

表1 感染性胃腸炎散発例からの月別ウイルス検出状況 -2002年

ウイルス別	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	合計
NV	GI		1			1					2	1	5
	GII		4	5	6	2		10		9	29	38	14
SV		1	1	1	1	1							5
NT	1	1	4			1	1					1	9
ROTA	1	4	21	18	1	1	1					6	53
Adeno	1	1	3		3	1	2			1	2	3	17
Astro				1	2				1	1			5
陽性例数 (検出率%)	7 (29.2)	12 (50.0)	36 (59.0)	22 (61.1)	7 (26.9)	5 (15.6)	14 (24.1)	0	10 (23.8)	31 (50.8)	42 (73.7)	25 (52.1)	211 (43.2)
検査数	24	24	61	36	26	32	58	19	42	61	57	48	488

\*NVはReal time PCR、SVはRT-PCRで同定

\*NTはNot typed

表2 小児患者糞便中のNV量

10 <sup>n</sup> copies/g	例数
11	1
10	10
9	17
8	17
7	14
6	9
5	9
4	5
3	7
計	89

表3 急性胃腸炎集団発生事例のウイルス検査結果

事例No.	発生時期	区分	検査数	EM陽性	NV陽性 /PCR	Genotype	copies/g(10 <sup>n</sup> )
1	H14.1	患者	9	5	7	GII	
2	H14.1	患者	3	2	3	GI:1 GII:3	
		従業員	17	0	0		
3	H14.2	患者	21	8	17	GI:7 GII:17	
4	H14.11	患者	6	2	6	GII	5~8
		従業員	11	0	0		
5	H14.12	患者	7	4	7	GII	5~10
		従業員	16	2	2	GII	5~7
6	H14.12	患者	6	4	6	GII	6~9
		従業員	2	0	0		
7	H15.1	患者	11	6	7	GII:7, GI:3	GII:4~9 GI:3~5
		従業員	4	0	0		
8	H15.2	患者	19	nt	16	GII	5~9
		従業員	8	nt	4	GII	5~9
計		患者	82	31	69	GI:15 GII:69	
		従業員	58	2	6	GII:6	

分担研究報告書

Norovirus の感染経路に関する考察

分担研究者 篠崎邦子 千葉県衛生研究所主席研究員

研究要旨：2002 年 11 月から 2003 年 2 月中旬までに千葉県内で発生した、カキを喫食していない非細菌性食中毒事例および急性胃腸炎集団発生事例 7 事例についてウイルス検査を行った。その結果、全事例から Norovirus を検出し Norovirus による集団発生であったことが判明した。系統解析の結果、遺伝子型は GI の DSV が 1 事例、GII の LV が 1 事例、SMV が 2 事例、HWV が 1 事例、MX が 2 事例であった。3 事例の調理従事者便、食品について RT-PCR を行った。2 事例の調理従事者各 1 名から Norovirus を検出し、それぞれ患者由来株の塩基配列と一致した。しかし、食品は全て RT-PCR 陰性であった。

A. 研究目的

Norovirus は非細菌性食中毒および冬季に多発する小児急性胃腸炎の主要な原因ウイルスである。食中毒における感染経路はカキでは明らかになってきたが、カキなどの貝類を含まない学校給食、仕出し弁当、旅館の食事などで発生し、これらの事例のほとんどが原因不明となっている。欧米での報告では、調理従事者を介して食品が汚染する可能性を推測している。そこで、2002 年の秋以降、県内で発生したカキを喫食していない非細菌性食中毒事例および急性胃腸炎集団発生事例について Norovirus の検出を行い、疫学調査と併せて感染経路について検討を試みた。

B. 研究方法

2002 年 11 月から 2003 年 2 月中旬までに千葉県内で発生したカキを喫食

していない非細菌性食中毒事例および急性胃腸炎集団発生事例 7 事例について、患者便、患者吐物、調理従事者便、食品（保存食）等を採用し検査材料とした。なお、これらの事例は保健所からの依頼検査として当所に搬入されたものである。

ウイルス検査は RT-PCR 法で行った。電顕法の検体処理でウイルスを濃縮した後、High Pure Viral RNA Kit (Roche) により核酸を抽出した。逆転写反応は Oligo (dT) で行い、PCR のプライマーは構造蛋白領域に設定した武田らの Genogroup I (GI)、Genogroup II (GII) に特異的なものと、平成 13 年 11 月厚生労働省食品保健課通知に示された片山らの GI (COG1F/G1SKR, G1SKF/G1SKR) G II (COG2F/G2SKR, G2SKF/G2SKR) を用いた。PCR 陽性検体は、ダイレクトシークエ

ンスにより塩基配列を決定し、系統解析を行った。

## C. 研究結果

### 1. 事例の概要

7事例の概要を表1に示した。事例1は保育所での発生で園児、職員に高率に患者がみられ、園児の発生のピークの1日後に職員の発生がみられた。事例2は小学校での発生で、1年生の2クラスに限局して患者がみられた。これら2事例は、発生状況から汚物を介した人一人感染と思われた。事例3は病院での発生で、患者の共通食が仕出し弁当であることからこの弁当による食中毒と思われたが、同じ弁当を喫食した他の施設で患者がみられないことから再度疫学調査が行われた。患者発生は、図1に示すようにピークの1日前に2名の発生があり、その内の1名(事務員)は子供が2日前に車内で嘔吐し発症していたことが判明し、家族内感染であると思われた。また、この事務員から感染が広がった可能性が推測されたが、患者の勤務場所に共通性がみられなかったことから、感染経路は推定できなかった。事例4~6はホテル・旅館での食中毒事例で、特に事例4は大規模な発生で発病率70%以上と高率であった。事例7は施設での発生で児童と宿泊の職員に患者がみられた。患者発生は図2に示すようにピークの4日前からみられ、15日は児童1名が食堂で嘔吐していた。児童と宿泊の職員は、3食とも施設内で調理したものを食べていることから、人一人感染と食中毒の両方の可能

性が考えられた。

### 2. 臨床症状

主な臨床症状を表2に示した。事例によって発生頻度に差がみられた。胃腸炎症状の他に発熱が乳幼児だけでなく成人にも高率にみられた。

### 3. ウイルス検査結果

7事例全例からNorovirusを検出し、Norovirusによる集団発生であったことが判明した。プライマー別の成績は、GIは事例が少ないの比較できなかったが、GIIではG2とCOG2ほぼ同等の陽性率を示した。しかし、バンドの濃淡を考慮に含めると、SMVを除いてG2の方が感度が良好であった。系統解析の結果、それぞれの事例で患者の塩基配列は一致した。また、その遺伝子型はGIのDSVが1事例、GIIのLVが1事例、SMVが2事例、HWVが1事例、MXが2事例で、集団発生の原因ウイルスは様々な株によるものであった。

3事例の調理従事者便、食品についてRT-PCRを行った。2事例(事例1と事例7)の調理従事者各1名からNorovirusを検出し、それぞれ患者由来株の塩基配列と一致した。また、食品は全て陰性であった。

## D. 考察

カキを喫食していない非細菌性食中毒事例および急性胃腸炎集団発出事例7事例のウイルス検査を行ったところ、全例からNorovirusを検出しNorovirusによる集団発生であったことが判明した。

これらの事例についてウイルス検査

結果と疫学調査から感染経路の検討を試みた。事例1は調理従事者1名からNorovirusを検出したが、患者発生状況から人一人感染による集団発生と思われた。事例2と事例3は施設内の限局した発生で、ある特定の場所（トイレ、廊下、室内等）が汚物によって汚染され感染源となったのではないかと思われる。事例7は施設内での発生で、人一人感染と食品を介する感染の両方が考えられる。遺伝子検査の結果、調理従事者1名からNorovirusを検出し、患者由来株の塩基配列と一致した。このことは、調理従事者が施設内で感染を受けた結果とも考えられる。また、一方、不顕性に感染を受けていた調理従事者を介して食品が汚染された可能性も推測される。しかし、食品からはウイルスが検出されずその関連性を明らかにできなかった。

食品は全て RT-PCR 陰性であった。

## E. 結論

1. カキを喫食していない非細菌性食中毒事例および急性胃腸炎集団発生事例7事例のウイルス検査を行ったところ、全例からNorovirusを検出した。

2. 系統解析の結果、遺伝子型はGIのDSVが1事例、GIIのLVが1事例、SMVが2事例、HWVが1事例、MXが2事例で、集団発生の原因ウイルスは様々な株によるものであった。

3. 2事例の調理従事者各1名からNorovirusを検出し、それぞれ患者由来株の塩基配列と一致した。しかし、

表1. 非細菌性食中毒および急性胃腸炎集団発生事例の概要

事例	発生日	発生場所	原因食品	発病率(%)
1	11.15~18	保育所		園児 49/75(65) 職員 12/31(39)
2	12.2~4	小学校		1年生 33/62(53)
3	1.15~17	病院		職員 11/317(3)
4	2.5~	ホテル*	ホテルの食事	高校生 90/119(76) その他 44/63(70)
5	2.10~	旅館*	旅館の食事	7/39(18)以上
6	2.10~	旅館*	旅館の食事	
7	2.15~18	福祉施設		職員 3/不明 児童 7/15(47)

\*他県の施設

表2. 主な臨床症状

事例	患者数 (人)	臨床症状(%)					
		下痢	嘔吐	嘔気	発熱	腹痛	頭痛
1	園児 49	45	55	39	59	24	2
	職員 12	83	42	50	25	58	33
2	児童 33	18	94	42	42	18	3
3	職員 11	64	45	45	73	64	27
7	児童 7	57	100	100	43	43	0

表3. ウイルス検索結果

事例	検体種別	検査数	RT-PCR陽性数				遺伝子型
			G1*	G2*	COG1**	COG2**	
1	患者便	5	0	5	0	3	LV
	吐物	1	0	0	0	0	
	調理従事者便	5	0	1	0	0	
2	食品	4	0	0	0	0	SMV
	患者便	4	0	2	0	3	
3	吐物	1	0	0	0	0	HWV
	患者便	11	0	10	0	7	
	弁当屋従業員	24	0	0	0	0	
4	食品	7	0	0	0	0	MX
	患者便	13	0	13	0	13	
5	吐物	10		6			
	患者便	6	0	4	0	4	
6	患者便	6	0	4	0	4	
7	患者便	3	3	0		0	DSV
	調理従事者便	3	1	0		0	
	食品	6					

\* 武田らのプライマー

\*\*片山らのプライマー

図1.事例3の患者発生状況

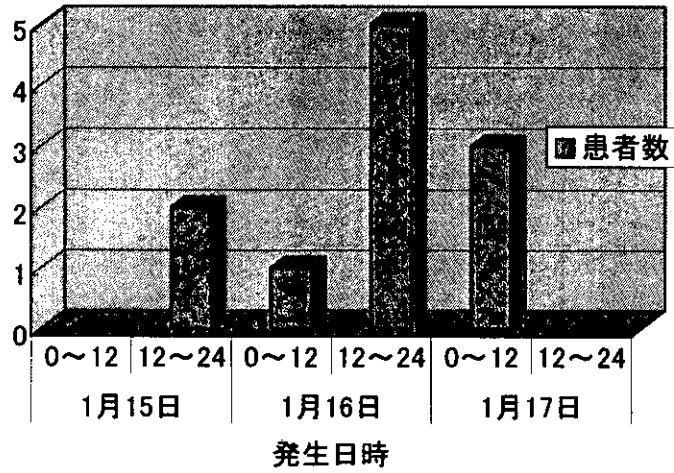


図2. 事例7の患者発生状況

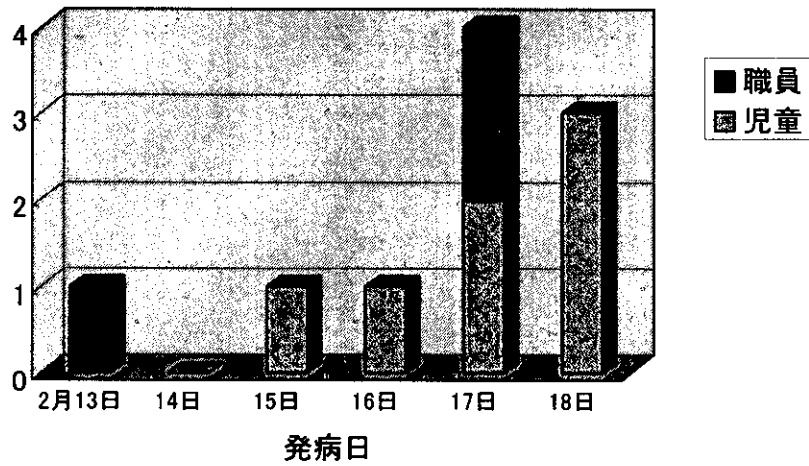
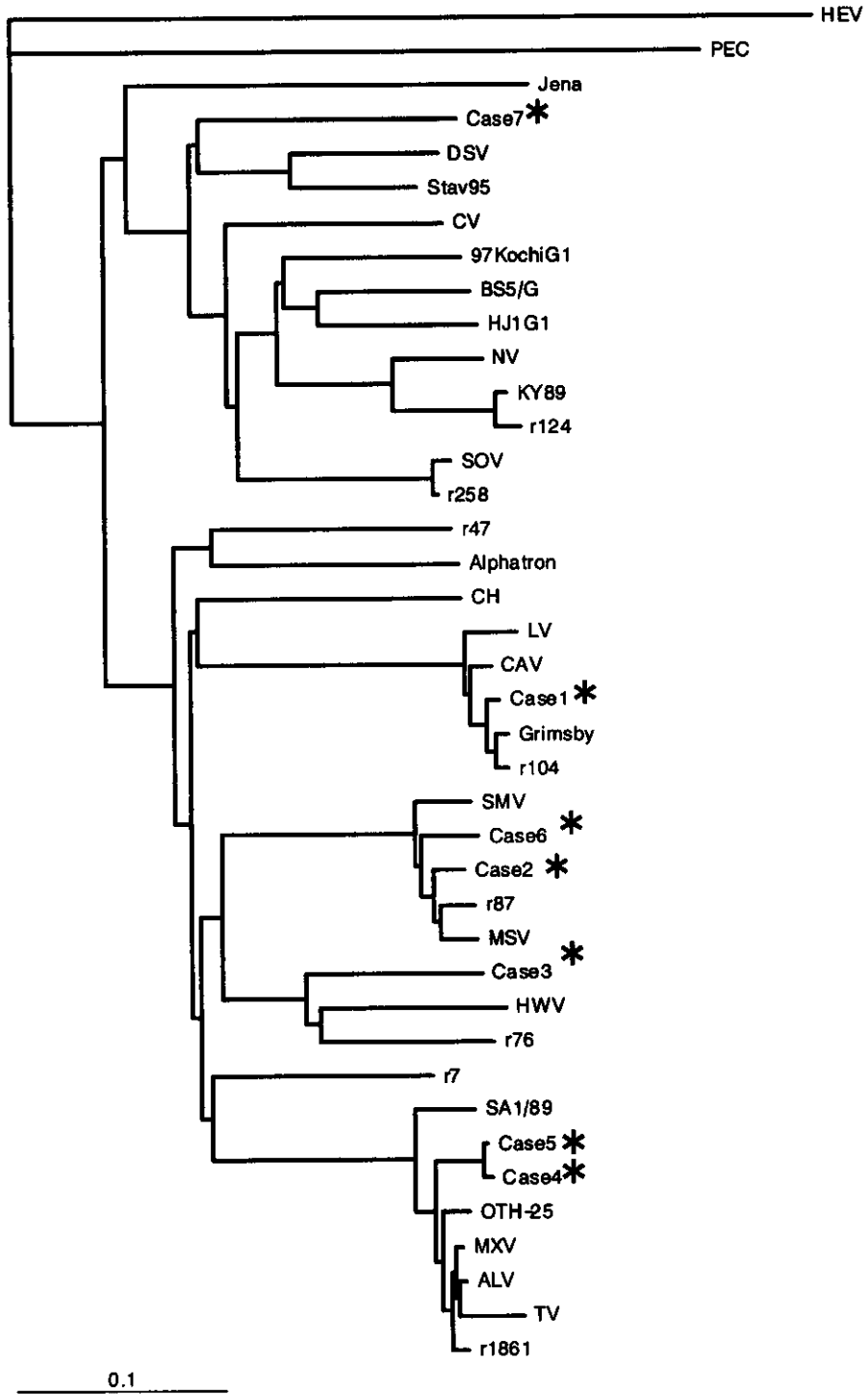


図3. Norovirus 系統樹



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

全国各地から検出された NV の遺伝子型と  
NV 感染者から排泄されたウイルス量について

分担研究者 国立感染症研究所感染症情報センター 西尾 治  
研究協力者 国立感染症研究所感染症情報センター 秋山 美穂  
鹿児島県環境保健センター 新川 奈緒美

**研究要旨** 全国各地の食中毒事例の患者ふん便から検出された NV 155 件、カキからの 21 件および海水からの 2 件について遺伝子型を調べた。G2 が G1 より 3 倍多く、G1 は 7 つの遺伝子型が見られ、Stav と Winchester の中間型および Chiba 型が多く、G2 は 11 遺伝子型が検出され、MX、Miami、SMV が多数見出された。急性期の患者のふん便 1g の NV 量は 1 億個以上に存在するものが多く認められ、特に乳幼児では排泄されるウイルス量が多い。吐物においても 1g 中に NV 量は 1,000 個～100 万個以下の範囲で汚染されており、ふん便と同様に吐物も感染源として対応することが感染防止に重要である。

**A 研究目的**

全国各地の食中毒事例の患者のふん便、食品および海水から検出されたノロウイルス(NV)の遺伝子型を決定して、食中毒、食品および海水との関連性を明らかにすることを目的とした。

さらに、NV による食中毒様集団発生事例における患者のふん便および吐物中に含まれるウイルス量を定量し、感染源としての意義を検討した。

**B 研究方法**

2001 年 10 月から 2002 年 6 月の

間に全国各地の食中毒様下痢症の集団発生事例の患者から検出された NV 155 件、食品（カキ）の 21 件および海水の 2 件を用いた。

2001 年 4 月から 2002 年の間に発生した NV による集団発生 10 事例の患者ふん便 64 件および吐物 6 件を用いた。

NV の定量：患者からのふん便および吐物は磷酸緩衝液 (PBS) で 10% 乳剤とした。粗遠心後、遠心上清からのウイルス RNA の抽出は QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用い、抽出 RNA からの cDNA 合成は Superscript II (Invitrogen) を用い



た。NV の定量は COG1F/COG1R (プローブ : RING1-TP (A), RING1-TP (B)), COG2F/COG2R (プローブ : RING2-TP) を用いた real time PCR で実施した。

遺伝子配列の決定は NV陽性のPCR産物をダイターミネーター法で行いUPGMA法により系統解析を行った。

### C 研究結果

1) 全国各地から検出された NV G1 のキャプシド領域の遺伝子型

(表 1)

NV の G1 は 38 患者から検出され、遺伝子型は Stav, Winchester, Stav と Winchester の中間型、Southampton, Chiba, Musgrove, Winchester と異なるものの類似するものの 7 つの遺伝子型が多く検出され、Stav と Winchester の中間型および Chiba 型が多く認められた。食品からは Chiba が 3 件、Stav が 1 件から見出された。

表 1. 全国各地からの NV G1 キャプシド領域 遺伝子型検出状況

	患者						食品	海水	計
	東北	関東	中部	中国	近畿	九州			
Stav		2				1	1		4
Winchester	4				1				5
Stav, Winchester の中間型	1					9			10
Southampton			3	1		1			5
Chiba		3		4	1		3		11
Musgrove						1			1
Winchester と異なる	1			2	1	2			6
計	6	5	3	7	3	14	4	0	42

2) 全国各地から検出された NV G2 のキャプシド領域の遺伝子型 (表 2)

NV の G2 は患者から 116 件検出され、G1 の 3 倍であった。検出された遺伝子型は Lordsdale, MX, Chitta, SMV, Hawaii, Hillngdon, Erfurt, Amsterdam, Leeds, Miami, Lordsdale と Hawaii 中間型の 11 遺

伝子型が検出され、MX および Miami は九州で、SMV は近畿で多く検出された。

食品では SMV と Erfurt を除いてすべての遺伝子型が検出された。特に患者からも多くみられた MX, Chitta, Miami がカキからも検出された。海水からは MX が見出されている。

表 2. 全国各地からの NV G2 キャプシド領域 遺伝子型検出状況

	患者						食 品	海 水	計
	東北	関東	中部	中国	近畿	九州			
Lordsdale		2							2
MX	2	4	9		3	34	3	2	57
Chitta	2	2		10			4		18
SMV			3		6	1			10
Hawaii							1		1
Hillingdon	1			1	1	2	1		6
Erfurt		2	2						4
Amsterdam	1			1			5		7
Leeds	1						1		2
Miami			2		1	21	5		29
Lordsdale,Hawaii の中 間型				2			1		3
計	7	10	16	14	11	58	21	2	139

3) NV による急性胃腸炎の発生状況 (表 3)

2001 年 4 月から 2002 年の間に発生した NV による集団発生 10 事例が発生し、発生時期は事例 1 の 7 月を除いて、ほかの事例はすべて 11 月から 2 月の間で、発生場所は料理店、ホテルが 7 事例、家庭、剣道大会およびサッカー大会が各 1 事例であった。事例の患者数は 3 名から 146 名であった。発症率は 40% から 75% であった。原因食材は事例 1 の中国産ウチ

ムラサキ貝、事例 2 および事例 6 のカキ以外は原因食材を特定することができなかった。

4) 事例別のふん便中のウイルス量 (表 4)

事例毎による遺伝子型の NV 排泄量に特に大きな違いは見られなかった。すなわち、多くの事例では半数以上でふん便 1g 中に 1 億個以上のコピー数が存在していた。原因食材では大アサリでは中腸腺 1g 当たりの NV コピー数は G1 が 230, G2 が 270 であった。

表 3. 集団胃腸炎の発生状況

No.	発生年月	患者概要	喫食者数	患者数	発症 (%)	陽性数/ 糞便等 検体数 (%)	原因食品等	遺伝子型
1	2001 . 7	職場宴会	31	23	74. 2	2/6 (33. 3)	中国産 ウチムラサ キ貝	Chiba, DSV, Winchester, Miami, Chitta, Hillingdon, MX
2	2001 . 11	家庭	5	3	60. 0	2/2 (100. 0)	カキ (寄せ鍋)	Hillingdon
3	2001 . 12	職場宴会	20	8	40. 0	2/3 (66. 6)	会席料理	Miami
4	2001 . 12	幼稚園 忘年会	105	76	72. 4	4/9 (44. 4)	—	MX
5	2001 . 12	職場 忘年会	224	137	61. 2	6/7 (85. 7)	会席料理	MX
6	2001 . 12	職場忘年 会	39	29	74. 4	5/5 (100. 0)	バカガイの 酢の物 (推定)	Musgrove, Winchester と 異なるもの, MX, SMV
7	2001 . 12	高校サッ カー大会	96	72	75. 0	16/19 (84. 2)	旅館の食事	MX
8	2002 . 1	結婚披露 宴	309	146	47. 2	5/5 (100. 0)	披露宴の 料理	MX
9	2002 . 1	婦人会新 年会	16	8	50. 0	1/4 (25. 0)	新年会の 食事	Southampton
10	2002 . 2	小中学校 剣道大会	192	43	—	10/17 (58. 8)	—	Miami

表 4. 事例別のふん便中のウイルス量

事例	検体	陽性数	ウイルス量(copies/g)								遺伝子型
			10 <sup>2</sup>   10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>   10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>   10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>   10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>   10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>   10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup>   10 <sup>9</sup>	10 <sup>9</sup> <	
1	ふん便	2					1	1			DSV, Winchester
	貝	2	2								Chiba,Miami, Chitta, Hillingdon,MX
2	ふん便	2			1				1		Hillingdon
3	ふん便	2							2		Miami
4	ふん便	4					1	1		2	MX
	吐物	2		1		1					MX
5	ふん便	6						3	2	1	MX
6	ふん便	5				1	1		1	2	Musgrove, Winchesterと 異なるもの, MX,SMV
7	ふん便	16			1	1	2	5	4	3	MX
	吐物	1			1						MX
8	ふん便	5						2	1	2	MX
9	ふん便	1					1				Southampton
10	ふん便	10					1	2	2	5	Miami

表 5. 年齢階層別のふん便中のウイルス量

年齢層	陽性数	10 <sup>8</sup> copies /g ≤ (%)	ウイルス量(copies/g)						
			10 <sup>3</sup>   10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>   10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>   10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>   10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>   10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup>   10 <sup>9</sup>	10 <sup>9</sup> <
乳幼児	4	75				1			3
小・中学生	8	75				1	1	2	4
高校生	14	50			1	1	5	4	3
成人	27	48	1	1		4	8	7	6

5) 年齢階層別のふん便中のウイルス量(表 5)

年齢階層別のふん便中の NV 量では年齢が低いほどウイルス量が多い傾向が認められた。

6) 吐物中のウイルス量

吐物では半数からウイルスが検出され、ウイルス量は 1,000 から 100 万コピー/g 以下であった。

D 考察

わが国における昨年の冬季を中心に流行した NV の G2 は G1 の 3 倍多く、ここ数年と同様であったが、検出された遺伝子型は G1 が 7、G2 が 11 で、増加する傾向にあるといえる。

昨年度の厚生労働省に届けられた食中毒事例、ウイルスによるものは約 15% で、カキ事例がその半数近く占めている。本研究においても食中毒事例の患者から多く検出された遺伝子型がカキからも検出されており、カキと食中毒との関連性が示唆された。また、海水から検出された遺伝子型も患者およびカキから多く検出された遺伝子型も MX 型であった。カキの汚染は海水からのものであり、今後海水のウイル

ス汚染についてもさらに詳細に監視する必要があるといえる。

急性期患者のふん便の半数以上には 1g 中に 1 億個以上含まれていることが明らかになった。さらに乳幼児では排泄されるウイルス量が多い傾向が見られた。NV は 100 個以下で感染・発病することが知られており、急性期患者便の極めて少量で多くの人を発病させる量に汚染されていることが示された。近年、幼稚園、学校、老人ホーム等で、貝類を含まない料理・給食あるいは加熱したものを介しての食中毒事例が多発しているが、この要因の一つとして、NV に汚染された人の手を介することが推察されていることも患者のウイルス量から起こりうることに推察される。ふん便中のウイルス量から推察すると、しっかり手洗いしないと食中毒の起きる危険性が大きいと予測される。また、吐物においてもふん便ほどは大量でないものの、多くのウイルスに汚染されており、吐物を介しての感染拡大事例も報告されている。したがって、感染拡大防止には吐物も感染源としての、ウイルス学的な処理が必要である。

## E 結論

わが国における食中毒患者、食品から検出される NV は 18 遺伝子型で、G2 が多く、近年では遺伝子型が多くなっている。

患者のふん便および吐物に含まれるウイルス量は大量であり、極めて少量でも多くの患者を発生することが可能であり、ふん便および吐物はヒトを介して食品が汚染されないようにすることが食中毒発生の防止の基本である。

## G 研究発表

### 1. 論文発表

西尾 治、加藤由美子：PCR産物のマイクロプレートハイブリダイゼーションによるノーウオークウイルスの確認および遺伝子型別について、日本臨床、2002

古田敏彦、竹内寛行、東谷市郎、西尾治：大アサリの喫食を原因とするノーウオーク様ウイルスとA型肝炎ウイルスによる食中毒事例—浜松市、病原微生物検出情報、23、119-120、2002

西尾 治、秋山美穂、長谷川斐子、古屋由美子、大瀬戸光明、杉枝正明：輸入生鮮魚介類からのA型肝炎ウイルス検出状況、病原微生物検出情報、23、274-275、2002

入谷展弘、勢戸祥介、春木孝裕、川本尋義、西尾 治、久保英幸、村上 司、蓑城昇次、瀧野 薫、小倉 壽：河川水からの Norwalk virus の検出、生活衛生、46、137-143、2002

入谷展弘、勢戸祥介、春木孝裕、西尾治、久保英幸、村上 司、蓑城昇次、瀧野 薫、綾田 稔、小倉 壽：リア

ルタイム PCR 法を用いた Norwalk virus 検出法の評価、大阪市立環境科学研究所報告、64、6-10、2002

西尾 治、新川奈緒美：ノーウオーク様ウイルスによる集団発生、日本医事新報 No.4105、5-9、2002

西尾 治、西 香南子、福田伸治、西田知子、篠原美千代、沖村容子、新川奈緒美、杉枝正明、古屋由美子、大瀬戸光明、鈴木 宏：ウイルス性食中毒の病因、臨床とウイルス、31：(1)、2003 印刷中

古田俊彦、秋山美穂、加藤由美子、西尾 治：ノロウイルス（ノーウオークウイルス）とA型肝炎ウイルスに汚染されたウチムラサキ貝による食中毒事例、感染症学雑誌、77（2）、89-94、2003

福田美和、川田一伸、矢野拓也、杉山 明、中山 治、西尾 治、関根大正、櫻井悠朗：養殖カキのウイルス浄化試験、感染症学雑誌、77:2、95-102、2003

Doan LT, Okitsu S, Nishio O, Pham DT, Nguyen DH, Ushijima H. :Epidemiological features of rotavirus infection among hospitalized children with gastroenteritis in Ho Chi Ming City, Vietnam. J Med. Virol. 2003, 69:588-94.

### 2. 学会発表

H.Ushijima,L. Li,H. Shimizu, T.P. Lan, S. Okitu,O. Nishio, J.K.Seo, J.G. Sim. :Molecular epidemiology of adenovirus among children with Diarrhea in Japan, Vietnam and Korea. The

Japan-United states . Cooperative Medical Science, July.16-28,2002 P11, Matumoto, Japan

西尾 治：ウイルス性食中毒の病因、臨床ウイルス学会、第 42 回日本臨床ウイルス学会、2002. 6. 6-7、秋田市

Ushijima H, Zhou Y, Okitsu S, Zhu L, Ishihara K, Nishio O. : Molecular epidemiological study of diarrheal viruses in Japan from 1996-2000 and gene analysis of rotavirus serotype G9.4<sup>th</sup> China-Japan International Congress of Virology , 26-28, Jun, 2002,(Kun Ming, China

Ushijima H, Li L, Lan DTP, Okitsu S, Nishio O, Seo, JK, Sim JG. : Molecular epidemiology of adenovirus among children with diarrhea in Japan, Vietnam, and Korea. 36<sup>th</sup> Joint Meeting Conference on Viral Disease,16-18, Aug, 2002,Matumoto

Doan TPL, Okitsu S, Nishio O, Pham TD, Nguyen HD, Ushijima H.: Epidemiological features of rotavirus infection among hospitalized children with gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. 1<sup>st</sup> Asian Congress of Pediatric Infectious Disease,10-13, Nov. 2002,Pattaya, Thiland

H.Ushijima, H. Kono, YM Zhou, DTP Lan, S. Peerakome, N.Maneeakarn, S. Okitsu, O. Nishio.:Recent trend of rotavirus infection in Japan, Thailand and Vetnam. VII International Congress of Virology, 2002,July, Paris

A.Kawamoto, N. Matsumoto, T. Hosoi,

O. Nishio.: Epidemiology investigation of Norwalk virus detected in humans, environment and oysters. VII International Congress of Virology,2002, July, Paris

西尾 治：ウイルス性食中毒、第 134 回日本獣医学会学術集会、2002. 9. 19-21、岐阜市

西尾治、秋山美穂、加藤由美子：リアルタイム PCR 法による A 型肝炎ウイルスの検出について、第 76 回日本感染症学会、2002. 4. 11-12、P. 251、東京

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、2002. 10. 16-18、P. 178、札幌

古屋由美子、原みゆき、片山丘、今井光信、加藤由美子、秋山美穂、西尾治：イカ塩辛が原因の Norwalk virus による食中毒事例、第 50 回日本ウイルス学会、2002. 10. 16-18、P. 179、札幌

西田知子、三上稔之、沖村容子、篠原美千代、西香南子、川本歩、木村博一、杉枝正明、大瀬戸光明、春木考祐、鈴木宏、西尾治：国内産および韓国産カキのノーウォークウイルスおよび A 型肝炎ウイルスの汚染状況、第 50 回日本ウイルス学会、2002. 10. 16-18、P. 179、札幌

杉枝正明、大瀬戸光明、福田伸治、川本歩、木村博一、三上稔之、西田知子、新川奈緒美、西香南子、古屋由美子、

西尾治：全国各地で発生したノーウォークウイルス (NV) による食中毒事例について、第 50 回日本ウイルス学会、2002. 10. 16-18、P. 180、札幌

新川奈緒美、中山浩一郎、伊東祐治、西尾治：Norwalk virus による胃腸炎集団発生患者から排泄されるウイルス量と遺伝子型について、第 50 回日本ウイルス学会、2002. 10. 16-18、P. 181、札幌

西香南子、松野重夫、西尾治：カキ及び養殖海域の Norwalk virus 調査と環境因子との関連性、第 50 回日本ウイルス学会、2002. 10. 16-18、P. 183、札幌

山下育孝、大瀬戸光明、吉田紀美、近藤玲子、天辻康夫、一口毅、西尾治：ロタウイルスとアデノウイルスを同時に鑑別して検出する迅速診断キットの評価、第 50 回日本ウイルス学会、2002. 10. 16-18、P. 221、札幌

李蕾、清水英明、沖津祥子、西尾治、鈴木映子、牛島廣治：日本、ベトナム及び韓国における急性下痢症小児から分離されたアデノウイルス 41 型の Genome Type による比較、第 50 回日本ウイルス学会、2002. 10. 16-18、P. 275、札幌



平成14年度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

ノーウォーク様ウイルス中空粒子および抗血清の作製

分担研究者 名取克郎 国立感染症研究所ウイルス第二部 主任研究官  
協力研究者 片山和彦 国立感染症研究所ウイルス第二部 主任研究官  
勢戸祥介 大阪市立環境科学研究所 主任研究員  
三好龍也 堺市衛生研究所 研究員

研究要旨 培養増殖が出来ないノーウォーク様ウイルス (NLV) の抗原を得る手段として、遺伝子組換えバキュロウイルス発現系を利用して NLV のウイルス様中空粒子 (VLPs) の作製を行ってきた。高濃度の NLV 抗原が得られ、また高度免疫血清の作製が可能になったことによりそれらを用いた NLV 検出法の開発およびウイルス学的研究の進展をみた。しかし NLV は遺伝学的にも血清学的にも多様なウイルスであり、遺伝子解析が進むにつれ新たな遺伝子型また血清型を持つ株の存在が示唆された。遺伝子系統樹解析からそれらを選別して VLPs の発現を試み、3 株について VLPs が作製できた。抗原性の検討結果は 3 株はそれぞれ新しい血清型であることを示した。

A. 研究目的

下痢症患者あるいは生カキから検出された NLV の遺伝子、特に構造蛋白領域 (ORF2) の 5'末端の約 300 塩基の解析によって血清型が異なると予測された株について、組換えバキュロウイルス発現系を用い VLPs の発現をおこなってきた。昨年までに Genogroup-I (G-I) で 4 株、Genogroup-II (G-II) で 13 株の NLV-VLPs の作製が可能になった。発現 VLPs の血

清型は G-I=4 種、G-II=7 種に分類された。これらの発現抗原 (VLPs) と抗 VLP 血清は抗原検出 ELISA 法の開発、血清学的診断と血清疫学、そして NLV のウイルス学的研究に活用されている。

我々は NLV すべての血清型の VLPs 発現を目的として来たが、NLV の血清型と遺伝子型の関係が明らかになるにつれ、遺伝子分類の中から血清学的にも異なると思われる株がさらに明らかになってきた。それらから血清型が異なると

考えられ、VLPs がまだ発現出来ていない株についてVLPs の作製を試みた。また日本において初めて検出され、遺伝学的に G-I、G-II と異なると考えられる NLV 株も見つかり、VLPs を発現して血清学的分類を試みた。

## B. 研究方法

診断および検査の目的で検出された遺伝子、すなわち PCR で増幅された NLV 構造蛋白をコードする ORF2 の 5' 末端から約 300 ベースの塩基配列を解析し、発現候補株を選出した。候補株について ORF2 の約 1650 bp、あるいは ORF2 から 3' 末端の Poly-A までの約 2300 bp を増幅してクローニング後、組換えバキュロウイルスを作出した。組換えバキュロウイルスを Tn-5 細胞に感染させ 5 日間培養後、電気泳動による 58K 蛋白の確認と電子顕微鏡による中空ウイルス粒子の観察によって VLPs の発現を調べた。VLPs が発現できた株については濃縮・精製後ウサギで抗血清を作製した。すでに作製できた VLPs 抗原と抗血清と共に ELISA 法で交叉反応試験を行ない抗原性を検討した。

## C. 研究結果

遺伝子の系統樹解析から発現候補株を選出し、G-I 3 株、G-II 4 株の計 7 株で ORF2 あるいは ORF2+3 の遺伝子が増幅できた。遺伝子をクローニングした

後、組換えバキュロウイルスを作出し構造蛋白の発現を調べると G-I、G-II 各々 1 株 (W18/G-I、U25/G-II) で VLPs が発現できた。他の 5 株では 58K 蛋白の産生は見られなかった。

2000 年にオランダの Dr. M. P. G. Koopmans らによって、集団胃腸炎患者から遺伝的に NLV に属すが G-I、G-II に分類されない Alpatron virus の検出が報告された。1999 年から 2001 年にかけて大阪市内で発生した非細菌性集団胃腸炎事例で、電子顕微鏡でウイルス粒子が観察されるが遺伝子が検出できなかった 7 事例で Alpatron virus 特異的プライマーを用いて PCR を行ない Alpatron に近縁な遺伝子を検出した。7 株はほぼ同一の塩基配列を示し、ORF2 領域のホモロジー検索でこれらはすでに報告されている Alpatron/1998/NL, Fort Lauderdale/US/98, Saint Cloud/US/98 と高い相同性 (核酸: 88~91%、アミノ酸: 98~99%) を示した。G-I、G-II に分類される NLVs とは 53~61% の低い相同性だった。ORF2 から Poly-A 末端までを RT-PCR で増幅して組換えバキュロウイルスを作出し、Tn-5 細胞に感染すると 58~60K 蛋白が産生され直径約 38 nm のウイルス様中空粒子が電子顕微鏡で観察された。

VLPs が発現できた 3 株 (W18/G-I、U25/G-II、Alpatron 23) についてウ

サギで抗血清を作製し、今までに発現した19株との交叉反応試験を行なった。W18/G-IとU25/G-IIは遺伝学的分類と同様に血清学的にも各々G-IとG-IIに分類され、今までに発現できたVLPsとは異なった血清型と判断できた。Alphatron 23はG-I、G-IIから同程度異なるような結果を示したが、G-IIの10-25株と1152株に対し他よりわずかに強い交叉が見られた。

#### D. 考察と結論

本年度に発現できた株を加えると、G-I=5株、G-II=15株、血清型ではG-I=5種、G-II=9種のNLV抗原および抗血清を持つことになる。開発中の患者材料からの迅速かつ簡便なNLV検出法である抗原検出ELISAキットは遺伝子検出法の70%前後の検出成績である。その理由は検出感度の問題はもちろんあるが、ELISAキットに用いた抗体の種類はまだすべてのNLV血清型に対する抗体を含んでいないことに起因する。新たな血清型のVLPs抗原の発現によって抗原検出ELISA法のNLV検出率の向上が期待できる。

Alphatron virusは日本でも存在することが認められた。発現VLPsを用いて健常者の血中抗体を調べると抗体保有率は非常に低かった。Alphatron virusは日本において他のNLV程に広く浸潤していないと考えられる。遺伝学

的に他のNLVとの距離が離れているが詳細に検討するとG-IIに近く、また血清学的にもG-IIの二つの株と交叉がわずかに見られたことからAlphatron virusは新しいGenogroupとは言いがたくG-IIに属すと考えられた。

Alphatron株を含め現在14種の血清型の異なるNLVのVLPs抗原作製が可能になり、NLVの血清学的診断、疫学研究の信頼性が増した。しかし今回発現に成功しなかった株を含め、まだいくつかの血清型が異なると考えられる発現候補株ある。現在それらについてのVLPs発現を試みている。

#### E. 研究発表

##### 1. 学会発表

- 1) 入谷展弘、勢戸祥介、久保英幸、春木孝祐、名取克郎、武田直和、瀬戸俊之、服部英司、綾田稔、小倉壽「乳幼児におけるNorwalk virus感染に対する免疫応答」第50回日本ウイルス学会総会、2002年10月、札幌。
- 2) 勢戸祥介、入谷展弘、名取克郎、武田直和、久保英幸、綾田稔、小倉壽、春木孝祐「大阪市内で検出したAlphatron type NVの遺伝子解析および抗原性解析」第50回日本ウイルス学会総会、2002年10月、札幌。
- 3) 白土(掘越)東子、片山和彦、田村

克、名取克郎、岡 智一郎、武田直和、宮村達男 「ノーウォーク様ウイルスの組織特異性を決定する因子の検討」 第50回日本ウイルス学会総会、2002年10月、札幌。

## 2. 誌上発表

- 1) Kitamoto N., Tanaka T., Natori K., Takeda N., Nakata S., Xi Jiang, M. K. 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.* 40:2456-2465, 2002
- 2) Masaru Tamura, Katsuro Natori, Masahiko Kobayashi, Tatsuo Miyamura, Naokazu Takeda ; Soluble histone molecules inhibit attachment of Norovirus to mammalian cells. In press.
- 3) 名取克郎 「組換え抗原を用いた血清診断」 *日本臨床* ; 60, 2002年