

Michiyo Shinohara, Kazue Uchida, Nakao Sakurai, Kuniko Shinozaki, Mineyuki Okada, Yoshiyuki Seto, Kunio Kamata, Noriyo Nagata, Keiko Tanaka, Tatsuo Miyamura and Naokazu Takeda. Genetic and antigenic diversity among noroviruses. J. Gen. Virol. 2006: 87, 909-919.

- (7) M. Okada, T. Tanaka, M. Oseto, N. Takeda and K. Shinozaki. Genetic analysis of noroviruses associated with fatalities in healthcare facilities. Archiv. Virol. Published online: 9 March 2006

2. 著書

なし

3. 学会発表

- (1) 内野清子、三好龍也、田中智之：ノロウイルス感染状況から見た環境汚染と流行予測の可能性。第53回日本ウイルス学会学術集会、パシフィコ横浜 2005. 11. 20-22
- (2) Prevalence of Norovirus Infection in Bangladesh

T.Tanaka, MU.Ahmed, T.Miyoshi, K.Uchino, Y. Ikeda, M.Yoshida, N.Kitamoto and N.Takeda Japan-Bangladesh Joint International Conference on Microbiology Education & the Prospect of Japanese Collaboration in Education & Research. Dhaka, Bangladesh, 2005.12.26-28

- (3) Prevalence of norovirus infection in Mymensingh, Bangladesh

T.Tanaka, MU.Ahmed, T.Miyoshi, K.Uchino, MM.Alam, Y.Ikeda, M.Yoshida, N.Kitamoto and N.Takeda

11th Asian Conference on Diarrhoeal Diseases and Nutrition(11th ASCODD 2006) Bangkok, Thailand, 2006.3.8-10

H: 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得

ノロウイルス対外診断ELISAキット

2. 実用新案登録

なし

		RT PCR	
		+	-
IC kit	+	118	38
	-	40	44

図 1. RT-PCR と IC kit の検査成績

一致率 : 68 %

感 度 : 75 %

特異性 : 54 %

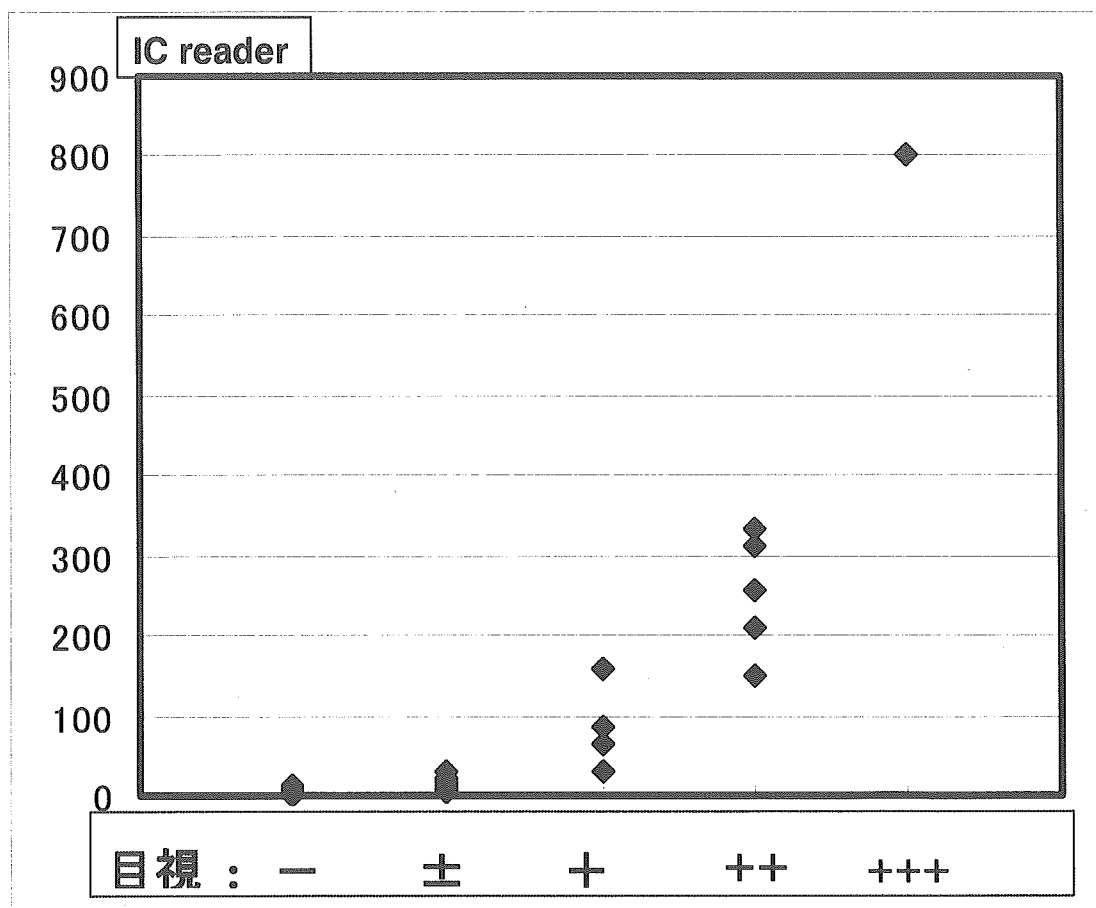


図 2. IC kit chromato reader による実測と目視との相関

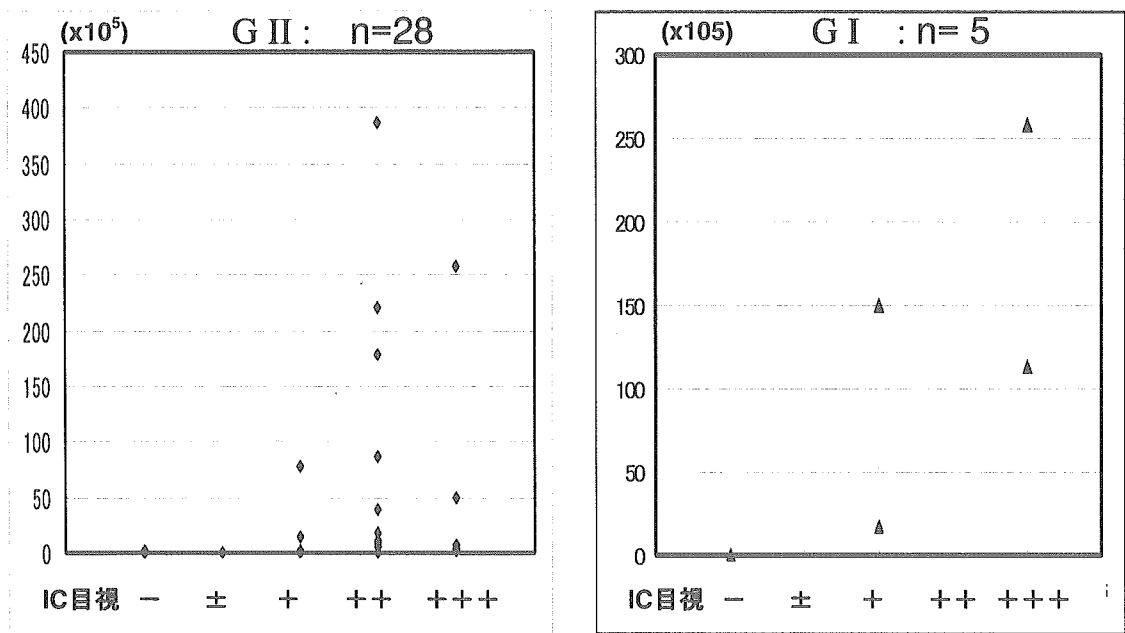


図 3. NV GII および GI 検体における NV copy 数と目視との相関

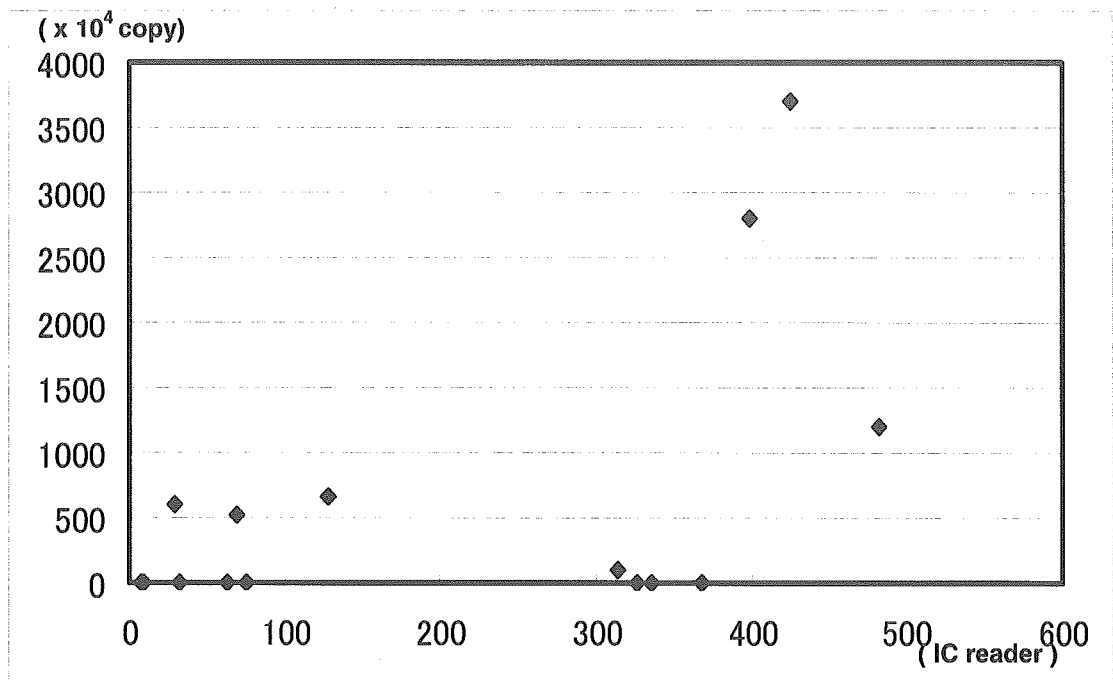


図 4. NV GII positive samples の copy 数と IC reader 値 (n=15)

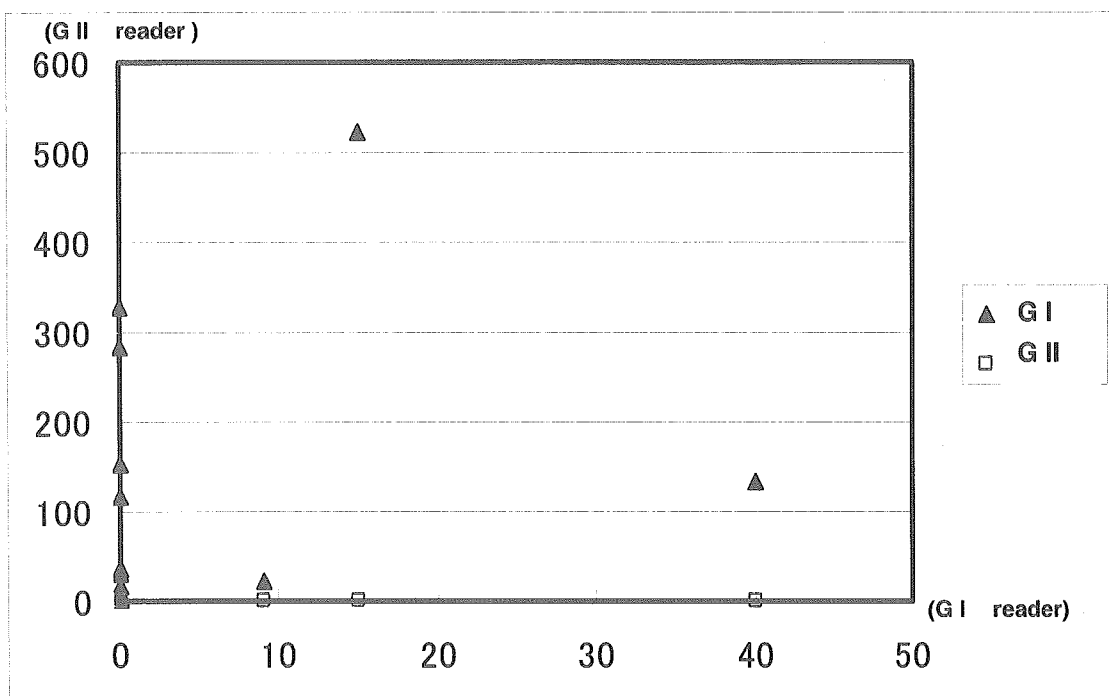


図 5. NV copy 0 の samples(陰性検体)における IC kit reader 値 (n=21)

図.6 NV 遺伝子型別検出状況

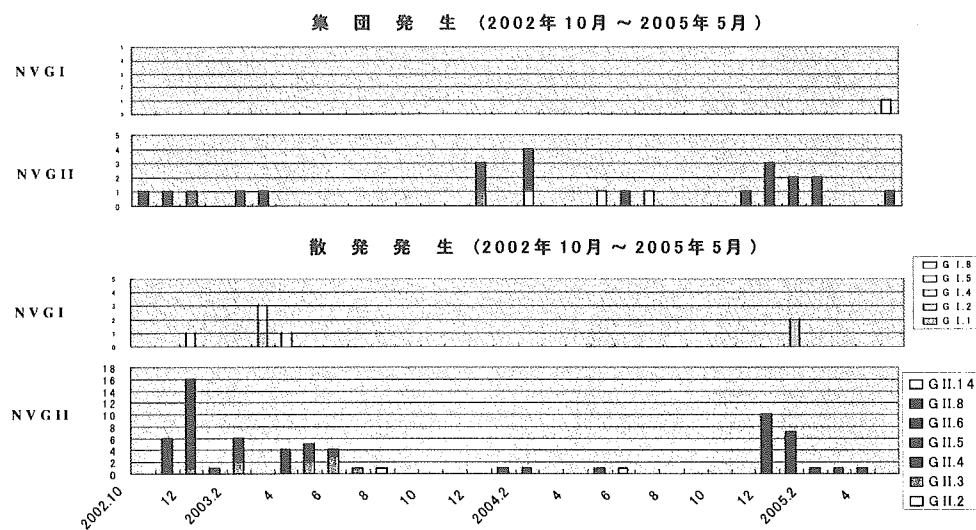


図.7 NVリアルタイムPCR測定(河川・下水処理場採取水)

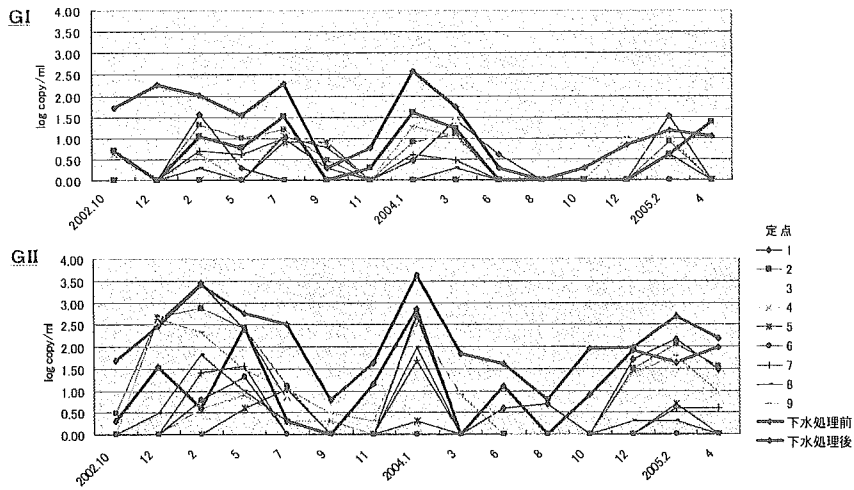
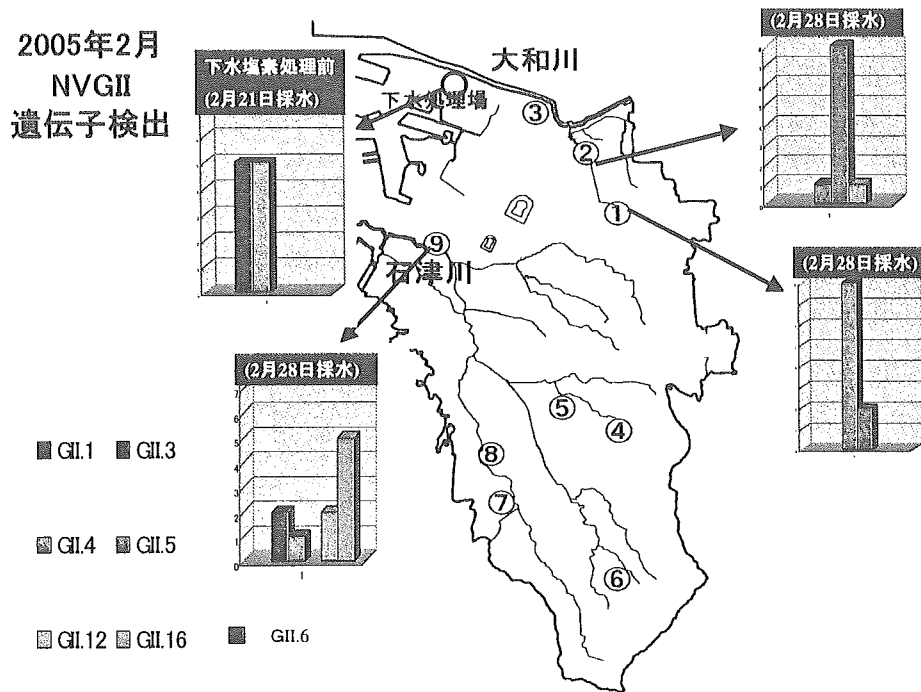


図.8 河川および下水処理場における NV 検出



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

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

研究課題：ヒトロタウイルス感染における抗原血症の解析と血清を利用した検査法の検討

研究要旨 ロタウイルス感染は、局所感染の好例である。小腸上皮細胞を標的細胞とする嘔吐下痢症の腸管感染症であり、ウイルス血症は起こさないと明確に示されてきた。ところが、下痢を発症し便中ロタウイルス陽性の患者で、急激に症状が悪化し、脳炎を起こしたり、突然死する例が無視できない例数報告されている。また、報告されずに、情報としては埋もれてしまっている例数もかなりあると予想される。こうした、ロタウイルス感染と中枢神経系との関連、それに伴うウイルス血症、抗原血症の論議が始まっている。そこで、ロタウイルス入院症例から、血清を集め、血清中でのロタウイルス抗原の存在を ELISA で検討した。その結果、ヒトロタウイルス感染において、急性期においては、ほとんどの症例で血清中にヒトロタウイルスの一重殻粒子の抗原 VP6 が予想を超えた量（血清の 16 倍希釈で検出可能）が含まれることが、ELISA により明らかとなった。この結果は、ヒト RV 感染において抗原血症がほぼ普遍的に起きていることを示している。翻って、微量の血清（血液）：約 4 μ l あれば、血清中のロタウイルス抗原 VP6 を検出することにより、ヒトロタウイルス感染の診断に使用可能であることを示唆する。

1) 研究目的

ロタウイルス（RV）は、生後 6 ヶ月から 2 年の乳幼児をピークとして感染し、重篤な嘔吐下痢症を起こすウイルスである。RV は、わが国のような温帯国では、冬季（12 月から 3 月）に感染が集中し、冬季乳幼児嘔吐下痢症の病因ウイルスとして知られる。散発例が圧倒的に多いが、大量のウイルスが下痢便に排泄されることから、食品や水を介した集団発生もみられる。RV は、小腸上皮細胞で特異的に増殖し、局所感染を起こすウイルスの典型とされてきた。しかし、RV 感染と中枢神経疾患、肝障害など胃腸炎以外の疾患との関連も報告されている。これに関連し、ヒトおよびマウスにおいて、RV 粒子内部抗原である VP6 が血清中に検出できるとの報告が提出されている。我々は、RV 感染症例（中枢神経症状のある群とない群）から多数の血清を得たので、果たしてヒト RV 感染において抗原血症が普遍的に起きるのかどうかを検討した。

また、もし、こうした抗原血症が明らかに

なり、微量で検査が可能となれば、微量の血清を用いた RV 感染の高度化検査として使用できるかどうかを検討した。

2) 材料と方法

平成 16 年 12 月 1 日から平成 17 年 4 月 30 日の間にロタウイルスに感染し（便中のロタウイルス抗原が陽性）発症し、入院となった 13 症例（入院時と退院時の少なくとも 2 回検体を採取）と、コントロールとして発熱を主訴に外来を受診した乳幼児 30 症例を対象とした。他に、ロタウイルス陽性例 17 例、ロタウイルス以外の病因ウイルス（ノロウイルス）による胃腸炎例 14 例の血清を検討した。A 群 RV は、2 種の外層蛋白質（VP4 と VP7）、1 種の内層蛋白質（VP6）、3 種のコア蛋白質（VP1, VP2, VP3）から構成される。本研究では、粒子中のもっとも多量に存在する内層タンパク質 VP6 の共通抗原に反応するモノクロン抗体（Y0-156）を固相した 96 穴プレートを用いた ELISA にて被検血清中の VP6 抗原量を測定した。

また、同様に VP7 ないし VP4 に特異的な中和モノクロン抗体を用いた ELISA により、VP7 抗原、VP4 抗原の検出も試みた。

3) 結果

ELISA による RV 感染血清中の RV 抗原検出結果は以下の通りであった。

1) RV 陽性の胃腸炎症例 30 例のうち 22 例が VP6 抗原陽性であった。一方、RV 陰性のコントロールおよび感染性胃腸炎症例 44 例のうち 4 例のみが VP6 抗原陽性であった。

2) RV 陽性胃腸炎症例のうち 2 回採血（急性期：入院時と回復期：退院時）した 13 例中、急性期では VP6 抗原が 11 例において陽性であり、しかもきわめて高値であった。一方、回復期では 4 例のみ陽性（低値）であった。

3) 急性期の血清希釈曲線から、VP6 抗原の検出は、血清の 1:16 倍希釈液で可能であることがわかった。

4) 中枢神経症状を呈した感染性胃腸炎症例において、RV 陽性の 11 例のうち 10 例で血清中 VP6 抗原が陽性であった。

4) 考察

ヒト RV 感染の急性期において、かなり普遍的に抗原血症が起きていることが明らかとなった。RV と胃腸炎以外の疾患との関連の可能性は、より濃厚となってきた。現在、RT-PCR による RV 遺伝子の検出、さらに、抗原血症を起こした血清を用いたウイルス分離実験も行っている。これらの結果より、抗原血症のみならず、ウイルス血症が起きているか否かを実証することは、RV 感染における胃腸炎の病態、および胃腸炎以外の疾患との関連を考える上で、きわめて重要である。

また、RV 感染においては、きわめて微量（約 4 μ l）の血清で RV 抗原が検出可能であることが、判明し、血清を用いた迅速診断も可能であることを示唆した。

研究協力者：和久田光毅博士（藤田保健衛生大学医学部ウイルス・寄生虫学）、浅野喜造博士、吉川哲史博士（藤田保健衛生大学医学部小児科）

5) 研究発表

論文発表

Nagashima, S., Sasaki, J., Taniguchi, K.: The 5' Ω terminal region of the Aichi virus genome encodes *cis*-acting replication elements required for positive- and negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* 79(11): 6918-6931, 2005.

Wakuda, M., Pongsuwanna, Y., Taniguchi, K.: Complete nucleotide sequences of two RNA segments of human picobirnavirus. *J. Virol. Methods* 126:165-169, 2005.

Komoto, S., Tsuji, S., Lee, B. J., Iwabu, Y., Kojima, Y., Otake, T., Taniguchi, K., Ikuta, K.: Higher frequency of premature stop codon mutations at *vpu* gene of human immunodeficiency virus type 1 CRF01_AE compared with that of other subtypes. *Microbes Infect.* 7(2):139-147, 2005.

Kamata, K., Shinozaki, K., Okada, M., Seto, Y., Kobayashi, S., Sakae, K., Oseto, M., Natori, K., Shirato-Horikoshi, H., Katayama, K., Tanaka, T., Takeda, N., Taniguchi, K.: Expression and antigenicity of virus-like particles of Norovirus and their application for detection of Noroviruses in stool samples. *J. Med. Virol.* 76:129-136, 2005.

Rahman, M., Banik, S., Faruque, A. S. G., Taniguchi, K., Sack, D. A., Ranst, M. V., Azim, T.: Detection and characterization of human group C rotaviruses in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 43(9):4460-4465, 2005.

Monnier N, Higo-Moriguchi K, Sun ZY, Prasad BV, Taniguchi K, Dormitzer PR.: High-resolution molecular and

antigen structure of the VP8* core of a sialic acid-independent human rotavirus strain. J Virol. 80 (3) :1513-1523, 2006

Komoto, S., Sasaki, J., Taniguchi, K. : Reverse genetics system for introduction of site-specific mutations into the double-stranded RNA genome of infectious rotavirus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (in press)

平成 17 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

愛知県民のノロウイルスに対する抗体保有状況

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
白土東子 国立感染症研究所 ウイルス第 2 部

研究要旨 愛知県民のノロウイルス (NV) に対する抗体保有状況を把握する目的で、GI の Seto 株 (G1) と Chiba 株 (G4) および GII の Ina 株 (G2)、Ichimiya (G3)、Narital04 (G4)、Hokushin 株 (G10)、Chitta 株 (G12) と Kamo 株 (G15)、計 8 株のウイルス陽粒子 (VLPs) を抗原として愛知県民の抗 NV 抗体を測定した。平成 11 年度と 16 年度における愛知県民の抗体保有状況を比較検討した結果、11 年度と比べて 16 年度では、GI の 2 株に対する保有率は低下していたが、GII の 6 株中 4 株で保有率の上昇が認められ、最近の GII 型 NV の流行を反映する結果と考えられた。抗体保有率と流行株との関連性を継続調査することにより、今後の流行株の予測、また感染症や食中毒の防疫対策のための基礎資料となることが期待される。

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。特に近年は、老人介護施設や病院等でヒト-ヒト感染によるノロウイルスの集団感染が多発し、感染症の原因ウイルスとしての側面が社会問題となっている。これら集団感染事例や散発事例からは、多様な遺伝子型の NV が検出されている。遺伝子データベースに登録されている NV の分子系統解析を行なうと、現時点で NV は、GI で 14 の遺伝子型に、GII で 17 の遺伝子型に分類

されているが、今後とも新たな遺伝子型の NV が出現してくることが予想される。

NV は未だ培養増殖できないウイルスであるので、NV に対する抗体を測定するに必要なウイルス抗原量を得ることは困難であった。しかし、NV の構造タンパク遺伝子を挿入した組換えバキュロウイルスを用いることで、native なウイルスと同じ抗原性を有するウイルス様粒子 (VLPs) を発現することが可能となり、異なる遺伝子型の NV をウイルス抗原として確保することが容易となってきた。

そこで、本研究では愛知県民の NV に対する抗体保有状況を把握する目的で、8 株の NV 由来の VLPs を抗原として用いた ELISA 法で愛知県民の抗 NV 抗体を測定し、平成 11 年度と 16 年度の NV に対する抗体保有状況を比較検討した。

B. 研究方法

①愛知県民の血清

平成 11 年の 4 月から 9 月に採血された 186 名 (0~62 歳) の血清と平成 16 年の 7 月から 8 月に採血された 197 名 (0~64 歳) の血清で、ウイルス検査に対するインフォームドコンセントが得られている血清を使用した。

② 抗体測定に使用した NV 株の由来
愛知県、千葉県および長野県で発生した食中毒事例の患者便から検出された NV からバキュロウイルス発現系でウイルス様粒子 (VLPs) として発現することができた、GI の 2 株と GII の 6 株、計 8 株を抗体測定用の抗原とした。NV 8 株の由来を表 1 に示した。

③抗ノロウイルス抗体の測定法

1. ウイルス様中空粒子を炭酸緩衝液 (pH 9.6) で $1\mu\text{g/ml}$ となるように希釈した。
2. 96 穴の ELISA プレートの各ウェルに $100\mu\text{l}$ を加え、 4°C に一晩置いた。
3. 各ウェルの液を除き、 $200\mu\text{l}$ の 2% BSA を含む PBS (2% BSA/PBS) を加え、 4°C に一晩置いた。
4. 各ウェルの液を除き、0.05% Tween を含む PBS (PBS-T) で 5 回洗浄した。
5. 被検血清を 1% BSA/PBS で 1:500 に

希釈し、 $100\mu\text{l}$ をウェルに添加後、 37°C に 1 時間置いた。

6. 各ウェルの液を除き、PBS-T で 5 回洗浄した。

7. 各ウェルにパーオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG (Cappel 社、1% BSA/PBS で 1:10000 に希釈したものを) $100\mu\text{l}$ 加え、 37°C に 1 時間置いた。

8. 各ウェルの液を除き、PBS-T で 5 回洗浄した。

9. 各ウェルに TMB 液 (Moss 社) を $100\mu\text{l}$ 加え、室温に 10 分間置いた。

10. 2N 硫酸を各ウェルに $50\mu\text{l}$ 加え、反応を停止した。

11. 450nm の吸光度を測定し、0.2 以上の検体をノロウイルス抗体陽性と判定した。

C. 研究結果

平成 11 年度と 16 年度における愛知県民の GI の 2 株と GII の 6 株に対する抗体保有率を測定し、その結果を表 2 と表 3 にそれぞれ示した。11 年度と 16 年度の県民全体の抗体保有率を比較すると、GI の Seto 株 (G1) に対する保有率は 50% から 44% に、Chiba 株 (G4) に対しては 34% から 27% と、2 株ともに抗体保有率の低下が認められた。一方、GII の Ina 株 (G2) が 47% から 60% に、Narita104 株 (G4) が 66% から 69% に、Hokushin 株 (G10) が 44% から 54% に、Kamo 株 (G15) が 48% から 50% と、GII の 6 株中 4 株で抗体保有率の上昇が認められたのに対して、Chitta 株 (G12) の 1 株が 60% から 53% に抗体保有率が低下した。

県民全体の GI と GII の 8 株に対する保有率を比べると、平成 11 年度と 16 年度ともに GII の Narita104 株に対する抗体保有率が最も高率であった。

図 1 に平成 11 年度と 16 年度における年齢階層別の抗 NV 抗体保有率を示した。

平成 11 年度の年齢別の保有状況では、5～9 歳と 10～14 歳の年齢層で Narita104 株に対する保有率が、他の株と比べて高く、GII/4 型がこの年齢層で流行していたことが示唆された。また、15 歳以上の年齢層で、GI の Seto 株 (G1) に対する保有率が相対的に高い傾向が認められた。

平成 16 年度の年齢別の保有状況では、15～19 歳を除いた年齢階層で Narita104 株 (GII/4) に対する抗体保有率が最も高かった。一方、15～19 歳では Ina 株 (GII/2) に対する保有率が最も高く、次いで、Narita104 株と Hokushin 株 (GII/10) の順であった。

D. 考察および結論

ノロウイルスは培養細胞で増殖できないウイルスであるので、ヒト血清中のノロウイルスに対する中和抗体を測定できない。従って、本研究では NV 遺伝子を挿入した組換えバキュロウイルスで発現されたウイルス様粒子 (VLPs) を抗原とした ELISA 法で愛知県民の NV に対する抗体保有率をそれぞれ測定した。ELISA 法では、抗体測定に用いる VLPs 抗原の濃度や被検血清の希釈濃度、また結果判定のための cut-off 値などを規定する必要がある

が、今回は、抗原量を 100ng/well、血清を 500 倍希釈、および吸光度 0.2 以上を示した検体を抗体陽性と判定することとし、平成 11 年度と 16 年度に採血された愛知県民について GI の 2 株と GII の 6 株、計 8 株に対する抗体保有率を比較検討した。その結果、11 年度と比べて 16 年度の県民全体の保有率は GI の 2 株に対しては低下していたのに対して、GII の 6 株中 4 株で保有率の上昇が認められ、最近の散发事例や集団発生事例における GII 型 NV の流行状況とよく一致する結果であった。また、16 年度の 8 株に対する抗体保有率を比較すると、ほとんどの年齢階層で Narita104 (GII/3、Lordsdale-like) に対する保有率が最も高く、近年の GII/3 株の流行状況を反映する結果と考えられたが、GII/3 型の NV 株は抗体保有状況の調査後においても胃腸炎集団発生事例から高頻度に検出されていた。現時点では、ELISA による抗体価と培養法による中和抗体価との相関性を検討することができないので、ELISA で感染防御抗体を測定できているのか否かについては不明である。今後、抗 NV 抗体保有率の推移と散发事例や集団発生から検出される NV の遺伝子型との関連性を継続調査することにより、流行株の予測および感染症や食中毒の防疫対策に活用できることが期待される。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Kamata K., Shinozaki K., Okada M.,

Seto. Y., Kobayashi S., Sakae K., Oseto M., Natori K., Shirato-Horikoshi H., Katayama K., Tanaka T., Takeda N., and Taniguchi K. Expression and Antigenicity of Virus-Like Particles of Norovirus and Their Application for Detection of Noroviruses in Stool Samples. *J. Med. Virol.* 76: 129-136, 2005

2) Yamashita T., Ito M., Taniguchi A., and Sakae K. Prevalence of Coxsackievirus A5, A6 and A10 in Patients with Herpangina in Aichi Prefecture, 2005. *Jpn. J. Inf. Dis.* 58:390-391, 2005

3) 椋島由佳, 伊藤 雅, 山下照夫, 藤浦明, 榮 賢司: 臨床とウイルス. 33: 228-233, 2005

2. 学会発表

1) 小林慎一, 小原真弓, 長谷川澄代, 大矢英紀, 尾西 一, 東方美保, 猿渡正子, 青木 聡, 田中保和, 柴田伸一郎, 中野陽子, 杉山 明, 榮 賢司: 平成 16 年度の東海・北陸地域におけるノロウイルスの検出状況と遺伝子解析. 第 53 回日本ウイルス学会総会, 横浜, 2005

2) 山下照夫, 伊藤 雅, 谷口晶子, 藤浦明, 榮 賢司: 新型アイチウイルス (2 型) の VP1 遺伝子の検出. 第 53 回日本ウイルス学会総会, 横浜, 2005

3) 伊藤 雅, 山下照夫, 谷口晶子, 榮 賢司: 臨床検体からの Human parechovirus (HPeV) 属の検出. 第 53 回日本ウイルス学会総会, 横浜, 2005

表1 抗体測定に使用したNV株の由来

	株名	遺伝子型	施設・原因食品・場所
GI	Seto/89/JP	GI/1	修学旅行・昼食・愛知
	Chiba407/87/JP	GI/4	レストラン・カキ・千葉
GII	Ina/02/JP	GII/2	保育園・給食・長野
	Ichimiya/91/JP	GII/3	レストラン・カキ・愛知
	Narita104/97/JP	GII/4	レストラン・カキ・千葉
	Hokushin/03/JP	GII/10	レストラン・昼食・長野
	Chitta/96/JP	GII/12	旅館・夕食・愛知
	Kamo/03/JP	GII/15	ホテル・宴会食事・愛知

表2 平成11年度の愛知県民のノロウイルスに対する抗体保有状況

年齢	検査数	GI		GII					
		Seto (G1)	CV (G4)	Ina (G2)	Ichimiya (G3)	Narita104 (G4)	Hokushin (G10)	Chitta (G12)	Kamo (G15)
0-4	48	12 (25)	4 (8)	10 (21)	23 (48)	19 (40)	13 (27)	20 (42)	18 (38)
5-9	23	8 (35)	6 (26)	11 (48)	21 (43)	21 (91)	9 (39)	11 (48)	12 (52)
10-14	14	6 (43)	6 (29)	6 (43)	7 (50)	11 (79)	7 (50)	8 (57)	6 (43)
15-19	12	11 (92)	8 (67)	10 (83)	7 (58)	10 (83)	8 (67)	10 (83)	10 (83)
20-29	46	21 (46)	16 (35)	25 (54)	18 (39)	30 (65)	21 (46)	30 (65)	23 (50)
30-39	23	18 (78)	13 (57)	10 (43)	15 (35)	15 (65)	9 (39)	17 (74)	8 (35)
40-49	11	10 (91)	6 (55)	9 (82)	8 (73)	10 (91)	10 (91)	10 (91)	7 (64)
50-62	9	7 (78)	6 (67)	7 (78)	5 (56)	6 (67)	5 (56)	6 (67)	6 (67)
計	186 (%)	93 (50)	63 (34)	88 (47)	86 (46)	122 (66)	82 (44)	112 (60)	90 (48)

表3 平成16年度の愛知県民のノロウイルスに対する抗体保有状況

年齢	検査数	GI		GII					
		Seto (G1)	CV (G4)	Ina (G2)	Ichimiya (G3)	Narita104 (G4)	Hokushin (G10)	Chitta (G12)	Kamo (G15)
0-4	47	12 (26)	4 (9)	13 (28)	12 (26)	21 (45)	14 (30)	16 (34)	10 (21)
5-9	32	13 (41)	7 (22)	22 (69)	15 (47)	22 (69)	17 (53)	14 (44)	17 (53)
10-14	18	9 (50)	5 (28)	12 (67)	11 (61)	16 (89)	13 (72)	12 (67)	10 (56)
15-19	20	11 (55)	7 (35)	19 (95)	14 (70)	16 (80)	16 (80)	12 (60)	15 (75)
20-29	21	9 (43)	5 (24)	14 (67)	9 (43)	19 (90)	16 (76)	13 (62)	10 (48)
30-39	20	10 (50)	7 (35)	13 (65)	8 (40)	14 (70)	10 (45)	12 (60)	12 (60)
40-49	20	11 (55)	9 (45)	11 (55)	8 (40)	13 (65)	10 (50)	12 (60)	10 (50)
50-64	19	12 (63)	10 (53)	14 (74)	11 (58)	15 (79)	12 (63)	14 (74)	14 (74)
計	197 (%)	87 (44)	54 (27)	118 (60)	88 (45)	136 (69)	107 (54)	105 (53)	98 (50)

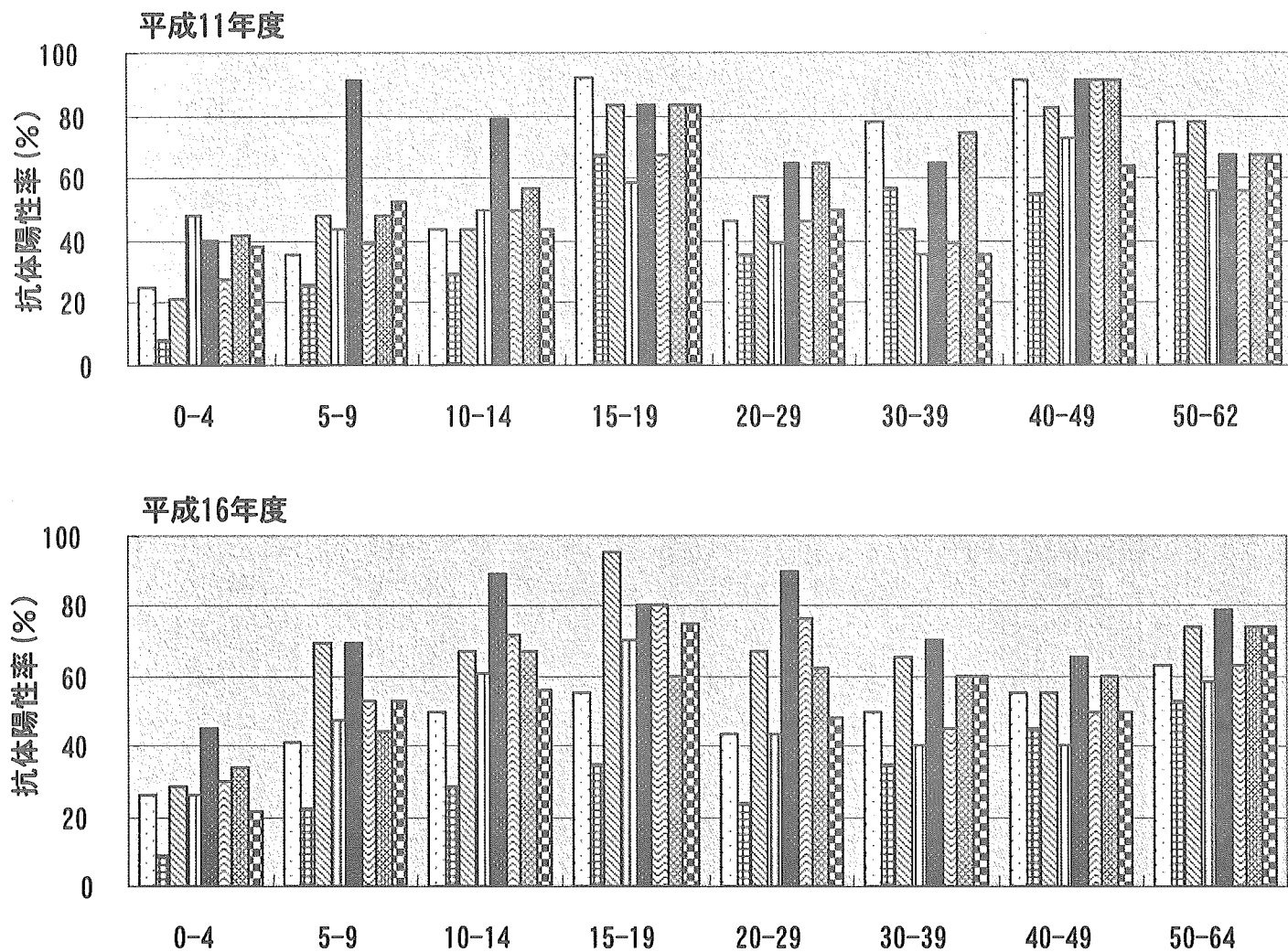
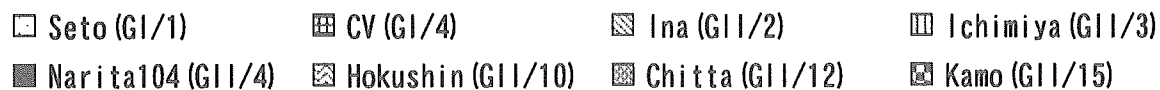


図1 平成11年度と16年度のノロウイルスに対する年齢階層別の抗体保有状況

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

「集団発生及び散発性胃腸炎から検出されたノロウイルス、 サポウウイルスの遺伝子型多様性」

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：2003年1月から2005年12月の間に愛媛県における集団発生及び散発性胃腸炎について、ノロウイルスとサポウウイルスの関与の程度を明らかにし、また、地域流行株の遺伝子型の分布を比較した。調査期間中に、散発例からノロウイルスは350株（検出率22.6%）、サポウウイルスが114株（検出率7.4%）検出され、散発例でのサポウウイルスの関連する割合が比較的高いことが明らかとなった。また、散発性胃腸炎から検出されたノロウイルスの遺伝子型はGⅡ/4Lordsdale、GⅡ/3Mexico、GⅡ/2Melksham、GⅡ/4Miami型株等が多かった。一方、食中毒や施設内集団発生事例では、原因はほとんどノロウイルスであり、サポウウイルスの関与は1事例に認められたのみであった。集団発生31事例中14事例からGⅡ/4Lordsdaleが検出され、次いでGⅡ/2Melkshamが多かった。集団発生から検出された株と遺伝子塩基配列が100%一致する株が、同時期に地域内で流行していたことから、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。また、現在ノロウイルスの検出に国内で最も汎用されているプライマーは、少なくとも国内で流行しているノロウイルスを広く検出していることが推測された。

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）、サポウウイルス（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。一方、SVに関しては報告が少なく、その胃腸炎に関与する役割の評価は大きくない。し

かし、我々の散発性胃腸炎の継続的病原検索では、近年、SVの検出頻度が高まってきている傾向がみられるので、今回は、3年間地域において散発発生する胃腸炎患者からのNVとSVをPCR法で検出し、両者の検出数の推移を比較した。また、NV及びSVの遺伝子シーケンスを行い、散発性胃腸炎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。

わが国におけるウイルス性急性胃腸炎の集団発生の原因に最近変化がみられ、従来、原

因の半数以上を占めていた、カキによる食中毒事例が著しく減少し、替って調理中の食品の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及びヒト-ヒト感染による施設内での胃腸炎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、地域におけるウイルスの流行実態を把握し、流行を制御する方策を講ずることが重要である。

B. 研究方法

材料：糞便材料は、2003年1月から2005年12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℃で冷凍保存した。

方法：糞便からのウイルス検索は、リアルタイムPCR又はnested RT-PCR及び電子顕微鏡法(EM)で行った。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。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。ロタウイルス、アストロウイルス、アデノウイルス等は主にEMによって検出されたものについて、ELISAやイムノクロマト法によって型別した。

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ケンス法で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、SV遺伝子のシーケンスは千葉県衛生研究所(岡田博士)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

2003年1月から2005年12月の間の愛媛県における散発性胃腸炎患者1,546名からのウイルス検出状況を表1、図1に示した。NVが350例と最も多く検出され、次いでロタウイルスが155例、SVが114例、アデノウイルスが38例、アストロウイルスが33例であった。検出されたNV350株のGenogroup別の内訳は、GⅡが圧倒的に多く316例(90.3%)で、GⅠは34例(9.7%)と非常に少なかった。また、散発性胃腸炎におけるSVの関与が予想以上に高く、今後注意深い監視が必要である。

ウイルス型別の季節消長を見るため、3年間の累積の月別検出率を図2に示した。NVは11月から増加し始め12月に検出率のピークを示した。その後4月頃までゆるやかに減少し、夏季には非常に検出され難くなるもののほぼ年間を通じてNVが検出された。一方、SVは11月から初夏まで検出されるが、NVの検出率が低下した3月から5月頃に比較的多く検出される傾向がみられた。ロタウイルスは毎シーズン2月から4月にかけて多く検出された。ロタウイルスやアストロウイルス等の検出法はEMであるため、単純にNV、SVの検出率との比較はできないが、消長の季節的な比較は可能である。ロタウイルスの流行は3月にピークがみられ、NVと比べると流行時期が明らかに遅いという特徴が観察された。

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31事例で、そのうち2事例がカキの摂食が原因と推定された。カキ等二枚貝が関連しない食中毒は、13事例あり、飲食店・ホテル等の料理や仕出弁当、福祉施設・寮・小学校等の給食が原因であっ

た。ヒトーヒト感染が疑われる施設内での胃腸炎集団発生が 16 事例あり、そのうち高齢者入居施設が 12 事例と最も多かった。その他には、医療機関（院内感染）、障害者施設、小学校で発生していた。3 年間の集団発生事例の発生様式、発生施設等と NV の遺伝子型を表 2 に示した。

これらの集団発生から、原因ウイルスとして NV が 30 事例から、SV が 1 事例から検出された。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。カキ関連 2 事例の患者から検出された NV には、G I、G II 両方の Genogroup が混在しており、遺伝子型はそれぞれ 5 種類及び 6 種類含まれていた。

カキが関連しない食中毒は 13 事例あったが、そのうち 1 事例は SV による食中毒であった。非カキ関連の 11 事例から検出された NV の遺伝子解析により、1 事例の例外を除き、患者からの NV 遺伝子型は事例ごとに 1 種類であったことが明らかにされた。例外的に 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。

非カキ事例の遺伝子型は、G II/4 Lordsdale が 4 事例、G II/2 Melksham が 3 事例、その他 G I/8 Sindlesham、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。

ヒトーヒト感染事例からは G II/4 Lordsdale が最も多く検出され、その他に、G II/11SaitamaU1、G II/3 Mexico、G I/3 DesertShield 等が検出された。

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 I、G II 共に 11 種類ずつ検出された（表 3）。G II の遺伝子型は、散発例から 10 種類、集団発生事例からは 9 種

類検出された。それらの中で散発例、集団発生事例の両方から検出された遺伝子型は 8 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。一方、G I では、散発例から 8 種類、集団発生事例から 7 種類検出されたが、両者に共通している遺伝子型は 4 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、多くの遺伝子型がカキ関連食中毒からの検出であったため、地域流行を反映している散発例の NV と共通な遺伝子型が少なかったためと考えられた。

G II で多く検出された遺伝子型は G II/4Lordsdale で、次いで G II/6Miami、G II/3Mexico、G II/2Melksham、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 G I/3DesertShield が多く、次いで G I/4Chiba、G I/7Winchester が多かった。

散発例からの月別 G II 遺伝子型検出数は、G II/4Lordsdale は調査期間を通じて、寒冷期に検出されており、2003 年 12 月から 2004 年 5 月と 2004 年 12 月から 2005 年 3 月にかけて地域流行があったことが伺われた。2003/2004 年の流行時期には、5 事例の胃腸炎集団発生があった。G II/3Mexico は 2003 年 12 月から 2004 年 3 月の間に地域流行があったことが示されている。同様に G II/2Melksham や G II/6Miami も 2 回の地域流行がみられている。2003 年 12 月には G II/3 型の集団発生が起こり、2004 年 6 月には G II/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た。

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。集団発生事例から検出された株には検体番号に“out”を付記した。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検体番号の後に数字でその

株数を表示した。検出数が多かった遺伝子型は、GⅡ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(図3)。GIについては、最も検出数が多かったGI/3DesertShieldについて、系統樹解析を行った図4を示した。

これらの遺伝子型株については、調査期間中に2回或いは3回の流行がみられたが、異なる流行期の株間に大きな変異はみられない場合が多かった。このことから、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、集団発生株とほとんど同一の株が、散发性例からも、ほぼ同時期に検出されており、散发性の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。

5. SVの分子系統樹解析

2003年～2005年の間に多くのSV株が検出され、カプシド領域の約400塩基長の分子系統樹解析を行った。SVの遺伝的多様性を代表する参照株と愛媛県で今までに検出されたSV流行株と共に解析した結果を図5に示した。調査期間に検出されたSVは、SGⅠ、SGⅡ、SGⅢの3つのGenogroupを構成していた。2003年検出のSV株は、5つのグループに分かれた。同様に、2004年、2005年の流行株もそれぞれ5つのグループに分かれた。流行時期が同じものは、ほぼ同じグループに属す傾向がみられ、SVにおいても経時的に流行株が変遷しているものと考えられた。

また、2003年12月に幼稚園の集団発生から検出されたSV03-1815outと同時期に散发性胃腸炎患者から検出されたSVとの塩基配列は100%一致していた。

6. NV遺伝子型とEM陽性率、検出コピー数

EMでSRSV陽性例は、すべてPCRでNVか又はSVとして同定され、NV及びSVの検出法が、現在流行しているNV及びSVを幅広く検出することが示された。表4には、NVの遺伝子型別のEM陽性率及びリアルタイムPCRで測定さ

れたNVコピー数/testを示した。その結果、リアルタイムPCRで測定されたコピー数は、遺伝子型による明らかな差異が認められなかった。このことは、今回用いたNV検出リアルタイムPCRが、NVの遺伝的多様性に拘らず、多くの遺伝子型を高感度に検出していることを示唆している。

D. 考 察

感染性胃腸炎は毎年冬季を中心に流行し、感染症発生動向調査では、インフルエンザに次いで患者報告数が多く、他の先進諸国と同様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主要原因としてNV、ロタウイルス、SV、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のうちNVが最も多くの感染性胃腸炎の発病原因となっており、また、しばしば食中毒や学校・施設において胃腸炎集団発生を引き起こし、衛生行政上の課題となっている。特に、2004/2005年のシーズンには、高齢者入居施設での急性胃腸炎の集団発生が多発し、一部の施設では入居者が死亡することが続いたため、公衆衛生上だけでなく社会的な問題となった。そのため、本県においても、高齢者入居施設における集団発生が多く報告され、12施設の患者の原因究明検査を行ったところ、すべてNVが原因であったことが判明した。また、従業員の検査や施設内の拭き取り検査では、施設中がNVにより汚染されていたことが明らかになった。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、2003年1月から2005年12月の3年間に、散发性胃腸炎及び食中毒等の集団発生から検出された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、散发性例から18種類の遺伝子型株が、集団発生例からは17種類の遺伝子型が検出された。双方で22種類検出され、多様な遺伝子型株が地域内で流

行を繰り返している様子が伺われた。

また、地域の散発性胃腸炎から検出された NV と集団発生事例から検出された NV との遺伝子塩基配列が 100%一致している事例がしばしば見出された。このことは地域の流行ウイルスが、調理中の食品を 2 次汚染し、食中毒の原因となったり、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。

今回の調査期間中は、散発性胃腸炎検体について、EM と並行して、NV 検出はリアルタイム RT-PCR、SV の検出は nested RT-PCR で行った。そのため、SV の検出率が比較的高く、SV の急性胃腸炎に対する関与が予想されていた以上に大きいことが示唆された。また、検出された SV の capsid 領域約 400 塩基を系統樹解析した結果、SG I、SG II、SGV の 3 種の Genogroup に分類され、さらに、検出株は年毎に 5 つのクラスターを形成し、SV における遺伝子型多様性が示された。

E. 結論

1) 2003 年 1 月から 2005 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 350 例 (検出率 22.6%)、ロタウイルスが 155 例 (10.0%)、SV が 114 例 (7.4%) 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 38 例 (2.5%)、33 例 (2.1%) で、SV が多く検出されたことが注目された。

2) NV の Genogroup は、G I が 34 例 (9.7%)、G II が 316 例 (90.3%) であった。G II の遺伝子型が 10 種類、G I が 8 種類であった。食中毒等集団発生からは G II が 10 種類、G I が 7 種類検出された。

3) 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検出され、地域で流行する 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

1) 山下育孝、近藤玲子、豊嶋千俊、大瀬戸光明、井上博雄、愛木智香子、秋山美穂、西尾治. 散発性胃腸炎と胃腸炎集団発生からのノロウイルス検出状況—愛媛県、病原微生物検出情報, 26 : 327-329, 2005

2) 山下育孝、近藤玲子、豊嶋千俊、大瀬戸光明、井上博雄、杉枝正明、古屋由美子、愛木智香子、秋山美穂、西尾治. 輸入生鮮魚介類からのノロウイルス検出状況とその遺伝子型、病原微生物検出情報, 26 : 337-338, 2005

2) 学会発表

山下育孝、近藤玲子、豊嶋千俊、大瀬戸光明、杉枝正明、古屋由美子、田中俊光、愛木智香子、秋山美穂、西尾治. 輸入生鮮魚介類及び急性胃腸炎患者から検出されたノロウイルス (NV) の分子疫学的解析、第 53 回日本ウイルス学会、2005 年 11 月 (横浜市)

G. 知的財産権の出願、登録状況

なし

表1. 散発性胃腸炎からの月別ウイルス検出状況

調査年	ウイルス名	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	計
2003年	ノロウイルス	16	14	6	8		7	3	3	1	1	3	16	78
	サポウイルス	2				7	7	3	1			3	8	31
	ロタウイルス	3	8	9	17	14						1	4	56
	アデノウイルス				1	4	5	1	1		1	1	1	15
	アストロウイルス				1	4	9			2				16
	レオウイルス											1		1
	計	21	22	15	27	29	28	7	5	3	2	9	29	197
検査数	34	40	36	39	37	50	53	42	37	24	30	38	460	
2004年	ノロウイルス	22	17	15	6	16	17	6		1	1	6	37	144
	サポウイルス		4	5	4	8	3					1	2	27
	ロタウイルス	3	8	27	16	1								55
	アデノウイルス		1	1	4	2		3				1	3	15
	アストロウイルス	1				9								10
	レオウイルス													0
	計	26	30	48	30	36	20	9	0	1	1	8	42	251
検査数	40	38	65	53	43	53	51	46	37	27	42	57	552	
2005年	ノロウイルス	26	9	7	5	7			5	1	2	12	54	128
	サポウイルス		10	10	5	10	7	2				5	7	56
	ロタウイルス	4	14	15	5	6								44
	アデノウイルス	1	1		1		2	1	1	1				8
	アストロウイルス				1					1		1	4	7
	レオウイルス													0
	計	31	34	32	17	23	9	3	6	3	2	18	65	243
検査数	41	51	49	29	41	40	42	50	50	37	32	72	534	
2003年 ～ 2005年 総計	ノロウイルス	64	40	28	19	23	24	9	8	3	4	21	107	350
	サポウイルス	2	14	15	9	25	17	5	1			9	17	114
	ロタウイルス	10	30	51	38	21						1	4	155
	アデノウイルス	1	2	1	6	6	7	5	2	1	1	2	4	38
	アストロウイルス	1			2	13	9			3		1	4	33
	レオウイルス											1		1
	計	78	86	95	74	88	57	19	11	7	5	35	136	691
検査数	115	129	150	121	121	143	146	138	124	88	104	167	1546	

表2 2003年から2005年に発生した集団発生事例からのNV遺伝子型

集団発生様式	原因施設等	事例数	原因ウイルスの遺伝子型		
食中毒 カキ関連	飲食店	2	GII/1Hawaii	GII/4Lordsdale	GI/2Southampton
			GI/8Sindlesham	GI/11SaitamaKU8	GI/12SaitamaKU19a
			GII/14Kashiwa47	GII/5Hillingdon	GII/15SaitamaKU80a
			GI/4Chiba	GI/13SaitamaT35a	
食中毒 非カキ関連	飲食店 旅館等	5	GI/8Sindlesham	GII/1Hawaii	GII/2Melksham
	仕出弁当	3	GII/4Lordsdale 2	GII/1Hawaii	GII/5Hillingdon
	福祉施設 寮	3	GII/4Lordsdale 2	GII/2Melksham	
	幼稚園 小学校	2	GII/2Melksham	Sapovirus	
	施設内ヒト-ヒト感染	高齢者施設	12	GII/4Lordsdale 9	GII/11SaitamaU1
医療機関		2	GI/3Mexico	nt	
障害者施設		1	GI/3DesertShield		
小学校		1	nt		

注)nt:未検査