

## 愛知県における食品媒介ウイルスの検出状況

研究協力者 小林 慎一 愛知県衛生研究所  
研究分担者 田中 智之 堺市衛生研究所

### 研究要旨

2010年4月から2011年3月までに胃腸炎患者から採取された糞便及び吐物、計324検体について胃腸炎ウイルス検索を試み、189検体(58.3%)から病原ウイルスが検出された。検出ウイルスの内訳は、ノロウイルス(NoV)が124検体(65.6%)、A群ロタウイルス(ARV)が47検体(24.9%)、アストロウイルス(AstV)が20検体(10.6%)、サポウイルス(SaV)が2検体(1.1%)であった。NoV陽性124検体中、122検体(98.4%)はGII陽性、3検体(2.4%)はGI陽性であった。このうちの1検体はGIとGIIの両方が検出された。シーケンス解析による遺伝子型別の結果、GI陽性の3検体全てはGI.4、GII陽性122検体中、GII.3が76検体(62.3%)、GII.4が27検体(22.1%)、GII.2が11検体(9.0%)、GII.13が5検体(4.1%)、GII.1、GII.6及びGII.12が各1検体(0.8%)であった。GII.4が優勢である例年と異なり、2010/11シーズンはGII.3が最多で、続いてGII.4の順であった。NoV GII.4陽性27検体の構造タンパク遺伝子の系統樹解析の結果、19検体が2006b型、1検体が2004型、7検体が2009a型に分類されたが、新たなNoV GII.4変異株は検出されなかった。ARV陽性47検体のG血清型は、G1が27検体(57.4%)、G3が19検体(40.4%)、G2が1検体(2.1%)であった。AstV陽性20検体は、1型が15検体(75.0%)、3型が1検体(5.0%)、8型が4検体(20.0%)であった。SaVはカプシド領域の遺伝子解析でGI.1及びGI.2の各1検体に分類された。胃腸炎ウイルスの流行状況の把握は、ウイルス性食中毒検査の効率的な実施に向けての有用な情報提供が期待される。

### A. 研究目的

感染性胃腸炎は感染症法で5類感染症定点把握疾患に定められており、全国約3,000箇所の小児科定点医療機関での患者発生数が毎週国立感染症研究所で集計

されている。また、合わせて、病原体定点医療機関で採取された感染性胃腸炎患者検体の原因ウイルス検索が実施されている。2006/07シーズンはノロウイルス(NoV)による感染性胃腸炎が大流行し、

老人施設、病院や学校でのNoV集団感染事例やNoV感染調理従事者を介した集団食中毒事件も多発し、大きな社会問題となった。感染性胃腸炎患者から検出されるウイルスは集団食中毒の原因ウイルスともなることから、病原体の特定には効率的な食中毒検査に有用な情報となる。

そこで、2010年4月から2011年3月に、愛知県感染症発生動向調査事業により当所に搬入された感染性胃腸炎患者検体からの、病原ウイルス検出と分子疫学的解析の結果を報告する。

## B. 研究方法

### 1. 材料

2010年4月から2011年3月までに感染症発生動向調査事業の病原体定点で採取された、散発性感症性胃腸炎患者の糞便及び吐物、計324検体を用いた。

### 2. ウイルス検査法

Veal infusion broth で糞便を10%乳剤、吐物は50%乳剤とした後、10,000 Gで遠心分離し、上清からHigh Pure Viral RNA Kit (Roche) を用いてウイルスRNAを抽出した。

ノロウイルス (NoV)、A群ロタウイルス (ARV) 及びアストロウイルス (AstV) についてはウイルス性下痢症診断マニュアルに収載されたプライマーを用いたRT-PCR法でウイルス検出検査を実施した。

NoVの遺伝子型は、構造タンパク遺伝子のPCR増幅産物をWizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) で精製後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI) を用いたダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定し、

Katayamaらの方法に従い型別分類した。

また、GII.4 NoV株については、GII.4のクラスター分類を目的として既知のGII.4変異株との相同性を解析した。系統樹解析はClustalWを用いた近隣結合法で行った。

ARVの外殻糖タンパク (VP7) の血清型 (P型) とAstVの血清型はウイルス性下痢症診断マニュアルの血清型別用プライマーを用いた遺伝子増幅法 (PCR) に従って決定した。

サポウイルス (SaV) については、Okadaら方法に従い構造タンパク遺伝子を増幅後、塩基配列を決定し遺伝子型別した。

(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. 食品媒介ウイルス検出状況

324検体中189検体 (58.3%) から病原ウイルスが検出された。検出された胃腸炎ウイルスの内訳はNoVが124検体 (65.6%)、ARVが47検体 (24.9%)、AstVが20検体 (10.6%)、SaVが2検体 (1.1%)であった。

図1に胃腸炎ウイルスの月別検出状況を示した。感染症発生動向調査の感染性胃腸炎患者報告数が11月～12月に急増するのに伴い、NoV GIIの検出頻度が高くなった。その後、NoV流行の終息に伴い、翌年の2～3月にARVが高頻度に検出された。NoVとARVの流行に明らかな季節性が認められた。また、AstVは11月から翌年の1月とNoVの流行期に一致して高頻

度に検出された。SaV は6月と翌年の3月に各1株検出されたのみで、昨シーズンの検出率(0.7%)とほぼ同率であった。

NoV の遺伝子群 (Genogroup) 別では、GI 陽性が3検体、GII 陽性が122検体であった。遺伝子解析の結果、GI 陽性の3検体は全てGI.4であった。GII 陽性の122検体中、GII.3が76検体(62.3%)、次いでGII.4が27検体(22.1%)、GII.2が11検体(9.2%)、GII.13が5検体(4.1%)、GII.1、GII.6及びGII.12が各1検体(0.8%)であった(図2)。GII.4は2006/07シーズンの大流行以降、2009/10シーズンまで主流の遺伝子型であったが、2010/11シーズンはGII.3が主流となった(図3)。

ARV 陽性47検体のG血清型別では、G1が27検体(57.4%)、G2が1検体(2.1%)、G3が19検体(40.4%)であった(図4)。過去5シーズンの愛知県のARVのG血清型の年次推移をみると、主たるG遺伝子型の年次変動を認めたと、G1が最も高頻度に検出され、以下、G3、G9、G2の順で、G1とG3は5年間にわたり毎年検出された。2010/11シーズンも例年通りの検出状況であることが確認された。

AstV 陽性29検体の血清型別では、1型が15検体(51.7%)、3型が1検体(3.4%)、8型が4検体(16.0%)であった。年間を通じて1型が検出されたが、2011年1月に検出されたAstV4検体については全て8型であり、一医療機関で採取された検体であったことから、地域流行を反映した結果と考えられた。

SaV の遺伝子群別及び遺伝子解析の結果は、GI.1とGI.2が各1検体であった。

## 2. GII.4株のクラスター解析

GII.4の遺伝子変異解析を目的としてGII.4陽性の27株についてクラスター分類した結果、2006b型が19株、2004型が1株、2009a型が7株であった(図5)。大きくは2つのクラスターに分類されたが、GII.4株に大きな遺伝子変異は起きていないことが確認された。

## D. 考察

2006/07シーズンにNoVGII.4の2006b型に分類される新たな変異株が出現し、世界的な大流行を起こした。それ以後、2009/10シーズンまでの4シーズンの間、2006a、2008a、2008b、2009a型の新たな変異株の出現が確認されているが、いずれも大きな流行を引き起こすことなく、2006型が主流株として流行してきた。しかしながら、2010/11シーズンはGII.3が台頭し、NoVの流行遺伝子型に変動を認めた。そこで、2009/10シーズンに検出されたGII.4株の亜型解析を実施した結果、2006型と2009a型の2つのクラスターに分類され、新たな変異株の出現は認められなかった。従って、GII.4の流行規模の減少は、2006bの4シーズンに渡る流行による感受性者の減少がひとつの要因と推察された。今後、抗原性の異なる新たなGII.4変異株が出現し、NoV流行を引き起こすことも想定されることから、引き続きGII.4変異株の出現に対する監視が必要である。一方、2010/11に台頭したGII.3についても、遺伝子解析と変異状況の監視が今後の検討課題と考える。

近年、世界的に第二世代ARVワクチン導入が進められており、わが国でも2011年11月にロタリックス接種が開始され、

ロタテックも承認申請の段階にある。ロタリックスは単価ヒトロタウイルス経口弱毒生ワクチン (G1P [8]) であり、ロタテックはウシ・ヒトロタウイルス組換えワクチン (G1~G4 と P[8] の 5 価) である。今後は、2 種の性格の異なるワクチン導入によるワクチン効果の把握及びワクチン株と野外株との遺伝子組換えの監視等を目的とした ARV の G 血清型の把握がワクチン導入後サーベイランスとして重要である。

愛知県では 2010 年 1 月に、SaV GI. 2 による大規模食中毒事例を経験している。この事例以前に GI. 2 が愛知県で検出されたことはなく、2009/2010 シーズンの散発性感染性胃腸炎患者からも例年と異なる特徴を有するような SaV 流行は認められなかった。本シーズンでは GI. 2 は 1 検体検出されたのみであり、地域流行には至らなかったと推察された。従来 SaV は小児の胃腸炎原因ウイルスと考えられてきたが、近年は成人の集団感染例が発生している。わが国では GIV による食中毒事例 (横浜の修学旅行先での事例及び愛媛の結婚式場での事例) や、2010 年の GI. 2 による愛知県及び川崎市の食中毒事例が報告されており、また、ヨーロッパ諸国でも SaV の流行が報告されている。SaV の感染源や感染経路等の疫学的な情報は依然不明とされているが、河川や下水などの環境水や二枚貝から SaV 検出が報告されていることから、SaV も NoV と同じ感染サイクルを有すると推察される。愛知県における SaV の流行は NoV ほど大きくはないものの、その動向には注視していく必要がある。

## E. 結論

2010 年 4 月から 2011 年 3 月までに感染症発生動向調査の病原体定点で採取された、散発性感染性胃腸炎患者の糞便および吐物、計 324 検体中 189 検体 (58.3 %) から胃腸炎ウイルスが検出された。今回、検出ウイルスの大勢は NoV GII であったが、遺伝子解析の結果、GII. 4 型から GII. 3 型へと流行遺伝子型に変化を認めた。今後、ロタウイルスワクチン接種の普及に伴い ARV の流行形態の変動も想定されることから、感染性胃腸炎の病原ウイルスの動向に注目が必要である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

小林慎一、藤原範子、安井善宏、伊藤 雅、山下照夫、藤浦 明、皆川洋子：2005~2009 年の 5 年間における A 群ロタウイルス検出状況—愛知県、病原微生物検出情報、32(3)：72-73, 2011.

### 2. 学会発表

Shinichi Kobayashi, Noriko Fujiwara, Yoshihiro Yasui, Teruo Yamashita, Akira Fujiura, Mamoru Noda, Hiroko Minaga. A Foodborne Outbreak of Sapovirus Linked to Catered Box-Lunch in Japan. XV International Congress of Virology. September 11-16, 2011, Sapporo, Japan

## 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

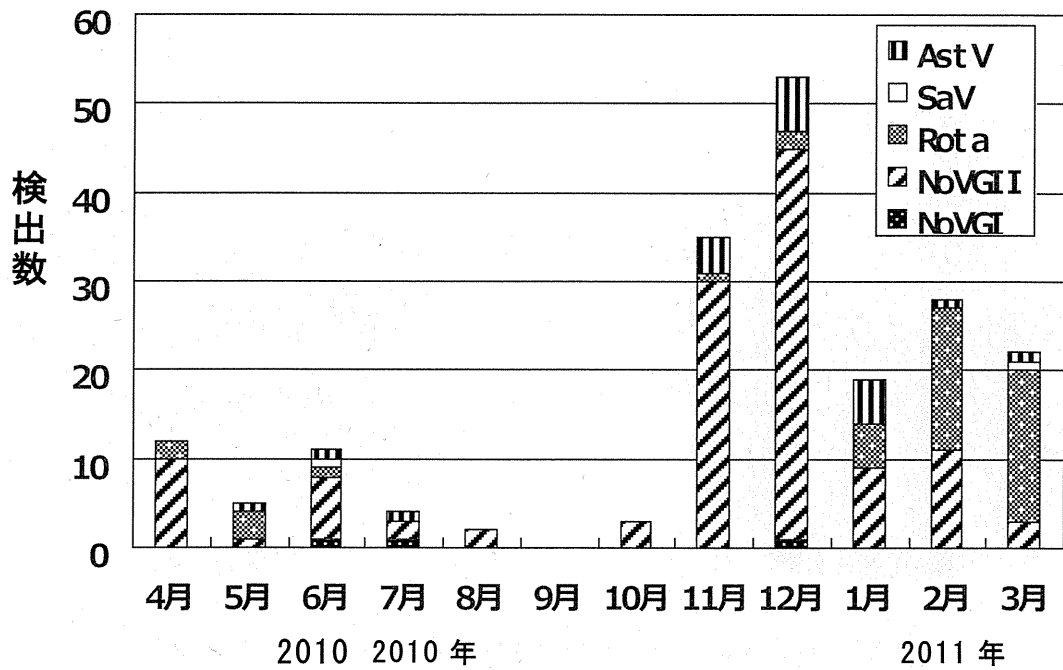


図1 月別ウイルス検出状

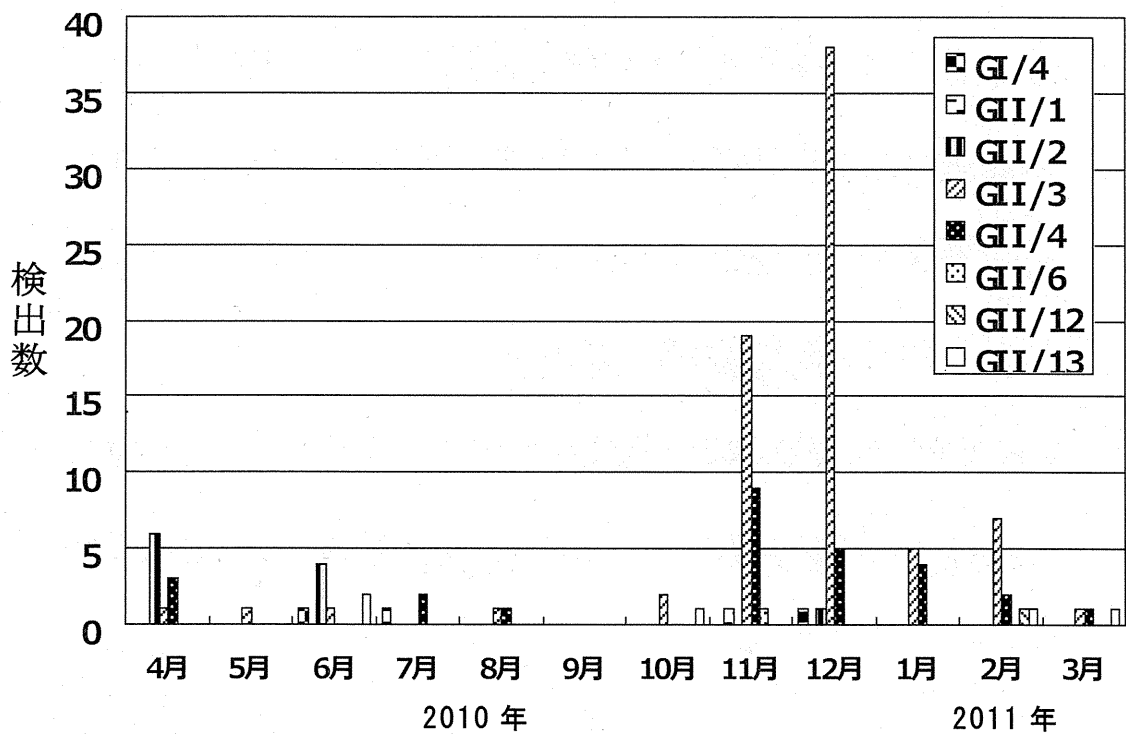


図2 月別・遺伝子型別ノロウイルス検出

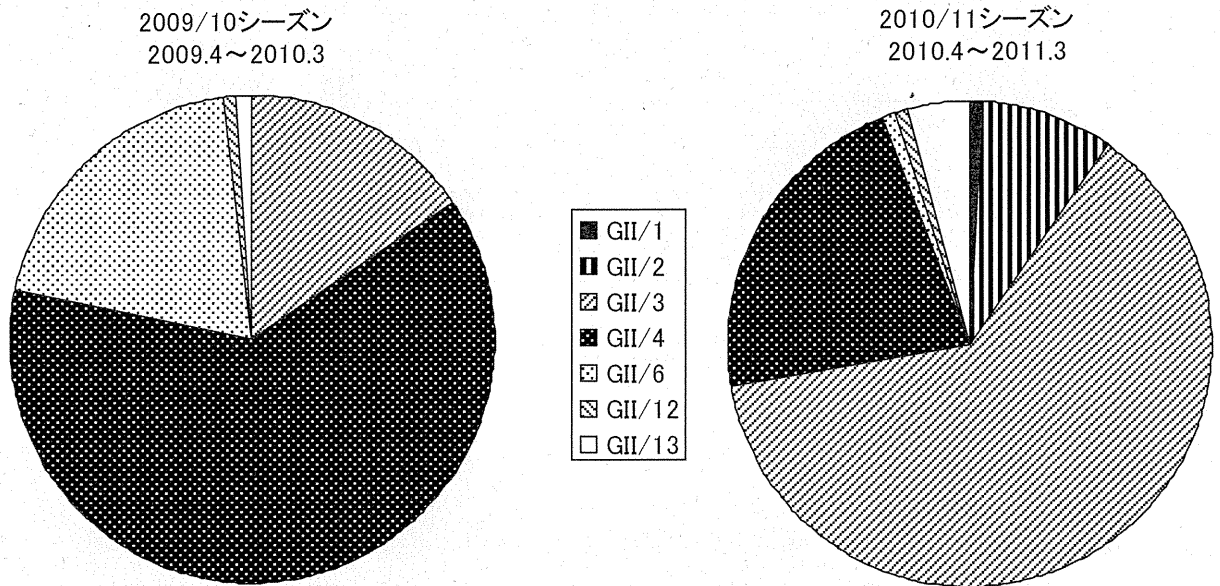


図 3 NoVGII の遺伝子型別の検出状

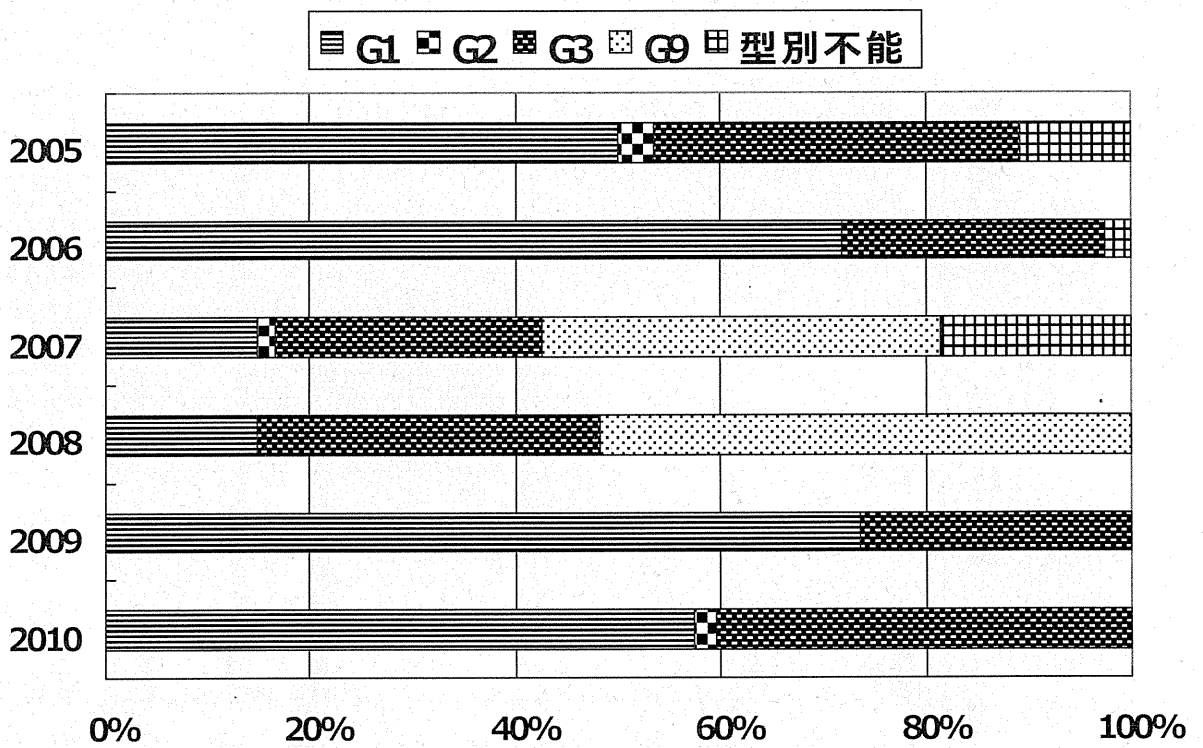


図 4 年別・血清型別 A 群ロタウイルス検出状

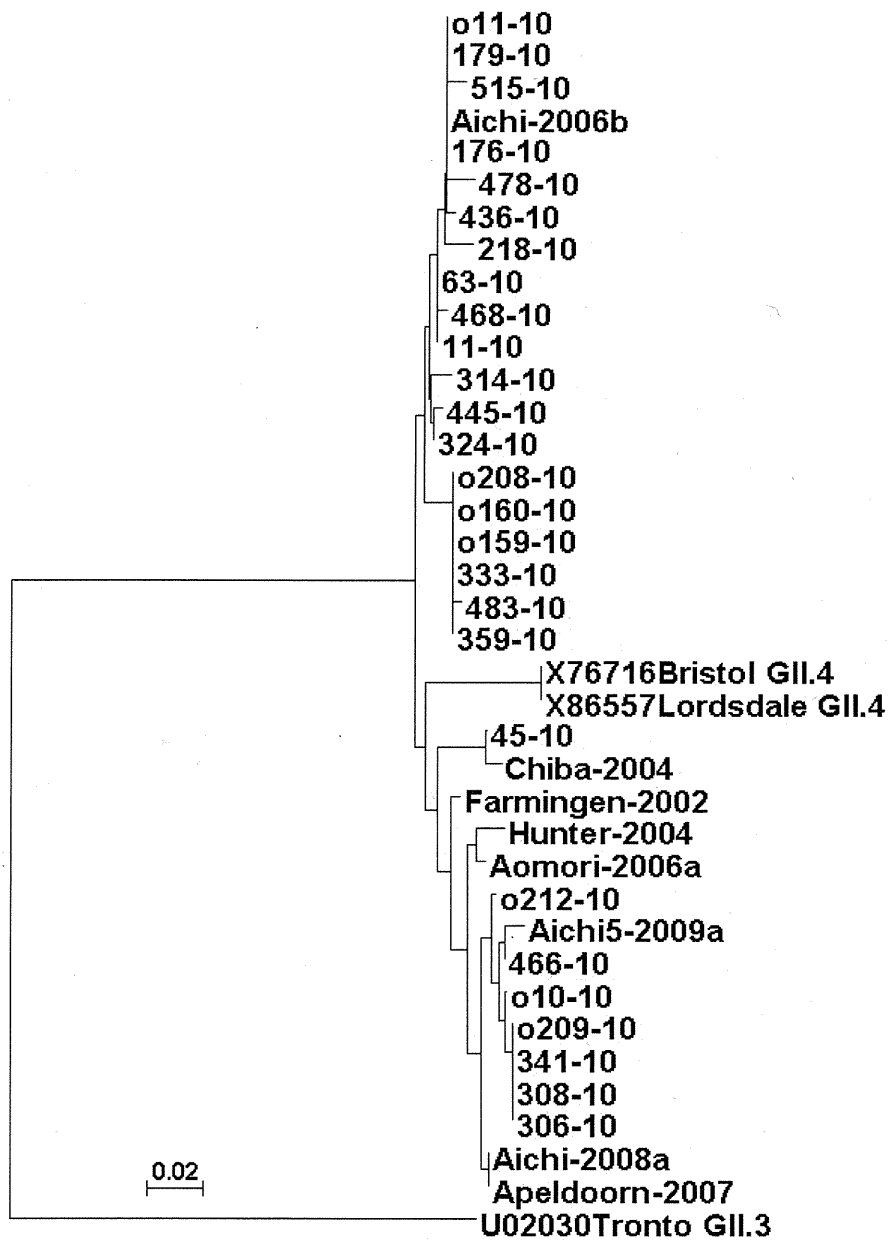


図5 GII.4 NoVのクラスター解析

## 愛媛県で検出されたノロウイルスの遺伝子解析

協力研究者	山下育孝	愛媛県立衛生環境研究所
分担研究者	田中智之	堺市衛生研究所
協力研究者	立花早苗	愛媛県立衛生環境研究所
協力研究者	青木里美	愛媛県立衛生環境研究所
協力研究者	川口利花	愛媛県立衛生環境研究所

### 研究要旨

2011 年 1 月から 12 月の間に、急性胃腸炎の散発例（散発性胃腸炎）及び集団発生例から検出されたノロウイルス（NoV）について分子疫学的解析を行い、愛媛県における NoV 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検出された NoV は 73 例（検出ウイルスの約 46.8%）で、そのうち GII が 98.6%（72 例）を占めていた。GII の遺伝子型は 4 種類で、GII. 4、GII. 13、GII. 2 の 3 タイプで全体の 96% を占めていたが、検出期間により遺伝子型の検出頻度に違いがみられた。1 月～5 月は、GII. 13（54.5%）、GII. 4（27.3%）の順に多かったが、10 月～12 月は、GII. 4（84.4%）が最も多く、次いで GII. 2（15.6%）であった。一方、集団発生例は 2 月～5 月に見られ、GII. 4 が 3 事例、GII. 3、GII. 12、GII. 13 及び GI. 4 が各 1 事例から検出され、GII. 4 が関与した事例が最も多かった。

調査期間中に最も多く検出された GII. 4 は、昨年引き続き 2006b と 2009a（NewOrleans1805/2009/USA 近縁）タイプで、この 2 種類のサブタイプが本県で流行していたことが示唆された。また、散発性胃腸炎及び集団発生例から検出された GII. 2、GII. 3、GII. 13 は、解析したすべての株が、VP1 領域とポリメラーゼ領域の間で遺伝子組換えを起こしたキメラウイルスであることが明らかになった。さらに、愛媛県で検出された GII. 13 と極めて類似している株が、他県でも流行していたことが示唆された。

### A. 研究目的

胃腸炎の起因ウイルスには、ノロウイルス（NoV）、サポウイルス、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、全国

の地方衛生研究所からの病原微生物検出報告によると、NoV の検出報告数が最も多い。また、集団発生事例の原因ウイルスの大半が NoV によるものであり、衛生行政上 NoV が最も重要視



されている。

食中毒等集団発生の予防及び食品の安全を確保するためには、地域における NoV を中心とした食中毒起因ウイルスの流行状況の把握と感染経路の解明が重要と考えられることから、散発性胃腸炎及び食中毒等集団発生病例から検出された NoV について分子疫学的解析を行った。

## B. 研究方法

### 1. 材料

2011年1月から12月の間に採取された感染症発生動向調査用の散発性胃腸炎患者糞便 348 検体及び食中毒等集団発生 11 事例から得られた 86 検体（患者糞便 63 検体、従事者糞便 23 検体）を用いた。糞便は検査実施まで  $-20^{\circ}\text{C}$  で冷凍保存した。

感染性胃腸炎患者数は、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 法やイムノクロマト法によって型別した。NoV 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 法で行った。サポウイルス遺伝子の検出は、岡田らの方法に準じ、カプシド領域を増幅するプライマーを用いた nested-PCR 法で行

った。一部の検体については、岡らのリアルタイム PCR 法を併用して実施した。

NoV 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、片山らが提唱する方法で遺伝子型別を行った。遺伝子型番号は影山らの方法に従った。さらに、型別株の一部については、ポリメラーゼ領域の系統樹解析を実施した。

(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. 感染性胃腸炎患者の週別発生状況

愛媛県における 2011 年の患者報告数の推移を図 1 に示した。2010/2011 シーズンは、12 月中旬 (第 50 週) に患者報告数のピークが見られた後、一旦減少し、2 月中旬から再び報告数が増加し、4 月上旬 (第 16 週) にピークに達した。一方、2011/2012 シーズンは、9 月下旬から患者報告数が増加し始め、11 月下旬 (第 48 週) にピークを迎えた。

### 2. 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 348 名からのウイルス検出状況を表 1、2 に示した。348 検体中、40.2% にあたる 142 検体からウイルスが検出された。そのうち、10 検体からは 2 種類のウイルスが検出され、2 検体からは 3 種類のウイルスが検出された。検出されたウイルスは 156 例で、NoV が 73 例 (46.8%) と最も多く、次いでサポウイルスが 46 例 (29.5%)、ロタウイルスが 32 例 (20.5%)、アデノ

ウイルスが4例(2.6%)、アストロウイルスが1例(0.6%)の順であった。検出されたNoVのGenogroup別内訳は GII が72例(98.6%)で圧倒的に多く、GIは1例(1.4%)と非常に少なかった。NoVは1月～4月及び10月～12月にかけて検出され、特に1～2月と10月～12月に高率に検出された。サポウイルスは1月～7月まで検出されたが、3月～5月の検出率が高かった。ロタウイルスは2月～4月に高率に検出された。

### 3. NoV が検出された食中毒等集団発生例

2011年に当所に搬入された集団発生例のうちウイルスが検出された7事例の概要を表3に示した。7事例のうち3事例(事例1、5、6)が食中毒と確定された。事例1では、飲食店の会席料理が原因とされ、患者及び無症状の調理従事者糞便から GII.4 が検出された。糞便中に排泄されたウイルス量は両者で大差はなかった。事例5は、昼食が原因で、当所に搬入された患者糞便からは GI.4 が検出された。事例7は食中毒とは確定されなかった有症状事例で GII.13 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3事例(事例2～4)あり、事例3、4からは GII.4 が、事例2からは GII.12 が検出された。

### 3. 検出された NoV の遺伝子型と月別検出状況

散发性胃腸炎から検出された NoV 73株のうち55株(GI 1株, GII 54株)について遺伝子型別を実施した結果、GII の遺伝子型は4種類認められ、内訳は、GII.4 が33株と最も多く、次いで GII.13 が12株、GII.2 が7株、

GII.3 が2株であった。また、GI の遺伝子型は GI.1 であった。NoV は、1月～4月及び10月～12月に検出され、1月～4月(2010/2011シーズン)の検出数は、GII.13 が12株(54.5%)で最も多く、次いで GII.4 が6株(27.3%)、GII.2 及び GII.3 が各2株(9.1%)であった。10月～12月(2011/2012シーズン)では、GII.4 が27株(84.4%)で最も多く、GII.2 が5株(15.7%)検出された。一方、集団発生事例は、2月～3月及び5月に発生し、GII.4 が3事例、GII.3、GII.12、GII.13 及び GI.4 が各1事例から検出された(図2)。

### 4. NoV GII の系統樹解析

散发例及び集団発生例から検出された GII の系統樹解析の結果を図3に示した。集団発生から複数検出された株は、事例毎に遺伝子塩基配列が100%一致していた。GII.4 に型別された、事例1において患者及び無症状の調理従事者から検出された株の塩基配列が一致していた。この事例からの検出株は、ヒト-ヒト感染と推定された事例4からの検出株とも塩基配列が一致していた。また、事例3と同一の株が散发例から検出されていた。県内で流行していた GII.13 株と県外で感染した事例7から検出された株の塩基配列が一致していた。

### 5. GII.4 のポリメラーゼ領域の系統樹解析

GII.4 は、2002年以降、NoV の主流型であり、複数の亜型が報告されている。そこで、昨年引き続き、VP1 NS 領域(図3)に加え、ポリメラーゼ領域(図5)について解析し、詳細に検討を行った。その結果、2011年1月～4月

(2010/2011 シーズン)に検出された株は、愛媛県において2007年から2009年の主流型であった2006bタイプと2009/2010シーズンに始めて検出された2009a(NewOrleans1805/2009/USA近縁)タイプであった。一方、10月～12月(2011/2012シーズン)に検出された株は、すべて2006bタイプであった。

#### 6. GII.2、GII.3、GII.13のポリメラーゼ領域の系統樹解析

NS領域による遺伝子解析でGII.2、GII.3及びGII.13に型別された株のポリメラーゼ領域の系統樹解析の結果を図5に示した。NS領域でGII.2と型別された株は、ポリメラーゼ領域の塩基配列をみると、すべてNeustrelitz260/2000/DE(GII.15)と類似していた。また、GII.3はポリメラーゼ領域がSaitamaU1/97/JP(GII.12)と、GII.13はポリメラーゼ領域がSaitamaU3/97/JP(GII.6)とそれぞれ高い相同性を示した。これら3つの遺伝子型の株は、すべてVP1領域とポリメラーゼ領域の間で遺伝子組換えを起こしたキメラウイルスであることが示された。

#### D. 考察

散発性胃腸炎の原因ウイルスの約47%はNoVであった。そのうち約99%はGIIであり、ヒト-ヒト感染におけるGIIの関与が非常に高いことが示された。2011年に散発性胃腸炎及び集団発生例から検出されたNoVの遺伝子型は、GIIが5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唆され

た。また、1つの遺伝子型が2～3カ月あるいは、それ以上地域で流行し、時として複数の遺伝子型のNoVが同時期に流行していることが示された。

食中毒事例において、患者と無症状の調理従事者から検出された株の塩基配列が一致していた。また、感染症集団発生事例から検出された株と同一の株が散発性胃腸炎から検出されていた。これらのことから、地域で散発的に流行しているウイルスが、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、学生寮、宿泊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が強く示唆された。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等の指導が重要である。

調査期間中に散発性胃腸炎から検出されたNoVの約60%は、GII.4であった。系統樹解析の結果、2006bが散発性胃腸炎から検出されたGII.4の大部分を占めていた。一方、集団発生例においては、GII.4が関与していた3事例のうち2事例が2009aによるものであったことからGII.4においては、2種類の亜型が本県で流行していたことが明らかになった。NoVにおけるGII.4の占有率は、2006bが流行の主流となっていた2007年から2009年に比べ減少している。これは、2006bの度重なる流行により住民の獲得免疫が高まったことによるものと推察される。また、今回GII.4以外の検出株は、すべてVP1領域とポリメラーゼ領域の間で遺伝子組換えが起こった

キメラウイルス（GII.2-GII.15、GII.3-GII.12、GII.13-GII.6 [VP1-ポリメラーゼ領域]）であることが示された。

以上の成績から NoV は、遺伝子型内での変異や異なった遺伝子型間の組換え等による新しい変異株の出現等を繰り返しながら地域流行を起こすことにより胃腸炎の最も重要な病原体となっていると考えられた。

県内で流行していた GII.13 と県外で感染した事例 7 から検出された株の塩基配列が一致していたことから、この遺伝子型の株は、本県だけでなく他県においても流行していたことが示唆された。全国で流行が見られる NoV 等食中毒起因ウイルスの探知及び感染経路等の解明には、全国レベルの情報共有システムが益々重要になってくると考えられる。

GII.4 の変異株の流行や GII.2、GII.3 及び GII.13 の遺伝子組換えウイルスが多数検出されてきていることから、今後も NoV の詳細な解析と発生動向の把握が必要と考えられた。

## E. 結論

1. 検出された NoV の Genogroup は、GII が 72 例 (98.6%)、GI が 1 例 (1.4%) であった。GII の遺伝子型は 4 種類見られ、GII.4 が 61% と最も多く、次いで GII.13 (22%)、GII.2 (13%)、GII.3 (4%) であった。食中毒等集団発生例では、GII.4 が 3 事例、GII.3、GII.12、GII.13、GI.4 が各 1 事例から検出された。
2. 不顕性感染の調理従事者が原因と考えられた食中毒が 1 事例見られ

たが、糞便中に排泄される NoV 量は、患者と不顕性感染者で大差はなかった。また、地域で散発的に流行している NoV が食中毒の原因と関連していることが示唆された。

3. 2011 年に検出された GII.4 は、2006b タイプと愛媛県で 2010 年から検出されている新しい変異株である 2009a (NewOrleans1805/2009/USA 近縁) タイプであった。
4. 調査期間中に検出された GII.2、GII.3 及び GII.13 は、解析したすべての株が、VP1 領域とポリメラーゼ領域の間で遺伝子組換えを起こしたキメラウイルスであることが明らかになった。
5. 県内で流行していた GII.13 と極めて類似している株が他県でも流行していたことが示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 青木紀子, 青木里美, 山下育孝, 田中 博, 岡 裕三, 土井光徳, 本村和嗣, 野田 衛: 愛媛県における急性胃腸炎の散発例および集団発生例からのノロウイルスの検出状況と遺伝子型別分類 (2009/2010 シーズン). 愛媛衛環研年報, 13, 7-14 (2010)

### 2. 口頭発表

1) 山下育孝, 青木紀子, 青木里美, 土井光徳, 古屋由美子, 西尾 治, 石井孝司, 野田 衛: A 型肝炎の国内発生における輸入生鮮魚介類の関与. 第 32 回日本食品微生物学会. 東京, 2011 年 10 月

2) Tomoyuki Tanaka, Noritoshi Kitamoto, Tomoichiro Oka, Tatsuya Miyoshi, Kiyoko Uchino, Hisaaki Yoshida, Setsuko Iizuka, Yoshiharu Morino, Yasutaka Yamashita, Seiya Harada, Naokazu Takeda and Kazuhiko Katayama. Rapid Detection kit for norovirus and sapovirus with viruses specific monoclonal antibodies. The 5<sup>th</sup> China Medicinal Biotech Forum November 7-9, Beijing, China

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

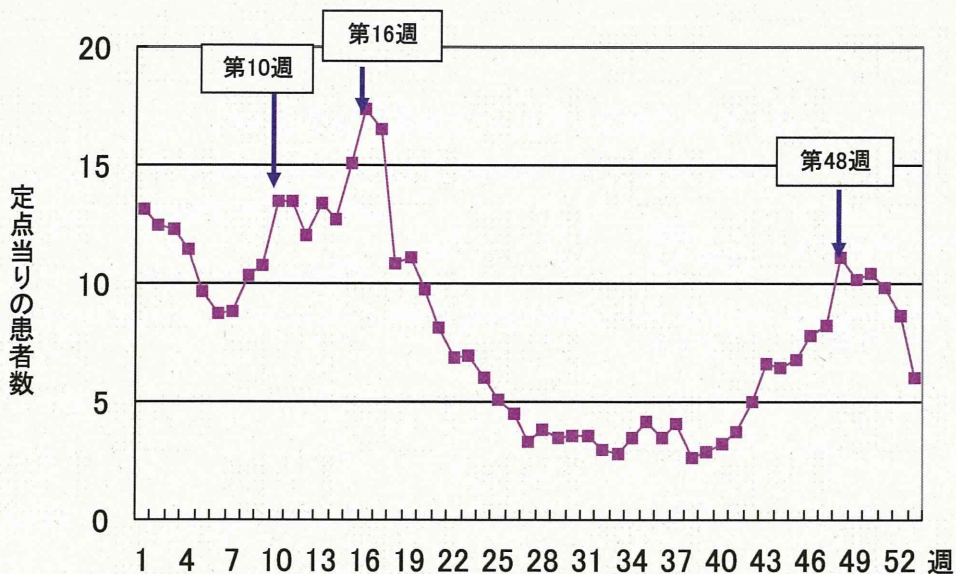


図1 感染性胃腸炎患者の週別発生状況

表1 散発性胃腸炎患者からのウイルス検出状況

検査数	348例
陽性検体数	142例
陽性検体率	40.2%
重複感染例	
2種類は、	10検体
3種類は、	2検体
ウイルス検出数	156例

ウイルス	検出数	検出率(%)
ノロウイルス	73	46.8
[ GI	1	]
GII	72	
サポウイルス	46	29.5
ロタウイルス	32	20.5
アデノウイルス	4	2.6
アストロウイルス	1	0.6
検出数	156	100

表2 散発性胃腸炎患者からの月別ウイルス検出状況

月	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	計
ノロウイルス	11	13*	5	6	1	1				17	11	8	73*
サポウイルス	2	7	12	8	8	7	2						46
ロタウイルス	1	10	4	15	1	1							32
アデノウイルス		2			1						1		4
アストロウイルス	1												1
検査数	25	35	28	39	22	25	33	26	28	40	27	20	348

\* GI 1例を含む。



表3 NoVが検出された食中毒等集団発生事例

事例 No.	発生日	原因施設	感染経路 (原因食品)	喫食者数	患者数	ノロウイルス陽性数/検査数		遺伝子型 (例数)
						患者便 吐物	従事者便	
1	2.27	飲食店	会席料理	22	16	10/10	1/6	GII.4(6)
2	2.28	小学校	感染症	不明	28	3/3		GII.12(2)
3	3.7	宿泊施設	感染症 *	15	4	3/3		GII.4(2)
4	3.8	学生寮	感染症 *		5	4/4		GII.4(2)
5	3.13	飲食店	昼食	209	13	2/4		GI.4(2)
6	3.21	葬儀	仕出料理	115	52	10/10	0/13	GII.3(4)
7	5.6	飲食店 *	不明	17	13	6/7		GII.13(5)

\* 推定

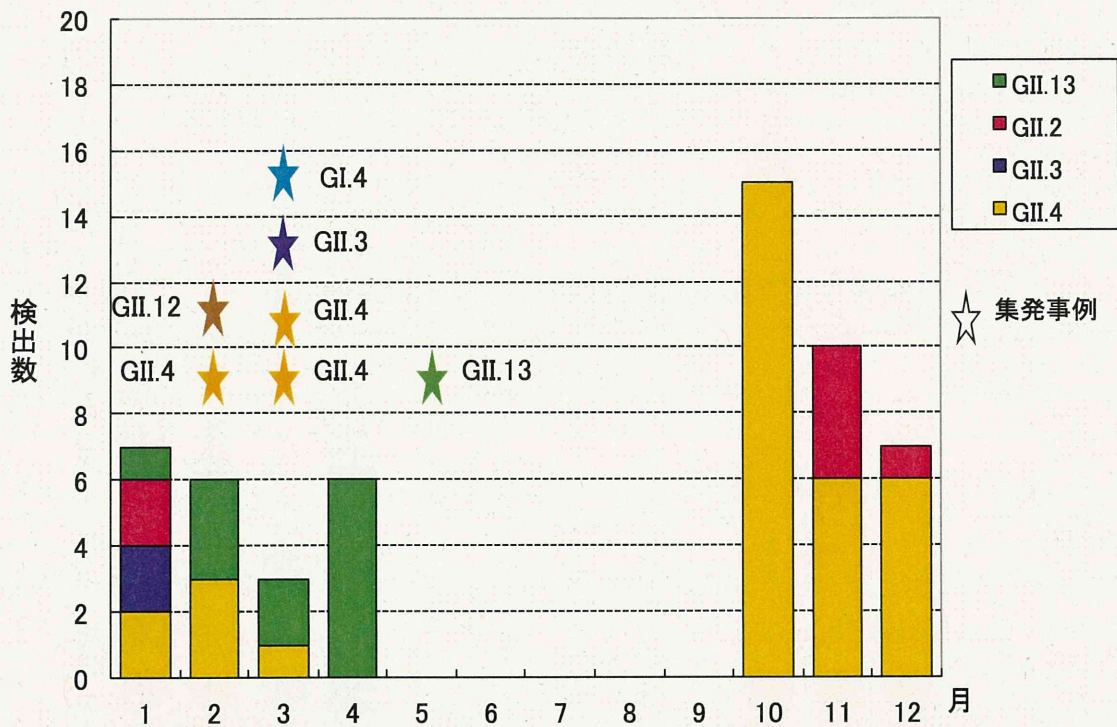


図2 NoV GIIの月別遺伝子型別検出状況

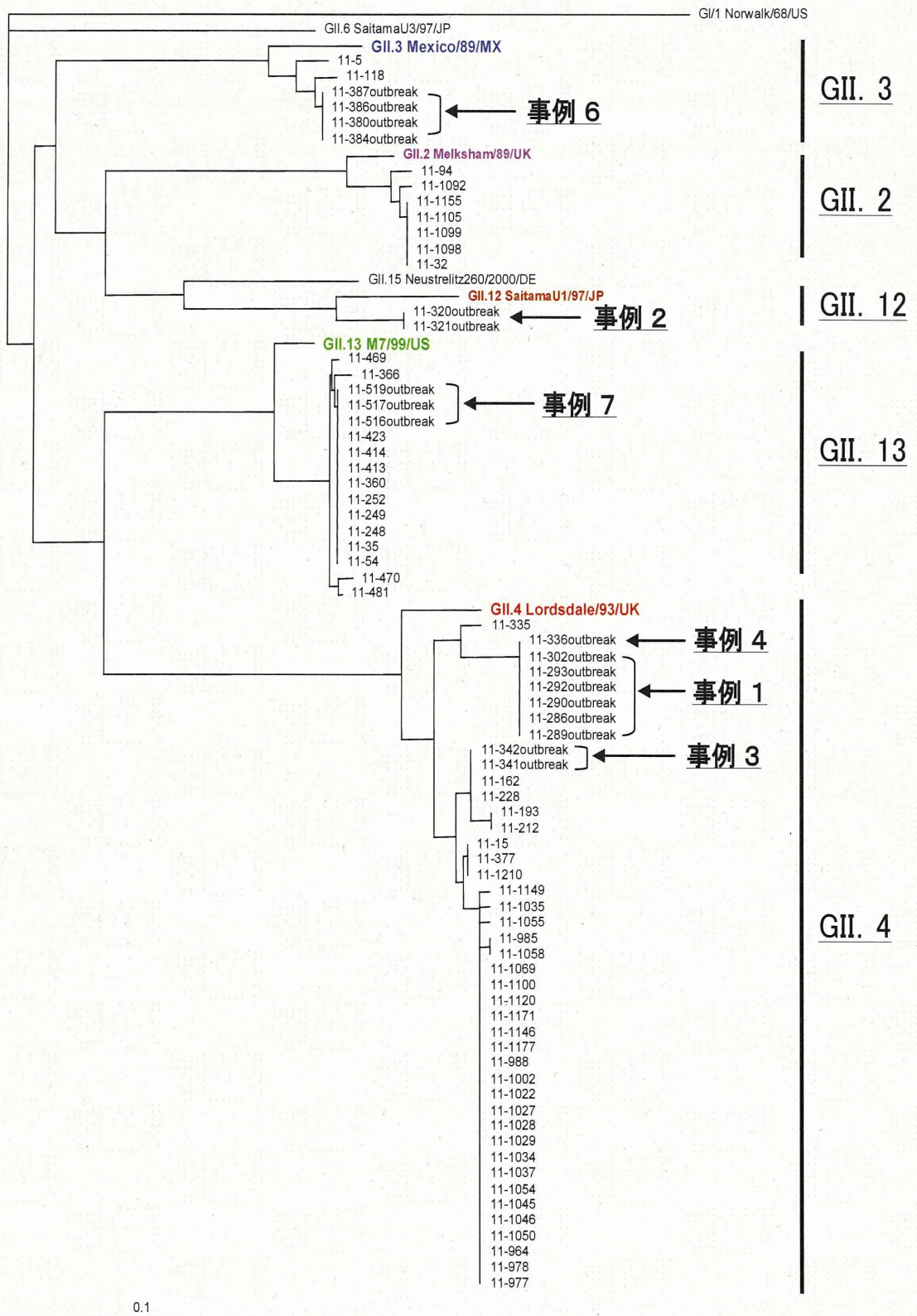


図3 NoV GII の系統樹[VP1 NS 領域]



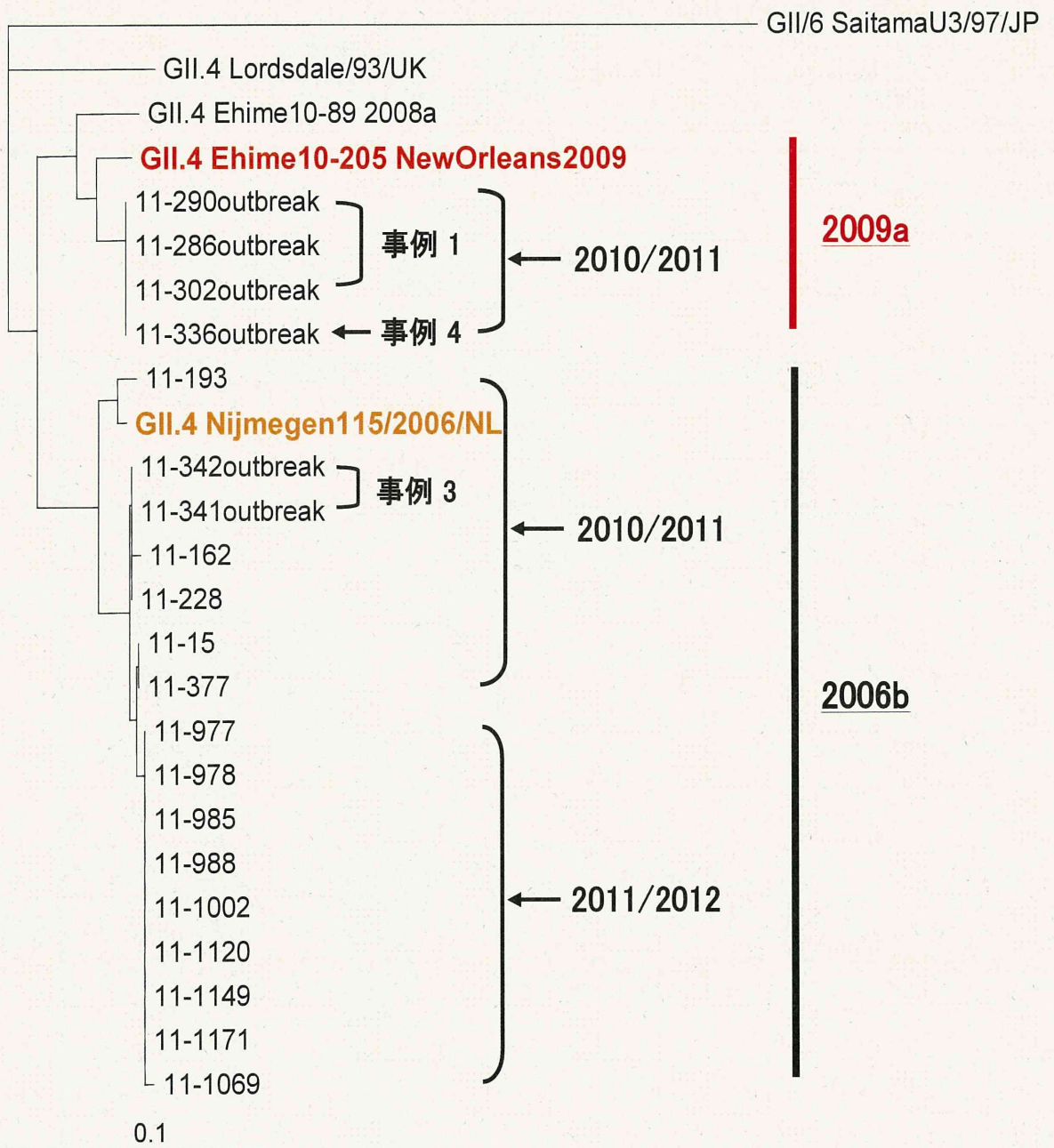


図4 NoV GII.4 の系統樹[ポリメラーゼ領域]

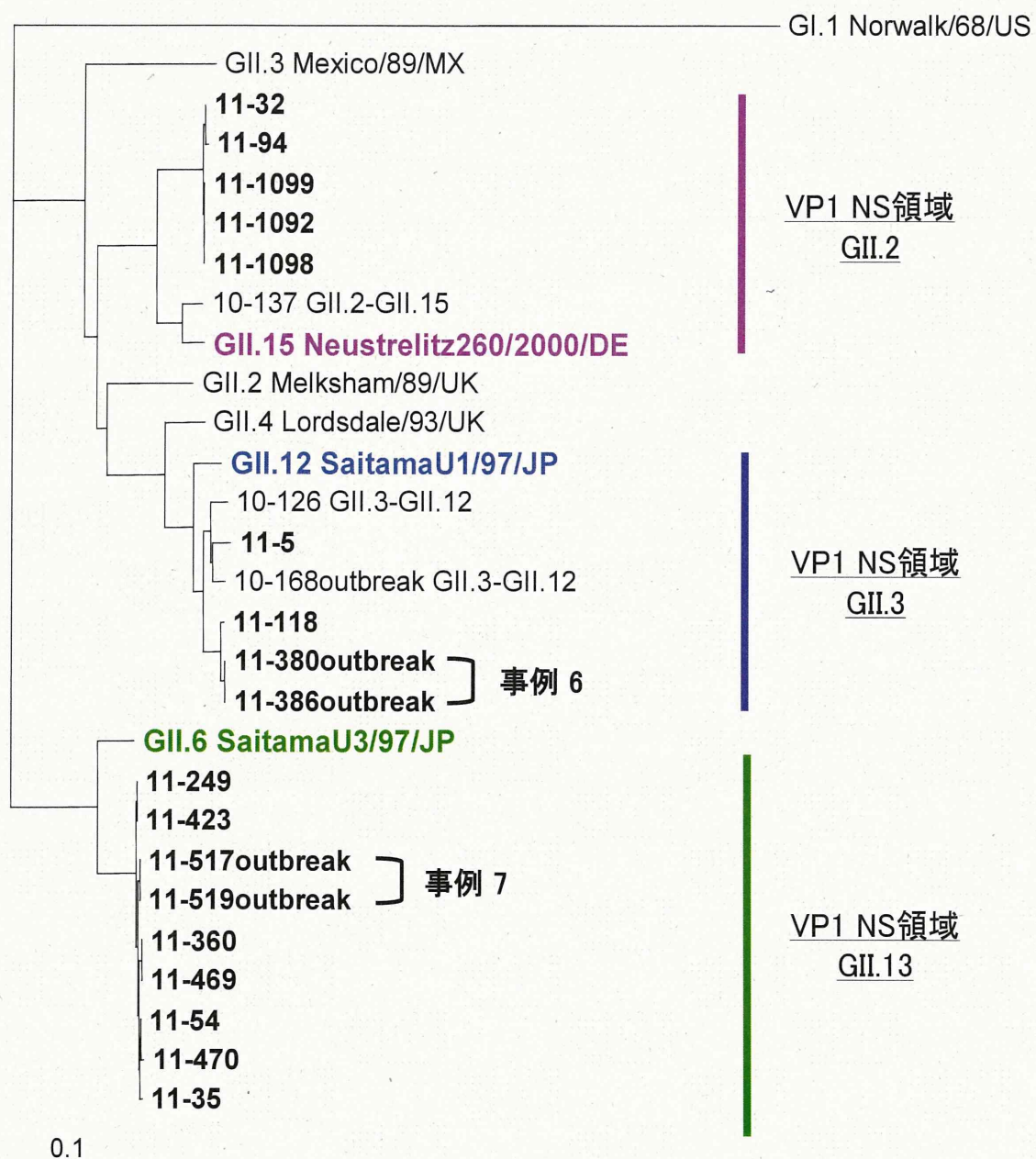


図5 NoV GII.4 以外の系統樹[ポリメラーゼ領域]

平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」

研究協力報告書

集団食中毒事例の原因食材となったアサリから検出された  
サポウイルスの塩基配列解析

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	戸高 玲子	国立感染症研究所
研究協力者	片山 和彦	国立感染症研究所
研究協力者	岡 智一郎	国立感染症研究所

研究要旨

集団食中毒事例の原因食材として同定したアサリについて、昨年度、従来法と新規法の2つの PCR 系を用いてサポウイルス核酸を増幅したところ、新規法の方が高い陽性率を示した。今年度はこれらの PCR 増幅産物をクローニングし、シーケンス解析を行った。合計60個のアサリを個別に解析したところ、アサリ個体間で異なる遺伝型のサポウイルスが検出される例があること、同一のアサリから異なる遺伝子型のサポウイルスが検出される例があることを明らかにした。2つの検出系によって検出されたサポウイルスの遺伝子型は概ね一致した。

A. 研究目的

近年、サポウイルスによる大規模な食中毒事例が発生している。我々は、2008年に島根県内で発生した食中毒事例について、患者糞便と原因食材の調査を通じて、加熱不十分なアサリが原因食材となったことを同定した。ノロウイルス同様、サポウイルスについても食中毒を疑われる事例は過去にいくつか報告があったものの、これが原因食材と患者糞便から同一のサポウイルス核酸を検出した世界で初めての事例であった(Iizuka & Oka et al, J. Med. Virol. 82, 1247-1254, 2010、

食品の安心・安全確保推進事業 「食品中のウイルスの制御に関する研究」平成21年度 総括・研究分担報告書 215-222, 2010)。

これまでに複数のサポウイルス核酸検出系が検出され、臨床検体の解析については高精度検出系が構築された。一方で、環境水からのサポウイルス核酸の検出法として、従来広く用いられている nested RT-PCR 系 (従来法) (Okada et al, Arch Virol. 151: 2503-2509, 2006)と比較して検出率が高い nested RT-PCR 系 (新規法) が構築された(Kitajima et al, Appl.

Environ. Microbiol. 76: 2461-2467, 2010)。そこで 2008 年に島根県内で発生した前述の食中毒事例患者糞便検体を対象にこれら 2 つの検出系を用いて再検討したところ、従来法と新規法の SaV 核酸検出率は一致したが、原因食材と同定したアサリ中腸腺 60 検体を個別に解析したところ、従来法と新規法のサポウイルス陽性数はそれぞれ、27、41 と、新規法の方が従来法より若干高い SaV 検出率を示した（平成 22 年度 総括・研究分担報告書 183-185, 2011）。そこで、本研究では、昨年度得られた増幅産物 68 サンプル（従来法 27 サンプル、新規法 41 サンプル）すべてについてクローニングを行い、2 つの検出系の特異性の検証、塩基配列解析による検出株の差異について検証することを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 材料

2008 年に島根県で発生した食中毒事例の原因食材として保存されていたアサリ（1 パックあたり 20 個、計 3 パック、合計 60 個）より取り出した中腸腺から精製し、合成した cDNA を鋳型に昨年度の本研究班で従来法、新規法を用いて増幅、精製した PCR 増幅産物を本研究の解析対象とした。

### 2. 方法

#### 1. サポウイルスの遺伝子解析

昨年度精製した PCR 増幅産物を、pCR2.1 ベクター (Invitrogen) にクローニングし、One Shot INV α F' Competent Cells (Invitrogen) にトラン

スフォームした。大腸菌からの Plasmid 抽出操作を省略するため、1 つの陽性サンプルにつき 8 つの大腸菌コロニーを選択し、M13-RV プライマー (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3')、M13-20 primer (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') を用いて ExTaq DNA polymerase によるコロニー PCR を行った。PCR 溶液の一部を 2% アガロース電気泳動し、増幅産物の有無を確認後、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて PCR 増幅産物を精製した。1 サンプルにつき、基本的には 4 クローンのシーケンスを行い、capsid 部分領域の塩基配列（約 300nt）を用いて系統樹解析を行った (Iizuka & Oka et al., J. Med. Virol. 82, 1247-1254, 2010)。SaV の genogroup, genotype は今年度我々が報告した新規タイプング法 (Oka et al., Arch Virol. 2011 NoV 11 [Equib ahead of print]) を用いた

(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。組換え DNA 実験は全て国立感染症研究所の承認を得た上で実験計画に基づいて、認定施設内で実施した。

## C. 研究結果

シーケンス解析の結果、従来法 27 サンプルのうち、1 サンプルはサポウイルス遺伝子ではなく、非特異増幅産物であった。新規法で増幅された 41 サンプルはすべてサポウイルスであった（表参照）。系統樹解析の結果、アサリ中腸腺由来の