

图 4 HAV 遗传子系統樹解析結果 (NJ 法)

2013-2015 年 2 月購入市販カキからの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
研究協力者	久常 有里	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

2013-2015 年の 2 月に購入した市販カキ中のノロウイルスの保有実態を明らかにした。カキから検出される遺伝子型は NoV GI では多様で、NoV GII では特定の優勢な遺伝子型が検出される傾向があった。また、検出された遺伝子型は、そのシーズンのヒトでの流行を反映していると考えられた。

カキにおけるノロウイルス遺伝子検査法では、Nested PCR 法と Real-time PCR 法での結果が乖離するケースがあり、そのほとんどが Nested PCR 法が陽性、Real-time PCR 法が陰性であった。

A. 研究目的

2013, 2014, 2015 年の 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。また、Nested PCR 法と Real-time PCR 法での判定結果を比較し、その整合性について検討する。

B. 研究方法

1. 材料

2013 年, 2014 年, 2015 年 2 月にスーパー及び加工業者から購入した 22 ロットを検査に用いた(2013 年: 7 ロット, 2014 年: 8 ロット, 2015 年: 7 ロット)(表 1)。

2. Nested PCR 法及び Real-time PCR 法

によるノロウイルスの検出

カキから中腸腺を摘出した後に 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 0.5% 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 Real-time 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、Real-time 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 (Applied biosystems) 及び ABI3500 ジェネティックアナライザ (Applied biosystems) を用いてダイレクトシーケンシング法により塩基配列を決定した。遺伝子型別にはカプシド遺伝子の翻訳開始点から 264bp の塩基配列を用いた。2013 年、2014 年は 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-kaisetsul.html> に示された分類に従った (後に対応表にしたがって新表記に変換)。2015 年については、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. カキ中腸腺中のノロウイルス量

カキ中腸腺中のウイルス量を図 1 に示した。NoV GI, GII とともに加熱調理用カキに含まれるウイルス量が生食用カキよりも多い傾向を示した (生食用平均コピー数は g 中腸腺あたり NoV GI で $4.4 \times 10^1 \sim 1.9 \times 10^2$, NoV GII で $8.3 \times 10^2 \sim 2.4 \times 10^3$, 加熱調理用平均コピー数は g 中腸腺あたり NoV GI で $1.3 \times 10^2 \sim 6.9 \times 10^2$, NoV GII で $7.4 \times 10^3 \sim 1.1 \times 10^4$ であった)。NoV GI と NoV GII の量比 (GII/GI) は、最小 2.1 倍で最大 100 倍であり、生食用カキより加熱調理用カキにおいてこの比が大きくなる傾向があった (図 2)。

2. Nested PCR 法と Real-time PCR 法での検出結果の比較

Nested PCR 法と Real-time PCR 法の検出結果を表 2 に示した。NoV GI, NoV GII とともに McNemer 検定において有意な差が認められた。検査結果の乖離は Nested PCR が陽性で Real-time PCR 陰性の場合のみであって、その逆は認められなかった。

3. カキから検出されたノロウイルスの遺伝子型

カキから検出されたノロウイルスの遺伝子型を図 3 に示した。NoV GI では多様な遺伝子型が検出されるのに対し、NoV GII では特定の遺伝子型が優勢となった。また、2013, 2014 年は GII.4 が優勢な遺伝子型であったが、2015 年は GII.17 が優勢な遺伝子型となった。Nested PCR の 2nd PCR の産物のダイレクトシーケンシングでは、複数の遺伝子型の混在によると思われるケースが観察され、シーケンシング波形データの乱れから遺伝子型が特定でき

ない、あるいは GII.4 で亜型が不明となる場合があった（データ省略）。

D. 考察

カキ中腸腺に含まれるノロウイルス量は生食用より調理加熱用カキで多い傾向があるが、それぞれの用途別カキのロット間ウイルス量は一様ではない。このことは、それぞれの養殖海域のノロウイルス量を反映しているものと思われる。また、NoV GI と NoV GII のカキ中のウイルス量比は圧倒的に GII が多いケースが見受けられ、特に加熱調理用カキで顕著であった。加熱調理用カキはおそらくノロウイルスに汚染されている海域で養殖されたものと考えられ、生食用海域と比べて NoV GII を高濃度に蓄積するためではないかと思われる。

Nested PCR 法と Real-time PCR 法による検出結果には乖離が生じ、特に Nested PCR が陽性で Real-time PCR 陰性になることが原因であると考えられた。これは、Real-time PCR 法での陽性判定が、検体 2 ウェルでの Real-time PCR の実測値が共に 10 コピー以上と規定されているため、特に中腸腺中のウイルス量が少ない NoV GI で検査結果の乖離が顕著であった。判定基準の見直しが必要であると考えられる。

カキから検出されたノロウイルスの遺伝子型は NoV GI では多様であり、一方 NoV GII では優勢な遺伝子型が検出される傾向があった。カキ購入月である 2 月から前々月までに全国の地方衛生研究所から病原微生物検出情報に寄せられたノロウイルスの遺伝子型を図 4 にまとめた。概

ね、病原微生物情報に寄せられた遺伝子型の多くがカキからも検出されており、ヒトでの流行を反映していると考えられた。2012/13 シーズンには GII.4 の新しい亜株 GII.4 Sydney 2012 の出現により GII.4 の検出割合が増加したが、2013/14 シーズン以降はその割合が減少傾向を示している。また、2013/14 シーズンは春先には GII.6 が、2014/15 シーズンは GII.17 Kawasaki 2014 が流行するなど、ここ数年シーズンは GII.4 以外の遺伝子型の割合が増えてきている。カキから検出される NoV GII の遺伝子型についてもこの傾向が見取れることから、カキ中のノロウイルスのモニタリングはヒトでの流行状況を把握する上で今後も重要であると考えられる。

E. 結論

カキ中腸腺中に蓄積されるノロウイルス量は生食用に比べ加熱調理用カキが高く、特に NoV GII のウイルス量は NoV GI に比べ圧倒的に多い。検出される遺伝子型は、そのシーズン中にヒトで流行している遺伝子型を反映しているものと考えられ、カキ中のノロウイルスをモニタリングすることは流行状況を把握する上で重要である。

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 市販カキ購入ロット数

購入年	ロットNo.	用途
2013	生食用	3ロット
	加熱調理用	4ロット
2014	生食用	5ロット
	加熱調理用	3ロット
2015	生食用	2ロット
	加熱調理用	5ロット

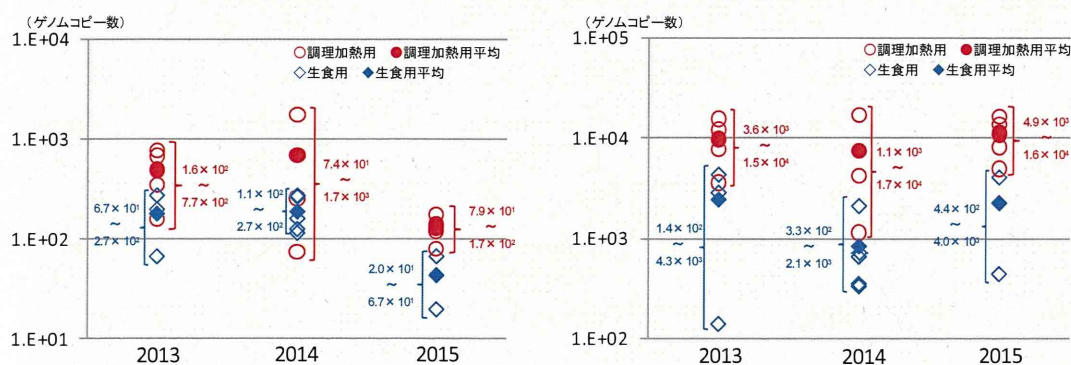


図1 カキ中腸腺中のノロウイルスゲノムコピー数(左: GI, 右: GII)

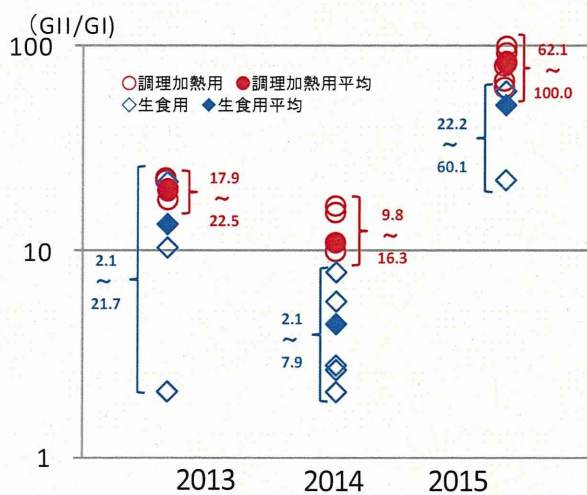


図2 カキ中腸腺中のGIとGIIのウイルス量比

表2 Nested PCR法とReal-time PCR法の結果比較

NoV GI		Real-time PCR	
		陽性	陰性
Nested PCR	陽性	6	36
	陰性	0	24

(MaNemer検定 p=0.000)

NoV GII		Real-time PCR	
		陽性	陰性
Nested PCR	陽性	50	11
	陰性	0	5

(MaNemer検定 p=0.001)

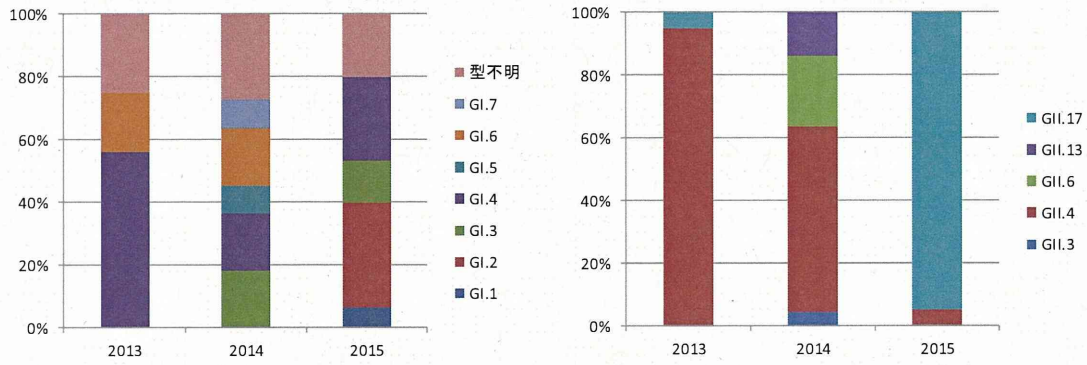


図3 カキから検出されたノロウイルスの遺伝子型(左: NoV GI, 右: NoV GII)

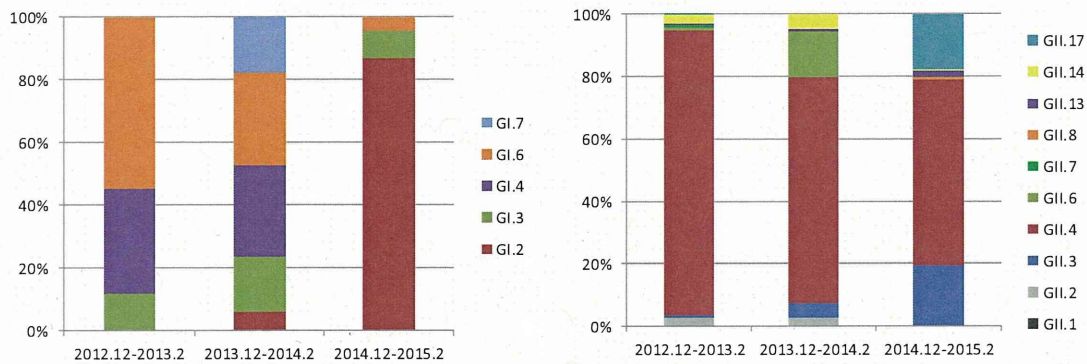


図4 12月から2月までに病原微生物検出状況に登録されたノロウイルスの遺伝子型(左: NoV GI, 右: NoV GII)

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」

総合研究協力報告(平成 25~27 年度)

ハイドロキシアパタイトによるカキ及びふき取り検体からの ノロウイルス濃縮法の検討

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(HAP)によるカキ及びふき取り検体からのノロウイルス濃縮法について検討した。HAP 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、ふき取り検体からの回収では市販のふき取りキットを使用し、ふき取り及び再浮遊に0.3% Zwittergent 加ダルベッコ PBS(-)を使用することで回収率が向上した(24-66%)。このことから HAP 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回収に適応できる可能性が示唆された。

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、カキやふき取り検体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、回収率が一樣でない等の問題がある。そこでカキ及びふき取り検体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(HAP)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

便からのノロウイルス回収試験の供試試料には、患者便を $10^2 \sim 10^7$ 倍に段階希釈した乳剤を用いた。

カキからの回収試験には、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、模擬検体とした。

ふき取りからの回収試験には、滅菌したステンレス製トレーを 100cm^2 ($10\text{cm} \times 10\text{cm}$) に区画し、各区画に 10^6 コピー程度のノロウイルスを含む便乳剤 $140 \mu\text{l}$ 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(-) 等に再浮遊させて、模擬ふき取り検体とした。

2. HAP によるウイルス回収

HAP によるノロウイルスの濃縮手順を図 1 に示した。便乳剤、カキ乳剤またはふき取り検体の試料 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 350 μl を加えて 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。

3. ノロウイルスの定量

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。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 (ロッシュ) 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 μl の反応系にテンプレートとして 2.5 μl 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. カキからのノロウイルス回収試験における NALC 処理時期の検討

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 HAP 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。

5. ふき取り回収時における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、再浮遊液として、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(-)、を検討した。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. 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 $10^2 \sim 10^7$

倍に段階希釈した乳剤を用い、HAP 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 10^3 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 法で検知が可能であった (表 1)。

2. カキからのノロウイルス回収試験

ノロウイルスを添加したカキ 10%乳剤からのウイルス回収試験を行った。乳剤から直接回収する場合と前処理として、NALC 処理をノロウイルス添加後に最初の遠心を行う前、または HAP 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 (図 1)。一方、HAP 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 (図 2)。

3. ふき取り検体からのノロウイルス回収試験

ふき取りに用いる素材 (①~⑤) について回収率を比較した。各回収率は、① 14.6%、② 8.2%、③ 6.6%、④ 5.0%、⑤ 5.3%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 2)。

ふき取り溶液、再浮遊液及びふき取り回数の検討について、ふき取り素材①と②を用いて検討した。ふき取り液として、キット付属のリン酸緩衝生理食塩水に変えてダルベッコ PBS(-)を使用することにより回収率の改善が認められた (表 3)。ふき取り回数も 1 回よりは 2 回実施した場合で回収率が向上し、さらにダルベッコ PBS(-)に 0.3%の Zwittergent を添加

することで素材①では 23.9-65.7%、素材②では 27-62%の回収率が得られた。一方、ふき取り液は PBS(-)のまま再浮遊時に 0.3%Zwittergent を加えた PBS(-)では、それほど効果は上がらなかった。

D. 考察

HAP を用いたノロウイルス濃縮法について、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、HAP 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)。

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 (図 1)、カキ乳剤中の夾雑物がノロウイルスの HAP への吸着を妨げている可能性が考えられた。次に、NALC 処理と HAP 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、HAP 添加前の NALC 処理でも 5.2%で、あまり効果はなかった。

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、この事も回収率に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 の添加を試みたところさらに回収率が向上した。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。

以上のことから、HAP を用いたノロウイルス濃縮法は、夾雑物が少ない試料であれば十分な回収率が得られる一方、夾雑物が多い検体ではその効果を十分に発揮できず、なんらかの工夫が必要と考えられた。

E. 結論

HAP を用いたウイルス濃縮法は、カキの乳剤のように夾雑物の多い試料からのウ

イルス回収には不適であるが、ふき取り検体のように夾雑物の少ない試料からは効率良くウイルス回収ができ、適用可能であることが示された。

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

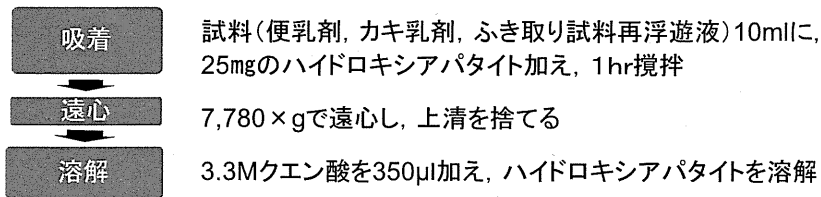


図1 ハイドロキシアパタイトによるノロウイルス回収手順

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 ²	3.8E+06	2.6E+06	68.1%	
	10 ³	4.0E+05	2.8E+05	70.9%	
	10 ⁴	4.5E+04	2.7E+04	60.1%	
	10 ⁵	4.3E+03	2.3E+03	53.8%	
試験2	10 ⁴	2.3E+04	1.4E+04	62.2%	
	10 ⁵	2.2E+03	1.1E+03	51.1%	
	10 ⁶	2.0E+02	4.4E+02	226.6%	2/2
	10 ⁷	3.2E+01	不検出	-	1/2

NALC添加時期	作業手順	NoV 回収率
処理なし	乳剤 → ▼ → △ → (上清) → □ → △ → (沈殿) → ◎ → 核酸抽出 (1hr)	1.5-1.7%
カキ乳剤遠心前	乳剤 → ▼ → ● → △ → (上清) → □ → △ → (沈殿) → ◎ → 核酸抽出 (15min) (1hr)	0.4%
リン酸アパタイト添加前	乳剤 → ▼ → △ → (上清) → ● → □ → △ → (沈殿) → ◎ → 核酸抽出 (1hr)	5.2%

▼;NoV添加, △;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2 カキ乳剤からのハイドロキシアパタイトによるNoV回収工程とウイルス回収率

表2 ふき取り回収時におけるふき取り素材の検討

試料 No.	綿球の素材及び用途	ハイドロキシアパタイト 吸着後の再浮遊	ウイルス塗付量 (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	6.6%
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3 ふき取り液, 再浮遊液, ふき取り回数によるノロウイルス回収率の差

試料No.	綿球素材及び用途	ふき取り液	再浮遊液	ふき取り回数	回収率 (%)
①	レーヨン (ふき取りキット)	キット付属リン酸緩衝生理食塩水		1回	3.3
		ダルベッコPBS(-)			6.8-15.7
		ダルベッコPBS(-)	0.3% Zwittergent加ダルベッコPBS(-)	2回	17.8-28.7
		0.3% Zwittergent加ダルベッコPBS(-)			18.3-30.3
				23.9-65.7	
②	ポリエステル (ふき取りキット)	キット付属リン酸緩衝生理食塩水		1回	4.0-6.0
		ダルベッコPBS(-)			5.5-8.2
		0.3% Zwittergent加ダルベッコPBS(-)		2回	27.0-62.0

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」

総合研究分担報告(平成25~27年度)

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

2013年2月、2014年2月及び2015年2月に購入した市販カキからの胃腸炎ウイルス(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)、パレコウイルス(PeV))の検出を試みた。15ロット50検体のうち12ロット25検体から、NoV、SaV、AstVのいずれかのウイルスが検出された。HAV、HEV、PeVは検出されなかった。

カキ及びヒトから検出されたNoVの遺伝子型を比較したところ、シーズン毎に遺伝子型別検出割合が類似していた。

A. 研究目的

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ことが知られており、ウイルスを含む二枚貝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、市販生カキの胃腸炎ウイルス浸淫状況を把握するとともに、NoV遺伝子型を解析し、ヒトから検出された遺伝子型別と比較することで関連性を検討する。また、海域による胃腸炎ウイルス検出状況について調査する。

B. 研究方法

1. 材料

2013年2月、2014年2月及び2015年2月に購入した市販生カキ(表1)15ロット50検体及び食中毒事例等から検出されたNoV 185株を用いた。

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3~4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(和光純薬、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(ライテック/ロジーズジャパン)および Oligo(dT)Primer(ライテック/ロジーズジャパン)を用いて行った。

2. 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スを行った後、BigDye Xterminator Purification Kit(ライテック/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ダイレクトシーケンスで配列を決定できなかった場合は、Mighty TA-cloning Kit(TaKaRa)、In-Fusion Cloning Kit(Takara)を用いて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。

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、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

市販生カキからのロット別ウイルス検出状況を表 3 に示した。15 ロット中 12 ロットからウイルスが検出された。2013 年及び 2014 年に購入したカキからは SaV 及び AstV が検出されたロットがあった。

採取海域別検出ウイルス検出状況を表 4 に示した。2013 年 2 月に購入した A 県 10 海域は 3 ロットを検査したため、最も

多い7種類の遺伝子型のNoVが検出されるとともにSaV及びAstVも検出された。A県の海域及びC県2海域は検査したロット全てにおいてウイルスが検出された。一方、C県1海域は3年間で3ロットを検査したが、ウイルスは検出されなかった。加熱調理用では8ロット中8ロット(100%)からウイルスが検出され、生食用は7ロット中4ロット(約57%)からウイルス検出された。

カキ及びヒトからのNoV遺伝子型別検出状況を図1に示した。2012/13シーズン及び2013/14シーズンでは、カキ及びヒトから最も多く検出された遺伝子型はGII.4(sydney2012)であったが、2014/15シーズンでは、前シーズンまでに検出されていなかったGII.17(Kawasaki2014)が検出された。2015/16シーズンは11月までのヒトの検査結果であるが、GII.4(sydney2012)が最も多く検出された。

NoV Capsid N/S 領域におけるGIの系統樹を図2に、GIIの系統樹は図3に示した。2015年2月に購入したカキから検出されたGII.17はGII.17 Kawasaki/308/2015に近縁な株であった。

D. 考察

今回2月に購入した市販生カキ15ロット中12ロット(80%)からウイルスが検出された。用途別では、加熱調理用8ロット中8ロット(100%)、生食用7ロット中4ロット(約57%)からウイルスが検出され、用途別を問わず高率にウイルスが検出された。A県では検査を実施したすべての海域のカキからウイルスが検出されたが、C県1海域のカキからは3年間をとおして

ウイルスが検出されなかったことから、海域により汚染状況に違いがみられることが示唆された。

カキ及びヒトから検出されたNoVの遺伝子型検出割合を比較したところ、シーズン毎に検出遺伝子型が類似していた。カキの購入時期が2月であることから、ヒトから検出されたウイルスが海へ流出し、カキ中に蓄積したことが示唆された。ヒトからのNoV検出が増加する時期には、カキを加熱して喫食するなどの必要があると思われる。また、感染予防のためには、迅速に遺伝子解析を行い、抗原変異等の有無を確認し、早急に情報提供するなど、注意喚起を促すことが有効であると考えられる。

E. 結論

3年間2月の市販カキからウイルス検出を試みた結果、加熱調理用、生食用を問わずウイルスが高率に検出された。遺伝子検出であるため、全てに感染性があるとは限らないが、加熱して喫食することが望ましいと思われた。また、前シーズンまで検出されていない新たな抗原性を獲得したNoVが突然出現し、カキにも蓄積する可能性があることが示され、迅速な遺伝子解析と情報還元が予防対策の一つとして有効と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし

3. その他：なし

表1 カキの用途及び採取海域

購入年月	ロット	用途	採取海域
2013年2月 (2012/13シーズン)	3130001	生食用	A県10海域
	3130002	生食用	C県1海域
	3130003	加熱調理用	A県10海域
	3130004	加熱調理用	A県11海域
	3130005	加熱調理用	A県10海域
2014年2月 (2013/14シーズン)	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
2015年2月 (2014/15シーズン)	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
PeV	Carolineらの方法(Journal of Medical Virology, 67:555-562(2002))に準ずる

表 3 市販生カキからのロット別ウイルス検出状況

購入年月	ロット	用途	検出ウイルス
2013年 2月	3130001	生食用	NoVG I .6、NoVG II .4、NoVG II .6、SaVG1/2
	3130002	生食用	検出せず
	3130003	加熱調理用	NoVG I .4、NoVG II .4、AstV
	3130004	加熱調理用	NoVG I .3、NoVG II .4、AstV
	3130005	加熱調理用	NoVG I .1、NoVG I .3、NoVG I .4、NoVG I .6、 NoVG II .4、NoVG II .13
2014年 2月	3140001	加熱調理用	NoVG II .4、SaV、AstV1型
	3140002	生食用	検出せず
	3140003	加熱調理用	NoVG I .4、NoVG II .4、G II .6、SaV、AstV1型
	3140004	加熱調理用	NoVG II
	3140005	生食用	NoVG II
2015年 2月	3150010	生食用	NoVG II .17、NoVG II .21
	3150011	生食用	NoVG II .17
	3150012	生食用	検出せず
	3150013	加熱調理用	NoVG II .3、NoVG II .4、NoVG II .17
	3150014	加熱調理用	NoVG I .2、NoVG II .13、NoVG II .17

表 4 採取海域別ウイルス検出状況

	2013年2月	2014年2月	2015年2月
A 県 10 海域	NoVG I .6、NoVG II .4 NoVG II .6、SaVG1/2	未検査	NoVG II .17
	NoVG I .4、NoVG II .4 AstV		
A 県 11 海域	NoVG I .1、NoVG I .3 NoVG I .4、NoVG I .6 NoVG II .4、NoVG II .13	未検査	NoVG I .2 NoVG II .13 NoVG II .17
	NoVG I .3、NoVG II .4 AstV		
A 県 12 海域	未検査	NoVG I .4、NoVG II .4 AstV	NoVG II .3 NoVG II .4 NoVG II .17
		NoVG I .3、NoVG II .4 AstV	
A 県 13 海域	未検査	NoVG II .4、SaV AstV1型	未検査
A 県 30 海域	未検査	未検査	NoVG II .17 NoVG II .21
C 県 1 海域	検出せず	検出せず	検出せず
C 県 2 海域	未検査	NoVG II	未検査

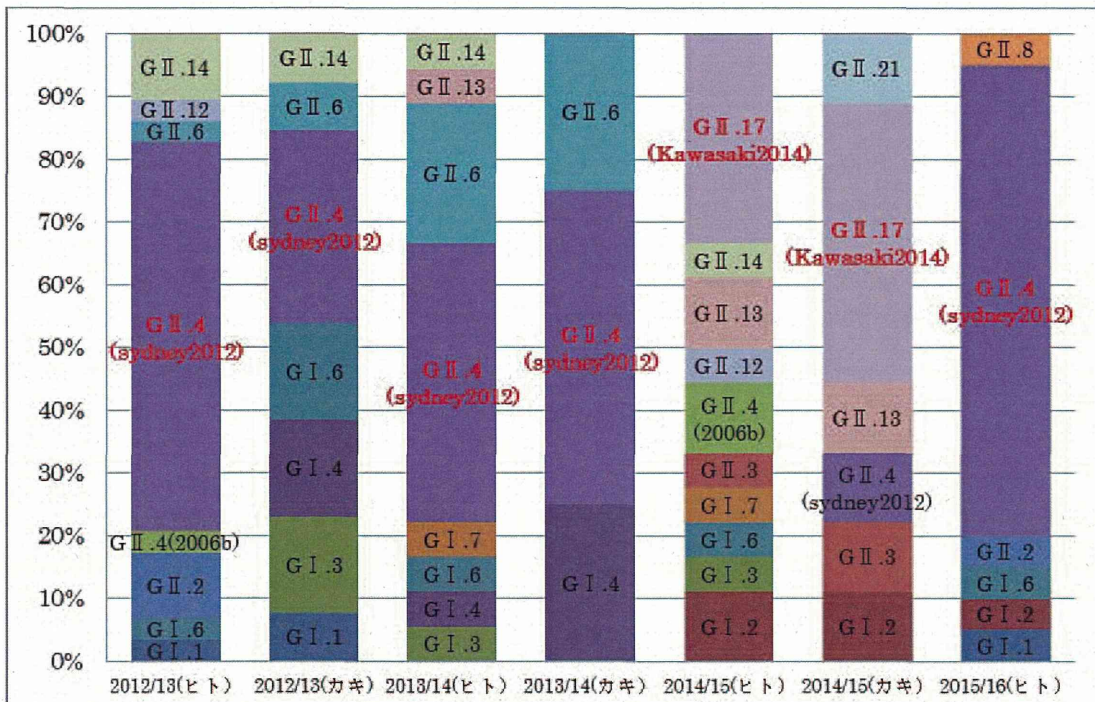


図1 カキ及びヒトからの NoV 遺伝子型別検出状況 (2012/13 シーズン~2015/16 シーズン)

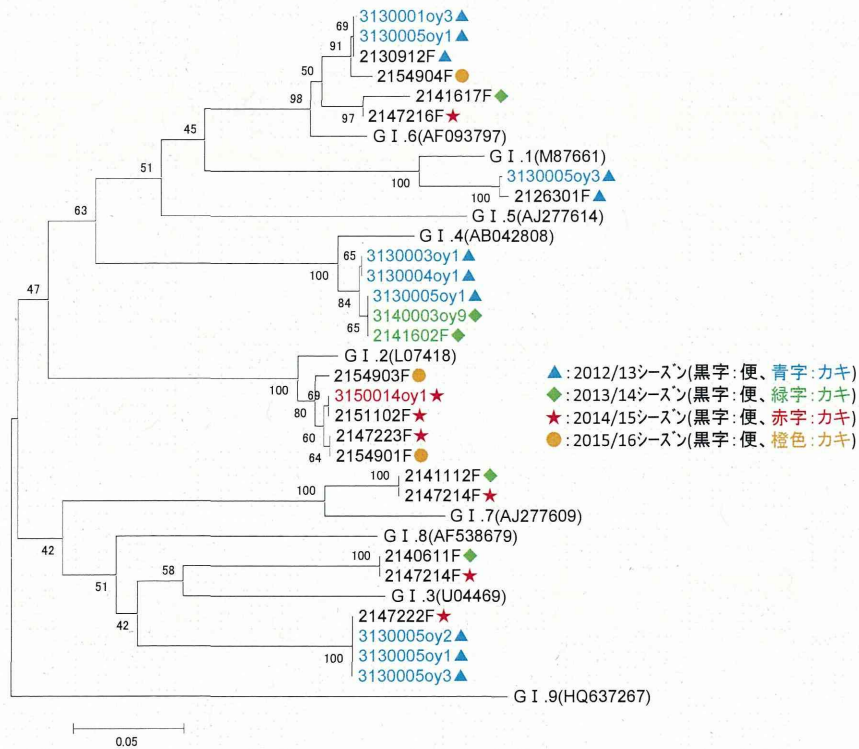


図2 NoV G I 系統樹 (Capsid N/S) (2012/13~2015/16 シーズン)

