

した際に、リアルタイム PCR の定量範囲は 10 コピー以上と結論を出したことから考え、10 コピー未満の数値については真に陽性であるのか検討する必要があった。そこで、COG1F/G1SKR・COG2F/G2-SKR で 1stPCR を実施し、その産物を鋳型としてリアルタイム PCR を実施したところ結果は統一性が見られなかった。非常に小さいコピー数であるか、または陰性であっても 2ndPCR で検出される検体もある反面、10 コピー以上であっても 2ndPCR が陰性の検体もあった。数コピーのものについてリアルタイム PCR の増幅曲線を確認すると、明らかな指数関数的増幅を示している検体もあり、一概に陰性と判断できない例も見られた。小さいコピー数が陽性であるか否かの検討は今後の課題であろう。

同一の cDNA から再現性を検討した結果は 10 コピー未満の数値はしばしば陰性に入れ替わり、再現性が少ないようであった。しかし 10 コピー以上の数値の時にはある程度再現性が認められた。

次に、処理に用いる検体量及び抽出に用いる懸濁液の量の違いにより検出コピー数に差が生じるかを検討した。これには中腸腺 5 個を 1 検体として処理をする前に、それぞれの中腸腺から少量を採取し、個別に処理をすることにより実施した。少量の中腸腺はおよそ 10% 乳剤となるように蒸留水を加えたのち、凍結融解し、常温で攪拌した液を 10,000rpm. で 10 分遠心した上清 140 μ l および 560 μ l から RNA を抽出した。140 μ l から抽出

した場合は、中腸腺 5 個から抽出した検体と少量から抽出した検体のリアルタイム PCR で実際に得られたコピー数は生食用カキではほぼ同じであり、加熱用カキでは 5 個からの方が若干大きかった。しかし、5 個からの抽出では陰性であっても少量から抽出する方法では陽性となったカキも存在し、また、中腸腺 1g あたりのコピー数に換算すると、少量から抽出した方が 10^1 から 10^2 倍大きい数値となった。このことから、中腸腺 5 個を処理する過程でかなり RNA が失われた可能性や、何らかの PCR 阻害物質を濃縮してしまった可能性が推察され、5 個を処理するときにはホモジナイズを強く行なわないことがこの検査の要点と思われる。さらに 5 個の中腸腺を用いる時には夾雑物の存在が多いと考えられる時には RNA 抽出溶液を加えた後に、カラムにのせる前に 12,000rpm. 20 分間の遠心を行い、夾雑物を除去することが必要であると考えられた。少量の中腸腺から処理を行い、RNA 抽出に用いる量を 4 倍の 560 μ l に増やした場合には、10 コピー以上の場合には数倍に増加していたが、10 コピー未満では変化が見られなかった。また、現時点ではリアルタイム PCR で 10 コピー未満の結果が出た場合には陽性とは即断できないことから、より有効な検体処理方法の確立と 10 コピー未満の検体についての更なる検討が今後の課題であると考えられた。

表8-1 再現性の検討

sample No	Realtime PCR		リアルタイム PCR (再)		リアルタイム PCR (2nd)	
	G1	G2	G1	G2	G1	G2
21	-	4.42	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	2.87	-	-
24	-	-	-	-	-	-
25	-	7.74	0.11	4.04	-	-
26	-	-	-	-	1.8×10^7	-
27	7.88	4.71	-	-	-	6.7×10^5
28	-	6.57	-	-	-	-
29	-	6.82	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-
31	-	6.73	-	-	-	-
32	-	-	1.29	2.96	-	-
34	-	4.19	-	-	-	-
36	-	19.97	0.06	36.64	-	-
41	-	-	-	-	-	-
43	-	15.48	-	35.9	-	-
44	-	1.15	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-
51	-	-	-	-	-	-
52	-	7.78	-	-	-	-
61	-	2.36	-	-	NT	-
61-1	-	-	-	-	NT	-
61-2	-	-	-	1.98	NT	-
61-3	-	6.19	-	-	NT	-
61-4	-	-	-	-	NT	-
61-5	-	-	-	-	NT	-
61*-1	0.03	-	-	9.87	-	-
61*-2	-	5.4	-	-	-	-
61*-3	0.02	9.97	-	-	-	-
61*-4	-	7.08	-	-	-	-
61*-5	-	-	-	-	-	-

表 8-2 再現性の検討

sample No	Realtime PCR		リアルタイムPCR (再)		リアルタイムPCR (2nd)	
	G1	G2	G1	G2	G1	G2
62	—	—	—	—	NT	—
62-1	—	—	—	—	NT	—
62-2	—	—	—	—	NT	—
62-3	—	—	—	—	NT	—
62-4	14.79	—	—	—	NT	—
62-5	1.34	—	—	—	NT	—
62*-1	—	—	—	—	—	—
62*-2	—	5.54	—	18.86	—	—
62*-3	—	—	—	—	—	—
62*-4	—	—	—	—	—	—
62*-5	—	—	—	—	—	—
66*	0.02	20.8	—	18.49	1×10^4	1.3×10^6
66*-3	0.12	54.43	0.12	23.42	—	3.6×10^3
66*-4	0.67	81.33	1.51	70.7	1×10^4	—
67	3.28	440.12	0.81	141.85	NT	159.29
67*	0.21	94.25	0.02	49.09	—	3.7×10^4
68	—	—	—	—	NT	—
68*	0.01	—	0.17	1.91	—	—
69	—	3.26	NT	—	—	—
70	19.42	1.58	NT	0.53	1.4×10^4	—
71	3.35	—	NT	2.45	—	—
72	2.54	—	NT	1.28	—	7.8×10^3
73	—	—	NT	—	—	—
74	15.19	—	NT	—	2×10^3	—

表9 検体量別検出コピー数

カキNo	No	使用した 中腸腺数	中腸腺重 量(g)	添加PBS 量(ml)	使用した 上清の量	リアルタイム PCR			
						G1	copy/g	G2	copy/g
19	61	5	4.67	20	ppt 140	-		2.36	3.9×10^2
	61-1	少量	0.158	1	140	-		-	
	61-2	少量	0.142	1	140	-		-	
	61-3	少量	0.123	1	140	-		6.19	1.3×10^4
	61-4	少量	0.108	1	140	-		-	
	61-5	少量	0.1	1	140	-		-	
	61*	5	4.67	20	ppt 140	-		5.75	9.5×10^2
	61*-1	少量	0.158	1	560	0.03	1.2×10^2	-	
	61*-2	少量	0.142	1	560	-		5.4	2.4×10^3
	61*-3	少量	0.123	1	560	0.02	1.0×10^2	9.97	5.0×10^3
	61*-4	少量	0.108	1	560	-		7.08	4.2×10^3
	61*-5	少量	0.1	1	560	-		-	
20	62	5	5.96	20	ppt 140	-		-	
	62-1	少量	0.151	1	140	-		-	
	62-2	少量	0.078	0.7	140	-		-	
	62-3	少量	0.121	1	140	-		-	
	62-4	少量	0.152	1	140	14.79	4.5×10^3	-	
	62-5	少量	0.137	1	140	1.34	2.5×10^3	-	
	62*	5	5.96	20	ppt 140	-		-	
	62*-1	少量	0.151	1	560	-		-	
	62*-2	少量	0.078	0.7	560	-		5.54	3.2×10^3
	62*-3	少量	0.121	1	560	-		-	
	62*-4	少量	0.152	1	560	-		-	
	62*-5	少量	0.137	1	560	-		-	
23	66	5	4	20	ppt 140	4.43	1.4×10^2	252.92	5.0×10^3
	66-1	少量	0.061	0.7	140	0.2	5.9×10^2	5.52	1.6×10^4
	66-2	少量	0.098	0.7	140	1.64	3.0×10^3	181.65	3.3×10^5
	66-3	少量	0.163	1	140	0.59	9.3×10^2	12.13	1.9×10^4
	66-4	少量	0.12	1	140	1.35	2.9×10^3	25.23	5.4×10^4
	66-5	少量	0.097	0.7	140	4.87	9.0×10^3	41.85	7.8×10^4
	66*	5	4	20	ppt 140	0.02	-	20.8	4.0×10^2
	66*-3	少量	0.163	1	560	0.12	4.7×10^1	54.43	2.1×10^4
	66*-4	少量	0.12	1	560	0.67	3.6×10^2	81.33	4.3×10^4
	67	5	4	20	ppt 140	3.28	6.3×10^1	440.12	8.5×10^3
	67-1	少量	0.055	0.7	140	0.24	7.9×10^2	8.57	2.8×10^4
	67-2	少量	0.048	0.3	140	10.53	1.7×10^4	123.41	2.0×10^5
	67-3	少量	0.077	0.7	140	2.83	6.6×10^3	109.88	2.6×10^5
	67-5	少量	0.095	0.7	140	10.56	2.0×10^4	132.19	2.5×10^5

枝番号は主番号の中腸腺1個ずつを表す

C. 研究総括

NV によるリスク評価を行なう基礎データを得る目的で本研究を行なったところ、カキ関連食中毒事例から得られた原因食品と推定、あるいは疑いのカキからのウイルス検出では、約半数のカキから 1 個あたり 200 コピー以上のものが見られた。しかしリアルタイム PCR および PCR 共に陰性のものも 1/5 例に見られた。リアルタイム PCR と PCR の不一致についてはプライマー、PCR 条件等の要因の解明も必要である。

多くの事例では原因食品が得られなかったため検査材料の収集が出来なかった。今後如何に原因食品を確保するかが本研究のキポイントである。

リアルタイム PCR による市販カキの陽性率は 1 個あたり 200 コピー以上とした時に 15% から検出され、特に 1 月、2 月が陽性率並びに 1 個あたりの汚染数も多く、カキによる食中毒事例の発生時期とカキの汚染時期はよく一致していた。このことからカキの NV 汚染が NV による食中毒発生を引き起こしていると強く示唆される。

海域の海水の NV 汚染とカキの汚染は同時期では必ずしも関連性が見られなかった。すなわち、海水から NV が検出されていないに拘わらず、カキが NV に汚染されていることがしばしば認められた。また海水の NV 量が 20 日前に比べ 1/9 量に低下したにも拘わらず、カキのウイルス量は 3 倍に増加したことも見られた。このことはカキの中腸

腺でウイルスが蓄積されていることによると推察された。今後海水の汚染をどのように位置づけるかが問題であり、基本的には海水の NV 汚染の防止策が急務である。

また、同じ海域で養殖されているカキでも個体により NV 汚染はさまざまであり、海域での正確なカキの NV 汚染を知るための検体採取場所（海流、養殖場所、カキ筏の上、中、下）、検査すべきカキの個数等を決めるためのデータの蓄積が今後の重要な問題の一つである。

現時点ではリアルタイム PCR で低い価の結果が出た場合には再現性に問題があり、陽性とは即断できないことから、低い価の検体について取り扱いを含め診断法の確立について、更なる検討が課題である。

カキおよび海水からの NV 検出感度のより高い検査法の確立がカキの安全性確保のために不可欠である。

検査に際して処理するカキの数が多いと、ウイルス RNA が失われる、何らかの PCR 阻害物質を濃縮する可能性が推測され、結果として低い価となるものも見られた。従って、1 件として検査するカキの個体数についての検討も必要である。

上述の如く、カキにおける NV のリスク評価を行なうには多くの問題が残されている。それらの解明にはさらに規模を拡大して、取り組まないとリスク評価の基礎データを得ることは困難であると思慮される。

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

免疫捕獲 RT-PCR 法による食中毒推定原因食品からの
ノーウォーク様ウイルスの検出

分担研究者 武田直和 国立感染症研究所 ウイルス第二部

協力研究者 榮 賢司 愛知県衛生研究所 微生物部部长

協力研究者 小林慎一 愛知県衛生研究所 微生物部主任研究員

研究要旨 ノーウォーク様ウイルス(NLV)は未だ培養不能なウイルスである。食中毒の推定原因食品から NLV を検出するためには、多量の食品から NLV を濃縮して回収する必要があるため、その検出には困難な点が多い。そこで、NLV に特異的な抗体を結合した磁気ビーズを調製し、推定原因食品から NLV を回収した後、RT-PCR を実施し、NLV を検出することを試みた。食中毒患者の糞便検体を用いた RT-PCR と抗原検出 ELISA の検査成績から、Chiba 型 NLV の関与が推定された食中毒事件において、本法で NLV の検出をおこなったところ、残品食品 9 品目のうちの 2 品目から NLV 遺伝子を検出することができた。また、遺伝子解析の結果、食中毒患者糞便と食品に由来する NLV は互いに極めて近縁な NLV であることが確認された。磁気ビーズを利用した免疫捕獲 RT-PCR 法は、多数の検体の迅速処理が可能であり、かつ簡便な NLV の検出法として食中毒検査には有用な方法であると考えられた。

A. 研究目的

平成 9 年 5 月に食品衛生法施行規則が改正され、新たにウイルスが食中毒の病因物質として追加指定された。これに伴って、ウイルス感染が疑われる食中毒事例及び食中毒症状を有する苦情事例については、行政的ウイルス検査が実施されることとなった。平成 12 年の食中毒統計によると、全国で 240

件のウイルス性食中毒が発生し、その内の 238 件(99.2%)がノーウォーク様ウイルス(NLV)に起因する食中毒事件であった。同様な報告は米国やオランダからもされており、いまや NLV は非細菌性食中毒の主要な病因物質として位置づけられるようになった。NLV による食中毒を予防し、その対策を講じてゆくためには本ウイルスの感染源

および感染経路を解明することが必須である。

NLV は未だ分離培養のための培養細胞系や実験動物系が確立されていないウイルスである。したがって、今日においても NLV の検出検査には RT-PCR 法を持ちいらざるを得ない状況にある。RT-PCR 法を用いることで、食中毒患者、調理人の便材料からのウイルス検出は効率よく、かつ迅速に行う体制は整ってきた。しかしながら食品等からの NLV の検出に関しては、NLV が調理食品や食材の中では増殖しないこと、したがって含まれるウイルス量が低いこと、さらに効率的な回収法がないなどの理由によって、カキをはじめとする二枚貝からの検出以外の推定原因食品から病原体を検出することは、多量の食品を処理しても今だ不可能な状態であるといわざるを得ない。

近年、遺伝子型の異なる NLV からバキュロウイルス発現系を用いてウイルス様中空粒子(Virus-like Particles : VLPs)の作製が可能となったことに伴い、VLPs に対する抗体も得ることができるようになった。そこで、食品から迅速、簡便に、かつ選択的に NLV を回収することを目的として抗 NLV 抗体を結合した磁気ビーズを用い、一食中毒事例における推定原因食品からの NLV 遺伝子検出を試み、免疫捕獲 RT-PCR 法を用いた NLV 検出法の可能性について検討した。

B. 研究方法

1. 材料

平成 13 年 2 月 27 日、愛知県内で給食弁当による集団食中毒が発生し、喫食した互いに関連の無い 11 か所の事業所 736 名の従業員うち、52 名(7.1%)が 2 月 28 日から 3 月 2 日にかけて、腹痛、下痢、発熱、嘔吐などの食中毒症状を訴えた。このうちの胃腸炎患者 9 名から糞便 9 検体を採取した。また、弁当の残品 9 品目を使用した。

2. 糞便検体からの NLV 検出

□RT-PCR

糞便検体を滅菌精製水で 10%乳剤とし、10,000rpm、20 分遠心分離後、その上清から Trizol LS Reagent (Gibco BRL)を用いて RNA を抽出した。抽出 RNA、Oligo(dt)15 プライマー (Promega)、Random プライマー(Takara)、Moloney murine leukemia virus 逆転写酵素(Gibco BRL)を用い、37℃、1 時間の反応させて cDNA を調製した。PCR 反応は、NLV の構造タンパク領域を増幅するプライマーを使用し、反応条件は 94℃ 30 秒、50℃ 30 秒、72℃ 1 分の 40 サイクルとした。PCR 産物の検出は、1.5%アガロース電気泳動で分離後、エチジウムブロマイド染色して 320bp のバンドの有無を確認した。また、PCR 産物を p GEM-T Vector にクローン化後、オートシーケンサー(LI-COR, model 4000)で塩基配列を決定した。

② 抗原検出 ELISA

組換えバキュロウイルスで発現した 7 種類の VLPs に対するウサギ抗血清を捕獲抗

体とし、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗 NLV 抗体(7 種)を検出抗体とするサンドイッチ型 ELISA を用いた。7 種類の VLPs は Genogroup I(GI)の、rSeto (Norwalk-like virus)、rFunabashi (Southampton-like virus)、および rChiba の 3 種、Genogroup II(GII)は、rNarita (Grimsby-like virus)、rChitta (Hawaii-like virus)、r47 および r7 の 4 種である。

3. 抗 Chiba 型 NLV 抗体結合磁気ビーズ法
組換えバキュロウイルスで発現した rChiba をウサギに皮下接種して抗体を作製した。Dynabeads M-280 Sheep Anti-Rabbit IgG (ダイナル社)、約 1mg に対して精製抗 rChiba 抗体 50 μ g を室温で 1 時間反応後、0.1 % BSA を含む PBS (PBS/BSA)で 1mg/ml に調製した。

食品(10~15g)の表面を精製水 2.5ml で食品を洗い流した後、8,000rpm で 20 分間冷却遠心し、上清を回収した。ダイフロン 1ml を遠心上清に添加・混和した後、8,000rpm で 10 分冷却遠心した。上清を回収し、50 μ g の抗 rChiba 抗体結合磁気ビーズを 37℃で 1 時間反応させた後、PBS/BSA で洗浄した。回収した磁気ビーズを精製水 100 μ l に懸濁させた後、Trizol 試薬 300 μ l で RNA を抽出した。以下、糞便検査と同様の方法で RT-PCR を実施した。

C. 研究結果

1 糞便検体からの NLV 検出

GI NLV、GII NLV、それぞれに特異的なプライマーを用いて PCR を実施した結果、糞便 9 検体のうち 6 検体(66.7%)が GI 特異的プライマーで陽性となった。得られた PCR 産物を遺伝子解析したところ、6 検体ともに GI の Chiba 株に近縁な NLV であった。また、抗原検出 ELISA で検査した結果、PCR 陽性の 6 検体が全て Chiba 株陽性として検出され、遺伝子型の分類と完全に一致する結果が得られた。

2 推定原因食品からの NLV 検出

食中毒の原因施設で収去された弁当の残品 9 品目について、抗 rChiba 抗体を結合した磁気ビーズを利用して NLV を濃縮・回収した後、RT-PCR を実施した。その結果、ロールキャベツとカレーマカロニの 2 品目から NLV 遺伝子が検出された。そこで、患者由来の NLV 遺伝子を基にして作製したプローブを用いてサザンブロッティングを行なったところ、プローブは食品由来の PCR 陽性産物 2 検体と特異的に反応することが確認された。

食品由来の PCR 産物をクローニング後、その塩基配列を決定し、食中毒患者由来の NLV 遺伝子との系統樹解析を行なった結果、食品由来の NLV と患者由来の NLV とも互いに相同性が高いウイルスであり、また、いずれの NLV も Chiba 株に近縁な NLV であることが明らかとなった。

D. 考察および結論

NLV に対する特異抗体を結合した磁気

ビーズを用いることで、食中毒の原因と推定された残品食品から迅速、かつ簡便に NLV を検出する系を確立することがた。バキュロウイルス発現系を利用した VLPs の作製、それを用いた抗体の作製、その抗体を用いた抗 NLV 抗体結合磁気ビーズの作製、さらに RT-PCR 法による NLV の検出、という一連の流れが有機的にかみ合っ、極端にウイルス量の少ない食品からも NLV の濃縮、精製、回収が可能となり、その結果として、食品中の NLV の検出がはじめて可能になった。画期的な成果といえる。しかしながら、NLV は抗原的多様性の大きいウイルスであることから、すべての型の NLV 検出に必要な抗体の数やその組み合わせについて、今後更なる検討を加える必要があるものと考えられる。また、現時点においては食品からの定性的な検出結果であるので、今後は食品中の NLV 汚染量を把握するために NLV の定量的検出法の検討が必要と考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

- Ishiko H, Shimada Y, Yanoha M, Hashimoto O, Hayashi A, Sakae K, Takeda N: Molecular diagnosis of human enteroviruses by phylogeny-based classification using the VP4 sequence. *J. Infect. Dis.* 2002;in press.
- Kojima S, Kageyama T, Fukushima S, Hoshino FB, Shinihara M, Uchida K, Natori K, Takeda N, Katayama K: Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods* 2002;100: 107-114.
- Utagawa ET, Nakazawa E, Matsuo K, Oishi I, Takeda N, Miyamura T: Application of an automated specimen search system installed in a transmission electron microscope for the detection of caliciviruses in clinical specimens. *J. Virol. Methods* 2002;100: 49-56.
- Li T-C, Takeda N, Miyamura T: Oral administration of hepatitis E virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice. *Vaccine* 2001;19: 3476-3484.
- Lin K-H, Chern C-L, Chu P-Y, Cheng C-H, Wang H-L, Sheu M-M, Huang W-L, Pongsuwanna Y, Yamamoto S, Yoshino S, Ishiko H, Takeda N: Genetic Analysis of of Recent Taiwanese Isolates of a Variant of Coxsackievirus A24. *J. Med. Virol.* 2001;64: 269-274.
- Magden J, Takeda N, Li T, Auvinen P, Ahola T, Miyamura T, Merits A, Kaariainen L: Virus-Specific mRNA Capping Enzyme Encoded by Hepatitis E Virus. *J Virol* 2001;75: 6249-55.
- Niikura M, Takamura S, Kim G, Kawai S, Saijo M, Morikawa S, Kurane I, Li T-C, Takeda N, Yasutomi Y: Chimeric

- recombinant hepatitis E virus-like particles as an oral vaccine vehicle presenting foreign epitopes. *Virology* 2001; in press.
- Sasaki J, Kusuhara Y, Maeno Y, Kobayashi N, Yamashita T, Sakae K, Takeda N, Taniguchi K: Construction of an infectious cDNA clone of Aichi virus (a new member of the Family Picornaviridae) and mutational analysis of a stem-loop structure at the 5' end of the genome. *J. Virol.* 2001;75: 8021-8030.
- Sheikh S, Sugitani M, Kinukawa N, Moriyama M, Arikawa Y, Komiyama K, Li T-C, Takeda N, Ishaque SM, Hasan M, Suzuki K: Hepatitis E virus infection in fulminant hepatitis patients and apparently healthy population in Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg* 2001;in press.
- Tanaka E, Takeda N, Li T-C, Orii K, Ichijo T, Matsumoto A, Yoshizawa K, Iijima T, Takayama T, Miyamura T, Yoshizawa K: Seroepidemiological study of hepatitis E virus infection in Japan using a newly developed antibody assay. *J. Gastroenterol.* 2001;36: 317-321.
- Someya Y, Takeda N, Miyamura K: Molecular cloning of the Chiba virus genome and functional expression of the 3C-like protein in *E.coli*. 6th International Symposium on Positive Strand RNA Viruses, Paris, France, 2001 May 28 - June 2.
- Takeda N, Suzaki Y, Ami Y, Li T, Miyamura K: Recombinant hepatitis E virus-like particles as an oral vaccine. 6th International Symposium on Positive Strand RNA Viruses, Paris, France, 2001 May 28 - June 2.
- Tanaka TN, Natori K, Kamada K, Kitamoto N, Utagawa E, Saito H, Shinozaki K, Okada M, Sakae K, Kobayashi S, Sawatari M, Nishi K, Yamasaki K, Seto Y, Hamano M, Oseto M, Matsuoka Y, Jiang X, Estes MK, Takeda N: Evaluation of a Norwalk-like virus antigen ELISA based on genogroup-specific monoclonal antibodies : A multi-institutional analysis. Thirty-Fifth Joint Working Conference on Viral Diseases, US-Japan Cooperative Medical Science Program, Honolulu, USA, 2001, August 7-9.
- Someya Y, Takeda N, Miyamura K: Molecular cloning of the Chiba virus genome and functional expression of the 3C-like protein in *E.coli*. Thirty-

2. 学会発表
国際学会

Fifth Joint Working Conference on
Viral Diseases, US-Japan Cooperative
Medical Science Program, Honolulu,
USA, 2001, August 7-9.

国内学会

食品中のノーフォークウイルスの検出—磁
気ビーズを用いた Immunocapture RT-
PCR 法の試み—。小林慎一、榮 賢司、
第 42 回日本臨床ウイルス学会、名古屋、
2001

ウイルス様中空粒子を用いた HIV 経口ワ
クチンの開発。高村史記、新倉昌浩、武
田直和、宮村達男、保富康宏。第 49 回
日本ウイルス学会総会、大坂、2001 11
月。

磁気ビーズを利用した RT-PCR による食
品からのノーフォークウイルスの検出。

小林慎一、榮 賢司、鎌田公仁夫、佐藤
俊則、名取克郎、武田直和。第 49 回日
本ウイルス学会総会、大坂、2001 11 月。

河川水から検出された NV の遺伝子解析。

植木 洋、有田富和、後藤郁男、佐藤千
鶴子、沖村容子、白石廣行、秋山和夫、
橋本 修、石古博昭、武田直和。第 49
回日本ウイルス学会総会、大坂、2001 11
月。

Norwalk virus ゲノムリコンビネーション
の解析。影山 努、小嶋慈之、福士秀悦、
星の文則、片山和彦、武田直和。第 49
回日本ウイルス学会総会、大坂、2001 11
月。

病院内で発生した集団胃腸炎事例での
NLVs 核酸検出及び抗体価測定。関根雅
夫、志田美奈子、勝見正道、熊谷正憲、
早川安彦、吉田菊喜、小山由紀子、佐藤
牧人、末武光子、遠藤廣子、名取克郎、
武田直和。第 49 回日本ウイルス学会総
会、大坂、2001 11 月。

単クローン抗体によるリコンビナントカリ
シウイルス粒子の共通エピトープの解析。
北元憲利、武田直和、名取克郎、田中智
之。第 49 回日本ウイルス学会総会、大
坂、2001 11 月。

新しいノーフォーク様ウイルス抗原検出
ELISA 法の確立とその実用例。岩上泰
雄、田中智之、鎌田公仁夫、内野清子、
吉田永祥、北元憲利、名取克郎、武田直
和。第 49 回日本ウイルス学会総会、大
坂、2001 11 月。

動物細胞におけるノーフォーク様ウイルス
中空粒子形成。田村 克、名取克郎、武
田直和、宮浦達男。第 49 回日本ウイル
ス学会総会、大坂、2001 11 月。

チバウイルス 3C 様プロテアーゼの活性中
心アミノ酸残基の同定。染谷雄一、武田
直和、宮村達男。第 49 回日本ウイルス
学会総会、大坂、2001 11 月。

Norwalk-like viruses のキャプシド蛋白質、
抗 Norwalk-like viruses 抗体遺伝子を
それぞれ発現する組換え植物の作出。松
村 健、一町田紀子、杉本千尋、大橋和
彦、李成一、上田一郎、伊藤敬三、恒光 裕、
武田直和、田中智之。第 49 回日本ウイ

ルス学会総会, 大坂, 2001 11 月.

E 型肝炎ウイルス組換え中空粒子の経口投与による感染防御抗体の誘導。李 天成、網 康至、須崎百合子、武田直和、宮村達男。第 49 回日本ウイルス学会総会, 大坂, 2001 11 月.

ヒトライノウイルスの系統解析による迅速同定。三浦里香、武田直和、山崎修道、石古博昭。第 49 回日本ウイルス学会総会, 大坂, 2001 11 月.

[Overview : ピコルナウイルス]遺伝子の多様性と病原性。武田直和。第 49 回日本ウイルス学会総会, 大坂, 2001 11 月.

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

小型球形ウイルス（NLVs）の患者からの検出動向

分担研究者 岡 部 信 彦
協力研究者 松 野 重 夫
山 下 和 予
吉 川 昌 江
(国立感染症研究所・
感染症情報センター)

はじめに

最近まで、小型球形ウイルス（NLVs）は食中毒の原因と思われる食材から検出出来なかったため、食中毒との因果関係を特定することが出来ず、「その他の病因物質」として取り扱われてきた。1997年5月30日に食品衛生法施行規則が一部改正施行され、新しく食中毒の原因物質にNLVsとその他のウイルスの項目が追加された。これ以降の非細菌性の食中毒については、都道府県や政令指定都市などの衛生研究所においてウイルス検査を行ない、厚生省に報告する制度が確立されました。一方、1997年1月から地方の衛生研究所と国立感染症研究所感染症情報センター間の病原体検出報告の収集還元がオンライン化され、これを契機にウイルス性食中毒発生の実態を明らかにするため、「ウイルス起因を疑う胃腸炎集団発生事例別情報」の収集が開始された。この情報には食品媒介事例のみならず、ウイルスの人→人感染による集団発生の報告も含まれている。

感染性胃腸炎発生数

図1に過去10年間に感染症週報に記載された1定点当りに報告された週別の感染性胃腸炎患者数を示した。毎年43週（10月）頃に増加し50週頃ピークになる。その後、5～10週に少し増加し、20週頃終息に向かう。病原体検出情報の結果から流行の後半はロタウイルス流行と重なっていると思われる。

週別NLVs検出報告数

図2は病原微生物検出情報に記載された過去3シーズンに各都道府県から報告されたNLVsの検出数のグラフである。検出法は旧来は電子顕微鏡で検出する方法が主であったが、現在はRT-PCR法が主になっている。PCR後はハイブリダイゼーションやシーケンスを行って遺伝子のグループ分けを行なっている。検出数はやはり毎年43週頃に増加し50週頃ピークになる。そして、12週頃終息に向かう。1998～2000のシーズンはあまり流行は無かったが、2000～1年の

シーズンは中規模の流行があった。2000～1年と2001～2年に検出されたNLVsのgenogroupの内訳をグラフに示したのが図3である。2000～1年シーズンはgenogroupを決定出来ないものが多いがグループを決定するはハイブリダイゼーションかシーケンスを実施してくてはならないので未分類が多いものと思われる。2001～2年に未分類が減少したのは各衛生研究所でハイブリダイゼーションやシーケンスが実施可能になった為と思われる。両シーズンともgenogroup IIがドミナントである。

NLVsによる食中毒事件の発生状況

厚生労働省の食品衛生審議会・食中毒部会資料によるとNLVsによる食中毒事件発生状況は平成10年は総数で123事件、患者数5213人、平成11年は116事件、患者数5217人である平成12年は総数で245事件、患者数8080人、平成13年は268事件、患者数7335人である。表1に月別の事件数と患者数を示した。その表から12～3月の冬期に集中している事が判明した。図1の感染性胃腸炎の患者の発生は10月頃に増加する事と比較して、乳幼児や小児に散発例が先行して発生して、その後、食中毒事件や集団発生が起これと思われる。平成13年の食中毒事件の原因施設別発生状況は飲食店159件患者数3575人（46%）、旅館45件患者数1327人（19%）、仕出屋12件1066人（15%）、学校〔給食施設等〕5件495人（7%）、事業場〔給食施設〕10件302人（4%）などである。

また、平成13年の原因食品別発生状況は表2に示した。やはりカキが原因の事件が半数を占めている。生カキによるNLVsの食中毒には2枚貝の生態が深く関わっていると考えられている。2枚貝は呼吸や餌を捕食の為に大量の海水を通過させる。この時、NLVsによる胃腸炎患者から排泄されたNLVsを含む糞便や吐物が污水处理場で処理されないまま河川を経由して、2枚貝の養殖海域に流れ込んだ場合、プランクトンなどの餌と共にカキの中腸腺に取り込まれ、やがて人に摂取されると考えられます。

そのほか、給食や仕出し弁当、宴会料理などが原因となる場合は、調理人が不顕性感染していた場合、調理人の家族がNLVsに感染している場合、調理人の手を経由して料理が汚染される。調理に使用した水が汚染されていたことなども原因と考えられる。

また、老人ホーム、介護施設、幼稚園や小学校での発生の場合は、食品を介してではなく、汚物を介して人から人に直接感染する事が考えられる。

NLVs食中毒事例

平成13年に病原微生物検出情報に記載された各地方衛生研究所から

寄せられたNLVs食中毒事例〔国内情報〕をいくつか紹介しておく。
資料1， 2， 3， 4。

図 1 . 過去 10 年間の感染性胃腸炎の週別発生数の比較

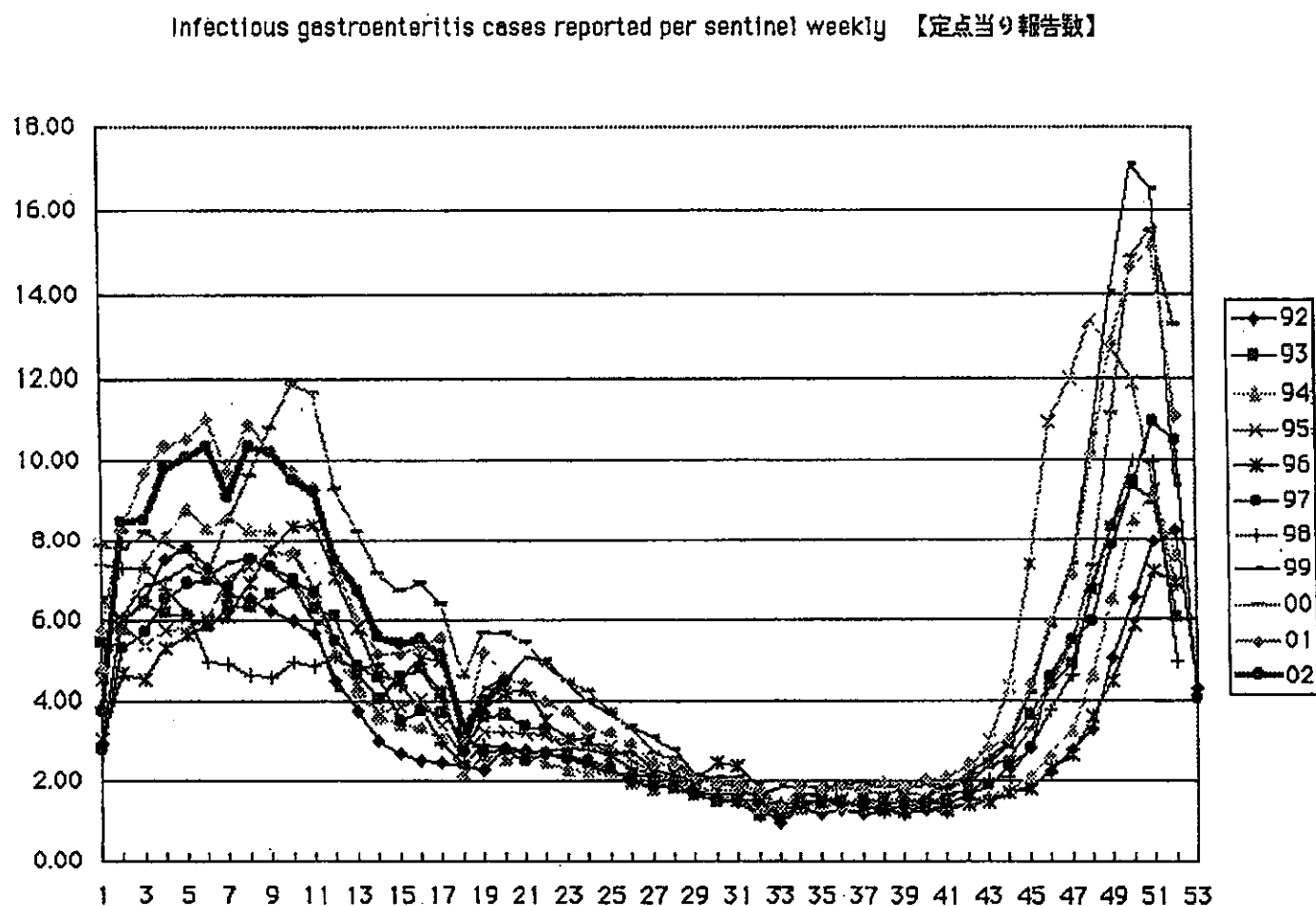
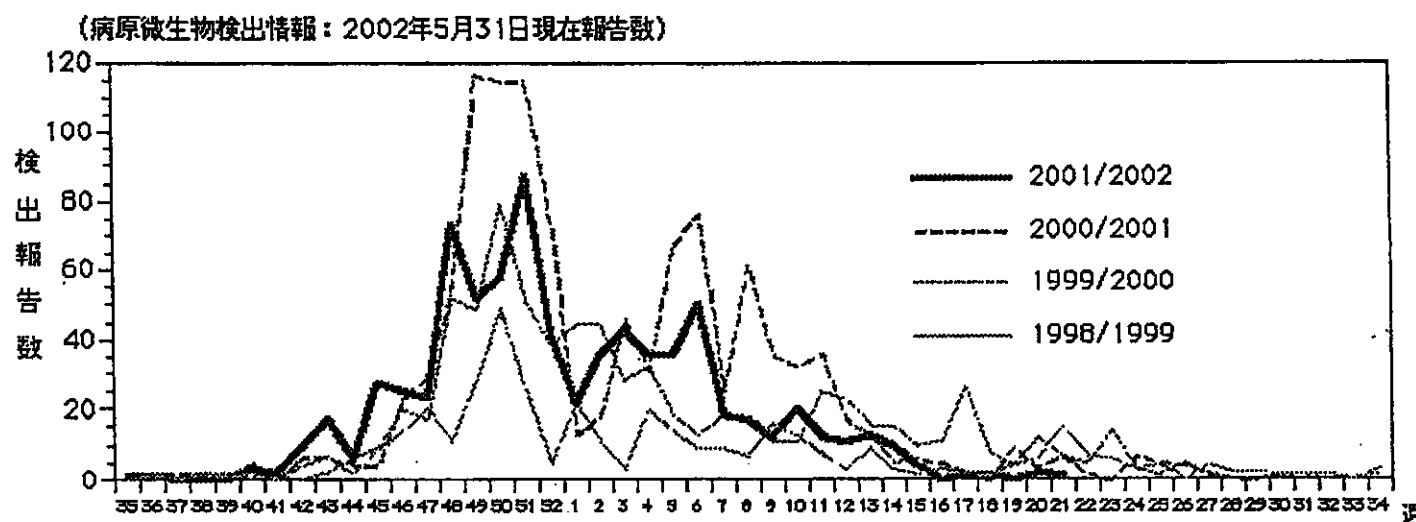


図2. 週別NLVs検出報告数の過去3シーズンとの比較
(1998/1999-2000/2001-2001/2002)

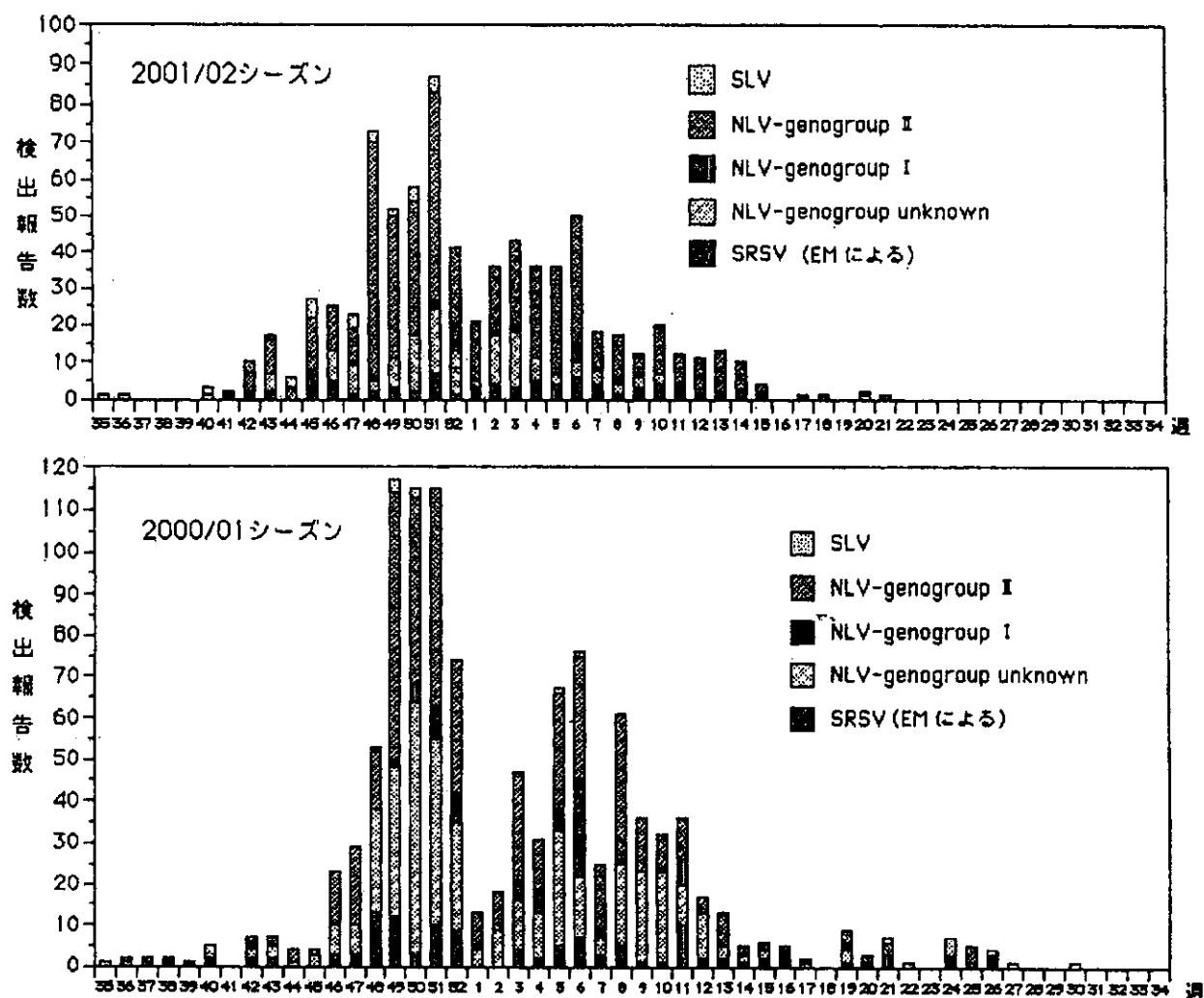


各都道府県市の地方衛生研究所からの検出報告を図に示した。



Infectious Agents Surveillance Report

図3. 検出されたSRSVの内訳（2000／2001－
2001／2002）



各都道府県市の地方衛生研究所からの検出報告を因に示した。

JASR

Infectious Agents Surveillance Report

表 1. ノーウォーク様ウイルス (NLVs) による食中毒事件の月別推移 (平成10年～13年)

	1月		2月		3月		4月		5月		6月	
	事件	患者	事件	患者	事件	患者	事件	患者	事件	患者	事件	患者
平成10年	47	982	16	881	16	329	2	54	9	1632	1	32
平成11年	12	594	17	512	12	736	12	261	5	475	3	180
平成12年	70	1846	45	1163	45	1541	13	410	4	424	4	133
平成13年	87	1747	71	1462	25	807	9	465	7	150	5	149

	7月		8月		9月		10月		11月		12月		総数	
	事件	患者	事件	患者	事件	患者	事件	患者	事件	患者	事件	患者	事件	患者
平成11年	1	9	0	0	0	0	3	172	9	360	19	762	123	5213
平成11年	2	137	2	200	0	0	3	112	10	424	38	1586	116	5217
平成12年	3	60	0	0	3	41	3	264	10	563	45	1635	245	8080
平成13年	2	43	0	0	1	11	5	120	14	799	42	1562	268	7335

表 2. ノーウォーク様ウイルス (NLVs) による
食中毒事件の原因施設別発生状況 (平成 13 年)

原因施設種別	事件数(件)	患者数(人)
飲食店	159	3575
旅館	45	1327
仕出屋	12	1066
事業場(給食施設等)	10	302
家庭	10	40
学校(給食施設等)	5	495
その他	3	145
病院(給食施設)	3	116
採取場所	1	1
不明	20	268
合計	268	7335

