

1. 平成 28-30 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」  
総合研究協力報告

## 食中毒疑い事例のノロウイルス検査における 検出用プライマー内配列の一致状況の解釈に関する検討

|       |        |              |
|-------|--------|--------------|
| 研究協力者 | 吉澄 志磨  | 北海道立衛生研究所    |
|       | 後藤 明子  | 北海道立衛生研究所    |
|       | 大久保 和洋 | 北海道立衛生研究所    |
|       | 石田 勢津子 | 北海道立衛生研究所    |
| 研究分担者 | 上間 匡   | 国立医薬品食品衛生研究所 |

### 研究要旨

北海道では、食中毒疑い事例の患者、調理従事者、食品等から検出されたノロウイルス遺伝子の塩基配列を比較し、その一致・不一致の情報を感染源等の判断の裏付けとして使用している。この比較には、RT-PCR の検出用プライマー内の配列 (RdRp 領域: 約 290 塩基、RdRp-VP1 領域: 約 340 塩基) を用いている。今回、この領域の比較結果がすべての検体で一致、またはほぼ一致 (1 塩基違いの検体あり) した事例について、より長い配列 (約 2,400 塩基; RdRp 領域: 793 塩基、VP1 領域全長: 約 1,630 塩基) で比較した場合でも同様の結果になるかどうかの検証を行った。その結果、NoV 検出用プライマー内配列が事例内の他の検体と一致していた検体の大多数は、RdRp-VP1 全長の比較でも一致またはほぼ一致 (1 塩基違い) しており、NoV 検出用プライマー内配列がすべての検体で一致していた事例の多くは、RdRp-VP1 全長の比較でも検体間の配列が一致するという状況から大きくは逸脱していなかった。一方で、RdRp-VP1 全長の比較により、検出用プライマー内配列の比較では見えなかった不一致が多く検出された事例も一部確認された。このことから、感染源等の判断の裏付けとして検出用プライマー内配列の比較結果を使用することは妥当であるが、疫学調査の結果からは感染源や感染経路の特定が難しい事例等についてはより精度の高い裏付けが必要であり、RdRp-VP1 全長配列での一致状況の確認が有用であると考えられた。

### A. 研究目的

ノロウイルス (NoV) はヒトに急性胃腸炎を引き起こす代表的なウイルスであり、

食中毒の病因物質としても重要視されている。北海道における食中毒疑い事例の NoV 検査では、患者、調理従事者、食品等

から検出された NoV 遺伝子について塩基配列を決定し、その一致・不一致の情報を感染源推定等に対する科学的根拠として使用している。しかし、ここで比較しているのは RT-PCR の検出用プライマー内の配列であり、これは RdRp 領域の一部(約 290 塩基)と RdRp-VP1 領域の一部(約 340 塩基)の情報に過ぎない。また、検出用プライマー設定領域は、NoV 遺伝子上で最も配列が保存されている領域である。そこで今回は、NoV 検出用プライマー内配列がすべての検体で一致、またはほぼ一致(1 塩基違いの検体あり)した事例を対象に、より長い配列で比較した場合でも同様の結果になるかどうかについて検証を行った。

## B. 研究方法

### 1. 材料

2013～2018 年の間に NoV 検査を実施した集団胃腸炎事例のうち、NoV 検出用プライマー内の配列がすべての検体で一致した食中毒事例から 19 事例 (NoV 陽性糞便 180 検体)、1 塩基違いの検体がみられた食中毒・感染症・感染経路不明事例から 5 事例 (NoV 陽性糞便 62 検体) を今回の調査対象として選択した。検出された NoV の遺伝子型は、配列一致の 19 事例では GII.Pe\_GII.4 Sydney 2012 が 9 事例、GII.P17\_GII.17 が 6 事例、GII.P16\_GII.2 が 4 事例、1 塩基違いの検体がみられた 5 事例では GII.P16\_GII.2 が 2 事例と、GII.P2\_GII.2, GII.P12\_GII.3, GII.Pe\_GII.4 Sydney 2012 がそれぞれ 1 事例であった。

### 2. 方法

NoV 陽性の 242 検体について 10% 便乳剤から RNA を抽出し、VP2 領域に設定したプライマーを用いて cDNA を合成した。これを鋳型として、RdRp 領域に設定された NV82 改変プライマー(1st)および P1 改変プライマー(nested)と、VP2 領域に設定した 2 種類のプライマーを用いて Nested PCR を行った。Nested PCR の増幅産物について、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。今回の比較に使用する塩基配列は、図 1 に示す「RdRp-VP1 全長配列」の 2,396 塩基 (GII.4, GII.17)、2,402 塩基 (GII.2)、2,420 塩基 (GII.3) である。

事例内で RdRp-VP1 全長配列を比較した際に不一致がみられた検体については、増幅過程でのエラーを考慮して再度 RNA 抽出からシーケンスまでを行い、不一致の再現を確認した上で結果を示した。

(倫理面への配慮)

本研究については、北海道立衛生研究所倫理審査委員会の審査を受け、承認を得た。

## C. 研究結果

調査に用いた 242 検体のうち、表 1 の事例 No. 5 と No. 15 の調理施設従業員(調理従事者、配膳係など、以下従業員)それぞれ 1 検体と No. 18 の従業員および患者それぞれ 1 検体を除く 238 検体について、RdRp-VP1 全長の塩基配列情報を得ることができた。

検出用プライマー内配列が事例内のすべての検体で一致した 19 事例について、RdRp-VP1 全長配列での比較結果を表 1 に

示した。9事例(事例No. 1~9)は、RdRp-VP1全長で比較しても塩基配列はすべての検体で一致した。5事例(事例No. 10~14)では1検体に1塩基の不一致が確認され、このうち事例No. 10の不一致は他の検体と同じGとAとの混合であった。また、2事例(事例No. 15, 16)では1塩基の不一致が2検体で確認され、このうちNo. 15の不一致はどちらも他検体と同じ塩基とそれとは異なる塩基の混合であった。さらに1事例(事例No. 17)では1塩基違いが3検体でみられた。2塩基以上の不一致が確認された事例は2事例(事例No. 18, 19)であった。事例No. 18では、1塩基違い、2塩基違い、3塩基違いがそれぞれ1検体ずつ確認された。2塩基違いのうちの1塩基は他の検体と同じTとCの混合であり、3塩基違いはいずれも他検体と同じ塩基との混合であった。事例No. 19では、1塩基違いが6検体、2塩基違いが1検体で確認され、1塩基違いは6検体中4検体が他検体と同じ塩基との混合であった。また、1塩基違いの4検体は、同じ位置(VP1領域の462番目の塩基)での同じ内容(T→T/CまたはC)の不一致であった。

次に、検出用プライマー内配列の比較で1塩基違いの検体を確認された5事例について、RdRp-VP1全長配列での比較結果を表2に示した。検出用プライマー内配列で1塩基違いだった検体は5事例で合計8検体あり、このうち事例No. 20の1検体と事例22の2検体、事例No. 24の1検体の合計4検体は、RdRp-VP1全長配列で比較しても不一致数は増加しなかった。残り4検体はRdRp-VP1全長配列の比較で不一致数が増加し、事例No. 21の1検体

は11塩基、事例No. 23の2検体はそれぞれ2塩基と3塩基(3塩基のうち2塩基は他検体と同じ塩基との混合)、事例No. 24の1検体は2塩基の不一致となった。また、すべての事例で、RdRp-VP1全長配列の比較により新たな不一致検体を確認された。事例No. 20では1塩基の不一致が従事者の3検体でみられ、このうち2検体は同じ位置(RdRp領域の535番目の塩基)での同じ内容(C→C/TまたはT)の不一致であった。事例No. 21, 22, 23は、1塩基違いが1検体確認された。事例No. 24では7検体に1塩基の不一致(このうち4検体は他検体と同じ塩基との混合)と、2検体に2塩基の不一致(どちらもそのうち1塩基は他検体と同じ塩基との混合)が確認された。この事例No. 24は、No. 19, 20と同様、複数検体で同じ位置に同じ内容の不一致がみられており、ひとつは従業員Aと患者C~Fの5検体でRdRp領域の532番目の塩基がA→A/GまたはGの不一致、もうひとつは患者G, H, Jの3検体でVP1の1253番目の塩基にC→C/TまたはTの不一致であった。

#### D. 考察

今回の調査では、「NoV検出用プライマー内配列は事例内の他の検体と一致していたがRdRp-VP1全長の比較では不一致が確認された」検体が37検体あり、このうち32検体は1塩基違いであった。残り5検体のうち4検体は2塩基違いであったが、このうち3検体は一方が他の検体と同じ塩基との混合であったことから、1塩基違いと2塩基違いの混合と考えられた。また、3塩基違いが1検体あったが、

これはすべての不一致が他検体と同じ塩基との混合であった。以上のように、不一致検体の多くは1塩基違いであり、NoV 検出用プライマー内配列が事例内の他の検体と一致していた検体の多くは、RdRp-VP1 全長の比較でも「一致」または「ほぼ一致」の結果となった。

検出用プライマー内配列の比較により1塩基の不一致が確認されていた8検体では、4検体はRdRp-VP1 全長配列で比較しても不一致箇所は増加しなかったが、4検体では増加がみられた。この4検体の内訳は、2塩基違いが2検体、3塩基違いが1検体（このうち2塩基は他検体と同じ塩基との混合）、11塩基違いが1検体であった。このうち少なくとも11塩基の不一致がみられたウイルスは、事例内の他の検体のものとは異なるウイルス株（別ルートからの感染）と判断されるが、これは検出用プライマー内配列の比較では見いだせない結果であった。

事例としてみると、検出用プライマー内配列の比較において全検体で配列が一致していた19事例のうち、9事例はRdRp-VP1 全長の配列も全検体で一致し、5事例は1検体で1塩基の不一致が確認されたのみであった。また、3事例では2~3検体で不一致が確認されたがいずれも違いは1塩基であった。このように、食中毒事例内の検体の比較においてNoV 検出用プライマー内配列がすべての検体で一致していた事例の多くは、RdRp-VP1 全長の比較でも「一致する」という状況から大きくは逸脱していなかったが、RdRp-VP1 全長の比較により、検出用プライマー内配列の比較では見えなかった不

一致が多く検出された事例も2事例（表1のNo. 18, 19）確認された。

RdRp-VP1 全長の比較により、複数検体で同じ位置に同じ内容の不一致がみられた事例が3事例（No. 19, 20, 24）あり、これは検出用プライマー内配列の比較からは得られなかった情報であった。表1および2に示すように、事例内の比較で不一致がみられる位置に大きな偏りはなく、感染後の変異が複数の検体で同じ位置に入る確率は低いと考えられる。そのため、同一事例内の複数検体で同じ位置に同じ内容の不一致がみられた場合は、感染源のウイルスが単一ではなかった（配列が異なるウイルスが混在していた）可能性が高い。このような感染源または汚染源としては、配列違いのNoVが混在している糞便、複数名のNoV感染者により糞便汚染されたトイレ、カキなどの二枚貝、二枚貝の中腸腺やパックの海水による環境汚染などが考えられる。このような場合は、RdRp-VP1 全長配列での比較結果が判断の裏付けとして有用であると思われる。

以上のことから、感染源等の判断の裏付けとして検出用プライマー内配列の比較結果を使用することは妥当であるが、疫学調査の結果からは感染源や感染経路の特定が難しい事例等についてはより精度の高い裏付けが必要であり、RdRp-VP1 全長配列での一致状況の確認が有用であると考えられた。しかし、何塩基の不一致から別のウイルス株といえるかの判断基準が定められていないことから、RdRp-VP1 全長配列での比較により、むしろ判断に困るケースも出てくると考えら

れる。判断基準の設定のため、今後は事例間の配列の比較も行い、情報の集積および分析を続けたい。

## E. 結論

NoV 検出用プライマー内配列が事例内の他の検体と一致していた検体の多くは、RdRp-VP1 全長の比較でも「一致」または「ほぼ一致 (1 塩基違い)」した。また、事例としてみた場合も、NoV 検出用プライマー内配列がすべての検体で一致していた事例の多くは、RdRp-VP1 全長の比較でも「一致する」という状況から大きくは逸脱していなかった。一方で、RdRp-VP1 全長の比較により、検出用プライマー内配列の比較では見えなかった不一致が多く検出される事例もあった。このことから、感染源等の判断の裏付けとして検出

用プライマー内配列の比較結果を使用することは妥当であるが、疫学調査の結果からは感染源や感染経路の特定が難しい事例等にはより精度の高い裏付けが必要であり、RdRp-VP1 全長配列での一致状況の確認が有用であると考えられた。

## 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

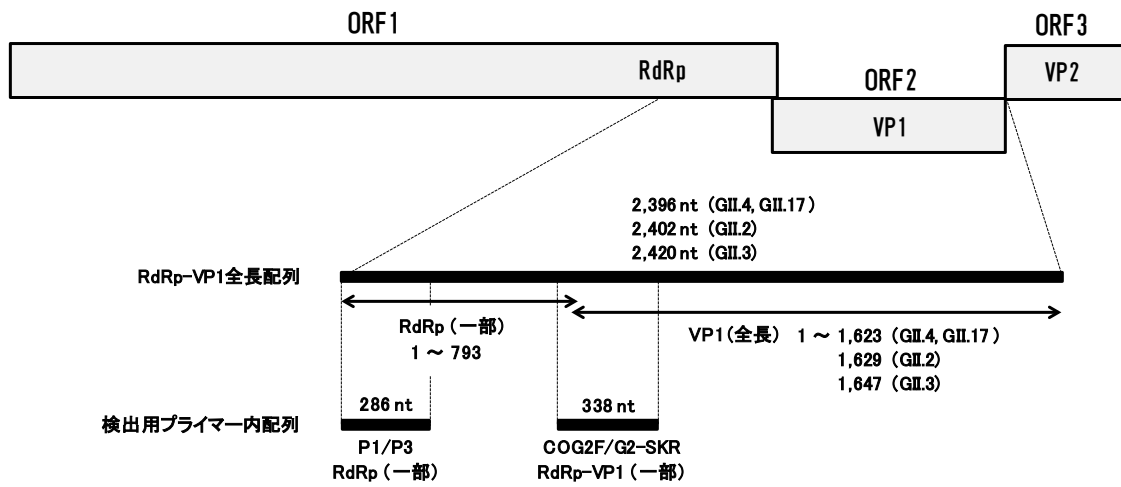


図 1 塩基配列の比較領域

表 1 検出用プライマー内配列がすべての検体で一致した事例における RdRp-VP1 全長の比較結果

| 事例 No. | 感染様式 | 検出遺伝子型        | 比較検体数 |    | RdRp-VP1全長の配列の違い ※2 |        |         |                |
|--------|------|---------------|-------|----|---------------------|--------|---------|----------------|
|        |      |               | 従業員※1 | 患者 |                     |        |         |                |
| 1      | 食中毒  | GILP17_GII.17 | 2     | 7  |                     |        |         | 一致             |
| 2      | 食中毒  | GILP16_GII.2  | 1     | 6  |                     |        |         | 一致             |
| 3      | 食中毒  | GILPe_GII.4   | 3     | 9  |                     |        |         | 一致             |
| 4      | 食中毒  | GILPe_GII.4   | 2     | 9  |                     |        |         | 一致             |
| 5      | 食中毒  | GILPe_GII.4   | 2     | 7  |                     |        |         | 一致             |
| 6      | 食中毒  | GILP17_GII.17 | 3     | 5  |                     |        |         | 一致             |
| 7      | 食中毒  | GILP17_GII.17 | 2     | 10 |                     |        |         | 一致             |
| 8      | 食中毒  | GILPe_GII.4   | 1     | 2  |                     |        |         | 一致             |
| 9      | 食中毒  | GILP16_GII.2  | 2     | 2  |                     |        |         | 一致             |
| 10     | 食中毒  | GILP16_GII.2  | 3     | 8  | 1 塩基                | 患者A    | G → G/A | (VP1 : 444)    |
| 11     | 食中毒  | GILPe_GII.4   | 3     | 10 | 1 塩基                | 従業員A   | C → T   | (VP1 : 1279)   |
| 12     | 食中毒  | GILPe_GII.4   | 3     | 6  | 1 塩基                | 従業員A   | T → C   | (RdRp : 541)※3 |
| 13     | 食中毒  | GILP17_GII.17 | 1     | 10 | 1 塩基                | 患者A    | C → T   | (VP1 : 570)    |
| 14     | 食中毒  | GILP16_GII.2  | 1     | 4  | 1 塩基                | 従業員A   | C → T   | (VP1 : 677)    |
| 15     | 食中毒  | GILP17_GII.17 | 1     | 2  | 1 塩基                | 患者A    | T → T/C | (VP1 : 1064)   |
|        |      |               |       |    | 1 塩基                | 患者B    | A → A/G | (VP1 : 1187)   |
| 16     | 食中毒  | GILPe_GII.4   | 2     | 6  | 1 塩基                | 患者A    | C → T   | (VP1 : 389)    |
|        |      |               |       |    | 1 塩基                | 患者B    | C → T   | (VP1 : 1420)   |
| 17     | 食中毒  | GILPe_GII.4   | 1     | 13 | 1 塩基                | 患者A    | C → T   | (VP1 : 636)    |
|        |      |               |       |    | 1 塩基                | 患者B    | C → T   | (VP1 : 1323)   |
|        |      |               |       |    | 1 塩基                | 患者C    | C → T   | (VP1 : 1527)   |
|        |      |               |       |    | 1 塩基                | 患者A    | A → G   | (VP1 : 1044)   |
| 18     | 食中毒  | GILPe_GII.4   | 3     | 4  | 2 塩基                | 患者B    | G → A   | (VP1 : 1610)   |
|        |      |               |       |    |                     |        | T → T/C | (VP1 : 1619)   |
|        |      |               |       |    | 3 塩基                | 従業員A   | T → T/C | (VP1 : 699)    |
|        |      |               |       |    |                     |        | G → G/A | (VP1 : 744)    |
|        |      |               |       |    |                     |        | T → T/C | (VP1 : 1167)   |
| 19     | 食中毒  | GILP17_GII.17 | 3     | 17 | 1 塩基                | 患者A, B | T → T/C | (VP1 : 462)    |
|        |      |               |       |    | 1 塩基                | 患者C, D | T → C   | (VP1 : 462)    |
|        |      |               |       |    | 1 塩基                | 患者E    | G → G/T | (VP1 : 831)    |
|        |      |               |       |    | 1 塩基                | 患者F    | T → T/C | (VP1 : 1297)   |
|        |      |               |       |    | 2 塩基                | 患者G    | T → C   | (VP1 : 783)    |
|        |      |               |       |    |                     |        | A → G   | (VP1 : 864)    |

※1 従業員:調理施設従業員(調理従事者、配膳係など)

※2 ○→△ ; 他の検体が○のところ△

※3 RdRp領域は全長配列を決定していないため、塩基配列不一致の位置は 1~793 (図1) で表示

表2 検出用プライマー内配列で1塩基違いの検体がみられた事例における RdRp-VP1 全長の比較結果

| 事例 No. | 感染様式 | 検出遺伝子型        | 比較検体数             |    | 検出用プライマー内配列の違い      | RdRp-VP1全長の配列の違い <sup>※2</sup> |                     |           |      |                                 |                   |
|--------|------|---------------|-------------------|----|---------------------|--------------------------------|---------------------|-----------|------|---------------------------------|-------------------|
|        |      |               | 従業員 <sup>※1</sup> | 患者 |                     |                                |                     |           |      |                                 |                   |
| 20     | 食中毒  | GII.Pe_GII.4  | 7                 | 9  | 患者A                 | 1塩基 (RdRp: 731)                | →                   | 患者A       | 1塩基  | A → G (RdRp: 731) <sup>※3</sup> |                   |
|        |      |               |                   |    | 従業員A                | 1塩基                            |                     | 従業員A      | 1塩基  | C → C/T (RdRp: 535)             |                   |
|        |      |               |                   |    | 従業員B                | 1塩基                            |                     | 従業員B      | 1塩基  | C → T (RdRp: 535)               |                   |
|        |      |               |                   |    | 従業員C                | 1塩基                            |                     | 従業員C      | 1塩基  | T → C (VP1: 736)                |                   |
| 21     | 感染症  | GII.P16_GII.2 | 3                 | 5  | 患者A                 | 1塩基 (RdRp: 138)                | →                   | 患者A       | 11塩基 | T → C (RdRp: 138)               |                   |
|        |      |               |                   |    |                     |                                |                     |           |      |                                 | A → G (RdRp: 376) |
|        |      |               |                   |    |                     |                                |                     |           |      |                                 | G → A (RdRp: 631) |
|        |      |               |                   |    |                     |                                |                     |           |      |                                 | T → C (VP1: 379)  |
|        |      |               |                   |    |                     |                                |                     |           |      |                                 | C → T (VP1: 466)  |
|        |      |               |                   |    |                     |                                |                     |           |      |                                 | A → G (VP1: 1030) |
|        |      |               |                   |    |                     |                                |                     |           |      |                                 | G → T (VP1: 1031) |
|        |      |               |                   |    |                     |                                |                     |           |      |                                 | C → T (VP1: 1041) |
|        |      |               |                   |    |                     |                                |                     |           |      |                                 | C → A (VP1: 1147) |
|        |      |               |                   |    |                     |                                |                     |           |      |                                 | T → C (VP1: 1247) |
|        |      |               |                   |    |                     | C → T (VP1: 1608)              |                     |           |      |                                 |                   |
|        |      |               |                   |    | 患者B                 | 1塩基                            | A → G (VP1: 920)    |           |      |                                 |                   |
| 22     | 不明   | GII.P12_GII.3 | 3                 | 7  | 患者A                 | 1塩基 (RdRp: 97)                 | →                   | 患者A       | 1塩基  | T → C (RdRp: 97)                |                   |
|        |      |               |                   |    | 患者B                 | 1塩基 (VP1: 39)                  | →                   | 患者B       | 1塩基  | T → A (VP1: 39)                 |                   |
|        |      |               |                   |    |                     |                                |                     | 患者C       | 1塩基  | C → T (VP1: 582)                |                   |
| 23     | 感染症  | GII.P2_GII.2  | 5                 | 11 | 患者A                 | 1塩基 (RdRp: 134)                | →                   | 患者A       | 2塩基  | A → C (RdRp: 134)               |                   |
|        |      |               |                   |    |                     |                                |                     |           |      | G → C (VP1: 929)                |                   |
|        |      |               |                   |    | 患者B                 | 1塩基 (RdRp: 124)                | →                   | 患者B       | 3塩基  | C → T (RdRp: 124)               |                   |
|        |      |               |                   |    |                     |                                |                     |           |      | T → T/C (VP1: 431)              |                   |
|        |      |               |                   |    |                     |                                |                     |           |      | A → A/G (VP1: 438)              |                   |
|        |      |               |                   |    | 患者C                 | 1塩基                            | C → T (VP1: 623)    |           |      |                                 |                   |
| 24     | 食中毒  | GII.P16_GII.2 | 1                 | 11 | 患者A                 | 1塩基 (VP1: 229)                 | →                   | 患者A       | 1塩基  | C → T (VP1: 229)                |                   |
|        |      |               |                   |    | 患者B                 | 1塩基 (RdRp: 145)                | →                   | 患者B       | 2塩基  | T → C (RdRp: 145)               |                   |
|        |      |               |                   |    |                     |                                |                     |           |      | T → C (VP1: 579)                |                   |
|        |      |               |                   |    |                     |                                |                     | 従業員A, 患者C | 1塩基  | A → G (RdRp: 532)               |                   |
|        |      |               |                   |    |                     |                                |                     | 患者D, E, F | 1塩基  | A → A/G (RdRp: 532)             |                   |
|        |      |               |                   |    |                     |                                |                     | 患者G       | 1塩基  | C → C/T (VP1: 1253)             |                   |
|        |      |               |                   |    |                     |                                |                     | 患者H       | 1塩基  | C → T (VP1: 1253)               |                   |
|        |      |               |                   |    |                     |                                |                     | 患者I       | 2塩基  | A → G (VP1: 916)                |                   |
|        |      |               |                   |    | C → C/A (VP1: 1151) |                                |                     |           |      |                                 |                   |
|        |      |               |                   |    | 患者J                 | 2塩基                            | C → T (VP1: 1253)   |           |      |                                 |                   |
|        |      |               |                   |    |                     |                                | A → A/G (VP1: 1554) |           |      |                                 |                   |

※1 従業員:調理施設従業員(調理従事者、配膳係など)

※2 ○→△; 他の検体が○のところ△

※3 RdRp領域は全長配列を決定していないため、塩基配列不一致の位置は1~793(図1)で表示



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」  
総合研究協力報告(平成28～30年度)

## 青森県における集団胃腸炎事例から検出されたノロウイルスの 分子疫学解析(2012/13～2017/18シーズン)

|       |       |              |
|-------|-------|--------------|
| 研究協力者 | 福田 理  | 青森県環境保健センター  |
| 研究協力者 | 坂 恭平  | 青森県環境保健センター  |
| 研究協力者 | 筒井 理華 | 青森県環境保健センター  |
| 研究分担者 | 上間 匡  | 国立医薬品食品衛生研究所 |
| 研究分担者 | 野田 衛  | 国立医薬品食品衛生研究所 |

### 研究要旨

2012年9月～2018年8月(2012/13～2017/18シーズン)に青森県内で発生した集団胃腸炎事例のうち、調理従事者からノロウイルスが検出された食中毒15事例の遺伝子解析を行った。その結果、4事例(事例番号2、8、12および15)で調理従事者由来株と発症者由来株に数塩基の違いが見られた。中でも、1塩基異なるものが複数例確認されたことから、同一発症者集団においては1塩基の置換は起こり得ることが示唆された。

### A. 研究目的

ノロウイルス(Norovirus、以下NoV)は、冬季の胃腸炎や食中毒の原因ウイルスの1つとして知られている。過去のノロウイルス食中毒の調査結果から、ウイルスに感染した調理従事者等を介して食品が汚染されたことが原因となっているケースが多く、食品から直接ウイルスを検出することは難しいため、食中毒事例のうち約70%で原因食品が特定できていない<sup>1)</sup>。

近年、調理従事者が関与する食中毒事例が増加傾向にあるとされており<sup>1)</sup>、このような事例では、調理従事者と発症者から同一の病原体が検出されることは、感

染源や感染経路を明らかにする上で、有力な手がかりとなる。一方、発症者と調理従事者等から検出されたNoVのシーケンス解析の結果、同じ遺伝子型が検出される場合、多くの事例では、塩基配列が一致するが一部の事例で塩基配列が1塩基異なる事例が認められる場合がある。

今回、2012/13～2017/18シーズンに青森県内で発生したNoVによる集団胃腸炎事例のうち、調理従事者からNoVが検出された食中毒事例について、分子疫学的に検討したので報告する。

### B. 研究方法

#### 1. 材料

2012/13～2017/18 シーズンに青森県内で発生した集団胃腸炎事例のうち、調理従事者から NoV が検出された食中毒 15 事例 573 検体（ふん便 370、吐物 9、拭取り 166、食品 28）を用いた（表 1）。

なお、感染地が県外であると推定される事例は除いた。

## 2. ウイルス RNA の抽出・cDNA 合成・NoV 遺伝子の検出（リアルタイム PCR 及び nested PCR）

「ノロウイルスの検出法について」（平成 15 年 11 月 5 日付食安監発第 1105001 号）に準じて行った。

## 3. 遺伝子解析

nested PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit で精製し、BigDye Terminator Kit (ABI PRISM) で BigDye 反応後、DNA ダイレクトシーケンサー ABI PRISM310 (Applied Biosystems)、Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用い遺伝子解析を行った。DNA ダイレクトシーケンス解析法により NoV Capsid 領域の塩基配列を決定し (GI : 260nt、GII : 279nt)、得られた塩基配列を塩基配列解析ソフトウェア Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version6<sup>2)</sup> を用い、Kimura 2-parameter model を用いた ML (Maximum-Likelihood) 法で系統樹を作成した。系統樹の信頼性の評価には bootstrap 法 (反復回数 1000) を用いた。標準株は文献<sup>3)</sup>に記載の株を使用した。

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

対象とした 15 事例のうち、4 事例（事例番号 2、8、12、15）において、調理従事者便由来株と発症者等便由来株に塩基配列の相違が見られた。

各事例で検出された NoV の遺伝子型の内訳及び各遺伝子型における塩基配列の相同性を表 2 に示す。

事例番号 2 では、GI. 6 において①と②の間で 7 塩基の相違 (C98T、A107G、A131C、G137A、C188T、C230T、A251G) が、GII. 4 において①と②の間で 1 塩基の相違 (A135G) が、それぞれ確認された。

事例番号 8 では、GII. 17 において①と②の間で 1 塩基の相違 (C138T) が確認された。

事例番号 12 では、GII. 17 において①と②の間で 1 塩基の相違 (T183A) が、①と③の間で 1 塩基の相違 (T234C) が、それぞれ確認された。

事例番号 15 では、GII. 4 において 1 塩基の相違 (G159A) が確認された。

なお、事例番号 15 では、発症者等便由来株同士で GII. 2 において①と②の間で 4 塩基の相違 (T66C、C123T、C126T、A207T) が確認された。

これらの塩基の置換の結果、事例番号 12 の GII. 17 の①と②の間でアミノ酸置換 (N61K) が確認され、遺伝学的な変異があった可能性がある。これ以外の塩基置換については、アミノ酸置換は認められなかった。

## D. 考察

今回対象とした15事例のうち、4事例において、調理従事者便由来株と発症者便由来株で1~7塩基の相違が確認された。

塩基配列が異なるものが検出される原因としては、元々異なる塩基配列のNoVが感染した可能性、感染経路上で増殖する際に置換が起こった可能性、検出過程での影響があった可能性などが考えられる。

今回対象とした事例では、塩基配列の相違が確認された位置は全て異なり、不規則であったことから、関連性を明確にすることはできなかった。

しかしながら、4事例で延べ6つの遺伝子型で塩基の置換が確認され、これらのうち4つが1塩基の置換であったことから、今回解析対象としたcapsid領域においては、同一事例集団であれば感染経路上で1塩基程度の置換は起こり得るといふことが示唆された。

4塩基、7塩基といった塩基の置換が感染経路上で起こり得るのか、あるいは元々異なる塩基配列を持ったNoVが感染していたのかについては、今後さらなるデータの蓄積により、検討していく必要があると考えられた。

#### E. 結論

1. 2012/13~2017/18シーズンに発生した食中毒事例のうち、調理従事者からNoVが検出された事例は15事例であった。
2. 4事例（事例番号2、8、12及び15）

において、同一事例で検出された調理従事者由来株と発症者等由来株で1~7塩基の相違が認められた。

3. 1塩基異なる場合が複数例認められたことから、capsid領域では感染経路上で1塩基程度の置換は発生することが示唆された。

#### 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

#### 文献

- 1) 厚生労働省：ノロウイルスに関するQ & A (最終改定:平成30年5月31日).
- 2) Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30, 2725-2729.
- 3) 片山和彦：ノーウォークウイルス（ノロウイルス）の遺伝子型（2015年改訂版）. 病原微生物検出情報, (<http://www.nih.go.jp/niid/ja/norovirus-m/norovirus-iasrs/5913-pr4274.html>)

表1 青森県内における調理従事者から NoV が検出された食中毒事例  
(2012/13～2017/18 シーズン)

| シーズン    | 事例番号 | 発生日       | 原因施設 | 摂食場所 | 遺伝子群              | 遺伝子型                          | ふん便   |     |       |     | 吐物  |     | 拭取り |     | 食品  |     |     |     |
|---------|------|-----------|------|------|-------------------|-------------------------------|-------|-----|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|         |      |           |      |      |                   |                               | 調理従事者 |     | 発症者ほか |     | 陽性数 | 検査数 | 陽性数 | 検査数 | 陽性数 | 検査数 | 陽性数 | 検査数 |
|         |      |           |      |      |                   |                               | 陽性数   | 検査数 | 陽性数   | 検査数 |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 2012/13 | 1    | H25.1.18  | 飲食店  | 飲食店  | NoV GII           | GII.4                         | 2     | 7   | 8     | 8   |     |     | 0   | 10  |     |     |     |     |
|         | 2    | H25.1.24  | 飲食店  | 飲食店  | NoV GI<br>NoV GII | GI.6、GI.7、GI.9<br>GII.2、GII.4 | 3     | 7   | 10    | 11  |     |     | 0   | 13  |     |     |     |     |
|         | 3    | H25.3.25  | ホテル  | ホテル  | NoV GII           | GII.4                         | 1     | 4   | 12    | 12  |     |     | 0   | 14  | 0   | 6   |     |     |
|         | 4    | H25.4.11  | 飲食店  | 事業所  | NoV GII           | GII.17                        | 2     | 2   | 3     | 3   |     |     | 0   | 10  |     |     |     |     |
| 2013/14 | 5    | H25.12.14 | ホテル  | ホテル  | NoV GII           | GII.4、GII.17                  | 3     | 28  | 22    | 25  |     |     | 4   | 17  |     |     |     |     |
|         | 6    | H26.1.15  | 飲食店  | 事業所  | NoV GII           | GII.4                         | 1     | 6   | 25    | 26  | 1   | 5   | 1   | 13  |     |     |     |     |
|         | 7    | H26.5.15  | 給食施設 | 給食施設 | NoV GII           | GII.4                         | 3     | 9   | 4     | 4   |     |     | 0   | 5   | 0   | 7   |     |     |
| 2014/15 | 8    | H26.12.31 | 飲食店  | 家庭   | NoV GII           | GII.17                        | 2     | 3   | 18    | 21  | 1   | 1   | 0   | 13  |     |     |     |     |
|         | 9    | H27.2.9   | 飲食店  | 学校   | NoV GII           | GII.13、GII.17                 | 3     | 16  | 13    | 14  |     |     | 0   | 6   |     |     |     |     |
|         | 10   | H27.2.12  | 給食施設 | 給食施設 | NoV GII           | GII.4                         | 3     | 4   | 7     | 7   |     |     | 0   | 6   | 0   | 9   |     |     |
| 2015/16 | 11   | H28.2.6   | 飲食店  | 飲食店  | NoV GII           | GII.4                         | 1     | 2   | 6     | 6   |     |     | 0   | 11  |     |     |     |     |
|         | 12   | H28.3.19  | 飲食店  | 飲食店  | NoV GII           | GII.17                        | 4     | 13  | 19    | 30  |     |     | 0   | 5   | 0   | 1   |     |     |
| 2016/17 | 13   | H28.12.10 | 飲食店  | 飲食店  | NoV GII           | GII NT、GII.2                  | 1     | 6   | 20    | 30  |     |     | 1   | 13  |     |     |     |     |
|         | 14   | H28.12.19 | 飲食店  | 飲食店  | NoV GII           | GII.2                         | 1     | 22  | 6     | 6   |     |     | 0   | 19  | 0   | 4   |     |     |
| 2017/18 | 15   | H30.4.9   | 飲食店  | 事業所他 | NoV GII           | GII NT、GII.2、<br>GII.4、GII.17 | 2     | 7   | 27    | 31  | 1   | 3   | 0   | 11  | 0   | 1   |     |     |
| 計       |      |           |      |      |                   |                               | 32    | 136 | 200   | 234 | 3   | 9   | 6   | 166 | 0   | 28  |     |     |

表2 食中毒事例において検出された NoV 遺伝子型の内訳

| シーズン    | 事例番号     | 発生日       | 遺伝子型              | ふん便   |       | 吐物 | 拭取り  | 相同性   |
|---------|----------|-----------|-------------------|-------|-------|----|------|-------|
|         |          |           |                   | 調理従事者 | 発症者ほか |    |      |       |
| 2012/13 | 1        | H25.1.18  | GII NT            |       | 1     |    |      | -     |
|         |          |           | GII.4 Sydney_2012 | 2     | 7     |    | 100% |       |
|         | 2        | H25.1.24  | GI.6              | ①     | 1     |    |      | 97.3% |
|         |          |           | GI.7              | ②     | 1     |    |      | -     |
|         |          |           | GI.9              |       |       | 1  |      | -     |
|         |          |           | GII NT            |       |       | 2  |      | -     |
|         |          |           | GII.2             |       | 1     |    |      | -     |
|         |          |           | GII.4 Sydney_2012 | ①     | 1     | 5  |      | 99.6% |
|         | ②        | 1         |                   |       |       | -  |      |       |
|         | 3        | H25.3.25  | GII.4 Sydney_2012 | 1     | 12    |    |      | 100%  |
| 4       | H25.4.11 | GII.17    | 2                 | 3     |       |    | 100% |       |
| 2013/14 | 5        | H25.12.14 | GII.4 Sydney_2012 | 2     | 22    |    | 4    | 100%  |
|         |          |           | GII.17            |       | 1     |    |      | -     |
| 2013/14 | 6        | H26.1.15  | GII.4 Sydney_2012 | 1     | 25    | 1  | 1    | 100%  |
|         |          |           | GII NT            |       | 1     |    |      | -     |
| 2013/14 | 7        | H26.5.15  | GII.4 Sydney_2012 | 3     | 3     |    |      | 100%  |
|         |          |           | GII.2             |       | 2     | 14 | 1    | 99.6% |
| 2014/15 | 8        | H26.12.31 | GII.17            | ①     | 2     | 13 |      | 100%  |
|         |          |           | ②                 | 1     | 4     |    | -    |       |
| 2014/15 | 9        | H27.2.9   | GII.13            | 2     | 13    |    |      | 100%  |
|         |          |           | GII.17            | 1     |       |    |      | -     |
| 2014/15 | 10       | H27.2.12  | GII.4 Sydney_2012 | 3     | 7     |    |      | 100%  |
|         |          |           | GII.2             | 1     | 6     |    |      | 100%  |
| 2015/16 | 11       | H28.2.6   | GII.4 Sydney_2012 | 1     | 6     |    |      | 100%  |
|         |          |           | GII.17            | ①     | 4     | 17 |      | 99.6% |
| 2015/16 | 12       | H28.3.19  | GII.17            | ②     | 1     |    |      | -     |
|         |          |           | ③                 | 1     |       |    | -    |       |
| 2016/17 | 13       | H28.12.10 | GII NT            |       | 1     |    |      | -     |
|         |          |           | GII.2             | 1     | 19    |    | 1    | 100%  |
| 2016/17 | 14       | H28.12.19 | GII.2             | 1     | 6     |    |      | 100%  |
| 2017/18 | 15       | H30.4.9   | GII.2             | ①     | 2     |    |      | 98.6% |
|         |          |           | ②                 | 1     |       |    | -    |       |
|         |          |           | GII.4             | ①     | 1     | 19 | 1    | 99.6% |
|         |          |           | ②                 | 1     |       |    | -    |       |
| 2017/18 |          |           | GII.17            |       | 2     |    |      | 100%  |
|         |          |           | GII NT            | 1     | 2     |    |      | -     |

※表1において1つの検体から複数の遺伝子型が検出されたものについては、表2において別々にカウントしているため、表1の陽性数と表2の数は必ずしも一致しない。  
※同じ遺伝子型であっても、1塩基でも異なるものは、①、②、③と区別した。

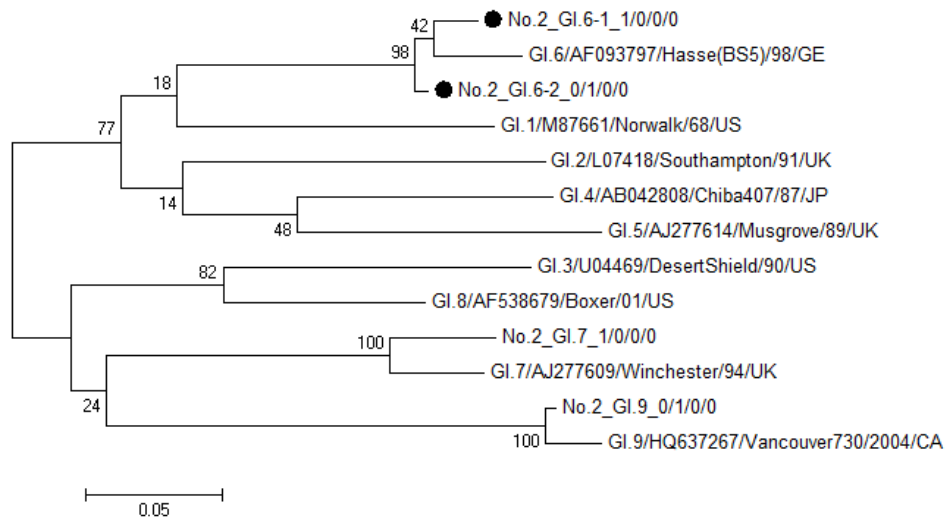


図1 食中毒事例から検出された NoV GI の系統樹 (260nt)

配列名：事例番号\_遺伝子型\_調理従事者数/発症者数/吐物数/拭取り数

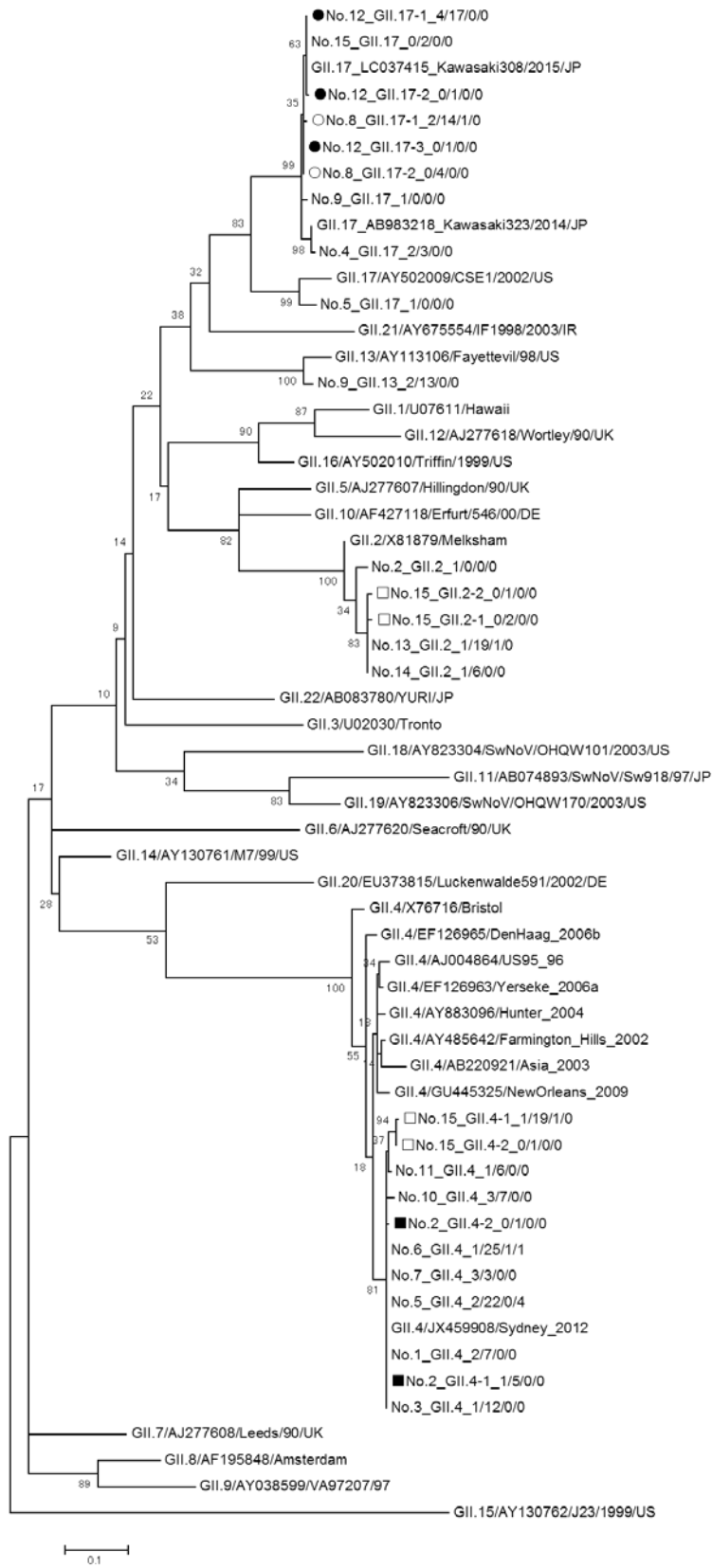


図2 食中毒事例から検出された NoV GII の系統樹 (279nt)

平成 28～30 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」  
研究分担報告

岩手県におけるノロウイルス集団発生事例の動向と  
不顕性感染者の実態について

|       |        |               |
|-------|--------|---------------|
| 研究分担者 | 上間 匡   | 国立医薬品食品衛生研究所  |
| 研究協力者 | 高橋 知子  | 岩手県環境保健研究センター |
| 研究協力者 | 佐藤 直人  | 岩手県環境保健研究センター |
| 研究協力者 | 川上 修央  | 岩手県環境保健研究センター |
| 研究協力者 | 白澤 彰   | 岩手県環境保健研究センター |
| 研究協力者 | 藤森 亜紀子 | 岩手県環境保健研究センター |
| 研究協力者 | 佐藤 卓   | 岩手県環境保健研究センター |
| 研究協力者 | 高橋 雅輝  | 岩手県環境保健研究センター |
| 研究協力者 | 岩渕 香織  | 岩手県環境保健研究センター |
| 研究協力者 | 梶田 弘子  | 岩手県環境保健研究センター |

### 研究要旨

2013/14～2017/18 シーズンの岩手県内のノロウイルスによる集団事例において、保育園では遺伝子型の多様性がみられ、高齢者施設では、食中毒の 1 例 (GII.17) を除き、すべて GII.4 によるものであった。2016/17 シーズンに保育園で多発した GII.2 による集団発生は、2017/18 シーズンは保育園に加えて、小学校、高校、障害者施設の若年層での発生も複数みられた。

2014 年 9 月～2017 年 11 月の流入下水から検出されたノロウイルスの遺伝子型は、同時期の集団発生では検出されない遺伝子型も多数みられ、感染しても病原性が低い、あるいは無症状の感染者の存在が示唆された。

同シーズンの岩手県内のノロウイルスによる集団事例において、無症状の調理従事者(事例発生時)の約 10.8%からノロウイルスが検出された。2015 年 1 月～2018 年 5 月のノロウイルス集団発生事例(114 事例)の感染者(525 名)のうち、不顕性感染者を含む事例(20 事例)の感染者(135 名)を症状の有無別で便中のノロウイルスコピー数を比較した場合、顕性感染者は不顕性感染者より有意に高いことが分かった。しかしながら、不顕性感染者の排泄するウイルスコピー数もまた、十分に感染を拡大させる量であり、集団発生等における感染源となる可能性が示唆された。このことから、不顕性感染者の存在と感染拡大の可能性

を認識し、家庭や、集団生活を行う様々な施設におけるノロウイルス等の感染症の拡大防止策を図ることが重要である。

## A. 研究目的

岩手県におけるノロウイルス集団発生事例の動向を把握し、集団発生事例の原因となりうる不顕性感染者の実態を調査することで、ノロウイルスによる食中毒等の集団発生の予防およびノロウイルスの感染拡大の防止に資するもの。

## B. 研究方法

### 1. 材料

2013/14～2017/18 シーズンの岩手県内のノロウイルスによる集団発生事例の疫学情報、2015年1月～2018年5月の事例の便検体および2014年9月～2017年11月の各月に県内A下水処理場で採取された流入下水を対象とした。

### 2. 集団発生の動向

2013/14～2017/18 シーズンの県内の事例の疫学情報を解析した。

### 3. 感染者の排泄ウイルス量と遺伝子型

検体として提供された患者便、無症状者便の10%糞便乳剤140 $\mu$ lからQIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)を用いてRNA抽出を行った後、PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time)

(TaKaRa)で逆転写を行いcDNAを合成した。ノロウイルスの検出は、厚生労働省通知法(平成19年5月14日付け食安監発題0514004号)に準じて行った。ノロウイルスが検出された検体について、増幅プライマーCOG1F/G1SKRおよびCOG2F/G2SKRを使用し、得られたPCR産物について、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、Norovirus

Genotyping

tool(<http://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus/#/>)を用いて遺伝子型を同定した。

検出されたノロウイルスコピー数の比較解析に、R version 3.4.3を使用し分散分析及び多重比較を行った。

### 4. 流入下水からのノロウイルス遺伝子の検出および遺伝子型別

2014年9月～2017年11月の各月に県内A下水処理場で採取された流入下水について、ノロウイルスの検出を行った。流入下水400mlを12,000rpm、20分冷却遠心し、その上清に2.5M MgCl<sub>2</sub>を添加(最終濃度0.05M)後、0.5N HClでpH3.5に調整したものを蛋白低吸着フィルター(0.47 $\mu$ m)でろ過した。フィルターを細断し、3%beef extractを添加後、振とうし、5分間静置した後、8,000rpm、1分遠心した。溶出液を回収し、QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)を用いてRNA抽出を行った後、PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time) (TaKaRa)で逆転写反応を行いcDNAを合成した。ノロウイルスの検出および遺伝子型別は、便検体と同様の方法で実施した。

(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、倫理面への配慮は不要である。

## C. 研究結果

### 1. 集団発生の動向

県内のノロウイルスの集団発生は、例年、11月～1月にピークとなるが、2017/18



シーズン同期に明瞭なピークはなく、例年、患者数が減少する6月にシーズン中、最多の発生があった(図1)。流行した遺伝子型は2016/17シーズンと同様にGⅡ.2、GⅡ.4が主流を占めており、発生施設についても、2016/17シーズンと同様に低年齢層である保育所で多く発生していたが、2016/17シーズンと異なり、小学校、高校、障害者支援施設等の若年層での発生も複数見られた(図2)。

5シーズンの発生状況から、流行する遺伝子型はシーズンごとに異なるが、GⅡ.4は恒常的に流行がみられた(図3)。2016/17、2017/18シーズンにおいて保育園では、GⅡ.2による大きな流行があったが、GⅡ.2以外の様々な遺伝子型のノロウイルスの集団発生も確認された(図2)。一方、高齢者施設では、食中毒事例1件(GⅡ.17)を除き、単一の遺伝子型(GⅡ.4)の集団発生であった(図4)。

#### 2. 感染者の排泄ウイルス量と遺伝子型

調査期間中の集団発生事例において、無症状の調理従事者(事例発生時)の約10.8%からノロウイルスが検出された(図5)。2015年1月～2018年5月の集団発生事例(114事例)の感染者(525名)のうち、不顕性感染者を含む事例(20事例)の感染者(135名)を症状の有無で便中のノロウイルスコピー数を比較した結果、顕性感染者は不顕性感染者より有意に高いことが分かった(図6)。また、遺伝子型別で比較した場合、全体ではウイルスコピー数に有意な差は認められなかったが、個別の比較において、GⅡ.2はGⅡ.4より有意にコピー数が高かった(図7)。症状の有無別で遺伝子型による比較

をした場合には、有症者で遺伝子型による有意差が認められた(ANOVA  $P=0.048$ )(図8)。

#### 3. 流入下水からのノロウイルス遺伝子の検出および遺伝子型別

2014年9月～2017年11月の調査期間中、ノロウイルスはGⅠ、GⅡともにほぼ毎月検出された。2014/15シーズン、2015/16シーズンと集団発生の多かったGⅡ.17、2016/17シーズンに多発したGⅡ.2は、集団発生が起こる約3か月前の流入下水から検出が確認された(図9)。

#### D. 考察

図2に見られるように、保育所で検出される遺伝子型の多様性は、図1に示される流行遺伝子型が反映されており、免疫の低い低年齢層の集団に周囲に存在する様々な遺伝子型が持ち込まれ、集団発生となっている可能性を示唆するものと考えられた。一方、高齢者施設では、食中毒の1例(GⅡ.17)を除き、すべてGⅡ.4によるものであり、入所者、利用者の免疫応答や、GⅡ.4が持ち込まれやすい状況にある等の原因が考えられるが不明である。流入下水から検出されるノロウイルスの遺伝子型は、食中毒や集団事例として探知されない顕性・不顕性感染者の存在を示唆するものであった。集団発生以前に流入下水から検出されており、流入下水等の環境中のウイルス調査が発生動向や流行遺伝子型の予測の一助となることが示唆された。不顕性感染者の排泄するウイルスコピー数は、顕性感染者より有意に低いことがわかったが、十分に感染を拡大させる量であり、集団発生

等における感染源となる可能性が示唆された。今後、感染者の年齢、発症からの日数、発症施設等、様々な要因を含めた解析が必要であると考え。

### E. 結論

不顕性感染者の存在と感染拡大の可能性を認識し、家庭や、集団生活を行う様々な施設におけるノロウイルス等の感染症の拡大防止策を図ることが重要である。

### 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

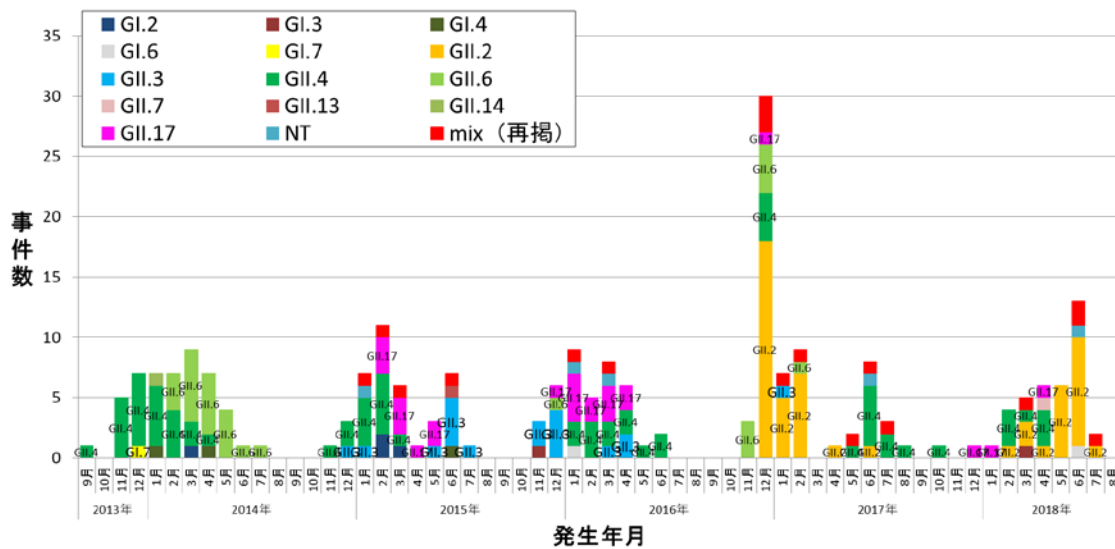


図 1. ノロウイルス遺伝子型月別発生状況(2013/14～2017/18 シーズン、岩手県)

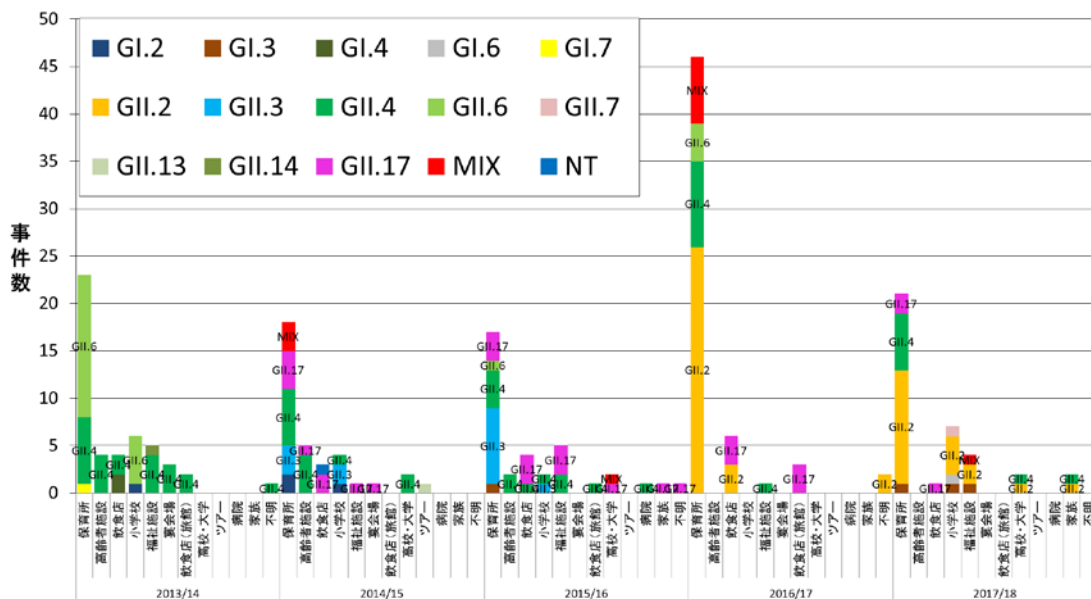


図 2. ノロウイルス施設別遺伝子型発生状況(2013/14～2017/18 シーズン、岩手県)

全体

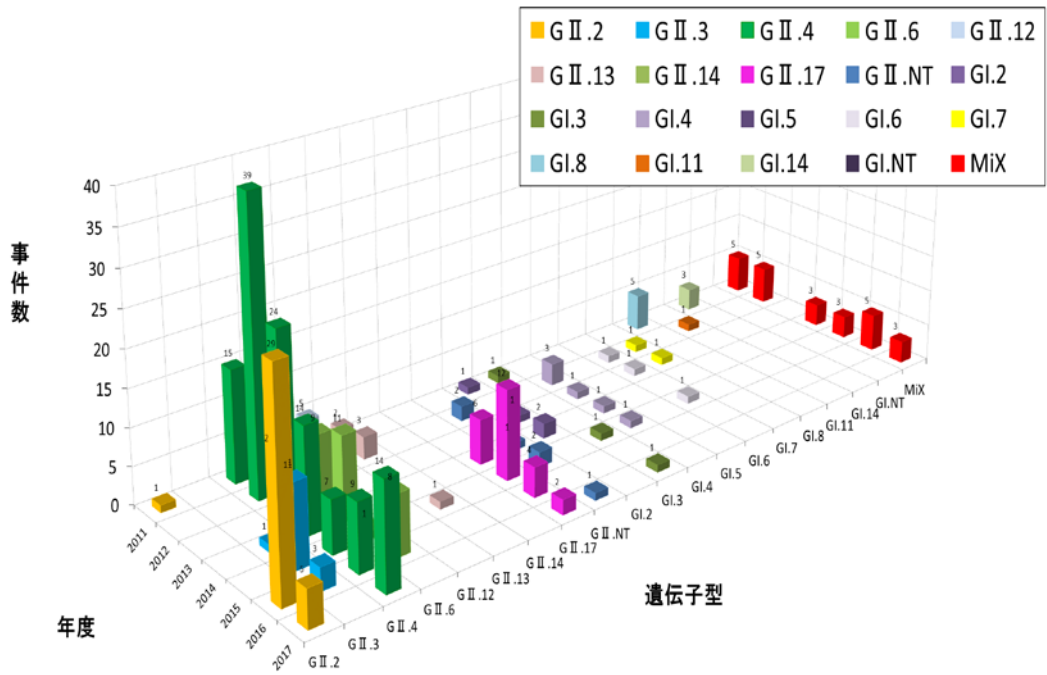


図 3. 集団発生事例における遺伝子型別の発生の推移( 2011~2017年度別、岩手県)

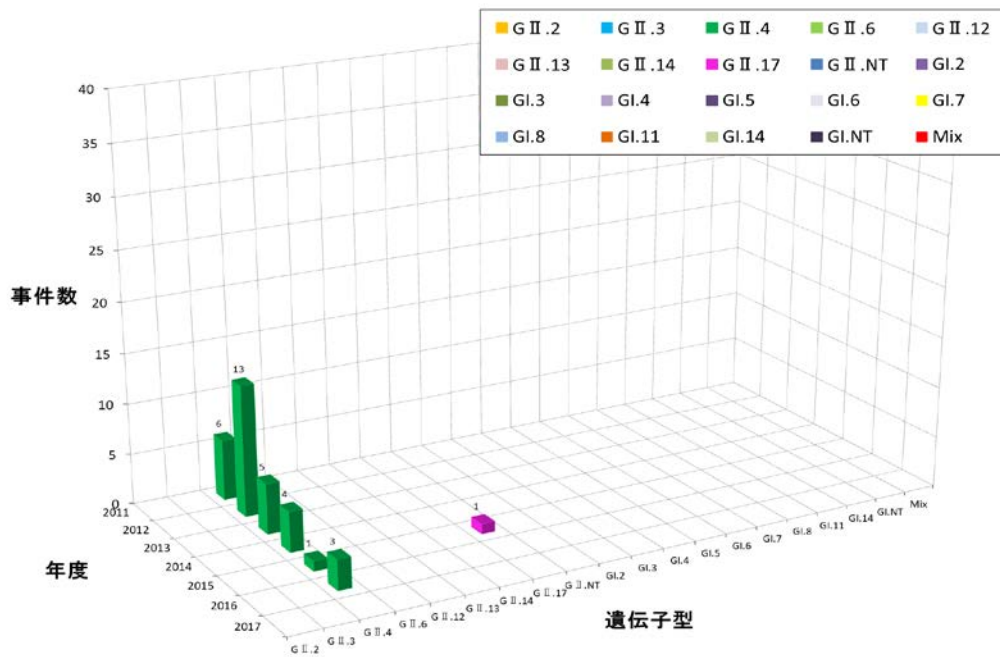


図 4. 集団発生事例(高齢者施設)における遺伝子型別の発生の推移 ( 2011~2017年度別、岩手県)

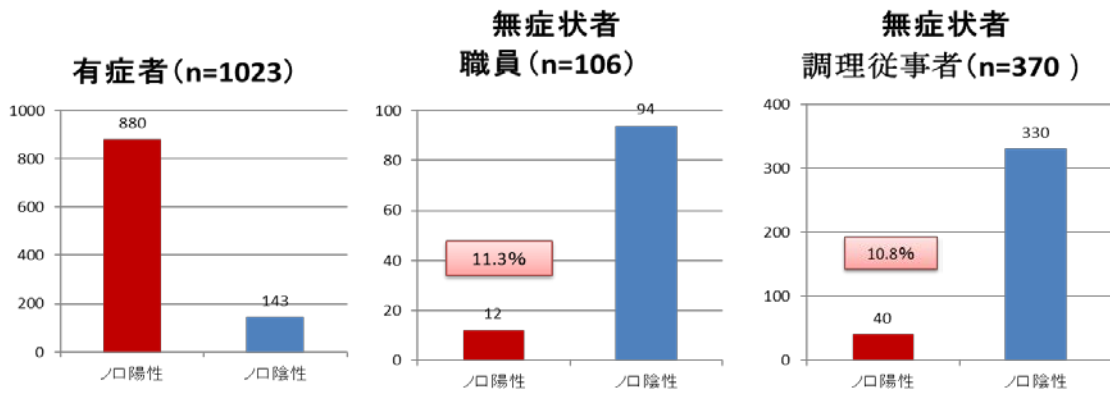
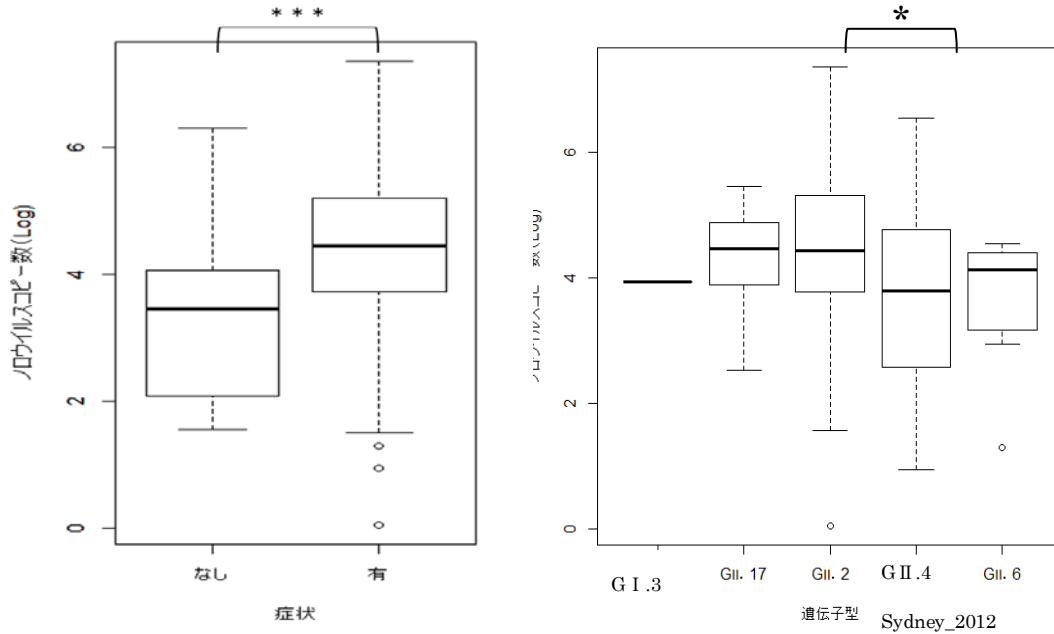


図 5. 有症者・無症状者(施設職員、調理従事者)からのノロウイルス検出状況  
(2013/14~2017/18 シーズン、岩手県)



●有症者のコピー数は、無症状者に比較して有意に高い

●全体で見ると遺伝子型によるコピー数に有意な差は認められない。  
●個別で見ると、GII.2 は GII.4 よりも有意にコピー数が高い。

有症状者(n=105)Log 平均値 : 4.33 (SD : 1.28)

無症状者(n=30)Log 平均値 : 3.36 (SD:1.27)

\*\*\* : P<0.001

ANOVA P=0.066

GII.4 vs GII.2 \* P=0.044

(Tukey の多重比較)

図 6. 症状の有無別ノロウイルスコピー数(Log) 図 7. 遺伝子型別ノロウイルスコピー数(Log)



平成 28-30 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

秋田県内で流通している二枚貝および下水からのノロウイルスの検出  
と秋田県における胃腸炎患者からのノロウイルスの検出状況

研究協力者 秋野 和華子 秋田県健康環境センター・保健衛生部  
研究分担者 斎藤 博之 秋田県健康環境センター・保健衛生部

研究要旨

2016 年 1 月～2018 年 8 月の期間、秋田県内で流通しているカキ等二枚貝についてノロウイルス (NoV) の検出を行った。2015/2016 シーズンの生カキからは GII. 3、GII. 4、GII. 17、GI. 2、GI. 4、生アサリからは GII. 6、GI. 7 が検出された。2016/2017 シーズンの生カキからは GII. 2、GII. 3、GII. 4、GII. 17、GI. 2、GI. 4、生アサリからは GII. 2、GI. 7 が検出された。2017/2018 シーズンの生カキからは GII. 2、GII. 4、GII. 17、GI. 1、GI. 2、生アサリからは GII. 4 が検出された。パック入りカキの浮遊液からは、2016 年 1 月および 2017 年 3 月に同一海域において GII. 17 が検出された。2016 年 12 月～2017 年 3 月に生カキから検出された GII の定量値 (単位: コピー数/g 中腸腺) はすべて  $10^2$  以上であった。また、2018 年 6 月、7 月の岩ガキにおいては、GII、GI ともに  $10^2$  以上である個体が多く存在していた。2016 年 11 月～2017 年 4 月に生アサリから検出された GII の定量値は、いずれも  $10^2$  以上  $10^3$  未満であった。GI の定量値は  $10^1$  以上  $10^2$  未満であった。2018 年 4 月～12 月には下水 (各月 1 回採水) についても NoV の検出を行い、検出された GII の遺伝子型は、4 月～6 月、11 月、12 月は GII. 2、GII. 4、GII. 17 で、7 月は GII. 2、GII. 17、8 月、9 月は GII. 2、10 月は GII. 17 であった。GI の遺伝子型は 4 月から 12 月の間、GI. 1、GI. 2、GI. 3、GI. 5、GI. 6 の 5 種類が検出された。2016 年 1 月～2018 年 8 月の期間、秋田県の食中毒事例は 5 事例であり、検出された遺伝子型は GII. 2、GII. 4、GII. 17 であった。また、集団感染事例および感染症発生動向調査において検出された NoV の遺伝子型は、GII. 2 が最も多かった。今回の結果から、カキ等二枚貝および下水からの NoV の検出は、市中の流行状況と関連するものと考えられた。

A. 研究目的

ノロウイルス (NoV) 等の胃腸炎ウイルス

スが検出される食中毒事例では、二枚貝が原因食品と推定されるケースがある。

二枚貝は、下水処理を潜り抜け生育海域に流れ出た NoV を、消化器官である中腸腺に取り込み蓄積すると考えられている。そのため、カキ等二枚貝の生食および加熱不十分な状態での喫食は、NoV による胃腸炎を引き起こす要因となっている。本研究では、秋田県内で流通している生食用カキおよび二枚貝について NoV の検出を試みるとともに、平成 30 年度は下水についても NoV の検査を行い、その汚染状況を調査した。

また、秋田県において 2016 年 1 月～2018 年 8 月までに感染性胃腸炎患者から検出された NoV の状況についても併せて報告する。

## B. 研究方法

### 1. 材料および対象

#### 1) パック入り市販生カキ

##### ①2016 年 1 月および 2016 年 10 月～2017 年 3 月購入分

秋田市内で購入した国産の生カキを用いた。2016 年 1 月は生食用 3 県 4 海域 (4 ロット)、2016 年 10 月～2017 年 3 月は生食用 2 県 6 海域 (6 ロット) を用意し、カキの中腸腺 2～4 個分を 1 検体として、1 パックにつき 2～3 検体 (合計: 50 検体) の検査を行った。また、2016 年 1 月および 2017 年 1 月以降は、パックに充填されている浮遊液についてもロットごとに検査を行った。

##### ②2016 年 2 月および 2017 年 4 月購入分

秋田市内で購入した国産の生カキを用いた。生食用 1 県 1 海域 (ロット) を 1 パックずつ用意し、カキの中腸腺 1 個分

を 1 検体として、合計 11 検体の検査を行った。また、2017 年 4 月購入分については、パックに充填されている浮遊液についても検査を行った。

#### 2) 市販岩ガキ

##### ①県外産殻付き岩ガキ

2017 年 5 月に秋田市内で購入した県外産 1 県 1 海域 (1 ロット) の岩ガキについて、中腸腺 1 個を 1 検体とし、2 検体の検査を行った。

##### ②秋田県産殻付き岩ガキ

秋田県内で購入した県内産岩ガキについて、2017 年 6 月は 2 海域 (2 ロット) 各 5 検体ずつ、2018 年 6～8 月は同一海域各月 10 検体ずつを用意し、中腸腺 1 個を 1 検体として、合計 40 検体の検査を行った。

#### 3) 市販殻付き生アサリ

##### ①2016 年 3 月購入分

秋田市内で購入した国産の殻付き生アサリを用いた。1 県 1 海域 (1 ロット) を 1 パック用意し、パックに入っていたアサリの中腸腺 (40 個分) を合わせ 1 検体として検査を行った。また、アサリは検査実施まで冷凍にて保存していたが、解凍の際に得られた液 (解凍液) についても検査を行った。

##### ②2016 年 10 月～2017 年 11 月購入分

秋田市内で販売している国産 (2 都道府県 2 海域) の殻付き生アサリを用いた。同一産地のアサリを同一店舗から継続して購入し、NoV 検出状況の推移を観察した。

1 海域 (1 ロット) : 産地 K は年間を通して販売されており 2016 年 10 月～2017 年 11 月まで、他方の 1 海域 (1 ロット) : 産地 H は販売されていた 2017 年 4 月～7 月の検査を行った。1 パックに入っているアサリの中腸腺をすべて合わせて 1 検体とした。また、2017 年 2 月以降のアサリについては、砂抜き (3%の食塩水で 6 時間程度) をした液の検査も実施した。

#### 4) 市販殻付き生ハマグリ

秋田市内で 2017 年 3 月と 10 月に販売していた中国産の殻付き生ハマグリについて検査を行った。アサリ同様、1 パックに入っているハマグリの中腸腺をすべて合わせて 1 検体とした。3 月のハマグリについては、砂抜きをした液についても検査を実施した。

#### 5) 下水

2018 年 4 月～12 月に秋田市内の下水処理場 (1 か所) にて月 1 回 (毎月第 4 月曜または火曜の午前) ずつ採取した流入水と放流水それぞれ 9 検体について、検査を実施した。

#### 6) 食中毒事例および集団感染事例

2016 年 1 月～2018 年 8 月に NoV が検出された食中毒事例 5 事例と集団感染事例 55 事例を集計対象とした (中核市である秋田市分の事例は除く)。

#### 7) 感染症発生動向調査

病原体定点医療機関において 2016 年 1 月～2018 年 8 月に小児科から採取された糞便検体 753 検体のうち NoV が検出され

た 157 検体を集計対象とした。

## 2. 方法

### 1) 二枚貝からのウイルス検出

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)「貝の中腸腺を用いた方法 (超遠心法)」に準じ濃縮を行い、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) により核酸を抽出した。抽出時にはニッポンジーンの「DNaseI (RT Grade)」を用い、オンカラム DNaseI 処理を実施した。その後、Kojima らの方法 (J. Virol. Methods, 100, 107-114, 2002) による RT-PCR と、Kageyama らの方法 (J. Clin. Microbiol., 41, 1548-1557, 2003) による nested リアルタイム PCR にて定性検査を行い、陽性検体については Capsid N/S 領域遺伝子を増幅し、ダイレクトシーケンスにて塩基配列を決定した。平成 28 (2016) 年度は Kitajima らの方法 (Appl. Environ. Microbiol., 76, 2461-2467, 2010.) により RT-PCR で SaV の検査も行った。平成 30 (2018) 年度は GII の増幅プライマーとして、SK プライマーに加え、特異的プライマー (GII. 2、GII. 4、GII. 17) を用い、複数の遺伝子型の検出を試みた (表 1)。また、同時に、GII. 4 については「ノロウイルス GII/4 2012 変異株検出用プライマーセット」(日本遺伝子研究所) を、GII. 17 については「Hypercool テクノロジー™による新型ノロウイルス検出用プライマー&プローブ」(日本遺伝子研究所) を使用しての確認も行った。平成 29 (2017) 年度以降はリアルタイム RT-PCR にて定量値の測定も実施した。



### 1) 下水からのウイルス検出

食品衛生検査指針微生物編 2015 年版「拭取りからのウイルス検出法」を参考に濃縮を行った。夾雑物の多い流入水については予めろ過（定性濾紙：No. 2）を行い検体液とした。検体 1L にポリエチレングリコール 6,000（最終濃度 12%）、NaCl（最終濃度 1mol/L）、MULLER-HINTON BROTH:OXOID（最終濃度 0.5%）を添加し、4°C で一夜放置後、検体 800mL を分取し、4°C、6,000rpm、20 分間遠心し、得られた沈殿物に PBS(-)150 $\mu$ L を添加した懸濁液を濃縮検体とした。核酸の抽出は自動核酸精製抽出装置（MagNA Pure LC2.0:Roche）で行い、その後は二枚貝からのウイルス検出と同様に検査を実施した。

### 3) 糞便検体からのウイルス検出

糞便乳剤から QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) により核酸を抽出した。その後、Kageyama らの方法（J. Clin. Microbiol., 41, 1548-1557, 2003）によりリアルタイム RT-PCR を行い、陽性検体については Capsid N/S 領域遺伝子を増幅し、ダイレクトシーケンスにて塩基配列を決定した。遺伝子型別は、Norovirus Genotyping Tool Version 2.0 (<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus>) および Blast 検索を用いて行った。

（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. 二枚貝からの検出状況

#### 1) 2016 年 1 月購入分の生カキ（表 2）

3 海域から GII が検出された。検出された遺伝子型は、GII. 3、GII. 17 であった。また、GI は 2 海域から検出されたが、うち 1 海域から検出された GI については型別不能であった。確認された GI の遺伝子型は GI. 2、GI. 4 であった。同時に SaV の検出も試みたが、すべての海域において不検出であった。浮遊液は、中腸腺からの検出率が高かった 1 海域から GII が検出され、遺伝子型は GII. 17 であった。

#### 2) 2016 年 2 月購入分の生カキ（表 3）

すべての検体から GII が検出された。検出された遺伝子型は、GII. 4 Sydney 2012、GII. 17 であった。GI は 5 検体から検出され、検出された遺伝子型は GI. 2、GI. 4 であった。SaV は不検出であった。

#### 3) 2016 年 10 月～2017 年 3 月購入分の生カキ（表 4）

2016 年 12 月以降、すべての月において NoV が検出された。検出された GII の遺伝子型は、海域 B の生カキから 2016 年 12 月～2017 年 3 月までの間、GII. 2 のみが検出され、定量値（単位：コピー数/g 中腸腺）はいずれも  $10^2$  以上  $10^3$  未満であった。海域 A の生カキからは、2016 年 12 月に GII. 3 が検出され、2017 年 1 月、3 月には GII. 17、2 月には GII. 2、GII. 17 が検出された。定量値は  $10^2$  以上  $10^4$  未満であった。GI の遺伝子型は、2017 年 1 月に海域 A、B から GI. 2 が検出され、2017 年 2 月には海域 A から GI. 4 が検出された。

定量値は 1.97～12.64 で、いずれも低い定量値であった。浮遊液は、3月に購入した海域 A から GII. 17 が検出され、定量値（単位：コピー数/mL）は 9.39 であった。

4) 2017 年 4 月購入分の生カキ（表 5）

5 検体中 1 検体から GI が検出され、遺伝子型は GI. 2 であった。定量値は 84.08 で低い定量値であった。

5) 2016 年 3 月購入分の生アサリ（表 6）

GII. 6、GI. 7 が検出され、同時に検査を行った SaV は検出されなかった。解凍液の NoV は不検出であった。

6) 2016 年 10 月～2017 年 3 月購入分の生アサリ（表 7）

年間を通して市販されていた産地 K の生アサリからは、2016 年 11 月～2017 年 1 月および 4 月に GII. 2 が検出され、定量値はいずれも  $10^2$  以上  $10^3$  未満であった。2017 年 10 月には GII. 4 Sydney 2012 が検出されたが、極微量のため定量値は得られなかった。2016 年 12 月、2017 年 1 月、4 月には GI. 7 が検出され、定量値は  $10^1$  以上  $10^2$  未満であった。砂抜き液は、中腸腺から NoV が検出されなかった 2017 年 2 月、3 月の検体についても検査を実施したが不検出であったため、2017 年 4 月以降は NoV が検出された検体のみ検査を行った。2017 年 4 月と 10 月購入分について検査を実施したが不検出であった。産地 H の生アサリからは、すべての月において検出されなかった。

7) 2017 年 3 月、10 月購入分生ハマグリ

中国産生ハマグリにおいては、いずれも不検出であった。3 月には砂抜き液についても検査を行ったが不検出であった。

8) 2017 年 5 月購入分県外産岩ガキ（表 8）

県外産（I 産）岩ガキからは GII. 4 Sydney 2012 が検出されたが、定量値は得られなかった。

9) 2017 年 6 月購入分県内産岩ガキ（表 9）

秋田県産岩ガキ（海域 B）から GII. 17 が検出された。定量値は低く 62.75 であった。

10) 2018 年 6 月、7 月、8 月購入分県内産岩ガキ（表 10）

6 月は 10 検体中 6 検体から GII が検出され、4 検体から GI が検出された。検出された GII の定量値は、 $10^2$  以上  $10^3$  未満が 3 検体、 $10^3$  以上が 1 検体で、2 検体は定量値が得られなかった。GI の定量値は  $10^1$  以上  $10^2$  未満が 1 検体、 $10^2$  以上  $10^3$  未満が 3 検体であった。確認された遺伝子型は GII が GII. 2、GII. 4、GII. 17 で、GI は GI. 1、GI. 2 であった。7 月は 10 検体中 3 検体から GII が検出され、7 検体から GI が検出された。検出された GII の定量値は、 $10^1$  以上  $10^2$  未満が 2 検体、 $10^2$  以上  $10^3$  未満が 1 検体であった。GI の定量値は  $10^1$  以上  $10^2$  未満が 1 検体、 $10^2$  以上  $10^3$  未満が 6 検体であった。確認された遺伝子型は GII が GII. 2、GII. 4、GII. 17 で、GI は GI. 2 のみであった。8 月は 10 検体中 1 検体から GII のみが検出された。定量値は、 $10^1$  以上  $10^2$  未満であった。

## 2. 下水からの検出状況（表 11）

GII は 11 月の放流水を除くすべての検体から、GI は 10 月の放流水を除くすべての検体から検出された。検出された GII の遺伝子型は、4 月～6 月、11 月、12 月は GII. 2、GII. 4、GII. 17 の 3 遺伝子型、7 月は GII. 2、GII. 17 の 2 遺伝子型、8 月、9 月は GII. 2、10 月は GII. 17 の 1 遺伝子型であった。GI の遺伝子型は検査を実施した 4 月から 12 月の間、5 種類（GI. 1、GI. 2、GI. 3、GI. 5、GI. 6）が検出された。定量値（単位：コピー数/mL）は、GII において流入水の最大値は 5 月の 18.08 で、放流水の最大値は 4 月の 12.86 であった。10 月の放流水は定量限界以下であった。GI においては流入水の最大値は 10 月の 6.75 で、放流水の最大値は 7 月の 9.08 であった。6 月、8 月、9 月の流入水と 8 月の放流水は定量限界以下であった。

## 3. 食中毒事例におけるウイルスの検出状況（表 12）

5 事例すべてが NoV GII の感染であり、検出された遺伝子型は GII. 2、GII. 4 Sydney 2012、GII. 17 であった。5 事例中 1 事例は、GII. 4 Sydney 2012 と GII. 17 が同時に検出された事例であった。2017 年 1 月の 1 事例はカキが原因食品と推定された事例であった。

## 4. 集団感染事例における NoV の遺伝子型別検出状況（表 13）

2016 年 10 月以降、GII. 2 の検出が増加し、27 例（45.8%）と最も多かった。次いで、GII. 4 Sydney 2012 が 15 例（25.4%）で 2017 年 4 月以降に多く検出された。

GII. 17 は 10 例（16.9%）で 2016 年 1 月～5 月に多くなっていた。GII. 6 の 2 例（3.4%）は 2016 年に検出された。GI. 4 の 2 例（3.4%）はどちらも GII. 2 が同時に検出された。2018 年 4 月に検出された GI. 2、GI. 7 の 1 例（1.7%）は同一事例からの検出であった。GI. 3 の 1 例（1.7%）は 2016 年 5 月の検出であった。

## 5. 感染症発生動向調査における NoV の遺伝子型別検出状況（表 14）

GII. 2 が 76 例（46.6%）と最も多く、その検出は 2016 年 11 月～2017 年 5 月、2018 年 2 月～8 月に集中していた。次いで、GII. 4 Sydney 2012 が 57 例（35.0%）の検出であり、2016 年の冬と 2017 年、2018 年の春に増加していた。GII. 17 の 9 例（5.5%）は、2016 年と 2018 年に検出され、冬に多く確認された。GI. 4 の 6 例（3.7%）はすべて 2018 年に検出され、そのうち 4 例は GII. 2 も同時に検出された。GI. 3 の 4 例（2.5%）は 2016 年の検出であった。GI. 2、GI. 5、GI. 7 はそれぞれ 3 例（1.8%）から検出された。GI. 5 が検出された 1 例は同時に GII. 2 も検出され、GI. 7 が検出された 1 例からは GII. 4 Sydney 2012 が同時に検出された。GI. 6 は 1 例（0.6%）からの検出であった。2018 年 5 月には、近年、本県での確認がなかった GII. 8 が 1 例（0.6%）検出された。

## D. 考察

二枚貝による食中毒事例が多発していた 2014/2015 シーズン（平成 27 年度報告書において報告）に比べ、2016 年は秋田県内において食中毒事例が大幅に減少し

た。しかしながら、2016年1月、2月に購入した生カキからは、2014/2015シーズンに引き続きGII.17が多く検出され、また、カキの流通が増加する1月以降に感染症発生動向調査および食中毒・集団感染事例においてもGII.17の検出数が多くなっていた。このことから、県内で流通した生カキの喫食によりGII.17の感染および不顕性感染を引き起こされ、感染の契機となっていた可能性も考えられた。2016/2017シーズン以降、GII.17の検出数は全国的に減少しているが（IASR\_HP：月別ノロウイルスGII遺伝子型検出報告状況）、2017年1月～3月の生カキや2017年6月および2018年6月～8月に購入した本県産の岩ガキからはこの遺伝子型が検出されている。また、2018年に検査を実施した下水からも高頻度で検出されていることから、GII.17はカキとの関連性が強く、不顕性感染等により環境中で維持され続けている可能性が考えられた。2016/2017シーズンに検出数が多くなっているとの報告があったGII.2（病原微生物検出情報 Vol.38 No.1）は、本県の感染症発生動向調査および集団感染事例においても2016年10月以降に多く検出されていた。また、2016年10月～2017年3月に購入した生カキおよび一年を通して検査を実施した生アサリからもGII.2が検出されていた。これらのカキやアサリは県外産であることから、産地周辺でも本県同様の流行があったものと考えられた。2018年6月、7月の岩ガキにおいては、多くの個体からGI.2の遺伝子型が検出されており、同時期に採取した下水検体からも同様の遺伝子型が確認されてい

た。この時期、本県では感染症発生動向調査および食中毒・集団感染事例においてGI.2が検出されていないことから、この遺伝子型が成人での不顕性感染やカキ等二枚貝により環境中で維持されていた可能性も考えられた。定量値においては、胃腸炎に関連したカキのNoV汚染量が $10^3$ コピー数/g程度であったとする報告がある（食品衛生学雑誌 2017 Vol.58 No.1）。2016年12月～2017年3月に購入した生カキから検出されたGIIの定量値はすべて $10^2$ 以上であった。また、2018年6月、7月に購入した岩ガキにおいては、GII、GIともに $10^2$ 以上である個体が多く存在していた。カキ1個当たりの中腸腺が1～3g程度であったことから、それらの供試カキは1～数個の喫食で感染が成立する可能性があると考えられた。アサリにおいては、今回検査に使用した中腸腺は1個当たり0.1～0.2g程度であり、得られた定量値から単純に換算すると、アサリ1個の喫食では感染の可能性は低いと考えられる。しかし、料理によってはアサリ数十個が使用され、また、殻の開口を目安に調理を終了した場合には、加熱不十分な状態で食卓に提供されることも危惧される。本来、アサリは加熱することが前提の食材であるが、調理の方法によっては注意が必要であると思われた。浮遊液は、2016年1月および2017年3月に同一の海域からNoVが検出された。この結果は調理時汚染の可能性を示唆しており、注意喚起を促すひとつのデータとして重要な結果であると考えられる。2017/2018シーズンの本県における感染症発生動向調査によるNoVの検出数は、4

月～6月に多くなっていたが、この結果は、GIIにおける下水の定量値と挙動が一致していた。また、6月の岩ガキにおける定量値も高かったことから、市中のNoVの流行が下水中のウイルス量に影響を及ぼし、岩ガキにおけるNoVの蓄積に繋がっていたものと考えられた。岩ガキはNoVの非流行期である夏季に出荷されるため、これまで喫食による感染の可能性が低いと考えられてきた。しかしながら、近年、NoVの流行は冬場に限局したものでなくなってきたように思われ、岩ガキへの影響が懸念される。今後もNoVの流行状況には注視していく必要があると考えられた。

## E. 結論

カキ等二枚貝および下水からのNoVの検出は、市中の流行状況と相関するものと考えられた。今後はさらにデータを蓄積し、啓発および情報提供に役立てていきたいと考えている。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Sato H, Shibata C, Akino W, Saito H, Saito Shihoko Saito, Monma N, Toukairin A, Takahashi H, Fujita H, Kadosaka T, Takada N, Kawabata H and Ando S: Survey of *Leptotrombidium akamushi* in Omono river basin in Akita Prefecture, Japan in 2011～2014. *Med. Entomol. Zool.*, 67 (3), 167-175 (2016)
- 2) Sato H, Shibata C, Fujiya Y, Akino W and Saito H: Epidemiology of scrub typhus in Akita Prefecture, 2007-2016.

*Infectious Agents Surveillance Report*, 38 (6), 5-6 (2017)

3) Saito H, Akino W, Sato H, Fujiya Y, Shibata C, Sato R and Shimizu H: Isolation of enterovirus D68 using suckling mice. *Infectious Agents Surveillance Report*, 38 (10), 11-12 (2017)

4) Konno T, Takahashi S, Ogawa C, Kashio H, Kumagai Y, Akino W, Saito H, Sasaki K, Kato Y, Daimon Y, Takashima M, Toyoshima Y, Detection of multiple pathogens from a patient with traveler's diarrhea and information regarding the tests performed - Akita Prefecture. *Infectious Agents Surveillance Report*, 39 (12), 17-18 (2018).

### 2. 学会発表

- 1) 斎藤博之、秋野和華子、野田衛：ノロウイルス遺伝子型別の効率化に関する検討、第37回日本食品微生物学会学術総会、2016、東京
- 2) 秋野和華子、斎藤博之、野田衛：市販生カキからのノロウイルス・サポウイルスの検出と秋田県内における流行状況の推移、第37回日本食品微生物学会学術総会、2016、東京
- 3) Saito H, Shimizu Y, Sato H, Akino W, Hayakawa S and Ushijima H: Immunological response in a patient of norovirus GII.P17-GII.17 infection. 第64回日本ウイルス学会学術集会、2016、札幌
- 4) 斎藤博之、秋野和華子、野田衛：疫学的視点から見たノロウイルス GII.P17-GII.17 型の病原性に関する一考

察、第 112 回日本食品衛生学会学術講演会、2016、函館

5) 斎藤博之、秋野和華子、佐藤寛子、清水優子、早川智、牛島廣治：ノロウイルス GII. 17 感染に伴う免疫応答と病原性に関する一考察、秋田応用生命科学研究会第 28 回講演会、2016、秋田

6) 斎藤博之、秋野和華子、佐藤寛子、清水優子、早川智、牛島廣治、野田衛：生カキが原因でノロウイルスに感染した症例におけるノロウイルス排泄状況と抗体価の推移、第 29 回秋田応用生命科学研究会講演会、2017、秋田

7) 斎藤博之、秋野和華子、佐藤寛子、清水優子、早川智、牛島廣治、野田衛：パンソルビン・トラップ法の捕捉抗体供給源としてのガンマグロブリンの再評価、第 38 回日本食品微生物学会学術総会、2017、徳島

8) 秋野和華子、斎藤博之、野田衛：市販生カキにおけるノロウイルス汚染の定量的調査、第 38 回日本食品微生物学会学術総会、2017、徳島

9) Saito H, Shimizu Y, Sato H, Akino W, Hayakawa S and Usijima H : Immunological response in a patient of noroviruses infection associated with raw oyster. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、2017、大阪

10) 斎藤博之、秋野和華子、佐藤寛子、清水優子、早川智、牛島廣治、野田衛：ノロウイルス GII. 17 に対するパンソルビン・トラップ法の有効性に関する検討、第 113 回日本食品衛生学会学術講演会、2017、東京

11) 秋野和華子、斎藤博之、野田衛、上間

匡：市販アサリからのノロウイルスの検出状況、第 39 回日本食品微生物学会学術総会、2018、大阪

12) 斎藤博之、秋野和華子、野田衛、上間匡：パンソルビンの再固定によるノロウイルスの回収率向上、第 39 回日本食品微生物学会学術総会、2018、大阪

13) Saito H, Akino W, Sato H, Fujiya Y, Shibata C, Sato R and Shimizu : Isolation of enterovirus D68 using suckling mice and the background. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会、2018、京都

14) 斎藤博之、秋野和華子、佐藤寛子、清水優子、早川智、牛島廣治、野田衛、上間匡：生カキ喫食後の胃腸炎症例から得られたノロウイルス感染の特徴、第 114 回日本食品衛生学会学術講演会、2018、広島

15) 斎藤博之、秋野和華子、佐藤寛子、藤谷陽子、柴田ちひろ、佐藤了悦、清水博之：乳飲みマウスによるエンテロウイルス D68 型の分離、第 32 回秋田応用生命科学研究会講演会、2018、秋田

## 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 特異的プライマーの配列

|                        |                                    |
|------------------------|------------------------------------|
| G II. 2* <sup>1</sup>  | F : ATG GTG CAG CCG GCC TCG TG     |
|                        | R : CCC AAC TCT AGA TTC AGT AGC    |
| G II. 4* <sup>2</sup>  | F : CAA CCC ATC TGA TGG GTC CG     |
|                        | R : GCC CAA GGG CGC GCT CCA        |
| G II. 17* <sup>2</sup> | F : GCC GCT CCA TCT AAT GAT GG     |
|                        | R : TAT ACA TCC TTG ACA AAT GAG CC |

\*1) 本研究において作成

\*2) 平成 27 年度 総括・研究分担報告書 (新潟県保健科学研究所 田村)

表 1 シーケンス用プライマー 参照

表 2 市販生カキからのウイルス検出状況 (2016 年 1 月購入分)

| シーズン    | 購入月        | 検体名<br>海域             | 加工日        | 個数      | ノロウイルス  |        | サポウイルス | 浮遊液               |
|---------|------------|-----------------------|------------|---------|---------|--------|--------|-------------------|
|         |            |                       |            |         | G II    | G I    |        |                   |
| 2015/16 | 1月         | 生カキ<br>A-21           | 2016年1月29日 | 3       | GII. 17 | (-)    | (-)    | ノロウイルス<br>GII. 17 |
|         |            |                       |            | 3       | GII. 17 | (-)    | (-)    |                   |
|         |            |                       |            | 2       | GII. 17 | GI. 2  | (-)    |                   |
|         |            |                       |            | 3       | GII. 17 | 検出     | (-)    |                   |
|         |            |                       |            | 3       | GII. 17 | (-)    | (-)    |                   |
|         |            |                       |            | 2       | GII. 17 | GI. 4  | (-)    |                   |
|         |            | 生カキ<br>C-1            | 2016年1月29日 | 3       | (-)     | (-)    | (-)    | ( - )             |
|         |            |                       |            | 3       | (-)     | GI. NA | (-)    |                   |
|         |            |                       |            | 3       | (-)     | (-)    | (-)    |                   |
|         |            | 生カキ<br>B-9            | 2016年1月29日 | 3       | (-)     | (-)    | (-)    | ( - )             |
|         |            |                       |            | 3       | GII. 17 | (-)    | (-)    |                   |
|         |            |                       |            | 3       | GII. 17 | (-)    | (-)    |                   |
|         | 3          |                       |            | (-)     | (-)     | (-)    |        |                   |
|         | 3          |                       |            | (-)     | (-)     | (-)    |        |                   |
|         | 2          |                       |            | (-)     | (-)     | (-)    |        |                   |
|         | 生カキ<br>B-5 | 未記入<br>消費期限：2016年2月1日 | 3          | GII. 17 | (-)     | (-)    | ( - )  |                   |
|         |            |                       | 3          | (-)     | (-)     | (-)    |        |                   |
|         |            |                       | 2          | (-)     | (-)     | (-)    |        |                   |
|         |            |                       | 3          | GII. 3  | (-)     | (-)    |        |                   |
|         |            |                       | 3          | GII. 17 | (-)     | (-)    |        |                   |
|         |            |                       | 2          | (-)     | (-)     | (-)    |        |                   |

表 3 市販生カキからのウイルス検出状況 (2016 年 2 月購入分)

| シーズン    | 購入月 | 検体名<br>海域   | 加工日        | 個数 | 採取量<br>(g) | ノロウイルス          |       | サポウイルス |
|---------|-----|-------------|------------|----|------------|-----------------|-------|--------|
|         |     |             |            |    |            | G II            | G I   |        |
| 2015/16 | 2月  | 生カキ<br>A-30 | 2016年2月22日 | 1  | 2.66       | GII. 17         | GI. 2 | (-)    |
|         |     |             |            | 1  | 2.87       | GII. 17         | GI. 4 | (-)    |
|         |     |             |            | 1  | 3.07       | GII. 17         | GI. 2 | (-)    |
|         |     |             |            | 1  | 3.22       | GII. 4*、GII. 17 | GI. 4 | (-)    |
|         |     |             |            | 1  | 3.02       | GII. 17         | (-)   | (-)    |
|         |     |             |            | 1  | 2.75       | GII. 17         | GI. 4 | (-)    |

\*) GII. 4 : GII. 4 Sydney 2012

表4 市販生カキからのNoV検出状況（2016年10月～2017年3月購入分）

| シーズン        | 購入月         | 検体名<br>海域     | 加工日                    | 個数      | ノロウイルス  |           |       |                 | 浮遊液<br>コピー数<br>/mL |
|-------------|-------------|---------------|------------------------|---------|---------|-----------|-------|-----------------|--------------------|
|             |             |               |                        |         | G II    |           | G I   |                 |                    |
|             |             |               |                        |         | 遺伝子型    | コピー数/g中腸腺 | 遺伝子型  | コピー数/g中腸腺       |                    |
| 2016/17     | 10月         | 生カキ<br>B-9    | 2016年10月14日            | 3       | (-)     | NT        | (-)   | (-)             | NT                 |
|             |             |               |                        | 3       | (-)     | NT        | (-)   | (-)             |                    |
|             | 11月         | 生カキ<br>B-9    | 2016年11月24日            | 3       | (-)     | NT        | (-)   | (-)             | NT                 |
|             |             |               |                        | 3       | (-)     | NT        | (-)   | (-)             |                    |
|             |             |               |                        | 2       | (-)     | NT        | (-)   | (-)             |                    |
|             | 12月         | 生カキ<br>B-9    | 2016年12月16日            | 3       | (-)     | NT        | (-)   | (-)             | NT                 |
|             |             |               |                        | 3       | (-)     | NT        | (-)   | (-)             |                    |
|             |             |               |                        | 2       | GII. 2  | 426.67    | (-)   | (-)             |                    |
|             |             | 生カキ<br>A-30   | 2016年12月16日            | 4       | GII. 3  | 445.49    | (-)   | (-)             | NT                 |
|             |             |               |                        | 4       | GII. 3  | 173.49    | (-)   | (-)             |                    |
|             | 1月          | 生カキ<br>B-9    | 2017年1月26日             | 3       | (-)     | NT        | (-)   | (-)             | (-)                |
|             |             |               |                        | 3       | GII. 2  | 110.27    | (-)   | (-)             |                    |
|             |             | 生カキ<br>B-9(S) | 未記入<br>消費期限：2017年1月31日 | 3       | GII. 2  | 683.92    | GI. 2 | 0.00            | (-)                |
|             | 2           |               |                        | GII. 2  | 887.84  | (-)       | (-)   |                 |                    |
|             | 生カキ<br>A-30 | 2017年1月27日    | 3                      | GII. 17 | 1446.27 | (-)       | (-)   | (-)             |                    |
|             |             |               | 3                      | GII. 17 | 1245.59 | GI. 2     | 12.64 |                 |                    |
|             |             |               | 3                      | GII. 17 | 1712.94 | (-)       | (-)   |                 |                    |
|             | 2月          | 生カキ<br>B-9(O) | 未記入<br>消費期限：2017年3月2日  | 4       | GII. 2  | 135.22    | (-)   | (-)             | (-)                |
|             |             |               |                        | 3       | GII. 2  | 392.16    | (-)   | (-)             |                    |
|             |             | 生カキ<br>A-30   | 2017年2月24日             | 3       | GII. 17 | 1041.57   | GI. 4 | 1.97            | (-)                |
|             |             |               |                        | 3       | GII. 2  | 674.51    | GI. 4 | 2.32            |                    |
|             | 2           | GII. 17       | 743.53                 | (-)     | (-)     |           |       |                 |                    |
|             | 3月          | 生カキ<br>B-6    | 未記入<br>消費期限：2017年3月20日 | 4       | GII. 2  | 150.90    | (-)   | (-)             | (-)                |
|             |             |               |                        | 4       | GII. 2  | 283.29    | (-)   | (-)             |                    |
| 生カキ<br>A-21 |             | 2017年3月17日    | 3                      | GII. 17 | 577.25  | (-)       | (-)   | GII. 17<br>9.39 |                    |
|             |             |               | 2                      | (-)     | NT      | (-)       | (-)   |                 |                    |
|             |             |               | 2                      | (-)     | NT      | (-)       | (-)   |                 |                    |

表5 市販生カキからのNoV検出状況（2017年4月購入分）

| シーズン    | 購入月 | 検体名<br>海域  | 加工日                    | 個数 | 採取量<br>(g) | ノロウイルス |           |       |           | 浮遊液 |
|---------|-----|------------|------------------------|----|------------|--------|-----------|-------|-----------|-----|
|         |     |            |                        |    |            | G II   |           | G I   |           |     |
|         |     |            |                        |    |            | 遺伝子型   | コピー数/g中腸腺 | 遺伝子型  | コピー数/g中腸腺 |     |
| 2016/17 | 4月  | 生カキ<br>B-9 | 未記入<br>消費期限：2017年4月18日 | 1  | 1.93       | (-)    | NT        | (-)   | (-)       | (-) |
|         |     |            |                        | 1  | 1.84       | (-)    | NT        | (-)   | (-)       |     |
|         |     |            |                        | 1  | 0.98       | (-)    | NT        | GI. 2 | 84.08     |     |
|         |     |            |                        | 1  | 1.90       | (-)    | NT        | (-)   | (-)       |     |
|         |     |            |                        | 1  | 1.87       | (-)    | NT        | (-)   | (-)       |     |



表6 市販生アサリからのNoV 検出状況 (2016年3月購入分)

| シーズン    | 購入月 | 検体名<br>産地 | 加工日       | 個数 | ノロウイルス |      | 解凍液 |
|---------|-----|-----------|-----------|----|--------|------|-----|
|         |     |           |           |    | G II   | G I  |     |
| 2015/16 | 3月  | 生アサリ<br>K | 2016年3月7日 | 40 | GII.6  | GI.7 | (-) |

表7 市販生アサリからのNoV 検出状況 (2016年10月～2017年11月購入分)

| 検体名<br>産地 | シーズン    | 購入月         | 加工日         | 個数  | ノロウイルス |           |      |           | 砂抜き液 |
|-----------|---------|-------------|-------------|-----|--------|-----------|------|-----------|------|
|           |         |             |             |     | G II   |           | G I  |           |      |
|           |         |             |             |     | 遺伝子型   | コピー数/g中腸腺 | 遺伝子型 | コピー数/g中腸腺 |      |
| 生アサリ<br>K | 2016/17 | 10月         | 2016年10月16日 | 26  | (-)    | NT        | (-)  | NT        | NT   |
|           |         | 11月         | 2016年11月25日 | 29  | GII.2  | 627.45    | (-)  | NT        | NT   |
|           |         | 12月         | 2016年12月17日 | 24  | GII.2  | 464.31    | GI.7 | 38.90     | NT   |
|           |         | 1月          | 2017年1月19日  | 20  | GII.2  | 981.96    | GI.7 | 26.10     | NT   |
|           |         | 2月          | 2017年2月13日  | 28  | (-)    | NT        | (-)  | NT        | (-)  |
|           |         |             | 2017年2月13日  | 29  | (-)    | NT        | (-)  | NT        | (-)  |
|           |         | 3月          | 2017年3月13日  | 31  | (-)    | NT        | (-)  | NT        | (-)  |
|           |         | 4月          | 2017年4月18日  | 21  | GII.2  | 445.49    | GI.7 | 32.94     | (-)  |
|           |         | 5月          | 2017年5月15日  | 25  | (-)    | NT        | (-)  | NT        | NT   |
|           |         | 6月          | 2017年6月14日  | 21  | (-)    | NT        | (-)  | NT        | NT   |
|           | 7月      | 2017年7月18日  | 25          | (-) | NT     | (-)       | NT   | NT        |      |
|           | 8月      | 2017年8月21日  | 29          | (-) | NT     | (-)       | NT   | NT        |      |
|           | 2017/18 | 9月          | 2017年9月13日  | 24  | (-)    | NT        | (-)  | NT        | NT   |
|           |         | 10月         | 2017年10月18日 | 34  | GII.4* | 0.00      | (-)  | NT        | (-)  |
| 11月       |         | 2017年11月20日 | 27          | (-) | NT     | (-)       | NT   | NT        |      |

\*) GII.4 : GII.4 Sydney 2012

表8 県外産岩ガキからのNoV 検出状況 (2017年5月購入分)

| シーズン    | 購入月 | 検体名<br>産地 | 加工日        | 個数 | 採取量<br>(g) | ノロウイルス |           |      |           |
|---------|-----|-----------|------------|----|------------|--------|-----------|------|-----------|
|         |     |           |            |    |            | G II   |           | G I  |           |
|         |     |           |            |    |            | 遺伝子型   | コピー数/g中腸腺 | 遺伝子型 | コピー数/g中腸腺 |
| 2016/17 | 5月  | 岩ガキ<br>I  | 2017年5月14日 | 1  | 2.21       | GII.4* | 0.00      | (-)  | NT        |
|         |     |           |            | 1  | 1.87       | (-)    | NT        | (-)  | NT        |

\*) GII.4 : GII.4 Sydney 2012

表9 秋田県産岩ガキからのNoV検出状況(2017年6月購入分)

| シーズン    | 購入月      | 検体名<br>海域  | 加工日       | 個数   | 採取量<br>(g) | ノロウイルス |           |      |           |
|---------|----------|------------|-----------|------|------------|--------|-----------|------|-----------|
|         |          |            |           |      |            | G II   |           | G I  |           |
|         |          |            |           |      |            | 遺伝子型   | コピー数/g中腸腺 | 遺伝子型 | コピー数/g中腸腺 |
| 2016/17 | 6月       | 岩ガキ<br>A   | 2017年6月8日 | 1    | 0.72       | (-)    | NT        | (-)  | NT        |
|         |          |            |           | 1    | 1.36       | (-)    | NT        | (-)  | NT        |
|         |          |            |           | 1    | 0.82       | (-)    | NT        | (-)  | NT        |
|         |          | 2017年6月10日 | 1         | 1.19 | (-)        | NT     | (-)       | NT   |           |
|         |          |            | 1         | 0.97 | (-)        | NT     | (-)       | NT   |           |
|         |          |            | 1         | 2.01 | GII. 17    | 62.75  | (-)       | NT   |           |
|         | 岩ガキ<br>B | 2017年6月9日  | 1         | 1.64 | (-)        | NT     | (-)       | NT   |           |
|         |          |            | 1         | 1.11 | (-)        | NT     | (-)       | NT   |           |
|         |          |            | 1         | 1.02 | (-)        | NT     | (-)       | NT   |           |
|         |          | 2017年6月10日 | 1         | 1.59 | (-)        | NT     | (-)       | NT   |           |

表10 秋田県産岩ガキからのNoV検出状況(2018年6月~8月購入分)

| シーズン    | 購入月 | 個数 | 採取量<br>(g) | ノロウイルス                               |                    |       |           |
|---------|-----|----|------------|--------------------------------------|--------------------|-------|-----------|
|         |     |    |            | G II                                 |                    | G I   |           |
|         |     |    |            | 遺伝子型                                 | コピー数/g中腸腺          | 遺伝子型  | コピー数/g中腸腺 |
| 2017/18 | 6月  | 1  | 2.40       | (-)                                  | NT                 | (-)   | NT        |
|         |     | 1  | 2.18       | GII. 4 <sup>*1</sup> 、GII. 17        | 614.90             | GI. 2 | 114.51    |
|         |     | 1  | 1.50       | GII. 2                               | 0.00 <sup>*2</sup> | (-)   | NT        |
|         |     | 1  | 2.78       | GII. 2、GII. 4 <sup>*1</sup>          | 1098.04            | GI. 1 | 436.08    |
|         |     | 1  | 2.62       | GII. 2、GII. 4 <sup>*1</sup> 、GII. 17 | 903.53             | GI. 2 | 95.69     |
|         |     | 1  | 2.12       | (-)                                  | NT                 | (-)   | NT        |
|         |     | 1  | 2.89       | GII. 2、GII. 4 <sup>*1</sup>          | 0.00 <sup>*2</sup> | (-)   | NT        |
|         |     | 1  | 2.40       | (-)                                  | NT                 | GI. 2 | 702.75    |
|         |     | 1  | 2.53       | GII. 2、GII. 4 <sup>*1</sup>          | 890.98             | (-)   | NT        |
|         |     | 1  | 2.57       | (-)                                  | NT                 | (-)   | NT        |
|         | 7月  | 1  | 1.73       | (-)                                  | NT                 | GI. 2 | 467.45    |
|         |     | 1  | 1.49       | GII. 2、GII. 17                       | 95.37              | (-)   | NT        |
|         |     | 1  | 1.50       | (-)                                  | -                  | GI. 2 | 243.45    |
|         |     | 1  | 1.70       | (-)                                  | NT                 | GI. 2 | 636.86    |
|         |     | 1  | 1.97       | GII. 2、GII. 4 <sup>*1</sup>          | 26.70              | GI. 2 | 46.43     |
|         |     | 1  | 1.67       | (-)                                  | NT                 | (-)   | NT        |
|         |     | 1  | 2.14       | (-)                                  | NT                 | (-)   | NT        |
|         |     | 1  | 1.58       | (-)                                  | NT                 | GI. 2 | 442.35    |
|         |     | 1  | 1.84       | GII. 2                               | 181.33             | GI. 2 | 177.88    |
|         |     | 1  | 1.68       | (-)                                  | NT                 | GI. 2 | 787.45    |
|         | 8月  | 1  | 2.30       | (-)                                  | NT                 | (-)   | NT        |
|         |     | 1  | 1.42       | (-)                                  | NT                 | (-)   | NT        |
|         |     | 1  | 1.29       | (-)                                  | NT                 | (-)   | NT        |
|         |     | 1  | 1.33       | (-)                                  | NT                 | (-)   | NT        |
|         |     | 1  | 1.68       | (-)                                  | NT                 | (-)   | NT        |
|         |     | 1  | 1.65       | (-)                                  | NT                 | (-)   | NT        |
|         |     | 1  | 2.28       | (-)                                  | NT                 | (-)   | NT        |
|         |     | 1  | 1.59       | (-)                                  | NT                 | (-)   | NT        |
|         |     | 1  | 1.33       | GII. 2、GII. 17                       | 93.80              | (-)   | NT        |
|         |     | 1  | 2.01       | (-)                                  | NT                 | (-)   | NT        |

\*1) GII. 4 : GII. 4 Sydney 2012

\*2) 0.00 : 定量限界以下

表 11 下水からの NoV 検出状況 (2018 年 4 月～12 月)

| シーズン    | 採水月     | 採水年月日日      | 検体名        | ノロウイルス                               |                    |       |                    |                    |
|---------|---------|-------------|------------|--------------------------------------|--------------------|-------|--------------------|--------------------|
|         |         |             |            | G II                                 |                    | G I   |                    |                    |
|         |         |             |            | 遺伝子型                                 | コピー数/mL            | 遺伝子型  | コピー数/mL            |                    |
| 2017/18 | 4月      | 2018年4月24日  | 流入水        | GII. 2、GII. 4 <sup>*1</sup> 、GII. 17 | 16.08              | GI. 3 | 3.71               |                    |
|         |         |             | 放流水        | GII. 2、GII. 4 <sup>*1</sup> 、GII. 17 | 12.86              | GI. 5 | 8.66               |                    |
|         | 5月      | 2018年5月21日  | 流入水        | GII. 2、GII. 4 <sup>*1</sup>          | 18.08              | GI. 1 | 1.55               |                    |
|         |         |             | 放流水        | GII. 2、GII. 4 <sup>*1</sup> 、GII. 17 | 10.17              | GI. 6 | 3.13               |                    |
|         | 6月      | 2018年6月18日  | 流入水        | GII. 2、GII. 4 <sup>*1</sup> 、GII. 17 | 3.36               | GI. 1 | 0.00 <sup>*2</sup> |                    |
|         |         |             | 放流水        | GII. 2、GII. 4 <sup>*1</sup> 、GII. 17 | 8.28               | GI. 2 | 3.08               |                    |
|         | 7月      | 2018年7月23日  | 流入水        | GII. 2、GII. 17                       | 5.33               | GI. 2 | 4.19               |                    |
|         |         |             | 放流水        | GII. 2、GII. 17                       | 4.98               | GI. 5 | 9.08               |                    |
|         | 8月      | 2018年8月20日  | 流入水        | GII. 2                               | 1.67               | GI. 3 | 0.00 <sup>*2</sup> |                    |
|         |         |             | 放流水        | GII. 2                               | 0.58               | GI. 5 | 0.00 <sup>*2</sup> |                    |
|         | 2018/19 | 9月          | 2018年9月18日 | 流入水                                  | GII. 2             | 0.45  | GI. 3              | 0.00 <sup>*2</sup> |
|         |         |             |            | 放流水                                  | GII. 2             | 3.84  | GI. 3              | 1.10               |
| 10月     |         | 2018年10月22日 | 流入水        | GII. 17                              | 3.70               | GI. 5 | 6.75               |                    |
|         |         |             | 放流水        | GII. 17                              | 0.00 <sup>*2</sup> | (-)   | NT                 |                    |
| 11月     |         | 2018年11月19日 | 流入水        | GII. 2、GII. 4 <sup>*1</sup> 、GII. 17 | 1.03               | GI. 5 | 2.90               |                    |
|         |         |             | 放流水        | (-)                                  | NT                 | GI. 2 | 0.49               |                    |
| 12月     |         | 2018年12月17日 | 流入水        | GII. 2、GII. 4 <sup>*1</sup> 、GII. 17 | 10.75              | GI. 5 | 1.29               |                    |
|         |         |             | 放流水        | GII. 2、GII. 4 <sup>*1</sup> 、GII. 17 | 8.08               | GI. 6 | 0.98               |                    |

\*1) GII. 4 : GII. 4 Sydney 2012

\*2) 0.00 : 定量限界以下

表 12 秋田県における食中毒事例の詳細 (2016 年 1 月～2018 年 8 月)

| 依頼年月日      | 推定原因食品      | 原因施設 | 検出ノロウイルス遺伝子型                  | 備考         |
|------------|-------------|------|-------------------------------|------------|
| 2016年1月8日  | 不明 (提供した料理) | 飲食店  | GII. 4 Sydney 2012<br>GII. 17 |            |
| 2016年1月26日 | 不明 (弁当)     | 仕出屋  | GII. 4 Sydney 2012            |            |
| 2016年2月9日  | 不明 (弁当)     | 飲食店  | GII. 17                       |            |
| 2017年1月15日 | カキ酢 (推定)    | 旅館   | GII. 2                        | 照会事例 : 宮城県 |
| 2018年3月3日  | 不明 (会食料理)   | 飲食店  | GII. 4 Sydney 2012            |            |



平成 28-30 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」班  
研究協力報告

## 宮城県の流入下水における食品媒介性ウイルスの挙動

|       |       |               |
|-------|-------|---------------|
| 研究協力者 | 坂上亜希恵 | 宮城県保健環境センター   |
| 研究協力者 | 小泉 光  | 宮城県気仙沼保健福祉事務所 |
| 研究協力者 | 菅原直子  | 宮城県東部下水道事務所   |
| 研究協力者 | 植木 洋  | 宮城県保健環境センター   |
| 研究分担者 | 上間 匡  | 国立医薬品食品衛生研究所  |

### 研究要旨

2016年7月から2019年1月の期間に週1回の頻度で採取した流入下水135検体を対象として、ノロウイルス（NoV）およびサポウイルス（SaV）遺伝子については定量的に、A型肝炎ウイルス（HAV）およびE型肝炎ウイルス（HEV）遺伝子については定性的に検出を行った。NoVおよびSaVは流行期および非流行期に係わらず年間を通してウイルス遺伝子が検出された。また、分子疫学的解析の結果、流入下水から検出されたウイルス遺伝子は地域における胃腸炎の流行と密接に関連していることが明らかになった。HAVは全国的に患者報告が増加した時期である2019年1月第1週に採取した検体からのみ遺伝子が検出された。さらに、HEVは調査期間中9検体から遺伝子が検出され、分子疫学的に解析した結果、検出株はすべて人獣共通感染症株の3型であった。本研究より、流入下水中の病原微生物を継続的に監視することは、地域における感染症の顕在的または潜在的な流行の探知に有用であると考えられた。

### A. 研究目的

感染性胃腸炎は多種の病原体による胃腸炎の総称であり、多くはウイルス感染を原因とする。しかし、原因の特定には分子生物学的手法が用いられることから、市中の医療機関では原因が特定されにくい。現在、感染性胃腸炎の流行の把握と感染拡大防止のための注意喚起には、感染症発生動向調査における小児科定点

医療機関からの患者報告数が用いられている。しかし、この値は発症者の病院の受診から患者数の集計、報告と時間的なずれがあることや、受診後の患者数であることから流行初期の探知は難しい。また、小児科定点のみからの患者数の報告であることから、成人の患者数については把握されていない。

一方、下水処理施設の流入下水中には、

ヒトから排泄されたウイルスなどの病原微生物が直接流れ込むため、流入下水の継続的な監視により、流行の早期探知や潜在的な流行の把握が可能であると考えられる。

そこで、流入下水中のウイルス遺伝子（感染性胃腸炎起因ウイルスおよび食品媒介性疾患起因ウイルス）をモニタリング対象とし、感染症流行の早期察知の可能性について検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 材料

県内の都市部に位置する下水処理場に流入する流入下水を2016年7月から2019年1月の毎週1回採水し、計135検体を試料とした。検体は200 mLの滅菌ポリ容器に採取し、 $-30^{\circ}\text{C}$ で保管した。

### 2. ウイルス遺伝子の検出

#### 1) 下水試料の濃縮

検体は解凍後十分に転倒混和し、25 mLを検査に供した。ポリエチレングリコールおよびNaClを終濃度がそれぞれ0.08 g/mL、0.021 g/mLとなるように加え、 $4^{\circ}\text{C}$ で1晩攪拌した。9,100×*g*で20分間冷却遠心した後、上清をアスピレーターで吸引除去し、沈渣の状況に応じに滅菌蒸留水を1.0mlから1.5ml加え、5.0 mLのクライオチューブに洗い込み、ウイルス濃縮液とした。

#### 2) ウイルス遺伝子の抽出と各ウイルス遺伝子の検出

ウイルス濃縮液140  $\mu\text{L}$ についてQIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN)を用いてウイルスRNAを抽出した。

逆転写反応および各ウイルス遺伝子の

検出は図1に示した方法で行った。

Real-time PCR法によるノロウイルス(NoV)およびサポウイルス(SaV)遺伝子の定量は、国立感染症研究所より分与された既知コピー数の陽性コントロールを用いて検量線を作成し、下水1 L当たりのコピー数に換算して求めた。

各ウイルス遺伝子が検出された場合はダイレクトシーケンスを行い、MEGA6でアライメント後、BlastまたはNorovirus typing toolを用いて遺伝子型を決定した。

### 3. 感染性胃腸炎の流行状況の把握

宮城県結核・感染症情報センター、仙台市感染症情報センターおよび国立感染症研究所の小児科定点における感染性胃腸炎患者報告数を用いて、下水処理区域の小児科定点における感染性胃腸炎患者報告数を算出し、研究期間中の流入下水中のウイルス遺伝子コピー数との比較を行った。

(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. 県内における感染性胃腸炎の流行状況

2016/2017 シーズンは全国的にNoV G II.2による感染性胃腸炎が大流行し、県内でも小児科定点における感染性胃腸炎患者報告数は、2016年第48週に45.7人となり、過去10年間で最多であった。

一方、2017年および2018年は、流行は小規模でピーク時でも、それぞれ9.9人、

8.9 人となっており、2016 年と比較すると流行期の小児科定点における患者報告数は著しく少なかった（図 2）。

## 2. NoV の検出状況

NoV 遺伝子は 2018 年の第 43 週（10 月下旬）を除き、研究期間中の全検体から検出された。GI 群は  $0.0 \text{ copies/L} \sim 3.5 \times 10^6 \text{ copies/L}$ 、GII 群は  $0.0 \text{ copies/L} \sim 5.2 \times 10^7 \text{ copies/L}$  で、GI 群と比較し全体的に GII 群が高い値で推移した（図 3）。流入下水中の GII 群遺伝子コピー数が急激に上昇した 2016 年の第 42 週（10 月中旬）以降、下水処理区内の小児科定点における感染性胃腸炎患者報告数が急増し、2016 年第 48 週（12 月上旬）には研究期間中で最多の 27.7 人となった。GII 群遺伝子においても、2016 年第 49 週（12 月上旬）に採取した検体で  $5.2 \times 10^7 \text{ copies/L}$  と研究期間中で最も多い値が確認された。また、この期間に流入下水から検出された遺伝子型は GII.2 型であり、同時期に全国で流行していた遺伝子型と一致した。加えて、この期間に発生した県内の NoV による感染性胃腸炎 109 事例中 103 事例について遺伝子型を確認したところ、90%以上が GII.2 であった。

一方、2017 年以降の流行期においては、2017 年第 49 週（12 月上旬）、2019 年第 1 週（1 月上旬）に流入下水中の NoV 遺伝子コピー数が増加し、小児科定点における感染性胃腸炎患者報告数の推移が同様の傾向を示したが、2016 年のような大規模な流行は確認されなかった。

GII 群では、これまでの傾向と異なり、従来の非流行期である 2018 年第 18 週（5 月上旬）から第 22 週（5 月下旬）に  $4.3$

$\times 10^6 \text{ copies/L} \sim 1.1 \times 10^7 \text{ copies/L}$  と高い値で検出された。遺伝子型は GII.2 型が検出されており、同時期に発生した感染性胃腸炎患者から検出された遺伝子型と一致した。

GI 群は下水中から GI.1 型、GI.2 型、GI.3 型、GI.4 型、GI.5 型、GI.6 型、GI.7 型と様々な遺伝子型が検出されたが、感染性胃腸炎患者検体から GI 群遺伝子は検出されなかった。

2017 年第 19 週（5 月上旬）から第 26 週（6 月中旬）、第 46 週（11 月上旬）から第 48 週（11 月下旬）、2018 年第 1 週（1 月上旬）から第 8 週（2 月下旬）、第 46 週（11 月中旬）から第 52 週（12 月下旬）にかけても小児科定点における感染性胃腸炎患者報告数の小さなピークが確認されたが、その期間の流入下水中の NoV 遺伝子コピー数にはほとんど変動がなかった。

## 3. SaV の検出状況

SaV 遺伝子も通年流入下水中から検出され、 $0.0 \text{ copies/L} \sim 9.3 \times 10^7 \text{ copies/L}$  の値で推移した（図 4）。

2016 年と比較し、2017 年以降は SaV 遺伝子が年間を通して高い値で検出されており、2017 年第 19 週（5 月上旬）から第 26 週（6 月中旬）、第 46 週（11 月上旬）から 2018 年第 8 週（2 月下旬）、第 46 週（11 月中旬）から第 52 週（12 月下旬）と 3 つの大きなピークがみられた。また、この期間における流入下水中の SaV 遺伝子コピー数の推移と小児科定点における感染性胃腸炎患者報告数の推移がほぼ一致しており、加えて、この時期に県内では SaV による感染性胃腸炎の集団発生事

例も確認された。2018年の第47週（11月下旬）に採取した検体からは $9.3 \times 10^7$  copies/Lと研究期間中で最も高い値のSaV遺伝子が検出された。遺伝子型はGI.1型が検出され、同時期に発生した感染性胃腸炎患者から検出された遺伝子型と同じであった。

### 3. A型肝炎ウイルス（HAV）およびE型肝炎ウイルス（HEV）の検出状況

HAVは135検体中1検体（0.7%）、HEVは135検体中9検体（6.7%）で検出された。

HAVは2019年第1週（1月上旬）に採取した検体から初めて遺伝子が検出され、分子疫学的解析の結果、遺伝子型1Aであった（図5）。この時期には全国的にHAV患者の報告例が増加したことを受け、厚生労働省より「A型肝炎発生届受理時の検体の確保等について（平成31年2月6日健感発0206第1号、薬生食監発0206第2号）」が発出され、2019年第1週から第3週において患者報告数が例年に比べて急増している旨および積極的疫学調査実施への配慮の旨が通知された。

HEVは、サブタイプまで分類できなかった1例（遺伝子型3）を除き、検出された遺伝子型は全て3aであった（図6）。2018年第36週（9月上旬）に検出された流入下水由来株は系統樹解析の結果、2018年第44週（11月上旬）に報告のあったE型肝炎患者由来株と97.4%のホモロジーが認められたが、疫学的な関連性は不明である。

## D. 考察

2016/2017シーズンはNoV GI.2による

感染性胃腸炎が全国的に流行し、県内の小児科定点における感染性胃腸炎患者報告数も、過去10年間で最多となった。一方、2017/2018シーズンおよび2018/2019シーズンは、感染性胃腸炎流行期の小児科定点における患者報告数や集団発生事例数が著しく少なかった。2017年と2018年の1月から12月までの期間内に県内で発生した感染性胃腸炎の集団発生事例数はそれぞれ18事例と19事例であったのに対し、2016年の同期間には116事例の発生があったことから、2017年および2018年の流行が2016年よりも少なかったことが確認された。また、2018年は例年の傾向と異なり、従来感染性胃腸炎の非流行期の4月から6月の期間に感染性胃腸炎集団発生事例が多発した。

下水処理施設の流入下水からはNoVのGI群、GII群ともにほぼ通年検出されたが、GI群と比較しGII群の遺伝子コピー数が高い傾向が認められ、GII群感染者の存在割合が高いことが考えられた。また、2018年は流入下水においても、GII群が従来の非流行期である5月上旬から5月下旬にかけて高い値で検出され、同時期に発生した感染性胃腸炎患者から検出された遺伝子型と一致した。

SaVもNoVと同様に通年検出されており、特に検出遺伝子コピー数が通常より高い週の前後では、流入下水から検出されたものと同じ遺伝子型による集団発生事例も確認された。また、2017年5月上旬から6月中旬、2017年11月上旬から2018年2月下旬、2018年11月中旬から12月下旬にかけて小児科定点における感染性胃腸炎患者報告数の小さなピークが



確認され、流入下水から検出された SaV 遺伝子コピー数はそれぞれ  $2.8 \times 10^7$  copies/L,  $2.9 \times 10^7$  copies/L,  $9.3 \times 10^7$  copies/L であった。同程度の小児科定点における感染性胃腸炎患者報告数のピークが確認された時期に流入下水から検出された NoVG II 群遺伝子コピー数が  $1.2 \times 10^7$  copies/L であることを考えると、検出された遺伝子コピー数に対して小児科定点あたりの患者報告数が少ないことから、SaV による感染性胃腸炎は NoVG II 群と比較すると現状の発生動向調査では探知されにくい可能性が示唆された。

HAV は 2019 年第 1 週に 1 検体のみ検出された。同時期の 2019 年第 1 週から第 3 週においては全国的に患者報告数が例年に比べ急増しており、県内においても都市部において第 2 週に 1 件、第 3 週に 2 件の A 型肝炎患者が報告された。このことより、流入下水からの HAV 遺伝子の検出は潜在的な流行を察知できる可能性があることが示唆された。

HEV は検出された遺伝子 9 株とも分子疫学的解析の結果すべて 3 型であった。検出された時期に HEV 患者の発生が報告されていることから検出された HEV は患者由来であることが推定されたが、3 型は人獣共通感染症事例からの検出例が多いことから、動物由来の可能性も考慮する必要があると考えられた。

## E. 結論

2016 年 7 月から 2019 年 1 月にかけて流入下水を対象に NoV および SaV 遺伝子を定量的に検出した結果、流入下水中の NoV 遺伝子はほぼ通年検出され、特に NoVG II 群遺伝子コピー数は感染症発生動向調査

で胃腸炎流行が確認される前に、遺伝子コピー数の増加が認められた。加えて、SaV も NoV と同様に通年検出され、2017 年以降は NoV よりも高コピー数で検出された。本研究より流入下水中の NoV をモニタリングすることで感染性胃腸炎流行の早期察知が可能であると考えられた。一方、SaV は検出された遺伝子コピー数に対して小児科定点あたりの患者報告数が少なく、病院受診に至らない散发事例や軽症例、または不顕性感染が多い可能性も示唆されることから、流入下水による流行の早期察知の指標に関してはさらなる検討が必要である。また、HAV および HEV 遺伝子が流入下水から検出された時期の前後には県内において患者の発生が確認された。本研究においては、これらの疫学的な関連性を解明するには至らなかったが、環境中の病原微生物を継続的に監視することは、地域における感染症の顕在的または潜在的な流行の探知や疫学的な関連の解明に有用であると考えられる。流入下水を対象とした水中の病原微生物の監視は、医療機関や保健所等との情報共有を行うことで、現況の患者報告数による流行状況の把握よりも迅速性の高い情報となり得ると推察される。

## 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

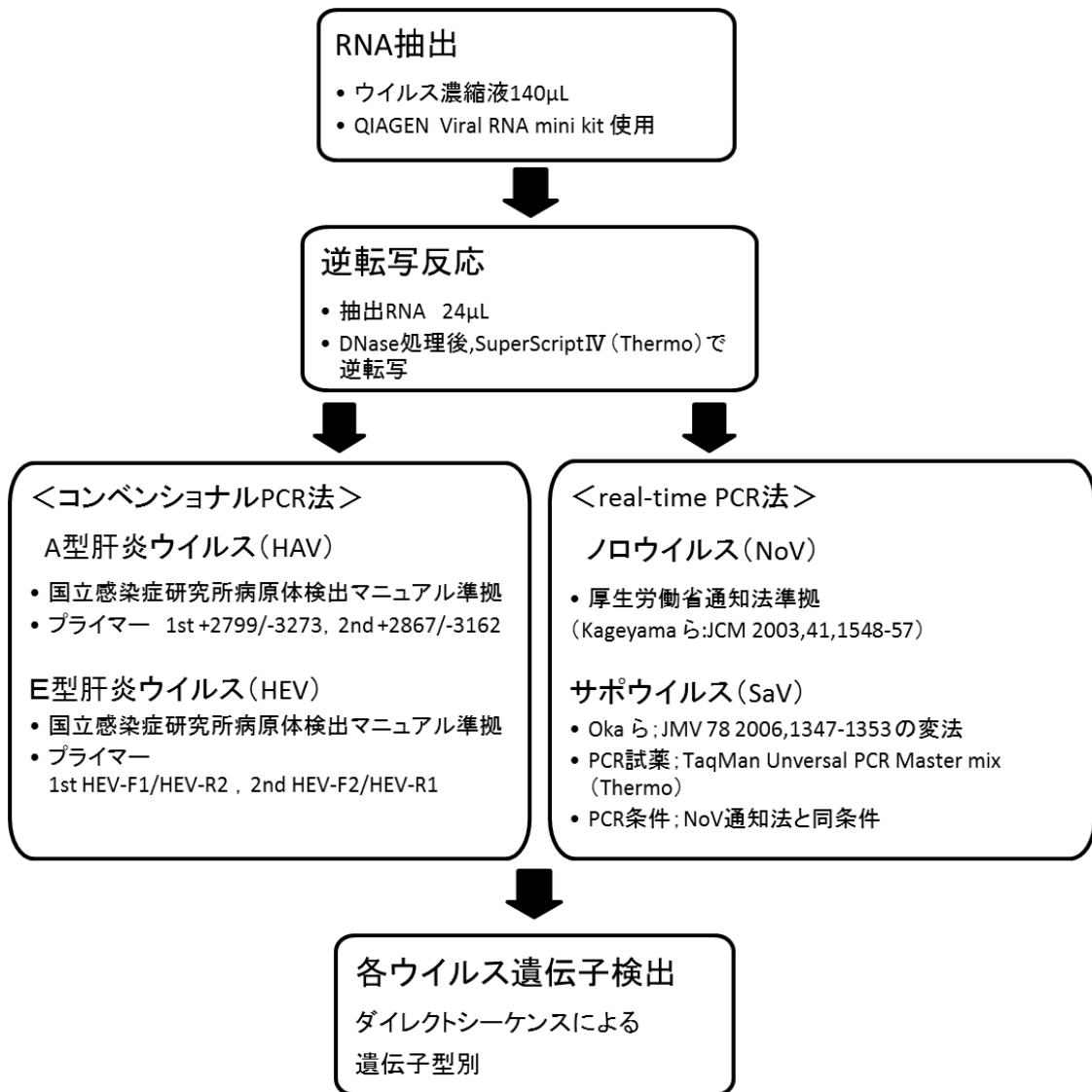


図1 ウイルス遺伝子の検出方法

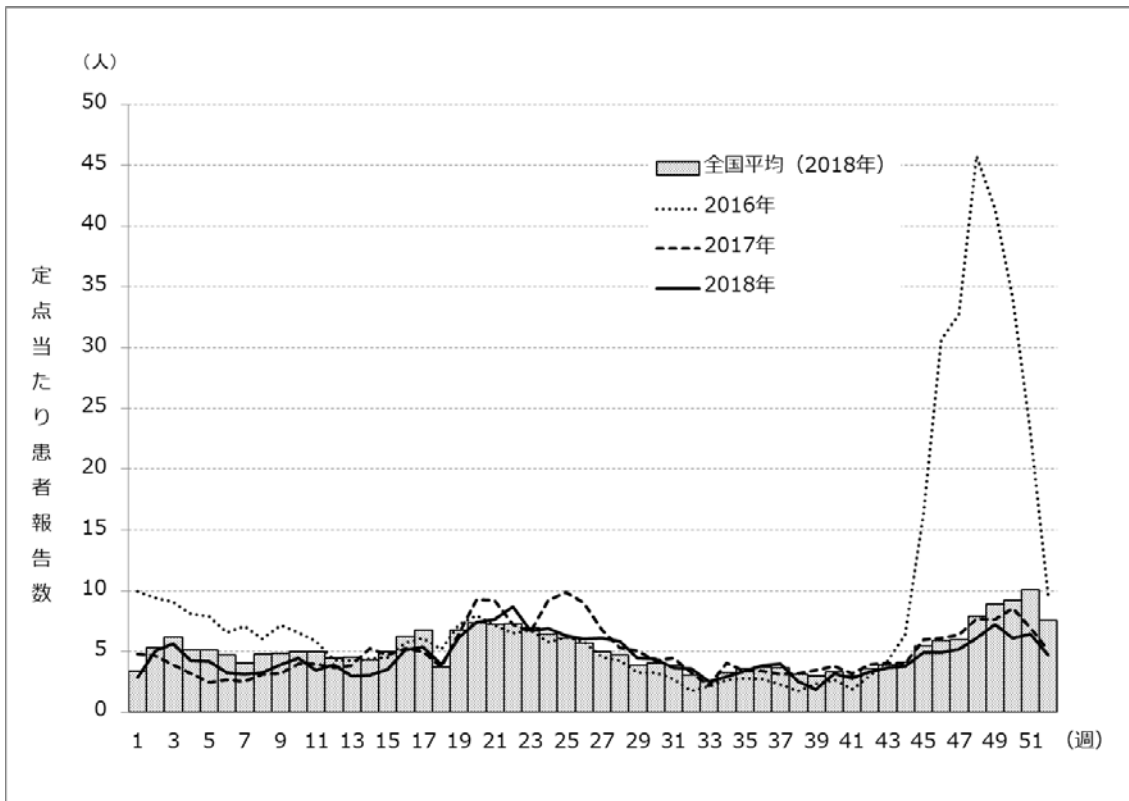


図2 宮城県における小児科定点感染性胃腸炎患者報告数

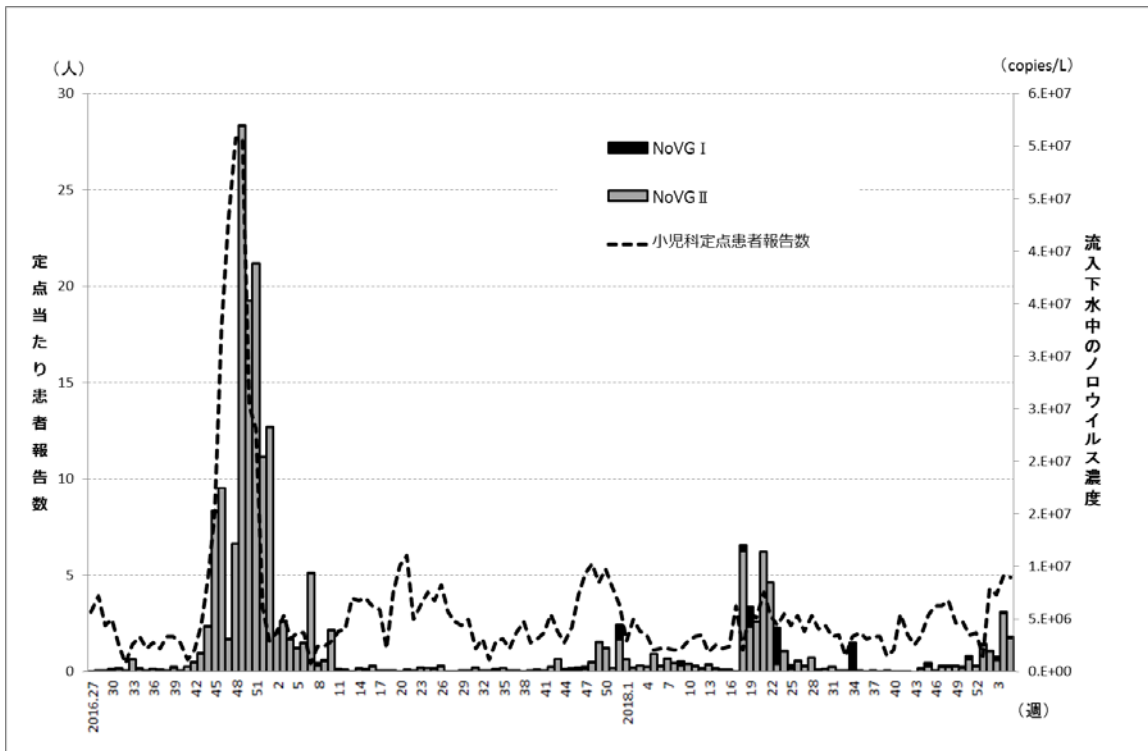


図3 小児科定点感染性胃腸炎患者報告数と流入下水中のNoV濃度推移

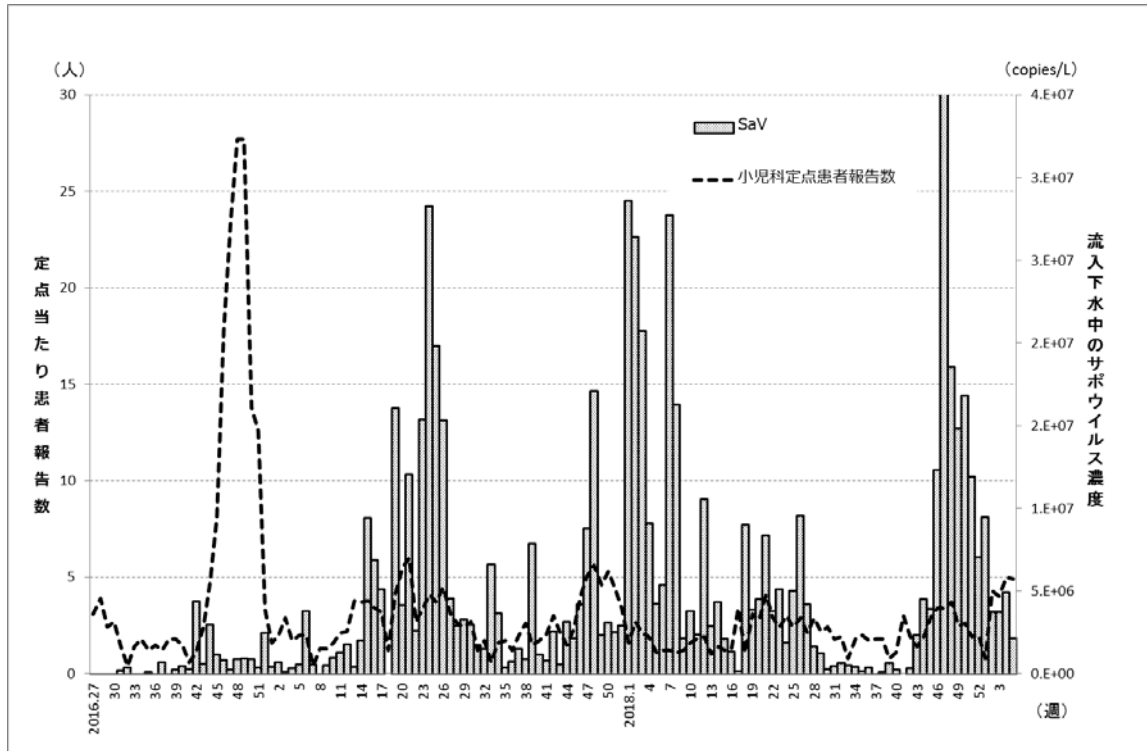


図4 小児科定点感染性胃腸炎患者報告数と流入下水中の SaV 濃度推移

| 年   | 2016 |   |   |    |    |    |   |   |   |   |   |   | 2017 |   |   |    |    |    |  |  |  |  |  |  |
|-----|------|---|---|----|----|----|---|---|---|---|---|---|------|---|---|----|----|----|--|--|--|--|--|--|
| 月   | 7    | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7    | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |  |  |  |  |  |  |
| HAV |      |   |   |    |    |    |   |   |   |   |   |   |      |   |   |    |    |    |  |  |  |  |  |  |
| HEV |      | 1 | 2 |    |    |    |   |   |   | 1 |   |   | 1    | 1 |   |    | 1  |    |  |  |  |  |  |  |

| 年   | 2018 |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    | 2019 |
|-----|------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|------|
| 月   | 1    | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 1    |
| HAV |      |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    | 1    |
| HEV |      |   |   |   |   |   |   |   | 1 |    |    |    | 1    |

図5 HAV および HEV 遺伝子検出数



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(平成28~30年度)

## 水溶性高分子ポリマーコーティングによる 手指汚染の水洗いによる簡易除去(総括)

|       |       |              |
|-------|-------|--------------|
| 研究協力者 | 田村 務  | 新潟県保健環境科学研究所 |
|       | 林 真由美 |              |
|       | 西田 晶子 |              |
|       | 渡部 香  |              |
|       | 広川 智香 |              |
|       | 新井 礼子 |              |
| 研究分担者 | 上間 匡  | 国立医薬品食品衛生研究所 |
|       | 野田 衛  |              |

### 研究要旨

ノロウイルスに感染した調理従事者による食品汚染が食中毒の原因となることが多い。そこで、トイレにおける手指汚染を簡易に除去する方法として、トイレを利用する前に水溶性ポリマーでコーティングして、水とともにウイルス汚染を簡易に除去する方法を考案し、その有効性を評価した。水溶性ポリマーとしてカルボキシメチルセルロースナトリウム(CMC)やポリエチレングリコール(PEG)を使用した。

評価の方法は次の(1)から(3)の3つの方法で行った(1)数段階の濃度のポリマーを指先腹面にコーティング後に墨汁を塗布して一定の水量で洗い、残った墨汁の量でどの濃度が有効か評価する方法、(2)指先腹面にコーティング後に糞便上清中のノロウイルスで汚染し、簡易に除去できるか評価する方法、(3)実際の手洗いを想定して、手全体にCMCをコーティングして、ノロウイルスの代替に大腸菌MS2ファージで汚染し、被験者10人の両手により評価する方法。

7%PEG 85%エタノール溶液、3%CMC 45%エタノール溶液の塗布が墨汁の除去に有効で、糞便上清に含まれるノロウイルスによる汚染も低減することが可能であった。CMCをコーティングした実際の手洗いを想定した実験では、水洗いのみでハンドソープによる手洗いと同等の汚染低減効果があった。

水溶性ポリマーをウイルスの汚染前に手にコーティングしておくこと、汚染したウイルスを水洗いで簡易に除去することが可能であった。

## A. 研究目的

調理従事者等からの食品の汚染は手指を介して汚染することが多いと考えられ、嚴重な手洗いの方法が周知されている。しかし推奨されている手洗い方法は時間や手間を要し、それを日々実践することは容易ではない。

手指がウイルスに汚染される機会として最も多いのはトイレと考えられ、特に自分のお尻を拭く際に手指を汚すことが多いと考えられる。

お尻を拭く作業を汚染作業と考え、その前に手袋をして行くと手を汚すことが無いが、手袋の着脱に手間がかかり、汎用的ではない。

そこで、トイレに入る前に手指を水溶性ポリマーでコーティングして、トイレの後に手を洗えば、ポリマーとともに簡単にウイルスを含む汚れを落とすことができるのではないかと考え、検討を行った。

## B. 研究方法

検討対象とした水溶性ポリマーは、ポリエチレングリコール 6000 (PEG) とカルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC) の二種類とした。

### I 水溶性ポリマーの有効性の評価と濃度の選定 -墨汁を使用した評価-

水溶性ポリマーを以下の濃度で調整して使用した。

ポリエチレングリコール 6000 を 85%エタノールに 1, 3, 5, 7, 10%に溶解して使用液とした。カルボキシメチルセルロースナトリウムは、45%エタノールに 1, 2, 3%に溶解して使用液とした。

PEG 液と CMC 液で、どの希釈濃度で最も墨汁の汚れを落とす効果があるかを評価した。対照として、墨汁のみ、および市販の消毒用ハンドジェルを使用した。

試験方法は、図 1 の手順で実施した。

### II ノロウイルスの汚染除去効果の検討

実験 I で効果が確認された 7%PEG 液と 3%CMC 液について、ノロウイルスによる汚染の除去効果を評価した。

ノロウイルス液:GII.4 型のノロウイルス陽性便を 0.5%BSA (牛血清アルブミン) 加 PBS(-)で溶解し、9000rpm 20 分遠心後の上清を更に 5 倍希釈して-80°Cに冷凍保管し、これを使用した。塗布量の 5 $\mu$ L 中のノロウイルスのコピー数は、1.5 $\times$ 10<sup>7</sup> 個であった。

実験方法は図 2 のとおりで、表 1 の条件設定で実施した。

### III 手全体を使用し実際の手洗いを想定した評価

#### 1. 使用したファージの調製

ノロウイルスの代替ウイルスとして、*Escherichia coli* phage MS2 (NBRC 102619 株) を使用した。宿主菌株は、*Escherichia coli* (以下、*E. coli*) (NBRC 106373 株) を使用した。

*E. coli* の増殖用培地として、Bacto Trypton (DIFCO) ; 1g、D(+)グルコース ; 0.1g、NaCl ; 0.8g、CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O ; 0.03g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O;0.015g を蒸留水 100ml に溶解し、121°C15 分オートクレーブ滅菌したブイヨン (以下、トリプトブイヨン) を使用した。

トリプトイオンに *E. coli* を接種して約 6 時間程度培養後、MS2 フェージを接種して一晩培養した。これを精製して 0.5%BSA 加 PBS (-) で、 $1 \times 10^6$  pfu/ $\mu$ l に希釈して塗布用原液とした。

## 2. 方法 1 ダブルレイヤーアガー法によるプラーク形成によるフェージの定量

トリプトイオンに寒天を 1%濃度に加えた培地約 10ml をシャーレに入れて下層平板を作製した。下層平板に被検液を入れ、更に約 6 時間程度トリプトイオンで培養した *E. coli* 菌液  $100 \mu$ l を入れた。ここに、寒天濃度 0.5~0.6%のトリプトイオン寒天培地約 10ml を入れて混釈した。固化した培地を安全キャビネット内で乾燥後、37°Cオーバーナイトで培養し、形成されたプラーク数をカウントした。なお、全てのフェージの定量はシャーレを 2 枚使用して、その平均をデータとした。

## 3. 方法 2 被験者の手の前処理と MS2 フェージの汚染

手指の消毒剤や手洗い剤の有効性を評価する ASTM インターナショナルの方法；ASTM E2011-13 : Standard Test Method for Evaluation of Hygienic Handwash and Handrub Formulations for Virus-Eliminating Activity Using the Entire Hand を参考に、方法 2 以降の試験を実施した。

被験者 14 人中当日都合のついた 10 人の両手を使用し、1 日 1 回実験を実施した。試験前の手の準備として、①抗菌性物質を含まない石鹸で手を洗い、1 分以上流水で流した。②ペーパータオルで水分を除

去し、乾燥させた。③1.5ml の 70%エタノールを手にとり、両手全面に広げて十分乾燥させたのち、試験を行った。

フェージ液の塗布方法は、片手あたり、 $1 \times 10^6$  pfu/ $\mu$ l のフェージ液  $40 \mu$ l (合計  $4 \times 10^7$  pfu) を塗布した。塗布は、手指の汚染の実態を考慮して、マルチチャンネルピペットに 4 本のチップを装着して  $2 \mu$ l にセットし、手の指と平に 5 か所塗布したのち、それぞれの手をもんで手の平面に広げて乾燥させた。

## 4. 方法 3 グローブジュース法 (以下、GJ 法) による手からのフェージの回収

クリーンルーム用の高度清浄滅菌アセトニトリル手袋 (M サイズ) に、0.1%ツイーン 20, 1%ペプトン加 PBS (-) を 40ml 入れ、これを被験者の両手に装着し、輪ゴムで手首を止めた。1 分間両手をよくもんだ後手袋を外し、左右の手袋のバッファーを混合した後、バッファーを 50ml 遠沈管に回収した。回収したバッファーの一部を  $0.22 \mu$ m のフィルターで濾過し、原液あるいは 1%ペプトン加 PBS (-) で適宜 10 倍段階希釈してプラーク法の被検液とした。

## 5. 方法 4 MS2 フェージによる手指汚染と手洗い試験

A から D の試験を図 3 のとおり実施した。各試験は、1 日 1 回として、1 日以上の間をあけて行った。手洗いは、25°C の水温で、1 分間で 2L の水流で 20 秒洗浄した。

(倫理面への配慮)

手指汚染の実験に参加した 14 名に、MS2



ファージはヒトへの感染力は無いことを説明し、承諾を得たうえで実験した。

## C. 研究結果

### I 墨汁の汚染除去効果の比較

PEG 液をコーティングした場合は、7%以上で、墨汁を落とす効果が最大となった(図4)。CMC 液をコーティングした場合は、3%が最も汚れ落とし効果が高かった。

一方、PEG 液や CMC 液でコーティングせず、墨汁を直接指に付けて 20 秒流水で洗っても、墨汁は全く落ちなかった。また、市販の消毒用ハンドジェルを付けても同様に墨汁は落ちなかった。

### II ノロウイルス汚染除去効果の比較

汚染の除去効果の結果を図5に示した。

2 本あるいは 3 本の指で同じ条件で実施したデータを算術平均してグラフに示した。

コーティングせずに、水流のみで指を洗った場合、洗浄後に指から回収できたノロウイルスは  $1.9 \times 10^3$  コピーであった。

7%PEG 液でコーティングした場合、 $1.1 \times 10^3$  コピーの回収量であった。この PEG 液でコーティングして、洗浄時に指をこすった場合は、回収量は  $2.5 \times 10^2$  コピーと、こすらない場合に比べ洗浄後に指から回収されるウイルスはおおよそ 1/5 となり、コーティングを使用しない場合に比べて、指への残存ウイルスは 13%となった。

3%CMC でコーティングした場合は、洗浄後のノロウイルスの回収量は  $4.0 \times 10^2$  コピーで、指への残存ウイルスはコーティングを使用しない場合の 21%となった。

### III 手全体を使用し実際の手洗いを想定した評価

A から D の各試験で、GJ 法により両手から回収された 80ml のバッファー中のファージ量の 10 人の平均を図6にまとめた。毎回の実験で、両手に接種したファージの総量を定量したところ、平均  $7.9 \log_{10} \text{pfu}$  から  $8 \log_{10} \text{pfu}$  であった。ファージを塗布後すぐに GJ 法で両手から回収した試験 A のファージ量は  $6.6 \log_{10} \text{pfu}$  で、試験 B の水洗いのみでは、ファージ量は  $5.5 \log_{10} \text{pfu}$  と 1 オーダー低かった。

試験 C のハンドソープ洗いでは、回収バッファー 80ml 中のファージ量は平均  $4.7 \log_{10} \text{pfu}$  と試験 B の水洗いのみより約 1 オーダー低く、有意差があった。

CMC コーティングを実施した試験 D は、回収バッファー中のファージ量が最も低く、平均  $4.4 \log_{10} \text{pfu}$  で、試験 B とは有意差があったが試験 C との有意差は無かった。

### D. 考察

墨汁の汚染除去実験で、PEG と CMC は墨汁塗布前にコーティングしておくことで、水洗いで簡易に墨汁を除去できることがわかった。また、濃度として、PEG であれば 85%エタノールに 7%溶液として、CMC は 45%エタノールに 3%溶液として使用すると良いことがわかった。この濃度設定で、コーティングした指にノロウイルスを含む糞便上清を塗布した場合、指を汚染し残存するノロウイルスを洗浄によって簡易に低減することができた。

また、実際の手洗いを想定した MS2 フェージを使用して、CMC によるコーティングの評価を行ったところ、ハンドソープを用いた手洗いと同等のウイルス低減効果があった。コーティング法とハンドソープの併用でより高いウイルス低減効果が期待できると思われる。

トイレに入る前にコーティングすれば、トイレ中の手指汚染を水洗いで簡易に除去することができ、食品取扱者の安全対策の一法として有効な方法と考えられる。

また、エタノール手指消毒薬と同様な感覚で使用でき、厳密な手洗いに比べて短時間でウイルス汚染の低減効果があることから、日常の糞口感染経路の抑制につながると考えられる。

3. その他：なし

## E. 結論

水溶性ポリマーによる手指のコーティング法は、水洗いで簡易にウイルス汚染を除去することができ、ハンドソープを用いた手洗いと同等のウイルス汚染除去効果があった。

## F. 研究発表

1. 論文発表  
無し
2. 学会発表

第 39 回日本食品微生物学会学術総会で「水溶性高分子ポリマーコーティングによる手指汚染の水洗いによる簡易除去」をテーマとして発表した。

## 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

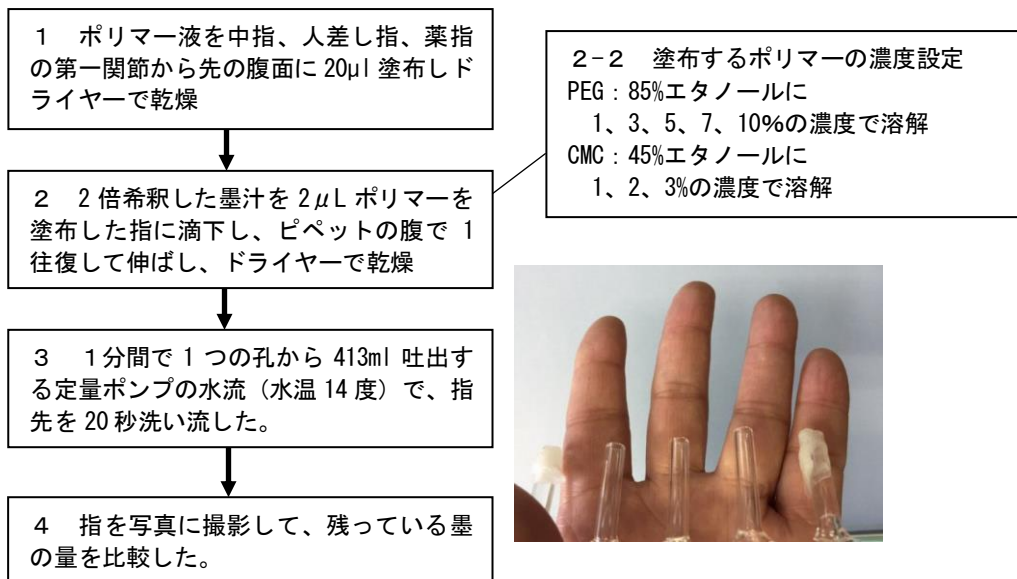


図1 墨汁を使用した水溶性ポリマーの有効性の評価と有効濃度の選定方法

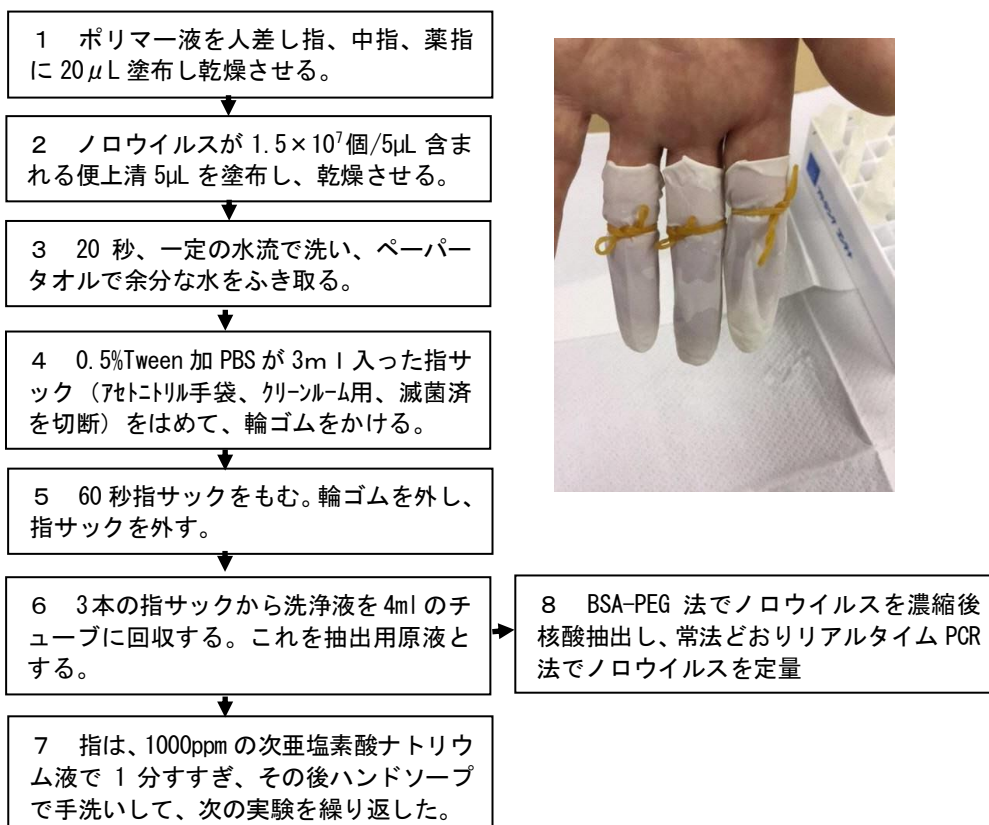


図2 ノロウイルスの汚染除去効果の検討の方法

表1 ノロウイルスの汚染除去効果の検討における条件設定

|     | 人差し指                          | 中指                            | 薬指                  |
|-----|-------------------------------|-------------------------------|---------------------|
| 1回目 | PEG液のみ                        | CMC液のみ                        | 塗布無し                |
| 2回目 | 7% PEG液<br>+ノロウイルス液           | 7% PEG液<br>+ノロウイルス液           | 7% PEG液<br>+ノロウイルス液 |
| 3回目 | 3% CMC液<br>+ノロウイルス液           | 3% CMC液<br>+ノロウイルス液           | 塗布無し                |
| 4回目 | 7% PEG液<br>+ノロウイルス液<br>+こすり洗い | 7% PEG液<br>+ノロウイルス液<br>+こすり洗い | 塗布無し                |
| 5回目 | コーティング無し<br>ノロウイルス液のみ         | コーティング無し<br>ノロウイルス液のみ         | 塗布無し                |

流水洗い:20秒流水で洗う

こすり洗い:5秒流水+こする+15秒流水

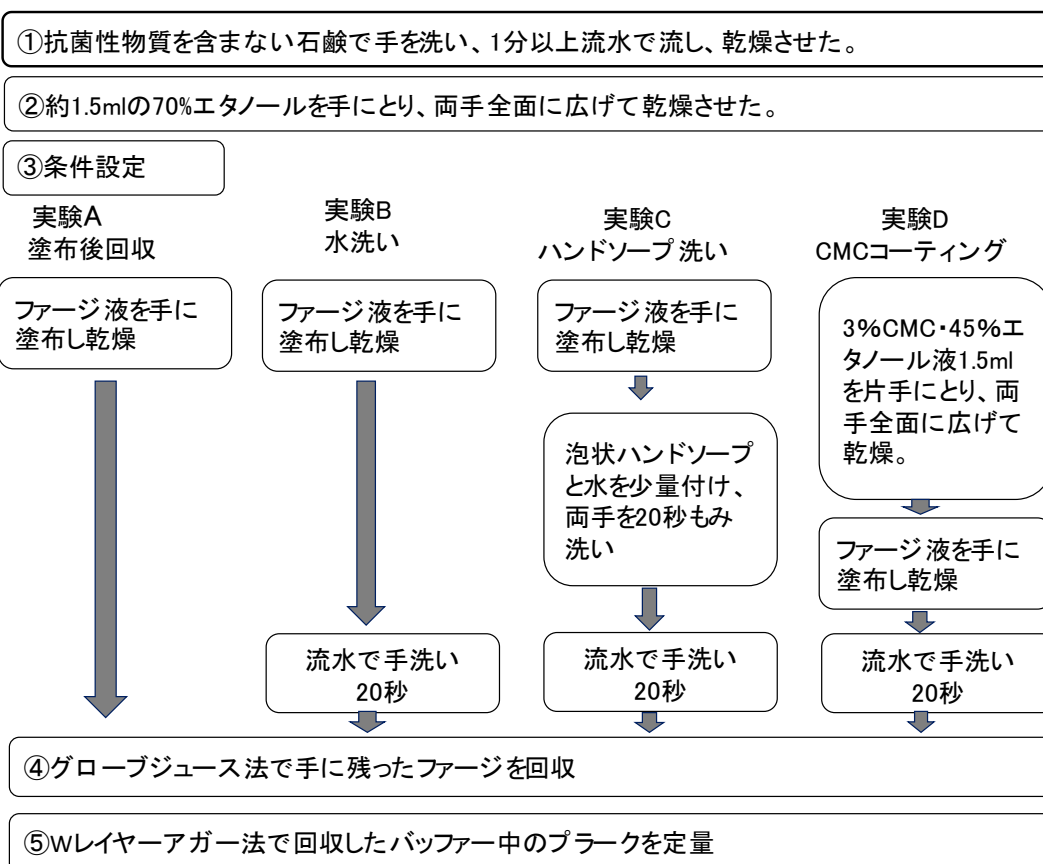


図3 手全体を使用し実際の手洗いを想定した評価の実験条件

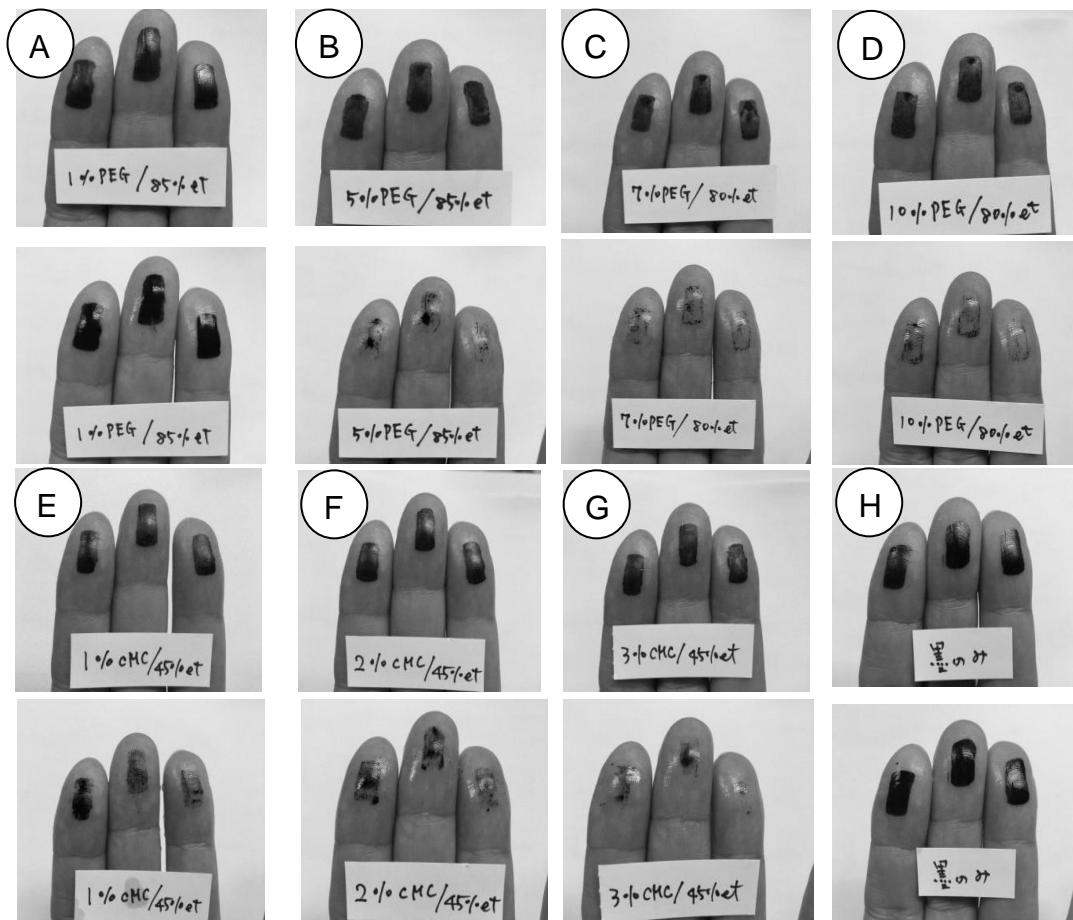


図4 コーティングによる墨汁の除去効果

A : 1%PEG、B : 5%PEG、C : 7%PEG、D : 10%PEG、E : 1%CMC、F : 2%CMC、G : 3%CMC、  
 H : コーティング無し墨のみ塗布。上段は洗浄前、下段は洗浄後

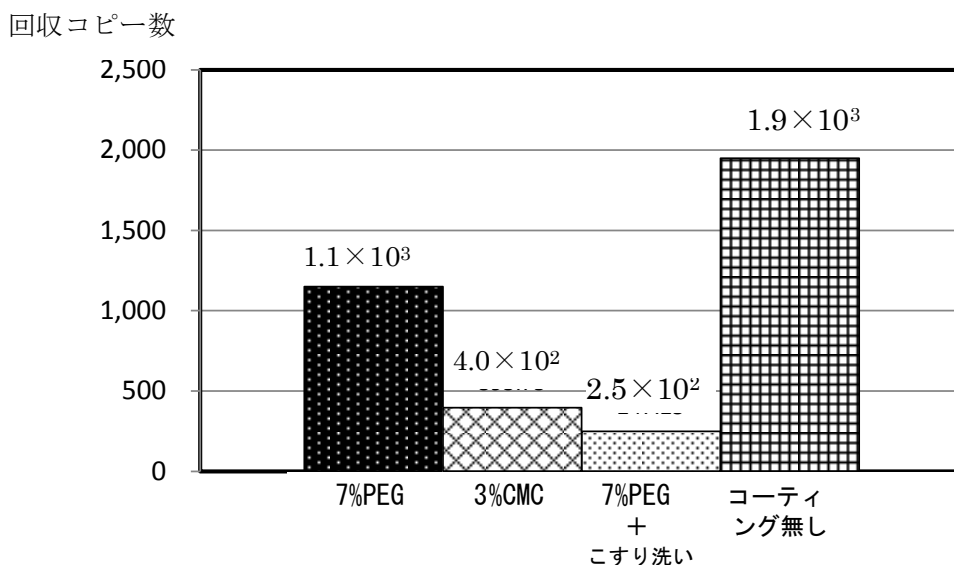


図5 3%CMC液と7%PEG液のコーティングによるノロウイルスの除去効果の比較

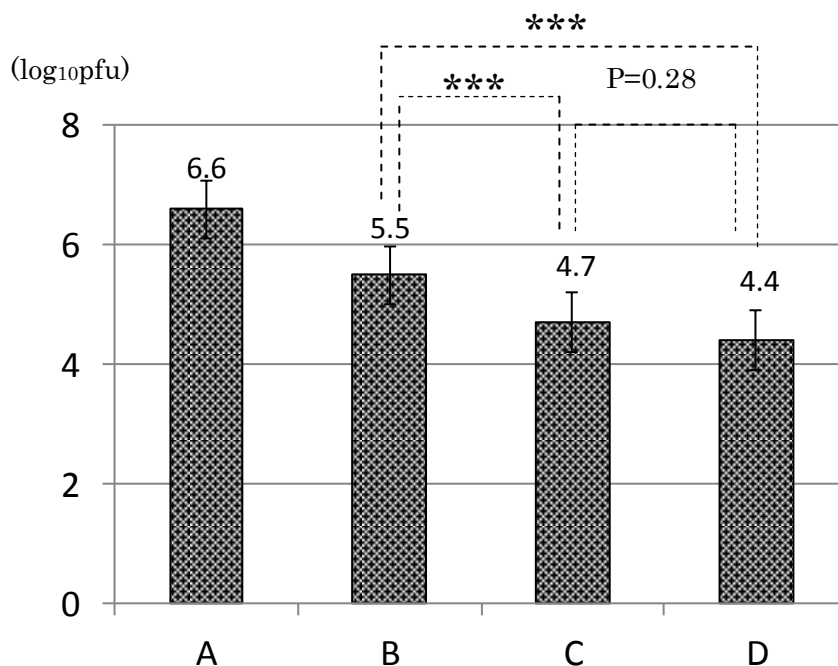


図6 手全体を使用した実験におけるGJ法による残存ファージの回収量の比較

両手全体で約8 log<sub>10</sub>pfuのファージを塗布し、AからDの実験後にGJ法で手に残存したファージの総回収量をグラフに示した。

\*\*\* : p < 0.001

A : ファージ液を手に塗布し乾燥、B : ファージ液を手に塗布後、水で手洗い

C : ファージ液を手に塗布して乾燥後市販の泡状ハンドソープで手洗い

D : カルボキシメチルセルロースによるコーティング後ファージ液を手に塗布して乾燥後手洗い

平成 28-30 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

Nested リアルタイム PCR を用いた食品および拭き取りからの  
ノロウイルス検出率の向上

|       |        |               |
|-------|--------|---------------|
| 研究協力者 | 永野 美由紀 | 東京都健康安全研究センター |
| 研究協力者 | 宗村 佳子  | 東京都健康安全研究センター |
| 研究協力者 | 浅倉 弘幸  | 東京都健康安全研究センター |
| 研究協力者 | 小田 真悠子 | 東京都健康安全研究センター |
| 研究協力者 | 新開 敬行  | 東京都健康安全研究センター |
| 研究分担者 | 上間 匡   | 国立医薬品食品衛生研究所  |

## 研究要旨

2016 および 2017 年度におけるノロウイルス (NoV) 食中毒 (疑いを含む) 事例の調査で搬入された食品と拭き取り 1,735 検体を対象に、nested リアルタイム PCR を実施した。その結果、87 検体が Nested リアルタイム PCR で NoV 陽性となった。87 検体の中で、41 検体は通常のリアルタイム PCR では未検出であった。食中毒事例における原因食品および感染経路の究明のためには、食品や拭き取り検体に対して nested リアルタイム PCR による検査を実施することが有用であると考えられた。

### A. 研究目的

ノロウイルス (NoV) による食中毒の調査では、食品や施設の拭き取り検体についても NoV 検査を実施し、感染源や感染経路の究明が行われる。しかしながら、これらの検体に含まれる NoV 量は微量であるため検出し難い。我々は、より効率的に NoV を検出するため、リアルタイム PCR で低い定量値を示した検体については、確認検査として Nested リアルタイム PCR を実施している。本研究では、通常のリアルタイム PCR の結果に関わらず、全ての食品や拭き取りに対して Nested リ

アルタイム PCR を実施することで、NoV 検出率が向上するかどうかを検討した。

### B. 研究方法

#### 1. 材料

2016 および 2017 年度において、NoV 陽性となった食中毒 (疑いを含む) 事例の調査で搬入された食品と拭き取り 1,735 検体 (食品 786 検体、拭き取り 949 検体) を材料とした。

#### 2. Nested リアルタイム PCR

1st PCR のプライマーは、G I 用に COG1F/G1SKR、G II 用に COG2F/G2SKR を用

いた。反応条件は 94°C 3 分の後、94°C 1 分、50°C 1 分、72°C 2 分を 35 回繰り返す、最終伸長反応は 72°C 15 分とした。得られた PCR 産物 5 $\mu$ L を滅菌蒸留水 45 $\mu$ L で 10 倍に希釈し、リアルタイム PCR の試料とした。

リアルタイム PCR は、厚生労働省通知（平成 19 年 5 月 14 日付け食安監発第 0514004 号）に準拠して行った。

### 3. 遺伝子型分類

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 Version 2.0 により遺伝子型を分類した。

（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. Nested リアルタイム PCR の結果

1,735 検体中 87 検体が Nested リアルタイム PCR で NoV 陽性となった。陽性となった検体の内訳は、食品が 36 検体（二枚貝 19 検体、一般食品 9 検体）、拭き取りが 61 検体（トイレ関連 51 検体、調理場関連 8 検体、その他 2 検体）であった。

本研究の結果と、通常検査時に実施したリアルタイム PCR の結果を比較した（図）。Nested リアルタイム PCR が陽性であった 87 検体の中で、通常のリアルタイム PCR で実測値 10 コピー以上の値を示したものは 46 検体であり、その内訳は食品が 5 検体（二枚貝 4 検体、一般食品 1 検体）、拭き取りが 41 検体（トイレ関連 37 検体、調理場関連 3 検体、その他 1 検体）であった。一方、通常のリアルタイム PCR

では未検出であったものは 41 検体であり、内訳は食品が 21 検体（二枚貝 15 検体、一般食品 6 検体）、拭き取りが 20 検体（トイレ関連 14 検体、調理場関連 5 検体、その他 1 検体）であった。

### 2. NoV の遺伝子型別

通常のリアルタイム PCR では 10 コピー未満で、Nested リアルタイム PCR では陽性となった 41 検体の遺伝子型分類を実施し、同一事例の患者および従事者由来株との塩基配列を比較した（表 1、2）。

食品 21 検体は、全ての検体について 2ndPCR で増幅が確認され、一般食品 6 検体については、患者および従事者由来株と遺伝子型および塩基配列が一致した。一方、二枚貝については、複数の遺伝子型が混在していることにより解析不能であったものが 15 検体中 7 検体確認された。また、患者と遺伝子型が一致しなかったものが 2 検体であった。6 検体については、患者由来株と塩基配列が一致した。

拭き取り 20 検体中 1 検体は、2ndPCR で増幅が確認できなかった。19 検体については増幅が確認できたが、二枚貝が関連した事例（事例 B および I）の検体については、解析不能もしくは患者由来株と遺伝子型が一致しないという結果であった。それ以外の検体については、患者および従事者由来株と遺伝子型が一致し、塩基配列の一致率は 99.7~100%であった。

## D. 考察

食品および拭き取りに含まれる NoV 量は微量であることに加え、食品検体については食品由来成分が遺伝子検査を阻害



することが知られている。そのため、通常のリアルタイム PCR では微量な NoV を検出することが困難である場合もある。今回の検討では、通常のリアルタイム PCR では未検出であっても、Nested リアルタイム PCR を実施することで陽性と判定される検体が存在することが明らかとなった。通常のリアルタイム PCR でも陽性となる検体には、トイレ関連の拭き取りが多く、これらの検体には比較的多量の NoV が含まれていると考えられる。一方で、通常のリアルタイム PCR では未検出で、Nested リアルタイム PCR では陽性となる検体には、二枚貝や一般食品、調理場関連の拭き取りの割合が多くなり、これらの検体に含まれる NoV 量はごく微量であると考えられた。残品や検食などの一般食品や調理場関連の拭き取りは、食中毒調査における原因食品や感染経路の特定する直接的な証拠となることから、これらの検体から NoV を検出することは極めて重要である。今後、食品や拭き取り検体からより確実に NoV を検出していくためには、nested リアルタイム PCR による検査を積極的に実施していくことが望ましいと考えられた。

## E. 結論

2016 および 2017 年度に NoV 陽性となった食中毒（疑いを含む）事例の食品と拭き取り 1,735 検体について、nested リアルタイム PCR を実施したところ、87 検体が陽性となり、その中で 41 検体は通常のリアルタイム PCR では未検出であった。食中毒調査において、原因食品および感染経路の究明のために食品や拭き取りの

NoV 検査を実施する際には、nested リアルタイム PCR による検査を実施することが望ましいと考えられた。

## 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

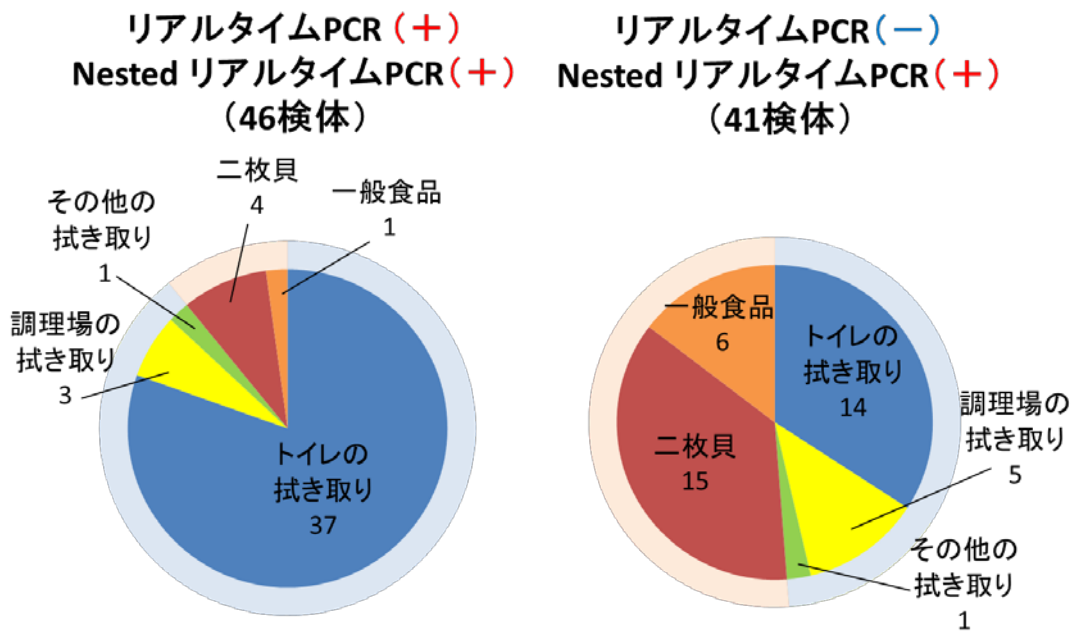


図 Nested リアルタイム PCR とリアルタイム PCR の比較

表 1 Nested リアルタイム PCR で陽性となった食品の遺伝子型 (21 検体)

| 事例 | 検体名                    | 遺伝子型      | 患者<br>遺伝子型        | 従事者<br>遺伝子型 |
|----|------------------------|-----------|-------------------|-------------|
| A  | 寿司(酢飯)                 | G II . 17 | G II . 17         | —           |
| D  | 生カキ                    | 解析不可      | G II . 17         | G II . 17   |
| K  | 生食用カキ3個                | G II . 17 | G II . 2          | —           |
| M  | 加熱用カキ                  | 解析不可      | G II . 17         | —           |
| M  | 生食用カキ(O県産)             | 解析不可      | G II . 17         | —           |
| O  | 冷凍カキフライ                | G II . 17 | G II . 17         | —           |
| P  | 白菜の塩漬け                 | G II . 4  | G II . 4          | G II . 4    |
| P  | キャベツ千切り                | G II . 4  | G II . 4          | G II . 4    |
| Q  | ホンビノス貝                 | 解析不可      | G II . 17         | —           |
| S  | はまぐり                   | G II . 17 | G II . 17         | —           |
| S  | かき                     | G II . 17 | G II . 17         | —           |
| T  | マカロニサラダ                | G II . 17 | G II . 17         | G II . 17   |
| U  | 生ガキ(H県産)               | G II . 17 | G II . 8          | —           |
| X  | カキ                     | 解析不可      | G II . 17         | —           |
| Y  | 生カキ(M産)                | 解析不可      | G I . 7 G II . 17 | —           |
| Y  | 生カキ(S産)                | 解析不可      | G I . 7 G II . 17 | —           |
| Y  | 生カキ(Z産)                | G II . 17 | G I . 7 G II . 17 | —           |
| Z  | 殻付き生ガキ                 | G II . 17 | G II . 17         | —           |
| AA | 生カキ(H県)                | G II . 17 | G II . 17         | —           |
| AB | 冷菜(クラゲ、キュウリ細切り、キュウリ漬物) | G II . 17 | G II . 17         | G II . 17   |
| AB | 冷菜(豆腐ハム、砂肝、魚揚げ物)       | G II . 17 | G II . 17         | G II . 17   |

表2 Nested リアルタイム PCR で陽性となった拭き取りの遺伝子型 (20 検体)

| 事例 | 検体名                  | 遺伝子型   | 患者<br>遺伝子型 | 従事者<br>遺伝子型 |
|----|----------------------|--------|------------|-------------|
| B  | トイレドア取っ手内側           | GII.3  | GII.3      | GII.2       |
| C  | スリッパ                 | GII.2  | GII.2      | —           |
| E  | 便器内                  | GII.2  | GII.2      | GII.2       |
| F  | ベット表面(おむつ替え)         | GII.2  | GII.2      | —           |
| G  | カット野菜用冷蔵ショーケースとって    | GII.2  | GII.2      | GII.2       |
| H  | 洋式トイレの便座             | 増幅不可   | GII.2      | GII.2       |
| I  | 刺身調理台上部              | 解析不可   | —          | GI.3 GII.2  |
| I  | 男性用洋便器フチ             | GI.3   | —          | GI.3 GII.2  |
| J  | トイレ従業員男 B1           | GII.2  | GII.2      | GII.2       |
| L  | 従事者用トイレ(ドアノブ、手洗器、便座) | GII.2  | GII.2      | GII.2       |
| N  | トイレ入口フロアマット          | GII.17 | GII.17     | —           |
| P  | 二槽シンク(右側)            | GII.4  | GII.4      | GII.4       |
| P  | 手洗い器(調理場)            | GII.4  | GII.4      | GII.4       |
| P  | トイレ(ドアノブ、ロータンク、レバー)  | GII.4  | GII.4      | GII.4       |
| R  | 従業員用トイレ便座裏           | GII.3  | —          | GII.3       |
| T  | 1階トイレ床               | GII.17 | GII.17     | GII.17      |
| V  | 男性用トイレ便座裏            | GII.17 | GII.17     | GII.17      |
| W  | トイレ便器内、便座裏           | GII.17 | GII.17     | —           |
| AB | トイレ手洗蛇口              | GII.17 | GII.17     | GII.17      |
| AB | シンク回り壁面              | GII.17 | GII.17     | GII.17      |

平成 28-30 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

東京都におけるノロウイルスを原因とした集団発生例での遺伝子型の  
解析 (2013/14~16/17 シーズン)

|       |        |               |
|-------|--------|---------------|
| 研究協力者 | 宗村 佳子  | 東京都健康安全研究センター |
| 研究協力者 | 永野 美由紀 | 東京都健康安全研究センター |
| 研究協力者 | 小田 真悠子 | 東京都健康安全研究センター |
| 研究協力者 | 木本 佳那  | 東京都健康安全研究センター |
| 研究協力者 | 森 功次   | 東京都健康安全研究センター |
| 研究協力者 | 奥津 雄太  | 東京都健康安全研究センター |
| 研究協力者 | 秋場 哲哉  | 東京都健康安全研究センター |
| 研究協力者 | 新開 敬行  | 東京都健康安全研究センター |
| 研究分担者 | 野田 衛   | 国立医薬品食品衛生研究所  |

研究要旨

2013/14~16/17 の4シーズンの東京都におけるノロウイルスを原因とした集団発生例において、検出された遺伝子型を解析した。その結果、2013/14 シーズンにおいては GII.4 が 55.1% (108/196) の事例から検出され最多であったが、2014/15 及び 2015/16 シーズンにおいては GII.17 がそれぞれ 33.1% (83/251)、42.6% (83/195) から検出され、最多遺伝子型となった。2016/17 シーズンでは、GII.2 が 65.7% (138/210) の事例から検出され最多となり、GII.17 は 11.9%(25/210)から検出され、これに次いだ。検出された GII.17のうち、85 例について全長解析を行なったところ、全て GII.P17-GII.17 であり、85 例中 82 例は系統樹上、Hu/GII.P17-GII.17/Kawasaki308/2015/JP (Kawasaki308 株) と同一のクラスターに属していた (系統樹は例示せず)。2017 年 2 月には、学校給食で提供された「刻みのり」を原因とした大規模な食中毒が東京都内で 4 事例発生したが、その遺伝子型は GII.P17-GII.17 であり、事例間および刻みのりと患者間でその配列は一致した。本事例においては、原因食品からのウイルス検出とともに、遺伝子解析による患者由来株と食品由来株の相同性の一致が解決の一助となったと考えられた。

## A. 研究目的

ノロウイルス(NoV)は代表的な胃腸炎感染症原因ウイルスであり、NoVの遺伝子型の把握は、長期的な疫学解析において有用である。今回、2013/14～16/17の過去4シーズンに東京都内で検出されたNoVについて、その遺伝子型を解析したので報告する。

## B. 研究方法

### 1. 材料

2013/14～16/17シーズンに食中毒あるいは施設内感染が疑われ、胃腸炎ウイルス検査の依頼があったもののうち、NoVが陽性となった882事例の患者糞便等から抽出したRNAを材料とした。

### 2. 方法

N/S領域の塩基配列をダイレクトシーケンスにより決定し、Norovirus Genotyping Tool Version 1.0により遺伝子型を分類した。また、GII.17が検出された検体うち85例については全長の塩基配列を確認した。また、16/17シーズンに検出されたGII.2の138例については*RdRp*領域の解析も実施した。

(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、倫理面への配慮は不要である。

## C. 研究結果

NoV陽性事例は2013/14シーズンは196、2014/15シーズンは251、2015/16シーズンは195、2016/17シーズンは210事例であった(図1)。遺伝子型別検出状況を見ると、GII.4は2013/14シーズンに

は55.1%(108/196)と半数以上を占めていたが、2014/15、2015/16シーズンではそれぞれ21.1%(53/251)、25.1%(49/195)と検出割合が減少した。これに対し、GII.17は2013/14シーズンにはわずか2例(1.0%)の検出であったが、次の2014/15シーズンには33.1%(83/251)、さらに2015/16シーズンでは42.6%(83/195)から検出され、この2シーズンにおいては最多遺伝子型となった。2016/17シーズンでは、GII.2が65.7%(138/210)の事例から検出され最多となった。前シーズンおよび前々シーズンでは最多検出型となっていたGII.17は、2016/17シーズンには検出割合が11.9%(25/210)にまで減少した。

GII.17検出例のうち全長解析を行った85例は全てGII.P17-GII.17であり、VP1の全長による系統樹解析の結果(系統樹は例示せず)、3例がHu/GII.P17-GII.17/Kawasaki323/2014/JP(Kawasaki323株)と同一のクラスターに属していたが、82例はHu/GII.P17-GII.17/Kawasaki308/2015/JP(Kawasaki308株)と同一のクラスターに属していた。Kawasaki323株と同一のクラスターに属していた検体は2013/14シーズンに検出された2例と2015年8月に検出された1例であった。GII.17の検出状況を月別に辿ると、2014/15は、シーズン当初にはわずか1例のみしか検出されていなかったが、2015年1月以降に検出例が急増していた。2015/16シーズンにおいても同様に、9月から12月までは9例しか検出されていなかったが、2016年1月以降に検出例が増

加し、シーズンを通して 83 例が検出された。GII.17 は、検出数のピークが 1 月以降と他の遺伝子型と比較して遅かった。

2016/17 シーズンに検出された GII.2 は、全て GII.P16\_GII.2 (GII.2 変異株) であった。GII.2 変異株は保育園等の小児集団での事例から多く検出されたが、2016 年 12 月に発生したパーティー参加者 76 名が発症した食中毒事例や 2017 年 1 月に特別養護老人ホーム 2 か所で発生した食中毒事例等の成人からも検出された。前シーズン、前々シーズンに多く検出されていた GII.17 は、2016/17 シーズンでは、検出例が減少したが、2017 年 2 月に東京都内で発生した学校給食で提供された「刻みのり」を原因とした大規模な食中毒 4 事例においては GII.17 が検出された。

#### D. 考察

2015 年以降、NoV の新規遺伝子型 GII.P17-GII.17 の流行が世界的な話題となり、国内および海外諸国で本遺伝子型の流行が広く報告された。今回の結果から、東京都においても同様に GII.P17-GII.17 が 2014/15 シーズン以降流行していたことが確認された。Kawasaki308 は、Kawasaki323 よりも時系列進化の観点から新しい株とされ、GII.17 は、Kawasaki323 から、Kawasaki308 の亜株に進化しつつ、2014/15 から 2015/16 の 2 シーズンにおいて、都内でも流行を維持していたと考えられた。GII.17 の検出が他の遺伝子型 (GII.4) に比し、やや遅れて増加し始める点についてはまだ十分な考察ができて

いない。今後、様々な角度から検証を試み NoV の流行状況の解明に役立てたい。

2016/17 シーズンでは GII.2 が主要流行遺伝子型となったが、病原微生物検出情報(国立感染症研究所) によると、これは全国的な傾向であったと考えられる。検出された GII.2 は全て GII.2 変異株であったが、ドイツや中国等からも GII.2 変異株によるアウトブレイクが報告されており、新たな変異株が世界各国で流行していたと考えられる。

2017 年 2 月に発生した「刻みのり」食中毒(東京都内の 4 事例合計での喫食者は 4,209 名、患者は 1,193 名)は意外な食材を原因としていたことや、規模の大きさなどから社会的関心も高い事例となった。GII.17 が流行していない 2016/17 シーズンにおいて、4 事例ともに GII.17 が原因ウイルスであり、その塩基配列が事例間ならびに刻みのりと患者の間でも一致したことも感染源を特定する有力な根拠の一つとなった。また、本事例に関しては、同一刻みのりの関与した事例が複数の自治体においても発生していたことが確認されたが、遺伝子型および配列の一致が関連を探知する根拠の一つとなった。厚生労働省通知「食中毒対策の推進について」(平成 28 年 4 月 1 日付け生食監発 0401 第 1 号)にもあるように、NoV 食中毒において遺伝子型等の分子疫学情報の充実は原因究明や予防をより一層推進する上で必要である。今後は、単一事例内の感染源の特定だけにとどまらず、「広域に散在」している可能性がある複数事例の感染源究明に向け、分子疫学的情報を活用し事例間の関連性の有無を迅速に察知で

きるようなシステム構築が必要と思われる。

## E. 結論

2013/14～16/17の4シーズンの東京都におけるNoVを原因とした集団発生例において、検出された遺伝子型を解析したところ、2013/14シーズンにおいて、最も多く検出されたNoVの遺伝子型はGII.4であった(55.1%)が、2014/15及び2015/16シーズンにおいてはGII.17がそれぞれ33.1%(83/251)、42.6%(83/195)から検出され、最多遺伝子型となった。2016/17シーズンにおいては、最も多く検出された遺伝子型はGII.2であった(65.7%)。2017年2月に都内で発生した学校給食で提供された刻みのりによるNoV食中毒4事例においては、全てでGII.17が検出され、その配列の一致を確認したことが原因究明の一助となった。遺伝子型の把握は、長期的な疫学解析において有用であるばかりでなく、食中毒事例間の関連性や原因食品を究明する上でも重要な情報であると考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 宗村佳子:東京都におけるノロウイルス検出状況(2015).食品衛生学雑誌,57(6):194-96(2016)
- 2) 宗村佳子,木本佳那,小田真悠子,奥津雄太,秋場哲哉,貞升健志:IASR 東京都におけるノロウイルス GII.17 流行の分子疫学.38(1):5-6(2017)
- 3) 宗村 佳子, 木本 佳那, 小田 真

悠子, 永野 美由紀, 奥津 雄太, 森 功次, 秋場 哲哉, 貞升 健志:拭き取り検体からのノロウイルス遺伝子検出状況. 食品衛生学雑誌, 58(4), 201-204(2017)

- 4) 宗村 佳子, 木本 佳那, 小田 真悠子, 奥津 雄太, 加藤 玲, 鈴木 康規, 齊木 大, 平井 昭彦, 秋場 哲哉, 新開 敬行, 貞升 健志:学校給食で提供された刻みのりによるノロウイルス食中毒. 食品衛生学雑誌, 58(6), 260-267(2017)
- 5) Somura Y, Mizukoshi F, Nagasawa K, Kimoto K, Oda M, Shinkai T, Murakami K, Sadamasu K, Katayama K, and Kimura H. A food poisoning outbreak due to food handler-associated contamination with the human norovirus GII.P16-GII.2 variant strain in Italian cuisine in Tokyo during the 2016/17 winter season. Jpn. J. Infect. Dis., 71, 172–173 (2018)

### 2. 学会発表

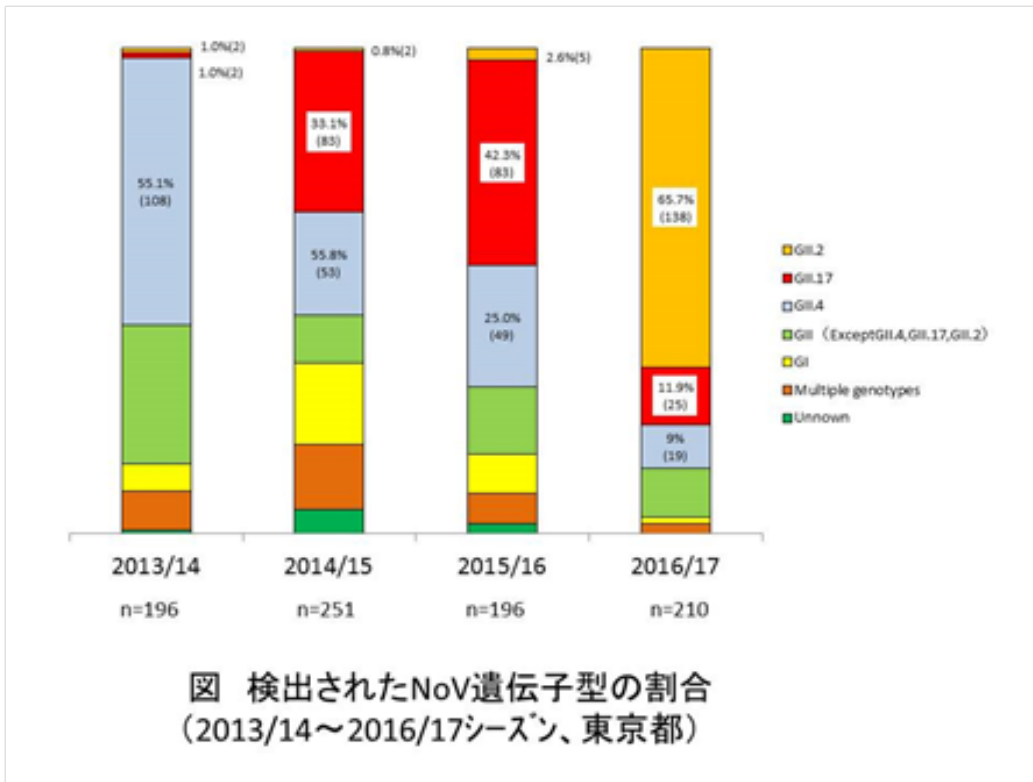
- 1) 宗村佳子:東京都におけるノロウイルス検出状況(2015).第 111 回食品衛生学会学術講演会シンポジウム
- 2) 宗村佳子:ノロウイルス食中毒一刻み海苔を原因とした大規模な即中毒事例を踏まえー. 第 113 回食品衛生学会学術講演会, 東京, 2017年11月10日

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





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」  
総合研究協力報告 (平成 28～30 年度)

## 川崎市における二枚貝のノロウイルス検出状況 及びノロウイルスの流行状況

|       |       |              |
|-------|-------|--------------|
| 研究協力者 | 清水 智美 | 川崎市健康安全研究所   |
| 研究協力者 | 若菜 愛澄 | 川崎市健康安全研究所   |
| 研究協力者 | 清水 英明 | 川崎市健康安全研究所   |
| 研究分担者 | 上間 匡  | 国立医薬品食品衛生研究所 |
| 研究分担者 | 野田 衛  | 国立医薬品食品衛生研究所 |

### 研究要旨

川崎市内で流通する二枚貝及び市内の河川に生息する二枚貝についてノロウイルス (NoV) 検査を行うとともに、ヒトにおける NoV の流行状況について解析し、二枚貝の保有ウイルスとの関連性について調査を行った。

市内で流通する生食用生カキの NoV 保有率 (陽性率) は 33.3% (4/12 検体) であり、25.0% (3 検体) から遺伝子型別不能の GI が検出された。加熱用生カキから NoV は検出されなかった (0/12 検体)。

市内で流通するシジミの陽性率は 4.2% (2/48 検体) と比較的低かったものの、生食又は加熱不十分な状態で喫食することによって NoV に感染する可能性があるため、注意が必要である。

河川のシジミから検出された GI 群と、ヒトから検出された GI 群の遺伝子型や塩基配列は異なっていたため、シジミが保有する GI 群はヒトでの流行と関連性が低いと考えられる。一方、GII 群では、河川のシジミから GII. 2、GII. 3、GII. 4 及び GII. 17 が検出され、近年のヒトにおける流行遺伝子型を反映する結果が得られた。また、河川のシジミから検出された NoV GI 群と GII 群の比率は 58.3 : 41.7 であり、GI 群の方がやや優勢であったのに対し、ヒトにおいては 13.5 : 86.5 で、GII 群が多くを占めていた。これらのことから、GI 群では不顕性感染又は、当所では把握していない GI 群患者 (顕性) が発生していた可能性があり、対して GII 群では GI 群と比して顕性感染となる可能性が高いと推察される。

今後も引き続き二枚貝が保有する NoV について調査し、長期間にわたりデータを蓄積するとともに、当市における NoV の流行状況について注視する必要があると考える。

## A. 研究目的

ウイルス性食中毒は、ウイルスに汚染された食品を喫食することによって引き起こされる。ウイルスに汚染された河川水や海水をろ過し、中腸腺中にウイルスを蓄積及び濃縮した二枚貝を、生食又は加熱不十分な状態で喫食することによる食中毒事例が多数報告されている。中でもノロウイルス (NoV) による食中毒は 1 事例あたりの患者数が多く、ほぼ毎年わが国における食中毒の患者数の最上位を占めている。また、NoV は冬季に流行する感染性胃腸炎の主要な原因ウイルスであり、小児から高齢者まで幅広い年齢層に感染し、保育園・高齢者福祉施設等において集団感染が多くみられる。NoV による食中毒は、感染症としての流行を背景としても発生することから、流行状況や遺伝子型を解析することは、予防対策上重要である。

そこで、本研究では、市内で流通する二枚貝及び市内の河川に生息する二枚貝について、NoV 保有率や保有遺伝子型の把握を目的として NoV 検査を行うとともに、ヒトにおける NoV の流行状況について解析し、二枚貝の保有ウイルスとの関連性について調査を行った。

## B. 研究方法

### 1. 材料

#### (1) 市内における二枚貝の NoV 検出

##### (ア) 市内流通の生食用生カキ

2017 年 10 月及び 12 月に 1 パックずつ購入した生食用生カキを材料とし、1 パックにつき 6 検体の検査を行った(12

検体)。

##### (イ) 市内流通の加熱用生カキ

2017 年 10 月及び 12 月に 1 パックずつ購入した加熱用生カキを材料とし、1 パックにつき 6 検体の検査を行った(12 検体)。

##### (ウ) 市内流通のシジミ

2017 年 8 月、10 月、12 月及び 2 月に 1 パックずつ購入したシジミを材料とし、各月 12 検体の検査を行った(48 検体)。

##### (エ) 市内の河川に生息するシジミ

市内河川の干潟にてシジミを採取した。2017 年 8 月、10 月、及び 2018 年 2 月に採取したものは毎月 12 検体ずつ、2018 年 6 月、8 月、10 月、11 月及び 12 月に採取したものは各月 24 検体ずつ検査を行った(156 検体)。

##### (2) 市内における NoV 検出状況

2013 年 9 月から 2018 年 12 月までの期間に当所において NoV 陽性となった食中毒(疑い含む)及び感染症集団発生事例を対象とした(197 事例)。

## 2. 二枚貝からの NoV 検出

### (1) 二枚貝からのウイルス濃縮

二枚貝 1 個体を 1 検体とした。食品のウイルス標準試験法検討委員会「二枚貝(カキ)からのウイルスの濃縮法(ポリエチレングリコールによる濃縮法)」を参考に、二枚貝の中腸腺を取り出し、9 倍量の  $\alpha$ -アミラーゼ(和光純薬)/PBS 液(2.8 mg/mL)を加えて 10%乳剤を作製した。37°C で 1 時間、恒温振とうして消化を行ったのち、10,000 rpm、20 分間冷却遠心した。その後は、厚生労働省通知法

「貝の中腸腺を用いる方法（ポリエチレングリコールによる濃縮方法）」に準じ、遠心上清にポリエチレングリコール 6,000 を 8%、NaCl を 2.1 g/100 mL になるように加えて軽く攪拌し、4°C で一晚静置し、10,000 rpm、20 分間冷却遠心した沈渣を 300 ～ 600  $\mu$ L の DDW で再浮遊させ濃縮した。

## (2) NoV の検査

QIAamp Viral RNA mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出し、Recombinant DNase I (TaKaRa) を用いて DNase 処理を行い、PrimeScript® II 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) を用いた逆転写反応によって cDNA を合成した。Capsid N/S 領域について semi nested PCR (1st: COG1F/G1SKR, COG2F/G2SKR, semi nested: G1SKF/G1SKR, G2SKF/G2SKR) を行い、陽性となった検体はダイレクトシーケンスによって塩基配列を解読し、Norovirus Genotyping Tool (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>) を用いて遺伝子型を決定した。

## (倫理面への配慮)

本研究の実施については、当所倫理審査委員会にて承認済みである（審査番号：28-3 及び 29-4）。

## C. 研究結果

### 1. 二枚貝における NoV 保有状況

#### (ア) 市内流通の生食用生カキ

12 検体中 4 検体から NoV が検出され、NoV 保有率(陽性率)は 33.3% となった。2017 年 10 月購入の 2 検体及び 12 月購入の 1 検体から、塩基配列がほぼ一致

する GI が検出されたが、既知の遺伝子型に分類されなかった。また、12 月購入の 1 検体から GII.17 が検出された(表 1)。

#### (イ) 市内流通の加熱用生カキ

加熱用生カキから NoV は検出されなかった(陽性率 0.0%) (表 2)。

#### (ウ) 市内流通のシジミ

48 検体中 2 検体から NoV が検出され、陽性率は 4.2% と低かった。2 検体ともに 2017 年 12 月購入のシジミであり、遺伝子型は GII.17 であった。2017 年 8 月、10 月及び 2018 年 2 月購入のシジミからは NoV が検出されなかった(表 3)。

#### (エ) 河川のシジミ

156 検体中 51 検体から NoV が検出された(陽性率 32.7%)。陽性検体の中で最も多く検出された遺伝子型は GI.4 で、41.2% (21/51 検体) を占めた。次いで多く検出されたのが GII.17 (10/51 検体、19.6%) であり、GII.2 (8/51 検体、15.7%)、GI.3 (6/51 検体、11.8%)、GII.3 (6/51 検体、11.8%) と続いた(表 4、図 1)。

河川のシジミから検出された NoV GI 群と GII 群の比率は 58.3 : 41.7 で、GI 群の方がやや優勢であった。陽性となった 51 検体中、21 検体 (41.2%) では GI 群と GII 群の両方が検出された。

### 2. 市内における NoV 流行状況

2013/14 シーズンの主流遺伝子型は GII.4 (51.0%) 及び GII.6 (27.5%)、2014/15 及び 2015/16 シーズンでは GII.4 (34.3%、24.4%) 及び GII.17 (23.9%、34.1%) が主流であった。2016/17 及び 2017/18 シーズンにおいては GII.2 (60.7%、42.3%) が最も

多く検出された。2018/19 シーズンは、9月から12月までの期間においてGII.2とGII.4が各3事例（各50.0%）で検出された（図2）。対象期間中に最も多く検出されたのはGII.4で、32.1%を占めた。次いで多かったのがGII.17（19.3%）、GII.2（17.0%）であり、これらの遺伝子型が近年の主流と言える。

NoV陽性となった197事例におけるGI群とGII群の検出比率は13.5:86.5であり、GII群が多くを占めた。

## D. 考察

### 1. 市内流通の二枚貝

市内で流通する生食用生カキの25.0%から遺伝子型別不能のGIが検出された。遺伝子型が割り当てられていないことから、報告数が稀な株であり、ヒトには感染しない又はヒトに対して病原性を持たないことが推測される。しかしながら今後ヒトへの感染例が報告される可能性があるため、詳細に解析する必要があると考えられる。

また、市内で流通するシジミのNoV保有率は4.2%と比較的低かったものの、生食又は加熱不十分な状態で喫食することによってNoVに感染する可能性があることが示唆された。シジミは加熱して喫食することがほとんどであるが、十分な加熱を施さない調理方法もあるため、注意が必要である。

### 2. 市内河川の二枚貝が保有するNoVとヒトでのNoV流行状況との比較

NoVGI群に着目すると、河川のシジミから最も多く検出されたGI.4（陽性検体中41.2%）は、ヒトでは2事例のみ（1.0%）

であった。次いで河川のシジミから多く検出されたGI.3（11.8%）は、ヒトにおける陽性事例の4.1%（8/197事例）、GI群陽性事例の中では28.6%（8/28事例）を占めていたが、河川のシジミから検出されたGI.3とヒトから検出されたGI.3では塩基配列が明らかに異なっており（データ未公開）、ヒトに感染したものが河川のシジミから検出されたとは考えにくい。これらのことから、河川のシジミが保有しているGI群と、ヒトで流行しているGI群の関連性は低いと考えられる。一方、NoVGII群については、河川のシジミから検出された遺伝子型がGII.17（19.6%）、GII.2（15.7%）、GII.3（11.8%）、GII.4（9.8%）と、近年のヒトにおける流行を反映していた。また、河川のシジミから検出されたGI群とGII群の比率はGI群の方がやや優勢であったのに対し、ヒトにおいてはGII群が多くを占めた。以上のことから、GI群では不顕性感染又は、当所では把握していないGI群患者（顕性）が発生していたこと可能性があり、対してGII群ではGI群と比して顕性感染となる可能性が高いと推察される。

GII.4において、ヒトから検出されたものと河川のシジミが保有していたものとで塩基配列が一致したものがあったが、ヒトでの検出年月とシジミの採取年月が同じ場合と異なる場合があり、時期のずれも様々であるため（図3）、今回得られたデータのみで関係性を明らかにするのは難しかった。したがって、今後も引き続き二枚貝が保有するNoVについて調査し、長期間にわたりデータを蓄積するとともに、当市におけるNoVの流行状況に

ついて注視する必要があると考える。

## E. 結論

- ・市内で流通する生食用生カキの 25.0% から遺伝子型別不能のGIが検出された。
- ・市内で流通するシジミのNoV保有率(陽性率)は4.2%と比較的低かったものの、生食又は加熱不十分な状態で喫食することによって NoV に感染する可能性があるため、注意が必要である。
- ・市内河川に生息するシジミの NoV 保有率(陽性率)は32.7%であった。
- ・河川のシジミから最も多く検出された NoV GI.4 は、ヒトにおいてはほとんど検出がなく、他のGI群の遺伝子型に着目しても、ヒトにおける流行との関連性は低かった。
- ・河川のシジミから検出された NoV GII群は、ヒトでの主流遺伝子型と一致す

る結果となった。

- ・GI群では不顕性感染又は当所で把握していない患者が発生したことが推測され、GII群ではGI群と比して顕性感染となる可能性が高いと考えられる。
- ・今後も定期的に二枚貝を採取し、データを蓄積する必要がある。

## 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 市内流通の生食用生カキにおける NoV 検査結果 (2017.10, 12)

| 採取年月         | 産地 | 検体数       | 陽性数      | 陽性率          | 遺伝子型                         |
|--------------|----|-----------|----------|--------------|------------------------------|
| 2017.10      | A  | 6         | 2        | 33.3%        | GI not typed<br>GI not typed |
| 2017.12      | A  | 6         | 2        | 33.3%        | GI not typed<br>GII.17       |
| <b>Total</b> |    | <b>12</b> | <b>4</b> | <b>33.3%</b> |                              |

表2 市内流通の加熱用生カキにおける NoV 検査結果 (2017.10, 12)

| 採取年月         | 産地 | 検体数       | 陽性数      | 陽性率         | 遺伝子型 |
|--------------|----|-----------|----------|-------------|------|
| 2017.10      | B  | 6         | 0        | 0.0%        |      |
| 2017.12      | B  | 6         | 0        | 0.0%        |      |
| <b>Total</b> |    | <b>12</b> | <b>0</b> | <b>0.0%</b> |      |

表3 市内流通のシジミにおける NoV 検査結果 (2017.8~2018.2)

| 採取年月         | 産地 | 検体数       | 陽性数      | 陽性率         | 遺伝子型             |
|--------------|----|-----------|----------|-------------|------------------|
| 2017.8       | C  | 12        | 0        | 0.0%        |                  |
| 2017.10      | D  | 12        | 0        | 0.0%        |                  |
| 2017.12      | D  | 12        | 2        | 16.7%       | GII.17<br>GII.17 |
| 2018.2       | D  | 12        | 0        | 0.0%        |                  |
| <b>Total</b> |    | <b>48</b> | <b>2</b> | <b>4.2%</b> |                  |

表4 河川のシジミにおけるNoV検査結果(2017.8~2018.12)

| 採取年月         | 検体数        | 陽性数       | 陽性率          | 遺伝子型  |
|--------------|------------|-----------|--------------|---|
| 2017.8       | 12         | 3         | 25.0%        | GII.4 (×2検体)、 <u>GI.3とGII.17</u>  |
| 2017.10      | 12         | 3         | 25.0%        | GI.3、GII.2、GII.4  |
| 2018.2       | 12         | 1         | 8.3%         | <u>GI.3とGII.17</u>  |
| 2018.6       | 24         | 3         | 12.5%        | GI.3、GII.2、GII.3  |
| 2018.8       | 24         | 5         | 20.8%        | GI.6 (×2検体)、 <u>GI.3とGII.3</u> 、 <u>GI.6とGII.2</u> 、 <u>GI.6とGII.17</u>   |
| 2018.10      | 24         | 9         | 37.5%        | GI.1、GII.3 (×2検体)、GII.17、 <u>GI.3とGII.17</u> 、 <u>GI.4とGII.4</u> 、 <u>GI.4とGII.17 (×2検体)</u> 、 <u>GI.6とGII.3</u>                          |
| 2018.11      | 24         | 13        | 54.2%        | GI.2、GI.4 (×3検体)、GI.5 (×3検体)、 <u>GI.2とGII.17</u> 、 <u>GI.4とGII.2 (×2検体)</u> 、 <u>GI.4とGII.3</u> 、 <u>GI.4とGII.17</u> 、 <u>GI.7とGII.17</u> |
| 2018.12      | 24         | 14        | 58.3%        | GI.2、GI.4 (×7検体)、GI not typed、 <u>GI.2とGII not typed</u> 、 <u>GI.4とGII.2 (×3検体)</u> 、 <u>GI.4とGII.4</u>                                   |
| <b>Total</b> | <b>156</b> | <b>51</b> | <b>32.7%</b> |   |

※下線：1つの検体から混合検出

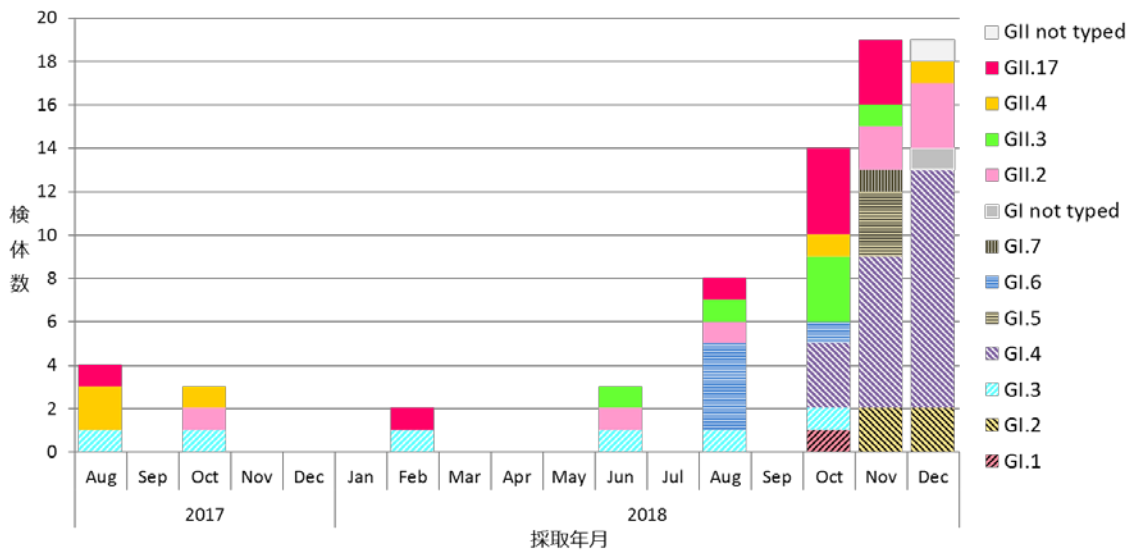
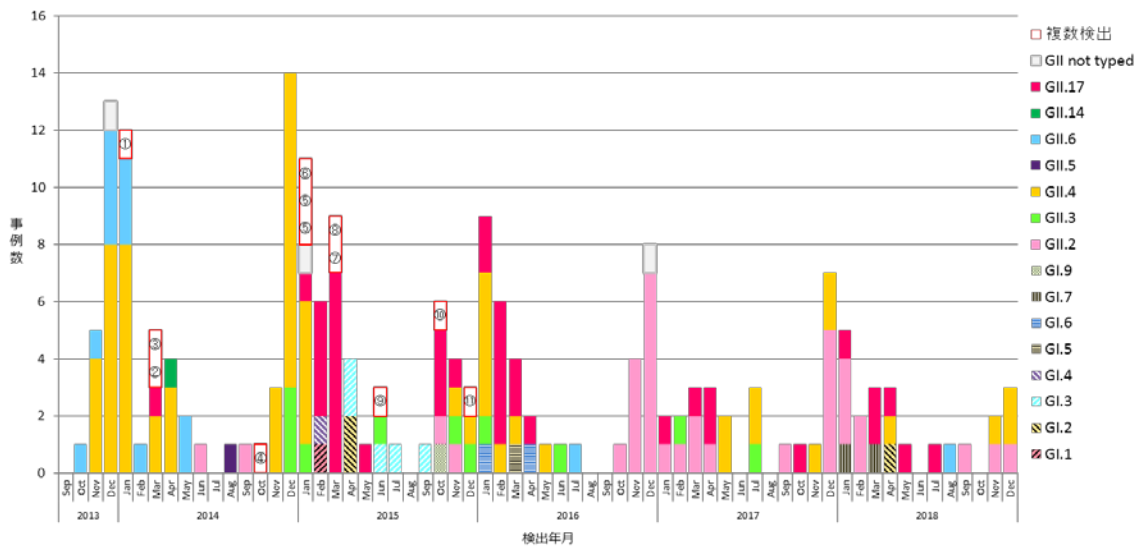


図1 河川のシジミにおけるNoV保有状況(2017.8~2018.12)

※混合検出されたものも積み上げて表示



※複数検出事例(1つの事例で複数の遺伝子型が検出された)

- ①GI.6, GII.4    ②GI.2, GII.6    ③GI.3, GI.4, GI.6, GII.6    ④GI.3, GII.5    ⑤GI.2, GII.4 (2事例)    ⑥GI.2, GII.2, GII.4
- ⑦GI.2, GI.7, GII.13, GII.17    ⑧GI.2, GII.17    ⑨GI.2, GI.3, GI.6, GII.4, GII.13, GII.17    ⑩GI.8, GII.2, GII.21    ⑪GI.6, GI.9

図2 市内におけるNoV検出状況(2013.9~2018.12)



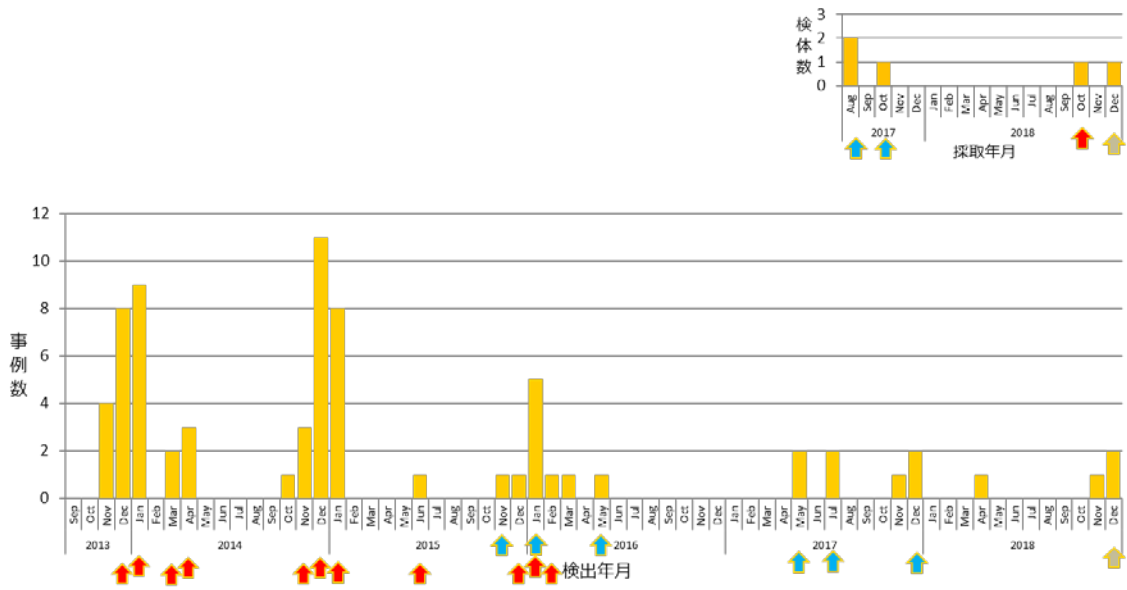


図3 市内河川のシジミにおけるNoV GII.4保有状況（上）及び  
市内ヒトにおけるNoV GII.4検出状況（下）（2013.9～2018.12）

※混合検出されたものも積み上げて表示

※N/S領域における塩基配列が一致した検体は同じ色の矢印で表示

平成 28-30 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

調理従事者および患者等から検出されたノロウイルスの遺伝子解析、  
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  
生食用カキのノロウイルス汚染調査

|       |        |              |
|-------|--------|--------------|
| 研究協力者 | 入谷 展弘  | 大阪健康安全基盤研究所  |
| 研究協力者 | 山元 誠司  | 大阪健康安全基盤研究所  |
| 研究協力者 | 改田 厚   | 大阪健康安全基盤研究所  |
| 研究協力者 | 阿部 仁一郎 | 大阪健康安全基盤研究所  |
| 研究協力者 | 上林 大起  | 大阪健康安全基盤研究所  |
| 研究協力者 | 平井 有紀  | 大阪健康安全基盤研究所  |
| 研究協力者 | 江川 和孝  | 大阪健康安全基盤研究所  |
| 研究協力者 | 馬場 孝   | 大阪健康安全基盤研究所  |
| 研究協力者 | 久保 英幸  | 大阪健康安全基盤研究所  |
| 研究分担者 | 野田 衛   | 国立医薬品食品衛生研究所 |
| 研究分担者 | 上間 匡   | 国立医薬品食品衛生研究所 |

### 研究要旨

施設フキトリまたは調理従事者からノロウイルス (NoV) が検出された食中毒 (疑いを含む) を対象に、患者由来 NoV との遺伝子解析を実施したところ、すべての事例において両者由来 NoV の遺伝子型、塩基配列が一致した。施設フキトリや調理従事者由来 NoV の遺伝子解析は食中毒の感染経路解明など原因究明につながる科学的根拠となった。

2016 年 9 月から 2018 年 12 月までの 3 シーズンにおける NoV 流行について分子疫学的解析を行ったところ、2016-2017 シーズンに保育所や小学校などで子どもを中心とした NoV GII.2 の大きな流行が認められた。また、この 3 シーズンは NoV GII.4 の検出数は少なかったが、2016 年 1 月および 3 月に発生した事例から検出された GII.4 株は、これまで報告のないキメラウイルス GII.P16-GII.4 Sydney\_2012 であった。

2016-2017~2018-2019 シーズンの期間に国産市販生食用カキ 16 ロットについて NoV および A 型肝炎ウイルス (HAV) の検索、うち 13 ロットについてはさらにサポウイルス (SV) および E 型肝炎ウイルス (HEV) の検索を行った。NoV は 3 ロット (3/16、18.8%)、SV は 1 ロット (1/13、7.7%) 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 (NoV) 食中毒の中で、調理従事者から食品等への二次汚染が原因であることは多い。今回、感染経路究明における施設フキトリおよび調理従事者由来ウイルス遺伝子解析の有用性について検討した。

また、ヒトの NoV 流行状況や食品中の NoV 汚染状況を把握することは NoV による胃腸炎の流行予測や食中毒・集団感染の予防対策に重要である。本研究では NoV 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 NoV 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 NoV 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カキについて NoV、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

#### 1) 調理従事者由来 NoV の遺伝子解析

2014 年 1 月～2018 年 12 月の期間に患者および原因施設調理従事者から NoV が検出された食中毒 (疑いを含む) 25 事例を対象とした。

#### 2) 施設フキトリ由来 NoV の遺伝子解析

NoV 食中毒推定原因食品の加工を行っ

た一施設のフキトリ 25 か所を対象とした。

#### 3) 胃腸炎事例から検出された NoV の遺伝子解析

2016 年 1 月および 3 月に発生した集団胃腸炎 2 事例から検出された NoV GII. 4 株 (OH16002、OC16023)、および 2016 年 9 月から 2018 年 12 月までの 3 シーズン (1 シーズン: 9 月から翌年 8 月までの期間) に当研究所へ検査依頼のあった集団胃腸炎 230 事例、患者糞便 847 検体 (2016-2017 シーズン 153 事例 554 検体、2017-2018 シーズン 66 事例 248 検体、2018-2019 シーズン (2018 年 12 月までの集計) 11 事例 45 検体) を用いた。

#### 4) 生食用カキの NoV 汚染調査

カキは 2016 年 12 月および 2017 年 2 月 (2016-2017 シーズン)、2017 年 12 月および 2018 年 2 月 (2017-2018 シーズン)、2018 年 12 月 (2018-2019 シーズン) に市販されていた国産生食用カキを月に 3～4 ロットずつ、合計 16 ロットを NoV、SV、HAV および HEV の検索に用いた (SV および HEV の検索は 2016-2017 および 2017-2018 シーズンのみ実施した)。16 ロットは 3 県 7 海域から採取されものであり、D 県産 7 ロット、C 県産 6 ロット、B 県産 3 ロットであった。

#### 2. 患者糞便材料からの NoV 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。

NoV 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

生カキは 1 ロットにつき、カキ 3 個をまとめて検査した。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 (Wako) / 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 を用いて合成した。

NoV 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

NoV 陽性検体は、Capsid N/S 領域遺伝子を増幅し、塩基配列を決定した。2016 年 1 月および 3 月に発生した 2 事例から検出された NoV GII.4 株 (OH16002、OC16023) は RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) 領域を増幅し (JCM 46, 2406-9, 2008)、塩基配列を決定して解析を行った。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 Oka らの方法 (Arch Virol 157, 349-352, 2012) に従った。

#### (倫理面への配慮)

本研究については、地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所倫理審査委員会の審査を受け、承認を得た。

## C. 研究結果

### 1. 調理従事者由来 NoV の遺伝子解析

解析した全ての事例において、調理従事者および患者由来 NoV の遺伝子型および塩基配列を比較したところ、同一事例の両者はすべて一致した (表 1)。

### 2. 施設フキトリ由来 NoV の遺伝子解析

8 か所から NoV が検出され、うち 6 か所はトイレ周辺であった (表 2)。フキトリ由来株と患者および食品由来株の遺伝

子型および塩基配列を比較したところ、すべて一致した。1 か所（食品加工機（裁断機）入口）では患者および食品由来株と同じ塩基配列以外に、1 塩基異なる塩基配列も認められた。フキトリ検体採取場所の NoV 汚染量（NoV RNA コピー数/検体）はトイレ取手（外）が最も高く、次いでトイレレバー、トイレ取手（内）であった。トイレ周辺以外の 2 か所では微量な汚染であった。

### 3. NoV 胃腸炎事例の発生状況

NoV は 177 事例(77.0%)577 検体(68.1%)から検出された。図 1 に事例の月別発生状況を示した。2016-2017 シーズンは 129 事例 (84.3%)、401 検体 (72.4%) が NoV 陽性であった。11 月 (43 事例) および 12 月 (46 事例) に保育園や小学校において発生数が急増した。カキ関連事例は 2 事例 (12 月および 1 月) であった。

2017-2018 シーズンは 40 事例 (60.6%)、146 検体 (58.9%) が NoV 陽性であり、大阪市で NoV 事例が増加し始めた 2003-2004 シーズン以降、NoV 事例発生数が最も少なかった。特に食中毒疑事例が 10 事例であり、カキ関連事例の発生もなかった。

2018-2019 シーズンは 8 事例 (72.7%)、30 検体 (66.7%) が NoV 陽性であり、前シーズンと同様、発生数が少ない状況で推移している。カキ関連事例の発生はなかった。

### 4. 生食用カキのウイルス汚染状況

表 3 にウイルス検出結果を示した。NoV 汚染は 18.8% (3/16 ロット) に認められ

た。中腸腺 1g あたりの NoV 汚染量 (NoV RNA コピー数) は 18~33 コピーであり、すべてリアルタイム RT-PCR の判定基準値である実測値 10 コピーよりも低い値であった。今回 NoV が検出されたのは B 県産、C 県産、D 県産のカキ 1 ロットずつからであり、2018 年 2 月に採取されたカキの検出率が最も高かった (2/3 ロット)。

SV 汚染は C 県産の 1 ロット (7.7%、1/13 ロット) に認められた。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。

### 5. 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 NoV の中で遺伝子型別できたものは、少なくとも 11 種類 (GI : 5 種類、GII : 6 種類) であった。最も多く検出されたのは、複数の遺伝子型が検出された事例を含めて 109 事例 (61.6%) から検出された GII. 2 であり、次いで GII. 4 (13.0%、23 事例)、GII. 17 (10.2%、18 事例)、GII. 6 (7.9%、14 事例) であった。

2016-2017 シーズンで最も多く検出された遺伝子型は GII. 2 (67.4%、87/129 事例) であり、次いで GII. 4 (10.9%、14/129 事例) であった。NoV GII. 2 が検出された事例は 10 月から発生が認められ、11 月および 12 月に集中し (83.9%、73/87 事例)、3 月まで認められた (図 1)。主な推定原因はヒトからヒトへの感染 (PP 疑感染) であり (76 事例)、主な発生施設は保育所 (53 事例)、小学校 (21 事例) であった。食中毒疑事例は 11 事例あり、うち 2 事例はカキ関連事例であった。NoV GII. 4 が検出された事例は 10 月から 1 月

に5事例、5月から7月までに9事例認められた。(図1)。主な推定原因はPP疑感染(11事例)であり、発生施設は保育所(10事例)および高齢者施設(1事例)であった。GII.4株の亜型はすべてSydney2012であった。

2017-2018シーズンで最も多く検出された遺伝子型はGII.2(50.0%、20/40事例)であり、次いでGII.4(20.0%、8/40事例)であった。NoVGII.2が検出された事例は11月および1月から6月に発生が認められ、PP疑感染が14事例(保育園10事例、小学校2事例、高齢者施設1事例、社会福祉施設1事例)と最も多かった(図1)。

2018-2019シーズンは2018年12月までの集計では、特定の遺伝子型の多発や稀な遺伝子型の出現は認められなかった(図1)。

市販生食用カキから検出されたNoVの遺伝子型については、2016-2017シーズンがGII.2(2016年12月)、2017-2018シーズンがすべてGII.17(2018年2月)であった。SVの遺伝子型はGI.1(2017年2月)であった。

#### 4. GII.4株(OH16002、OC16023)の遺伝子解析

Capsid N/S領域でNorovirus Genotyping ToolによるGII.4亜型の分類を行ったところ、OH16002株はGII.4亜型不明、OC16023株はGII.4 Sydney\_2012であった。近隣接合法による分子系統樹解析では2株ともこれまで報告されていたSydney\_2012とは少し異なる遺伝的グループを形成した(図2)。RdRp領域は2株ともにGII.P16に分類された(図3)。

両株の塩基配列を比較したところ、互いに非常に近縁であった(塩基配列相同性RdRp領域720塩基において98.9%、Capsid N/S領域282塩基において98.9%)。

#### D. 考察

病原体や感染経路の特定は、食中毒の判断を行う上で非常に重要な根拠となる。また、調理従事者からの汚染が原因として疑われる場合、施設フキトリや調理従事者と患者から検出された病原体の遺伝子型等が一致することは有力な判断材料になる。今回、解析したすべての事例において調理従事者と患者の両者由来NoVの遺伝子型、塩基配列が一致していたことは調理従事者からの二次汚染が原因であったことを強く示唆している。事例番号15(表1)については、患者グループ内に喫食時に胃腸炎症状を呈していたヒトが存在したため判断が困難であった事例であり、実際に調理従事者由来NoVの遺伝子解析結果が有力な判断材料になった。事例番号22については、施設内で嘔吐の報告があり、判断が困難な事例であった。調理従事者と患者に由来するNoVの塩基配列は一致していたが、疫学的に嘔吐場所からの感染も否定できなかった。結果として、本事例では食中毒の判断には至らなかったが、検出されたNoVの遺伝子解析結果は原因を特定する上で必要とされた。事例番号23については、患者はすべて市外であったが、他衛生研究所よりご提供いただいた患者由来NoV塩基配列と、当研究所の検査結果より得られた調理従事者由来NoV塩基配列が一致した。本事例においては食中毒の判断には

至らなかったが、検出された NoV の遺伝子解析が原因究明に役立った。また、異なる検査機関におけるウイルスゲノムの遺伝子解析には共通の領域を用いる必要性が改めて示された。

また、食品が加工される際に汚染されてから約 2 か月後に起こった広域発生の食中毒において、施設フキトリ検体から NoV を検出することができた。本事例では患者や食品由来株との遺伝子解析結果が汚染経路の解明につながる科学的根拠となった。施設フキトリ検査は汚染経路の解明や原因施設の特定に有効な手段となりうることが示された。また、調理従事者由来 NoV の遺伝子解析において、すべての事例で患者由来株と遺伝子型、塩基配列が一致していたことは調理従事者からの二次汚染が原因であったことを強く示唆している。

しかし、患者等からの検査を実施している中で、遺伝子解析を並行して行うことには作業場所、人員、コンタミネーション、コスト等の多くの課題があるため容易ではない。事例ごとに状況を考慮して遺伝子解析実施を判断する必要があると考えられた。

3 シーズンの NoV 流行について分子疫学的解析を行ったところ、2016-2017 シーズンは子どもを中心に NoV GII.2 の大きな流行が認められた。しかし、他の 2 シーズンは NoV 流行が低調であり、NoV GII.4 の検出数も少なかった。これまで GII.4 の新しい亜型の出現が周期的な大流行をもたらしている。最近の GII.4 亜型出現は 2012 年の Sydney\_2012 であり、GII.4 Sydney\_2012 には 2 種類 (GII. Pe

および GII. P4) の RdRp 領域遺伝子型が確認されていた。今回、2 事例から確認された NoV GII.4 Sydney\_2012 はそれまで報告例がない RdRp 領域遺伝子型 (GII. P16) をもつキメラウイルスであり、当初は GenBank においても同キメラウイルス遺伝子の登録を確認することができなかった。NoV 事例の発生状況と検出された NoV の遺伝子解析結果から、本キメラウイルスは子どもから成人までの幅広い年齢層に感染を起こしていたが、今のところ、胃腸炎の発生数に影響していないと考えられた。GII.4 亜型の主流である Sydney\_2012 は出現から約 6 年が経過しており、新たな亜型の出現が危惧されている。今回認められたキメラウイルスも NoV GII.4 の変化の一つであり、本株を含めて GII.4 亜型の変化や動向を注意深く監視していく必要がある。また、2016-2017 シーズンに大きく流行した GII.2 株のように、今後は新しい GII.4 亜型に加えて他の遺伝子型についても早期に探知することが NoV 感染症の流行予測や予防対策に重要であると考えられた。継続した流行の監視と遺伝子型別による解析が必要である。

カキの NoV 汚染は、ヒトから排出された NoV が下水から河川・海に至り、養殖場を汚染することが最大の要因と考えられている。今回の調査においては、3 ロットから NoV が検出された。しかし、ウイルス量は微量であり、3 シーズンのカキ関連事例の発生数は 2 事例と少なく、カキのウイルス汚染状況とカキ関連事例発生が関連していることが示唆された。生カキの NoV 陽性率や汚染ウイルス量がカキ

関連 NoV 食中毒発生の危険度を表す指標の一つになる可能性がある。NoV 以外に SV が検出されたことから、カキ喫食による食中毒の原因ウイルスとして NoV だけでなく SV も考慮する必要がある。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. NoV 食中毒の感染経路など原因究明において、施設フキトリや調理従事者由来 NoV の遺伝子解析は非常に有用であった。
2. 最近 2 シーズンは NoV 流行が低調で推移しているが、新しいキメラウイルスの出現も確認されており、NoV 流行の監視と遺伝子型別による解析は必要である。
3. 国産市販生食用カキには NoV および SV の汚染が認められ、食中毒の感染源として注意する必要がある。
4. 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、HAV は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、継続した監視が必要である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 入谷展弘, 上林大起, 改田 厚, 阿部仁一郎, 中村寛海, 山元誠司, 久保英

幸, 小笠原 準, 伯井紀隆, 森 宏美, 坂本徳裕, 廣川秀徹, 松本健二, 吉村高尚, 土見日出夫, 喜多直哉, 伊藤大樹, 野田 衛: 集団胃腸炎事例からのノロウイルス GII.P16-GII.4 Sydney\_2012 の検出—大阪市, 病原微生物検出情報 月報 37(No. 437), 18-20 (2016)

2) 山元誠司, 上林大起, 改田 厚, 久保英幸, 入谷展弘, 小笠原 準, 伯井紀隆, 森 宏美, 藤森良子, 廣川秀徹, 松本健二, 吉村高尚: G2 型の A 群ロタウイルスによる感染性胃腸炎集団事例, 2016 年—大阪市, 病原微生物検出情報 月報 37(No. 437), 21-22 (2016)

3) 入谷展弘, 改田 厚, 山元誠司, 上林大起, 阿部仁一郎, 久保英幸, 野田 衛, 西尾孝之, 小笠原 準: 市販生カキにおけるウイルス汚染調査 (2010-2011~2015-2016 シーズン), 大阪市立環境科学研究所報告 調査・研究年報 78, 1-6 (2016)

4) 入谷展弘, 上林大起, 改田 厚, 阿部仁一郎, 山元誠司, 久保英幸, 平井有紀, 野田 衛, 小笠原 準: 2016-2017 シーズンに大阪市内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 79, 1-4 (2017)

5) 山元誠司, 江川和孝, 馬場 孝, 平井有紀, 改田 厚, 久保英幸, 阿部仁一郎, 小笠原準, 春見 真, 藤森良子, 藤原遥香, 岡田めぐみ, 桑原 靖, 村中康一: ヒトパレコウイルス 3 型が原因と考えら



れた感染性胃腸炎集団事例—大阪市 2018年, 病原微生物検出情報 月報 39, 203-204 (2018)

6) van Beek J, de Graaf M, Al-Hello H, Allen DJ, Ambert-Balay K, Botteldoorn N, Brytting M, Buesa J, Cabrerizo M, Chan M, Cloak F, Di Bartolo I, Guix S, Hewitt J, Iritani N, Jin M, Johne R, Lederer I, Mans J, Martella V, Maunula L, McAllister G, Niendorf S, Niesters HG, Podkolzin AT, Poljsak-Prijatelj M, Rasmussen LD, Reuter G, Tuite G, Kroneman A, Vennema H, Koopmans MPG: Analysis of norovirus molecular surveillance data collected through the NoroNet network, 2005 - 2016, The Lancet Infectious Diseases 18, 545-553 (2018)

## 2. 学会発表

1) 山元誠司, 改田 厚, 上林大起, 久保英幸, 入谷展弘: 2015/16 シーズンに大阪市内で流行したロタウイルス A (G2P[4]株) の遺伝子解析, 第 64 回日本ウイルス学会, 札幌 (2016. 10. 23-25)

2) 上林大起, 改田 厚, 山元誠司, 久保英幸, 入谷展弘: 手足口病流行へのコクサッキーウイルス A6 の関与, 第 64 回日本ウイルス学会, 札幌 (2016. 10. 23-25)

3) 入谷展弘, 上林大起, 改田 厚, 阿部仁一郎, 山元誠司, 久保英幸, 野田衛: 2016/17 シーズンに大阪市内で認められ

たノロウイルス GII.2 流行, 第 65 回日本ウイルス学会, 大阪 (2017. 10. 24-26)

## 3. 業界関係者向け説明会

1) 「ウイルスによる感染症について—ノロウイルス胃腸炎と感染予防対策」食品衛生講演会、2017 年 2 月 21 日、天王寺都ホテル、南東部ブロック食品衛生協会、講師 (入谷展弘)

2) 「ノロウイルス胃腸炎と感染予防対策」平成 30 年度ノロウイルス講演会、2018 年 11 月 14 日、サンクスエア堺サンクスエアホール、合計約 190 名、公益社団法人大阪食品衛生協会、講師 (入谷展弘)

3) 「ノロウイルス胃腸炎と感染予防対策」平成 30 年度ノロウイルス講演会、2018 年 11 月 22 日、大阪ガス (株) ハグミュージアムハグホール、合計約 170 名、公益社団法人大阪食品衛生協会、講師 (入谷展弘)

## 4. 行政関係者向け説明会

1) 「ノロウイルス食中毒調査における遺伝子解析について」第 58 回近畿食品衛生監視員研修会特別講演、2017 年 8 月 24 日、大阪市中央公会堂、講師 (入谷展弘)

## 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 調理従事者および患者から検出されたノロウイルス遺伝子の比較

| 事例<br>番号 | 年    | 発生<br>場所 | 推定<br>原因 | 患者      |         |        | 調理従事者   |         |              |      |
|----------|------|----------|----------|---------|---------|--------|---------|---------|--------------|------|
|          |      |          |          | 検査<br>数 | 陽性<br>数 | 遺伝子型   | 検査<br>数 | 陽性<br>数 | 患者由来NoVとの比較* |      |
|          |      |          |          |         |         |        |         |         | 遺伝子型         | 塩基配列 |
| 1        | 2014 | 飲食店      | 不明       | 7       | 6       | GII.6  | 2       | 1       | ○            | ○    |
| 2        | 2014 | 飲食店      | 食品       | 3       | 3       | GII.6  | 3       | 3       | ○            | ○    |
| 3        | 2014 | 飲食店      | 食品       | 7       | 5       | GII.4  | 7       | 4       | ○            | ○    |
| 4        | 2015 | 飲食店      | 食品       | 18      | 10      | GII.17 | 3       | 2       | ○            | ○    |
| 5        | 2015 | 飲食店      | 食品       | 11      | 10      | GII.17 | 2       | 1       | ○            | ○    |
| 6        | 2015 | 飲食店      | 食品       | 29      | 19      | GII.17 | 3       | 2       | ○            | ○    |
| 7        | 2015 | 結婚式      | 不明       | 2       | 1       | GII.4  | 9       | 1       | ○            | ○    |
| 8        | 2015 | 飲食店      | 食品       | 5       | 5       | GII.4  | 2       | 1       | ○            | ○    |
| 9        | 2016 | 飲食店      | 食品       | 6       | 6       | GII.17 | 4       | 1       | ○            | ○    |
| 10       | 2016 | 飲食店      | 食品       | 1       | 1       | GII.4  | 5       | 2       | ○            | ○    |
| 11       | 2016 | ホテル      | 食品       | 9       | 7       | GII.4  | 4       | 1       | ○            | ○    |
| 12       | 2016 | 飲食店      | 食品       | 4       | 3       | GII.17 | 4       | 2       | ○            | ○    |
| 13       | 2016 | 飲食店      | 食品       | 2       | 1       | GII.7  | 10      | 1       | ○            | ○    |
| 14       | 2016 | 飲食店      | 食品       | 7       | 6       | GII.17 | 2       | 1       | ○            | ○    |
| 15       | 2016 | 飲食店      | 食品       | 13      | 10      | GII.6  | 4       | 1       | ○            | ○    |
| 16       | 2016 | 飲食店      | 食品       | 9       | 5       | GII.2  | 3       | 1       | ○            | ○    |
| 17       | 2017 | 飲食店      | 食品       | 3**     | 3**     | GII.4  | 3       | 1       | ○            | ○    |
| 18       | 2017 | 飲食店      | 食品       | 3       | 3       | GII.2  | 4       | 4       | ○            | ○    |
| 19       | 2017 | 飲食店      | 食品       | 3       | 3       | GII.17 | 2       | 1       | ○            | ○    |
| 20       | 2017 | 飲食店      | 食品       | 12      | 5       | GII.17 | 5       | 1       | ○            | ○    |
| 21       | 2017 | 飲食店      | 食品       | 4       | 4       | GII.4  | 6       | 1       | ○            | ○    |
| 22       | 2018 | 飲食店      | 不明       | 25**    | 15**    | GII.2  | 9       | 1       | ○            | ○    |
| 23       | 2018 | 飲食店      | 食品       | 不明**    | 3**     | GII.17 | 4       | 1       | ○            | ○    |
| 24       | 2018 | 飲食店      | 食品       | 9       | 6       | GI.3   | 16      | 3       | ○            | ○    |
| 25       | 2018 | 飲食店      | 食品       | 13      | 11      | GII.2  | 4       | 3       | ○            | ○    |

\*○：患者由来株と同一

\*\* 他自治体の検査結果含む

表2 一施設のフキトリから検出されたノロウイルスの遺伝子解析

| 検出箇所           | 遺伝子型   | ウイルス量<br>(NoV RNA コピー数/検体) | 患者・食品由来株<br>との比較* |      |
|----------------|--------|----------------------------|-------------------|------|
|                |        |                            | 遺伝子型              | 塩基配列 |
| トイレ取手 (外)      | GII.17 | $1.4 \times 10^5$          | ○                 | ○    |
| トイレ取手 (内)      | GII.17 | $3.2 \times 10^3$          | ○                 | ○    |
| 便器内側           | GII.17 | $3.5 \times 10^2$          | ○                 | ○    |
| トイレ便座          | GII.17 | $4.7 \times 10^2$          | ○                 | ○    |
| トイレレバー         | GII.17 | $3.9 \times 10^3$          | ○                 | ○    |
| トイレ床           | GII.17 | $7.7 \times 10^2$          | ○                 | ○    |
| 食品加工機 (裁断機) 入口 | GII.17 | 11                         | ○                 | ○**  |
| 作業場電話子機        | GII.17 | 5                          | ○                 | ○    |

\* ○：患者・食品由来株と同一

\*\* 2種類の NoV 遺伝子が検出された。一つは患者・食品由来株と同一であり、  
もう一つは1塩基の相違が認められた (99.7%の塩基配列相同性)

表3 市販生食用カキからのウイルス検出結果（2016-2017～2018-2019 シーズン）\*

| シーズン      | 年月       | 検体<br>番号 | 採取海域・産地 | NoV<br>(コピー/g) **       | SV           | HAV | HEV |
|-----------|----------|----------|---------|-------------------------|--------------|-----|-----|
| 2016-2017 | 2016年12月 | OY16-1   | B2      | <b>GII. 2</b> (33 ***)  | —            | —   | —   |
|           |          | OY16-2   | C99     | —                       | —            | —   | —   |
|           |          | OY16-3   | D2      | —                       | —            | —   | —   |
|           | 2017年2月  | OY16-4   | D99-1   | —                       | —            | —   | —   |
|           |          | OY16-5   | D2      | —                       | —            | —   | —   |
|           |          | OY16-6   | D99-1   | —                       | —            | —   | —   |
|           |          | OY16-7   | C2      | —                       | <b>GI. 1</b> | —   | —   |
| 2017-2018 | 2017年12月 | OY17-1   | D99-1   | —                       | —            | —   | —   |
|           |          | OY17-2   | C2      | —                       | —            | —   | —   |
|           |          | OY17-3   | C1      | —                       | —            | —   | —   |
|           | 2018年2月  | OY17-4   | D2      | <b>GII. 17</b> (19 ***) | —            | —   | —   |
|           |          | OY17-5   | D99-1   | —                       | —            | —   | —   |
|           |          | OY17-6   | C1      | <b>GII. 17</b> (18 ***) | —            | —   | —   |
| 2018-2019 | 2018年12月 | OY18-1   | C2      | —                       | nt           | —   | nt  |
|           |          | OY18-2   | B5      | —                       | nt           | —   | nt  |
|           |          | OY18-3   | B2      | —                       | nt           | —   | nt  |

\* —：陰性、nt：未検査

\*\* 中腸腺1gあたりのNoV RNA コピー数

\*\*\* 実測値10コピー/tube未満

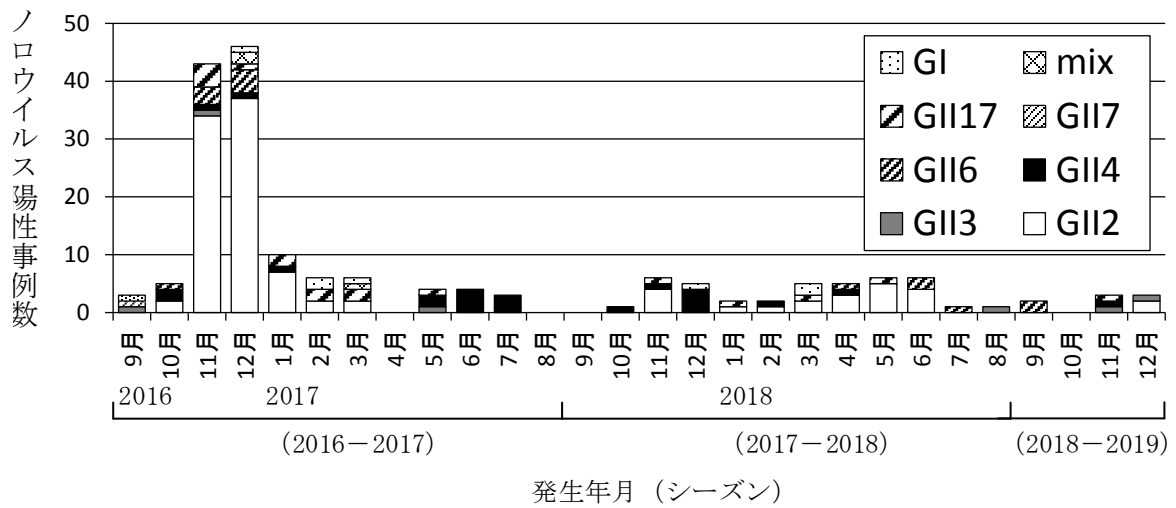


図1 大阪市における月別ノロウイルス事例発生状況

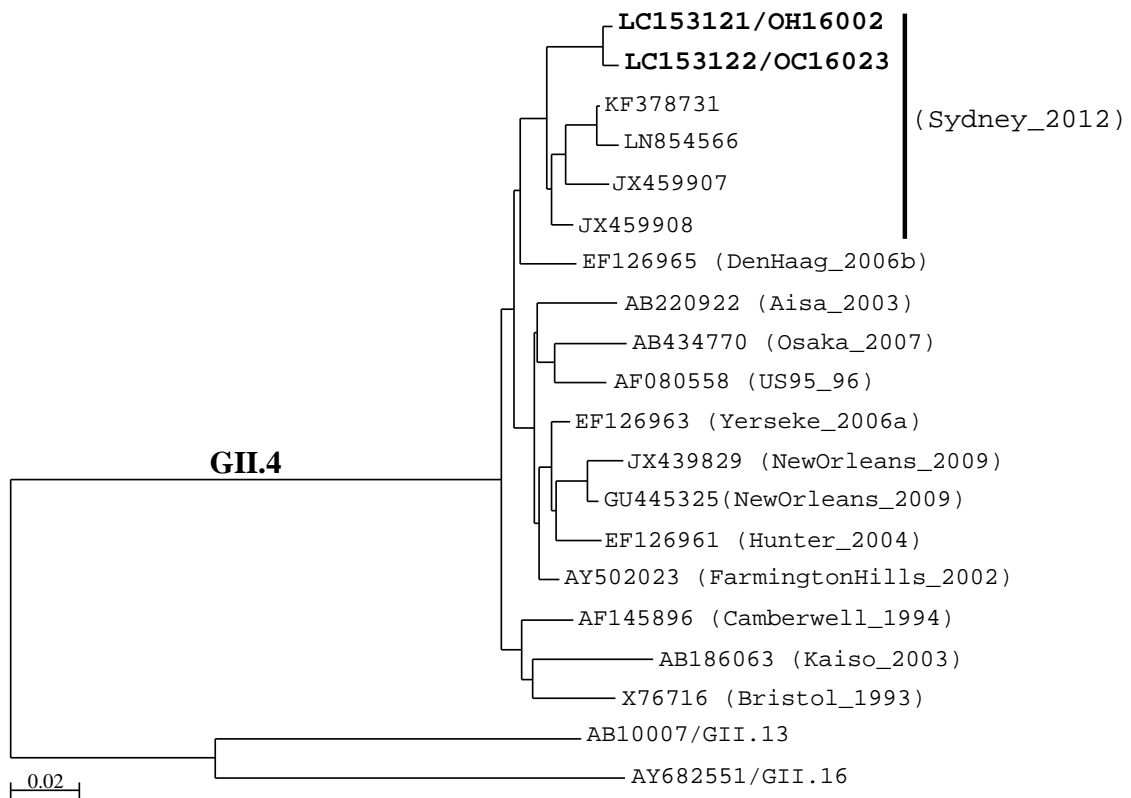


図2 ノロウイルス Capsid N/S 領域 (282 塩基) における分子系統樹  
分子系統樹は近隣接合 (neighbor-joining) 法で作成した。

**太字** : 大阪市で検出された GII.P16-GII.4 Sydney\_2012 株

他 : NoV 参考株

( ) : GII.4 亜型

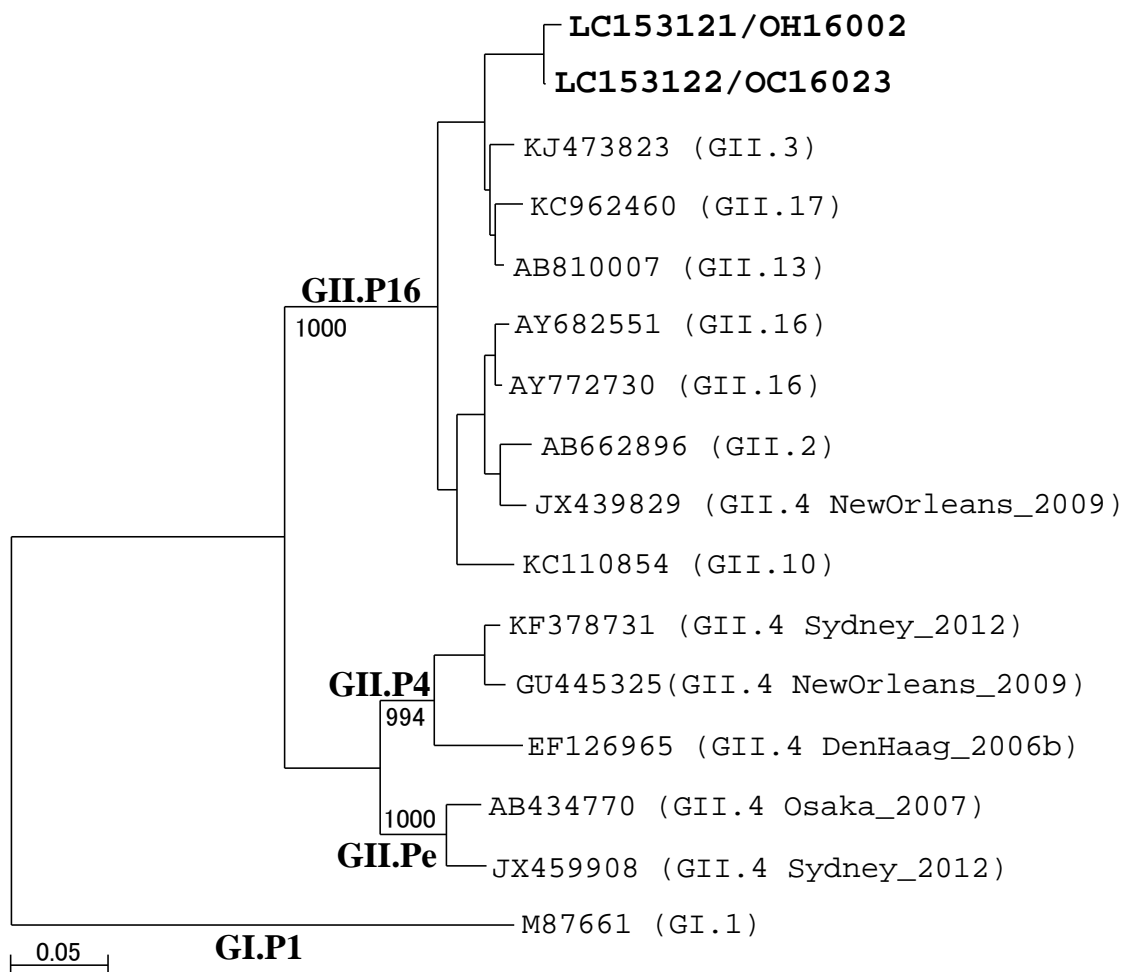


図3 ノロウイルス RdRp 領域 (720 塩基) における分子系統樹  
 分子系統樹は近隣接合 (neighbor-joining) 法で作成した。ブートストラップ値は遺伝的グループを支持する枝にそれぞれ示した。

**太字**： 大阪府で検出された GII.P16-GII.4 Sydney\_2012 株

他： NoV 参考株

( )： Capsid 領域における遺伝子型

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」  
総合研究協力報告(平成 25～27 年度)

## ノロウイルスふき取り調査及び 下水サンプルを用いた腸管感染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 | 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 | 福井 陽子 | 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 | 山本 憲  | 堺市衛生研究所      |
| 研究協力者 | 小林 和夫 | 大阪健康安全基盤研究所  |
| 研究協力者 | 野田 衛  | 国立医薬品食品衛生研究所 |
| 研究分担者 | 上間 匡  | 国立医薬品食品衛生研究所 |

### 研究要旨

調理施設におけるノロウイルス (NoV) の汚染状況や不顕性感染も含めた調理従事者における NoV の感染実態を明らかにすること及びふき取り検査法の検討を行うため、調理施設のトイレ等のふき取り調査を行った。また、カキなどの二枚貝の重要な汚染源である下水中のウイルスについて調査を行い、腸管感染ウイルスの流行解析を行った。

ふき取り調査では、NoV 遺伝子は検出されなかった。模擬サンプルを用いたふき取り検査の NoV 遺伝子検出期間に関する検討では、汚染後 1 ヶ月以上検出されることが考えられた。

下水調査では、NoV については、臨床サンプルと下水サンプルから検出される遺伝子型に相関がみられた。NoV 遺伝子量は、11 月～2 月の感染性胃腸炎患者の報告数と相関がみられていたが、2017/18 シーズンは NoV による感染性胃腸炎患者や食中毒の発生の報告が少数にもかかわらず、下水中の NoV 遺伝子量は高値であった。原因は不明であるが、不顕性感染が多かった等が考えられる。サポウイルス等の臨床サンプルから検出の少ない下痢症ウイルスについても下水サンプルからは高頻度に検出され、不顕性感染等の存在が示唆された。

下水サンプルから A 型肝炎ウイルスが検出された。この地域には、同時期に A 型肝炎の届出はなかったが、この系統のウイルスの地域的な流行があった可能性が考えられた。



下水サンプルを用いた流行解析は、流入地域におけるウイルス感染の包括的把握が可能と考えられる。これらウイルス感染症の感染実態を解明する上で有用な情報を提供すると考える。

## A. 研究目的

ノロウイルス (NoV) 食中毒は、調理従事者等による食品汚染を原因とした事例が多く、不顕性感染者が発端となることも多くある。しかしながら感染経路等の詳細について不明な点が多い。また、食中毒発生施設などにおける汚染経路特定のための NoV のふき取りについては、検査法や検出感度等の課題がある。

調理施設における NoV の汚染状況や不顕性感染も含めた調理従事者における NoV の感染実態を明らかにすること及びふき取り検査法の検討を行うため、調理施設のトイレ等のふき取り調査を行った。

また、食中毒や感染性胃腸炎の散発・集団発生から得られた患者便等の臨床面と下水処理場の流入水の環境面の両面から NoV 等の腸管感染ウイルスの検出状況を調査し、不顕性感染や、病院を受診しないなど食中毒や感染性胃腸炎として報告されない感染者由来のウイルスの感染実態を検証することを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. ふき取り調査

#### 1-1 材料

5 名以上の調理従事者が在籍している調理施設の調理従事者用トイレ等（調理施設内の冷蔵庫の取っ手、物資搬入口のドアノブ、調理従事者専用トイレのドアノブ、照明スイッチ、手洗い蛇口栓、水

洗レバー、便器（便座の裏側又は便器の内側）をふき取り対象とし、31 施設の 179 検体を調査材料とした。ふき取りは、2017 年 10 月～2018 年 1 月に実施した。

#### 1-2 方法

ワイプチェック TE-302（佐藤化成工業所）のリン酸緩衝生理食塩水 10mL を 1mL に減量したものをを用いてふき取り、「ノロウイルス拭取り検査用試薬キット」（島津製作所）を用いて、添付文書に従い NoV 遺伝子検出を行った。

また、ふき取り検査で NoV を検出可能な期間の検討を行うため、スライドガラスに NoV を塗布、風乾後 20°C で保管し、風乾直後、1 週間、2 週間、1 ヶ月後 (n=3) に上記の方法で NoV 遺伝子検出を行った。

### 2. 下水サーベイランス

#### 2-1 材料

環境サンプルとして、2016 年 1 月から 2018 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 (2 リットル) 108 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 9 事例、散発事例（感染症発生動向調査における感染性胃腸炎患者等）56 例を調査対象とした。

#### 2-2 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、流入水を遠心後 (3,400xg 30min) のち、13,000xg 45min)、上清 1,000ml を分取し、最終濃度 0.05M となるように

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(0.45μm)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。

#### 2-3 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、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い、A型肝炎ウイルス(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った。陽性例については、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 2.0(<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus/>)に従った。また、流入水を用いて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. ふき取り調査結果

#### 1-1 トイレ等のふき取り調査結果

31施設から採取した179検体において、NoV遺伝子は検出されなかった。

#### 1-2 ふき取り検査の検出期間の検討

1週間、2週間、1ヶ月後のすべてのサンプルでNoV遺伝子が検出された。Ct値についても大きな変化はみられなかった(図1)。

### 2. 下水サーベイランス結果

#### 2-1 NoV 遺伝子検出結果

臨床サンプルからGIで4種類(GI.1, 2, 3, 4)、GIIで7種類(GII.1, 2, 3, 4, 6, 13, 17)計11遺伝子型のNoVが検出された。2016/17シーズンはGII.2型が、それ以外のシーズンではGII.4型が散発例から高頻度に検出された(図2)。

下水サンプルでは、GIで5種類(GI.1, 2, 3, 4, 7)、GIIで8種類(GII.2, 3, 4, 6, 8, 13, 17, 21)計13遺伝子型が検出された。GI.2, GII.2, GII.4, GII.6, GII.17型が多く検出された(表1)。

#### 2-2 下水中のNoV 遺伝子定量測定結果

下水中のNoV遺伝子量は、冬季に増加し、夏季に減少する傾向がみられた。ほとんどの調査点で、GIIの遺伝子量は、GIより10~100倍程度多かった。(図3)。2016/17シーズンまでは、感染症発生動向調査による感染性胃腸炎患者の報告数(11月~2月)が多いほど、NoV GIIの遺伝子量が増加していた。しかし、2017/18年シーズンについては、感染性胃腸炎患者の報告数(11月~2月)は少数であっ

たが、同時期の下水中の NoV GII 遺伝子量は多かった (図 4)。

### 2-3 NoV 以外のウイルス遺伝子検出結果

SaV については、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, 3, 6, GII. 1, 2, 3, 8, GV)、GI. 1, 2 が多く検出された (表 2)。GV 型については、2016, 2017 年は検出がなかったが、2018 年には、臨床サンプルから 5 月に、下水サンプルから多くの月で検出された (表 2)。

AsV, AiV については、下水サンプルでは、年間を通じて多くの月で検出された。臨床サンプルからは AsV が 2018 年 7 月と 12 月に検出され、AiV は検出されなかった (表 2)。

HAV については、2018 年 5 月に急性肝炎症例から検出され、遺伝子型は IA 型であった。下水サンプルについては、2016 年 6 月の B 下水処理場、2, 5 月の C 下水処理場、2018 年 12 月の D 下水処理場から検出された (表 2)。遺伝子型は、2016 年はすべて IIIA 型、2018 年は IA 型であった (図 4)。

## D. 考察

### 1. ふき取り調査

調理施設のふき取り調査では、NoV は検出されなかった。聞き取り調査では、調査対象施設は、調査前に体調不良者もなく、トイレの清掃も行われており、衛生管理が良く行われている施設であった。調査結果もこのことを反映していると考えられた。また、ふきとり調査を行った期間には、この地域で NoV の大きな流行

がみられておらず、これらの要因により、検出されなかった可能性が考えられる。

ふき取り検査出期間の検討では、1 ヶ月後のサンプルでも NoV 遺伝子が検出された。1 ヶ月以上前の汚染でも、ふき取り検査で陽性になる可能性があり、実際の事例においては、調理従事者等の検査結果と合わせて解析するなど、ふき取り検査陽性の解釈に注意が必要と考えられる。

今回使用したキットは、検体処理から結果判定まで、3 時間程度と、従来の PEG 沈法 (7.5 時間程度) と比較して、簡便で短時間で結果が得られ、ふき取り調査法として有用な方法と考えられる。

### 2. 下水サーベイランス

NoV の遺伝子型については、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。特に下水中から高頻度に検出される遺伝子型 (GI. 2 型 GII. 2 GII. 4 GII. 6 GII. 17 型) が臨床サンプルでも検出された。GII. 21 型については、頻度は低い下水サンプルから 3 年連続で検出された。2014/15 年シーズンに大きな流行がみられた GII. 17 型もそれ以前に下水サンプルから検出されていた。このような検出頻度の低い遺伝子型についても、今後の流行株となる可能性があり、注意が必要と考える。

これまで 11 月～2 月の感染性胃腸炎患者の報告数と NoV 遺伝子量に相関がみられていた。しかし、2017/18 年シーズンは、NoV によると考えられる感染性胃腸炎患者の報告数が数シーズン前と比較して少数であったにもかかわらず、同時期の下水中の NoV 遺伝子量 (GII) は、高値であ

った。不顕性感染や軽症例が多く、医療機関を受診しないため感染性胃腸炎患者として報告されない症例が多かった等の可能性が考えられるが、原因は不明であり、詳細な遺伝子解析等が必要と考える。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、統計や報告に現れない NoV 感染症の流行状況を把握することができると考えられる。

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年間を通して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、小児以外の成人での感染が多く、小児定点由来の感染性胃腸炎報告数に現れない可能性などが考えられた。

HAV については、下水処理場の流入水から HAV 遺伝子が検出された。同時期には当該下水処理場の地域では患者発生の報告はなかったが、この地域に HAV 感染者が存在し、ウイルスの地域的な流行があった可能性が考えられた。

A 型肝炎については、潜伏期間が約 1 カ月と長期であり、不顕性感染も多いため、疫学調査において感染源の特定が一般的に困難な事例が多く、感染実態の把握をすることも難しい。下水中の HAV 遺伝子を解析することにより、流入地域における不顕性感染を含めたウイルス感染を把握することが可能と考えられた。

また、下水中に含まれるウイルスは、カキなどの二枚貝の重要な汚染源であり、それらを解析することは、カキなどの汚染源の調査やカキ等を原因とする食中毒の解析にも寄与すると考えられる。

## E. 結論

調理施設のトイレ等を対象としたふき取り調査を実施したが、NoV は検出されなかった。ふき取り検査での NoV 遺伝子の検出可能な期間に関する検討では、1 ヶ月後のサンプルでも遺伝子が検出された。

下水サンプルから NoV 以外にも SaV、AsV、AiV、HAV が検出された。これらの結果より流入地域におけるウイルスの流行状況の包括的把握が可能であった。また、これらウイルス感染症の感染実態を解明する上で有用な情報を提供すると考える。

## 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

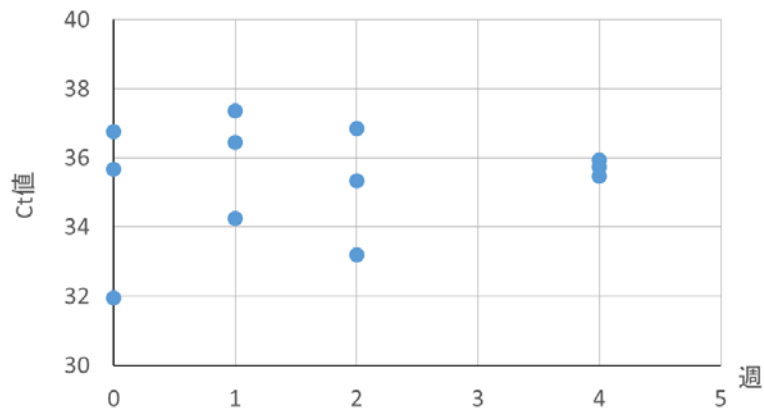


図1 ふき取り検査におけるNoV検出期間

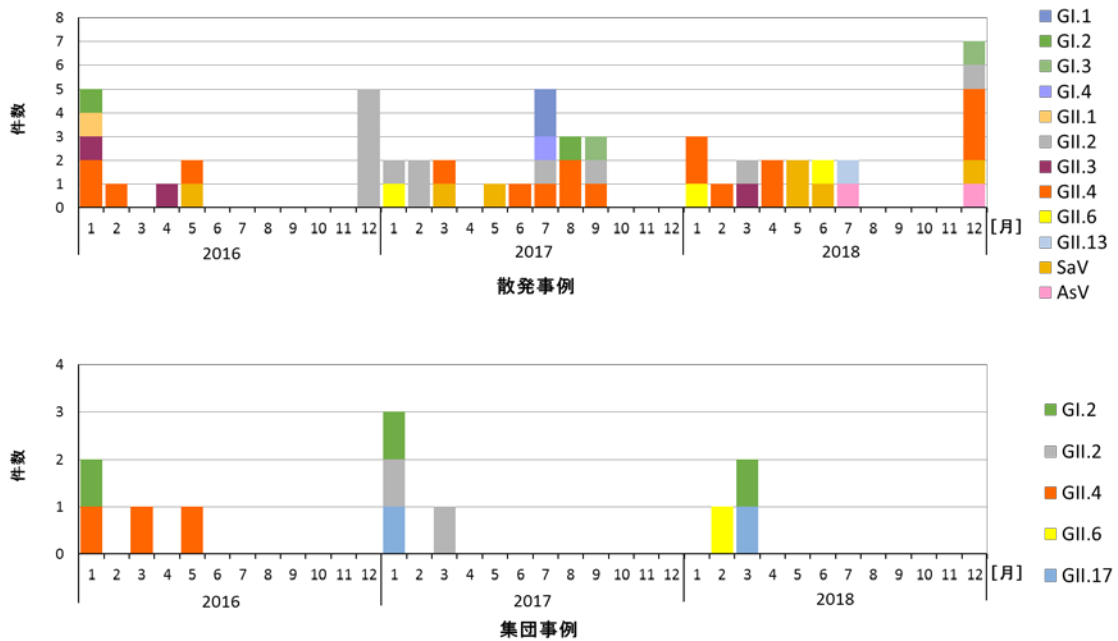


図2 臨床検体からの下痢症ウイルス検出状況





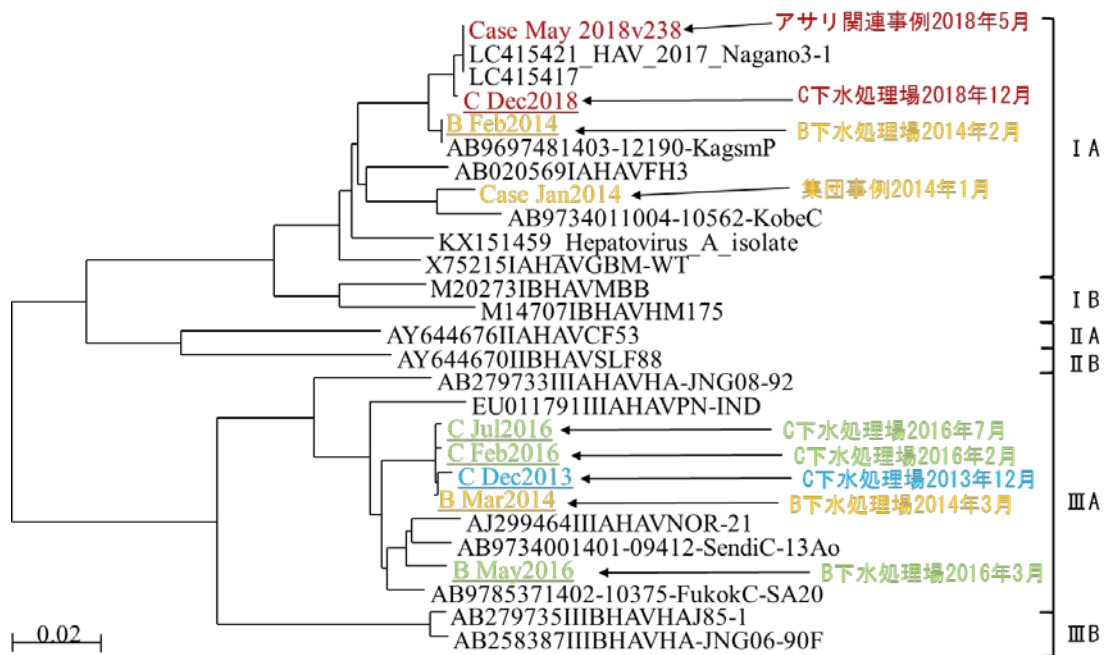


図 5 HAV 遺伝子系統樹解析結果(NJ 法)



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」  
総合研究協力報告(平成28~30年度)

## ふき取り検体からのノロウイルス検出法の改良及び ウイルスモニタリングに関する研究

|       |       |                      |
|-------|-------|----------------------|
| 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         |
| 研究分担者 | 上間 匡  | 国立医薬品食品衛生研究所         |

### 研究要旨

食中毒調査の精度向上のため、ふき取り検体からのノロウイルス検出法について、検査時間の短縮および検出感度の向上を目的に改良を行った。一般的にふき取り検体からのノロウイルス検出には、超遠心やPEG沈殿などのウイルスの濃縮操作を行う。開発した方法(改良法)は、①ふき取り時に綿棒等に浸す液、及びウイルス回収の際の再浮遊液に0.3% Zwittergent加PBS(-)または2.5% Tween20加PBS(-)を用い、少量(0.7-0.8ml)の再浮遊液に回収する、②ふき取り液からの核酸抽出には、QIAamp Viral RNA Mini Kitを用いる場合は、試量を $140\mu\text{l}\times 2$ にし、核酸溶出量を $50\mu\text{l}$ にする、もしくはNucleoSpin Virusを用いる場合は、試量を $400\mu\text{l}$ にし、核酸溶出量を $30\mu\text{l}$ にする、③検出はNested-リアルタイムPCR法で行い、2<sup>nd</sup> PCRのサイクル数を30回、Cp値25以下を陽性とする、等によりウイルス濃縮工程を省略しても効率的にノロウイルスを検出することができた。ふき取り検体からのノロウイルス検出限界は、 $100\text{cm}^2$ あたり $10^3$ ゲノムコピー程度であった。

この改良法を用いて公共施設トイレ周辺のふき取りによるノロウイルスモニタリング調査を行ったところ、便座裏から高率にノロウイルスが検出された。このことから、流行期の公共施設トイレはノロウイルスの感染リスクが高いことが確認された。

### A. 研究目的

ウイルス性食中毒発生時の検査では患者便、調理従事者便、原因と疑われる食品の検査に加え、調理施設からのウイルス検出も重要な検査事項である。しかしながら、

調理施設のふき取り検体中のウイルス量は少量であり、効率的な検出法が必要とされている。平成25~27年度に実施した厚生労働科学研究費補助金「食品中のウイルス検出法に関する研究」(H27-1食品等からの

ウイルス検出法および遺伝子解析法の開発-3)では、ふき取り検体からハイドロキシアパタイト(HAP)によるノロウイルス濃縮法について検討を行い、一定の回収率を得た。本研究では、更なる検出感度の向上と検査工程の簡略化を目的として、検査法の改良を検討した。また、人が集まる公共施設トイレ周辺は、流行期にはノロウイルスの感染リスクが高まると考えられるが、具体的なデータがない。そこで、改良法を用いた公共施設トイレ周辺のノロウイルスモニタリング調査を行い、感染リスクを明らかにすることも目的とした。

## B. 研究方法

### 1. ふき取り検体からのノロウイルス検出法の改良

供試材料には、ノロウイルス(遺伝子型 GII.17)陽性の10%便乳剤を $10^1 \sim 10^3$ 倍に階段希釈した便乳剤を用いた。ステンレス製トレー上の10 cm×10 cmの区画に希釈した便乳剤140  $\mu$ lを滴下し、コーンラージ棒で塗布した後60分間自然乾燥させて模擬検体とした。その後、0.3% Zwittergent 加 PBS(-)に湿らせたふき取り棒(BMフキトレールA:GSIクレオス)で、縦10回、横10回、右斜め5回、左斜め5回を1セットとし、ふき取り操作を2セット実施した。各希釈につき改良法では6区画、以前報告したHAP法では5区画のふき取りを行った。改良法およびHAP法の操作手順を図1に示す。すなわち改良法は、ふき取り棒に回収したウイルスを0.7mlの0.3% Zwittergent 加 PBS(-)に再浮遊させ、その全量を回収して抽出試料とし、その内280  $\mu$ lを用いてRNA抽

出を行なった。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、Kageyamaら(J. Clin. Microbiol. 2003)のプライマーおよびプローブを使用して、LC480 Probes Master(ロッシュ)で増幅し、ウイルスゲノム量を定量した。また、HAP法は平成27年度総括・協力分担報告書「食品中の病原ウイルスの検出法に関する研究」にて報告した方法に従って行った。模擬検体作成時に塗布した各希釈倍率の便乳剤についても核酸抽出および定量を行い、これを塗布量としてふき取り検体の回収率を求めた。

### 2. ふき取り液中に添加する界面活性剤の比較試験

ふき取り用模擬検体は、研究方法1.に述べた手順で作成した。また、ふき取りからノロウイルス検出までの流れは図1に示した改良法の手順に従った。ふき取り液中の界面活性剤については、Zwittergentの他、食品添加物指定のあるTween20(2%、2.5%)及びシュガーエステル(0.5%、1%)を検討した(表1)。

### 3. ふき取り検体からのウイルス核酸抽出に用いる核酸抽出キットの比較試験

ふき取り用模擬検体は、研究方法1.に述べた手順で作成した。その後、0.3% Zwittergent 加 PBS(-)または、2.5% Tween20 加 PBS(-)に湿らせたふき取り棒でふき取りを行い、図2に示した工程でウイルス検出を行った。すなわち、ふき

取り棒に回収したウイルスを 0.7-0.8ml の 0.3% Zwittergent 加 PBS(-)、または 2.5% Tween20 加 PBS(-)に再浮遊させ、その全量を回収した。同一ふき取り回収液から QIAamp Viral RNA Mini Kit と NucleoSpin Virus による RNA 抽出を行った後、PrimeScript RT reagent Kit(タカラバイオ)と付属の Random Primer 6 mer を用いて逆転写反応を行った。定量試験では表 2 にあるリアルタイム PCR 用のプライマー、プローブ系を用いウイルスゲノム数を定量した。定性試験では、表 2 の Nested-リアルタイム PCR 法により、Cp 値 25 以下を陽性と判断した。それぞれの試験につき 5 区画のふき取り実験を実施した。

#### 4. トイレ周辺におけるノロウイルスモニタリング

2016/17 シーズンは (平成 28 年 10 月から 12 月)、県内 9 つの公共施設内トイレを、2017/18 シーズンは (平成 29 年 10 月から 12 月)、県内 6 つの公共施設内トイレを調査対象とした。ふき取りは、洋式トイレ 1 個室につき便座、内鍵またはドアノブ、ペーパーホルダー、水洗レバーまたは手すり (平成 28 年のみ) の 4 カ所のふき取りを行い、内鍵またはドアノブ 66 検体、ペーパーホルダー 68 検体、便座裏 70 検体、水洗レバーまたは手すり 32 検体を採取して試験に供した。ふき取り検体は採取後、図 1 に示す改良法にて処理を行い、cDNA 合成反応を行った後、表 2 に示す Nested -リアルタイム PCR 法により陽性・陰性の判定を行った。その内、陽性検体については、リアルタイム PCR 法による

定量と Capsid N/S 領域についての Nested PCR 法を実施した。また、得られた 2<sup>nd</sup> PCR 産物のダイレクトシーケンスにより遺伝子配列を決定し、Norovirus Genotyping Tool Version 1.0 (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>) を用いて遺伝子型を決定した。なお、今回はノロウイルス GII のみを検査対照とした。

(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. 改良法と HAP 法の回収率、検出率の比較

10<sup>1</sup>~10<sup>3</sup> 倍に階段希釈した便乳剤を用いて模擬ふき取り検体を作成し、検出率及び回収率を調べた結果を表 3 に示した。100cm<sup>2</sup> あたり 10<sup>4</sup>~10<sup>5</sup> ゲノムコピー程度のウイルス量を塗布した場合は、改良法、HAP 法ともにすべての検査においてウイルスが検出された。一方、10<sup>3</sup> ゲノムコピー程度のウイルス量を塗布した場合は、改良法では 6 区画全てで検出されたものの、HAP 法では 5 区画中 3 区画のみの検出となった。回収率は改良法で 34.4%以上、HAP 法では 23%以上であった。更に 10<sup>2</sup> ゲノムコピー程度のウイルス量を塗布した場合、改良法では 6 区画中 3 区画で検出された。

#### 2. ふき取り液に添加する界面活性剤の比較

ふき取り液に添加する界面活性剤の種類、濃度と模擬ふき取り検体からのウイルス回収率を比較した結果を図 3 に示し

た。0.3% Zwittergent が最も回収率が高く、32.6~88.3%であった。次に高かったのは 2.5% Tween20 で、22.7~84.8%であった。食品添加物指定の Tween20 とシュガーエステルは共に回収率が 10~80%台とバラツキが大きい、PBS(-)に比べるとウイルス回収率において一定の効果が認められた。ただし、シュガーエステルは泡沫性が強く扱い難かった。

### 3. ふき取り検体からの核酸抽出に使用するキットの比較

模擬検体からのノロウイルスのふき取り回収において、核酸抽出キットの比較を行った結果を表 4 と表 5 に示した。定量試験におけるリアルタイム PCR での実測値 (表 4) は、ふき取り液中の界面活性剤が 0.3% Zwittergent の場合、QIAamp Viral RNA Mini Kit の実測値に対し、NucleoSpin Virus の値は約 2 倍であった。ただし、塗布したウイルス量に対するふき取り平均回収率は、QIAamp Viral RNA Mini Kit の 41.1%に対し NucleoSpin Virus は 33.4%と劣った。ふき取り液中の界面活性剤が 2.5% Tween20 の場合、QIAamp Viral RNA Mini Kit の実測値に対し、NucleoSpin Virus の値はやや良い程度であり、塗布したウイルス量に対するふき取り平均回収率は、QIAamp Viral RNA Mini Kit の 32.6%に対し NucleoSpin Virus は 18.1%と大きく劣った。

次に Nested-リアルタイム PCR 法による定性試験での判定結果 (表 5) は、100cm<sup>2</sup>あたり 10<sup>3</sup> ゲノムコピーオーダーのウイルス量を塗布した場合、ふき取り液中の界面活性剤の種類に関わらず、QIAamp

Viral RNA Mini Kit ではほぼすべてで、NucleoSpin Virus ではすべてでウイルスが検出された。一方、100cm<sup>2</sup>あたり 10<sup>2</sup> ゲノムコピーオーダーのウイルス量を塗布した場合、ウイルス量が少なくなるほど、検出率は低下し、NucleoSpin Virus の方が、QIAamp Viral RNA Mini Kit に比べ、わずかに検出率が高かった。

### 4. 公共施設トイレにおけるノロウイルスモニタリング

ふき取り場所別のノロウイルス GII の陽性数及び検出遺伝子型を表 6 に示した。場所別で最も多く検出されたのは便座裏で、70 検体中 8 検体から検出された。また、ペーパーホルダーからも 68 検体中 1 検体でウイルスが検出された。シーズン別の比較では、2016/17 が 8 検体、2017/18 シーズンが 1 検体で、2016/17 シーズンでの検出率が高かった。検出遺伝子型については、2016/17 シーズンでは GII. 2 が 5 検体と最も多く、それ以外に GII. 6、GII. 7 および GII. 17 もそれぞれ 1 検体ずつ検出された。2017/18 シーズンは GII. 4 Sydney2012 が 1 検体のみであった。

ふき取り場所毎のウイルス定量値で最も高かったのは便座裏で 6.7×10<sup>5</sup> コピー/検体、最も低かったのはペーパーホルダーで 6.0×10<sup>2</sup> コピー/検体であった。

今回実施したトイレ周辺ふき取りによるノロウイルスモニタリング調査でのノロウイルス検出状況と、2016/17、2017/18 シーズンの広島県における定点当りの感染性胃腸炎患者報告数を比較したところ (図 4)、患者報告数が概ね警報終息基準値 (定点あたり 12 人) を超えているとト

イレのふき取り検体からもノロウイルスが検出されている傾向が認められた。

#### D. 考察

平成 25～27 年度に実施した「厚生労働科学研究費補助金「食品中のウイルス検出法に関する研究」(H27-1 食品等からのウイルス検出法および遺伝子解析法の開発・3)では、ふき取り検体からのハイドロキシアパタイト(HAP)によるノロウイルス濃縮法について検討を行い、一定の回収率を得た。今回の改良法は、ふき取り棒に付着したウイルスを再浮遊させる液量を HAP 法の 10ml から 0.7ml 程度に減らすとともに、核酸抽出時に供試する試料を 140  $\mu$ l から 280  $\mu$ l に増やすことで、HAP 法によるウイルス濃縮工程を省略することができた。その結果、HAP にノロウイルスを吸着させるために要した攪拌時間(1 時間)が不要となった他、改良法は HAP 法に劣らないウイルス回収率を示した。また、各ウイルス塗布量におけるふき取りからのノロウイルス検出率も、 $10^4$  コピー程度までは両方法の検出率、回収率ともに大きな差はなかったが、 $10^3$  コピー程度の塗付量に対して HAP 法では検出率が低下するのに対し、改良法では 100%の検出率で、検出限界の向上が認められた。このことより今回の改良法は、検査時間や検出感度の点からも優れた方法であることが明らかとなった。

次に、これまでふき取り液に添加している Zwittergent は、皮膚刺激性、眼刺激性があることより、施設等のふき取り後にはふき取った場所をしっかりと洗浄する必要がある。そこで、現行の

Zwittergent よりも人体に優しい食品添加物として使用が認められている界面活性剤 2 剤(Tween20、シュガーエステル)について検討を行った(図 3)。Tween20、シュガーエステルとも界面活性剤不添加の PBS(-)に比べると回収率の向上が認められ一定の効果を示したものの、Zwittergent にはやや及ばなかった。これは、Zwittergent が両イオン界面活性剤に対し、Tween20、シュガーエステルは非イオン性界面活性剤であり、性質の違いが回収率に影響しているのかもしれない。しかしながら、食品添加物指定の界面活性剤も Zwittergent の代用品として有用であることが示唆された。

最後に更なるウイルス検出効率の向上には、ふき取り検体から核酸抽出を行う際にできるだけ多い容量の検体を供試でき、かつ少量の溶出液で核酸を溶出できるキットが必要である。これまで使用している QIAamp Viral RNA Mini Kit では、供試する検体容量を正規の使用では 140  $\mu$ l のところを 2 倍の 280  $\mu$ l で供試し、計 4 回カラムに通すことで対応してきた。また、溶出液量も正規の 60  $\mu$ l のところを 50  $\mu$ l で溶出している。そこで、QIAamp Viral RNA Mini Kit よりも多い容量の検体を処理でき、かつより少量の溶出液で核酸溶出が可能なキットとして NucleoSpin Virus の適用性について検討した(表 4)。0.3% Zwittergent 加 PBS(-)でのふき取り回収試験では、QIAamp Viral RNA Mini Kit に比べ NucleoSpin Virus では cDNA 中のウイルスゲノムコピー数が約 2 倍の結果を示し、良好であった。一方 2.5% Tween20 加 PBS(-)でのふき取り回

収試験では、QIAamp Viral RNA Mini Kit に比べ NucleoSpin Virus では cDNA 中のウイルスゲノムコピー数はやや多い程度であったことから、Tween20 をふき取り液に添加した場合は NucleoSpin Virus との相性が良くないことが判明した。Nested-リアルタイム PCR 法による検出結果では、QIAamp Viral RNA Mini Kit、NucleoSpin Virus とともに 100cm<sup>2</sup> あたり 10<sup>3</sup> ゲノムコピーオーダーのウイルス量があればほぼ検出可能であるが、10<sup>2</sup> ゲノムコピーオーダーのウイルス量では、少なくなればなるほど不検出となる割合が高くなる傾向が認められた (表 5)。ただし、NucleoSpin Virus の方が QIAamp Viral RNA Mini Kit と比べてやや良い結果であったことは、NucleoSpin で抽出した核酸の濃度が QIAamp Viral RNA Mini Kit より濃いことを反映していると考えられた。最終的に本法での検出限界は、100cm<sup>2</sup> あたり 10<sup>3</sup> ゲノムコピーオーダー程度であると推察された。

ノロウイルス流行期におけるトイレ周辺のノロウイルスモニタリングでは、便座裏 70 検体中 8 検体から、ペーパーホルダー 68 検体中 1 検体からノロウイルスが検出され、流行期の公共施設のトイレは少なからずノロウイルスに汚染されていることが実証された。特に便座裏汚染率は調査した部位別で最も高く、ウイルス汚染量も 10<sup>3</sup> コピー以上あるので注意が必要である。また、ペーパーホルダーからノロウイルスが検出されたことより、ペーパーホルダーを介して二次感染が起る可能性が示された。シーズン別の比較では、2016/17 シーズンが 8 検体、

2017/18 シーズンが 1 検体で、2016/17 シーズンの検出率が高かったが、この結果はそのシーズンの胃腸炎患者報告数とリンクしていると考えられる。広島県における小児の感染性胃腸炎患者報告数とトイレモニタリング調査の結果を見ても、定点当たりの患者報告数が増加するとトイレ周辺のふき取りも陽性になっていたことから、トイレの汚染状況はノロウイルスの流行状況を反映していると考えられた。検出遺伝子型については、そのシーズンに広島県および全国において低年齢層を中心に流行していた遺伝子型が検出されていた。

## E. 結論

ふき取り検体からノロウイルスを検出する際には、再浮遊液の量を減らし、更に核酸抽出に用いる試料を増すことでハイドロキシアパタイト (HAP) 等による濃縮行程が省略でき、更に検出感度も向上することを確認した。

また、ふき取り液には食品添加物指定の界面活性剤も添加可能であった。

ふき取り液からのウイルス核酸抽出には NucleoSpin Virus を用いることで PCR 反応に持ち込めるウイルスゲノムコピー数が現行の 2 倍程度に増加し、一連のふき取り操作から Nested-リアルタイム PCR 法での検出限界は、100cm<sup>2</sup> あたり 10<sup>3</sup> コピーオーダー程度であると推察された。

感染性胃腸炎流行期の公共施設トイレは、高率にノロウイルスに汚染されており、感染リスクがあることが実証された。特に便座裏の汚染が目立って確認されたことから、この部位の重点的清掃や汚染

を軽減する対策を講じる必要がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

1) 谷澤 由枝, 重本 直樹, 高尾 信一, 野田 衛: 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濃縮法の検討, 第37回日本食品微生物学会学術総会, 2016, 東京

2) 谷澤 由枝, 重本 直樹, 高尾 信

一, 野田 衛: ふき取り検体からのノロウイルス検出法の改良及び公共施設トイレにおけるノロウイルスモニタリング, 第38回日本食品微生物学会学術総会, 2017, 徳島

## 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

0.3% Zwittergent加PBS(-)で湿らせたふき取り棒で、ふき取り操作を2セット実施  
 (1セット：縦10回、横10回、右斜め5回、左斜め5回)

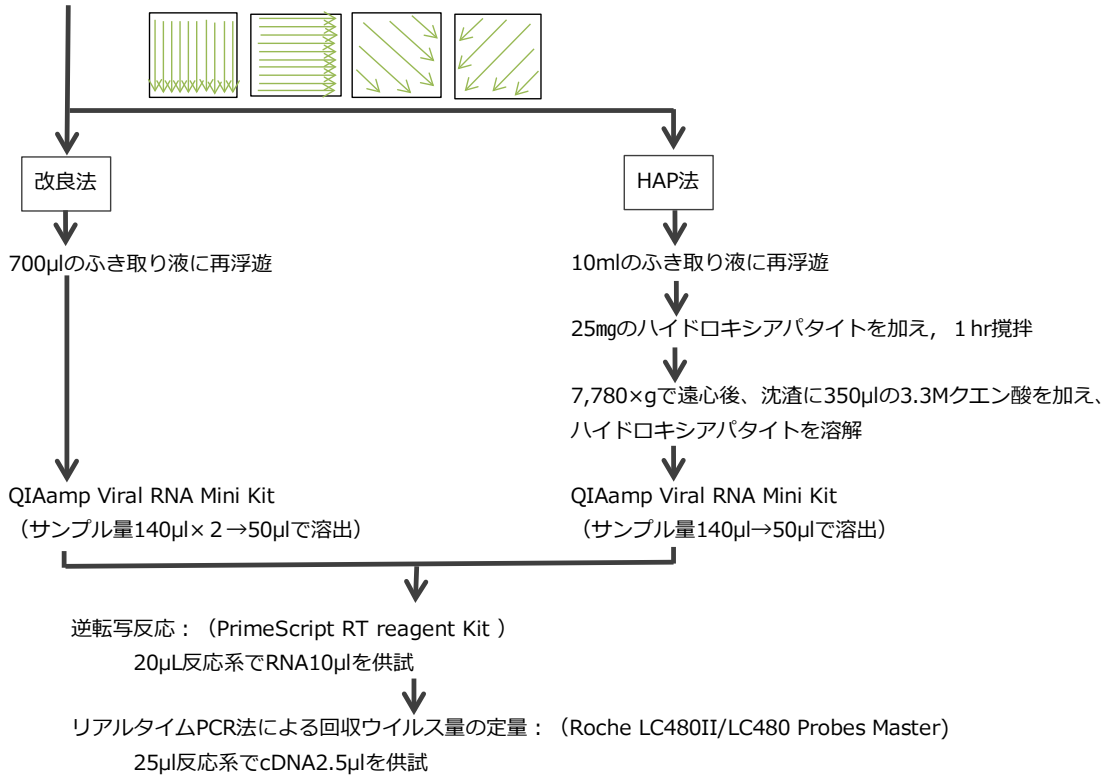


図1 ふき取り検体からのウイルス検出試験

表1 使用した界面活性剤とその特徴

| 名称                       | 区分         | 安全性等                             | HLB** |
|--------------------------|------------|----------------------------------|-------|
| Zwittergent              | 両イオン性界面活性剤 | タンパク溶解作用<br>皮膚刺激性、強い眼刺激          | -     |
| Tween20<br>(ポリソルベート)     | 非イオン性界面活性剤 | 食品添加物<br>ADI* : 10mg/kg BW/day   | 16.7  |
| シュガーエステル<br>(シヨ糖脂肪酸エステル) | 非イオン性界面活性剤 | 食品添加物<br>ADI* : 0-30mg/kg BW/day | 16    |

\*ADI : 1日摂取許容量

\*\*HLB : Hydrophilic-Lipophilic Balance (界面活性剤の水と油への親和性の程度を表す値)



ふき取り液に湿らせたふき取り棒で、ふき取り操作を2セット実施  
 (1セット：縦10回、横10回、右斜め5回、左斜め5回)

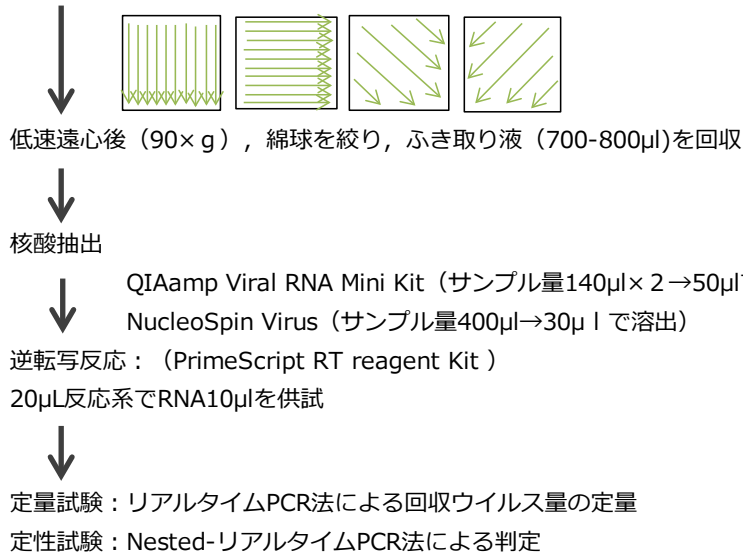


図2 ふき取り検体からのウイルス検出試験

表2 Nested-リアルタイムPCR反応条件

|         | 使用酵素                            | プライマー                          | プローブ       | 反応系  | 反応温度条件   |
|---------|---------------------------------|--------------------------------|------------|------|--|
| 1st PCR | TaKaRa EX Taq                   | COG2F, ALPF<br>/G2SKR, G2ALSKR | -          | 50μl | 94℃/3min<br>(94℃/1min→50℃/1min→72℃/1min)×40<br>72℃/15min |
| 2nd PCR | LightCycler480<br>Probes Master | COG2F/COG2R                    | RING2AL-TP | 25μl | 95℃/10min<br>(95℃/15sec→56℃/60sec)×40<br>40℃/30sec       |

表3 改良法およびHAP法のふき取り検体からのノロウイルス検出率と回収率

| 方法   | 便乳剤<br>希釈率 | ウイルス塗布量<br>(ゲノムコピー/100cm <sup>2</sup> ) | 検出率<br>(陽性数/検査数) | 回収率<br>(%) |
|------|------------|---|------------------|------------|
| 改良法  | 原液         | 1.7~2.1×10 <sup>5</sup>                 | 6/6              | 42.1~62.9  |
|      | 10倍        | 2.0~2.1×10 <sup>4</sup>                 | 6/6              | 38.0~63.7  |
|      | 100倍       | 2.1~2.7×10 <sup>3</sup>                 | 6/6              | 34.4~111.9 |
|      | 1000倍      | 3.0~4.8×10 <sup>2</sup>                 | 6/3              | -          |
| HAP法 | 原液         | 2.2×10 <sup>5</sup>                     | 5/5              | 24.9~61.7  |
|      | 10倍        | 1.5×10 <sup>4</sup>                     | 5/5              | 30.4~60.9  |
|      | 100倍       | 3.4×10 <sup>3</sup>                     | 3/5              | 23.0~32.1  |

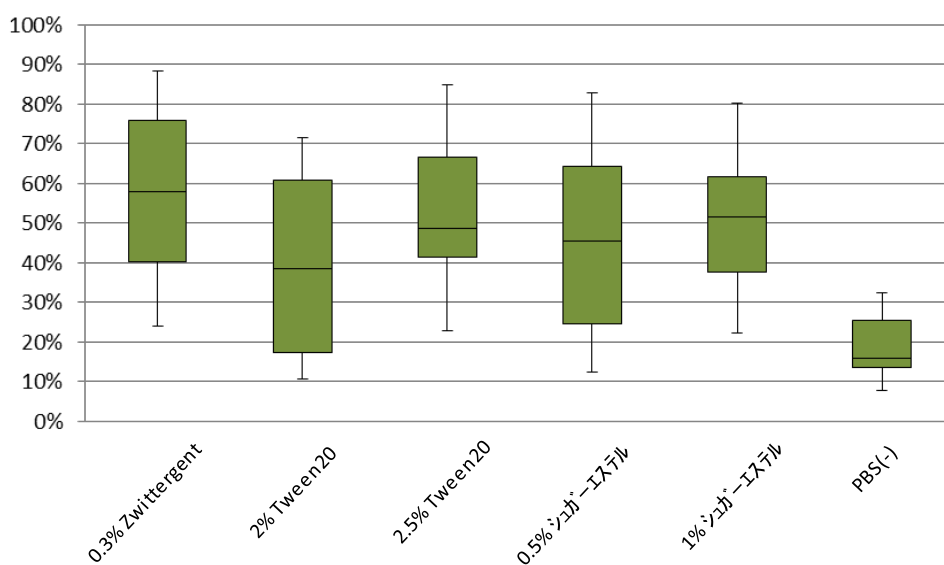


図3 ふき取り液中の界面活性剤の種類、濃度とノロウイルス回収率

表4 ふき取り検体からのノロウイルス検出における核酸抽出キットの性能比較

| ふき取り検体中の<br>界面活性剤 | ウイルス塗布量<br>(コピー/100cm <sup>2</sup> ) | サンプル<br>No. | QIAamp Viral RNA Mini Kit            |                    | NucleoSpin Virus                     |                    |
|-------------------|--------------------------------------|-------------|--------------------------------------|--------------------|--------------------------------------|--------------------|
|                   |                                      |             | リアルタイムPCR<br>実測値<br>(コピー/2.5μl cDNA) | ふき取り<br>回収率<br>(%) | リアルタイムPCR<br>実測値<br>(コピー/2.5μl cDNA) | ふき取り<br>回収率<br>(%) |
|                   |                                      |             | 0.3% Zwittergent                     | 5,320              | 1                                    | 23.9               |
|                   |                                      | 2           | 25.5                                 | 47.9               | 55.2                                 | 43.6               |
|                   |                                      | 3           | 23.1                                 | 43.4               | 36.0                                 | 28.4               |
|                   |                                      | 4           | 26.9                                 | 50.6               | 59.2                                 | 46.7               |
|                   |                                      | 5           | 9.8                                  | 21.8               | 22.7                                 | 17.9               |
|                   |                                      | 平均          | 21.8                                 | 41.7               | 42.3                                 | 33.4               |
| 2.5% Tween20      | 4,120                                | 1           | 12.1                                 | 32.7               | 18.8                                 | 21.4               |
|                   |                                      | 2           | 17.8                                 | 45.1               | 14.8                                 | 15.7               |
|                   |                                      | 3           | 12.1                                 | 32.3               | 15.3                                 | 17.2               |
|                   |                                      | 4           | 6.8                                  | 18.0               | 16.9                                 | 18.7               |
|                   |                                      | 5           | 12.6                                 | 35.0               | 15.2                                 | 17.7               |
|                   |                                      | 平均          | 12.3                                 | 32.6               | 16.2                                 | 18.1               |

表5 ふき取り検体からのノロウイルス検出限界

| ふき取り検体中の<br>界面活性剤 | ウイルス塗布量<br>(コピー/100cm <sup>2</sup> ) | 試験<br>回数 | 陽性率                          |                     |
|-------------------|--------------------------------------|----------|------------------------------|---------------------|
|                   |                                      |          | QIAamp Viral<br>RNA Mini Kit | NucleoSpin<br>Virus |
| 0.3% Zwittergent  | 5,320                                | 5        | 5/5                          | 5/5                 |
|                   | 2,950                                | 5        | 4/5                          | 5/5                 |
|                   | 600                                  | 5        | 2/5                          | 3/5                 |
|                   | 110                                  | 5        | 0/5                          | 2/5                 |
| 2.5% Tween20      | 4,120                                | 5        | 5/5                          | 5/5                 |
|                   | 230                                  | 5        | 2/5                          | 3/5                 |

表6 ふき取り別場所におけるノロウイルス検出数と遺伝子型

| シーズン    | ふき取り場所      | 検体数 | 陽性数 | 検出遺伝子型(検体数)                   | ウイルス量<br>(コピー/検体)                      |
|---------|-------------|-----|-----|-------------------------------|--|
| 2016/17 | 内鍵またはドアノブ   | 34  | 0   | -                             | -                                      |
|         | ペーパーホルダー    | 36  | 1   | GII.6(1)                      | $6.0 \times 10^2$                      |
|         | 便座裏         | 38  | 7   | GII.2(5), GII.7(1), GII.17(1) | $1.6 \times 10^3 \sim 6.7 \times 10^5$ |
|         | 水洗レバーまたは手すり | 32  | 0   | -                             | -                                      |
| 2017/18 | 内鍵またはドアノブ   | 32  | 0   | -                             | -                                      |
|         | ペーパーホルダー    | 32  | 0   | -                             | -                                      |
|         | 便座裏         | 32  | 1   | GII.4 Sydney2012(1)           | $2.1 \times 10^3$                      |

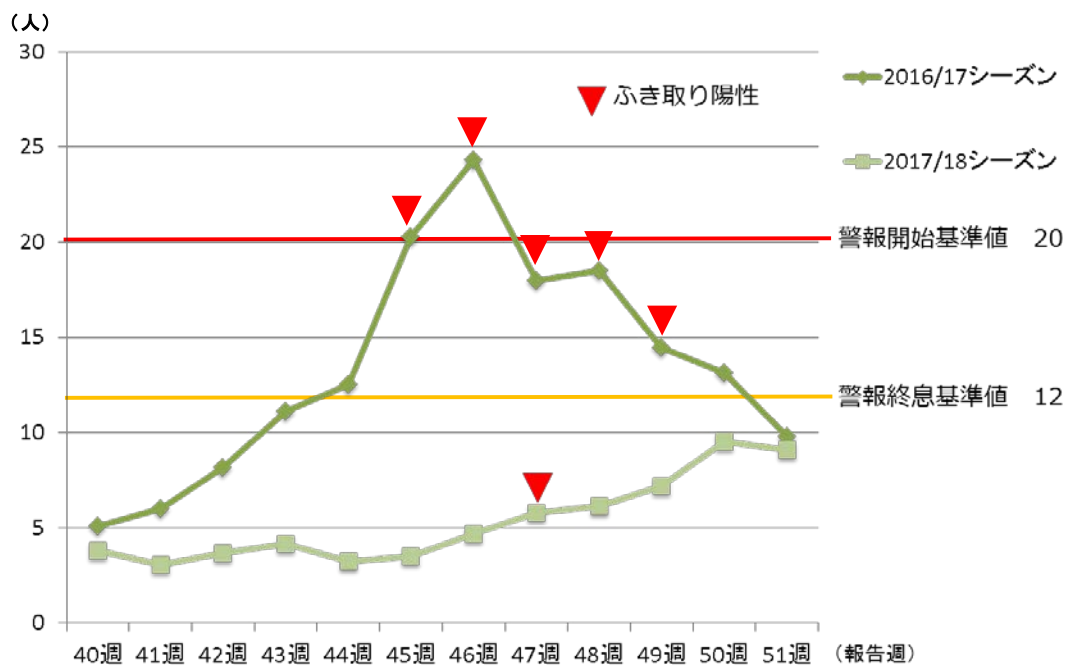


図4 定点当りの感染性胃腸炎患者報告数（広島県）と公共施設トイレのふき取りからのノロウイルス検出

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)  
「ウイルスによる食品媒介性疾患の制御に関する研究」  
総合研究分担報告(平成 28～30 年度)

カキからのノロウイルス検出および検出法の検討、ならびに  
ノロウイルス GⅡの ORF2 全長遺伝子解析手法に関する検討

|       |        |              |
|-------|--------|--------------|
| 研究協力者 | 山本 美和子 | 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     |
| 研究分担者 | 野田 衛   | 国立医薬品食品衛生研究所 |
| 研究分担者 | 上間 匡   | 国立医薬品食品衛生研究所 |
| 研究協力者 | 福永 愛   | 広島市衛生研究所     |
| 研究協力者 | 則常 浩太  | 広島市衛生研究所     |
| 研究協力者 | 兼重 泰弘  | 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     |
| 研究協力者 | 坂本 綾   | 広島市衛生研究所     |

## 研究要旨

カキおよびヒトから検出されたノロウイルス(NoV)の遺伝子型を比較した。2016/17 シーズンは、カキからは Hu/GⅡ/JP/2015/GⅡ.P17-GⅡ.17/Kawasaki308 に近縁の GⅡ.17 のみが検出された。一方で、ヒトからは全国規模の流行が認められた GⅡ.2 が最も多く検出された。このことから、GⅡ.17 では潜在的な軽症者や不顕性感染者の存在が推測された。

二枚貝中には遺伝子検査を阻害する物質が存在し、NoV 等の検出感度を低下させている可能性がある。カキ中腸腺および対照群として DDW へ NoV を添加した回収試験の結果、中腸腺からの NoV 回収率は、対照群と比較して約 100 分の 1 以下の成績となり、阻害物質が検出感度に大きな影響を及ぼすことが示唆された。

カキからの NoV 検出感度の改良を目的として、アセトン添加法による検討を行った結果、中腸腺 1g に対し 250  $\mu$ l のアセトンを追加した場合に、検出率の向上が認められた。また、ポリエチレングリコール(PEG)沈殿法における至適アミラーゼ溶液添加量を検討した結果、中腸腺 1g に対し 10  $\mu$ l のアミラーゼ溶液を追加した場合に最も検出率が高かった。

NoV による食中毒等の発生時に詳細な分子疫学的解析を行うため、可変領域である P2 ドメインを含む ORF2 全長遺伝子(約 1680 塩基)の解析手法について検討を行った。検体からの RNA 抽出工程の改良、逆転写反応系の検討、各種プライマー

の設計により、検出数の多い6遺伝子型(GII.2、GII.3、GII.4、GII.6、GII.14、GII.17)のORF2全長遺伝子を解析する手法を確立した。

## A. 研究目的

### 1. カキおよびヒトから検出される NoV の比較

二枚貝は、中腸腺に NoV 等のウイルスを蓄積するとされる。そこで、カキおよびヒトから検出される NoV の遺伝子型に相関性があるか調査した。

### 2. カキ中腸腺への NoV 添加回収試験

二枚貝の中腸腺には多くの NoV が蓄積されていると推測される。一方で、二枚貝中には遺伝子検査を阻害する様々な物質が存在する。そのため、通知法のリアルタイム PCR 法による定量検査を実施しても陽性判定基準である実測値 10 コピー以上となるケースは非常に少ない。

そこで、カキ中腸腺および対照群として DDW への NoV 添加回収試験により、阻害物質が検出感度に及ぼす影響を評価した。

### 3. カキからの NoV 検出法の改良

カキからの NoV 検出法の改良として、アセトン添加法による検討を行った。中腸腺に対し、どの程度の割合でアセトンを添加した場合に、検出率の向上が認められか評価した。また、PEG 沈殿法による NoV 検出率向上のため、前処理の段階で、中腸腺に添加するアミラーゼ溶液の至適量についての検討も行った。

### 4. NoV GII の ORF2 全長遺伝子の解析手法に関する検討

NoV GII による食中毒等の発生時に、現行

の NoV 遺伝子解析の主流である N/S 領域解析よりも詳細な分子疫学的解析が可能な手法について検討した。

## B. 研究方法

### 1. カキおよびヒトからの NoV 検出および遺伝子型別分類

2016/17 シーズンに採取されたカキ 8 検体および糞便 9 検体を用いた。前処理後、RNA を抽出し、逆転写(RT)反応により cDNA を合成した。

N/S 領域増幅用のプライマー組を用いた semi-nested PCR を行い、増幅産物の精製後、ダイレクトシーケンスにより、遺伝子配列を解析し、遺伝子型を決定した。

### 2. カキ中腸腺への NoV 添加回収試験

NoV 陰性のカキ中腸腺に、希釈した NoV GII 陽性便乳剤を添加し、PBS(-)を加え、10% 乳剤とした。PEG 沈殿法で濃縮し、1ml の DDW で再浮遊させた。対照群は、同便乳剤を 1ml の DDW に添加した。上述と同様に、RNA 抽出および RT 反応を行い、cDNA を合成した。リアルタイム PCR 法による定量検査を行い、それぞれ 2 ウェルの実測値コピー数を比較した。

### 3. カキからの NoV 検出法の改良

#### 1) アセトン添加法についての検討

NoV 陽性カキ中腸腺 1g に、それぞれ割合を変えてアセトンを添加した。添加後、10 秒間ボルテックスを行い、3,000rpm、4℃、5分遠心した上清 250 μl を微量遠心チュー

ブに回収し、さらに 12,000rpm、5 分遠心し、上清を RNA 抽出材料とした。RNA 抽出工程以降は、「2. カキ中腸腺への NoV 添加回収試験」と同様である。

## 2) アミラーゼ至適量の検討

NoV 陽性カキ中腸腺 1g に、それぞれ割合を変えてアミラーゼ溶液を添加した。

アミラーゼ溶液は、50ml の遠心管に 5g の  $\alpha$ -アミラーゼ粉末(和光純薬)および PBS(-)20ml を添加・混合し、8,000g、4°C、20 分遠心後、孔径 0.22  $\mu$ m の滅菌フィルターでろ過し、ろ液と等量のグリセリンを添加したものを使用した。

## 4. NoV GII の ORF2 全長遺伝子の解析手法に関する検討

IASR の胃腸炎ウイルス検出状況(2008/09 ~2017/18 シーズン)をもとに、全国的に検出数の多い 6 遺伝子型(GII.2、GII.3、GII.4、GII.6、GII.14、GII.17)を解析対象とした。

これら 6 遺伝子型が検出された糞便検体 10%乳剤の遠心上清を RNA 抽出材料とした。

RNA 抽出の際のキャリア RNA は、キット付属品もしくは Yeast tRNA(Ambion)を使用した。RT 反応は当所で汎用的に実施している方法(以下、A 法)および逆転写酵素と RT 用プライマーを変更した方法(以下、B 法)により行った。

A 法では、High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit(ABI)と Oligo(dT)<sub>12-18</sub> Primer(Invitrogen)を用いた。

B 法では、SuperScript III Reverse Transcriptase(Invitrogen)および TX30SXN Primer(5' -GACTAGTTCTAGATCGCGAGCGGCCGC CCT<sub>30</sub>-3' )を用いた。

既知のフォワードプライマーおよび新たに設計したリバースプライマー(表 1)を用い、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase(TaKaRa)を用いた semi-nested PCR を行った。

PCR 産物を ExoSAP-IT Express(Thermo Fisher Scientific)により精製後、表 2 に示したプライマーを用いて、シーケンス解析を行った。

(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. カキおよびヒトからの NoV 検出状況

2016/17 シーズンのカキおよびヒトからの NoV 検出状況を表 3 に示した。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 株検出された。

参考に、2012/13 シーズンから 2016/17 シーズンまでのカキおよびヒトからの NoV 検出状況を図 1 に示した。

### 2. カキ中腸腺への NoV 添加回収試験

リアルタイム PCR 法による定量検査の結果、カキ中腸腺では実測値平均 0.19 コピー/ $5\mu$ l、対照群の DDW では平均 24.19 コピー/ $5\mu$ l であった。すなわち、カキ中腸腺からの NoV 検出率は、対照群の 0.79%であり、約 100 分の 1 以下の検出感度であった。

### 3. カキからの NoV 検出法の改良

#### 1) アセトン添加法についての検討

アセトン添加割合による NoV 回収率を図

2 に示した。概ね 10~30%の添加で回収率が高くなったが、特に 25%の割合で添加した場合に、最も良好な結果であった。

## 2) アミラーゼ至適量の検討

PEG 沈殿法におけるアミラーゼ溶液添加量の相違による NoV 検出コピー数を図 3 に示した。中腸腺 1g あたり、10  $\mu$ l を添加した場合に最も検出コピー数が高かった。

## 4. NoV G II の ORF2 全長遺伝子の解析

キャリア RNA 及び RT 反応を変更して合成した cDNA を用いて PCR を行い、電気泳動により増幅産物を確認した(図 4a, b, c)。キャリア RNA として、Yeast tRNA を用い、B 法による RT 反応で合成した cDNA を用いて PCR を行った場合に、6 遺伝子型の ORF2 全長遺伝子を網羅的に増幅することが可能であった。シーケンス解析は、共通プライマー 3 種類、型特異的プライマー 3 種類の計 6 種類のプライマーを使用することで、ORF2 全長遺伝子を解析することができた。

## D. 考察

カキおよびヒトから最も多く検出される NoV の遺伝子型は、過去の状況も踏まえると、シーズンにより一致する場合と一致しない場合があった。NoV の遺伝子型によりカキへの蓄積に差がある、あるいは、遺伝子型によってはヒトに感染しても、軽症や不顕性感染で経過し、看過されているため、ヒト由来検体から検出されないなどの要因が推察された。

カキ中腸腺への NoV 添加回収試験により、カキからの NoV 検出は、検査の過程で約 100 分の 1 程度、検出感度が低下していること

が明らかとなった。カキに含まれる遺伝子検査を阻害する物質の影響を極力低減できるような検査法を思案していかなければ、偽陰性の問題が生じ、NoV 汚染量の正確な評価も困難である。

カキからの NoV 検出の改良法としてのアセトン添加法の検討、PEG 沈殿法によるアミラーゼ溶液の至適添加量の検討を行い、それぞれ検出率の向上に寄与できる条件を決定した。しかし、最適な条件で検査を行っても、検出率が若干良くなる程度にとどまった。今後も引き続き検査法の検討・改良を行っていく必要がある。

NoV 遺伝子解析の主流である N/S 領域は遺伝的多様性に乏しく、疫学的関連性を検討するには情報量が少ないことが欠点として挙げられる。RNA 抽出工程、RT 反応系、PCR 系の検討・改良により、過去 10 シーズンの統計で、全国的に検出数の多い NoV G II の 6 遺伝子型の ORF2 全長遺伝子を PCR で網羅的に増幅し、遺伝子解析可能な手法を確立した。食中毒等の発生時に、詳細な分子疫学的解析が必要となった場合に、有効に活用できると考えられる。

## E. 結論

3 年間の研究期間において、カキおよびヒトから検出される NoV 遺伝子型の比較、カキからの NoV 検出の改良、NoV の詳細な分子疫学的解析手法の確立等に取り組んだ。

ただし、カキからの NoV 検出感度は依然として不十分であり、今後更なる検出法の改良が必要である。

## 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 PCR用プライマー

|            | プライマー        | 極性         | 配列(5' →3')                 |
|------------|--------------|------------|----------------------------|
| 1st        | COG2F        | sense      | CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG |
| 2nd        | G2SKF        | sense      | CNTGGGAGGGCGATCGCAA        |
| 1st、2nd 共通 | panG II_VP1R | anti-sense | GCWANRAAAGCYCCWGCCATT      |

表2 シークエンス解析用プライマー

|          | プライマー              | 極性         | 配列(5' →3')              |
|----------|--------------------|------------|-------------------------|
| 各型共通     | G2-SKF             | sense      | CNTGGGAGGGCGATCGCAA     |
|          | G2-SKR             | anti-sense | CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT |
|          | panG II_VP1R       | anti-sense | GCWANRAAAGCYCCWGCCATT   |
| G II. 2  | G II. 2_inner-F    | sense      | AAATYACYATGTTYCCYCAT    |
|          | G II. 2_inner-shF  | sense      | AATTCACCCCAGTYGGWCTYA   |
|          | G II. 2_inner-R    | anti-sense | ARACYCTTCCCTGRAAGTCAGG  |
| G II. 3  | G II. 3_inner-F    | sense      | TCYGAAATGTCYAATTTCYAG   |
|          | G II. 3_inner-shF  | sense      | ACAARRTTCACCCCAGTTGG    |
|          | G II. 3_inner-R    | anti-sense | TYCCRTTYAGRTTATCCAATTG  |
| G II. 4  | G II. 4_inner-F    | sense      | CCACCYACAGTTGARTC       |
|          | G II. 4_inner-shF  | sense      | CACYCCAGTYGGYGTIRYC     |
|          | G II. 4_inner-R    | anti-sense | GRATCYTYCCYACRAARTCTGG  |
| G II. 6  | G II. 6_inner-F    | sense      | ACCAACYGTKGARTCAAARAC   |
|          | G II. 6_inner-shF  | sense      | AACATGAAYYTDGCCCHGC     |
|          | G II. 6_inner-R    | anti-sense | CAYCTRCCATTTTGKGGTTG    |
| G II. 14 | G II. 14_inner-F   | sense      | CAGTTCACCTTTCTGGTCCC    |
|          | G II. 14_inner-shF | sense      | TCACACCYATTGGTGTCAATG   |
|          | G II. 14_inner-R   | anti-sense | CTTGCAACGCCATAYAACATG   |
| G II. 17 | G II. 17_inner-F   | sense      | TWGARTCTAARACWAARCC     |
|          | G II. 17_inner-shF | sense      | AAATTCACACCAGTKGGMRTC   |
|          | G II. 17_inner-R   | anti-sense | CRAASASKASRCCYKTGAAGT   |



表3 カキおよびヒトからの NoV 検出状況(2016/17 シーズン)

| 採取日        | 区分        | 結果および遺伝子型           |
|------------|-----------|---------------------|
| 2016/09/10 | カキ        | —                   |
| 2016/10/10 |           | —                   |
| 2016/10/28 |           | —                   |
| 2016/11/05 |           | —                   |
| 2016/11/25 |           | G II . 17           |
| 2016/12/03 |           | —                   |
| 2016/12/22 |           | G II . 17           |
| 2017/01/10 | G II . 17 |                     |
| 2016/09/12 | ヒト        | G II . 2            |
| 2016/09/14 |           | G II . 3            |
| 2016/10/17 |           | G II . 2            |
| 2016/10/18 |           | G II . 4 Sydney2012 |
| 2016/10/28 |           | G II . 4 Sydney2012 |
| 2016/11/10 |           | G II . 2            |
| 2016/11/24 |           | G II . 2            |
| 2016/12/01 |           | G II . 17           |
| 2016/12/13 |           | G II . 2            |

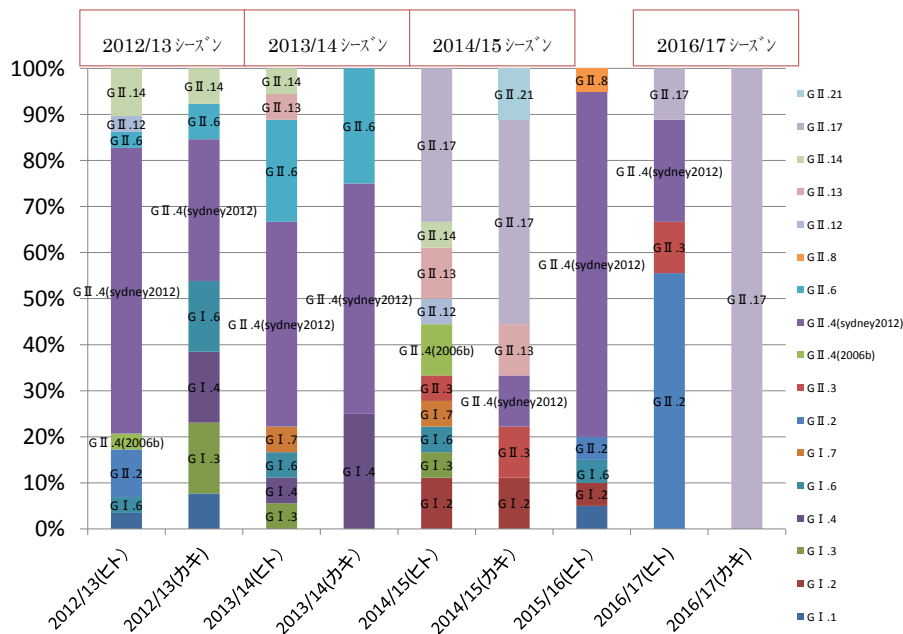


図1 カキおよびヒトからの NoV 遺伝子型シーズン別検出割合



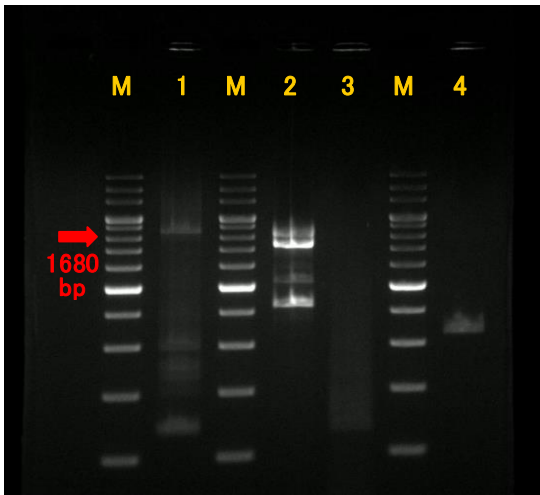


図 4a 電気泳動像(キット付属のキャリア RNA と A 法により合成した cDNA を使用)

M:200bp ladder  
1:GⅡ.3、2・3:GⅡ.6、4:GⅡ.14

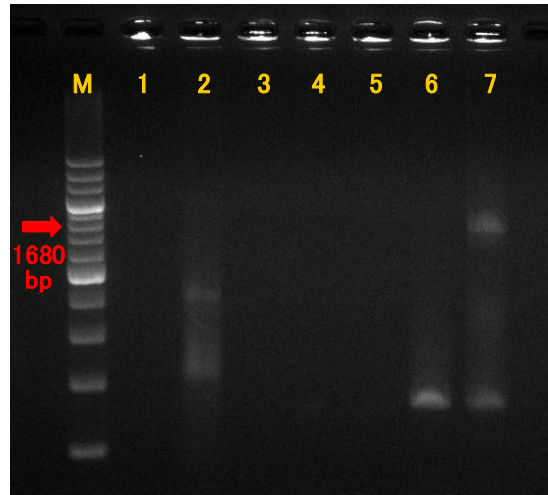


図 4b 電気泳動像(キット付属のキャリア RNA と A 法により合成した cDNA を使用)

M:200bp ladder  
1:GⅡ.4 Den Haag 2006b  
2:GⅡ.4 New Orleans 2009  
3:GⅡ.4 Sydney 2012  
4・5:GⅡ.2、6・7:GⅡ.17

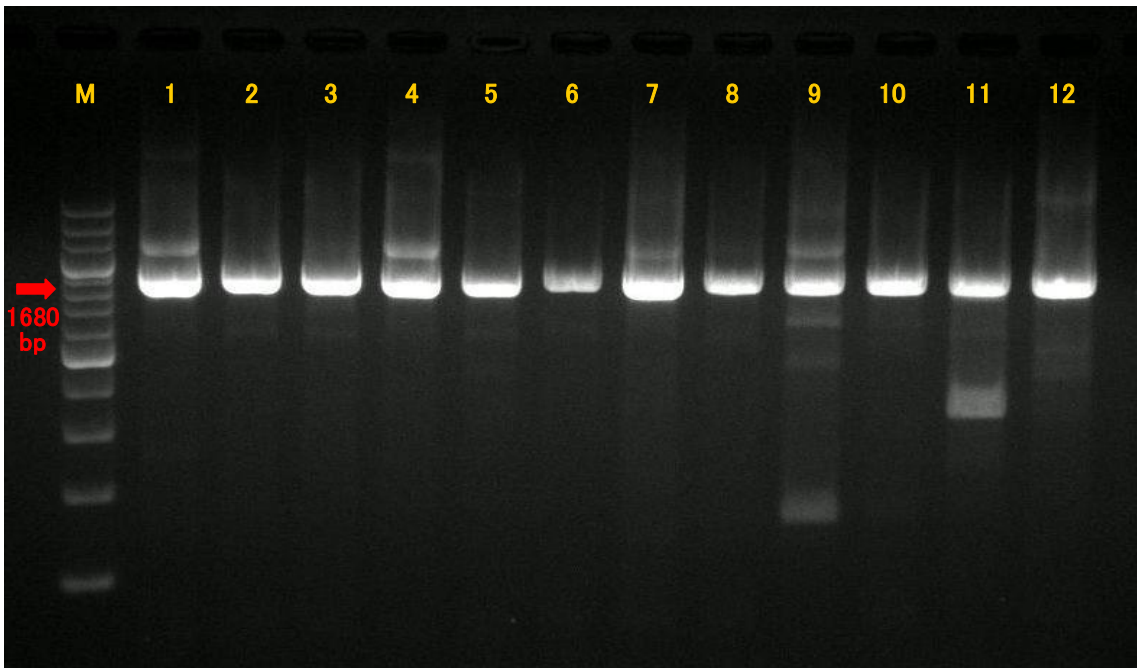


図 4c 電気泳動像(Yeast tRNA と B 法により合成した cDNA を使用)

M:200bp ladder、1:GⅡ.3、2・3:GⅡ.6、4・5:GⅡ.14  
6:GⅡ.4 Den Haag 2006b、7:GⅡ.4 New Orleans 2009  
8:GⅡ.4 Sydney 2012、9・10:GⅡ.2、11・12: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)  
「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」  
総合研究分担報告(平成28~30年度)

流入水中ノロウイルスの定量、  
市販ノロウイルス検出キットの反応性評価  
および抗ノロウイルス活性のある化合物の探索

|       |       |              |
|-------|-------|--------------|
| 研究協力者 | 小林 孝行 | 福岡県保健環境研究所   |
| 研究協力者 | 吉富 秀亮 | 福岡県保健環境研究所   |
| 研究協力者 | 中村 麻子 | 福岡県保健環境研究所   |
| 研究協力者 | 芦塚 由紀 | 福岡県保健環境研究所   |
| 研究協力者 | 梶原 淳睦 | 福岡県保健環境研究所   |
| 研究分担者 | 上間 匡  | 国立医薬品食品衛生研究所 |

## 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からのNoV検出を行った。2015年11月から2017年10月までの期間における感染性胃腸炎報告数とNoV検出量の動態に関連が認められた。

調理従事者の健康管理対策の一環として、市販NoV検出キットについて遺伝子型毎の検出率について評価した結果、一部のキットでGII.2、GII.6に対する反応性が低いものがみられた。

NoVの感染予防対策に寄与する化合物の探索を目的に、抗NoV活性を有する化合物の活性評価を行った。235化合物を対象に抗NoV活性の評価を行った結果、1化合物がFCVおよびMNVに対する抗ウイルス活性を示し、濃度依存的なウイルス感染価の抑制がみられた。作用機序はウイルス粒子への直接的なものではないことが示唆された。

## 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の生活環の一つとして、感染者の糞便中に排出された後、トイレから下水を経由し、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。その

ため下水中のNoVの動態の迅速な把握は感染拡大の防止や二枚貝の汚染防止に寄与すると考えられる。本研究では、終末処理場流入水からのNoV検出状況や汚染量とヒトにおける感染性胃腸炎の発生動向との関連性を明らかにすることを目的とした。

NoVの糞便検査には、医療機関におい

てはイムクロマト法が広く用いられている。迅速簡便で安価である一方、検出感度については問題点があることが指摘されている。また、イムクロマト法は NoV に対する抗体を用いているため、遺伝子変異に伴う抗原性の変化の検出感度への影響が懸念される。そこで、市販されている各種の NoV 検出キットについて、糞便検体を用いて遺伝子型ごとの検出感度を比較し、それらの実用性を評価した。

NoV の感染予防には手指や調理器具の洗浄、あるいは糞便や嘔吐物によって汚染された環境の消毒が重要である。NoV を不活化させるには次亜塩素酸ナトリウムなどの消毒剤が挙げられるが、人体への影響から手指等への使用が難しく、より安全かつ効果の高い消毒剤が望まれている。そこで、NoV の感染予防対策に資する化合物の探索を目的として、NoV 代替ウイルスであるネコカリシウイルス (FCV) 及びマウスノロウイルス (MNV) を用いたスクリーニング系により抗 NoV 活性を有する化合物の活性評価を行った。

## B. 研究方法

### 1. 材料

終末処理場流入水は 2015 年 11 月から 2017 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 48 検体を用いた。

市販 NoV 検出キットはメーカーの異なる 3 種類のキット (キット A、キット B、キット C) を使用した。キットの評価には 2013 年から 2017 年の食中毒で搬入され、NoV 陽性となった糞便検体、合計 32 検体

を使用した。検体は GI. 2、GI. 3、GII. 2、GII. 3、GII. 4、GII. 6 および GII. 17 の NoV を含むものを使用した。

抗 NoV 活性を評価する化合物として、天然生理活性物質ライブラリーを購入し、235 化合物について評価を行った。NoV 代替ウイルスとして FCV-F9 株および MNV を使用し、それらのウイルスを接種する細胞として CRFK 細胞および RAW264.7 細胞をそれぞれ用いた。

### 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。NoV 検出は、厚生労働省通知法に準拠し、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) により RNA 抽出を行い、One Step PrimeScript RT-PCR Kit (Takara) を用いてリアルタイム PCR 法により NoV を定量した。プライマーには COG1F/COG1R および COG2F/COG2R セットを使用した。

### 3. 市販 NoV 検出キットの反応性評価

糞便検体をリン酸緩衝液 (pH7.5) で約 10%乳剤とし、10,000rpm で 20 分間遠心分離した。この上清から QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いて RNA を抽出し、One Step PrimeScript RT-PCR Kit を用いてリアルタイム PCR 法により NoV を定量した。また、定量した糞便検体を市販 NoV 検出キットに滴下し、陽性バンドの検出を確認した。

### 4. 抗 NoV 化合物のスクリーニングと活性評価

抗 NoV 化合物の活性評価の方法は Ohbarr の方法 (J. Antibiotics, 70, 443-447, 2017.) に基づいて行った。スクリーニング

では、評価を行う化合物を 100  $\mu$ M、10  $\mu$ M、1  $\mu$ M および 0.1  $\mu$ M の 4 段階に細胞培地を用いて希釈調製し、FCV または MNV と反応させた。抗ウイルス活性の評価は細胞変性効果 (CPE) の有無により判断した。

抗ウイルス活性が認められた化合物は細胞生存率 (各濃度における生細胞数/コントロール [化合物およびウイルス液を非接種] の生細胞数) を指標として抗 NoV 活性を評価した。化合物を 360  $\mu$ M から 2.8  $\mu$ M まで 2 倍段階希釈で調製後、スクリーニングと同様の手順でウイルス液と反応させ、培養した。生細胞数の測定には Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所) を用いた。同時に、各希釈濃度における化合物の CRFK 細胞および RAW264.7 細胞に対する毒性を評価した。

また、化合物が FCV、MNV に与える感染価抑制効果を測定した。即ち、化合物を 14.4  $\mu$ M、7.2  $\mu$ M、3.6  $\mu$ M、0  $\mu$ M (細胞培地のみ) に希釈調製し、スクリーニングと同様の方法でウイルス液と反応させ、培養を行った。24 時間後に培養上清を回収し、TCID50 assay によりウイルスの感染価を測定した。

さらに、化合物の作用がウイルス粒子への直接の作用か、または宿主細胞に作用して増殖を抑える作用か検討を行った。10  $\mu$ M の化合物または細胞培地のみを、それぞれ FCV または MNV と 1 時間反応後、遠心式フィルター Amicon Ultra-0.5 (メルクミリポア) で化合物を除去した。回収したウイルス液の感染価を TCID50 assay により測定し、両者の感染価を比較した。

(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。GI の最大値は、2016 年は 2 月の  $5.2 \times 10^4$  コピー/L (A 終末処理場)、2017 年は 5 月に B 終末処理場からの検体でのみ検出され、検出値は  $9.0 \times 10^4$  コピー/L であった。GII の最大値は、2016 年は 6 月の  $2.5 \times 10^6$  コピー/L (A 終末処理場)、2017 年は 1 月の  $9.6 \times 10^7$  コピー/L (B 終末処理場) であった。

### 2. 市販 NoV 検出キットの反応性評価

市販 NoV 検出キットについて遺伝子型毎の反応性評価の結果を示した (図 2)。GII.4 および GII.17 に対する反応性は、キット A、B および C ともに高かった。GII.4 に対する陽性一致率 (陽性数/検体数) はそれぞれ 80%、80%、100% であった。また、GII.17 に対する陽性一致率はそれぞれ 67%、100%、100% であった。一方、GII.2 および GII.6 に対する反応性はキット A と B は低く、キット C は高かった。GII.2 に対する陽性一致率はそれぞれ 27%、18%、72% であった。また、GII.6 に対する陽性一致率は 20%、20%、100% であった。全検体 (32 検体) に対する各キットの陽性一致率はキット A が 47%、キット B が 56%、キット C が 94% であった。

### 3. 抗 NoV 化合物のスクリーニングと活性評価

天然生理活性物質 235 化合物について評価した結果、23 化合物が FCV または MNV に対する抗ウイルス活性を示した。この

うち 19 化合物が 100 $\mu$ M、4 化合物が 10 $\mu$ M 以下の濃度で CPE を抑制した。13 化合物が FCV に対して、9 化合物が MNV に対して抗ウイルス活性を示し、1 化合物（化合物 A とする）が両ウイルスに対する抗ウイルス活性を示した。

化合物 A による細胞生存率は FCV、MNV それぞれにおいて 18 $\mu$ M で最大を示したが、それを超える濃度では低下した（図 3, 上）。細胞毒性は CRFK 細胞に対して 18 $\mu$ M、RAW264.7 細胞に対して 11.3 $\mu$ M を超える濃度でみられた（図 3, 下）。

化合物 A によるウイルス感染価抑制効果の結果を（図 4）に示した。化合物 A の濃度依存的な感染価の抑制がみられた。抑制効果は 14.4 $\mu$ M で最大を示し、FCV に対して 4.56log<sub>10</sub>、MNV に対して 5.83log<sub>10</sub> の感染価の抑制がみられた。

遠心式フィルターで化合物を除去後のウイルス感染価を比較したところ、10 $\mu$ M の化合物 A と細胞培地のみ添加時の感染価に差は現れなかった（データ省略）。

#### D. 考察

2015/2016 シーズンの福岡県感染症発生動向調査における定点当たりの感染性胃腸炎報告数は例年に比べて少なく、2015 年 11 月のピークの後には減少し、その後は横ばいを続けた。今回の流入水調査においても、NoV 量は例年よりも少なく、検出値は 2015 年 11 月から 2016 年 3 月にかけてほぼ平坦に推移した。また、2016/2017 シーズンの感染性胃腸炎報告数は 2016 年 11 月ごろから増加し始め、2016 年 12 月（第 51 週）に一峰性のピークとなった。この 12 月におけるピークは

流入水中の NoV 検出を開始した 2013 年 1 月からの調査期間中で最大の値（17.97）であった。NoV 量は 2016 年 11 月ごろから増加し始め、2017 年 1 月に一峰性のピークを示し、特に B 終末処理場における NoV GII の定量値は過去の調査期間中における最大値（ $9.6 \times 10^7$  コピー/L）を示した。これは 2016 年 12 月における感染性胃腸炎報告数の増加が 2017 年 1 月における流入水中の NoV 量の増加に反映されたものと考えられる。これらのことから感染性胃腸炎の報告数と流入水中の NoV 量には関連があり、流入水調査をすることで県内の NoV 流行状況を把握することができると示唆された。

市販 NoV 検出キットの検出感度等について評価を行ったところ、キットの種類によって遺伝子型毎の反応性に違いがみられた。近年流行していた GII.4 および GII.17 に対して、今回使用したキットはいずれも高い反応性を有していることが示された。しかし、キット A および B は 2016/17 シーズンに全国的に流行した GII.2、および福岡県で多く検出されていた GII.6 に対する反応性が低かった。このことから、GII.2 と GII.6 に対して偽陰性となりやすい市販キットがあることが示唆された。NoV 量が多くても検出できない場合があったが、その要因として便検体に含まれる夾雑物がキットの反応性に影響を与えている可能性が考えられた。今回の検討により、GII.2 と GII.6 の遺伝子型は検出キットにより検出感度が十分ではないことが示唆された。流行するノロウイルスの遺伝子型が変化した場合、迅速に市販 NoV 検出キットの評価を行い、

問題がある場合には速やかに医療機関や食品事業者等に対し情報提供を行うことが重要である。

抗 NoV 化合物のスクリーニングを行った結果、23 化合物が抗ウイルス活性を示し、このうち化合物 A のみが FCV および MNV 両ウイルスに対して抗ウイルス活性を示した。化合物 A について細胞生存率を指標とした抗ウイルス活性を測定したところ、濃度依存的な細胞生存率の上昇が認められ 18 $\mu$ M で最大を示した。しかし、細胞毒性が付近の濃度 (CRFK 細胞 : 18 $\mu$ M 以上、RAW264.7 細胞 : 11.3 $\mu$ M 以上) でみられた。そこで細胞毒性の影響が少ない低濃度域における化合物 A のウイルス感染価抑制効果を検討したところ、FCV および MNV に対して有意な感染価の抑制がみられ、化合物 A の抗 NoV 活性が確認された。

抗ウイルス剤にはウイルス粒子に直接作用する化合物、または宿主細胞に作用して増殖を抑える化合物 (ウイルスの接着、侵入、複製、放出のいずれかのステップに作用) が考えられ、前者は消毒剤、後者は治療薬としての応用が主に期待される。化合物 A は遠心式フィルターの処理によっても感染価の減少がみられなかったことから、ウイルス粒子への直接的な作用ではないことが示唆された。よって治療薬としての応用が期待されるが、詳細な作用機序は明らかになっていないため今後の課題である。

## E. 結論

県内の感染性胃腸炎報告数と終末処理場流入水からの NoV 量には関連が認めら

れ、流入水調査の結果は NoV の流行を反映していた。

GII. 4、GII. 17 は全てのキットで検出可能であった。しかし、GII. 2 および GII. 6 に対して検出できないキットがあることが示唆された。

天然生理活性物質 235 化合物について抗 NoV 活性を評価したところ、23 化合物が FCV または MNV に対する抗ウイルス活性を示した。そのうちの化合物 A は FCV および MNV 両方に顕著な抗ウイルス活性を有し、その作用機序はウイルス粒子への直接的なものではないことが示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Takayuki Kobayashi, Hideaki Yoshitomi, Asako Nakamura, Yuki Ashizuka, Jumboku Kajiwara and Mamoru Noda: Genetic characterization of rarely reported GI.Pc\_GI.5 norovirus strain detected from a foodborne suspected outbreak in Japan., *Jpn J Infect Dis*, 71 (5) :390-392 (2018)

### 2. 学会発表

芦塚由紀、吉富秀亮、野田衛 : 飲用水からノロウイルスが検出された食中毒事例, 第 37 回日本食品微生物学会, 東京都, 9 月 15 日, 2016

中村麻子、吉富秀亮、小林孝行、芦塚由紀、梶原淳睦、野田衛 : 市販ノロウイルス検出イムノクロマトキットの遺伝子型別反応性評価, 第 64 回福岡県公衆衛生学会, 福岡市, 5 月 18 日, 2017

小林孝行、吉富秀亮、中村麻子、芦塚





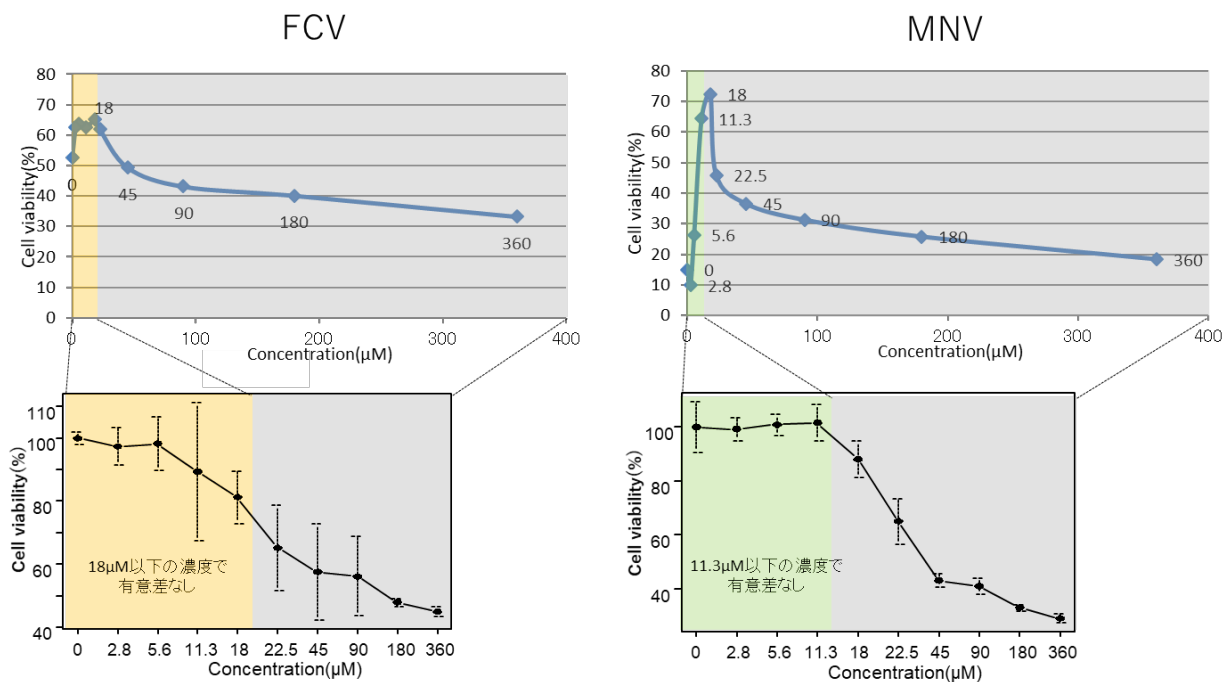


図3 化合物 A を添加時の細胞生存率の測定  
 上：ウイルス+化合物 A (0-360μM) 添加時の細胞生存率  
 下：細胞毒性試験 (化合物のみ添加)

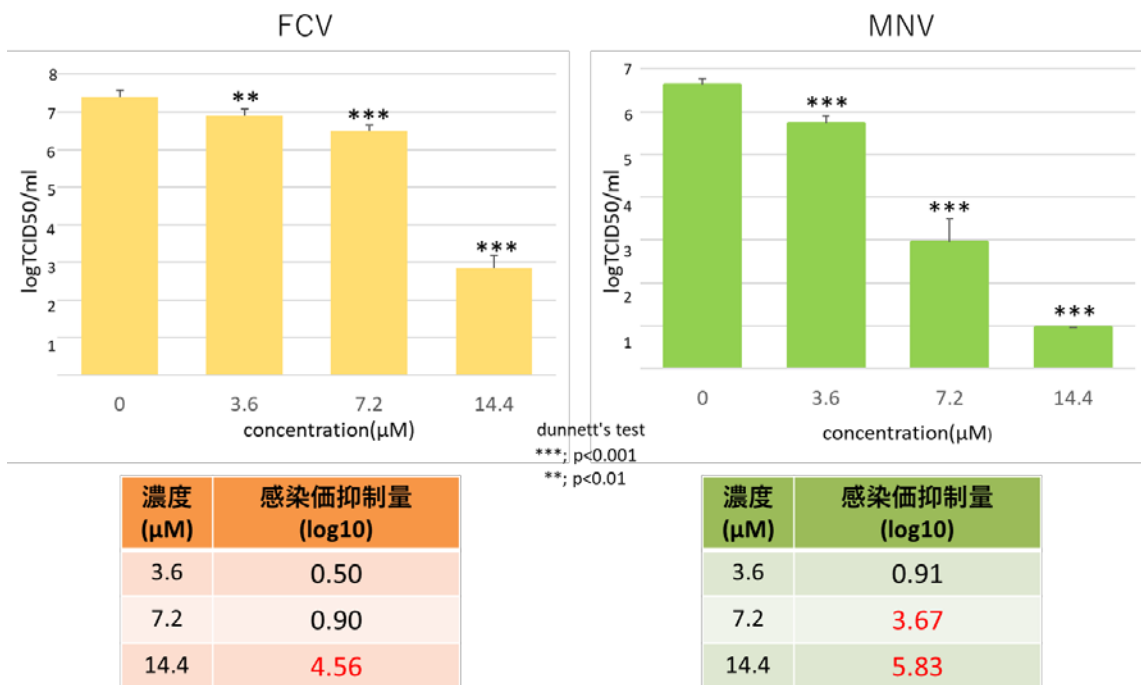


図4 化合物 A によるウイルス感染価抑制効果の測定結果