

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。

平成 24 年度は 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。産地別では、兵庫県産で同じ採取海域で、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。

検査したすべてのカキから A 型肝炎ウイルスは検出されなかった。

### 3. カキから検出されたノロウイルスの遺伝子型

平成 22 年度に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 OY10-2 および OY10-4)、GII. 2 型が 2 ロット (検体番号 OY10-5 および OY10-9)、GII. 6 型が 1 ロット (検体番号 OY10-8) であった。検体番号 OY10-3 および OY10-6 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、OY10-2 が NewOrleans1805/2009/US 株 (GenBank accession number GU445325) に、OY10-4 が 2006b 株に近縁であった。

平成 23 年度にリアルタイム RT-PCR で陽性となったすべての検体は、PCR で遺伝子が増幅されなかったため、遺伝子型は不明であった。

平成 24 年度に検出されたノロウイルス

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 Sydney/NSW0514/2012/AU 株 (GenBank accession number JX459908) に近縁であった。

### D. 考察

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アイチウイルス、アストロウイルス、サポウイルス、A 群ロタウイルスおよびエンテロウイルスが検出された。これらのウイルスの多くは、ノロウイルスなどとの共検出であり、カキの喫食に伴う混合感染であったことが示唆された。単独のウイルス検出例では、ノロウイルスを含む他の胃腸炎ウイルスや食中毒起因細菌が陰性であったため、胃腸炎の原因ウイルスであったと考えられた。エンテロウイルスの単独検出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。カキには様々なウイルスが蓄積されていることが報告されており、3 年間の結果から、カキの喫食を伴う食中毒疑事例ではノロウイルス以外に少なくとも 5 種類のウイルス感染があったことが示された。また、患者のほとんどが 18 歳以上であり、検出されたウイルスの種類は、年齢層が影響していた可能性も示唆された。

現状の食中毒原因究明におけるウイルス検査では、ノロウイルスのみ検査されることが多い。今回は、2 事例だけであったが、ノロウイルス以外のウイルス検査を実施することで、患者からのウイルス

陽性率が高くなった。ノロウイルス陰性や検出率が低い事例については、他のウイルス検査を追加実施する必要があると考えられた。今回の結果から、カキ関連食中毒疑事例において患者に子どもが含まれない場合、単独で検出例の認められたアイチウイルス、サポウイルス、アストロウイルスがノロウイルスの次に検査の優先度が高いと判断された。他のウイルスは優先度が低く、状況に応じて検査を検討することが望ましいと考えられた。

本調査期間中に大阪府で認められたカキ関連食中毒疑事例は、平成 22 年度に 5 事例、平成 23 年度に 6 事例、平成 24 年度（平成 25 年 1 月まで）に 1 事例であった。カキ関連の食中毒事例は毎年発生し、カキのノロウイルス汚染も依然として認められており、カキは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。今回調査したカキすべてにおいて A 型肝炎ウイルスの汚染は認められず、国産市販生カキ喫食に伴う感染のリスクは、ノロウイルスに比べて非常に低いことが示された。しかしながら、カキは A 型肝炎の主な原因食品の一つであり、継続した監視が必要であると思われる。

カキや他の食品から信頼性の高いウイルス検査法を確立するために、カキのウイルス検査の RNA 抽出、DNase 処理および cDNA の作製において新たな方法を導入した。その結果、多くのノロウイルス陽性検体において、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。本方法は、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

- ・カキ関連食中毒疑事例の患者便からノロウイルス以外に 5 種類のウイルスが検出され、カキの喫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。
- ・カキ関連食中毒疑事例において、ノロウイルスだけでなく他のウイルス検査の実施が原因究明に有用である場合が認められた。患者に子どもが含まれない場合、アイチウイルス、サポウイルス、アストロウイルスがノロウイルスの次に検査の優先度が高いと判断された。
- ・市販国産生食用カキには毎年ノロウイルス汚染が認められており、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), 大阪府立環境科学研究所報告 調査・研究年報 平成 21 年

3) 入谷展弘, 久保英幸, 改田厚, 関口純一朗, 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: 大阪府で認められた 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, 脇田隆宇, 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, 関口純一朗, 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, IASR 31(No.369), 321-322 (2010)

6) N Iritani, A Kaida, N Abe, J Sekiguchi, H Kubo, K Takakura, K Goto, H Ogura, Y Seto: An increase of GII.2 norovirus infections during the 2009-2010 season in Osaka City, Japan, Journal of Medical

7) T Oka, K Mori, N Iritani, S Harada, Y Ueki, S Iizuka, K Mise, K Murakami, T Wakita, K Katayama: Human sapovirus classification based on complete capsid nucleotide sequences, Archives of Virology 157, 349-352, 2012

8) 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, 齊藤博之, 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)

9) 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, IASR 33(No.394), 333-334 (2012)

10) 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) T Sanekata, T Nakano, K Taniguchi, A Yui, N Iritani, N Hurelbaatar, G Batbaatar, C Batsuren, G Adya, and G Choijamts: 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シーズンに大阪府で認められた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. Choijyants, G. Choijyants: 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)

7) 上間匡, 石井孝司, 小原真弓, 田中俊光, 増本久人, 入谷展弘, 斎藤哲也, 吉田徹也, 山下育孝, 柴田伸一郎, 田中智之, 内野清子, 野田衛: A型肝炎ウイルス検出PCRの高感度化の検証, 第32回日本食品微生物学会, 東京 (2011. 10. 6-7)

8) 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)

9) 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 シーズンに大阪市内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，大津（2012.9.21）

10) 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）

11) 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）

12) 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 Choijyamts：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 ウイルスの検査方法

ウイルス	方法	プライマーおよびプローブ	参考文献またはキット
サポウイルス	リアルタイム RT-PCR	SaV124F, 1F, 5F, 1245R SaV124TP, 5TP (プローブ)	Oka et al., JMV 78, 1347-53, 2006
アストロウイルス	RT-PCR	AC1', AC230	Sakon et al., JMV 61, 125-31, 2000
アイチウイルス	RT-PCR	C+, C-	Yamashita et al., JCM 38, 2955-61, 2000
C 群ロタウイルス	RT-PCR	G8S, G8A	Kuzuya et al., JCM 34, 3185-9, 1996
A 群ロタウイルス	ELISA		ロタクロン (TFB)
腸管アデノウイルス	ELISA		アデノクロン E (TFB)
エンテロウイルス	リアルタイム RT-PCR	Ge08F, Ge08R Ge08-Probe (プローブ)	Tapparel et al., JCM 47, 1742-9, 2009 (一部改変して使用)
パレコウイルス	RT-PCR	E23P1, HPV-N1	Ito et al., JGV 85, 391-8, 2004
ボカウイルス	リアルタイム RT-PCR	HBoV1F, 234F, 1R, 3R, 24R H1234 (プローブ)	Kantola et al., JCM 48, 4044-50, 2010
A 型肝炎ウイルス	リアルタイム RT-PCR	HAV+449, -557 HAV+482-P (プローブ)	西尾ら IASR 23, 274-5, 2002

表2 カキ関連食中毒疑事例からのウイルス検出状況

ウイルス	陽性事例数 (%) n=88	陽性検体数 (%) n=286
ノロウイルス	85 (96.6)	197 (68.9)
その他ウイルス	26 <sup>1)</sup> (29.5)	40 <sup>2)</sup> (14.0)
アイチウイルス	20 (22.7)	29 (10.1)
アストロウイルス	5 (5.7)	8 (2.8)
サポウイルス	7 (8.0)	7 (2.4)
A群ロタウイルス	1 (1.1)	1 (0.3)
エンテロウイルス	1 (2.2 <sup>3)</sup> )	5 (3.0 <sup>3)</sup> )

- 1) 25 事例からそれぞれ 2~4 種類のウイルスが検出された。
- 2) 27 検体からそれぞれ 2~3 種類のウイルスが検出された。
- 3) 検査事例数 45、検体数 164 であり、他のウイルスと検査数が異なる。

表3 事例番号 01-12 におけるウイルス検査結果<sup>1)</sup>

検体 番号	ノロウイルス	アイチウイルス	その他ウイルス
1	—	—	—
2	+	—	—
3	—	+	—
4	+	—	—
5	+	—	—
6	—	—	—
7	—	+	—
8	—	—	—

- 1) —は陰性、+は陽性

表4 事例番号01-17におけるウイルス検査結果<sup>1)</sup>

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 <sup>2)</sup>	+	NT	NT	NT	NT
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-
4 <sup>2)</sup>	+	NT	NT	NT	NT
5	-	-	+	+	-
6	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-
8	-	+	-	-	-
9	-	+	-	+	-
10	+	-	+	-	-
11	-	-	-	-	-
12	-	+	-	+	-
13 <sup>2)</sup>	+	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5 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<sup>1)</sup>

年度	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 <sup>2)</sup> (コピー/個)		PCR	遺伝子型	リアルタイム RT-PCR
				GI	GII			
H22	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.4 mix	—
	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	—
H23	OY11-1	岡山県日生海域	2011年12月	—	—	NT		—
	OY11-2 <sup>3)</sup>	岡山県邑久海域	2011年12月	—	195	—		—
	OY11-3 <sup>3)</sup>	兵庫県相生海域	2011年12月	—	221	—		—
	OY11-4	兵庫県相生海域	2011年12月	—	—	—		—
	OY11-6 <sup>3)</sup>	広島県呉湾	2011年12月	—	181	—		—
	OY11-7	岡山県日生海域	2011年12月	—	—	—		—
	OY11-8	広島県呉湾	2011年12月	—	—	NT		—
	OY11-9	岡山県日生海域	2011年12月	—	—	NT		—
H24	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

3) PCR陰性だが、リアルタイム RT-PCRの実測値が10<sup>2</sup>以上のため、ノロウイルス陽性と判定

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」

総合研究協力報告(平成 22～24 年度)

## 愛知県における感染性胃腸炎患者からのノロウイルス検出状況

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

2009年4月から2012年3月の3年度にわたり散発性感染性胃腸炎患者から検出されたノロウイルス(NoV)の分子疫学的解析を行った。調査期間内に感染症発生動向調査事業協力医療機関で採取された胃腸炎患者の糞便及び吐物、計834検体について胃腸炎ウイルス検索を試み、352検体(42.2%、352/834)からNoVが検出された。NoV陽性352検体の内、10検体(2.8%)がGI陽性、342検体(97.2%)がGII陽性であり、GII型が大勢を占めた。主流となった遺伝子型は、2009年度がGII.4、2010年度がGII.3、2011年度がGII.4と、調査年度により変動を認めた。調査期間内では、新たなGII.4遺伝子の変異は認めなかった。また、2010年のGII.3はGII.12-GII.3のキメラウイルスであった。感染性胃腸炎の流行規模と、NoV遺伝子型やGII.4型NoVの遺伝子変異の出現との関連性も想定されることから、今後も流行遺伝子型や特にGII.4の遺伝子変異に関する監視が必要である。

### A. 研究目的

ノロウイルス(NoV)は、冬季に流行する感染性胃腸炎の主要な原因ウイルスの1つである。2006/07流行シーズンは、全国的にNoVに起因する感染性胃腸炎が大流行し、集団感染事例や食中毒事例が多発した。その流行の主体はGII.4型に分類される遺伝子型であり、新たな変異ウイルス、2006b型の出現が大流行の要因と推察されている。それ以後のシーズンも流行規模の大小はあるが、NoVの継続的流行が認められている。特に2012/13シーズンは2006/07シーズンに次ぐ規模でNoV

が流行している。そこで、NoVの各遺伝子型の流行状況を把握し、感染予防や食中毒防止の基礎資料とするために、2009年4月から2012年3月の散発性感染性胃腸炎患者からの検出されたNoVの分子疫学的解析を行った。

### B. 研究方法

#### 1. 材料

2009年4月～2012年3月に愛知県の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834検体を用いた。

## 2. NoV の検査法

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。NoV の検出検査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.4NoV 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。

(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. NoV の検出状況

2009 年度は 246 検体の内 93 検体 (GI 陽性 3、GII 陽性 90、37.8%)、2010 年度は 321 検体の内 131 検体 (GI 陽性 4、GII 陽性 127、40.8%)、2011 年度は 267 検体の内 128 検体 (GI 陽性 3、GII 陽性 125、47.9%) から NoV が検出され、いずれの調査期間においても GII 型が GI 型に比べて高頻度に検出された。

### 2. NoV の遺伝子解析

図 1 に NoV の月別・遺伝子型別の検出状況を示した。感染症発生動向調査の感染性胃腸炎患者報告数が急増する 11 月～12 月に GII 型の検出頻度が高かった。

図 2 に 2009 年度から 2011 年度の GII NoV の遺伝子型別検出状況を示した。GI で 3 種類、GII で 7 種類の多様な遺伝子型の NoV 流行が確認された。その中でも、2009 年度と 11 年度は GII.4 が主流であったが、2010 年度は GII.3 が主流となり、年度により首座となる遺伝子型に変動を認めた。

GII.4 の遺伝子変異解析を目的として、調査期間を通じて検出された GII.4 株についてクラスター分類した結果、2006 b、2004、2009a 型が検出されたが、新たな変異型に分類されるような GII.4 は認められなかった。また、2010 年度に主流となった GII.3 は、ポリメラーゼと構造タンパク領域で遺伝子組換えがおきたキメラウイルス (GII.12-GII.3) であった。

## D. 考察

2006/07 シーズンに GII.4 の 2006b 型に分類される新たな変異株が出現し、世界的に大流行した。それ以後も、流行規模の大小はあるが、冬季をピークとして感染性胃腸炎流行が続いている。調査期間とした 2010 年の感染性胃腸炎の流行規模は比較的大きく、2009 年度と 2011 年度は流行規模の小さい年であった。調査期間を通じて、GI 型と比べて GII 型 NoV が高頻度に検出された。検出ウイルスの遺伝子解析の結果、調査期間を通じて、GII.4 に大きな遺伝子変異が起きていないことが確認された。また、2010 年度に感染性

胃腸炎の流行規模が大きくなった要因として、GII.3のキメラウイルスの出現したためと推察された。NoVは遺伝的に多様に富むウイルスであるので、今後も流行の主流となるウイルスの遺伝子変異の監視が必要である。

## E. 結論

2009年4月から2012年3月の3年度にわたり散発性感染性胃腸炎患者由来のNoVの分子疫学的解析の結果、調査年度により主流となるGIIの遺伝子型に変動を認めた。GII.3のキメラウイルスが出現した2010年度は感染性胃腸炎の流行規模の大きいシーズンであった。今後も、NoVの遺伝子変異や遺伝子構造の変化がNoV流行に関わると想定されるので、主流となるNoVに対する監視が重要である。

## 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) 小林慎一, 藤原範子, 安井善宏, 山下照夫, 藤浦明, 皆川洋子: 食中毒事例から検出されたサポウイルスの遺伝子解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 2010.11.7-8, 徳島市

2) 藤原範子, 安達啓一, 水谷絵美, 伊藤雅, 安井善宏, 小林慎一, 山下照夫, 藤浦明, 皆川洋子: 愛知県におけるノロウイルスの検出状況. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 2010.11.7-8, 徳島市

3) 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

4) 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, 2012.6.16, 豊中市

5) 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, 2012.11.13-15, 大阪市,

## 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

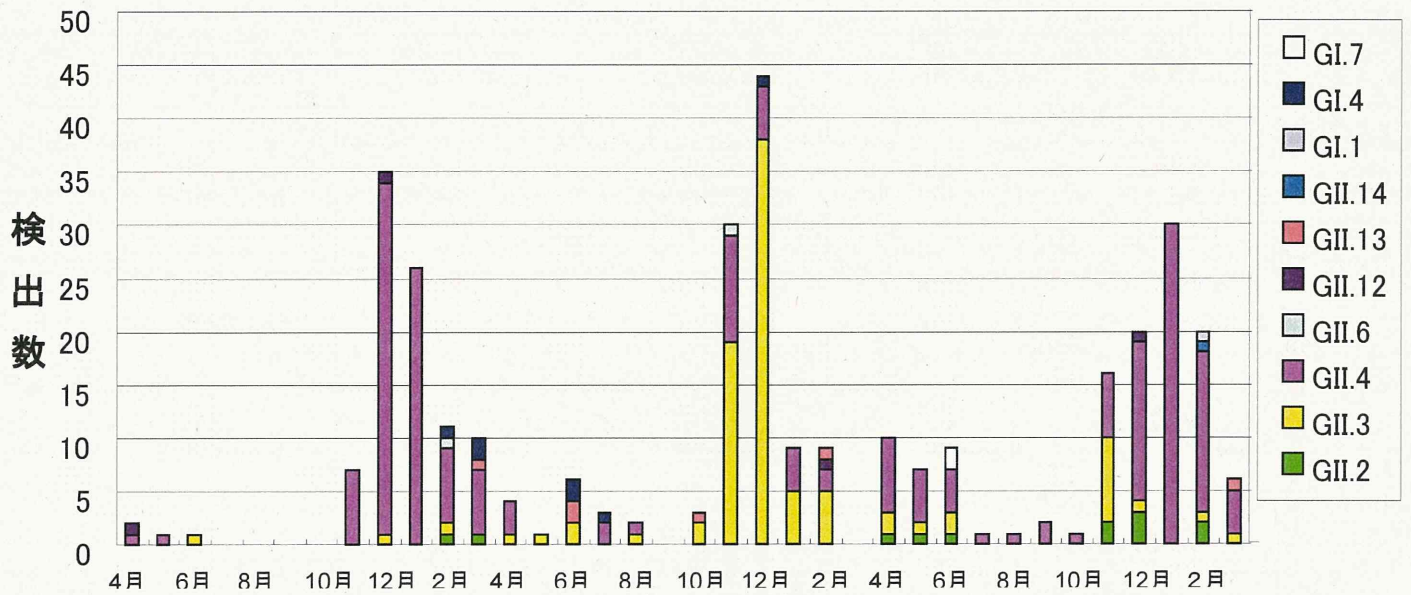


図1 ノロウイルスの月別・遺伝子型別の検出状況 (2009年度～2011年度)

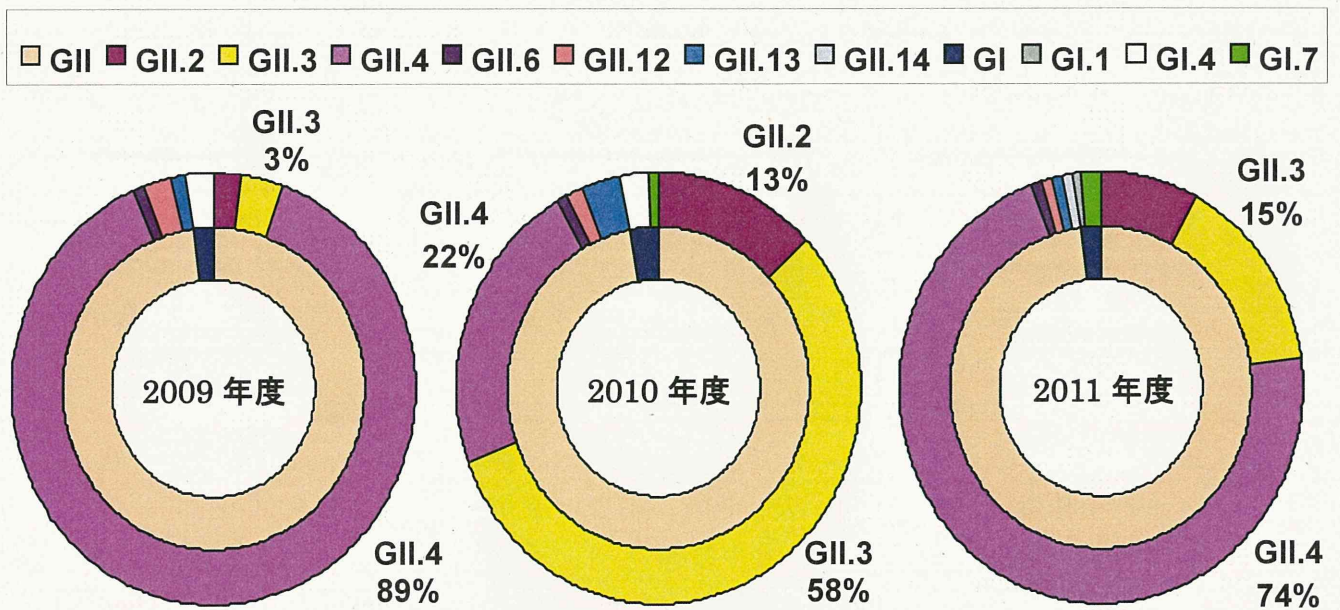


図2 愛知県の散发胃腸炎患者からのノロウイルスの年度別・遺伝子型別の検出状況

## 愛媛県で検出されたノロウイルスの分子疫学的解析

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	青木里美	愛媛県立衛生環境研究所
協力研究者	青木紀子	愛媛県立衛生環境研究所(現西条保健所)
協力研究者	立花早苗	愛媛県立衛生環境研究所(現県立新居浜病院)
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、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。2010年～2012年の間に、散発性胃腸炎から検出されたNoVは305例(検出ウイルスの約52.4%)で、そのうちGIIが296例(97.0%)を占めていた。検出されたGIIの遺伝子型は7種類で、GII.4とGII.13は、4シーズンから、GII.2は2012/2013シーズンを除く3シーズンから検出され、GII.3は2009/10及び2010/11シーズン、GII.7とGII.6は2011/12シーズン、GII.12は2009/10シーズンに検出された。集団発生例から検出されたNoVは、GII.4が最も多く調査期間中を通して検出され、また、GII.3、GII.2は2009/2010及び2010/2011シーズンに検出されており、散発性胃腸炎と集団発生事例から検出されたNoVの遺伝子型分布に関連性が認められた。また、県内で発生した食中毒5事例は、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。

2012/2013シーズンに散発性胃腸炎及び集団発生例から検出されたGII.4株は、すべてSydney/NSW0514/2012/AUと高い相同性を示すGII.4の新しい変異株で、過去に検出された2006b、2008a及び2009aとは異なっていた。調査期間中に検出された遺伝子型GII.2、GII.3、GII.7及びGII.13の株の大部分は、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、散発性胃腸炎及び食中毒等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。

## B. 研究方法

### 1. 材料

2010 年 1 月～2012 年 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 1,186 検体及び食中毒等集団発生 37 事例から得られた 334 検体を用いた。糞便は検査実施まで -20℃ で冷凍保存した。

### 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 (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シング法により決定し、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. 散発性胃腸炎患者からのウイルス検出状況

散発性胃腸炎患者からのウイルス検出状況を表 1 に示した。1,186 名の患者検体から 582 例 (49.1%) のウイルスが検出された。NoV が 305 例 (52.4%) で最も多く、次いでサポウイルスが 125 例 (21.5%)、ロタウイルスが 116 例 (19.9%)、アデノウイルスが 32 例 (5.5%)、アストロウイルスが 4 例 (0.7%) であった。検出された NoV の Genogroup 別の内訳は、GII が 296 例 (97.0%)、GI が 9 例 (3.0%) で、GII が圧倒的に多かった。

### 2. 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 305 株のうち解析が可能であった 267 株 (GI 8 株, GII 259 株) について遺伝子型別を行った結果、GI が 5 種類 (GI. 1, GI. 4, GI. 6, GI. 8, GI. 14)、GII が 7 種類確認された。

検出数の大半を占めた GII の遺伝子型別検出状況を表 2、表 3、図 1 に示した。

検出された遺伝子型は、GII.4 が 124 株 (47.9%) で最も多く、次いで GII.2 が 50 株、GII.3 が 41 株、GII.13 が 28 株、GII.7 が 13 株、GII.6 が 2 株、GII.12 が 1 株であった。

2009/10 シーズンは、例年より遅く 1 月～5 月に NoV が検出された。検出された遺伝子型は GII.4 が約 54% で最も多かった。2010/2011 シーズンは、10 月～1 月に NoV が多く検出され、その多くは GII.2 と GII.3 であった。一方、2 月～4 月には GII.13 が多く検出された。シーズン中に最も多く検出された GII.3 と次に多かった GII.2 を合わせると検出された NoV の約 67% を占めていた。2011/2012 シーズンは、10 月～6 月まで長期間にわたり NoV が検出された。10 月～2 月は GII.4 が多く、1 月～6 月には、GII.2、GII.13、GII.7 が多かった。2012/2013 シーズンは、12 月に検出された GII.13 の 1 株を除き、すべて GII.4 (97.4%) であった。

### 3. NoV が検出された食中毒等集団発生例

2010 年～2012 年に当所に搬入された集団発生例のうち、NoV が検出された 27 事例の発生時期と検出遺伝子型を表 4 に示した。27 事例中 21 事例が県内発生例であった。そのうち GII.4 が関与した事例が 13 件 (食中毒事例 7 件) で最も多く、調査期間を通してみられた。2011 年 2 月、2012 年 2 月、3 月、11 月、12 月の計 5 事例は、おのおのの食中毒事例において、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。また、GII.3 が関与した事例は、2010 年 1 月～2011 年 3 月に 3 件、GII.2

は 2010 年 1 月に 1 件あった。GII.2 あるいは GII.3 と GII.4 の重複事例が各 1 件、GI と GII の混合事例が 1 件あった。

### 3. NoV GII.4 の亜型の検出状況

検出された GII.4 株について、カプシド N/S 領域に加え、ポリメラーゼ領域及びカプシド P1/P2 領域の系統樹解析による亜型の型別を行い、その結果を表 5 に示した。2009/2010 シーズンは、散发性胃腸炎から 2006b (Nijmegen115/2006/NL) が 18 株、2008a (Apeldoorn317/2007/NL 近縁) と 2009a (NewOrleans1805/2009/USA 近縁) が各 6 株検出された。また、集団発生例では、4 事例が 2006b で、1 事例が 2009a であった。2008a 及び 2009a タイプの株は、愛媛県において過去に検出事例はなく 2009/2010 シーズンに初めて確認された。2010/2011 シーズンは、散发性胃腸炎ではすべて 2006b であったが、集団発生例では 2006b と 2009a が各 2 事例認められた。2011/2012 シーズンは、散发性胃腸炎では 2006b が大部分を占めたが、2008a、2009a も少数例検出された。一方、集団発生例では 1 事例が 2009a であった。2012/2013 シーズンに散发性胃腸炎及び集団発生例から検出された株は、2006b、2008a 及び 2009a とは異なる GII.4 の新しい変異株で、Sydney/NSW0514/2012/AU と高い相同性を示した (図 2)。これらの株は、愛媛県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。

### 4. NoV GII.4 以外の遺伝子解析

N/S 領域による遺伝子解析で GII.2、GII.7、GII.13、GII.6 および GII.12 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 3、4 に示した。N/S 領域で GII.2 と型別された株は、ポリメラー



ゼ領域が GII.2 と GII.15 (Neustrelitz 260/2000/DE) の 2 つに分かれ、大部分は、ポリメラーゼ領域が GII.15 でカプシド領域が GII.2 のキメラウイルスであった。GII.3 の株は、ポリメラーゼ領域ではすべて GII.12 に分類され、株間の相同性は 97～100% であった。また、GII.7、GII.13 の株はポリメラーゼ領域がすべて GII.6 (SaitamaU3/97/JP) のキメラウイルスであった。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

散発性胃腸炎の原因ウイルスの 52.4% は NoV であった。そのうち 97.0% 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。

2010 年～2012 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 7 種類、GI が 5 種類で、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。散発性胃腸炎と集団発生事例から検出された NoV の遺伝子型の分布が良く一致していたことから、地域で散発的に見られているウイルスとカキ等二枚貝が関与していない集団発生の原因ウイルスとの間には強い関連性が示唆された。また、調査期間中に本県で発生し、食中毒と確定された 5 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、5 事例中 3 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ことが改めて認識された。

2012/2013 シーズンは、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 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。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。

ポリメラーゼ領域とカプシド領域の系統樹解析により、調査期間中に検出された遺伝子型 GII.2、GII.3、GII.7 及び GII.13 の株の多くは、ポリメラーゼ領域がそれぞれ、GII.15、GII.12、GII.6、GII.6 であることが明らかになった。このことから、2010 年以降、愛媛で散発的に流行している GII.4 以外の遺伝子型のウイルスの大部分は、ポリメラーゼ領域とカプシド領域の間で遺伝子組み換えを起こしたキメラウイルスであることが示唆された。

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

## E. 結論

1. 2010年～2012年に散発性胃腸炎から検出されたNoVは305例で、検出ウイルスの52.4%を占めていた。検出されたGenogroupは、GIIが296例(97.0%)、GIが9例(3.0%)で、遺伝子型はGIIが7種類、GIが5種類であった。
2. 散発性胃腸炎と集団発生例から検出されたNoVの遺伝子型の分布が良く一致していた。不顕性感染の調理従事者が原因と考えられた食中毒が5事例見られ、そのうち3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NoV GII.4は、過去に検出された2006b、2008a及び2009aタイプとは異なる新しい変異株(Sydney/NSW0514 / 2012/AU近縁)であった。
4. 調査期間中に検出されたGII.4以外の遺伝子型の株の大部分は、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であった。

## 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. 学会発表

- 1) 青木紀子, 青木里美, 山下育孝, 土井光徳, 野田 衛: 愛媛県において2009/2010シーズンに検出されたノロウイルスGII/4の分子疫学的解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会. 徳島, 2010年11月
- 2) 山下育孝, 青木紀子, 青木里美, 土井光徳, 野田 衛: 愛媛県で検出されたノロウイルスGII/6の分子疫学的解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会. 徳島, 2010年11月
- 3) 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: 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

## 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

表1 散発性胃腸炎患者からのウイルス検出状況

検査数	1,186例
ウイルス検出数	582例
ウイルス検出率	49.1%

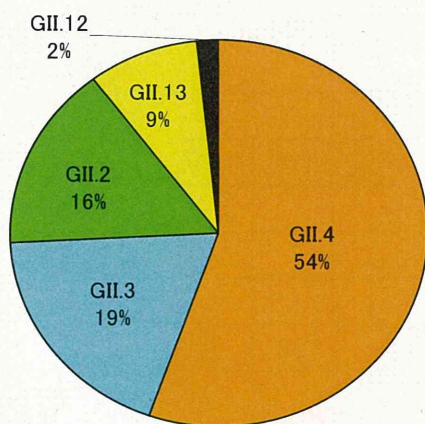
ウイルス	検出数	検出率(%)
ノロウイルス	305	52.4
〔 GI	9	〕
GII	296	
サポウイルス	125	21.5
ロタウイルス	116	19.9
アデノウイルス	32	5.5
アストロウイルス	4	0.7
検出数	582	100

表2 散発性胃腸炎患者から検出されたノロウイルスGIIの遺伝型

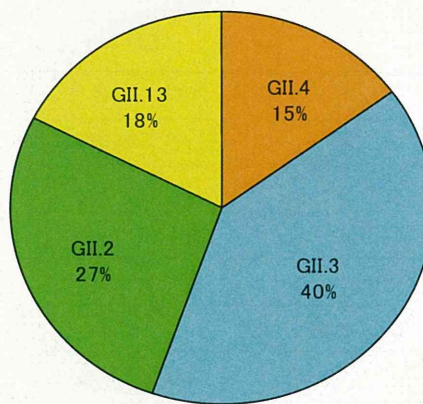
遺伝子型	検出数	検出率(%)
GII. 4	124	47.9
GII. 2	50	19.3
GII. 3	41	15.8
GII. 13	28	10.8
GII. 7	13	5.0
GII. 6	2	0.8
GII. 12	1	0.4
計	259	100

表3 月別遺伝子型検出状況

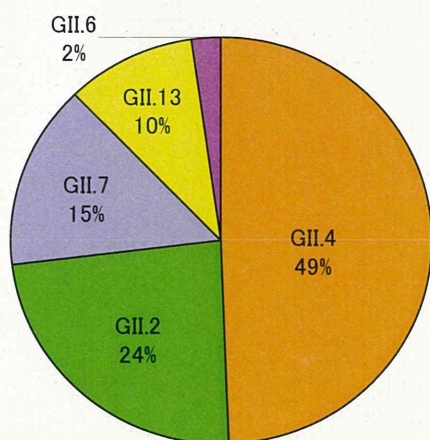
シーズン	2009/2010												2010/2011												2011/2012												2012/13	
年	2010												2011												2012													
月	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
GII.4		16	6	7	1	2							5	2	3	1							15	6	6	13	3		1					1	19	17		
GII.2			7	2								3	15	2									4	1	2	9	5											
GII.3		1	4	2	1	2	1				1	5	22	2																								
GII.13	1	2	1		1							1	1	3	2	6										1		2	3	2	1				1			
GII.7																										7	1	4	1									
GII.6																											1	1										
GII.12		1																																				



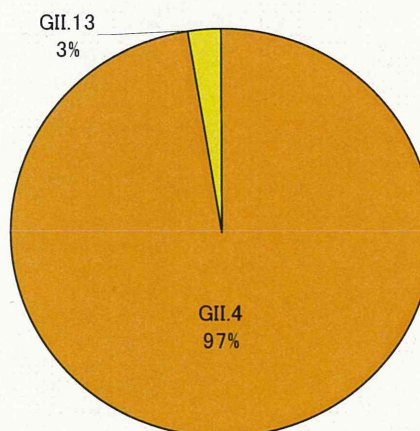
2009/2010シーズン



2010/2011シーズン



2011/2012シーズン



2012/2013シーズン

図1 ノロウイルスGIIの遺伝子型の推移