

表9 二枚貝が関与する食中毒疑い事例での検出ウイルス

事例番号	検体番号	ノロウイルス		アイチウイルス
		GI	GII	
186	1	+	-	-
	2	+	+	-
	3	+	+	+
	4	+	-	-
	5	+	+	-
206	1	+	+	-
	2	-	+	-
	3	+	+	-
215	1	+	+	+
	2	-	+	+
258	1	-	+	-
	2	+	+	-
	3	-	+	+
	4	-	+	-
	5	-	+	-
	6	-	+	-
	7	-	-	-

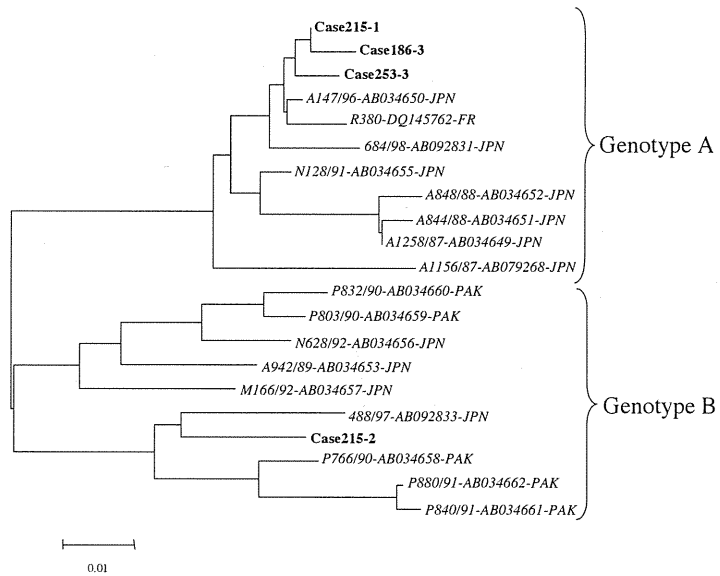


図3 食中毒疑い事例から検出されたアイチウイルスの系統樹解析

太字:検出ウイルス(事例番号-検体番号), 斜字:レファレンス株

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)

Multiplex real-time PCR を 利用した腸管系ウイルス検査の検討

研究協力者	小和田 和誠	福井県衛生環境研究センター
研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所
研究協力者	山本 希	福井県衛生環境研究センター
研究協力者	平野 映子	福井県衛生環境研究センター
研究協力者	中村 雅子	福井県衛生環境研究センター
研究協力者	大村 勝彦	福井県衛生環境研究センター

研究要旨

ノロウイルス以外の腸管系ウイルス 6 種 (サポウイルス、アストロウイルス、A 群ロタウイルス、C 群ロタウイルス、アデノウイルス、エンテロウイルス) について検査対応を迅速化するために、Multiplex real-time PCR 法の導入を検討した。Multiplex real-time PCR を、アニーリング温度は 57°C、プライマーおよびプローブの濃度は各 0.2 μM の条件に設定することで良好な検出感度が得られた。本法の実施により、2009 年 4 月から 2012 年 12 月の間に採取された小児散発例患者の糞便 122 検体中 59 検体および食中毒等の集団発生 64 事例 598 検体中 5 事例 11 検体からウイルスを検出した。また、検出されたウイルスの遺伝子型の調査を実施し、検出が可能な遺伝子型を確認した。本法は、短時間で様々な腸管系ウイルスの検索が可能なことから、感染症発生動向調査および集団発生時の緊急検査の両者で有用であると考えられた。

A. 研究目的

非細菌性食中毒あるいは地域流行として小児に蔓延する感染性胃腸炎は、毎年患者発生数が多い疾病の一つであり、その発症要因として多様なウイルスの関与が指摘されている。しかしながら、ウイルスの個別検査は操作が煩雑なうえに多くの時間や経費を要し、食中毒などの集団発生事例への迅速な検査対応が困難と

なる。そこで、サポウイルス (SaV)、アストロウイルス (AstV)、C 群ロタウイルス (RVC) の同時検出系と、A 群ロタウイルス (RVA)、アデノウイルス (AdV)、エンテロウイルス (EntV) の同時検出系の 2 種類の Multiplex real-time PCR 検査系を設計し、6 種類のウイルスのより迅速な検査体制の構築を目的とした。

B. 研究方法

1. 材料

Multiplex real-time PCR 設計の検討に用いる陽性対照検体として、SaV、RVA、AdV および EntV については、過去に当センターでウイルスが検出された糞便検体を用いた。その他については、岡山県環境保健センターより分与された RVC 陽性糞便および愛媛県立衛生環境研究所より分与された AstV 陽性糞便を用いた。

設計した検査系の有効性の検討については、2009年4月から2012年12月の間に採取された感染性胃腸炎疑い小児散発例患者の糞便 122 検体および食中毒等の集団発生 64 事例の 598 検体（糞便 532 検体、直腸拭い液 33 検体、嘔吐物 5 検体、牡蠣 2 検体、拭き取り 26 検体）を用いた。

2. 方法

1) 遺伝子検査用 cDNA の作製

糞便および嘔吐物は滅菌水で 10% 乳剤とし、8,500G、10 分間冷却遠心後の上清を試料とし、直腸拭い液は粗遠心後の上清を試料とした。牡蠣は中腸腺摘出後、滅菌水で 10% 乳剤とし、30% ショ糖を用いた超遠心 (36,000rpm、2hr) で濃縮したものを試料とした。試料から、QIAamp Viral RNA mini kit [QIAGEN] を用いて核酸を抽出した。そして、その核酸 10 μ L をテンプレートとして、5 \times First Strand buffer [Life technologies] 4 μ L、DTT (100mM) [Life technologies] 2 μ L、dNTP mix (10mM) [Promega] 1 μ L、ランダムプライマー (Nona-deoxyribonucleotide mixture) (1 μ g/ μ L) [TaKaRa] 0.5 μ L、RNase

inhibitor (40 U/ μ L) [Wako] 0.25 μ L、Super Script III Reverse Transcriptase [Life technologies] (200 U/ μ L) 1 μ L および滅菌水 1.25 μ L で構成される逆転写反応液を用い、30 $^{\circ}$ C : 10 分、50 $^{\circ}$ C : 60 分、98 $^{\circ}$ C : 5 分処理する逆転写反応を実施し、cDNA を作製した。

2) Multiplex real-time PCR 検査系の検討

陽性対照検体から作製した cDNA を用いて、Multiplex real-time PCR 実施時のアニーリング温度を、54 $^{\circ}$ C から 64 $^{\circ}$ C の間で実施し、各ウイルスの検出感度が良好となる温度を検討した。また、プライマーおよびプローブの濃度を 0.1 μ M から 0.4 μ M の間で実施し、各ウイルスの検出感度が良好となる濃度を検討した。

3) Multiplex real-time PCR によるウイルスの検索

前述のアニーリング温度と試薬濃度の検討の結果、検出感度が良好となった条件を参考に以下のように Multiplex real-time PCR を実施した。まず、得られた cDNA 2 μ L をテンプレートとして、QuantiTect 2 \times Multiplex PCR Master mix [QIAGEN] 10 μ L、primer/ probe set (each 0.2 μ M) 3 μ L および滅菌水 5 μ L で構成される PCR 反応液を用い、95 $^{\circ}$ C : 15 分処理後、94 $^{\circ}$ C : 60 秒と 57 $^{\circ}$ C : 90 秒を 45 回処理する反応条件で Multiplex real-time PCR を実施した。プライマーおよびプローブは、これまでに報告されている (表 1) のものを利用し、A セット (SaV \cdot AstV \cdot RVC) もしくは B セット (EntV \cdot AdV \cdot RVA) の組み合わせで使用した。real-time PCR 装置は、StepOne Plus [Life technologies] を使用した。

4) NoV の遺伝子検査

ノロウイルス (NoV) は前述と同様に cDNA 合成後、国立感染症研究所発行のウイルス性下痢症診断マニュアル (第3版) のリアルタイム PCR 法に準じて検査した。

5) 検出ウイルスの遺伝子型別

NoV は片山ら (Virol. 299, 225-239 (2002))、SaV は岡田ら (Arch Virol. 151, 2503-2509 (2006)) の方法に準じて Capsid 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、型別分類を実施した。

RVA、AstV については、国立感染症研究所発行のウイルス性下痢症診断マニュアル (第3版) の方法に準じて、型別の RT-PCR を実施し、型別分類を実施した。また、増幅産物をダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、BLAST 検索によってウイルスの型別を確認した。

AdV については、国立感染症研究所発行の咽頭結膜熱・流行性角結膜炎検査診断マニュアル (第2版) に掲載の [PCR_方法 2-1] に準じて、hexon 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、型別分類を実施した。

EntV については、CODEHOP-PCR により、VP1 領域の増幅産物を得て、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、BLAST 検索によってウイルスの遺伝子型を決定した。

(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. Multiplex real-time PCR 条件の検討

Multiplex real-time PCR 実施時のアニーリング温度を、54°C から 64°C の間で検討したところ、56-58°C で実施した場合に比較的良好な検出感度が得られた (図1)。また、PCR に用いるプライマーおよびプローブの濃度を 0.1 μM から 0.4 μM の間で検討したところ、Multiplex real-time PCR kit [QIAGEN] にて推奨されている 0.2 μM でも十分に良好な検出感度が得られた (図2)。以上のことから、Multiplex real-time PCR のアニーリング温度は 57°C、プライマーおよびプローブ濃度は各 0.2 μM に設定した。

2. 小児散発例患者からの検出

感染性胃腸炎疑い小児散発例患者の糞便 122 検体について腸管系ウイルスの検索を実施した結果、NoV が最も多く 36 検体 (29.5%) から検出された。その他の腸管系ウイルスは、Multiplex real-time PCR によって合計 59 検体 (48.4%) から検出され、その中の 10 検体は NoV 陽性検体であった。内訳は、SaV が 10 検体、AstV が 5 検体、RVA が 25 検体、AdV が 10 検体および EntV が 19 検体であった。この中には混合感染の 9 検体 (SaV と EntV の同時検出が 1 検体、SaV と AdV の同時検出が 1 検体、SaV と RVA の同時検出が 2 検体、RVA と AstV の同時検出が 1 検体、RVA と EntV の同時検出が 2 検体、AstV と EntV の同時検出が 1 検体、SaV と AdV と RVA の同時検出が 1 検体) が含まれていた。

3. 集団発生事例からの検出

食中毒等の集団発生 64 事例の 598 検体について腸管系ウイルスの検索を実施した結果、NoV が最も多く 40 事例 280 検体

(46.8%)から検出された。その他の腸管系ウイルスは、Multiplex real-time PCRによって合計5事例11検体(1.8%)から検出され、その中の4検体はNoV陽性検体であった。内訳はSaVが3事例3検体、RVAが2事例2検体、RVCが1事例4検体、AdVが1事例1検体およびEntVが1事例1検体であった。

4. ウイルスの遺伝子型別

Multiplex real-time PCRの実施によりウイルスが検出された検体について、ウイルスの遺伝子型別を実施した。

SaVは、GI.1が5検体、GI.2が2検体、GI.3、GII.1、GII.2、GII.5、GIVおよびGVが各1検体であった。AstVは、4型が3検体、1型および3型が各1検体であった。RVAは、G1が20検体、G3が6検体、G2が1検体であった。AdVは、41型が4検体、1型が3検体、31型が2検体、2型および3型が各1検体であった。EntVは、エコーウイルス(Echo)25型が4検体、B群コクサッキーウイルス(CoxB)2型が2検体、Echo3型、Echo6型、Echo9型、CoxA6型、CoxA9型、CoxA16型、CoxB1型およびCoxB4型が各1検体型別された。また、ワクチン株のポリオウイルス(Polio)1型が1検体、Polio2型およびPolio3型が各2検体型別された(表2)。

D. 考察

SaV、AstV、RVCの同時検出系、およびRVA、AdV、EntVの同時検出系を設計した。その結果、これらのウイルスの検索に要する時間を大幅に削減することが可能であったことから、食中毒などの緊急時対応に非常に効果的な検出系であると考え

られた。

感染性胃腸炎疑い小児散発例患者からは、NoV以外にもRVAやSaVなどが検出されており、福井県内においても様々な腸管系ウイルスが潜伏していることが確認された。今後、これらのNoV以外のウイルスが集団発生の誘発因子となる可能性があると考えられた。また、表3に示す通り、混合感染の検体も19検体(15.6%)あることから、流行動態のモニタリングの際は、何か一つのウイルスが検出されたら検索を終了するのではなく、複数のウイルスを検索することで流行実態をより正確に把握することが重要であると考えられた。そのため、本法のような検査系は緊急検査だけでなく、感染症発生動向調査でも有用であると考えられた。

2009年4月から2012年12月の間に発生した食中毒等の集団発生64事例のうち、40事例(62.5%)の発生要因はNoVと推定され、ウイルスに起因する集団発生事例ではNoVが大半を占めるというこれまでの結果と同様であった。そのため、集団発生の際には、まず初めにNoVの検査を実施し、NoVの関連性が低いと推定された場合に他のウイルスの検索を実施することが効率的だと考えられた。

集団発生事例において、NoV以外のウイルスが検出された検体は5事例11検体(表4)であった。その中の4事例については、検出されたウイルスは各事例で1名のみを検出であり、他の有症者からの検出がないことから、集団発生の原因となった可能性は低いと考えられた。これらは不顕性の散発例が検出されたケースと推定した。複数の有症者から同じRVC

が検出された1事例については、RVCが集団発生の原因となったと考えられた。

この事例は、中学校とその中学校区内にある小学校2校および保育園の4施設で同時期に集団発生した事例であった。3施設（中学校、B小学校、保育園）から搬入された6検体からは、NoVが5検体から検出された。その中に、AdVの同時検出が1検体およびRVAの同時検出が1検体含まれていた。残る1施設（A小学校）の4検体からはNoVは検出されなかったが、RVCが4検体全てから検出された。これにより、検査前は原因が同一事例であると考えられていたが、RVCが検出された小学校では、他の施設と感染源が異なることが示唆された。NoV陽性事例であっても、有症者にNoV陰性の検体がある場合には、Multiplex real-time PCRで他のウイルスの検索を実施する必要があると考えられた。Multiplex real-time PCRでは複数のウイルスの有無を検索することが可能なため、今回のように想定外のウイルスの検出をすることがある。そのため、ウイルスの流行動態を客観的に把握する方法としても、本法は有用であると考えられた。

検出されたウイルスの型別検査を実施し、本法で検出が可能な遺伝子型を確認した。検出されていない遺伝子型のウイルスについては、今後も検査数を増やして検索可能であるか検討する必要がある。

E. 結論

多様な腸管系ウイルスの検索を迅速に行うために、SaV、AstV、RVCの同時検出系、およびRVA、AdV、EntVの同時検出系の2

種類のMultiplex real-time PCR法を設計し、導入を検討した。

本法により、NoV以外の様々な腸管系ウイルスの存在が示唆された。集団発生ではNoVが著しく多いため、NoVの検査後に他の腸管系ウイルスの検索を実施することが効率的である。本法は、短時間で様々な遺伝子型の腸管系ウイルスが検出可能であり、客観的にウイルスを検索することから、感染症発生動向調査および集団発生時の緊急検査の両方で有用であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

小和田和誠，中村雅子，平野映子，大村勝彦，東方美保：マルチプレックスリアルタイムPCR法を利用した腸管系ウイルスの検出．第39回北陸公衆衛生学会，2011年11月，福井県福井市

小和田和誠，東方美保，山本希，平野映子，中村雅子，大村勝彦：Multiplex real-time PCR法を利用した福井県内の胃腸炎ウイルスの検出．第60回日本ウイルス学会学術集会，2012年11月，大阪府大阪市

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

表1 Multiplex real-time PCR で使用するプライマーおよびプローブ

	プライマー	プローブ	標的領域	出典
S a V	SaV124F、SaV1F SaV5F、SaV1245R	SaV124TP、 SaV5TP	Polymerase	Oka, et al. (2006)
A s t V	HastV.fwd、HastV.rev	HastV.probel+2	Capsid	Logan, et al. (2007)
R V A	JVKF、JVKR	JVKP	NSP3	Jothikumar, et al. (2009)
R V C	CRV7F、CRV7R	CRV7	VP7	Mori, et al. (2012)
A d V	JTVXF、JTVXR	JTVXP	Hexon	Jothikumar, et al. (2005)
E n t V	Enteroprimer1F、 Enteroprimer1R	Enterotaqman1	5' -UTR	Nijhuis, et al. (2002)

表2 Multiplex real-time PCR で検出されたウイルス

	2009	2010	2011	2012	Total
S a V	G I . 1 (1)	G I . 1 (2) G I . 2 (1) G II . 2 (1) G II . 5 (1) G V (1)	G I . 1 (2)	G I . 2 (1) G I . 3 (1) G II . 1 (1) G I V (1)	13
A s t V		Type3 (1) Type4 (1)		Type1 (1) Type4 (2)	5
R V A	G3 (1) G3 (1)	G1 (5)、G2 (1) G3 (2)	G1 (2)、G1 (1) G3 (3)	G1 (11)	27
R V C			(4)		4
A d V	Type2 (1) Type3 (1) Type41 (2)	Type31 (1)	Type1 (1) Type1 (1) Type31 (1) Type41 (2)	Type1 (1)	11
E n t V	CoxA9 (1) CoxB4 (1) Echo9 (1) Echo25 (4) Polio1 (1)	CoxA16 (1) CoxB1 (1) CoxB2 (2) Enterov71 (1)	CoxA6 (1) Echo3 (1) Polio2 (2) Polio3 (2)	Echo6 (1)	20

※ (内)・・・陽性検体数

※太字・・・集団発生事例からの検出

表3 小児散発例から複数のウイルスが検出された混合感染例

NoVとの混合感染	NoV以外のウイルスの混合感染
NoV(GII.4) + AdV(Type2)	SaV(GI.1) + RVA(G1)
NoV(GII.4) + Echo6	SaV(GI.1) + RVA(G3)
NoV(GII.4) + CoxB2	SaV(GI.1) + AdV(Type31)
NoV(GII.4) + Enterov71	SaV(GII.2) + CoxA16
NoV(GII.4) + Polio1	RVA(G3) + CoxA16
NoV(GII.6) + Echo25 【3検体】	RVA(G3) + Polio2
NoV(GII.13) + SaV(GII.1)	RVA(G1) + AstV(Type1)
NoV(GII.13) + AdV(Type1)	AstV(Type4) + CoxB2
	SaV(GI.1) + RVA(G2) + AdV(Type31)
計10検体 (8.2%)	計9検体 (7.4%)

表 4 集団発生事例からの Multiplex real-time PCR によるウイルスの検出

No.	初発患者 発生年月日	発生施設	発症者 数	NoV 陽性数/ 検査数	Multiplex 陽性数/ 検査数	Multiplex 陽性ウイルス [患者種別]	推定 感染経路
1	2009.10.17	旅館	6	0/5	2/5	RVA [有症者 1名] EntV [有症者 1名]	不明
2	2010.2.27	家庭	10	4/10	1/10	SaV [有症者 1名]	ヒト-ヒト 感染
3	2011.5.22	中学校 小学校 保育園	100 以上	5/10	6/10	RVC [有症者 4名] RVA [有症者 1名] AdV [有症者 1名]	ヒト-ヒト 感染
4	2012.2.21	社員食堂	26	6/8	1/8	SaV [従事者 1名]	ヒト-ヒト 感染
5	2012.3.20	飲食店	3	0/6	1/6	SaV [従事者 1名]	不明

図 1 アニーリング温度の検討

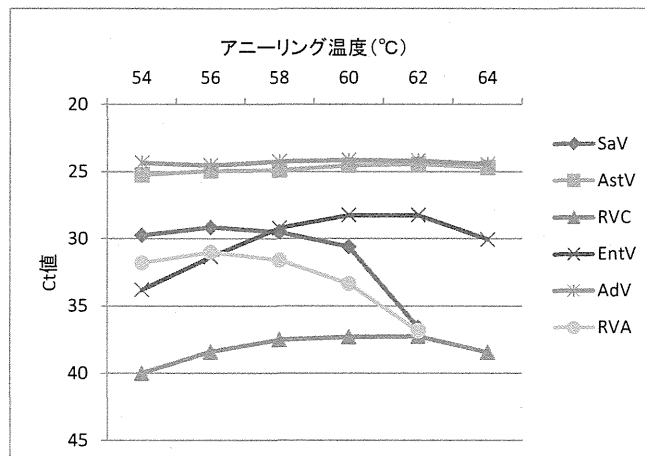
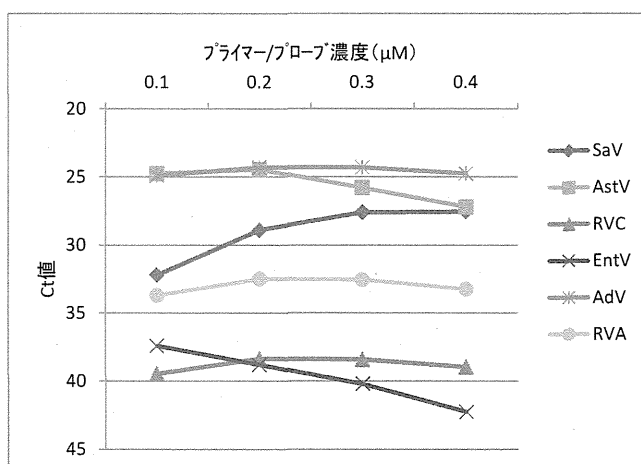


図 2 プライマーおよびプローブ濃度の検討



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)

終末処理場の処理前の下水及び生カキにおける
ノロウイルス等汚染実態調査

研究協力者	三上 稔之	青森県環境保健センター
研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所
研究協力者	筒井 理華	青森県環境保健センター
研究協力者	東海林 彰	青森県環境保健センター
研究協力者	古川 紗耶香	青森県環境保健センター
研究協力者	吉田 綾子 ⁽¹⁾	青森県環境保健センター
研究協力者	井上 治 ⁽²⁾	青森県環境保健センター

研究要旨

地域のノロウイルス (NV) や A 型肝炎ウイルス (HAV) 等の汚染実態を明らかにするため、下水処理施設に流れ込む処理前の下水を経時的に採水し、ウイルス検出を実施した。検出されたウイルス遺伝子濃度と感染症発生動向調査の感染性胃腸炎患者情報との相関について検討した。下水を経時的に採取し、モニタリングした結果、合流水では、41 検体中から NVG I 型は 37 検体、NVG II 型は 38 検体、アストロウイルス (AstV) は 32 検体、サポウイルス (SaV) は 4 検体から検出された。エンテロウイルス (EV) は 34 検体中 1 検体から検出された。HAV は 41 検体中全てから検出されなかった。ロタウイルス (RotaV) 及びアデノウイルス (AdV) は 5 検体全てから検出されなかった。

分流水 49 検体中 NVG I 型及び NVG II 型は全てから、AstV は 43 検体、SaV は 15 検体から検出された。EV は 42 検体中 6 検体から検出され、HAV は 49 検体中全てから検出されなかった。RotaV 及び AdV は 13 検体全てから検出されなかった。

また、市販生カキは中腸腺に様々なウイルスを蓄積することが知られていることから、生カキ及びパック内浮遊水の汚染実態を明らかにし、リスク評価の基礎資料とするため、NV、AstV、SaV、EV 及び HAV の遺伝子検出を実施した結果、生カキの中腸腺 30 検体とパック内浮遊水 15 検体全てからいずれの遺伝子も検出されなかった。

A. 研究目的

下痢等を主症状とする急性胃腸炎の原因ウイルスであるNV、SaV、AstV、EV、RotaV およびAdV等は、感染者の腸管内で増殖し、糞便中に排泄され、各家庭の汚物が下水に流入することから、下水処理施設に流れ込む処理前の汚水を経時的に採水し、ウイルス検出を実施することで、地域のNV等の汚染実態を明らかにすることができる。本研究では、検出されたウイルス遺伝子濃度と感染症発生动向調査による感染性胃腸炎患者情報との相関について検討した。

また、市販生カキの中腸腺及びパック内浮遊水のNV、SaV、AstV、HAVの汚染実態を明らかにし、生カキのリスク評価の基礎資料とする。

B. 研究方法

1. 材料

(1) 下水流入水

2010年11月～2012年12月に下水処理施設の流入水である合流水を41検体と分流水を49検体(1～4回/月)採取し、ウイルス検出に用いた。

(2) 市販生食用カキ

市販生食用カキは、2010年11月～2011年3月に購入した15パック(中腸腺30検体及びパック内浮遊水15検体)について調査を実施した。

2. 方法：下水流入水

(1) 検体処理

合流水及び分流水の濃縮は、各1Lを3,000 rpm、20分間冷却遠心後、上清にポリエチレングリコール6000を8%、0.5 M

NaClになるように添加し(以下、PEG濃縮という)、常温で2時間攪拌後、3,000 rpm、20分間冷却遠心を行い、沈渣を(-)PBS1.0 mLに懸濁し、再度3,000 rpm、20分間遠心を実施した。

(2) RNA抽出とウイルス遺伝子検出

RNA抽出は、QIAamp ViaL RNA Mini Kit(QIAGEN)により行った。cDNA合成はDNase処理後、RT反応により行った。

下水流入水からのNV、AstVおよびHAVはリアルタイムPCR法、SaV、EV、およびRotaVはRT-PCR法、AdVはPCR法により行った。

NVはKageyamaらの方法(J. Clin. Microbiol. 2003)、SaVはYanらの方法(J. Virol. Methods. 2003.)、AstVはYokoiらの方法(感染症雑誌. 2009)、EVはIshikoらの方法により実施した。

HAVは、「A型肝炎ウイルスの検出法」(平成21年12月1日、食安監発1201第2号)、AdVはMiura-Ochiaiらの方法(J. Infect. Dis. 2002)、RotaVは国立感染症研究所ウイルス性下痢症検査マニュアル(第3版)2003により実施した。

3方法：市販生食用カキ

リアルタイムPCR法及びRT-PCR法によりNV・HAV等遺伝子検出を行った。RT-PCR法により検出したPCR産物について、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、塩基配列比較を行い、近隣結合法により遺伝子系統解析を行った。

(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、不要である。

C. 研究結果

1. 結果 1

(1) 下水流入水

遺伝子検出の結果、合流水は 41 検体中から NVG I 型が 37 検体、NVG II 型が 38 検体、AstV が 32 検体、SaV は 4 検体から検出された。EV は 34 検体中 1 検体から検出された。HAV は 41 検体中全てから検出されなかった。RotaV 及び AdV は 5 検体全てから検出されなかった。NVG I 型の検出コピー数は、最小コピー数 8.0×10^1 コピー/mL ～ 最大コピー数 1.2×10^5 コピー/mL、NVG II 型は 1.2×10^2 コピー/mL ～ 3.6×10^5 コピー/mL、AstV は 3.0×10^2 コピー/mL ～ 6.2×10^5 コピー/mL の範囲で検出された。分流水 49 検体中 NVG I 型及び G II 型は全てから、AstV は 43 検体、SaV は 15 検体から検出された。EV は 42 検体中 6 検体から検出され、HAV は 49 検体中全てから検出されなかった。RotaV 及び AdV は 13 検体全てから検出されなかった。NVG I 型の検出コピー数は、最小コピー数 3.4×10^2 コピー/mL ～ 最大コピー数 1.9×10^6 コピー/mL、NVG II 型は 1.3×10^3 コピー/mL ～ 2.7×10^6 コピー/mL、AstV は 5.0×10^3 コピー/mL ～ 2.8×10^7 コピー/mL の範囲で検出された (表 1、表 2、図 1、図 2)。

(2) 市販生食用カキ

2010 年 11 月～2011 年 3 月に購入した生カキの中腸腺 30 検体とパック内浮遊水 15 検体から、NV、AstV、SaV、EV 及び HAV は検出されなかった (表 3)。

D. 考察

合流水と分流水の NVG I 型、NVG II 型、

AstV のコピー数を比較すると、雨水を含まない分流水は雨水を含む合流水よりもウイルス量は 10～100 倍多く検出された。これらのことから、合流水は雨水等の影響を受けることが考えられるが、分流水は雨等の天候による影響を受けないと考えられ、地域の NV 等の汚染実態を把握する科学的データとして有効であると考えられる。

下水からの NVG I 型と NVG II 型のウイルス検出コピー数は、NVG I 型と NVG II 型原因の集団事例や散発事例の発生状況と同様の傾向が示され、秋から春に多く検出された。また、NVG I 型と NVG II 型のウイルス検出コピー数を比較すると NVG II 型が多く検出され、NVG I 型より NVG II 型を原因とする事例の発生が多いことが明らかとなった。

図 3 に示したように感染性胃腸炎患者報告数の増加後に NV が多く検出され、集団事例や散発事例の発生や流行ウイルス遺伝子型を把握する指標となると考えられる。一方、患者報告数の増加前にも NV が検出されたことから、散発事例の発生を推測すると共に感染拡大を予知する指標となるものと考えられる。

図 4 では AstV について、冬季は NV (図 3) と同様の傾向を示し、患者発生の動向を推測することができる。AstV は、初冬に多く検出され、冬季の感染性胃腸炎患者の中には NV 以外に AstV も含まれていたと推測される。本研究において、年間を通して、下水から AstV が検出されていることから、高齢者施設や家庭内における感染を防ぐため、患者便やその付着物等を適切な消毒方法により処理するこ

とが重要である。

例年、初夏から初冬に感染症発生動向調査による患者報告数が増加する手足口病やヘルパンギーナ等の主な原因ウイルスであるEVが下水から検出され、NV等急性胃腸炎ウイルス以外の感染症に起因するウイルスが下水から検出されたことから、地域の感染症の発生動向を推測することができると考えられる。検出されたEVは、複数のウイルス遺伝子の存在が考えられ、複数のEVを解析することにより地域の発生状況や原因ウイルスを把握することができ、感染症の拡大防止対策の科学的根拠に寄与することができると考えられる。

本研究では、生カキの中腸腺及びパック水からいずれの遺伝子も検出されなかったが、生カキの中腸腺には複数のNV遺伝子が蓄積されているとの報告があり、同一食中毒事例で生カキを喫食した発症者便から複数のNV遺伝子が検出された。生カキの中腸腺及び発症者便のNV遺伝子解析することにより、発症者由来株との比較ができ、原因究明等食中毒対策の科学的根拠になるものと考えられる。

E. 結論

合流水では、NVG I型は37検体、NVG II型は38検体、AstVは32検体、SaVは4

検体、EVは1検体から検出された。HAV、RotaV及びAdVは検出されなかった。分流水では、NVG I型及びNVG II型は49検体、AstVは43検体、SaVは15検体、EVは6検体から検出された。HAV、RotaV及びAdVは検出されなかった。

また、市販生カキでは、中腸腺及びパック内浮遊水からNVG I型、NVG II型、AstV、SaV、EV、HAVは検出されなかった。

感染性胃腸炎患者報告数の増加後にNVが多く検出され、集団事例や散发事例の発生や流行の主遺伝子型等を把握する指標になると考えられる。

生カキの中腸腺及び発症者便のNV遺伝子解析することにより、発症者由来株との比較ができ、原因究明等食中毒対策の科学的根拠になるものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表：なし
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

その他：なし

表1 合流水・分流水からのウイルス検出成績

2010~2012	陽性数/検体数							
	NVG I	NVG II	AstV	SaV	EV	HAV	RotaV	AdV
合流水	37/41	38/41	32/41	4/41	1/34	0/41	0/5	0/5
分流水	49/49	49/49	43/49	15/49	6/42	0/49	0/13	1/13

表2 合流水・分流水からのウイルス検出コピー数

2010~2012	ウイルス検出コピー数		
	NVG I	NVG II	AstV
合流水	$8.0 \times 10^1 \sim 1.2 \times 10^5$	$1.2 \times 10^2 \sim 3.6 \times 10^5$	$3.0 \times 10^2 \sim 6.2 \times 10^5$
分流水	$3.4 \times 10^2 \sim 1.9 \times 10^6$	$1.3 \times 10^3 \sim 2.7 \times 10^6$	$5.0 \times 10^3 \sim 2.8 \times 10^7$

表3 カギ・パック水のウイルス検出成績

2010~2011	陽性数/検体数					
	NVG I	NVG II	AstV	SaV	EV	HAV
カギ中腸腺	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
パック水	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15

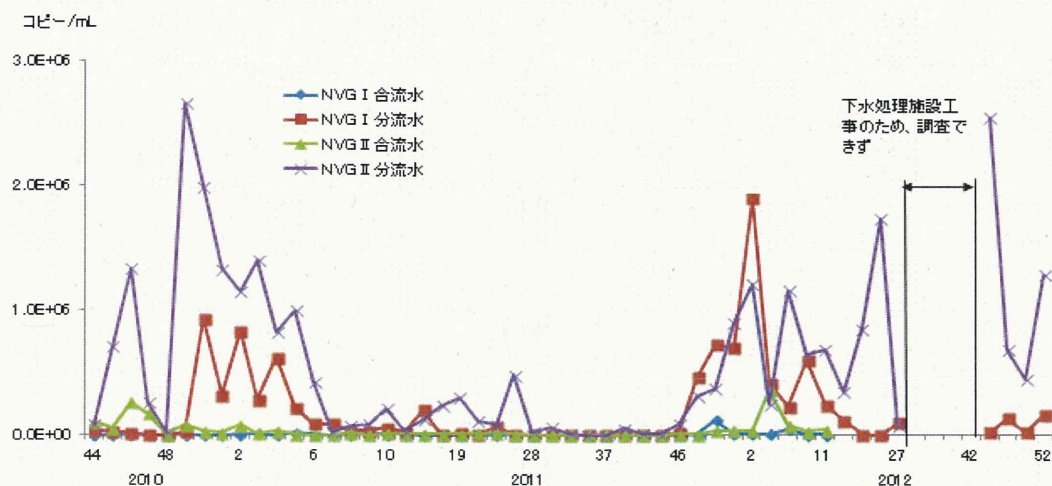


図1 合流水・分流水からのNVG I・NVG IIの検出推移

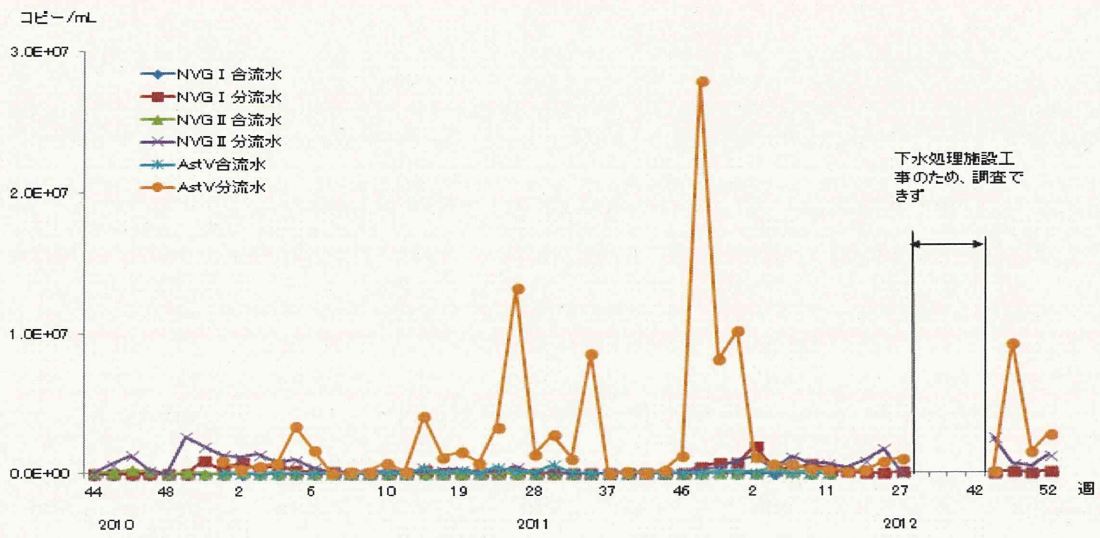


図2 合流水・分流水からのNVG I・NVG II・AstVの検出推移

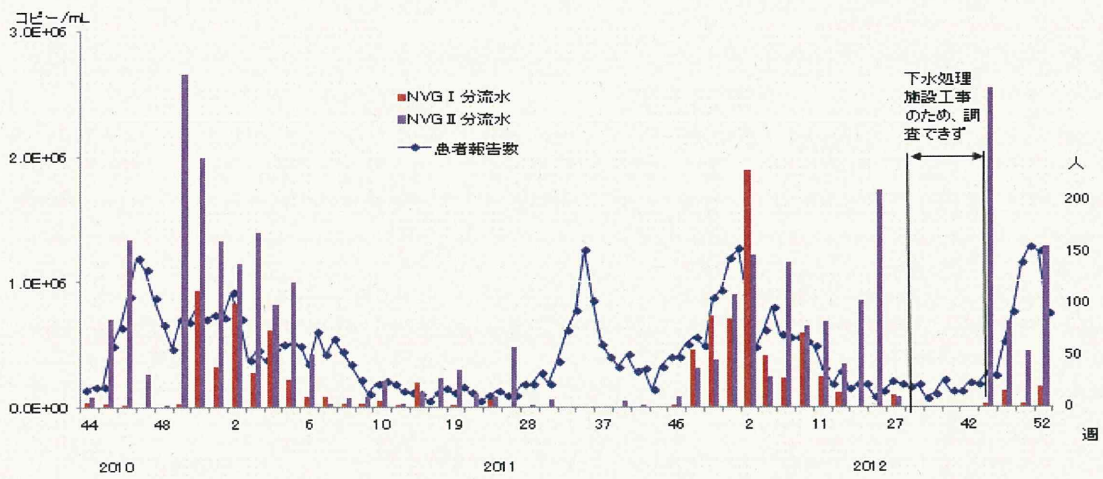


図3 分流水からのNVG I・NVG IIの検出コピ-数・感染性胃腸炎患者報告数

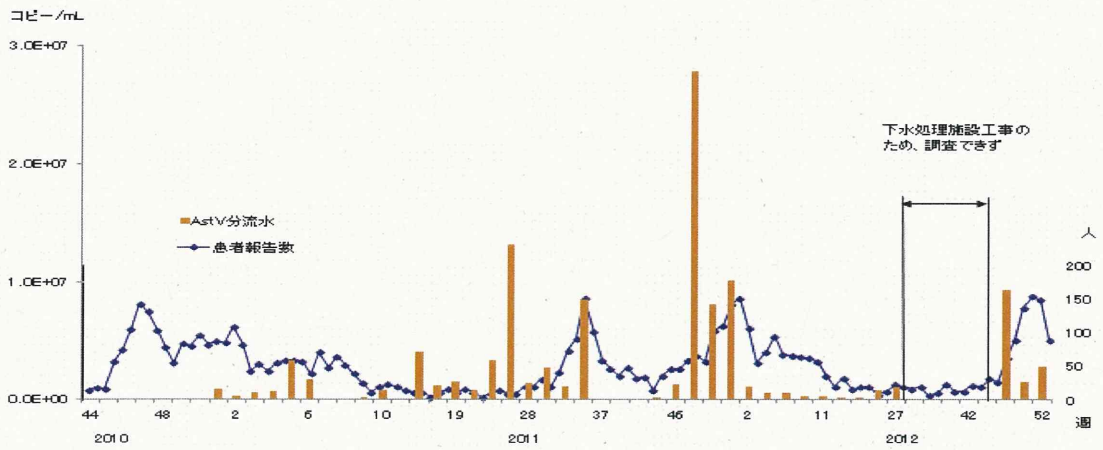


図4 分流水からのAstVの検出コピー数・感染性胃腸炎患者報告数

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)

富山県におけるノロウイルス・サポウイルス検出状況

研究協力者	名古屋 真弓	富山県衛生研究所
研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所
研究協力者	稲崎 倫子	富山県衛生研究所
研究協力者	板持 雅恵	富山県衛生研究所
研究協力者	嶋 一世	富山県衛生研究所
研究協力者	堀元 栄詞	富山県衛生研究所
研究協力者	小渕 正次	富山県衛生研究所
研究協力者	滝澤 剛則	富山県衛生研究所

研究要旨

2010～2012年に胃腸炎患者、下水流入水、岩ガキからノロウイルス (NoV)・サポウイルス (SaV) の検出を試みたところ、患者からも下水からも NoV GII. 4 が最も多く検出された。GII. 4 の 2006b 亜型は 3 年間にわたり検出されたが、2012/13 シーズンには新たな 2012 亜型が検出された。NoV の GI、特に GI. 4 は下水から多数検出されるものの患者は少なく、不顕性感染が多いと考えられた。2011 年 6 月には NoV GII. 2 が患者、下水、岩ガキの全てから検出された。岩ガキから NoV が検出されたことで、生食による感染リスクが改めて示唆された。2003～2011 年の NoV を調査したところ、多数のキメラウイルスの存在が確認され、NoV GII. 2 や GII. 3 の一時的な流行にキメラウイルスが関与した可能性が示唆された。

A. 研究目的

胃腸炎患者、下水流入水、岩ガキからノロウイルス (NoV)・サポウイルス (SaV) を検出し、患者での流行型や不顕性感染を含めた地域の流行状況を把握すること、岩ガキによるウイルス性食中毒のリスクを推測することを目的とした。

また、通常国内では NoV のカプシド領域 (ORF2) をもとに型別が行われている

が、近年、NoV が ORF1 と ORF2 の間で高頻度に組み換えを起こすことが知られている。そこで、2003～2011 年の NoV 陽性検体を対象に組み換え型 (キメラウイルス) を検出し、流行に与える影響を推測することを目的とした。

B. 研究方法

1. 患者検体

富山県において 2010 年 1 月から 2012 年 12 月に発生した食中毒、感染性胃腸炎（集団発生例及び小児散発例）から得られた糞便を用いた。検体採取は管轄の厚生センター、保健所が行った。

糞便検体の 10%乳剤上清から、厚生労働省通知（食安監発 115001 号）に基づき RNA を抽出し、DNase 処理、逆転写反応を行った。NoV の検出には、リアルタイム PCR を用い、PCR には、ポリメラーゼ領域 3' 末端からカプシド領域を対象とした G1-SKF/G1-SKR、G2-SKF/G2-SKR もしくはキメラウイルスの検出と同じプライマー（後述）を用いた。SaV の検出には、カプシド領域を対象としたプライマー SV-F11/SV-R1 及び SV-F2/SV-R2 による nested PCR (Okada et al., Arch. Virol., 147: 1445-1451, 2002) を用いた。PCR 産物から、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。

2. 下水流入水

県西部に位置する下水処理場において、2010 年 1 月から 2012 年 12 月の毎月 1 回下水流入水 1 リットルを採取した。

下水流入水を 3,000rpm で 30 分遠心して得られた上清に、最終濃度 0.05M になるように塩化マグネシウムを添加し、0.5 規定の塩酸を用いて pH3.5 に調整した。この液を陰電荷膜にろ過吸着させた後、陰電荷膜を 3% beef extract 液 10ml に浸漬し、超音波処理により吸着分子を溶出した。溶出液を再度遠心後、回収される上清を 100 倍濃縮下水検体とした。また、PEG 沈殿法により 250 倍濃縮下水検体も調整した。濃縮下水検体から、ヒト検体と同様に RNA 抽出、DNase 処理、逆転写反

応、PCR を行った。

3. 岩ガキ

2011 年 4~6 月、2012 年 5~7 月の計 14 回、富山県の 3 漁港で採取した岩ガキ 117 個を用いた。

岩ガキは中腸腺を取り出したあと、同一ロット 3 個分を 1 検体として PBS (-) にて 10%乳剤にした。 α -アミラーゼを加えて 37°C 1 時間消化したのち、遠心上清を 12% PEG6000 及び 5.8% NaCl にて凝集させ遠心した。0.5% Zwittergent 加 PBS (-) にて沈殿を再浮遊させ、濃縮カキ検体とした。濃縮カキ検体から、ヒト検体と同様に RNA 抽出、DNase 処理、逆転写反応を行った。NoV の検出には、リアルタイム PCR と PCR を用いた。PCR は、ポリメラーゼ領域 3' 末端からカプシド領域を対象としたプライマー COG1F/G1-SKR 及び G1-SKF/G1-SKR (GI 用)、COG2F/G2-SKR を及び G2-SKF/G2-SKR (GII 用) を用いて Semi-nested PCR を行った。SaV の検出は、ヒト検体と同様に行った。

4. NoV キメラウイルスの検出

2003~2011 年に富山県で得られた NoV 陽性の患者糞便検体 cDNA 435 検体を用い、ORF1/ORF2 ジャンクション領域を対象としたプライマー 1421f/G1-SKR 及び 1364f/G1-SKR (GI 用)、1421f/NV2oR 及び 1364f/G2-SKR (GII 用) (Nakamura et al., Jpn. J. Infect. Dis., 62: 394-398, 2009) を用いた nested PCR を行った。塩基配列を決定し、ポリメラーゼ領域 (ORF1 の 3' 末端側、GI : 496bp、GII : 499bp) とカプシド領域 (ORF2 の 5' 末端側、GI : 295bp、GII : 282bp) を、Norovirus Genotyping Tool (URL :

<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool#>) を用いてそれぞれ型別した。

(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. 患者からの NoV、SaV 検出状況

3 年間にウイルス性感染性胃腸炎及び食中毒等の集団発生は 64 事例あった。62 事例から NoV が、1 事例から SaV が検出され、1 事例からは NoV と SaV が同時に検出された。7 事例はカキ（生岩ガキ 2 事例、生ガキ 3 事例、加熱カキ 2 事例）を喫食していた。小児散発例では、37 例から NoV、10 例から SaV が検出された。

2. 患者、下水流入水、岩ガキから検出された NoV 及び SaV の型別

集団発生の患者からは NoV GII. 4、GII. 13、GII. 2 などが検出された（表 1）。散発例の患者からは NoV GII. 4、GII. 2、GII. 3、SaV GI. 1 などが検出された。（表 2）。下水流入水からは、NoV GII. 4、GI. 4、GII. 1、GII. 2、SaV GI. 1 などが検出された（表 3）。NoV GI. 4 は、下水から 2010 年 6 月まで継続して検出されたが、その後減少し、2012 年 9 月以降には再び増加した。岩ガキは、2011 年 5 月と 6 月の計 2 検体から NoV GII. 2 が検出され、SaV は検出されなかった（表 4）。

患者、下水、岩ガキから検出された NoV 及び SaV についてまとめた（表 5）。NoV GI は、患者と下水で共通の遺伝子型は少なく、GI. 4、GI. 7、GI. 8、GI. 11 のみ（検出された 12 種類の型のうち 4 種類）であっ

た。また、GI. 4 以外は検出時期が異なっていた。NoV GII では、GII. 2、GII. 3、GII. 4、GII. 12、GII. 13 が患者からも下水からも検出され（検出された 8 種類の型のうち 5 種類）、特に NoV GII. 2、GII. 4 は患者と下水の検出時期がおおむね一致していた。SaV は、GI. 1、GI. 2、GII. 1 が患者からも下水からも検出された。GI. 1 は検出時期がおおむね一致していた。

3. 検出された NoV の比較

得られた NoV の塩基配列を用いて系統樹解析を行った（詳細は平成 22、23、24 年度総括・研究分担報告書を参照）。NoV GI. 4 は下水から多数検出され、患者由来株 1 例と近縁であった。2010～2011 年には患者と下水で近縁な GII. 2 が検出され、さらに 2011 年 5～6 月に岩ガキから検出された GII. 2 とも相同性が高かった。

2012 年 4 月の患者から検出された NoV GI 及び 7 月の下水から検出された GII は、型不明であった。

GII. 4 については、毎シーズン 2006b 亜型が検出されていたが、2011/12 シーズンは 2012 亜型が増加した。2009a 亜型は概ね毎シーズン検出されたが、検出数はそれぞれのシーズンの 2006b、2012 亜型よりも少なかった。2008a 亜型は 2010 年の 12 月にみられたのみであった。

4. キメラウイルスの解析

2003～2011 年に富山県で得られた NoV 陽性の患者糞便検体 cDNA 435 検体のうち、387 検体（GI：27 検体、GII：360 検体）から塩基配列が得られた。Norovirus Genotyping Tool でポリメラーゼ領域と capsid 領域で型別が異なったのは 12 種類（GI：13 検体、GII：112 検体）であっ

た(表6)。カプシド領域でGII.2のNoVは、年によって流行タイプが異なっていた(図1)。NoVGII.2は2010年から2011年にかけて多く検出されていたが、この時期にGII.16とのキメラウイルスの増加が顕著に認められた。また、2002/2003シーズンにはGII.12とのキメラウイルスが確認された。カプシド領域でGII.3と分類されたNoVのうち、ポリメラーゼ領域でもGII.3と分類されたのは2004年の1例のみであった(図2)。2005/06にはGII.12とのキメラが増加しており、2009/10シーズンにはGIIBとのキメラが増加していた。

D. 考察

3年間にわたる調査では、患者、下水いずれからでもNoVGII.4の検出が最も多かった。GII.4の2006b亜型は3年間にわたり検出されたが、2012/13シーズンには新たな2012亜型が流行し始めた。2012亜型は、P2d領域の抗原性に関わるエピトープのアミノ酸に変異があったことから(田村ら、病原微生物検出状況(IASR)33:394, 333-334, 2012)、新たな流行を引き起こしたと考えられており、今後もGII.4の亜型の動向に注意していく必要がある。

NoVGII.2は2011/12シーズンまで毎シーズン確認され、特に2011年6月には患者、下水、岩ガキ全てから検出された。従って、この時期にヒト、環境、岩ガキの中で循環していたと考えられる。

NoVGI.4は、下水から多数検出された。これは、これまでの調査(Iwai et al., Appl Environ Microbiol 75:1264-1270, 2009)と同様の結果であった。ヒトのNoV

は、ヒトの体内でしか増殖しないことから、NoVGI.4はヒト集団の中で長い間流行していると思われる。下水からの検出頻度に対して患者からの検出が1例のみであったのは、病原性が低く、不顕性感染が多いためと推測される。しかしながら、このような型が変異を起こし病原性が強まると、多数の患者を出す可能性もあることから、今後も動向を監視する必要がある。

他に、NoVGII.3は2012年1~2月、GII.13は2010年11月~2011年3月及び2012年3~6月、GII.12は2011年10~12月に一時的な流行があったと考えられた。

NoVGIIは患者と下水両方から検出されることが多かったが、GIは下水からのみ検出される場合が多かった。下水からのみ検出された型(NoVGI.1、GI.2、GI.3、GI.6、GI.12、GI.14、GII型不明)は、病原性が低く不顕性感染している可能性が高い。一方、患者からのみ検出された型(NoVGI.13、GI型不明、GII.6、GII.7、SaVGII.3)は、下水では他の主要な株に紛れて検出されなかったか、一過性の流行しかなかったと推測される。しかしながら、同じ時期に患者と下水両方から検出された場合、互いに近縁であることが多く、下水が不顕性感染を含めた流行型の指標となりうることが示された。

下水や患者から型不明のNoVが検出され、今後、これらのNoVによる流行が危惧される。

SaVは小児散発例や下水から検出されることが多かった。特にGI.1は継続して流行していた。SaVは小児に病原性を示すことが多いが、成人では感染しにくいから、

不顕性感染していると考えられる。しかしながら、2012年3月に富山県では初めての SaV 単独による集団感染事例が発生し、また2011年1月のカキ喫食事例では NoV と SaV が検出された。小児に加え、成人での SaV 感染リスクも無視できないと考えられた。

2003年以降の NoV についてキメラウイルスの有無を調べたところ、12種類が得られた。NoV GII.2 や GII.3 の一時的な流行(2005/06、2009/10、2010/11 シーズン)にキメラウイルスが関与した可能性が示唆された。ORF2 がカプシド蛋白をコードしていて免疫原性に関わる一方、ポリメラーゼを含む ORF1 は病原性に関与すると考えられていることから、カプシド領域では同じ型に分類される NoV でも、ORF1 との組み合わせによっては、流行と被害の程度が大きく変わる可能性がある。従って、NoV のキメラウイルスの検索は重要と考えられる。今回の調査で多数のキメラウイルスが検出されたことから、今後得られたノロウイルスについて組み換えの有無を確認し、流行監視に役立つ必要がある。

E. 結論

2010～2012年の調査で、患者からも下水からも NoV GII.4 の検出が最も多かった。さらに GII.4 の亜型をみると、シーズンにより少しずつ変化しており、特に2012/13 シーズンは新たな亜型が流行し始めていた。NoV の GI、特に GI.4 は不顕性感染が多い傾向を示した。2011年6月には NoV GII.2 が患者、下水、岩ガキの全てから検出され、この時期の流行型で

あったと考えられた。岩ガキから NoV が検出され、生食による感染リスクが示唆された。

2003年以降の NoV を調査したところ、多数のキメラウイルスが存在していることが示された。中でも、NoV GII.2 や GII.3 の一時的な流行にキメラウイルスが関与した可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 宗玄俊一, 小原真弓, 長谷川澄代, 岩井雅恵, 滝澤剛則: 当院における小児ウイルス性下痢症の臨床的およびウイルス学的検討(2002～2008年). 小児感染免疫. 22: 23-28, 2010.

2. 学会発表

1) Mayumi Obara, Masae Iwai, Masatsugu Obuchi, Eiji Horimoto, Takeshi Kurata, Takenori Takizawa. Recombinant noroviruses of GII/3 prevalent from 2003 to 2010 in Toyama prefecture, Japan. XV International Congress of Virology, September 2011, Sapporo

2) 佐多徹太郎, 名古屋(小原)真弓, 滝澤剛則: ノロウイルス組換え株が感染性胃腸炎の流行に与える影響. 平成24年度北陸腸内細菌研究会研究発表会, 金沢市, 平成24年7月14日

3) 名古屋(小原)真弓, 板持(岩井)雅恵, 稲崎倫子, 堀元栄詞, 小渕正次, 佐多徹太郎, 滝澤剛則: ノロウイルスにおけるキメラウイルスが感染性胃腸炎の流行に与える影響. 第60回日本ウイルス学会学術集会, 大阪市, 平成