

図 2. 河川水中におけるノロウイルス遺伝子のコピー数と経時的変化

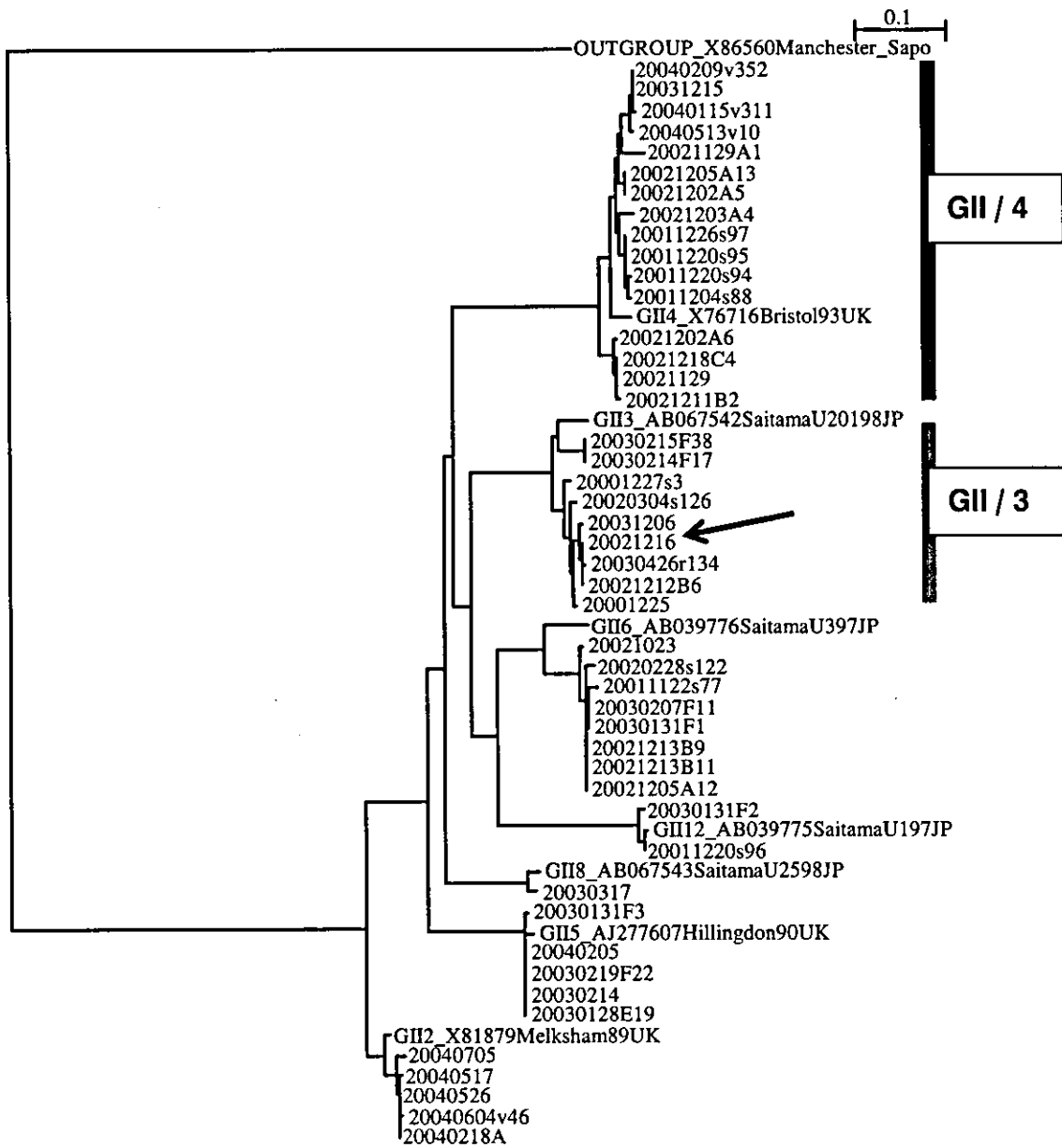


図 3. NV GII 型 遺伝子系統樹解析

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

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 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、その性状を明らかにした。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。各抗体に抵抗性の変異株（M-1-2H, M-2-3E, M-2-11G）を作成し、すでに調製したマウスモノクローナル抗体はこれらの変異株を中和した。一方、各種マウスモノクローナル抗体に対する抵抗性変異株に対して、3種のヒト型抗体もすべて中和した。M-1-2H, M-2-3E, M-2-11Gの変異アミノ酸は、それぞれ、VP4のVP8'のNo.170, No.203, VP7のNo.149であった。こうして、得られたヒト抗体は、ヒト特異的であり、マウスの認識する抗体とは異なることが示された。3種の各ヒト抗体の感染防御能を、生後5～6日齢のBALB/cマウスを用いて調べた結果、150 $\mu$ gの抗体の経口投与により、 $1.7 \times 10^6$  FFUのKU株による下痢発症の程度を有意に阻止した。

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

#### A. 研究目的

ヒトロタウイルスは、乳幼児嘔吐下痢症の病原ウイルスである。散発例がほとんどであるが、食品、水などを介しての集団発生も起こる。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60万人が死亡している。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、その性状を明らかにした。さらに、乳のみマウスを利用して、得られた抗体のロタウイルス感染予防効果を検討した。

#### B. 研究方法

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。

ヒトロタウイルスKU株（G1P[8]）を親株として、得られた3種の各抗体存在下で培養することにより、各抗体に抵抗性の変異株を調製した。

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。

### C. 研究結果

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、得られた3種の抗体のウイルス蛋白質特異性の検討では、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した。

得られた各抗体存在下で、ヒトロタウイルスKU株を培養し、各抗体に抵抗性の変異株M-1-2H、M-2-3E、M-2-11Gを得た。これまでに、われわれが調製した各種交叉中和能を示すマウスモノクロナール抗体は、これらの変異株をすべて中和した。一方、すでに調製済みの、各種マウスモノクロナール抗体に抵抗性の変異株に対する、得られた3種のヒト抗体の中和能を調べた結果、ヒト抗体はいずれの抵抗性変異株も中和した。

M-1-2H、M-2-3EのVP4遺伝子、M-2-11GのVP7遺伝子の塩基配列を親株のKU株のそれらと比較した結果、M-1-2H、M-2-3Eでは、VP8'領域のアミノ酸No. 170およびNo. 203が、M-2-11Gでは、VP7遺伝子のアミノ酸No. 149が、それぞれ置換していた。

3種の各ヒト抗体の感染防御能を、生後5～6日齢のBALB/cマウスを用いて調べた結果、1500gの各ヒト抗体の経口投与により $1.7 \times 10^6$  FFUのKU株の感染を有意に阻止した。

### D. 考察

得られたヒト型抗体は、cross-reactiveに複数の血清型の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。各抗体に対する抵抗性変異株を作成して行った中和エピトープの解析によると、マウスが認識する中和エピトープとヒトが認識する中和エピトープには違いが有ることが示唆された。さらに多く

のヒト型中和モノクローン抗体の解析が必要である。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。現在、SCIDマウスを用いた感染治療効果を検討している。

さらに、得られた各抗ヒトロタウイルスヒト型抗体遺伝子を乳酸菌に挿入し、腸管での発原系を試みる予定である。

### E. 研究発表

#### 論文発表

Higo-Moriguchi K, Akahori Y, Iba Y, Kurosawa Y, Taniguchi K: Isolation of human monoclonal antibodies neutralizing human rotaviruses. *J Virol* 78 (4):3325-3332, 2004

Ahmed UA, Kobayashi N, Wakuda M, Sanekata T, Taniguchi K, Kader A, Naik TN, Ishino M, Alam MM, Kojima K, Mise K, Sumi A: Genetic analysis of group B human rotaviruses detected in Bangladesh in 2000 and 2001. *J Med Virol* 72 (1):149-155, 2004

Shiomi H, Urasawa T, Urasawa S, Kobayashi N, Taniguchi K: Isolation and characterization of poliovirus mutants resistant to heating at 50°C for 30 min. *J Med Virol* 72 (1):149-155, 2004

Shinozaki K, Okada M, Kaiho I, Nagashima S, Taniguchi K: Characterization of Human Rotavirus Strains with G12 and P[9] detected in Japan. *J Med Virol* 72 (1):149-155, 2004

Nagashima S, Sasaki J, Taniguchi K: The 5'-terminal region of the Aichi virus genome encodes cis-acting replication elements required for positive- and negative-strand RNA synthesis. *J Virol* (in press)

Wakuda M, Pongsuwanna Y, Taniguchi K:

Complete nucleotide sequences of two RNA  
segments of human picobirnavirus. J Virol  
Methods (in press)

平成 16 年度厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

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

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  
名取克郎 国立感染症研究所 ウイルス第 2 部

研究要旨 既存の抗原検出キットで陰性となった食中毒患者に由来するノロウイルス (NV) 3 株は遺伝子解析の結果、Ina virus が GII/2 Hokushin virus が GII/10、Kamo virus が GII/15 に分類され、今までに抗体が作製されていない新しい遺伝子型の NV と考えられた。そこで、3 株の NV の構造タンパク遺伝子を組み入れたバキュロウイルスを用いてウイルス様中空粒子 (VLPs) を発現し、3 株の VLPs に対する免疫血清を作製した。得られた免疫血清を用いた抗原検出 ELISA は、特異性が高く、実際の食中毒事例でも RT-PCR 法とほぼ同じ感度でノロウイルスを検出することができた。

A. 研究目的

ノロウイルス (NV) は、ウイルス性食中毒および冬季に流行する散発性下痢症の主要な原因ウイルスである。特に食中毒および老人介護施設や病院等における嘔吐下痢症の集団発生時の検査では、2 次感染の防止など防疫対策の観点から迅速診断が求められる。NV は未だ培養増殖ができないウイルスであることから、従来の NV 検出検査では電子顕微鏡 (電顕) 法が標準法として実施されてきた。しかし、電顕法は検体の精製から観察、判定までに多大な労力と日数を要する方法で

あるので、迅速診断には不適な方法である。そこで、電顕法に代わる NV の迅速かつ汎用的な診断法として、組換えバキュロウイルスで発現された NV のウイルス様粒子に対する抗体を利用した NV 抗原検出 ELISA 法が検討されている。しかしながら、NV は GI で 14 の遺伝子型に、GII で 17 の遺伝子型に分類され、抗原的にも多様性に富む一群のウイルスであることから、PCR 陽性の検体でも治験用の抗原検出 ELISA で陰性となるような NV 株が認められることがある。そこで、今回は既存の抗原検出 ELISA で陰性となった 3

株の NV について、構造タンパク領域の遺伝子解析を行うとともに、それら 3 株の抗原性の相違を組換えバキュロウイルスで発現されたウイルス様粒子に対する抗体を用いて検討した。

## B. 研究方法

### ①ウイルス様中空粒子の発現

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 産物をクローニング後、バキュロウイルストランスフェクターに組み込み、組換えバキュロウイルスを作製した。次いで、Tn5 細胞に組換えバキュロウイルスを感染後、5~6 日培養した上清について SDS 電気泳動と電子顕微鏡観察を行い、ウイルス様粒子 (Virus-like particles, VLPs) の発現を確認した。

### ② 抗原検出 ELISA

培養上清から精製濃縮した 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 NV 抗体を捕捉抗体およびビオチン化 NV 抗体を検出用抗体とした NV 抗原検出 ELISA を構築し、抗原性の検討や食中毒患者の糞便検体からの NV 検出に用いた。

## C. 研究結果

### ① VLPs 発現に用いられた 3 株の NV の遺伝子解析

NV Hu/GII/Ina/02/JP、NV Hu/GII/Hokushin/03/JP、NV Hu/GII/Kamo/03/JP の 3 株が既存の抗原検出 ELISA キットで陰性となったので、それら 3 株の構造タンパク領域 (ORF2) の塩基配列を決定し、過去に当所で VLPs として発現された NV 2 株との相同性について比較検討した。

その結果、NV 5 株の相同性は核酸で 64.6%~74.1%、アミノ酸で 66.5%~79.4% となり、5 株ともに互いに異なる遺伝子型 (抗原型) の NV と考えられた (表 1)。

GenBank 等の遺伝子データベースに収載されている NV 株との分子系統樹解析の結果、Ina 株は GII/2、Hokushin 株は GII/10、Kamo 株は GII/15 に分類され、3 株ともに過去に VLPs 発現が実施されていない遺伝子型のウイルスと考えられた (図 1)。

### ② 抗原検出 ELISA の成績

NV 5 株の VLPs を用いて今回新たに構築した抗原検出の ELISA の交差反応性を検討した。その結果、いずれの抗原検出系ともに特異性は高く、使用した濃度範囲で交差反応はほとんど認められなかった (図 2)。

VLPs 発現に使用された NV 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、その検査成績を表 2 に示した。

3 事例ともに全ての糞便検体が既存の

抗原検出では陰性であったが、今回の ELISA で RT-PCR とほぼ同じ感度で NV を検出することができた。

#### D. 考察および結論

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るので、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。NV 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、NV 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り、今後とも NV の流行状況の継続的な監視が必要である。

NV はウイルス性食中毒の主要な原因ウイルスであるが、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。しかし、食品や環境中でウイルスは増殖しないことから、汚染ウイルス量は微量と考えられる。食品や環境由来検体から NV を検出するためには効率よく NV を濃回収した後、回収した NV を高感度に検出する方法が必要である。今後は、多数の遺伝子型に対する NV 抗体を磁気ビーズに結合し、免疫磁気ビーズの食品や環境由来検体からの効率的な

NV の回収法への応用も期待される。

#### E. 研究発表

##### 学会発表

- 1) 山下照夫、伊藤 雅、藤浦 明、榮 賢司：東南アジアからの帰国者から分離された 4 種類の新型エンテロウイルス. 第 52 回日本ウイルス学会、横浜、2004 11 月.
- 2) 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. 第 52 回日本ウイルス学会、横浜、2004 11 月.



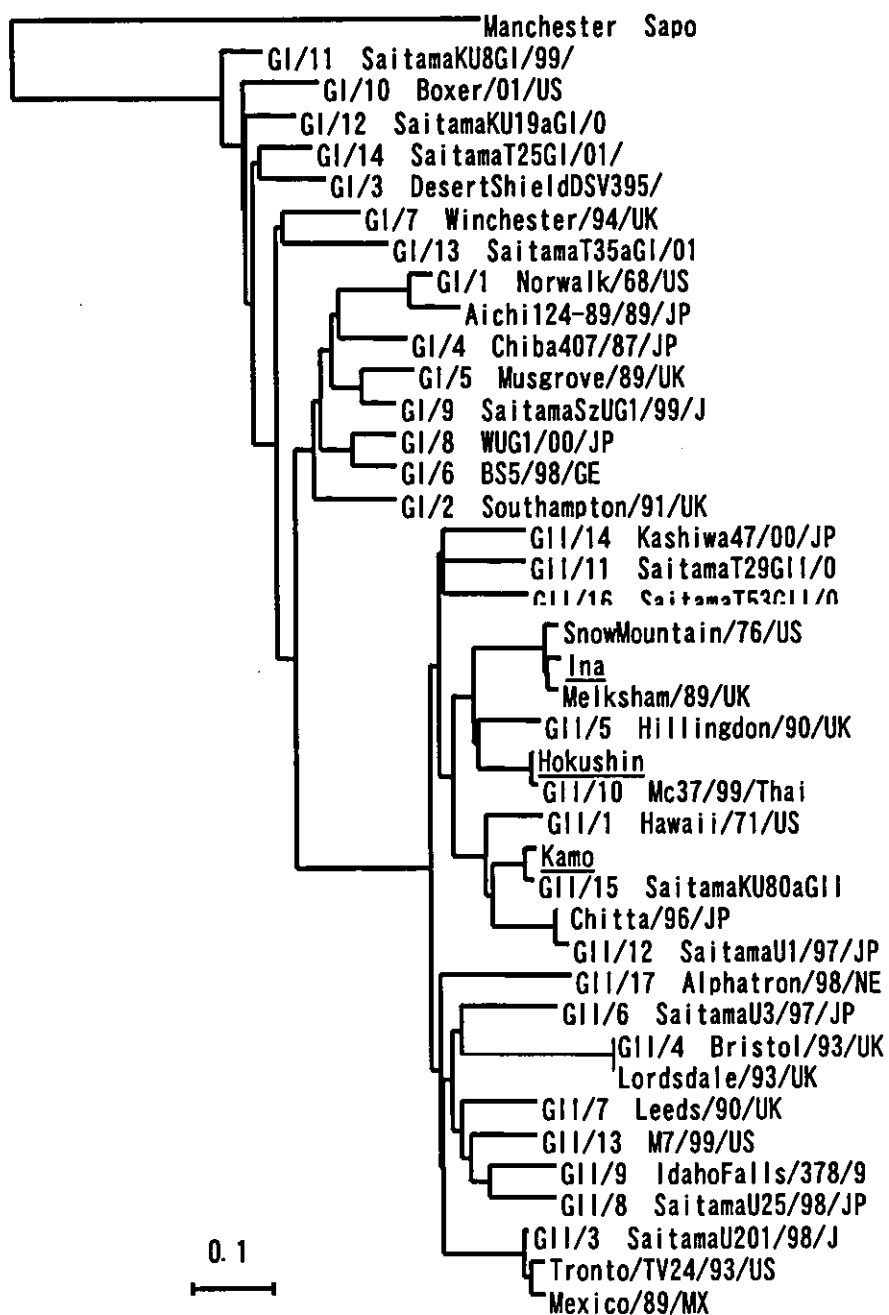


図1 VLPs 発現されたノロウイルスの系統樹解析  
アンダーラインで示したウイルスを VLPs 発現に用いた。

表1 ノロウイルス発現株の相同性の比較

ORF2 塩基数		Nucleotide 相同性 (%)				
		Chitta	Hokushin	Ina	Kamo	Sinsiro
Chitta	1608 bp	—	64.6	70.1	74.1	67.3
Hokushin	1647 bp	77.2	—	71.3	70.0	65.6
Ina	1629 bp	76.0	77.4	—	70.6	66.3
Kamo	1623 bp	79.4	75.0	77.4	—	70.0
Sinsiro	1647 bp	69.9	67.2	66.5	69.0	—

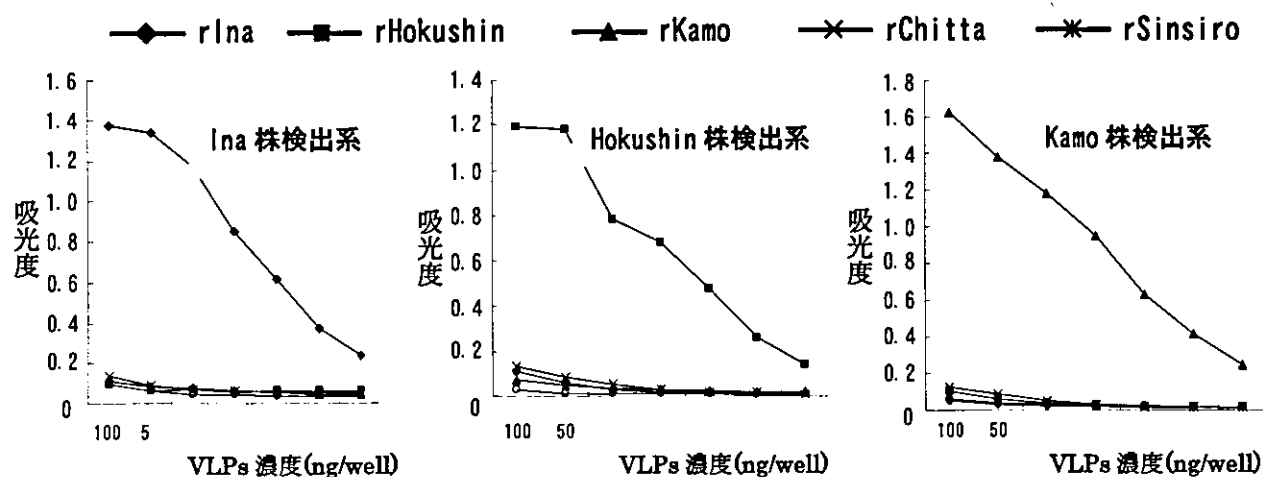


図2 抗原検出ELISAのVLPsに対する交差反応

表 2 食中毒由来検体の検査結果

	RT-PCR	D-ELISA <sup>1)</sup>	N-ELISA <sup>2)</sup>
	陽性数/検査数	陽性数/検査数	陽性数/検査数
事例 1	4/6	0/6	2/6
事例 2	2/3	0/6	1/3
事例 3	3/8	0/6	3/8

1) 既存の抗原検出法

2) 今回、構築した抗原検出法

## 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

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 山下育孝、近藤玲子、豊嶋千俊（同上）

研究要旨：2001年10月から2004年9月の間に愛媛県において検出されたノロウイルスのシーケンスを行い、地域流行株の遺伝子型の分布を調査するとともに、集団発生から検出されたノロウイルスの遺伝型と比較を行った。調査期間中に、散発例から G II /4Lordsdale、G II /3Mexico、G II /2Melksham、G II /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 G II /4Lordsdale、3 事例から G II /2Melksham が検出され、G II /3Mexico、G II /4Miami、G II /8Amsterdam 型が各々 1 事例から検出された。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。

#### 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。

胃腸炎集団発生の集計方法が我が国とは異なっているが、英国では病院、学校、保健福祉施設等での発生事例数が食中毒発生事例数を大きく上回っている。愛媛県においても、最近、カキによる食中毒事例が少なくなる傾向がみられており、調理中の食品の 2 次汚染

によると考えられる食中毒、原因食品が不明な集団発生が多くみられるようになった。下痢症ウイルスの地域での流行が、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、また、ヒト-ヒト感染による施設内での胃腸炎集団発生の原因となると考えられるので、今回は、3 カ年に渡り愛媛県で検出されたノロウイルスの遺伝子シーケンスを行い、地域において散発発生する胃腸炎患者からのウイルスと集団発生事例の原因ウイルスとの遺伝子型の比較を行ったので、その結果を報告する。

#### B. 研究方法

材料：糞便材料は、2001年10月から2004年9月の間に、感染症発生動向調査病原体検

査のために採取された散発性感染性胃腸炎患者糞便及び胃腸炎集団発生の患者糞便を用いた。糞便は検査実施まで $-20^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。

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、ABI Genetic analyzer 310 を用い PCR 産物のダイレクトシークエンス法で NV 遺伝子塩基配列を決定した。NV 遺伝子解析の一部は国立感染症研究所 (西尾博士) に依頼して行った。NV の遺伝子型別は Katayama らが提唱する方法で、カプシド領域の系統樹解析により行った。

### C. 研究結果

#### 1. 散発性胃腸炎患者からのウイルス検出状況

2001 年 10 月から 2004 年 9 月までの愛媛県における散発性胃腸炎患者からのウイルス検出状況は、NV が最も多く検出され、次いで A 群ロタウイルス、サポウイルス (SV)、アデノウイルス、アストロウイルスであった (表 1)。検出された NV341 株の Genogroup 別の内訳は、G II が圧倒的に多く 322 株 (94.4%) で、G I は 19 株 (5.6%) と非常に少なかった。

月別の検出数の推移を図 1 に示した。例年、NV は 10 月頃から検出され始め 12 月に検出率のピークに至り、4 月頃に終息する比較的規則的な消長がみられていたが、2002/03 年シーズンは NV の流行が早く始まり、検出率のピークは 11 月であった。2003/04 シーズンは逆に NV の流行の始まりが遅れ、1 月がピークで、6 月まで流行が続いた様子が見られ

る。また 2002 年及び 2003 年の夏には、流行期ではないにも関わらず NV が少数例検出されており、ほぼ年間を通じて地域社会の中で NV が保持されていることが伺われた。ロタウイルスは例年と同様、毎シーズン 2 月から 4 月にかけて多く検出された。SV は NV の主流行期の前後に多く検出される傾向がみられた。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が年間を通じて検出されたこと、それぞれ例年の動向と同じであった。

#### 2. 集団発生事例からの NV の遺伝子型

調査期間中に愛媛県内で報告された食中毒事例及び集団発生事例は 16 例で、そのうち 4 事例はカキの摂食が原因と推定された。1 例からは SV が原因ウイルスとして検出されたが、残りの 15 例からは NV が検出され、NV が原因の集団発生と判定された。

これらの事例のウイルス検査結果と検出された遺伝子型を表 2、表 3 に示した。カキ関連事例では患者からの NV 検出率が高かったが、調理や配膳に携わった従業員からは全く検出されなかった。遺伝子型別ができた 3 事例では、集団毎に G I、G II 両方の Genogroup が検出され、遺伝子型は 3 種類から 10 種類含まれていたことが明らかにされた。

一方、非カキ関連事例では 1 事例の例外を除き、患者から検出された遺伝子型は事例ごとに 1 種類であった。さらに、従業員の検体が採取された 7 事例中 4 事例で、従業員からも NV が検出され、遺伝子型は患者から検出されたものと一致していた。3 種類の遺伝子型が検出された事例は、県外の多くの県から参加があったスポーツ大会での集団発生であり、複数の経路により感染した患者が会場に集合したため、複数の遺伝子型が検出されたものと考えられた。

非カキ事例の原因ウイルスの遺伝子型は、G II/4 Lordsdale が 5 事例、G II/2 Melksham が 3 事例、その他 G II/6 Miami、G II/8 Amsterdam、G II/3 Mexico の各型がそれぞれ 1 事例から検出された。スポーツ大会での

集団発生からは、G II /1 Hawaii、G II /4 Lordsdale、G II /5 Hillingdon が検出された。

### 3. 散発例及び集団発生例から検出された遺伝子型の分布

散発例及び集団発生事例から検出された NV の遺伝子型は、G II で 14 種類、G I で 9 種類あった (表 4)。散発例からの G II の遺伝子型は 11 種類で、集団発生事例からは 12 種類あり、散発例、集団発生事例の両方から検出された遺伝子型は 9 種類で、両者における遺伝子型の分布が比較的類似していた。G I では、散発例から 6 種類、集団発生事例から 5 種類検出されたが、両者に共通している遺伝子型は 2 種類に過ぎなかった。これは、集団発生事例から検出された G I は、すべてカキの摂食が関連した食中毒からの検出であったためと考えられた。

G II で多く検出されたのは 4 型 (Loadsdales) で、次いで 3 型 (Mexico)、2 型 (Melksham)、6 型 (Miami) の順で多く検出された。G I は全体に検出数が少なかったが、その中では 4 型 (Chiba)、7 型 (Winchester) が多かった。

散発例からの月別 G II 遺伝子型検出数を表 5 に示した。4 型 (Loadsdales) は 2002 年 7 月から 2003 年 1 月にかけてと 2003 年 12 月から 2004 年 5 月にかけての 2 回の地域流行があったことが示され、その流行時期に 5 事例の胃腸炎集団発生があった。3 型 (Mexico) は 2001 年 10 月から 2 月と、2003 年 12 月から 2004 年 3 月の間にやはり 2 回の地域流行があったことが示されている。同様に 2 型 (Melksham) や 6 型 (Miami) も 2 回の地域流行がみられている。2003 年 12 月には 3 型の集団発生が起こり、2004 年 6 月には 2 型の集団発生が 3 事例起こっている。これらのことから食中毒等の集団発生の背景には、地域における NV の流行があり、両者の密接な関連が推測される。

### 4. NV 遺伝子型別の系統樹解析

非カキ関連の食中毒又は集団発生を起こした NV 遺伝子型について、散発性胃腸炎から

検出された株と系統樹解析を行った (図 2)。集団発生事例から検出された株をイタリック体とアンダーラインで表示した。系統樹解析で 100% 同一株が複数見られた場合は、同じ集団発生事例或いは流行期毎に囲み数字でその株数を表示した。調査期間に非カキ関連集団発生を起こした遺伝子型は、G II の 2 型、3 型、4 型、6 型の 4 種類であり、それぞれの遺伝子型別に系統樹を示した。

これらの遺伝子型株は、調査期間中にほぼ 1 シーズン又は 2 シーズン間隔で、2 回の流行期を迎えていたが、異なる流行期の株間に大きな変異はみられなかった。これらのことから、NV の遺伝子型株が比較的長期間地域社会に土着的に流行を繰り返していたことが推察された。

集団発生事例から検出された株は、事例毎に遺伝子塩基配列が 100% 一致していた。さらに、ほとんどの集団発生株と同一の株が、散発性例からも、ほぼ同時期に検出されており、散発性の NV が食中毒や胃腸炎集団発生に密接に関連していることが伺われた。

### 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。

今回は、2001 年 10 月から 2004 年 9 月の 3 年間に、散発性胃腸炎及び食中毒等の集団発生から検出され保存していた NV について、カプシド領域の一部の遺伝子塩基配列を決定し、系統樹解析を行った。その結果、多様な

遺伝子型株が地域で繰り返し流行しており、散発性例から 17 種類、集団発生例からも 17 種類検出され、双方で 23 種類検出された。

また、地域の散発性胃腸炎から検出された NV と遺伝子塩基配列が 100%一致している株が、集団発生事例から検出された。このことは地域の流行ウイルスが、調理中の食品の 2 次汚染の原因となったり、病院や老人福祉施設に持ち込まれて、施設内でヒト-ヒト伝播で感染が拡大し、胃腸炎集団発生を惹き起こしていることを推測させる。

#### E. 結論

1) 2002 年 1 月から 2002 年 12 月に、散発性胃腸炎から EM および RT-PCR、リアルタイム PCR で NV が 341 例 (検出率 22.7%)、ロタウイルスが 154 例 (10.3%)、SV が 79 例 (5.3%) 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 43 例 (2.9%)、32 例 (2.1%) であった。

2) 検出された NV の Genogroup は、G I が 19 例 (4%)、G II が 322 例 (96%) であった。

3) 散発性胃腸炎からは G II の遺伝子型が 11 種類、G I が 6 種類であった。食中毒等集団発生からは G II が 12 種類、G I が 5 種類検出された。

4) 食中毒等集団発生の原因ウイルスと 100% シークエンスが一致した株が、同じ時期の散発性胃腸炎からも検出され、地域で散発的に流行する NV が集団発生の原因と関連していることが示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

杉枝正明、新川奈緒美、大瀬戸光明、徳竹由美、山口 卓、秋山美穂、西尾 治：Norovirus 感染により排泄されるウイルス量について。臨床とウイルス、32：189-194 (2004)

##### 2. 学会発表

山下育孝、大瀬戸光明、近藤玲子、豊嶋千俊、西尾治：急性胃腸炎の散発例及び集団発生例から検出されたノロウイルス(NV)の分子疫学。第 52 回日本ウイルス学会、横浜市、2004 年 11 月。

#### G. 知的財産権の出願、登録状況

なし

図1 感染性胃腸炎患者からのウイルス検出状況

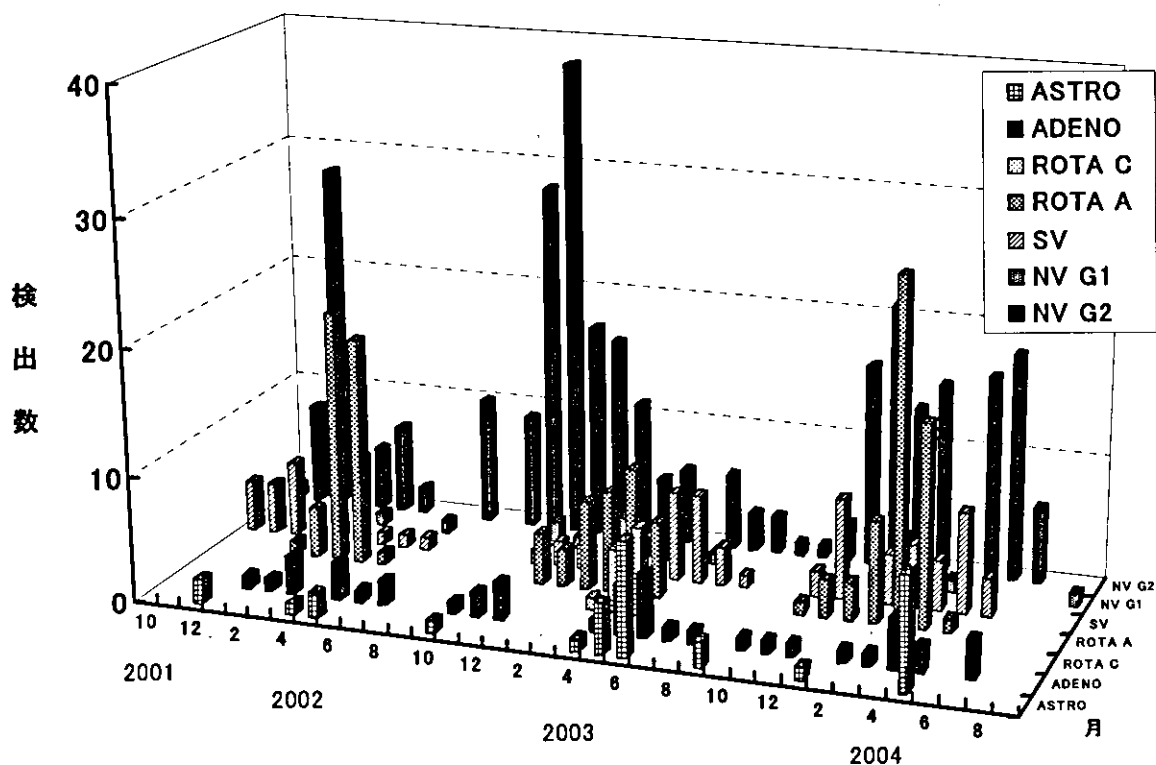


表1 感染性胃腸炎患者からのウイルス検出状況  
(2001.10-2004.9)

ウイルス	検出数	検出率 (%)
ノロウイルス G I	19	22.7
ノロウイルス G II	322	
サポウイルス	79	5.3
ロタウイルス A群	141	9.4
ロタウイルス C群	13	0.9
アデノウイルス	43	2.9
アストロウイルス	32	2.1
その他	12	1.1
合計	661	44.1

検査数 1499 例



表2 集団発生事例のウイルス検査結果－カキ事例－

事例NO	発生時期	区分	検査人数	EM陽性	NV陽性(PCR)	NV Genogroup	遺伝子型		原因	発生施設
							GII	GI		
①	2002.1	患者	9	5/7	7	GII:7	—	—	会席料理(カキ)	(広島で発生)
②	2002.1	患者	3	2	3	GII:2, GI&GII:1	Ch Kashiwa47	Southampton	会席料理(酢カキ)	飲食店
		従業員	17	0	0					
③	2002.2	患者	23	8/17	17	GII:10, GI&GII:7	Mel Hillingdon, Chitta, MX, SaitamaT29, IdahoFal	Winchester, Chiba, SaitamaT35a, SaitamaUK19a	カキの赤だし	病院
④	2003.1	患者	11	6	9	GII:7, GI&GII:2	Kashiwa47, Hillingdon, SaitamaKU80a	Chiba, SaitamaT35a	会席料理(酢カキ)	飲食店
		従業員	4	0	0					

表3 集団発生事例のウイルス検査結果－非カキ事例－

事例NO	発生時期	区分	検査人数	EM陽性	NV陽性(PCR)	SV陽性(PCR)	遺伝子型	原因	発生施設
1	2002.11	患者	6	2	6		Lordsdale		飲食店
		従業員	11	0	0				
2	2002.12	患者	7	4	7		Lordsdale		ホテル
		従業員	16	2	2				
3	2002.12	患者	6	4	6		Miami		飲食店
		従業員	2	0	0				
4	2003.2	患者	19	5	16		Amsterdam	会席料理	旅館
		従業員	8	2/5	4				
5	2003.4	患者	9	1/7	5		Lordsdale, Hawaii, Hillingdon		スポーツ大会
6	2003.12	患者	14	2	10		Mexico		病院
7	2003.12	患者	11	8	0	10			幼稚園
		従業員	14	0	0	0			
8	2004.2	患者	10	5	7		Lordsdale	給食	福祉施設
		従業員	8	—	5		Lordsdale		
		食品	9	—	3		Lordsdale		
9	2004.4	患者	1	0	1		Lordsdale		寄宿舎(寮)
		従業員	3	3	3		Lordsdale		
10	2004.6	患者	7	0	6		Melksh		合宿施設
11	2004.6	患者	5	1	4		Melksh	天ぷら御膳	飲食店
		従業員	3	0	0				
12	2004.6	患者	5	3	5		Melksh		学校

表4 散発例及び集団発生例から検出されたノロウイルスの遺伝子型

ノロウイルスGII

ノロウイルスGI

遺伝子型	散発例	集団発生例	計	遺伝子型	散発例	集団発生例	計
GII/4 Lordsdale	51	28	79	GI/4 Chiba	6	2	8
GII/3 Mexico	33	7	40	GI/7 Winchester	3	2	5
GII/2 Melksham	25	15	40	GI/3 DesertShield	3		3
GII/6 Miami	19	6	25	GI/13 SaitamaT35a		2	2
GII/5 Hillingdon	12	4	16	GI/12 SaitamaKU19a		2	2
GII/8 Amsterdam	7	10	17	GI/1 Ndr w	2	a	2
GII/12 Chit	4	7	11	GI/8 Sindlesham	1		1
GII/14 Kashiwa47	2	3	5	GI/11 SaitamaKU8	1		1
GII/15 SaitamaKU80a	2	1	3	GI/2 Southampton		1	1
GII/11 SaitamaT29		2	2	計	16	9	25
GII/1 Hawaii		1	1				
GII/13 M7	1		1				
GII/9 IdahoFalls		1	1				
GII/7 Leeds	1		1				
計	157	85	242				

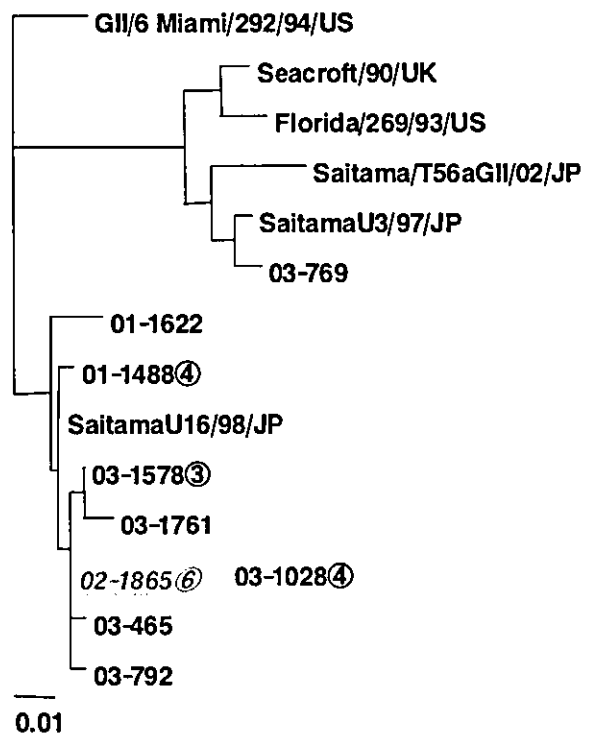
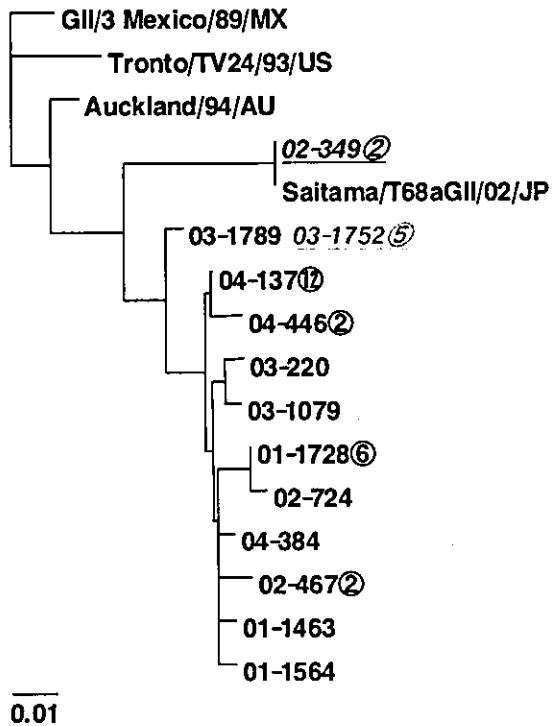
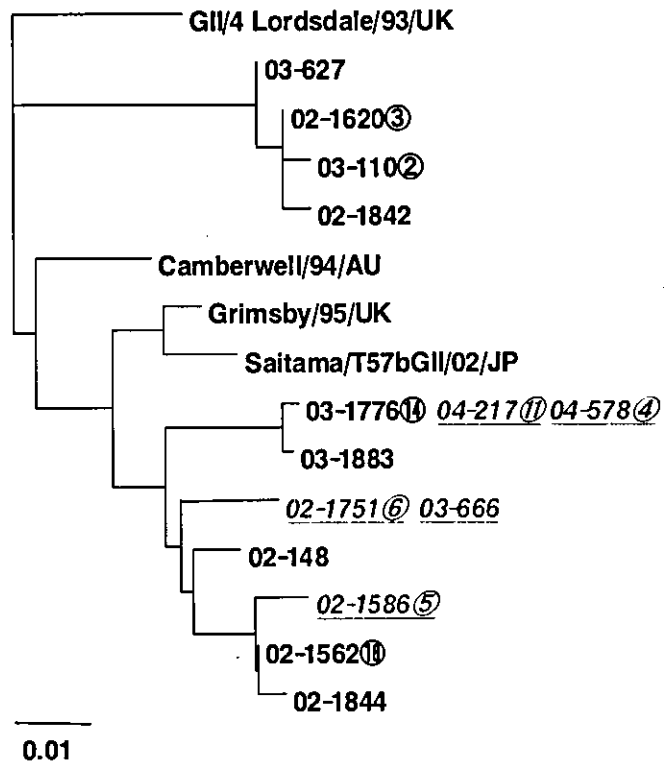
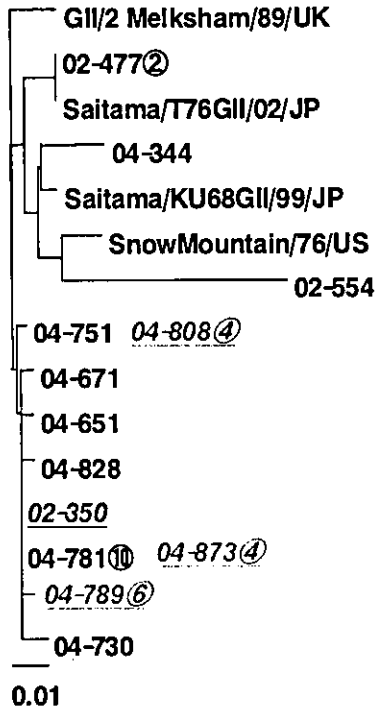
表5 散発性胃腸炎からのノロウイルス遺伝子型の月別検出数

遺伝子型	2001			2002												2003												2004							合計	
	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7		
GII/4 Lordsdale				1					1	6		1	11	7	6	2	1											3	3	3	3	2	1			51
GII/3 Mexico	1	1	7	2	1		1									1				1							2	8	4	4					33	
GII/2 Melksham				2	2																							1			8	9	3		25	
GII/6 Miami	3	2														1	2	2	2	1	1	1	2	1	1										14	
GII/5 Hillingdon				1	3		1									1	1												1						12	
GII/8 Amsterdam				1														1									4		1					7		
GII/12 Chit				1												1	2																	4		
GII/14 Kashiwa47													1	1																				2		
GII/15 SaitamaBU																								1	1										2	
GII/13 M7					2																													2		
GII/7 Leeds							1																											1		

■: 非カキ集団発生があった月

■: カキ関連食中毒発生した月

図2 NV遺伝子型別の系統樹解析



分 担 研 究 報 告 書

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)

分担研究者 篠崎邦子 千葉県衛生研究所室長

協力研究者 岡田峰幸 千葉県衛生研究所研究員

研究要旨: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 NV を検出した。検出した NV の 80%以上が G II であった。NV の遺伝子型は、GI G II の新たな遺伝子型を含めて、GI は 13 遺伝子型、G II は 16 遺伝子型に分類された。集団では、G II-3、4、5 が全シーズンで検出され、03/04 シーズンは G II-4 が主流行になっていた。散発では、G II-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。

A. 研究目的

ノロウイルス(NV)は、平成 10 年に食中毒統計に加わって以来その発生件数は年々増加し、平成 12 年から3年間発生患者数で第 1 位となり、食中毒の主要な病原体となってきている。また、学校、保育所、老人施設、障害者施設など人から人への感染による集団発生も急増し、公衆衛生上重要性が増してきている。

NV は遺伝的に多様性であり、多くの遺伝子型の存在が明らかになってきている。NV の分子疫学調査を行うことはウイルスの動向を知るうえで重要である。今回、千葉県で過去6年間に集団発生および散発から検出された NV の遺伝子型の検討を行った。

B. 研究方法

1999年9月から2005年1月初旬までの期間に、当所に行政検査の依頼のあった集団発生 227 事例の患者から採取した 1345 検体と感染症発生動向調査事業検査定点から搬入された急性胃腸炎患者の 750 検体を検査材料とした。

ウイルス検査は RT-PCR 法と電子顕微鏡法(EM)で行った。NV の RT-PCR は、EM の検体処理でウイルスを濃縮した後、High Pure Viral RNA Kit (Roche 社製)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(G II)に特異的なものと、Alphatron、Amsterdam 検出用に G II プライマーを別途設定したものをを用いた。PCR 陽性検体