

GI を特異的に認識する NV#3912 抗体、また GII を特異的且つ広範囲に認識する NS#14 抗体を用いた。検出抗体には、武田らの作製したウサギ高力価家兎免疫血清、GI には r124, r258, rCV, r645 の 4 血清、 GII には r104, r809, r18-3, r336, r754, r1876, r485, r47, r7K, r10-25 の 10 血清を用いた。

## 2. 非特異反応の検討

NV 抗原検出 ELISA 法の問題点を次の三つの方法にて検討した。

### a) 臨床糞便検体の酸処理による反応性の検討

糞便検体は、採取された時期にもよるが、sIgA を主とする、腸管内に存在する NV 特異抗体がウイルス表面に反応していることが考えられる。そこで、材料を酸処理し、抗体の解離を試みた。具体的には、検体を pH3.0 で一時間反応後、pH7.0 に還元し ELISA 法にて測定した。

### b) 糞便検体、ウイルス様粒 (VLPs) のアルカリ処理による反応性の検討

ウイルスカプシド蛋白を、アルカリ処理し、分解されたカプソマーの反応性を検討した。

具体的には、pH7.0, pH8.0, pH9.0, pH10.0 の検体処理バッファーを作製し、これらを用いて糞便を通常の処理方法で処理し ELISA 法にて測定した。VLPs は、r-Norwalk virus (rNV), r-Mexico virus (rMX), r-Snow Mountain virus (rSMV), r-Glimsby virus (rGV), r-Sapporo virus (rSV) を用いた。rNV, rSMV, rGV について

は Dr. Estes, rMX については Dr. Xi Jiang, rSV については中田博士(元札幌医科大学小児科学教室)より分与を受けた。

### c) Western blot 法による糞便中の反応蛋白の解析

ELISA 法にて測定した検体について、モノクローナル抗体との反応性を Western blot (WB) にて解析した。

糞便検体を処理後、型のごとく PAGE し、固相に使用せる GI、GII 特異モノクローナル抗体と反応させた。フィルム上に発光させ、現像後解析した。

## 3. 感染症事例における抗原検出 ELISA 法の評価

堺市において経験した感染症事例について、NV 抗原検出 ELISA 法の評価を行った。

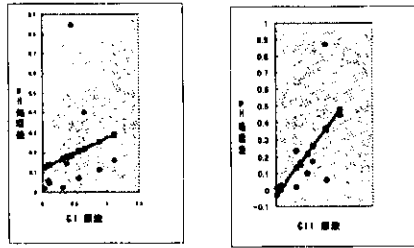
## 4. 新しい NV 抗原検出系 ELISA の構築

現行の ELISA 法は、検出抗体に免疫家兎血清を用いているが、家兎免疫血清作製には、経済性に欠けている。そこで、これまで作られたモノクローナル抗体から、NV#23 抗体を検出抗体としての反応性を検討した。細胞培養から無尽蔵に得られるモノクローナル抗体を用いることは、特異性のみならず経済性においても優れていると考える。固相抗体は、現行の NV#3912, NV#14 を用いた。

## C. 研究結果

### 1. a) 臨床糞便検体の酸処理による反応性の検討

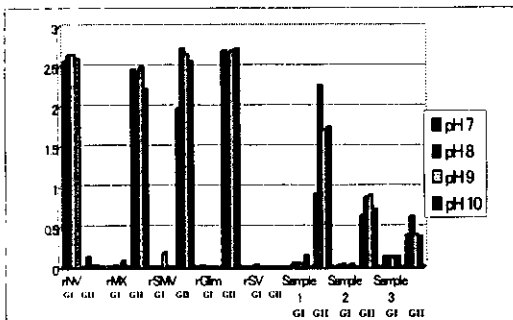
図 1 に示すように、pH 処理前後における OD 値の相関性は乏しかった。



pH処理による吸光度の変化 (検体はYari primer RT-PCR 陽性)  
 [ 検体pH3.0 → pH7.0に還元 → ELISA測定 ]

b) 糞便検体、ウイルス様粒 (VLPs) のアルカリ処理による反応性の検討

図 2 に結果を示す。VLPs についてはほとんど差は見られなかった。臨床検体については、pH8.0 処理に反応性が高くなる傾向がみられた。しかし、GI との反応性に変化は見られなかった。



検体処理bufferのpH変化によるVer2 ELISA反応動態

c) Western blot 法による糞便中の反応蛋白の解析

図 3.、図 4.、図 5 および図 6 に結果を示す。

用いた糞便検体の NV 抗原検出 ELISA 法および RT-PCR 法の結果は下記のとおりである。

NV-ELISA

	RT-PCR	GI index,	GII index
No. 77	(+)	0.1	2.5
No. 95	(+)	0.1	14.2
No. 97	(+)	0.1	9.9
No. 61	(-)	1.1	6.8
No. 80	(-)	0.2	7.1
No. 82	(-)	0.1	10.1
PC:	(+)	(+)	(+)
No. 84	(-)	0.1	1.7
No. 96	(+)	0.1	0.4
No. 40	(-)	0.01	0.01
No. 101	(+)	0.2	0.1

NV-VLPs は 20ng/lane を用いた。

図 3 は、GI 検出に用いる NV#3912 抗体との反応性を示した。

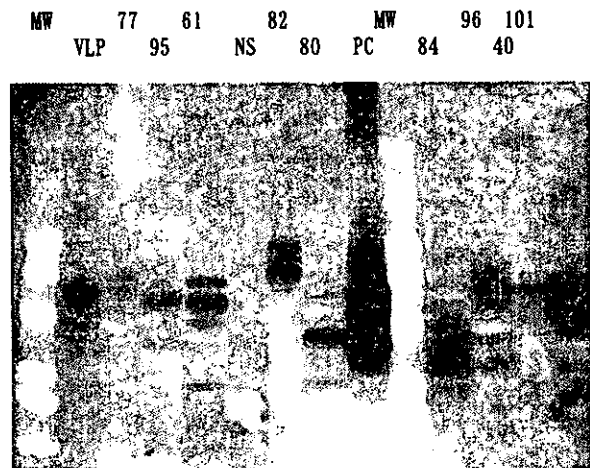


図 3 GI 特異的抗体との反応

NS: no sample loaded

図 4 には、GII 検出に用いる NV#14 抗体との反応性を示した。

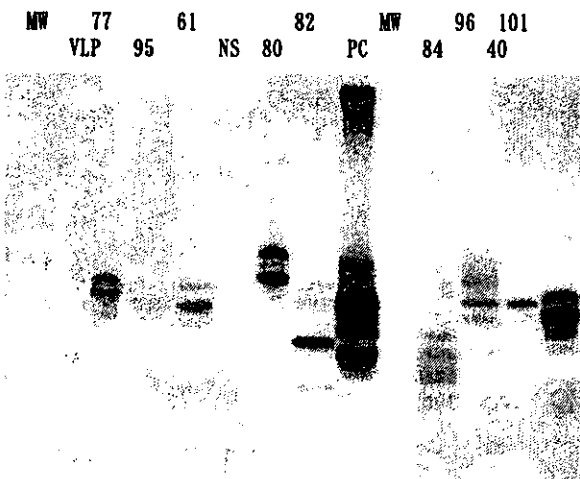


図 4 G II 特異的抗体との反応  
NS: no sample loaded

NV の VLP は WB では NV#14 に反応していないことが分かる。

NV#3912, NV#14 はいずれもマウス抗体である。そこでヒト糞便中蛋白のマウス IgG に対する反応性を検討し、図 5 に示した。

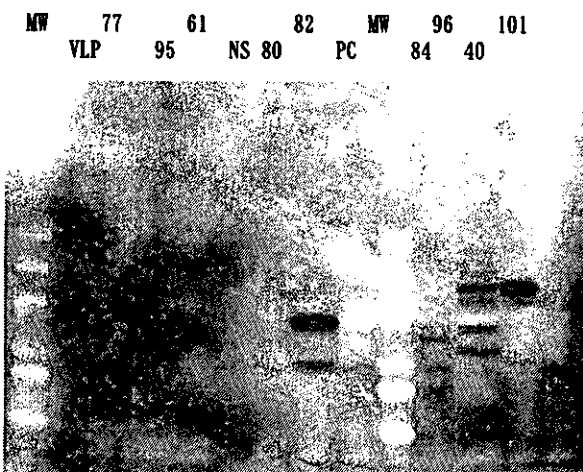


図 5 抗マウス IgG との反応性

検体番号 82, 84, 40, 101 では、非特異的反応がみられる。

また、検出系の抗体は、家兎 IgG で

ある。そこで、兎 IgG に対する反応性を検討した(図 6)。

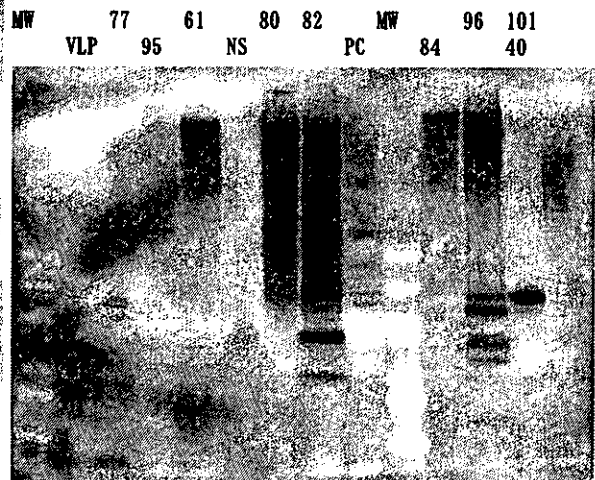


図 6 抗ウサギ IgG との反応

NS: no sample loaded

検体番号 80, 82, 96, 40 には非特異反応がみられ、その他にもマイナーな反応物が見られる。

以上の WB の結果から、ヒト糞便中には、NV 特異的モノクローナル抗体のみならず、正常マウス抗体、正常兎抗体に対する反応蛋白の存在が認められた。これらの蛋白は、NV 抗原検出 ELISA 法に見られる、非特異反応のひとつの要因と推測された。

## 2. NV 感染症事例での NV 抗原検出 ELISA 法の評価

平成 14 年 3 月 25 日に堺市内某学園で食中毒発生の通達があった。その時の時系列を示し、本衛生研究所の取った検査体制について紹介する。

3 月 25 日 10:00AM

保健所より発生事例通達

同日 11:30AM

9 検体搬入(吐物 1, 糞便 8)

ウイルス、細菌検査に 2 分割

同日 12:40

ELISA, RT-PCR、細菌検査開始

同日 16:40

ELISA 法の結果が判明し、糞便 5/8, 吐物 1/1 陽性であった。

この時点で、ELISA 法の結果として関係各部署に連絡した。続いて病原細菌検査の縮小を検討した。

翌 3 月 26 日 10:40

polymerase 領域 PCR 9/9 陽性

GI/GII 領域 PCR 9/9 陽性

と判明し、報告した。

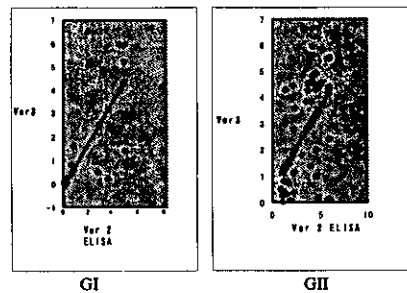
以上の結果から、この食中毒事例は NV が原因であると判断した。

細菌検査は縮小したが、検査に要する費用は総計 1,076,000 円であった。

### 3. 新しい NV 抗原検出系 ELISA の構築

検出用抗体に NV#23 を用いた成績を図 7 に示す。図中 Ver2 とは、現行の ELISA 法であり、Ver3 とは検出抗体にモノクローナル抗体 NV#23 を用いた新しい ELISA 法である。

使用した検体は、すべて RT-PCR 法陽性検体である。GI, GII いずれにおいても、3 検体が Ver3 より Ver2 で良い反応性が認められた。



抗原検出 ELISA Ver2, Ver3 の検出感度の比較  
(PCR 陽性検体を使用)

### D. 考察

すでに構築された NV 抗原検出 ELISA 法の感度の向上と、非特異的反応の原因を究明すべく、いくつかの点について検討を加えた。

まず、糞便検体の前処理であるが、反応性の sIgA を取り除く酸処理を試みたが、期待された成果は得られなかった。糞便中のウイルスを電子顕微鏡で観察した場合、ごく早期の検体を除いて、多くの検体には抗体の付着が認められる。pH3.0 は不十分な処理 pH なのか、今後の検討課題である。

次に、ウイルスカプシドを変性、カプソマーに解離する目的で、検体および VLPs のアルカリ処理を行った。糞便検体は pH8.0 処理で最も高い OD 値を示す傾向が見られた。しかし、解離しやすいと思われた VLPs に差が認められなかったのは、予想外であった。pH8.0 の糞便検体前処理バッファーを使用することは、今後の検体測定に一途の光を与えるものとする。今後、検体数を増やして、確認していく予定である。

一方、これまでの NV 抗原検出 ELISA 法では、RT-PCR 法との検出一致率は

約 69% であった。中でも ELISA (+) / PCR (-) の非特異的反応と考えられる率は 5% にみられた。

今回、ヒト糞便中のいかなる蛋白が、NV 特異的モノクローナル抗体に反応しているのかを検討したが、その結果からは、さまざまな蛋白質の反応が認められた。特に、固相系に用いられるマウス抗体、検出系に用いられるウサギ抗体との反応性も WB 法で認められた。これらの蛋白が、NV 抗原検出 ELISA 法での、非特異的反応生成物がある可能性は高い。この反応蛋白の由来は、現時点では明らかでないが、ELISA 法の非特異的反応を減少する意味でも解析は重要である。また、今後の ELISA 法においても、さらに構築中の新しい抗原検出 ELISA 法 Ver3 においても、正常マウス血清、正常家兎血清を糞便検体前処理バッファーに加えることは、意義ある事と考える。

現行の ELISA 法は、尚、改良点は残すものの、NV 感染症事例時でのスクリーニング検査として意義を持っている。我々のいくつかの事例においても、その意義が発揮された。とりわけ、食中毒事例では、細菌検査との平行検査が基本であり、ELISA 法での陽性率が 50% 以上であれば、病原細菌検査は不要と考えている。そのためには搬入される初期検体は、少なくとも 10 検体以上が必須である。

4 時間で貴重な消耗品費を無駄にするかしないかは、初期搬入検体の多寡に掛かっていると言っても過言ではない。

また、現行の NV 抗原検出 ELISA 法を診断的検査方法に昇格させるべき改良を重ねていかねばならないと考えている。

## E. 結語

NV 抗原検出 ELISA 法の構築とこの方法が感染症事例でのスクリーニング検査として、有効であることを述べた。さらに、ELISA 法の非特異的反応を減少する手段として、糞便検体の前処理バッファーを pH8.0 にすること、さらに前処理バッファーに正常マウス血清、正常ウサギ血清を加えることが、有効であることが推測された。

固相抗体、検出抗体いずれもマウスモノクローナル抗体を用いた新しい NV 抗原検出 ELISA 系は、向上すべき点はあるが、期待できる測定系である。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 内野清子、岩上泰雄、田中智之  
モノクローナル抗体による免疫学的検出法. 日本臨床 2002. 60 (6), 1188-1193
2. Kitamoto N, Tanaka T, Natori K, Takeda N, Nakata S, Jiang X and Estes.  
Cross-reactivity among several recombinant Calicivirus virus-like particles (VLPs) with monoclonal antibodies obtained from mice immunized

orally with one type of VLP.  
J. Clin. Microbiol. 2002.  
40 (7), 2459-2465

3. 田中智之、斎藤博之、原 みゆき、東方美保、武田直和. 嘔吐下痢症の対応と予防. 健 2003, 2, 42-44.

## 2. 学会発表

1. 岩上泰雄、内野清子、鎌田公仁夫、北元憲利、阪本瑠子、家永信彦、武田直和、田中智之  
小児下痢症の腸管内ウイルス重感染の可能性.  
日本臨床ウイルス学会、2002、秋田
2. 内野清子、岩上泰雄、三好龍也、吉田永祥、前田章子、田中智之、鎌田公仁夫、北元憲利、名取克郎、武田直和  
NLV 抗原検出 ELISA 法を用いた食中毒事例への対応と評価・問題点.  
日本ウイルス学会学術集会・総会、2002、札幌

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

下痢症ウイルスの検出法、予防法、汚染指標および疫学に関する研究

分担研究者 谷口孝喜 藤田保健衛生大学医学部教授

研究要旨

ロタウイルス感染の予防・治療を目的として、ヒト由来のファージ抗体ライブラリーから、ヒトロタウイルスを中和するヒト型モノクローナル抗体を分離した。得られた3種の抗体（1-2H, 2-3E, 2-11G）は、それぞれP[4]+P[8]、P[6]+P[8]、およびG1特異的であった。1-2Hおよび2-3E抗体はVP4を、2-11G抗体はVP7を認識した。FabフラグメントからIgG1分子へ変換後も、抗体の性状は変わらなかった。これらのヒト型抗体は、多様な血清型を示すほとんどのヒトロタウイルスを中和することから、その有用性が示された。

1) 研究目的

ヒトロタウイルス（HRV）感染により、開発途上国を中心に年間約80万人が死亡している。先進国においても、ほぼすべての乳幼児が感染・発症し医療経済的にも重要な疾患である。また、下痢症以外の疾患との関連も示唆されている。こうして、HRV感染の予防が急務であるが、有効なワクチン開発はなされていない。一方、抗体の経口投与による受動免疫、治療の効果が、ヒト、マウスにおいて確認されている。本研究では、ファージディスプレイ法により、ヒト由来のファージ抗体ライブラリーを利用して、多数のHRVに対して中和活性を有する抗体を3クローン調製したので報告する。G12血清型は、1990年にフィリピンの乳幼児で初めて検出されたが、それ以来、ヒトでも動物でもまったく検出されなかった。しかしながら、10年以上を経た2001年にタイの下痢患者から検出され、培養細胞での分離も成功した。このG12のヒトロタウイルスが、どのような変異の結果生じたかを、遺伝子の配列を決定することにより検討した。

2) 材料と方法

HRV KU株の精製ビリオンを抗原として、ヒトの扁桃腺、骨髄、臍帯血および末梢血から作製したファージ抗体ライブラリーからファージディスプレイ法により抗HRV抗体（Fab）を単離した。中和試験は、蛍光フォーカス減少法により、抗体のウイルス蛋白特異性は、バキュロウイルス発現系で調製したVP4、VP2/6およびVP2/6/7人工空粒子を用いたELISAにより行った。ヒト型IgG1への変換は、FabのV<sub>H</sub>およびC<sub>L</sub>V<sub>L</sub>領域をIgG1カセットにクローニングして行い、ヒト型IgG1分子は、このカセットを含むpCMV-Script発現ベクターをCHO-K1細胞にトランスフェクトして得た。

3) 結果

単離した321クローン中、中和活性を有する代表的な3クローン（1-2H, 2-3E, 2-11G）を選択した。ロタウイルスの表面蛋白質（中和抗原ないし感染防御抗原）は、VP4とVP7よりなるが、これら抗体のウイルス蛋白質特異性を調べたところ、1-2H抗体および2-3E抗体はVP4を認識し、2-11G抗体はVP7をそれぞれ認識した。ロタウイルスには、Gタイプ

が G1~G15 の 15 種、P タイプが P [1] ~ P [22] の 22 種存在するが、1-2H 抗体および 2-3E 抗体は、それぞれ P [4] と P [8] タイプおよび P [6] と P [8] タイプのヒトロタウイルス株に対して交叉反応性中和能を示した。一方、2-11G 抗体は、G1 タイプのヒトロタウイルス株を特異的に中和能した。これら 3 種の抗体について、Fab フラグメントから IgG1 分子へ変換したが、返還後も同様の中和活性を示した。

#### 【考察】

得られたヒト型抗体は、幅広いヒトロタウイルス株を中和することから、その有用性が高いと思われる。今後、各抗体に対する抵抗性変異株を作成して中和エピトープの解析を行うとともに、乳のみマウスを利用した *in vivo* での感染防御効果および下痢治療効果を検討したい。

研究協力者：守口匡子（藤田保健衛生大学医学部ウイルス・寄生虫学）、黒澤良和（藤田保健衛生大学総合医科学研究所免疫部門）

#### 5) 研究発表

##### 論文発表

Higo-Moriguchi K, Akahori Y, Iba Y, Kurosawa Y, and Taniguchi K.: Cross-reactive neutralizing monoclonal antibodies against human rotavirus recovered from phage-display library. (Submitted for publication)

Sasaki J, Taniguchi K: The 5' -end sequence of the genome of Aichi virus, a picornavirus, contains an element critical for viral RNA encapsidation. J Virol 77:3542-3548, 2003

Adah MI, Wade A, Oseto M, Kuzuya K and Taniguchi K: First detection of human group C rotaviruses in Nigeria and sequence analysis of their genes encoding VP4, VP6 and VP7 proteins. J Med. Virol 66:269-275, 2002

Pongsuwanna Y, Guntapong R, Chiwakul M, Tacharoenmuang R, Onvimala N, Wakuda M, Kobayashi N and Taniguchi K: Detection of a human rotavirus with G12 and P [9] specificity in Thailand. J. Clin. Microbiol. 40:13390-13394, 2002.

Adah M. I. Abel W., Oseto M., Kuzuya K., and Taniguchi K.: First detection of human group C rotaviruses in Nigeria and sequence analysis of their genes encoding VP4, VP6 and VP7 proteins. J. Med. Virol., 66:269-275, 2002

Takahashi K, Ohashi K, Abe Y, Mori S, Taniguchi K, Ebina T, Nakagomi O, Terada M, and Shigeta S.: Protective Efficacy of a Sulfated Sialyl Lipid (NMS03) against Human Rotavirus-Induced Diarrhea in a Mouse Model. Antimicrob Agents Chemother. 46:420-424, 2002



厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

食中毒原因食品からのノロウイルス検出の試み

分担研究者 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 愛知県の1事例と長野県の2事例、計3事例のノロウイルス(NV)に起因した食中毒事例において、食中毒の原因調査を目的に収去された推定原因食品からのNVの検出を試みた。愛知県と長野県のそれぞれ1事例については食品から抽出したウイルス溶液を超遠心機で濃縮する方法で、また、長野県の1事例では抗NV抗体を結合した磁気ビーズを用いて食品からNVを回収する方法でNVの検出検査を実施したが、今回調査した3事例の食中毒原因食品からNVを検出することはできなかった。磁気ビーズを用いて食品からNVを回収する方法は簡便であるが、抗原的に多様性のあるNVを回収するためには、複数の抗体を準備する必要があると考えられた。

A. 研究目的

平成9年5月の食品衛生法の改正で、食中毒の病因物質としてウイルスが追加指定されたことに伴い、ウイルス感染が疑われる食中毒および食中毒症状を有する苦情事例について行政的ウイルス検査が実施されている。厚生労働省の食中毒統計によると、平成13年のウイルス性食中毒の発生件数は270件(食中毒事件総数の14.0%)、患者数7371人(患者総数の14.8%28.5%)となっている。ウイルス性食中毒の病因物質として、小型球形ウイルス(small round structured virus, SRSV) …その多くはノロウイルス(NV)であるので以

下ではNVとする…、A群およびC群ロタウイルス、アストロウイルスおよびA型肝炎ウイルスなどが挙げられるが、この3年間に発生したほとんどすべての食中毒事例がNVに起因するものであり、NV以外のウイルスが原因とされる事例は3件のみとなっている。しかしながら、NVは培養できないウイルスであることから、電子顕微鏡法(電顕法)に代わる迅速・簡便かつ高精度の検査法としてreverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)が開発されてきた。

このRT-PCR法を用いることで、食中毒患者からのNV検出は、比較的容

易となってきたが、食中毒の感染源および感染経路の究明には推定原因食品や環境由来検体からの病原体の検出も必要である。今回我々は、NVに起因した食中毒の原因として推定された食品からのNV検出を試みた。

## B. 研究方法

### 1 材料

平成14年12月に愛知県で発生した食中毒1事例と14年11月と12月に長野県で発生した食中毒2事例、計3事例から収去された推定原因食品を検査材料とした。

### 2 糞便検体からのNV検出検査

#### ① NV遺伝子検出法(PCR法)

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QIAamp Viral RNAキット(Qiagen)を用いてRNAを抽出した。One step RT-PCRキット(Invitrogen)を使用してNVの構造タンパク領域を増幅するプライマーで逆転写反応とPCR反応を行った。PCR反応条件は94℃ 15秒、55℃ 30秒、68℃ 1分の35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にて3500bpのバンドの有無を確認した。また、PCR産物をpGEM-T Vectorに組み込むことでクローニングを行なった後、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

糞便検体中のNVのELISA法による

検出。デンカ生研社製のSRSV抗原検出キットを使用し、添付文書に従ってNVの検出検査を行った。

### 3 抗NV抗体(NS#14)結合磁気ビーズの調製法

Dynabeads M-450 Sheep Anti-Mouse IgG (ダイナル社)約1mgに対してマウス腹水(NS#14抗NVモノクローナル抗体、堺市衛生研究所の田中智之博士より分与)100 $\mu$ l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。

### 4 磁気ビーズを用いたRT-PCRによる食品からのNV検出法

食品(10~15g)の表面を精製水8mlで食品に付着するウイルスを洗い流した後、8000rpmで20分間冷却遠心後、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、8000rpmで10分冷却遠心した。上清を回収し、50 $\mu$ gのNS#14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 $\mu$ lに懸濁させた後、Trizol試薬300 $\mu$ 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。検査法の概要を図1に示した。

### 5 超遠心機を用いた食品からのNV検出法

磁気ビーズ法と同様の方法で食品からのウイルス抽出液を調製し、ダイフロン処理した。ウイルスの抽出液を35000rpm、2.5時間遠心後、沈殿物を精製水100 $\mu$ lに懸濁した。以下、磁気ビーズ法と同様の方法で

RT-PCRを行った。検査法の概要を図2に示した。

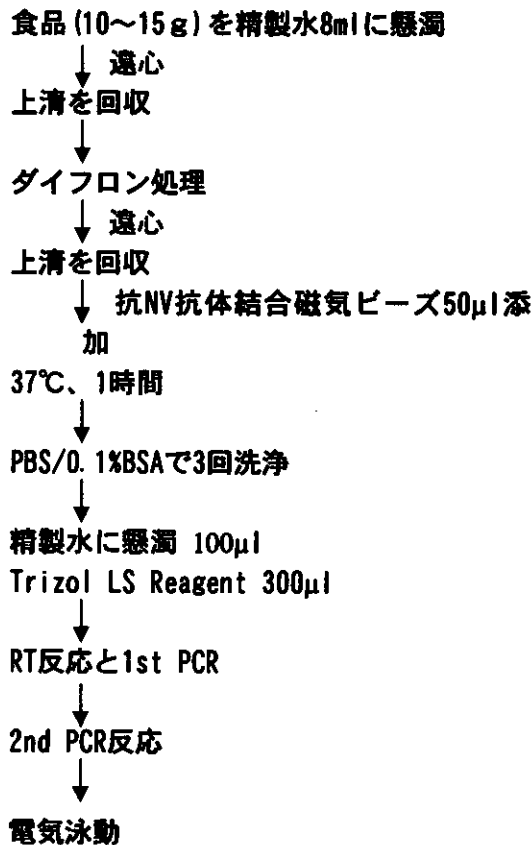
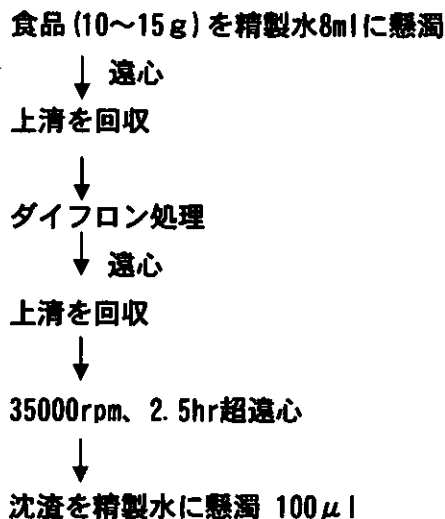


図1 磁気ビーズ法による食品からのNVの検出検査法



Trizol LS Reagent 300µl

↓  
以下、磁気ビーズ法と同様

図2 超遠心法による食品からのNVの検出検査法

### C. 研究結果

#### 事例1 (愛知県)

平成14年の12月、弁当屋が調製した弁当を喫食した会社従業員29名のうち18名(18/29、62.1%)が嘔吐、発熱、腹痛などの食中毒様の症状を呈した。表1に患者糞便検体のPCRおよびELISAによる検査結果を示した。PCR法で患者4名からG2 NVが検出されたが、抗原検出ELISAでは特異的反応が認められず、またPCR陽性の4検体ともにNS#14(モノクローナル抗体)結合磁気ビーズとの反応性も認められなかった。従って、推定原因食品のNV検出検査は超遠心法で実施した。弁当の残品としてのハムカツ、揚げ茄子のわさび醤油和え、豚肉、八宝菜風煮、切り干し大根、オレンジの6品についてNVの検出検査を実施したが、6品ともにNVは検出されなかった。

#### 事例2 (長野県)

平成14年の10月に長野県内の保育園で発生した事例であり、園児102名のうちの62名(62/102、60.8%)と成人13名のうちの2名(2/13、15.4%)、計115名中64名(64/115、55.7%)が嘔吐、下痢などの食中毒様の症状を発症した。PCRおよびELISA

によるNVの検出検査の結果を表2に示した。患者糞便3検体のうちの2検体がG2 NV陽性であった。また、抗原検出ELISAでは3検体ともに特異的反応は認められなかったが、PCR陽性の1検体がモノクローナル抗体結合磁気ビーズと反応することが確認された。そこで、食中毒原因食品と推定された昼食とおやつの残品であるみそ汁、鶏肉と大根の五目煮、小女子、プリンポンチについて、NS#14抗体結合磁気ビーズを用いてNVの検出検査を行ったが、4品ともにNVは陰性であった。

### 事例3（長野県）

平成14年の11月に長野県内の保育園で起きた事例であり、園児106名のうちの49名(49/106、46.2%)と成人18名のうちの1名(1/18、5.6%)、計124名中の50名(64/115、40.3%)が嘔吐、腹痛、発熱などの食中毒様の症状を呈した。PCRおよびELISAによるNVの検出検査の結果を表3に示した。患者糞便3検体のうちの2検体がG2 NV陽性であった。また、抗原検出ELISAで、PCR陽性の1検体がG2 NVと判定されたが、弱陽性でありNS#14抗体結合磁気ビーズとの反応性は認められなかった。従って、超遠心を用いた方法で推定原因食品のNV検出検査は実施した。給食の残品としての小松葉おなか和え、サケフライ、みそ汁、手づくりミルクティーの4品についてNVの検出検査を実施したが、4品ともにNV検出は陰

性であった。

### D. 考察および結論

ウイルス性食中毒の感染源や感染経路を解明するためには、食中毒患者からのウイルス検出とともに原因食品や環境由来検体からのウイルス検出が必要である。高感度にウイルスを検出できる方法としてRT-PCR法が開発され、食中毒患者の糞便検体からは比較的簡便にウイルスを検出することが可能となってきた。それに対して、食品や環境中でウイルスは増殖しないので食品などを汚染しているウイルス量は微量と考えられる。ウイルス性食中毒の主要な原因ウイルスであるノロウイルス(NV)は未だ分離培養できないウイルスであるので、食品中のウイルスを検出するためには効率よく食品から原因ウイルスを回収し、回収したウイルスを高感度に検出する方法が必要である。

磁気ビーズを用いたNV検出法は操作が簡便でかつNVの濃縮効果を期待できる有用な方法であるが、ビーズに結合させる抗体を用意する必要がある。今回検討した3事例の糞便検体では抗原検出ELISAで明確な陽性反応を確認することができなかった。図3に3事例から検出されたNVの系統樹解析の結果を示した。愛知県事例から検出されたNVはすでにポリクローナル抗体が作製されている株と91~93%の相同性であり、ELISAで陽性となることが期待さ

れたが、実際は陰性の結果であった。この原因が PCR と ELISA の検出感度の差異によるのか、糞便中の抗体の影響によるのか、あるいは過去の株との抗原性の違いによるのかなどについては今後の検討課題である。また、長野県の 2 事例から検出された NV は Snow Mountain ウイルスに近縁の株であり、抗体作製に用いられた株との相同性が低いことから抗原検出 ELISA で陰性を示したと考えられた。

長野県の 1 事例では G2 NV を広く認識するとされるモノクローナル抗体を結合した磁気ビーズを用いて食品からの NV 検出を試みたが、効率的な NV の回収はできなかった。モノクローナル抗体はポリクローナル抗体と比べてウイルスの抗原認識部位が限られることから、効率的な NV の回収ができなかったものと考えられた。食品から NV を回収するにはポリクローナル抗体を結合した磁気ビーズの方が適していると思われるが、抗原的多様性の大きい NV に対応するためには、複数のポリクローナル抗体を準備する必要がある、新たな抗体の作成は今後の課題である。

#### E. 研究発表

学会発表

1) S. Kobayashi, K. Sakae, K. Kamata, T. Sato, K. Natori and N. Takeda.

Development of an Immunomagnetic Capture RT-PCR for Detection of "Norwalk-like viruses" from Foods.

XII International Congress of Virology, 2002.

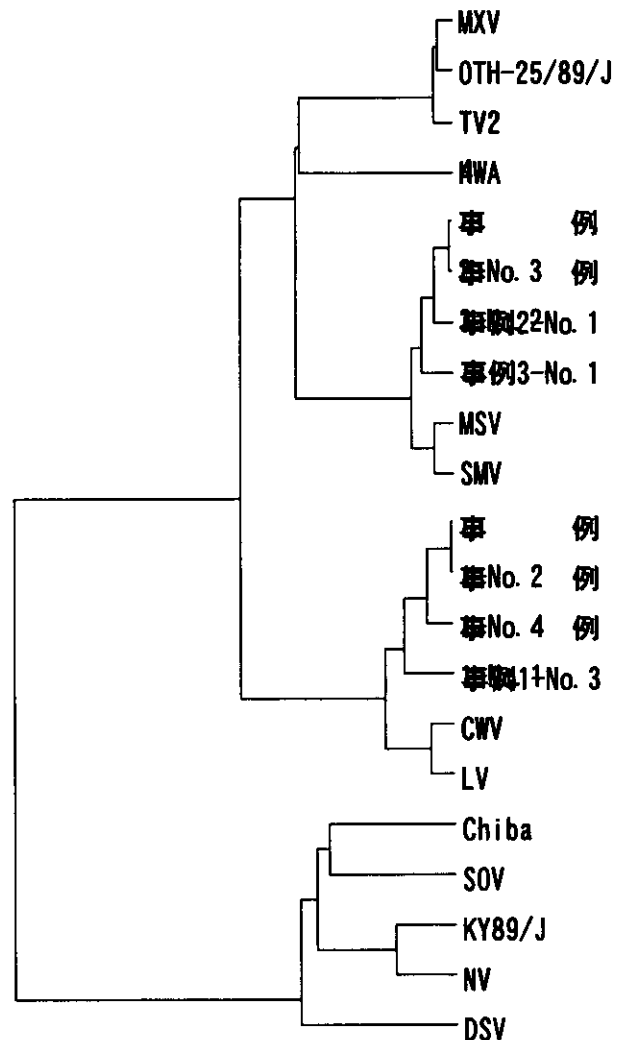


図 3 食中毒事例から検出された NV の系統樹解析

表1 事例1のPCRおよびELISAの検査結果と磁気ビーズとの反応性

検体	PCR		NV抗体(#NS14) 結合 磁気ビーズとの反応性	ELISA : 吸光度			
	G1	G2		G1		G2	
No. 1	-	+	-	0.54	+	0.77	+
No. 2	-	+	-	0.34	+	0.20	-
No. 3	-	+	-	0.81	+	0.22	-
No. 4	-	+	-	0.73	+	0.64	+
				PC: 0.20		PC: 0.23	

表2 事例2のPCRおよびELISAの検査結果と磁気ビーズとの反応性

	PCR		NV抗体(#NS14) 結合 磁気ビーズとの反応性	ELISA : 吸光度			
	G1	G2		G1		G2	
No. 1	-	+	-	0.63	+	0.31	+
No. 2	-	-	-	0.27	-	0.32	+
No. 3	-	+	+	0.12	-	0.27	-
				PC: 0.26		PC: 0.27	

表3 事例3のPCRおよびELISAの検査結果と磁気ビーズとの反応性

	PCR		NV抗体(#NS14) 結合 磁気ビーズとの反応性	ELISA : 吸光度			
	G1	G2		G1		G2	
No. 1	-	+	-	0.25	-	0.19	-
No. 2	-	+	-	0.15	-	0.48	+
No. 3	-	-	-	0.74	+	0.52	+
				PC: 0.25		PC: 0.27	

## 散発及び集団発生胃腸炎のウイルス疫学及びリアルタイム PCR を用いた ノロウイルス検出法に関する研究

分担研究者 大瀬戸光明（愛媛県立衛生環境研究所）  
協力研究者 近藤玲子、山下育孝、吉田紀美（同上）

**研究要旨：**ウイルス性食中毒や胃腸炎集団発生の背景には、地域社会における種々なウイルスの流行があり、地域における散発性胃腸炎の流行実態の把握が必要である。2002 年愛媛県においては、春季にロタウイルス、秋から冬季にかけてノロウイルスの流行が認められた。また、ノロウイルスの流行様態が例年と異なり、夏季のノロウイルス検出や冬季流行の早期開始等の特徴があった。遺伝子解析では全て Genotype II、Lordsdale 株に近縁の株であり、本年の特徴的な流行は、ウイルス側の要因によるものとは考えられなかった。ノロウイルスの診断に、リアルタイム PCR を用い、その有用性が認められた。

### A. 研究目的

近年、ウイルスによる食中毒や施設内での胃腸炎集団発生の報告が増加傾向にある。ヒトに急性胃腸炎をおこすウイルスは、ノロウイルス (NV)、サボウイルス (SV)、ロタウイルス、腸管アデノウイルス、アストロウイルス等がよく知られているが、ウイルス性食中毒の 9 割以上は NV が原因であるとされており、衛生行政上は NV が最も重要視されている。

下痢症ウイルスの地域での流行は、魚介類や飲料水の汚染及び調理食品の 2 次汚染機会の増大をもたらし、急性胃腸炎集団発生の原因となる。食品媒介性ウイルスによる胃腸炎集団発生の制御には、地域における下痢症ウイルスの流行動向を把握しておくことが重要で、愛媛県においては長期継続的に急性胃腸炎患者の原因ウイルス検索を行ったので、その結果を報告する。

また、ノロウイルスの診断法としてリアル

タイム PCR が報告されているので、今年度は散発性および集団発生胃腸炎の診断に適用し、その有用性が認められていたので報告する。

### B. 研究方法

材料：糞便材料は、2002 年 1 月から 12 月の間に、感染症発生動向調査病原体検査定点で主に小児の感染性胃腸炎患者から採取した 488 検体及び胃腸炎集団発生の患者糞便を用いた。

方法：糞便からのウイルス検索は、電子顕微鏡法 (EM) 及び RT-PCR で行った。EM は常法により疎精製した糞便材料を、2%PTA 染色後 4 万倍で観察し、下痢症ウイルスの検索を行った。NV 遺伝子の検出は、影山らの COGF/R 系プライマーと RING TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR を行った。SV 遺伝子の検出は、カプシド領域を増幅する SV 系 (千葉県衛生研究所 岡田らの設計)

プライマーを用いた nested PCR を行った。NV の遺伝子解析は、国立感染症研究所（西尾博士）に依頼し、ABI Genetic analyzer 310 による PCR 産物のダイレクトシーケンス法で NV 遺伝子塩基配列を決定した。そのうち 279 塩基長のカプシド領域部分の塩基配列およびアミノ酸配列について NJ 法により系統樹解析を行った。

## C. 研究結果

### 1. 感染性胃腸炎患者発生動向

2002 年 1 月から 12 月までの愛媛県感染症発生動向調査における感染性胃腸炎の患者発生報告数（定点あたり／週）の消長（図 1）及び県内 6 医療圏域別患者数の推移（図 2）を示した。感染性胃腸炎患者発生は毎年、冬季に 2 峰性のピークを示すが、2002 年は 1 月から 4 月まで 10 人／週程度の比較的平坦なピークがみられ、9 月下旬から 11 月下旬にかけての急峻な患者発生ピークがみられた。圏域別には今治圏域では 9 月中旬（38 週）に定点当たり患者数が 10 人／週を超え、その後新居浜・西条、宇摩圏域、中・南予地域へ流行が順次拡大した。流行のピークは 11 月中旬（46 週）で定点当たり 21.3 人／週に上った。感染性胃腸炎の冬季ピークは例年 12 月中・下旬にあり、本年は約 1 か月早くピークを迎えた。2002 年の患者数合計は 15,831 人で、過去 3 年の患者数とほぼ同じであった。

### 2. 散発性急性胃腸炎患者からのウイルス検出状況

2002 年の散発性急性胃腸炎から EM 及び PCR で検出したウイルスを表 1 に示した。NV は 122 例（検出率 25%）検出され最も多かった。次いでロタウイルスが 53 例（検出率 10.9%）検出された。その他にアデノウイルスが 17 例、アストロウイルスが 5 例、検出された。今年 SV が少なく 5 例であった。EM で SRSV が陽性で、PCR で増幅されない未同定ウイルスが 9 例あった。

ロタウイルスは例年と同様、主に 3 月から 4 月に多く検出された。NV は 1 月から 4

月に少数例検出され、7 月には夏季にも関わらず 10 例も検出された。感染性胃腸炎患者が増加し始めた 9 月中旬以降、NV の検出が増加し、11 月には 40 例の NV が検出された。12 月には患者数の減少に伴って、NV 検出数も減少した。それと共にロタウイルスやアデノウイルスが検出された。これらのことから、例年より早期に始まった感染性胃腸炎の流行の主要原因は NV であったことが明らかとなった。NV の遺伝子型は G I が 5 株に対して、G II が 117 株で、散発性胃腸炎では圧倒的に G II が多く関与していることが示された。

アストロウイルスが春、秋に検出されたことやアデノウイルスでは季節的消長がみられなかったことは、それぞれ例年の動向と同じであった。

### 3. 2002 年流行した NV の遺伝子系統樹解析

本年度は夏季にも NV が比較的多く検出され、また、例年より早く 9 月下旬から流行し始めた感染性胃腸炎が 11 月にはピークを迎えるという特異な流行形態を示したので、流行期中に検出された NV ウイルスのうち、地域や患者年齢の異なる 19 株について、カプシド領域（SKF/R プライマーの増幅部位、276bps）の遺伝子塩基配列の解析を行った。近隣結合法を用いた系統樹解析では、図 3 に示すごとく、検出された愛媛株はすべて G2 の Lordsdale 株のクラスターに属した。愛媛株間の相同性は非常に高く、2 株を除くと 98% 以上の相同性を示し、県内全域でほぼ同一のウイルス株が蔓延していたことが示された。

### 4. 糞便中の NV コピー数

本年度は NV の検出にリアルタイム PCR を用いたため、糞便中に含まれる NV の量を推定することができ、その結果を表 2 に示した。糞便 1g に含まれるウイルス量に換算すると、 $10^{10}$  コピー以上が 11 例（12.4%）あり、50% が  $10^8$  コピー以上の大量のウイルスを排泄していると考えられた。

### 5. 食中毒等集団発生事例からの NV 検出状況



表3には2002年1月から2003年2月の間に発生した食中毒事例及び食中毒と断定されなかった急性胃腸炎集団発生事例からのNV検出状況を示した。

8事例のうち4事例(No.1、2、3、8)は食中毒事例とされたが、他の4事例は患者発生状況から必ずしも食中毒とはいえず胃腸炎集団発生事例として取り扱われた。また、カキが関与した事例が4事例(No.1、2、3、7)あり、酢カキの2事例(No.2、7)と赤だしの具のカキが加熱不十分であった1事例(No.3)では、GIとGIIの両方の遺伝子型株が混在して検出された。カキが食材に含まれていない他の4事例では、すべてGIIのみが検出された。No.8では調理従事者からも高率にGIIが検出され、調理従事者から食品が汚染される危険性が大きかったことが伺われた。8事例の患者82名からGIが15例(18.3%)、GIIが69例(84.1%)検出され、散発性胃腸炎患者からの遺伝子型別検出率とは異なる分布であった。

また、事例No.4以降は集団発生事例のNV検出にリアルタイムPCRを用いたので、患者及び従業員の糞便中NVウイルス量を定量することができた。患者の糞便1g中のウイルス遺伝子コピー数は $10^5$ から $10^{10}$ であった。従業員では $10^5$ から $10^9$ で患者と同程度のウイルス量を排泄していることが示された。

#### D. 考察

感染性胃腸炎は毎年冬季を中心に流行し、我が国においても他の先進諸国と同様その患者数の多さから公衆衛生上重要な疾患として注目されている。冬季の感染性胃腸炎の原因としてロタウイルス、NV、アストロウイルス、腸管アデノウイルス等の多彩なウイルスが関与している。これらの原因ウイルス、特にNVは、しばしば食中毒を引き起こし、また、学校や施設において胃腸炎集団発生の原因としても衛生行政上の課題となっている。食中毒や集団発生の制御のためには、地域におけるこれらのウイルスの流行動向を把握し

ておくことが重要である。

本年度は散発性胃腸炎からNVを検出するために、影山らの方法に準じてリアルタイムPCRを実施した。リアルタイムPCRは、TaqManプローブを用いることにより、確認テストと定量を同時に行うことになるため、従来と比べて著しく迅速性が向上した。また、リアルタイムPCRは増幅効率も非常に高く、1反応チューブに目的遺伝子のcDNAが1コピーあれば検出可能である。今後糞便からのウイルスRNA抽出液中に含まれるインヒビターがどのように影響しているか検討が必要であろう。

迅速化とともに糞便中のウイルス量が推定され、従来法のRT-nested PCRに比べてより情報の多い成績が得られた。小児の散発性胃腸炎の糞便と成人の食中毒等集団発生例の糞便に含まれるウイルス量は、ほぼ同程度であることが示された。糞便1g中には $10^5$ から $10^{10}$ コピーの大量のウイルスが含まれていると推定され、糞便の汚染源としての重要性が再認識された。従って海水や河川水の汚染防止にはし尿下水処理システムの改良、調理中の食品汚染防止には手洗いの徹底が重要である。

NVによる感染性胃腸炎は例年12月下旬に流行のピークを迎えていたが、本年は11月中旬に流行ピークとなった。例年より1か月以上も早く流行した原因を究明するため、流行株の遺伝子塩基配列の解析を行った。NVの抗原性と関連するカプシド領域の276bpsについて系統樹解析の結果、調査した19例の流行株はすべてGIIのLoadsdale株と同じクラスターに属していた。Loadsdale株は最近2、3年全国的な優先株であり、今回の流行が早かったことの説明はできなかった。当地では2002年夏季から冬季にかけて、数年ぶりの異常渇水に見舞われており、このような特異な気象状況がNVの流行に影響したのかもしれない。NVの流行疫学を解明するためには、ウイルスの抗原性、住民の免疫状況等に加えて、種々な気象条件

も考慮して詳細な解析が必要と考えられた。

G. 知的財産権の出願、登録状況  
なし

## E. 結論

1)2002年1月から2002年12月に小児の散発性急性胃腸炎からEMおよびRT-PCR、リアルタイムPCRでNVが122例(検出率25.0%)、ロタウイルスが53例(10.9%)検出された。アデノウイルス、アストロウイルスはそれぞれ17例(3.5%)、5例(1.0%)検出された。2000年、2001年に比較的多く検出されたSVは5例であった。

2)検出されたNVの遺伝子型別内訳は、GIが5例(4%)、GIIが117例(96%)であった。

3)2002年はNVが例年より1か月早く流行したが、流行株はすべて Loadsdaile 株に近縁の株であった。

4)NVの検出にリアルタイムPCRを用いたので、小児の散発例及び成人の集団発生例とも急性期糞便中には1g当たり $10^5$ から $10^{10}$ 個程度のウイルスが含まれていることが推定された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

近藤玲子、山下育孝、吉田紀美、大瀬戸光明、浅井忠男、井上博雄、西尾治、秋山美穂：愛媛県において10月から流行したノーウォークウイルス様ウイルス胃腸炎。病原微生物検出情報，24：9-10（2003）

### 2. 学会発表

1) 岡田峰幸、篠崎邦子、大瀬戸光明：Sapporo virus の検出及び分子疫学的解析。第43回日本臨床ウイルス学会、秋田市、2002、6月。

2) 大瀬戸光明、近藤玲子、山下育孝、吉田紀美、杉枝正明、古屋由美子、藤本嗣人、長谷川斐子、加藤由美子、秋山美穂、西尾治：輸入魚介類のウイルス汚染実態調査。第50回日本ウイルス学会、札幌市、2002、10月。

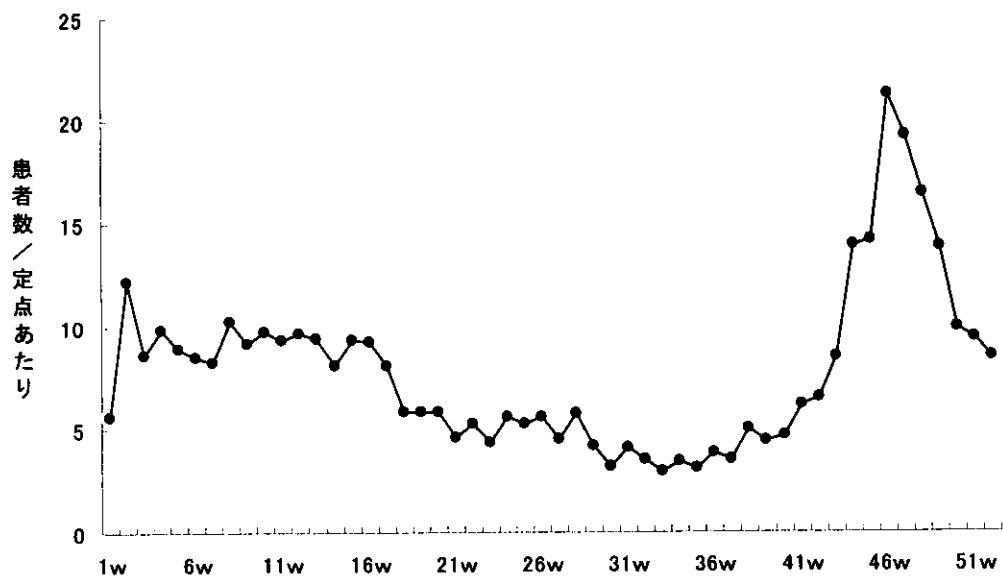


図1 2002年愛媛県の感染性胃腸炎週別患者報告数(感染症発生動向調査)

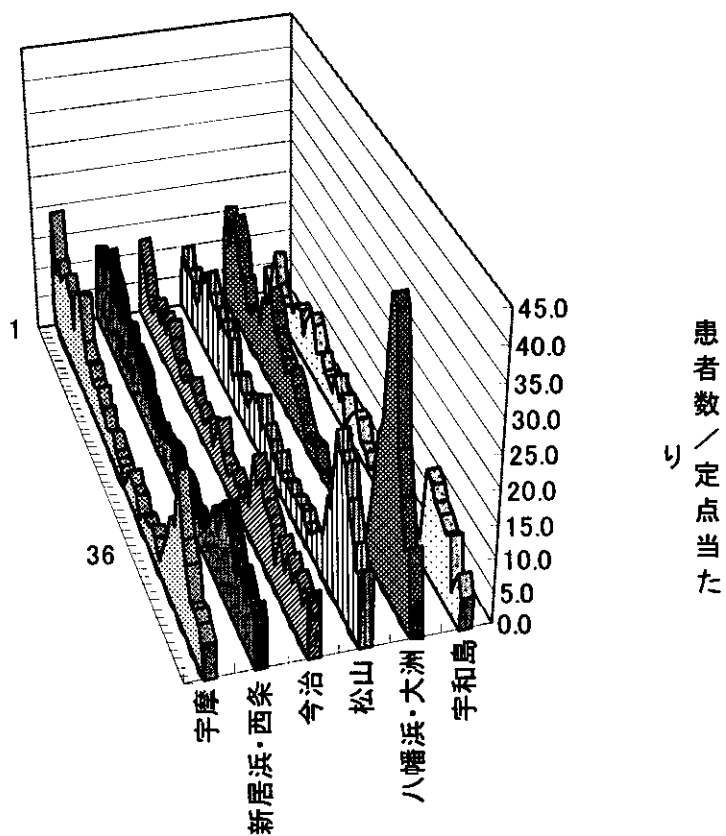


図2 圏域別感染性胃腸炎患者報告数の推移

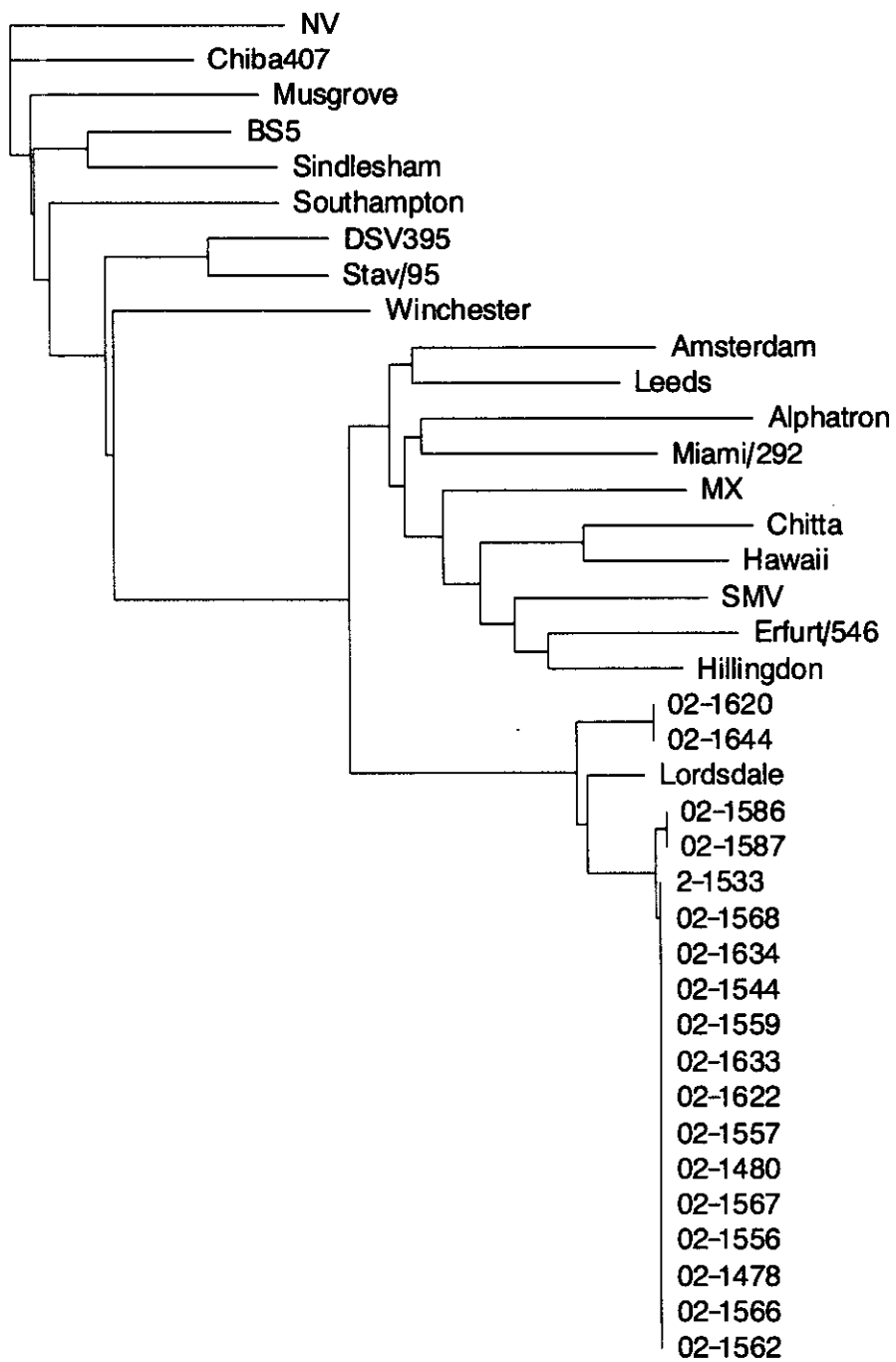


図3 2002年愛媛県で流行したNVの系統樹解析