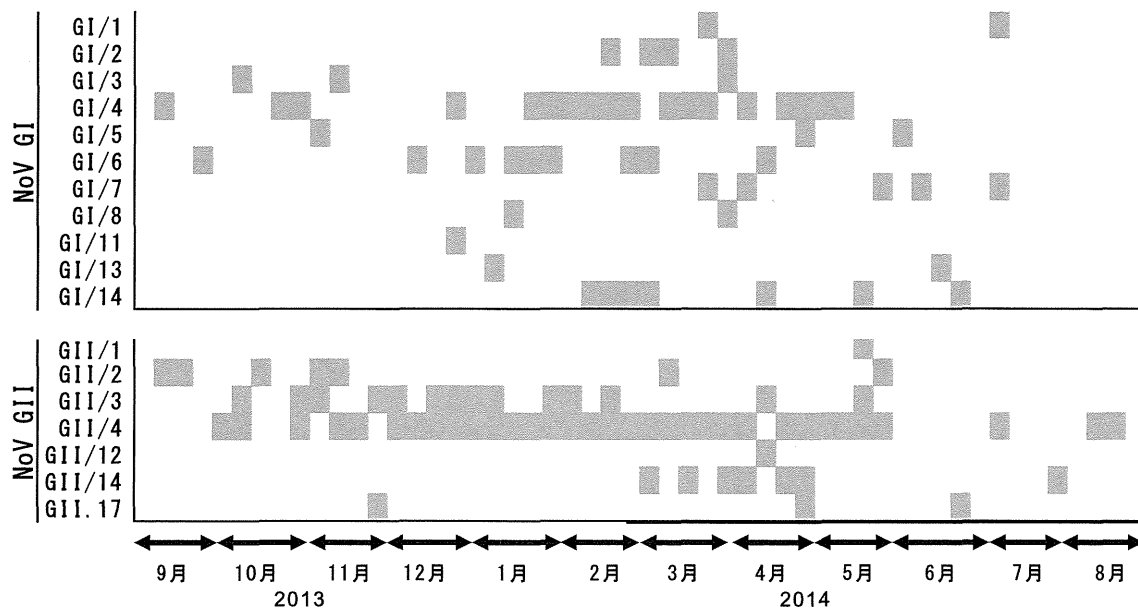


表 3 下水検体からの週別・遺伝子型別検出状況 (2013/14 シーズン)



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

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
研究分担者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

2014 年(1~12 月)は大阪市において集団胃腸炎 107 事例がノロウイルス(NV)陽性となった。2014 年春季には低年齢層において GII/6 株による事例が多発し、7 月まで認められた。主に流行していた GII/6 株は互いに非常に近縁であり、過去の GII/6 株とは遺伝的に異なっていた。2014 年 9~12 月には再び低年齢層において互いに非常に近縁な GII/3 株による事例が多発した。GII/4 株による事例は 1~3 月、12 月に発生しており、2014 年 12 月に発生した 1 事例から検出されたものが 2006b 亜型、他はすべて Sydney 2012 亜型に分類された。また、8 月および 12 月に発生した 2 事例から、大阪市で過去にほとんど検出されたことのない GII.17 (新統一命名法による)株が検出された。

国産市販生カキ 7 ロットについて 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。1 ロットから NV GI/4 および GII.17 が検出された。SV、HAV および HEV は検出されなかった。

A. 研究目的

ノロウイルス(NV)の流行規模は GII/4 の変異株出現と関連していることが指摘されており、NV 流行状況の把握や分子疫学的解析は NV 胃腸炎の流行予測や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

2014 年 (1~12 月) に当研究所へ検査依頼のあった集団胃腸炎 137 事例、患者糞便 481 検体を用いた。

国産生カキは 2014 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 5 ロット) に市販されていた合計 7 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。7 ロットは 4 県 6 海域から採取されものであり、C 県産 3 ロット、D 県産 2 ロット、A 県産 1 ロット、B 県産 1 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、フィルター付滅菌バッグ (GSI クレオス) に入れて破砕した後、9 倍量の PBS(-) および 25mg/ml の α -アミラーゼ/PBS 溶液を加え、37°C で 60 分間攪拌した。アミラーゼ処理後、フィルターろ液 12ml を 10,000rpm 20 分間遠心した。遠心上清 10ml に PEG 6000 および NaCl を加え (最終濃度 12% PEG および 1M NaCl)、4°C で 2 時間放置した。さらに 4°C 10,000rpm 30 分間遠心した沈渣に 0.3ml 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 の遺伝子型番号は、Kageyama ら (JCM 42, 2988-95, 2004) に従った。

また、検出された NV 株に変異ウイルスの疑いがある場合、RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) 領域および全 Capsid 領域を増幅し (JCM 46, 2406-9, 2008)、過去の株と塩基配列を比較した。RdRp 領域の遺伝子型別は、Norovirus Genotyping Tool ver. 1.0 (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool#/>) を用いて行った。

(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. NV 胃腸炎事例の発生状況

107 事例 (78.1%)、317 検体 (65.9%) から NV が検出された。NV 事例は 1~5 月まで多く発生し、夏季に減少したが、9 月から再びみられるようになり、11 月に急増した (図 1)。NV が検出された 107 事例のうち、ヒトからヒトへ感染が拡がった事例は少なくとも 91 事例 (85.0%) 認められ、主な原因施設は保育園であった。食中毒が疑われた事例は 15 事例 (14.0%) であり、そのうちカキの喫食が関連していた事例は 2 月、3 月、11 月に発生した 3 事例であった。

2. 市販生カキのウイルス汚染状況

市販生カキからのウイルス検査結果を表に示した。2014 年 2 月に市販されていた A 県産の加熱調理用 1 ロット (N14-2) から NV が検出された。中腸腺 1g あたりの NV 汚染量 (NV RNA コピー数) は、GI で 62 コピー、GII で 1,472 コピーであっ

た。検査したすべてのカキから SV、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 の中で遺伝子型別できたものは、11 種類 (GI : 5 種類、GII : 6 種類) であった。最も多く検出されたのは 41 事例 (38.3%) から検出された GII/6 であり、次いで GII/3 (40 事例、37.3%)、GII/4 (19 事例、17.8%) であった。

GII/6 株が検出された事例は 4~5 月に多く発生し、7 月まで認められた (図 1)。ヒトからヒトへの感染がほとんどであり (38/41 事例、92.7%)、主に保育園 (27 事例) および小学校 (6 事例) での発生であった。41 事例中 38 事例から検出された GII/6 株は Capsid N/S 領域において互いに非常に近縁 (塩基配列相同性 $\geq 97.6\%$) であった (2013/14 株)。RdRp 遺伝子を比較したところ、2013/14 株は GII.P7 型に分類され、2008-2009 シーズンに大阪市で流行した 2008/09 株と互いに近縁 (塩基配列相同性 $\geq 96.2\%$) であった (図 2)。Capsid 全長配列を比較したところ、2013/14 株は、過去の GII/6 株とは異なる遺伝的グループを形成し (図 3)、特徴的なアミノ酸置換が 4 か所 (N/S 領域 1 か所、P1 領域 2 か所、P2 領域 1 か所) 認められた。

GII/3 株が検出された事例は 5 月、9~12 月に発生し、11 月に集中していた。ヒトからヒトへの感染がほとんどであり (35/40 事例、87.5%)、主に保育園 (31 事例) での発生であった。40 事例すべてから検出された GII/3 株は Capsid N/S 領

域において互いに非常に近縁であった（塩基配列相同性 \geq 98.9%）。

GII/4 株が検出された事例は1~3月、12月に発生しており、食中毒や高齢者施設など患者が成人の場合が57.9%（11/19事例）であった。2014年12月に発生した1事例から検出されたものが2006b 亜型、他はすべて Sydney 2012 亜型に分類された。

また、8月（食中毒事例）および12月（高齢者施設）に発生した2事例から、大阪市で過去にほとんど検出されなかったGII.17（新統一命名法による）株が検出された。

市販生カキから検出されたNVの遺伝子型は、GI/4 およびGII.17であった（表）。

D. 考察

2013-2014 シーズンは、2013年12月にNV事例が急増し、主にGII/4 Sydney 2012 亜型が検出された（入谷ら、平成25年度研究協力報告書）。その後、NV事例は5月まで多発した。GII/4 株による事例は3月まで認められ、4月および5月は主にGII/6 株による事例が多発した。大阪府の感染性胃腸炎の定点あたり患者報告数も2014年第20~21週に過去10年間で最も多くなっており、事例の発生状況と同様であった。2013-2014 シーズンに認められたGII/6 株による胃腸炎事例は、主に同一または非常に近縁なウイルスが原因であり、発生施設の多くが保育園や小学校であったことから、本株は主に低年齢層においてヒトからヒトへ直接感染が拡大したものと推測された。RdRp および Capsid 遺伝子の解析から、

本株は過去に検出されたGII/6 株と遺伝的に異なっていた。Capsid 領域には4か所の特徴的なアミノ酸置換が認められたことから抗原性の変異も示唆され、遺伝子の変異が今回の流行の原因の一つであると考えられた。2014年8月以降は大阪市内で本株は検出されておらず、流行は終息したものと考えられた。

2014年9月から再び保育園においてNV胃腸炎事例がみられるようになり、11月に急増した。遺伝子型別の結果、流行したNVはGII/3 であり、春季に流行したウイルスとは異なっていた。この流行株の変化が、春季に続いて9~12月に同じ低年齢層で大きく流行したことに関連している可能性がある。本GII/3 株の流行原因の一つとして、遺伝子の変異が関連しているかどうか詳細な遺伝子解析を行う必要がある。

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。2014年2月市販の加熱調理用生カキからNVが検出され、GI/4 およびGII.17 に分類された。GII.17 は非常に稀な遺伝子型であり、大阪市では過去の検出例はほとんどなかったが、2014年8月および12月に発生した2事例からGII.17 株が検出された。稀な遺伝子型の検出および流行については、変異ウイルスと同様に流行状況を監視する必要がある。また、今回、カキにおいて稀な遺伝子型NVの出現を捉えたこと、後にそのウイルスによる胃腸炎事例が発生したことは、カキのNV調査がウイルス汚染実態の把握やリスク評価だけでなく、

NV の流行予測にもつながる可能性を示唆している。

SV、HAV および HEV は検出されなかったが、SV および 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. 2014 年春季に低年齢層に多発した NV 集団胃腸炎の主な原因は同一または非常に近縁な GII/6 株であり、過去の株と遺伝的に異なっていた。
2. 2014 年 9～12 月にかけて保育園で多発した NV 集団胃腸炎の主な原因は同一または非常に近縁な GII/3 株であった。
3. 国産市販生カキに NV 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。
4. 今回の調査から国産市販生カキに SV、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) 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 86, 2019-2025 (2014)

2) 山元誠司, 入谷展弘, 改田 厚, 久保英幸, 長谷 篤, 藤森良子, 森 宏美, 伯井紀隆, 辻本光広, 半羽宏之: 大阪市におけるロタウイルス感染症集団事例発生状況と流行株の特徴 (2009～2013 年), 病原微生物検出情報 月報 '35(No. 409), 67-68 (2014)

3) 入谷展弘, 山元誠司, 改田 厚, 阿部仁一郎, 久保英幸, 西尾孝之, 伯井紀隆, 大平真由, 安井典子, 榊田晴美, 細井舞子, 松本珠美, 坂本徳裕, 廣川秀徹, 半羽宏之, 野田 衛: 2014 年 9～11 月に発生したノロウイルスによる胃腸炎集団事例について—大阪市, 病原微生物検出情報 月報 2014/12/26 掲載 (インターネット版)

2. 学会発表

1) 山元誠司, 入谷展弘, 改田 厚, 久保英幸, 西尾孝之: 大阪市におけるロタウイルス遺伝子構成の変遷: Wa から DS-1, 平成 26 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, 神戸 (2014. 10. 3)

2) 入谷展弘, 山元誠司, 改田 厚, 久保英幸, 野田 衛: 2013/14 シーズンに大阪市において集団胃腸炎事例から検出されたノロウイルス GII.6 株の分子疫学

的解析，第62回日本ウイルス学会，横浜
(2014. 11. 10-12)

3) 山元誠司，改田 厚，久保英幸，入
谷展弘：ユニークな G3 型 VP7 遺伝子を有
するロタウイルス DS-1 様 G3P[8]株の遺
伝子解析，第62回日本ウイルス学会，横
浜 (2014. 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

表 国産市販生カキからのウイルス検出結果¹⁾

シーズン	検体番号	採取海域・産地種類	年月	NV ²⁾ (コピー/g)	SV	HAV	HEV
2013 -2014	N14-1	D99 生食用	2014年2月	—	—	—	—
	N14-2	A10 加熱調理用	2014年2月	GI/4+(62) GII.17+(1,472)	—	—	—
2014 -2015	OY14-1	D1 生食用	2014年12月	—	—	—	—
	OY14-2	B9 生食用	2014年12月	—	—	—	—
	OY14-3	C2 生食用	2014年12月	—	—	—	—
	OY14-4	C1 生食用	2014年12月	—	—	—	—
	OY14-5	C2 生食用	2014年12月	—	—	—	—

1) — : 陰性、+ : 陽性

2) 中腸腺 1g あたりの NV RNA コピー数

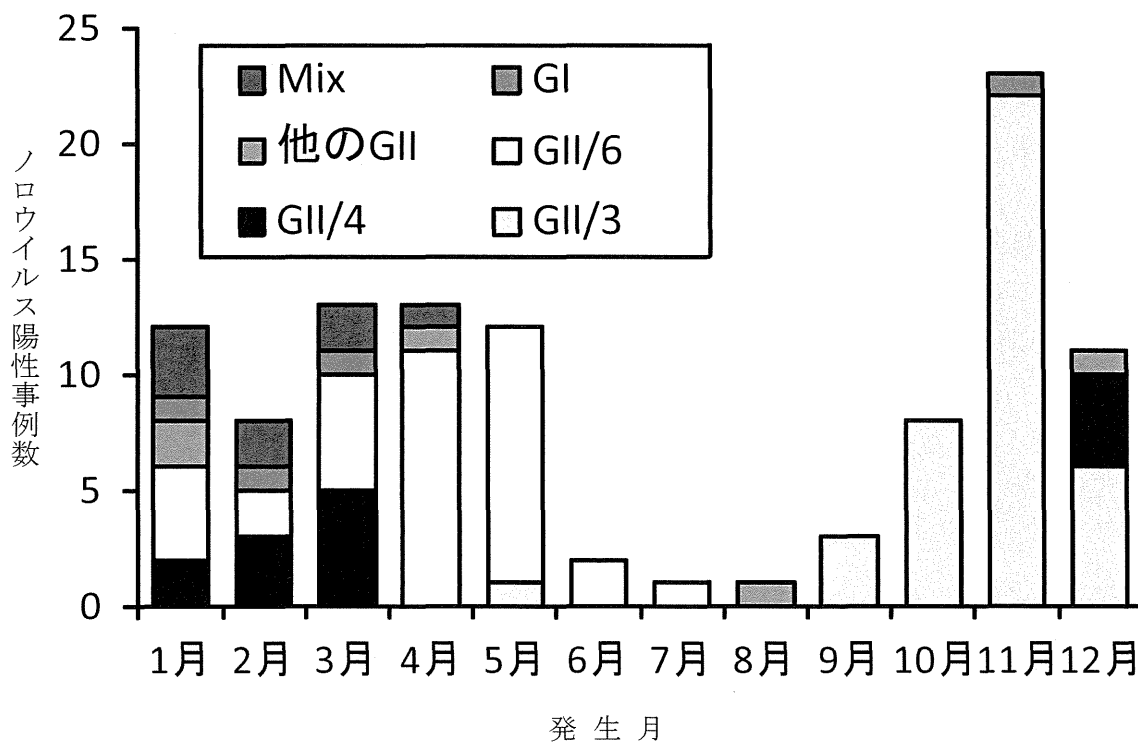


図1 大阪市における月別ノロウイルス事例発生状況 (2014年)

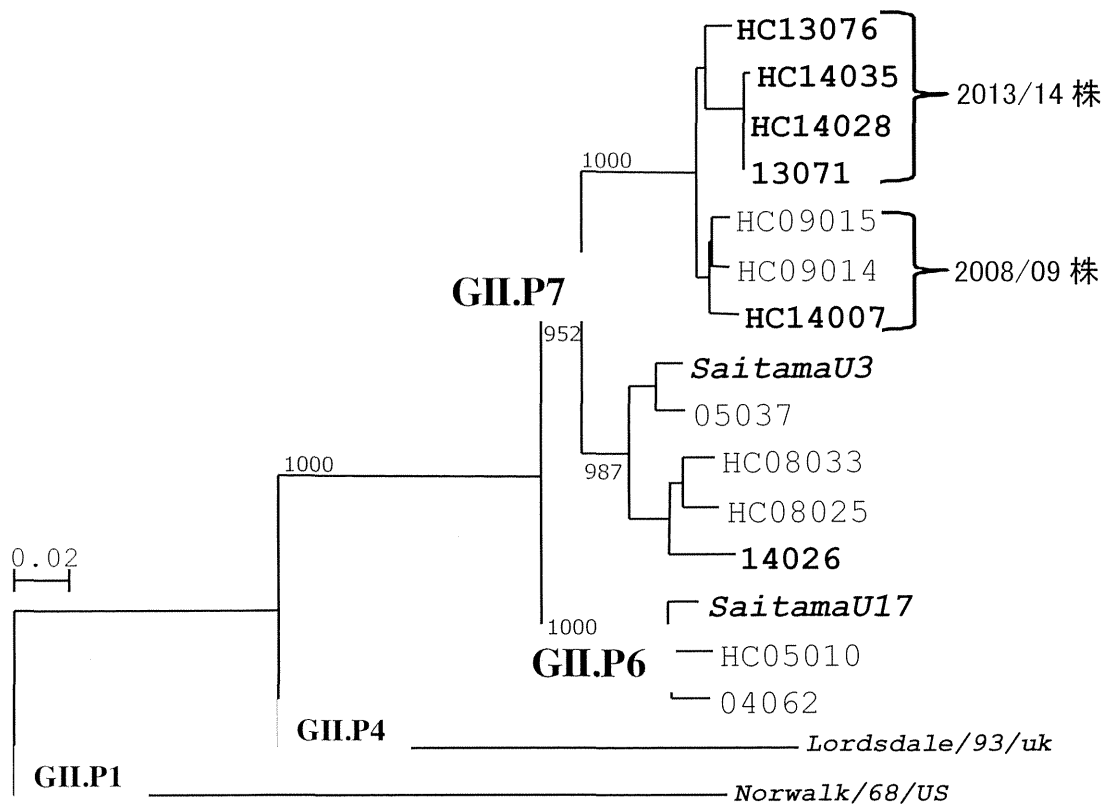


図2 RdRp 領域 (約 800 塩基) における GII/6 株の分子系統樹

分子系統樹は近隣接合法 (NJ) 法で作成した。

ブートストラップ値は遺伝的グループを支持する枝にそれぞれ示した。

太字 : 2013-2014 シーズンに検出された株、斜体 : NV 参考株、他 : 過去に大阪市で検出された株

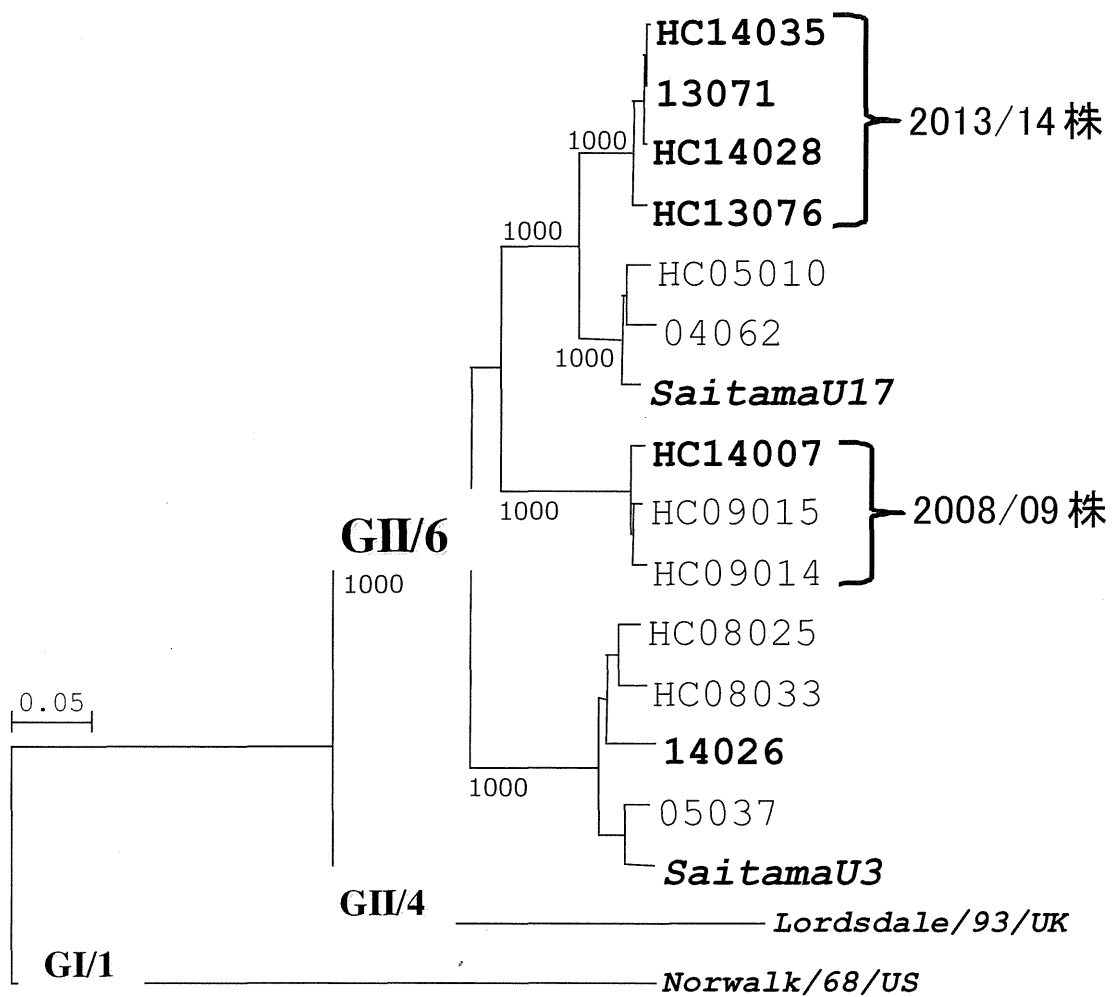


図3 全 Capsid 領域における GII/6 株の分子系統樹

分子系統樹は近隣接合法 (NJ) 法で作成した。

ブートストラップ値は遺伝的グループを支持する枝にそれぞれ示した。

太字 : 2013-2014 シーズンに検出された株、斜体 : NV 参考株、他 : 過去に大阪市で検出された株

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

下水サンプルを用いた A 型肝炎ウイルス及び 下痢症ウイルスの流行解析

研究協力者	三好 龍也	堺市衛生研究所
研究協力者	内野 清子	堺市衛生研究所
研究協力者	岡山 文香	堺市衛生研究所
研究協力者	芝田 有理	堺市衛生研究所
研究協力者	吉田 永祥	堺市衛生研究所
研究協力者	田中 智之	堺市衛生研究所
研究協力者	小林 和夫	堺市衛生研究所
研究分担者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

堺市内における A 型肝炎ウイルス (HAV) 及び下痢症ウイルスの流行状況を解析するため、A 型肝炎患者及び散発・集団感染事例の胃腸炎患者由来の臨床検体と下水由来の環境検体の両面からウイルスの分子疫学的解析を行った。

下水流入水 3 検体 (2013 年 12 月、2014 年 2、3 月) から HAV 遺伝子を検出した。同時期に当該下処理場の地域では患者発生はなかったが、この地域に HAV 感染者が存在していたと推測された。

ノロウイルス (NoV) は、下水中の遺伝子量が NoV の流行期である冬季に増加し、臨床検体から検出された遺伝子型のほとんどが下水中からも検出された。サポウイルス、アストロウイルス、アイチウイルスについては、臨床検体からの検出は少数であったが、下水検体からは高頻度で検出された。これらのウイルスについては、不顕性感染など顕在化しないウイルス感染の多いことが示唆された。

下水中のウイルス遺伝子検出では、広域的な感染状況は把握することができる。さらに感染源や経路を解明する上で有用な情報を提供すると考えられる。この調査から得られた結果は、HAV、下痢症ウイルス感染症の理解や対策に寄与することが期待される。

A. 研究目的

A 型肝炎の原因である A 型肝炎ウイル

ス (HAV) は、感染者の糞便中に排出されたウイルス粒子が感染源となり、経口感

染する。また、魚介類等の喫食が原因と考えられる HAV 感染による食中毒も報告されている。2014 年 1 月から 4 月までに国内で A 型肝炎患者報告が 305 例あり、過去 3 年間（2011 年 176 例、2012 年 157 例、2013 年 128 例）に比し、大きく増加した。堺市内でも 2013 年 10 月～2014 年 5 月までに 4 例と例年（2011 年 0 例、2012 年 1 例、2013 年 10 月まで 0 例）より多い報告数であった。

そこで、下水流入水及び A 型肝炎患者等から HAV 遺伝子検出を行い、堺市内における HAV 流行状況を解析することを試みた。

一方、我々は、これまで、散発・集団感染事例の胃腸炎患者由来の臨床検体と下水由来の環境検体の両面からノロウイルス（NoV）等の下痢症ウイルスの遺伝子検出を行い、堺市内における下痢症ウイルスの流行動態の把握を試みている。

今年度も引き続き調査を行い、市内の下痢症ウイルスの流行について考察し、感染性胃腸炎の全体像を把握する一助とする。

B. 研究方法

1. 材料

(1) HAV 調査材料

環境検体として、2013 年 8 月から 2014 年 12 月までに堺市内の 3 つの下水処理場で毎月 1 回採水された流入水 51 検体を調査対象とした。臨床検体として、2014 年 1 月に発生した家族内感染事例の患者 3 名からの血清 3 検体及び糞便 1 検体を調査対象とした。

(2) 下痢症ウイルス調査材料

環境検体として、2012 年 1 月から 2014 年 12 月までに堺市内の 3 つの下水処理場で毎月 1 回採水された流入水 108 検体及び放流水 108 検体、計 216 検体を調査対象とした。臨床検体として、同期間に発生した食中毒及び集団感染事例 14 事例、散発事例（感染症発生動向調査における感染性胃腸炎患者等）95 事例の糞便を調査対象とした。

2. 下水の濃縮法

これまでの報告書に準じて行った。すなわち、流入水及び放流水を遠心後（3,400xg 30min、13,000xg 45min）、上清 1,000ml を分取し、最終濃度 0.05M の $MgCl_2$ を添加後、HCl で pH3.5 に調整した。調整済み液を HA フィルター（0.45 μm ）でろ過し、ウイルスをフィルターに吸着させた。フィルターを細断し、pH10.5 グリシン buffer（流入水：5.0ml、放流水：2.0ml）で溶出後、HCl で pH6.5 に再調整し、11,000xg 20min 遠心した上清を RNA 抽出用のサンプルとした。

3. ウイルス遺伝子検出法

臨床検体については、RNA 抽出後、HAV については、nested RT-PCR（primers: JCT-2F/1R-A/2R）により遺伝子検出を行い、NoV、サポウイルス（SaV）、アストロウイルス（AsV）、アイチウイルス（AiV）については、ウイルス性下痢症診断マニュアルに準じてウイルス遺伝子をそれぞれ検出した。陽性検体については、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、系統樹解析により遺伝子型を判定した。

下水検体（流入水）については、濃縮処理後、臨床検体と同様にウイルス遺伝

子検出を行った。HAV については、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、下痢症ウイルスについては、TA クローニングを行い塩基配列を決定した。遺伝子型は系統樹解析により判定した。NoV の遺伝子型番号は、従来法（片山らの方法）に従った。また、流入水及び放流水を用いて NoV リアルタイム PCR を実施し、採取水 1ml 当たりのコピー数を算出した。

（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. HAV 遺伝子検出結果

2013 年 12 月に C 処理場にて、2014 年 2、3 月に B 処理場にて採水した流入水から HAV 遺伝子を検出した。遺伝子型は、2013 年 12 月：ⅢA 型、2014 年 2 月：IA 型、2014 年 3 月：ⅢA 型であった（図 1）。

家族内感染事例では、肝炎を発症した患者 3 名から HAV 遺伝子を検出し、遺伝子型は 3 名とも IA 型であった（図 1）。

2. NoV 遺伝子検出結果

臨床検体では GI で 5 種類（GI/1, 4, 6, 7, 14）、GII で 6 種類（GII/2, 4, 6, 12, 13, 14）計 11 遺伝子型の NoV が検出され、GII. 4 型が最も高頻度に検出された（図 2）。

下水検体では、GI で 9 種類（GI/1, 2, 4, 7, 10, 11, 12, 13, 14）、GII で 11 種類（GII/2, 3, 4, 6, 7, 10, 12, 13, 14, 16 及び GII. 17（新統一命名法による））計 20 遺伝子型が検出された。下水検体でも GII/4 型が最も高頻度に検出された（表 1）。

この結果から当市全体では少なくとも

21 種類の遺伝子型 NoV の感染、流行が推測され、その中で GII/4 が主流行遺伝子型であったと考えられた。

3. 下水中の NoV 遺伝子定量測定結果

GI および GII とともに調査期間のほとんどの月で検出され、NV 遺伝子コピー数は、GI よりも GII の方が高値であった（図 3）。10 月から増加し、7、8 月に減少する傾向がみられ、NoV 小児散発事例が減少後も高いコピー数の NoV 遺伝子が検出された（図 4）。

4. SaV、AsV、AiV 遺伝子検出結果

SaV については、臨床検体からの遺伝子検出は少数で、遺伝子型は GI. 1, 2, GII. 1 型が検出された。しかし、下水検体では、年間を通じてほとんどの月で検出され（GI. 1, 2, 3, GII. 1, 2, 3, GV）、GI. 1, 2, GII. 1 型が多く検出された（表 2）。

AsV については、臨床検体では、2013 年に散発事例から 5 例検出された。下水検体では、年間を通じてほとんどの月で検出された（表 2）。

AiV については、臨床検体からの検出はなかったが、下水検体からは、2012 年 11 月を除く全ての月で検出された（表 2）。

D. 考察

1. HAV について

下水および家族内感染事例の患者から IA 型 HAV が検出されたが、系統樹解析結果では異なる系統のウイルスであり、また、患者の居住地も HAV が検出された下水処理場の地域ではなく両者の疫学的関連はないものと考えられた。

B 及び C 下水処理場の流入水から HAV が検出されたが、同時期に当該下水処理場

の地域では患者発生はなかった。この地域に HAV 感染者が存在していたと推測された。

2014 年に全国的に流行している HAV の主要な遺伝子型は IA 型であり、III A 型は東北地方を中心に限局的に流行している型であったと報告されている (IDWR 2014 年第 22 号)。しかし、今回の結果より、堺市内においては IA のみならず III A 型の HAV の感染者も存在していたと考えられた。

A 型肝炎については、不顕性感染が多く、また、潜伏期間が約 1 カ月と長期である。したがって、疫学調査において感染源の特定や感染実態の把握をすることが一般的に困難な事例が多い。今回、下水から検出した HAV は感染者糞便由来と推定され、下水中の HAV 遺伝子を解析することにより、流入地域における不顕性感染を含めたウイルスの浸淫状況を把握することが可能と考えられた。

2. 下痢症ウイルスについて

下水の NoV 遺伝子の定量値は、NoV の流行期である冬季に増加し、臨床検体から検出された遺伝子型のほとんどが下水中からも検出された。下水中の NoV 遺伝子を調査することにより、NoV 流行を解析することが可能と考えられる。流行期前の下水中の NoV を解析することにより、その後の NoV 流行や変異株の出現などを早期に探知することが可能と考える。

SaV、AsV、AiV については、臨床検体からの検出は少数であったが、下水検体からは高頻度で検出された。これらのウイルスについては、臨床症状が NoV に比べて軽症又は不顕性感染が多い、成人での

感染が多いなどが考えられ、感染症発生動向調査の感染性胃腸炎として顕在化しないウイルス感染、流行があることが示唆された。

下水中のウイルス遺伝子検出では、病原性等を解析することはできないが、広域的な感染状況は把握することができると考えられた。

E. 結論

臨床と環境の両面から HAV 及び下痢症ウイルス遺伝子を検出・解析することによって、流入地域におけるこれらのウイルスの浸淫状況の包括的把握が可能と考えられる。さらに感染源や経路を解明する上で有用な情報を提供すると考えられる。この調査から得られた結果は、HAV、下痢症ウイルス感染症の理解や対策に寄与することが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) 三好龍也 内野清子：下水中ノロウイルス検出情報と流行解析、臨床とウイルス、42:237-241、2014

(2) 三好龍也 内野清子 岡山文香 芝田有理 吉田永祥 小林和夫 左近直美 土生川洋 田中智之 野田 衛：臨床検体および下水検体を用いた堺市内の A 型肝炎の流行解析、病原体検出情報 (IASR) 36:6-7、2015

2. 学会発表

(1) 三好龍也 内野清子 岡山文香 芝田有理 左近直美 田中智之 野田 衛 小林和夫：堺市内における下水サンプル

を用いた A 型肝炎ウイルスの流行解析、
第 62 日本ウイルス学会学術集会、横浜市
2014. 11

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

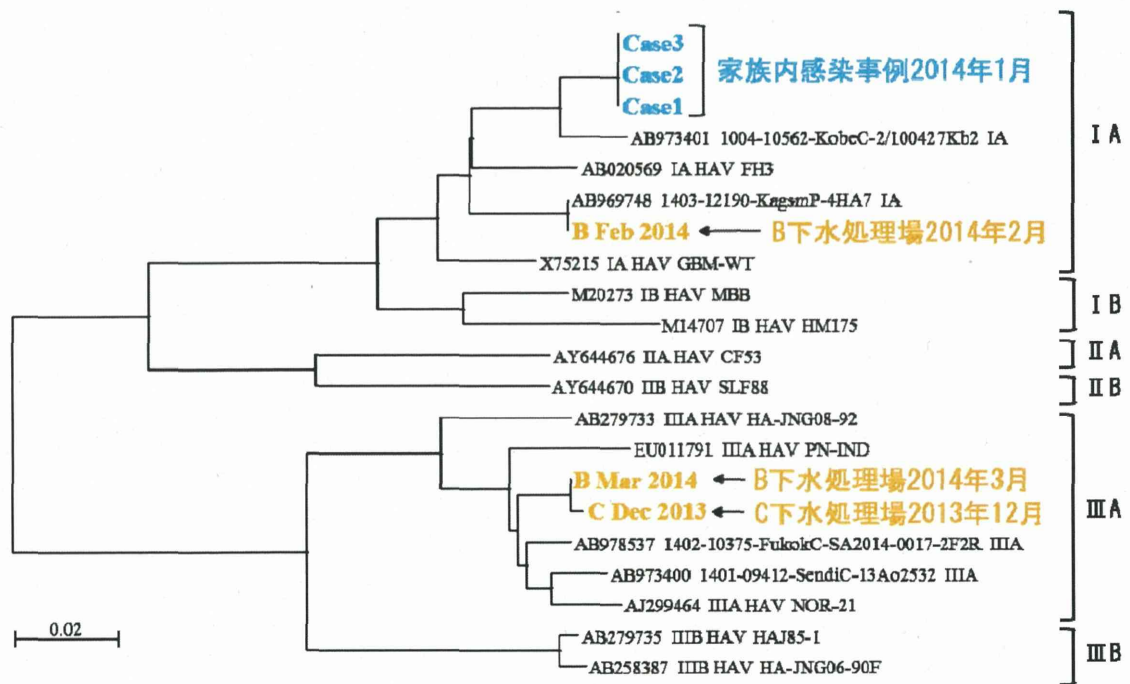


図 1 HAV 遺伝子系統樹解析結果 (NJ 法)

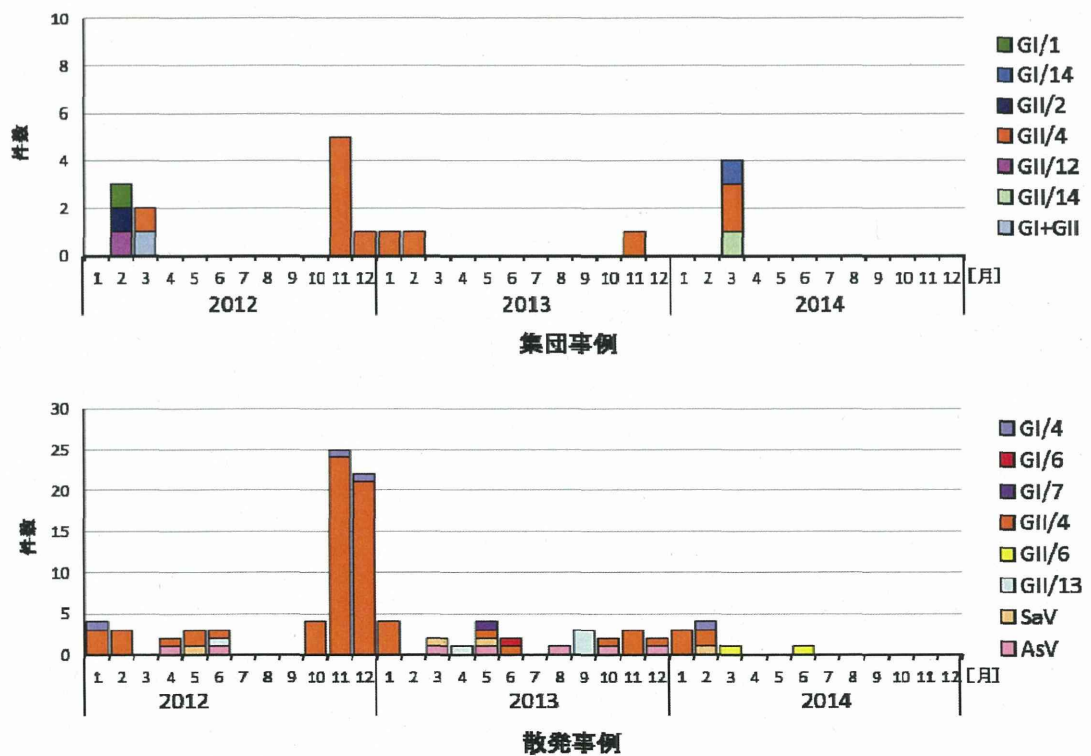

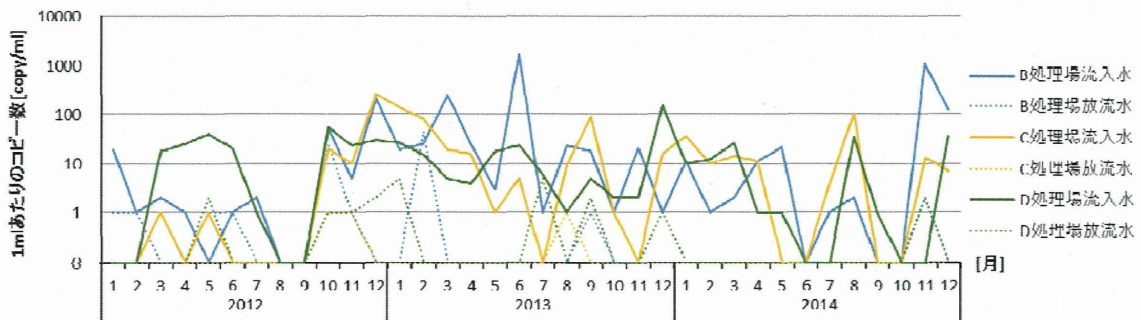


図 2 臨床検体からの下痢症ウイルス検出状況

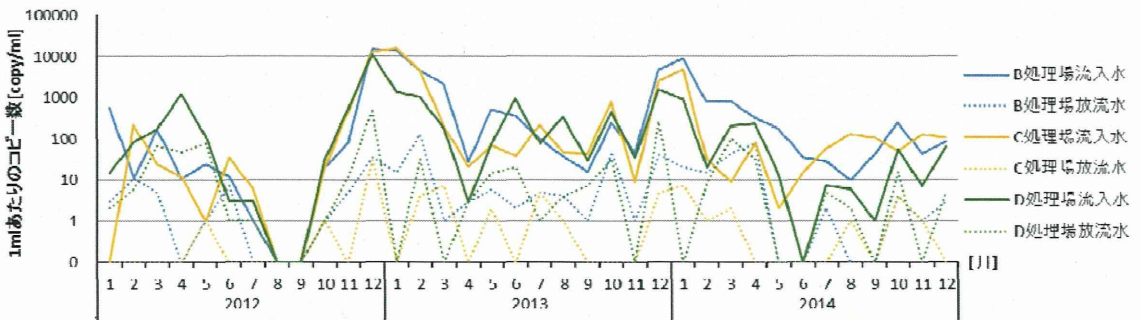
表1 下水中のNoV検出状況 (B~D 定点流入水)

検出 virus	2012年												2013年												2014年																							
	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月												
NoV	GI/1	B																																														
	GI/2	B																																														
	GI/4	B																																														
	GI/7	B																																														
	GI/10	B																																														
	GI/11	B																																														
	GI/12	B																																														
	GI/13	B																																														
	GI/14	B																																														
	GII/2	B																																														
	GII/3	B																																														
	GII/4	B																																														
	GII/6	B																																														
	GII/7	B																																														
	GII/10	B																																														
	GII/12	B																																														
	GII/13	B																																														
	GII/14	B																																														
	GII/16	B																																														
GII.17*	B																																															

*: GII.17は新統一命名法による
 型別実施中



NoV GI リアルタイムPCR測定結果



NoV GII リアルタイムPCR測定結果

図3 下水中のNoV遺伝子定量結果

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

2014 年 2 月購入の市販カキにおけるノロウイルス検出状況

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
研究協力者 谷澤 由枝 広島県立総合技術研究所・保健環境センター
研究分担者 野田 衛 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

2014 年 2 月に購入した市販カキ 8 ロット中のノロウイルス保有実態を明らかにするため、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 法での定量結果からカキ中腸腺 1g 中のウイルス量は、NoV GI が $7.7 \times 10^1 \sim 1.7 \times 10^3$ コピー、NoV GII が $3.3 \times 10^2 \sim 1.7 \times 10^4$ コピーであり、NoV GII のコピー数は GI の 2.0~16.3 倍であった。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クエンスし、ノロウイルスの遺伝子型を特定したところ、GI では GI/4、5、6、7、12、14 が、GII では GII/3、4、6、14 が検出された。特に GII/4 が 8 ロット 13 検体、GII/6 が 4 ロット 5 検体から検出され、カキの中でも優勢な遺伝子型であった。

A. 研究目的

2014 年 2 月に購入した市販カキ中に含まれるノロウイルス量と検出ノロウイルスの遺伝子型を調べ、カキ中のノロウイルス保有実態を明らかにする。

B. 研究方法

1. 材料

2014 年 2 月にスーパー及び加工業者から購入した A 県産の市販カキ 8 ロット。(海域 No. A-10 : 2 ロット、No. A-11 : 2 ロット、No. A-12 : 1 ロット、No. A-13 : 2 ロット、No. A-21 : 1 ロット)

2. 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

カキから中腸腺 2g を摘出した後に 9 倍容の PBS(-)を加え、1 分間ストマックして 10%乳剤を作製、 α -アミラーゼで 37°C /1 時間処理した後に 7,780×g で遠心して上清 10ml を回収した。その後 PEG 沈殿法によりウイルス濃縮を行ってから 5% Zwittergent を 400 μ l 加え、200 μ l から High pure RNA Isolation Kit (Roche) で RNA 抽出を行った。抽出 RNA は、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い、これら cDNA をテンプレートにして 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。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。

3. ノロウイルスの遺伝子型別

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ス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に示した。リアルタイム PCR 法での実測値が 10 コピー以上の検体については Nested PCR 法でも陽性となった。一方、リアルタイム PCR 法での実測値が 10 コピー未満の検体については、Nested PCR 法で不検出となる検体が GI で 19 検体中 11 検体、GII では 10 検体中 2 検体であった。

2. カキ中のウイルス量

リアルタイム PCR 法により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)。NoV GI が $7.7 \times 10^1 \sim 1.7 \times 10^3$ コピー/g 中腸腺、NoV GII が $3.3 \times 10^2 \sim 1.7 \times 10^4$ コピー/g 中腸腺であり、NoV GII のコピー数は NoV GI の 2.0~16.3 倍であり、海域によってばらつきがあった。

3. カキから検出されたノロウイルスの遺伝子型

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)。NoV GI では GI/4、5、6、7、12、14 が検出され、GI/4、6、12、14 が 2 ロットから、GI/5、7 が 1 ロットから検出された。一方 NoV GII では GII/3、4、6、14 が検出され、GII/4 が 8 ロットすべてから、GII/6 が 4 ロット、GII/14 が 3 ロット、GII/3 が 1 ロットから検出された。GII/4 については Sydney 2012 と亜型まで特定できた検体もあったが、一部については他の遺伝子型との混在による影響のため GII/4 までしか同定できなかった。

D. 考察

通知法の記載ではリアルタイム PCR 法での定量実測値が 10 コピー以上を陽性と