

波形が混合した Electropherogram のサンプルから、配列特異的なシーケンス用プライマーにより、GII/4 と GII/6 の遺伝子塩基配列を得ることができた。

ノロウイルス以外にも、サポウイルス、アストロウイルス、アイチウイルスなど、胃腸炎関連ウイルスも検出され、多様なウイルスの存在が確認できた。

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

3. その他：なし

表1 Primers for RT-PCR

Target	1st PCR		2nd PCR	
	name	sequence	name	sequence
Sapovirus ^{※1}	SAV124F	GAY CAS GCT CTC GCY ACC TAC	1245Rfwd	TAG TGT TTG ARA TGG AGG G
	1F	TTG GCC CTC GCC ACC TAC	SVR2	GWG GGR TCA ACM CCW GGT GG
	5F	TTT GAA CAA GCT GTG GCA TGC TAC		
	SVR13	GGT GAN AYN CCA TTK TCC AT		
	SVR14	GGT GAG MMY CCA TTC TCC AT		
Astrovirus ^{※2}	Precap1	GGA CTG CAA AGC AGC TTC GTG	AC1	ATG GCT AGC AAG TCT GAC AAG
	AC230	GGT TTT GGT CCT GTG ACA CC	AC230	
Aichivirus ^{※3}	C+	ACA CTC CCA CCT CCC GCC AGT A	C94b	GAC TTC CCC GGA GTC GTC GTC T
	C-	GGA AGA GCT GGG TGT CAA GA	264k	GAC ATC CGG TTG ACG TTG AC

※1 Kitajima M et al. Detection and genetic analysis of human sapoviruses in river water in Japan.

App. Environ. Microbial., 76: 2461-2467, 2010.

※2 Sakon N, et al. Genomic characterization of human astrovirus type 6 Katano virus and the establishment of a rapid and effective reverse transcription-polymerase chain reaction to detect all serotypes of human astrovirus. J. Med. Virol., 61: 125-131, 2000.

Sakamoto T. et al. Molecular epidemiology of astroviruses in Japan from 1995 to 1998 by reverse transcription-polymerase chain reaction with serotype-specific primers (1 to 8). J. Med. Virol., 61(3):326-331, 2000.

※3 Yamashita T. et al. Application of a reverse transcription-PCR for identification and differentiation of Aichi virus, a new member of the Picornavirus family associated with gastroenteritis in humans.

J Clin Microbiol. , 38: 2955-2961, 2000.

表2 ノロウイルスのリアルタイムPCRによる検出状況

NO.	加熱/ 生食区分	産地	中腸腺 (g)	中腸腺 (個数)	NoroGI				NoroGII							
					Noro GI 実測コピー数	Noro GI 陽性数	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	中腸腺1gあ たりのコピー 数	中腸腺1gあ たりの平均コ ピー数	Noro GII 実測コピー数	NoroGII 陽性数	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	中腸腺1gあ たりのコピー 数	中腸腺1gあ たりの平均コ ピー数
1-1	生食用	HG	3.1	1		-					11.30	2+	2,973	2,576	959	910
1-2			2.4	1					6.25	1,215	506					
1-3			2.8	1				15.20	3,541	1,265						
3-1		HG	3.8	1		-				0.30	-	96		25		
3-2			2.5	1												
3-3			3.2	1												
2-1		M	2.3	1	0.07	-	14.48		6.30		4.75	1+	983	3,559	427	1,173
2-2			3.3	1					29.34	8,352	2,531					
2-3			2.4	1	0.21		41.20		17.17	6.85	1,344		560			
4-1	加熱用	N	3.2	1		-				56.70	3+	15,180	14,373	4,744	6,008	
4-2			3.4	2					74.95	10,425		6,132				
4-3			4.9	2				83.00	17,513	7,148						
5-1		N	3.2	1		-				79.50	3+	21,929	25,173	6,853	11,747	
5-2			3.7	2	0.17		26.48		14.31	210.30		32,758		17,707		
5-3			3.9	2					123.35	20,830		10,682				
6-1		H	2.8	2		-						1+		5,038		2,770
6-2			4.2	2					4.35	727	346					
6-3			3.6	2	6.06		988.81		549.34	57.30	9,350		5,194			

表3 検出された胃腸炎ウイルスの遺伝子解析による型別結果

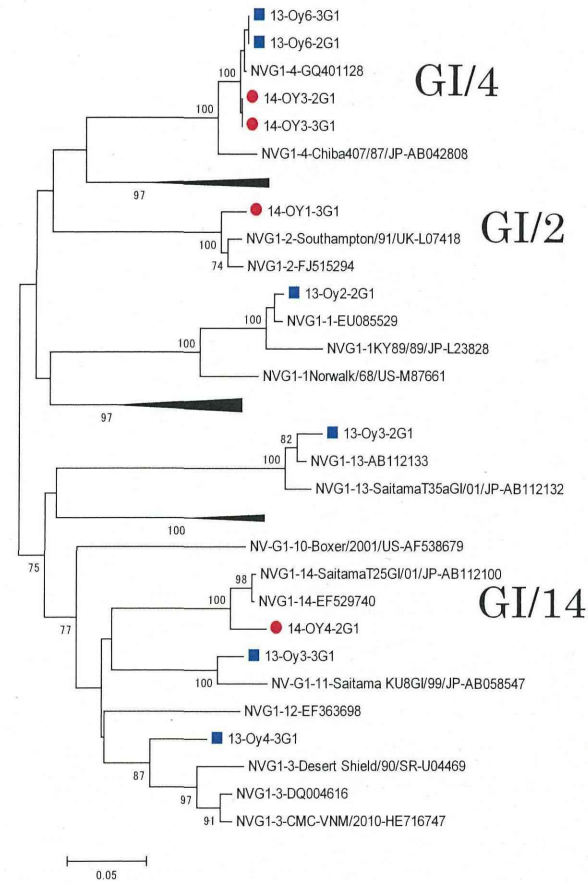
NO.	加熱/生食 区分	産地	Noro GI	Norovirus GII				Sapovirus	Astrovirus	Aichivirus										
				PCRプライマー によるシーケ ンス採取	シーケンスプライマーによる採取															
					G2-4F	G2-4R	G2-6F				G2-6R									
1-1	生食用	HG	GI/2	GII/4 2012																
1-2																				
1-3											Ast 1									
2-1		HG			GII/4 2012															
2-2																				
2-3							Mix	GII/4 2012	GII/4 2012	GII/6	GII/6									
3-1							Mix	GII/4 2012	Mix	GII/13	×			A						
3-2						M	GI/4							A						
3-3							GI/4	Mix	Mix	Mix	Mix	GII/6	GI-2	A						
4-1	加熱用	N	GI/14	Mix	GII/4 2012	GII/4 2012	GII/6	▼GII/6		Ast 1	A									
4-2																				
4-3													Mix	GII/4 2012	GII/4 2012	GII/6	GII/6		Ast 1	Canine Kobu
5-1		N		Mix	GII/4 2012	GII/4 2012	GII/6	▼GII/6		Ast 1	A									
5-2													Mix	GII/4 2012	GII/4 2012	GII/6	▼GII/6		Ast 1	A
5-3													Mix	GII/4 2012	GII/4 2012	GII/6	▼GII/6		Ast 1	
6-1		H			GII/4 2012						Ast 1									
6-2														GII/6						
6-3														Mix	Mix	GII/4 2012	×	×	GI-2	Ast 1

“Mix” は Electropherogram 上で波形の混合がみられたサンプル、▼はノイズが多いサンプル、×は波形がみられなかったサンプル。

表4 逆転写酵素の違いによるリアルタイムPCRの定量検査結果の相違

NO.	加熱/生食 区分	産地	Norovirus GI				Norovirus GII			
			Transcriptor RT		High capa RT		Transcriptor RT		High capa RT	
			実測コ ピー数	陽性・ 陰性判定	実測コ ピー数	陽性・ 陰性判定	コピー数	陽性・ 陰性判定	コピー数	陽性・ 陰性判定
1-1	生食用	HG		-		-		-	11.30	+
1-2				-		-		-	6.25	-
1-3				-		-		-	15.20	+
2-1		HG		-		-		-		-
2-2				-		-		-		-
2-3				-		-		-		-
3-1		M		-	0.08	-		-	4.75	-
3-2				-	0.11	-		-	29.34	+
3-3				-	0.21	-		-	6.85	-
4-1	加熱用	N		-		-	0.20	-	56.70	+
4-2				-		-	0.58	-	74.95	+
4-3				-		-	0.35	-	83.00	+
5-1		N		-		-	1.50	-	79.50	+
5-2				-	0.17	-	2.21	-	210.30	+
5-3				-		-	0.77	-	123.35	+
6-1		H		-		-		-		-
6-2				-		-		-		-
6-3				-	6.05	-	0.38	-	57.30	+

Norovirus GI
233bp



Norovirus GII
233bp

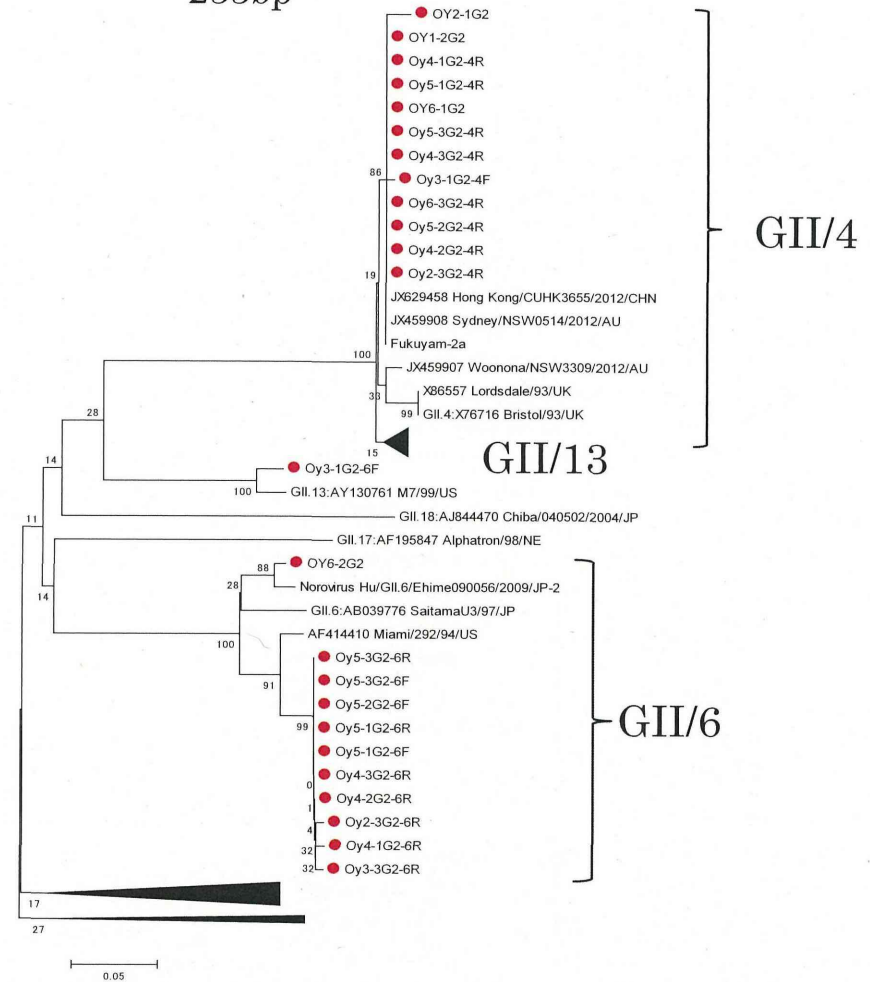


図1 ノロウイルスの塩基配列に基づく系統樹

■ 2013年2月購入 ● 2014年2月購入

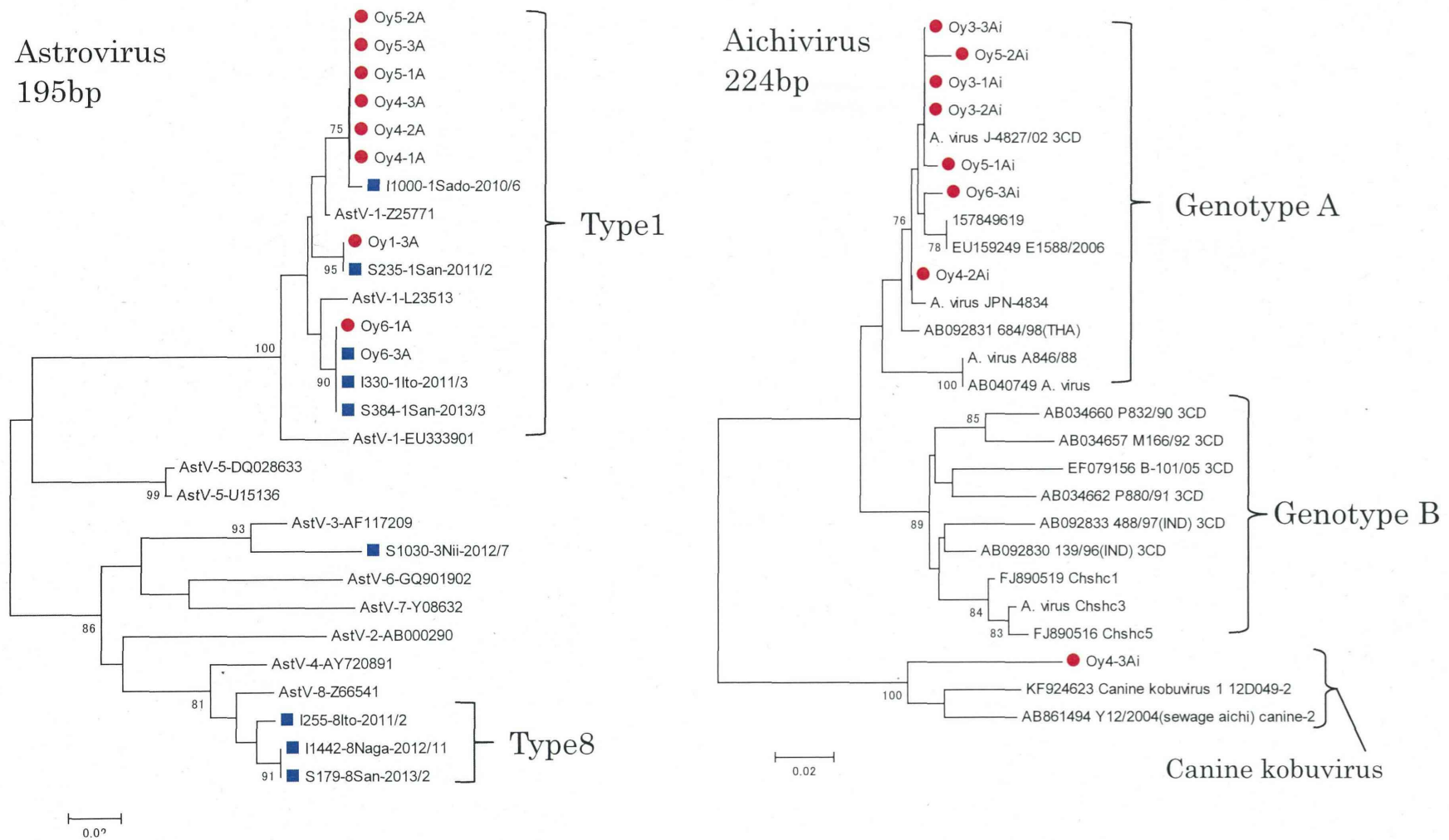


図2 アストロウイルスとアイチウイルスの塩基配列に基づく系統樹

● : カキ検体 ■ : 2010年以降の患者検体

平成 26 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

ウイルス性胃腸炎検査における SPIA (Single Primer Isothermal Amplification) 法導入に関する検討

研究協力者	森 功次	東京都健康安全研究センター
研究分担者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	宗村 佳子	東京都健康安全研究センター
研究協力者	永野 美由紀	東京都健康安全研究センター
研究協力者	木本 佳那	東京都健康安全研究センター
研究協力者	林 志直	東京都健康安全研究センター

研究要旨

食中毒事例の調査において、感染推定原因食品の検査は重要であるが、食品試料中に含まれるウイルス量は微量であり、検査の高感度化が必要である。このような背景から様々な前処理方法が検討および報告されている状況にある。本研究は抽出後のウイルス RNA を逆転写する際に一連の反応として cDNA を増幅させる SPIA 法についてウイルス性胃腸炎検査に導入が可能であるか検討した。その結果、ウイルス培養上清希釈液およびカキ乳剤に添加したウイルス培養上清において検出値の向上が確認できた。しかし、カキ乳剤における結果からアミラーゼなどを用いる前処理が本反応を有効に作用させるために必要であると推察されたことから、検査の対象とする食品試料に応じた前処理の選択および設定が本反応を導入する場合に必須であると思われた。

A. 研究目的

ウイルス性胃腸炎の検査において、特に食中毒事例に関わる食品検体からのウイルス検出について検査の高感度化は大きな課題である。現在の状況として試料に応じた前処理方法や real-time PCR 法による検出はひろく導入および実施されていると思われる。そこで逆転写反応の際にあわせて cDNA を増幅させる SPIA (Single Primer Isothermal

Amplification) 法に着目しウイルス性胃腸炎の検査に導入が可能であるかを検討することを目的とした。

B. 研究方法

1. 材料

Murine Norovirus (MNV) S7 株の培養上清およびヒトノロウイルス (NoV) を含む糞便乳剤を供試ウイルスとした。

2. 方法 1: SPIA 法による増幅効果の比較

MNV ウイルス液および NoV を含む糞便乳剤の希釈列を作製し、各希釈段階における SPIA 法を用いた際の遺伝子増幅の効果について確認した。すなわち、Ovation Pico WTA System V2 (Takara/NuGEN) 添付の試薬および指定の温度条件を用いて逆転写反応による cDNA 合成、二本鎖 cDNA 合成、SPIA 反応による cDNA 増幅をそれぞれ実施した。得られた cDNA は Ultrafree-DA (Merck-Millipore) により精製し、random primer による逆転写試薬である High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies) を用いて合成した cDNA とともに real-time PCR 法により定量し、増幅効率を比較した。

3. 方法 2; SPIA 法とアミラーゼ処理の効果の比較

カキ中腸腺乳剤に MNV ウイルス液を希釈列を作製し、上記の方法と同様に各希釈段階における SPIA 法を用いた際の遺伝子増幅の効果についてアミラーゼ処理による場合と効果を比較した。

(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. 結果 1: SPIA 法による増幅効果の比較
random primer により合成した MNV 培養上清由来の cDNA 希釈列の定量値 $1.8 \times 10^6 \sim 9.1 \times 10^5$ (copies/ μ L) に対し、SPIA 反応を用いた cDNA は $3.3 \times 10^2 \sim 1.9 \times 10^7$ (copies/ μ L) と検出値が向上した。反応に用いた RNA1 μ L あたりの計算値は random primer が $7.3 \times 10^1 \sim 3.6 \times 10^5$ (copies)、

SPIA 法が $1.6 \times 10^3 \sim 9.4 \times 10^7$ (copies) であった。NoV 希釈列を用いた検討においては、1000 倍希釈以降で検出値の向上がみられた。

2. 結果 ; SPIA 法とアミラーゼ処理の効果の比較

カキ乳剤における検討において、amylase による前処理と SPIA 法を組み合わせた場合の検出値がもっとも高値であったが、amylase による前処理なしで RNA を抽出した場合、SPIA 法による検出値は random primer を用いた検出値より低値であった。

D. 考察

以上の結果から、SPIA 法は反応における阻害物質の存在が大きく影響すると思われる。そのため本反応系は試料に含まれるウイルス量が微量と推測される食品材料からのウイルス検査において有効であると考えられるが、カキ乳剤における検討結果が示すように、試料に適した前処理を実施することが本反応系を有効に作用するための必須な条件と推定される。検査試薬が高価であることに加えて、効果的な前処理方法を設定・選択することが本法を用いて検出感度の向上を図る際に重要である。

E. 結論

- ・逆転写反応の際に SPIA 法を導入することにより検出値が高値となる。
- ・SPIA 法は阻害物質の影響が大きく、適切な前処理方法を設定および選択することが必要となる。

F. 研究発表

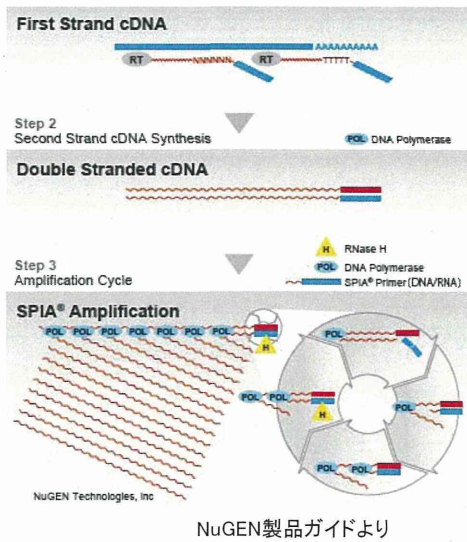
1. 論文発表

2. 学会発表

・森功次ほか：ウイルス性胃腸炎検査における SPIA (Single Primer Isothermal Amplification) 法導入に関する検討. 第 35 回日本食品微生物学会学術総会、2014、堺市

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



1. 抽出したRNAを鋳型にcDNA合成
2. 合成されたcDNAを鋳型に二本鎖cDNA合成
3. 二本鎖cDNAを鋳型にSPIA反応によるcDNA増幅
(増幅されたcDNAをreal-time PCRにより測定)

図1: SPIA法の反応原理と工程

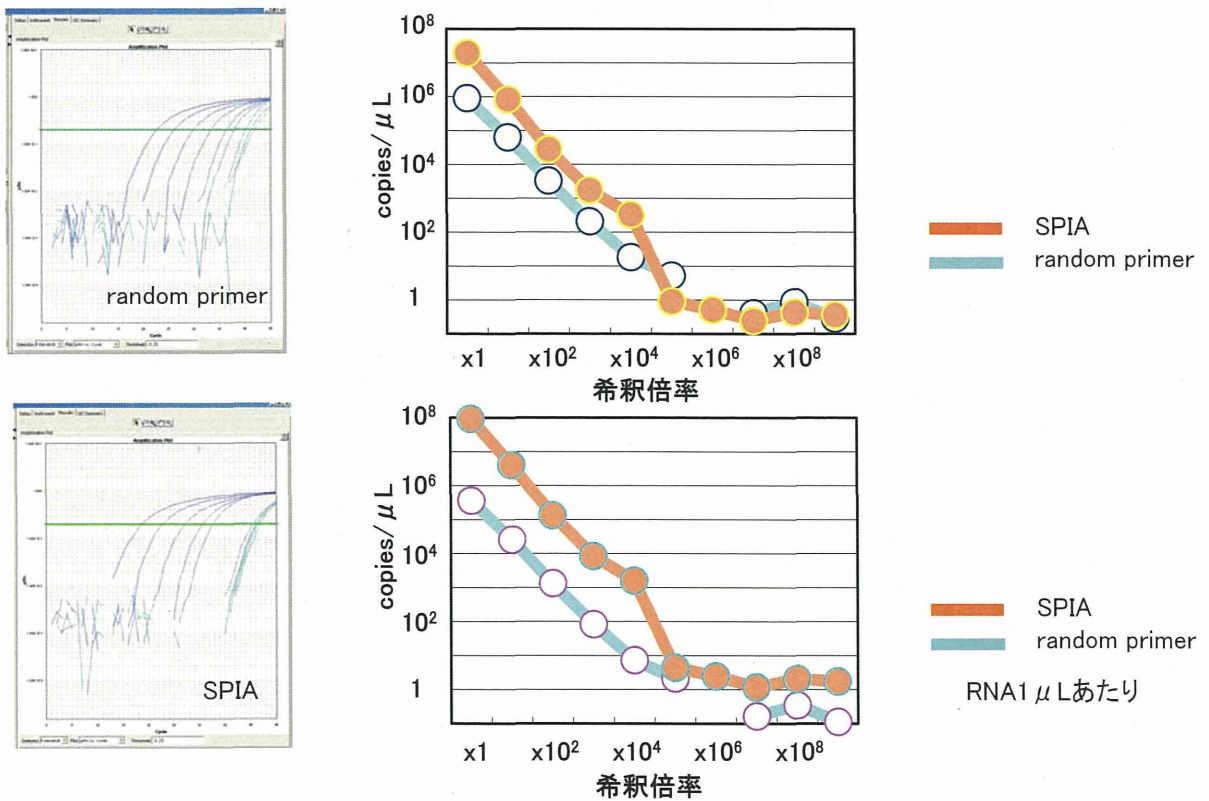


図2: MNV培養上清を用いた比較

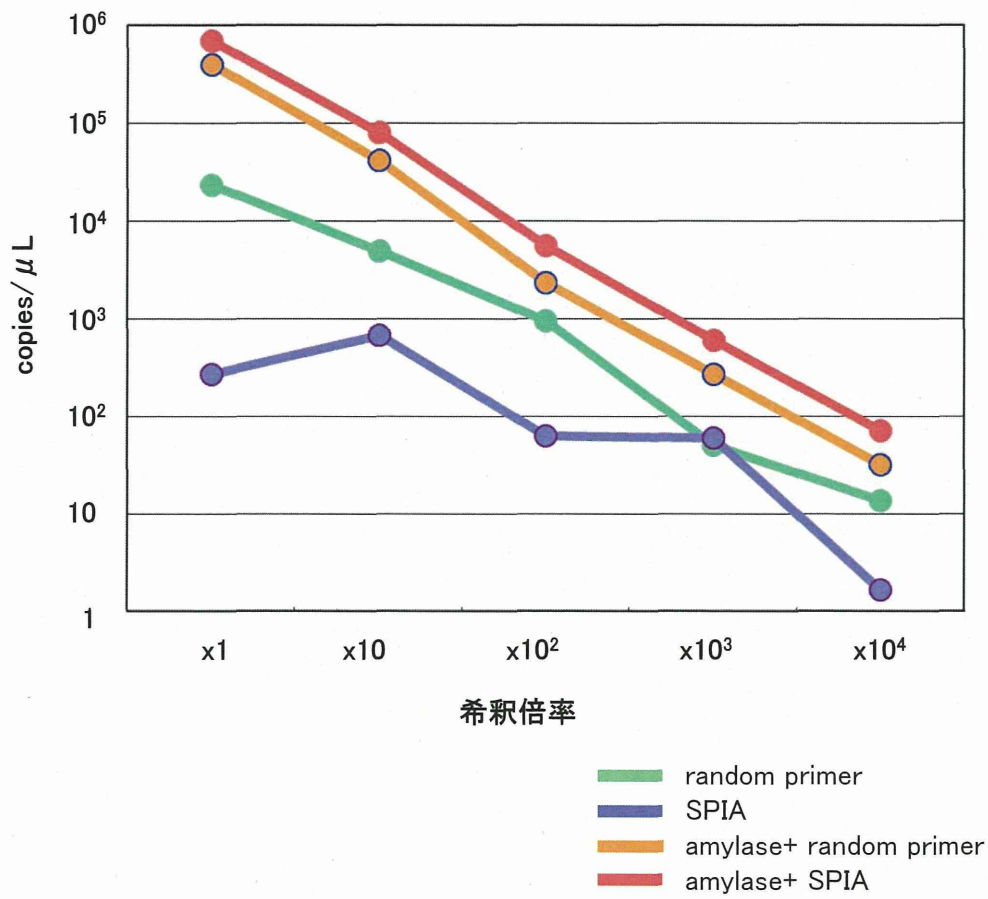


図3: カキ中腸腺乳剤に添加したMNV培養上清における比較

平成 26 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

東京都におけるノロウイルス検出状況(2013 年度)

研究協力者	宗村 佳子	東京都健康安全研究センター
研究分担者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	森 功次	東京都健康安全研究センター
研究協力者	永野美由紀	東京都健康安全研究センター
研究協力者	木本 佳那	東京都健康安全研究センター
研究協力者	林 志直	東京都健康安全研究センター

研究要旨

2013 年 4 月～2014 年 3 月に胃腸炎ウイルス検査の依頼があった 444 事例の糞便を材料としてノロウイルス(NoV)の検出を試みたところ、201 事例(45.3%) 1,254 名から NoV が検出された。このうち、GI は 16 例、GII は 167 例、GI & GII が 18 例であった。月別では 12 月が 50 例で最も多く、次いで 1 月(44 例)が多かった。検出された遺伝子型では GII.4 が 108 例(53.5%)と最多であり、次いで GII.6 が 33 例(16.4%)であった。GII.6 発生例のうち、16 例(48.5%)は小児施設で発生していた。また、都内では近年検出されていなかった GII.17 が 4 月以降 4 事例から検出され、Pol 領域の塩基配列を確認したところ、いずれも GII.P3 となり、キメラウイルスであることがわかった。

A. 研究目的

ノロウイルス(NoV)は感染性胃腸炎や食中毒の代表的な原因ウイルスであり、NoV の遺伝子型の把握は、長期的な疫学解析において有用である。今回、2013 年度に東京都内で検出された NoV について、その遺伝子型を解析したので報告する。

B. 研究方法

1. 材料

2013 年 4 月～2014 年 3 月に食中毒あるいは施設内感染が疑われ、胃腸炎ウイルス

検査の依頼があった 444 事例 3,762 例(患者及び食品取扱従事者等)の糞便を材料とした。

2. 方法

検体より RNA を抽出した後、Kageyama ら(J Clin Microbiol, 2003)の方法によりリアルタイム RT-PCR を実施した。陽性事例については、N/S 領域の塩基配列をダイレクトシーケンスにより決定し、Norovirus Genotyping Tool Version 1.0 により遺伝子型を分類した。また、一部の検体についてはポリメラーゼ(Pol)領

域の塩基配列を確認した。

(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

201 事例 (45.3%) 1,254 名から NoV が検出された。月別では 12 月が 50 例で最も多く、次いで 1 月 (44 例) に多く検出された (表 1)。発生施設別では、飲食店が最も多く 80 例 (39.8%) を占め、次いで保育園等乳幼児施設が 35 例であった。患者から NoV が検出された事例のうち 150 例については飲食店従業員や施設職員等関係者の NoV 検索を行い、そのうち 38 例 (25.3%) から NoV が検出された。201 事例のうち、GI は 16 例、GII は 167 例、GI & GII が 18 例であった (表 1)。検出された遺伝子型では GII.4 が 108 例 (53.5%) と最多であり、次いで GII.6 が 33 例 (16.3%) であった (図 1)。GII.6 検出事例のうち、約半数にあたる 16 例は小児施設 (乳幼児施設及び小学校) で発生していた (図 2)。小児施設で発生した NoV 感染事例は 41 例であったが、GII.6 の占める割合は 39.0% で最多であり、次いで GII.4 が 12 例 (29.3%) であった。また、都内では最近 5 年間では検出されていなかった GII.17 が 4 事例 8 名から検出された。検出された時期は 4 月 2 事例 (1 例は GI & GII 検出事例のうちの 1 名)、9 月及び 10 月にそれぞれ 1 事例であった。これら 8 株の N/S 領域の遺伝子配列を比較したところ、100% 一致した。このうち 3 例 5 株について Po1 領域の塩基配列についても確認したとこ

ろ、いずれも GII.P3 であった。

D. 考察

東京都における 2013 年度の胃腸炎ウイルス検査の依頼数は合計で 3,762 件となり、これは前年度の 5,007 件、前々年度の 4,876 件に比較して少なかった。遺伝子型別では、GII.4 が最多となり、これは前及び前々年度と同様であった。次いで GII.6 が多かったが、GII.6 は 4~8 月には全く検出されず、秋以降に検出が目立ち始め年度合計で 33 例 (16.8%) が検出された。全国的にも、GII.6 は 2010/11~2012/13 シーズンには 4~21 例しか報告がなかったが、2013/14 シーズンには 116 例と大幅に増加している (IASR による)。過去に東京都で行った遺伝子解析では、GII.6 は 2008 年度に 260 例中 31 例 (11.9%) と多く検出され、そのうちの 64.5% (20/31) は小児施設で発生していた。今回も GII.6 検出例の約半数が小児施設での発生であったが、GII.6 が小児施設で多く発生した理由は今回の調査内では解明できず、検討を続けたい。

都内では近年検出されていなかった GII.17 が 4 事例から検出されたが、Po1 領域の塩基配列を確認したところいずれも GII.P3 となり、キメラウイルスであることがわかった。キメラウイルスの出現が NoV の大流行に繋がる可能性は高いことが指摘されており、キメラウイルスの検出にも注意を払っていく必要があると考えられた。

E. 結論

2013 年 4 月~2014 年 3 月に胃腸炎ウイ

ルス検査の依頼があった 444 例中 201 例 (45.3%) から NoV が検出された。検出された遺伝子型では GⅡ.4 が 108 例 (53.5%) と最多であり、次いで GⅡ.6 が 33 例 (16.3%) であった。GⅡ.6 発生例のうち、約半数にあたる 16 例は小児施設で発生していた。また、これまであまり検出されてこなかった GⅡ.P3/GⅡ.17 が 4 事例で検出された。

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表

1) 宗村佳子、森功次、永野美由紀、木本佳那、林志直、甲斐明美：東京都内の小児施設におけるノロウイルス検出状況 (2013/14)。平成 26 年度地方衛生研究所全国協議会第 29 回関東甲信越静岡ウイルス研究部会

G. 知的財産権の出願・登録状況

4. 特許取得：なし
5. 実用新案登録：なし
6. その他：なし

表 1 東京都における月別ノロウイルス検出事例数(2013/14)

	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	合計
G I	5	1	1	2	0	1	0	2	0	0	4	0	16
G II	9	5	4	2	1	3	7	20	50	37	11	18	167
G I & G II	5	2	0	0	0	0	0	1	0	7	2	1	18
合計	19	8	5	4	1	4	7	23	50	44	17	19	201

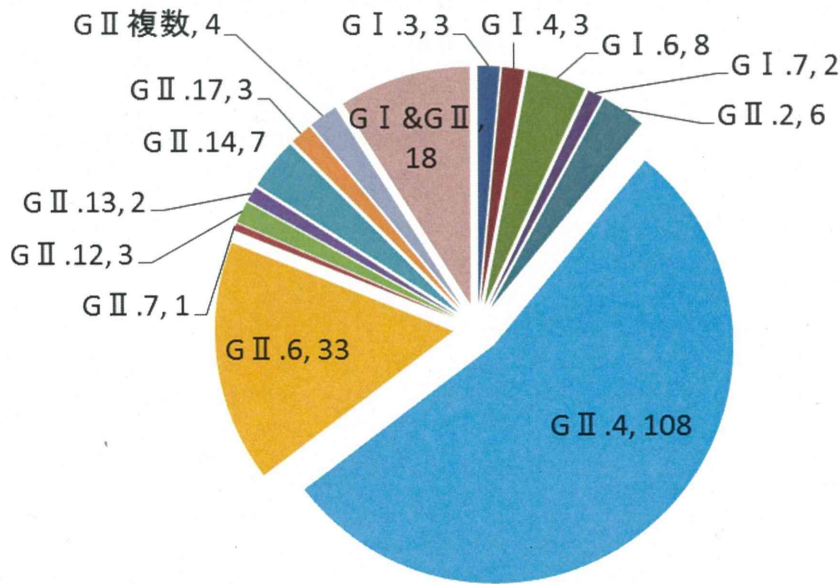


図 1 遺伝子型別ノロウイルス検出事例数(2013/14,n=201)

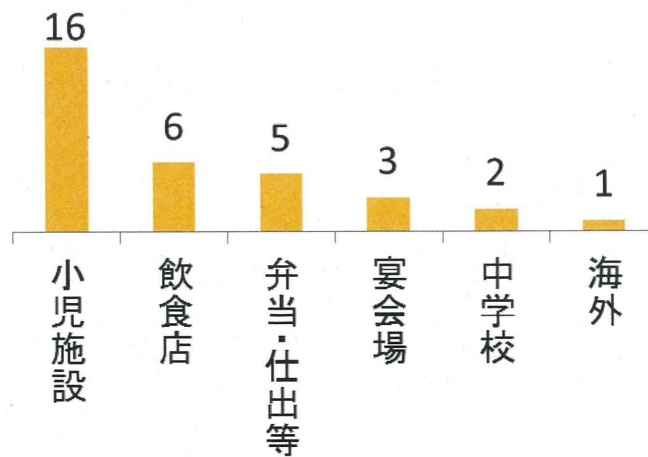


図 2 発生施設別の G II .6 事例数 (n=33)

2013/14 シーズンのノロウイルス検出状況

研究協力者	小林 慎一	愛知県衛生研究所
研究分担者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

2013/14 シーズンに散発性感染性胃腸炎患者から採取された糞便 292 検体についてノロウイルス (NoV) の検出検査を実施した結果、83 検体 (28.4%) から NoV が検出され、遺伝子グループ I (GI) 陽性が 2 検体 (2.4%)、遺伝子グループ II (GII) 陽性が 81 検体 (97.6%) であった。NoV 陽性検体の系統樹解析の結果、GI は 6 と 11 の 2 遺伝子型に、GII は 1, 2, 3, 4, 6, 13, 14 の 7 遺伝子型に型別され、GII/4 が 58.0% と過半数を占めた。GII/4 陽性の 47 検体をクラスター解析した結果、Asia 2003 と Sydney 2012 の 2 変異型に分類され、Sydney 2012 型が 97.9% と大勢を占めた。また、胃腸炎集団発生 15 事例のうち 12 事例から GII/4 が検出され、その全てが Sydney 2012 型であった。同シーズンに採水された流入下水 52 検体のうち、GI 陽性が 35 検体 (67.3%)、GII 陽性が 41 検体 (78.8%) とほぼ同じ割合で年間を通じて検出された。

A. 研究目的

ノロウイルス (NoV) は、乳幼児から高齢者までの幅広い年齢層のヒトに感染し、冬季に流行する感染性胃腸炎の主要な原因ウイルスの一つであり、またウイルス性食中毒の主要な病因物質である。2006/07 シーズンの NoV の大流行以降、2 年間隔で NoV の流行が繰り返しており、2012/13 シーズンには GII/4 の新たな変異株が出現し、全国的に大流行した。NoV の流行状況が感染性胃腸炎の発生動向やウイルス性食中毒の発生状況に大きく関与していると想定されることから、NoV の制御やウイルス性食中毒の予防対策に

は、NoV の流行遺伝子型や遺伝子変異に関する流行動態の把握が肝要である。

そこで、2013/14 シーズンの愛知県における NoV 流行状況の把握を目的として、感染性胃腸炎散発事例、胃腸炎集団発生事例、流入下水について、NoV の検出検査及び分子疫学解析を実施した。

B. 研究方法

1. 材料

2013 年 9 月～2014 年 8 月に愛知県感染症発生動向調査の病原体定点で採取された感染性胃腸炎患者の糞便 292 検体、同シーズンに当所に搬入された胃腸炎集団

発生 17 事例からの患者便 89 検体と従事者便 85 検体、愛知県内 1 ヲ所の下水処理場で毎週 1 回採取された流入下水 52 検体を用いた。

2. ノロウイルス検査法

Veal infusion broth で糞便を 10 %乳剤、吐物は 50 %乳剤とした後、10,000 G で遠心分離し、上清から High Pure Viral RNA Kit (Roche) を用いてウイルス RNA を抽出した。下水検体はポリエチレングリコール 6000 で 10 倍濃縮後、RNA 抽出した。NoV 遺伝子検出検査はウイルス性下痢症診断マニュアルに記載されたプライマーを用いた One Step RT-PCR 法で実施した。

NoV の遺伝子型は、構造タンパク遺伝子の PCR 増幅産物を Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) で精製後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI) を用いたダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定し、Katayama らの方法 (Virology, 299: 225-239, 2002)) に従い型別分類した。GII/4 NoV については、GII/4 のクラスター分類を目的として既知の GII/4 変異株との相同性を解析した。系統樹解析は ClustalW を用いた近隣結合法で行った。

(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. 感染性胃腸炎散発事例からのノロウイルス検出状況

表 1 に感染性胃腸炎患者からの NoV の月別・遺伝子型別の検出状況を示した。

病原体定点で採取された患者便 292 検体中 83 検体 (28.4%、83/292) が NoV 陽性であった。その内、2 検体 (2.4%) が Genogroup I (GI) NoV 陽性であり、81 検体 (97.6%) が GII NoV 陽性であり、GII NoV が大勢を占めた。感染性胃腸炎の流行に合致して、NoV が高頻度に検出された。GI NoV の遺伝子型別では、GI/6 と GI/11 の各 1 検体、GII NoV の遺伝子型別では GII/4 が 47 検体 (58.0%)、次いで GII/6 : 17 検体 (21.0%)、GII/3:6 検体 (7.4%)、GII/14:5 検体 (6.2%)、GII/2:4 検体、GII/1 と GII/13 が各 1 検体 (1.2%) であり、GII/4 が過半数を占めた。

2. GII/4 変異型のクラスター解析

散発性感染性胃腸炎患者由来の GII/4 陽性の 47 株をクラスター解析した結果、Sydney 2012 変異型が 46 株 (97.9%) と Asia 2003 型が 1 株 (2.1%) に分類され、2006b 型や 2009 型は全く検出されなかった。

3. 胃腸炎集団発生事例からのノロウイルス検出状況

表 2 に当所で検査した胃腸炎集団発生 17 事例からの NoV 検出状況を示した。17 事例のうち、GI 陽性が 2 事例で、2 事例ともに GI/6 に型別された。GII 陽性の 15 事例の内、12 事例から GII/4 が検出され、全てが Sydney 2012 変異型であった。残り 3 事例のうち、GII/3 陽性が 1 事例、GII/6 陽性が 2 事例であった。

4. 流入下水検体からのノロウイルス検出状況

表 3 に下水検体からの NoV 検出状況を示した。下水検体 52 検体の内、GI 陽性が 35 検体 (67.3%)、GII 陽性が 41 検体

(78.8%)と年間を通じてほぼ同じ割合で検出された。検出された遺伝子型はGIで11遺伝子型(GI/1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 13, 14), GIIで7遺伝子型(GII/1, 2, 3, 4, 12, 13, 17(新統一法))に分類された。

D. 考察

2013/14シーズンに散発性感染性胃腸炎患者から検出されたNoVの大勢はGII NoVであり、遺伝子解析の結果、GII/4が主流の遺伝子型であった。2012/13シーズンに、新たなGII/4変異型であるSydney 2012型が出現し、全国的に大流行したが、2013/14シーズンも引き続きSydney 2012型が大勢を占めた。また、2012/13シーズン、愛知県内では少なくとも5種類のGII/4変異株が流行していたが、2013/14シーズンはAsia 2003とSydney 2012の2種類であり、変異株の分布に変化を認めた。

胃腸炎集団発生事例についてもGII/4が高頻度に検出され、その全てがSydney2012型であった。

GII/4はヒトでの感染を繰り返す中で多様な変異型が出現しているが、その中から感染性や増殖性に優れたウイルスが大規模流行を起こすと推察される。NoVの培養増殖系及び感染動物実験系は未確立であるので、NoVの遺伝子型や遺伝子変異の継続的監視が重要と考えられる。

下水検体からは、GIで11遺伝子型、GIIで7遺伝子型と多様なNoVがシーズンを通じて検出された。GIIについては、ヒトでの流行期に合致して、下水検体からも高

頻度にNoVが検出された。一方、GIは散発、集発事例からの検出例数がGIIに比べ小数であるのに対し、下水からは高頻度に検出された。この結果は、NoVの成人間での流行や、不顕性感染NoVなどの反映と考えられる。下水中のNoV動態を調査することは、NoVの発生動向を把握する手段として有用であり、NoV流行株の早期探知や流行予測への活用につなげたい。

E. 結論

2013/14シーズンに感染性胃腸炎の散発事例及び集団発生事例から検出されたNoVは、GII/4が主流であり、前シーズンに全国的に大流行したSydney 2012変異型が大勢を占めた。また、下水検体からは、GI、GIIともに多様な遺伝子型のNoVがシーズンを通じて検出された。下水検体のNoV調査はヒトでの流行状況把握を補完する有用な手段と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 中根邦彦、小林慎一：岡崎市におけるノロウイルス遺伝子型の6年間の特徴—2007年4月～2013年3月—、感染症学雑誌 88(6)：875-877 (2014)

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 散発胃腸炎患者からのノロウイルスの月別・遺伝子型別検出状況
(2013/14 シーズン)

採取月	検査数	GI		GII						
		GI/6	GI/11	GII/1	GII/2	GII/3	GII/4	GII/6	GII/13	GII/14
9月	14									
10月	14									
11月	21				1	1	4	1		
12月	46				3		6	3	1	1
1月	30	1				2	11			2
2月	26						8	5		1
3月	19		1			1	3	2		1
4月	34						6	4		
5月	28					1	5	2		
6月	18						2			
7月	21			1			1			1
8月	21					1	1			
計	292	1	1	1	4	6	47	17	1	5

表2 胃腸炎集団発生事例のノロウイルス検査成績(2013/14 シーズン)

事例	検査日	検体		NoV陽性者数	NoV遺伝子型	原因施設
		患者	従事者			
1	10月4日	3	11	患者3、従事者1	GII/4 Sydney 2012	飲食店
2	11月7日	6		患者5	GII/4 Sydney 2012	バスツアー
3	11月19日	4	14	患者3、従事者1	GII/4 Sydney 2012	飲食店
4	12月17日	13		患者9	GII/4 Sydney 2012	飲食店
5	12月19日	2	18	患者1、従事者2	GII/4 Sydney 2012	飲食店
6	12月25日	5	7	患者4、従事者1	GII/4 Sydney 2012	飲食店
7	12月25日	5	5	患者2、従事者2	GI/6	飲食店
8	1月18日	3		患者2	GII/4 Sydney 2012	【照会】飲食店
9	1月31日	2		患者2	GII/4 Sydney 2012	【照会】飲食店
10	2月1日	2		患者2	GII/6	【照会】飲食店
11	2月18日	7	16	患者5、従事者4	GI/6	病院
12	3月1日	4		患者4	GII/4 Sydney 2012	飲食店
13	3月13日	11	3	患者8、従事者2	GII/4 Sydney 2012	老人福祉施設
14	3月15日	5	5	患者5、従事者2	GII/3	飲食店
15	3月19日	4		患者4	GII/4 Sydney 2012	【照会】旅館
16	3月20日	7	6	患者6、従事者1	GII/4 Sydney 2012	飲食店
17	5月29日	6		患者6	GII/6	ホテル
計		89	85	患者71、従事者16		