

平成 28 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)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究協力報告

カキからのノロウイルス検出について

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	松室 信宏	広島市衛生研究所

研究要旨

2016/17 シーズンに採取されたカキのノロウイルス(NoV)浸淫状況を把握するとともに、ヒトから検出された NoV 遺伝子型との関連性を調べた。カキからは GII.17 のみが 3 ロットから検出され、それらは Hu/GII/JP/2015/GII.P17-GII.17/Kawasaki308 に近縁な株であった。ヒトからは、全国的に流行している GII.2 が最も多く 5 株検出された。RdRp 領域の解析ができた 2 株はいずれも GII.P16-GII.2 であり、それらは過去に検出された株とは違うクラスターを形成しており、ORF1-2 JCT 領域で組換えが起きた可能性が示唆された。

カキからの NoV 検出法の改良を試みた。阻害物質の除去を目的にアセトンを追加する方法を実施したところ、NoV 検出感度は従来法と同等あるいは若干高い結果であった。

A. 研究目的

カキ等の二枚貝はノロウイルス(NoV)による食中毒の主要な原因食品となっている。一方、カキが関連する食中毒事例から検出される NoV の遺伝子型は GI が比較的多いなど、必ずしも、ヒトで流行している遺伝子型や二枚貝以外の食中毒事例や集団感染事例から検出される遺伝子型と一致するわけではない。そのため、二枚貝から検出される NoV 遺伝子型とヒ

トから検出される遺伝子型に関するデータを蓄積することはカキ関連食中毒の予防や発生要因の解明に重要である。そこで、2016/17 シーズンに採取されたカキの NoV 浸淫状況を調べるとともに、ヒトから検出された NoV 遺伝子型と比較し、両者の関連性を明らかにすることを目的とした。

一方、カキからのウイルス検出検査において、カキに含まれるグリコーゲン等

の阻害物質が検出感度を下げていると考えられる。そこで、検査法を検討し、検出感度の向上を試みた。

B. 研究方法

1. 材料

2016年6月から2016年9月までにA県10海域で採取したカキ4ロット、2016年10月から2017年1月に採取された市販カキ(A県海域)7ロットおよび2016年9月から12月までにNoVが検出された糞便9検体を用いた。

2. 方法

1) カキからのNoV検出法

カキは中腸腺1~2gを1検体とし実施した。

(1) ウイルス濃縮

① アミラーゼ・ポリエチレングリコール(PEG)沈殿法

中腸腺をPBS(-)で10%乳剤とし、 α -アミラーゼ(和光純薬製)を添加した。37°C, 1時間消化した後、4°C, 10,000rpm, 20分間遠心し、上清を回収した。上清にPEG 6000を8%, NaClを2.1g/100mlとなるように添加した。4°Cで一夜静置し、4°C, 10,000rpm, 20分間遠心した。沈渣にDDWを500 μ l(沈渣が多い場合は1ml)添加し、再浮遊させた後、12,000rpm, 5分間遠心した。

② アミラーゼ・アセトン法

中腸腺をバイオマッシャーに入れ、等量のPBS(-)と α -アミラーゼを添加し粉碎・攪拌した。37°C, 1時間消化した後、PBS(-)と等量のアセトンを添加し、攪拌した。4°C, 3,000rpm, 5分間遠心し、3層の場合は中間層、2層の場合は上層の下

部を500 μ l分取した。

(2) NoV検出および遺伝子型別

前処理した検体を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(ライフテクノロジーズジャパン)およびOligo(dT)Primer(ライフテクノロジーズジャパン)を用いて行った。

増幅用プライマーは、Capsid N/S領域: 1st primer COG1F/G1SKR, COG2F/G2SKR, 2nd primer G1SKF/G1SKR, G2SKF/G2SKRを用い、semi nested PCRにより増幅し、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(ライフ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。

(3) α -アミラーゼの検出感度の比較

販売中止となった和光純薬製の α -アミラーゼ(015-03731)(以下、旧アミラーゼ)とその後販売された α -アミラーゼ(017-23671)(以下、新アミラーゼ)との検出感度をアミラーゼ・PEG沈殿法で濃縮し、得られたNoV cDNAの実測値コピー数および中腸腺1gあたりのコピー数に換算し比較した。

2) 糞便から検出されたNoV遺伝子型別

糞便はDDWで10%乳剤とし、12,000rpm, 5分間遠心した後、カキからのNoV検出法と同様に実施した。増幅用プライマーは、Capsid N/S領域: COG1F/G1SKR,

COG2F/G2SKR, RdRp 領域:P1/G2SKR を用いた。

(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 検出状況

カキからの NoV 検出状況を表 1 に示した。2016 年 6 月以降、6 月に GII.6, 7 月に GII.4 Sydney2012, 11 月, 12 月および 2017 年 1 月から GII.17 が各 1 ロットから検出された。

2016/17 シーズンにおけるヒトから検出された NoV 遺伝子型を表 2 に示した。GII.2 が 5 株, GII.4 が 2 株, GII.3 および GII.17 が各 1 株検出された。集団発生事例は 2 事例のみであったが、いずれも GII.2 が検出された。RdRp 領域の解析ができた 2 株の GII.2 はいずれも GII.P16-GII.2 であった。

VP1 領域(291nt)における NoV GII.17 の系統樹を図 1 に示した。3 ロットのカキおよび糞便 1 検体から検出された NoV はいずれも Hu/GII/JP/2015/GII.P17-GII.17/Kawasaki308 に近縁な株であった。

RdRp 領域(642nt, 213aa)における NoV GII 系統樹を図 2, 3 に示した。2016/17 シーズンに検出された 2 株は、広島市において 2011/12 シーズンから 2013/14 シーズンまでに検出された 7 株とは異なるクラスターに分類されており、入谷らが報告 (IASR Vol. 37p.136-138) した GII.P16-GII.4 Sydney2012 と同じクラスターに分類された。

2012/13 シーズン以降のカキおよびヒトからの NoV 遺伝子型別検出割合を図 4 に示した。2015/16 シーズンを除く過去 3 シーズンは、カキおよびヒトから最も多く検出された遺伝子型が一致していたが、2016/17 シーズン(2017 年 1 月 10 日現在)は一致しなかった。

2. アミラーゼ・アセトン法による NoV GII 検出

同一ロットのカキ A, B, E を用いて行った旧および新アミラーゼ・PEG 沈殿法と新アミラーゼ・アセトン法の実測値コピー数および中腸腺 1g あたりに換算したコピー数の比較を図 5, 6 に示した。

新アミラーゼを使用したアミラーゼ・PEG 沈殿法とアミラーゼ・アセトン法を比較すると、実測値コピー数、中腸腺 1g あたりに換算したコピー数のいずれも同一ロット間でのコピー数の差は認められるものの、全体的にアミラーゼ・アセトン法が同等あるいは若干高い結果となった。

同一ロットのカキ A, B を用いて行った新アミラーゼ・PEG 沈殿法、新アミラーゼ・アセトン法および旧アミラーゼ・PEG 沈殿法の実測値および中腸腺 1g あたりに換算したコピー数の比較では、旧アミラーゼ・PEG 沈殿法が最も高い結果となった。

D. 考察

1. NoV 検出状況

2016/17 シーズンは、ヒトから検出された遺伝子型は GII.2 が 5 株と最も多かったが、カキからは GII.17 のみが 3 ロットから検出された。ヒトから検出された遺伝子型とカキから検出された遺伝子型が異なっており、GII.17 は患者としては把

握されていないものの、軽症者や不顕性感染者は存在していることが推測された。

RdRp 領域の解析ができた 2 株の G II. 2 はいずれも G II. P16 であった。過去に検出された株とは異なるクラスターを形成しており、入谷らが報告した G II. P16-G II. 4 Sydney2012 と同じクラスターに分類された。NoV は ORF1-2 JCT 領域で頻繁に組換えが起こることが知られている。解析できた 2 株も遺伝子組換えを起こした可能性が示唆された。

2. アミラーゼ・アセトン法による NoV G II 検出

新アミラーゼ・アセトン法と新アミラーゼ・PEG 沈法を比較した場合、同一ロット間でのコピー数の差は認められるものの、全体的に同等あるいは若干高い結果となった。旧アミラーゼ・アセトン法と比較するといずれも低い結果となったが、旧アミラーゼはすでに販売中止となっており、新アミラーゼを使わざるを得ない状況となっている。今回、新アミラーゼ・アセトン法を検討し、検出感度はアミラーゼ・PEG 沈法と同等あるいは若干高い結果であったが、アミラーゼ・アセトン法はアミラーゼ・PEG 沈法に比べ、検査時間が短いことや、高速遠心機を使用しなくても検査が可能などのメリットが得られた。

E. 結論

2016/17 シーズンのカキからは NoV G II. 17 が 3 ロットから検出された。いずれも Hu/G II /JP/2015/G II. P17-G II. 17 /Kawasaki308 に近縁な株であった。ヒトからは G II. 2 が 5 株と最も多く検出された。RdRp 領域の解析ができた 2 株はいずれも G II. P16-G II. 2 であった。それらは、過去に検出された株とは異なり、入谷らが報告した G II. P16-G II. 4 Sydney2012 と同じクラスターに分類されたことから、ORF1-2 JCT 領域で組換えが起きた可能性が示唆された。

カキからの NoV 検出法として検討したアミラーゼ・アセトン法の検出感度は、従来法であるアミラーゼ・PEG 沈法と同等あるいは若干高い結果であったが、検査時間の短縮が図れる等のメリットが得られた。

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

表1 カキからの NoV 検出状況

採取日又は加工日 又は消費期限	採取海域	用途	結果および遺伝子型
2016/06/18	A 県 10 海域	—	G II.6
2016/07/03	A 県 10 海域	—	G II.4 Sydney2012
2016/08/14	A 県 10 海域	—	—
2016/09/10	A 県 10 海域	—	—
2016/10/10	A 県 10 海域	加熱調理用	—
2016/10/28	A 県 14 海域	加熱調理用	—
2016/11/05	A 県 20 海域	加熱調理用	—
2016/11/25	A 県 10 海域	生食用	G II.17
2016/12/03	A 県 12 海域	生食用	—
2016/12/22	A 県 10 海域	加熱調理用	G II.17
2017/01/10	A 県 10 海域	加熱調理用	G II.17

表2 ヒトから検出された NoV 遺伝子型(2016/17 シーズン)

採取日	散発・集団の別	遺伝子型
2016/09/12	散発	G II.2
2016/09/14	散発	G II.3
2016/10/17	集団	G II.P16-G II.2
2016/10/18	散発	G II.4 Sydney2012
2016/10/28	散発	G II.4 Sydney2012
2016/11/10	散発	G II.2
2016/11/24	散発	G II.P16-G II.2
2016/12/01	散発	G II.17
2016/12/13	集団	G II.2

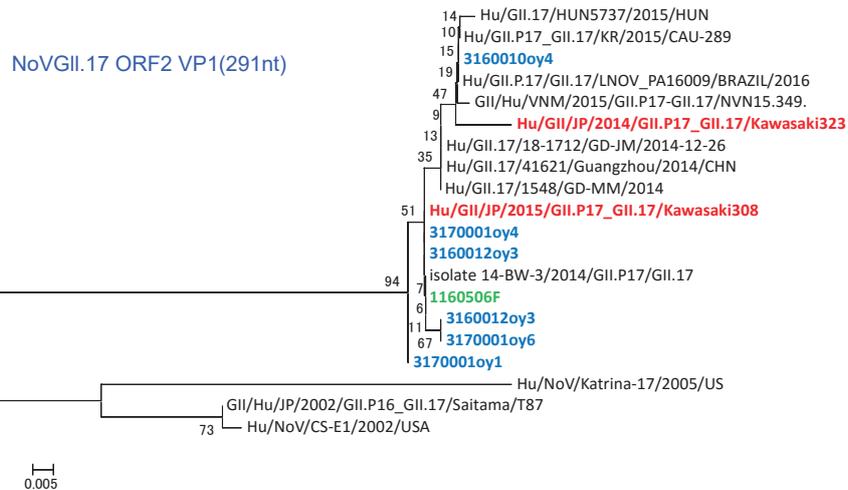


図1 NoVGII.17 系統樹(VP1 領域 291nt)

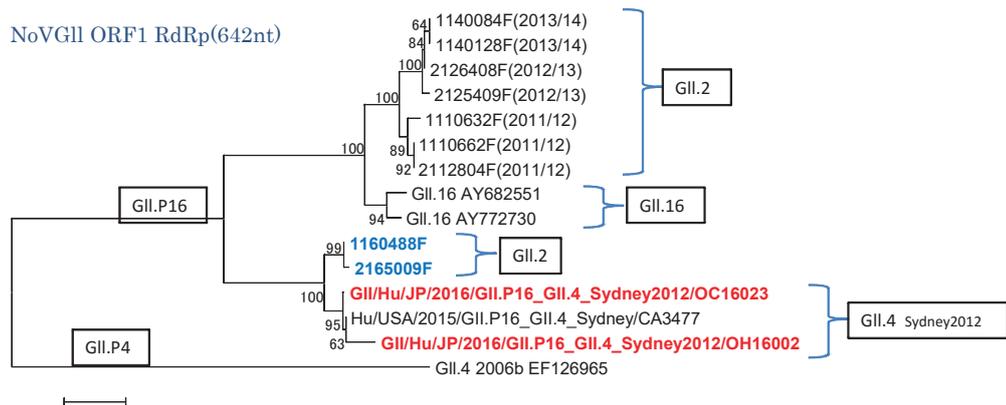


図 2 NoVG II 系統樹(RdRp 領域 642nt)

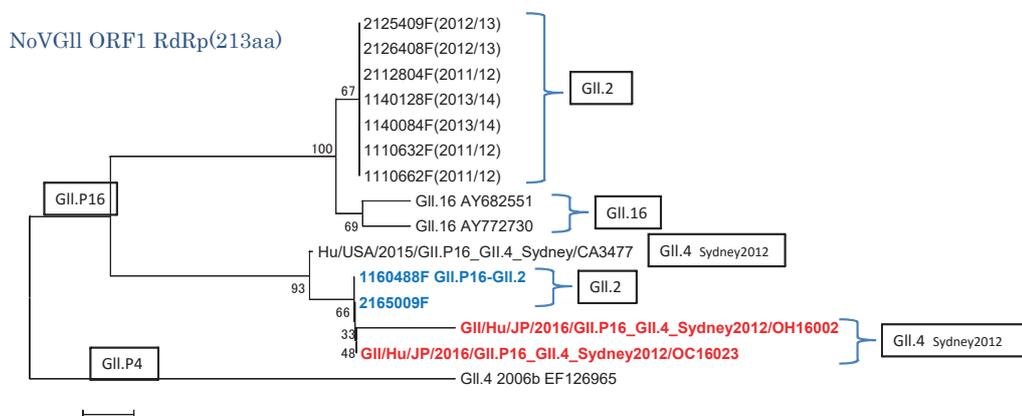


図 3 NoVG II 系統樹(RdRp 領域 213aa)

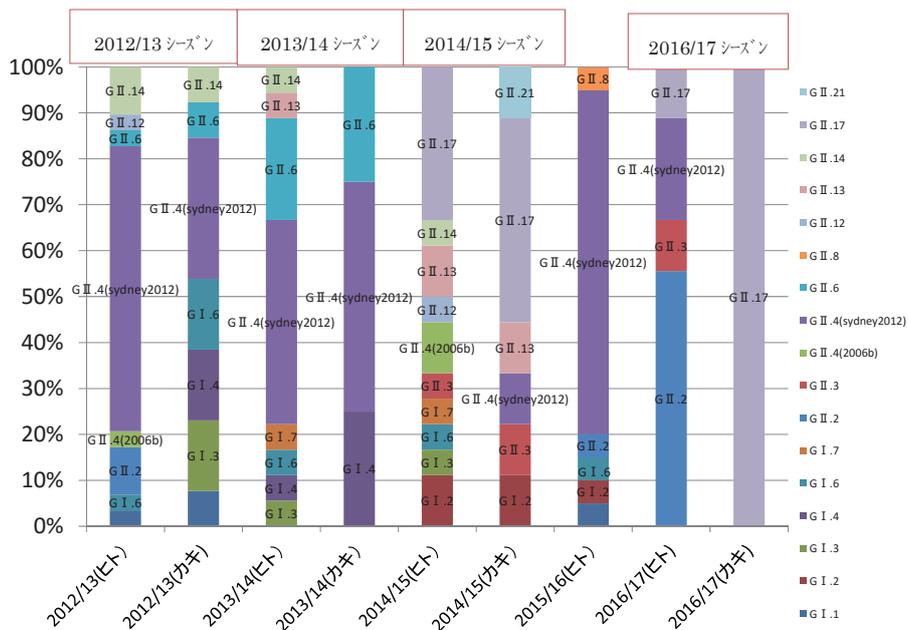


図 4 カキおよびヒトからの NoV 遺伝子型別検出割合

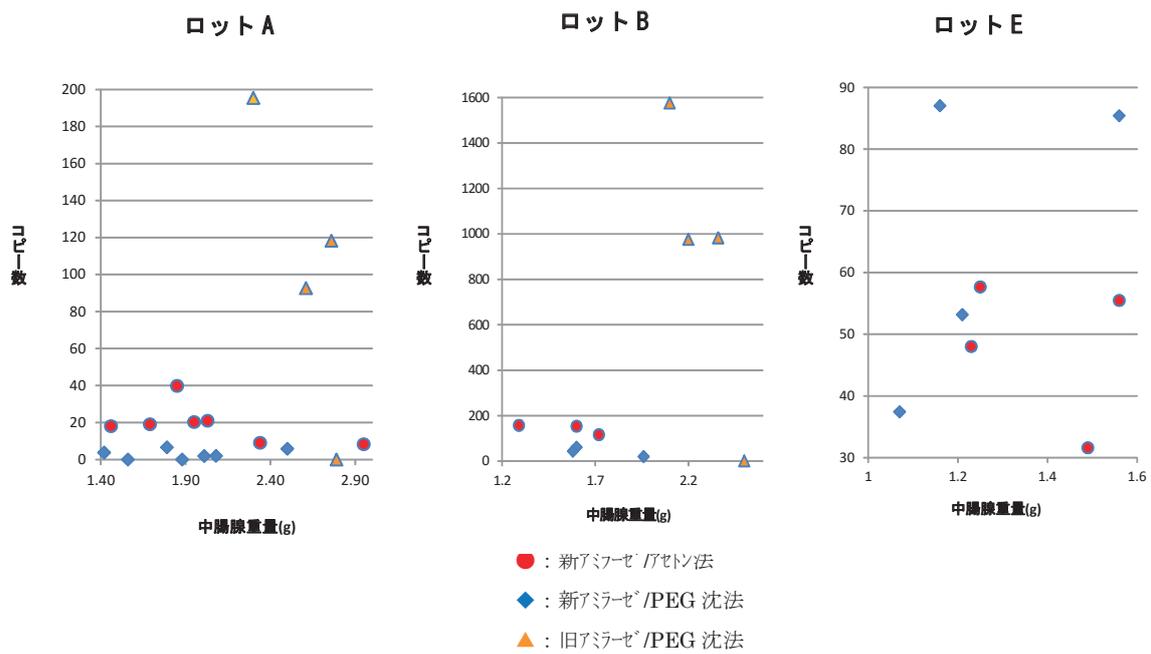


図5 実測値コピー数の比較

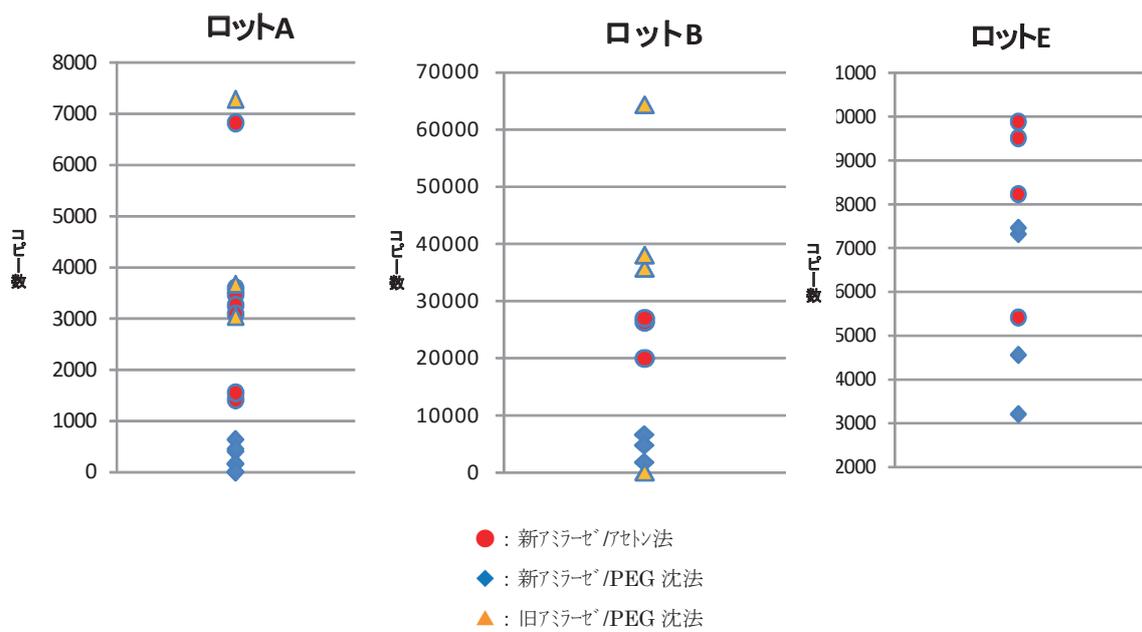


図6 中腸腺 1g あたりコピー数の比較