

2013年1～2月に発生した胃腸炎患者からの検出遺伝子型を確認した。その結果、NoVについてはGII/4 Sydney2012が登録延べ数の約75%を占めており、この時期に、全国的にGII/4 Sydney2012の流行があったことが示唆された。

以上のように、全国的に流行していたと考えられるNoV遺伝子型が、カキからも採取海域に関わらず高率に検出されており、ヒトでのウイルス流行状況とカキのウイルス蓄積に関連性があることが示された。ただ、NoV GI/14は、2011/12シーズンの患者由来株としてCaliciWebへの登録はないが、カキからは検出されていた。NoVに感染しても症状がでない或いは軽微であるケースが少なからず存在することから、胃腸炎患者由来のデータよりも下水由来のデータの方がヒトでの感染状況をより反映していると考えられる。全国の下水からのNoV検出情報を集約するシステムがあれば、二枚貝のNoV汚染状況の解析にも有用であると考えられる。

#### 5. ヒト型以外のNoVの検出について

今回、生食用カキ1検体からブタ型のNoVが検出された。カキの検査では、動物由来と考えられるNoVや遺伝子群/型不明のNoVが検出されるケースがあるが、これらのウイルスがヒトの健康被害に関与するかどうかの判断は難しい。ヒト型以外のNoVがヒトに感染するかどうか、発症に関わるかどうかについて、今後さら

なる情報の集積が必要である。

#### E. 結論

1. 生食用カキであっても、ロット（採取海域）によっては高いウイルス陽性率を示した。
2. 加熱用カキは生食用カキに比べてウイルス陽性率が高い傾向にあった。
3. NoV陽性率の高いロットからはSaVも検出された。
4. ヒトでの流行遺伝子型と考えられるGII/4 Sydney2012がカキからも高率に検出された。
5. ブタ型NoVがカキから検出された。ヒト型以外のNoVがヒトの健康被害に関与するかどうかについて、検討が必要である。

#### 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
3. その他：なし

表1 市販生カキからのウイルス検出状況

区分	ロット	養殖地 (県-海域)	加工年月日	検体 No. ※1	PCR検査結果 (陽性: 遺伝子群/型を記載、陰性:-)					
					NoV			SaV	HAV	HEV
					I	II	IV			
生 食 用	a	A-13	2013年2月23日	1	GI/4	GII/4.2012 GII/6	-	-	-	-
				2	GI/11	GII/2	-	-	-	-
				3	-	GII/4.2012 GII/6	-	GI/2	-	-
				4	GI/14	GII/4.2012 GII/6 GII/11	-	GI/2	-	-
				5	GI/11	GII/4.2012	GIV/1	GI/2	-	-
				6	GI/4	GII/4.2012 GII/6	-	GI/2	-	-
	b	B-3	2013年2月22日	1	-	-	-	-	-	-
				2	-	-	-	-	-	-
				3	-	-	-	-	-	-
				4	-	-	-	-	-	-
				5	-	-	-	-	-	-
				6	-	-	-	-	-	-
	c	C-1	2013年2月22日	1	-	-	-	-	-	-
				2	-	-	-	-	-	-
				3	-	-	-	-	-	-
				4	-	-	-	-	-	-
				5	-	-	-	-	-	-
				6	-	GII/4.2012	-	-	-	-
	d	D-1	2013年2月23日	1	-	GII/4.2012	-	-	-	-
				2	-	-	-	-	-	-
				3	-	-	-	-	-	-
				4	-	GII/4.2012	-	-	-	-
				5	-	-	-	-	-	-
				6	-	-	-	-	-	-
e	E-1	2013年2月22日	1	-	-	-	-	-	-	
			2	-	-	-	-	-	-	
			3	-	-	-	-	-	-	
			4	-	-	-	-	-	-	
			5	-	-	-	-	-	-	
			6	-	-	-	-	-	-	
f	E-1	2013年2月22日	1	-	-	-	-	-	-	
			2	-	-	-	-	-	-	
			3	-	-	-	-	-	-	
			4	-	-	-	-	-	-	
			5	-	-	-	-	-	-	
			6	-	-	-	-	-	-	
加 熱 用	g	B-1	2013年2月22日	1	-	-	-	-	-	
				2	-	GII/4.2012 GII/4.2006b GII/11	-	-	-	-
				3	GI/7	GII/4.2012	-	-	-	-
				4	-	GII/4.2012	-	-	-	-
				5	-	GII/4.2012 ブタ型 ※2	-	-	-	-
				6	-	GII/4.2012	-	-	-	-
	h	C-1	2013年2月23日	1	-	-	-	-	-	
				2	-	GII/4.2012 GII/6	-	-	-	-
				3	-	-	-	-	-	-
				4	-	-	-	-	-	-
				5	-	GII/4.2012	-	-	-	-
				6	-	GII/6	-	GI/6	-	-

※1: 1ロットにつき2パックずつ使用しており、No.1~3、No.4~6がそれぞれ同一パックの検体である

※2: SwNoV/OHQW101/2003/US (AY823304) に近縁

平成 25 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

## 市販カキの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

### 研究要旨

市販カキの汚染実態を明らかにするため、平成 25 年 2 月に購入した市販カキからノロウイルス (NoV) やサポウイルス等の検出を行った。カキ 11 検体から NoV GI /1、GI /7、GI /11、GI /14、NoV GII /4、GII /4/2012、GII /11、GII /12、GII /13、GII /14、SaV GI /2 が検出された。

市販カキの遺伝子解析結果、複数の NoV 遺伝子の保有が判明出来た。保有ウイルス量に個体差があり、ノロウイルス感染における症状の程度や潜伏時間が摂取ウイルス数に関連すると仮定すると、喫食するカキの個体や数によりそれらが異なることが示唆される。

### A. 研究目的

2012/13 シーズンのノロウイルス(NoV)の流行は、2012 年に初めて検出された NoV GII/4/2012 変異株が主流であった。カキはノロウイルス食中毒の主な原因食品として知られている。本研究は昨シーズンの NoV の流行株やサポウイルス (SaV)、A 型肝炎ウイルス (HAV)、E 型肝炎ウイルス (HEV) 等の保有状況調査を実施することにより市販カキの汚染実態を明らかにすることを目的とした。

### B. 研究方法

#### 1. 材料

平成 25 年 2 月に購入した市販カキ 15 検体を用いた。購入カキは A 県産 (生食用 2 ロット[No.7-12]、B 県産 (生食用 1 ロット[No.4-6]、加熱調理用 1 ロット[No.1-3]、D 県産 (加熱調理用 1 ロット[No.13-15]) であった。なお、[ ]内は表 1 の検体番号(No.)を示す。

#### 2. 検出方法

カキの濃縮法は、「食品中の病原ウイルスの検出法に関する研究」から示された「二枚貝 (カキ) からのウイルスの濃縮法」に基づき実施した。カキの中腸腺を秤量し、

約 2g を 1 検体とした。10%乳剤をアミラーゼ処理後、PEG 濃縮し RNA 抽出した。NoV は通知法（平成 19 年 5 月 14 日食安監発第 0514004 号厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知）に基づき、Real-time PCR 法によりウイルス遺伝子の定量を行い、RT-PCR 法によりウイルス遺伝子を検出した。NoV 陽性株は DNA ダイレクトシーケンシング法にて塩基配列を決定し、系統樹解析を行った。SaV は Kitajima ら（Kitajima, Appl Environ Microbiol, 76,2010）の方法、HAV は野田らの方法（平成 23 年度分担報告書改良法）および HEV は E 型肝炎検査マニュアル（国立感染症研究所）に基づき RT-PCR 法によりウイルス遺伝子検出を行い、SaV、HAV、HEV 陽性株は NoV 同様 DNA 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. 検出結果

平成 25 年 2 月に購入した市販カキの NoV の結果は、NoV GI が 15 検体中 11 検体から検出され、 $9.50 \times 10^0 \sim 3.17 \times 10^2$  コピー/g であった。NoV GII は 15 検体中 12 検体から検出され、 $4.20 \times 10^1 \sim 8.82 \times 10^2$  コピー/g であった（図 1）。SaV は 15 検体中 1 検体から検出された。HAV および HEV は検出されなかった。

### 2. 解析結果

シーケンシング解析の結果、NoV では 11 検体、SaV では 1 検体から遺伝子解析ができた。NoV では、No1、2 が GII /14、No3

が GI /14 および GII /14、No4 が GI /7 および GII /4/2012Sydney、No5 が GI /7、No6 が GII /13、No7 が GI /14 と GII /11、No8 が GI /1 と GII /4、No9 と No11 が GII /11、No12 が GI /11 および GII /12 であり、SaV では No8 が GI /2 であった（表 1、図 2、3）。

## D. 考察

平成 25 年 2 月に購入した市販カキの遺伝子解析の結果からカキ 11 検体から NoV GI /1、GI /7、GI /11、GI /14、NoV GII /4、GII /4/2012Sydney、GII /11、GII /12、GII /13、GII /14、SaV GI /2 の 11 種類の遺伝子が検出された。カキ No3 からは NoV GI /14 および NoV GII /14、No4 からは NoV GI /7 および NoV GII /4/Sydney、No7 からは NoV GI /14 および NoV GII /11、No8 からは NoV GI /1 および NoV GII /4、No12 からは NoV GI /11 および NoV GII /12 が検出され、同一検体から複数の遺伝子が検出されたことからカキの喫食による集団事例患者から NoV GI と NoV GII が同時に検出される事例が発生する可能性が推測された。また、定量検出からカキに含まれるウイルス量の個体差が確認された。

今回、市販カキから多種の NoV が検出され、生カキ喫食により NoV の感染リスクが非常に高いことが示唆された。

## E. 結論

市販カキから、10 遺伝子型の NoV、1 遺伝子型の SaV の遺伝子が検出された。複数の NoV を保有に加えて保有ウイルス量に個体差があり、発症がウイルス数に関与すると仮定すれば喫食するカキ数により発症までの時間や症状の軽重等が異なることが考

えられる。

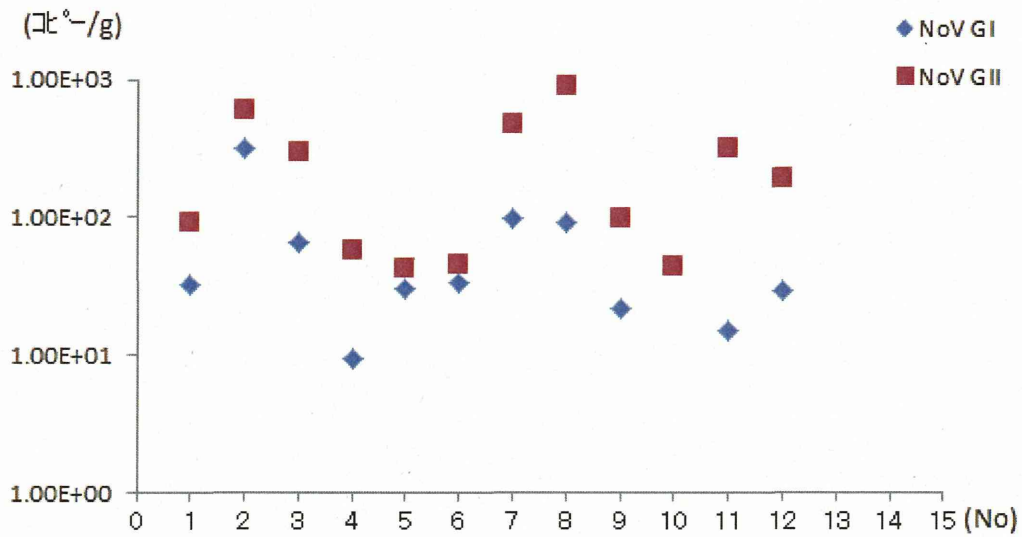


図 1. NoV GI、NoV GII のウイルス量の比較

表 1. 市販カキにおける NoV GI、NoV GII、SaV 検出状況

No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
NoVG I /1								■							
NoVG I /7				■	■										
NoVG I /11												■			
NoVG I /14			■				■								
NoVG II /4								■							
NoVG II /4/2012Sydney				■											
NoVG II /11							■		■		■				
NoVG II /12												■			
NoVG II /13						■									
NoVG II /14	■	■	■												
SaVG I /2								■							

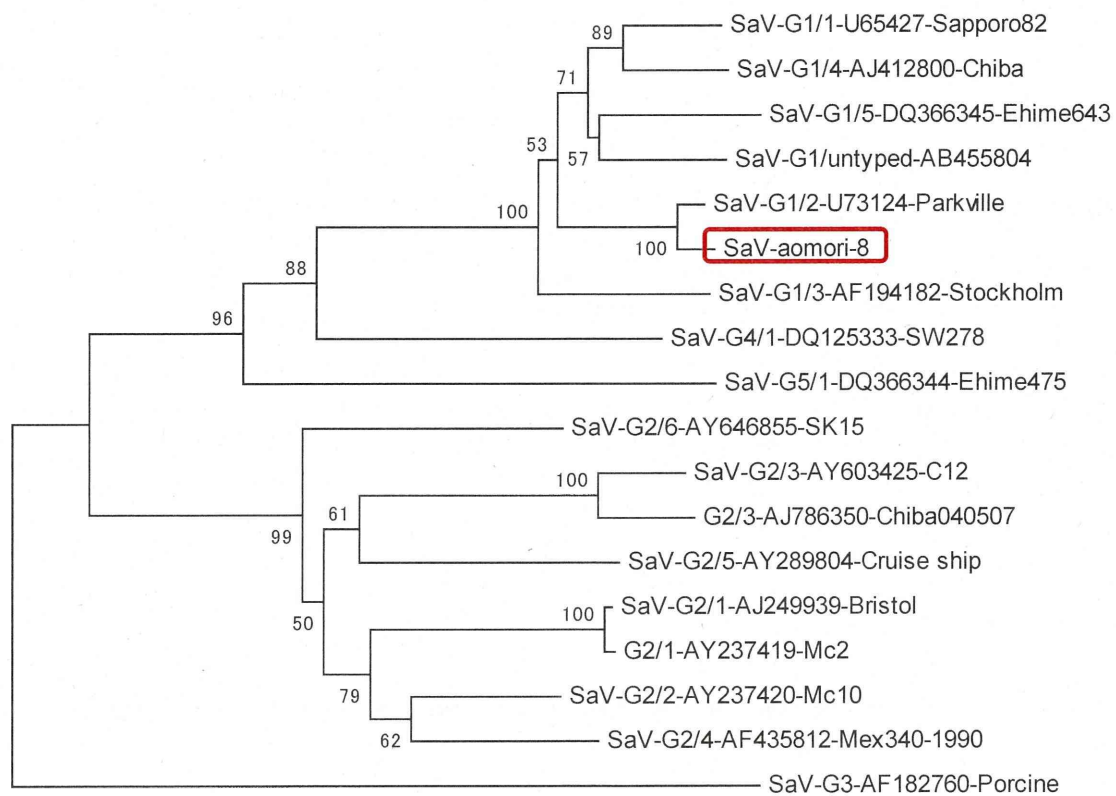


図 2. SaV の系統樹

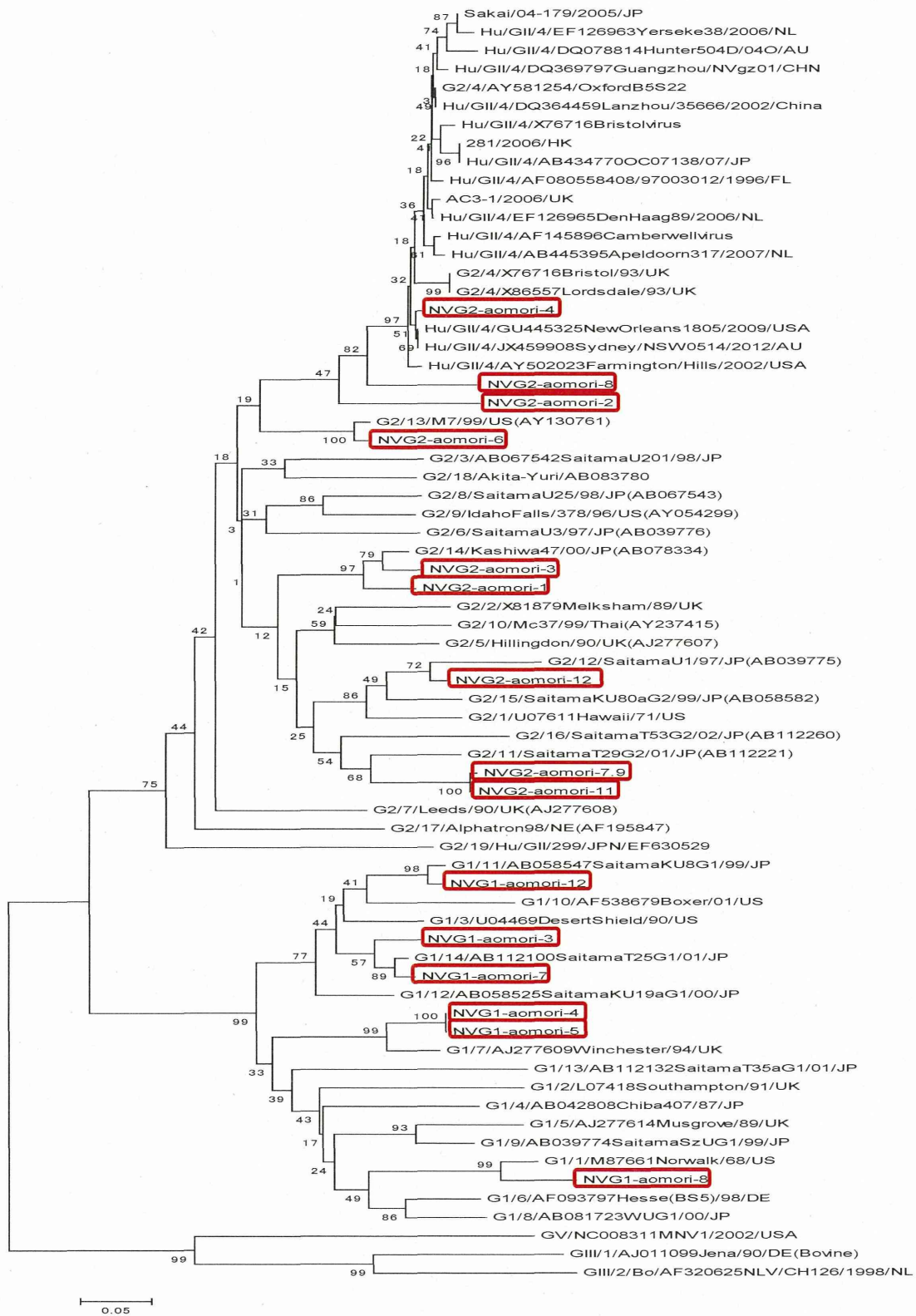


図 3. NoV GI、NoV GII の系統樹

平成 25 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」

研究分担報告

## 2013 年 2 月に購入した生カキからのノロウイルス・サポウイルスの 検出状況

研究協力者	田村 務	新潟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

### 研究要旨

2012-13 年の冬季にノロウイルス GII/4 Sydney 2012 変異株による胃腸炎が大流行したことから、この型のノロウイルスによるカキの汚染が疑われた。そこで、当該シーズンの 2013 年 2 月に市販されていた生食用カキ 2 ロット、加熱調理用カキ 4 ロット、合計 6 ロットの生カキを購入し、1 ロットあたり 3 検体抽出してノロウイルスとサポウイルスについて検索した。その結果、全てのロットからノロウイルス GII が検出され、このうち 5 つのロットについてはノロウイルス GII/4 Sydney 2012 の存在が確認できた。加熱調理用のカキは 3 検体中 3 検体から検出されたロットが 3 ロット、2 検体が検出されたロットが 1 ロットに対し、生食用カキの 2 ロットは 3 検体中 1 検体のみの検出で検出率は低かった。このほか、GI 型ノロウイルスが生食用の 1 ロットから、加熱調理用の 3 ロットから検出され、サポウイルスは加熱調理用の 3 ロットから検出された。

流行しているノロウイルスによる生カキの汚染が確認され、生食用、加熱調理用ともすべてのロットのカキからノロウイルスが検出されたことから、ノロウイルス胃腸炎流行時の生カキは加熱調理用としての取扱いが望まれる。

### A. 研究目的

カキはノロウイルス等のウイルスを中腸腺に濃縮することから、それを生で食べたり、加熱が不十分で喫食したりすることで食中毒が起こることが知られている。2012 年 11 月 28 日の IASR で GII/4 ノロウイルスの新しい変異株(GII/4 2012

Sydney) が全国で検出されていることが報告され、この型のノロウイルスによる胃腸炎が 2012 年 12 月に大流行した。このため、当該ウイルスによるカキの汚染が危惧されたことから、2013 年 2 月に市販の生カキにおけるノロウイルスとサポウイルスの汚染状況を調べた。



## B. 研究方法

### 1. 材料

生カキ：新潟県内のスーパー等で、2013年2月に購入したD県産生食用生カキ2ロット、F県産加熱調理用生カキ2ロット、A県産加熱調理用生カキ2ロット合計6ロットを材料とした。

### 2. カキからのノロウイルス遺伝子の抽出方法

中腸腺1個から2個を1検体として、1ロットあたり3検体検索した。中腸腺の総量は2.2gから4.5gの範囲となった。

これをアミラーゼ処理PEG濃縮法（野田ら：広島市衛生研究所年報 25, 35-43, 2006）によってノロウイルスを濃縮し、High Pure Viral RNA Kitにより核酸を抽出した。DNase処理は、DNaseI (Invitrogen) を使用してオンカラム処理法により実施した。

### 3. 抽出核酸の逆転写

抽出RNAの逆転写には、High Capacity RNA-to-cDNA Kit (ABI) (以下、High Capa.) と Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) (以下、Transcriptor。)を用いて実施した。High Capaに含まれているRandom PrimerとOligo dtをプライマーとして、25°C10分、37°C1時間、85°C5分の条件で実施した。

ノロウイルスの遺伝子の特異的に検出するため、特異性を高めた逆転写として、TranscriptorとPANR-G1, PANR-G2のプライマーセットを使用して、58°C30分、85°C5分の反応条件で実施した。このプライマ

ーを含む逆転写反応の条件は、厚生労働省通知「平成25年10月22日付け食安監発1022第1号ノロウイルスの検出法について」の一部改正についての中の一般食品からのウイルス濃縮法」に準じた。

### 4. 定性試験

ノロウイルスの定性試験のコンベンショナルPCRのプライマーには、GIは1st PCRにCOG1F/G1SKRを使用し2nd PCRにG1SKF/G1SKRを、GIIは1st PCRにCOG2F/G2SKRを使用し2nd PCRにG2SKF/G2SKRを使用した。非特異反応を抑えるため、Transcriptorによる逆転写反応後、1st PCRにAptaTaq (Roche)を使用し、タッチダウンPCR法として、94°C3分の変性後、94°C30秒、55°C30秒、72°C30秒のサイクルでアニーリング温度を1サイクル1度ずつ50°Cまで下げたのち、50°Cのアニーリング温度で40サイクル反応後、72°C7分の伸長を実施した。2nd PCRは、Takara EX-Taq Hot Start version (タカラバイオ)を使用して、94°C3分の変性後、94°C30秒、50°C30秒、72°C1分を30サイクル反応後、72°C7分の伸長を実施した。

また、1st PCRとしてEX-Taq (タカラバイオ)によるコンベンショナルPCRを実施後、「平成15年11月5日付け食安監発第1105001号」通知中のリアルタイムPCR法で検出する2ndリアルタイムPCR法も実施した。リアルタイムPCR法の試薬はTaqMan Universal PCR Master Mix (ABI)を使用した。

サポウイルスについては、Kitajimaら (Appl. Environ. Microbiol. 2010;76:

2461-2467) の方法により実施した。プライマーセット 1st: SAV124F, 1F, 5F / SVR13, R14, 2nd: 1245Rfwd / SVR2 を使用して、EX-Taq を用いてコンベンショナル PCR 法で 2nd PCR まで実施して検出した。

定性試験で陽性となった検体については、BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (ABI) を使用してダイレクトシーケンシング法により遺伝子解析を実施した後 MEGA5.2 により系統樹を作成し、遺伝子型別を実施した。

## 5. 定量試験

カキに含まれる GII ノロウイルスの定量を行うため、通知法に記載の方法に準じてノロウイルスの定量を実施した。

## 6. 逆転写反応と PCR 反応の組み合わせ

定量試験、定性試験における逆転写反応と PCR 反応の試薬の組み合わせについては、表 1 に記載した。

### (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. ノロウイルスの定性試験による検出状況(表 1)

コンベンショナル Nested PCR 法では、Transcriptor を用いた遺伝子配列特異的プライマーの使用による 58℃ の高温による逆転写のためか、GI 及び GII ノロウイルスとも、電気泳動結果は非特異バンドの無いきれいなシングルバンドとなり、遺伝子解析が容易であった。

検出状況では、GI ノロウイルスが、生食用のカキ 2 ロット中 1 ロットの 3 検体中 2 検体から、加熱調理用のカキ 4 ロット中 3 ロットの 4 検体から検出された。遺伝子型は、GI/1、GI/3、GI/4、GI/13 と多様であった(図 1)。

GII ノロウイルスは、生食用のカキ 2 ロット 6 検体中 2 検体(2 ロットそれぞれ 1 検体) から検出され、加熱調理用のカキ 4 ロット 12 検体中 11 検体から検出された。検出された遺伝子型は、A 県産のロット 6 の 3 検体の PCR 増幅産物の解析で、波形が混合していることから判別できなかったが、他の 5 ロットの 10 検体すべて GII/4 の Sydney2012 変異株であった(図 2)。

2nd PCR としてリアルタイム PCR 法により検出する方法では、GI は加熱調理用のみで 3 ロット 5 検体から検出され、GII は生食用 1 ロット、加熱調理用 4 ロット 13 検体から検出され、コンベンショナル PCR の結果と若干の相違があった。

### 2. ノロウイルスの定量試験結果

ノロウイルスの定量のため、1st のみのリアルタイム PCR を実施したところ、陽性判定基準の 10 コピーを超えたのは、加熱調理用の 1 ロット 2 検体で、GII ノロウイルスのみであった。しかし、10 コピー未満の増幅も生食用の 2 ロット 3 検体、加熱調理用の 4 ロット 9 検体で確認された。これらのコピー数から中腸腺 1 個あたりのコピー数を算出した。GII ノロウイルスは、D 県産、A 県産のカキは、300 コピー前後の数値となったが、F 県産の加熱調理用のカキの 1 個あたりのコピー数は

10<sup>3</sup>コピーを超え、最大で3.3×10<sup>3</sup>コピーとなった。

GI ノロウイルスの定量では、全ての検体の実測値は陽性判定基準の10コピー未満であった。A県産の1ロット1検体のみ増幅が確認され、中腸腺1個あたり420コピーであった。

サポウイルスは、加熱調理用の3ロット3検体から検出された。これらの遺伝子型はすべてGI/2で、2012-13シーズンに新潟県内の感染症発生動向調査や食中毒疑い事例で検出された株と同じ型であった(図3)。

#### D. 考察

2012-13の冬季は、ノロウイルスGII/4の新たな変異株Sydney\_2012の出現により、感染性胃腸炎が大流行した。この流行がカキの汚染に影響することが推測され、今回の調査により、GII/4 Sydney\_2012変異株のノロウイルスが生食用、加熱調理用のカキ6ロット18検体中5ロット10検体から検出された。ノロウイルスの流行の影響が、カキの汚染と密接な関連性があることが確認された。なお、残りの1ロットは、ノロウイルスGIIは陽性であったが、複数の型のウイルス遺伝子の混在により型別が困難であった。

このほか、多様な型のGIノロウイルスやサポウイルスも検出されたことから、これらのウイルスもヒト集団中で感染・循環していたことが推測された。

GIIノロウイルスは、定性試験で6ロット14検体が陽性となり、定量試験でも6ロット14検体で増幅が確認できたが、GIノロウイルスは、定性試験で4ロット6

検体が陽性となったが、定量試験では1ロット1検体しか増幅が確認されなかったことから、GIノロウイルスのカキの汚染量はGIIノロウイルスに比べて少ないものと推測された。

汚染の程度の差はあるものの、生食用の生カキを含むすべてのロットの生カキからノロウイルスが検出されたことから、ノロウイルス胃腸炎流行時は、生食用カキとして出荷する際は十分確認の上出荷することや生食に関するいろいろな注意点を添付しておくことが望まれる。また消費者や飲食店営業者も生食用のカキを過信せず、できるだけ加熱調理して提供、喫食をこころがけるような注意が必要と考えられた。

#### E. 結論

ノロウイルスGII/4 Sydney 2012変異株による胃腸炎流行シーズンに、市販されていた生食用と加熱調理用の生カキから同ウイルスを検出した。ノロウイルス胃腸炎流行時の生カキのノロウイルスの汚染リスクは高く、販売、調理、喫食時には汚染リスクを十分考慮する必要がある。

#### 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

表1 ノロウイルス、サポウイルスの検出状況

検索したウイルス							Norovirus													Sapovirus					
試験の区分							定性試験						定量試験							定性試験					
RTの方法及びPrimer PCRの試薬							RT: High capa & Random Primer 1st: Ex Taq 2nd: Universal PCR master mix		RT: Transcriptor & Gene specific primer 1st: AptaTaq Touch down PCR 2nd: EX Taq Hot Start				RT: High capa & Random Primer 1st: Universal PCR master mix							RT: High capa & Random primer 1st: Ex Taq 2nd: Ex Taq					
加熱/生 食区分	産地 県名	海域 番号	ロット No.	検体 No.	中腸腺 個数	中腸腺 総重量 (g)	Noro GI		Noro GII			Noro GI				Noro GII				判定	Genotype				
							Noro GI (Ct値)	Noro GII (Ct値)	判定	Genotype	3検体中 の陽性数	判定	Genotype	3検体中 の陽性数	Noro GI (実測値コ ピー数)	中腸腺1gあ たりのコ ピー数	中腸腺1個 あたりのコ ピー数	中腸腺1個 あたりの平 均コピー数	Noro GII (実測値コ ピー数)			中腸腺1gあ たりのコ ピー数	中腸腺1個 あたりのコ ピー数	中腸腺1個 あたりの平 均コピー数	
生食用	D県	1	1	1-1	1	2.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
				1-2	1	3	-	-	-	-	-	0/3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
				1-3	1	4.4	-	-	-	-	-	-	+	GII/4_2012	1/3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	3	3-1	2	3.1	-	30.26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			3-2	2	3.5	-	28.05	+	GI/13	2/3	+	GII/4_2012	1/3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			3-3	2	3.2	-	-	+	GI/3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
加熱調 理用	F県	1	4	4-1	2	4.4	-	18.83	-	-	-	+	混合	2/3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
				4-2	1	2.2	-	18.9	-	-	1/3	+	GII/4_2012	2/3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
				4-3	2	3.8	26.02	20.05	+	GI/3	+	GII/4_2012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1	5	5-1	1	3.4	-	28.05	-	-	0/3	+	GII/4_2012	3/3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
				5-2	1	3.7	-	25.6	-	-	+	GII/4_2012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
				5-3	1	3.6	-	17.4	-	-	+	GII/4_2012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	A県	10	2	2-1	2	3.9	16.4	23.9	-	-	1/3	+	GII/4_2012	3/3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
				2-2	2	4.5	13.6	20.77	+	GI/1	+	GII/4_2012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
				2-3	2	3.7	-	-	-	-	+	GII/4_2012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		20	6	6-1	2	2.8	13.59	21.29	-	-	2/3	+	混合	3/3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
				6-2	2	4.1	-	25.41	+	GI/4	+	混合	2.39	205	420	420	1.53	131	269	307	+	GI/2			
				6-3	2	2.9	12.62	23.3	+	GI/4	+	混合	-	-	-	-	1.44	126	183	-	-				
検出数/検体数							5/18	13/18			6/18			13/18	0/18 (10コピー 以上を陽性 判定)				2/18 (10コピー 以上を陽性 判定)				3/18		
PC:Noro GII 10 <sup>4</sup> 個 添加 きなこ								22.63				+								10.91					

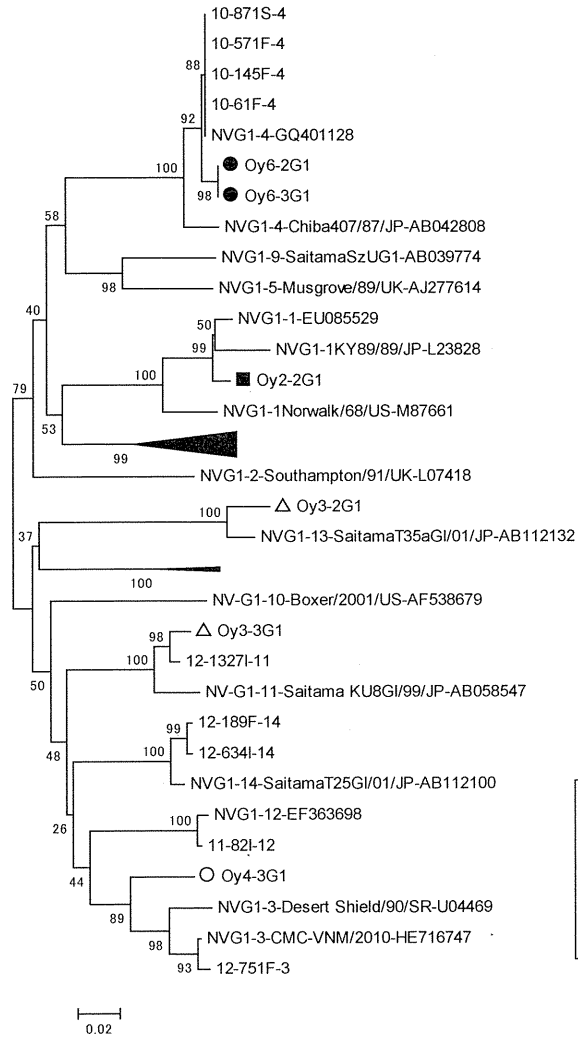
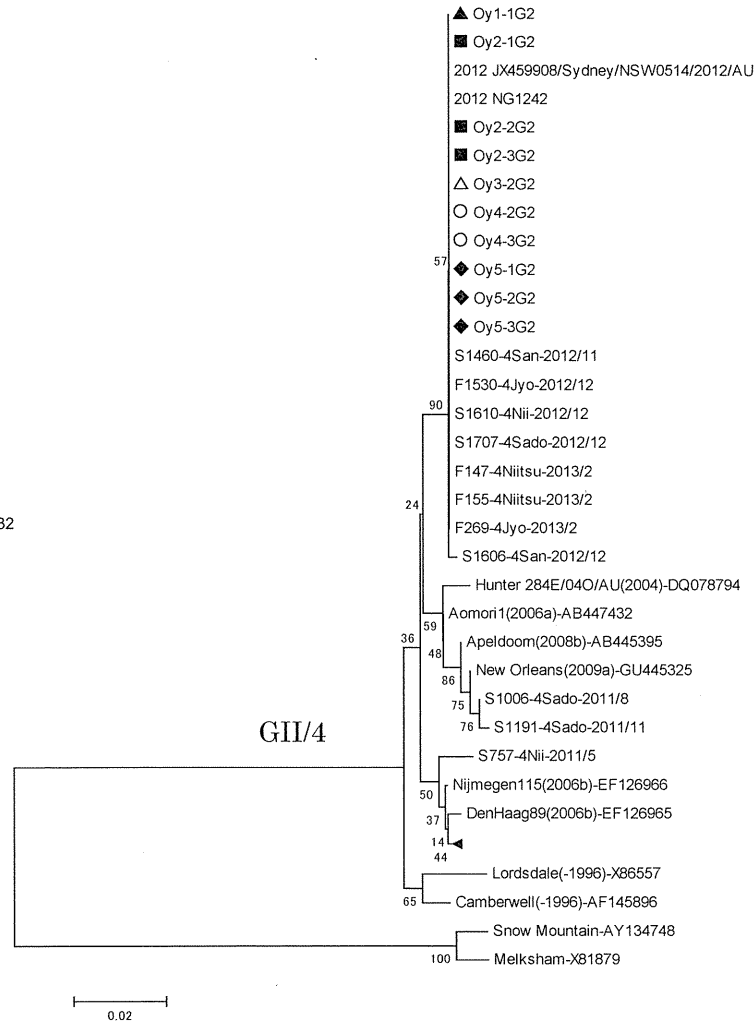


図1 GI ノロウイルスの系統樹



- ※検体の  
 マーカー表示
- ロット1 : ▲  
 2 : ■  
 3 : △  
 4 : ○  
 5 : ◆  
 6 : ●

図2 GII ノロウイルスの系統樹

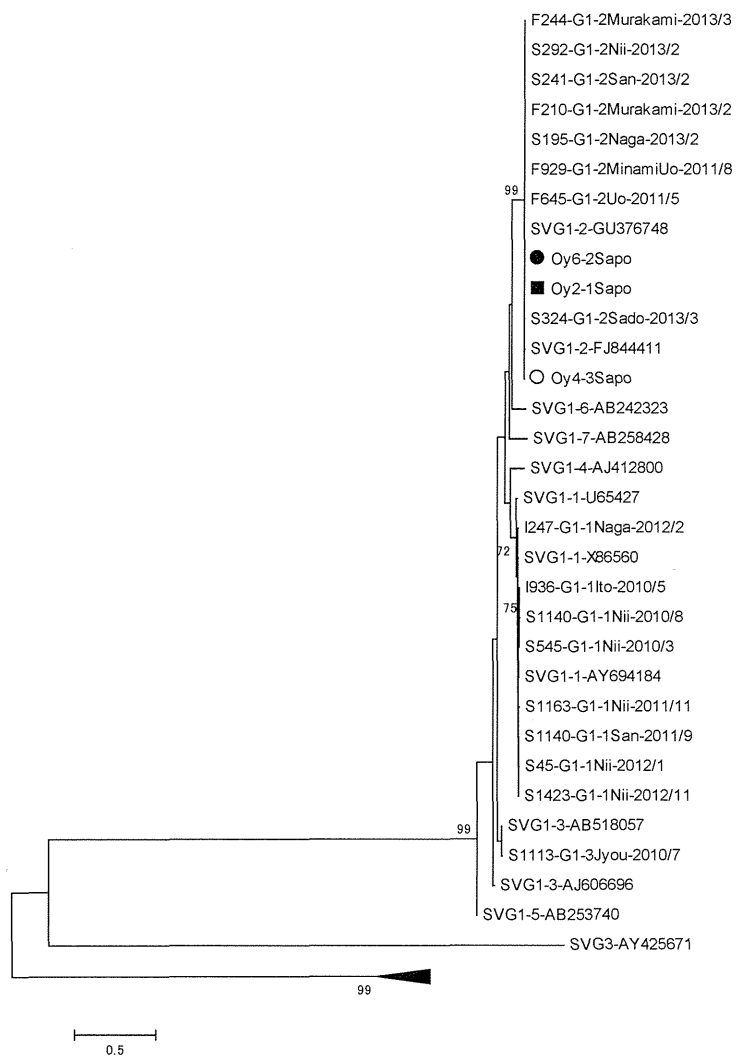


図 3 サポウイルスの系統樹

平成 25 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

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的解析  
および国産市販生カキのウイルス汚染調査

研究協力者	入谷 展弘	大阪市立環境科学研究所
研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所
研究協力者	山元 誠司	大阪市立環境科学研究所
研究協力者	改田 厚	大阪市立環境科学研究所
研究協力者	阿部 仁一郎	大阪市立環境科学研究所
研究協力者	久保 英幸	大阪市立環境科学研究所

#### 研究要旨

2013 年 4 月から 12 月までの期間で集団胃腸炎 39 事例がノロウイルス (NV) 陽性となった。2013-2014 シーズンは 9 月から NV 胃腸炎事例の発生が認められ、12 月に急増した。胃腸炎事例から検出された NV の遺伝子型には少なくとも 9 種類認められ、GII/4 型が最も多かった。GII/4 株はすべて Sydney 2012 亜型に分類された。

国産市販生カキ 11 ロットについてノロウイルス (NV)、サポウイルス (SV)、A 型肝炎ウイルス (HAV) および E 型肝炎ウイルス (HEV) の検索を行った。2 ロットからウイルスが検出され、1 ロットは NV のみで遺伝子型は GII/4 型、他の 1 ロットからは NV および SV が検出され、遺伝子型はそれぞれ GII/6 型および GII/1 型であった。HAV および HEV は検出されなかった。

#### A. 研究目的

2012-2013 シーズンは全国的にノロウイルス (NV) が大きく流行し、その原因の一つとして新たに出現した GII/4 型の変異株との関連性が指摘されている。GII/4 株は遺伝子の変異を起こしながら大きく流行している事が報告されており、NV 流行状況の把握や分子疫学的解析は NV 胃腸炎の予防対策に重要である。本研究では NV 流行を把握し、新たな変異ウイルスの出現を監視す

るために、集団胃腸炎事例の患者糞便について NV の検索および遺伝子型別を行った。

カキはウイルス性食中毒の主な原因食品の一つとして知られている。カキの NV 汚染については、これまで継続した調査が実施されてきた。しかし、他のウイルスについては情報が多くない。そこで、国産市販生カキのウイルス汚染実態を明らかにするために生食用および加熱調理用の生カキについて NV、サポウイルス (SV)、A 型肝炎ウイ

ルス (HAV) および E 型肝炎ウイルス (HEV) の検索を行った。

## B. 研究方法

### 1. 材料

2013 年 4 月から 12 月までの期間に当研究所へ検査依頼のあった集団胃腸炎 67 事例、患者糞便 347 検体を用いた。

国産生カキは 2013 年 2 月 (加熱調理用 1 ロット、生食用 1 ロット) および 12 月 (生食用 9 ロット) に市販されていた合計 11 ロットを NV、SV、HAV および HEV の検索に用いた。市販生カキは 1 ロットにつき、カキ 3 個をまとめて検査した。11 ロットは 4 県 7 海域から採取されたものであり、D 県産 4 ロット、A 県産 3 ロット、C 県産 2 ロット、B 県産 2 ロットであった。

### 2. 方法

#### 1) 患者糞便材料からの NV 検出

ウイルス RNA は、10~20%糞便乳剤から QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) を用いて抽出した。cDNA は Random hexamer (Amersham) および逆転写酵素 AMV XL (Life Science) を用いて作製した。NV の検出は、Kageyama ら (JCM 41, 1548-57, 2003) のリアルタイム RT-PCR 法に従って行った。

#### 2) カキからのウイルス検出

カキの前処理には、野田ら (広島市衛生研究所年報 25, 35-43, 2006) のアミラーゼ処理・PEG 法を用いた。即ち、むき身カキから中腸腺を摘出し、破碎した後、4~10 倍量の PBS(-) および 25mg/ml の  $\alpha$ -アミラーゼを加え、37°C で 60 分間攪拌した。アミラーゼ処理後、3,000rpm 10 分間および

10,000rpm 20 分間遠心した。遠心上清に PEG 6000 および NaCl を加え (最終濃度 12% PEG および 1M NaCl)、4°C で一夜放置した。さらに 4°C 10,000rpm 30 分間遠心した沈渣に 0.6ml の 0.5% Zwittergent 加 PBS(-) を加え、RNA 抽出用試料とした。

ウイルス RNA は、High Pure Viral RNA kit (Roche) を用いて抽出した。DNase 処理は、DNase I recombinant, RNase Free (Roche) を用いて、RNA 抽出時にカラム上で行った。cDNA は、High-Capacity cDNA RT Kit with RNase Inhibitor (Life Technologies) および Random hexamer を用いて作製した。NV は糞便と同じ方法、SV は Kitajima ら (AEM 76, 2461-7, 2010) の方法、HAV は野田らの方法 (平成 23 年度 総括・分担研究報告書「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」)、HEV は国立感染症研究所病原体検査マニュアル (平成 17 年 4 月) に従って検査した。

#### 3) ウイルスの遺伝子型別

NV が陽性となった場合は、Capsid N/S 領域遺伝子を増幅し、塩基配列を決定した。他のウイルスについては、PCR 産物をダイレクトシーケンスした。NV および SV の遺伝子型番号は、それぞれ Kageyama ら (JCM 42, 2988-95, 2004) および Oka ら (Arch Virol 157, 349-52, 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。

## C. 研究結果

### 1. NV 胃腸炎事例の発生状況



39 事例 (58.2%)、163 検体 (47.0%) から NV が検出された。2013-2014 シーズンの NV 事例は 9 月から認められるようになり、12 月に急増した (図)。NV が検出された 39 事例のうち、ヒトからヒトへ感染が広がった事例は少なくとも 23 事例 (59.0%) 認められ、主な原因施設は保育所および高齢者施設であった。食中毒が疑われた事例は 16 事例 (41.0%) であり、カキの喫食が関連していた事例は 1 事例のみであった。

## 2. 市販生カキのウイルス汚染状況

市販生カキからの NV 検査結果を表に示した。2013 年 2 月に市販されていた 2 ロットのうち加熱調理用 1 ロット (N13-2) から NV が検出され、2013 年 12 月に市販されていた 9 ロットのうち生食用 1 ロット (OY13-2) (11.1%) から NV および SV が検出された。ウイルスが検出されたカキはすべて A 県産であった。中腸腺 1g あたりの NV 汚染量 (NV RNA コピー数) は、加熱調理用で 45 コピー、生食用で 220 コピーであった。検査したすべてのカキから HAV および HEV は検出されなかった。

## 3. 検出されたウイルスの遺伝子型

胃腸炎事例から検出された NV の中で遺伝子型別ができたものは、少なくとも 9 種類 (GI : 4 種類、GII : 5 種類) であった。最も多く検出されたのは GII/4 型 (46.2%) であり、次いで GII/13 型 (17.9%) であった。GII/4 株はすべて Sydney 2012 亜型に分類された。

市販生カキから検出された NV の遺伝子型は、2013 年 2 月分 (N13-2) から検出された NV が GII/4 型であり、Sydney 2012 亜

型に分類された。2013 年 12 月分 (OY13-2) から検出された NV は GII/6 型、SV は GII/1 型に分類された (表)。

## D. 考察

2012-2013 シーズンは全国的に NV の大きな流行が認められ、大阪市では 11 月に NV 胃腸炎事例の発生が最も多くなった (入谷ら、大阪市立環境科学研究所報告調査・研究年報 75, 18-22, 2013)。2013-2014 シーズンは、12 月に事例発生が急増し、2012-2013 シーズンと比較して流行の広がりが 1 ヶ月遅れていた。2013 年の大阪府の感染性胃腸炎患者数も第 49 週から定点あたり 10 を超えるようになり、事例の発生状況と同様であった。

2011-2012 シーズンに新しく出現した変異株である GII/4 Sydney 2012 株は、2012-2013 シーズンに大阪市を含めて全国的に大きく流行した (入谷ら 大阪市立環境科学研究所報告 調査研究・年報 75, 18-22, 2013)。2013-2014 シーズンも引き続いて GII/4 Sydney 2012 株が NV の主な流行株となっている。2013 年 12 月まで期間で、事例発生数は 2012-2013 シーズンと比べて少ないが、今後も GII/4 Sydney 2012 株の流行状況を監視していく必要がある。

カキの NV 汚染は、ヒトから排出された NV が下水から河川・海に至り、養殖場を汚染することが最大の要因と考えられている。2013 年 2 月市販の生カキから GII/4 Sydney 2012 株が検出されたことは、同時期のヒトにおける流行が反映されたものと考えられた。2013 年 12 月市販の生カキから検出された NV GII/6 株や SV GII/1 株も同様に、

カキ養殖場につながる河川付近にある下水処理施設の対象地域において流行していたことが示唆された。今回の調査から、NV以外にSVが検出されたことから、カキ喫食による食中毒の原因ウイルスとしてNVだけでなくSVも考慮する必要があると考えられた。HAVおよびHEVは検出されなかったが、HAVはカキからの検出やカキ喫食による食中毒も報告されており、市販生カキ中の汚染監視は重要である。HEVについては、カキにおける汚染実態が明らかにされておらず、今後の継続した調査が必要である。

## E. 結論

1. 2013-2014 シーズンは12月にNV事例の発生が急増し、GII/4 Sydney 2012株が主に検出された。
2. 国産市販生カキにはNVおよびSVの汚染が認められ、食中毒の感染源として注意する必要がある。
3. 今回の調査から国産市販生カキにHAVおよびHEVの汚染は認められなかったが、カキ喫食に伴う食中毒の原因ウイルスとして重要と考えられ、継続した監視・調査が必要である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 入谷展弘, 改田厚, 阿部仁一郎, 山元誠司, 久保英幸, 平井有紀, 後藤薫, 長谷篤: 2012-2013 シーズンに大阪市で認められたノロウイルス流行, 大阪市立環境科学研究所報告 調査・研究年報 平成24年度版 第75集, 18-22 (2013)

2) N Iritani, A Kaida, N Abe, H Kubo, J Sekiguchi, SP Yamamoto, K Goto, T Tanaka, M Noda: Detection and genetic characterization of human enteric viruses in oyster-associated gastroenteritis outbreaks during 2001-2012 in Osaka City, Japan, Journal of Medical Virology (in press)

### 2. 学会発表

1) 山元誠司, 入谷展弘, 改田厚, 久保英幸, 長谷篤: 感染性胃腸炎患者からのパレコウイルスの検出, 平成25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 (2013.9.20)

2) 入谷展弘, 改田厚, 阿部仁一郎, 山元誠司, 久保英幸, 平井有紀, 後藤薫, 長谷篤: 2012-2013 シーズンに大阪市で認められたノロウイルス流行について, 第25回ウイルス性下痢症研究会学術集会, 神戸 (2013.11.9)

3) 入谷展弘, 山元誠司, 改田厚, 岡智一郎, 久保英幸: 2012/13 シーズンに大阪市で多発したサポウイルス集団胃腸炎事例, 第61回日本ウイルス学会, 神戸 (2013.11.10-12)

4) 山元誠司, 入谷展弘, 改田厚, 久保英幸: 2013年4~5月に大阪市内で流行したロタウイルス (G1-P[8]-I2) の遺伝子解析, 第61回日本ウイルス学会, 神戸 (2013.11.10-12)

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

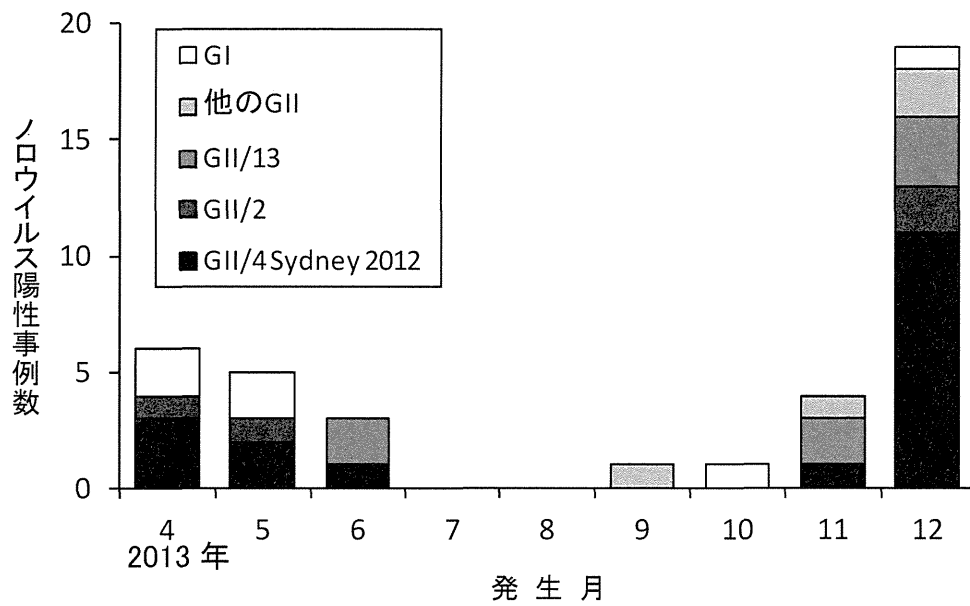


図 月別ノロウイルス事例発生状況（平成 25 年度）

表 国産市販生カキからのウイルス検出結果<sup>1)</sup>

シーズン	検体番号	採取海域・産地 種類	年月	NV <sup>2)</sup> (コピー/g)	SV	HAV	HEV
2012 -2013	N13-1	C2 生食用	2013年2月	-	-	-	-
	N13-2	A10 加熱調理用	2013年2月	+(45) GII/4 Sydney 2012	-	-	-
2013 -2014	OY13-1	D2 生食用	2013年12月	-	-	-	-
	OY13-2	A11 生食用	2013年12月	+(220) GII/6	+	-	-
	OY13-3	D2 生食用	2013年12月	-	-	-	-
	OY13-4	D2 生食用	2013年12月	-	-	-	-
	OY13-5	D3 生食用	2013年12月	-	-	-	-
	OY13-6	C3 生食用	2013年12月	-	-	-	-
	OY13-7	B4 生食用	2013年12月	-	-	-	-
	OY13-8	A10 生食用	2013年12月	-	-	-	-
	OY13-9	B4 生食用	2013年12月	-	-	-	-

1) - : 陰性、+ : 陽性

2) 中腸腺 1g あたりの NV RNA コピー数