

表4 食中毒等集団発生事例から検出されたノロウイルスの遺伝子型

シーズン	2009/2010		2010/2011			2011/2012		2012/2013			計	
発生年	2010		2011			2012						
発生月	1	2	11	2	3	5	2	3	10	11		12
GII.4	1	1	1	1	2		1	1	1	2*	4*	15
GII.4+GII.3		1										1
GII.4+GII.2	1											1
GII.3	1		1		1							3
GII.12				1								1
GII.13						1*						1
GII.14							1*					1
GI+GII		2*										2
GI.4					1							1
GII(型不明)										1*		1

* 県外発生の1事例を含む

表5 ノロウイルスGII.4の亜型の推移

シーズン	2009/2010		2010/2011		2011/2012		2012/2013	
	散発	集発	散発	集発	散発	集発	散発	集発
2006b	18	4	11	2	41			
2008a	6				2			
2009a	6	1		2	1	1		
2012新変異株							36	7*

* 県外発生の食中毒2事例を含む

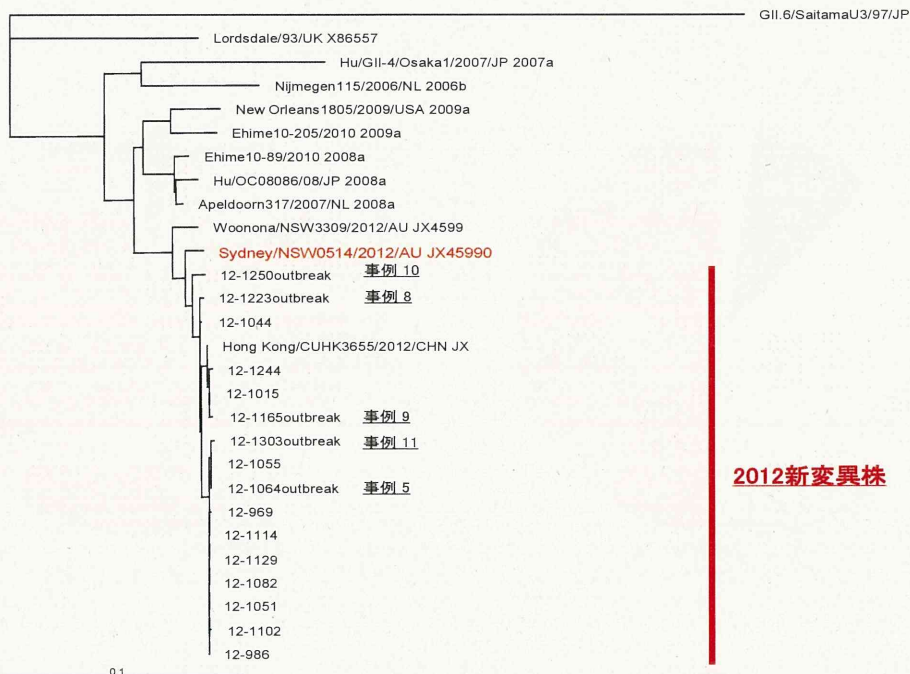


図2 NoV GII.4の系統樹[Capsid P1/P2領域]

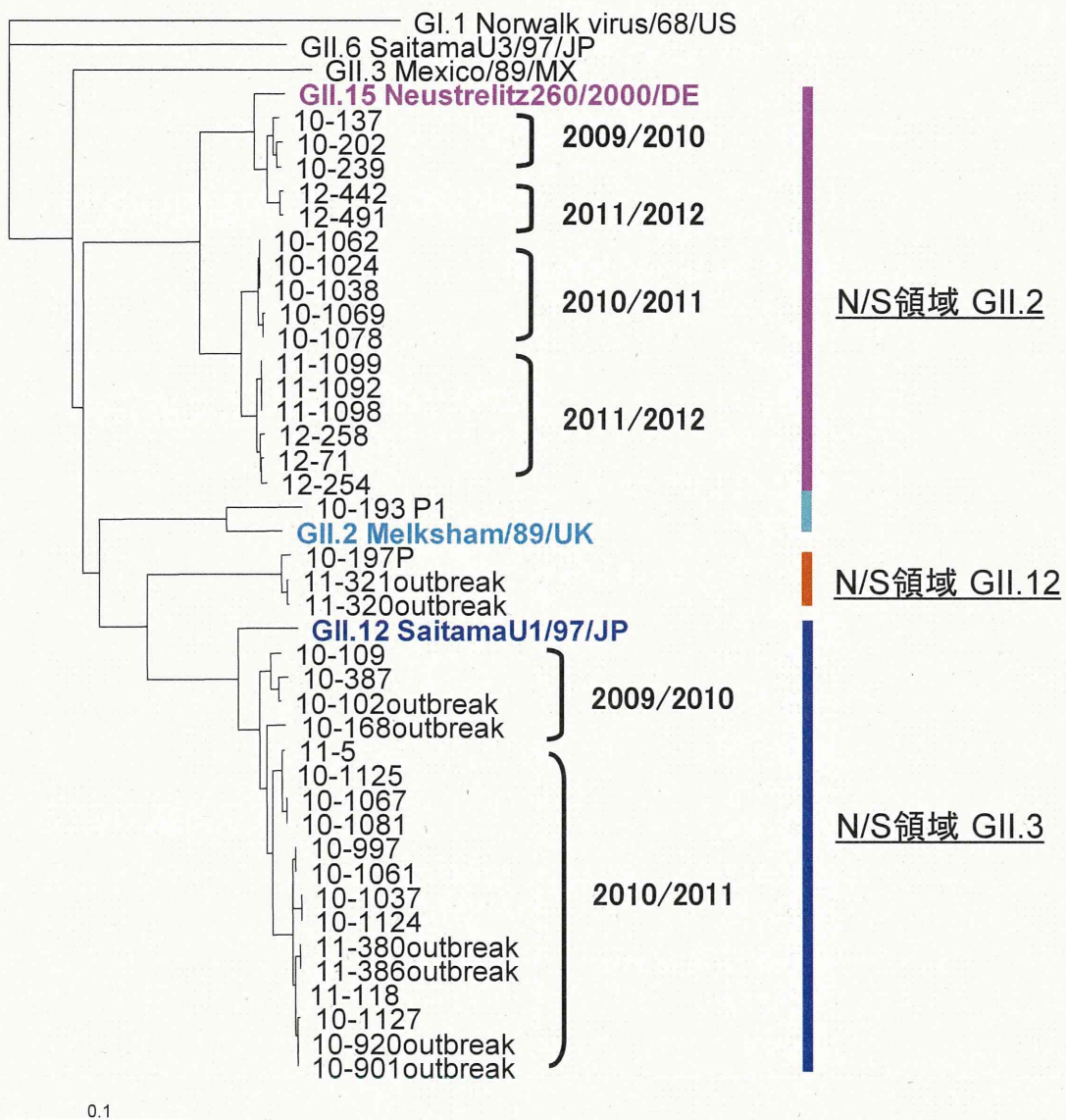


図3 遺伝子型GII.2、GII.3、GII.12の系統樹[ポリメラーゼ領域]

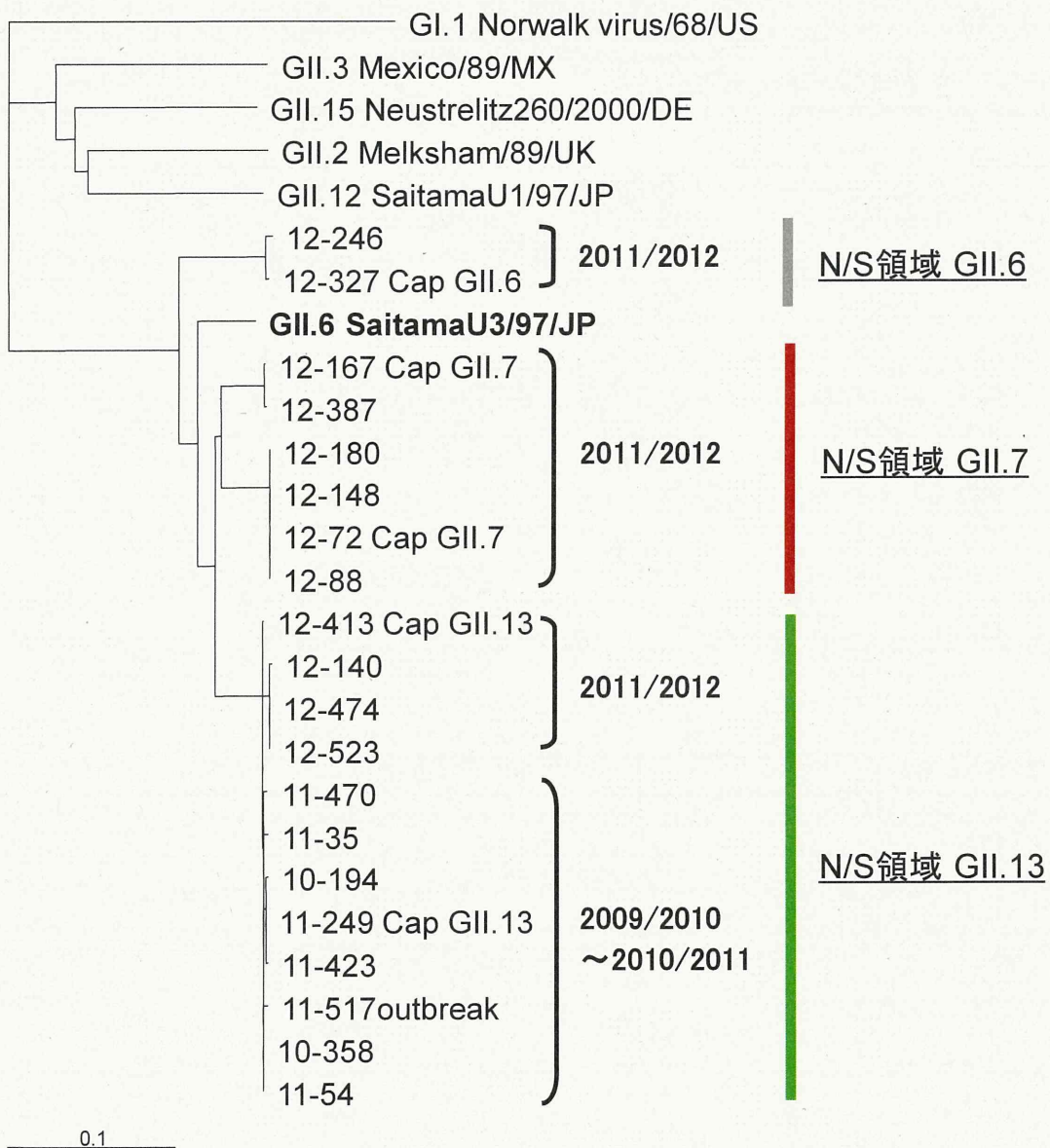


図4 遺伝子型GII.6、GII.7、GII.13の系統樹[ポリメラーゼ領域]

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)

新たに報告されたプライマーによる
食品・患者からのサポウイルスの検出

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	岡 智一郎	国立感染症研究所

研究要旨

河川水からのサポウイルス (SaV) 検出を目的に新たに設計されたプライマーを用いた nested RT-PCR をおこない、アサリ中腸腺および感染性胃腸炎患者からの SaV 検出率を従来法と比較した。その結果、アサリ、胃腸炎患者とも新規法の検出率が従来法より優れることが明らかとなった。

さらにアサリにおいては PCR 増幅産物をクローニングしシーケンス解析を行った結果、アサリ個体間で異なる遺伝子型の SaV 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 SaV が検出されることが明らかとなった。

胃腸炎患者検体では新規法の結果はリアルタイム 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 1 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。

A. 研究目的

近年、サポウイルス (SaV) による食中毒事例が発生していることが明らかになってきた。しかし、原因食品からの SaV 検出報告は極めて稀である。

我々は、2008 年に島根県内で発生した食中毒事例について、食材のアサリから患者糞便と同様のノロウイルス (NV) およびサポウイルス (SaV) 遺伝子を検出することに成功している (Iizuka et al, J. Med. Virol. 82, 1247-1254, 2010、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)。

近年、河川水からの SaV 検出に有効な新たなプライマーセットを用いる PCR 系 (新規法) が構築された (Kitajima et al, Appl. Environ. Microbiol 76: 2461-2467, 2010)。

そこで本研究では、食中毒事例の患者糞便を含む胃腸炎患者糞便と食中毒の原因食材と疑われたアサリを対象に、従来

法 (Okada et al, Arch Virol, 151: 2503-2509, 2006)と、新規法の SaV 遺伝子検出率を比較検証することを主な目的とした。

B. 研究方法

1. 材料

食品検体として2008年に島根県で発生したNoVとSaVを原因とする食中毒事例Aの原因食材と疑われたアサリ中腸腺60個(1パックあたり20個、計3パック)、胃腸炎患者検体として事例Aの患者糞便24検体と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糞便514検体、計538検体を用いた。

2. ウイルス核酸の抽出

アサリ中腸腺はアサリ1個の中腸腺の半量(約50 μ g)に9倍量のPBS(-)を加え10%乳剤を作成し、乳剤1ml当たり2.5mgの α -アミラーゼ(和光純薬)を添加し、37 $^{\circ}$ C、1時間、時々攪拌しながらグリコーゲンの消化をおこなった後、12000rpm、7分間遠心し、上清140 μ lをViral RNA Mini Kit(Qiagen)を用いてRNA抽出をおこなった後、既報(Iizuka et al., 先に掲載)のとおりcDNA合成を行った。

食中毒患者検体については既報のとおり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。

3. Nested PCR、リアルタイムPCR

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、患者検体ではこれらの系でサポウイルス陽性となった検体についてリアルタイムRT-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。

4. サポウイルスの遺伝子解析

アサリ由来のPCR増幅産物は、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 et al, 先に掲載)。

患者由来の PCR 産物は 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スを行った。

SaVの遺伝子群は既報の分類法 (Oka et al., Arch Virol. 157: 349-352, 2012)に従った。

(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。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

1. アサリ中腸腺からの SaV 検出状況

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 1)。

系統樹解析の結果、アサリ中腸腺由来のサポウイルスとして、従来法からは GI. 1, GI. 3, GI. 5, GI. 6, GI. 7, GII. 3, GII. 4,

GIV 株が、新規法からは GI. 1, GI. 3, GI. 5, GI. 6, GI. 7, GII. 4, GIV、GV 株が検出された (表 1)。

2. 胃腸炎患者からの SaV 検出状況

食中毒事例患者を含めた胃腸炎患者検体 538 検体から従来法で計 36 検体、新規法で 49 検体が SaV 陽性となった。genogrouping 法は比較可能な検体において、従来法とほぼ同じ検出数であった (表 2)。

リアルタイム RT-PCR 法では食中毒検体では従来法および新規法で陽性となった 12 検体中 11 検体が陽性となった (表 2)。

また、発生動向調査の検体は従来法、新規法いずれかの方法で陽性となった 38 検体すべてについてリアルタイム RT-PCR 法での定量が可能であった。ただし、このうち 2 検体については既報 (Oka et al., 先に掲載) のカットオフ基準値 (25 コピー/ウェル) 以下のシグナルであった。

検出された SaV のうち、塩基配列を決定できた従来法 PCR 産物 35 検体、新規法 PCR 産物 48 検体について系統樹解析をおこなったところ、従来法では GI 24 株、GII 9 株、GV 1 株に、新規法では GI 29 株、GII 17 株、GV 2 株が検出された。SaV GI の検出数には 2 つの検出系で大きな差が認められなかったが、SaV GII は新規法が 17 株、従来法が 9 株と 2 倍の検出数であった (表 2)。genogrouping 法で陽性となった株の遺伝子群は系統樹解析の結果とすべて一致した (表 2)。

3. アストロウイルスとの交差反応

胃腸炎患者由来の PCR 産物の遺伝子解析の結果、新規法で 2010 年の 1 検体、2012 年 4 検体がアストロウイルス 1 型である

ことが明らかとなった。なお、増幅産物は SaV の Nested PCR 産物 (約 420bp) より若干小さい位置 (約 400bp) に電気泳動像が認められた。

D. 考察

食中毒事例においては、感染ルートの解明を目的として、食用貝などの原因食品、食材ならびに患者糞便検体から検出されたウイルスの部分塩基配列の解析を行い、比較解析することが重要である。そのため、本研究では3年間を通じ、塩基配列解析に適した増幅産物を得ることができる新規系と従来法の有用性を中心に順次、比較検証した結果、新規法はアサリ中腸腺、胃腸炎患者検体とも従来法より高い検出率を示した。

新規法の検出率が高い原因を探るため、SaV 陽性の患者検体についてリアルタイム RT-PCR を行い、検体中の SaV コピー数を測定したが、感度に差は認められなかった。また、検出された遺伝子型についてみると、アサリ中腸腺由来株は新規法、従来法で大きな差は認められなかったが、患者検体の場合は新規法で SaV G II が従来法の約2倍検出され、genogroup の偏りが認められた。しかし、環境水を検体とした Kitajima らの報告 (先に掲載) では検出系による genogroup の偏りは認められておらず、今後、さらに検討が必要と考えられた。

本研究で行ったアサリ個々の中腸腺から検出された SaV の詳細な遺伝子解析結果から、特定の貝 (個体) の抜き取り検査を行う場合、必ずしも患者と同一の株 (塩基配列) の同定に至らない可能性が

あることが示された。この問題は環境水を通じて多様な遺伝子型のウイルスを蓄積すると考えられる食用貝の解析に共通する問題として、今後の食中毒検査の技術的な注意点として留意が必要である。

E. 結論

環境水のサポウイルス検出および遺伝子解析に有用な新規法を食用貝や胃腸炎患者検体に適用したところ、新規法は従来法と比較して高い検出率を示した。

しかし、新規法を臨床検体に適用した場合、アストロウイルス 1 型にも反応する例が認められた。そのため、新規法で増幅産物が得られた場合、塩基配列を確認することが望ましい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Iizuka S., Oka T., Tabara K., Omura T., Katayama K., Takeda N., Noda M. Detection of sapoviruses and noroviruses in an outbreak of gastroenteritis linked genetically to shellfish J. Med. Virol. 2010 Jul ; 82(7):1247-54.
- (2) Oka T, Mori K, Iritani N, Harada S, Ueki Y, Iizuka S, Mise K, Murakami K, Wakita T, Katayama K. Human sapovirus classification based on complete capsid nucleotide sequences. Arch Virol. 2011 Nov 11.
- (3) Iizuka S., Takai-Todaka R., Ohshiro H., Kitajima M., Wang Q., Saif L. J., Wakita T., Noda M., Katayama K., Oka T., , Detection of multiple human

sapoviruses from imported frozen
individual clams, Food and
Environmental Virology. in press

2. 学会発表
なし

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. アサリ中腸腺からのSaV検出状況

Pack 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	陽性数
従来法	-	GI.3	-	-	-	-	-	-	GII.4	GI.3、 GII.4	-	-	擬陽 性	GI.3、 GII.4	GI.5、 GIV	GII.4	GII.4	GI.7	GI.6	-	9
新規法	GI.5	GI.5	-	-	GI.5	GI.5	GI.1	GI.5	GI.5	GI.1、 GIV	-	-	GI.3	GI.5、 GI.3	GI.1	GI.5	GII.4	GI.5	GI.5	GI.6	16

Pack 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	陽性数
従来法	GI.3	-	GI.1	-	-	-	GII.4	-	-	GII.3	-	-	-	-	-	-	GI.1	GI.5	GI.1	GII.4	8
新規法	-	GI.5	GI.6	-	-	-	-	GI.7	-	-	-	GI.5	GI.1	-	GI.3	GI.5	GI.5、 GI.6	GI.5、 GI.6	GV	GI.5	11

Pack 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	陽性数	
従来法	GI.3	GI.6	GI.5	GI.1	-	GII.4	GII.3	-	GI.5	-	-	GI.3、 GIV	-	GI.5	-	-	-	-	-	-	9	
新規法	GI.5	GII.4	GI.5	-	-	GI.5	GI.3	-	GI.5	GI.5、 GI.6	-	GI.3、 GII.4	GI.5	GI.3、 GII.4	-	GI.3	GI.5	GI.5	GI.5	GI.5	-	14

表2. 胃腸炎患者からのSaV検出状況

	ID	従来法	新規法	genogroupin g PCR	遺伝子型 (系統樹解 析)	リアルタイムPCR による定量値 (copies/g stool)
食中毒事例	D1711	+	+	-	GII	1.9×10^8
	D1729	+	+	GI	GI	2.1×10^{10}
	D1732	+	+	GII	GII	1.2×10^7
	D1736	+	+	GI	GI	6.7×10^9
	D1737	+	+	GII	GII	1.2×10^{10}
	D1738	+	+	GII	GII	7.4×10^8
	D1739	+	+	GII	GII	2.4×10^8
	D1714	+	+	GI	GI	-
	D1718	+	+	GII	GII	3.5×10^8
	D1734	+	+	GI	GI	3.2×10^8
	D1741	+	+	GI	GI	3.9×10^7
	D1743	+	+	GI	GI	3.5×10^5
2010	96-10	+	+	NT	GI	1.7×10^5
	111-10	-	+	NT	GI	7.5×10^7
	169-10	+	-	NT	GI	7.1×10^6
	209-10	+	+	NT	GI	1.4×10^6
	356-10	+	+	NT	GII	1.2×10^8
	412-10	+	+	NT	GII	3.8×10^8
	521-10	-	+	NT	GI	5.3×10^8
	592-10	-	+	NT	GII	7.4×10^9
	606-10	-	+	NT	GII	9.1×10^5
	610-10	-	+	NT	GI	5.1×10^9
	614-10	-	+	NT	GII	8.9×10^8
619-10	-	+	NT	GII	4.1×10^8	
2011	274-11	-	+	GI	GI	$-(1.4 \times 10^4)$
	307-11	+	+	GV	GV	3.4×10^6
	338-11	+	+	GI	GI	3.6×10^7
	341-11	+	+	GI	GI	2.0×10^7
	355-11	-	+	-	GI	1.7×10^7
	366-11	+	+	GI	GI	1.3×10^8
	412-11	+	+	-	GI	$-(1.2 \times 10^4)$
	432-11	-	+	-	GV	3.5×10^5
	437-11	+	+	GI	GI	1.5×10^8
	448-11	+	+	GI	GI	4.7×10^7
	461-11	-	+	-	GII	1.5×10^6
	505-11	-	+	-	GII	3.1×10^5
	513-11	+	+	GI	GI	5.4×10^9
	587-11	+	+	GI	GI	7.9×10^8
593-11	+	+	GI	GI	9.9×10^7	
2012	128-12	+	+	GI	GI	1.3×10^8
	163-12	+	+	GI	GI	4.6×10^9
	167-12	+	+	GI	GI	7.2×10^7
	197-12	+	+	GI	GI	7.4×10^9
	210-12	+	+	GI	GI	1.9×10^8
	227-12	+	+	GI	GI	8.9×10^7
	288-12	+	+	-	GI	2.6×10^7
	372-12	+	+	GII	GII	9.7×10^7
	385-12	-	+	GII	GII	3.1×10^7
	394-12	-	+	GII	GII	3.6×10^9
	702-12	+	+	-	ND	1.1×10^7

NT: Not tested

ND: Not detectable by direct sequencing

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)

蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法による下痢症ウイルスの検出と解析

研究協力者	重本 直樹	広島県立総合技術研究所・保健環境センター
研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所
研究協力者	東久保 靖	広島県立総合技術研究所・保健環境センター
研究協力者	久常 有里	広島県立総合技術研究所・保健環境センター

研究要旨

ウイルス 10 種 (ノロウイルス GⅠ、ノロウイルス GⅡ、サポウイルス、アストロウイルス、アイチウイルス、ボカウイルス、パレコウイルス、A 群ロタウイルス、C 群ロタウイルス、アデノウイルス) を 3 つの反応系で包括的に検査できる蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法を開発した。本法は、増幅遺伝子の色とサイズで検査対象ウイルスを容易に判別でき、食中毒・感染症事例の検査に用いることで各事例におけるウイルスの感染実態を明らかにすることができた。ノロウイルス GⅡの優勢ゲノタイプの GⅡ.4 は、シーズン毎にカプシドの特定部位アミノ酸が変異し、短期間で流行タイプが変遷していることを明らかにした。

A. 研究目的

食中毒等の事例において包括的に下痢症ウイルスを検査するための検査方法を開発するとともに、これまでの事例においてノロウイルス及び他の下痢症ウイルスの感染実態を明らかにする。またノロウイルス GⅡの優勢ゲノタイプである GⅡ.4 について、カプシドの特定部位におけるアミノ酸変異状況を明らかにする。

B. 研究方法

1. 材料

2007/08 年～2012/13 シーズン(前半)の食中毒疑い及び、感染性胃腸炎集団発生事例、280 検体(98 事例)の有症者便、2005-12 年までの小児感染性胃腸炎患者便 206 検体を用いた(表 1)。

2. 蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法による下痢症ウイルスの検出

10%糞便乳剤から QIAamp Viral RNA mini Kit (キアゲン) を用いて RNA 抽出を行った。抽出 RNA を Random primer

pd(N)9 (タカラバイオ) と ReverTra Ace (TOYOBO) により、30°C, 10 分、42°C, 60 分、99°C, 5 分の逆転写反応を行った後、これをテンプレートにして蛍光マルチプレックス PCR を行った。マルチプレックス PCR には Multiplex PCR Assay Kit (タカラバイオ) または AmpliTaq Gold Fast PCR Master Mix, UP (ライフテクノロジー) を使用し、表 2、表 3 に示すプライマーと PCR 反応条件により実施した。PCR 増幅産物は 2%アガロースゲルで電気泳動した後、泳動ゲルを UV トランスイルミネーター上で UV 照射して蛍光バンドと蛍光色を確認した。

3. GII.4 株 VP1 領域のアミノ酸変異検出
ノロウイルス GII の G2SKF/G2SKR の PCR 産物、およびノロウイルス GII.4 の GII.4cap_5898-5918/GII.4cap_6415-6394 (福田ら、広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告 2010) の PCR 産物の塩基配列を解析した。QIAquick PCR Purification Kit (キアゲン) により精製した後、SequiTherm EXCEL II DNA Sequencing Kit-LC (EPICENTRE Biotechnologies) および LI-COR 4200 series sequencer (LI-COR) を用いてダイレクトシーケンシング法により塩基配列を決定した。ノロウイルス GII の遺伝子型はカプシド遺伝子の翻訳開始点から 264bp の塩基配列を MEGA 5 プログラム (<http://www.megasoftware.net/>) を用いて解析、系統樹を作成して決定した。ノロウイルスの遺伝子型の分類は Kageyama ら (J. Clin. Microbiol. 2004) および病原体検出情報 (<http://idsc.nih.gov/pathogen/refer/noro-kaisetu1.html>) に

示された分類に従った。ノロウイルス GII.4 については、解析した塩基配列から VP1 領域の S ドメインの 6、9、15、45 番目及び、P2 ドメインの 296-298、393-395、412-414 番目のアミノ酸を決定した。

4. 食中毒疑い事例から検出したアイチウイルスの解析

2 枚貝が関与したと思われる食中毒疑い 4 事例 (17 検体) について、表 2 にあるノロウイルス及びアイチウイルス用の検出プライマーを用いて検査を行った。アイチウイルス陽性検体については増幅産物の塩基配列を解読し、Pham ら (J. Clin. Microbiol. 2007) の分類に従っ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. Set A, B, C の蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法について

下痢症ウイルス既知の検体を用い Set A から C までの蛍光マルチプレックス RT-PCR 法の検証を行った。Set A では、ノロウイルス GI 陽性検体、ノロウイルス GII 陽性検体、サポウイルス陽性検体、アストロウイルス陽性検体に対し、それぞれ 330bp (緑)、344bp (赤)、430bp (黄)、230bp (青) が目視で確認された (図 1)。Set B では、アイチウイルス陽性検体、ボカウイルス陽性検体、パレコウイルス陽性検体に対し、それぞれ 519bp (緑)、291bp (橙)、195bp (赤) の増幅バンドが確認された (図 1)。Set C では、A 群

ロタウイルス陽性検体、C群ロタウイルス陽性検体、腸管アデノウイルス陽性検体に対し、それぞれ145bp（緑）、351bp（赤）、300bp（橙）の増幅バンドが確認された（図1）。Set A、B、Cとも検出対象ウイルス以外のウイルスとの交差反応は認められなかった。

2. 集団感染事例（2010/11～2012/13 シーズン前半）におけるウイルス検出状況

2010/11年から2012/13シーズン前半までの食中毒疑い、感染性胃腸炎集団発生事例（37事例112検体）についてSet A、B、Cの蛍光RT-マルチプレックスPCR法を用い、下痢症ウイルスの検出を行った（食中毒事例についてはノロウイルスのコンベンショナルなRT-PCRも併用）。検出された原因ウイルスの事例数はノロウイルスGⅡが31事例、腸管アデノウイルス、A群ロタウイルス、サポウイルスが各1事例、不検出が3事例であった（図2）。また、原因ウイルス以外に複数のウイルスが検出された例が6事例あった（表4）。内訳は、ノロウイルスGⅡによる食中毒疑い1事例からノロウイルスGIとアイチウイルスが、ノロウイルスGⅡを原因とする集団感染症5事例からノロウイルスGI、アデノウイルス1型、2型、パレコウイルスが、アデノウイルス41型による集団感染症1事例からアストロウイルスが検出された。付随して観察されたウイルスはいずれの場合も一人の患者のみからの検出であった。

3. Fast PCR 酵素を用いた Set A の蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法の評価 食中毒疑い、感染性胃腸炎集団発生 28

事例、75検体を材料に表2のSet Aプライマーを用い、Multiplex PCR Assay KitとAmpliAq Gold Fast PCR Master Mix, UPの比較を行った。検体毎の検出結果はほぼ一致していたが、ノロウイルスGI及びGⅡの重感染1検体においてMultiplex PCR Assay Kitでは両者が検出されたのに対し、AmpliAq Gold Fast PCR Master Mix, UPではノロウイルスGIのみが検出された（表5）。しかし、事例毎の検出ウイルスは同じ結果となった（表5）。PCR反応時間は、Multiplex PCR Assay Kitが3.5時間要するのに対し、AmpliAq Gold Fast PCR Master Mix, UPは1.5時間であった。

4. 2010/11年～2012/13シーズン前半に検出されたノロウイルスの遺伝子型とGⅡ.4株のアミノ酸変異状況

2010/11年シーズンから2012/13年シーズン前半までに観察されたノロウイルスの遺伝子型は表6のとおりであった。2010/11年シーズンはGⅡ.4がほとんどであったが、2011/12年シーズンになるとその割合が下がり、代わってGⅡ.2、GⅡ.12、GⅡ.13などが確認された。2012/13シーズン前半については、GⅡ.4の割合が再度増し、GⅡ.12が昨シーズンに引き続き確認された。また、2012/13シーズン前半において検出されたGⅡ.4はすべてSydney/NEW0514/2012/AU様の新しいサブタイプであった。GⅡ.4のVP1領域のSドメイン及びP2ドメインの特定部位のアミノ酸（6、9、15、45、296-298、393-395、412-414）を詳細に観察すると2010/11シーズン、2011/12シーズン、2012/13シーズン（前半）は、それぞれ4種類、4種類、

1種類のタイプに分かれた(表7)。2010/11シーズンの主流タイプ(S₆N₉A₁₅Q₄₅S₂₉₆R₂₉₇N₂₉₈S₃₉₃T₃₉₄T₃₉₅N₄₁₂V₄₁₃P₄₁₄)に対し、2011/12シーズンの流行株は6番、9番、393番のアミノ酸がN、S、Gへ変異していた。一方、2012/13シーズンでは、413番のアミノ酸がTに変異しているのみであった。過去6シーズンを通してみた場合、検出されたアミノ酸のタイプは概ね1シーズンもしくは2シーズンで消失し、新しいタイプに移行していた(表8)。

5. 食中毒疑い事例から検出したアイチウイルスの解析

二枚貝の関与が疑われる食中毒疑い4事例17検体のうち9検体でノロウイルスGIが、14検体でノロウイルスGIIが検出され、これらのうちノロウイルスGIとGIIの重感染検体が7検体あった(表9)。アイチウイルスは4検体から検出され、いずれもノロウイルスとの重感染であった(表9)。アイチウイルス陽性検体のPCR産物について塩基配列を解読し、系統樹解析を行ったところ3検体がゲノタイプA、1検体がゲノタイプBであった(図3)。

D. 考察

Set A、B、Cの蛍光RT-マルチプレックスPCR法を過去の既知検体を用いて評価したところ、対象ウイルスを問題なく検出できることが確認された。また、本法を用いて広島県内の2010/11年から2012/13シーズン前半までの食中毒疑い、感染性胃腸炎集団発生事例について検査した結果、検出ウイルスのほとんどはノロウイルスGIIによるものであったが、主要因ウイルス以外に一部の患者便からは

ノロウイルスGI、アイチウイルス、パレコウイルス、アデノウイルスが検出された。複数のウイルスが検出された6事例のうち5事例は保育所での感染症事例であり、患者がたまたま保有していたケースと考えられる。一方、食中毒疑いの1事例は二枚貝が関係している可能性もあり、ノロウイルス以外のウイルスの関与も否定できない。今回、Set A、B、Cの蛍光RT-マルチプレックスPCR法を用いることにより10種類の下痢症ウイルスを包括的に検査できることが確かめられた。本法は食中毒疑い、感染性胃腸炎集団発生事例における原因ウイルスの究明に有効なツールとして活用できる。

一方、マルチプレックスPCR法の反応時間短縮を目的にFast PCR酵素の適用についての検討において、AmpliTaq Gold Fast PCR Master Mix, UPとMultiplex PCR Assay Kitを比較した。両者の蛍光RT-マルチプレックスPCRでの検出結果は、ノロウイルスGI及びGIIの重感染1検体の結果を除き、同一の結果となった。重感染の場合、増幅効率の高いほうのウイルスが検出されることから、両試薬の特性により各ウイルスの増幅効率に差が生じたものと思われる。しかしながら、事例別での検査結果に違いは認められなかったことから、十分な数の検体数が確保できるのであれば、Fast PCR用の酵素を使用しても問題がないと考えられた。ただし、Fast PCRは各ステップの反応時間が短いことから、使用するサーマルサイクラーとの相性を事前に見極め、事前に反応条件の適正化を図っておく必要があると思われる。

ノロウイルス GII.4 の VP1 領域における特定部位のアミノ酸の変異について、その変遷を過去 6 シーズンで比較したところ、検出されたタイプは概ね 1 年から 2 年で消失し、新たに別のタイプへ移行していることが明らかになった。このことはノロウイルスが VP1 タンパクを変異させることでヒトの免疫機構から逃れていることを示しているのかもしれない。さらに今回のように VP1 領域の特定部位のアミノ酸を流行シーズン毎に追跡することで、流行タイプの変遷を簡便に知ることができることがわかった。また、2012/13 シーズンはこれまでの優勢サブタイプであった 2006b に代わり、Sydney/NEW0514/2012/AU 様の新しいサブタイプが出現した。特に広島県では検出された GII.4 はすべてこのサブタイプとなっており、これまでの検出されてきた 2006b を席捲する勢いである。2006 年から検出されてきたサブタイプである 2006b がこのまま消えていくのか、この新しいサブタイプが継続して流行の中心になるのか、今後の動向について引き続き注視する必要があると考えられる。

二枚貝の関与が疑われる食中毒疑い事例からはノロウイルス GI、GII 双方が検出され、両者の重感染も多く認められた。また、ノロウイルスが検出された検体の一部からはアイチウイルスが検出された。しかしながら、アイチウイルス単独感染例は認められず、本ウイルスが患者の下痢症にどの程度関与しているのかは不明である。検出されたアイチウイルス 4 株の遺伝子型はゲノタイプ A が 3 株、ゲノタイプ B が 1 株で、両タイプが普遍的に

存在していると思われた。二枚貝が食材に含まれる食中毒事例からはノロウイルスと同時にアイチウイルスが検出されることが多いが、今回の事例も同様な結果であった。今回は患者便からの検出であるが、カキがアイチウイルスをどの程度蓄積しているか、保有率を含め詳細な調査が必要である。

E. 結論

下痢症ウイルス 10 種（ノロウイルス G I、ノロウイルス GII、サポウイルス、アストロウイルス、アイチウイルス、ボカウイルス、パレコウイルス、A 群ロタウイルス、C 群ロタウイルス、アデノウイルス）を 3 つの反応系で包括的に検査できる蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法を開発した。本法は、増幅遺伝子の色とサイズで対象ウイルスを容易に判別でき、食中毒・感染症事例の検査に用いることでウイルスの感染実態を明らかにすることができた。さらに Set A のプライマーセットについては、Fast PCR 用の酵素を適用することで反応時間を半分以下に短縮することができる。

ノロウイルス GII の優勢ゲノタイプの G II.4 は、シーズン毎にカプシドの特定部位アミノ酸が変異し、流行タイプが 1~2 シーズンという短い期間で変遷していることを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

重本直樹、久常有里、東久保 靖、谷澤由枝、福田伸治、松尾 健、田中智之、野田 衛：Fast PCR 酵素を用いた蛍光 RT-

マルチプレックス PCR 法による下痢症ウイルスの迅速検出，広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告，20，5-10 (2012)

2. 学会発表

重本直樹、谷澤由枝、福田伸治、田中智之、野田衛：下痢症ウイルスの検出法（蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法によ

る下痢症ウイルスの検出）、衛生微生物技術協議会第 33 回研究会、2012 年 6 月、横浜

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 使用検体の内訳

検体の種類	事例数	検体数
2012/13年シーズン食中毒疑い, 感染性胃腸炎集団発生事例検体	9	23
2011/12年シーズン食中毒疑い, 感染性胃腸炎集団発生事例検体	12	50
2010/11年シーズン食中毒疑い, 感染性胃腸炎集団発生事例検体	16	39
2009/10年シーズン食中毒疑い, 感染性胃腸炎集団発生事例検体	24	71
2008/09年シーズン食中毒疑い, 感染性胃腸炎集団発生事例検体	7	22
2007/08年シーズン食中毒疑い, 感染性胃腸炎集団発生事例検体	30	75
2005-12年の小児感染性胃腸炎患者便検体		206
	98	486

表2 マルチプレックスPCRの使用プライマー

使用プライマー	配列 (5' → 3')	標識蛍光	増幅長 (bp)	濃度 (μM)	引用
Set A ノロウイルスGI					
G1SKF	CTGCCCGAATTYGTAATGA	Alexa488	330	0.4	Kojima <i>et al.</i> (2002)
G1SKR	CCAACCCARCCATRTACA			0.4	
ノロウイルスGII					
G2SKF	CNTGGGAGGGCGATCGCAA	Alexa594	344	0.4	Kojima <i>et al.</i> (2002)
G2SKR	CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT			0.4	
G2ALSKR	CCACCAGCATATGAATTGTACAT			0.2	Nishida <i>et al.</i> (2007)
サボウイルス					
SV-F21	ANTAGTGTITGARATGGAGGG		435	0.2	Okada <i>et al.</i> (2002)
SV-R2	GWGGGRTCAACMCWGGTGG	Alexa532		0.2	
アストロウイルス					
AC1'	ATGGCTAGCAAGTCTGACAAG	Alexa350	230	0.2	Sakon <i>et al.</i> (2000)
AC230	GGTTTTGGTCTGTGACACC			0.2	
Set B アイチウイルス					
C(+) 6261	ACACTCCCACCTCCCGCCAGTA	Alexa488	519	0.4	Yamashita <i>et al.</i> (2000)
C(-) 6779	GGAAGAGCTGGGTGTCAGA			0.4	
ボカウイルス					
HBov 01.2	TATGGCCAAGGCAATCGTCCAAG	Alexa546	291	0.2	Albuquerque <i>et al.</i> (2007)
HBov 02.2	GCCGCGTGAACATGAGAAACAGA			0.2	
パレコウイルス					
AN345	GTAACASWWGCTCTGGGSCAAAAG			0.4	Nix <i>et al.</i> (2008)
AN344	GGCCCCWGRTCAGATCGAYAGT	Alexa594	195	0.4	
Set C A群ロタウイルス					
RotaA-fwd1	GGATGTCCTGTACTCCTTGTCAAAA	Alexa488	145bp	0.4	Logan <i>et al.</i> (2006)
RotaA-fwd2	GGAGGTTCTGTACTCATTGTCAAAAA	Alexa488		0.4	
Rota rev1	TCCAGTTTGGAACTCATTTCCA			0.4	
Rota rev2	TCCAGTTTGGAAAGTCATTTCCATT			0.4	
C群ロタウイルス					
G8NS1	ATTATGCACAGACTATGCCAC	Alexa594	351bp	0.4	葛谷ら (2003)
G8NA2	GTTTCTGTACTAGCTGGTGAAC			0.4	
アデノウイルス					
Ad-A1m	GCCGCARTGGTCTTACATGCACATC	Alexa546	300bp	0.2	Allard <i>et al.</i> (1992)
Ad-A2	CAGCACGCCGGGATGTCAAAGT			0.2	(slightly modified)

表3 マルチプレックスPCR反応条件

Primer Set	PCR Reagent	Initial activation	3 step cycling			Number of cycles	Final extension
			Denaturation	Annealing	Extension		
A, C B	Multiplex PCR Assay Kit (TaKaRa)	94°C/60sec	94°C/30sec	57°C/90sec 55°C/90sec	72°C/90sec	40	72°C/10min
A	AmpliTaQ Gold Fast PCR Master Mix, UP (life technologies)	95°C/10min	96°C/3sec	57°C/10sec	68°C/5sec	40	72°C/10sec



図1. 蛍光RT-マルチプレックスPCR(Set A, B, C)の電気泳動像

M:100bpラダー, 1:ノロウイルスGI, 2:ノロウイルスGII, 3:サボウイルス, 4:アストロウイルス, 5:アイチウイルス, 6:ボカウイルス, 7:パレコウイルス, 8:A群ロタウイルス, 9:C群ロタウイルス, 10:アデノウイルス

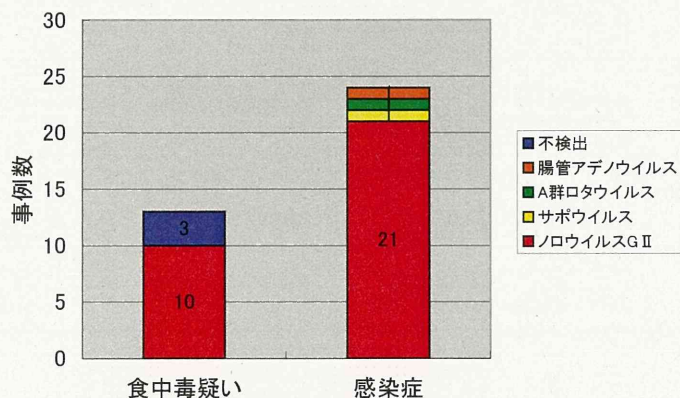


図2 2010/11~2012/13シーズン前半までの食中毒・下痢性感染症事例の原因ウイルス

表4 複数のウイルスが検出された事例の検出状況

分類	主要因ウイルス	その他の検出ウイルス
ケース1 食中毒疑い	ノロウイルスGII	ノロウイルスGI, アイチウイルス
ケース2 感染症	ノロウイルスGII	アデノウイルス2, パレコウイルス
ケース3 感染症	ノロウイルスGII	ノロウイルスGI, アデノウイルス1
ケース4 感染症	ノロウイルスGII	アデノウイルス41
ケース5 感染症	アデノウイルス41	アストロウイルス
ケース6 感染症	ノロウイルスGII	アデノウイルス1

表5 過去の食中毒・感染症事例検体での検証

PCR反応試薬	検出ウイルス					陰性
	NoV GI	NoV GII	NoV GI & GII	SaV	HAstV	
検体別 (75検体)						
Multiplex PCR Assasy kit	5	54	3	3	1	9
AmpliQ Gold Fast PCR Master Mix, UP	6	54	2	3	1	9
事例別 (27事例)						
Multiplex PCR Assasy kit	2	18	3	1	1	2
AmpliQ Gold Fast PCR Master Mix, UP	2	18	3	1	1	2

表6 2010/11～2012/13シーズン前半において検出されたノロウイルスの遺伝子型の事例数

シーズン	事例数	GII.1	GII.2	GII.4	GII.8	GII.12	GII.13
2010/11	13		1	12			
2011/12	12	1	3	6	1	3	2
2012/13(前半)	6			4		2	
2010-2013(前半)	31	1	4	22	1	5	2

表7 2010/11~2012/13シーズン前半のNoV GII.4検出株のVP1領域における特定アミノ酸の変異状況
アミノ酸の位置

シーズン・事例番号	検体番号	アミノ酸の位置													
		Sドメイン				P2ドメイン									
		6	9	15	45	296	297	298	393	394	395	412	413	414	
2010/11	227	1	S	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	N	V	P
		2	N	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	N	V	P
	228	1	S	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	N	V	P
	229	1	S	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	N	V	P
	231	1	S	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	N	V	P
	232	1	S	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	N	V	P
	233	2	S	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	N	V	P
	234	1	S	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	N	V	P
	235	1	S	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	N	V	P
	237	2	S	N	T	Q	S	R	N	S	T	T	N	I	H
238	1	S	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	N	V	P	
239	1	N	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	N	V	H	
240	3	S	N	T	Q	S	R	N	S	T	T	N	I	H	
2011/12	244	17	S	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	N	V	P
	246	1	N	S	A	Q	S	H	N	G	T	T	N	V	P
	247	15	N	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	D	V	P
	248	1	N	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	D	V	P
	249	2	N	S	A	Q	S	R	N	G	T	T	N	V	P
	252	1	N	S	A	Q	S	R	N	G	T	T	N	V	P
2012/13	258	1	S	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	N	T	P
	260	1	S	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	N	T	P
	262	1	S	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	N	T	P
	264	1	S	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	N	T	P

表8 流行シーズン毎にみた変異タイプの変遷

変異タイプ ¹⁾	流行シーズン						
	06/07	07/08	08/09	09/10	10/11	11/12	12/13(前半)
NNATSRNSTTNVH (2006b Ni jimegen115/2006/NL)	● ²⁾	△					
NNAQTRNGTTNVH	●						
NNAQSRNSTTNVH	●	△	●		△		
NSAQSRNSTTNVH	△ ³⁾						
SNAQSRNSTTNVH	△						
NNAQSRNGTTNVP		●		●			
NNATSRNSTTNAQ		△					
NNATSRNGTTNVH		△					
NNAQSRNGTTNVH			●				
NNAQSHNGTTNVQ				△			
SNTQSRNSTTNIH (2009a NewOrleans1805/2009/USA)				●	●		
SNTQSRNSTTNTH				△			
SNAQSRNSTTNVP					●	△	
NNAQSRNSTTNVP					△		
NSAQSHNGTTNVP						△	
NNAQSRNSTTDVP						●	
NSAQSRNGTTNVP						●	
SNAQSRNGTTNTH							
(2012 Sydney/NEW0514/2012/AU)							●
SNAQSRNSTTNTTP							

¹⁾ VP1領域の6, 9, 15, 45, 296-298, 393-395, 412-414番目のアミノ酸を示す

²⁾ 複数事例から確認されたタイプ

³⁾ 単発事例でのみ確認されたタイプ