

判断している。そこで、10 コピー以上と 10 コピー未満でリアルタイム PCR 法と Nested PCR 法での結果を比較してみると、リアルタイム PCR 法で 10 コピー以上の値を示した検体は Nested PCR 法でも陽性となり、両者の検査結果は一致した。一方、リアルタイム PCR 法で 10 コピー未満となった検体についても Nested PCR 法では陽性となる検体があり、両者の結果に不一致が認められた。ただし、リアルタイム PCR 法の結果を定性的に判断すると、逆に Nested PCR 法で陰性となってしまう検体が少なからずあることから、リアルタイム PCR 法を定性的手法として考えれば本方法の検出感度は Nested PCR 法よりはやや高いと思われる。

カキ中腸腺 1g 中のウイルス量を算定した結果を図に示した。ロット間のウイルス量比は最大で NoV GI で 23 倍、NoV GII で 51 倍となり養殖海域毎にカキが蓄積するノロウイルス量に大きな差があることがわかった。また、8 ロットとも NoV GI より NoV GII のウイルス量が多く、その比 (NoV GII/ NoV GI) は 2.0 倍～16.3 倍であった。ただし、ウイルス量が少ないほどこの比率は小さくなる傾向があり (ロット 1～4 では 8.0～16.3、ロット 5～8 では 2.0～5.8)、海域毎に NoV GI と NoV GII のウイルス量の比が異なるのか、あるいはウイルス量が少ない状況では、NoV GII より NoV GI のほうが比較的カキに取り込まれ易いのかもかもしれない。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、NoV GI、GII とも多様な遺伝子型が確認できた。特に 8 ロットから検出された GII/4 や 4

ロットから検出された GII/6 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の集計 (<https://nesid3g.mhlw.go.jp/Byogentai/Pdf/data96j.pdf>) において 2013/14 シーズンでも多く検出された遺伝子型で、人で流行したこれらの遺伝子型がカキの中でも比較的良く蓄積されている結果となった。特に今回は、系統樹解析では GII/4、GII/6 のグループに分類されたものの、PCR 産物の塩基配列解析結果から両者の混合と思われるものも多く見られており、カキの中でもこの 2 つの遺伝子型が 2013/14 シーズンは優勢であったと考えられる。一方、普段検出されない GI/5、GI/7、GI/12、GI/14、GII/14 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た。

## E. 結論

2014 年 2 月購入の市販カキを使って 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、養殖海域毎に差が認められた。NoV GII のウイルス量は NoV GI の 2.0～16.3 倍で、この比率はカキ中のウイルス量が少ないほど小さくなる傾向があった。

また、Nested PCR 法の 2nd PCR 産物のダイレクトシーケンスの結果から NoV GI では GI/4、5、6、7、12、14 が、NoV GII では GII/3、4、6、14 が検出され、特に GII/4、GII/6 の検出率が高かった。

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 市販カキからのノロウイルス検出状況

ロット No.	海域	検体番号	Nested PCR		リアルタイムPCR <sup>1)</sup>		検出されたNoVの遺伝子型	
			NoV GI	NoV GII	NoV GI	NoV G2	NoV GI	NoV GII
1	A-10	1-1	-	+	1.7	29.9	-	GI/6
		1-2	+	+	2.2	46.7	GI/12	GI/14
		1-3	+	+	5.7	79.8	GI/14	GI/4(Sydney2012)
2	A-11	2-1	+	+	33.0	274.0	GI/6	GI/4
		2-2	+	+	20.2	228.0	GI/4	GI/4
		2-3	+	+	11.8	133.0	GI/14	GI/4
3	A-13	3-1	+	+	0.1 <sup>2)</sup>	8.2	GI/7	GI/14
		3-2	-	+	1.1	15.2	-	GI/3
		3-3	-	+	1.7	19.2	-	GI/4(Sydney2012)
4	A-10	4-1	+	+	3.6	14.6	GI/1	GI/1(Sydney2012)
		4-2	-	+	3.5	25.8	-	GI/4
		4-3	+	+	2.8	37.9	GI/6	GI/4
5	A-12	5-1	-	+	4.4	8.6	-	GI/6
		5-2	+	+	1.8	13.1	GI/12	GI/4(Sydney2012)
		5-3	+	+	4.0	5.3	GI/12	GI/6
6	A-11	6-1	-	-	3.2	5.3	-	-
		6-2	-	+	1.1 <sup>2)</sup>	13.4	-	GI/4(Sydney2012)
		6-3	-	+	0.0	5.8	-	GI/1(Sydney2012)
7	A-13	7-1	-	+	1.5 <sup>2)</sup>	3.5	-	GI/6
		7-2	-	+	2.9 <sup>2)</sup>	4.5	-	GI/4(Sydney2012)
		7-3	-	+	1.6 <sup>2)</sup>	4.4	-	GI/14
8	A-21	8-1	-	+	0.0 <sup>2)</sup>	1.4	-	GI/6
		8-2	-	+	2.3 <sup>2)</sup>	10.0	-	GI/4(Sydney2012)
		8-3	+	-	2.4 <sup>2)</sup>	1.7	GI/b	-

<sup>1)</sup> 二重測定での平均値

<sup>2)</sup> 二重測定のうち一方のみで陽性であった際の実測値

(コピー/g 中腸腺)

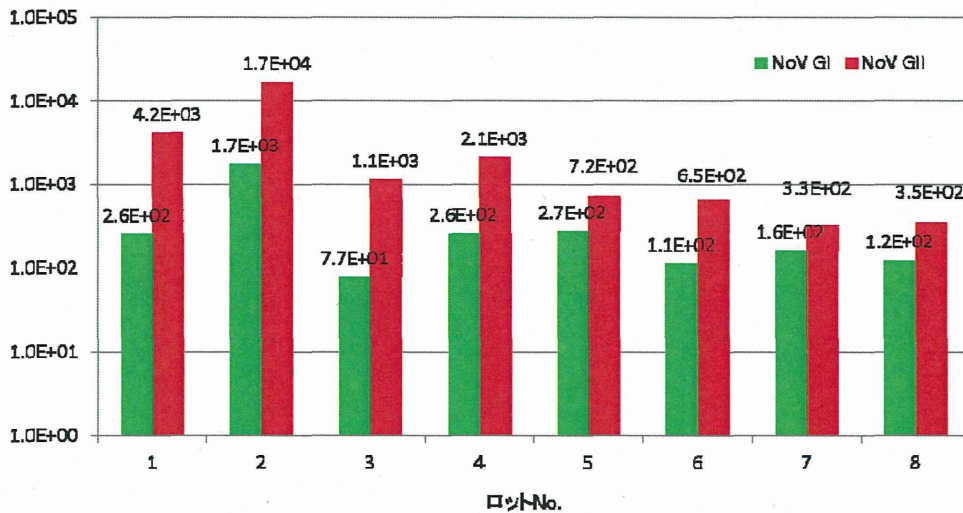


図 2014年2月に購入した市販カキ中のノロウイルス量

## ハイドロキシアパタイトによるカキからのノロウイルス回収法の検討

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

ハイドロキシアパタイトによるカキからのノロウイルス回収法について検討した。ハイドロキシアパタイトによるカキ乳剤からの回収率は 2%未満で、N-アセチル-L-システイン処理を組み入れても 5%程度であった。一方、患者便の希釈検体を用いた場合の回収率は、 $10^3$  コピー程度のウイルス量があれば 50%以上の回収率が得られ、また  $10^2$  コピー程度でも Nested PCR 法で検知が可能なことから、清浄なサンプルであれば本法により効率良くウイルスが回収できることが明らかになった。

### A. 研究目的

食品からのウイルス回収法として非晶性リン酸カルシウム微粒子を用いたウイルス濃縮法が Shinohara ら (J. Virol. Methods 2013) により報告されており、短時間でのウイルス濃縮やウイルス回収率の低い食品への適用が可能となっている。一方、カキからのノロウイルス濃縮法については超遠心法や PEG 沈殿法などがあるが、回収率が一様でない等の問題がある。そこでカキからのノロウイルス回収法として非晶性リン酸カルシウム微粒子と同様な物資であるハイドロキシアパタイトを利用したウイルス回収法の適用性について検討する。

### B. 研究方法

#### 1. 材料

ノロウイルス回収試験の供試試料には、Nested PCR 法で陰性となったカキ 10%乳剤に  $10^5 \sim 10^6$  コピー相当のノロウイルス GII を含む便乳剤を  $100 \mu\text{l}$  添加した模擬検体、及び患者便を  $10^2 \sim 10^7$  倍に段階希釈した乳剤を用いた。

#### 2. ハイドロキシアパタイトによるウイルス回収

供試検体(カキの中腸腺の 10%乳剤または段階希釈便乳剤)10ml にアパタイト HAP (和光純薬) を 25mg 加え、10 分毎に Vortex しながら 1 時間処理した。7,780 ×g で 10 分遠心後に上清を捨て、沈渣に 3.3M クエン酸を加えてアパタイト HAP を溶解した。再度 7,780 ×g で 10 分間遠心した後に上清を回収し、RNA 抽出試料とし

た。RNA 抽出には QIAamp Viral RNA mini Kit (キアゲン) を用い、マニュアルに従って RNA 抽出を行った。

### 3. 回収ノロウイルスの定量及び遺伝子検出

抽出 RNA は、PrimeScript RT reagent kit (タカラバイオ) と付属の Random Primer 6mer を用いて、30°C/10min、42°C/60min、99°C/5min の温度条件で逆転写反応を行い、cDNA を作製した。

ウイルスゲノムの定量には LC480 probe master (ロッシユ) と Kageyama ら (J. Clin. Microbiol. 2003) のプライマー及びプローブを使用して、リアルタイム PCR 反応を行った。反応条件は通知法に準拠し、25  $\mu$ l の反応系にテンプレートとして 2.5  $\mu$ l の cDNA を加えて行った。

また、一部については Nested PCR 法を実施して (1st PCR に COG2F, ALPF/G2SKR, G2ALSKR、2nd PCR に G2SKF/G2SKR, G2ALSKR) 定性的検出を行った。

### 4. カキ乳剤の前処理条件

前処理にはイソアミルアルコール、 $\alpha$ -アミラーゼ、N-アセチル-L-システイン (NALC) の 3 つを検討した。イソアミルアルコール処理ではカキ 10%乳剤 12ml に対しイソアミルアルコール 1.5ml を添加後に 10 回転倒混和し、7,780 $\times$ g で 30 分遠心して上清を 10ml 回収した。 $\alpha$ -アミラーゼ処理ではカキ 10%乳剤 12ml に対し 30mg を添加、37°C で 1 時間処理した後、7,780 $\times$ g で 30 分遠心して上清を 10ml 回収した。NALC 処理では、カキ 10%乳剤 12ml に対し 120mg を添加、37°C で 1 時間処理した後、7,780 $\times$ g で 30 分遠心して上清を 10ml 回収した。それぞれ処理したカキ 10%

乳剤の遠心上清に 10<sup>5</sup> コピー相当のノロウイルス GII を含む便乳剤を添加し、ハイドロキシアパタイトによるノロウイルスゲノム回収を実施した。

### 5. NALC 処理適用時期の検討

カキからのノロウイルス濃縮工程における NALC 処理適用時期について検討した。

供試試料にはノロウイルス陰性のカキ 10%乳剤に 10<sup>6</sup> コピー相当のノロウイルス GII の便乳剤を加えたものを用いた。NALC 処理の適用時期としては、カキ 10%乳剤を遠心する前の室温での転倒混和 15 分、または、遠心上清を得た後にアパタイト HAP を添加する前の 2 つについて検討した (図 1)。なお、NALC の添加量は試料 1ml に対し、5mg とした。

(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. 希釈便乳剤を用いた検出限界

ノロウイルス陽性の患者便を 10<sup>2</sup>~10<sup>7</sup> 倍に段階希釈した乳剤を用い、ハイドロキシアパタイトでの回収率及び、回収限界を調べた。患者便の希釈検体での回収率は 10<sup>3</sup> コピー程度のウイルス量があれば 50%以上の回収率が得られ、また 10<sup>2</sup> コピー程度でも Nested PCR 法で検知が可能なることから、清浄なサンプルであれば本法により効率良くウイルスが回収できることが明らかになった (表 1)。

### 2. カキ乳剤の前処理方法の検討

カキ 10%乳剤を予めイソアミルアルコール、 $\alpha$ -アミラーゼ、N-アセチル-L-ス

ステインによる前処理を行い、その後ノロウイルスを添加した後のハイドロキシアパタイトによるウイルス回収率を調べた。前処理を行わない場合では10%程度の回収率であったが、イソアミルアルコール処理、 $\alpha$ -アミラーゼ処理ではそれぞれ2.9%、4.1%となり、無処理に比べ逆効果となった(表2)。一方、NALC処理を行った場合は23.7%となり、ウイルス回収率の向上が認められた(表2)。

### 3. NALC 処理適用時期別のノロウイルス回収率

ノロウイルスを添加したカキ10%乳剤へのNALC処理を、遠心上清を得る前とハイドロキシアパタイトを加える前に実施し、それぞれのノロウイルスの回収率を比較した。NALC処理を行わなかった際のウイルス回収率は1.5~1.7%であったのに対し、遠心上清を得る前のNALC処理では0.4%となり回収率が低下した(表3)。一方、ハイドロキシアパタイトを添加する前のNALC処理では5.2%とやや回収率が改善された(表3)。

## D. 考察

ハイドロキシアパタイトを用いたノロウイルス回収法について、段階希釈便を用いた試験では $10^3$ コピー以上のウイルス量であれば50%以上の回収率が得られ、 $10^2$ コピー程度のウイルス量であってもNested PCR法で検知可能なウイルス量の回収が可能であることから、ハイドロキシアパタイトのノロウイルス回収能は非常に高いことが示唆された(表1)。一方、カキ中腸腺の10%乳剤からのノロウイルス回収については、 $10^6$ コピー程度のウイ

ルス量が存在していても前処理をしない場合は回収率2%未満で(表3)、カキ乳剤中の夾雑物がノロウイルスのハイドロキシアパタイトへの吸着を妨げている可能性が考えられた。そこでカキの乳剤を前もってイソアミルアルコールや $\alpha$ -アミラーゼ、NALC処理を行い、夾雑物の影響を軽減させた後に $10^5$ コピー程度のノロウイルスを添加してハイドロキシアパタイトでの回収試験を行った。イソアミルアルコール、 $\alpha$ -アミラーゼの処理については無処理に比べノロウイルス回収率の低下を招いたが、NALC処理においては回収率向上効果が認められた(表2)。次に、予め $10^6$ コピー程度のノロウイルスを添加したカキ乳剤を用い、改めてNALC処理とハイドロキシアパタイトを組み合わせたノロウイルス回収試験を行ったところ、回収率はいずれも低く、ハイドロキシアパタイト添加前のNALC処理でも5.2%しか得られなかった。このことから、NALC処理がハイドロキシアパタイトへの吸着を妨げるカキ中夾雑物の低減効果がある一方、ノロウイルスそのものにも影響し、結果として期待された回収率が得られない可能性がある。実際にハイドロキシアパタイトへの添加前NALC処理においては、カキ乳剤の遠心上清を改めてNALC処理すると白濁し不溶性の沈殿が生じることが観察されており、この際にノロウイルスの回収ロスが生じていると考えられる。

以上のことから、ハイドロキシアパタイトを用いたノロウイルス回収法は、清浄な試料であれば十分な回収率が得られる一方、カキの乳剤など夾雑物が多い検体ではその効果を十分に発揮できないと

考えられた。しかしながら、このことは拭き取り検体のように微量なウイルスで、夾雑物の混入が少ない試料においては利用できる可能性が高く、今後このような試料への適用性を試してみる必要があると思われる。

#### E. 結論

ハイドロキシアパタイトによるノロウイルス回収法は、患者便の希釈便検体においては  $10^3$  コピー程度のウイルス量があれば 50%以上の回収率が得られ、また  $10^2$  コピー程度でも Nested PCR 法で検知が可能なことから、清浄なサンプルであれば本法により効率良くウイルスが回収できることができることが明らかになった。一方、夾雑物が多く含まれるカキの乳剤からのノロウイルス回収率は 2%未満で、N-アセチル-L-システイン (NALC) 処理

を組み入れても 5%程度であった。このことから、ハイドロキシアパタイトによるノロウイルス回収法は清浄なサンプルからのウイルス回収に効果が高いと考えられた。

#### 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

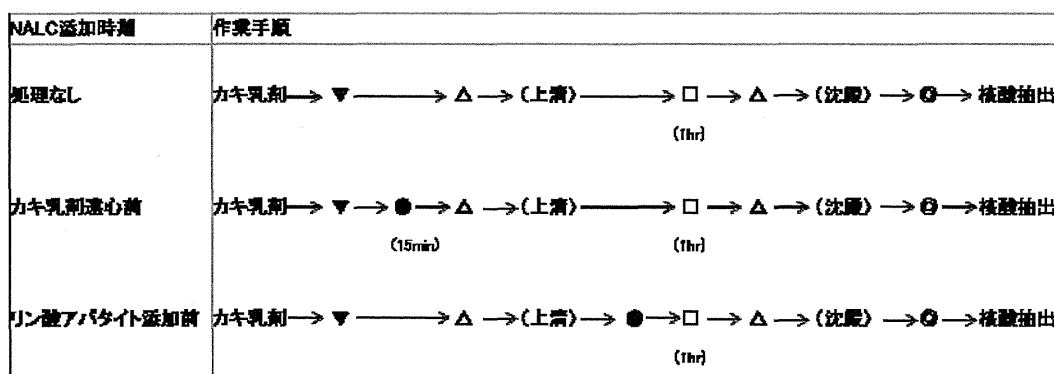
##### 3. その他：なし

表1 段階希釈便を用いたハイドロキシアパタイトによるノロウイルス回収試験の結果

	便乳剤 希釈率	乳剤中のウイルス コピー数 (A)	回収ウイルス コピー数 (B)	回収率 (%) (B/A)	Nested PCR 陽性率
試験1	10 <sup>2</sup>	3.8E+06	2.6E+06	68.1%	
	10 <sup>3</sup>	4.0E+05	2.8E+05	70.9%	
	10 <sup>4</sup>	4.5E+04	2.7E+04	60.1%	
	10 <sup>5</sup>	4.3E+03	2.3E+03	53.8%	
試験2	10 <sup>4</sup>	2.3E+04	1.4E+04	62.2%	
	10 <sup>5</sup>	2.2E+03	1.1E+03	51.1%	
	10 <sup>6</sup>	2.0E+02	4.4E+02	226.6%	2/2
	10 <sup>7</sup>	3.2E+01	不検出	-	1/2

表2 カキ乳剤の前処理方法の効果

	前処理方法	ウイルス添加量	ウイルス回収量	回収率 (%)
		(A)	(B)	(B/A)
試験1	イソミルアルコール	2.7E+05	7.8E+03	2.9%
	無処理	2.7E+05	2.7E+04	10.1%
試験2	α-アミラーゼ	3.0E+05	1.2E+04	4.1%
	NALC	3.0E+05	7.1E+04	23.7%
	無処理	3.0E+05	3.2E+04	10.6%



▼: NoV添加, Δ: 遠心(7,780×g), ●: NALC添加, □: ハイドロキシアパタイト添加, ●: クエン酸添加

図1 NALC処理を絡めたカキ乳剤からのハイドロキシアパタイトによるNoV回収工程



表3 ハイドロキシアパタイトを用いたノロウイルス回収法におけるカキからのウイルス回収率

NALC処理時期		添加ウイルス コピー数(A)	回収ウイルス コピー数(B)	回収率(%) (B/A)
試験1	無処理	1.7E+06	2.9E+04	1.7%
	カキ遠心上清回収前	1.7E+06	6.5E+03	0.4%
試験2	無処理	2.3E+06	3.3E+04	1.5%
	カキ遠心上清回収前	2.3E+06	9.2E+03	0.4%
	ハイドロキシアパタイト添加前	2.3E+06	1.2E+05	5.2%

## 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	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	田中 寛子	広島市衛生研究所
研究協力者	瀧口 由佳理	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

2014年2月に購入した市販カキ5ロット15検体から胃腸炎ウイルス(ノロウイルス(NoV)、サポウイルス(SaV)、アストロウイルス(AstV)、A型肝炎ウイルス(HAV)、E型肝炎ウイルス(HEV)、パレコウイルス(PeV))の検出を試みた。その結果、NoVが最も多く、4ロット7検体から検出された。次いでSaVとAstVがそれぞれ2ロット3検体から検出され、HAV、HEV、PeVは検出されなかった。

ヒトから検出されたNoVについてみると、カキを喫食した3事例では11種類の遺伝子型が検出されたが、喫食しなかった9事例では5種類の遺伝子型しか検出されなかった。カキを喫食しなかった事例では、GII/4型(Sydney 2012亜型)およびGII/6が多く検出された。

#### A. 研究目的

ノロウイルスが原因となった食中毒等の中には、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腸管系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、カキの喫食の有無によるノ

ロウイルスの遺伝子型の違いを比較した。

#### B. 研究方法

##### 1. 材料

2014年2月に購入した市販カキ5ロット15検体および2013年9月から2014年11月に検出された食中毒等事例の便163検体を用いた。

##### 2. カキからのRNA抽出および逆転写反応

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。37°C、1時間消化した後、10,000rpm、30分間遠心し、上清を回収した。回収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、完全に溶解した。10,000rpm、30分間遠心した後、沈渣に800 $\mu$ lのDDWを加え、再浮遊させた後、12,000rpm、5分間遠心し、上清をQIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)を用いてRNA抽出した。逆転写反応は、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(ライテクノロジー・ズジャパン)およびOligo(dT)Primer(ライテクノロジー・ズジャパン)を用いて行った。

### 3. ウイルス検出法

NoVは、厚生労働省通知法(平成25年10月22日付け食安監発第1022第1号)\*に準じて行った。リアルタイムPCRで陽性になった検体については、Capsid 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(ライテクノロジー・ズジャパン)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。系統樹はMEGA5.05を用い、Neighbor-joining法

で作成した。NoVの遺伝子型は、国内で一般的に行われているCapsid N/S領域の部分配列に基づく片山らの分類法に従った。

SaVは、Okaら\*の方法に準じてリアルタイムPCRを行い、陽性となったものはKitajimaら\*の1st primer SV-F13,14/R13,14 2nd primer SV-F22/R2を使用したnested PCRを行ない、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。

AstVは、横井ら\*の方法に準じてリアルタイムPCRを行い、陽性となったものは、Sakonら\*の1st primer AC4/AC6、北橋ら\*の2nd primer Beg/UDA12を用い、NoV同様にシーケンスを行い遺伝子型別を行った。HAV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。HEVは、影山ら\*の方法、パレコウイルスは、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。

(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

2014年2月に購入した市販生カキ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)、SaV(2ロット)、AstV(2ロット)であった。HAV、HEV、PeVは検出されなかった。

NoVの遺伝子型別の検出状況は、GI/4が1ロット2検体、GII/4(Sydney 2012 亜型)が2ロット4検体、型別できなかったGIIが2ロット3検体であった。それらの系統樹を図1、2に示した。SaVは遺伝子型別できなかった。AstVは2ロット3検体から1型が検出された。

## 2. 養殖海域別検出状況

市販生カキ5ロットの養殖海域別検出状況を表4に示した。A県12海域産のカキでは、NoV GI/4、NoV GII/4(Sydney 2012 亜型)、NoV GII/6、SaV、AstV(1型)が検出された。A県13海域産のカキでは、NoV GII/4(Sydney 2012 亜型)、SaV、AstV(1型)が検出された。C県1海域産のカキからはウイルスは検出されなかった。C県2海域産のカキからはNoV GIIが検出された。

## 3. カキ喫食の有無によるNoV遺伝子型別検出状況

カキの喫食の有無によるNoVの遺伝子型検出状況を比較した。カキの喫食がある事例(表5)では、3事例で11種類(GI/2、GI/3、GI/4、GI/6、GI/7、GI/11、GI/14、GII/4、GII/12、GII/13、GII/14)の遺伝子型が検出された。GII/4およびGII/13が2事例で検出された。また2014年11月に発生した事例では、GIが6種類、GIIが4種類の計10種類

のウイルスが検出された。

カキの喫食のない事例(表6)では、9事例で5種類(GI/7、GI/14、GII/4、GII/6、GII/13)の遺伝子型が検出された。GII/4が最も多く、6事例から検出された。次いでGII/6が3事例から検出された。

## D. 考察

今回調査した5ロットのうち4ロットからウイルスが検出された。NoVは4ロットから3種類の遺伝子型が検出され、2013年2月に購入したカキから検出されたNoV遺伝子型(7種類)に比べ少なかった(平成24年度「食品中の病原ウイルスの検出法に関する研究」報告書参考)。最も多く検出された検体からは、3種類のウイルス(NoV、SaV、AstV)が検出され、NoVはGI、GIIともに検出された。カキには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。

養殖海域別のウイルス検出状況は、A県12海域産のカキから最も多い3種類のウイルス(NoV、SaV、AstV)が検出され、NoVは3種類の遺伝子型(NoV GI/4、NoV GII/4(Sydney 2012 亜型)、NoV GII/6)が検出された。一方、C県1海域産のカキからは、ウイルスは検出されなかった。養殖海域によりウイルスの浸淫状況が異なることが示唆された。

カキの喫食の有無によるNoV遺伝子型検出状況は、喫食のない場合が9事例中5種類の遺伝子型が検出されているのに対し、喫食がある場合は3事例11種類の遺伝子型が検出されており、カキの喫食がある事例が多く、遺伝子型が検出されて

いた。一方、カキを喫食していない事例では、GII/4 (Sydney 2012 亜型) が 6 事例、GII/6 が 3 事例と特定の遺伝子型が検出される傾向が認められた。カキには多種類の NoV 遺伝子型が含まれているため、それらが別々に、あるいは数種類が同時に検出されることが示唆された。

## E. 結論

市販生カキからは NoV が最も多く検出されたものの、SaV、AstV などの胃腸炎ウイルスも検出された。

養殖海域別では、3 種類 4 遺伝子型が検出された海域と検出されない海域があり、海域によりウイルス浸淫状況が異なることが示唆された。

カキを喫食した事例から多種類の NoV 遺伝子型が検出されたことから、多種類の NoV 遺伝子型が含まれているカキを喫食し、そのうちの数種類に感染した場合に、違う種類の遺伝子型が別々に、あるいは数種類が同時に検出され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 カキの用途および養殖海域

ロット	用途(加熱/生食)	海域
3140001	加熱調理用	A 県 13 海域
3140002	生食用	C 県 1 海域
3140003	加熱調理用	A 県 12 海域
3140004	加熱調理用	A 県 12 海域
3140005	生食用	C 県 2 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 25 年 10 月 22 日付け食安監発第 1022 第 1 号)に準ずる
SaV	Oka らの方法(Journal of Medical Virology 78:1347-1353(2006))に準ずる 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 Sakon らの方法(Journal of Medical Virology 61:125-131(2000) に準ずる 北橋らの方法(感染症学雑誌第 73 : 559-564, 1999)に準ずる
PeV	Caroline らの方法(Journal of Medical Virology, 67:555-562(2002))に準ずる

表3 市販生カキからのウイルス検出状況

ロット	NoVG I	NoVG II	SaV	AstV	HAV	HEV	PeV
3140001	1	—	—	—	—	—	—
	2	—	G II/4 *2012	—	1 型	—	—
	3	—	G II/4 *2012	+	1 型	—	—
3140002	1	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	—	—
3140003	1	—	—	—	—	—	—
	2	G I/4	G II/4 *2012 G II/6	+	1 型	—	—
	3	G I/4	G II/4 *2012	+	—	—	—
3140004	1	—	+	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—	—
	3	—	+	—	—	—	—
3140005	1	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—	—
	3	—	+	—	—	—	—

＋：リアルタイム PCR で陽性であったが、型別できなかったもの

\*2012：Sydney 2012 亜型

表4 海域別検出状況

養殖海域	検出ウイルス
A 県 12 海域	NoVG I /4、NoVG II/4(Sydney 2012 亜型)、NoVG II/6、SaV、AstV(1 型)
A 県 13 海域	NoVG II/4(Sydney 2012 亜型)、SaV、AstV(1 型)
C 県 1 海域	検出せず
C 県 2 海域	NoVG II

表5 カキを喫食した事例(糞便)からの NoV 遺伝子型別状況

事例	発生年月	検出ウイルス	陽性数/検査数	遺伝子型(解析検体数)
1	2014年2月	NoVG I	14/15	G I /4(4)
		NoVG II	1/15	G II /4(1) (Sydney 2012 亜型)
2	2014年2月	NoVG II	6/6	G II /13(5)
3	2014年11月	NoVG I	5/6	G I /2(1)
				G I /3(1)
				G I /6(1)
				G I /7(1)
		NoVG II	6/6	G I /11(1)
				G I /14(2)
				G II /4(1) (Sydney 2012 亜型)
				G II /12(2)
				G II /13(1)
				G II /14(2)

表6 カキを喫食していない事例(糞便)からの NoV 遺伝子型別状況

事例	発生年月	検出ウイルス	陽性数/検査数	遺伝子型(解析検体数)
1	2013年12月	NoVG II	7/7	G II /4(3) (Sydney 2012 亜型)
2	2014年1月	NoVG II	12/12	G II /6(5)
3	2014年1月	NoVG I	1/9	—
		NoVG II	8/9	G II /4(5) (Sydney 2012 亜型)
4	2014年1月	NoVG I	1/43	G I /14(1)
		NoVG II	42/43	G II /4(6) (Sydney 2012 亜型)
5	2014年2月	NoVG II	2/2	G II /4(2) (Sydney 2012 亜型)
6	2014年2月	NoVG I	1/11	G I /7(1)
		NoVG II	10/11	G II /4(3) (Sydney 2012 亜型)
7	2014年4月	NoVG II	4/4	G II /4(1) (Sydney 2012 亜型)
8	2014年4月	NoVG II	13/13	G II /6(3)
9	2014年5月	NoVG II	9/9	G II /13(4)



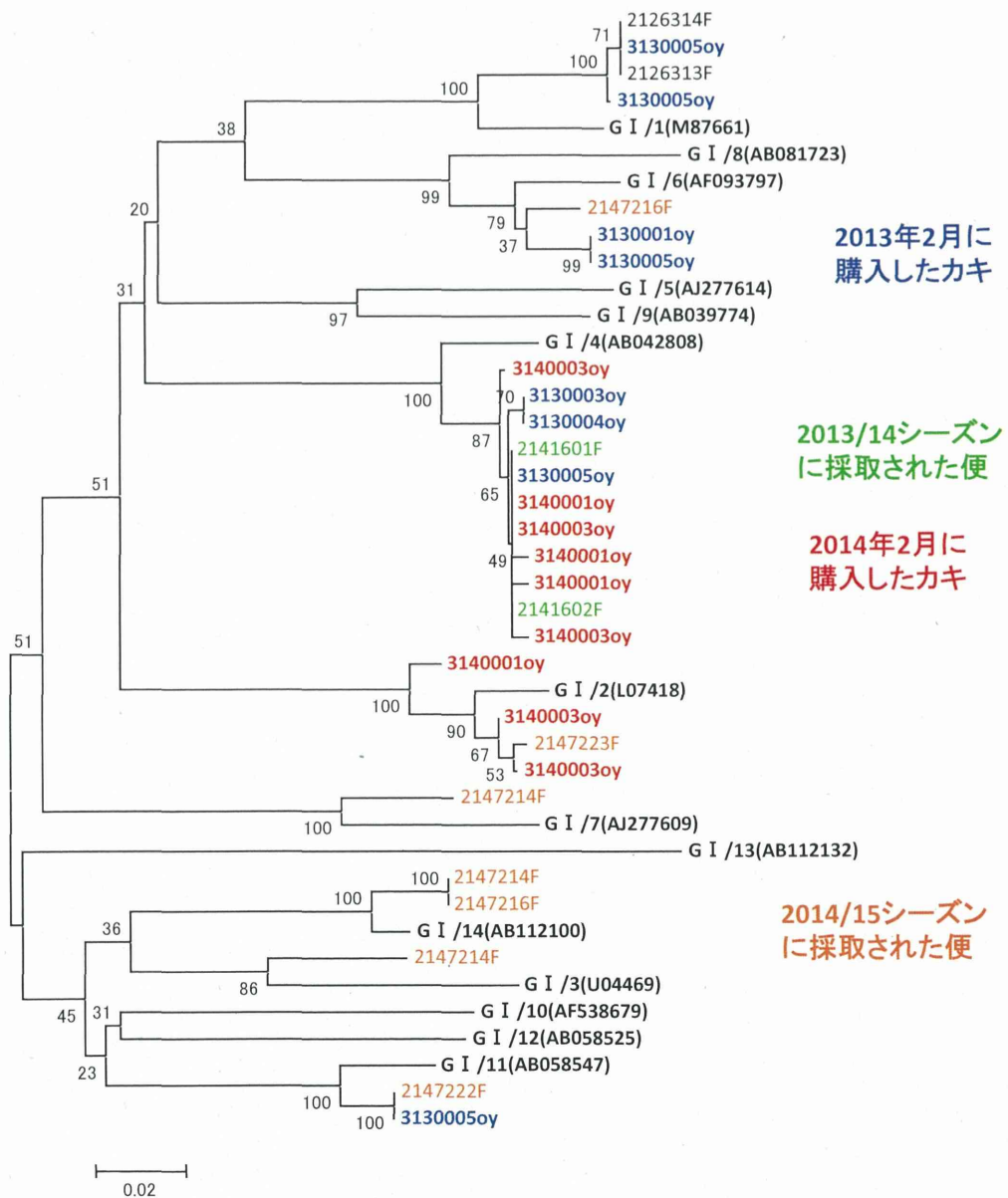
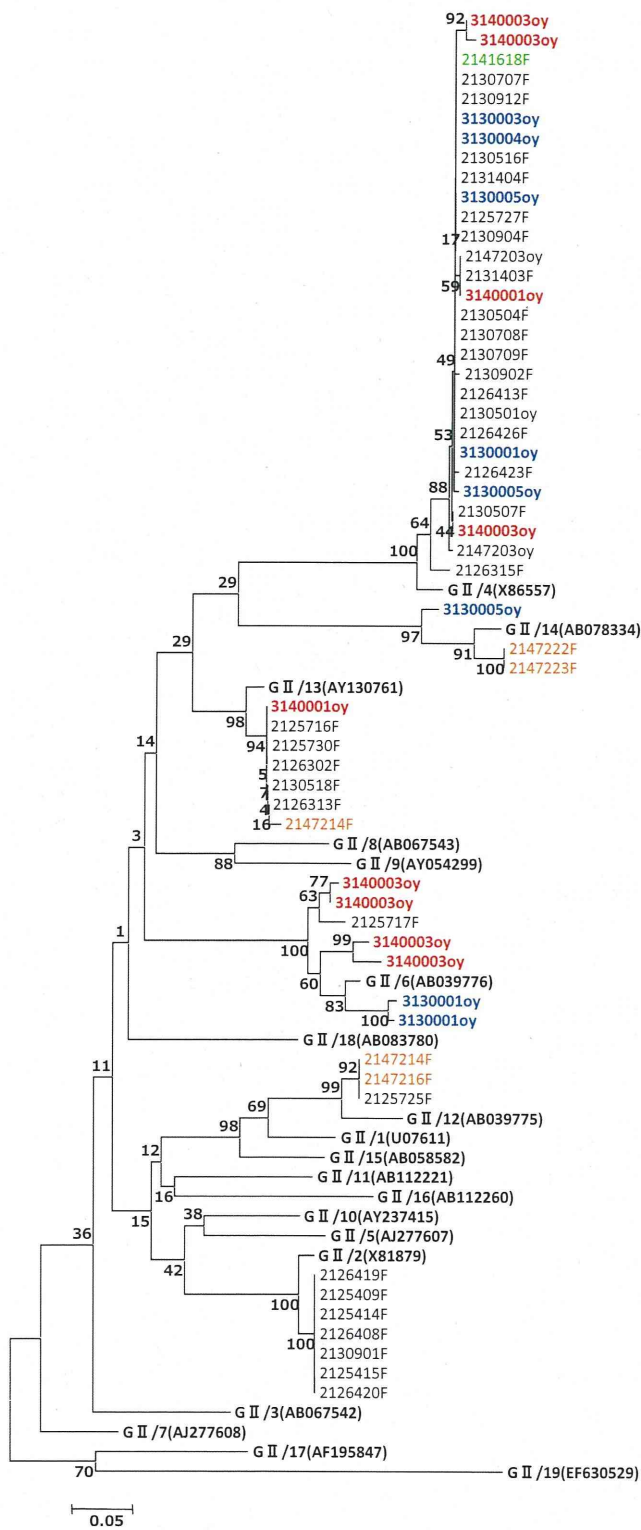


図1 GI (Capsid N/S 領域)系統樹(221bp)



2013/14シーズン  
に採取された便

2013年2月に  
購入したカキ

2014年2月に  
購入したカキ

2014/15シーズン  
に採取された便

図 2 G II (Capsid N/S 領域)系統樹(267bp)

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に関する研究」

研究協力報告

## 2013/2014 シーズンに愛媛県で検出されたノロウイルス GII/6 の分子疫学的解析

研究協力者 山下育孝 愛媛県立衛生環境研究所  
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 年 10 月～2014 年 9 月の間に、急性胃腸炎の散発例（散発性胃腸炎）から検出されたノロウイルス(NoV)は 115 例(検出ウイルスの 54.2%)で、そのうち GII が 98.3%(113 例)を占めていた。型別が可能であった GII の内訳は、GII/2 が 35 例、GII/6 が 33 例、GII/4 が 16 例、GII/3 が 14 例、GII/14 が 2 例、GII/7 が 1 例であった。GII/6 の検出数は 2001 年以降で最も多く、5 月～6 月を中心に、11 月～7 月に検出された。GII/2 は検出が 10 月～12 月に集中し、GII/4 は 1 月～5 月に、GII/3 は 2 月に多く検出された。検出時期により遺伝子型の分布に違いがみられた。集団発生例(県内事例)では、6 事例から NoV GII が、1 事例から GI と GII が検出された。遺伝子型別の結果、11 月の 1 事例と 1 月の 2 事例から GII/4 が、12 月の 1 事例から GII/6 がそれぞれ検出された。

調査期間中に検出された GII/6 のうち、1 月～7 月に検出された 27 例及び 12 月の集団発生検出株(2014 年主流行株)は同一のクラスターを形成し、カプシド(Cap)N/S 領域の塩基配列の相同性が 97.3～100%で近縁であった。一方、11 月～1 月の検出株(6 例)は前者とは別のクラスターを形成し 2009 年流行株と近縁であった。Cap 全長領域においても同様であった。2014 年主流行株は、ポリメラーゼ(Pol)領域においても 99.3～100%と近縁であるが、Cap 領域で別のクラスターに分類された 11 月～1 月検出株や 2009 年流行株と 95.8～97.0%の相同性を示した。2014 年主流行株は過去に検出された株と遺伝子学的に異なる新しい変異株であり、この株の出現が感染性胃腸炎患者数増加の原因の一つと考えられた。

### A. 研究目的

急性胃腸炎の起因ウイルスには、NoV、サポウイルス、ロタウイルス、アストロウイルス、腸管アデノウイル

ス、アイチウイルス等があるが、全国の地方衛生研究所からの病原微生物検出報告によると、NoV の検出報告数が最も多い。また、集団発生事例の原因

ウイルスの大半が NoV によるものであり、衛生行政上 NoV が最も重要である。NoV には多くの遺伝子型が存在し、近年は全国的に GII/4 変異株が流行の主流となっているが、他の遺伝子型による食中毒や感染症の報告もある。

食中毒等集団発生の予防及び食品の安全を確保するためには、地域におけるこれらのウイルスの流行状況の把握と感染経路の解明が重要と考えられる。そこで、愛媛県における急性胃腸炎からのウイルス検索を行い、今回、NoV GII/6 の地域流行を認めたので、GII/6 の流行状況を把握すると共に、その流行要因を明らかにするため分子疫学的解析を行った。

## B. 研究方法

### 1. 材料

2013年10月～2014年9月の間に採取された感染症発生動向調査用の散発性胃腸炎患者糞便 399 検体及び食中毒等集団発生 13 事例から得られた 184 検体（患者糞便 68 検体、従事者糞便 46 検体、食品 21 検体、ふき取り 49 検体）を用いた。糞便は検査実施まで $-20^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。

感染性胃腸炎患者数は、感染症発生動向調査における定点当たり週別患者報告数を使用した。

### 2. 方法

糞便からのウイルス検索は、電子顕微鏡法(EM)、リアルタイム RT-PCR 法または RT-PCR 法で行った。EM は常法により粗精製した糞便材料を、2%PTA 染色後 4 万倍で観察し、胃腸炎起因ウイルスの検索を行った。ロタウイルス、アデノウイルスは主に EM で

検出されたものについて、ELISA 法やイムノクロマト法によって型別した。NoV 遺伝子の検出は、影山らのリアルタイム RT-PCR 法(J.Clin.Microbiol 41, 2003)で行った。サポウイルス遺伝子の検出は、岡田らの方法(Arch.Virol 151, 2006)に準じ、Cap 領域を増幅するプライマーを用いた nested-PCR 法で行った。NoV 陽性例については、Cap N/S 領域の塩基配列をダイレクトシーケンス法により決定し、片山らが提唱する方法で遺伝子型別を行った。遺伝子型番号は影山らの方法に従った。また、GII/6 型別株の一部については、Pol 領域、Pol 領域から Cap N/S 領域及び Cap 全長領域の塩基配列を決定し系統樹解析を実施すると共に、過去の検出株と比較した。

(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、倫理面に問題ないと考えられる。

## C. 研究結果

### 1. 感染性胃腸炎患者の週別発生状況

愛媛県における 2004/2005 ～ 2013/2014 シーズンの定点当たりの患者報告数の推移を図 1 に示した。2013/2014 シーズンは、11月～12月の患者報告数が少なく、2014年5月～6月の患者報告数が 2004/2005 シーズン以降の 10 年間で最も多かった。

### 2. 散発性胃腸炎患者からのウイルス検出状況

散発性胃腸炎患者 399 名からのウイルス検出状況を表 1 に示した。399 検体中、49.4%にあたる 197 検体からウイルスが検出され、そのうち、14 検体から 2