

## 愛媛県で検出されたノロウイルスの分子疫学的解析と 2012/2013 シーズンに検出されたノロウイルス GII.4 変異株について

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	青木里美	愛媛県立衛生環境研究所
協力研究者	四宮博人	愛媛県立衛生環境研究所

### 研究要旨

愛媛県におけるノロウイルス (NoV) の流行状況を明らかにするため、2012 年 1 月～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 NoV について分子疫学的解析を行った。調査期間中に散発性胃腸炎から検出された NoV は 109 例 (検出ウイルスの約 52.2%) で、そのうち GII が 96.3% (105 例) を占めていた。1 月～6 月に検出された GII の遺伝子型は 5 種類 (GII.4、GII.2、GII.7、GII.13、GII.6) であったが、10 月～12 月は、ほとんどが GII.4 (97.4%) で、検出時期により遺伝子型の分布に違いがみられた。集団発生例では、11 事例から NoV GII が検出された。このうち、型別が可能であった 10 事例中 9 事例で GII.4 の関与が示唆された。また、県内発生の食中毒事例 (4 事例) は、いずれも不顕性感染の調理従事者による食品汚染が原因と考えられた。

調査期間中に最も多く検出された GII.4 は、1 月～6 月は、2006b、2008a 及び 2009a タイプであった。一方、10 月～12 月に検出されたウイルスは、いずれも、2012 年 3 月にオーストラリアで検出された GII.4 の新しい変異株 (GII.4/Sydney/NSW0514/2012/AU) と高い相同性を示し、過去に検出されたウイルスとは異なっていた。これらのことから、新しい変異株の出現が、11 月～12 月の感染性胃腸炎の大流行に関与していたと推測された。1 月～6 月に検出された GII.2、GII.7、GII.13 は、解析したすべての株が、カプシド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った。

### 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、散发性胃腸炎及び食中毒等集団発生事例から検出された NoV について分子疫学的解析を行った。

## B. 研究方法

### 1. 材料

2012年1月～12月の間に採取された感染症発生動向調査用の散发性胃腸炎患者糞便 421 検体及び食中毒等集団発生 16 事例から得られた 232 検体（患者糞便 93 検体、従事者糞便 54 検体、食品 42 検体、ふき取り 43 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あ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 プロンプを用いたリアルタイム PCR 法(J. Clin. Microbiol 41, 2003)で行った。サポウイルス遺伝子の検出は、岡田らの方法(Arch. Virol 151, 2006)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(J. Med. Virol 78, 2006)を併用して実施した。

NoV 陽性例については、カプシド N/S 領域の塩基配列をダイレクトシーケ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、ポリメラーゼ領域及びカプシド P1/P2 領域の塩基配列を決定し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 2004 年～2012 年の定点当たりの患者報告数の推移を図 1 に示した。2011/2012 シーズンにあたる 1 月から 3 月上旬は、例年に比べ患者報告数が少なく、3 月下旬(第 12 週)から報告数が増加し始め、4 月中旬(第 15 週)から下旬(第 17 週)に定点あたりの報告数がピークとなった。一方、2012/2013 シーズンは、10 月下旬(第 43 週)から患者報告数が急増し、12 月上旬(第 49 週)にピークを迎えた。ピーク時の定点あたりの患者報告数は、最も多かった 2006/2007 シーズンに次いで多かった。

### 2. 散发性胃腸炎患者からのウイルス検出状況

散发性胃腸炎患者 421 名からのウイルス検出状況を表 1、2 に示した。421 検体中 203 検体(48.2%)からウイルスが検出され、そのうち、6 検体からは 2 種類のウイ

ルス (NoV とサポウイルスが4検体、サポウイルスとA群ロタウイルスが2 検体) が検出された。調査期間中に検出されたウイルスは209例で、NoV が109例 (52.2%) で最も多く、次いでサポウイルスが52例 (24.9%)、ロタウイルスが44例 (21.0%)、アデノウイルスが3例 (1.4%)、アストロウイルスが1例 (0.5%) であった。検出されたNoVは GIIが105例 (96.3%) で圧倒的に多く、GIは4例 (3.7%) と非常に少なかった。NoVは1月～6月及び10月～12月にかけて検出され、特に1月～2月と11月～12月に高率に検出された。サポウイルスは4月と9月を除く各月から検出されたが、5月～7月の検出率が高かった。ロタウイルスは3月～5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

2012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11事例の概要を表3に示した。11事例のうち7事例 (事例1、3、4、5、9～11) が県内発生例であった。そのうち4事例 (1、3、5、9) は、施設が提供した食品を原因とする食中毒と確定され、患者及び無症状の調理従事者糞便からNoV GII.4が検出された。また、事例3、5では、糞便中に排泄されたウイルス量は、患者と無症状の調理従事者で大差はなかった。事例10、11は食中毒とは確定されなかった有症苦情例でNoV GII.4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1例 (事例4) あった。

県外事例では、2事例から GII.4、1事例から GII.14が検出された。

### 4. 検出されたNoVの遺伝子型と月別検出状況

散発性胃腸炎から検出されたNoV 109

株のうち解析が可能であった99株 (GI 4株, GII 95株) について遺伝子型別を行った。その結果、GIが4種類 (GI.1、GI.4、GI.6、GI.14)、GIIが5種類確認された。GIIでは、GII.4が54株で最も多く検出され、次いでGII.2が16株、GII.7が13株、GII.13が10株、GII.6が2株であった。

検出数の大半を占めたGIIの月別遺伝子型別検出状況を図2に示した。1月～6月 (2011/2012 シーズン) に検出されたGIIの遺伝子型は5種類で、GII.4が17株 (29.8%) で最も多く、次いでGII.2が16株 (28.1%)、GII.7が13株 (22.8%)、GII.13が9株 (15.8%)、GII.6が2株 (3.5%) であった。10月～12月 (2012/2013 シーズン) では、GII.13の1株を除き、すべてGII.4 (37株) であった。一方、NoVが検出された県内発生例の集団事例は、2月～3月と10月～12月に見られたが、いずれもGII.4が検出された。

### 5. GII.4の遺伝子解析

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、カプシドN/S領域 (図3) に加え、ポリメラーゼ領域 (図4) 及びカプシドP1/P2領域 (図5) について解析し、詳細に検討を行った。また、GII.4の変異株の月別検出数の推移を図7に示した。系統樹解析の結果、2012年1月～6月 (2011/2012 シーズン) に検出されたウイルスは、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シーズンに初めて検出されたGII.4/Apeldoorn317/2007/NL株やGII.4/OC08086/08/JP株に近縁な2008aタイプ及びGII.4/NewOrleans1805/2009/USAに近縁な2009aタイプであった。一方、

10月～12月(2011/2012シーズン)に検出されたウイルスは、2006b、2008a 及び 2009a とは異なる新しいクラスターに分類され、株間の相同性は、ポリメラーゼ領域で 99～100%、カプシド P1/P2 領域で 98.4～100%であった。これらは GII.4/Sydney/NSW 0514/2012/AU と高い相同性(ポリメラーゼ領域が 98.8～99.3%、カプシド P1/P2 領域が 97.8～98.4%)を示す GII.4 の新しい変異株であった。これらのウイルスは、愛媛において過去に検出例はなく、2012/2013 シーズンに初めて確認された。

2012年2月～3月に県内で発生した食中毒事例1と3から検出されたNoV GII.4は、2009aと2006bタイプであった。一方、2012年10月～12月に発生した食中毒等集団事例からは、いずれも GII.4 の新しい変異株が検出された。おのおの食中毒事例(事例1、3、5、9)において、患者及び無症状の調理従事者から検出されたウイルスのカプシド N/S 及びポリメラーゼ領域の塩基配列は 100%一致していた。

#### 6. GII.4 以外(GII.2、GII.7、GII.13、GII.6)の遺伝子解析

N/S 領域による遺伝子解析で GII.2、GII.7、GII.13 及び GII.6 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6に示した。N/S 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、いずれも GII.15 (Neustrelitz260/2000/DE)に分類された。また、GII.7、GII.13 はポリメラーゼ領域が GII.6(SaitamaU3/97/JP)であった。これら3つの遺伝子型の株は、すべてカプシド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。遺伝子型 GII.6 の株は、カプシド領域、ポリメラーゼ領域とも GII.6 で、キメラウイルスではなかった。

#### D. 考察

散发性胃腸炎の原因ウイルスの 52.2%はNoVであった。そのうち 96.3%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。2012年に散发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4種類で短期間に多様な遺伝子型のウイルス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。

最近、カキ等の二枚貝を原因とする食中毒事例が減少し、調理従事者による食品汚染が原因と推定される事例が多くなっている。調査期間中に本県で食中毒と確定された4事例は、不顕性感染の調理従事者が原因と推定される事例で、患者と不顕性感染の調理従事者から検出された株の塩基配列は、事例ごとに 100%一致していた。また、4事例中2事例では、糞便中に排泄されるウイルス量が、患者と不顕性感染の調理従事者で大差はなかった。これらのことから、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日常の手洗いの指導が重要である。

2011/2012 シーズンに散发性胃腸炎から検出された NoV の約 30%は、GII.4 であった。系統樹解析の結果 2006b、2008a、2009a の3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 が流行の主流であった 2007 年～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が免疫を獲得してきたことによるものと考えられる。また、GII.4 以外の遺伝子型の大部分は、ポリメラーゼ領域とカプシド領域との間で遺伝子組換えを起こしたキメラウイルス（GII.15-GII.2、GII.6-GII.7、GII.6-GII.13 [ポリメラーゼ-カプシド領域]）であることが示唆された。

一方、2012/2013 シーズン(2012 年 10 月～12 月)は、定点あたりの感染性胃腸炎患者報告数が 2006/2007 シーズン(2006 年 10 月～12 月)に次いで多く、散発性胃腸炎や食中毒等集団発生から検出された NoV のほとんどが GII.4/Sydney/NSW0514/2012/AU と高い相同性を示す GII.4 の新しい変異株であった。これらのことから、過去に検出された株とは遺伝子学的に異なる新しい変異株の出現が、2012 年 10 月～12 月の急性胃腸炎の大流行の原因であると考えられた。

GII.4/Sydney/NSW0514/2012/AU 類似株は、2012 年 1 月～5 月に北海道、大阪市、沖縄県、新潟県で検出されていたことから、これらのウイルスが 2012/2013 シーズンに愛媛に持ち込まれたものと考えられた。

また、県内で流行していた GII.4 変異株と県外で感染した食中毒事例 7,8 から検出された株が近縁であったことから、2012/2013 シーズンの主流型であった GII.4 の新しい変異株が、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。

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になっていると考えられることから、今後も NoV の詳細な解析と発生動向の把握が必要である。

## E. 結論

1. 2012 年 1 月～12 月に散発性胃腸炎から検出された NoV は 109 例で、検出ウイルスの 52.2% を占めていた。検出された Genogroup は、GII が 105 例 (96.3%)、GI が 4 例 (3.7%) で、遺伝子型は GII が 5 種類、GI が 4 種類であった。1 月～6 月は、多種類の遺伝子型(GII.4、GII.2、GII.7、GII.13、GII.6) が検出されたが、2012/2013 シーズンにあたる 10 月～12 月は、GII.13 の 1 例を除き、すべて GII.4 であった。
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 4 事例見られ、事例ごとの遺伝子塩基配列は 100% 一致していた。そのうち 2 事例は、糞便中に排泄される NoV 量が患者と不顕性感染者で大差はなかった。
3. 2012 年 10 月～12 月に検出された GII.4 に型別されたウイルスは、1 月～6 月に検出された 2006b、2008a 及び 2009a タイプとは異なる GII.4 の新しい変異株 (GII.4/Sydney/NSW0514/2012/AU 近縁) であった。
4. 調査期間中に検出された GII.2、GII.7 及び GII.13 は、解析したすべての株が、ポリメラーゼ領域とカプシド領域との間で遺伝子組換えを起こしたキメラウイルスであった。
5. 県内で流行していた GII.4 と極めて類似している株が他県においても流行

していたことが示唆された。

愛媛県で検出された GII.4 以外のノロウイルスの分子疫学的解析. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪, 2012 年 11 月

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

- 1) 山下育孝、青木里美、青木紀子、立花早苗、菅美樹、川口利花、服部昌志、大倉敏裕、四宮博人、野田 衛 :

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許習得 : なし
2. 実用新案登録 : なし
3. その他 : なし

感染性胃腸炎(2004~2012年)

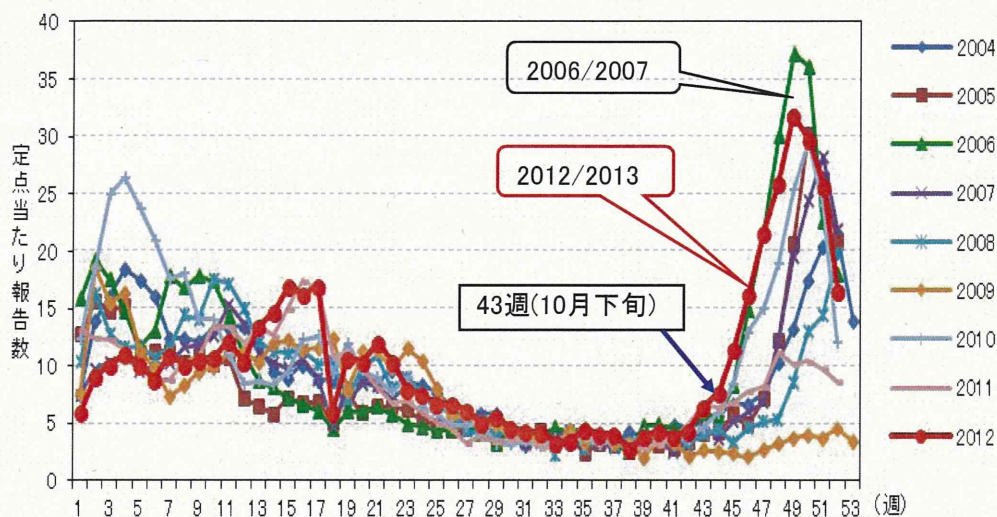


図1 感染性胃腸炎患者の週別発生状況

表1 散発性胃腸炎患者からのウイルス検出状況

検査数	421例	ウイルス	検出数	検出率(%)
陽性検体数	203例	ノロウイルス	109	52.2
陽性検体率	48.2%	〔 GI	4	〕
重複感染例		〔 GII	105	
2種類は、6検体		サポウイルス	52	24.9
ウイルス検出数 209例		ロタウイルス	44	21.0
		アデノウイルス	3	1.4
		アストロウイルス	1	0.5
		検出数	209	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	27*	17*	10	9	4*	1				1	20	20*	109
サポウイルス	6	8	4		6	5	10	1		2	5	5	52
ロタウイルス		1	7	30	5	1							44
アデノウイルス							2		1				3
アストロウイルス				1									1
検査数	51	43	43	56	34	33	30	19	15	24	34	39	421

\* 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	2.5	菓子店	団子	11	7	3/5	3/6	GII.4
2	2.26	飲食店(県外)	仕出料理	5	5	1/1		GII.14
3	3.1	葬儀場	弁当	73	49	12/14	2/5	GII.4
4	10.12	病院	感染症			6/8		GII.4
5	11.16	病院	施設の給食	119	27	10/12	2/14	GII.4
6	11.20	結婚式場(県外)	食事	239	77	1/1		GII
7	11.24	披露宴会場(県外)	食事		47	2/4		GII.4
8	12.5	旅館(県外)	食事			3/3		GII.4
9	12.8	特別養護老人 ホーム	給食	115	52	10/10	1/10	GII.4
10	12.16	不明(有症苦情 飲食店)		11	8	6/7	0/7	GII.4
11	12.19	不明(有症苦情 飲食店)		7	4	2/4		GII.4

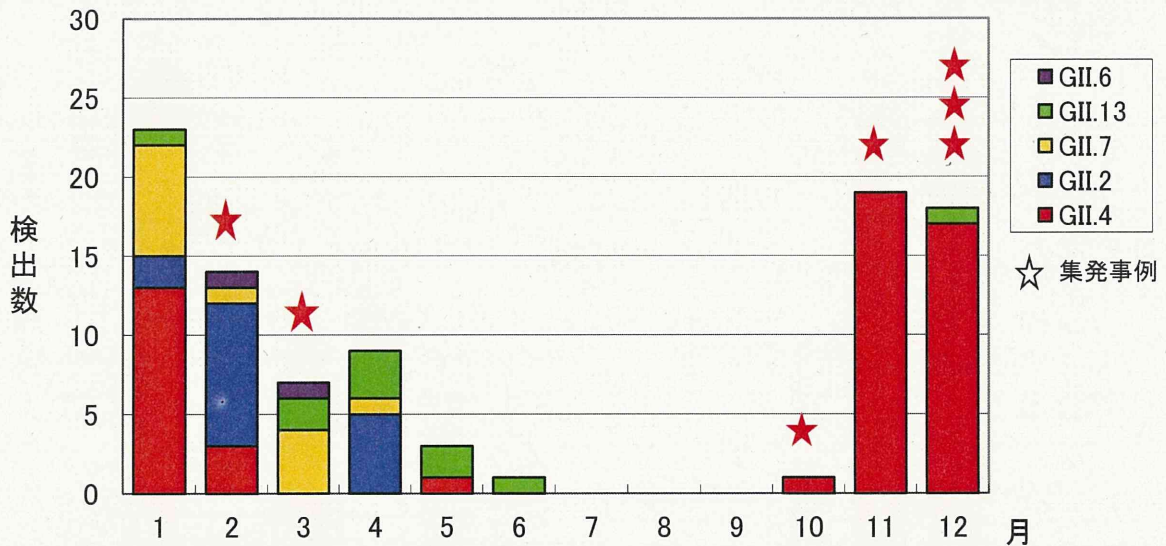


図2 NoV GIIの月別遺伝子型別検出状況



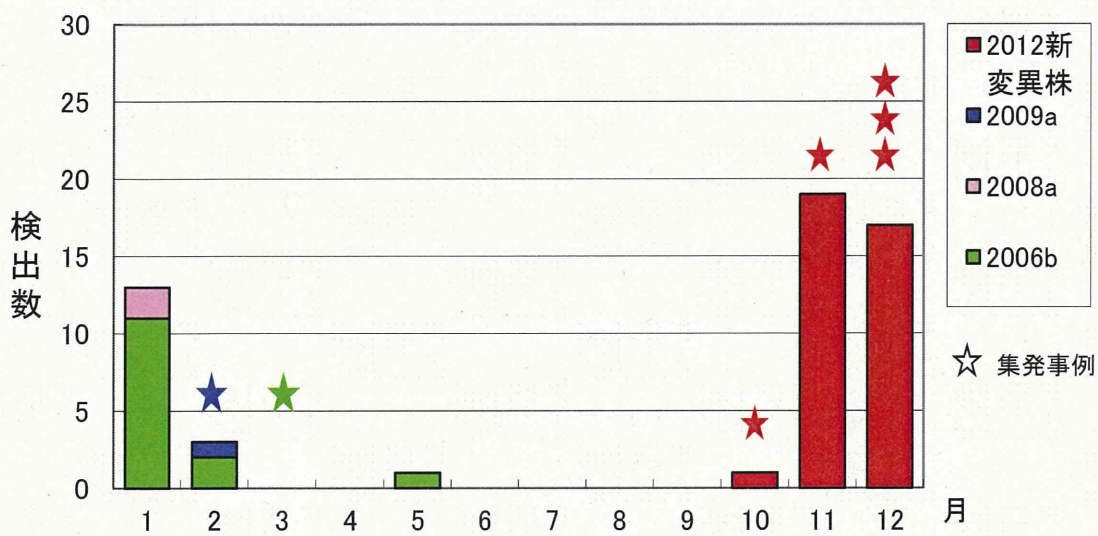


図7 NoV GII.4変異株の月別検出状況

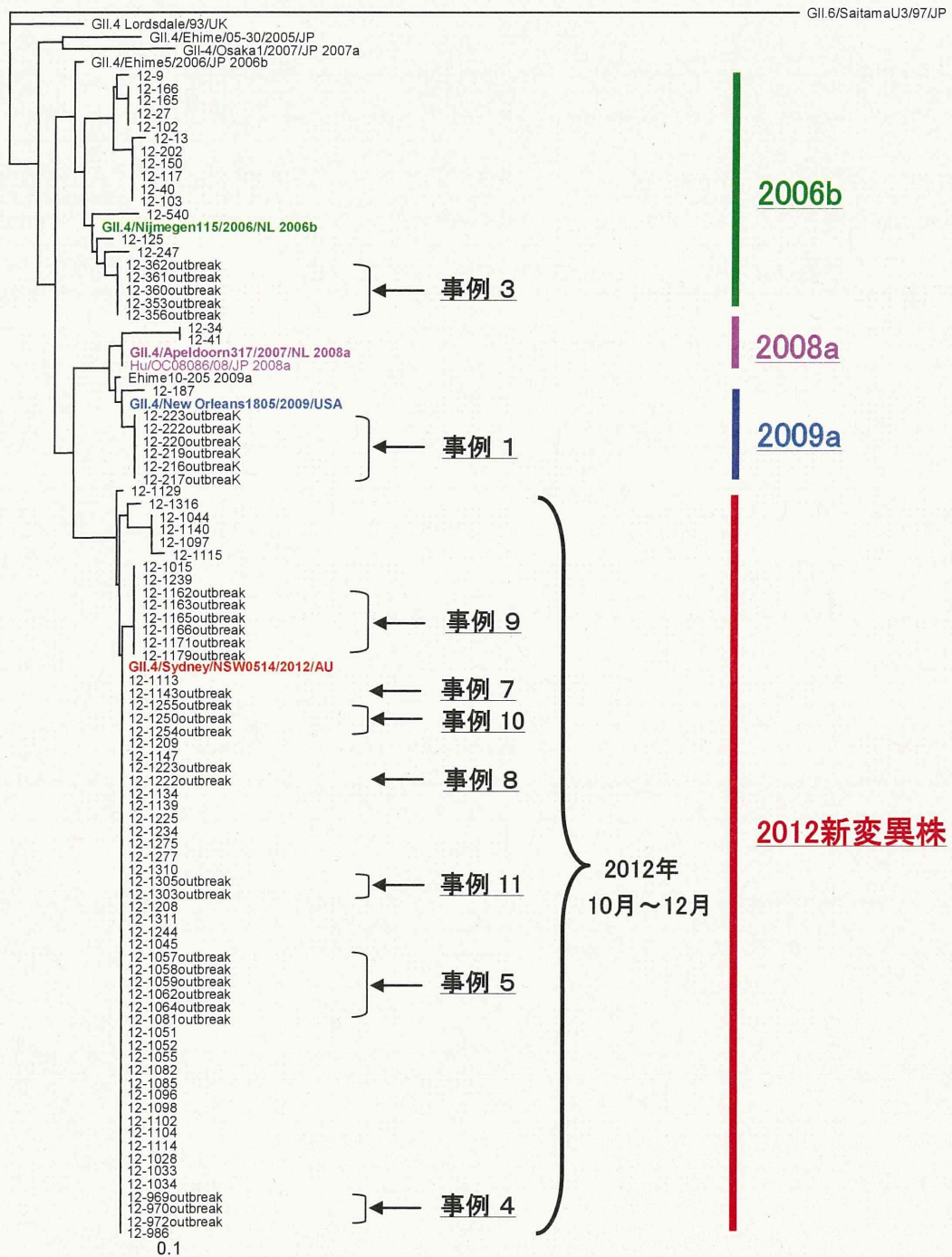


図3 NoV GII.4 の系統樹 [Capsid NS 領域]

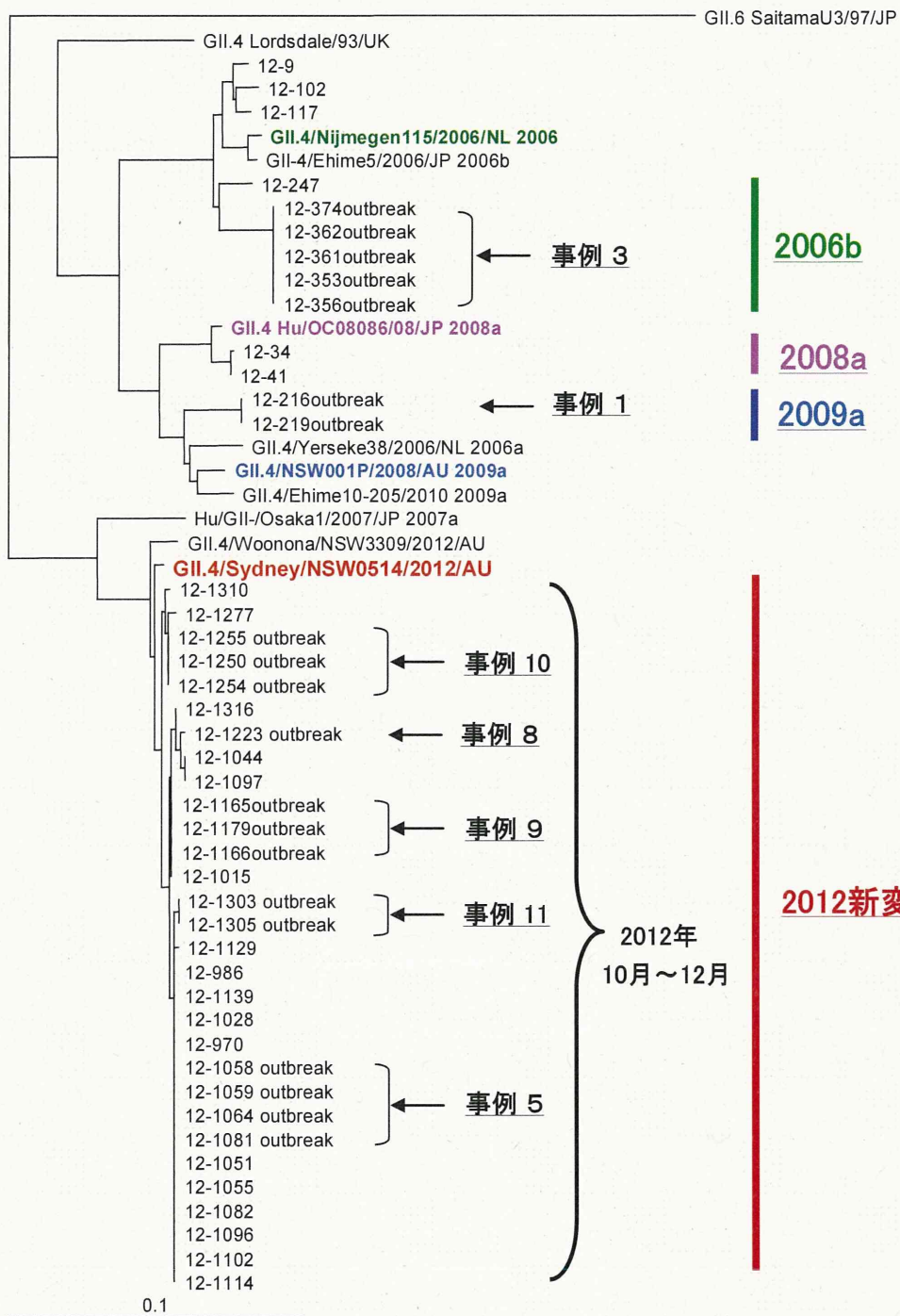


図4 NoV GII.4 の系統樹[ポリメラーゼ領域]

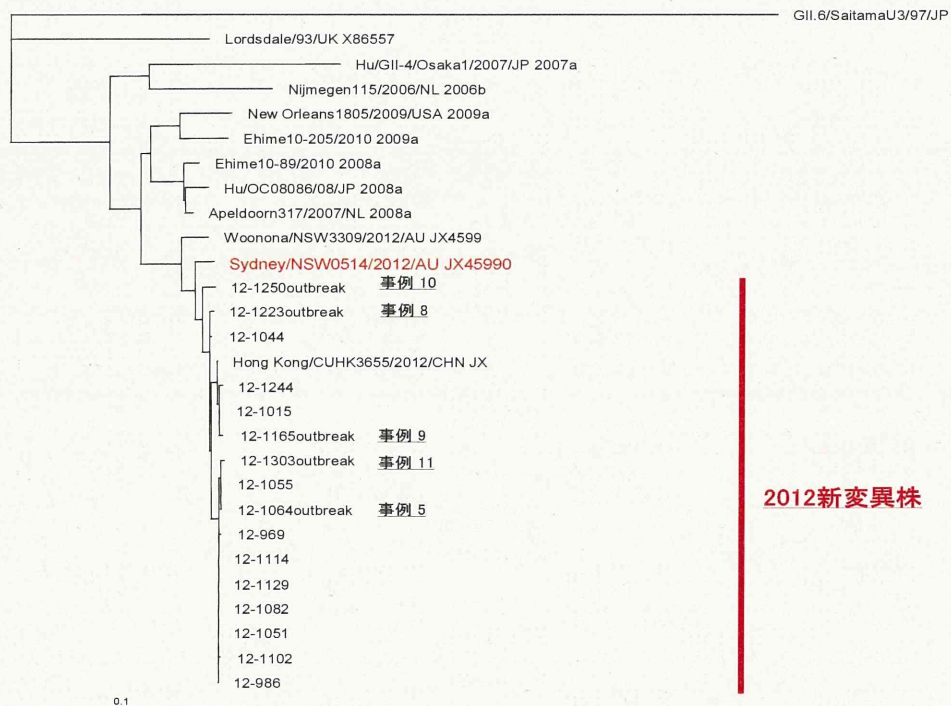


図5 NoV GII.4 の系統樹[Capsid P1/P2 領域]

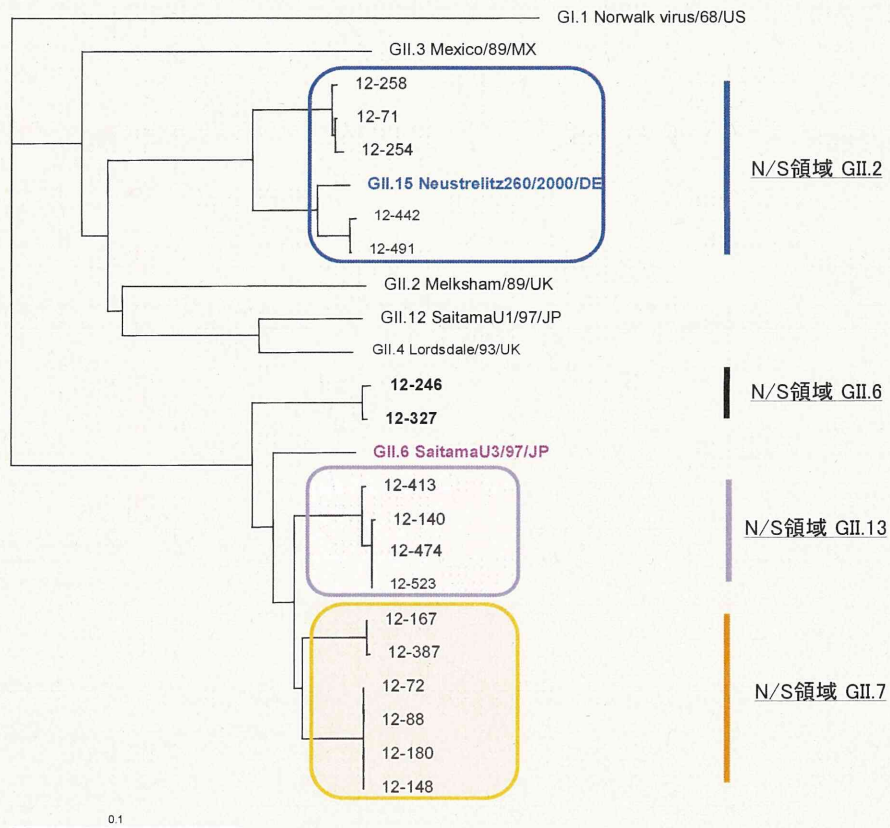


図6 NoV GII.4 以外の系統樹[ポリメラーゼ領域]

パンソルビン・トラップ法による食品からのノロウイルス遺伝子の検出  
ー弁当屋を原因施設としたノロウイルス集団食中毒事例ー

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	斎藤 博之	秋田県健康環境センター
研究協力者	木内 郁代	島根県保健環境科学研究所

### 研究要旨

食品検体からの高感度ノロウイルス (NoV) 検出法として開発されたパンソルビン・トラップ法(パントラ法)を実際の食中毒事例へ適用し、原因食品と推定された弁当から患者および従事者あるいは原因施設の拭き取り検体と塩基配列が同一の NoV 遺伝子を検出した。パントラ法によって、原因食品から患者と同一の遺伝子配列の NoV を検出した初めての事例であり、NoV による食中毒発生時の原因食品検査法として有用であった。

#### A. 研究目的

一般的な食品から高感度に NoV の検出を行うことを目的に開発されたパントラ法は改良を重ね、検出した NoV 遺伝子のシーケンス解析が可能となったが、実際の食中毒事例への適用はこれからである。今回、弁当屋を原因施設とし患者数 200 名以上となった食中毒事例において、原因食品として 3 日分 4 種類の弁当が弁当容器に入った状態で持ち込まれた。個々の食品の量は少ないが、品目数が多く、従来の濃縮法 (PEG 法、超遠心法) では検査が困難と考えられたため、パントラ法による検出を試み、その有用性を検証した。

#### B. 研究方法

##### 1. 食中毒事例の概要

2012 年 3 月 20 日、県西部で開催されたスポーツ大会に参加した中学生複数名が腹痛などの食中毒症状を呈しているとの情報を管轄保健所が探知し、調査した結果、市内の弁当屋 (X 施設) が製造した弁当を食べた関係者のみが発症していることが判明した。X 施設は多数の団体・施設に弁当および総菜を提供しており、その後の保健所の聞き取り調査の結果、最終的に 229 名の患者が把握された。

さらに、前後して X 施設が提供した食品を含む弁当および料理を提供した他の 2 施設からも食中毒症状を呈する患者が各々 49 名、28 名発生した。

##### 2. 材料

X 施設の弁当あるいは総菜を喫食後、食

中毒様症状を呈した患者ふん便 12 検体、X 施設の調理従事者ふん便 18 検体、施設の拭き取り 20 検体 (3/20 採取 10 検体、3/26 採取 10 検体)、X 施設が調理した弁当 3 日分 4 種類 (3/17 弁当、3/17 大会用、3/18 大会用、3/19 弁当) を検査材料とした。

### 3. ノロウイルスの検出法

患者および調理従事者ふん便は通知法に従い real-time PCR 法で検出した。

拭き取り検体についてはふきふきチェック II (栄研化学) で採取した拭き取り液上清 8ml を Beef extract 添加 PEG 沈法 (溝口ら: IASR, 32, 358-359, 2011) で濃縮した液 200  $\mu$ l を用い、自動核酸抽出装置 (Magtration System12CG) にて RNA 抽出を行った。抽出した RNA を High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (ABI) を用いて cDNA 合成後、COG1F/G1SKR および COG2F/G2SKR による 1st PCR、G1SKF/G1SKR および G2SKF/G2SKR による nested PCR、さらに 1st PCR 産物を用いた real-time PCR (nested real-time PCR) を行った。

食品検体はパントラ法 (斎藤: 日本食品微生物学会雑誌、29、32-37、2012) により RNA 抽出を行い、G1SKR および G2SKR、斎藤が今年度開発した逆転写反応専用プライマー PANR-G1 および PANR-G2 (本報告書「斎藤博之、パンソルビン・トラップ法によって食品検体から検出されたノロウイルスの遺伝子解析法の開発」) を用いた cDNA 合成後、拭き取り検体と同様の PCR、nested real-time PCR を行った。(図 1)

### 4. 系統樹解析

PCR 産物のゲル電気泳動で予想位置に

バンドが認められた場合は切り出して、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit および Applied Biosystems 3130 ジェネティックアナライザ (Applied biosystems) を用いてダイレクトシーケンスを行い、MEGA4 を用いて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. 患者、調理従事者からの検出状況

患者ふん便 12 検体中 12 検体、調理従事者ふん便 18 検体中 6 検体が NoV GII/4 陽性であった。

### 2. 拭き取り検体からの NoV 検出状況

3/20 採取の拭き取り検体 1 検体 (調理済み食品用バット) から NoV GII/4 が検出された。3/26 採取の検体からは NoV は検出されなかった (表 1)。

### 3. 食品からの NoV 検出状況 (表 2、図 2)

3 日分、4 種類の弁当の食品は検体量の関係で 1~3 種類の食品をプールして合計 16 検体として検査を行った。

G2SKR プライマーで cDNA 合成を行った場合、nested real-time PCR で 7 検体に蛍光シグナルが認められたが (表 2)、nested PCR ではほとんどの検体で予想位置付近にバンドが認められ (図 2)、切り出し後ダイレクトシーケンスをした結果、すべて黄色ブドウ球菌の 16s リボソームの配列であった。

PANR-G2 プライマーで cDNA 合成を行った場合、nested real-time PCR で 4 検体

に蛍光シグナルが認められ (表 2)、このうち 3 検体が nested PCR で NoVGII の位置にバンドが認められた (図 2)。これらのバンドを切り出した後、ダイレクトシーケンスを行った結果、2 検体 (3/17 大会用オレンジ、3/18 大会用オレンジ+唐揚げ) は NoV GII/4、1 検体 (3/19 弁当唐揚げ+フライ) は NoV GII/2 であった。

#### 4. 系統樹解析

患者、調理従事者、拭き取り検体、食品検体から検出された NoV 遺伝子を対象に NoV capsid 領域約 290bp の系統樹解析を行ったところ、患者由来株、調理従事者由来株とオレンジ+唐揚げ由来株は 100%一致した。また、拭き取り検体 (調理済み食品バット) 由来株とオレンジ由来株は 100%一致し、患者や調理従事者由来株とは 2 塩基異なっていた。唐揚げ+フライ由来株は GII/2 であった (図 3)。

#### D. 考察

今回、患者数 200 名以上の NoV を原因とする食中毒事例の食品検査において本研究班で開発されたパントラ法を導入して原因食品からの NoV 遺伝子を検出することができた。さらに、新たに設計された逆転写反応専用プライマー PANR-G2 で cDNA 合成した食品由来の NoV 株は従来法であるランダムプライマーあるいは G2SKR プライマーで cDNA 合成、PCR して得られた患者、調理従事者、ふき取り由来株と同一の塩基配列をもつことが確認され、実際の食中毒検査で使用可能であった。

本事例では nested real-time PCR の陽性数は従来の G2SKR プライマーを使用し

た場合の方が多くなったが、この点に関しては今後、事例数を重ねて検証していく必要があると思われた。

さらに、患者・調理従事者からは capsid 領域 290bp において、同一の塩基配列をもつ株が検出されたが、食品および拭き取りからはそれらとは塩基配列の異なる 2 種類の株も検出された。この点に関しては、食中毒を起こすような施設は普段から環境がウイルスに汚染されている可能性があること、検出されたウイルスの感染性の有無、さらにヒトの体内でのウイルス株の分布・選択等、多方面の可能性を考慮しながら詳細な解析が必要と考える。

#### E. 結論

弁当屋を原因施設とした食中毒事例において、患者の喫食した食品からパントラ法により RNA を抽出し、新たに開発された逆転写反応専用プライマーを用いることによって、NoV 遺伝子の検出・シーケンスが可能であった。そして、食品から検出された NoV には患者・調理従事者と塩基配列が同じ株が認められ、遺伝子レベルで感染源の究明が可能であった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

飯塚節子、斎藤博之、田中智之、野田衛：パンソルビン・トラップ法による食品からのノロウイルス遺伝子の検出—弁当屋を原因施設としたノロウイルス集団食中毒事例から—第 60 回日本ウイルス学会

学術集会、2012年11月、大阪

2. 実用新案登録：なし

3. その他：なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし

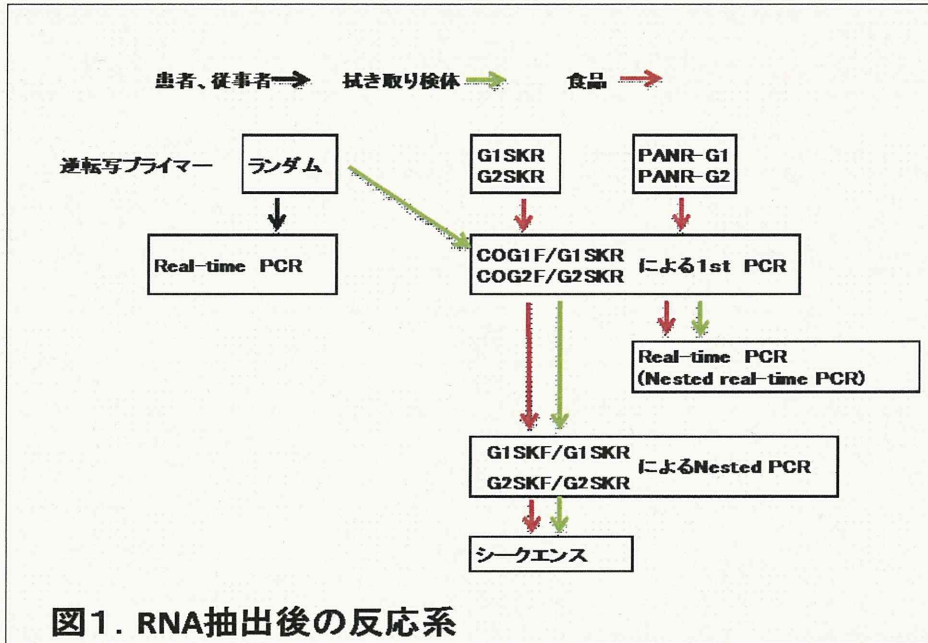


表1. 3月20日採取の拭き取り検体の検査結果

検体番号	検体名	ノロウイルス
1	生食用まな板	検出せず
2	生食用包丁	検出せず
3	付け合わせ用シンク	検出せず
4	付け合わせ用シンク蛇口	検出せず
5	調理済み食品用ボール	検出せず
6	調理済み食品コンテナ	検出せず
7	調理済み食品用バット	NoV GII/4
8	加熱前用まな板	検出せず
9	加熱前用包丁	検出せず
10	配膳室の作業台	検出せず

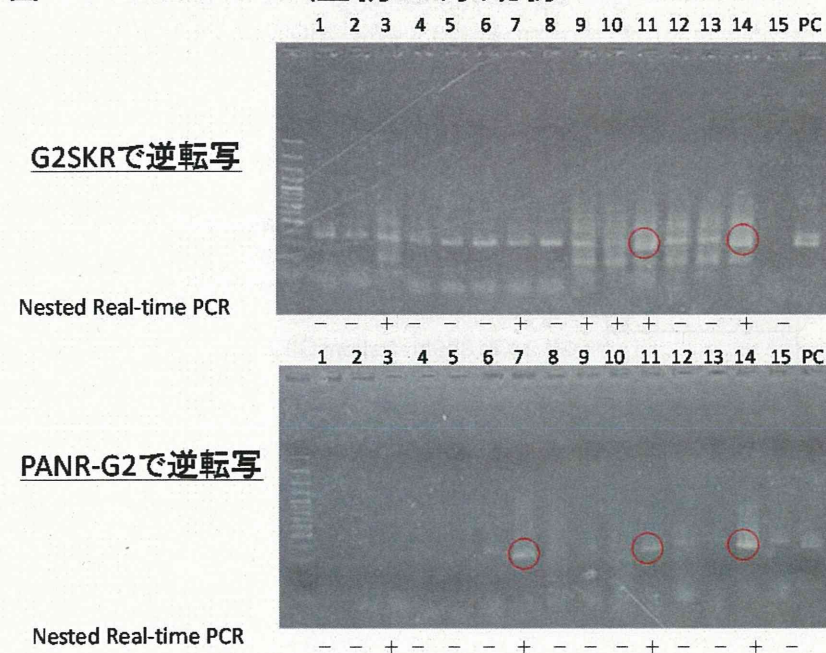
3月26日採取の拭き取り検体10検体はすべて陰性



表2. 食品からのNoV検出結果

検体番号	弁当の種類	食品名	G2SKRで逆転写			PANR-G2で逆転写			
			nested real-time PCR	nested PCR	遺伝子型	nested real-time	nested PCR	遺伝子型	
A	1	3月17日 弁当	トマト、千キャベツ、昆布巻き	検出せず	-		検出せず	-	
	2	3月17日 弁当	卵焼き、肉団子、油揚げ	検出せず	-		検出せず	-	
	3	3月17日 弁当	焼き魚	NoVG II	+ ?	?	NoVG II	-	
B	4	3月17日 大会用	フライ、唐揚げ	検出せず	-		検出せず	-	
	5	3月17日 大会用	スパゲティ、ナムル、卵焼き	検出せず	-		検出せず	-	
	6	3月17日 大会用	さつまいも(煮)、千キャベツ	検出せず	-		検出せず	-	
	7	3月17日 大会用	オレンジ	NoVG II	+ ?	?	NoVG II	+	NoVG II / 4
C	8	3月18日 大会用	煮卵、肉団子、餃子	検出せず	-		検出せず	-	
	9	3月18日 大会用	ソーセージ、串肉、フライ	NoVG II	+ ?	?	検出せず	-	
	10	3月18日 大会用	焼きそば、漬け物	NoVG II	+ ?	?	検出せず	-	
	11	3月18日 大会用	オレンジ、唐揚げ	NoVG II	+	?	NoVG II	+	NoVG II / 4
D	12	3月19日 弁当	煮卵、かまぼこ、千キャベツ	検出せず	-		検出せず	-	
	13	3月19日 弁当	油揚げ、ひじき煮物、おひた	検出せず	-		検出せず	-	
	14	3月19日 弁当	唐揚げ、フライ	NoVG II	+	?	NoVG II	+	NoVG II / 2
	15	3月19日 弁当	焼き魚	検出せず	-		検出せず	-	
	16	3月19日 弁当	オレンジ、シューマイ	NoVG II	-		検出せず	-	

図2. Nested PCR 産物の泳動像



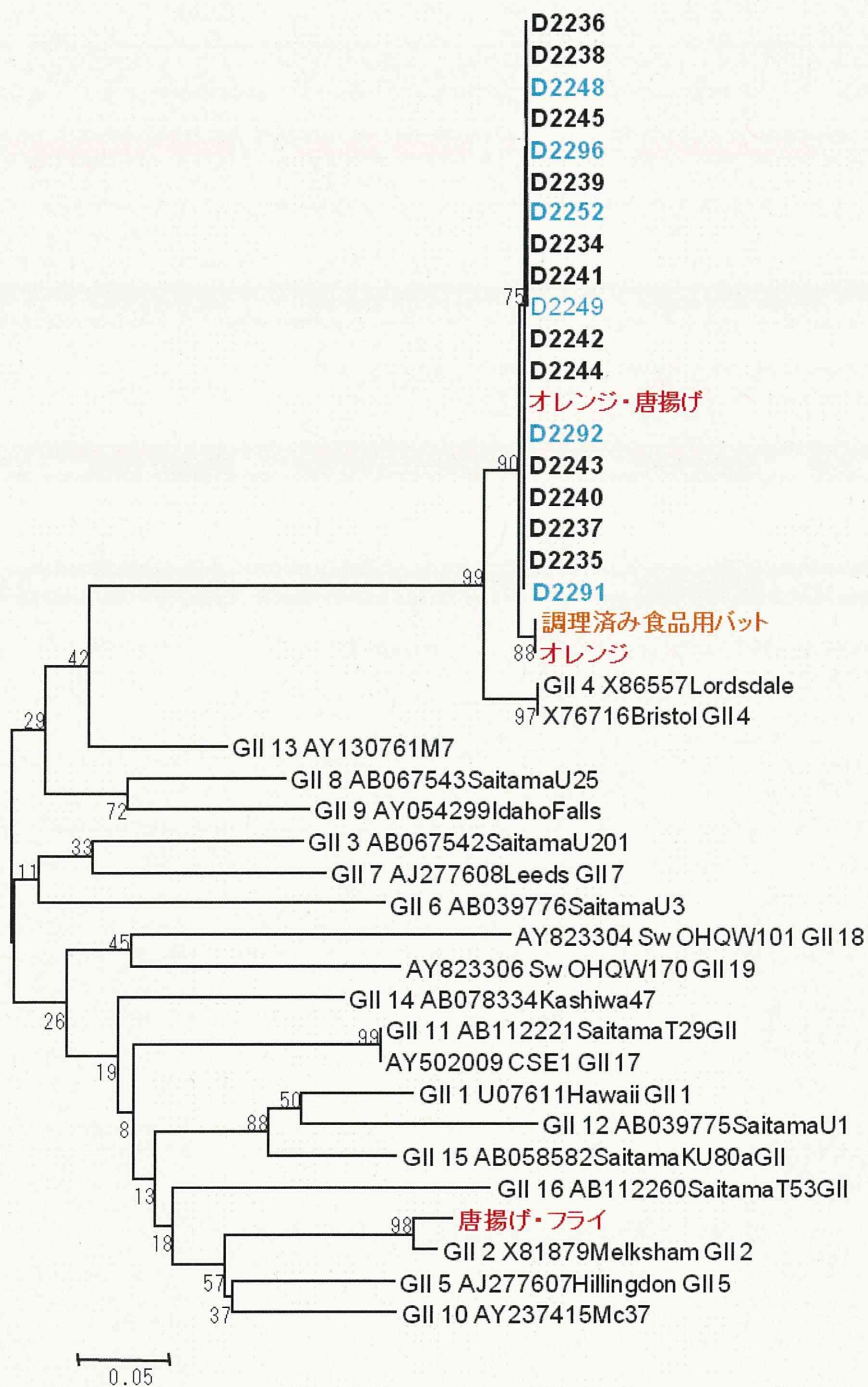


図 3. NoV capsid 領域約 290bp の系統樹解析  
患者、調理従事者、拭き取り、食品

## 感染性胃腸炎患者糞便に対するサポウイルス検出系の比較

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

### 研究要旨

平成 22、23 年度の研究で、食中毒事例の原因食材と同定したアサリについて従来法と新規法の 2 つの nested RT-PCR 系を用いてサポウイルス (SaV) の検出を比較した。その結果、新規法のほうが高い陽性率であった。今年度はこの 2 法を食中毒事例を含む感染性胃腸炎患者検体を用いて比較した結果、新規法のほうが検出率が高く、リアルタイム RT-PCR の結果ともほぼ一致した。しかし、新規法はアストロウイルス I 型とも反応し、SaV とほぼ同じ分子量の nested PCR 産物を生成することも示された。また、サポウイルスの遺伝子群 (genogroup) を増幅産物の長さの違いによって判定する nested RT-PCR 系 (genogrouping 法) の検出率が従来法とほぼ同じであること、塩基配列解析をすることなく遺伝子群別の判定が可能であることを検証した。

### 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 (Iizuka et al, J. Med. Virol. 82, 1247-1254, 2010、)。この事例では、原因食材と患者糞便から同一のサポウイルス遺伝子を検出する事に初めて成功した。

その後、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)。2008 年に島根県内で発生した前述の食中毒事例の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高い SaV 検出率を示した。なお、最終的に検出された遺伝子型は両者で概ね一致した。(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 22 年度 総括・研究分担報告書 183-185, 2011、平成 23 年度 総括・研究分担報告書 169-173, 2012)。

島根県保健環境科学研究所では臨床検体からのサポウイルスの検出に従来法を用いてきた。新規法は環境水からのサポウイルス検出を目的に構築されたが、臨床検体への適用例は報告がない。そこで、本研究では前述の食中毒患者ふん便を含めた臨床検体について、従来法と新規法の検出率の違い、特異性および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主な目的とした。

サポウイルスの遺伝子群(genogroup)、型(genotype)の解析は、通常、塩基配列決定後、系統樹解析によって行う。サポウイルスの遺伝子群(genogroup)を増幅産物の長さの違いによって判定する nested RT-PCR 法(genogrouping 法)(Okada et al, 先に掲載)が構築されているが、臨床検体への応用例は限られている。そこで、この genogrouping 法についてもその有用性を評価、検証した。

## B. 研究方法

### 1. 材料

2008 年に島根県内で発生した食中毒事例の患者ふん便 24 検体、2010~2012 年に島根県感染症発生動向調査事業で採取された感染性胃腸炎患者ふん便 514 検体、合計 538 検体を検査材料とした

### 2. ウイルス検査法

食中毒患者検体については既報(Iizuka et al. 先に掲載)のとおり cDNA 合成を行った。発生動向調査事業で採取された検体については、病原体定点

医療機関にて 0.5%gelatin 添加 Veal infusion broth を用いて調製された約 10%ふん便乳剤の遠心上清から Viral RNA Mini Kit(Qiagen)を用いて RNA 抽出をおこなった後、Turbo DNA Free Kit(Ambion)による DNase 処理、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Applied biosystems)により cDNA 合成を行った。

Nested PCR による SaV の検出はプライマーとして 1st SaV124F, SaV1F, SaV5F/SV-R13, SV-R14、2nd 1245Rfwd/ SV-R2 を用いる新規法(Kitajima et al, 先に掲載)と 1st SV-F13, SV-F14/ SV-R13, SV-R14、2nd SV-F22/SV-R2 を用いる従来法(Okada et al, 先に掲載)、さらに、食中毒検体、2011 年、2012 年の検体については、1st SV-F13, SV-F14/ SV-R13, SV-R14、2nd SV-F13, SV-F14/ G1-R, G2-R, G4-R, G5-R を用いる genogrouping 法(Okada et al, 先に掲載)を行った。また、これらの系でサポウイルス陽性となった検体についてはリアルタイム PCR(Oka et al., J. Med. Virol. 78 : 1347-53, 2006)による検出、定量を行った。ウイルス定量は既報のプラスミド(Oka et al., 先に掲載)の段階希釈によって作成した検量線より算出した。

塩基配列の決定は PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit(Qiagen)により精製した後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit および Applied Biosystems 3130 ジェネティックアナライザ(Applied biosystems)を用いてダイレクトシーケンシングを行った。SaV の遺伝子群は既報