

## 愛知県におけるノロウイルス流行状況 (2014/15 シーズン)

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

2014/15 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 300 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、101 検体 (33.7%) から NoV が検出され、遺伝子グループ I (GI) 陽性が 7 検体 (6.9%、7/101)、遺伝子グループ II (GII) 陽性が 94 検体 (93.1%、94/101) であった。NoV 陽性検体の系統樹解析の結果、GI は 2 と 3 の 2 遺伝子型、GII は 3, 4, 17 の 3 遺伝子型に型別され、GII. 4 が 59.6%と過半数を占めた。GII. 4 陽性の 56 検体をクラスタ解析した結果、2006 b と Sydney\_2012 の 2 変異型に分類され、Sydney\_2012 型が 85.7%と多勢であった。また、胃腸炎集団発生 24 事例のうち約半数の 13 事例 (54.2%) から GII. 17 が検出され、その多くが 2015 年 1 月～4 月の発生事例からの検出であった。同シーズンに採水された流入下水 50 検体のうち、GI 陽性が 42 検体 (84.0%)、GII 陽性が 35 検体 (70.0%) と GI 型の方が高率に検出されたが、両遺伝子型ともに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 の新たな変異株である Sydney\_2012 型が出現し、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重要である。

そこで、2014/15 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及び流入下水について、NoV の検出検査並びに分子疫学解析を実施した。

### B. 研究方法

#### 1. 材料

2014 年 9 月～2015 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 300 検体、同シーズンに当所に搬入された胃腸炎集団発生 24 事例からの患者便 121 検体と従事者便 77 検体、愛知県内 1 ヶ所の下水処理場で毎週 1 回採取された流入下水 50 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、Kroneman A らの方法 (Arch Virol 158: 2059-2068, 2013) 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 300 検体中 101 検体 (33.7%、101/300) が NoV 陽性であった。その内、Genogroup I (GI) NoV 陽性が 7 検体 (6.9%)、Genogroup II (GII) NoV 陽性が 94 検体 (93.1%) 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. 2 の 2 検体と GI. 3 の 5 検体、GII NoV の遺伝子型別では GII. 4 が 56 検体 (59.6%)、次いで GII. 3 : 29 検体 (30.9%)、GII. 17 : 9 検体 (9.6%) 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 56 株をクラスター解析した結果、48 株 (85.7%) が Sydney\_2012 変異型、8 株 (14.3%) が 2006b 型に分類された。

### 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 24 事例からの NoV 検出状況を示した。24 事例のうち、GI 陽性が 2 事例で、GI. 2 と GI. 3 の各 1 事例に遺伝子型別された。GII 陽性の 22 事例の内、GII. 17 陽性が 12 事例、GII. 3 陽性が 5 事例、GII. 4 陽性が 4 事例、残り 1 事例が GII. 13 と GII. 17 の同時検出であった。

### 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 50 検体の内、GI 陽性が 42 検体 (84.0%)、GII 陽性が 35 検体 (70.0%) と GI の方が高率に検出されたが、

両遺伝子グループともに年間を通じて検出された。検出された遺伝子型はGIで9遺伝子型(GI.1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9), GIIで6遺伝子型(GII.2, 3, 4, 13, 14, 17)に分類された。

#### D. 考察

2014/15シーズンに散发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、2014/15シーズンも引き続きSydney\_2012型が優勢であった。また、2013/14シーズン、愛知県内ではAsia 2003とSydney\_2012の2種のGII.4変異株が流行したが、2014/15シーズンは、Sydney\_2012と2006bの2種の変異株が検出され、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は、GII.17検出例が過半数を占め、特に2015年1月～4月の発生事例から高頻度に検出された。愛知県では、これまでGII.17に起因する集団発生例はなく、感染拡大に至った要因は不明である。先シーズンまでの主流であったGII.4は全てSydney\_2012型であったが、検出事例数は激減した。

下水検体からは、GIで9遺伝子型、GIIで6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NoVが検出された。一方、GIは散发、集発事例からの検出例数がGIIに比べて少数であるのに対し、下水からは高率に検出さ

れた。この結果は、NoVの成人の間での流行や、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

2014/15シーズンに感染性胃腸炎の散发事例検出された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。一方、集団発生事例からはGII.17に起因する事例が多発したのに対して、GII.4検出事例は激減した。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

なし

##### 2. 学会発表

1) 中村範子, 尾内彩乃, 廣瀬絵美, 安達啓一, 伊藤 雅, 安井善宏, 小林慎一, 山下照夫, 皆川洋子: 愛知県における胃腸炎ウイルスの流行状況 (2008/09~2013/14), 第63回日本ウイルス学会学術集会, 福岡市, 11/22 (2015)

2) 山下照夫, 安達啓一, 伊藤 雅, 廣瀬絵美, 中村範子, 尾内彩乃, 安井善宏, 小林慎一, 皆川洋子: 下水から検出されるコブウイルスの長期的遺伝子解析, 第63回日本ウイルス学会学術集会, 福岡市, 11/22 (2015)

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 散発性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（2014/15 シーズン）

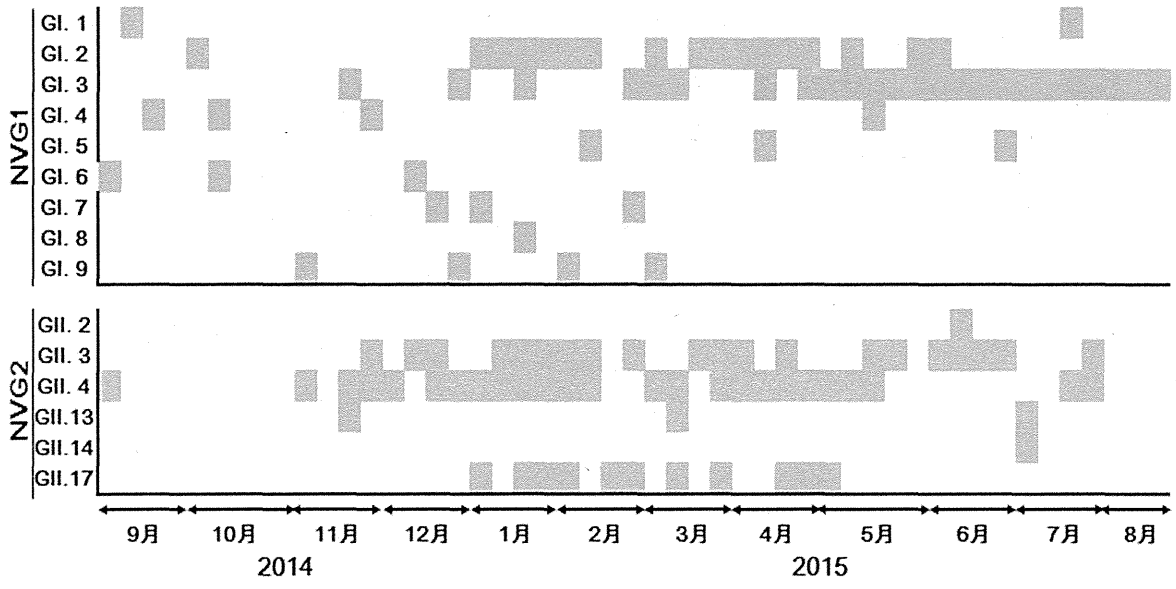
	検査数	GI		GII		
		GI.2	GI.3	GII.3	GII.4	GII.17
9月	23					
10月	21			1		
11月	28				5	
12月	57			15	21	1
1月	27			5	6	1
2月	25			4	5	3
3月	28			4	8	1
4月	14				2	1
5月	26		1		5	1
6月	31	1	3		3	
7月	13		2		1	1
8月	7					
計	300	2	5	29	56	9

表2 胃腸炎集団発生事例のノロウイルス検査成績 (2014/15 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
		患者数	従事者			
1	11月28日	3		患者2	GII.3	【照会】* ホテル
2	12月18日	6	4	患者5、従事者4	GII.4 Sydney 2012	飲食店
3	12月24日	7	5	患者7、従事者2	GII.17	飲食店
4	1月12日	8	4	患者3、従事者2	GII.4 Sydney 2012	飲食店
5	1月15日	3		患者3	GII.3	飲食店
6	1月16日	4	2	患者3	GII.3	保育園
7	1月16日	15	3	患者12、従事者2	GII.17	飲食店
8	2月10日	4	2	患者3、従事者1	GII.17	飲食店
9	2月13日		14	従事者1	GII.17	飲食店
10	2月13日	2	4	患者2	GII.3	飲食店
11	2月14日	8		患者7	GII.3	【照会】飲食店
12	2月19日	2		患者2	GII.4 Sydney 2012	飲食店
13	3月5日	10		患者8	GII.17	【照会】飲食店
14	3月6日	18	16	患者18、従事者2	GII.17	飲食店
15	3月23日	12	12	患者10、従事者2	GII.17	飲食店
16	3月24日	4	3	患者4、従事者2	GII.17	飲食店
17	3月27日	1		患者1	GII.17	【照会】飲食店
18	3月28日	2	1	患者2、従事者1	GII.17	ホテル
19	4月3日	2		患者2	GII.17	【照会】飲食店
20	4月17日	4	7	患者2	GII.13&GII.17	飲食店
21	4月20日	2		患者2	GII.17	【照会】飲食店
22	5月23日	2		患者2	GI.2	【照会】飲食店
23	6月15日	1		患者1	GII.4 Sydney 2012	【照会】飲食店
24	7月24日	1		患者1	GI.3	【照会】飲食店
計		121	77	患者100、従事者19		

【照会】: 他自治体からの検査依頼

表3 下水検体からの週別・遺伝子型別検出状況 (2014/15 シーズン)



平成 27 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	上林 大起	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

2015 年(1~12 月)は大阪市において集団胃腸炎 75 事例がノロウイルス(NV)陽性となった。2015 年 1 月~3 月には非常に稀な遺伝子型であるノロウイルス GII.17 による胃腸炎事例が多発した。本ウイルスは同時期にアジアで流行していた新しい遺伝子型である GII.P17-GII.17 株であった。

国産市販生カキ 13 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。NV が生食用カキ 3 ロット、加熱調理用カキ 2 ロットから検出された。SV は生食用カキ 2 ロットから検出された。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)には多くの種類の遺伝子型が存在しており、近年では遺伝子型の一つである GII.4 が世界的に大きく流行している。NV の流行は GII.4 等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

2015 年 (1~12 月) に当研究所へ検査依頼のあった集団胃腸炎 107 事例、患者糞便 403 検体を用いた。

国産生カキは 2015 年 1 月 (生食用 5 ロット)、2 月 (加熱調理用 4 ロット、生食用 1 ロット) および 11 月 (生食用 3 ロット) に市販されていた合計 13 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。13 ロットは 3 県 9 海域から採取されものであり、D 県産 6 ロット、C 県産 4 ロット、A 県産 3 ロットであった。

### 2. 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。

### 3. 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) に入れて破碎した後、9 倍量の PBS (-) および 25mg/ml の  $\alpha$ -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。

### 4. 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。また、Capsid N/S 領域において GII.17 型に分類された株のいくつかは、RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) 領域を増幅し (JCM 46, 2406-9, 2008)、塩基配列を決定した。Capsid N/S および 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。



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、SVの遺伝子型別はOkaraの方法(Arch Virol 157, 349-352, 2012)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. NV胃腸炎事例の発生状況

75事例(70.1%)、254検体(63.0%)からNVが検出された。NV事例は1月に最も多く発生し、8月を除くすべての月に発生が認められた(図1)。NVが検出された75事例のうち、ヒトからヒトへ感染が拡がった事例(PP事例)は少なくとも42事例(56.0%)認められ、主な原因施設は保育園(64.3%、27/42事例)であった。カキが関連していた事例は11事例(14.7%)あり、うち7事例が1月に発生していた。カキ以外の食品が関連していた事例は19事例(25.3%)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。NVは生食用カキ3ロット、加熱調理用カキ2ロットから検出され、すべてGIIであった。中腸腺1gあたりのNV汚染量(NV RNAコピー数)は、62~803コピーであった。SVは生食用カキ2ロットから検出された。検査したすべてのカキから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、9種類(GI:5種類、GII:4種類)であった。最も多く検出されたのは33事例(44.0%)から検出されたGII.4であり、次いでGII.17(29事例、38.7%)であった。

NV GII.17が検出された事例は1~3月に集中して発生し(82.8%、24/29事例)、1月(12事例)が最も多かった(図1)。GII.17事例の中で、PP事例が11事例(37.9%)、カキの喫食関連事例が10事例(34.5%)、カキ以外の食品疑い事例が8事例(27.6%)であった(図2)。PP事例の主な発生施設は高齢者施設(6事例)であった。今回検出されたすべてのGII.17株はCapsid N/S領域において互いに近縁(塩基配列相同性 $\geq$ 98.2%)であり、同時に国内地域で検出された株(Kawasaki308/JP/2015, GenBank 番号LC037415)や中国で流行していた株(14F1502/GZ/GD/CHN/2014, GenBank 番号KP718638)と互いに近縁であった( $\geq$ 98.5%)。27事例から検出されたGII.17株についてRdRp遺伝子を比較したところ、互いに近縁であり( $\geq$ 98.8%)、すべてGII.P17型に分類された。

NV GII.4が検出された事例は2014-2015シーズンである1~8月の期間には11事例(複数の遺伝子型が検出された2事例を含む)と少なかったが、9月以降に22事例発生し、2015-2016シーズンの主流の遺伝子型となった。検出されたGII.4株はすべてSydney 2012亜型に分類された。

市販生カキから検出されたNVの遺伝子型はGII.3(4ロット)およびGII.13(1

ロット)であった。GII.13株の遺伝子は複数の塩基配列が混じっており、単一の塩基配列として確定することができなかった。SVの遺伝子型はGI.1およびGI.3であった(表)。

#### D. 考察

2014-2015シーズンは、2014年12月までNV GII.3による集団胃腸炎が保育所で多発した(入谷ら、平成26年度研究協力報告書)。2015年1月以降は、NV GII.3による事例は認められなくなり、NV GII.17による事例が1~3月に多発した。NV GII.17は大阪市において過去にほとんど検出されたことがなく、非常に稀な遺伝子型であった。大阪市では2014年12月にシーズンで最初のNV GII.17による事例が発生した後、1月に急増している。国内の他地域においても同時期に同様の現象が認められており、NV GII.17は全国的に流行していたと考えられた。また、大阪市内で認められたNV GII.17による事例の多くは食中毒や高齢者施設における集団事例であり、主に成人層における流行であった。

RdRp遺伝子の解析から、大阪市内で流行したGII.17株は新たな遺伝子型のNV GII.P17-GII.17であった。本株は同時期に国内他地域やアジアで流行していた株と非常に近縁であり、本株が国内だけでなく、国を越えて広く流行していたことが示唆された。

市販生カキのウイルス汚染状況においては、30.0%の生食用カキおよび50.0%の加熱調理用カキにNV汚染が認められ、加熱調理用カキの方がNVの汚染率が高く、

ウイルス量も多かった。また、生食用カキの22.2%にSV汚染が認められ、NVだけでなく、SVもカキ喫食による食中毒の原因ウイルスとして考慮する必要があると考えられた。HAVおよびHEVは検出されなかったが、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. 2015年1月から3月に大阪市内で多発したノロウイルス集団胃腸炎事例の主な原因は、同時期にアジアで流行の認められたGII.P17-GII.17株であった。

2. 国産市販生カキにNVおよびSV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。

3. 今回の調査から国産市販生カキに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) Miranda de Graaf, Janko van Beek, Harry Vennema, Alexander T. Podkolzin, Joanne Hewitt, Filemon Bucardo-Rivera, Kate Templeton, Janet Mans, Johan Nordgren, Reuter Gábor, Maureen Lynch, Lasse Dam Rasmussen, Nobuhiro Iritani,

Martin C. Chan, Vito Martella, Katia Balay, Jan Vinjé, Peter A. White, Marion P. Koopmans: Emergence of a novel GII.17 norovirus - End of the GII.4 era?, *Eurosurveillance* 20(26), pii=21178 (2015)

2) 上林大起, 改田 厚, 阿部仁一郎, 久保英幸, 山元誠司, 入谷展弘, 西尾孝之, 伯井紀隆, 森宏美, 西 貴美, 安井典子, 榊田晴美, 細井舞子, 青木理恵, 坂本徳裕, 廣川秀徹, 半羽宏之, 松本健二, 吉村高尚: コクサッキーウイルス B4型が検出された集団胃腸炎について—大阪市, 病原微生物検出情報 月報 36(No. 428), 197-198 (2015)

3) 入谷展弘, 山元誠司, 改田 厚, 上林大起, 久保英幸, 野田 衛: 2014～2015 シーズンに流行したノロウイルス GII.17 について, *食品衛生研究* 65(10), 7-15 (2015)

4) 入谷展弘, 山元誠司, 改田厚, 阿部仁一郎, 久保英幸, 平井有紀, 上林大起, 野田 衛, 西尾孝之: 2014-2015 シーズンに大阪で認められたノロウイルス流

行, 大阪市立環境科学研究所報告 調査・研究年報 77, 13-16 (2015)

5) 上林大起, 左近直美, 入谷展弘, 三好龍也, 改田厚, 阿部仁一郎, 山元誠司, 久保英幸, 平井有紀, 内野清子, 吉田永祥, 岡山文香, 芝田有理, 塚田和宏, 駒野淳, 弓指孝博, 西尾孝之, 加瀬哲男, 田中智之, 高橋和郎: 大阪府内におけるノロウイルスの流行状況 (2010-2013), 大阪府立公衆衛生研究所報告 53, 15-21 (2015)

#### 学会発表

1) 入谷展弘, 山元誠司, 改田 厚, 阿部仁一郎, 上林大起, 久保英幸, 野田衛: 大阪市におけるノロウイルス GII.17 の流行状況, 第 63 回日本ウイルス学会, 福岡 (2015. 11. 22-24)

#### 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<sup>1)</sup>

シーズン	検体 番号	採取海域・産地 種類	年月	NV <sup>2)</sup> (コピー/g)	SV	HAV	HEV
2014 -2015	OY14-6	C2 生食用	2015年1月	—	GI.1	—	—
	OY14-7	D99-1 生食用	2015年1月	—	—	—	—
	OY14-8	D99-1 生食用	2015年1月	GI.3 (504)	—	—	—
	OY14-9	C1 生食用	2015年1月	GI.3 (185)	—	—	—
	OY14-10	C99 生食用	2015年1月	—	—	—	—
	N15-1	C2 生食用	2015年2月	—	GI.3	—	—
	N15-2	D99-1 加熱調理用	2015年2月	—	—	—	—
	N15-3	A10 加熱調理用	2015年2月	GI.13 mix (787)	—	—	—
	N15-4	A21 加熱調理用	2015年2月	—	—	—	—
	N15-5	A10 加熱調理用	2015年2月	GI.3 (803)	—	—	—
2015 -2016	OY15-1	D1 生食用	2015年11月	—	—	—	—
	OY15-2	D99-2 生食用	2015年11月	GI.3 (62)	—	—	—
	OY15-3	D99-3 生食用	2015年11月	—	—	—	—

1) — : 陰性

2) 中腸腺 1g あたりの NV RNA コピー数

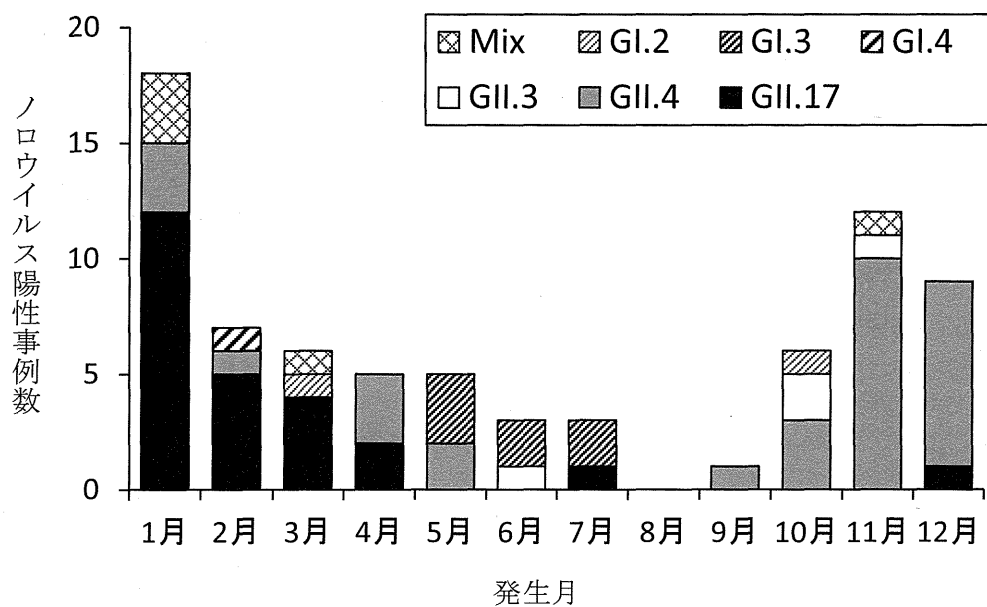


図1 大阪市における月別ノロウイルス事例発生状況 (2015年)

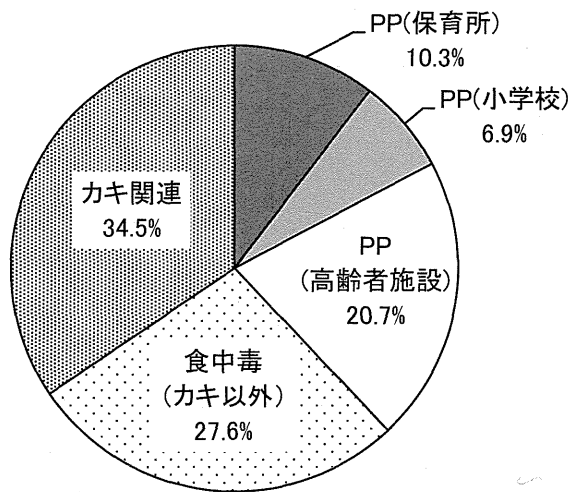


図2 GII.17 事例の推定原因

平成 27 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

## 堺市における下水サンプルを用いた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	中谷 誠宏	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	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

堺市内における下痢症ウイルス及び A 型肝炎ウイルスの流行状況を把握するため、感染性胃腸炎の散発・集団感染事例由来の臨床サンプルと下水由来の環境サンプルの両面からウイルスの遺伝子検出を行い、ウイルスの分子疫学的解析を行った。

ノロウイルス (NoV) は、NoV による小児の感染性胃腸炎の流行期である冬季に下水中の遺伝子量が増加し、臨床サンプル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。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、臨床サンプルからの検出は少数であったが、下水サンプル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、不顕性感染が多い等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。臨床と環境の両面からウイルス遺伝子を検出・解析することによって、腸管感染ウイルスの流行状況の全体像を把握することが可能と考える

### A. 研究目的

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サンプルと下

水由来の環境サンプルの両面からノロウイルス (NoV) 等の下痢症ウイルス及び A 型肝炎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及び A 型肝炎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及び A 型肝炎ウイルスの流行について考察し、ウイルス感染の全体像を把握する一助とする。

## B. 研究方法

### 1. 材料

環境サンプルとして、2013 年 1 月から 2015 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。臨床サンプルとして、同期間に発生した食中毒及び集団感染事例 7 事例、散發事例（感染症発生動向調査における感染性胃腸炎患者等）51 例から得られた糞便を調査対象とした。

### 2. 下水サンプルの濃縮法

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<sub>2</sub> 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

臨床サンプルについては、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それぞれウイルス遺伝子検出を行った。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。

下水サンプル（流入水）については、濃縮処理後、臨床サンプルと同様にウイルス遺伝子検出を行った。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、Norovirus Genotyping Tool Version 1.0

（<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>）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. NoV 遺伝子検出結果

2015 年は、臨床サンプルから GI で 1 種類（GI.2）、GII で 2 種類（GII.4, 17）計 3 遺伝子型の NoV が検出された。集団事例 2 例中 2 例、散發事例 18 例中 10 例から GII.4 型が検出され、最も高頻度に検出された（図 1）。また、過去 2 年間、散發例から検出がみられなかった GI.2 型が 18 例中 6 例から検出された。

下水サンプルでは、GI で5種類 (GI. 1, 2, 3, 4, 9)、GII で5種類 (GII. 2, 3, 4, 13, 17)計 10 遺伝子型が検出された。GI. 2, GII. 4, GII. 17 型が年間を通じてほとんどの調査月で検出された (表 1)。

## 2. 下水中の NoV 遺伝子定量測定結果

下水中の NoV 遺伝子量は、小児の感染性胃腸炎が増加する 10 月から増加し、翌年の 7、8 月に減少する傾向がみられた。しかし、2015 年は、下水中の NoV 遺伝子量が過去 2 年間と比べ低値であった (図 2, 3)。

## 3. NoV 以外のウイルス遺伝子検出結果

SaV については、2015 年の臨床サンプルからの遺伝子検出はなかったが、下水サンプルでは、年間を通じてほとんどの月で検出され (GI. 1, 2, GII. 1, GV)、GI. 1, 2 型が多く検出された (表 2)。

AsV については、2015 年は、6 月に散発事例から 1 例検出されたが、下水サンプルでは、年間を通じてほとんどの月で検出された。

AiV については、2015 年は、4 月に散発事例から 1 例検出されたが、下水サンプルからは、全ての月で検出された。

HAV は、2015 年は、臨床サンプル、下水サンプルともに検出されなかった。

## D. 考察

NoV による小児の感染性胃腸炎患者数の増加する冬季に下水の NoV 遺伝子の定量値は増加した。また、2015 年 1 月以降流行が拡大した NoV GII. 17 型や臨床サンプルから高頻度に検出される NoV GII. 4 型がほとんどの調査月で下水中からも検出された。これらのことより、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できると考えられる。一方、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。

2015 年の下水中の NoV 遺伝子量が過去 2 年間と比べ低値であった原因は不明であるが、小児の感染性胃腸炎患者数も過去 2 年間比べ少し低値であったことから NoV 感染者が少数であった可能性が考えられた。

SaV、AsV、AiV については、臨床サンプルからの検出は少数であったが、下水サンプル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、成人での感染の可能性などが考えられ、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。臨床と環境の両面からウイルス遺伝子を検出・解析することによって、下痢症ウイルスなどの腸管感染ウイルスの浸淫状況の全体像の把握ができると考える。

NoV は数年に一度、新しい遺伝子型や変異株が出現し、それによる流行がみられる。下水サーベイランスのデータをこれらの予測にどのように役立てていくかが今後の課題である。

## E. 結論

NoV については、下水から得られる結果



と NoV の流行と関連がみられ、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た。一方、SaV、AsV、AiV については、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。

臨床と環境の両面からウイルス遺伝子を検出・解析することによって、腸管感染ウイルスの流行状況の全体像を把握することが可能と考える。

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

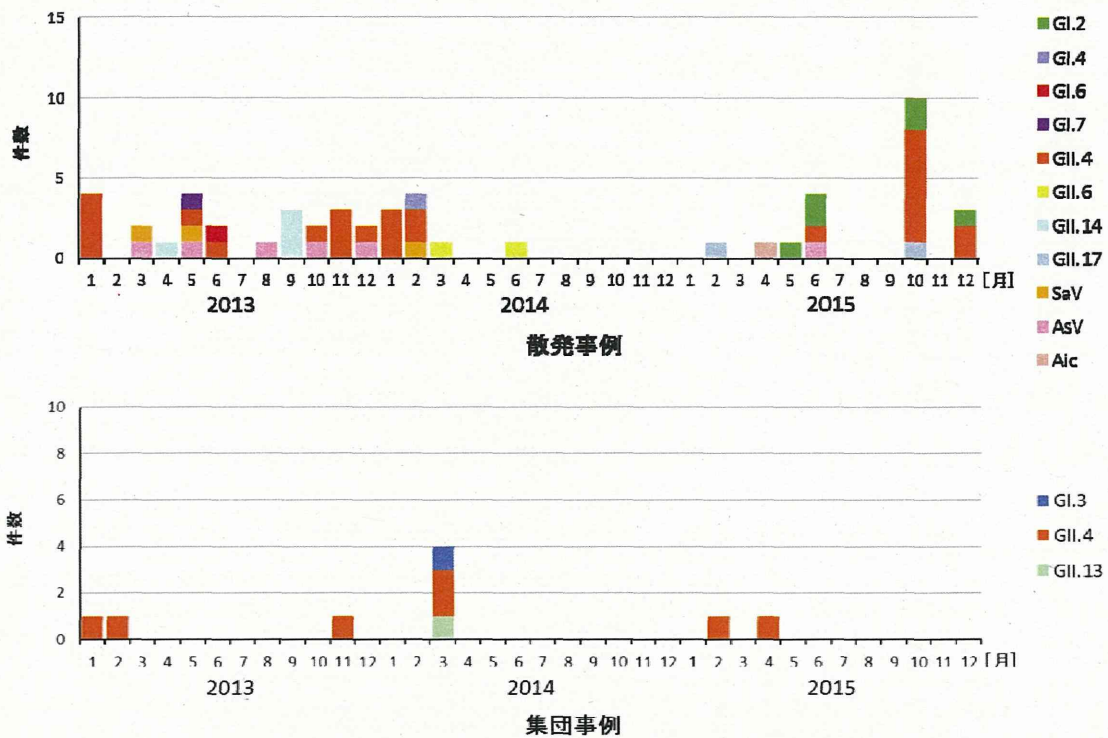


図 1 臨床検体からの下痢症ウイルス検出状況

表 1 下水中の NoV 検出状況 (B~D 定点流入水)

検出 virus	2013年												2014年												2015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	■																																				
		C	■																																				
	GI.2	B	■		■										■	■											■	■	■	■	■	■	■				■	■	
		C	■												■	■											■	■	■	■	■	■	■				■	■	
	GI.3	B	■																																				
		C	■																																				
	GI.4	B	■																																				
		C	■																																				
	GI.7	B																																					
		C																																					
	GI.8	B																																					
		C																																					
	GI.9	B																																					
		C																																					
	GI.un	B																																					
		C																																					
	GII.2	B	■	■																																			
		C	■	■																																			
GII.3	B	■	■																																				
	C	■	■																																				
GII.4	B	■	■																																				
	C	■	■																																				
GII.6	B																																						
	C																																						
GII.12	B																																						
	C																																						
GII.13	B																																						
	C																																						
GII.14	B																																						
	C																																						
GII.17	B																																						
	C																																						
GII.21	B																																						
	C																																						
GII.un	B																																						
	C																																						
GIV	B																																						
	C																																						

型別実施中

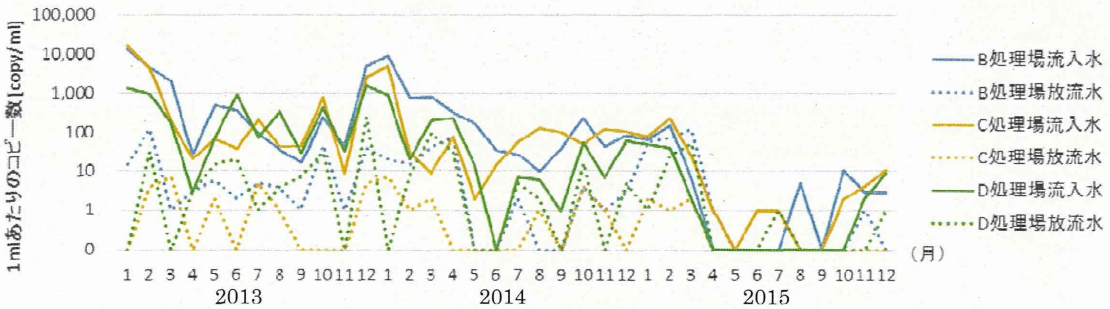
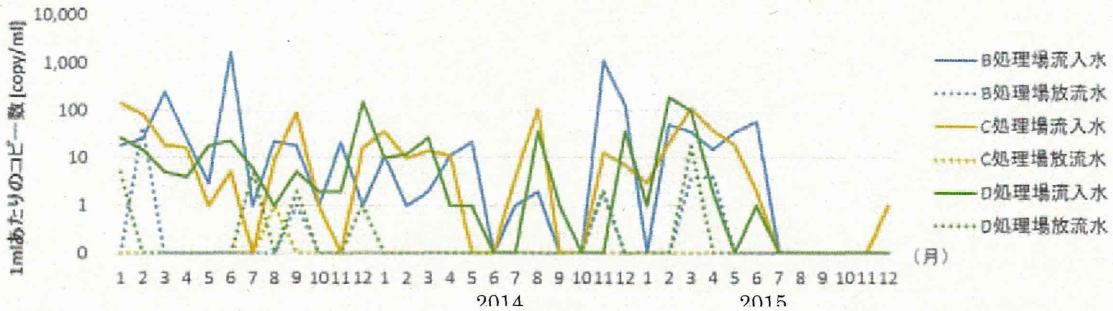


図 2 下水中の NoV 遺伝子定量結果

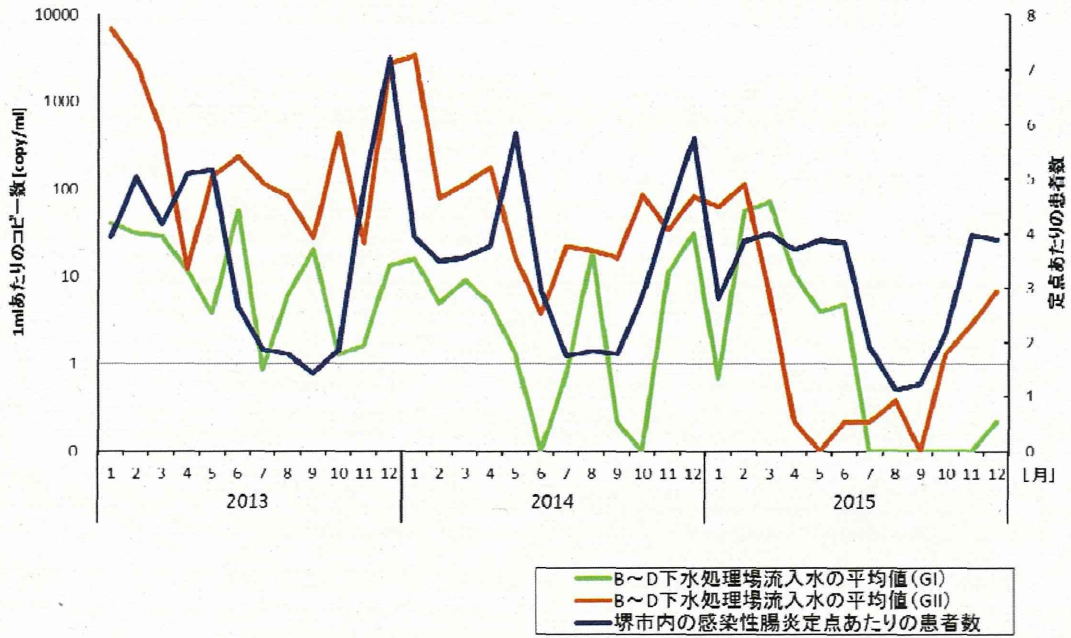


表 2 SaV AsV AiV 検出状況

検体由来	検出 virus	2013年												2014年												2015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
散発事例	SaV	GI.1																																			
		GI.2																																			
		GII.1																																			
	AsV																																				
下水	SaV	GI.1																																			
		GI.2																																			
		GI.3																																			
	GII.1	GI.1																																			
		GI.2																																			
		GI.3																																			
	GV	GI.1																																			
		GI.2																																			
		GI.3																																			
	SaV	GI.1																																			
		GI.2																																			
		GI.3																																			
	AsV	GI.1																																			
		GI.2																																			
GI.3																																					
AiV	GI.1																																				
	GI.2																																				
	GI.3																																				

型別実施中



## 2015 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

2015 年 2 月に購入した市販カキ 7 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  $2.0 \times 10^1 \sim 1.7 \times 10^2$  コピー、NoV GII が  $4.4 \times 10^2 \sim 1.6 \times 10^4$  コピーであり、NoV GII のコピー数は GI の 22~100 倍であった。Nested PCR 法で陽性となった検体の 2nd PCR 産物のダイレクトシーケンスによりノロウイルスの遺伝子型を特定したところ、NoV GI では GI. 1、2、3、4 が、NoV GII では GII. 4、17 が検出された。特に GII. 17 が 7 ロット 18 検体、GI. 2 が 5 ロット 5 検体、GI. 4 が 4 ロット 4 検体で検出され、カキから検出された NoV において優勢な遺伝子型であった。

### A. 研究目的

2015 年 2 月 (2/11~2/14) 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

2015 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 6 ロット、C 県産の市販カキ 1 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 : 1 ロット、

No. C-2 : 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、 $\alpha$ -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 0.5% Zwittergent を 400  $\mu$ l 加え、200  $\mu$ 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、