平成16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）
「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」
分担研究報告書

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

分担研究者　入谷展弘　（大阪市立環境科学研究所　微生物保健課）

協力研究者　改田　厚、阿部仁一郎、久保英幸　（同上）

勢戸祥介　（大阪市立大学大学院医学研究科）

研究要旨

2004年3月中旬～5月にGII/2型ノロウイルス（NV）の流行が園児、小学生、中学生を中心に大阪市内で認められた。過去のNV集団事例発生状況から、4月・5月のNVの大きな流行およびGII/2型NVの流行は大阪市では初めてであった。また検出されたGII/2型NV株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型NV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。

A. 研究目的

ノロウイルス（NV）は、幅広い年齢層のヒトに感染し、秋～冬季に流行することが知られている。最近、NVの感染経路として食品を介した発生だけでなく、ヒトからヒトへと直接感染が拡がっていく発生も注目されている。今回、2004年3月中旬～5月に大阪市において相次いで発生した集団胃腸炎事例からGII/2（Melksham）型NVを検出し、分子疫学的解析を行った。

B. 研究方法

1）検査材料

2003年11月～2004年5月の期間にNVが検出された非細菌性集団胃腸炎43事例を対象に遺伝子型別を行った。また1996年度以降に大阪市で集団事例および小児散発性胃腸炎事例から検出されたGII/2型NV株を解析に用いた。

2）NVの遺伝子型別

NV陽性検体について、Kojimaら（JVM, 100, 107-114, 2002）のプライマー（GI用：G1SKF/R、GII用：G2SKF/R）を用いてCapsid N terminal/Shell domain（N/S）領域を増幅し、ダイレクトシーケンス法により、オートシーケンサー（ABI PRISM310, ABI）で塩基配列を決定した。NVの遺伝子型別はKatayamaらの方法（Virology 299, 225-239, 2002）に基づいて行い、遺伝子型番号

は Kageyama ら（JCM 42, 2988-2995, 2004）に従った。複数の NV 陽性検体が認められた事例については、少なくとも陽性 2 検体以上について遺伝子型別を行った。

C. 研究結果

2003 年 11 月～2004 年 5 月の期間に GII/2 型 NV は 12 事例（12 月：1 事例、3 月：4 事例、4 月 2 事例、5 月 5 事例）から検出され、11 事例は 2004 年 3 月中旬以降に発生した事例であった（図 1、表 1）。2004 年 4 月および 5 月に発生した GII/2 型 NV 以外の 4 事例は大阪市以外で発生した事例であった。2004 年 3 月中旬までは GII/4（Bristol）型 NV が最も多く検出されていた（37.1%）。GII/2 型 NV が検出された 12 事例のうち 9 事例（事件番号 03199、04042、04073 以外）の患者は園児、小学生、中学生が中心であり、ヒトからヒトへ直接感染が拡がった事例であると考えられた。NV が検出された 43 事例において、患者の主症状は嘔吐・下痢であり、検出された NV の遺伝子型で特に症状の差は認められなかった。2004 年 3 月中旬以降に発生した GII/2 型 NV を原因とする集団胃腸炎 11 事例および小児散発例 3 例の地理的関連は、事件番号 04071 および 04075 の施設が隣接していたが、他の事例の施設および小児散発例患者住所は隣接していなかった。2004 年 6 月以降、大阪市内で GII/2 型 NV は検出されていない。

1996～2003 年度の大阪市における NV 集団事例発生状況から 4 月・5 月の発生は、4 月に 3 事例（1997 年度、2002 年度および 2003 年度に各 1 事例）認められているのみであった（図 2）。1996 年度以降、GII/2 型 NV が検出されたのは集団事例で 17 事例、小児散発例で 4 例であり、その中で 2004 年 3 月中旬以降に検出されたものは、集団事例で 11 事例、小児散発例で 3 例であった（表 2）。2003 年度以前に発生した GII/2 型 NV による 5 事例の集団事例は、発生時期が 12 月～3 月であり、主に飲食店等で成人を中心に発生しており、発生時期・施設、患者年齢層において今回の GII/2 型 NV の流行とは異なっていた（表 3）。2002 年度に小児散発例から検出された 1 例は、海外感染例であったため、小児散発例からの GII/2 型 NV の検出は 1996 年度以降初めてであった（表 4）。

12 事例から検出された GII/2 型 NV について同じ事例内の株間では、2 事例（事件番号 04056 および 03199）に 1 塩基の相違が認められたが、他の 10 事例では 100%一致した（図 3）。2004 年 3 月～5 月に発生した 11 事例間の株では、塩基配列の相同性が 98.7%～100%、推定アミノ酸配列の相同性が 99.0%～100%であった。同時期に小児散発例から検出された GII/2 型 NV 株も塩基配列および推定アミノ酸配列の相同性が 99.0%～100%であった。2003 年 12 月に検出された GII/2 型 NV 株（事件番号 03199）と 2004 年 3 月～5 月に検出された株とは、塩基配列で 89.7%～90.7%、推定アミノ酸配列で 97.0%～98.0%の相同性であり、分子系統樹上においても異なるクラスターに分類された（図 3）。2003 年度以前に検出した GII/2 型 NV 株と 2004 年 3 月～5 月に検出した株との塩基配列の比較では塩基

配列で 90.7%～99.0%、推定アミノ酸配列で 99.0%～100.0%の相同性であり、分子系統樹上においても明確な相違は認められなかった（図 3)。

D. 考察

2004年3月中旬までの大阪市におけるNV集団事例の流行像は、発生時期・施設、推定原因、患者年齢層において過去の流行とほぼ同様であった。検出されたNVの遺伝子型は少なくとも11種類認められ、GII/4型NVが最も多く検出されていたが、過去の流行と比較して特に注目する変化は認められなかった。3月中旬以降、大阪市内で発生した集団事例からは遺伝的に同一あるいは近縁なGII/2型NV株のみが検出されるようになった。GII/2型NVによる集団事例の発生時期や地理的関係等の疫学情報から、同時多発的な発生であると考えられた。また今回流行していたNV株は、12月に検出されたGII/2型NV株（事件番号03199）とは異なる株であったことから、3月中旬以降に出現し、大阪市内で拡がったと考えられた。これまで、大阪市では遺伝的に同一であると考えられたNV株の大きな流行が、1997年度に認められている（JCM 38, 2649-2654, 2000)。本NV流行は同じNV株で汚染された生カキの喫食が原因と考えられ、食品を介した同時多発的な発生であった。今回は食品を介さずに、遺伝的に同一あるいは近縁な株が大阪市内の各地域で同時多発的に発生しており、過去に例をみたことがない。今回のNV流行から食中毒の原因としてだけではなく、感染症としてのNVの重要性が示された。2004年6月以降は、大阪市内でGII/2型NV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。

今回、GII/2型NVが大きく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。またヨーロッパではGII/4型NV変異株の大流行が報告されており（Lancet 363, 682-688, 2004)、遺伝子の変異によるNV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型NV株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。

2004年3月中旬～5月にかけて大阪市で認められたNV流行は、流行時期、流行NV株、患者年齢層が非常に稀な例であり、過去のNV流行とは全く異なっていた。今後、これまで流行が認められない遺伝子型のNVが突然、大きな流行を起こす可能性もあり、NV流行の監視と流行株の遺伝子型別等の解析を引き続き行っていく必要があると考えられた。

E. 結論

- 2004年3月中旬～5月にかけて大阪市内では、園児、小学生、中学生を中心に遺伝的に同一あるいは近縁なGII/2型NV株が流行していた。

- 過去に検出したNVの解析から、1996年月以降において、4月・5月のNVの大きな流行およびGII/2型NVの流行は、大阪市では初めてであった。

F.研究発表
1）論文発表
○Kaida A, Kubo H, Iritani N, Murakami T, and Haurki K: Isolation of echovirus type 13 in Osaka City during 2001-2002, Japanese Journal of Infectious Diseases, 57, 127-128 (2004)

○Iritani N, Seto Y, Kubo H, Haruki K, Murakami T, Kaida A, Ayata M, and Ogura H: Probe typing of noroviruses detected in Osaka City, Japan, Japanese Journal of Infectious Diseases, 58, 53-54 (2005)

○Seto Y, Iritani N, Kubo H, Kaida A, Murakami T, Haruki K, Nishio O, Ayata M, and Ogura T: Genotyping of norovirus strains detected in outbreaks between April 2002 and March 2003 in Osaka City, Japan, Microbiology and Immunology. (in press)

2）学会発表
○入谷展弘，勢戸祥介，久保英幸，春木孝祐，村上　司，簑城昇次，改田厚，綾田　稔，小倉　壽：プローブ型別によるノロウイルス流行の分子疫学的解析，平成16年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部ウイルス部会総会（2004．9．10）

○西田知子，野田　衛，大瀬戸光明，三上稔之，篠原美千代，入谷展弘，植木　洋，川本　歩，秋山美穂，西尾治：市販生食用カキのノロウイルス汚染状況，第88回日本食品衛生学会（2004.11.11-12）

○西田知子，野田　衛，三上稔之，篠原美千代，大瀬戸光明，入谷展弘，植木　洋，吉澄志磨，岩田祐之，西尾治：3シーズンにおける国内産生食用カキのノロウイルスおよびA型肝炎ウイルス汚染状況，第52回日本ウイルス学会（2004．11．21-23）

○入谷展弘，改田　厚，勢戸祥介，久保英幸，村上　司，綾田　稔，小倉壽:2004年3月-5月に発生した集団胃腸炎事例から検出されたGII/2（Melksham）型ノロウイルスの遺伝子解析，第52回日本ウイルス学会(2004.11．21-23)

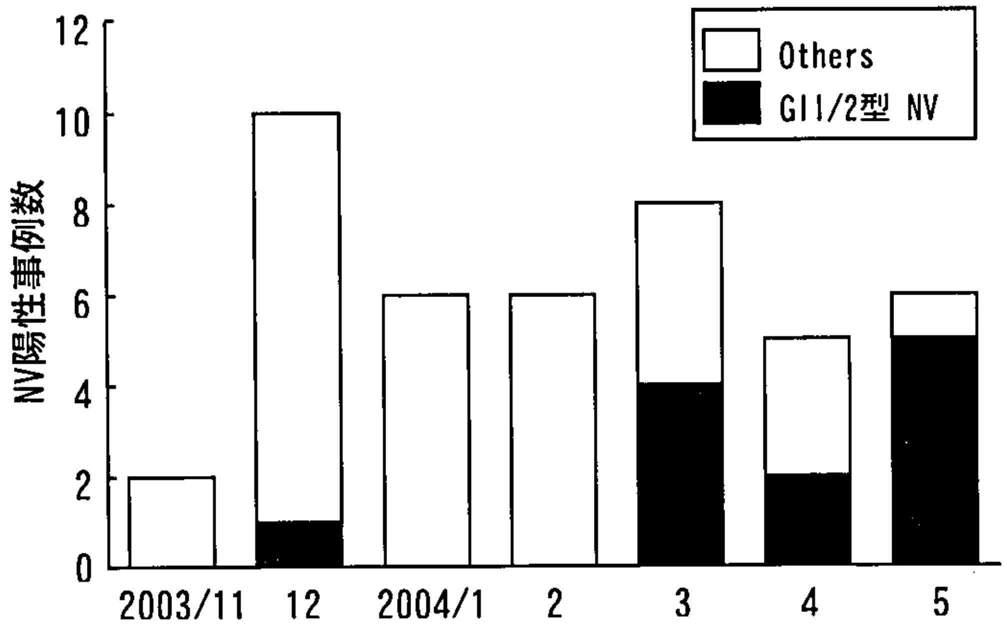

図 1. 集団胃腸炎事例からの月別 NV 検出状況（2003 年 11 月～2004 年 5 月）

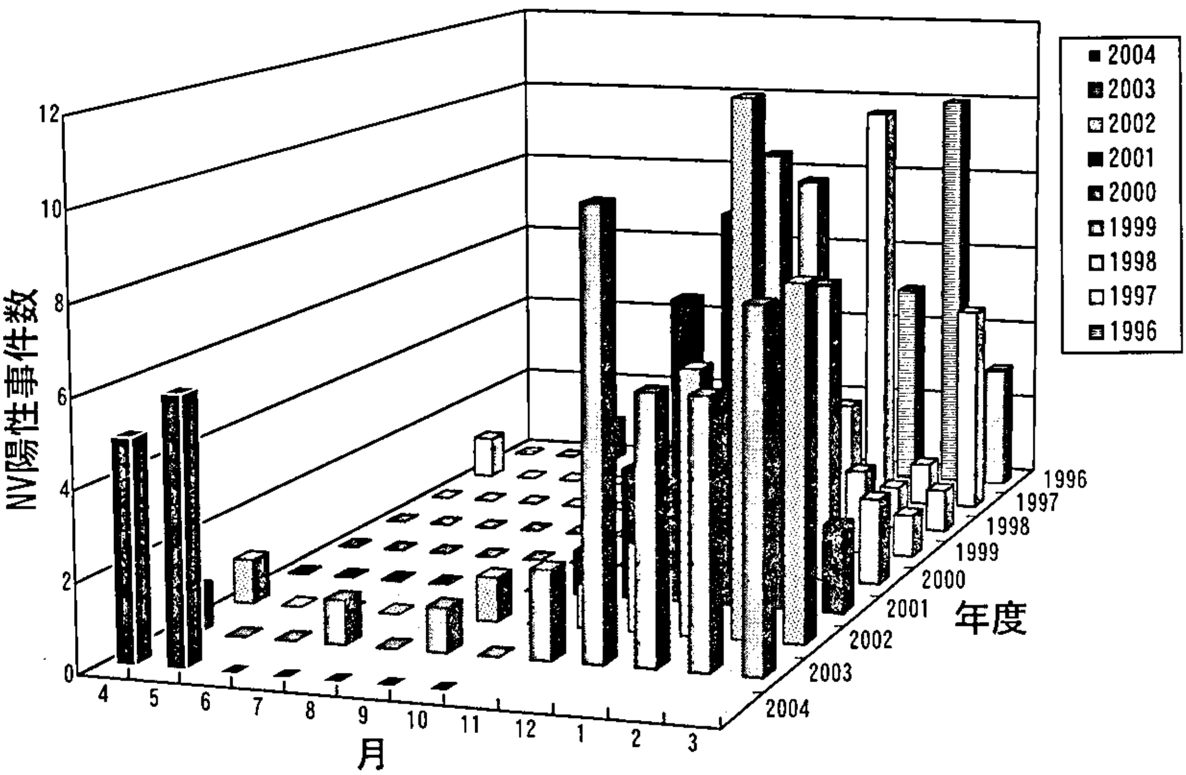

図 2. 大阪市における集団胃腸炎事例からの NV 月別検出状況
（1996 年 4 月～2004 年 10 月）

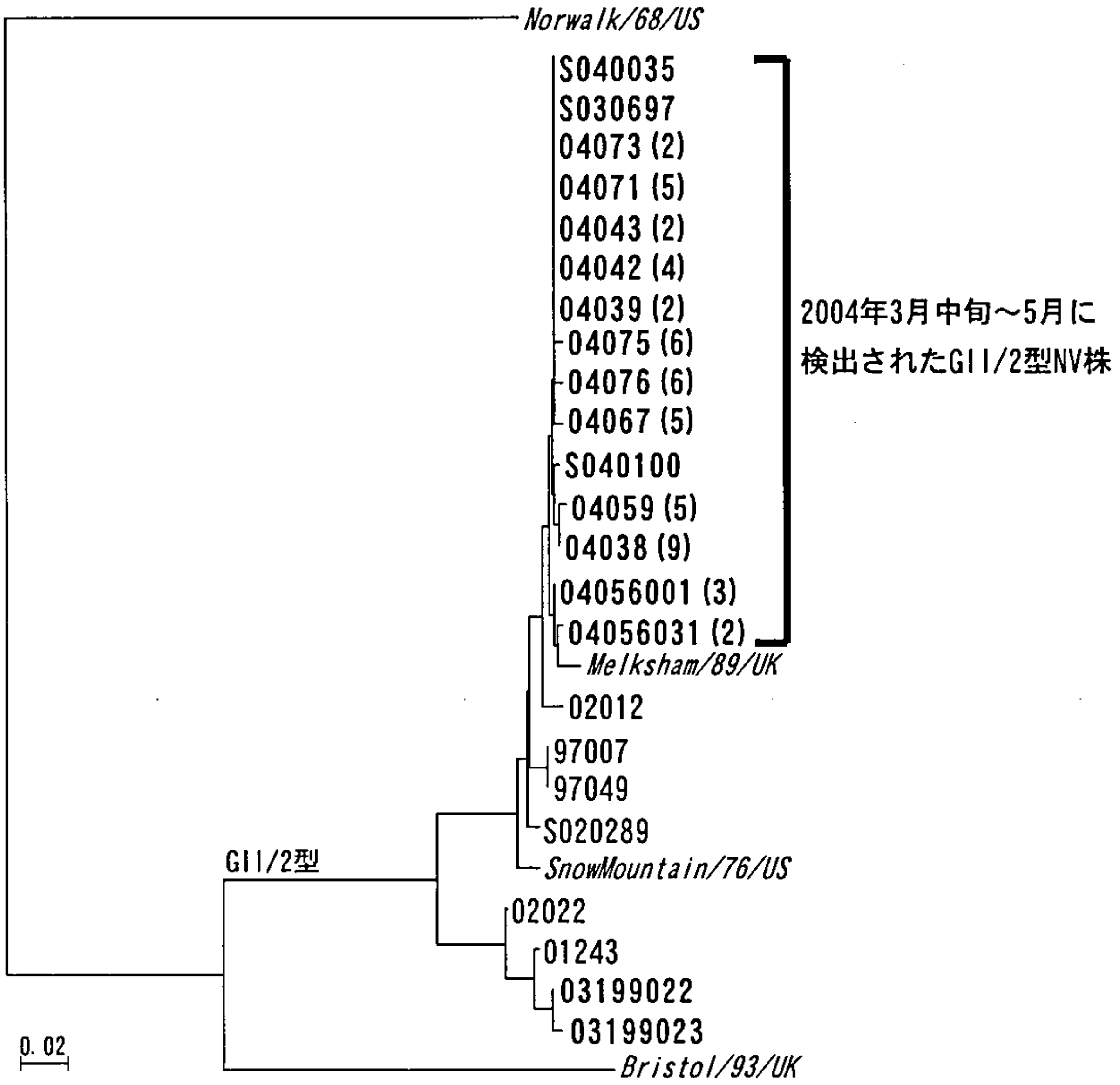

図 3. 大阪市で検出された GII/2 型 NV 株の Capsid N/S 領域における分子系統樹

太字：2003 年 12 月～2004 年 5 月に検出された GII/2 型 NV 株

斜体：NV 参考株

（ ）：同じ事例内で塩基配列を決定した株数

表1．2003年11月～2004年5月にNVが検出された集団事例

事例番号	発生年/月/日	原因施設	喫食者数	患者数	NV検査数	NV陽性数	遺伝子型	推定原因[a]	備考
03177	03/11/3	保育園	53	51	47	40	GII/4	3	
03185	03/11/30	飲食店	9	8	6	4	GII/1	1	
03187[b]	03/12/1	飲食店	11	9	1	1	GII/4	1	
03188	03/12/6	飲食店	4	4	4	2	GII/6	1	
03190[b]	03/12/8	飲食店	40	26	1	1	GII/3	*[c]	
03193	03/12	飲食店	4	3	3	3	GI/1, GII/3, GII/6	*	
03194	03/12/18	飲食店	5	5	5	5	GII/3	*	
03196	03/12/16	飲食店	39	16	9	9	GII/4	1	
03197	03/12/22	飲食店	2	2	1	1	GII/3	*	
03199	03/12/23	飲食店	24	16	13	4	GII/2, GII/4	2	患者は成人
03202	03/12	飲食店	4	3	3	2	GII/4	*	
03203	03/12	養護老人施設	*	*	8	7	GII/4	3	
04002[b]	04/1/1	ホテル	183	68	5	4	GI/4, GII/3, GII/12	*	
04003[b]	04/1/1	ホテル	30	14	1	1	GII/4	2	
04004[b]	04/1	ホテル	*	*	2	1	GII/4	2	
04010	04/1/18	飲食店	2	2	2	2	GII/3, GII/4	1	
04011	04/1/17	飲食店	3	3	1	1	GII/5	*	
04014	04/1/23	社員食堂	1657	359	30	24	GII/4	2	
04019	04/2/3	飲食店(弁当)	50	12	5	3	GI/1	*	
04020	04/2/5	*	*	1	1	1	GI/1, GII/4	*	
04021	04/2/12	飲食店	442	6	6	4	GII/5	*	
04024[b]	04/2/13	飲食店(仕出)	66	21	1	1	GII/4	*	
04027[b]	04/2/25	旅館	348	134	4	3	GII/4	*	
04029	04/2/26	飲食店	6	4	4	2	GII/5	2	
04032	04/3/3	飲食店	12	9	7	5	GI/1, GII/5	1	
04034	04/3/8	飲食店	3	3	2	1	GI/1, GII/8	1	
04037	04/3/6	飲食店	2	2	2	1	GI/12	1	
04038	04/3/11	飲食店	60	29	29	22	GII/2	*	患者は幼稚園児
04039	04/3/15	家庭	*	2	2	2	GII/2	*	兄弟（小学生）
04041	04/3/14	飲食店	*	2	2	2	GII/5	2	
04042	04/3/14	飲食店	71	40	10	9	GII/2	2	患者は成人
04043	04/3/17	保育園	*	20	2	2	GII/2	3	
04047[b]	04/4/3	旅館	565	162	3	3	GII/4	2	
04048[b]	04/4/7	飲食店	14	6	1	1	GII/8	1	
04056	04/4/12・13	幼稚園	*	114	60	50	GII/2	3	
04057[b]	04/4/23	旅館	796	325	1	1	GII/4	*	
04059	04/4/18-30	小学校	*	268	84	74	GII/2	3	
04062[b]	04/5/1	寄宿舎(弁当)	176	72	2	2	GII/6	*	
04067	04/5/10-15	中学校	*	154	41	26	GII/2	3	
04071	04/5/16-23	幼稚園	*	95	56	49	GII/2	3	
04073	04/5/22	飲食店	5	4	2	2	GII/2	*	患者は成人
04075	04/5/25	小学校	*	41	22	19	GII/2	3	
04076	04/5/25・26	小学校	*	11	9	9	GII/2	3	

a: 1. 共通食にカキを含む, 2. 食品, 3. ヒトからヒト

b: 他都市における発生

c: 特定不可

□ : GII/2型NVが検出された事例

表 2. 大阪市におけるGII/2型NV検出例（1996年4月〜2004年10月）

年度	集団事例		小児散発例	
	GII/2型	他の遺伝子型	GII/2型	他の遺伝子型
1996	2	18	0	22
1997	0	19	0	11
1998	0	8	0	17
1999	0	17	0	55
2000	0	21	0	39
2001	3	26	0	25
2002	0	31	1	36
2003	5	30	1	45
2004	7	4	2	5
合計	17	174	4	255

表 3. 1996〜2002年度に大阪市においてGII/2型NVが検出された集団事例

事件番号	発生年/月/日	原因施設	喫食者数	患者数	NV検査数	NV陽性数	遺伝子型	推定[a]原因	備考
97007	97/1/8	飲食店	*[b]	6	3	2	GII/2	*	患者年齢不明
97049	97/3/8	飲食店	4	3	1	1	GII/2	*	患者は成人
01243	01/12	事業所	80	50	31	24	GII/2, GII/4	2	患者は成人
02012	02/1	ホテル	28	9	7	6	GII/2, GII/3, GII/7, GII/13	1	患者は成人
02022	02/1	*	2	2	1	1	GII/2	*	患者は成人

a：1. 共通食にカキを含む、2. 食品
b：特定不可

表 4. GII/2型NVが検出された小児散発性胃腸炎発生例

検体番号	発症年/月/日	年齢	症状	備考
S020289	02/8/5	11歳	嘔吐、下痢、腹痛、発熱（38.8℃）	海外感染例
S030697	04/3/19	5歳	嘔吐、下痢	保育園での感染 （表1の集団事例とは異なる施設）
S040035	04/4/21	6ヶ月	嘔吐、下痢	
S040100	04/5/31	3ヶ月	嘔吐、下痢、発熱（40℃）	家族内感染

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

分担研究者　西尾　治　（国立感染症研究所　感染症情報センター）
研究協力者　徳竹　由美、中村　友香、粕尾　しず子、小林　正人、和田　啓子
（長野県環境保全研究所）
秋山　美穂、愛木　智香子（国立感染症研究所　感染症情報センター）

研究要旨

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Lordsdale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。

A．研究目的

平成15年に国内で発生した井戸水を原因とした食中毒事例は2事例報告されているのみである。平成16年5月下旬、長野県内の旅館でノロウイルスに汚染された井戸水を原因とした食中毒事例が発生したので報告する。

B．研究方法

検査材料：患者便38件（長野県9件、他県29件)、従事者便13件、食品3件、自家水は貯水槽原水1件、調理室から1件、客室洗面所から2件について行った。また、関連調査として、近隣ホテルの井戸水原水2件についてもノロウイルス検査を行った。

井戸水の検査方法：水試料の前処理で水中のウイルス濃縮は、①超遠心法のみの濃縮と、②「ウォーターコンセル・ビルコン」キットで濃縮後、超遠心法で濃縮した二法で行った。

ノロウイルス検出検査：ふん便試料は10%乳剤とし、10,000rpm. 20分間遠心を行いその上清をRNA抽出に用いた。

RNAの抽出は、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) にて行い、抽出RNAはDNase処理後、random hexamer を用い、SuperscriptⅡ逆転写酵素 (Invitrogen) で逆転写し、cDNAを合成した。RT-PCRは、カプシド領域のプライマーを用いて、ふん便は1st PCR、食品および自家水はNested PCRを実施し、増幅されたPCR産物は、ダイターミネーター法でダイレクトシークエンスを行い、塩基配列を決定

した。自家水については、リアルタイムPCRを行い、検体中のウイルス量を算出した。

C．研究結果

1）事例概要

平成16年5月31日、長野県の旅館を利用した後、山梨県を旅行していたグループが急性胃腸炎症状を示していると連絡が入った。保健所が調査した結果、5月22日以降の利用者から発症者が確認され、潜伏期間は利用日ごとの朝食を暴露点とすると平均27時間、夕食を暴露点とすると平均38時間30分であった。摂食状況調査の結果、日ごとのメニューに有意差が認められるものはなかった。

患者は当該施設全館にわたる発症が認められたこと、当該施設利用中に発症した患者はなく、いずれも、当施設を利用後に発症していること。施設を吐物等で汚染した状況がなかった。その後の詳細な調査で、発症者の利用日が5月22日から29日までの8日間に、26グループ160名中18グループ65名（40.6%）が発症していた(表1)。食中毒事件と断定された。

そこで、患者便、従事者便について細菌検査を行ったが、有意な食中毒の起因菌が検出されなかった。

2）ノロウイルス検査結果

患者便38件中28件（長野県9件中8件、他県29件中20件）、従事者便13件中6件からノロウイルスが検出された。食品は3件とも陰性であった。

塩基配列が決定された患者便4件、従事者便1件、6月3日客室洗面所採水、6月9日採水の貯水槽原水の塩基配列は、

表1　利用日別発症状況

利用日	利用グループ数	発症グループ数
5／17	5	0
18	3	0
19		
20	1	0
21		
22	12	5
23	5	5
24		
25		
26	2	2
27	2	2
28	3	3
29	4	4

全て同一でLordsdale類似株であった。

関連調査として行った、近隣ホテルの井戸水原水2件からは、ノロウイルスが検出されなかった。

3）自家水の状況

当該井戸の深さは、深く掘ると温泉が出る地域のため浅く、別の井戸では深さが10mであった。

自家水は、一本の井戸から屋上の貯水槽に汲み上げており、塩素注入機が貯水槽上部から滴下する方法で、水の汲み上げポンプに連動して塩素注入のポンプが作動する。貯水槽内部は、底部に砂が少量あるのみで清潔であった。

調理コーナー以外の厨房内、各階パントリー、全客室、各階トイレ、浴室の蛇口等全てで自家水が使用され、客の飲用水、製氷機にも用いられていた。

残留塩素の測定は、厨房内洗い場の給水栓でほぼ毎日行っており、5月9日以降、

表2　自家水の検査結果および残留塩素濃度

採水日	採水場所	濃縮法	ノロウイルス検査		細菌検査				残留塩素濃度(ppm)
			RT-PCR	ﾘｱﾙﾀｲﾑPCR (log10 個/l)	食中毒原因菌	一般細菌数	大腸菌群数	糞便性大腸菌群	
6月3日	客室洗面所	超遠心	陽性	4.5	−	30個/ml以下	30個/ml以下	NT	0.19
		超遠心ﾋﾞﾙｺﾝ	陽性	2.2					
6月9日	貯水槽原水	超遠心	陽性	5.9	NT	30個/ml以下	NT	陽性	消毒前
		超遠心ﾋﾞﾙｺﾝ	陽性	3.5					

0.05ppmと低い状態が続いており、5月31日の立ち入り調査での保健所の測定でも0.05ppmと低く、塩素注入機の調整を行うよう指示した。6月3日測定の残留塩素濃度は、貯水槽内の水0.22ppm、浴室給水栓0.13ppm、客室洗面所給水栓 0.19ppm、6月9日では、調理室給水栓0.50ppm、客室洗面所給水栓0.56ppmであった。

井戸水の検査成績：6月9日採水の貯水槽原水（消毒前）からノロウイルスが検出され、リアルタイム PCR 法で検出された1ℓ 中のノロウイルスコピー数は、客室洗面所が、超遠心法で 31000 コピー、ビルコン濃縮後超遠心法で 170 コピー、貯水槽原水は、超遠心法で710000コピー、ビルコン濃縮後超遠心法で3100コピーを示した（表2）。

細菌検査では6月3日の検査では食中毒菌、ふん便性大腸菌群は認められなかったが、一般細菌、大腸菌群が 30 個/ml 以下で検出された。

なお、6月9日の細菌検査では一般細菌は30個/ml以下で、ふん便性大腸菌群が陽性であった。

D．考察

発症者の利用日が5月22日から29日までの8日間に渡り、26グループ160名中18グループ65名（40.6%）が発症していた（表1）。そこで、患者の症状および潜伏期間当該施設の食事の時間から推察すると、ノロウイルスが最も原因物質として考えられた。そこで患者のふん便検査でノロウイルスが検出され食中毒事件と断定された。

本事例は、患者の共通食が当該施設の飲食物しかなく、当該施設の食事を暴露点と想定すると、患者の発生状況から、5月22日から5月29日まで連続して患者発生が見られた。当該施設による食事が原因となる食中毒と断定されたが、食品からはノロウイルスが検出されず、摂食状況調査の結果、日ごとのメニューに有意差が認められるものはなかった。

当該施設で用いられている自家水（井戸水）は調理コーナー以外の厨房内、各階パントリー、全客室、各階トイレ、浴室の蛇口等全てで自家水が使用され、客の飲用水、製氷機にも用いられていたこ

とから自家水が原因飲料水として推察された。

そこで、客室洗面所および貯水槽原水についてノロウイルス汚染をリアルタイム PCR 法で調べたところ感染、発病させるに十分量の汚染が認められ、さらに RT-PCR 法で検出されたノロウイルスの塩基配列は患者便、従事者便と完全に一致したことにより、自家水が原因であったと考えられた。なお、検出された遺伝子型は全国的に流行している Lordsdale 類似株であった。

関連調査として行った、近隣ホテルからの井戸水原水 2 件からはノロウイルスが検出されなかったため、当該施設の井戸のみが汚染されたものと推測される。

自家水の細菌検査で貯水槽原水が、糞便性大腸菌群が陽性を示したことから、井戸水にふん便が混入したと推測でき、ノロウイルスも汚染されていたと推察された。このように井戸水が汚染されたのは何らかのふん便汚染があったものと推測され、井戸水に大量のノロウイルスが汚染された要因の一つに、井戸を深く掘ると温泉が出ることから井戸の深さが 10m と浅いことが考えられた。

ノロウイルスによる感染症・食中毒が急増している現在、井戸水などを使用する場合は原水がノロウイルスに汚染される事例が増えると推察され、塩素濃度は水道水の基準値を保持していたが、ノロウイルスは塩素に強く、この程度では不活化されないことから、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と考えられた。

また、水試料の前処理で水中のウイルス濃縮は、超遠心法のみの濃縮と、「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が、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。

E. 結論

ノロウイルスによる感染症・食中毒が急増しており、井戸水などを使用する場合は原水がノロウイルスに汚染される事例が増えると推察され、ノロウイルスは塩素に強く、通常の塩素濃度ではノロウイルスを不活化できないことから、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と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Li L, Shimizu H, Doan LTP, Tung PG, Okitu S, Nishio O , Suzuki E, Seo JK, Sim JG, Muller WEG, Ushijima H : Characterizations of Adenovirus Type 41 isolates from children with acute gastroenteritis in Japan, Vietnam and Korea. J Clin Microbiol. 42:4032-4039, 2004

Tsuguto Fujimoto, Teruo Okafuji,

Masahiro Ito, Soichi Nukuzuma, Masatsugu Chikahira, and Osamu Nishio :Evaluaation of a bedside immunochromatographic test for deyection of Adenovirus in respiratory samples, by comparison to virus isolation,PCR,and Real-Time PCR. J Clin Microbiol.42:5489-5492,2004

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

新川奈緒美、川元孝久、秋山美穂、加藤由美子、西尾治：吐物が感染源と推察されたノロウイルス集団胃腸炎事例について、臨床とウイルス、32:195-201、2004

西尾治、秋山美穂、愛木智香子：ノロウイルスによる食中毒、月刊 HACCP、109：48-50、2004

2．学会発表

平潟洋一、有澤孝吉、西尾治、中込治:長崎市のレストランで発生したノロウイルス GII メキシコ株の集団食中毒、第 78 回日本感染症学会、東京、2004 年 4 月 6-7 日

荒川香南子、中野陽子、山内昭則、杉山明、中山治、西尾治:カキ及び養殖海域のノロウイルス汚染調査、衛生微生物協議会第 25 回研究会、埼玉、2004 年 7 月 8-9 日

愛木智香子、西尾治、大瀬戸光明、杉枝正明、古屋由美子:輸入生鮮魚介類のウイルス汚染実態調査成績について、第 53 回日本感染症学会東日本地方会、新潟、2004 年 10 月 21-22 日

岩間真人、神田隆、西尾治:ノロウイルスによる食中毒等の防止に関する調査、第 63 回日本公衆衛生学会、松江、2004 年 10 月 27-29 日

西田知子、野田衛、大瀬戸光明、三上稔之、篠原美千代、入谷展弘、植木洋、川本歩、秋山美穂、西尾治:市販生食用カキのノロウイルス汚染状況、日本食品衛生学会第 88 回学術講演会、広島、2004 年 11 月 11-12 日

秋山美穂、愛木智香子、西尾治、福田伸治、西田知子:平成 15 年度に発生したノロウイルスによる食中毒事例について、日本食品衛生学会第 88 回学術講演会、広島、2004 年 11 月 11-12 日

西尾治:ノロウイルスによる食中毒、第 36 回日本小児感染症学会、東京、2004 年 11 月 12-13 日

乾あやの、十河剛、藤澤知雄、西尾治:ノロウイルスによる急性胃腸炎の臨床的特徴、第 36 回日本小児感染症学会、東京、2004 年 11 月 12-13 日

古屋由美子、原みゆき、片山丘、杉枝正明、大瀬戸光明、藤本嗣人、宇宿秀三、田中俊光、西尾治:輸入生鮮魚介類のウイルス汚染状況について、第52回日本ウイルス学会、横浜、2004年11月21-23日

田村務、西川眞、西尾治、鈴木宏:急激に感染拡大したノロウイルス,Lordsdale近縁種による急性胃腸炎の分子疫学的解析、第52回日本ウイルス学会、横浜、2004年11月21-23日

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、2004年11月21-23日

西田知子、野田衛、三上稔之、篠原美千代、大瀬戸光明、入谷展弘、植木洋、吉澄志磨、岩田祐之、西尾治:3シーズンにおける国内産生食用カキのノロウイルスおよびA型肝炎ウイルス汚染状況、第52回日本ウイルス学会、横浜、2004年11月21-23日

Phan Gia Tung、大亀路生、Tuan Anh Nguyen、沖津祥子、西尾治、牛島廣治:Genetic Diversity of Sapovirus in Fecal Specimens from Infants and Children with Acute Gastroenteritis in Pakistan、第52回日本ウイルス学会、横浜、2004年11月21-23日

西田知子、岡本玲子、中尾利器、松村建道、加藤大智、岩田祐之、西尾治:山口県内におけるノロウイルス胃腸炎集団発生事例および市販生食用カキの汚染状況、平成16年度日本獣医公衆衛生学会、新潟、2005年2月10-12日

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

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

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　Grant Hansman　国立感染症研究所ウイルス第二部　研究生
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　大阪市立大学医学部神経ウイルス感染学教室　講師
入谷展弘　大阪市立環境科学研究所　主任研究員

研究要旨 ノロウイルス（NoV）、サポウイルス（SaV）は組織培養細胞および実験動物等で培養増殖が出来ないウイルスである。このことはこれらのウイルスの基礎研究および血清学的研究に支障を来していた。遺伝子組換えバキュロウイルス発現系を用いて形状および抗原性が変わらない中空粒子（VLPs）の発現によって大量のウイルス抗原が得られ、さらに免疫血清の作製も可能になった。我々はすでにNoVにおいては遺伝子型I（GI）で６株（６種抗原型）、遺伝子型II（GII）で１９株（１１種抗原型）のVLPs発現に成功し免疫血清の作製も終了している。それらはNoVのウイルス学的研究および下痢症診断法の開発等に用いられている。しかしNoVは遺伝学的にGIは１４、GIIは１７種に分類されており、我々の昨年度までの抗原解析の結果から抗原的にも同様に分類されると予測される。以上のように抗原的に異なると考えられる未発現の遺伝子型がまだ存在する。特に14の遺伝子型に分類されるGIではまだ６株のVLP発現しか出来ていない。多くの下痢症例から未発現の株の検索を行ない、発現候補株を選出してVLPs発現を試みた。その結果、本年度は抗原型が異なる新たな３株でVLP発現に成功した。SaVにおいても遺伝子型I（G-1）に加えて、本年度は遺伝子型V(G-5)属す１株でVLPsの発現に成功した。免疫血清を作製し抗原性を解析した。さらに、患者材料からSVを迅速に検出する抗原ELISA法の確立に向けての予備試験に着手した。

A. 研究目的

ウイルスが原因と考えられる集団食中毒や施設内集団発生の胃腸炎が多く報告されている。原因ウイルスの同定には遺伝子検出法が用いられているが作業可能な実験室が限られている。遺伝子組み換えバキュロウイルス発現法によって作出されたNoV-VLPs,およびそれらの免疫血清を用いて、簡便な方法として患者材料からのELISA法による病原体の検出法や、原因食品からのウイルス検出法などが開発されつつある。しかしながら遺伝子検出・系統解析の進展によっ

て、我々がすでにVLPsを作製した株と血清学的に異なると思われる新たなNoV株がみいだされつつある。それらの株のVLPs発現、高度免疫血清の作製はまだやらねばならない問題である。また、遺伝的および抗原的解析が遅れていたSaVにおいてもNoV同様にVLPsの作出、免疫血清の作製が必要である。

B. 研究方法

NoV株; 下痢症患者あるいは生カキから検出されたNOV遺伝子の構造蛋白領域(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Poly-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。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。

SaV株; 胃腸炎患者からみいだされたSaV株の構造蛋白をコードする領域をPCRで増幅し、組換えバキュロウイルスを作出してNoV同様にVLPs発現を試み、発現できた株について抗血清を作製して抗原性を検討した。

C. 研究結果

NoV株; 遺伝子系統解析からG-Iで２株、G-IIで３株の発現候補株が選出され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のち組換えバキュロウイルスを作出してVLPs発現を試みた結果、G-I=２株(GI-7, GI-9)、G-II=1株(Kamo8)でVLPsの発現が認められた。G-IIの2株では構造蛋白の発現が確認できなかった。発現VLPsを精製してウサギで免疫血清を作製したKamo8株はすでに作製済みのNoV抗原、抗血清とのELISA法による交叉反応試験の結果、すでに発現した株とは異なった抗原型に分類された。GI-7株およびGI-9株はVLPsの増殖・精製を終えて、ウサギに接種し免疫血清の作製を行う段階である。

SaV株; SaVのくわしい遺伝子系統解析が片山らによってなされ、SaVにおいては遺伝子型I～V(G-I～V)に分類できるとされている。昨年度にG-Iに属すMc114株のVLP発現に成功して免疫血清を作製した。本年度はG-VのNK24株でVLPが発現でき抗血清を作製した。交叉試験の結果、G-IとG-Vに属す株は抗原的にも大きく異なり、SaVもまた血清学的に幾つかの種に分類されると考えられた。また免疫血清を用いた抗原検出ELISA法の予備試験の結果は、NoV同様に簡便な方法として有用であることが示された。しかしまだ抗原性が異なると考えられる他の遺伝子型のVLP発現、免疫血清の作製が必要であり、引き続いて試みなければならない問題である。

D. 考察と結論

NoVの遺伝子系統解析によれば現在までにG-Iは１４、G-II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予測されている。本年度に発現できた3株を加えると、G-I = 8株、G-II = 21株の抗原および抗血清が作製できたことになり、抗原性での分類ではG-I = 8種、G-II = 14種になる。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、日本における NoV の血清疫学的研究の進展が期待出来る。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。

SaV の VLPs 発現量は NoV に比べて非常に少なく、免疫原としての精製 VLP を準備する事は困難な作業であったがしかしながらG-I, G-V の2株で免疫血清を作製でき、抗原性の解析の結果 SaV もまた抗原的に幾つかに分類される事が示唆された。今後さらに新たな遺伝型の VLP 発現によって SaV の抗原解析が進展することが期待できる。

E. 研究発表

学会発表

1) 白土東子、名取克郎、小川智子、Hansman Grant、鎌田公仁夫、景山 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」;第52回日本ウイルス学会総会、2004年11月、横浜

2) 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」;第52回日本ウイルス学会総会、2004年11月、横浜

3) ハンスマン グラント、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」;第52回日本ウイルス学会総会、2004年11月、横浜

3) Grant Hansman, Katsuro Natori, Tomoichirou Oka, Naokazu Takeda, Kazuhiko Katayama; Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins, 第二回国際カリシウイルス会議、2004年11月、フランス ディジョン市

4) Tanaka T, Kitamoto K, Miyoshi T, Uchino K, Oseto M, Sakae K, Kobayashi S, Natori K, Jiang Xi, Parker T, Estes MK, Takeda N;「Diagnostic kit for Norovirus Infection」第二回国際カリシウイルス会議、2004年11月、フランス ディジョン市

誌上発表

1) Shinichi Kobayashi, Katsuro Natori, Naokazu Takeda, Kenji Sakae: Immunomagnetic Capture RT-PCR for Detection of Norovirus from Foods Implicated in a Foodborne Outbreak. Microbiol. Immunol. 48 (3), 201-204, 2004

2) G. S. Hansman, K. Natori, H. Ushijima, K. Katayama, and N. Takeda. Characterization of polyclonal antibodies raised against sapovirus genogroup five virus-like particles. Archives of Virology. Online

3) G. S. Hansman, K. Katayama, T. Oka, K. Natori, and N. Takeda. Mutational study of sapovirus expression in insect cells. Virology Journal. (2005) (2) 1:13

4) G. S. Hansman, K. Natori, T. Oka, S.

Ogawa, K. Tanaka, N. Nagata, H. Ushijima, N. Takeda, and K. Katayama. Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. Archives of Virology (2005) 150: 21-36.

5) G. S. Hansman, L. Doan, T. Kguyen, S. Okitsu, K. Katayama, S. Ogawa, K. Natori, N. Takeda, Y. Kato, O. Nishio, K. Abe, and H. Ushijima. Detection of norovirus and sapovirus infection among children with gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. Archives of Virology (2004) 149: 1673-1688.

厚生労働科学研究費補助金(振興・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」
分担研究報告書

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

分担研究者　片山和彦　国立感染症研究所　ウイルス第2部

研究要旨

NoV の予防衛生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、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ンと 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。

A. 研究目的

ウイルス性急性胃腸炎の原因ウイルスとして知られる Norwalk virus (NoV)は、ヒト以外に感染せず、実験動物系、in vitro における培養細胞系も見いだされていない。そのため、NoV の感染及び増殖機序の解析が遅れている。本研究では、ゲノム全長の塩基配列を明らかにした U201 株を基に、U201 ゲノム全長 cDNA を含むプラスミドクローンを作成し、このクローンから構築した各種プラスミドクローンを用いた哺乳類細胞へのトランスフェクションにより、NoV の細胞内での転写翻訳、粒子形成について調べることを目的とした。

B. 研究方法

1. 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

図 1 に構築したプラスミドを示した。pT7U201F は U201 ゲノム全長を組み込んだプラスミド、pT7U201ORF23 は ORF2; VP1 以降ゲノム末端まで組み込んだプラスミド、pT7U201ORF3 は ORF3;VP2 からゲノム末端までを組み込んだプラスミドを示した。pT7U201F-ORF1/GFP は 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、pT7U201F-Pro/mはプロテアーゼモチーフGDCG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を示した。pT7IRES-GFP, pT7GFPはそれぞれ、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である。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CO_2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。図2には、トランスフェクション 24 時間後のウエスタンブロットの結果を示した。

2. 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。1ug 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。図3にはトランスフェクション 24 時間後のノーザンブロットを示した。

3. 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観察にて検出した (図6)。

4. 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 に際懸濁した。再建濁した VLP は、2.28g CsCl/5ml OPTI-MEM