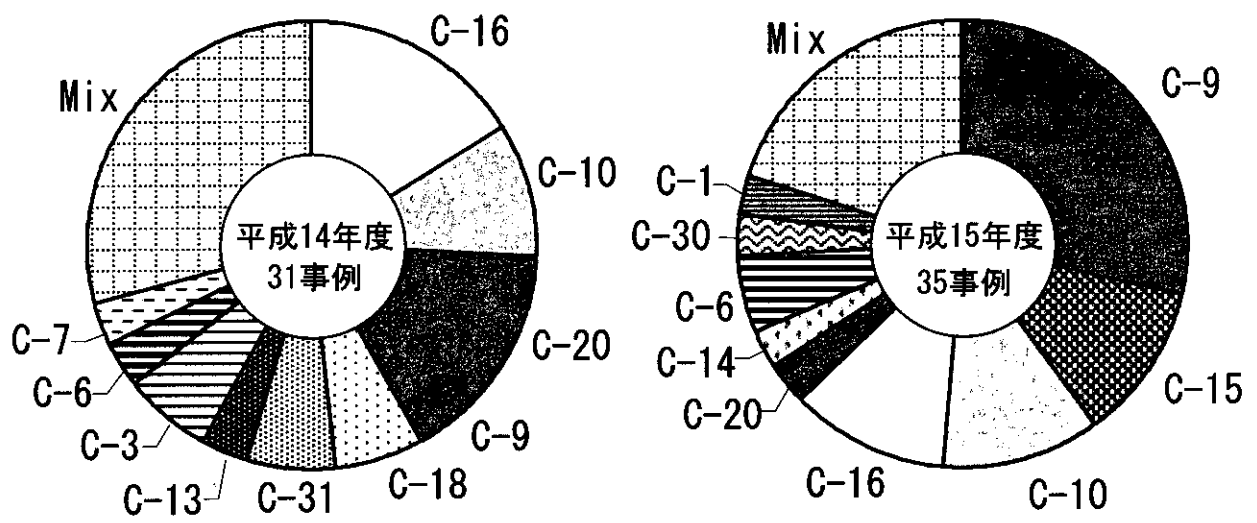


図1 集団胃腸炎事例から検出されたNVの遺伝子型



平成 15 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）  
分担研究報告書

食品中の微生物汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究

分担研究項目 ノロウイルス検査における RNA 抽出コントロールとしての  
エコーウイルス 9 型 Hill 株の適用について

分担研究者	兵庫県立健康環境科学研究所	藤本嗣人
協力研究者	同	近平雅嗣
	国立感染症研究所	西尾 治（主任研究者）
	同	秋山美穂

**研究要旨** ノロウイルス検査の RNA 抽出時のポジティブコントロールとしてエコーウイルス 9 型 Hill 株（E9 Hill）が使用可能であることが明らかになった。これまで、ポリオウイルス 2 型 Sabin 株（P2）がこの目的のために用いられてきた。しかし、ポリオ撲滅プログラムの進展とともに、実験室診断においても P2 の使用が難しくなりつつある。今回、新たにデザインしたプライマー対を使用して、E9 Hill は高感度かつ正確に検出可能であった。また、E9 Hill の添加はノロウイルス検査に影響しなかった。

#### A. 研究目的

RT-PCR 法において、検査材料からの RNA 抽出は重要な工程である。特にノロウイルス検査における RNA 抽出は、検査材料が糞便や食材であるために、検体中に RT-PCR 反応を阻害する物質が含まれている可能性が高い。そのため我々はノロウイルス検査における RNA 抽出コントロールとしてポリオウイルス 2 型 Sabin 株（P2）を用い、「ウイルス性下痢症診断マニュアル（第 3 版）（以下マニュアルとする）」の中で標準化した。しかし、ポリオ根絶計画は最終段階に進み、P2 の実験室での保管・管理の厳密化が進み、その使用が困難になることが予想される。また、ワクチン株であっても感染した場合に、ポリオ様の麻痺を発症する可能性がきわめて稀ながら存在す

る。そこで P2 の代替として、一般的にヒトに病原性がないと考えられている E9Hill を用いる系を確立することを目的とした。

#### B. 研究方法

##### 糞便材料の処理および RNA 抽出

糞便材料の処理および RNA 抽出は、マニュアル<sup>1)</sup>に準じて行った。兵庫県内の患者からウイルス検査目的で採取されたノロウイルス陽性 8 名および下痢症以外の患者 12 名（うち 6 名は無菌性髄膜炎）の合計 20 名の糞便を用いた。

これらの糞便を PBS(-)2.7mL に加えて全量 3mL（10%）になるよう加え、激しく攪拌して乳剤を作製した。その乳剤 200  $\mu$ L を分取して 12,000rpm で 20 分間冷却遠心した。この遠心上清から QIAamp Viral

RNA mini kit (Qiagen)を用い、添付のマニュアルに従って RNA を抽出した。

検体 20 件のうち、ノロウイルス陽性検体 8 件の便乳剤遠心上清 138  $\mu$  L に E9 Hill 培養上清 2  $\mu$  L を追加分注したものを作製して RNA 抽出コントロールとした。

### cDNA の合成

マニュアル<sup>1)</sup>に準じ SuperScript™ II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase (Invitrogen)を用いて全量 30  $\mu$  L の系でおこなった。反応液組成は、RNA 抽出液、14  $\mu$  L、5 $\times$ 添付バッファー、6  $\mu$  L、10mM dNTP (Invitrogen)、1.5  $\mu$  L、pd(N)<sub>6</sub> (Amersham Biosciences、500ng/ $\mu$  L に調製)、0.8  $\mu$  L、Ribonuclease Inhibitor (40U/ $\mu$  L) (Invitrogen)、1.0  $\mu$  L、100mM dTT #、1.5  $\mu$  L、上記の RT 酵素(200U/ $\mu$  L)、1.5  $\mu$  L および RNA 用の水 3.7  $\mu$  L を用いた。反応温度は 42°C 1 時間とし、99°C 5 分間加熱して酵素を失活させ、4°C に急冷した。温度制御には下記の PCR の過程を含めて Thermal cycler Dice (TaKaRa)を用いた。

### E9 Hill 用のプライマー

E9 Hill の全ゲノム配列 (GenBank accession No. X84981) 7420base のうち、ポジション 5003-5671 の間に、増幅産物のサイズが 260-280bp になるようプライマー (T<sub>m</sub> 値は約 50°C) を設定した。この領域は、これまで使用してきたポリオウイルスの増幅部位に近く、pd(N)<sub>6</sub> に代えて pd(T)<sub>12-18</sub> を用いた場合でもゲノムの 3'末端 (ポリ A 鎖) からの位置が大きく異ならないためである。

E9Hill 用のプライマー対は Primer3

([http://www-genome.wi.mit.edu/genome\\_software/other/primer3.html](http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html)) および Genetyx 等のソフトウェアを利用してデザインした。E9Hill-F, 5'-Gtt AAC TCC ACC CTA CAg AT-3'、センスプライマー、ポジション 5192-5211 および E9Hill-R, 5'-TgAACT CAC CAT ACT CAg TC-3'、アンチセンスプライマー、ポジション 5459-5440 である。このプライマー対による E9 Hill の増幅産物のサイズは 268bp と計算された。

### ノロウイルス検出用プライマー

マニュアルに準じてジェノグループ G1 用のプライマー対として G1-SKF, 5'-CTg CCC gAA TTY gTA AAT gA-3' (Y= C or T)/G1-SKR, 5'-CCA ACC CAR CCA TTR TAC A-3' (R= A or G) および COG1F, 5'-CgY Tgg ATg CgN TTY CAT gA-3' (N=A,C,G or T)/COG1R, 5'-CTT AgA CgC CAT CAT CAT TYA C-3'を用いた。同様にジェノグループ G2 にも 2 種類のプライマー対として、G2-SKF, 5'-CNT ggg Agg gCg ATC gCA A-3' / G2-SKR, 5'-CCR CCN gCA TRH CCR TTR TAC AT-3' (H=A,C or T) および COG2F, 5'-CAR gAR BCN ATg TTY AgR Tgg ATg Ag-3' (B=C,g or T)/COG2R, 5'-TCg ACg CCA TCT TCA TTC ACA-3' を用いた。

### PCR

マニュアルに準じて Ex-Taq (TaKaRa)を用いた。反応は 94°C で 3 分間反応後、94°C 30 秒、50°C 30 秒、72°C 1 分を 1 サイクルとして 40 サイクルの PCR 増幅を行い、72°C 7 分反応させた。反応液の組成は、蒸

留水, 17.7  $\mu$ L, 10 $\times$  Ex Taq バッファー, 2.5  $\mu$ L, 2.5mM dNTP 2  $\mu$ L, センスプライマー (100  $\mu$ M), 0.12  $\mu$ L, アンチセンスプライマー (100  $\mu$ M), 0.12  $\mu$ L, cDNA, 2.5  $\mu$ L, Ex Taq, 0.12  $\mu$ L で全量 25  $\mu$ L とした。

プライマー対はノロウイルス用 4 対、E9Hill-F および E9Hill-R に加えて、エンテロウイルスのユニバーサルプライマー<sup>2)</sup>である EVP4 および OL68-1 も用いた。

### E9 Hill 用 PCR の感度に関する実験

E9 Hill の RD-18S 細胞での力価は Reed-Muench 法で 5.67log TCID<sub>50</sub>/25  $\mu$ L であった。このウイルス液を PBS(-) で 10<sup>-2</sup> ~ 10<sup>-8</sup> に階段希釈して、各希釈倍率の 140  $\mu$ L から前述の通り cDNA を合成した。これを上記の PCR で増幅して産物が見られるか否かを検討した。

### アガロース電気泳動による増幅産物の確認

2% ウルトラピュア アガロース (Invitrogen) および TAE バッファーを用いてミューピッド $\alpha$  (100V) で 30 分間泳動した。染色はエチジウムブロマイドで行い、UV 照射下で写真撮影した。マーカーには 100bp DNA Ladder (第一化学) を用いた。

## C. 研究結果

### E9 Hill 用のプライマーを用いた PCR

ノロウイルス陽性の下痢症検体 8 件に E9Hill を添加してから RNA 抽出した検体では、E9Hill-F および E9Hill-R を使用した PCR で 268bp の増幅産物が明瞭に観察

された。一方、未添加の対応するノロウイルス陽性検体では、同じ反応で全く増幅産物が見られなかった(Fig.1)。その他の無菌性髄膜炎検体 6 件および感染性胃腸炎検体 6 件 (計 12 件) でも増幅産物は確認されなかった。

### ノロウイルス特異的プライマーを用いた PCR

E9 Hill を添加したノロウイルス陽性検体 8 件についてノロウイルス PCR を実施したところ、全ての検体でノロウイルスのゲノムが確実に検出された。Table.1 に示した通り、8 件中 1 件はジェノグループ G1 と G2 の混合感染、5 件は G2 の感染、2 件は G1 に感染していたと判定された。これらの結果は E9Hill を添加しない検体で得られた結果と同じで、添加による影響は観察されなかった。

### エンテロウイルス検出用プライマーを用いた PCR

E9 Hill を添加したノロウイルス陽性検体 8 件では増幅がはっきりと確認できたが、未添加の同じ 8 件はすべて陰性であった。その他の 12 名中 5 名の検体からエンテロウイルス遺伝子が検出された。うち 4 名は無菌性髄膜炎患者であり、1 名は感染性胃腸炎患者 (髄膜炎に伴う嘔吐が疑われた患者) であった。この結果から E9 Hill 用にデザインしたプライマー対は少なくとも今回 5 名から検出されたエンテロウイルスのゲノムを増幅しないことが示された。

### E9 用 PCR の感度

10<sup>-6</sup> 倍まで明瞭な 268bp の増幅産物が見

られた(Fig.2)。陽性コントロールは確実に検出される必要があり、 $10^{-4}$ 倍希釈は明瞭な増幅バンドが観察されて非特異増幅がほとんど見られなかったので、陽性コントロールの希釈倍率として適切と考えられた。計算の結果、E9 Hill の力価  $3.5 \log \text{TCID}_{50}/25 \mu\text{L}$  のウイルス液  $2 \mu\text{L}$  が RNA 抽出コントロールとして適していた。

#### D. 考察

本研究の目的は、国がノロウイルス検査法を標準化する目的で発行する検査マニュアル中で用いられるポリオウイルスに代えて E9 Hill を用いる手法を示すことであり、それが可能なことが明らかになった。E9 Hill の添加は、ノロウイルス PCR に影響が見られず、反応を阻害しないものと考えられる。今回デザインした E9Hill 用プライマー対による E9 Hill の PCR で、検査結果に影響しないレベルの少量の非特異的な増幅が見られるケースが見られた (Fig.1, 2) が、これは添加する E9 Hill 溶液を希釈することで防止でき、力価  $3.5 \log \text{TCID}_{50}/25 \mu\text{L}$  のウイルス液  $2 \mu\text{L}$  が RNA 抽出コントロールとして適していると計算された。この陽性コントロールを添加した場合、ノロウイルス検査においても前述したように検査結果に影響を及ぼさなかった。

糞便中のウイルス RNA の抽出は、糞便以外に適切な検査材料がないノロウイルス検査において特に重要であるので、その抽出法の標準化が必要である。しかし、2003 年現在、ウイルス RNA 抽出キットとして市販されているもので、糞便を適用対象としているものは、我々が把握している限り、存在しない(ただし、糞便中のウイルス

DNA を対象としたものは近年入手可能となった)。これは、RNA が壊れやすい物質で、RT-PCR に及ぼす糞便の組成等が個々に異なり、標準化しにくいためと考えられる。E9Hill と今回デザインしたプライマー対 (E9Hill-S +E9Hill-R) を使用した手法は、RNA 抽出および RT 反応過程のコントロール実験として有用であると考ええる。

#### E. 参考文献

- 1) 西尾治：ノロウイルスの RT-PCR 法、ウイルス性下痢症診断マニュアル (第 3 版), 44-62, 2003.
- 2) 石古博昭、成沢忠、北村明子 他：PCR 増幅 DNA のストリンジェント・リバーシ固相ハイブリダイゼーションによるエンテロウイルスの型鑑別、臨床とウイルス, 22: 199-207,1994.

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 藤本嗣人、近平雅嗣、芥川 宏、西尾治：兵庫県阪神地域における妊婦および 0-9 歳児のkokosakkyu-B 群ウイルスに対する中和抗体保有状況について、兵庫県立健康環境科学研究センター年報、2、103-106、2003.
- 2) 藤本嗣人、近平雅嗣、秋山美穂、西尾治：ノロウイルス検査における RNA 抽出コントロールとしてのエコーウイルス 9 型 Hill 株の適用について、兵庫県立健康環境科学研究センター年報、2、107-110、2003.
- 3) 藤本嗣人、近平雅嗣、増田邦義、西尾治、吉田 茂：日本において一般的に軽症と考えられている手足口病が、兵庫県におい

て死亡例と後遺症例を含む、重症中枢神経患者を多発させたケースに関する調査研究、ひょうごの公衆衛生、18、23-24、2003.

- 4) 岡藤隆夫、岡藤輝夫、藤本嗣人、近平雅嗣：アデノウイルス感染症－免疫クロマト法による迅速診断法の有用性について－、外来小児科、6、293-295、2003.
- 5) 近平雅嗣、藤本嗣人、池野まり子、押部智宏：2002/2003 シーズンのノロウイルスの施設内流行事例、病原微生物検出情報月報、24、319-320、2003.
- 6) 藤本嗣人、近平雅嗣、岡藤輝夫、岡藤隆夫：アデノウイルスによる滲出性扁桃炎－兵庫県、病原微生物検出情報月報、24、136-137、2003.

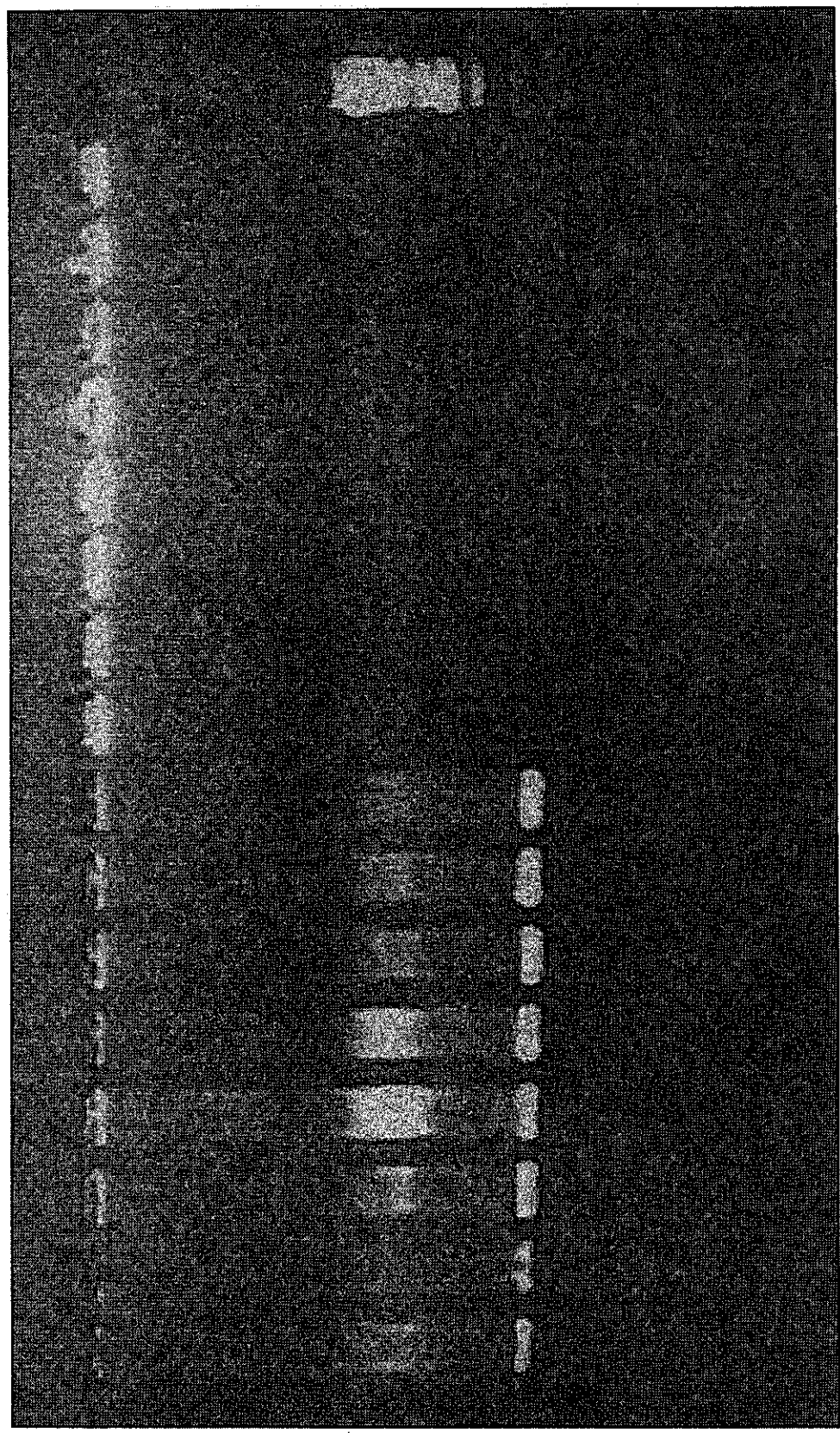
## 2. 学会発表

- 1) 藤本嗣人、近平雅嗣、西尾 治：コクサッキーB 群ウイルスに対する小児および妊婦の抗体保有調査、第 44 回日本臨床ウイルス学会、鹿児島市、2003.
- 2) 宗村徹也、七種美和子、川上千春、野口有三、藤本嗣人、近平雅嗣、吉田弘：分子系統学的手法によるエンテロウイルス同定のためのクラスタリング尺度の設定、第 44 回日本臨床ウイルス学会、鹿児島市、2003.
- 3) 藤本嗣人、近平雅嗣、西尾 治、岡藤 輝夫、岡藤 隆夫：平成 15 年に兵庫県で発生した 過去 10 年間で最大規模の咽頭結膜熱の流行時におけるウイルス検索結果および臨床現場におけるアデノウイルス迅速診断キットの有効性に関する検討、平成 15 年度兵庫県公衆衛生協会中央研究会、神戸市、2003.

Table.1 Results of *Norovirus* specific PCRs and E9 Hill specific PCR

Primer pair	<i>Norovirus</i> positive samples E9 Hill added								product size
	1	2	3	4	5	6	7	8	
G1-SKF/ G1-SKR	+	-	-	-	-	-	+	+	330bp
COG1F/ COG1R	+	-	-	-	-	-	+	+	85bp
G2-SKF/ G2-SKR	+	+	+	+	+	+	-	-	344bp
COG2F/ COG2R	+	+	+	+	+	+	-	-	98bp
E9 Hill-F/ E9 Hill-R	+	+	+	+	+	+	+	+	268bp

+: positive, -: negative



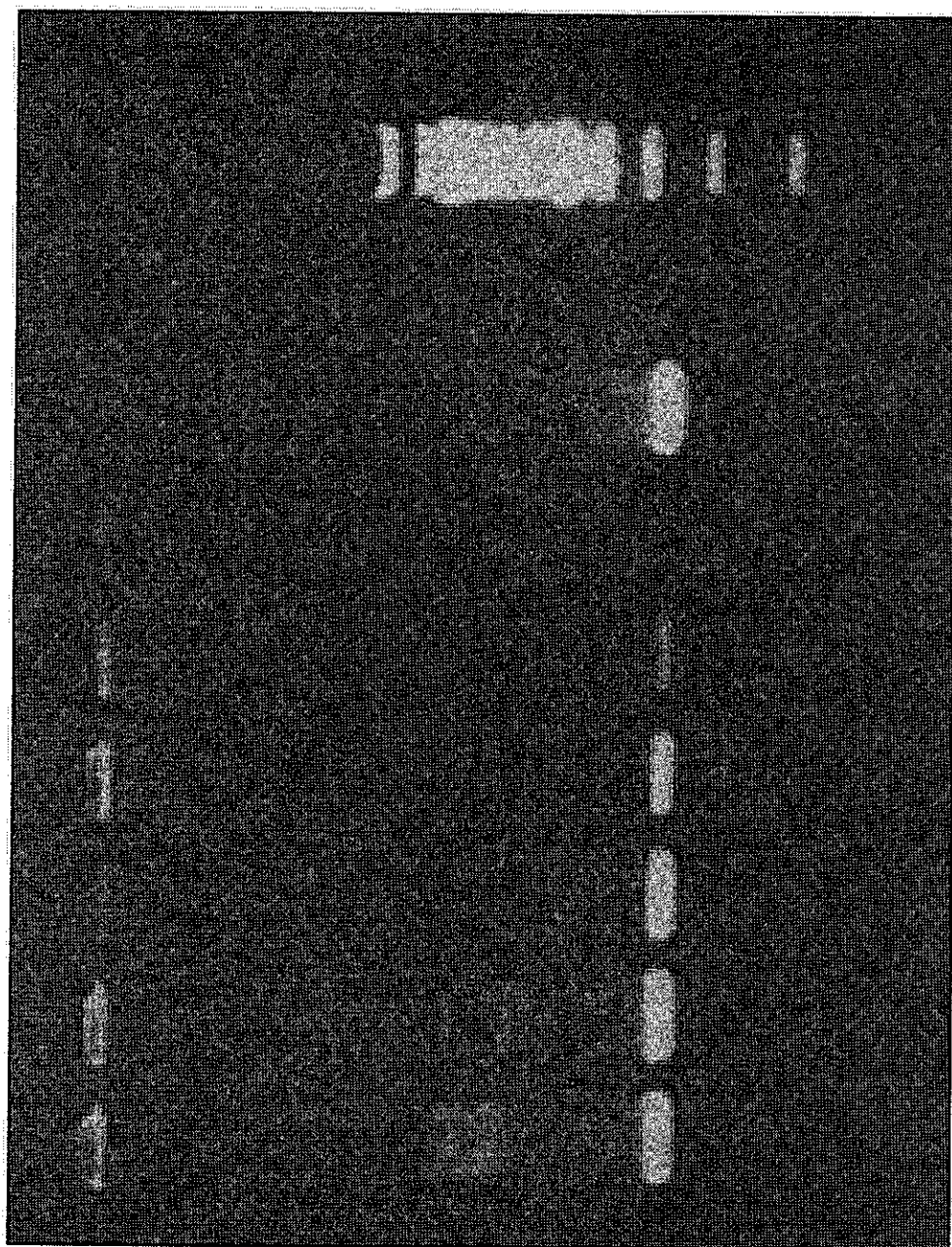
268bp →

Sample 1-8, E9 Hill added      Sample 1-8

Fig.1 E9Hill特異的PCRはE9Hill添加検体のみ陽性

DNA Ladder





268bp →

DNA Ladder

$\times 10^{-2}$   $10^{-3}$   $10^{-4}$   $10^{-5}$   $10^{-6}$   $10^{-7}$  Pos. Neg.

Fig.2 E9HIII特異的PCRの検出感度

平成 15 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）  
分担研究報告書

食品中の微生物汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究

分担研究項目 輸入、国内の食品及び環境中のウイルス汚染に関する研究

分担研究者 兵庫県立健康環境科学研究所 センター 藤本嗣人  
協力研究者 静岡県環境衛生科学研究所 杉枝正明

**研究要旨** 輸入食品（海産物）41 件を対象にウイルス分離試験(Hep-2 および GL37)を実施した。2 ヶ月間にわたって盲継代を繰り返したがウイルスは分離されなかった。これまで平成 13 年度に 100 検体、平成 14 年度に 119 検体についてウイルス分離を実施したが陰性であり、合計 260 検体の輸入海産物からウイルスは分離されなかった。

**A. 研究目的**

輸入食品についてウイルスの分離試験を行うことにより、輸入食品の安全性を試験する。これにより食品のウイルス汚染における健康被害リスク評価を行うための基礎データを得る。

**B. 研究方法**

**検体**

平成 15 年度に静岡県で購入された 41 検体[中国（27 件）、韓国（9 件）、北朝鮮（2 件）、ロシア（1 件）から輸入された貝類 39 件およびベトナムおよびインドネシアから輸入されたエビ 2 件]を用いた。検体は 2003 年 4～2004 年 2 月に静岡県で購入され処理された乳剤を用いた。

**検査方法**

2 種類の細胞（Hep-2 および GL37）によるウイルス分離を行った。ウイルス分離は 24 ウェルマイクロプレートを用いて 2 ヶ月間、その間に盲継代をして細胞変性(CPE)を観察した。

**C. 研究結果**

① 41 検体の食品からエンテロウイルスおよびその他のウイルスは分離されなかった。

② 赤貝とハマグリで継代を重ねても、細胞の弱いながら変形を起こすものが見られた

が、エンテロウイルスおよびアデノウイルス等の細胞変性とは異なっていた。特に、赤

貝およびハマグリにこの傾向が見られた。

**D. 考察**

海産物からウイルスが分離されなかった。したがって、試験した輸入食品はエンテロウイルス、アデノウイルス等のウイルスに汚染されていないと考えられた。この

結果は過去 2 年（平成 13 年度 100 検体および平成 14 年度 119 検体）と同じである。

調査した検体からウイルスが分離されなかったことから、輸入海産物のエンテロウイルス、アデノウイルス等の汚染率が低いことが推定された。

本年度は、①ウイルスが細胞にアダプテーションするのに時間がかかる可能性があり、②ごく微量のウイルスしか魚介類に含まれていない可能性の 2 つを考慮して 2 ヶ月間と、これまでの 3 週間より長く分離培養を実施した。しかし、長期間培養を継続してもウイルスは分離されなかった。ハマグリおよび赤貝で培養細胞を変性させる傾向が強いことは、平成 13 年度も報告したが、この傾向は長期間の継代培養をしても程度は弱まるものの観察された。

諸外国では日本で流行していない血清型のエンテロウイルスが流行しているため、輸入食品中の感染性ウイルスはたとえ頻度が少なくても、その国内への侵入を軽視することはできない。本調査は長期間の培養によってウイルスを検出することを試みたが、少数の検体を丁寧に調査するよりも、多数の検体について数週程度のウイルス分離あるいは遺伝子検出によってスクリーニングする方が、低頻度と推定されたエンテロウイルス汚染魚介類を検出するのに、適した戦略であるように思慮された。

## E. 結論

輸入魚介類 41 検体について、Hep-2 細胞および GL37 細胞を用いて 2 ヶ月間ウイルス分離を試みたがウイルスは分離されなかった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 藤本嗣人、近平雅嗣、芥川 宏、西尾 治：兵庫県阪神地域における妊婦および 0-9 歳児のコクサッキー B 群ウイルスに対する中和抗体保有状況について、兵庫県立健康環境科学研究所年報、2、103-106、2003.
- 2) 藤本嗣人、近平雅嗣、秋山美穂、西尾 治：ノロウイルス検査における RNA 抽出コントロールとしてのエコーウイルス 9 型 Hill 株の適用について、兵庫県立健康環境科学研究所年報、2、107-110、2003.
- 3) 藤本嗣人、近平雅嗣、増田邦義、西尾 治、吉田 茂：日本において一般的に軽症と考えられている手足口病が、兵庫県において死亡例と後遺症例を含む、重症中枢神経患者を多発させたケースに関する調査研究、ひょうごの公衆衛生、18、23-24、2003.
- 4) 岡藤隆夫、岡藤輝夫、藤本嗣人、近平雅嗣：アデノウイルス感染症—免疫クロマト法による迅速診断法の有用性について—、外来小児科、6、293-295、2003.
- 5) 近平雅嗣、藤本嗣人、池野まり子、押部智宏：2002/2003 シーズンのノロウイルスの施設内流行事例、病原微生物検出情報月報、24、319-320、2003.
- 6) 藤本嗣人、近平雅嗣、岡藤輝夫、岡藤隆夫：アデノウイルスによる滲出性扁桃炎—兵庫県、病原微生物検出情報月報、24、136-137、2003.

## 2. 学会発表

- 1) 藤本嗣人、近平雅嗣、西尾 治：コクサッキーB 群ウイルスに対する小児および妊婦の抗体保有調査、第 44 回日本臨床ウイルス学会、鹿児島市、2003.
- 2) 宗村徹也、七種美和子、川上千春、野口有三、藤本嗣人、近平雅嗣、吉田弘：分子系統学的手法によるエンテロウイルス同定のためのクラスタリング尺度の設定、第 44 回日本臨床ウイルス学会、鹿児島市、2003.
- 3) 藤本嗣人、近平雅嗣、西尾 治、岡藤 輝夫、岡藤 隆夫：平成 15 年に兵庫県で発生した 過去 10 年間で最大規模の咽頭結膜熱の流行時におけるウイルス検索結果および臨床現場におけるアデノウイルス迅速診断キットの有効性に関する検討、平成 15 年度兵庫県公衆衛生協会中央研究会、神戸市、2003.
- 4) 杉枝正明、古屋由美子、大瀬戸光明、藤本嗣人、新川奈緒美、田中俊光、山口卓、長谷川斐子、西尾 治：輸入生鮮魚介類によるウイルス汚染状況について、第 51 回日本ウイルス学会、京都市、2003.

輸入食品の組織培養によるウイルス分離/H15年度 兵庫県立健康環境科学研究所

検体採取日	受け取り日	Sample name	DATA	GL37細胞	Hep-2細胞	
1	2003/4/22	2003/4/23	03-6	04/22/03: 中国産赤貝	—	—
2	"	"	03-7	04/22/03: 中国産ハマグリ	—	—
3	"	"	03-8	04/22/03: 中国産ハマグリ	—	—
4	"	"	03-9	04/22/03: 中国産赤貝	—	—
5	"	"	03-10	04/22/03: 韓国産タイラ貝	—	—
6	2003/5/15	2003/6/11	03-16	05/15/03: 中国産赤貝	—	—
7	"	"	03-17	05/15/03: 中国産ハマグリ	—	—
8	"	"	03-18	05/15/03: 韓国産タイラ貝	—	—
9	"	"	03-19	05/15/03: 中国産ハマグリ	—	—
10	"	"	03-20	05/15/03: 中国産赤貝	—	—
11	2003/6/18	2003/6/24	03-26	06/18/03: 中国産赤貝	—	—
12	"	"	03-27	06/18/03: 北朝鮮産ハマグリ	—	—
13	"	"	03-28	06/18/03: 中国産ハマグリ	—	—
14	"	"	03-29	06/18/03: 韓国産赤貝	—	—
15	"	"	03-30	06/18/03: 中国産ハマグリ	—	—
16	2003/7/30	2003/8/9	03-36	07/30/03: 中国産赤貝	—	—
17	"	"	03-37	07/30/03: 韓国産タイラ貝	—	—
18	"	"	03-38	07/30/03: 中国産ハマグリ	—	—
19	"	"	03-39	07/30/03: ベトナム産ブラックタイガー	—	—
20	"	"	03-40	07/30/03: 中国産赤貝	—	—
21	"	"	03-41	07/30/03: 中国産ハマグリ	—	—
22	"	"	03-42	07/30/03: 中国産ハマグリ	—	—
23	2003/8/29	2003/9/10	03-49	08/29/03: 中国産ハマグリ	—	—
24	"	"	03-50	08/29/03: ロシア産赤貝	—	—
25	"	"	03-51	08/29/03: 中国産赤貝	—	—
26	"	"	03-52	08/29/03: 中国産ハマグリ	—	—
27	"	"	03-53	08/29/03: 中国産赤貝	—	—
28	"	"	03-54	08/29/03: 韓国産赤貝	—	—
29	2004/1/23	2004/2/20	03-87	01/23/04: インドネシア産ブラックタイガー	—	—
30	"	"	03-88	01/23/04: 韓国産赤貝	—	—
31	"	"	03-89	01/23/04: 中国産赤貝	—	—
32	"	"	03-90	01/23/04: 中国産ハマグリ	—	—
33	"	"	03-91	01/23/04: 中国産ハマグリ	—	—
34	"	"	03-92	01/23/04: 北朝鮮産ハマグリ	—	—
35	"	"	03-93	01/23/04: 韓国産タイラ貝	—	—
36	2004/2/6	2004/2/20	03-102	02/06/04: 中国産赤貝	—	—
37	"	"	03-103	02/06/04: 中国産ハマグリ	—	—
38	"	"	03-104	02/06/04: 韓国産タイラ貝	—	—
39	"	"	03-105	02/06/04: 韓国産ハマグリ	—	—
40	"	"	03-106	02/06/04: 中国産ハマグリ	—	—
41	"	"	03-107	02/06/04: 中国産赤貝	—	—

\* 検体はすべて静岡県で購入されたものである。

平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金 (食品安全確保研究事業)  
分担研究報告書

食品中の微生物汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究

分担研究項目 日本とベトナムの小児における Norovirus 感染に関する研究  
下痢症ウイルスの迅速診断法の開発—Multiplex-PCR 法—

分担研究者 牛島 廣治 東京大学大学院医学研究科発達医科学 教授  
研究協力者 沖津 祥子 顔 海念 Tuan Anh Nguyen Tung Gia Phan  
大亀 路生 東京大学院・医・発達医科学  
西尾 治 国立感染症研究所

研究要旨

NV 感染小児下痢便が貝類を汚染していると考えられている。本研究は貝類汚染と NV 感染小児下痢便との因果関係を探ることを目的とし、1995 年から 2000 年と 2002 年 10 月から 2003 年 9 月において日本 5 箇所の病院から得られた小児下痢便検体と、さらに、海外 (ベトナム) で得られた小児下痢便検体に対して Norovirus (NV) の検査を行った。RT-PCR 法で陽性となった検体に対し遺伝子解析後系統樹を作成した結果、小児の NV 下痢症患者において毎年、Lordsdale 株と Mexico 株に近縁な株が NV 感染の 80% 以上を占めていることが判明した。有用な診断法の開発を目的とし、Multiplex-PCR 法を開発し、下痢症を引き起こすウイルスである NV の Genogroup I と Genogroup II (GI, GII)、Sapovirus, Astrovirus の 4 種のウイルスを同時に検出できることを証明した。

A. 研究目的

貝類による NV 感染は日本において重大な問題である。貝類の汚染の原因として、NV 感染小児便が河川に流れ、貝類を汚染しているという考えもあるため、小児における NV 感染発生状況を把握することは貝類の汚染状況を知るために重要である。また、日本で消費されている貝類の多くは海外から輸入されているものが多く、海外の NV 感染状況を知ることにも必要である。そこで、日本と海外の小児における NV 感染状況を把握すること

を目的とした。

また、診断法に用いられている PCR 法は費用と時間がかかるため、同時に数種のウイルスを検出できる診断法の確立は意義のあることである。そこで NV と同様に貝類に蓄積される SV、同じ小型ウイルスである AstV を同時検出できる Multiplex-PCR 法の開発を試みた。

B. 研究方法

1995 年 7 月から 2000 年 6 月において日本 5 箇所の病院から得られた小児便

2654 検体と、2002 年から 2003 年に得られた 515 検体において、ポリメラーゼとキャプシド領域のプライマーを用いて、RT-PCR 法を行い NV を検出した。また、海外の小児の検体は、2002 年 10 月から 2003 年 9 月にベトナムのホーチミン市第一小児病院で集めた下痢症便 1010 検体について RT-PCR 法を用いて同様に NV を検出した。NV 陽性の検体についてはキャプシド領域を用いて遺伝子解析を行い系統樹を書き、遺伝子型 (Genotype) による NV の流行を調べた。

Multiplex-PCR 法には、4 種のプライマーセット、NVGI 用 (G1SKF-G1SKR)、NVGII 用 (COG2F-G2SKR)、SV 用 (SV5317-SV5749)、AstV 用 (PreCAP1-82b) を用いた。検出の評価としては、cDNA を段階希釈して Monoplex-PCR と Multiplex-PCR の検出限界を比較した。また 2001 年 12 月から 2003 年 4 月において中国雲南省における小児下痢症患者から採取した糞便検体に対して Multiplex-PCR 法を用いて、陽性となった検体については、目的した産物が得られたどうか確認するため、遺伝子解析を行いウイルスの同定をした。

### C. 結果

1995 年から 2000 年の間に得られた 2654 検体のうち 292 検体が NV 陽性となり、292 検体のうち、7 検体が GI、285 検体が GII であった。2002 年から 2003 年に得られた 515 検体のうち 101 検体が NV 陽性となり、101 検体のうち、5 検体が GI、96 検体が GII であった。2000 年以前の検体で NVGII であった 285 検体を

遺伝子解析し、系統樹を作製した結果、165 検体が Lordsdale-cluster である (GII/1)、72 検体が Mexico-cluster である (GII/2) に属し、残りの 55 検体は 6 つのクラスターに分かれた。GII/1 は毎年検出される NV の約 60% を、GII/2 が約 20% を占め、ふたつの Genotype で小児における NV 感染の約 80% を占めることがわかった。2002 年から 2003 年の検体において、同様に遺伝子解析を行った結果、NVGII96 検体のうち 76 検体が GII/1、12 検体が Seacroft-cluster である (GII/8)、4 検体が GII/2、残りに検体がさらに 3 つの cluster に属した。ベトナムで得られた検体では、56 検体が NV 陽性となり、56 検体すべてが GII であった。Genotype のうちわけは、46 検体が GII/1、10 検体が GII/2 であった。日本の小児における NV 感染の流行は 11 月・1 月にピークが見られた (図 1)。ベトナムにおいては、NV の流行に偏りは見られなかった。

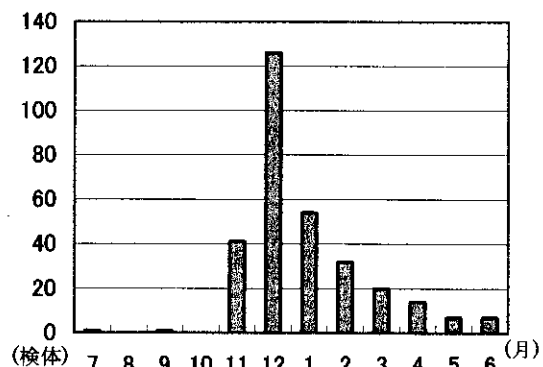


図 1 日本における NV 感染の流行時期

Multiplex-PCR 法と Monoplex-PCR 法を比較した結果、4 種のウイルス全てにおいて、cDNA の 10 倍段階希釈系列において 1 オーダーのみ Monoplex-PCR がよ

り検出感度が高い結果となった。中国で得られた検体に対して Multiplex-PCR を行った結果、NVGI 2 検体、NVGII 9 検体、SV 3 検体、AstV 6 検体を検出した。陽性となったすべての検体に対して遺伝子解析を行い、Multiplex-PCR 法の結果と比較した結果、PCR 法で陽性であった検体すべてがターゲットとしたウイルスであることが確認された。

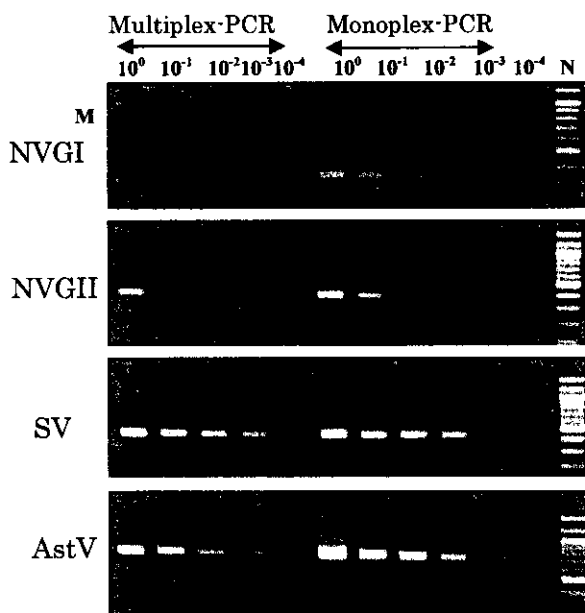


図2 Multiplex-PCRとMonoplex-PCRのcDNA10倍段階希釈による比較

#### D. 考察

日本の小児 NV 感染において、2000 年以前において Lordsdale 株と Mexico 株に近縁な株が流行し、この 2 種類の株が 80% を占めていた。2002 年から 2003 年においては、GII/1 (79%)、GII/8 (12.5%)、GII/2 (4%) の順に NV が流行しており、GII/2 にかわって今後 GII/8 が流行し始める可能性がある。2002 年から 2003 年のベトナムにおいては、GII/1 (82%) と GII/2 (18%) の 2 つの Genotype のみ検

出され、ほとんど日本と同様な Genotype が流行していることが判明した。世界的にみて小児においては GII/1,2 が流行していると考えられる。小児 NV 感染と貝類の NV 汚染の因果関係については、日本の小児感染のピークが 11 月-1 月であり、貝類から NV が検出されるのは 1 月以降であるという状況を考えると NV 感染小児便が貝類汚染の原因であることは否定できない。しかし、小児からは毎年きまった Genotype が流行している事実を考慮にいと貝類汚染には NV 感染小児便以外にもほかの要因が疑われる。今後、小児だけでなく大人の散発例を対象として疫学調査が必要であろう。

今回 Multiplex-PCR を用いて、糞便検体より NVGI, NVGII, SV, AstV の 4 種のウイルスを同時に検出できることを明らかにした。検出感度は Monoplex と比べると、わずかであるが落ちた結果となった。しかし、中国の小児の便検体を用いて行った臨床検査の結果より Multiplex-PCR は同時に 4 種のウイルスを検出し、また遺伝子解析の結果、ターゲットとしたウイルスであることが確認されたことより、検出感度における Monoplex とのわずかな差は問題ないと思われる。

従来の Monoplex-PCR に比べて、Multiplex-PCR では、時間と費用ともに節約できるという利点を考えると、臨床または、食品検査のように大量な検体を検査するときにおいて、Multiplex-PCR 法は有効な診断法となりうるであろう。

#### E. まとめ

日本の小児 NV 感染において、



Lordsdale 株とに近縁な株が 1995 年から 2000 年において毎年、NV 感染の約 80% を占めており、2002 年から 2003 年においては両方の株に近縁な株のみ占めていた。2002 年から 2003 年の日本の結果では Seacroft に近縁な株が多く検出されたが、Genotype の流行は大きな変化はなかった。Multiplex-PCR 法により NVGI, NVGII, SV, AstV の 4 種を同時に検出することに成功し、さらに目的とする遺伝子を増幅できたことが遺伝子解析により確認できた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Tran T-T Huy, Ushijima H, Ngoc TT, Ha LD, Hayashi S, Sata T, Abe K.

Recombination of genotype B and C in hepatitis B virus isolated from a Vietnamese patient with fulminant hepatitis. *Jpn J Infect Dis* 56: 35-37, 2003.

2. Yumei Zhou, Lei Li, Shoko Okitsu, Niwat Maneekarn, and Hiroshi Ushijima

Distribution of Human Rotaviruses, especially G9 Strains, in Japan from 1996 to 2000. *Microbiol & Immunol* 47: 591-599, 2003.

3. Schroder HC, Ushijima H, Krasko A, Gamulin V, Thakur NL, Diehl-Seifert B, Mueller WEG

Emergence and disappearance of an immune molecule, an antimicrobial lectin, in basal metazoa, a tachylectin-related protein in the

sponge *Suberites domuncula*.

*J Biol Chem* 278:32810-7, 2003.

4. Huy TT Tran, Ushijima H, Quang X, Phuong N, Li TC, Hayashi S, Lien TX, Sata T, Abe K.

Prevalence of hepatitis virus types B through E and genotypic distribution of HBV and HCV in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Hepatology Research* 26: 275-280, 2003.

5. Komoriya T, Kohno H, Kimura A, Ushijima H.

The development of sensitive latex agglutination tests for detecting astroviruses (serotype 1 and 3) from clinical stool specimen. *JARMAN* 13: 103-114, 2003.

6. Okame M, Yan H, Akihara S, Okitsu S, Tani H, Matsuura Y, Ushijima H.

Evaluation of a newly developed immunochromatographic method for detection of Norovirus. *J. J. A. Infect. Dis* 77: 637-639, 2003.

7. Zhou Y, Li L, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H.

Distribution of human rotaviruses, especially G9 strains in Japan from 1996 to 2000. *Microbiol Immunol* 47: 591-9, 2003.

8. Yan H, Yagyu F, Okitsu S, Nishio O, Ushijima H.

Detection of norovirus (GI, GII), sapovirus and astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR. *J Virol Methods* 114: 37-44, 2003.

9. Huy T T-T, Ushijima H, Win KM, Luengrojanakul, Shrestha PK, Zhong ZH, Smirnov AV, Taltavull TC, Sata T, Abe K.  
High prevalence of hepatitis B virus pre-S mutant in countries where it is endemic and its relationship with genotype and chronicity. *J Clin Microbiol* 41: 5449-5455, 2003.
10. Phan PG, Tuan NA, Okame M, Maneekarn N, Nishio O, Okitsu S, Ushijima H.  
Human astrovirus, Norovirus (GI, GII), and Sapovirus infections among diarrheal children in Pakistan. (*J Med Virol* in press)
11. Hansman GS, Katayama K, Maneekarn N, Peerakome S, Khamrin P, Tonusin S, Okitsu S, Nishio O, Takeda N, Ushijima H.  
Genetic diversity of Norovirus and Sapovirus in hospitalized infants with sporadic cases of acute gastroenteritis. (*J Clin Microbiol* in press)
12. Hansman GS, Doan LT, Katayama K, K Nguyen TA, Okitsu S, Kato Y, Nishio O, Takeda N, Ushijima H.  
Norovirus strains belonging to the Lordsdale virus cluster are a major cause of acute sporadic infantile gastroenteritis in Ho Chi Minh city, Vietnam (*J Clin Microbiol* submitted)
13. Adhikary AK, Inada T, Numaga J, Suzuki E, Ushijima H, Banik U, Mukoyama A, Matsuno S.  
Characterization of hexon and fiber genes of a novel strain of adenovirus involved in epidemic keratoconjunctivitis. *J Clin Pathol* 57: 95-97, 2004
14. Sakamoto T, Ushijima H, Okitsu S, Suzuki E, Sakai K, Morikawa S, Muller WEG.  
Establishment of an HIV cell-cell fusion assay by using two genetically modified HeLa cell lines and receptor gene. *J Virol Methods* 114:159-166, 2003
15. Huy Tran T-T, Ushijima H, Quang VX, Win KM, Luengrojanakul P, Kikuchi K, Sata T, Kenji Abe.  
Genotype C of hepatitis B virus can be classified into at least two subgroups. *J Gen Virol* 85: 283-292, 2004.

食品中の微生物汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究  
地理情報システム(Geographic Information System, GIS)を利用した食品汚染と  
危機管理対応の検討

分担研究者 鈴木 宏 新潟大学大学院医歯学総合研究科  
国際感染医学講座公衆衛生学分野  
共同研究者 田村 務、西川 眞 新潟県保健環境科学研究所ウイルス科

研究要旨

本邦では食中毒の病原としてSRSVがそのトップになり、新潟県でも年々患者数が増加し、平成15年度は既に患者数は300を超えるほどとなり、重要性が増してきた。これまで集団急性胃腸炎事例と小児の散発性急性胃腸炎について分子疫学的情報を加味した地図情報システム (Geographic Information System, GIS) を用い両疾患の関連性を検討してきたが、特に小児の散発性急性胃腸炎報告が特定の地域に偏っていることがあり、その解析は不十分であった。本年は上記の関連性について更に検討を加えた。

1. 感染性胃腸炎発生動向と感染性胃腸炎集団発生の両疾患の関連性について、GISを用い時系列、空間的に検討し、集団発生はサーベイランス定点報告が始まると同時に起こり、その後は小児の急性胃腸炎報告数の急増に伴い集団発生が見られるなど、両疾患の強い関係が確認された。
2. 2003年から2004年にかけて県内各地の小児感染性胃腸炎患者と病院、保育所、学校、養護施設、介護老人施設等における感染性胃腸炎集団事例の糞便からアミノ酸配列で100%一致するNVのG2に属するMaryland 6 タイプ類似株（新潟株）を主流とする流行が確認された。
3. 新潟株は、患者入院先で医療スタッフへの二次感染を多数発生し、伝染力、臨床症状の強さ、県内での流行規模から、本株はMaryland 6 タイプ(G2)類似株ではあるが、これまでの国内で見られたのとは異なる新型である可能性が示唆された。
4. 感染源に食品が疑われる感染性胃腸炎集団発生事例では、種々のジェノタイプのNVが検出された。

以上から、感染性胃腸炎の集団発生防止には、サーベイランスの動向より報告数が増加に転じた時点で、速やかに注意喚起を促す必要があると思われる。また、汚染食品による食中毒は、保菌者を介して次なる集団発生につながる可能性があり、検出株の遺伝子解析データを県内のみならず全国規模で共有できることが重要と考えられた。

## A. 研究目的

地理情報を入れた感染症疫学解析法により、英国のJ.Snowはコレラの発生が共同井戸と関連すること明確に提示するなど、地理情報の有用性は確立している。

これまでは手作業による患者等の地図上への表示が行われてきたが、最近では、詳細な地理情報と種々のデータがコンピューターに正確に取り込まれ、多面的な分析を容易に行える状況になりつつある。しかし、世界的にも感染症への応用としては未開拓の領域でもある。患者数、場所、動向、様式などを視覚的に地図上に捉える地理情報システム(GIS, Geographical Information System)による感染症疫学解析の有効性が確認され、海外でもサーベイランス情報解析の一つに採用されつつある。

研究対象のSRSV(ノロウイルス、NV)は食中毒の病原としてトップになり、新潟県でも年々患者数が増加し、平成15年度には患者数は300を超え、重要性が増してきた。しかし、本疾患対策に際し重要と思われる本ウイルスの地域的伝播情報は不十分な点が多い。

我々はNVの県内伝播状況を空間的、時系列的に解析すべく、患者情報とNVの分子疫学情報を地理情報として解析するGISを用い、流行、伝播システムの解明を行い、今後の感染制御の一助になる可能性を追求することと、危機管理システムの一環とし、感染症の予防・制御に資するシステムの開発・実践を目指した。

第一年度は食品汚染ではないがウイルス性で糞口感染の類似性に注目し、無菌性髄膜炎流行時の県内2地域における患者発生疫学解析についてGIS法を用いて行い、その有用性が示唆された。第二年度は、食中毒発生事例と小児の急性胃腸炎患者からのNV感染症の疫学にNVの分子疫学的情報に加えGIS

解析を試みた。分子疫学的には両疾患の関連性が強く示唆されたが、小児の散発性急性胃腸炎報告が特定の地域に偏り、空間的解析においては相互の関連性は示されなかった。また、1982年から2002年の20年間におけるSRSV感染症の推移を検討し、SRSV感染症のピークは常に12月と1月と変化は一定であった。

本年も昨年と同様にカキなどの二枚貝や調理従事者を介した集団食中毒と小児感染性胃腸炎の関連を、GISを用い時系列的、空間的に解析を試みた。

## B. 研究方法

感染症発生動向調査事業(以下「サーベイランス」)患者定点から報告された感染性胃腸炎患者数の推移を調べ、同時期に採取された小児感染性胃腸炎患者と感染性胃腸炎集団事例の患者の糞便から検出したNVのジェノタイプを決定し、更にはそれらの情報に加えGIS解析として地理的、時間的に検討して両疾患相互の関連を検討した。調査期間は平成15年第37週(9月7日～)から平成16年第3週(～1月18日)までの約4か月間である(図1)。便からのウイルス抽出はExtragen IIを用い、ポリメラーゼ連鎖反応領域中220bpの配列を比較した。

## C. 結果及び考察

### 1. サーベイランス定点報告数の推移と検出株

感染性胃腸炎患者は年間をとおして報告があるが、冬季に流行した。平成15年第37週に1地域で7.8人/定点/週と顕著な患者数の増加し、第40週以後は、新潟県内全域に感染者の拡大が見られた(図1)。

### 2. 小児感染性胃腸炎事例検出株の検討