

图3. Lost activity of siRNA16 by mismatching

siRNA16	5'-UGCUCAGUUCCAUUUAAUdTdT-3'
1m/siRNA16G.....
2m/siRNA16AG.....
3m/siRNA16A.A.G.....

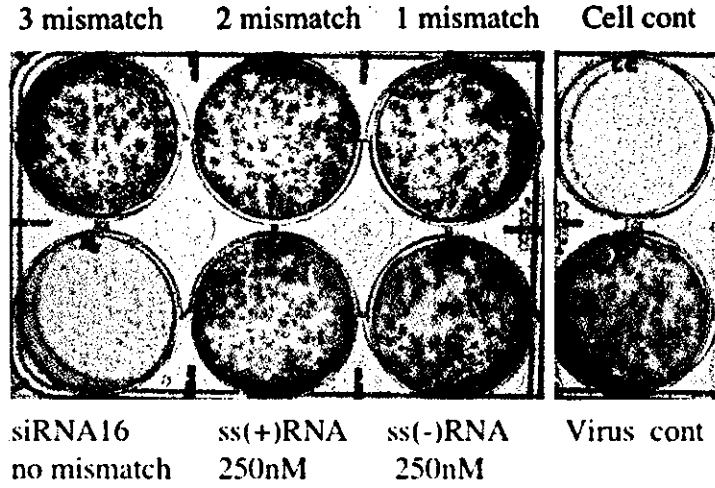
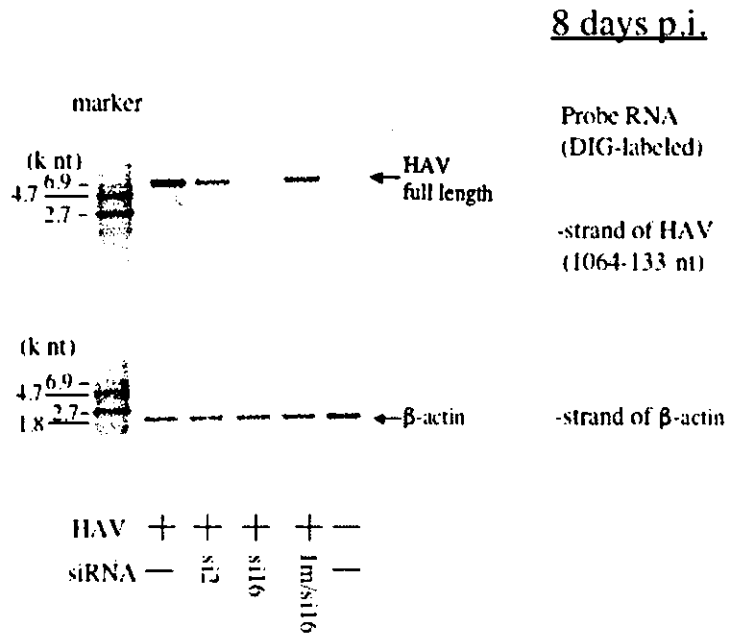


图4. Northern blot analysis of HAV infected cells



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

Sapovirus (SaV) 中空粒子の作成と抗原検出 ELISA の構築

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

Sapovirus (SaV) は、Norovirus (NoV) に近縁な、カリシウイルス科に属するウイルスで、小児の散発性非細菌性下痢症の病原ウイルスの一つである。ゲノム全長塩基配列を決定した SaV を分子系統解析すると、ゲノグループ I, II, III, IV, V の5つのグループに分かれる。このうちゲノグループ I とゲノグループ V の構造蛋白質領域のクローニング及び、リコンビナントバキュロウイルス発現系を用いた VLP の発現に成功した。発現に成功した粒子をウサギ及びモルモットに免疫し、ポリクローナル抗体を作成、これらを用いたサンドイッチ抗原 ELISA システムを構築した。

研究目的

Sapovirus (SaV) は、Norovirus (NoV) に近縁なカリシウイルス科に属するウイルスで、小児の散発性非細菌性下痢症の病原ウイルスの一つである。現在、SaV の検出系は電子顕微鏡観察が中心であり、高感度な RT-PCR システムによる SaV ゲノムの検出系や ELISA による抗原検出系など簡便な診断法は開発途上にある。これまでに幾つかの研究施設で SaV のウイルス様中空粒子 (VLP) の作出が試みられたが、VLP の大量発現および安定供給に成功した例はない。本研究では、SaV の構造蛋白質コード領域をバキュロウイルスに組み込み VLP の大量発現と、これを用いた抗原検出 ELISA システムの構築を試みた。

研究方法

1) SaV 株の選択と塩基配列解析

データベースに既報の SaV である Manchester 株、Bristol 株の核酸アライメントから Sapo4130S 5'-MRA AAY GCC TAC AAA YTG GC-3', 5'-Sapo4290S-GTT GGY ATH AAC ATG GAC WST KWC C-3', Sapo5058A-5'-GCG AGA GCC TGG TCA TAG TT-3' を合成し、SaV 検出用プライマーとした (Manchester 株の 5' 末端塩基を 1 としてプライマーの 5' 末端の塩基がどこに位置するかを数字で表記した。また、S はセンスプライマーを、A はアンチセンスプライマーを意味する)。SaV 検出用 primer セットを用いた semi-nested RT-PCR によって、散発性ウイルス下痢症患者糞便検体をスクリーニングした。スクリーニングで得

られた SaV ゲノムの構造蛋白質部分 929 塩基対または、769 塩基対の増幅産物を direct sequence し、塩基配列を決定した。決定した塩基配列をデータベース上の株とアライメントし、NJ 法による分子系統樹を作成した (図 1)。この分子系統樹から、GI クラスターの Mc114 株、GII クラスターの SakaiC12 株、そして、GV クラスターの NK24 株を選択し、全塩基配列を決定した。決定した全塩基配列に基づき、ゲノムにコードされた ORF を解析した。

2) 組換えバキュロウイルス作成と VLP の発現

SaV はゲノム上に 2 つの ORF をコードしており、ORF1 の 3' 末端側に構造蛋白質 VP1 がコードされ、ORF2 に構造蛋白質 VP2 がコードされている。SaV GI, GII, GV の VP1 は全て共通のアミノ酸配列モチーフ MEG からスタートすることが知られている。そこで、このモチーフの M (メチオニン) 残基の ATG コドンよりゲノム末端までをバキュロウイルスのトランスファーベクターに組み込み、GI クラスターの Mc114 株、GII クラスターの SakaiC12 株、そして、GV クラスターの NK24 株のリコンビナントバキュロウイルスを作成した。

作成したリコンビナントバキュロウイルスは、MOI 10 で Th5 昆虫細胞に感染させた。感染後 5 -6 日で細胞をハーベストし、培養上清に放出された VLP を超遠心操作で回収した。回収した VLP は CsCL 浮上密度勾配遠心法で分離精製した。

3) ポリクローナル抗体の作成と抗原検出サ

ンドイッチ ELISA

分離精製した各種 VLP を約 50ug/匹ウサギ、及びモルモットに接種し、抗 VLP ポリクローナル抗体を作成した。96 ウェルプレートに VLP をコートし、GI 及び GV に対するポリクローナル抗体の反応性を測定した。

ウサギ抗 VLP 抗体をキャプチャー抗体として 96 ウェルプレートにコートした後、VLP を添加し、モルモット抗 VLP 抗体を検出用一次抗体として反応させた。検出は HRP(ホースラディッシュペーパーオキシダーゼ)ラベル抗モルモット IgG 抗体を用い、OD 値を OD フォトメーターで測定した。

研究結果

1) 組換えバキュロウイルス作成と VLP の発現

GI クラスターの Mc114 株、GII クラスターの SakaiC12 株、そして、GV クラスターの NK24 株のリコンビナントバキュロウイルスを MOI 10 で Th5 昆虫細胞に感染させ、培養上清に放出された VLP を超遠心操作で回収した。回収した VLP は CsCL 浮上密度勾配遠心法で分離精製し、電子顕微鏡観察を行った (図 2)。GI クラスターの Mc114 株の VLP は、直径約 48nm で、表面にダビデの星と呼ばれるネイティブ SaV に特徴的な構造を有していた。GV クラスターの NK24 株もほぼ同様な特徴を示したが、粒径の異なる小型の粒子も含まれていた。GII クラスターの SakaiC12 株は、他の 2 つに比べ VLP の産出量が極端に少なかった。粒径は Mc114 とほぼ同じであった。C12 株を

除いて、ウサギ、及びモルモットの免疫に十分な量の VLP を作出することに成功した。VLP 作出の再現性は良好で、本研究で初めて安定した SaV-VLP の作出技術が構築された。また、GII, GV VLP の作出に成功したのは世界で本研究が初めてである。

2) ポリクローナル抗体の特異性

分離精製した各種 VLP を約 50ug/匹ウサギ、及びモルモットに接種して作成した、抗 VLP ポリクローナル抗体の特異性を確認した。96 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 100ng の GI VLP をコートし、GI 及び GV に対するポリクローナル抗体の反応性を測定した。また、同様に 96 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 100ng の GV VLP をコートし、GI 及び GV に対するポリクローナル抗体の反応性を測定した (図 3)。GI VLP に対する抗 GI ポリクローナル抗体は、ウサギ、モルモットともに 1028 - 2048 倍希釈でも十分特異的に反応しうることが明らかになった (図 3 及び図 4)。GV VLP に対する抗 GV ポリクローナル抗体も同様であった。GI, GV 間の交差反応は原液の抗体を用いた場合でも、ほとんど認められず、抗体の特異性は高かった。

次に、ウサギ抗 VLP 抗体をキャプチャー抗体として 96 ウェルプレートにコートした後、100ng の VLP を添加し、モルモット抗 VLP 抗体を検出用一次抗体として反応させたサンドイッチ抗原検出 ELISA の特異性を確認した (図 5)。OD 値のカットオフを 0.1 以下とし、GI サンドイッチシステムに対する GI VLP, GII VLP, GV VLP 添加時の OD 値を調べたと

ころ、GI VLP のみ 0.46 を示し、他は 0 であった。同様に GV サンドイッチシステムに対するそれぞれの VLP の反応は GV のみが 2.41 を示し、他は 0 であった。この結果、サンドイッチ抗原検出 ELISA システムは、目的の抗原のみを特異的に認識し、交差反応は認められないことが示された。

まとめ

SaV GI, GII, GV の VLP 作出に成功し、安定した大量発現が得られた GI, GV VLP を使用して、ポリクローナル抗体を作成した。これらの抗体、VLP を利用して、抗原検出サンドイッチ ELISA システムの構築に成功した。本システムは、VLP を用いた特性検討の結果、SaV をゲノグループ特異的に検出しうることが示唆された。現在、サポウイルスには GI - GV まで 5 種類のゲノグループが存在することが明らかにされている。また、GI と GII には幾つかの遺伝的に異なるサブグループが存在することも明らかにされている。本研究で、GI, GII, GV がそれぞれ、互いに異なる抗原性を有することが明らかになった。近縁の NoV では、ゲノグループはもちろん、各ゲノグループ内に存在する 14 - 17 種類のゲノタイプも互いに異なる抗原性を有することが知られている。従って、サポウイルスにおいても、同じゲノグループ内に存在するサブグループが、互いに異なる抗原性を有する可能性がある。今後、異なるサブグループの VLP と抗体を作成し、抗原性を比較検討する必要がある。さらに、本研究で構築した抗原検出サンドイッチ ELISA システムは、実際の患者便材料へ

利用可能かどうか検討する必要もある。

学会発表

- 1) Grant S. Hansman, Katsuro Natori, Tomoichiro Oka, Satoko Ogawa, Hiroshi Ushijima, Naokazu Takeda, and Kazuhiko Katayama: Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. 第52回日本ウイルス学会学術総会、横浜、平成16年11月21日
- 2) 影山 努、小嶋 慈之、李 天成、片山和彦、武田 直和: 蛍光プローブを用いたHEVの高感度検出法および遺伝子型識別法の開発 第52回日本ウイルス学会学術総会、横浜、平成16年11月21日
- 3) 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と切断地図の作製 第52回日本ウイルス学会学術総会、横浜、平成16年11月21日
- 4) 松原 尚子、Grant H. Hansman、岡智一郎、名取 克郎、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学術総会、横浜、平成16年11月21日
- 5) 片山和彦、白土(堀越) 東子、岡智一郎、松原尚子、影山努、宮村達男、武田直和: 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 第52回日本ウイルス学会学術総会、横浜、平成16年11月21日
- 6) 片山和彦、Grant H. Hansman、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、さいたま、平成16年7月9日
- 7) 片山和彦: ノロウイルス食中毒と予防 日本食品衛生セミナー、静岡、平成16年12月6日
- 8) Grant S. Hansman, Kazuhiko Katayama, Tomoichiro Oka, Katsuro Natori, Satoko Ogawa, Hiroshi Ushijima and Naokazu Takeda: Expression of Human Sapovirus Virus-like Particles. The 7th Symposium on Positive-Strand RNA viruses. Palace Hotel, San Francisco, CA. May 29, 2004
- 9) Tomoichiro Oka, Kazuhiko Katayama, Satoko Ogawa, Grant S. Hansman, Hiroshi Ushijima, Tatsuo Miyamura, and Naokazu Takeda: In vitro Proteolytic Processing of the Sapovirus ORF1 polyprotein. Palace Hotel, San Francisco, CA. May 29, 2004
- 10) Kazuhiko Katayama, Tomoichiro Oka, Satoko Ogawa, Haruko Shirato-Horikoshi, Tatsuo Miyamura, and Naokazu Takeda: Analysis of Norovirus replication using full-length genome. Palace Hotel, San Francisco, CA. May 29, 2004
- 11) K. Katayama, T. Oka, S. Ogawa, H. Shirato, T. Miyamura, and N. Takeda: Study on Norovirus replication in vitro. Second International Calicivirus Conference. Dijon France. November 6-10 2004.
- 12) G. S. Hansman, K. Natori, T. Oka, N. Takeda, and K. Katayama: Cross-reactivity among

sapovirus recombinant capsid proteins. Second International Calicivirus Conference. Dijon France. November 6-10 2004,

論文発表

【1】 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.

【2】 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.

【3】 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.

【4】 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.

【5】 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.

【6】 Guntapong R, Hansman GS, Oka T, Ogawa S, Kageyama T, Pongsuwanna Y, and Katayama K. Norovirus and Sapovirus Infection in Thailand. *Jpn J Infect Dis* 57: 276-278, 2004.

【7】 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.

【8】 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.

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

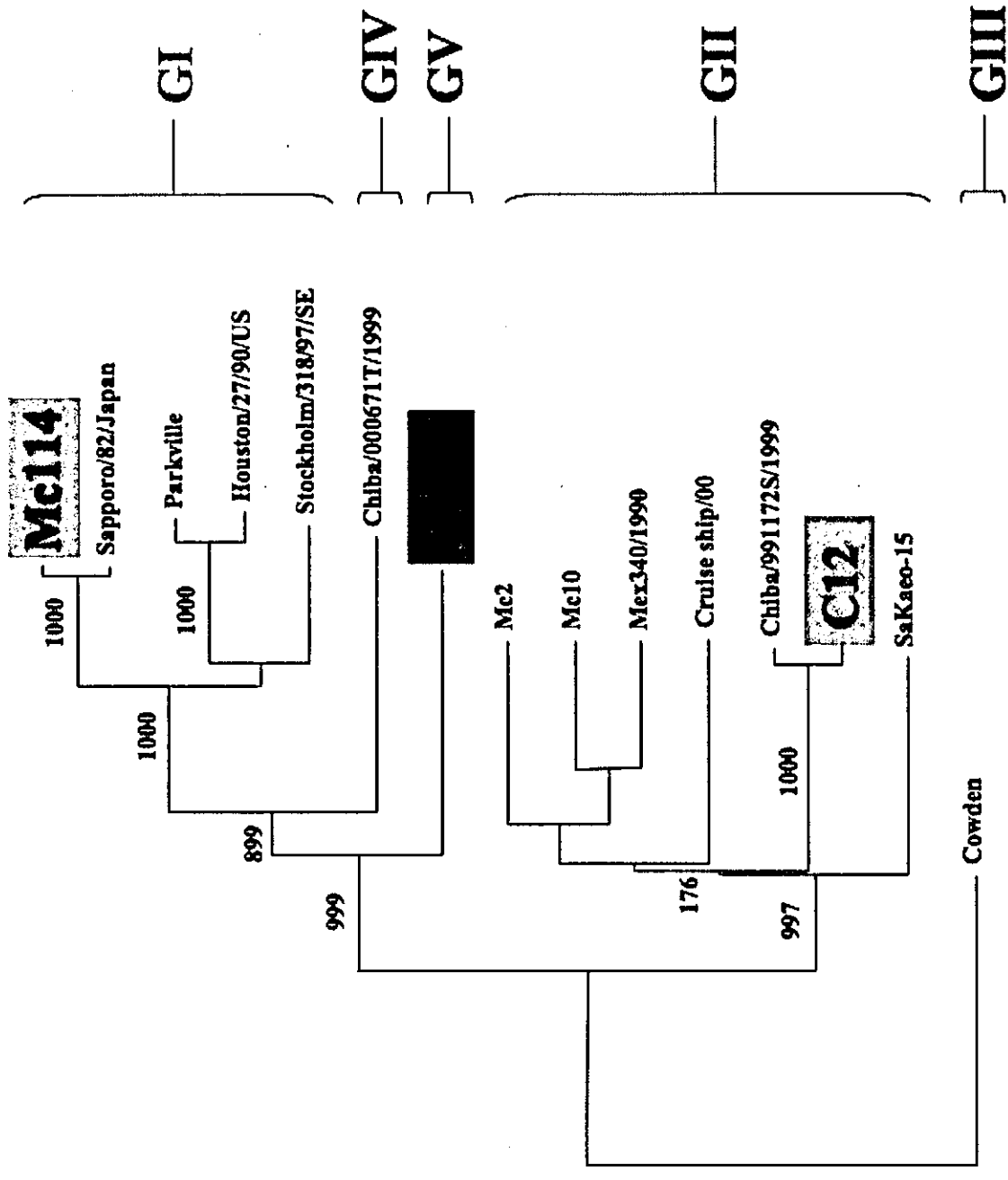
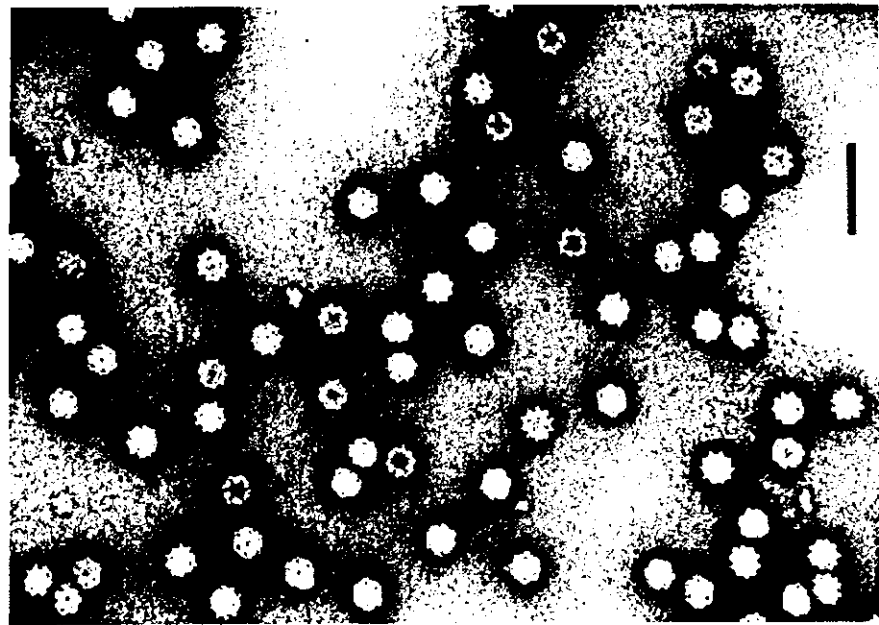
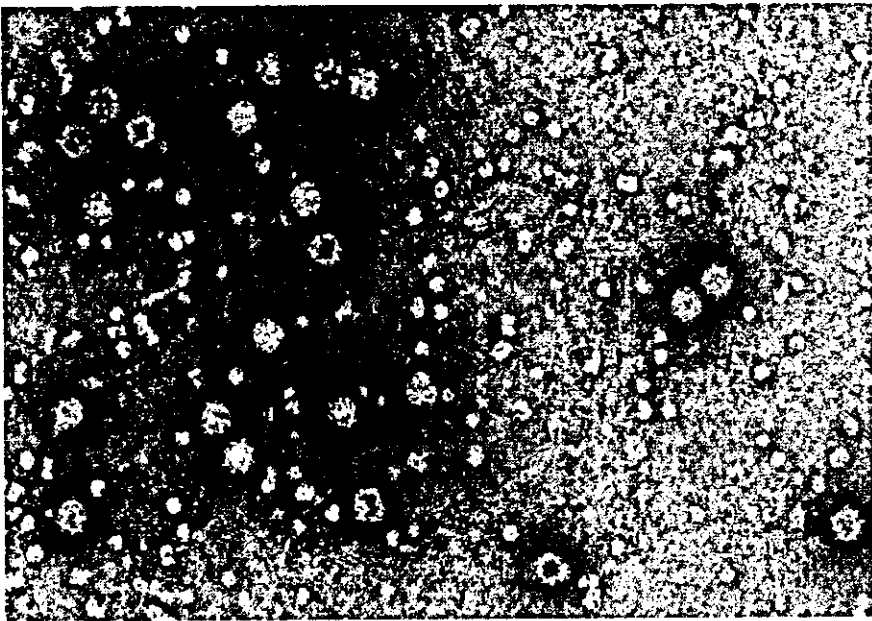


図1. サポウイルスの分子系統樹



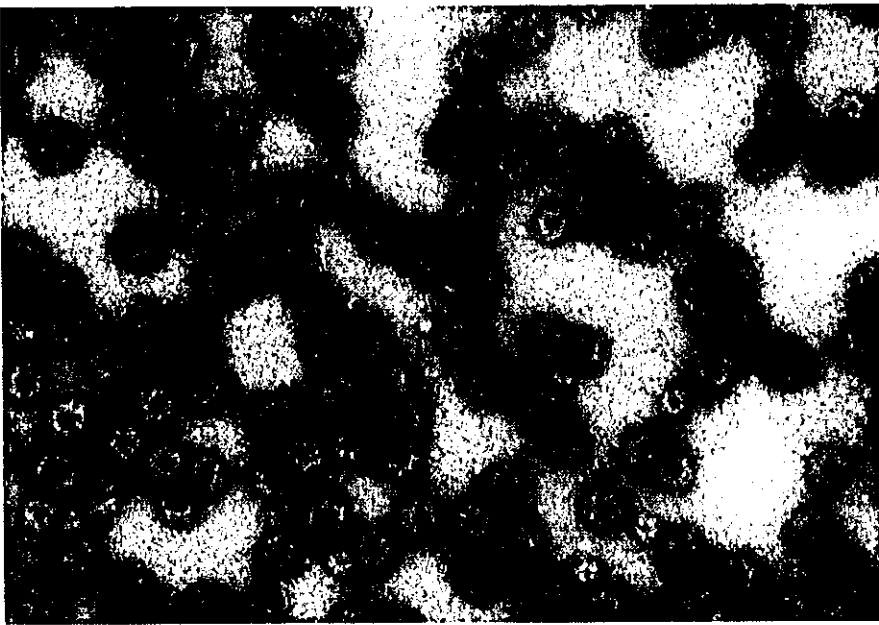
Me114

GI



C12

GII



GV

GV

図2. サポウイルスVLPの電子顕微鏡像

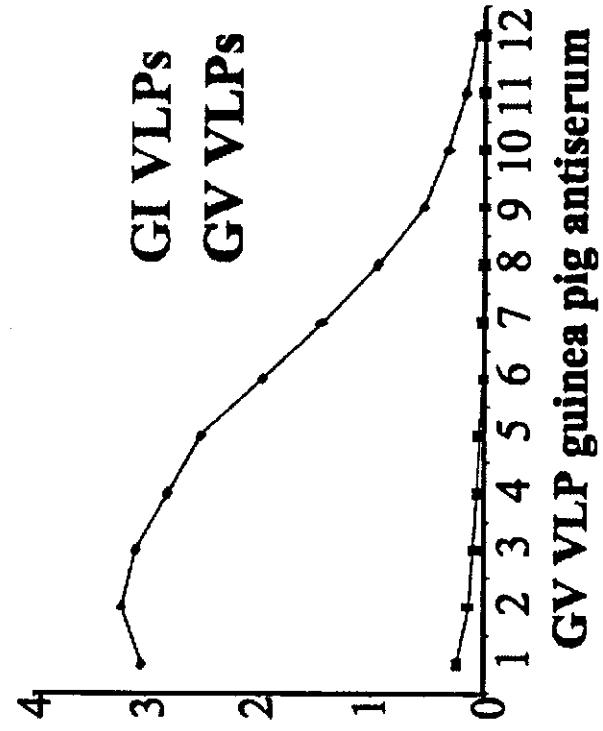
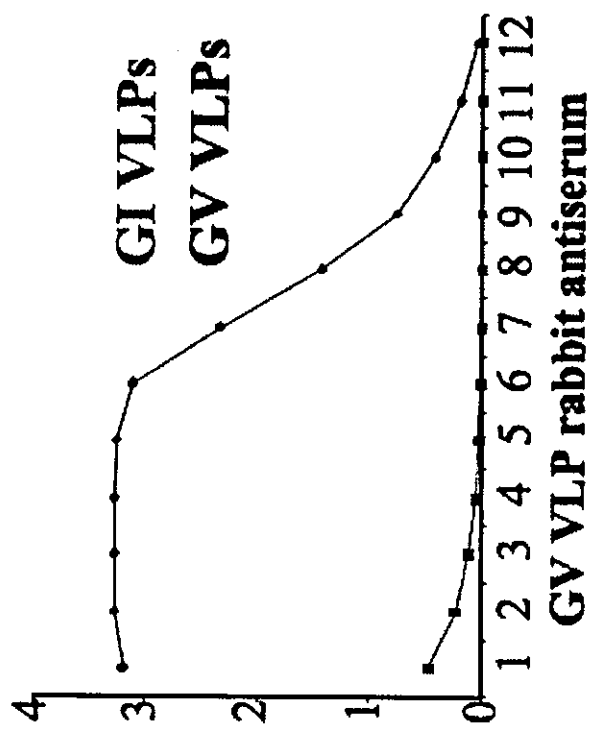
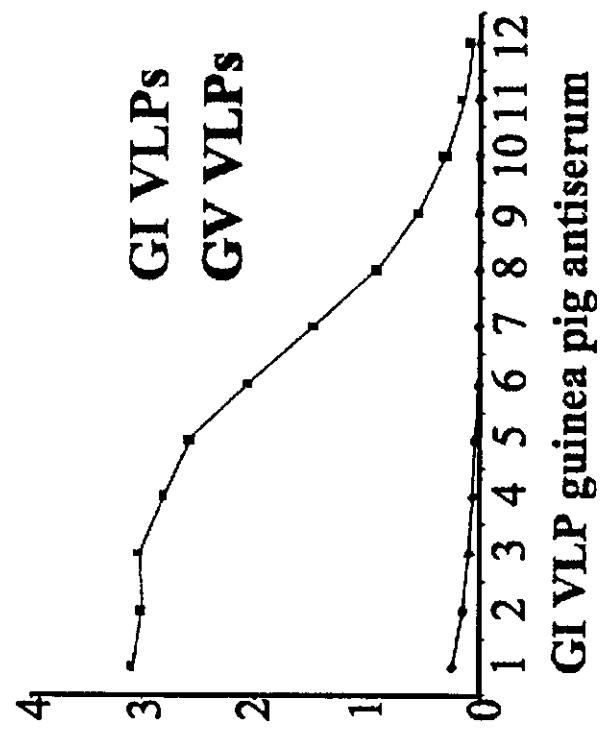
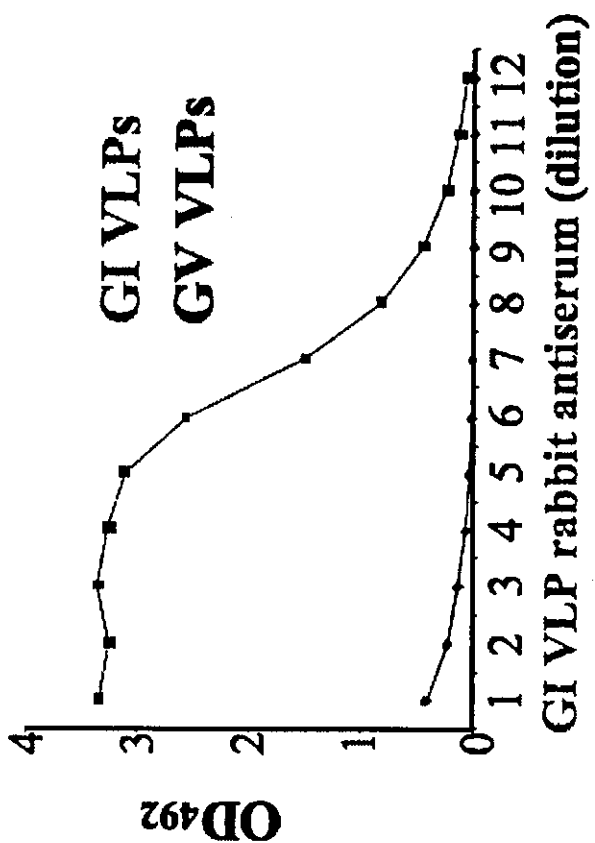


図3. ポリクローナル抗体の反応性確認試験1

VLP rabbit antisera

antisera VLPs	GI	GV
GI	1024	4
GV	4	1028

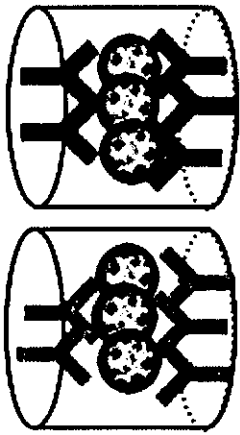
VLP guinea pig antisera

antisera VLPs	GI	GV
GI	2048	2
GV	2	2048

- 100 ng of VLPs
- × 1000 dilution
- OD cutoff > 0.15

図4. ポリクローナル抗体の反応性確認試験2

GI and GV antigen ELISA



antiseram VLPs	GI	GV
GI	0.46	0.00
GV	0.00	2.41
GII	0.00	0.00

- 1:8000 dilution
- capture: VLP rabbit
- detector: VLP guinea pig
- OD cutoff > 0.1

図5. 抗原検出サンドイッチELISAの特異性確認試験

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）

ウイルス性食中毒の予防に関する研究

分担研究報告書

3型E型肝炎ウイルス構造蛋白の発現

分担研究者 李 天成 国立感染症研究所

研究要旨 遺伝子型3のHEV VLPを作製した。N末端から111アミノ酸を欠失したORF2を発現した場合は、これまでの遺伝子型1や遺伝子型4の場合と同様、直径27nmのVLPであった。一方、ORF2の全長の発現では、直径35-38nmのネイティブなウイルス粒子とほぼ同じ直径を有するVLPが作製できた。

協力研究者 永田 典代、宮村達男（国立感染症研究所）、恒光 裕（動物衛生研究所）

A. 研究目的

E型肝炎ウイルス（HEV）はE型肝炎の原因ウイルスである。現在、少なくとも四つの遺伝子型が知られている。これまで先進国においてE型肝炎は輸入感染症と思われてきたが、近年、まったく海外渡航歴のない急性E型肝炎患者が発見されるなど、日本でもすでに土着しているウイルスであることが明らかになってきた。HEVが増殖できる培養細胞系は確立されておらず、組換えバキュロウイルス発現システムを用いて作製されたウイルス様中空粒子（VLP）がウイルスの形態や抗原性の研究に用いられてきた。我々はこれまでに1型と4型のHEVについてN末端を欠失した構造蛋白を発現してVLPを作製し、その抗原性と免疫原性がネイティブなHEVと似ていることを明らかにした。しかしながら、これらVLPはネイティブなHEVに比べ明らかに小さなサイズの粒子であった。本研究では3型の構造蛋白を発現し、ネイティブなHEVに近いサイズを持つVLPの作製を試みた。

B. 研究方法

3型HEV ORF2の全長、およびN末端から111アミノ酸を欠失した領域をRT-PCR法で増幅し、常法どおり組換えバキュロウイルスを作製した。昆虫細胞をMOI:10で感染後、ORF2全長を発現する場合は感染細胞から、N末端を欠失させたORF2を発現する場合は培養上清からウイルス様中空粒子（VLP）を回収し、ショ糖密度勾配遠心法、塩化セシウム平衡密度勾配遠心法で精製した。発現蛋白のN末端アミノ酸配列はEdman法で決定した。ウサギ抗VLP抗体、E型肝炎患者血清、および遺伝子型1に対する単クローン抗体を用い、免疫電子顕微鏡、ELISA法等で抗原性を比較した。

C. 研究結果

1. N末端から111アミノ酸を欠失したORF2の発現

これまで発現した遺伝子型1や遺伝子型4と同様、感染細胞内には感染2日目に、非感染細胞やバキュロウイルス野生株感染細胞では検出されない分子量58k、および54kのバンドが出現した。発現は5日目にプラトーに達し、7～8日目には58k以外に57k、56k、および54kのバンドが出現した。上清中には感染

後4日目から57k、56k、および54Kのバンドが出現し、これらの発現は7日目にプラトーに達した。感染7日目の上清を回収し、超遠心法で濃縮し、その沈査を電子顕微鏡で観察したところ、直径約27nmの中空粒子が多数観察された。遺伝子型3のVLPが作製できた。感染上清を健常人血清と遺伝子型4 HEV 感染患者血清と反応後、電子顕微鏡で観察したところ、患者血清でのみ凝集塊が観察された。したがってVLPはネイティブなHEVと同じ抗原性を有する粒子であった。

2. ORF2の全長の発現

感染細胞内には感染2日目に、非感染細胞やバキュロウイルス野生株感染細胞では検出されない分子量72kおよび58kのバンドが出現した。発現は5日目にプラトーに達し、7~8日目には66k、および54Kのバンドが出現した。上清中からはウイルス特異蛋白は全く検出されなかった。感染7日目の感染細胞を回収し、細胞を破碎後、遠心上清を回収した。超遠心法で濃縮し、その沈査を電子顕微鏡で観察したところ、直径35-38nmのネイティブなウイルス粒子とほぼ同じ直径を有する中空粒子が多数観察された。

D. 考察

遺伝子型3のVLPを作成することができ、遺伝子型1および遺伝子型4と合わせて3種類のVLPを作製することができた。患者血清を用いた抗体ELISAで抗原性を見る限り差はなさそうである。したがって、高い抗体価を持つ急性期の血清を用いた場合、いずれのVLPを用いても診断は可能と思われる。しかしながら、ホモの組み合わせに比べヘテロでは反応性が若干弱く、血清疫学を行う際、どの抗原を用いるかによって抗体価に差が生じる可能性がある。単クローン抗体では遺伝子型1

VLPと遺伝子型4 VLPで抗原性に差が検出されており、これが患者血清との反応性の差となっているのかもしれない。患者がどの遺伝子型のウイルスに感染していたかとも絡む問題であり、今後の課題である。35-40nmの粒子の三次構造の解析により、ネイティブなHEV構造の情報が得られることも期待できる。

E. 結論

組換えバキュロウイルスで遺伝子型3の構造蛋白全長を発現することによって、ネイティブな粒子とほぼ同じ直径を持つVLPを作製することができた。

F. 研究発表

1. 学会発表

李 天成、恒光 裕、永田 典代、宮村 達男、武田 直和。3型HEV構造蛋白の発現と抗原性の解析。日本ウイルス学会、第52回学術集会 2004年11月 横浜
影山 努、小嶋 慈之、李 天成、片山 和彦、武田 直和。蛍光プローブを用いたHEVの高感度検出法および遺伝子型識別法の開発。日本ウイルス学会、第52回学術集会 2004年11月 横浜

2. 論文発表

Tanaka E, Matsumoto A, Takeda N, Li T-C, Umemura T, Yoshizawa K, Miyakawa Y, Miyamura T, Kiyosawa K: Age-specific Antibody to Hepatitis E Virus Stays Constant during the Past 20 Years in Japan. *J. Viral Hepatitis* 2005; in press.
Maloney BJ, Takeda N, Suzaki Y, Ami Y, Li T-C, Miyamura T, Arntzen CJ, Mason HS: Challenges in creating a vaccine to prevent hepatitis E. *Vaccine* 2005;23: 1870-1874.

Takamura S, Niikura M, Li TC, Takeda N,
Kusagawa S, Takebe Y, Miyamura T,
Yasutomi Y: DNA vaccine-encapsulated
virus-like particles derived from an
orally transmissible virus stimulate
mucosal and systemic immune
responses by oral administration. *Gene
Ther* 2004;11: 628-35.

Matsubayashi K, Nagaoka Y, Sakata H,
Sato S, Fukai K, Kato T, Takahashi K,
Mishiro S, Imai M, Takeda N, Ikeda H:
Transfusion-transmitted hepatitis E
caused by apparently indigenous
hepatitis E virus strain in Hokkaido,
Japan. *Transfusion* 2004;44: 934-40.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

ノロウイルス感染のリスクアナリシスの為のリスクプロファイル

(平成 17 年 4 月 19 日)

国立感染症研究所感染症情報センター	西尾 治
国立医薬品食品衛生研究所	春日文子
国立感染症研究所ウイルス第二部	武田直和

〈リスクプロファイル要目〉

この文書は平成 14 年度厚生科学研究費補助金、食品・化学物質安全総合研究事業、食品中の微生物のリスク評価に関する研究（主任研究者 山本茂貴）でとりまとめられた「ノーウオークウイルス/小型球形ウイルスのための微生物学的リスクアナリシスの為のリスクプロファイル」を基に、最近のノロウイルスの研究成果を取り込みながら、本ウイルスが関与する食品安全上の問題点を、その介在食品や公衆衛生上の影響、経済的影響をも含めて、総合的に記載するものである。

1. 問題となる病原微生物・媒介食品の組み合わせについて

* 対象病原微生物：ノロウイルス（2003 年 8 月以降ノロウイルスと命名された。）

* この病原微生物が原因とされる感染症もしくは食品衛生上の問題点（食中毒など）に関与する食品または加工食品と、その生産流通も含めた摂取環境や摂取状態についての概略：

原因が特定もしくは強く示唆された国内の集団発生事例の多くは（12.1%）、海産物及びその加工製品の摂取と関連付けられている。これは、施設内の「ヒトーヒト」感染が集団発生の主流であるノロウイルス海外報告事例とは対照的である。厚生労働省の食中毒統計によると、問題となる特定食品とその摂取形態としてカキ（平成 13 年に報告のあった食中毒の 44.0%）がそのトップに挙げられている。平成 15 年にはカキは 24%と半数近くに減少した。さらに、本邦においては、冬期にカキを生もしくはウイルスの不活化には不十分な加熱で摂取する食習慣（食文化）がある。この他に原因食品として挙げられているものには、シジミ貝の醤油漬けを始めとした二枚貝の未加熱調理食品、イカの塩辛やその他の魚介類の半調理品と加工食品、そのほかにサラダ、パン、ゼリーの様な菓子類などもある。

2. 公衆衛生上の問題点について

* 当該病原微生物の、公衆衛生上に大きな影響を及ぼし得る重要な特性（病原性、温度抵抗性、薬剤抵抗性など）について：

カリシウイルス科に属するノロウイルスは、本邦及び西洋における非細菌性感染性胃腸炎の、散発事例、集団発生事例双方の原因病原体として大きな割合を占めている (Evans et al, 1998, Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan, 1999-2001, Koopmans et al, 2002)。ノロウイルスは人体に経口的に摂取されることにより初めて小腸上皮細胞で増殖を開始し、感染を引き起こすことが知られている。非常にわずかなウイルスの摂取により感染発症するのがノロウイルスの特徴であり (Kapikian et al, 1996)、これが検出・分離と集団発生防止対策上の大きな問題となる。ウイルスが媒介食品中で増殖しないことから、流通過程の条件のほとんどは問題とならないが、生産から消費に至る全段階における交差

汚染への考慮を必要とする。これに加えて、ウイルスの培養方法が未確立なため、加熱時の時間・温度（85℃、1分の加熱が必要）、酸性度（pH3で安定）など調理・加工によるウイルスの不活化に関する入手可能なデータが少ないことが、食品衛生上の対策案を考慮する上で問題となり得る。

* 引き起こされる疾病の特徴：

○ 感受性人口（疾病に罹る可能性のある人々）

ノロウイルス感染症は感染免疫抗体が出来にくく、仮に出来たとしても短期間で（約3ヶ月）で消失することが報告されている。またIgG抗体を保有していても感染した事例が集団発生の報告から多数見られるなど、液性免疫の有効性が疑問視されている。恐らく腸管のIgA抗体が感染防御には重要であると考えられる。したがって、程度の差は有るにしても、現時点では全人口がこのウイルスに対して感受性があると言える。一般的なウイルス感染症として、小児、高齢者と免疫低下している者がより感染と重篤症状を呈するリスクが高いと考えられる。

○ 人における年間罹患率と年齢、性別、地域、季節間における、そのばらつきと違い

近年、ノロウイルス検出の報告事例は著しく増加し、病原微生物検出情報（IASR）によると、1991年には161件であったものが、2001、2002、2003年には888、1,299、1,855件となっている（National Institute of Infectious Diseases and Tuberculosis and Infectious Diseases Control Division, Ministry of Health, Labour and Welfare, 2002a）。最近の食中毒統計によると平成2001、2002、2003年には年間269、268、278件のノロウイルスが原因と考えられる食中毒が発生しており、7,335、7,961、10,603名が感染したと考えられる。これは、病原微生物検出情報へ報告された数の8.3、6.1、5.7倍に上る。また、ウイルスが原因と疑われた食中毒のうち、80%がノロウイルス感染であったことが報告されている。ヒト-ヒト感染による集団発生も毎年のように報告されるが、まとまった統計学的データは現在のところ存在しない。

感染性胃腸炎として感染症サーベイランスへ報告された事例は1998年に469,354あった。これに対して、食中毒統計によると同年41,550の微生物による食中毒患者の報告があり、この内5,213人がウイルス性食中毒と考えられた。また、集団食中毒の個別報告患者数から、ウイルス性食中毒患者の84%がノロウイルスによるものと推定された。更にPCRおよび電子顕微鏡によるこのウイルスの症例からの検出率は平均80%と報告されている。この比率が近年も同様と仮定すると、ノロウイルスの感染性胃腸炎に占める割合は、2001年で約10.5%（推定61,831人）となる。

ノロウイルス感染は症状が他の感染性胃腸炎に比して軽微で検体提出の同意を得にくいことや検出技術の問題もあり、病原体検出情報ではサルモネラの報告（2,863）の方が上回っているが、1,923件の検出がある（提出検体中の検出率40%）。

英国の1995年から1996年の感染性胃腸炎の集団発生サーベイランスによると、ノロウイルスによる集団発生数は680件(全集団発生中の43%)、患者数22,699人となっており、事件数でサルモネラの3倍、患者数で5倍報告されている(Evans et al, 1998)。アメリカでは、1997年から1998年6月の間にCDCへ報告された非細菌性急性胃腸炎の内96%(86/90)がノロウイルス感染で、オランダでは過去7年間にRIVMへ報告された胃腸炎の集団発生の80%がノロウイルスVに起因していると報告されている(Koopmans et al, 2002)。

患者発生には季節性があり、冬に増加が見られる。具体的には、集団発生報告数、病原微生物検出数共に、報告数の増加が11月に始まり4月にベースラインへ戻る(National Institute of Infectious Diseases and Tuberculosis and Infectious Diseases Control Division, Ministry of Health, Labour and Welfare, 2002a, b)。現在のところ本邦のノロウイルス感染症の、性別、年齢別、地域別の発生状況に関するデータはない。

英国の集団発生感染症のサーベイランスによると、乳幼児と高齢者が感染人口の大部分を占めるが、これは5歳から64歳人口の集団発生については施設内発生が少なく実態把握が難しいことと、症状が比較的軽い傾向があるために、この年齢群における医療機関の受診率が低いことが大きく影響していると考えられている(Dedman et al, 1998)。英国の報告によれば、高齢者に死亡事例が見られるが、厚生労働省発行の人口動態統計(Vital statistics of Japan, Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan)によると、ウイルスが特定されて以来、本邦では報告がない。現実的には感染性胃腸炎として診断されており、それらは病原体が特定されていないので、その実態は明らかでない。

○ 病原微生物への暴露による臨床症状

代表的な臨床症状は悪心・嘔吐、下痢、腹痛の三つである。発熱を伴う症例はアデノウイルスやその他のウイルス性疾患に比して稀であり軽度で、その他に頭痛、咽頭痛、食欲不振、筋肉痛などを伴うことがある。発症までの潜伏期は一般に24から48時間で、上記の症状は1~2日程度継続する。潜伏期、有症期共にウイルス摂取量や感染形態(食品の経口摂取か、ヒト-ヒト感染により直接ウイルスを摂取したか等)、また感染者の免疫状態などにより異なってくる。

○ 臨床症状の重症度

個人差はあるが、一般に臨床症状は軽い。罹患者はほとんどの場合2日程度前述の様な症状が持続し、重篤な後遺症または慢性の後遺症なしに軽快する。

○ 致死率

これまで死亡例の報告はなかったが、平成16年11月から平成17年1月12日までに、因果関係不明なものを含むが、12名の死亡例が報告された。大部分が老人介護施設や老人ホームからの報告であり、ノロウイルス感染による嘔吐の結果、吐物が器官に詰まった窒

息死や、吐物が肺に入った結果引き起こされた肺炎である。

○ 長期後遺症の性状と発生頻度

ほとんど皆無。重度の脱水による脳障害の発生の可能性はあるが、現在のところ本邦における報告はない。

○ 確立した治療方法およびその実用性

ノロウイルス感染に対する直接効果のある薬剤はない根本治療はない。経口の対症療法としての補液療法が第一選択である。

○ 年間全症例中の食中毒の割合

ノロウイルス感染症例の全数把握は現行の感染症発生動向調査のサーベイランス・データからはできないため、年間の全症例中の食中毒の割合は求め得ない。英国の報告ではノロウイルスによる感染症の内わけは、1995-1996年の間に報告された680件の集団発生中21件(3.1%)が食中毒(水系感染を含む)、607件(89.3%)は人-人感染と考えられている(CDPH 1995-1996, UK)。また、この報告における食中毒が疑われる集団事例341例の6.2%をノロウイルスのよるものが占めている。米国では1997年から1998年6月の間にCDCに感染経路の報告のあったNLV集団発生の内47%(24/51)が食中毒であった(Koopmans et al, 2002)。

* 食中毒の特徴

○ 食中毒の原因および疫学(加工、保存状況を含めた、原因食品の特徴・特性、調理方法、ハンドリングなど食品を介した伝播に影響を及ぼす事項についての概略)

2000年の食中毒統計によると、年間に人口10万人に対し34人(総数43,307人)が食中毒に罹患し、このうち原因物質が判明した95%の内19.6%(8,080/41,202)がノロウイルスによる感染で、ブドウ球菌の35.7%に次ぐ患者数を報告している。年次ごとに多少は異なるが、患者数は増加の傾向にあり、サルモネラ属菌、腸炎ビブリオとカンピロバクターを含めた5大食中毒原因物質となっている。2004年の報告では、速報値ながら、単独の病原物質として最大の患者数(43.4%, 11,049人)を出している。原因施設は様々で、外食産業(レストラン、ケータリング)、給食、パーティ、家庭内などが指摘されているが、詳細な報告はない。先に指摘したように、原因食物は、二枚貝の生食または不十分な加熱での摂食がもっとも大きな割合を占めているたが2003年では1/4程度に減少し、一方、食品取扱者によるノロウイルスの食品汚染による事件が増加している。非衛生的な食物の取扱い、人から他の食材の交差汚染により食中毒が発生・拡大することも指摘されている。

○ 原因食物(食材、加工食品など)

ノロウイルスによる食中毒は、ウイルスの培養が出来ないことと、極微量のウイルス摂

取で感染が成立し、検出が困難であることから、孤発性の症例は見逃されやすく、集団発生でも原因食物不明と報告されていることが多い。

2000年1月～2003年10月に、地方衛生研究所から国立感染症研究所感染症情報センターに報告された集団発生事例としてのノロウイルス検出報告のうち、推定原因食品が記載されていた287件の中カキが154件(53.6%)、カキ以外の貝類45件を含めると貝類が原因とされたものは69.3%に上る(IASR Vol. 24 No. 12 (No. 286), 2003)。

○ 集団食中毒の発生頻度と特性

年間の報告された食中毒の総件数は食中毒統計によるとここ数年間、特にウイルスが個別の原因として挙げられた4年前からは、大きな変化はなく、1500件前後を推移している。ウイルスが原因とされるものは、年々少しずつ増えており、約250件となっている。

食中毒の影響人口からの区分を見ると、少人数から中規模のグループが食中毒の発生源となっている事が多いと報告されている。施設別では、大半がレストラン、仕出し等の外食産業で生じている(Vol. 20 No. 11 (No. 237), 1999)。しかし、医師の診断と法規上の関連から、家庭内の小規模な軽症の食中毒は現行のシステムでは報告されていない可能性が高く、この結果が正確に現状を反映しているとは一概に言い切ることはできない。

○ 孤発性 / 散発性症例の頻度と特性

現行の病原体分離情報上は孤発例と集団発生例および食中毒と人-人感染の区別がなく、地方衛生研究所で分離した株について報告されたものを集計しているに過ぎないため、孤発例のみに関した情報を得ることは難しい。ただし乳幼児の散発性急性胃腸炎患者からのノロウイルス検出例は病原体検出情報から捉えることができる程度可能である。また、各病院検査室や民間大規模検査センターからの情報が含まれていないため、件数そのものが過少である可能性が高い。一方、食中毒統計では主に集団での発生を捉らえており、一人事例は近年報告がされるようになったものの、まだ報告は少ない。

○ 集団発生事例からの疫学的データ

上記、食中毒の原因と疫学参照。

* 疾病の医学経済学的インパクトもしくは波及効果

○ 医療費および医療機関受診費・入院費

医療費としての推計は現在のところ無いが、宮城県保健環境センター年報によると1995年から1997年に(株)日本食品衛生協会の集計結果から、ノロウイルス食中毒による患者一人当たりの賠償金額は15,595円、また一事件あたりも370,387円とサルモネラ事例の10分の1と報告されている(Abe et al, 2000)。しかしながら、患者一人当たりの金額は、カンピロバクターや病原性大腸菌より高い(Abe et al, 2000)。