

## A. 研究目的

ノロウイルスの汚染リスクのある食品は二枚貝であり、とりわけカキは生食用として販売されていることから、食中毒の原因となる場合が多い。

現在、カキのノロウイルスの検査は厚生労働省から示されている通知法で実施される場合が多いと推定される。しかし、通知法では、検査感度が十分ではないことから、検査法の改良等が行われている。これまで、カキのウイルス汚染率に関して多くの報告があるが、改良された試験法での汚染実態調査はあまり実施されていない。また、現在、リアルタイム PCR 法における陽性基準は実測値 10 コピー数/g とされているが、汚染量が少ない場合、陰性と判定される可能性がある。

一方、カキにはヒトで流行したウイルスが蓄積されることから、カキから検出されたウイルスの遺伝子型を調べることで、下水と同様にヒトで流行した遺伝子型を把握することができる。また、2012/13 シーズンはノロウイルス GII/4 2012 変異株が大きな流行を起こしたことから、同株のカキへの蓄積が想定される。前シーズンまで同株は国内ではほとんど検出されていないことから、同流行期に採取されたカキから同株を検出することで、流行ウイルスが同シーズンにカキに蓄積することを直接的に示すことができると考えられる。

そこで、改良された試験法を用いてのカキの食品媒介ウイルスの汚染状況の把握、検査法における問題点の把握、検出ウイルスの遺伝子型を特定し、ヒトの流行との関連性を明らかにすることなどを

目的として、2013 年 2 月に全国 9 自治体で市販カキを採取し、代表的な食品媒介ウイルスであるノロウイルス、サポウイルス、A 型肝炎ウイルスおよび E 型肝炎ウイルスの検出を試みるとともに遺伝子型別を実施した。

なお、検査機関ごとの調査結果については、各研究協力報告を参考にさせていただきたい。

## B. 研究方法

### 1. 材料

2013 年 2 月に全国 9 自治体で購入した国産の市販生カキ 56 ロット 159 検体を検査材料とした(表 1)。供試カキは 7 (便宜的に、養殖海域を都道府県別にまとめ、A~G と表記) の産地のものであった。原則として 1 ロット (パック) につき、中腸腺 1.5~2.0g を 1 検体として、3 検体を検査に用いた。

### 2. 検査対象ウイルスおよび検査方法

ノロウイルスを中心として、サポウイルス、A 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルス等について検査した。

検査方法は、カキの前処理については、「食品のウイルス標準試験法検討委員会」のホームページに記載されている「二枚貝 (カキ) からのウイルスの濃縮法」([http://www.nihs.go.jp/fhm/csvdf/kentest/csvdf001\\_wg\\_100820.pdf](http://www.nihs.go.jp/fhm/csvdf/kentest/csvdf001_wg_100820.pdf)) を基本とした方法(一部改変)で実施した。

濃縮材料からの RNA 抽出、DNase 処理および逆転写反応も同ホームページに掲載されている、「濃縮材料からのウイルス RNA の抽出・DNase 処理・逆転写反応」(<http://www.nihs.go.jp/fhm/csvdf>)

/kentest/csvdf002\_wg\_100820.pdf) を基本とした方法(一部改変)で実施した。

各検査対象ウイルスの遺伝子検出は、リアルタイム PCR 法または nested PCR 法で行った。

Nested PCR 法でウイルスが検出された場合、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定後、系統樹を作成し、遺伝子型を決定した。ノロウイルスの遺伝子型は国内で一般的に行われているカプシド N/S 領域の部分配列に基づく片山らの分類法に従った。サポウイルスの遺伝子型別は岡らの分類法に従った。一部の株については、クローニング後各クローンの塩基配列を決定した。

(検査法の詳細については、各研究協力者の研究協力報告を参照)

(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. 市販カキ等からのウイルスの検出状況

#### (1) 各食品媒介ウイルスの検出状況

Nested PCR 法により市販カキ等 56 ロット 159 検体のうちノロウイルスは 41 ロット (73.2%), 97 検体 (61.0%) から検出された (表 2)。

サポウイルスは nested PCR 法またはリアルタイム PCR 法により 49 ロット中 13 ロット (26.5%), 141 検体中 27 検体 (19.1%) から検出された。

A 型肝炎ウイルスおよび E 型肝炎ウイルスはそれぞれ 31 ロット 83 検体, 28 ロット

80 検体について検査したが、いずれも陰性であった (表 3, 4)。

#### (2) 産地別のウイルス検出率の比較

産地別のノロウイルス検出状況をロット別にみると、産地 A は GI が加熱調理用カキ 80.0% (12/15), 生食用カキ 61.5% (8/13), GII が加熱用カキ 100% (15/15), 生食用カキ 92.3% (12/13) と加熱調理用カキ, 生食用カキとも高い検出率を示した (表 3)。その他の産地では GI が加熱調理用カキ 0%~66.7%, 生食用カキ 0%~33.3%, GII が加熱調理用カキ 0%~100%, 生食用カキ 0%~80.0% で、産地ごとに検出率は大きく異なった。

検体別にみても (表 4), 産地 A は GI が加熱調理用カキ 58.5 (24/41), 生食用カキ 41.0% (16/39), GII が加熱用カキ 90.2% (37/41), 生食用カキ 76.9% (30/39) で加熱調理用カキ, 生食用カキとも高い検出率を示し、その他の産地では GI が加熱調理用, 生食用カキとも 0%~22.2%, GII が加熱調理用カキ 0%~100%, 生食用カキ 0%~25.0% であった。

サポウイルスの多くは産地 A のカキから検出された。

#### (3) 生食用カキと加熱調理用カキのウイルス検出率および定量値の比較

生食用カキと加熱調理用カキのノロウイルス検出率をロット別にみると、加熱用カキ 91.7% (22/24), 生食用 58.1% (18/31), 養殖カキ 100% (1/1), 検体別にみると加熱用カキ 83.3% (55/66), 生食用カキ 43.3% (39/90), 養殖カキ 100% (3/3) であった (表 2)。

サポウイルスの検出率はロット別では加熱調理用カキ 36.4% (8/22), 生食用カキ

18.5%(5/27), 検体別では加熱調理用カキ 30.2%(19/63), 生食用カキ 10.3%(8/78)であった(表 3, 4)。

ノロウイルスのリアルタイム PCR 法で定量値が得られた(実測値 10 未満のデータを含む)ものについて, 定量値の算術平均値を比較すると, GI では加熱調理用カキ 415 コピー数/g, 生食用カキ 133 コピー数/g, GII では加熱調理用カキ 4,109 コピー数/g, 生食用カキ 1,059 コピー数/g で, いずれも加熱調理用カキが 3~4 倍程度高い定量値を示した(表 5)。最大の定量値は加熱調理用カキで GI が 1,015 コピー数/g, GII が 16,520 コピー数/g, 生食用カキでは GI が 432 コピー数/g, GII が 5,271 コピー数/g であった。GI と GII の比較では, GII が約 10 倍程度高い定量値を示した。

## 2. 検出ウイルスの遺伝子型

118 株のノロウイルスが遺伝子型別され, GI(39 株)が 7 種類, GII(79 株)が 9 種類に分類された(表 6)。GII/4 が 51 株と最も多く, 全検出遺伝子型の 43.2%を占めた。GII/4 のうち 2012 変異株が 50 株(GII/4 の 98.0%)と大半を占め, 他の 1 株(2.0%)は 2006b 変異株であった。GII/4 2012 変異株は, ノロウイルスが検出されなかった産地 E を除き, すべての産地のカキから検出された。ノロウイルス検出率が高かった産地 A のカキから, 産地 B のカキのみから検出された GI/7, GII.18 (ブタ型ノロウイルス)を除くすべての遺伝子型のノロウイルスが検出された。

サポウイルスは 14 株が遺伝子型別され, 13 株(92.9%)が GI.2, 1 株が GI.6 であった。

## 3. リアルタイム PCR 法と nested PCR 法の比較

リアルタイム PCR 法による定量値と nested PCR 法の結果を比較した結果, nested PCR 法陽性検体のうち, リアルタイム PCR 法で 10 以上の定量値を示し陽性と判定されたものは, GI で 29 検体中 2 検体(6.9%), GII で 57 検体中 24 検体(42.1%)に過ぎなかった(表 7)。また, nested PCR 法陽性で, リアルタイム PCR 法で定量値が得られた(実測値: >0)ものは, GI が 23 検体(79.0%), GII で 50 検体(87.7%)であった。一方, nested PCR 法陰性で, リアルタイム PCR 法陽性(定量値 10 以上)と判定されたものは GI, GII とも認められず, 定量値が得られたものは GI が 14 例, GII が 6 例であった。

## D. 考察

### 1. カキのノロウイルス汚染状況

今回の調査結果から, 生食用カキ, 加熱調理用カキに関わらず, 市販カキの多くがノロウイルスに汚染されていることが明らかになった。今回の調査は, ノロウイルスの流行の最中である 2013 年 2 月に採取されたカキを対象としており, また, 単年の結果であることから, 一般的なカキのノロウイルス汚染率とは言えないが, 流行期の市販カキのノロウイルス汚染率は低くないものと考えられる。今後, 異なる時期に採取されたカキを含め, データの蓄積を図る必要がある。

### 2. 産地別のノロウイルス検出率の比較

ノロウイルス検出率は産地ごとに大きく異なった。検体の採取時期はすべて 2013 年 2 月であることから, この検出率

の違いは、当該時期の各産地で生産加工されたカキのノロウイルス汚染実態を反映しているものと考えられる。今回の調査では、各地域でのみ入手可能なものを含め、各地域で購入できた市販カキを検体に供したため、産地別の検体数は流通量を正確に反映するものではない。しかし、複数の検査機関で購入可能であったものは、各地で流通しており、その検査数はある程度流通量を反映しているものと思われる。

### 3. 生食用カキと加熱用カキのノロウイルス検出率、定量値の比較

生食用カキと加熱調理用カキのノロウイルス検出率および定量値を比較すると、検出率、定量値とも加熱調理用カキが高い値を示した。加熱用カキについては、加熱調理を徹底する必要があるとともに、生食用カキにも汚染のリスクがあることから、生食でのリスクがあることを正確にリスクコミュニケーションするとともに、流行期には生食を控えるなどの指導が必要である。

一方、産地を考慮すると、加熱調理用カキが生食用カキよりノロウイルス検出率が高いとは必ずしも限らなかった。

### 4. 検出ノロウイルスの遺伝子型

今回、多くの産地のカキから GII/4 2012 変異株が検出された。GII/4 2012 変異株は、2012/13 シーズンに大きな流行を起こしたが、それ以前には同ウイルスはほとんど検出されていない。そのため、カキから検出された GII/4 2012 変異株は、2012/13 シーズンにヒトで流行した株に由来すると考えられる。

また、カキから GI が 7 種類、GII が 9

種類と多彩な遺伝子型のノロウイルスが検出され、それらの遺伝子型のノロウイルスもヒトの間で流行したものと思われる。

### 5. リアルタイム PCR 法と nested PCR 法の比較

リアルタイム PCR 法と nested PCR 法の結果を比較した結果、nested PCR 法陽性検体のうち、リアルタイム PCR 法で実測値 10 以上を示し陽性と判定されたものは GII で 45%、GI では 7%に過ぎなかった。このことから、現在の陽性判定基準に基づくリアルタイム PCR による検査では、偽陰性となる場合が多く、カキの安全性を確保することが困難であることが示された。

一方、リアルタイム PCR 法で実測値が得られたものを陽性とした場合では、nested PCR 法陽性検体の GI で 79%、GII で 88%が陽性となり、両法の一致率は高くなったが、nested PCR 法陰性でリアルタイム PCR 陽性となるものが GI で 14 例、GII で 6 例認められた。この原因として、コピー数が少ないことによる結果の解離に加え、リアルタイム PCR 法の偽陽性の可能性も否定できない。そのため、陽性判断基準を下げる（たとえば 1 以上を陽性とする）と偽陽性と判定されるケースが増加する可能性がある。さらに、「食品のウイルス検査に関する精度管理（鈴木研究分担報告）」に記載されているように、検査機関ごとの定量値にバラつきが認められることから、実測値 10 以上を陽性と判断すること自体にも問題点を内在している。

これらのことから、現状としては、リ

リアルタイム PCR 法で検査を行う場合、①実測値 10 以上を示した場合は陽性、実測値 10 以下の定量値が得られた検体については判定保留として、nested PCR 法で再検査を行う、②通常のコンベンショナル PCR 法による増幅産物を鋳型 DNA としてリアルタイム PCR を行う nested リアルタイム PCR 法で実施するなどの対応が、カキの安全性を確保する上で望まれると考えられる。

## 6. その他の食品媒介ウイルスの汚染状況

サポウイルスはロット別では 27%、検体別では 19%から検出され、サポウイルスのカキの汚染率も低くないことが示された。このことから、カキ等の二枚貝関連食中毒事例ではサポウイルスが原因となる例が少なくないと考えられる。そのため、二枚貝関連事例では、ノロウイルスのみならずサポウイルスについても検査の必要性がある。

検出されたサポウイルスの遺伝子型は大半が GI.2 であった。2012/13 シーズンに食中毒事例や感染症事例から検出されたサポウイルスは GI.2 が多く、ヒトでの流行を反映しているものと考えられた。

一方、A 型肝炎ウイルスおよび E 型肝炎ウイルスは検査数が少ないものの、全て陰性であった。このことから、市販カキにおける両ウイルスの汚染リスクは高くないものと考えられる。しかし、A 型肝炎ウイルスはノロウイルスと同様の感染経路で感染し、国際的にも二枚貝を介しての食中毒事例が問題となっている。E 型肝炎ウイルスは水系感染を起

こし、また、イノシシ等の野生動物や豚にも感染することから、それらの排泄物が河川を汚染し、二枚貝に蓄積される危険性は存在するものと考えられる。そのため、A 型肝炎ウイルスや E 型肝炎ウイルスについても検査を継続し、汚染実態をより正確に把握する必要がある。

## E. 結論

カキの食品媒介性ウイルスの汚染状況および検査法の問題点の把握等を目的として、9 自治体において 2013 年 2 月に採取された国産の市販生カキ等を対象にウイルス検出を試み、以下の結果を得た。

1. ノロウイルスは 73%(41/56)、サポウイルスは 26%(13/49)のロットから検出され、A 型肝炎ウイルスおよび E 型肝炎ウイルスは陰性(それぞれ 31, 28 ロット検査)であった。
2. 加熱調理用カキは生食用カキと比較してノロウイルスの検出率、定量値とも高い値を示した。
3. 産地別のノロウイルス検出率は 0%~96%で大きく異なった。
4. ノロウイルスの遺伝子群別では、GII が高い検出率、定量値を示した。
5. 検出ウイルスの遺伝子型はノロウイルス GI が 7 種類、GII が 9 種類に分類され、その 42%は GII/4 2012 変異株が占めた。サポウイルスは GI.2 が大半を占めた。
6. リアルタイム PCR 法の定量値と nested PCR 法の結果を比較すると、nested PCR 法で陽性となった検体の多くは、リアルタイム PCR 法で陰性となった。

F. 研究発表

1. 論文発表

(各研究協力報告に記載)

2. 学会発表

(各研究協力報告に記載)

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 検査機関別・産地別検査検体数

検査機関	産地(都道府県)別検査検体数							計
	A	B	C	D	E	F	G	
①	15			4				19
②	1		1					2
③	6			6		6		18
④	21							21
⑤	12		3				3	18
⑥	12		3					15
⑦	6	6		3				15
⑧	6	12	12	6	12			48
⑨	1		2					3
計	80	18	21	19	12	6	3	159

表2 市販カキ等のノロウイルス検査結果

区分		GI 結果	GII 結果		ノロウイルス結果			
			-	+	-	+	検出率	
ロット別	加熱用	-	2	7	2	22	91.7%	
		+	0	15				
	生食用	-	13	8	13	18		58.1%
		+	0	10				
	養殖カキ	-	0	1	0	1		100.0%
	全体	-	15	16	15	41		73.2%
+		0	25					
検体別	加熱用	-	11	28	11	55	83.3%	
		+	1	26				
	生食用	-	51	19	51	39	43.3%	
		+	2	18				
	養殖カキ	-	0	3	0	3	100.0%	
	全体	-	62	47	62	97	61.0%	
		+	3	47				

結果は nested PCR 法の判定に基づく。

表3 市販カキ等の産地別ウイルス検査結果(ロット別)

ウイルス	区分	結果	産地(都道府県別)							計
			A	B	C	D	E	F	G	
NoV GI	加熱用	-	3	1	3	1		1		9
		+	12	2	0	0		1		15
		検出率(%)	80.0%	66.7%	0.0%	0.0%		50.0%		62.5%
	生食用	-	5	2	6	4	4			21
		+	8	1	0	1	0			10
		検出率(%)	61.5%	33.3%	0.0%	20.0%	0.0%			32.3%
	養殖カキ	-							1	1
		+							0	0
		検出率(%)							0.0%	0.0%
	全体	-	8	3	9	5	4	1		30
		+	20	3	0	1	0	1		25
		検出率(%)	71.4%	50.0%	0.0%	16.7%	0.0%	50.0%		45.5%
NoV GII	加熱用	-	0	0	1	1		0		2
		+	15	3	2	0		2		22
		検出率(%)	100.0%	100.0%	66.7%	0.0%		100.0%		91.7%
	生食用	-	1	2	5	1	4			13
		+	12	1	1	4	0			18
		検出率(%)	92.3%	33.3%	16.7%	80.0%	0.0%			58.1%
	養殖カキ	-							0	0
		+							1	1
		検出率(%)							100%	100.0%
	全体	-	1	2	6	2	4	0	0	15
		+	27	4	3	4	0	2	1	41
		検出率(%)	96.4%	66.7%	33.3%	66.7%	0.0%	100.0%	100.0%	73.2%
NoV 検査ロット数			28	6	9	6	4	2	1	56
SaV	加熱用	-	7	3	2	1		1		14
		+	7	0	0	0		1		8
		検出率(%)	50.0%	0.0%	0.0%	0.0%		50.0%		36.4%
	生食用	-	5	3	5	5	4			22
		+	5	0	0	0	0			5
		検出率(%)	50.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%			18.5%
	全体	-	12	6	7	6	4	1		36
		+	12	0	0	0	0	1		13
		検出率(%)	50.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	50.0%		26.5%
検査ロット数			24	6	7	6	4	2		49
HAV HEV	加熱用	-	5(4)*	3	3(2)	1	0			12(10)
	生食用	-	5	3	5(4)	2	4			19(18)
	検査ロット数			10(9)	6	8(6)	3	4		31(28)

\*:( )内は HEV の検査ロット数(HAV と同じ件数の場合は省略)。

結果は nested PCR 法の判定に基づく。

表中の NoV, SaV, HAV および HEV はそれぞれ、ノロウイルス, サボウイルス, A 型肝炎ウイルス, E 型肝炎ウイルスを示す(以下の表も同様)。



表4 市販生カキ等の産地別ウイルス検出状況(検体別)

ウイルス	区分	結果	産地(都道府県別)							計
			A	B	C	D	E	F	G	
NoV GI	加熱用	-	17	7	7	3		5		39
		+	24	2	0	0		1		27
		検出率(%)	58.5%	22.2%	0.0%	0.0%		16.7%		40.9%
	生食用	-	23	7	14	14	12			70
		+	16	2	0	2	0			20
		検出率(%)	41.0%	22.2%	0.0%	12.5%	0.0%			22.2%
	養殖カキ	-							3	3
		+							0	0
		検出率(%)							0.0%	0.0%
	全体	-	40	14	21	17	12	5	3	112
		+	40	4	0	2	0	1	0	47
		検出率(%)	50.0%	22.2%	0.0%	10.5%	0.0%	16.7%	0.0%	29.6%
NoV GII	加熱用	-	4	1	4	3		0		12
		+	37	8	3	0		6		54
		検出率(%)	90.2%	88.9%	42.9%	0.0%		100%		81.8%
	生食用	-	9	7	13	12	12			53
		+	30	2	1	4	0			37
		検出率(%)	76.9%	22.2%	7.1%	25.0%	0.0%			41.1%
	養殖カキ	-							0	0
		+							3	3
		検出率(%)							100%	100%
	全体	-	13	8	17	15	12	0	0	65
		+	67	10	4	4	0	6	3	94
		検出率(%)	83.8%	55.6%	19.0%	21.1%	0.0%	100%	100.0%	59.1%
NoV 検査検体数			80	18	21	19	12	6	3	159
SaV	加熱用	-	21	9	6	3		5		44
		+	17	0	1	0		1		19
		検出率(%)	44.7%	0.0%	14.3%	0.0%		16.7%		30.2%
	生食用	-	22	9	11	16	12			70
		+	8	0	0	0	0			8
		検出率(%)	26.7%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%			10.3%
	全体	-	43	18	17	19	12	5		114
		+	25	0	1	0	0	1		27
		検出率(%)	36.8%	0.0%	5.6%	0.0%	0.0%	16.7%		19.1%
検査検体数			68	18	18	19	12	6		141
HAV HEV	加熱用	-	11(10)*	9	7(6)	3	0			30(28)
	生食用	-	15	9	11(10)	6	12			53(52)
	検査検体数			26(25)	18	18(16)	9	12		83(80)

※:( )内は HEV の検査検体数(HAV と同じ件数の場合は省略)。

結果は nested PCR 法の判定に基づく。

表5 生食用カキと加熱調理用カキにおけるノロウイルス定量値の比較

項目	ノロウイルス GI			ノロウイルス GII		
	生食用	加熱用	全体	生食用	加熱用	全体
平均値	133.0	414.5	266.0	1,058.5	4,108.7	2,747.0
最小値	9.5	27.9	9.5	42.0	45.0	42.0
最大値	431.9	1,015.0	1,015.0	5,271.0	16,520.0	16,520.0
陽性検体数	19	17	36	25	31	56

リアルタイム PCR で実測値が得られた(>0)検体の集計。

数値はカキ中腸腺 1g 当たりのコピー数。

表6 検出ウイルスの遺伝子型

ウイルス	遺伝子群	遺伝子型	産地(都道府県別)							計	
			A	B	C	D	E	F	G		
NoV	GI	GI/1	4								4
		GI/3	3			1		1			5
		GI/4	18								18
		GI/6	5								5
		GI/7		3							3
		GI/13	1								1
		GI/14	1	1		1					3
		計	32	4	0	2	0	1	0		39
	GII	GII/2	2								2
		GII/4 2012	31	6	3	4		5	1		50
		GII/4 2006b		1							1
		GII/6	6		2				1		9
		GII/11	4	1							5
		GII/12	1								1
		GII/13	1	1							2
		GII/14	3	3						1	7
		GII/17	1								1
		GII.18		1							1
	計	49	13	5	4	0	5	3		79	
	GIとGIIの計		81	17	5	6	0	6	3		118
SaV	GI	GI.2	12					1		13	
		GI.6			1					1	
		計	12	0	1	0	0	1	0	14	

表7 リアルタイムPCR法の定量値と nested PCR法の結果の比較

項目		定性判定	NoV GI 定量結果(実測値)			NoV GII 定量結果(実測値)		
			-	<10	≥10	-	<10	≥10
全体		-	31	14		14	6	
		+	6	21	2	7	26	24
区分別	加熱用	-	13	2		4		
		+	4	13	2	1	15	16
	生食用	-	16	11		10	6	
		+	2	8		3	11	8
	養殖カキ		-	2	1		3	
			+					
検査機関別	②	-	2			1		
		+					1	
	③	-	12			3	1	
		+	5	1		1	11	2
	④	-	1	4			1	
		+		14	2		2	18
	⑤	-	12	4		5		
		+	1	1		6	7	
	⑦	-	4	6		3	5	
		+		5			4	3
	⑨	-				2		
		+						1

定性判定は nested PCR 法の結果に基づく。

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検出法に関する研究

平成 25 年度 研究協力報告書

本村	和嗣	佐藤	直人
吉澄	志磨	植木	洋
三上	稔之	森	功次
田村	務	小林	慎一
入谷	展弘	三好	龍也
重本	直樹	山下	育孝
山本	美和子	原田	誠也
吉富	秀亮		

平成 26 (2014) 年 3 月

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検出法に関する研究」  
研究協力報告

2012-2013 シーズン、本邦におけるノロウイルス流行の分子疫学

研究協力者 本村 和嗣 大阪大学微生物病研究所  
研究分担者 田中 智之 堺市衛生研究所  
研究協力者 Norovirus Surveillance Group of Japan\*

研究要旨

本研究では、自然界でのノロウイルスの分子進化機序を明らかにすることを目的とし、直近7年間に全国各地で発生した計382のGroup II type4 (GII.4) ノロウイルス感染症例について、ウイルス ORF2-3全長の配列情報を取得し、ゲノム配列の進化系統ならびに立体構造解析を調べた。更に、昨年、大流行したSydney\_2012の全長ゲノム配列が判明した20株についてはゲノム構造を調べた。系統樹解析を行なった結果、(1)異なる起源をもつ3種類のGII.4株、2006b、2009a (New\_Orleans 2009)、Sydney\_2012が流行していたことがわかった。更に、(2) Sydney\_2012は、昨シーズン、国内で流行した主要な株であることがわかった。(3) 抗原エпитープA-Eの領域に関して、Sydney\_2012は、2006bと比較して、6箇所、特徴的変異が見つかった。(4) ゲノム構造解析の結果、Sydney\_2012はGII.4亜株間のキメラウイルスで、ORF1がGII.4\_2007aであり、ORF2と3はGII.4であった。Sydney\_2012は、抗原性を大きく変え、集団免疫より逃避できた可能性が高いことが示唆された。

A. 研究目的

我々は、科学的知見に基づくヒトノロウイルスの感染症対策に役立てるために、全国の衛生研究所と国立感染症研究所(ウイルス第二部と病原体ゲノム解析研究センター)が協力して「Norovirus Surveillance Group of Japan」を立ち上げ、2006年より国内で流行したヒトノロウイルスの全ゲノム情報の収集と解析を実施している。解析情報には、流行株の性質を規定する全ゲノムの配列情報に加

えて、流行株の遺伝的特徴、蛋白質の構造と機能の特徴、自然界での経時変化の特徴などが含まれる。

我々は、過去5シーズンにわたるノロウイルス流行株の全ゲノム解析(n=325)により、国内で発生した流行株は、ゲノム組換えにより複製能と免疫逃避能をバランスよく変化させ、適応変化能力を高めたキメラウイルスであることを報告してきた。日本では、昨シーズン、2006-2007秋冬期に次ぐ、急性胃腸炎感染者数の増

加が報告された。今回は、2012-2013 秋冬期に全国各地で流行したノロウイルスについて、過去に流行した株と比較し、流行株の (1) 種類、分布、動態、(2) 特異的変異、(3) 構造の特徴、(4) 発生機構を明らかにする。これらの解析をもとに流行発生のしくみを検討し、流行株の検出、サーベイランス、リスク評価、創薬やワクチン開発等に幅広く役立つ重要な科学基盤を提供すると考えている。

## B. 研究方法

2006年05月15日から2013年03月10日の間に、20の道府県で発生し、各道府県の衛生研究所にてノロウイルス感染症と確定した537症例を対象とした。糞便中のノロウイルスゲノムRNAを抽出した。糞便にPBSを加え10%懸濁液を作成し、11000×g、20分間遠心の後、その上清をRNA抽出液とした。このRNA抽出液より、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を使って、ノロウイルスRNAを抽出した後、G2SKFとOligo dT<sub>30</sub>SXN (Katayama K et. al; Virology. 2002 Aug 1;299(2):225-239.) を用いてcDNAを合成した。cDNAをtemplateにして、4種のGII.4特異的プライマーを用いて相互に重複するNoVゲノムcDNA断片2種(約5.3kb, 2.5kb)をPCR増幅した。ABI3730 (Applied Biosystems) を用い、direct sequence法により、塩基配列を調べた。345の糞便試料について、ヒトノロウイルス全長ゲノム(約7.5 kbps)の塩基配列を得た。ゲノム配列の進化系統を近隣接合法、最尤法により推定した。ゲノム構造をbootscanning plots法、探索的系統分析法、情報部位分析法により解析した。

カプシドタンパク質立体構造を、Molecular Operating Environment (MOE) の解析ツールを用いて、ホモロジーモデリング法により構築し、特徴的なアミノ酸変異の立体的位置を、PyMOL解析ツールを用いて、構造上表示した。

(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

我々は、これまでに国立感染症研究所ウイルス二部と全国各地の衛生研究所の協力を得て現在、2006年から2011年までの5年間に日本で流行したノロウイルス流行株のゲノム全長の解析を行っている。今年度は、昨シーズン流行したウイルス株のORF2-3領域について解析した。系統樹解析を行なった結果、

- 1) 異なる起源をもつ3種類のGII.4株、2006b、2009a (New\_Orleans 2009)、Sydney\_2012が流行していたことがわかった。
- 2) Sydney\_2012は、昨シーズン、国内で流行した主要な株であることがわかった。
- 3) Baric博士らが提唱した抗原エピートープA-Eの領域に関して、Sydney\_2012は、2006bと比較して、6箇所、特徴的変異が見つかった。
- 4) ゲノム構造解析の結果、Sydney 2012はキメラウイルスで、ORF1がGII.4\_2007aであり、ORF2と3はGII.4であった。2006bは、過去5シーズンにわたり、日本国内で流行していた主

要な株である。

このことは、ヒト集団において、2006b に対する集団免疫が浸透していることが示唆される。Sydney\_2012 は、抗原性を大きく変え、集団免疫より逃避できた可能性が高いことが示唆された。

#### D. 考察

我々は、2011年度の研究報告書で、ヒト集団の免疫淘汰圧から逃避できた、遺伝子型や新亜株の流行、それに伴い遺伝子型置換がおこる可能性を指摘していた。2012-2013シーズンに、Sydney\_2012 亜株が出現し、日本国内だけでなく世界で大流行した。ゲノム構造の解析の結果、ORF1がGII.4\_2007aであり、ORF2と3はGII.4のGII.4亜株間のキメラウイルスであることがわかった。GII.4\_2007aは、2007年11月-12月にかけて近畿地方で局地的に発生した集団発生事例で検出された。2006-2013年シーズンにおいて、発生したのは、2007年のみであった。その後、どこで維持されていたのかは不明である。が、ORF1がGII.4\_2007aの複製蛋白質とカプシドの遺伝情報が効率的に交換され、新たな性質（免疫逃避能と増殖能）を獲得した変異ウイルスが発生し、その中で免疫逃避能力と高い感染・増殖能力をバランスよく獲得したウイルスが、ヒト集団内で広がったと推察している。

今後、更に、Sydney\_2012の全長ウイルスゲノムを明らかにして、ORF1について情報を蓄積し特徴的な変異の抽出やその意気についての考察を続けていきたい。2006bの流行規模が縮小しているため、今後、ゲノム上、多様性、および保存箇所

について明らかにし、タンパク質の構造がわかっている場合は、立体構造上配置し、その意義について考察していきたい。

#### E. 結論

1. 2012-2013におけるノロウイルスの主な流行株は Sydney\_2012 であった。
2. Sydney 2012 はキメラウイルスで、ORF1がGII.4\_2007aであり、ORF2と3のGII.4である2006bは、過去5シーズンにわたり、日本国内で流行していた主要な株である。
3. ゲノムの多様性はノロウイルスがヒト集団内で生き残るための手段であり、その手段を予測する試みはヒト集団の流行を予測することに繋がる。

#### F. 研究発表

1. 論文発表
  - 1) 田中智之. ノロウイルス食中毒. 臨床とウイルス(2013), 41(1);44-51
2. 学会発表
  - 1) 本村和嗣、大出裕高、横山 勝、中村浩美、伊藤 彩、岡 智一郎、片山和彦、野田 衛、武田直和、田中智之、佐藤裕徳。ノロウイルス感染者体内における混合感染の実態。第61回日本ウイルス学会学術総会 2013年11月10日~12日、神戸市
  - 2) 佐藤裕徳、横山 勝、本村和嗣、中村浩美、岡 智一郎、片山和彦、武田直和、野田 衛、田中智之。ノロウイルスGII.4\_2006bのカプシドと酵素に働くアミノ酸変化の制約。第61回日本ウイルス学会学術総会 2013年11月10日~12日、神戸市

- 3) 斎藤博之、東方美保、岡智一郎、片山和彦、田中智之、野田 衛。パンソルビン・トラップ法によって得られたノロウイルス RNA の効率的な検出に関する検討。第 61 回日本ウイルス学会学術総会 2013 年 11 月 10 日～12 日、神戸市
- 4) 三好龍也、家永信彦、柏井健作、吉田永祥、岡山文香、芝田有理、内野清子、田中智之。市販のノロウイルス抗原検出 IC キットの比較検討。第 61 回日本ウイルス学会学術総会 2013 年 11 月 10 日～12 日、神戸市
- 5) 田中智之、左近直美、三好龍也、上林大起、内野清子、加瀬哲男。大阪府における 2012/13 シーズンのノロウイルス集団感染の実情。第 61 回日本ウイルス学会学術総会 2013 年 11 月 10 日～12 日、神戸市
- 6) 重本直樹、谷澤由枝、島津幸恵、高尾信一、田中智之、野田、衛、福田伸治。蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法による小児胃腸炎患者便からの下痢症ウイルスの検出。第 61 回日本ウイルス学会学術総会 2013 年 11 月 10 日～12 日、神戸市

#### 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

#### \*Members of Norovirus Surveillance Group of Japan

吉澄志磨先生（北海道立衛生研究所）、三上稔之先生（青森県環境保健センター）、斎藤博之先生（秋田県健康環境センター）、蛇口哲夫先生、高橋朱実 先生、高橋知子先生、佐藤直人先生（岩手県環境保健研究センター）、植木洋先生（宮城県保健環境センター）、田村務先生（新潟県保健環境科学研究所）、滝澤剛則先生、名古屋真弓 先生（富山県衛生研究所）、篠原美千代先生（埼玉県衛生研究所）、篠崎邦子先生（千葉県衛生研究所）、吉田徹也先生（長野県環境保全研究所）、小林慎一先生（愛知県衛生研究所）、東方美保先生、小和田和誠先生（福井県衛生環境研究センター）、内野清子先生、三好龍也先生（堺市衛生研究所）、入谷展弘先生（大阪市立環境科学研究所）、福田伸治先生、重本直樹先生（広島県立総合技術研究所保健環境センター）、伊藤文明先生、阿部勝彦先生、山本美知子先生（広島市衛生研究所生物科学部）、飯塚節子先生（島根県保健環境科学研究所）、近藤玲子先生、山下育孝先生（愛媛県立衛生環境研究所）、船津丸貞幸先生、増本久人先生（佐賀県衛生薬業センター）、原田誠也先生（熊本県保健環境科学研究所）、松岡由美子先生（熊本市環境総合研究所）、岩切章先生（宮崎県衛生環境研究所）



図1. 日本におけるGII.4亜株の年次推移

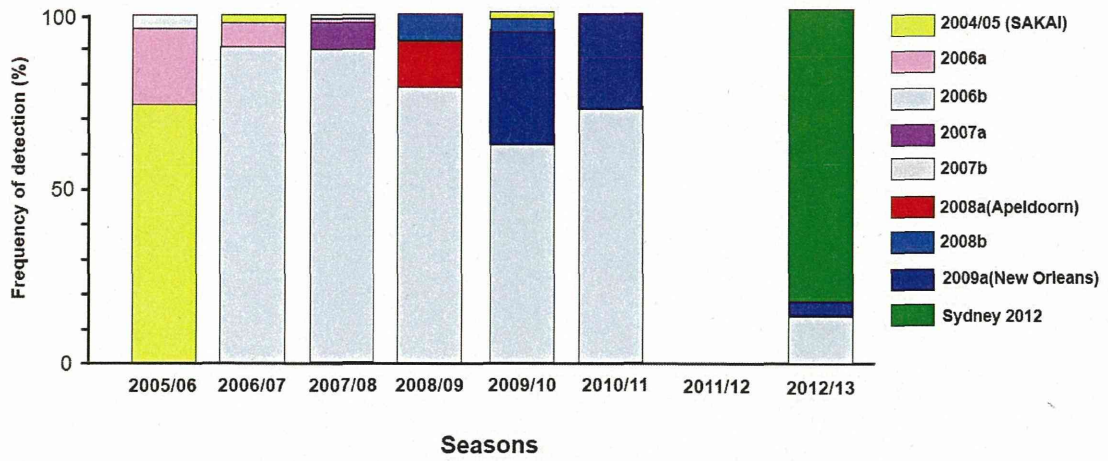
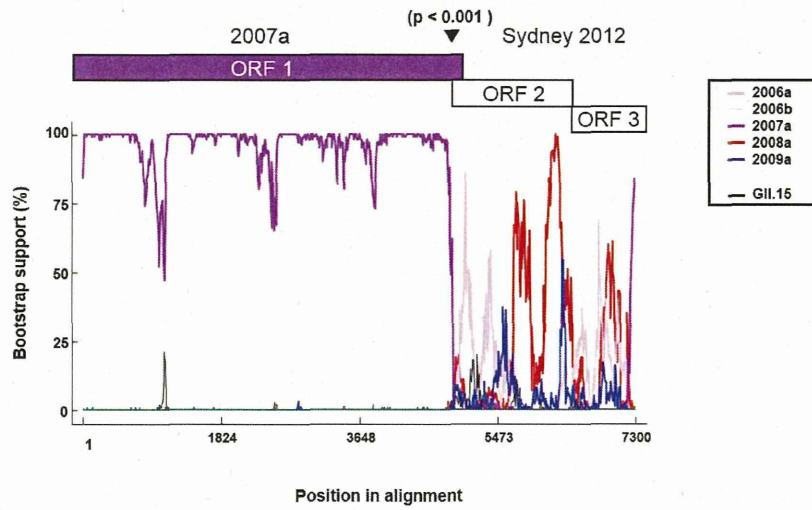


図2. Sydney 2012類似株 (n=5) の全長ゲノム構造解析



RDP ver. 4.0 (Recombination Detection Program)

## 市販カキからの腸管系ウイルスの検出

研究協力者	吉澄 志磨	北海道立衛生研究所
研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所

### 研究要旨

カキのウイルス汚染状況の把握を目的として、2013 年 2 月下旬に加工された国産の市販生カキを対象に、1 ロットあたり 6 検体について 4 種類の腸管系ウイルスの検索を行った。生食用カキは、5 海域 6 ロットのうち 3 ロットからノロウイルス (NoV) が検出された。このうち 1 ロットの NoV 陽性率は 100% であり、すべての検体において複数の遺伝子型が確認された。また、サポウイルス (SaV) の陽性率も 67% と高かった。他の 2 ロットは NoV の GII/4 Sydney2012 のみの検出であり、陽性率は低かった。2 海域 2 ロットの加熱用カキの NoV 陽性率は 83%, 50% と高く、いずれも複数の遺伝子型の蓄積が認められた。1 ロット 1 検体からは SaV も検出された。生食用、加熱用ともに、最も多くの検体から検出された NoV 遺伝子型は GII/4 Sydney2012 であった。今回、加熱用だけでなく生食用のカキでも、ロットによっては高いウイルス陽性率を示しており、ヒトの健康被害の原因として注意が必要と考えられた。

### A. 研究目的

我が国において、食中毒患者の約半数はノロウイルス (NoV) 感染によるものである。NoV による食中毒の原因食品としては、例年 1 割前後をカキが占めており、カキにおける NoV 汚染のリスク管理の必要性が示されている。カキの NoV 汚染は、海域での生育時に海水とともに NoV を取り込み、それが中腸腺に蓄積されることが主な原因である。中腸腺には海水中の NoV 以外の腸管系ウイルスも蓄積されることから、NoV だけでなく他の腸管系ウイルスについても、カキ喫食による健康被害

の危険性について検討を行う必要がある。そこで今回、カキのウイルス汚染状況の把握を目的として、同じ時期に加工された国産の生カキを対象に、NoV など 4 種類の腸管系ウイルスについて検索を行った。

### B. 研究方法

#### 1. 材料

2013 年 2 月 24 日に札幌市内で購入した国産 (5 道県分) の市販生カキを調査対象とした。購入品は、生食用が 5 海域 6 ロット (a~f; e と f は同一海域で採

取された別ロット品)、加熱用が2海域2ロット(g, h)である。加工年月日は2013年2月22日または23日であった。これら8ロットの生カキをそれぞれ2パックずつ用意し、カキの中腸腺1.5~2.0gを1検体として、1パックにつき3検体を調査に用いた。

## 2. 検索ウイルス

NoV、サポウイルス(SaV)、A型肝炎ウイルス(HAV)、E型肝炎ウイルス(HEV)について検索を行った。

## 3. 方法

10%中腸腺乳剤に1ml当たり2.5mgの $\alpha$ -アミラーゼ(和光純薬)を添加し、37°C1時間の処理後、ポリエチレングリコール沈殿法により濃縮を行った。濃縮沈査に、使用した乳剤10ml当たり400 $\mu$ lの0.5%Zwittergent加PBS(-)を加えて再浮遊させ、これをRNA抽出材料とした。RNA抽出にはHigh Pure Viral RNA Kit(Roche)を使用した。結合バッファーにRNA抽出材料200 $\mu$ lを加えて良く混合し、カラムに通した後、DNase I(Roche)を乗せて15分間の処理を行った。阻害剤除去処理と二度の洗浄の後、溶出バッファー50 $\mu$ lを加えて遠心し、回収された溶液を抽出RNAとした。cDNAは、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(life technologies)によりランダムプライマーを用いて合成した。このcDNAを鋳型とし、Nested PCRにより各ウイルスの遺伝子の増幅を試みた。使用プライマーは次に示す通りである。NoVは、厚生労働省通知の方法(食安監発第0514004号、平成19年5月14日)に従い、GI検出用として1st;

COG1F/G1-SKR、nested; G1-SKF/R、GII用として1st; COG2F/G2-SKR、nested; G2-SKF/R、GIV用として1st; ALPF/G2AL-SKR、nested; G2-SKF/G2AL-SKRを使用した。SaVは1st; SaV124F, 1F, 5F/SV-R13, R14、nested; 1245Rfwd/R2 (Kitajima et al, Appl Environ Microbiol, 76:2010)を、HEVは1st; HEV-F1/HEV-R2、nested; HEV-F2/HEV-R1(国立感染症研究所発行、E型肝炎検査マニュアル)を、HAVは1st; 2F/1R-A、nested; 2F/2R(野田ら、厚生労働科学研究「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」平成23年度総括・研究分担報告書)を使用した。

増幅産物について、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。塩基の混合がみられた検体については、Mighty TA-Cloning Kit (TaKaRa)を用いてクローニングを行い、それぞれ16クローンの塩基配列を決定した。この塩基配列を基に、近隣結合法により系統樹を作成し、遺伝子型の同定を行った。NoVのGII/4型のみ亜型分類も行った。

(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

市販生カキからのウイルスの検出状況を表1に示した。

生食用カキでは、6ロット(a~f)のうち3ロット(a, c, d)からウイルス遺伝子が検出された。ロットcとdのウイルス陽性

率はそれぞれ 1/6 と 2/6 であり、検出されたウイルスは、いずれも NoV の GII/4 Sydney2012 のみであった。一方、ロット a のウイルス陽性率は 6/6 と非常に高く、検出ウイルスは NoV (GI/4, GI/11, GI/14, GII/2, GII/4 Sydney2012, GII/6, GII/11, GIV/1)、SaV (GI/2) と多岐にわたった。

加熱用カキは、2 ロット (g, h) ともウイルス遺伝子が検出された。ロット g のウイルス陽性率は 5/6 であり、検出ウイルスは NoV (GI/7, GII/4 2006b, GII/4 Sydney2012, GII/11) とブタ型 NoV であった。ロット h のウイルス陽性率は 3/6 であり、NoV (GII/4 Sydney2012, GII/6) と SaV (GI/6) が検出された。

生食用、加熱用カキのいずれにおいても、HAV 及び HEV の遺伝子は検出されなかった。

## D. 考察

### 1. 採取海域による違い

今回の調査に用いた生食用カキの採取海域は 5 カ所であったが、2 海域では最もウイルス陽性率が低く 0% であったのに対し、最も高いものは 100% (1 海域) であった。いずれのロットも 2013 年 2 月 22 日または 23 日に加工されたものであり、同じ時期に採捕されたと考えられるが、採取海域によりウイルス陽性率が大幅に異なっていたことが示された。生食用のカキであっても健康被害の原因となり得ることから、モニタリング調査と注意喚起が必要である。

### 2. 生食用と加熱用の違い

養殖県が同じ 2 セット ; 生食用 b と加熱用 g、生食用 c と加熱用 h についてウ

ルス陽性率を比較したところ、ロット b, g の陽性率はそれぞれ 0/6, 5/6、ロット c, h は 1/6, 3/6 であり、どちらも加熱用の方が大幅に高かった。加熱用カキについては、加熱調理を徹底する必要がある。

### 3. 検出ウイルスの種類

ウイルス陽性検体は、NoV 単独検出か、NoV と SaV の混合検出のどちらかであり、カキ喫食による健康被害としては NoV の関与が大きいと考えられた。また、NoV 陽性率の高かったロット a, g, h では複数の NoV 遺伝子型の蓄積が確認され、特に、NoV 陽性率が 100% であったロット a は、他のロットに比べて NoV の GI の検出率が非常に高く (83%)、SaV も高率 (67%) に検出された。以上の結果から、NoV 汚染率の高いロットでは、NoV の複数の遺伝子型や NoV 以外のウイルスの蓄積の可能性も高いと推測された。

### 4. NoV 流行株とカキへの蓄積

今回の調査において、カキから最も多く検出された NoV 遺伝子型は GII/4 Sydney2012 であり、ウイルス陽性カキ 17 検体中 15 検体からの検出であった。ウイルス陽性検体が確認されたのは 4 海域 5 ロットであったが、海域に関わらずすべてのロットで GII/4 Sydney2012 の検出率が最も高かった。

ヒトでの NoV 流行状況を確認するため、全国の地方衛生研究所から NoV の塩基配列が登録されている CaliciWeb ([2http://teine.cc.sapmed.ac.jp/~calicinew/](http://teine.cc.sapmed.ac.jp/~calicinew/)) を利用した。今回調査対象としたカキの採捕時期は 2013 年 2 月中旬頃と考えられることから、約 1 ヶ月前に遡る