

表3 二枚貝及び喫食患者からのウイルス検出状況（二枚貝喫食事例 No.4）

検体	NoV		SaV	AiV	AstV	RV-A	RV-C	AdV	PeV	HAV	HEV	
	GI	GII										
患者糞便	1	-	GII.13	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT
	2	GI.14	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT
	3	-	GII.13	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT
ホタテ	PEG濃縮	1	-	GII.6	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
		2	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
		3	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
		4	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
		5	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
		6	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
		7	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
		8	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	50%乳剤	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		13	-	GII.13	-	-	+	-	-	-	-	-
		14	-	GII.2	-	-	-	-	-	-	-	-
		15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		16	-	-	-	typeB	-	-	-	-	-	-

NT: not tested

表4 二枚貝及び喫食患者からのウイルス検出状況（二枚貝喫食事例 No.5）

検体	NoV		SaV	AiV	AstV	RV-A	RV-C	AdV	PeV	HAV	HEV		
	GI	GII											
患者糞便	1	-	GII.2	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT	
	2	-	GII.6	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT	
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT	
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT	
	5	GI.12	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT	
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT	
カキ	PEG濃縮	調理済	1	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
			2	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
			3	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
			4	-	GII.14	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
		調理前	5	-	GII.6	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
			6	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
			7	-	GII.9	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
			8	-	GII.6	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	50%乳剤	調理前	9	-	GII.11	-	typeA	+	-	-	-	-	
			10	-	GII.11	-	-	-	-	-	-	-	
			11	-	GII.6	-	-	+	-	-	-	-	
			12	-	GII.6	-	-	-	-	-	-	-	
			13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			15	-	GII.6	-	-	-	-	-	-	-	
			16	-	GII.11	-	-	-	-	-	-	-	

NT: not tested

表5 NoV 以外のウイルスが検出された非二枚以外関連の食中毒疑い事例

検出ウイルス	No.	糞便検査数	検出検体数 (延べ数)						
			NoV	RV-A	SaV	AiV	AdV	RV-C	PeV
NoV+1種類	1	8	7 (GI.4)	-	1+1*	-	-	-	-
	2	5	4 (GI.6)	-	1*	-	-	-	-
	3	3	3 (GI.3)	-	1*	-	-	-	-
	4	3	3 (GI.4)	-	-	1*	-	-	-
	5	9	9 (GI.4)	-	-	1*	-	-	-
	6	9	7 (GI.4)	-	-	1*	-	-	-
	7	7	6 (GI.4)	-	-	-	1*	-	-
	8	10	9 (GI.4)	-	-	-	1*	-	-
	9	5	4 (GI.8)	-	-	-	1*	-	-
	10	4	2 (GI.3)	-	-	-	-	-	1*
NoV+2種類	11	10	8 (GI.3)	-	1	-	1*	-	-
	12	25	21 (GI.16)	-	1	-	-	1	-
NoV以外	13	6	-	6 (G1)	-	-	-	-	-
	14	2	-	-	-	-	1	-	-

* NoVも検出

網掛け: 検査検体の半数以上から検出されたウイルス

表6 感染症疑い事例における発生施設別ウイルス検出状況

発生状況、施設	検査事例数	ウイルス検出事例数			
		NoV 単独	SaV 単独	NoV+他のウイルス	原因ウイルス※ 不明
小中高校生合宿	1	-	-	1 : 6検体中 NoV (5)、SaV (1)	-
中学校	6	2	1	-	3
中学生合宿	1	1	-	-	-
高校	4	1	-	-	3
高校生合宿	2	2	-	-	-
高校寮	2	2	-	-	-
専門学校	1	-	-	-	1
大学寮	1	1	-	-	-
高等養護学校	2	2	-	-	-
知的障害者施設	19	14	2	2 : 4検体中 NoV (2)、NoV+AdV (1) : 5検体中 NoV (3)、SaV (2)	1
精神障害者施設	1	1	-	-	-
身体障害者施設	1	1	-	-	-
事業所	3	2	-	-	1
スポーツ大会	1	1	-	-	-
飲食店	2	1	-	1 : 7検体中 NoV (4)、SaV+AdV (1)	-
合計	47	31	3	4	9

※ 検査検体の半数以上から特定の胃腸炎ウイルスが検出されなかった事例

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

研究要旨

集団胃腸炎発生時にノロウイルス (NoV) 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をはかった。2012 年 1 月～12 月にかけて得られた 563 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 356 事例 (63. 2%) であった。内訳は NoV が検出された事例が 335 事例と多くを占めていたが、28 事例 (7. 9%) はその他のウイルスが検出された事例であった。これら NoV 以外のウイルスが検出された事例のうち、サポウイルスが検出された事例はこれまでの検索結果と同様に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 月～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 : NoV) 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 NoV のほか、サポウイルス (Sapovirus :

SaV)、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、食品を介さ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、原因物質が確定される率を向上させることを目的として NoV 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 2010 年、2011 年に継続してデータの集積をはかった。

B. 研究方法

1. 材料

2012 年 1 月～12 月にかけて得られた 563 件の胃腸炎事例に関連した糞便 5545 件を検査材料とした。

2. 胃腸炎ウイルスの検索

2010 年、2011 年の調査と同様の方法により、NoV、SaV、A 群ロタウイルス (GARV)、C 群ロタウイルス (GCRV)、アストロウイルス (AstV)、および腸管アデノウイルス (AdenoV) について real-time PCR 法を用いて検索を実施した。

3. 塩基配列の解析

real-time PCR 陽性の場合には 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 563 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 356 事例(63.2%)であった。内訳は NoV が検出された事例が他のウイルスとの同時検出事例を含めて 335 事例 (94.1%) と最も多くを占めていたが、SaV : 10 事例 (2.8%)、GARV : 9 事例(2.5%)、SV+AstV および GCRV : 各 1 事例(0.3%)とその他のウイルスに起因すると考えられる事例が

20 事例 (5.6%) みられた (表 1)。その他に生カキ等の喫食歴のある胃腸炎事例から NoV と同時に SaV が検出される事例がみられ、2012 年に NoV 以外のウイルスが検出された事例は計 28 事例 (7.9%) であった。

2012 年は 2010 年および 2011 年同様に検出数に大きな差はあるが、NoV の次に多く検出されたウイルスは SaV であった。SaV の検出時期は 2 月～6 月、8 月、11 月、12 月と 2010 および 2011 年同様に季節的な特徴はみられなかった (図 1)。2012 年は NoV 以外のウイルスが検出され、食品の関与が推定される事例から検出されたウイルスは SaV のみであった。

2. 塩基配列の解析

糞便試料から検出されたウイルスの塩基配列による遺伝子型を図 2 に示した。SaV の検出された 18 事例のうち 14 事例から塩基配列情報が得られ、9 事例が GI.2 に型別され、その他は GII.3 が 2 事例、GI.3、GII.2 および GII.2 がそれぞれ 1 事例であった。これらの SaV 検出事例のうち、NoV が同時に検出された 7 事例はいずれも生カキの喫食歴があり、NoV と同時に暴露されたことによる SaV 感染が推測された。GARV が検出された 9 事例はいずれも食品の関与が考えにくい感染症的な集団事例であった。これらのうち 8 事例の塩基配列情報が得られ、G9 が 4 事例、G2 が 3 事例、G1 および G81 がそれぞれ 1 事例であった。SaV との同時検出事例でみられた AstV は type1 であったが食品の関与した事例か否かについては不明であった。

D. 考察

2011年の胃腸炎集団事例におけるウイルス検出状況において、起因ウイルスとして NoV 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～12月にかけて発生したウイルス性胃腸炎の NoV との同時検出事例を含めた 8.9%からその他のウイルスが検出され、2011年にも 10.1%の事例から NoV 以外のウイルスが検出されたことから、ほぼ一定の割合で NoV 以外のウイルスが胃腸炎事例に関与しているものと推察された。NoV 以外のウイルスが検出された事例のうち、調理従事者の関与が推定される事例や生カキの喫食歴のある事例から SaV が検出されたことから、施設内の感染症的な集団事例のほか、NoV 同様の要素により SaV による胃腸炎が発生していることが確認できた。2011年に検出された SaV は食品の関与が推定される事例および感染症的な事例において近縁な GI/2 が多くの割合を占めており、GI/2 の大きな流行があったものと思われた。しかし夏以降 GI/1 が検出されており、流行の主体が変化する可能性も考えられる。今後も NoV 以外の胃腸炎ウイルスについて検索を継続し、データの集積をはかる予定である。

E. 結論

2012年の胃腸炎集団事例におけるウイルス検出状況において、起因ウイルスとして NoV が大きな割合を占めていることは2010年および2011年の流行と同様であった。しかし、2012年にも 7.9%の事例から NoV 以外のウイルスが検出されたことから、ほぼ一定の割合で NoV 以外のウイルスが胃腸炎事例に関与しているものと推察され

た。NoV 以外のウイルスが検出された事例のうち、調理従事者の関与が推定される事例や生カキの喫食歴のある事例から SaV が検出されたことから、施設内の感染症的な集団事例のほか、NoV 同様の要素により SaV による胃腸炎が発生していることがこれまでの検索結果と同様に確認できた。検出された SaV は2011年から近縁な GI.2 が多くの割合を占めており GI.2 の大きな流行があったものと思われたが、2012年末に検出された SaV は GII が主となっており、流行の主体が変化する可能性も考えられる。NoV 以外のウイルスが集団胃腸炎に関与していることがこれまでの検索により確認できたことから、今後も NoV 以外の胃腸炎ウイルスについて検索を継続する予定である。

E. 結論

- ・NoV 以外のウイルスがほぼ一定の割合で胃腸炎事例に関与しているものと推察された。

- ・SaV が調理従事者の関与が推定される事例や生カキの喫食歴のある事例から検出されたことから、NoV 同様の感染経路で SaV による胃腸炎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

- ・森功次、永野美由紀、秋場哲哉、林志直、甲斐明美、野田衛：DNA シーケンサを用いた SSCP によるノロウイルス集団胃腸炎事例の解析。第33回日本食品微生物学会学術総会、2012、福岡市

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 : 東京都における胃腸炎ウイルス検出状況 (2012年1月～12月)

検査事例数	563	
ウイルス検出事例数	356	(100%)
NoVG I	28	(7.9%)
NoVG II	285	(80.1%)
NoVG I +G II	15	(4.2%)
SaV	10	(2.8%)
GARV	9	(2.5%)
同時検出・その他*	9	(2.5%)

* : NoV+SaV : 7, SaV+Ast : 1, GCRV : 1

28事例(7.9%)からはNoV以外のウイルスを検出

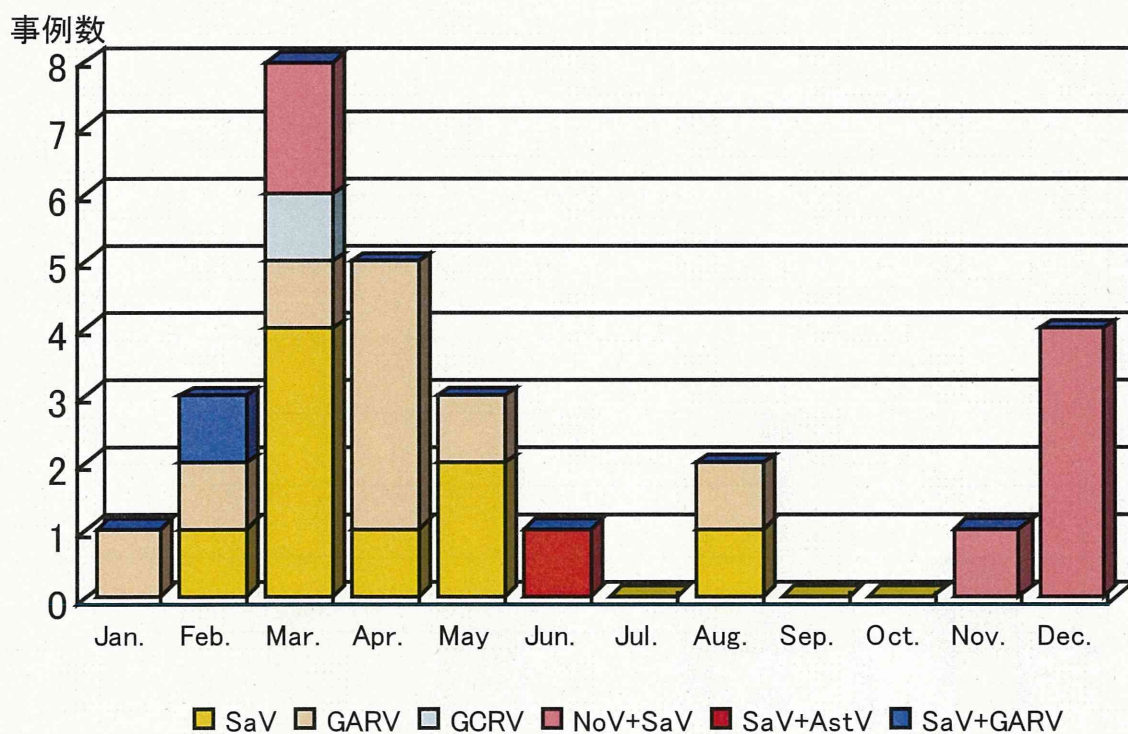
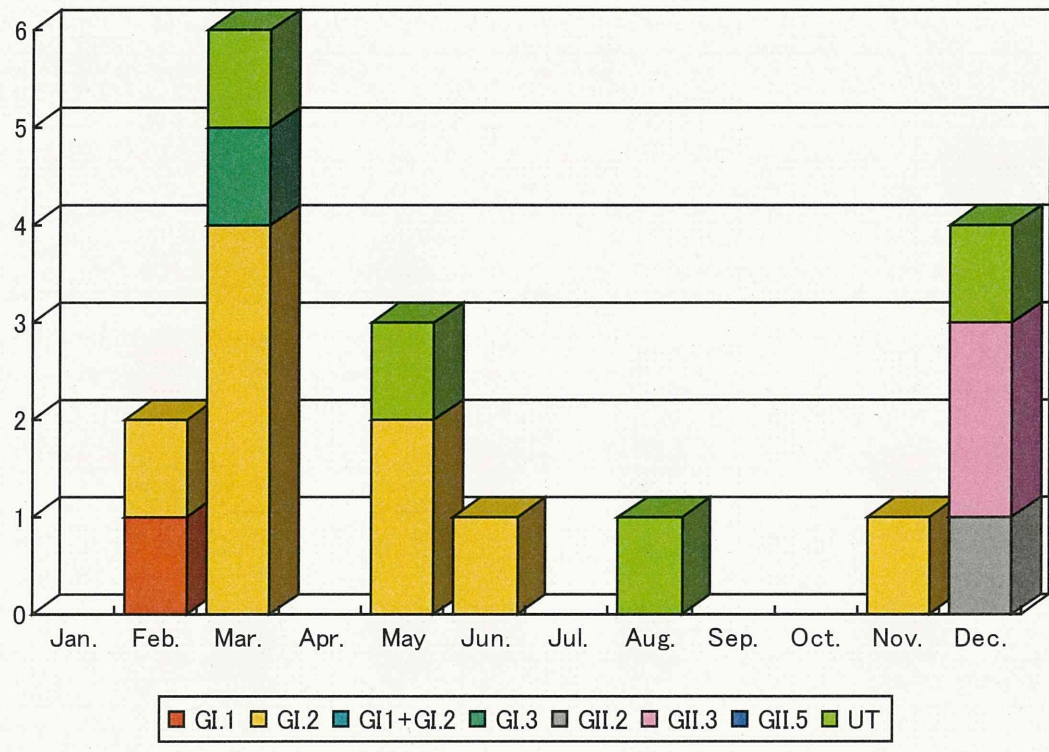


図1 : 集団胃腸炎事例におけるNoV以外の胃腸炎ウイルス検出状況 (東京都、2012年1月～12月)

事例数 サポウイルス



事例数 A群ロタウイルス

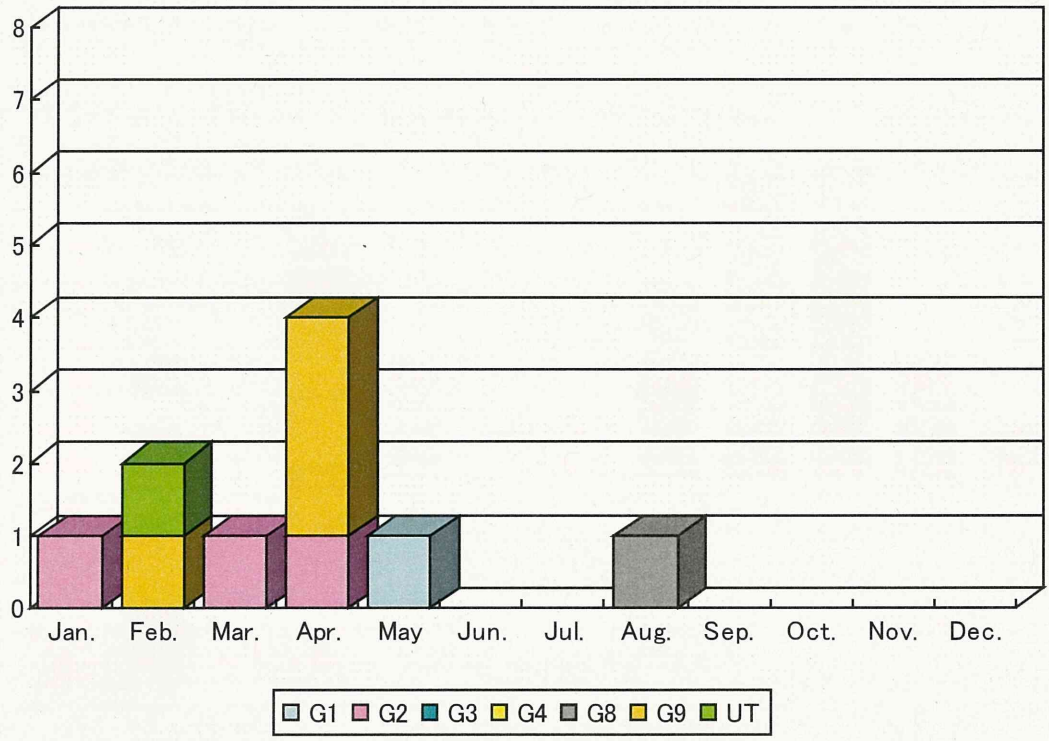


図2：検出されたウイルスの遺伝子型（東京都：2012年）

平成 24 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

カキ関連食中毒疑事例からのエンテロウイルス、
パレコウイルス、ボカウイルスの検出および
国産生食用カキのノロウイルス・A 型肝炎ウイルス汚染調査

研究協力者	入谷 展弘	大阪市立環境科学研究所
研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所
研究協力者	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
	山元 誠司	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

研究要旨

2001 年 1 月～2004 年 11 月の期間に当研究所に搬入されたカキの喫食を伴う食中毒疑事例についてエンテロウイルス、パレコウイルス、ボカウイルスの検索を行った。その結果、エンテロウイルスが 1 事例 (2.2%) 5 検体 (3.0%) から検出された。パレコウイルスおよびボカウイルスは検出されず、カキ関連食中毒疑事例における検査の優先度は低いと考えられた。

2012 年 12 月初旬の市販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、22.2%がノロウイルス陽性であった。2011-2012 シーズンは、大阪府でカキ関連食中毒事例の発生がほとんど認められていないが、依然として生食用カキにノロウイルス汚染があり、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

冬季に多発する食中毒は主にノロウイルスが原因である。他の腸管系ウイルスも食中毒の原因になりうるが、そ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ウイルスと食中毒との関連性を明らかにすることを目的としてカキの喫食を伴う食中毒疑事例を対象にエンテロウイルス、パレコウイルス、ボカ

ウイルスの検出を行った。

また、生食用カキにおけるウイルスの汚染状況把握とカキからのウイルス検査方法の確立を目的に国産市販生食用カキのノロウイルスおよび A 型肝炎ウイルス検査を実施した。

B. 研究方法

1. 材料

2001年1月～2004年11月の期間に当研究所に搬入されたカキの喫食を伴う食中毒疑 45 事例の患者糞便 164 検体を対象として、エンテロウイルス、パレコウイルス、ボカウイルスの検査を実施した。なお、今回対象とした検体は、ノロウイルスを含む他の 8 種類のウイルス検査済であり、それらの結果は昨年度の本研究班報告書において報告している。

国産食用カキは、2012年12月初旬に市販されていた9ロットを、1ロットにつきカキ 3 個をまとめてノロウイルスおよび A 型肝炎ウイルスの検査に用いた。9 ロットの産地は、兵庫県産 4 ロット、岡山県産 3 ロット、広島県産 2 ロットであった。

2. カキ関連食中毒患者糞便材料からのウイルス検出

エンテロウイルスは Tapparel らのリアルタイム RT-PCR 法 (JCM 47, 1742-9, 2009) を一部改変して実施し、パレコウイルスは Ito らの RT-PCR 法 (JGV 85, 391-8, 2004)、ボカウイルスは Kantola らのリアルタイム RT-PCR 法 (JCM 48, 4044-50, 2010) を用いて実施した。

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) のアマラーゼ処理・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 α -アマラーゼを加えて、37°C で 60 分間攪拌し、グリコーゲンの消化を行った。アマラーゼ処理後、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°C で 2-3 時間放置した。さらに 4°C 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 (Life Technologies)、cDNA の作製には SuperScript III (Life Technologies) および Random Hexamer primer (Roche)、ノロウイルス検査には Kageyama らのリアルタイム RT-PCR 法 (JCM 41, 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。A 型肝炎ウイルスは西尾らのリアルタイム RT-PCR 法 (IASR 23, 274-5, 2002)、を用いて検査を実施した。

(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. カキ関連食中毒疑事例からのウイルス検出状況

今回対象としたカキ関連食中毒疑事例は、すべてノロウイルスが陽性の事例であった。エンテロウイルスは、1 事例 (2.2%) 5 検体 (3.0%) から検出され、単独で検出されたのは 1 検体のみであった (表 1)。パレコウイルスおよびボカウイルスはすべて陰性であった。エンテロウイルスが検出された事例 (事例番号 01-17) は、ノロウイルスの検出率が低

かった事例であり、昨年度の本研究班報告書において報告したように他にアイチウイルスおよびアストロウイルスが検出されている（表 2）。本事例においてノロウイルスが検出されたのは 5/22 (22.7%) であり、他のウイルス検査を含めると 12/22 (54.5%) がウイルス陽性となった。

2. 生食用カキのノロウイルス汚染状況

2012 年 12 月に収去された 9 ロット中 2 ロット (22.2%) からノロウイルスが検出された（表 3）。産地別では、兵庫県産で、同じ採取海域・異なる採取日のカキ 2 ロットが陽性となった。カキ 1 個あたりのウイルス量 (RNA コピー数) は 1 コピーと微量であり、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 コピー以下であった。

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.13 型（検体番号 OY12-1）および GII.4 型（検体番号 OY12-9）であった。GII.4 型に分類された OY12-9 は、今シーズンにヒトで流行している新しい GII.4 変異株の Sydney/NSW0514/2012/AU 株（GenBank accession number JX459908）に近縁であった。

今回検査したカキから A 型肝炎ウイルスは検出されなかった。

D. 考察

対象としたカキ関連食中毒疑事例の患者糞便材料より、ノロウイルス以外にエンテロウイルスが 1 事例から検出された。本事例 (01-17) は、他にアイチウイルスおよびアストロウイルスが検出されてお

り、カキの喫食に伴う混合感染であったことが示唆された。今回検出されたエンテロウイルスと胃腸炎との関連性については、さらに型別など詳細な解析が必要であると考えられた。検出されなかったパレコウイルスおよびボカウイルスについては、カキ関連食中毒疑事例における検査の優先度は低いと判断された。

2012 年 12 月初旬に市販されていた国産生食用カキに 22.2% のノロウイルス汚染が認められたが、汚染されていたウイルス量は少なかった。2012-2013 シーズンの大阪市におけるカキ関連食中毒疑事例は、1 月までに 1 事例の発生が認められている。カキ関連の食中毒事例は減少傾向にあるが、カキのノロウイルス汚染は依然として認められ、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。

E. 結論

・カキ関連食中毒疑事例の患者便からエンテロウイルスが検出された。胃腸炎との関連性については、より詳細な解析が必要であると考えられた。

・パレコウイルスおよびボカウイルスは検出されず、カキ関連食中毒疑事例における検査の優先度は低いと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 本村和嗣, 横山勝, 岡智一郎, 片山和彦, 野田衛, 田中智之, 佐藤裕徳, Norovirus Surveillance Group of Japan (吉澄志麻, 三上稔之, 斉藤博之, 高橋

朱実, 蛇口哲夫, 高橋知子, 植木洋, 田村務, 名古屋真弓, 滝澤剛則, 篠崎邦子, 吉田徹也, 小林慎一, 東方美保, 内野清子, 入谷展弘, 阿部勝彦, 伊藤文明, 福田伸治, 飯塚節子, 山下育孝, 近藤玲子, 増本久人, 船津丸貞幸, 松岡由美子, 岩切章): ノロウイルスのゲノム解析と流行発生のおくみ, 感染症学雑誌 86, 563-568 (2012)

2) 田村務, 渡邊香奈子, 田澤崇, 渡部香, 広川智香, 吉澄志磨, 横井一, 森功次, 入谷展弘, 藤井慶樹, 木内郁代, 加藤聖紀, 仁平稔, 野田 衛: ノロウイルス GII/4 の新しい変異株の遺伝子解析と全国における検出状況, 病原微生物検出情報 月報 33(No.394), 333-334 (2012)

3) J van Beek, K Ambert-Balay, N Botteldoorn, J S Eden, J Fonager, J Hewitt, N Iritani, A Kroneman, H Vennema, J Vinjé, P A White, M Koopmans: Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, Eurosurveillance 18(1) pii=20345 (2013)

2. 学会発表

1) 入谷展弘, 改田厚, 田中智之, 野田衛: カキの喫食を伴う食中毒疑い事例からのウイルス検出, 第53回日本臨床ウイルス学会, 大阪 (2012. 6. 16-17)

2) 入谷展弘, 改田厚, 阿部仁一郎, 久保英幸, 山元誠司, 後藤薫, 長谷篤: 2010-11~2011-12 シーズンに大阪市で発生した非細菌性集団胃腸炎事例から検出されたノロウイルスの分子疫学, 平成24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, 大阪 (2012. 9. 21)

3) 入谷展弘, 改田厚, 山元誠司, 久保英幸: 2012年4~6月に大阪市内保育所で多発した集団胃腸炎事例のウイルス学的調査, 第60回日本ウイルス学会, 大阪 (2012. 11. 12-15)

4) 勢戸祥介, 小川貴史, 今井一人, 入谷展弘, 改田厚, 久保英幸: 大阪市内で検出された Norovirus GII.6 の抗原性と組織血液型抗原結合について, 第60回日本ウイルス学会, 大阪 (2012. 11. 12-15)

5) 實方剛, 入谷展弘, 改田厚, 中野俊也, 谷口孝喜, 油井晶子, Batbaatar Gunchin, Gotov Choijyants: モンゴル国における急性胃腸炎患者からのパレコウイルス、ボカウイルス、アイチウイルスの検出状況, 第60回日本ウイルス学会, 大阪 (2012. 11. 12-15)

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 カキ関連食中毒疑い事例からのエンテロウイルス、パレコウイルス、ボカウイルス検出状況

ウイルス	陽性事例数 (%) n=45	陽性検体数 (%) n=164
ノロウイルス	45 (100.0)	112 (68.3)
エンテロウイルス	1 (2.2)	5 (3.0)
パレコウイルス	0	0
ボカウイルス	0	0

表2 事例番号 01-17 におけるウイルス検査結果¹⁾

検体 番号	ノロウイルス	アイチウイルス	アストロウイルス	エンテロウイルス	その他ウイルス
1 ²⁾	+	NT	NT	NT	NT
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-
4 ²⁾	+	NT	NT	NT	NT
5	-	-	+	+	-
6	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-
8	-	+	-	-	-
9	-	+	-	+	-
10	+	-	+	-	-
11	-	-	-	-	-
12	-	+	-	+	-
13 ²⁾	+	NT	NT	NT	NT
14	-	-	-	+	-
15	-	+	-	+	-
16	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-
18	-	+	+	-	-
19	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-
22	+	-	-	-	-

1) -は陰性、+は陽性、NTは“not tested”

2) 材料が残っていなかったため、他のウイルス検査を実施できなかった。

表3 国産市販生食用カキからのノロウイルスおよびA型肝炎ウイルス検出結果¹⁾

検体 番号	採取海域・産地	採取年月	ノロウイルス			A型肝炎ウイルス
			リアルタイム RT-PCR ²⁾ (コピー/個)		PCR (遺伝子型)	リアルタイム RT-PCR
			GI	GII		
OY12-1	兵庫県室津海域	2012年12月	—	1	+(GII.13)	—
OY12-2	岡山県虫明海域	2012年12月	—	—	NT	—
OY12-3	岡山県邑久海域	2012年12月	—	—	NT	—
OY12-4	兵庫県相生海域	2012年12月	—	—	NT	—
OY12-5	広島県呉湾	2012年12月	—	—	NT	—
OY12-6	広島県呉湾	2012年12月	—	—	NT	—
OY12-7	兵庫県岩美海域	2012年12月	—	—	NT	—
OY12-8	岡山県邑久海域	2012年12月	—	—	NT	—
OY12-9	兵庫県室津海域	2012年12月	—	1	+(GII.4)	—

1) -は陰性、+は陽性、NTは“not tested”

2) カキ1個あたりのノロウイルス RNA コピー数

平成 24 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

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

2011 年 8 月から 2012 年 7 月までに胃腸炎患者から採取された糞便及び吐物、計 306 検体について胃腸炎ウイルス検索を試み、206 検体(67.3%)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 127 検体(61.7%)、A 群ロタウイルス(RV-A)が 65 検体(24.9%)、サポウイルス(SaV)が 9 検体(4.4%)、アストロウイルス(AstV)が 5 検体(2.4%)であった。NoV 陽性 127 検体中、125 検体(98.4%)が GII 陽性、2 検体(1.6%)が GI 陽性であった。シーケンス解析による遺伝子型別の結果、GI 陽性の 2 検体は GI.1 と GI.7 の各 1 検体、GII 陽性 125 検体中、GII.4 が 84 検体(67.2%)、GII.13 が 17 検体(13.6%)、GII.3 が 13 検体(10.4%)、GII.2 が 8 検体(6.4%)、GII.6、GII.12 及び GII.14 が各 1 検体(0.8%)であった。GII.3 が優勢であった 2010/11 シーズンと異なり GII.4 が優勢となった。RV-A 陽性 65 検体の G 血清型は、G3 が 25 検体(38.5%)、G1 が 24 検体(36.9%)、G2 が 9 検体(13.8%)、G9 が 7 検体(10.8%)であった。SaV 陽性の 9 検体はカプシド領域の遺伝子解析で 8 検体が GI、1 検体が GII に分類された。AstV 陽性 5 検体は、全て 1 型であった。NoV GII.4 陽性 64 検体の構造タンパク遺伝子の系統樹解析の結果、26 検体が 2006b 型、9 検体が 2004 型、29 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。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となる。

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。感染性胃腸炎の原因ウイルスとして、ノロウイルス(NoV)、ロタウイ

ルス(RV)、サポウイルス(SaV)、アストロウイルス(Ast)が挙げられる。例年、感染性胃腸炎の流行にともない、胃腸炎ウイルスの集団感染や食中毒事例が多発している。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、病原体の特定は食中毒

検査対象ウイルスの選択や食中毒検査法の改良に有用な情報となる。

そこで、2011年8月から2012年7月(11/12シーズン)に、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の検索と遺伝子解析を試みた。

B. 研究方法

1. 材料

2011年8月から2012年7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、散発性感染性胃腸炎患者の糞便及び吐物、計306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記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 (Virology, 299:225-239, 2002)) 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 らの方法 (Arch Virol, 151:2503-2509, 2006) 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

306 検体中 206 検体 (67.3%) 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 127 検体 (61.7%)、RV-A が 65 検体 (24.9%)、SaV が 9 検体 (4.4%)、AstV が 5 検体 (2.4%) 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 1～5 月に AR-V 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、SaV 陽性の 9 検体の内、2 検体は 11 月、残り 7 検体は翌年の 4 月から 6 月に検出された。AstV 陽性 5 株は 6 月から 7 月の NoV の流行期に検出された。

NoV の遺伝子群 (Genogroup) 別では、GI 陽性が 2 検体、GII 陽性が 125 検体で

あった。遺伝子解析の結果、GI 陽性の 2 検体は GI. 1 と GI. 7 の各 1 検体であった。GII 陽性の 125 検体中、GII. 4 が 84 検体 (67.2%)、GII. 13 が 17 検体 (13.6%)、GII. 3 が 13 検体 (10.4%)、GII. 2 が 8 検体 (6.4%)、GII. 6、GII. 12 及び GII. 14 が各 1 検体 (0.8%) であった。(図 2)。2010/11 シーズンは GII. 3 が優勢であったが、11/12 シーズンは GII. 4 が優勢となった (図 3)。

RV-A 陽性 65 検体の G 血清型は、G3 が 25 検体 (38.5%)、G1 が 24 検体 (36.9%)、G2 が 9 検体 (13.8%)、G9 が 7 検体 (10.8%) 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したが、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。

SaV 陽性の 9 検体は capsid 領域の遺伝子解析で 8 検体が GI、1 検体 GII に分類された。

AstV 陽性 5 検体は、全て 1 型であった。

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 64 株についてクラスター分類した結果、2006b 型が 26 株、2004 型が 9 株、2009a 型が 29 株であった。大きくは 3 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。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、2004 型、2006 型と 2009a 型の 3 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 シーズンに亘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。

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、わが国でもロタリックスが 2011 年 11 月に、ロタテックが 2012 年 7 月に発売されている。

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のサーベイランスとして重要となる。

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流行はNoVと比べて小さいが、その発生動向に継続的監視が必要である。

E. 結論

2011年8月から2012年7月までに胃腸炎患者から採取された糞便及び吐物、計306検体について胃腸炎ウイルス検索の結果、NoV GII.4型が感染性胃腸炎の主要な原因ウイルスであることが確認された。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体ウイルスサーベイランスの意義が益々重要となる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Shinichi Kobayashi, Noriko Fujiwara, Yoshihiro Yasui, Teruo Yamashita, Reiji Hiramatsu, Hiroko Minagawa. A foodborne outbreak of sapovirus linked to catered box lunches in Japan. Arch of Virol., 157:1995-1997 2012.

2. 学会発表

1) 藤原範子、廣瀬絵美、安達啓一、伊藤 雅、安井善宏、小林慎一、山下照夫、皆川洋子：愛知県における胃腸炎ウイルスの流行状況（2010/11シーズン）、第53回日本臨床ウイルス学会、豊中市、2012年6月16日

2) 小林慎一、藤原範子、安井善宏、山下照夫、皆川洋子：愛知県における肥育ブタからのノロウイルス検出状況（2011/12シーズン）、第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪市、2012年11月13日-15日

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

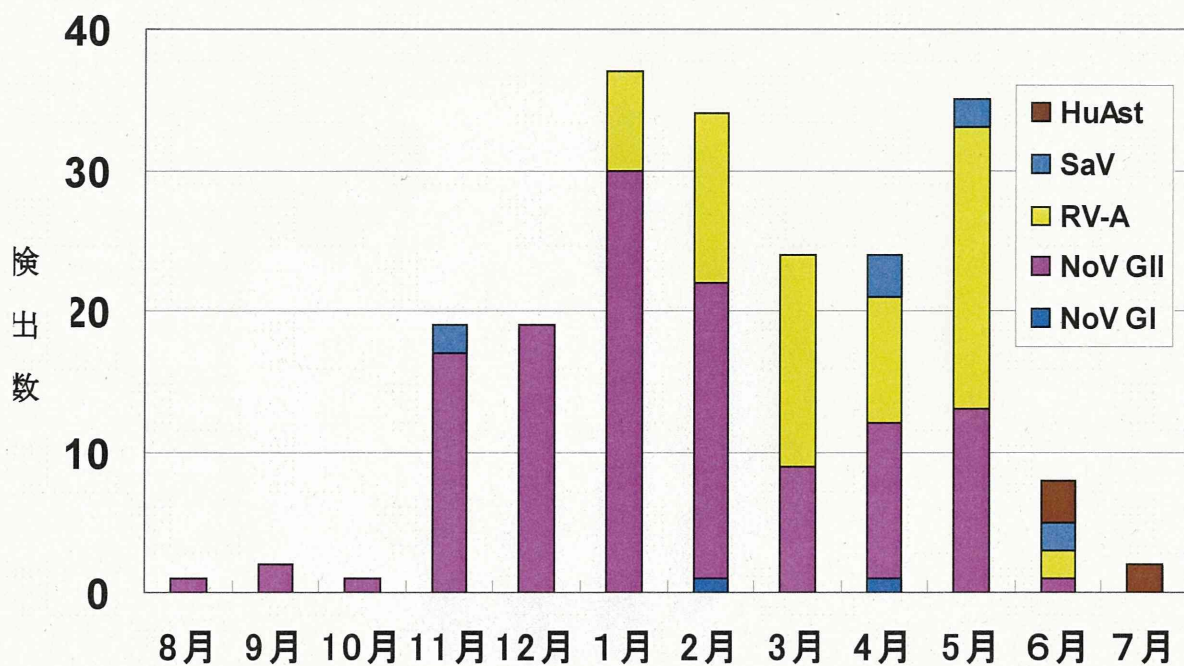


図1 月別ウイルス検出数(2011/12 シーズン)

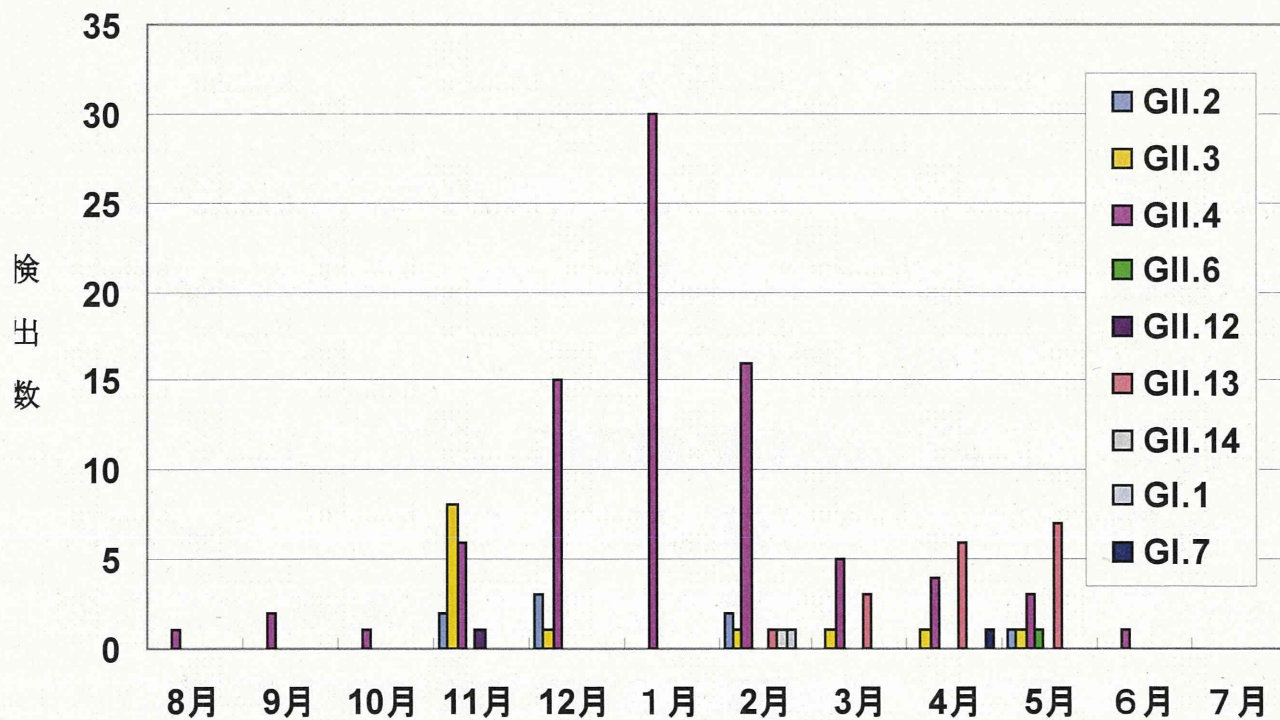


図2 月別・遺伝子型別ウイルス検出状況 (2011/12 シーズン)

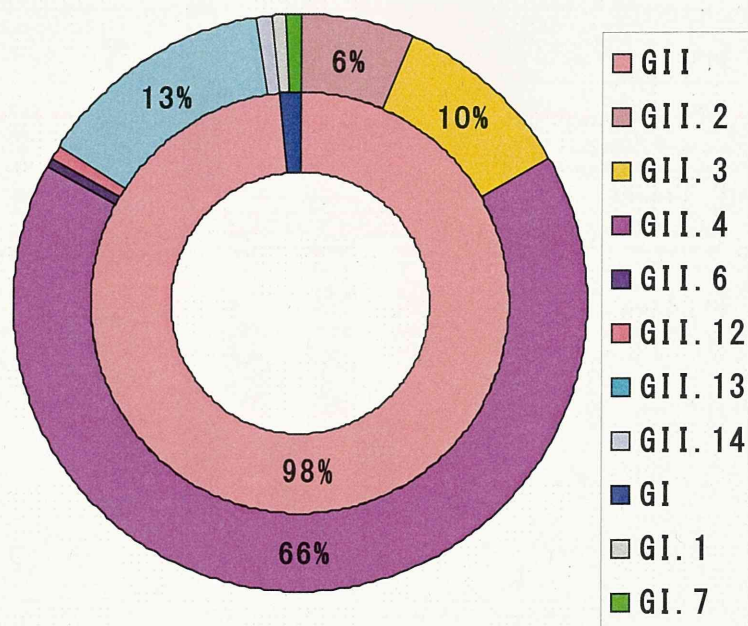


図3 NoVGIIの遺伝子型別検出状況

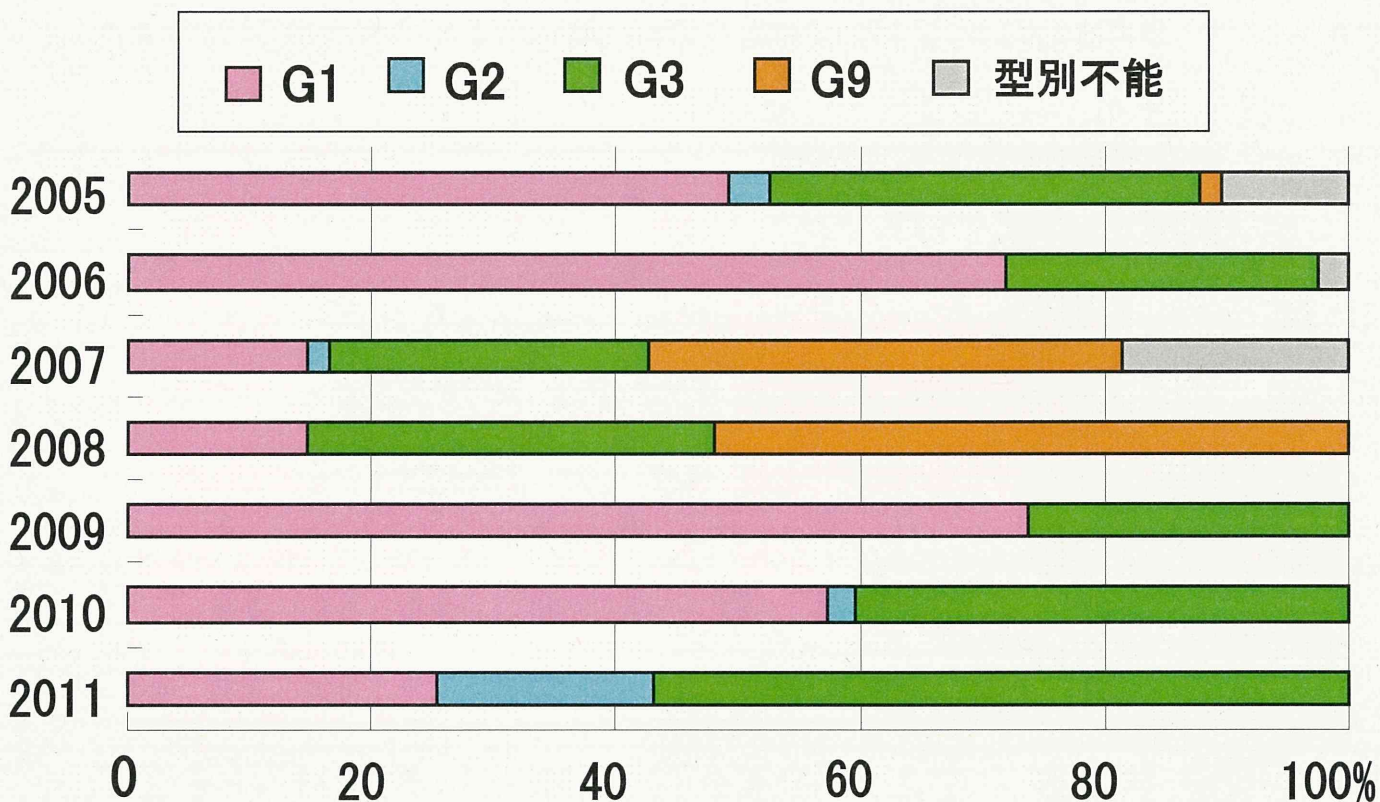


図4 年別・血清型別A群ロタウイルス検出状況