

## 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

2012年10月～2015年12月の間に、感染性胃腸炎患者検体から検出されたノロウイルス 339 例(検出ウイルスの 54.2%)のうち解析が可能であった 307 例(GI 53 例, GII 254 例)について遺伝子型別を行った。その結果、GI は 4 種類、GII は 9 種類の遺伝子型が確認された。検出された GI の約 60%を占めた GI.3 は、2015 年 6 月～8 月の夏季に多く検出された。GII で検出数が最も多かった遺伝子型 GII.4 の大部分は Sydney2012 と近縁であった。2012 年の流行以降、Sydney2012 タイプが GII.4 の主流になっていることが示された。2014 年 5 月～6 月に GII.6 の新しい変異株が多数検出された。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一つと考えられた。期間中に検出された GII.2 は、ポリメラーゼ領域と capsid 領域の間で遺伝子組み換えを起こした GII.P16-GII.2 のキメラウイルスであった。また、GII.3 は GII.P12-GII.3、GII.14 は GII.P7-GII.14 のキメラウイルスであった。愛媛県では過去に検出例がない GII.17 が 2015 年 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(HRV)、アストロウイルス(AsV)、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。過去の事

例から NoV の流行は、変異株の出現と関連しており、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、愛媛県において感染性胃腸炎患者検体から検出された NoV の分子疫学的解析を行った。

### B. 研究方法

## 1. 材料

2012年10月～2015年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1,260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プローブを用いたリアルタイムPCR法(J.Clin.Microbiol 41, 2003)で行った。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法で行った。AsV検出は左近らのRT-PCR法で実施した。

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ス法により決定し、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領域を増幅し、塩基配列を決定した後、両領域の系統樹解析を実施した。また、GII.4では、さらに、カプシドP1/P2領域、GII.6ではカプシド全長領域の解析を実施した。

(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。2012年11月～12月の患者報告数は、2006年に次いで多かったが、同時期の2013年～2015年の患者数は、2012年に比べ少なかった。一方、2014年5月～6月の患者報告数は2006年以降で最も多かった。また、2015年6月～7月の患者報告数も例年に比べ多かった。

### 2. 感染性胃腸炎患者からのウイルス検出状況

1,260名の患者検体から625例(49.6%)のウイルスが検出された。NoVが339例(54.2%)で最も多く、次いでSaVが153例、HRVが76例、AsVが41例、アデノウイルス(AdV)が16例であった。検出されたNoVの内訳は、GIIが278例(82.0%)、GIが61例(18.0%)で、GIIが圧倒的に多かった。

表1に月別のウイルス検出状況を示す。NoV、SaVともほぼ年間を通して検出されたが、NoV GIIは主に冬季に、NoV GIは主に2013年の春～夏、2015年の夏に検出された。SaVは2013年11月～12月と2015年6月～7月に検出数が増加し、HRVは年により若干異なるが、主に3月～6月に検出された。

### 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 339例のうち解析が可能であった307例(GI 53例、GII 254例)について遺伝子型別を行った。その結果、GIは4種類、GIIは9種類の遺伝子型が確認された。GIの内訳は、GI.3が32例、GI.6が17

例、GI.2 が 3 例、GI.4 が 1 例であった。GII の内訳は、GII.4 が 91 例(35.8%)で最も多く、次いで GII.2 が 54 例、GII.3 が 41 例、GII.6 が 38 例、GII.17 が 14 株、GII.14 が 8 例、GII.13 が 4 例、GII.7 及び GII.12 が各 2 例であった。

NoV の遺伝子型別の月別及びシーズン別検出状況を図 2、図 3、図 4 に示す。

GI.6 が 2013 年 7 月をピークとして 3 月～8 月に、GI.3 が 2015 年 6 月をピークとして 5 月～8 月に検出された。GII では、2012 年 11 月～12 月に GII.4、2013 年 8 月～12 月に GII.2、2014 年 4 月～6 月に GII.6 の検出数がそれぞれ増加した。また、2015 年 2 月～4 月に愛媛県では初めて GII.17 が検出された。

2012/2013 シーズンは 9 種類(GII : 7 種類、GI : 2 種類) の遺伝子型が確認された。GII.4 が全体の 45.4% を占め、次いで GII.2、GI.6 が多かった。2013/2014 シーズンは、8 種類(GII : 4 種類、GI : 4 種類)確認され、その内 GII.2 と GII.6 で全体の 66.0% を占めていた。2014/2015 シーズンは、5 種類(GII : 3 種類、GI : 2 種類)で、全体の 37.2% が GI.3 であった。2015/2016 シーズンでは、4 種類(GII : 3 種類、GI : 1 種類)の遺伝子型が確認され、GII.4、GII.3 の検出数が多かった。

#### 4. NoV GI の遺伝子解析

カプシド N/S 領域の系統樹解析を行った結果を図 5 に示す。GI.3 及び GI.6 の大部分は、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。

#### 5. NoV GII.4 の亜型の検出状況

検出された GII.4 株について、カプシド N/S 領域に加え、ポリメラーゼ領域及びカプシド P1/P2 領域の系統樹解析によ

る亜型の型別を行い、その結果を表 2 に示す。2014/2015 シーズンに検出された GII.4 の 16 例中 5 例は 2006b タイプであったが、調査期間中に検出されたその他の GII.4 は、すべて GII.4/Sydney/NSW0514/2012/AU と高い相同性を示す Sydney2012 タイプであった。

#### 6. GII.4 以外の NoV 遺伝子解析

N/S 領域による遺伝子解析で GII.2、GII.3、GII.12、GII.14 および GII.17 に型別された株のポリメラーゼ領域の系統樹解析の結果を図 6 に示す。N/S 領域で GII.2 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.16 に分類され、GII.P16-GII.2 のキメラウイルスであることが明らかになった。GII.3 の株は、ポリメラーゼ領域ではすべて GII.12 に分類され、同様に GII.14 の株は GII.7 に、GII.12 の株は GII.g にそれぞれ分類され、GII.P12-GII.3、GII.P7-GII.14、GII.g-GII.12 のキメラウイルスであった。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。

2013 年 11 月～2014 年 7 月に多く検出された GII.6(33 例)の N/S 領域での分類結果を図 7 に示す。この間に検出された GII.6 は、2 つのグループに分かれた。1 つは、2009 年流行株と同じグループに分類され、11 月～1 月に 6 例検出されたが、大部分(27 例)はこれらとは別のグループに分類され、2014 年 4 月～6 月を中心に 1 月～7 月に検出された。これら 2014 年の主流株と過去に検出された

GII.6 について、カプシド全長領域(図 8) 及びポリメラーゼ領域(696 塩基)(図 9)の系統樹解析を行い詳細に検討した。その結果、カプシド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、GII.6\_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 8)。

11 月~1 月の検出株は、ポリメラーゼ領域においてもカプシド領域と同様に 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、ポリメラーゼ領域においても 99.3~100%と近縁であったが、カプシド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 月の検出株と 95.8~97.0%の相同性を示した(図 9)。

#### D. 考察

感染性胃腸炎の原因ウイルスの 54.2%は NoV であった。そのうち 18.0%が GI で、NoV 胃腸炎における GI の関与は低いと考えられるが、2015 年 6 月~8 月に GI.3 が多数検出された。これらの GI.3 は塩基配列の相同性が高く、この時期に、近縁な GI.3 の地域流行があったものと推察された。また 6 月~7 月には SaV や AsV 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、2015 年 6 月~7 月の感染性胃腸炎患者数が例年よりも多くなった原因の一つと考えられた。

NoV GII では、GII.4、GII.2、GII.3、GII.6、GII.17、GII.14 の検出数が多かった。遺伝子解析の結果、GII.4 は、

2014/2015 シーズンに 2006b タイプが 5 例検出されたが、その他はすべて Sydney 2012 タイプであった。Sydney 2012 タイプは、2012/2013 シーズンの全国流行以降、それまでの主流行タイプであった 2006b に代わり、GII.4 の主流になっていることが示唆された。

GII.6 は 2013/2014 シーズンに感染性胃腸炎から 33 例検出され、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 月に検出された 27 例は塩基配列の相同性が高く、この時期に、近縁な GII.6 の地域流行があったことが示唆された。これらの株は、ポリメラーゼ領域では 2009 年流行株に最も近縁(相同性 95.8~97.0%)であり、カプシド領域では Saitama/U16/JP に近縁であったことから、ポリメラーゼ領域とカプシド領域の間で遺伝子組換えを起こした新しい変異株であると考えられた。2014 年 5 月~6 月の感染性胃腸炎患者報告数が 2006 年以降の 10 年間で最も多く、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一つであると考えられた。

調査期間中に検出されたカプシド N/S 領域が GII.2、GII.3、GII.14 の株は、ポリメラーゼ領域がそれぞれ、GII.16、GII.12、GII.7 であったことから、ポリメラーゼ領域とカプシド領域の間で遺伝子組み換えを起こしたキメラウイルスであることが示された。

愛媛県では過去に検出例のない GII.17 が、2015 年 2 月~4 月に集中して検出された。これらの株は、N/S 領域、

ポリメラーゼ領域とも近縁であり、また、GII.P17-GII.17/Kawasaki308 と高い相同性を示したことから、Kawasaki308 と近縁な GII.17 による地域流行がこの時期にあったものと推察された。しかし、感染性胃腸炎患者数の増加は見られていないことから、GII.17 の流行は広範囲に及んでいなかったか、あるいは GII.4 等の遺伝子型の NoV に比べて症状が軽いか不顕性感染が多い可能性が示唆された。

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ながら地域流行を起こしていることから、NoV の流行を把握し食中毒等集団発生を予防するためには、NoV の遺伝子解析による変異株の継続的監視及び新たに出現した GII.17 による胃腸炎の病態解明が必要であると考えられる。

#### E. 結論

1. 2015 年 6 月～8 月の夏季を中心に近縁な GI.3 の地域流行が見られ、また、6 月～7 月に SaV、AsV の検出数がそれぞれ増加した。このことが、6 月～7 月の感染性胃腸炎患者数増加の原因の一つと考えられた。
2. 2012/2013 シーズンに流行が見られた GII.4 は、すべて GII.4/Sydney/NSW0514/2012/AU と近縁な GII.4 の新しい変異株であった。この Sydney 2012 タイプが、それ以降、GII.4 の主流行タイプとなっていた。
3. 2014 年 5 月～6 月に GII.6 の新しい変異株が多数検出された。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一つと考えら

れた。

4. 愛媛県では過去に検出例のない GII.17 が 2015 年 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。
5. 調査期間中に検出されたカプシド N/S 領域が GII.2、GII.3、GII.12、GII.14 の株は、すべてキメラウイルスであった。

#### 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



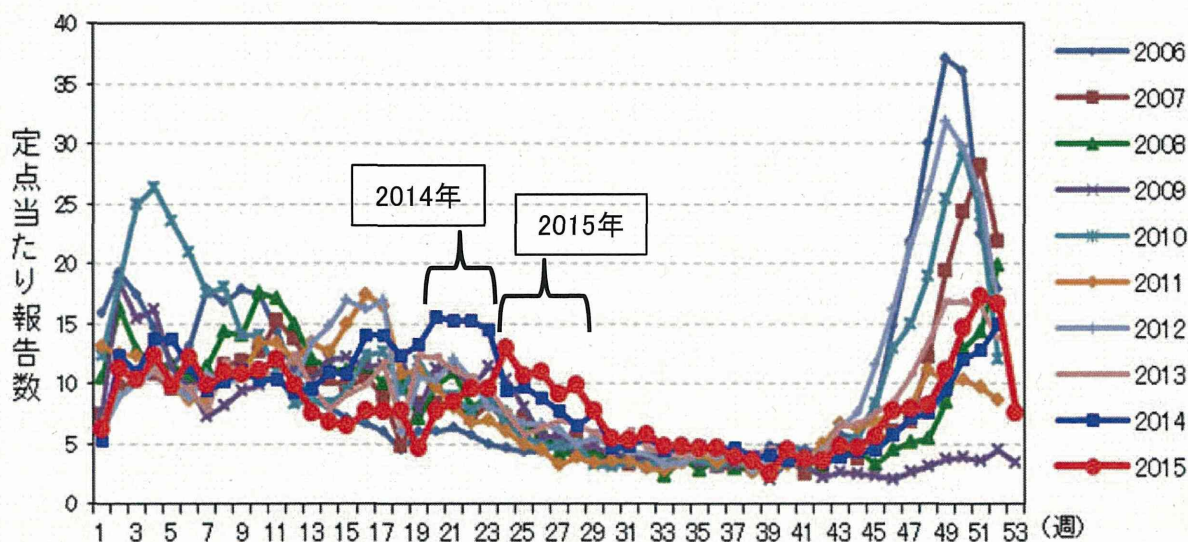


図1 感染性胃腸炎患者の週別発生状況

表1 月別ウイルス検出状況

シーズン	2012/2013												2013/2014												2015/2016												2015/16																											
年	2012			2013									2014												2015																																							
月	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12																									
NoV GI			1	1		1	2	2	4	6	1						2																								1	1	1	4	18	7	7																	
NoV GII	1	20	19	9	5	6		10	4		5	9	12	19	14	14	20	3	6	15	8	1					3	10	6	10	15	5	1		1								5	22																				
SaV	2	5	5	5	5	3	8	5			1	1		10	18	1	4	2	5	6	2	3	1			2	3	8	1	5	4	5	20	10			1				1	1																						
HRV				5	4	7	7	4	2							1		18	4									2		1	8	2	2									5	4																					
AsV																1	1		12	5	1																																											
AdV				1								1	1			1						1	1					1	2	1																																		

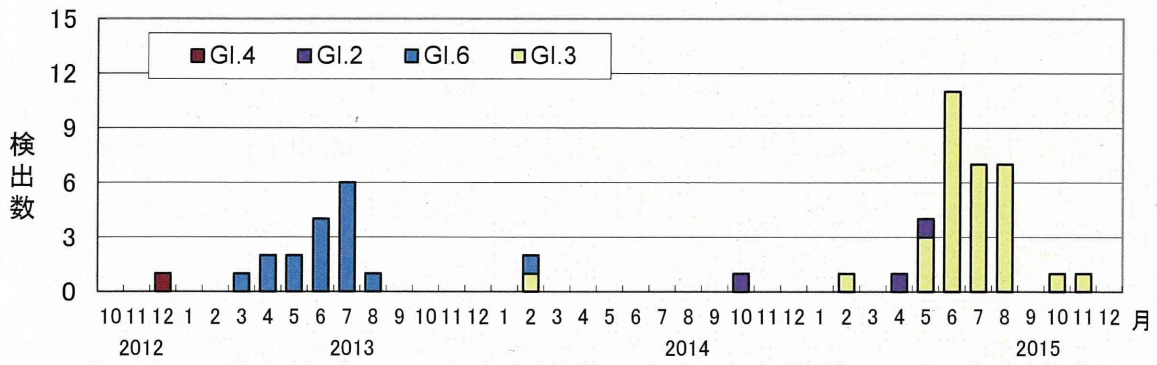


図2 NoV GI の月別遺伝子型別検出状況

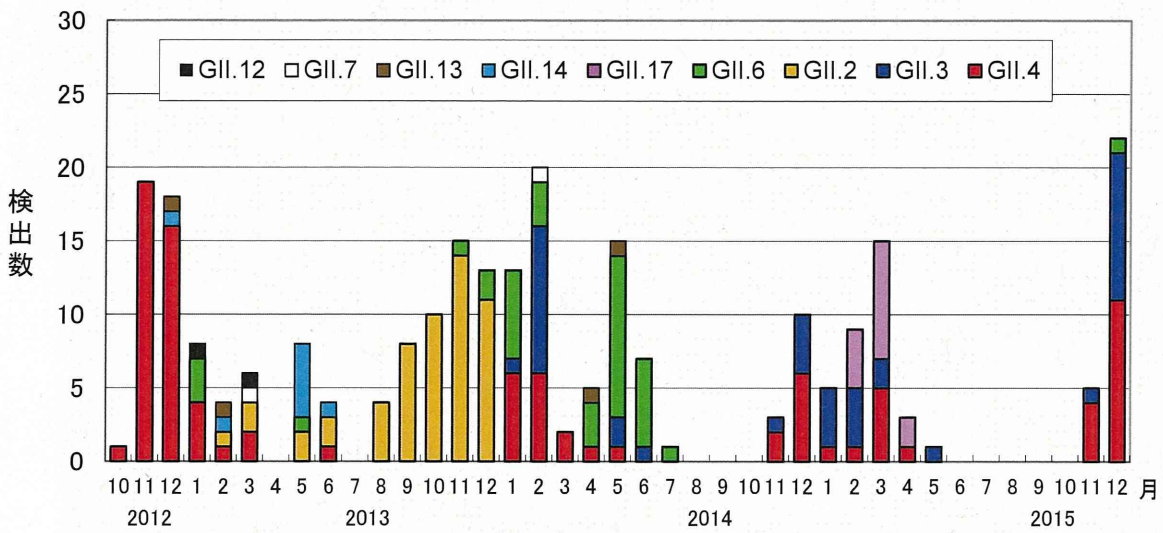


図3 NoV GII の月別遺伝子型別検出状況

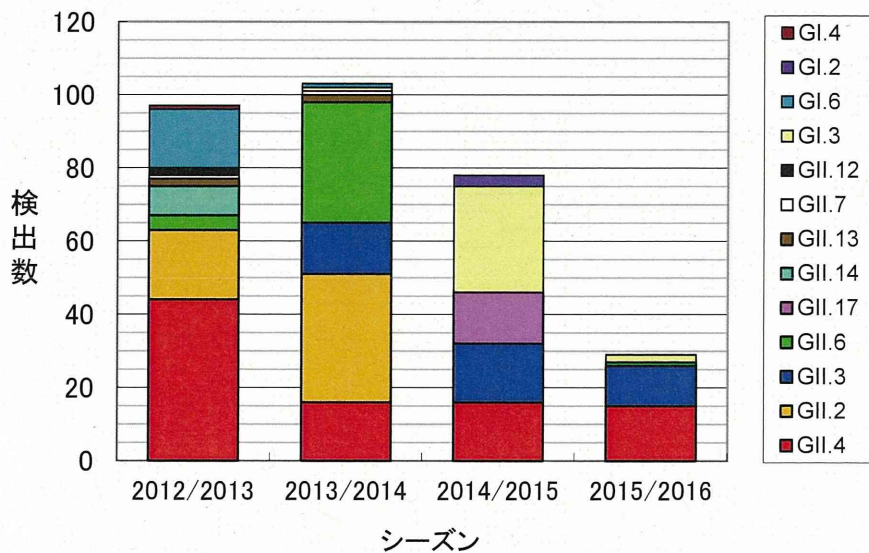


図4 シーズン別 NoV遺伝子型別検出状況

表2 NoV GI.4の亜型の推移

シーズン	2012/2013	2013/2014	2014/2015	2015/2016
Sydney2012	44	16	11	15
2006b			5	
計	44	16	16	15

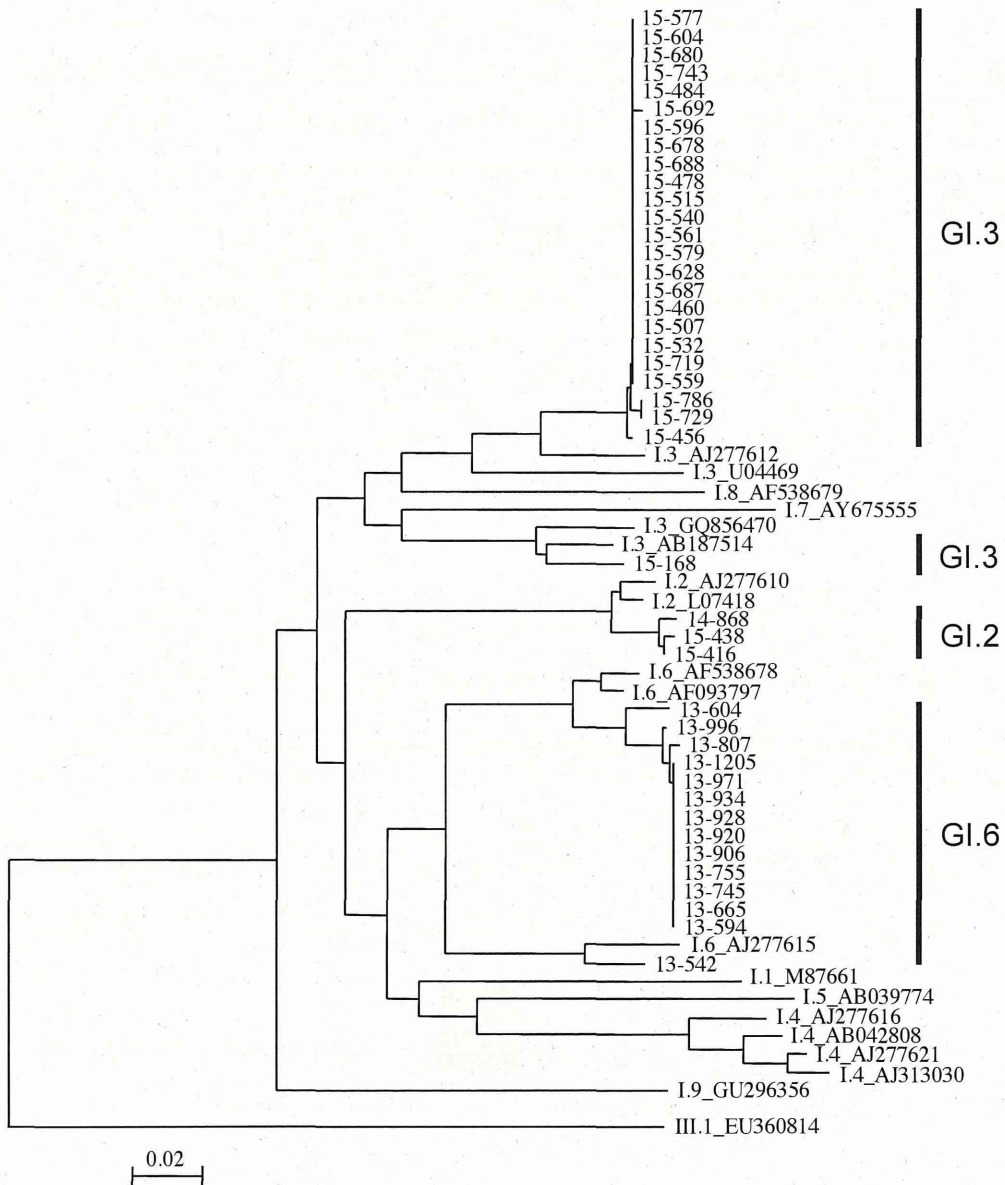


図5 NoV GI のカプシドN/S領域の系統樹(291bp)



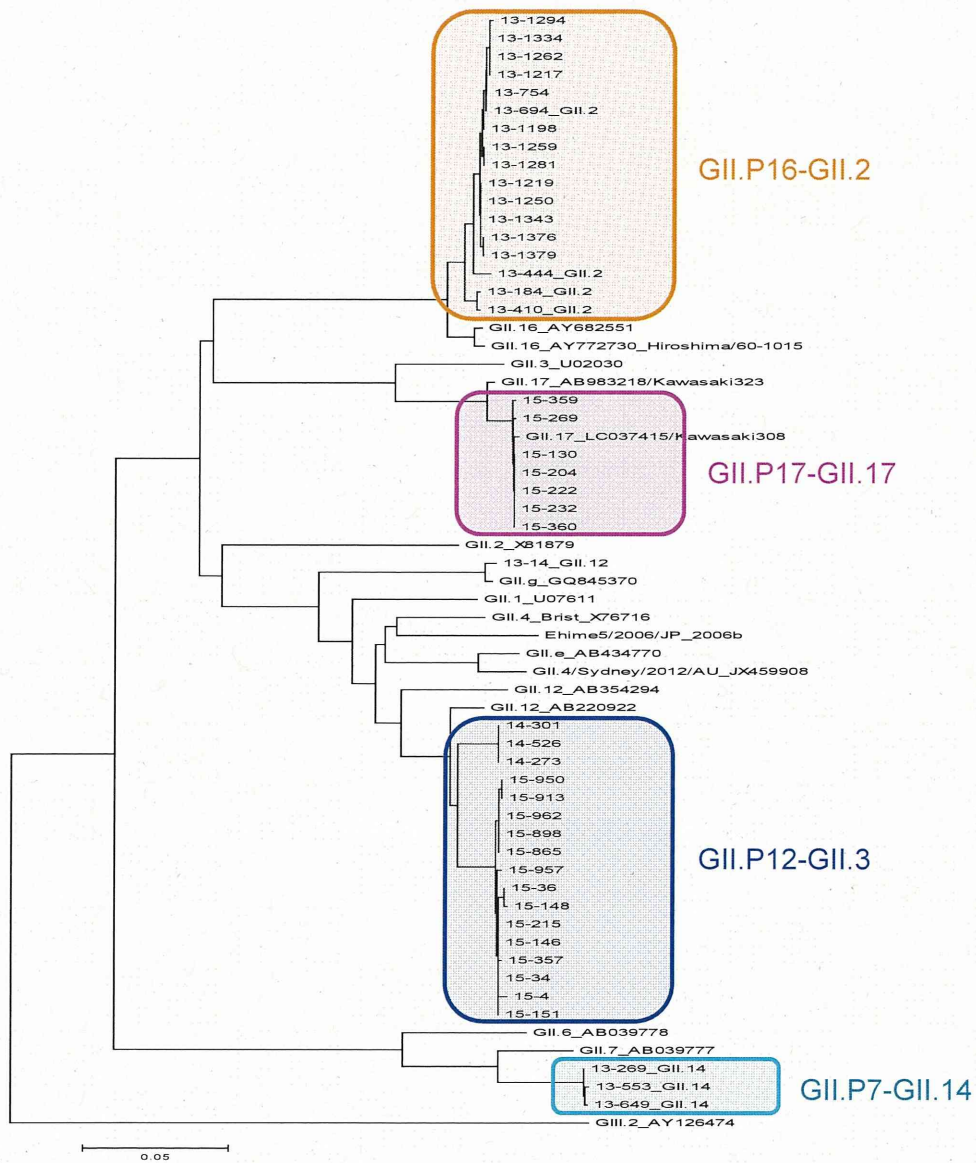


図6 NoV GII のポリメラーゼ領域の系統樹(660bp)

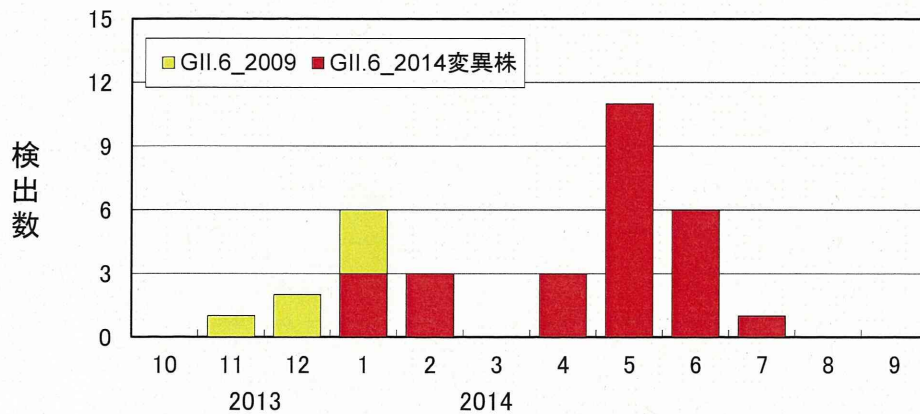


図7 NoV GII.6 変異株の検出状況

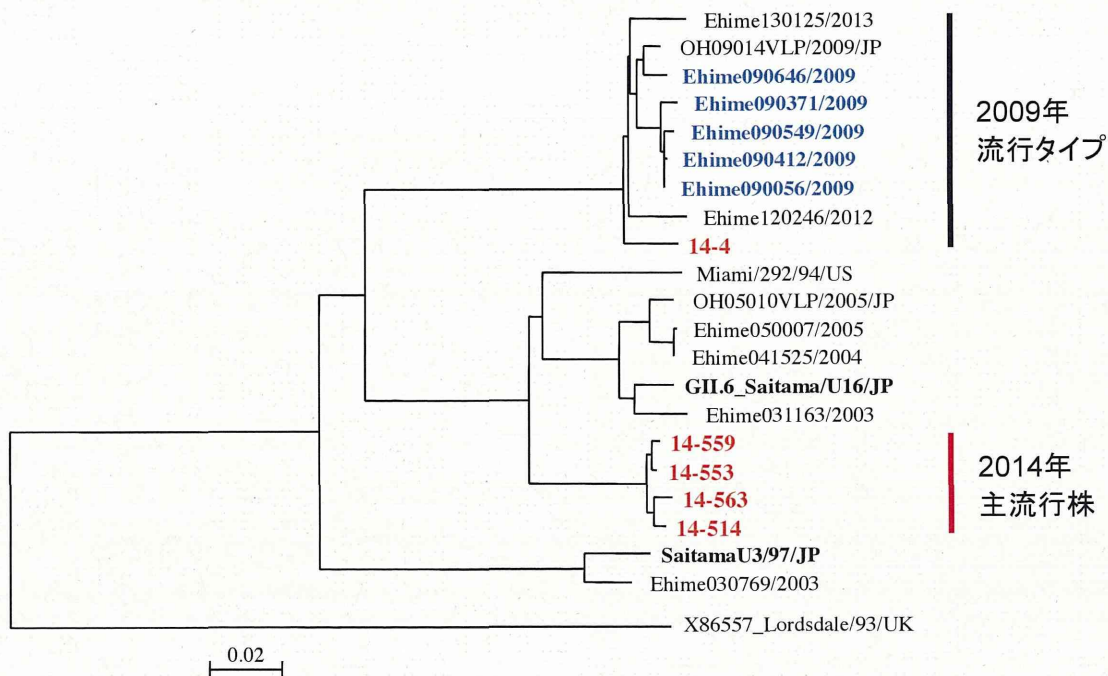


図8 NoV GII.6 のカプシド全長領域の系統樹

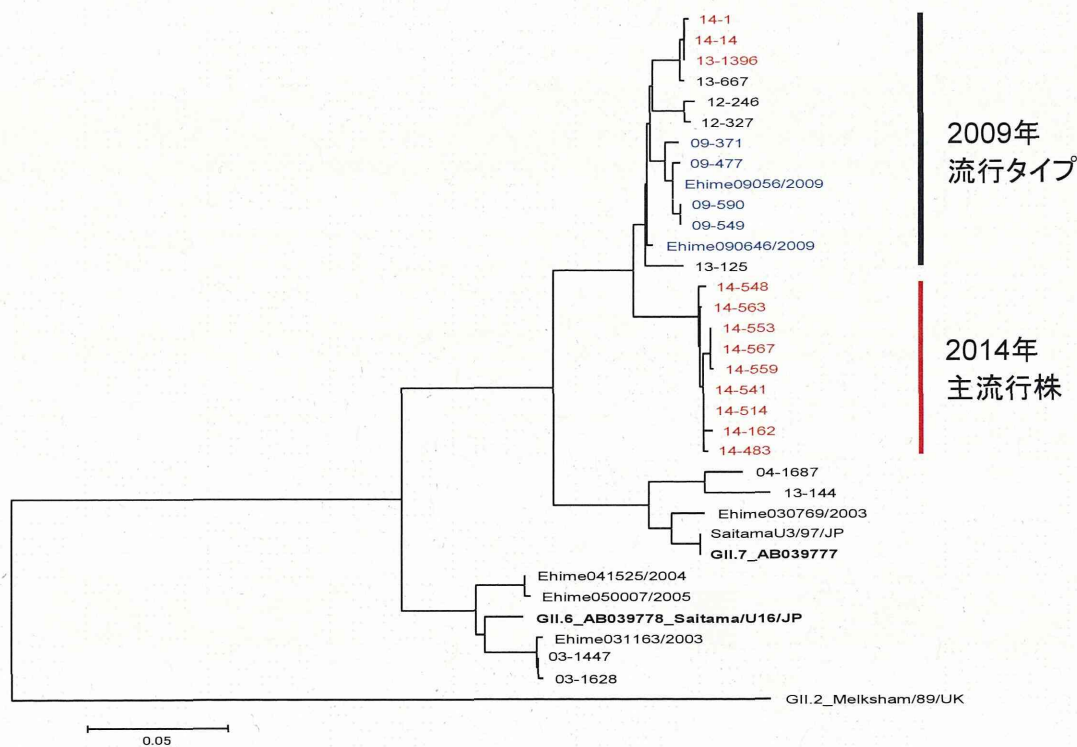


図9 NoV GII.6 のポリメラーゼ領域の系統樹(696bp)

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)

## 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からの NoV 検出を行った。流入水は 52 検体、市販カキは 18 ロット 54 検体を材料とした。流入水調査の結果、例年 11 月頃から翌年 7 月頃まで  $10^6$  コピー/L を超える NoV が検出された。市販カキの調査の結果、最大 60,861 コピー/中腸腺 1g の NoV が検出され、加熱調理用は 100%、生食用は 67%の割合で NoV が検出された。流入水調査は市中の流行状況の把握、2 月の市販カキ調査は流行株の予測に有用であることが示唆された。

### 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 の生活環境の一つとして、感染者の便中に排出された後、下水から海水に至り、貝類に蓄積し、再びヒトに感染する一連の循環が知られている。

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 2015 年 10 月までの期間に、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 回採取した流入水合計 52 検体を用いた。

市販カキは 2013 年、2014 年および 2015 年のそれぞれ 2 月に県内で購入した 18 ロット 54 検体を材料とした。産地は A 県産 (海域番号: 10 または 20 または 30) が 16 ロット、C 県産 (海域番号: 2) および G 県産 (海域番号: 2) がそれぞれ 1 ロットであった。カキの区分は生食用が 12 ロット、加熱調理用が 6 ロットであった。

#### 2. 終末処理場流入水からの NoV 検出法

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°C 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、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 検出法

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、 $\alpha$ -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 $\mu$ L で再浮遊させ、RNA 抽出を行った。RNA 抽出および 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 および

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、EmeraldAmp PCR Master Mix (Takara) により、COG1F/G1SKR および COG2F/G2SKR プライマーセットによる 1stPCR、G1SKF/G1SKR および 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. NoV 遺伝子型の決定法

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、3500x1 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。決定した塩基配列は NoroNet 上の Norovirus Typing Tool (<http://www.rivm.nl/en/Topics/N/NoroNet>)を用いて解析した。

(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

流入水からの NoV 検出結果を図 1 に示した。NoVGI の最大値は、2014 年は 2 月の  $5.9 \times 10^4$  コピー/L (B 終末処理場)、2015 年は 5 月の  $2.1 \times 10^7$  コピー/L (A 終末処理場)であった。また、NoVGII の最大値は、2014 年は 4 月の  $7.7 \times 10^6$  コピー/L (B 終末処理場)、2015 年は 2 月の  $4.1 \times 10^7$  コピー/L (A 終末処理場)であった。

### 2. 市販カキからの NoV 検出

市販カキからの NoV 検出結果を図 2 に示した。18 ロット中 14 ロットから NoV

が検出された。市販カキの区別では、加熱調理用は6ロット中6ロット(100%)、生食用は12ロット中8ロット(67%)からNoVが検出された。中腸腺1g当たりのNoV量は最大で60,861コピーが検出された。遺伝子群別に比較すると、中腸腺に含まれるNoV遺伝子量の平均値はGIが212コピー/g、GIIが6412コピー/gであり、NoVGIIが約30倍有意に多かった( $P < 0.01$ , Mann-Whitney U検定)。カキの区別にNoV量を比較すると、加熱調理用が5634コピー/g、生食用が2691コピー/gであり、加熱調理用が約2倍有意に多かった( $P < 0.05$ , Mann-Whitney U検定)。

カキから検出されたNoVの遺伝子型を表に示した。2013年はGII.4 Sydney\_2012が4ロット、GII.6が2ロット、GI.4、GII.2、GII.13、GII.14、GII.17がそれぞれ1ロットから検出された。2014年はGII.4 Sydney\_2012、GII.6、GII.13がそれぞれ3ロット、GII.14が2ロット、GI.3、GI.4、GI.7、GII.3がそれぞれ1ロットから検出された。2015年はGII.17が6ロット、GI.3、GII.3がそれぞれ2ロット、GI.1、GI.2、GI.4がそれぞれ1ロットから検出された。

#### D. 考察

福岡県における発生動向調査事業および食中毒の発生状況から、2012/13シーズンは10月から翌3月までGII.4\_sydney 2012が流行したことが明らかになっている。また、2013/14シーズンは1月をピークに9月から翌年4月までGII.4\_sydney 2012およびGII.6が検出された。2014/15シーズンはGII.4\_sydney 2012、GII.6、およびGII.3などのNoVGIIが報告され、

12月から5月にかけてNoVGI.3も報告された。

流入水中のNoVを定量した結果、2013/14シーズンはNoVGIIが9月から翌7月まで $10^6$ コピー/Lから $10^7$ コピー/L程度が検出され、NoVGIは1月から7月まで $10^4$ コピー/L程度が検出された。2013/14シーズンはNoVGIが流行していないため、非流行期の流入水中のNoV量は $10^4$ コピー/L以下であり、流行期のNoV量は $10^6$ コピー/L以上であることが示唆された。流入水から検出された最大値はGI、GIIともに $10^7$ コピー/Lを超えており、流行期の流入水に含まれるNoV量について遺伝子群の差はないと考えられる。2014/15シーズンは市中の流行と同様に、シーズン前半はNoVGIIが、後半はNoVGIが流行したことが流入水調査からも示唆されたことから、流入水調査は市中のNoV流行を把握する有用な方法であると言える。

市販カキ18ロットからNoVの検出を行った結果、NoVの遺伝子群別ではNoVGIIがNoVGIより約30倍多かった。この要因として、2012/13シーズンおよび2013/14シーズンはNoVGIがほとんど市中に流行しておらず、NoVGIIの流行が主であったことが考えられる。また、市販カキの区別に汚染率を見ると、生食用より加熱調理用のほうが、汚染率が高いことが示されたが、中腸腺に含まれるNoV量の差は約2倍しかなく、生食用のカキも喫食により食中毒の発生リスクがあることが示唆された。また、カキから検出されたGII.4 Sydney\_2012、GII.6、GII.17は市中における主な流行遺伝子型であったことから、2月の市販カキに蓄積されるNoV



とそのシーズンの主流株は一致することが示唆された。一方で、GI 遺伝子群や GII.13 および GII.14 のように市中での検出が稀な遺伝子型もカキに含まれていることから、比較的小規模な流行または不顕性感染を引き起こす NoV が環境中に存在し、カキに濃縮されていると考えられた。

NoV の生活環の一つは、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。本研究の結果から、NoV 胃腸炎の感染拡大の防止は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重要であると考えられる。

#### E. 結論

・流入水中の NoV 調査はヒトでの流行状況を反映し、流行の指標となるデータを得られる有用な方法であると考えられた。  
・2月の市販カキはそのシーズンに流行する NoV が蓄積されており、カキ中の NoV を解析することにより、流行の早期探知、流行株の予測につながると考えられた。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし

2. 学会発表

吉富秀亮, 芦塚由紀, 野田衛: 市販カキから検出されたノロウイルス GII.17 の分子疫学解析, 第36回日本食品微生物学会, 川崎市, 11月13日, 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

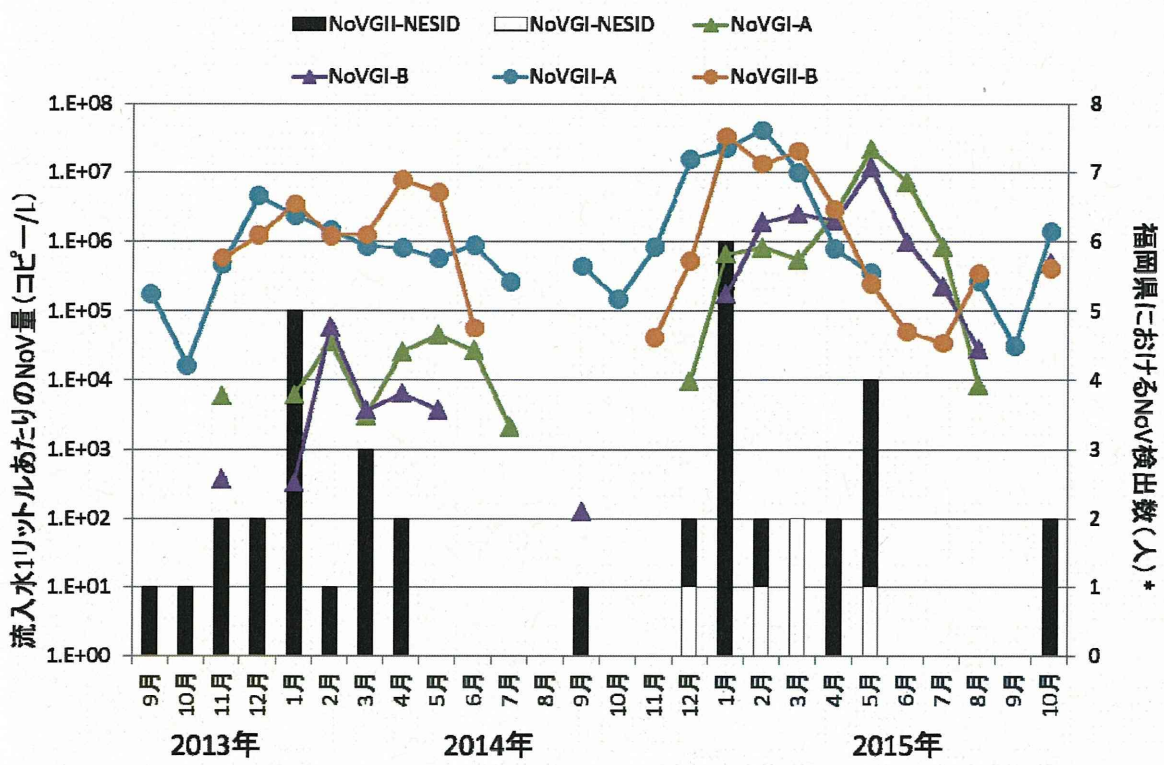


図1 流入水中ノロウイルス量の推移および市中の流行状況  
 なお、患者からの NoV 検出数は NESID データを引用した

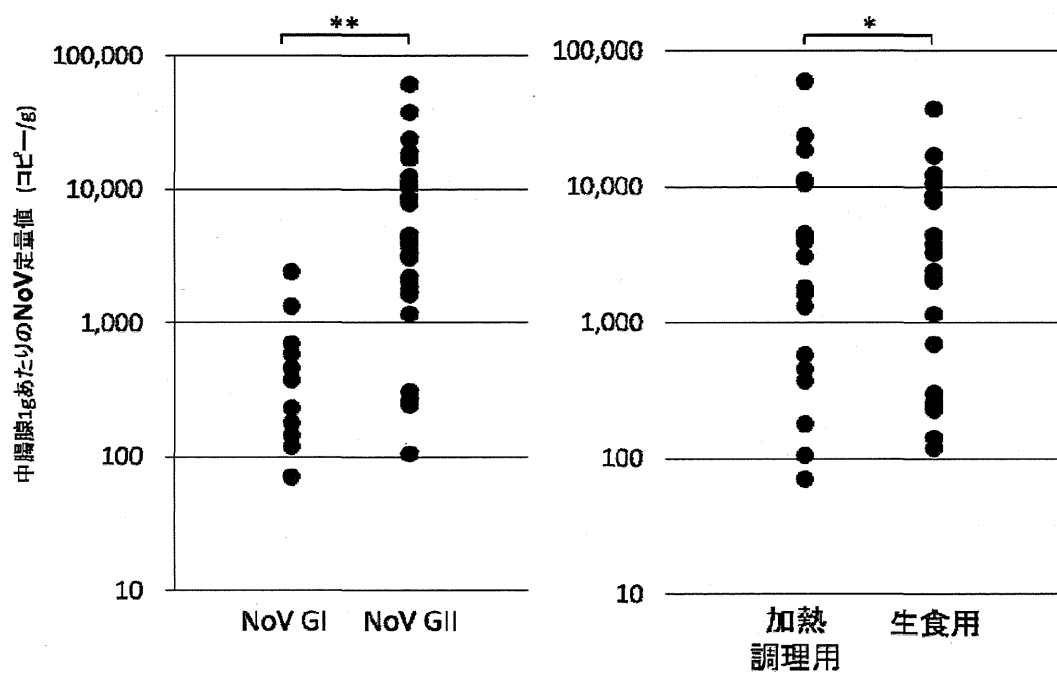


図2 カキ中腸腺に含まれる NoV 量の比較

A) NoVGI と NoVGII の比較、B) 加熱調理用カキと生食用カキの比較

\* :  $P < 0.05$  , \*\* :  $P < 0.01$  , Mann-Whitney U test

表 市販カキ一覧および検出された NoV の遺伝子型

検体種別	購入年	消費期限日	産地	遺伝子型	
				GI	GII
1 生食用	2013	2月23日	A県		GII.2, GII.4 Sydney_2012
2 "		2月22日	"		GII.4 Sydney_2012
3 "		2月22日	"		GII.6
4 加熱調理用		2月22日	"	GI.4	GII.4 Sydney_2012, GII.14, GII.17
5 "		2月21日	G県		GII.4 Sydney_2012, GII.6, GII.13
6 生食用		2月23日	C県		
7 "	2014	2月6日	A県		
8 "		2月7日	"		
9 "		2月9日	"		
10 加熱調理用		2月10日	"	GI.3, GI.4	GII.3, GII.4 Sydney_2012, GII.6, GII.13, GII.14
11 "		2月15日	"		GII.4 Sydney_2012, GII.6, GII.13
12 生食用		2月15日	"	GI.7	GII.4 Sydney_2012, GII.6, GII.13, GII.14
13 加熱調理用	2015	2月14日	"	GI.4	GII.3, GII.17
14 "		2月13日	"	GI.2	GII.17
15 生食用		2月4日	"	GI.1	GII.17
16 "		2月11日	"	GI.3	GII.17
17 "		2月11日	"	GI.3	GII.3, GII.17
18 "		2月9日	"		GII.17

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)

## 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 ノロウイルス、サポウイルスによる集団・散発事例の分子疫学解析

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	原田 誠也	熊本県保健環境科学研究所
研究協力者	西村 浩一	熊本県保健環境科学研究所
研究分担者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

### 研究要旨

熊本県内で市販されている生カキのノロウイルス (NoV) の検査及び下痢症の散発・集団発生事例から検出された NoV 並びにサポウイルス (SaV) の遺伝子解析を行った。

2014 年 2 月、11 月及び 2015 年 2 月に採取された生食用及び加熱調理用生カキ 9 ロットのうち、8 ロットから NoV 遺伝子が検出された。中腸腺 1g あたりの NoV 遺伝子量は、最小 894 コピー、最大 28,669 コピーであり、遺伝子型は、GII. 4、GII. 17 など合計 11 種類であった。生カキから検出された主な遺伝子型は、カキを採取した時期にヒトの間で流行していた遺伝子型と同じであったことから、カキの NoV 蓄積とヒトでの NoV 流行状況に関連性があることが示された。生食用カキからも NoV 遺伝子が検出されており、NoV に起因した生食用カキによる食中毒をどのようにして防止するかが今後の課題であると考えられた。

2012/13 シーズンから 2014/15 シーズンに熊本県内で下痢症の散発・集団発生事例から検出された NoV 及び SaV の遺伝子解析を行ったところ、NoV の遺伝子型は GI. 3、GII. 4、GII. 7、GII. 17 など合計 11 種類であり、SaV の遺伝子型は GI. 1、GI. 2 など合計 7 種類であった。NoV の主要な遺伝子型は GII. 4、SaV の主要な遺伝子群は GI であり、同シーズンに全国的に流行した遺伝子型または遺伝子群が熊本県でも流行していたことが分かった。

### A. 研究目的

カキを原因とするノロウイルス (NoV) 食中毒防止対策に資するため、熊本県内で市販されている生カキの NoV 汚染状況

調査を行った。

また、NoV 及び SaV は冬季を中心に流行する感染性胃腸炎の主要な原因ウイルスであり、流行期に入ると感染の機会が増

加し、特に食品を取扱う者が感染すると、食品を介しての下痢症の集団発生（食中毒）の原因となり得る。そこで、NoV 及び SaV の流行状況を把握し、流行予測や予防対策に寄与することを目的に、熊本県内で発生した下痢症の散発・集団発生事例の調査及び分子疫学解析を行った。

## B. 研究方法

### 1. 材料

#### 1) カキ

2014年2月、11月及び2015年2月に採取された生食用カキ5ロット16検体、加熱調理用生カキ4ロット13検体を検査材料とした。

#### 2) 便

2012/13 シーズンから 2014/15 シーズン(2012年9月から2015年8月)の間に、熊本県内で発生した下痢症の散発 288 事例、集団 59 事例 (507 検体) を検査材料とした。

### 2. 方法

#### 1) カキの NoV 検査

1 検体あたり 1.5g 以上の中腸腺を PBS(-) で 10% 乳剤とし、 $\alpha$ -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) を用いてウイルス RNA を抽出 (抽出過程で DNaseI を用いた非加熱処理) し、PrimeScript (TaKaRa) を用い

て 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-time PCR 法により NoV 遺伝子の定量 (実測値  $\geq 10$  を陽性と判定) を行った。また、Nested RT-PCR 法により Cap 領域を増幅し、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定した。

#### 2) 便の NoV 検査

便 0.1g を PBS(-) で 10% 乳剤とし、10,000rpm、10 分、4°C で遠心分離後、遠心上清からウイルス RNA を抽出し、DNase 処理 (加熱処理)、cDNA 合成を行い、Real-time PCR 法で NoV のスクリーニングを行った。NoV 陽性検体について Nested RT-PCR 法により Cap 領域を増幅し、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定した。系統樹は MEGA を用い、NJ 法で作成した (集団事例は一部の検体について実施)。また、GII.17 が検出された株は、RdRp 領域 (国立感染症研究所の木村らが開発した方法) についても塩基配列を決定し、系統樹解析を行った。

#### 3) 便の SaV 検査

上記と同じ方法で cDNA 合成までを行い、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て、Cap 領域及び Pol 領域をターゲットとする RT-PCR 法で SaV のスクリーニングを行った。SaV 陽性検体について、Cap 領域は Kitajima ら (A. Envi. Microbiol. ; 76, 2461-2467, 2010) 及び Pol 領域は大阪市立環境科学研究所の入谷が開発したプライマーを用いて再度 RT-PCR 法を行い、ダイレクトシーケンス法で塩



基配列を決定し、系統樹を上記と同じ方法で作成した（集団事例は一部の検体について実施）。

（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. 市販カキの検査結果

市販カキからの NoV の検出状況を表 1 に示した。生食用カキ 5 ロット 16 検体中 2 ロット 2 検体及び加熱調理用生カキ 4 ロット 13 検体中 3 ロット 8 検体が NoV 陽性となり、中腸腺 1g あたりの NoV 遺伝子量は、最小 894 コピー、最大 28,669 コピーであった。また、Real-time PCR 法で陰性と判定されたが、定量値が得られたもの（実測値<10）も含めて中腸腺 1g あたりの NoV 遺伝子量を算出した結果を表 2 に示した。生食用カキでは最小 165 コピー、最大 958 コピーであり、加熱調理用生カキでは最小 241 コピー、最大 28,669 コピーであった。

Real-time PCR 法で陰性、Nested RT-PCR 法で陽性となったケースや、Nested RT-PCR 法で陽性となったが塩基配列を決定できなかったケースがあり、最終的に塩基配列が決定できた株の遺伝子型は、GII. 17 が 8 検体、GII. 4 が 3 検体、GI. 3、GI. 4 が各 2 検体、GI. 2、GI. 7、GI. 9、GII. 3、GII. 6、GII. 13、GII. 21 が各 1 検体であった。

なお、GII. 17 の Cap 領域について、系統解析を行った結果、図 1 に示すように 2015 年 9 月に IASR で報告のあった

Kawasaki323 株（2014 年 3 月に川崎市で採取され検出された株）に近縁である株や、Kawasaki308 株（2015 年 2 月に川崎市で採取され検出された株）と完全に一致した株が検出された。

#### 2. 便の NoV、SaV 検査結果

散発 288 事例中 NoV 遺伝子が 81 事例、SaV 遺伝子が 15 事例、NoV+SaV 遺伝子（混合）が 5 事例から検出され、集団 59 事例（507 検体）中 NoV 遺伝子が 28 事例（183 検体）、SaV 遺伝子が 2 事例（6 検体）から検出された。

#### 3. 便から検出された NoV の型別及び系統解析

NoVGI 及び GII における Cap 領域の系統樹をそれぞれ図 2 及び 3 に示した。Cap 領域の系統解析の結果、NoV の遺伝子型は図 4 に示したように GII. 4、GII. 6、GII. 7 など合計 11 種類であった。さらに、GII. 4 及び GII. 17 について詳しく系統解析を行ったところ、GII. 4 は図 5 に示すように 2006b 亜型、2012 亜型に分けられ、GII. 17 は図 6 に示したとおり、Kawasaki308 株または Kawasaki323 株に近縁である株が大半を占め、大きく 3 つのグループ分けられた。

Cap 領域の主な遺伝子型の株間の塩基配列の相同性は、GI. 3 が 99.7~100%、GI. 6 が 97.3~100%、GII. 4 (2006b) が 99.6~100%、GII. 4 (2012) が 99.3~100%、GII. 17 が 98.9~100%であり、それぞれの参照株との塩基配列の相同性は、Desert 1990 株 (GI. 3) とは 89.8~90.1%、Hesse98 株 (GI. 6) とは 96.1~96.4%、Den Haag 2006b 株 (GII. 4) とは 99.2~99.6%、Sydney 2012 株 (GII. 4) とは 99.0~100%、

Kawasaki308 株 (GII. 17) とは 98.9~100% であった。

一方、GII. 17 の RdRp 領域の系統解析では、図 7 に示すように、Cap 領域の場合と同様に 3 つのグループに分けられた。RdRp 領域の GII. 17 の株間の塩基配列の相同性は、98.6~100% であり、Kawasaki308 株とは 98.5~99.7% であった。

#### 4. SaV の型別及び系統樹解析

Cap 領域または Pol 領域の系統樹を図 8 及び 9 に示した。Cap 領域及び Pol 領域の系統解析の結果、図 10 に示したとおり SaV の遺伝子型は GI. 1、GI. 2 など合計 7 種類であった。

Cap 領域の主な遺伝子型の株間の塩基配列の相同性は、GI. 1 が 100%、GI. 2 が 99.8% であり、それぞれの参照株との塩基配列の相同性は、Manchester 株 (GI. 1) とは 98.9~100%、Potsdam 株 (GI. 2) とは 95.8~95.9% であった。

また、Pol 領域の主な遺伝子型の株間の塩基配列の相同性は、GI. 1 が 96.1~100%、GI. 2 が 99.5~100%、であり、それぞれの参照株との塩基配列の相同性は、Manchester 株 (GI. 1) とは 92.9~93.1%、Potsdam 株 (GI. 2) とは 93.6% であった。さらに、Cap 領域と Pol 領域の遺伝子型は一致し、キメラウイルスは確認されなかった。

#### D. 考察

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た。加熱調理用生カキの方が生食用カキよりも NoV 遺伝子が検出される割合が大きく、中腸腺 1g あたりの NoV 遺伝子量が多かった。

また、2014 年 11 月に採取されたカキからは NoV が検出されず、2014 及び 2015 年の 2 月に採取されたカキのすべてのロットから NoV が検出された。これらのことから、環境中の NoV 調査は、生食用カキよりも加熱調理用生カキの方が適しており、ヒトで NoV が流行し始める 11 月頃よりも、NoV が流行し環境中に排泄されてカキに蓄積する 2 月頃に採取された生カキが適していることが示された。検出された NoV の遺伝子型は 2014 年では GII. 4、2015 年では GII. 17 の検出割合が大きかった。これらは、ヒトにおいて同時期に全国で流行していた遺伝子型と一致し (図 11)、カキの NoV 蓄積とヒトでの NoV 流行状況に関連性があることが示された。また、生食用カキからも NoV 遺伝子が検出されており、NoV に起因する生食用カキによる食中毒のリスクも皆無ではないことから、どのようにしてその発生を防止するかが今後の課題であると考えられた。

Real-time PCR 法及び Nested RT-PCR 法の 2 種類の方法を用いて検査したところ、Real-time PCR 法で陰性と判定された検体 (実測値<10) から Nested RT-PCR 法で陽性と判定されるケースがあった。特に、Real-time PCR 法で陰性と判定 (実測値<10) されたが、定量値を得られた検体 (0<実測値<10) において、Nested RT-PCR 法では高い割合で NoV 陽性と判定された。このことから、より感度の高い検査法の開発や判定基準の再検討を行う必要性が示唆された。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があった。カキの中腸腺には複数の遺伝子型が含まれ