

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

## カキにおけるノロウイルス遺伝子検出法の比較 及び検出ウイルスの遺伝子型について

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	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

カキからノロウイルスを検出するにあたり、Semi-nested PCR 法とリアルタイム PCR 法で検査を行った。リアルタイム PCR 法で実測値 10 コピー未満を陰性とした場合、Semi-nested PCR 法に比べ陽性率が低くなる可能性が示唆された。Semi-nested PCR 法で陽性となった検体の 2nd PCR 産物をダイレクトシーケンスし、ノロウイルスの遺伝子型を特定したところ、主にゲノグループ I (GI) では GI.4 及び GI.6 が、ゲノグループ II (GII) では GII.4 が検出された。カキ中腸腺 1g 中のウイルス量は GI が  $6.7 \times 10^1 \sim 7.7 \times 10^2$  コピー、GII が  $1.4 \times 10^2 \sim 1.5 \times 10^4$  コピーであり、GII のコピー数は GI の約 20 倍であった。

### A. 研究目的

市販カキからノロウイルスを検出するにあたり Semi-nested PCR 法とリアルタイム PCR 法で検査を行い、両方法での検査結果を比較する。また、カキ中に含まれるノロウイルスのコピー数、検出遺伝子型を明らかにする。

### B. 研究方法

#### 1. 材料

2013 年 2 月にスーパーマーケット及び業者から購入した A 県産の市販カキ 7 ロット。(海域 No. 10 : 1 ロット、No. 11 : 2

ロット、No. 12 : 1 ロット、No. 13 : 1 ロット、No. 14 : 1 ロット、No. 20 : 1 ロット)

#### 2. Semi-nested PCR 法及びリアルタイム PCR 法によるノロウイルスの検出

カキ 10%乳剤を  $\alpha$ -アミラーゼで 37°C・1 時間処理した遠心上清 10ml を PEG 沈殿法により濃縮、350  $\mu$ l の 5% Zwittergent を加えて再浮遊した後、200  $\mu$ l を High pure RNA Isolation Kit (Roche) により RNA 抽出した。RNA 抽出には各ロットあたり 3 検体を用いた。その後、High-Capacity cDNA Transcription Kit (Life Technologies) により 25°C, 10 分、37°C, 60

分、85°C、5 分の逆転写反応を行った後、これらをテンプレートにして Semi-nested PCR 法とリアルタイム PCR 法でノロウイルスの検出を行った。Semi-nested PCR 法ではプライマーとして、1st PCR に COG1F/G1SKR (GI 用) と COG2F, ALPF/G2SKR, G2ALSKR (GII 用) を、2nd PCR に G1SKF/G1SKR (GI 用) と G2SKF/G2SKR, G2ALSKR (GII 用) を用いた。また、リアルタイム PCR 法では Kageyama ら (J. Clin. Microbiol. 2003) のプライマー及びプローブを使用した。Semi-nested PCR では 2nd PCR 産物を 2% アガロースゲルで泳動後にエチジウムブロマイド染色し、UV 照射してバンドの有無により陽性確認を行った。リアルタイム PCR 法では各検体についてダブルで測定し、実測値 10 コピー以上を陽性と判断した。

### 3. ノロウイルスの遺伝子型別

Semi-nested PCR の 2nd PCR 産物を用い、ノロウイルスの遺伝子型別を行った。PCR 産物を QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) により精製後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) 及び ABI3500 ジェネティックアナライザ (Life Technologies) 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。カプシド遺伝子の翻訳開始点から 264bp の塩基配列を MEGA5 プログラム (<http://www.megasoftware.net/>) を用いて解析、Neighbor joining 法にて系統樹を作成して遺伝子型を特定した。遺伝子型別の分類は Kageyama ら (J. Clin.

Microbiol. 2004) 及び病原微生物検出情報 (<http://idsc.nih.gov/pathogen/refer/noro-kaisetsu1.html>) に示された分類に従った。

(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. 検査法による陽性率の比較

ロットあたり 3 検体を供試した際の各検査法での検査結果を表 1 に示した。Semi-nested PCR 法ではロット No. 2~6 の 5 ロットで 3 検体とも NoV GI、GII が陽性となり、ロット No. 7 では NoV GII が陽性となった。一方、リアルタイム PCR 法ではロット No. 2~7 の 6 ロットにおいて 3 検体とも NoV GII が陽性となったが、NoV GI ではロット No. 4 と No. 5 を除く 5 ロットにおいて 3 検体とも陰性となった。両検査法で完全一致したのはロット No. 1 の NoV GI とロット No. 2~7 の NoV GII の検査結果で、その他については陽性率が両方法で異なった。

### 2. カキ中のウイルス量

リアルタイム PCR 法の結果からロット毎にカキ中腸腺 1g 中に含まれるウイルス量を調べた (図 1)。ウイルス量が最も少なかったのは GI、GII ともロット No. 1 でそれぞれ  $6.7 \times 10^1$ 、 $1.4 \times 10^2$  コピーであった。一方、ウイルス量が最も多かったものは、GI、GII ともロット No. 5 でそれぞれ  $7.7 \times 10^2$ 、 $1.5 \times 10^4$  であった。

### 3. カキから検出されたノロウイルスの遺伝子型

Semi-nested PCR 法で陽性となった 2nd

PCR 産物をダイレクトシーケンスし、検出ノロウイルスの遺伝子型を調べた (表 2)。NoV GI 陽性となった 6 ロットすべてからは GI/4 が、一部 3 ロットからは GI/6 も検出された。一方、NoV GII については陽性となった 7 ロットすべてから GII/4 が、1 ロットから GII/11 が検出された。なお、一部の検体では適当な型に当てはまらなかったケース (検体番号 2-3) や、複数の遺伝子型の混在により型別不能になったケース (検体番号 4-3, 5-1, 6-2) があつた。

#### D. 考察

通知法の記載に従ってリアルタイム PCR 法での実測値が 10 コピー未満を陰性と判断すると、Semi-nested PCR 法とリアルタイム PCR 法の結果が NoV GI においてかなり異なつた。このことは、NoV GI は GII に比べカキ中のウイルス量が少ないためと考えられた。一方、リアルタイム PCR 法の結果を定性的に判断すると、両方法での結果の相違が小さくなる。このことから、定量実測値を加味したリアルタイム PCR 法では陽性率が低くなることを考慮しなければならないことが判明した。今回の検体として用いたロットの購入が 2 月であるため、カキ内におけるノロウイルスの量はシーズン中でも多い時期と考えられるが、今後はシーズンを通してウイルス量が少ない月、多い月で両方法の結果がどのように異なるのか詳しく調べる必要がある。

カキ中腸腺中 1g のウイルス量を算定した結果を図 1 に示したが、7 ロットとも NoV GI より NoV GII のウイルス量が多く、

その比 (NoV GI/ NoV GII) は 2.1 倍～22.5 倍であつた。

Semi-nested PCR の 2nd PCR 産物のダイレクトシーケンスによる遺伝子型別では、今回型別できた GI/4、GI/6、GII/4 はともに感染性胃腸炎患者のサーベイランス事業の調査 (<https://nesid3g.mhlw.go.jp/Byogentai/Pdf/data64j.pdf>) でも良く検出される型で、これらの型がカキの中でも優勢であると考えられた。一方、普段検出されない GII/11 のような型も検出され、カキの中には多様な遺伝子型が存在していると思われる。一方、NoV GI では適当な型に当てはまらなかったケースや、複数の型の存在によりシーケンスデータ不良で型別できなかったケースがあり、今後は PCR 産物をクローニングして、一つ一つのクローン解読と型別を行い、詳しい解析を進めることが必要と考える。

#### E. 結論

2013 年 2 月購入の市販カキを使って Semi-nested PCR 法とリアルタイム PCR 法で検査を行った。リアルタイム PCR 法で実測値 10 コピー未満を陰性とした場合、ウイルス量が少ない NoV GI において両方法での検査結果が異なることが多かつた。NoV GI と GII のカキ中のウイルス量を比較すると約 20 倍であつた。カキから検出されたノロウイルスの遺伝子型は、GI/4、GI/6、GII/4 など感染性胃腸炎患者からもよく検出される遺伝子型が多かつたが、GII/11 のように稀な型も検出された。

#### F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

東久保靖、久常有里、谷沢由枝、重本直樹、高尾信一、田中智之、野田衛、福田伸治：蛍光 RT-Multiplex PCR 法による食中毒等集団感染事例からの下痢症ウイルスの検出. 第 56 回広島県獣医学術学会、2013 年 8 月、広島市

重本直樹、谷澤由枝、島津幸枝、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集会、2013 年 11 月、神戸市

東久保靖、久常有里、谷沢由枝、重本直樹、高尾信一、田中智之、野田衛、福田伸治：蛍光 RT-Multiplex PCR 法による食中毒等集団感染事例からの下痢症ウイルスの検出. 平成 25 年度獣医学術中国地区学会、2013 年 10 月、鳥取市

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. Semi-nested PCR法とリアルタイムPCR法での検出結果

ロット No.	産地/海域	検体 番号	Semi-nested PCR		リアルタイムPCR			
			NoV GI	NoV GII	NoV GI		NoV GII	
			検出結果	検出結果	検出結果	実測値 <sup>1)</sup>	検出結果	実測値 <sup>1)</sup>
1	A県/No.20	1-1	-	+	-	1.37 <sup>2)</sup>	-	2.31 <sup>2)</sup>
		1-2	-	+	-	0.538 <sup>2)</sup>	-	1.26 <sup>2)</sup>
		1-3	-	-	-	0	-	2.39
2	A県/No.12	2-1	+	+	-	5.89	+	101
		2-2	+	+	-	3.45	+	115
		2-3	+	+	-	5.64	+	111
3	A県/No.14	3-1	+	+	-	0.84	+	49.8
		3-2	+	+	-	5.55	+	68
		3-3	+	+	-	0.399	+	34.8
4	A県/No.11	4-1	+	+	-	5.03	+	131
		4-2	+	+	+	14.5	+	201
		4-3	+	+	-	9.38	+	186
5	A県/No.11	5-1	+	+	+	12.6	+	207
		5-2	+	+	+	12.2	+	236
		5-3	+	+	-	8.06	+	221
6	A県/No.10	6-1	+	+	-	1.56	+	51.2
		6-2	+	+	-	2.89	+	75.3
		6-3	+	+	-	4.01	+	57.5
7	A県/No.13	7-1	-	+	-	3.6	+	46.4
		7-2	+	+	-	6.17	+	50.2
		7-3	-	+	-	1.9	+	25.1

1)二重測定での平均値

2)二重測定のうち一方でのみ陽性であった際の実測値

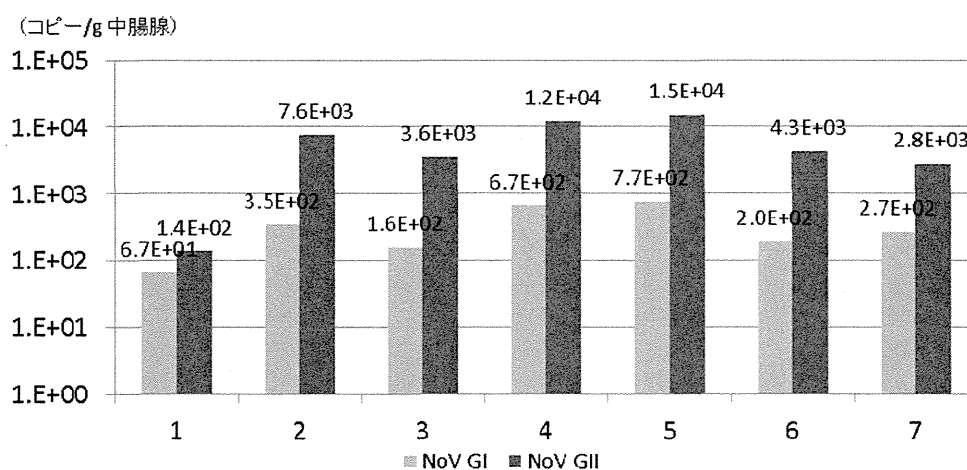


図1. 2月購入市販カキ中のノロウイルス量

表2. Semi-nested PCRの2nd PCR産物ダイレクトシーケンスによるノロウイルスのタイピング

ロットNo.	産地/海域	検体番号	NoV GI	NoV GII
1	A県/No.20	1-1	-	GII/11
		1-2	-	GII/4
		1-3	-	-
2	A県/No.12	2-1	GI/4	GII/4
		2-2	GI/6	GII/4
		2-3	NT <sup>1)</sup>	GII/4
3	A県/No.14	3-1	GI/4	GII/4
		3-2	GI/4	GII/4
		3-3	GI/4	GII/4
4	A県/No.11	4-1	GI/4	GII/4
		4-2	GI/4	GII/4
		4-3	Mix <sup>2)</sup>	GII/4
5	A県/No.11	5-1	Mix <sup>2)</sup>	GII/4
		5-2	GI/6	GII/4
		5-3	GI/4	GII/4
6	A県/No.10	6-1	GI/4	GII/4
		6-2	Mix <sup>2)</sup>	GII/4
		6-3	GI/6	GII/4
7	A県/No.13	7-1	-	GII/4
		7-2	GI/4	GII/4
		7-3	-	GII/4

<sup>1)</sup>not typed

<sup>2)</sup>複数の型の混在により型別不可

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

## 市販生カキからの胃腸炎ウイルス検出状況

研究協力者	山本美和子	広島市衛生研究所
研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所
研究協力者	田中 寛子	広島市衛生研究所
研究協力者	藤井 慶樹	広島市衛生研究所
研究協力者	京塚 明美	広島市衛生研究所
研究協力者	石村 勝之	広島市衛生研究所

### 研究要旨

2013 年 2 月に購入した市販生カキ 5 ロット 15 検体について胃腸炎ウイルス (ノロウイルス (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)、アストロウイルス (AstV)、アデノウイルス (AdV)、パレコウイルス (PeV)、エンテロウイルス (EV)) の検索を行った。その結果、NoV が最も多く、4 ロット 8 検体から検出された。ついで AstV が 3 ロット 5 検体、SaV が 2 ロット 4 検体、AdV が 1 ロット 1 検体から検出された。

NoVG II/4 が検出された株を解析したところ、そのすべてが 2012/2013 シーズンにヒトの間で大流行を起こした G II/4 Sydney 2012 変異株であることが確認できた。

### A. 研究目的

ノロウイルスが原因となった食中毒・有症事例のなかには、二枚貝を喫食した事例がある。二枚貝は中腸線にノロウイルス等のウイルスを蓄積するといわれており、ウイルスが含まれているカキを生あるいは加熱不足で喫食することで、感染が成立し嘔吐や下痢等の症状を呈することがある。そこで、それらの胃腸炎を起こすウイルスの市販カキへの浸淫状況について調べるとともに、ノロウイルス G II/4 が検出された株について、2012/2013

シーズンにヒトの間で大流行した Sydney2012 変異株との相同性について解析した。

### B. 研究方法

#### 1. 材料

2013 年 2 月に購入した市販カキ 5 ロット、15 検体を検査材料とした。採取海域等は表 1 に示した。

#### 2. ウイルス検出法

カキは中腸線 1.5g 以上を 1 検体とし、1 ロットあたり 3 検体実施した。中腸線を

PBS (-) で 10%乳剤とし、 $\alpha$ -アミラーゼを 10ml 当たり 25mg 添加した。36°C 1 時間消化した後、10,000rpm30min 遠心し、上清を回収した。遠心上清にポリエチレングリコール 6000 を 8%、NaCl を 2.1g/100ml となるよう添加し溶解した。10,000rpm30min 遠心した後、沈渣に 400  $\mu$ l の DDW を加え、再浮遊させた後、10,000rpm5min で遠心し、上清について QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)を用いて RNA 抽出を行った。逆転写反応は、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(ABI) および Oligo (dT) Primer(Invitrogen)を用いて行った。

### 3. NoV の検出方法

NoV の検出方法は、厚生労働省通知法(平成 19 年 5 月 14 日付け食安監発第 051404 号)に準じて行った。リアルタイム PCR 法で陽性になった検体については、cDNA をカプシド N/S 領域の 1st primer COG1F/G1SKR、COG2F/G2SKR、2nd primer G1SKF/G1SKR、G2SKF/G2SKR を用いた semi nested PCR で増幅し、増幅産物を QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN)を用いて精製した。BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(ABI)でサイクルシーケンスを行った後、BigDye Xterminator Purification Kit(ABI)で精製し、ダイレクトシーケンスまたは Mighty TA-cloning Kit(Takara)を用いて TA クローニングを行った後、シーケンスを行い遺伝子配列を解析し、遺伝子型を決定した。SaV の検出は、Kitajima ら\*の 1st primer SV-F13、14/R13、14 2nd primer SV-F22/R2 を使用した nested PCR

で行ない、ノロウイルスと同様に、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を解析し、型別を行った。A 型肝炎ウイルスの検出は、「糞便および食品中の A 型肝炎ウイルスの検査法について」(平成 14 年 8 月 16 日付け食監発第 0816001 号)に準じてリアルタイム PCR 法で行った。E 型肝炎ウイルスの検出は、影山ら\*の方法、アストロウイルスの検出は、横井ら\*の方法、アデノウイルスの検出は、AlBert ら\*の方法、パレコウイルスおよびエンテロウイルスの検出は、Caroline ら\*の方法に準じてそれぞれリアルタイム PCR 法で行った。

今回、リアルタイム PCR 法での判定は、Ct 値 40 未満のものを陽性とした。

\* それぞれの方法の出典については表 2 にまとめた。

### 4. NoVG II /4 Sydney2012 変異株との相同性解析

ノロウイルス G II /4 が検出された株については、2012/2013 シーズンにヒトの間で大流行した 2012 Sydney 変異株であるか否かを確認するために Hu/G II /4/Sydney/NSW0514/2012/AU (JX459908)との相同性を比較し、分子系統樹を作成した。

(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. ウイルス検出状況

2013 年 2 月下旬に購入した市販カキ 5 ロット 15 検体のウイルス検出状況を表 3 に示した。



今回検査した 5 ロットから検出されたロット別ウイルス検出数は多い順に NoV (4 ロット)、AstV(3 ロット)、SaV(2 ロット)、EV (2 ロット)、AdV(1 ロット)であった。

市販カキ 5 ロット 15 検体のうち 4 ロット 8 検体から検出された NoV の遺伝子型は、GI/1 が 1 ロット 2 検体、GI/4 が 2 ロット 2 検体、GI/6 が 2 ロット 2 検体、GI/11 が 2 ロット 3 検体、GII/4 が 4 ロット 7 検体、GII/6 が 1 ロット 1 検体、GII/14 が 1 ロット 1 検体であった。最も多くの遺伝子型が検出されたロットからは GI/1、GI/4、GI/6、GI/11、GII/4、GII/14 の 6 タイプが検出された。1 ロットからは全く検出されなかった。SaV は、2 ロット 4 検体から検出された。遺伝子型はすべて GI/2 であった。AstV は、3 ロット 5 検体、AdV は 1 ロット 1 検体、EV は 2 ロット 4 検体から検出された。HAV、HEV、PeV は全く検出されなかった。

## 2. 海域別検出状況

市販カキ 5 ロットの採取海域別ウイルス検出状況を表 4 に示した。A 県 10 海域では、NoVG I /4、GI/6、GII/4、GII/6、SaVG I /2、AstV が検出された。C 県 1 海域では、AdV が検出された。A 県 11 海域では、NoVG I /11、GII/4、AstV、EV が検出された。A 県 10 海域では、NoVG I /1、GI/4、GI/6、GI/11、GII/4、GII/14、SaVG I /2、AstV、EV が検出された。

## 3. NoVG II /4 Sydney2012 変異株との相同性解析

今回検出された、NoVG II /4 について、2012/2013 シーズンにヒトの間で大流行した Sydney2012 変異株 (Hu/G II /4/Sydney

/NSW0514/2012/AU (JX459908)) との相同性について解析した。4 ロット 7 検体から G II /4 が検出され、カプシド N/S 領域 (283bp) における塩基配列を解析した結果、Hu/G II /4/Sydney/NS0514/2012/AU (JX459908) との相同性は 99.7%~100% であることが分かった。分子系統樹は図 1 に示した。

## D. 考察

2013 年 2 月に採取された市販カキ 5 ロット中 4 ロットから NoV が検出された。遺伝子型は GI が 4 タイプ (1、4、6、11)、GII が 3 タイプ (4、6、14) であった。SaV は 2 ロットから検出され、遺伝子型は 1 種類 (SaVG I /2) であった。AstV は、3 ロットから、AdV は 1 ロットから EV は 2 ロットから検出された。

今回調査した 5 ロットすべてから、いずれかの胃腸炎ウイルスが 1 種類~4 種類が検出された。またノロウイルスについてはカキ 1 個から多種類の遺伝子型が検出されることが確認できた。最も多く検出された検体からは、4 種類のウイルス (NoV、SaV、AstV、EV) が検出され、NoV の遺伝子型は 4 タイプ検出された。カキ 1 粒に多種類のウイルスおよび遺伝子型が蓄積されていることが示唆された。

今回検査したウイルス以外のウイルスについてもカキに含まれている可能性があることが想定されるため、今後はさらにウイルスの種類を広げ検査を実施していければと考えている。

海域別のウイルス検出状況は、A 県 10 海域から最も多い 4 種類のウイルス (NoV、SaV、AstV、EV) が検出された。検出され

たウイルスの種類が最も少ない C 県 1 海域では AdV のみが検出され、NoV は検出されなかった。

検出された NoVG II /4 の塩基配列を解析したところ、すべて 2012/2013 シーズンにヒトの間で大流行を起こした、Sydney2012 変異株であることが分かった。このことから、ヒトから排泄された NoVG II /4 Sydney2012 変異株がカキの中に蓄積されていることが考えられた。また、NoV 以外のウイルスでは AstV が 5 ロット中 3 ロットから検出され、高率に汚染されている可能性が示唆された。

近年、カプシド領域とポリメラーゼ領域の間で遺伝子組み換えを起こしたキメラウイルスの存在が報告されているため、今回、カプシド領域とポリメラーゼ領域の一部を含むプライマーを使用し、シーケンスを試みたが、うまく増幅できずシーケンスすることができなかった。今後は、プライマー等の改良を加え、カキからの NoV についても、特徴的なキメラウイルスの存在の確認を試み、より明瞭なマーカーとしてヒト-カキの循環系を明らかにしたいと考えている。

## E. 結論

1. 市販生カキのウイルス検索を行ったところ、NoV が最も多く 5 ロット中 4 ロットから検出された。ついで AstV が 3 ロットと多く、SaV 2 ロット、EV 2 ロット、Ad 1 ロットであった。
2. NoVG II /4 が検出された株を解析したところ、そのすべてが G II /4 Sydney2012 変異株 (Hu/G II /4/Sydney/NSW0514/2012/AU (JX459908)) と、99.7~100%の相同性であることが分かった。ヒトの間で大流行した NoV が排泄され、カキに蓄積している可能性があることが示唆された。

## 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 採取海域

ロット	検体番号	採取海域
1	3130001	A 県 10 海域
2	3130002	C 県 1 海域
3	3130003	A 県 10 海域
4	3130004	A 県 11 海域
5	3130005	A 県 10 海域

表 2 ウイルス検査法

ウイルス	検出法
NoV	厚生労働省通知法「ノロウイルス検出法について」(平成 19 年 5 月 14 日付食安監発第 051404 号) に準ずる
SaV	Kitajima らの方法(Applied and Environmental Microbiology, Apr.2010,2461-2467) に準ずる
HAV	厚生労働省通知法「糞便および食品中の A 型肝炎ウイルスの検査法について」(平成 14 年 8 月 16 日付け食監発第 0816001 号) に準ずる
HEV	影山らの方法 (第 52 回日本ウイルス学会学術集会) に準ずる
AstV	横井らの方法 (感染症学雑誌第 83 巻第 2 号) に準ずる
AdV	Albert らの方法 (Journal of Medical Virology,70:228-239(2003)) に準ずる
PeV	Caroline らの方法 (Journal of Medical Virology,67:555-562(2002)) に準ずる
EV	Caroline らの方法 (Journal of Medical Virology,67:555-562(2002)) に準ずる

表 3 ウイルス検出状況

ロット 番号	検体番号	NoV	SaV	HAV	HEV	AstV	AdV	PeV	EV
1	3130001-1	-	-	-	-	-	-	-	-
	-2	-	G I /2	-	-	-	-	-	-
	-3	G I /6 G II /4 G II /6	-	-	-	-	-	-	-
2	3130002-1	-	-	-	-	-	+	-	-
	-2	-	-	-	-	-	-	-	-
	-3	-	-	-	-	-	-	-	-
3	3130003-1	G I /4 G II /4	-	-	-	+	-	-	-
	-2	-	-	-	-	-	-	-	-
	-3	G II /4	-	-	-	-	-	-	-
4	3130004-1	G I /11	-	-	-	+	-	-	-
	-2	-	-	-	-	+	-	-	+
	-3	G II /4	-	-	-	-	-	-	-
5	3130005-1	G I /4 G I /6 G I /11 G II /4	G I /2	-	-	+	-	-	+
	-2	G I /1 G II /4	G I /2	-	-	+	-	-	+
	-3	G I /1 G I /11 G II /4 G II /14	G I /2	-	-	-	-	-	+

表 4 海域別検出状況

海域	検出ウイルス
A 県 10 海域	NoVG I /4,6、NoVG II/4,6、SaVG I /2、AstV
C 県 1 海域	AdV
A 県 11 海域	NoVG I /11、NoVG II/4、AstV、EV
A 県 10 海域	NoVG I /1,4,6,11、NoVG II/4,14、SaVG I /2、AstV、EV

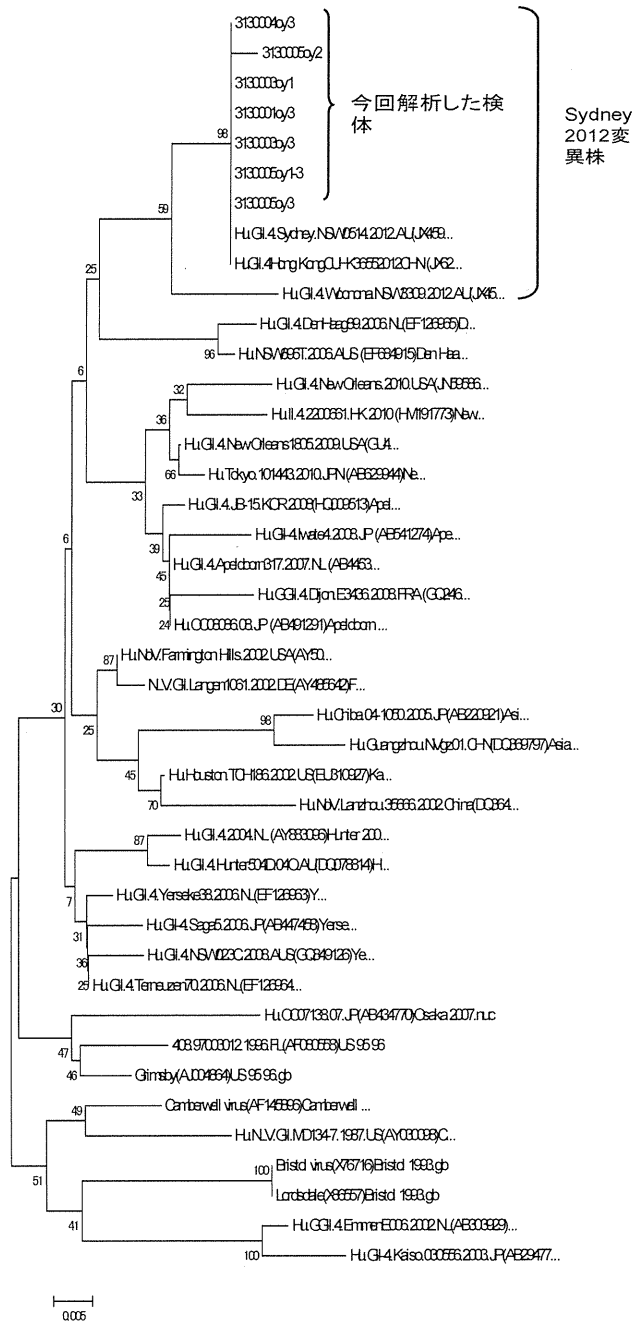


図 1 NoVG II/4 Capsid N/S 領域系統樹

## 2013 年 2 月採取のカキからのノロウイルス検出

研究協力者	吉富 秀亮	福岡県保健環境研究所
研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所
研究協力者	吉山 千春	福岡県保健環境研究所
研究協力者	世良 暢之	福岡県保健環境研究所

### 研究要旨

2013 年 2 月に福岡県内で販売されていた市販カキの中腸腺に含まれるノロウイルス (NoV) の定量及び遺伝子型の決定を行った。その結果、6 ロット中 5 ロットから NoV 遺伝子が検出された。中腸腺 1g 当たりに含まれる NoV の遺伝子の量は最少 71 コピー、最大 3,071 コピーであった。NoV の遺伝子型は、GI 群は GI/4 の 1 種類、GII 群は GII/2、GII/4、GII/6、GII/11、GII/12、GII/13 および GII/14 の 7 種類であった。GII/4 はすべて GII/4\_2012 変異株 (Sydney/NSW0514/2012/AU 近縁株) であった。

### A. 研究目的

ノロウイルス (NoV) による食中毒の原因食材の一つである市販カキの NoV 汚染状況を把握することを目的として、2013 年 2 月に福岡県内で販売されていた生食用カキ、加熱調理用カキおよび殻付カキを含む 6 ロットの市販カキからの NoV の検出及び遺伝子型の決定を行った。

### B. 研究方法

#### 1. 材料

2013 年 2 月に採取された生食用カキ 4 ロット、加熱調理用カキ 1 ロットおよび殻付カキ 1 ロット、合計 6 ロットを購入し、材料とした。

#### 2. NoV の検出法

1 ロットのカキから中腸腺を 1g~2.5g 採取し 1 検体とした。1 ロット当たりの検体数は 3 検体とした。中腸腺の重量を測定し、9 倍量の PBS(-)を加え、粉碎処理した後、 $\alpha$ -アミラーゼを 10mL 当たり 25mg 添加し、よく混和した後、37°C で 1 時間静置した。フィルター付き滅菌バッグを用いて濾過し、濾過液 10mL を 10,000rpm、20 分間、4°C で遠心分離し、上清を 35,000rpm、2 時間、4°C で超遠心分離した。上清を取り除き、沈渣を 0.5% Zwittergent (Merk) 400 $\mu$ L で再浮遊させ、RNA 抽出を行った。RNA 抽出及び DNase 処理は High Pure Viral RNA Kit (Roche) を用いて行い、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied

Biosystems)を用いて cDNA の合成を行った。合成した cDNA を用いて、TaqMan Universal Master MIX (Applied Biosystems) により COG1F/COG1R 及び COG2F/COG2R プライマーセットを用いて Real-time PCR を行い、NoV 遺伝子を定量した。また、合成した cDNA を用いて、EmeraldAmp PCR Master Mix (Takara)により、COG1F/G1SKR 及び COG2F/G2SKR プライマーセットによる 1stPCR、G1SKF/G1SKR 及び G2SKF/G2SKR プライマーセットによる Nested PCR を行い、NoV ゲノムの N/S 領域を増幅した。

### 3. 系統解析

N/S 領域の増幅産物は BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)によりダイレクトシーケンスを行い、Applied Biosystems 3130xl ジェネティックアナライザ (Applied Biosystems)を用いて塩基配列を決定した。解析が困難な場合は、TOPO TA Cloning Kit (Life Technologies)を用いて TA クローニングを行い、再度塩基配列の決定を試みた。決定した塩基配列は MEGA4 を用いて近隣接合法により系統解析を行い、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. NoV の検出 (表 1)

Real-time PCR 法による遺伝子定量の結果、4 ロット 8 検体から NoV が検出された。遺伝子群別に見ると、GI が 3 ロット

4 検体、GII が 4 ロット 7 検体から検出された。中腸腺 1g 当たりに含まれる NoV 遺伝子の量は最少 71 コピー、最大 3,071 コピーであった。また、Nested PCR の結果、5 ロット 13 検体から NoV 遺伝子が検出された。遺伝子群別に見ると GI が 1 ロット 2 検体、GII が 5 ロット 13 検体から検出された。

### 2. 系統解析(表 1、図 1)

系統解析の結果、検出された GI は GI/4 であり、GII は GII/2、GII/4、GII/6、GII/11、GII/12、GII/13 および GII/14 であった。また、GII/4 はすべて GII/4\_2012 変異株 (Sydney/NSW0514/2012/AU 近縁株)であった。

ダイレクトシーケンスにより解析が困難であった PCR 産物をクローニングした結果、検体番号 4-3 の NoV GII を除き、すべてのクローンが同一の遺伝子型であった。検体番号 4-3 の NoV GII については、24 クローンの塩基配列を解析し、10 クローンが GII/12、8 クローンが GII/4\_2012、6 クローンが GII/13 であった。

## D. 考察

2012 年 10 月から 2013 年 3 月までに福岡県内で発生した食中毒疑い事例のうち 16 事例から NoV が検出され、12 事例が GII/4\_2012 変異株を原因とするものであった<sup>1)</sup>。また、2012 年度の感染症発生動向調査においても感染性胃腸炎由来 NoV の遺伝子型のおよそ 7 割は GII/4\_2012 変異株であった<sup>2)</sup>。これらのことから、福岡県の周辺は GII/4\_2012 変異株が広く分布



していたと思われる。今回の市販カキの調査結果においても、福岡県周辺の海域を産地とするカキからGII/4\_2012変異株が検出されたことから、市販カキの調査はそのシーズンのNoVの流行株を反映しているものと考えられた。

NoVが検出された市販カキの産地であるA県とG県はともに西日本に位置しているが、距離は離れている。今回の調査ではその両方からGII/4\_2012が検出された。2011-12シーズンに新たに出現したGII/4\_2012は、2012年12月に2012-13シーズンにおいて全国の食中毒事例や感染性事例から検出されていると報告されており<sup>3)</sup>、今回の調査により2013年2月には西日本の広範囲に分布し、カキ中に集積していたことが示唆された。一方で、GII/4\_2012以外の遺伝子型も複数検出されたことから、感染性胃腸炎の主な原因ウイルスではない遺伝子型も広く分布していることが示唆された。

検出されたNoV GIIの定量結果では、生食用市販カキに含まれるNoVの平均コピー数は中腸腺1g当たり490コピーであったのに対し、加熱調理用市販カキに含まれるNoVの平均の量は中腸腺1g当たり1,603コピーであったことから、生食用と比較して加熱調理用の方が汚染されている傾向が認められた。

#### E. 結論

1. 市販カキ6ロットのうち5ロットからNoV遺伝子が検出された。
2. カキ中腸腺1gに含まれるNoVの量は最小71コピー、最大3,071コピーであった。

3. 生食用と比較して加熱調理用の方が汚染されていた。

4. カキから検出されたNoVの遺伝子型は、GI群は1種類であったがGII群は多種類であった。また、GII/4はすべてSydney株と近縁のGII/4\_2012変異株であった。

5. 環境中には感染性胃腸炎の主な原因ではないNoVの遺伝子型も広く分布していることが示唆された。

#### 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

#### H. 参考文献

- 1) 福岡県保健環境研究所所報 第40号, p17, p123, 2013
- 2) 福岡県結核・感染症発生動向調査事業資料集 平成24年, 2013
- 3) IASR Vol. 33, p333-334, 2012

表 1 検体一覧と NoV 検出結果

検体	産地	検体番号	Real-time PCR (単位はコピー/g)		Nested PCR		遺伝子型	
			GI	GII	GI	GII	GI	GII
1 生食用	A県	1-1		260		+		GII/4_2012
		1-2						
		1-3				+		GII/2
2 生食用	A県	2-1	119	241		+		GII/4_2012
		2-2		1155		+		GII/4_2012
		2-3	230			+		GII/4_2012
3 生食用	A県	3-1						
		3-2		303		+		GII/6
		3-3				+*2		GII/14
4 加熱調理用	A県	4-1		105		+		GII/4_2012
		4-2		1633	+	+*3	GI/4	GII/11
		4-3	580	3071	+*1	+*4	GI/4	GII/4_2012, GII/12, GII/13
5 殻付カキ	G県	5-1				+		GII/6
		5-2	71			+		GII/4_2012
		5-3				+		GII/14
6 生食用	C県	6-1						
		6-2						
		6-3						

\*1~\*4 はクローニング後、シークエンス解析を行った検体を示す。

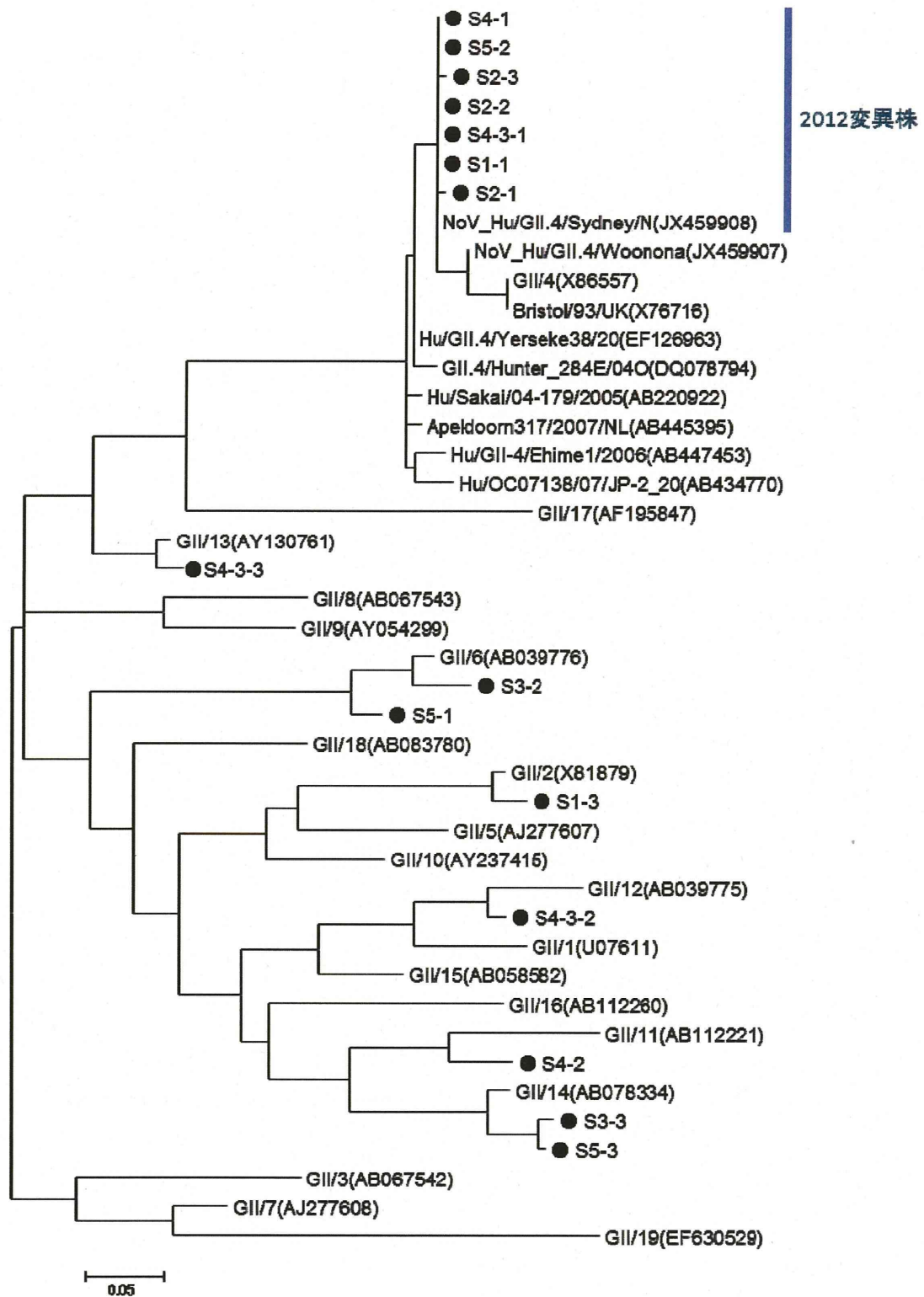


図1 NoV GII/4 の系統樹 (N/S 領域)

## 下水および養殖カキからのノロウイルス検出

研究協力者	佐藤 直人	岩手県環境保健研究センター
研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所
研究協力者	高橋 雅輝	岩手県環境保健研究センター
研究協力者	齋藤 幸一	岩手県環境保健研究センター

### 研究要旨

2013 年 10 月から 2014 年 1 月に、県内の A 湾に隣接する下水処理施設の流入水・放流水および A 湾産の養殖カキからノロウイルス遺伝子の検出を試みた。その結果、流入水および放流水のいずれからでもノロウイルス GI および GII が検出され、当該下水処理施設におけるノロウイルスの除去率はおよそ  $10 \sim 10^2$  オーダーであった。養殖カキからは、1 月にノロウイルス GII が検出されたが、検出に養殖海域や水深による違いはみられなかった。

### A. 研究目的

本県は生食用カキの主産地であり、ノロウイルス汚染のないカキの生産は、ノロウイルスによる食中毒の発生防止を図る上で重要である。

そこで今回、安全・安心な生食用カキの生産体制の構築に資することを目的に、県内 A 湾に併設されている下水処理施設の流入水・放流水に含まれるノロウイルス量を調査し、汚水処理過程におけるノロウイルス除去率について検証した。併せて、A 湾で養殖したカキのノロウイルス検出状況を調査し、環境水におけるノロウイルスの挙動とカキへのノロウイルスの蓄積状況との関連性を検討した。

### B. 研究方法

#### 1. 材料

##### 1) 下水処理施設の流入水・放流水

2013 年 10 月～2014 年 1 月までの間、県内 A 湾に隣接する下水処理施設（対象人口：8000 人、処理方法：長時間エアレーション法）の流入水および放流水を毎月 2 回採取し、計 16 検体を用いた（表 1）。

##### 2) 養殖カキ

2013 年 10 月～2014 年 1 月までの間、A 湾のカキ養殖海域の 3 地点（A、B、C）に、海水面より 2m および 10m の位置に垂下したカキを調査 1 回あたり 1 箇所から各 3 件を毎月 2 回採取し、計 144 件を用いた（表 2）。

#### 2. 試料前処理方法

1) 環境水は 12,000rpm で 20 分間遠心後、上清を pH3.5 に調整、陰電荷フィル