

種類のウイルスが、1検体から3種類のウイルスが検出された。検出ウイルス214例の内訳は、NoV が115例(54.2%)で最も多く、次いでサポウイルスが52例(24.8%)、A群ロタウイルスが23例(10.9%)、アストロウイルスが20例(8.5%)、アデノウイルスが4例(1.9%)であった。検出されたNoVは GIIが113例(98.3%)、GIが2例(1.7%)で、ほとんどGIIであった。

NoVは8月～9月を除き、ほぼ年間を通して検出され、特に、10月～2月と5月～6月の検出率が高かった。サポウイルスもほぼ年間を通して検出されたが11月～12月に多かった。A群ロタウイルス、アストロウイルスは、4月に高率に検出された。

3. 検出された NoV の月別遺伝子型別 検出状況

散发性胃腸炎から検出された NoV 115 例のうち解析が可能であった 103 例(GI 2 例, GII 101 例)について遺伝子型別を行った。その結果、GI は 2 種類、GII は 6 種類の遺伝子型が確認された。内訳は GI/6 及び GI/14 が各 1 例、GII では、GII/2 が 35 例(34.7%)、GII/6 が 33 例(32.7%)と多く、次いで GII/4 が 16 例(15.8%)、GII/3 が 14 例(13.9%)、GII/14 が 2 例(1.9%)、GII/7 が 1 例(1.0%)であった。

検出された NoV GII の月別遺伝子型別検出状況を図 2 に示した。GII/2 は、10 月～12 月に集中して検出された。GII/6 は 11 月～7 月に検出されたが、特に 5 月～6 月の検出数が多く、この間に検出された NoV の 77.3%を占めていた。GII/4 は、1 月～5 月に検出され、GII/3 は 2 月の検出数が多かった。

4. 食中毒等集団発生例からのウイルス 検出状況

調査期間中に当所に搬入された集団発生例からのウイルス検出状況を表 2 に示した。13 事例中 8 事例から NoV が、1 事例からサポウイルス(遺伝子型 GI.2)が検出された。検出された NoV の内訳は GII/4 が 3 事例(2013 年 11 月 1 事例、2014 年 1 月 2 事例)、GII/6 が 1 事例 (2013 年 12 月)であった。

5. NoV GII/6 の遺伝子解析

2013/2014 シーズンに検出された GII/6 と過去に検出された GII/6 について、Cap N/S 領域(282 塩基)(図 3)、Cap 全長領域(図 4)及び Pol 領域(696 塩基)(図 5)の系統樹解析を実施し、詳細に検討を行った。また、GII/6 変異株の月別検出数の推移を図 6 に示した。

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、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 2009 年流行株と同じクラスターに分類された(図 3、図 6)。Cap 全長領域においても、N/S 領域と同様に、2014 年主流行株は、塩基配列の相同性が 98.7～99.2%と近縁であり、Saitama/U16/JP と 91.2～91.4%の相同性を示したが、2009 年流行株とは塩基配列の相同性が 82.8～83.2%で、別のクラスターに分類された(図 4)。

11 月～1 月の検出株(6 例)は、Pol 領域においても Cap 領域と同様に 2009 年流行株に近縁で、同一のクラスターを形成した。一方、2014 年主流行株は、Pol 領域においても 99.3～100%と近縁

であったが、Cap 領域で別のクラスターに分類された 2009 年流行株及び 11 月～1 月の検出株(6 例)と 95.8～97.0% の相同性を示した (図 5、図 6)。

D. 考察

2013/2014 シーズンに散発性胃腸炎から検出された GII/6 は 33 例で、NoV の遺伝子型別を開始した 2000 年以降で最も多かった。系統樹解析の結果、1 月～7 月に散発性胃腸炎から検出された 27 例及び 12 月に集団発生例から検出された株の相同性は、Cap N/S 領域が 97.3～100%、Pol 領域が 99.3～100% で、非常に近縁であった。このことから 12 月から 7 月に愛媛県において、極めて、類似した GII/6 株の地域流行があったことが示唆された。これらの株は、Pol 領域では 2009 年流行株に最も近縁(相同性 95.8～97.0%)であり、Cap 領域では Saitama/U16/JP に近縁であったことから、Pol 領域とカプシド領域の間で遺伝子組換えを起こしたキメラウイルスであると考えられた。

2013/2014 シーズンは、5 月～6 月の感染性胃腸炎患者報告数が 2004/2005 シーズン以降の 10 年間で最も多かった。同時期に、患者から前述の NoV GII/6 が高率に検出された。これらのことから、過去に検出された株とは遺伝子学的に異なる新しい変異株の出現が、この時期の患者数増加の原因の 1 つであると考えられた。

NoV は、遺伝子型内での変異や異なった遺伝子型間の組換えによる新しい変異株の出現等を繰り返し、世界的な流行や地域流行を起こしていることから、今後も NoV の詳細な遺伝子解析と

発生動向の把握が必要である。

E. 結論

1. 2013/2014 シーズンに愛媛県で NoV GII/6 の地域流行が認められた。11 月～1 月に検出された GII/6 は、2009 年流行株と近縁であったが、12 月の集団発生例及び 1 月～7 月に検出された GII/6 は、過去に検出された株と遺伝子学的に異なる GII/6 の新しい変異株であった。
2. GII/6 の新しい変異株は、2014 年 5 月～6 月に多数検出された。この時期の感染性胃腸炎患者数は過去 10 年間で最も多いことから、新しい変異株の出現が患者数増加の原因の 1 つと考えられた。

謝辞: 研究に協力していただいた、愛媛県立衛生環境研究所 溝田文美、菅美樹、四宮博人先生に深謝いたします。

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. 特許習得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

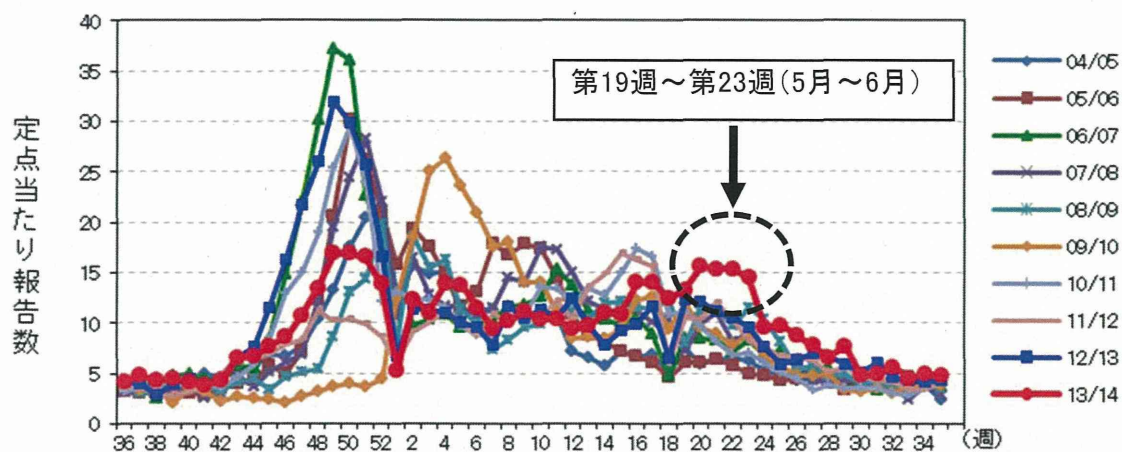


図1 感染性胃腸炎患者の週別発生状況

表1 散発性胃腸炎患者からの月別ウイルス検出状況

月	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	計
ノロウイルス	12	19	14	15	22	3	6	15	8	1			115
サポウイルス		10	18	1	4	2	5	5	3	3	1		52
ロタウイルス					1		18	3	1				23
アストロウイルス				1	1		12	5	1				20
アデノウイルス	1			1					1	1			4
検査数	40	49	48	36	39	15	48	42	31	27	13	13	399

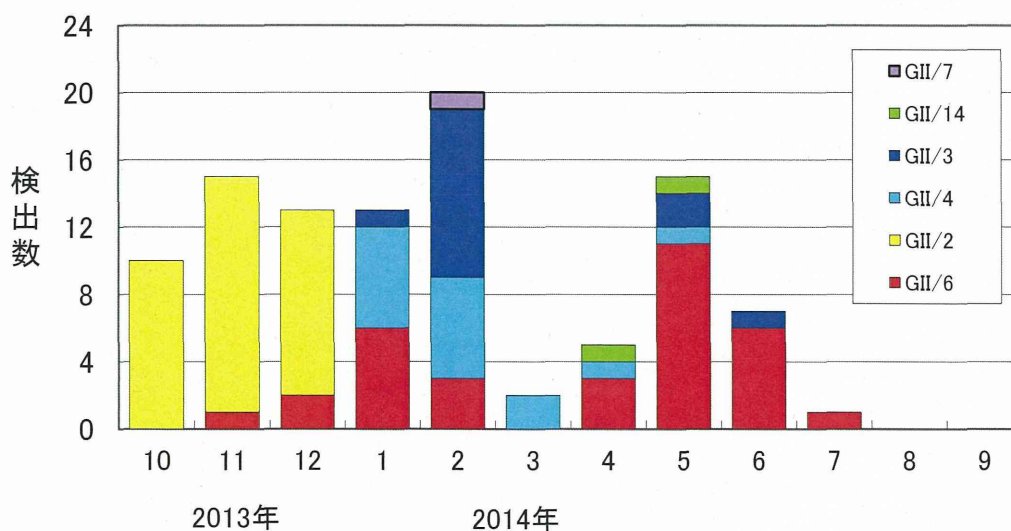


図2 ノロウイルスの月別遺伝子型別検出状況

表2 集団発生例からのウイルス検出状況

年.月 遺伝子型	2013 .10月	2013 .11月	2013 .12月	2014 .1月	2014 .2月	2014 .3月	2014 .4月	2014 .7月	計
事例数	1	1	2	2	3	2	1	1	13
NoV GII4		1		2 *					3
NoV GII/6			1						1
NoV GII			1			1			2
NoV GI/1とGII					1				1
NoV GI(県外)					1				1
SaV GI.2						1			1

(遺伝子型:カプシドNS領域、食中毒事例:赤字) * 2事例中 1事例は食中毒

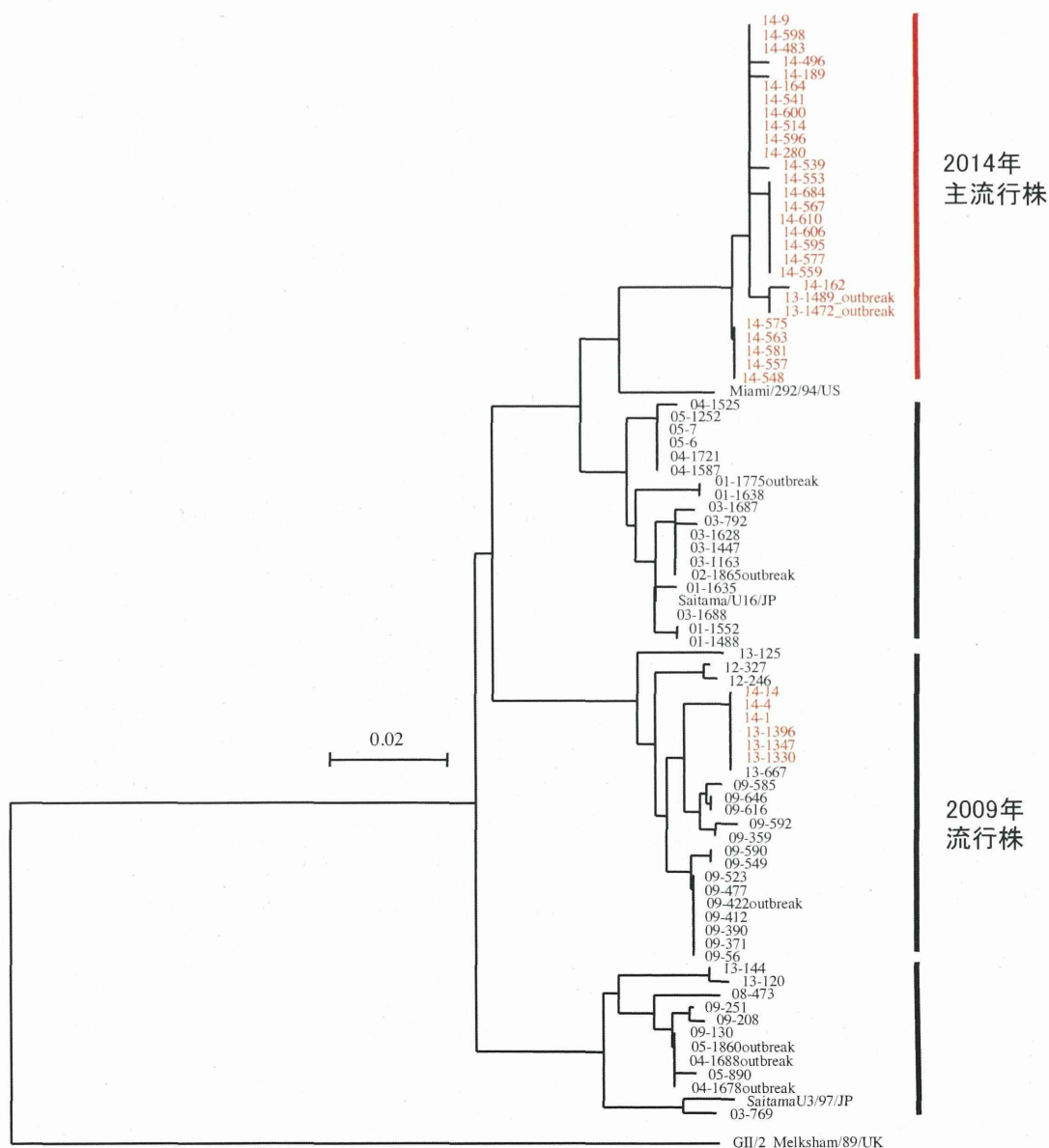


図3 ノロウイルスGII/6のカプシドN/S領域の系統樹(282bp)

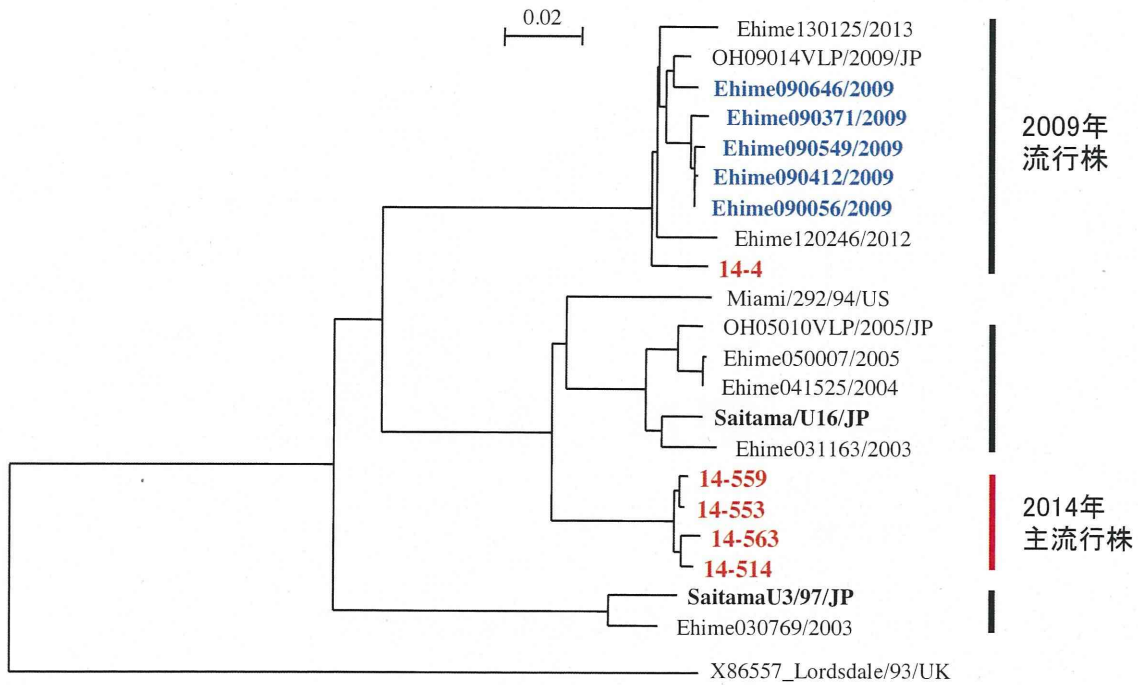


図 4 ノロウイルス GII/6 のカプシド全長領域の系統樹

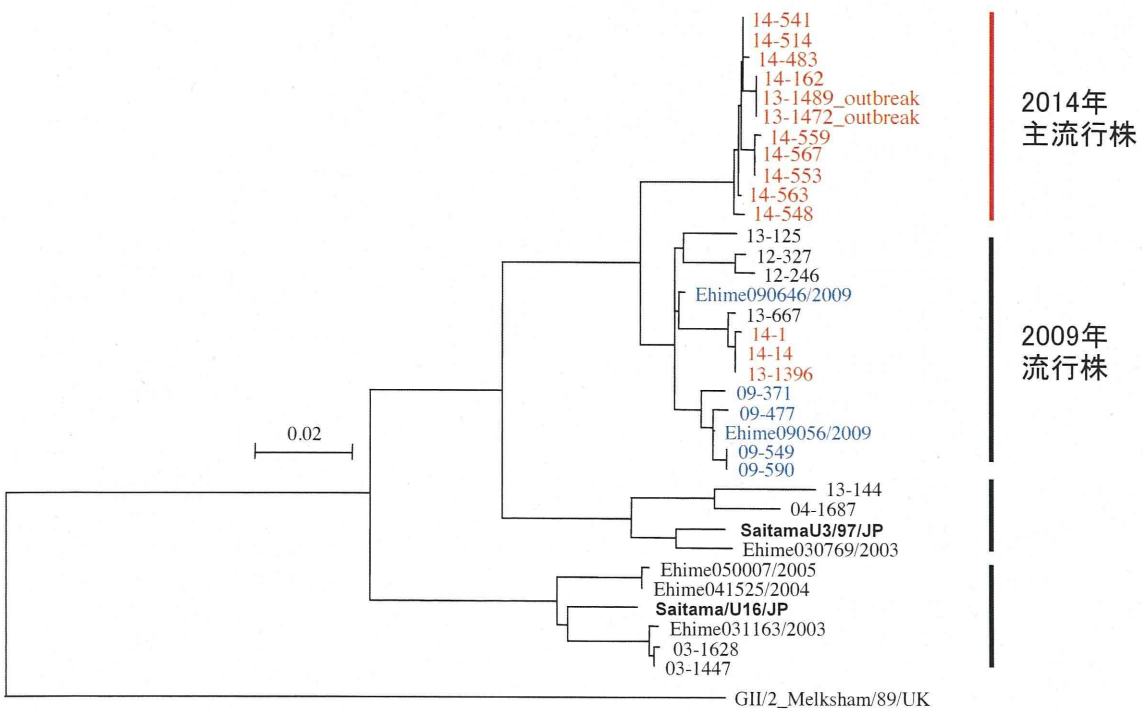


図 5 ノロウイルス GII/6 のポリメラーゼ領域の系統樹 (696bp)

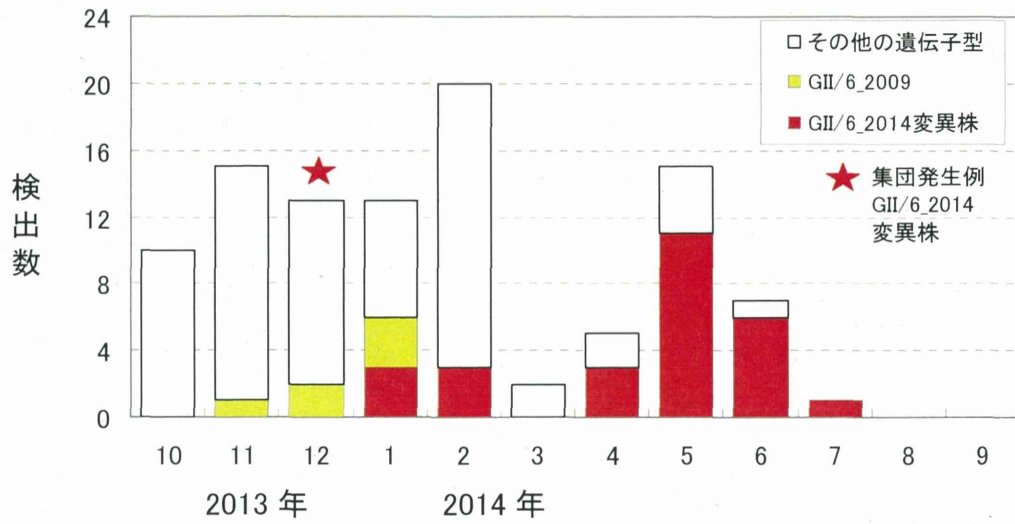


図6 ノロウイルス GII/6 変異株の検出状況

終末処理場流入水および市販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	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	芦塚 由紀	福岡県保健環境研究所

研究要旨

ノロウイルス (NoV) の流行状況を把握するため、環境検体である終末処理場流入水および食品検体である市販カキのノロウイルス検出状況について調査した。終末処理場流入水中のNoVGⅠは2月から6月にかけて検出され、NoVGⅡは11月から7月かけて検出された。検出されたNoV量はNoVGⅠに対しNoVGⅡが約100倍多かった。2014年2月に購入した市販カキ6ロット中3ロット(加熱調理用2ロット、生食用1ロット)から最大11388コピー/中腸腺1gのNoVが検出された。遺伝子型はGI/4、GI/7、GI/14、GⅡ/3、GⅡ/4_Sydney_2012、GⅡ/6、GⅡ/13およびGⅡ/14であった。

A. 研究目的

ノロウイルス (NoV) は主に冬季に流行し、食中毒や感染性胃腸炎の原因ウイルスの一つとして知られている。NoVの生活環はヒトに感染し下水流入水に排出され、貝類に蓄積し、再びヒトに感染する一連の循環であると考えられている。

今回、NoVの感染状況の把握および感染拡大の防止に寄与することを目的に、終末処理場流入水および市販カキからのNoV検出を行った。

B. 研究方法

1. 材料

終末処理場流入水は2013年9月から2014年10月まで期間に都市部にあるA

終末処理場および非都市部にあるB終末処理場から毎月1回採取した流入水を用いた。

市販カキは2014年2月に県内で購入した6ロット18検体を材料とした。6ロットはすべてA県産であり、生食用が4ロット(海域番号:10、20、30)、加熱調理用が2ロット(海域番号:10)であった。

2. 終末処理場流入水からのNoV検出

流入水中のウイルス濃縮は国立感染症研究所が示す「ポリオウイルス感染症の実験室診断マニュアル」に準拠した。すなわち、流入水1Lを良く混和し、4℃で3000rpm、30分間遠心し、上清に塩化マグネシウムを添加、PH3.5に調整後、陰電荷フィルターにウイルスを吸着させ、10mL

の 3%ビーフエキストラクト存在下で誘出し、これをウイルス濃縮液とした。

NoV 検出は、厚生労働省通知法（平成 19 年 5 月 14 日付け食安監発第 0514004 号）に準拠しリアルタイム PCR 法により行った。すなわち、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) により RNA 抽出を行い、SuperScript® III Reverse Transcriptase (Life technologies) および Random primer (Life technologies) を用いて逆転写反応により cDNA を合成し、TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) を用いてリアルタイム PCR 法により NoV を定量した。

3. 市販カキからの NoV 検出

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、 α -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 10000rpm、20 分間、4°C で遠心分離し、上清を 35000rpm、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 μ 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

リアルタイム PCR 法により NoV 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、N/S 領域を増幅した。

4. 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シングを行い、3500xl 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。解析が困難であった NoVGII については、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. 終末処理場流入水からの NoV 検出

NoVGI については、A 終末処理場では 2 月および 5 月に二峰性のピークがあり、B 終末処理場では、2 月に一峰性のピークがみられた(図 1)。NoVGII については、A 終末処理場では 12 月に一峰性のピークがあり、B 終末処理場では、1 月および 4 月に二峰性のピークがみられた(図 2)。流入水中の NoV 量は NoVGI に対し NoVGII が約

100倍多かった。

2. 市販カキからのNoV検出

市販カキ6ロット中3ロットからNoVが検出された(表1)。検出された3ロットのうち2ロットは加熱調理用、1ロットは生食用であった。NoVのコピー数は1g当たり最小180コピー、最大11388コピー検出された。検出されたNoVGIIの遺伝子型はGII/4、GII/7、およびGII/14であった(図3)。また、検出されたNoVGIIの遺伝子型はGII/3、GII/4、GII/6、GII/13、およびGII/14であった(図4)。NoVGII/4はすべてGII/4_Sydney_2012亜型に分類された。

D. 考察

2013/14シーズンの福岡県感染症発生動向調査において、NoVは2013年11月から検出数が増加し、2014年5月頃まで検出されていた(福岡県結核・感染症発生動向調査事業資料集平成25年,2013)。今回の調査においても流入水中のNoV量は11月から増加し始め、12月から1月にかけてピークが認められたことから、流入水調査は感染性胃腸炎の流行初期との関連が認められた。より正確には、毎月第一週に流入水を採水し検査を行うため、10月からNoV感染者数は増加し始め、11月以降のNoV流行によって下水に流入するNoV量が増加したと考えられる。

流入水中のNoVGIIの定量結果を終末処理場別にみると、A終末処理場では12月に一峰性のピークがあり、B終末処理場では、1月および4月に二峰性のピークがみられ異なる傾向が認められた(図2)。A終末処理場とB終末処理場では採水地点

が異なることから、県内でのNoVの流行状況には地域性があったと思われる。

2014年4月から5月にかけて、B終末処理場の病原体定点医療機関において採取された感染性胃腸炎検体から検出されたNoVGIIの遺伝子型は、GII/4_Sydney_2012亜型が1件、GII/6が1件であり、集団事例は観察されていなかった。このことから、流入水中のNoVのモニタリング調査は臨床検体よりも感度が良く市中の流行をより正確に把握する方法であると言える。

2013年9月から2014年1月までに、感染性胃腸炎および食中毒事例由来糞便から検出されたNoVの遺伝子型は、GII/4_Sydney_2012亜型が最も多く、次いでGII/6であった。2014年2月に購入した市販カキから検出したNoVもこれら二つの遺伝子型を含んでおり、市販カキの産地は他県であったことから、全国的にGII/4_Sydney_2012亜型とGII/6が流行していたことが示唆された。一方、感染性胃腸炎や食中毒から検出されていないGII/13およびGII/14もカキ中に蓄積されていたことから、不顕性感染を引き起こしているNoVが存在していることが推察される。

NoVの生活環は①ヒトへの感染、②下水流入水への排出、および③貝類への蓄積であると考えられている。今回の検討においても、それぞれのNoV検出状況は関連があることが示唆された。流入水中のウイルスを不活化させること、およびカキにウイルスを蓄積させないことがNoV胃腸炎の感染拡大の防止につながることを示された。

E. 結論

1. 終末処理場流入水および市販カキからの NoV 検出状況は、市中の NoV 流行を反映していることが示された。
2. 2013/14 シーズンの NoV の主な流行亜型は GH/4_Sydney_2012 亜型と GII/6 であり、福岡県内とカキの産地であった A 県では同一であった。
3. 不顕性感染を起こしている NoV が環境中に存在し、カキ中に蓄積されていることが示唆された。

健環境研究所の年報第 41 号, 84-87, 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

F. 研究発表

1. 論文発表

芦塚由紀、吉富秀亮、吉山千春、濱崎光宏、石橋哲也、堀川和美：福岡県におけるノロウイルスの検出状況。福岡県保

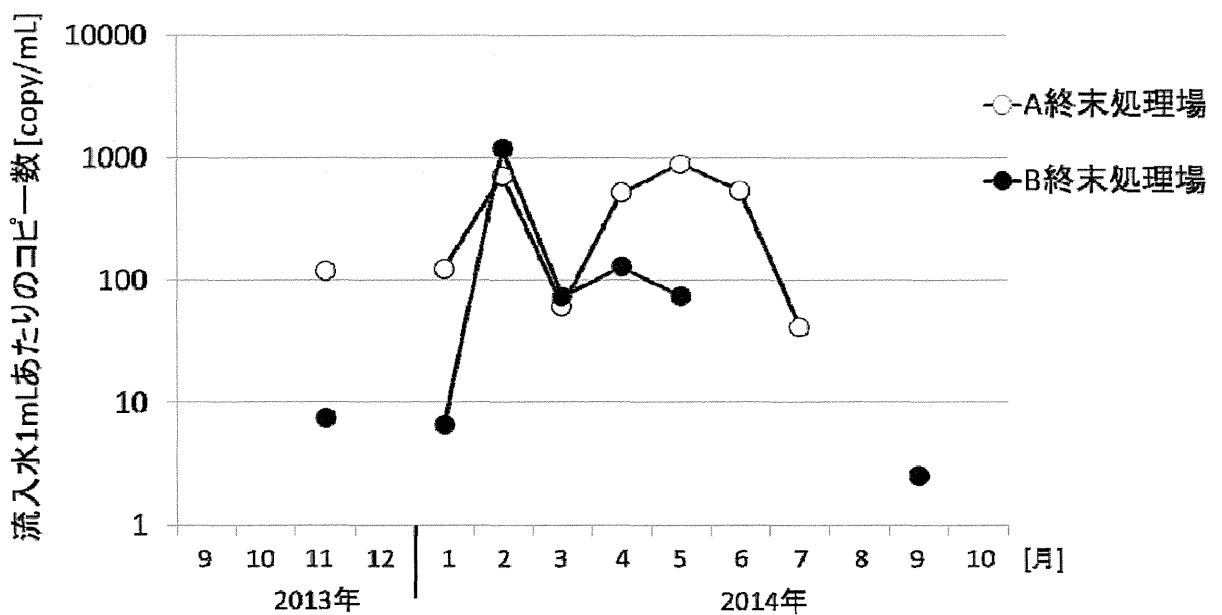


図 1. 流入水中の NoVGI 検出状況

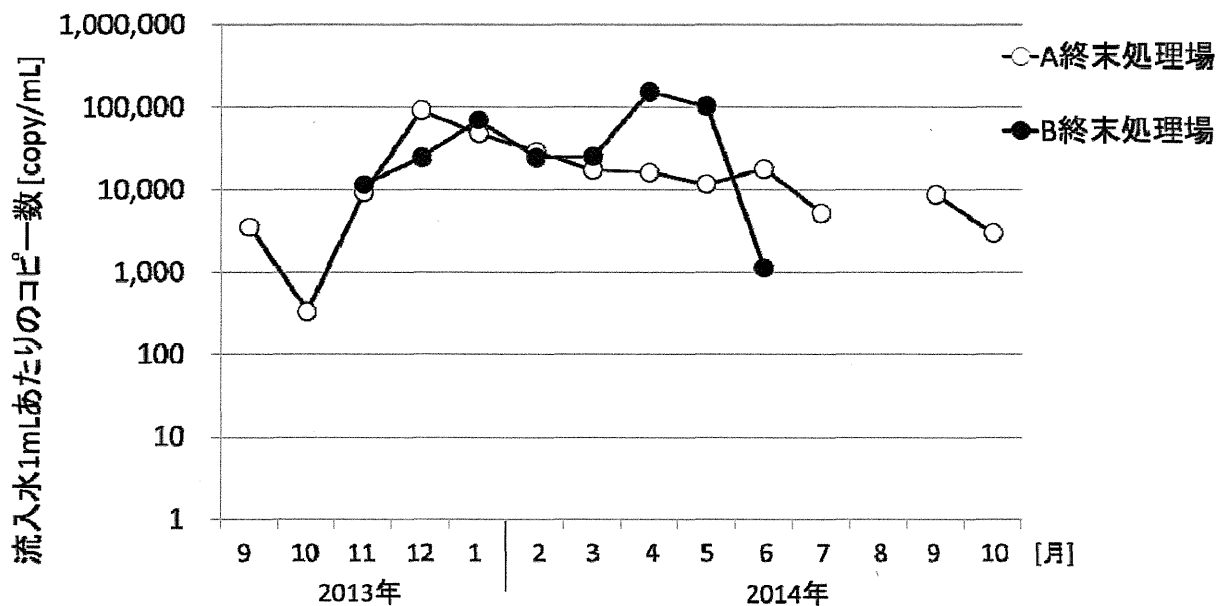


図 2. 流入水中の NoVGII 検出状況

表 1. 市販カキからの NoV 検出結果

検体	加工日	消費期限日	産地	海域番号	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		2月6日	A県	10	1-1	0	0	-	-		
					1-2	0	0	-	-		
					1-3	0	0	-	-		
2 生食用	2月4日	2月7日	A県	30	2-1	0	0	-	-		
					2-2	0	0	-	-		
					2-3	0	0	-	-		
3 生食用	2月6日	2月9日	A県	30	3-1	0	0	-	-		
					3-2	0	0	-	-		
					3-3	0	0	-	-		
4 加熱調理用	2月10日		A県	10	4-1	374	11388	+	+		GII/3, GII/4,
					4-2	458	4255	+	+	GI/4, GI/14	GII/6, GII/13,
					4-3	180	4545	+	+		GII/14
5 加熱調理用	2月15日		A県	10	5-1	0	0	-	+		
					5-2	0	1805	-	+		GII/4, GII/6,
					5-3	0	0	-	+		GII/14
6 生食用	2月15日		A県	20	6-1	0	0	-	-		
					6-2	0	2193	-	+	GI/7	GII/4, GII/6,
					6-3	0	2030	+	+		GII/13, GII/14

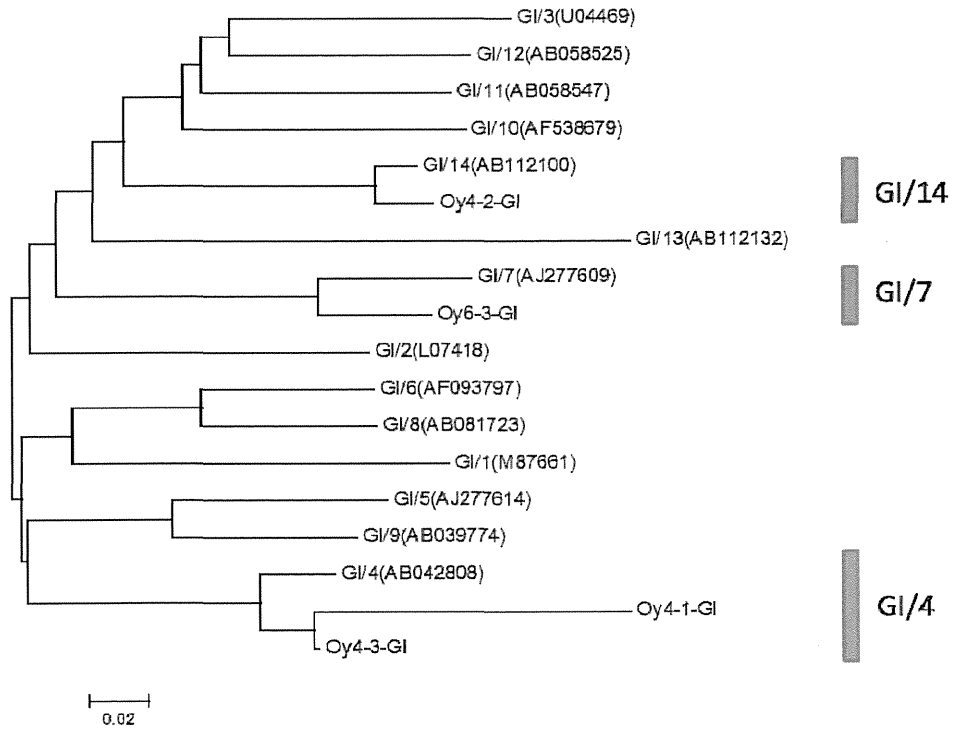


図 3. カキから検出された NoVGI のカプシド N/S 領域の系統樹

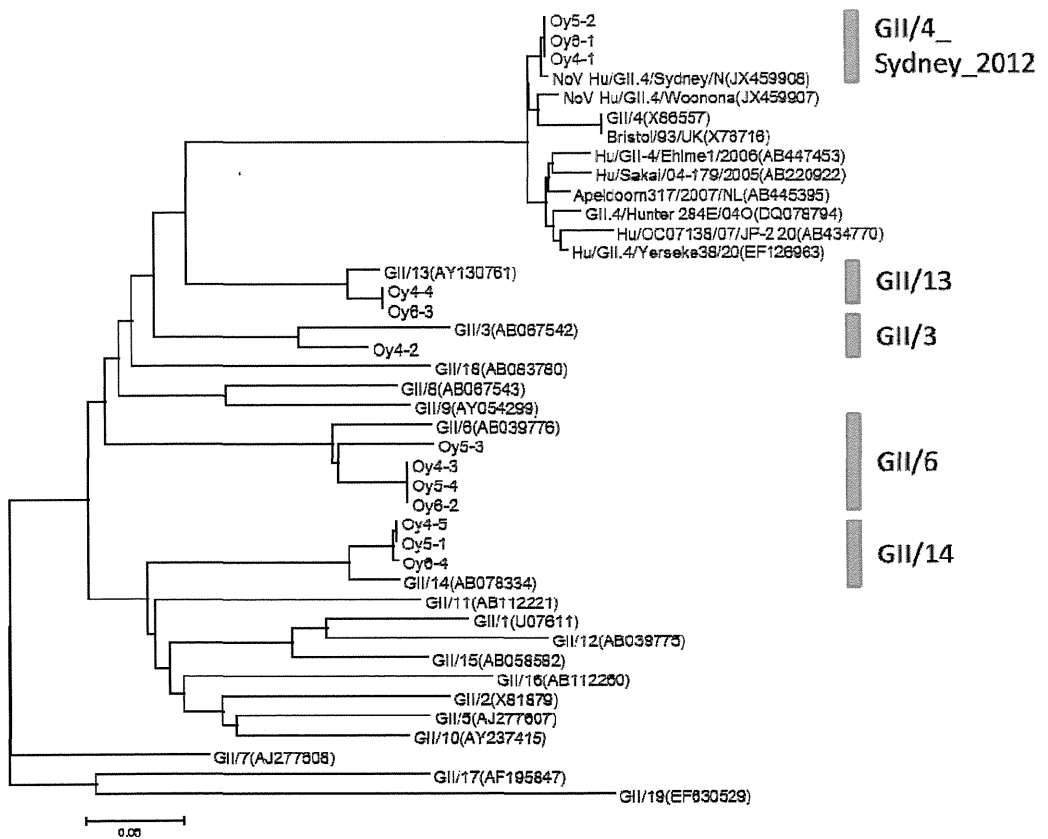


図 4. カキから検出された NoVGII のカプシド N/S 領域の系統樹

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

熊本県における市販カキからのノロウイルスの検出及びサポウイルス による散発事例の流行疫学解析

研究協力者	原田 誠也	熊本県保健環境科学研究所
研究協力者	吉岡 健太	熊本県保健環境科学研究所
研究協力者	戸田 純子	熊本県保健環境科学研究所
研究協力者	大迫 英夫	熊本県保健環境科学研究所

研究要旨

熊本県内で市販されている生カキのノロウイルス (NoV) の検査を行った。2014 年 2 月に購入した生食用及び加熱調理用生カキ各 1 ロット、並びに 2014 年 11 月に購入した加熱調理用生カキ 1 ロットのうち、2014 年 2 月に購入した 2 ロットから NoV 遺伝子が検出された。中腸腺 1g 中の NoV 遺伝子量は、最小 233 コピー、最大 41,136 コピーであった。遺伝子型は GI/2、GI/4、GI/13、GI/14、GII/4 及び GII/6 の 6 種類 (生食用: 2 種類、加熱調理用: 5 種類) であり、GII/4 は Sydney2012 亜型に分類された。

次に、2011 年 4 月～2014 年 12 月間に、熊本県内で検出された下痢症由来 SaV (散発事例: 39 株、集団 1 事例: 4 株) の遺伝子解析を行ったところ、散発事例株は、GI.1: 7 株、GI.2: 12 株、GI.3: 3 株、GI.5: 1 株、GII.1: 2 株、GII.3: 4 株、GIV: 1 株及び型別不能 (NT): 9 株であり、集団事例株は、GII.3: 3 株及び NT: 1 株であった。年度別にみると、2011 年度～2013 年度間は GI が約 7 割を占めたが、2014 年度は GII ヘシフトした。

A. 研究目的

近年、カキを原因とする NoV 食中毒は減少したが、依然としてカキは原因食材の一つであることから、市販されている生カキの NoV 汚染状況を調査した。

また、サポウイルス (SaV) は、NoV に次いで冬季に発生する散発及び集団下痢症の主要な原因ウイルスであり、近年、食中毒や感染症の報告が増加している。

そこで、熊本県内における SaV の流行遺伝子型を把握するため、散発及び集団事例から検出された SaV の遺伝子解析を行ったので併せて報告する。

B. 研究方法

1. 材料

1) カキ

2014 年 2 月に購入した生食用カキ 1 ロ

ット4検体、加熱調理用生カキ各1ロット4検体、及び2014年11月に購入した加熱調理用生カキ1ロット3検体を検査材料とした。

2) 糞便

2011年4月から2014年12月の間に、熊本県内で発生した散発下痢症事例の患者糞便460検体及び2014年11月に発生した集団下痢症事例1件の患者糞便4検体の計464検体を検査材料とした。

2. 方法

1) カキのNoV検査

検体あたり1.5g以上の中腸腺をPBS(-)で10%乳剤とし、 α -アミラーゼを10mlあたり25mg添加した。36°Cで1時間静置後、10,000rpm、20分間、4°Cで遠心分離し、上清を回収した。遠心上清10mlにポリエチレングリコール6,000を1.2g、NaClを0.58g加え、完全に溶解させた。10,000rpm、30分、4°Cで遠心分離し、沈渣に0.5%Zwittergent加PBS(-)を加え、再浮遊させたものからQIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) でウイルスRNAを抽出し、PrimeScript (TaKaRa) でcDNAを合成した。その後、厚生労働省通知(平成19年5月14日付け食安監発第0514004号)に準じ、Real-timePCR法によりNoV遺伝子の定量を行った。また、Nested RT-PCR法によりカプシドN/S領域を増幅し、ダイレクトシーケンス法で遺伝子型を決定した。その後、MEGA5.2を用い、NJ法で作成した系統樹により遺伝子型を決定した。なお、遺伝子型は、kageyamaら(J. Clin. Microbiol. :42, 2988-2995, 2004.) の分類に従った。

2) 糞便のSaV検査

糞便0.1gをPBS(-)で10%乳剤とし、10,000rpm、10分、4°Cで遠心分離後、遠心上清から、上記と同じ方法でウイルスゲノムを抽出し、cDNA合成を行った。SaVのスクリーニングは、Okaら(J. Med. Virol. ;78, 1347-1353, 2006.) 及びVINJEら(Vinje et al : J. Clin. Microbiol., 38, 530-536, 2000) のプライマーを用いたRT-PCR法で実施した。

スクリーニング陽性検体について、カプシド領域はKitajimaら(A. Envi. Microbiol. ;76, 2461-2467, 2010) 及びポリメラーゼ領域は大阪市立環境科学研究所の入谷らが開発したプライマーを用いて再度RT-PCR法を行い、上記と同じ方法で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. 市販生カキの検査結果

2014年2月購入の生食用カキ1ロット4検体中2検体からNoV GIが、1検体からNoV GIIが検出され、加熱調理用生カキ1ロット4検体すべてからNoV GI及びNoV GIIが検出されたが、11月購入の加熱調理用生カキ1ロット3検体からは検出されなかった。また、中腸腺1g中のNoV遺伝子の量は、最小233コピー、最大41,136コピーであった。遺伝子型はGI/2、GI/4、GI/13、GI/14、GII/4及びGII/6の6種類であり、加熱調理用生カキから5種類の遺伝子型が検出された。GII/4はSydney2012亜型に分類された(表1)。

なお、一部の検体で、Nested RT-PCR 法で陽性、Real time PCR 法で陰性となったケースや塩基配列を決定できなかったケースがあった。

2. 糞便からの SaV 検査結果

散发事例の糞便 460 検体中 39 検体 (8.4%) から SaV が検出された。遺伝子型の内訳は、GI.1:7 株、GI.2:12 株、GI.3:3 株、GI.5:3 株、GII.1:2 株、GII.3:4 株、GIV:1 株及び NT:9 株であった (表 2)。

最も検出率が高かった遺伝子型を年度別にみると、2011 年度は 11 株中 5 株 (45.5%)、2012 年度は 17 株中 6 株 (35.5%) が GI.2、2013 年度は 7 株中 5 株 (71.4%) が GI.1 であり、2014 年度は 4 株中 2 株 (50%) が GII.3 であった (図 1)。

また、2014 年 11 月に発生した集団事例の糞便 4 検体すべてから SaV が検出され、遺伝子型は GII.3:3 株及び NT:1 株であった (表 3)。

3. SaV の系統樹解析

散发及び集団事例由来 SaV について、カプシド領域及びポリメラーゼ領域の系統樹解析を行ったところ、カプシド領域の相同性は、GI.1 が 99.4~99.6%、GI.2 が 98.7~98.9% であった。ポリメラーゼ領域の相同性は、GI.1 が 96.5~99.7%、GI.2 が 98.3~99.8% であった。両領域共に遺伝子型間での大きな変異は認められず、また、カプシド領域及びポリメラーゼ領域の遺伝子型が異なるキメラウイルスは検出されなかった (図 2-a、b)。

なお、集団事例から検出された GII.3 株は、ポリメラーゼ領域の相同性が 100% であり、散发事例から検出された GII.3 株に極めて近縁であった。

D. 考察

2014 年 2 月に購入した市販生カキから NoV の検索を行ったところ、様々な遺伝子型が検出され、中腸腺 1g あたりのウイルス量は、NoV GI より NoV GII の方が多かった。特に、加熱調理用生カキ 1 ロット 4 検体から 5 種類の遺伝子型が検出され、2012 年度~2013 年度に流行した GII/4 Sydney2012 亜型も 3 検体から検出された。このことから、環境中の NoV 調査には生食用カキよりも加熱調理用生カキの方が適していると思われた。

今回、Real time PCR 法及び RT-PCR 法の 2 種類の方法を用いて検査したところ、Nested RT-PCR 法では NoV 陽性となっても、Real time PCR 法での実測値が 10 コピー未満で陰性と判定されるケースがあり、より高感度な検査法を開発する必要性が考えられた。また、Nested RT-PCR 法で陽性となった検体のうち、塩基配列が決定できなかったケースもあった。カキの中腸腺には複数の遺伝子型が含まれている可能性があることから、今後、クローニングを用いたシーケンスの必要性が考えられた。

2011 年 4 月~2014 年 12 月間に、熊本県内で発生した散发及び集団下痢症事例から検出された SaV の遺伝子解析を行った結果、2011 年度~2013 年度間は GI.1 及び GI.2 が、2014 年度は GII.1 及び GII.3 が優勢に検出された。また、この間に検出された GI.1 株及び GI.2 株は、カプシド領域及びポリメラーゼ領域で若干の変異は認められたものの、年度ごとの大きな変化は認められなかった。このことから、2011 年度~2013 年度間に県内で流行

していた GI.1 株及び GII.2 株は、ほぼ同一株によるものと考えられた。しかし、2014 年度は GI.1 及び GI.2 は検出されおらず、散发事例から GII.1 及び GII.3 が検出され、さらに集団事例から GII.3 が検出されたことから、GII にシフトしていることが推察された。

SaV は、NoV に次ぐ食中毒及び感染症の原因ウイルスとして注目されており、近年、集団事例の報告も増加していることから、今後、SaV についても病原体サーベイランスを強化していくことが重要である。

E. 結論

2014 年 2 月及び 11 月に購入した市販生カキから NoV の検索を行ったところ、2 月に購入した生食用及び加熱調理用生カキから 6 種類の遺伝子型が検出され、その中には 2012 年度～2013 年度に全国で流行していた GII/4 Sydney 2012 亜株と近縁な株が含まれていた。

NoV の検査法について、Real time PCR 法と Nested RT-PCR 法で結果に相違がみられたことから、より高感度な検査法を開発する必要性が考えられた。さらに、Nested RT-PCR 法で陽性となった検体の

うち、塩基配列が決定できなかったケースがあったことから、クローニングを用いたシーケンスの必要性も考えられた。

2011 年 4 月から 2014 年 12 月の間に散发及び集団下痢症事例から検出された SaV の遺伝子解析を行ったところ、7 種類の遺伝子型が検出された。2011 年度～2013 年度間は GI.1 及び GI.2 が多く検出されたが、遺伝子型間での大きな変化は認められなかった。また、2014 年度は散发及び集団事例から GII.1 及び GII.3 が検出されたことから、GI から GII へ流行遺伝子型のシフトが考えられた。

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 カキからのNoV検出状況

検体	産地	年月	番号	NoroGI			NoroGII			
				Real-time PCR	Nested RT-PCR	遺伝 子型	Real-time PCR	Nested RT-PCR	遺伝 子型	
1 生食用	D-1	2014年 2月	①-1		+	GI/2				
			①-2		+	GI/4				
			①-3							
			①-4				233	+	GII/?	
2 加熱 調理用	A-10	2014年 2月	②-1	343	+	GI/13	2,682	+	GII/6	
			②-2		+	GI/?	5,553	+	GII/4	
			②-3	844	+	GI/4	41,136	+	GII/4	
			②-4	378	+	GI/14	5,022	+	GII/4	
3 加熱 調理用	A-10	2014年 11月	③-1							
			③-2							
			③-3							

*中腸腺1gあたりのコピー数

表2 散発事例におけるSaV検出状況
(2011年4月～2014年12月)

	2011年度	2012年度	2013年度	2014年度	計
検出数	11	17	7	4	39
GI.1	2		5		7
GI.2	5	6	1		12
GI.3	1	2			3
GI.5		1			1
GII.1	1			1	2
GII.3		2		2	4
GIV		1			1
型別不明	2	5	1	1	9

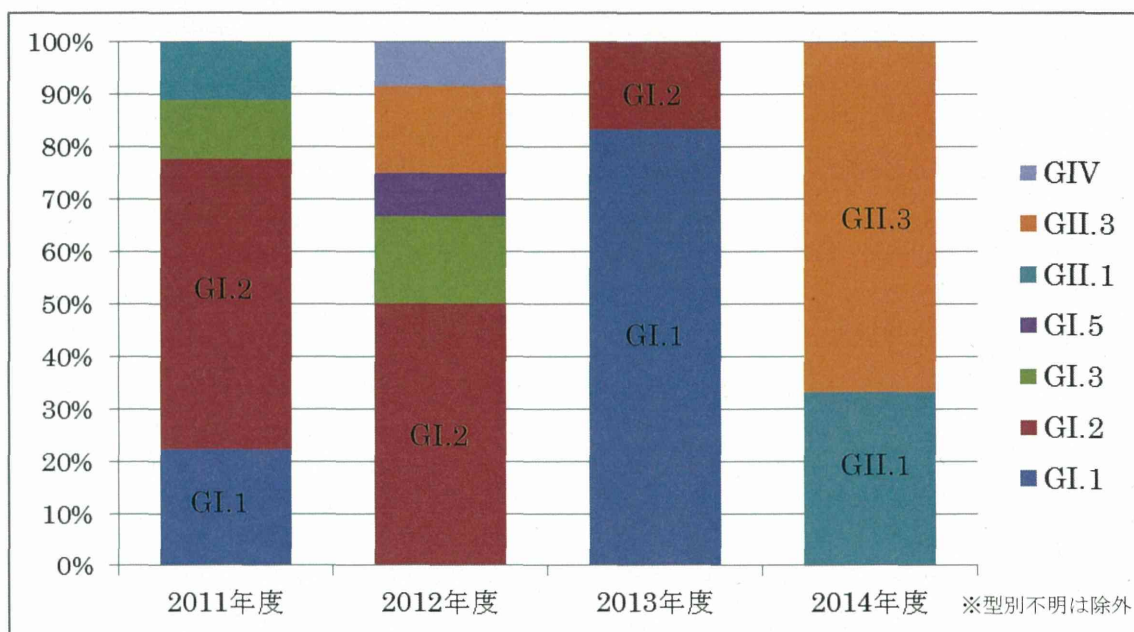


図1 散発事例における年度別 SaV 検出割合

表3 2014年に SaV が検出された集団事例（熊本県）

発生時期	検体	発生場所	遺伝子型	推定感染源
12月	有症者4検体	結婚式場	GII.3	不明

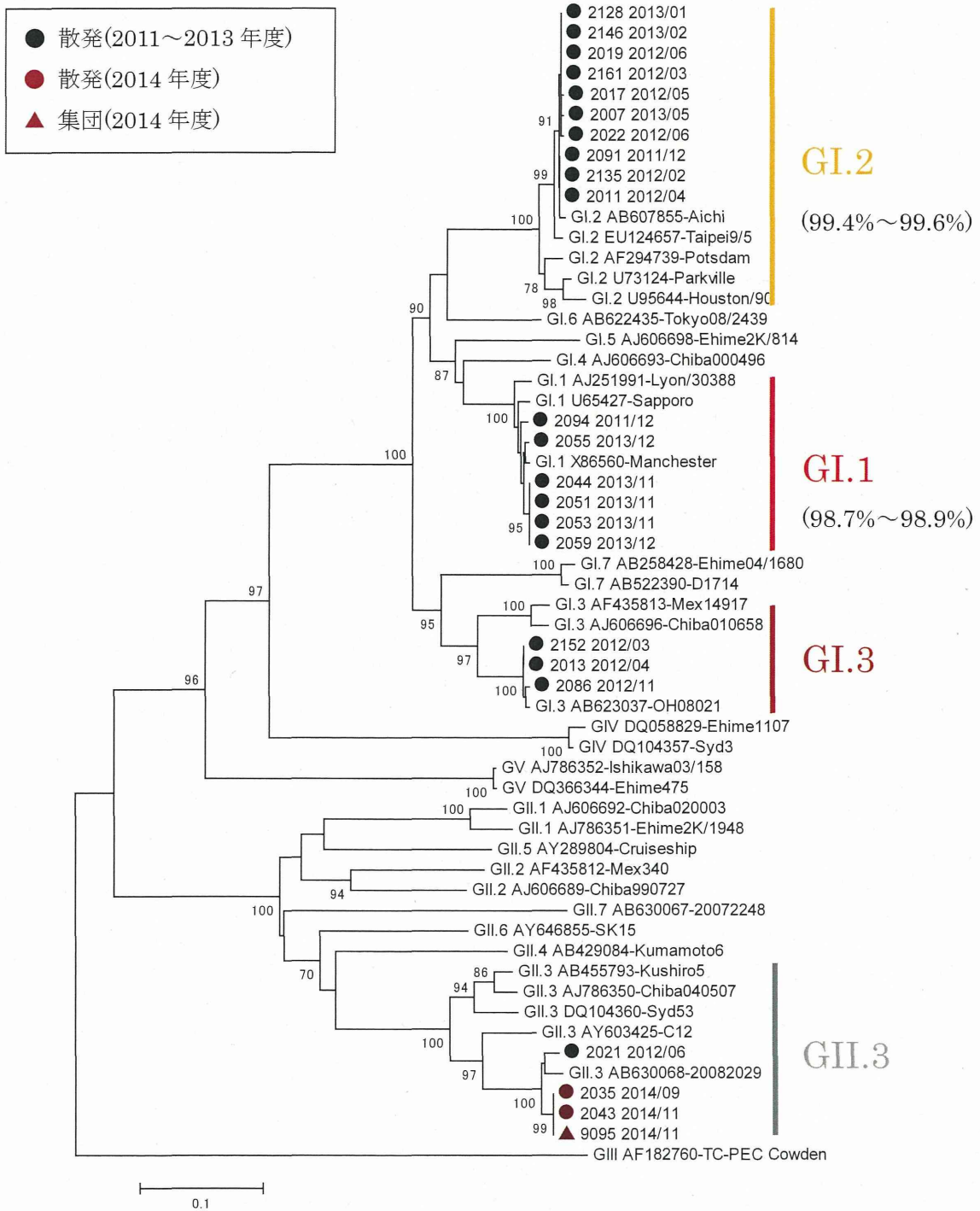


図 2-a SaV のカプシド領域における系統樹

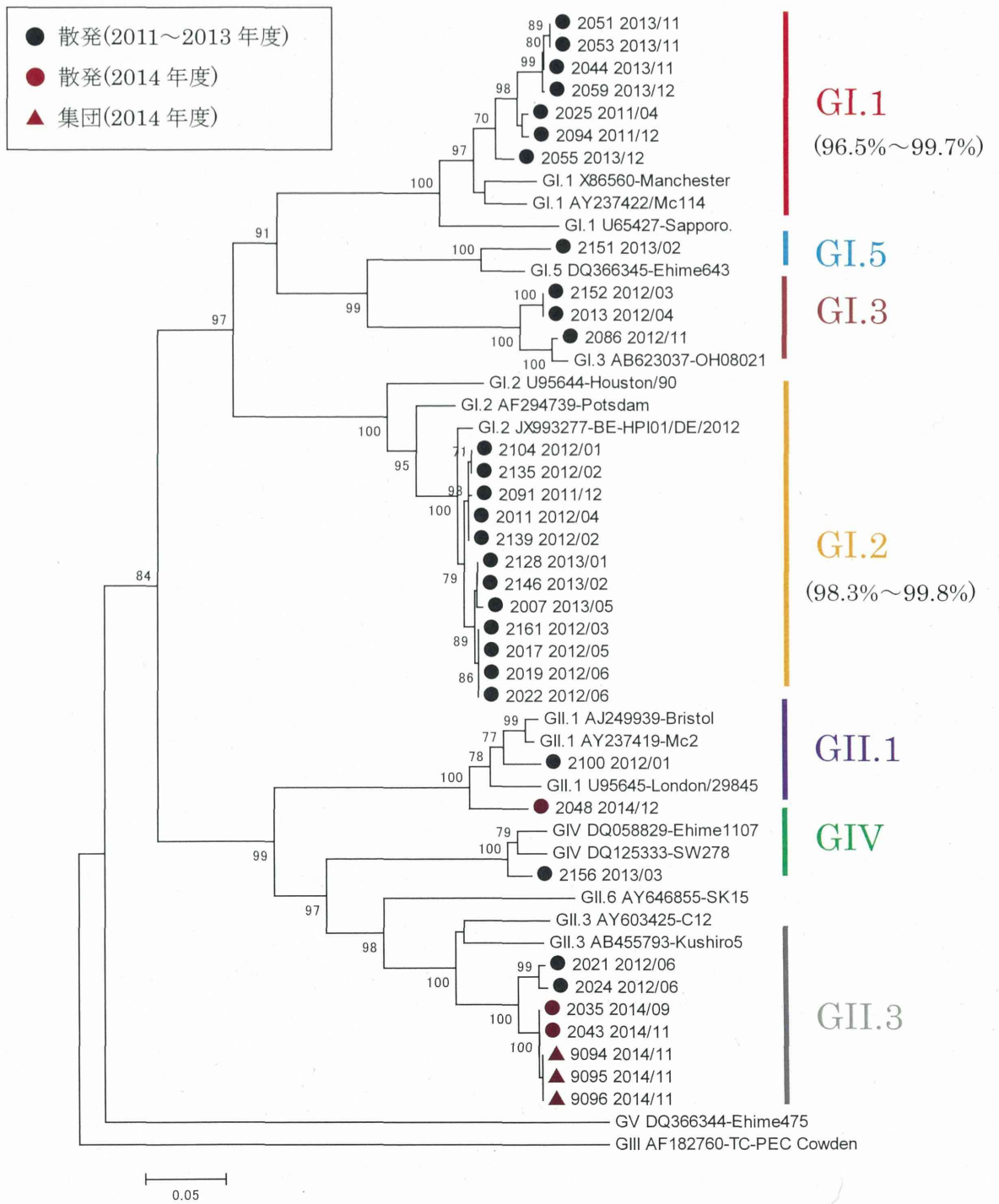


図 2-b SaV のポリメラーゼ領域における系統樹