腸炎症状があったにもかかわらず、4 検体 (11.4%) からは、検索を行った下痢症ウイルス遺伝子は検出されなかった。

#### 3. 事例 No. 21-17 における推定原因食材

と同一ロットの冷凍加熱調理用カキからの下痢症ウイルス遺伝子の検索結果（表4）

本事例は、冷凍加熱調理用カキの加熱調理不足により食中毒が発生したことが、疫学調査結果などから結論付けられた事例であった。当該事例で調理された同一ロットの冷凍加熱調理用カキが残されていたことから、下痢症ウイルスの検索を実施した。その結果、8検体中最も高率に検出されたのはAiVおよびAstVの4検体（50.0%）であった。次いで多かったのは、NoVGIIの3検体（37.5%）でNoVGIは2検体（25.0%）であった。SaV、ARotVおよびCRotVはいずれも不検出であった。

また、下痢症ウイルス遺伝子が検出された6検体のうち5検体は、複数のウイルス遺伝子が検出された。検体No. 21-17\_0-7および21-17\_0-8の2検体は、3種類のウイルスが検出された。

#### 4. 検出されたウイルスの遺伝子解析結果

SaVは患者等糞便6検体から7株が検出され、遺伝子型別したところ、GIが1株、GIIが4株およびGIVが2株であった（表5）。検体No. 19-33-11からは2株のSaVが検出され、遺伝子群はGII（Nagano 33-11-2/Jan2008/JPN）およびGIV（Nagano 33-11-1/Jan2008/JPN）であった（表2、図1）。また、同じ事例から検出された同じ遺伝子群のSaV株の配列はそれぞれ非常に近縁であった（図1）。

AiVは患者糞便5検体およびカキ4検体の合計9検体から9株が検出され、すべて遺伝子型Aに分類された（表6）。系統樹解析の結果、検体No. 21-17-7の患者糞

便由来株（Nagano17-7/Oct2009/JPN）およびカキ由来4株（Nagano17-0ys1/Oct2009/JPN、Nagano17-0ys2/Oct2009/JPN、Nagano17-0ys3/Oct2009/JPN およびNagano17-0ys8/Oct2009/JPN）は非常に近縁であった（図2）。また、事例No. 19-33の患者由来3株は、同じクラスターに分類された（図2）。

AstVは事例No. 21-17の原因と推定された、同一ロットの冷凍加熱調理用カキ残品8検体中4検体から4株が検出された。遺伝子型別を実施した結果、3株は遺伝子型T1に、残りの1株はT8に分類された（表7、図3）。

#### D. 考察

今回、二枚貝（カキ）関連食中毒事例における、NoVを含む下痢症ウイルスによる疫学を明らかにするため、患者糞便、食品残品等を試料としてNoV、SaV、AiV、AstV、ARotVおよびCRotVの遺伝子検索を行った。

患者等糞便35検体からNoVGIおよびNoVGIIがそれぞれ19検体（54.3%）と最も高率に検出された。その他としては、SaVが6検体（17.1%）およびAiVが5検体（14.3%）と比較的高率に検出された。これらのことから、カキ関連食中毒事例において、NoV以外のリスクとしてはSaVおよびAiVについて今後検討を加える必要があると考えられた。

カキ関連食中毒事例で推定原因食品（食材）として採取されたカキについてウイルス検索を行ったところ、患者等糞便から検出率の高いNoVよりも、AiVやAstV遺伝子が高率に検出されることが判

明した。興味深いことに、カキからは AstV が高率に検出されたものの、患者等糞便からはまったく検出されなかった。可能性の一つとして、これら患者の多くが AstV に対する免疫を獲得していたことが推察された。これらのことから、AstV は高率に原因食材のカキを汚染しているが、食品衛生上のリスクとしては SaV や AiV に比べて低い可能性があると考えられた。

今回の調査で、事例 No. 21-17 において患者糞便由来 AiV 株および推定原因食材のカキ由来 AiV 株が遺伝学的に非常に近縁であった(図 2) ことから、これらの株の因果関係が強く示唆された。

Guyader ら (J Clin Microbiol, 46, 2008) は、フランスにおけるカキ関連の集団感染性胃腸炎事例において我々と同様の調査を実施し、エンテロウイルス (EV) が 12 検体中 6 検体 (50.0%) から検出されたと報告している。このことから、今後は EV についても調査を追加し、食品衛生上のリスクを明らかにする必要があるかもしれない。

## E. 結論

二枚貝 (カキ) 関連食中毒事例について各種下痢症ウイルス遺伝子を検索したところ、NoV 以外に患者等糞便からは SaV および AiV 遺伝子が比較的高率に検出された。推定原因食品 (食材) のカキからは、NoV よりも AiV および AstV が高率に検出された。

同一事例の患者糞便由来 AiV 株および推定原因食材のカキ由来 AiV 株は遺伝学的に非常に近縁であったことから、因果関係が強く示唆された。

二枚貝 (カキ) 関連食中毒事例については、NoV 以外に SaV および AiV が食品衛生上のリスクになっていると推察された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 吉田徹也, 中沢春幸: 塵埃感染の疑われたノロウイルスによる集団感染性胃腸炎事例. 感染症誌, 84: 702-707, 2010.

2) 吉田徹也, 宮坂たつ子, 畔上由佳, 内山友里恵, 笠原ひとみ, 上田ひろみ, 長瀬博, 藤田暁, 野田衛: 掃除機ダストにおけるノロウイルスおよびサポウイルス汚染実態調査. 病原微生物検出情報, 31: 317-319, 2010.

### 2. 学会発表

吉田徹也, 森功次, 秋場哲哉, 永野美由紀, 宇宿秀三, 熊崎真琴, 宮坂たつ子, 畔上由佳, 内山友里恵, 笠原ひとみ, 上田ひろみ, 長瀬博, 藤田暁: アストロウイルス血清型 8 型による集団感染性胃腸炎事例. 日本ウイルス学会第 58 回学術集会, 2010. 11, 徳島県.

## 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