

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 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 の塩基配列を使用し、Norovirus Genotyping Tool Version 1.0 (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>) にて遺伝子型別を行った。

(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. 検査法による比較

ロットあたり 3 検体を供試した際の Nested-PCR 法とリアルタイム PCR 法での検査結果を表に示した。NoV GI ではすべての検体でリアルタイム PCR 法での実測

値が 10 コピー以下となり、通知法上の判定基準によってすべて陰性扱いとなったため、Nested-PCR 法の結果との乖離が顕著となった。一方、NoV GII では、実測値が概ね 10 コピー以上となったため、RT-PCR 法とリアルタイム PCR 法との結果は 1 検体を除いて一致した。

2. カキ中のウイルス量

リアルタイム PCR 法の実測値からロット毎にカキ中腸腺 1g 中に含まれるウイルス量を換算した (図)。NoV GI が $2.0 \times 10^1 \sim 1.7 \times 10^2$ コピー/g 中腸腺、NoV GII が $4.4 \times 10^2 \sim 1.6 \times 10^4$ コピー/g 中腸腺であった。海域別では C-2 が最もノロウイルスによる汚染が低く、A-11 が最も高かった。また、NoV GII のコピー数は NoV GI の 22~100 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. 1、2、3、4 が検出され、GI. 2 が 5 ロットから、GI. 4 が 4 ロットから検出された。一方 NoV GII は GII. 17 が 6 ロットから検出された。なお、前年、前々年に多く検出された GII. 4 は 1 ロットのみからの検出であった。

D. 考察

リアルタイム PCR 法では実測値 10 コピー未満を陰性とする通知法での規定により、Nested PCR 法に比べ陰性になる割合が高いことが示された。特にカキ中の NoV GI のウイルス量が NoV GII より 1~2 桁少

ないことから、その傾向は NoV GI で顕著であった。養殖海域によるノロウイルスの汚染度合にはバラツキがあり、今回調査した海域では、C-2 海域が他の海域に比べ汚染度合が低かった。カキ中の NoV GI と NoV GII のウイルス量比 (NoV GII/NoV GI) は 22~100 倍と、ロット毎にバラツキがあったが、ウイルス量の多い汚染海域ほどこの比が大きくなる傾向が見受けられた。

カキから検出されたノロウイルスの遺伝子型は NoV GI で 4 種類のゲノタイプ、一方、NoV GII では 2 種類のゲノタイプが観察され、NoV GI の方が多様性に富んでいた。NoV GI では、GI.2 と GI.4 が主流であり、一方 NoV GII では GII.17 がそのほとんどを占めた。IASR のノロウイルス 検 出 状 況 (<http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr-noro.html>) によると、GII.17(旧表記 GII/11)は、2014/15 シーズンにおいて 2014 年 12 月以降から報告があり、2 月に検出数がピークとなっている。このことから、当時期においてカキの中に高い割合で蓄積されたものと考えられた。例年は GII.4 がヒトでの流行の主流で、カキからも高頻度で検出されることが多いが、今回のようにマイナーな遺伝子型が流行した際にはその影響がカキから検出されるノロウイルスの遺伝子

型にも強く影響していることが示された。

E. 結論

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した。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 $4.4 \times 10^2 \sim 1.6 \times 10^4$ コピーであった。ウイルス量の少ない NoV GI では Nested PCR 法とリアルタイム PCR 法での判定結果において乖離が顕著であった。検出された遺伝子型は 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 NoV GII では、GII.17 が大半を占め、当時のヒトでの流行の影響を強く反映していると考えられた。

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. 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 ¹⁾		検出遺伝子型	
			NoV GI	NoV GII	NoV GI	NoV GII	NoV GI	NoV GII
1	A-10	1-1	+	+	0.7	100.0	GI.4	GII.17
		1-2	-	+	0.4	36.5	-	GII.17
		1-3	+	+	3.5	169.0	GI.1	GII.17
2	A-10	2-1	-	+	0.9 ²⁾	43.9	-	GII.17
		2-2	+	+	0.9	77.9	GI.2	GII.17
		2-3	+	+	1.2	63.3	GI.3	GII.17
3	A-11	3-1	+	+	2.4	184.0	GI.4	GII.17
		3-2	+	+	1.1	111.0	GI.3	GII.17
		3-3	+	+	1.8	125.0	GI.2	GII.17
4	A-11	4-1	+	+	2.5	240.0	GI.4	GII.17
		4-2	+	+	1.3	192.0	OG ³⁾	GII.17
		4-3	+	+	2.8	177.0	GI.2	GII.17
5	A-12	5-1	+	+	1.8	200.0	GI.2	GII.17
		5-2	+	+	1.4	157.0	NA ⁴⁾	GII.17
		5-3	+	+	1.9	151.0	GI.4	GII.17
6	A-13	6-1	-	+	1.0 ²⁾	79.7	-	GII.17
		6-2	+	+	0.9 ²⁾	35.1	OG ³⁾	GII.17
		6-3	+	+	0.7 ²⁾	36.6	GI.2	GII.17
7	C-2	8-1	-	-	0.0	5.0	-	-
		8-2	-	+	0.6 ²⁾	7.4 ²⁾	-	GII.4 (Sydney 2012)
		8-3	-	-	0.1 ²⁾	4.0 ²⁾	-	-

¹⁾二重測定での平均値

²⁾二重測定のうち一方のみで陽性であった際の実測値

³⁾outgroup

⁴⁾not assign

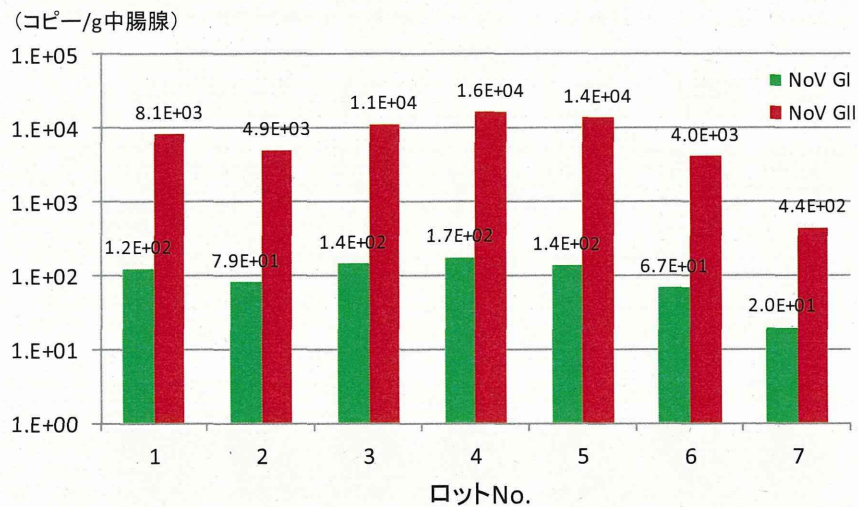


図. 2015年2月に購入した市販カキ中のノロウイルス量

ふき取り検体からのハイドロキシアパタイトによる ノロウイルスの濃縮法の検討

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を用いた濃縮方法のふき取り検体への適応とその有用性について検討した。ふき取りキット付属のリン酸緩衝生理食塩水をふき取り及び再浮遊に使用した場合は低い回収率であったが、ダルベッコ PBS(-)に変更し、更に Zwittergent を添加することで回収率が向上した (24-66%)。ハイドロキシアパタイトを用いたノロウイルス濃縮法が、ふきとり検体からのノロウイルス濃縮に適応できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

昨年度の研究でハイドロキシアパタイトを利用したカキからのノロウイルス回収法について検討を行ったところ、夾雑物が多く含まれるカキへの適用は難しかったが、清浄な検体であれば効率良くウイルスが回収できる事を確認した。また、ふき取り検体の濃縮法として超遠心法や PEG 沈殿法などがあるが、特別な器材が必要なことや時間がかかるといった問題がある。そこで今回ハイドロキシアパタイトを用いたノロウイルス濃縮法のふき取り検体へ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材料には、

ノロウイルス (遺伝子型 GII. 17) 陽性の 10%糞便乳剤を PBS(-) で希釈したものを用いた。

2. PEG 沈殿法の回収率および検出限界

ハイドロキシアパタイトを用いた濃縮法の検討の前に、現在ふき取り検体で行っている濃縮法である PEG 沈殿法について、その回収率および検出限界を把握するための検査を行った。PBS(-) で 10^2 - 10^7 倍に段階希釈した患者便乳剤をそれぞれ添加後 10ml にメスアップし、PEG6000 (最終濃度 12%) 及び NaCl (最終濃度 1M) を加え冷蔵で 1 晩処理し、遠心 (7, 780 × g, 30min) で得られた濃縮沈渣に PBS(-) 350 μ l を加えて再浮遊させた溶液を RNA 抽出材料とした。

また、過去に PEG 沈殿法にて濃縮を行

い、Nested PCR 法にてノロウイルス陽性となったふき取り検体について、リアルタイム PCR 法にて定量を行った。

3. 模擬ふき取り検体の作製とハイドロキシアパタイトを用いたウイルス濃縮法

ハイドロキシアパタイトによるふき取り検体からのノロウイルス濃縮手順を図 1 に示した。まず、滅菌したステンレス製トレーを 100cm² (10cm×10cm) に区画し、各区画に 10⁶ コピー程度のノロウイルスを含む便乳剤 140 μl を滴下、コーンラージ棒で塗布し 60 分間自然乾燥させた。その後、PBS(-)等のふき取り液に湿らせた綿棒で縦 10 回、横 10 回、右斜め 5 回、左斜め 5 回を 1 セットとしてふき取りを行い、10ml の PBS(-)等の再浮遊液に再浮遊させたものを模擬ふき取り検体とした。次に模擬ふき取り検体 10ml にアパタイト HAP (和光純薬) を 25 mg 加え、1 時間攪拌した。7,780×g で 10 分遠心した後、上清を取り除き、沈渣に 3.3M クエン酸 350 μl を加え混和してハイドロキシアパタイトを溶解し、RNA 抽出用試料とした。

4. ノロウイルスの定量

RNA 抽出用試料からの RNA 抽出には QIAamp Viral RNA mini Kit (キアゲン) を使用した。抽出 RNA は、PrimeScript RT reagent kit (タカラバイオ) と付属の Random Primer 6mer を用いて逆転写反応を行い、得られた cDNA のウイルスゲノムコピー数を定量した。定量には LC480 probe master (ロッシュ) と Kageyama ら (J. Clin. Microbiol. 2003) のプライマー及びプローブを使用した。

5. ふき取り素材の検討

ふき取り素材は、①レーヨン製ふき取りキット (日本ベクトン・ディッキンソン)、②ポリエステル製ふき取りキット (エルメックス)、③レーヨン製検体採取用綿棒 (コパンフロックテクノロジー)、④ポリエステル・フロック繊維製検体採取用綿棒 (ピューリタン・メディカルプロダクト)、⑤ウレタン製口腔内清掃用スポンジ (カワモト) の計 5 つについて検討を行った。ふき取り液及びふき取り後の再浮遊には、すべてダルベッコ PBS(-) を用いた。

6. ふき取り溶液、再浮遊液及びふき取り回数の検討

ふき取り溶液として、キット付属リン酸緩衝生理食塩水、ダルベッコ PBS(-)、0.3% Zwittergent 加 PBS(-)、0.5% Zwittergent 加 PBS(-) の 4 つについて検討した。また、ふき取り回数については 1 セット 1 回ふき取った場合と、1 セットふき取り後綿棒を再浮遊液で洗い、もう 1 セットふき取りを行ない計 2 回ふき取った場合で比較を行った。

(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. PEG 沈殿法の回収率及び検出限界

希釈便乳剤を用いた回収試験では、添加ウイルス 10³ コピー程度 (10⁶ 希釈) 以上で検出可能であった。定量可能であった 10²–10⁶ 倍段階希釈の便乳剤での回収率は、11.2%–21.7%であった (表 1)。

過去の検査において Nested PCR 法で陽性

となったふき取り検体 6 検体の定量試験を行ったところ、実測値で $10^0 \sim 10^1$ オーダーであり、検体中のゲノムコピー数に換算すると $10^2 \sim 10^3$ コピーのオーダーであった。1 検体については、Nested PCR 法では陽性であったが、リアルタイム PCR 法では不検出となった (表 2)。

2. ふき取り素材の検討

ふき取り素材①-⑤について回収率を比較した。各回収率は、①14.6%、②8.2%、③6.6%、④5.0%、⑤5.3%となった。素材によって回収率に若干の差が認められた (表 3)。

3. ふき取り溶液、再浮遊液及びふき取り回数の検討

ふき取り素材として①を用いた際の回収率は、ふき取り回数 1 回の場合で、ふき取り液としてキット付属のリン酸緩衝生理食塩水を使用した場合 3.3%、ダルベッコ PBS(-)の場合 6.8-15.7%となった。ふき取り回数が 2 回の場合、ダルベッコ PBS(-)を使用した場合は 17.8-28.7%となり、ふき取り回数 1 回の場合より回収率が向上した。更に、ダルベッコ PBS(-)に 0.3%の Zwittergent を添加して 2 回ふき取りをした場合では 23.9-65.7%と回収率が大きく向上した。ふき取り液は PBS(-) のままで再浮遊時に 0.3% Zwittergent を加えた場合には 18.3-30.3%で、ふき取り液、再浮遊液共にダルベッコ PBS(-) の場合と同程度の回収率となった。また、Zwittergent を 0.5%にした場合の回収率は 3.6-18.3%であった。

ふき取り素材として②を用いた際の回収率は、ふき取り回数 1 回の場合、キッ

ト付属のリン酸緩衝食塩水では 4.0-6.0%、ダルベッコ PBS(-)の場合では 5.5-8.2%となった。ふき取り回数が 2 回で 0.3% Zwittergent 加 PBS(-)を使用した場合は 27.0-62.0%と回収率の向上が認められた (表 4)。

D. 考察

食中毒事案では、調理従事者を介した食品の二次汚染を原因とする事例が多く報告されており、環境汚染の把握と汚染経路の解明を目的として、調理従事者等の検便と同時にふき取り検査が行われることが多い。そこで、本研究ではふき取り検体中のウイルスを特殊な試薬や装置を必要とせず、短時間で濃縮できる方法として、ハイドロキシアパタイトによるノロウイルス濃縮法についてその適応の可能性について検討した。

まず、過去の検査においてノロウイルス陽性であったふき取り検体中にどの程度のウイルスが含まれているかを調べた。更に、現在ふき取り検査に使用している濃縮法である PEG 沈殿法での回収率を調べた。ふき取り検査で陽性であった 6 検体について定量を行ったところ、 $10^2 \sim 10^3$ ゲノムコピー/検体 (実測値 $10^0 \sim 10^1$ コピーオーダー/反応) であった。階段希釈をした便乳剤を用いて PEG 沈殿法での検出率及び検出限界を調べたところ、回収率は 11.2-21.7%であった。また添加ウイルス量が 10^2 コピーでは検出不可となったことから、PEG 沈殿法でのノロウイルスの検出には、検体中に 10^3 コピー以上のウイルス量が必要と考えられた。

ふき取り素材の比較では、素材によっ

て回収率に若干の差を認めた。ふき取りを目的として作られた綿棒では、その他の綿棒に比べて回収率が若干良い傾向が見られた。ふき取りキットは、ふき取り検査を目的に作られているため、ふき取り操作が行い易く、この事も回収率へ影響している可能性が考えられた。

ふき取り溶液の検討では、キットに付属しているリン酸緩衝生理食塩水では低い回収率となった。そこで、溶液をダルベッコ PBS(-)に変更したところ若干回収率の向上が認められた。さらに回収率の向上を目的として、界面活性剤である Zwittergent の添加を試みた。0.3% Zwittergent を添加してふき取りしたところ、キット①を使用した場合で 23.9-65.7%、キット②を使用した場合 27-62%と回収率が向上した。ふき取り液に Zwittergent を用いる事でステンレス製トレーからノロウイルスが遊離しやすくなり、回収率が向上すると考えられた。しかし、Zwittergent を 0.3%および 0.5%を添加した場合の回収率は 0.3%で 27.0-62.0%、0.5%で 13.6-18.3%となった。濃度が 0.3%から 0.5%へ上昇すると、ハイドロキシアパタイトを加えて攪拌する際に、泡沫が多く生じることが観察された。この泡沫により遠心管内での液体の混和が制限され、ハイドロキシアパタイトへのウイルス吸着率が低下したのではないかと考えられた。

以上のことから、ふき取り検体からの

ノロウイルス回収には、ふき取りキット付属のリン酸緩衝生理食塩水を Zwittergent 加ダルベッコ PBS(-)に変更し、ふき取り回数を 2 回に増やす事でハイドロキシアパタイトを用いた濃縮法が適用できる可能性が示唆された。今後、検出限界などの詳細な検討が必要である。

E. 結論

ハイドロキシアパタイトを用いたふき取り検体からのノロウイルスの回収法は、特別な機器が不要で短時間で濃縮可能である。保健所等でふき取り検体採取時によく用いられるふき取りキットでは、付属のリン酸緩衝生理食塩水をダルベッコ PBS(-)に変更することで回収率が上昇した。更に Zwittergent を添加することで、24-66%の回収率が得られた。

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

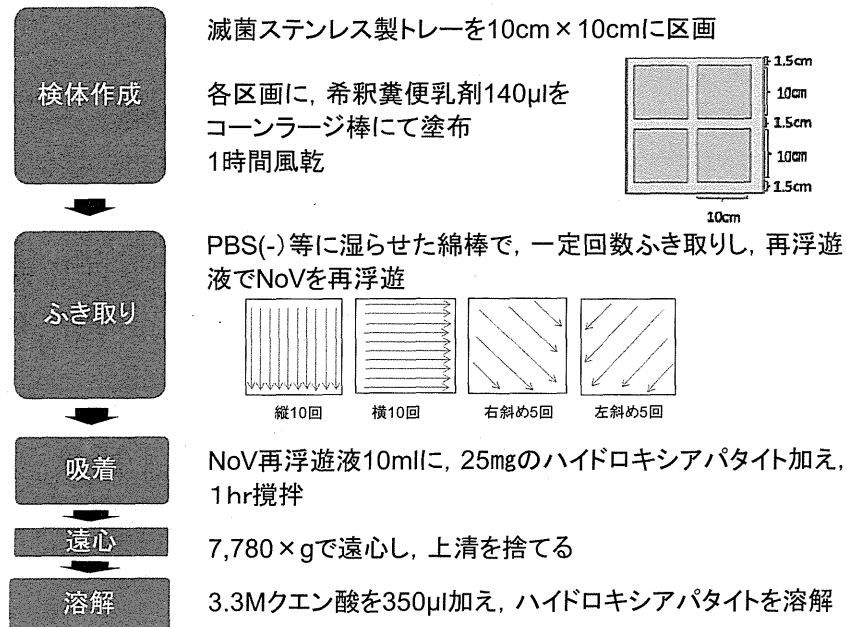


図1 ヒドロキシアパタイトによるふき取り検体からのノロウイルス回収手順

表1 段階希釈便を用いたPEG沈殿法によるノロウイルス回収率

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)
10 ²	8.29E+06	1.35E+06	16.30%
10 ³	8.15E+05	9.13E+04	11.20%
10 ⁴	1.01E+05	1.44E+04	14.30%
10 ⁵	4.89E+03	1.06E+03	21.67%
10 ⁶	1.06E+03	2.14E+02	20.19%
10 ⁷	1.07E+02	不検出	—

表2 過去のふき取り陽性検体(Nested-PCR陽性)の定量試験

検体No.	採取場所	リアルタイムPCR定量値	
		検体中のウイルスコピー数	実測値
1	トイレのドアノブ	2.46E+03	24.60
2	トイレのドアノ照明スイッチ	1.14E+03	11.40
3	手指消毒剤ポンプヘッド	2.78E+04	27.80
4	便器蓋カバー	3.28E+03	32.80
5	調理場入口引き戸	4.77E+02	4.77
6	トイレの取っ手	-	不検出

表3 ふき取り素材別ウイルス回収試験の結果

No.	綿球素材および用途	ハイドロキシアパタイト 吸着後の再浮遊	ウイルス塗布量 (ゲノムコピー)	回収ウイルス量 (ゲノムコピー)	回収率 (%)
①	レーヨン (ふき取りキット)		9.24E+05	1.35E+05	14.6%
②	ポリエステル (ふき取りキット)		1.10E+06	8.99E+04	8.2%
③	レーヨン (綿棒)	ダルベッコPBS(-)	9.24E+05	6.14E+04	6.7%
④	ポリエステル・フロック繊維 (綿棒)		5.40E+06	2.68E+05	5.0%
⑤	ウレタン (口腔内洗浄スポンジ)		1.19E+06	6.33E+04	5.3%

表4 ふき取り, 再浮遊液の検討試験の結果

No.	綿棒素材 及び用途	ふき取り液	溶解液	ふき取り 回数	回収率 (%)
		キット付属リン酸緩衝食塩水		1回	3.3%
			ダルベッコPBS(-)	1回	6.8-15.7%
				2回	17.8-28.7%
①	レーヨン (ふき取りキット)	ダルベッコPBS(-)	0.3%Zwittergent加 ダルベッコPBS(-)		18.3-30.3%
		0.5%Zwittergent加ダルベッコ PBS(-)		2回	13.6-18.3%
		0.3%Zwittergent加ダルベッコ PBS(-)			23.9-65.7%
		キット付属リン酸緩衝食塩水		1回	4-6%
②	ポリエステル (ふき取りキット)		ダルベッコPBS(-)	1回	5.5-8.2%
			0.3%Zwittergent加 ダルベッコPBS(-)	2回	27-62%

市販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	則常 浩太	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	八島 加八	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

2015年2月に購入した市販カキ5ロット20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)、A型肝炎ウイルス(HAV)、E型肝炎ウイルス(HEV)、アストロウイルス(AstV)、エンテロウイルス(EV)、パレコウイルス(PeV))の検出を試みた。その結果、NoVが4ロット8検体から検出された。SaV、HAV、HEV、AstV、EV、PeVは検出されなかった。

NoVの遺伝子型別は、4ロット5検体からGII.17(Kawasaki2014)が検出され、GI.2、GII.3、GII.4(sydney2012)、GII.13、GII.21がそれぞれ1検体から検出された。

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。二枚貝は中腸腺にノロウイルス等の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、ノロウイルスの遺伝子型別を行い、ヒトから検出された遺伝子型別との関連性を検討した。

B. 研究方法

1. 材料
2015年2月に購入した市販カキ(表1)5ロット20検体及び2014年11月から2015年11月に発生した食中毒事例等の便64検体を用いた。
2. カキからのRNA抽出及び逆転写反応
カキは中腸腺1.5g以上を1検体とし、1ロットあたり4検体について検査を実施した。中腸腺をPBS(-)で10%乳剤とし、 α -アミラーゼ(Nagase)を添加した。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1ml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。遺伝子型別を行うため、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シングを行った後、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シングまたはIn-Fusion Cloning Kit(Takara)を用いてクローニングを行った後シーケンシングを行い、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。

SaVは、Okaら*の方法に準じてリアルタイムPCR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、EV、PeV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

2015年2月に購入した市販生カキ5ロット20検体のウイルス検出状況を表3に示した。

4ロット8検体(40%)からNoVが検出された。SaV、HAV、HEV、AstV、EV、PeVは検出されなかった。検出されたNoVの遺伝子型は、GII.17(Kawasaki2014)が最も多く、5検体から検出され、GI.2、GII.3、GII.4(sydney2012)、GII.13、GII.21が各1検体から検出された。

用途及び採取海域別検出状況を表4に示した。生食用では3ロット12検体のうち2ロット3検体(25%)から2種類の遺伝子型のNoV(GII.17(Kawasaki2014)、GII.21)が検出され、加熱調理用では、2ロット8検体のうち2ロット5検体(約63%)から5種類のNoV(GI.1、GII.3、GII.4(sydney2012)、GII.13、GII.17(Kawasaki2014))が検出された。海域別では、A県No.30海域からは2種類の

遺伝子型の NoV (G II. 17 (Kawasaki2014)、G II. 21)、A 県 No. 10 海域から 1 種類の遺伝子型 NoV (G II. 17 (Kawasaki2014)、A 県 No. 12 海域からは 3 種類の遺伝子型の NoV (G II. 3、G II. 4 (sydney2012)、G II. 17 (Kawasaki2014))、A 県 No. 11 海域からは 3 種類の遺伝子型の NoV (G I. 2、G II. 13、G II. 17 (Kawasaki2014)) が検出された。C 県 No. 1 海域からはウイルスは検出されなかった。

2. ヒト糞便からの NoV 遺伝子型別検出状況

2014 年 11 月から 2015 年 11 月までのヒトからの NoV 遺伝子型別検出状況を図 1 に示した。同一事例から同一遺伝子型が検出された場合は 1 として計上し、同一事例から複数の遺伝子型が検出された場合、遺伝子型毎にそれぞれ 1 として計上した。2015 年 1 月から G II. 17 (Kawasaki2014) が検出され始め、4 月まで検出されたが、2015 年 9 月からは G II. 4 (sydney2012) が検出され、10 月、11 月は G II. 4 (sydney2012) のみの検出であった。

3. Capsid N/S 領域における NoV 分子系統樹

NoV G I 及び G II の分子系統樹を図 2 及び図 3 に示した。2015 年 2 月に購入したカキから検出された G II. 17 は G II. 17 Kawasaki/308/2015 に近縁な株であった。また、2015 年 1 月以降にヒトから検出された G II. 17 についても同様であった。

D. 考察

今回調査した市販カキ 5 ロット 20 検体

のうち、4 ロット 8 検体 (40%) から NoV が検出された。G II. 17 (Kawasaki2014) が最も多く 4 ロット 5 検体 (25%) から検出された。また、同シーズンにヒトから検出された株も、G II. 17 (Kawasaki2014) が多い結果であり、ヒトから検出された NoV とカキから検出された NoV は同様の傾向を示した。用途別では、加熱調理用からの検出率が高く、約 63% から NoV が検出されたが、生食用からも 25% 検出された。遺伝子の検出であるため、全てに感染性があるとは限らないが、十分に加熱し、喫食することが望ましいと思われる。採取海域別では、C 県 1 海域で採取されたカキからは検出されなかったが、A 県では、今回調査した 4 海域全てにおいて NoV が検出された。これまでの結果から、カキからの NoV 検出は、シーズンによるヒトからの検出状況と同じ動向を示すことが示唆されたが、海域による影響もあることが示唆された。系統樹解析の結果、2014/15 シーズンに検出された NoV の遺伝子型は、ヒト及びカキとも G II. 17 Kawasaki/308/2015 に近縁な株であった。一方、2015/16 シーズンの 11 月までにヒトから検出された NoV は G II. 4 (sydney2012) が主流であったことから、同シーズンのカキからも G II. 4 (sydney2012) が検出されることが推測される。抗原変異を常に繰り返しているウイルスであるため、ヒトから検出される NoV の動向をいち早く捉え、免疫を保持している人が少ないと考えられるウイルスであれば、早急の注意喚起が予防に有効であると考えられた。

E. 結論

2015年2月に購入した市販生カキから NoV が検出された。2014/15 シーズンに最も多く検出された遺伝子型はヒト、カキともに GII.17 (Kawasaki2014) であった。2015/16 シーズン 11 月まではヒトから検出された NoV は GII.4 (sydney2012) が主流であったが、今後、本格的なシーズンに入るにあたり、GII.17 (Kawasaki2014) の動向に注意する必要がある。

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 カキの用途および養殖海域

ロット	用途(加熱/生食)	海域
3150010	生食用	A 県 30 海域
3150011	生食用	A 県 10 海域
3150012	生食用	C 県 1 海域
3150013	加熱調理用	A 県 12 海域
3150014	加熱調理用	A 県 11 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
EV	Caroline らの方法(Journal of Medical Virology, 67:555-562(2002))に準ずる
PeV	Caroline らの方法(Journal of Medical Virology, 67:555-562(2002))に準ずる

表1 カキからのウイルス検出状況

		NoV	SaV	HAV	HEV	AstV	EV	PeV
3150010	1	—	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—	—	—
	3	G II.21	—	—	—	—	—	—
	4	G II.17(Kawasaki2014)	—	—	—	—	—	—
3150011	1	G II.17(Kawasaki2014)	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	—	—	—
	4	—	—	—	—	—	—	—
3150012	1	—	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	—	—	—
	4	—	—	—	—	—	—	—
3150013	1	—	—	—	—	—	—	—
	2	G II.3 G II.17(Kawasaki2014)	—	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	—	—	—
	4	G II.4(Sydney2012)	—	—	—	—	—	—
3150014	1	—	—	—	—	—	—	—
	2	G II.13	—	—	—	—	—	—
	3	G I.2 G II.17(Kawasaki2014)	—	—	—	—	—	—
	4	G II.17(Kawasaki2014)	—	—	—	—	—	—

表4 用途及び採取海域別検出状況

用途	採取海域	検出ウイルス
生食用	A 県 30 海域	NoVG II.17(Kawasaki2014) NoVG II.21
	A 県 10 海域	NoVG II.17(Kawasaki2014)
	C 県 1 海域	検出せず
加熱調理用	A 県 12 海域	NoVG II.3、NoVG II.4(Sydney2012) NoVG II.17(Kawasaki2014)
	A 県 11 海域	NoVG I.2、NoVG II.13 NoVG II.17(Kawasaki2014)

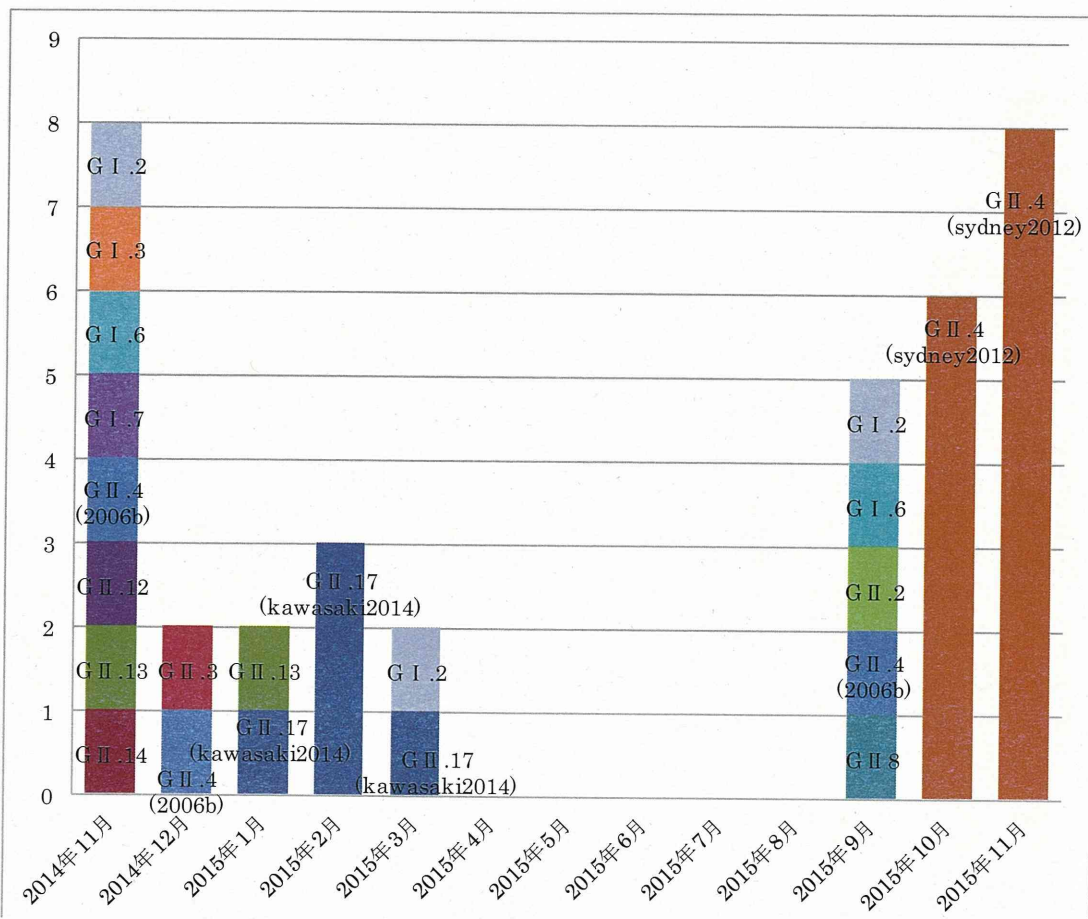


図1 ヒト(糞便)からのノロウイルス遺伝子型別検出状況(2014年11月～2015年11月)

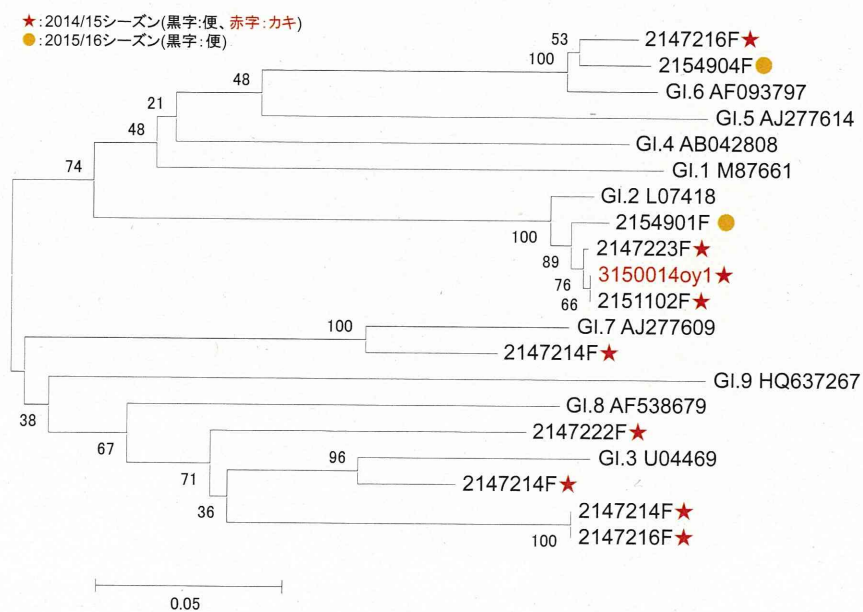


図2 NoVG I (CapsidN/S)系統樹

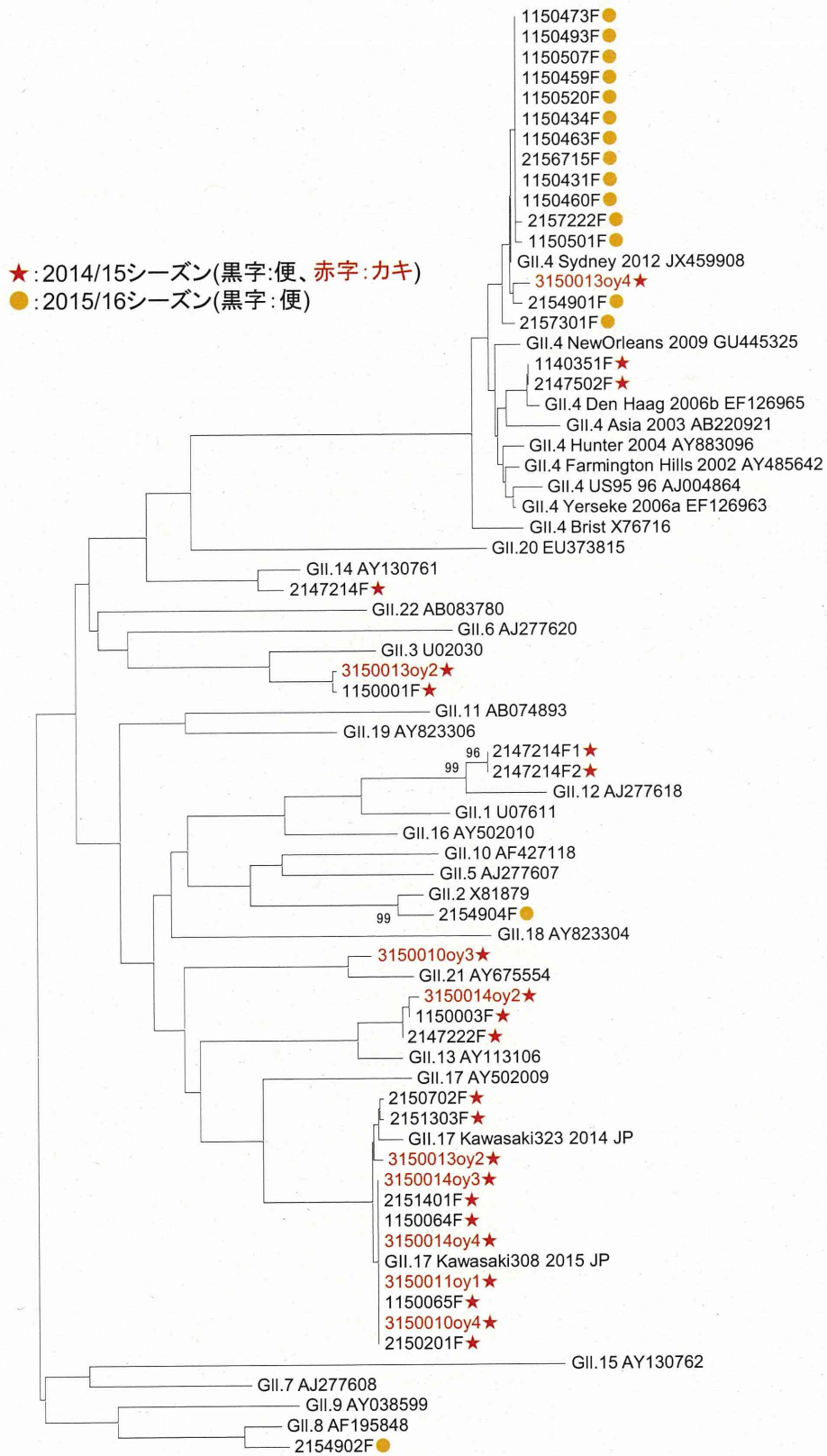


図3 NoVG II (CapsidN/S)系統樹

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に関する研究」
研究協力報告

感染性胃腸炎から検出されたノロウイルスの分子疫学的解析

研究協力者	山下育孝	愛媛県立衛生環境研究所
研究協力者	溝田文美	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

2015 年 1 月～12 月の間に、感染性胃腸炎から検出されたノロウイルス (NoV) は 105 例(検出ウイルスの約 52.5%)で最も多く、そのうち GII が 65 例、GI が 40 例で、例年に比べ GI の検出割合が高かった。遺伝子解析の結果 93 例の型別ができた。GI の内訳は、GI.3 が 31 例、GI.2 が 2 例、GII では、GII.4 が 23 例、GII.3 が 22 例、GII.17 が 14 例、GII.6 が 1 例であった。6 月～8 月に近縁な GI.3 が多数検出された。また、6 月～7 月にサポウイルス(SaV)、6 月にアストロウイルスの検出数がそれぞれ増加し、6 月～7 月の感染性胃腸炎患者数の増加との関連性が示唆された。GII で検出数の多かった遺伝子型 GII.4 の大部分は Sydney 2012 タイプであり、GII.3 は、ポリメラーゼとカプシド領域の間で遺伝子組み換えを起こした GII.P12-GII.3 のキメラウイルスであった。また、愛媛県では過去に検出例がない GII.17 が 2 月～4 月に検出された。これらの遺伝子型の株は非常に近縁であり、GII.P17_GII.17/ Kawasaki308 と高い相同性を示した。

A. 研究目的

感染性胃腸炎の起因ウイルスには、ノロウイルス(NoV)、サポウイルス(SaV)、ロタウイルス、アストロウイルス、腸管アデノウイルス等が知られているが、NoV の検出数が最も多く、また、食中毒等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 の流行は、変異株の出現と関連していることから、遺伝

子解析による遺伝子型や変異株の把握が、NoV 流行予測やウイルス性食中毒の予防に有用と考えられる。

そこで、2015 年に愛媛県において感染性胃腸炎から検出された NoV について分子疫学的解析を行った。

B. 研究方法

1. 材料

2015 年 1 月～12 月の間に採取された

感染症発生動向調査用感染性胃腸炎患者糞便 387 検体を用いた。糞便は検査実施まで -20℃ 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 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。NoV 検出は、影山らの COGF/R 系プライマーと RINGTaqMan プロブを用いたリアルタイム PCR 法(J.Clin.Microbiol 41, 2003)で行った。また、SaV 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、アストロウイルス検出は左近らの RT-PCR 法(J.Med.Virol 61,2000)でそれぞれ実施した。

NoV 陽性例については、カプシド N/S 領域の塩基配列をダイレクトシーケンシング法により決定し、Norovirus Genotyping Tool により遺伝子型別を行った。さらに、型別株の一部については、ポリメラーゼ領域からカプシド N/S 領域及びカプシド P1/P2 領域を増幅し、塩基配列を決定した後、系統樹解析を実施した。

(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 2006 年～2015 年の定点当たりの患者報告数の推移を図 1 に示す。2014/2015 シーズンは、1 月～5 月の患者報告数は例年に比べ少なく、6 月～7 月の患者報告数は 2006 年以降の 10 年間で最も多かった。2015 年 12 月に患者報告数は例年と同様にピークを迎えたが、ピーク時の定点当たりの患者報告数は少なかった。

2. 感染性胃腸炎患者からのウイルス検出状況

感染性胃腸炎患者 387 名からのウイルス検出状況を表 1 に示す。387 検体中、46.0% にあたる 178 検体からウイルスが検出され、そのうち、2 検体からは 3 種類のウイルス、18 検体から 2 種類のウイルスが検出された。検出ウイルス 200 例の内訳は、NoV が 105 例(52.5%)で最も多く、次いで SaV が 48 例(24.0%)、ロタウイルスが 22 例(11.0%)、アストロウイルスが 20 例(10.0%)、アデノウイルスが 5 例(2.5%)であった。検出された NoV は GII が 65 例(61.9%)、GI が 40 例(38.1%)で、例年に比べると GI の検出割合が高かった。NoV は年間を通して検出され、特に、GII は 2 月～3 月と 12 月、GI は 6 月～8 月の検出率が高かった。SaV は 6 月～7 月に、ロタウイルスは 4 月に、アストロウイルスは 6 月に多く検出数された。

3. 検出された NoV の遺伝子型と月別検出状況

感染性胃腸炎から検出された NoV 105 例のうち解析が可能であった 93 例(GI 33 例, GII 60 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 4 種類の遺伝子型が確認された。GI の内訳は、GI.3 が 31 例(93.9%)、GI.2 が 2 例(6.1%)、GII では、GII.4 が 23 例

(38.3%)、GII.3 が 22 例(36.7%)、GII.17 が 14 例(23.3%)、GII.6 が 1 例(1.7%)であった。

検出された NoV の月別検出状況を図 2 に示す。6 月～8 月の夏季に GI.3 が多数検出された。GII では、GII.17 が 2 月～4 月に集中して検出された。GII.4 は、1 月～4 月と 11 月～12 月に検出されたが、3 月と 11 月～12 月の検出数が多かった。GII.3 は 1 月～2 月及び 12 月の検出数が多く、GII.6 は 12 月に検出された。

4. NoV GI の遺伝子解析

カプシド N/S 領域、ポリメラーゼ領域の系統樹解析を行った結果を図 3～4 に示す。GI.3 の大部分は、カプシド N/S 領域で同一のクラスターを形成し、塩基配列の相同性が 97.3～100% で近縁であった。これらは、ポリメラーゼ領域においても非常に近縁であり、カプシド領域同様 GI.3 に分類された。また、カプシド N/S 領域が GI.2 の株はポリメラーゼ領域においても GI.2 に分類された。

5. NoV GII の遺伝子解析

カプシド N/S 領域、ポリメラーゼ領域及び GII.4 のカプシド P1/P2 領域の系統樹解析を行った結果を図 5～7 に示す。検出数が最も多かった GII.4 は、2 つのクラスターに分かれた。大部分は、GII.4/Sydney/NSW0514/2012/AU と高い相同性(N/S 領域が 99.3～100%、P1/P2 領域が 97.4～97.9%、ポリメラーゼ領域が 98.0～98.7%)を示す Sydney2012 タイプで、一部 2006b タイプが含まれていた。N/S 領域で GII.3 に型別された株は、ポリメラーゼ領域の塩基配列をみると、いずれも GII.12 に分類され、キメラウイルスであることが明らかにになった。GII.17 に型別された株の

塩基配列の相同性は、N/S 領域で 98.2～100%、ポリメラーゼ領域で 99.7～100% で、これらの株は非常に近縁であった。また、GII.P17-GII.17/ Kawasaki308 と高い相同性を示した。

D. 考察

感染性胃腸炎の原因ウイルスの 52.5% は NoV であった。例年 NoV に占める GI の割合は約 5% と少なかったが、今年 は 38.1% を占めた。そのうち約 94% が GI.3 で、6 月～8 月に多数検出された。GI.3 は北海道の小学校で発生した集団事例や大阪等で散発例や集団発生例から検出されていることから、本県だけでなく、いくつかの地域で GI.3 の地域流行があったものと推察された。また愛媛県においては 6 月～7 月に SaV が、6 月にアストロウイルスが多く検出された。例年ウイルスの検出数が少なくなる夏季に、NoV GI.3 や SaV 等の検出数が増加したことが、6 月～7 月の感染性胃腸炎患者数が 2006 年以降の 10 年間で最も多くなった原因の一つと考えられた。

NoV GII では、GII.4、GII.3、GII.17 の順に検出数が多かった。遺伝子解析の結果、GII.4 は 2006b タイプが数例検出されたが、大部分は Sydney2012 タイプであった。2014/2015 シーズンに検出された GII.4 の多くは Sydney2012 タイプであったことから、Sydney2012 タイプが 2012/2013 シーズンの全国流行以降 2006b タイプに代わり GII.4 の主流になっていると推察された。また、GII.3 は、ポリメラーゼとカプシド領域の間で遺伝子組み換えを起こした GII.P12-GII.3 のキメラウイルスであることが示唆された。

愛媛県では過去に検出例のない