

## B. 研究方法

野生イノシシは本州西部の2地点(A地点、B地点)で2003年11月から2006年8月に捕獲し、野生ニホンジカは北海道(西興部村、静内町)で2006年7月から2007年2月に捕獲を行った(エゾシカ、*C. n. yesoensis*)。それぞれ血清、肝臓、直腸糞を採取した。

ELISAとWBには国立感染症研究所の李天成博士より分与された組換え精製ウイルス粒子様抗原を用いた。また、豚のWB感度試験の際には李博士より分与された、ORF2を発現する組み換えBaculovirusを用いて調整した診断用抗原を用いた。イノシシの標準陽性血清は、飼育豚に組換え精製ウイルス粒子様抗原を免疫して作成した(昨年度の報告書で報告)。また、豚の感度試験に用いた陽性血清は、動物衛生研究所の恒光裕博士から提供いただいた。RT-PCRの方法および使用プライマーはTakahashiら(2003)に準じた。

(倫理面からの配慮について)免疫血清の採血はいずれも深麻酔後全採血、安楽死処分を行ったものであり、動物福祉の観点からも問題は無いと判断された。

## C. 研究成果

野生イノシシはそれぞれA地点で57頭捕獲し、血清42検体、肝臓37検体を採取、B地点では50頭捕獲し、血清45検体、肝臓50検体を採取した。ELISA吸光度は高い値を示すものも少数みられたが、分布は低値に偏る右裾広がり示した(図1)。

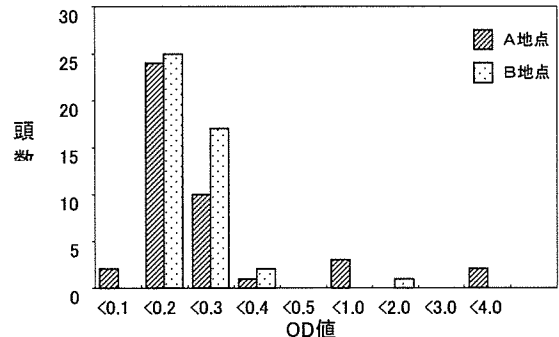


図1. 野生イノシシにおけるELISA OD値(IgG抗体)の頻度分布

ELISA吸光度が0.3以上の検体についてWBを行ったところ、もっとも吸光度が高い1個体で陽性となった。ELISA吸光度のカットオフ値を以下の式(カットオフ値=平均+3×標準偏差)を用いて設定したところ、二次抗体(KPL社アルカリフォスファターゼ標識)を500倍希釈で使用した場合ELISA吸光度1.67と設定され、これを適用した場合の抗体陽性率は2.3%(2/87)となった。地域ごとでみると、A地点の2個体が陽性と判断され、A地点が4.8%、B地点が0%であった。また、肝臓を用いたRT-PCRによるHEV-RNAの検出も試みた結果、A地点で捕獲された3個体からHEV-RNAが検出された。遺伝子型はいずれもGenotype IIIであった。これらの個体は、同一日に同じ場所で捕獲された0歳獣であり、同腹の兄弟と考えられた。

昨年度までの調査により、野生ニホンジカのHEVに対する抗体保有率が低いことを報告したが、この結果をより確実にするため本年度も北海道で25頭のシカを捕獲し18例の血清を採取した。その結果、ELISA吸光度は0.01~0.65の

値を示し、明らかな陽性例は認められなかった。

提供いただいた豚の陽性血清を用いて感度試験を行ったところ、ELISA 抗体価は 1 : 12,800 であった。調整した細胞抗原を用いて WB を行ったところ、予想される分子量の位置にバンドが確認されたのは 1 : 800 までであった。

#### D. 考察

昨年度の結果同様ニホンジカにおけるHEV抗体保有頻度は低く、ニホンジカがHEVの感染源となる危険性は低いという結果が支持された。また、イノシシの抗体陽性率には地域間で違いがみられたが、両者とも高いとはいえず0~4.8%の値にとどまった。過去のさまざまな地域での調査から、イノシシの抗体保有率は2~57%と報告されており、イノシシの抗体保有率にはかなりの地域差があることが示唆された。また、A地点では3例のウイルス陽性が確認されたことから、この地域のウイルス陽性率は8.1%(3/37)と計算されるが、3頭の陽性個体は同腹の兄弟の可能性が高いことから、実際HEVに汚染されている地域は局所的であることが示唆される。このことから、サンプリングを行う場所やどのような個体をサンプリングするかで、その地域の抗体保有率およびウイルス陽性率に影響を及ぼすことが考えられた。

#### E. 結論

本研究では、昨年度までの研究にさらに例数と動物種を増やして疫学調査を拡大した。その結果、ニホンジカのHEV保有頻度は大変低いことが

確認された。また、今回調査を行った地域のイノシシの抗体保有率もこれまでの報告に比べて低かったことから、HEVに汚染されている野生イノシシは局所的に存在し、抗体保有率にはかなりの地域差があることが考えられた。今後食用として野生イノシシの有効活用を促進する際には、定期的に地域単位のサーベイランスが必要であると考えられる。また、HEVの感染ルートを明らかにするためには、大型野生動物や家畜のみならず、齧歯類とヒトにおいても疫学的調査を拡大してゆく必要がある。

豚の陽性血清を用いたELISAとWBでの成績の比較では、WBはELISAに比べ16倍低い感度を示した。このため、豚やイノシシの血清学的確定診断には、WBの感度の改善や他診断法の導入などが必要と考えられた。

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし

2. 学会発表

松浦友紀子、李天成、吉松組子、有川二郎、恒光裕、高島郁夫、鈴木正嗣、宮村達男、武田直和、日本に生息するシカのE型肝炎ウイルス抗体保有状況調査、第54回日本ウイルス学会、名古屋（2006年11月）

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

共同研究者

松浦友紀子 食品の安全性高度化推進研究推進  
事業 リサーチ・レジデント  
吉松組子 北海道大学大学院医学研究科附属動  
物実験施設 助手

平成18年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）  
分担研究報告書

A 型肝炎ウイルス (HAV) の RT-LAMP 法による迅速遺伝子診断

分担研究者：米山徹夫（国立感染症研究所、ウイルス第二部）

共同研究者：清原知子、戸塚敦子（国立感染症研究所ウイルス第二部）

島崎典子（北里環境科学センター）

太田嘉則（栄研化学）

研究要旨

A 型肝炎は、患者の糞便中に排出されたウイルスが水や食品、汚染された容器等を介して口に入ることにより感染する。日本では衛生環境の整備が進み、患者数は大幅に減少した。近年は食中毒として飲食店などから広がった集団感染が時々報告され、問題となることがある。臨床材料からは 1A 型の HAV が広汎に検出される。診断法として、IgM 抗体の検出や RT-PCR 法による遺伝子検出法が確定診断に使われている。RT-PCR は増幅に時間がかかり、検出系が複雑で高価である。ウイルス分離は長期間かかり実用的ではない。そこで、廉価、簡便、迅速な遺伝子検出法である Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法による HAV の遺伝子迅速検出法を確立した。

A. 研究の目的

HAV の実験室診断に使える廉価、簡便、迅速な診断法の開発を目的として、Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を応用して、HAV の遺伝子迅速診断を試みた。

10<sup>8</sup> FFU/mL の感染価の HAV 株、KRM238, TKM005 (1B 型)、KRM031 (1A 型) から QIAamp Viral RNA Mini kit (GIAGEN) で RNA を調製し、RT-LAMP kit (栄研化学) を用いて 62.5°C で 60 分間反応を行い、比濁法によるリアルタイム検出を行った。

B. 研究方法

RT-LAMP 法のプライマーは PrimerExplorer V3 により遺伝子型 3B の細胞馴化株 KRM238 の 5' 非翻訳領域の塩基配列を元にして設計した。約

C. 研究成果

1. KRM238 から抽出した HAV RNA を感度良く検出し、バックグラウンドの低いプライマー G20 を作成したが、1A 型 KRM031 の RNA が効果的に増幅できな

かった。

2. G20 プライマーのひとつに、KRM031 株特異的なプライマーを混合使用することにより、3種類の異なる遺伝子型の HAVRNA を同じように増幅できた (表 1)。
3. RT-LAMP 法により感染価約 0.6FFU に相当する HAVRNA を 50%の効率で検出できた (表 1)
4. ループプライマーを使用することにより、反応時間を 50 分に短縮した。
5. 抽出した HAVRNA を 10 倍の階段希釈し、増殖曲線を作成し、定量化することが示された。定量範囲は  $10^1$ FFU- $10^5$ FFU/5 $\mu$ l であった (図 1)。
6. 標的部位内で一カ所切断する制限酵素 *Afl*III で KRM238 の増幅産物を切断し、アガーロスゲルで調べると、ラダー状のバンドが 143bp と 116bp の断片に集約され、RT-LAMP の反応の特異性が確認できた (図 2)。
7. RT-PCR 陽性の他の腸管系ウイルス検体、ポリオ、サポ、ノロ、HEV は LAMP で陰性であった。反応は HAV 特異的であることが示された (図 3)。
8. WHO の PCR 国際標準品と比較すると 1FFU は 0.7IU (PCR 国際単位) に相当した (図 4)。

#### D. 考察

HAV の細胞馴化株を使って RT-LAMP 法の検出法を確立した。検出感度はウイルスの感染価を測定するのとはほぼ同じレベル

であった。WHO の参照品から他の RT-PCR 法と遜色ない感度であることが示された。廉価、簡便、迅速なことから臨床検体のスクリーニングや医薬品のウイルスバリデーションへの適用が期待される。

#### E. 健康棄権情報

なし。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. Kiyahara T., Sato S., Totsuka A., Miyamura T., Ito T., and Yoneyama T. Shifting seroepidemiology of hepatitis A in Japan, 1973-2003. *Microbiol. Immunol.* 51:185-191, 2006

##### 学会発表

1. Kiyahara T., Sato S., Totsuka A., Miyamura T., Ito T., and Yoneyama T. The Shifting Seroepidemiological Pattern of Hepatitis A in Japan, as of 2003. 5th World Congress on Vaccination, Immunization and Immunotherapy. Fairmont The Queen Elizabeth, Montreal, Canada. 6-9 November 2006
2. 米山徹夫、清原知子、下池貴志、戸塚敦子：A 型肝炎ウイルス (HAV) の RT-LAMP 法による迅速診断、第 54 回日本ウイルス学会総会、名古屋、2006 年。

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

Table 1

Sensitivity of RT-LAMP assay for detection of HAV strains

Virus strain (genotype)	Name of RNA	RNA dilution	FFU/ 5 $\mu$ L	No. of positivesamples/ no. of tested samples	Positive (%)
KRM238 (IIIB)	RNA238	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>5</sup>	6/6	100
		10 <sup>-2</sup>	10 <sup>4</sup>	6/6	100
		10 <sup>-3</sup>	10 <sup>3</sup>	8/8	100
		10 <sup>-4</sup>	10 <sup>2</sup>	8/8	100
		10 <sup>-5</sup>	10 <sup>1</sup>	8/8	100
		10 <sup>-6</sup>	10 <sup>0</sup>	5/8	63
		10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-1</sup>	1/8	13
		10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-2</sup>	0/8	0
TKM005 (IB)	RNA005	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>5</sup>	6/6	100
		10 <sup>-2</sup>	10 <sup>4</sup>	6/6	100
		10 <sup>-3</sup>	10 <sup>3</sup>	8/8	100
		10 <sup>-4</sup>	10 <sup>2</sup>	8/8	100
		10 <sup>-5</sup>	10 <sup>1</sup>	8/8	100
		10 <sup>-6</sup>	10 <sup>0</sup>	6/8	75
		10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-1</sup>	1/8	13
		10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-2</sup>	0/8	0
KRM031 (IA)	RNA031	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>5</sup>	6/6	100
		10 <sup>-2</sup>	10 <sup>4</sup>	6/6	100
		10 <sup>-3</sup>	10 <sup>3</sup>	8/8	100
		10 <sup>-4</sup>	10 <sup>2</sup>	8/8	100
		10 <sup>-5</sup>	10 <sup>1</sup>	8/8	100
		10 <sup>-6</sup>	10 <sup>0</sup>	4/8	50
		10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-1</sup>	1/8	13
		10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-2</sup>	0/8	0

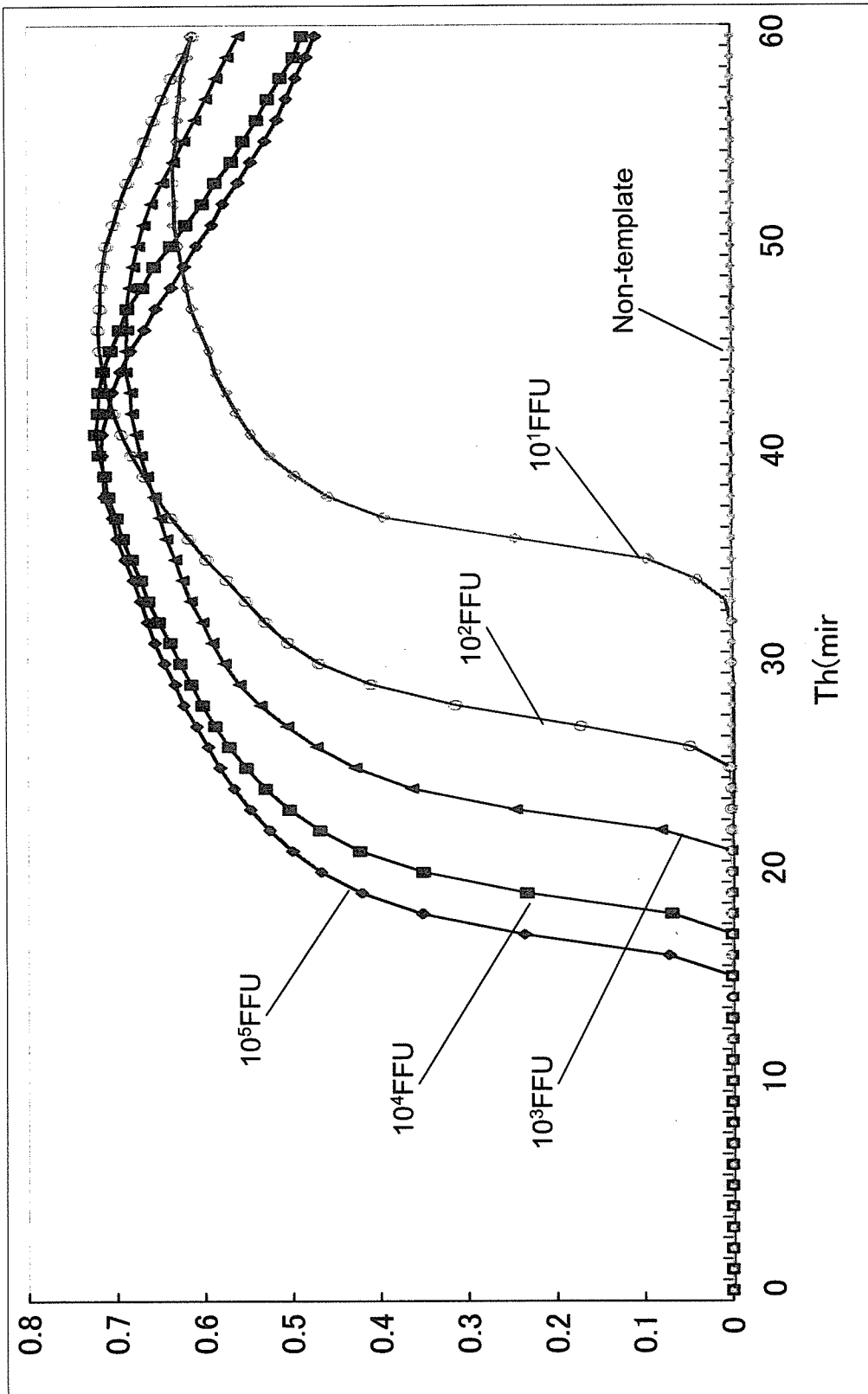


Fig.1(A) HAVKRM238株のRT-LAMP増幅曲線

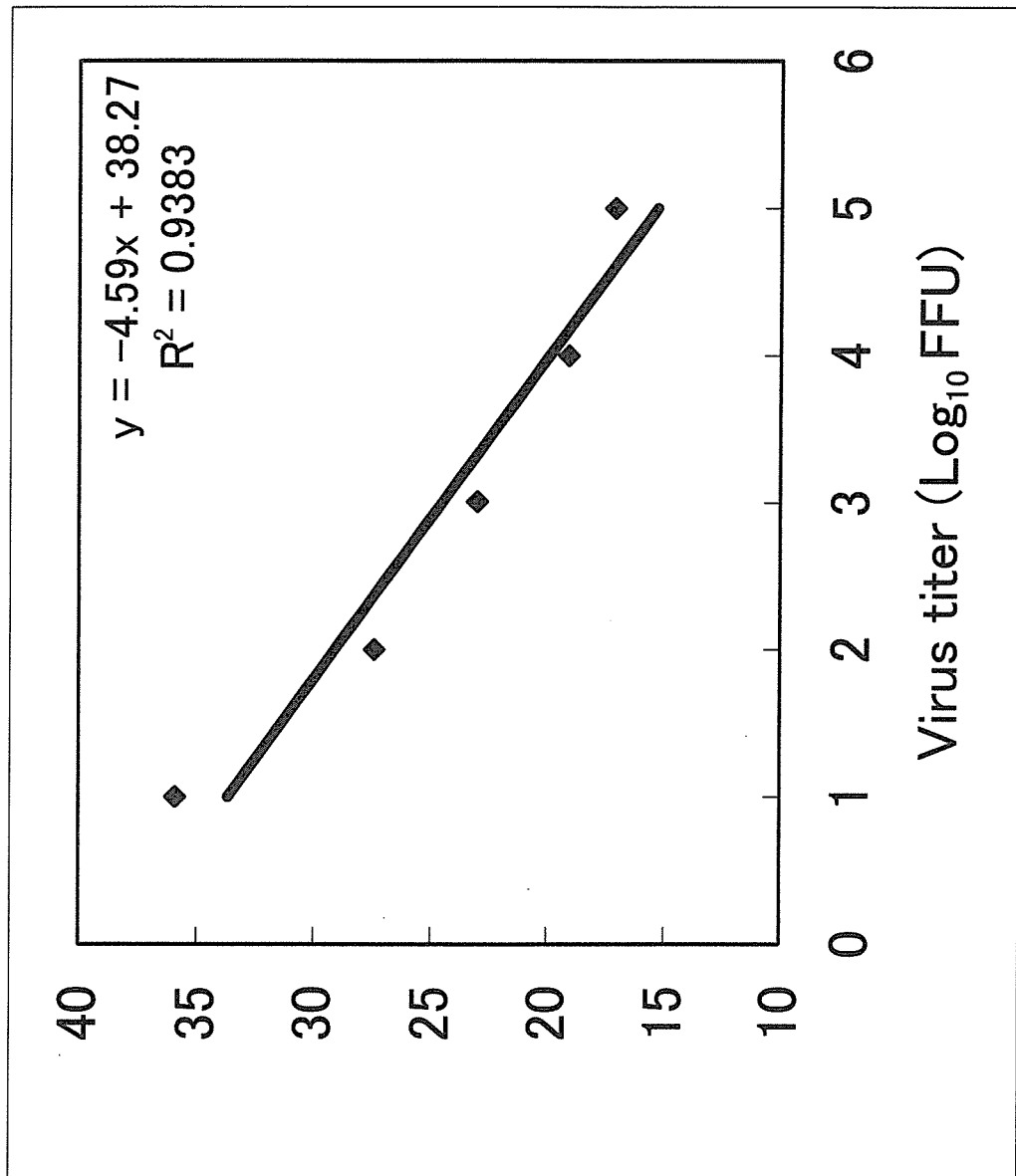


Fig.1(B) 増幅曲線(A)より得られた定量線



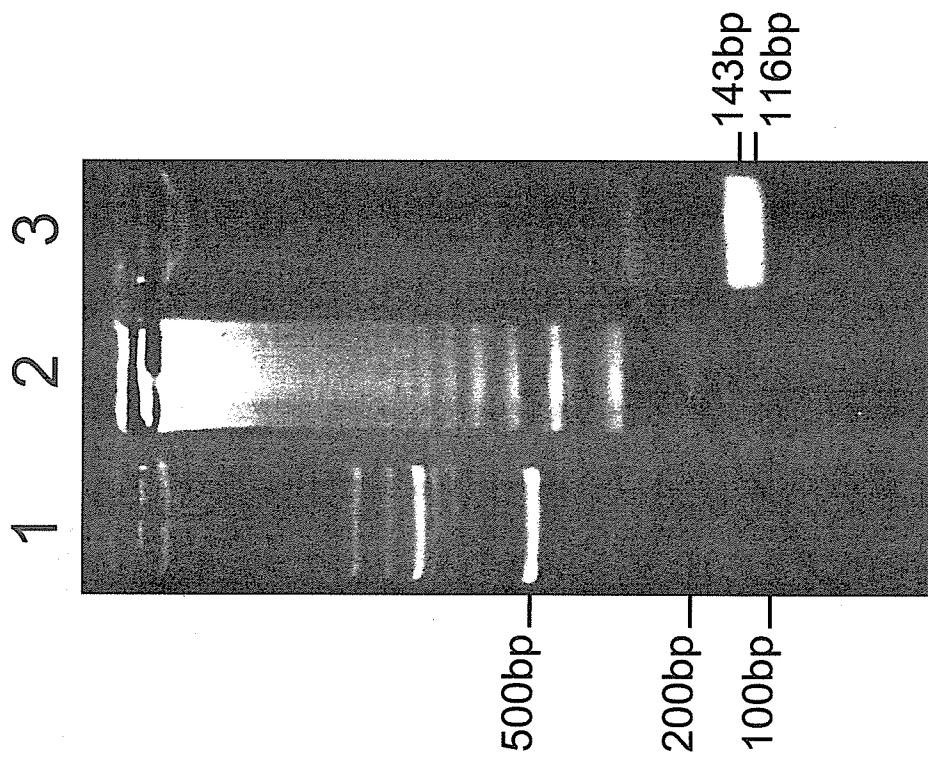


Fig.2 RT-LAMP産物の制限酵素処理

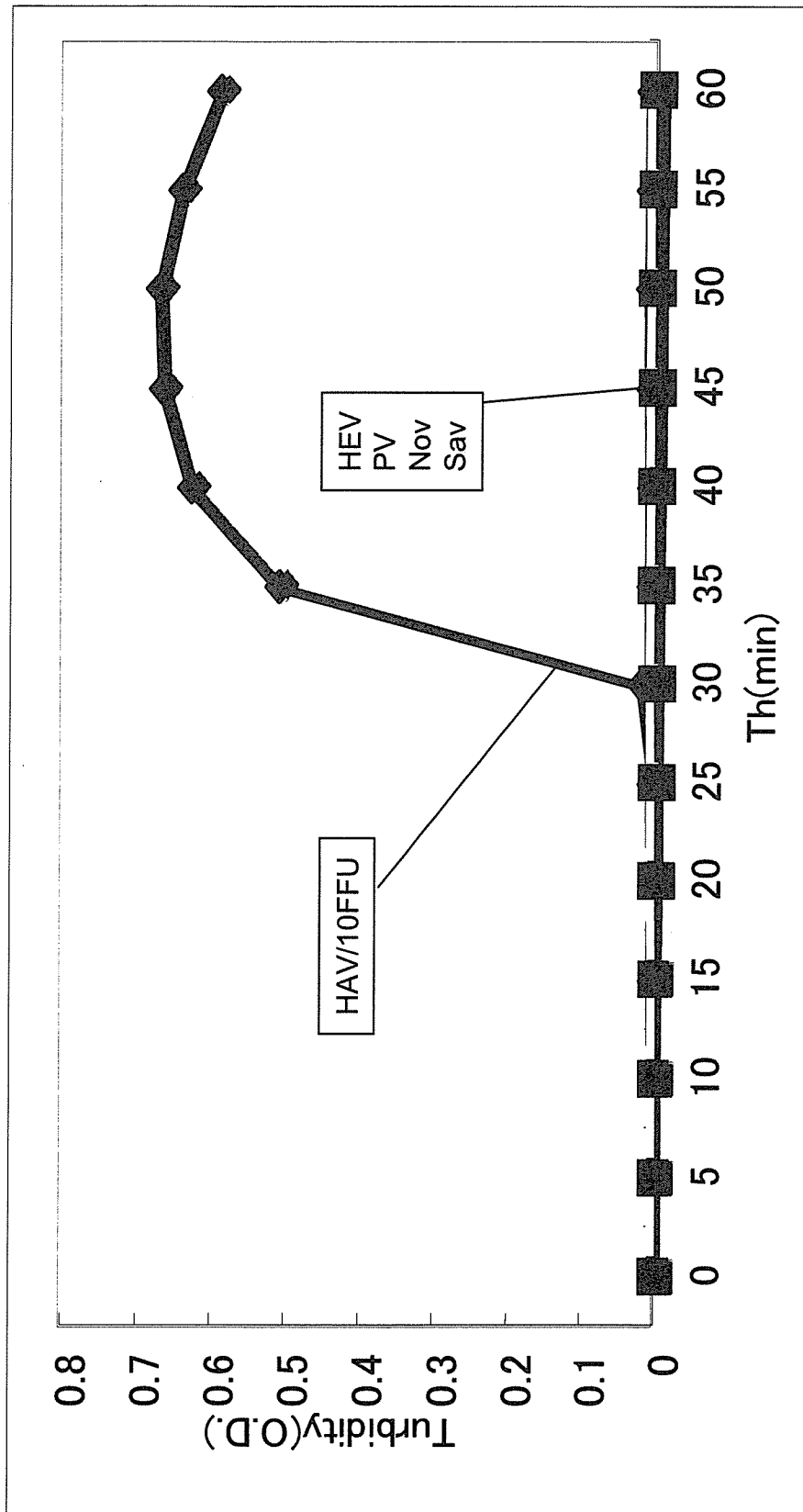


Fig.3 RT-LAMPの特異性

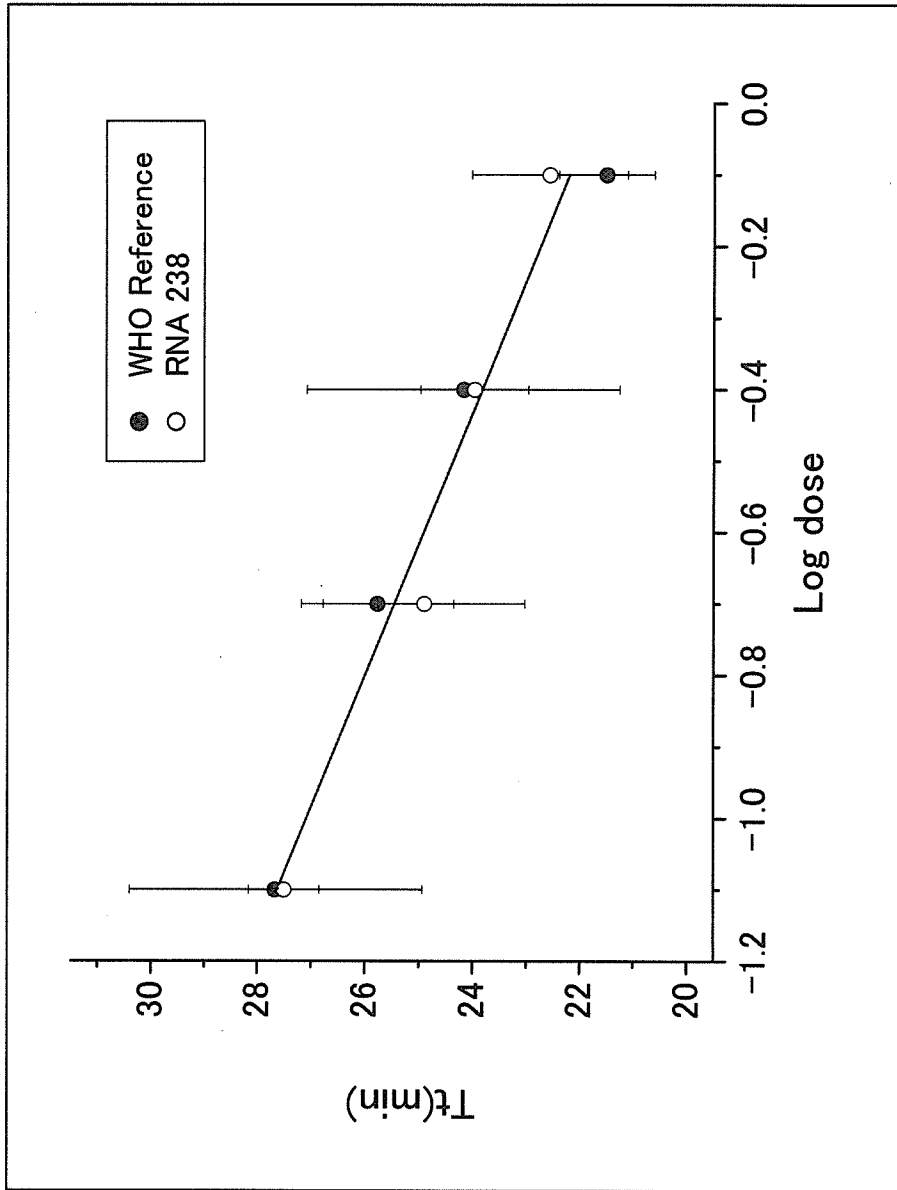


Fig.4 WHO ReferenceとHAVの平行線分析,縦棒はそれぞれの用量での95%信頼限界を示す。

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）  
「ウイルス性食中毒の予防に関する研究」班  
分担研究報告書

ヤマトシジミからの HEV 遺伝子の検出

分担研究者 李 天成（国立感染症研究所ウイルス第二部）

**研究要旨** 自然環境の E 型肝炎ウイルス (HEV) の汚染状況を把握するため、ヤマトシジミから HEV 遺伝子の検出を試みた。32 検体 (パック) のうち、2 検体のヤマトシジミから 3 型 HEV 遺伝子が検出された。日本の一部の河川水は HEV に汚染されていることが示された。

**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。また、HEV 遺伝子はブタ、イノシシ、シカ、マングースなどの動物から分離され、イノシシ、シカ由来の HEV がヒトに感染することも明らかになり、E 型肝炎は人畜共通感染症でもある。自然環境に HEV の汚染状況を把握するため、ヤマトシジミから HEV 遺伝子の検出を試みた。

**B. 研究方法**

2005 年 12 月から 2006 年 3 月までの間に収穫され、市販された産地の異なるヤマトシジミを 32 パック購入し、取り出した中腸線を出発材料として本研究に用いた。1g の中腸線を 10ml PBS 緩衝液に溶かしたあと、4℃で 30 分間振動し、その後、

6000rpm, 15 分遠心して、沈査を取り除く。さらに上清を超遠心によって濃縮する。RNA の抽出は 140ul DW に溶かされた濃縮サンプルを用いて行われた。感染症検査マニュアルに掲載された方法に従って cDNA 合成し、RT-PCR 法で HEV 遺伝子を増幅した。TA クローニングキットを用いて増幅された遺伝子をクローニングして、各クローンの塩基配列を解析した。さらに系統解析によって遺伝子型を判明した。

**C. 研究結果**

32 検体 (パック) のうち、2 検体のヤマトシジミから HEV 遺伝子が検出された。塩基配列および系統樹解析により、シジミの中に塩基配列の異なる株が混在するが、HEV 遺伝子がいずれも 3 型 (Genotype 3, G3) であった。

**D. 結果と考察**

シジミは淡水あるいは汽水域に生息し、主に川や湖から取れている。今回 3 型の HEV 遺伝子が日本産ヤマトシジミから検出されたことから、日本の一部の河川水に HEV の汚染が存在することが推測される。感染源はかつ

きり分かっていないが、HEVのリザーバであるブタとイノシシ糞便とともに排泄されたウイルスが川に流れ込むことも考えられる。

また、HEV陽性のシジミは二月末と三月初めに採集したものでこの時期は猟期の後半に当たる。捕獲された野生動物特にイノシシの解体の過程で不要な汚物が川に流されることもあるので、この時期に限ってHEV遺伝子の検出率は普段より高いと考えられる。

シジミの中に存在するHEVの感染性の有無を感染実験などによって明らかにする必要があるが、日本におけるシジミの食用仕方からシジミからヒトに感染する可能性が高くないだろう。

#### F. 研究発表

1. 学会発表
2. 論文発表

Li T-C, Miyamura T, Takeda N: Detection of hepatitis E virus RNA from the bivalve Yamato-Shijimi (*Corbicula japonica*) in Japan. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2007;76:170-172.

Li T-C, Saito M, Ogura G, Ishibashi O, Miyamura T, Takeda N: Serological evidence for hepatitis E virus infection in mongoose. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2006;74:932-936.

Nakai I, Kato K, Miyazaki A, Yoshii M, Li TC, Takeda N, Tsunemitsu H, Ikeda H: Different fecal shedding patterns of two common strains of hepatitis e virus at three Japanese Swine farms. Am J Trop Med Hyg 2006;75:1171-1177.

Mochizuki M, Ouchi A, Kawakami K, Ishida T, Li TC, Takeda N, Ikeda H, Tsunemitsu H: Epidemiological

study of hepatitis E virus infection of dogs and cats in Japan. Vet Rec 2006;159:853-854.

#### 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

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

ウイルス性食中毒の予防に関する研究

平成 18 年度 協力研究報告書

田中 智之  
吉澄 志磨  
三上 稔之  
高橋 朱実  
植木 洋  
滝澤 剛則  
東方 美保  
内野 清子  
北元 憲利  
福田 伸治  
野田 衛  
近藤 玲子  
船津丸 貞幸  
松岡 由美子

平成 19 (2005) 年 4 月

平成 18 年度厚生科学研究食品の安心・安全確保推進研究事業  
「ウイルス性食中毒の予防に関する研究」

協力研究総括報告

分担研究者	田中 智之	( 堺市衛生研究所 )
研究協力者	吉澄 志磨	( 北海道立衛生研究所 )
研究協力者	三上 稔之	( 青森県環境保健センター )
研究協力者	高橋 朱実	( 岩手県環境保健研究センター )
研究協力者	植木 洋	( 宮城県保健環境センター )
研究協力者	滝澤 剛則	( 富山県衛生研究所 )
研究協力者	東方 美保	( 福井県衛生環境研究センター )
研究協力者	内野 清子	( 堺市衛生研究所 )
研究協力者	北元 憲利	( 兵庫県立大学環境人間学部 )
研究協力者	福田 伸治	( 広島県保健環境センター )
研究協力者	野田 衛	( 広島市衛生研究所, 現:国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部 )
研究協力者	近藤 玲子	( 愛媛県立衛生環境研究所 )
研究協力者	船津丸 貞幸	( 佐賀県衛生薬業センター )
研究協力者	松岡 由美子	( 熊本市環境総合研究所 )

A. 研究目的

2006/2007 年のノロウイルス (NV) 感染シーズンは、過去に例のない特徴的な感染パターンを示した。すなわち、通年の感染時期に比べ約 1 ヶ月、47 週から NV 流行が始まった。さらに感染数は過去 10 年間のサーベイランスでは最高で、定点あたり報告数が警報値 20 を超え 4 週間続いた。

これらの NV 感染増加・拡大の要因 (原因) を究明するため、本研究の分担研究において選ばれた全国 12 地方衛生研究所及び 1 大学の研究協力者のもとに、解析を試みた。

B. 研究方法

12 地方衛生研究所 (地衛研) において、①NV 感染症発生の実態、②感染原因 (要因)、とくにカキの喫食との関連について、③NV の遺伝子学的特徴、④感染予防に寄与できる手立て、の 4 点について、各地衛研の感染事例を中心に解析を進めた。

C. 研究成果

① 2006/2007 年シーズンの NV 感染は、例年より流行パターンが、少なくとも 1 ヶ月早く地域によっては第 47 週によって定点あたり警報値 20 を超えた 30 以上の報告、さらには 48 週で

40 を超えた報告が今回の研究でも明らかになった。

② 感染拡大は、多くの事例においてヒト-ヒト感染によるものであった。今回の調査研究では、NV 感染 562 事例中明らかに生カキの喫食による食中毒事例として判明しているのは僅か 7 事例 (1. 2%) に過ぎなかった。2007 年のカキの調査では、流行株と同一の遺伝子を持つものが検出され始め、下水あるいは生活用水の汚染によるものと考えられた。

2006/2007 シーズンの食中毒事例では、調理従事者の顕性或いは不顕性 NV 感染が、食材を汚染し、汚染食材による食中毒事例が多く施設で報告された。NV 感染予防対策のリスクマネジメントに大きな方針を与えるものである。

③ NV の遺伝子解析では、流行の主たる NV 遺伝子型は GII/4 によるものであることが判明した。かつ、遺伝子型分析では、過去の cluster に属さない変異株株が出現していることが多くの地衛研で判明した。それらをさらに詳しく解析した 1 地衛研の結果を見ると、2003/04-2005/06 年の 3 シーズンは“AACCTG”モチーフの株が主流であったのに対し、2006/07 年シーズンは“AATTG”に変異しており、同じ GII/4 でもその流行株 (変異型) は年により変化していることが見られた。さらに、他の 1 地衛研では、長期にわたり排出されている NV 遺伝子が、その期間中に点変異を起こしているという報告がなされて

いる。これらの点から、NV 遺伝子の変異が年ごとに見られ、その変異株が、流行の原因となる可能性が高いことが示唆されている。さらに、GII のみならず GI からは、GI/8 NV 遺伝子型がみられ始め、且つ、これが将来に流行の大きなウイルスになる可能性の予測もされている。

#### ④ 感染予防

NV 感染予防には、まず NV のウイルス学的診断が先行する。NV の診断には、これまで ELISA 法が唯一診断方法として厚生労働省より認可された。しかし、検査方法として普遍化している RT-PCR 法に比べるとその感度は低く、簡便、経済的かつ迅速な診断的価値をもつ ELISA 法の感度を高めなければならない。サポウイルスも同様に診断方法の確立が求められている。これらのウイルス遺伝子型を広範囲に認識する高モノクローナル抗体の作製が今後も必要である。

NV の予防には、現時点では確実性の高い消毒法が優先する。今回の研究には、塩素系消毒薬の濃度と作用時間が NV 遺伝子に及ぼす影響を詳細に検討した報告がある。今後の、色々な感染現場で実践され、科学的理論が証明され、感染予防の成果が大きくなることが期待される。また、環境汚染の 1 つである NV は、下水処理場で対応かのであることの報告もされている。塩素系消毒薬での対応を含めつつ、関係部署との協働のもとに、感染予防対策を進めなければならない。



#### D. 今後の課題

今年度の研究成果から、以下のことが明らかになり、これを基に NV 感染拡大予防策を講じる手段に活用しなければならない。

1) ノロウイルスの変異株が、大流行に大きく関与している。流行に繋がる流行前の散発発生事例にもこのような変異株が検出されている。流行予測のため、変異株の初期段階での検出と情報発信を行わなければならない。

2) 感染拡大予防には、初期の嘔吐物や糞便の処理・消毒が重要である。ベストな消毒方法を、今回の報告成果を検証しつつ確立し、普遍化しなければならない。

3) 汚染カキによる感染事例が激減していたが、これは、決してカキが清潔になったことを意味するのではない。環境中にはノロウイルス遺伝子が検出されており、ノロウイルスの自然サイクルを考えればカキ汚染は必須である。安全・安心なカキ流通のために、NV 遺伝子を不活化する下水処理過程を、今回の成績を参考にしつつ関係部署と協議・検討しなければならない。

#### E. 健康危機情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Tomoyuki Tanaka, Noritoshi Kitamoto, Xi Liang, and Mary K. Estes: High efficiency cross-reactive monoclonal antibody

production by oral immunization with recombinant Norwalk virus-like particles. *Microbiol. Immunol.* 2006; 50:883-888

2) Miyoshi T, Uchino K, Matsuo M, Ikeda Y, Yoshida H, Sibata H, Fujii F and Tanaka T. Characterization of Norovirus outbreaks during a non-epidemic season. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2006; 59:140-141

3) Uchino K, Miyoshi T, Matsuo M, Ikeda Y, Yoshida H, Teranaka Y, Sugimoto M, Sakai Y, Sibata H, Fujii F and Tanaka T. Combined genogroup I and II Norovirus infection at a nursery. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2006; 59; 2007-272

4) Okada M, Tanaka T, Oseto M, Takeda N, Shinozaki K: Genetic analysis of noroviruses associated with fatalities in healthcare facilities. *Arch Virol* 2006;151:1635-1641.

5) Hansman GS, Natori K, Shirato-Horikoshi H, Ogawa S, Oka T, Katayama K, Tanaka T, Miyoshi T, Sakae K, Kobayashi S, Shinohara M, Uchida K, Sakurai N, Shinozaki K, Okada M, Seto Y, Kamata K, Nagata N, Tanaka K, Miyamura T, Takeda N: Genetic and antigenic diversity among noroviruses. *J Gen Virol* 2006;87:909-919.

6) 田中智之、三好龍也、内野清子、武田直和. 世界的に見たノロウイルスの現状。臨床と微生物 2006; 33:385-391

- 7) 田中智之、三好龍也、内野清子、  
武田直和. 新興・再興感染症の感染  
制御の実際 8. ノロウイルス. 治療  
学 2006; 40:79-82
- 8) 小林宣道、田中智之. ノロウイル  
ス感染症. Pharma Medica  
2006;24:21-25

## 2. 学会発表

- 1) Kamata K, Katoh D, Mangan K,  
Gondaira F, Hirano M, Satoh S,  
Sakae K, Kobayashi S, Oseto M,  
Seto Y, Kitamoto N, Tanaka T,  
Takeda N: Development of a New  
ELISA for Detection of  
Noroviruses in Stool Specimens.  
In American Society of  
Microbiology. 106<sup>th</sup> General  
meeting. Orlando, FL, 2006.5.
- 2) 三好龍也、内野清子、田中智之:  
ノロウイルス感染者のウイルス排  
泄期間と排出コピー数  
第54回日本ウイルス学会学術集  
会。名古屋、2006.11

## G. 知的財産権の出願、登録状況

なし

平成18年度厚生労働科学研究補助金（食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」  
協力研究報告書

2006/07 シーズンのノロウイルスによる食中毒事例の発生状況

研究協力者 吉澄志磨（北海道立衛生研究所）

分担研究者 田中智之（堺市衛生研究所）

研究協力者 石田勢津子、池田徹也、奥井登代（北海道立衛生研究所）

**研究要旨：**ノロウイルス (NV) による食中毒の発生状況を把握するため、北海道において2006年9月～2007年2月に発生した食中毒18事例及びNV感染症179事例について分子疫学的解析を行った。2006/07シーズンに発生した食中毒は全て調理従事者による食品汚染が原因と考えられる事例であり、検査を行った15事例全て、調理従事者からMVが検出された。そのうち14事例では、2名以上の調理従事者がNV陽性であった。食中毒事例から検出されたNVの遺伝子型は、18事例中17事例がGII/4であり、残り1事例はGI/8であった。

NV感染症事例においても、全ての発生施設でGII/4が優勢(69.2～100%)であった。さらにGII/4NVのサブタイプ分類を行ったところ、2006/07シーズンの流行タイプは、食中毒と感染症事例で一致した。今シーズン流行したGII/4株は、前シーズンまでに検出された株とは別のクラスターに分岐した。

#### A. 研究目的

ノロウイルス (NV) の感染様式は、食中毒とヒトからヒトへの二次感染（感染症事例）の大きく2つに分類される。最近の北海道においては、NVによる集団胃腸炎事例の大半を感染症事例が占め、食品媒介によるNVの集団感染は全体の1割程度である。しかし、NVによる食中毒は大規模な患者数に発展することが多く、その予防対策は急務である。本研究では、NVによる食中毒の発生状況を把握するため、感染症事例を含めた集団胃腸炎事例について、患者由来NVの遺伝子型を指標とした分子疫学的解析を行った。

#### B. 研究材料と方法

##### 1. 調査対象

北海道において2006年9月～2007年2月に発生し、当所で検査を行った197事例（食中毒18事例；糞便290検体、カキ8検体、感染症179事例；糞便762検体、吐物4検体）を対象とした。対象事例の発生施設別内訳は、食中毒事例；飲食店6事例、旅館5事例、事務所3事例、会場場所2事例、病院1事例、家庭1事例、感染症事例；高齢者施設92事例、病院25事例、社会福祉施設25事例、小中学校・高校13事例、保育所・幼稚園11事例、

宿泊施設 5 事例、その他（飲食店、集会場、家庭） 8 事例であった。

集団胃腸炎の月別発生数には、集団胃腸炎発生施設の自主検査により NV が検出された感染症 88 事例（病院 56 事例、高齢者施設 31 事例、社会福祉施設 1 事例）の数も含めて示した（図 1）。

## 2. 検査方法

RNA 抽出用の材料として、糞便は 10% 乳剤、吐物は 10~50% 乳剤、カキは中腸腺の 10% 乳剤をポリエチレングリコール法により濃縮したものを使用した。RNA は QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出し、DNaseI で処理した後、random hexamer を用いて cDNA 合成を行った。PCR には、ポリメラーゼ領域増幅用に P1/P3 及び NV・SM82/NV81 を、キャプシド領域増幅用に COG1F/G1-SKR 及び COG2F/G2-SKR を用い、カキの nested PCR には、それぞれ P1/P2、Y1/Y2、G1-SKF/G1-SKR 及び G2-SKF/G2-SKR を用いた。PCR 産物についてはダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、キャプシド領域の塩基配列を用いて遺伝子型を同定した。系統樹解析は ClustalX を用いた近隣結合法により行った。

## C. 研究結果

### 1. ノロウイルスによる集団胃腸炎の発生状況

2006/07 シーズンの NV による集団胃腸炎事例について、月別発生数を図 1 に示した。今シーズンは、シーズン初めの事例報告数が例年に比べ大幅に増加し、11 月の事例数は例年の約 7 倍であった。しかし、増加傾向がみら

れたのは 1 月までであり、2 月には例年並の数に落ち着いた。全ての月において、発生数の 90~95% を感染症事例が占め、食中毒の発生は 10~2 月の間で合計 18 事例であった。

感染症事例の発生数を施設別にみると、病院で著しい増加が認められ（例年の約 9 倍）、高齢者施設が約 4 倍、社会福祉施設が 2~3 倍の増加、小中学校・高校、宿泊施設及びその他の事例は例年並みで、保育所・幼稚園の事例は 1/2 程度に減少した。

### 2. 食中毒事例の発生状況

NV による食中毒事例の疫学情報と検査結果を示した（表 1）。今シーズン発生した食中毒は全て調理従事者による食品汚染が原因と考えられるものであり、発症者 100 人以上の大規模食中毒が 4 事例認められた。

食中毒 18 事例のうち 14 事例は患者と調理従事者について検査を行い、残り 4 事例のうち、3 事例は患者のみ、1 事例は調理従事者のみの検査であった。検査を行った 15 事例全て、調理従事者から NV が検出され、そのうち 14 事例では 2 名以上の調理従事者が NV 陽性となった。

患者と調理従事者の双方から NV 遺伝子が検出された 14 事例について、それぞれの塩基配列を比較したところ、全ての事例において両者は 100% 一致することが確認された。検出されたノロウイルスの遺伝子型は、18 事例中 17 事例が GII/4 であり、残り 1 事例は GI/8 であった。

### 3. 食中毒と感染症事例から検出されたノロウイルスの遺伝子型の比較

感染症事例から検出された NV の遺伝子型を発生施設別に示し、食中毒事