

200400616A

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

食品由来のウイルス性感染症の検出法の高度化、実用化に関する研究

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 武 田 直 和

平成 17 (2005) 年 4 月

厚生労働科学研究研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

食品由来のウイルス性感染症の検出法の高度化、実用化に関する研究

平成 16 年度 総括分担研究報告書

主任研究者 武田 直和

平成 17 (2005) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告書

食品由来のウイルス性感染症の検出法の

高度化、実用化に関する研究 …………… 武田 直和 …… 1

II. 分担研究報告書

1. ノロウイルス感染迅速診断キット、ICキットの開発および

ノロウイルス感染食中毒事例と環境中ノロウイルス

遺伝子との関連性についての研究…………… 田中 智之 ……13

2. 食品由来のウイルス性感染症の検出法の高度化、

実用化に関する研究 ……………谷口 孝喜 ……21

3. 新たに中空粒子として発現されたノロウイルス3株の

遺伝子解析とその抗原性 …………… 榮 賢司 ……25

4. 散発性及び集団発生の胃腸炎から検出された

ノロウイルスの遺伝型多様性に関する研究……………

大瀬戸 光明 ……31

5. 千葉県で検出されたノロウイルスの遺伝子型の推移(1999～2005)

…………… 篠崎 邦子 ……39

6. 食品由来のウイルス性感染症の検出法の高度化、

実用化に関する研究 ……………齊藤 博之 ……49

7. 九州3地研で検出されたノロウイルス(NV)の

遺伝子型別について ……………

松岡 由美子 ……55

8. 2004年3月～5月に大阪市で流行したGII/2型ノロウイルスの

分子疫学的解析 ……………

入谷 展弘 ……61

9. ノロウイルスに汚染された井戸水による

食中毒事例について ……………

西尾 治 ……69

10. ノロウイルスおよびサポウイルス中空粒子の発現と 高力価免疫血清の作製	名取 克郎	75
11. ノロウイルス (NoV) 全長 cDNA クローンを用いた 複製機構の解析	片山 和彦	79
12. サポウイルス ORF1 の切断地図の作製	岡 智一郎	95
13. カリシウイルスと血液型物質との 結合に関する研究	白土 東子	103
14. カリシウイルスデータベース構築に関する報告	片山 和彦	107
Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧		113
Ⅳ. 研究成果の刊行物・別冊		116

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
総括研究報告書

食品由来のウイルス性感染症の検出法の高度化、実用化に関する研究

主任研究者 武田 直和 国立感染症研究所 ウイルス第二部第一室長

研究要旨 本年度に発現できた3株を加えると、GIで6株、GIIで19株の抗原および抗血清が作製できた。血清学的にはGIで7種、GIIで14種、計21種である。VLPsと抗血清の成績を基に、迅速かつ簡便なノロウイルス診断ICキットを構築するとともに、より広範に感度よくNoV抗原を検出するELISAを構築するために、VLPsと単クローン抗体研究を推進した。分子疫学研究から、GIIが流行の主役であること、わが国でもGII/4に遺伝子の変化が起こっていることが示された。NoVの複製機構の解析とSaV ORF1の切断地図作成が進展し、予防・治療を目的とした創薬研究の足がかりができた。井戸水に起因するノロウイルス感染症・食中毒を解析した。NoVを多数解析するうえでのSSCPの有効性を明らかにした。NoVの結合には型物質が重要であるが、型物質以外の因子を必要とするNoVもあることを示した。カリシウイルスデータベースを構築した。これによって、NoVを同定する上で共通の資源活用が全国レベルで可能になった。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ロタウイルスに感染防御能を有するとおもわれる3種のヒト型モノクローナル抗体を分離した。

分担研究者

田中 智之 堺市衛生研究所
谷口 孝喜 藤田保健衛生大学
栄 賢司 愛知県衛生研究所
大瀬戸光明 愛媛県立衛生環境研究所
篠崎 邦子 千葉県衛生研究所
斎藤 博之 秋田県衛生科学研究所
松岡由美子 熊本市環境総合研究所
入谷 展弘 大阪市立環境科学研究所
西尾 治 国立感染症研究所
名取 克郎 同上
片山 和彦 同上
岡 智一郎 同上
白土 東子 同上

協力研究者

内野 清子 堺市衛生研究所
三好 龍也 同上
池田 芳春 同上
吉田 永祥 同上
北元 憲利 姫路工業大学
守口 匡子 藤田保健衛生大学
黒澤 良和 同上
小林 慎一 愛知県衛生研究所
山下 育孝 愛媛県立衛生環境研究所
近藤 玲子 同上
豊嶋 千俊 同上

岡田 峰幸 千葉県衛生研究所
東方 美保 福井県衛生環境研究センター
飯塚 節子 島根県保健環境科学研究所
新屋 拓郎 熊本市環境総合研究所
平野 敬之 佐賀県衛生薬業センター
小河 正雄 大分県衛生環境研究センター
改田 厚 大阪市立環境科学研究所
阿部仁一郎 同上
久保 英幸 同上
勢戸 祥介 大阪市立大学
徳竹 由美 長野県環境保全研究所
中村 友香 同上
粕尾 しず子 同上
小林 正人 同上
和田 啓子 同上
秋山 美穂 国立感染症研究所
愛木 智香子 同上
三瀬 敬治 札幌医科大学医学部

A. 研究目的

食品由来ウイルス感染症は国民の食生活にとり益々脅威となってきた。ノロウイルス（NoV）による集団食中毒やA型肝炎ウイルス（HAV）による集団急性肝炎など、ウイルスに汚染された食品が原因となった疾病が的確に捉えられるようになってきたことが背景にある。発生状況を正確に把握し、その

結果を国民、行政機関、および医療関係者に迅速かつ的確に提供することは、本感染症を制圧する上で重要な施策のひとつである。本感染症の制御を困難にしている最大の理由は、現在ある検出法の検出限界を超えた、極めて微量のウイルス量で感染が成立することである。このため、二枚貝と NoV、二枚貝と HAV の組合せ以外は原因食品や原因物質を特定できるに至っていない。さらに、関与するウイルスが極めて多彩であるため、ターゲットが絞りにくい点も理由にあげられる。食品由来ウイルス感染症からは、上記の二つのウイルスのほか、サボウイルス (SaV)、ロタウイルス (RV)、アイチウイルス (AiV)、アストロウイルス (AstV) が検出される。いずれも RNA を遺伝子にもつウイルスであるが、これらを効率よく、かつ厳密に区別する必要がある。また、本感染症の制圧には、原因となった食品が汚染されるまでのウイルスの伝播経路を明らかにする必要がある。

本研究では、(1) 患者の便や血清の抗原検出に免疫学的手法を導入し、迅速性と簡便性の向上を計る、(2) 原因食品からの抗原検出では遺伝子増幅による定量法を確立するとともに、免疫学的手法を用いた濃縮法を導入し、検出効率の向上を目指す、(3) 環境からの抗原検出には生化学、電気化学的手法で濃縮を行うと共に、各種膜分離技術を応用して効率の向上を計る、(4) 個々のウイルスについてその検査材料別に検査法を把握しその検出限界を明らかにすることを目的とする。ウイルス性食中毒のリスク評価には感染価を測定することが必須であり、そのための培養細胞を用いた培養系の確立が急務である。これに向けた基礎実験を並行して行う。これらの成果を基に、本感染症に関与するウイルスが食品を汚染するまでの経路を明らかにすることにより、検査法とその検出限界が明確になる。また、検出法をマニュアルとして広く普及することによって、国内における検査法の標準化が可能になる。

B. 研究方法

(1) 組換えバキュロウイルスを用いた NoV 中空粒子 (VLPs) の作製

構造蛋白領域 (ORF2) の 5' 末端から約 300 塩基の解析によって VLPs 発現候補株を選出した。候補株について ORF2 の約 1650bp、

あるいは ORF2 から 3' 末端のポリ A までの約 2300bp 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。Tn5 細胞に感染後、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。

(2) 単クローン抗体およびポリクローン抗体を用いた NoV 抗原検出 ELISA

GI NoV を特異的に認識する単クローン抗体 #3912 と GII NoV を特異的かつ広範囲に認識する単クローン抗体 #NS14 を抗原捕獲抗体として混合し、マイクロプレート上の 1 穴に固相した。検出抗体として NV23 を用いた。

VLPs を免疫源としてウサギに接種し、免疫血清を作製した。得られたウサギ抗 NoV 抗体を捕捉抗体およびビオチン化 NoV 抗体を検出用抗体とした NoV 抗原検出 ELISA を構築した。

(3) IC kit の構築

GI, GII を特異的に認識する単クローン抗体、#3912 および #NS14 を用い捕獲抗体および金標識検出抗体として IC キットを構築した。

(4) 環境中ノロウイルス遺伝子検索

濾過水 1000ml を HA フィルターで吸着させ、2ml に溶出し濃縮 RNA 抽出用サンプルとした。ウイルス性下痢症診断マニュアル (第 3 版) に従い、ABI PRISM 7700 で NVGII のコピー数を測定し、河川水 1ml 当りのコピー数を算出した。Capsid 領域の塩基配列に基づいて系統樹を作成し、遺伝子型別、遺伝子番号を決定した。

(5) NoV の一本鎖高次構造多型解析 (Single Strand Conformation Polymorphism: SSCP 解析)

ビオチン化プライマーを用い平成 15 年 11 月 5 日付け食安監発第 1105001 号「NoV の検出法について」に準拠して RT-PCR を行なった。増幅産物を SSCP バッファで希釈して熱変性後、SSCP ゲルにアブライし、ゲル温度を 24℃ に保ちながら泳動した。電気泳動終了後、ゲル中の PCR 産物をナイロン膜へ転写し、ビオチン化学発光検出キットを用いて SSCP パターンを検出した。

(6) ヒト型抗体の作製

ヒトロタウイルス (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。感染防御実験は、生後 5~7 日齢の BALB/c マウスを用いて、精製各抗体を感染 1 時間前に経口投与し、下痢の程度をスコア化して、判定した。

(7) NoV の遺伝子増幅と遺伝子解析

井戸水からの水試料の前処理で水中のウイルス濃縮は、①超遠心法のための濃縮と、②「ウォーターコンセル・ビルコン」キットで濃縮後、超遠心法で濃縮する方法で行った。ウイルス性下痢症検査マニュアル (第 3 版) の術式にある GI と GII に特異的なプライマーに加え、Alphatron 株、Amsterdam 株の検出用にプライマーを別途設定した。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。

(8) リコンビナントワクチニアウイルスを用いた NoV-RNA の細胞内転写、翻訳

1. プラスミドの作製

U201 株のゲノム全長、VP1 以降ゲノム末端まで、および VP2 からゲノム末端までを組み込んだプラスミドを作製した。IRES-GFP 遺伝子を ORF1 の 3A-like protein から RdRp N 末端部分と入れ替え、RdRp を産生不能としたプラスミド、プロテアーゼモチーフ GDCC に点突然変異を導入して GDGG と改変し、プロテアーゼの活性を奪ったプラスミド、キャップ非依存性翻訳、キャップ依存性翻訳をモニターするコントロールプラスミドを作製した。これらのプラスミドコンストラクトを単独、又は同時にヒト株化細胞である 293T 細胞にトランスフェクションした。また、T7RNA ポリメラーゼを発現するリコンビナントワクチニアウイルス (vTF7) をスーパーインフェクションさせ、細胞内に T7RNA ポリメラーゼを供給し、NoV-RNA を大量に細胞内で合成させた。トランスフェクション後の細胞は、37℃の CO₂ インキュベーターで 6 時間から 72 時間まで、目的に応じて培養した。

2. 翻訳産物の確認

翻訳された NoV 蛋白質は、トランスフェクション 6, 12, 24, 48, 72 時間後に細胞をハーベストし、抗 N-terminal protein 抗体、抗 NTPase 抗体、抗 3A-like protein 抗体、抗 VPg 抗体、抗抗体、抗 protease 抗体、抗

RNA dependent RNA polymerase (RdRp) 抗体、抗 VP1 抗体 (抗 VLP 抗体)、抗 VP2 抗体を用いたウエスタンブロッティングで確認した。

3. ノーザンブロッティングによる NoV-RNA の検出

各種コンストラクトと vTF7 のスーパーインフェクションから 6, 12, 24, 48, 72 時間後に細胞を Isogen RNA 抽出液で処理し、全 RNA を抽出精製した。RNA と混在する DNA は DNase 処理により完全に除去した。1 μ g の RNA をノーザンブロッティングに用いた。U201 の VP1 領域のプラス鎖 RNA をジゴキシゲニン標識 UTP 存在下 in vitro で合成し、マイナス鎖 U201RNA 検出用 RNA プローブとして用いた。同様に合成した U201 の VP1 領域のマイナス鎖 RNA をプラス鎖 U201RNA 検出用プローブとして用いた。ハイブリダイゼーション及び、ハイブリダイズしたジゴキシゲニン RNA プローブの検出は、検出用キットのプロトコールに従った。

4. 免疫蛍光抗体法による細胞内発現蛋白質の検出

スーパーインフェクション後 6, 12, 24, 48, 72 時間後に、細胞をパラフォルムアルデヒドで固定し、抗 U201VP1 または VP2 抗体を 1 次抗体として反応させた。その後、アレクサフロア 488 (緑色) 抗ウサギ IgG 抗体またはアレクサフロア 594 (赤色) 抗ウサギ IgG 抗体を 2 次抗体として用いて、細胞内に発現した U201 蛋白質を共焦点レーザー顕微鏡にて検出した。

5. 塩化セシウム浮上密度勾配遠心による細胞内 VLP の解析

スーパーインフェクション後 48 時間で細胞をハーベストし、3 回の凍結融解を繰り返して細胞内部より VLP を抽出した。SW32Ti で 31000rpm, 2.5 時間の超遠心で VLP を沈降させ、VLP を無血清培地 OPTI-MEM に懸濁した。再建濁した VLP は、2.28g CsCl/5ml OPTI-MEM となるように CsCl を加えて調整した後、SW55Ti で 45000rpm, 24 時間の浮上密度勾配遠心を行った。遠心後、約 200 μ l ずつ遠心管底部よりフラクションした。各フラクションは、TLA55 で 45000rpm, 2 時間の超遠心を行い、各フラクションに含まれる蛋白質を沈降させた後、解析に用いた。

6. VLP に取り込まれた遺伝子の解析

各フラクションより沈降させた蛋白質は、DNase, RNase で処理後、Viral RNA キットを用いて核酸を抽出し、RT-PCR に用いた。U201RNA の検出には、SKG2F, SKG2R のプライマーセットを用いた RT-PCR を行った。RT 及び PCR は下痢症ウイルス検出マニュアル（第3版）に従って行った。

7. 透過型電子顕微鏡による VLP の観察

酢酸ウランによるネガティブ染色を行い、定法にしたがって観察した。

(9) サポウイルス ORF1 の切断地図の決定

SaV Mc10 の full-length cDNA clone を作製した。この plasmid を鋳型として、サポウイルス ORF1 の全長もしくは一部に対応する遺伝子領域を T7 promoter 配列を有するセンスプライマーと、終止コドンおよびポリ A テイルを有するアンチセンスプライマーを用いて PCR 法によって増幅した。この PCR 産物を鋳型として Rabbit reticulocyte *in vitro* coupling transcription/ translation system (プロメガ) を用いて ³⁵S メチオニン標識タンパク質を発現させた。翻訳産物を直接、あるいは昨年度の本研究事業で作製したサポウイルス ORF1 に対する 8 種類の部位特異抗体を用いた免疫沈降法を行った後にウエスタンブロット法で検出し、各切断産物の検出、同定を行った。プロテアーゼの活性部位と推測される GDCG モチーフに変異を導入した full-length cDNA clone を作製し、これを鋳型として上記と同様に遺伝子増幅と発現産物の解析を行った。

(10) 唾液中の型物質の定量

採取後、直ちに 100℃、10 分間加熱処理を行い、その後 13,000g、5 分間にて遠心し、その上清を回収した。上清中の H、A、B、Le^a、Le^b 各型物質量を分泌型試験の半定量系により測定した。唾液と抗 H レクチン、抗 A 抗体、抗 B 抗体、抗 Le^a 抗体、抗 Le^b 抗体それぞれを 26℃ で 10 または 20 分間反応させた後に、O 型赤血球、A1 型赤血球、B 型赤血球、Ficin 処理 Le^a 陽性赤血球、Ficin 処理 Le^b 陽性赤血球を加え 26℃ で 5 分間反応後、肉眼的検査により凝集阻止の有無を調べた。

(11) 唾液中の型物質と NV VLPs との結合

唾液を採取後、直ちに 100℃、10 分間加熱処理を行い、その後 13,000g、5 分間にて遠心し、その上清を回収した。上清中の H、A、B 各型物質の有無を赤血球凝集阻止反応によ

り調べ、それぞれのサンプルの血液型を判定した。唾液と VLPs との結合は Saliva-VLP binding assay (ELISA-based) にて検出した。

(12) カリシネットの構築

カリシウイルスに特化したデータベースを作成し、DDBJ と協力しながらカリシウイルス研究者の遺伝子配列情報の解析をサポートすることを目的としたサブデータベース及び情報交換の場の構築を試みた。

(倫理面への配慮)

唾液の使用は、国立感染症研究所医学研究倫理審査委員会での承認、提供者からのインフォームド・コンセントを得た上で行った。

C. 研究結果

[1] 患者の便や血清の抗原検出に免疫学的手法を導入し、迅速性と簡便性の向上を計る研究

(1) NoV 中空粒子の発現と高力価免疫血清の作製

本年度に発現できた 3 株を加えると、GI で 6 株、GII で 19 株の抗原が作製できた。抗原的には GI で 7 種、GII で 14 種、計 21 種と思われる。新たに GII/2、GII/10、GII/15 の VLPs に対する抗血清をウサギで作製した。

(2) NoV 抗原検出 ELISA

GII/2、GII/10、GII/15 株の由来となった集団発生について RT-PCR と抗原検出 ELISA を実施し、3 事例全てにおいて RT-PCR とほぼ同じ感度で NoV を糞便検体から検出することができた。

(3) IC キットの評価

RT-PCR 法との一致率は 67%、感度 71%、特異性 61%であった。本法の感度は ELISA 法とほぼ同程度であったが、RT-PCR 法との一致率および特異性は ELISA 法と比べると低かった。

[2] ウイルス濃縮法に関する研究

(1) 環境水からのノロウイルスの濃縮

井戸水の中のウイルス濃縮は、超遠心法のみでの濃縮と、「ウォーターコンセル・ビルコン」キットで濃縮後、超遠心法で濃縮した二法で行った。リアルタイム PCR 法で検出されたコピー数は超遠心法が、ビルコン濃縮後超遠心法に比べ約 200 倍高いコピー数を示した。これは、ビルコン濃縮を行うことでウイルスのロスが出るため、ビルコン濃縮後超遠心法の方が低いコピー数を示したと考え

られた。しかし、実測値ではビルコン濃縮後超遠心法の方が高いコピー数を示したため、検査水中に含まれるウイルス量が少ない場合には有効であると考えられた。

[3] 検出系の確立に向けた基礎研究

(1) SSCP 解析を活用した NoV の同定

NoV の流行、あるいは集団感染などの危機管理において行政対応に直接役立つ情報を素早く把握する手法として種々の事例について SSCP 解析を検討した。最大 50 検体の PCR 産物の遺伝子配列の異同を 1 日半で比較することができるため、集団感染等の危機管理局面での行政判断に必要な情報の早期把握に役立つものと考えられた。複数の機関で行った SSCP 解析データをネットワーク上で照合するシミュレーションも行った。

(2) ノロウイルス (NoV) 全長 cDNA クロームを用いた複製機構の解析

ゲノム全長の塩基配列を明らかにした U201 株を基に、作成したプラスミドクロームと T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子組換えワクチニアウイルス (vTF7) を用いて、哺乳類細胞内における NoV ゲノムの転写翻訳機構を調べた。哺乳類細胞にキャップ構造の付加された完全長の NoV ゲノム RNA を導入した場合、NoV ゲノム RNA の ORF1 にコードされるウイルス蛋白質が翻訳され、プロテアーゼ、ポリメラーゼなどがその機能を発揮し、約 2.3kb のサブゲノム RNA が転写された。しかし、サブゲノム RNA から ORF2 及び ORF3 は翻訳されず粒子形成は認められなかった。これを補うため、完全長の NoV ゲノム RNA と ORF2 及び ORF3 をコードする約 2.3 Kb のサブゲノム RNA を細胞内に同時に供給すると、VLP と核酸を内包した不定形粒子の形成が認められた。

(3) サポウイルス ORF1 の切断地図の作製 *in vitro* transcription/translation system および部位特異抗体を用いてサポウイルス ORF1 の切断産物を同定し、7つの最終産物からなる切断地図 (NH₂-p11-p28-p35 (NTPase)-p32-p14 (VPg)-p70 (Pro-Pol)-p60 (VP1)-COOH) を決定することに初めて成功した。またカリシウイルスのプロテアーゼで高度に保存されているアミノ酸モチーフに変異を導入することで、この切断がサポウイルスの ORF1 にコードされる自己のプロテアーゼに依存することを明らかにした。

[4] 培養系の確立に向けた基礎研究

(1) NoV および SaV と血液型物質との結合に関する研究

NoV GI に属する 4 株、4 クラスター、NoV GII に属する 10 株、7 クラスター、計 11 クラスター 14 株の NoV VLPs、さらに SaV GI に属する 1 株の SaV VLPs を用い、型物質との結合を検討した。その結果、NoV GI に属する VLPs はすべて唾液と結合した。これに対し、NoV GII の VLPs は 7 株が唾液に結合し、3 株は結合しなかった。同じクラスターに属するウイルス株は同じ結合パターンを示した。クラスターによって結合パターンに違いはあるものの、GI の 4 株では共通して H、A 型物質を含む唾液への結合が高かった。一方、GII の 7 株では共通して B、A 型物質を含む唾液への結合が高く、同じジェノグループに属する株には共通項があることが明らかになった。SaV は全く唾液に結合しなかった。

[5] ノロウイルスの分子疫学および遺伝子解析に関する研究

(1) 堺市内の河川からのノロウイルス検出

河川水中の GII ノロウイルスのコピー数は 1 月、2 月をピークとし漸次減少し夏季には低値となっている事、散発、集団感染症の発生時期とその程度、および河川水から検出されるコピー数との間には、時間差を持った有意な関連性は認められないことが判明した。しかし、流行時期、採水時期の時間差から推測して、感染事例から何らかの形でウイルスが河川水に汚染したのと考えられた例も存在した。

(2) 千葉県におけるノロウイルス遺伝子型の推移

1999 年 9 月から 2005 年 1 月初旬までの期間に、集団発生 227 事例、1345 検体、散発 750 検体のうち集団発生 138 事例、514 検体 (66.4%、41.7%)、散発 178 検体 (30.5%) から NOV を検出した。検出した NoV の 80% 以上が GII であった。GI は 13 遺伝子型、GII は 16 遺伝子型に分類された。集団では、GII-3、4、5 が全シーズンで検出され、03/04 シーズンは GII/4 が主流行になっていた。散発では、GII/4 が全シーズンで高頻度に検出された。集団事例は、02/03 シーズン以降保育園、学校、老人施設における人-人感染事例の増加が認められた。

(3) 九州 3 地研で検出されたノロウイルス

(NV) の遺伝子型

2003年2月から2005年1月までに九州の3地研で検出されたNVについてCapsid領域の遺伝子型別をおこなった。3地研で検出された遺伝子型はGIが6種類、GIIが7種類検出された。前年度に流行した遺伝子型が次の年に流行するわけではないこと、GII/4型については2003年11月から検出が増加した。

(4) 大阪市で流行したGII/2型ノロウイルスの分子疫学的解析

2004年3月中旬～5月にGII/2の流行が園児、小学生、中学生を中心に大阪市内で初めて認められた。検出されたGII/2は遺伝的に同一あるいは近縁であった。2004年6月以降は、GII/2は検出されておらず、今回の流行は終息したものと考えられた。

(5) ノロウイルスに汚染された井戸水による食中毒事例

平成16年5月下旬、長野県内の旅館でノロウイルスによる食中毒事例が発生した。この施設を利用した26グループ160名中18グループ65名が発症し、施設で利用していた自家水(井戸水)、患者および従事者からノロウイルスが検出された。検出されたノロウイルスの塩基配列は、井戸水、患者便、従事者便共に一致しGII/4類似株であった。本食中毒事件は当該施設の井戸がノロウイルスに汚染されていたことから、自家水(井戸水)によるものと判断された。

(6) 愛媛県における散発性及び集団発生から検出されたNoVの遺伝学的多様性

散発例からGII/4Lordsdale、GII/3Mexico、GII/2Melksham、GII/4Miami型株等が多く検出された。一方、カキの摂食が関与しないノロウイルス食中毒及び集団発生12事例中5事例からGII/4Lordsdale、3事例からGII/2Melkshamが検出され、GII/3Mexico、GII/4Miami、GII/8Amsterdam型が各々1事例から検出された。

[6] 予防・治療法に関する研究

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3種のヒト型モノクローナル抗体を分離した。感染防御能を、生後5～6日齢のBALB/cマウスを用いて調べた結果、1500gの抗体の経口投与により、 1.7×10^6 FFUのKU株による下痢発症の程度を有意に阻止した。

[7] カリシウイルスデータベースの構築

ホームページ上では、ノロウイルスの分子系統解析法を簡単に習得し、実行できるようにガイドした“分子系統樹の作り方”(パワーポイントファイル)を公開した。また、ノロウイルスの各ゲノタイプの標準配列を公開し、ホームページにアクセスした研究者が、自由にダウンロードして分子系統解析に使用できるようにした。さらに、研究者間のコミュニケーションが図れるように掲示板形式のフォーラムサイトをもうけ、ホームページ上で意見交換ができるようにした。

D. 考察

[1] 患者の便や血清の抗原検出に免疫学的手法を導入し、迅速性と簡便性の向上を計る研究

今年始に報告された、本邦での様々な地域の様々な病院内、特別養護老人ホームにおけるノロウイルス集団感染事例で求められているのは、ノロウイルスの簡便かつ迅速な診断方法である。診断の確立は感染拡大の予防や重症化予防に大きな貢献ができる。ノロウイルス感染診断には、いくつかの方法が開発されているが、いずれも一長一短がある。中でも、今回の研究主眼であるICキットはその簡便性では他法に比べ大きな長所となっているが、感度、特異性は低く精度の向上が今後の研究課題である。

抗原検出ELISA法は迅速かつ簡便で、検査に高額な機器を必要とせず、また検体間でのコンタミネーションの危険性が低いなどの利点があり、食中毒検査のように多数の検体を検査する場合には非常に有用な方法である。その反面、特異性が高いために検査検体の抗原性が一致していないと検出感度が低下するという欠点がある。NoVは遺伝学的にも血清学的にも多様性の大きいウイルスでことから、NoVの流行株を的確に検出できるように、キットに使用する抗体の組み合わせや抗体の追加が重要な課題である。

改良ELISAは、感度、特異性それにRT-PCR法との一致率は、一昨年度、昨年度の方法に比べ、著しく向上した。感染性胃腸炎の散発事例においても、食中毒の流行事例においても、十分対応できる診断方法と考える。これまでも強調してきているが、ウイルス性食中毒と細菌性食中毒の鑑別は、極めて重要で、予後対応は大きく異なってくる。さらに、そ

の鑑別に要する費用は大きい。今回の ELISA 法は、初期に搬入される検査検体が多ければ多いほど鑑別診断は容易で且つ経済性を示し、diffuse outbreak の感染事例に十分対応できる測定キットと考える。感度をより向上させるため、また、広範囲な感染原のウイルス株を検出するためにも、現有の単クローン抗体に加えて、他の抗原決定基を認識する抗体の作製が必要であると考えている。

NoV を免疫学的手法で検出する上でその基礎は高力価血清の作製であるが、そのためには中空粒子の作製が不可欠である。NoV の遺伝子系統解析によれば現在までに GI は 14、GII は 17 のクラスターに分類されると考えられ、そして各クラスターは血清学的にも異なると思われる。本年度に発現できた 3 株を加えると、GI で 9 株、GII で 19 株の抗原および抗血清が作製できたことになり、血清学的には GI で 7 種、GII で 14 種、計 21 種である。これらの抗原、抗血清の保持によって NoV の血清学的関係が次第に明らかになり、さらに患者材料からの簡便な検出法である抗原検出 ELISA 法の改良の進展が期待される。また大量に作製できる VLPs は NoV 抗原として下痢症、胃腸炎患者の血清学的診断にも有用である。

[2] 検出系の確立に向けた基礎研究

NoV の解析はシークエンスを決定して比較する方法が一般的であるが、数週間～数ヶ月を要するため行政側との時間軸のずれが大きく、個々の局面で有効な情報を提供するという目的には向いていない。遺伝子解析が必要となるような事例は検体数も多いのが普通であるから、行政対応に役立てるためには多くの NoV の遺伝子の異同をシークエンスせずに短期間に比較する手法の導入が必要になる。行政判断で重要なのは複数の NV 遺伝子が「同じかどうか」であり、その情報を迅速に把握する手法として SSCP 解析を用いることは意義があるものと考えられた。また、あらかじめ対照試料を配布しておくことで異なる機関で行った SSCP 解析のデータをネットワーク上で照合できるようになるため、広域にわたる事例であっても対応可能になる可能性が開けた。

[3] 培養系の確立に向けた基礎研究

カリシウイルス科 *Lagovirus* 属のウサギ出血病ウイルスは H 型物質に結合することが

知られている。しかし、今回の研究で、NoV の型物質認識パターンは様々であり、型物質を認識しない株も存在することが明らかになった。また、SaV は型物質に結合しない可能性があり、カリシウイルス科に共通の特徴ではないことが示唆された。今後さらに詳細な解析を行うことにより、型物質がカリシウイルスの単なる結合因子として働いているのか、細胞への侵入にも関与するレセプターであるのかを検討したい。

[4] 下痢症ウイルスの分子疫学および遺伝子解析に関する研究

食中毒や感染性胃腸炎が多発する秋から冬にかけて、堺市内の河川水でもノロウイルスのコピー数が増加している。河川水中のノロウイルスノ遺伝子型からそのシーズンにおける流行ウイルスを予測する事は困難であるが、継続調査によって次期の流行の遺伝子型を予測する事は不可能でないかもしれない。

遺伝的多様性を示す NoV 流行を詳細に解析していくためには、Capsid N/S 領域の遺伝子型別による解析が必要であること、老人保健施設や保育所など介護を伴う施設では、なんらかの原因で NV 患者が発生すると人一人感染により感染が拡大する可能性が高く、ウイルス感染を制御する事が難しく長期化しやすいことが示されている。人一人感染は糞口感染と空気感染（吐物が空气中に飛散しエアロゾルになる）によって起こると考えられ、保育所では屋内の遊戯室で園児が嘔吐した後患者発生し、糞口感染だけでなく乾燥した吐物が飛散し次ぎの感染を生じる可能性も推測された。施設内で NoV を拡大させないための対策は、汚物によって汚染された環境の消毒、患者に接触したときの手洗いを徹底するなどの衛生管理が重要であると考えられた。今後、集団生活の場で患者が発生した場合の処置方法をマニュアル化する必要がある。

EU グループ (European Food-borne Viruses Network) は、2002 年を境にして、GII/4 の polymerase 領域に変化が認められることを報告している。今回千葉で検出した GII/4 の一部の株について ORF2 の解析をおこなったところ、同時期を境にして ORF2 領域に変化が認められた。GII/4 の遺伝子の変化と、老人施設、障害者施設、病院での集団発生の増

加との関連性の可能性が推測されたが、さらに詳細な解析が必要と思われた。九州でも GII/4 型については 2003 年 11 月から検出が増加したが、当該株についてはヨーロッパで急増している株類似株か今後調査していく必要があると考えられた。GII/2 大阪で流行した原因の一つとして、大阪市では集団事例においても、小児散発例においても過去に GII/2 型の流行がなかったことが考えられた。GII/4 変異株のように遺伝子の変異による流行の変化についても検討必要がある。今回、比較した領域において過去の GII/2 と明確な相違は認められなかったが、他の遺伝子領域についても解析する必要があると考えられる。

流行株の検出時期と集団発生時期がほぼ一致していたことから、地域社会でのノロウイルスの流行が食中毒や胃腸炎集団発生と密接な関連を持っていることが示唆された。ウイルス性食中毒や胃腸炎集団発生の制御には、カキ等の食品のノロウイルス汚染を減少させる対策とともに、地域社会におけるウイルスの流行実態を把握し、対策を強化させることが重要である。

[5] 予防・治療法に関する研究

得られたヒト型抗ノロウイルス抗体は、cross-reactive に複数の血清型のヒトノロ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。乳のみマウスを利用した *in vivo* での感染防御効果から、ヒトへの応用の可能性が示唆された。

NoV の予防を目的とした創薬の研究を推進するためには、ウイルスの複製機構など NoV の基礎的研究が必須である。しかし、NoV は実験動物系、*in vitro* における培養細胞系も見いだされておらず、NoV の感染及び増殖機序の解析が遅れている。本研究ではワクチニアウイルスのキャッピング酵素によって修飾を受けないサブゲノムの翻訳が機能していないため複製サイクルが停止していると考えられたが、プロテアーゼによる非構造蛋白の切断は効率よく起こっていた。また、ゲノム RNA の複製も起こっていた。したがって、プロテアーゼや RNA ポリメラーゼの活性をスクリーニングする上で有用なアッセイ系であると考えられる。

本研究によって SaV ORF1 のプロセッシングが自己のプロテアーゼによって行なわれ

ることが明らかになった。また、SaV ORF1 内部の 1 カ所の切断点を同定に成功し、サボウイルスのプロテアーゼの基質特異性が他のカリシウイルスと同様であることを示すことが出来た。上記の NoV 同様、プロテアーゼ阻害剤のスクリーニングに有用なアッセイ系が確立できた。

[6] カリシウイルスデータベースの構築

NoV を同定する上で共通の資源活用が全国レベルで可能になった。今後、カリシウイルスデータベースに希望者が容易にアクセスし、十分に活用できるようにページデザインの見直し、登録データの充実などを図っていく予定である

E. 結論

迅速かつ簡便なノロウイルス診断 IC キットの構築を行ったが、感度、特異性の向上を図る必要がある。より広範に感度よく NoV 抗原を検出する ELISA を構築するために、更なる VLPs と単クローン抗体研究を推進する必要がある。分子疫学研究から、GII/4 の遺伝子の変化と、老人施設、障害者施設、病院での集団発生の増加との関連性の可能性が推測された。また、地域で散発的に流行する NoV が集団発生の原因と関連していることも示唆された。さらに詳細な解析が必要である。NoV の複製機構の解析と SaV ORF1 の切断地図作成が進展し、プロテアーゼやポリメラーゼ阻害剤のアッセイ系として有望である。今後、予防・治療を目的とした創薬研究の足がかりができた。環境からのノロウイルスによる感染症・食中毒が急増している。井戸水などの原水が汚染される可能性があることを啓発していく必要がある。NoV の結合には型物質が重要であるが、型物質以外の因子を必要とする NoV もある。NoV を多数解析するうえでの SSCP の有効性を明らかにした。カリシウイルスデータベースを構築することによって、NoV を同定する上で共通の資源活用が全国レベルで可能になった。感染防御能を有するとおもわれる 3 種のヒト型モノクローナル抗体を分離した。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Fukushi S, Kojima S, Kageyama T, Takai R, Hoshino FB, Oka T, Takeda N and Katayama K. Analysis of the Enzymatic Activity of RNA-Dependent RNA Polymerase from Norovirus. *J of Virol.* 78: 3889-3896, 2004.

Hansman GS, Katayama K, Maneekarn N, Peerakome S, Khamrin P, Tonusin S, Okitsu S, Nishio O, Takeda N and Ushijima H. Genetic Diversity of Norovirus and Sapovirus in Hospitalized Infants with Sporadic Cases of Acute Gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *J of Clin Micro* 42: 1305-1307, 2004.

Hansman GS, Doan LT, Kgyuen TA, Okitsu S, Katayama K, Ogawa S, Natori K, Takeda N, Kato Y, Nishio O, Noda M, Ushijima H. Detection of norovirus and sapovirus infection among children with gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Arch Virol* 149: 1673-1688, 2004.

Kageyama T, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Kojima S, Takai R, Oka T, Takeda N, and Katayama K. Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan. *J Clin Microbiol.* 42: 2988-2995, 2004.

Katayama K, Miyoshi T, Uchino K, Oka T, Tanaka T, Takeda N, and Hansman GS. Novel Recombinant Sapovirus. *Emerg Infect Dis* 10: 1874-1876, 2004.

Hansman GS, Natori K, Oka T, Ogawa S, Tanaka K, Nagata N, Ushijima H, Takeda N, and Katayama K. Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. *Archives of Virology* 150: 21-36, 2005.

Hansman GS, Kuramitsu M, Yoshida H, Katayama K, Takeda N, Ushijima H, Surenkhand G, Gantolga D, Kuroiwa C.

Viral gastroenteritis in Mongolian infants. *Emerg Infect Dis* 11: 180-182, 2005.

Hansman GS, Katayama K, Oka T, Natori K, Takeda N. Mutational study of sapovirus expression in insect cells. *Virology Journal* 2:13, 2005.

Oka, T., Katayama, K., Ogawa, S., Hansman, GS., Kageyama, T., Ushijima, H., Miyamura, T. & Takeda N. Proteolytic Processing of Sapovirus ORF1 Polyprotein. *J Virol.* 2005 *in press.*

白土（堀越）東子、武田直和：冬でも怖い食中毒（冬の食生活予防は万全ですか？）．*食生活*：98 2004.

武田直和、米山徹夫、清水博之、白土（堀越）東子：食品由来の感染症．*ネオエカス感染症・アレルギーと生体防御* 2005年印刷中

2. 学会発表

Tanaka T, and co-author Kitamoto N, Kamata K, Miyoshi T, Uchino K, Oseto M, Sakae K, Kobayashi S, Natori K, Jiang X, Parker T, MK Estes and Takeda N. Diagnostic kit for Norovirus Infection. Second International Calicivirus Conference. November 6-10, 2004, Dijon
Tomoyuki Tanaka, Noritoshi Kitamoto, Keizo Ito, Kunio Kamata, Tatsuya Miyoshi, Kiyoko Uchino, Mitsuaki Oseto, Kenji Sakae, Shinichi Kobayashi, Katsuro Natori, Hisayoshi Yoshida, Xi Jiang, David Y Graham, Tracy Parker, Mary K Estes and Naokazu Takeda: Development of Immunochromato Kit for Rapid Diagnosis of *Norovirus* Infection. Fortieth Anniversary United States-Japan Cooperative Medical Science Program. December 7-10, 2004, Kyoto

Katayama K., Oka T., Ogawa S., Shirato-Horikoshi H., Miyamura T., Takeda N. : Analysis of Norovirus replication using full-length genome. 7th International Symposium on Positive strand RNA viruses, San Francisco, USA, May 27-June 1, 2004.

Hansman GS., Katayama K., Oka T., Natori K., Ogawa S., Ushijima H., Takeda N. : Expression of Human Sapovirus-like Particles. 7th International Symposium on Positive strand RNA viruses, San Francisco, USA, May 27-June 1, 2004.

Oka T., Katayama K., Ogawa S., Hansman GS., Ushijima H., Miyamura T., Takeda N. : In vitro Proteolytic Processing of the Sapovirus ORF1 polyprotein. 7th International Symposium on Positive strand RNA viruses, San Francisco, USA, May 27-June 1, 2004.

Katayama K., Oka T., Ogawa S., Shirato H., Miyamura T., Takeda N. : Study on Norovirus replication in vitro. Second International Calicivirus Conference, Dijion, France, Nov 6-10, 2004.

Hansman GS., Natori K., Oka T., Takeda N., Katayama K. : Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. Second International Calicivirus Conference, Dijion, France, Nov 6-10, 2004.

Oka T., Katayama K., Ogawa S., Hansman GS., Kageyama T., Miyamura T., Takeda N. : In vitro proteolytic processing and identification of the cleavage site of Sapovirus ORF1. Second International Calicivirus Conference, Dijion, France, Nov 6-10, 2004.

内野清子、三好龍也、田中智之、片山和彦、武田直和：ノロウイルス遺伝子型別からみたウイルス浸淫状況の把握。第52回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2004年11月

伊藤 雅、三好龍也、田中智之、山下照夫、小林慎一、藤浦 明、李 天成、武田直和：野

生動物の E 型肝炎ウイルス (HEV) および HEV 抗体保有状況。同上

片山和彦、グラント・ハンスマン、岡智一郎、牛島廣治、三好達也、田中智之、宮村達男、武田直和：Sapovirus ゲノムの解析、衛生微生物技術協議会第25回研究会、さいたま市、2004年7月8-9日。

片山和彦、岡智一郎、白土東子、松原尚子、影山努、小川智子、宮村達男、武田直和：ノロウイルス全長クローンをを用いた複製機構の解析。第52回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2004年11月。

岡智一郎、小川智子、Hansman Grant、影山努、片山和彦、宮村達男、武田直和：サポウイルス ORF1 のプロセッシング産物の同定。同上

松原尚子、Hansman Grant、名取克郎、岡智一郎、普後一、濱野國勝、宮村達男、武田直和、片山和彦：サポウイルス粒子形成機構の解析。同上。

Hansman Grant、名取克郎、岡智一郎、小川智子、牛島廣治、武田直和、片山和彦：Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins。同上。

白土(堀越)東子、名取克郎、小川智子、Hansman Grant、鎌田公仁夫、影山努、片山和彦、宮村達男、武田直和：カリシウイルスと血液型物質との結合の解析。同上

白土(堀越)東子、名取克郎、小川智子、鎌田公仁夫、影山努、片山和彦、宮村達男、武田直和：ノロウイルスと血液型物質との結合の解析、第27回日本分子生物学会年会、2004年12月8-11日、神戸

H. 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

新興・再興感染症研究事業

食品由来のウイルス性感染症の検出法の高度化、実用化に関する研究

平成 16 年度 分担研究報告書

分担研究者 田中 智之
谷口 孝喜
榮 賢司
大瀬戸光明
篠崎 邦子
斎藤 博之
松岡由美子
入谷 展弘
西尾 治
名取 克郎
片山 和彦
岡 智一郎
白土 東子

平成 17 (2005) 年 4 月

平成 16 年度 厚生労働省新興再興感染研究事業
「食品由来のウイルス性感染症の検出方法の高度化、実用化に関する研究」
分担研究報告書

ノロウイルス感染迅速診断キット、IC キット、の開発
およびノロウイルス感染食中毒事例と環境中ノロウイルス遺伝子との関連性
についての研究

分担研究者 田中智之 (堺市衛生研究所)

共同研究者 内野清子、三好龍也、池田芳春、吉田永祥 (堺市衛生研究所)

共同研究者 北元憲利 (兵庫県立大学環境人間学部)

共同研究者 武田直和、名取克郎 (国立感染症研究所ウイルスⅡ部)

研究概要:

ノロウイルスの迅速かつ簡便な診断方法の開発を目的として、イムノクロマト・キット、IC キット、の構築を試みた。IC キットの測定時間は 15 分である。ノロウイルス散発性食中毒事例で得た便検体を用いた結果は、RT-PCR 法との一致率 67%、感度 71%、特異性 61%であった。キットの構築に使用したモノクローナル抗体との反応性の低い genotype も存在しており、今後これらの genotype の反応性を高める改良が必要である。

河川水を対象として検出した環境中のノロウイルス遺伝子には、流行ウイルスの遺伝子型と極めて類似性の高いものが認められた。環境汚染を示す結果であった。

A: 研究目的

ノロウイルスの検査診断方法には、電子顕微鏡法、抗原検出 ELISA 法、RT-PCR 法、real Time PCR 法などあるが、いずれの方法も一長一短を有している。これまで、これらの方法の中で簡便、経済的かつ多検体が同時測定できる ELISA 法の開発を行い、ノロウイルス診断系として申請出来る段階まで改良を加えてきた。

しかし、平成 17 年初めに、日本での特別養護老人ホームにおけるノロウイルスの集団感染事例が相次いで報告され、患者死亡の関与にまで言及された。これら

の感染事例に共通している点は、ノロウイルスが原因ウイルスとして迅速な診断がなされていなかった点にある。迅速なあるいは簡便な診断方法が確立されていれば感染拡大の予防は可能だったかも知れず、これまでの研究成果の普及への努力と現場とが著しくかけ離れていることを立証するものであった。

この点を厳しく受け止め、今年度は、迅速かつ極めて簡便なイムノクロマト診断キット、IC キット、の開発を研究主眼とした。

併せて、食中毒感染事例において、こ

これらの事例から検出されたノロウイルス遺伝子が環境から検出されるノロウイルス遺伝子とどの程度の相同性があるのか、つまり、環境中のノロウイルスが食中毒や感染性胃腸炎の原因ウイルスとしてどの程度関与しているのかについて調査研究を行った。

B: 研究方法

1. 材料および方法:

1) 特異的モノクローナル抗体の作製

前年度報告したノロウイルス抗原検出 ELISA 法の成績から、検出感度をさらに高めるために、反応性の低いあるいは認められない genotype を認識する新たなモノクローナル抗体の作製を行った。VLP 抗原には名取らの作製した #8-VLP および三好らの作成した V63-VLP 株を用いた。クローンの作製・スクリーニングは定法に従った。陽性コントロールとして、これまで診断系に用いられてきた MAb#3912, MAb#NS14 および MAb#NV23 を用いた。反応性の確認に用いられた genotype を代表する各種の VLPs は、Dr. Estes (ペイラー医科大学) および名取らによって作成されたものを用いた。

2) IC kit の構築

GI, GII を特異的に認識するモノクローナル抗体、#3912 および #NS14、を用い capture 抗体および gold-labeled の detective antibodies として IC キット構築に用いた。

散发性食中毒事例から得られた 46 便検体について 1% 便乳剤 を作製し、遠心後、100ul をノロウイルス抗原検出に用いた。判定時間は 100ul を滴下後 15 分である。

対照方法の RT-PCR 法は NV capsid region のプライマー・セットを用いた。

3) 環境中ノロウイルス遺伝子検索

堺市内の河川 9 定点で、2002 年 10 月から 2004 年 6 月にかけてほぼ 2 ヶ月毎に採水した。1 定点あたり 2000ml を出発材料とし、濾過水 1000ml を HA フィルターで吸着させ、2ml に溶出し濃縮 RNA 抽出用サンプルとした。サンプル 140 μ l を QIAmp Viral RNA mini kit (QIAGEN) による抽出操作を行い、Buffer AVL 60 μ l で RNA を溶出した。得られた RNA から Super Script II RT で cDNA を作製し、ウイルス性下痢症診断マニュアル (第 3 版) に従い、ABI PRISM 7700 で NVGII のコピー数を測定し、河川水 1ml 当りのコピー数を算出した。

さらに、NVGII の Capsid 領域を RT-PCR 法で増幅し、Capsid 領域の塩基配列を、片山らの方法に基づいて系統樹を作成し、遺伝子型別、遺伝子番号を決定した。

C: 結果

1. #8-VLP および V63-VLP に対して作製されたモノクローナル抗体を表 1 に示す。GI/GII 交差反応性のあるいくつかのクローンは、今後、抗原検出 ELISA 法あるいは抗原検出 IC キットに利用出る可能性は高い。しかし、GII/2 の反応性はいずれのモノクローナル抗体において低かった。検出感度の向上には、今後 GII/2 を特異的に認識するクローンの作製が必要と考える。

2. IC キットの測定結果を表 2 に示す。RT-PCR 法との一致率は 67%、感度 71%、特異性 61%であった。本法の感度は ELISA

法とほぼ同程度であったが、RT-PCR 法との一致率および特異性は前報の ELISA 法と比べると低かった。

3. ノロウイルス GI の検出は見られなかった。年間を通してみると河川水中の GII ノロウイルスのコピー数は1月、2月をピークとし漸次減少し夏季には低値となっている事が判明した(図 2)。当研究所で把握し得た堺市内におけるノロウイルスによる散発、集団感染症の発生時期とその程度、および河川水から検出されるコピー数との間には、時間差を持った有意な関連性は認められなかった。しかし、これは我々の把握できない、あるいは届けられていない大小のノロウイルス感染症が発生していた事を意味するものと考えられる。2004年1月の採水で3定点から GII/3 を検出した。これらの株間の相同性は 95.7~98.2%と高く類似のノロウイルスと考えられた。2003年12月の感染事例の検討結果からこの GII/3 は上記のノロウイルスに最も近い株で、流行時期、採水時期の時間差から推測して、感染事例から何らかの形でウイルスが河川水に汚染したものと考えられた(図 3)。

D: 考察

今年始に報告された、本邦での様々な地域の様々な病院内、特別養護老人ホームにおけるノロウイルス集団感染事例は大きなインパクトを与えた。なかでも、ノロウイルス感染の合併症による死亡事例の報告は、あたかもノロウイルスが、SARS コロナウイルスや高病原性鳥インフルエンザウイルスのごとき致死率の高いウイルスとしての印象を与えた。ノロウ

イルスを研究している者にとっては、ノロウイルス感染は self-limited disease, つまり自己限定性の急性感染症で回復率の高い感染症である事は周知となっている。

このような集団感染事例で求められているのは、ノロウイルスの簡便かつ迅速な診断方法である。診断の確立は感染拡大の予防や重症化予防に大きな貢献ができる。ノロウイルス感染診断には、いくつかの方法が開発されているが、いずれも一長一短がある。中でも、ELISA 法や今回の研究主眼である IC キットはその簡便性では他法に比べ大きな長所となっているが、残念ながら、感度、特異性は低い。現在の IC キットは RT-PCR 法に比べ感度 71%、特異性 61%であった。これらの精度の向上が今後の研究課題である。

モノクローナル抗体には、捕捉出来ない NV genotype も存在しており、新たにこれらと反応する抗体の作製と補充が必要となる。いくつかの候補抗体を既に作成しており、今後、臨床検体を用いて反応性を確認する予定である。

食中毒や感染性胃腸炎が多発する秋から冬にかけて、河川水でもノロウイルスのコピー数が増加している。また、集団発生事例と類似したノロウイルスが河川中から検出されており、環境汚染が拡大している事が示唆される。しかし、河川水中の genotype からそのシーズンにおける流行ウイルスを予測する事は困難である。継続調査は次期の流行の genotype を予測する事は不可能でないかもしれない。河川水中のノロウイルス調査を継続し、地域定着性の検討や感染拡大予測などの

ノロウイルス感染による健康危機管理に
対策に寄与したいと考える。

E: 結 語

迅速かつ簡便なノロウイルス診断ICキ
ットの構築を行った。現時点では RT-PCR
法との一致率は 67%, 感度 71%、特異性
61%であった。今後の改良と共に、感度、
特異性の向上を図る予定である。

F: 研究危機情報

なし

G: 研究業績

1. 論文発表

(1) 田中智之 「微生物の基礎知識」
ノロウイルス 感染と消毒 2004:
11(1);28-31.

2. 著書

なし

3. 学会発表

(1) 三好龍也、萱谷 太、内野清子、
北元憲利、田中智之: ノロウイルスの
持続感染の可能性—院内感染事例か
らの考察—
第 52 回日本ウイルス学会学術集会、パ
シフィコ横浜

(1) 内野清子、三好龍也、田中智之、片
山和彦、武田直和: ノロウイルス遺伝
子型別からみたウイルス浸淫状況の把
握.

第 52 回日本ウイルス学会学術集会、パ

シフィコ横浜

(3) Tanaka T, and co-author Kitamoto N,
Kamata K, Miyoshi T, Uchino K, Oseto M,
Sakae K, Kobayashi S, Natori K, Jiang
X, Parker T, MK Estes and Takeda N.
Diagnostic kit for Norovirus Infection.
Second International Calicivirus
Conference. November 6-10, 2004, Dijon

(4) Tomoyuki Tanaka, Noritoshi
Kitamoto, Keizo Ito, Kunio Kamata,
Tatsuya Miyoshi, Kiyoko Uchino,
Mitsuaki Oseto, Kenji Sakae, Shinichi
Kobayashi, Katsuro Natori, Hisayoshi
Yoshida, Xi Jiang, David Y Graham,
Tracy Parker, Mary K Estes and Naokazu
Takeda: Development of Immunochromato
Kit for Rapid Diagnosis of *Norovirus*
Infection. Fortieth Anniversary United
States-Japan Cooperative Medical
Science Program. December 7-10, 2004,
Kyoto

H: 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

(antibody dilution, 1:16,000)

genogroup		G I						
genotype		1	2	3	4	8	11	
VLP		124	r258	r645	rCV	W18	#8	
antibody	anti V63	3208						
		1720	0.141	0.145	0.135	0.158	0.114	0.123
		7258						
		9818	0	0	0	0.01	0	0.087
	anti #8	2184	0	0	0	0	0	0
		104	0	0	0	0.028	0	0.153
		138	0	0	0	0.048	0	0.011
		561	0	0	0	0.011	0	0
	PC	711	0	0	0	0.03	0	0.156
		NV3912	0.17	0.181	0.146	0.145	0.126	0.106
		NV23						
		NS14	0	0	0	0.1	0	0

		G II																	
		1	2	3			4	5	6		7	8	10	12	14	15	17		
		r485	NG1	r336	r18-3	Sh-5	104	754	V63	7k	r445	10-25	U25	NG15	r76	r47	Kamo8	Alph	
antibody	anti V63	3208	0.075	0					0.119		0.026	0.234	0.198	0.197	0.23				
		1720	0	0	0.178	0.169	0.154	0.129	0.015	0.149	0.152	0.147	0.025	0.066	0.016	0.015	0.122	0.01	0.154
		7258	0	0					0.059					0.086	0.215	0.085	0.047		0.043
		9818	0.127	0				0.142	0.142					0.019					0
	anti #8	2184	0	0	0	0	0	0	0	0.058	0.014	0	0	0	0	0	0	0	0
		104	0	0									0.171	0.165					0
		138	0.051	0.097	0.091	0.087	0.083	0.075	0.136	0.094	0.077	0.084			0.041	0.026			0.546
		561	0.012	0.021	0.092	0.086	0.074	0.096	0.032	0.051	0.101	0.093	0.024	0.043	0.045	0.131	0.092	0.067	0.094
	PC	711	0	0	0.034	0.018	0.044			0.074		0.004	0.13	0.054	0.031	0.027	0.077	0.077	0
		NV3912	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		NV23	0.014	0.01	0.021	0.003			0.062		0.02	0.004	0.163		0.109	0.091	0.031	0.062	
		NS14	0.065	0.121	0.096	0.067	0.242	0.043	0.142		0.025	0.022	0.162		0.068	0.072	0.018	0.076	

OD titer
 0.75<
 0.5~0.75
 0.25~0.5
 0.1~0.25
 <0.1

表 1. 交差反応性モノクローナル抗体

		RT-PCR	
		+	-
IC kit	+	20	7
	-	8	11

一致率 : 31/46 = 67 %
 感 度 : 20/28 = 71 %
 特異性 : 11/18 = 61%

図 1. IC kit と RT-PCR 法との検出感度の比較